

オオムギ子葉鞘細胞による非病原菌 *Erysiphe pisi* の認識と拒否性の誘導

小 林 一 成
三重大生物資源学部

Recognition of Nonpathogen, *Erysiphe pisi*, by Barley Coleoptile Cells and Induced Inaccessibility

Issei KOBAYASHI
Faculty of Bioresources, Mie University

Abstract

The barley coleoptile cell-powdery mildew system is advantageous for observing host-parasite interaction. When a nonpathogen, *Erysiphe pisi*, attacks coleoptile cells, cell level resistance (inaccessibility) is induced. The mechanism for recognition and the expression of inaccessibility were examined by this system. Cytoplasmic responses of coleoptile cells to attack by *E. pisi* were examined by the video-analysis. Coleoptile cells responded to *E. pisi* at the prepenetration stage and the fungus appeared to be recognized by coleoptile cells at that time. Confirmation of this point was attempted by cytological examination and the results from *E. pisi* germlings apparent by give out chemical signal(s) to bring about inaccessibility in coleoptile cells. Water-soluble extracts obtained from *E. pisi* conidia exhibited inaccessibility inducing activity. The cytological examination indicated the inaccessibility inhibitor which may suppress inaccessibility to possibly by released by the pathogen, *E. graminis*. Cytoplasmic responses of coleoptile cells at prepenetration stage indicated the actin cytoskeleton to perhaps be involved in the inaccessibility of coleoptile cells. When coleoptiles were treated with inhibitors of actin, *E. pisi* formed a haustorium. Actin cytoskeleton would thus appear likely involved in the recognition or expression of inaccessibility.

Key words: barley, powdery mildew, inaccessibility, recognition, cytoskeleton

目 次

第一章 緒論	82	第四節 感染率の算出及び統計処理	84
第二章 材料及び方法	83	第三章 <i>E. pisi</i> 接種によって誘導される子葉鞘細胞質 の形態的变化	84
第一節 供試植物及び子葉鞘ボートの調製	83	第一節 序	84
第二節 供試菌	84	第二節 材料と方法	85
第三節 菌接種及び培養	84	第一項 子葉鞘上における <i>E. pisi</i> の形態形成及び 子葉鞘細胞に認められる形態的变化の観察	85
第一項 菌接種	84	第二項 マイクロインジェクションにより子葉鞘 細胞内に注入した油滴の細胞内移動速度の測定	86
第二項 培養	84	第三項 子葉鞘細胞における原形質糸の数及び 配向変化の解析	87

第三節 結果	87	第四項 拒否性インデューサー粗標品の分画	113
第一項 子葉鞘上における <i>E. pisi</i> の形態形成及び 子葉鞘細胞の形態的变化	87	第三節 結果	113
第二項 子葉鞘細胞にマイクロインジェクションした 油滴の細胞内移動	90	第一項 人工基質上における <i>E. pisi</i> の形態形成	113
第三項 子葉鞘細胞における原形質糸の数及び配向	93	第二項 菌体抽出物の分離	115
第四節 考察	94	第三項 菌体抽出物の拒否性誘導活性	116
第四章 <i>E. pisi</i> の侵入行動に伴う子葉鞘細胞細胞骨格 の動的变化	95	第四項 拒否性インデューサー粗標品の低分子・ 高分子分画の拒否性誘導能	116
第一節 序	95	第四節 考察	117
第二節 材料及び方法	96	第七章 <i>E. pisi</i> によって誘導される拒否性へのアクチン 繊維の関与	118
第一項 間接蛍光抗体法による微小管の染色	96	第一節 序	118
第二項 ローダミン-ファロイジンによる アクチン繊維の染色	96	第二節 材料及び方法	119
第三項 細胞骨格配向変化率の算出	97	第一項 供試薬剤	119
第四項 レーザースキャン顕微鏡観察	97	第二項 <i>E. pisi</i> の感染率及び子葉鞘細胞の原形質 流動に及ぼす各阻害剤の影響の検討	119
第三節 結果	97	第三項 アクチン繊維の配向変化に及ぼす サイトカラシンの影響の検討	120
第一項 子葉鞘細胞における微小管の配向	97	第三節 結果	120
第二項 子葉鞘細胞におけるアクチン繊維の配向	100	第一項 <i>E. pisi</i> の感染率及び子葉鞘細胞の原形質 流動に及ぼす各阻害剤の影響	120
第三項 <i>E. pisi</i> の感染行動に伴う細胞骨格配向 変化率の推移	103	第二項 アクチン繊維の配向変化に及ぼす サイトカラシンの影響	122
第四節 考察	104	第四節 考察	122
第五章 <i>E. pisi</i> 侵入以前に決定される拒否性の誘導	105	第八章 <i>E. graminis</i> による拒否性誘導の抑制	124
第一節 序	105	第一節 序	124
第二節 材料及び方法	105	第二節 材料及び方法	125
第一項 <i>E. pisi</i> による拒否性誘導の決定時期	105	第一項 <i>E. pisi</i> 菌体除去と <i>E. graminis</i> 移植の タイミングが <i>E. graminis</i> の感染率に 与える影響の検討	125
第二項 <i>E. pisi</i> の付着器成熟によって誘導される 拒否性の持続性の検討	107	第二項 <i>E. graminis</i> が持つ拒否性インヒビターの 細胞学的証明法	125
第三節 結果	107	第三節 結果	127
第一項 拒否性誘導の決定時期	107	第一項 <i>E. pisi</i> 菌体除去と <i>E. graminis</i> 移植の タイミングが <i>E. graminis</i> の感染率に 与える影響の検討	127
第二項 付着器成熟期までに誘導が決定される 拒否性の持続性	108	第二項 <i>E. graminis</i> が持つ拒否性インヒビターの 細胞学的証明法	127
第四節 考察	109	第四節 考察	128
第六章 <i>E. pisi</i> 菌体から放出される拒否性インデューサー の検索	110	第九章 総合考察	129
第一節 序	110	謝辞	131
第二節 材料及び方法	111	引用文献	132
第一項 人工基質上における <i>E. pisi</i> の形態形成系の検索	111		
第二項 ガラス板上に接種された <i>E. pisi</i> 菌体からの 物質の抽出	111		
第三項 <i>E. pisi</i> 菌体抽出物の拒否性誘導活性の測定	112		

第一章 緒 論

特定の植物は、ある限られた特定の病原菌のみに侵され、病気になる。換言すれば、ある植物病原菌は唯一のあるいはごく限られた宿主植物上でのみ病原性を発揮できる。宿主-寄生者間のこの特異的関係を寄生性の特異性と呼ぶ⁹⁷⁾。特定の植物と特定の病原菌の間に認められ

る寄生性の特異性は極めて厳格なものであることから考えると、このような関係が両者の相互認識とその結果発現される種々の反応によって決定づけられていることは疑いない。従って、寄生性の特異性の決定機構には、感染場における相互認識と病原性並びに抵抗性の発現という重要な問題が含まれており、この決定機構を解明することは植物病理学上のみならず生物学的にも十分に意義

があるといえる。宿主-病原菌の関係が1つあるいは極めて少数の因子によって決定されている場合は別として、一般には菌と植物が接触してから植物が菌に侵され、結果的に植物が発病するまでの過程にはいくつかの段階があると考えられる。従って、寄生性の特異性の決定機構を明らかにするためには、各段階における認識と発現が感染場において、いつ、どの様になされているかを解明する必要がある。

感染場における認識と発現に着目して寄生性の特異性を解明して行く上で、誘導感受性現象¹⁰³⁻¹⁰⁶⁾あるいは誘導抵抗性現象^{27,65,67,80,94,103,105)}を詳細に検討するのは極めて有効な方法であると考えられる。誘導感受性現象とは、植物に予め病原菌あるいは親和性菌を接種しておく、本来感染できない非病原菌や非親和性菌がその植物に感染増殖可能になる現象で、糸状菌を植物に接種した場合ばかりでなく、ウイルス^{37,52)}、細菌²⁰⁾などにも認められている。逆に、誘導抵抗性現象はある植物に本来感染できない非親和性菌や非病原菌を接種しておく、後から接種した病原菌や親和性菌の感染や発病が抑制される現象である。ある植物に感受性や抵抗性が誘導される際には、前接種された菌が植物に認識された結果、植物が後接種された菌を受け入れる、あるいは受け入れない状態になると考えられる。従って、前接種菌の認識とそれに続く感受性、抵抗性因子の発現、あるいは後接種菌に対するこれらの因子の発現抑制などを調べることで、より、認識や感受性、抵抗性の機構を探る糸口が見つかると考えられる。従来、これらの現象に関する研究は、植物固体が罹病するか否かを観察するレベルで行われてきた。しかし、実際の感染場では胞子を形成する菌と植物の関係は多くの場合1胞子対1細胞から始まっていると考えられるので、誘導感受性及び誘導抵抗性の機構を解明して行く第一歩は、菌が接種されてから細胞に侵入を試み、感染が成立するまでの段階を詳細に検討することにある。Ouchi and Oku^{99,104)}は、この誘導感受性を組織以下のレベルで解析し、組織、細胞レベルの誘導感受性を受容性と呼ぶことを提唱した。また逆に、Kunoh *et al.*⁸⁴⁾も同様の考えに基づき、細胞レベルの誘導抵抗性を拒否性と呼ぶことを提唱した。これらの考えは、感受性あるいは抵抗性の誘導という現象を最終的には分子レベルで解析することを目指している。誘導感受性あるいは誘導抵抗性を細胞レベルで研究するには、オオムギ子

葉鞘とうどんこ病菌の系は極めて有用な系であるといえる。子葉鞘は、部分的に解剖することにより一層の表皮細胞からなる系を作れるので^{22,126)}、生きた細胞を連続観察することができ、植物の1細胞対菌の1胞子という細胞レベルの詳細な検討ができるからである。このような特徴を持つ子葉鞘にうどんこ病菌を接種すると、菌の形態形成から発病までの過程が接触、付着、付着器形成、侵入、吸器形成、二次菌糸の伸長、及び胞子形成等の段階からなっていることを明瞭に識別できる。先の考え方に従うと、これらの段階の一部あるいは全てにおいて菌と宿主の間に相互認識が行われ、その結果として菌が感染し発病に至るか否かが決定されていると推定される。うどんこ病菌は絶対寄生菌であるので、この菌を用いて分子レベルの解析を行うときには制約を受けることが多いが、子葉鞘の系を用いると、うどんこ病菌の感染過程における宿主と菌のダイナミックな変化についての観察が容易で、発病に至るまでの各段階と形態変化を関連付けて論ずることが可能である。

前述のように、うどんこ病菌は絶対寄生菌であるため人工培養ができないので、その感染過程を生化学的手法を用いて解析することは難しいが、最終的にこれらの現象を分子レベルで解明することを目指す場合、実際の感染場で観察される細胞学的事実を説明できる生化学的裏付けも必要になる。

本研究では、以上のような観点から寄生性の特異性を解明するための1つのモデル系としてオオムギ-うどんこ病菌の系を用いて、特に子葉鞘細胞による非病原菌の認識とその結果誘導される拒否性に関して細胞学的検討を加えるとともに、その結果から推定される拒否性誘導の機構を物質レベルで解明する糸口を生化学的手法によって得ようとした。

第二章 材料及び方法

ここでは、各章に共通の供試材料及び方法について述べることにし、各章で用いた供試材料及び方法に関してはその都度詳述する。

第一節 供試植物及び子葉鞘ボートの調製

オオムギ (*Hordeum vulgare* L. 品種コピンカタギ) を供試植物とした。オオムギ種子をルベロン (北興化学工

業株式会社) 10^4 倍希釈液に30分間浸漬し、表面殺菌した。その後、 20°C の流水で8時間水洗した。シャーレの底に水を含ませた濾紙を敷き、この上に水洗した種子を蒔いて 20°C で22時間催芽させた。プラスチック容器にパーミキュライト及び KNOP 液 (常法) をそれぞれ適量入れ、発芽した種子を播種した。播種後、容器を人工気象器内において 20°C , 70% RH, $11.8 \text{ Wm}^{-2} \cdot 16 \text{ h/day}$ の条件で8日間培養した。播種後8日目のオオムギ植物から子葉鞘を切り出し、Takamatsu *et al.*¹²⁶⁾ の方法に従って解剖し、子葉鞘ポートを調製した (図1)。子葉鞘を縦半分に切り、両端にビニールテープを貼って固定し、外側表皮を除去して内側表皮のみを残した。以下、このようにして調製した子葉鞘ポートを単に子葉鞘と略記する。子葉鞘は、小型プラスチックシャーレ中の純粋または 0.01 M CaCl_2 溶液に浮かべた。

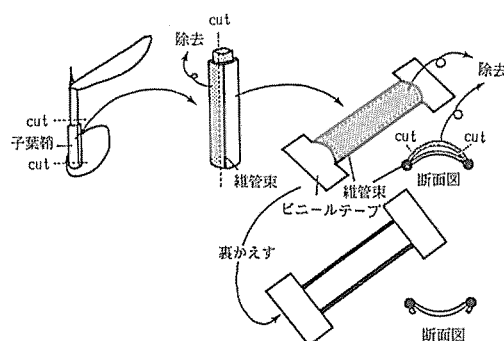


図1 子葉鞘ポートの作製法

第二節 供試菌

供試菌として、供試植物オオムギに対して非病原菌であるエンドウうどんこ病菌 (*Erysiphe pisi* D. C., race 1) 及び病原菌にあるオオムギうどんこ病菌 (*E. graminis* D. C. f. sp. *hordei* Em. Marchal, race 1) を用いた。両菌を、 20°C , 70% RH, $11.8 \text{ Wm}^{-2} \cdot 14 \text{ h/day}$ の人工気象器内において、それぞれの宿主であるエンドウ (*Pisum sativum* L. 品種アラスカ) 上及びオオムギ上で継代培養し、宿主葉上に形成された分生孢子 (以下単に孢子と略す) を各実験に供試した。

第三節 菌接種及び培養

第一項 菌接種

菌接種は次の2つの方法のうちいずれかにより行った。

1. 筆接種法

宿主葉上に形成された若い菌叢から筆を用いて孢子を掻き取り、これの子葉鞘上とに払い落とすことにより接種した。孢子は1つの子葉鞘当り20~30個の密度になるようにほぼ均一に接種し、1つの孢子の周囲4細胞以内には、他の孢子が存在しないようにした。以下単に接種と記述した場合は、この筆接種方を意味するものとする。

2. 移植接種法

一対の子葉鞘A、Bを用意し、子葉鞘Aに筆接種法を用いて孢子を接種して本節第二項で述べる方法により所定時間培養した。培養後、子葉鞘A上で生育中の孢子を顕微鏡マニプレーターを用いて釣り上げ、子葉鞘Bの1細胞上に移植した。以下単に移植と記述した場合は、この移植接種法を意味するものとする。

なお、*E. pisi* 及び *E. graminis* の移植を行う時期は、それぞれ接種後2.0~2.5及び5.5~6.0時間目とした。これらの時期は、それぞれ *E. pisi* の発芽管先端が膨潤を開始した時期、*E. graminis* の付着器発芽管が伸長を停止する時期にあたる。

第二項 培養

孢子を接種または移植した子葉鞘は、小型プラスチックシャーレ中の純水または 0.01 M CaCl_2 に浮かべた。このシャーレは蓋をせずに紙箱に入れ、 20°C , 70% RH, 暗黒の条件下で所定時間培養した。

第四節 感染率の算出及び統計処理

菌接種後24時間目に子葉鞘を光学顕微鏡 (BH2: オリパス, 東京) 観察し、吸器形成の有無を確認した。本研究では、吸器形成を感染成立とみなし、感染率を、以下の式により算出した。

$$\text{感染率 (\%)} = \frac{\text{吸器形成孢子数}}{\text{観察付着器数}} \times 100$$

また、得られたデータは分散未知の場合は χ^2 検定 (両側) を用いて、反復試験の分散を用いた場合は t 検定 (両側) を用いてそれぞれ解析した。

第三章 *E. pisi* 接種によって誘導される子葉鞘細胞質の形態的变化

第一節 序

Kunoh *et al.* は、オオムギ子葉鞘1細胞に病原菌 (*E.*

graminis) 及び非病原菌 (*E. pisi*) を種々のタイミングで接種及び移植する一連の実験を行い、1細胞レベルにおける感受性(受容性)^{82,86)}、および抵抗性(拒否性)^{82,84,85,87)}が誘導されることを証明してきた。最近彼らは、*E. pisi* によって子葉鞘細胞に拒否性が誘導される現象は、遅くとも *E. pisi* の付着器が侵入を開始してから0.5~3.0時間後までには既に決定されていることを示した⁸⁷⁾。このことは、遅くとも菌の侵入開始から0.5時間目までには、菌が与える化学的または物理的刺激あるいはその両者が子葉鞘細胞に拒否性を誘導するための引金となっている可能性を示唆している。しかしながら、種々の菌と植物の組合せで報告されているように、ファイトアレキシン合成に関する多くの生化学的データは^{32,44,51,114)}、菌侵入前の感染過程初期に宿主細胞が菌を認識していることを強く示唆している。例えば、Schmelzer *et al.*¹¹⁴⁾ は、ダイズ胚軸に *Phytophthora megasperma* f. sp. *glycinea* を接種し、ファイトアレキシン合成に関与する酵素である phenylalanine ammonia-lyase (PAL), chalcone synthase (CHS) 及び 4-coumarate: CoA ligase (4CL) をコードする mRNA 活性の増加を経時的に検討し、接種後6時間でこれら全ての活性がピークに達したことを報告している。また、Hahn *et al.*⁵¹⁾ は、同じ菌をダイズの根に接種して、グリセオリン I の量を経時的に定量し、接種後わずか2時間目にはグリセオリン I の蓄積が既に始まっていることを見出した。うどんこ病菌の感染過程は特に形態的手法により良く研究されているが、これまでの研究は細胞質凝集やバピラ形成^{2,3,21,24,40)} など、顕著な形態変化が認められる侵入開始前後の時期に集中してきた。しかし、Kunoh *et al.*⁸¹⁾ は、オオムギ子葉鞘細胞に *E. pisi* を接種した場合、実際にこの菌が侵入を開始する約1時間前に *E. pisi* の付着器下に微弱な細胞質凝集(一次凝集)が認められることを観察し、この時点までには既に子葉鞘細胞が *E. pisi* の存在を認識している可能性を示している。このことと、上述のように他の菌-寄生者関係では宿主植物は菌が侵入を開始する以前に菌の存在を認識している可能性が強く示唆されていることを考えると、うどんこ病菌の系においても侵入以前の現象を深く追求する必要があると考えられる。これを明らかにすることは、感染場において実際に起こっている現象を明らかにする上で重要な情報を与えると考えられる。そこで本章では、非病原

菌である *E. pisi* をオオムギ子葉鞘細胞に接種し、*E. pisi* が侵入を開始する以前に子葉鞘細胞に認められる形態的变化を光学顕微鏡を用いて詳細に観察するとともにその変化の定量的測定を試み、*E. pisi* が子葉鞘細胞によって認識される時期を推定することとした。

第二節 材料と方法

第一項 子葉鞘上における *E. pisi* の形態形成及び子葉鞘細胞に認められる形態的变化の観察

子葉鞘上における *E. pisi* の形態形成及びそれに伴う子葉鞘細胞の反応の過程を明らかにするため、以下のような実験を行った。

1. タイムラプスビデオを用いた連続観察

E. pisi の形態形成及び子葉鞘細胞に認められる形態変化のタイミングを明らかにするため、タイムラプスビデオを用いて菌及び子葉鞘細胞を連続観察した。子葉鞘に *E. pisi* を接種し、小型プラスチックシャーレ中の純水に浮かべ3~4時間培養した。培養後、連続観察用に考案したチャンバーにビニールテープで子葉鞘を固定し、チャンバーをビデオカメラ (DK5053, CU5053: 日立電子、東京) を装着した倒立型光学顕微鏡 (IM35: カール・ツァイス、西ドイツ) のステージに取り付けた (図2)。観察中は、チャンバー内に純水を還流させ、常に子葉鞘の裏面が新鮮な純水に接するようにした。観察開始後、子葉鞘細胞に認められる形態変化及び *E. pisi* の生育過程をタイムラプスビデオテープレコーダー (BR-9000: ビクター、東京) により、モード24 (1/12 倍速) で6~9時間録画した。実験中は、実験室内を $20 \pm 2^{\circ}\text{C}$, $70 \pm 10\%$ RH の条件に保った。なお、この実験は9反復し、*E. pisi* の形態形成及び子葉鞘細胞の形態変化が認められた平均時間及びその標準誤差を求めた。

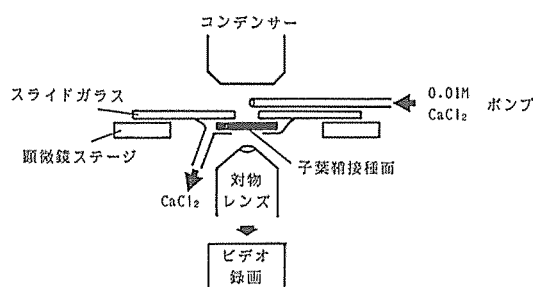


図2 倒立顕微鏡を用いた子葉鞘細胞の連続ビデオ観察系

2. 走査型電子顕微鏡 (SEM) 観察

E. pisi の形態形成及び子葉鞘細胞表面の変化を微細構造的に観察するため SEM 観察を行った。子葉鞘に *E. pisi* を接種し、所定の時間培養した後、光学顕微鏡により *E. pisi* の形態形成を写真撮影した。撮影後、直ちにその子葉鞘をタンニン酸固定し⁸³⁾、常法により脱水・臨界点乾燥し、SEM 用の試料を作成した。試料表面に約 30Å の厚さの金を蒸着し、加速電圧 15 kV で SEM (HHS-2X: 日立, 東京) 観察を行った。また、必要に応じて子葉鞘細胞上の菌体を SEM マニプレーターを用いて裏返し、菌と子葉鞘細胞の接触面を観察した。

第二項 マイクロインジェクションにより子葉鞘細胞内に注入した油滴の細胞内移動速度の測定

E. pisi 接種によって誘導される子葉鞘細胞の状態変化を定量的に表現するために、子葉鞘細胞にシリコンオイルをマイクロインジェクションし、油滴の移動軌跡及び移動距離を解析した。

1. 子葉鞘細胞へのシリコンオイルのマイクロインジェクション

子葉鞘細胞の膨圧を低下させずにマイクロインジェクションを行うと、マイクロニードルを細胞に突き刺した際に細胞内容物が細胞外に噴出する。そこで、これを防ぐためにマイクロインジェクションを行う前に、子葉鞘細胞の膨圧を低下させるため、子葉鞘を 0.3 M マンニトール溶液に10分間浮かべた。処理後、子葉鞘をスライドガラスにのせ、インジェクションスコープ (IMT-YF: オリンパス, 東京)¹³⁰⁾ のステージに置いた。マイクロニードル (口径約 0.1 μm) により、直径 8~10 μm の油滴となるようにシリコンオイル (SH-200: ナカラテクス, 京都) を子葉鞘中央部の細胞内に1細胞に1油滴ずつ注入した (注入圧, 約 2~3 kg/cm^2)。子葉鞘当たり約50個の細胞に注入した。注入後急激に膨圧が増すと、注入した油滴が細胞外に排出されたり、細胞が死んだりするので、0.25, 0.20, 0.10 M のマンニトール溶液に順次5分間ずつ浮かべた後、純水に浮かべて 20°C, 70% RH で3~5時間培養した。

2. 油滴の移動軌跡及び移動距離の解析

シリコンオイルを注入した子葉鞘を前節第一項に述べ

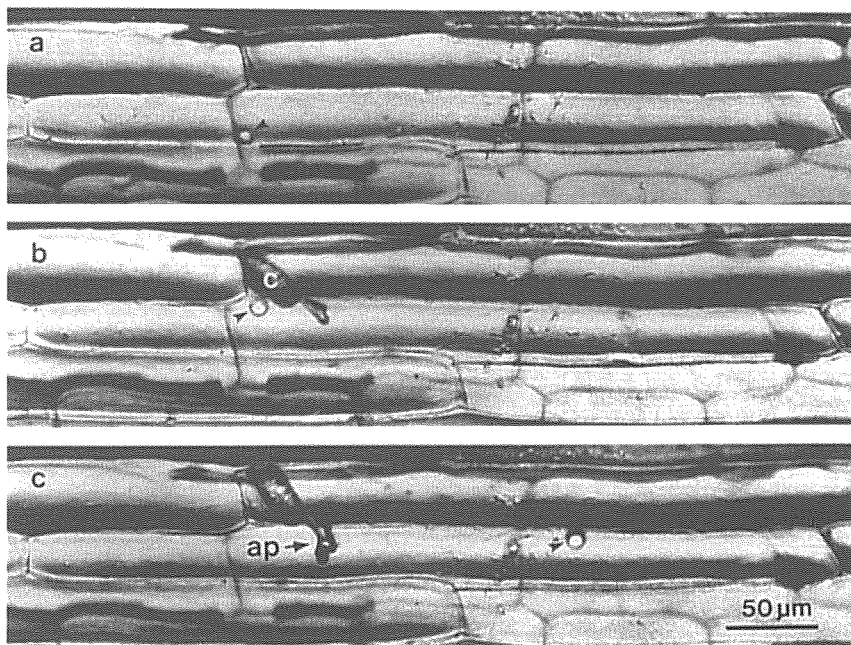


図3 マイクロインジェクションによる子葉鞘細胞原形質流動速度の定量的測定法

- 子葉鞘細胞にシリコンオイルを注入する。シリコンオイルは細胞中で油滴 (矢尻) として認められる。
 - 別の子葉鞘に接種してあった *E. pisi* (c) を細胞上に移植する。
 - E. pisi* 移植後2.5時間目、付着器 (ap) が成熟した。
- a, b, c とも油滴の位置 (矢尻) は移動している。油滴の移動をビデオ撮影し、画面から移動軌跡を解析する。

た連続観察用チャンバーに固定し、注入した油滴が移動している細胞を選びタイムラプスビデオで油滴の動きを1～3時間記録した(図3a)。この後、予め別の子葉鞘に接種してあった *E. pisi* の胞子をこの細胞上に移植し、接種後の油滴を動きをさらに8～9時間記録した(図3b, c)。記録した画像を再生し、モニター(CT1403: 日立電子, 東京)上から、5分間毎の油滴の移動軌跡を透明なセロファン上にトレースした。トレースした移動軌跡を画像解析装置(IBAS-1: カール・ツァイス, 西ドイツ)によって解析し、5分間毎の移動距離を求め、平均速度($\mu\text{m}/\text{min}$)を算出した。なお、実験中は、実験室内を $20\pm 2^\circ\text{C}$, $70\pm 10\%$ RHの条件に保ち、実験は6反復行った。

3. 子葉鞘細胞に及ぼすマイクロインジェクション処理の影響の解析

子葉鞘細胞にシリコンオイルをマイクロインジェクションすることにより、子葉鞘細胞の状態が変化するか否かを調べるために、前述の方法に従ってシリコンオイルを注入した子葉鞘細胞上に、*E. pisi* あるいは *E. graminis* を移植し、両菌の感染行動に及ぼす影響を検討した。非病原菌である *E. pisi* は通常子葉鞘細胞に感染し吸器形成することはないので、*E. pisi* の感染行動に対する影響は付着器下のパピラ形成を観察し、この菌が侵入を試みたか否かを指標にした。また、*E. graminis* の場合は子葉鞘細胞に吸器形成できるので、吸器形成率を指標とした。子葉鞘は、接種後24時間所定の方法(第二章)で培養し、*E. pisi* の付着器下に形成されたパピラあるいは *E. graminis* の付着器下に形成された吸器を観察し、それぞれ侵入率あるいは感染率を求めた。侵入率は以下の式により、感染率は第二章第四節に示した式により算出した。

$$\text{侵入率 (\%)} = \text{パピラ形成を誘導した付着器数} / \text{観察付着器数} \times 100$$

なお、対照区としてシリコンオイルを注入していない細胞上にそれぞれの菌を移植し、培養24時間目の侵入率あるいは感染率を同様に算出した。

第三項 子葉鞘細胞における原形質糸の数および配向変化の検討

E. pisi を接種した子葉鞘細胞内における原形質糸の数及びその配向の変化を検討するため以下の実験を行っ

た。子葉鞘に *E. pisi* を接種し、2～3時間培養後、発芽している胞子を選び30分毎に微分干渉顕微鏡(Axiophot: カール・ツァイス, 西ドイツ)により写真撮影を行った。子葉鞘細胞は平均約 $40\mu\text{m}$ の深さを持っており、また光学顕微鏡の焦点深度は細胞の深さ全体をカバーできないので、1枚の写真から1細胞中の原形質糸を全て捉えることは困難である。そこで、細胞中の原形質糸を可能な限り多く捉えるため、写真撮影の際には顕微鏡のステージを $10\mu\text{m}$ ずつ下げ、顕微鏡の焦点位置を段階的に変えながら、1つの細胞につき3～4枚の写真撮影した(図4a)。撮影した写真を撮影時間毎に透明なセロファンにトレースで重ね合わせ、1細胞中の原形質糸像を再構成した。再構成した像から、細胞内の原形質糸の数及びその配向を調べた(図4b)。

なお、無接種細胞及び、凍結乾燥により調製した *E. pisi* の死胞子を接種した細胞に関して同様の実験を行い、原形質糸の数及び配向の変化を算出した。

第三節 結果

第一項 子葉鞘上における *E. pisi* の形態形成及び子葉鞘細胞の形態的变化

1. 子葉鞘上における *E. pisi* の形態形成

接種した *E. pisi* の胞子からは、0.5～1.5時間後に発芽管が形成され、2.0～2.5時間後には、発芽管の先端部が膨潤し始め、付着器形成が開始された(図5-a)。以下、発芽管先端部が膨潤し始めた構造を膨潤付着器と定義する。膨潤付着器には、1つから数個の突起が不規則に形成され、接種後3.5～6.0時間が経過すると突起のうち1つに環状構造が識別された(図5-b)(後述)。この環状構造が形成された後、付着器が侵入行動を開始するまでの間に、付着器に形態変化は認められなかった。本研究においては、環状構造が形成された付着器を成熟付着器と定義することとした。なお、この構造の詳細な特徴等に関しては、本項3で述べる。接種後24時間目に観察したところ、付着器は吸器形成に常に失敗し、侵入地点にはパピラが形成されていた(図5-e)。また、侵入に失敗した付着器には新たに二次突起が形成される場合があった(図5-e)。

2. *E. pisi* 侵入開始前に子葉鞘細胞に認められる形態変化

E. pisi が子葉鞘細胞に侵入を開始する以前に認めら

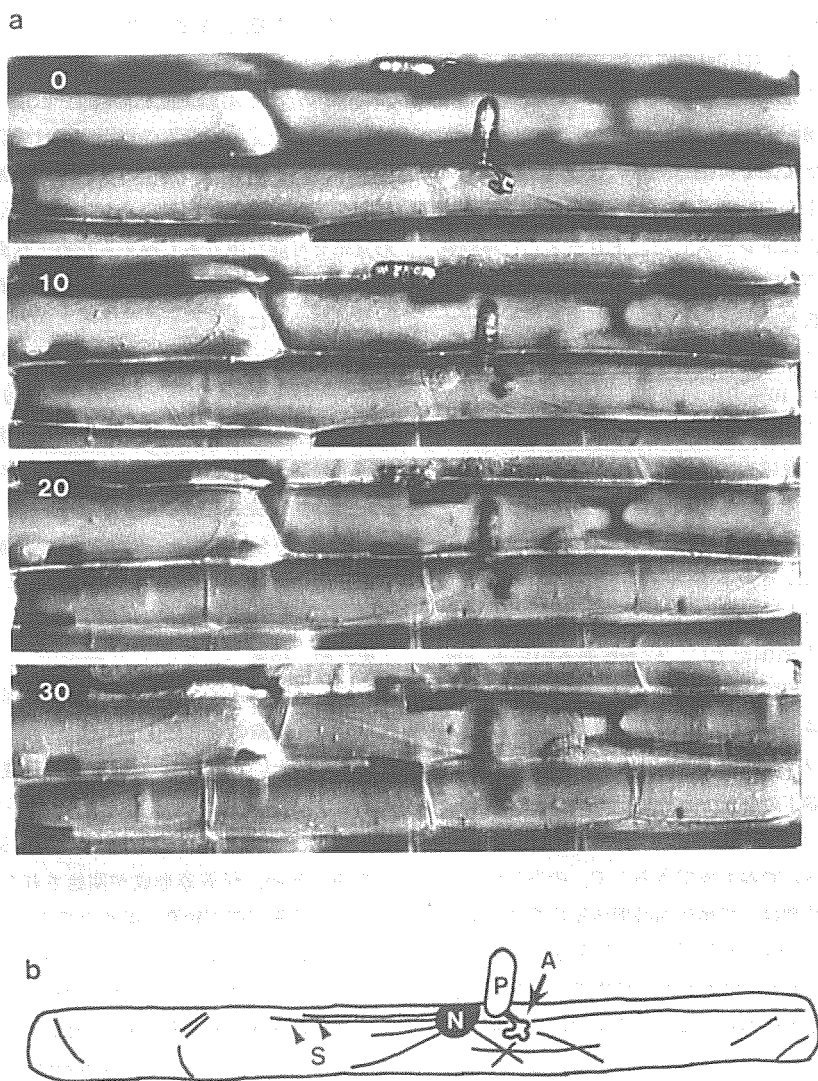


図4 子葉鞘細胞中の原形質糸数の測定法

- a. *E. pisi* 接種後一定時間に子葉鞘細胞を $10\mu\text{m}$ ずつ焦点位置をずらしながら写真撮影する。写真左上の数字は *E. pisi* の付着器に焦点が合った状態を $0\mu\text{m}$ として焦点位置の深さ (μm) を示している。
- b. 撮影後写真を重ね合わせて再構成した図。この場合、細胞内には15本の原形質糸が観察された。
- S, 原形質糸, N, 核, P, *E. pisi* 分生子, A, *E. pisi* 付着器

