

癌腫病菌カバノアタケの感染による
シラカンバ植物体内での抗菌性化合物の生成

(課題番号 11660139)

平成 11 年度～平成 13 年度科学研究費補助金 (基盤研究 (C) (2))

研究成果報告書

平成 14 年 3 月

研究代表者 横田信三

(宇都宮大学農学部助教授)

目次

はじめに	1
第1章 感染シラカンバ幼植物体と非感染幼植物体の生長量の比較	3
1-1 緒言	3
1-2 実験方法	3
1-2-1 供試材料	3
1-2-2 生重量、茎長及び主根長の測定	3
1-3 結果と考察	4
第2章 感染・非感染幼植物体の抽出成分の比較及び β -シトステロールの定量	9
2-1 緒言	9
2-2 実験方法	9
2-2-1 供試材料	9
2-2-2 抽出成分の比較	9
2-2-2-1 菌の接種	9
2-2-2-2 有機溶媒抽出	9
2-2-2-3 有機溶媒抽出物及び β -シトステロール標品のトリメチルシリル (TMS) 誘導体化	10
2-2-2-4 ガスクロマトグラフ質量分析計 (GC-MS) による TMS 化抽出物の定性分析	10
2-2-3 β -シトステロールの定量	11
2-2-3-1 菌の接種	11
2-2-3-2 有機溶媒抽出	11
2-2-3-3 有機溶媒抽出物のアルカリ加水分解	12
2-2-3-4 有機溶媒抽出物、加水分解物及び β -シトス	12

テロール標品の TMS 誘導体化		六目
2-2-3-5	GC-MS による β -シトステロールの定量	13
2-3	結果と考察	13
2-3-1	感染・非感染幼植物体の抽出成分の比較	13
2-3-2	有機溶媒抽出物及び加水分解物中の β -シトステロールの定量	14
第3章 β -シトステロールの抗菌活性試験		31
3-1	緒言	31
3-2	実験方法	31
3-2-1	供試菌	31
3-2-2	液体培地を用いた抗菌活性試験	31
3-2-3	寒天培地を用いた抗菌活性試験	32
3-3	結果と考察	32
3-3-1	液体培地を用いた抗菌活性試験	32
3-3-2	寒天培地を用いた抗菌活性試験	32
第4章 感染・非感染幼植物体の粗酵素液の二次元電気泳動		40
4-1	緒言	40
4-2	実験方法	40
4-2-1	供試材料	40
4-2-2	菌の接種	41
4-2-3	幼植物体からの粗酵素液の調製	41
4-2-4	粗酵素サンプルの調製	41
4-2-5	色素結合法による粗酵素液中のタンパク質の定量	41
4-2-6	粗酵素液の二次元電気泳動	42
4-2-6-1	等電点電気泳動 (一次元目の泳動)	42
4-2-6-2	SDS-PAGE (二次元目の泳動)	43

4-2-7	ゲルの銀染色	44
4-2-8	タンパク質スポットの解析	44
4-3	結果と考察	45
4-3-1	CONTROL①,②と TREATMENT との二次元電気泳動におけるタンパク質スポットの比較	45
4-3-2	画像処理によるタンパク質 (pH3~7、分子量 100kDa 以下) スポットの比較	45
	おわりに	52
	引用文献	54

はじめに

樹木における抗菌性化合物の生成に関する研究は、草本類などに比べるとかなり少ないのが現状である。樹木においては、様々な材料レベル、即ち培養細胞、無菌植物体、苗木、そして立木などを用いて研究が行われて来たが、その大部分は、野外で生育している立木を対象としたものである。しかし、この場合他の微生物、昆虫、生育環境など、様々な要因を排除することが出来ない。また、再現実験を行う場合、厳密に同じ遺伝的形質を持つ材料を揃えるのが困難である。また、樹木の場合、栽培植物のレース特異的な防御反応に類似したものに関する研究については進展していない。更に、栽培植物では、抗菌性化合物をファイトアレキシン（感染刺激によって新生する抗菌性化合物）とファイトアンチシピン（構成的または前駆体から簡単な生化学的反応を経て生成する抗菌性化合物）に分類されているが、樹木の場合には、この様な分類が困難である場合が多い。

本研究においては、病原菌としてカンバの癌腫病菌であるカバノアナタケの2つの異なる菌株を用い、そして宿主として無菌シラカンバ幼植物体を使用し、菌の感染によって植物体内に生成する抗菌性化合物について調査・検討した。その研究成果について、ここに報告する。

研究組織

研究代表者： 横田 信三 （宇都宮大学農学部・助教授）

交付決定額（配分額）

（金額単位：千円）

	直接経費	間接経費	合計
平成11年度	1,500	0	1,500
平成12年度	800	0	800
平成13年度	900	0	900
総計	3,200	0	3,200

研究発表

口頭発表

- 1) 横田信三、長谷川文紀、笹本浜子、吉澤伸夫：カバノアナタケに感染したシラカンバ幼植物体に生成するファイトアンチシピン、第17回日本植物細胞分子生物学会大会要旨集、57 (1999)
- 2) S. Yokota, F. Hasegawa, H. Sasamoto, N. Yoshizawa: Phytoanticipin formed in *Betula platyphylla* var. *japonica* plantlets infected with *Inonotus obliquus*. Abstracts of XVI International Botanical Congress, 650 (1999)
- 3) 横田信三、紅屋大介、吉澤伸夫、笹本浜子：カバノアナタケに感染したシラカンバ幼植物体から得られたβ-シトステロールの定性・定量分析、第50回日本木材学会大会要旨集、420 (2000)
- 4) 横田信三、粕川典子、吉澤伸夫、笹本浜子：カバノアナタケに感染したシラカンバ幼植物体の感染初期の反応、第51回日本木材学会大会要旨集、364 (2001)
- 5) S. Yokota, D. Takashima, H. Sasamoto, N. Yoshizawa: Analysis of specific proteins produced in the birch plantlets infected with *Inonotus obliquus*. Abstracts of 10th International Congress on Molecular Plant-Microbe Interactions, 455 (2001)

場合	質量対価	質量範囲	分子式
002.7	0	002.7	分子式不明
008	0	008	分子式不明
009	0	009	分子式不明
005.2	0	005.2	分子式不明

第1章 感染シラカンバ幼植物体と非感染幼植物体の生長量の比較

1-1 緒言

病原菌に冒された樹木は、その生長量が減退することが予想されるが、野外で生育している立木について、その生長に対する樹病の影響を評価するのは困難である。本章では、無菌のシラカンバ幼植物体を用いて、菌感染による生長量への影響について検討した。

1-2 実験方法

1-2-1 供試材料

植物体として、2.5 μ M インドール酢酸と 0.1 μ M 1-ナフタレン酢酸を含む MS 培地 (Murashige & Skoog 1962) で腋芽培養により誘導したシラカンバ (*Betula platyphylla* var. *japonica*) 無菌幼植物体 No.8 (図1) を用いた。尚、継代は3ヶ月毎に、同組成の培地に腋芽を含む外植体を植えることによって行った。

接種用の菌として、ポテトデキストロース寒天培地 (Difco Laboratories, Detroit, Michigan, U.S.A.) で継代培養した癌腫病菌カバノアナタケ (*Inonotus obliquus*) (北海道大学大学院農学研究科環境資源学専攻、森林資源科学講座、森林化学分野研究室から入手) IO-U1 株 (北海道大学雨竜演習林内にて採取) 及び IO-B2 株 (北海道美深町にて採取) を用いた。尚、図2にカバノアナタケに感染した成木及びその材を示す。

1-2-2 生重量、茎長及び主根長の測定

3ヶ月または4ヶ月間培養したシラカンバ幼植物体 (3本/フラスコ) の第3節間にメスで傷を加え、そこにカバノアナタケを接種し (TREATMENT) (図3)、更に1ヶ月間培養した後、生重量、茎長及び主根長についてそれぞれ測定を行った。尚、対照として、傷を加えず菌も接種しないもの (CONTROL①)、及び傷を加えたのみで菌を接種しないもの (CONTROL②) を同様に1ヶ月間培養し、各測定を行った。

1-3 結果と考察

生長量の測定は、合計5回行った。その結果を表1に示す。CONTROL①、CONTROL②及び TREATMENT の各処理区において、生重量、主根長及び莖長について比較し、検定を行った。測定4までは、有意差が見られた処理区はなかったが、主根長において CONTROL②、TREATMENT になるにつれて明らかな減少傾向が見られた。また、生重量においては、CONTROL①と比較して TREATMENT の値が減少していた。更に、測定5においては、生重量について CONTROL①と CONTROL②との間、主根長について CONTROL①と CONTROL②との間及び CONTROL②と TREATMENT との間に、それぞれ有意差（危険率5%）が認められた。

測定4までにおいて、検定の結果、有意差が見られなかったが、これは同じ処理区において大きなばらつきが見られたことが原因と考えられる。例えば、カバノアナタケ IO-U1 株を接種した4ヶ月生シラカンバを用いた場合の測定結果（測定2）において、主根長が減少しているが、この場合の標準偏差は CONTROL①、CONTROL②、TREATMENT の順に 99、83、79 であった。これは、平均値が同じ順番で 126、113、104 であるという結果を考慮すると、非常に大きい標準偏差であることが分かる。また、IO-U1 株を3ヶ月生シラカンバに接種した場合（測定1）、及び IO-B2 株（測定3、4）を用いた場合も、主根長の標準偏差が平均値の6~8割と大きいばらつきをしめした。t 検定においては、ばらつきが大きいほど有意差が現れ難くなるため、そのことが今回の検定結果につながったと考えられる。

有意差が見られない場合があるのだが、主根長及び生重量に減少傾向が見られたことから、カバノアナタケの感染がシラカンバ幼植物体の生長にかなり影響を及ぼすと考えられる。特に、全ての測定に共通して、菌感染が主根の生長を阻害することが判明した。このことは、菌感染後のシラカンバ植物体内の生理的变化を反映しているものと考えられる。

表1 シラカンバ幼植物体の生重量、主根長及び茎長

測定No.	菌株	菌接種前の 培養期間	処理区	生重量 (g)	主根長 (mm)	茎長 (mm)
測定 1	IO-U1	3ヶ月	CONTROL①	0.38	59.1	55.6
			CONTROL②	0.40	53.0	55.2
			TREATMENT	0.38	51.8	52.7
測定 2	IO-U1	4ヶ月	CONTROL①	0.62	126.1	96.0
			CONTROL②	0.51	113.3	84.3
			TREATMENT	0.48	104.2	97.8
測定 3	IO-B2	3ヶ月	CONTROL①	0.50	62.4	72.7
			CONTROL②	0.55	56.8	77.2
			TREATMENT	0.45	52.9	77.0
測定 4	IO-B2	4ヶ月	CONTROL①	0.43	75.8	80.0
			CONTROL②	0.52	73.6	89.6
			TREATMENT	0.47	57.6	87.0
測定 5	IO-B2	3ヶ月	CONTROL①	0.37*	85.1*	79.1
			CONTROL②	0.62*	117.2*	88.2
			TREATMENT	0.41	79.1*	90.7

* : t- 検定 (危険率 5%) において有意差あり

シリカンバ (浮葉植物) に付いたシラカンバの幼植物体

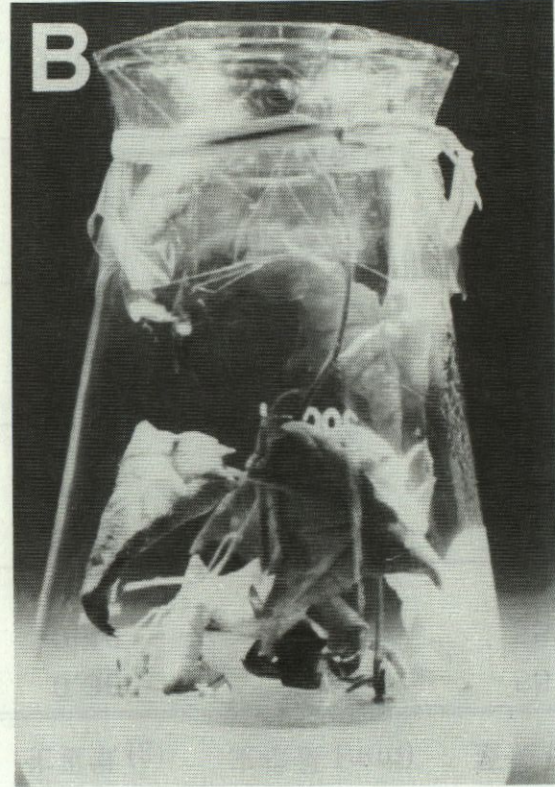


図1 シラカンバ幼植物体
A: 3ヶ月生、B: 4ヶ月生

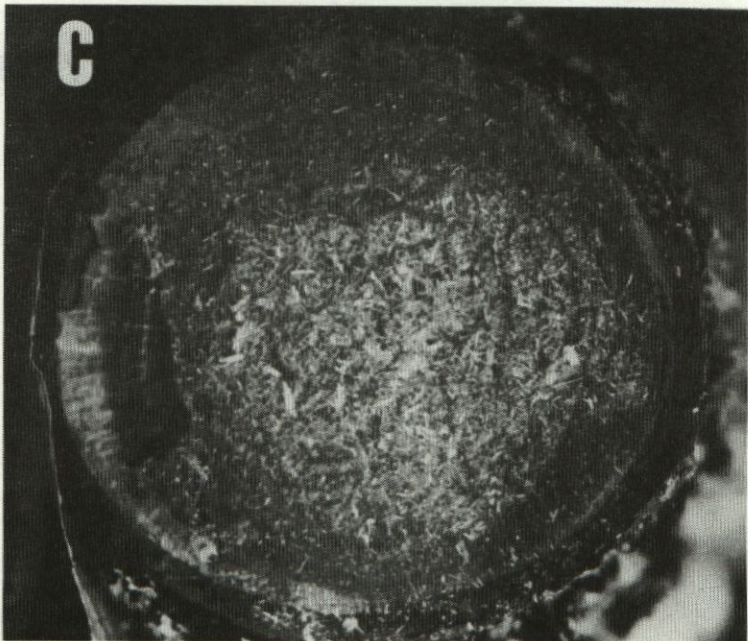
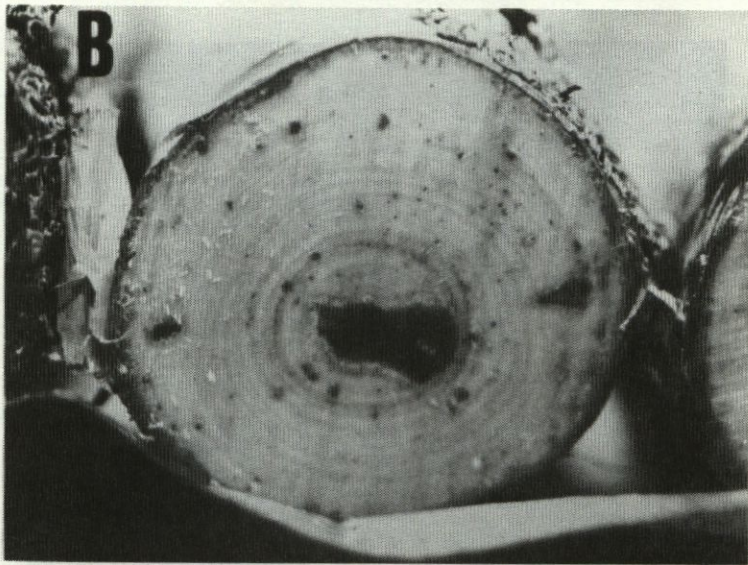


図2 カバノアナタケに感染したシラカンバ
成木及びその材（北海道美深町にて撮影）
A：感染成木、B：健全材、C：感染材

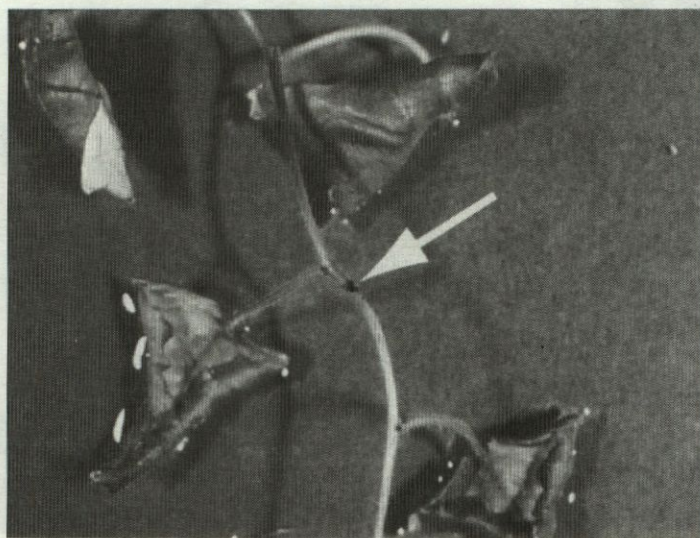
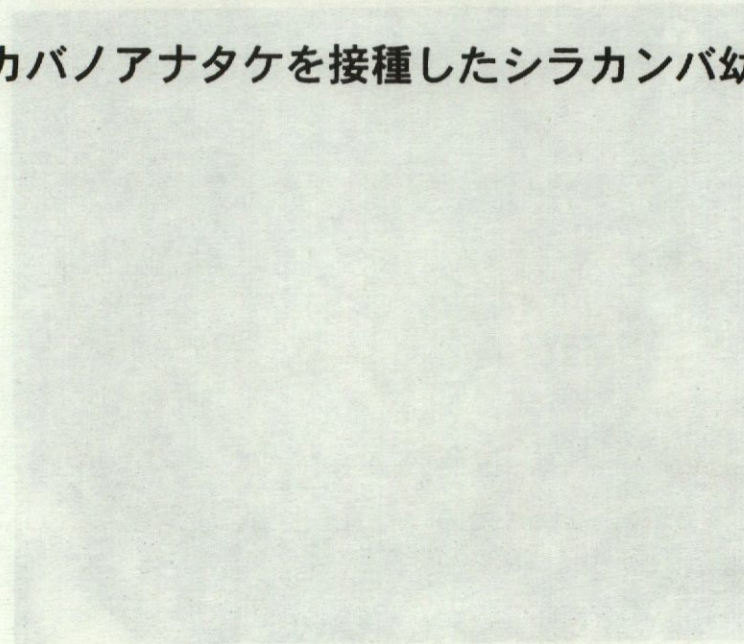


図3 カバノアナタケを接種したシラカンバ幼植物体



ハバノアナタケの接種を受けたシラカンバ幼植物体 (図3) の子実の観察 (左から順に) A: 木知薬劑、B: 林全製、C: 林薬製

第2章 感染・非感染幼植物体の抽出成分の比較及び β -シトステロールの定量

2-1 緒言

他の植物の場合、多くの抗菌性化合物が病原菌の感染から極短期間で生成していると報告されている (Sequeira 1967, Hunter ら 1978, Hanawa ら 1995)。そこでこのことを考慮して、本章では、菌感染後1週間、1日毎のシラカンバ幼植物体における抽出成分の変化について検討した。また、シラカンバ幼植物体には β -シトステロールが含まれていることが分かっているが (阿部 1999)、この化合物は生理活性の高いトリテルペン類に分類され、シラカンバ幼植物体内におけるファイトアンチシピンとして作用している可能性があると考えられる (長谷川 1999, 紅屋 2000)。その推定に基づいて、本章では、菌接種後のシラカンバ幼植物体において β -シトステロールの含有量がどう変化しているのか検討した。

2-2 実験方法

2-2-1 供試材料

植物体として、1-2-1と同じ無菌シラカンバ幼植物体 No.8 を用いた。接種用の菌として、抽出成分の比較にはカバノアナタケ IO-B2 株を、 β -シトステロールの定量には IO-U1 株をそれぞれ使用した。

2-2-2 抽出成分の比較

2-2-2-1 菌の接種

3ヶ月間培養した無菌シラカンバ幼植物体 (3本/フラスコ) の茎頂から第3節間にメスで傷を付け、そこにカバノアナタケ IO-B2 株を接種した (TREATMENT)。接種後、更に1週間培養した。尚、対照として、傷を加えず菌も接種しないもの (CONTROL①)、及び傷を加えたのみで菌を接種しないもの (CONTROL②) を同様に1週間培養した。

2-2-2-2 有機溶媒抽出

感染初期の抽出成分を各処理区間で比較するために、菌接種後0日目から7日

目までのシラカンバ幼植物体を有機溶媒で抽出した。各幼植物体 (CONTROL①、CONTROL②、TREATMENT) は、1日毎に採取して液体窒素で急速凍結し、抽出操作を行う前まで-80℃のディープフリーザー内で保存した。

保存しておいた幼植物体を液体窒素で再び急速凍結し、乳棒で粉碎した後、粉砕物を 300mL 容コニカルフラスコへ移し、これにジクロロメタン 100mL を加えて抽出した。抽出は、恒温振とう器 (ユニサーモ・シェーカー NTS-120, EYELA) を用いて室温 (25℃) 下で1時間行った。抽出後、抽出液を桐山ロートを用いて濾過し、この抽出液を 500mL 容分液ロートに入れ、飽和食塩水を加えて良く振り、塩析を行った。ジクロロメタン抽出液を 1L 三角フラスコへ移し、これに無水硫酸ナトリウムを大過剰量加えて脱水した。濾過時の抽出残渣を元のコニカルフラスコに戻し、これに酢酸エチル 100mL を加えて、ジクロロメタンの場合と同様に抽出した。桐山ロートで濾過した後、抽出液を 500mL 容分液ロートに移して飽和食塩水で塩析し、ジクロロメタン抽出液と一緒にし、無水硫酸ナトリウムで脱水した。これを、先端に綿を詰めた円筒状カラムで濾過し、ロータリーエバポレーターで溶媒を留去後、抽出物をアセトン及びメタノールで溶解し、5mL 容サンプル管に移した。溶媒をアスピレーター及び真空ポンプを用いて完全に除去し、抽出物の重量を測定した後、分析を行う前まで-30℃のフリーザー内で保存した。

