

①

エンドウ褐紋病菌サプレッサーの構造と作用機構

1994年3月

加藤敏郎

エンドウ褐紋病菌サプレッサーの構造と作用機構

1994年3月

加藤敏朗

**Structure and Mode of Action
of Suppressors, Pathogenicity Factors
of Pea Pathogen,
*Mycosphaerella pinodes***

March, 1994

Toshiaki Kato

『エンドウ褐紋病菌サプレッサーの構造と作用機構』

緒 言	1
第1章 エンドウ褐紋病菌サプレッサーの精製および構造解析	4
第1節 エンドウ褐紋病菌サプレッサーの精製	4
第1項 胞子発芽液の調製	4
第2項 サプレッサーの精製	7
(1) 限外ろ過	7
(2) ゲルろ過	7
(3) Sep-PAK C ₁₈ による分離	7
(4) 逆相カラムを用いた高速液体クロマト	8
(5) イオン配位子カラムを用いた高速液体クロマト	8
第2節 エンドウ褐紋病菌サプレッサーの構造解析	8
第1項 アミノ酸の組成分析	10
第2項 糖の組成分析	10
第3項 アミノ酸配列の解析	13
第4項 核磁気共鳴による構造解析	13
(1) 核磁気共鳴法(NMR)による構造解析の方法	13
(2) Suppressin Aの構造解析	15
(3) Suppressin Bの構造解析	15
(4) Suppressinの一次構造	23
(5) Suppressinの立体構造の推定	23
第3節 まとめ	23
第2章 エンドウ褐紋病菌サプレッサーおよびそのペプチド断片の 生理活性 <i>-in situ assay-</i>	29
第1節 実験材料および方法	30
第1項 供試試料	30
第2項 ピサチンの定量	30
第3項 接種試験	34

第4項	ATPase活性の組織化学的な検出.....	34
第2節	ピサチンの生合成に及ぼす効果.....	34
第1項	ファイトアレキシン蓄積の経時的変化に及ぼす Supprescin Aの効果.....	34
第2項	ファイトアレキシン蓄積に及ぼすSupprescin 処理濃度の効果.....	36
第3項	ファイトアレキシン蓄積に及ぼす合成ペプチドの効果.....	36
第3節	菌の感染に及ぼす効果.....	40
第1項	非親和性菌の感染に及ぼすSupprescinの効果.....	40
第2項	エンドウ褐紋病菌の感染に及ぼす合成ペプチドの効果.....	40
第4節	エンドウ組織におけるATPase活性に及ぼす Supprescinの効果.....	43
第5節	まとめ.....	43
第3章	エンドウ褐紋病菌サプレッサーおよびそのペプチド断片の 生理活性 <i>-in vitro assay-</i>	46
第1節	実験材料および方法.....	46
第1項	供試試料.....	46
第2項	エンドウ原形質膜画分の調製.....	46
(1)	バッファー類の調製.....	48
(2)	エンドウ上胚軸の準備.....	49
(3)	粗ミクロソーム画分の調製.....	49
(4)	水性二相分配法による原形質膜粗画分の調製.....	49
(5)	シヨ糖密度勾配遠心分離法による原形質膜画分の調製.....	49
第3項	ATPase活性の測定.....	50
第4項	ATPase活性のカイネティクス解析.....	50
(1)	ATPase活性の測定.....	51
(2)	両逆数プロットによる阻害様式の推定.....	51
(3)	Michaelis定数(K_m)および最大比活性(V_{max})の算出.....	51
(4)	阻害定数の算出.....	51
第5項	酸性ホスファターゼ活性の測定.....	55

第 6 項	プロテインキナーゼ活性の測定	55
第 2 節	ATPase 活性に及ぼす効果	58
第 1 項	ATPase 活性の阻害効果	58
第 2 項	ATPase 活性に対する Supprescin A の効果	58
第 3 項	ATPase 活性阻害様式の解析	58
第 3 節	酸性ホスファターゼ活性に及ぼす効果	61
第 4 節	プロテインキナーゼ活性に及ぼす効果	67
第 5 節	まとめ	70
第 4 章	エンドウ褐紋病菌サプレッサーの糖鎖の機能について	72
第 1 節	実験方法	72
第 1 項	エンドウ原形質膜 ATPase 活性に対する効果	72
第 2 項	エンドウのファイトアレキシン蓄積に及ぼす効果	72
第 3 項	エンドウ褐紋病菌の感染に及ぼす効果	73
第 2 節	実験結果	73
第 1 項	エンドウ原形質膜 ATPase 活性に対する効果	73
第 2 項	エンドウのファイトアレキシン蓄積に及ぼす効果	73
第 3 項	エンドウ褐紋病菌の感染に及ぼす効果	76
第 3 節	まとめ	76
第 5 章	エンドウ原形質膜 H ⁺ -ATPase cDNA のクローニングと 構造解析	80
第 1 節	高等植物の原形質膜 H ⁺ -ATPase 遺伝子の構造	81
第 1 項	原形質膜 H ⁺ -ATPase の構造	81
第 2 項	高等植物の原形質膜 H ⁺ -ATPase 遺伝子の比較	84
第 2 節	エンドウ原形質膜 ATPase cDNA のクローニング	86
第 1 項	PCR プライマーの設計と合成	86
第 2 項	PCR 法によるエンドウ原形質膜 H ⁺ -ATPase cDNA の増幅	86
(1)	鋳型となるエンドウ cDNA の調製	86
(2)	PCR 法による ATPase cDNA の増幅	86
第 3 項	PCR 増幅断片のクローニング	88

第3節	エンドウ原形質膜H ⁺ -ATPase cDNAの構造解析	88
第1項	実験方法	88
(1)	デリーションクローンの作成	88
(2)	塩基配列の決定	92
(3)	ゲノミックサザン分析	92
第2項	結果および考察	93
(1)	エンドウ原形質膜H ⁺ -ATPase遺伝子の塩基配列および 推定アミノ酸配列	93
(2)	ゲノミックサザン分析	93
第4節	まとめ	99
第6章	総合考察および結論	103
摘 要	115
参考文献	118
謝 辞	128

緒 言

農耕の歴史は、病虫害との戦いの歴史であるといっても過言ではない。人類は、有史以来、食料の安定的な確保を目指して、実りの少ない野性種に改良を加え、生産性の高い栽培種を人工的に作出してきた。しかしながら、このように野性種からかけ離れた品種を作出し、人為的エネルギーを費やすことで維持してきた"mono culture"は、時として異常気象をはじめとする自然の摂理の前ではもろくも崩れ、人類の生命を脅かしてきたことは飢饉の歴史が物語っている。自然生態系においては、多種多様の生物が一定の相互関係のもとに共存し、微妙なバランスを保っているものと考えられる。しかし、農業においては、自然生態系にみられるような微妙なバランスが保たれておらず、生態学的に不安定であり、気象条件など環境の変化に対する緩衝能が低下しており、病害(虫)の大発生を招きやすい状態にあるものと推測される。これは、自然状態への回帰とも考えられる。

昨今のバイオテクノロジーの進歩によって、抵抗性を有する植物種を効率的に作出することが可能となりつつあるが、植物の生理や病気の原理の解明なくしては改変のターゲットを絞りきれないであろう。また、ある種の病気に強い品種が開発できても、別の病原菌の発生によって耐病性が崩れされるという従来の交雑育種においても問題であったいわゆるbreak-downが起こるにはそう長い歳月を必要としないかもしれない。一方、病原菌や病害虫に対して高い防除効果を有する様々な殺菌(虫)剤が開発されてきたが、これとても耐性を有する菌や虫の出現によって効力が低下し、さらに強い効果を有する農薬の開発が避けられなくなる状況も生まれている。言うまでもなく、殺作用の高い農薬の使用は人々の健康を損なう恐れがあり、戦後、農薬に依存した農業に対する反省から低農薬・有機栽培が見直されてきており、そのためにも植物の病気の原理に基づいた安全かつ効果的な防除方法の開発が望まれているのが現状であろう。

「植物はなぜ病気に罹るのか」を考える上で、植物と病原菌との特異性決定機構の解明は避けて通れない課題である。地球上には約10万種の糸状菌、約1600種の細菌が生存するといわれているが、これらのうちで植物を加害するものは、糸状菌が約8000種、細菌が約200種とされている(奥 1988)。しかし、1種あるいは1品種の植物を加害するのは高々数十種程度であり、さら

に重要病原菌となると10指にも満たない。このことは、植物は大方の病原微生物に対して抵抗性であること、換言すれば、病原菌は特定の植物に寄生性を獲得した特殊な微生物であることを如実に物語っている。

植物の抵抗性は、植物体表面の物理的強度や常在する抗菌性物質などによる静的抵抗性の他に、病原菌の感染を認識して能動的に起こす形態変化や生理変化などによる動的抵抗性とに大別され(奥 1988)、後者は植物の抵抗性にとってより重要であるとされている。一方、病原菌は、植物が本来備えている様々な抵抗性を乗り越えて感染を可能にする特殊な微生物であると考えられる。Gäumann(1951)が提唱した病原菌としての適応条件を、Oku(1980)は以下の3点にまとめている(奥 1988, 白石 & 奥 1992)。

- 1)植物に侵入する能力：創傷部侵入、自然開口部侵入、角皮侵入など
- 2)宿主の抵抗性に打ち勝つ能力：宿主特異的毒素、サプレッサーなど
- 3)宿主を加害する能力：特異的・非特異的毒素、細胞壁分解酵素など

このような"植物が示す抵抗反応"、および、"病原菌による抵抗反応の抑制"の実体が解明されたあかつきには、病害防除のための新しい視点やバイオテクノロジーによる植物改変のターゲットを提案できるであろう。この結果として、より安全な農産物をより効率的に生産できることはいうまでもない。

本論文においては、エンドウ褐紋病菌による宿主エンドウの抵抗反応を抑制する仕組みについての解明を試みた。エンドウ褐紋病菌に関しては、以前の研究から、褐紋病菌孢子発芽液中に、エンドウの抵抗反応を誘導する引き金となる物質"エリシター(elicitor)"とともに抵抗反応を抑制する物質"サプレッサー(suppressor)"の存在することが明らかとなっている(Oku *et al.* 1977, Shiraishi *et al.* 1978b)。その後、エンドウ褐紋病菌以外の植物病原菌に関しても、サプレッサー活性を示す物質の存在が報告され(Doke 1975, Heath 1981, Kessman & Barz 1986, Ziegler & Pontzen 1982, Oku *et al.* 1987, Storti *et al.* 1988, Kodama *et al.* 1989)、サプレッサーが病原性決定因子として重要な役割を果たしているものと考えられるようになった(Shiraishi *et al.* 1991b)。病原性決定因子としては宿主特異的毒素(HST)が知られているが、HST生産菌は *Alternaria*属菌と *Helminthosporium*属菌(この他には *Phyllosticta maydis*のみ)に限られていることから、大多数の植物病原菌の宿主特異性決定にはサプレッサーが関与しているものと考えられている。しかし、1970年代後半から現在までそれらの構造や作用の詳細は不明であった。

エンドウに対するサプレッサーの生理的作用としては、1)動的抵抗反応の

中心であるファイトアレキシンの蓄積抑制効果(Oku *et al.* 1977)、2)エンドウ原形質膜ATPase活性の阻害効果(Yoshioka *et al.* 1990, Shiraishi *et al.* 1991a)、3)エンドウ組織の局部的罹病化(受容化;本来感染できない非親和性菌の感染が可能となる)の誘導作用(Oku *et al.* 1980)が既に判明している。さらに、ファイトアレキシンの蓄積阻害に関しては、エンドウのファイトアレキシシン(ピサチン)生合成系の鍵酵素とされるフェニルアラニンアンモニアリアーゼ(PAL)およびカルコン合成酵素(CHS)の遺伝子発現が、サプレッサーによって遅延することが明らかにされている(Yamada *et al.* 1989, Yoshioka *et al.* 1990)。このように、サプレッサーはエンドウ褐紋病菌の病原性を決定する因子として中心的な役割を果たしている(Shiraishi *et al.* 1991b)という生理学的証拠が蓄積してきたにもかかわらず、他のサプレッサーと同様にその化学構造やエンドウ細胞中の標的分子に対する作用機作の詳細は不明であった。

本論文においては、褐紋病菌サプレッサーの単離精製とその化学構造の決定(第1章)、精製サプレッサーの生理活性およびサプレッサーとしての活性を有する化学構造の特定(第2章、第3章、第4章)、サプレッサーの第一次作用点と予測されているエンドウ原形質膜ATPaseの遺伝子解析(第5章)について述べ、得られた知見を第6章において総合的に考察した。

なお、本論文作成にあたり、終始御指導・御援助頂いた岡山大学農学部 奥 八郎名誉教授、白石友紀教授、山田哲治教授、一瀬勇規助教授をはじめ植物病学研究室および応用遺伝子工学研究室の学生諸氏、また、サプレッサーの精製とNMRによる構造解析に関して絶大な御援助を賜った新日本製鐵株式会社先端技術研究所解析科学研究部 齋藤公児主任研究員およびCTCラボラトリーズ株式会社 田中昌子リーダー、さらに、本研究の機会を作って頂いた新日本製鐵株式会社技術開発本部技術開発企画部ライフサイエンス企画グループ 藤武義秀部長および同社先端技術研究所ライフサイエンス研究センター 田原 誠主任研究員に、厚く御礼申し上げます。

第1章 エンドウ褐紋病菌サプレッサーの精製および構造解析

植物は、様々な病原菌から身を守るために種々の防御機構を備えている(Ouchi 1991)。微生物の攻撃によって植物体内にはファイトアレキシン(微生物の攻撃を受け植物が生産する低分子の抗菌物質)やPR蛋白質(Pathogenesis-related protein)、リグニンをはじめとする多数の化学的、物理的障壁が形成される。植物の防御反応を誘導する物質は、“エリシター”と呼ばれ(review; Darvill & Albersheim 1984)、菌の培養ろ液(de Wit 1986)や孢子発芽液(Oku et al. 1977, Shiraishi et al. 1978b)中に見い出されている。数種のエリシターは、単離・精製され、その化学構造が決定されている(Coleman et al. 1992, de Wit & Kadde 1981, Farmer & Helgeson 1987, Parker et al. 1991, Sharp et al. 1984, Toppan & Esquerré-Tugayé 1984)。一方、病原菌は、エリシターによって誘導される宿主植物の防御反応を抑制する能力を備えていることが次第に明らかとなってきた。宿主植物の抵抗反応の起動を抑制あるいは遅延させる物質は“サプレッサー”と呼ばれ、エンドウ褐紋病菌(Oku et al. 1977, Shiraishi et al. 1978b)の他、Table 1-1に掲げた数種の植物病原菌の培養ろ液あるいは孢子発芽液中に見い出されている(Doke 1975, Heath 1981, Kessman & Barz 1986, Ziegler & Pontzen 1982, Oku et al. 1987, Storti et al. 1988, Kodama et al. 1989)。しかし、Table 1-1に示したように、サプレッサーの多くは水溶性の糖あるいは糖ペプチドであり、現在までいずれも単離精製さらに化学構造決定には至っていなかった。本章においては、エンドウ褐紋病菌 *Mycosphaerella pinodes* が産生するサプレッサー2種類を単離精製し、それらの化学構造を解析した経緯と結果について述べる。

第1節 エンドウ褐紋病菌サプレッサーの精製

精製の手順をFig.1-1に示し、以下にその詳細を述べる。

第1項 孢子発芽液の調製

エンドウ褐紋病菌 *Mycosphaerella pinodes* OMP 1株(ATCC42741, IFO-30342)をCzapek培地に植種し、20℃にて6日間培養して、形成された孢子を回収した。得られた孢子を1mlあたり1~2x10⁶孢子となるように滅菌水に

Table 1-1. List of phytopathogenic fungi producing suppressors for plant defense reaction

Pathogenic fungus	Composition	Host plant	References
<i>Phytophthora infestans</i>	Glucan, Phosphoglucan	Potato	Doke (1975)
<i>Mycosphaerella pinodes</i>	Glycopeptide	Pea	Oku <i>et al.</i> (1977)
<i>Uromyces phaseoli</i> var. <i>typica</i>	?	Bean	Heath (1981)
<i>Phytophthora megasperma</i> f.sp. <i>glycinea</i>	Mannan-glycoprotein	Soybean	Ziegler & Pontzen (1982)
<i>Ascochyta rabiei</i>	Glycoprotein	Chickpea	Kessman & Barz (1986)
<i>Mycosphaerella ligulicola</i>	Glycopeptide?	Chrysanthemum	Oku <i>et al.</i> (1987)
<i>Mycosphaerella melonis</i>	Glycopeptide?	Cucumber	Oku <i>et al.</i> (1987)
<i>Phytophthora infestans</i>	?	Tomato	Storti <i>et al.</i> (1988)
<i>Botrytis</i> sp.	Peptide+?	Onion	Kodama <i>et al.</i> (1989)

Modified from Shiraishi & Oku(1992).

Prepare pycnospores of *M. pinodes*

Suspend the spores in sterilized water and shake for 20h at 20°C

Ultrafiltrate through Millipore PTGC142(MW.10000 cut)

Low MW fr.
(< 10,000)

High MW fr.
(> 10,000)

Elicitor fraction

GFC [Toyopearl HW40F]

Crude suppressor fraction

Sep-PAK C18

void (0%)

20% MeOH_{aq}

HPLC [Inertsil-ODS; H₂O-MeOH gradient]

HPLC [HPX-42A; H₂O]

Supprescin A

Supprescin B

Determine their chemical structures

- Amino acid composition
- Amino acid sequences
- ¹³C-, ¹H-NMR

Fig. 1-1. Purification procedure of *M. pinodes* -suppressors.

懸濁し、20℃にて20時間振盪培養して胞子を発芽させた。培養後、遠心分離ないしろ過により、菌体を除去して得られた遠心上清あるいはろ液（胞子発芽液と呼ぶ）からサプレッサーの精製を行った。1ℓの胞子発芽液から1.5gの乾燥物が得られた。

第2項 サプレッサーの精製

(1) 限外ろ過

ポアサイズ10000のミリポアPTGC142を用いて胞子発芽液の限外ろ過を行った。高分子量画分はエンドウの動的抵抗反応を誘導するエリシターを含み、低分子量画分にサプレッサー活性が認められている(Shiraishi *et al.* 1978b)。高分子量画分については、さらに透析により脱塩を行ない、凍結乾燥後、脱イオン水に溶解し、グルコースを標品としてフェノール硫酸法(Dubois *et al.* 1956, Hodge & Hofreiter 1962)で定量し、所定の濃度に調製して、褐紋病菌エリシターとして以降の実験に用いた。一方、低分子量画分は、凍結乾燥し、脱イオン水に溶解し、以下の精製に供した。1ℓの胞子発芽液から乾燥重量で560mgの低分子量画分が得られた。

(2) ゲルろ過

限外ろ過で得られた低分子量画分を遠心分離(12,000rpm, 5分間)し、上清をToyopearl HW40Fカラム(2.5cm i.d. x 40cm;TOSOH社製)で分画した。ピサチン(エンドウのファイトアレキシン)蓄積抑制効果を指標として、顕著なサプレッサー活性が認められた画分を回収した。1ℓの胞子発芽液より乾燥重量で170mgのサプレッサー画分を得た。この画分は、ピサチンの蓄積抑制だけでなく原形質膜ATPaseを阻害する(Yoshioka *et al.* 1990)。

(3) SepPAK C₁₈による分離

さらに、サプレッサー画分をSep-PAK C₁₈カートリッジ(Waters社製)に通し、素通りした画分および各濃度(0, 10, 20, 40, 60, 80, 100%(v/v))のメタノール水で溶出した画分を各々回収した。これらのピサチン蓄積と *in vitro* におけるエンドウ原形質膜ATPase活性に対する効果を調べた結果、Sep-PAK C₁₈を素通りした画分および10-20%メタノールで溶出された画分には、顕著なピサチン蓄積抑制効果が認められた。一方、ATPase阻害効果は、20%メタノールで溶出された画分にのみ認められた。以上の結果から、両溶出画分には、それぞれ

作用の異なるサプレッサー分子が存在することが強く示唆された。両画分を各々のA画分、B画分として、さらに精製を進めた。

(4) 逆相カラムを用いた高速液体クロマト

A, B画分とも Inertsil-ODSカラム(4.6mm i.d. x 250mm; Gasukuro Kogyo社製)を用いて、水とメタノールのグラジェント法にて分画・分取した。

A画分については、4つの画分として分取し、ピサチン蓄積およびATPase活性に及ぼす効果を調べた結果、いずれの画分もピサチン蓄積を抑制する効果を有していたが、分取前のA画分と同様にATPase活性に対する阻害効果は認められなかった。このうち、最もメジャーなピークを含む画分は、孢子発芽液1ℓから乾燥重量で2.2mg得られたので、Supprescin Aと命名して化学構造の決定に供した。

一方、B画分については上述のODSカラムでは数種の物質の混在が見られたもののほとんどがボイドに溶出されたので、イオン配位子カラムを用いて精製を試みた。

(5) イオン配位子カラムを用いた高速液体クロマト

HPX-42Aカラム(7.8mm i.d. x 300mm; Biorad社製)を用いて、水を移動相として80℃で分離し、5分画を分取し(Fig.1-2(a))、エンドウ原形質膜ATPase活性に対する阻害効果を調べたところ、Fig.1-2(b)に示したように、程度に違いはあるものの5つの分画すべてでATPase活性阻害効果が認められた。B1画分は1.8mgの乾燥標品を得ることができたが、その他の分画は構造解析に必要な量を確保できなかつたので、その後の解析は、B1分画(以下、Supprescin Bと呼ぶ)についてのみ実施した。

第2節 エンドウ褐紋病菌サプレッサーの構造解析

Shiraishi *et al.*(1978)は、薄層クロマトグラフィーにて純化したサプレッサーがニンヒドリン反応陽性であることや、また、Oku *et al.*(1980)はpronaseやproteinase K処理によりサプレッサー活性が失活することを報告しており、褐紋病菌サプレッサーの活性発現にはペプチド鎖が必要であることは既に判明していた。さらに、当研究室において、褐紋病菌サプレッサーは糖を含む化合物であるとの予備的な実験結果も得ていた。

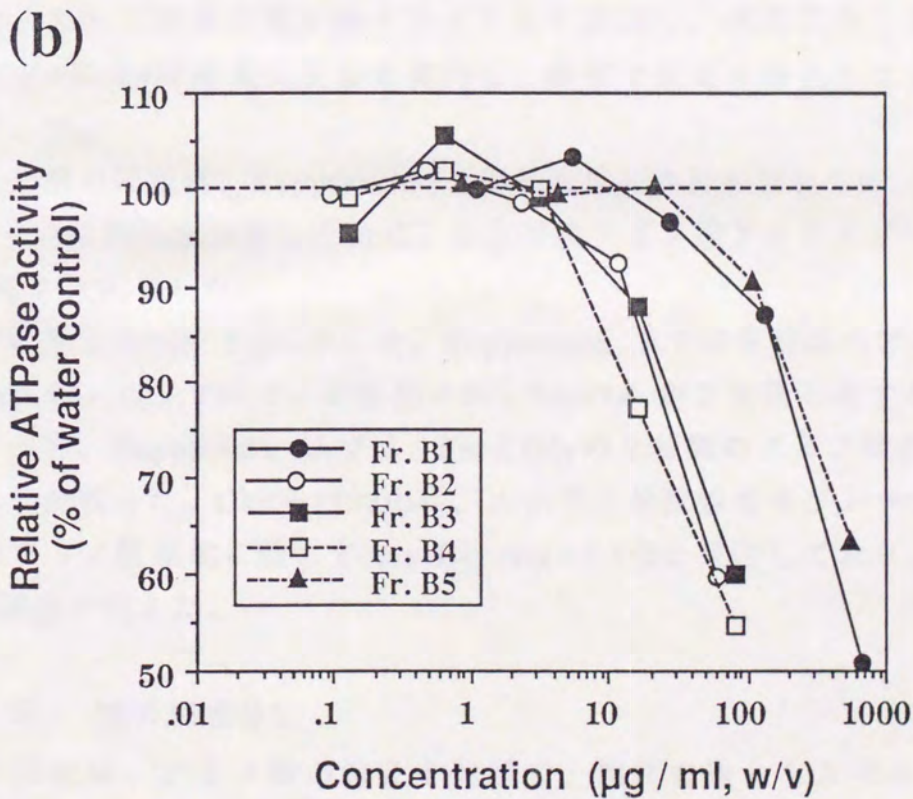
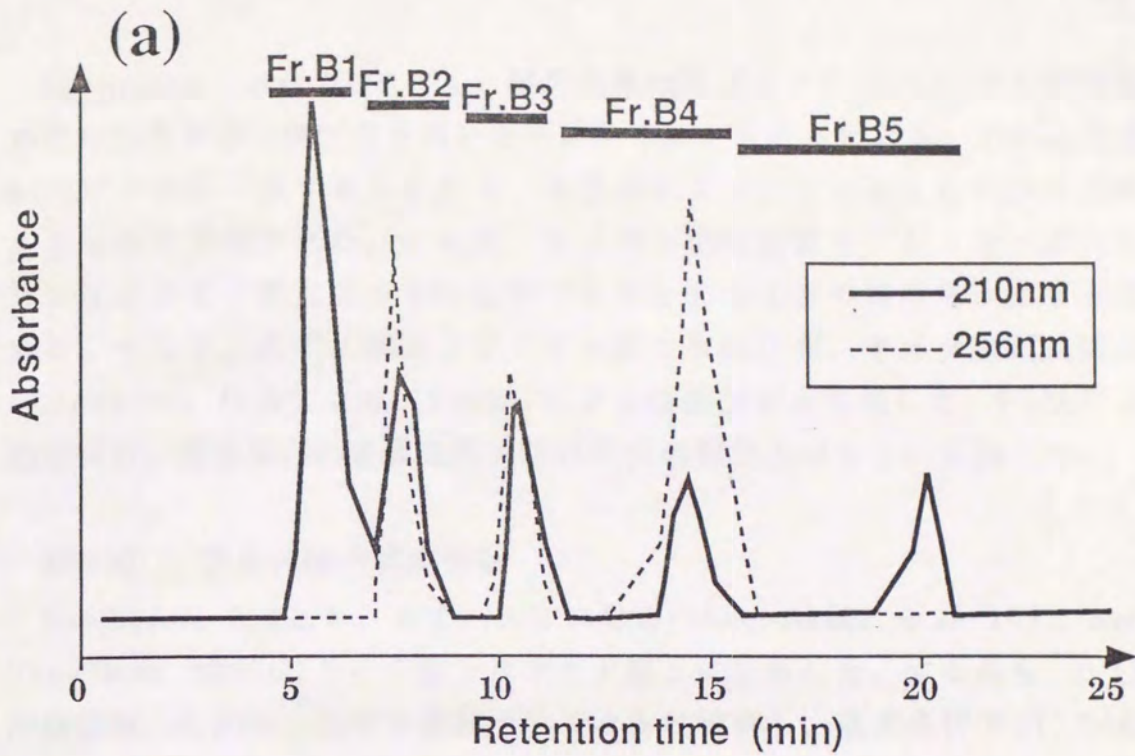


Fig. 1-2. Separation of the fraction B by HPX-42A-HPLC(a) and the effect of fractions on the plasma membrane ATPase activity(b).

Supprescin AおよびBとも、精製の際の高速液クロ(HPLC)では紫外吸光の他に屈折率(RI)検出器を用いたモニタリングも行った結果、210nm吸光度とRIのピークが一致することから、2種のサプレッサーはともに糖ペプチドであるものと予想された。これは、エンドウ褐紋病菌サプレッサーがニンヒドリン反応および糖反応ともに陽性であるとする上述の報告と一致する見解である。そこで、まず、糖およびアミノ酸の組成分析、アミノ酸配列解析を行い、ついで、核磁気共鳴(NMR)による構造解析を実施した。NMRによる構造解析は、新日鐵(株)齋藤公兎主任研究員の御助力のもとに実施した。

第1項 アミノ酸の組成分析

Supprescin A,Bとも、まず、スミス分解(Abdel-Akher *et al.* 1952, Smith & Van-Cleve 1955)によって糖とペプチド鎖とに分解した。すなわち、0.1M 酢酸緩衝液、0.25M 過ヨウ素酸ナトリウムに溶解し、遮光条件で4℃,24時間反応させ、さらに過剰の亜ヒ酸ナトリウムを添加し、水素化ホウ素ナトリウム存在下で4℃,24時間還元反応を実施し、酢酸で反応を停止して、脱塩後、凍結乾燥した。

アミノ酸の同定は、Supprescin A,Bともスミス分解物を6N HCl存在下で110℃・24時間加水分解した後に、日立社製アミノ酸アナライザー(model L-8500)により実施した。

分析結果をTable 1-2に示した。Supprescin Bでは5種類のアミノ酸、すなわちAsp,Glu,Gly,Thr,Serが観察され、Serのみが2当量存在するとの結果を得た。一方、Supprescin Aでは、SerとGlyの2種類のアミノ酸が2:1の組成で含むことが判った。Okura(1980)は、エンドウ褐紋病菌サプレッサーのひとつF5のアミノ酸組成に関してAsp:Gly:Ser=1:1:2と報告しており、Supprescin Bとの関連が伺えた。

第2項 糖の組成分析

糖の同定は、アミノ酸の場合と同様に、両化合物ともスミス分解物を1N HClにて加水分解した後に、Lichrosorb-NH₂カラム(4mm i.d. x 250mm ; Waters社製)を用いて、アセトニトリル:15mM リン酸緩衝液(80:20(V/V))を溶媒系としたHPLCにて、分析した。

Supprescin AについてはGalNAc [N-acetyl galactosamine]のピークのみ検出された。一方、Supprescin Bの分析結果はTable 1-3に示すように、Gal

Table 1-2. Amino acid compositions of the Suppressin A and B purified from the germination fluid of pycnospores of a pea pathogen, *Mycosphaerella pinodes*

Amino acid	Suppressin A		Suppressin B	
	nmol	Ratio(X/Gly)	nmol	Ratio(X/Gly)
Aspartic acid	ND	0.000	1.257	0.963
Glutamic acid	ND	0.000	1.239	0.949
Glycine	1.927	1.000	1.305	1.000
Serine	3.904	2.026	2.625	2.011
Threonine	ND	0.000	1.378	1.056

Suppressors were hydrolyzed in a solution of 6N HCl at 110°C for 24 h, and then the amounts of amino acids in the hydrolysates were determined. ND: not detected.

Table 1-3. Sugar compositions of the Supprescin B purified from the germination fluid of pycnospores of a pea pathogen, *Mycosphaerella pinodes*

Sugars	Retention time (min)	Area	Ratio (X/Gal)
Gal	8.55	15970021	(1.00)
GalNAc-OH	6.93	16433564	1.03

[Galactose]とGalNAcが1:1の組成比で検出された。

第3項 アミノ酸配列の解析

ABI社製ペプチドシーケンサー(model 477A)により実施した。

Suppescin Bについてはそのアミノ酸配列を Ser-Ser-Gly-Asp-Glu-Thrと決定できたが、Suppescin Aについてはアミノ酸配列を決定できなかった。これはSuppescin Aの分子が非常に小さいことを意味しており、アミノ酸組成分析の結果を考慮して、Suppescin AとSuppescin Bとが類似していると仮定すると、Suppescin Aのペプチド部分はSer-Ser-Glyというアミノ酸配列を持つことが予想された。

第4項 核磁気共鳴による構造解析

糖ペプチドである2つのSuppescinのアミノ酸配列、糖鎖の結合などの化学構造を確定するために核磁気共鳴(NMR)による分析を実施した。

(1) 核磁気共鳴法(NMR)による構造解析の方法

NMRの測定は、高精度温度制御装置および低温空気供給装置を付設した日本電子社製 α -400, EX-400スペクトロメーターを用いた。測定温度は24.0℃とし、 ^1H の測定は400.05 MHzでH5プローブを、 ^{13}C の測定は100.50 MHzでTH5プローブを使用した。

実施した測定手法は、Ernst著"Principles of NMR in one and two dimensions"(1987)を参考書として、以下のように実施した。

1)スピンの帰属について：

^1H : 一次元、

Absolute and Phase-sensitive DQF-COSY、

Relayed-COSY、

Absolute and Phase-sensitive HOHAHA(重水、軽水)、

^{13}C : 一次元、

C-HCOSY、

COLOC、

2)立体構造情報について：

^1H : 一次元差NOE、

Absolute and Phase-sensitive NOESY(重水、軽水)、

^{13}C : ^1H デカップリング、
 ^1H ノンデカップリング、
選択的 ^1H ノンデカップリング、

3)その他:

必要に応じて、デカップリング実験を実施、また、重水あるいは軽水の吸収はHMG法およびDANTEパルスによるpresaturated法を使用した。測定試料は、pH5.0に調整した重水ないし軽水のリン酸緩衝液を溶媒とし、5mM程度の濃度に調整した。

以下の測定条件にてNMRスペクトルを計測し、日本電子社製のオリジナルソフトウェアを活用してスペクトルの処理を実施し、必要に応じてドリフトコレクションや位相補正を実施した。

1) ^1H 一次元NMRスペクトルの測定:

積算32-128回。スペクトル幅8000Hz。データポイント32K。
delay time 4sec。

2) ^1H 二次元NMRスペクトルの測定:

積算16ないし32回。データサイズF2=1024,F1=512。ゼロフィリング後1K×1K。sinesquareによるフーリエ変換。

NOESYについては、mixing-timeを100-800msecまで検討し、スピン拡散の影響を検討して最適値を500msecと決定。スペクトル幅4500Hz。delay time 3sec。ゼロフィリング後1K×1K。
gaussianによるフーリエ変換。

3) ^{13}C 一次元NMRスペクトル:

積算1000-4000回。データポイント32K。スペクトル幅4000Hz。
delay time 3.8sec。

INEPTなどについては、積算10000-40000回、delay time 5secで実施した。

4) ^{13}C - ^1H 二次元NMRスペクトル:

積算512回。データサイズF2=512,F1=512。ゼロフィリング後1K×1K。exponentialによるフーリエ変換。

COLOCについては、J値を3,5,8Hzに設定して、それぞれ測定した。スペクトル幅4000Hz。delay time 4sec。

(2) Suppresscin Aの構造解析

Suppresscin Aは、加水分解後のアミノ酸分析などの結果から、Ser, Gly, GalNAcを有していることが判明している。過去の研究例から、糖であるGalNAcはSerないしThrと結合してムチン型の糖ペプチドを形成するか、あるいは、Asnと結合して複合型の糖ペプチドを形成するかのいずれかであることが示されている(三崎ら 1976, Vliethurt *et al.* 1983)。Suppresscin Aについては、Table 1-2で示したようにAsnが認められなかったことからSerと結合したムチン型の糖ペプチドである可能性が高い。Suppresscin Aのペプチド部分のアミノ酸配列をプロテイン・シーケンサーで決定することができなかつたので、 ^1H -、 ^{13}C -NMRスペクトルで検出されたすべての吸収を二次元手法などを用いて解析し、さらにペプチド結合しているアミド水素とカルボニル炭素の帰属をCOLOC法を用いて決定した。

Fig. 1-3に一次構造決定の論拠となった ^1H -、 ^{13}C -NMRスペクトルを例示し、解析結果をTable 1-4に示した。

(3) Suppresscin Bの構造解析

Suppresscin Bは、加水分解後のアミノ酸および糖分析の結果から、Ser, Gly, Asp, Glu, ThrおよびGalNAc, Galの含んでいることが判明している(Table 1-2, 3)。前述のように、糖であるGalNAcはSerないしThrと結合してムチン型の糖ペプチドを形成するか、あるいはAsnと結合して複合型の糖ペプチドを形成するかのいずれである(三崎ら 1976, Vliethurt *et al.* 1983)。しかし、複合型の糖ペプチドの場合、GalNAc以外の糖、例えばGlcNAcやManが存在するはずであるが、Suppresscin Bにおいてはこれらの存在は認められなかつた。また、ムチン型の糖ペプチドはSer-X-Asp-X-Thrというアミノ酸配列を有することが多く報告されており(Oppenheimer *et al.* 1989)、Suppresscin BはSSGDETのアミノ酸配列を有していたことから、SerないしThrとO-グリコシド結合したムチン型の糖ペプチドである可能性が強く示唆された。

Suppresscin Bについては、先のSuppresscin Bと同様にNMRスペクトルにおいて、 ^1H -、 ^{13}C -NMRスペクトルで検出されたすべての吸収を二次元手法などで解析し、さらにペプチド結合しているアミド水素とカルボニル炭素の帰属をCOLOC法で決定した。また、様々な立体構造情報は、NOESYスペクトルやINEPTなどで得られる結合定数の解析から決定した。

Fig. 1-4に一次構造決定の論拠となった ^1H -、 ^{13}C -NMRスペクトルを例示し、解析結果をTable 1-5に示した。

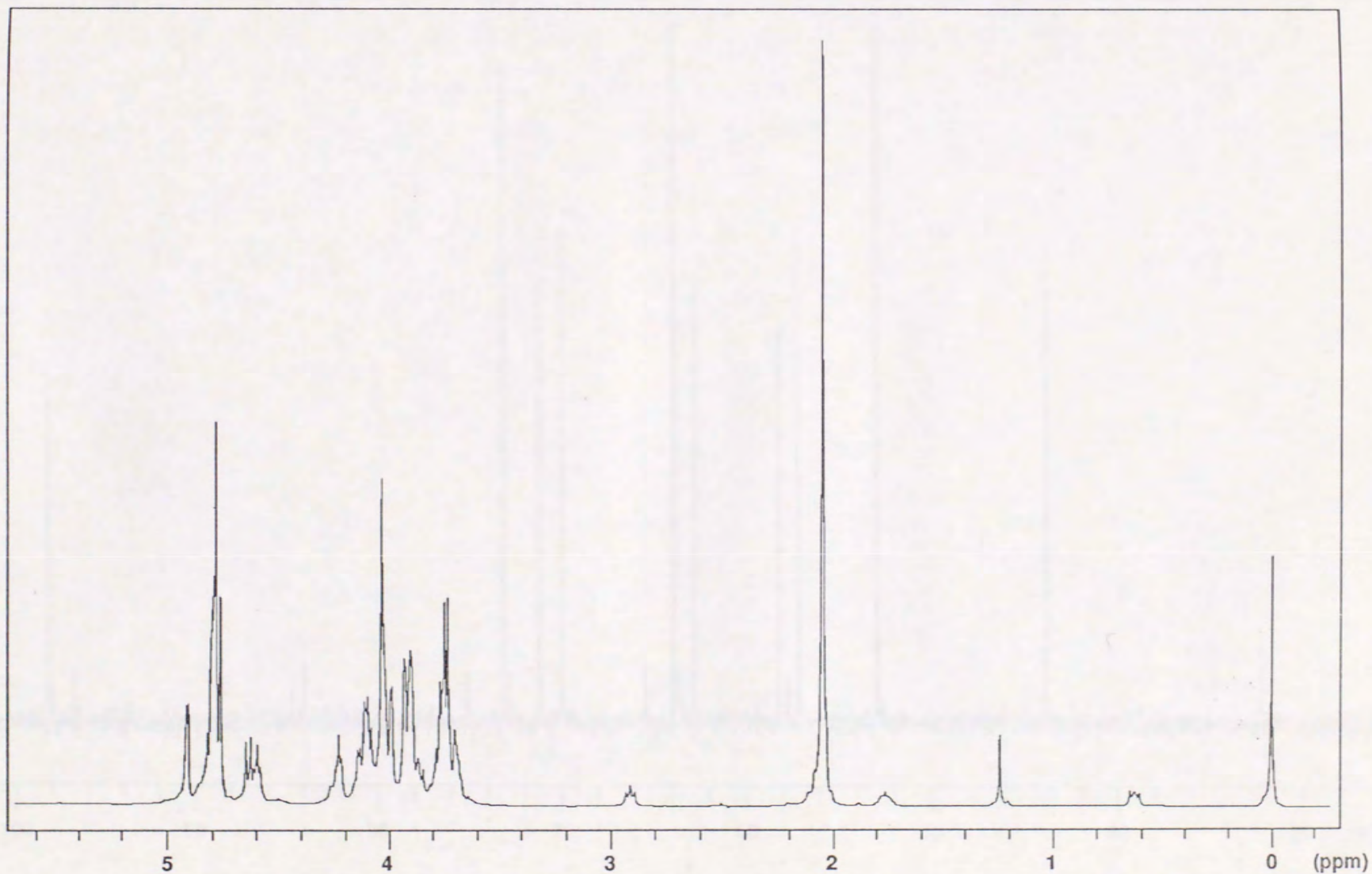


Fig.1-3(a). $^1\text{H-NMR}$ spectrum of Suppressin A in D_2O .

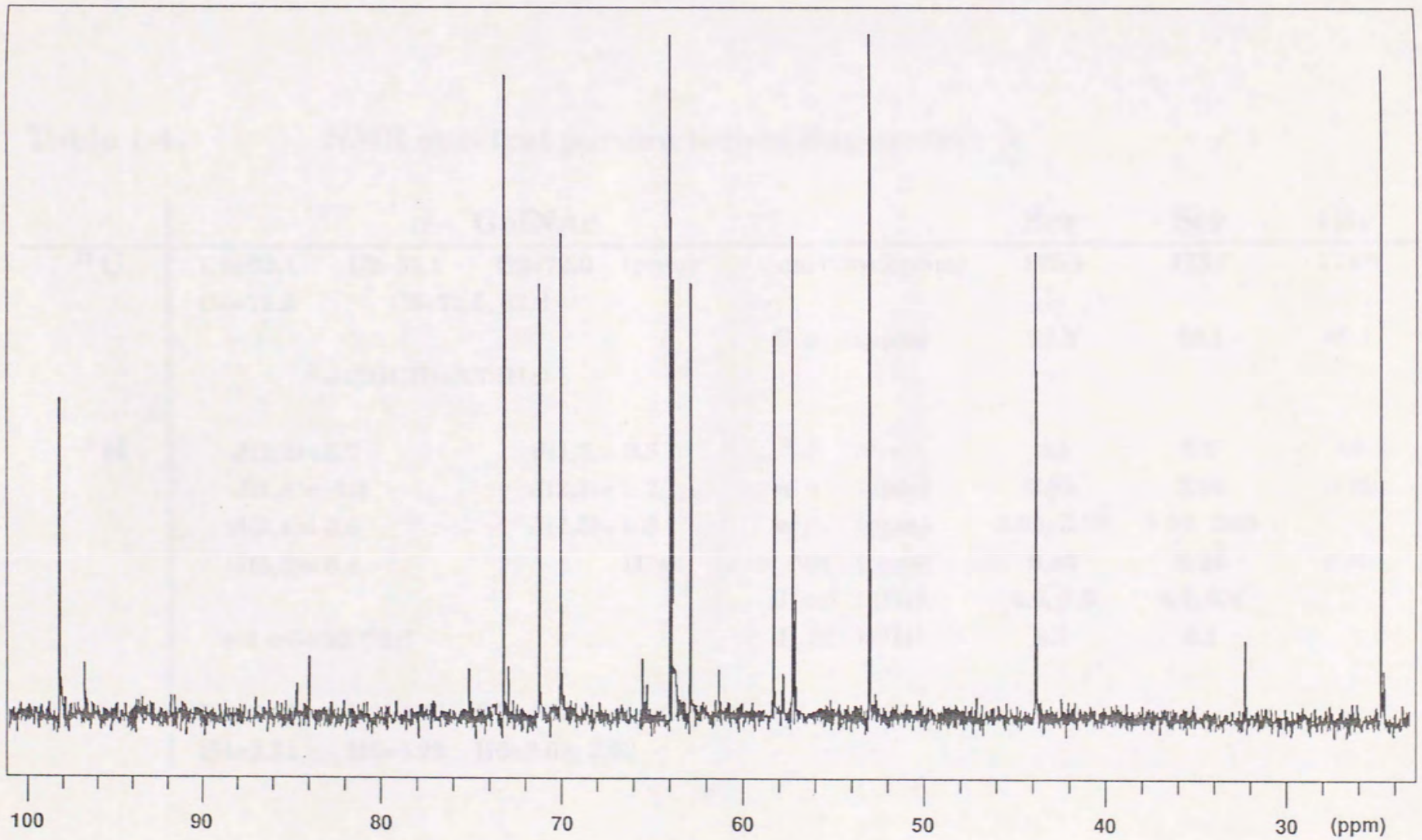


Fig. 1-3(b). ^{13}C -NMR spectrum of Suppressin A in D_2O .

