植物のエリシター応答発光の発見とプライミング検出技術への

応用に関する研究*

Studies on Discoveries of Elicitor-Responsive Photon Emissions in Plants and Their Applications for Development of a Defense Priming Detection System

伊代住浩幸 Hiroyuki Iyozumi

*東京大学大学院農学生命科学研究科審査論文 2017年(平成 29年)

目 次

緒 論
第I章 病害抵抗反応に伴う極微弱発光の検出に適した植物試料と病害抵抗反応誘導因子の組み合わせ ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・
第1節 緒言4
第2節 各種植物からの病害抵抗反応に伴う極微弱発光の検出 ・・・・・・・・・・・・
 材料及び方法 ····································
2. 結果 ······8
3. 考察
第3節 病害抵抗性に関連する極微弱発光の特性解析 ・・・・・・・・・・・・・16
1. 材料及び方法 ·······16 。 4.m
2. 結果 ···································
3. 万祭 ···································
第4則 エリシターで処理した植物の極微弱充元 ····································
1. 树科及0万亿 ····································
2. 和木 24 3. 考察
5. 行东 20
第Ⅱ章 エリシター応答発光の増強に基づいたプライミング検出システムの開発・・・・・28
第1節 緒言
第2節 病害抵抗性誘導物質の前処理で増強されるイネのエリシター応答発光の特性解析 ・・・29
1. 材料及び方法 ····································
2. 結果 ····································
第3節 各種植物培養細胞における病害抵抗性誘導物質によるフライミンク活性の
エリンター応答発光を指標とした検出 ・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・37
1. 材料及い方法 ····································
2.
5. 写奈 40 第4節 イマゼ姜細胞のエリシターに次発光の通路を提携とする病害所提供話述道励好の探索: 45
1 材料及び方法 ····································
1. 仍有及び方法 40 2 結里
2. 烟水 3. 老蓉 ···································
第5節 イネ培養細胞のキチンエリシター応答発光の増強におけるサリチル酸経路の役割・・・49
1. 材料及び方法 1. 材料及び方法
2. 結果 ······51
3. 考察 ·······52
第Ⅲ章 総合考察・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・・
摘要
Summary ······61
謝辞 ······63
引用文献 ••••••••••••••••••••••••••••••••••••

緒論

特殊な発光器官を持たない生物も、極微弱な光を放射 している (Slavinski, 1988;渡辺・稲場, 1991a, b)。こ の発光現象は、極微弱発光(Ultraweak photon emission: UPE), 自家化学発光 (Spontaneous chemiluminescence) あるいは, バイオフォトン (biophoton) などと呼ばれている(Abels, 1986; Popp, 1988; Cifra and Pospíšil, 2014)。生体から放射される極微弱光に関 する報告は, 1920 年代に A.G. Gurwitch が報告した, タマネギの根端細胞の Mitogenetic Radiation (近接させ たタマネギ鱗片細胞の有糸分裂を促進する紫外域の電磁 波と推定)にまで遡る(Abeles, 1986)。 残念ながら現 在まで Mitogenetic Radiation の機器による検出は成功 していないが、生体から放射される極微弱光の存在に関 する研究は、その後も続けられた。しかし、100~104光 子数/秒/cm²と発光強度が弱いため(図1),機器による 測定は、単一光子計数が可能な高感度光センサーが登場 するまで待たなければならなかった。

1950年代になってようやく, Colli らが光電子増倍管 を用いてコムギ,レンズマメなど植物の黄化幼苗におけ る可視光域の発光を初めて検出し(Colli and Facchini, 1954; Colli et al., 1955),それ以降,多くの研究者によ り,細菌から植物,哺乳類にいたる様々な生物種の個体・ 組織・細胞などで極微弱な発光現象が報告されるように なった(Popp, 1988; Beloussov et al., 2000)。

生体の極微弱発光は自家発光 (spontaneous photon emission) と光誘導(遅延)発光(photo-induced / delayed luminescence) に分類され、それぞれ、生化学反応ある いは光励起反応により生体内に生じる、電子的に励起さ れた物質の基底状態への緩和に伴い発光すると考えられ ている(Popp et al., 1992)。特に自家発光は、恒常的に 幅広い波長域(紫外域~近赤外域)で観察され、生体の 活動レベルの変化や外部からの刺激によって発光強度が 変化する。発光のメカニズムとしては, in vitro 実験の 結果などから、励起種としてフリーラジカルや活性酸素 種 (Reactive oxygen species: ROS) が生成し、周囲の蛍 光性物質(不飽和脂肪酸、核酸、アミノ酸、ポリフェノ ール他)が過酸化を受けて励起・発光する場合や,励起 カルボニルから蛍光性物質へのエネルギー移行による発 光(渡辺・稲場, 1991a)のほか,活性酸素の一種である 一重項酸素そのものの発光(Abels, 1986), DNA 分子 の巻き戻しに由来する発光なども推定されている (Slavinski, 1988)。つまり、生物発光におけるルシフ ェリン-ルシフェラーゼ反応のような,発光に特化した システムではなく、生体内で別の働きを持つ物質・酵素 などが発光に関与すると考えられている。例えば、蛍光 性物質がペルオキシダーゼやオキシゲナーゼによって酸 (素) 化されて発光すると推測されるケースは, 生物発 光の始原的な姿だと考えられている(渡辺・稲葉,1991a)。



図1 生体極微弱発光と生物発光の比較

*光のパワー: P= hc/λ ≒ 2×10⁻¹⁶ /λW

h:プランク定数(6.626×10⁻³⁴ J ▪ s), c:真空中の光の速度(2.998×10⁸ m/s), *λ*:光の波長(nm)

生体が放射する極微弱光の測定は、植物の芽生えで最 初に成功したが、その後の高感度フォトンカウンティン グカメラを用いたダイズ芽生えの測定において、

根端や 胚軸など、細胞分裂が活発な部位が強く発光することが 示唆されている(Ichimura et al., 1989)。植物の生育を 調節するホルモン物質を与えた場合の発光の測定結果は これを支持しており、アズキの芽生えに根の成育を促進 する濃度(10 µM)のジベレリン(Gibberelin A₃: GA₃) を与えると、わずかではあるが無処理に比べて発光が増 加する。この発光は根冠部分で特に強く、成育の促進と 関連すると推測されており,同濃度において根の成育を 抑制するアブシジン酸を与えた場合には、発光は強く抑 制されている(Kai et al., 1995)。こうした,植物の生 長との関連が認められる発光の有力な原因としては、細 胞分裂時の物質代謝における各種酸(素)化酵素の働き や、呼吸増加に伴う活性酸素生成の増加などが推定され ている。実際に、ホウレンソウ細胞から分離したミトコ ンドリアにおいて, 呼吸鎖の駆動に伴う発光が報告され ており、呼吸量など細胞の活動レベルを反映することが 示唆されている(Hideg et al., 1991)。

自家発光測定は酸化的ストレス状態のモニタリング (稲場, 1983; Khabiri *et al.*, 2014)のほか,腫瘍細胞 の判別(Musumeci *et al.*, 1992),脳活動のモニタリン グ(Kobayashi *et al.*, 1999),腎不全の判別(Agatsuma *et al.*, 1992)など,生理変化の指標としての応用が試み られている。

一方,各種のストレスを負荷された植物においても発 光の増加が観察されている。植物を傷つけると,付傷部 位から周囲よりも強い極微弱発光が一時的に観察される (Suzuki *et al.*, 1991)。付傷に伴う活性酸素種の生成 とそれによる膜脂質の過酸化は,発光に強く関わると考 えられており,一重項酸素(¹O₂)の関与が示唆されてい る(Saline and Bridges, 1981; Chen *et al.*, 2003)。植 物にとって致死的な高温では,劇的な発光の増加が認め られる(Havaux, 2003; Havaux *et al.*, 2006)。また, 急激な温度低下によっても一時的な発光の増加が認めら れ,凍霜害に対する耐性検定への応用も試みられている

(Agaverdiyev et al., 1965)。温度変化は、呼吸の増減 とともに酸素と脂質の反応速度に影響し、発光を増減さ せると考えられており、付傷部位における発光も十分な 温度がないと認められない(Flor-Henry et al., 2004)。

極微弱発光の性質を理解するために,発光強度の経時 変化の解析と並んで,分光解析も研究の当初から行われ ていた(Colli *et al.*, 1955; Slawinski *et al.*, 1981)。光 の波長は,励起種の種類やその生成部位に依存するため, 波長を調べて極微弱発光の発光源を同定することが目的 とされた。従来の分光測定装置では感度が足りないため, 1970年代には日本で光電子増倍管とフィルター分光を 組み合わせた高感度な自動分光測定装置が開発された (Inaba et al., 1979)。1990年代初めには、回折格子に よる分光と二次元測定用の光電子増倍管を組み合わせた, 多波長同時分光測定装置も開発され(Nagoshi et al., 1992),発光源の特定が精力的に試みられた(渡辺・稲 場,1991a,b)。しかしながら、極めて弱い発光強度と発 光波長の幅広さが、生体中の発光源の特定を困難にして いる。報告されている唯一の成功例として、腎不全症患 者の血漿で検出される 430 nm にピークを持つ発光にお いて,発光前駆物質として Indoxyl-8-glucronide が特定 されているに過ぎない(Agatsuma et al., 1994)。一方 では、発光分子種を特定せずとも極微弱光を連続的に測 定し, 生理変化の動的な指標として捉える試みは, 極微 弱光研究の中での一つの研究分野である。特に自家発光 の測定では、発光・蛍光プローブ等も使わないため、測 定行為が生理反応に与える影響が極めて小さい。また, 測定システムが非常にシンプルであることも利点に挙げ られる。そのため、植物においても、生理変化を伴う各 種のストレス,例えば,付傷 (Salin et al., 1981; Chen et al., 2003),嫌気的処理(Roschger et al., 1992), ホ ルモン処理(Kai et al., 1995), 塩処理(大矢ら, 1998), 乾燥ストレス(大矢ら, 2000),低温処理(Agaverdiyev et al., 1965),高温処理(Havaux, 2003; Havaux et al., 2006), 除草剤処理(Hideg and Inaba, 1991; Inagaki et al., 2007, 2008, 2009) などのストレスの負荷後に自 家発光の増加が観察されている。そして、上記のような 非生物的なストレスだけでなく,昆虫の食害(川畑ら, 2004; Yoshinaga et al., 2006), センチュウの接種(袴 田ら, 2004), そして病害(江原, 1994; Bennett et al., 2005; Kobayashi et al., 2007) といった生物的ストレス に応答した発光について近年報告されるようになってき た。

植物が持つユニークなストレス応答として,全身獲得 抵抗性(Systemic acquired resistance: SAR)がある。 元々は,壊死病斑を生じさせる病原体に感染すると,そ れ以降,同じ病原体のみならず,他の病原体に対しても 抵抗性を発揮する現象から発見された(Ryals *et al.*, 1994)。SAR研究が始まる前の1980年に日本では SAR 誘導活性を有する物質であるプロベナゾール

(Probenazole: PBZ) が偶然発見されている(Sekizawa et al., 1980)。SAR についての研究が進み,本作用におけるサリチル酸(Salicylic acid: SA)の重要性が明らか

になると(Ryals *et al.*, 1994), それをもとに,より強 カかつ安定的に抵抗性を誘導する物質として,アシベン ゾラルSメチル(Acibenzolar-S-methyl: ASM),チア ジニル(Tiadinil: TDL),イソチアニル(Isotianil)な どが開発・商品化されている。これらを称して,病害抵 抗性誘導剤(プラントアクティベーター)と呼ぶ(有江・ 仲下, 2007)。

植物病害への対策には、動物病になぞらえ、罹病した 植物個体を治癒あるいは延命させるための処置である 「治療」、植物病害の蔓延を防止するための処置である 「防除」、そして、作付け前から様々な方法で病害発生 リスクを低減させ,経済的な被害が発生しないようにす る「予防」がある(難波,2008)。治療,防除,予防そ れぞれにおいて, 耕種的, 物理的, 生物的, 化学的な手 段が存在し、コスト及び労力・効果・持続性(薬剤耐性 の回避,環境負荷の低減)のバランスを考慮した総合的 病害虫・雑草管理(Integrated Pest Management)が行 われるが(難波, 2008),病害抵抗性誘導剤は、化学的 な予防技術と言えるものであり,病害抵抗性品種の導入 と並び,植物病害対策の基幹技術に成り得るものである。 現在では SA を介する経路 (SAR) 以外にも、ジャスモ ン酸 (Jasmonic acid: JA) やエチレン (Ethylene: ET) を介する経路 (Induced systemic resistance: ISR, Wound-induced systemic resistance: WSR), ブラシノ ステロイド (Brassinosteroid: BR) を介する経路 (Brassinosteroid-induced disease resistance: BDR) t_{c} ども明らかになってきている(仲下・安田, 2004)。しか しながら、これまでに商品化されているのは病害抵抗性 誘導剤としてのみ登録された、わずか4剤で、しかも全 て SA 類似の物質である(有江・仲下, 2007)。SAR の 研究が最も進んでいることも理由にあるが、より根本的 な問題として、旧来の接種検定法に代わりうる選抜方法 が未だ存在しないことがあげられる。一般殺菌剤で一次 スクリーニングに利用されているような、ハイスループ ットスクリーニングが病害抵抗性誘導剤に適用できてい ないため、開発のボトルネックになっている。

この課題に取り組むため,著者は各種の病害抵抗性誘 導で共通する,特徴的な現象に注目した。すなわち,病 害抵抗性を誘導された植物では,それが誘導されていな い場合に比べて,病原体の攻撃に対する抵抗反応が加速, 増強されるもので,この現象を引き起こす作用はプライ ミング (Priming/Dfense priming) と呼ばれている

(Conrath et al., 2015)。従来プライミングの指標とされている抗菌物質生産や関連する遺伝子発現では、サン プルの破壊やマーカーの検出操作が処理速度や簡便性を 制限している。プライミングによる加速・増強を非破壊 で迅速に捉えるのに向いた病害抵抗反応の発見は,病害 抵抗性誘導剤のハイスループットスクリーニングを実現 する上で重要なブレイクスルーになると考えられた。

静岡県農林技術研究所(2007年に農業試験場から改称) では、1980年代から非病原性糸状菌による病害抵抗性誘 導を利用した病害防除法の確立に取り組んできた。一方 で、1990年代初めから農業分野における極微弱光測定技 術利用の可能性を模索しており、病害抵抗反応の簡易検 出への応用として両者が結びついた。

本研究は 1996 年から 2010 年まで静岡県農林技術研 究所において行ったものであり,本論文はその研究成果 を取りまとめたものである。

第 I 章 病害抵抗反応に伴う極微弱発光の検出に適した植物試料と病害 抵抗反応誘導因子の組み合わせ

第1節 緒言

植物の表層のワックス成分や細胞壁,精油のもとにな るような,細胞内に蓄えた抗菌物質などは,常在して自 然界の環境ストレスや無数の微生物による攻撃をかわす 障壁となることから,Constitutive defense(静的抵抗性) と呼ばれる。その静的抵抗性を打破して侵害する能力, つまり病原性を有するものの侵入を感知し,阻止しよう と,新たに発動させる防衛機構はInducible defense(動 的抵抗性)と呼ばれる(Freeman and Beattie, 2008)。

病原体の多くは、植物の検知をかいくぐり、動的抵抗 性を発揮させずに,植物細胞から養分を引き出す。植物 細胞を生かしたまま養分を摂取するものを活物寄生 (biotroph) という。各種植物のうどんこ病菌, さび病 菌などの病原糸状菌や、ファイトプラズマ、植物ウイル ス、ウイロイドなどが含まれる。一方、植物の動的抵抗 性を逆手に取って,細胞死を誘導し,養分を摂取するも のを死物寄生(necrotroph)と呼ぶ。灰色かび病菌,各 種 *Rhizoctonia* 属菌, サツマイモ黒腐病菌を含む Ceratocystis 属菌, Alternaria 属菌などの病原糸状菌の 他, 軟腐病を起こす Pectobacterium 属細菌などが含ま れる。また、宿主細胞への侵入時には biotroph として植 物の検知をかいくぐり, 侵入後に necrotroph として細 胞死を誘導する病原体は半活物寄生(hemibiotroph)と され、イネいもち病菌を含む Pyricularia 属菌、ウリ類 つる割病菌やトマト萎凋病菌を含む Fusarium 属菌,各 種炭疽病菌を含む Colletotrichum 属菌など,多数の病原 糸状菌のほか、イネ白葉枯病菌を含む Xanthomonas 属 細菌、タバコ野火病菌を含む Pseudomonas 属菌などの 病原細菌も半活物寄生とされる (Glazebrook, 2005; Vleeshouwers, 2014)

多くの biotroph もしくは hemibiotroph, さらに一部 の necrotroph は、感染に必要な植物との相互作用メカ ニズムの制約から、その宿主範囲は比較的狭い

(Freeman and Beattie, 2008)。ある病原体に対して, 同一種内の全ての植物個体が抵抗性を示す場合は,非宿 主抵抗性(non-host resistance)と呼ばれる(Gill *et al.*, 2015)。これに対して,同一種内で病原体に対する抵抗 性の程度に違いがある場合(品種間差)は,全く病徴が 認められない免疫(immunity)と呼べるレベルから,多

少の病徴は認められるものの、拡大が防がれる抵抗性 (resistant),明瞭な病徴が示される罹病性(susceptible) まで,連続的に認められる(Freeman and Beattie, 2008)。 病害抵抗反応の発動には高いコストを必要とするため, 植物は、病原体による静的抵抗性の打破を監視し、その 侵入を検出するシステムを重層的に備え,常時病害抵抗 反応を発動させるのではなく、必要に応じて、適切なセ ットの病害抵抗反応を発動させることで無駄なコストを 省いている。第1層目は,幅広い種類の病原体(微生物) に共通する分子パターン (Pathogen/Microbe associated molecular pattern(s): PAMP(s)/MAMP(s)) O Pattern recognition receptor (PRR) による認識を経て発動され るもので, Pattern triggered immunity (PTI) と呼ばれ, 一般にそれほど顕著ではないものの,幅広い,病原体レ ースに効果を示すことから圃場(基礎的)抵抗性,水平 抵抗性とも呼ばれる。進化の過程で、ある病原菌は PTI を抑制する働きを持つ分子 (Effector)を獲得し,特権的 に栄養を引き出す機会を得る。この場合、植物は「罹病 性」であり、明瞭な病徴を示す。これに対して、Effector を認識して動的抵抗性を発動できる植物は、「抵抗性」 であり, Effector の認識に関わるタンパク質は R

(Resistant) -protein, それをコードする遺伝子は Rgene と称される。Effector の認識を経て発動される動的 抵抗性は, Effector-triggered immunity (ETI) と呼ば れ,顕著な防御力と病原体レースに対する特異性の高さ から真性(R遺伝子依存)抵抗性,垂直抵抗性とも呼ば れる (Jones and Dangles, 2006; Tsuda and Katagiri, 2010)。ETIは,病原体の進化がもたらす新たな Effector により打破されることがあるが,植物側もR遺伝子の進 化により新たな ETI を発現する (Zigzag model: Jones and Dangles, 2006)。これは、イネいもち病に対する抵 抗性品種に典型的な例を見ることができるが、ETIの打 破は抵抗性の「崩壊」と呼ばれるほど、劇的な防御力の 低下につながるため、昨今の育種の課題となっている。 一方, Effector により PTI の抑制は起きるものの, PAMPs/MAMPs が往々にして複数のPRR に認識される ため(Boller and Felix, 2009),崩壊しにくい。育種に おいても、真正抵抗性と圃場抵抗性の組み合わせや、複 数の圃場抵抗性遺伝子の集積により、崩壊しにくい抵抗 性の獲得が試みられている(Horo et al., 2016)。

病原体の認識に成功し,動的抵抗性を発動させる過程 で、植物は様々な病害抵抗反応を繰り出す(Boller and Felix, 2006) 。 遅くとも数分内にはシグナル物質でもあ る活性酸素種(Reactive oxygen species/intermediates: ROSs/ROIs) の生成 (Levine et al., 1994; Alvarez et al., 1998) が始まり、数時間内には、遺伝子発現を経て、キ チナーゼやグルカナーゼなどの糖加水分解酵素(Mauch et al., 1988; Ji and Kuć, 1996), 過敏感細胞死 (Greenburg, 1996; Van Aken and Van Breusegem, 2015),抗菌物質であるファイトアレキシンの蓄積 (Ahuja et al., 2012), アポプラストへのカロースの沈 着(Luna et al., 2010), 細胞壁の強化(Iiyama et al., 1994)などが始まる。細胞死やカロースの沈着は、侵入を 受けた細胞で病原体を封じ込める。サツマイモ貯蔵根で みられるように、ファイトアレキシンの合成は隣接細胞 でも行われ(瓜谷, 2001),被害の拡大を防ぐ。

病害抵抗反応には、初期の ROSs/ROIs 生成や過敏感 細胞死、各種の酵素反応が介在するファイトアレキシン 合成や細胞壁の強化に至るまで、高エネルギー中間体の 励起種の生成を伴う生化学反応が多く含まれ、極微弱発 光の発光源になりうると考えられる。ROS そのものの発 光としては、一重項酸素 1O2の発光(1分子発光:λ=1270 nm; 2 分子発光: λ=634 nm, 703 nm) が報告されてい るが、生物の極微弱発光では、ROSによる、脂質やタン パク質の酸化で生じる三重項励起カルボニル ³R=O* (λ=350-550 nm)からの発光のほか, ROS や励起カル ボニルによって、クロロフィル、カロテノイド、アント シアニンやメラニンなどの色素が励起されることによる 発光 (メラニン λ=550-600 nm; クロロフィル λ=670-740 nm; クロロフィル蛍光 λ=750-1000 nm),または, 近接分子の発光を受けて色素から生じる蛍光などが、よ り優占すると考えられる(渡辺・稲葉, 1991a; Pospíšil et al., 2014)。三重項励起カルボニルは、初期病害抵抗反応 のオキシダティヴバーストで生成するスーパーオキシド ('O₂),スーパーオキシドの不均化で生じる過酸化水 素(H2O2)などの存在による,細胞膜成分の酸化のほか, サツマイモ貯蔵根におけるファイトアレキシン

(ipomeamarone) 生成(Fujita *et al.*, 1982)のように
P450 モノオキシゲナーゼが介在する二次代謝産物合成の反応中間体などに存在する(Guengerich *et al.*, 2011)。
また、シロイヌナズナの ETI における過敏感細胞死では、
ROS ではなく活性窒素種(Reactive nitrogen species:
RNS)の発光への関与が示されているが(Bennett *et al.*, 2005),直接的には、この場合にも RNS による膜脂質、
タンパク質の過酸化(Repetto *et al.*, 2012)の関与が推

測される。

エリシター (elicitor) は,植物の病害抵抗反応を誘導 する要因の総称で,病原体や宿主成分など生物由来分子 (Keen et al., 1983; Boller and Felix, 2006)のほか, 無機元素 (Fawe et al., 1998;渡辺ら, 2000),紫外線 (Kunz et al., 2008;神頭ら, 2011)などが報告されて いる。PAMPs/MAMPs あるいは effctor はともに病原 体(微生物)由来のエリシターであるが,上述のとおり, PAMPs/MAMPs は微生物の科以上のレベルで概ね共通 して存在しており,植物側の受容体も,狭くても種内で 共通している (Boller and Felix, 2009)。

PAMPs/MAMPs の代表として、キチン (poly-B1,4-Nacetyl-D-glucosamine) が知られている。キチンは, 植 物病原糸状菌の主要な細胞壁構成成分の一つであり、そ の分解物であるキチンオリゴ糖は、細菌由来の flg22 と 並び最もユニバーサルな MAMP であり、多くの植物に 対してエリシターとして働くことが報告されている (Shibuya and Minami, 2001)。また、純度の高い精製 品が粉末状態で市販されており、精密な試験に安定的な 利用が可能である。イネにおいて、キチン受容体である CEBiP (Chitin oligosaccharide Elicitor-Binding Protein) & CERK1 (Chitin Elicitor Receptor Kinase 1)の複合体によって認識され、病害抵抗反応を引き起こ すことが明らかにされた (Kaku et al., 2006; Shimizu et al., 2010; Hayafune et al., 2014)。イネ以外の植物 種においても類似のシステムが保存されている(Shinya et al., 2015)。イネでは6量体以上の重合度で明瞭な活 性が認められ、1 µM 程度からキチン応答性の遺伝子発 現を誘導し(Minami et al., 1996), 100 µM でファイ トアレキシン生成を強く誘導することが報告されている (Yamada *et al.*, 1993) 。

また,植物の根圏で生息させることで生育促進効果及 び,病害防除効果を示すことが報告されている植物生育 促進菌類 (Plant growth promoting fungi : PGPF) は, 菌体だけでなく,その培養ろ液にも強いエリシター活性 が認められる(Meera *et al.*, 1994; Koike *et al.*, 2001; 原液 \sim 1/2 水希釈で使用)。中でも *Penicillium simplicissimum* GP17-2 株の培養ろ液は、キュウリ,タ バコ,シロイヌナズナ,イネなどにエリシター活性が確 認され,新規の MAMPs として注目されているエリシタ ーである (Koike *et al.*, 2001; Hossain *et al.*, 2007)。

病害抵抗反応はダイナミックな生理変化を伴うため, 肉眼による病徴観察にはじまり,感染組織の顕微鏡観察 や代謝産物の検出,病害抵抗反応に先立つ遺伝子発現の 解析など,そのモニタリングのために多方面からのアプ ローチが試みられている。 本研究論文の目的でもある 病害抵抗性誘導の検出にも,病害抵抗反応のモニタリン グ技術が使われるが,病徴観察以外の顕微鏡的・生化学 的手法では,サンプルの破壊や加工を伴い,サンプリン グのタイミングや処理方法に付随する制限がある。また 近年,ルシフェリンールシフェラーゼシステムのような 発光マーカーを利用して,同一サンプルにおいて既知の 病害抵抗性誘導関連遺伝子/タンパク質発現を連続的に 非侵襲的に観察する方法が用いられるが (Ono *et al.*, 2004; Ono *et al.*, 2011),遺伝子組換えによる植物の加 工や,検出用試薬の添加などによる対象への干渉は避け られない。

本研究で扱う生物の極微弱発光(Ultraweak photon emission: UPE)は、Ultraweak chemiluminescence, biophoton とも呼ばれ、励起種生成を伴う生化学反応を 発光源とすると考えられている(Abeles, 1986)。植物 の病害抵抗反応では、高エネルギーの励起種が生成する 生化学反応が起きており、それに伴う発光が観察される 可能性が高い。病徴観察以外で植物の病害抵抗反応を非 侵襲的かつ連続的に測定する技術は、これまでにないユ ニークな指標となり、病害抵抗性誘導におけるプライミ ングの簡易な検出方法の作成につながる可能性がある。

本章研究では、第一に各種の植物と病原体の組み合わ せで、病害抵抗反応に関連した発光の検出を試みた。第 二に、病害抵抗反応に関連した発光の特性を解析し、病 害抵抗反応に伴って、定常状態と波長組成や強度が異な る発光現象が生じていることを明らかにした。第三に、 病原体接種の代替として、病害抵抗反応の引き金となる 因子、すなわち、エリシターで病害抵抗反応を引き起こ すことで、安定的な発光(エリシター応答発光)が得ら れることを明らかにし、植物の病害抵抗反応の新たな検 出方法として確立した。

第2節 各種植物からの病害抵抗反応に伴う 極微弱発光の検出

1. 材料及び方法

1) 極微弱発光測定装置

発光強度の経時的変化は、フォトンカウンター(図 2 MSPCI 浜松ホトニクス)で測定した。本装置は、240 ~630 nm に感度を持つ光電子増倍管(R329P 浜松ホトニクス)と、直径 60 mm、高さ 15 mm までのサンプルを円周上に 16 個搭載可能な円盤型サンプルテーブルを暗箱内に収めた測定部構造で、光検出器の下でサンプルテーブルを回転させ、各サンプルからの発光を約1分ごとに2秒間測定した。

2) 供試植物及び病原体

極微弱発光の測定には、入手しやすく、測定試料の調 性が容易な、1 年生植物の芽生え、葉、貯蔵根などを用 いることとし、モデル植物であり実用植物でもある、タ バコ及びイネに加えて、静岡県内で栽培が盛んなメロン、 イチゴ、トマト、サツマイモを解析対象とした。タバコ (Nicotiana tabacum) に対しては、病原体として野火 病菌(Pseudomonas amygdalipv. tabaci) 及び立枯病菌 (Ralstonia solanacearum)、イネ (Oryza sativa) に

対しては、いもち病菌 (*Pyricularia oryzae*) 及び白葉枯 病菌 (*Xanthomonas oryzae* pv. oryzae), メロン (*Cucumis melo*) に対しては, つる割病菌 (*Fusarium* oxysporum f. sp. melonis), トマト (*Solanum lycopersicum*)に対しては, 青枯病菌 (*R. solanacearum*), イチゴ (*Fragaria×ananassa*) に対しては, 炭疽病菌 (*Colletotrichum gloeosporioides*), サツマイモ (*Ipomoea batatas*) に対しては, つる割病菌 (*F.*



図2 フォトンカウンター (MSPCI 左:チェンバーを開けたところ、右:サンプルホルダー)

表1 供試した植物品種

植物種	供試 部位	品種	抵抗性
タバコ Nicotiana tabacum	葉切片	Bright Yellow 4 Burley 21 みちのく1 号 遠州	野火病, 立枯病に罹病性 野火病に抵抗性(<i>N. longiflora</i> 由来の強抵抗性) 野火病に抵抗性(<i>N. longiflora</i> 由来の強抵抗性) 立枯病に抵抗性(<i>Rps</i> 遺伝子とpolygene 由来)
イネ Oryza sativa	葉切片	コシヒカリ 黄金晴 ツキミモチ ササニシキ 中系 314 号 黄玉	いもち病に罹病性 いもち病レース 001 に抵抗性 (<i>Pi-a</i>) いもち病レース 007 に抵抗性 (<i>Pi-i,k</i>) 白葉枯病に罹病性 白葉枯病に抵抗性 白葉枯病に抵抗性
メロン Cucumis melo マクワウリ Cucumis melo var. makuwa	幼植物	アムス 大井 アンデス 黄金 9 号 (マクワウリ)	つる割病全レースに罹病性 つる割病レース0及び2に抵抗性(Fom-1) つる割病レース0及び2に抵抗性(Fom-1) つる割病レース0及び1に抵抗性(Fom-2)
トマト Solanum lycopersicum	幼植物	ポンテロ ーザ がんばる根 LS89 Walter	青枯病, 萎凋病に罹病性 青枯病に抵抗性(圃場抵抗性と考えられる) 青枯病に抵抗性(圃場抵抗性と考えられる) 萎凋病(レース2)に抵抗性
イチゴ Fragaria×ananassa	小葉	女峰 炭強 2(静岡農林研成) 炭強 20(静岡農林研成) 宝交早生	炭疽病抵抗性の程度 女峰 ≦ 炭強2 < 炭強20 ≦ 宝交早生 (圃場抵抗性と考えられる)
サツマイモ Ipomoea batatas	貯蔵根 切片	ベニコマチ	つる割病抵抗性 極弱

oxysporum f. sp. batatas) を用いた。供試品種として, タバコとイネ,メロンでは対象病害に対して真性抵抗性 を持つ品種と罹病性の品種,イチゴとトマトでは,圃場 抵抗性程度が異なる品種を用いた。サツマイモでは,罹 病性品種のみを用い,接種に病原菌及び非病原性菌(*F.* oxysporum SK-102株)を用いた。供試品種の対象病害 に対する抵抗性の概要は表1に,用いた病原体の種類は 表2に示した。