2-2-2-3 有機溶媒抽出物及びβ-シトステロール標品のトリメチルシリル (TMS) 誘導体化

トリメチルシリル (TMS) 誘導体化は、以下の手順で行った。有機溶媒抽出物及びβ-シトステロール標品を、テフロン・シリコンセプタムの付いたキャップのあるミニバイアル (Wheaton, Millville, NJ, U.S.A.) に入れ、モレキュラーシーブス (4A, 1/16) を入れて予め脱水しておいたピリジン 1mL を加えて溶解した。これに *N,O*-ビス (トリメチルシリル) トリフルオロアセトアミド (和光純薬) 0.5mL を加えて密栓した後、70℃のオイルバス (OB-BS、アドバンテック) 中で 15 分間反応させて TMS 化を行った。

2-2-2-4 ガスクロマトグラフ質量分析計 (GC-MS) による TMS 化抽出物の定性分析

分析は、Agilent Technologies 社 (Wilmington, DE, U.S.A.) 製 GC-MS (HP5971 Series GC-MSD) 及び J&W Scientific 社 (Folsom, CA, U.S.A.) 製キャピラリーカラム(DB-1, 0.25mm ID, 15m length, 0.25 μ m df)を使用して行った。分析条件は次の通りである。イオン源温度：280 $^{\circ}$ C、インジェクションポット温度：250 $^{\circ}$ C、*m/z* レンジ：40~650、キャリアーガス：He、流速：60.8 cm/sec、カラム温度プログラム：100 $^{\circ}$ C (1min 保持) \rightarrow 250 $^{\circ}$ C (5 $^{\circ}$ C/min, 35min 保持)。尚、各サンプル溶液 1 μ L を GC に注入して分析を行った。

2-2-3 β -シトステロールの定量

2-2-3-1 菌の接種

3ヶ月間培養した無菌シラカンバ幼植物体 (3本/フラスコ) の茎頂から第3節間にメスで傷を付け、そこにカバノアナタケ IO-U1 株を接種した (TREATMENT)。接種後、更に1ヶ月間培養した。尚、対照として、傷を加えず菌も接種しないもの (CONTROL①)、及び傷を加えたのみで菌を接種しないもの (CONTROL②) を同様に1ヶ月間培養した。

2-2-3-2 有機溶媒抽出

菌接種後、1ヶ月間培養した幼植物体 (CONTROL①、CONTROL②、TREATMENT) を 1L ビーカーに移し、液体窒素で急速凍結後、乳棒で粉碎した。これを 300mL 容コニカルフラスコに移し、これにメタノール 150mL を加えた後、恒温振とう器 (ユニサーモ・シェーカー NTS-120, EYELA) を用いて室温 (25 $^{\circ}$ C) 下で3日間振とうしながら抽出した。抽出後、抽出液を桐山ロートを用いて濾過し、抽出液を 500mL 容ナス形フラスコに集めた。溶媒をロータリーエバポレーター (N-1, EYELA) で留去後、フラスコを-30 $^{\circ}$ Cのフリーザー内で保存した。元の抽出残渣を 300mL 容コニカルフラスコに戻し、ジクロロメタン 150mL を加え、同様に3日間抽出した。桐山ロートを用いてジクロロメタン抽出液を濾別し、その抽出液をメタノール抽出物の入っている 500mL 容ナス形フラスコに移した後、ロータリーエバポレーターで溶媒を留去した。次に、ナス形フラスコ内の抽出物を適量のメタノール及びジクロロメタンに溶解して 500mL 容分液ロートへ移し、ジクロロメタン 50mL と水で分配した。有機層を 300mL 容コニカルフラスコへ移した後、残っ

た水層に対して、ジクロロメタンを用いて同様の抽出操作を更に2回行った。残った水槽を 100mL 容三角フラスコへ移した後、300mL 容コニカルフラスコ内のジクロロメタン抽出液を分液ロートへ移し、飽和食塩水を加えて塩析した。有機層を、大過剰量の無水硫酸ナトリウムを入れておいた 1L 容三角フラスコへ移して、脱水を行った。上記の 100mL 容三角フラスコ内の水溶液に対して、酢酸エチルを用いてジクロロメタンの場合と同様に抽出を行った後、1L 容三角フラスコ内のジクロロメタン抽出液と併せて、脱水を行った。1L 容三角フラスコ内の溶液を、予め先端を綿栓し適量の無水硫酸ナトリウムを入れておいたガラス製カラムを通して 500mL 容ナス形フラスコへ移した。ロータリーエバポレーターで溶媒を留去した後、さらにアスピレーター及び真空ポンプを用いて溶媒を完全に除去した。この抽出物を、適量のジクロロメタン及び酢酸エチルを用いて溶解し、予め秤量しておいた 100mL 容ナス形フラスコへ移した。溶媒を同様にして留去・除去後、フラスコを秤量して抽出物の重量を求めた。

2-2-3-3 有機溶媒抽出物のアルカリ加水分解

エステル型の β -シトステロールを定量するために、上記で得られた有機溶媒抽出物をアルカリで加水分解した。各抽出物 (CONTROL①: 49.4mg、CONTROL②: 51.3mg、TREATMENT: 52.0mg) をテフロン・シリコンセプタムの付いたキャップのあるミニバイアル (Wheaton, Millville, NJ, U.S.A.) に入れ、それぞれメタノール 3mL で溶解した。これに 1M KOH 水溶液 1mL を加え、密栓した後、100°C のオイルバス (OB-BS、アドバンテック) 中で 1 時間反応させた。反応後、反応液を 50mL 容分液ロートに移し、10mL ジクロロメタンと飽和食塩水で 3 回分配した。ジクロロメタン抽出液を無水硫酸ナトリウムで脱水した後、先端を綿栓したガラス製カラムを通して 30mL 容ナス形フラスコへ移した。溶媒をロータリーエバポレーターで留去した後、更にアスピレーター及び真空ポンプで溶媒を完全に除去した。

2-2-3-4 有機溶媒抽出物、加水分解物及び β -シトステロール標品の TMS 誘導体化

有機溶媒抽出物、加水分解物及び β -シトステロール標品の TMS 誘導体化は、2-2-2-3 と同じ手順で行った。

2-2-3-5 GC-MSによるβ-シトステロールの定量

分析は、2-2-2-4と同様に行った。まず、検量線を作成するためにβ-シトステロール溶液を3種類の濃度(6.7, 66.7, 667μg/mL)にそれぞれ調整した。これらをGC-MSセレクトイオンモニタリング(SIM)モードで測定し、検量線を作成した。尚、SIMのターゲットイオンは m/z 357、クオリファイアイオンは m/z 129、396、486にそれぞれ設定した。次に、CONTROL①、CONTROL②及びTREATMENTの各抽出物及び加水分解物のTMS化物を、同様にSIMモードで測定し、作成した検量線を基に各サンプルに含まれているβ-シトステロールを定量した。

2-3 結果と考察

2-3-1 感染・非感染幼植物体の抽出成分の比較

抽出物のTMS化物をGC-MS分析した結果、感染後0日目から7日目までの抽出成分に、CONTROL①、CONTROL②及びTREATMENT間で大きな相違は見られなかった(図4-15)。従って、感染後0日目から7日目の間で、ファイトアレキシンに相当する化合物は生成していないものと考えられる。

β-シトステロールのイオン強度量が、CONTROL①に比べてCONTROL②では多少減少の傾向が見られ、TREATMENTでは多少増加の傾向が見られた。この結果より、傷害を加えたことによりβ-シトステロール量が減少し、カバノアナタケの感染により増加したと示唆される。これは、シラカンバ幼植物体内でβ-シトステロールが量的に増加し、ファイトアンチシピンとして作用している可能性があると考えられる。しかし、β-シトステロールの存在形態としては、遊離型、エステル型、配糖体型があり(Nes 1989)、本研究においては遊離型のβ-シトステロールのみを分析したため、得られた結果は、幼植物体内の全β-シトステロール量を表しているわけではない。

GC-MS分析の結果、0日目から7日目の全処理区間において、保持時間31.07分付近にピークを持つ化合物のイオン強度が、TREATMENTにおいてCONTROL①、CONTROL②より倍増していることが分かった。この化合物は、そのマススペ

クトルをデータベースによって照合したところ、10-demethylsqualene、2,6,10,15,19,23-hexamethyl-2,6,10,14,18,20-tetracosahexaene 又は 2,6,10,15,19,23-hexamethyl-2,6,10,14,18,22-tetracosahexaene であることが示唆された。この化合物が新たなファイトアンチシピンである可能性があるため、今後この化合物を同定し、定量する必要がある。

2-3-2 有機溶媒抽出物及び加水分解物中の β -シトステロールの定量

GC-MS 分析による SIM モード測定によって、有機溶媒抽出物及び加水分解物中の β -シトステロールの定量を行った。定量に使用した検量線を図 16 に、そして定量結果を表 2 に示す。

有機溶媒抽出物の β -シトステロール量は、CONTROL①と比較して CONTROL②においては 2 倍以上に増加し、TREATMENT においては半分以下に減少していた。一方、加水分解物中の β -シトステロール量は、CONTROL①と比較して CONTROL②においては 16 倍以上に増加し、TREATMENT においては 10 倍に増加していた。Seshadri と Vedantham (1971)は、アメリカシラカンバ(*Betula papyrifera*)、アメリカミズメ (*B. Lenta*) 及びキハダカンバ(*B. alleghaniensis*)など、カバノキ属の各成木中に含まれる抽出成分を定量し、トリテルペン類であるベチュリンの 1.5% (15mg/g DW) が最大で、その他 β -シトステロールなどは存在するが極少量であることを見出した。Fisher ら(1981)は、マツ属 (*Pinus*) など 4 属の針葉樹について木部を対象にステロール類を定量した結果、平均して 0.72mg/g FW の値を得ている。その他の樹種、そして樹皮などを対象にしたステロール類の定量結果 (Höll & Goller 1982, Komae & Hayashi 1971, Rowe *et al.* 1980) と比較しても、本研究における β -シトステロールの定量結果は大きい値を示した。しかし、Höll と Goller (1982)は、成木モミ (*Picea abies*) において辺材部から心材部へとステロール量が増加する傾向を見出し、その原因は、若年時において既に多量のステロールが存在し、やがてその部分が心材化したことが原因であると考察している。本研究では、幼植物体のシラカンバを対象に定量を行った結果、比較的大きな値となったことから、シラカンバにおいても、モミと同様な傾向が存在することが考えられる。

本研究において、傷害と菌接種の処理を加えてから 1 ヶ月後に、抗菌活性を持

つと思われる β -シトステロールを定量した。しかし、多くの抗菌性化合物が、病原菌の感染から極短時間で生成している事実 (Hanawa *et al.* 1995, Hunter *et al.* 1978, Sequeira 1967) を考慮すると、シラカンバにおいてももっと短いスパンで経時的に分析する必要がある。

本研究では、幼植物体を無処理、傷害のみ、傷害及び菌の感染という3つの処理区に分けて β -シトステロールの定量を行ったが、その結果、有機溶媒抽出物中(遊離型)の β -シトステロールは、TREATMENTにおいてはCONTROL①と比較して半分以下に減少していた。Minamikawaら(1963)は、サツマイモ(*Ipomea batatas*)を用いた実験において、*Ceratocystis fimbriata* 菌をサツマイモの根に接種した後に、抗菌性を持つ2つのクマリン化合物を定量した結果、一定時間後までは増加の傾向を示し、その後減少に転じていることを見つけた。同時に彼らは、菌による代謝実験を行い、その結果からクマリン化合物の減少の要因を菌によるものだと結論を下した。本研究における β -シトステロールの急激な減少も、同様に菌によって代謝されたことが原因と考えられる。このことを確認するために、サツマイモの場合と同様の代謝実験を行う必要がある。

今回の定量の結果、傷害を加えたことにより遊離型の β -シトステロール量が2倍以上に増加し、さらに菌を接種した処理区では急激に減少していた。カブ(*Brassica campestris*, アブラナ科)の切片を用いた実験において (Monde *et al.* 1991)、ファイトアレキシンである brassinin とその前駆物質にあたる脂肪族系カラシ油配糖体及びインドール系カラシ油配糖体を経時的に HPLC で追跡したところ、インドール系カラシ油配糖体の含量は増加するが、その誘導物質 brassinin は蓄積しないことが判明した。反対に、脂肪族カラシ油配糖体は、経時的に減少していた。このことから、高杉ら(1997)は、アブラナ科植物が傷つくと、病原菌の感染に備えて脂肪族系カラシ油配糖体を分解してインドール系カラシ油配糖体を生産・備蓄し、病原菌感染に際して、備蓄したインドール系カラシ油配糖体を分解して brassinin に変換すると考察した。また Hunter ら(1978)は、綿(*Gossypium sp.*)を用いた実験において、*Rhizoctonia solani* 菌を接種した後、抗菌性を持つと思われる7種類のテルペンを経時的に定量したところ、2種類のテルペン量は減少傾向若しくは横這いに転じてい

た。これに対して彼らは、2種類のテルペンが前駆物質として働き、他のテルペン類へと自動酸化されて変換したと考察している。これらのことから、本研究における定量結果を考察すると、遊離型の β -シトステロールが別のファイトアンチシピンの前駆体として作用していることが考えられる。即ち、傷害を受けた時点で、その後の感染に備えた準備段階として前駆体としての β -シトステロールが増加し、実際にカバノアナタケが感染した時点で簡単な化学変化によって別のファイトアンチシピンへと変換したために、TREATMENTにおいて β -シトステロール量が減少したと考えられる。シラカンバへのカバノアナタケの感染を実験林において調査した結果(山口 1989)によると、感染には人為的にしろ自然要因にしろ、殆どの場合幹への傷害が関与している。傷害が菌感染の大きな要因である事実を考慮すると、菌が感染していない段階でも、その後の感染に備えていち早くファイトアンチシピンの前駆体を生成・蓄積させる機構が、シラカンバ幼植物体に備わっていると推察される。

β -シトステロールは、植物界において広く存在するステロールであるが、存在形態としては遊離型、エステル型及び配糖体型があり、本研究においては、遊離型及び配糖体型のものを定量した。そのため、定量結果における数値の変動は必ずしも全 β -シトステロールの生合成及び代謝量を表している訳ではなく、植物体中のエステラーゼ又は β -グルコシダーゼによって、それぞれエステル型及び配糖体型から遊離して来ることが考えられる。Höll と Goller (1982)によれば、トウヒにおいてエステルを加水分解することによって、検出されるステロールが約 50%増加することを見出している。本研究の結果では、CONTROL①と比較して CONTROL②では約 16 倍、TREATMENT では約 10 倍に増加していた。このことから、上記で考察したように、傷害または菌の感染によって、エステル型の β -シトステロールが増加し、これが前駆体のような役割で、別のファイトアンチシピンへと変換されるものと推察される。今後、配糖体型の β -シトステロールを定量し、傷害または菌感染のよって、シラカンバ幼植物体内の β -シトステロールの存在形態及び代謝がどの様に変化するのか調べる必要がある。

目目0

表2 β -シトステロールの定量結果

処理区	有機溶媒抽出物 (mg/g FW)	加水分解物 (mg/g FW)
CONTROL①	10.2	1.0
CONTROL②	26.3	16.5
TREATMENT	4.7	10.0

目目1

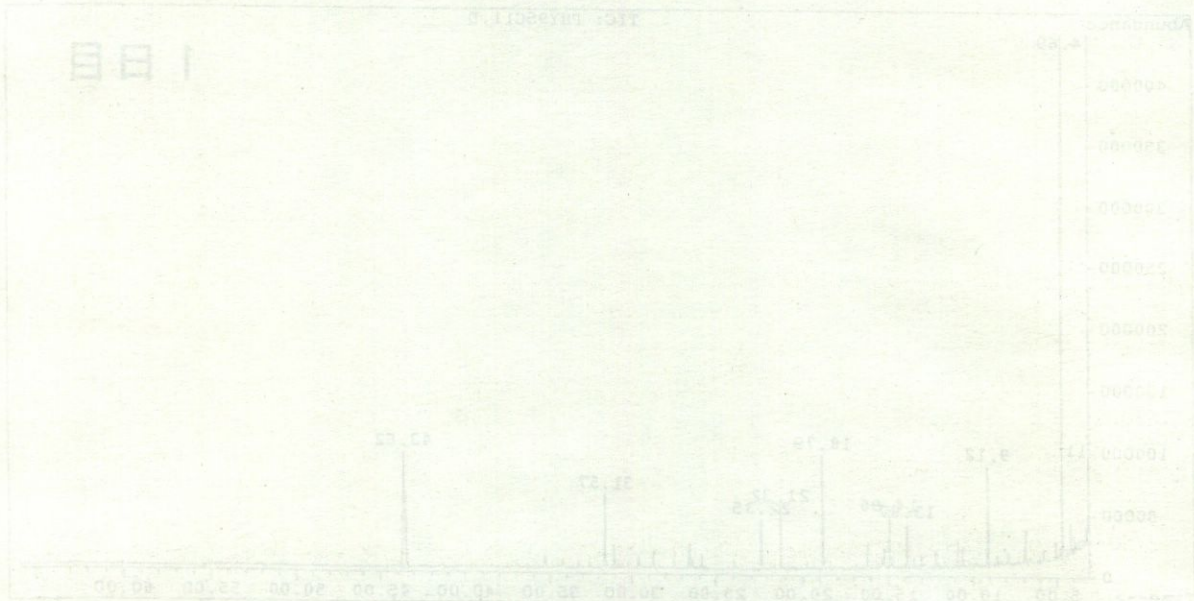
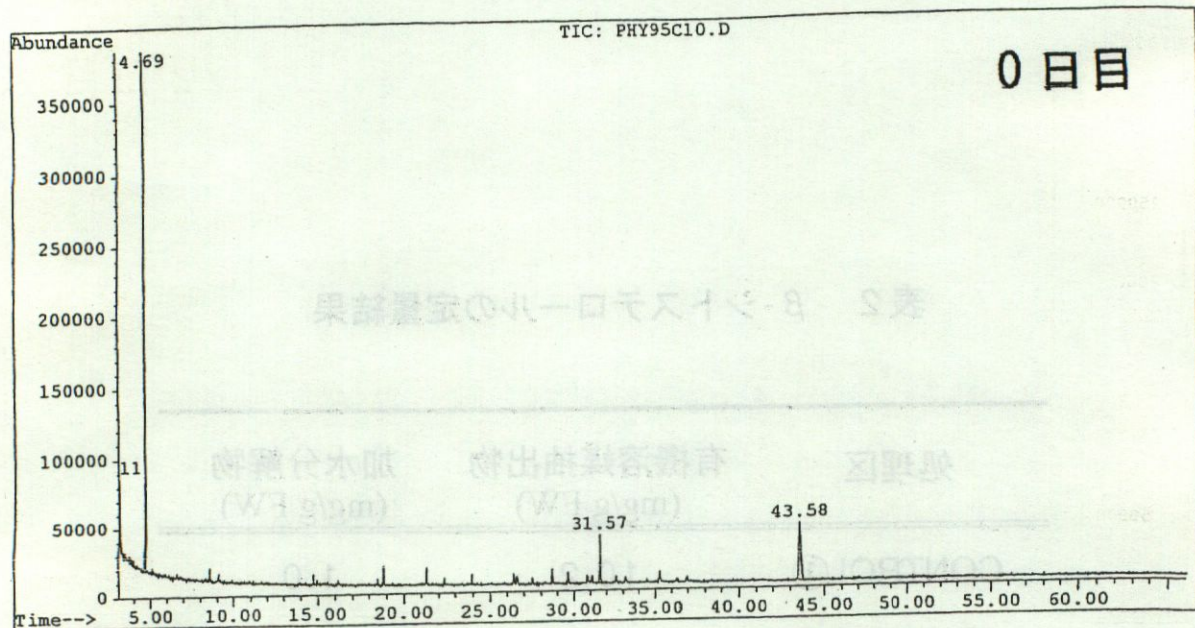


図4 CONTROL①抽出物(目目1)のTMS化合物のGC-MS分析におけるTIC

File : C:\HPCHEM\1\DATA\2000\SYSEQ1\PHY95C10.D
 Operator : S. Yokota
 Acquired : 16 Jan 101 8:54 pm using AcqMethod SHIN-P1
 Instrument : 5971 - In
 Sample Name: controll, day 0
 Misc Info : 1.0mg/1.5mL, 1mic.L injected
 Vial Number: 3



File : C:\HPCHEM\1\DATA\2000\SYSEQ1\PHY95C11.D
 Operator : S. Yokota
 Acquired : 16 Jan 101 11:14 pm using AcqMethod SHIN-P1
 Instrument : 5971 - In
 Sample Name: controll, day 1
 Misc Info : 1.1mg/1.5mL, 1mic.L injected
 Vial Number: 5