Table 1-4. NMR spectral parameters of Suppressin A

	α - GalNAc				Ser	Ser	Gly
^{13}C	C1=92.1 C4=71.5	C2=55.1 C5=72.5, 62.2	C3=72.0 (ppm)	carbonyl(ppm)	175.1	175.7	174.8
				C α (ppm)	57.3	58.1	49.1
	$^3\text{J}(\text{COCH})=5.7$ (Hz)						
^1H	J(1,2)= 3.7		J(1,3)= 0.8	$^3\text{J}(\theta)=$	3.1	2.9	3.0
	J(1,4)= -1.2		J(2,3)= 9.7	w α (ppm)	3.91	3.94	3.75
	J(3,4)= 3.6		J(4,5)= 0.6	w β (ppm)	3.95, 3.99	3.97, 3.99	
	J(5,5)= 6.4		(Hz)	NH (ppm)	8.35	8.24	8.49
				J($\alpha\beta$) (Hz)	4.6, 8.5	4.7, 8.4	
	w2-w3= 22 (Hz)			J($\beta\beta$) (Hz)	8.3	8.1	
	H1=4.85	H2=4.40	H3=4.03 (ppm)				
	H4=3.51	H5=4.22	H6=3.69, 3.63				

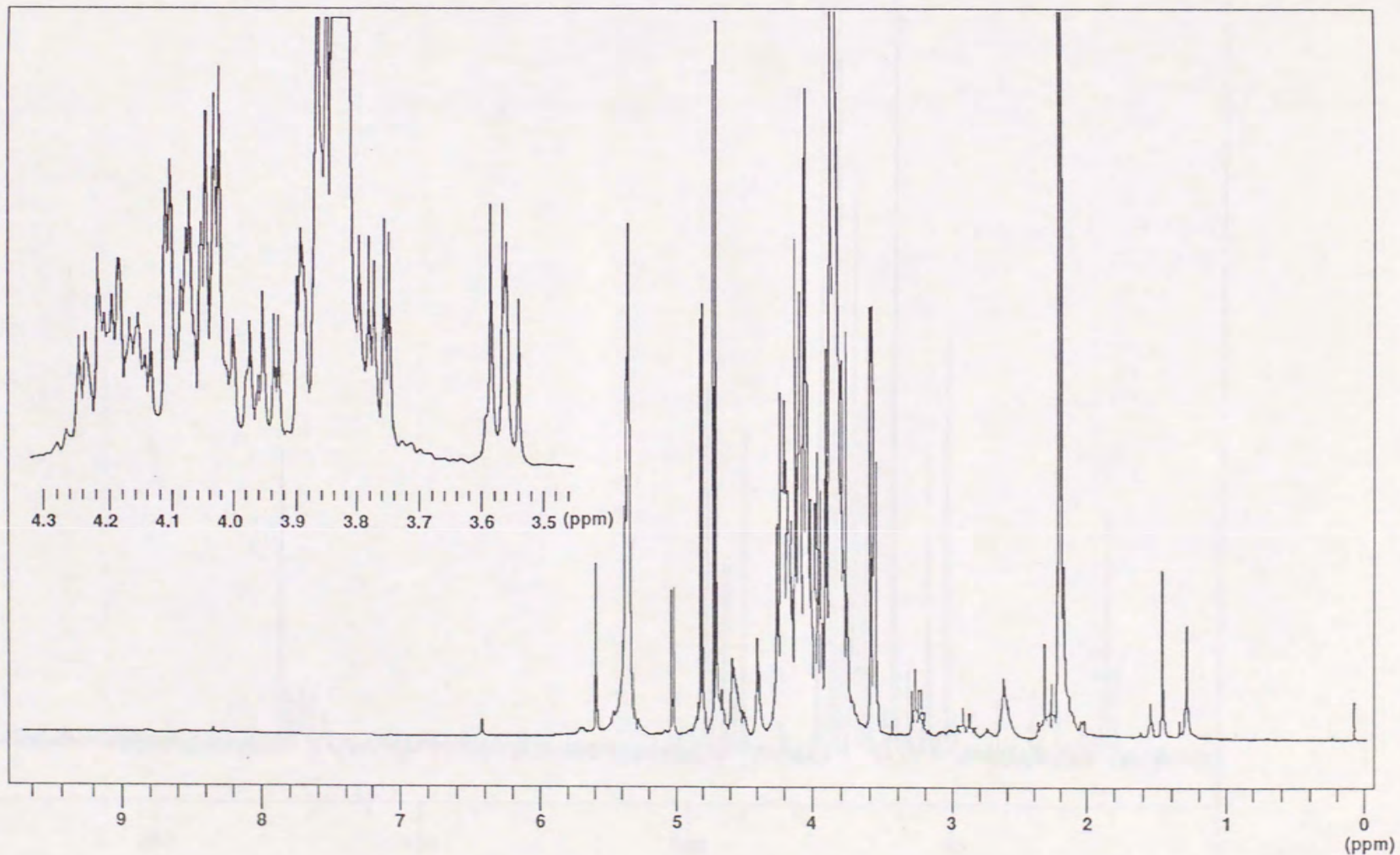


Fig.1-4(a). $^1\text{H-NMR}$ spectrum of Suppressin B in D_2O .

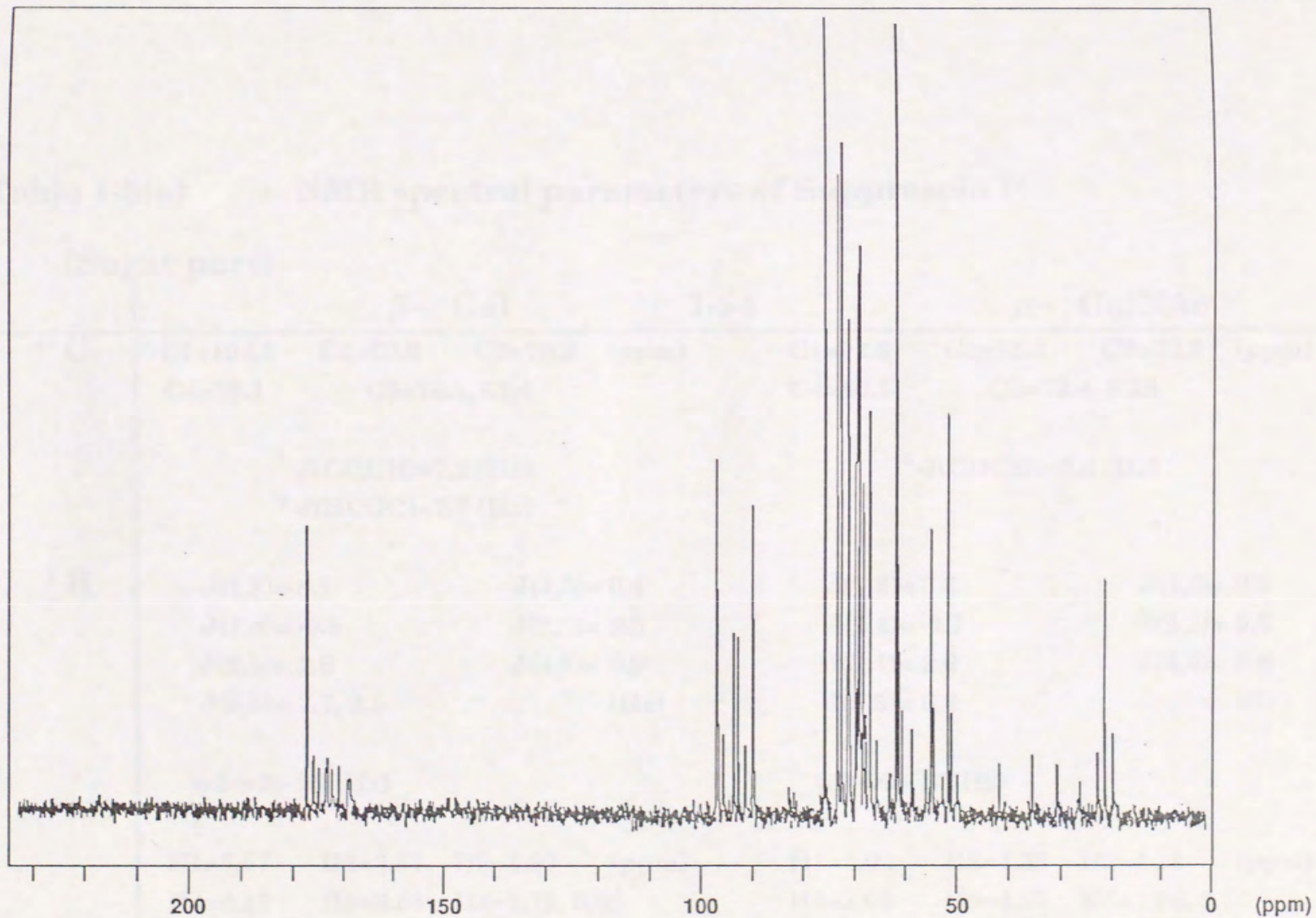


Fig.1-4(b). ^{13}C -NMR spectrum of Suppressin B in D_2O .

Table 1-5(a) NMR spectral parameters of Suppressin B

(Sugar part)		β - Gal			1- \rightarrow 4	α - GalNAc		
^{13}C	C1=104.1	C2=69.9	C3=70.8	(ppm)	C1=92.3	C2=55.4	C3=72.3	(ppm)
	C4=70.1	C5=76.1, 62.4			C4=80.1	C5=72.4, 62.5		
	$^3\text{J}(\text{COCH})=7.2$ (Hz)				$^3\text{J}(\text{COCH})=5.0$ (Hz)			
	$^3\text{J}(\text{HCOC})=7.7$ (Hz)							
^1H	$\text{J}(1,2)= 8.1$		$\text{J}(1,3)= 0.4$		$\text{J}(1,2)= 3.6$		$\text{J}(1,3)= 0.8$	
	$\text{J}(1,4)= -0.5$		$\text{J}(2,3)= 9.9$		$\text{J}(1,4)= -1.1$		$\text{J}(2,3)= 9.5$	
	$\text{J}(3,4)= 3.8$		$\text{J}(4,5)= 0.9$		$\text{J}(3,4)= 3.6$		$\text{J}(4,5)= 0.6$	
	$\text{J}(5,5)= 7.7, 3.5$		(Hz)		$\text{J}(5,5)= 6.4$		(Hz)	
	w2-w3= 29 (Hz)				w2-w3= 25(Hz)			
	H1=5.57	H2=3.57	H3=3.67	(ppm)	H1=5.02	H2=4.35	H3=4.11	(ppm)
H4=4.11	H5=3.55	H6=3.73, 3.65		H4=3.06	H5=4.27	H6=3.66, 3.60		

Table 1-5(b) NMR spectral parameters of Suppressin B

(amino acid part)		Ser	Ser	Gly	Asp	Glu	Thr	
¹³ C	carbonyl(ppm)	175.1	175.7	174.8	179.2	178.1	177.5	
	C α (ppm)	57.3	58.1	49.1	50.0	53.5	59.5	
¹ H	³ J (θ)=	3.1	2.9	3.5	3.8	2.1	4.1	
	w α (ppm)	3.91	3.94	3.75	4.01	3.75	3.62	C γ
	w β (ppm)	3.95, 3.99	3.97, 3.99		2.95, 2.87	2.11, 2.01	3.97, 3.92	1.35
	NH (ppm)	8.35	8.24	8.49	8.55	8.24	8.50	
	J(αβ) (Hz)	4.6, 8.5	4.7, 8.4		4.0, 8.0	7.4	5.0	
	J(ββ) (Hz)	8.3	8.1		16.5	βγ 8.1	6.7	

(4) Suppresscinの一次構造

NMRによる構造解析の結果から導かれたSuppresscin AおよびBの化学構造をFig.1-5に示した。両Suppresscinともペプチド配列中のSer残基に糖がO-グリコシド結合しているムチン型の糖ペプチドであった。GalNAc-Ser-Ser-Glyの構造を有するSuppresscin Aは、Gal-GalNAc-Ser-Ser-Gly-Asp-Glu-Thrの構造を持つSuppresscin Bの一部であることが判明した。両者ともペプチド鎖が、低分子のペプチドとしては非常に珍しい α ヘリックス型の構造を有していた。

(5) Suppresscinの立体構造の推定

NMRにて得られた立体構造に関する情報を基に、水溶液中における両化合物の立体構造の推定を行なった。CTCラボラトリーズ(株)の協力で、IRIS4D 70Gワークステーションにて、分子動力学計算プログラムCHARMm(Karplus *et al.* 1991)を活用して立体構造の推定を実施した。

その結果をFig.1-6およびFig.1-7に示す。Fig.1-6およびFig.1-7(a)では、炭素原子を青色、酸素原子を赤色で表現したボールスティックとして表示した。また、Fig.1-7(b)では、スティック表示した化学構造の骨格とともに、電荷分布を色で表示した[赤色:正電荷、青色:負電荷、黄色;電荷なし]。NMRによる種々の解析にて得られた情報を反映させると、両化合物ともペプチド鎖は α ヘリックス型の構造をとり、糖鎖とペプチド鎖がV字型の配座を保持する特異な構造であることが推定された。さらにSuppresscin BのV字型部分には正電荷が局在しており、N末のアミドとともに糖鎖やペプチドの電荷がV字型部分に集中していることが推定された。

種々の生体反応は、それに関わる物質の微細な立体構造の効果とエレクトロスタティックな効果との影響が支配的であると考えられており(日本化学会編「実験化学講座 生物有機」1991)、Suppresscin Bで観察された特異な立体構造と電荷分布はサプレッサーの機能上重要な意味を持つものと推察した。

第3節 まとめ

エンドウ褐紋病菌胞子発芽液中より2種類のサプレッサーを精製し、世界に先駆けてその化学構造を明らかにすることができた。両者はムチン型糖ペプチドであり、GalNAc-O-Ser-Ser-Gly(分子量452Da)をSuppresscin A、Gal-

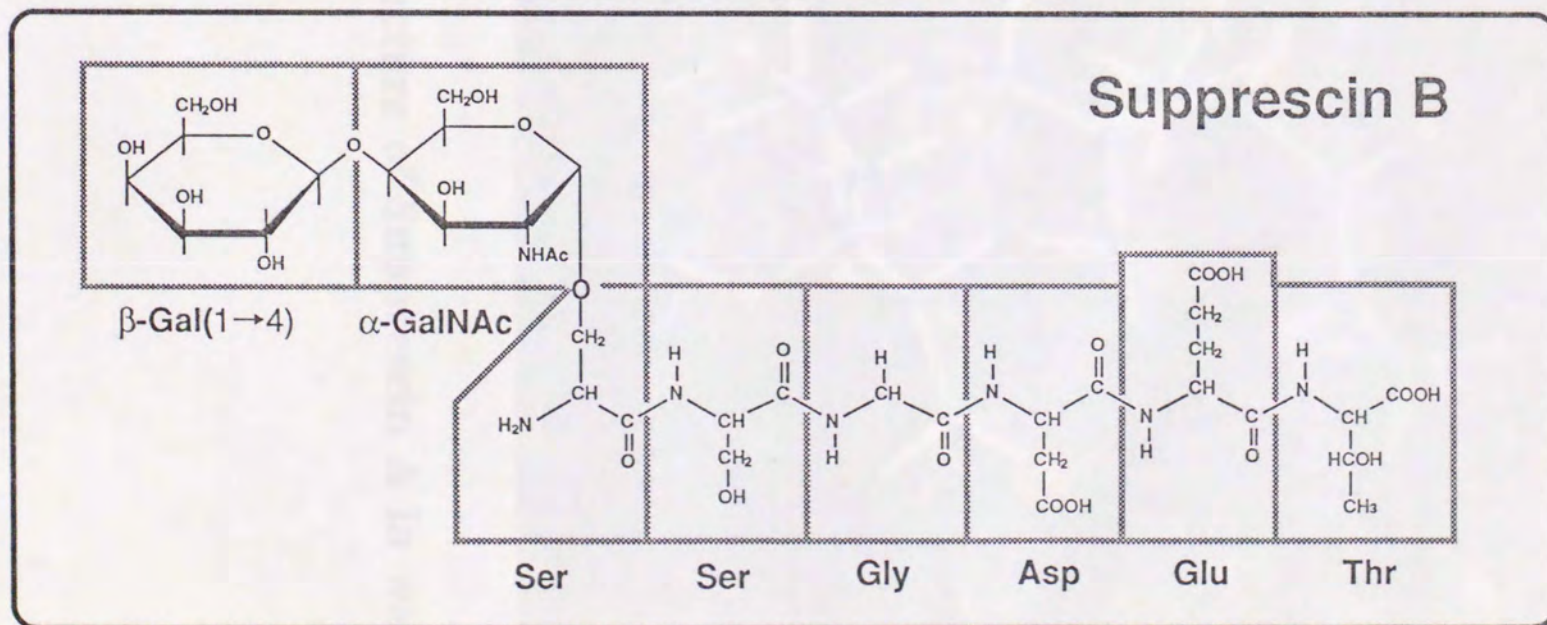
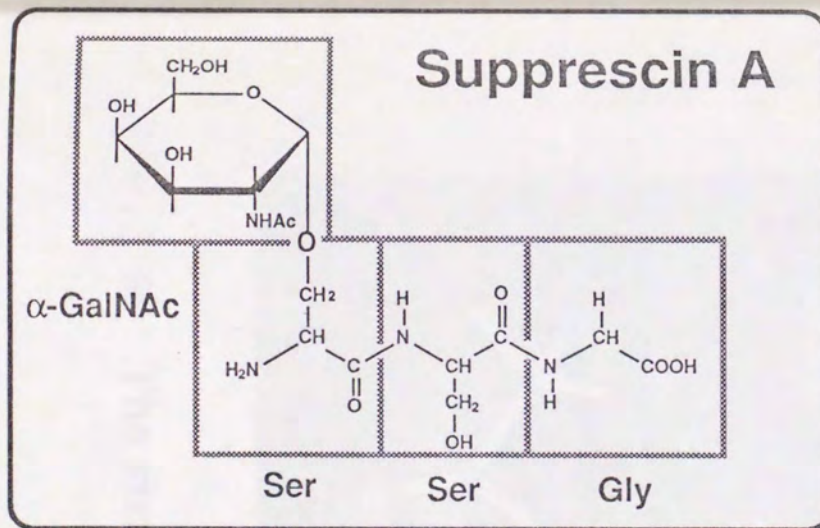


Fig. 1-5. Chemical structures of two suppressors.

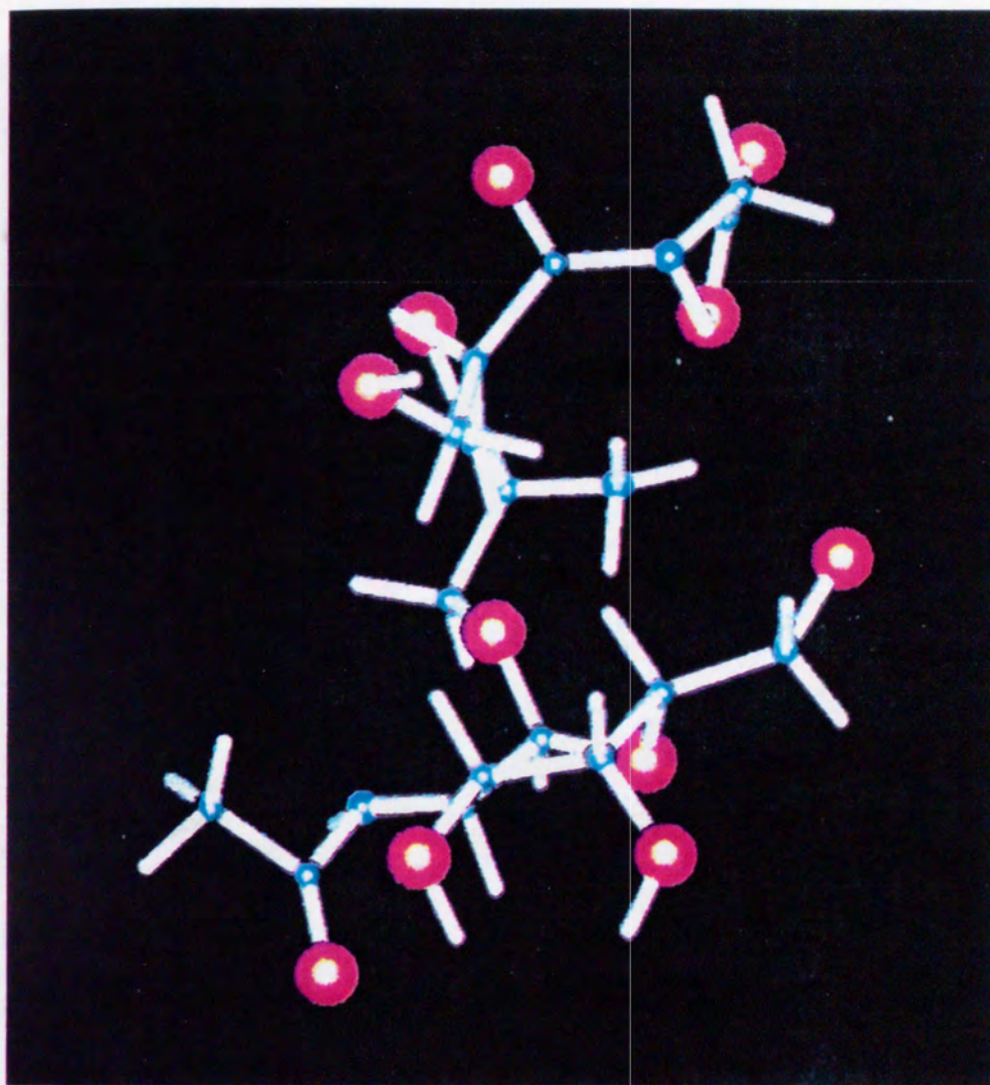


Fig.1-6. The structure of Supprescin A in water.

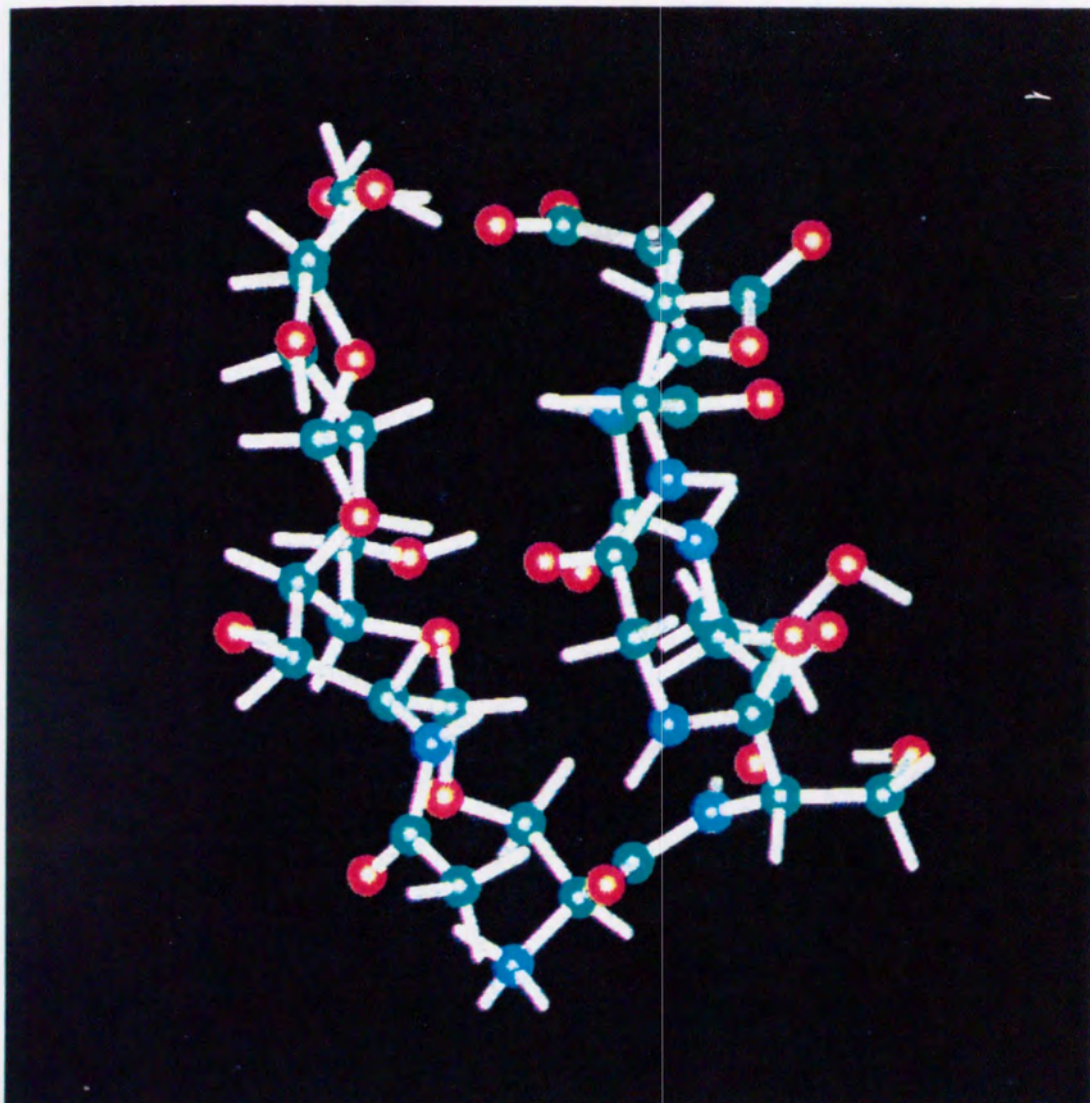


Fig.1-7(a). The structure of Supprescin B in water.

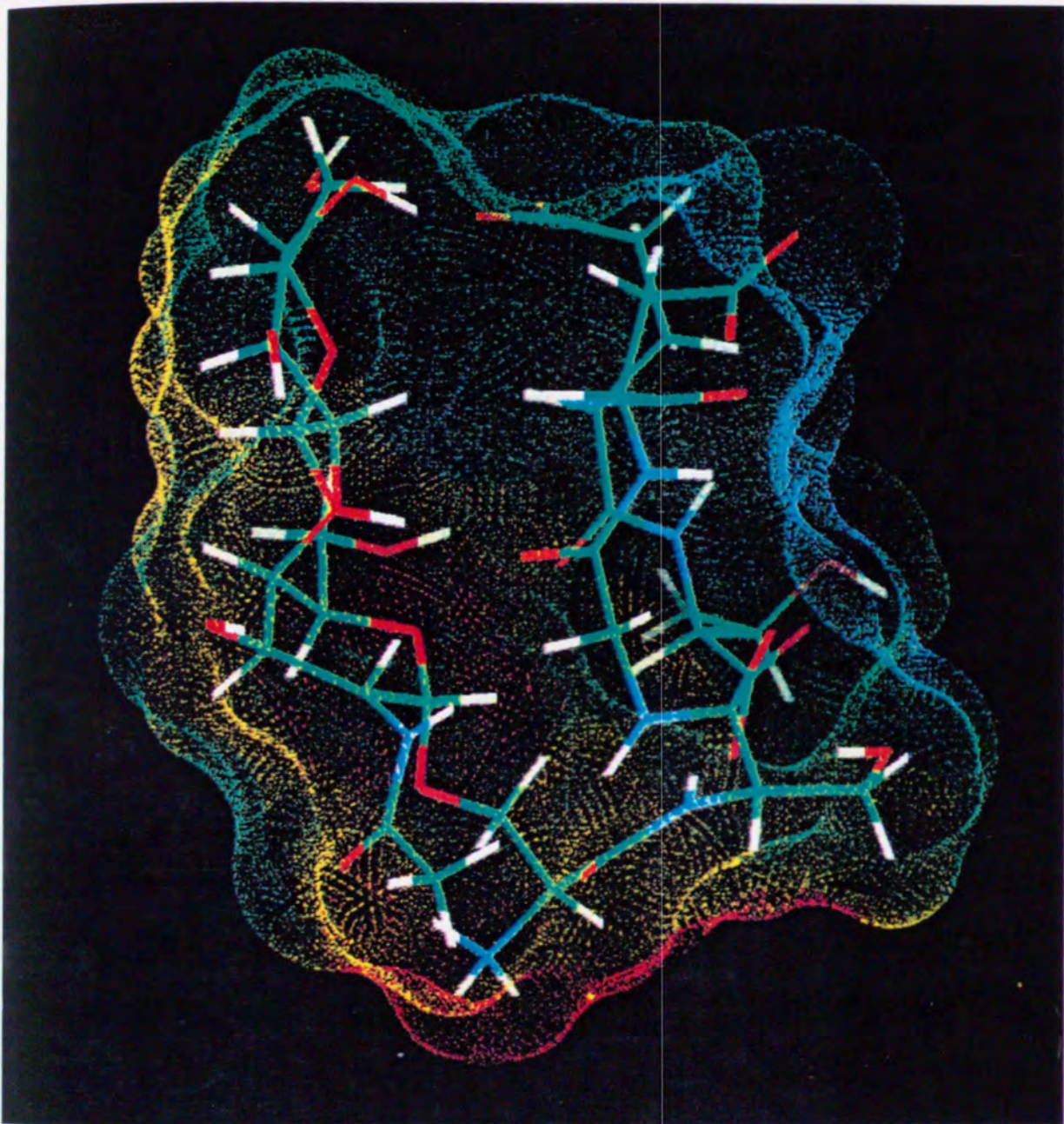


Fig.1-7(b). The structure of Suppresscin B in water with the distribution of electron.

GalNAc-O-Ser-Ser-Gly-Asp-Glu-Thr(分子量959Da)を Suppresscin B と命名した。Suppresscin A の構造は Suppresscin B の構造の一部であることから、両者は共通の生成系から生じたものと考えられる。

Suppresscin B のアミノ酸配列に関して、蛋白配列データベース NBRF-PIR を用いてホモロジー検索を実施した結果、完全一致するものは見い出せなかったが、6残基中連続する5残基が一致する蛋白は多数見いだされた。例えば、ヒトの IL-1ra [Interleukin-1 receptor antagonist] (Carter *et al.* 1990)、酵母の SEC2 蛋白 (Nair *et al.* 1990) および SEC7 蛋白 (Achstetter *et al.* 1988)、エン麦の液泡 H⁺-ATPase のプロテオリピド・サブユニット (Lai *et al.* 1991) などの膜系に作用する蛋白に相同性がみられたことから、Suppresscin B が膜系に作用する可能性が推定された。

褐紋病菌 サプレッサー には、Suppresscin A および B 以外の別の分子種が存在する (Fig. 1-2) ので、実際の感染現場においては複数の サプレッサー 分子が相加あるいは相乗的に作用して、より強い サプレッサー としての活性が具現しているものと推察できる。

第2章 エンドウ褐紋病菌サプレッサーおよびそのペプチド断片 の生理活性 *-in situ assay-*

部分純化したエンドウ褐紋病菌サプレッサーに関しては、以下の様な知見が既に明らかにされている。まず、サプレッサーは、エリシターによって誘導されるエンドウのファイトアレキシン(ピサチン)の蓄積を抑制あるいは遅延させる効果(Oku *et al.* 1977)を有しており、この蓄積抑制は、ピサチンの生合成に関与する鍵酵素であるフェニルアラニンアンモニアリアーゼ(PAL)およびカルコン合成酵素(CHS)の両遺伝子の *de novo* な発現が抑制された結果である(Yamada *et al.* 1989, Yoshioka *et al.* 1990)。また、褐紋病菌サプレッサーは、エンドウに対して本来感染ができない非親和性の菌の感染を可能にすることも示されており(Oku *et al.* 1980)、褐紋病菌の病原性を決定する因子として重要な役割を果たしていることが判明している(Shiraishi *et al.* 1991b)。さらに、サプレッサーは、エンドウの原形質膜のATPase活性を阻害することが *in vitro* (Yoshioka *et al.* 1990) および *in situ* (Shiraishi *et al.* 1991a) の実験で確かめられている。

さらに、Oku *et al.* (1980) は、褐紋病菌由来の粗サプレッサー画分が pronase あるいは proteinase K 処理を施すとサプレッサー活性が消失することより、サプレッサーのペプチド部分がサプレッサー活性にとって重要な役割を担っていることを報告している。第1章で明らかにしたようにエンドウ褐紋病菌サプレッサーが、GalNAc-Ser-Ser-Gly および Gal-GalNAc-Ser-Ser-Gly-Asp-Glu-Thr という構造を有する糖ペプチドであったことは、それらのペプチド部分がサプレッサー活性発現に重要であることを強く示唆している。

本章においては、2種類の精製サプレッサーが従来報告されている部分純化サプレッサーの生理活性を担っていることを検証すると共に、サプレッサーのペプチド部分だけで活性を有しているか否かを明らかにするために、精製した2種類のサプレッサーと、その配列に基づいて化学合成したペプチド断片について、*in situ* で活性を調べた結果について報告する。具体的には、1) エンドウのファイトアレキシン蓄積を抑制する効果、および2) エンドウ褐紋病菌ないし非親和性菌の感染促進の効果、さらに、3) エンドウ組織のATPase活性の阻害効果について調べた。

第1節 実験材料および方法

第1項 供試試料

本章あるいは次章の実験に用いた試料の一覧をTable2-1に示した。前章において精製し、化学構造を決定した2種類のエンドウ褐紋病菌サプレッサー (Supprescin A and B) のアミノ酸配列に基づいて合成した2~6残基の11種類のペプチドを供試試料とした。2種のジペプチドSGおよびGDは、Sigma Chemical Company (St. Louis, MO, U.S.A.)より、GGGはPeptide Institute Inc.(Osaka, Japan)より、それぞれ購入した。その他の8種類のペプチドはFmoc固相合成法(Merrifield 1963)によって合成し、0.05% トリフルオロ酢酸を含む0~60%のアセトニトリル濃度勾配によって、Cosmosil 5C18カラム (4.6mm i.d. x 150mm; Nakarai Chemicals, Kyoto, Japan)を用いたHPLCにて精製した。これらのペプチドのアミノ酸組成は、HITACHI製アミノ酸アナライザー(model L-8500)にて分析し、その結果をTable2-2に示した。

第2項 ピサチンの定量

エンドウのファイトアレキシンであるピサチンの蓄積に対する各種ペプチドの阻害効果の検定は、Fig.2-1に示す手順で実施した。実験では、播種後、20~22℃の暗所恒温室内にて、6~9日間生育させたエンドウ (*Pisum sativum* L. cv. Midoriusui) の上胚軸を用いた。実験に先立って、上胚軸を長さ1.5cmに切断し、さらに軸方向に2分した。褐紋病菌エリシターを終濃度500 μ g/ml(グルコース換算)になるように添加した供試液50 μ lに上述の上胚軸切片を浸漬し、22℃・暗所で18時間静置後に蓄積したピサチンを熱エタノールで抽出し、減圧乾固後、下記の溶媒に溶解し、Matsuda *et al.*(1983)の方法で以下の条件によりHPLCにて定量した。

カラム： Lichrosorb Si100

溶媒： n-Hexan:Tetrahydrofuran:Acetic acid, 88:12:0.5(v/v)

検出： OD 309nm

対照区として、エリシター、エリシターと褐紋病菌サプレッサー粗画分 (100 μ g/ml, BSA換算)および脱イオン水処理組織について同様の実験を行った。

Table 2-1. List of tested compounds

Nomenclature	Chemical structure	Molecular weight(Da)	Source*
Supprescin A	GalNAc - Ser - Ser - Gly	452	1)
Supprescin B	Gal - GalNAc - Ser - Ser - Gly - Asp - Glu - Thr	959	1)
SSG	Ser - Ser - Gly	249.2	2)
SSGDET	Ser - Ser - Gly - Asp - Glu - Thr	594.5	2)
TSGDET	<u>Thr</u> - Ser - Gly - Asp - Glu - Thr	608.5	2)
SSGTED	Ser - Ser - Gly - <u>Thr</u> - Glu - <u>Asp</u>	594.5	2)
SSGD	Ser - Ser - Gly - Asp	364.3	2)
GDET	Gly - Asp - Glu - Thr	420.4	2)
GDE	Gly - Asp - Glu	319.3	2)
DET	Asp - Glu - Thr	363.3	2)
SG	Ser - Gly	162.1	3)
GD	Gly - Asp	190.2	3)
GGG	Gly - Gly - Gly	189.2	4)

- * 1) purified from spore germination fluids of *M. pinodes*.
 2) synthesized by a solid-phase method.
 3) purchased from Sigma Co.Ltd..
 4) purchased from the Peptide Institute Inc..

Table 2-2. Results of amino acid analysis

Peptide	Ser	Gly	Asx	Glx	Thr
SSG	1.87	(1)			
SSGDET	1.85	(1)	1.03	1.00	0.95
TSGDET	0.93	(1)	0.93	0.93	1.87
SSGTED	1.82	(1)	0.94	0.93	0.90
SSGD	1.73	(1)	1.00		0.95
GDET		(1)	1.01	0.98	0.95
GDE		(1)	1.01	0.93	
DET			(1)	0.94	0.73

() : The ratio of amino acid compositions were based on the areas of Gly or Asx as the standard.

Etiolated pea epicotyl [grown at 20-22°C for 6-9 days]

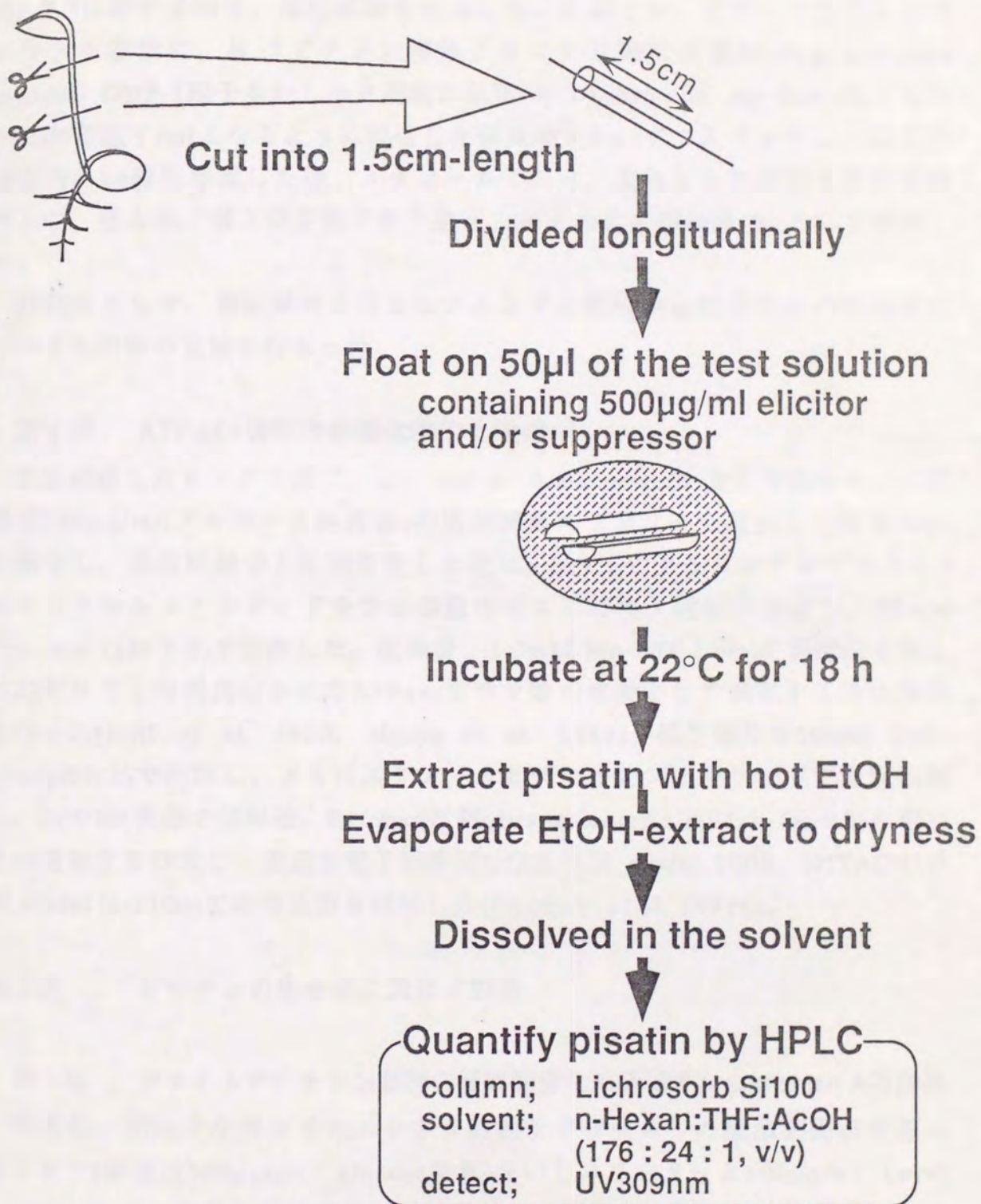


Fig. 2-1. Procedure of quantification of pisatin accumulated in the pea epicotyl.

