

# 博士論文

植物のエリク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

伊代住浩幸

# 目 次

|   |     |
|---|-----|
| 略語説明  | vii |
| 緒論  | 1   |
| <b>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</b> |     |
| 第 1 節 緒言  | 7   |
| 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  | 13  |
| 2) 供試植物及び病原体  | 13  |
| 3) 病原体の接種と極微弱発光測定                                       | 14  |
| 2. 結果   |     |
| 1) 病原体（野火病菌・立枯病菌）を接種したタバコ葉の発光                           | 17  |
| 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                          | 19  |
| 3) 病原体（つる割病菌）を接種したメロン幼植物の発光                             | 21  |
| 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                         | 23  |
| 5) 病原体（炭疽病菌）を接種したイチゴ葉の発光                                | 25  |
| 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                         | 27  |
| 3. 考察   | 27  |
| 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   | 29  |
| 2) 供試菌株   | 30  |
| 3) 病原体の接種と極微弱発光の測定                                      | 30  |

|                          |                                   |    |
|--------------------------|-----------------------------------|----|
| 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      | 31 |
| 5 )                      | 発光の二次元イメージング                      | 31 |
| 6 )                      | イポメアマロンの検出                        | 31 |
| 7 )                      | サツマイモで観察される極微弱発光の分光測定             | 32 |
| ①                        | 極微弱発光の分光測定方法                      | 32 |
| ②                        | 非病原性フザリウム菌の接種                     | 34 |
| ③                        | 2, 4-D 処理                         | 34 |
| ④                        | 変温処理                              | 34 |
| ⑤                        | 分光データの解析                          | 35 |
| 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    | 35 |
| 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          | 36 |
| 3 )                      | 極微弱発光の二次元イメージング                   | 37 |
| 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      | 38 |
| 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          | 38 |
| 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 | 40 |
| 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      | 40 |
| 3.                       | 考察                                | 42 |
| 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                         | 44 |
| 2 )                      | 供試植物試料の栽培・培養条件                    | 44 |
| 3 )                      | 供試エリシター                           | 45 |
| 4 )                      | エリシター応答発光の測定                      |    |
| ①                        | サツマイモ                             | 46 |

|                       |    |
|-----------------------|----|
| ① タバコ                 | 46 |
| ② イネ                  | 46 |
| 5) エリシター応答発光の分光解析     | 47 |
| 2. 結果                 |    |
| 1) サツマイモ貯蔵根のエリシター応答発光 | 47 |
| 2) タバコ葉切片のエリシター応答発光   | 48 |
| 3) イネ葉切片のエリシター応答発光    | 49 |
| 4) イネ培養細胞のエリシター応答発光   | 52 |
| 3. 考察                 | 53 |

## 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                                       | 57 |
| 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<br>の特性解析 |    |
| 1. 材料及び方法                                    |    |
| 1) 供試植物                                      | 60 |
| 2) 供試エリシター                                   | 61 |
| 3) 病害抵抗性誘導物質                                 | 61 |
| 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            |    |
| ① 葉切片  | 61 |
| ② 懸濁培養細胞                                     | 62 |
| 5) エリシター応答発光の分光解析                            | 63 |
| 6) エリシター応答発光とPR遺伝子発現の比較解析                    | 63 |

|   |    |
|---|----|
| 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                                       | 65 |
| 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                                    | 68 |
| 3 ) 増強されたエリシター応答発光の波長組成   | 69 |
| 4 ) P R 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                             | 70 |
| 5 ) エリシター添加後の増加分から求めた P R 遺伝子発現とエリシター<br>応答発光の増強程度の比較           | 72 |
| 3. 考察   | 74 |
| 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<br>活性のエリシター応答発光を指標とした検出    |    |
| 1. 材料及び方法   |    |
| 1 ) エリシター   | 77 |
| 2 ) 供試培養細胞  | 77 |
| 3 ) 病害抵抗性誘導物質   | 80 |
| 4 ) 極微弱発光測定   | 81 |
| 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<br>R O S 生成                 | 81 |
| 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<br>の増強解析                     | 83 |
| 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<br>と R O S 生成・P R 遺伝子発現の増強解析 | 83 |
| 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<br>の増強解析                     | 86 |
| 3. 考察   | 89 |

## 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 . . . . . 91
  - 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 . . . . . 91
  - 3) イネを用いた植物検定 (Aグループ) . . . . . 92
  - 4) キュウリを用いた植物検定 (Bグループ) . . . . . 92
2. 結果 . . . . . 94
3. 考察 . . . . . 96

## 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 . . . . . 99
  - 2) RNA iによる*Os WRKY45*遺伝子の特異的発現抑制
    - ① RNA iコンストラクトの作成 . . . . . 99
    - ② 形質転換イネ培養細胞の作出 . . . . . 101
  - 3) 病害抵抗性誘導物質および異性体 . . . . . 103
  - 4) エリシター処理 . . . . . 103
  - 5) 極微弱発光測定 . . . . . 103
  - 6) 定量的RT-PCRによる*Os WRKY45*遺伝子の発現量解析 . . . . . 104
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 . . . . . 104
  - 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 . . . . . 108
3. 考察 . . . . . 111

|          |     |
|----------|-----|
| 第Ⅲ章 総合考察 | 113 |
| 摘要       | 119 |
| Summary  | 124 |
| 謝辞       | 129 |
| 引用文献     | 130 |

## 略語説明

|       |   |
|-------|---|
| ABA   | Abscisic acid                                   |
| ASM   | Acibenzolar-S-methyl                            |
| BABA  | $\beta$ -aminobutyric acid                      |
| BDR   | Brassinosteroid-mediated disease resistance     |
| BL    | Brassinolide                                    |
| BR    | Brassinosteroid                                 |
| CEBiP | Chitin oligosaccharide elicitor-binding protein |
| CERK1 | Chitin elicitor receptor kinase 1               |
| CP    | Cerato-platanin                                 |
| CRP   | Carpropamid                                     |
| DMF   | <i>N,N'</i> -dimethylformamide                  |
| DNA   | Deoxyribonucleic acid                           |
| ERPE  | Elicitor-responsive photon emission             |
| ET    | Ethylene  |
| ETI   | Effector-triggered immunity                     |
| GA3   | Gibberellin A3                                  |
| HBA   | Hydroxybenzoic acid                             |
| ISR   | Induced systemic resistance                     |
| JA    | Jasmonic acid                                   |
| MAMPs | Microbe associated molecular patterns           |
| NPR1  | Non-expressor of PR-1                           |
| PA    | Phosphatidic acid                               |
| PAL   | Phenylalanine ammonia lyase                     |



|                |   |
|----------------|---|
| PAMPs          | Pathogen associated molecular patterns          |
| PBZ            | Probenazole                                     |
| PCR            | Polymerase chain reaction                       |
| PDB            | Potato dextrose broth                           |
| PGPF           | Plant growth promoting fungi                    |
| PLD            | Phospholipase D                                 |
| PR protein     | Pathogenesis related protein                    |
| PRR            | Pattern recognition receptor                    |
| PTI            | Pattern triggered immunity                      |
| R-gene/protein | Resistant gene/protein                          |
| RNA            | Ribonucleic acid                                |
| RNAi           | RNA interference                                |
| RNS            | Reactive nitrogen species                       |
| ROIs           | Reactive oxygen intermediates                   |
| ROS            | Reactive oxygen species                         |
| RT-PCR         | Reverse transcription polymerase chain reaction |
| SA             | Salicylic acid                                  |
| SAR            | Systemic acquired resistance                    |
| TDL            | Tiadinil  |
| TLC            | Thin layer chromatography                       |
| UPE            | Ultraweak photon emission                       |
| WSR            | Wound-induced systemic resistance               |

## 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、バイオフィトン (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. Gurwitsch 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 (Abels, 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、 $10^0 \sim 10^4$  光子数/秒/cm<sup>2</sup> 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。

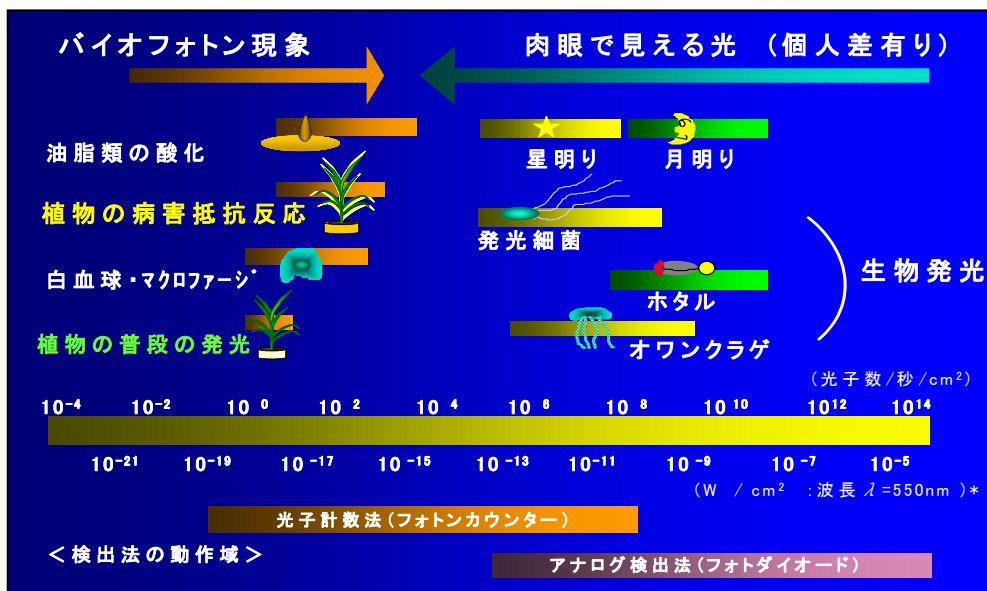


図 1 生体極微弱発光と生物発光の比較

\*光のパワー :  $P = hc/\lambda \approx 2 \times 10^{-16} / \lambda W$

$h$ : プランク定数 ( $6.626 \times 10^{-34} \text{ J} \cdot \text{s}$ ),  $c$ : 真空中の光の速度 ( $2.998 \times 10^8 \text{ m/s}$ )

$\lambda$ : 光の波長 (nm)

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; Belousov *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）。

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  $\mu\text{M}$ ) のジベレリン (Gibberelin A<sub>3</sub>: GA<sub>3</sub>) 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、発光に強く関わりと考えられており、一重項酸素 (<sup>1</sup>O<sub>2</sub>) の関与が示唆されている (Saline and Bridges, 1981; Chen *et al.*, 2003)。植物にとって致命的な高温では、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- $\beta$ -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)、嫌氣的処理 (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、より強力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) な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/Defense 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



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)) の 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 R-gene 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 $^1\text{O}_2$ の発光(1分子発光: $\lambda=1270$  nm; 2分子発光: $\lambda=634$  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 $^3\text{R}=\text{O}^*$ ( $\lambda=350$ -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  $\lambda=550-600$  nm；クロロフィル  $\lambda=670-740$  nm；クロロフィル蛍光  $\lambda=750-1000$  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ブバーストで生成するスーパーオキシド ( $\cdot\text{O}_2^-$ )，スーパーオキシドの不均化で生じる過酸化水素 ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ) 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 effector 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- $\beta$ 1,4-*N*-acetyl-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) と 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  $\mu\text{M}$  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  $\mu\text{M}$  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-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

発光強度の経時的变化は、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。



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)

#### 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 amygdali* pv. *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. 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,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$  2 g,  $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  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°C, 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°C の熱水中で 1 時間攪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 200 g 分の煎汁・デキストロース 20 g/L) 中で 28°C, 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、立枯病菌の滅菌水懸濁液 ( $1 \times 10^8$  cfu/ml) を減圧接種した後、φ50 mm のプラスチックシャーレ (栄研化学工業 (株)) 内で滅菌水に浮かべ、25°C 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。

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



表 2 供試した病原体

| 宿主    | 病名    | 病原名   | 菌株名(分譲元)              |
|-------|-------|---|-----------------------|
| タバコ   | 野火病   | <i>Pseudomonas amygdali</i> pv. <i>tabaci</i>                                       | MAFF301075            |
|       | 立枯病   | <i>Ralstonia solanacearum</i> phylotype I   | MAFF301069            |
| イネ    | いもち病  | <i>Pyricularia oryzae</i><br>レース 001, 007   | 愛知県農業総合試験場<br>山間農業研究所 |
|       | 白葉枯病  | <i>Xanthomonas oryzae</i> pv. <i>oryzae</i><br>レース I                                | MAFF 311018           |
| メロン   | つる割病  | <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>melonis</i><br>レース 0, レース 1, レース 2, レース<br>1,2y | 九州沖縄農業センター            |
| トマト   | 青枯病   | <i>Ralstonia solanacearum</i> phylotype I   | MAFF 301070           |
|       | 萎凋病   | <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>lycopersici</i><br>レース 2                        | 静岡農林研保存株              |
| イチゴ   | 炭疽病   | <i>Colletotrichum gloeosporioides</i>   | 静岡農林研保存株              |
| サツマイモ | つる割病  | <i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. <i>batatas</i>                                     | 静岡農林研保存株              |
|       | 非病原性菌 | <i>Fusarium oxysporum</i> SK-102 株  | 静岡農林研保存株              |

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、いもち病菌の分生孢子懸濁液 (1×10<sup>7</sup> cells/ml) あるいは、白葉枯病菌懸濁液 (1×10<sup>8</sup> 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) のプラスチ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 (1×10<sup>7</sup> 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) のプラスチ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 ( $1 \times 10^7$  cells/ml) もしくは、青枯病菌懸濁液 ( $1 \times 10^8$  cells/ml) 1 ml を全体に噴霧接種し、直ちに 25°C 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チ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、炭疽病菌の分生孢子懸濁液 ( $1 \times 10^7$  cells/ml) 1 ml を全体に噴霧接種し、25°C 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  $\phi 50$  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°C、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 ( $1 \times 10^7$  cells/ml) 250  $\mu$ l を切片上面に塗布接種し、20°C 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/ $\text{cm}^2$  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/ $\text{cm}^2$  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)。

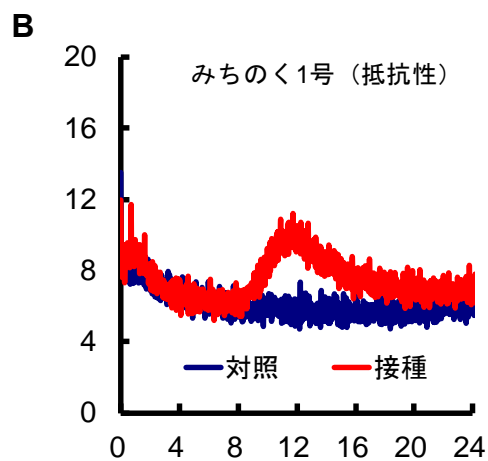
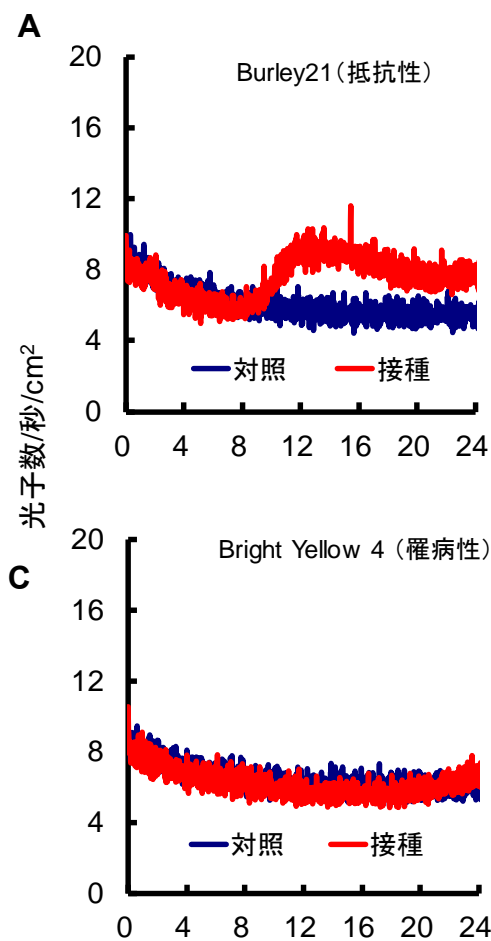


図3 野火病菌を接種したタバコ葉の発光

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 ( $1 \times 10^8$  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)

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/cm<sup>2</sup>に達した (図 4 A, B)。

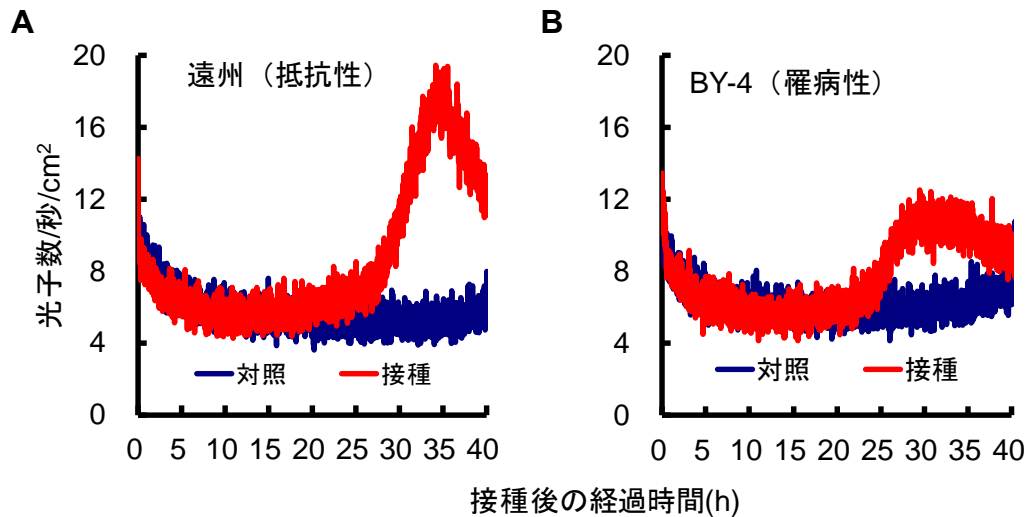


図 4 立枯病菌を接種したタバコ葉の発光

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 ( $1 \times 10^8$  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。

## 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 5 B)。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 5 C, 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 6 A~C)。

