

さび病菌冬孢子形成誘導因子精製過程の改善

佐野 遥香 (筑波大学 生物学類) 指導教員: 山岡 裕一 (筑波大学 生命環境系)

1. 背景および目的

さび菌は担子菌門さび菌目に属する植物寄生菌で、機能的および形態的に異なる複数の孢子世代を持つ。冬孢子はさび菌の分類および同定に重要であり、また感染拡大に機能する夏孢子世代から休眠性の冬孢子世代へ人為的に移行できれば感染拡大の制御も可能となることから、冬孢子形成誘導に関する研究は重要である。野沢ら (1996) は、冬孢子形成を誘導する物質がコムギ赤さび病菌 (*Puccinia triticina*) の冬孢子堆が多量に形成されている罹病コムギの抽出物に存在することを確認した。また同様の物質の存在はさび菌が感染したコムギ以外の宿主植物の抽出液でも報告されている (近藤 1997, 野沢ら 1999)。しかし、これらの冬孢子形成誘導活性因子は精製途中で活性が失われてしまったため構造決定に至っていない。その原因として、1) 活性を示すために複数の物質が関与しておりそれらが分離されたため、2) 不安定な物質で容易に分解されてしまったため、3) 分画中に含まれ、pH を安定化していた共雑物が除かれたため等が考えられる。本研究では、pH を安定化させることで冬孢子形成誘導因子の活性を保つことができると考え、緩衝液を用いたバイオアッセイ法の確立を目的とした。

2. 材料および方法

(1) 成分抽出と供試する分画の精製

供試材料として、*Puccinia miscanthi* の冬孢子堆を多量に形成していたススキの葉を筑波大学菅平高原実験センター内のススキ草原で9月30日および10月1日に採集した。採集した葉は乾燥後、 CH_2Cl_2 で脱脂し MeOH と蒸留水で抽出した。この粗抽出液を下記の方法でバイオアッセイを行い、水粗抽出液中に冬孢子形成誘導因子が含まれることを確認した。水粗抽出液は HP21 カラムクロマトグラフィーにかけ、得られた分画を下記の方法でバイオアッセイを行った。活性が確認された水溶出分画 W7 及び 10% メタノール溶出分画 M10 を以下の実験に用いた。

(2) バイオアッセイ

コムギ赤さび病菌の単孢子堆分離菌株 1 株を供試菌とし、播種後約 6 日のコムギ (品種: 農林 61 号) の子葉に夏孢子を接種した。夏孢子堆が裂開を開始した子葉の先端 4cm を切り、供試液 2 ml の入ったサンプル瓶に入れ 20°C、14 時間照明 (7400 lux) : 10 時間暗黒条件下で 10 日間培養した。冬孢子堆の形成レベルを近藤ら (1997) の判定基準に従い、0 から 3 までの 4 段階に判定した。サンプル毎に 3 反復行い、その平均値を求めた。

(3) pH と緩衝液の効果

水粗抽出液を KOH および HCl を用いて pH 2.31 から 11.99 の範囲に調整しバイオアッセイを行った。

HP21 精製後に活性が確認された分画 W7 と M10 について、酢酸カリウム緩衝液、トリス緩衝液、CAPSO 緩衝液を用いて、それぞれ pH 3.49 から 6.95、pH 6.05 から 8.52、pH 9.00 から 10.03 の範囲でバイオアッセイを行った。

3. 結果および考察

KOH、HCl で pH を調整した水粗抽出液を用いてバイオアッセイを行った結果、pH 3.59 から 10.89 の範囲で安定的な冬孢子堆の形成が確認された。pH 2.31 と 11.99 ではコムギ子葉に枯れが見られた。また、pH 3.06 では子葉に枯れはみられなかったが冬孢子堆は形成されなかった。pH 11.18 と 11.48 では冬孢子堆はわずかに形成された。

3種類の緩衝液を用いた分画 W7 と M10 のバイオアッセイ結果をそれぞれ図 1 と 2 に示した。酢酸カリウム緩衝液では、分画 W7 では pH 4.48 から 6.95、M10 では pH 3.68 から 6.95 の範囲で冬孢子堆の形成が見られほぼ同程度の結果が示された。トリス緩衝液と CAPSO 緩衝液では、分画 W7 と M10 でバイオアッセイの結果が異なった。分画 W7 では、トリス緩衝液 pH 6.05 から 8.52 および CAPSO 緩衝液 pH 9.00 から 10.03 で冬孢子堆は形成されたが安定しなかった。分画 M10 では、トリス緩衝液 pH 6.05 から 8.52 の範囲、CAPSO 緩衝液 pH 9.00 から 10.03 の範囲で安定的な冬孢子堆の形成が見られた。

以上の結果より、酢酸カリウム緩衝液を用いて pH 4.48 から 6.95 に調整することで、冬孢子形成誘導因子の活性を失うことなく精製された分画のバイオアッセイを行える可能性が高いと考える。

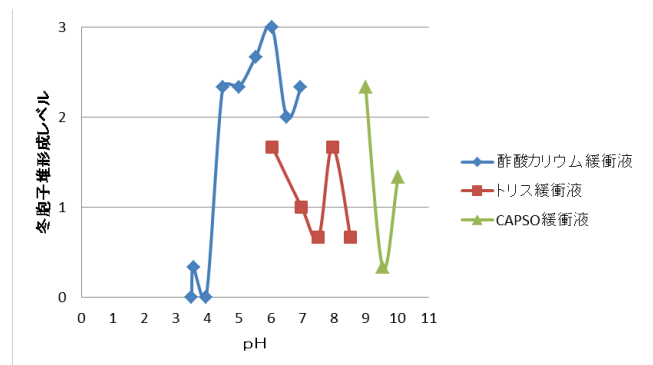


図1. 3種類の緩衝液を用いた分画W7のバイオアッセイ結果

冬孢子堆形成レベル
0; 冬孢子堆の形成が見られないまたは僅かに見られるもの、
1; 冬孢子堆が散在的に形成されているもの、
2; 冬孢子堆がグリーンアイランドの周りに断続的に形成されているもの、
3; 冬孢子堆の形成がグリーンアイランドの周りで、取り囲むように形成されているもの。
各サンプル毎に3反復行いその平均値を求めた。

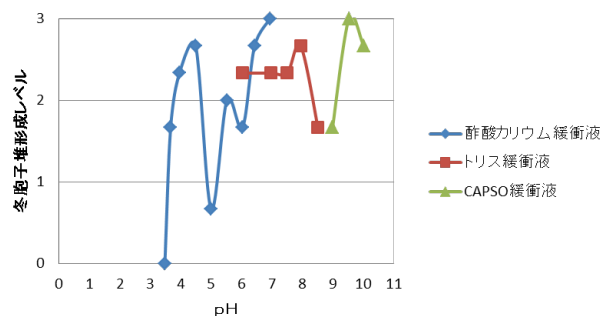


図2. 3種類の緩衝液を用いた分画M10のバイオアッセイ結果