れる形態変化の連続観察結果9例のうち3例の経時的変化を図6に示した。他の観察結果もこれら3例と同様の傾向であった。*E. pisi* の付着器成熟から 19.2 ± 52.8 分後には、少なくとも1本以上の原形質糸が付着器下を通過するようになり (図5-b), 178.8 ± 42.0 分後には付着

器下に微弱な細胞質凝集 (一次凝集) が確認された (図5-c)。一次凝集は通常10~30分間断続的に見られるが、付着器成熟から 283.3 ± 30.6 分後にはさらに活発な凝集 (二次凝集, CA) が開始された (図5-d)。連続的に観察すると一次凝集と二次凝集は形態的に明らかに異

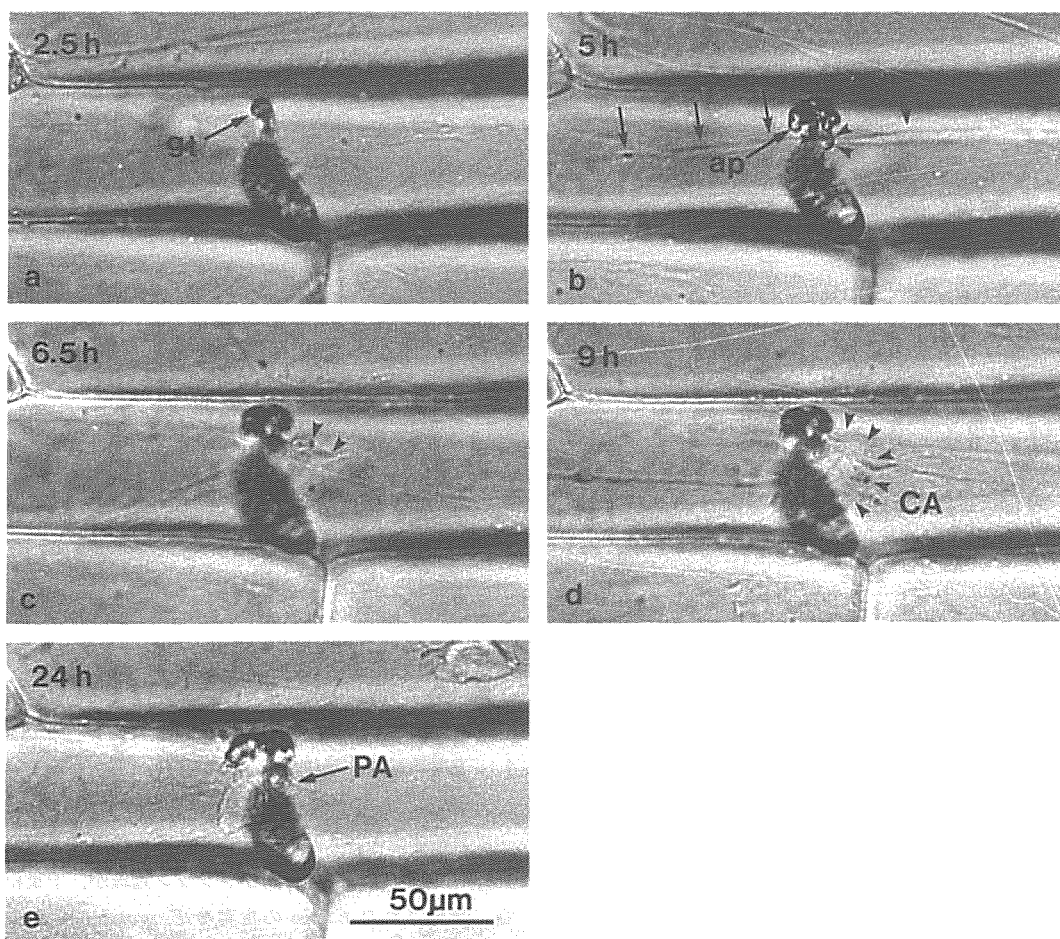


図5 オオムギ子葉鞘上での *E. pisi* の形態形成と子葉鞘細胞の反応

- E. pisi* 接種後2.5時間目、発芽管先端が膨潤し付着器形成が開始される。
- 同5時間目、付着器 (ap) 先端に環状構造 (矢尻) が認められる。また、付着器下に原形質系 (矢印) が通過している。
- 同6.5時間目、付着器下に原形質の激しい流れ (矢尻) が認められる。
- 同9時間目、付着器先端下に細胞質凝集 (矢尻) が認められる。
- 同24時間目、吸器は認められず感染に失敗している。PA, パピラ。

なっていた。すなわち、一次凝集は輪郭が明瞭でなく原形質系に沿った細長い形態で、単に原形質流動が断続的に活発化するように見えるのに対し、二次凝集は輪郭が明瞭で形態も円形に近く凝集の動きは連続して活発であり、断続することはなかった。本研究では、以後単に細胞質凝集と記載する場合には二次凝集を指すものとする。以上の結果から、*E. pisi* が実際に侵入を開始する4～5時間前には既に子葉鞘細胞に形態変化が認められることが明らかになった。また、二次凝集開始後、平均21.4

±7.5分で侵入孔 (pp) が観察されることが既に明らかにされており二次凝集が侵入行動開始の大まかな指標となりうるとされているので⁸¹⁾、本研究でも二次凝集開始時間を *E. pisi* の侵入開始時間と定義することとした。

3. 成熟付着器の微細構造

本項1. に述べたように、*E. pisi* を接種後、3.5～6.0時間目に付着器突起の1つに環状構造が形成されると付着器は伸長を停止し、他の突起下に環状構造が形成されることはなかった (図5-2, 7b)。この環状構造の形態

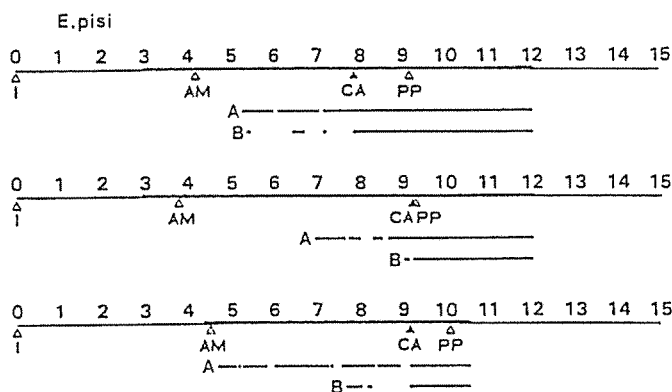


図6 子葉鞘細胞における *E. pisi* の形態形成及び子葉鞘細胞にみられる形態変化の経時的推移 (1目盛=60分)
 I, 接種, AM, 付着器成熟, CA, 細胞質凝集開始, PP, 侵入孔確認
 A, 付着器下で原形質流動が顕著であった時期
 B, 付着器下を原形質糸が通過していた時期
 いずれの場合も CA 開始前に原形質流動と原形質糸の配向が変化している。

的特徴をさらに詳細に明らかにするため、付着器成熟前後(環状構造形成前後)の形態を SEM 観察した。光顕観察によって付着器突起の一つに環状構造が認められ、成熟付着器であると判断された付着器を SEM 観察したところ、観察17胞子中16胞子の付着器突起側面と子葉鞘細胞表面との接触角は鈍角であった(図7d)。これに対して、光顕で環状構造が確認できず、未成熟と判定されたものでは観察15胞子中14胞子で付着器突起側面と子葉鞘細胞表面の接触角が鋭角であった(図7c)。このことから、環状構造が形成された突起の裏面は平面であろうと推定されたので、さらに SEM マニプレーターを用いて成熟付着器を子葉鞘細胞表面から引き剥し、付着器裏面及び子葉鞘細胞表面の付着器痕を露出した。一つの付着器には複数の突起が形成されるが(図7a, b, f)、環状構造が観察された付着器突起裏面のみは平面で(図7e, f)、同じ付着器にある環状構造が形成されなかった突起は全て丸みをおびていた(図7f)。また、付着器痕には侵入の形跡が全く認められなかった(図7g)。以上の観察から、環状構造は、突起が子葉鞘細胞表面に接着した結果出現するものであると判断された。従って、ここで

定義した付着器成熟期とは付着器が細胞表面に接着する時期に相当すると結論できる。

第二項 子葉鞘細胞にマイクロインジェクションした油滴の細胞内移動

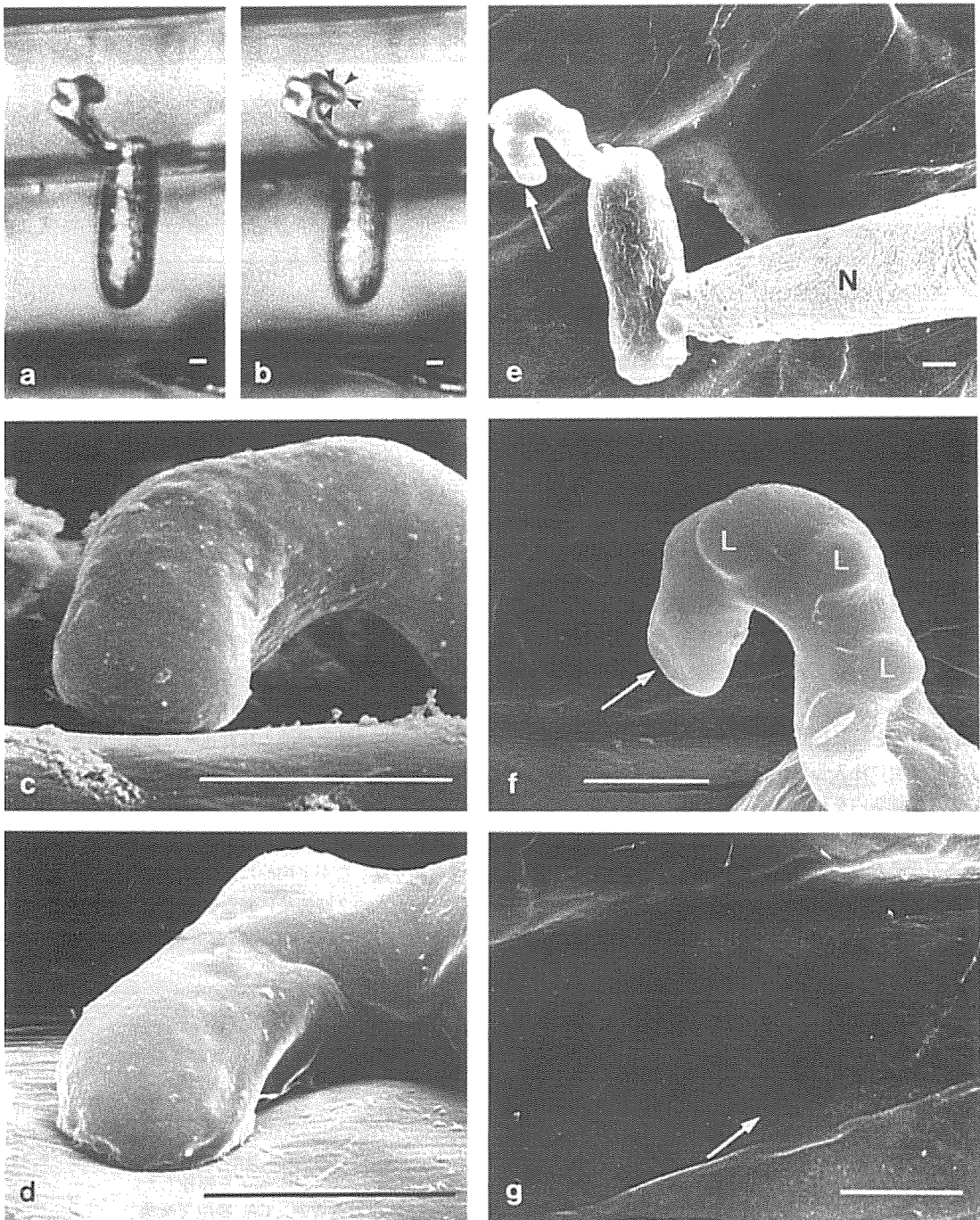
1. 子葉鞘細胞に及ぼすマイクロインジェクション処理の影響

子葉鞘細胞に注入したシリコンオイルの移動の観察に先だて、マイクロインジェクション処理が、子葉鞘細胞に接種された *E. pisi* の生育や *E. graminis* の感染に影響を及ぼすか否かを検討した。

マイクロインジェクション処理した子葉鞘細胞に移植した *E. pisi* の胞子からは正常な成熟付着器が形成された。接種後24時間目に観察した結果、付着器下には正常なバピラが形成され、侵入率は96.9%となり、対照区の100%と有意差は認められなかった($p>0.05$) (表1A)。また、マイクロインジェクション処理した細胞に *E. graminis* を移植した場合には、付着器下には正常な吸器が形成され、感染率は64.0%となり、対照区の68.3%と有意差は認められなかった($p>0.05$) (表1B)。以上の結果から、マイクロインジェクション処理は子葉鞘細胞

図7 *E. pisi* 付着器。先端環状構造形成前及び後の付着器と付着器接触面の SEM 像。

- 環状構造(矢尻)形成前(a)及び形成後(b)の光顕像。
- 環状構造形成前の付着器先端の SEM 像、付着器先端と細胞表面との接触角は鋭角である。
- 環状構造形成後の付着器先端の SEM 像、接触角は鈍角である。
- d の付着器を SEM マニプレーターで裏返す。矢印で示した部分は裏返し操作前に相互に接触していた。



f 付着器環状構造を持つ突起の裏面 (矢印) は平滑であり侵入突起等は認められない。その他の突起 (L) の裏面は丸みをおびている。

g 子葉鞘表面の付着器痕にも侵入孔等の変化は認められない。矢印は f の矢印部分が接触していた位置を示す。

(スケール=5 μ m)

表1 子葉鞘細胞へのシリコンオイルインジェクションが *E. graminis* 及び *E. pisi* の侵入行動に及ぼす影響

A <i>E. pisi</i>		
	バピラ形成を誘導した胞子数 ／観察胞子数	侵入率 (%)
対照区	48/48	100 a
インジェクション処理区	31/32	96.3 a
B <i>E. graminis</i>		
	吸器形成胞子数 ／観察胞子数	感染率 (%)
対照区	48/75	64.0 b
インジェクション処理区	41/60	68.3 b

a, b 各表において同じ文字間には有意差なし ($P>0.05$)

上の *E. pisi* の生育及び *E. graminis* の感染に全く影響を及ぼさないと判断できる。

2. 子葉鞘細胞に注入した油滴の運動

子葉鞘細胞にシリコンオイルをマイクロインジェクションする際、油滴の直径が $10\ \mu\text{m}$ を越えると、油滴は細胞内でほとんど移動しなかった。油滴が直径 $5\ \mu\text{m}$ 以下であると、本実験で用いた装置によってその動きを解析するには小さすぎた。そこで本実験では、 $8\sim 10\ \mu\text{m}$ の油滴を注入し、その動きを解析することとした。子葉鞘細胞に注入した油滴のうち、約20%は原形質流動にのって細胞内を移動した。しかし、残りの約80%は、注入した位置に留まり、細胞内を全く移動しなかった。油滴が移動しなかった子葉鞘細胞では、油滴が液胞内に注入されたかあるいはその他の理由で原形質流動に沿って移動できない状態にあると判断し、観察対象から除外した。注入された油滴は、稀に細胞の中央部を横切る場

合も見られたが、ほとんどの場合、子葉鞘細胞の側壁に沿って移動した。これは、子葉鞘細胞中央部に大きな液胞が存在しているためであると考えられる。*E. pisi* を接種する前の細胞中の油滴の移動速度は、平均 $3.16\pm 0.72\ \mu\text{m}/\text{min}$ であった。

図8は油滴の移動速度の推移の1例を示している。*E. pisi* を子葉鞘に移植すると、油滴の移動速度は若干増加し、平均 $4\sim 5\ \mu\text{m}/\text{min}$ となった。さらに、付着器成熟時期になると油滴の移動速度は急激に増加した。観察6例を平均すると、付着器の成熟から 24.0 ± 10.0 分後に平均最大値 $72.7\pm 1.2\ \mu\text{m}/\text{min}$ (*E. pisi* 移植前の移動速度の23倍)を示した。その後、断続的に移動速度は増減を繰り返したが平均的に高い状態が続いた。最大値を示してから約2時間後に細胞質凝集が開始されると、移動速度は急激に減少し、観察6例の平均速度は $7.3\pm 0.1\ \mu\text{m}/\text{min}$ となった。

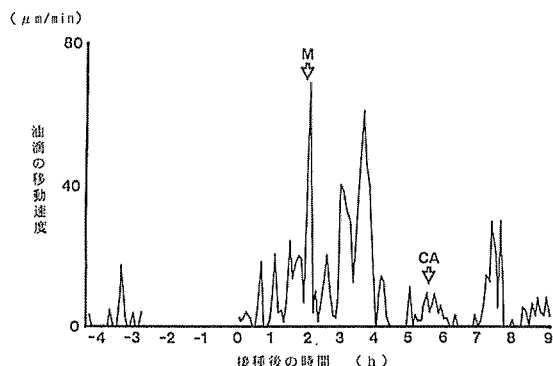


図8 子葉鞘細胞に注入された油滴の移動速度の変化
X軸0の時に *E. pisi* を移植した。
M, 付着器成熟, CA, 細胞質凝集

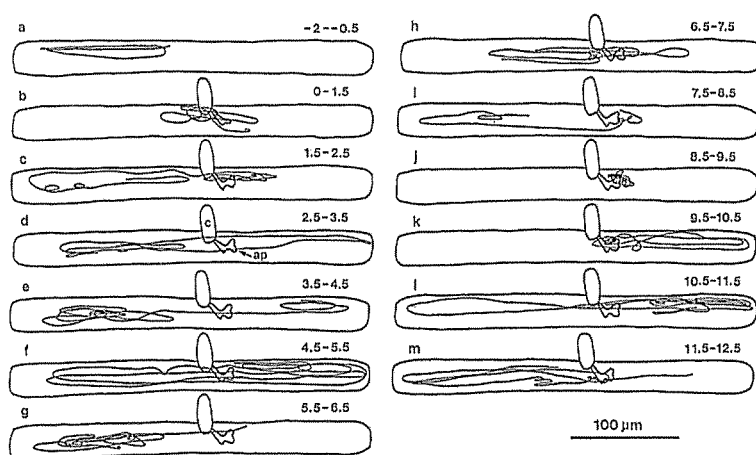


図9 子葉鞘細胞に注入した油滴の移動軌跡

各図の右上の数字は *E. pisi* 接種後の時間を示す。この例では付着器は接種6.0時間目に成熟し、細胞質凝集は8.7時間目に開始された。

ap, 付着器, C, *E. pisi* 胞子

子葉鞘細胞に注入した油滴の移動軌跡のうち1例を図9に示す。油滴は *E. pisi* を移植した直後には菌体の周囲のみを移動したが、その後特定の部位に限らず、細胞全体を移動した。しかし、付着器下に細胞質凝集が開始されると、油滴は付着器下のみを低速で移動するようになった。細胞質凝集開始後1～2時間経過すると、細胞質凝集開始前と同様に、油滴は再び細胞全体を移動するようになった。なお、他の観察例に関してもほぼ同様の結果が得られた。

第三項 子葉鞘細胞における原形質糸の数及び配向

子葉鞘を経時的に写真撮影し、原形質糸の数及び配向の変化を調べた。子葉鞘細胞の厚さは約40 μmであったので、10 μm ずつ焦点位置を変えた3～4枚の写真から一細胞中の原形質糸をほぼ完全に捉えることができた(図4)。

図10は *E. pisi* を接種した子葉鞘細胞内の原形質糸数の経時的变化の1例を示している。付着器が成熟するまでの原形質糸数は5～7本であったが、付着器成熟時期

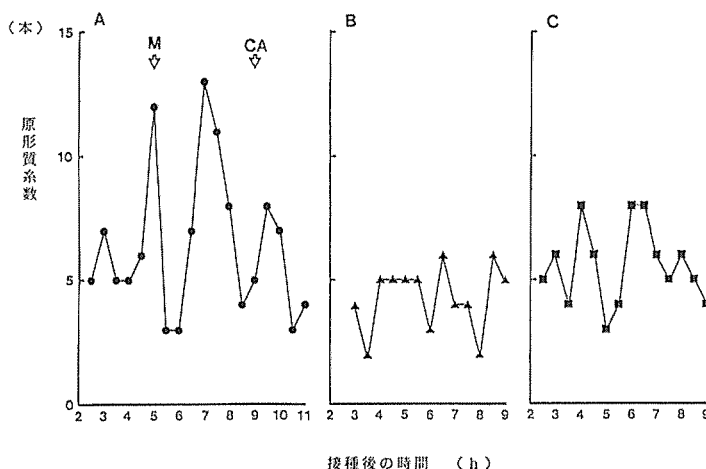


図10 子葉鞘細胞における原形質糸数の経時的变化

A, *E. pisi* 接種, B, 無接種, C, *E. pisi* 死菌接種, M, 付着器成熟, CA, 細胞質凝集

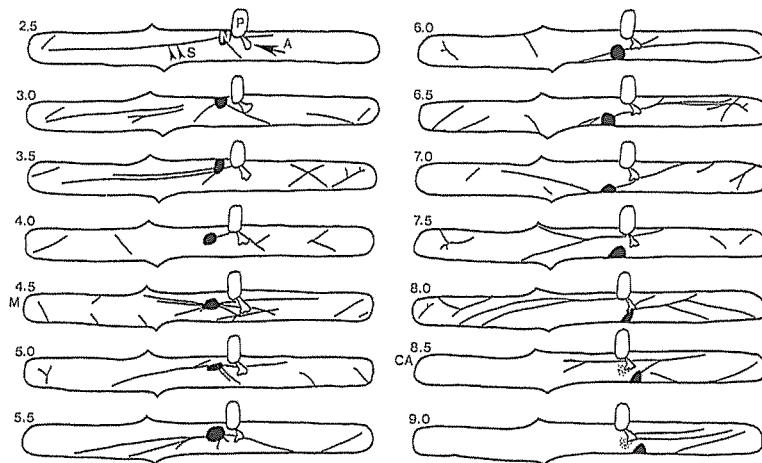


図 11 *E. pisi* を接種した子葉鞘細胞における原形質系配向の変化
各図の左上に示した数字は *E. pisi* 接種後の時間を示す。
S, 原形質系, N, 核, P, *E. pisi* 菌体

に最初のピークが現われ、12～15本に増加した。原形質糸数はその後も増減を繰り返し、一次凝集及び二次凝集の開始時期にもピークが現われる場合があった（図 10A）。これに対して、無接種の場合及び凍結乾燥により調製した *E. pisi* の死胞子を接種した場合には、このような増減は全く認められず、いずれの場合にも観察期間中の原形質糸数は3～8本であった（図 10B, C）。

原形質系の経時的配向変化の様子を図 11 に示す。*E. pisi* の付着器が成熟する以前（接種後2.5～4.0時間）には、原形質系の増加はみられず、特別な配向を示すこともなかった。しかし、*E. pisi* の付着器が成熟した時期（接種後4.5時間目）には原形質糸数が増加し、複数の原形質糸が付着器を中心に配向するようになった。その後、観察終了までのほとんどの期間、原形質糸は付着器下を通過する配向を示した（接種後5.0～9.0時間）。

以上のように *E. pisi* の付着器が成熟する時期に、原形質糸数及び配向に急激な変化がおこることが明らかになった。

第四節 考察

菌の攻撃を受けた植物に認められる形態変化のうち、侵入地点下に認められる細胞質凝集及びパピラ形成は、種々の植物で観察されている^{4,42,55,75,110,140}。これらの形態変化は、主に菌の侵入開始直前から侵入開始以降に認められる反応であるが、この時期よりかなり早い侵入

開始前に植物が菌の存在を認識している可能性を示す知見も得られている。例えば植物によるファイトアレキシン生成に関する生化学的あるいは分子遺伝学的研究^{32,44,51,114} は、これに関わる酵素系が実際に菌が侵入を開始する以前に作動することを示している。また、Kunoh *et al.*⁸¹⁾ は、オオムギ子葉鞘細胞に非病原菌である *E. pisi* を接種し、菌の侵入開始前後に認められる子葉鞘細胞の変化を調べ、二度の連続した凝集、すなわち一次凝集及び二次凝集が起こることを明らかにした。タイムラプスビデオによる連続観察の結果、本実験においても *E. pisi* の付着器が成熟する時期に一次凝集が観察された。一次凝集開始が確認できる時期は、実際に菌が侵入を開始する時期より4～5時間前であり、Kunoh *et al.*⁸¹⁾ の報告より約3～4時間早かった。これは、Kunoh *et al.*⁸¹⁾ が細胞質凝集に注目していたため、その開始を中心に観察が行われたこと、およびその観察が15分毎に行われたことから、原形質流動の断続的変化を見落としたためであると考えられる。さらに彼ら⁸¹⁾ は、一次凝集が開始された時期に *E. pisi* の付着器を光学顕微鏡及び走査電子顕微鏡を用いて詳細に観察し、この時期にはまだ菌が侵入を開始していないことを確かめている。このことは本実験の結果からも明らかであり、*E. pisi* を接種した細胞に認められる形態変化は実際に菌が侵入を開始するよりかなり早くおこることは確実である。従って、子葉鞘細胞は、*E. pisi* が侵入を開始するより

かなり以前に何らかの機構で菌の存在を認識していると推定される。この時期に子葉鞘細胞が菌の侵入などの物理的な刺激を受けていないとすると、菌から放出される化学的シグナルが種々の形態変化の引き金になっている可能性は極めて高い。また、成熟付着器の SEM 観察から明かなように、この時期は *E. pisi* の付着器突起が子葉鞘細胞の表面に強く接着する時期である。従って、なんらかの形で付着器の接着が子葉鞘細胞による *E. pisi* の認識に関わっていると考えられる。

このように、菌の侵入開始前に子葉鞘細胞に形態変化が起こることが明らかになったので、次にこの形態変化を定量化することを試みた。子葉鞘細胞に注入した油滴の移動速度は、*E. pisi* の付着器成熟期に最大になり、原形質糸の数も付着器成熟期に急激に増大することが明らかになった。これらの事実も、遅くともこの時期までに *E. pisi* の存在が子葉鞘細胞によって認識されていることを示唆しており、前述の結果を支持すると考えられる。本実験で見出されたような細胞質変化と類似の現象は他の菌と植物の組合せにおいても報告されている。Tomiyama¹²⁸⁾ 及び Kitazawa *et al.*⁷⁵⁾ は、ジャガイモ組織に親和性及び非親和性の *Phytophthora infestans* を接種して詳細な光学顕微鏡観察を行い、非親和性菌を接種した場合には、侵入地点下における細胞質の蓄積、侵入地点下への核の移動、及び原形質糸数の増加等の形態的变化が侵入開始の前後に起こるが、親和性菌を接種した場合には起こらないことを見出している。

一方、子葉鞘細胞内に注入した油滴の運動軌跡をさらに侵入開始時期まで観察すると、*E. pisi* の付着器下に二次凝集が認められる時期には油滴の移動速度は著者に低下することが明らかになった。この速度低下の原因として次の二つの可能性が考えられる。

- ①油滴を移動させる原形質流動速度が実際に低下した。
 - ②油滴を移動させる原形質流動に極性が生じ、一点に向かって推進力が働くようになった。
- 観察期間を通して細胞内の原形質流動が停止することはなかったので、①の可能性は低いと考えられる。しかし、Bushnell and Zeyen²⁴⁾ が示しているように細胞質凝集が起こっている地点はミトコンドリアや ER などのオルガネラが高密度に認められるので、②の可能性、すなわち原形質流動に一定の極性が生じ、オルガネラを一点に集中させるような推進力が働くことは十分に考えられる。

このことは、原形質糸の配向変化からも推測される。子葉鞘細胞内の原形質糸は *E. pisi* の付着器成熟期にこの付着期を中心に配向し、あたかもこれらの原形質糸によって付着器下にオルガネラが集積されるように見える。油滴の移動速度は細胞内の原形質流動速度と完全に一致するものではないので、あくまでも細胞の生理状態の変化を知るための一つの指標と考えるべきである。しかし、油滴の移動の推進力は明らかに原形質流動であると考えられるので、本研究では、この油滴の移動速度を単に原形質流動速度と以下に表記する。

第四章 *E. pisi* の侵入行動に伴う子葉鞘細胞細胞骨格の動的変化

第一節 序

前章で明らかにしたように、*E. pisi* を接種された子葉鞘細胞の形態的变化は、この菌の付着器が細胞上で成熟する時期に観察され始めた。この時期は、*E. pisi* が実際に侵入を開始する約 4～5 時間前である。この時期に認められた形態変化は、原形質流動速度の増高、原形質糸数の増加及び配向の変化であり、いずれも原形質流動と関係している。これらの事実をもとにすると、*E. pisi* を子葉鞘に接種すると、この菌の付着器が成熟する時期までに何らかの化学的シグナルが菌体から放出され、子葉鞘細胞はそれを認識し、結果的に細胞内の原形質流動に関連した変化が起こるものと推定される。この時期には、*E. pisi* の付着器からは侵入菌糸はまだ形成されておらず、子葉鞘細胞が菌から物理的な刺激を受けている可能性は低いと考えられる。

原形質流動に関連したこのような変化は、当然細胞内の生理的变化を反映していると考えられる。原形質流動は、細胞内における物質の能動的な輸送を通して、高等生物の細胞内における恒常性維持に機能していると考えられており⁶⁾、その駆動力にアクチンが関与していると考えられている^{7,19,70,108,123)}。アクチンは筋細胞中の主要なタンパク質であり、ミオシンとともに筋収縮を引き起こすことは良く知られていたが^{9,30,66)}、現在では高等植物を含む多くの非筋細胞にも普遍的にアクチンが存在することが明らかになっている^{8,73,107,111,116,117,139)}。アクチンは細胞骨格と呼ばれるタンパク質群の一つであり、もう一つの代表的細胞骨格であるチューブリンとともに、

細胞外からの刺激に対して敏感に反応すること^{111,112,122)}や細胞外からの刺激を細胞内に伝達する系への関与^{12,13,96,121)}が最近明らかになりつつある。これらのことを考え合わせると、子葉鞘に *E. pisi* を接種した際に認められた形態変化は、子葉鞘細胞の細胞骨格が動的に変化した結果認められた現象であることは十分に考えられる。また、もし実際にこのような事実が確認されれば、細胞骨格が何らかの形で菌の存在の認識あるいは菌の侵入成否に関わっている可能性もあわせて示唆される。

そこで本章では、*E. pisi* を接種した子葉鞘細胞における細胞骨格、特にチューブリン及びアクチンの重合体である微小管及びアクチン繊維の配向変化を次のような手法を用いてそれぞれ細胞組織化学的に染色し、観察した。また、配向変化の程度を可能な限り数的に示すため、後述するように配向変化率を算出した。