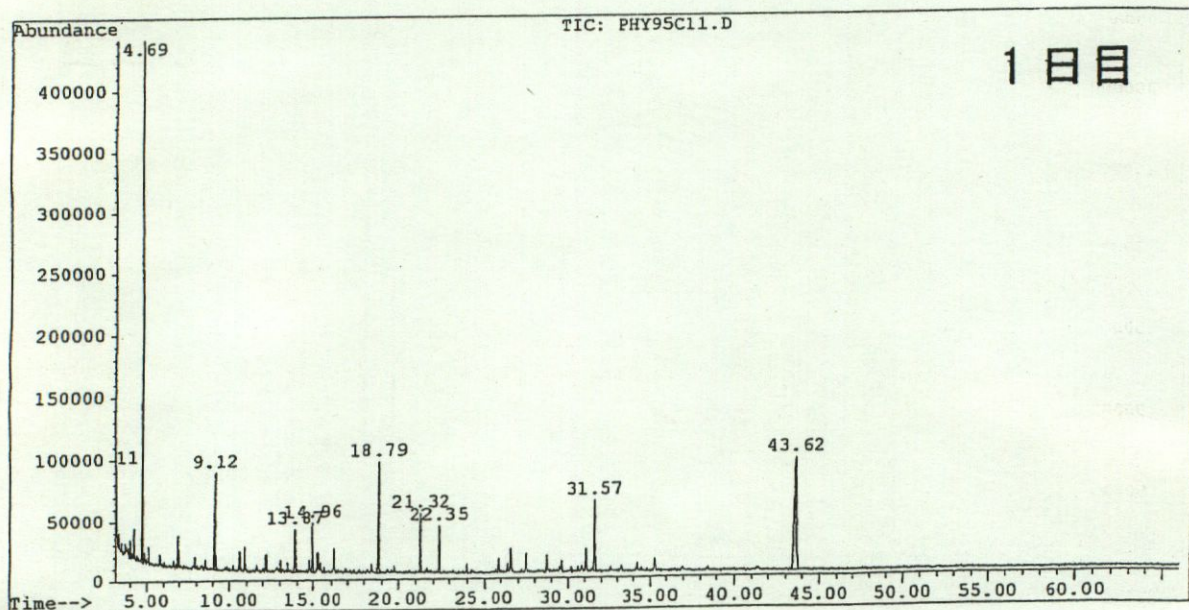
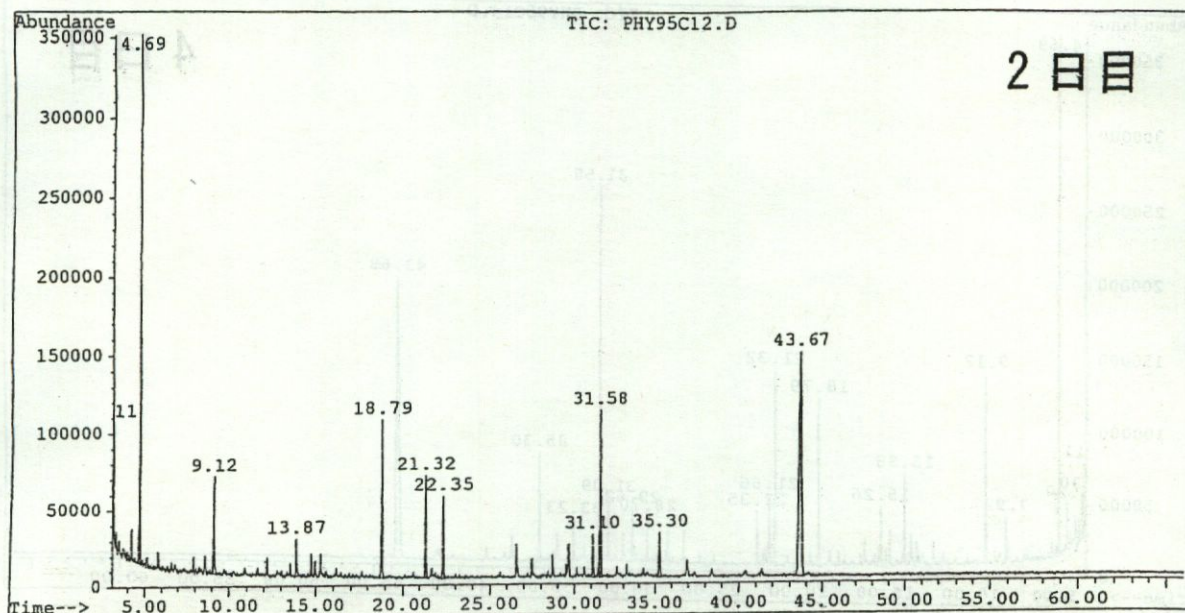


図 4 CONTROL①抽出物 (0 及び 1 日目) の TMS 化物の GC-MS 分析における TIC

File : C:\HPCHEM\1\DATA\2000\SYSEQ1\PHY95C12.D
 Operator : S. Yokota
 Acquired : 17 Jan 101 1:34 am using AcqMethod SHIN-P1
 Instrument : 5971 - In
 Sample Name: control1, day 2
 Misc Info : 1.0mg/1.5mL, 1mic.L injected
 Vial Number: 7



File : C:\HPCHEM\1\DATA\2000\SYSEQ1\PHY95C13.D
 Operator : S. Yokota
 Acquired : 17 Jan 101 3:53 am using AcqMethod SHIN-P1
 Instrument : 5971 - In
 Sample Name: control1, day 3
 Misc Info : 1.1mg/1.5mL, 1mic.L injected
 Vial Number: 9

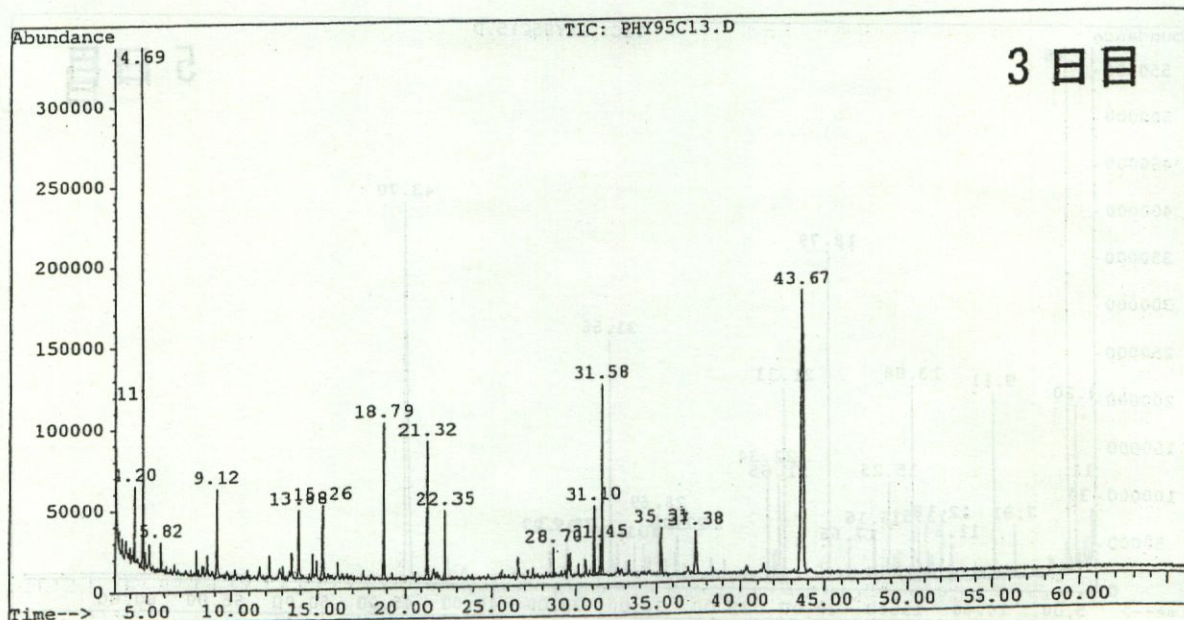
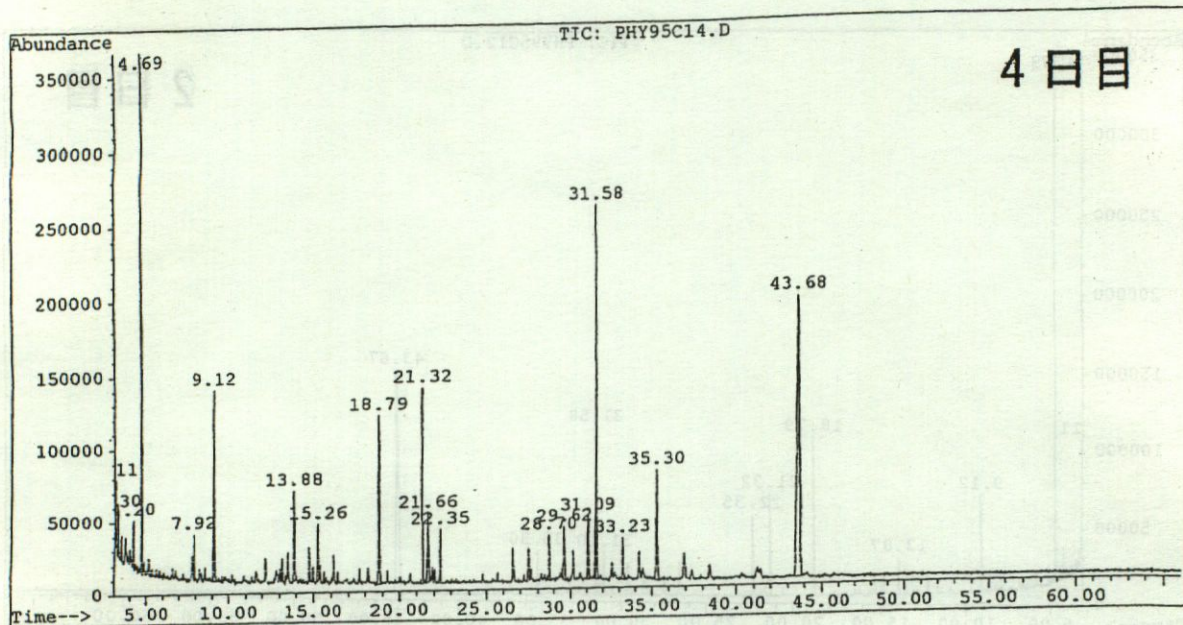


図5 CONTROL①抽出物 (2及び3日目) の TMS 化物の GC-MS 分析における TIC

File : C:\HPCHEM\1\DATA\2000\SYSEQ1\PHY95C14.D
 Operator : S. Yokota
 Acquired : 17 Jan 101 6:13 am using AcqMethod SHIN-P1
 Instrument : 5971 - In
 Sample Name: controll, day 4
 Misc Info : 0.9mg/1.5mL, 1mic.L injected
 Vial Number: 11



File : C:\HPCHEM\1\DATA\2000\SYSEQ1\PHY95C15.D
 Operator : S. Yokota
 Acquired : 17 Jan 101 8:33 am using AcqMethod SHIN-P1
 Instrument : 5971 - In
 Sample Name: controll, day 5
 Misc Info : 1.1mg/1.5mL, 1mic.L injected
 Vial Number: 13

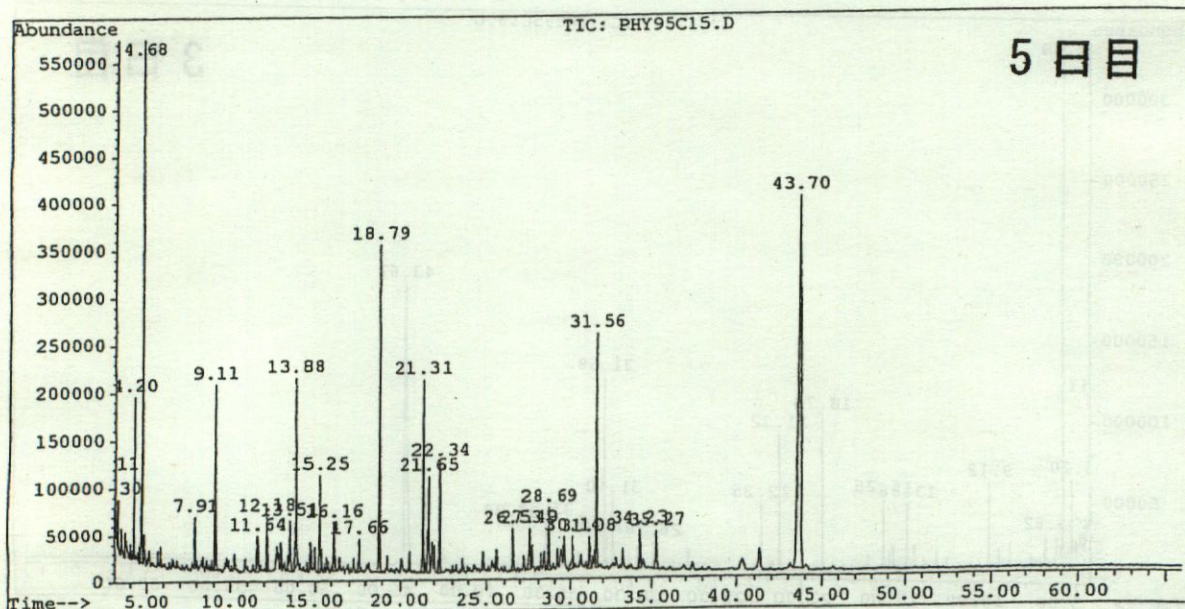
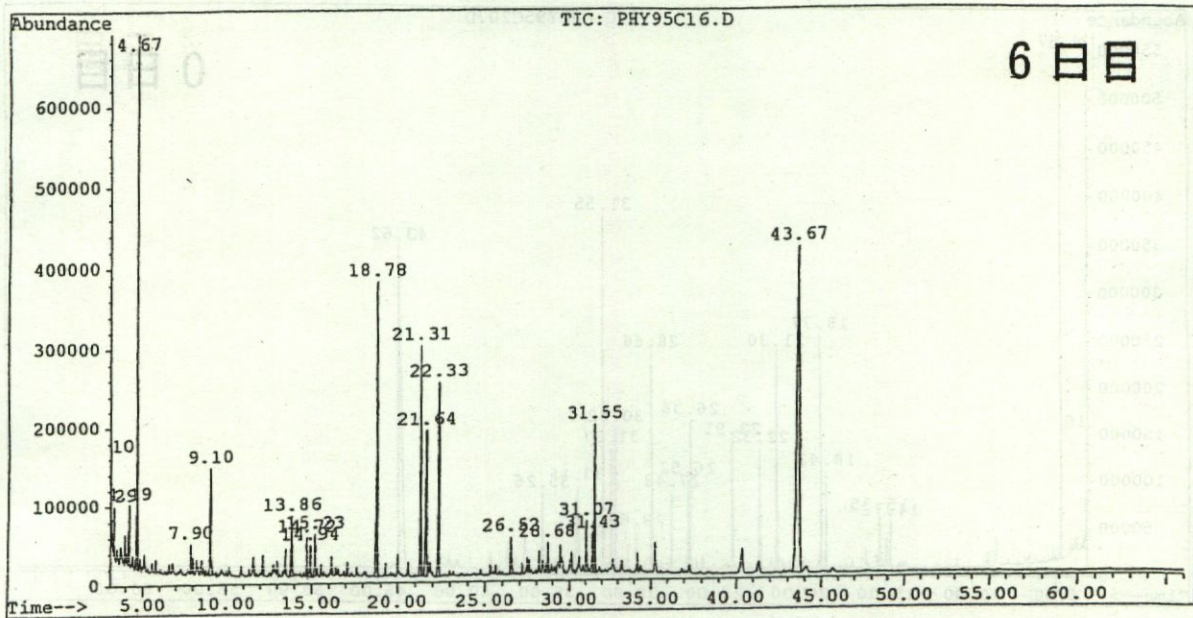


図 6 CONTROL①抽出物 (4 及び 5 日目) の TMS 化物の GC-MS 分析における TIC

File : C:\HPCHEM\1\DATA\2000\SYSEQ1\PHY95C16.D
 Operator : S. Yokota
 Acquired : 17 Jan 101 10:53 am using AcqMethod SHIN-P1
 Instrument : 5971 - In
 Sample Name: control1, day 6
 Misc Info : 1.1mg/1.5mL, lmic.L injected
 Vial Number: 15



File : C:\HPCHEM\1\DATA\2000\SYSEQ1\PHY95C17.D
 Operator : S. Yokota
 Acquired : 17 Jan 101 1:13 pm using AcqMethod SHIN-P1
 Instrument : 5971 - In
 Sample Name: control1, day 7
 Misc Info : 1.0mg/1.5mL, lmic.L injected
 Vial Number: 17

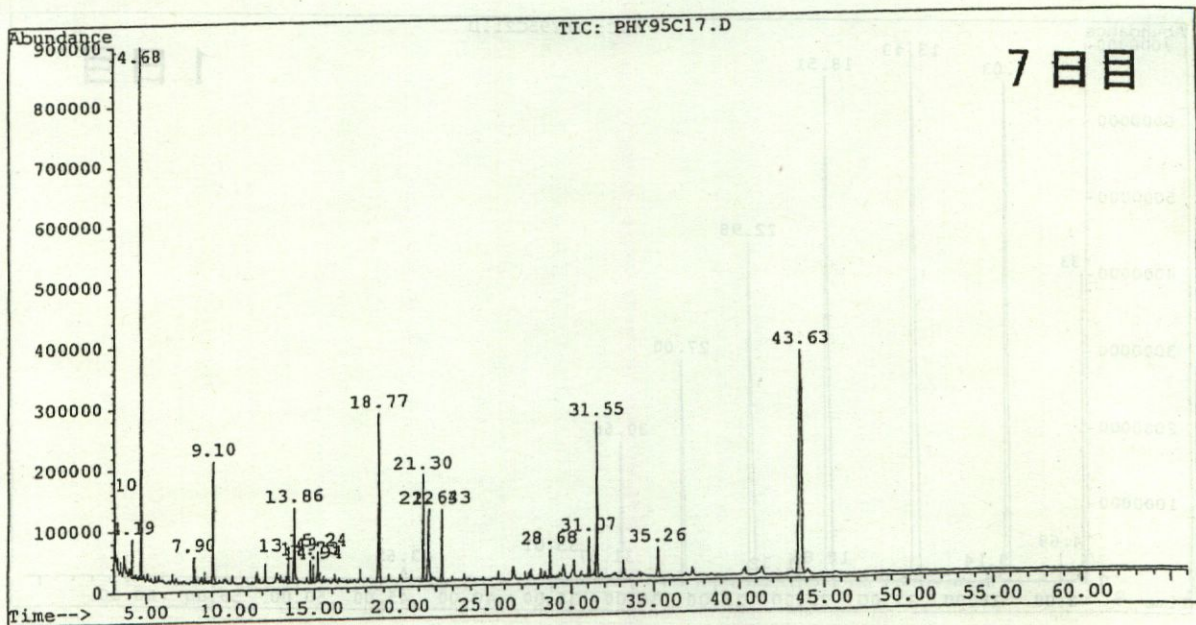
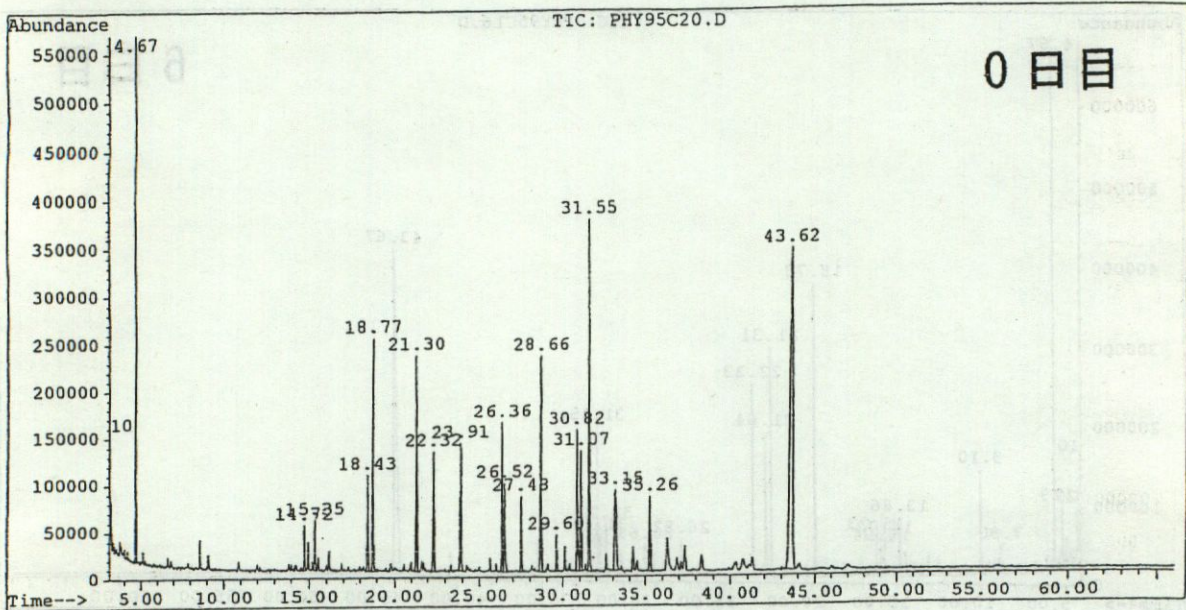


図7 CONTROL①抽出物 (6及び7日目) の
 TMS化物の GC-MS 分析における TIC

File : C:\HPCHEM\1\DATA\2000\SYSEQ1\PHY95C20.D
 Operator : S. Yokota
 Acquired : 17 Jan 101 3:33 pm using AcqMethod SHIN-P1
 Instrument : 5971 - In
 Sample Name: control2, day 0
 Misc Info : 1.0mg/1.5mL, 1mic.L injected
 Vial Number: 19



File : C:\HPCHEM\1\DATA\2000\SYSEQ0\PHY95C21.D
 Operator : S. Yokota
 Acquired : 18 Jan 101 3:10 pm using AcqMethod SHIN-P1
 Instrument : 5971 - In
 Sample Name: control2, day 1
 Misc Info : 1.1mg/1.5mL, 1mic.L injected
 Vial Number: 3