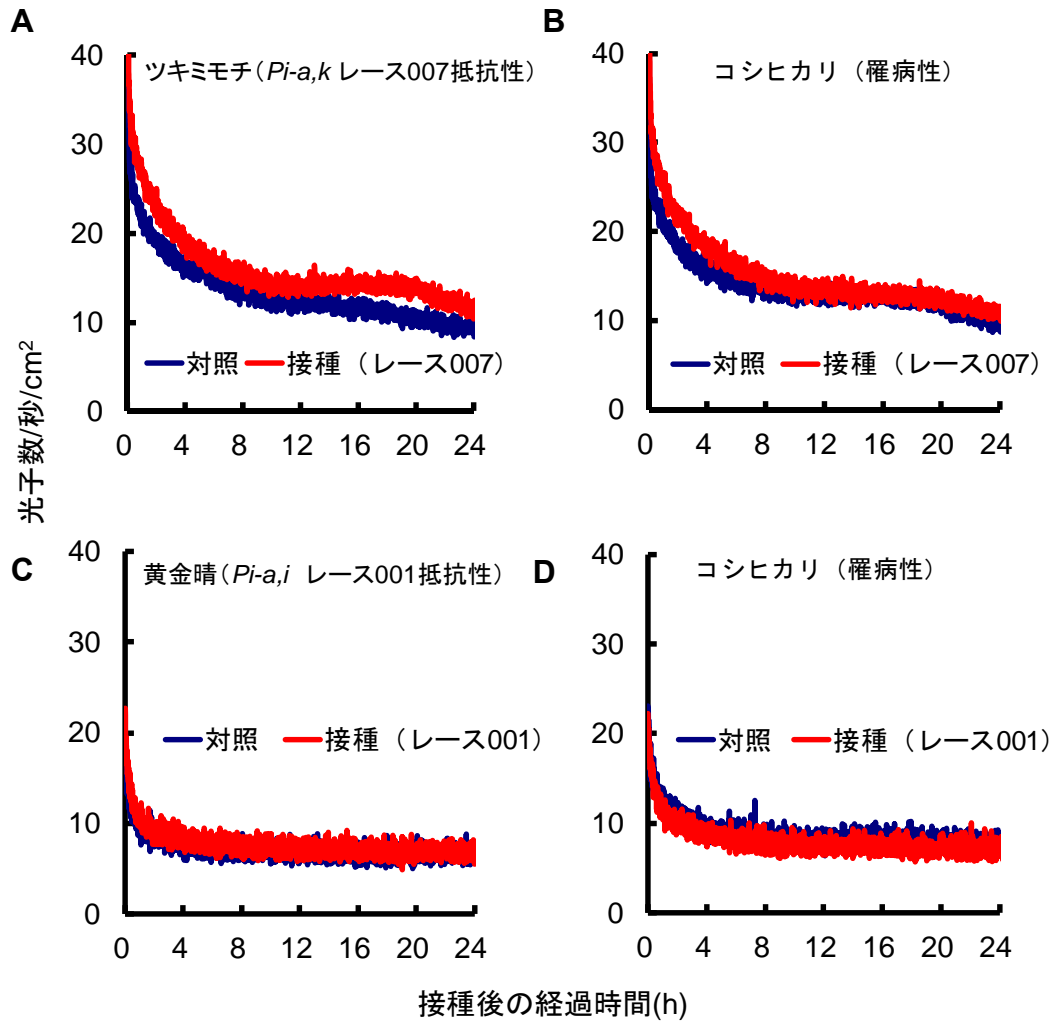
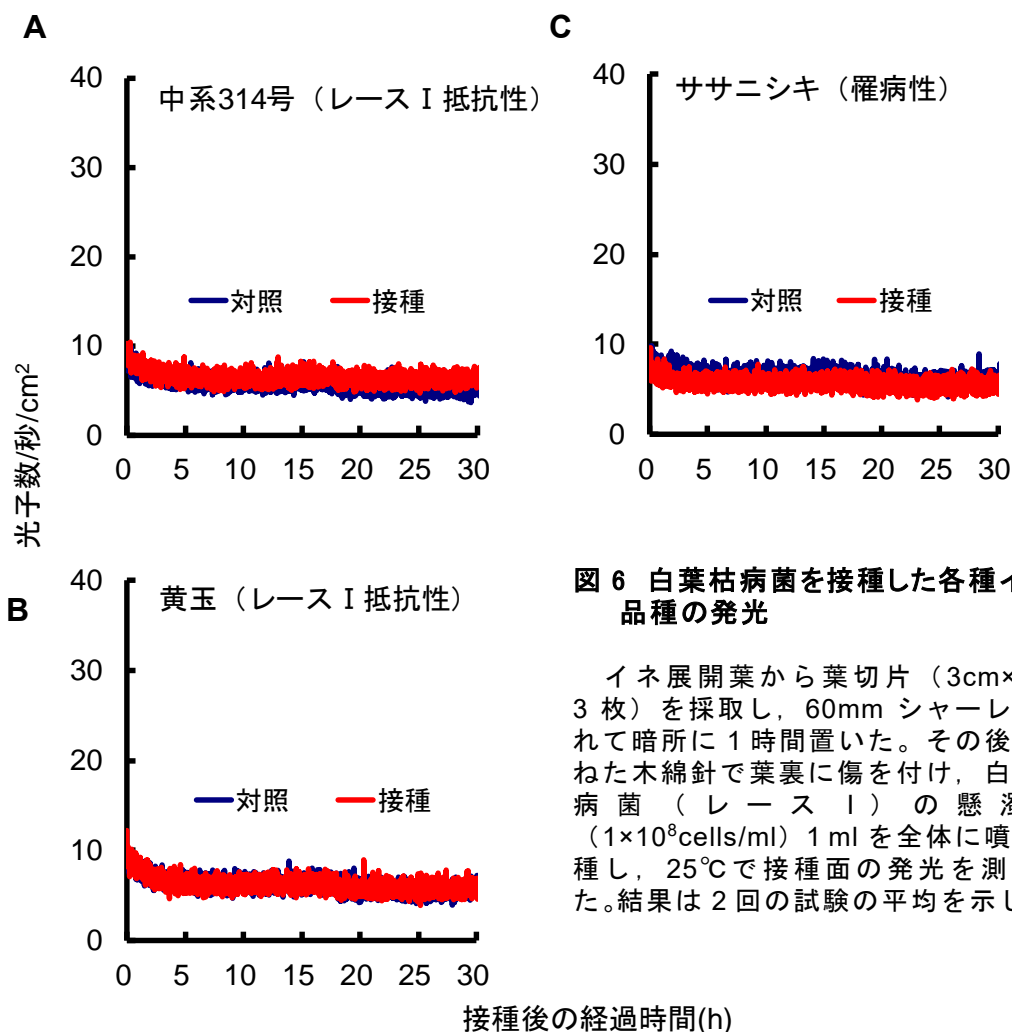


図 5 いもち病菌を接種した各種イネ品種の発光

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( $1 \times 10^6$  cells/ml)1 ml を全体に噴霧接種し、25°C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 7 A~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 7 D)。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 7 A)。

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 7 B)。*Fom-1* を持つ別のメロン‘アンデス’ (図 7 C) 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。

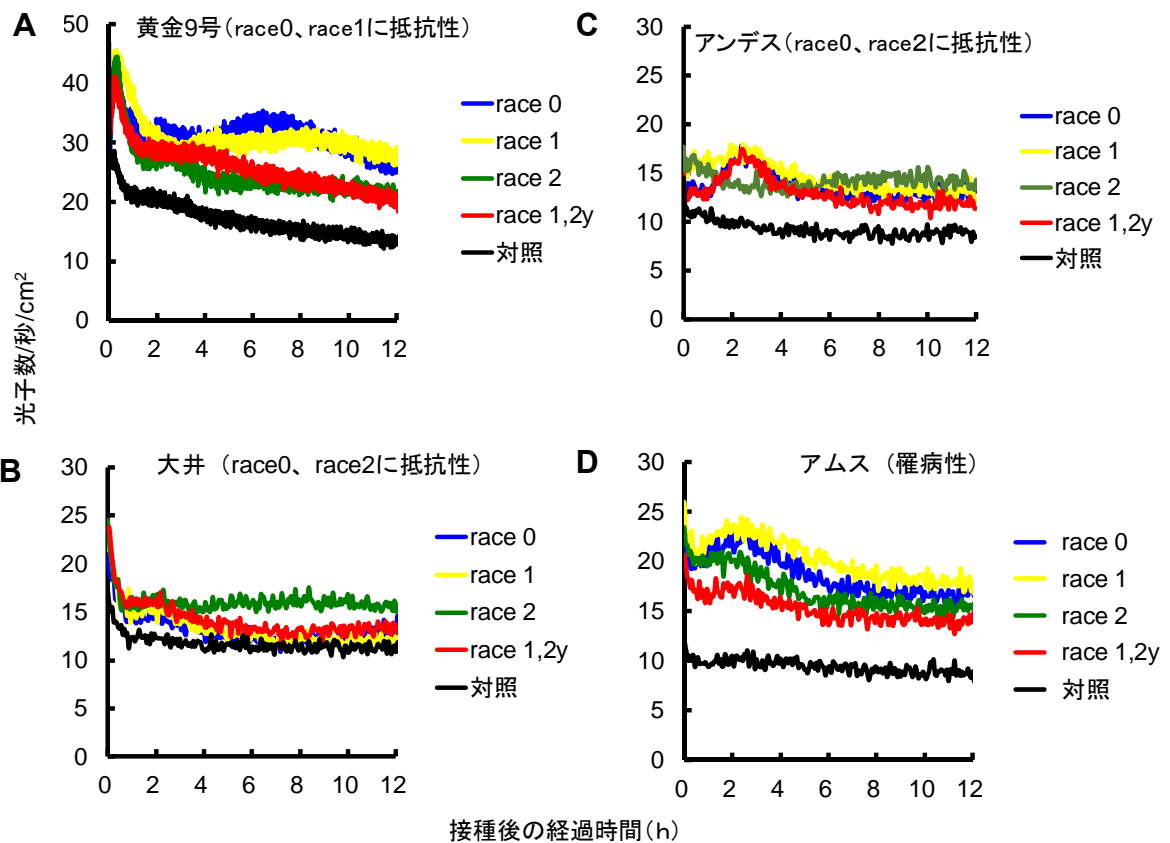


図 7 つる割病菌各レースを接種したレース判別用メロン各品種の発光

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 ( $1 \times 10^7$  cells/ml) 1 ml を全体に噴霧接種し、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。

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<br>抵抗性/<br>発光パターン* | レース 0 | レース 1 | レース 2 | レース 1,2y |
|--------------------------|-------|-------|-------|----------|
| アムス                      | S     | S     | S     | S        |
|                          | +/-   | +/-   | +/-   | +/-      |
| 大井                       | R     | S     | R     | S        |
|                          | +/-   | +/-   | +/+   | +/-      |
| アンデス                     | R     | S     | R     | S        |
|                          | +/-   | +/-   | +/+   | +/-      |
| 黄金 9 号<br>(マクワウリ)        | R     | R     | S     | S        |
|                          | +/+   | +/+   | +/-   | +/-      |

\* 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 8 A~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 9 A, B)。



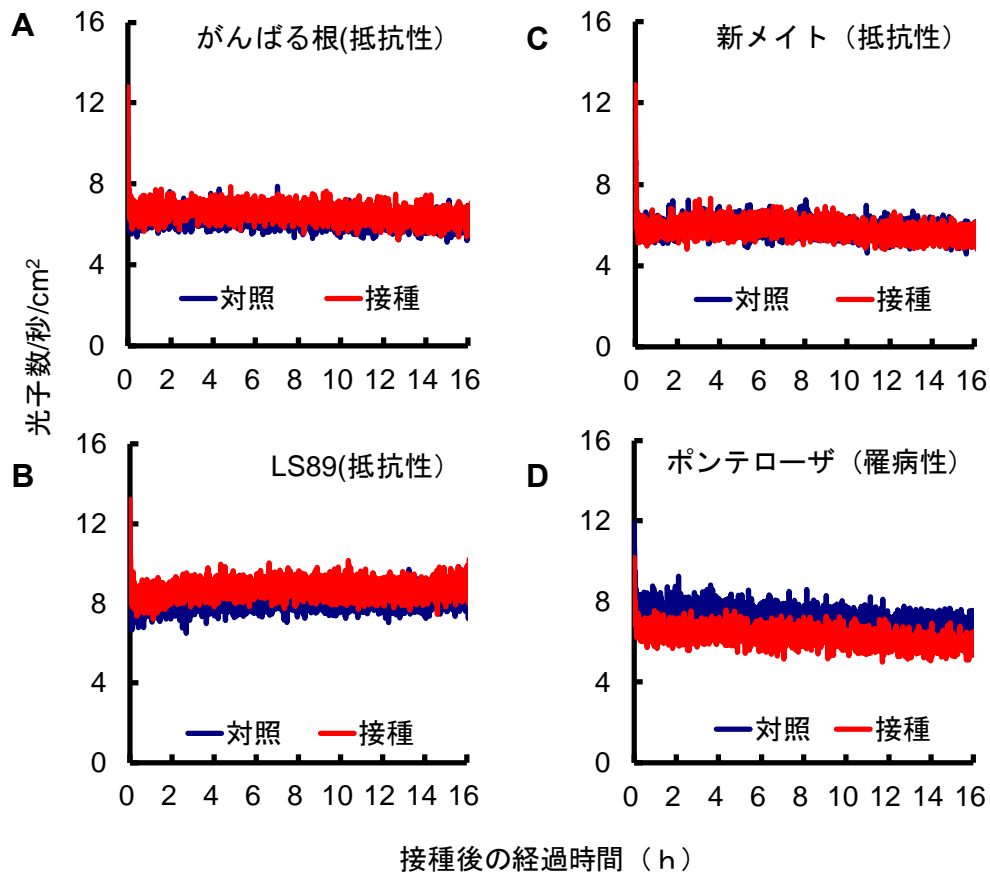


図 8 青枯病菌を接種したトマト各品種の発光

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 ( $1 \times 10^8$  cells/ml) 1 ml を全体に噴霧接種し、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。

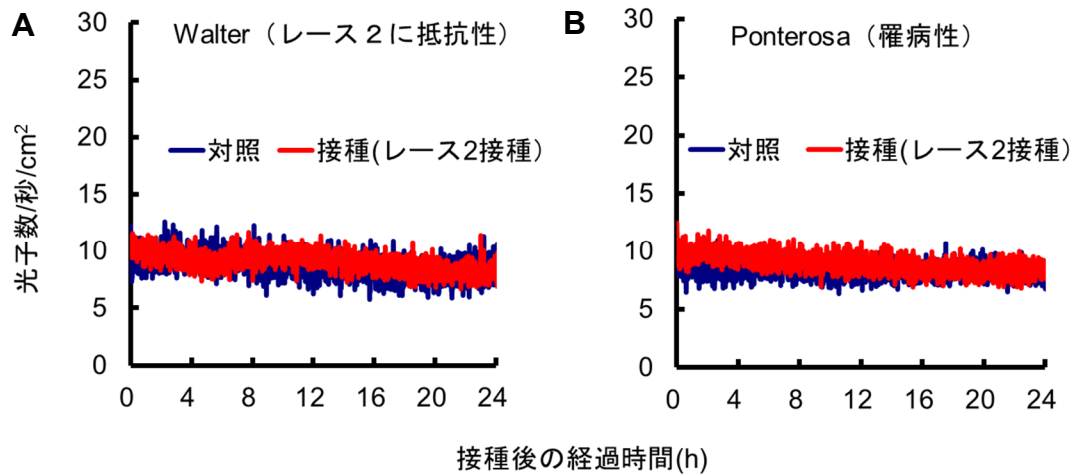
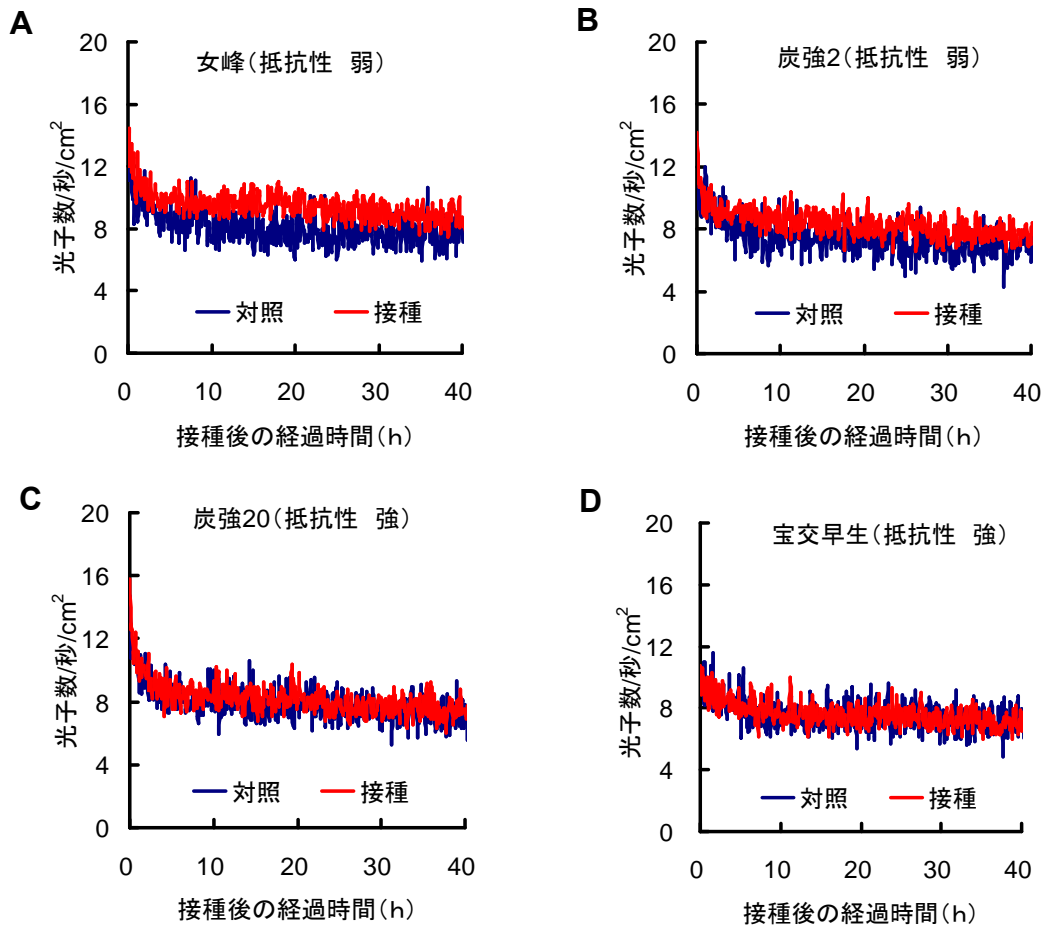


図 9 萎凋病菌を接種したトマト各品種の発光

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、萎凋病菌の出芽孢子懸濁液（ $1 \times 10^7$  cells/ml）1 ml を全体に噴霧接種し、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。