病原体のうち,細菌はジャガイモ半合成寒天培地(ジ ャガイモ 300 g 分の煎汁,スクロース 15 g,ペプトン 5 g, Na₂HPO₄・12H₂O 2 g, Ca(NO₃)₂・4H₂O 0.5 g,寒 天 15 g,蒸留水 で 1000 mL にメスアップ後オートクレ ーヴ,pH 6.8) で 25℃,2 日間培養した菌体を滅菌水に 懸濁して用いた。糸状菌のうち,いもち病菌は,オート ミール寒天培地(オートミール 50 g を 80℃の熱水中で 1 時間撹拌し煮汁をガーゼでろ過したもの・寒天 20 g, 蒸留水で 1000 ml にメスアップ後オートクレーヴ,pH 5.8)上で形成させた分生胞子を Tween20(和光純薬)
0.02%を含む滅菌水に懸濁して用いた。*Fusarium*属菌(つる割病,萎凋病),炭疽病菌はジャガイモ・デキストロース液体培地(Potato dextrose broth, PDB:ジャガイモ 200g分の煎汁・デキストロース 20g/L)中で
28℃,120 rpm,4日間振とう培養した培養物をガーゼでろ過,遠心洗浄して菌糸体を除いて得た分生胞子(*Fusarium*属菌は出芽細胞:bud-cell)を滅菌水に懸濁して用いた。

3)病原体の接種と極微弱発光測定

病害抵抗反応に伴う極微弱発光は非常に発光強度が弱いことが予測されたため、いずれの植物サンプルも接種前に 1~5 時間,暗黒下において,光照射によって発生する遅延蛍光が減衰してから,病原体の接種を実施した。

タバコは,播種後10週目の植物の完全展開葉からリ ーフディスク(φ40 mm)を採取し,滅菌水に浮かべ3時 間暗所に置いた。野火病菌あるいは,立枯病菌の滅菌水

宿主	病名	病原名	菌株名(分譲元)	
タバコ ー	野火病	Pseudomonas amygdali pv. tabaci	MAFF301075	
	立枯病	Ralstonia solanacearum phylotype I	MAFF301069	
	1. <i>1. 4. i</i>	Pyricularia oryzae	愛知県農業総合試験場	
/ / -	いもち病	レース 001, 007	山間農業研究所	
11	<u>~ * + 11 r</u>	Xanthomonas oryzae pv. oryzae		
	日枼枯抦	レース I	MAFF 311018	
メロン	って刺亡	Fusarium oxysporum f. sp. melonis		
	つる割病	つる割病 レース 0,レース 1,レース 2,レース 1,2y		九州冲禅晨業センター
	青枯病	Ralstonia solanacearum phylotype I	MAFF 301070	
		Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici		
	委凋病	レース 2	静尚晨杯研保存株	
イチゴ	炭疽病	Colletotrichum gloeosporioides	静岡農林研保存株	
サツマイモー	つる割病	Fusarium oxysporum f. sp. batatas	静岡農林研保存株	
	非病原性菌	Fusarium oxysporum SK-102 株	静岡農林研保存株	

表2 供試した病原体

懸濁液(1×10⁸ cfu/ml)を減圧接種した後,φ50 mmの プラスティックシャーレ(栄研化学工業(株))内で滅 菌水に浮かべ,25℃で発光を測定した。1回の試験は2 反復で行い,結果は2回の試験の平均を示した。

イネは 5-6 週齢の植物体の展開葉から葉切片(3 cm×1 cm 3 枚)を採取し,滅菌水で湿らせた濾紙を敷いた 60 mm シャーレに入れて暗所に 1 時間置いた。その後,束 ねた木綿針で葉裏に傷を付け,いもち病菌の分生胞子懸 濁液(1×10⁷ cells/ml)あるいは,白葉枯病菌懸濁液 (1×10⁸ cells/ml)1 mlを全体に噴霧接種し,25℃で接 種面の発光を測定した。結果は 2 回の試験の平均を示し た。

メロンは、インキュベーター内(25℃・明期12時間) のプラスティックシャーレで子葉を展開させた幼植物 (催芽4-6日後・10個体)を使用した。滅菌水で湿らせ た濾紙を敷いたシャーレに移し、5時間暗所に置いた後、 つる割病菌の出芽細胞懸濁液(1×10⁷ cells/ml)1 mlを 全体に噴霧接種し、直ちに25℃で発光を測定した。1回 の試験は2反復で行い、結果は2回の試験の平均を示し た。

トマトは、インキュベーター内(25℃・明期12時間) のプラスティックシャーレで子葉を展開させた幼植物 (催芽4-6日後・10個体)を使用した。滅菌水で湿らせ た濾紙を敷いたシャーレに移し、5時間暗所に置いた後、 萎凋病菌の出芽細胞懸濁液(1×10⁷ cells/ml)もしくは、 青枯病菌懸濁液(1×10⁸ cells/ml)1 ml を全体に噴霧接 種し,直ちに25℃で発光を測定した。1回の試験は2反 復で行い,結果は2回の試験の平均を示した。

イチゴは、小葉を採取し、滅菌水で湿らせた濾紙を敷 いたプラスティックシャーレに入れて暗所に1時間置い た。その後、束ねた木綿針で葉裏に傷を付け、炭疽病菌 の分生胞子懸濁液(1×10⁷ cells/ml)1mlを全体に噴霧 接種し、25℃で葉裏の発光を測定した。1回の試験は2 反復で行い、結果は2回の試験の平均を示した。

サツマイモは, 貯蔵根から φ50 mm, 厚さ 8 mm の円 盤状の切片を作成し, シャーレに入れて 20℃, 暗黒下で 12 時間エイジングした。その後, つる割病菌もしくは, 非病原性菌の出芽細胞懸濁液 (1×10⁷ cells/ml) 250 µl を切片上面に塗布接種し, 20℃で接種面の発光を測定し た。1 回の試験は 2 反復で行い, 結果は 2 回の試験の平 均を示した。

2. 結果

1)病原体(野火病・立枯病)を接種したタバコ 葉の発光

いずれのタバコ品種でも対照の水処理では、処理開始 から12時間の時点で5~6光子/秒/cm²以下の発光強 度で推移した。野火病菌を接種すると、野火病抵抗性品 種'Burley21'及び'みちのく1号'では、接種0.5~1時間 後の短時間の発光増加に続き,8時間後から始まり12時 間後に10光子/秒/cm²以上のピークを迎え漸減する 発光パターンが認められた(図3)。これに対し,罹病 性品種'Bright Yellow 4'(BY-4)では水処理と比べて明 瞭な変化が認められず,抵抗性の有無により,病原菌接 種時の極微弱発光に明瞭な差異が認められた(図3)。 立枯病菌の接種により,優性1因子の立枯病抵抗性遺伝 子を有する品種'遠州'と立枯病抵抗性遺伝子を持たない 罹病性品種 BY-4の葉は,ともに接種後20時間過ぎから 発光を増加させたが,'遠州'のピーク発光強度がより高く, 20光子/秒/cm²に達した(図4A, B)。





図3 野火病菌を接種したタバコ葉の発光

タバコ展開葉から葉切片(直径 40 mm)を採取し,滅 菌水に浮かべて3時間暗所に置いた後,野火病菌(1× 10⁸ cfu/ml)を減圧接種し,シャーレ内で滅菌水に浮か べて25°Cで発光を測定した。結果は2回の試験の平均 を示した。

接種後の経過時間(h)



図4 立枯病菌を接種したタバコ葉の発光

タバコ展開葉から葉切片(直径 40 mm)を採取し、滅菌水に浮かべて 3 時間前後暗所に置いた後, 立 枯病菌(1×10[°] cfu/ml)を滅圧接種し、シャーレ内で滅菌水に浮かべて 25[°]Cで発光を測定した。結果は 2 回の試験の平均を示した。

2)病原体(いもち病菌・白葉枯病菌)を接種し たイネ葉の発光

イネ葉切片へのいもち病菌の接種では、レース 007 を 接種した場合に抵抗性品種'ツキミモチ'では、24 時間後 まで接種した葉片の発光が上回り、接種後 20 時間前後 には一時的な発光増高も認められた(図 5 A)のに対し、 罹病性品種'コシヒカリ'においては、接種した葉片の発光 が対照より高い状態が、接種直後から 10 時間程度認め られた(図5B)。しかしながら、レース001を接種した抵抗性品種"黄金晴"と罹病性の"コシヒカリ"では接種 区と対照区の間で差がなく、品種間にも明瞭な差が認め られなかった(図5C,D)。

これと同様に、白葉枯病菌を接種した場合にも、接種 区と対照区あるいは、抵抗性と罹病性の品種間差が明瞭 でなかった(図6A~C)。



図5 いもち病菌を接種した各種イネ品種の発光

イネ展開葉から葉切片(3 cm×1 cm 3 枚)を採取し,60 mm シャーレに入れて暗所に 1 時間置いた。その後,束ねた木綿針で葉裏に傷を付け,いもち病菌(レース 001 もしくは 007)の懸濁液(1×10⁶ cells/ml) 1 ml を全体に噴霧接種し,25℃で接種面の発光を測定した。結果は 2 回の試験の平均を示した。



3)病原体(つる割病菌)を接種したメロン幼植物の発光

子葉期の幼植物につる割病菌の出芽細胞を接種する と、いずれのメロン及びマクワウリ品種でも接種直後か ら対照の水処理に比べて発光が増加した(図7A~D)。 つる割病菌のレース0,1,2,1,2y全てに罹病性のメロ ン品種'アムス'は、レース1,2yに対してやや発光強度が 低かったものの、4レース全ての接種で、接種後2時間 で発光ピークに達し、その後漸減する同傾向の発光パタ ーンが認められた(図7D)。これに対し、抵抗性遺伝子 Fom-2を持ち、レース0,1に抵抗性のマクワウリ品種'黄 金9号'は、全てのレースの接種で、接種後10~20分の 早い段階で発光のピークに達した。その後、レース0,1 の接種では 6~8 時間後にゆるやかな第二ピークを持つ 発光パターンが認められる一方で,レース 2, 1,2y に対 しては接種後 3~4 時間後に第二ピークを持つ発光パタ ーンが認められた(図7A)。

抵抗性遺伝子 Fom-1 を持ち,レース 0,2 に抵抗性 のメロン'大井'は,レース 0,1,1,2yの接種後2時間過 ぎにピークに達し,その後漸減する発光パターンを示す 一方で,レース2 に対しては他の3 レースに対するのと 異なり,接種後8~10時間に緩やかなピークを持つ発光 パターンを示した(図7B)。Fom-1 を持つ別のメロン 'アンデス'(図7C)でも同様に,レース2 に対してのみ 異なる反応を示した。表3 に本試験の結果をまとめた。



図7 つる割病菌各レースを接種したレース判別用メロン各品種の発光

湿濾紙上で子葉を展開させた幼植物(催芽 4-6 日後・10 個体)を 60mm シャーレに移し,5 時間前後暗所に置いた後,つ る割病菌の出芽胞子懸濁液(1×10⁷cells/ml)1 ml を全体に噴霧接種し,25℃で発光を測定した。結果は2 回の試験の平均を 示した。

表3 つる割病菌各種レースを接種したメロン品種の反応(上段:病徴,下段:発光)

接種レース 抵抗性/ 発光パターン*	レース 0	レース 1	レース 2	レース 1,2y
	S	S	S	S
	+/-	+/-	+/-	+/-
	R	S	R	S
入 开	+/-	+/-	+/+	+/-
アンデス	R	S	R	S
	+/-	+/-	+/+	+/-
黄金9号	R	R	S	S
(マクワウリ)	+/+	+/+	+/-	+/-

* S∶罹病性, R∶抵抗性

* 対照処理(水)との比較

+/-:接種後3時間以内の発光増加あり/接種後6時間以降の発光増加なし +/+:接種後3時間以内の発光増加あり/接種後6時間以降の発光増加あり

4)病原体(青枯病菌・萎凋病菌)を接種したト マト芽生えの発光

トマト幼植物への青枯病菌の接種では, 罹病性の'ポン テローザ'で, 病原菌接種により対照の水処理に比べて平 均発光強度が若干低くなったが, いずれの品種において も一過性の発光増加は認められなかった(図8A~D)。 また、トマト幼植物への萎凋病菌の接種では、罹病性及 び抵抗性品種ともに対照の水処理に対して明瞭な発光変 動は認められなかった(図9A, B)。



接種後の経過時間(h)

図8 青枯病菌を接種したトマト各品種の発光

湿濾紙上で子葉を展開させた幼植物(催芽 4-6 日後・10 個体)を 60mm シャーレに移し,5 時間前 後暗所に置いた後,青枯病菌の懸濁液(1×10⁸cells/ml)1 ml を全体に噴霧接種し,25℃で発光を測定 した。結果は2回の試験の平均を示した。



図9 萎凋病菌を接種したトマト各品種の発光

湿濾紙上で子葉を展開させた幼植物(催芽4-6日後・10個体)を60mm シャーレに移し,5時間暗 所に置いた後,萎凋病菌の出芽胞子懸濁液(1×10⁷cells/ml)1ml を全体に噴霧接種し,25℃で発光を 測定した。結果は2回の試験の平均を示した。

5) 病原体(炭疽病菌)を接種したイチゴ葉の発 光

炭疽病菌の分生胞子懸濁液を接種したイチゴ小葉では、タバコのリーフディスクやメロンの幼植物で認められた一過性の発光増加は認められなかった(図10)。今回供試した品種は、炭疽病抵抗性の強さにおいて、'女峰'

≦'炭強 2'< '炭強 20'≦ '宝交早生'の関係にある。各品種において、病原菌を接種した区と水処理の対照区の発光強度を比べると、抵抗性の弱い'女峰'及び、'炭強 2'では、接種区の発光強度が対照区に比べて高い傾向にあったが(図 10 A, B),抵抗性が強い'炭強 20'及び、'宝交早生'では対照区と差がなかった(図 10 C, D)。</p>



接種試験による抵抗性の程度: 女峰 ≦ 炭強2 < 炭強20 ≦ 宝交早生

図 10 炭疽病菌を接種したイチゴ各品種の発光

イチゴ小葉を採取し、60mmシャーレに入れて暗所に1時間置いた。その後、束ねた木綿針で 葉裏に傷を付け、炭疽病菌の分生胞子懸濁液(1×10⁷cells/ml)1mlを全体に噴霧接種し、25℃ で接種面の発光を測定した。結果は2回の試験の平均を示した。

6)病原体(つる割病菌)を接種したサツマイモ 貯蔵根切片の発光

サツマイモ貯蔵根切片の表面につる割病菌(F. oxysporumf.sp. batatas)の出芽細胞を接種すると,接 種 1~2時間後から発光強度が上昇し,接種 14~18時間 後をピークに,漸減した(図 11)。ピーク時の発光強度 は 300 光子/秒/cm²を越えた。また,非病原性の F. oxysporumを接種した場合にも,病原体接種には及ばな いがピークで 200 光子/秒/cm²を越える発光が認めら れた。対照として同量の水を処理した場合には,接種区 でピークを迎える時間帯でも 15 光子/秒/cm²程度で あり,病原体の接種により他の植物に比べて著しい発光 の増加が認められた(図 11)。測定終了後,病原菌接種 切片上には菌糸が旺盛に成育していたが,非病原菌接種 切片では,菌糸の成育は認められなかった(図省略)。

3. 考察

本研究では,病害抵抗反応に伴う発光現象の検出を目 的に,各種作物において,病原体を接種し,それに対す る罹病性品種と抵抗性品種の反応を比較解析した。

病原体の侵害に対して,植物はまず基礎的抵抗性(PTI) を発揮するが,病原体は,それを抑制・遅延させるか, あるいはそれに耐えるかして感染を成立させる(瓜谷ら, 2001; Tsuda and Katagiri, 2010)。本研究において, タバコ立枯病,メロンつる割病において抵抗性・罹病性 に共通した発光増加が認められたのは,この基礎的抵抗 性(PTI)に由来する可能性が考えられた。 これと同様に、サツマイモ貯蔵根に対して、つる割病 菌あるいは非病原性フザリウム菌を接種した場合の発光 は、強度の差はあったものの、基礎的抵抗性に由来する 同質の反応と推測される。サツマイモ貯蔵根に病原性を 示す黒斑病菌、偽黒斑病菌、つる割病菌、紫紋羽病菌な どは、侵入の仕方が似ており、侵入に対する病害抵抗反 応として、ファイトアレキシンであるイポメアマロンを はじめとするテルペン類が合成される(瓜谷ら、2001)。 イポメアマロンの糸状菌成育抑制効果はサツマイモ病原 体に対しては比較的弱く、病原体は侵害を続けることが 出来ると考えられている(瓜谷ら、2001)。そのため、 つる割病菌の接種により、非病原性菌に比べて強い発光 が長く続いたのは、侵害を止められず、サツマイモが抵 抗反応を続けていたのが原因だと推測される。

一方, 真性抵抗性を持つタバコ野火病抵抗性品種では, 極微弱発光の測定において野火病菌の接種 8~12 時間後 に, 罹病性品種では認められない一過的な発光増加が認 められた(図10)。野火病抵抗性のタバコに野火病菌を 接種して過敏感反応を誘導すると,接種の9~12 時間後 に活性酸素種(O²)の生成と細胞死が起きることが報告 されている(Krzymowska *et al.*, 2007)。過敏感細胞死に 基づく極微弱発光の発生は Bennett らにより報告されて おり(Bennett *et al.*, 2005),抵抗性品種で認められた発 光の一過的な増加は,過敏感反応に由来する可能性が推 察される。

しかしながら,立枯病菌に対して真性抵抗性を持つ抵 抗性品種と罹病性品種の間に認められた発光パターンの



図 11 つる割病菌あるいは非病原菌を接種したサツマイモ貯蔵根の発光

結果は2回の試験の平均を示した。

違いを、病害抵抗反応に関連付けて推察することは、今 回はできなかった。同様に、つる割れ病菌のレースに対 して真性抵抗性を持つメロン品種(レース0と抵抗性品 種の組み合わせを除く)からは、表3に示したように、 病原菌の接種の6~10時間後にピークを持つ極微弱発光 が発生し、この発光は罹病性反応では認められないこと から、抵抗性反応に起因すると考えられるが、その種類 を推察することはできなかった。

タバコ葉あるいはサツマイモ貯蔵根切片への病原菌接 種では共に,水処理と明瞭に区別される発光の増加が観 察された。タバコ葉への細菌接種では,常用される細胞 間隙への浸潤接種をおこない,また,サツマイモ貯蔵根 切片への接種では,切断面への塗布をおこなったことに より,他の植物種のケースに比べて病原体の細胞への接 触機会が多く,その結果,病害抵抗反応を示す細胞数が 多くなったと考えられ,接種方法が発光誘導に与えた影 響が大きかった。

これとは対照的に、イネ葉、トマト幼植物、イチゴ小 葉などでは、いずれの組み合わせにおいても、対照区と の発光の差は明瞭には認められなかった。罹病性の組み 合わせでは、測定後に接種部位の病徴を確認しており、 接種に問題は無く(データ省略)、少なくとも、今回の 方法による病害抵抗反応に伴う発光変動の検出は、難し いと考えられた。

以上のように,複数の植物と病原体の組み合わせにお いて早期に明瞭な発光の増加が認められたのは,一部の 組み合わせに限られたが,発光パターンが植物の抵抗性 を反映することが確認された。今回供試した中で,サツ マイモ貯蔵根切片とフザリウム菌の組合せでは,特に強 い発光が長時間にわたって観察され,病害抵抗性に関連 した発光の特性を調べる上で好適なモデルと考えられた ため,第3節ではこの組み合わせを用いて解析を進めた。

第3節 病害抵抗性に関連する極微弱発光の 特性解析

1. 材料及び方法

1)供試植物

サツマイモ品種'ベニコマチ'の貯蔵根から直径 50 mm, 厚さ8 mm の切片を作成し,試験に用いた。切片は,プ ラスティックシャーレに入れて 20℃,暗黒下で 12 時間 エイジングした後に使用した。また,切片を 10 分間沸騰 水中においたものを不活性化サンプルとして使用した。

2) 供試菌株

第2節で使用した非病原性フザリウム菌F. oxysporum

SK-102株を使用した。本菌株は接種試験によってサツ マイモに対する病原性がないことを確認している。ジャ ガイモ・デキストロース液体培地(Potato dextrose broth, PDB:ジャガイモ200g分の煎汁・デキストロース20g/ L)中で28℃,120 rpm,4日間振とう培養した培養物を ガーゼでろ過して菌糸体を除き,出芽細胞(bud-cell) 懸濁液を得た。遠沈と滅菌水への再懸濁を5回行い,細 胞を洗浄した。洗浄した細胞は滅菌水で1×10⁵~10⁷出 芽細胞/mlになるよう滅菌水で段階希釈して試験に用い た。また,チューブに入れた胞子懸濁液を5分間,沸騰 水中に置いたものを同様に洗浄して不活性化サンプルと した。対照には,滅菌水を使用した。サツマイモのファ イトアレキシンであるイポメアマロン(Ipomeamarone) の生成を誘導する対照菌として,サツマイモ黒斑病菌 (*Ceratocyctis fimbriata* NBRC 30501)を用い,非病原性

フザリウム菌と同様に接種源(内生胞子)を調整した。

3) 病原体の接種と極微弱発光の測定

サツマイモの発光強度の経時変化は、フォトンカウン ター(C1230 浜松ホトニクス)で測定した。本装置 は、185~650 nmに感度を持つ光電子増倍管(R208 浜 松ホトニクス)と、直径60 nm、高さ15 nm までのサ ンプルを円周上に16個搭載可能な円盤型サンプルテーブ ルを暗箱内に収めた構造で、光検出器の下でサンプルテ ーブルを回転させながら測定を行った。今回の試験で は、所定濃度の胞子懸濁液を上面に塗布したサツマイモ 切片を直径60 nmのポリスチレンシャーレ(栄研)に入 れ、サンプルテーブルに格納し、各サンプルについて 42.4秒ごとに1秒間の測定を20℃で24時間連続しておこ なった。

4) サツマイモ貯蔵根切片上における非病原性 フザリウム菌の発芽

発光測定用のサンプルと同様に非病原性フザリウム菌 を接種した切片を20℃で暗所に維持し,接種の3時間後 および6時間後に接種面を含む組織薄片を採取した。小 川ら(1986)の方法に従い,非病原性フザリウム菌の出 芽細胞を染色した後,光学顕微鏡下で1枚の薄片あたり 100個以上の胞子を観察し,4枚の平均発芽率を求めた。

5)発光の二次元イメージング

発光の二次元イメージングには、ARGUS-50/VIM フォ トンカウンティングカメラ(浜松ホトニクス)を備えた 撮像用暗箱を使用した。サツマイモ切片上面に非病原性 フザリウム菌の出芽細胞懸濁液を 1×10⁷ 個/ml の濃度で 「F」の字に塗布し,暗箱内で 20℃,6時間インキュベー トした後に5分間発光を積算し,2次元画像を得た。ネ ガティブコントロールとして,滅菌水を同様に塗布した 切片を使用した。

6) イポメアマロンの検出

サツマイモ貯蔵根では黒斑病菌, 偽黒斑病菌, つる割 病菌,紫紋羽病菌などの侵入に対する抵抗反応として, ファイトアレキシンであるイポメアマロン (Ipomeamarone) を生成することが報告されている (Oguni and Uritani, 1974; 瓜谷, 2001)。非病原性フザリ ウム菌を接種したサツマイモにおいて, 既報 (Oguni and Uritani, 1974) に従い, 薄層クロマトグラフィー (Thin layer chromatography: TLC) によりイポメアマロンの検出を試 みた。サツマイモ貯蔵根から厚さ5mm,重さ70gの切 片を切り出し,非病原性フザリウム菌の出芽細胞懸濁液 (1×10⁷ 個/ml)を上面に塗布接種した。ポジティブコン トロールとして、サツマイモ黒斑病菌の 出芽細胞懸濁液 (1×10⁷個/ml), ネガティブコントロールとして, 滅菌 水を同様に塗布したものを用意した。接種した切片は, 湿室条件で、20℃、暗黒下において48時間インキュベー ションした。インキュベーション後、それぞれの切片を 100 mlの抽出溶媒(クロロフォルム - メタノール 1:1

vol/vol) 中で摩砕した。摩砕液はガラス繊維ろ紙(GA200 アドバンテック) でろ過した。ろ過残渣を 50 ml の抽出 溶液で洗い,洗い液を先の抽出物と合わせ,50mlの脱イ オン水と混合し、2 層に遠心分離させ、下層のクロロフ オルム層を採取・乾燥してイポメアマロンを含むとされ る脂質画分を得た。脂質画分は2mlの抽出溶媒に溶解し, 200 μl をシリカゲルプレート (PK-5 Whatman) にスポ ットして n-ヘキサン-酢酸エチル (4:1 vol/vol) で1時間 展開した。展開後のプレートに Ehrlich 試薬(10% pdimethylaminobenzaldehyde を含む 95 %エタノール-濃塩 酸 1:1 vol/vol 溶液)を噴霧し, Rf 値 0.63 付近の赤桃色 スポットの存在でイポメアマロンの生成を確認した。な お、切片接種面に Ehrlich 試薬を直接噴霧することで、イ ポメアマロンを含むセスキテルペン類を赤桃色に発色さ せることが出来るため,一部の切片で発色を確認したの ち実際の抽出を行った。

7) サツマイモで観察される極微弱発光の分光測 定

非病原性フザリウム菌の接種により、サツマイモで観





MSPC II の外観(左)とチェンバー内部(右) 外周:サンプルホルダー 内周:フィルターフォルダー



図 12 分光型フォトンカウンターMSPCI(上)と測定波長特性(下) ※各フィルターを透過した光子数を透過率及び量子効率で補正した。

察される極微弱発光の発光スペクトルの特性を明らかに するため,成長ホルモン作用のある薬剤処理及び変温 処理によって生じる極微弱発光の発光スペクトルと比較 解析を行った。

極微弱発光の分光測定方法

極微弱発光の分光測定には、分光型フォトンカウンタ ー(MSPCII 浜松ホトニクス)を用いた(図12)。本 装置は240-630 nmに感度を有するヘッドオン型光電子 増倍管(R329 浜松ホトニクス)とサンプル用及び、分 光フィルター用の回転円盤を収めた高精度の暗箱からな る。装置内には直径 60 mm、高さ15 mm までのサンプ ルを16 個まで搭載可能である。分光用フィルターは 9 枚まで搭載可能で、本研究ではそれぞれ半値幅で約50 nm の透過帯域を持ち、透過帯域の重なりが少ない、帯 域透過フィルターのセット(図12 日本真空光学)を使 用し、280-630 nm の波長域をカバーした。それぞれの サンプルからの発光は8分ごとに40秒間(フィルター 無し及び7枚のフィルター測定に各5秒間)測定した。 1 回の試験にそれぞれの処理で2枚の切片を使用し、試 験は3回行った。

② 非病原性フザリウム菌の接種

非病原性フザリウム菌 SK-102 株の出芽細胞懸濁液 (1×10⁷個/ml) 0.2 mlをサツマイモの上面に均一に塗 布接種した。対照として,滅菌蒸留水を同様に塗布した。 接種直後から 20℃, 36 時間,極微弱発光の分光測定を 行った。

③ 2,4-D処理

2,4-D (2,4-dichlorophenoxyacetic acid) は細胞の伸 長成長を促進し,分化を制御するオーキシン作用を示す。 また,2,4-D は適切な処理濃度でサツマイモのカルス形 成を誘導する (Liu and Cantlife, 1984; Schultheis *et al.*, 1990) など大きな生理状態変化を誘起するため発光変化 が期待される。本研究では2,4-D (和光純薬)を10 mM Tris-HCl (pH 7.0) で 2 mg/L に希釈して使用した。0.2 ml の 2,4-D 溶液, あるいは対照として溶媒をサツマイモ 上面に塗布した。塗布直後から 20℃, 65 時間,極微弱 発光の分光測定を行った。

④ 変温処理

サツマイモの貯蔵根は長期間の保存に際して,事前に 高温・高湿度処理される(R.H. 90-95%, 30-32℃で1 週間)が,この間に呼吸速度は上昇し,収穫時に出来た 傷にはコルク層が形成されるなど,生理状態に変化が認 められており(小川ら,1987),発光変化が期待される。 本研究では,装置内を長期間高湿度に保つことが困難で あったため,短時間の温度変化に曝した場合の発光変化 を調べた。すなわち,暗箱内の温度を最初の 4 時間は 20 ℃に維持し,その後 33℃まで上昇させ 10 時間維持 した後,20 ℃に温度を下げて 10 時間維持した。サンプ ル温度はサンプルに直径 1 mm 程度の熱電対プローブを 直接差し込み,自記温度計 (TR-52S T&D)で記録した。 極微弱発光の分光測定は 24 時間行った。

⑤ 分光データの解析

それぞれの波長域における発光強度 **L**は、下式により 算出した。

$I_i = (N_i - N_i b) / (QE_i \times T_i)$

Niと Nib はそれぞれ i番目のフィルターを通過して検 出されたサンプルあるいはブランクホルダーの発光を示 す。QEiは i番目のフィルターの透過域に対応する波長 域における光電子増倍管の量子効率の平均値,そして Ti は i番目のフィルターの半値幅での平均透過率を示す。 サツマイモ貯蔵根切片から放射される極微弱発光の波長 組成は,測定した全ての波長域における発光量の合計に 対する,各波長域における発光量の割合で示した。図中 の波長組成の推移は10測定点ごとの移動平均を示した。 本研究では,280-430 nm の領域では殆ど発光が検出さ れなかったため,430-480 nm,480-530 nm,530-580 nm 及び 580-630 nm の 4 波長域の値のみを表示した。

2. 結果

1) フザリウム菌接種条件の違いによるサツマイ モの極微弱発光の変動

表4・図13に示すとおり,生のサツマイモに非病原性 フザリウムの生菌を接種した場合のみ,発光の顕著な増 加が認められた(表4・図13:1~4番)。熱処理して不 活性化したサツマイモでは,不活性化菌(表4・図13: 7番)でも生菌(表4・図13:8番)でも発光の増加は殆 ど検出されず,生のサツマイモに死菌,あるいは滅菌水 を処理した場合(表4・図13:5,6番)を下回った。さ らに,測定中24時間の積算発光量は接種胞子濃度の増 加に伴って増加した。また,接種胞子濃度が高いほど, 発光強度がピークに到達する時間が早まった(表4・図 13:1~4番)。

2) サツマイモ貯蔵根切片上におけるフザリウム菌 の発芽 接種3時間後で平均4.5%,6時間後では36.8% の胞子が発芽していた(図表略)。

	サツマイモ	フサ	ザリウム菌	極微弱発光		
実験番 号	熱処理 ^{a)}	熱処理り	濃 度 (細胞数/ml)×10⁵	最高発光強度 (光子数/秒/cm ²)	積算発光量 (24 時間)×10 ³	発光ピ ー ク (測定開始後 h)
1	無	無	100	257	2934	10
2	無	無	20	162	1976	13
3	無	無	5	144	1257	22
4	無	無	1	108	838	≧24
5	無	有	100	42	395	≧24
6	無	滅菌水 ^{c)}	0	18	144	0 ^{d)}
7	有	有	100	23	102	0 ^{d)}
8	有	無	100	18	90	0 ^{d)}