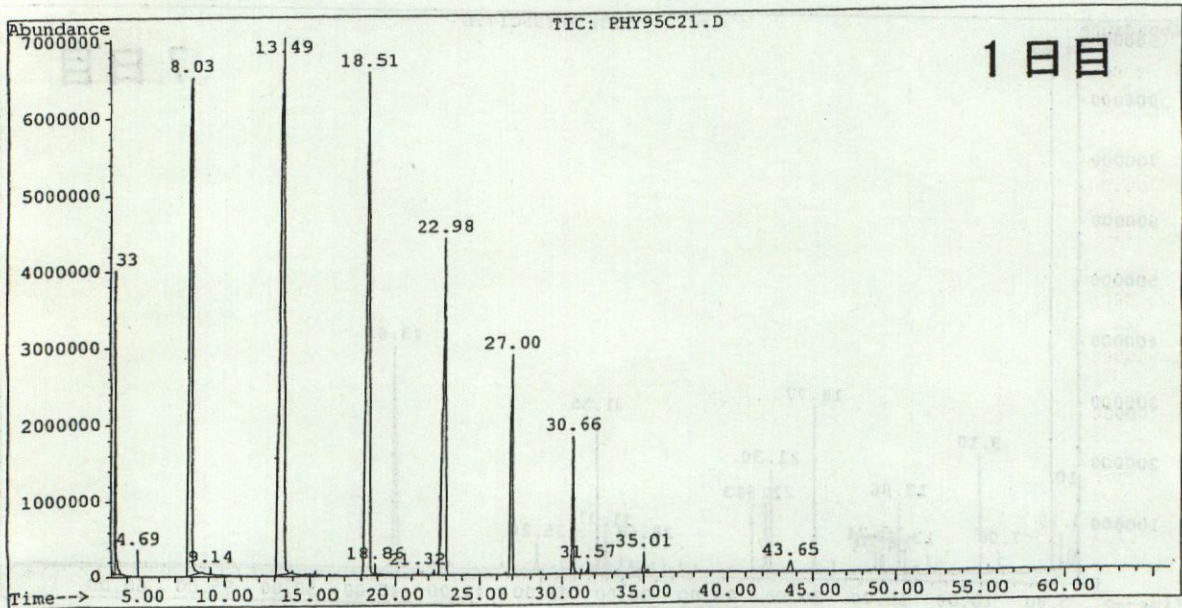
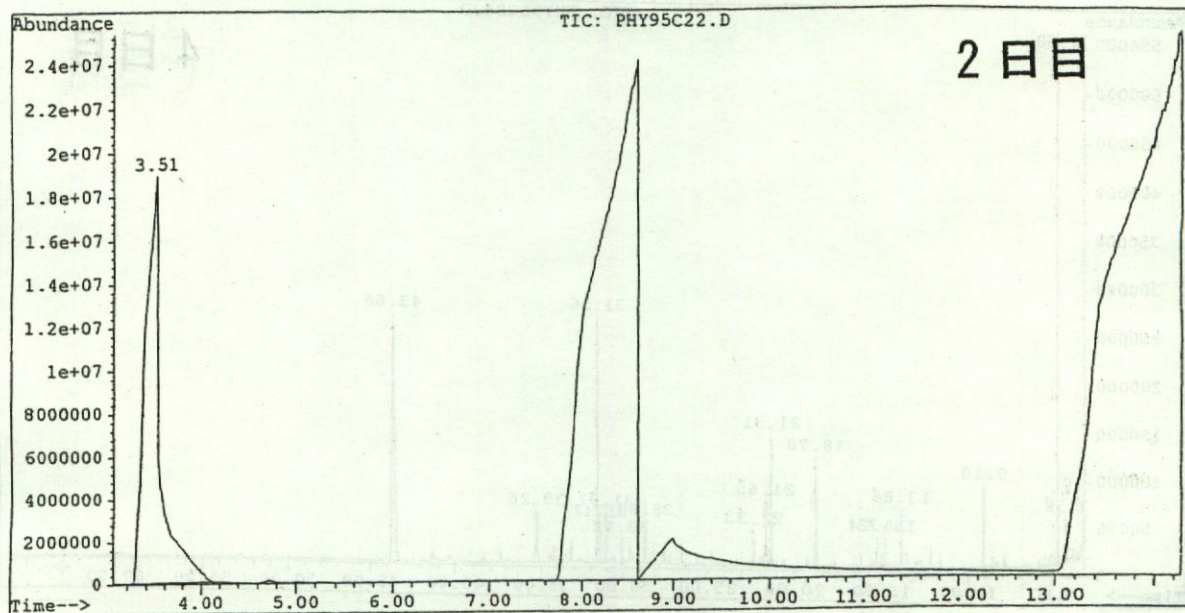


図 8 CONTROL②抽出物 (0 及び 1 日目) の TMS 化物の GC-MS 分析における TIC

File : C:\HPCHEM\1\DATA\2000\SYSEQ1\PHY95C22.D
 Operator : S. Yokota
 Acquired : 17 Jan 101 8:13 pm using AcqMethod SHIN-P1
 Instrument : 5971 - In
 Sample Name: control2, day 2
 Misc Info : 1.1mg/1.5mL, 1mic.L injected
 Vial Number: 23



File : C:\HPCHEM\1\DATA\2000\SYSEQ0\PHY95C23.D
 Operator : S. Yokota
 Acquired : 18 Jan 101 10:50 pm using AcqMethod SHIN-P1
 Instrument : 5971 - In
 Sample Name: control2, day 3
 Misc Info : 1.1mg/1.5mL, 1mic.L injected
 Vial Number: 7

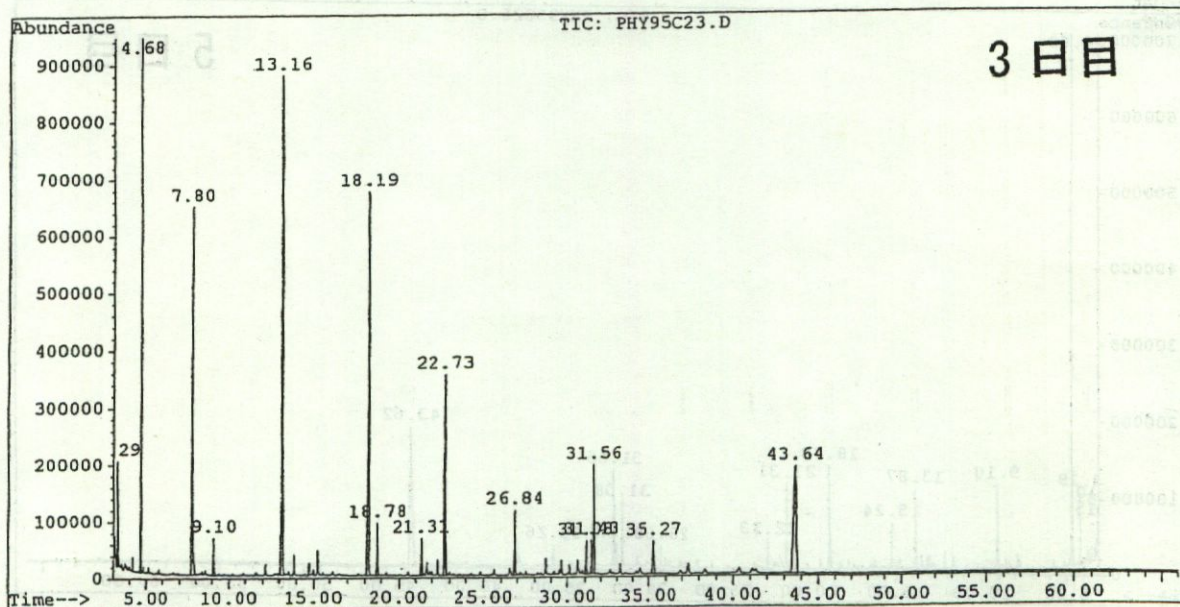
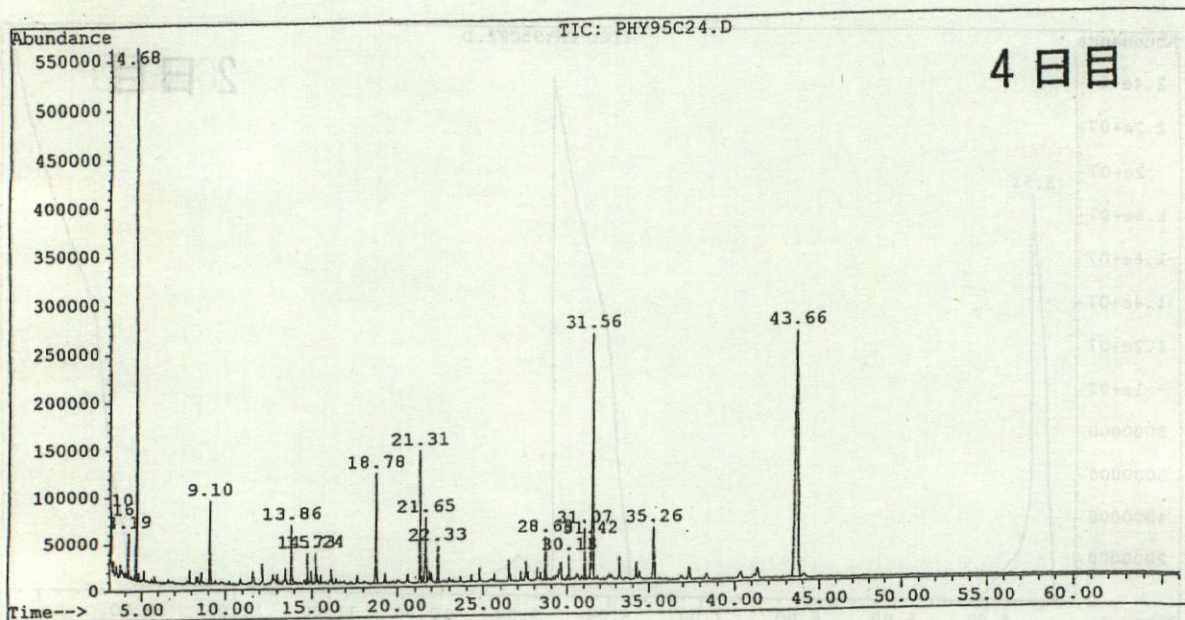


図9 CONTROL②抽出物 (2及び3日目) の TMS 化物の GC-MS 分析における TIC

File : C:\HPCHEM\1\DATA\2000\SYSEQ0\PHY95C24.D
 Operator : S. Yokota
 Acquired : 19 Jan 10 1:10 am using AcqMethod SHIN-P1
 Instrument : 5971 - In
 Sample Name: control2, day 4
 Misc Info : 1.0mg/1.5mL, 1mic.L injected
 Vial Number: 9



File : C:\HPCHEM\1\DATA\2000\SYSEQ0\PHY95C25.D
 Operator : S. Yokota
 Acquired : 19 Jan 10 3:30 am using AcqMethod SHIN-P1
 Instrument : 5971 - In
 Sample Name: control2, day 5
 Misc Info : 1.0mg/1.5mL, 1mic.L injected
 Vial Number: 11

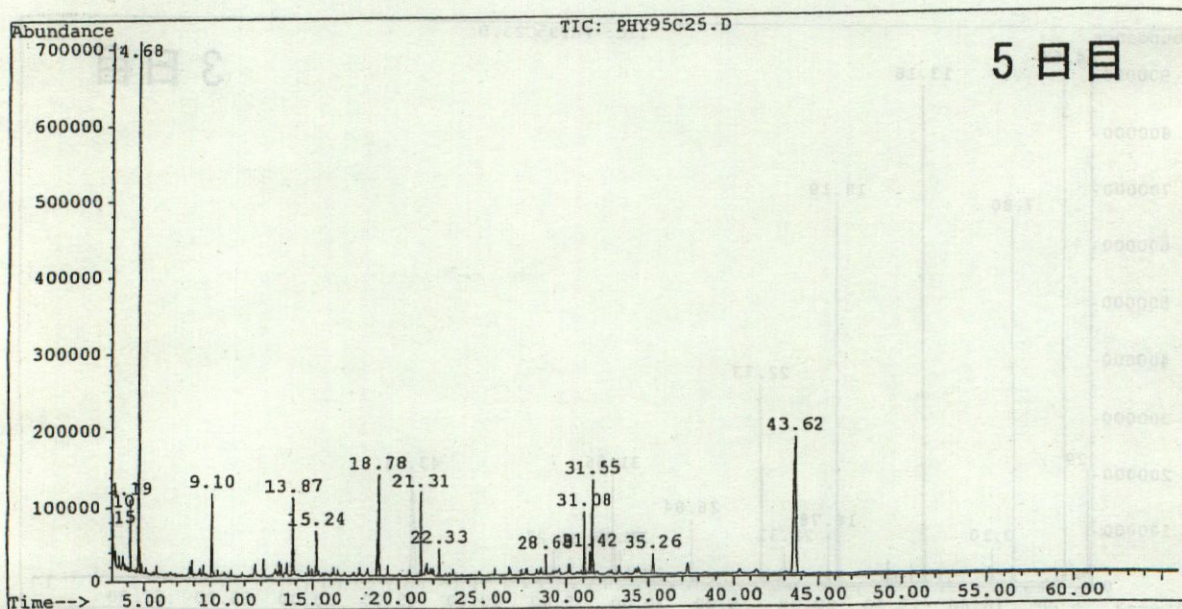
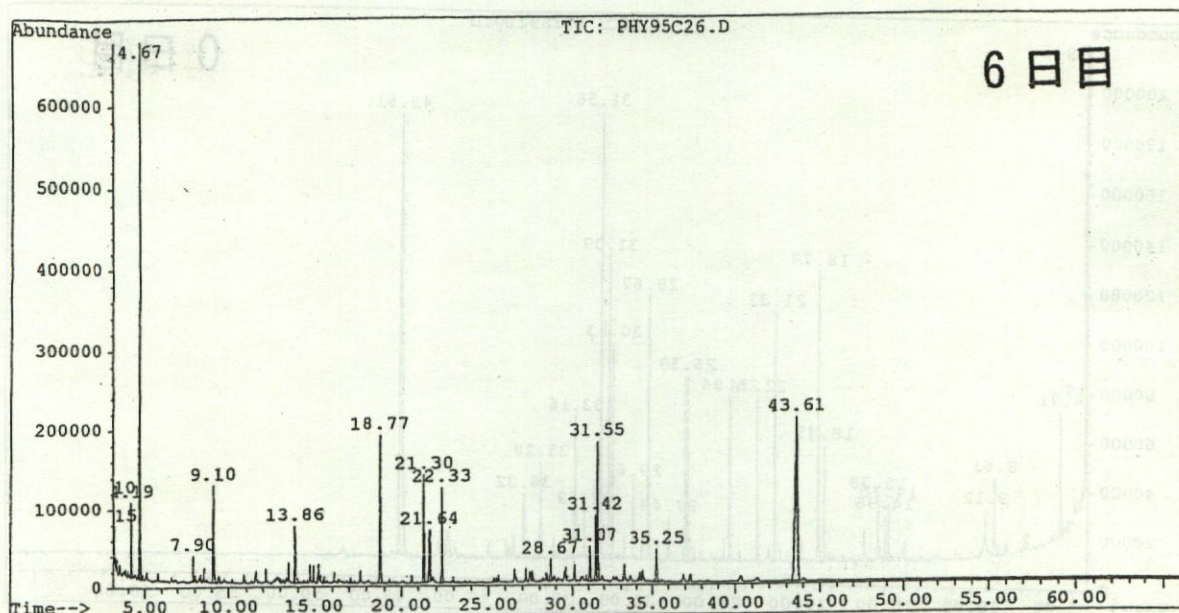


図 10 CONTROL②抽出物 (4 及び 5 日目) の TMS 化物の GC-MS 分析における TIC

File : C:\HPCHEM\1\DATA\2000\SYSEQ0\PHY95C26.D
 Operator : S. Yokota
 Acquired : 19 Jan 101 5:50 am using AcqMethod SHIN-P1
 Instrument : 5971 - In
 Sample Name: control2, day 6
 Misc Info : 1.0mg/1.5mL, 1mic.L injected
 Vial Number: 13



File : C:\HPCHEM\1\DATA\2000\SYSEQ0\PHY95C27.D
 Operator : S. Yokota
 Acquired : 19 Jan 101 8:10 am using AcqMethod SHIN-P1
 Instrument : 5971 - In
 Sample Name: control2, day 7
 Misc Info : 1.1mg/1.5mL, 1mic.L injected
 Vial Number: 15

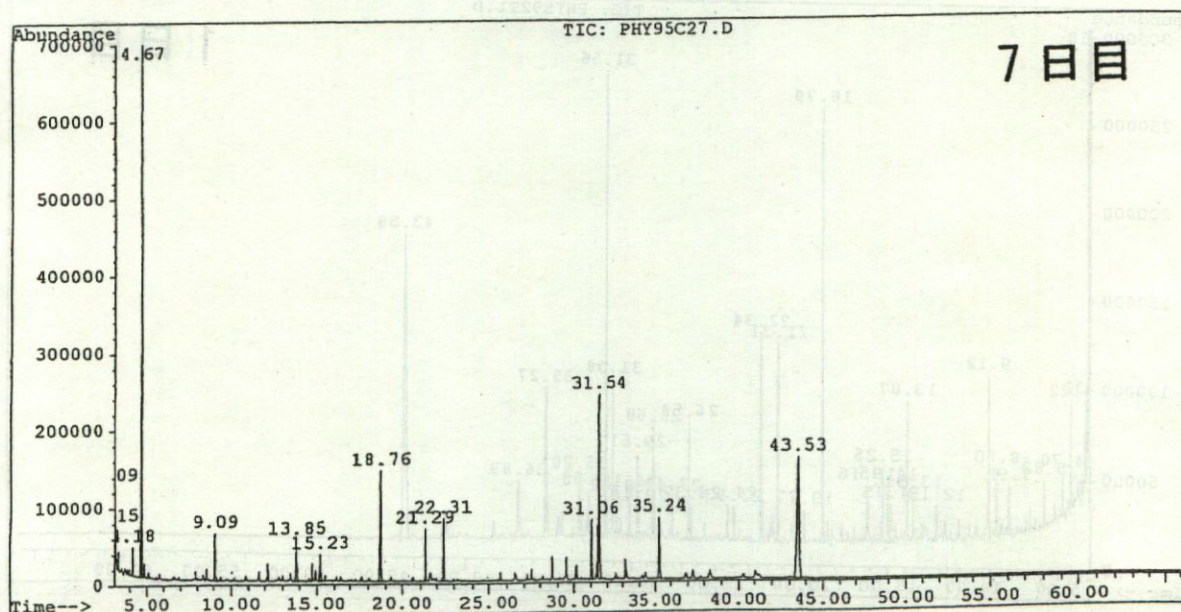
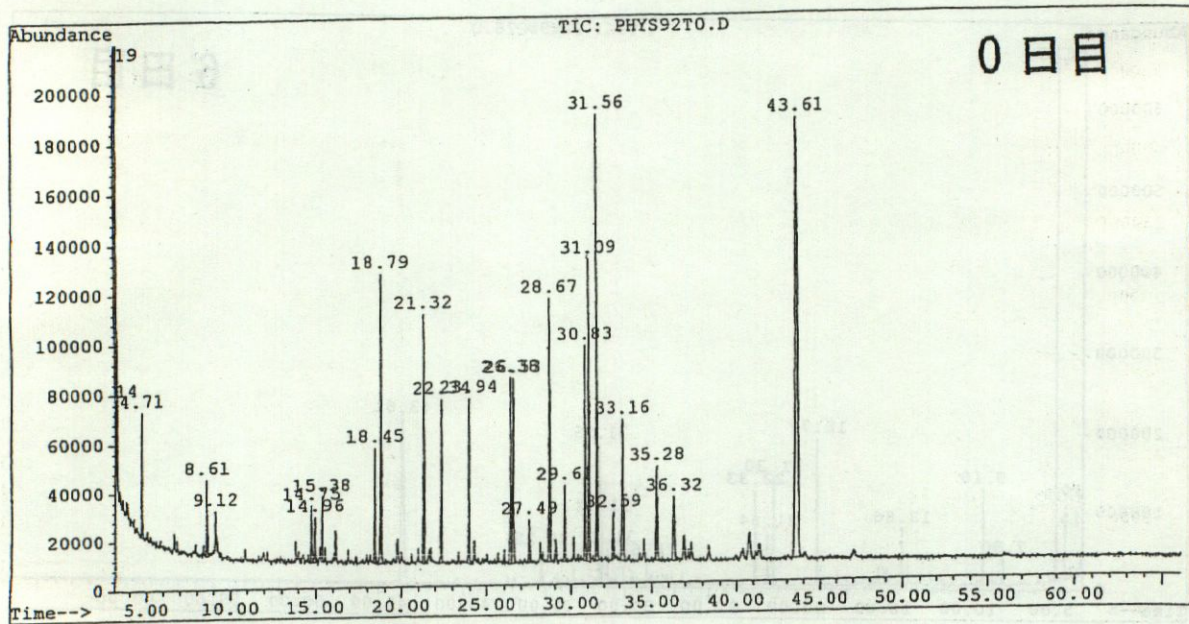


図 11 CONTROL②抽出物 (6 及び 7 日目) の TMS 化物の GC-MS 分析における TIC

File : C:\HPCHEM\1\DATA\2000\PHYS92T0.D
 Operator : S. Yokota
 Acquired : 26 Dec 100 6:21 pm using AcqMethod SHIN-P1
 Instrument : 5971 - In
 Sample Name: treatment, day 0
 Misc Info : 1.03mg/1.5mL, 1mic.L injected
 Vial Number: 3.