### 5) 病原体（炭疽病菌）を接種したイチゴ葉の発光

炭疽病菌の分生孢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’ $\leq$ ‘炭強 2’ $<$ ‘炭強 20’ $\leq$ ‘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 2’及び、‘宝交早生’では対照区と差がなかった（図 10 C, D）。



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、炭疽病菌の分生孢子懸濁液 ( $1 \times 10^7$  cells/ml) 1 ml を全体に噴霧接種し、25°C 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. oxysporum* f. 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/cm<sup>2</sup> 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/cm<sup>2</sup> 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/cm<sup>2</sup> 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生育していたが、非病原菌接種切片では、菌糸の生育は認められなかった (図省略)。

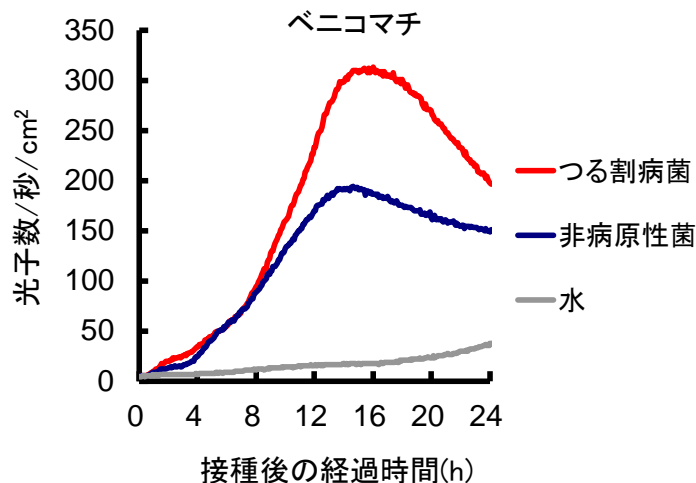


図 11 つる割病菌あるいは非病原菌を接種したサツマイモ貯蔵根の発光

結果は 2 回の試験の平均を示した。

## 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 ( $O_2^-$ ) 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、プラスチ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°C, 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  $1 \times 10^5 \sim 10^7$  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, チューブに入れた孢子懸濁液を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 (*Ceratocystis fimbriata* NBRC 30501) を用い, 非病原性フザリウム菌と同様に接種源 (内生孢子) 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 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, 所定濃度の孢子懸濁液を上面に塗布したサツマイモ切片を直径60 mm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個以上の孢子を観察し、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 $1 \times 10^7$  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5 mm、重さ70 g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（ $1 \times 10^7$  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 ( $1 \times 10^7$  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, 温室条件で,  $20^{\circ}\text{C}$ , 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, 下層のクロロフォルム層を採取・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 2 ml の抽出溶媒に溶解し, 200  $\mu\text{l}$  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% *p*-dimethylaminobenzaldehyde 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。

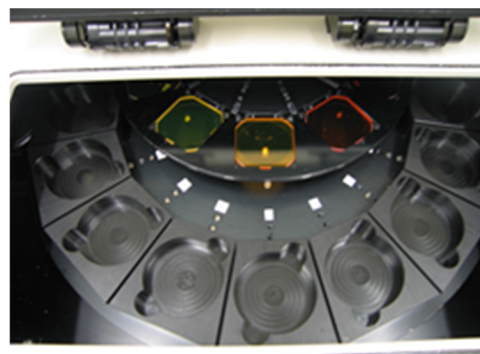
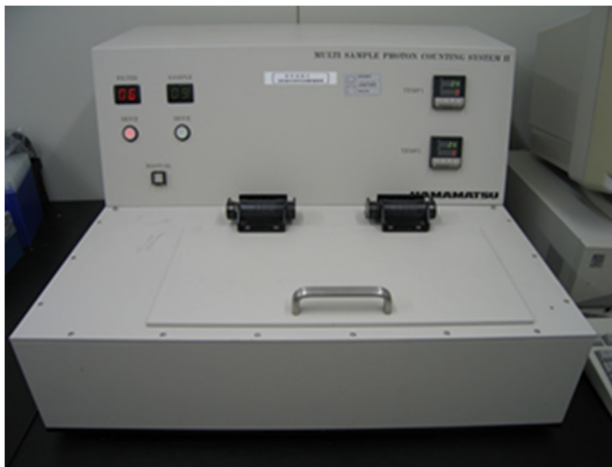
## 7) サツマイモで観察される極微弱発光の分光測定

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。

### ① 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 (MSPC II 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。



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

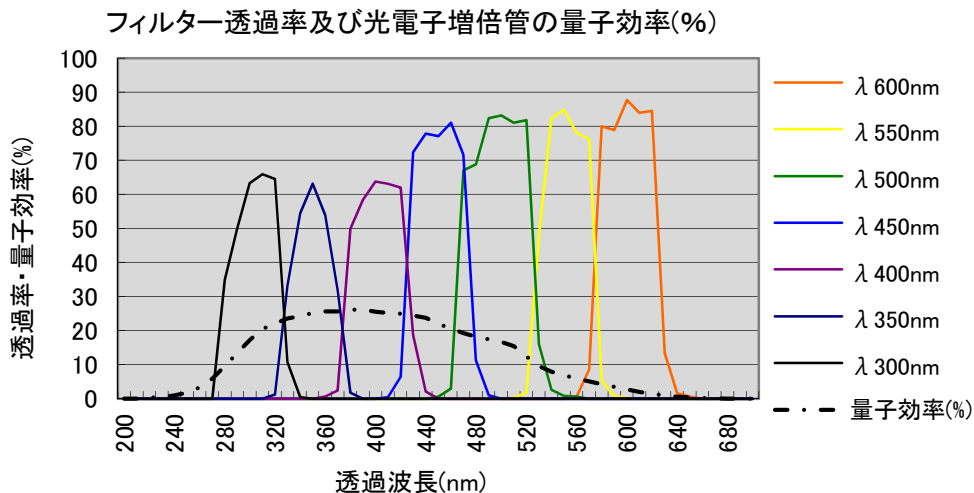


図 12 分光型フォトンカウンターMSPC II（上）と測定波長特性（下）

※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。

## 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 ( $1 \times 10^7$  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°C, 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°C, 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 °C 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 °C に維持し, その後 33°C まで上昇させ 10 時間維持した後, 20 °C に温度を下げ 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  $I_i$  は、下式により算出した。

$$I_i = (N_i - N_{ib}) / (QE_i \times T_i)$$

$N_i$  と  $N_{ib}$  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。 $QE_i$  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  $T_i$  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孢子濃度の増加に伴って増加した。また、接種孢子濃度が高いほど、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)。

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

| 実験<br>番号 | サツマイモ             |                   | フザリウム菌                             | 極微弱発光                                   |                                      |                        |
|----------|-------------------|-------------------|------------------------------------|---|--------------------------------------|------------------------|
|          | 熱処理 <sup>a)</sup> | 熱処理 <sup>b)</sup> | 濃度<br>(細胞数/ml)<br>×10 <sup>5</sup> | 最高発光<br>強度 (光子<br>数/秒/cm <sup>2</sup> ) | 積算発光量<br>(24 時間)<br>×10 <sup>3</sup> | 発光ピーク<br>(測定開始<br>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 <sup>c)</sup> | 0                                  | 18                                      | 144                                  | 0 <sup>d)</sup>        |
| 7        | 有                 | 有                 | 100                                | 23                                      | 102                                  | 0 <sup>d)</sup>        |
| 8        | 有                 | 無                 | 100                                | 18                                      | 90                                   | 0 <sup>d)</sup>        |

- 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。

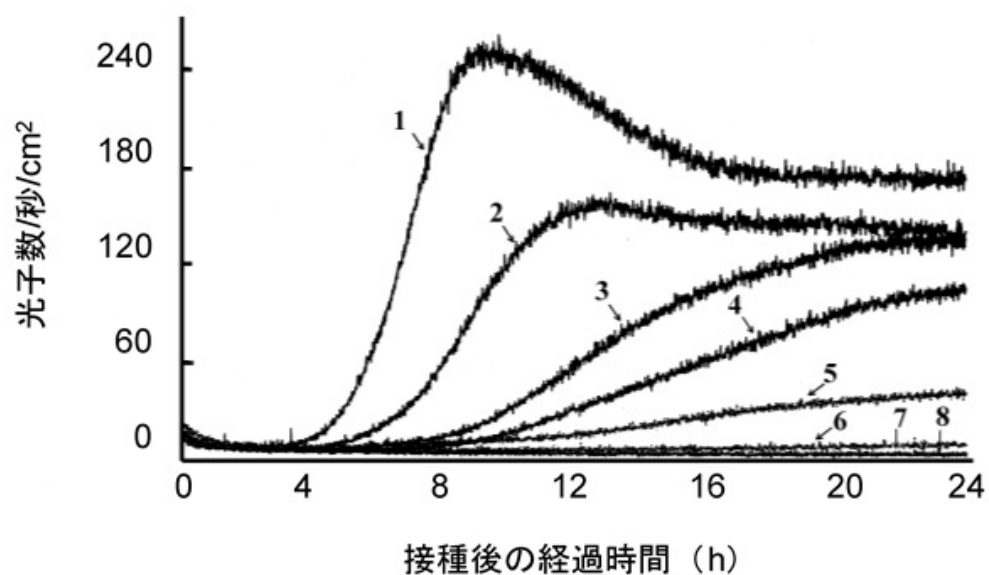


図 13 フザリウム菌とサツマイモの相互作用に伴う発光の強度推移

図中の番号は表 4 の実験番号に対応する。

## 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 % の孢子が発芽していた (図表略)。

### 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孢子懸濁液を「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。

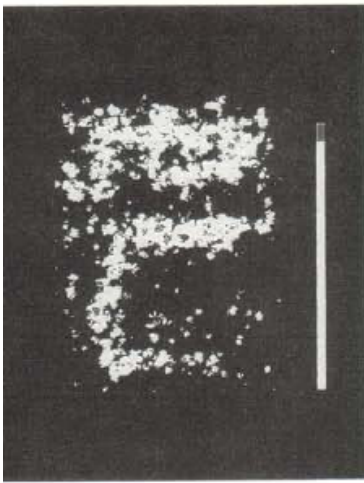


図14 フォトンカウンティングカメラで撮影したサツマイモ塊根切片の発光の二次元イメージ

サツマイモ切片に「F」の形に孢子を塗布接種し、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。

IP ⇒



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。

#### 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、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）。

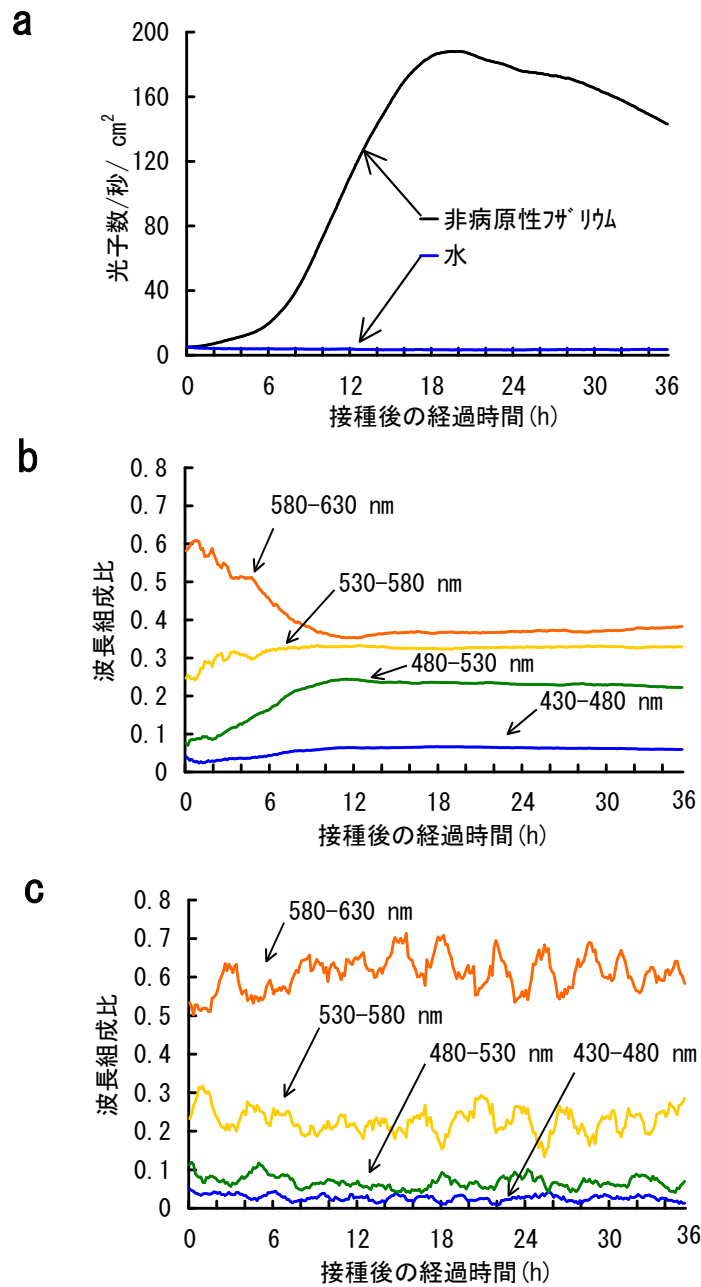


図 16 非病原性フザリウム菌あるいは蒸留水を接種したサツマイモの発光量の推移(a) 及び波長組成の推移(b: 非病原性フザリウム菌, c: 蒸留水)

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，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）。

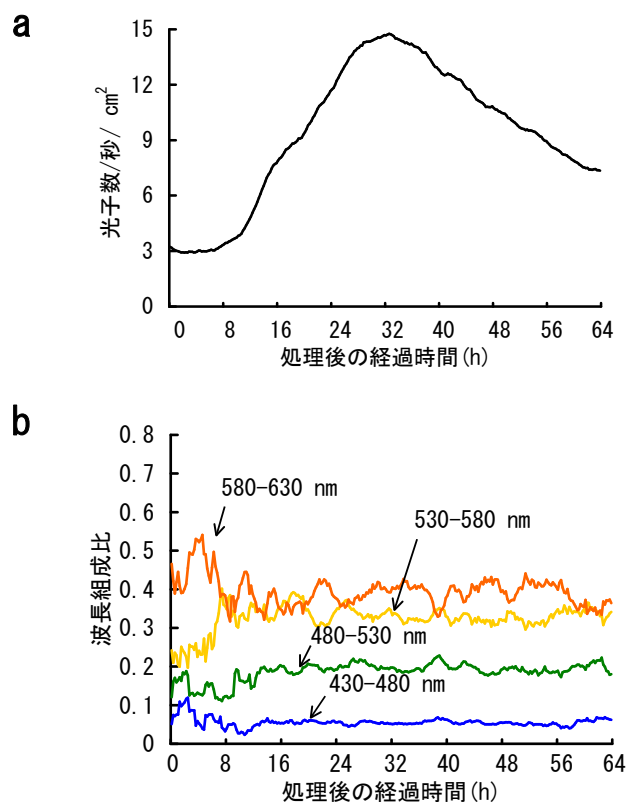


図 17 2,4-D で処理したサツマイモの発光量(a)及び発光波長組成(b)の推移

グラフ中の値は 10 測定点の移動平均で示している。

## 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 18 a）。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 18 b 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。

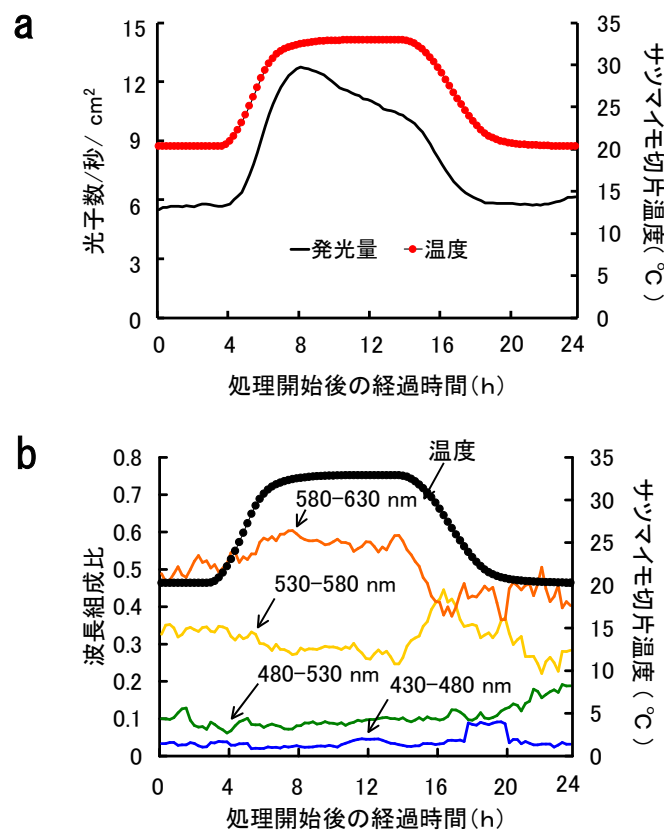


図 18 サツマイモの温度変化とサツマイモの発光量(a)及び発光波長組成(b)の推移

グラフ中の値は 10 測定点の移動平均で示している。

### 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。 $2 \times 10^6$  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。 $5 \times 10^5$  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  $1 \times 10^7$  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ると推測される。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。

$2 \times 10^6$  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、Cerato-platanin (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* を含む子嚢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, 接種部位周辺でファ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（MSPC II 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  $\phi 60$  mm 以上の部分から、 $\phi 50$  mm、厚さ 8 mm の切片を作成し、 $\phi 60$  mm のプラスチックシャーレ（栄研）に入れて 20°C、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°C、夜間を 18°C 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°C、夜間を 18°C 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°C、100 rpm で振とう培養し、10 日ごとに 14 g 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*-acetylchitooligosacchhalide) 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、1  $\mu$ M 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  $\mu$ M 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 ( $\phi$ 5 mm) を一つ投入した。暗所、25°C 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  $\mu$ m 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。

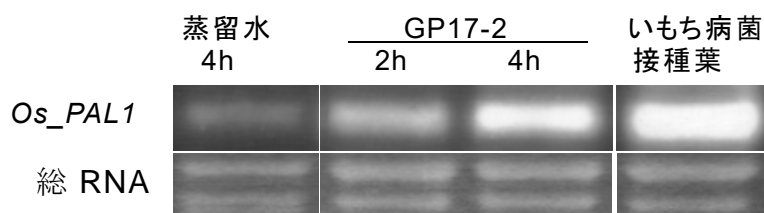


図 19 GP17-2 株培養ろ液で処理したイネ培養細胞における *Os\_PAL1* 遺伝子の発現増加

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。

#### 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のプラスチ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，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。

