

平成 21 年 3 月 20 日現在

研究種目：基盤研究(B)
 研究期間：2006～2008
 課題番号：18380033
 研究課題名（和文） 植物病害における病原性因子の役割に関する電子顕微鏡・生化学解析
 研究課題名（英文） Ultrastructural and biochemical analysis of pathogenicity factors in plant diseases
 研究代表者 朴 杓允 (PARK PYOYUN)
 神戸大学・大学院農学研究科・教授
 研究者番号：20147094

研究成果の概要：病原菌の生産する宿主特異的毒素、活性酸素、細胞外物質の役割を明らかにした。毒素は感受性植物に罹病性反応だけでなく、抵抗性・修復反応といった予想外の細胞応答を引起こした。侵入菌糸に生じる活性酸素の生成を止めると、感染を阻止できた。菌が分泌する細胞外物質は菌と植物表面に間に集積するが、この物質は宿主粘着因子からなることが分かった。この因子を酵素で分解すると、菌は宿主から剥離し病害が抑制された。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	4,300,000	1,290,000	5,590,000
2007 年度	3,100,000	930,000	4,030,000
2008 年度	2,300,000	690,000	2,990,000
年度			
年度			
総計	9,700,000	2,910,000	12,610,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農学・植物病理学

キーワード：感染生理、細胞・組織、生理活性、免疫学、病理学

1. 研究開始当初の背景

(1) 腐生性病原菌の主要な病原性因子は宿主特異的毒素であると平成 18 年頃認識されていた。しかし、毒素は植物に細胞膜変性を引起して菌の感染に貢献すること以外の毒素作用については当時分かっていなかった。毒素の植物に対する罹病性反応と連動するその他の細胞応答について調べるのが求められていた。

(2) 研究を始める当時、植物病害に見られる活性酸素は抵抗性を誘導する植物側のシグナル分子であると考えられていたが、病原菌が生産する活性酸素についてその存在すら認められていなかった。菌に感染場面で見られる全ての活性酸素は植物側から生じた活

性酸素が拡散した結果であると誤解されていた。本研究では、菌側から生産される活性酸素の实在とその役割を調べようとした最初の例である。

(3) 病原菌と植物の接触点を電子顕微鏡観察すると、細胞外物質が接触点である植物表面に集積しているのが知られていた。しかし、この物質はどのような成分からなり、どのような役割を持つのか分かっていなかった。状況から菌が植物表面に粘着するための物質を分泌しているとの予想で研究を始めた。

2. 研究の目的

(1) ナシ黒斑病菌の生産する宿主特異的毒素(AK 毒素)は感受性細胞にのみ細胞膜変性を

引起すことが知られている。細胞膜変性に連動して植物において防御応答と未知の罹病性応答が起こることが推定されていた。罹病性応答には活性酸素生産が予測され、防御応答には防御多糖類の集積が考えられた。その物質の化学成分と活性酸素の細胞学・生化学解析を行い、細胞膜変性の本態の解明を行う。加えて、ナシ黒星病菌の病原性機構を調べた。(2)病原菌が植物に感染する際、菌の侵入菌糸先端にも活性酸素が生じる。活性酸素を消去剤や活性酸素生成酵素の突然変異体株を作成して活性酸素消去した場合の細胞応答と病害抑制を調べる。

(3)病原菌の生産する細胞外物質にどのようなタンパク成分が含まれているか調査する。成分が分かるとそれらを分解できる酵素を細胞外物質に作用させて菌を植物から剥離させて、細胞外物質に接着役割があるのかどうかを調べる。

3. 研究の方法

(1)ナシ黒斑病菌の生産する宿主特異的毒素は宿主にのみ細胞膜変性を引起す。この変性には変性部位に多糖類(カロース)の蓄積、ゴルジ小胞の変性膜への融合、活性酸素の生成が伴っていることが知られていた。

①これら出来事のうち、細胞膜変性、ゴルジ小胞と断片膜の定量を電子顕微鏡観察と計測学法により調査した。

②細胞膜変性部位にはカロースが集積する。この物質の合成部位と蓄積部位を免疫電顕法により調べた。

③変性細胞膜には活性酸素が集積していることが予期された。細胞膜に生成する H_2O_2 を細胞化学法により証明を図る。

④この活性酸素により細胞膜の脂質が過酸化されているかどうかを生化学的に調査した。ナシ幼果から細胞膜分画を単離し、この膜分画にNADPHと毒素を処理して過酸化生成物質量を計測して過酸化脂質生成の実態を調べた。

