



ナシ黒斑病菌の生産する宿主特異的 A K 毒素とその類縁化合物の病理学的役割に関する細胞学的解析

細木, 直樹

(Degree)

博士 (学術)

(Date of Degree)

2008-03-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲4368

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1004368>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



氏 名	細木 直樹
博士の専攻分野の名称	博士（学術）
学 位 記 番 号	博い第 745 号
学位授与の 要 件	学位規則第 5 条第 1 項該当
学位授与の 日 付	平成 20 年 3 月 25 日

【 学位論文題目 】

ナシ黒斑病菌の生産する宿主特異的AK毒素とその類縁化合物の病理学的役割に関する細胞学的解析

審 査 委 員

主 査	教 授	朴	杓允
	教 授	土佐	幸雄
	教 授	大野	隆

(氏名： 細木 直樹 NO. 1)

自然界に生息する植物と病原糸状菌の間では、多様な化学物質が病原性や抵抗性に関与するシグナルとして使われる。このシグナルのうち、菌から生産された宿主特異的毒素(HST)分子は、宿主の受容体と結合して毒性を発揮すると言われている。しかし、菌から生産された物質のみが毒素の特異性を示すのか、他の化合物、例えば人工的に合成された毒素類縁化合物については同様な病理学的役割があるのか興味が持たれる。本研究では HST とその類縁化合物を用いてその病理学的評価を行った。

第 1 章では、研究の背景と目的について記述した。ナシ黒斑病菌が生産する AK 毒素は本菌の主要な病原性決定因子と考えられてきた。本毒素に感受性を示す二十世紀ナシ(宿主)は、毒素処理や菌感染により壊死が生じるのに反して、長十郎ナシは毒素に非感受性であるのに加え、菌の感染も起こらない。本毒素は、宿主細胞に細胞膜の透過性機能の失調を伴う細胞膜障害を誘導し、最終的に細胞死を引き起こす。しかし、毒素作用の初期の膜変性については未だ不明な点が多い。また、毒素分子の活性発現および特異性を支配する原子団を探索するために、AK 毒素の類縁化合物(AKA)を用いて壊死形成の解析が行われてきたが、AKA の病理学的役割については十分に調査されていない。そこで本研究は AK 毒素 I の既知の作用に関する情報をもとに、数種の AKA 作用を様々な基準を用いて解析した。加えて得られた結果から毒素の特異性と活性を支配する原子団について考察した。

第 2 章では、AK 毒素 I により誘導される細胞内イオン漏出部位と細胞膜の構造変化についてははじめに調査を行なった。毒素処理した宿主葉を透過電顕(TEM)と走査電顕(SEM)で観察すると、毒素処理後 6 時間の膜陥入部位において多くの原形質連絡は依然として細胞膜と連続していた。また Mg イオンを可視化する固定法で固定した組織を TEM 観察した結果、細胞膜変性前にイオンの漏出を認めた。これらの結果からイオン漏出の原因は原形質連絡の切断ではないことが分かったが、どのような構造変化により起こるのかは現在不明であった。

第 3 章では AK 毒素および 6 つの AKA の作用機作を壊死形成、細胞膜の透過性機能、 H_2O_2 の生成を伴う細胞膜変性を指標として調査した。その結果、AKA は二十世紀葉に壊死誘導性のものと壊死非誘導性の 2 つのタイプに大別された。壊死非誘導性 AKA には毒素活性が無かったのに対して、壊死誘導性 AKA は全ての指標において AK 毒素と類似の活性を持つことが分かった。

第 4 章では AKA の二十世紀葉に対する感染誘導を調べた。壊死非誘導性 AKA には感染誘導能は無いが、壊死誘導性 AKA は非病原菌胞子の感染を誘導することが分かった。また、これらの組織を TEM 観察すると、壊死誘導性 AKA を添加した非病原菌は感染に成功し、

(氏名： 細木 直樹 NO. 2)

組織中に増殖した。その際、付着器直下と貫穿菌糸に多量の H_2O_2 の生成を認めた。一方、非壊死誘導性 AKA を添加した非病原菌においては、ナシ葉クチクラで菌糸の伸長が停止し、貫穿菌糸における H_2O_2 生成も少量しか認められなかった。これらから壊死誘導性 AKA は AK 毒素と同様の病理学的役割を持つことが分かった。

第 5 章では、本研究を以下のように総括した。AK 毒素の宿主認識から細胞膜障害までの初期作用が菌の感染の際に重要であるため、毒素の初期作用の調査を行なった。その結果、毒素処理後 20 分以内に細胞膜の機能が破壊されていることを証明した。次に AK 毒素の既知の作用機作を指標として、AKA の毒素活性と感染誘導能について調査したところ、壊死非誘導性 AKA には病理学的活性が無く、壊死誘導性 AKA は AK 毒素と類似の毒素活性と感染誘導能を有することが分かった。次に、得られた結果から、AK 毒素の活性発現を支配する原子団について考察を行なった。AK 毒素 I 分子のアミノ酸および共役カルボン酸部分には活性発現に必要な「かさ高さ」もしくは「疎水性」の最適値が存在する可能性がある。またエポキシド部分は本毒素の活性発現に必須であり、宿主受容体との相互作用において重要な役割を担うと推定できた。また、本毒素のエポキシ部と宿主受容体中の SH 基が求核置換反応により結合する可能性が考えられた。ここで得られた知見は毒素の病理学的意味を深く理解できる情報を提供している。