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  $\phi 60$  mm のプラスチックシャーレに分注し、終濃度 0.2, 1.0  $\mu\text{M}$  となるように調整したキチンエリシター溶液 150  $\mu\text{l}$  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°C で光子カウンター 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 600  $\mu\text{l}$  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、分光型光子カウンター 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 I 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/ $\text{cm}^2$  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/ $\text{cm}^2$  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  $\mu\text{M}$  以上で発光の増加が認められ、100  $\mu\text{M}$  では塗布 15 時間前後に 80 光子/秒/ $\text{cm}^2$  程度のピークが認められた (図 20 左)。

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 20 右)。

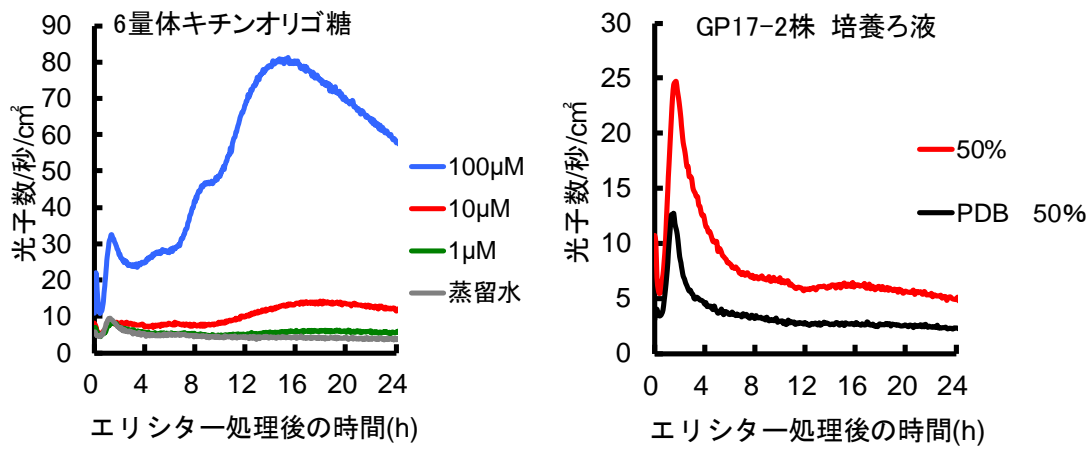


図 20 サツマイモ塊根スライスのエリシター応答発光

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  $\mu\text{l}$ /スライスで塗布し、発光を PCX-100 で 12 時間測定した。

## 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/ $\text{cm}^2$  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)。

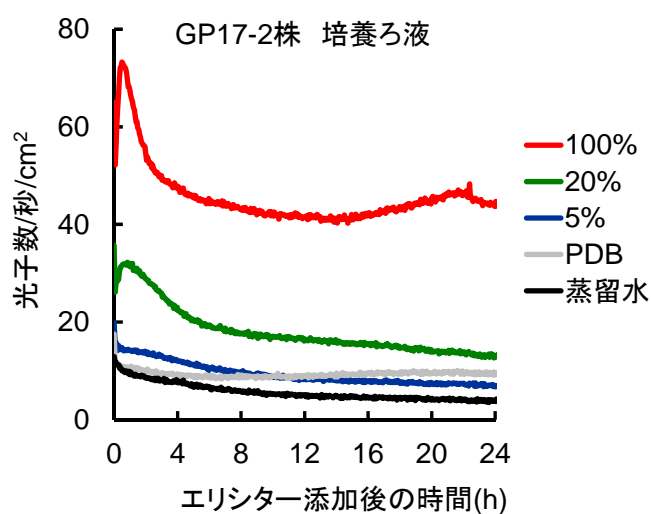


図 21 タバコリーフディスクのエリシター応答発光

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。

### 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<sup>2</sup>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、5 μM 以上の処理で溶液交換直後から発光が高まり、20 μM 処理区で蒸留水処理より 3~4 光子/秒/cm<sup>2</sup> 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)。

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/cm<sup>2</sup>まで達した (図 23 左)。

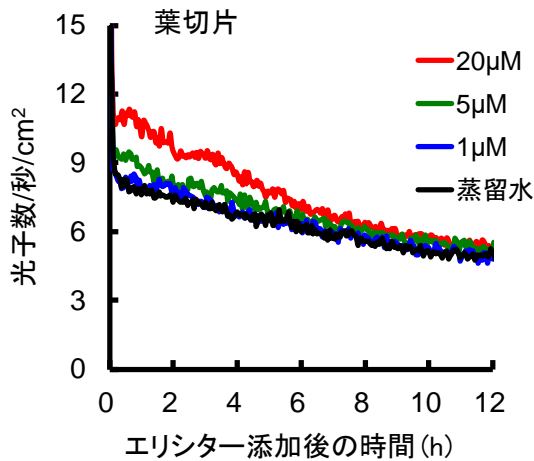


図 22 イネ葉切片の 6 量体キチンオリゴ糖応答発光

蒸留水に 1×1 cm の葉切片を浮かべて 26 °C, 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。

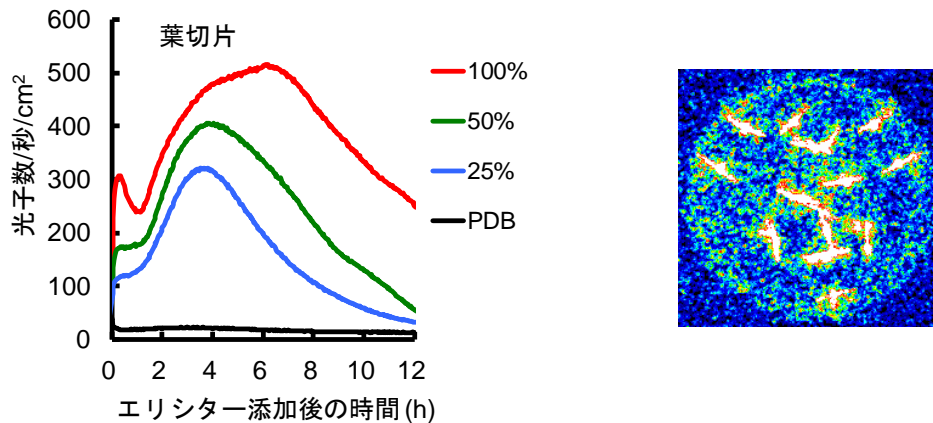


図 23 イネ葉切片の GP17-2 株培養ろ液応答発光

蒸留水に 1×1cm の葉切片を浮かべて 26°C, 12 時間暗黒下でインキュベートした後, 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。

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 23 右)。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)。

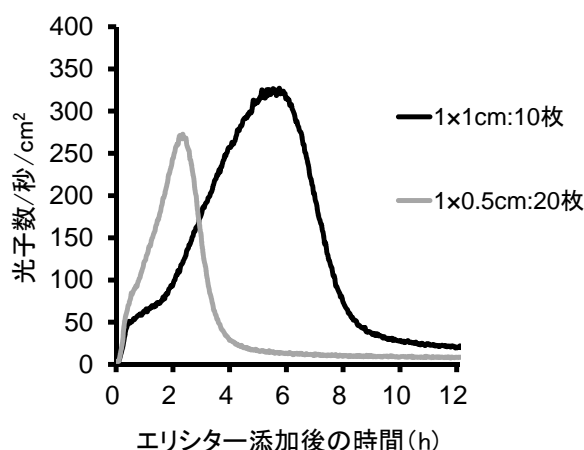


図 24 葉切片の大きさによるイネの GP17-2 株培養ろ液応答発光の違い

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°C, 12 時間暗黒下でインキュベートした後, 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。

1 cm×1 cm の葉切片 10 枚の発光強度変化に比べて, 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)。

GP17-2 株の培養ろ液に浮かべたイネ葉切片からの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 590-630nm の割合の減少と 480-590nm の割合の増加が認められ, 処理 1 時間後以降はほぼ同じ組成で推移した (図 25)。

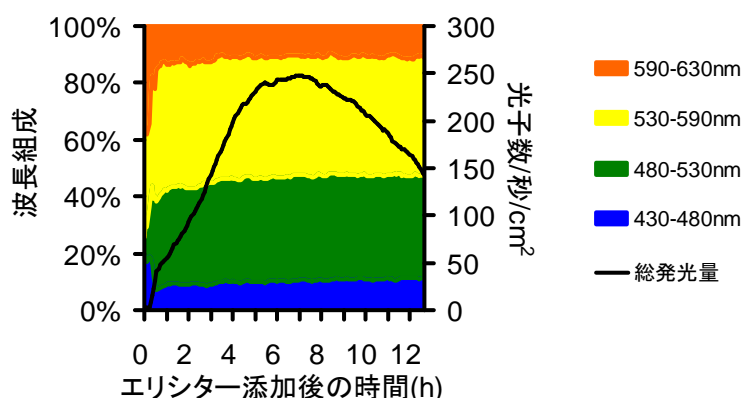


図 25 イネ葉切片の GP17-2 培養ろ液応答発光の波長組成の推移

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。

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  $\mu\text{M}$  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 26 上左)。応答発光は 0.2  $\mu\text{M}$  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 26 上右)。

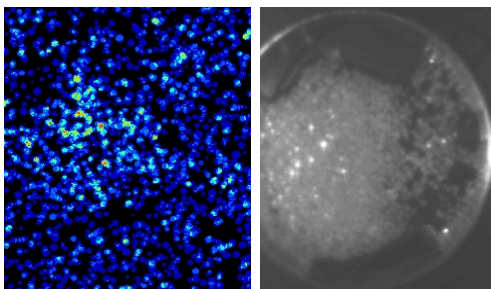
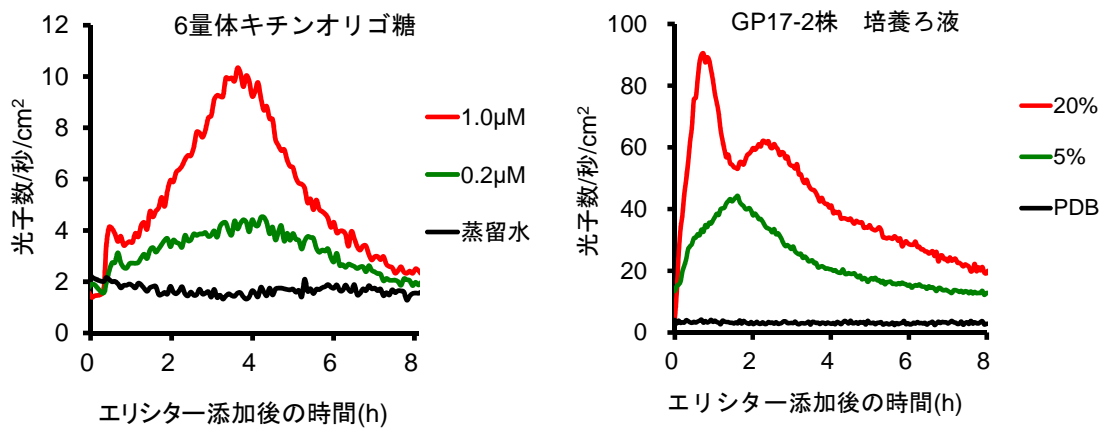


図 26 イネ培養細胞のエリシター応答発光

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  $\mu\text{M}$  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 26 下)。

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)。

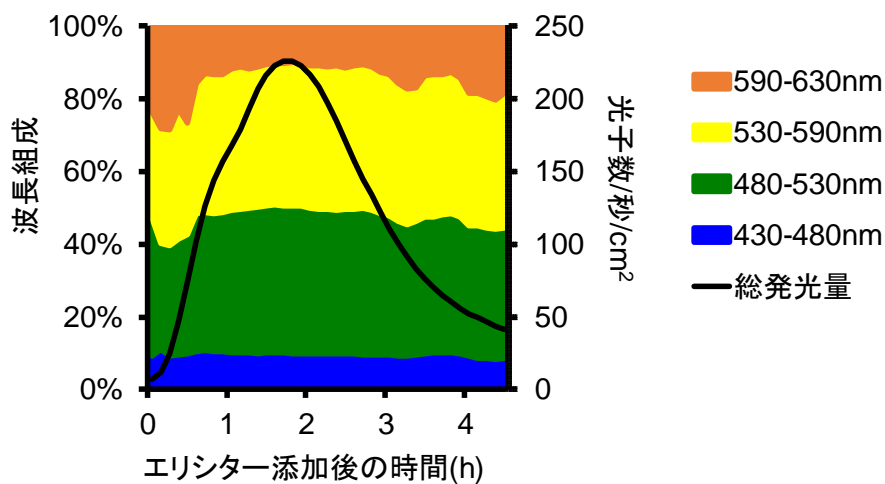


図 27 イネ培養細胞の GP17-2 培養ろ液応答発光の波長組成の推移

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

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（オキシダティブ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 ( $\text{HgCl}_2$ ) 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ォスファチジン酸（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  $Ca^{2+}$  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。



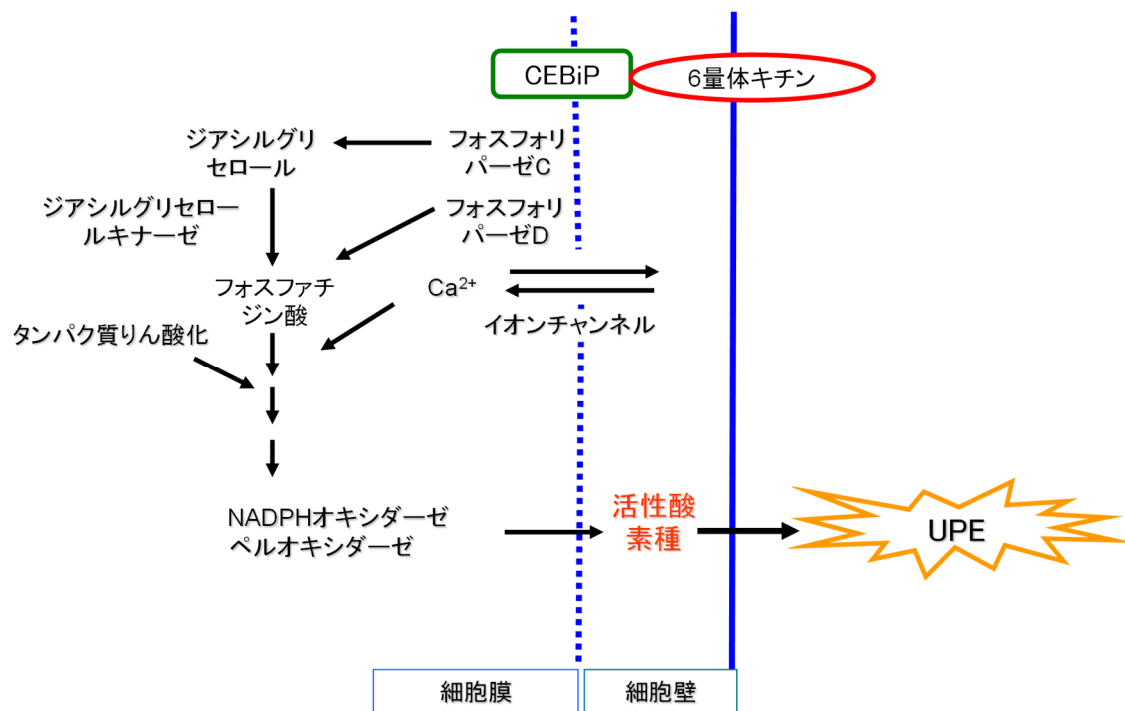


図 28 キチンエリシターの受容からエリシター応答発光の放射にいたる経路(推定)

(Kageyama *et al.* 2006 を一部改変)

## 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), Wound-induced 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 ( $\beta$ -アミノ酪酸 ( $\beta$ -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 (レポーター遺伝子アッセイ) 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 °C 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 °C、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 °C に凍結保存し、使用時に 37 °C 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: Murrler-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、培養細胞用に 1,000 倍のストック液を準備した。

## 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

### 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 °C ・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 のプラスチックシャーレ (栄研) 中の 3 ml の 20 µM ASM 溶液に浮かべ、26 °C ・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3ml入れたプラスチ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3ml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、0.5g（生鮮重量）の細胞を含む1.5mlの細胞懸濁液を直径60mmのプラスチ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。1.5mlのイネ

細胞懸濁液に，PBZ，MJ，CRP 及び ASM を 20，100 あるいは 200  $\mu\text{M}$  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  $\mu\text{M}$  PBZ で 4 時間前処理 (26 $^{\circ}\text{C}$ ・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  $^{\circ}\text{C}$  でエリシター応答発光をフoton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  $\mu\text{M}$  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 $^{\circ}\text{C}$ ，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otonカウンター PCX-100 により 26 $^{\circ}\text{C}$  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 45 mg (生鮮重量) を採取し，液体窒素中で凍結・摩砕後，RNeasy $^{\circledR}$  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 $^{\text{TM}}$  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 $^{\circledR}$  Premix Ex Taq $^{\text{TM}}$  (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°C・10 秒の後, DNA 変性 95°C・75 秒, アニール・伸長 64°C・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。

**表 5 定量的 RT-PCR に用いたプライマーセット**

| 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<br>サイズ<br>(bp) |
|----------------|-------------------------------|--------------------------------|--------------------|
| <i>Os_PAL1</i> | 5' AGGTCAACTCCGTGAACGAC 3'    | 5' AGGTCAGCCCGTTGTTGTAG 3'     | 192                |
| <i>Cht-1</i>   | 5' TACAAGCGCTACTGCGACAT 3'    | 5' CAGCCATTGTGGGCATTACT 3'     | 201                |
| <i>EL2</i>     | 5' CCTGACCTCACTGCACTTCA 3'    | 5' AGCTTGGCTTGATTGCTGAT 3'     | 227                |
| <i>PBZ1</i>    | 5' GCCGAATACGCCTAAGATGA 3'    | 5' TCACCCATTGATGAAGCAAA 3'     | 220                |
| <i>RUBQ1</i>   | 5' CCAGTAAGTCCTCAGCCATGGAG 3' | 5' GGACACAATGATTAGGGATCACTT 3' | 237                |

