宿主葉上における

さび病菌の分化*

Won K. Kim, R. Rohringer

Research Branch, Canada Agriculture
Winnipeg, Manitoba, Canada

コムギ黒さび病菌 (*Puccinia graminis* (Pers) f. sp. *tritici* Eriks and Henn.) は絶対寄生菌で、世界中のコムギ生育地域のいたるところで大きな被害をもたらしている黒さび病の病原体である。このさび病菌胞子の宿主葉上における挙動の追究は、初期感染の遺伝学や生化学に有益な情報を与え、さらには罹病性や抵抗性に関係する初期の生化学的変化の解明にもつながろう。寄生者の1細胞が宿主に付着してから、親和性ないしは不親和性の関係が成立するまでに、以下に述べる一連の過程が進行する。この過程の解明によって、この間の寄生者と宿主との相互関係が結局は感染型**に結びつくのか、それともそのことと無関係であるのかがわかる。すなわち、感染型のある特定の遺伝子単位が、この相互作用に関係しているかどうか明らかにされることになる。

1. 宿主生細胞上の発芽

コムギ葉表面に発芽したさび病菌の夏胞子 (uredospore) は、発芽管をのばして気孔に達し、そこで付着器 (appressorium) を形成する。つぎに、貫入糸 (侵入糸, infection peg) ができて気孔に入り、気孔下嚢 (substomatal vesicle) に分化する。そして、感染菌糸 (infection hyphae) がつくられて細胞間隙内に入っていき、吸器 (haustorium) が内部の宿主細胞に密着してつくら

れ、菌糸は宿主細胞内に入って栄養源を吸収する^(2,7,17)。

以上のような発芽管の分化は、精巧で、時間的に順序立った菌発育過程であり、これは葉の表面で同調的に進められる⁽¹⁷⁾。さび病感染コムギ葉を16時間暗所でインキュベートしている間に、夏胞子は発芽して発芽管を形成し、それが伸長して気孔に達し、付着器を形成する。しかし、さらに暗所でインキュベートしても、菌の発育は付着器の段階から進むことはない。一方、16時間光を与え、のち8時間暗くしてインキュベートすると、菌は貫入糸、気孔下嚢、感染菌糸、さらには吸器を形成するまでにいたる。このように、環境を調節することによって、抵抗性品種、罹病性品種の区別なく、コムギの葉上で菌のさまざまな生育段階をとらえることができるので、罹病性品種および抵抗性品種の葉上での菌の発育の内容を同じものにして、両品種における生化学的変化を比較することができる。こうした研究は、菌の発育が不規則である場合の両品種間の比較よりも意味があると考えられる。

さらに、胞子発芽を同調させることにより、初期感染のある段階における菌内の分子の変化を正確にいいあてることが可能となり、また親和性、不親和性に関与する各種の寄生者-宿主間の遺伝型が、宿主と寄生者の相互関係にどのようにして、またいつ影響を与えるかを知ることが可能となろう。

2. 発芽に影響を与える物理的因子

葉中で菌の分化がおこりはじめると、葉上での発芽管の直線的生長は止まる。これらの分化は、孔辺細胞 (guard cell)、気孔 (stoma) および呼吸腔*** (substomatal cavity) の位置と関係があり^(3,7-9)、発芽管の方向づけや付着器の形成は、宿主からの刺激に対応してなされるとみられる⁽⁷⁾。この方向づけには、屈水性反応 (hydrotropic response) と屈触性反応 (thigmotropic response) の2種類の刺激が関係している。最近、LewisとDay⁽⁷⁾は屈触性反応についての研究をさらに進め、コムギ葉表面のろうの結晶配列が、菌糸の気孔接触の機会を多くしていることを見いだした。すなわち、発芽管は結晶配列の短軸に平行して発育する。そして、ろう層の配列が乱されると発芽管の直線的生長はみられず、そのときには発芽管が気孔を探し当てることができない場合もあり、付着器を形成できないこともある。