第3項 接種試験

エンドウ褐紋病菌の感染に及ぼす各種ペプチドの効果を調べるために、Fig.2-2に示す手順で、接種試験を実施した。実験では、明所にて生育させたエンドウ成葉に、各ペプチド水溶液とエンドウ褐紋病菌 *Mycosphaerella pinodes* OMP-1 孢子ないしキク花腐れ病菌 *Mycosphaerella ligulicola* 孢子を約 50-100万孢子/mlとなるように混合した供試液を5 μ lずつスポットし、22℃の湿室内に24時間静置した後、メタノールで固定、脱色した処理葉を顕微鏡観察して、侵入孢子数と発芽孢子数を数え、両者の比を感染率(%)として評価した。

対照区として、供試試料を含まないエンドウ褐紋病菌孢子のみの接種区についても同様の実験を行なった。

第4項 ATPase活性の組織化学的な検出

裏面剥離したエンドウ葉に、Supprescin A, Supprescin Bを単独あるいは終濃度500 μ g/ml(グルコース換算値)の褐紋病菌エリシターを混合した溶液50 μ lを滴下し、湿潤状態で1時間静置した後に、0.2%のグルタルアルデヒドと4%のパラホルムアルデヒドを含む溶液中で0℃にて1時間前固定し、50mM Tris-Mes (pH 7.2)で洗浄した。洗浄後、3.5mM Mg-ATPと4mM 硝酸鉛を与えて22℃にて1時間反応させてATPase活性を鉛の沈着として検出する活性染色を行った(Hall *et al.* 1980, Moore *et al.* 1987)。処理切片を50mM Tris-Mes (pH7.2)で洗浄し、さらにエタノールとプロピレンオキシドで脱水処理し、SPURR樹脂で包埋後、Reichert社製ultra-microtome(model OmU2)を用いて超薄切片を作成し、透過型電子顕微鏡(JOEL社製 model 100B, HITACHI社製 model H-7100)で鉛の沈着を観察した(Shiraishi *et al.* 1991a)。

第2節 ピサチンの生合成に及ぼす効果

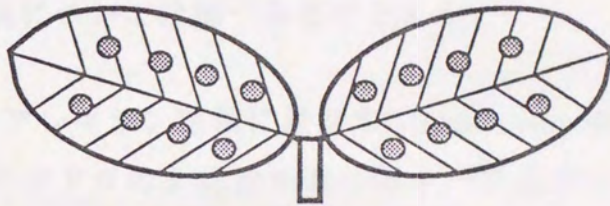
第1項 ファイトアレキシン蓄積の経時的変化に及ぼすSupprescin Aの効果

播種後、明所で生育させたエンドウ品種ミドリウスイの成葉を褐紋病菌エリシター(終濃度500 μ g/ml, glucose換算)ないしエリシターと100 μ g/ml (w/v) Supprescin Aとの混合液で処理し、処理後3時間ごとに固定した処理葉から逐次ピサチンを熱エタノール抽出して、HPLCにて定量した。

Mix *M. pinodes*-spores
with test compound solution



Spot 5 μ l of the mixture on a pea leaf



Incubate at 25°C for 24 h

Fix and discolor the leaf with MeOH



Count germinating spores and infecting spores
under microscope

$$\text{Infection frequency} = \frac{\text{The number of infecting spores}}{\text{The number of germinating spores}} \times 100(\%)$$

Fig. 2-2. Procedure of an infection test.

結果をFig.2-3に示した。ピサチンはエリシター単独処理区においては、処理後9時間で検出されその後時間の経過とともに蓄積量が増高した。しかし、エリシターとともにSupprescin Aを処理した場合、ピサチン蓄積は、エリシター単独処理に比べて3～6時間遅延することが判明した。同様の結果は部分純化されたサプレッサーについても報告されている(Yoshioka *et al.* 1990, Yamada *et al.* 1989)。

エリシターによって顕著なピサチン蓄積が認められ、かつ、サプレッサーによる有意な蓄積抑制が認められた、処理後18時間目の組織におけるピサチン蓄積量を以降の実験については調べることにした。

第2項 ファイトアレキシン蓄積に及ぼすSupprescin処理濃度の効果

暗所で生育させたエンドウの上胚軸を切り取り、終濃度500 μ g/ml(グルコース換算値)の褐紋病菌エリシターに所定の濃度のサプレッサーを添加した処理液に浸漬し、22 $^{\circ}$ C・暗所で18時間静置した後に、蓄積したピサチンを熱エタノールで抽出し、HPLCを用いて定量した。

結果をFig.2-4に示した。実験では、サプレッサーとしてSupprescin A (○)あるいはSupprescin B (●)を単独で処理した実験区とSupprescin Bに一定濃度(220 μ M)のSupprescin Aを混合処理した実験区(△)とを設けた。Fig.2-4は、エリシター単独処理区でのピサチン蓄積量を100(%)、水処理区を0(%)として、各々の実験区のピサチン蓄積量を相対値として標記した。Supprescin A, Bとも濃度に依存して、ピサチン蓄積を抑制した。また、両Supprescinを混合で処理した場合には、相加的な効果が認められたことより、実際の感染現場においては、Supprescin A, Bあるいはさらに別の分子種のサプレッサーが相加的に作用して、より強いサプレッサー活性が現れていることが強く示唆された。

第3項 ファイトアレキシン蓄積に及ぼす合成ペプチドの効果

Fig.2-5に結果を示した。縦軸は、各処理区において観測されたピサチン蓄積量を、水処理区およびエリシター単独処理区の観測値(各々0.8, 21.4 μ g / g fr. wt.)をもとに以下の式に従って算定した相対値として表記した。

$$\text{ピサチン蓄積相対値} = \frac{(\text{試験区の蓄積量}) - (\text{水処理区の蓄積量})}{(\text{エリシター単独処理区の蓄積量}) - (\text{水処理区の蓄積量})} \times 100(\%)$$

また、実験では、各供試サンプルとも5倍・25倍希釈の3濃度について実施し、

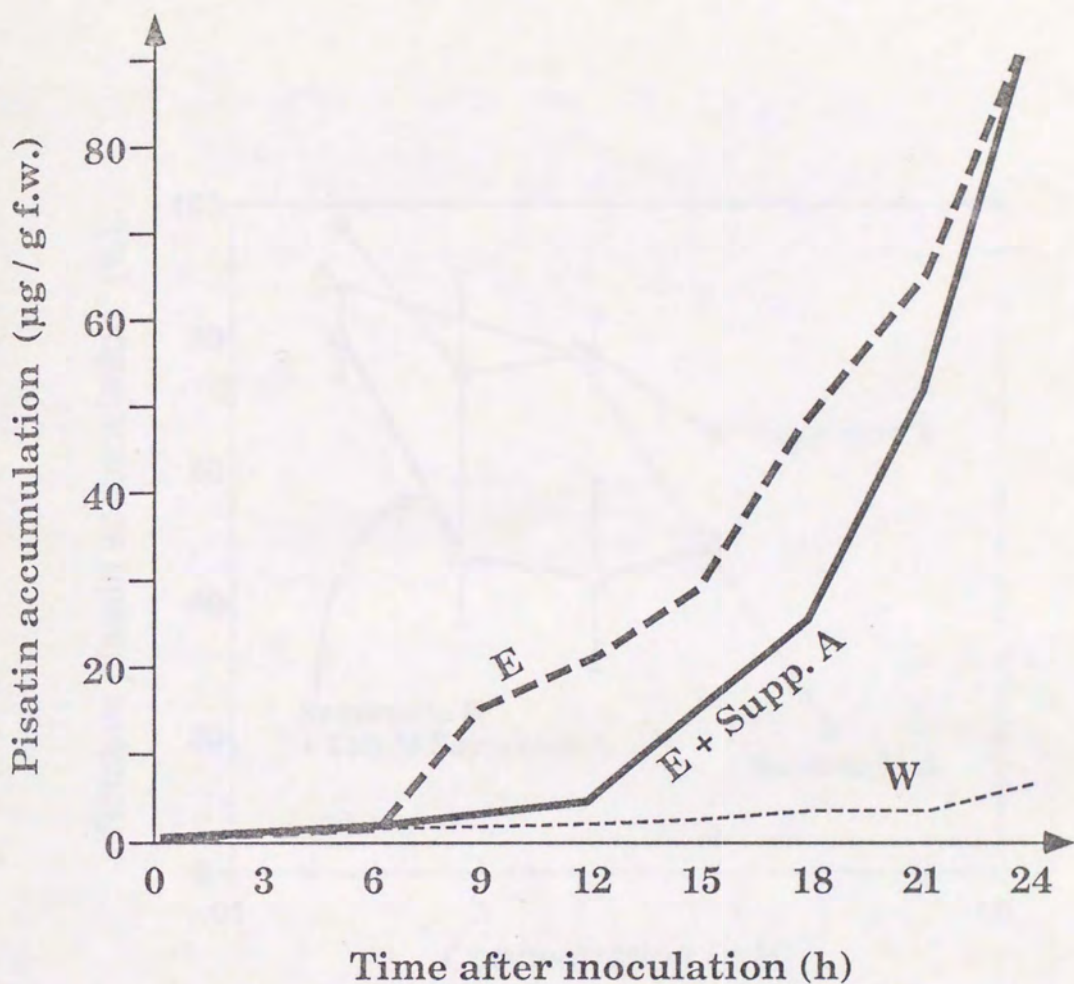


Fig. 2-3. Change in pisatin accumulation in pea leaves after treatment with elicitor and Suppressin A (E+Supp.A), elicitor alone (E) or water (W).

Final concentration of elicitor and Suppressin A were 500 µg/ml (glucose equiv.) and 100 µg/ml (w/v), respectively.

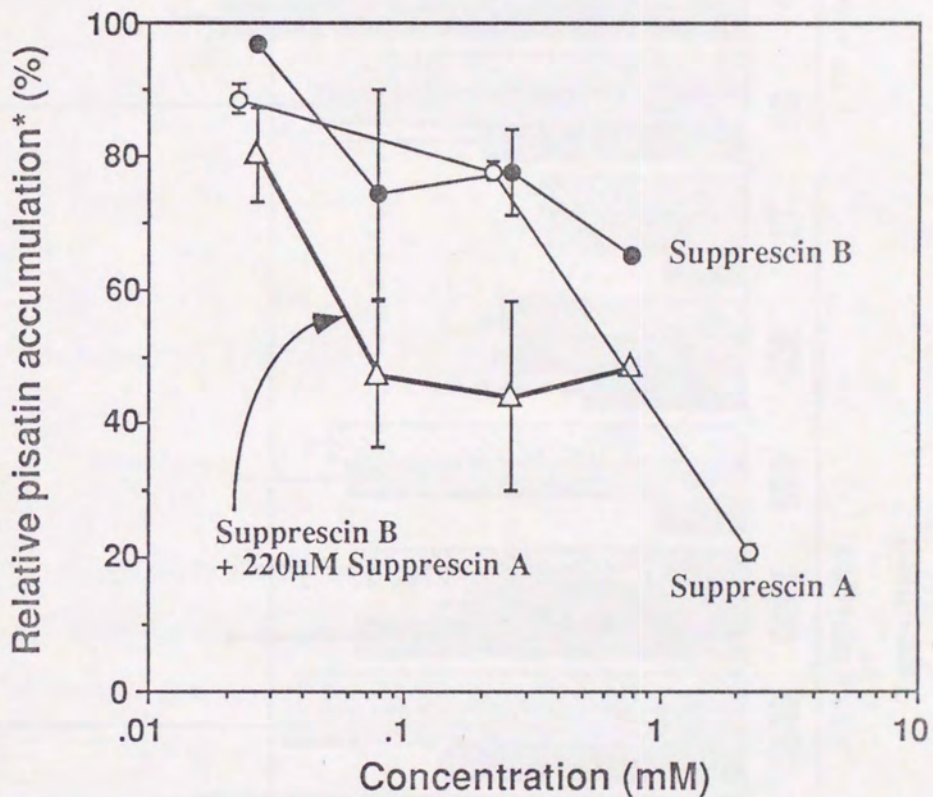


Fig. 2-4. The effect of Suppresscin A and B on pisatin accumulation in pea leaves.

*) Expressed in percentage where the pisatin accumulation by elicitor-treatment (w/o suppressor) is 100 and the accumulation by water-treatment (w/o elicitor nor suppressors) is 0.

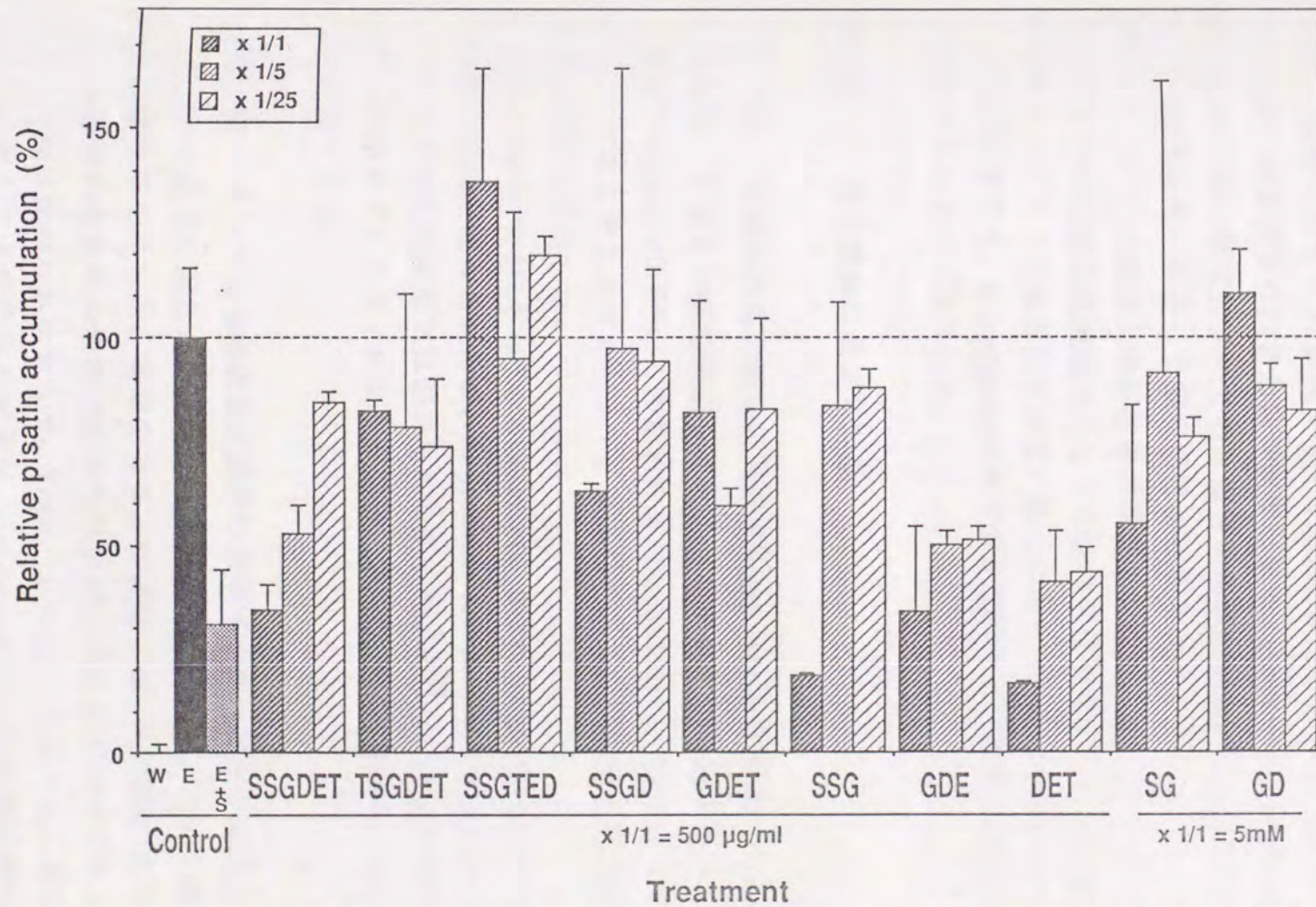


Fig.2-5. The effect of partial or analogous peptides of Suppresscins on pisatin accumulation in pea epicotyls.

W: Treatment with water only and the data[0.8±0.4 µg pisatin / g fr. wt.] was dealt as 0% standard.
 E: Treatment with 500µg/ml(glucose equiv.) fungal elicitor and the data[21.4±3.4 µg pisatin / g fr. wt.] was dealt as 100% standard.
 E+S: Treatment with elicitor plus 100µg/ml(BSA equiv.) crude suppressor.
 peptides: Treatment with elicitor plus represented concentration of peptide.

各処理区について2ないし3回の反復を実施し、得られた実験データの平均値をプロットし、標準誤差をエラーバーとして示した。

図に示したように、糖ペプチドであるSupprescin AおよびBは、そのペプチド部分だけでもファイトアレキシンの蓄積を抑制する活性を有していた。さらに、実験を行なった範囲では、i)GDEおよびDETについては処理濃度20 $\mu\text{g/ml}$ で50%程度の阻害効果が観察された、ii)SSGおよびSSGDについては500 $\mu\text{g/ml}$ の高い濃度についてのみ阻害効果が観察された、iii)SSGDETについてのみ処理濃度に依存した阻害活性が観察された、そして、iv)それ以外のペプチドについては顕著な阻害効果が観察されなかった。"Asp-Glu"配列を有するペプチドは比較的濃度であっても阻害活性を示し、一方、"Ser-Ser-Gly"を有するペプチドは処理濃度が高い場合においては阻害活性を示した。

以上の結果より、Supprescinのペプチド配列中には作用の異なる複数の部位の存在することが示唆された。

第3節 菌の感染に及ぼす効果

第1項 非親和性菌の感染に及ぼすSupprescinの効果

発芽後、2週間明所で生育させたエンドウの成葉を切り取り、葉表面に所定濃度のSupprescinを5 μl と非親和性菌*Mycosphaerella ligulicola* OML株胞子液5 μl との混合液をスポットして、室温状態で4日間静置した後に形成される病斑の状態を観察した。

結果をTable 2-3に示した。Supprescin Bでは100 $\mu\text{g/ml}$ 以上の処理区において病斑の形成が認められたが、Supprescin Aでは実験を行ったいずれの濃度においても顕著な病斑形成は認められなかった。Oku et al.(1980)が報告している褐紋病菌サプレッサーによる非親和性菌の感染誘導効果は、Supprescin Bのみで再現できた。

第2項 エンドウ褐紋病菌の感染に及ぼす合成ペプチドの効果

Fig.2-6に結果を示した。エンドウ褐紋病菌*M. pinodes* OMP-1株は、約60%程度の感染率を示した。実験を行なった範囲では、SSGDETについてのみ10~20%程度の感染率の増加が認められたが、それ以外のペプチドについては顕著な影響は認められなかった。Table 2-3に示したように、精製したサプレッサーに関してキク花腐れ病菌*M. ligulicola*を用いた接種試験の結果では、

Table 2-3. Colony formation of *Mycosphaerella ligulicola* on pea leaves in the presence of Suppressins

Suppressin A		Suppressin B	
Concentration ($\mu\text{g/ml}$)	Lesion formation	Concentration ($\mu\text{g/ml}$)	Lesion formation
0	ND	0	ND
125	ND	1	ND
250	ND	10	ND
500	ND	100	+
1000	ND	1000	++

The leaves were subjected to visual observation for disease symptom 4 days after inoculation. ND: Not detected.

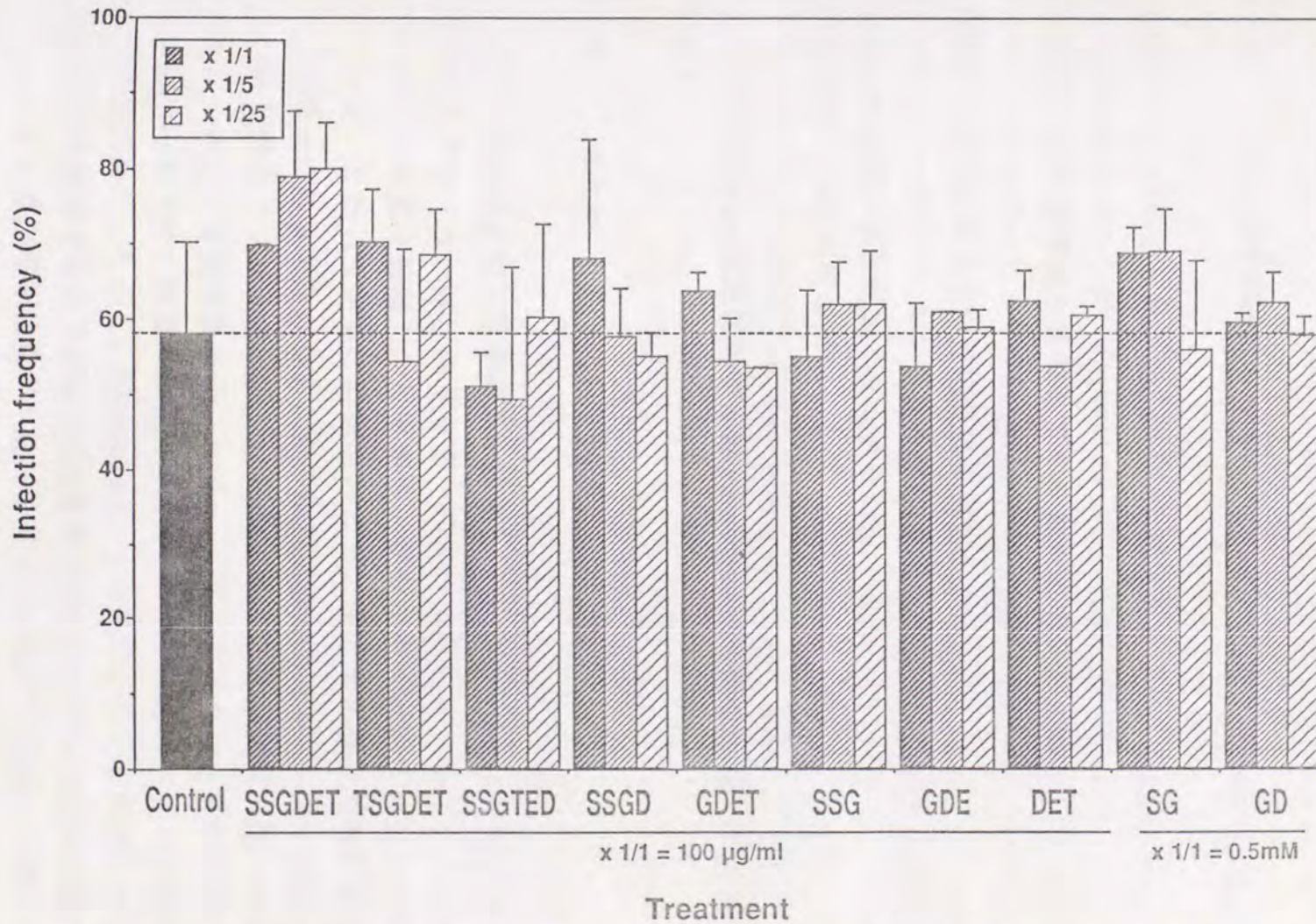


Fig. 2-6. The effect of partial or analogous peptides of Suppresscins on the infection by *M. pinodes* in pea leaves.

Control: Inoculation with *M. pinodes* spores suspension alone.

Supprescin Bについてのみ感染促進効果が認められており、本効果はそのペプチド部分であるSSGDETが担っていることが強く示唆された。さらに、SSGDETの6残基は置換や断片化すると感染促進効果が見られなくなることから、本活性には6残基が必須であるものと考えられる。

第4節 エンドウ組織におけるATPase活性に及ぼすSupprescinの効果

結果をFig.2-7に示した。Supprescin単独処理区では、Supprescin Bには沈着は認められなかったが、Supprescin Aには沈着が認められた。エリシター単独処理区では水処理区と比較してやや強い鉛の沈着が認められた。興味深いことに、エリシターとともにSupprescin Aを処理した区においてはSupprescin A単独処理区とは異なり鉛の沈着は検出できなかった。すなわち、Supprescin Aはエリシター共存下においてはATPase活性を阻害するものと思われる。

奥田(1992)は、褐紋病菌エリシターが*in vitro*においてはエンドウ原形質膜ATPase活性を10%程度増高させるが、Supprescin Aを同時に処理した場合にはエリシターによる活性増高が認められなかったと報告しており、上述の*in situ*におけるATPase活性に対するSupprescin Aの効果を反映しているものと思われる。

第5節 まとめ

エンドウ褐紋病菌胞子発芽液より精製し、その化学構造を決定した(第1章)2種類のサプレッサーは、エリシターによって誘導されるエンドウのファイトアレキシン蓄積を抑制したことから、ともにサプレッサーとしての活性を有していた。しかしながら、興味深いことに両者は共通の構造を有する糖ペプチドであったにもかかわらず、その生理活性は異なっていた。Supprescin Bでは、部分純化サプレッサー画分に認められる3種の生理活性、すなわちファイトアレキシン蓄積阻害効果、ATPase活性阻害効果、感染促進効果のいずれもが認められたが、他方のSupprescin Aにはファイトアレキシン蓄積阻害効果のみが認められた。しかし、Supprescin Aはエリシターが共存した場合にはATPase活性を阻害することが*in vitro*(奥田 1992)および*in situ*の実験で観察され、エリシターの作用を相殺する効果を有していることが強く示唆された。

Supprescin Bおよびそのペプチド部分であるSSGDETには、ファイトアレキ

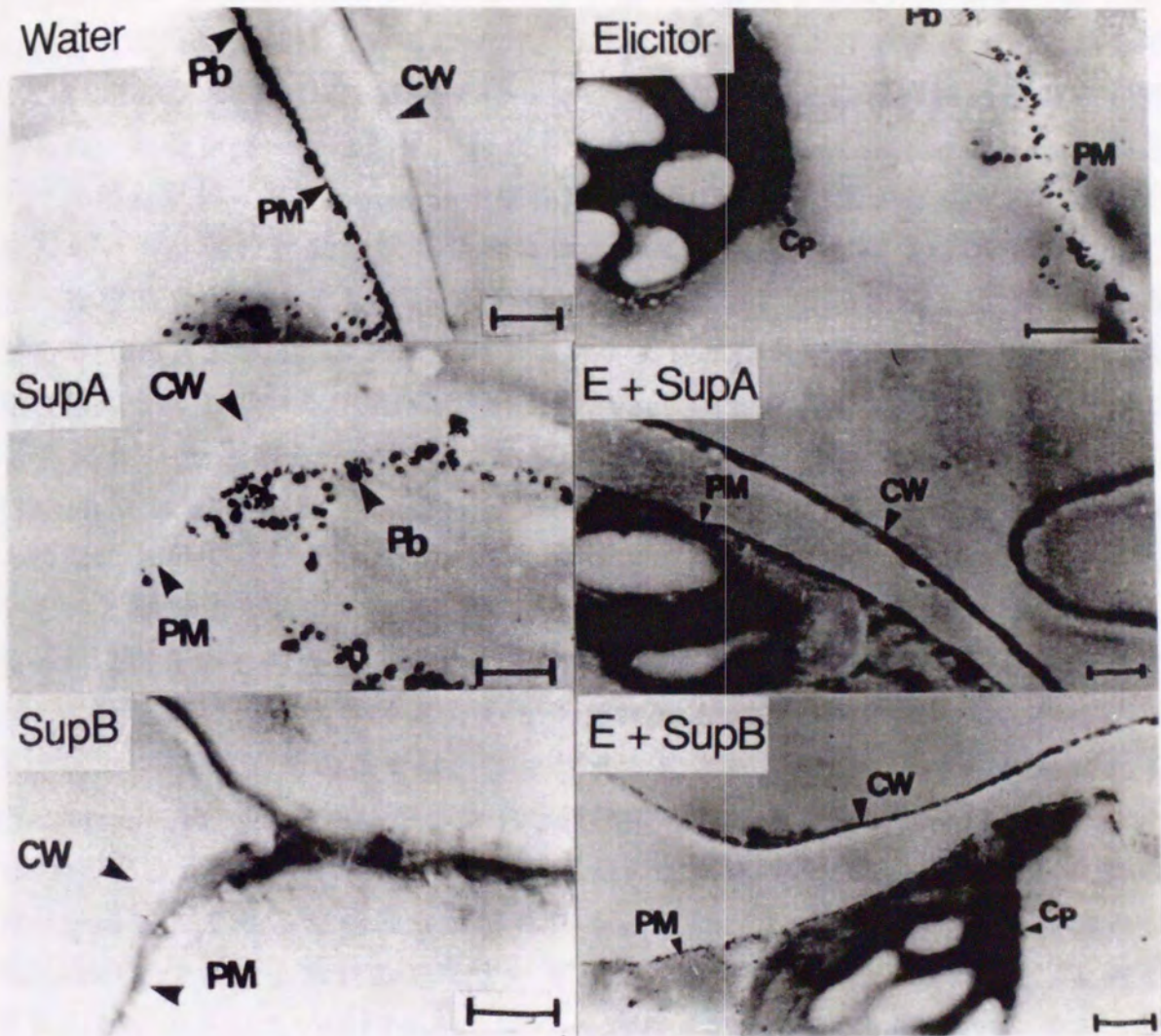


Fig. 2-7. Effects of elicitor and/or Suppresscins from *Mycosphaerella pinodes* on ATPase activities in plasma membrane of pea mesophyll cells.

The letters of CW, PM, and Pb indicate cell wall, plasma membrane and the lead deposit, respectively. The length of the bar represents 1 μm.

シン蓄積抑制活性および感染促進活性が認められたことは、Supprescin Bのペプチド部分がサプレッサーの活性を担っていることを示している。本結果は、pronaseなどの処理によってサプレッサー活性が消失するというOku *et al.* (1980)の報告を裏付けている。一方、Suppresein Aおよびそのペプチド部分であるSSG、さらにGDEやDETではファイトアレキシン蓄積抑制活性のみが認められ、顕著な感染促進効果が認められなかったことは、両Supprescinに共通した作用点以外にもSupprescin Bが作用する独自の作用点が存在することを示唆している。菌の感染の阻害要因には、パピラ形成など宿主細胞壁の変化などの物理的な障壁、そして、ファイトアレキシンに代表される化学的な障壁がある(Oku 1991)。エンドウのファイトアレキシンであるピサチンは、感染阻害効果を有している(Shiraishi *et al.* 1978a, Oku *et al.* 1986)が、その蓄積は、エリシター処理後6~9時間、菌接種では12~15時間以降に顕在化する(Shiraishi *et al.* 1978a, Yamada *et al.* 1989, Nasu *et al.* 1992)ため、菌の感染の初期においては、感染阻害を起こすほどの顕著なピサチン蓄積は起こらないものと推定できる。したがって、ファイトアレキシンは、感染後期の侵入菌糸の成育ないし伸展を抑制する(久能 1990)が、感染初期の菌の侵入行動に対しては他の要因が関与するものと予想される。この点について、少なくともエンドウ-褐紋病菌の系では、エリシターによって誘起される感染阻害因子(Yamamoto *et al.* 1986)やエンドウ組織中の内性サプレッサー(Nasu *et al.* 1992)の存在が明らかにされており、感染の初期過程においてこれら宿主側の因子が関与している可能性も示唆される。また、サプレッサーは、植物の抵抗反応の1つと考えられるキチナーゼや β -1,3-グルカナーゼの活性化を抑制することが示されている(Yoshiokia *et al.* 1992b)。Supprescin BおよびSSGDETで感染促進効果が認められたことは、それらがファイトアレキシン蓄積抑制以外にも、感染阻害因子・内生サプレッサー・キチナーゼ・ β -1,3-グルカナーゼなどの一連の抵抗反応(あるいは抵抗性の全て)を打破していることを示唆している。

第3章 エンドウ褐紋病菌サプレッサーおよびそのペプチド断片 の生理活性 -in vitro assay-

構造を決定した(第1章)2種類のサプレッサーは、共に、褐紋病菌エリシターによって誘導されるエンドウのファイトアレキシン蓄積を抑制した。しかしながら、Supprescin Bは単独でエンドウ原形質膜ATPase活性を阻害するが、Supprescin A単独では阻害しないことが*in situ*の実験で示された。2種類のサプレッサーは、各々GalNAc-Ser-Ser-Gly, Gal-GalNAc-Ser-Ser-Gly-Asp-Glu-Thrという構造を有する糖ペプチドであり、Supprescin BはSupprescin Aの構造にGalとAsp-Glu-Thrとを付加した構造であり、両者の構造の差がATPase活性に対する阻害効果の違いを示していることが容易に推定された。

そこで、本章では、原形質膜ATPase活性の阻害効果を担うSupprescinの構造および阻害機構を明らかにするために、精製した2種類のサプレッサーに加え、化学合成したサプレッサーのペプチド部分およびその断片などについて、エンドウ原形質膜ATPase活性に対する効果を*in vitro*で調べた。さらに、酸性ホスファターゼ活性や動物由来プロテインキナーゼC活性に対する影響についても調べることにした。

第1節 実験材料および方法

第1項 供試試料

本章で用いた試料の一覧は前章のTable2-1に示した。精製した2種類のエンドウ褐紋病菌サプレッサー (Supprescin A and B) と11種類の合成ペプチドについて実験を行った。

なお、Supprescinsを構成する2種の糖および5種類のアミノ酸は、それぞれ単独あるいは混合した場合においても原形質膜ATPase活性に対して顕著な影響は認められなかった。

第2項 エンドウ原形質膜画分の調製

エンドウの上胚軸より、水性二相分配法にて、"right-side out"の原形質膜画分を調製した (吉田 & 上村 1987, Yoshida *et al.* 1986)。以下に実験操作の

Etiolated pea epicotyls

— *An aqueous two-polymer phase partitioning*

Plasma membrane fraction

— *Sonicated in the presence of 0.5% Triton X-100*

In vitro ATPase assay

0.5 μ g/25 μ l Pea PM fraction*
80mM Tris-Mes(pH6.5)
0.2-3mM Mg-ATP
± *suppressor or peptide*
↻ 25°C, 15min

<molybdenum blue>

- chill on ice water
- add 50 μ l of molybdenum reagent§
- incubate at 25°C for 30min
- measure OD₈₂₀

Fig.3-1. Assay of ATPase activity.

* Insensitive to N_3^- , NO_3^- , but sensitive to VO_4^{3-} .

§ 0.42% Ammonium molybdeum/1N H_2SO_4 .

詳細を述べる。

(1) バッファー類の調製

Buffer A 0.25M sucrose
75mM MOPS/KOH (pH7.6)
5mM EGTA[Ethylenglycol bis(2-amino ethyl ether) tetraacetic acid]
5mM EDTA[Ethylenediaminetetraacetic acid]
10mM KF[Potassium fluoride]
2mM PMSF[Phenylmethanesulfonyl fluoride]
4mM SHAM[Salicylhydrooxamix acid]
1.5%(w/v) PVP[Polyvinylpyrrolidone(MW=24,000)]
10µg/ml BHT[Butylated hydroxytoluene]
0.5%(w/v) BSA[Bovine searum albumin; Fr. V(fatty acid free)]
2.5mM K₂S₂O₅[Potassium metabisulfite]

Buffer B 10mM Potassium phosphate buffer(pH7.8)
0.25M sucrose

Buffer C 0.25M sucrose
75mM MOPS/KOH (pH7.6)
1mM EDTA[Ethylenediaminetetraacetic acid]
10mM KCl[Potassium chloride]
0.2mM PMSF[Phenylmethanesulfonyl fluoride]
10µg/ml BHT[Butylated hydroxytoluene]
1mM DTT[Dithiothreitol]

Buffer D 1 43%(w/w) sucrose in buffer C

Buffer D 2 32%(w/w) sucrose in buffer C

Buffer E 0.25mM sucrose
5mM MOPS/KOH(pH7.6)

水性二相分配buffer 2.8g PEG[Polyethylene glycol; Av.Wol.Wt.3,350; Sigma P-3640]
2.8g Dextran T500[Pharmacia]
14.6ml 100mM NaCl in buffer C
18.7ml buffer C

(2) エンドウ上胚軸の準備

エンドウ品種ミドリウスイ(*Pisum sativum* L. cv. Midoriusui)種子を、室温にて1晩、水道流水中に浸し膨潤させた後、バーミキュライトへ播種した。播種後、暗所・20~22℃の恒温室で6~10日間生育させた芽生えの上胚軸を刈り取り、秤量後、試料とした。

以降の作業はすべて4℃の低温室内にて実施した。

(3) 粗ミクロソーム画分の調製

- 試料を重量比1のbuffer Aに浸漬し、4℃で1時間静置した。
- 乳鉢にて試料を入念に磨砕した。
- 磨砕した試料をガーゼで濾し、ろ液を遠沈管に移した。
- 遠心分離[8000-12000xg, 15min, 4℃]した。
- 遠心上清をさらに超遠心[156000xg, 20min, 4℃]に掛けた。
- 沈澱(粗ミクロソーム画分)を回収した。

(4) 水性二相分配法による原形質膜粗画分の調製

- 粗ミクロソーム画分をbuffer Bに再懸濁し、テフロンホモジナイザーで分散させた。
- 電子レンジにて加熱・脱気したのちに冷却した5倍量の水性二相分配bufferへ粗ミクロソーム画分懸濁液を添加し、30回程度、転倒混和した。
- 遠心分離[500-1000×g, 4min, 0℃]した。
- 上層部を回収し、等量のbuffer Cにて希釈して、水性二相分配を繰り返した。
- 上層部を回収し、さらに超遠心[156000×g, 20min, 4℃]に掛けた。
- 沈澱(原形質膜粗画分)を回収した。

(5) ショ糖密度勾配遠心分離法による原形質膜画分の調製

- 原形質膜粗画分をbuffer Cに再懸濁し、テフロンホモジナイザーで分散させた。
- 下層部にbuffer D 1、上層部にbuffer D 2を重層した遠心管へ、原形質膜粗画分懸濁液を穏やかに重層した。
- 超遠心分離[156000×g, 1.5h, 0℃]を行なった。

- buffer D 1、D 2 の界面付近に集積した膜画分をシリンジで回収した。
- 回収液をbuffer Eで希釈し、超遠心分離[156000×g, 20min, 0℃]を行なった。
- 上清を捨て、沈澱を適当量のbuffer Eに懸濁し、テフロンホモジナイザーで分散させた。
- 試料の蛋白濃度をウシ血清アルブミン(BSA)を標準試料としてLowry法(Lowry *et al.* 1951)で求めた。
- 適当量ごとに分注し、使用時まで、-80℃にて保存した。

第3項 ATPase活性の測定

エンドウの上胚軸より調製した原形質膜画分を用い、Perlin & Spanswick (1981)の方法に従って、原形質膜ATPase活性を調べた。本ATPase活性は、オルトバナジン酸感受性かつ硝酸イオンおよびアザイド非感受性のP-type ATPase活性であることを確認している。操作手順をFig.3-1に示す。

原形質膜画分は、実験に先立って、界面活性剤 Triton X-100(0.5%)存在下で、氷上にて超音波処理(HITACHI社製 INSONATOR model 200M; 40W; 5min)を施した。これを100mM Tris-Mes(pH6.5)にて150倍に希釈したものを酵素液とした。この処理によりATPase活性は約2倍程度に増高した。

5倍濃度の供試試料(サプレッサーないしはペプチド)水溶液あるいは蒸留水5μlへ、2.5mM ATPおよび2.5mM MgSO₄を含む100mM Tris-Mes(pH6.5)溶液10μl、さらに、0.5μg蛋白(BSA equiv.)/10μl 100mM Tris-Mes(pH6.5)酵素液10μlを添加したものを反応液とした。反応液は、氷上に静置した96穴マイクロタイタープレートに準備し、混和後、速やかに25℃の水浴へ移し、15分間反応させた。反応後、氷冷したモリブデン試薬[0.42% モリブデン酸アンモニウム - 1N 硫酸溶液]を2倍量添加することにより酵素反応を停止させ、さらに、酵素反応によって生じた無機リン酸とモリブデンの反応を25℃にて30分間行なって、820nmの吸光を計測し、反応液中の無機リン酸濃度を定量した。反応前後の無機リン酸量の差から無機リン酸生成量を算出してATPase活性とした。1処理区あたり3反復を実施した。

第4項 ATPase活性のカイネティクス解析

ATPase活性の阻害様式を解析するために、基質濃度を変えて実験した。すなわち、前項の反応液のATPおよびMgSO₄の終濃度を3mM~0.19mMの範囲の

5濃度について、1処理区あたり2ないし3反復を実施した。

カイネティクス解析のデータ処理手順をFig.3-2に示し、以下にその詳細を述べる。

(1) ATPase活性の測定

供試試料1種あたり、試料3～4濃度×基質5濃度×2～3反復を実験して、各々の処理区の比活性(単位： $\mu\text{mol Pi/h/mg protein}$, BSA equiv.)を算出した(例、Fig.3-3(a))。

(2) 両逆数プロットによる阻害様式の推定

横軸に基質濃度の逆数を、縦軸に比活性の逆数をプロットし、供試試料の濃度ごとに最小自乗法にて近似直線を引いた(例、Fig.3-3(b))。このとき、各直線のX切片およびY切片の位置関係から阻害様式を推定することができる。すなわち、Y切片で交点を結ぶと「拮抗阻害; Competitive」、X切片で交点を結ぶと「非拮抗阻害; Noncompetitive」、平行線を描くと「反(不)拮抗阻害; Uncompetitive」と推定できる(参考書:大西1987)。

(3) Michaelis定数(K_m)および最大比活性(V_{max})の算出

カイネティクスの解析は、以下に示すMichaelis-Mentenの式を基本として実施した。

$$v = \frac{V_{max}^{app} [S]}{K_m^{app} + [S]}$$

v : 比活性, $[S]$: 基質濃度
 K_m^{app} : 見かけ上のミハエレス定数,
 V_{max}^{app} : 見かけ上の最大比活性,

Taylor展開を併用した最小自乗法(Sakoda & Hiromi 1976)により、供試試料の濃度ごとに見かけ上の K_m および V_{max} を算出した(解析プログラム; Fig.3-4)。

(4) 阻害定数の算出

供試試料非添加実験区すなわち水処理区について計算された K_m および V_{max} を使って、以下の式に基づいて拮抗阻害定数 K_i および反拮抗阻害定数 K_i' を算出した。

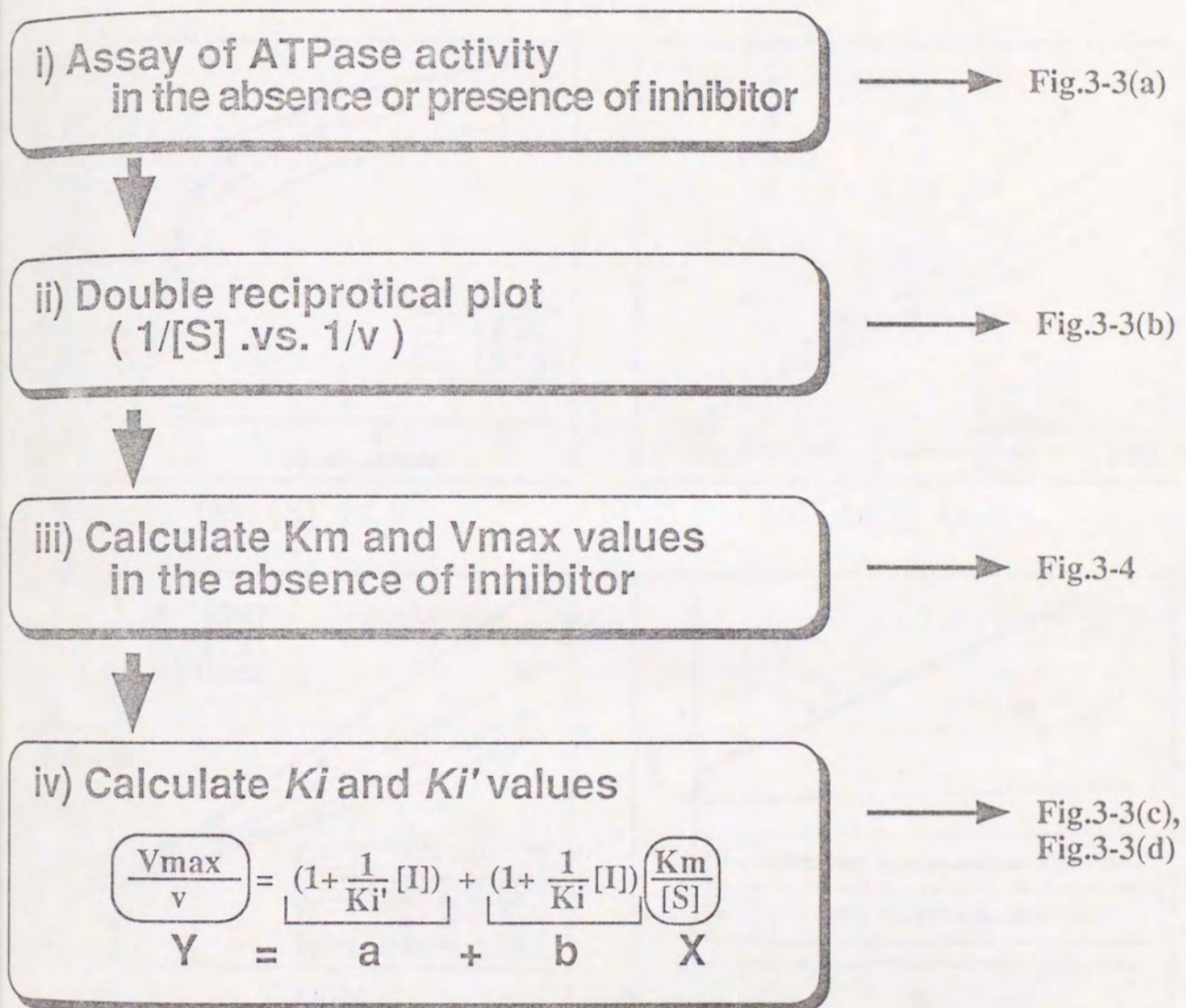
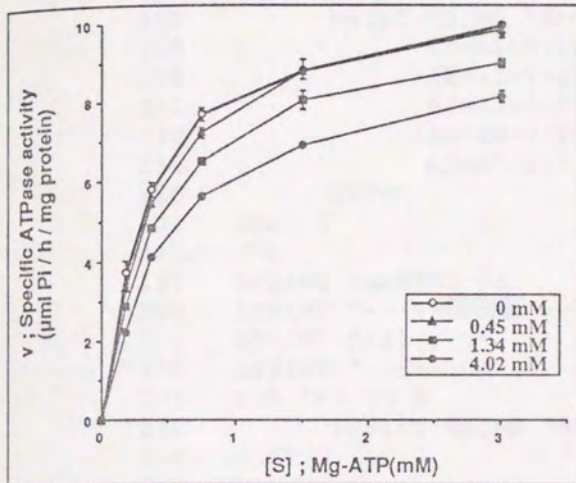
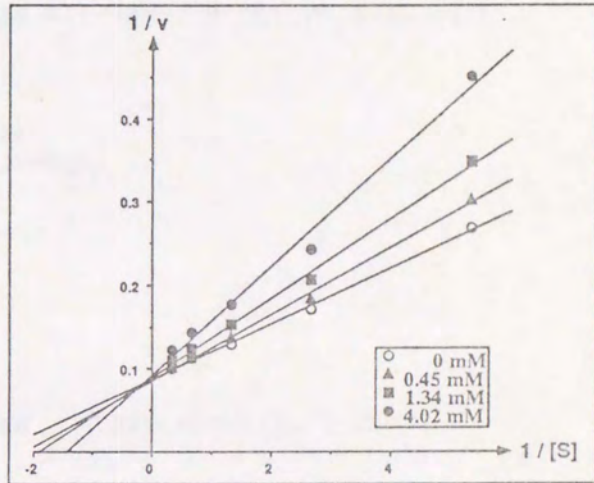


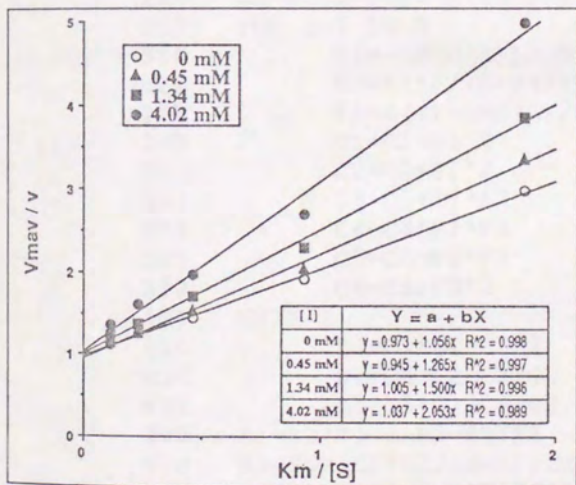
Fig.3-2. Scheme of kinetic analysis.