表 4	フザリウム菌の接種条件がサツマ	イモの極微弱発光に与える影響
-----	-----------------	----------------

a)サンプルを沸騰水中に 10 分間おいて不活性化した。

b)サンプルを沸騰水中に5分間おいて不活性化した。

c)無処理対照

d)実験番号 6-7 では測定中に発光ピークが認められなかった。



図 13 フザリウム菌とサツマイモの相互作用に伴う発光の強度推移 図中の番号は表4の実験番号に対応する。

3) 極微弱発光の二次元イメージング

サツマイモ切片の表面に非病原性フザリウム菌の胞子 懸濁液を「F」の形に塗布接種し、ARGUS-50/VIM で二次 元イメージングを行ったところ、塗布した部分で周囲に 比べて強い発光が認められた(図14)。これより、非病 原性フザリウム菌を接種したサツマイモでは、菌と接し ている部分で主に発光していることが示された。

4) 非病原性フザリウム菌の接種によるイポメア マロン蓄積の検出

非病原性フザリウム菌を接種したサツマイモにおいて, サツマイモの主要なファイトアレキシンである,イポメ アマロンの蓄積を調べたところ、TLC プレートアッ セイにおいて、対照の黒斑病菌を接種した場合と比べる と量は少ないものの、ほぼ同位置にイポメアマロンの存 在を示す、赤桃色のスポットが検出された(図15 矢印 Rf=0.63 付近)。

5) フザリウム菌との相互作用に伴う発光の波長 組成変化

滅菌水を塗布したサツマイモ貯蔵根切片の発光は,ほ ぼ 480-530 nm, 530-580 nm 及び,580-630 nm の 3 波 長域で構成されていた(図 16 c)。波長組成は,多少の 変動を見せたものの,測定終了まで安定していた。一方,



図 14 フォトンカウンティングカメラで撮影した サツマイモ塊根切片の発光の二次元イメージ サツマイモ切片に「F」の形に胞子を塗布接種し、12 時間 後に ARGUS-50/VIM フォトンカウンティングカメラで5分 間の発光を積算して2 次元イメージを取得した。



図 15 サツマイモのファイトアレキシン (イポメアマロン) 生成の TLC 解析

- 1: サツマイモ黒斑病菌を接種した切片
- 2: 非病原性フザリウム菌を接種した切片
- 3: 滅菌水を処理した切片

それぞれの処理後、サツマイモ切片を 20°C、48 時間 インキュベートしてから、脂質画分の抽出を行い、TLC 解析に用いた。図中矢印(IP)はイポメアマロンの展開位置 (Rf=0.63の赤桃色スポット)を示す。 非病原性フザリウム菌を接種したサツマイモ貯蔵根切片 では,波長組成が発光量の増加に伴って,大きく変化し た(図 16 b)。すなわち,580・630 nm 域の割合が急激 な減少を見せる一方で,480・530 nm の発光の割合は急 激な増加を示し,530・580 nm の割合はわずかに増加し た。また,430・480 nm 域の発光も増加し主要な成分と して加わった。こうした変化は,総発光量の増加がまだ 緩やかな接種後2・10時間に起きた。総発光量は接種20 時間後でピークに達するまで増加を続けたが,波長組成 は接種12時間後を過ぎると,測定終了まで殆ど変化し なかった(図 16 a, b)。



図 16 非病原性フザリウム菌あるいは蒸留水を接種した サツマイモの発光量の推移(a)及び波長組成の推移 (b: 非病原性フザリウム菌, c: 蒸留水) ^{グラフ中の値は 10 測定点の移動平均で示している。}

6) 比較解析①: 2,4-D 処理により誘導される発 光の波長組成変化

2,4-D を処理したサツマイモ貯蔵根切片では、処理後 10時間過ぎから総発光量の増加が認められ、32時間後 にピークに達し、その後緩やかに減少した(図 17 a)。 2,4-D処理後、比較的早い段階で480-530 nm 及び530-580 nm 域の割合の増加と、580-630 nm 域の割合の減少 が認められた。処理後 16時間過ぎから測定終了時まで は、波長組成は殆ど変化せず、非病原性フザリウム菌の 接種で誘導される発光と類似していた(図 17 b)。

7)比較解析②:変温処理により誘導される発光の波長組成変化

暗箱内の温度上昇によりサツマイモ貯蔵根切片内部の 温度は20℃から33℃に2時間で上昇し,およそ8時間 保たれた後,暗箱内の温度低下により4時間かけて20℃ まで低下した(図18a)。サツマイモ切片からの発光量 は,切片温度の上昇に伴って増加し,ほぼ同時に最高値 に達した。その後も切片温度は約8時間に渡って最高値 に維持されたのに対して,発光量は速やかに減少をはじ めた。図18bにみられるとおり,極微弱発光の波長組成 は切片温度の上昇に伴い, 580-630 nm 域の割合が増加 し, 530-580 nm 域の割合が減少したが, 切片温度が 33 ℃に保たれているときには,総発光量が減少しても 波長組成は変化しなかった。しかしながら, 切片温度が 33 ℃から 20℃に下がる過程では,総発光量の減少に伴 って波長組成に変化が認められた。すなわち, 一時的に 580-630 nm 域の割合が急激に減少し, 530-580 nm 域の 割合が増加した。温度上昇時に比べて温度低下時のほう が波長組成の変化が顕著に認められた。

3. 考察

第2節において,特に病原菌(非病原菌)接種時の発 光強度の上昇程度が高く,また長く認められた,フザリ ウム菌を接種したサツマイモの極微弱発光をモデルに, 病害抵抗反応との関係性と,発光の特性について解析を 進めた。

接種源の濃度と発光の関係からは、濃度上昇に伴う発 光強度の上昇と共に、発光強度推移にも明瞭な差異が認 められた。2×10⁶ 個/ml 以上の高濃度で接種した場合に は、接種の4時間後から急激な発光の増加が認められ、 一度ピークを形成する特徴的な発光パターンを示した。



図 17 2,4-D で処理したサツマイモの発光量(a)及び 発光波長組成(b)の推移

グラフ中の値は10測定点の移動平均で示している。





グラフ中の値は10測定点の移動平均で示している。

5×10⁵ 個/ml 以下ではこのピークが認められず, 接種の 24 時間後に向けて発光が漸増する発光パターンを示し た。一方, 熱処理して不活化した胞子を1×10⁷ 個/ml で 接種した場合,接種の約6時間後から発光が増加し始め, 測定終了時まで増加し続けた。これは, 出芽細胞表面の 分子がサツマイモに認識され, 弱いながらも病害抵抗反 応を誘導したことに基づくと推測される。熱処理で不活 性化したサツマイモ上にフザリウム菌を接種した場合の 発光は熱処理なしのサツマイモに水処理した場合よりも 弱く, 顕著な発光増加はサツマイモから放射されたと判 断できた。

2×10⁶ 個/ml 以上で接種した場合には,明らかに発光 強度上昇のタイミングが早く,発芽が確認され始める接 種4時間後には上昇し始めるため,発芽前のフザリウム 菌体表面に存在するエリシター成分に応答した発光であ る可能性も示唆される。その場合、熱処理で不活性化し た接種源では明瞭な反応が認められないため、タンパク 質,揮発性成分など,熱処理で活性が失われるものであ ることが考えられる。サツマイモ黒斑病菌の近縁種 Ceratocystis fimbriata f. sp. Platani で発見された, Ceratoplatanin (CP) は、宿主細胞表面への固着に関与すると考 えられる分泌性タンパク質で、サツマイモ黒斑病菌やF. oxysporum を含む子のう菌科で広くゲノム中に類似の配 列が確認されている(Yu and Li, 2014)。CP は宿主及び 非宿主に対して共に、ファイトアレキシン合成を誘導す るエリシター活性を示すことが報告されており(Scala et al., 2004),非病原性フザリウム菌の出芽細胞で同様に働 いていると仮定すれば,発芽した細胞が増えるに伴い, 急激な発光強度の上昇が認められ、熱処理により活性が 低下した結果を説明できると考えられる。

イポメアマロンが植物にとっても強い毒性を発揮す るため、その生成・蓄積は、ほぼ感染部位とその周辺細 胞に限られることが知られている(瓜谷ら、2001)。TLC 解析により、非病原性フザリウム菌の接種によってイポ メアマロンの蓄積が検出されたため、接種部位周辺でフ アイトアレキシン生合成へ至る病害抵抗反応が起きてい ることは確実である。さらに、発光の2次元解析から、 ほぼ接種部位でのみ発光が観察された結果と併せると、 ファイトアレキシン生合成へ至る一連の病害抵抗反応が、 極微弱発光の発生に関与すると考えられる。発光を病害 抵抗反応の指標として利用する場合に、発光強度の推移 に加えて、波長組成の変化も重要な指標になりうる。発 光反応は様々なものが並行して起きていることが想定さ れるが、病害抵抗反応が進行している細胞では、通常の 代謝は抑制され、病害抵抗反応のための生化学反応が優 先的に起きており,発光反応も通常の発光とは異なるこ とが期待された。測定の結果は,定常状態や呼吸が亢進 するような場面(580-630 nm が優占)に比べて,より短 い波長域の光の割合が増加しており(480-580 nm が優占), 波長組成にも生理状態の変化が反映されていると判断で きた。

第2,3節の結果から,病害抵抗反応,すなわち,病原 体と植物の相互作用による発光を検出することができた。 その際,病害抵抗反応の引き金,すなわち,エリシター となるのは,タンパク質(ペプチド)や脂質,糖質など 病原体の構成分子や,二次代謝産物であり,それらは病 原体そのものよりも安定性や定量性に優れることから, 病害抵抗反応の解析や,免疫付与のツールとして活用さ れている(Yamaguchi *et al.*, 2005; Garcia-Brugger *et al.*, 2006; Hossain *et al.*, 2007; Schwessinger and Ronald 2012)。 そこで,第4節では,エリシターを接種源として病害抵 抗反応に伴う発光の検出を試みた。

第 4 節 エリシターで処理した植物の極微弱 発光

1. 材料及び方法

1) 極微弱発光測定装置

極微弱発光の経時変化の測定にはフォトンカウンタ ー(PCX-100 浜松ホトニクス)を使用した。本装置は 240-630nmに感度を持つ光電子増倍管(R329P 浜松ホ トニクス)が,固定式のサンプルテーブル(16 サンプル) 上を移動して測定を行う。サンプルは直径 60 mm のポ リスチレンシャーレ(栄研)に入れて測定した。発光の 分光測定にはフィルター分光型フォトンカウンター (MSPCII 浜松ホトニクス)を使用した。発光の二次 元イメージングには,ARGUS-50/VIM フォトンカウン ティングカメラ(浜松ホトニクス)を備えた撮像用暗箱 を使用した。

2) 供試植物試料の栽培・培養条件

サツマイモ (*Ipomoea batatas*[']ベニコマチ') は,傷が 少ない貯蔵根の ϕ 60 mm 以上の部分から、 ϕ 50 mm,厚 さ 8 mm の切片を作成し、 ϕ 60 mm のプラスティックシ ャーレ (栄研) に入れて 20℃,暗黒下で 12 時間エイジ ングしてから測定に用いた。

タバコ (*Nicotiana tabacum* 'Bright Yellow 2') は, 育苗培土 (宇部培土) に播種し,温度制御ガラス温室で 日中の 12 時間を 28℃,夜間を 18℃に調節して栽培し た。3 週間後に鉢上げし,播種後 5~7 週目の個体を使用 した。 イネ(*Oryza sativa*'日本晴')は、催芽後、育苗培土(宇 部培土)に播種し、温度制御ガラス温室で日中の 12 時 間を 28℃、夜間を 18℃に調節して栽培した。本研究に は葉齢 5.5~7.5 の植物体(播種後 6~7 週目)を用いた。 イネ培養細胞'日本晴'は、玄米の胚から誘導して、葉緑体 を持たないカルスを使用した。誘導した細胞は、改変 N6 液体培地(Kuchitsu *et al.*, 1993:表6参照)で 25℃, 100 rpm で振とう培養し、10日ごとに 14gの細胞を 300 ml の新鮮培地 100 ml に移植継代した。

3) 供試エリシター

本研究では、キチンオリゴ糖(*N*-acetylchitooligosacchalide)及び、PGPF (Plant growth promoting fungi:植物成育促成菌類)の液体培養ろ液を使用した。 キチンオリゴ糖は、イネでは6量体以上で明瞭な活性が 認められ、1µM 程度からキチン応答性の遺伝子発現を 誘導し(Minami *et al.*, 1996),100µMでファイトア レキシン生成を強く誘導する(Yamada *et al.*, 1993)。 本研究では、市販品で最も重合度が高い6量体キチンオ リゴ糖(Hexa-*N*-acetylchitohexaose:生化学工業)を滅 菌水に溶解して使用した。

PGPFは Penicillium simplicissimum GP17-2株(岐 阜大学大学院 百町教授より分譲)を使用した。PGPF の培養ろ液は Koike et al. (2001)の方法に従い調製し た。GP17-2株培養ろ液のイネ培養細胞に対するエリシ ター活性は、フェニルアラニンアンモニアリアーゼ遺伝 子(Os_PAL1)の発現増加で確認した(図19)。400ml のジャガイモ - デキストロース液体培地(PDB)中に GP17-2株の培養菌糸片(φ5 mm)を一つ投入した。暗 所、25℃で10日間静置培養した後、成育した菌糸マッ トを除いた培養物をガーゼでろ過し、その通過液をさら に孔径 0.25 µmのメンブランフィルターでろ過滅菌した 培養ろ液(約300ml)をエリシターとして使用した。主 要なエリシター成分と推定される高分子量の糖は、およ そ 5~10 mg/Lの濃度で含まれている(百町 私信)。 溶媒対照として PDBを使用した。

4) エリシター応答発光の測定

① サツマイモ

病斑, 食害痕等が認められない φ60 mm 以上の貯蔵根 から, φ50 mm, 厚さ 8 mm の円盤状の切片を作成し, シャーレに入れて 20 ℃, 暗黒下で 12 時間エイジング した。その後, 1, 10, 100 µM のキチンエリシター250 µl または 50%の GP17・2 株培養ろ液 250 µl を切片上面 に塗布接種し, その直後から, 20℃でフォトンカウンタ ーPCX-100 により極微弱発光測定を開始した。対照とし て, キチンエリシターでは蒸留水, GP17・2 株培養ろ液 では **50% PDB** を同量処理した。全ての実験は 3 回繰り 返した。

② タバコ

暗所に 4 時間置いた個体の第 5~7 葉から, φ50 mm の切片を作成し, それをシャーレ内の蒸留水 3 ml に浮 かべ, 暗所・26 ℃でクロロフィル遅延蛍光の減衰と傷口 のエイジングのため 12 時間インキュベートした。イン キュベート後に, シャーレ内の蒸留水を 100%, 20%, 5%の GP17-2 株培養ろ液, PDB, あるいは蒸留水に置 換し, 直後より 26 ℃でフォトンカウンターPCX-100 に より極微弱発光測定を開始した。全ての実験は 3 回繰り 返した。

③イネ

葉切片からの発光の測定には、最上位葉(第 5-8 葉) を使用した。暗所に 4 時間置いたイネ葉の幅 1 cm 以上 の部分 10 cm から、長さ 1 cm (10 枚) もしくは長さ 0.5 cm (20 枚) の切片を作成し、蒸留水 3 ml を入れた φ60 mm のプラスティックシャーレに葉表を上にして 10 枚 浮かべ、暗所・26℃でクロロフィル遅延蛍光の減衰と傷 ロのエイジングのため 12 時間インキュベートした。イ ンキュベート後に、溶液を 3 ml の 1、5、20 µM のキチ ンエリシター溶液もしくは蒸留水に置換し、直後より 26℃でフォトンカウンターPCX-100 により極微弱発光 測定を開始した。同様に、100%、50%、25%の GP17-2 株培養ろ液もしくは PDB と置換し、微弱発光を測定し た。



図 19 GP17-2 株培養ろ液で処理したイネ培養細胞に おける Os_PAL1 遺伝子の発現増加

イネ培養細胞'日本晴'(培養 10 日目)に5 %容量の PGPF エリシター を加え、2 及び 4 時間後に細胞を採取し、総 RNA を抽出した。 アガロ ースゲル電気泳動後、セルロースメンブレンに転写し、Digoxigenin 抗体 で標識した Os_PAL1 プローブとハイブリダイゼーションを行った。発現シ グナルは、化学発光法で検出した(上段)。総 RNA 量は泳動ゲルの臭化 エチル染色で確認した。

培養細胞からの発光の測定には、培養 10 日目の 1 g の細胞を含む 2.85 mlの細胞懸濁液を φ60 mm のプラス ティックシャーレに分注し、終濃度 0.2, 1.0 µM となる ように調整したキチンエリシター溶液 150 µl を添加し た。対照として蒸留水を用いた。その添加直後から,26℃ でフォトンカウンターPCX-100 により極微弱発光測定 を開始した。全ての実験は3回繰り返した。

エリシターに GP17-2 株培養ろ液を用いた場合は,1 gの細胞を含む 2.4 mlの細胞懸濁液に GP17-2 株培養ろ 液の原液もしくは PDB で 4 倍希釈したものを 60 0 µl 添 加した(終濃度 20%, 5%)。対照には PDB を用いた。

5) エリシター応答発光の分光解析

分光測定は 430-480 nm, 460-480 nm, 480-500 nm, 500-520 nm, 520-540 nm, 540-560 nm 及び, 560-580 nm 域について, 分光型フォトンカウンターMSPC II を 用いておこなった。各波長域に対応する透過率半値幅を 持つ帯域透過フィルター(日本真空光学)を順次光電子 増倍管(R329:浜松ホトニクス)の前に挿入し, 1回5 秒間,エリシター添加後6時間の連続分光測定をおこな った。フィルターを通過して測定された光子数を当該波 長域におけるフィルターの透過率の平均値と光電子増倍 管の量子効率(QE)の平均値で補正した上で,測定回ご とに各波長域における発光量の全波長域における発光量 に対する割合を求めた(第1章 第3節 1.材料及び方法 7)を参照)。

2. 結果

1) サツマイモ貯蔵根のエリシター応答発光

サツマイモ貯蔵根切片は,無処理で5光子/秒/cm² 以下の発光強度だが,溶媒の蒸留水あるいは PDB の塗 布で1~2時間後に10光子/秒/cm²程度の一時的な発 光増加が認められたが,速やかに低下した。エリシター として6量体キチンオリゴ糖を塗布すると10 μ M 以上 で発光の増加が認められ,100 μ M では塗布15時間前後 に80光子/秒/cm²程度のピークが認められた(図20 a)。

一方,50%濃度のGP17-2株培養ろ液の塗布では,PDB 塗布とほぼ同時期に2倍程度の強度で発光ピークが認め られ,同様のパターンで発光強度が低下し,測定中を通 じて2倍程度の発光強度で推移した(図20b)。

2) タバコ葉切片のエリシター応答発光

蒸留水に浮かべたタバコのリーフディスクの発光は 10 光子/秒/cm²未満で推移した。蒸留水を 20 %以上 の濃度の GP17-2 培養ろ液に置換すると,置換直後に発 光の増加が認められ,ピークを形成した。100%ろ液処理 では,それに加えて,処理開始 12 時間過ぎから再び発 光が増加し,緩やかなピークを形成した(図 21)。

3) イネ葉切片のエリシター応答発光

蒸留水に浮かべたイネ葉切片からの発光は,10光子/

秒/ cm^2 以下で推移し、漸減した。溶液を6量体キチン オリゴ糖溶液に置換すると、 5μ M 以上の処理で溶液交 換直後から発光が高まり、 20μ M 処理区で蒸留水処理よ り $3\sim4$ 光子/秒/ cm^2 発光が増加するピークが、0.5及 び3時間後に認められた(図22)。



図 20 サツマイモ塊根スライスのエリシター応答発光

塊根スライス作成後,12時間エイジングした後に所定濃度の6量体 キチンオリゴ糖水溶液あるいは、GP17-2 培養ろ液を250 μ/ノスライス で塗布し、発光をPCX-100 で測定した。



図 21 タバコリーフディスクのエリシター応答発光

リーフディスク作成後, 蒸留水に浮かべて 12 時間エイジング した後に所定濃度の GP17-2 培養ろ液に溶液を置換し, 直後から 発光を PCX-100 で測定した。 一方,エリシターとして GP17-2 株培養ろ液を使用した
 場合,葉切片では溶液交換直後及び 4~6 時間にピーク
 を持つ非常に強い発光が認められ,原液では 500 光子/
 秒/cm²まで達した(図 23 a)。

イネの GP17-2 株培養ろ液に対する応答発光強度が極めて高かったため、高感度カメラ(ARGUS50/VIM)による2次元画像の取得を試みた。葉切片は、ほぼ切断面のみ発光していた(図23b)。測定終了後、葉の表面はエリシター溶液を撥いており、切断面のみエリシター溶液が浸透していた(図省略)。

1 cm×1 cm の葉切片 10 枚の発光強度変化に比べて,



図 22 イネ葉切片の 6 量体キチンオリゴ糖応答発光

蒸留水に1×1 cm の葉切片を浮かべて26 ℃,12 時間暗黒下で インキュベートした後,溶液を所定濃度の6量体キチンオリゴ糖水溶液 もしくは対照の蒸留水に交換し,発光をPCX-100 で12 時間測定した。



図 23 イネ葉切片の GP17-2 株培養ろ液応答発光

蒸留水に1×1cm の葉切片を浮かべて26℃,12 時間暗黒下で インキュペートした後,蒸留水を等量の所定濃度のGP17-2 培養ろ液 あるいは PDB で置換し,発光を PCX-100 で12 時間測定した。2 次元 画像は100%培養ろ液処理区で,開始8時間後からARGUS50/VIM フォトンカウンティングカメラで10分間積算して取得した。 同じ面積で切断部分を2倍にした,0.5 cm×1 cmの葉 切片20枚の発光強度は、増加・減少ともより急激に変 化した(図24)。



図 24 葉切片の大きさによるイネの GP17-2 株 培養ろ液応答発光の違い

蒸留水に1 cm ×1 cm の葉切片 10 枚あるいは 0.5 cm ×1 cm の葉切片 20 枚を浮かべて 26℃, 12 時間暗黒下で インキュペートした後,蒸留水を3 ml の 50% GP17-2 培養 ろ液で置換し,発光を PCX-100 で 12 時間測定した。



図 25 イネ葉切片の GP17-2 培養ろ液応答発光の 波長組成の推移

イネ葉切片(1 cm×1 cm10 枚)の処理溶液を 100%GP17-2 培養ろ液で溶液を置換した直後から、分光型フォトンカウンター MSPC II でフィルター分光法により測定を開始した。

4) イネ培養細胞のエリシター応答発光

イネの懸濁培養細胞に6量体キチンオリゴ糖を添加す ると、葉切片では殆ど応答が認められなかった 1.0 µM において、添加直後と 3~4 時間後にピークを持つ明瞭 な応答発光が認められた(図26a)。応答発光は0.2 µM でも認められ、遺伝子発現等では検出が困難な微弱なエ リシター応答を検出していると考えられた。

一方,GP17-2 株の培養ろ液をイネ培養細胞に添加す ると,培養細胞でも非常に強い応答発光が認められ, 20%濃度では添加直後から発光が急増しピークを形成 した後,2時間後に二つ目のピークを持つ応答発光が認 められ,5%濃度では一つ目のピークは明瞭でなくなる が,2時間後にピークが認められた(図26b)。





図 26 イネ培養細胞のエリシター応答発光 培養 10 日目のイネ懸濁培養細胞 '日本晴' に所定濃度 になるようにエリシター溶液を 5%容量(GP17-2 培養ろ液の 20%濃度は 20%容量)で添加後,直ちに発光を PCX-100 で 12 時間測定した。二次元画像は、1 /M の 6 量体キチン オリゴ糖を添加し、3 時間後から ARGUS50/VIM フォトン カウンティングカメラで 30 分間積算して取得した。

高感度カメラ(ARGUS50/VIM)により2次元画像を 撮影すると,所々に強く発光している細胞小塊が観察さ れた(図26c)。

イネ培養細胞の GP17-2 株の培養ろ液応答発光を処理 開始直後からフィルター分光法により連続的に測定した ところ,処理直後から発光強度の上昇に伴い,比較的長 めの 590-630 nm の割合の減少と 480-590 nm の割合の 増加が認められた。処理 1 時間後以降,ほぼ同じ組成で 推移した後,発光強度の低下に伴い,処理前の波長組成 に近づいた(図 27)。



図 27 イネ培養細胞の GP17-2 培養ろ液応答発光の 波長組成の推移

イネ懸濁培養細胞 '日本晴'に GP17-2 培養ろ液を 20%容量で 添加した直後から、分光型フォトンカウンターMSPC II でフィルター 分光法により測定を開始した。

3. 考察

微生物由来のエリシターである MAMPs には、細胞表 面に存在するものの他、分泌されるもの、微生物の細胞 が崩壊するときに細胞内から放出されるものなどが知ら れている(Boller and Felix, 2009)。それらは、様々な タイミングや濃度で植物細胞に認識され、病害抵抗反応 を誘起すると考えられる。しかしながら、エリシターと して培養菌体から調製されたものや、試薬として購入可 能なものは,実際の微生物と植物の相互作用に比べて, 高い濃度で、一斉に、多数の細胞に認識させることがで きる。本研究において使用した PGP17-2 株培養ろ液あ るいは、6 量体キチンオリゴ糖をサツマイモ貯蔵根切片 に塗布すると,塗布直後から発光強度が急激に上昇した。 同様の傾向はタバコ葉やイネ葉, イネ培養細胞でも認め られており、多数のエリシター分子が一斉に多くの細胞 に認識された結果だと考えられた。また、いずれも数時 間以上は対照区よりも高い発光を持続しており、発光の 分光測定など、発光特性の調査にも有利な性質と考えら れた。

エリシター応答発光の発光強度の推移(発光パターン) を決める要因としては、①植物の応答性(レセプターの 有無)、②エリシターが誘起する抵抗反応の種類(オキ シダティヴバーストのように早く,比較的短いものか, ファイトアレキシン生成のように比較的長いものか), ③植物試料の調製方法(エリシターが細胞に接触しやす いか)などが挙げられる。①については,塩化水銀(HgCl₂) や紫外線のような,細胞傷害の副作用として病害抵抗反 応を誘導するエリシターと異なり,MAMPsは品種特異 的エリシターではないものの,非特異的ではないため, レセプターが存在しない植物は反応できない。タバコの 培養細胞では、同じ種由来であっても、誘導や培養等の 条件によってレセプターを喪失してキチンオリゴ糖に反 応できなくなった例もある(Okada et al., 2002)。②に ついては、MAMPs はそれぞれ比較的類似した抵抗反応 を誘起するとされているが、全く同じというわけではな く、同じ種類の抵抗反応を誘導する場合でも、タイミン グが異なることもある(Denoux et al., 2008)。本研究 におけるサツマイモ貯蔵根のキチンオリゴ糖と GP17-2 培養ろ液に対する反応ではその差が顕著であった。一方 で、キチンオリゴ糖応答発光は、強度こそ違え、フザリ ウム菌接種に類似した発光パターンを示しており、類似 した抵抗性が誘起されていると推察される。③について は、本研究におけるイネ葉切片のサイズと切断部位の発 光への影響から明らかになったことである。同じ面積の 葉をより沢山の切片にしたことで、切断面、つまり、エ リシターとの接触面積が増えて,発光の上昇がより急激 になった一方で,減衰は早く,総発光量も減った(図24)。 サツマイモ貯蔵根でのファイトアレキシン生成について 報告されているように、病害抵抗反応には病原菌の侵害 を受けた細胞の近隣細胞の存在が非常に重要で、病原菌 封じ込めのための物質生産や, エネルギー供給なども近 隣細胞から行われている(瓜谷ら, 2001)。今回のケー スでは、エリシターとの接触面積は半分だが、より大き な葉切片で、より強く、長く続く発光が確認されており、 切片サイズの調整で発光時間や強度をある程度コントロ ールできると考えられる。一方で、懸濁培養細胞は、数 個から大きくても数十個程度の細胞塊でしかないため, 強い発光は長くは望めない一方で,ワックス層など持た ないためエリシターと細胞の接触は非常に容易で反応は 一斉に起きると推察される。

GP17-2 培養ろ液エリシターに対するイネ葉切片及び 培養細胞の応答発光の分光解析の結果は、フザリウム菌 を接種したサツマイモでの波長組成の変化と同様に発光 波長が短波長側へシフトしており、エリシターの処理で 病害抵抗反応に伴う生理変化が起きていることが推定さ れた。

著者らのグループでは各種阻害剤を用いた薬理学的 解析から、イネ培養細胞のキチンエリシター応答発光の 制御機構について明らかにした(図 28, Kageyama et al., 2006を一部改変)。レセプター(CEBiP)からのシグナ ルが、脂質二重膜からのシグナル分子の切りだしからフ オスファチジン酸(Phosphatidic acid: PA)の合成、タン パク質リン酸化及び脱リン酸化シグナルやカルシウムイ オン Ca²⁺のフラックスを経て、活性酸素生成、そして、 その先の極微弱発光に至る経路が推定されている。

以上のように、エリシターで病害抵抗反応を引き起こ すことで、安定的な発光(エリシター応答発光)が得ら れることを明らかにし、植物の病害抵抗反応の新たな検 出方法として確立することができた。第Ⅱ章では、新規 の病害抵抗性誘導物質(プラントアクティベーター)を 選抜するため、エリシター応答発光を指標に病害抵抗性 誘導によるプライミングを迅速・簡便に検出するシステ ムを開発した。



第Ⅱ章 エリシター応答発光の増強に基づいたプライミング検出

システムの開発

第1節 緒言

病原菌は植物の静的抵抗性を打破し、動的抵抗性であ る基礎的抵抗性(PTI)を抑制・改変するなどして感染を 成立させる(Tsuda and Katagiri, 2010)。植物病害の防除 には, 病原体が侵入・繁殖し難いように環境を整えた上 で,静的抵抗性や,病原菌の感染行動の認識に関わる遺 伝子の導入などにより動的抵抗性を強化した品種を使用 するか、あるいは、殺菌・静菌効果を有する化学的・生 物的な殺菌剤を用いる。これらが植物病害の主な防除策 であるが、これらを補完するのが病害抵抗性誘導の利用 である。病害抵抗性誘導は,病害抵抗性品種に匹敵する 防除効果を上げることも多く、病原菌の薬剤耐性の発達 により,殺菌剤の効果が劣る場合にも有効である(有江・ 仲下,2007)。病害抵抗性誘導は,誘導メカニズムや作 用スペクトルの違いから, Systemic acquired resistance (SAR), Induced systemic resistance (ISR), Woundinduced systemic resistance (WSR) などに分類されるが, 生物的/非生物的な刺激を局所的に与えることで,全身的 な保護効果を得る点で共通している(仲下・安田,2004)。

病害抵抗性誘導の効果の本体として,当初は Pathogenesis related protein (PR protein: Görlach *et al.*, 1996; Lawton *et al.*, 1996) や,ファイトアレキシンの合成 (Iwata, 2001) などの直接誘導が注目された。これらは 病害抵抗性誘導物質で直接誘導される防御応答 (Direct defense) として考えられており,比較的高濃度(数 mM 以上)の処理で誘導される (Thulke and Conrath, 1998)。