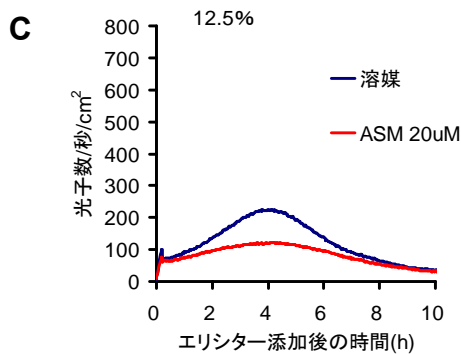
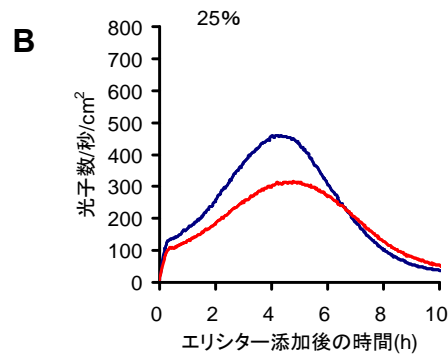
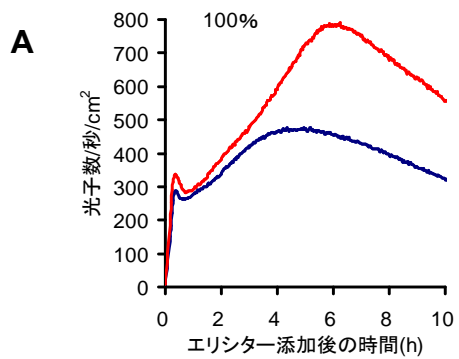


図 29 イネ葉切片の GP17-2 培養ろ液に対する濃度別応答発光と ASM 前処理の効果

イネ葉切片を ASM あるいは溶媒に浮かべて 26°C, 12 時間暗黒下でインキュベートした後、前処理液を 100%(A), 25%(B), 12.5%(C) の GP17-2 培養ろ液に置換し、溶液交換直後から発光測定を開始した。発光測定にはフotonカウンター PCX-100 を用いた。

## 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。

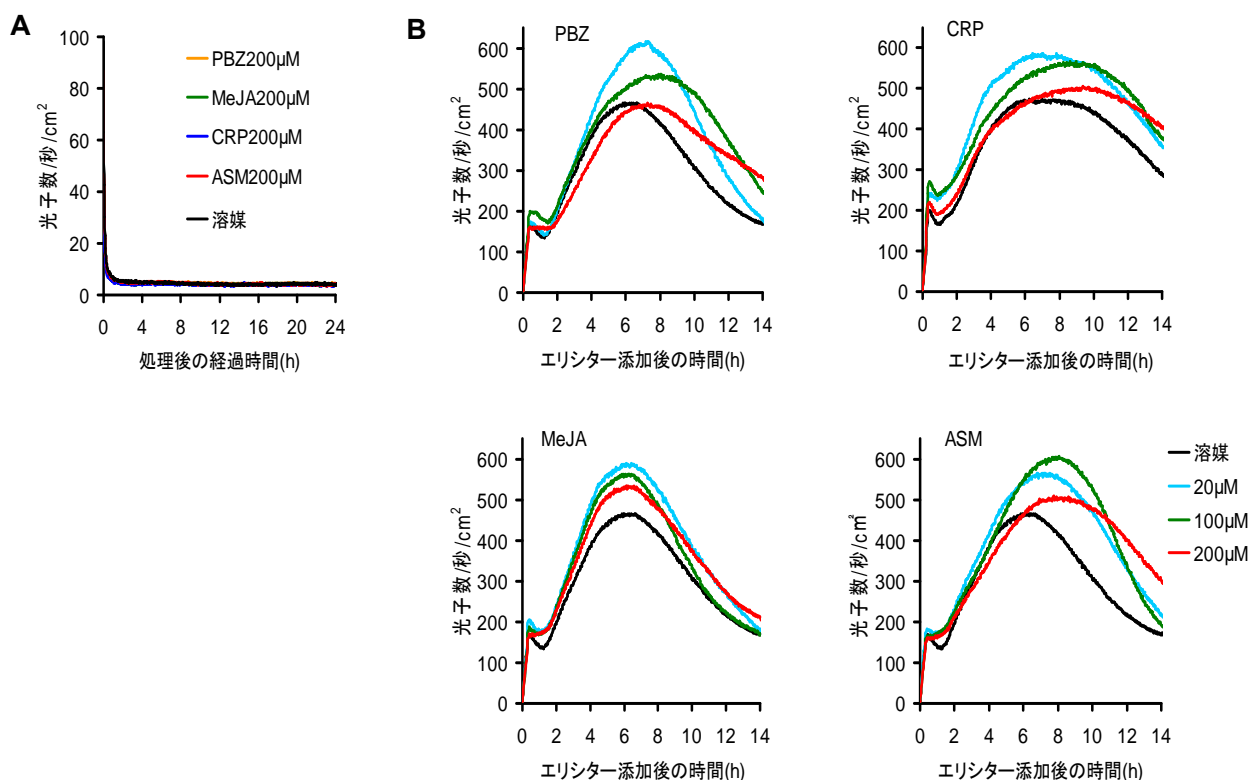


図 30 病害抵抗性誘導物質で前処理したイネ葉切片におけるエリシター応答発光の増強

- A: イネ葉切片を 200  $\mu\text{M}$  の PBZ, MJ, CRP, ASM あるいは 1% の溶媒に浮かべて、26 $^{\circ}\text{C}$ 、24 時間発光を測定した。  
 B: 20~200  $\mu\text{M}$  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 $^{\circ}\text{C}$ 、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otonカウンターPCX-100 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  $\mu\text{M}$  処理による増強が最大で、ASM では 20  $\mu\text{M}$  と 100  $\mu\text{M}$  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  $\mu\text{M}$  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  $\mu\text{M}$  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。

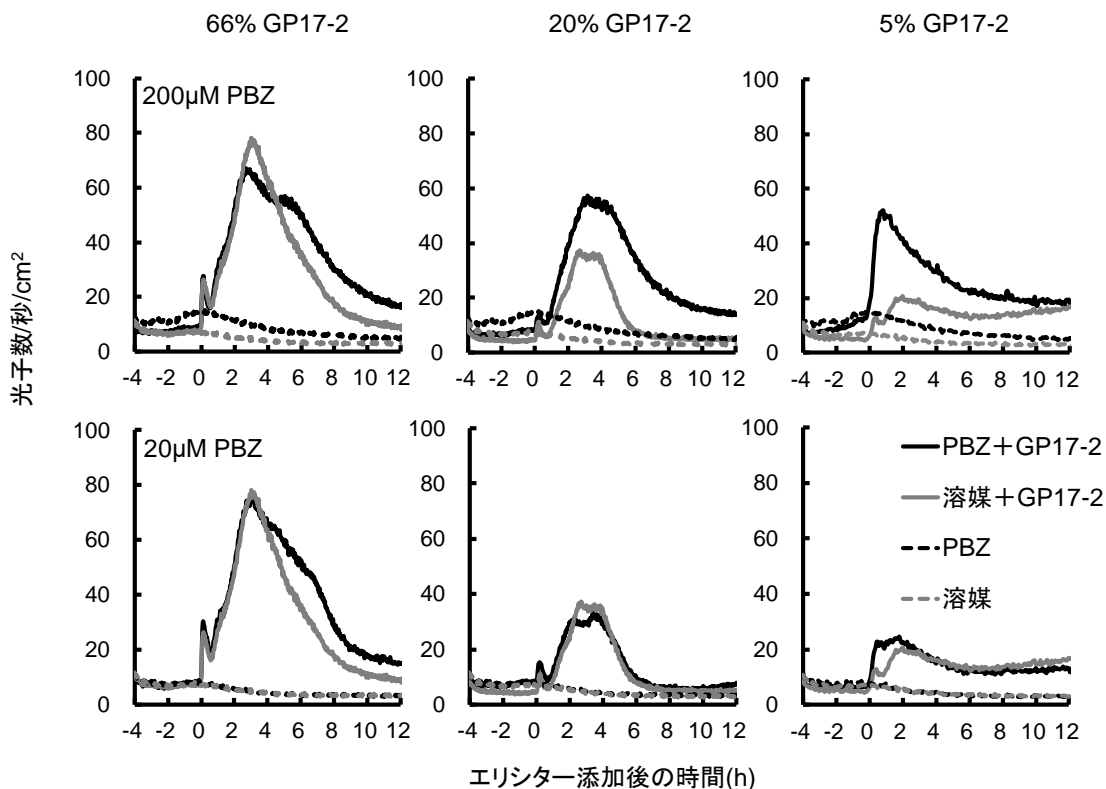


図 31 エリシター濃度とエリシター応答発光の増強

イネ培養細胞を所定濃度の PBZ 溶液 (20, 200  $\mu\text{M}$ ) 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)。

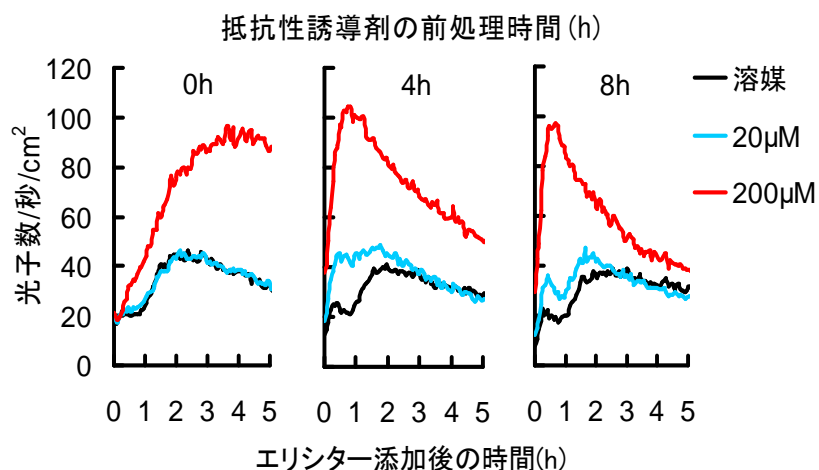


図 32 抵抗性誘導物質の前処理時間とエリシター応答発光の増強

イネ培養細胞を所定濃度の PBZ 溶液 (20, 200  $\mu\text{M}$ ) 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)。

## 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ー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  $\mu\text{M}$  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  $\mu\text{M}$ ) 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  $\mu\text{M}$  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  $\mu\text{M}$  処理で最大の増強効果が得られた。

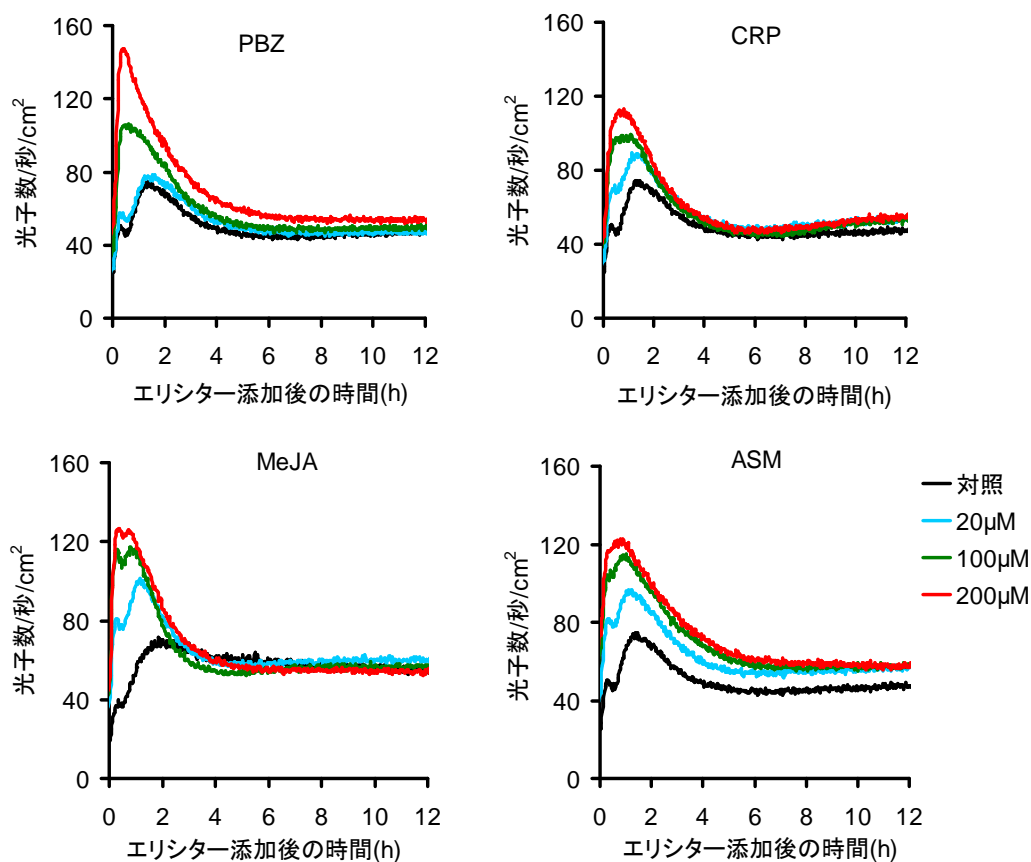


図 33 病害抵抗性誘導物質で前処理したイネ培養細胞のエリシター応答発光の増強

イネ培養細胞を所定濃度(20, 100, 200  $\mu\text{M}$ )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)。

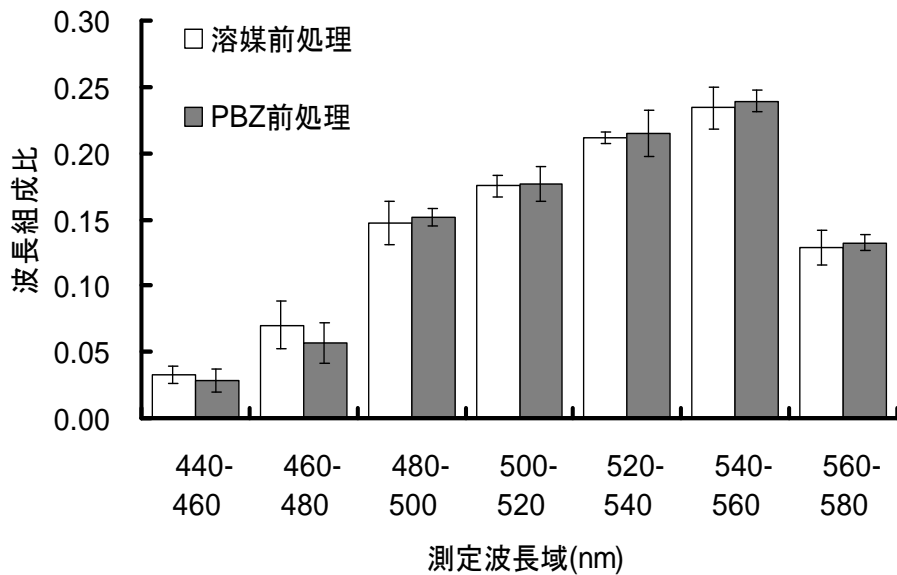


図 34 抵抗性誘導物質の前処理により増強されたエリシター応答発光の波長組成

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  $\mu$ M 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 ( $\pm$ 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)。

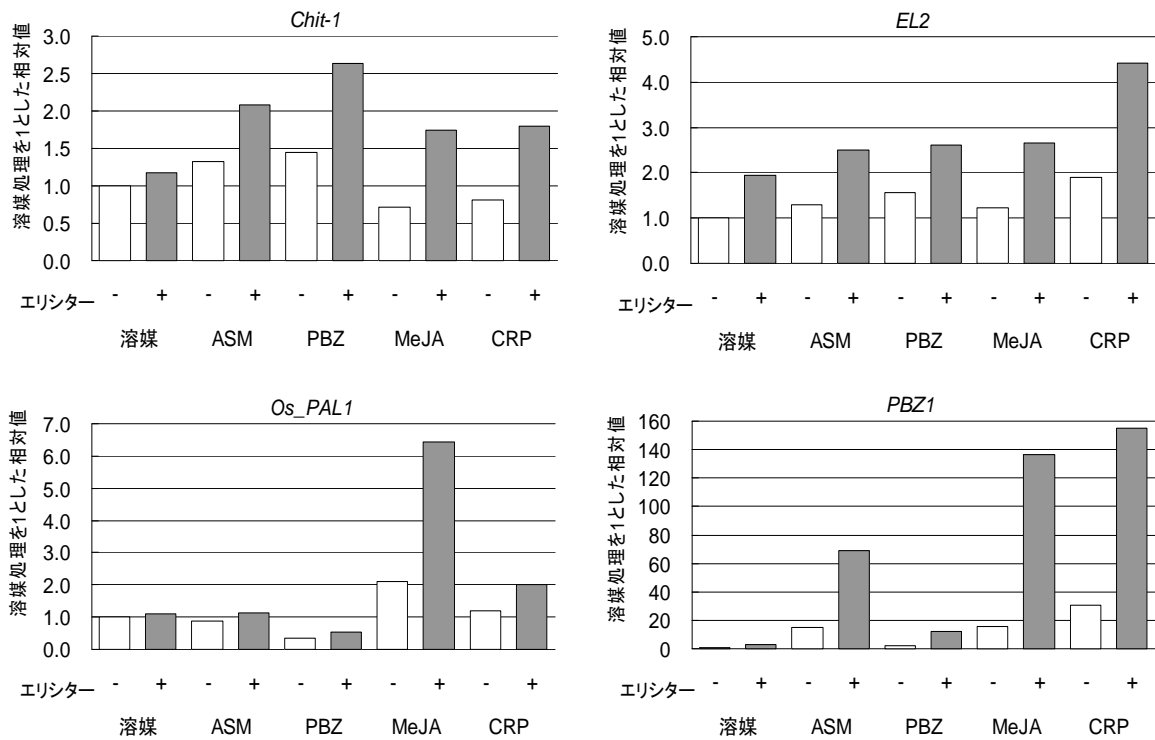


図 35 エリシター添加前(白色)及び添加後(灰色)の PR 遺伝子発現への各種病害抵抗性誘導物質前処理の影響

イネ培養細胞を 200  $\mu$ M 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。

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、*Chit-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。



## 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ができず，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，*PBZI* 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，*PBZI* 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  $\mu$ M 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）。

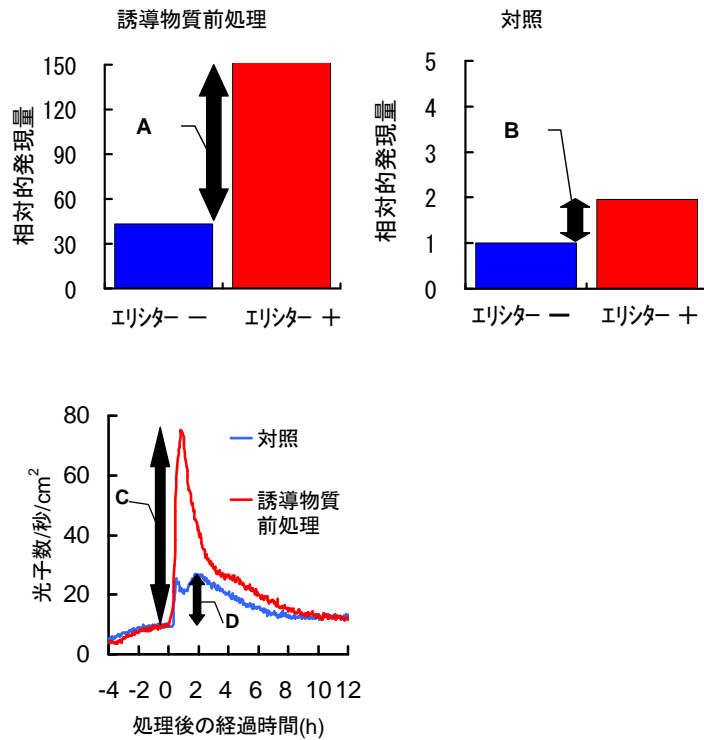


図 36 エリシター応答反応の増強程度の算出(上段:遺伝子発現, 下段:発光)