第二節 材料及び方法

第一項 間接蛍光抗体法による微小管の染色

微小管は、Kobayashi *et al.*⁷⁶⁾の方法に従い、次のように染色した。子葉鞘に *E. pisi* を接種し、所定の方法により培養した。接種後4.5時間目から15分毎に付着器形成を観察し、1子葉鞘当り5～6個の成熟付着器が形成されたことを確認後、1%ホルムアルデヒド溶液 [ホルマリン (ナカライテスク、京都) 2.9 ml, 10 mM リン酸バッファー (pH 7.4 以下、リン酸バッファーと略記) 100 ml] により、室温で30分間固定した。また、別の子葉鞘上で同様に接種後8時間目から15分毎に付着器下の細胞反応を観察し、胞子及び形成された付着器の位置を紙に記録した。1子葉鞘当り5～6個の付着器下に二次凝集が開始されてから0, 1, 3時間後に同様の固定を行った。固定後、さらに4%ホルムアルデヒド溶液 [ホルマリン (ナカライテスク、京都) 12.9 ml, リン酸バッファー 100 ml] により、室温で30分間固定した。4%ホルムアルデヒド溶液で直接子葉鞘を固定すると細胞に原形質分離がおきるので、これを防ぐ目的で固定を二段階に分けて行った。固定した試料をリン酸バッファーで3分間ずつ3回洗浄後、スライドガラスにのせ、染色しようとする子葉鞘細胞の細胞壁を顕微鏡マニピレーターを用いて僅かに傷つけた。この処理の意義については後述する。処理後、抗体の浸透性をさらに高めるため、

0.5%トリトン溶液 (Triton-X 100 0.5 ml, リン酸バッファー 99.5 ml) により、室温で30分間処理した。処理した試料をリン酸バッファーで3分間ずつ3回洗浄後、BSA-PBS [牛血製アルブミン (ナカライテスク、京都) 1 mg, NaCl 9 ml, リン酸バッファー, 100 ml] で5倍に希釈した一次抗体 (抗酵母チューブリンモノクローナル抗体 078b; セラ・ラボ、イギリス) により、37°C で1時間処理した。一次抗体処理した試料を BSA-PBS で5分間ずつ4回洗浄後、BSA-PBS で20倍に希釈した二次抗体 (FITC 標識抗ラット IgG ヤギ血清: ザイメット、アメリカ) により、37°C で1時間処理した。染色した試料をリン酸バッファーで5分間4回洗浄後、スライドガラス上にのせて維管束を取り除き、包埋液 [グリセリン 40 g, *p*-フェニレンジアミン 100 mg, リン酸バッファー 60 ml] を一滴滴下したカバーガラスをのせ、プレパラートを作成した。蛍光顕微鏡 (Axiophot: カール・ツァイス、西ドイツ、フィルターセット: BP490, FT510, LP565) によりプレパラートを観察し、写真撮影を行った。

本法では、特異的に微小管を染色するため間接蛍光抗体法を用いた。抗体は、高分子であるため、植物の細胞壁を通過することはできない。そのために、植物細胞に本法を用いる際には、酵素的に細胞壁を消化したり^{1,62,116,137)}、凍結切片を作成する^{64,68)}方法がよく用いられてきたが、本実験のように植物細胞上にある菌の位置を問題にする場合には、染色前の処理によって位置がずれたり、見失われてしまっては意味が無い。試行錯誤の結果、試料固定後に対象細胞の細胞壁に顕微鏡マニピレーターを用いて小さな傷をつけるだけで抗体が細胞内に浸透することを見出した。そこで、本実験では、この処理を行って抗体を子葉鞘細胞内に浸透させることとした。

第二項 ローダミン-ファロイジンによるアクチン繊維の染色

子葉鞘に *E. pisi* を接種し、所定の方法により培養した。接種後、第一項と同様の時間に子葉鞘を取り出し、1%ホルムアルデヒド溶液により、室温で30分間固定した。固定した試料を、リン酸バッファーで3分間ずつ3回洗浄後、染色液の浸透性を高めるために0.5%トリトン溶液で、30分間、室温で処理した。再びリン酸バッファーで3分間ずつ3回洗浄した後、F-アクチンを特

異的に染色するローダミン-ファロイジン溶液 [ローダミン-ファロイジン (マイクロプロベス, 米国) 5 μ l, リン酸バッファー 45 μ l] により, 室温, 暗黒下で1時間染色した。染色した試料をリン酸バッファーで5分間洗浄後, スライドガラス上にのせて維管束を取り除き, 包埋液を1滴滴下してカバーガラスをのせ, プレパラートを作成した。蛍光顕微鏡によりプレパラートを観察し, 写真撮影を行った。

また, 第三節に述べるようにアクチン繊維の配向は原形質系の配向と類似していたことから, 原形質系とアクチン繊維が位置的に一致するか否か, すなわち原形質系がアクチン繊維を含むか否かをさらに検討した。子葉鞘に *E. pisi* を接種し, 6.0時間培養した後微分干渉顕微鏡観察により *E. pisi* の成熟付着器下を原形質系が通過している細胞を選び写真撮影した。写真撮影後, この子葉鞘を直ちに1%ホルムアルデヒド溶液に浸漬して30分間固定し, 前述したと同様の染色処理を行った。染色後, 予め写真撮影した細胞を選び出し, 蛍光顕微鏡 (フィルターセット: BP546, FT580, LP590) によってアクチン繊維の配向を写真撮影し, この配向と原形質系の配向とを比較検討した。

第三項 細胞骨格配向変化率の算出

前述の方法により子葉鞘細胞の微小管あるいはアクチン繊維を染色した後, 蛍光顕微鏡下でこれらの配向を観察した。無接種対照区の細胞内の細胞骨格とは明らかに異なっている配向を示す接種細胞を配向変化細胞と定義し, 以下に示す式によってそれぞれの細胞骨格の配向変化率を算出した。

$$\text{配向変化率 (\%)} = \frac{\text{配向変化細胞数}}{\text{被接種細胞数}} \times 100$$

なお, アクチン繊維及び微小管の配向変化の基準は, それぞれ第三節第一項及び第二項に詳述する。

第四項 レーザースキャン顕微鏡観察

第一項及び第二項で述べた方法により染色した微小管及びアクチン繊維をレーザースキャン顕微鏡 (LSM10: カール・ツァイス, 西ドイツ)^{6,79,140)} により観察した。レーザースキャン顕微鏡装置の概要を図12に示した。この顕微鏡は, 光源にレーザーを採用し, 焦点深度が極めて浅くなるように設計されており (約 0.2 μ m), 蛍光染色した試料を横方向に走査するとあたかも走査面の切片

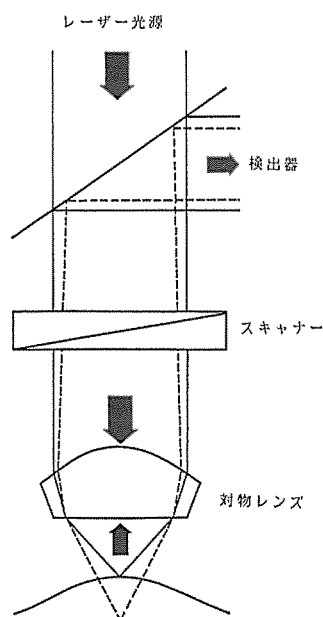


図12 レーザースキャン顕微鏡の基本的な原理図
矢印はレーザー光の光路を示す。

を作成したかのように観察することができる (図13)。このような像を光学的切片と呼び, この像をさらに画像処理すれば焦点合成像 (図15-2a) や三次元再構成像 (図15-1b, 2b, 17-1b) を作成することができる。さらに, レーザーを縦方向に走査すると, 同様の原理で断面像を作成することができる (X-Z スキャン; 図17-2a, b)。

このレーザースキャン顕微鏡を用い, *E. pisi* を接種した子葉鞘細胞に認められる微小管及びアクチン繊維の配向変化をさらに詳細に観察した。子葉鞘細胞に *E. pisi* を接種し, 第一項及び第二項に述べた方法で微小管及びアクチン繊維をそれぞれ染色し, 蛍光顕微鏡で染色状態を確認した後, 試料を-80°Cのフリーザー内に保存した。凍結保存した試料を随時取り出して解凍し, レーザースキャン顕微鏡観察に供試した。なお, レーザー光源は, 微小管の観察 (FITC 励起) の際にはアルゴン L488, アクチン繊維の観察 (ローダミン励起) の際にはアルゴン L514をそれぞれ使用した。

第三節 結果

第一項 子葉鞘細胞における微小管の配向

E. pisi 無接種の子葉鞘細胞を間接蛍光抗体法により

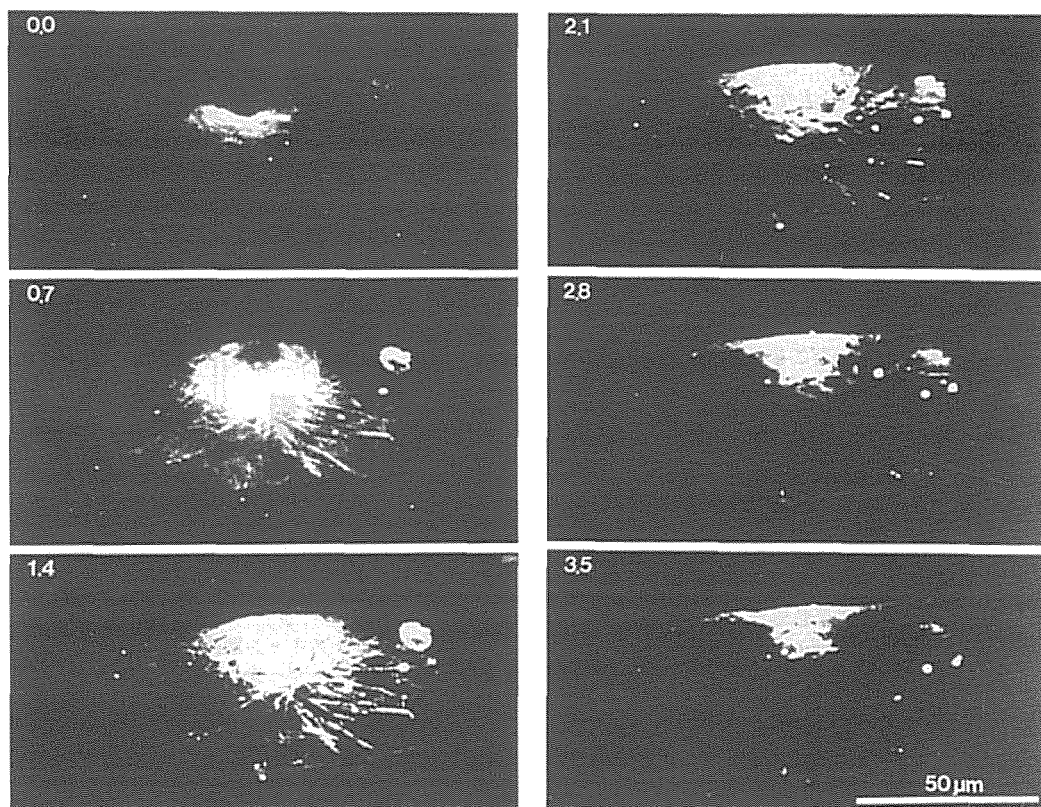


図 13 レーザースキャン顕微鏡により観察した微小管の光学切片像

E. pisi 付着器下に細胞質凝集が開始されてから1時間目のネットワーク状に配向した微小管の光学切片像。各図の左上の数字は、子葉鞘細胞壁直下を0 μm として切片の深さ (μm) を示している。

染色したところ、細胞内の微小管は緑色蛍光を発する繊維状の構造として鮮明に観察された (図 14-1a, b)。同一細胞内の微小管は互いにはほぼ平行な規則的配列を示し細胞の長軸に対して直角から斜めの配向を示した。この微小管の配向をレーザースキャン顕微鏡によって観察し、三次元再構成像を作成したところ、微小管は細胞壁の裏打ちをするように籠状に配列していることが明らかになった (図 15-1a, b)。また、抗体を細胞内に浸透させる目的で子葉鞘細胞の細胞壁につけた傷の部分には、強い蛍光が認められた (図 14-1a, b, 14-3a, b, 矢印)。こ

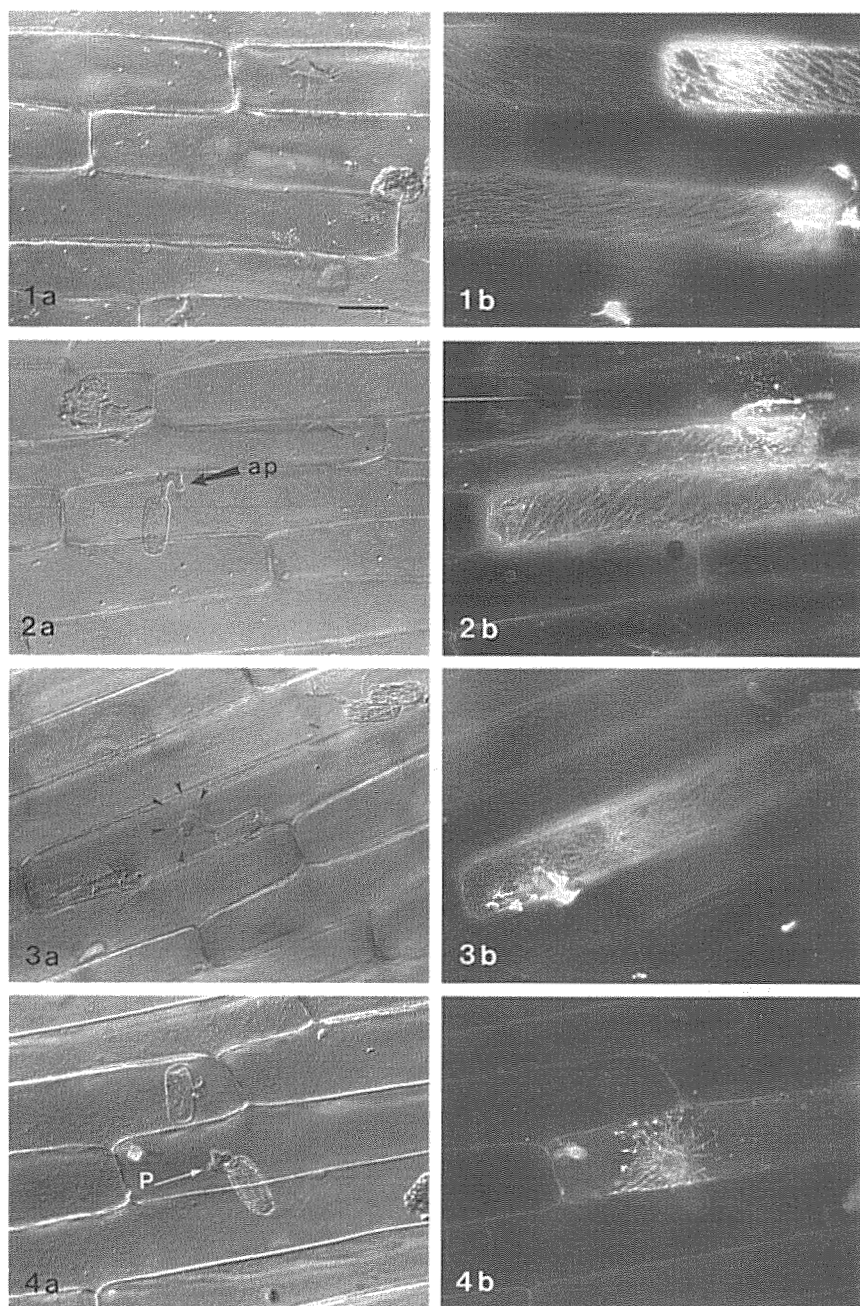
の強い蛍光は一連の染色処理から一次抗体処理を省いた場合にも同様に観察されたことから、二次抗体の非特異的吸着によるものであると考えられる。

一方、接種した *E. pisi* が成熟付着器を形成した子葉鞘を染色し、微小管の配向を蛍光顕微鏡観察したところ本節第四項に述べるようにごく少数の成熟付着器下には既に配向変化が認められたが、ほとんどの場合全く変化が認められなかった (図 14-2a, b)。さらに、*E. pisi* の付着器下で細胞質凝集が認められた子葉鞘細胞を観察したところ、付着器を中心に放射状に配向を示し、明らか

図 14 子葉鞘細胞における微小管の配向変化

それぞれ a, b は同一視野の微分干渉顕微鏡像 (a)、及び間接蛍光抗体法により染色した蛍光顕微鏡像 (b) を示す。各組写真の大矢尻は同一地点を示す。

1a, b 対照区の子葉鞘細胞。微小管は、細胞の長軸に対して直角から斜めに配向していた。



- 2a, b 接種後6.0時間目には *E. pisi* の付着器 (ap) が成熟した。この時期には微小管の配向変化は認められない。
- 3a, b 接種後9.0時間目に *E. pisi* の付着器下に細胞質凝集 (小矢尻) が観察された。この時期には多数の微小管が、侵入地点を中心に配向した。
- 4a, b 細胞質凝集開始後1時間目には、付着器下にパピラ (P) が形成され始め、微小管はパピラを中心にネットワーク状に配向した。

(スケール=20 μm)

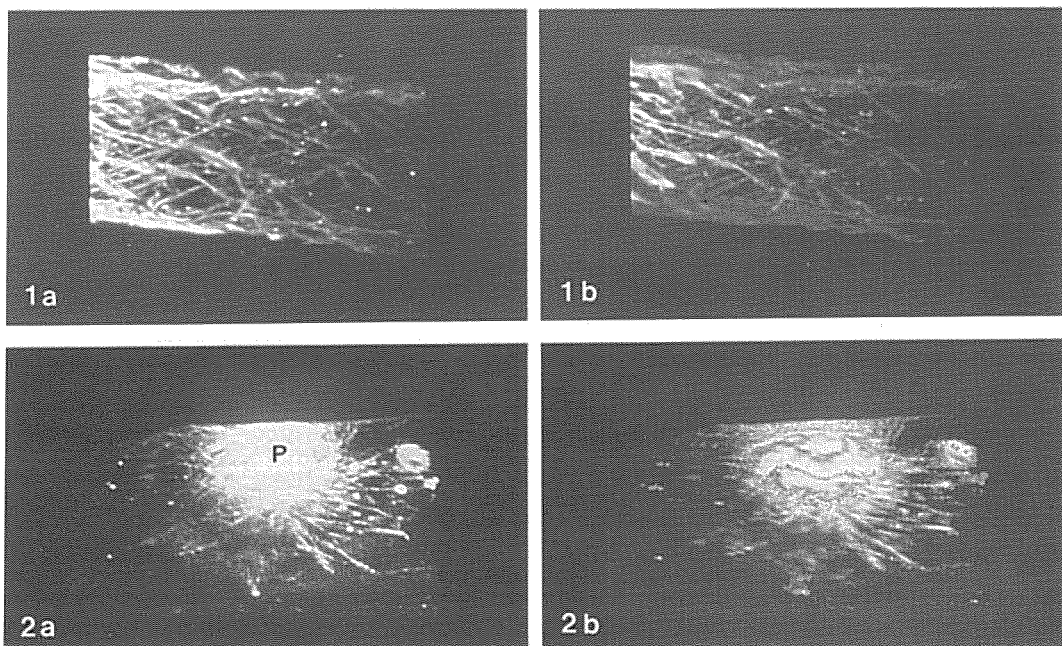


図 15 レーザースキャン顕微鏡による子葉鞘細胞の微小管の観察

1a, b 対照区の子葉鞘細胞における微小管の焦点合成像 (a) 及び三次元再構成像 (b)。15枚の切片から合成された像。微小管は細胞壁を裏打ちするように籠状に配向している。

2a, b 図14に示した *E. pisi* 付着器下に細胞質凝集が開始されてから1時間目の微小管の光学切片から作製された焦点合成像 (a) 及び三次元再構成像 (b)。微小管は細胞の深部から浅い方向に配向しており山状を呈していた。

P, パピラ

な配向変化が認められた (図 14-3a, b)。細胞質凝集開始後1時間目には、付着器下にパピラが観察され、このパピラを中心にしてさらに多数の微小管がネットワーク状に配向するようになった (図 14-4a, b)。個々の微小管は細胞質凝集開始直後に比べてやや太く見え、細胞内にはこのネットワーク状の微小管以外は観察できなくなった (図 14-4a, b)。細胞質凝集開始後1時間目の放射状に配向した微小管をレーザースキャン顕微鏡で観察し三次元再構成像を作成した結果、微小管はパピラを頂点にして細胞の深部から浅い部分に向かって山状に配向していることが明らかになった (図 15-2a, b)。

以上のように、微小管の配向変化は付着器を中心に微小管が放射状に配向する形態であることが明らかになったので、第三項に述べる配向変化率を算出する際には、このような配向変化の見られた細胞を微小管の配向変化細胞と定義することとした。

第二項 子葉鞘細胞におけるアクチン繊維の配向

無接種の子葉鞘細胞をローダミン-ファロイジン染色すると、アクチン繊維は赤い蛍光を発し、微小管の染色像よりやや太い繊維状の構造として観察された。細胞内におけるアクチン繊維の配向は微小管のそれとは異なり、明らかに規則性は認められず、ほとんどのものは細胞の長軸とほぼ平行からやや斜めに配向していた (図 16-1a, b)。アクチンの配向を立体的に検討するため、レーザースキャン顕微鏡観察を行い三次元再構成像を作成した結果、微小管の場合とは異なり細胞壁の直下のみでなく細胞内全体に分布することが明らかになった (図 17-1b)。

一方、*E. pisi* を接種すると、子葉鞘細胞内のアクチン繊維の配向が変化することが明らかになった。接種した *E. pisi* が成熟付着器を形成した子葉鞘を染色し、蛍光顕微鏡観察したところ、成熟付着器下を走行している

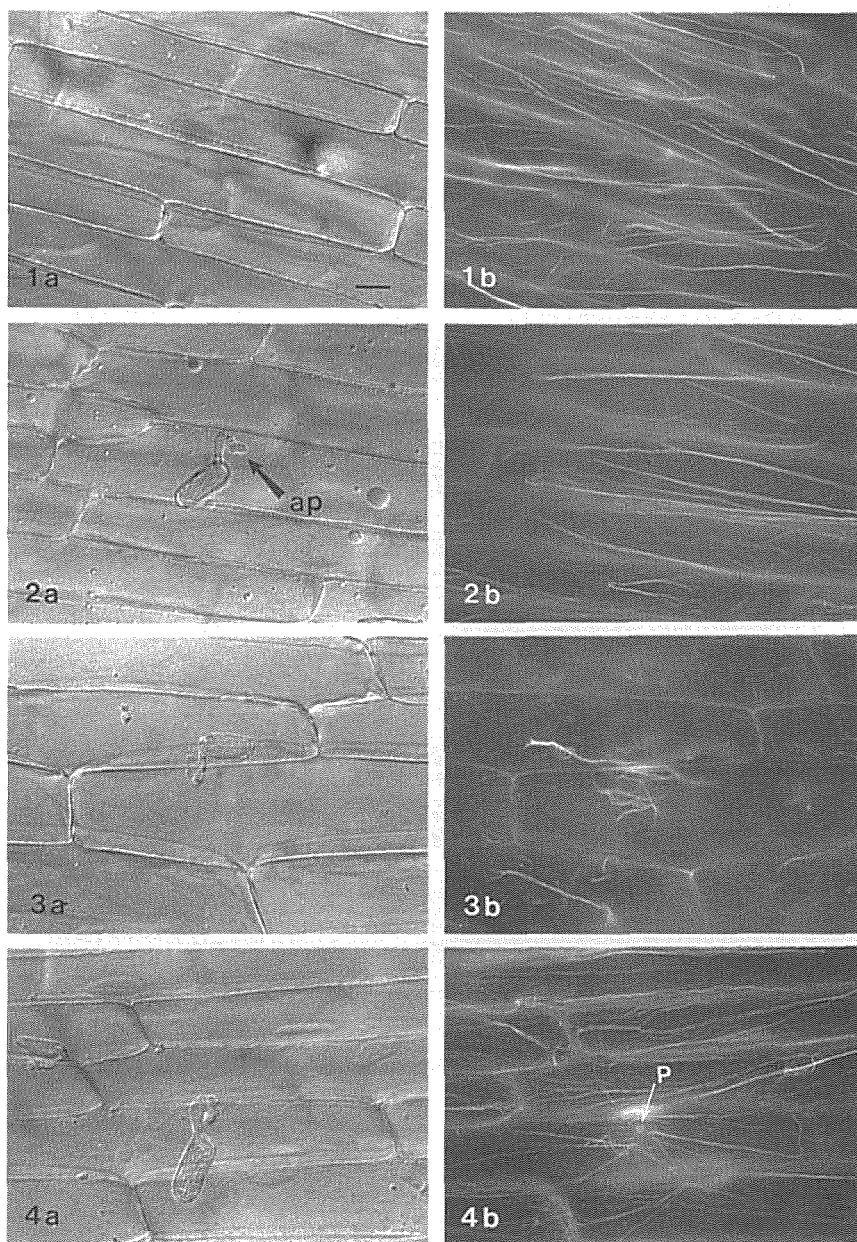


図 16 子葉鞘細胞におけるアクチンの配向変化

それぞれ a, b は同一視野の微分干渉顕微鏡像 (a), 及びローダミン-ファロイジン染色による蛍光顕微鏡像 (b) を示す。各組写真の矢尻は同一地点を示す。

1a, b 対照区の子葉鞘細胞。アクチン繊維は、細胞の長軸とほぼ平行かやや斜めに配向していた。

2a, b 接種後5.0時間目に *E. pisi* の付着器 (ap) が成熟し、数本のアクチン繊維がその付着器下を走行するのが観察された。

3a, b 細胞質凝集開始後1時間目には *E. pisi* の付着器下に多数のアクチン繊維が観察された。

4a, b 細胞質凝集開始後3時間目には *E. pisi* の付着器下に観察されたパピラ (P) を中心にアクチン繊維が放射状に配向した。

(スケール=20 μm)

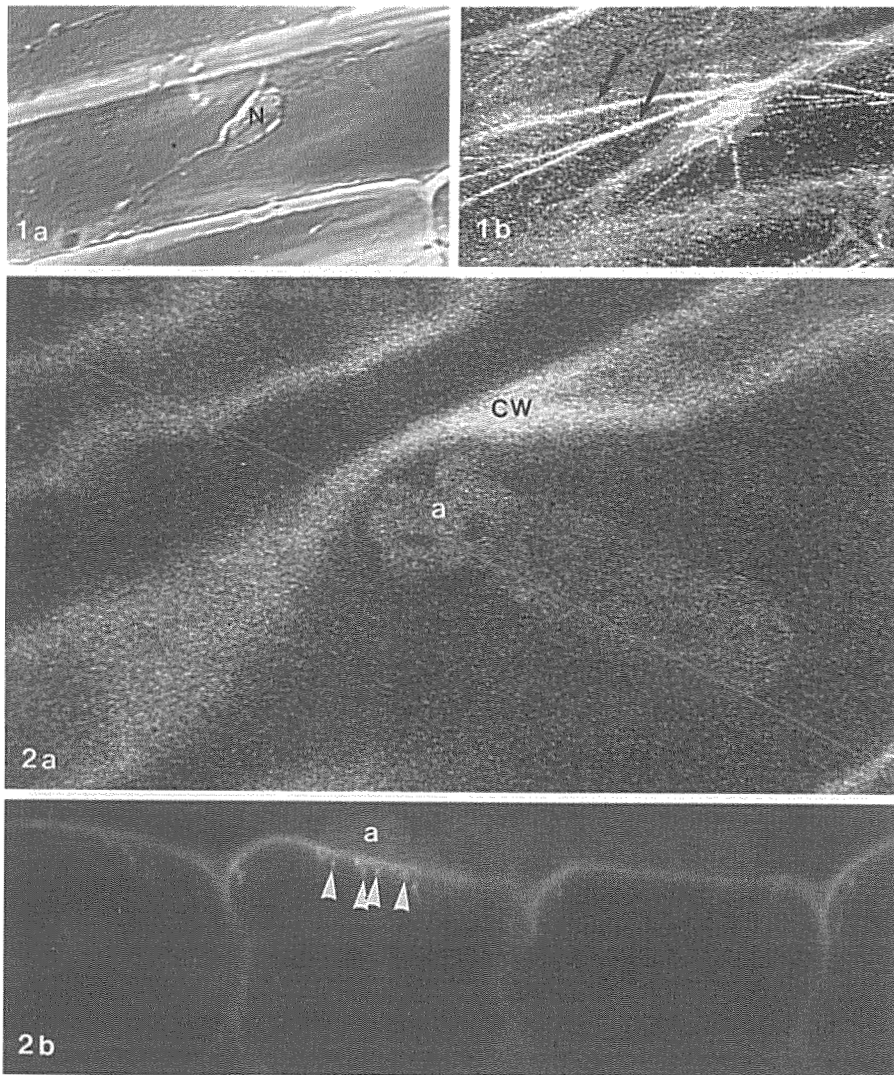


図 17 レーザースキャン顕微鏡による子葉鞘細胞アクチン繊維の観察

- 1a, b 対照区の子葉鞘細胞の微分干渉像 (a) 及びアクチン繊維 (矢印) の三次元再構成像 (b)。子葉鞘細胞内のアクチン繊維は、細胞内全体に観察された。
- 2a, b *E. pisi* を接種後、5.5時間目に子葉鞘細胞上で付着器が成熟した。この子葉鞘細胞の光学切片像 (a) 及び a に示した線の部分でレーザーを縦方向に走査して作製した X-Z スキャン像 (b)。多数のアクチン繊維が付着器下に観察された (矢尻)。
- a, 付着器, CW, 子葉鞘細胞細胞壁, N, 核

数本のアクチン繊維が観察された (図 16-2a, b)。焦点を変えながら観察した結果、アクチン戦地は成熟付着器直下を通過していると考えられた。そこで、この付着器下を通過しているアクチン繊維が細胞内のどの程度の深さを通過しているかを正確に知るために、レーザース

キャン顕微鏡を用いて X-Z スキャンすることにより、縦断面像を観察した (図 17-2a, b)。この結果、成熟付着器下を通過するアクチン繊維は付着器直下の細胞質に局在する事が明らかになった。従って、微小管の場合とは異なり、アクチン繊維の配向は、付着器成熟の時期に

既に変化していることが明らかになった。

付着器下に細胞質凝集が観察される時期には、アクチン繊維の配向はさらに顕著に変化した。細胞質凝集開始後1時間目には *E. pisi* の付着器下に多数のアクチン繊維が観察され (図16-3a, b), 3時間目になると微小管の場合と同様に付着器下に形成されたパピラを中心に放射状に配向した (図16-4a, b)。しかし、微小管の場合とは異なり、侵入地点周囲以外の細胞部位にもアクチン繊維は認められた。このように、アクチン繊維の配向変化には、成熟付着器下を数本のアクチン繊維が走行する場合と付着器下に多数のアクチン繊維が認められる場合とが観察された。そこで、第三項に述べる配向変化率を算出する際、いずれかの変化が認められた細胞をアクチン繊維の配向変化細胞と定義した。以上述べたように、アクチン繊維の配向はその形態及び変化の起こる時期から見て、前章に述べた原形質系の配向変化に類似していたので、さらに原形質系とアクチン繊維が位置的に一致するか否かを検討した。*E. pisi* を接種後、6.0時間目に子葉鞘細胞を微分干渉顕微鏡で観察し、*E. pisi* の成熟付着器下を原形質系が通過している細胞を選んで写真撮影した (図18)。この子葉鞘を直ちに所定の方法で固定し、アクチンの染色を行ったところ、微分干渉顕微鏡により観察された原形質系の位置 (図18A; 矢尻) と、アクチン繊維の位置 (図18c; 矢尻) とがほぼ一致した。このことから原形質系はアクチン繊維を含んでいることが明らかになった。