File : C:\HPCHEM\1\DATA\2000\PHYS92T1.D
 Operator : S. Yokota
 Acquired : 26 Dec 100 8:41 pm using AcqMethod SHIN-P1
 Instrument : 5971 - In
 Sample Name: treatment, day 1
 Misc Info : 1.05mg/1.5mL, 1mic.L injected
 Vial Number: 5

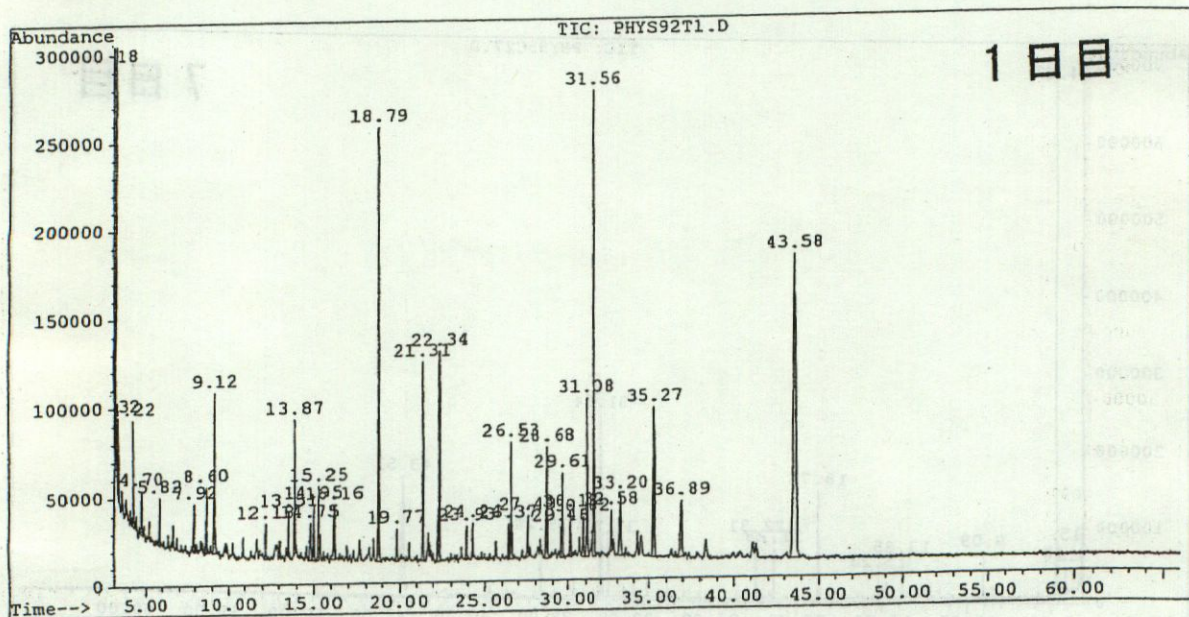
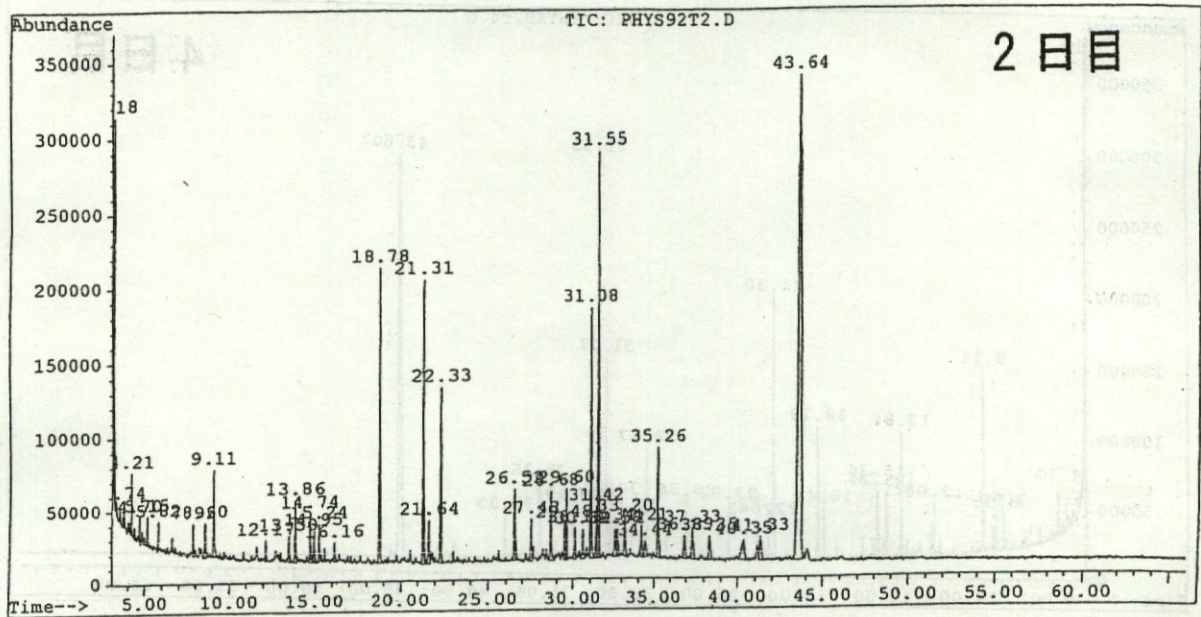


図 12 TREATMENT 抽出物 (0 及び 1 日目) の TMS 化物の GC-MS 分析における TIC

File : C:\HPCHEM\1\DATA\2000\PHYS92T2.D
 Operator : S. Yokota
 Acquired : 26 Dec 100 11:01 pm using AcqMethod SHIN-P1
 Instrument : 5971 - In
 Sample Name: treatment, day 2
 Misc Info : 1.04mg/1.5mL, 1mic.L injected
 Vial Number: 7



File : C:\HPCHEM\1\DATA\2000\PHYS92T3.D
 Operator : S. Yokota
 Acquired : 27 Dec 100 1:21 am using AcqMethod SHIN-P1
 Instrument : 5971 - In
 Sample Name: treatment, day 3
 Misc Info : 1.03mg/1.5mL, 1mic.L injected
 Vial Number: 9

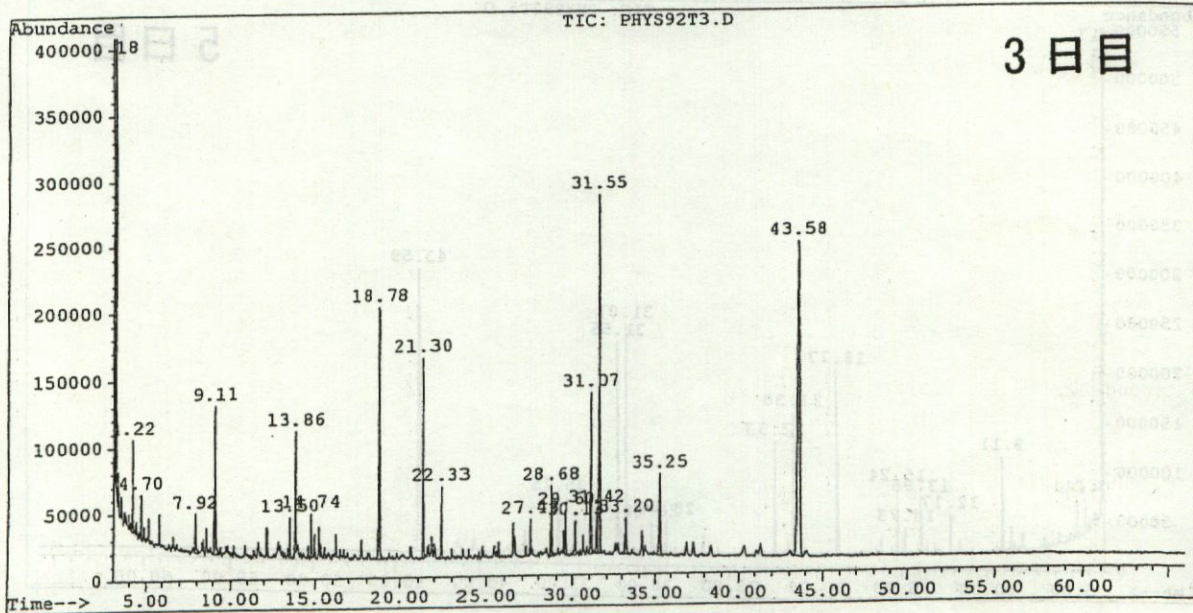
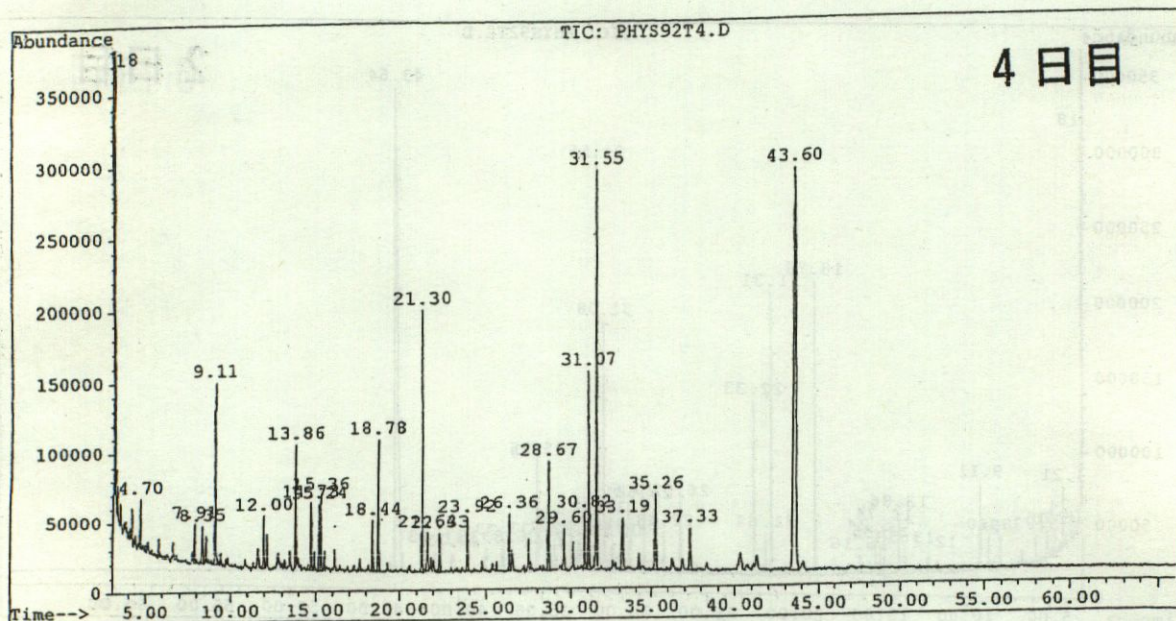


図 13 TREATMENT 抽出物 (2 及び 3 日目) の TMS 化物の GC-MS 分析における TIC

File : C:\HPCHEM\1\DATA\2000\PHYS92T4.D
 Operator : S. Yokota
 Acquired : 27 Dec 100 3:41 am using AcqMethod SHIN-P1
 Instrument : 5971 - In
 Sample Name: treatment, day 4
 Misc Info : 1.04mg/1.5mL, 1mic.L injected
 Vial Number: 11



File : C:\HPCHEM\1\DATA\2000\PHYS92T5.D
 Operator : S. Yokota
 Acquired : 27 Dec 100 6:01 am using AcqMethod SHIN-P1
 Instrument : 5971 - In
 Sample Name: treatment, day 5
 Misc Info : 1.07mg/1.5mL, 1mic.L injected
 Vial Number: 13

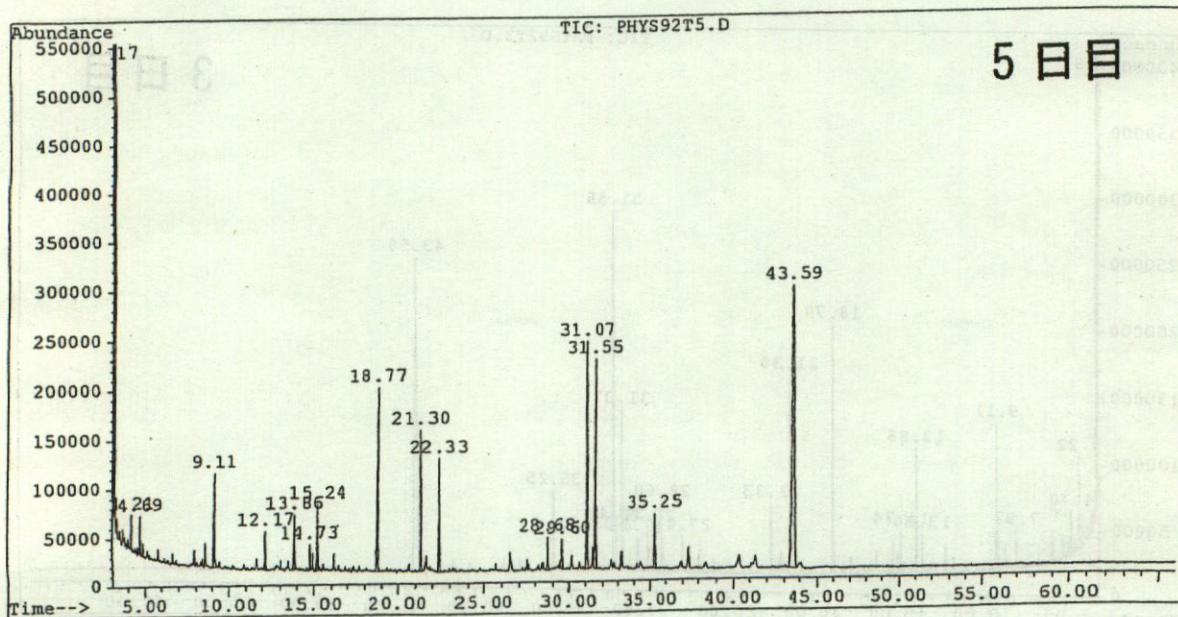
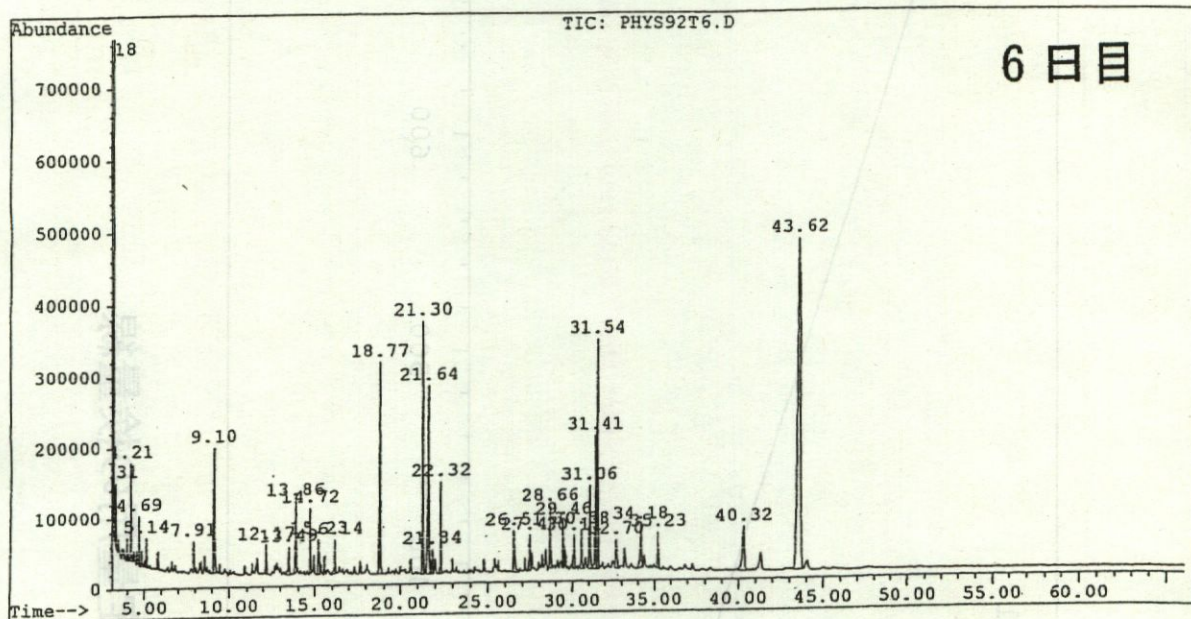


図 14 TREATMENT 抽出物 (4 及び 5 日目) の TMS 化物の GC-MS 分析における TIC

File : C:\HPCHEM\1\DATA\2000\PHYS92T6.D
 Operator : S. Yokota
 Acquired : 27 Dec 100 8:21 am using AcqMethod SHIN-P1
 Instrument : 5971 - In
 Sample Name: treatment, day 6
 Misc Info : 1.02mg/1.5mL, 1mic.L injected
 Vial Number: 15



File : C:\HPCHEM\1\DATA\2000\PHYS92T7.D
 Operator : S. Yokota
 Acquired : 27 Dec 100 10:41 am using AcqMethod SHIN-P1
 Instrument : 5971 - In
 Sample Name: treatment, day 7
 Misc Info : 1.08mg/1.5mL, 1mic.L injected
 Vial Number: 17

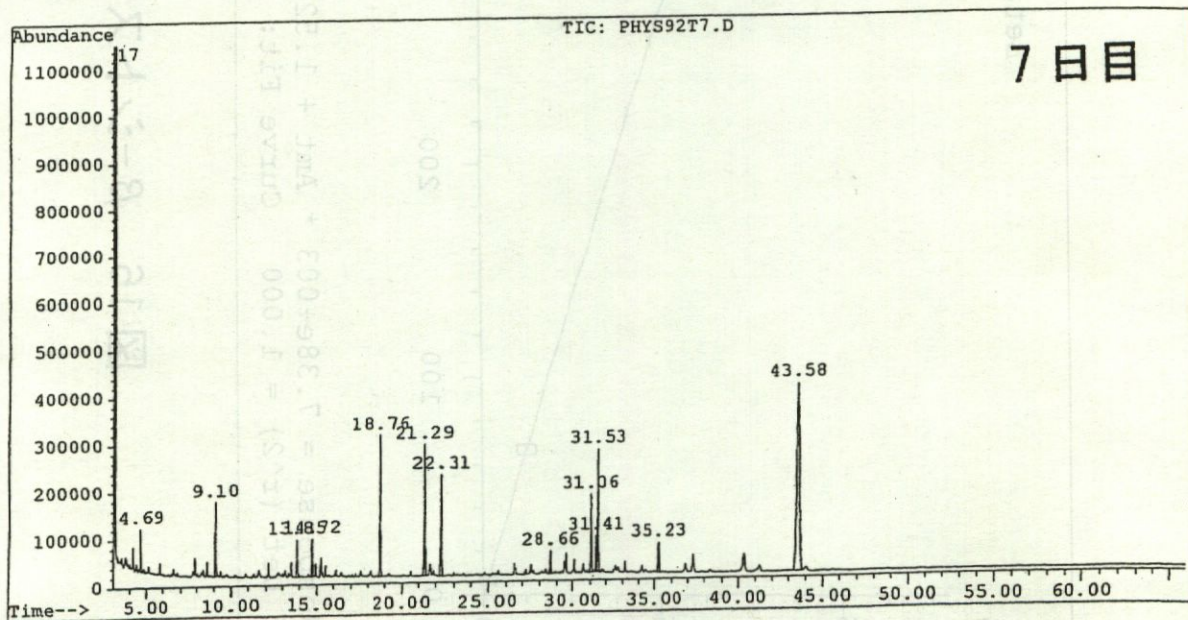


図 15 TREATMENT 抽出物 (6 及び 7 日目) の TMS 化物の GC-MS 分析における TIC

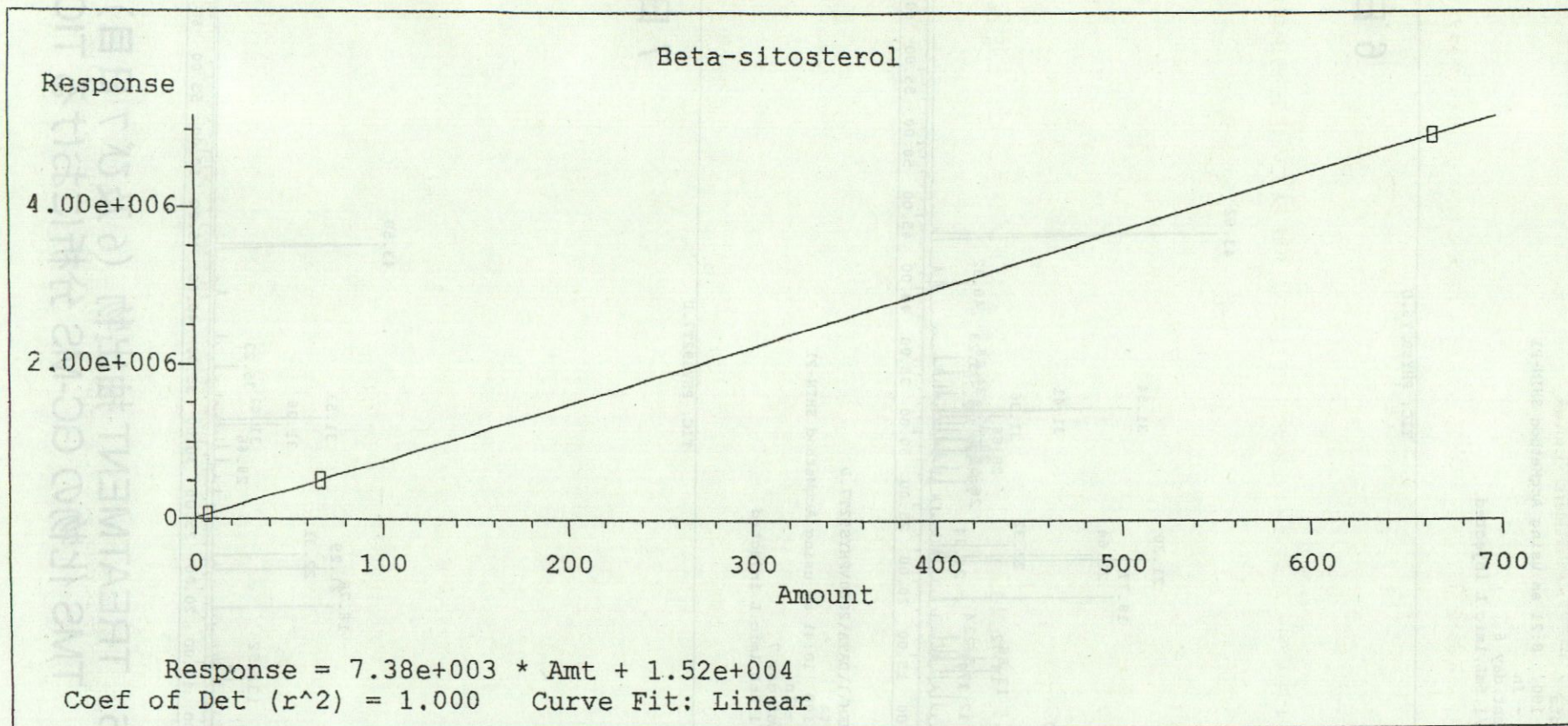


図 16 β -シトステロール定量用の検量線

第3章 β -シトステロールの抗菌活性試験

3-1 緒言

植物には、生体防御機構である免疫系（抗原・抗体反応）が認められないことから、これに代わる病原体の侵入或いは傷害時に生ずる防御物質ファイトアレキシンが脚光を浴び、様々な化合物が見出されて来た（市原と上野 1997）。ファイトアレキシンは、1940年に定義されて以来、今日まで300以上の化合物が単離・同定されて来た（Smith 1996）。一方、ファイトアレキシンが菌の感染後 *de novo* 生合成される化合物と定義されるのに対し、その定義には含まれない抗菌性化合物も存在する。それは、菌の感染以前より植物体の構成成分として含まれる化合物であり、更に、植物体の構成成分から簡単な生化学的反応を経て生合成される抗菌性化合物である。それらは、Van Etten ら(1994)によってファイトアンチシピンと定義されている。