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-」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-」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。

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

| 相対的増強程度 <sup>a)</sup> と溶媒前処理におけるエリシター添加後の増加 <sup>b)</sup> |                      |            |              |             |         |
|---|----------------------|------------|--------------|-------------|---------|
| 前処理 <sup>c)</sup>   | <i>Os_PAL1</i>       | <i>EL2</i> | <i>Cht-1</i> | <i>PBZ1</i> | 極微弱発光   |
| PBZ   | 2.3 <sup>a)</sup>    | 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  | (0.09) <sup>b)</sup> | (0.93)     | (0.18)       | (2.19)      | (22.79) |

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/cm<sup>2</sup>)。

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。

### 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なく、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 20  $\mu\text{M}$  の処理で発光の増強を示したものの、100  $\mu\text{M}$  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  $\mu\text{M}$  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  $^{\circ}\text{C}$  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  $^{\circ}\text{C}$  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。

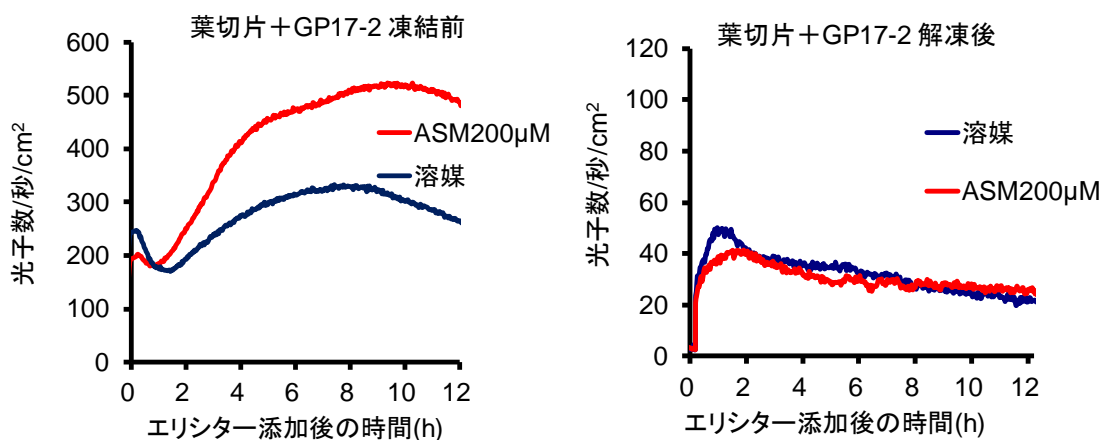


図 37 GP17-2 培養ろ液の凍結保存によるエリシター活性の低下

### 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

#### 1. 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  $\mu\text{M}$ , 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 ( $\mu\text{M}$  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 12 g を 100ml の改変 N6 液体培地 (Kuchitsu *et al.*, 1993, 表 7) で 25°C, 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 (*Triticum aestivum*) は‘ハルユタカ’HY-1 株を用い, 細胞 5 g を 100 ml のコムギ用 LS 培地 (表 7) に移し, 25°C, 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 5 g をブドウ用 LS 培

地（表 7）100 ml 中で 25 °C，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 10 g を 100 ml の 4X 培地（Gamborg *et al.*, 1968，表 7）に移し，20 °C，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。

表 7 懸濁細胞培養に用いた培地の組成

| 成分量(mg/L)   | イネ用<br>改変 N6 | コムギ用<br>改変 LS | ブドウ用<br>改変 LS | ジャガイモ用<br>4X |
|---|--------------|---------------|---------------|--------------|
| <b>無機塩類</b>   |              |               |               |              |
| (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>     | 463          |               |               | 134          |
| NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>                     |              | 1650          | 1650          |              |
| KNO <sub>3</sub>                                    | 2830         | 1900          | 1900          | 2500         |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>                     | 400          | 170           | 370           |              |
| H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>                      | 1.6          | 6.2           | 6.2           | 3            |
| MnSO <sub>4</sub> ·4H <sub>2</sub> O                | 4.4          | 22.3          | 22.3          | 10           |
| ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O                | 1.5          | 8.6           | 8.6           | 2            |
| KI  | 0.83         | 0.83          | 0.83          | 0.75         |
| Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O | 0.05         | 0.25          | 0.25          | 0.25         |
| CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O                | 0.005        | 0.025         | 0.025         | 0.025        |
| CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O                |              | 0.025         | 0.025         | 0.025        |
| CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O                | 0.005        | 440           | 440           | 150          |
| MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O                | 166          | 370           | 370           | 246          |
| FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O                | 185          | 27.8          | 27.8          |              |
| Na <sub>2</sub> -EDTA                               | 5.56         | 37.3          | 37.3          |              |
| Fe-EDTA   | 7.41         |               |               |              |
| FeNaEDTA  |              |               |               | 36.7         |
| NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O |              |               |               | 169.57       |
| <b>ビタミン類</b>  |              |               |               |              |
| 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-HCl  | 0.5          |               |               | 1            |
| チアミン-HCl  | 0.1          | 1             | 1             | 10           |
| グリシン  | 2            |               |               |              |
| <b>炭素源</b>  |              |               |               |              |
| シヨ糖   | 30000        | 30000         | 30000         | 20,000       |
| <b>ホルモン</b>   |              |               |               |              |
| 2,4-D   | 1            | 1             | 0.2           | 2            |
| NAA   |              |               |               | 0.5          |
| IAA   |              |               |               | 0.5          |
| カイネチン   |              |               |               | 0.2          |
| pH  | 5.8          | 5.8           | 5.8           | 5.6          |



### 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)、 $\beta$ -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。0.5 g (生鮮重量) の細胞を含む 1.5 ml の細胞懸濁液に、1.5  $\mu$ l 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  $\mu$ M 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  $\mu$ M の間の濃度やそれより高い 500  $\mu$ M 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中に 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。

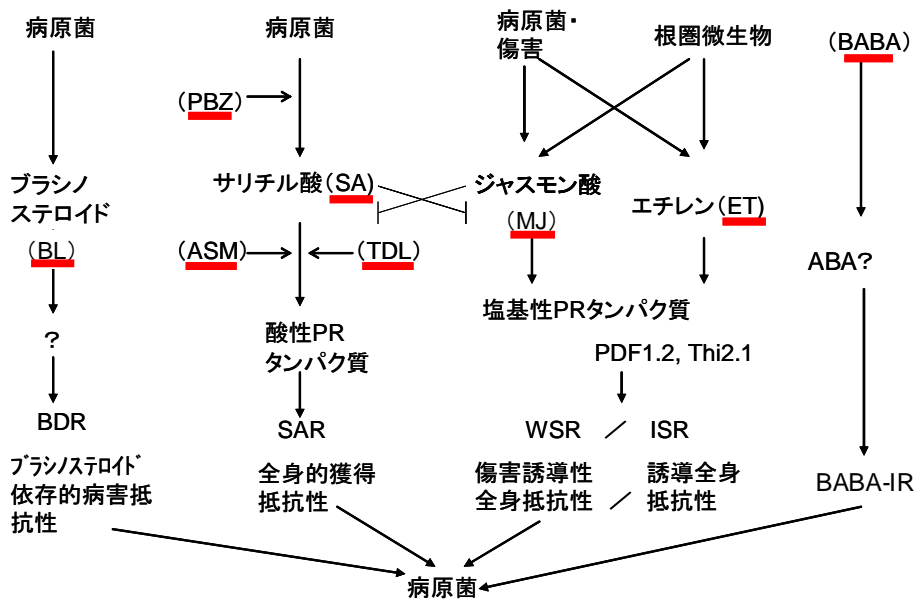


図 38 各種病害抵抗性誘導経路と関連する物質

(カッコ内は供試した物質名)

#### 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MSPC I 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、0.5 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 のプラスチックシャーレに採取し、細胞を 200  $\mu$ M ASM (ジャガイモは 20  $\mu$ M) 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。

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) |
|-------|----------------|-------------------|----------------------------|----------------------------|----------|
| コムギ   | <i>PAL2</i>    | フェニルアラニンアンモニアリアーゼ | 5' CAAGTCGATTGAGCGTGAG 3'  | 5' GCGCTCTGGACATGGTTAG 3'  | 336      |
|       | <i>ACT1</i>    | アクチン (内部標準)       | 5' CCTCATGCCATTCTTCGTTT 3' | 5' GCAGTCTCCAGCTCCTGTTC 3' | 176      |
| ブドウ   | <i>CHIT4c</i>  | クラス 4 キチナーゼ       | 5' TGCCTTGTGGTATTGGATGA 3' | 5' TTGACAGCAGCAGTGTTC 3'   | 114      |
|       | <i>Act2</i>    | アクチン (内部標準)       | 5' TCCTTCGTCTTGACCTTGCT 3' | 5' ACGGAATCTCTCAGCTCCAA 3' | 245      |
| ジャガイモ | <i>StrbohB</i> | NADPH オキシダーゼ      | 5' GTGAGCCTCCAAGTGGTGAT 3' | 5' CCAATGCCAAGGCCTACTAA 3' | 163      |
|       | <i>EF-1α</i>   | 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

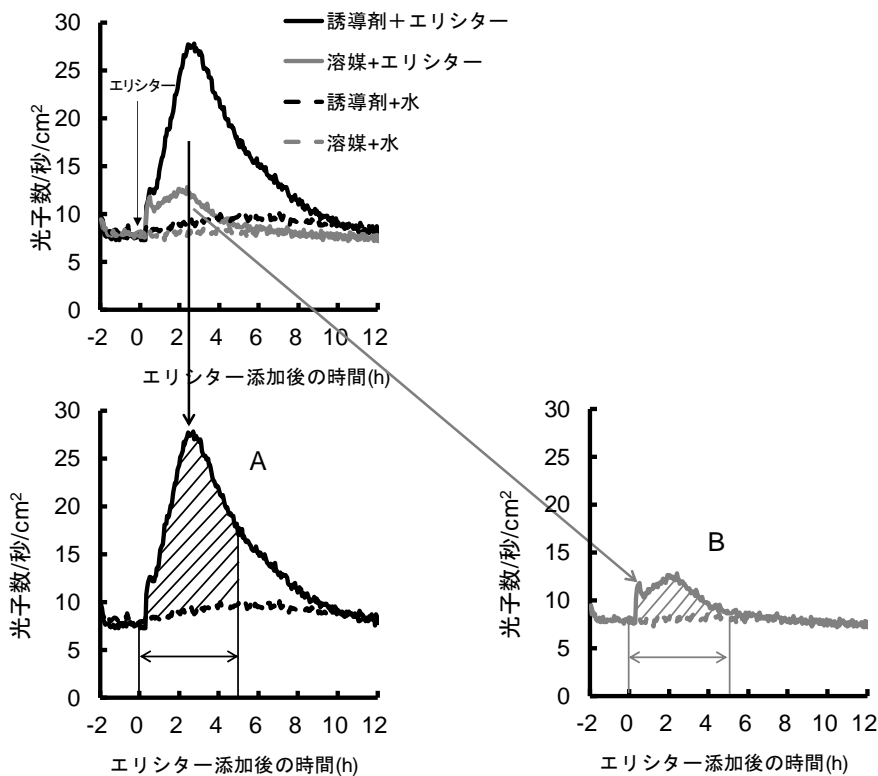


図 39 エリシター応答発光の測定と増強程度算出の方法

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)。

## 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 0.5 g の細胞を含む 1.5 ml の細胞懸濁液をプラスチ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oton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 °C で，また，その他の 3 植物は 25 °C で行った。

## 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  $\mu\text{M}$  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 左）。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 40 右），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。

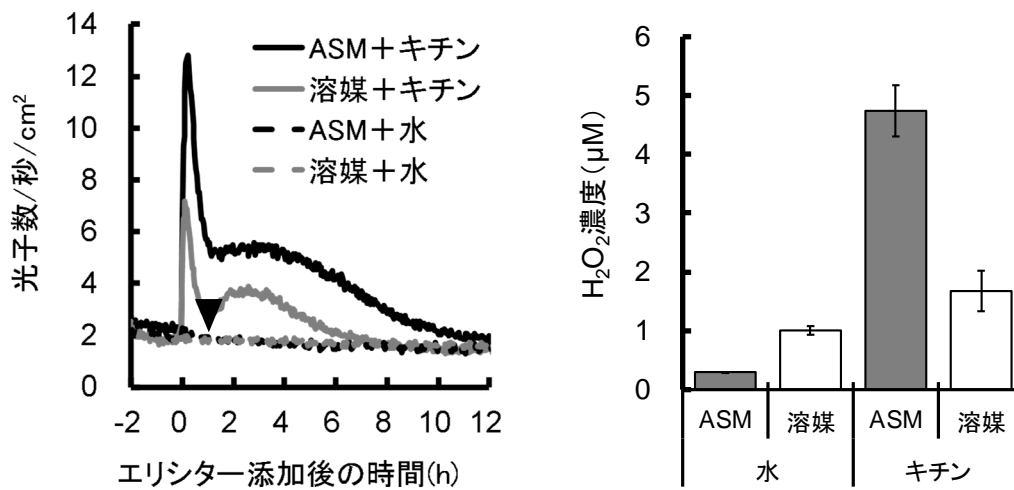


図 40 ASM のプライミング効果によるエリシター応答発光と ROS の増強(コムギ)

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。

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41左)。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41右)。

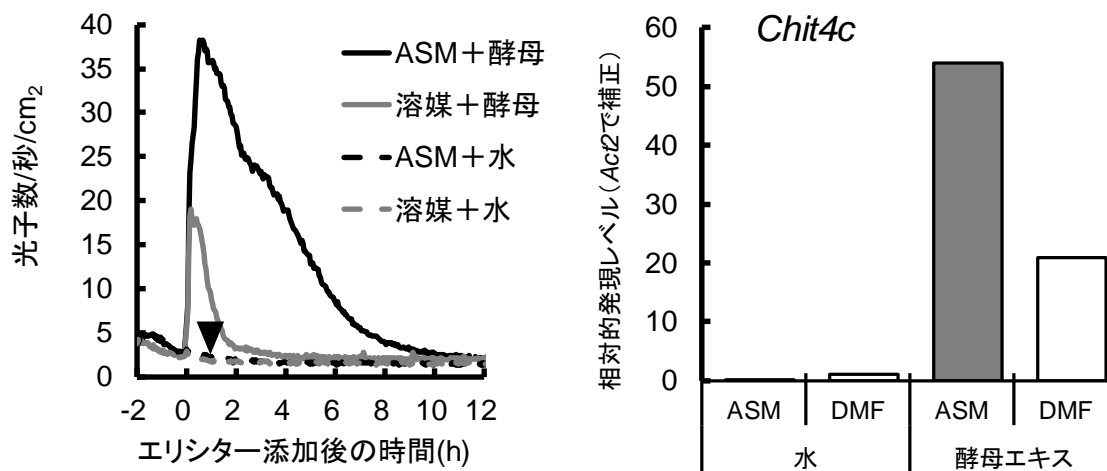


図 41 ASM のプライミング効果によるエリシター応答発光と PR 遺伝子の増強(ブドウ)

ブドウ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(キチナーゼ遺伝子: *Chit4c*)発現の増強(右)。ASM200  $\mu$ M(溶媒 0.1%DMF)で 2 時間前処理した後、エリシターとして酵母エキスを 1.0 mg/ml(対照 滅菌水)で添加。エリシター添加 1 時間後の時点(▼印)で遺伝子発現を解析した。

アラキドン酸エリシター20  $\mu$ M 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 42 左)。エリシター添加の 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 42 右)。

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。

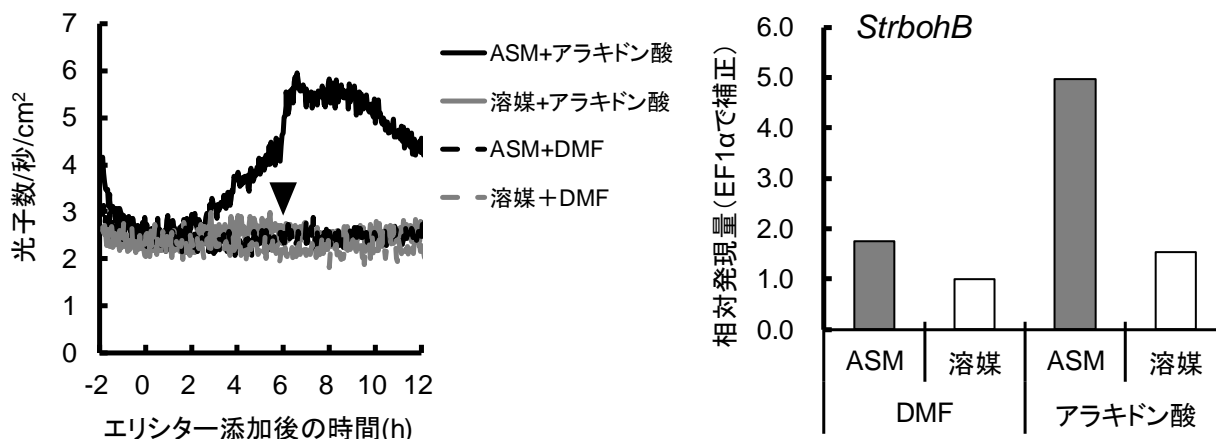


図 42 ASM のプライミング効果によるエリシター応答発光と PR 遺伝子の増強(ジャガイモ)

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: *StrbohB*)発現の増強(右)。ASM $20\ \mu\text{M}$ (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 $20\ \mu\text{M}$ (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 $200\ \mu\text{M}$ 処理で発光の抑制が認められたが、 $20\ \mu\text{M}$ で良好な増強を示した。一方、WSR/ISR 経路に作用する MJ は、 $200\ \mu\text{M}$ 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 $200\sim 20\ \mu\text{M}$ 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、 $10\ \text{ppm}\cdot 24$ 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、 $200\ \mu\text{M}$ 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  $\mu\text{M}$  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)。

