

## 総合論文

## イチゴ黒斑病菌の生成する宿主特異的毒素

山本 幹博

(生産物利用講座)

Host-Specific AF-Toxins Produced by Causal Pathogen  
of Alternaria Black Spot of Strawberry

Mikihiro Yamamoto

(Department of Agricultural Products Technology)

Occurrence of Alternaria black spot of strawberry was first reported on var. Morioka-16. Among varieties tested, var. Morioka-16 was found to be only one susceptible variety. The pathogen, however, showed pathogenicity on pear leaves which is susceptible to black spot of Japanese pear. The causal pathogen of black spot of strawberry, *Alternaria alternata* strawberry pathotype produced three host-specific toxins (HSTs), which were chemically characterized, and named AF-toxin I, II and III, respectively. HSTs are considered as a primary determinant of pathogenicity, that is, interaction between the host plant and the pathogen. We here introduce briefly researches on host-specific toxin focusing on AF-toxins.

Key words : host-specific toxin, AF-toxin, strawberry

## はじめに

ある植物病原菌はなぜ特定の植物種（あるいは品種）しか侵すことができないか、という病害の特異性（宿主特異性あるいは選択性）の解明に関しては、現在も様々な病原菌とその宿主植物の組み合わせで広範で精力的な研究が続けられている。宿主選択性の決定は物質を介して行われると概念的に理解されているが、実際の病原菌感染場面においては物質は異種生物間（病原菌と宿主植物）の複雑な相互作用中に生成・分泌されると考えられ、明快な選択性を示す物質の精製・同定には困難を伴う。その中で、一部の植物病原系状菌の生成する宿主特異的毒素（host-specificあるいはhost-selective toxin, 以下HSTと略す）は明快な選択性を説明し得る好例である。

植物病原系状菌は培養中植物に毒性を示す多様な

代謝産物を生成するが、その多くはいわゆる非特異的毒素であり、本来宿主でない植物（非宿主）に対しても毒性を発揮する。このような非特異的毒素と明確に区別するため、HSTは非特異的毒素以下の条件を具備すべきものと定義された<sup>1)</sup>。①宿主植物にだけ毒性を発揮する病原菌の代謝産物であり、②病原菌の毒素生成能の有無と病原性の一致すること、③宿主品種の毒素耐性と病害抵抗性の序列の一致すること、④病原菌感染によって誘起される宿主組織の生理・生化学的諸変化が毒素処理によって再現されること、の4項目であった。その後、⑤病原菌の病死発芽時の毒素放出<sup>10)</sup>、⑥放出毒素による宿主植物への菌受容化誘導<sup>17)</sup>の2つの条件が補足され、当初の毒性の高さ・選択性への注目に加え、病原菌感染場面での役割に対する認識が強化され、病原菌の

Received October 1, 1996

Table 1 Host-specific toxins ( HST ) from pftytopathogenic fungi

| Pathoges                            | HST              | Plent         |
|-------------------------------------|------------------|---------------|
| <i>Alternaria alternata</i>         |                  |               |
| Apple pathotype                     | AM-toxin         | Apple         |
| Japanese pear pathotype             | AK-toxin         | Japanese pear |
| Rough lemon pathotype               | ACR(L)-toxin     | Lemon         |
| Strawberry pathotype                | AF-toxin         | Strawberry    |
| Tangerine pathotype                 | ACT & ACTG-toxin | Citrus        |
| Tobacco pathotype                   | AT-toxin         | Tobacco       |
| Tomato pathotype                    | A(A)L-toxin      | Tomato        |
| <i>Cochliobolus carbonum</i> race 1 | HC-toxin         | Corn          |
| <i>C. heterostrophus</i> race T     | HMT-toxin        | Corn          |
| <i>C. sacchari</i>                  | HS-toxin         | Sugarcane     |
| <i>C. victoriae</i>                 | HV-toxin         | Oat           |
| <i>Periconia circinata</i>          | PC-toxin         | Milet         |
| <i>Phyllosticta maydis</i>          | PM-toxin         | Corn          |
| <i>Corynespora casicola</i>         | CC-toxin         | Tomato        |