一方で,Direct defense を殆ど示さない濃度での前処理 で,病原菌やエリシターに対する植物の病害抵抗反応が 加速・増強するように,植物細胞のコンディションを整 える間接的な作用がある。この作用は,リポ多糖応答性 のヒト白血球の防御反応が,インターフェロン前処理に より増強される現象になぞらえて,プライミング

(priming) と呼ばれている(Conrath *et al.*, 2015)。病害 抵抗性誘導により,幅広いスペクトラムで病害抵抗反応 が増強される現象は早くから知られていたが

(Hammerschmidt and Kuc, 1982; Stumm and Gessler, 1986), 病原菌の攻撃を受けた後の反応であるため, Direct defense に比べると解析が遅れていた。しかし, Kauss ら が, ジャスモン酸やサリチル酸などによるプライミング で, パセリ培養細胞におけるエリシター応答性のファイ

トアレキシン合成(Kauss et al., 1992a,b) が加速・増強さ れる現象を報告したのを皮切りに、様々な病害・虫害・ 環境ストレスなどに対する抵抗反応において、プライミ ング活性の存在が明らかにされた(Kauss et al., 1995; Fauth et al., 1996; Katz et al., 1998; Kohler et.al., 2002; Herms et al., 2002)。プライミング活性は、自然条件では、非親 和性菌の感染が引き起こす干渉作用として観察されるほ か、根圏微生物による ISR の主要な作用としても認めら れている(Pieterse et al., 1996, 1998)。さらに、このプラ イミング活性は, SAR であればサリチル酸 (Salicylic acid: SA), ISR であればジャスモン酸(Jasmonic acid: JA)や エチレン(Ethylene: ET)などのシグナル物質を与えた場 合に加えて、既知の分類には当てはまらない経路で抵抗 性を誘導する物質 (β -アミノ酪酸 (β -aminobutyric acid: BABA) やピラクロストロビン (Pyraclostrobin)) におい ても報告されている(Conrath et al., 2015)。病原体の感 染戦略に応じて,植物はそれぞれに異なった病害抵抗反 応を示すように進化してきたが、病害抵抗性誘導で認め られる幅広い防御スペクトルは、それぞれの病原体のタ イプに合わせて、プライミングにより、植物が本来備え る抵抗反応が増強されることによると考えられる (Zimmerli et al., 2000; Kohler et al., 2002; Conrath et al., 2015) 。

病害抵抗性誘導を人為的・化学的に引き起こす農薬が、 「病害抵抗性誘導剤(Plant activator / Plant defense activator)」である。商品化された初めての病害抵抗性誘 導剤は日本発であり、1974年、病原菌に対する抗菌活性 を示さず、病害を防ぐ物質としてプロベナゾール (Probenazole: PBZ)が開発され、後年、その作用が病害 抵抗性誘導によることが明らかにされた(Iwata, 2001)。 その後、1996年にアシベンゾラルSメチル(Acibenzolar-S-methyl: ASM)、2003年にチアジニル(Tiadinil: TDL)、 2009年にイソチアニル(Isothianil)などが、病害抵抗性 誘導を作用機作とする農薬として登録されている

(Kessmann et al., 1994; Tally et al., 1999; 有江・仲下, 2007)。また,殺菌・静菌作用で農薬登録された物質の 中にも,バリダマイシンA(ValydamycinA)やカルプロ パミド(Carpropamid: CRP)など,実際の使用場面におけ る効果から,病害抵抗性誘導が明らかにされたものがあ るが(Araki and Kurahashi, 1999; Ishikawa et al., 2005), それらを含めても病害抵抗性誘導剤の登録数は一般の殺 菌剤に比べて非常に少ない。その大きな理由として、病 害抵抗性誘導活性を評価する効率的なスクリーニング方 法がなかったことが挙げられる。病害抵抗性誘導の場合, 通常の殺菌剤開発における抗菌活性評価のような、直接 的かつ簡易な評価方法が開発されていなかったため、手 間の掛かる病原菌の接種による防除効果の判定を行わざ るを得なかった。近年になって,病害抵抗性誘導メカニ ズムに関する研究成果を基に、シグナル伝達因子や PR タンパク質に関するものなど,病害抵抗性誘導物質の処 理で直接誘導される遺伝子発現をルシフェリンールシフ ェラーゼ発光や色素蓄積に変換して評価することで, 簡 便性や迅速性を高めた方法(レポータージーンアッセイ) が試みられるようになり (Ono et al., 2004, 2011; Narusaka et al., 2006; Noutoshi et al., 2012), スクリーニングの効率 化に道が開かれつつある。

これら,既知のいわゆる "-omics" データを活用して行 われるスクリーニングが非常にパワフルである一方,病 害抵抗性誘導には未だ明らかにされていないメカニズム も存在する可能性は否定できない。また,これらのスク リーニングには遺伝子組換えや,シグナル検出のための 試薬添加など,結果に影響する可能性のある侵襲的な操 作を何かしら伴っている。

これに対し、本研究では、病害抵抗反応の新たな非侵 襲的検出指標として、エリシター応答発光を見出した。 エリシター応答発光は、作用機作が不明な新規物質のプ ライミングによる病害抵抗反応の増強を検出するのに適 しており、上述のレポータージーンアッセイとは異なる アプローチで, 簡便・迅速な病害抵抗性誘導物質の活性 評価を実現できると考えた。そこで本章では、第一に、 病害抵抗性誘導剤処理によりエリシター応答発光が増強 されることを, イネの植物体(葉切片)と懸濁培養細胞 を用いて実証した。さらに、各種病害抵抗性誘導物質に よるプライミング作用の検出指標としての特性を解明す るため、エリシター応答発光と、各種 PR 遺伝子発現の 変動を比較解析した。そして第二に,各種植物において, エリシター応答発光の増強を指標にして、各種抵抗性誘 導物質のプライミング作用に対する検出能力を明らかに した。その中から、スクリーニングに最適なものを選び、 新規病害抵抗性誘導骨格の探索を行い、最終的に7種類 の新規骨格を得た。第三に、プライミングによるエリシ ター応答発光の増強機構について解析を行い、「プライ ミング検出システム」としてのエリシター応答発光の有 用性について考察した。

第2節 病害抵抗性誘導物質の前処理で増強 されるイネのエリシター応答発光の 特性解析

1. 材料及び方法

1)供試植物

イネ(Oryza sativa '日本晴')は,催芽後,育苗培土 (宇部培土)に播種し,温度制御ガラス温室で日中の12 時間を28℃,夜間を18 ℃に調節して栽培した。本研究 には葉齢 5.5~7.5 の植物体(播種後 6~7 週目)の最上 位展開葉を用いた。

イネ培養細胞'日本晴'は、玄米の胚から誘導した、葉緑 体を持たないカルスを使用した。誘導した細胞は、改変 N6 液体培地(Kuchitsu *et al.*, 1993)で 25 ℃, 100 rpm で振とう培養し、10 日ごとに 14 g の細胞を 300 ml の フラスコに入れた新鮮培地 100 ml に移植・継代した。

2) 供試エリシター

植物成育促進菌類(PGPF)である *Penicillium simplicissimum* GP17-2 株の培養ろ液を Koike *et al.* (2001)の方法に従って調製した。調製した培養ろ液は、 冷蔵して数日のうちに使用するか, -70 ℃に凍結保存し、 使用時に 37 ℃で溶解して使用した。

3) 病害抵抗性誘導物質

本研究では、イネに病害抵抗性を誘導するという報告 のある4種類の化合物、プロベナゾール(PBZ: Uchiyama *et al.*, 1973; Sekizawa, 1980),メチルジャスモン酸 (MJ: Murller-Uri, *et al.*, 1988; Nojiri *et al.*, 1996; Schweizer *et al.*, 1997a, b),カルプロパミド(CRP: Thieron and Kurahashi, 1998; Araki and Kurahashi, 1999),及び、アシベンゾラルSメチル(ASM: Rohilla *et al.*, 2001)を使用した。PBZ,CRP及びASMは和 光純薬から、また、MJはSigma-Aldrichから購入した。 これらの抵抗性誘導物質は、既報の使用例を参考に20~ 200 µM で植物に処理した。各抵抗性誘導物質の原体を 溶媒の2% Tween20を含む *N*Nジメチルホルムアミド (DMF: 和光純薬)に溶かし、葉切片用に100倍、培養

4)病害抵抗性誘導物質で前処理したイネのエリ シター応答発光の測定

細胞用に 1,000 倍のストック液を準備した。

① 葉切片

病害抵抗性誘導剤のプライミング効果に対するエリ シター濃度の影響を調査した。幅 1cm 以上のイネの葉身 を 26 ℃・暗所に 4 時間以上置いた後,葉身から長さ 1 cm の切片 10 枚を切り出した。それを,直径 60 mm の プラスティックシャーレ(栄研)中の 3 ml の 20 µM ASM 溶液に浮かべ,26 ℃・暗所で前処理を開始した。12 時 間後,蒸留水で100,25 あるいは12.5%濃度に調整した GP17-2 培養ろ液各 3 ml と前処理液を弱光下で置換し, エリシター処理を行った。処理直後より,フォトンカウ ンターPCX-100 (浜松ホトニクス)で極微弱光放射の測 定を,26℃で10時間行った。

次に,各種抵抗性誘導物質のプライミング効果の調査 を行った。同様に準備したイネ葉身の切片10枚を,PBZ, MJ, CRP 及び ASM の 20,100,200 µM 溶液を3 ml 入れたプラスティックシャーレに浮かべ,前処理を開始 した。前処理開始の直後より,フォトンカウンターPCX-100 で極微弱光放射の測定を12時間行った。その後,弱 光下で前処理液を GP17-2 培養ろ液原液 3 ml に置換し, 直ちに測定を再開した。全ての実験は 3 回繰り返した。

② 懸濁培養細胞

葉と同様に培養細胞で,病害抵抗性誘導剤のプライミ ング効果に対するエリシター濃度の影響を調査した。培 養 10 日目のイネ細胞培養物から,0.5 g(生鮮重量)の 細胞を含む 1.5 mlの細胞懸濁液を直径 60 mm のプラス ティックシャーレに採取した。それに,終濃度が 20 ま たは 200 µM になるように,PBZ のストック液を 1.5 µl 添加し,直ちに 26 ℃でフォトンカウンターPCX-100 に より極微弱発光の測定を開始した。対照として,同量の DMF を添加したものを用意した。PBZ 前処理の 4 時間 後,終濃度で 66,20 あるいは 5%となるように,前処理 液の一部を等量の GP17-2 培養ろ液原液と弱光下で置換 し,エリシター処理を行った。その後,直ちに極微弱発 光の測定を再開した。

前処理時間がエリシター応答発光の増強に与える影響を調査するため、同様に準備した細胞懸濁液に、終濃 度 20 または 200 µM で PBZ を添加し、0、4 あるいは 8 時間、26 ℃・暗所で前処理した後、終濃度 5%で GP17-2 培養ろ液をエリシターとして処理した。その直後から、 フォトンカウンターにより 26℃で発光測定を開始した。

最後に,各種抵抗性誘導物質のプライミング効果の調 査を行った。1.5 ml のイネ細胞懸濁液に,PBZ,MJ, CRP 及び ASM を 20,100 あるいは 200 µM の濃度で 4 時間前処理した後に,終濃度 5%で GP17-2 培養ろ液エ リシターを添加した。その直後から,エリシター応答発 光を測定した。全ての実験は 3 回繰り返した。

5) エリシター応答発光の分光解析

0.5 g の細胞を含む 1.5 ml のイネ細胞懸濁液を,200 µM PBZ で 4 時間前処理(26℃・暗所)した後に,終濃 度 5%で GP17-2 培養ろ液エリシターを添加し,26 ℃で エリシター応答発光をフォトンカウンターPCX-100 で 測定した。分光測定は 440-460 nm, 460-480 nm, 480-500 nm, 500-520 nm, 520-540 nm, 540-560 nm 及び, 560-580 nm 域について行った。各波長域について,第 I 章第 3 節 1.材料及び方法 7)に記述した方法で測定値を 補正し,発光ピーク前後の 10 点の測定値を平均し,全 波長域の発光量の合計に対する割合を求めた。処理間に おける波長組成の比較は,波長域ごとに,比率を逆正弦 変換した値を用いて分散分析を行った。結果は 6 反復の 平均を示した。

6) エリシター応答発光と PR 遺伝子発現の比較 解析

エリシター添加前に, 200 µM の PBZ, MJ, CRP あ るいは ASM で 0.5 g の細胞を含む 1.5 ml のイネ細胞懸 濁液を26℃,4時間,暗黒下において前処理した。前処 理終了時に終濃度 5%で GP17-2 培養ろ液エリシターを 添加し,その直後からフォトンカウンターPCX-100 によ り26℃で発光を測定した。遺伝子発現解析のため、エリ シター添加直前および添加 30 分後に,各処理区から細 胞45mg(生鮮重量)を採取し、液体窒素中で凍結・摩 砕後, RNeasy® Plant Mini Kit と RNase Free DNase Kit (QIAGEN)により全 RNA を抽出した。cDNA は 500 ngの全RNAからランダムヘキサマーをプライマーとし て Perfect Real Time™ RT-PCR kit (タカラバイオ)を 用いて合成した。PR 遺伝子 mRNA の定量のため, cDNA 混合液を 40 倍希釈したものを鋳型として, SYBR® Premix Ex Taq[™](タカラバイオ)を用いたリアルタイ ム定量 PCR 解析を Mx3000-P Real Time PCR System (アジレント)で実施した。病害抵抗反応関連遺伝子(PR 遺伝子)として,病原菌感染時及び,イネのキチンオリ ゴ糖処理時の発現増加が報告されている, phenylalanine ammonia lyase (Os_PAL1 : X16099, Minami et al., 1989), chitinase (Cht-1: D16221, Nishizawa et al., 1993), EL2 (EL2: D64038, Minami et al., 1996) 及び, PBZ1 (PBZ1: E12488, Midoh and Iwata, 1996)を用い、それぞれの遺伝子の発現量は特異 的プライマーセット(表 5)を用いて解析した。PCRは, ポリメラーゼ活性化 95℃・10 秒の後, DNA 変性 95℃・ 75 秒, アニーリング・伸長 64℃・30 秒を 40 サイクル 行った。各遺伝子の発現量を同じサンプルの rice poly ubiquitin 遺伝子(RUBQ1: AF184279.1)の発現量で標 準化し、相対的発現量として以後の解析に用いた。 RUBQ1の発現は、全ての処理区で安定していた。1回 の PCR では,解析対象の cDNA 2 反復のほか,内部標 準遺伝子と標的遺伝子の標準曲線を作成するための cDNA 希釈系列(50~640 ng, 8 段階)と, cDNA を入

れないコンタミネーションチェック用の溶液も同時に反応させた。RNA 抽出および発光測定は 2 反復で行い, PCR も各 RNA サンプル当り 2 反復で行った。結果は 2 反復の平均で示した。

2. 結果

1) イネ葉切片におけるエリシター応答発光の増 強

GP17-2 の培養ろ液原液に浮かべたイネ葉片から放射 される極微弱発光は、ASM の前処理により発光の増強 が認められた。しかしながら、希釈した培養ろ液の応答 発光の場合には、むしろ発光が抑制された(図29)。エ リシター濃度が薄いほど増強程度は高まるという、パセ リの培養細胞を用いたプライミングに関する報告 (Kauss *et al.*, 1992a, b)とは異なった。後述するイネ

(Rauss et al., 1992a, b) とは異ならた。後述するイネ 培養細胞の GP17-2 培養ろ液応答発光では既報と同じく, 低濃度のエリシターで増強程度が増す傾向であった。 GP17-2 培養ろ液中のエリシター成分が植物体(葉)と 培養細胞で異なる働きを示すことが推測されたが, 葉を 用いる試験では, この結果を踏まえて培養ろ液の原液を 用いた。

各種病害抵抗性誘導物質溶液にイネ葉片を浮かべて 12時間前処理することで、その後のGP17-2培養ろ液処 理に応答して放射される極微弱発光の最高発光強度は、 最大で1.2~1.3倍に増強され、測定中の総発光量に明瞭 な増加が認められた(図 30 B)。PBZ、CRP、MJでは 20 µM 処理による増強が最大で、ASM では 20 µM と 100 µM の効果が同程度であった。また、いずれの病害 抵抗性誘導物質処理でも、最高濃度の 200 µM では増強 程度がやや低い傾向が認められた。 各種病害抵抗性誘導物質および溶媒に浮かべたイネ 葉片では、極微弱光放射の明瞭な変動は認められず(図 30 A 200 µMのみ表示),応答発光の増強は、病害抵 抗性誘導物質処理によるプライミングによると考えられ た。

2) イネ懸濁培養細胞におけるエリシター応答発 光の増強

イネ懸濁培養細胞では, 葉切片の場合と異なって, 5% 程度の低濃度の GP17-2 培養ろ液に対する応答発光にお いて,病害抵抗性誘導物質の前処理による明瞭な発光の 増強が認められ,むしろ高い濃度では発光増強程度は低 くなり,既報の培養細胞のプライミングによるエリシタ 一応答の増強と同様の傾向が認められた(図 31)。

プライミングのもうひとつの特徴として,前処理時間 を長くすることで,増強効果が向上し,反応が加速 (acceleration)することが挙げられる(Kauss *et al.*, 1992a)。エリシター応答発光でも同様の傾向が認めら れており,イネ懸濁培養細胞を 200 pM PBZ で処理した 場合,エリシターと同時の処理でも発光の増強は認めら れたが,前処理時間を設けることで,発光のピーク到達 までの時間が短くなった(図 32)。また,同時処理では 増強効果が認められなかった低濃度処理(20 pM)でも, 前処理時間を設けることで,増強効果が現れた。

このようなエリシター応答発光の増強と加速は、供試 した誘導物質全てで、20-200 µM 処理において認められ た(図 33)。葉切片で認められた高濃度での増強程度の 低下はなく、いずれも 200 µM 処理で最大の増強効果が 得られた。

遺伝子名	フォワードプライマー	リバースプライマー	増幅物 サイズ (bp)
Os_PAL1	5' AGGTCAACTCCGTGAACGAC 3'	5' AGGTCAGCCCGTTGTTGTAG 3'	192
Cht-1	5' TACAAGCGCTACTGCGACAT 3'	5' CAGCCATTGTGGGCATTACT 3'	201
EL2	5' CCTGACCTCACTGCACTTCA 3'	5' AGCTTGGCTTGATTGCTGAT 3'	227
PBZ1	5' GCCGAATACGCCTAAGATGA 3'	5' TCACCCATTGATGAAGCAAA 3'	220
RUBQ1	5' CCAGTAAGTCCTCAGCCATGGAG 3'	5' GGACACAATGATTAGGGATCACTT 3'	237

表5 定量的 RT-PCR に用いたプライマーセット



図 30 病害抵抗性誘導物質で前処理したイネ葉切片におけるエリシター応答発光の増強

A:イネ葉切片を 200 /M の PBZ, MJ, CRP, ASM あるいは 1%の溶媒に浮かべて, 26°C, 24 時間発光を測定した。 B:20~200 /M の各種病害抵抗性誘導物質の溶液にイネ葉切片を浮かべて, 26°C, 12 時間暗黒下で前処理した後, 前処 理液を等量の GP17-2 培養ろ液原液に置換し, 溶液交換直後から発光測定を開始した。発光測定にはフォトンカウンター PCX-100 を用いた。



図 31 エリシター濃度とエリシター応答発光の増強

イネ培養細胞を所定濃度の PBZ 溶液(20, 200 μM)あるいは、対照の DMF0.1%溶液で 前処理した。PBZ 前処理の 4 時間後, 終濃度で 66, 20 あるいは 5%となるように、前処理液 の一部を等量の GP17-2 培養ろ液原液と弱光下で置換し、エリシター処理を行った。その 後, 直ちに極微弱発光の測定を再開した(図中 0 h)。



図 32 抵抗性誘導物質の前処理時間とエリシター応答発光の増強

イネ培養細胞を所定濃度の PBZ 溶液(20,200 µM)あるいは,対照の DMF0.1% 溶液で前処理した。前処理開始から 0,4 あるいは 8 時間後に,GP17-2 培養ろ液 (5 %v/v)を添加し,測定を開始した(図中 0 h)。



応答発光の増強

イネ培養細胞を所定濃度(20, 100, 200 µM)の PBZ, MJ, CRP, ASM 又は対照の 溶媒で前処理した。前処理開始から4時間後にGP17-2 培養ろ液(5%v/v)を添加し, 極微弱光測定を開始した(図中 0h)。発光測定にはフォトンカウンターPCX-100を用いた。

3) 増強されたエリシター応答発光の波長組成

病害抵抗性誘導物質 PBZ の前処理により増加したエ リシター応答発光と対照の溶媒前処理時のエリシター応 答発光の波長組成を発光ピーク付近で詳細に比較すると, 発光強度では誘導剤前処理区が2倍以上も高いのにも関 わらず,波長組成には有意な差が認められず,同じ発光 反応が起きていることが示唆された (図34)。



図 34 抵抗性誘導物質の前処理により増強された エリシター応答発光の波長組成

GP17-2 培養ろ液(5 % v/v)によるエリシター処理の 4 時間前から, 200 µM PBZ でイネ培養細胞を前処理することで,図 32 のようにエリシ ター応答発光が増加した。各波長域で発光ピーク時の 10 測定点の平均 をとり,波長組成比を求めた。結果は6回の試験の平均を示した。カラム 中の縦棒は標本標準偏差(±SD)を示す。対照の応答発光と,前処理で 増加した応答発光の間では、各波長域の組成比に逆正弦変換後の分散 分析で有意な差は認められなかった(p=0.01)。

4) PR 遺伝子発現に対する各種病害抵抗性誘導物 質の前処理の効果

PR 遺伝子の発現量は,抵抗性誘導物質の前処理を終了 し,エリシター添加直前の対照区(溶媒前処理)の値を 1とした相対値で表した。ASM, PBZ, MJ あるいは CRP の4時間の前処理により,*Cht-1* 遺伝子はそれぞれ1.32, 1.45,0.72,0.8となり,また,*EL2* は1.29,1.57,1.22, 1.89,*Os_PAL1* は0.89,0.34,2.11,1.18で,この3遺伝 子は抵抗性誘導物質の前処理による変動が小さかった。 これに対し,*PBZ1* 遺伝子は15.09,2.27,15.72,30.47 と病害抵抗性誘導物質処理に強く影響されていた(図 35 白色カラム)。

一方、エリシター添加 30 分後における PR 遺伝子の発現量は、溶媒前処理区では、PBZ1 で 3.19、EL2 で 1.93、 Cht-1 で 1.18、Os_PAL1 で 1.09 と、全体に発現増加は少なく、殆ど発現が変動していない遺伝子もあった。これに対して、各種病害抵抗性誘導物質の前処理区では、Os_PAL1 遺伝子発現における PBZ 前処理の場合を除いて、溶媒前処理区における発現量を上回った(図 35 灰色)

カラム)。中でも, *PBZ1*は, ASM, PBZ, MJ, CRPの 前処理により, それぞれ 69.21, 12.24, 136.4, 154.81 と 大きく増加しており, エリシター添加無しでの発現レベ ルを考慮しても, 病害抵抗性誘導物質処理による明瞭な 増強が認められた。


図 35 エリシター添加前(白色)及び添加後(灰色)の PR 遺伝子発現への各種病害抵抗性誘導物質 前処理の影響

イネ培養細胞を 200 µM の各種病害抵抗性誘導物質で 4 時間前処理した後に, GP17-2 培養ろ液エリシターを添加した。 エリシター添加直前(白色)及び添加 30 分後(灰色)にサンプルを採取し, PR 遺伝子の発現を定量的 RT-PCR で解析した。

5) エリシター添加後の増加分から求めた PR 遺 伝子発現とエリシター応答発光の増強程度の 比較

PR 遺伝子発現は,対照の値,エリシターに応答した値, プライミング状態でエリシターに応答した値を,全て同 じもの(特定遺伝子のmRNA量)に基づいて求めている のに対して、極微弱発光に関しては、少なくとも対照の 定常時とエリシター応答時とは性質が異なる。そのため, 遺伝子発現のように対照に対する相対値で示すことでき ず、プライミング活性による増強程度を遺伝子発現と直 接比較するのは困難である。そこで、エリシター応答発 光と比較するために便宜的に、エリシター処理後の PR 遺伝子発現量の増加分を求め、病害抵抗性誘導物質前処 理区の値を溶媒前処理区の値で割り算した値を増強程度 とした(図 36)。その結果を見ると, EL2 遺伝子は, CRP の前処理により対照の溶媒前処理に比べて 2.7 倍に増強 された他は, 1.1~1.5 倍と変化が小さかった(表 6)。Cht-1遺伝子 は4.2~6.6 倍で4 種類の誘導物質により同程度 に増強された。これに対して, PBZ1 遺伝子は MJ および CRP の前処理により 55 倍以上に増強されたが、ASM で は 24.7 倍, PBZ では 4.6 倍で, 増強程度は誘導物質ごと

に大きく異なった。*Os_PAL1* 遺伝子は MJ の前処理による増強が 50.1 倍と顕著である一方, CRP で 9.6 倍, ASM で 2.9 倍, PBZ では 2.3 倍と, 誘導物質ごとに大きな差が認められたが, *PBZ1* 遺伝子とは傾向が異なった。

エリシター応答発光の増強程度は、図 33 中の 200 µM 処理の結果から算出した。エリシター応答発光は、4 種 類の誘導物質の前処理により、ピーク到達時間が約 2 時 間後から1時間後に一様に早まり、さらに最大発光強度 の増強程度はそれぞれ対照の2.7~3.4 倍で、作用性の異 なる誘導物質のプライミング活性にもかかわらず、増強 が同程度に認められた(表 6)。

3. 考察

プライミングは病原体の接種後に始めてその効果が明 らかになるため、病害抵抗性誘導処理による PR タンパ ク質の直接的な発現増加などに比べて研究が進んでいな かった(Conrath *et al.*, 2015)。しかしながら、病害防除 効果そのものではく、病原体やエリシターに対して植物 が示す、個々の応答反応に注目することで、プライミン グに関する精密な研究が進められるようになった(Kauss *et al.*, 1992a,b; Katz *et al.*, 1998)。本節では、著者らが発



図 36 エリシター応答反応の増強程度の算出(上段:遺伝子発現,下段:発光)

防御関連遺伝子発現の増強程度は、図中の A を B で割った値を用いた。なお、防御関連遺伝子の 発現量は、対照の「エリシターー」の値を1とする相対値で示した。遺伝子発現増加量(A, B)は「エリシター+」の 値から「エリシターー」の値を引いたものである。

エリシター応答発光の増強程度は図中 C を D で割った値を用いた。なお、エリシター処理後の発光増加量 (C, D) は、ピーク発光量とエリシター添加直前(図中 0h)の発光量の差分である。

ーーーーーーーーーーーーーーーーーーーーーーーーーーーーーーーーーーーー						
前処理。	Os_PAL1	EL2	Cht-1	PBZ1	極微弱発光	
PBZ	2.3 ^{a)}	1.1	6.6	4.6	3.3	
MJ	50.1	1.5	5.6	55.1	2.7	
CRP	9.6	2.7	5.4	56.8	3.2	
ASM	2.9	1.3	4.2	24.7	3.4	
溶媒	(0.0 9) ^{b)}	(0.93)	(0.18)	(2.19)	(22.79)	

表 6 病害抵抗性誘導物質のプライミング活性に基づくエリシター応答の増強効果

a)表中の増強程度は、図 35 の方法で算出した。抵抗性誘導物質で前処理した細胞における、エリシター処理後の遺伝子発現および極微弱発光の増加分の値を、前処理していない細胞での増加分の値で割った比を示す。 遺伝子発現を調査した同じサンプルで発光を測定した。
 b)エリシター処理後の各種遺伝子発現の増加分は、対照における同じ遺伝子のエリシター添加直前の値を1とする相対値を用いた。発光の増加分はエリシター処理後のピーク発光量からエリシター無添加の場合の発光量を引いた値(単位は光子数/秒/cm²)。

c) イネ培養細胞は 200µM PBZ, MJ, CRP あるいは ASM で前処理し, 4 時間後に GP17-2 培養ろ液エリシター(5 %v/v)を添加した。

見したエリシター応答発光が,各種の病害抵抗性誘導物 質の前処理により,エリシターが誘導する各種 PR 遺伝 子の発現増強と並行して増強されることを見出し,プラ イミングの指標として利用可能であることを明らかにで きた。また,PR 遺伝子は,通常 Direct defense の指標に 用いられることもあり,PAL や PBZ1 など一部の遺伝子 では,プライミングが検出できるものの,直接的な誘導 が顕著で,病害抵抗性誘導物質の種類により発現程度に 大きな差が認められる傾向があった。これに対して,エ リシター応答発光は、作用性が異なると考えられる各種 の病害抵抗性誘導物質の処理により、明瞭かつ似通った レベルで増強され、様々なタイプの病害抵抗性誘導を対 象にしたスクリーニングに適した特性を持つことを明ら かにした。

これに加え、同じエリシターに対する応答発光の増強 を植物体と培養細胞で比較することで、発光反応だけで は見えない両者のエリシター応答の差異が発見された。 葉切片において GP17-2 培養ろ液エリシターが誘導する 応答発光には, ASM 前処理による応答発光の増強に関し てエリシター濃度の影響が強く認められ、希釈したエリ シターでは応答発光が抑制された(図29)。この結果を GP17-2 の培養ろ液が複数のエリシター成分の混合物で あること(Koike et al., 2001)に照らして考えると, GP17-2 培養ろ液は、大量に存在して、ASM の作用で植物の応 答が抑制されるエリシター成分と、量は比較的少ないも のの、ASM によって応答が増強されるエリシター成分の 両者を含有し、後者の濃度が一定の閾値を越えると、発 光全体として ASM による応答発光の増強が顕在化する ケースが想定される。Hossain et al. (2007)は, GP17-2 培 養ろ液で処理したシロイヌナズナにおける病害防除効果 が、部分的にサリチル酸依存であるものの、大部分はそ れ以外(ジャスモン酸/エチレン)の作用によるとして いる。個々のエリシター成分が誘起する抵抗反応の詳細 や,ASM 処理との相互作用については明らかにされてい ないが、イネ葉切片で観察されたエリシター応答発光の 変動は, GP17-2 培養ろ液が誘導する抵抗反応の多面性を 反映していると考えられる。一方で,懸濁培養細胞では, より低濃度の培養ろ液処理でも, ASM 処理により発光が 抑制されることは無かった。このことから、葉に分化し た細胞ではじめて発現するレセプターからのシグナルが, 葉において ASM 処理で抑制される GP17-2 培養ろ液応答 発光に関与する可能性が推察される。

さらに、イネ葉切片では、いずれの抵抗性誘導物質も 20µMの処理で発光の増強を示したものの、100µM以上 の濃度では、増強程度はむしろ低下する場合も認められ た(図 30)。例えば、サリチル酸とジャスモン酸は、そ れぞれ Direct Defense を誘導する高濃度では、その生合 成から、下流のシグナル伝達まで明瞭な拮抗を示すが (Niki et al., 1998)、プライミングのみ示すような低濃度 では、拮抗が認められない(Mur et al., 2006)。ここでは、 エリシターが誘起する病害抵抗反応が、高濃度の病害抵 抗性誘導物質処理による Direct Defense と拮抗している 可能性が考えられる。