シラカンバ幼植物体には、 β -シトステロールが含まれていることが分かっている（阿部 1999）。この化合物は、生理活性の高いトリテルペン類に分類され、シラカンバ幼植物体内におけるファイトアンチシピンとして作用している可能性がある（長谷川 1999、紅屋 2000、粕川 2001）。その推定に基づいて、本章では β -シトステロールの抗菌活性の有無について、寒天培地及び液体培地を用いて検討した。

3-2 実験方法

3-2-1 供試菌

PDA 培地で継代培養したカバノアナタケ IO-U1 株及び IO-B2 株を用いた。

3-2-2 液体培地を用いた抗菌活性試験

PDA (Difco Laboratories, Detroit, Michigan, U.S.A.) 液体培地 495 μ L の入った 24 穴プラスチックシャーレ (3047, Falcon, New Jersey, U.S.A.) に、ジクロロメタンに溶解した β -シトステロール溶液 5 μ L 及び滅菌蒸留水中に懸濁した菌糸懸濁液 (IO-U1 株又は IO-B2 株) を 100 μ L 注入し、25 $^{\circ}$ C の暗所下で培養しながら倒立顕微鏡 (IX 70, オリンパス) 下で菌糸伸長を観察した。観察は、初日は 2 時間毎、その後 1 週間は、24 時間毎に写真を撮りながら行った。注入した β -シトステロールの濃度は 0.1, 1, 10,

50, 100, 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の 6 種類に調整した。尚、対照として、 β -シトステロール及びジクロロメタンを含まない処理区 (CONTROL 1)、及びジクロロメタンを含む処理区 (CONTROL 2)を設定した。

3-2-3 寒天培地を用いた抗菌活性試験

予め PDA 培地で前培養したカバノアナタケ (IO-U1 株又は IO-B2 株) の菌糸体をコルクボーラー (直径 6mm) でディスク状に割り貫き、これを別の PDA 培地の入ったシャーレ (直径 9cm) の中央に置いた。次に、菌糸体ディスクより 2.5cm 離れた縦・横 4 箇所に通紙 (直径 6mm) を置き、この上に同一濃度の β -シトステロールのジクロロメタン溶液 2 μL を滴下し、シャーレをパラフィルム M (PM996, American National Can_{TM}, Greenwich, Conn., U.S.A.) で密閉した (図 17)。その後、25 $^{\circ}\text{C}$ の暗所下で培養しながら菌糸伸長を観察した。通紙へ滴下した β -シトステロールの濃度は、1, 10, 100, 1000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の 4 種類に調整した。尚、対照として、 β -シトステロールを含まない処理区を設定した。

3-3 結果と考察

3-3-1 液体培地を用いた抗菌活性試験

菌接種後 1 週間、写真を撮影しながら観察を続けたが、菌糸の成長に殆ど変化は見られなかった (図 18, 19)。その後、どの処理区においても正常な菌糸の成長が観察された。これは、PDA 液体培地に比べてジクロロメタンの比重が重く、ジクロロメタンに溶解した β -シトステロールがシャーレの底に付着して培地内に分散しなかったため、その阻害を受けずに菌糸が成長したせいだと考えられる。

3-3-2 寒天培地を用いた抗菌活性試験

β -シトステロール溶液を含む通紙付近において、どのような菌糸の成長が見られるか観察した。培養中の各処理区における様子を図 20, 21 に示す。菌糸の伸長には、変化を見せずに通紙上を伸長して行く場合と、通紙の両側へ回り込んで通紙を避けるように伸長して行く場合が見られ、後者の場合、 β -シトステロールが抗菌活性を示したと判断した。抗菌活性試験の結果を表 3 に示す。試験の結果、 β -シトステロール溶液の濃度が 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の場合において、最も顕著な抗菌活性を示し

た。しかし、溶液濃度が 1,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の場合では、若干抗菌活性が減少したように観察された。また、IO-U1 株の対照区において若干の抗菌活性が見られた。

今回の抗菌活性試験において、 β -シトステロール溶液の濃度が 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ の処理区において、両菌株に対して最も顕著な抗菌活性が見られた (表 3)。抗菌性化合物がその活性を示す場合、その濃度が 10~500 $\mu\text{g}/\text{mL}$ という例が多く (森ら 2000、Mace *et al.* 1985、野中ら 1982、Takasugi *et al.* 1978)、今回の結果も同様な傾向を示していると考えられる。しかし、1,000 $\mu\text{g}/\text{mL}$ と高濃度の場合、抗菌活性が減少したように見られた。従って、 β -シトステロールが植物体内でファイトアンチシピンとして作用する場合、濃度が高すぎると効果が下がる可能性も考えられる。また、IO-U1 株の対照区 (β -シトステロールを含まない) において、若干抗菌活性を示したような現象が見られたことなど、 β -シトステロールの抗菌活性については未だ不明な点があり、他の試験方法を行うなど、今後の検討が必要である。

果たして β -シトステロールは、シラカンバにおいてファイトアンチシピンとしての機能をもつのであろうか。高杉ら (1979) によれば、クワ (*Morus bombycis*) の枝表面は多年に亘り多くの病原菌に接触するが、無傷の場合には殆ど感染しない。そこで彼らは、枝表皮の先在抗菌成分として数種の抗菌性フラボン albanin A~H を単離した。植物成分として普通に分布するそれらのフラボンとは対照的に、天然物としては珍しい 2-アリールベンゾフラン骨格を持つ化合物、moracin A~Z も同じクワのファイトアレキシンとして単離されていることから、彼らは正常二次代謝産物合成経路のちょっとした変更が、希なタイプのファイトアレキシンを生み出すのではないかと考えた (高杉ら 1997)。シラカンバの場合も同様に、実験林における調査結果 (山口 1989) によれば、無傷でカバノアナタケに感染している例は殆どない。また、 β -シトステロールは、植物界に最も普遍的に存在するステロールであり、更に樹皮中にも存在する (Bhatt & Agrawal 1973, Sainsbury & Webb 1972, Dhingra *et al.* 1971)。これらの事例及びシラカンバの特徴を考慮すると、 β -シトステロールがクワにおけるフラボンと同様に、表皮における先在抗菌成分として生合成され、菌の感染を受けて生合成経路が変更され、何らかの希な構造を持つ抗菌性化合物へと変換されている可能性も考えられる。

表3 β -シトステロールの抗菌活性試験結果

β -シトステロール 濃度 ($\mu\text{g}/\text{mL}$)	菌 株	
	IO-U1	IO-B2
0	+	-
1	-	-
10	+	+
100	+++	++
1,000	+	+

- : 抗菌活性なし
- + : 抗菌活性 小
- ++ : 抗菌活性 中
- +++ : 抗菌活性 大

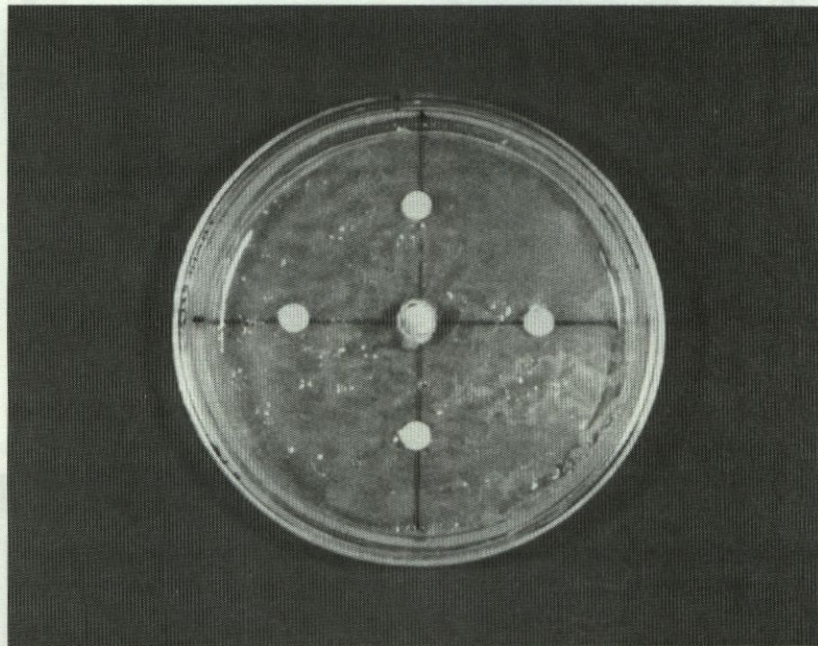


図17 寒天培地を用いた抗菌活性試験
(試験開始直後)

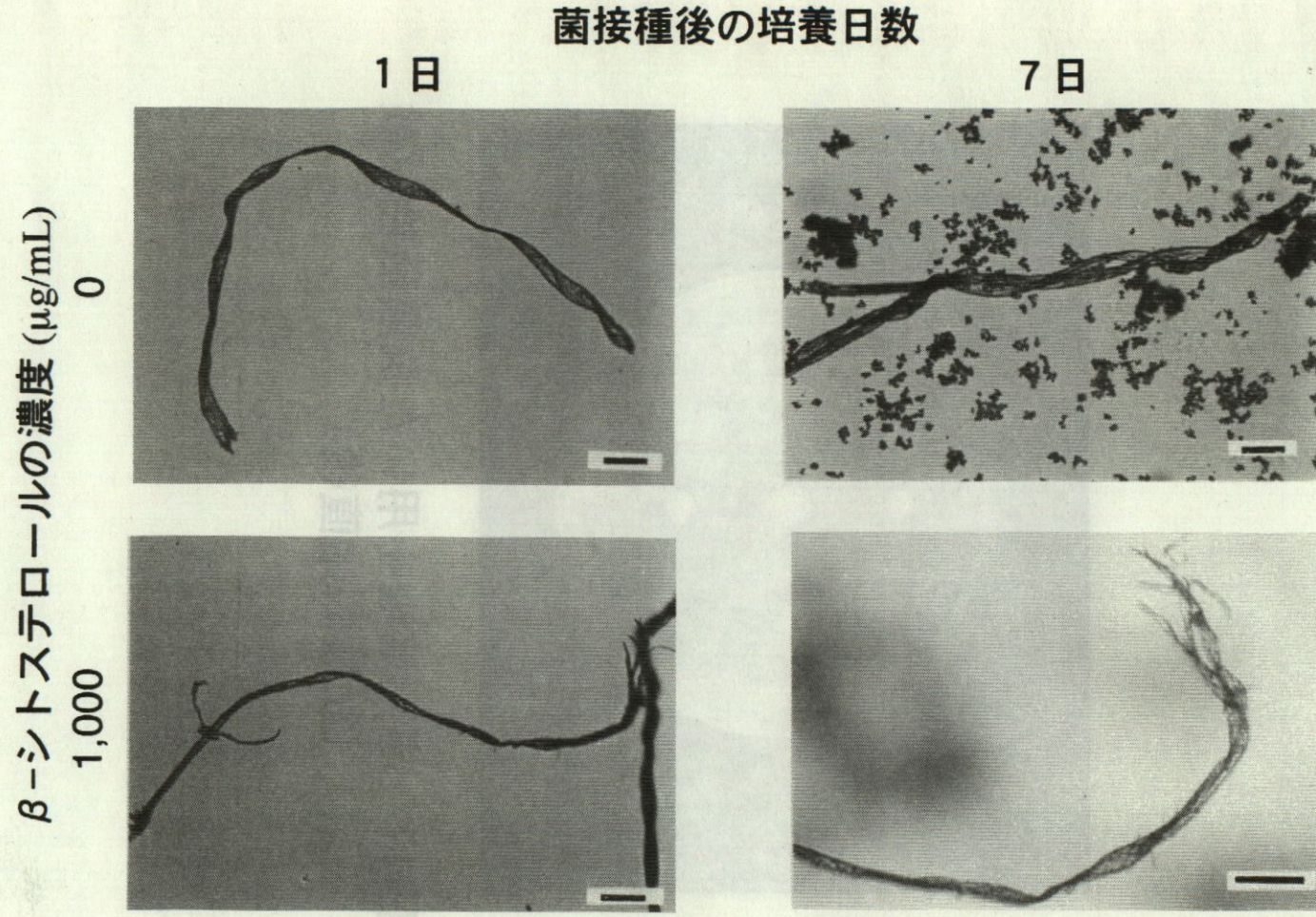


図18 液体培地を用いた抗菌活性試験 (IO-U1株)
Bar = 50μm

菌接種後の培養日数

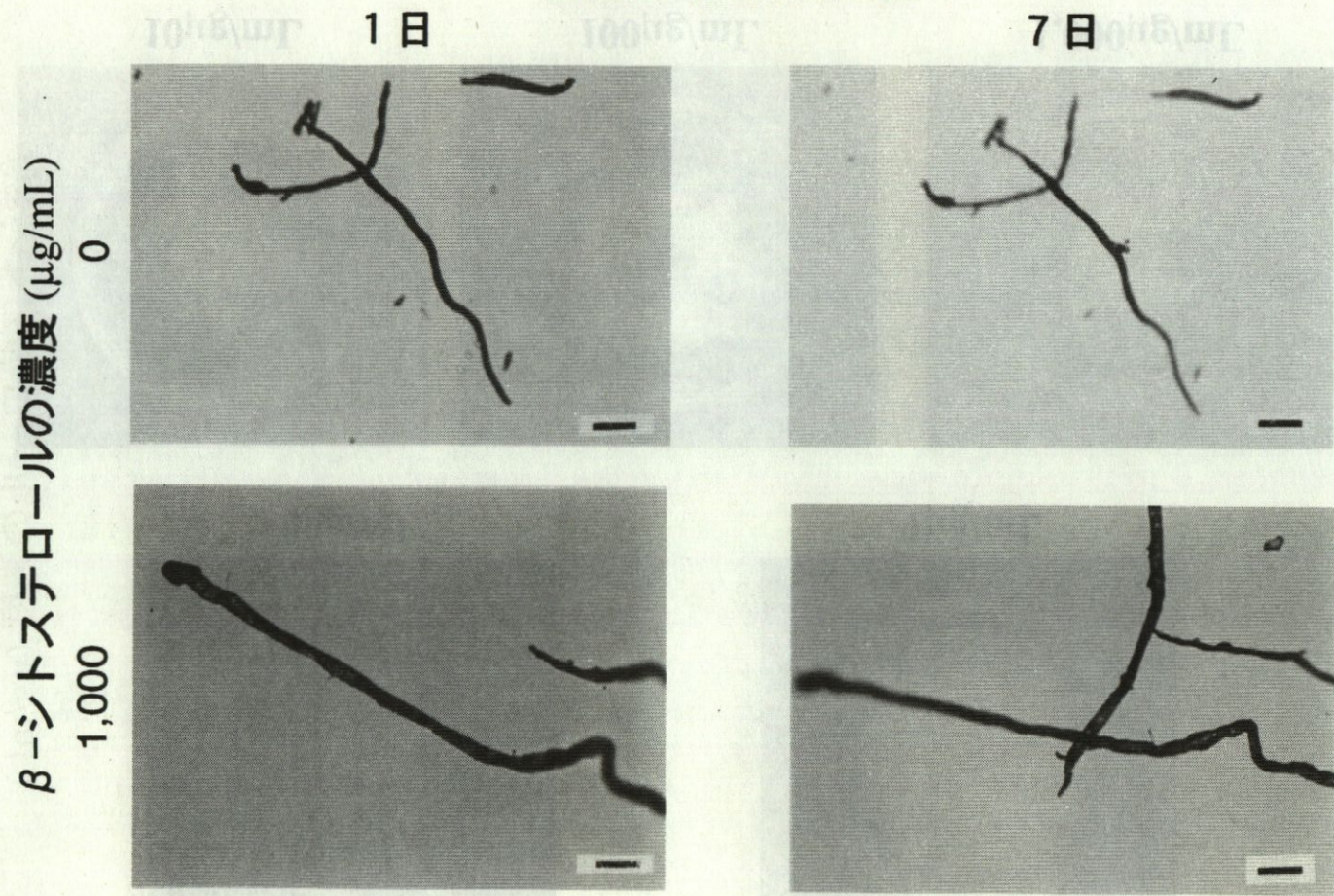


図19 液体培地を用いた抗菌活性試験 (IO-B2株)
Bar = 50 μm

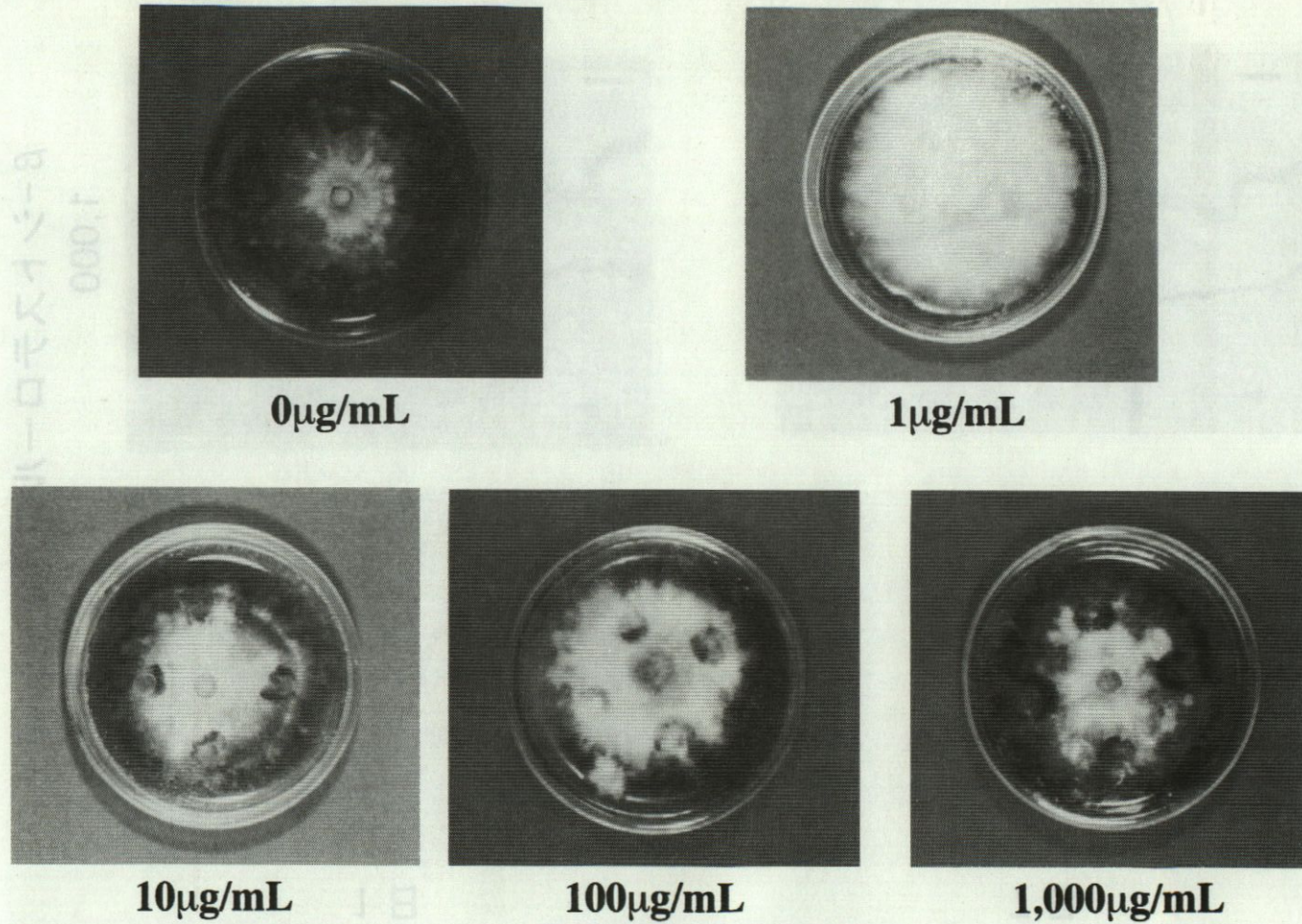


図20 寒天培地を用いた抗菌活性試験 (IO-U1株、培養30日目)