第三項 *E. pisi* の感染行動に伴う細胞骨格配向変化率の推移

子葉鞘に *E. pisi* を接種後1.5時間毎に固定し、微小管及びアクチン繊維の配向変化を観察し、配向変化率を算出した (図19)。

微小管の配向が変化した細胞は、接種後4.5時間目から観察されたが、7.5時間目までは配向変化率が約10%程度と低率のまま推移した。その後、微小管の配向変化率は、接種後7.5~12時間の間に急激に上昇し、12時間目には約80%に達した。微小管の配向が急激に変化する時期は、*E. pisi* の付着器下に細胞質凝集が開始される時間とはほぼ一致した。

一方、アクチン繊維の配向も接種後4.5時間目には変化し始めたが、微小管の場合とは異なり、接種後4.5~7.5時間の間に配向変化率が急激に上昇した。接種後7.5

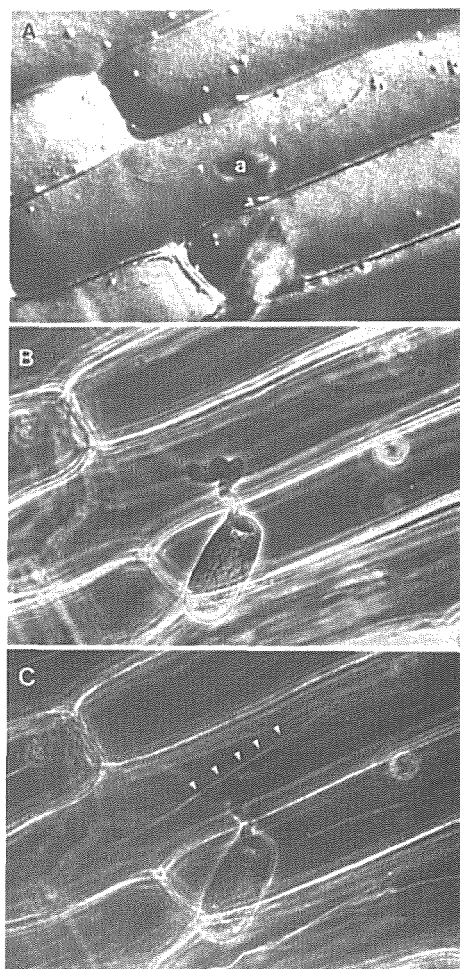


図18 原形質系とアクチン繊維との位置関係

- A *E. pisi* の付着器 (a) 下を走行する原形質系 (矢尻)。
- B A と同一細胞のファロイジン染色後の位相差像。
- C この試料の同一部位の蛍光像。A で原形質系が観察されたのとほぼ同じ位置にアクチン繊維が観察された (矢尻)。

時間目の配向変化率は約80%となり、12時間目までこの水準が維持された。アクチン繊維の配向が急激に変化する時期は、*E. pisi* の付着器が成熟する時間とはほぼ一致した。従って、アクチン繊維の配向変化は微小管に比べ、約3時間早く開始されることが示された。

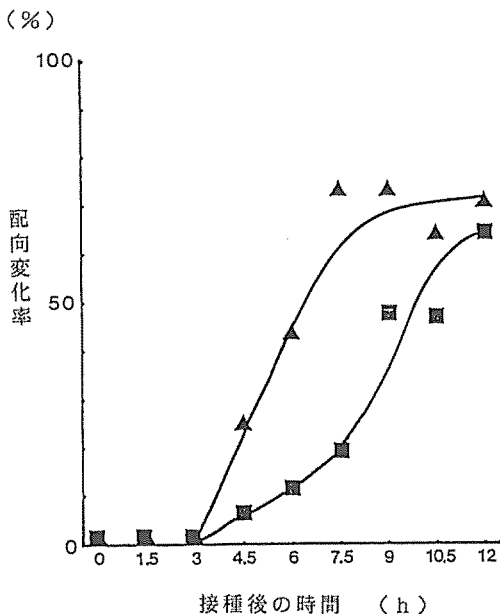


図 19 子葉鞘細胞におけるアクチン繊維及び微小管の配向変化率の推移

▲ アクチン繊維 ■ 微小管

配向変化率 = (配向変化細胞数 / 被接種細胞数) × 100 (%)

第四節 考察

細胞骨格は、アクチン、チューブリンに代表される繊維状タンパク質の総称で、動物^{53,57,133)}、植物^{7,8,19,64,68,70,73,103,108,111,116,117,123,139)}及び微生物^{1,62,137)}を問わず、各種の真核生物の細胞に普遍的に存在する。これらのタンパク質は細胞内で重合した繊維状の形態で機能し、細胞の形態維持⁴⁵⁾、細胞内の物質輸送^{18,48,113)}、オルガネラの細胞内配置^{8,73,139)}など多様な機能を有することが知られている。本章では、特に細胞骨格系のタンパク質のうちアクチンとチューブリンに関して、細胞内における配向を細胞化学的に検討した。この結果、*E. pisi*を接種すると、菌の形態形成に呼応して子葉鞘細胞内のアクチン繊維及び微小管の配向はいずれも劇的に変化することが明らかになった。

アクチンの配向変化は、*E. pisi*の付着器が成熟する時期とほぼ一致したのに対し、微小管の配向変化は付着器下で細胞質凝集が開始される時期と一致した。付着器下で細胞質凝集が開始されていない場合には、付着器下の微小管の配向には何ら変化は認められなかった。微小

管の配向変化が開始される時期から考えて、この変化は菌の侵入による物理的刺激によって誘導された可能性が高い。レーザースキャン顕微鏡観察の結果、付着器下で細胞質凝集が観察される時期のネットワーク状の微小管配向を三次元的にみると、無接種の場合とは全く異なり、細胞の深部から付着器直下に向かって山状に配向していた (図 15-2a, b)。この中心部にパピラが形成されたこと、及び微小管は細胞内で物質輸送に参与している^{18,48,113)}ことから考えて、微小管がパピラ形成に参与している可能性が示唆される。さらに興味深いことに、この時期に子葉鞘細胞内には、このネットワーク状に配向した微小管以外は観察できなくなった (図 14-4a, b)。この原因は明らかではないが、ネットワーク状に配向した微小管は無接種の細胞に認められたそれに比べ太さが太く見えること、微小管は常に重合と脱重合を繰り返し、いわゆる“トレッドミリング”を行っていること¹³⁴⁾から考えて、菌侵入前に認められた微小管が脱重合し、菌の侵入地点下に重合してネットワーク状の配向を形成するのかも知れない。いずれにせよこの現象は、菌の感染行動にともなう微小管配向の調節機構に関わっており、今後解明していくべき問題である。

一方、アクチンの配向変化は実際に菌が侵入を開始する4～5時間前から認められる (図 16-2a, b, 20)。この時期は、前章で述べた原形質流動速度及び原形質糸の数と配向の変化が認められる時期と一致している。このように、配向変化が起こる時期からみると、前章で述べた*E. pisi*侵入前に子葉鞘細胞に認められる形態変化はアクチン繊維の配向変化と密接に関係していると考えられた。また、無接種の子葉鞘細胞における微小管の配向は規則的で多くのものが細胞の長軸に対して直角から斜めに配向していたのに対し (図 14-1a, b)、アクチン繊維は細胞の長軸とほぼ平行に不規則な配向を示している (図 16-1a, b)。前章で述べた原形質糸の配向はこのアクチンの配向と酷似していた。さらに、原形質糸とアクチン繊維の位置的な関係を検討した結果、原形質糸はアクチン繊維を含むと結論された (図 18)。実際にアクチン繊維は原形質流動と密接に関わっていることが報告されており^{7,19,70,108,123)}、上記の観察結果はこれらの報告とも一致している。

以上述べてきたように、菌が実際に侵入行動を開始する前に子葉鞘細胞内のアクチン繊維の配向は変化する。

このような変化は、子葉鞘細胞が菌から何らかのシグナルを受け取った結果生じたものであると考えられ、アクチン繊維が菌の認識に直接関与する、あるいは認識の結果子葉鞘細胞の防御機構発現に関与する可能性を示している。最近になって、細胞骨格が細胞外からの刺激あるいはシグナルを伝達する機構に関与することが動物細胞において明らかにされた。Srinivasan *et al.*¹²¹ は、ラットから神経軸索の電位依存 Na^+ チャンネルタンパク質を純化し、このタンパク質とアクチン結合タンパク質との直接的な相互作用が電気的興奮の伝達と密接な関係にあることを明らかにした。さらにシグナル伝達機構への細胞骨格の直接的な関与の証拠として、細胞膜レセプターの受けた細胞増殖シグナルを核内遺伝子に伝える機構への関与の可能性も指摘されている⁹⁶⁾。これらのことから考えて、アクチン繊維の配向変化が子葉鞘細胞による菌の認識によって起こる可能性も高い。また、前章でも述べたように、*E. pisi* の付着器下に特定のオルガネラや物質を局在させることにより防御反応の発現に関与している可能性も否定できない。

第五章 *E. pisi* 侵入以前に決定される拒否性の誘導

第一節 序

Kunoh *et al.*^{82,84,87)} は、オオムギ子葉鞘1細胞上にオオムギの病原菌である *E. graminis* と非病原菌である *E. pisi* を同時に存在させると両菌の侵入成否は相互にどのように影響しあうか、という点に注目し、子葉鞘細胞に誘導される受容性と拒否性の検討を続けてきた。彼らの一連の報告から次のようなことが既に明らかになっている。

① 子葉鞘細胞に *E. pisi* が先に侵入すると拒否性が誘導され、後から侵入を試みる病原菌 *E. graminis* が感染しにくい状態になる^{82,84)}。

② 子葉鞘細胞に *E. graminis* が先に侵入すると受容性が誘導され、後から侵入を試みる非病原菌 *E. pisi* が感染できるようになる^{82,86)}。

③ 子葉鞘細胞に拒否性が誘導されるか受容性が誘導されるかは両菌の侵入時間差に相関する⁸²⁾。しかし、これらの報告は、実際には子葉鞘細胞に拒否性あるいは受容性がいつ誘導されるのかを明らかにしていない。最近 Kunoh *et al.*⁸⁷⁾ は、子葉鞘に *E. pisi* を接種

し、この菌の付着器下に細胞質凝集が開始されてから、すなわち侵入が開始されてから0.5、1、3時間目に菌体を除去し、さらにその同一細胞に *E. graminis* を移植して感染率を調べた。その結果、*E. pisi* 侵入開始後0.5時間目に菌体を除去した場合にも *E. graminis* の感染率は有意に低下し、*E. pisi* が侵入を開始して0.5時間後にはその細胞に拒否性が既に決定されていることを明らかにした。

しかしながら、第三章及び第四章に述べた結果は、*E. pisi* を子葉鞘に接種すると、実際に菌が侵入を開始する4～5時間前には既に子葉鞘細胞が菌の存在を認識している可能性を示唆している。従って、このような早期の子葉鞘細胞の反応が防御反応すなわち拒否性の誘導に直接関係するか否か、検討すべき重要な問題点として浮かび上がってきた。実際、ファイトアレキシンが合成される系では、この合成に関わる酵素群の生合成は菌侵入前に誘導されることが知られているので^{44,51,114)}、*E. pisi* を接種した子葉鞘にみられた形態変化が、直接的あるいは間接的に拒否性誘導と関連している可能性も考えられる。従って、菌が侵入を開始する前に子葉鞘細胞への拒否性誘導が決定されていることは十分に考えられることである。そこで本章では、上記の Kunoh *et al.*⁸⁷⁾ の菌体除去の方法を応用して、*E. pisi* の付着器成熟を中心とした種々の時期に菌体を取り除き、子葉鞘細胞の拒否性誘導が遅くともいつまでに決定されるか、その時期を詳細に調べた。

第二節 材料及び方法

第一項 *E. pisi* による拒否性誘導の決定時期

E. pisi を子葉鞘に接種後、所定の方法で培養し、接種後2～3.5及び4～5.5時間の間15分毎に *E. pisi* の形態を顕微鏡観察し、菌体除去の時期を決定した。菌体除去は図20に示す3通りの時期に行った。

① 発芽管先端が膨潤し、付着器形成が開始される時期 (A)

② 付着器成熟時期 (B)

③ 付着器成熟後2時間目 (C)

顕微鏡観察により、これらの時期に達したことが確認された菌体を顕微鏡マニプレーターを用いて除去し(図21-2)、*E. pisi* 菌体を除去した同一細胞上に予め別の子葉鞘上で生育させた *E. graminis* を、*E. pisi* 除去と *E.*

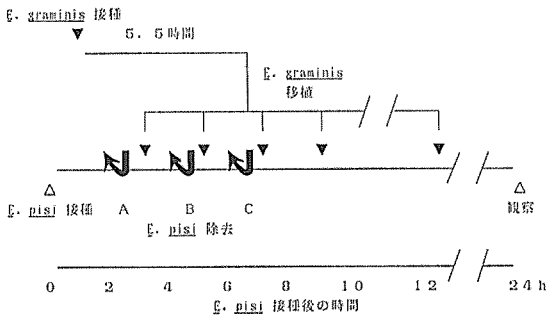


図20 *E. pisi* 及び *E. graminis* の接種，移植及び除去のスケジュール

- A 発芽管先端が膨潤した時期
- B 付着器が成熟した時期
- C 付着器成熟後2時間目

graminis の侵入開始が様々な時間差となるように移植した (図21-3)。*E. graminis* の侵入開始時期，付着器下で細胞質凝集を開始される時期とほぼ一致するので^{2,21)}，本実験においても細胞質凝集開始時間を侵入開始時間と定義した。*E. graminis* の細胞質凝集は通常接種後10～12時間目に開始されるので，接種後9～12時間の間，15分毎に顕微鏡観察して *E. graminis* の付着器下の細胞質凝集開始を確認し，*E. pisi* 菌体除去から *E. graminis* 侵入開始までの時間を求めた。*E. pisi* の除去及び *E. graminis* の移植を行った子葉鞘を所定の方法で培養し，*E. graminis* 接種後24時間目に吸器形成の有無を確認し (図21-5)，感染率を算出した。また *E. pisi* を接種していない子葉鞘細胞上に *E. graminis* を移植して対照区とした。ある処理区における感染率が対照区と比較して有意に低下した場合，その処理によって子葉鞘細胞に拒否性

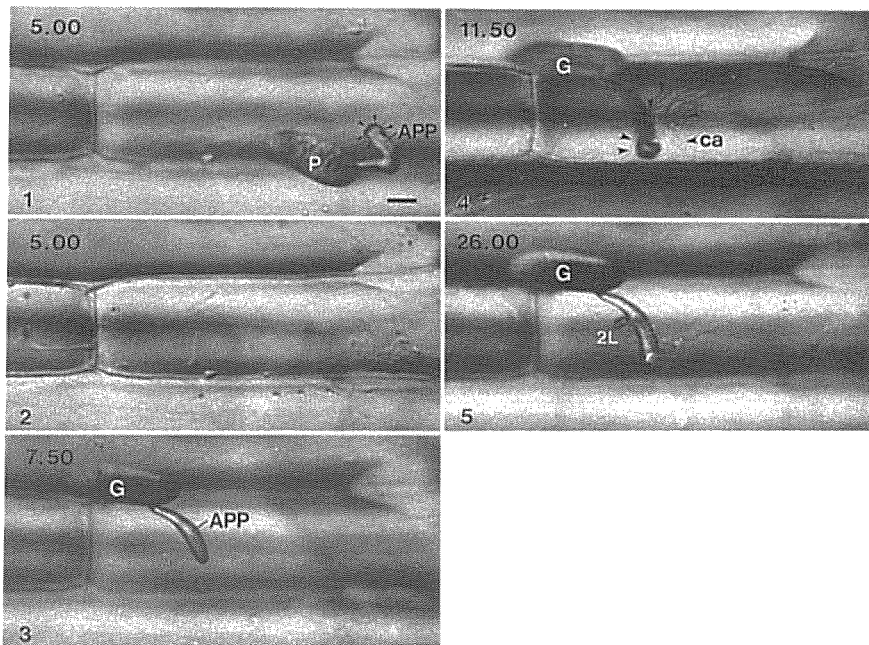


図21 *E. pisi* 侵入開始以前に決定される拒否性の検定法

1. *E. pisi* (P) 接種後5.00時間目，*E. pisi* 付着器 (app) 先端に環状構造 (矢尻) が認められ，付着器が成熟した。
2. 同時期，*E. pisi* 菌体を除去する。
3. *E. pisi* 接種後7.50時間目，別の子葉鞘に接種してあった *E. graminis* (G) を細胞上に移植する。APP，付着器。
4. *E. pisi* 接種後11.50時間目，*E. graminis* 付着器先端下に細胞質凝集 (矢尻) が認められる。
5. *E. pisi* 接種後26.00時間目，*E. graminis* は感染に失敗し，第二突起 (2L) から再び侵入を試みるが感染に失敗している。

が誘導されたと判断した。

第二項 *E. pisi* の付着器成熟によって誘導される拒否性の持続性の検討

子葉鞘に *E. pisi* を接種し所定の方法で培養後、4～5.5時間の間15分毎に *E. pisi* の形態を顕微鏡観察し、成熟付着器を形成した菌体を前項に述べた方法により直ちに除去し、その後6, 12, 18, 24時間目に *E. graminis* をその細胞に移植した (図22)。 *E. graminis* 接種後24時間目に *E. graminis* の吸器形成の有無を確認し、感染率を算出した。第一項の場合と同様の対照区を設け、各処理における感染率の低下を比較し、その処理によって拒否性が誘導されたか否かを検討した。

第三節 結果

第一項 拒否性誘導の決定時期

発芽管先端が膨潤する時期に子葉鞘細胞から *E. pisi* を除去し、同一細胞に *E. graminis* を移植した場合には (表2), *E. pisi* の菌体除去から *E. graminis* の侵入開始までの時間差が5.00～12.75時間の範囲内では、いずれの時間帯の感染率も対照区の感染率 (64.0%) と有意差がなかった。従って、発芽管先端が膨潤する時期に *E. pisi* を除去してしまうと拒否性は誘導されないと結論さ

表2 *E. pisi* 除去から *E. graminis* 侵入開始までの時間差と *E. graminis* 感染率との関係～*E. pisi* 発芽管先端が膨潤する時期に除去した場合～

<i>E. pisi</i> 除去から <i>E. graminis</i> 侵入開始 までの時間差 (hr)	A/B*	感染率 (%)
5.00- 5.75	10/11	90.9
6.00- 6.75	6/16	40.0
7.00- 7.75	6/ 9	66.7
8.00- 8.75	8/16	50.0
9.00- 9.75	8/12	66.7
10.00-10.75	10/14	71.4
11.00-11.75	5/ 7	71.4
12.00-12.75	3/ 6	50.0
計	56/90	62.2

* A：呼器形成胞子数, B：観察胞子数

れた。

しかし、付着器成熟時期に菌体を除去した場合には (表3), 菌体の除去から *E. graminis* の侵入開始までの時間差が6.00～12.75時間であると、感染率は32.2%となり、対照区の感染率に比べ有意に低下し ($P < 0.01$) 拒否性が誘導されることが明らかになった。しかし、時

表3 *E. pisi* 除去から *E. graminis* 侵入開始までの時間差と *E. graminis* 感染率との関係～*E. pisi* を付着器成熟時期に除去した場合～

<i>E. pisi</i> 除去から <i>E. graminis</i> 侵入開始 までの時間差 (hr)	A/B*	感染率 (%)		A/B*	感染率 (%)
2.00- 2.75	5/ 7	71.4	}	16/22	72.7
3.00- 3.75	11/15	73.3			
4.00- 4.75	8/13	61.5	}	17/34	50.0
5.00- 5.75	9/21	42.9			
6.00- 6.75	5/23	21.7	}	28/87	32.2**
7.00- 7.75	4/11	36.4			
8.00- 8.75	4/ 8	50.0			
9.00- 9.75	2/15	13.3			
10.00-10.75	5/13	38.5			
11.00-11.75	5/10	50.0			
12.00-12.75	3/ 7	42.9			
計				61/155	42.7**

* A：呼器形成胞子数, B：観察胞子数

** *E. pisi* を接種していない細胞に移植した *E. graminis* の感染率64.0%と有意差あり ($P < 0.01$)

表 4 *E. pisi* 除去から *E. graminis* 侵入開始までの時間差と *E. graminis* 感染率との関係～
E. pisi を付着器成熟後 2 時間目に除去した場合～

<i>E. pisi</i> 除去から <i>E. graminis</i> 侵入開始 までの時間差 (hr)	A/B*	感染率 (%)	A/B*	感染率 (%)
0.00- 0.75	2/ 4	50.0	34/55	61.8
1.00- 1.75	12/16	75.0		
2.00- 2.75	7/15	46.7		
3.00- 3.75	13/20	65.0		
4.00- 4.75	2/ 9	22.2	33/100	33.0**
5.00- 5.75	6/15	40.0		
6.00- 6.75	3/ 9	33.3		
7.00- 7.75	6/14	42.9		
8.00- 8.75	3/11	27.3		
9.00- 9.75	4/10	40.0		
10.00-10.75	4/15	26.7		
11.00-11.75	5/15	33.3		
12.00-12.75	0/ 2	0.0		
計			67/155	43.2**

* A: 呼吸形成胞子数, B: 観察胞子数

** *E. pisi* を接種していない細胞に移植した *E. graminis* の感染率 64.0% と有意差あり (P < 0.01)

間差が 2.00～3.75 及び 4.00～5.75 時間であると、感染率はそれぞれ 72.7%, 50.0% となり対照区の感染率と有意差が認められず拒否性は誘導されなかった。

さらに、付着器成熟後 2 時間目に菌体を除去した場合 (表 4)、菌体の除去から *E. graminis* の侵入開始までの時間差が 4.00～12.75 時間であると、感染率は 33.0% となり、対照区の感染率に比べ有意に低下し (P < 0.01)、拒否性が誘導された。しかし、この場合も時間差が 0.00～3.75 時間であると、感染率が 61.8% となり、対照区の感染率と有意差が認められず拒否性は誘導されなかった。

以上の結果から、遅くとも *E. pisi* の付着器が成熟する時期までには、その下にある子葉鞘細胞では拒否性誘導が決定されていることが明らかになった。また、この場合にはいずれも *E. graminis* の感染を約 50% 抑制する程度の拒否性が誘導されることが明らかになった。

第二項 付着器成熟期までに誘導が決定される拒否性の持続性

本項では、*E. pisi* の付着器成熟期までに誘導が決定される拒否性にどの程度持続性があるのか検討した。*E. pisi* 除去から *E. graminis* 移植までの時間が約 6, 12,

18, 24 時間となるように、図 22 に示したスケジュールで除去、培養及び移植を行った。除去後 6 及び 12 時間培養した場合、*E. graminis* の感染率はそれぞれ 29.7 及び 31.6% となり、対照区の感染率 (64.0%) と有意差が認められた (P < 0.01)。しかし、24 時間培養した場合には感染率は 56.6% となり、対照区と有意差が認められな

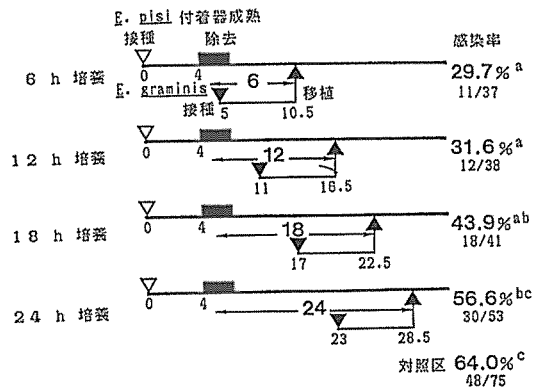


図 22 *E. pisi* 付着器成熟によって誘導される拒否性の持続性

a, b, c, 異なる文字間に有意差有り (P < 0.05)。

かった。また、18時間培養した場合には、感染率は43.9%となり対照区に比べ有意に低下したが ($P < 0.05$)、この感染率は24時間培養した場合との間にも有意差が認められなかった。すなわち、*E. pisi* 付着器成熟から *E. graminis* の移植までの時間が12時間以内の場合、拒否性は持続したが、16時間までには拒否性は低下し始め、24時間までには消失した。

第四節 考察

子葉鞘1細胞対菌1胞子の系を用いた Kunoh *et al.*^{82,84)} による実験から、*E. pisi* 接種により子葉鞘細胞に誘導される拒否性は、接種された *E. pisi* と同一細胞に移植された *E. graminis* との侵入時間差と相関があることが示唆されている。彼らの実験は、菌の侵入時期と拒否性発現との関係を示してはいるが、子葉鞘細胞に拒否性が発現するまでの時間を明らかにしてはいない。本章の実験結果が示すように、*E. pisi* の付着器成熟前に菌体を取り除くと子葉鞘細胞に拒否性が誘導されないのに対し、*E. pisi* の付着器成熟時期またはそれ以降に取り除いた場合には拒否性が誘導されることから、拒否性誘導の決定は付着器成熟の時期に起こると推定される。前述したようにこの時期は、*E. pisi* が侵入を開始する4～5時間前である。

このように菌が侵入を開始する以前に植物の抵抗反応が高められる現象として、*Phytophthora infestans* の遊走子をジャガイモ葉に接種した場合に生成される O_2^- が知られている²⁵⁾。この報告によると、*P. infestans* 遊走子は接種後4時間頃から侵入を開始するが、 O_2^- 生成は接種後1時間目から認められる。 O_2^- は、動物の生体防御に関与していることが報告されているので^{17,31)}、Doke³⁹⁾ は、菌の感染行動に伴って植物細胞でも生成される。 O_2^- もジャガイモの抵抗反応に関与していると考えている。一方、Smith and Cruickshank¹¹⁹⁾ は、エンドウ莢の内果皮に非病原菌の *Monilinia fructicola* の胞子懸濁液を接種すると、接種後1～2時間目にはファイトアレキシンであるピサチンが胞子懸濁液中に浸出してくると報告し、ファイトアレキシンを誘導するエリシターがかなり早い段階に胞子から放出されると推定している。これらの報告にみらるように、菌と植物が接触すると、菌侵入以前のかかなり早い時期に菌から化学的因子が放出され、それによって植物は菌の存在を認識し、抵抗反応

が誘導されると考えられる。第三章で述べたように、付着器成熟時期には子葉鞘細胞上に物理的な刺激が与えられた形跡は無いので、この時期に決定されている拒否性誘導は *E. pisi* から放出される化学的因子による可能性が高い。そこで、子葉鞘細胞に拒否性を誘導するような化学的因子を想定し、以後この因子を拒否性インデューサーと称することにする。

本章の結果から考えて *E. pisi* が放出する拒否性インデューサーは、遅くとも *E. pisi* の付着器が成熟する時期までには放出されていると考えられる。第三章および第四章の結果から、*E. pisi* の付着器成熟時期には、①子葉鞘細胞における原形質流動速度及び原形質糸数とその配向に変化が起こる、②細胞骨格、特にアクチン繊維の配向変化が起こることが明らかになった。これらが起こる時期と同時期に子葉鞘細胞への拒否性誘導が決定されることは、*E. pisi* の付着器成熟時には拒否性インデューサーが菌側から放出され、それが細胞によって認識された結果、原形質流動の変化となって現われることを示唆している。この変化が本章で明らかにした拒否性誘導と直接関係するかどうかについては第八章の実験で明らかにするが、これら二つの現象が時間的に一致していることから考えると、これらの現象の間には何らかの関係があると推定される。

Kunoh *et al.*⁸⁴⁾ の結果によると、子葉鞘細胞に *E. pisi* が侵入を開始すると、2時間以内に *E. graminis* の感染を100%抑制する強い拒否性が誘導される。また、彼らの別の報告⁸⁷⁾ によると、*E. pisi* が侵入を開始してから0.5時間目まで *E. pisi* 菌体が存在していれば *E. graminis* の感染を50%程度低下させる程度の拒否性が誘導され、3時間目まで存在すれば、*E. graminis* の感染をほぼ完全に抑制する拒否性が誘導される。本実験では、侵入開始よりも4～5時間以前、すなわち遅くとも付着器が成熟する時期には、拒否性誘導が決定されていることを明らかにしたが、誘導される拒否性は *E. graminis* の感染率を約50%抑制できる程度であった。この結果は、拒否性誘導には少なくとも二つの段階があることを示唆している。すなわち、第一段階は *E. pisi* の付着器成熟時に放出される拒否性インデューサーによって *E. graminis* の感染率を約50%抑制する程度の拒否性が誘導される段階、さらに第二段階は *E. pisi* が実際に侵入を開始してから *E. graminis* の感染率をほぼ完全に阻止する

拒否性が誘導される段階である。ここではこれらを第一期、第二期拒否性と称して論議を進めることとする。本章の実験で示したように、付着器成熟後子葉鞘細胞上から菌体を除去しても12時間目までは拒否性に低下は認められなかったが、18時間以上になると拒否性は低下した(図22)ことから、*E. pisi* の付着器成熟時期に放出される拒否性インデューサーによって誘導される拒否性すなわち第一期拒否性は、可逆的なものであることが示唆された。これに対して、*E. pisi* の侵入にともなって誘導される第二期拒否性は、侵入開始から1.5時間以降に菌体を取り除いても少なくとも37時間まで持続する⁸⁷⁾、すなわち、かなり長時間にわたって非可逆的であるので第一期拒否性とはこの点で異なっている。しかし、これまでの各種の実験からは、第一期、第二期の拒否性は本質的に異なるのか、あるいは両者の本質は同じであって、第二期拒否性は単に拒否性インデューサーの放出量に依存して第一期拒否性が高まるだけなのかは明らかではない。以上述べてきたように、本章の実験から、拒否性インデューサーの存在が示唆されるとともに、それによって誘導される拒否性の特徴が明らかになった。この拒否性インデューサーの存在を証明するためには、実際に菌体から拒否性インデューサーを分離し、その性質を明らかにする必要があるが、この点については次の章で述べることとする。

本章の実験結果から次のような疑問点が新たに明らかになってきた。*E. pisi* の付着器成熟時に細胞上から菌体を除去してから、その細胞上に移植した *E. graminis* の侵入開始までの時間差が6時間以上の場合にのみ拒否性が誘導された。さらに、*E. pisi* 菌体除去を2時間遅らせて、付着器成熟後2時間目とすると、拒否性が誘導され始める侵入時間差は2時間短くなった。すなわち、*E. pisi* 菌体除去から *E. graminis* 侵入開始までの時間差が4時間以上の場合に拒否性が誘導された。この事実は、付着器成熟時に拒否性インデューサーが子葉鞘細胞に与えられてから実際に拒否性が誘導されるまでに少なくとも6時間を要すると仮定するとうまく説明できる。しかし、第八章に詳しく述べるように、*E. graminis* の移植と *E. pisi* の除去の時間的な前後関係があるために、この仮説によって単純に説明することはできない。

第六章 *E. pisi* 菌体から放出される拒否性インデューサーの検索

第一節 序

前章で論じたように、第一期拒否性の誘導は、*E. pisi* が子葉鞘細胞に侵入を開始する4～5時間前には決定されている。この時期は *E. pisi* の付着器が成熟する時期に相当することから、拒否性インデューサーは遅くとも付着器成熟期までには放出されている、あるいは作用する状態になっていると考えられる。従って、*E. pisi* の胞子を大量に採集し、成熟付着器を形成させれば、研究に十分な量の拒否性インデューサーを抽出することは可能であると思われる。しかし、うどんこ病菌は絶対寄生菌であるため、宿主上で大量培養することは困難であり、仮に宿主上で大量に培養したとしても胞子に同調的に形態形成させる必要があり、菌体から物質を分離するような生化学的実験には不向きである。さらに、物質を分離しても宿主由来の物質と区別することは難しい。ところが、人工基質をうどんこ病菌の発芽床として用いても、宿主上と形態的にはほぼ同じ成熟付着器^{35,77)}や吸器類似構造^{56,147)}が形成されることが知られており、条件さえ検討すれば *E. pisi* も人工基質上で成熟付着器を形成し、*E. pisi* から拒否性インデューサーを分離することが可能であろう。

前章にも述べたように、拒否性インデューサーによって誘導される拒否性の本質はまだ明らかではないので、これまでに報告されている種々のエリクター^{10,11,14-16,33,36,50,72,124)}のように、それを与えた結果合成されてくる抗菌性物質すなわちファイトアレキシンを指標にして拒否性誘導活性を測定することはできない。しかし、Kunoh *et al.* の一連の研究^{82,84,86,87)}や本研究のように、*E. graminis* の感染率低下を拒否性の指標とすれば、分離した菌体抽出物の拒否性誘導活性をバイオアッセイする事は可能である。