* Rust Fungus Differentiation on Host Leaves

訳：瓜谷美代子 Miyoko Uritani

** 訳者註：罹病型、抵抗型、中間型などのこと。

*** 訳者註：気孔のま下にある広い細胞間隙

発芽や発芽管の形成は、多くの因子によって影響を受ける。すなわち、光の強さ（1,000 フィート燭で発芽はみられず、発芽管の直線の生長は300 フィート燭で阻害される）、温度（30℃で発芽は抑制される）、湿度、炭酸ガス（夏胞子は暗所で炭酸ガスを固定するが、わずかの炭酸ガスも阻害的に働き、発芽は炭酸ガスがないとはじめておこる）などである⁽¹⁶⁾。

3. 人工細胞膜上の発芽

Dickinson⁽⁸⁾ は、ニトロセルロース、ポリスチレン、メタクリル酸メチル重合体の膜上で発芽管を生長させ、その形態がこれらの膜上のうねの状態（その頻度や高低）に関係すると述べている。膜の状態に従って、胞子は枝分れのない直線的な発芽管からジグザグ型のもの、また分化するものまで種々の発芽管をつくる。屈触性反応は、厚さの変化がくり返して存在するプラスチック膜、うねが平行して存在するニトロセルロース膜に発芽管が触れることでおこる。プラスチック膜は、表面のろうを完全に除去した状態の葉の表面を鋳型としてつくられたものであり、膜の刺激は、高低のあるその表面の形態によっておこるものであって、表面のろうの化学的性質によるものではない。付着器の形成は菌糸が気孔を越えると誘導され、またそれに続く分化は一對の孔辺細胞の突出部によって誘導されることが明らかにされた⁽⁸⁾。

上記のように、さび病菌夏胞子を *in vitro* の状態で分化に導くことができるようになったが、その分化の様相は、本菌が宿主植物に侵入した初期の場合と類似していた^(4,5,9,13)。

普通、未分化の発芽胞子では、発芽管は伸長するが、感染組織内でみられるような分化はおこらない。そこで、発芽管の発育が正常な過程で進むように、種々のさび病菌を使っていくつかの実験技術が考え出されている。たとえば、湿った人工膜上で夏胞子は発芽するが、発芽胞

子は普通の条件では枝分れのない長い発芽管をつくるだけで分化しない。しかし、これに高温ショック処理をすると、感染組織内でおこるような分化を誘導することができる（図1）。これは、接触による刺激や熱ショックが化学的な情報に変換され、それに菌が反応したと考えられる。宿主に無関係に発芽胞子を分化させるこの方法は、宿主-寄生者の関係を研究する生化学者にとって有用であろう。この方法によって得られた発芽胞子の分化の生化学的様相は、宿主上にみられるさび病菌の分化の場合と酷似しているからである。また、*in vitro* の系は、栄養物や阻害因子の影響を知るために便利な方法である。

4. 発芽に影響を与える化学因子

発芽は、胞子そのもの、あるいは菌体によって生成される阻害物質（自己阻害物質）や促進物質によっても調節されている^(8,16)。たいていの菌の胞子は、その胞子サスペンションの密度が高かったり、表面上に胞子が過密であったりすると、ほとんどあるいはまったく発芽しない。これは多くの場合、菌胞子から放出される阻害物質がその主な原因となっている。

すでに、種々のさび病菌胞子から発芽自己阻害物質が分離され、その性質が明らかにされている。たとえば、コムギ黒さび病菌夏胞子には、発芽阻害物質としてシス-4-ヒドロキシ-3-メトキシ桂皮酸のメチルエステル（メチル・シス-フェルラ酸）が含まれている。一般に、桂皮酸誘導体の側鎖の二重結合はシス-トランス幾何異性をおこし、シス異性体は、植物によって酵素的に合成されたトランス異性体から光化学反応によりつくられることがわかっている⁽⁸⁾。シス異性体は阻害性をもつが、トランス異性体は不活性である。

一方、自己阻害を受けている胞子の発芽を促進する化合物も見いだされている。たとえば、*n*-ノナナル（*n*-nonanal）はコムギ黒さび病菌胞子の蒸留液中の促進物質として証明された。また、自己阻害を受けているコムギ黒さび病菌夏胞子の発芽は、ペルオキシダーゼと過酸化水素を含む稀釈液にその胞子を浮かせることで促進されることが報告されている。これは阻害物質であるメチル・シス-フェルラ酸が、

ペルオキシダーゼの作用によって発

図1 発芽過程と温度依存性^(4-6,9)

