

論文の内容の要旨

論文題名

植物のエリシター応答発光の発見とプライミング検出技術への応用に関する研究

氏名 伊代住 浩幸

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“エリシター応答発光（ERPEs）”を発見した。さらに、ERPEsの増強に基づき化合物のプライミング活性を評価する、新しい「プライミング検出システム」を開発した。

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/cm²）が観察された。一方、つる割病菌もしくは非病原性フザリウム菌を接種したサツマイモ貯蔵根のスライスでは、長時間持続し、強いUPEが観察された。UPEは接種の1～2時間後から増加し始め、14～18時間後にピークを迎え、1日以上強い発光が続いた。非病原性菌を接種した場合の最大発光量（200光子数/秒/cm²）は病原菌を接種した場合（300光子数/秒/cm²）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の生成は試験中のサツマイモに病害抵抗反応が誘導されていたことを意味する。さらに、UPE に付随する生理状態の推移を捉えるため、病害抵抗反応に伴う UPE の連続的な分光解析を実施した。フザリウム菌の接種後 2~10 時間の間は、発光強度の増加は緩やかであるが、波長組成は主要な波長帯が 580~630 nm から 480~580 nm の短波長側に劇的に変化した。その後、発光強度は接種後 20 時間前後でピークを迎えるものの、接種後 10~36 時間の波長組成は安定していた。ファイトアレキシンを含む、防御関連物質の合成に関わる生理状態変化がこの現象に寄与することが示唆される。より安定で扱いやすい UPE 発生システムを得るため、病害抵抗反応の“エリシター”として、キチン 6 量体と植物生育促進菌類 (PGPF) の培養ろ液を用いた。キチンエリシターと PGPF エリシターは共に、サツマイモ貯蔵根スライス、タバコ葉、イネ葉でそれぞれ明瞭に UPE の増加を誘導した。特にイネ葉切片と PGPF エリシターの組合せにおいて、サツマイモとフザリウム菌の組み合わせで観察されたような高いレベルの UPE が波長組成変化を伴って観察された。イネの懸濁培養細胞も PGPF エリシターの使用により強い UPE 生成し、比較的低濃度 (1 μ 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強い ERPE を生じた。病害抵抗性誘導剤の前処理は ERPE を増強させた。病害抵抗性誘導剤の前処理による ERPE の増強はイネ懸濁培養細胞でも認められた。前処理時間を延長することで、病害抵抗性誘導剤による発光増強の加速 (ピーク到達時間の短縮) と、より低濃度でのプライミング効果の発現が認められた。病害抵抗性誘導剤の単独処理では目立った発光増強は認められなかった。エリシター応答発光の波長組成は、増強の前後でほぼ同じであった。そのため、病害抵抗性誘導剤は、おそらく ERPE そのものを増強している。*PBZ1*, *Os_PAL1*, *Chit-1* や *EL2* といったエリシター応答性の遺伝子発現は、病害抵抗性誘導剤の前処理により増強され、同時に ERPE も増強されており、ERPE が、イネの細胞が病害抵抗性誘導剤により防御応答のプライミングを受けた状態で増強されていることを示している。このプライミング検出システムは、イネとキチン 6 量体、コムギとキチン 6 量体、ジャガイモとアラキドン酸、ブドウと酵母エキスといった植物培養細胞とエリシターの

組み合わせにおいても適用可能であった。プライミングの検出は全身的獲得抵抗性 (SAR), 傷害誘導性抵抗性 (WSR), 誘導性全身的抵抗性 (ISR), β アミノ酪酸誘導抵抗性 (BABA-IR) 及び, ブラシノステロイド依存的抵抗性 (BDR) について行った。SAR を誘導する化合物によるプライミングは, 試験した全ての組み合わせで本検出システムにより検出された。イネとキチンの組み合わせでは, BDR 誘導化合物を除き, 供試した化合物のプライミング活性が検出された。コムギとキチンの組み合わせでは, BABA-IR と BDR には本検出システムは適用できなかった。ブドウと酵母エキスの組み合わせでは, BABA-IR に適用できず, WSR と ISR において ERPE の強い抑制が観察された。ジャガイモとアラキドン酸の組み合わせは供試した全てのタイプの化合物に本検出システムを適用可能であったが, 抵抗性誘導化合物濃度の適用範囲が狭かった。供試した組み合わせの中で, イネとキチンの組み合わせが最も安定しており, 適用可能な抵抗性誘導物質濃度の範囲が最も広がった。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で実施した。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。