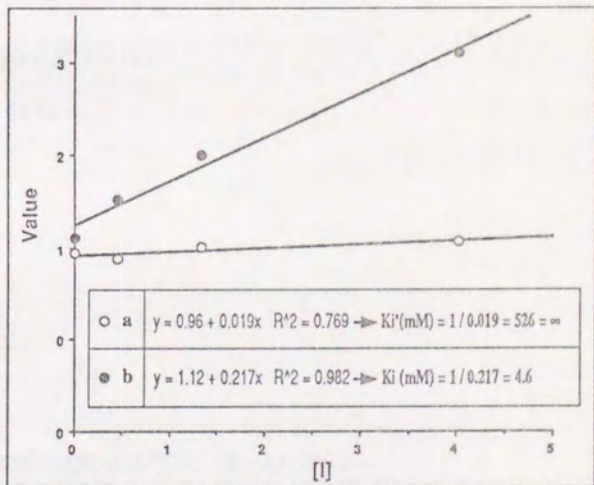
(a) [S] .vs. v



(b) 1/[S] .vs. 1/v



(c) Km/[S] .vs. V_{max}/v



(d) [I] .vs. a, b values

Fig. 3-3. Examples of kinetic analysis.

```

10 CLS
20 PRINT "*** Km & Vmax の計算 ***"
30 DIM W$(50):PRINT
40 INPUT "タイトル?",W$
50 INPUT "データ数?",N
60 DIM S(N),V(N)
70 A1=0:A2=0:A3=0:A4=0:A5=0
80 PRINT "基質濃度[S], 比活性vの入力": PRINT
90 FOR I=1 TO N
100 PRINT USING "data-### ";I:INPUT " [S],v",S(I),V(I)
110 A1=A1+S(I)
120 A2=A2+V(I)
130 A3=A3+S(I)^2
140 A4=A4+S(I)*V(I)
150 A5=A5+S(I)*S(I)*V(I)
160 PRINT
170 NEXT I
180 J=0
190 LPRINT :LPRINT W$
200 LPRINT "-----観測値-----"
210 LPRINT "[S]", "v"
220 LPRINT "-----"
230 FOR I=1 TO N
240 LPRINT USING "##.#### ###.##";S(I),V(I)
250 NEXT I
260 LPRINT "-----"
270 K=(A1*A5-A3*A4)/(A3*A2-A1*A4)
280 M=(A5*A2-A4^2)/(A3*A2-A1*A4)
290 C1=0:C2=0:C3=0:C4=0:C5=0:C6=0
300 FOR I=1 TO N
310 F1=-(M*S(I))/(K+S(I))/(K+S(I))
320 F2=S(I)/(K+S(I))
330 F3=V(I)-M*S(I)/(K+S(I))
340 C1=C1+F1^2
350 C2=C2+F2^2
360 C3=C3+F1*F2
370 C4=C4+F1*F3
380 C5=C5+F2*F3
390 C6=C6+F3^2
400 NEXT I
410 Z1=C1*C2-C3^2
420 Z2=C4*C2-C5*C3
430 Z3=C5*C1-C4*C3
440 B1=Z2/Z1 : B2=Z3/Z1
450 D1=SQR(C6*C2/(N-1)/Z1) : D2=SQR(C6*C1/(N-1)/Z1)
460 IF ABS(B1/K)<.000001 AND ABS(B1/M)<.000001 THEN GOTO 520
470 K=K+B1 : M=M+B2
480 J=J+1
490 IF J>50 THEN GOTO 510
500 GOTO 290
510 LPRINT "IMPOSSIBLE"
520 LPRINT
530 LPRINT USING "計算回数 = ### *****";J+1
540 LPRINT USING " Km = ##.### ± ##.###";K,D1
550 LPRINT USING " Vmax = ##.### ± ##.###";M,D2
560 LPRINT "*****"
570 END

```

Fig.3-4. N88BASIC program of kinetic analysis to calculate the apparent values of K_m and V_{max} .

$$\frac{V_{max}}{v} = \left(1 + \frac{1}{K_i'} [I]\right) + \left(1 + \frac{1}{K_i} [I]\right) \frac{K_m}{[S]}$$

v: 比活性,

K_i: 拮抗阻害定数, K_i': 反拮抗阻害定数,
[I]: 阻害物質濃度, [S]: 基質濃度

K_m/[S]および各処理区のV_{max}/vを求めてプロットし、供試試料の濃度ごとに最小自乗法で近似直線を求め (Fig.3-3(c))、さらに、供試試料濃度[I]に対してFig.3-3(c)における近似式のY切片(a)および傾き(b)をプロットする (Fig.3-3(d))。この時、[I]:bプロットの直線の傾きの逆数および[I]:aプロットの傾きの逆数が、各々K_i、K_i'を与える。

第5項 酸性ホスファターゼ活性の測定

ATPase活性の測定の反応条件に準じて酸性条件下で実験した (Fig.3-5)。但し、エンドウ原形質膜画分は1反応あたり1μg(BSA equiv.)とし、基質は5mM pNPP [*p*-nitrophenyl phosphate] (Bethesda Res. Lab.より購入) とした。25℃にて15分間反応させた後、等容量の1N KOHを添加して反応を停止させ、直ちに、405nmの吸光を計測し、pNP [*p*-nitrophenol]濃度の定量し、ホスファターゼ活性を求めた。

また、同様の実験をジャガイモ由来酸性ホスファターゼ (Boehringer Mannheimより購入) についても実施した。

第6項 プロテインキナーゼ活性の測定

ラット脳由来リン脂質依存性プロテインキナーゼ (Boehringer Mannheimより購入) を酵素液として、Kitano *et al.* (1986)の方法を改変して実施した。Fig.3-6に操作手順を示し、以下にその詳細を述べる。

ATP以外の化合物を混合し、ATP添加に先立って30℃にて5分間保温した。その後、ATP溶液を添加し、30℃にて10分間反応させ、等容量のATP-BSA混液と2倍量の40% TCA [Trichloroacetic Acid]を添加して、反応を停止した。氷温にて10分間静置し、遠心分離を行って、蛋白を沈澱させた。上清を捨て、得られた蛋白沈澱を20% TCAで軽く洗浄した。再び遠心分離を行い、上清を捨て、沈澱部の放射活性を液体シンチレーションカウンターにて計測した。酵素非添加実験区の放射活性をバックグラウンドとして補正し、供試試料非添加実験区すなわち水処理区の放射活性の補正值を100%として、各実験区の

Etiolated pea epicotyls

— *An aqueous two-polymer phase partitioning*

Plasma membrane fraction

— *Sonicated in the presence of 0.5% Triton X-100*

In vitro Phosphatase assay — (25 μ l/reaction)

1 μ g (BSA equiv)	Pea PM fraction*
80mM	Tris-Mes (pH 6.5)
3mM	MgSO ₄
5mM	<i>p</i> -nitrophenyl phosphate
\pm	<i>suppressor or peptide</i>

\curvearrowright 25°C, 15min

- chill on ice water
- add 25 μ l of 1N KOH
- measure OD₄₀₅

Fig.3-5. Assay of phosphatase activity.

*) Acid phosphatase from potato (0.1 μ g dry wt. Boehringer #108219) was used for the positive control.

50µg/ml	phosphatidyl serine	(40µl / reaction)
40µM	OAG	
0.5mM	CaCl ₂	
10mM	MgCl ₂	
10µg	Histone III-S	[Sigma #H-5505]
2.5µU	Protein kinase C	[from rat brain; Boehringer #1459-651]
25mM	Tris-HCl(pH7.5)	
±	inhibitor	

↓ pre-incubation at 30°C for 5min

9.5µM	cold ATP	(+10µl / reaction)
5µCi(20nM)	[γ- ³² P]ATP	(5000Ci/mmol)

- incubation at 30°C for 10min
- add 50µl of ATP-BSA mix
2mM cold ATP / 2,000ppm BSA(fr.V) / 25mM Tris-HCl(pH7.5)
- add 100µl of 40% TCA
- on ice for 10min
- centrifuge for 10min
- discard the supernatant
- rinse the pellet with 20% TCA
- centrifuge for 10min
- discard the supernatant

↓ measure the radioactivity

Fig. 3-6. Assay of protein kinase C activity.

Total volume of the reaction mixture was 50µl.
 Inhibitor: 340, 68, 13.6 µg/ml(w/v) of Suppresscin B.
 500, 100, 20 µg/ml(w/v) of Suppresscin A or peptide.
 5, 1, 0.2mM of GGG peptide.

プロテインキナーゼ活性を評価した。

第2節 ATPase活性に及ぼす効果

第1項 ATPase活性の阻害効果

反応液に添加した試料濃度とその時のATPase活性との関係をFig.3-7に示した。横軸に反応液に添加した試料の濃度を対数表示し、その時に計測されたATPase活性を縦軸にプロットした。ATPase活性は、水処理区、すなわちサブレッサーやペプチド試料を添加していない対照区で観察された活性に対する相対値として表示した。

実験を行った範囲では、Supprescin Bによる阻害効果が最も顕著であり、0.5mMでおよそ50%の活性阻害が観察されたが、Supprescin Aは2mMの高濃度で処理した場合においてもATPase活性に影響しなかった。一方、合成ペプチドによる阻害効果は、Supprescin Bほどは顕著でなかったが、実験を行なった範囲では、Supprescin Bのペプチド部分であるSSGDETによる阻害効果が最も高かった。

なお、3種のペプチドSG, GD, GGG、およびSupprescin Bを構成する5種のアミノ酸を単独ないし混合で処理した場合、ATPase活性に対する影響は認められなかった。このことより、他のペプチドで観察されたATPase活性阻害は、アミノ酸配列に依存した効果であるものと考えられる。

第2項 ATPase活性に対するSupprescin Aの効果

Supprescin Aは、実験を行った濃度範囲では、2mMの高濃度で処理した場合でもATPase活性の阻害効果が認められなかった(Fig.3-7)。しかし、興味深いことにSupprescin Bと混合処理すると、Supprescin BによるATPase阻害効果を低減することが判明した(Fig.3-8)。このことは、Supprescin AがATPase分子内のSupprescin Bの作用(結合)部位に対して競合することを示唆している。

第3項 ATPase活性阻害様式の解析

ATPase活性阻害が認められたSupprescin Bおよび8種の合成ペプチドに関して、その阻害様式の差異を明らかにするために、カイネティクス解析を実施した。

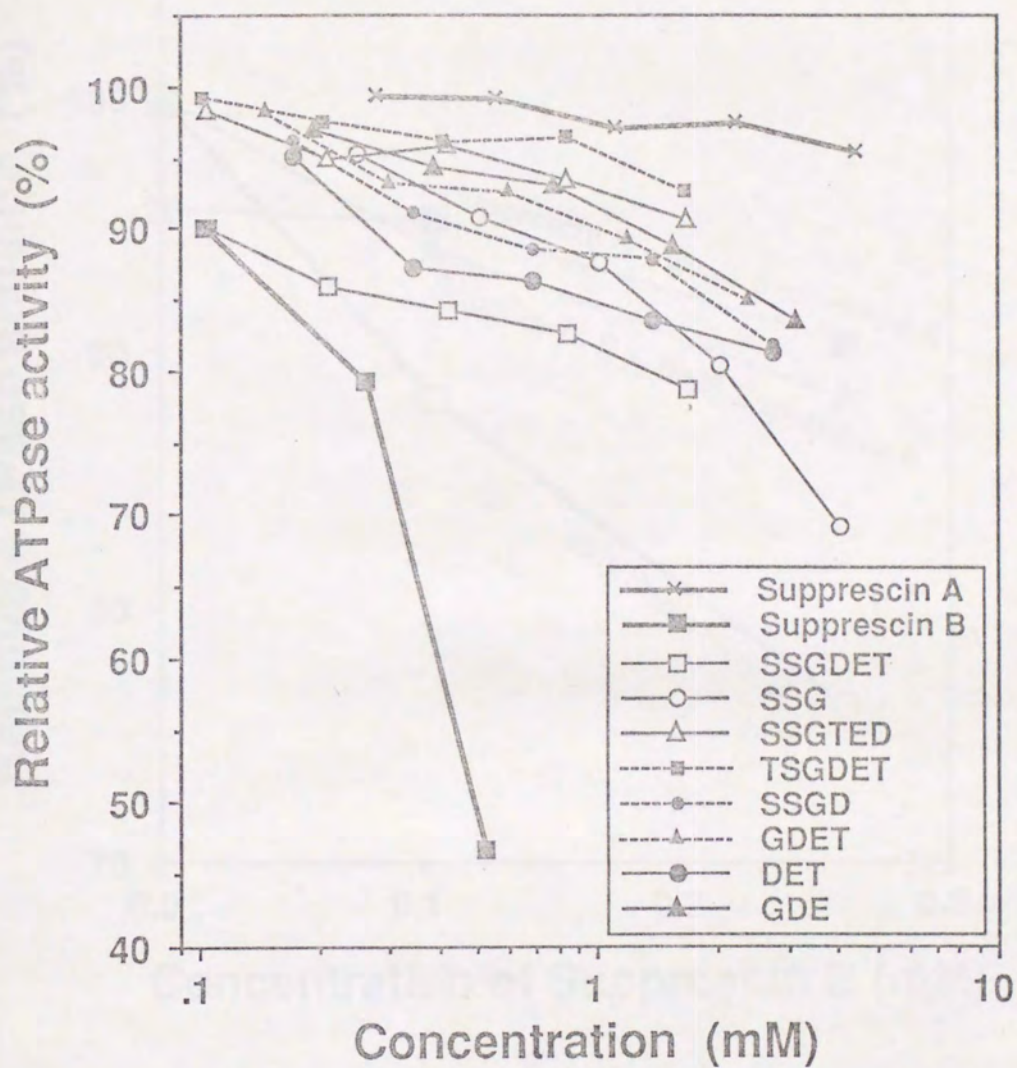


Fig. 3-7. The effects of Suppresscins, their peptide moieties and related peptides on the ATPase activity in the pea plasma membrane.

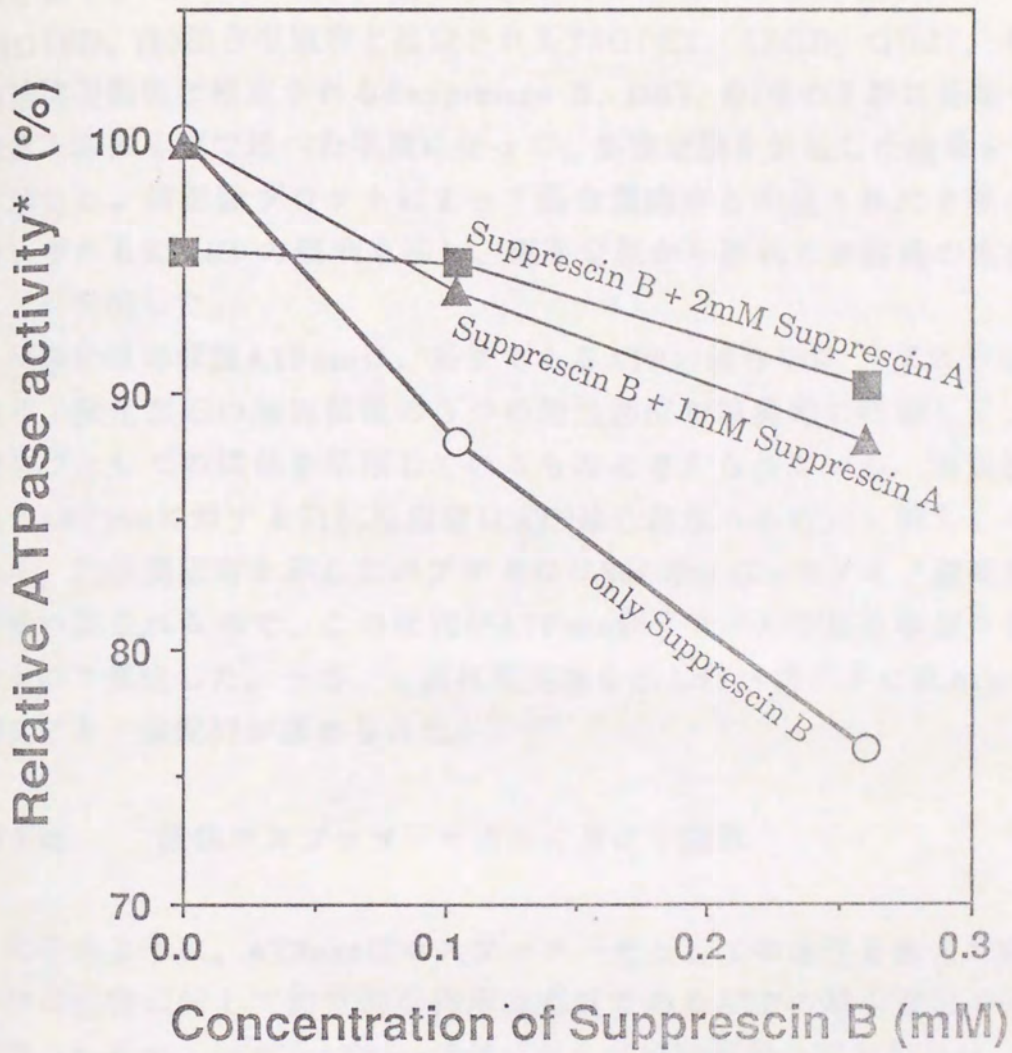


Fig. 3-8. The effects of Suppresscin A on the inhibition of ATPase by Suppresscin B

*) Expressed in percentage where the ATPase activity in the absence of Suppresscins is 100(6.83±0.29 μmol Pi/h/mg protein, BSA equiv.).

得られた結果をLineweaver-Burkプロット、いわゆる両逆数プロットとしてFig. 3-9(a)~(c)に示した。9種の試料は、推定される阻害様式の違いから3群に分類できた。すなわち、(a)拮抗型阻害と推定されるSSG, SSGDET, SSGTED、(b)混合型阻害と推定されるTSGDET, SSGD, GDET、そして、(c)非拮抗型阻害と推定されるSupprescin B, DET, GDEの3群に分類できた。本章第1節第4項で述べた手順に従って、阻害定数を算出した結果をTable 3-1に示した。両逆数プロットによって混合型阻害と推定された3種のペプチドはいずれも $K_i < K_i'$ の傾向を示し、阻害定数から拮抗と非拮抗の混合型であることが判明した。

植物の原形質膜ATPaseは、基質であるATPの結合部位、プロトン輸送部位、脱リン酸化反応の触媒部位の3つの活性部位が協調的に作動して、プロトンポンプとしての機能を発揮しているものと考えられている。本実験で観察されたATPaseに対する拮抗型阻害はATP結合部位への作用に因るものと考えられる。拮抗型阻害を示したペプチドにはSer-Ser-Glyのアミノ酸配列が共通して見い出されるので、この配列がATPase分子中のATP結合部位へ作用しているものと推定した。一方、非拮抗型阻害を示したペプチドにはAsp-Gluという酸性アミノ酸配列が認められた。

第3節 酸性ホスファターゼ活性に及ぼす効果

前述のように、ATPaseはホスファターゼとしての活性を備えた酵素である。本酵素活性に対して拮抗的な作用は基質であるATPの結合部位の奪い合いと予想されるが、一方、ATPase活性に対して非拮抗的な阻害作用は、ATPase分子内のホスファターゼドメインの阻害に起因するものと予想した。そこで、ATPase活性測定に供したサプレッサーおよびペプチドに関して、ホスファターゼ活性に対する阻害効果を調べた。先のATPase活性測定に用いたエンドウ原形質膜画分の他に、市販のジャガイモ由来酸性ホスファターゼについても、ATPase活性測定と同様の反応条件(反応液pH、温度など)で調べた。

結果をFig. 3-10に示した。供試試料のうちATPase活性に対して非拮抗阻害を示すSupprescin B、DETおよびGDEと、混合型阻害を示すペプチド中SSGDおよびGDETが、原形質膜ホスファターゼ活性を阻害する結果を得た(Fig. 3-10(a))。またこれと同様の結果が、ジャガイモ酸性ホスファターゼに関しても得られた(Fig. 3-10(b))。実験を行った範囲では、これら5種類以外のペプチ

Group - 1
Competitive inhibition

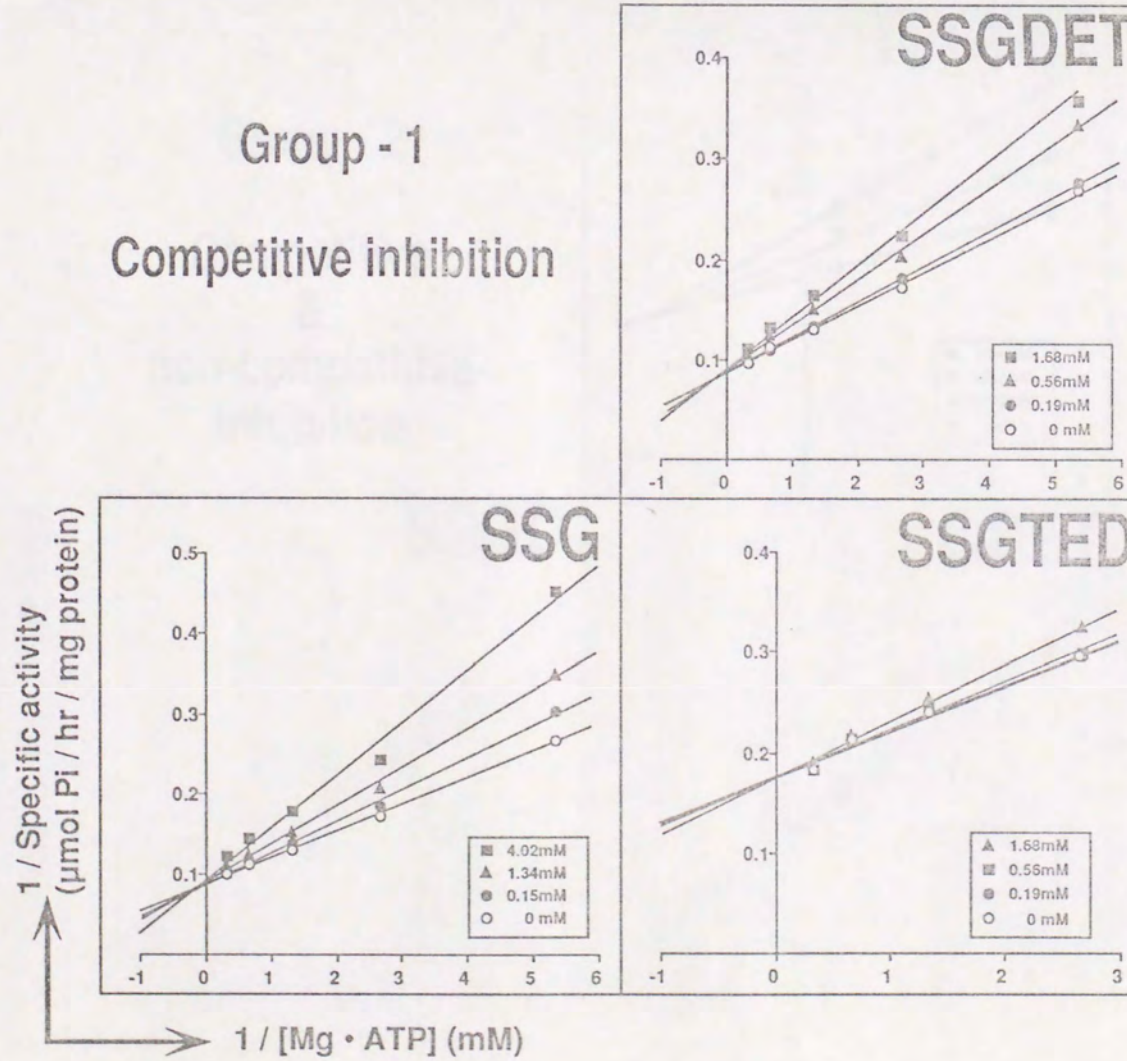


Fig.3-9(a). Lineweaver-Burk plots.

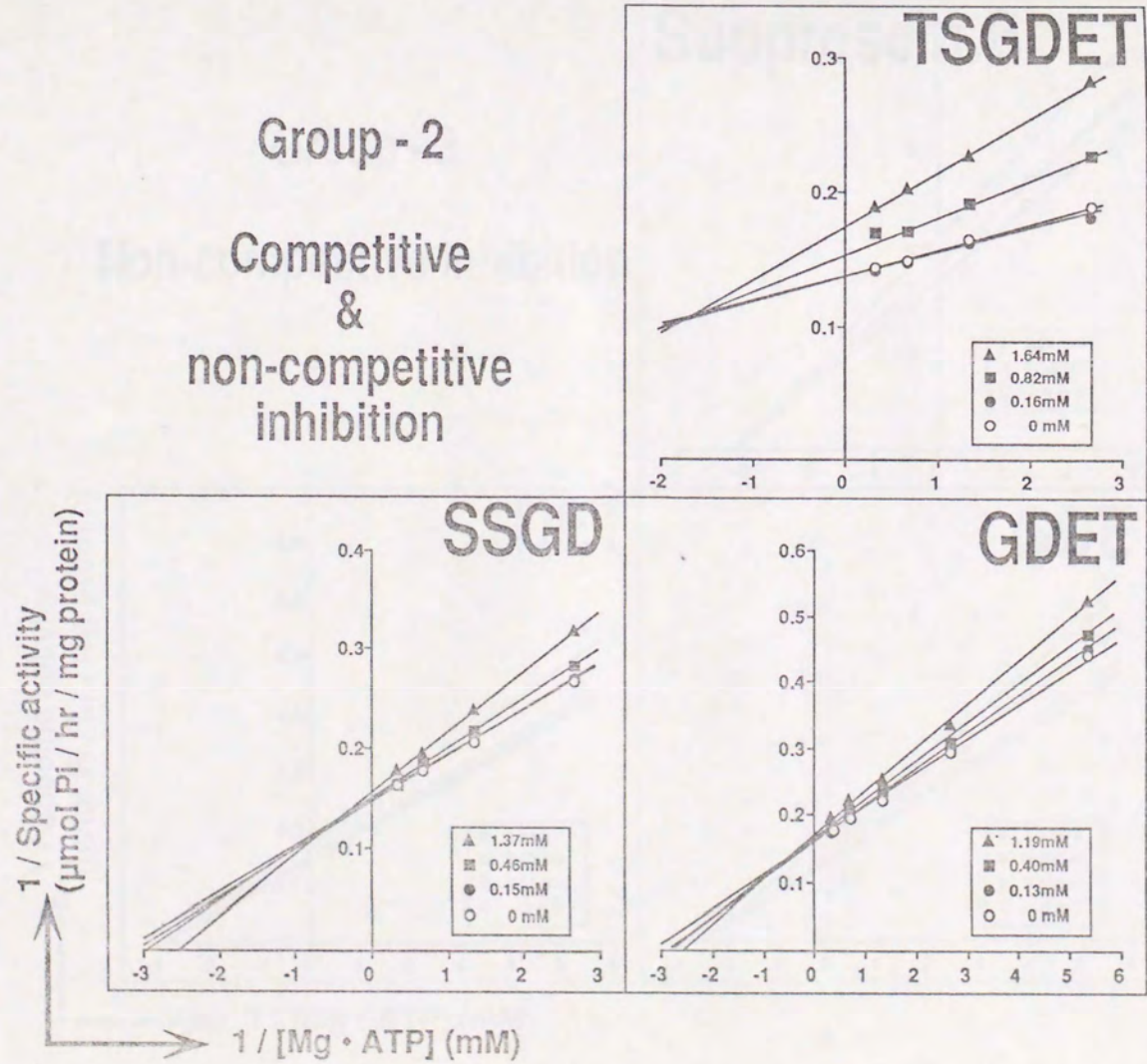


Fig.3-9(b). Lineweaver-Burk plots.

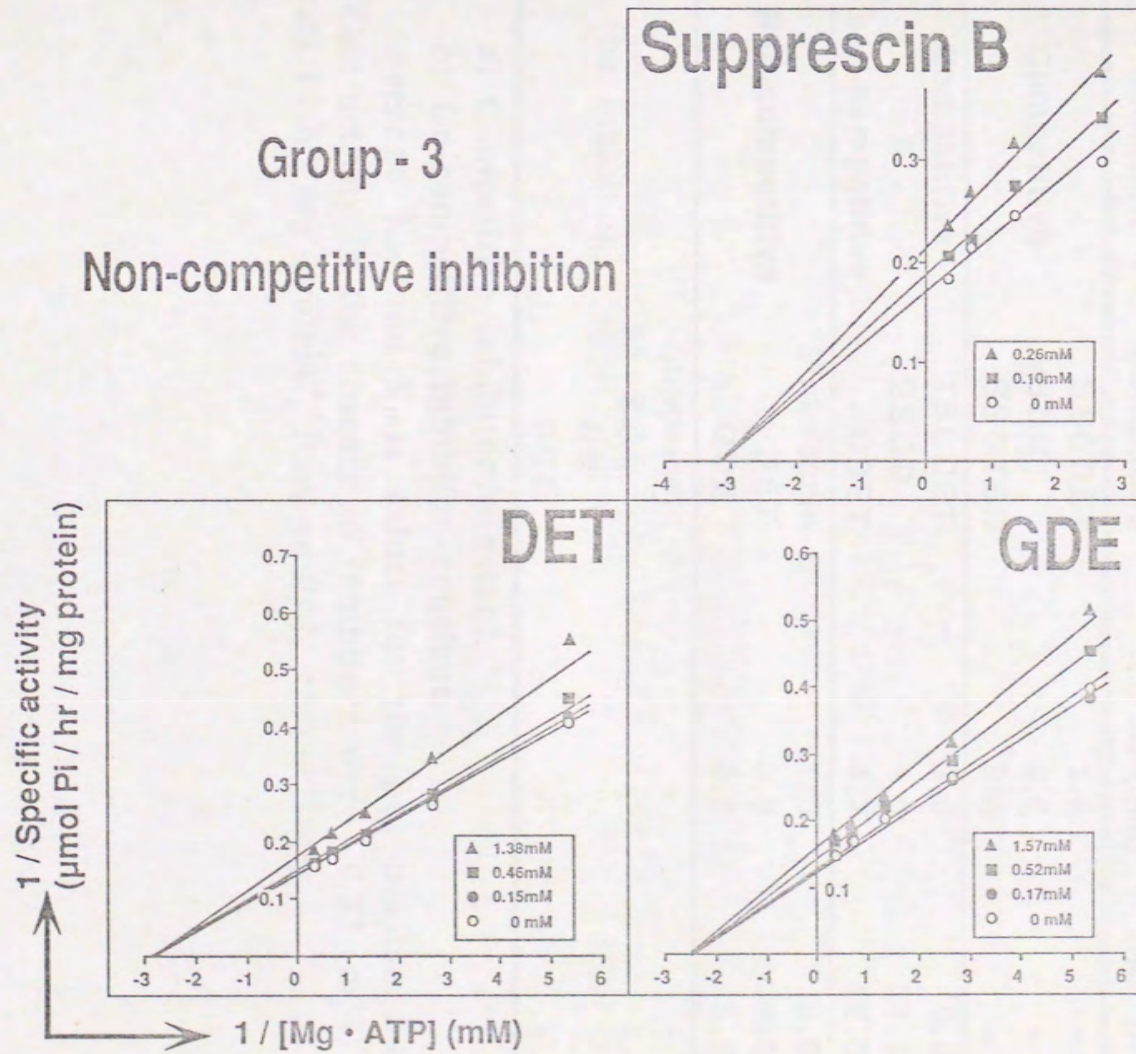


Fig.3-9(c). Lineweaver-Burk plots.

Table 3-1. Summary of kinetic data for inhibition of ATPase activity

Inhibition	Compound	Ki (mM) ^{a)}	Ki' (mM) ^{b)}
Competitive	SSGDET	1.6	∞
	SSG	4.6	∞
	SSGTED	8.5	∞
Competitive & non-competitive	TSGDET	3.0	6.0
	SSGD	4.0	21.1
	GDET	4.7	17.0
Non-competitive	Supprescin B	1.0	0.9
	DET	3.9	5.1
	GDE	4.5	6.5
(No inhibition)	Supprescin A	-	-
	SG	-	-
	GD	-	-
	GGG	-	-

a) Competitive inhibitor constant.

b) Un-competitive inhibitor constant.

Average K_m and V_{max} values for the pea plasma membrane ATPase activity in the absence of inhibitors were 0.32 (mM) and 7.2 ($\mu\text{mol Pi} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{mg protein}^{-1}$, BSA equiv.), respectively.

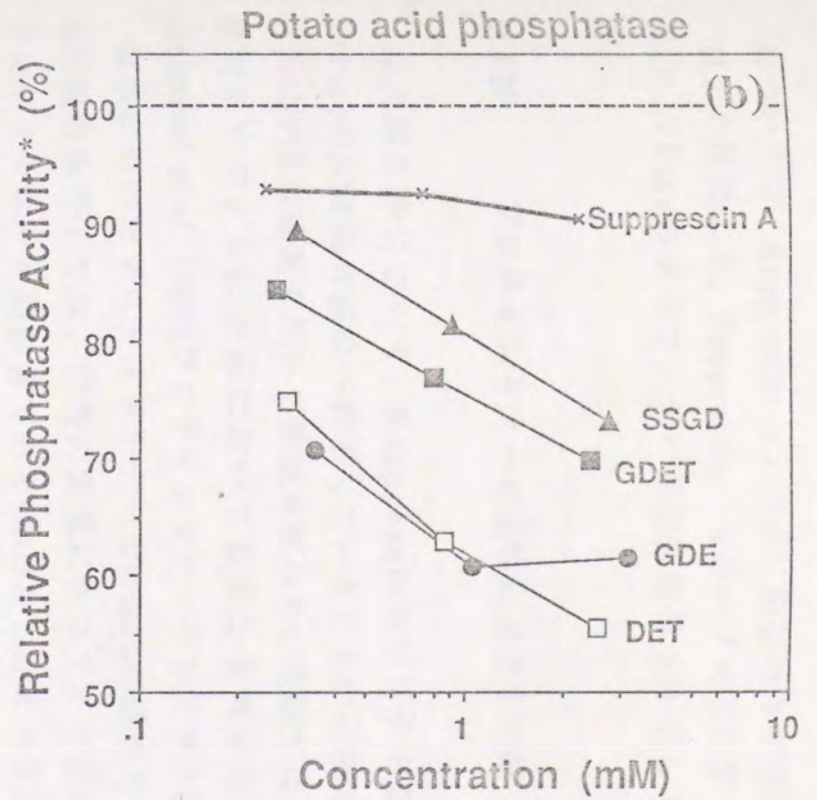
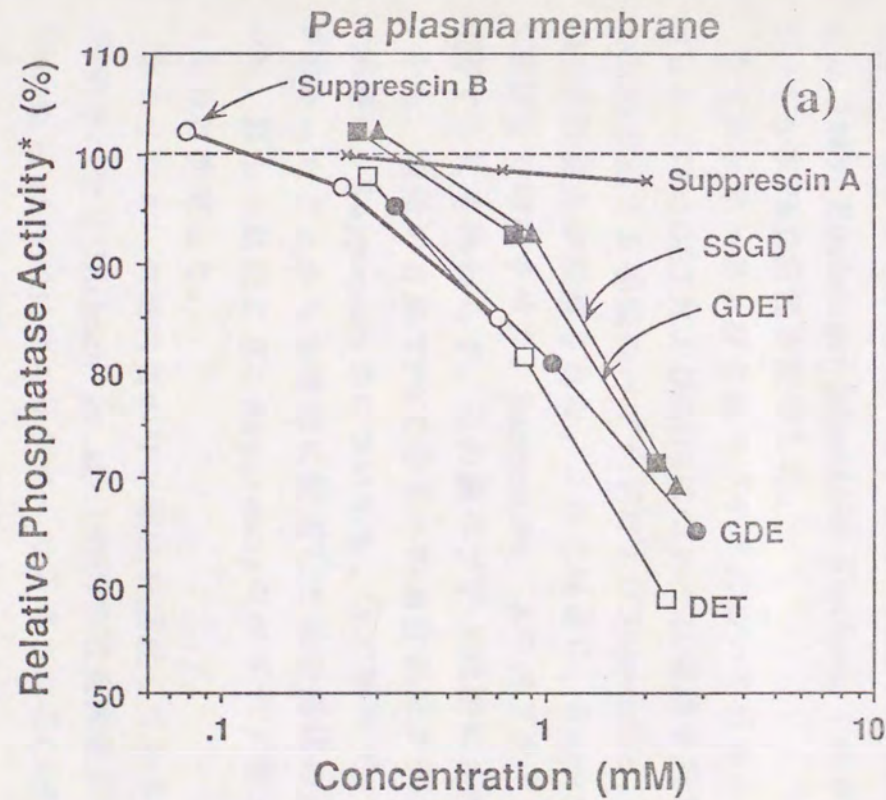


Fig.3-10. The effects of Suppressins and related peptides on the phosphatase activity in the pea plasma membrane(a) or on the acid phosphatase from potato(b).