夏胞子の洗浄: 1) 250mg の胞子を 0.01% トリトン X-100 または再蒸留水 250~500 ml 中で5分間振盪する。2) 胞子を 1 l の水に懸濁し、のち減圧濾過する。

芽阻害性のないダイマーとなるためであることが明らかとなっている。実際には、阻害物質と促進物質のバランスによって発芽が調節されているのであろうし、基質上——とくに宿主植物上にコロニーをつくるのに関与しているのであろう。

5. 微細構造の変化

発芽後の分化中における微細構造の変化については、主にさび病感染コムギ葉や人工膜上の、発芽胞子の電子顕微鏡の研究からかなりのことがわかっている。核分裂は、通常、付着器形成の直前に誘導され、その際に核小体はいわゆる“非膨潤(unexpanded)”型から“膨潤(expanded)”型に転移しつつあり⁽¹⁶⁾、これに続いて核小体の放出がおこる。第2の核分裂は付着器中でおこり、第3の分裂は気孔下囊中でおこる。通常、吸器の母細胞は2個の核を有し、残りの核は感染菌糸中に存在する。核小体は分化しつつある発芽胞子中に見いだされるが、未分化の発芽胞子中には小さな非結晶性核小体のみがみられる^(2,16)。核の主要機能の1つは、タンパク質合成に必要なリボゾーム RNA の合成であるから、上記の知見から、絶対寄生における発芽管の核の役割を推測することができる。すなわち、夏胞子とその発芽管中の核小体の欠如や縮小は、夏胞子が発芽中にタンパク質合成を行なう能力が不足していることを示しているとも考えられ、このことが、さび病菌の宿主植物に対する絶対依存の理由となっているのかもしれない。

Williams と Ledingham⁽²¹⁾ は、休眠中の夏胞子よりも発芽管の中に、より多量のミトコンドリアが含まれていることを観察した。また、ミトコンドリア、核その他の細胞器官が、代謝作用の最も活発である菌糸の先に向かって移動することもわかった。

6. 走査電子顕微鏡による観察

すでに幾人かの研究者は、コムギ葉表面の微細構造と

図 2 発芽胞子の典型的な感染構造への分化⁽¹²⁾

比較的短い直線的な発芽管と、それに続く付着器 (Ap)、気孔下囊 (Sv) および感染菌糸 (Ih) (570 倍)

図 3 ミリポア膜上の枝分れのない長い発芽管からなる未分化の発芽胞子⁽¹²⁾ (410 倍)

関連して、黒さび病菌夏胞子が発芽する際の状態を走査電子顕微鏡を用いて研究している^(7,12,17)。付着器は外側

にあるために、観察のできる唯一の菌の感染構造であった。発芽胞子のそのままの表面状態は、顕微鏡のサンプルを作る際にこわれて変化している。分化中の発芽胞子は、菌糸が十分に集合して典型的な菌分化構造の進行を示したが、一方、未分化の発芽胞子は枝分れのない発芽管を生成したにすぎなかった(図2, 3)。菌の分化中に菌糸が集合する原因は、分化中の菌を宿主葉表面に密着させる粘液層によると考えられる。

7. 生化学的变化

さび病菌夏胞子の発芽と分化の生化学的变化については、それほど研究されていない。コムギ黒さび病菌夏胞子は、発芽に際してタンパク質の合成を必要とし^(4,18)、それは貯蔵性メッセンジャー RNA によって担われると考えられる^(4,6,18,14,19)。一方、分化については、アクチノマイシン D に対する感受性から判断されるように、新しいメッセンジャー RNA の合成によるものと考えられる⁽⁴⁾。すなわち、分化の際におこる核分裂は、付着器が形成される間に核酸代謝が本質的に変化していることを示唆している。また、Dunkle ら⁽⁴⁾は、RNA 合成阻害剤が存在すれば、熱ショック処理の際の分化が妨げられることを明らかにした。タンパク質合成阻害剤もまた、熱処理にともなう分化を阻害する。このように、菌の分化には明らかに RNA 合成がともない、また分化の完了にはタンパク質の合成が必要となる。