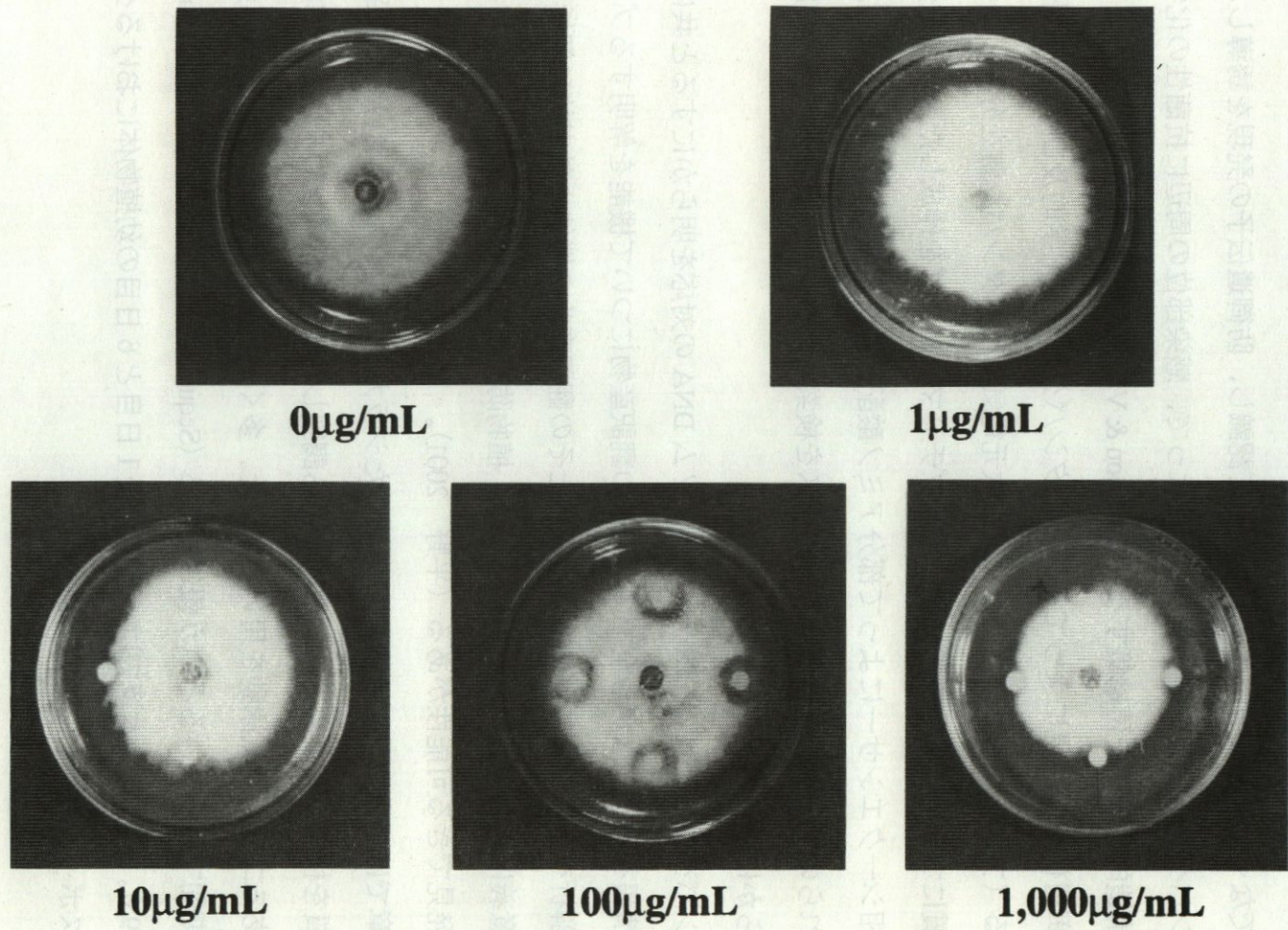


図21 寒天培地を用いた抗菌活性試験 (IO-B2株、培養30日目)

第4章 感染・非感染幼植物体の粗酵素液の二次元電気泳動

4-1 緒言

植物は、微生物やウイルスなどの病原体の感染に対応して、様々な防御反応を誘導する。植物組織表層のクチクラ層や細胞壁などの構造的な障壁による静的防御だけでなく、植物は病原体を異物として認識し、防御遺伝子の発現を誘導し、種々のタンパク質を生成・蓄積することによって、感染部位の周辺に抗菌性の化学的環境と構造的な障壁を再構築する (Van Loon & Van Strien 1999)。

防御遺伝子の発現によって生成したタンパク質の生化学的及び物理的特性を解明する (プロテオミクス) ために、二次元電気泳動でタンパク質を分離し、各タンパク質について質量分析計によってペプチドマッピングを作成したり、質量分析計や気相シーケンサーによって部分アミノ酸配列を決定することが行われる。そしてこれらのデータを基にデータベースを検索し、タンパク質と遺伝子の対応関係が明らかにされる (平野 2001)。

タンパク質とそれらをコードするゲノム DNA の対応を明らかにすると共に、ゲノム情報を利用しながら全ての遺伝子の翻訳産物について機能を解明するプロテオーム解析を行うことによって、遺伝子とその翻訳産物の機能を効率的に解析可能になる意義は大きい。この解析によって、植物防御反応に関わる新規なタンパク質を多数発見できる可能性がある (平野 2001)。

本章では、カバノアナタケに感染したシラカンバ幼植物体における特異的タンパク質を検出するために、幼植物体から調製した粗酵素液をプロテオーム解析の一つである二次元電気泳動を用いて調べた。多くの抗菌性反応が、病原菌の感染から極短期間で生じているという報告がある (Sequeira 1967, Hunter *et al.* 1978, Hanawa *et al.* 1995)。従って、本章では、菌感染後1日目と6日目の幼植物体におけるタンパク質スポットの変化について検討した。

4-2 実験方法

4-2-1 供試材料

植物体として、1-2-1で使用した無菌シラカンバ幼植物体 No.8 を用いた。

供試菌として、PDA 培地で継代培養したカバノアナタケ IO-B2 株を用いた。

4-2-2 菌の接種

カバノアナタケのシラカンバ幼植物体への接種は、1-2-2 と同様に行い、3つの処理区、CONTROL①、CONTROL②及び TREATMENT を設定した。

4-2-3 幼植物体からの粗酵素液の調製

酵素抽出用溶液を調製するために、以下に示す3種類の保存液を、EXT-1:EXT-2:EXT-3 = 3:2:1 (容量比) の割合で使用直前に混合した。EXT-1 は、7.54g の Trizma Preset pH Crystal 7.5 (Sigma, St. Louis, MO, U.S.A.) と 560mg の EDTA (同仁) を約 100mL の水に溶解し、全量を 200mL に合わせて調製した。EXT-2 は、Tween 80 を 6mL の水に溶解し、全量を 200mL に合わせて調製した。EXT-3 は、463mg のジチオトレイトール (DTT) を水に溶解し、全量を 50mL に合わせて調製した。

CONTROL①、CONTROL②及び TREATMENT の各幼植物体を菌接種後 0~7 日間毎日採取し、パイレックス製 1L ビーカー又はアルミナ製乳鉢に移し、液体窒素を注いで急速凍結後、乳棒で粉碎した。上記で調製した抽出用溶液 1.0~1.5mL、Polyclar SB-100 50~100mg 及び少量の石英砂を加えて、冷却しながら乳棒で磨り潰して酵素を抽出した。得られた抽出液を 50mL 容遠沈管に移し、4℃、10,000rpm で 30 分間遠心分離した。遠心後、上澄み液を別の 50mL 容遠沈管に移し、-30℃のフリーザー内で保存した。

4-2-4 粗酵素サンプルの調製

上記で調製した粗酵素液を、Ultrafree-MC (Millipore, Bedford, MA, U.S.A.) を用いて 4℃、10,000rpm で 30~60 分間遠心機にかけて濾過した。次に、予め中に入っている蒸留水を抜いた MicroSpinG-25 カラム (Amersham Biosciences, Little Chalfont, Buckinghamshire, England) に 4-2-3 の粗酵素抽出用溶液 250 μ L を加え、4℃、3,000rpm で 1 分間遠心した。これを 5 回繰り返した後、濾過した粗酵素液 50 μ L をカラムのゲル中心に添加し、4℃、3,000rpm で 1 分間遠心して脱塩処理を行った。得られた酵素液を別の 1.5mL エッペンチューブに移し、直ちに電気泳動に使用しない場合は、-30℃のフリーザー内で保存した。

4-2-5 色素結合法による粗酵素液中のタンパク質の定量

クーマシーブリリアントブルー G250 (BIO-RAD, Hercules, CA, U.S.A.) 50mg を 95%エタノール 25mL に溶解し、これに 85%リン酸 50mL を加え、蒸留水で全量を 500mL に調製後、Whatman No.1 濾紙で濾過して CCB 試薬を調製した。標準タンパク質としてウシ血清アルブミン(Sigma)を用い、これを 0.5, 1.0, 1.5, 2.0mg / 10mL の濃度で NaCl / Pi 緩衝液 (2.0g Na₂HPO₄, 0.6g KH₂PO₄, 7.0g NaCl, 0.2g NaN₃ / 1L H₂O) に溶解して、標準タンパク質溶液を調製した。

各標準タンパク質溶液及び粗酵素液を 50 μ L ずつ分光光度計用 3mL キュベットに入れた。キュベットに CCB 溶液を 2.5mL 加え、良く混合し、室温で 5 分間放置後、分光光度計で 595nm における吸光度を測定した。標準タンパク質溶液の吸光度から検量線を作成し、これを基に各粗酵素液中のタンパク質量を算出した。

4-2-6 粗酵素液の二次元電気泳動

4-2-6-1 等電点電気泳動 (一次元目の泳動)

膨潤用ストック溶液 (12g 尿素、12g CHAPS、125 μ L IPG Buffer、微量の Bromophenol blue / 25mL H₂O) 700 μ L に DTT 1.96mg を溶解し、これを IPG ストリップ (Amersham Biosciences) の膨潤液として使用した。菌接種後 1 日目及び 6 日目の酵素液サンプル (1 日目、C1: 50 μ L 4.65 μ g; C2: 50 μ L 6.05 μ g; T: 25 μ L 4.68 μ g ; 6 日目、C1: 15 μ L 4.82 μ g; C2: 50 μ L 4.55 μ g; T: 50 μ L 3.65 μ g) を膨潤液と混合し、Dry Strip 膨潤トレイの 1 つに注入した。IPG ストリップのゲル側を下に向けて膨潤液に浸した。その後、1 ストリップを 4mL の IPG Cover Fluid で覆い、室温で最低 10 時間以上膨潤させた。

MultiTemp III 恒温循環装置 (Amersham Biosciences) の温度を 20 $^{\circ}$ C に設定し、Multiphor II (Amersham Biosciences) のクーリングプレートの位置を水平に調節した。約 4mL のシリコンオイル (1.5CS) をクーリングプレート上に載せ、Immobiline Dry Strip トレイをクーリングプレートの最上部に気泡を取り除きながら設置した。15mL のシリコンオイルを Immobiline Dry Strip トレイに注ぎ、Dry Strip アライナーをその表面に置いた。膨潤した IPG ストリップを蒸留水で洗い、酸性側が陽極側のトレイの最上部に来るようにゲル面を上にしてアライナーの溝に移した。IEF 用電極濾紙を 110mm の長さに 2 本切り、0.5mL の蒸留水で湿らせ、その濾紙を IPG

ストリップの陽極及び陰極側の先端部分のゲルの一部と接触するように置いた。更に、電極を電極濾紙と接触するように設置し、約 150mL のシリコンオイルをトレイ内に注いだ。

泳動は、Power PAC3000 (BIO-RAD)を用いて次の条件で行った。段階 1 : 500V, 2mA, 5W, 1min ; 段階 2 : 3,000V, 2mA, 5W, 1hr 30min ; 段階 3 : 3,000V, 2mA, 5W, 7hr。IEF 終了後、直ちに二次元目の電気泳動を行わない場合は、IPG ストリップをキャップ付き 20cm 試験管に入れ、-30℃のフリーザー内で保存した。

4-2-6-2 SDS-PAGE (二次元目の泳動)

キャップ付き 20cm 試験管中の SDS 平衡化用 buffer (1.5M Tris-HCl buffer (pH8.8) 6.7mL, 尿素 72.07g, グリセロール 69mL, SDS 4.0g, Bromophenol blue 2,3 粒 / 蒸留水で全量を 200mL に調整)10mL に、100mg の DTT を加えて溶解した。そこに IPG ストリップを挿入し、キャップを締めて試験管を横倒しにしてシェーカーに乗せ、15 分間ゆっくりと振とうさせて 1 度目の平衡化を行った。試験管中の平衡化用 buffer 10mL にヨードアセトアミド 250mg を溶解し、これに一度目の平衡化が終わった IPG ストリップを入れ、同様に 15 分間振とうして二度目の平衡化を行った。平衡化後、IPG ストリップを蒸留水で濡らした濾紙にゲル面が付かないように横鉛直にして立て、3 分間放置して余分な平衡化溶液を除去した。

MultiTemp III 恒温循環装置の温度を 15℃に設定し、3mL のシリコンオイルを Multiphor II のクーリングプレートに載せ、この上に ExcelGel SDS ゲル (Amersham Biosciences)を取り出して気泡が入らないように載せた。Multiphor II buffer strip positioner をクーリングプレート上に置いて固定した。無色の陰極側の ExcelGel バッファーストリップ(Amersham Biosciences)を positioner の上側に、黄色の陽極側の ExcelGel バッファーストリップを positioner の下側に、それぞれゲルに密着させるように置いた。平衡後乾燥させた IPG ストリップを、ゲル側を下に向けて positioner のマイナス側の下の穴の所で SDS ゲル上に置いた。IEF サンプルアプリケーション濾紙を、SDS ゲル上の IPG ストリップの両端にあるゲル支持フィルムの端の下に差し込んだ。IPG ストリップの右側のゲル表面に、マーカー用のアプリケーション濾紙を置き、1 μ L の分子量マーカーをそれに添加した。Multiphor II の電極ホル

ダーの電極が、各バッファーストリップの上に来るように調節して設置し、Multiphor II 泳動装置の安全リッドを閉め、パワーサプライと接続した。

泳動は、次の条件で行った。段階 1 : 600V, 20mA, 30W, 30min ; 段階 2 : 600V, 50mA, 30W, 1hr 10min。段階 1 で、Bromophenol blue 色素の最前部が IPG ストリップから抜け出して 1~2mm 離れた時に、泳動を一旦止めた。IPG ストリップとアプリケーション濾紙を取り除き、陰極側のバッファーストリップを IPG ストリップが載っていた位置に移動し、電極ホルダーの位置を調節後、段階 2 の泳動を行った。Bromophenol blue 色素の最前部が、陽極側バッファーストリップに到達してから 5 分後に泳動を終了した。

4-2-7 ゲルの銀染色

固定液 (エタノール 100mL、酢酸 25mL / 蒸留水で全量を 250mL に調整) にゲルを浸し、静かに 30 分間振盪した。次に、増感液 (エタノール 75mL、グルタルジアルデヒド(25%, w/v) 25mL、チオ硫酸ナトリウム(5%, w/v) 10mL、酢酸ナトリウム 17g / 蒸留水で全量を 250mL に調整) にゲルを浸し、静かに 30 分間振盪した。その後、蒸留水 250mL にゲルを浸して 5 分間振盪し、この操作を 3 回繰り返した。銀染色液 (硝酸銀溶液 (2.5%, w/v) 25mL、ホルムアルデヒド (37%, w/v) 0.1mL / 蒸留水で全量を 250mL に調整) にゲルを浸し、静かに 20 分間振盪した。蒸留水 250mL にゲルを浸して 1 分間振盪し、この操作を 2 回繰り返した。ゲルを現像液 (炭酸ナトリウム 6.25g、ホルムアルデヒド (37%, w/v) 0.05mL / 蒸留水で全量を 250mL に調整) に浸し、静かに 4 分間振盪した。次に、停止液 (EDTA-Na · 2H₂O 3.65g / 蒸留水で全量を 250mL に調整) にゲルを浸し、静かに 10 分間振盪した。その後、蒸留水 250mL にゲルを浸して 5 分間振盪し、この操作を 3 回繰り返した。最後にゲルを保存液 (87%グリセロール 25mL / 蒸留水で全量を 250mL に調整) に浸し、静かに 20 分間振盪した。

染色後、ゲル保存用セロファンシートを保存液に浸し、ゲルをサンドイッチ状に覆い、室温で 2 日間乾燥した。

4-2-8 タンパク質スポットの解析

ゲルのイメージをスキャナーでコンピューターに取り込み、そのイメージを

PhotoShop 及び Illustrator で解析し、菌感染後の特異的なタンパク質の等電点 (pI) 及び分子量を算出した。

4-3 結果と考察

4-3-1 CONTROL①、② と TREATMENT との二次元電気泳動におけるタンパク質スポットの比較

菌感染後、1日目及び6日目の各処理区の幼植物体から調製した粗酵素液を、二次元電気泳動したゲルの写真を図 22、23 に示す。1日目と6日目の各処理区全てにおいて、pH が酸性から中性 (pH3~7)、分子量が 100kDa 以下の部分にかけて、特に多くのタンパク質スポットが出現した。1日目と6日目との間に、特に大きな相違は認められなかった。

4-3-2 画像処理によるタンパク質 (pH3~7、分子量 100kDa 以下) スポットの比較

全ての処理区において、pH が酸性から中性 (pH3~7)、分子量が 100kDa 以下の部分において特に多くのタンパク質スポットが出現したので、Photoshop 及び Illustrator を用いた画像処理により、その部分を拡大し、より詳しい解析を行った。今回、確認出来たスポットについてそれぞれマークを付け、TREATMENT において特に変化の見られたスポットを1日目では数字で、6日目ではアルファベットでそれぞれ示した (図 24、25)。更に、数字又はアルファベットを付けたタンパク質スポットの内、菌感染後、消失又は薄くなったスポットについては四角印を付け、菌感染後、出現又は濃くなったスポットについては丸い角の四角印を付けた。これらのスポットに関する pI 及び分子量を表 4 にまとめた。

1日目において、スポット 1~9 までが菌感染後、消失又は薄くなったスポットであり、特にスポット 13 は、菌感染後、新たに出現したスポットである (図 24)。従って、スポット 13 が、菌の感染による植物体内での代謝の変化に特に関係している可能性がある。6日目において h、スポット a~f までが菌感染後、消失又は薄くなったスポットであり、g 及び h が菌感染後、濃くなったスポットである (図 25)。6日目では、新しく出現したスポットは確認出来なかった。図 24 と 25 の比

較により、1日目の方が、6日目に比べて変化したタンパク質の数が多いことが分かった。この結果より、菌感染初期の方が、より多くの反応が植物体内で生じている可能性がある。今後、2～5日目の植物体からの粗酵素液についても二次元電気泳動を行い、その経過を更に詳しく調べる必要がある。

スポット2 ($pI = 3.1$, $Mw = 103.3kDa$) とスポットa ($pI = 3.1$, $Mw = 100.0kDa$)、スポット3 ($pI = 3.3$, $Mw = 94.1kDa$) とスポットb ($pI = 3.3$, $Mw = 96.5kDa$) は、それぞれの pI 及び分子量から、同一のタンパク質であると考えられる。菌感染後、同一のスポットが消失したことから、これら二つのタンパク質が、菌の感染による植物体内でのそれぞれ共通した代謝の変化に関係している可能性がある。

今後の課題として、 pH が中性～酸性、分子量を $100kDa$ 以下の範囲に限定して二次元電気泳動を行い、分離能を上げて更に詳細に解析する必要がある。また、次の段階として、特に菌感染による植物体内での代謝の変化に関係しているスポットを切り取り、酵素消化後、質量分析計 (MALDI-TOF-MS) で分析し、得られたマススペクトルをデータベースと比較することにより、タンパク質を同定する必要がある。

表4 注目タンパク質の等電点 (pI) 及び分子量

スポットの 特徴	1日目			6日目		
	スポット	pI	Mw (kDa)	スポット	pI	Mw (kDa)
	1	3.2	121.0	a*	3.1	100.0
	2*	3.1	103.0	b*	3.3	96.5
	3*	3.3	94.1	c	3.9	114.0
消失又は 薄くなった スポット	4	3.5	72.6	d	6.2	40.8
	5	3.9	75.0	e	5.8	31.6
	6	4.3	50.7	f	5.7	27.8
	7	4.5	55.1			
	8	3.8	25.8			
	9	3.9	19.4			
新しく 出現又は 濃くなった スポット	10	4.5	20.7	g	4.8	36.0
	11	4.7	20.7	h	4.2	23.5
	12	4.9	20.7			
	13	5.3	39.9			
	14	4.9	66.1			