*) Expressed in percentage where the phosphatase activity in the absence of each compound is 100[(a) $2.71 \pm 0.10 \mu\text{mol pNP/h/mg protein}$; (b) $30.4 \pm 1.0 \mu\text{mol pNP/h/mg protein}$].

ドについては、Supprescin Aと同様に阻害効果が認められなかった。

以上の結果より、Supprescin Bのペプチドに存する酸性アミノ酸配列Asp-GluはATPaseのホスファターゼ活性部位へ作用していることが強く示唆された。

第4節 プロテインキナーゼ活性に及ぼす効果

本章第2節において、Supprescinのペプチド部分のうちSer-Ser-GlyがATPaseのATP結合部位へ作用していることが示唆された。そこで、ATPase以外のATP関連酵素を用いて検証を試みた。実験では、ATP関連酵素のうちで細胞内のシグナル伝達系において重要な役割を果たしていると考えられる(Shiraishi *et al.* 1990)プロテインキナーゼをモデル酵素として選んだ。

実験に用いたプロテインキナーゼ(PKC)の活性の性状をFig.3-11に示した。本実験の条件下では、活性の発現にホスファチジルセリンを必要とし、ジアシルグリセロール類似体であるOAGおよびカルシウムイオンには依存していなかった。この結果は、Huang *et al.*(1986)と同じ結果であり、本実験条件が妥当であることを示している。また、PKCに特異的な阻害ペプチド[Mailnow *et al.* 1989; Boehringer Mannheim Biochem. Cat.No. 1443 976]は、0.1 μ Mにおいても本PKC活性を阻害した。

サブレッサーおよび合成ペプチドについて行なった実験の結果をFig.3-12に示した(TSGDETおよびGDEについては実験を行っていない)。SSGTEDとGGGを除く5種類のペプチドおよびSupprescin Bは処理濃度に依存したPKC活性阻害が観察された。これとは逆に、Supprescin AはPKC活性を濃度に依存して増高させた。Supprescin Aのペプチド鎖であるSSGはPKC活性を阻害するにも拘わらず、元の糖ペプチドは逆に本酵素の活性を増高させたことから、糖鎖の有無でPKC分子への結合部位が異なることが推測された。また同様に、Supprescin Bについても、元の糖ペプチドがSSGDETに比べて阻害が弱かったことから糖鎖に起因した結合部位の差異があることを示唆している。以上の結果より、Supprescinのペプチド部分がPKC阻害に関与しているものと推定した。

菌エリシターが蛋白質のリン酸化を誘起していることが、ダイズ(Grab *et al.* 1989)やパセリ(Dietrich *et al.* 1990)の培養細胞について報告され、さらに、Conrath *et al.*(1991)はエリシターで誘導されるCaイオンの取り込みとKイオン

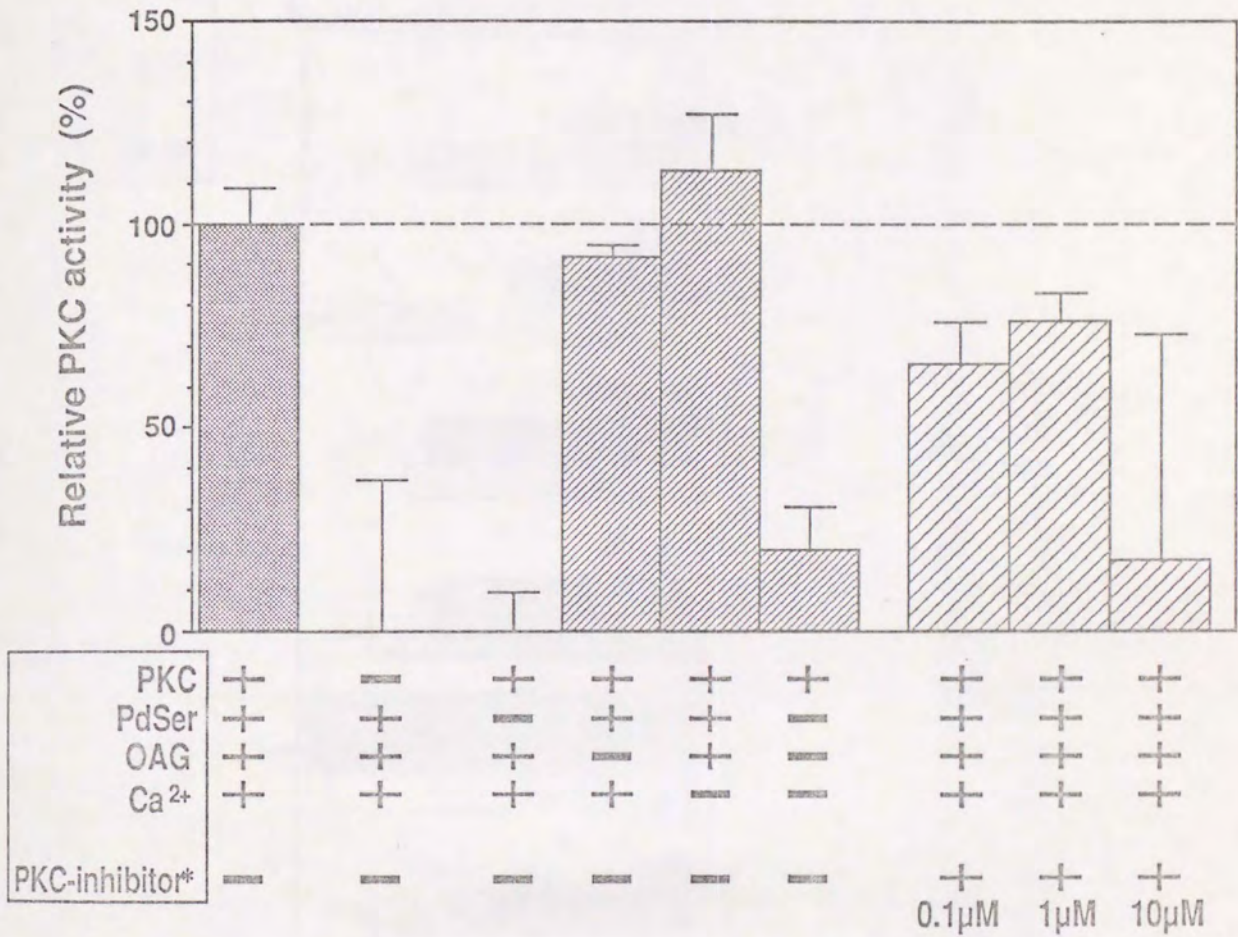


Fig.3-11. Characterization of PKC activity.

*) The sequences of the peptide corresponds to the pseudosubstrate region of protein kinase C(Mailnow *et al.* 1989). Molecular weight of the peptide was 1543.8Da.

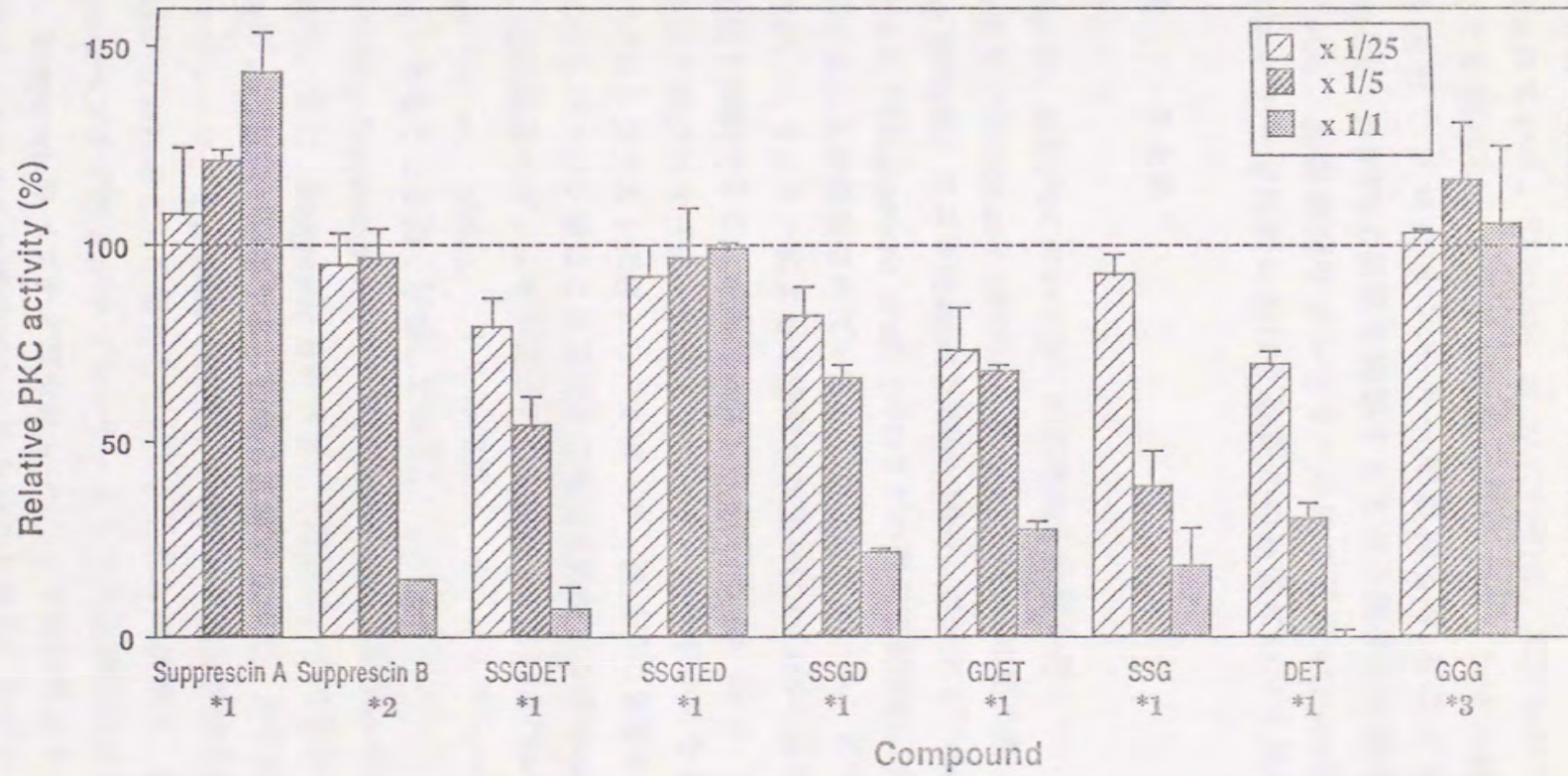


Fig. 3-12. The effect of Suppresscins or their peptides on the protein kinase C activity.

*1: x1/1 = 500µg/ml, *2: x1/1 = 340µg/ml, *3: x1/1 = 5mM.

の放出をプロテインキナーゼの阻害剤であるK252aが阻害することを報告しており、植物の抵抗反応の起動にはプロテインキナーゼが深く関与していることが示されている。Shiraishi *et al.*(1990)は、K252aがピサチンの蓄積を抑制することを報告し、エンドウ細胞においてエリシター認識からピサチン蓄積に至る過程でプロテインキナーゼが関与することを示唆しているが、Suppresscin BがPKC活性を抑制するという結果との関連で興味深い課題を提起している。褐紋病菌サプレッサーの原形質膜ATPase活性に対する効果とプロテインキナーゼ活性に及ぼす効果との連関については今後の課題である。

第5節 まとめ

ATPaseは、細胞内において多くの基礎的な役割を担っている"master enzyme"として知られている(Serrano 1989)。P-type ATPaseの阻害剤であるオルトバナジン酸(Briskin 1990)は、アズキ(Hattori & Ohta 1989)、ピーナッツ(Steffens *et al.* 1989)、そしてペチュニア(Hagendoorn *et al.* 1991)などの懸濁培養細胞に対してはエリシターとして作用することが報告されている。しかしながら、エンドウ組織では、オルトバナジン酸が、エリシターによって誘導されるPALやCHSの遺伝子の転写およびピサチンの蓄積を抑制することが報告されている(Yoshioka *et al.* 1990, 1992a)。さらに、PAL遺伝子のプロモーター領域とレポーター遺伝子からなる"キメラ"遺伝子をエンドウのプロトプラストに導入し、レポーター遺伝子の発現を調べたtransient assayでも、オルトバナジン酸はこの遺伝子の発現を抑制する(Yamada *et al.* 1992)。同様の結果が、褐紋病菌サプレッサーについても報告されている(Yoshioka *et al.* 1990, 1992a, Yamada *et al.* 1992)。これらの知見は、サプレッサーの第一次作用点が原形質膜ATPaseであることを強く示唆している。

本章では、Suppresscinのペプチド部分が*in vitro*でATPase活性を抑制することを明らかにした。また、Suppresscin Bのペプチド部分は、エリシターで誘導されるファイトアレキシンの蓄積を阻害することは第2章で述べた。さらに、Oku *et al.*(1980)は褐紋病菌サプレッサーをpronaseで処理してペプチド部分を加水分解するとサプレッサーの活性が失われることを報告している。これらの結果は、糖ペプチドであるサプレッサーのペプチド部分がサプレッサーとしての生理活性に必須であることを示している。Suppresscinのペプチド部分は α -ヘリックスの構造をとっているが、このペプチド部分だけではその構造がみられないことから、サプレッサーの糖鎖部分はペプチド鎖の立体構造に影響を与えているものと考えられる(Shirasahi *et al.* 1992, Saitoh *et*

al. in preparation)。

界面活性剤存在下で超音波処理したエンドウ原形質膜画分のATPase活性を阻害したことは、Supprescin Bやそのペプチドが本酵素の直接阻害していることを示している。さらに、本章での実験結果から、6残基からなるSupprescin Bのペプチド部分には少なくとも2つの活性部位が存在することが明らかとなった。すなわち、i)"Ser-Ser-Gly"配列はATPase活性を拮抗的に阻害することから、ATP結合部位へ作用している、ii)"Asp-Glu"配列はATPase活性を非拮抗的に阻害し、非拮抗的な阻害が認められたペプチドの多くはATPase活性のみならず酸性ホスファターゼ活性を阻害したことから、ホスファターゼ部位へ作用していることが示唆された。ウサギ骨格筋由来のホスホプロテインホスファターゼ・インヒビターの活性部位にも酸性アミノ酸が多くみられる(Aitken & Cohen 1982)こととも関連しているかもしれない。

H⁺-ATPase分子内のATP結合部位は、4つのモチーフ(Lys-Gly-Ala-Pro, Asp-Pro-Pro-Arg, Thr-Gly-Asp, Gly-Asp-Gly-X-Asn-Asp-Ala-Pro-Ala/Ser-Lue-Lys)がポケットを形成して、ATPを捕捉するとされている(Serrano 1989)。一方、プロテインキナーゼC分子のATP結合部位は、"Gly-X-Gly-X-X-Gly-X_n-Lys"といわれており(Hunter & Cooper 1985)、ATPaseのATP結合部位とは異なっているために、ATPase活性とPKC活性に対するサプレッサーおよびそのペプチドの阻害効果に違いがみられたものと思われる。

Supprescin AとBとは、ATPase活性に対しては競合的な効果を示したが、ファイトアレキシンの蓄積に対しては相加的に作用する(Shiraishi *et al.* 1992)ことから、エンドウ細胞には複数の異なるサプレッサーの作用点が存在するものと推察した。事実、Supprescin AとBとを含む粗サプレッサー画分を用いた実験では、ピサチンの生合成に関わる酵素活性を阻害すること(Hiramatsu *et al.* 1986)や、また、サプレッサーは、原形質膜中のリン脂質代謝系にも影響を与えることも報告されている(Toyoda *et al.* 1992)。原形質膜のATPase活性は酵素周辺の脂質環境によっても制御されている(Kasamo & Nouchi 1987)ことを考え合わせるならば、サプレッサーはエンドウ原形質膜ATPase活性を、直接(Kato *et al.* 1993)のみならず間接的(Toyoda *et al.* 1992)にも阻害している可能性は残っているであろう。

第4章 褐紋病菌サブレッサーの糖鎖の機能について

前章までで、褐紋病菌サブレッサーのペプチド部分のみでサブレッサー活性が認められたことを述べた。しかしながら、ペプチド部分のみで認められたサブレッサー活性は、もとのサブレッサーに比べて弱いことが判明した。これは、糖ペプチドであるサブレッサーの特異な立体構造、すなわち、 α ヘリックス型のペプチド鎖とV字型に折れ曲がった立体配座が、サブレッサーの活性にとって重要な意味を持っていることを示唆している。そこで、サブレッサー分子における糖部分は、単に分子構造の保持に寄与しているだけなのか、あるいはサブレッサーの標的分子への結合に関して何らかの作用を担っているのかを明らかにするために、サブレッサーを構成する糖ないしアミノ糖の生理活性について調べることにした。

第1節 実験方法

第1項 エンドウ原形質膜ATPase活性に対する効果

エンドウ原形質膜の調製方法とATPase活性の測定方法については、第3章で述べた方法に準拠した。

供試糖として、サブレッサーを構成するガラクトース(Gal)およびN-アセチルガラクトサミン(GalNAc)の他に、ガラクトサミン(GalN)、N-アセチルグルコサミン(GlcNAc)、N-アセチルマンノサミン(ManNAc)について、終濃度0.2mMないし1mMとなるように反応液へ添加してATPase活性に対する効果を*in vitro*で調べた。また、1mM S S G D E Tペプチドを同時に添加した処理区についても同様の実験を行った。

第2項 エンドウのファイトアレキシン蓄積に及ぼす効果

明所で生育させたエンドウ成葉を使って、第2章で述べた方法に従って、エンドウのファイトアレキシンであるピサチンの蓄積に及ぼす効果を調べた。

供試糖には、サブレッサーを構成するガラクトース(Gal)およびN-アセチルガラクトサミン(GalNAc)を用いた。

第3項 エンドウ褐紋病菌の感染に及ぼす効果

明所で生育させたエンドウ成葉へ種々の濃度の糖ないしアミノ糖を添加したエンドウ褐紋病菌孢子懸濁液を滴下し、第2章で述べた方法に従って、エンドウ褐紋病菌の感染に及ぼす糖類の効果を調べた。

供試糖として、サプレッサーを構成するガラクトース(Gal)およびN-アセチルガラクトサミン(GalNAc)の他に、グルコース(Glc)およびN-アセチルグルコサミン(GlcNAc)について、終濃度0~2.5%(w/v)の範囲で実施した。

第2節 実験結果

第1項 エンドウ原形質膜ATPase活性に対する効果

結果をFig.4-1に示した。実験を行った5種類の糖ないしアミノ糖については、単独処理では顕著なATPase活性抑制の効果は認められなかった。また、Suppresscin Bのペプチド部分であるSSGDETを添加すると約30%程度のATPase活性阻害が観察されたものの、その阻害効果に対する糖類の影響は認められなかった。このことは、サプレッサーを構成するペプチドと糖とは単に共存するだけではSuppresscin B程の阻害効果はないことと同時に、ペプチドによるATPase阻害作用を糖はキャンセルできないことを示している。

第2項 エンドウのファイトアレキシン蓄積に及ぼす効果

GalないしGalNAcを終濃度で0.5%(およそ25mMに相当)処理した時のピサチン蓄積量を調べた結果をFig.4-2に示した。

まず、糖非添加区においては、菌エリシター処理(500 μ g/ml, glucose equiv.)によって顕著なピサチン蓄積がみられ、粗サプレッサー画分を同時に処理(50 μ g/ml, BSA equiv.)すると70%程度の蓄積抑制が観察された。

Gal添加区においては、水処理区・エリシター処理区とも糖非添加区に比べてピサチン蓄積が亢進したことから、Galはわずかではあるがエリシターとしての活性を有していることが示唆された。一方、サプレッサー・エリシター区に処理した場合にはサプレッサーによるピサチン蓄積抑制効果は有意に低下した。この結果は、Galがサプレッサーの作用を打ち消す効果を持つことを示唆している。

GalNAcを添加した場合、水処理区あるいはエリシター単独処理区におけるピサチン蓄積量との間に有意な違いは見い出せなかったが、一方、サプレッ

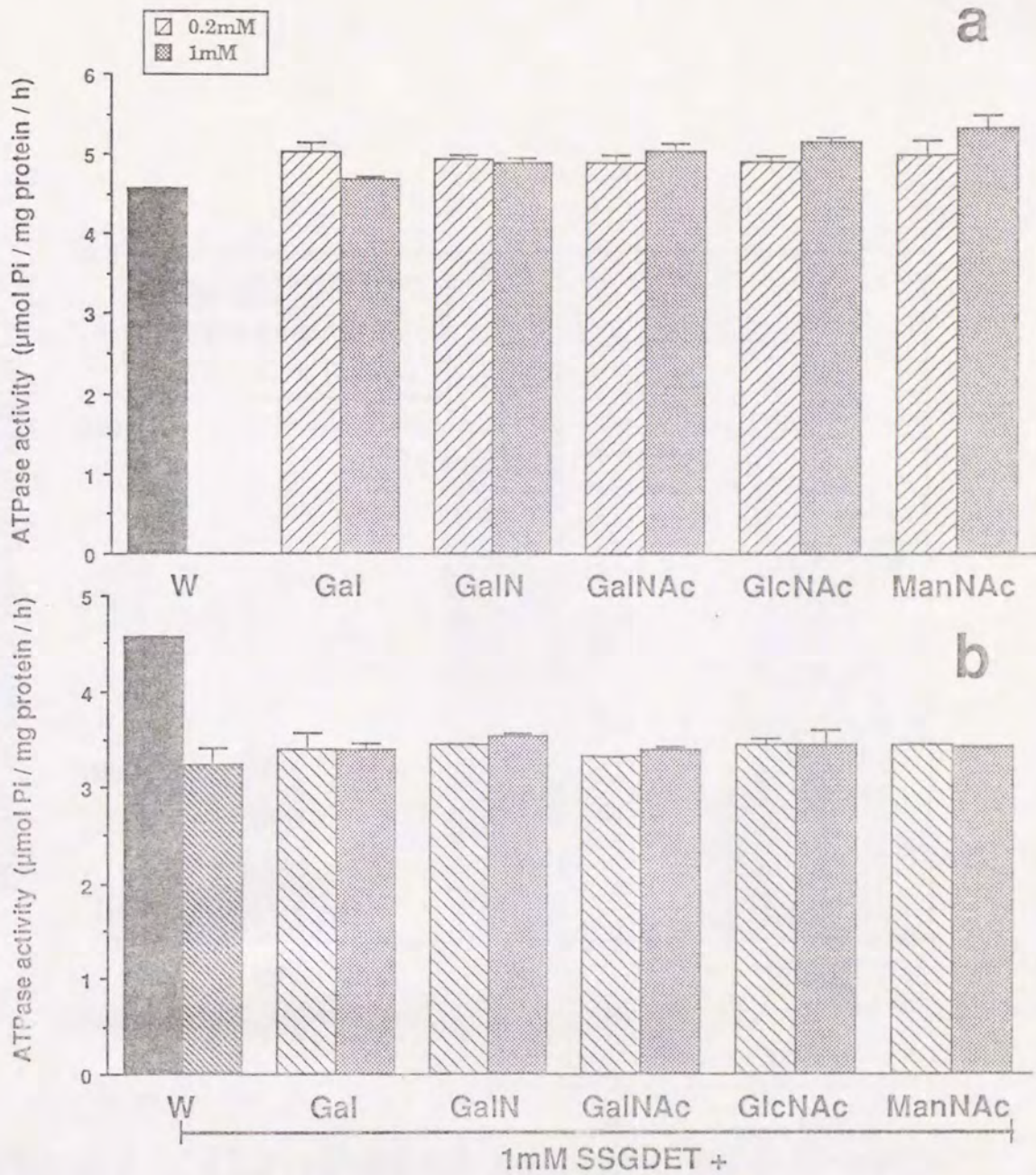


Fig. 4-1. Effect of sugar or amino sugar on the plasma membrane ATPase activity *in vitro*, in the absence(a) or presence(b) of SSGDET peptide.

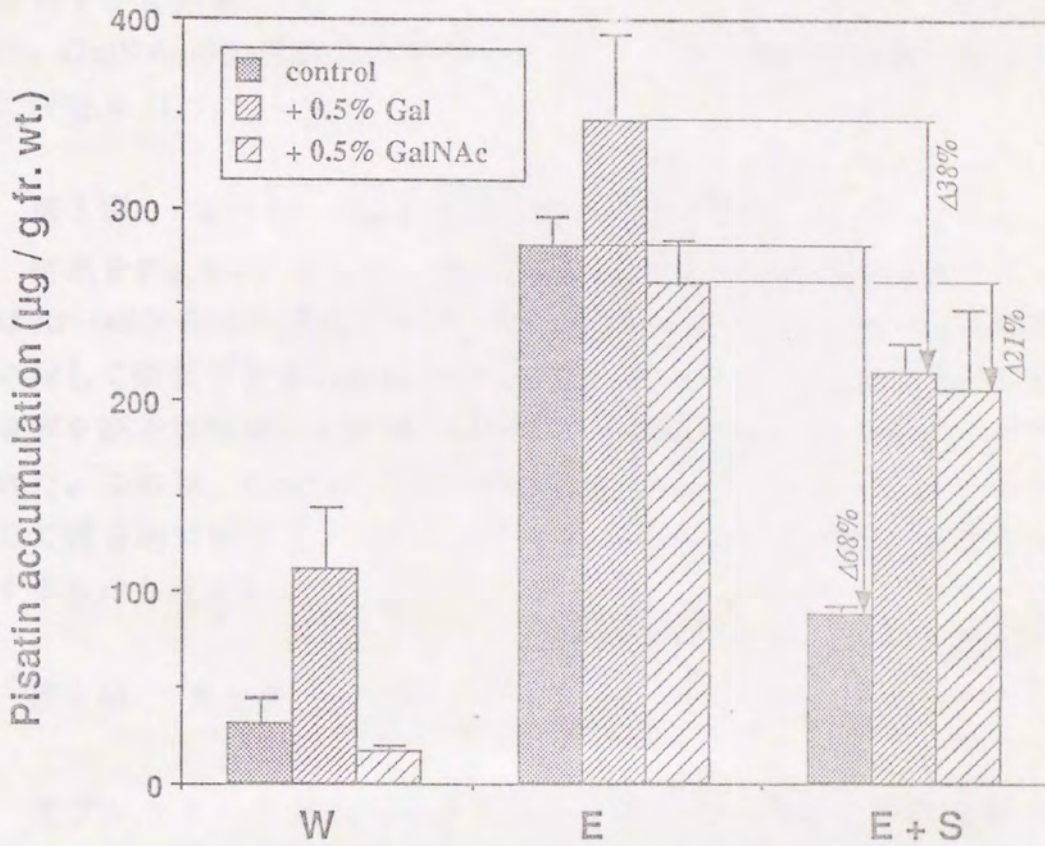


Fig. 4-2. The effect of galactose and N-acetyl galactosamine on the pisatin accumulation in pea leaves.

W: In the absence of elicitor and suppressor.

E: In the concomitant presence of 500µg/ml(glucose equiv.) fungal elicitor.

E + S: In the concomitant presence of fungal elicitor and 50µg/ml(BSA equiv.) crude suppressor.

サーによる阻害効果はGalNAcの共存下では20%程度に低減したことから、GalNAcもサプレッサーの作用部位に対して競合的に作用していることが推定された。そこで、処理濃度を変えてGalNAcの効果を調べた結果、Fig.4-2と同様に単独ではピサチン蓄積に影響しないが、エリシターによるピサチン蓄積をわずかに抑制した。さらに、サプレッサーによるピサチン蓄積の抑制効果は、GalNAcの処理濃度に依存して低減し、先の示唆を裏付ける結果が得られた(Fig.4-3)。

第3項 エンドウ褐紋病菌の感染に及ぼす効果

結果をFig.4-4に示した。糖を添加していない水処理区において、褐紋病菌は70~80%程度の感染率を示した。GalおよびGlcについては褐紋病菌の感染に対して顕著な影響は認められなかったが、GalNAcは処理濃度に依存して感染率を顕著に低減する結果が得られ、同様の傾向がGlcNAcについても認められた。これは、GalNAcおよびGlcNAcが褐紋病菌サプレッサーの作用点に対して競合的に作用し、サプレッサーの感染誘導作用を低下させることに起因するものと考えた。

第3節 まとめ

サプレッサーを構成する糖ないしアミノ糖に関して検討を行った結果、Gal, GalNAcとも原形質膜ATPase活性に対しては顕著な影響が認められなかったもの、ファイトアレキシンの蓄積および褐紋病菌の感染に対して、何らかの作用をしていることが明らかとなった。Galは、ファイトアレキシン蓄積を増高させる、いわゆるエリシターとしての作用に加え、サプレッサーに対する競合的な作用を有していたことから、Supprescin B分子中のGal分子はエンドウ細胞における作用点への結合に関与していることが推定される。また、Galはエリシター活性を示したことから、エリシターの標的分子へも作用する可能性が示唆された。一方、GalNAcは、サプレッサーによるファイトアレキシン蓄積抑制、および、褐紋病菌の感染を抑制したことから、褐紋病菌サプレッサーの標的分子への結合に深く関与している可能性が示唆された。同様の結果が、GlcNAcについても観察されたことから、これらアミノ糖のアセチル基が重要な意味を持っているものと推定される。GlcNAcの重合体であるキトサンがエンドウのファイトアレキシン蓄積を誘導するエリシターとしての

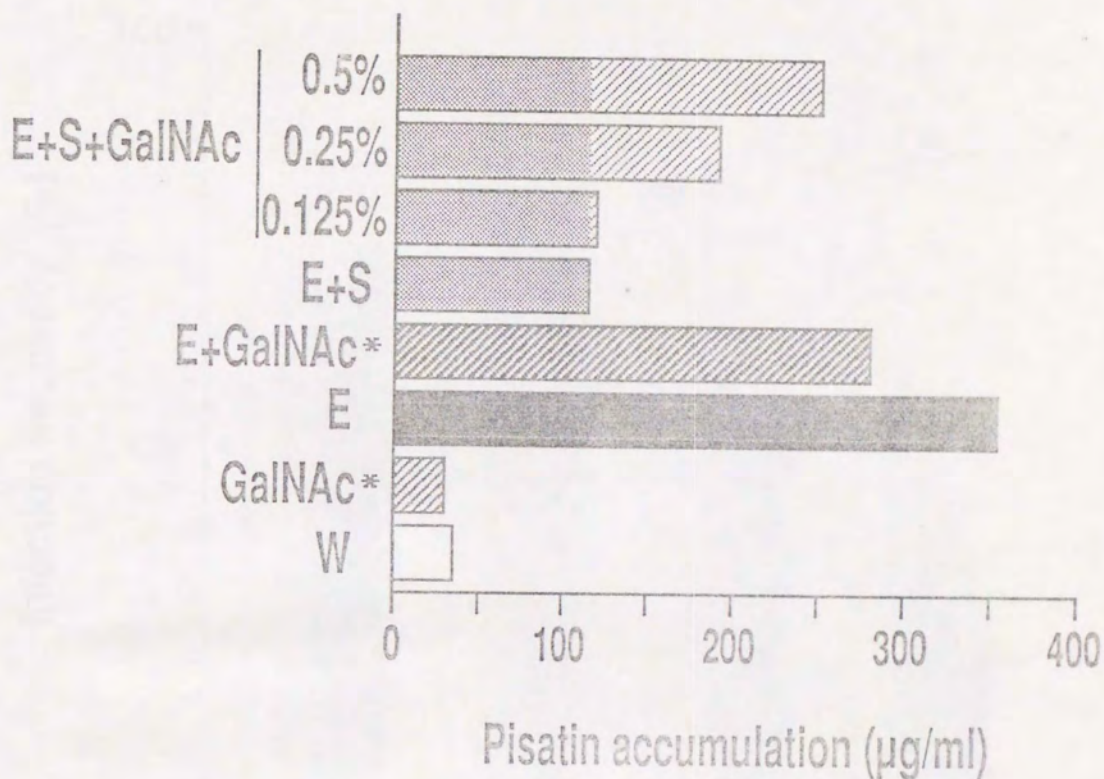


Fig. 4-3. Effect of N-acetyl galactosamine on the pisatin accumulation on pea leaves.

W : Treatment with water alone as control,

E : Treatment with 500µg/ml(glucose equiv.) fungal elicitor,

S : Treatment with 50µg/ml(BSA equiv.) crude suppressor from *M.pinodes*,

GalNAc*: Treatment with 0.5%(w/v) GalNAc.

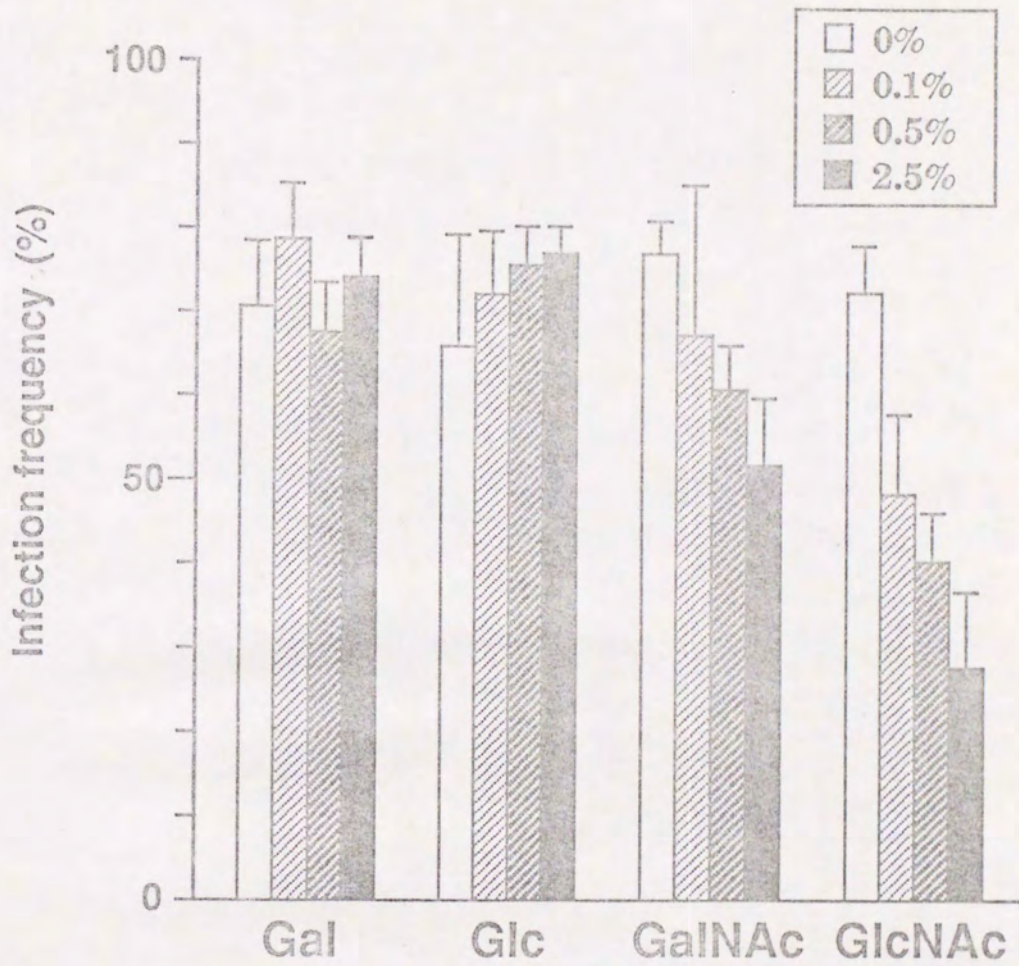


Fig. 4-4. Effect of sugars or amino sugars on the infection by *M. pinodes*.

活性を有している(Walker-Simmons *et al.* 1983)との知見もあり、サプレッサー分子が原形質膜ATPase以外に、エリシターの標的分子へも作用していることも考えられよう。今後、サプレッサー分子中の糖鎖の役割についてさらに詳細な研究が望まれる。

第5章 エンドウ原形質膜H⁺-ATPase cDNAのクローニングと構造解析

原形質膜ATPaseは、プロトンポンプとして機能し、膜を介したプロトンの移送に伴う膜内外の電位勾配の形成(Spanswick 1981)やpHの調節(Smith & Raven 1979)、さらに、その他のイオンや栄養物の能動輸送(Poole 1978, Marre 1979, Marre *et al.* 1986)の役割を担っていることから、細胞の成長や恒常性の維持に関して中心的な役割を果たす "master enzyme" として知られている(Serrano 1988, 1989)。

1986年に出芽酵母*Saccharomyces cerevisiae*(Serrano *et al.* 1986)や赤パンカビ*Neurospora crassa*(Addison 1986, Harger *et al.* 1986)の原形質膜ATPase遺伝子がクローニングされ、翌年には分裂酵母*Schizosaccharomyces pombe*(Ghislain *et al.* 1987)についても遺伝子が報告され、原形質膜ATPaseに関する分子遺伝学的な解析が進んだ。一方、高等植物については、Schaller & Sussman(1988a)がエンバクの原形質膜ATPaseの部分アミノ酸配列を報告し、その後現在までに、シロイヌナズナ(Harper *et al.* 1989, 1990, Pardo & Serrano 1989)、タバコ(Boutry *et al.* 1989, Perez *et al.* 1992)、トマト(Ewing *et al.* 1990)、イネ(Wada *et al.* 1993)などの原形質膜ATPase遺伝子が相次いで明らかにされた。

高等植物のATPase遺伝子はゲノム中に少なくとも3コピー存在するとされており、各々の遺伝子のアミノ酸配列およびコード領域の塩基配列は高い相同性を有しているものの、組織特異的な発現制御を受けていると報告されている(Harper *et al.* 1990, Perez *et al.* 1992)。ATPase遺伝子の発現のストレス応答性に関しては、低浸透圧ストレスを与えるとダイズ根のATPase遺伝子発現が増高することが報告されている(Surowy & Boyer 1991)が、病原菌あるいはそれらのシグナル物質に対する応答に関してはあまり報告例が無い。Yoshioka *et al.*(1990)は、エンドウ褐紋病菌由来エリシターおよびサプレッサーを処理したエンドウ組織より調製したRNAについて、シロイヌナズナATPase cDNA(Harper *et al.* 1989)をプローブとしたノーザン分析を実施し、ATPase RNAの蓄積量の変化を経時的に調べたところ、ATPase RNA蓄積量は常にほぼ一定であったと報告している。しかしながら、Shiraishi *et al.*(1991a)は、エンドウ褐紋病菌サプレッサーを処理したエンドウ組織のATPase活性を

経時的に調べたところ、サブレッサー処理後6時間まではATPase活性が消失していたが、処理後9時間を経過すると活性が回復してくることを突き止めた。このATPase活性の回復は、サブレッサーの不活化とも考えられるが、褐紋病菌胞子を接種した同様の実験においても同じ結果が得られたことより (Shirashihi *et al.* 1991a)、サブレッサーに対する感受性の異なるATPase分子種へと更新された可能性が考えられた。この点を明らかにするとともに、サブレッサーとATPase分子との相互作用を直接的に明らかにすることを旨として、エンドウ原形質膜ATPase遺伝子のクローニングを行った。

第1節 高等植物の原形質膜H⁺-ATPase遺伝子の構造

第1項 原形質膜H⁺-ATPaseの構造

Mito *et al.* (1988)はサブユニット構造を有する原形質膜ATPaseの存在を示唆する結果を報告しているが、現在、広く認められている原形質膜ATPaseはペプチド部分の分子量が約100kDaの単一蛋白質であり (Serrano 1989)、糖鎖修飾を受けていると考えられている (Ballou *et al.* 1991)。原形質膜ATPase遺伝子から予測されたアミノ酸配列の解析の結果、ATPaseは分子内に8~9つの疎水性領域が見い出され、それらは膜貫通領域に相当すると考えられており、Serrano (1989)はFig. 5-1のような構造モデルを提唱している。C末端については細胞質側 (Davis & Hames 1989)にあるとする報告と細胞の外側 (Antolovic *et al.* 1991)にあるとする報告がされている。ATPaseは分子内に3つの活性部位、すなわち、ATPが結合して自己リン酸化を担う"kinase"ドメイン、イオンチャンネルとして機能する"transduction"ドメイン、そして脱リン酸化を担う"phosphatase"ドメインを有し、それぞれが協調的に作動することによりプロトンポンプとして機能していると考えられている (Serrano 1989)。各々の活性部位を構成すると見られる6つの領域は、Table 5-1に示したアミノ酸配列を有し、植物やカビのH⁺-ATPaseのみならず細菌のK⁺-ATPaseや動物のCa²⁺-およびNa⁺/K⁺-ATPaseについても完全に保存されている (Serrano 1989)。

原形質膜ATPaseの阻害剤であるオルトバナジン酸に対する感受性の異なるATPase分子種が酵母の系で発見されている (Ballou *et al.* 1991, Ghislain *et al.* 1987)。オルトバナジン酸に対する耐性は、修飾糖鎖の構造の違い (Ballou *et al.* 1991)あるいは活性部位のアミノ酸配列の点変異 (Ghislain *et al.* 1987)によるものである。さらに、Palmgren *et al.* (1990, 1991)はATPaseのC末端側の部

