

表1 各シャペロンと共に発現したPis-GDHの酵素活性

	比活性 (U/mg)	
	非加熱	加熱後
TcFKBP	1.86	3.48
PhFKBP	0.392	2.98
pACYC184	0.107	3.54

加熱は90°Cで15分間

考えられた。精製後の酵素活性を表1に示した。これらの比活性は基質としてグルタミン酸を用い、補酵素NADがNADHになる際の340 nmの値の変化から生成量を見積もった。測定は50°Cで行った。

これらの結果から、精製後のPis-GDHの加熱による活性化はTcFKBP, PhFKBP および pACYC184 では、それぞれ1.9倍、7.6倍、33倍となった。加熱後の比活性に大きな違いが見られないことから、FKBPを共発現させたものでは非加熱状態での比活性が比較的高くなっていることが明らかとなった。加熱後の活性を100%として非加熱状態の活性を表したものと図1に示す。これらのことからも、FKBPを共発現することによって、大腸菌で生産された状態での活性が比較的高く、FKBPの中でも TcFKBP の方が高い活性を示した。このことから、大腸菌体内での超好熱アキア由来グルタミン酸脱水素酵素活性にはシャペロンが影響しており、なかでもプロリン異性化酵素活性が大きく寄与していることが明らかとなった。

今後は、それぞれの共発現を行ったPis-GDHの構造に関する測定を行う予定である。

謝 謝

最後に本研究にご理解とご援助を下さいました財団法人

イネいもち病菌に対するイネ由来新規生理活性物質の探索

東京理科大学理工学部応用生物科学科
嘱託助教 成川(奈良) 恵

研究背景・目的

イネの三大病害の一つであるイネいもち病は、イネいもち病菌 (*Magnaporthe oryzae*) によって起こり、イネの苗代期から出穂後まで各期を通じて発生し、イネの成長やコメの収穫に甚大な被害を及ぼすことが知られている。これまでイネいもち病菌はイネの地上部に感染し病害を引き起こすと考えられてきたが、近年同菌がイネやムギ類の根に

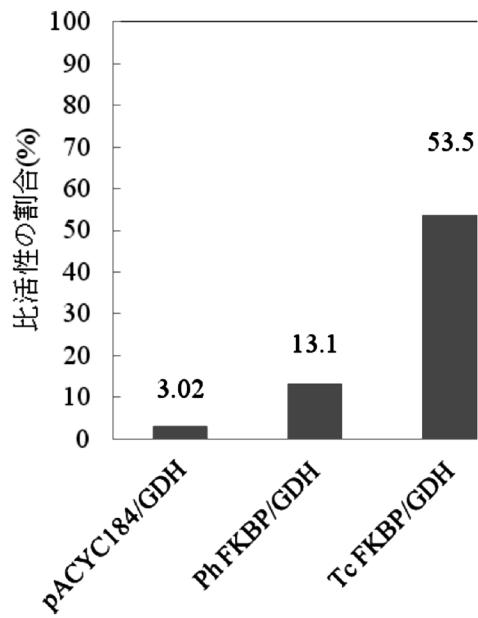


図1 加熱後の活性を100%とした時の非加熱状態時の比活性の割合

農芸化学研究奨励会に深く感謝いたします。また、ともに実験を行った共同研究者の方々にも厚くお礼申し上げます。

参考文献

- 郷田秀一郎, 櫻庭春彦, 大島敏久 (2009) 大腸菌で生産される超好熱菌由来の不活性型グルタミン酸脱水素酵素の活性化機構, 生化学, **81**, 1049–1055.
- J. DiRuggiero, & F. T. Robb (1995) *Appl. Environ. Microbiol.*, **61**, 159–164.
- S. Goda, M. Kojima, Y. Nishikawa, C. Kujo, R. Kawakami, S. Kuramitsu, H. Sakuraba, Y. Hiragi, & T. Ohshima (2005) *Biochemistry*, **44**, 15304–15313.
- A. Ideno, & T. Maruyama (2002) *Gene*, **292**, 57–63.

感染する能力を持つことが明らかになった。ただし、自然条件下で同様の現象が起こっているのか、また起こっているならば好気性菌であるイネいもち病菌が土壌中でどのように植物体に到達するかは全く明らかになっていない。

また、感染成立後、イネ根中で成長しているイネいもち病菌の菌糸は、イネ地上部中で成長する菌糸と異なり、きれいな円柱状に成長しつつ分岐がほとんどみられないことが明らかとなっている。さらに、イネいもち病菌のイネ地上部への感染機構とイネ根への感染機構が異なることや、イネいもち病菌の感染時にイネにおいて発現する応答遺伝子群が地上部と根で異なること、イネ根中では宿主であるイネの細胞死を引き起こさないことなどから、イネいもち病菌はイネの各組織を判別する能力を有しており、宿主の

組織ごとに自身の形態や細胞機能を変化させる可能性が考えられたが、その認識メカニズムに着目した研究は行われていない。そこで本研究では、イネの地上部抽出物と根抽出物に対するイネいもち病菌の反応性の違いを検出し、違いをもたらす化合物を同定することで、イネいもち病菌の宿主認識機構および感染前後の成長調節機構を明らかにすることを目的とし、実験を行った。