氏名	細木 直樹		
論文 題目	ナシ黒斑病菌の生産する宿主特異的 AK 毒素とその類縁化合物の病理学的役割に関する細胞学的解析		
審査委員	区 分	職 名	氏 名
	主 査	教授	朴 杓允
	副 査	教授	土佐幸雄
	副 査	教授	大野 隆
	副 査		
	副 査		印
要 旨			
自然界に生息する植物と病原系状態の間では、多様な化学物質が病原性や抵抗性に関与するシグナルとして使われて相互認識している。これらシグナルのうち、菌から生産された化学シグナルである宿主特異的毒素(HST)は、宿主の受容体と結合して毒性を発揮すると言われている。しかし、菌から生産された物質のみが毒素の特異性を示すのか、他の化合物、例えば人工的に合成された毒素類縁化合物については同様な病理学的役割があるのか興味を持たれる。本研究では HST とその類縁化合物を用いてその病理学的評価を行った。 第1章では、研究の背景と目的について記述した。ナシ黒斑病菌が生産する AK 毒素は本菌の主要な病原性決定因子と考えられてきた。本毒素に感受性を示す二十世紀ナシ(宿主)は、毒素処理や菌感染により壊死が生じるのに反して、長十郎ナシは毒素に非感受性であるのに加え、壊死も菌の感染も起こらない。本毒素は、宿主細胞に細胞膜の透過性機能の失調を伴う細胞膜障害を誘導し、最終的に細胞死を引き起こす。しかし、イオン漏出に関わる毒素作用の初期の変性膜の具体的損傷については未だ不明な点が多い。また、毒素分子の活性発現および特異性を支配する原子団を探索するために、AK 毒素の類縁化合物(AKA)を用いて壊死形成の解析が行われたが、AKA の病理学的役割については調査されていない。そこで本研究は AK 毒素 I の既知の作用に関する情報をもとに、数種の AKA 作用を様々な基準を用いて解析した。加えて得られた結果から、膜受容体に対する毒素の特異性と活性を支配する原子団について考察した。 第2章では、AK 毒素 I により誘導される細胞内イオン漏出部位と細胞膜の構造変化についてはじめに調査を行なった。毒素処理した宿主葉を透過電顕(TEM)と走査電顕(SEM)で観察すると、毒素処理後 6 時間の膜陥入部位において多くの原形質連絡は依然として細胞膜と連続していた。また Mg イオンを可視化する固定法で固定した組織を TEM 観察した結果、細胞膜変性前の 20 分以内にイオンの漏出を原形質連絡に認めた。これらの結果からイオン漏出の原因は原形質連絡の切断ではないことが分かったが、どのような構造変化により起こるのかは現在不明であった。 第3章では AK 毒素および 6 種の AKA の作用機作を壊死形成、細胞膜の透過性機能、H₂O₂ の生成を伴う細胞膜変性を指標として調査した。その結果、AKA は二十世紀葉に壊死誘導性のものと壊死非誘導性の 2 つのタイプに大別された。壊死非誘導性 AKA には毒素活性が無かったのに対して、壊死誘導性 AKA は全ての指標において AK 毒素と類似の活性を持つことが分かった。 第4章では AKA の二十世紀葉に対する感染誘導を調べた。壊死非誘導性 AKA には感染誘導能は無いが、壊死誘導性 AKA は非病原菌胞子の感染を誘導することが分かった。また、これらの組織を TEM 観察すると、壊死誘導性 AKA を添加した非病原菌は感染に成功し、組織中に増殖した。その際、付着器直下と貫穿菌糸に多量の H₂O₂ の生成を認めた。一方、非壊死誘導性 AKA を添加した非病原菌においては、ナシ葉クチャクラで菌糸の伸長が停止し、貫穿菌糸における H₂O₂ 生成も少量しか認められなかった。これらから壊死誘導性 AKA は AK 毒素と同様の病理学的役割を持つことが分かった。 第5章では、本研究を以下のように総括した。AK 毒素の宿主認識から細胞膜障害までの初期作用が菌の感染の際に重要であるため、毒素の初期作用の調査を行なった。その結果、毒素処理後 20 分以内に細胞膜の機能が破壊されていることを証明した。次に AK 毒素の既知の作用機作を指標として、AKA の毒素活性と感染誘導能について調査したところ、壊死非誘導性 AKA には病理学的活性が無く、壊死誘導性 AKA は AK 毒素と類似の毒素活性と感染誘導能を有することが分かった。次に、得られた結果から、AK 毒素の活性発現を支配する原子団について考察を行なった。AK 毒素 I 分子のアミノ酸および共役カルボン酸部分には活性発現に必要な「かさ高さ」もしくは「疎水性」の最適値が存在する可能性がある。またエギキンド部分は本毒素の活性発現に必須であり、宿主受容体との相互作用において重要な役割を担うと推定できた。また、本毒素のエポキシ部と宿主受容体中の SH 基が求核置換反応により結合する可能性が考えられた。ここで得られた知見は毒素の病理学的意味を深く理解できる情報を提供している。 本研究は宿主特異的 AK 毒素とその類縁化合物について、作用機作を研究したものであり、その病理学的役割について重要な知見を得たものとして価値ある集積であると認める。よって、学位申請者の細木直樹は、博士(学術)の学位を得る資格があると認める。			