

アカパンカビの分生子発芽過程におけるオーキシシン 及びジベレリンの作用*

富田 香織**

昭和薬科大学生物化学研究室

The Effects of Auxin and Gibberellin on the Conidial Germination in *Neurospora crassa*

Kaori TOMITA

Showa College of Pharmaceutical Sciences,
Machida City, Tokyo 194, Japan

要 旨

現在植物ホルモンには、オーキシシン、ジベレリン、サイトカイニン、エチレン、アブシジン酸及びブラシノステロイドの6種が知られており、その中でオーキシシン及びジベレリンは、特に茎に対して強い成長促進効果がある。

オーキシシンは、1934年にインドール酢酸 (IAA) の結晶としてKöglらにより人尿及び酵母から、またThimann (1935)により *Rhizopus suinus* を培養した後の培地から取り出された。ジベレリンの発見は、1938年、藪田により *Gibberella fujikuroi* の培養液から抽出、単離されジベレリンと命名された。このように、オーキシシン及びジベレリンの発見はカビと深く関係している。オーキシシンとジベレリンの発見以来、これまでに、これらの作用について多くの研究がなされてきたが、その結果について検討してみると、無菌操作、培地成分、カビの成長段階等への考慮等、実験条件に大きな問題のある報告が多いことがわかった。植物の生活環においても、オーキシシンやジベレリンは、限られた場所あるいは限られた時期に効果が認められる。そこで、実験条件の諸問題点を改善し、菌におけるオーキシシン及びジベレリンが、確かに成長物質として体内で生産し、成長の制御物質として働いているかどうかについてアカパンカビを材料として、高等植物におけるオーキシシンやジベレリンの研究と同様、成長と分化に沿って詳細に調べた。

材料として用いたアカパンカビは、子囊菌門のタマカビ目に属するカビで、これまでに多くの突然変異体が分離されており遺伝生化学的研究の蓄積は大きい。アカパンカビは、無性生殖環と有性生殖環を持っている。本研究では、この無性的に形成される胞子の分生子を採集し実験を行なった。液体培養した場合の分生子発芽過程はまず始めに分生子の受動的吸水膨潤があり形態的、生理的生化学的内部変化の後発芽管形成が起こり、次に発芽管と若い菌糸の伸長という段階を経ることにな

広島大学総合科学部紀要Ⅳ理系編、第19巻 (1993)

* 広島大学審査学位論文

口頭発表日 1993年1月22日、学位取得日 1993年3月3日

**現在の所属：東京都町田市東玉川学園3丁目3165番地 昭和薬科大学生物化学研究室

る。個々の成長についてオーキシン及びジベレリンの作用を調べるのには良い材料であると考えた。アカパンカビの前培養には、グリセロールを含む完全培地を用い、液体培養には、Friesを含む液体培地を用いた。分生子を完全培地に接種し、26℃暗黒中で培養し、最後の一日間光照射した。前培養から得られた菌体から分生子を採集し、分生子の密度を調整した後、各実験を行なった。操作中に用いた器具は乾熱し、滅菌水は純粹を高圧蒸気滅菌したものをを用いた。

はじめに、分生子の密度とオーキシンの関係について調べた。アカパンカビの分生子を液体振盪培養した場合、培地の分生子の密度は、分生子の発芽に影響を及ぼす。これは、“分生子密度効果”と言われる。Nakamuraら(1978)は、分生子を 2×10^6 分生子 ml^{-1} の密度で培養を行なった場合、オーキシンが発芽率を高めることを報告しているが、分生子の“密度効果”とオーキシンの関係についての詳しいことは研究されていない。本研究において、まず分生子の“密度効果”とオーキシンの関係について確かめ、次に分生子発芽過程に続く若い菌糸の伸長におけるオーキシンとジベレリンの作用を調べ、さらに、これら分生子発芽過程における核数増加にともなうオーキシン及びジベレリンの作用を、蛍光顕微鏡で観察し調べた。これまでにアカパンカビの内生ジベレリンとしてGA₃がガスクロマトグラフィー-マススペクトロメトリー(GC-MS)により同定されている。内生オーキシンについては、アベナ屈曲試験による生物検定はなされているが、機器によるオーキシンの同定はなされていないことから、カビの中に存在する植物ホルモンの定性、定量も機器分析方法を用いて研究される必要があると考え、アカパンカビにおけるオーキシンの機器分析による定性、定量を試みた。