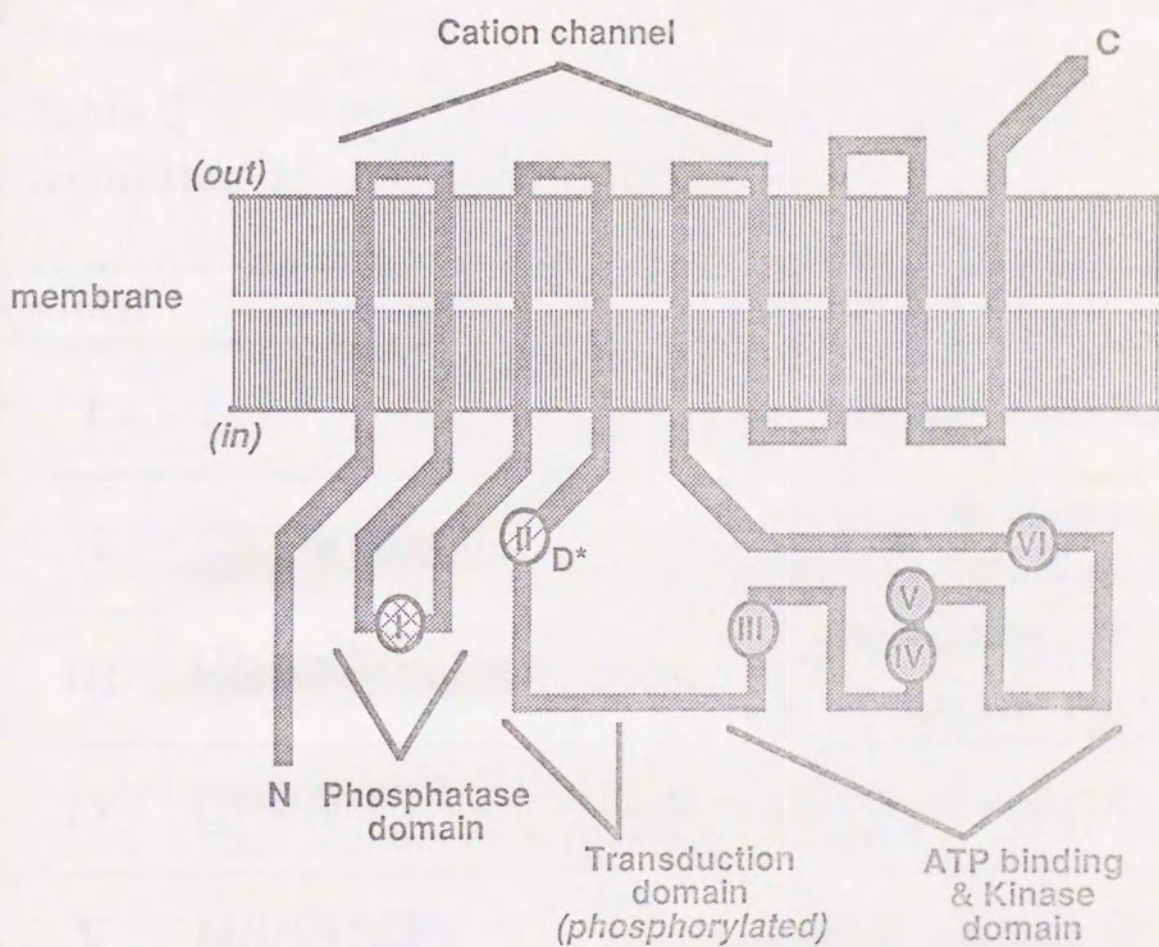


Fig. 5-1. Structural model of P type ATPase.

from Serrano(1989)

Table 5-1. Proposed functional domains of plasma membrane H⁺-ATPases

motif	Sequence	Proposed functions
I	TG[E]S	phosphatase activity(E)
II	[D]KTGTLT	phosphorylation and transduction(D)
III	[K]GAP	ATP binding(K) and/or kinase activity
IV	[D]PPR	ATP binding(D)
V	M(I/L)TG[D]	ATP binding(D)
VI	G[D]GVN[D]AP(A,S)L[K]	ATP binding (two D and K)

from Serrano(1989)

分を切除するとATPase活性が変化すると報告している。また、プロテインキナーゼによるリン酸化によって活性が制御されているとの報告もある (Schaller & Sussman 1988b, Serrano 1989)。

Palmgren *et al.* (1991)は、原形質膜ATPaseの調節機構として、i)動物のCa²⁺-ATPaseのようなalternative splicingによる複数の分子種の発現(Gunteski-Hamblin *et al.* 1988, Strehler *et al.* 1989)、ii)ATPase酵素分子中のauto-inhibitory domainの欠失による活性化、iii)プロテインキナーゼによるリン酸化による活性調節、さらに、iv)何らかのエフェクター分子との協調による機能制御などが挙げられると報告している。前述の修飾糖鎖の変化も含め、原形質膜ATPaseは多様な調節を受けて、"master enzyme"としての役割を担っているものと考えられる。

第2項 高等植物の原形質膜H⁺-ATPase遺伝子の比較

現在までに塩基配列の決定された4種の高等植物の原形質膜H⁺-ATPaseの一覧をTable 5-2に示した。そのうち、シロイヌナズナ、タバコ、トマトでは、複数の遺伝子がクローニングされている。同じ植物種のATPase遺伝子では、塩基配列で90%程度の相同性が認められ、異種植物間においても、塩基配列で71~90%、アミノ酸配列レベルで80~95%程度の非常に高い相同性が見出されている。また、高等植物以外のH⁺-ATPase、K⁺-ATPase、Ca²⁺-ATPase、さらにNa⁺/K⁺-ATPaseとは、アミノ酸レベルで45~60%程度の比較的高い相同性を有していることから、輸送するカチオンに違いがあっても、一連のATPaseは進化的にみて同じ分子から派生したものであろうと考えられている (Serrano 1989)。

植物のゲノム中には少なくとも3種類の原形質膜H⁺-ATPase遺伝子が存在し (Pardo & Serrano 1989, Perez *et al.* 1992)、それらは組織特異的および分化時期特異的な発現をしていることが明らかにされている (Harper *et al.* 1990, DeWitt *et al.* 1991, Perez *et al.* 1992)。これらmulti-gene familyを構成していると考えられている原形質膜ATPaseが、酵素蛋白質レベルで異なる機能をしているのか、また、異なる調節を受けているのか否かは明らかにされていない。さらに、植物の原形質膜H⁺-ATPase遺伝子は、アラビドプシスでは15ないし17のエクソンに (Harper *et al.* 1990, Pardo & Serrano 1989)、また、タバコでは21のエクソン (Perez *et al.* 1992)に分断されてゲノム中にコードされている事実は、Palmgren *et al.* (1991)が予測しているようなalternative splicingによ

Table 5-2. List of plant plasma membrane H⁺-ATPase genes

Plant material	Gene name	Sequence type	Reference
Arabidopsis	AHA 1	cDNA	Harper <i>et al.</i> (1989)
	AHA 2	genomic, cDNA	Harper <i>et al.</i> (1990)
	AHA 3	genomic, cDNA	Pardo & Serrano(1989)
Tobacco	PMA 1	genomic	Perez <i>et al.</i> (1992)
	PMA 2	genomic*, cDNA	Boutry <i>et al.</i> (1989)
			Perez <i>et al.</i> (1992)
	PMA 3	genomic*, cDNA	Perez <i>et al.</i> (1992)
	PMA 4	cDNA	Moriau <i>et al.</i> (1992?)
Tomato	LHA 1	cDNA	Ewing <i>et al.</i> (1990)
	LHA 2		
Rice	OSA 1	cDNA	Wada <i>et al.</i> (1992)

*) Partial nucleotide sequences.

る多彩なATPase分子種の生合成の可能性を示唆しているように思える。

第2節 エンドウ原形質膜H⁺-ATPase cDNAのクローニング

第1項 PCRプライマーの設計と合成

シロイヌナズナ(Harper *et al.* 1989, Pardo & Serrano 1989)、タバコ(Boutry *et al.* 1989)、トマト(Ewing *et al.* 1990)の原形質膜H⁺-ATPase遺伝子の塩基配列の比較から、Fig.5-2に示す4種のオリゴヌクレオチドをPCR用のプライマーとして設計し、Millipore社製BIOSERCH CYCLONE™にて合成した。プライマー#1は第1膜貫通領域に相当する部分の19mer(順鎖)、プライマー#2は第4膜貫通領域の直下流に相当する17mer(順鎖)、プライマー#3は第5膜貫通領域の直上流に相当する18mer(相補鎖)、そして、プライマー#4は第9膜貫通領域の下流に相当する18mer(相補鎖)であり、プライマー#1, #2, #4は一部2種の塩基を導入したミックスプライマーとして合成した。

第2項 PCR法によるエンドウ原形質膜H⁺-ATPase cDNAの増幅

(1) 鋳型となるエンドウcDNAの調製

エンドウ品種ミドリウスイ(*Pisum sativum* L. cv. Midoriusui)をバーミキュライトに播種し、25℃暗黒下で6日間育成させた後、その上胚軸を液体窒素中で磨碎し、グアニジンチオシアネート/CsCl法にて全RNAを調製し、さらに、oligotex™ dT30(日本ロッシュ社製)を用いてPoly(A)⁺RNAを得た(参考書; 渡辺&杉浦「クローニングとシーケンス」)。得られたPoly(A)⁺RNAを鋳型にAmersham社製cDNA合成キット(cDNA synthesis system plus™)を用いてcDNAを合成した。

(2) PCR法によるATPase cDNAの増幅

エンドウcDNAを鋳型として、前項で述べたプライマーを用いて、polymerase chain reaction (PCR) 反応を以下の条件で実施した。

反応液組成	(100μl/反応)
cDNA	350ng
primer	各100pmole
KCl	50mM

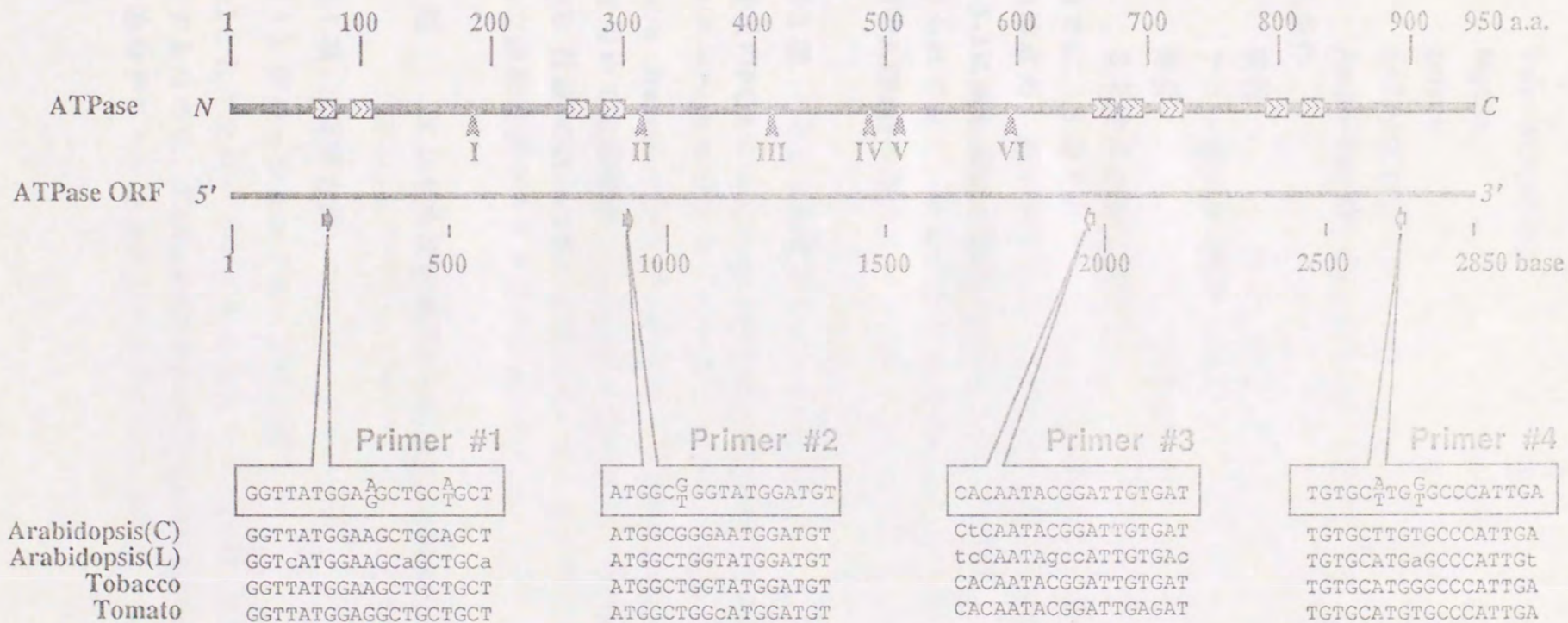


Fig. 5-2. Design of PCR primers for ATPase cDNA cloning.

☒ : Transmembrane regions.

▲ : Functional domains (see Table 5-1)

Tris · HCl(pH8.3)	10mM
MgCl ₂	1.5mM
gelatin	0.01%(w/v)
dATP/dCTP/dGTP/dTTP	各0.2mM
Ampli-Taq DNA polymerase	5units

反応条件

変性	95℃、30秒
アニーリング	55℃、1分
伸長	72℃、2分
3 2 サイクル	

実験では、3通りのプライマーの組み合わせについてPCRを実施した。反応後の溶液の一部をアガロース電気泳動にかけ、増幅DNA断片を調べた結果をFig.5-3に示した。プライマー#2と#4の組み合わせにおいてのみ増幅断片が得られており、泳動距離からその増幅断片の長さは1.7kbpと計算され、他の植物ATPaseの場合とよく一致するサイズであった。

第3項 PCR増幅断片のクローニング

前項のPCRによって唯一得られた増幅断片を解析するために、プラスミドベクターへのサブクローニングを実施した(Fig.5-4)。このPCR増幅断片をKlenow fragment(TAKARA社製)およびT4 polynucleotide kinase(TAKARA社製)を用いて末端修復し、プラスミドベクター pBlueScript SK(-) (STRATAGENE 社製)のHincII部位に挿入し、これを大腸菌XL1-Blue株に導入した。得られた組換えプラスミドを以下pc2と呼ぶ。

第3節 エンドウ原形質膜H⁺-ATPase cDNAの構造解析

第1項 実験方法

(1) デリションクローニングの作成

pc2としてクローニングされたエンドウcDNAの塩基配列を全長にわたって解析するために、TAKARA社製Kilo-Sequencing用Deletion Kitに準拠した方法で一連のデリションクローニングを作成した(Fig.5-5)。

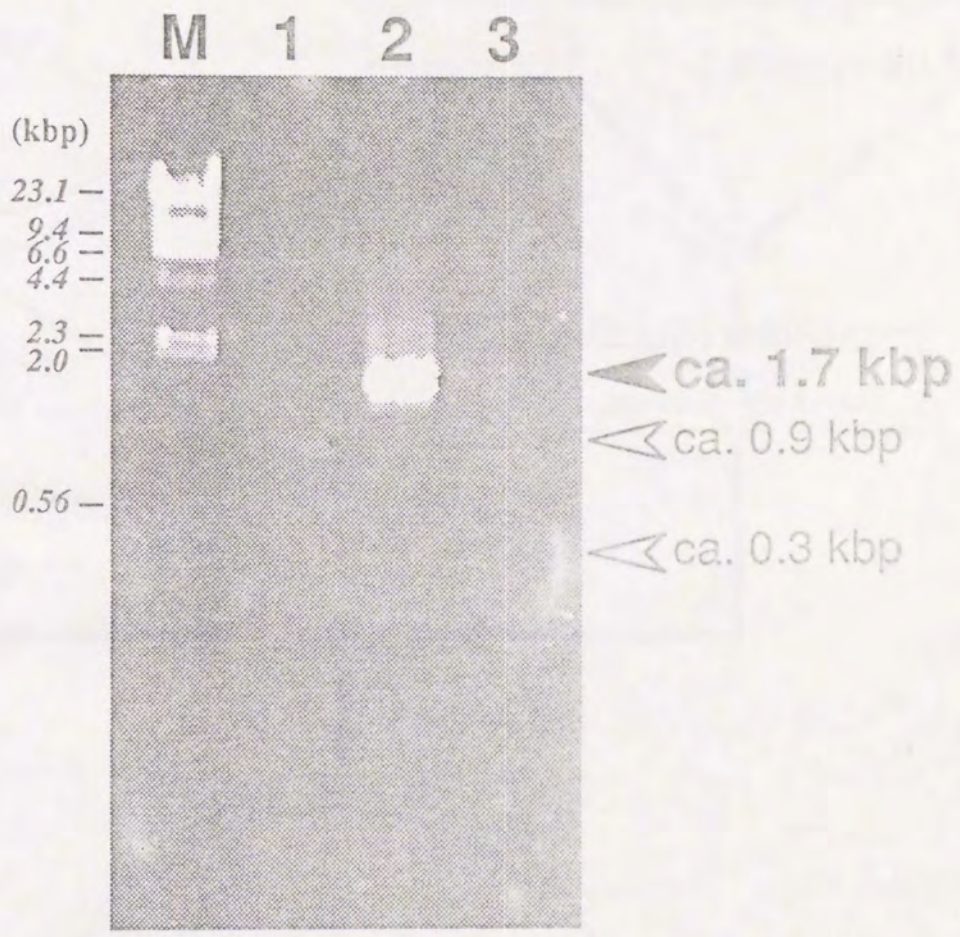


Fig.5-3. Amplified DNA fragments by PCR.

- Lane M: Molecular weight marker (λ / HindIII),
- Lane 1: Amplified with primer #2 and #3,
- Lane 2: Amplified with primer #2 and #4,
- Lane 3: Amplified with primer #1 and #4.

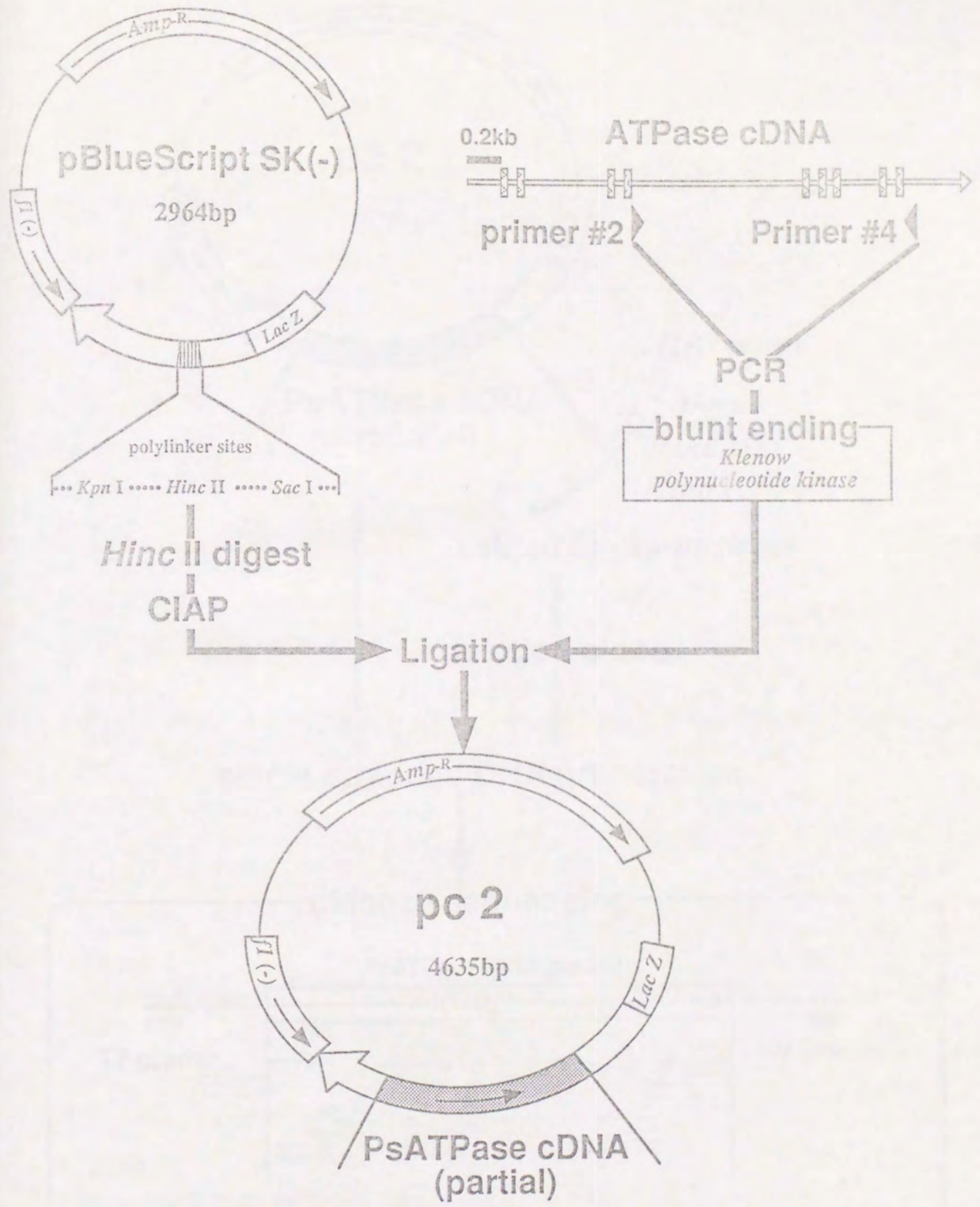


Fig. 5-4. Cloning strategy of PsATPase cDNA.

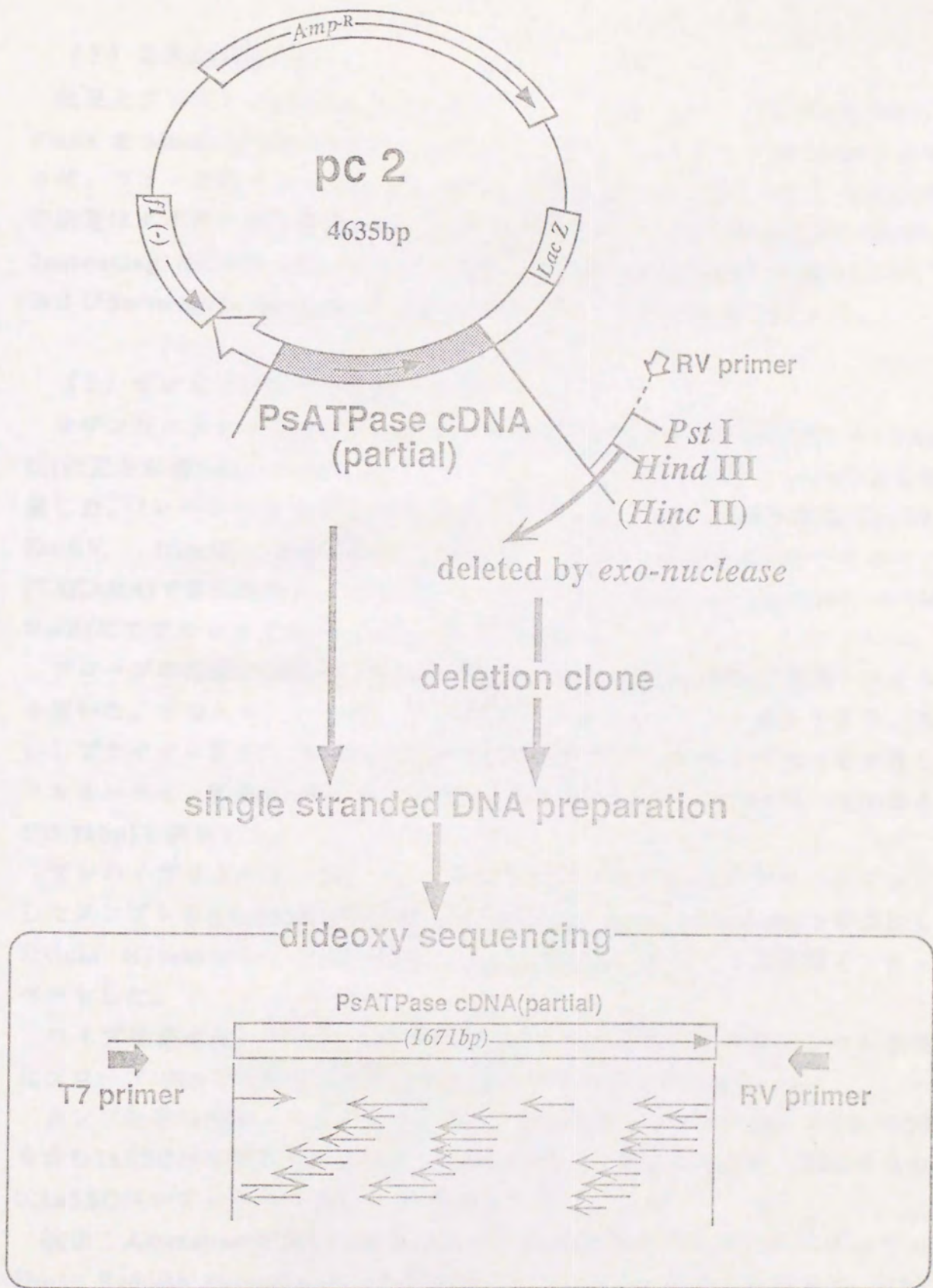


Fig. 5-5. Sequencing strategy of PsATPase cDNA.

(2) 塩基配列の決定

組換えプラスミドpc2および一連のデリーションクローンの形質転換体に、Vieira & Messing(1987)の方法に準拠して、ヘルパーファージM13KO7を感染させ、ファージ粒子より抽出した組換え一本鎖DNAを鋳型とした。塩基配列の決定はダイデオキシ法(Sanger *et al.* 1977)で行い、TAKARA社製7-DEAZA Sequencing Kitを用いた。シーケンス結果の解析は、HITACHI社製DNASIS™およびSoftware Development社製GENETYX™のプログラムを使用した。

(3) ゲノミックサザン分析

サザンプロットニング：Murray & Thompson(1980)の方法を改変したCTAB法(渡辺&杉浦(eds) 1989)に基づいて、エンドウ胚軸よりゲノミックDNAを調製した。1レーンあたり30 μ gのエンドウゲノミックDNAを制限酵素[EcoRI, EcoRV, HincII, HindIII]にて各々消化し、1% SeakemGTGアガロース(TAKARA)で電気泳動し、ナイロンメンブレンHybond-N⁺(Amersham)へ0.4M NaOHにてアルカリプロットニング(Reed & Mann 1985)した。

プローブの作成：プローブDNAの標識は、Amersham社製ECL標識システムを用いた。すなわち、pc2クローンを鋳型として、プライマー#2と#3、ないしプライマー#3'(#3プライマーの相補鎖)と#4を使ってPCRを実施し、フルオレセイン修飾dUTPを取り込ませた2種類のプローブDNA(約1 kbpおよび0.7kbp)を調製した。

プレハイブリダイゼーション：エンドウゲノミックDNAをプロットニングしたメンブレンを0.5M NaClと5%(w/v) Blocking agent(Amersham)とを添加したGold Hybridization Buffer(Amersham)に浸漬し、42℃にて3時間インキュベートした。

ハイブリダイゼーション：その後、上記の通り調製したフルオレセン標識化プローブDNAを添加し、42℃にて1晩インキュベートした。

メンブレンの洗浄：ハイブリダイゼーション後のメンブレンは、0.1% SDSを含む1xSSCバッファー中で60℃・15分間洗浄し、さらに、0.1% SDSを含む0.1xSSCバッファー中で60℃・15分間洗浄した。

検出：Amersham社製ECL検出システムに添付のプロトコールに従って、Horse Raddish Peroxidase[HRP]標識抗フルオレセイン抗体と反応させ、HRPの基質溶液を処理し、化学発光を起こさせ、Amersham社製検出フィルムHyperfilm-ECLにて20分間露光した後に現像した。

第2項 結果および考察

(1) エンドウH⁺-ATPase遺伝子の塩基配列および推定アミノ酸配列

Fig.5-5に塩基配列決定のストラテジー、Fig.5-6に決定された塩基配列および推定アミノ酸配列を示し、Fig.5-7に他種植物のH⁺-ATPaseのアミノ酸配列と比較した結果を示す。今回決定できた塩基配列は1691塩基(そのうち35塩基のプライマー部分を含む)であり、アミノ酸配列は563残基(そのうち11残基はプライマー部分)である。他種植物のH⁺-ATPase遺伝子ではアミノ酸約950残基からなることを考慮すると、約60%に相当する部分の配列を明らかにできた。

pc2としてクローニングされたエンドウcDNAの塩基配列および推定されるアミノ酸配列は、シロイヌナズナ、タバコ、トマト、イネのそれらと比較すると、アミノ酸配列で79~86%、塩基配列で73~76%の高い相同性を示した。さらに、Serrano(1989)が提唱するP-typeATPaseの活性部位とみられる6つの保存配列のうち、Fig.5-6中でボックス標記した4つが所定の位置に見い出され、C端側の第5~第9膜貫通領域と考えられる疎水性領域も観察された。これらのことはpc2クローンはエンドウ原形質膜ATPaseのcDNAの1つであることを強く示唆している。

Table5-3に現在までに、配列が明らかにされている植物H⁺-ATPase遺伝子および酵母*Saccharomyces cerevisiae*、分裂酵母*Schizosaccharomyces pombe*、赤パンカビ*Neurospora crassa*のH⁺-ATPase遺伝子とのホモロジー解析の結果を示し、それらの結果に基づいて描いたホモロジー樹系図をFig.5-8に示した。

(2) ゲノミックサザン分析

プライマー#2と#3にて増幅される約1kbpのDNA断片をプローブとして実施した結果をFig.5-9(a)に、また、プライマー#3'と#4にて増幅される約0.7kbpのDNA断片をプローブとして実施した結果をFig.5-9(b)に示した。

処理した制限酵素の種類によって検出されたバンドの数に違いが見られたが、両プローブとも5~10本のバンドが認められた。0.7ないし1kbpの比較的長いプローブを用いたため1つの遺伝子を複数のバンドとして検出している可能性やH⁺-ATPase遺伝子との相同性が高い他の遺伝子をも検出している可能性などエンドウH⁺-ATPase遺伝子について検出された結果がすべて独立したH⁺-ATPase遺伝子であると断定することはできないが、シロイヌナズナやタバコでは少なくとも3種のH⁺-ATPase遺伝子が存在すること(Harper *et al.* 1990,

		primer #2----->			
1	ATG GCT GGT ATG GAT GTA CTT TGC AGT GAC AAG ACT GGT ACA CTT ACA CTT AAC AAG CTG				60
1	M A G M D V L C S	D K T G T L T		L N K L	20
61	AAT GTT GAC AAG AAC TTG ATA GAG GTC TTT GAA AAG GGT AGT GGA CAA GAA CAT GTT ATG				120
21	N V D K N L I E V F E K G S G Q E H V M				40
121	CTT CTT GCT GCA AGG GGT TCC AGG ATT GAA AAC CAG GAT GCC ATA GAT GCC GCC ATT GTT				180
41	L L A A R A S R I E N Q D A I D A A I V				60
181	GGA ACT CTA GCT GAT CCA AAA GAG GCA AGG GCT GGA GTA AGA GAG ATT CAT TTC TTA CCA				240
61	G T L A D P K E A R A G V R E I H F L P				80
241	TTC AAT CCC GTG GAT AAG AGA ACT GCC TTG ACT TAC ATT GAT AGC AAT GGA AAT TGG CAC				300
81	F N P V D K R T A L T Y I D S N G N W H				100
301	CGT GCA AGC AAA GGT GCT CCA GAG CAG ATC ATG AAC CTG TGT AAC CTT AGG GAA GAT GCA				360
101	R A S K G A P E Q I M N L C N L R E D A				120
361	AAG CGG AAC ATC CAT GCT ATT ATT GAC AAG TTT GCA GAG AGA GGT CTT CGT TCT CTT GCT				420
121	K R N I H A I I D K F A E R G L R S L A				140
421	GTT TCT AGA CAG GAG GTT CCT GAG AAA ACT AAA GAA AGT GCT GGT GGT CCT TGG CAG TTT				480
141	V S R Q E V P E K T K E S A G G P W Q F				160
481	GTT GGT TTG TTG TCA CTG TTT GAC CCA CCT AGG CAT GAC AGT GCT GAA ACT ATT CGG AGA				540
161	V G L L S L F D P P R H D S A E T I R R				180
541	GCT CTT CAT CTT GGT GTC AAT GTT AAG ATG ATT ACT GGT GAT CAA CTT GCC ATA GCA AAG				600
181	A L H L G V N V K M I T G D Q L A I A K				200
601	GAG ACT GGG AGG AGA CTT GGG ATG GGA ACT AAT ATG TAC CCA TCT GCT ACC TTG CTT GGA				660
201	E T G R R L G M G T N M Y P S A T L L G				220
661	CAA GAC AAA GAT GCG AGT ATT GCT GCA CTT CCA GTT GAA GAG CTG ATT GAG AAG GCA GAT				720
221	Q D K D A S I A A L P V E E L I E K A D				240
721	GGA TTT GCT GGA GTA TTT CCA GAG CAC AAA TAT GAA ATT GTA AAG AAG TTG CAA GAA AGG				780
241	G F A G V A E I V K K L Q E R				260
781	AAA CAC ATT TGT GGA ATG ACT GGA GAT GGT GTC AAC GAT GCT CCA GCT TTG AAG AAG GCC				840
261	K H I C G M T G D G V N D A P A L K K A				280
841	GAT ATT GGA ATC GCT GTT GCC GAT GCT ACG GAT GCC GCA AGA GGT GCT TCT GAT ATT GTC				900
281	D I G I A V A D A T D A A R G A S D I V				300
901	CTC ACA GAA CCT GGA TTG AGT GTT ATC ATC AGT GCA GTC TTA ACT AGT AGG GCT ATT TTC				960
301	L T E P G L S V I I S A V L T S R A I F				320
961	CAA AGG ATG AAA AAC TAC ACG ATC TAT GCA GTA TCT ATC ACT ATC CGT ATA GTG TTT GGC				1020
321	Q R M K N Y T L Y A V S I I I R I V F G				340
1021	TTC ATG TTC ATT GCA CTG ATA TGG AAA TTT GAC TTT CCG CCC TTT ATG GTG CTT ATT ATT				1080
341	F M F I A L I W K F D F P P F M V L I I				360
1081	GCC ATC CTA AAT GAT GGT ACT ATT ATG ACG ATA TCA AAA GAT AGG GTG AAA CCA TCG CCT				1140
361	A I L N D G T I M T I I A K D R V K P S P				380
1141	CTT CCA GAT AGC TGG AAG CTA TCC GAG ATA TTT ACT ACT GGA GTT GTG CTT GGT AGT TAC				1200
381	L P D S W K L S E I F T T F V V I G S Y				400
1201	TTC GCA ATG ATG ACA GTT ATA TTC TTC TGG CAC GCA TAT AAA ACA GAT TTT TTC CCG AAA				1260
401	F A M M T V I F F W H A Y K T D F F P K				420
1261	GTG TTT GGA GTT GCG ACT CTT GAA AAA AAC GCA CAC GAT GAT TTC CGA AAA CTC GCC TCT				1320
421	V F G V A T L E K N A H D GAT TTC CGA AAA CTC GCC TCT				440
1321	GCA ATC TAT CTT CAA GTG AGC ACT ATT AGT CAG GCA CTT ATA TTT GTT ACT CGA TCA CGA				1380
441	A I Y L Q V S T I S Q A L I F V T R S R				460
1381	GGT TGG TCG TAT GTC GAG CGT CCC GGT TTA TTG CTG GTT GCT GCC TTT ATT GTC GCT CAA				1440
461	G W S Y V E R P G L L L V A A F I V A Q				480
1441	CTT ATT GCA ACT TTG ATT GCG GTT TAT GCT AGC TGG AGT TTC GCC GCA ATT GAA GGA ATA				1500
481	L I A T L I A V Y A S W S F A A I E G I				500
1501	GGT TGG GGT TGG GCT GGT GTT ATA TGG CTA TAC AAC ATA ATA TTC TAT ATC CCG CTC GAT				1560
501	G W G W A G V I W L Y N I I F Y I P L D				520
1561	TTC ATT AAA TTT TTC ACT CGC TAT GCT TTG AGC GGA AGG GCT TGG GAT CTT GTC ATT GAG				1620
521	F I K E F T R Y A L S G R A W D L V I E				540
1621	CAA AGG ATT GCT TTC ACA AGG CAA AAG GAT TTC GGC AAG GAA CAA AGG GAG CTT CAA TGG				1680
541	Q R I A F T R Q K D F G K E Q R E L Q W				560
	---primer #4				
1681	GCC CAT GCA CA				1691
561	A H A				563

Fig. 5-6. Partial nucleotide and amino acid sequences of PsATPase cDNA.

II-VI: Functional motifs, 5-9: Transmembrane regions.

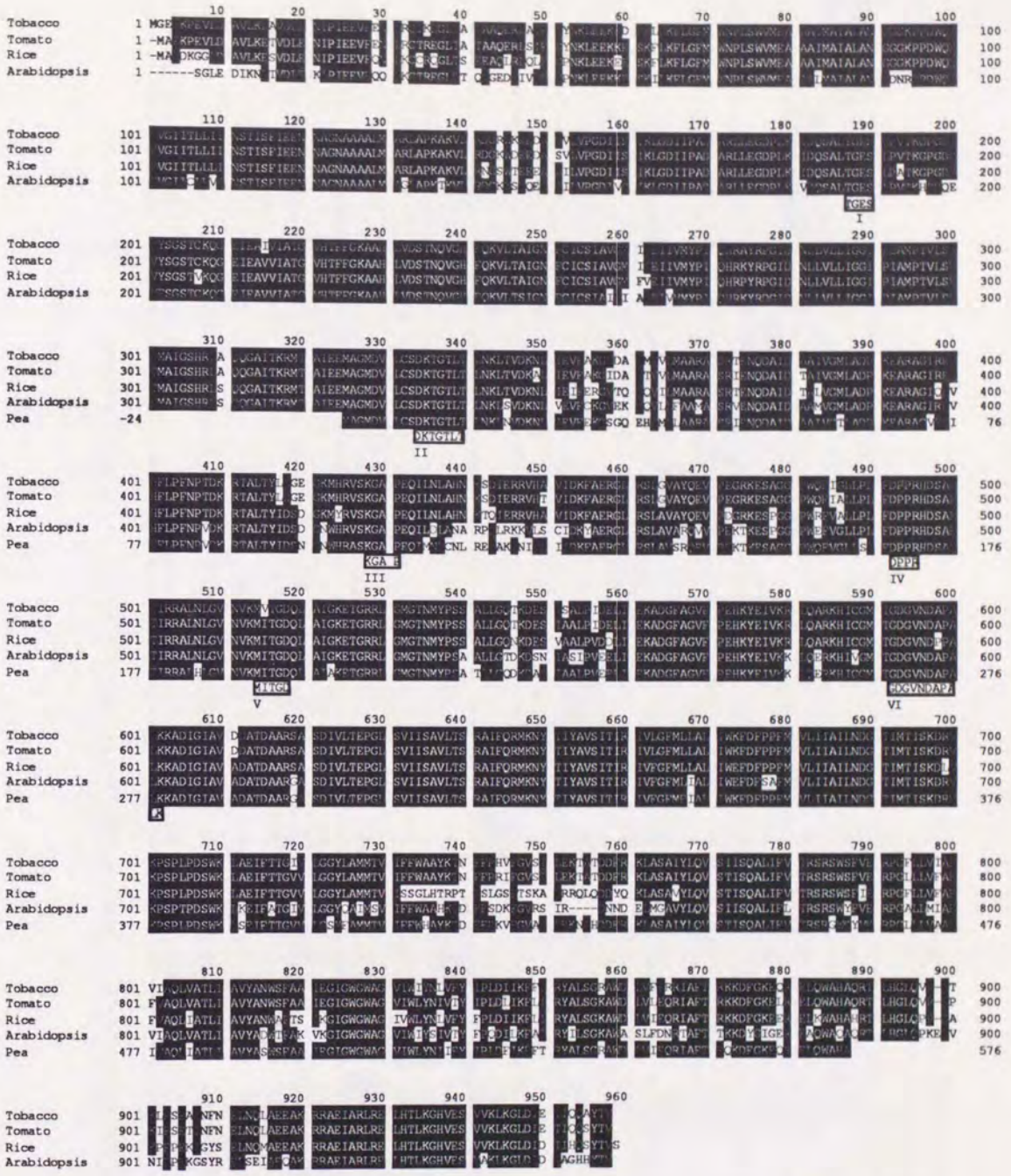


Fig.5-7. Alignment of amino acid sequences of Plant H⁺-ATPases.

Tobacco: PMA1(Perez *et al.* 1992), Tomato: LHA1(Ewing *et al.* 1990), Rice: OSA1(Wada *et al.* 1992), Arabidopsis: AHA1(Harper *et al.* 1989) and Pea : PsATPase in this chapter. Reversed characters indicate conserved residues of more than three kinds of plant H⁺-ATPases.

Table 5-3. Homology of ATPases based on cDNA and amino acid sequences

Organism		Pea	Arabidopsis			Tomato	Rice	Tobacco				<i>N. crassa</i>	<i>S. cerevisiae</i>	<i>S. pombe</i>
	gene	PsATPase	AHA 1	AHA 2	AHA 3	LHA 1	OSA 1	PMA 1	PMA 2	PMA 3	PMA 4	NC-1	PMA 1	PMA 1
	a.a.	563	948	947	948	956	957	957	956	954	952	920	918	919
	bases	1691	2850	2847	2850	2871	2871	2874	2871	2871	2859	2763	2757	2760
Pea	PsATPase	100	78.5	79.5	79.8	85.8	80.3	85.6	85.1	85.6	80.2	33.4	35.5	36.4
Arabidopsis	AHA 1	72.9	100	94.2	87.7	80.0	79.2	80.1	80.5	80.0	88.2	36.2	36.2	37.6
	AHA 2	73.3	89.0	100	88.5	81.3	80.0	80.8	81.8	81.2	88.4	36.4	36.0	38.1
	AHA 3	72.9	77.7	79.5	100	79.7	78.9	79.5	80.3	79.5	85.9	37.1	35.9	37.3
Tomato	LHA 1	75.3	70.8	72.1	71.6	100	87.8	95.9	96.1	97.3	80.5	35.0	35.6	36.0
Rice	OSA 1	74.0	72.1	72.2	72.9	76.9	100	86.7	87.4	87.6	79.3	35.1	35.6	35.9
Tobacco	PMA 1	75.5	71.8	72.2	72.1	88.8	76.9	100	95.9	96.2	80.6	34.5	35.6	36.0
	PMA 2	75.9	71.9	72.9	72.4	89.5	76.7	90.2	100	95.7	81.8	34.9	35.7	36.4
	PMA 3	76.0	71.3	72.4	71.6	94.3	77.1	90.0	90.4	100	80.3	35.6	36.4	36.5
	PMA 4	74.1	77.1	78.5	76.7	72.3	72.7	72.3	72.7	72.1	100	37.1	35.9	35.7
<i>N. crassa</i>	NC-1	49.4	50.6	50.7	50.6	48.0	51.2	49.4	49.1	49.7	50.2	100	75.2	74.7
<i>S. cerevisiae</i>	PMA 1	52.5	52.0	52.9	52.2	51.3	52.1	51.5	52.8	52.0	52.7	68.4	100	73.3
<i>S. pombe</i>	PMA 1	49.5	51.4	51.7	51.5	50.9	51.0	51.1	51.0	50.0	51.1	71.4	71.8	100

Right-upper parts are pair of amino acid sequences.
Left-lower parts are pair of amino acid sequences.