一方, イネ懸濁培養細胞の GP17-2 培養ろ液応答発光 は,供試したいずれの病害抵抗性誘導物質 (ASM, PBZ, MJ, CRP)の前処理によっても増強効果が認められ,そ の効果は少なくとも 20~200 µM の間では濃度依存的に 上昇した(図 33)。エリシター成分が培養細胞に誘導す るエリシター応答発光は,少なくともサリチル酸系とジ ャスモン酸系の異なる 2 種類のシグナル伝達経路の抵抗 性誘導により増強され,かつ,葉で認められたプライミ ングよりもダイナミックレンジが広いことが示され,病 害抵抗性誘導活性に関する化合物ライブラリーのスクリ ーニングに好適であると考えられた。

GP17-2 培養ろ液は, 調製後4 ℃で冷蔵し, 数日内で使 用するか, 1 回使用分ごとに小分けして-70 ℃で冷凍保 存し, 解凍して使用したが, 凍結保存後に発光誘導活性 が著しく低下するケースが認められた(図 37)。大量の 化合物のスクリーニングのためには, エリシターの性状 が安定している必要がある。

そこで,第3節では,汎用的な病害抵抗性誘導物質の 高効率スクリーニングシステム構築のため,各種植物の 培養細胞を用いて,エリシター応答発光を指標として, 各種病害抵抗性誘導物質のプライミング活性を評価した。



図 37 GP17-2 培養ろ液の凍結保存によるエリシター 活性の低下

- 第3節 各種植物培養細胞における病害抵抗 性誘導物質によるプライミング活性 のエリシター応答発光を指標とした 検出
- 材料及び方法

1) エリシター

エリシターは、論文等で当該植物における活性が明ら

かにされており,基礎的抵抗反応を引き起こすものとし て,生物由来の Microbe associated molecular patterns (MAMPs)を用いた。イネ(Kuchitsu *et al.*, 1993)とコ ムギ(Ortmann *et al.*, 2004)には6量体キチンオリゴ糖 (生化学工業),ブドウ(Busam *et al.*, 1997)には酵母エ キス(Difco),また,ジャガイモ(Nakane *et al.*, 2003) には,アラキドン酸(Sigma-Aldrich)を使用した。キチ ンは20 μM,酵母エキスは20 mg/mlで滅菌蒸留水に溶解 し,懸濁培養細胞の5%量を添加した。アラキドン酸は2 mMでDMFに溶解し,懸濁培養細胞の1%量を添加した。

なお、イネで使用するキチンエリシターについては、 比較的低濃度(μMオーダー)で ROS 生成と密接に関係 しながら発光を誘導し、SAR 経路、WSR 経路に関与する 病害抵抗性誘導物質の前処理で、エリシター応答発光が 増強されることを確認している(Kageyama *et al.*, 2006; 影山ら、2007)。

2) 供試培養細胞

イネ (*Oryza sativa*) は、'金南風'KI 株 12gを 100ml の 改変 N6 液体培地 (Kuchitsu *et al.*, 1993, 表 7) で 25℃, 120 rpm, 暗黒条件で振とう培養し、培養 9~10 日後の懸 濁培養細胞を使用した。

コムギ (*Tritichum aestivum*) は'ハルユタカ'HY-1 株を 用い,細胞 5gを100 mlのコムギ用 LS 培地 (表 7) に移 し,25℃,120 rpm,暗黒条件で振とう培養し,培養13~ 14 日後の懸濁培養細胞を試験に供試した。

ブ ド ウ (*Vitis vinifera*) は, 'Baily Alicante B'RPC00004VW株5gをブドウ用LS 培地(表7)100 ml 中で25 ℃,120 rpm,暗黒条件で振とう培養し,培養14 日後の懸濁培養細胞を使用した。

また,ジャガイモ (Solanum tuberosum) については 'Lisera'PC1018株を用い,細胞 10gを 100 mlの4X 培地 (Gamborg *et al.*, 1968,表7) に移し,20 ℃,120rpm, 暗黒条件で振とう培養し,培養 14 日後の懸濁培養細胞 を使用した。

3) 病害抵抗性誘導物質

既報の病害抵抗性誘導経路に関係する物質を供試した(図 38)。プロベナゾール(PBZ),アシベンゾラル Sメチル(ASM),チアジニル(TDL),カルプロパミ ド(CRP),β-アミノ酪酸(BABA)は,残留農薬分析用 の標準品を和光純薬から購入した。メチルジャスモン酸 (MJ),ブラシノライド(Brassinolide: BL)は Sigma-Aldrichから購入した。BABAは滅菌水に,その他の病害 抵抗性誘導物質は2%Tween20を含む N'N'ジメチルホ ルムアミド(DMF:和光純薬)に溶解し,終濃度の1,000 倍濃度のストック液を調製した。0.5g(生鮮重量)の細 胞を含む 1.5 ml の細胞懸濁液に, 1.5 µl の抵抗性誘導物 質ストック液をエリシター処理の 2 時間前に添加し, 前 処理した。全ての抵抗性誘導物質は 20 と 200 µM で処理 し, その濃度でエリシター応答発光の増強が不明瞭な場 合には, 20 と 200 µM の間の濃度やそれより高い 500 µM の処理も行った。また, エチレン (ET: ジーエルサイエ ンス) は,機器分析用の標準ガスを密閉容器中の雰囲気 に 10 ppm で混入し, 細胞懸濁液をエリシター処理前に 24 時間暴露した。

4) 極微弱発光測定

エリシター応答発光の経時的測定には,240~630 nm に感度を有するR329P光電子増倍管を備える浜松ホトニ クス社製のフォトンカウンターMSPCIを使用した。

5) 病害抵抗性誘導物質のプライミング効果によるエリシター応答発光と ROS 生成

本章第2節では、イネ懸濁培養細胞に GP17-2 培養ろ 液が誘起するエリシター応答発光は、各種病害抵抗性誘 導物質の前処理により、病害抵抗反応関連遺伝子 (PR遺 伝子)発現と共に増強されることを明らかにしているが、 本現象がその他の植物でも認められるかを調査した。

コムギ,ブドウ及びジャガイモのそれぞれで,0.5g(生 鮮重量)の細胞を含む 1.5 mlの細胞懸濁液を直径 60 mm のプラスティックシャーレに採取し,細胞を 200 µM ASM (ジャガイモは 20 µM)で処理し,直ちにフォトン カウンターで極微弱発光の測定を行った。ASM 処理の 2 時間後に,エリシターを所定の濃度で添加し,極微弱発 光の測定を再開した。エリシター処理1時間後に各種培 養細胞における ROS 生成あるいは,PR 遺伝子発現の解 析を行った。コムギについては,影山ら(2007 b)の方法 で ROS である過酸化水素の生成量と PAL2 遺伝子の発現 量を調査した。PR 遺伝子の解析は,本章第 2 節 1.材料及 び方法 6)の方法に従い行った。供試したプライマーセ ットは表 8 に示した。また,ブドウについては Chit4c 遺 伝子,ジャガイモは StrbohB 遺伝子を対象に発現量解析 を行った。

発光の増強程度の算出のため、エリシター添加サンプ ルの発光量からエリシター無添加サンプルの発光量を差 し引いて、エリシター添加後5時間の積算発光量を求め た(図 39)。抵抗性誘導物質前処理区の積算発光量を, 溶媒前処理区(対照)の積算発光量で除してエリシター 応答発光の増強程度を算出した。

6)各種抵抗性誘導物質のプライミング効果によるエリシター応答発光の増強解析

イネ,コムギ,ジャガイモ及びブドウの培養細胞を用 いて,抵抗性誘導メカニズムが異なる各種抵抗性誘導物 質(図 38)によるエリシター応答発光の増強の違いを解 析した(図 39)。

各種植物について 0.5gの細胞を含む 1.5 mlの細胞懸

濁液をプラスティックシャーレに採取し,所定の方法で 各病害抵抗性誘導物質を細胞に添加した。所定の前処理 時間の後,エリシターを所定の濃度で添加し,直後から 極微弱発光をフォトンカウンターにより測定した。抵抗 性誘導物質の前処理及び極微弱発光測定は,ジャガイモ は20℃で,また,その他の3植物は25℃で行った。

表7 懸濁細胞培養に用いた培地の組成

	イク田	コンゼ田	ゴバナ田	ジャガノエ田
成分量(mg/L)	4 不用 改変 N6	コム _午 用 改変 LS	ン つ の 変 LS	クマガイ C用 4X
(NH4) ₂ SO ₄	463			134
NH ₄ NO ₃		1,650	1,650	
KNO ₃	2,830	1,900	1,900	2,500
KH ₂ PO ₄	400	170	370	
H ₃ BO ₃	1.6	6.2	6.2	3
MnSO ₄ 4H ₂ O	4.4	22.3	22.3	10
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	1.5	8.6	8.6	2
KI	0.83	0.83	0.83	0.75
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	0.05	0.25	0.25	0.25
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.005	0.025	0.025	0.025
CoCl ₂ ·6H ₂ O		0.025	0.025	0.025
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0.005	440	440	150
MgSO ₄ ·7H ₂ O	166	370	370	246
FeSO ₄ ·7H ₂ O	185	27.8	27.8	
Na ₂ -EDTA	5.56	37.3	37.3	
Fe-EDTA	7.41			
FeNaEDTA				36.7
NaH ₂ PO ₄ · 2H ₂ O				169.57
ビタミン類				
酒石酸鉄				
ミオイノシトール	100	100	100	100
ニコチン酸	0.5			1
ピリドキシン-HCI	0.5			1
チアミン-HCI	0.1	1	1	10
グリシン	2			
炭素源				
ショ糖	30,000	30,000	30,000	20,000
ホルモン				
2,4-D	1	1	0.2	2
NAA				0.5
IAA				0.5
カイネチン				0.2
pН	5.8	5.8	5.8	5.6



図 38 各種病害抵抗性誘導経路と関連する物質 (カッコ内は供試した物質名)

表8 エリシター応答遺伝子発現解析に使用したプライマーセット

植物種*	遺伝子名	機能	フォワードプライマー	リバースプライマー	増幅物 (bp)
PAL2		フェニルアラニンア ンモニアリア ー ゼ	5' CAAGTCGATTGAGCGTGAG 3'	5' GCGCTCTGGACATGGTTAG 3'	336
774	ACT1	アクチン (内部標準)	5' CCTCATGCCATTCTTCGTTT 3'	5' GCAGTCTCCAGCTCCTGTTC 3'	176
<i>CHIT</i> ブドウ <i>Act</i> :	CHIT4c	クラス 4 キチナ ー ゼ	5' TGCCTTGTGGTATTGGATGA 3'	5' TTGACAGCAGCAGTGTTTCC 3'	114
	Act2	アクチン (内部標準)	5' TCCTTCGTCTTGACCTTGCT 3'	5' ACGGAATCTCTCAGCTCCAA 3'	245
ジャガイモ	StrbohB	NADPH オキシダーゼ	5' GTGAGCCTCCAACTGGTGAT 3'	5' CCAATGCCAAGGCCTACTAA 3'	163
	EF-1α	伸長因子 (内部標準)	5' ACCAAGGCTGCTCAGAAGAA 3'	5' TATTTTGCCACCGTCTGTCA 3'	217

*イネ用は第2節表5に記載



図 39 エリシター応答発光の測定と増強程度算出の方法 エリシター応答発光からベースライン発光(水処理)の値を引いた積算発光(斜線部: キチン添加後5時間)を求め,抵抗性誘導物質前処理(A)を溶媒前処理(B)で除して 増強程度を算出した(増強程度=A/B)。

2. 結果

1) 病害抵抗性誘導物質のプライミング効果によるエリシター応答発光と ROS 生成・PR 遺伝子 発現の増強解析

6 量体キチンエリシター1 pM で処理したコムギ培養 細胞では、処理数分後と 2~3 時間後にピークを持つ二 相性の発光増加が確認され、ASM の前処理により、明瞭 な増強が認められた(図 40 A)。エリシター添加の1時 間後に ROS 生成量を評価したところ、キチン応答性の ROS 生成が ASM の前処理により明瞭に増強されており

(図 40B),同様に,PR 遺伝子の PAL2 の発現増加も 確認された(図省略)。ASM の抵抗性誘導によりコムギ の病害抵抗反応が増強されている状態で,エリシター応 答発光の増強が起きていることが確認された。

酵母エキスエリシター1 mg/ml で処理したブドウ培養 細胞では,処理数分後と1~2時間後にピーク(肩)を持 つ二相性の発光増加が確認され,ASMの前処理により, 明瞭な増強と発光時間の延長が認められた(図 41A)。 エリシター添加の1時間後に酵母エキス応答性のキチナ ーゼ遺伝子(*Chit4c*)発現量を評価したところ, ASM の 前処理により明瞭に増強されていることが確認された (図 41B)。

アラキドン酸エリシター20 µM で処理したジャガイモ 細胞では,処理の 4~6 時間後にピークを持つ弱い発光 増加が認められたが,ASM の前処理により明瞭な増強と 発光増加時間の延長が認められた(図 42A)。エリシタ 一添加の 6 時間後に アラキドン酸応答性の NADPH オ キシダーゼ遺伝子(*StrbohB*)発現量を評価したところ, ASM の前処理により明瞭に増強されていることが確認 された(図 42B)。

以上のように、イネと同様に、コムギ、ブドウ及びジ ャガイモにおいても ASM の病害抵抗性誘導効果により、 エリシター応答発光のプライミングが認められることが 判明した。



図 40 ASM のプライミング効果によるエリシター応答発光と ROS の増強(コムギ) コムギ培養細胞におけるエリシター応答発光の増強(左)と ROS 生成の増強(右)。ASM200 μM(溶媒 0.1%DMF)で2時間前処理した後、エリシターとして6量体キチンを 1.0 μM(対照 滅菌水)で添加。 エリシター添加1時間後の時点(▼印)で ROS 生成を評価した。







図 42 ASM のプライミング効果によるエリシター応答発光とPR 遺伝子の増強(ジャガイモ) ジャガイモ培養細胞におけるエリシター応答発光の増強(左)と病害抵抗反応関連遺伝子(NADPH オキシダーゼ遺伝

子 : *Strboh*B)発現の増強(右)。ASM20 μM(溶媒 0.1%DMF)で 2 時間前処理した後, エリシターとしてアラキドン酸を 20 μM (対照 1%DMF)で添加。エリシター添加 6 時間後の時点(▼印)で遺伝子発現を解析した。

2)各種抵抗性誘導物質のプライミング効果によるエリシター応答発光の増強解析

試験結果をまとめて表9に示した。SAR 経路に作用す る物質は、全ての植物種でエリシター応答発光を増強さ せた。ジャガイモでは、各種物質の200 µM 処理で発光 の抑制が認められたが、20 µM で良好な増強を示した。 一方、WSR/ISR 経路に作用する MJ は、200 µM 処理 でイネにおいて良好な増強を示し、コムギ、ジャガイモ でも低濃度で増強が認められたが、ブドウでは200~20 µM で、酵母エキスエリシターに対する応答発光を抑制 した(図43)。同じくWSR/ISR 経路に作用するエチ レン(ET)は、10 ppm・24 時間の前処理で、イネ、コ ムギ、ジャガイモにおいて発光を増強させたが、ブドウ では発光を抑制した(図43)。 近年明らかになった, BDR 経路に作用するブラシノラ イド(BL)は、200 µM 処理でジャガイモ、ブドウにお いて発光を増強させたが(図43)、イネ、コムギでは明 瞭な変動が認められなかった。また、近年、アブシジン 酸(Abcisic acid: ABA)が関与する誘導経路に作用する ことが明らかになってきた BABAは、イネ、ジャガイモ への500 µM 処理で増強が認められたが(図43)、ブド ウ、コムギでは明瞭な変化が認められなかった。以上の ように、各種の病害抵抗性誘導物質による、エリシター 応答発光の増強に関するデータが得られ、複数の植物種 - エリシターの組み合わせを用いることで、いずれの病 害抵抗性誘導経路の活性も検出できた(表9、図43)。

物質	抵抗性誘導の タイプ	イネ	コムギ	ジャガイモ	ブドウ
ASM	SAR	10.7	2.4	3.2 _(20 µM)	5.6
SA	SAR	3.7	3.1	1.7 _(20 µM)	1.8
TDL	SAR	5.1	2.1	2.3 _(20 µM)	2.2
PBZ	SAR	12.5	4.4	2.0 _(20 µM)	4.2
MJ	WSR/ISR	2.8	1.3 _(66.7 µM)	3.0 _(50 µM)	0.3
ET	WSR/ISR	1.6	1.8	1.7	0.2
BL	BDR	1.0	0.9	1.5	3.3
BABA	未知	1.7 _(500 µM)	1.1	1.5 _(500 µM)	1.0

表9 各種抵抗性誘導物質の前処理(2 h・200 µM)によるエリシター応答発光の変動

・表中の数字はエリシター応答発光の変動(X=1.0:変動なし、1.1<X:増強、X<0.9:抑制)。

▪ 病害抵抗性誘導物質の濃度が 200 µM 以外の場合は表中(XµM)で表示。

・使用したエリシター(イネ及びコムギ:6量体キチン 1 μM, ジャガイモ:アラキドン酸 20 μM, ブドウ:酵母エキス 1 mg/ml)。

• エチレン(ET)は、ガスで 10ppm • 24 h 処理。



図 43 各種病害抵抗性誘導物質の前処理によるエリシター応答発光の変動(抜粋)

作用する誘導経路	処理形態	濃度	前処理時間
SAR	有機溶媒希釈	200µM 以下	2 時間以上
WSR/ISR(MJ)	有機溶媒希釈	200µM 以下	2 時間以上
WSR/ISR(ET)	ガス	10ppm	~24 時間
BDR	有機溶媒希釈	200µM 以上	2 時間以上
BABA-IR	水希釈	500µM 以上	2 時間以上

表 10	病害	低抗性誘導物質の処理方法	£
	/F3 🖬 .		-

3. 考察

本スクリーニングシステムの特徴として,方法に示し たとおり,非常に簡便なことがあげられるが,24時間処 理する ET を除けば,前処理から判定終了まで半日かか らず終了する迅速性においても他の方法(接種試験:1~ 数週間,マイクロアレイ:2~3日,レポーターアッセイ: 1日)に対して優位にある(表10)。

また,表9に示したように,ジャガイモは供試した総 ての抵抗性誘導物質が持つプライミング活性を,エリシ ター応答発光の増強として検出することができたが,他 の3種の植物ではそれができなかった。その上,ジャガ イモにしても,BLとBABAによるエリシター応答発光 の増強程度は十分でなく,かつ,SAR経路の抵抗性誘導 物質による増強程度も,他の植物よりやや低かった。こ のように,いずれか1種類の植物種で全ての誘導経路に 対応することは困難と考えられ,誘導経路に応じて検出 感度が高い植物種を選ぶことにより,高感度な検出が実 現できる。

一方,抵抗性誘導物質の種類によっては,それぞれの 植物種で評価に好適な処理濃度が異なる場合があった。 病害抵抗性誘導物質には副次的な効果も知られており, 植物種によっては比較的低濃度でも生育を阻害する場合 もある。複数の植物種によるスクリーニングシステムを 採用することで,そのリスクを軽減した評価が可能にな ると思われる。

興味深いことに、WSR/ISR (化合物:MJ, ET) に 関しては、イネ、コムギ、ジャガイモでは、エリシター 応答発光の増強を認めたが、ブドウでは非常に低濃度か ら逆に抑制が認められた。この現象の原因については未 解明であるが、作用未知の物質について WSR/ISR か、 それ以外の抵抗性誘導経路に作用するかを判別する手段 に利用できる可能性がある。

以上のように,主要な複数の作物種で病害抵抗性誘導 物質のスクリーニングシステムを作成したが,中でもイ ネとキチンエリシターの組み合わせは,BDRの活性検出 は出来なかったものの,それ以外については,対応する 病害抵抗性誘導物質の濃度レンジが広く,増強程度も高 かった。イネとキチンエリシターの組み合わせを軸に, 適宜,他の植物種を併用することで,汎用性の高いスク リーニングシステムが構築可能である。そこで,第4節 では,農薬原体供給企業の協力を得て,イネとキチンエ リシターの組み合わせによる化合物ライブラリーのスク リーニングを行い,植物体での病原体接種検定と組み合 わせて,実際に病害抵抗性誘導物質の選抜を試みた。

第4節 イネ培養細胞のエリシター応答発光 の増強を指標とする病害抵抗性誘導 物質の探索

1. 材料及び方法

1) 供試化合物

協力企業 A が合成した化合物群の中から,病害抵抗性 誘導が期待される化合物群 A グループ 1,006 剤及び,協 力企業 B が合成した中から,殺虫・殺菌・除草効果など が認められないか,極めて低い化合物を選び出し,さら に構造的特徴の重複が少なくなるように選抜された化合 物群 B グループ 7,941 剤を用いた。A グループは 5000 ppm 水和剤(協力企業 A で製剤), B グループは 2 % Tween20 を含有する NNジメチルホルムアミド(DMF: 和光純薬)に 5000 ppm で溶解したものをストック液と した。

2)イネ培養細胞のエリシター応答発光の増強 を指標とした選抜

改変 N6 液体培地(Kuchitsu et al., 1993) で 10 日間 振とう培養したイネ培養細胞'金南風'2.5gを含む培養物 **5.94 ml**を φ60 mm のプラスティックシャーレ (栄研) に採取した。それに、終濃度 50 ppm になるよう、化合 物のストック液を 60 µl 添加・混合し、その2時間後に エリシターとして 4~20 µM の 6 量体キチンオリゴ糖 (生化学工業) 300 µl を添加して(終濃度 0.2~1 µM), エリシター応答発光を測定した。対照として、化合物処 理では原体を含まない製剤成分(A グループ)もしくは 2% Tween20 を含有する DMF (B グループ) を, また, キチンエリシター処理では蒸留水を同量処理した。二相 性のキチンエリシター応答発光の特徴と異なる発光を示 したものを除き、既存の病害抵抗性誘導剤であるアシベ ンゾラル-S-メチル (ASM: 和光純薬) 200 µM の前処理 による発光増加量の 29%以上の発光増加が認められた 化合物を選抜した(図44)。この選抜基準を設定したの は,病害抵抗性誘導活性を持つ既存の殺菌剤の中で,比 較的エリシター応答発光の増強が穏やかなカルプロパミ ドが、平均でこの程度の発光増加を示すためである。ま た、一般にエリシター濃度が低いほうがプライミングに よるエリシター応答の増強程度が大きくなるが、抵抗性 誘導活性が弱めの場合は、エリシター濃度を高めたほう が、プライミングを検出しやすくなるため(図 45, ASM 20 µM 以下),活性が弱い化合物まで幅広く選抜するこ と目的とした B グループでは、終濃度 1 µM でキチンを 添加した。



図 44 キチンエリシター応答発光の増強程度の算出

キチンエリシター応答発光からベースライン発光(水処理)の値を引いた積算発光 (斜線部:キチン添加後5時間)について,候補化合物前処理の値(A)から溶媒前処理 の値(B)を引いて発光増加量を求めた。その発光増加量が,200 μM ASM の前処理 による発光増加量の29 %以上の値を示した化合物を選抜した。



図 45 エリシター処理濃度によるプライミング検出力の違い

図 44 の方法により 1.0 µM と 0.2 µM のキチンエリシター処理で 200~4 µM の ASM 前処理(2 時間)による プライミングを検出した。図中の数字(%)は、200 µM 処理に対する発光増加の割合(%)を示す。

3) イネを用いた植物検定(A グループ)

直径 9 cm の止水可能な白磁鉢に水稲育苗用土(くみ あい宇部粒状培土, JA 全農)を詰め, 湛水後, 1.5 葉期 の水稲品種'愛知旭'(いもち病抵抗性遺伝子 Pi-a)を3株 ずつ4カ所に移植し, ガラス温室内で維持した。移植か ら約2週間後(2.5 葉期)に候補化合物の水和剤を, 有効 成分濃度が10アールあたり300gになるように, 一鉢あ たり,200ppmの希釈液10ml(製剤約0.4g)を水面施用 した。水面施用の3週間後(4~5葉期),イネいもち病 菌(レース007)の分生胞子懸濁液(1×10⁶ cells/ml)を噴 霧接種し,接種5日後に接種時の最上位葉の病斑数を調 査した。2回の試験で連続して,対照の水処理に対して, 平均で防除価75以上を示したものを,病害抵抗性誘導 剤の候補化合物として選抜した。

4) キュウリを用いた植物検定(Bグループ)

直径9 cmのポリ鉢に園芸培土 (ナース・豊土,(株)ホー チ・アグリコ)を詰め、25℃・暗所・湿室で一晩催芽し たキュウリ品種、霜知らず地這い、種子を3粒/鉢で播種 し,底面給水によりガラス温室内で維持した。子葉展開 後に,化合物を100 ppmの濃度で子葉の表裏に綿棒で塗布 し,3日間の誘導期間後,キュウリ炭疽病菌 (*Colletotrichum orbiculare*)の分生胞子懸濁液(1×10⁶ cells/ml)を噴霧接種した。その後、25℃で24時間暗所・ 湿室に置いたのち、25℃・16時間蛍光灯照明下で維持し、 本葉第一葉の発病面積率を調査した。試験は1薬剤に対し 2鉢で行った。対照の溶媒前処理に対して平均で防除価75 以上を示した化合物について,同じ方法で再試験を行い、 再び防除価75以上を示した化合物を、最終的に病害抵抗 性誘導剤の候補化合物として選抜した。

2. 結果

エリシター応答発光を指標とした1次スクリーニング の結果,供試した8,947剤の化合物から,2,309剤の化合 物(選抜率25.8%)を選抜した(表11)。Aグループか ら選抜した456剤のうち,117剤についてイネを用いた 植物検定を行った結果,48剤が高い抵抗性誘導活性を示 し,構造相関解析の結果,抵抗性誘導活性を有する5種 類の新規骨格が得られた(表12)。

一方, B グループから選抜した 1,853 剤についてキュ ウリを用いた植物検定を行った結果, 21 剤が高い誘導活 性を示し,構造相関解析の結果,抵抗性誘導活性を有す る2種類の新規骨格を発見した(表12・図46)。

以上の結果から, 8,947 剤のスクリーニングの結果,抵 抗性誘導活性を有する新規骨格7種類が得られた。

3. 考察

プライミングによる病害抵抗反応の増強は、病害抵抗 性誘導物質とエリシターの協力作用である。これまでの 報告では、エリシター濃度は比較的薄く、PR 遺伝子発現 も殆ど誘導しないレベルが好適だとされている(Kauss *et al.*, 1992a)。エリシター応答発光でも、同様の傾向は認 められ、200 µM の ASM でイネ培養細胞を前処理した場 合、0.1~10 µM の6量体キチンオリゴ糖エリシターでは、 0.1 µM で最も増強程度が高かった(影山ら、2007)。し かし、新規骨格の探索の場合は、後の構造最適化による 効果の向上を見込んで、比較的低い活性でも選抜するこ とがある。そこで、より低い濃度 4~200 µM の ASM で 細胞を前処理した場合の 0.2 及び 1.0 µM のキチンエリシ ター応答発光増強を比較したところ、1 µM のエリシター 濃度でより低濃度の ASM の活性を検出できた(図 45)。 比較的弱いプライミング活性を検出するには、エリシタ ーによる刺激をやや強めにするのが有効だと考えられた。 このことを考慮して、弱い抵抗性誘導活性を検出したい 化合物群 B のスクリーニングでは、キチンエリシターの 処理濃度は 1.0 μM とした。

近年,病害抵抗性誘導剤の開発効率化のために様々な 手法が考案されているが,中でも、レポータージーンア ッセイは,通常の遺伝子発現解析を遥かに超える簡便性 を実現している(鳴坂,2008)。レポータージーンアッ セイでは,プライミングではなく,誘導物質処理で直接 発現変動する遺伝子プロモーターを使用するため,解明 が進んでいる病害抵抗性誘導にのみ対応する。一方で, 本研究によるエリシター応答発光の増強を用いれば,既 知の誘導メカニズムには当てはまらないものまで検出で きる可能性が高い。実際に,プライミング活性を持つが, 誘導経路が未知なピラクロストロビン(Herms et al., 2002) などの処理でも,発光の増強を確認している(伊代住ら, 2008)。

協力企業の化合物ライブラリーについて、プライミン グ活性化合物のスクリーニングを実施した結果は、ライ ブラリーの一次スクリーニングとしては高めの選抜率と なった。A グループ化合物は、既知の病害抵抗性誘導物 質の構造をもとに合成展開したライブラリーのため、予 め選抜率が高くなることが予想された。また、B グルー プが、多様な骨格の中から新規の活性骨格を得ることを

表 11 イネのキチンエリシター応答発光の増強を指標に

した一次スクリーニング結果

	供試化合物数	選抜数	選抜率(%)	
化合物群	1006	450	45.00	
A グル ー プ	1006	400	40.00	
化合物群	7041	1052	22.22	
B グル ー プ	7941	1000	23.33	
計	8947	2309	25.81	

表 12	植物検定による2次クリ	ーニング結果
------	-------------	--------

	供試化合物数	選抜数	新規骨格数*	
イネ	117	40	F	
(いもち病)	117	40	5	
キュウリ	1952	21	n	
(炭疽病)	1655	21	2	
計	1970	69	7	

*構造・活性相関解析により、選抜された化合物間で共通する骨格を割り 出した。 目標としていたため、比較的活性の弱いものも取りもら さないように、選抜ラインを ASM による増強の 29%以 上としたことも影響した。本研究においては、イネとイ ネいもち病菌、キュウリとキュウリ炭疽病菌の組み合わ せでそれぞれ接種試験を行い、最終的に、合計7種類の 新規活性骨格を得ることができた。異なる植物種あるい は病原体を用いることで、別の選抜結果が得られる可能 性は高く、エリシター応答発光の増強により選抜した候 補化合物は、プライミング活性を示す化合物群を集めた 2次ライブラリーとして活用できる。

今回のスクリーニングでフォトンカウンターの原価 償却分を除くランニングコストを試算したところ,1 剤 当たり233円(人件費は1人分)となり,ハウス内等で 植物体への接種を行う従来法のランニングコスト600円 (同 ライブラリー提供企業の試算による)と比べて安 く実施できた。また,1回の測定に要した時間は,準備 時間を含めて合否判定まで8時間程度で(図47),1~ 数週間かかる従来法に比べて短時間で済んだ。このよう に、エリシター応答発光の増強を指標として、汎用性・ 簡便性(安価)・迅速性を備えたプライミング活性物質 の選抜方法が作成できた。

本方法は、第3節で述べたように既知の病害抵抗性誘 導経路について幅広く対応するだけでなく、解析が進ん でいない未知の誘導経路にも対応していると考えられる。 本方法の指標であるエリシター応答発光については、第 I章で述べたとおり、発光メカニズムの解析を進めてい るが、一方で、発光増強のメカニズム解析は、残された 課題である。そこで、第5節では、近年明らかにされつ つあるプライミングメカニズムに関する知見をもとに、 イネ培養細胞のキチンエリシター応答発光の増強メカニ ズムの解析を試みた。



溶媒前処理



選抜化合物前処理

図 46 選抜された候補化合物の効果(抜粋)

病原菌接種7日後のキュウリの様子。溶媒前処理(左), 選抜化合物前処理(右)。 発病面積率の評価は接種4日後に実施。



図 47 作成したプライミング活性化合物選抜方法

第5節 イネ培養細胞のキチンエリシター 応答発光の増強におけるサリチル 酸経路の役割

1. 材料及び方法

1) 懸濁培養細胞

イネ懸濁培養細胞は'金南風'を使用した。1 mg/L の 2,4-D を含む改変 N6 液体培地(Kuchitsu *et al.*, 1993)で 25℃,暗所,120 rpm で振とう培養し,10 日ごとに15 g を新鮮培地に植え継いだ。病害抵抗性誘導剤及びエリ シター添加にあたっては,培養10 日目のイネ懸濁培養 細胞から,培養細胞 0.5 g(生鮮重量)と1 mlの液体培 地を採取して,直径35 mm のプラスティックシャーレ (イワキ)に分注した。