まず、分生子の密度について実験を行った。分生子を液体振盪培養した場合の発芽は、培地の密度に依存しており、発芽の最適密度が 2×10^6 分生子 ml^{-1} であることが明らかとなった。 2×10^4 - 2×10^7 分生子 ml^{-1} の密度の間では、アカパンカビの分生子の発芽は、分生子の密度が高すぎても、低すぎても抑えられた。高い密度(2×10^7 分生子 ml^{-1})で分生子の培養を行なった場合に示された発芽の抑制は、培地の濃度を2倍にしても回復しなかった。さまざまな分生子密度におけるIAAと2,4-ジクロロフェノキシ酢酸(2,4-D)の効果を調べたところ、IAA、2,4-Dともに最適濃度は $1 \mu\text{M}$ であった。低い密度で分生子を培養した場合に最適濃度のIAA及び2,4-Dを添加すると、最適密度で培養を行なった場合と同レベルの発芽率の値を得ることができた。高い密度で培養を行なった場合には、IAA、2,4-D共に発芽に影響を及ぼさなかった。2倍の濃度の培地でも発芽に何の影響も及ぼさなかった。 2×10^4 、 2×10^6 分生子 ml^{-1} の密度で培養を行なった場合では、分生子培養開始後8時間までに発芽が完了したが、高い密度で培養を行なった場合には、分生子培養開始後24時間以上を経過しても発芽率は100%に至らず60%程度に終わった。最適濃度のIAA及びGA₃は、低い密度で分生子の培養を行なった場合の発芽完了までの時間をはやめた。そこで、高等植物において拮抗的に阻害することで知られる2,4,6-トリクロロフェノキシ酢酸(2,4,6-T)を用いてIAAの作用を調べた。抗オーキシン剤2,4,6-T($2 \mu\text{M}$)は、分生子発芽を抑え、IAA(1 - $10 \mu\text{M}$)は、この抑制効果を回復させた。次に分生子を培養した時の培養濾液の中に発芽に影響する物質があるかどうかを調べた。分生子発芽の最適密度である 2×10^6 分生子 ml^{-1} の密度で培養を行なった後、分生子懸濁液をミリポアフィルターで濾過し、分生子を除いた培養濾液を用意した。この培養濾液を培地として用い、 2×10^5 、 2×10^6 分生子 ml^{-1} の密度で培養を行なった実験から、培養濾液が分生子の発芽を促進することが明らかになった。この促進効果は低密度(2×10^4 分生子 ml^{-1})でも見られたが、最適密度で培養を行なった場合ほど顕著ではなかった。高い密度で培養を行なった場合に発芽は抑えられたが、この培養濾液を3分の1に希釈すると、最適密度で培養を行なった場合と同レベルの効果を示した。これらの結果から、分生子の培養濾液には何らかの発芽を促す活性物質が放出されていることが明

かとなった。培養濾液の内生遊離型及び結合型オーキシシンについてアベナ屈曲試験で調べたが、結合型は検出されず、また遊離型オーキシシンの濃度は発芽に効果を示すIAAの濃度とは一致しなかった。また、この活性物質は、透析膜を通らず、熱処理により活性を失ったことから、オーキシシンのような低分子の物質ではなく、高い分子量をもつ物質であると考えられる。次にIAAの活性物質の生産に対する経時変化を調べた。分生子を最適密度で培養を行なった場合でも、分生子培養初期には、培養濾液の活性は認められなかったが、培養開始後1時間にはすでに顕著な活性が示された。この活性レベルは、培養開始後5時間に至るまで変わらず高い値を示した。低い密度の場合には、分生子培養開始後2時間の培養濾液は活性を示さなかったが、分生子培養後4時間には認められ、6時間には最適密度で培養を行なった場合と同様の高いレベルを示した。また、 $1\mu\text{M}$ のIAAを与えることにより、分生子を低い密度で1時間あるいは3時間培養を行なった場合の活性物質の生産量が高まり、活性物質の濃度もIAAにより高められた。これらの結果から、オーキシシンは、活性物質と共に発芽の調節に関与している可能性が示唆される。

次に発芽に続く若い菌糸の伸長について調べた。分生子を 2×10^4 分生子 ml^{-1} の密度で5時間培養し、この時間を菌糸伸長試験開始時としてIAA、2,4-D及び GA_3 を加え、菌糸伸長に及ぼす作用について調べた。分岐していない菌糸についてマップメジャーを用いて顕微鏡写真から菌糸の長さを測定した。

IAA ($1\mu\text{M}$)、2,4-D ($1\mu\text{M}$) 及び GA_3 (0.1mM) は、アカパンカビの菌糸の伸長において、発芽と同様に促進作用を示した。菌糸の長さの測定後のStudentのt-testによる検定の結果、菌糸伸長試験開始後1時間で95%で有意差が認められた。抗オーキシシン剤2,4,6-T ($2\mu\text{M}$) は、若い菌糸の伸長を抑え、この阻害効果は、IAA ($2\mu\text{M}$ - $10\mu\text{M}$) により打ち消された。IAAと GA_3 の両者の作用は相加的であった。この結果は、IAAと GA_3 がそれぞれ異なった役割をもって働いている可能性が示唆される。