病原性発揮の第1義的決定因子としてのHSTを定義している。

今日、HST生産菌であるとされている病原糸状菌は14例が知られている<sup>9,12)</sup>(Table 1)。このうち半分にあたる7例が*Alternaria alternata* (Fries) Keisslerに属しているが、本菌では残念ながら未だ完全世代は発見されておらず、現在集合種とされている。また、本種はこれら病原菌のみで形成されるわけではなく、圧倒的多数は植物病原菌ではなく、つまりどの植物に対しても寄生できない腐生菌(非病原性菌)として広く自然界に存在している。しかし本菌は、多数の分生胞子を形成するため空中飛散胞子も多く、植物体内への物理・生化学的侵入能力を備えており、植物の抵抗性が弱まった場合などでのいわゆる「日和見感染」を引き起こすことがしばしば観察される。また、一方では農産物の貯蔵病害を引き起こす糸状菌の主たるうちの1つである。本文では、このうちイチゴ黒斑病菌とその生成するHSTであるAF毒素についての研究を紹介する。

### 1. イチゴ黒斑病菌の同定とその寄生能力

イチゴ黒斑病菌は東北地方でイチゴの新品種盛岡16号の作付が拡大しつつある中その発生がはじめて

報告された。本病は多数のイチゴ品種のうち盛岡16号にだけ発病し、きわめて品種特異性の顕著な病原菌であることを明らかとした<sup>3)</sup>。

興味あることに、人工接種によって二十世紀ナシなどナシ黒斑病感受性の日本ナシ品種群にも強い病原性を示すことを見いだした。この特徴ある明確な宿主範囲は、本病原菌が胞子発芽時および人工培養時に病原菌の宿主範囲と特異性を同じくする植物範囲にのみ活性を示す毒素、宿主特異的毒素(HST)を生産するためであった。本病原菌は新規の宿主範囲を示すことから新病原菌とすべきであるとの考え方もあるが、分類上の基本となる形態が集合種*A. alternata* (Fr.) Keisslerの範疇に属し、また未知のHSTを生産するため、他のHST生産病原菌の例にならぬ、本菌は*A. alternata*属する病原性(HST生成能)を異にする病原型とみなすべきで*A. alternata* strawberry pathotypeと呼称することを提案した。

イチゴ黒斑病は本来は宿主ではないナシ黒斑病感受性ナシ品種をも侵すことから、ナシ黒斑病菌との比較において*A. alternata*の病原性・寄生性の分化に興味ある材料と考えられた。そこで茎頂培養によって盛岡16号の無病苗育成し、これを二十世紀ナシ

Table 2 Specific toxicities of AF-toxin and AK-toxins

|               | AF-toxin I                | II            | III           | AK-toxins            |
|---------------|---------------------------|---------------|---------------|----------------------|
| Strawberry    |                           |               |               |                      |
| Susceptible   | $10^{-8}$ M <sup>a)</sup> | $> 10^{-4}$ M | $10^{-8}$ M   | $> 10^{-4}$ M        |
| Resistant     | $> 10^{-4}$ M             | $> 10^{-4}$ M | $> 10^{-4}$ M | $> 10^{-4}$ M        |
| Japanese pear |                           |               |               |                      |
| Susceptible   | $10^{-8}$ M               | $10^{-8}$ M   | $10^{-5}$ M   | $5 \times 10^{-9}$ M |
| Resistant     | $> 10^{-4}$ M             | $> 10^{-4}$ M | $> 10^{-4}$ M | $> 10^{-4}$ M        |

a) Minimum concentration for inducing leaf-necrosis.

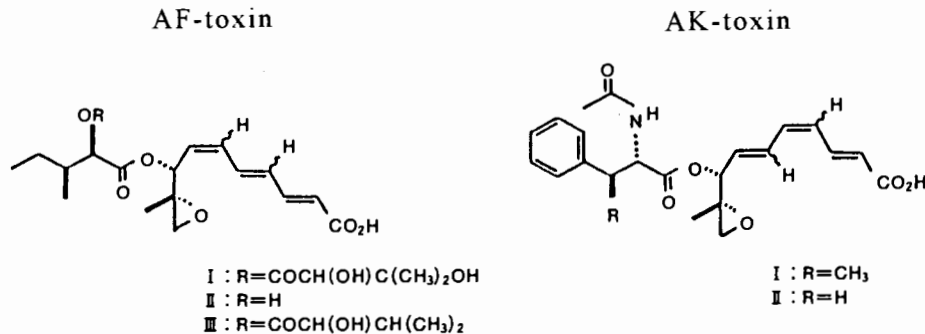


Fig. 1 Chemical structures of AF-toxins and AK-toxins.