2) RNAi による Os WRKY45 遺伝子の特異的発現抑制

イネにおいては、近年、SA 依存性の全身獲得抵抗性 (Systemic acquired resistace: SAR) が確認され, 転写 因子である OsWRKY45 (WRKY45) が極めて重要な役 割を果たすことが明らかにされている(Shimono et al., 2006; Iwai et al., 2007)。一方で、イネの病害抵抗反応 における SA シグナル伝達経路は OsWRKY45 ともう一 つ,双子葉植物の SAR において決定的な役割を持つ NPR1 (Non-expressor of PR-1) のイネホモログである OsNPR1 (NH1) を介する経路に分岐する (Sugano et al., 2010; Takatsuji et al., 2010)。しかしながら、イ ネにおいて, SAR 誘導剤である ASM 処理で正の制御を 受ける病害抵抗反応に関する遺伝子の大半は OsWRKY45 依存性で、OsNPR1 依存性の遺伝子は主に ASM により負の制御を受ける光合成関連遺伝子などで あり (Sugano et al., 2010; Nakayama et al., 2013), OsWRKY45 をノックダウンすることで、イネのキチン 応答発光の増強における SAR の関与を明らかにできる と考えた。

① RNAi コンストラクトの作成

OsWRKY45 (AK066225) 特異的な RNAi ベクターは Gateway の pENTR/D-TOPO クローニングキット (Invitrogen) と pANDA ベクター (Miki and Shimamoto 2004; Miki et al., 2005) 奈良先端大 故島 本教授より分譲)により作製した。OsWRKY45 遺伝子 の cDNA 断片(トリガー配列 309 bp, 5'-GGACACGGGC CGGGTAAAACGATCGAAAGAAGATGGATTCCACG CGTGTGTACAGAAATAATTAGCGGCAGCGCGGAT CTTAATTTGGAACTTGCAAAGATACTCCTAATTAG CCTGGCTAGATTAGTTTGTAAATTCCTTGTTGATG TGTCGTCTCAGCTTTAAGCTGCAGACATGCTAGCA AGTAACAACACGATTAGTACGTAGTAATGTGGTTC TTGATTATGAGCTGGGGGGTCTTAACCTTTTTGTG TGACAAGCAAGAGAAGAGGATTTGGGTACAATGT AATCCTGTTCTTCCGCTTTCGA-3') はダイレクショ ナルクローニング用のプライマーセット (forward 5'-CACCGGACACGGGCCGGGTAAAACGATCGAAAGA -3'及び reverse 5'-TCGAAAGCGGAAGAACAGGATTA CATTGTACCCA-3')を用いて PCR により増幅した。増 幅したトリガー配列のpENTR/D-TOPOへの組込みと大 腸菌 (One Shot TOP10®: サーモフィッシャーサイエン ティフィック) への導入は, pENTR/D-TOPO クローニ ングキットの説明書に従い行った。カナマイシン耐性を 指標に選抜したクローンの中で目的の配列を有するもの を増殖し、エントリークローンを得た。エントリークロ ーンを制限酵素 Nrul で消化し、フェノール・クロロフォ ルム抽出及びエタノール沈殿で精製した。150 ngのエン トリークローンを 150 ng の pANDA ベクター, 0.5 μl の Topoisomerase I (プロメガ) と混合し, TE バッファ - (pH8.0) で 8 µl に調整した後, 2 µl の LR clonase ック)を加えて 25 °C, 一晩インキュベーションし, LR クローニング反応により, pANDA ベクターに OsWRKY45 断片を組込み, LR クローニング産物で大 腸菌 (One Shot TOP10®: サーモフィッシャーサイエン ティフィック)を形質転換した。ハイグロマイシン及び カナマイシン耐性を指標に選抜したクローンの中で, GUS リンカーを挟んでトリガー配列が逆向きに一組挿 入された目的の配列(図 48)を持つものを大量増殖し、 pANDA-OsWRKY45-RNAi を得た。

② 形質転換イネ培養細胞の作出

pANDA-OsWRKY45-RNAi ベクターを導入した Rhizobium radiobacter (Agrobacterium tumefaciens) EHA105 株を用いて形質転換イネ培養細胞を作製した。 RNAi ベクターを持つ EHA105 株を AB 寒天平板で 25℃・暗所・3日間培養し,200 ppm のアセトシリンゴ ン(シグマ-アルドリッチ)を含む AAM 液体培地(表 13) に OD₆₀₀=0.1 程度に懸濁し接種菌液とした。7日間培養 したイネ培養細胞'金南風'(KI 株)の培養液を除き,細 胞 5 g を接種菌液に 90 秒間浸した後,直ちに菌液を除 き,滅菌ろ紙を敷いた改変 N6 平板培地上 (200 ppm ア セトシリンゴン含有)に重ならないように細胞塊を広げ, 23 ℃・暗所で3日間共存培養した。共存培養後,細胞塊 を滅菌水で 5 回すすぎ,最後に 300 ppm のカルベニシ リンを含む滅菌水で1 回すすいでから,300 ppm のカル



図 48 イネ培養細胞 OsWRKY45-RNAi 系統の作出

表 13 形質転換に使用した培地

AB培地(1L:DW)						
K ₂ HPO ₄		3g				
NaH₂PO₄∙2H₂O		1.3g				
NH₄CI		1g				
KCI		150mg				
CaCl₂•2H₂O		10mg				
FeSO₄•7H₀O		2.5mg				
Glucose		5g				
pН		7.2				
(Bacto-agar)		15g				
オートクレーヴ		121°C•	15分			
*オートクレーヴ後に加	用					
1M MgSO ₄ •7H ₂ O	溶液	1.2ml				
_AA培地(1L:DW)				<u>AAストック(各10</u>	0ml:DW)	
AA-1(×1,000)	1m			AA-1(×1,000)	MnSO₄∙6H₂O	1,000mg
AA-2(×1,000)	1ml				H_3BO_3	300mg
AA-3(×1,000)	1ml				ZnSO₄∙7H₂O	200mg
AA-4(×1,000)	1ml				Na₂MoO₄∙2H₂O	25mg
AA-5(×1,000)	1ml				CuSO₄∙5H₂O	2.5mg
AA-6(×1,000)	1ml				CoCl2•6H2O	2.5mg
AA-7(×100)	10m				KI	75mg
AA-8(×50)	20m			AA-2(×1,000)	CaCl₂∙2H₂O	15g
Casamino acids	0.5g			AA-3(×1,000)	ZnSO₄∙7H₂O	25g
Sucrose	68.5g			AA-4(×1,000)	Fe-EDTA	4g
Glucose	36g			AA-5(×1,000)	NaH ₂ PO ₄ •2H ₂ O	15g
L-Glutamine	0.9g			AA-6(×1,000)	Nicotinic acid	100mg
Aspartic acid	0.3g				Thiamine-HCI	1000mg
					Pyridoxine-HCI	100mg
pH	5.2				Myo-inocitol	10g
オートクレーウ	121°C	; 15分	•	AA-7(×100)	L-Arginine	1,767mg
				$\Delta \Delta = 8(\times 50)$		/ 0 mg
				$\overline{\Lambda}$ $\overline{\Lambda}$ $\overline{\Lambda}$ $\overline{\Lambda}$ $\overline{\Lambda}$ $\overline{\Lambda}$ $\overline{\Lambda}$	NOI	IUg
					保存	4°C

ベニシリン,50 ppm のハイグロマイシン,50 ppm のカ ナマイシンを含む 100 ml の改変 N6 液体培地に細胞を 移し,100 rpm・25 ℃・暗所で7日間除菌を行い,その 後は12日ごとに15gを改変 N6 培地(2,4・D・1 mg/L, 50 ppm ハイグロマイシン含有)に植え継いだ。極微弱 発光測定及び RNA 抽出には,培養 10日目の細胞を用い た。これらの細胞系統について,RNAiのトリガー二本 鎖 RNA の発現確認のため,gus リンカー配列の生成を RT-PCR により確認した。

3) 病害抵抗性誘導物質および異性体

病害抵抗性誘導物質として、アシベンゾラル S メチル (ASM:和光純薬), チアジニル(TDL:和光純薬), サリチル酸ナトリウム(SANa:和光純薬)を使用した。 各種病害抵抗性誘導物質は、2%の Tween20(和光純薬) を含む NNジメチルホルムアミド(DMF:和光純薬)を 溶媒として、20 mM の 100 倍ストック液を作成し、1% (v/v)量を培養細胞に添加した。対照は同量の溶媒を用 いた。

サリチル酸の異性体である 3-ヒドロキシ安息香酸(3-HBA:和光純薬)及び 4-ヒドロキシ安息香酸(4-HBA: 和光純薬)は、同様に、2% Tween20 を含有する DMF に溶解し、20 mM の 100 倍ストック液を作成した。

4) エリシター処理

キチンエリシターとして 6 量体キチンオリゴ糖 (N acetylchitohexaose:生化学工業)を使用した。6 量体キ チンオリゴ糖は、滅菌水を溶媒として 20 μ M ストックを 作成し、終濃度で1 μ M になるように、5 %量 (v/v)を 病害抵抗性誘導物質またはサリチル酸の異性体処理の 2 時間後に培養細胞に添加した。対照は同量の滅菌水を用 いた。

5) 極微弱発光測定

サンプルからの発光はフォトンカウンターPCX-100 (浜松ホトニクス)を用いて、本章第2、3節に準じて測 定した。直径60mmのプラスティックシャーレ(栄研) に、培養10日目のイネ培養細胞0.5g(生鮮重量)と液 体培地1mlを分注し、病害抵抗性誘導物質の処理を行 った。細胞を入れたシャーレをフォトンカウンターにセ ットし、直ちに測定を開始した。2時間の前処理終了時 に測定を一時停止し、直ちにエリシターを添加して測定 を再開した。シャーレのセット以降、全ての処理は暗所 で行い、測定は26℃・3反復で実施した。各種処理にお けるエリシター応答発光量は、キチンエリシター添加後 5時間の積算光子数から水処理対照の値を差し引いた値 で示した(図44)。

6) 定量的 RT-PCR による OsWRKY45 遺伝子の発現 量解析

培養細胞に病害抵抗性誘導物質処理を行った2時間後に, 生重量 50 mg の細胞を採集した。その細胞から, RNeasy Plant Mini kit と RNase Free DNaseI (キアゲン) によ り総 RNA を抽出・精製し、500 ng の総 RNA から シャーサイエンティフィック)によりcDNAを合成した。 定量的 PCR は, SYBR® Premix Ex Tag (タカラバイ オ) により, Mx3000-P (アジレント)を用いて 95 ℃・ 5 秒, 64 ℃・30 秒で 30 サイクル行った。OsWRKY45 遺伝子 (AK066255) の発現量は, RUBQ1 (Rice *ubiquitin 1*; AK121590) の発現量で標準化した。プラ イマーは, OsWRKY45 には, forward 5'-GAACGACGA GGTTGTCTTCG-3' 及び reverse 5'-ACGCGTGGAAT CCATCTTCT-3', RUBQ1には, forward 5'-CCAGTAA GTCCTCAGCCATGGAG-3'及び reverse 5'-GGACA CAATGATTAGGGATCACTT-3'を使用した。

2. 結果

1) Os WRKY45 遺伝子発現を抑制したイネ培養細胞 におけるエリシター応答発光の増強

OsWRKY45 遺伝子発現のノックダウンが認められた 系統は,野生株と外観及びハウスキーピング遺伝子 (*Ubq1*)の発現で違いは認められなかった(図 49,図 50 A)。



図 49 培養 10 日目の金南風(左)と OsWRKY45-RNAi 系統(右)

溶媒前処理した OsWRKY45-RNAi 系統における OsWRKY45 遺伝子発現は,金南風と比較すると,同等 もしくは低いレベルであった(図 50 A 白カラム;金南 風に対する発現割合の平均 OsWRKY45-RNAi#1: 77.6%, OsWRKY45-RNAi#2:51.2)。ASM は単子葉 植物及び双子葉植物で全身獲得抵抗性を誘導することが 知られており(Görlach *et al.*, 1996; Lawton *et al.*, 1996), イネにおいて OsWRKY45 転写因子の発現を誘 導する(Shimono *et al.*, 2007)。しかしながら, ASM で 前処理した OsWRKY45-RNAi 系統における OsWRKY45 遺 伝子発現は金南風よりも明らかに低く, OsWRKY45 のノ ックダウンが確認された(図 50 A 灰色カラム;金南風 に対する発現割合の平均 OsWRKY45-RNAi#1:25.9%, OsWRKY45-RNAi#2:44.3%)。

1µMの6量体キチンオリゴ糖処理は、処理数分後と2 時間後にピークを持つ二相性のエリシター応答発光を誘 導する (Kageyama et al., 2006: 影山ら, 2007)。 Os WRKY45-RNAi#1 においては、キチンエリシター応答発光は金南 風とほぼ同程度であったが、OsWRKY45-RNAi#2 におい ては弱くなっていた。加えて、これらの2系統では、二 相目のピークが金南風よりも1時間遅れた(図50B灰色 のライン)。OsWRKY45-RNAiの影響は、ASMの前処理 によるエリシター応答発光の増強においてより明瞭であ った。金南風では、キチンエリシター応答発光の5時間 積算光子数は ASM 前処理により, 溶媒前処理に比較し て 339 % 増加した(黒色のライン 図 50 B)。 しかしな がら, OsWRKY45-RNAi 系統では, ASM 前処理によるキ チンエリシター応答発光の増加は明瞭に抑制された(図 50 B; OsWRKY45-RNAi#では-3% OsWRKY45-RNAi#2 では 57 %)。これらの結果から, ASM によるキチンエ リシター応答発光の増強への OsWRKY45 転写因子の寄 与が確認された。

TDLはイネ用の病害抵抗性誘導剤として上市され、タ バコにおいて、ASMと同様の経路で病害抵抗性シグナル 伝達に作用することが報告されている (Yasuda et al., 2004; Yasuda et al., 2006)。図51に示す通り、イネ培養細 胞(金南風)において、TDLもOsWRKY45遺伝子発現を誘 導し、OsWRKY45-RNAi#1系統においては、それが抑制さ れていた (図51 A 灰色カラム;金南風に対する発現割 合の平均OsWRKY45-RNAi#1:34.3%)。TDLで前処理し た金南風において、キチンエリシター応答発光の5時間積 算光子数は、溶媒前処理から228%増加した一方で、 OsWRKY45-RNAi#1系統では78%の増加であった。以上の 結果から、TDLによるキチンエリシター応答発光の増強 におけるOsWRKY45転写因子の寄与が確認された。

2)サリチル酸経路によるエリシター応答発光の 増強に関する解析

ASMとTDLは, SAの機能的アナログであり, SAが関 与する病害抵抗性シグナル伝達経路の下流に作用し, 双 子葉植物において, SARを誘導する (Lawton *et al.*, 1996; Yasuda *et al.*, 2006)。長い間, イネにおいては, 健全葉に定常的にSAが蓄積していることから,抵抗性 誘導におけるSAの関与は明らかでなかった(Yang et al., 2004)。しかしながら,Shimono et al. (2007)が,イネ において,SA処理がOsWRKY45遺伝子発現を増加させ ること,そして,Iwai et al. (2007)は、8葉期の生育の 進んだイネの最上位展開葉へのSA処理が,病害抵抗性 を誘導することなどを明らかにした。以上から、イネに おけるSAの病害抵抗性への寄与は明らかである。

図52に示すように、SAで前処理した金南風では、 OsWRKY45遺伝子発現及びキチンエリシター応答発光の 増強が観察される一方で、OsWRKY45-RNAi系統では、 それらが弱まっていた(図52A ;灰色カラム)。

OsWRKY45-RNAi#1系統でのOsWAKY45遺伝子の発現 割合は金南風に対して55.4%であった。図52B に示すよ う,SAで前処理した金南風におけるキチンエリシター応 答発光の増加率は179%で、それに対して、OsWRKY45-RNAi#1系統では37%であった。加えて、図53に見られる ように天然型SAが金南風においてキチンエリシター応 答発光を増強させる(溶媒処理から156%の増加)のに対 して,SAの構造異性体(3-HBA及び4-HBA)は殆ど効果 を見せなかった(3-HBAにより24%, 4-HBAにより10%の 増加)。SA及びその生物学的に不活性な構造異性体の間 で認められる異性体効果は、SAR誘導における物質特異 性や構造的要件などを示すためにしばしば用いられてお り (Conrath et al., 1995; Thulke et al., 1998),本研究にお いてもそれが確かめられた。これらのSAシグナル伝達阻 害実験の結果は、少なくともSAR誘導物質によるキチン エリシター応答発光の増強では、イネに本来備わってい る防御応答のホルモンシグナル伝達を必要とすることを 示している。

3. 考察

二相性の強度推移(第一相が第二相よりも短い)は、 イネ培養細胞におけるキチンエリシター応答発光の特徴 的な性質である(Kageyama et al., 2006)。イネ細胞によ るキチンの認知後、細胞内シグナル伝達因子であるフォ スファチジン酸(PA)が二相性で生成され、活性酸素種 (ROS)の生成を誘導する(Yamaguchi et al., 2003; Yamaguchi et al., 2005)。著者らは、これまでにフォスフ オリパーゼ D(PLD)により引き起こされる二相目の PA 生成を抑制することで、キチンエリシター応答発光のニ 相目の減少が引き起こされる一方で、PAの添加により キチンエリシター応答発光の二相目に似た発光が誘導さ れることを報告している(Kageyama et al., 2006)。また、 キチンエリシター応答発光の強度推移は ROS 生成と比 例しており, ROS 消去はキチンエリシター応答発光の減 少を引き起こす(Kageyama *et al.*, 2006; 影山ら, 2007; 加 藤ら, 2010)。このように, イネ培養細胞におけるキチン エリシター応答発光は PA シグナル伝達を介して生成さ れており, ROS 生成と密接に関係している。

Zhan and Xiao (2015) は、"PA-ROS-SA"で構成される シグナル増幅モジュールを提唱している。ここでは、病 原体関連分子パターン (PAMPs) もしくはエフェクター の認知が第一相の ROS 及び SA 生成(認識の 0.5-2 時間 後)を引き起こし、第一相が続く第二相(認識の 2-10 時 間後)を引き起こすとしている。本研究において、SA も しくは SA の機能的アナログによる前処理はキチンエリ シター応答発光を増加させ、SA シグナル伝達の阻害は キチンエリシター応答発光の増強を弱める結果となって おり、"PA-ROS-SA"モジュールによる SA シグナル伝達 経路の増強は、イネ培養細胞において二相性のキチンエ リシター応答発光を駆動している可能性がある。

キチンエリシター応答発光の増強が SA 及び SA の機 能的アナログによって誘導される一方で,メチルジャス モン酸やエチレンなど他の分子もイネ細胞をプライミン グし,キチンエリシター応答発光を増強する (Kato et al., 2014)。さらに,イネにおけるキチン応答自体はジャス モン酸生成を伴う (Desaki et al., 2012)。こうした複雑性 を説明するには,各種 PLD 及び PLD 由来の PA が,様々 な種類のホルモンシグナル伝達経路に組み込まれ,かつ, 機能重複しながら多目的のシグナル伝達構成要因として 働くことを考慮する必要がある (Testerink and Munnik, 2006; Zhao, 2015)。 今後のエリシター応答発光増強機構 の解明が,「多目的プライミング検出システム」の開発 を加速するだけでなく,植物における PLD 由来の PA と ROS によるシグナル伝達の複雑性を解明するのに役立 つかもしれない。



図 50 OsWRKY45 ノックダウンによる ASM 誘導性キチンエリシター応答発光増強の抑制

(A) 金南風の野生系統と OsWRKY45-RNAi 系統はそれぞれ 200 µM の ASM (灰色のカラム)もしくは溶媒 (白色のカラム)で前処理した。前処理開始から 2 時間後,キチン添加の直前に,生重量 50 mg の細胞を採取し, OsWRKY45 及び Ubq1 遺伝子発現量を定量的 RT-PCR により解析した。gus リンカー配列 (gus)は, RNAi の トリガーニ本鎖 RNA の発現確認のために RT-PCR により解析した。グラフ中の縦棒は標準偏差。(B)エリシター 応答発光測定は前処理開始直後(-2 h)から開始し,エリシター添加のため一時停止(0 h)した後に再開し,その後 12 時間継続した。グラフの値は,3 回の試験の平均値を示す。



エリシター添加後の時間(h)

図 51 OsWRKY45 ノックダウンによる TDL 誘導性キチンエリシター応答発光増強の抑制

(A) 金南風の野生系統と OsWRKY45-RNAi 系統はそれぞれ 200 µM の TDL (灰色のカラム)もしくは溶媒(白色のカラム)で前処理 した。前処理開始から2時間後,キチン添加の直前に,生重量 50 mg の細胞を採取し, OsWRKY45 及び Ubq1 遺伝子発現量を定量的 RT-PCR により解析した。グラフ中の縦棒は標準偏差。(B)エリシター応答発光測定は前処理開始直後(-2 h)から開始し,エリシター添加 のため一時停止(0 h) した後に再開し,その後 12 時間継続した。グラフの値は,3 回の試験の平均値を示す。



図 52 OsWRKY45 ノックダウンによる SA 誘導性キチンエリシター応答発光増強の抑制 (A)金南風の野生系統と OsWRKY45-RNAi 系統はそれぞれ 200 µM の SA (灰色のカラム)もしくは 溶媒(白色のカラム)で前処理した。前処理開始から 2 時間後,キチン添加の直前に,生重量 50 mg の 細胞を採取し, OsWRKY45 及び Ubq1 遺伝子発現量を定量的 RT-PCR により解析した。グラフ中の縦棒 は標準偏差。(B)エリシター応答発光測定は前処理開始直後(-2 h)から開始し,エリシター添加のため, 一時停止(0 h)した後に再開し,その後 12 時間継続した。グラフの値は,3 回の試験の平均値を示す。



図 53 イネ培養細胞におけるキチンエリシター応答発光の増強で認められた SA の異性体効果 エリシター応答発光測定は前処理開始直後(-2 h)から開始し、エリシター添加のためー時停止(0 h)した後に再開し、 その後 12 時間継続した。グラフの値は、3 回の試験の平均値を示す。

第Ⅲ章 総合考察

1. 病害抵抗性誘導によるプライミングの意義

植物の病害抵抗性のうち,代謝変動を伴う「動的抵抗 性」は,「病原体の認識」に係る部分と,「病原体に対 する攻撃」に係る部分に分けられる。いずれも,病原体 と植物の長い生存競争の歴史が生んだ共進化の賜物であ るが,病原体と植物の攻防における進化の「いたちごっ こ」を生み出しているのは主に前者であり,病原体,植 物双方が決定的な武器を持った後は,それぞれ,「いか に相手に攻撃させないか」,「いかに相手を認識し,効 率よく封じ込めるか」という点で進化している (Jones and Dangle, 2006)。

病原体による妨害がある中で、PRR/R-protein からの 信号入力と、病害抵抗反応の発動を結び付け、防御を成 立させるのが、病害抵抗性誘導によるプライミングの役 割である。汎用性が高い PRR の増加や、付加的な MAP キナーゼ群、転写因子の準備、クロマチン(ヒストンタ ンパク質)の改変による防御関連遺伝子群の転写により、 病原体の Effector による病害抵抗反応の抑制を克服する 堅牢なシグナル伝達を確立すると考えられている (Conrath et al., 2015)。当該植物が病害虫を認識できる センサーを持っていれば、糸状菌・細菌・ウイルス病害 や草食性害虫まで効果が期待できるため(Lawton et al., 1996; Mandadi and Scholthof, 2013)、病害抵抗性誘導剤は、 抵抗性品種と組み合わせ、抵抗性崩壊を抑止したり、農 薬の使用量を削減し、抵抗性病害虫の発達を防止したり するのに有効である。

また, プライミングによる病害抵抗性のエピジェネティックな改変は, 栄養繁殖ではもちろん (樋口・尾松, 2010), 種子繁殖により次世代へも引き継がれるケースが報告されており (Luna et al., 2012; Slaughter et al., 2012), 環境ストレス応答も含めて, 複合的なストレス適応策の 手段としても有効だと考えられる。

一方でプライミングは、一過的ではあるものの、汎用 的な抵抗性を実現するため、植物に相応のコストを強い る(Van Hulten et al., 2006)。イネにおける、ASM (BTH) による病害抵抗性誘導の例では、SAR 経路のうち、 OsNPR1 (NH1) 依存の経路で、ASM の処理による光合 成やタンパク質合成関連の遺伝子発現の抑制が報告され ている (Sugano et al., 2010; Nakayama et al., 2013)。その ため、寡照な条件など、一次代謝に不利な条件では、生 育抑制につながる可能性もある。WRKY45 (OsWRKY45) を過剰発現する遺伝子組換えイネでは、陽光定温器内で の栽培時に,環境ストレス応答のクロストークによると 考えられる下流の PR 遺伝子 (*Pb1, PR-2*)の恒常的な発 現を伴う成育抑制が認められている (Shimono *et al.*, 2006)。この現象は通常の温室内では認められていない が,他の環境応答とのクロストークの影響 (Fujita *et al.*, 2006; Yasuda *et al.*, 2008; Singh *et al.*, 2014)を含め,病害 抵抗性誘導の活用においては,通常の殺菌・殺虫剤とは 異なる視点が必要とされる。

2. エリシター応答発光検出の意義

生物の極微弱発光現象は特定の発光器官に依存せず, その発光強度は、いわゆる生物発光に比べて非常に弱い ことから、応用のために発光源や発光のメカニズムを解 析するのに,既知の生理変化から推定することになる(渡 辺・稲葉, 1991a,b)。植物の極微弱発光現象は, 植物の 構造的・機能的な多様性に加え、葉緑体をはじめ、細胞 内外の光や励起分子のエネルギーを蛍光に変換する色素 を発達させていることから,発光源を捉えにくい (Hideg, 1991; Hideg et al., 1991)。そのような中で, 植物病理学 の始まりから,その生化学反応が注目されており(瓜谷, 2001),発光源としての可能性が高いと推測された病害 抵抗反応に注目し、貯蔵根や、懸濁培養細胞など、組織 構造や色素の影響を受けにくい材料も活用しながら研究 を進めた。本研究において発見した病害抵抗反応に伴う 発光は、大別して「病原体の認識」を反映する発光と「病 原体に対する攻撃」を反映する発光を捉えていると考え られる。サツマイモ貯蔵根の非病原性フザリウム菌応答 発光は、第1章第3節の結果から、前者と後者を共に含 んだものであり、キチンエリシター応答発光は、第1章 第4節で述べた発光メカニズムの解析結果(Kagevama et al., 2006; 影山ら, 2007)から, 前者であると考えられる。

Zhang and Xiao (2015) は、高濃度の MAMPs 処理によ って引き起こされる強い PTI シグナルは ETI と同様のシ グナル伝達モジュール (二相性の PA-SA シグナリング) を駆動するとしている。キチンエリシターや PGPF エリ シターの処理において、濃度が高まるにつれて、二相性 が顕著になること(第 I 章第 4 節)は、PTI におけるこ のシグナル伝達モジュールの関与を裏付けていると推察 される。また、エリシター濃度の上昇につれて、プライ ミングによる増強程度が小さくなるのは、インプットが 増加しシグナル強度が増高した PTI が飽和に近づいたこ とを示し、シグナル伝達の実態に即していると考えられ る。

Tsuda and Katagiri (2010) は、PTI と ETI では、共に SA, JA, ET などのホルモンに依存する各種抵抗性誘導 経路を利用するものの、関連遺伝子の欠損変異体を組み 合わせた解析から、前者は相乗的に (synergistically:全 ての誘導経路を備える野生型の抵抗力が、それぞれ単独 の誘導経路のみ有する変異体の抵抗力の合計を上回る)、 後者は補償的に (compensatory:それぞれ単独の誘導経路 のみ有する変異体の抵抗力の合計が、全ての誘導経路を 備える野生型の抵抗力を上回る)利用するモデルを提案 している。それぞれの誘導経路が補償的に働く ETI は、 シグナル伝達の強度と頑健性において PTI を上回ること で、「病原体に対する攻撃」システムは PTI と同じであ るが、それをより効果的に活用していることが示されて いる。

各種ホルモンの機能的アナログである病害抵抗性誘 導剤の処理は、シグナル伝達の強化(エリシター応答初 期では ROS の生成の増加)をもたらすもので、ETI にお ける、増強されたシグナル伝達と相似しており、エリシ ター応答発光とプライミングによるその増強は、病原体 の認識に関わるシグナルとその増強、即ち「病害抵抗反 応の増強」を反映していると考えられる。

エリシター応答発光の増強を指標とするプライ ミング検出システムの特性

エリシター応答発光によるプライミング検出範囲の 広さは、MAMPs をエリシターとして使用したことによ ると考えられる。MAMPsは,複数の病害抵抗性経路を活 性化させ、それぞれの経路がお互いに synergetic に防御 に寄与すること(Tsuda et al., 2009)や, 複数のレセプタ ーに認識されている(キチンオリゴ糖: Kaku et al., 2006) ことが明らかにされている。その上, MAMPs 応答のシグ ナル伝達に介在する,フォスフォリパーゼ D (PLD) に よるフォスファチジン酸 (PA) 生成が, 生物的/非生物 的ストレス応答に関わる各種のホルモンシグナル伝達経 路に組み込まれ、それぞれがオーバーラップすることが 指摘されており、様々なストレス応答の影響を受けやす い。このことが、単一の検出システムで、様々に異なる 病害抵抗性誘導物質によるプライミングを発光の増強と して検出することにつながっていると考えられる。例外 として, 第Ⅱ章第3節で明らかにしたように, JA/ET に よる病害抵抗性誘導に対して,ブドウ-酵母エキスシス テムにおいては、イネーキチンシステムなど他の組み合 わせとは反対に、エリシター応答発光の強い抑制が観察 されているが、このことを逆に利用して、検出システム の組み合わせで JA/ET 経路によるプライミングを特定 できることが期待される。このような特性も併せて,エ リシター応答発光の増強を指標とするプライミング検出 システムは,機能未知の化合物ライブラリーを「プライ ミング活性」で絞り込んで,二次ライブラリーを作成す るために用いる(第Ⅱ章第4節)ことで,その利点を最 大限に発揮できると考えられる。

近年,病害抵抗性誘導シグナルの全身伝播を担う物質 として SAR では Azelaic Acid, Pipecolic acid (Shah *et al.*, 2014), ISR では JA-Ile (Aubert *et al.*, 2015) などが発見 され,それら自体も病害抵抗性誘導物質として働くこと が明らかにされている。これにより,新たなリード化合 物および作用点の情報がもたらされ,候補化合物骨格の バラエティの拡大が予想される。今後も,このような物 質の発見は続く可能性は高く,対象誘導経路を限定しな い「プライミング検出装置」の重要性が増すと考えられ る。

ケミカルプライミングによる植物のストレス耐 性の向上

生物的ストレスと非生物的ストレスに対する植物の応 答は, SAR と ABA 応答の関係のように, ネガティヴに クロストークする例が報告されている(Yasuda *et al.* 2008; Jiang *et al.*, 2010)一方で, ストレスの種類によっ てはポジティヴにクロストークすることもある(crosstolerance: Achuo *et al.*, 2006; Qui and Yu, 2008)。このよ うなクロストークはシグナル伝達の初期から生じている と考えられ, 生物的ストレス応答, 非生物的ストレス応 答の初期で共に重要なシグナル伝達を担っている ROS の生成は, クロストークの交点にあると考えられている (Fujita *et al.*, 2006; Atkinson and Urwin, 2012; Rejeb *et al.*, 2014)。

