

植物の光誘導抵抗性発現機構の解析

上野 誠

目 的

近年、病原菌の感染なしに病原菌感染時に誘導される HR 同様の病徴を示す変異植物体が報告されるようになった。これら変異体は擬似病斑形成変異体と呼ばれ、トウモロコシ、オオムギ、シロイヌナズナ及びイネで報告されている。

イネ品種関口朝日は、イネいもち病菌に対して異なる反応を示す (Arase et al. 2000)。即ち、暗黒条件下ではいもち病斑や褐点病斑が多数形成される野生型反応を示すのに対して、光条件下ではいもち病斑より大型の関口病斑が形成される変異型反応を示す。しかも、形成される関口病斑は野生型反応で形成されるいもち病斑や褐点病斑に比べると形成数が著しく低下することが明らかにされた (Arase et al. 1997)。さらに、関口病斑における菌糸伸展はほとんど認められず、病斑上の孢子形成に至っては皆無であることも明らかにされた。このことは関口病斑形成が変異イネの光依存的な抵抗性反応であることを示した。また、最近の研究によりイネいもち病菌接種により誘導されるこの光依存的な抵抗性反応である関口病斑形成にはインドール系化合物であるトリプタミンが関与していることを明らかにした。トリプタミンはトリプトファンがトリプトファン脱炭酸酵素 (TDC) により、脱炭酸されることにより合成され、合成されたトリプタミンはモノアミン酸化酵素 (MAO) により酸化され過酸化水素が生成されることが知られているが、イネいもち病菌接種により形成される関口病斑形成時にもこれら酵素活性が増加し、カタラーゼ活性の低下による多量の過酸化水素が生成されることを明らかにしている (Ueno et al. 2003)。しかし、トリプタミン経路の活性にどのような光質が関係しているのかは明らかにしていない。そこで本研究では変異イネにおける光依存的な抵抗反応にどのような光質が関与しているのかを調査した。

材料及び方法

イネいもち病菌の孢子懸濁液 (5×10^9 spores/ml) をイネ品種関口朝日に噴霧接種した。接種イネは温室条件下のプラスチックボックスに置き、サランラップ (透過波長: 200-800nm)、UVA フィルム (透過波長: $390\text{nm} <$)、BPB-60 フィルム (透過波長: 550-650nm)、BPB-55 フィルム (透過波長: 500-600nm)、BPB-50 フィルム (透過波長:

450-550nm)、BPB-45 フィルム (透過波長: 400-500nm) 及びアルミホイルで覆って、昼光色蛍光灯照射下 ($380\mu\text{W}/\text{cm}^2$) の 26°C の人工気象器内に保った。また、サランラップで覆って BLB 蛍光灯 (300-400nm) 下に保った区も用意した。接種 72 時間後に接種イネ葉を採取し、関口病斑の面積を測定後に以下の実験に用いた。

TDC の活性は [^{14}C] トリプトファンと TDC が反応し、1 時間あたりに生成される mg タンパク質当たりの [^{14}C] トリプタミンの量で表した。

タンパク質含量は Bradford (1976) の方法によって求めた。碎液中のタンパク質含量は γ -グロブリンにより作成した検量線より算出した。以後のタンパク質含量の測定にはすべてこの方法を用いた。

MAO 活性は、MAO とキヌラミンが反応し、1 時間あたりに生成される mg タンパク質当たりの 4-hydroxyquinoline の量で表した。

カタラーゼ活性値は、mg タンパク質当たりの 1 分間における H_2O_2 の減少量 (μmol) 活性で表わした。1mM EDTA と 10mM 過酸化水素を含む反応液 1ml 中で 3 分間培養し、240nm の吸光度の減少を算出した。

過酸化水素の測定は以下の方法を用いて行った。粗酵素 200 μl に 1800 μl の反応液 (166mM NH_4OH , 0.02mM $\text{Fe}(\text{II})\text{SO}_4$, MCLA 0.1 μM) を添加してフォトカウンターで 30 秒間、MCLA と過酸化水素が反応して生成される蛍光を測定した。同様の方法で標準の過酸化水素を様々な濃度で測定して検量線を作成して試料 1g 生重当たりの過酸化水素量を算出した。