⑤活性酸素を発生させるNADPH oxidase 活性を感受性ナシ細胞で特異的に生成していることを生化学的に調べ、細胞化学法のNBT法によりスーパーオキシドアニオンの発生を確認した。

⑥ナシ黒星病の病原性機構についても調査した。感受性ナシ・抵抗性ナシ・非宿主ナシ葉に黒星菌レース1を接種して、表皮ペクチンの分解を指標として病原性因子であるペクナーゼ活性を電顕解析する。

(2)病原菌の病原性と活性酸素の関わりについて調べる。

①病原菌は植物に侵入する際に付着器や侵入菌糸に活性酸素が生じる。この活性酸素を

塩化セリウム法という電顕細胞化学により検出した。その生成量をimage J法により定量化した。

②侵入菌糸に生じる活性酸素をアスコルビン酸やDPIと言った消去剤を胞子に処理して、活性酸素量を計測した上で、病害抑制を調べた。

③活性酸素の生成酵素であるNADPH oxidaseのNoxAとNoxBの突然変異体を分子生物学法により作出した。

④NoxAとNoxBの突然変異体を感受性・抵抗性・熱処理抵抗性ナシ葉に接種して、生じる活性酸素量を定量化し、同時に病害抑制について調べた。

(3)植物表面には菌の細胞外物質が形成される。この物質はすべて病原糸状菌でみられる菌生産物である。この物質成分が不明なので、免疫組織化学法を使って成分の推定を行った。

①動物にはlaminin, fibronectin, vitronectin, collagen VIといった細胞接着因子とintegrinの存在が認められている。これらの抗体を細胞外物質に処理して、その物質に細胞接着因子の抗原基が存在するか調べた

②化学組成が推定できたら細胞接着因子を分解できる酵素を細胞外物質を分解できるかどうかを調べ、剥離を走査電顕法により証拠を得る。

③酵素処理して実際に宿主剥離が起こり、病害抑制も同時に認められるかどうかを調べる。

4. 研究成果

(1)病原性因子の中核を構成する宿主特異的毒素の作用の詳細が分かった。毒素は宿主の細胞膜に変性を起こして宿主が本来有する抵抗性を抑え菌の感染を成功裡に導く役割を果たす。一方、宿主は一方的に毒素により攻撃され弱らせられるのではなく、毒素ストレスに対して抵抗し防御を図り生き延びようとする。毒素刺激により細胞膜のNADPH oxidaseを活性化してスーパーオキシドアニオンを形成し、変性細胞膜に蓄積する。この活性酸素は膜リン脂質を過酸化し膜脂質機能を崩壊させる。宿主はこれに反応して過酸化脂質を含む細胞膜を細胞外に放出させて防御する。減少した細胞膜はゴルジ小胞を細胞膜に融合させることで補充を図る。また、防御多糖類であるカロースをゴルジ小胞に入れて輸送し、障害細胞膜部位に放出して、侵入してくる菌に対して防御を図ることが分かった。

また、ナシ黒星病菌の病原性機構の1つであるペクローナーゼと病原性の関係について細胞学的に調べた。感受性ナシ葉では侵入菌

糸周辺のペクチンが多量に溶解し抵抗性葉では少量しか分解していなかった。これはペクチナーゼも病原性に関係あることを示す。

(2) ナシ黒斑病菌や黒星病菌は植物に侵入する際に侵入菌糸に活性酸素が特異的に生じる。アスコルビン酸やDPIと言った活性酸素阻害剤を処理すると、侵入菌糸の活性酸素が除去されて病害が抑制された。これを別の実験で実証するために菌の細胞膜のNADPH oxidaseのNox AとNox B遺伝子を破壊してノックアウト株を作成した。Nox A突然変異株を植物に接種しても病害抑制は起こらなかったが、Nox B突然変異株を植物に接種すると、病害抑制が起こった。このためNox B遺伝子が病原性侵略力に関係する因子であることが分かった。