園で栽培することで、ナシの栽培園におけるイチゴ黒斑病菌の存在の可能性を病斑から菌の分離・同定および病原性・毒素生成能により調査を行った<sup>2)</sup>。イチゴ葉上に形成された複数の病斑の1つからイチゴ黒斑病菌が分離されたことから、非常に低密度ながらイチゴ黒斑病菌の存在を確認した。一方、イチゴ黒斑病菌はナシ黒斑病菌に比べ二十世紀ナシに対しては病斑形成能力が劣り、両菌のナシに対する寄生適応能力に違いがあるものと推察した。しかし、ナシ園におけるイチゴ黒斑病菌の存在は、下記に述べる両菌の宿主特異的毒素の類似性・構造活性相関とあわせると、形態的に同一種と考えられる *A. alternata* からの病原性・寄生性の分化・進化研究への好材料であると考えられる。

## 2. AF 毒素の単離・精製と化学構造の決定

毒素はきわめて微量な複数の代謝産物から構成され、かつ不安定であるため、その単離・精製に難渋したが、最終的には生物活性を異にする3種類の宿主特異的毒素 (AF 毒素 I, II および III) を得ることに成功した<sup>3)</sup> (Table 2)。

毒素 I は盛岡16号イチゴと二十世紀ナシ葉に $10^{-8}$  M まで葉脈壊死を誘起した<sup>7)</sup>。毒素 II は同様の低濃度で二十世紀ナシ葉に葉脈壊死を誘起したが、盛

岡16号イチゴ葉には $10^{-4}$  M の高濃度においても全く無毒であった。毒素 III は毒素 I 同様盛岡16号イチゴに $10^{-8}$  M まで葉脈壊死を誘起し、二十世紀ナシ葉に対しては $10^{-5}$  M と低かった。一方、これら3種の毒素はいずれも $10^{-4}$  M の高濃度でも本病抵抗性のイチゴおよびナシ品種には無毒であった。

AF 毒素 I, II および III の構造は Fig. 1 のように決定され<sup>5,6)</sup>、いずれもエポキシ構造を付加したデカトリエン酸を共有する同族体であった。この構造は先に報告されたナシ黒斑病菌毒素 (AK 毒素) と酷似しており<sup>4)</sup>、イチゴあるいはナシに対する活性発現の上で興味ある問題を提起した。例えば、AK 毒素のアミド NH に相当する位置に、AF 毒素 II では2級の水酸基が存在し、ナシに毒性が発揮される。しかし、AF 毒素 II がアシル化された AF 毒素 I や III はナシの他にイチゴに毒性が発揮される。イチゴに対する活性発現にはこの部分が隠蔽される必要があると考えられる。構造上のわずかな違いが選択毒性発現に顕著な影響を与えていることを明らかとしたが、さらに病原菌である *A. alternata* について考えるならば、代謝経路のごく小さな違いがナシ黒斑病菌となるか、イチゴ黒斑病菌となるかを決定しているとも推察でき、前節で述べた病原性・寄生性の分化・進化研究の観点からも今後の研究が期待

される。

### 3. AF 毒素の宿主選択的作用機構

AF 毒素は感受性イチゴおよびナシの細胞膜機能に速やかに障害を与える<sup>3,7,8)</sup>。例えば、毒素投与後短時間に感受性葉組織からカリウムイオンなどの急激な異常漏出がみられる。さらに電気生理学的解析から起電性プロトンポンプ活性に不可逆的の障害を起こすことが判明した。このような変調は抵抗性品種の細胞では認められない。さらに興味深いことには、イチゴ葉に壊死を誘起しない AF 毒素 II を前処理しておく、AF 毒素 I のプロトンポンプ活性阻害効果が抑えられる。AF 毒素 I による壊死斑形成についても同様に、AF 毒素 II による保護効果が認められた。このような構造類似体によるアゴニスト・アンタゴニスト的競合現象は、宿主特異的毒素の受容体説を積極的に支持すると同時に、第一次作用点としての毒素レセプター単離への手がかりを提供している。

### 4. イチゴ黒斑病菌の感染過程における AF 毒素の役割

AF 毒素の生成はイチゴ黒斑病菌の分離株のうち、病原性を保有する菌株だけに認められた。毒素は孢子発芽時に生成・放出され、その主体は AF 毒素 I であった。病原孢子を噴霧接種した感受性イチゴ葉では、病斑の出現に先立って、葉組織から顕著な電解質漏出が観察された<sup>15)</sup>。この原因は葉上で発芽した孢子の放出 AF 毒素によるものであり、感染初期過程に AF 毒素がすでに作用しており、感染成立に大きく関与していることを示唆している。