**表 9 各種抵抗性誘導物質の前処理 (2 h・200  $\mu\text{M}$ ) によるエリシター応答発光の変動**

| 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 <sub>(20 <math>\mu\text{M}</math>)</sub>  | 5.6 |
| SA   | SAR       | 3.7   | 3.1  | 1.7 <sub>(20 <math>\mu\text{M}</math>)</sub>  | 1.8 |
| TDL  | SAR       | 5.1   | 2.1  | 2.3 <sub>(20 <math>\mu\text{M}</math>)</sub>  | 2.2 |
| PBZ  | SAR       | 12.5  | 4.4  | 2.0 <sub>(20 <math>\mu\text{M}</math>)</sub>  | 4.2 |
| MJ   | WSR/ISR   | 2.8   | 1.3 <sub>(66.7 <math>\mu\text{M}</math>)</sub> | 3.0 <sub>(50 <math>\mu\text{M}</math>)</sub>  | 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 <sub>(500 <math>\mu\text{M}</math>)</sub> | 1.1  | 1.5 <sub>(500 <math>\mu\text{M}</math>)</sub> | 1.0 |

- ・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  $\mu\text{M}$  以外の場合は表中 ( $X \mu\text{M}$ ) 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  $\mu\text{M}$ , ジャガイモ: アラキドン酸 20  $\mu\text{M}$ , 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。



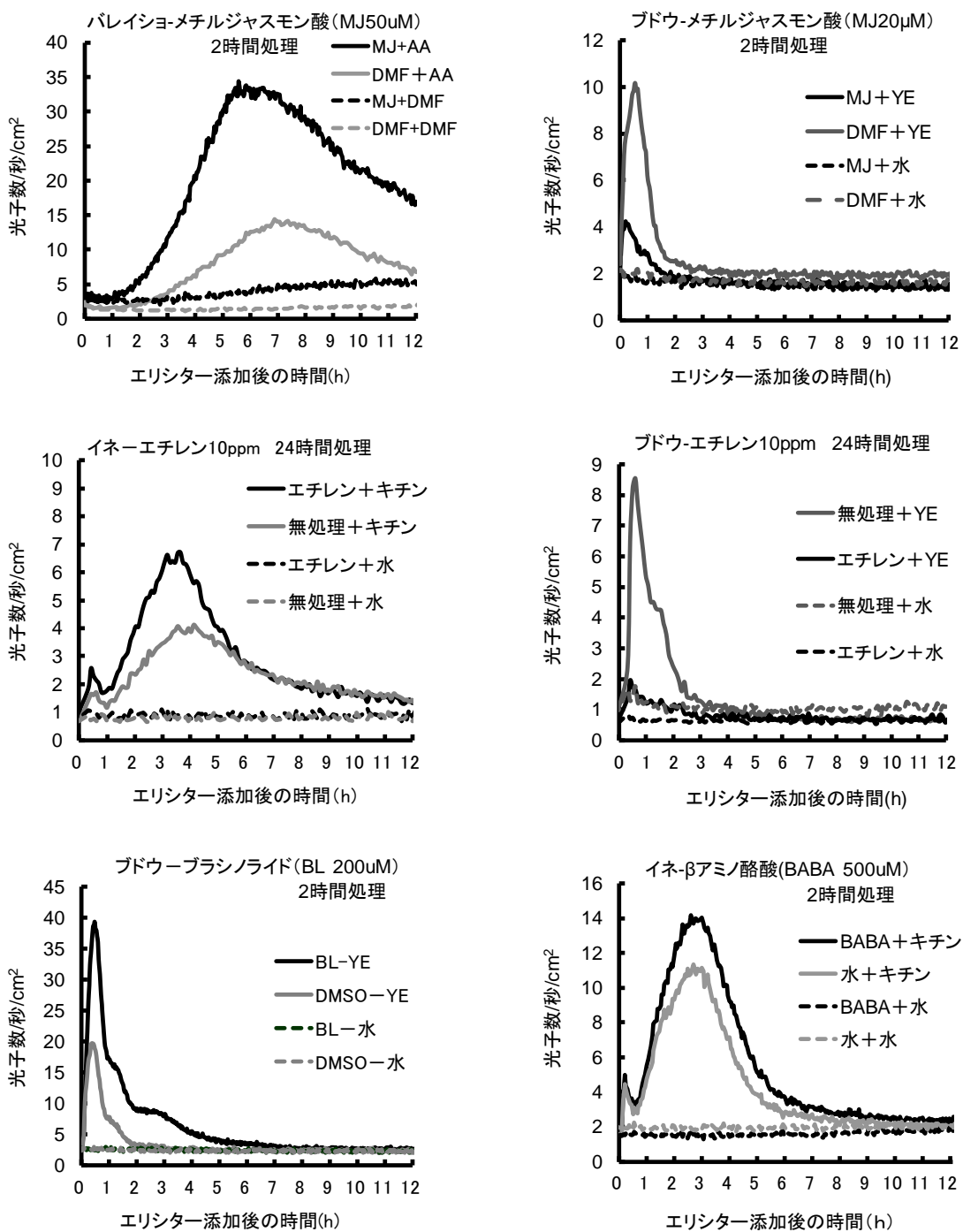


図 43 各種病害抵抗性誘導物質の前処理によるエリシター応答発光の変動(抜粋)

### 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）。

表10 病害抵抗性誘導物質の処理方法

| 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 | 200 $\mu$ M 以下 | 2時間以上 |
| WSR/ISR(MJ) | 有機溶媒希釈 | 200 $\mu$ M 以下 | 2時間以上 |
| WSR/ISR(ET) | ガス     | 10ppm          | ～24時間 |
| BDR         | 有機溶媒希釈 | 200 $\mu$ M 以上 | 2時間以上 |
| BABA-IR     | 水希釈    | 500 $\mu$ M 以上 | 2時間以上 |

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，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 *N,N'*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’ 2.5 g を含む培養物 5.94 ml を  $\phi$ 60 mm のプラスチックシャーレ（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  $\mu$ l 添加・混合し，その 2 時間後にエリシターとして 4~20  $\mu$ M の 6 量体キチンオリゴ糖（生化学工業）300  $\mu$ l を添加して（終濃度 0.2~1  $\mu$ M），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ズラル-S-メチル（ASM：和光純薬）200  $\mu$ M 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  $\mu\text{M}$  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  $\mu\text{M}$  でキチンを添加した。

### 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稻育苗用土（くみあい宇部粒状培土, JA 全農）を詰め、湛水後、1.5 葉期の水稻品種‘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 300 g 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）の分生孢子懸濁液（ $1 \times 10^6$  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  $^{\circ}\text{C}$ ・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*）の分生孢子懸濁液（ $1 \times 10^6$  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。

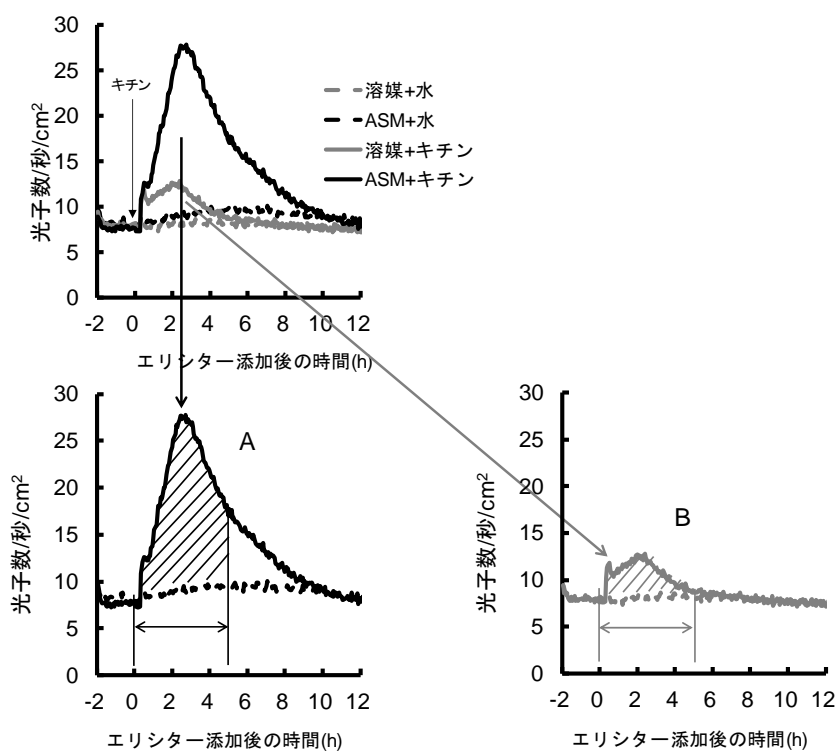


図 44 キチンエリシター応答発光の増強程度の算出

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  $\mu\text{M}$  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。

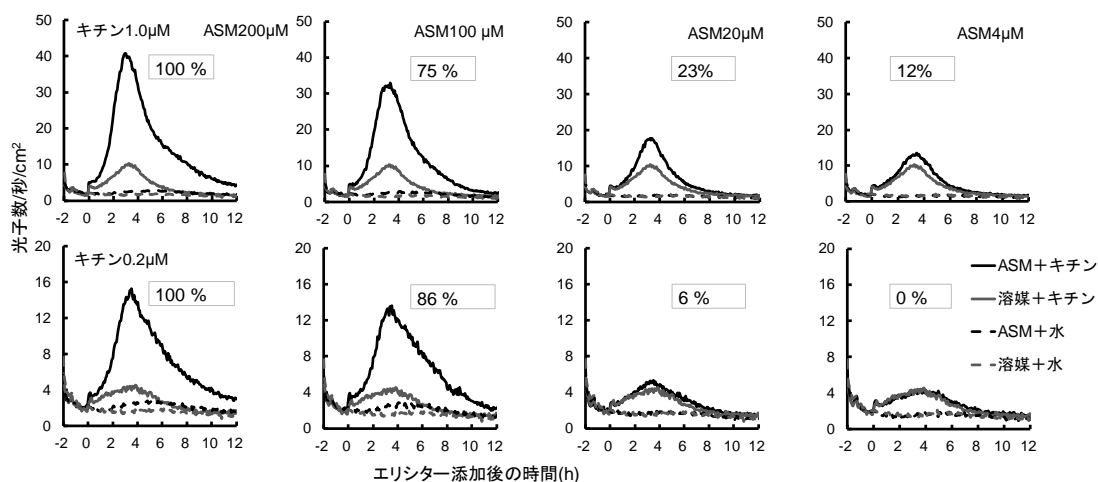


図 45 エリシター処理濃度によるプライミング検出力の違い

図 44 の方法により 1.0  $\mu\text{M}$  と 0.2  $\mu\text{M}$  のキチンエリシター処理で 200~4  $\mu\text{M}$  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  $\mu\text{M}$  処理に対する発光増加の割合 (%) を示す。

## 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。

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 A グループ | 1006   | 456  | 45.33  |
| 化合物群 B グループ | 7941   | 1853 | 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(いもち病)  | 117    | 48  | 5      |
| キュウリ(炭疽病) | 1853   | 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。



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。



### 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  $\mu\text{M}$  の ASM でイネ培養細胞を前処理した場合、0.1~10  $\mu\text{M}$  の 6 量体キチンオリゴ糖エリシターでは、0.1  $\mu\text{M}$  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  $\mu\text{M}$  の ASM で細胞を前処理した場合の 0.2 及び 1.0  $\mu\text{M}$  のキチンエリシター応答発光増強を比較したところ、1  $\mu\text{M}$  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  $\mu\text{M}$  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、レポーター遺伝子アッセイは、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)。レポーター遺伝子アッセイでは、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ピン (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。

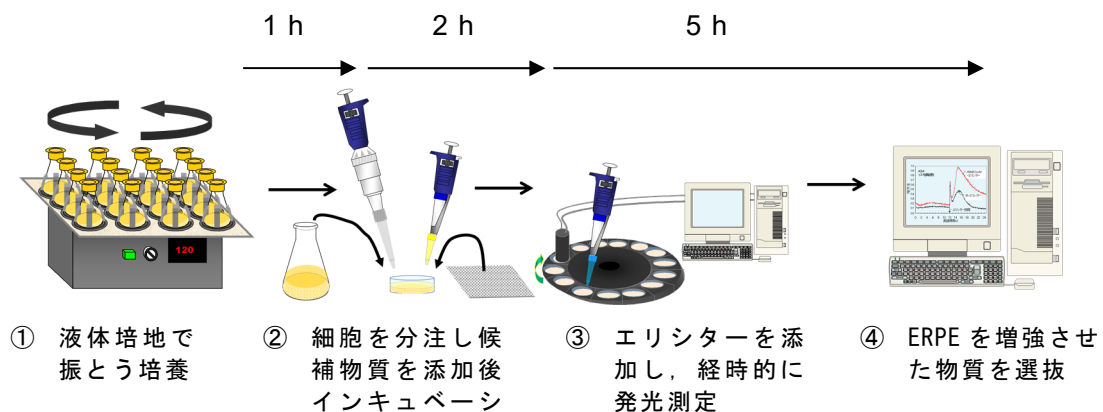


図 47 作成したプライミング活性化合物選抜方法

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。

## 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°C, 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 のプラスチックシャーレ (イワキ) に分注した。

#### 2) RNAi による *OsWRKY45* 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 resistance: 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'-GGACACGGGCCGGGTAAAACGATCGAAA  
GAAGATGGATTCCACGCGTGTGTACAGAAATAATTAGCGGCAGCGCGGATCTTAAT  
TTGGAACCTTGCAAAGATACTCCTAATTAGCCTGGCTAGATTAGTTTGTAATTCCTT  
GTTGATGTGTCGTCTCAGCTTTAAGCTGCAGACATGCTAGCAAGTAACAACACGAT  
TAGTACGTAGTAATGTGGTTCTTGATTATGAGCTGGGGGTCTTAACCTTTTTTGTGT  
GACAAGCAAGAGAAGAGGATTTGGGTACAATGTAATCCTGTTCTTCCGCTTTCGA-  
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'-  
CACCGGACACGGGCCGGGTAAAACGATCGAAAAGA-3'及び reverse 5'-TCGAAAGCG  
GAAGAACAGGATTACATTGTACCCA-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 *NruI* 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 バッファー（pH8.0）で 8 µl に調整した  
後、2 µl の LR clonase enzyme mix II（サーモフィッシャーサイエンティフィック）  
を加えて 25 °C、一晚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。

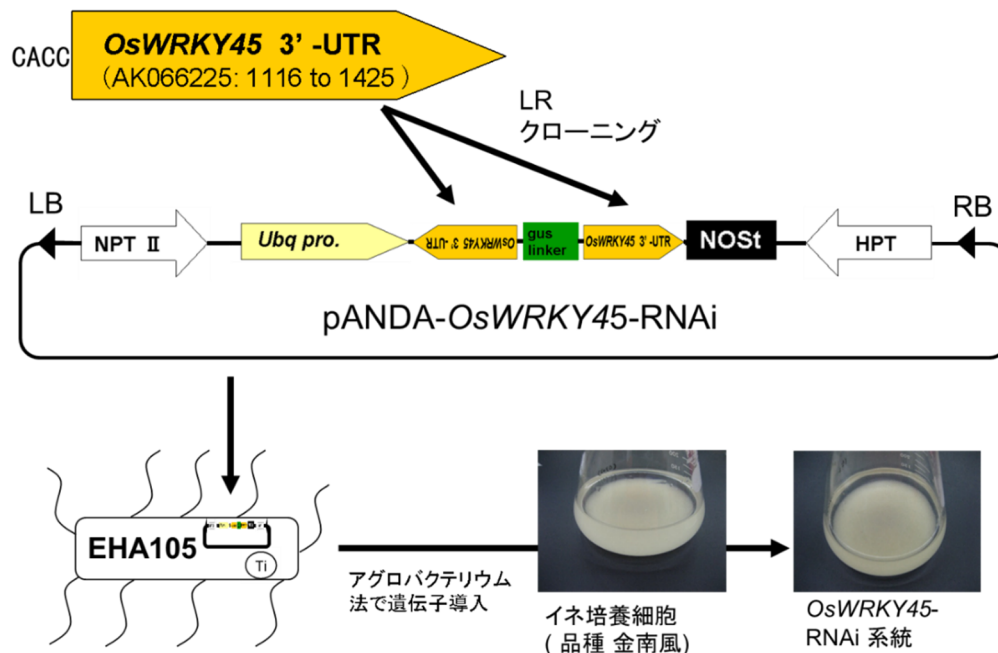


図 48 イネ培養細胞 OsWRKY45-RNAi 系統の作出

## 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 OD<sub>600</sub>=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 °C・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 °C・暗所で 7 日間除菌を行い、その後は 12 日ごとに 15 g 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。

表 13 形質転換に使用した培地

| AB培地(1L:DW)   |           |
|---|-----------|
| K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>                     | 3g        |
| NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O | 1.3g      |
| NH <sub>4</sub> Cl                                  | 1g        |
| KCl   | 150mg     |
| CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O                | 10mg      |
| FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O                | 2.5mg     |
| Glucose   | 5g        |
| pH  | 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 <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O溶液           | 1.2ml     |

| AA培地(1L:DW)    |           | AAストック(各100ml:DW) |   |         |
|----------------|-----------|-------------------|---|---------|
| AA-1(×1,000)   | 1ml       | AA-1(×1,000)      | MnSO <sub>4</sub> ·6H <sub>2</sub> O                | 1,000mg |
| AA-2(×1,000)   | 1ml       |                   | H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>                      | 300mg   |
| AA-3(×1,000)   | 1ml       |                   | ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O                | 200mg   |
| AA-4(×1,000)   | 1ml       |                   | Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O | 25mg    |
| AA-5(×1,000)   | 1ml       |                   | CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O                | 2.5mg   |
| AA-6(×1,000)   | 1ml       |                   | CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O                | 2.5mg   |
| AA-7(×100)     | 10ml      |                   | KI  | 75mg    |
| AA-8(×50)      | 20ml      | AA-2(×1,000)      | CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O                | 15g     |
| Casamino acids | 0.5g      | AA-3(×1,000)      | ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O                | 25g     |
| Sucrose        | 68.5g     | AA-4(×1,000)      | Fe-EDTA   | 4g      |
| Glucose        | 36g       | AA-5(×1,000)      | NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O | 15g     |
| L-Glutamine    | 0.9g      | AA-6(×1,000)      | Nicotinic acid                                      | 100mg   |
| Aspartic acid  | 0.3g      |                   | Thiamine-HCl  | 1000mg  |
|                |           |                   | Pyridoxine-HCl                                      | 100mg   |
|                |           |                   | Myo-inocitol  | 10g     |
| pH             | 5.2       | AA-7(×100)        | L-Arginine  | 1,767mg |
| オートクレーヴ        | 121°C・15分 |                   | Glycine   | 75mg    |
|                |           | AA-8(×50)         | KCl   | 15g     |
|                |           |                   | 保存  | 4°C     |