以上のような観点から本章では、まず *E. pisi* を人工基質上で形態形成させる系を確立した上で菌体抽出物を得、子葉鞘を処理した際の *E. graminis* の感染率の低下を指標として拒否性インデューサーの検索を行った。

第二節 材料及び方法

第一項 人工基質上における *E. pisi* の形態形成系の検索

第一節に述べたように、*E. pisi* 菌体から物質を抽出するためには人工基質上で同調的に形態形成させる系が必要である。そこで、以下の実験により、子葉鞘細胞上での形態形成と比較検討しながら、最適な人工系を検索した。

1. 人工基質

以下に述べる4種の人工基質上に *E. pisi* を接種し、菌の形態形成を調べることにした。

- 1) 透析膜：透析用セルロースチューブ（ナカライテスク、京都）を約6cm四方の大きさに切り取り、30分間3回イオン交換水中で煮沸して、膜に付着しているグリセリン及び硫化物を除去した。これをJKワイパー（十條製紙、東京）に包んでデシケーター内で十分に乾燥させ、実験の都度に取り出してイオン交換水に浸漬した後、1.5cm四方に切って実験に供試した。
- 2) パラフィルム：パラフィルム（アメリカン・カン・カンパニー、米国）を約1.5cm四方の大きさに切り取り、実験に供試した。
- 3) プラスチック板：プラスチック製の小型シャーレ（1007：ファルコン、米国）の底面を実験に供試した。
- 4) ガラス板：スライドガラスを実験に供試した。

なお、上記の人工基質のうち、1)及び2)については Kobayashi *et al.*⁷⁷⁾ の方法に従い、それらの膜を支持するために2%寒天上に置くことにした。

2. *E. pisi* 形態形成の観察

E. pisi を上記の人工基質に接種し、100% RH、20°C、暗黒下で12時間培養した後、菌の形態形成を光学顕微鏡（BH-2、オリンパス：10×20）で観察した。また、対照区として子葉鞘に *E. pisi* を接種し、所定の方法（第二章）で12時間培養し、同様に光顕観察した。菌の各形態形成は以下のように定義し、次の式により形態形成率を算出することとした。

発芽胞子：発芽管が伸長した胞子

成熟付着器形成胞子：第三章に定義した成熟付着器を形成した胞子

$$\text{発芽率 (\%)} = (\text{発芽胞子数} / \text{観察全胞子数}) \times 100$$

$$\text{成熟付着器形成率 (\%)} = (\text{成熟付着器形成胞子数} / \text{観察全胞子数}) \times 100$$

また、形態形成の過程を経時的に知るため、*E. pisi* をガラス板及び子葉鞘上に接種し、接種直後から1時間毎に10時間まで観察し、形態形成率を算出した。また、この観察の際には、発芽率、成熟付着器形成率の他に、以下のように定義した膨潤発芽管の形成率も算出した。

膨潤発芽管形成胞子：発芽管先端部が基質表面に接着し、その先端部が膨潤した胞子

$$\text{膨潤発芽管形成率 (\%)} = (\text{膨潤発芽管形成胞子数} / \text{観察全胞子数}) \times 100$$

なお、一回の実験では少なくとも100個以上の胞子を観察し、これを三回反復した。

3. ガラス板上に接種された *E. pisi* の侵入能力の検討

人工基質上で形成された *E. pisi* の付着器が侵入能を有するか否かを検討するため、ガラス板上で発芽した胞子を第二章の方法に準じて光顕マニピュレーターで子葉鞘上に移植し、その付着器の侵入能力を調べた。

ガラス板上で成熟した付着器は、ガラス表面に強く接着するため、胞子が無傷の状態で移動させることは不可能であった。そこで、接種後3～4時間目に発芽管先端が膨潤した胞子を選び、子葉鞘上に移植した。移植後、所定の方法（第二章）で24時間培養し、菌の形態形成及び付着器突起下のバピラ形成を観察した。

第二項 ガラス板上に接種された *E. pisi* 菌体からの物質の抽出

人工基質上に接種された *E. pisi* 菌体から物質を抽出するためには、大量の胞子を基質上に接種する必要がある。また、菌体から放出された物質のみを回収するためには、菌を死滅させたり、菌体内物質を漏出させないような緩やかな条件で抽出を行う必要がある。これらの条件を満足するような方法を予備的に検討した結果、以下の方法が最適であると判断された。

1. 接種原

第二章第一節に述べた方法で表面殺菌、催芽したエンドウ種子をパーミキュライトを入れたプランターに約20粒ずつ播種後、人工気象室（PT-1A-S、日本医化、大阪）内に置き、20°C、70% RH の条件で栽培した。14日

間栽培後、*E. pisi* の胞子を筆接種し、人工気象室内でさらに7日間培養を続け、エンドウがうどんこ病菌に罹病し、大量に形成された胞子を実験に供試した。

2. 接種、培養および抽出

ガラス板上への *E. pisi* 胞子の接種と培養及び、菌体からの物質の抽出法を、図23に要約した。上記の方法で大量培養した *E. pisi* 胞子をガラスシャーレ（直径 18 cm）の底に約 1500胞子/mm² の密度になるように筆接種した。*E. pisi* を接種したシャーレを 20°C、95% RH の条件下で所定時間培養後、80 ml の滅菌純水をシャーレ内に注ぎ、0°C、15分間振盪器上で振盪した（120ストローク/分）。振盪後、上清を回収し、ガラスフィルター（GF-A: ワットマン、英国）及び濾過滅菌フィルター（GV、日本ミリポアリミテッド、東京）を通して胞子等の不溶物を除去した。濾過液を凍結乾燥して秤量後、-80°C のフリーザー内に保存した。保存試料を 0.01 M CaCl₂ 溶液で所定の濃度に溶解し、各実験に供試した。

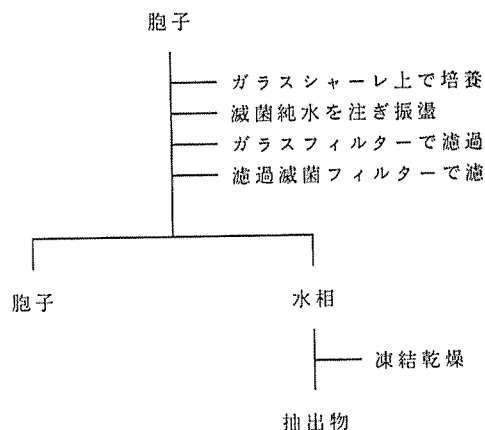


図 23 菌体からの物質抽出の手順

また、菌体抽出物の回収量を経時的に定量するため、上述の方法で *E. pisi* をガラスシャーレに接種し、0、0.5、1.0、3.0、6.0及び9.0時間培養後、菌体抽出液を回収した。抽出液は上述の方法で濾過及び凍結乾燥を行い、胞子10⁶個当りの回収量を算出した。

3. 高速液体クロマトグラフィー（HPLC）による抽出物の分析

回収した抽出物の性質を明らかにする一端として、以下のように HPLC（LC-9A、島津製作所）による分析を行った。上記の方法で回収した抽出物を所定の濃度に調整し、遠心分離（MRX-150: トミー精工、10000 rpm、10分）により不溶物を取り除いた後、HPLC 分析用試料とした。50 µg の試料をインジェクターあるいはオートインジェクターにより注入し、水系分子ふるいカラム（TSK-GEL, G3000PW: 東ソー）により、純水を移動相として流速 1.0 ml/min の条件で分離した。分離した試料は、フォトダイオードアレイ検出器（SPD-M6A: 島津製作所、京都）により検出した。

第三項 *E. pisi* 菌体抽出物の拒否性誘導活性の測定

1. 拒否性誘導活性の測定

希釈後の CaCl₂ 濃度が 0.01 M となるように適当な濃度の CaCl₂ 溶液で菌体抽出物を希釈し、所定の濃度の菌体抽出物を調製して処理液とした。1 子葉鞘あたり 50 µl の処理液を時計皿（直径 2.5 cm）に入れ、*E. graminis* を接種した子葉鞘 2～3 個を接種後直ちにこの上に置いた。処理した子葉鞘を所定の方法（第二章）で 24 時間培養後、光学顕微鏡により *E. graminis* の吸器形成を観察して感染率を算出し、対照区の感染率より有意に低下した場合には拒否性が誘導されたと判断した。対照区として、*E. graminis* を接種した子葉鞘を、上述と同様の方法により時計皿上で 0.01 M CaCl₂ 溶液で処理し、接種後 24 時間目の感染率を算出した。また、抽出物が菌の形態形成に直接影響を及ぼすか否かを確かめるため、発芽率、成熟付着器形成率、侵入率を第一項に示した方法で算出した。なお、前節第二項の方法によって回収した菌体抽出物のうち、上記の方法で拒否性誘導活性が認められた抽出物を、以下では拒否性インデューサー粗標品と呼ぶこととする。

2. 拒否性インデューサー粗標品の処理時期と拒否性誘導活性の関係

拒否性インデューサー粗標品の作用性の一端を知るため、子葉鞘に *E. graminis* を接種する前（前処理）及び接種した後（後処理）に所定時間の粗標品処理を行い、拒否性誘導活性を調べた。

前処理は、図29に示したスケジュールに従って行った。本項 1 で述べた方法により 2 mg/ml の濃度に調整した

粗標品で子葉鞘を1, 3, 6, 9及び12時間処理した後、*E. graminis* を接種した。接種する直前に、子葉鞘下面に付着した粗標品を取り除くため、純水で二、三回子葉鞘下面を洗浄した。接種後、子葉鞘を時計皿に入れた0.01 M CaCl_2 溶液上で24時間培養を続けた後、*E. graminis* の感染率を算出した。対照区として、粗標品で前処理しない子葉鞘に *E. graminis* を接種し、時計皿に入れた0.01 M CaCl_2 溶液上で24時間培養後、感染率を算出した。

また、図30に示したスケジュールに従って後処理を行った。子葉鞘に *E. graminis* を接種後、本項1に述べた方法により1, 3, 6, 9, 12及び18時間2 mg/mlの粗標品溶液上で培養した。培養後、子葉鞘下面に付着した粗標品を純水で洗浄し、0.01 M CaCl_2 溶液上に移して、さらに接種後24時間目まで培養を続けた。培養後 *E. graminis* の感染率を算出した。対照区として、24時間0.01 M CaCl_2 溶液上で培養した区（無処理対照区）および2 mg/mlの粗標品上で培養した区（拒否性インデューサー処理区）を設け、同様に感染率を算出した。

第四項 拒否性インデューサー粗標品の分画

拒否性インデューサー粗標品を純化するための手がかりを得る目的で、粗標品を限外濾過によって分画し、各画分の拒否性誘導活性を調べた。

5 mg/mlの濃度に調整した粗標品200 μl を限外濾過膜（UFP2-LGC: 日本ミリポアリミテッド、東京）に通し濾液約200 μl に300 μl の純水を加え、低分子（分子量<約10000）画分とした。また、濾過膜上の僅かな残渣に500 μl の純水を加え、高分子（分子量>約10000）画分とした。各画分の拒否性誘導活性を本節第三項1の方法に従って測定した。

第三節 結果

第一項 人工基質上における *E. pisi* の形態形成

本実験で供試した4種のいずれの人工基質上においても、*E. pisi* の胞子の発芽率は90.2~95.1%の高率に達した。これらの率は、子葉鞘上の発芽率91.2%とほぼ同様であり有意差は認められなかった（表5）。透析膜上においては成熟付着器は全く形成されなかったが、他の3種の基質上における成熟付着器形成率は、32.3~49.7%と比較的高い値を示し、子葉鞘上におけるその率48.5%との間に有意差は認められなかった。特に、ガラ

表5 各種人工基質及び子葉鞘上における *E. pisi* の形態形成

人工基質	発芽率 (%)	成熟付着器形成率 (%)
透析膜	95.1a	0.0b
パラフィルム	90.8a	35.0c
プラスチック板	90.2a	32.3c
ガラス板	91.6a	49.7d
子葉鞘	91.2a	48.5d

各カラム中で異なる文字間に有意差あり ($P < 0.05$)

ス板上に *E. pisi* を接種した場合には、その率は49.7%に達し、他の基質上に比べ有意に高い成熟付着器形成率を示した。ガラス板上（図24B）と子葉鞘上（図24A）とで形成された付着器の形態はほぼ同様であった。これらの結果から、*E. pisi* の形態形成のための人工基質としてガラス板が最適であると判断されたので、以下の実験ではガラス板を用いることとした。

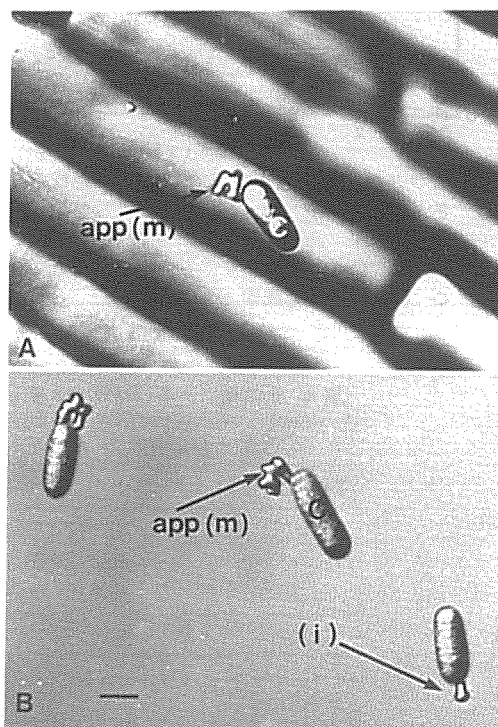


図24 子葉鞘上 (A) およびガラス板上 (B) に形成された *E. pisi* 付着器の形態
app (m), 成熟付着器, (i), 膨潤付着器

次に、ガラス板上における形態形成を経時的に観察し、子葉鞘上における形態形成と比較した(図25, 26)。ガラス板上に接種した *E. pisi* 胞子は、接種後2時間目に約60%が発芽し、接種後3時間目には約90%となり定常状態に達した(図25)。このような発芽率の推移は子葉鞘上の場合とほぼ同様であった(図26)。さらに、ガラス板上では、膨潤発芽管形成胞子は接種後3時間目から出現し、その後徐々にその形成率は増加して5時間目以降には約60%となり定常状態に達した(図25)。子葉鞘上に接種した場合にもほぼ同様の傾向が見られたが、ガラス板上よりも1時間早く膨潤発芽管が観察され始め、その率は接種後5時間目には約50%となり定常状態に達したが、ガラス板上に比べその率はやや低かった(図

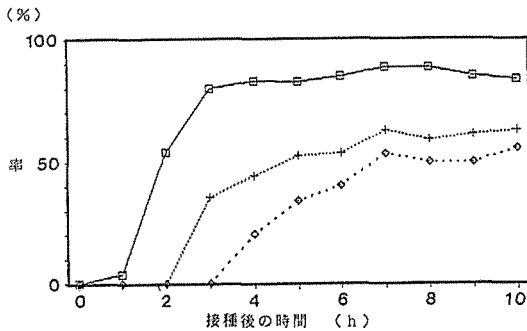


図 25 ガラス板上に接種した *E. pisi* の形態形成の経時的推移

□ 発芽率
+ 膨潤付着器形成率
◇ 成熟付着器形成率

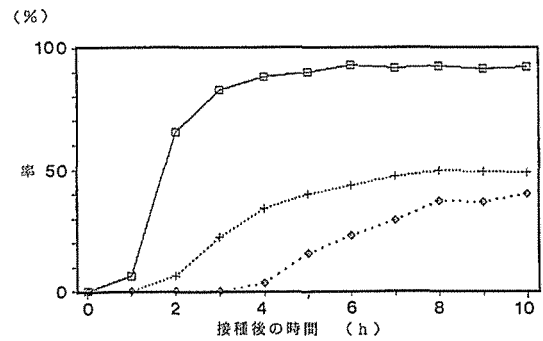


図 26 子葉鞘上に接種した *E. pisi* の形態形成の経時的推移

□ 発芽率
+ 膨潤付着器形成率
◇ 成熟付着器形成率

26)。いずれに接種した場合も、接種後4時間目から成熟付着器形成胞子が観察され始め、7～8時間目に定常状態に達した。形成率はガラス板上の方が子葉鞘上よりも常に高く、接種後10時間目の率はガラス板上では55.2%、子葉鞘上では39.8%となり、約15%の差が認められた。

以上の結果をまとめると、ガラス板に接種された *E. pisi* 胞子は、子葉鞘上と同様に発芽し、発芽管先端を膨潤させて成熟付着器を形成し、形態形成はガラス板上の方が子葉鞘上に比べ若干良好であるといえる。

さらに、ガラス板上で形成された膨潤発芽管が侵入能を有するか否かを調べた(表6)。発芽管先端が膨潤し

表 6 子葉鞘上あるいはガラス板上から子葉鞘上へ移植した *E. pisi* の侵入能力

A 子葉鞘→子葉鞘			
観察胞子総数	形態形成	観察胞子数	侵入
50	成熟付着器形成	48	48
	成熟付着器形成せず	1	0
	死滅	1	—
B ガラス板→子葉鞘			
観察胞子総数	形態形成	観察胞子数	侵入
65	成熟付着器形成	59	58
	成熟付着器形成せず	3	0
	死滅	3	0

た胞子を65個選んで子葉鞘上に移植し、接種後24時間目にその後の菌の形態形成を観察したところ、それらのうち59個は、成熟付着器を形成し、さらにそのうち58個の付着器突起下にパピラ形成が認められ、これらの付着器が侵入を試みたことが明らかになった(表6A)。しかし、移植胞子のうち3個は付着器を形成せず、他の3個は移植後の過程で潰れていた。同様の条件で子葉鞘上から別の子葉鞘上へ移植した場合にも、50個中48個の胞子は移植された子葉鞘上で正常に成熟付着器を形成し、付着器突起下にはパピラが観察された(表6B)。これらのことから、ガラス板に接種された *E. pisi* は、子葉鞘上と同様に侵入能を持った付着器を形成することが明らかとなった。

第二項 菌体抽出物の分離

菌体の水抽出物は、接種直後の未発芽胞子からも $0.70 \pm 0.06 \text{ mg}/10^6$ 胞子得られた(図27)。接種後0.5時間目まではその量は増加しなかったが、発芽が始まる接種後1.0時間目にはやや増加し、さらに発芽が定常状態にはいる3.0時間目には $1.07 \pm 0.11 \text{ mg}/10^6$ 胞子と最大量に達した。付着器が成熟してガラス表面に付着する時期に相当する6.0時間目以降にはその量が減少し、9.0時間目には $0.65 \pm 0.05 \text{ mg}/10^6$ 胞子となった。接種直後から9.0時間目までを見る限り、収量にそれほど大きな変動はみられなかった。また、顕微鏡観察の結果いずれの時間に抽出操作を行っても、抽出処理の影響で胞子や菌体が死滅している様子は観察されなかった。

一方、各時間に回収された抽出物の HPLC による溶出曲線を比較したところ(図28)、いずれの時間に回収された抽出物の溶出曲線も保持時間6.92、7.21及び9.11分の位置に主なピークが認められ、ほぼ同じ特徴を示し

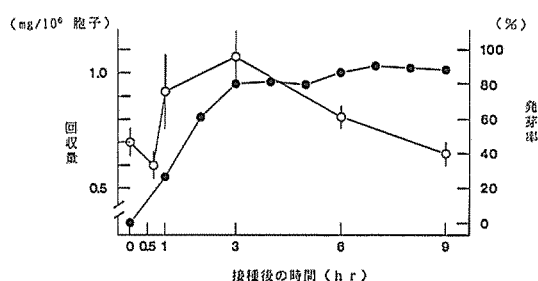


図27 *E. pisi* の発芽率及び菌体抽出物の回収量の推移
● 発芽率
○ 菌体抽出物の回収量

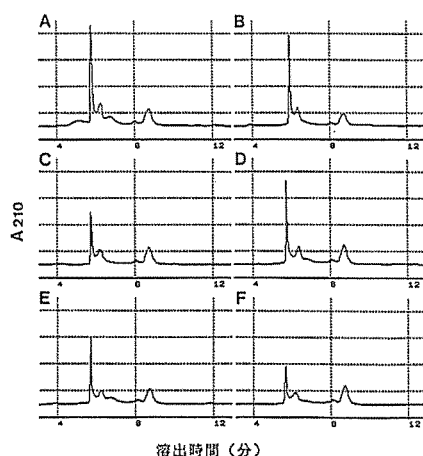


図28 *E. pisi* 接種後種々の時間に回収された菌体抽出物の HPLC による溶出曲線
A: 0時間, B: 0.5時間, C: 1.0時間
D: 3.0時間, E: 6.0時間, F: 9.0時間
溶出条件 カラム: TOSOH TSK-GEL 3000PW,
流速: 1.0 ml/min
移動相: 水

表7 拒否性インデューサーの拒否性誘導活性及び *E. graminis* の形態形成に及ぼす影響

処理濃度 (mg/ml)	感染率 (%)	感染抑制率*** (%)	発芽率 (%)	成熟付着器形成率 (%)	侵入率 (%)
2.0	46.9**	42.1	87.5	83.6	81.6
1.0	67.9*	16.2	—	—	—
0.5	74.5*	8.0	—	—	—
0.2	75.1*	7.3	—	—	—
対照区	81.0	—	90.7	75.5	72.8

* 同一カラム内で対照区と有意差あり ($P < 0.05$)

** 同一カラム内で対照区と有意差あり ($P < 0.01$)

*** 感染抑制率 = $|1 - (\text{各処理区の感染率} / \text{対照区の感染率})| \times 100$ (%)

た。この結果から、いずれの時間に回収しても同一の抽出物が得られると考えられたので、以下の実験には接種9時間後に回収された抽出物を用いることとした。

第三項 菌体抽出物の拒否性誘導活性

E. graminis の感染率に及ぼす菌体抽出物の影響を表7に示す。抽出物を含まない 0.01 M CaCl_2 で処理した子葉鞘上では、*E. graminis* の感染率は、81.0%の高い値を示した。これに対し、子葉鞘を *E. graminis* 接種直後から菌体抽出物で処理した場合には、処理濃度に依存して吸器形成が阻害された (表7)。0.2, 0.5, 1.0及び2.0 mg/ml の抽出物で処理すると、*E. graminis* の感染率はそれぞれ75.1, 74.5, 67.9及び46.9%となり、いずれの場合にも対照区より有意に減少した (表7)。これらを、抽出物処理による *E. graminis* の感染抑制率に直すと、それぞれ7.3, 8.0, 16.2及び42.1%となり、菌体抽出物は子葉鞘細胞に拒否性を誘導することを示した。

次に、*E. graminis* を接種した子葉鞘を拒否性インデューサー粗標品で一定期間前処理 (図29)あるいは後処理 (図30) し、拒否性誘導活性を検討した。接種前に1, 3, 6, 9及び12時間粗標品で子葉鞘を前処理しても *E. graminis* の感染率は対照区の感染率と有意差が認められなかった (図29)。一方、接種後1, 3, 6, 9, 12及び18時間粗標品で子葉鞘を後処理すると、1及び3時間処理区では無処理対照区と有意差は認められなかったが (図30)、6時間以上処理した区では、感染率は無処理対照区に比べて有意に低下した。この場合の感染率は、接種後子葉鞘を24時間連続して粗標品処理した区の率と有意差が認められなかった。従って、*E. graminis* 接種直後から子葉鞘を6時間以上拒否性インデューサーで処理すると、子葉鞘細胞には拒否性が誘導されることが明らかになった。

第四項 拒否性インデューサー粗標品の低分子・高分子画分の拒否性誘導

拒否性インデューサー粗標品を限外濾過膜を用いて分子量10000を基準に低分子と高分子に分画し、各画分の拒否性誘導活性を検討した結果を表8に示す。*E. graminis* を接種した子葉鞘を低分子画分で処理した場合の感染率は51.5%となり、対照区 (77.8%) に比べ有意に低下し、子葉鞘細胞には拒否性が誘導された。また、低分子画分処理した場合の感染率は拒否性インデューサー

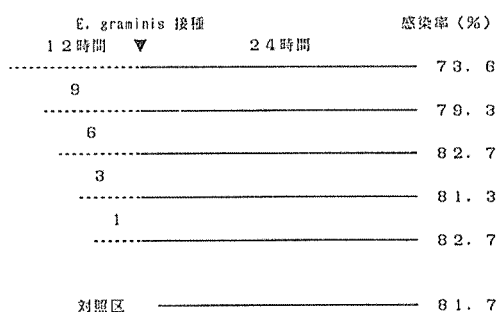


図29 拒否性インデューサー粗標品の前処理が *E. graminis* の感染率に及ぼす影響

..... 粗標品で処理した機関
—— カルシウム液で処理した期間

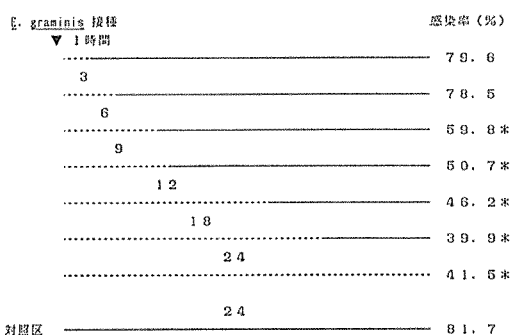


図30 拒否性インデューサー粗標品の後処理が *E. graminis* の感染率に及ぼす影響

..... 粗標品で処理した期間
—— カルシウム液で処理した期間

* 対照区と有意差有り

表8 拒否性インデューサー粗標品の低分子・高分子画分の拒否性誘導能

画 分	感染率 (%)	感染抑制率 (%)
低分子画分	51.5*	33.8
高分子画分	74.1	4.8
拒否性インデューサー粗標品	47.1*	39.5
対照区	77.8	—

* 対照区と有意差あり ($P < 0.05$)

粗標品処理の場合と有意差はみられなかった。一方、高分子画分で処理した場合の感染率は対照区と有意差がみられなかった。以上の結果から、拒否性インデューサーは低分子画分に含まれ、その分子量は10000以下であることが明らかになった。

第四節 考察

本章では、*E. pisi* から菌体抽出物を得るため、人工基質上で培養して成熟付着器を形成させる系を最初に考案した。うどんこ病菌は絶対寄生菌であり宿主上でのみその生活環を完結できるが、人工膜上においてもある程度の形態形成を行うことは報告されている^{35,56,77,147}。Heintz⁵⁶は、メタクリル樹脂上でブドウうどんこ病菌 *Oidium tuckeri* が侵入菌糸を形成し、葉表面上と同様に侵入孔を形成することを顕微鏡観察によって確認している。Kobayashi *et al.*⁷⁷は、寒天上において透析膜上に *E. graminis* を接種すると成熟付着器を形成し、この成熟付着器は侵入能および吸器形成能を持っていることを証明した。本実験でも、*E. pisi* をガラス板上に接種することにより、形態的には子葉鞘上に接種した場合とほぼ同様の成熟付着器を高率に形成し、これらの付着器が子葉鞘細胞への侵入能を持つことを明らかにした。これに対して、Clayton²⁹は、乾燥したスライドガラス上に *E. graminis* を接種しても、90% RH 以下の外的湿度下においてほとんど発芽せず、100% RH 下においても10%以上は発芽しないと報告している。また、Manners and Hossain⁹⁰は、*E. graminis* f. sp. *hordei*, *avenae* 及び *tritici* をスライドガラス上に接種した場合、付着器は形成せず短い発芽管のみを形成すると述べている。これらの事実は、*E. graminis* が形態形成するためには発芽床に一定の水分が必要であることを示唆している。従って、うどんこ病菌の形態形成に良好な条件は、菌種によってかなり異なり、最適条件を決定するためには個々の菌について検討する必要があると考えられる。

第五章に述べたように、子葉鞘に接種した *E. pisi* 菌体の取り除き実験の結果から、第一期拒否性を誘導する拒否性インデューサーは次のような特徴を持つと推定された。

①拒否性インデューサーは、化学的因子である。

②拒否性インデューサーは、*E. pisi* の付着器が成熟する時期までその菌体が子葉鞘細胞上に無ければ作用しない。

③拒否性インデューサーによって誘導される拒否性は、*E. graminis* の感染率を約50%抑制する程度の強さを持っている。

本章の実験結果は、これらの推定を支持している。*E. pisi* をガラス板に接種して培養し、成熟付着器を形成さ

せた菌体から得た抽出物の拒否性誘導活性を検討した結果、*E. pisi* は明らかに化学的因子である拒否性インデューサーを持っており、それは分子量10000以下の水溶性低分子物質である(表7)ことが明らかになった。また、抽出処理によって胞子や菌体が死滅することはなかったので、拒否性インデューサーは胞子あるいは菌体表面の細胞壁に含まれる物質である可能性が高い。ファイトアレキシン合成を誘導するエリシターはこれまで多くの糸状菌菌体から分離されており、それらの多くは多糖^{10,11,14-16,50}あるいは糖蛋白^{36,72}であることが証明されている。Ayers *et al.*^{14,15}は、*Phytophthora megasperma* var. *sojae* の培養濾液あるいは菌体のオートクレーブ標品からダイズにグリセオリン合成を誘導するエリシターを分離し、活性の強いフラクションは分子量が5000から20000の範囲にある分子量の不均一な多糖であると報告している。このエリシターに比べると、本実験で分離された拒否性インデューサーの分子量は比較的小さい。透析により外液に容易に溶出するような低分子エリシターの化学的性質はあまり知られていないが¹³⁵、Alberkksheim and Valent⁵は、*P. megasperma* var. *sojae* の菌体を $\text{exo-}\beta\text{-1, 3-glucanase}$ 処理した分解物から、エリシター活性を有する分子量約10000の比較的低分子の物質を得ている。また、Darvill and Albersheim³⁴は、エリシター活性を持つ多糖の最小単位を明らかにするため、人工的に合成した糖鎖の活性を測定し、わずか7個のグルコースの糖鎖が活性を示すことを明らかにした。これらの報告をもとにすると、本実験で分離した拒否性インデューサーも抗菌性物質の合成を誘導する物質である可能性も否定できない。この点を明らかにすることは今後の重要な課題である。また、分離された拒否性インデューサーの組成や構造は現在のところ不明であるが、予備実験の結果この拒否性インデューサーは数種の蛋白分解酵素及び熱に耐性であることが判明しているので、活性部分には蛋白を含まない可能性が高い。

第五章の実験結果から、*E. pisi* 菌体の子葉鞘上に付着器成熟時あるいはそれ以降まで存在させておけば、拒否性が誘導されることが明らかになった。この結果は次のように二通りに解釈できる。

①拒否性インデューサーは、付着器成熟時に菌体から放出される。

②拒否性インデューサーは、①以前に放出されるが、

その効果が現われるまでに一定時間を要する。

本章の実験結果から、*E. pisi* の未発芽胞子が拒否性インデューサーを持っており（図27）、形態形成に伴って抽出量が極端に増減することもない（図27）ので、①より②の可能性の方が高いと考えられる。このことはインデューサー粗標品で子葉鞘を後処理した結果からも支持される。すなわち、*E. graminis* を子葉鞘に接種した直後から一定期間拒否性インデューサー粗標品で処理すると、接種後6時間以上処理すると感染率は有意に低下し子葉鞘細胞に拒否性が誘導されることが明らかになったが、1及び3時間処理では拒否性が誘導されなかった。この結果は、拒否性インデューサーが子葉鞘細胞に6時間作用することにより拒否性が誘導されると解釈でき、②の可能性を支持している。一方、拒否性インデューサーで子葉鞘を前処理した場合には、6時間以上処理しても拒否性が誘導されなかったので、拒否性の誘導は非可逆的なものではなく一過的なものである可能性が高い。実際に、エリシター処理によってファイトアレキシン生合成系の酵素が *de novo* 合成される系では mRNA 合成量や酵素活性は一過的に上がり、まもなく低下することが知られている^{26,41,49}。