(3) ナシ黒斑病菌、ナシ黒星病菌、コムギいもち病菌胞子は、植物表面で発芽し、その先に付着器という特別の植物への侵入構造体を形成する。付着器と植物の間には菌から分泌された細胞外物質が集積する。この物質成分について免疫組織化学法を用いて調べると、laminin, fibronectin, vitronectin, collagen VIといった動物の細胞接着因子類似物質が認められた。この物質は糖タンパクでできているため、これらを分解できる酵素(collagenase, gelatinase)を処理すると、細胞外物質は溶解し菌は植物表面から剥離した。その結果、病害抑制が得られた。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 15 件)

1. Hyon, G-S, Muranaka, Y, Ikeda, K. Inoue, K, Hosogi, N, Meguro H, Yamada T, Hida, S, Suzuki, T, and Park, P. (2009). The extracellular matrix produced from *Alternaria alternata* Japanese pear pathotype plays a possible role of adhesion on the surfaces of host leaves during plant infection. J. Electron Microsc. Technol. Med. Biol. (in press) (査読有)
2. Park, P. and Ikeda, K. (2008) Ultrastructural analysis of responses of host and fungal cells during plant infection. J. Gen. Plant Pathol. 74:2-14. (査読有)
3. Hosogi, N, Hyon, G-S, Inoue, K, Jiang, S, Ikeda, K. and Park, P. (2008) Ultrastructural identification of ion-leakage sites in host cells treated with AK-toxin I from *Alternaria alternata* Japanese pear pathotype. J. Electron Microsc. Technol. Med. Biol. 21:172-178. (査読有)
4. Jiang, S., Park, P. and Ishii, H. (2008). Ultrastructural study on acibenzolar-S-methyl-induced scab resistance in epidermal pectin layers of Japanese pear leaves. Phytopathology. 98:585- 591. (査読有)
5. Tanaka, A, Takemoto, D, Hyon, G-S, Park, P. and Scott, B. (2008) NoxA activation by the small GTPase RacA is required to maintain a mutualistic symbiotic association *Epichloe festucae* and perennial ryegrass. Molecular Microbiology, 68 : 1165-1178. (査読有)
6. Kubo E, Park, P. and Sugimoto, Y.(2008) Reactions of *Lotus japonicus* ecotypes and mutants to root parasitic plants. J. Plant Physiol. 166:352-362.. (査読有)
7. Jiang, S, Park, P. Ishii, H. (2007) Ultrastructural study on scab resistance expressed in epidermal pectin layers of pear leaves. J. Gen. Plant Pathol 73: 314-323. (査読有)
8. Deepak, S, A. Ishii, H, Park, P. (2007) Acibenzolar-S-methyl primes cell wall strengthening genes and reactive oxygen species forming scavenging enzymes in cucumber after fungal pathogen attack. Physiol Mol Plant Pathol. 69:52-61. (査読有)
9. Jiang, S, Park, P. Ishii, H. (2007). Immunohistochemical and cyto- chemical analysis of extracellular matrix produced from *Venturia nashicola*, scab fungus on the surfaces of susceptible Japanese pear leaves. J. Electron Microsc. Technol. Med. Biol. 21:7-11. (査読有)
10. Inoue, K, Suzuki, T, Ikeda, K. Jiang, S, Hosogi, N, Hyon, G-S, Hida, S, Yamada, T, and Park, P. (2007) Extracellular matrix (ECM) of *Magnaporthe oryzae* may have role in host adhesion during fungal penetration and is digested by matrix metalloproteases. J Gen. Plant. Pathol. 73: 388-398. (査読有)
11. Horiuchi, Y, Okumoto, K, Akahoshi, Y, Minamoto, G, Onoe, T, Ikeda, K. and Park, P. (2007) A novel staining method for thin sections and *en bloc* tissue of rat kidney fixed with glutaraldehyde and osmium tetroxide using methanolic hafnium chloride. J. Electron Microsc. Technol. Med. Biol. 21:21-28. (査読有)
12. Park, P. (2007) Oxygen-bubbly glutaraldehyde fixation. J. Electron Microsc. Technol. Med. Biol. 21:31-37. (in Japanese) (査読有)
13. Shimizu, N., Hosogi, N., Hyon, G, Jiang, S., Inoue, K., and Park, P. (2006) Reactive oxygen species (ROS) generation and the