さらに、キチンエリシター応答に介在する PLD-PA(-ROS)シグナルモジュールは、複数の非生物的ストレス 応答でも介在が報告されており(Testerink and Munnik, 2006; Zhao, 2015),シグナル伝達の初期段階でのクロス トークを介したエリシター応答発光の増強を指標にして、 非生物的ストレスを検出できる可能性がある。著者らの 研究グループでは、これらを踏まえ、本システムによる、 生物的・非生物的(高温・低温・塩)複合ストレス抵抗 性誘導剤の選抜の可能性を検討し、一定の成果を得てい る(伊代住ら、2008)。植物のケミカルプライミングに よる環境ストレス耐性の向上は、病害抵抗性誘導と並ん で注目されているものであり、今後の発展が見込まれる 領域である(Conrath *et al.*, 2015; Savvides *et al.*, 2016)。 このように,エリシター応答発光の利用の可能性は,今 後も広がると思われる。

5. 体温測定のように~植物の極微弱発光測定技術 の今後

日々進歩する,測定技術とビッグデータの収集・解析 技術によって形成される,いわゆる「-omics」データベー スを複数組み合わせる発想(Multi-omics)により,生物 の生理を多面的に捉え,より価値の高いアウトプットを 得ようとする動きが加速しており(Higdon et al., 2014), 本研究論文で対象とした,病害抵抗性誘導剤の開発も Multi-omics データの活用により発展が見込まれる分野 である。

一方,極微弱発光測定技術は、今後、測定感度の向上、 同時分光技術の進化とともに、測定機器の携帯化、低価 格化が進み、測定データがより手軽に、波長特性と共に 取得可能になると予測される(Cifra and Pospišil, 2014)。 前述のように、生物の極微弱発光は非侵襲的な生体情報 として、蛍光マーカーや発光レポーターを使用した情報 とは一線を画するものである。生物の極微弱発光をプロ テオミクスや生化学分析情報と併せて、植物のストレス 応答解析に活用する報告も現れており(Komatsu *et al.*, 2013), Muti-omics データの一つとして扱われることが 期待される。将来的には、Multi-omics 解析への組み込み により、生物の極微弱発光と他の-omics データとの関係 性が明らかにされることで、植物の生理状態の診断にお いて, 医療における非侵襲的な生体情報の代表格である、 体温測定と同様な存在になるかもしれない。

摘

1954年に植物の芽生えにおいて極微弱発光(UPE)の 測定に関する最初の報告があって以来,あらゆる生物が, 特別な"発光"システムを細胞内に持たなくても発光でき ることが明らかにされてきている。UPE は弱すぎて肉眼 では見えないが,生化学反応の副産物であり,特に体内・ 外のストレスに対する細胞の生理変化を反映すると考え られている。1990年代より,著者とその共同研究者らは, 植物の生理状態変化を非侵襲的かつ即時的に調べる方法 として、UPE 測定技術を用いることを検討し、特に植物 の病害抵抗反応に注目してきた。一方,過去20~30年間 の間に,植物に全身的な病害抵抗性を誘導する物質,い わゆる"病害抵抗性誘導剤"を用いた植物の病害抵抗性誘 導が植物病害防除において実用的な技術となり,注目さ れてきている。病害抵抗性誘導剤は、植物細胞を「プラ イミング」し、病原体の攻撃に対する植物の抵抗反応を 加速・増強することにより効果を発現するため、この、 新しいカテゴリーの農薬の開発には、従来の殺菌剤や殺 虫剤の選抜とは異なる戦略を用いることが必要とされて いる。

この課題を解決するため,第一に,著者はUPE 測定技 術により非侵襲的に簡便に測定できる病害抵抗反応指標 である,植物の"エリシター応答発光 (ERPEs)"を発見し た。さらに,ERPEsの増強に基づき化合物のプライミン グ活性を評価する,新しい「プライミング検出システム」 を開発した。

病害抵抗反応に伴う極微弱発光の検出に適した植物試料と病害抵抗反応誘導因子の組み合わせの選定

タバコ, イネ, メロン, トマト, イチゴ, サツマイモ について, それぞれ"宿主抵抗性"の程度が異なる病原 体と品種の組み合わせにおいて UPE を測定した。野火病 菌を接種したタバコ葉では, 野火病菌に対する真正抵抗 性遺伝子を持つ品種においてのみ, 接種 12 時間後にピ ークを持つ一過性の UPE の増加(10 光子数/秒/cm²)が 観察された。一方, つる割病菌もしくは非病原性フザリ ウム菌を接種したサツマイモ貯蔵根のスライスでは, 長 時間持続し, 強い UPE が観察された。UPE は接種の1~ 2 時間後から増加し始め, 14~18 時間後にピークを迎え, 1 日以上強い発光が続いた。非病原性菌を接種した場合 の最大発光量(200 光子数/秒/cm²)は病原菌を接種した

要

停止した。サツマイモで観察された UPE は両ケースとも 植物の基礎的抵抗性に基づくと推測された。病原菌を接 種した場合には、植物は感染を止められず、強く発光し つづけたと推測される。基礎的抵抗性に基づくと推測さ れる UPE の増加は、タバコと立枯病菌、メロンとつる割 病菌の組合せでも観察されたが、抵抗性と罹病性の違い が明確ではなかった。この試験では、イネとイチゴにお いて病原体接種後の明瞭な UPE の増加は認められなか った。UPEの特性を明らかにするため、サツマイモと非 病原性フザリウム菌の組み合わせで生じる UPE につい てより詳細に解析した。UPE の強度は接種源もしくは植 物の状態に依存し, UPE がフザリウム菌との相互作用に よりサツマイモから生じていることが明らかとなった。 ファイトアレキシンであるイポメアマロンの生成は試験 中のサツマイモに病害抵抗反応が誘導されていたことを 意味する。さらに、UPE に付随する生理状態の推移を捉 えるため,病害抵抗反応に伴う UPE の連続的な分光解析 を実施した。フザリウム菌の接種後2~10時間の間は、 発光強度の増加は緩やかであるが、波長組成は主要な波 長帯が 580~630 nm から 480~580 nm の短波長側に劇的 に変化した。その後,発光強度は接種後20時間前後でピ ークを迎えるものの、接種後 10~36 時間の波長組成は 安定していた。ファイトアレキシンを含む、防御関連物 質の合成に関わる生理状態変化がこの現象に寄与するこ とが示唆される。より安定で扱いやすい UPE 発生システ ムを得るため、病害抵抗反応の"エリシター"として、 キチン6量体と植物生育促進菌類(PGPF)の培養ろ液を 用いた。キチンエリシターと PGPF エリシターは共に、 サツマイモ貯蔵根スライス,タバコ葉,イネ葉でそれぞ れ明瞭に UPE の増加を誘導した。特にイネ葉切片と PGPF エリシターの組合せにおいて、サツマイモとフザ リウム菌の組み合わせで観察されたような高いレベルの UPE が波長組成変化を伴って観察された。イネの懸濁培 養細胞も PGPF エリシターの使用により強い UPE 生成 し、比較的低濃度(1 µM 以下)のキチン6量体の処理で も明瞭な UPE 増加を示した。

2. エリシター応答発光の増強に基づいたプライ ミング検出システムの開発

イネにおける PGPF エリシター応答性の UPE を用い て,病害抵抗性誘導剤がエリシター応答発光(ERPE)に 及ぼす影響を評価した。PGPF エリシターで処理したイ ネ葉切片は一過性の比較的強い ERPE を生じた。病害抵 抗性誘導剤の前処理は ERPE を増強させた。病害抵抗性 誘導剤の前処理による ERPE の増強はイネ懸濁培養細胞 でも認められた。前処理時間を延長することで、病害抵 抗性誘導剤による発光増強の加速(ピーク到達時間の短 縮)と、より低濃度でのプライミング効果の発現が認め られた。病害抵抗性誘導剤の単独処理では目立った発光 増強は認められなかった。エリシター応答発光の波長組 成は、増強の前後でほぼ同じであった。そのため、病害 抵抗性誘導剤は、おそらく ERPE そのものを増強してい る。PBZ1, Os PAL1, Chit-1 や EL2 といったエリシター応 答性の遺伝子発現は、病害抵抗性誘導剤の前処理により 増強され,同時に ERPE も増強されており, ERPE が,イ ネの細胞が病害抵抗性誘導剤により防御応答のプライミ ングを受けた状態で増強されていることを示している。 このプライミング検出システムは,イネとキチン6量体, コムギとキチン6量体,ジャガイモとアラキドン酸,ブ ドウと酵母エキスといった植物培養細胞とエリシターの 組み合わせにおいても適用可能であった。プライミング の検出は全身的獲得抵抗性(SAR),傷害誘導性抵抗性 (WSR),誘導性全身的抵抗性(ISR),βアミノ酪酸誘 導抵抗性(BABA-IR)及び,ブラシノステロイド依存的 抵抗性(BDR)について行った。SAR を誘導する化合物 によるプライミングは, 試験した全ての組み合わせで本 検出システムにより検出された。イネとキチンの組み合 わせでは, BDR 誘導化合物を除き,供試した化合物のプ ライミング活性が検出された。コムギとキチンの組み合 わせでは, BABA-IR と BDR には本検出システムは適用 できなかった。ブドウと酵母エキスの組み合わせでは, BABA-IR に適用できず, WSR と ISR において ERPE の 強い抑制が観察された。ジャガイモとアラキドン酸の組 み合わせは供試した全てのタイプの化合物に本検出シス テムを適用可能であったが、抵抗性誘導化合物濃度の適 用範囲が狭かった。供試した組み合わせの中で、イネと キチンの組み合わせが最も安定しており、適用可能な抵 抗性誘導物質濃度の範囲が最も広かった。イネとキチン の組み合わせを用いて、2セットの化合物ライブラリー のプライミング活性に関するスクリーニングを植物への 病原体接種試験と組み合わせて実施した。スクリーニン グを実施した 8,947 化合物の中から,病害抵抗反応のプ ライミングに関する7種類の新しい骨格構造が発見され た。ERPE の増強の基本的なメカニズムを明らかにする ため, 著者らはイネにおけるサリチル酸依存性の誘導抵 抗性(全身的獲得抵抗性:SAR)の主要な調節因子であ る OsWRKY45 遺伝子のノックダウンを実施すると共に,

サリチル酸の異性体がキチンエリシター応答発光(C-ERPE)の増強に及ぼす影響を評価した。野生型の細胞に いては、SAR 誘導性の病害抵抗性誘導剤により C-ERPE が 200~300%増加した一方で、OsWRKY45 ノックダウン により C-ERPE の増加は 60%未満まで弱められた。天然 型のサリチル酸は野生型の細胞において C-ERPE を 150%増加させたが、サリチル酸の構造異性体の効果は低 かった(10-24%の増加)。これらのサリチル酸シグナル 伝達の破壊試験により、C-ERPE の増強は、少なくとも SAR 誘導物質によるプライミングに関しては、植物が本 来備えている病害抵抗反応のためのホルモンシグナル伝 達を必要とすることが示された。

以上のように、本研究では、UPE 測定技術を用いるこ とで、植物の病害抵抗性の新奇な解析技術が開発された。 本技術は、高い非侵襲性を備え、multi-omics 解析に組み 入れることで、汎用的なストレス応答解析手法への発展 が見込まれる。

Studies on discoveries of elicitor-responsive photon emissions in plants and

their applications for development of a defense priming detection system

Hiroyuki IYOZUMI

Summary

Since the first report of the ultraweak photon emission (UPE) from germinating plants in 1954, there have been a lot of evidences that every organism can emit light, which is too weak to recognize by naked eyes, without specific "light emitting" systems in their cells. UPEs are thought to be byproducts of biochemical reactions and to reflect physiological changes, especially to be the responses to external/internal stresses. Since 1990's, the author and colleagues have been considering to apply the UPE measurements to evaluate physiological conditions of plants non-invasively and immediately, and focused on the disease resistant responses in plants. Especially in last few decades, the induced disease resistance in plants became a practical method of crop protection, the substances that induce systemic disease resistance in plants, so-called 'plant defense activators' have been of interest. Because plant defense activators become effective by "priming" plant cells for accelerated and enhanced esistance responses against pathogens, this new category of agrochemicals needs alternative strategies for efficient screening of candidates that are different from ordinary fungicides/pesticides.

To solve this problem, firstly the author discovered the "elicitor-responsive photon emissions (ERPEs)" in plant, a type of disease resistance response marker which can be measured non-invasively and easily by UPE measurement technique. Then the author developped a 'defense priming detection system' to evaluate the priming abilities of chemicals based on potentiation of ERPEs

1. Selection of favorable combinations of defense response inducers and plant materials to detect defense responserelated UPEs.

Using various combinations of pathogen and plant cultivars with different degrees of "host resistance", UPEs were measured for tobacco, rice, melon, tomato, strawberry and sweet potato. Tobacco leaves, that were inoculated with the causal bacterium of wildfire disease, had transient increase in UPE (10 counts/sec/cm²) which peaked 12 hours after inoculation, only in the case of cultivars that contain a true resistance gene. On sliced sweet potato storage root that was inoculated with the causal fungus of Fusarium wilt disease or non-pathogenic F. oxysporum, long-lasting and strong UPEs were observed. The UPEs started to increase after 1-2 hours and peaked after 14-18 hours of inoculation, and a high level of UPE lasted for 1 day or longer. The peak emission was lower in the case of a non-pathogen (200 cps/cm²) than a pathogen (300 cps/cm²) and the fungal growth stopped. The UPEs in sweet potatoes were assumed to be caused by basal resistance in both cases. In the case of pathogen inoculation, it is assumed that the plant could not stop the infection and kept emitting a higher level of UPE. Although the UPE increases assumed to be caused by basal resistance were also observed in tobacco-bacterial wilt and melon-Fusarium wilt combinations, differences between the resistant and susceptible responses were not obvious. In the cases of rice and strawberry, no significant increase of UPE was observed after pathogen inoculation. To clarify the characteristics of UPE, UPE generated in the combination of sweet potato and nonpathogenic F. oxysporum was analvzed. The inoculum/plant condition-dependent intensity variation of UPE revealed that the observed UPE generated from sweet potato through the interactions with F. oxysporum. The production of ipomeamarone as a phytoalexin means that the defense response was induced in the sweet potato. The consecutive spectral analysis of defense response-related UPE was conducted to observe the process of physiological transitions accompanying UPE. Although the emission intensity increased slowly, the spectrum range changed to be shorter drastically (the major band changed from 580-630 nm to 480-580 nm) from 2 hours after inoculation until 10 hours after inoculation with F. oxysporum. The spectrum was stable

from 10 to 36 hours after inoculation, whereas the emission intensity peaked approximately 20 hours after inoculation. It is suggested that a change in the physiological state associated with the synthesis of defense-related substances including phytoalexin contributes to this phenomenon. To obtain a more stable and easily-handled UPE generation system, chitin hexamer and culture filtrate of plant growth promoting fungi (PGPF) were used as defense "elicitors". Both the chitin elicitor and the PGPF elicitor induced obvious increases of UPEs in slices of sweet potato storage root, tobacco leaves and rice leaves, respectively. Especially, a high level of UPE with spectral change observed using a combination of sweet potato and Fusarium was also observed in the combination of rice leaf segments and PGPF elicitor. Suspension-cultured rice cells also generate a high level of UPE using the PGPF elicitor, and showed an obvious increase of UPE after applying a relatively low concentration (below 1 µM) of chitin hexamer, too.

2. Development of priming detection system based on the potentiation of elicitorresponsive photon emission

UPE from rice induced by the PGPF elicitor was measured to estimate the influence of pretreated plant defense activators on elicitor-responsive photon emissions (ERPEs). Rice leaf segments that were treated with the PGPF elicitor transiently generated relatively high levels of elicitor-responsive photon emissions. Pretreatments using plant defense activators increased ERPEs. The increase was also observed in suspension-cultured rice cells. Prolonged pretreatment allowed the plant defense activators to accelerate (peak earlier) photon generation and to act at lower concentrations. The activators themselves did not induce any marked photon emission in rice leaf segments or cells. The spectral compositions of the increased and non-increased elicitorresponsive photon emissions from rice cells were almost the same. Therefore, plant defense activators probably potentiate the ERPEs themselves. The elicitor-responsive expression of the PBZ1, Os PAL1, Chit-1 and EL2 genes were enhanced by pretreatment of rice cells with plant defense activators, when ERPEs were also enhanced. The results indicate that the ERPEs are potentiated when rice cells are primed for disease resistance by plant defense activators. This priming detection system was also applicable to other plant cell culture and elicitor combinations, such as rice and chitin hexamer, wheat and chitin hexamer, potato and arachidonic acid, grape and

yeast extract. The Priming detection was performed for systemic acquired resistance (SAR), wound induced resistance (WSR), induced systemic resistance (ISR), β-aminobutyric acid induced resistance (BABA-IR), and brassinosteroiddependent resistance (BDR). The priming by SAR-inducing chemicals was detected by all tested combinations. The combination of rice and chitin could be applied the system to detect priming by all tested chemicals except BDR inducer. The combination of wheat and chitin was not applicable to detect priming by BDR and BABA-IR. The combination of grape and yeast was not applicable to priming by BABA-IR and showed strong repressions of ERPEs in WSR and ISR. Although the combination of potato and arachidonic acid was applicable to priming by all tested types of chemicals, the applicable range of inducer concentration was narrow. Among the tested combinations, the combination of rice and chitin was most stable and was applicable for the widest range of inducer concentration. Using the combination of rice and chitin, screening of two sets of chemical libraries for priming activities were carried out in combination with pathogen inoculation tests on potted plants. Among 8947 compounds that were screened, 7 new skeletal formulae for defense priming were discovered by these screenings. To elucidate the mechanisms underlying the ERPE potentiation, the author performed gene knockdown of OsWRKY45, a major regulator of salicylic acid (SA)-dependent resistance (systemic acquired resistance: SAR) in rice, and estimated the effects of SA isomers on chitin-ERPE (C-ERPE) potentiation. The SAR inducing plant defense activators induced a 200-300% increase in C-ERPE in the wild type cells, whereas OsWRKY45 knockdown attenuated the increase in C-ERPE to less than 60%. The native SA induced more than a 150% increase in C-ERPE in the wild type cells, but structural isomers of SA were less effective (10-24% increase). These SA signalingdisruption experiments indicate that the potentiation of C-ERPE requires intrinsic components of the hormonal signaling for defense, at least for priming by inducers of SAR.

In conclusion, by using UPE measurement technique, a new type of analysis of disease resistance in plsnts was developed in this study. This non-invasive analysis might develop as a versatile stress response analyzer when it is built in "multiomics" analyses.

謝辞

本研究の推進にあたり、東京大学大学院農学生命科学 研究科 植物病理学研究室の難波成任教授には、終始、 貴重な御助言を賜り、御多忙のなか本論文の御校閲を賜 った。東京大学名誉教授の日比忠明氏には、論文の作成 にあたり御助言を賜った。浜松ホトニクス電子管事業部 の杉江正美氏には,研究開始当初よりフォトンカウンタ ーの製作および改良に関して一貫して担当して頂いた。 また,同社中央研究所の平松光夫博士ならびに本澤洋江 氏には、研究の立ち上げにあたって御支援を頂いた。ク ミアイ化学工業株式会社の故永山孝三博士,清水力博 士,渡辺哲博士,高垣真喜一博士,古瀬勝美氏ならび に、日本曹達株式会社の佐野愼亮博士、馬場康司氏、加 登恵子氏には、化合物や細胞株の提供のほか、実験への 御協力、研究方針に関するディスカッションなど、病害 抵抗性誘導剤の選抜方法の確立に関する研究で、終始御 支援を頂いた。静岡県病害虫防除所元所長の牧野孝宏博 士には、極微弱発光研究に携わる機会を与えて頂いたと ともに、終始御支援を頂いた。静岡県経済農業協同組合 連合会の市川健氏には,静岡県農業試験場病害虫部にお いて、研究に関する御指導・御支援を頂いた。また、静 岡県農業試験場病害虫部(農林技術研究所植物保護 科),の皆様には,研究推進において御支援を頂いた。 静岡県農林技術研究所果樹研究センターの影山智津子博 士ならびに、静岡大学農学部の稲垣栄洋教授、静岡県経 済産業部貫井秀樹主査には,病害抵抗性誘導剤の選抜方 法の確立に関して共同で研究を推進していただくと共 に、本論文の作成においても日々のディスカッションを 通じて貴重な御助言を賜った。そして,静岡県工業技術 センター所長の加藤公彦博士には、本研究立ち上げか ら、本研究に関わる三つの研究プロジェクトを通じて、 一貫して熱心な御指導を頂き、論文の作成においても貴 重な御助言を頂いた。ここに記して深謝の意を表した い。

引用文献

- Abels, F. B. (1986). Plant chemiluminescence. Ann. Rev. Plant Physiol. 37:49-72
- Achuo, E. A., Prinsen, E. and Höfte, M. (2006). Influence of drought, salt stress and abscisic acid on the resistance of tomato to *Botrytis cinerea* and *Oidium neolycopersici*. Plant Pathol. 55: 178–186.
- Agatsuma, S., Nagoshi, T., Kobayashi, M., Usa, H., Watanabe, H., Sekino, H. and Inaba, H. (1994). Indoxyl-β-Dglucronide, the primary emitter of low level chemiluminescence in plasma of hemodialysis patiens. Clin. Chem. 40: 1580-1586.
- Agatsuma, S., Nagoshi, T., Kobayashi, M., Usa, M., Watanabe, H., Sekino, H. and Inaba, H. (1992). Hydroxyl radicalinduced characteristic chemiluminescent spectra from plasma of hemodialysis patients. Clin. Chem. 38:48-55.
- Agaverdiyev, A.S., Doskoch, Y.E. and Tarusov, B.N. (1965). Effect of low temperatures on the ultraweak luminescence of plants. Biofizika. 10:832-836.
- Ahuja, I., Kissen, R. and Bones, A. M. (2012). Phytoalexins in defense against pathogens. Trends Plant Sci.17: 73-90.
- Alvarez, M.E., Pennell, R. I., Meijer, P-J., Ishikawa, A., Dixon, R.A. and Lamb, C. (1998). Reactive oxygen intermediates mediate a systemic signal network in the establishment of plant immunity. Cell. 92: 773–784
- Araki, Y. and Kurahashi, Y. (1999). Enhancement of phytoalexin systhesis during rice blast infection of leaves by pre-treatment with carpropamid. J. Pesticide Sci. 24: 369-374.
- 有江力・仲下英雄 (2007). 抵抗性誘導機構とプラントア クティベーター. 植物防疫 61:531-536.
- Atkinson, N. and Urwin, P. E. (2012). The interaction of plant biotic and abiotic stresses: from genes to the field. J. Exp. Bot. 63: 3523-3543.
- Aubert, Y., Widemann, E., Miesch, L., Pinot, F. and Heitz1, T. (2015). CYP94-mediated jasmonoyl-isoleucine hormone oxidation shapes jasmonate profiles and attenuates defence responses to *Botrytis cinerea* infection. J. Exp. Bot. 66: 3879–3892.
- Beloussov, L., Popp, F-A., Voeikov, V. and Wijk, R.V. editors (2000). Biophotonics and coherent systems, Moscow University Press, Moscow.
- Bennett, M., Mehta, M. and Grant, M. (2005). Biophoton imaging: a nondestructive method for assaying R gene

responses. Mol. Plant Microbe Interact. 18:95-102.

- Boller, T. and Felix, G. (2009). A renaissance of elicitors: Perception of microbe-associated molecular patterns and danger signals by pattern-recognition receptors. Annu. Rev. Plant Biol. 60: 379-406.
- Busam, G., Kassemeyer, H.-H. and Matern, U. (1997). Differential expression of chitinases in *Vitis vinifera* L. responding to systemic acquired resistance activators or fungal challenge. Plant Physiol. 115: 1029-1038.
- Chen, W. L., Xing, Da, Tan, Shi-Ci, Tang, Yong-Hong and He, Younghon. (2003). Imaging of ultra-weak biochemiluminescence and sinlet oxygen generation in germination soybean in response wounding. Luminescence, 18:37-41.
- Cifra, M. and Pospíšil, P. (2014). Ultra-weak photon emission from biological samples: definition, mechanisms, properties, detection and applications. J. Photochem. Photobiol. B: Biol. 139: 2–10.
- Colli, L. and Facchini, U. (1954). Light emission by germinating plants. Nuovo Cimento. 12: 50-155.
- Colli, L., Facchini, U., Guidotti, G., Dugnani-Lonati, R., Orsenigo, M. and Sommariva, O. (1955). Further measurements on the bioluminescence of seedlings. Experientia. 31:479-481.
- Conrath, U., Beckers, G. J. M., Langenbach, C. J. G. and Jaskiewicz, M. R. (2015). Priming for enhanced defense. Ann. Rev. Phytopathol. 53: 97–119.
- Conrath, U., Chen, Z., Ricigliano, J.R. and Klessig, D. F. (1995) Two inducers of plant defense responses, 2,6dichloroisonicotinec acid and salicylic acid, inhibit catalase activity in tobacco. PNAS 92: 7143-7147.
- Denoux, C., Galletti, R., Mammarell, N., Gopalan, S., Werck, D., De Lorenzo, G., Ferrari, S., Ausubel, F. M. and Dewdney, J. (2008). Activation of defense response pathways by OGs and Flg22 elicitors in Arabidopsis seedlings. Mol. Plant. 1: 423-445.
- Desaki, Y., Otomo, I., Kobayashi, D., Jikumaru, Y., Kamiya, Y., Venkatesh, B., Tsuyumu, S., Kaku, H. and Shibuya, N. (2012). Positive crosstalk of MAMP signaling pathways in Rice Cells. PLoS ONE 7: e51953.
- 江原淑夫 (1994). ウイルスに対する植物の応答. ウイルス 44: 55-60.
- Fauth, M., Merten, A., Hahn, M., Jeblick, W. and Kauss, H.

(1996). Competence for elicitation of H_2O_2 in hypocotyls of cucumber is induced by breaching the cuticle and is enhanced by salicylic acid. Plant Physiol. 110:347-354.

- Fawe, A., Abou-Zaid, M., Menzies, J. G. and Bélanger, R. R. (1998). Silicon-mediated accumulation of flavonoid phytoalexins in cucumber. Biochem. Cell Biol. 88: 396-401.
- Flor-Henry, M., McCabe, T.C., de Bruxelles, G.L, and Roberts, M. (2004). Use of highly sensitive two-dimensional luminescence imaging system to monitor endogenous bioluminescence in plant leaves. BMC Plant Biol. 4:19-25.
- Freeman, B. C. and Beattie, G. A. (2008). An overview of plant defenses against pathogens and herbivores. Plant Health Instruct. DOI: 10. 1094/PHI-I-2008-0226-01.
- Fujita, M., Fujita, Y., Noutoshi, Y., Takahashi, F., Narusaka, Y., Yamaguchi-Shinozaki, K. and Shinozaki, K. (2006). Crosstalk between abiotic and biotic stress responses: a current view from the points of convergence in the stress signaling networks. Curr. Opin. Plant Biol. 9: 436-442.
- Fujita, M., Oba, K. and Uritani, I. (1982). Mixed function oxygenase from cut-injured *Ceratocystis fimbriata*-infected sweet potato root tissues. Plant physiol. 70: 573-578.
- Gamborg, O. L., Miller, R. A. and Ojima, K. (1968). Nutrient requirements of suspension cultures of soybean root cells. Exp. Cell Res. 50: 151-158.
- Garcia-Brugger, A., Lamotte, O., Vandelle, E., Bourque, S., Lecourieux, D., Poinssot, B., Wendehenne, D. and Pugin, A. (2006). Early signaling events induced by elicitors of plant defenses. MPMI 7: 711–724.
- Gill, U. S., Lee, S. and Mysore, K. S. (2015). Host versus nonhost resistance: Distinct Wars with Similar Arsenals. Phytopathol.105: 580-587.
- Glazebrook, J. (2005). Contrasting mechanisms of defense against biotrophic and necrotrophic pathogens. Annu. Rev. Phytopathol. 43: 205-227.
- Görlach, J., Volrath, S., Knauf-Beiter, G., Hengy, G., Beckhove, U., Kogel, K-H., Oostendorp, M., Staub, T., Ward, E., Kessmann, H. and Ryals, J. (1996).
 Benzothiadiazole, a novel class of inducers of systemic acquired resistance, activates gene expression and disease resistance in wheat. Plant Cell 8: 629–643.
- Greenberg J.T. (1996). Programmed cell death a way of life for plants. PNAS. 93:12094-12097.
- Guengerich, F. P., Sohl, C. D. and Chowdhury, G. (2011). Multi-step oxidations catalyzed by cytochrome P450 enzymes: processive vs. distributive kinetics and the issue

of carbonyl oxidation in chemical mechanisms. Arch Biochem Biophys. 507: 126–134.

- 袴田哲司・加藤公彦・牧野孝宏・山本茂弘 (2004). マツ ノザイセンチュウを接種しクロマツから発生する微 弱発光. 日植病報 70: 162-167.
- Hammerschmidt, R. and Kuc, J. (1982). Lignification as a mechanism for induced systemic resistance in cucumber. Physiol. Plant Mol. Pathol. 20:61-71.
- Havaux, M. (2003). Spontaneous and thermoinduced photon emission: new methods to detect and quantify oxidative stress in plants. Trends in Plant Science. 8:409-413.
- Havaux, M., Triantaphylidès, C. and Genty, B. (2006). Autoluminescence imaging: a non-invasive tool for mapping oxidative stress. TRENDS Plant Sci. 11: 480-484.
- Hayafune, M., Berisio, R., Marchetti, R., Silipo, A., Kayama, M., Desaki, Y., Arima, S., Squeglia, F., Ruggiero, A., Tokuyasu, K., Molinaro, A., Kaku, H. and Shibuya, N. (2014). Chitin-induced activation of immune signaling by the rice receptor CEBiP relies on a unique sandwich-type dimerization. PNAS 111: E404-413.
- Herms, S., Seehaus, K., Koehle, H. and Conrath, U. (2002). A strobilurin fungicide enhances the resistance of tobacco against tobacco mosaic virus and *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci.* Plant Physiol. 130: 120-127.
- Hideg, É. (1991). On the spontaneous ultraweak light emission of plants. J. Photochem. Photobiol. B: Biol. 18: 239-244.
- Hideg, É. and Inaba, H. (1991). Dark adapted leaves of paraquat-resistant tobacco plants emit less ultraweak light than susceptible ones. Biochem. Biophys. Res. Commun.178: 438-443.
- Hideg, É., Kobayashi, M. and Inaba, H. (1991). Spontaneous ultraweak light emission from respiring spinach leaf mitochondria. Biochem. Biophys. Acta 1098:27-31.
- 樋口康一・尾松直志 (2010). チアジニル粒剤のイチゴ炭 疽病 (Glomerella cingulata)に対する防除効果. 九病虫 研会報 56:9-12.
- Higdon, R., Stewart, E., Stanberry, L., Haynes, W., John Choiniere, J., Montague, E., Anderson, N., Yandl, G., Janko, I., Broomall, W., Fishilevich, S., Lancet, D., Kolker, N. and Kolker, E. (2014). MOPED enables discoveries through consistently processed proteomics data. J. Proteome Res. 13: 107–113.
- Horo, J. T., Fujii, T., Yamashita, Y. McGoey, S. and Koizumi,
 S. (2016). Rice Blast Control Efficacy of Three Genes (*Pib*, *pi21*, and *Pb1*) Conferring Complete and Partial Resistance.