### 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、アシベンズラル 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 *N,N'*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  $\mu$ M ストックを作成し, 終濃度で 1  $\mu$ 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 60 mm のプラスチックシャーレ (栄研) に, 培養 10 日目のイネ培養細胞 0.5 g (生鮮重量) と液体培地 1 ml 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  $^{\circ}$ C  $\cdot$  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 Quantitect Reverse Transcription Kit (サーモフィッ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 Taq (タカラバイオ) により、Mx3000-P (アジレント) を用いて 95 °C・5 秒、64 °C・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'-GAACGACGAGGTTGTCTTCG-3' 及び reverse 5'-ACGCGTGGAATCCATCTTCT-3', *RUBQ1* には、forward 5'-CCAGTAAGTCCTCAGCCATGGAG-3' 及び reverse 5'-GGACACAATGATTAGGGATCACTT-3' を使用した。

## 2. 結果

### 1) *OsWRKY45* 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 (*Ubiq1*) の発現で違いは認められなかった (図 49, 図 50 A)。

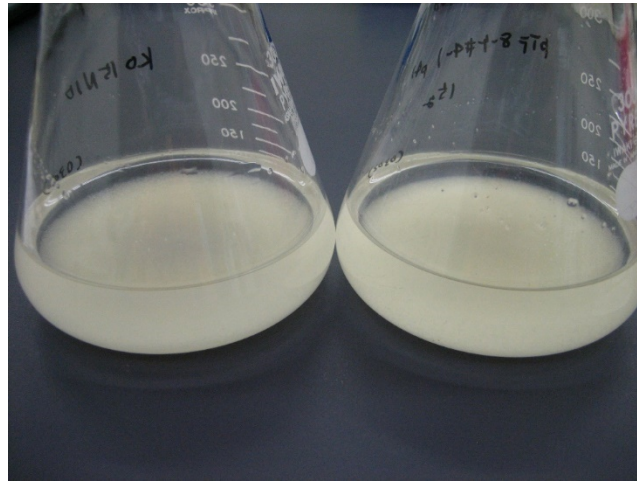


図 49 培養 10 日目の金南風(左)と *OsWRKY45-RNAi* 系統(右)

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 %)。

1  $\mu$ M 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)。*OsWRKY45-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 50 B 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#1 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。

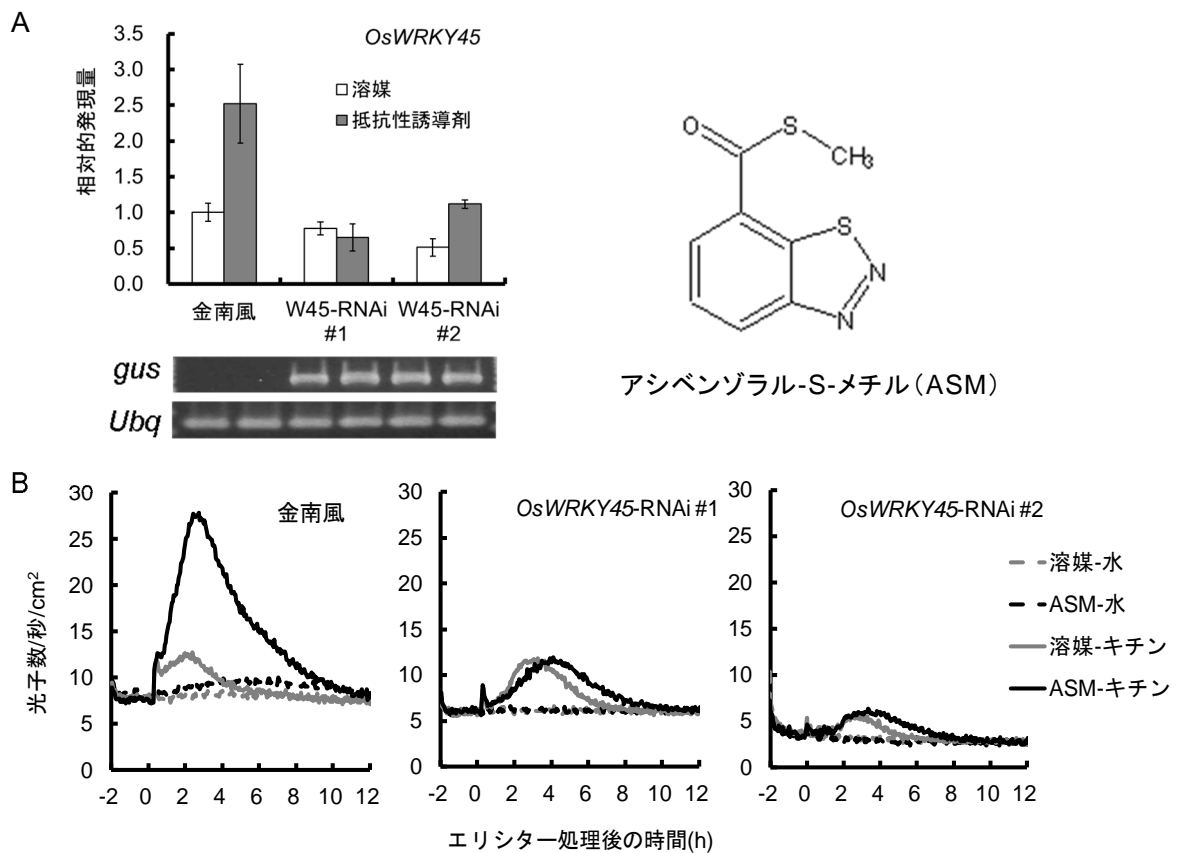


図 50 *OsWRKY45* ノックダウンによる ASM 誘導性キチンエリシター応答発光増強の抑制

(A) 金南風の野生系統と *OsWRKY45*-RNAi 系統はそれぞれ 200  $\mu$ M 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 のトリガー二本鎖 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。

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。

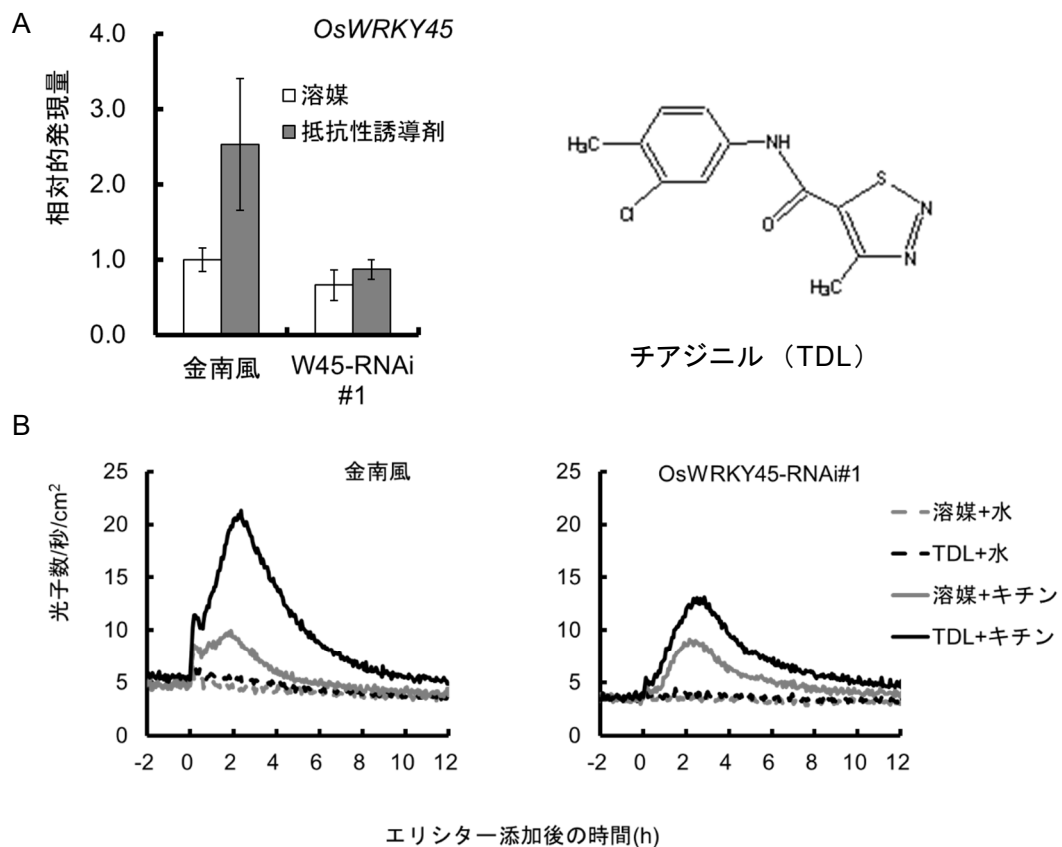


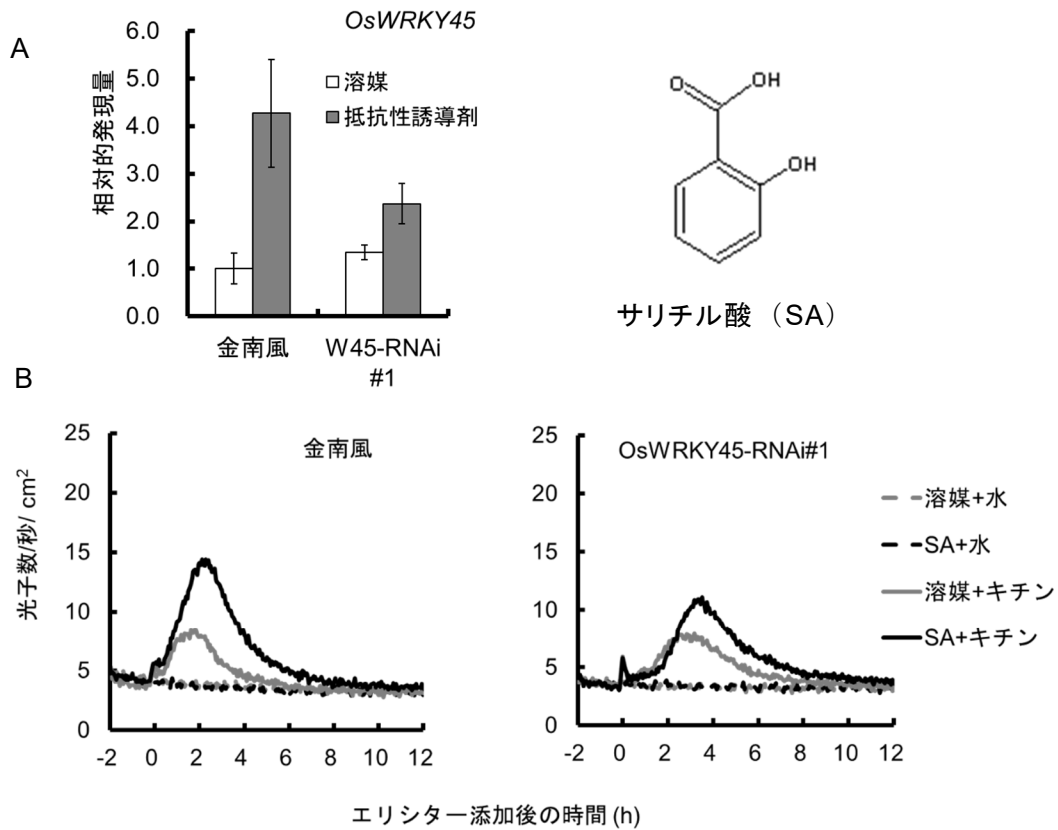
図 51 *OsWRKY45* ノックダウンによる TDL 誘導性キチンエリシター応答発光増強の抑制

(A) 金南風の野生系統と *OsWRKY45*-RNAi 系統はそれぞれ 200  $\mu$ M 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。

## 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

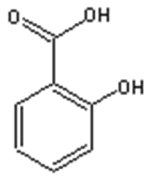
ASMとTDLは、SAの機能的アナログであり、SAが関与する病害抵抗性シグナル伝達経路の下流に作用し、双子葉植物において、SARを誘導する (Lawton *et al.*, 1996; Yasuda *et al.*, 2006)。長い間、イネにおいては、健全葉に定常的にSAが蓄積していることから、抵抗性誘導におけるSAの関与は明らかでなかった (Yang *et al.*, 2004)。しかしながら、Shimono *et al.* (2007) が、イネにおいて、SA処理が *OsWRKY45* 遺伝子発現を増加させること、そして、Iwai *et al.* (2007) は、8葉期の生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52 A ; 灰色カラム)。*OsWRKY45-RNAi#1* 系統での *OsWRKY45* 遺伝子の発現割合は金南風に対して55.4%であった。図52 B に示すように、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。

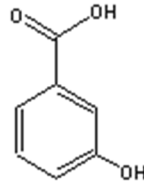


**図 52 *OsWRKY45* ノックダウンによる SA 誘導性キチンエリシター応答発光増強の抑制**

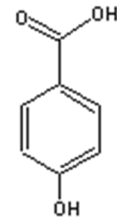
(A) 金南風の野生系統と *OsWRKY45*-RNAi 系統はそれぞれ 200  $\mu$ M の SA (灰色のカラム)もしくは溶媒(白色のカラム)で前処理した。前処理開始から2時間後, キチン添加の直前に, 生重量 50 mg の細胞を採取し, *OsWRKY45* 及び *Ubq1* 遺伝子発現量を定量的 RT-PCR により解析した。グラフ中の縦棒は標準偏差。(B)エリシター応答発光測定は前処理開始直後(-2 h)から開始し, エリシター添加のため一時停止(0 h)した後に再開し, その後12時間継続した。グラフの値は, 3回の試験の平均値を示す。



サリチル酸 (2-HBA)



3-HBA



4-HBA

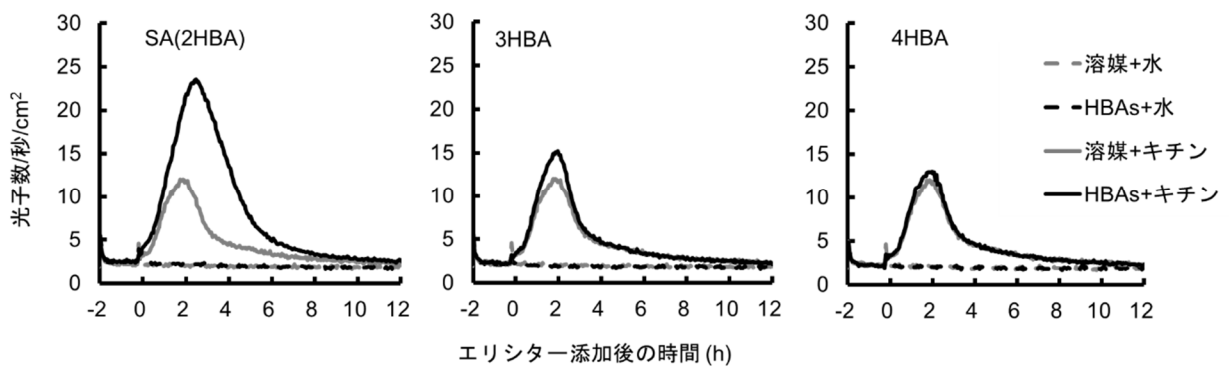


図 53 イネ培養細胞におけるキチンエリシター応答発光の増強で認められた SA の異性体効果

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。

### 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、これまでにフォスホオリパーゼ 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二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。

## 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 I 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 I 章第 4 節で述べた発光メカニズムの解析結果 (Kageyama *et al.*, 2006; Kageyama *et al.*, 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、「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。

### 3. 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、フォスホリパーゼ D (PLD) によるフォスファチジン酸 (PA) 生成が、生物的/非生物学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、様々な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。

#### 4. 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、ネガティブ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ブにクロストークすることもある (cross-tolerance : 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 Pospíšil, 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 要

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つて以来、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“エリクター応答発光（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。

### 1. 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/cm<sup>2</sup>) 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/cm<sup>2</sup>) は病原菌を接種した場合 (300 光子数/秒/cm<sup>2</sup>) に比べて低く、菌糸の成育は停止した。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  $\mu\text{M}$  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),  $\beta$  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がった。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。野生型の細胞においては, 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 by-products 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 resistanse 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 response-related 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/cm<sup>2</sup>) 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/cm<sup>2</sup>) than a pathogen (300 cps/cm<sup>2</sup>) 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 analyzed. 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  $\mu$ M) of chitin hexamer, too.

## **2. Development of priming detection system based on the potentiation of elicitor-responsive 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 elicitor-responsive 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),  $\beta$ -aminobutyric acid induced resistance (BABA-IR), and brassinosteroid-dependent 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 signaling-disruption 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 plants was developed in this study. This non-invasive analysis might develop as a versatile stress response analyzer when it is built in “multi-omics” 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oton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、高垣真喜一氏、古瀬勝美氏ならびに、日本曹達株式会社の佐野慎亮博士、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- $\beta$ -D-glucuronide, the primary emitter of low level chemiluminescence in plasma of hemodialysis patients. *Clin. Chem.* 40: 1580-1586.
- Agatsuma, S., Nagoshi, T., Kobayashi, M., Usa, M., Watanabe, H., Sekino, H. and Inaba, H. (1992). Hydroxyl radical-induced 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 synthesis 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.
- Belousov, 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 bio-chemiluminescence and singlet 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, 2,6-dichloroisonicotinic 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<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 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.
- Hermes, 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 system of extra-weak chemi- and bioluminescence for biochemical applications. *Photochem. 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., Iyoyumi, H and Nukui, H. (2008). Difference in ultraweak photon emissions between sulfonylurea-resistant and sulfonylurea-susceptible biotypes of *Scirpus juncooides* 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., Mitsuhashi, 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  $\beta$ -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*-acetylchitoooligosaccharide 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-Tomiya, 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 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. 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). バイオフィ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 counting imaging and spatiotemporal characterization of ultraweak photon emission from 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 growth-promoting 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). *N*-acetylchitooligosaccharides, 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). H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 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.
- Mauch, F., Mauch-Mani, B. and Boller, T. (1988). Antifungal Hydrolases in Pea Tissue II. Inhibition of fungal growth by combinations of chitinase and  $\beta$ -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). Jasmonate-induced 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 concentration-specific 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., Shimon, 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 immune-induction 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., Mitsuhashi, 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 stress-induced 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). Ceratoplatenin, 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 Métraux, 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 non-fungicidal 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-1,1-dioxide (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』 土壤施肥編 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 acid-mediated 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  $\beta$ -aminobutyric acid. *PNAS* 97: 12920-12925.