マメさび病菌夏胞子のリボゾーム RNA の研究により、リボゾームの量は発芽中に変化しないことがわかった。RNA は鋳型活性をもつフラクシオンを含み、そのフラクシオンは発芽胞子の分化中に集積されるが、未分化のものでは減少する^(18,14)。発芽中の夏胞子は少なくともヘキサマーか、おそらくそれより密度の高い一連のポリゾームを含んでいた⁽¹⁹⁾。分化の状態には関係なく、リボゾームのうち少なくとも 55% は発芽後 8 時間までポリゾームの形で存在し、のち 35% に減少した。夏胞子は、他の菌と同様に完全なタンパク質合成装置をそなえているが、リボゾームが活性的であるのは、発芽管の伸長と分化が行なわれるわずかの期間のみである。

ところで、コムギ黒さび病菌の夏胞子は、非宿主基質上で発芽する際に RNA を合成するが、RNA 全量としては減少している。この減少は、主にリボゾーム RNA の分解によるか、またはおそらく正常な発芽過程の 1 段

階として巨大分子との複合体をつくるためと考えられる⁽⁶⁾。そのような複合体は、核酸をフェノール法で分離する際に、遠心後に生じる中間層に集積したのかもしれない(中間層には DNA とタンパク質が多いことが見いだされている)。一方、ラジオアイソトープ実験によれば、夏胞子の発芽時と分化時に新しい RNA 分子が合成されるが、未分化のものでは合成されない⁽⁶⁾。ポリアクリルアミドゲル電気泳動、蔗糖密度勾配遠心およびリボヌクレアーゼ T₁ による部分加水分解によって、この新しく合成された RNA は不均一であり、たとえば電気泳動後のゲル内で 16S~5S の範囲に存在することが証明された。このフラクシオン中に存在する RNA の一部は、休眠中の夏胞子中に形成されており、分化の過程で、それがさらに複合体となったものから放出されたのかもしれない。

コムギ黒さび病菌夏胞子の RNA 種は、25S, 18S, 5S の rRNA と 4.5S の tRNA であり、分子量(近似値)はそれぞれ 1.65×10^6 , 0.80×10^6 , 3.6×10^4 , 2.4×10^4 ダルトンであった。

分化中には DNA も合成される⁽²⁰⁾。ミトコンドリア DNA の合成は、夏胞子発芽の際かその直後に始まるようであり、これはおそらく初期のミトコンドリア合成に関係があると考えられる。また、チトクロムオキシダーゼその他の電子伝達酵素群の活性は、夏胞子発芽中に増加する。電子顕微鏡による研究から、ミトコンドリアの合成は発芽管が伸長する際に行なわれると考えられる⁽²¹⁾が、これは分化が始まるとみられなくなる。発芽管の伸長は付着器の出現で止まることから、ミトコンドリアの合成は発芽管が伸長する間だけ続けられているのであろう。

コムギ黒さび病菌夏胞子を用いては研究されていないが、マメさび病菌の夏胞子は数種類の DNA 依存性 RNA ポリメラーゼを含んでおり、分化中の RNA 合成にはそれらの酵素が関与するものと考えられている⁽¹⁰⁾。

コムギ黒さび病菌の発芽夏胞子中にはリボヌクレアーゼが含まれており、それは基質特異性の面で、宿主植物のものとも、また宿主-寄生者複合体のものとも異なる⁽¹¹⁾。この酵素機能は、ある種の RNA 分子の選択的分解を通して転写後のプロセスに関与していると考えられている。また、発芽中の夏胞子は発芽増地にリボヌクレアーゼを放出することも知られている⁽¹¹⁾。

8. 化学成分の変化

コムギ黒さび病菌の発芽胞子の分化、未分化と関連して、化学成分とその濃度変化が広く研究されてきた。葉酸やポリアミン類はタンパク質合成に重要な役割をもつと考えられている⁽⁵⁾ので、発芽中の胞子についてこれらが測定された。分化している胞子では、未分化のものに比べて全葉酸量もメチル化葉酸量も少なかったが、グルタミン酸単位数の小さいフォルミル化葉酸は多かった。黒さび病菌夏胞子はスペルミジンと未同定のポリアミンを少量含んでいる。スペルミジン量は発芽後、とくに分化の後に増加する。