感受性イチゴ葉にも非病原菌に対する誘導抵抗性反応が存在し、非病原性 *A. alternata* (腐生菌) を前接種しておく、後接種のイチゴ黒斑病菌の感染が抑制された。一方、予め AF 毒素 I で葉を前処理しておく、非病原性の *A. alternata* の感染を誘導した。このように非病原菌の接種によって誘導される抵抗性にはファイトアレキシンの関与が強く示唆された。しかし、イチゴ葉中から誘導される抵抗性因子の探索を試みた結果、強い抗菌性を示すファイトアレキシン様物質の誘導・生成は認められず、むしろ葉上の菌の付着器から宿主内への感染菌糸の形成を特異的に阻害する因子(感染阻害因子)を見

いだした。その主成分を単離し、(+)-カテキンと同定した。これは感染阻害物質として化学構造の明らかとなった最初の事例である。(+)カテキンはイチゴ葉に先在性の物質であるが、各種非病原性糸状菌孢子をイチゴ葉に噴霧接種するとその濃度が増加した。しかし、低濃度の AF 毒素 I を孢子に混ぜて接種すると、(+)-カテキン濃度の増加は認められず、非病原菌であっても葉組織への侵入・初期定着が可能であった。

以上からイチゴ黒斑病菌の孢子発芽時に生成・放出される AF 毒素 I がイチゴ葉中の(+)-カテキンなど感染阻害因子の増加を抑制し、その結果として感染成立に導くもの、つまり AF 毒素 I がイチゴ黒斑病菌の病原性を規定していると考えた。

### 5. AF 毒素利用による黒斑病感受性の遺伝解析

AF 毒素は HST であるため、毒素感受性を指標としてイチゴ品種盛岡16号の黒斑病感受性の遺伝的解析を行った<sup>14,16)</sup>。感受性品種(盛岡16号)と抵抗性品種(宝交早生)の交配種子を得、その実生について毒素検定を行った結果、感受性と抵抗性は1:1に分離し、盛岡16号の自殖交配次代では3:1に分離し感受性が優性であった。さらに、感受性遺伝子をホモに有する個体がヘテロの個体に比べ毒素および病原菌感受性の高いことを明らかとした。劣性個体は無反応であった。これらの結果は、病原菌接種による観察と完全に一致した。したがって、毒素に対する宿主植物の定量的反応性が不完全優性検出の糸口となり、盛岡16号における黒斑病感受性は AF 毒素感受性と同一の一对の対立遺伝子に支配される不完全優性として遺伝するものと考察した。毒素の単離・精製は困難を伴うことが多いが、その反面精製された毒素を用いることで、材料・時間的に制約の多い病原菌接種による従来の検定法を大幅に改良することができ、抵抗性品種育成のための大量スクリーニングに応用できると考えた。

### おわりに

以上 HST 研究を AF 毒素を一例として述べてきた。イチゴ黒斑病菌の示す高い特異性は AF 毒素によって介在されており、また、AF 毒素の意義は病原性発揮の第1義的因子としての役割にあると考えられる。このような因子の例としては、数種の病原

菌において宿主植物の抵抗反応の発現を抑制する因子(サプレッサー)が知られている<sup>1,13)</sup>。これらサプレッサーは宿主に壊死を誘起せず、抵抗反応のみを抑制するが、病原菌の生成する因子としての感染場面上における基本的な役割、つまり菌に対する受容性を誘導する点では類似した機能を果たしていると考えられる。逆に、この点に限るならば HST として当初注目を集めた壊死を伴う高い植物毒性は必須ではないと考えられる。

しかし一方、高活性・高選択性は、感染以外の他の場面、例えば微生物代謝経路と病原菌の進化・分化、細胞上の受容体の探索などの面から依然として非常に興味ある研究対象を提供していると考えられる。特にまた進化・分化の点では、本文では紹介しきれなかったが、イチゴ黒斑病菌に限らず HST を生成する *A. alternata* 病原菌はその病原性が不安定で毒素生成能を失活し易いなど特徴的な性質を持ち、今後解明すべき点が多い。HST に関する研究は我が国では現在、鳥取大学および名古屋大学のグループを中心として精力的に進められている。その高い毒性ゆえに、また現在までのところ数種病原菌しか生成することが知られていないため、特異性・選択性の中では例外視される HST 生産菌による病害であるが、今後新たな HST の探索はもちろん、上記提起されている課題に関しても明らかにされるものと期待している。