さらに、図27の結果からみて拒否性インデューサー粗標品は、計算上1胞子当り約1ng回収されたが、回収時のロスなどを考慮すると、実際は1胞子が放出する拒否性インデューサーは1ng以上である可能性が高い。従って、1子葉鞘細胞に1胞子が接種されたとすると、1細胞上で放出される量は少なくとも1ngであると考えて良いであろう。一方、本実験では拒否性インデューサー粗標品は、1子葉鞘当り100 μ g与えられ（2mg/ml \times 50 μ l）、さらに、1子葉鞘を構成する細胞数は約2000個であるので、計算上は1子葉鞘細胞当り約50ngの拒否性インデューサー粗標品が与えられたことになる。この値は、実際の感染場で1胞子によって与えられると推定される量1ngに比べて50倍高い。第五章の実験結果から、拒否性インデューサーによって誘導される拒否性は、*E. graminis* の感染率を約50%程度抑制する強さを持つと推定される。本章の結果から、2mg/mlの拒否性インデューサー粗標品で子葉鞘を処理した場合、子葉鞘には*E. graminis* の感染率を約40～50%抑制する程度の拒否性が誘導され、この推定と極めて良く一致した。しかしながら、拒否性インデューサーの効果はおそらく濃

度に依存すると考えられるので（表7）、上述のように2mg/mlという濃度が実際の感染場で与えられる濃度以上であるとする、感染率の抑制程度が一致したことが、感染場で起こっていることを正しく示しているとはいえない。しかし、菌体から抽出物を得る際のロスや拒否性インデューサー粗標品溶液に子葉鞘を浮かべるという処理方法から考えて、子葉鞘を処理した拒否性インデューサー粗標品が全て子葉鞘細胞に作用したとは考え難いので、この程度の数字のずれは十分に有り得ると考えられる。しかし、この点については、今後なお拒否性インデューサーによる処理法を改良した上で慎重に検討して行くべき問題であろう。

さらに、本章の結果から拒否性インデューサーは胞子が未発芽の状態から持っていることが明らかになったので、拒否性インデューサーは接種されて間もなく子葉鞘細胞に与えられ始めると考えられる。しかし、第三章及び第四章の結果から、子葉鞘細胞に認められる形態変化は主に付着器下に観察されており上記の考えと矛盾する。この矛盾点は、次のように二通りに説明できる。

①拒否性インデューサーと形態変化を誘導する物質は異なるかも知れない。

②付着器が成熟した結果、子葉鞘細胞表面に強く接着し、付着面で拒否性インデューサーが濃縮される。現段階ではこのいずれが正しいかは明らかではないが、拒否性インデューサーの純化が進めばこの点も明らかになると考えられる。

これまで、絶対寄生菌であるうどんこ病菌は培地上で培養できないことから、生化学的な研究には不向きであると考えられてきた。しかし、最近になって*E. graminis* 胞子からのDNAの抽出と特定のDNA断片のクローニング⁴⁶やRFLP分析²⁸に関する報告がなされており、うどんこ病菌もこの種の研究の対象として注目され始めている。本実験の結果やこれらの報告は、今後うどんこ病菌から核酸やタンパク質を含む種々の物質が抽出され、分析に供される可能性を示している。

第七章 *E. pisi* によって誘導される拒否性への アクチン繊維の関与

第一節 序

第三章で述べたように、*E. pisi* を接種すると、付着

器が成熟する時期、すなわちこの菌が侵入を開始する4～5時間前に、原形質流動速度の増加、原形質糸の数と配向に急激な変化が誘導される。この変化は、原形質糸がアクチンを含むことから考えて（第四章）、アクチン繊維の何らかの変化に起因していることはほぼ間違いない。一方、第五章に述べたように、この時期までには、子葉鞘細胞に第一期拒否性の誘導が決定されている。この事実は、第六章の結果から、拒否性インデューサーがこの時期までに子葉鞘細胞に作用することにより拒否性誘導が決定されると考えることによって解釈できる。従って、第三章から第六章の結果より、子葉鞘細胞に認められる形態的、生理的变化とそれぞれの変化の主要因については明らかになってきた。また、子葉鞘細胞に認められる形態的变化の開始時期と第一期拒否性誘導が決定される時期とがほぼ一致することから、形態変化と拒否性誘導の決定とは何らかの関係があることもほぼ間違いない。しかし、今のところこれら二つの現象を結びつける証拠は得られていない。

第三章及び第四章でも議論したように、アクチン繊維は原形質流動と密接に関係しており^{7,19,70,108,123)}、物質やオルガネラの細胞内輸送にも関わっているの^で^{8,18,48,73,113,139)}、形態変化のみでなく拒否性誘導にも何らかの役割を果たしている可能性は否定できない。細胞内で機能しているF-アクチンは、単量体であるG-アクチンが重合して繊維状の形態をとる分子であり、その＋末端では常にG-アクチンが重合を、また－末端では常に脱重合を行っていることが知られており、アクチンが細胞内で機能するためには、この重合と脱重合の繰り返しが必要であると考えられている¹³⁴⁾。従って、もしアクチン繊維が形態変化と拒否性誘導の両者に関与しているとすると、アクチンの重合あるいは脱重合を阻害すれば、子葉鞘細胞に認められる形態変化と拒否性の誘導を同時に阻害できるはずである。

そこで、本章では、*E. pisi* の付着器が成熟する時期に認められる形態的变化とこの菌による拒否性誘導との関係を明らかにするために、子葉鞘に誘導される形態変化及び拒否性に対してアクチン重合阻害剤及び脱重合阻害剤がどの様に影響をするかを調べた。

第二節 材料及び方法

第一項 供試薬剤

アクチンの機能を阻害する薬剤としてアクチンの重合阻害剤であるサイトカラシン^{93,127,129,141)}及び脱重合阻害剤であるファロイジン^{102,138)}を供試した。サイトカラシンには20数種の化合物が知られているが¹⁴³⁾、本実験ではこのうちサイトカラシンA（シグマ、米国）、B（アルドリッチ、米国）、C（アルドリッチ、米国）、D（シグマ、米国）及びE（アルドリッチ、米国）の5種を供試した。サイトカラシンは全て1 mg/mlの濃度になるようジメチルスルフォキシド（DMSO: メルク・ジャパン、東京）に溶解し、これを原液として各実験に供試した。

また、ファロイジン（シグマ、米国）は、1 mg/mlの水溶液を調整し、これを原液として各実験に供試した。なお予備実験の結果、純水あるいは0.01 M CaCl₂溶液にDMSOを加えて24時間培養しても、1%の濃度までは子葉鞘細胞及び*E. pisi*に全く影響はみられなかったが、10%以上になると多数の子葉鞘細胞が原形質分離を起こして死滅し、*E. pisi*の付着器成熟も阻害された。

第二項 *E. pisi* の感染率及び子葉鞘細胞の原形質流動に及ぼす各阻害剤の影響

子葉鞘に*E. pisi*を接種し、直ちに前章第二節第三項に述べた方法により、時計皿上で子葉鞘を培養した。予め時計皿上には、最終濃度が1、10及び100 µg/mlになるように純水で希釈したサイトカラシンA、B、C、D、Eならびに10、100及び1000 µg/mlのファロイジンを100 µlずつ入れ、この上に子葉鞘をおいた。なお、サイトカラシン溶液上に子葉鞘をのせる際には、子葉鞘下面についた水滴をキムワイプで十分に拭き取り、サイトカラシンが希釈されないようにした。所定（第二章）の培養方法により24時間培養後、*E. pisi*の吸器形成を観察し、以下の式により感染率を算出した。

$$\text{感染率 (\%)} = \frac{\text{吸器形成付着器数}}{\text{成熟付着器数}} \times 100$$

また、同時に子葉鞘細胞の原形質流動を観察し、以下の式により原形質流動停止率を算出した。

$$\text{原形質流動停止率 (\%)} = \frac{\text{原形質流動停止細胞数}}{\text{観察細胞数}} \times 100$$

さらに、サイトカラシンAに関しては、その最終濃度

が0.2, 0.5, 1.0及び2.0 $\mu\text{g/ml}$ となるように純水で希釈し、同様の方法で子葉鞘を処理して *E. pisi* の感染率及び子葉鞘細胞の原形質流動停止率を算出した。また病原菌である *E. graminis* を接種し、0.01 M CaCl_2 溶液で培養すると感染率が上昇することが知られているので、サイトカラシン処理との相乗効果が認められるか否かを調べるために、純水のかわりに0.01 M CaCl_2 溶液でサイトカラシンAを同様に希釈した区を設けた。

なお、対照実験として *E. pisi* を接種後、時計皿に純水または0.01 M CaCl_2 溶液を入れ、この上で24時間培養した後、同様の検討を行った。

それぞれの区の観察は、3反復以上行い、少なくとも6個以上の子葉鞘を観察した結果から平均値及び標準誤差を算出した。また、観察の際は1細胞に1孢子がのっているものを選び、1つの子葉鞘につき20～50個の孢子及び子葉鞘細胞を観察した。

第三項 アクチン繊維の配向変化に及ぼすサイトカラシンの影響

前項で述べた方法と同様に、最終濃度が0.2, 0.5, 1.0及び2.0 $\mu\text{g/ml}$ になるように純水で希釈したサイトカラシンAを時計皿に入れ、*E. pisi* を接種した子葉鞘をこの上においた。所定（第二章）の方法で24時間培養後、子葉鞘を第四章第二節第二項に述べた方法により固定し、アクチン繊維の染色を行った。染色後、蛍光顕微鏡観察を行い、アクチンの配向変化を写真撮影し、第四章に示した結果と比較検討した。

第三節 結果

第一項 *E. pisi* の感染率及び子葉鞘細胞の原形質流動に及ぼす各阻害剤の影響

E. pisi を接種した子葉鞘を5種のサイトカラシン水溶液及び純水上で培養した結果を表9に示す。純水で培養した対照区では、*E. pisi* は子葉鞘細胞に吸器を全く形成しなかった。また、子葉鞘細胞を観察したところ原形質流動が停止している細胞は全くなかった。

これに対してサイトカラシン処理区ではいずれも、子葉鞘細胞の原形質流動は完全に停止したが、流動を停止させる濃度はサイトカラシンの種類によって異なっていた。サイトカラシンDは、供試した最高濃度である100 $\mu\text{g/ml}$ で処理した場合にのみ原形質流動の停止が観察され、流動停止率は100%となった。サイトカラシンB、

表9 *E. pisi* の吸器形成及び子葉鞘細胞の原形質流動に及ぼすサイトカラシンの影響

	流動停止率* (%)	吸器形成率** (%)
サイトカラシン A		
1 $\mu\text{g/ml}$	100	15.5
10 $\mu\text{g/ml}$	100	0.0
100 $\mu\text{g/ml}$	100	0.0
サイトカラシン B		
1 $\mu\text{g/ml}$	0.0	0.0
10 $\mu\text{g/ml}$	52.5	0.0
100 $\mu\text{g/ml}$	100	0.0
サイトカラシン C		
1 $\mu\text{g/ml}$	0.0	0.0
10 $\mu\text{g/ml}$	100	23.5
100 $\mu\text{g/ml}$	100	0.0
サイトカラシン D		
1 $\mu\text{g/ml}$	0.0	0.0
10 $\mu\text{g/ml}$	0.0	0.0
100 $\mu\text{g/ml}$	100	0.0
サイトカラシン E		
1 $\mu\text{g/ml}$	0.0	0.0
10 $\mu\text{g/ml}$	100	27.6
100 $\mu\text{g/ml}$	100	0.0
フェロイジン		
10 $\mu\text{g/ml}$	0.0	0.0
100 $\mu\text{g/ml}$	0.0	0.0
1000 $\mu\text{g/ml}$	61.4	12.7
水		
	0.0	0.0

* 流動停止率＝流動停止細胞数／観察細胞数×100

** 吸器形成率＝吸器形成付着器数／成熟付着器数×100

C及びE処理区では、10 $\mu\text{g/ml}$ 以上の濃度で原形質流動が停止した。流動停止率は100 $\mu\text{g/ml}$ の濃度ではどの種類のサイトカラシンでも100%、10 $\mu\text{g/ml}$ では、C、Eは100%、Bは52.5%であった。また、サイトカラシンAは低濃度でも強い効果を示し、1 $\mu\text{g/ml}$ の低濃度処理区においても流動停止率は100%となった。ただし、いずれの処理区でも100 $\mu\text{g/ml}$ で処理した場合には、多くの子葉鞘細胞が死滅し、*E. pisi* の付着器成熟も強く阻害された。100 $\mu\text{g/ml}$ 処理区では、DMSOの濃度が

10%以上になるので、サイトカラシンよりもむしろ DMSO の影響が現れたと考えられる。Hazen and Bushnell⁵⁴⁾ も 5% DMSO が子葉鞘細胞及び *E. graminis* の生育に第二節に述べた予備実験の結果と同様の影響を与えたことを報告している。

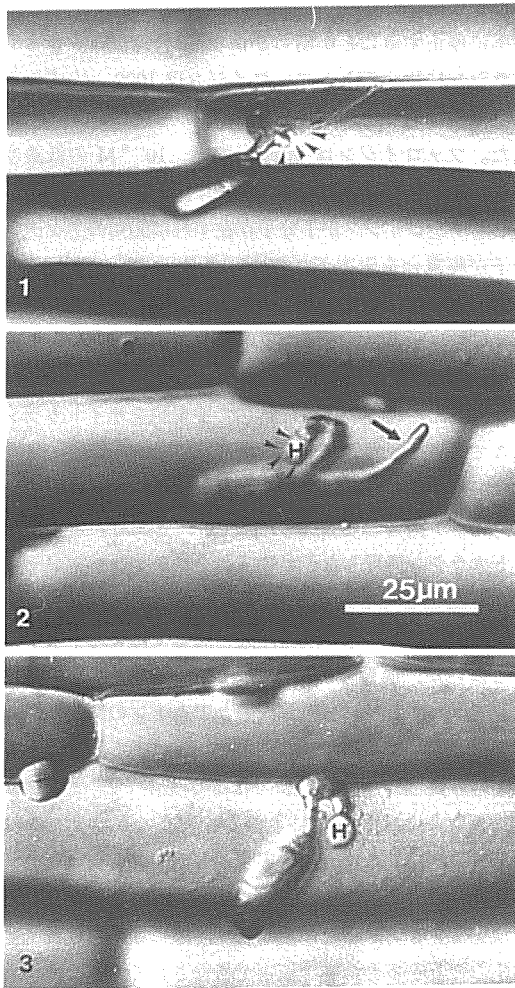


図 31 アクチン重合阻害剤及び脱重合阻害剤処理が *E. pisi* の吸器形成に及ぼす影響 (接種後24時間目)

1. 対照区 (水処理区) における *E. pisi* の形態。侵入地点下に細胞質凝集が認められるが (矢尻), *E. pisi* は吸器形成できない。
2. 1.0 $\mu\text{g/ml}$ サイトカラシン処理区。*E. pisi* は吸器 (H) 形成に成功し、二次菌糸 (矢印) が伸長した。
3. 1000 $\mu\text{g/ml}$ ファロイジン処理区。*E. pisi* は吸器 (H) 形成に成功するが二次菌糸の伸長は認められない。

E. pisi は対照区では全く吸器を形成しなかったが (図 31-1), 10 $\mu\text{g/ml}$ のサイトカラシン C, E で処理した場合の感染率はそれぞれ, 23.5, 27.6% となり, 子葉鞘細胞に吸器を形成することができるようになった (図 31-2)。また, サイトカラシン A は特に強い効果を示し, 1 $\mu\text{g/ml}$ の低濃度処理の場合でも吸器形成が観察された (感染率 15.5%)。吸器形成に成功した *E. pisi* の発芽管基部あるいは胞子からは, 二次菌糸の伸長が認められた (図 31-2; 矢印)。吸器形成が認められた処理区では, いずれの場合も子葉鞘細胞の原形質流動は完全に停止していた (流動停止率 100%)。

一方, ファロイジン処理区でも, 子葉鞘細胞の流動停止率は 61.4% となったが, 吸器形成は 1000 $\mu\text{g/ml}$ という高濃度処理の場合に限られていた (感染率 12.7%) (図 31-3)。また, この場合には, 吸器形成しても二次菌糸が伸長することはなかった (図 31-3)。

以上の結果が示すように, アクチン重合阻害剤, 脱重合阻害剤いずれの処理によっても, *E. pisi* の感染と子葉鞘細胞の原形質流動阻害とが平行的におこった。

以上の結果から, 子葉鞘細胞の原形質流動の停止及び *E. pisi* の吸器形成に対してサイトカラシン A は低濃度で強い効果を示すことが明らかになったので, サイトカラシン A に関してさらに詳細に検討を加えることとした。まず, 1 $\mu\text{g/ml}$ 以下の濃度で処理した場合, 子葉鞘細胞の原形質流動及び *E. pisi* の吸器形成が影響をうける可否かを調べた。図 32 に示すように, 供試最低濃度である 0.2 $\mu\text{g/ml}$ の場合にも原形質流動は 100% 停止し *E. pisi* の吸器形成も認められた (感染率 24.3%)。0.5, 1.0 及び 2.0 $\mu\text{g/ml}$ 処理区における感染率はそれぞれ 12.3, 9.2 及び 5.6% となり, 濃度が高くなるにつれて感染率がやや低下する傾向が認められた。

また, カルシウム添加区におけるサイトカラシンの効果を調べたところ (図 33), いずれの処理区においてもカルシウムを添加した場合には感染率が約 1.55 倍に上昇し, カルシウムはサイトカラシン A の効果を高める作用を示した。特にサイトカラシン A が 0.5 及び 1.0 $\mu\text{g/ml}$ の区ではカルシウムを添加していない場合にはそれぞれ感染率が 12.3 及び 9.2% であったのに対し, カルシウム添加区ではそれぞれ 46.8, 42.9% となり, きわめて高い感染率を示した。

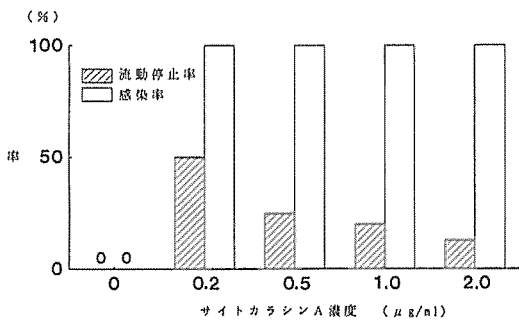


図 32 *E. pisi* の吸器形成及び子葉鞘細胞の原形質流動に及ぼすサイトカラシンAの影響

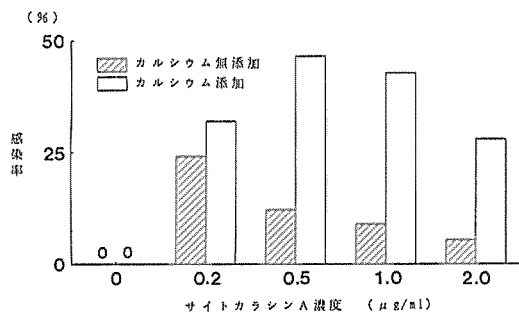


図 33 サイトカラシンAの吸器形成誘導効果に及ぼすカルシウム添加の影響

第二項 アクチン繊維の配向変化に及ぼすサイトカラシンの影響

E. pisi を接種した子葉鞘細胞のアクチン繊維は、*E. pisi* の形態形成の進行に呼応してその配向が変化することを第四章に詳しく述べた。本項の実験では、この変化に及ぼすサイトカラシンAの影響を検討した。第四章に述べたように、サイトカラシン処理をしなかった場合、接種後24時間目には *E. pisi* の付着器を中心に放射状に配向する多数のアクチン繊維が観察された (図 34-1a, b)。これに対して、サイトカラシンの供試最低濃度である $0.2 \mu\text{g/ml}$ で処理しても子葉鞘細胞内全体にアクチン繊維は稀にしか観察されず、付着器を中心に配向するアクチン繊維はほとんど観察されなかった (図 34-2a, b)。さらに、 $0.5 \mu\text{g/ml}$ 以上の濃度で処理すると、子葉鞘細胞内はもとより、侵入地点下にも全くアクチン繊維は観察されなかった (図 34-3, 4, 5)。また、サイトカラシン処理をしない場合及び $0.2 \mu\text{g/ml}$ のサイトカラシンAで処理した場合には付着器下にパピラが形成されたのに対し、 $0.5 \mu\text{g/ml}$ で処理した場合にはほとんどパ

ピラが形成されず、 $1.0 \mu\text{g/ml}$ 以上の濃度で処理した場合には全く形成されなかった。

第四節 考察

本章の実験結果より、子葉鞘をアクチン重合阻害剤及び脱重合阻害剤で処理すると子葉鞘細胞の原形質流動は高率に停止することが明らかになった (表 9)。サイトカラシンに比べると、ファロイジンは $1000 \mu\text{g/ml}$ の高濃度で処理した場合にのみ *E. pisi* の感染に影響を及ぼした。ファロイジンは *in vitro* では、 10^{-8}M の低濃度でもアクチンに結合することができ、アクチン10分子に対してファロイジンが1分子存在すれば50%のアクチン分子が脱重合を阻害される¹³⁸⁾。しかし、ファロイジンは細胞膜を通過しにくい¹⁰²⁾、通常は高濃度で処理しなければ効果を示さない。本実験においてもファロイジンが高濃度でしか効果を示さなかったのはこのためであると考えられる。これに対して子葉鞘をサイトカラシンAで処理した場合には、 $0.2 \mu\text{g/ml}$ という極めて低濃度でも全ての子葉鞘細胞の原形質流動が停止し、他のサイトカラシンよりも効果が高かった (図32)。また、サイトカラシン処理した子葉鞘細胞をローダミン-ファロイジン染色しても細胞内にアクチン繊維は観察できなかった。高等植物の原形質流動に関してはまだ不明な部分も多いが、藻類の *Chara*⁷³⁾ や *Nitella*¹⁷⁾ に関して詳細に研究されており、原形質流動とアクチンの関係がかなり明らかにされている。これらの報告によると、原形質流動の駆動機構は動物の筋肉収縮の機構^{9,30,66)}と同様にアクチン-ミオシン系によるので、サイトカラシンによってアクチンの重合を阻害すると原形質流動は駆動機構を失い停止すると考えられている。サイトカラシン処理によりアクチン繊維が崩壊し、同時に原形質流動も停止することが多くの高等植物で報告されていることから推察すると^{107,109,127,129,142)}、これらの植物の原形質流動もアクチン-ミオシン系に依存していることはほぼ間違いない。従って、子葉鞘細胞の原形質流動が停止したのは、サイトカラシン処理により細胞内のアクチン繊維への重合が阻害されたことに起因すると解釈できる。

このようにサイトカラシンは、子葉鞘細胞の原形質流動を効果的に停止させるとともに、オオムギ子葉鞘への *E. pisi* の感染を可能にした (表 9)。すなわち、*E. pisi* はオオムギ子葉鞘細胞に単独で接種しても吸器を形成す

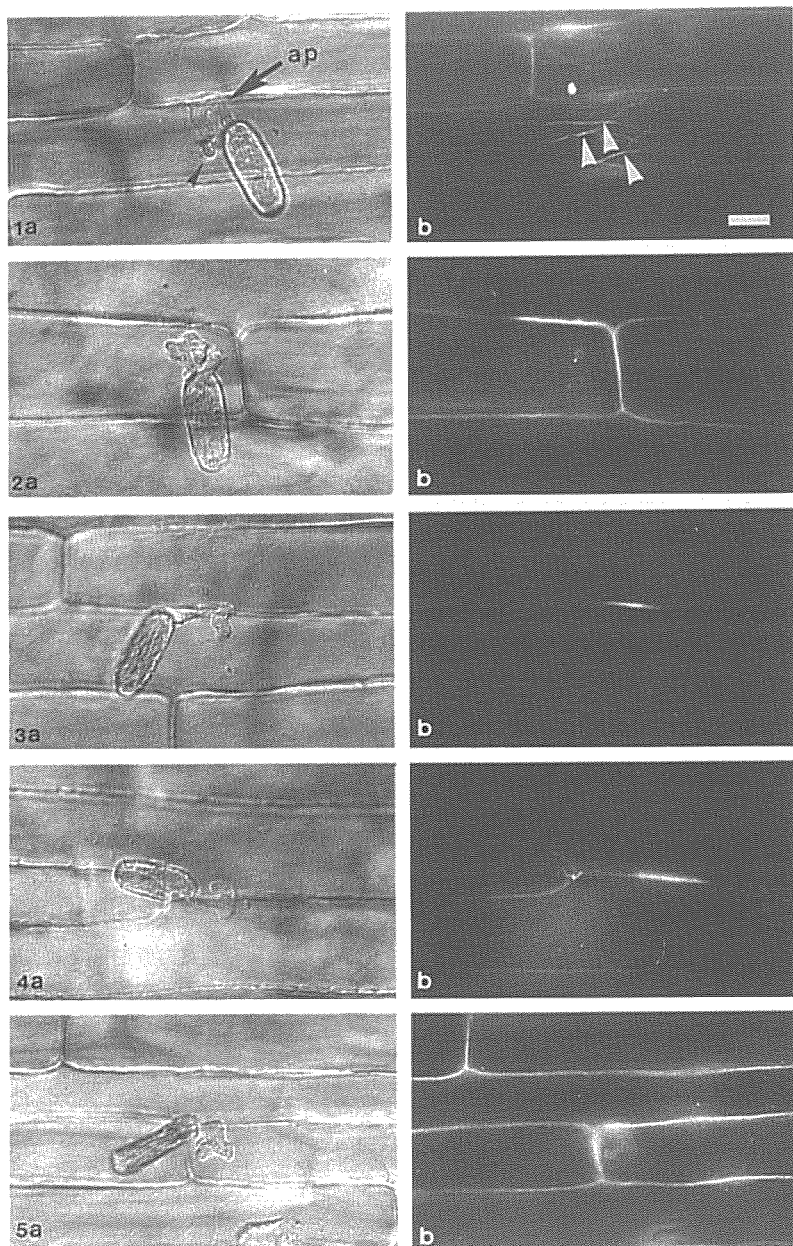


図 34 アクチン繊維の配向変化に及ぼすサイトカラシン A の影響

(*E. pisi* 接種後24時間目)

それぞれ a, b は同一視野の微分干渉顕微鏡像 (a), 及びローダミン-ファロイジン染色による蛍光顕微鏡像 (b) を示す。

1a, b *E. pisi* 接種後24時間目の対照区。付着器 (ap) 下にはパピラが形成されており (黒矢尻), 多数のアクチン繊維 (白矢尻) が観察される。

2a, b 0.2 µg/ml サイトカラシン A 処理区。細胞中にアクチン繊維は稀にしか観察されず, 付着器を中心に配向するアクチン繊維もほとんど観察されなかった。

3, 4, 5a, b 0.5 µg/ml (3) 1.0 µg/ml (4) 2.0 µg/ml (5) サイトカラシン A 処理区。細胞内に全くアクチン繊維は観察されず, 付着器下にパピラ形成も認められなかった。

(スケール=10 µm)

ることはできないが、サイトカラシン処理した子葉鞘では、吸器を形成するようになった(図32-2)。しかも、サイトカラシンが *E. pisi* の感染に影響を及ぼした供試最低濃度は、原形質流動に影響を及ぼした供試最低濃度と一致する傾向にあった(表9)。第四章にも述べたように、*E. pisi* が実際に侵入を開始する以前にアクチン繊維の配向が変化するので、サイトカラシンはアクチンの重合を阻害することによって、*E. pisi* の感染を阻止する機構、すなわち拒否性の誘導あるいはその発現を阻害するものと推定できる。このことは逆に、アクチン繊維が *E. pisi* の侵入成否に直接的に関わっている可能性を強く示唆している。この推定はファロイジン処理によって *E. pisi* が子葉鞘細胞に感染可能になることから支持される。ファロイジンはアクチンの脱重合阻害剤であり、サイトカラシンの作用とは全く逆であるにも関わらず、*E. pisi* の感染に対して同様の効果を示すことは、細胞内におけるアクチンの機能が損なわれること自体が *E. pisi* の感染を可能にしていることを強く示唆している。前述したように、細胞内で機能するアクチンは繊維状の F-アクチンの形態をとっているが、常にトレッドミリングと呼ばれる重合、脱重合の繰り返し、アクチンが細胞内で機能するために必要であると考えられている¹³⁴⁾。以上を要約すると、子葉鞘細胞内のアクチン繊維は *E. pisi* による拒否性の誘導に密接に関わっており、その重合あるいは脱重合を阻害することにより子葉鞘細胞に拒否性が誘導がされなくなると考えられる。

本実験では、5種のサイトカラシンとファロイジンを用いて *E. pisi* の感染に及ぼす影響を調べ、サイトカラシン A、C 及び E とファロイジンが *E. pisi* の感染を可能にすることを明らかにした。これまでサイトカラシン B は、多種の植物の原形質流動とアクチン繊維の関係を研究するために用いられてきたが^{109,127,129,142)}、他のサイトカラシンが高等植物の研究に用いられた例は少ない。Yahara *et al.*¹⁴³⁾ によると、これまでに20数種のサイトカラシンが分離されており、それぞれの作用性が異なる。また、Parthasarathy¹⁰⁷⁾ によれば、同じサイトカラシン B でも原形質流動に作用する濃度は植物の種によって異なる。従って、サイトカラシンの作用を調べる場合には、本実験のように数種のサイトカラシンの作用をまず比較する必要がある。

アクチンを含め、細胞骨格を構成する物質が菌の攻撃

に対する植物の防御反応に関わっていることは、現在までのところほとんど報告されていない。Tu¹³¹⁾ によると、アルファルファモザイクウイルスによってインゲンに形成される局部病斑は、サイトカラシン B 処理により減少する。また、Tomiyama *et al.*¹²⁹⁾ は、*Phytophthora infestans* を接種したジャガイモ塊茎細胞をサイトカラシン B あるいはコルヒチンで処理することにより、過敏感細胞死が遅延すると述べている。同様な過敏感細胞死を抑制する効果については、*E. graminis* を接種したオオムギの系でも報告されており⁶⁴⁾、細胞骨格が過敏感細胞死に何からの役割を果していることを示唆しているが、具体的に抵抗性の発現に関係する機構は明らかにされていない。本実験の結果は、拒否性誘導・発現へのアクチンの関与を明白に示し、抵抗性機構の解明を大きく前進せしめたと言えよう。

本実験ではさらに、サイトカラシン A とカルシウムの相乗効果について調べ、カルシウムがサイトカラシン A の効果をさらに高めることを明らかにした(図33)。*E. graminis* に関しては、カルシウムがオオムギ上での病斑形成^{59,60)} や子葉鞘細胞への感染率¹²⁶⁾ を高めることがよく知られているが、現在のところ、その機構は明らかでない。しかし、本章の実験結果とカルシウムが細胞骨格系の調節に深く関わっているという事実^{96,120)} は多くのことを示唆している。すなわちカルシウムは、*in vitro* では、アクチンの脱重合を促進することが知られており⁹³⁾、植物に与えると原形質流動速度の低下^{98,125)}、細胞内のアクチン繊維の崩壊を引き起こす⁹⁴⁾。これらの事実は、カルシウムも細胞骨格に直接作用することにより、感染を促進する可能性を示唆している。しかし、本章で明らかにしたように、カルシウムはサイトカラシン A と相乗効果を示すこと、またカルシウムのみではオオムギ子葉鞘に *E. pisi* が感染可能にならないことなどから、カルシウムが細胞骨格に影響を与えてとしても、その作用点はサイトカラシン A のそれとは異なることが考えられる。

第八章 *E. graminis* による拒否性誘導の抑制

第一節 序

第五章の実験から、*E. pisi* の付着器が成熟してから *E. graminis* の侵入開始までの時間差が6時間以上の場合

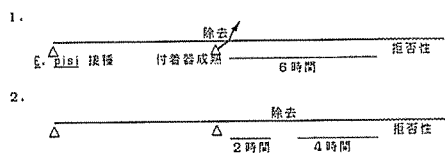
合、細胞に拒否性が誘導されることが示された。この結果、「拒否性インデューサーが放出されてから細胞に拒否性が誘導されるまでに一定の時間が必要である」と仮定すれば説明できる (図 35A)。第六章で述べたように、*E. pisi* から抽出した拒否性インデューサーも最低6時間以上子葉鞘を処理しなければ拒否性が誘導されない。

一方、*E. graminis* によって *E. pisi* に対する受容性が誘導される^{82,86)}ことを考えると、「拒否性誘導に関わる *E. pisi* のインデューサーの作用に *E. graminis* が干渉する」という第二の仮定を考慮する必要がある (図 35B)。言い換えれば、*E. pisi* の放出する拒否性インデューサーの働きを抑制する物質を *E. graminis* が持っている可能性を考える必要があるということである。