絶対寄生者によって宿主上にコロニーがつくられるかどうかは、さび病菌がそうであるように、宿主-寄生者の相互作用の場における膜の状態に依存していることもあるので、ステロール類が夏胞子から分類、同定された⁽¹¹⁾。夏胞子は、未知のステロール、コレステロール、エルゴスト-7-エノールかまたはスチグマステロールのどちらかをそれぞれ微量に含み、スチグマスト-7-エノールを多量に含んでいた。発芽後は、スチグマスト-7-エノールは減少する傾向にあったが、分化と未分化の発芽胞子の間では、量的な差はなかった。

そのほか、宿主-寄生者相互関係における初期認識と特異性を明らかにすることがますます重要視され、種々の遺伝型において胞子発芽とそれに続く分化の各段階を精密に理解することが今や必要欠くべからざるものとなっている。そのため、特異性を決定するためのバイオアッセイが考案されている。黒さび病に対するコムギの抵抗性を決定する遺伝子特異的 RNA に関する筆者らの最近の研究は、コムギ葉上の黒さび病菌夏胞子の性質を正確に理解することによって、かなり解明されることとなろう⁽¹⁵⁾。

Summary — Differentiation of germ tubes of wheat stem rust fungus into infection structures (appressorium, infection peg, substomatal vesicle, infection hyphae, haustorium) is a series of subtle and precisely timed orderly sequence of fungal development, which could be synchronized on leaf surface. Our recent work on the gene-specific RNA determining resistance in wheat to stem rust is partly based on the precise understanding of the behaviour of stem rust uredospores on wheat leaves.

文 献

- 1) A. K. Chakravorty, M. Shaw & L. A. Scrubb : *Nature*,

- 247, 577 (1974).
2) M. A. Ehrlich & H. G. Ehrlich : *Ann. Rev. Phytopathology*, 9, 155 (1971).
3) S. Dichinson : *Phytopath. Z.*, 70, 62 (1971).
4) L. D. Dunkle, R. Maheshwari & P. J. Allen : *Science*, 163, 481 (1968).
5) W. K. Kim : *Can. J. Bot.*, 49, 1119 (1971).
6) W. K. Kim & R. Rohringer : *Can. J. Bot.*, 52, 1309 (1974).
7) B. G. Lewis & J. R. Day : *Trans. Br. Mycol. Soc.*, 58 (1), 139 (1972).
8) V. Macko & R. C. Staples : *Bull. Torrey Bot. Club.*, 100(4), 223 (1973).
9) R. Maheshwari, P. J. Allen & A. C. Hildbrandt : *Phytopathology*, 57(8), 855 (1967).
10) M. S. Manocha : *Can. J. Bot. Microbiol.*, 19, 1175 (1973).
11) R. Nowak, W. K. Kim & R. Rohringer : *Can. J. Bot.*, 50, 185 (1972).
12) Y. C. Paliwal & W. K. Kim : *Tissue and Cell*, 6 (3), 391 (1974).
13) L. Ramakrishnan & R. C. Staples : *Contrib. Boyce Thompson Inst.*, 24, 197 (1970).
14) L. Ramakrishnan & R. C. Staples : *Phytopathology*, 60, 1087 (1970).
15) R. Rohringer, N. K. Howes, W. K. Kim & D. J. Samborski : *Nature*, 249, 585 (1974).
16) M. Shaw : *Phytopath. Z.*, 50, 159 (1964).
17) R. A. Shipp & D. J. Samborski : *Can. J. Bot.*, 52, 1107 (1974).
18) P. Trocha & J. M. Daly : *Plant Physiology*, 46, 520 (1970).
19) R. C. Staples, L. Ramakrishnan & Z. Yaniv : *Phytopathology*, 60 (1), 58 (1970).
20) R. C. Staples : *Physiol. Plant Pathol.*, 4, 415 (1974).
21) P. J. Williams & G. A. Ledingham : *Can. J. Bot.*, 42, 1503 (1964).

藤原鎮男・原口紘太

生物分析化学演習

本書は、近年の機器分析法の発展に伴う分析化学の進歩を、生物化学的素材を中心に、基礎から応用まで解説したもので、用語解説、演習問題が豊富に加えられており、テキスト、演習書として最適である。

A 5 判 ¥2300

東京文京 東京大学出版会 総目録呈