アカパンカビの分生子発芽過程の分生子の発芽と共に、分生子の核数が増加することがLoo (1976) により報告されている。そこで、オーキシシン及びジベレリンの核数増加に及ぼす影響について調べた。分生子の核を2%グルタルアルデヒドで固定し、 $2\mu\text{g ml}^{-1}$ の4,6-ジアミノ-2-フェニルインドール (DAPI) で染色した後オリンパスBH-2RFK落射蛍光顕微鏡を用いて、核の数及び分生子の輪郭を観察した。

分生子培養開始後3時間の対照の平均の核数が2.7に対してIAA ($1\mu\text{M}$) 処理を行なった場合には3.5、2,4-D ($1\mu\text{M}$) 処理を行なった場合にも3.5となり、IAA及び2,4-Dは核分裂を促進した。分生子培養開始後3時間の対照では核数1個の分生子が認められたがIAA及び2,4-Dを加えて培養を行なった場合には、核数が3個、4個の分生子が増加し、核数1個の分生子は認められなかった。分生子発芽過程にある分生子のうち、発芽管を持つものと、持たないものとに分けて観察を試みたところ、IAAは発芽管を持たない分生子の核数増加にも影響を与えていることが観察された。 GA_3 についても核数増加に及ぼす影響について調べた。分生子培養開始後1時間の対照の平均の核数が1.9に対して GA_3 処理を行なった場合には2.3となり、およそ1時間のうちにジベレリンは核分裂を促進した。分生子培養後3時間では、対照では核数1個の分生子が認められたのに対して、ジベレリン処理を行なった場合には核数1個の分生子は認められず、核数5個以上持つ分生子が5割以上認められた。

これまでの結果から、分生子発芽過程において、内生オーキシシンが関与している可能性が考えられることから、アカパンカビの分生子培養開始後7時間及び22時間の菌体及び培地からの抽出物を用いて、IAAの定量、同定を行なった。菌体を凍結乾燥した後、内部標準としてインドールプロピ

オン酸 (IPA) を加え、80% エタノール中で破碎し、吸引濾過し濃縮した。水相を酒石酸で pH3.5 に調整し、石油エーテルで洗った後、ジエチルエーテルで抽出を行なった。抽出物を、ポリビニルピロリドン、DEAE-セファデックス A-25 カラム及び C-18 セットアップパックカートリッジにより精製し高速液体クロマトグラフィー (HPLC) 分析を行なった。培地では、内部標準の IPA を加えた後、ジエチルエーテルで抽出し、その後菌体と同様の方法で精製を行なった。検出器は、IAA に対して特異性が高い蛍光検出器を用いた。HPLC 分析では、培養開始後 7 時間及び 22 時間の菌体及び培地からの抽出物において、標準品 IAA と同じ保持時間にピークが認められ、IAA の存在が認められた。それぞれの IAA 量を、IAA と IPA の比で計算を行なったところ、培養開始後 7 時間の菌体では、 $36\text{ng} \cdot (\text{g 乾燥重量})^{-1}$ で培地の濃度は 0.3nM 、総量は 1 Liter あたり 65ng 、また培養開始後 22 時間の菌体は、 $11\text{ng} \cdot (\text{g 乾燥重量})^{-1}$ で培地の濃度は 1 Liter あたり 394ng であった。HPLC より精製された IAA 画分を分取し、試料のトリメチルシリル (TMS) 誘導体について分析を行なった。TMS 誘導体のマススペクトログラムについて、保持時間及びイオン強度比が一致し、アカパンカビの抽出物で、HPLC 及び MS 分析により、IAA が同定された。

本研究により、アカパンカビの分生子発芽過程において、内生のオーキシンは、発芽官の突出、若い菌糸の伸長、分生子の核数増加及び培地中の活性物質濃度の増加等、諸現象を制御している可能性が示唆された。少なくとも、吸水から発芽管の突出までと、その後の発芽管及び菌糸の伸長の 2 つの段階は、異なる作用に基づき制御されている可能性がある。最初の段階は、オーキシシン及びジベレリンにより、細胞壁のマトリックスである β -1,3 及び 1,6 グルカンのゆるみ、活性物質の合成及び培地への放出、核分裂周期が調節されている可能性がある。一方、発芽管の突出以後の段階においては、細胞壁の合成と分解に関する酵素等を含む先端小胞群の菌糸基部から先端への移動及び細胞壁のゆるみと合成が、IAA 及び GA_3 により調節されていることが考えられる。このような制御機構における IAA と GA_3 の相互作用は、相加的でありそれぞれ異なる作用点、受容物質があると考えられる。これらのことを、糸状菌の *Gibberella fujikuroi*、*Penicilium notatum* においても調べたところ、やはり分生子の発芽過程に、IAA 及び GA_3 が関与していることが明らかになった。このことにより、IAA と GA_3 は、糸状子囊菌の発芽過程の調節機構において重要な役割を果たしていると考えられる。