このような作用性を示す物質として、ファイトアレキシン合成の引金となるエリシターの働きを抑制するサプレッサーがよく知られている。サプレッサーの存在は *Mycosphaerella pinodes*^{100,101,118,145)}、*Phytophthora megasperma*¹⁴⁹⁾ 及び *Phytophthora infestans*³⁸⁾ などの菌で報告されているが、絶対寄生菌でその存在が証明された例はない。

本章では、上記の二つの仮定が正しいか否かを明らかにし、*E. graminis* がこのような因子を持っているか否かを調べた。

A 第一の仮定：拒否性が誘導されるまでには一定の時間を要する。



B 第二の仮定：拒否性インデューサーの働きに *E. graminis* が干渉する。

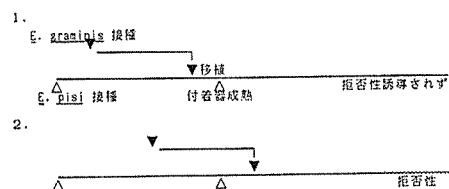


図 35 第五章の実験結果を説明する二つの仮定 (詳細は本文参照)

第二節 材料及び方法

第一項 *E. pisi* 菌体除去と *E. graminis* 移植のタイミングが *E. graminis* の感染率に与える影響

第五章及び第六章の結果では、拒否性インデューサーは、*E. pisi* の付着器が成熟する頃 (接種後3.5~6.0時間) まで与え続けられなければ拒否性を誘導しなかった。従って *E. graminis* がこれを抑制する因子を放出するとすれば、*E. pisi* の付着器成熟と *E. graminis* の移植のタイミングによって感染率が影響を受けるはずである。以下 *E. graminis* がこのような因子を持つと仮定して、これを拒否性インヒビターと呼ぶ。そこで、図37に示するような5通りの条件で菌体除去と移植を行い、*E. graminis* の感染率を比較した。

- E. graminis* を *E. pisi* の付着器成熟前に移植し、その後 *E. pisi* の付着器が成熟した時点で *E. pisi* を除去する。
- 付着器が成熟した時点で *E. pisi* を除去し、その後 *E. graminis* を移植する。
- E. pisi* の付着器が成熟する前に *E. graminis* を移植し、*E. pisi* の付着器成熟後2時間目に *E. pisi* を除去する。
- E. pisi* の付着器が成熟した時点で *E. graminis* を移植し、*E. pisi* の付着器成熟後2時間目に *E. pisi* を除去する。
- 付着器成熟後2時間目に *E. pisi* を取り除き、その後 *E. graminis* を移植する。

そして、*E. graminis* 接種後24時間目に顕微鏡観察し、感染率を算出した。なお、対照区では、*E. graminis* を子葉鞘に移植し、0.01M CaCl₂ 溶液上で所定の方法 (第二章) によって培養し、24時間後に感染率を同様に算出した。

第二項 *E. graminis* が持つ拒否性とインヒビターの細胞学的証明

第五章で述べたように、*E. pisi* の付着器成熟時に *E. pisi* 菌体を除去した場合に、除去後6時間目以降に *E. graminis* が侵入を開始すると、拒否性が誘導された。また、付着器成熟後2時間目に除去した場合には、*E. graminis* の侵入開始が除去後4時間目以降に拒否性が誘導され、付着器成熟期に *E. pisi* を除去した場合に比べ時間差が2時間短縮された。このことは、第一節に述べ

た第一の仮定 (図 35A) に従えば, *E. pisi* の付着器成熟時から拒否性が働き始めるまでに約 6 時間を要すると解釈できる (図 35A-1)。従ってこの場合には, *E. graminis* を *E. pisi* の侵入前に移植しても侵入後にしても拒否性の誘導には影響がないはずである。しかし本章第一項の結果から, 移植のタイミングは拒否性誘導に関係することが示された。すなわち, *E. pisi* の付着器が成熟する前に *E. graminis* を移植すると *E. pisi* によって誘導される拒否性の影響を受けず, 成熟後に移植すると拒否性の影響を受ける。この結果は, *E. graminis* が *E. pisi* の付着器成熟前から作用していると拒否性インデューサーの働きを抑制する因子 (すなわち, 本章で定義した拒否性インヒビター) を持っていると考えることにより理解できる (図 35B)。*E. graminis* を *E. pisi* の付着器成熟後に移植すると拒否性インデューサーの働きは抑制されないから, 必ず拒否性が誘導されるはずである (図 35B-2)。ところが, *E. graminis* は通常接種後 10~11 時間後には侵入を開始するので (図 36-1), 移植後 4~5.5 時間目には必ず侵入を開始する (図 36-2)。なぜなら, この菌の移植は接種後 5.5~6 時間目に行うからである。これらのことから, いずれの仮定に従っても, *E. graminis* を *E. pisi* の付着器成熟前に移植した場合には *E. graminis* の感染率は拒否性の影響を受けないことになる。その理由は次の通りである。

① *E. pisi* の付着器成熟後 6 時間目には拒否性は誘導されるが, *E. graminis* はこれ以前に侵入を開始してしまうので, 拒否性の影響を受けない (図 36-3)。

② *E. graminis* の拒否性インヒビターによって拒否性の誘導が抑制されたので *E. graminis* は拒否性の影響を受けないで侵入行動を開始できる。またこの場合, *E. pisi* の付着器成熟後 6 時間目になっても拒否性は誘導されないはずである (図 36-4)。

このような理由から, 単純に *E. graminis* を *E. pisi* の付着器成熟前に移植しても, その感染率を見ることによって, ①, ②のいずれの結果なのか判定できない。そこで本項では, 図 36-5 に示すように, *E. pisi* の付着器成熟前に第一の *E. graminis* (G1) を移植し, 一定時間後に G1 を除去した後に第二の *E. graminis* (G2) を移植し, G2 の感染率で結果を判定しようとした。もし, *E. graminis* のインヒビターが存在するなら, G1 を *E. pisi* の付着器成熟前に移植することによって拒否性の発

現を抑えられ, G2 を移植する事によってさらにこの状態が続くと考えられる。従って, インヒビターが存在するならば G2 の感染率は侵入開始時期とは関係なく, 拒否性の影響を受けないはずである。しかも, G2 の侵入開始時期は, *E. pisi* の付着器成熟後 6 時間以降にずれこむので, *E. graminis* が拒否性インヒビターを持っていないとすると拒否性の影響を受け, 感染率は低下すると考えられる。従って, 図 36-5 のように接種, 移植及び除去を行った場合, *E. graminis* の感染率が低下せず, 拒否性が誘導されない場合には拒否性インヒビターの存在が示唆されるが, 感染率が低下した場合には拒否性インヒビターの存在は否定される。

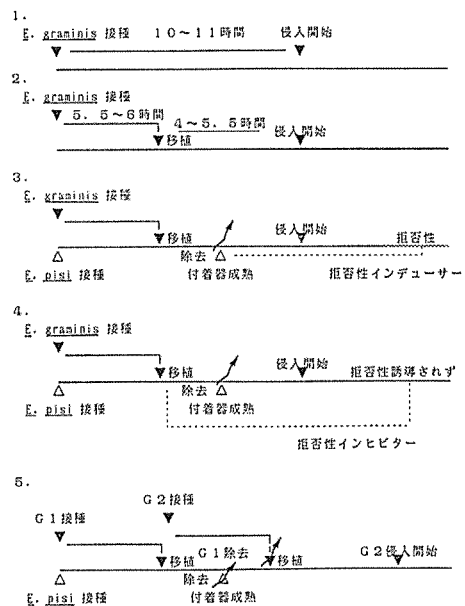


図 36 *E. graminis* の接種, 移植, 侵入開始及び *E. pisi* の接種, 付着器成熟, 除去ならびに拒否性誘導の相関 (詳細は本文参照)

接種, 移植及び除去のタイミングは, 図 38 に示すような 3 通りの条件で行った。

実験 1: 子葉鞘に *E. pisi* を接種し, *E. pisi* の付着器が成熟する以前 (*E. pisi* 接種後 3.5~4.0 時間目) に *E. pisi* の存在する細胞に *E. graminis* (G1) を移植した。その後観察を続け, *E. pisi* の付着器が成熟した時点で *E. pisi* を除去した。G1 移植後 3 時間培養を続けた後 G1 を除去し, 直ちに第二の *E. graminis* (G2) をその細胞

に移植した。G2 接種後24時間目に G2 の吸器形成の有無を観察した。

実験2：実験1と同様の手順で接種，除去，移植及び観察を行うが，G1 除去後さらに3時間培養した後，G2 を移植する。

実験3：対照実験として，*E. pisi* を接種していない細胞に G1 を移植し，3時間後に G1 を除去して，前述と同様に G2 を移植し，G2 接種後24時間目に G2 の吸器形成の有無を観察した。

上記の条件で菌体の除去及び接種を行い，*E. graminis* 接種後24時間目に顕微鏡観察し，感染率を算出した。

第三節 結果

第一項 *E. pisi* 菌体除去と *E. graminis* 移植のタイミングが *E. graminis* の感染率に与える影響

種々のタイミングで *E. graminis* の移植と *E. pisi* の菌体を除去した結果，*E. graminis* の感染率は，図37のようになった。付着器成熟時期に菌体を除去した場合について述べる（図37A, B）。*E. pisi* の付着器成熟以後に *E. graminis* を移植するとその感染率は33.3%となり対照区に比べ有意に低下したが（ $P < 0.01$ ）（図37B），付着器成熟以前に *E. graminis* を移植すると感染率は58.5%となり対照区との間に有意差が認められなかった（図37A）。次に，*E. pisi* 付着器成熟後2時間目に菌体を除去する場合について述べる（図37C, D, E）。付着器成熟前に *E. graminis* を移植すると（図37C），感染

率は65.2%となり対照区と有意差が認められなかった。ところが，付着器成熟直後に *E. graminis* を移植し，その後2時間目に *E. pisi* を除去した場合，あるいは付着器成熟2時間目に *E. pisi* を除去し，その後 *E. graminis* を移植した場合には（図37D, E）それぞれ感染率は37.5，32.9%となり対照区に比べ有意に低下した（前者は $P < 0.05$ ，後者は $P < 0.01$ ）。以上の結果から，*E. pisi* の付着器成熟以後に *E. graminis* を移植すると拒否性が誘導されるが，付着器成熟以前に移植した場合には拒否性が誘導されないと判断された。

第二項 *E. graminis* が持つ拒否性インヒビターの細胞学的証明

実験3における G2 の感染率は63.8%となった（図38）。この感染率は，第五章で用いた対照区，すなわち菌を前接種していない細胞に移植した *E. graminis* の感染率64.0%と有意差は認められなかった（ $P > 0.05$ ）。従って，G1 を移植，除去しても，G2 の感染率は影響を受けなかった。

一方，実験1における G2 の感染率は61.2%となり（図38），実験3の感染率63.8%との間に有意差が認められなかった（ $P > 0.05$ ），実験1の条件では子葉鞘細胞に拒否性は誘導されないと判断された。すなわちこの結果は *E. graminis* が拒否性インヒビターを持っていることを示している。

さらに，実験2における G2 の感染率が38.8%となり（図38），実験3の対照区における感染率に比べ有意に低

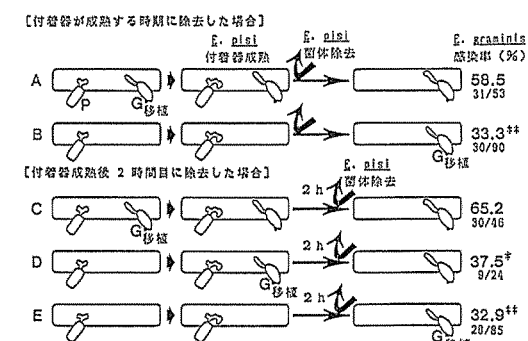


図37 *E. graminis* 移植のタイミングとその感染率との関係

* 対照区の感染率（64.0%）と有意差有り（ $P < 0.05$ ）

†† 対照区の感染率（64.0%）と有意差有り（ $P < 0.01$ ）

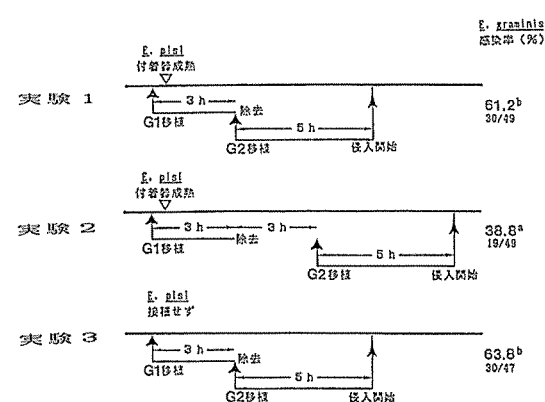


図38 *E. graminis* が持つ拒否性インヒビターの細胞学的証明法

（詳細は本文参照）

a, b 異なる文字間に有意差有り（ $P < 0.01$ ）

い値をとったことから ($P < 0.01$), 実験2の条件では子葉鞘細胞に拒否性が誘導されると判断された。すなわちこの結果は, *E. graminis* が持っている拒否性インヒビターの効果は, 菌体を取り除かれてから3時間以上経過すると消失することを示している。

第四節 考察

本章の実験結果から, 第一節に述べた仮定のうち「拒否性誘導に関わる *E. pisi* のインデューサーの作用に *E. graminis* が干渉する」という第二の仮定が正しいと結論づけることができる。このことは, *E. graminis* が拒否性の誘導に至るまでのいずれかの過程あるいは拒否性発現そのものを抑制する因子を持つことを示唆している。以後, *E. graminis* のこの因子を拒否性インヒビターと呼ぶことにする。本章の実験結果は, この拒否性インヒビターのいくつかの特徴を示している。第一の特徴は, *E. graminis* の拒否性インヒビターは *E. pisi* の拒否性インデューサーが作用する前に細胞に与えられると効力があるが, その逆の順序になると効力を発揮することはないということである。従って, 拒否性インヒビターが作用するためにはそれが子葉鞘細胞に与えられるタイミングが重要である。第二の特徴は, 実験3の結果から, *E. graminis* の菌体が除去されてしまうと拒否性インヒビターの効果は3時間以内しか持続しないことである。この事実が拒否性インヒビターのどのような性質に基づいているのかは不明であるが, それ自体が不安定な物質であるのかあるいは子葉鞘に与えられた結果分解されるためであることが考えられる。

E. pisi が持つ拒否性インデューサーと *E. graminis* が持つ拒否性インヒビターの作用は Bushnell and Rowell²³⁾ が寄生性の特異性を説明するために提唱したモデルによってうまく説明できる。彼らは, 拒否性因子の一つと考えられるファイトアレキシンの生成を誘導するエリシターとその誘導を抑制するサプレッサーによって寄生性の特異性を説明している。彼らのモデルによると, 全ての菌はエリシターを持っており, この因子は植物のファイトアレキシンを合成するためのレセプターに結合してその合成を開始させる。しかし, 病原菌は, エリシターがレセプターに結合することを特異的に阻害するサプレッサーを持っているために, 植物にファイトアレキシンを合成させずに侵入に成功する。現在では, エリシ

ターは病原菌に対するファイトアレキシシン合成に限らず, 抵抗反応の引金となるものであるとされ, それらの定義は広義に解釈されている。そこで, このモデルを本実験に当てはめれば, *E. pisi* も *E. graminis* も拒否性インデューサー (エリシターに相当) を持っているが, *E. pisi* の付着器が成熟する (すなわち, 拒否性インデューサーが放出される) 前に *E. graminis* を移植すると *E. graminis* の持つ拒否性インヒビター (サプレッサーに相当) の作用によって, *E. pisi* の拒否性インデューサーの作用が阻害され, 拒否性が発現しないと考えることができる。現在のところ, ① *E. graminis* もエリシターをもつのか, ②子葉鞘細胞の拒否性の実体は何か, という点については明らかではない。これら二つの点は, 今後の研究の焦点である。

サプレッサーとエリシターが共存することは *Mycosphaerella pinodes*^{58,100,101,118,144,145)}, *Phytophthora megasperma*¹⁴⁹⁾ 及び *Phytophthora infestans*³⁸⁾ などの菌で報告されている。*M. pinodes* のサプレッサーはエンドウのファイトアレキシシンであるピサチンの合成を抑制することが知られている^{58,100,101,118,144,145)}。Yamada *et al.*¹⁴⁴⁾ は, エンドウ胚軸を *M. pinodes* のサプレッサーで処理すると, ピサチンの合成が抑制されるが, その効果はピサチン合成を3~6時間遅延させるのみであることを見出し, この間にサプレッサーの分解が起こるのではないかと考えた。前述のように, 本章の実験から示唆された拒否性インヒビターも子葉鞘細胞上から *E. graminis* の菌体を除去してから3時間でその効力を失うので, この点に関しては *M. pinodes* のサプレッサーに類似している。しかし, *M. pinodes* のエリシターで処理したエンドウ胚軸でピサチン合成が開始された後にサプレッサー処理しても, その後のピサチン合成は阻害されるので⁵⁸⁾, *M. pinodes* のサプレッサーはピサチンの合成系をも阻害する作用を合わせ持つことになり, この点に関しては本実験で示された拒否性インデューサーの性質とは異なる。

本章の実験結果は, *E. graminis* が拒否性インヒビターを持っていることを示唆しているが, その物質の存在そのものを証明したわけではない。前述した拒否性インデューサーを *E. graminis* が持っているか否かという問題とともに, 菌体からそれらの因子を分離し, その性質を明らかにして行くという直接的な証明をする必要がある。

第九章 総 合 考 察

絶対寄生菌であるうどんこ病菌を人工培地上で培養する系は未だ確立されていないので、この菌の感染過程を検討するために生化学的あるいは分子生物学的手法を適用することには数々の問題がある。しかし、オオムギ子葉鞘細胞では、顕微鏡下で生きたままの状態を連続的に観察することが可能であるので、菌と植物細胞とのダイナミックな形態変化を知るためにはこの系の利点は大きい。このような理由から Kunoh *et al.*^{82,84-86,87)} は、オオムギ子葉鞘と病原菌であるオオムギうどんこ病菌および非病原菌であるエンドウうどんこ病菌を用いて詳細な細胞学的観察を行っており、多くの形態学的データが蓄積されている。従って、前述したような生化学的、分子生物学的研究における難点がある程度解消できれば、顕微鏡下で観察できる形態の変化を追求することによって最終的に物質レベルまで掘り下げることが可能になると考えられる。

本研究では、以上に述べたような観点から実験を行い、次のような事実を明らかにしてきた。

- ① *E. pisi* の付着器が成熟する時期に子葉鞘細胞の原形質流動速度が急激に増加する。
- ② *E. pisi* の付着器が成熟する時期に子葉鞘細胞の原形質糸の数が増加し、配向も変化する。
- ③ *E. pisi* の付着器が成熟する時期に子葉鞘細胞のアクチン繊維の配向が変化する。
- ④ 原形質糸はアクチン繊維を含んでいる。
- ⑤ *E. pisi* によって誘導される拒否性は少なくとも第一期拒否性と第二期拒否性とに分けられる。
- ⑥ 第一期拒否性の誘導は、遅くとも *E. pisi* の付着器が成熟する時期までには決定されている。
- ⑦ *E. pisi* は第一期拒否性の誘導に関与する化学的因子、すなわち拒否性インデューサーを持っており、拒否性インデューサーは、効果を発揮するためには最低でも6時間以上細胞上に存在する必要がある。
- ⑧ アクチン繊維の重合あるいは脱重合を阻害すると、子葉鞘細胞の原形質流動が停止するとともに、子葉鞘細胞への *E. pisi* の単独感染が可能になる。
- ⑨ *E. graminis* は、*E. pisi* の持っている拒否性インデューサーの効果を抑制する拒否性インヒビターを持っている。

これらの事実をもとにすると、*E. pisi* によって拒否性が誘導される過程は次のように推定される(図39)。

- ① *E. pisi* が子葉鞘細胞に接触する。
- ② 直ちに *E. pisi* 胞子から拒否性インデューサーが放出され始める。
- ③ 3～6時間後に子葉鞘細胞は拒否性インデューサーを認識する。
- ④ 認識の結果、アクチン繊維が付着器下を中心に配向するように変化する、原形質や原形質流動が変化する。
- ⑤ この結果、付着器下に物質やオルガネラが集積され、拒否性誘導が決定される。

子葉鞘細胞による拒否性インデューサーの認識は、第一期拒否性誘導の引金になっていると考えられる。子葉鞘細胞による拒否性インデューサーの認識がどの様に行われるかは不明であるが、ファイトアレキシン合成のエリシターに関しては、それに対するレセプターの存在が想定されており、拒否性インデューサーに対するレセプ

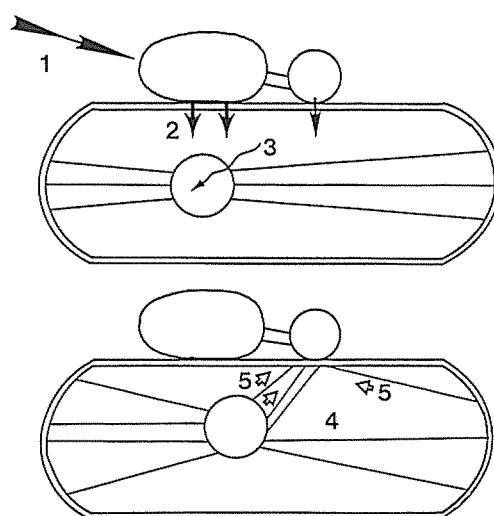


図39 拒否性インデューサーの認識から拒否性誘導に至る過程への細胞骨格の関与の推定図

- 1 *E. pisi* 胞子が子葉鞘細胞に接触する
- 2 *E. pisi* から拒否性インデューサーが放出される
- 3 子葉鞘細胞は拒否性インデューサーを認識する。
- 4 認識後、アクチン繊維の配向変化が誘導される
- 5 この結果、付着器下に物質やオルガネラが集積され、拒否性誘導が決定される

ターの存在も否定できない。今後、拒否性インデューサーが純化され、第一期拒否性の実体が明らかになれば、レセプターの存在を解明することも可能であろう。

Lamb *et al.*⁸⁸⁾ は、菌と植物の間の一般的な関係として、植物がエリシターを認識した結果、何らかの方法によってその情報が核に伝えられ、抵抗性に関与する遺伝子が発現されるという考えを提唱している。この考え方に従えば、拒否性インデューサーが子葉鞘細胞に認識された結果、拒否性に関与する遺伝子が発現すると考えるのが妥当であろう。*E. pisi* の付着器成熟時期に認められた子葉鞘細胞の形態的变化も、拒否性インデューサー認識の結果発現したものと考えられる。第三章及び第四章の実験結果から考えて、菌侵入開始前に子葉鞘細胞に認められる形態変化は、アクチン繊維の何らかの変化に関係している可能性が高い。特に原形質糸がアクチンを含むことから、原形質糸数の増加はアクチン繊維数の増加による可能性が高い。第七章にも述べたように、アクチン繊維は常に重合と脱重合を繰り返しているが、細胞はある程度 G-アクチンのプールを持っており、これが重合に利用されると考えれば、急速な原形質糸数の増加もうまく説明することができる。実際に、微生物⁷¹⁾ や動物¹¹⁵⁾ の細胞が分裂する際には収縮リングと呼ばれるアクチン繊維の束が分裂部位に速やかに形成されることが知られている。これらの事実とアクチン繊維の配向変化は拒否性の発現に直接関わっている可能性が高いこと(第七章) から、少なくとも第一期拒否性に関与する遺伝子にはアクチンの変化に関与する遺伝子群が含まれていると考えられる。アクチン繊維は、多くのアクチン結合蛋白によってその重合、脱重合及び配向が調節されており^{47,89,92,146,148)}、アクチンの変化に関与する遺伝子の中にはアクチン結合蛋白をコードする遺伝子が含まれるかも知れない。また、細胞膜には細胞骨格系蛋白に結合する“細胞膜裏打ち構造”を構成する蛋白群が存在し、細胞膜上のレセプターを介した情報伝達系に関与することが知られている¹²⁰⁾。これらの事実から、拒否性インデューサー処理によって子葉鞘細胞における種々のアクチン結合蛋白の挙動がどのように変化するかを明らかにすることは今後重要な研究課題になると考えられる。

本研究の結果及び Kunoh *et al.*⁸⁷⁾ の報告から、拒否性誘導は少なくとも第一期及び第二期の二つに分かれることが強く示唆された。このことは、緒言に述べたように、

菌が植物に感染するまでにはいくつかの段階があるという考えを強く支持するものである。この考え方に従えば、後述するような子葉鞘—うどんこ病菌の系で認められる現象は、次のようなモデルを用いてうまく説明できる。本研究のように、子葉鞘を用いる実験系では、細胞集団から得たデータをもとにして個々の細胞における状態変化を推定しようとしているので、次に述べるような確率的な考え方が必要になる。ある菌 1 胞子がある植物 1 細胞と接触し、感染が成立するまでの過程を次のようなモデルで表わすことにする (図 40)。その菌に特有の感染成立までの段階を S_n 、ある 1 胞子がある植物細胞上で S_n から S_{n+1} に進む確率を P_n ($0 \leq P_n \leq 1$) とする。 P_n の値は、この菌と植物の相互関係に特有のものである。従って図 40A の例で説明すると、この菌 1 胞子がある植物に接触した場合、最終的に感染に成功する確率 I は、

$$I = P_1 \cdot P_2 \cdot P_3 \cdot P_4$$

という式で与えられる。個々の P_n は、次のような要因の影響を受けると考えられる。

①ある段階から次の段階に進む際に P_n の値を引き下げる因子の存在

②ある段階から次の段階に進む際に P_n の値を引き上げる因子の存在

③植物細胞の生理的変異

④菌胞子の生理的変異

①、②は、その存在が遺伝的に決定されている因子であり P_n の値を大きく変化させ、菌の感染成否に重大な影響を与える。③、④は、外部環境の変化などによって変異する。

このモデルに基づけば、ある菌の感染過程において、ある P_n の値が引き上げられ、 I の値が大きくなった細胞の状態が受容性、逆にある P_n の値が引き下げられ、 I の値が小さくなった細胞の状態が拒否性であると定義できる。このモデルにおける I 及び P_n は次のような特徴を持っている。(図 40B, C)。

①複数の P_n が 1 になっても、全ての P_n が 1 にならないれば感染率 (I) は 1 にならない (図 40B)。

②いずれか 1 つの P_n が 0 になれば、感染率 (I) は 0 になる (図 40C)。

このような I 及び P_n の性質から、実際の感染場で起こる現象を次のように説明することができる。

- 1) うどんこ病菌の感染率はオオムギ—*E. graminis* の関係においても100%にはなり難い。100%になるためには、①に示したように全ての P_n が1になる必要がある。
- 2) 子葉鞘細胞への *E. pisi* の感染率は0%である。また、*E. pisi* によって拒否性が誘導されると *E. graminis* の感染率が0%にまで低下する場合がある⁸⁴⁾。このことは、*E. pisi* によっていずれかの P_n が0になったと推定される。
- 3) *E. graminis* によって *E. pisi* に対する受容性が誘導されても *E. pisi* の感染率は30~40%程度である^{82,86)}。*E. graminis* が、受容性を誘導する因子あるいは拒否性を阻害する因子によって1つの P_n を上昇させても、*E. pisi* の感染率 (I) は、他の P_n の影響によって劇的に上昇することはないと推定される。

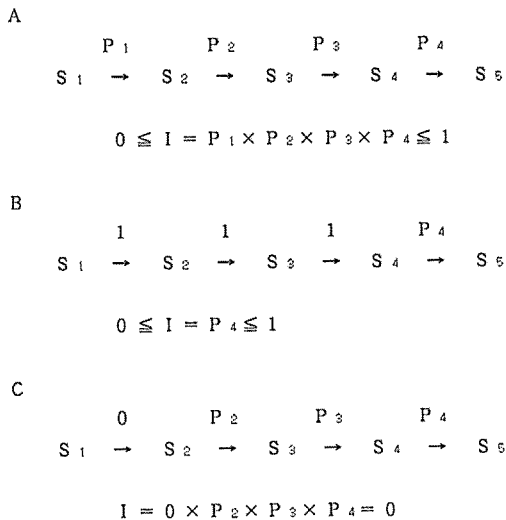


図 40 感染過程の確率モデル

- A 感染過程にはいくつかの段階 (S_n) があり、ある確率で各段階 (P_n) から次の段階 (P_{n+1}) に進む。
- B 全ての P_n が1にならないと感染率は1にならない。
- C P_n が一つでも0になると感染率は0になる。

第八章に示したように、*E. graminis* は *E. pisi* の拒否性インデューサーによって誘導される第一期拒否性の影響を回避する因子、拒否性インヒビターを持っていることが示唆された。しかし、*E. pisi* の拒否性インデューサーの効果を打ち消すものとして *E. graminis* が拒否性

インヒビターを持っているとは考え難い。むしろ、*E. graminis* 自身も拒否性インデューサーとよく似た因子を持っており、*E. graminis* 自身が誘導する第一期拒否性を回避するために拒否性インヒビターを持っている可能性が高いと考えられる。実際、*E. graminis* とオオムギの間にはレースー品種の間で親和性・非親和性関係が知られており⁶¹⁾、非親和関係にある菌はオオムギに感染できないことから考えて、*E. graminis* も拒否性インデューサーを持っている可能性が高い。これが事実であるとする、少なくとも本研究で用いた子葉鞘—うどんこ病菌の系では、寄生性の特異性が拒否性インデューサーと拒否性インヒビターとの関係によって説明できるかも知れない。この点を明らかにするためには、今後 *E. graminis* にも拒否性インデューサーが存在するか否かを証明する必要があると考えられる。

本研究では、実際の感染場で起こっている細胞形態学的な現象を出発点として、それへの関与が推定される物質の存在を化学的に証明することにより以上に述べてきたような事実を明らかにしてきた。今後の研究に多くの課題を残してはいるが、本研究によって、拒否性誘導への細胞骨格の関与等が明らかになった。これまで、形態学的手法を用いた研究は、データ自体が正しいものであっても1つのデータに複数の解釈が可能である場合が多く、その現象を正しく説明することができず、単なる現象の記載に留まる場合が多かった。しかし、この種の実験は常に出発点であり、それを論理的に組み合わせ、現象をできる限り定量的に表現し、最終的には別の手法をも用いて解析することにより初めて意味をなすものである。構造・形態と機能を切り離して考えることは無意味であり、今後もこのような視点に立って研究を進めていく必要があると考える。

謝 辞

稿を終えるにあたり、ご多忙中にもかかわらず懇切なるご指導を賜り、また御校閲の労を賜りました岡山大学農学部教授奥八郎博士に深く感謝の意を捧げます。また、本研究の遂行並びに本稿のまとめにあたり終始多数の有益なるご助言を賜りました三重大学生物資源学部教授久能均博士並びに助教山岡直人博士に深甚なる謝意を表

します。さらに、本研究を行うにあたり多大なるご協力を頂いた三重大学生物資源学部植物病理学研究室の卒業生、在校生諸氏、なかでも小村朋三君、坂本裕子君、豊田和弘君の三氏に厚くお礼申し上げます。

引用文献

- 1) ADAMS, A. E. M. and PRINGLE, J. R. Relationship of actin and tubulin distribution to bud growth in kwild-type and morphogenic-mutant *Sccharomyces cerevisiae*. *J. Cell Biol.* 98: 934-945 (1984).
- 2) AIST, J. R. Papillae and related wound plugs of plant cells. *Ann. Rev. Phytopathol.* 14: 145-163 (1976).
- 3) AIST J. R. and ISRAEL, H. W. Papilla formation: timing and significance during penetration of barley coleoptiles by *Erysiphe graminis hordei*. *Phytopathology* 67: 455-461 (1977).
- 4) AIST, J. R. and WILLIAMS, P. H. The cytology and kinetics of cabbage root hair penetration by *Plasmiodiophora brassicae*. *Can. J. Bot.* 49: 2023-2034 (1971).
- 5) ALBERSHEIM, P. and VALENT, B. S. Host-pathogen interactions in plants, when exposed to oligosaccharides of fungal origin, defend themselves by accumulating antibiotics. *J. Cell Biol.* 78: 627-643 (1978).
- 6) ALBERTS, B., BRAY, D., LEWIS, J., RAFF, M., ROBERTS, K. and WATSON, J. D. Special features of plant cells. in *Molecular Biology of The Cell*. Garland Pub., Inc., New York. pp. 1137-1186 (1989).
- 7) ALLEN, N. S. and ALLEN, R. D. Cytoplasmic streaming in green plants. *Ann. Rev. Biophys. Bioeng.* 7: 497-526 (1978).
- 8) ALLEN, R. D., WEISS, D. G., HAYDEN, J. H., BROWN, D. T., FUJIWAKE, H. and SHIMPSON, M. Gliding movement of and bidirectional transport along single native microtubules from squid axoplasm: evidence for an active role of microtubules in cytoplasmic transport. *J. Cell Biol.* 100: 1736-1752 (1985).
- 9) AMOS, L. A. Structure of muscle filaments studied by electron microscopy. *Ann. Rev. Biophys. Biochem.* 14: 291-313 (1985).
- 10) ANDERSON, A. J. Isolation from three species of *Colletotrichum* of glucan-containing polysaccharides that elicit browning and phytoalexin production in bean. *Phytopathology* 68: 189-194 (1978).
- 11) ANDERSON-PROUTY, A. J. and ALBERSHEIM, P. Host-pathogen interactions VIII isolation of a pathogen-synthesized fraction rich in glucan that elicits a defense response in the pathogen's host. *Plant Physiol.* 56: 286-291 (1975).
- 12) 新井孝夫. 細胞骨格とシグナル伝達, 細胞工学別冊 5 細胞内シグナル伝達機構, pp. 157-166 (1989).
- 13) 新井孝夫, 松本 元. ヤリイカ巨大軸作における微小管の機能分化とその細胞生物学的意義. 蛋白質核酸酵素 34: 150-159 (1989).
- 14) AYERS, A. R., EBEL, J., FINELLI, F., BERGER, N. and ALBERSHEIM, P. Host-pathogen interactions. IX. Quantative assays of elicitor activity and characterization of the elicitor present in the extracellular medium of cultures of *Phytophthora megasperma* var. *sojae*. *Plant Physiol.* 57: 751-759 (1976).
- 15) AYERS, A. R., EBEL, J., VALENT, B. and ALBERSHEIM, P. Host-parasite interactions X. fraction and biological activity of an elicitor isolated from the mycelial walls of *Phytophthora megasperma* var. *sojae*. *Plant Physiol.* 57: 760-765 (1976).
- 16) AYERS, A. R., VALENT, B., EBEL, J. and ALBERSHEIM, P. Host-pathogen interactions. XI. composition and structure of wall-released elicitor fractions. *Plant Physiol.* 57: 766-774 (1976).
- 17) BABIOR, B. M., KIPNES, S. S. and CURNUTTE, J. T. Biological defence mechanisms. The production by leucocytes of superoxide, a potential bacteriocidal agent. *J. Clin. Invest.* 52: 741-744 (1973).
- 18) BÄHLER, M. and GREENGARD, P. Synapsin I bundles F-actin in a phosphorylation-dependent manner. *Nature* 326: 704-707 (1987).
- 19) BRADLEY, M. O. Microfilaments and cytoplasmic streaming. Inhibition of streaming with cytoplasm. *J. Cell Sci.* 12: 327-343 (1973).
- 20) BRATHWAITE, C. W. D. and DICKEY, R. S. Synergism between *Pseudomonas caryophylli* and a species of *Corynebacterium*. *Phytopathology* 60: 1046-1051 (1970).
- 21) BUSHNELL, W. R. and BERGQUIST, S. E. Aggregation of host cytoplasm and formation of papillae and haustoria in powdery mildew of barley. *Phytopathology* 65: 310-318 (1975).
- 22) BUSHNELL, W. R., DUECK, J. and ROWELL, J. B. Living haustoria and hyphae of *Erysiphe graminis* f.