方法・結果

実験材料としてイネいもち病菌は日本産P2株を用い、イネはP2株に感受性のコシヒカリを用いた。コシヒカリは種子消毒後三日間浸種し、鳩胸状に催芽した種粉をポットに播種し、一ヶ月間屋外温室で土耕栽培した。そのイネを地上部と地下部にわけてサンプリングし、液体窒素で急速凍結してから-80°Cで保存したものを抽出材料とした。さらに抽出材料としてワラと種粉も使用した。

まず、イネいもち病菌の菌糸形態変化を容易に観察するための実験系の構築を行った。計画当初はシャーレに生育した菌糸の観察を行う予定であったが、より詳細な観察のためにスライドカルチャー法も同時に試みた。様々な培地組成や寒天濃度および固化剤の種類を試験した結果、スライドグラス上に0.1%アガロースを滴下するか、1.0%アガロース片をのせ、そこにピンセットで搔き取った菌糸片を植えて抽出物を添加する方法が、より簡便で詳細な観察が可能だったので、この方法を以後用いることにした。今回は、アガロースにスクロースを入れたものと入れないものを同時に試験した。

予備実験において、ワラとショ糖のみ含有した培地を用いてシャーレで8日間生育させたイネいもち病菌は、菌糸が顕著に黒くなり、気中菌糸がほとんど伸長しないことがわかった。このことから、ワラの水抽出物には菌糸のメラニン化を促進する因子が存在する可能性が示唆され、ワラをオートクレーブして抽出物として用いていることからその因子はタンパク質ではない可能性が高いことがわかった。そこで、全ての抽出材料において、オートクレーブした水抽出物をイネいもち病菌菌糸片に滴下した。また、-80°Cで保存したイネ葉と根については、液体窒素下ですりつぶして水抽出したものも同様に供試した。その結果、アガロース濃度にかかわらずイネ葉抽出物（オートクレーブしたものとしていないもの両方）とイネワラにおいて菌糸および菌糸片周辺が茶褐色に変色した（図1）。顕微鏡で観察してみると、菌糸に沿って茶褐色の粒状の物質が多数確認できた。さらに、この変色はスクロースとイネいもち病菌の存在によって促進されることもわかった。この現象が葉の抽出物を処理したもので顕著に見られたことか

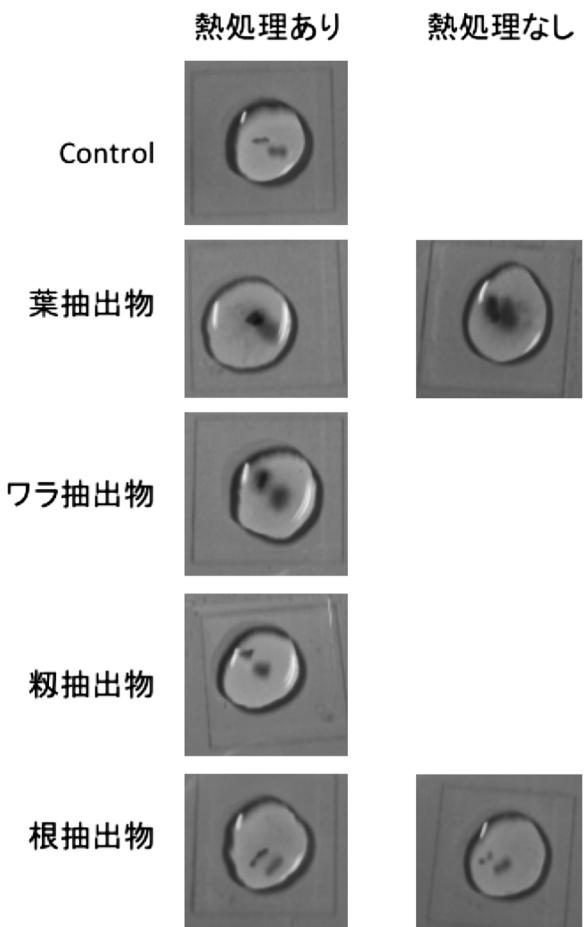


図1 イネいもち病菌菌糸片に対するイネ抽出物の効果。葉およびワラ抽出物を添加すると、イネいもち病菌周辺に茶褐色の色素の沈着がみられる。

ら、葉において蓄積する物質がイネいもち病菌の色素沈着を促進することが示唆された。

今後の予定

上記で述べたように、感染成立後のイネいもち病菌とイネの間の相互作用は未だ解明されていない部分がある。本研究から、イネいもち病菌がイネの組織別に異なる反応を起こし、特にイネ葉にイネいもち病菌の色素沈着を促進する因子が含まれている可能性が示唆された。そして、その反応を簡便に検出する系も確立できたので、今後はイネ抽出物由来の生理活性因子を単離同定し、イネにおける目的因子の分布やイネいもち病菌への作用を綿密に調べていく予定である。

謝 辞

本研究を遂行するに当たり、ご支援賜りました公益財団法人農芸化学研究奨励会に深く感謝いたします。