#### 文 献

- 1) 道家紀志：過敏反応と情報伝達。植物感染生理学最近の進歩(奥 八郎ら編), pp. 81-93, 植物感染生理学最近の進歩刊行会, 名古屋(1991)
- 2) Hayashi, N., Yamamoto, M., Tsuge, T. and Nishimura, S.: Comparison of parasitic fitness between two pathotypes of *Alternaria alternata* to Japanese pear. *Ann. Phytopath. Soc. Japan*, **58**, 734-740 (1992)
- 3) Maekawa, N., Yamamoto, M., Nishimura, S., Kohmoto, K., Kuwada, M. and Watanabe, Y.: Studies on host-specific toxins produced by *Alternaria alternata* strawberry pathotype causing Alternaria black spot of strawberry (1) Production of host-specific toxins and their biological activities. *Ann. Phytopath. Soc. Japan*, **50**, 600-609 (1984)
- 4) Nakashima, T., Ueno, T. and Fukami, H.: Structure elucidation of AK-toxins, host-specific phytotoxic metabolites produced by *Alternaria kikuchiana* Tanaka. *Tetrahedron Lett.*, **23**, 4469-4472 (1982)
- 5) Nakatsuka, S., Ueda, K., Goto, T., Yamamoto, M., Nishimura, S. and Kohmoto, K.: Structure of AF-toxin II, one of the host-specific toxins produced by *Alternaria alternata* strawberry pathotype. *Tetrahedron Lett.*, **27**, 2753-2756 (1986)
- 6) 中塚進一・上田和生・後藤俊夫・山本幹博・西村正暁・甲元啓介：イチゴ黒斑病菌毒素 AF-toxin 類の構造と宿主選択性。第28回天然有機化合物討論会論文集, pp. 33-40, (1986)
- 7) Namiki, F., Yamamoto, M., Nishimura, S., Nakatsuka, S., Goto, T., Kohmoto, K. and Otani, H.: Studies on host-specific toxins produced by *Alternaria alternata* strawberry pathotype causing Alternaria black spot of strawberry (4) Protective effect of pretreatment with AF-toxin II on AF-toxin I induced toxin action and fungal infection against strawberry tissues. *Ann. Phytopath. Soc. Japan*, **52**, 428-436 (1986)
- 8) Namiki, F., Okamoto, H., Katou, K., Yamamoto, M., Nishimura, S., Nakatsuka, S., Goto, T., Kohmoto, K., Otani, H. and Novacky, A.: Studies on host-specific toxins produced by *Alternaria alternata* strawberry pathotype causing Alternaria black spot of strawberry (5) Effect of toxins on membrane potential of susceptible plants by means of electrophysiological analysis. *Ann. Phytopath. Soc. Japan*, **52**, 610-619 (1986)
- 9) Nishimura, S. and Kohmoto, K.: Host-specific toxins and chemical structure from *Alternaria* species. *Annu. Rev. Phytopathol.*, **21**, 87-116 (1983)
- 10) Nishimura, S. and Scheffer, R. P.: Interactions between *Helminthosporium Victoriae* spores and oat tissues. *Phytopathol.*, **55**, 629-634 (1965)
- 11) Pringle, R. B. and Scheffer, R. P.: Host-specific toxins. *Annu. Rev. Phytopathol.*, **2**, 133-156 (1964)
- 12) Scheffer, R. P. and Livingston, R. S.: Host-specific toxins and their role in plant disease. *Science*, **223**, 17-21 (1984)
- 13) 白石友紀：病原性とサプレッサー。植物感染生理学最近の進歩(奥 八郎ら編), pp. 55-65, 植物感染生理学最近の進歩刊行会, 名古屋(1991)
- 14) Yamamoto, M.: Use of host-specific toxins for breeding disease-resistant crops. in *Host-Specific toxins: Recognition and Specificity Factors in Plant Disease* (K. Kohmoto and R. D. Durbin eds.), pp. 195-206, Tottori Univ., Tottori (1989)

- 15) Yamamoto, M., Nishimura, S., Kohmoto, K. and Otani, H.: Studies on host-specific toxins produced by *Alternaria alternata* strawberry pathotype causing Alternaria black spot of strawberry (2) Role of toxins in pathogenesis. Ann. Phytopath. Soc. Japan, **50**, 610-619 (1984)
- 16) Yamamoto, M., Namiki, F., Nishimura, S. and Kohmoto, K.: Studies on host-specific toxins produced by *Alternaria alternata* strawberry pathotype causing Alternaria black spot of strawberry (3) Use of toxin for determining inheritance of disease reaction in strawberry cultivar Morioka-16. Ann. Phytopath. Soc. Japan, **51**, 530-535 (1985)
- 17) Yoder, O. C. and Scheffer, R. P.: Role of toxin in early interaction of *Helminthosporium victoriae* with susceptible and resistant oat tissue. Phytopathol., **59**, 1954-1959 (1969)