- ROS-induced lipid peroxidation, associated with plasma membrane modification, were caused in host cells by AK-toxin I from *Alternaria alternata* Japanese pear pathotype. J. Gen. Plant Pathol. 72: 6-15. (査読有)
14. Tanaka, A. Christensen, M. J. Takemoto, D., Park, P., and Scott, B. (2006) A novel role of reactive oxygen species in regulating a fungal-plant mutualistic interaction. Plant Cell. 18:1052-1066. (査読有)
 15. Park, P. (2006) Ultrastructural analysis of cell responses of host cells to pathogen infection. J. Gen. Plant Pathol. 72:404- 407. (査読有)
- [学会発表] (計 24 件)
1. 井上加奈子, 池田健一, 中屋敷均, 朴杓允 (2008) いもち病菌におけるハイドロフォビン(Mpg1)の接着能力への影響、第8回糸状菌分子生物学コンファレンス、11月17-18日、金沢
 2. Hyon, G-S. Morita, Y. Hosogi, N. Ikeda, K. Nakayashiki, H. Park, P. (2008) Pathological roles of reactive oxygen species at penetration pegs of *Alternaria alternata* Japanese pear pathotype during plant infection. Proceeding of 9th Asia-Pacific Microscopy Conference (APMC9), 2008 November 2-7, Jeju, Korea.
 3. Hosogi, N. Hyon, G-S. Osato, T. Inoue, Ikeda, K. Park, P. (2008) Cytological study for pathological roles of compounds analogous to AK-toxins, Disease Determinants, during plant infection. Proceeding of 9th Asia-Pacific Microscopy Conference (APMC9), 2008 November 2-7, Jeju, Korea.
 4. Ikeda, K. Inoue, K. Park, P. (2008) Possible roles of extracellular matrix (ECM) in phytopathogenic fungus *Magnaporthe oryzae*. Proceeding of 9th Asia-Pacific Microscopy Conference (APMC9), 2008 November 2-7, Jeju, Korea.
 5. 河野友美, 山北由貴, 太田文清, 朴杓允, 中西テツ, 安田(高崎)剛志 (2008) ニホンナシ花柱内における自家・他家花粉管の微細構造の解析、園芸学会、平成20年度秋季大会、9月27-29日、三重
 6. 目黒紘子, 井上加奈子, 池田健一, 朴杓允 (2008) 各種糸状菌の胞子発芽過程における貯蔵物質の代謝変動、平成20年度日本植物病理学会関西西部会、9月18日~19日、和歌山
 7. 大里友之, 池田健一, 朴杓允 (2008) *Sclerotinia minor* の菌核形成における活性酸素種の病理学的役割 (2) 活性酸素種の局在、平成20年度日本植物病理学会関西西部会、9月18日~19日、和歌山
 8. 鶴見知洋, 池田健一, 朴杓允 (2008) 灰色かび病菌におけるストロビルリン系薬剤の発芽抑制効果、平成20年度日本植物病理学会関西西部会、9月18日~19日、和歌山
 9. 大里友之, 池田健一, 朴杓允 (2008) *Sclerotinia minor* の菌核形成における活性酸素種の病理学的役割、平成20年度日本植物病理学会大会、9月18日~19日、和歌山
 10. 玄康洙, 森田雄一, 池田健一, 中屋敷均, 朴杓允 (2008) ナシ黒斑病菌における活性酸素種 (reactive oxygen species; ROS) 生成遺伝子 *NoxA* 及び *NoxB* 変異株の細胞学・病理学的比較調査、平成20年度日本植物病理学会、9月18日~19日、和歌山
 11. 井上加奈子, 池田健一, 朴杓允 (2008) いもち病菌の胞子発芽における天然栄養源の影響、平成20年度日本植物病理学会、4月26日~28日、松江
 12. 下井沙紀, 池田健一, 山崎将紀, 對馬誠也, 朴杓允, (2008) イネ葉面フローラからのコラゲナーゼ活性を有する微生物のスクリーニング、日本農芸化学会、3月26-29日、名古屋
 13. Inoue, K. Ikeda, K. Park, P. (2007) Possible roles of the extracellular matrix (ECM) from *Magnaporthe oryzae* during the fungus-host adhesion. The 4th International rice blast conference, Oct. 9-14, Changsha, Hunan, China
 14. Ikeda, K. Shina, K. Kadotani, N. Tanaka, M. Murata T. Chuma I. Tosa, Y. Park, P. Mayama S. Nakayashiki, H. MoDim2, the *Magnaporthe oryzae* methyltransferase orthologous to *Neurospora crassa* Dim-2 is dispensable for the life cycle of the fungus in nature. 4th International rice blast conference, Oct. 9-14, 2007 Changsha, Hunan, China
 15. 玄康洙, 森田雄一, 篠木武, 池田健一, 中屋敷均, 朴杓允, (2007) ナシ黒斑病菌における活性酸素種 (ROS) 生成遺伝子 *NoxB* の機能解析、平成19年度日本植物病理学会関西西部会、10月6日~7日、岐阜
 16. 池田健一, 田中正起, 村田聡樹, 椎名宏太, 土佐幸雄, 眞山滋志, 朴杓允, 中屋敷均, (2007) いもち病菌のシトシン DNA メチル化は 同菌の生活環において必須ではない、平成19年度日本植物病理