JARQ 50: 209-217.

- Hossain, M. M., Sultana, F., Mayumi Kubota, M., Koyama, K. and Hyakumachi, M. (2007). The plant growth-promoting fungus *Penicillium simplicissimum* GP17-2 induces resistance in Arabidopsis thaliana by activation of multiple defense signals. Plant Cell Physiol. 48: 1724-1736.
- Ichimura, T., Hiramatsu, M., Hirai, N. and Hayakawa, T. (1989). Two-dimensional imaging of ultra-weak emission from intact soybean roots. Photochem. Photobiol. 50 :283-286.
- Iiyama, K., Lam, T.B.T. and Stone, B. A. (1994). Covalent cross-links in the cell wall. Plant physiol. 104 315-320.
- 稲場文男, (1983). 極微弱光計測技術の医学及び生命科学 への応用. 光学 12: 166-179.
- Inaba, H., Shimizu, Y., Tsuji, Y. and Yamagishi, A. (1979). Photon counting spectral analyzing sysytem of extra-weak chemi-and bioluminescence for biochemical applications. Photchem. Photobiol.30:169-175.
- Inagaki, H., Imaizumi, T., Wang, G.-Xi, Tominaga, T., Kato, K., Iyozumi, H. and Nukui, H. (2007). Spontaneous ultraweak photon emission from rice (*Oryza sativa* L.) and paddy weeds treated with a sulfonylurea herbicide. 89: 158– 162.
- Inagaki, H., Ishida, Y., Uhino, A., Kato, K., Kageyama, C., Iyoumi, H and Nukui, H. (2008). Difference in ultraweak photon emissions between sulfonylurea-resistant and sulfonylurea-susceptible biotypes of *Scirpus juncoides* following the application of a sulfonylurea herbicide. Weed Biol. Manage. 8: 78-84.
- Inagaki, H., Toshiyuki Imaizumi, T., Wang, G.-Xi, Tominaga, T., Kato, K., Iyozumi, H. and Nukui, H. (2009). Sulfonylurea-resistant biotypes of *Monochoria vaginalis* generate higher ultraweak photon emissions than the susceptible ones. Pest. Biochem. Physiol. 95: 117–120.
- Ishikawa, R., Shirouzu, K., Nakashita, H., Lee, H. Y., Motoyama, T., Yamaguchi, I., Teraoka, T. and Arie, T. (2005). Foliar spray of validamycin A or validoxylamine A controls tomato Fusarium wilt. Phytopathology 95: 1209-1216.
- Iwai, T., Seo, S., Mitsuhara, I. and Ohashi, Y. (2007). Probenazole-induced accumulation of salicylic acid confers resistance to *Magnaporthe grisea* in adult rice plants. Plant Cell Physiol. 48: 915–924.
- Iwata, M. (2001). Probenazole a plant defense activator. Pesticide Outlook 12:28-31.

- 伊代住浩幸・稲垣栄洋・加藤公彦・貫井秀樹 (2008). 抵 抗誘導能力評価方法及び抵抗性誘導能力評価装置. 特 願 2008-84091.
- Ji, C. and Kuć, J. (1996). Antifungal activity of cucumber β-1,3-glucanase and chitinase. Physiol. Mol. Plant Pathol. 49: 257-265.
- Jiang, C. -J. Shimono, M., Shoji Sugano, S., Kojima, M., Yazawa, K., Yoshida, R., Inoue, H., Hayashi, N., Sakakibara, H. and Takatsuji, H. (2010). Abscisic acid interacts antagonistically with salicylic acid signaling pathway in rice-*Magnaporthe grisea* interaction. MPMI 23: 791-798.

Jones, J. D. G. and Dangl, J. L. (2006). The plant immune system. Nature 444: 323-329.

- Kageyama, C., Kato, K., Iyozumi, H., Inagaki, H., Yamaguchi, A., Furuse, K. and Baba, K. (2006). Photon emissions from rice cells elicited by *N*-acetylchitooligosaccharide are generated through phospholipid signaling in close association with the production of reactive oxygen species. Plant Physiol. Biochem. 44: 901–909.
- 影山智津子・加藤公彦・稲垣栄洋・伊代住浩幸・古瀬勝 美・馬場康司 (2007a).病害抵抗性誘導物質の前処理に より増強される各種エリシター応答発光の特性.日植 病報 73:15-20.
- 影山智津子・加藤公彦・稲垣栄洋・伊代住浩幸 (2007b). イネ培養細胞からのエリシター応答発光に対する過酸化水素の関与について.日植病報 73: 300-303.
- Kai, S., Ohya, T., Moriya, K. and Fujimoto, T. (1995). Growth control and biophoton radiation by plant hormones in red bean. Jpn. J. Appl. Phys. 34:6530–6538.
- Kaku, H., Nishizawa, Y., Ishii-Minami, N., Akimoto-Tomiyama, C., Dohmae, N., Takio, K., Minami, E. and Shibuya, N. (2006). Plant cells recognize chitin fragments for defense signaling through a plasma membrane receptor PNAS 103: 11086-11091.
- 神頭武嗣・松浦克成・小河拓也・宇佐美俊行・雨宮良幹 (2011).紫外光 (UV-B)照射によるイチゴうどんこ病 の防除.植物防疫 65:28-32.
- 加藤公彦・本津洋江・伊代住浩幸・貫井秀樹 (2010). 6 量体キチンが誘導するエリシター応答発光と過酸化 水素との量的相関. 日植病報 76:142-148.
- Kato, K., Iyozumi, H., Kageyama, C., Inagaki, H., Yamaguchi, A. and Nukui, H. (2014).

Application of ultra-weak photon emission measurements in agriculture. J. Photochem. Photobiol. B: Biol. 139: 54–62.

- Katz, V., Thulke, O. U. and Conrath, U. (1998). A benzothiadiazole primes parsley cells for augmented elicitation of defense responses. Plant Physiol. 117:1333-1339.
- Kauss, H., Theisinger-Hinkel, E., Mindermann, R. and Conrath, U. (1992a). Dichloroisonicotinic and salicylic acid, inducers of systemic acquired resistance, enhance fungal elicitor responses in parsley cells. Plant J. 2: 655-660.
- Kauss, H., Krause, K. and Jeblick, W. (1992b). Methyl jasmonate conditions parsley suspension cells for increased elicitation of phenylpropanoid defense responses. Biochem. Biophys. Res. Commun. 189: 304-308.
- Kauss, H. and Jeblick, W. (1995). Pretreatment of parsley suspension cultures with salicylic acid enhances spontaneous and elicited production of H2O2. Plant Physiol. 108: 1171-1178.
- 川畑龍三,三池徹,上船雅義,岡部弘高,高木正見,甲 斐昌一 (2004). バイオフォトン計測による植物の食 害応答の解析. 応動昆 48:289-296.
- Keen, N. T., Yoshikawa, M. and Wang, M. C. (1983).
 Phytoalexin Elicitor Activity of Carbohydrates from *Phytophthora megasperma* f.sp. *glycinea* and Other Sources.
 Plant Physiol. 71: 466-471.
- Khabiri, F., Hagens, R., Smuda, C., Soltau, A., Schreiner, V., Wenck, H., Wittern, K.-P., Duchstein, H.-J. and Mei, W. (2014). Non-invasive monitoring of oxidative skin stress by ultraweak photon emission (UPE)-measurement. I: Mechanisms of UPE of biological materials. Skin Res. Technol. 14: 103-111.
- Kobayashi, M., Sasaki, K., Enomoto, M. and Ehara, Y. (2007). Highly sensitive determination of transient generation of biophotons during hypersensitive response to cucumber mosaic virus in cowpea. J. Exp. Bot. 58: 465–472.
- Kobayashi, M., Takeda, M., Ito, K., Kato, H. and Inaba, H. (1999). Two-dimensional photon couting imaging and spatiotemporal characterization of ultraweak photon emission ftrom a rat's brain. J. Neurosci. Methods. 93:163-168.
- Kohler, A., Schwindling, S. and Conrath, U. (2002). Benzothiadiazole-induced priming for potentiated responses to pathogen infection, wounding, and infiltration of water into leaves requires the NPR1/NIM1 gene in Arabidopsis. Plant Physiol. 128:1046-1056.
- Koike, N., Hyakumachi, M., Kageyama, K., Tsuyumu, S. and Doke, N. (2001). Induction of systemic resistance in

cucumber against several diseases by plant growthpromoting fungi: lignification and superoxide generation. Eur. J. Plant Pathol. 107:523-533.

- Komatsu, S., Makino, T. and Yasue, H. (2013). Proteomic and Biochemical Analyses of the Cotyledon and Root of Flooding-Stressed Soybean Plants. PLoS ONE 8: e65301.
- Krzymowska, M., Konopka-Postupolska, D., Sobczak, M., Macioszek, V., Ellis, B. E. and Hennig, J. (2007). Infection of tobacco with different *Pseudomonas syringae* pathovars leads to distinct morphotypes of programmed cell death. Plant J. 50: 253-264.
- Kuchitsu, K., Kikuyama, M. and Shibuya, N. (1993). Nacetylchitooligosaccharides, biotic elicitor for phytoalexin production, induce transient membrane depolarization in suspension-cultured rice cells. Protoplasma. 174:79-81.
- Kunz, B. A., Dando, P. K., Grice, D. M., Mohr, G. P. G., Schenk, P. M. and Cahill, M. (2008). UV-induced DNA damage promotes resistance to the biotrophic pathogen *Hyaloperonospora parasitica* in Arabidopsis. Plant Physiol. 148: 1021-1031.
- Lawton, K.A., Friedrich, L., Hunt, M., Weymann, K., Delaney, T., Kessman, H., Staub, T. and Ryals, J. (1996). Benzothiadiazole induces disease resistance in Arabidopsis by activation of the systemic acquired resistance signal transduction pathway. Plant J. 10: 71–82.
- Levine, A., Tenhaken, R., Dixon, R and Lamb, C. (1994). H₂O₂ from the oxidative burst orchestrates the plant hypersensitive disease resistance response. Cell. 79: 583-593.
- Liu, J. R. and Cantlife, D. J. (1984). Somatic embryogenesis and plant regeneration in tissue culture of sweet potato (*Ipomoea batatas* Poir.). Plant Cell Rep. 3: 112-115.
- Luna, E., Bruce, T. J. A., Roberts, M. R., Flors, V. and Ton, J. (2012). Next-generation systemic acquired resistance. Plant Physiol. 158:844–853.
- Luna, E., Pastor, V., Robert, J., Flors, V., Mauch-Mani, B. and Ton, J. (2010). Callose deposition: A multifaceted plant defense response. MPMI 24: 183-193.
- Mandadi, K., K. and Scholthof1, K.-B., G. (2013). Plant immune responses against viruses: How does a virus cause disease? Plant Cell 25: 1489–1505.
- Mauch, F., Mauch-Mani, B. and Boller, T. (1988). Antifungal hydrolases in pea tissue II. Inhibition of fungal growth by combinations of chitinase and β-1,3glucanase. Plant Physiol. 88: 936-942.

- Midoh, N. and Iwata, M. (1996). Cloning and characterization of a probenazole inducible gene for intracellular pathogenesis-related protein in rice. Plant Cell Physiol. 37: 9-18.
- Miki, D. and Shimamoto, K. (2004). Simple RNAi vectors for stable and transient suppression of gene function in rice. Plant Cell Physiol. 45: 490-495.
- Miki, D., Itoh, R. and Shimamoto, K. (2005). RNA silencing of single and multiple members in a gene family of rice. Plant Physiol. 138: 1903-1913.
- Minami, E., Kuchitsu, K., He, D.Y., Kouchi, H., Midoh, N., Ohtsuki, Y. and Shibuya N. (1996). Two novel genes rapidly and transiently activated in suspension-cultured rice cells by treatment with *N*-acetylchitoheptaose, a biotic elicitor for phytoalexin production. Plant Cell physiol. 37:563-567.
- Minami, E., Ozeki, Y., Matsuoka, M., Koizuka, N. and Tanaka, Y. (1989). Structure and some characterization of the gene for phenylalanine ammonia lyase from rice plants. Eur. J. Biochem. 185: 19-25.
- Mueller-Uri, F., Parthier, B. and Nover, L. (1988). Jasmonateinduced alteration of gene expression in barley leaf segments analyzed by in vivo and in vitro protein synthesis. Planta. 176: 241-247.
- Mur, L. A. J., Kenton, P., Atzorn, R., Miersch, O. and Oasternack, C. (2006). The outcomes of concentrationspecific interactions between salicylate and jasmonate signaling include synergy, antagonism, and oxidative stress leading to cell death. Plant Physiol. 140: 249-262.
- Musumeci, F., Triglia, A.and Grasso, F. (1992). Experimental evidence on ultraweak photon emissio from normal and tumour human tissues (Chapt.12). Recent advances in biophoton research and its applications (Edited by Popp. F. A., Li, K.H. and Gu, Q.) World Scientific, Singapore. 307-324.
- Nagoshi, T., Watanabe, N., Suzuki, S., Usa, M., Watanabe, H., Ichimura, T. and Inaba, H. (1992). Spectral analyses of low level chemiluminescence of a short lifetime using a highly sensitive polychromatic spectrometer incorporating a two dimensional photon-counting type detector. Photochem. Photobiol. 56: 89-94.
- 仲下英雄・安田美智子 (2004). 全身獲得病害抵抗性と植物ホルモン. 植調 39: 203-213.
- Nakane, E., Kawakita, K., Doke, N. and Yoshioka, H. (2003). Elicitation of primary and secondary metabolism during defense in the potato. J. Gen. Plant Pathol. 69: 378–384.

- Nakayama, A., Fukushima, S., Goto, S., Matsushita, A., Shimono, M., Sugano, S., Jiang, C.-J., Akagi, A., Yamazaki, M., Inoue, H. and Takatsuji, H. (2013). Genome-wide identification of WRKY45-regulated genes that mediate benzothiadiazole-induced defense responses in rice. BMC Plant Biol. 13: 150–161.
- 難波成任 (2008). 植物医科学(上), 養賢堂, 東京 215-319.
- Narusaka, M., Abe, H., Kobayashi, M., Kubo, Y., Kawai, K., Izawa, N. and Narusaka, Y. (2006) A model system to screen for candidate plant activators using an immuneinduction system in Arabidopsis. Plant Biotechnol 23: 321– 327.
- 鳴坂義弘・平塚和之・安部洋 (2008). プラントアクティ ベーターの創薬に向けたハイスループットスクリー ニングシステムの開発. 植物防疫 61: 537-541.
- Niki, T., Mitsuhara, I., Seo, S., Ohtsubo, N. and Yuko Ohashi, Y. (1998). Antagonistic Effect of Salicylic Acid and jasmonic Acid on the Expression of Pathogenesis-related (PR) protein genes in wounded mature tobacco leaves. Plant Cell Physiol. 39: 500-507.
- Nishizawa, Y., Kishimoto, N., Saito, A. and Hibi, T. (1993). Sequence variation, differential expression and chromosomal location of rice chitinase genes. Mol. Gen. Genet. 241: 1-10.
- Nojiri, H., Sugimori, M., Yamane, H., Nishimura, Y., Yamada, A., Shibuya, N., Kodama, O., Murofushi, N. and Omori, T. (1996). Involvement of jasmonic acid in elicitor-induced phytoalexin production in suspension-cultured rice cells. Plant Physiol. 110: 387-392.
- Noutoshi, Y., Okazaki, M., Kida, T., Nishina, Y., Morishita, Y., Ogawa, T., Suzuki, H., Shibata, D., Jikumaru, Y., Hanada, A., Kamiya, Y. and Shirasu, K. (2012). Novel plant immune-priming compounds Identified via high-throughput chemical screening target salicylic acid glucosyltransferases in Arabidopsis. Plant Cell 24: 3795–3804.
- 大矢智幸・倉重秀昭・甲斐昌一 (1998). 環境ストレスと 植物の生態成長-光学的手法によるイオンストレスの 早期検出. 九州大学工学集報 71:15-21.
- 大矢智幸・吉田敏・川畑龍三・岡部弘高・甲斐昌一 (2000). 環境ストレスと植物の生態成長-光学的手法による乾 燥傷害の早期検出-.九州大学工学集報 73: 25-31.
- Okada, M., Matsumura, M., Ito, Y. and Shibuya, N. (2002). High-affinity binding proteins for *N*-acetylchitooligosaccharide elicitor in the plasma membranes from wheat, barley and carrot cells: conserved presence and correlation

with the responsiveness to the elicitor. Plant Cell Physiol. 43: 505–512.

- Ono, S., Tanaka, T., Watakabe, Y., Hiratsuka, K. (2004) Transient assay system for the analysis of PR-1a gene promoter in tobacco BY-2 cells. Biosci Biotechnol Biochem 68: 803–807.
- Ono, S., Kusama, M., Ogura, R., Hiratsuka, K. (2011) Evaluation of the use of the tobacco PR-1a promoter to monitor defense gene expression by the luciferase bioluminescence reporter system. Biosci Biotechnol Biochem 75: 1796-1800.
- Ortmann, T., Sumowski, G., Bauknecht, H. and Moerschbacher, B. M. (2004). Establishment of a reliable protocol for the quantification of an oxidative burst in suspension-cultured wheat cells upon elicitation. Physiol. Mol. Plant Pathol. 64: 227-232.
- Pieterse, C. M. J., van Wees, S. C. M., Hoffland, E., van Pelt, J. A. and van Loon, L. C. (1996). Systemic resistance in Arabidopsis induced by biocontrol bacteria is independent of salicylic acid accumulation and pathogenesis-related gene expression. Plant Cell. 8: 1225-1237.
- Pieterse, C. M. J., van Wees, S. C. M., van Pelt, J. A., Knoester, M., Laan, R., Gerrits, H., Weisbeek, P. J. and van Loon L. C. (1998). A Novel Signaling Pathway Controlling Induced Systemic Resistance in Arabidopsis. Plant Cell. 10: 1571-1580.
- Popp, F-A. (1988). Biophoton emission. Experientia. 44:543-630.
- Popp, F-A., Li, K. H. and Gu, Q. editors (1992). Recent advances in biophoton research and its applications. World Science. Singapore.
- Pospíšil, P, Prasad, A. and Rác, M. (2014). Role of reactive oxygen species in ultra-weak photon emission in biological systems. J. Photochem. Photobiol. B: Biol. 139: 11-23.
- Qiu, Y. and Yu, D. (2008). Over-expression of the stressinduced OsWRKY45 enhances disease resistance and drought tolerance in Arabidopsis. Environ. Exp. Bot. 65: 35-47.
- Rejeb, I. B., Pastor, V. and Mauch-Mani B. (2014). Plant responses to simultaneous biotic and abiotic Stress: molecular mechanisms. Plants (Basel) 3: 458-75.
- Repetto, M., Semprine, J. and Boveris, A. (2012). Lipid Peroxidation: Chemical Mechanism, Biological Implications and Analytical Determination. "Lipid Peroxidation". ISBN 978-953-51-0716-3, Chapter 1.

- Rohilla, R., Singh, U. S. and Singh, R. L. (2001). Mode of action of acibenzolar-S-methyl against sheath blight of rice, caused by *Rhizoctonia solani* Kühn. Pest Manage. Sci. 58:63-69.
- Roschger, P., Devaraj, B., Scott, R. Q. and Inaba. H. (1992). Induction of a transient enhancement of low level chemiluminescence in intact leaves by anaerobic treatment. Photochem. Photobiol. 56: 281-284.
- Ryals, J., Uknes, S. and Ward, E. (1994). Systemic acquired resistance. Plant Physiol. 104: 1109-1112.
- Salin, M. L. and Bridges, S. M. (1981). Chemiluminescence in wounded root tissue. Plant Physiol. 67:43-46.
- Savvides, A., Ali, S., Tester, M. and Fotopoulos, V. (2016). Chemical priming of plants against multiple abiotic stresses: mission possible? Trends Plant Sci. 21: 329-338.
- Scala, A., Pazzagli, L., Comparini, C., Santini, A., Tegli, S. and Cappugi, G. (2004). Cerato-platanin, an early-produced protein by *Ceratocystis fimbriata* f.sp. *Platani*, elicits phytoalexin synthesis in host and non-host plants. J. Plant Pathol. 86: 27-33.
- Schultheis, J. R., Cantlife, D. J. and Chee, R. P. (1990). Optimizing sweet potato [*Ipomoea batatas* (L.) Lam] root and plantlet formation by selection of proper embryo developmental stage and size, and gel type for fluidized sowing. 9: 356-359.
- Schweizer, P., Buchala, A. and Me'traux, J. P. (1997a). Gene expression patterns and levels of jasmonic acid in rice treated with the resistance inducer 2,6-dichloroisonicotinic acid. Plant Physiol. 115: 61-70.
- Schweizer, P., Buchala, A., Silverman, P., Seakar, M., Raskin, I. and Métraux, J. P. (1997b). Jasmonate-inducible genes are activated in rice by pathogen attack without a concomitant increase in endogenous jasmonic acid levels. Plant Physiol. 114: 79-88.
- Schwessinger, B. and Ronald, P. C. (2012). Plant innate immunity: perception of conserved microbial signatures. Annu. Rev. Plant Biol. 63: 451–82.
- Sekizawa, Y. (1980). Recent progress in studies on nonfungicidal controlling agent, probenazole, with reference to the induced resistance mechanism of rice plants. Rev. Plant Prot. Res. 13: 114-121.
- Shah, J., Chaturvedi, R., Chowdhury, Z., Venables, B. and Petros, R. A. (2014). Signaling by small metabolites in systemic acquired resistance. Plant J. 79: 645-658.
- Shibuya, N. and Minami, E. (2001). Oligosaccharide signaling

for defense responses in plant. Physiol. Mol. Plant Pathol. 59: 223-233.

- Shimizu, T., Nakano, T., Takamizawa, D., Desaki, Y., Ishii-Minami, N., Nishizawa, Y., Minami, E., Okada, K., Yamane, H., Kaku, H., Shibuya, N. (2010). Two LysM receptor molecules, CEBiP and OsCERK1, cooperatively regulate chitin elicitor signaling in rice. Plant J. 64: 201-214.
- Shimono, M., Sugano, S., Nakayama, A., Jiang, C.J., Ono, K., Toki, S. and Takatsuji, H. (2007). Rice WRKY45 plays a crucial role in benzothiadiazole-inducible blast resistance. Plant Cell 19: 2064–2076.
- Shinya, T., Motoyama, N., Ikeda, A., Wada, M., Kamiya, K., Hayafune, M., Kaku, H. and Shibuya, N. (2012). Functional characterization of CEBiP and CERK1 Homologs in Arabidopsis and rice reveals the presence of different chitin Receptor systems in plants. Plant Cell Physiol. 53: 1696-1706.
- Shinya, T., Nagasawa, T., Kaku, H. and Shibuya, N. (2015). Chitin-mediated plant-fungal interactions: catching, hiding and handshaking. Curr. Opin. Plant Biol. 26: 64-71.
- Singh, P., Yekondi, S., Chen, P-W., Tsai, C-H., Yu, C-W., Wu, K. and Zimmerli, L. (2014). Environmental History Modulates Arabidopsis Pattern-Triggered Immunity in a HISTONE ACETYLTRANSFERASE1–Dependent Manner. Plant Cell 26: 2676-2688.
- Slaughter, A., Daniel, X., Flors, V., Luna, E., Hohn, B. and Mauch-Mani, B. (2012). Descendants of primed Arabidopsis plants exhibit resistance to biotic stress. Plant Physiol. 158: 835–843.
- Slawinski, J., Grabikowski, E. and Ciesla, L. (1981). Spectral distribution of the ultraweak luminescence from germinating plants. J. Luminescence. 24/25: 791-794.
- Slawinski, J. (1988). Luminescence research and its relation to ultraweak cell radiation. Experientia. 44: 559-571.
- Stumm, D. and Gessler, C. (1986). Role of papillae in the induced systemic resistance of cucumbers against *Colletotrichum lagenarium*. Physiol. Mol. Plant Pathol. 29: 405-410.
- Sugano, S., Jiang, C.J., Miyazawa, S., Masumoto, C., Yazawa, K., Hayashi, N., Shimono, S., Nakayama, A., Miyao, M. and Takatsuji, H. (2010). Role of OsNPR1 in rice defense program as revealed by genomewide expression analysis. Plant Mol. Biol. 74: 549-562.
- Suzuki, S., Usa, M., Nagoshi, T., Kobayashi, M., Watanabe, N., Watanabe, H. and Inaba, H. (1991). Two-dimensional

imaging and counting of ultraweak light emission patterns from injured plant seedlings. J. Photochem. Photobiol. B: Biol. 9: 211-217.

- Takatsuji, H., Jiang, C.J. and Sugano, S. (2010) Salicylic Acid Signaling Pathway in Rice and the Potential Applications of Its Regulators. JARQ 44: 217-223.
- Testerink, C. and Munnik, T. (2006) Phosphatidic acid: a multifunctional stress lipid in plants. Trends Plant Sci 10: 368–375.
- Thieron, M., R. Pontzen, R. and Kurahashi, Y., (1998). Carpropamid: a rice fungicide with two modes of action. Pflanzenschutz-Nachrichten Bayer 51: 257-278.
- Thulke, O. and Conrath, U. (1998). Salicylic acid has a dual role in the activation of defense-related genes in parsley. Plant J. 14: 35–42.
- Tsuda, K., Sato, M., Stoddard, T., Glazebrook, J. and Katagiri, F. (2009). Network Properties of Robust Immunity in Plants. PLoS Genet. 5: e1000772.
- Tsuda, K. and Katagiri, A. (2010). Comparison of signaling mechanisms engaged in pattern-triggered and effector-triggered immunity. Curr. Opin. Plant Biol. 13: 459-465.
- Uchiyama, M., Abe, H., Sato, R., Shimura, M. and Watanabe, T. (1973). Fate of 3-allyloxy-1,2-benzisothiazole-1,1dioxide (Oryzemate®) in rice plants. Agric. Biol. Chem. 37: 737-745.
- 瓜谷郁三 (2001). サツマイモの病傷害に伴う呼吸増加. ストレスの植物生化学 (瓜谷郁三編), 学会出版センタ ー, 東京 9-25.
- Van Aken, O. and Van Breusegem, F. (2015). Licensed to kill, mitochondria, chloroplast and cell death. Trends Plant Sci. 20: 754-766.
- Van Hulten, M., Pelser, M., van Loon, L.C., Pieterse, C. M. J. and Ton, T. (2006). Costs and benefits of priming for defense in Arabidopsis. PNAS 103: 5602–5607.
- Vleeshouwers, V. G. A. A. and Oliver, R. P. (2014). Effectors as tools in disease resistance breeding against biotrophic, hemibiotrophic, and necrotrophic plant pathogens. MPMI 27: 196–206.
- 渡辺和彦・前川和正・神頭武嗣・三好昭宏 (2000). 無機 元素による全身獲得抵抗性誘導. 『農業技術大系』土 壌施肥編 第2巻 作物栄養 V 6: 8-14.
- 渡辺治夫・稲場文男 (1991) a. 生物フォトンの生化学-代 謝,発光機構,進化-①. O plus E. 143: 112-123.
- 渡辺治夫・稲場文男 (1991)b. 生物フォトンの生化学-代 謝,発光機構,進化-②. O plus E. 143: 139-153.
- Yamada, A., Shibuya, N., Kodama, O. and Akatsuka, T. (1993).
 Induction of phytoalexin formation in suspension-cultured rice cells by *N*-acetylchitooligosaccharides. Biosci. Biotechnol. Biochem. 57: 405-409.
- Yamaguchi, T., Minami, E. and Shibuya, N. (2003). Activation of phospholipases by *N*- acetylchitooligosaccharide elicitor in suspension-cultured rice cells mediates reactive oxygen generation. Physiol. Plantarum. 118:361-370.
- Yamaguchi, T., Minami, E., Ueki, J. and Shibuya, N. (2005). Elicitor-induced activation of phospholipases plays an important role for the induction of defense responses in suspension-cultured rice cells. Plant Cell Physiol. 46: 579-587.
- Yang, Y., Qi, M. and Mei, C. (2004). Endogenous salicylic acid protects rice plants from oxidative damage caused by aging as well as biotic and abiotic stress. Plant J. 40: 909– 919.
- Yasuda, M., Nakashita, H. and Yoshida, S. (2004). Tiadinil, a Novel class of activator of systemic acquired resistance, induces defense gene expression and disease resistance in Tobacco. J. Pest. Sci. 29: 46–49.
- Yasuda, M., Kusajima, M., Nakajima, M., Akutsu, K., Kudo, T., Yoshida, S. and Nakashita, H. (2006). Thiadiazole carboxylic acid moiety of tiadinil, SV-03, induces systemic acquired resistance in tobacco without salicylic acid accumulation. J. Pest Sci. 31: 329–334.
- Yasuda, M., Ishikawa, A., Jikumaru, Y., Seki, M., Umezawa, T., Asami, T., Maruyama-Nakashita, A., Kudo, T., Shinozaki, K., Yoshida, S. and Nakashita, H. (2008) Antagonistic Interaction between Systemic Acquired Resistance and the Abscisic Acid-Mediated Abiotic Stress Response in Arabidopsis. Plant Cell 20: 1678-1692.
- Yoshinaga, N., Kato, K., Kageyama, C., Fujisaki, K., Nishida, R. and Mori, N. (2006). Ultraweak photon emission from herbivory-injured maize plants. Naturwissenschaften 93: 38-41.
- Yu, H. and Li, L. (2014). Phylogeny and molecular dating of the cerato-platanin-encoding genes. Gen. Mol. Biol. 37: 423-427.
- Zhang, Q. and Xiao, S. (2015). Lipids in salicylic acidmediated defense in plants: focusing on the roles of phosphatidic acid and phosphatidylinositol 4-phosphate. Front. Plant Sci. 6: 387.
- Zhao, J. (2015) Phospholipase D and phosphatidic acid in plant defense response: from protein–protein and lipid–protein

interactions to hormone signaling. J. Exp. Bot. 66: 1721-1736.

Zimmerli, L., Gabor Jakab, G., Metraux, J.-P. and Mauch-Mani, B. (2000). Potentiation of pathogen-specific defense mechanisms in Arabidopsis by β-aminobutyric acid. PNAS 97: 12920-12925. 静岡県農林技術研究所 〒438-0803 静岡県磐田市富丘 678-1 電話(0538) 35-7211

茶業研究センター 〒439-0002 菊川市倉沢 1706-11 電話(0548) 27-2880

果樹研究センター 〒424-0101 静岡市清水区茂畑 電話(054) 376-6150

伊豆農業研究センター 〒413-0411 賀茂郡東伊豆町稲取 3012 電話(0557) 95-2341

森林・林業研究センター 〒434-0016 浜松市浜北区根堅 2542-8 電話(053) 583-3121

	平成 30 年 3 月 23 日 印刷 平成 30 年 3 月 31 日 発行	
〒438-0803 静岡県磐田市富丘 678-1		
編集兼 発行者	静岡県農林技術研究所 電話(0538) 35-7211	
印刷所	住所 静岡県袋井市新屋 4 丁目 5-2 名称 松本印刷株式会社 電話 (0538)43-6300	