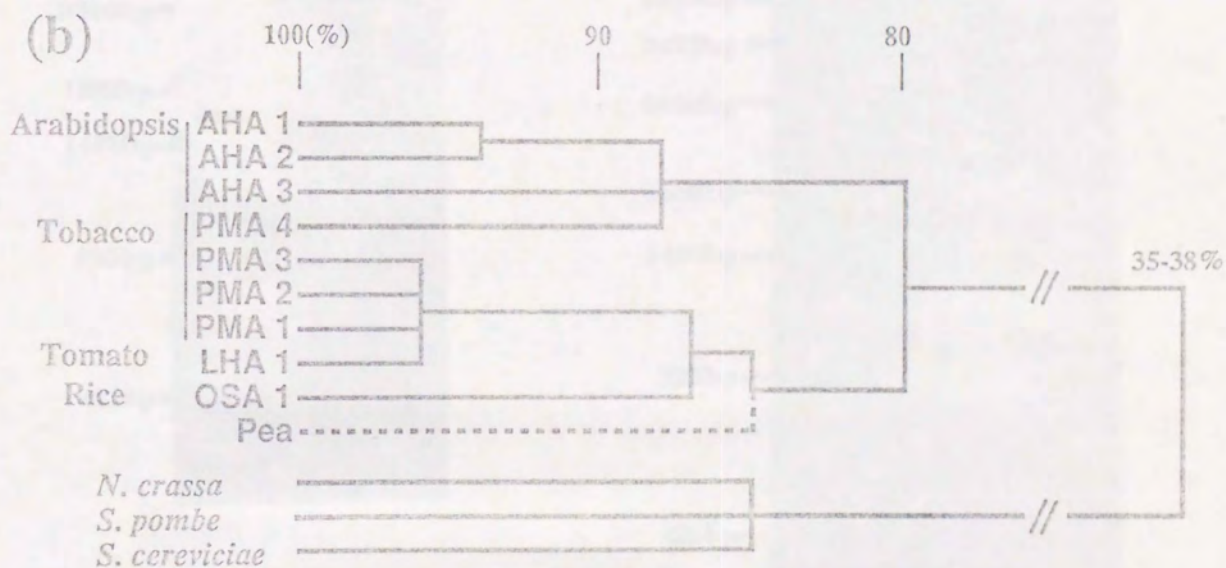
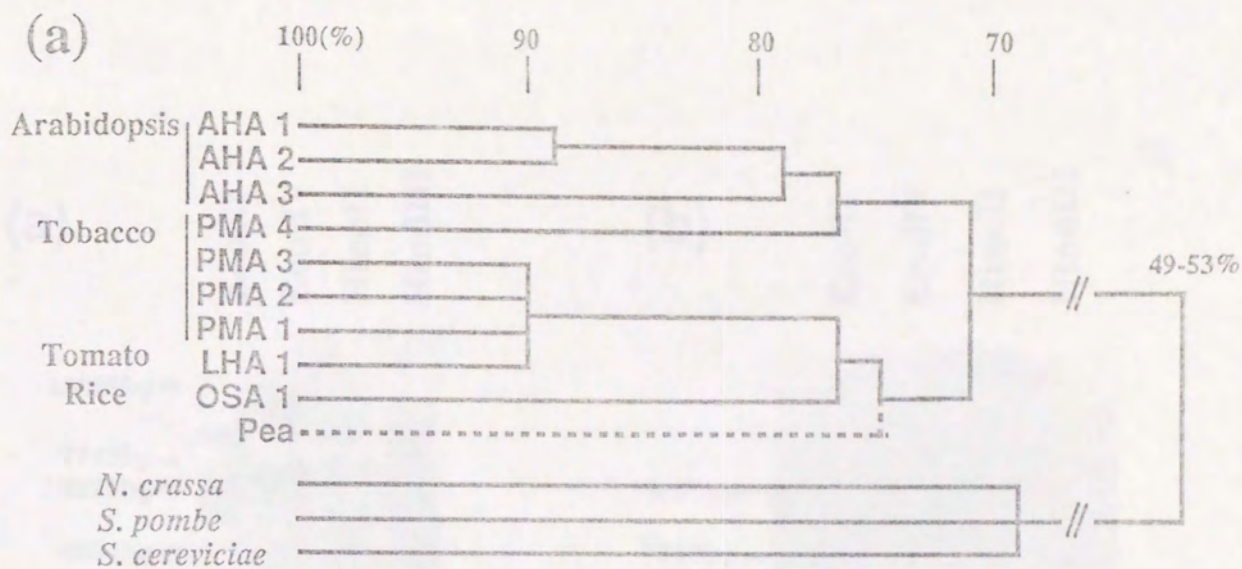


Fig.5-8. Homology tree cluster of nucleotide sequences(a) and amino acid sequences(b) of plant H^+ ATPases.

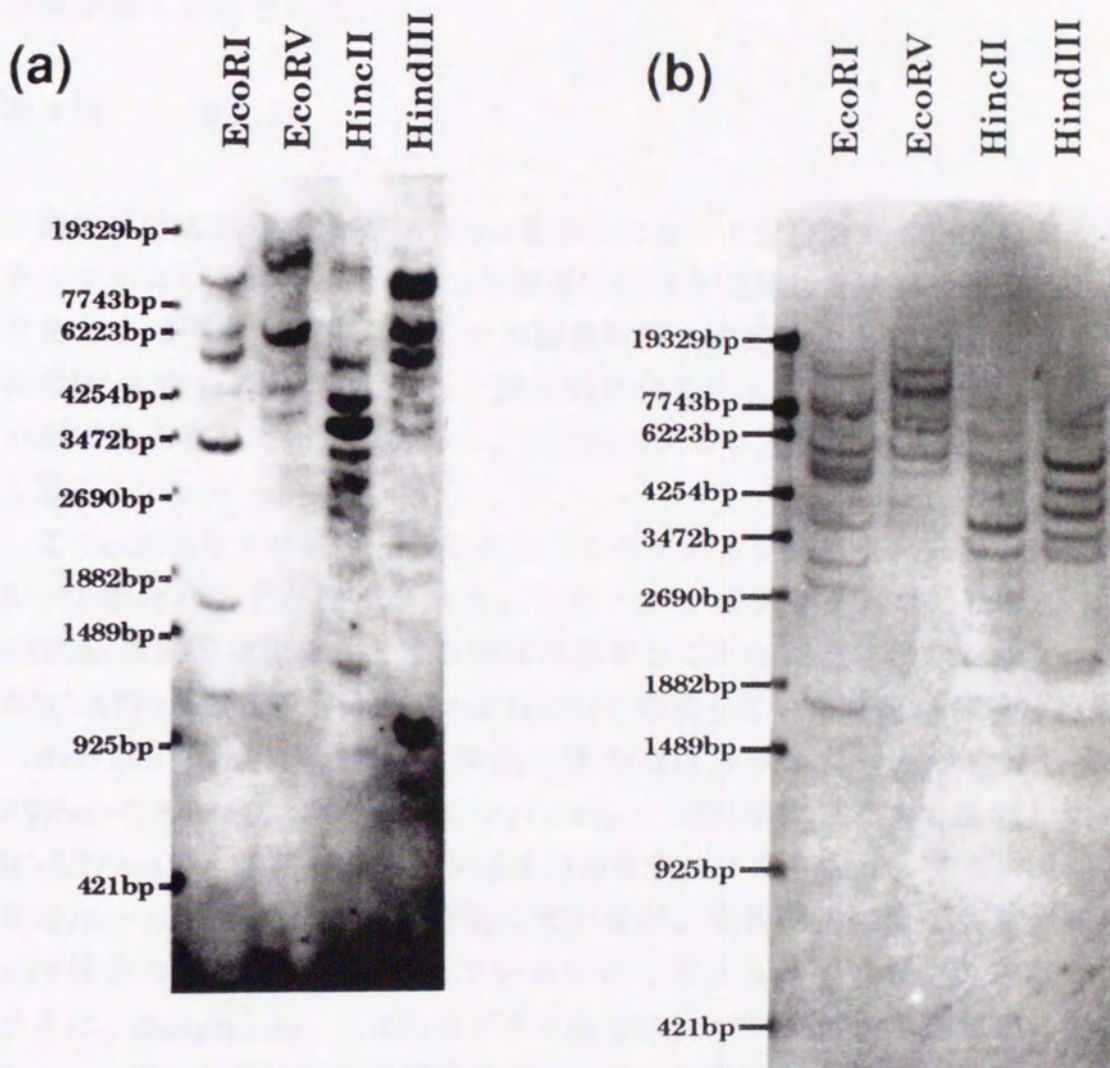


Fig. 5-9. Results of genomic Southern analysis.
 (a):1kbp DNA fragment, amplified with primer #2 & #3, as the probe,
 (b):0.7kbp DNA fragment, amplified with primer #3' & #4, as the probe.

Perez *et al.* 1992)や、トマトのH⁺-ATPase cDNAを用いたサザン分析によって、ATPase遺伝子と相同性の高い他のイオンポンプをコード遺伝子をも検出している可能性を指摘しているものの、6~8個のバンドが検出されている(Ewing *et al.* 1990)。エンドウH⁺-ATPase遺伝子もmulti-gene familyを形成している可能性が強く示唆された。

第4節 まとめ

高等植物の原形質膜H⁺-ATPase遺伝子において保存されている塩基配列をプライマーとし、エンドウcDNAを鋳型にPCRを実施した結果、予想通りの大きさを示す増幅断片が得られ、その塩基配列を決定したところ、他種の高等植物のH⁺-ATPase遺伝子とアミノ酸配列で80%以上、塩基配列で75%程度と高い相同性を有していたことから、本cDNAがエンドウのH⁺-ATPaseであるものと推定した。

このcDNAをプローブとしてエンドウのゲノミックサザン分析を行った結果、5~10個のバンドが検出された。シロイヌナズナやタバコでは原形質膜H⁺-ATPase遺伝子は少なくとも3種は存在することが報告されており、エンドウのH⁺-ATPase遺伝子もmulti-gene familyを形成している可能性が示された。

Serrano(1989)は、他のATP結合性の蛋白分子の構造を参考にして、H⁺-ATPaseのATP結合ドメインについてFig.5-10に示すモデルを提唱している。H⁺-ATPaseのATP結合ドメインは4つのモチーフからなり、アミノ酸配列の上では20~70残基毎に離れて存在しているが、立体構造ではそれらが隣接してATP結合のポケットを形成しているものと考えられている。第3章で述べたように、Supprescin Bのペプチド部分にはATPase活性を拮抗的に阻害するSer-Ser-Glyと非拮抗的に阻害するAsp-Gluとが存在することを考慮すると、ATPaseに対する作用としてはFig.5-11(a)に示すモデルが考えられる。つまり、ATP結合のポケットにGal-GalN Ac-Ser-Ser-Glyが入り込み、さらにAsp-Glu-Thrは隣接すると思われるフォスファターゼドメイン(motif I)と何らかの相互作用を持つというモデルが想定できる。

一方、H⁺-ATPase分子のATP結合部位と予測されているドメインに存在するAsp残基は、ATPとの結合において中心的な役割を果たしていると考えられており(Serrano 1989)、また、それらのドメインにはSupprescin B分子に見い出されたGly-Asp配列が複数個存在することなどから、サプレッサー分子が、

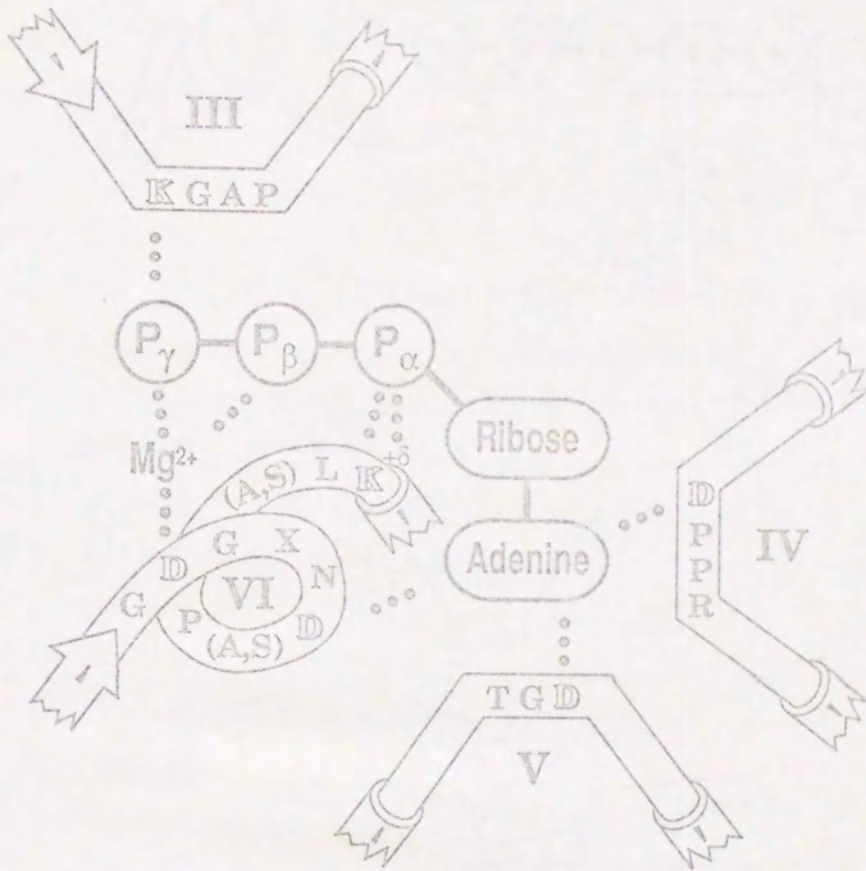
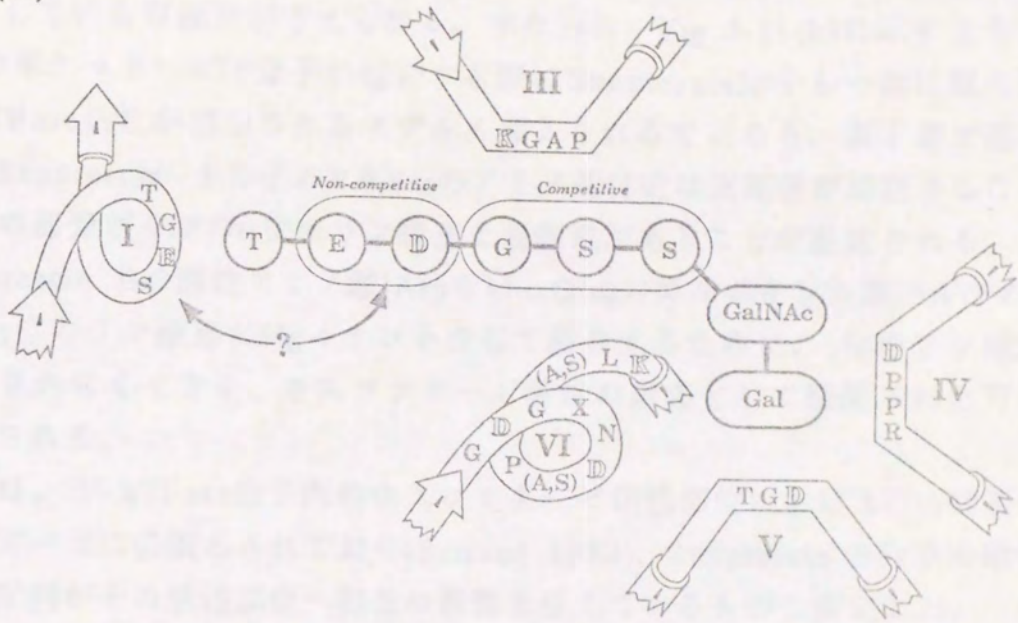


Fig. 5-10. Hypothetical ATP-binding site of ATPases (Serrano 1989).

Roman numbers III to VI correspond to the conserved motifs(see Table 5-1).
Arrows and cylinders represent stands of β -sheets and α -helices, respectively.

(a)



(b)

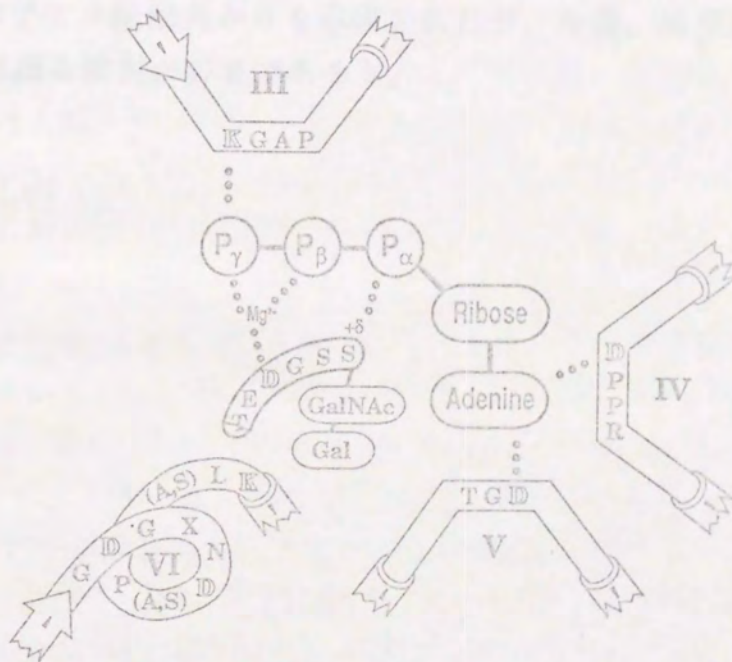


Fig. 5-11. Hypothetical mode of action of Suppressin on the ATPase.

Roman numbers III to VI correspond to the conserved motifs(see Table 5-1).
Arrows and cylinders represent stands of β -sheets and α -helices, respectively.

ATP分子との直接結合ないし H^+ -ATPase分子中のATP結合のポケット形成の攪乱を起こしている可能性が考えられる。すなわち、Fig.5-11(b)に示すように、ATPaseのポケットへATP分子が結合する際にSupprescin分子も一緒に取り込まれ、ATPase活性が阻害されるモデルも考えられるであろう。第1章で述べたようにSupprescin B分子のN末Serのアミノ基付近は正電荷が局在することから、その部分がATPの α 位のリン酸基と親和性があることが推定される。また、Supprescin Bの酸性アミノ酸(AspないしGlu)のカルボキシル基がATPの β 位および γ 位のリン酸基とMgイオンを介して結合するために、 γ 位のリン酸が加水分解されにくくなり、ホスファターゼ活性の阻害として観測された可能性が想定される。

あるいは、 H^+ -ATPase分子内のホスファターゼ活性部位におけるGlu残基はホスファターゼに必須とされており(Serrano 1989)、Supprescin B分子の酸性アミノ酸配列がその活性部位へ相当の影響を与えているものと推定した。

以上のように、 H^+ -ATPase分子とSupprescin B分子との直接的な結合の可能性が H^+ -ATPaseのアミノ酸配列からも示唆されたが、今後、精製 H^+ -ATPase蛋白を用いたより詳細な検討が必要であろう。

第6章 総合考察および結論

植物は諸々の微生物による攻撃から身を守るために様々な防御機構を備えている。植物の防御反応は、菌の細胞壁の分解物など、菌が植物に感染する際におそらく必然的に生じる"引金"物質(エリシター)を植物が認識して能動的に誘起されるものと思われる。では、このようにエリシターを生産する病原菌が、何故、宿主植物に感染できるのであろうか。Oku *et al.* (1977)は、エンドウ褐紋病菌について、エリシターが存在するにも拘らず、菌がエンドウの防御反応の起動を抑制し、感染に成功していることを突き止め、そのような役割を担う物質をサプレッサーと定義した。その後、エンドウ褐紋病菌以外の植物病原菌についてもサプレッサーの存在が報告され(Doke 1975, Heath 1981, Kessman & Barz 1986, Ziegler & Pontzen 1982, Oku *et al.* 1987, Storti *et al.* 1988, Kodama *et al.* 1989)、サプレッサーが病原菌の病原力(広義)や宿主特異性の決定に重要な因子であると考えられるようになった(Shiraishi *et al.* 1991b)。しかしながら、いずれのサプレッサーも単離・精製に成功してはならず、その化学構造は不明であり、作用機構の詳細を明らかにすることができてはいなかった。

エンドウ褐紋病菌サプレッサーの生理作用については、1)菌が寄生できる植物種に限って認められ(Oku *et al.* 1980)、2)ファイトアレキシンと呼ばれる抗菌性物質の蓄積阻害(Oku *et al.* 1977)などにより、本来病原性のない菌の感染をも許すようになること(Oku *et al.* 1980)、3)抵抗性反応に関与する一連の酵素の遺伝子発現を抑制(遅延)すること(Yamada *et al.* 1989, Yoshioka *et al.* 1990)が明らかにされている。病原菌が植物の防御反応の発現を回避するためには、(a)エリシターの認識・受容を妨げる、(b)防御反応に至る情報伝達過程を切断する、(c)防御遺伝子の発現を妨げる、(d)化学的・物理的障壁(特にファイトアレキシンや感染阻害因子など)の合成系そのものを阻害する、あるいは、(e)これら一連の抵抗反応を支える宿主細胞の基本的な代謝系を阻害する、といった能力を備えているものと考えられている(白石&山田 1993)。褐紋病菌サプレッサーのエンドウ組織に対する作用は、特に(b)と(e)の効果であろうと予測されており(Shiraishi *et al.* 1991b)、その作用点としては、4)原形質膜ATPaseである可能性が高いこと(Yoshioka *et al.* 1990, Shiraishi *et al.* 1991a)が推定されていた。本論文においては、エンドウ褐紋病菌胞子発芽液よりサ

プレッサーを単離・精製し、その化学構造を決定し、サプレッサー活性を担う化学構造の特定とサプレッサーの作用機作の解明を試みた。

本論文では、まず、第1章で褐紋病菌の胞子発芽液より2種類のサプレッサーを単離・精製し、そのこれらの化学構造を解析した。ついで、第2章および第3章では、精製サプレッサーおよびそれらのペプチド部分について検討を行い、続く第4章では、糖部分について検討した。さらに、第5章では、サプレッサーの第一次作用点と予測されているエンドウ原形質膜ATPaseの遺伝子に関する研究を行なった。これらの研究によって得られた知見を以下に列記する。

- 1-1) エンドウ褐紋病菌 *Mycosphaerella pinodes* OMP-1株の胞子発芽液より2種類のサプレッサーを精製し、それらの化学構造を以下のように決定した。

Suppresscin A: GalNAc-O-Ser-Ser-Gly

Suppresscin B: Gal(1→4)-GalNAc-O-Ser-Ser-Gly-Asp-Glu-Thr

- 1-2) 両Suppresscinともムチン型の糖ペプチドであり、そのペプチド部分は α ヘリックスの構造を有し、糖とペプチドはV字型に折れ曲がった特異な立体配座を保持しており、折れ曲がりの部分は強い正電荷を帯びていた。
- 2-1) 両Suppresscinとも、エンドウのファイトアレキシンであるピサチンの蓄積を有意に抑制し、さらに、混合で処理すると相加的な効果が認められた。
- 2-2) 両Suppresscinのペプチド部分(SSGおよびSSGDET)は、ピサチン蓄積を抑制する効果が認められ、合成ペプチドGDEとDETについてもその効果が認められた。
- 3-1) Suppresscin Bはエンドウ原形質膜ATPase活性を阻害した。Suppresscin Aは原形質膜ATPase活性を単独では阻害しなかったが、Suppresscin Bの阻害効果を低減させる効果が認められた。
- 3-2) 両Suppresscinのペプチド部分は、Suppresscin Bほど強くはないが、ATPase活性を阻害した。
- 3-3) サプレッサーのペプチド部分は、ATPase活性に対して拮抗的に作用するSSG配列および非拮抗的に作用するDE配列のように作用の異なる複数の活性部位が存在していた。

- 3-4) DE配列を有するペプチドは、酸性ホスファターゼ活性を阻害したことから、ATPaseのホスファターゼ部位へ作用していることが類推された。
- 4-1) Supprescinを構成する糖であるGal, GalNAcは、ともにサプレッサーによるピサチン蓄積抑制の効果を低減させた。
- 4-2) Gal, GalNAcはともにエンドウ原形質膜ATPase活性を阻害しなかった。
- 4-3) GalNAcは褐紋病菌のエンドウへの感染を阻害したが、Galにはその効果が認められなかった。
- 5-1) Supprescin Bは非親和性菌の感染を促進する効果が認められたが、Supprescin Aでは認められなかった。
- 5-2) Supprescin Bのペプチド部分のみでも感染が促進された。
- 6-1) エンドウ原形質膜ATPase遺伝子のcDNAの部分塩基配列を明らかにした。
- 6-2) エンドウゲノム中には、複数のATPase遺伝子ないし類似の遺伝子が存在することを明らかにした。

2種のサプレッサーは構造的に共通しているものの、サプレッサーとしての作用の点で違いが認められた。すなわち、ともにエンドウのファイトアレキシンであるピサチンの蓄積を有意に抑制するが、非親和性菌の感染を促進する効果およびエンドウ原形質膜のATPase活性を阻害する効果はSupprescin Bにのみ認められた (Table 6-1)。

また、サプレッサーのペプチド部分だけでサプレッサーとしての活性が認められたものの、もとのサプレッサーに比べて弱い活性であった。この事実は、サプレッサー分子の特異な立体構造がサプレッサー活性にとって重要であるとともに、標的分子への結合に糖部分、特にGalNAcも深く関与していることを物語っている。

Supprescin A および Bはピサチン蓄積の抑制に関しては相加的な作用を示し、さらに、この他にもサプレッサー活性を有する分子種が存在することから、実際の感染現場においては、複数種のサプレッサーが相加ないし相乗的に作用してより強力なサプレッサー活性が具現しているものと考えられるであろう。

本論文の総括として、褐紋病菌サプレッサーの作用機構に関する推定モデ

Table 6-1. Biological activities of two Suppresscins

Biological activity	Suppresscin A (Mr, 452)	Suppresscin B (Mr, 959)
Phytoalexin	↓	↓
<i>in situ</i>	— *	↓
ATPase	— *	↓
<i>in vitro</i>	— *	↓
Susceptibility	—	↑

*) Inhibit the activity in the concomitant presence of elicitor.

ルをFig.6-1~4に示し、以下に、各ケースごとに述べる。

【ケース1】：原形質膜ATPaseに対する直接作用 (Fig. 6-1)

サプレッサーのATPaseに対する作用は、ペプチド部分が担っていることを明らかにした。

第2章および第3章で述べたように、Supprescin Bは原形質膜ATPase活性を*in vitro*および*in situ*で阻害し、Supprescin Aは単独では顕著な阻害活性が認められないもののエリシターによって亢進するATPase活性増高を抑制し、かつSupprescin Bによる活性阻害を低減する活性が認められた。原形質膜ATPase活性に対する詳細な検討の結果、両Supprescinに共通したSer-Ser-Glyのアミノ酸配列がATPase活性を基質拮抗的に作用することから、サプレッサーはATPaseに対して直接的に作用することは明らかであり、Supprescin AはATPase活性阻害は起こさないが、そのペプチド配列によってATPase分子に結合しうる可能性が示唆された。さらに、Supprescin Bについて認められるATPase活性阻害は、Supprescin Bに存在するAsp-Gluのアミノ酸配列に因るATPase酵素分子のホスファターゼ活性部位への作用であることが推定された。

この結果は、P type ATPaseおよびホスファターゼの阻害剤であるオルトバナジン酸(Briskin 1990)が、エンドウ組織に対してサプレッサーとして作用する(Yoshioka *et al.* 1990, 1992a, 1992b)報告と合致する。しかしながら、オルトバナジン酸は、アズキ(Hattori & Ohta 1989)、ピーナッツ(Steffens *et al.* 1989)、ペチュニア(Hagendoorn *et al.* 1991)などの培養細胞に対してはエリシターとして作用するとしている。また、Hagendoorn *et al.*(1991)は、菌エリシターによるATPase活性阻害が細胞内のpH変化をもたらし、これが引き金となって抵抗反応が起動されると考察している。これとは逆に、Macri *et al.*(1983)は、*Cercospora beticola*毒素"CBT"がエンドウの原形質膜ATPase活性を阻害することを報告している。植物の原形質膜ATPaseは、成長、分化、物質の輸送などの基本的な代謝を支える"master enzyme"と考えられており(Serrano 1989)、ATPase活性の変化が動的抵抗性などの細胞応答の変化をもたらすことは容易に推測される。しかしながら、エリシターおよびサプレッサーないし宿主特異的毒素といった逆の作用を司る因子がともにATPase活性を抑制しているとの知見を説明するためにはそれぞれの系におけるATPaseの役割をより詳細に明らかにしていく必要がある。

原形質膜ATPaseの活性部位はエンドウ細胞質側に存在することから、実際

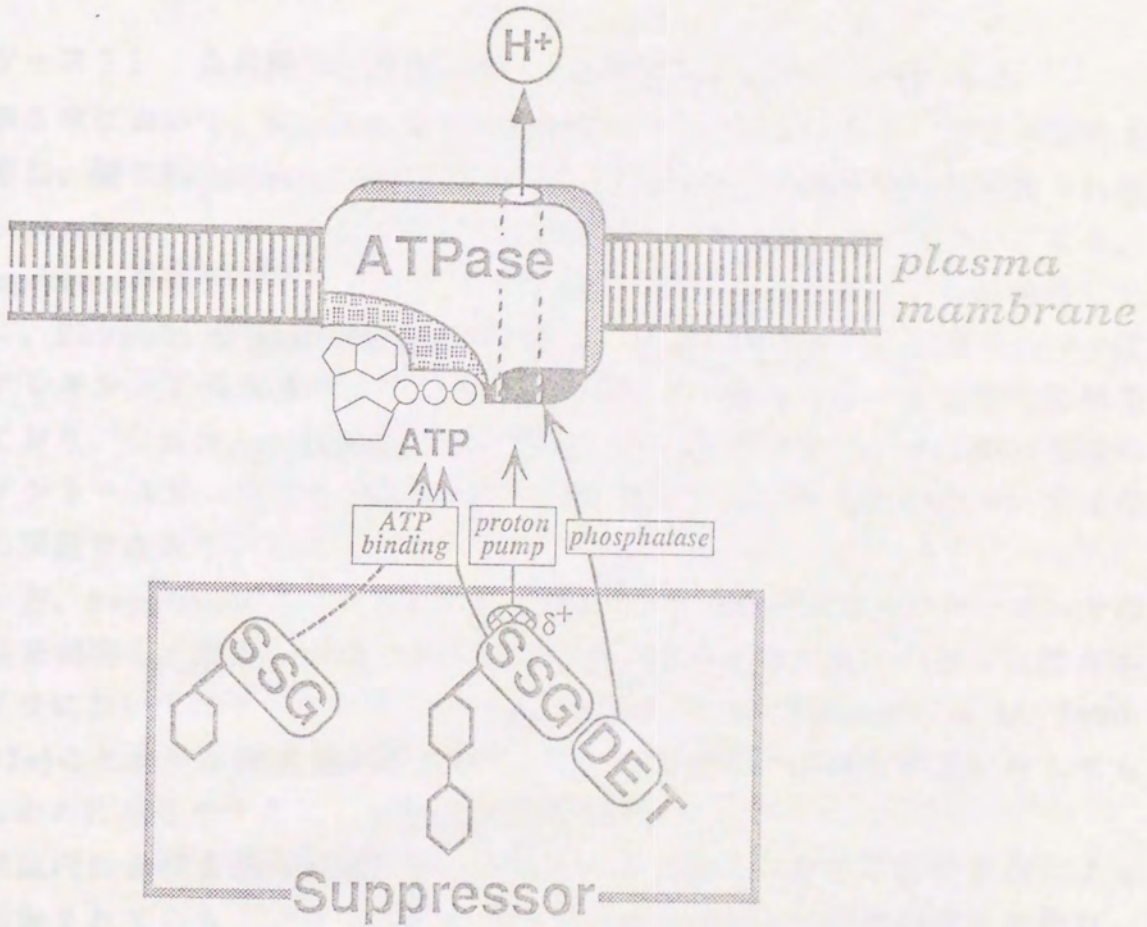


Fig. 6-1. Predicted action sites of suppressor -case 1-

の感染現場において、サプレッサーのATPaseの活性部位に対する直接的な作用を証明するためには感染組織におけるサプレッサーの局在を調べねばならないが、V字型の立体配座を有するSuppresscinの折れ曲がり部分は強い正電荷を帯びており、Suppresscinがエンドウ細胞内に存在した場合、プロトンポンプであるATPaseへと引き寄せられて、より効果的に作用する可能性も否定できない。

【ケース2】：蛋白質リン酸化／脱リン酸化反応への作用 (Fig. 6-2)

第3章において、Suppresscin Bは動物由来のプロテインキナーゼCの活性を阻害し、逆にSuppresscin Aは増高させることが、*in vitro*の実験で観察された。Suppresscin Aによる活性増高の意義については明らかではない。また、Suppresscinの部分ペプチドについてもPKCの活性を阻害することが判明した。既に、Shiraishi *et al.*(1990)およびToyoda *et al.*(1992)は、エンドウのファイトアレキシン蓄積の誘導にプロテインキナーゼが関与している可能性を報告しており、これがSuppresscinによる直接的な作用であるのか、あるいは後述のイノシトールリン脂質代謝系を介した間接的な作用であるのかについては今後の課題であろう。

一方、Suppresscin BにみられるAsp-Gluのアミノ酸配列はホスファターゼの活性を阻害し、また、ホスファターゼの阻害剤であるオルトバナジン酸がエンドウにおいてはサプレッサーと同様の効果を示した(Yoshioka *et al.* 1990, 1992a)ことから、サプレッサーがリン酸化蛋白質脱リン酸化酵素に対しても何らかの作用を有することが推定される。

細胞内における種々の蛋白質の活性は、リン酸化／脱リン酸化反応によって制御されている。プロテインキナーゼやホスファターゼの活性の変化は、リン酸化で制御されているATPase(Schaller & Sussman 1988, Serrano 1989)ばかりでなく、その他の細胞内シグナル伝達系に対しても多大な影響を引き起こしていることが推測される。

【ケース3】：ATPase以外の作用点を介した作用 (Fig. 6-3)

Suppresscinの糖鎖部分は、サプレッサーの特異な立体構造の保持ばかりでなく、ATPaseあるいはそれ以外の作用点への結合において重要な役割を果たしていることが示唆された。

Suppresscinを構成する糖(Gal, GalNAc)は、少なくとも*in vitro*では原形質膜

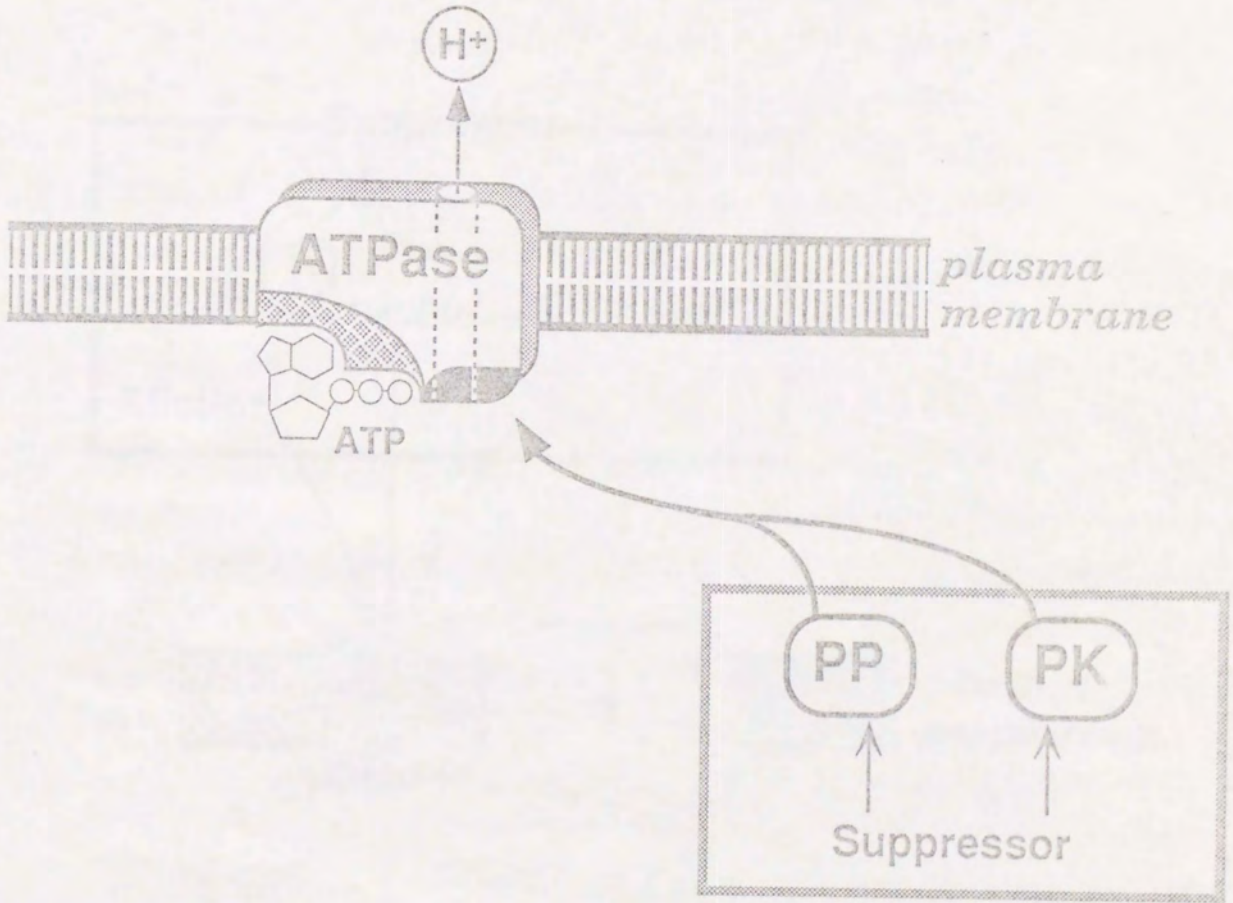


Fig.6-2. Predicted action sites of suppressor -case 2-.

PK: Protein kinase, PP: Phosphoprotein phosphatase.

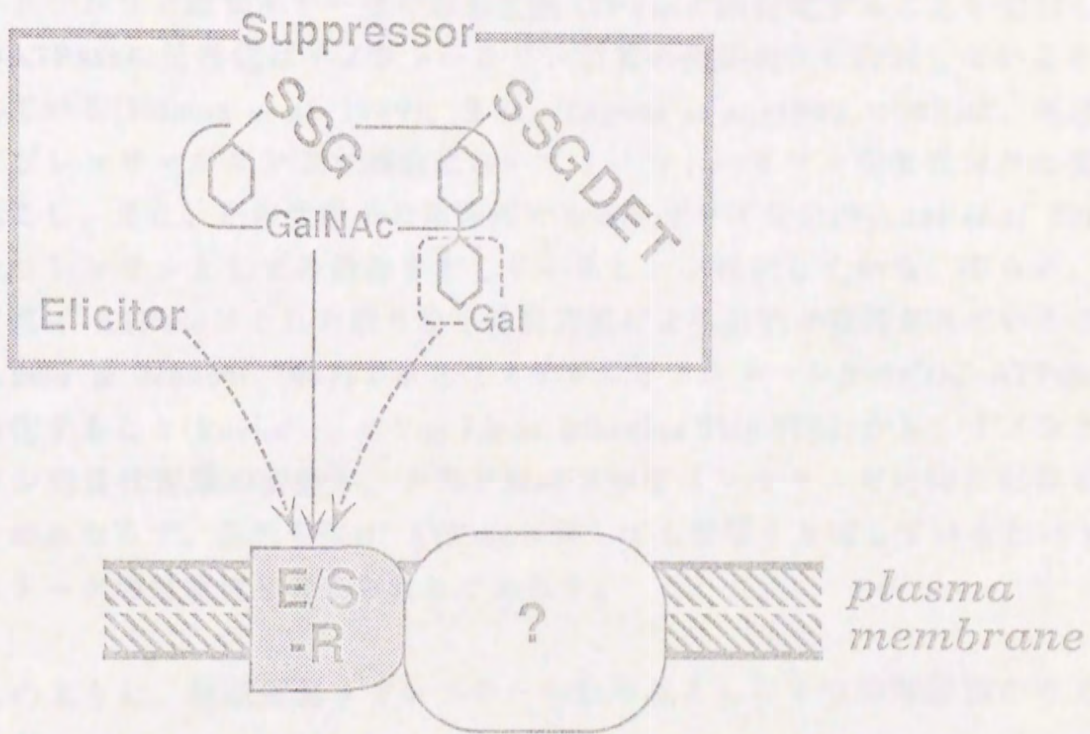


Fig.6-3. Predicted action sites of suppressor -case 3-.

E/S-R: Receptor of elicitor and suppressor.