- 学会関西西部会, 10月6日~7日、岐阜
17. 井上加奈子、池田健一、朴 杓允 (2007) いもち病菌の胞子発芽における接着能力、成 19 年度日本植物病理学会関西西部会, 10月6日~7日、岐阜
 18. 朴杓允 (2007) より迅速な試料作製法: 急速脱水、医学生物学電子顕微鏡技術学会第 23 回学術講演会、5月19日、小倉
 19. 玄康洙、竹本大吾、田中愛子、Bary Scott、姜山、池田健一、朴 杓允(2007) 植物感染時に生じる活性酸素種の電顕定量法、医学生物学電子顕微鏡技術学会、5月19日、小倉
 20. 井上加奈子、池田健一、朴 杓允、(2007) いもち病菌感染器官の各種阻害剤処理による剥離効果、平成 19 年度日本植物病理学会, 3月28日~30日、宇都宮
 21. 玄康洙、篠木武、池田健一、中屋敷均、朴 杓允 (2007) ナシ黒斑病菌の貫穿菌糸における活性酸素種 (ROS) 生成遺伝子 *NoxA* の機能解析、平成 19 年度日本植物病理学会, 3月28日~30日、宇都宮
 22. 細木直樹、中馬いづみ、篠木武、池田健一、中屋敷均、眞山滋志、土佐幸雄、朴 杓允 (2007) いもち病菌小型分生子の病理学的役割を解明するための基礎調査、平成 19 年度日本植物病理学会, 3月28日~30日、宇都宮
 23. 姜 山、朴 杓允、石井英夫 (2006) ナシ接種した黒星病菌の匍匐菌糸におけるペクチナーゼ活性及び菌糸細胞壁分解に関する電顕計測解析、平成 18 年度日本植物病理学会、6月3日~5日、北海道
 24. 井上加奈子、姜山、細木直樹、玄康洙、兪輝星、朴 杓允、池田健一 (2006) 糖タンパク分解酵素によるコムギいもち病菌の感染器官の宿主粘着阻害に関する細胞学研究、平成 18 年度日本植物病理学会、6月3日~5日、北海道

[その他]

研究成果が評価されて、2008年10月4日に第32回井植文化賞の個人賞、科学技術部門を受賞した。この受賞については読売新聞、神戸新聞、産経新聞、毎日新聞、朝日新聞に掲載され、当日の夕方のNHKニュースでも報道された。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

朴 杓允 (PARK PYOYUN)
神戸大学大学院・農学研究科・教授
研究者番号: 20147094

(2) 研究分担者:

中屋敷 均 (NAKAYASHIKI HITOSHI)
神戸大学大学院・農学研究科・准教授
研究者番号: 50252804
池田 健一 (IKEDA KENICHI)
神戸大学・自然科学系先端融合研究環重点
研究部・助教
研究者番号: 40437504
(3) 連携研究者