- sp. *hordei* with intact and partly dissected host cells of *Hordeum vulgare*. *Can. J. Bot.* 45: 1719-1732 (1967).
- 23) BUSHNELL, W. R. and ROWELL, J. B. Suppressors of defence reactions: a model for roles in specificity. *Phytopathology* 71: 1012-1014 (1981).
 - 24) BUSHNELL, W. R. and ZEYEN, R. J. Light and electron microscope studies of cytoplasmic aggregates formed in barley cells in response to *Erysiphe graminis*. *Can. J. Bot.* 54: 1647-1655 (1976).
 - 25) CHAI, H. B. and DOKE, N. Activation of the potential of potato leaf tissue to react hypersensitively to *Phytophthora infestans* by cystospore germination fluid and the enhancement of this potential by calcium ions. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 30: 27-37 (1987).
 - 26) CHAPPELL, J. and HAHNBROCK, K. Transcription of plant defence genes in response to UV light or fungal elicitor. *Nature* 311: 76-78 (1984).
 - 27) CHO, B. H. and SMEDEGAARD-PETERSON, V. Induction of resistance to *Erysiphe graminis* f. sp. *hordei* in near-isogenic barley lines. *Phytopathology* 76: 301-305 (1986).
 - 28) CHRISTIANSEN, S. K. and GIESE, H. Genetic analysis of the obligate parasitic barley powdery mildew fungus based on RFLP and virulence loci. *Theor. Appl. Genet.* 79: 705-712 (1990).
 - 29) CLAYTON, C. N. The germination of fungus spores in relation to controlled humidity. *Phytopathology* 32: 921-943 (1942).
 - 30) COOKE, R. The mechanism of muscle contraction. *CRC Crit. Rev. Biochem.* 21: 53-118 (1986).
 - 31) CURNUTTE, J. T., and BABIOR, B. M. Biological defence mechanisms. The effect of bacteria and serum on superoxide production by granulocytes. *J. Clin. Invest.* 53: 1662-1672 (1974).
 - 32) CUYPERS, B., SCHMELZER, E. and HARLBROCK, K. *In situ* localization of rapidly accumulated phenylalanine ammonia-lyase mRNA around penetration sites of *Phytophthora infestans* in potato leaves. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 1: 157-160 (1988).
 - 33) DANIELS, D. L. and HADWIGER, L. A. Pisatin-inducing components in filtrates of virulent and avirulent *Fusarium solani* cultures. *Physiol. Plant Pathol.* 8: 9-19 (1976).
 - 34) DARVILL, A. G. and ALBERSHEIM, P. Phytoalexins and their elicitors—a defence against microbial infection in plants. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 35: 243-275 (1984).
 - 35) DICHINSON, S. Growth of *Erysiphe graminis* on artificial membranes. *Physiol. Plant Pathol.* 15: 219-221 (1979).
 - 36) DIXON, R. A. and FULLER, K. W. Characterization of components from culture filtrates of *Botrytis cinerea* which stimulated phaseollin biosynthesis in *Phaseolus vulgaris* cell suspension cultures. *Physiol. Plant Pathol.* 11: 287-296 (1977).
 - 37) DODDS, J. A. and HAMILTON, R. I. The influence of barley stripe mosaic virus on the replication of tobacco mosaic virus in *Hordeum vulgare* L. *Virology* 50: 404-411 (1972).
 - 38) DOKE, N. and TOMIYAMA, K. Suppression of hypersensitive response of potato tuber protoplasts to hyphal wall components by water soluble glucans isolated from *Phytophthora infestans*. *Physiol. Plant Pathol.* 16: 177-186 (1980).
 - 39) DOKE, N. Involvement of superoxide anion generation in the hypersensitive response of potato tuber tissues to infection with an incompatible race of *Phytophthora infestans* and to the hyphal wall components. *Physiol. Plant Pathol.* 23: 345-357 (1983).
 - 40) EDWARDS, H. H. and ALLEN, P. J. A fine-structure study of the primary infection process during infection of barley by *Erysiphe graminis* f. sp. *hordei*. *Phytopathology* 60: 1504-1509 (1970).
 - 41) EDWARDS, K., CRAMER, C. L., BOLWELL, G. P., DIXON, R. A., SCHUCH, W. and LAMB, C. J. Rapid transient induction of phenylalanine ammonia-lyase mRNA in elicitor-treated bean cells. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82: 6731-6735 (1985).
 - 42) EHRLICH, M. A. and EHRLICH, H. G. Ultrastructure of the hyphae and haustoria of *Phytophthora infestans* and hyphae of *P. parasitica*. *Can. J. Bot.* 44: 1495-1503 (1956).
 - 43) EGGER, M. D. and PETRAN, M. New reflected-light microscope for viewing unstained brain and ganglion cells. *Science* 157: 305-308 (1967).
 - 44) ESNAULT, R., CHIBBAR, R. N., LEE, D., VAN HUYS-TEE, R. B. and WARD, E. W. B. Early differences in production of mRNA for phenylalanine ammonia-lyase and chalcone synthase in resistant and susceptible cultivars of soybean inoculated with *Phytophthora megasperma* f. sp. *glycinea*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 30: 293-297 (1987).
 - 45) FUKUDA, H. and KOBAYASHI, H. Dynamic organiza-

- tion of the cytoskeleton during tracheary-element differentiation. *Develop. Growth Differ.* 31: 9-16 (1987).
- 46) GIESE, H., RASMUSSEN, S. K. and JENSEN, H. P. Extrachromosomal plasmid-like DNA in the obligate parasitic fungus *Erysiphe graminis* f. sp. *hordei*. *Theor. Appl. Genet.* 79: 56-64 (1990).
 - 47) GLENNEY, JR. J. R., TACK, B. and POWELL, M. A. J. Calpactins: two distinct Ca^{++} -regulated phospholipid- and actin-binding proteins isolated from lung and placenta. *J. Cell Biol.* 104: 503-511 (1987).
 - 48) GOLDSTEIN, J. L., ANDERSON, R. G. W. and BROWN, M. S. Coated pits, coated vesicles, and receptor-mediated endocytosis. *Nature* 279: 682-685 (1979).
 - 49) GREEN, N. E., HADWIGER, L. A. and GRAHAM, S. O. Phenylalanine ammonia-lyase, tyrosine ammonia-lyase, and lignin in wheat inoculated with *Erysiphe graminis* f. sp. *tritici*. *Phytopathology* 65: 1071-1074 (1975).
 - 50) HADWIGER, L. A. and BECKMAN, J. M. Chitosan as a component of pea-*Fusarium solani* interactions. *Plant Physiol.* 66: 205-211 (1980).
 - 51) HAHN, M. G., BONHOFF, A. and GRISEBACH, H. Quantitative localization of the phytoalexin glyceollin I in relation to fungal hyphae in soybean roots infected with *Phytophthora megasperma* f. sp. *glycinea*. *Plant Physiol.* 77: 591-601 (1985).
 - 52) HAMILTON, R. I. and DODDS, J. A. Infection of barley by tobacco mosaic virus in single and mixed infection. *Virology* 42: 266-268 (1972).
 - 53) HARTWIG, J. H. and SHEVLIN, P. The architecture of actin filaments and the ultrastructural localization of actin-binding protein in the periphery of lung macrophages. *J. Cell Biol.* 103: 1007-1020 (1986).
 - 54) HAZEN, B. E. and BUSHNELL, W. R. Inhibition of the hypersensitive reaction in barley to powdery mildew by heat shock and cytochalasin B. *Physiol. Plant Pathol.* 23: 421-438 (1983).
 - 55) HEATH, M. C. Ultrastructure of host and nonhost reactions to cowpea rust. *Phytopathology* 62: 27-38 (1972).
 - 56) HEINZ, C. Infection mechanisms of grape vine powdery mildew (*Oidium tuckermii*): comparative studies of the penetration process on artificial membranes and leaf epidermis. *Vitis* 25: 215-225 (1986).
 - 57) HEUSER, J. E. and KIRSCHNER, M. W. Filament organization revealed in platinum replicas of freeze-dried cytoskeletons. *J. Cell Biol.* 86: 212-234 (1980).
 - 58) HIRAMATSU, H., ICHINOSE, Y., SHIRAIISHI, T., OKU, H. and OUCHI, S. Regulation of pisatin biosynthesis in pea leaves by elicitor and suppressor produced by *Mycosphaerella pinodes*. *Ann. Phytopath. Soc. Japan* 52: 53-58 (1986).
 - 59) 平田幸治 (1958). オオムギ白渋病菌の穿入菌糸及び吸器と機動細胞との関係に就いての観察 第4報 吸器の発育とCaとの関係 日植病報 23: 139-144.
 - 60) 平田幸治, 富樫邦彦 (1957). オオムギ白渋病菌の穿入菌糸及び吸器と機動細胞との関係に就いての観察 第3報 (1)副細胞感染 (2)Ca塩類による罹病性増大 日植病報 22: 230-236.
 - 61) 日浦運治 (1960). うどんこ病菌のraceの病原性と品種抵抗性. 植物防疫 14: 517-521.
 - 62) HOCH, H. C. and STAPLES, R. C. The microtubule cytoskeleton in hyphae of *Uromyces phaseoli* germ-lings: its relationship to the region of nucleation and to the F-actin cytokeleton. *Protoplasma* 124: 112-122 (1985).
 - 63) HOCH, H. C. and BOURETT, T. M. Inhibition of cell differentiation in *Uromyces* with D_2O and taxol. *Eur. J. Cell Biol.* 41: 290-297 (1986).
 - 64) HOGETSU, T. and OHSHIMA, Y. Immunofluorescence microscopy of microtubule arrangement in root cells of *Pisum sativum* L. var Alaska. *Plant Cell Physiol.* 27: 939-945 (1986).
 - 65) HOOKER, A. L. The genetics and expression of resistance in plants to rusts of the genus *Puccinia*. *Ann. Rev. Phytopathol.* 5: 163-182 (1967).
 - 66) HUXLEY, H. E. The mechanism of muscular contraction. *Science* 164: 1356-1366 (1969).
 - 67) HWANG, B. K. and HEITEFUSS, R. Induced resistance of spring barley to *Erysiphe graminis* f. sp. *hordei*. *Phytopath. Z.* 103: 41-47 (1982).
 - 68) IWATA, K. and HOGETSU, T. Arrangement of cortical microtubules in *Avena* coleoptiles and mesocotyles and *Pisum* epicotyls. *Plant Cell Physiol.* 29: 807-815 (1988).
 - 69) JOHNSTON, C. O. and HUFFMAN, D. Evidence of local antagonism between two cereal rust fungi. *Phytopathology* 48: 69-70 (1958).
 - 70) KAMIYA, N. Physical and chemical basis of cyto-

- plasmic streaming. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 32: 205-236 (1981).
- 71) KANBE, T., KOBAYASHI, I. and TANAKA, K. Dynamics of cytoplasmic organelles in the cell cycle of the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*: Three-dimensional reconstruction from serial sections. *J. Cell Sci.* 94: 647-656 (1989).
 - 72) KEEN, N. T. and LEGRAND, M. Surface glycoproteins: evidence that they may function as the race specific phytoalexin elicitors of *Phytophthora megasperma* f. sp. *glycinea*. *Physiol. Plant Pathol.* 17: 175-192 (1980).
 - 73) KERSEY, Y. M., HEPLER, P. K., PALEVITZ, B. A. and WESSELIS, N. K. Polarity of actin filaments in characean algae. *Proc. Nat. Acad. Sci. USA* 73: 165-167 (1976).
 - 74) KILMARTIN, J. V. and ADAMS, A. E. M. Structural rearrangements of tubulin and actin during the cell cycle of the yeast *Saccharomyces*. *J. Cell Biol.* 98: 922-933 (1984).
 - 75) KITAZAWA, K., INAGAKI, H. and TOMIYAMA, K. Cinephotographic observations on the dynamic responses of protoplasm of potato plant cell to infection by *Phytophthora infestans*. *Phytopath. Z.* 76: 80-86 (1973).
 - 76) KOBAYASHI, I., SAKAMOTO, Y., YAMAOKA, N. and KUNOH, H. An immunofluorescent cytochemical technique applying micromanipulation to detect microtubules in plant tissues inoculated with fungi. *Can. J. Bot.* (in press) (1991).
 - 77) KOBAYASHI, I., TANAKA, C., YAMAOKA, N. and KUNOH, H. Morphogenesis of *Erysiphe graminis* conidia on artificial membranes. *Trans. mycol. Soc. Japan* 32: 187-198. (1990).
 - 78) KOHNO, T. and SHIMMEN, T. Ca^{2+} -induced fragmentation of actin filaments in pollen tubes. *Protoplasma* 141: 177-179 (1987).
 - 79) 久場健司 コンフォーカル・レンズ：共焦点レーザー 走査型顕微鏡. 生体の科学 41: 134-143 (1990).
 - 80) KUĆ, J. Induced systemic resistance in plants to diseases caused by fungi and bacteria. In *The Dynamics of Host Defence*. (ed. by Bailey, J. A. and Deverall, B. J.) Academic Press, New York. pp. 191-221 (1983).
 - 81) KUNOH, H., AIST, J. R. and HAYASHIMOTO, A. The occurrence of cytoplasmic aggregates induced by *Erysiphe pisi* in barley coleoptile cells before the host cell walls are penetrated. *Physiol. Plant Pathol.* 26: 199-207 (1985).
 - 82) KUNOH, H., HAYASHIMOTO, A., HARUI, M. and ISHIZAKI, H. Induced susceptibility and enhanced resistance at the cellular level in barley coleoptiles. I. The significance of timing of fungal invasion. *Physiol. Plant Pathol.* 27: 43-54 (1985).
 - 83) KUNOH, H., ISHIZAKI, H. and NAKAYA, K. Cytological studies of early stages of powdery mildew in barley and wheat leaves (II). Significance of the primary germ tube of *Erysiphe graminis* on barley leaves. *Physiol. Plant Pathol.* 10: 191-199 (1977).
 - 84) KUNOH, H., KATSURAGAWA, N., YAMAOKA, N. and HAYASHIMOTO, A. Induced accessibility and enhanced inaccessibility at the cellular level in barley coleoptiles. III. Timing and localization of enhanced inaccessibility in a single coleoptile cell and its transfer to an adjacent cell. *Physiol. Plant Pathol.* 33: 81-93 (1988).
 - 85) KUNOH, H., KOMURA, T., KOBAYASHI, I. and YAMAOKA, N. Induced accessibility and enhanced inaccessibility at the cellular level in barley coleoptiles. (VII) Enhancement of inaccessibility at the prepenetration stage of a nonpathogen. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 37: 399-407 (1990).
 - 86) KUNOH, H., KURODA, K., HAYASHIMOTO, A. and ISHIZAKI, H. Induced susceptibility and enhanced resistance at the cellular level in barley coleoptiles. II. Timing and localization of induced susceptibility in a single coleoptile cell and its transfer to an adjacent cell. *Can. J. Bot.* 64: 889-895 (1986).
 - 87) KUNOH, H., TOYODA, K., YAMAOKA, N. and KOBAYASHI, I. Induced susceptibility and enhanced resistance at the cellular level in barley coleoptiles. V. Duration of stimulus by a nonpathogen in relation to enhanced inaccessibility. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 35: 507-518 (1989).
 - 88) LAMB, J. C., LAWTON, M. A., DRON, M. and DIXON, R. A. Signals and transduction mechanisms for activation of plant defenses against microbial attack. *Cell* 56: 215-224 (1989).
 - 89) MAEKAWA, S., ENDO, S. and SAKAI, H. Purification and partial characterization of a new protein in porcine brain which bundles actin filaments. *J. Biochem.* 94: 1329-1337 (1983).
 - 90) MANNERS, J. G. and HOSSAIN, S. M. M. Effects of temperature and humidity on conidial germination of

- Erysiphe graminis*. *Trans. Br. Mycol. Soc.* 46: 225-234 (1963).
- 91) MARKS, J. and HYAMS, J. S. Localization of F-actin through the cell division cycle of *Schizosaccharomyces pombe*. *Eur. J. Cell Biol.* 39: 27-32 (1985).
 - 92) MARUYAMA, K. and EBASHI, S. α -Actinin, a new structural protein from striated muscle. *J. Biochem.* 58: 13-19 (1965).
 - 93) MARUYAMA, K. and TSUKAGOSHI, K. Effects of KCl, MgCl₂, and CaCl₂ concentrations on the monomer-polymer equilibrium of actin in the presence of cytochalasin D. *J. Biochem.* 96: 605-611 (1984).
 - 94) 松本 勲, 浅田泰次. ダイコンベと病及びキュウリ炭そ病の誘導抵抗性における木化誘導因子の役割. *日植病報* 50: 483-490 (1984).
 - 95) MICHE, S. M., MOSEKER, M. S. and MORROW, J. S. Erythrocyte adducin: a calmodulin-regulated actin-binding protein that stimulates spectrin-actin binding. *J. Cell Biol.* 105: 2837-2845 (1987).
 - 96) 西田栄介. リン酸化による細胞骨格系の制御. *実験医学* 5: 604-609 (1987).
 - 97) 西村正陽. 宿主特異性毒素 改訂版最新植物病理学概論 平井篤造他著 pp. 147-170 (1981).
 - 98) OKAZAKI, Y. and TAZAWA, M. Effect of calcium ion on cytoplasmic streaming during turgor regulation in a brackish water charophyte *Lamprothamnium*. *Plant Cell Environ.* 9: 491-494 (1986).
 - 99) OKU, H. and OUCHI, S. Host plant accessibility to pathogens. *Rev. Plant Protec. Res.* 9: 58-71 (1976).
 - 100) OKU, H., SHIRAIISHI, T. and OUCHI, S. Suppression of induction of phytoalexin, pisatin. *Naturwissenschaften* 64: 643 (1977).
 - 101) OKU, H., SHIRAIISHI, T. and OUCHI, S. Role of specific suppressors in pathogenesis of *Mycosphaerella* species. In *Molecular Determinants of Plant Diseases*. (ed. by Nishimura, S. et al.) Japan Sci. Soc. Press, Tokyo; Springer-Verlag, Berlin. pp. 145-156 (1987).
 - 102) VON OLENHUSEN, K. G. and WOHLFARTH-BOTTERMANN, K. E. Evidence for actin transformation during the contraction relaxation cycle of cytoplasmic cycle blockage by phalloidin injection. *Cell Tissue Res.* 196: 455-470 (1979).
 - 103) OUCHI, S., HIBINO, C., OKU, H., FUJIWARA, M. and NAKABAYASHI, H. The induction of resistance or susceptibility induced by pathogens. In *Recognition and Specificity in Plant-Parasite Interactions*. (ed. by DALY, J. M. and URITANI, I.), Japan Sci. Soc. Press, Tokyo; University Park Press, Baltimore. pp. 49-65 (1979).
 - 104) OUCHI, S. and OKU, H. Physiological basis of susceptibility induced by pathogens. In *Plant Infection*. (ed. by ASADA, Y. et al.), Japan Sci. Soc. Press, Tokyo; Springer-Verlag, Berlin. pp. 117-136 (1982).
 - 105) OUCHI, S., OKU, H., HIBINO, C. and AKIYAMA, I. Induction of accessibility and resistance in leaves of barley by some races of *Erysiphe graminis*. *Phytopath. Z.* 79: 24-34 (1974).
 - 106) OUCHI, S., OKU, H., HIBINO, C. and AKIYAMA, I. Induction of accessibility to a nonpathogen by preliminary inoculation with pathogen. *Phytopath. Z.* 79: 142-154 (1974).
 - 107) PARTHASARATHY, M. V. F-actin architecture in coleoptile epidermal cells. *Eur. J. Cell Biol.* 39: 1-12 (1985).
 - 108) PARTHASARATHY, M. V., PERDUE, T. D., WITZTUM, A. and ALVERNAN, J. Actin network as a normal component of the cytoskeleton in many vascular plant cells. *Amer. J. Bot.* 72: 1318-1323 (1985).
 - 109) PERDUE, T. D. and PARTHASARATHY, M. V. *In situ* localization of F-actin in pollen tubes. *Eur. J. Cell Biol.* 39: 13-20 (1985).
 - 110) POLITIS, D. J. Ultrastructure of penetration by *Colletotrichum graminicola* of highly resistant oat leaves. *Physiol. Plant Pathol.* 8: 117-122 (1976).
 - 111) ROBERTS, I. N., LLOYD, C. W. and ROBERTS, K. Ethylene-induced microtubule reorientations: Mediation by helical arrays. *Planta* 164: 439-447 (1985).
 - 112) SAWHNEY, V. K. and SRIVASTAVA, L. M. Wall fibrils and microtubules in normal and gibberellic-acid-induced growth of lettuce hypocotyl cells. *Can. J. Bot.* 53: 824-835 (1975).
 - 113) SCHIEBLER, W., JAHN, R., DOUCET, J.-P. ROTHLEIN, J. and GREENGARD, P. Characterization of synapsin I binding to small synaptic vesicles. *J. Biol. Chem.* 25: 8383-8390 (1986).
 - 114) SCHMELZER, E., BORNER, H., GRISEBACH, H., EBEL, J. and HAHNBROCK, K. Similar time courses of mRNA induction in hypocotyls infected with a fungal pathogen and in cell cultures treated with fungal elicitor. *FEBS letters* 172: 59-63 (1984).
 - 115) SCHROEDER, T. E. Actin in dividing cells: contrac-

- tile ring filaments bind heavy meromyosin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 70: 1688-1692 (1973).
- 116) SCHROEDER, M., WEHLAND, J. and WEBER, K. Immunofluorescence microscopy of microtubules in plant cell; stabilization by dimethylsulfoxide. *Eur. J. Cell Biol.* 38: 211-218 (1985).
- 117) SHEETZ, M. P. and SPUDICH, J. A. Movement of myosin-coated fluorescent beads on actin cables *in vitro*. *Nature* 303: 31-35 (1983).
- 118) SHIRAISHI, T., OKU, H., YAMASHITA, M. and OUCHI, S. Elicitor and suppressor of pisatin induction in spore germination fluid of pea pathogen. *Mycosphaerella pinodes*. *Ann. Phytopath. Soc. Japan* 44: 659-665 (1978).
- 119) SMITH, M. M. and CRUICKSHANK, I. A. M. Dynamics of free pisatin elicitor accumulation in infection-droplets of *Monilinia fructicola* on pea endocarp. *J. Phytopath.* 117: 301-311 (1986).
- 120) 祖父江健治, 池田和隆. 細胞膜裏打ち構造の役割とその制御機構. 蛋白質 核酸 酵素. 34: 1551-1565 (1989).
- 121) SRINIVASAN, Y., ELMER, L., DAVIS, J., BENNET, V. and ANGELIDES, K. Ankyrin and spectrin associate with voltage-dependent sodium channels in brain. *Nature* 333: 177-180 (1988).
- 122) STEEN, D. A. and CHADWICK, A. V. Ethylene effects in pea stem tissue evidence of microtubule mediation. *Plant Physiol.* 67: 460-466 (1981).
- 123) STEIGER, C. J. and SCHLIWA, M. Actin localization and function in higher plants. *Protoplasma* 141: 1-12 (1987).
- 124) STEKOLL, M. S. and WEST, C. A. Purification and properties of an elicitor of castor bean phytoalexin from culture filtrates of the fungus *Rhizopus stolonifer*. *Plant Physiol.* 61: 38-45 (1978).
- 125) TAKAGI, S. and NAGAI, R. Intracellular Ca^{2+} concentration and cytoplasmic streaming in *Vallisneria* mesophyll cells. *Plant Cell Physiol.* 27: 953-959 (1986).
- 126) TAKAMATSU, S., ISHIZAKI, H. and KUNOH, H. Cytological studies of powdery mildew in barley and wheat. V. Effects of calcium on the infection of barley by *Erysiphe graminis hordei*. *Can. J. Bot.* 56: 2544-2549 (1978).
- 127) THOMAS, D. DES, S., DUNN, D. M. and SEAGULL, R. W. Cytochalasin selectivity inhibits synthesis of secretory protein, cellulase in *Achlya*. *Can. J. Bot.* 55: 1797-1800 (1977).
- 128) TOMIYAMA, K. Cell physiological studies on the resistance of potato plant to *Phytophthora infestans*. *Ann. Phytopath. Soc. Japan* 21: 54-62 (1956).
- 129) TOMIYAMA, K., SATO, K. and DOKE, N. Effect of cytochalasin B and colchicine on hypersensitive death of potato cells infected by incompatible race of *Phytophthora infestans*. *Ann. Phytopath. Soc. Japan* 48: 228-230 (1982).
- 130) TOYODA, H., MATSUDA, Y., SHOJI, R. and OUCHI, S. A microinjection technique for conidia of *Erysiphe graminis* f. sp. *hordei*. *Phytopathology* 77: 815-818 (1987).
- 131) TU, J. C. Effect of calcium, magnesium and cytochalasin B on the formation of local lesion by alfalfa mosaic virus in *Phaseolus vulgaris*. *Physiol. Plant Pathol.* 12: 167-172 (1978).
- 132) TUCKER, B. E., HOCH, H. C. and STAPLES, R. C. The involvement of F-actin in *Uromyces* cell differentiation: The effect of cytochalasin E and phalloidin. *Protoplasma* 135: 88-101 (1986).
- 133) VERKHOVSKY, A. B., SURGUCHEVA, T. M., SVITKINA, I. S. and GELFAND, V. I. Organization of stress fibers in cultured fibroblasts after extraction of actin with bovine brain gelsolin-like protein. *Exp. Cell. Res.* 173: 244-255 (1987).
- 134) WANG, Y. Exchange of actin subunits at the leading edge of living fibroblasts: Possible role of treadmilling. *J. Cell Biol.* 101: 597-602 (1985).
- 135) WEST, C. A. Fungal elicitors of the phytoalexin response in higher plants. *Naturwissenschaften* 68: 447-457 (1981).
- 136) WHITE, J. G., AMOS, W. B. and FORDHAM, M. An evaluation of confocal versus conventional imaging of biological structures by fluorescence light microscopy. *J. Cell Biol.* 105: 41-48 (1987).
- 137) WICK, S. M. and DUNIEC, J. Effects of various fixatives on the reactivity of plant cell tubulin and calmodulin in immunofluorescence microscopy. *Protoplasma* 133: 1-18 (1986).
- 138) WIELAND, T. Modification of actins by phallotoxins. *Naturwissenschaften* 64: 303-309 (1977).
- 139) WILLIAMSON, R. E. Organelle movements along actin filaments and microtubules. *Plant Physiol.* 82: 631-634 (1986).
- 140) WILLIAMSON, B. and HADLEY, G. Penetration and infection of orchid protocorms by *Thanatephorus cucumeris* and other *Rhizoctonia* isolates. *Phytopathology* 60: 1092-1096 (1970).

- 141) WILLIAMSON, R. E. and HURLEY, U. A. Growth and regrowth of actin bundles in *Chara*: bundle assembly by mechanisms differing in sensitivity to cytochalasin. *J. Cell Sci.* 85: 21-32 (1986).
- 142) WITZTUM, A. and PARTHASARATHY, M. V. Role of actin in chloroplast clustering and banding in leaves to *Egeria*, *Elodea* and *Hydrilla*. *Eur. J. Cell Biol.* 39: 21-26 (1982).
- 143) YAHARA, I., HARADA, F., SEKITA, S., YOSHIHARA, K. and NATORI, S. Correlation between effects of 24 different cytochalasins on cellular structures and cellular events and those on actin *in vitro*. *J. Cell Biol.* 92: 69-78 (1982).
- 144) YAMADA, T., HASHIMOTO, H., SHIRAISHI, T. and OKU, H. Suppression of pisatin, phenylalanine ammonia-lyase mRNA, and chalcone synthase mRNA accumulation by a putative pathogenicity factor from the fungus *Mycosphaerella pinodes*. *Mol. Plant-Microbe. Interact.* 2: 256-261 (1989).
- 145) YAMAMOTO, Y., OKU, H., SHIRAISHI, T., OUCHI, S. and KOSHIZAWA, K. Non-specific induction of pisatin and local resistance in pea leaves by elicitors from *Mycosphaerella pinodes*, *M. melonis* and *M. ligulicola* and the effect of the suppressor from *M. pinodes*. *J. Phytopath.* 117: 136-143 (1986).
- 146) YAMASHIRO-MATSUMURA, S. and MATSUMURA, F. Purification and characterization of an F-actin-binding 55-kilodalton protein from HeLa cells. *J. Biol. Chem.* 260: 5087-5097 (1985).
- 147) YANG, S. L. and ELLINGBOE, A. H. Cuticle layer as a determining factor for the formation of mature appressoria of *Erysiphe graminis* on wheat and barley. *Phytopathology* 62: 708-714 (1972).
- 148) YIN, H. L. and STOSSEL, T. P. Control of cytoplasmic actin gel-sol transformation by gelsolin, a calcium-dependent regulatory protein. *Nature* 281: 583-586 (1979).
- 149) ZIEGLER, E. and PONTZEN, R. 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.