ATPase活性に対して影響しない。しかしながら、Galはファイトアレキシン蓄積を促進し、かつサプレッサーによるファイトアレキシン蓄積を抑制する。また、GalNAcは、菌エリシターによるファイトアレキシン蓄積誘導およびサプレッサーによるその抑制を低減させる効果を有することが観察された。このことは、ATPaseやそれ以外の標的分子へのサプレッサーの結合や作用に関して、糖部分が深く関与していることを示唆している。

【ケース4】：イノシトールリン脂質代謝系に対する作用 (Fig. 6-4)

Chen & Boss(1990)は、ニンジン培養細胞を細胞壁分解酵素で処理するとイノシトールリン脂質キナーゼや原形質膜ATPaseが活性化することを報告し、このATPaseの活性化はイノシトールリン脂質の代謝変化に起因していると考えられている(Memon *et al.* 1989)。また、Toyoda *et al.*(1992, 1993)は、褐紋病菌サプレッサーがエンドウ細胞においてイノシトールリン脂質代謝系の変動を起こし、また、その代謝系の阻害剤であるネオマイシン(Tysnes *et al.* 1987)がサプレッサーとしての活性を有していることを報告している。さらに、原形質膜H⁺-ATPaseはそれを取り巻く脂質環境により活性が制御されていること(Kasamo & Nouchi 1987)やホスファチジルイノシトールがNa⁺/K⁺-ATPaseを活性化すること(Roelofsen & Van Linde-Sibenius Trip 1981)から、イノシトールリン脂質代謝系の変動が、その下流のプロテインキナーゼ活性に影響を及ぼすのみならず、原形質膜H⁺-ATPaseに対しても影響を及ぼしているというクロストークの可能性も考えられるであろう。

このように、褐紋病菌サプレッサーの作用点として4つの可能性が考えられたが、

- 1) 原形質膜ATPaseは細胞の基本的な代謝系を支える"master enzyme"と考えられており(Serrano 1989)、この活性変化が細胞の生理的な変化の引き金となっているものと推定される。
- 2) P type ATPaseの阻害剤であるオルトバナジン酸(Briskin 1990)が、エンドウ組織においては、エリシターによるピサチン蓄積の誘導を抑制し(Yoshioka *et al.* 1990)、ピサチン合成系の鍵酵素であるフェニルアラニンアンモニアリアーゼやカルコン合成酵素の遺伝子発現を抑制すること(Yoshioka *et al.* 1992a)、抵抗反応に関与するとされるキチナーゼや β -1,3-グルカナーゼの活性化を抑制すること(Yoshioka *et al.*

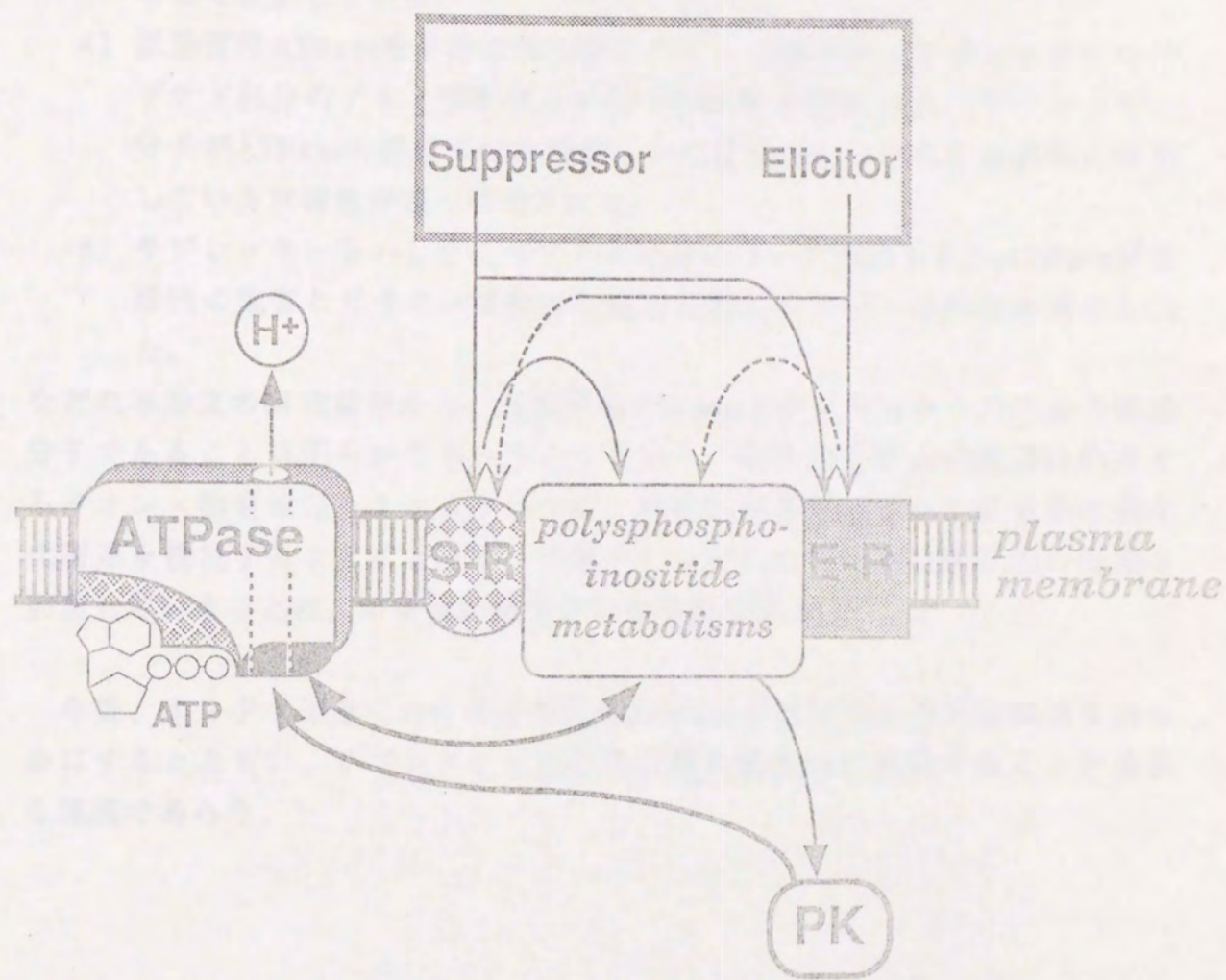


Fig.6-4. Predicted action sites of suppressor -case 4-.

E-R: Receptor of elicitor,
PK: Protein kinase.

S-R: Receptor of suppressor,

1992b)などサプレッサーとして作用する。

という従来の知見に加えて、

- 3) 界面活性剤存在下で超音波処理したエンドウ原形質膜画分を用いた *in vitro* の実験において、サプレッサーないしそのペプチド部分がATPase活性を阻害したことは、それらがATPaseの酵素活性を直接阻害していることを示している。
- 4) 原形質膜ATPase分子内の活性部位のアミノ酸配列とサプレッサーのペプチド部分のアミノ酸配列との間で類似性が認められ、サプレッサー分子がATPaseの活性部位の機能ないし酵素反応の過程を直接的に攪乱している可能性が強く示唆された。
- 5) サプレッサーないしそのペプチド部分について認められたATPase酵素活性の阻害とピサチン蓄積の抑制との間に平行な関係が認められた。

などの本論文の研究結果から、原形質膜ATPaseがサプレッサーの直接の標的分子であることは明らかであろう。すなわち、病原菌は宿主の膜系に存在するイオン・物質輸送、エネルギー生産、情報伝達系をはじめとする基本的な代謝系を攪乱することによって、それらに与えられている防御応答の発現を回避していることは、本研究の結果からも妥当である。

今後、エンドウ細胞における原形質膜ATPaseの役割やその制御機構を明らかにするとともに、サプレッサー結合蛋白質を直接的に同定することが重要な課題であろう。

摘 要

植物は諸々の微生物による攻撃から身を守るために様々な防御機構を備えているにも拘らず、ある種の微生物は特定の植物の防御機構を乗り越えて寄生する。植物の防御反応は、菌の細胞壁の分解物など、菌が植物に感染しようとする際に必然的に生じる"引金"物質を植物が認識して能動的に誘起される。奥ら(1977)は、エンドウ褐紋病菌について、"引金"物質が存在するにも拘らず、菌がエンドウの防御反応の起動を抑制し、感染に成功していることを突き止め、そのような役割を担う物質をサプレッサーと定義した。その後、エンドウ褐紋病菌以外の植物病原菌についてもサプレッサーの存在が報告され、サプレッサーが病原性決定因子として重要な役割を担っていることが広く認められるようになった。病原性決定因子としては、宿主特異的毒素(HST)が知られているが、その生産菌は*Alternaria*属菌と*Helminthosporium*属菌に限られ、他の多くの植物病原菌の宿主特異性を担うサプレッサーを生産しているものと考えられている。しかしながら、それらの構造や詳細な作用機構については解明されてはいなかった。

エンドウ褐紋病菌サプレッサーの生理作用については、1)菌が寄生できる植物種に限って効果が認められ、2)ファイトアレキシンと呼ばれる抗菌性物質の蓄積阻害などにより、本来病原性のない菌の感染をも許すようになること、3)抵抗性反応に関与する一連の酵素の遺伝子発現を抑制(遅延)することが明らかにされており、サプレッサーは、単独処理した場合でも宿主組織に壊死を起こすことはなく、抵抗反応の抑制や感受化をもたらすという点でHSTとは大きく異なっている。サプレッサーの植物側の作用点としては、4)原形質膜ATPaseである可能性が高いことが推定されていた。本論文においては、エンドウ褐紋病菌胞子発芽液よりサプレッサーを単離・精製し、その化学構造を決定し、サプレッサー活性を担う化学構造の特定とサプレッサーの作用機作の解明について研究した。

(1) 褐紋病菌サプレッサーの精製および構造解析

エンドウ褐紋病菌胞子発芽液より、限外ろ過、ゲルろ過、SepPAK-C18、逆相カラム、イオン配位子カラムなどを用いて、2種類のサプレッサー(Suppressin A, B)を単離し、アミノ酸分析(組成および配列)、糖組成分析、核

磁気共鳴法(NMR)にて化学構造をGalNAc-Ser-Ser-Gly, Gal-GalNAc-Ser-Ser-Gly-Asp-Glu-Thrと決定し、各々Suppresscin AおよびBと命名した。

(2) 褐紋病菌サプレッサーの生理活性

両Suppresscinともエリシターによって誘導されるエンドウのファイトアレキシン(ピサチン)蓄積を抑制したが、原形質膜ATPase活性阻害(*in vitro*, *in situ*)と非病原菌の感染促進効果はSuppresscin Bにのみ認められた。Suppresscin Aは、Suppresscin BによるATPase活性阻害の程度を低減する効果がみられたことより、両Suppresscinに共通した化学構造がATPase分子への結合に深く関与していることが示唆された。

(3) サプレッサーとしての活性を担う化学構造とその作用機構

1) Suppresscinのペプチド部分に関する検討: Suppresscinのアミノ酸配列に準じて、化学合成した2~6残基の11種類のペプチドに関して、ピサチン蓄積抑制効果、原形質膜ATPase活性阻害効果(*in vitro*)、エンドウ褐紋病菌の感染に及ぼす効果を調べた結果、Suppresscin Bのペプチド部分であるSer-Ser-Gly-Asp-Glu-Thrについては上記3つのサプレッサー活性が認められたことから、本ペプチド部分がサプレッサーとしての活性を担っていることが判明した。しかしながら、もとのSuppresscin Bに比べて弱い効果であったことから、糖鎖部分の重要性が示唆された。また、両Suppresscinに共通したペプチド部分であるSer-Ser-Glyは、ピサチン蓄積抑制の他にATPase活性阻害の効果が認められたことから、Suppresscin AのATPase分子への結合を裏付ける結果であった。ATPase活性に関するカイネティクス解析の結果、Ser-Ser-Glyを含むペプチドは拮抗型の阻害、Asp-Gluを含むペプチドは非拮抗型の阻害であることを明らかにし、後者は酸性ホスファターゼの活性をも阻害したことから、ATPase酵素分子のホスファターゼ部位へ作用していることが推定された。Suppresscinないしその部分ペプチドが、界面活性剤存在下で超音波処理したエンドウ原形質膜画分におけるATPase活性を阻害したことは、それらが原形質膜ATPaseを直接阻害していることを示している。

2) Suppresscinの糖部分に関する検討: Suppresscinを構成するGalおよびGalNAcは、サプレッサーによるピサチン蓄積の抑制を低減させる効果が認められ、さらに、GalNAcについてはエンドウ褐紋病菌の感染を阻害する効果も認められたことなどから、GalやGalNAcはサプレッサーの作用点への結合に

において、重要な役割を担っていることが示唆された。

(4) エンドウ原形質膜ATPase遺伝子の解析

サプレッサーの標的分子と考えられたエンドウ原形質膜ATPaseについて、その遺伝子解析を実施した。既報の他種高等植物の原形質膜H⁺-ATPase遺伝子の塩基配列に基づいて設計したDNAプライマーセットを用いて、エンドウcDNAを鋳型としたPCR[Polymerase chain reaction]法により増幅したDNA断片をクローニングし、コード領域の約60%に相当する1.7kbpの塩基配列を決定した。その結果、他種高等植物の原形質膜ATPase遺伝子とは塩基配列で73~76%、アミノ酸配列で79~86%の高い相同性が認められた。塩基配列を決定した範囲に存在するATPaseの活性部位とみられるドメインのアミノ酸配列は完全に保存されていた。さらに、ATPaseの活性部位(特にATP結合部位およびホスファターゼ部位)には、GluないしAsp残基が重要であるとされていることから、Supprescin Bに存在するAsp-Glu配列がATP分子と直接結合するか、あるいはATPase分子の活性ドメインの機能を攪乱することによって活性阻害を引き起こしている可能性が考えられた。

このように、植物病原菌はサプレッサーを生産して、宿主の防御反応を抑制することによって感染に成功している。サプレッサーの標的分子としてはいくつかの可能性が考えられたが、原形質膜ATPaseがその1つであることを明らかにした。今後、エンドウ細胞における原形質膜ATPaseの役割やその制御機構を明らかにすると共に、サプレッサーが結合する標的分子を直接的に同定することが重要な課題であろう。

参 考 文 献

- Abdel-Akher, M., Hamilton, J. K., Montgomery, R. and Smith, F. (1952) A new procedure for the determination of the fine structure of polysaccharides. *J.Amer.Chem.Soc.* 74: 4970-4971.
- Achstetter, T., Franzusoff, A., Field, C. and Schekman, R. (1988) SEC7 encodes an unusual, high molecular weight protein required for membrane traffic from the yeast Golgi apparatus. *J.Biol.Chem.* 263: 11711-11717.
- Addison, R. (1986) Primary structure of the *Neurospora* plasma membrane H⁺-ATPase deduced from the gene sequence. *J.Biol.Chem.* 261: 14896-14901.
- Antolovic, R., Brüller, H.-J., Bunk, S. and Schoner, W. (1991) Epitope mapping by amino-acid-sequence-specific antibodies reveals that both ends of the a subunit of Na⁺/K⁺-ATPase are located on the cytoplasmic side of the membrane. *Eur.J.Biochem.* 199: 195-202.
- Ballou, L., Hitzeman, R. A., Lewis, M. S. and Ballou, C. E. (1991) Vanadate-resistant yeast mutants are defective in protein glycosylation. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA.* 88: 3209-3212.
- Boutry, M., Michelet, B. and Goffeau, A. (1989) Molecular cloning of a family of plant genes encoding a protein homologous to plasma membrane H⁺-translocating ATPases. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 162: 567-574.
- Briskin, D. P. (1990) The plasma membrane H⁺-ATPase of higher plant cells: biochemistry and transport function. *Biochim.Biophys.Acta.* 1019: 92-109.
- Carter D.B., Deibel, Jr.M.R., Dunn, C.J. Tomich, C.S.C., Laborde, A.L., Slightom, J.L., Berger, A.E., Bienkowski, M.J., Sun, F.F., McEwan, R.N., Harris, P.K.W., Yem, A.W., Waszak, G.A., Chosay, J.G., Sieu, L.C., Hardee, M.M., Zurcher-Neely, H.A., Reardon, I.M., Heinrikson, R.L., Truesdell, S.E., Shelly, J.A., Eessalu, T.E., Taylor, B.M. and Tracy, D.E. (1990) Purification, cloning, expression and biological characterization of an interleukin-1 receptor antagonist protein. *Nature.* 344: 633-638.
- Chen, Q. and Boss, W. F. (1990) Short-term treatment with cell wall degrading enzymes increases the activity of the inositol phospholipid kinases and the vanadate-sensitive ATPase of carrot cells. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 94: 1820-1829.
- Coleman, M. J., Mainzer, J. and Dickerson, A. G. (1992) Characterization of a fungal glycoprotein that elicits a defense response in French bean. *Physiol. Mol. Plant. Pathol.* 40: 333-351.

- Conrath, U., Jeblick, W. and Kauss, H. (1991) The protein kinase inhibitor, K-252a, decreases elicitor-induced Ca^{2+} uptake and K^{+} release, and increases coumarin synthesis in parsley cells. *FEBS Lett.* 279: 141-144.
- Darvill, A. G. and Albersheim, P. (1984) Phytoalexins and their elicitors - a defense against microbial infection in plants. *Ann.Rev.Plant Physiol.* 35: 243-275.
- Davis, C. B. and Hammes, G. G. (1989) Topology of the yeast plasma membrane proton-translocating ATPase. *J.Biol.Chem.* 264: 370-374.
- de Wit, P. J. G. M. and Kodde, E. (1981) Further characterization and cultivar-specificity of glycoprotein elicitors from culteru filtrates and cell walls of *Cladosporium fulvum*(syn. *Fulvia fulva*). *Physiol.Plant Pathol.* 18: 297-314.
- de Wit, P. J. G. M. (1986) Elicitation of active resistance mechanisms. *In* Biology and Molecular Biology of Plant-Pathogen Interaction. Edited by Bailey, J. A. pp. 149-169. Springer-Verlag, Berlin.
- DeWitt, N. D., Harper, J. F. and Sussman, M. R. (1991) Evidence for a plasma membrane proton pump in phloem cells of higher plants. *Plant J.* 1: 121-128.
- Dietrich, A., Mayer, J. E. and Hahlbrock, K. (1990) Fungal elicitor triggers rapid, transient, and specific protein phosphorylation in parsley cell suspension cultures. *J.Biol.Chem.* 265: 6360-6368.
- Doke, N (1975) Prevectin of the heypersensitive reaction of potato cells to infection with an incompatible race of *Phytophthora infestans* by constituents of the zoospores. *Physiol.Plant Pathol.* 7: 1-7.
- Dubois, M., Gilles, K. A., Hamilton, J. K., P.A., R. and Smith, F. (1956) Colorimetric method for determination of sugars and related substunces. *Anal.Chem.* 28: 350-356.
- Ernst, R. *et al.* (1987) "Principles of NMR in one and two dimensions". Oxford,
- Ewing, N. N., Wimmers, L. E., Meyer, D., Chetelat, R. T. and Bennett, A. B. (1990) Molecular cloning of tomato plasma membrane H^{+} -ATPase. *Plant Physiol.* 94: 1874-1881.
- Farmer, E. E. and Helgeson, J. P. (1987) An extracellular protein from *Phytophthora parasitica* var *nicotianae* is associated with stress metabolite accumulation in tobacco callus. *Plant Physiol.* 85: 733-740.
- Gäumann, E. (1951) "Pflanzliche Infektionslehre". Birkhauser
- Ghislain, M., Schlessner, A. and Goffeau, A. (1987) Mutation of a conserved glycine residue modifies the vanadate sensitivity of the plasma membrane H^{+} -ATPase from

Schizosaccharomyces pombe. *J.Biol.Chem.* 262: 17549-17555.

- Grab, D., Feger, M. and Ebel, J. (1989) An endogenous factor from soybean (*Glycine max* L.) cell cultures activates phosphorylation of a protein which is dephosphorylated in vivo in elicitor-challenged cells. *Planta*. 179: 340-348.
- Gunteski-Hamblin, A.-M., Greeb, J. and Shull, G. E. (1988) A novel Ca²⁺ pump expressed in brain, kidney, and stomach is encoded by an alternative transcript of the slow-twitch muscle sarcoplasmic reticulum Ca-ATPase gene. *J.Biol.Chem.* 263: 15032-15040.
- Hagendoorn, M. J. M., Poortinga, A. M., Wong Fong Sang, H. W., van der Plas, L. H. W. and van Walraven, H. S. (1991) Effect of elicitors on the plasma membrane of *Petunia hybrida* cell suspensions. *Plant Physiol.* 96: 1261-1267.
- Hager, K. M., Mandala, S. M., Davenport, J. W., Speicher, D. W., Benz Jr., E. J. and Slayman, C. W. (1986) Amino acid sequence of the plasma membrane ATPase of *Neurospora crassa*: Deduction from genomic and cDNA sequences. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA.* 83: 7693-7697.
- Hall, J. L., Browning, A. J. and Harvey, D. M. R. (1980) The validity of the lead precipitation technique for the localization of ATPase activity in plant cells. *Protoplasma.* 104: 193-200.
- Harper, J. F., Surowy, T. K. and Sussmun, M. R. (1989) Molecular cloning and sequence of cDNA encoding the plasma membrane proton pump (H⁺-ATPase) of *Arabidopsis thaliana*. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA.* 86: 1234-1238.
- Harper, J. F., Manney, L., DeWitt, N. D., Yoo, M.-H. and Sussman, M. R. (1990) The *Arabidopsis thaliana* plasma membrane H⁺-ATPase multigene family. *J.Biol.Chem.* 265: 13601-13608.
- Hattori, T. and Ohta, Y. (1985) Induction of phenylalanine ammonialyase activation and isoflavone glucoside accumulation in suspension-cultured cells of red bean, *Vigna angularis*, by phytoalexin elicitors, vanadate, and elevation of medium pH. *Plant Cell Physiol.* 26: 1101-1110.
- Heath, M. C. (1981) The suppression of the development of silicon-containing deposits in French bean leaves by exudates of the bean rust fungus and extracts from bean rust-infected tissue. *Physiol.Plant Pathol.* 18: 149-155.
- Hiramatsu, M., Ichinose, Y., Shiraishi, T., Oku, H. and Ouchi, S. (1986) Regulation of pisatin biosynthesis in pea leaves by elicitor and suppressor produced by *Mycosphaerella pinodes*. *Ann.Phytopath.Soc.Japan.* 52: 53-58.
- Hodge, J. E. and Hofreiter, B. T. (1962) *In* Methods in Carbohydrate Chemistry. Edited by Whistler, R. L. and Wolfrom, M. L. pp. 388. Academic Press., New York.

- Huang, K.-P. *et al.* (1986) . *Meth. in Enzymol.* 200: 241-252.
- Hunter, T. and Cooper, J. A. (1985) *Annu.Rev.Biochem.* 54: 897-930
- Karplus *et al.* (1991) "QUANTA CHARMM ver.3.2". Polygen Corp.,
- Kasamo, Y. and Nouchi, I. (1987) The role of phospholipids in plasma membrane ATPase activity in *Vigna radiata* L. (mung bean) roots and hypocotyls. *Plant Physiol.* 83: 323-328.
- Kato, T., Shiraishi, T., Toyoda, K., Saitoh, K., Satoh, Y., Tahara, M., Yamada, T. and Oku, H. (1993) Inhibition of ATPase activity in pea plasma membranes by fungal suppressors from *Mycosphaerella pinodes* and their peptide moieties. *Plant Cell Physiol.* 34: 439-445.
- Kessman, H. and Barz, W. (1986) Elicitation and suppression of phytoalexin and isoflavone accumulation in cotyledons of *Cicer arietinum* L. as caused by wounding and by polymeric components from the fungus *Ascochyta rabiei*. *J.Phytopathol.* 117: 321-335.
- Kitano, T., Go, M., Kikkawa, U. and Nishizuka, Y. (1986) Assay and purification of protein kinase C. *Meth. in Enzymol.* 124: 349-352.
- Kodama, M., Kajiwara, K., Otani, H. and Kohmoto, K. (1989) A host-recognition factor from *Botrytis* affecting scallion. In *Host-Specific Toxins, Recognition and Specificity Factors in Plant Disease*. Edited by Kohmoto, K. and Durbin, R. D. pp. 33-44. Tottori University Press, Tottori.
- 久能 均 (1990) 感染に対する宿主細胞の反応とその制御. In *植物感染生理学*. Edited by 西村正暘 and 大内成志. pp. 71-98. 文永堂出版, 東京.
- Lai, S., Watson, J.C., Hansen, J.N. and Sze, H. (1991) Molecular cloning and sequencing of cDNAs encoding the proteolipid subunit of the vacuolar H⁺-ATPase from a higher plant. *J.Biol.Chem.* 266: 16078-16084.
- Lowry, O. H. and Rosebrough, N. J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J.Biol.Chem.* 193: 265-275.
- Macrí, F., Dell'antone, P. and Vianello, A. (1983) ATP-dependent proton uptake inhibited by *Cercospora beticola* toxin in pea stem microsomal vesicles. *Plant Cell Environ.* 6: 555-558.
- Mailnow, R., Schulman, H. and Tsien, R. W. (1989) Inhibition of postsynaptic PKC of CaMKII blocks induction but not expression of LTP. *Science.* 245: 862-866.
- Marre, E. (1979) Integration of solute transport in cereals. In *Recent Advances in the*

Biochemistry of Cereals. Edited by Laidman, D. L. and Jones, R. G. W. pp. 3-25. Academic, New York.

Marre, M. T., Romani, G., Bellando, M. and Marre, E. (1986) Stimulation of weak acid uptake and increase in cell sap pH as evidence for fusicoccin- and K⁺-induced cytosol alkalization. *Plant Physiol.* 82: 316-326.

Masuda, Y., Shiraishi, T., Ouchi, S. and Oku, H. (1983) A rapid and accurate analysis of isoflavonoid phytoalexins by high-performance liquid chromatography. *Ann. Phytopathol.Soc.Japan.* 49: 558-560.

Memon, A. R., Chen, Q. and Boss, W. F. (1989) Inositol phospholipids activate plasma membrane ATPase in plants. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 162: 1295-1301.

Merrifield, R. B. (1963) Solid phase peptide synthesis. I. The synthesis of a tetrapeptide. *J.Am. Chem.Soc.* 85: 2149-2154.

三崎 旭 他(1976) 構造研究の実際例. In 実験生化学講座 第4巻「糖質の化学(下)」. Edited by 日本生化学会. pp. 577-662. 東京化学同人, 東京.

Mito, N., Kimura, T. and Asahi, T. (1988) Partial purification and characterization of an ATPase in mung bean hypocotyl plasma membrane: Suggestion for a new type of higher plant plasma membrane ATPase. *Plant Cell Physiol.* 29: 875-882.

Moore, R., McClelen, C. E. and Smith, H. S. (1987) "Phosphatases". CRC press, Boca Raton, Florida.

Moriau, L., Bogaerts, P., Jonniauz, J.L. and Boutry, M.. Identification and characterization of a second plasma membrane. (Unpublished)

Murray, M. G. and Thompson, W. F. (1980) Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nuc.Acids Res.* 8: 4321-4325.

Nair, J., Mueller, H., Peterson, M. and Novick, P. (1990) Sec2 protein contains a coiled-coil domain essential for vesicular transport and a dispensable carboxy terminal domain. *J.Cell.Biol.* 110: 1897-1909.

Nasu, K., Shiraishi, T., Yoshioka, H., Hori, N., Ichinose, Y., Yamamada, T. and Oku, H. (1992) An endogenous suppressor of the defense response in *Pisum sativum*. *Plant Cell Physiol.* 33: 617-626.

日本化学会編 (1991) "実験化学講座 第27巻「生物有機」". 丸善, 東京.

大西正健 (1987) "酵素反応速度論実験入門". 学会出版センター, 東京.

Oku, H., Shiraishi, T. and Ouchi, S. (1977) Suppression of induction of phytoalexin, pisatin, by low-molecular-weight substances from spore germination fluid of pea pathogen,

Mycosphaerella pinodes. *Naturwissenschaften*. 64: 643.

Oku, H., Shiraishi, T., Ouchi, S., Ishiura, M. and Matsueda, R. (1980) A new determinant of pathogenicity in plant disease. *Naturwissenschaften*. 67: 310.

Oku, H. (1980) Determinant for pathogenicity without apparent phytotoxicity in plant diseases. *Proc. Japan Acad.* 56(Ser B): 367-371.

Oku, H., Shiraishi, T. and Ouchi, S. (1986) Specificity of local resistance induced in pea leaves by elicitor isolated from *Mycosphaerella pinodes*. *Ann. Phytopath. Soc. Japan*. 52: 347-348.

Oku, H., Shiraishi, T. and Ouchi, S. (1987) Role of specific suppressors in pathogenicity of *Mycosphaerella* species. In *Molecular Determinants of Plant Diseases*. Edited by Nishimura, S. pp. 145-156. Japan Sci. Soc. Press, Tokyo/Springer-Verlag, Berlin.

奥 八郎(1988) "病原性とは何か". 農文協, 東京.

Oku, H. (1991) Resistance of plants against diseases. *J. Pest. Sci.* 16: 109-114.

奥田潤子 (1992) 岡山大学卒業論文.

Oppenheimer, N.J. and James, T.L.(eds) (1989) "Nuclear Magnetic Resonance(part A/B)". *Meth. in Enzymol.* 176/177.

Ouchi, S. (1991) Molecular biology of fungal host-parasite interactions. In *Molecular Strategies of Pathogens and Host Plants*. Edited by Patil, S. S., Ouchi, S., Mills, D. and Vance, C. pp. 15-27. Springer-Verlag, New York.

Palmgren, M. G., Larsson, C. and Sommarin, M. (1990) Proteolytic activation of the plant plasma membrane H⁺-ATPase by removal of a terminal segment. *J. Biol. Chem.* 265: 13423-13426.

Palmgren, M. G., Sommarin, M., Serrano, R. and Larsson, C. (1991) Identification of an autoinhibitory domain in the C-terminal region of the plant plasma membrane H⁺-ATPase. *J. Biol. Chem.* 266: 20470-20475.

Pardo, J. M. and Serrano, R. (1989) Structure of a plasma membrane H⁺-ATPase gene from the plant *Arabidopsis thaliana*. *J. Biol. Chem.* 264: 8557-8562.

Parker, J. E., Schulte, W., K., H. and D., S. (1991) An extracellular glycoprotein from *Phytophthora megasperma* f.sp. *glycinea* elicits phytoalexin synthesis in cultures parsley cells and protoplasts. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 4: 19-27.

Perez, C., Michelet, B., Ferrant, V., Bogaerts, P. and Boutry, M. (1992) Differential expression within a three-gene subfamily encoding a plasma membrane H⁺-ATPase

in *Nicotiana plumbaginifolia*. *J.Biol.Chem.* 267: 1204-1211.

- Perlin, D. S. and Spanswick, R. M. (1981) Characterization of ATPase activity associated with corn leaf plasma membranes. *Plant Physiol.* 68: 521-526.
- Poole, R. J. (1978) Energy coupling for membrane transport. *Ann.Rev.Plant Physiol.* 29: 437-460.
- Reed, K. C. and Mann, D. A. (1985) Rapid transfer of DNA from agarose gels to nylon membranes. *Nuc.Acids Res.* 13: 7207-7221.
- Roelofsen, B. and van Linde-Sibenius Trip, M. (1981) The fraction of phosphatidylinositol that activated the (Na⁺+K⁺)-ATPase in rabbit kidney microsomes is closely associated with the enzyme protein. *Biochim.Biophys.Acta.* 647: 302-306.
- Saitoh, K., Shiraishi, T., Kato, T., Kim, H.-M., Tanaka, M., Sato, Y., Yamada, T., Tahara, M., Ichinose, Y. and Oku, H. (in prep.) Structural analysis of two suppressors, Suppressin A and B, secreted by a pea pathogen *Mycosphaerella pinodes*, by NMR spectroscopy and molecular dynamics. *Biochem.J.* (submitted).
- Sakoda, M. and Hiromi, K. (1976) Determination of the best-fit values of kinetic parameters of the Michaelis-Menten equation by the method of least squares with the Taylor expansion. *J.Biochemistry.* 80: 547-555.
- Sanger, F., Nicklen, S. and Coulson, A. R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA.* 74: 5463-5467
- Schaller, G. E. and Sussman, M. R. (1988a) Isolation and sequence of tryptic peptides from the proton-pumping ATPase of the oat plasma membrane. *Plant Physiol.* 86: 512-516.
- Schaller, G. E. and Sussman, M. R. (1988b) Phosphorylation of the plasma-membrane H⁺-ATPase of oat roots by a calcium-stimulated protein kinase. *Planta.* 173: 509-518.
- Serrano, R., Kielland-Brandt, M. C. and Fink, G. R. (1986) Yeast plasma membrane ATPase is essential for growth and has homology with (Na⁺+K⁺), K⁺- and Ca²⁺-ATPases. *Nature.* 319: 689-693.
- Serrano, R. (1988) Structure and function of proton translocating ATPase in plasma membranes of plants and fungi. *Biochim.Biophys.Acta.* 947: 1-28.
- Serrano, R. (1989) Structure and function of plasma membrane ATPase. *Annu.Rev.Plant Physiol. Plant Mol.Biol.* 40: 61-94.
- Sharp, J. K., McNeil, M. and Albersheim, P. (1984) The primary structure of one elicitor-active and seven elicitor-inactive hexa(β-D-glucopyranosyl)-D-glucitols isolated from the mycelial walls of *Phytophthora megasperma* f.sp. *glycinea*. *J.Biol.Chem.*

- Shiraishi, T., Oku, H., Tetsuji, Y. and Ouchi, S. (1978a) Inhibitory effect of pisatin on infection process of *Mycosphaerella pinodes* on pea. *Ann.Phytopath.Soc.Japan.* 44: 641-645.
- Shiraishi, T., Oku, H., Yamashita, M. and Ouchi, S. (1978b) Elicitor and suppressor of pisatin induction in spore germination fluid of pea pathogen, *Mycosphaerella pinodes*. *Ann.Phytopath.Soc.Japan.* 44: 659-665.
- Shiraishi, T., Hori, N., Yamada, T. and Oku, H. (1990) Suppression of pisatin accumulation by an inhibitor of protein kinase. *Ann.Phytopath.Soc.Japan.* 56: 261-264.
- Shiraishi, T., Araki, M., Yoshioka, H., Kobayashi, I., Yamada, T., Ichinose, Y., Kunoh, H. and Oku, H. (1991a) Inhibition of ATPase activity in pea plasma membranes in situ by a suppressor from a pea pathogen, *Mycosphaerella pinodes*. *Plant Cell Physiol.* 32: 1067-1075.
- Shiraishi, T., Yamada, T., Oku, H. and Yoshioka, H. (1991b) Suppressor production as a key factor for fungal pathogenesis. In *Molecular Strategies of Pathogens and Host Plants*. Edited by Patil, S. S., Ouchi, S., Mills, D. and Vance, C. pp. 151-162. Springer-Verlag, New York.
- Shiraishi, T., Saitoh, K., Kim, H.-M., Kato, T., Tahara, M., Oku, H. and Yamada, T. (1992) Two suppressors, Suppressin A and B, secreted by a pea pathogen *Mycosphaerella pinodes*. *Plant Cell Physiol.* 33: 663-667.
- 白石友紀 and 奥 八郎(1992) 植物の感染制御機構：病原菌シグナルによる制御。バイオサイエンスとインダストリー。50: 1103-1109.
- 白石友紀 and 山田哲治(1993) 病原菌の宿主特異性とその分子機構：宿主特異性とサプレッサー。植物細胞工学。5: 12-18.
- Smith, F. and Van-Cleve, J. W. (1955) *ibid.* 77: 3091-.
- Smith, F. A. and Raven, J. A. (1979) Intracellular pH and its regulation. *Ann.Rev.Plant Physiol.* 30: 289-311.
- Spanswick, R. M. (1981) Electrogenic ion pumps. *Annu.Rev.Plant Physiol.Plant Mol.Biol.* 32: 267-289.
- Steffens, M., Ettl, F., Kranz, D. and Kindl, H. (1989) Vanadate mimics effects of fungal cell wall in eliciting gene activation in plant cell cultures. *Planta.* 177: 160-168.
- Storti, E., Pelucchini, D., Tegli, S. and Scala, A. (1988) A potential defense mechanism of tomato against the late blight disease is suppressed by germinating sporangia-derived substances from *Phytophthora infestans*. *J.Phytopathol.* 121: 275-282.

- Strehler, E. E., Strehler-Page, M.-A., Vogel, G. and Carafoli, E. (1989) mRNAs for plasma membrane calcium pump isoforms differing in their regulatory domain are generated by alternative splicing that involves two internal donor sites in a single exon. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*. 86: 6908-6912.
- Surowy, T. K. and Bayer, J. S. (1991) Low water potentials affect expression of genes encoding vegetative strage proteins and plasma membrane proton ATPase in soybean. *Plant Mol.Biol.* 16: 261-262.
- Toppan, A. and Esqueré-Tugayé, M.-T. (1984) Cell surfaces in plant-microorganism interactions. IV. fungal glycopeptides which elicit the synthesis of ethylene in plants. *Plant Physiol.* 75: 1133-1138.
- Toyoda, K., Shiraishi, T., Yoshioka, H., Yamada, T., Ichinose, Y. and Oku, H. (1992) Regulation of polyphosphoinositide metabolism in pea plasma membranes by elicitor and suppressor from a pea pathogen, *Mycosphaerella pinodes*. *Plant Cell Physiol.* 33: 445-452.
- Toyoda, K., Shiraishi, T., Yamada, T., Ichinose, Y. and Oku, H. (1993) Rapid changes in polyphosphoinositide metabolism in pea in response to fungal signals. *Plant Cell Physiol.* 34: 729-735.
- Tysnes, O.-B., Verhoeven, A. J. M. and Holmsen, H. (1987) Neomycin inhibits agonist-stimulated polyphosphoinositide metabolism and responses in human platelets. *Biochem.Biophys. Res.Commun.* 144: 454-462.
- Vieira, J. and Messing, J. (1987) Production of single-stranded plasmid DNA. *Meth. in Enzymol.* 153: 3.
- Vlilgethurt *et al.* (1983) "Advanced in Carbohydrate Chemistry and Biochemistry".
- Wada, M., Takano, M. and Kasamo, K. (1992) Nucreotide sequence of a complementary DNA encoding plasma membrane H⁺-ATPase from rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Physiol.* 99: 794-795.
- Walker-Simmons, M., Hadwiger, L. A. and Ryan, C. A. (1983) Cytosan and pectic polysaccharides both induce the accumulation of the antifungal phytoalexin pisatin in pea rods and antinutrient protenase inhibitors in tomato leaves. *Biochem.Biophys.Res.Commun.* 110: 194-199.
- 渡辺 格(監修) and 杉浦昌弘(編集)(1987) 「植物バイオテクノロジー実験マニュアル クローニングとシーケンス」. 農村文化社, 東京.
- Yamada, T., Hashimoto, H., Shiraishi, T. and Oku, H. (1989) Suppression of pisatin, phenylalanine ammonia-lyase mRNA, and chalcone synthase mRNA accumulation by a putative pathogenicity factor from the fungus *Mycosphaerella pinodes*.

- Yamada, T., Tanaka, Y., Sriprasertsak, P., Kato, H., Hashimoto, T., Kawamata, S., Ichinose, Y., Kato, H., Shiraishi, T. and Oku, H. (1992) Phenylalanine ammonia-lyase genes from *Pisum sativum*: Structure, organ-specific expression and regulation by fungal elicitor and suppressor. *Plant Cell Physiol.* 33: 715-725.
- Yamamoto, Y., Oku, H., Shiraishi, T., Ouchi, S. and Koshizawa, K. (1986) Non-specific induction of pisatin and local resistance in pea leaves by elicitors from *Mycosphaerella pinodes*, *M. melonis* and *M. liglicola* and the effect of suppressor from *M. pinodes*. *J.Phytopathol.* 117: 136-143.
- Yoshida, S., Kawata, T., Uemura, M. and Niki, T. (1986) Properties of plasma membrane isolated from chilling-sensitive etiolated seedling of *Vigna radiata* L. *Plant Physiol.* 80: 152-160.
- 吉田静夫 and 上村松生(1987) 細胞膜の分離法. 蛋・核・酵. 別冊30: 48-54.
- Yoshioka, H., Shiraisi, T., Yamada, T., Ichinose, Y. and Oku, H. (1990) Suppression of pisatin production and ATPase activity in pea plasma membranes by orthovanadate, verapamil and a suppressor from *Mycosphaerella pinodes*. *Plant Cell Physiol.* 31: 1139-1146.
- Yoshioka, H., Shiraishi, T., Kawamata, S., Nasu, K., Yamada, T., Ichinose, Y. and Oku, H. (1992a) Orthovanadate suppresses accumulation of phenylalanine ammonia-lyase mRNA and chalcone synthase mRNA in pea epicotyls induced by elicitor from *Mycosphaerella pinodes*. *Plant Cell Physiol.* 33: 201-204.
- Yoshioka, H., Shiraishi, T., Nasu, K., Yamada, T., Ichinose, Y. and Oku, H. (1992b) Suppression of the activation of chitinase and β -1,3-glucanase in pea epicotyls by orthovanadate and a suppressor from *Mycosphaerella pinodes*. *Ann.Phytopath. Soc.Japan.* 58: 405-410.
- Ziegler, E. and Pontzen, R. (1982) Specific inhibition of glucan-elicited glyceollin accumulation in soybeans by an extracellular mannan-glycoprotein of *Phytophthora megasperma* f.sp. *glycinea*. *Physiol.Plant Pathol.* 20: 321-331.

謝 辞

本研究は、岡山大学農学部 奥 八郎名誉教授、中筋房夫教授、および、生物資源研究所 井上成信教授のご指導のもとに行なったものである。この場を借りて厚く御礼申し上げる。

研究遂行および論文作製にあたり、終始ご指導、ご鞭撻を頂いた岡山大学農学部 白石友紀教授に深く感謝の意を表す。また、研究上、ご指導、ご助言を頂いた岡山大学農学部 山田哲治教授、一瀬勇規助教授に厚く御礼申し上げます。

研究遂行上、NMR解析および分子動力学計算について多大なご援助を賜った 新日本製鐵株式会社技術開発本部先端技術研究所解析科学研究齋藤公児主任研究員およびCTCラボラトリーズ株式会社 田中昌子リーダーに厚く御礼申し上げます。また、酵素カイネティクス解析について良きアドバイスを賜った富山県立大学工学部助手 加藤康夫博士に感謝の意を表す。さらに、ペプチド合成についてご援助を賜った新日本製鐵株式会社技術開発本部先端技術研究所ライフサイエンス研究センター 林 良雄主任研究員並びに佐藤吉美研究員に御礼申し上げます。

岡山大学における研究の機会を作って頂き、またご助言を賜った、新日本製鐵株式会社技術開発本部技術開発企画部ライフサイエンス企画グループ 藤武義秀部長、同社先端技術研究所ライフサイエンス研究センター 宇野 功研究所長、並びに田原 誠主任研究員に厚く御礼申し上げます。

研究実施にあたり、ご援助、ご助言を頂いた現名古屋大学農学部助手 吉岡博文博士、さらに、豊田和弘氏、金 洪模氏、日野 勲氏(現北興化学)、木場章範氏、水越留美女史、吉本優子女史をはじめ、岡山大学農学部植物病学研究室並びに応用遺伝子工学研究室の諸氏に厚く御礼申し上げます。

昭和62年より平成元年までの派遣期間中に遺伝子解析手法を御教授下さった 名古屋大学遺伝子実験施設 杉浦昌弘教授に厚く御礼申し上げます。

本研究中のラジオアイソトープ実験は、岡山大学RI共同利用津島施設を利用させて頂いた。蜂屋欽司先生をはじめ同施設の職員の方々に厚く御礼申し上げます。

本論文中に用いた写真やスライド作製にあたり、ご助力を賜った新日本製鐵株式会社先端技術研究所 熊木幹彦氏に厚く御礼申し上げます。

末筆ではあるが、岡山大学での派遣期間から論文完成までの長きに亘って暖かく見守って、かつ我儘を許してくれた 妻 暁美に心より感謝したい。また、時期同じくして生まれ出た長男 聖の今後に期待を込めて、論文を締め括りたい。