* : 2=a, 3=bの可能性

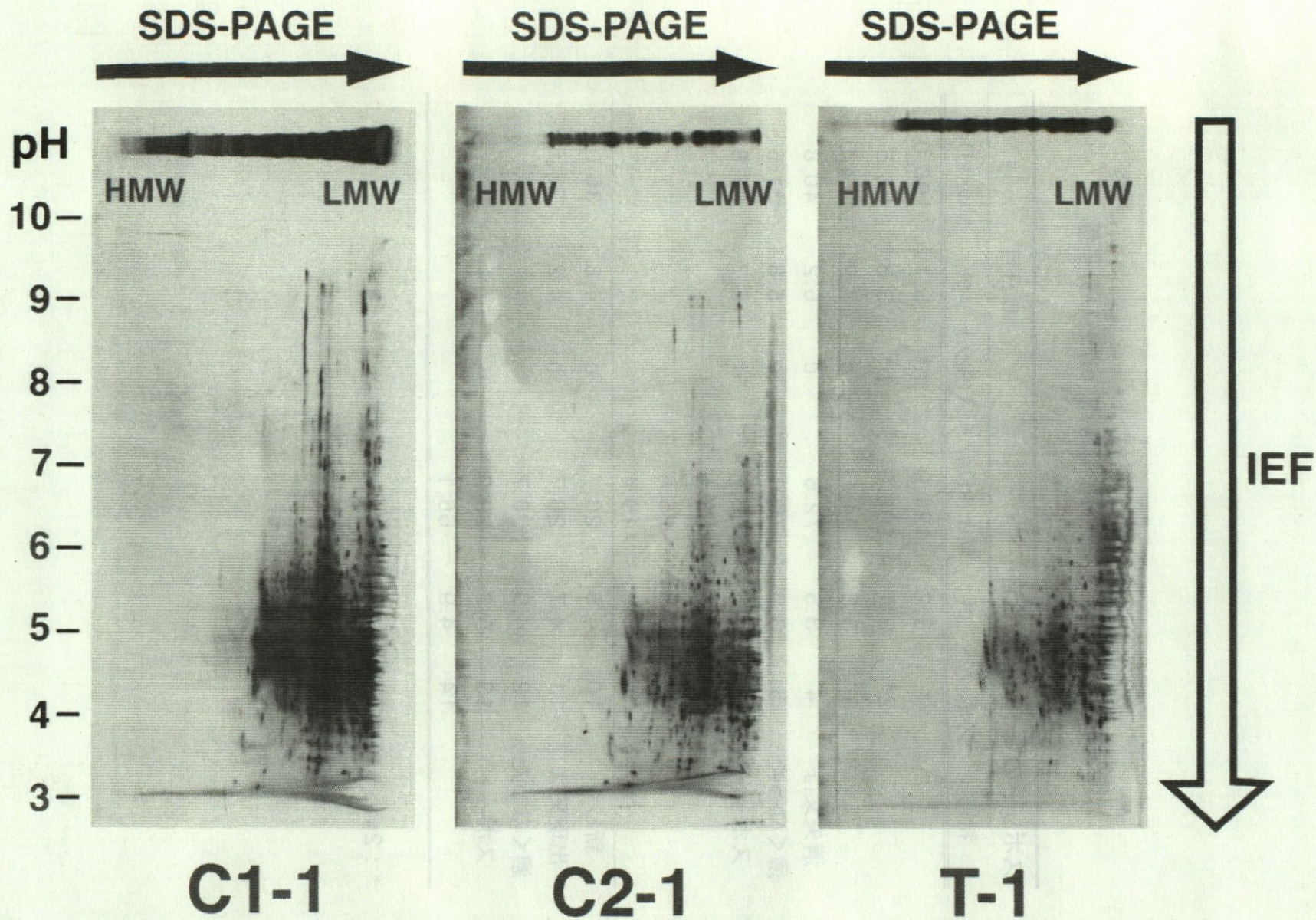


図22 菌感染後1日目に調製した各粗酵素液の二次元電気泳動ゲル

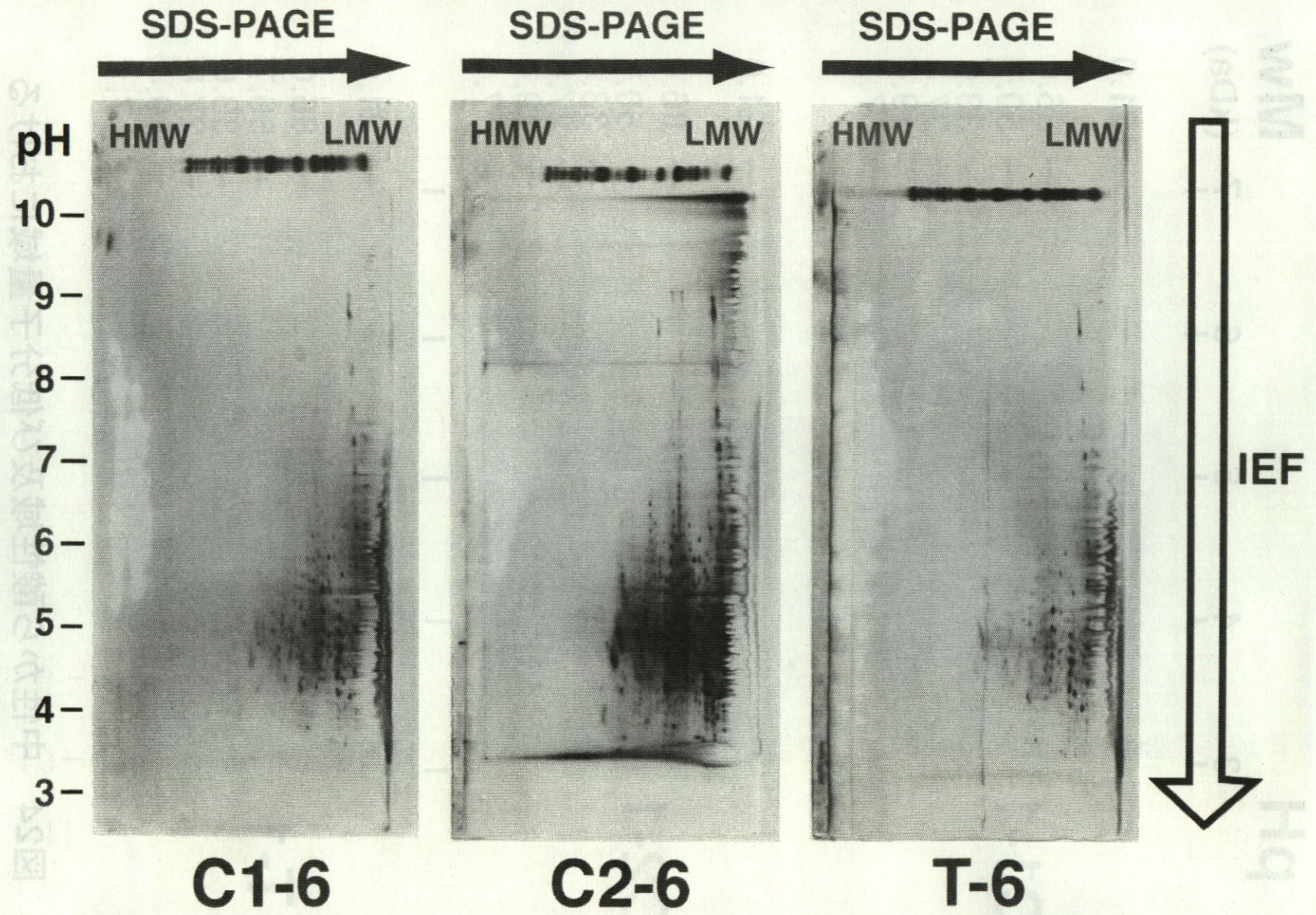


図23 菌感染後6日目に調製した各粗酵素液の二次元電気泳動ゲル

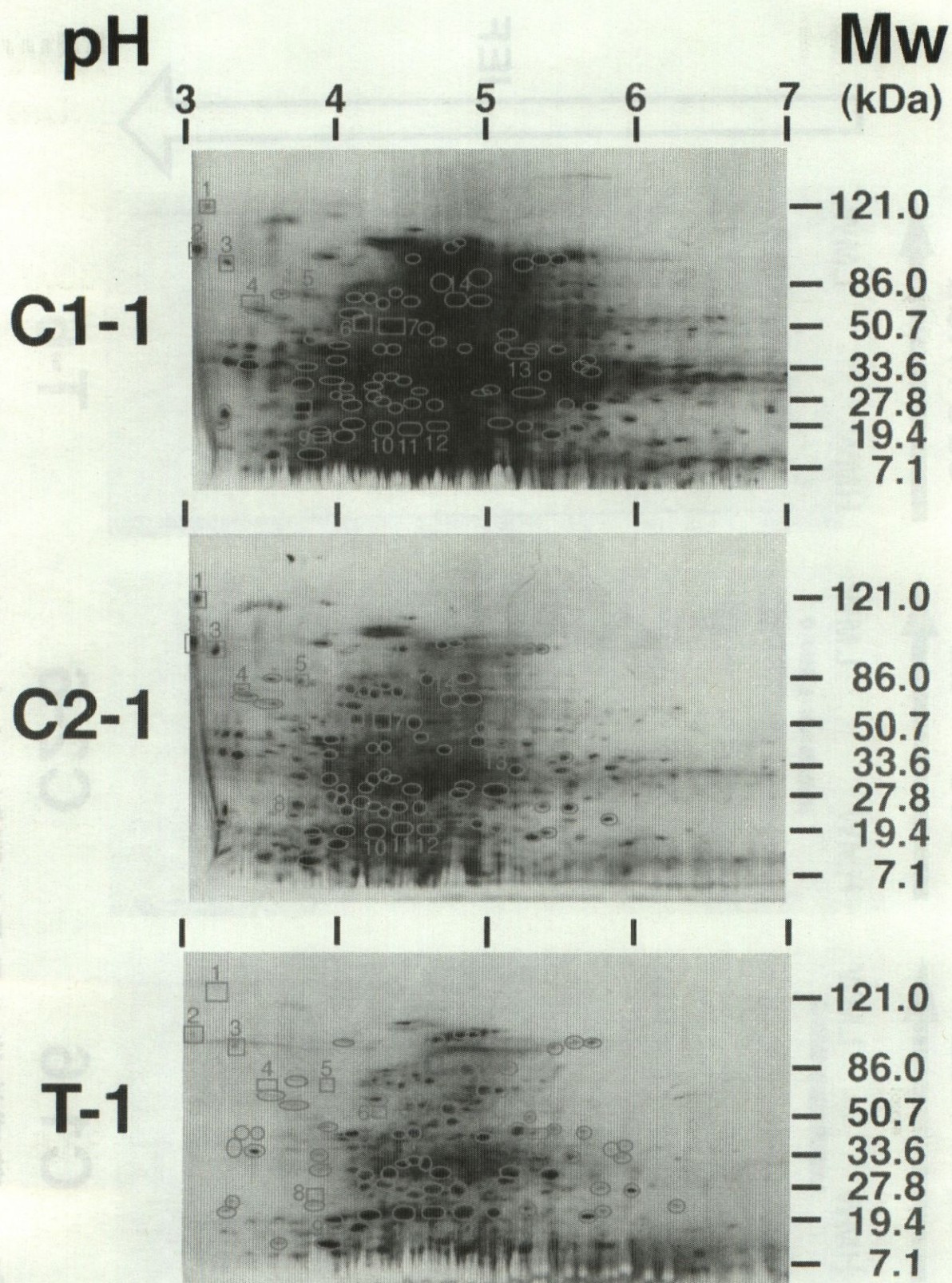


図24 中性から酸性域及び低分子量域における
1日目の二次元電気泳動ゲル

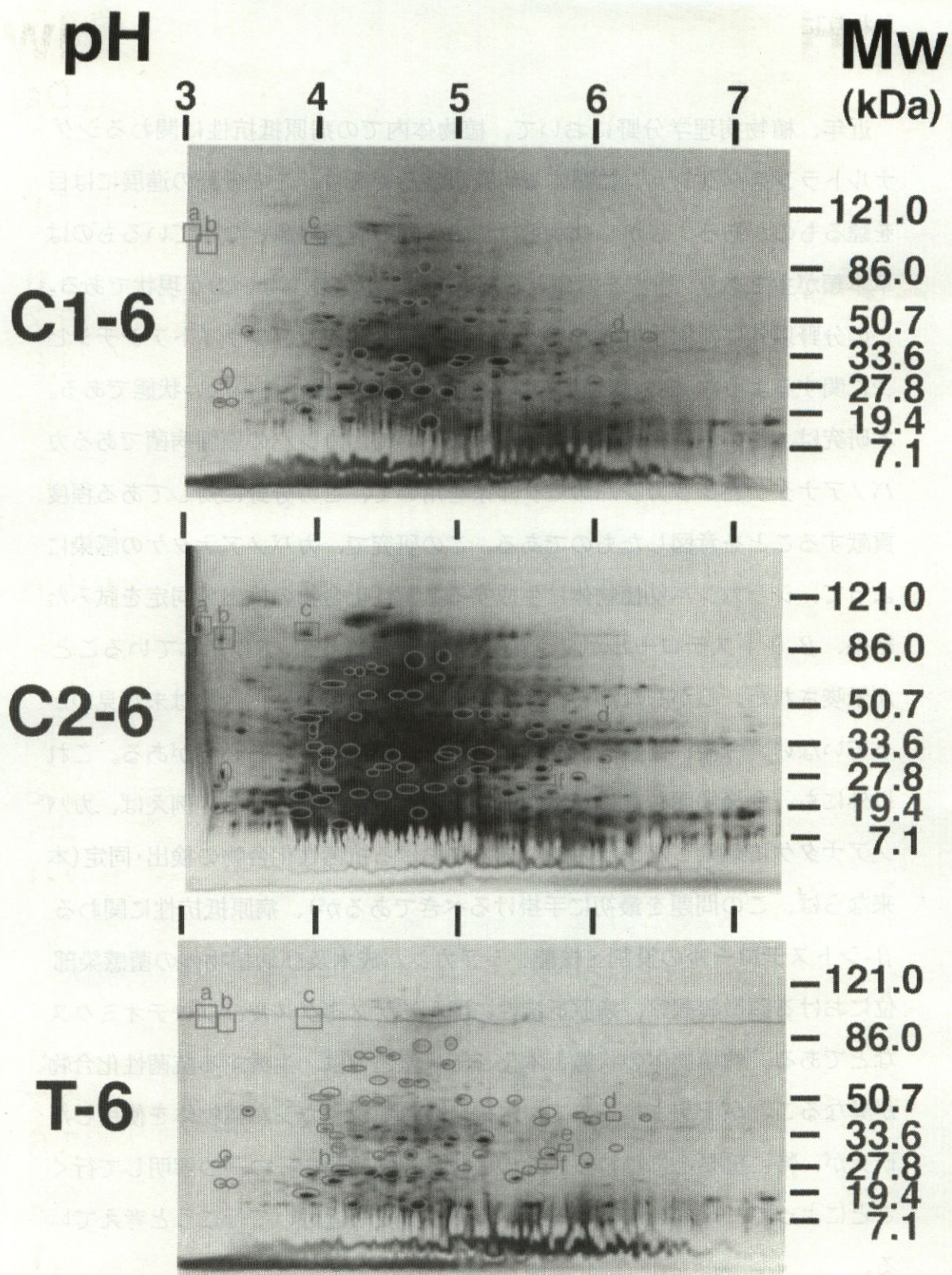


図25 中性から酸性域及び低分子量域における6日目の二次元電気泳動ゲル

おわりに

近年、植物病理学分野において、植物体内での病原抵抗性に関わるシグナルトランスダクションに関する研究が盛んであり、この分野の進展には目を瞞るものがある。しかしながら、この分野の研究対象となっているものは草本類が主であり、樹木を対象としたものは、かなり少ないのが現状である。この分野以外に、樹木におけるファイトアレキシン及びファイトアンチシピンに関するような、樹木病理学の基本的な研究例も遙かに少ない状態である。本研究は、この様な樹木病理学の現状において、カンバの癌腫病菌であるカバノアナタケとシラカンバのモデル系を用いて、この分野に対してある程度貢献することを意図したものである。この研究で、カバノアナタケの感染によって、シラカンバ幼植物体に生成する抗菌性化合物の検出・同定を試みた結果、 β -シトステロールがファイトアンチシピンとして作用していることが示唆された。しかしながら、今のところ確実な抗菌性化合物は未だ見つかっていない。今後、確実な抗菌性化合物を検出・同定する必要がある。これ以外にも、今後解明しなければならない問題が山積している。例えば、カバノアナタケに感染したシラカンバ成木における抗菌性化合物の検出・同定(本来ならば、この問題を最初に手掛けるべきであるが)、病原抵抗性に関わる β -シトステロールの役割・機能、シラカンバ成木及び幼植物体の菌感染部位における顕微鏡観察、病原抵抗性に関わるゲノミクス及びプロテオミクスなどである。幼植物体の状態と木化した状態とでは、生成する抗菌性化合物が異なることが予想されるので、木化した無菌シラカンバ植物体を使用した研究が、特に重要と思われる。この様な多くの問題を一つ一つ解明して行くことによって、草本類におけるレベルに一步でも近付いて行こうと考えている。

最後に、本研究を遂行するに当たり、シラカンバ幼植物体の培養・増殖に御協力下さった、横浜国立大学大学院情報研究院の笹本浜子先生、カバノアナタケの菌株を御提供下さいました北海道大学大学院農学研究科の寺沢實

先生及び玉井裕先生、そして実験に御協力して頂いた宇都宮大学教育学部の山田洋一先生及び宇都宮大学農学部の上田俊策先生に感謝申し上げます。また、実験に協力してくれた当時の4年生学生、紅屋大介君、粕川典子さん、そして高島大輔君に感謝致します。

研究代表者 横田信三

引用文献

阿部孝子：シラカンバ幼植物体の抽出成分、宇都宮大学農学部森林科学科
第5回生 卒業論文 (1999)

紅屋大介：シラカンバ幼植物体に含まれる β -シトステロールの機能の解明、
宇都宮大学農学部森林科学科 第6回生 卒業論文 (2000)

Bhatt, K., Y.K. Agrawal: Chemical investigation of the trunkbark from *Ficus racemosa*. J. Indian Chem. Soc., 50, 611 (1973)

Dhingra, V.K., S.K. Mukerjee, T. Saroja, T.R. Sehadri: Chemical investigation of bark and sapwood of *Dalbergia latifolia*. Phytochemistry, 10, 2551 (1971)

Fischer, F., H. Koch, B. Borchers, R. Höntsch, K.-D. Pruzina: Gewinnung und Verwertung von Phytosterolen aus Hols. Pharmazie, 36, 456-462 (1981)

Hanawa, F., M. Kanauchi, S. Tahara, J. Mizutani: Lettucenin A as a phytoalexin of dandelion and its elicitation in dandelion cell cultures. J. Fac. Agr. Hokkaido Univ., 66, Pt.2, 151-162 (1995)

長谷川文紀：アラゲカワラタケ及びカバノアナタケに感染したシラカンバ幼植物体に生成するファイトアンチシピン、宇都宮大学農学部森林科学科
第5回生 卒業論文 (1999)

平野 久、「プロテオーム解析 (理論と方法)」平野 久 編、東京化学同人、
東京 pp.2-3 (2001)

Höll, W., I. Goller: Free sterols and steryl esters in the trunkwood of *Picea abies* (L.)
Karst. Z. Pflanzenphysiol., 106, 409-418 (1982)

Hunter, R.E., J.M. Halloin, J.A. Veech, W.W. Carter: Terpenoid accumulation in
hypocotyls of cotton seedlings during aging and after infection by *Rhizoctonia*
solani. Phytopathology, 68, 347-350 (1978)

市原耿民、上野民夫、「植物病害の化学」、市原耿民・上野民夫 編、学会出
版センター、東京、p.4 (1997)

粕川典子：カバノアナタケに感染したシラカンバ幼植物体における β -シト
ステロールのファイトアンチシピンとしての作用の解明、宇都宮大学農
学部森林科学科 第7回生 卒業論文 (2001)

Komae, H., N. Hayashi: Palmitone and phytosterols from *Neolitsea sericea*.
Phytochemistry, 10, 1953-1954 (1971)

Mace, M.E., R.D. Stipanovic, A.A. Bell: Toxicity and role of terpenoid phytoalexins
in *Verticillium* wilt resistance in cotton *Gossypium barbadense* cultivar seabrook-
sea-island. Physiol. Plant Pathol., 26, 209-218 (1985)

Minamikawa, T., T. Akazawa, I. Uritani: Analytical study of umbelliferone and
scopoletin synthesis in sweet potato roots infected by *Ceratocystis fimbriata*. Plant
Physiol., 38, 493-497 (1963)

Monde, K., M. Takasugi, J.A. Lewis, G.R. Fenwick, Z. Naturforsch., 46c, 189
(1991)

森満範、青山政和、土居修一：ホオノキ樹皮中の抗菌成分、林産試験場報（北海道立林産試験場）、14, 1-5 (2000)

Murashige, T., F. Skoog: A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.*, 15, 473-497 (1962)

Nes, W.R.: Steroids, in "Natural Products of Woody Plants II", J.W. Rowe ed., Springer-Verlag, Heidelberg, p.808 (1989)

野中福次、牧角啓一、森田昭：ビワのファイトアレキシン、aucuparin、の抗菌性について、佐賀大学農学部彙報、53, 27-36 (1982)

Rowe, J.W., A.H. Corner, B.A. Nagasampagi: Terpenoid and other extractives of western white pine bark. *Phytochemistry*, 19, 1121-1131 (1980)

Sainsbury, M., B. Webb: Hydrocarbons and terpenoids from the bark of *Lophopetalum rigidum*. *Phytochemistry*, 11, 3541 (1972)

Sequeira, L.: Accumulation of scopolin and scopoletin in tobacco plants infected by *Pseudomonas solanacearum*. *Phytopathology*, 57, 830 (1967)

Seshadri, T.R., T.N.C. Vedantham: Chemical examination of the barks and heartwoods of *Betula* species of American origin. *Phytochemistry*, 10, 897-898 (1971)

Smith, C.J.: Accumulation of phytoalexins: defence mechanism and stimulus response system. *New Phytologist*, 132, 1-45 (1996)

高杉光男、門出健次、白田昭：病害抵抗性とファイトアレキシン、「植物病害の化学」、市原耿民・上野民夫 編、学会出版センター、東京、pp.143-149 (1997)

Yakasugi, M., L. Muñoz, T. Masamune, A. Shirata, K. Takahashi: Stilbene phytoalexins from diseased mulberry. *Chem. Lett.*, 1241-1242 (1978)

高杉光男、長尾繁光、L. Muñoz、石川真一、正宗直、白田昭、高橋幸吉、第22回天然有機化合物討論会講演要旨集、p.275 (1979)

Van Etten, H.D., J.W. Mansfield, J.A. Bailey, E.E. Farmer: Two classes of plant antibiotics: Phytoalexin versus "phytoanticipins". *Plant Cell*, 6, 1191-1192 (1994)

Van Loon, L.C., E.A. van Strien: The families of pathogenesis-related proteins, their activities and comparative analysis of PR-1 type proteins. *Physiol. Mol. Plant Pathol.*, 55, 85-97 (1991)

山口岳広：カバノアナタケによるシラカンバの腐朽被害、日本林学会北海道支部大会発表論文集、37, 91-93 (1989)