結 果

光条件の違いがイネいもち病菌感染イネ葉での関口病斑形成、トリプタミン蓄積及びトリプタミン関連酵素の活性に与える影響

BPB-60 フィルムや UVA フィルムの透過光区ではサランラップ透過光区と同程度の関口病斑面積率であった。しかし、BPB-55、BPB-50 及び BPB-45 の透過光区、BLB 照射区及び暗黒区では関口病斑面積率はサランラップ透過光区と比較すると抑制されていた。また、トリプタミン蓄積を調査した結果、関口病斑が多数形成される BPB-60 フィルムや UVA フィルムの透過光区ではサランラップ透過光区と同程度のトリプタミンが蓄積された。しか

し、BPB-55, BPB-50, BPB-45 の透過光区, BLB 照射区及び暗黒区ではトリプタミン蓄積はサランラップ透過光区と比較すると抑制されていた。

TDC 活性は、関口病斑が多数形成された BPB-60 フィルムや UVA フィルムの透過光区ではサランラップ透過光区と同程度であった。しかし、BPB-55 フィルム, BPB-50 フィルム及び BPB-45 フィルムの透過光区, BLB 照射区及び暗黒区における TDC 活性はサランラップ透過光区と比較すると非常に抑制されていた。また、MAO 活性も関口病斑が多数形成される BPB-60 フィルムや UVA フィルムの透過光区ではサランラップ透過光区と同程度であった。しかし、BPB-55 フィルム, BPB-50 フィルム及び BPB-45 フィルムの透過光区, BLB 照射区及び暗黒区における MAO 活性は、サランラップ透過光区の約 1/2 に抑制されていた。

BPB-60 フィルムや UVA フィルムの透過光区ではサランラップ透過光区と同程度の低い活性であった。しかし、BPB-55 フィルム, BPB-50 フィルム及び BPB-45 フィルムの透過光区, BLB 照射区ではカタラーゼ活性は暗黒区と同程度の高い値を示した。一方、過酸化水素生成量はカタラーゼ活性とは逆に関口病斑が多数形成された BPB-60 フィルムや UVA フィルム透過光区ではサランラップ透過光区と同程度の高い値を示した。しかし、BPB-55 フィルム, BPB-50 フィルム, BPB-45 フィルムの透過光区や BLB 照射区における過酸化水素生成は、暗黒区のそれと同じ低い値を示した。

考 察

イネいもち病菌接種した関口朝日葉を長波長域 (550–650nm) の光条件下 (赤色光下) に保つと、関口病斑の形成は顕著に誘導され、高いトリプタミン蓄積やトリプタミン関連酵素の活性増大が認められた。しかし、接種葉を短波長域 (200–500nm) の光条件下に保つと、それらは著しく抑制された。さらに、光合成阻害剤 DCMU を前処理したイネ葉では光依存的な抵抗性に関与しているトリプタミン経路の活性は抑制され、関口病斑形成も著しく阻害され、トリプタミンの前駆体であるトリプトファンの合成も光依存的に高められることが明らかにされている (Imaoka et al. 2006)。このことは光合成、特に葉緑体機能が関口病斑形成の誘導に深く関与している可能性を示している。さらに、長波長域の光条件下に保った接種イネ葉ではカタラーゼ活性は低い値を示し、過酸化水素生成は逆に高い値を示した。このことより、長波長域の光条件での関口朝日葉におけるカタラーゼ活性の低下が

MAO によるトリプタミン酸化により生成した過酸化水素の蓄積を誘導し、これが関口病斑形成を誘導したと考えられた。最近、我々は赤色光がいくつかの植物で病原菌に対する抵抗性を誘導できる可能性を示唆した。今後、赤色光は植物保護に利用することができるかもしれない。

引用文献

- Arase S, Fukuyama R, Tokizawa K, Ikegami S, Honda Y, Nozu M. (1997) The effects of light and photo - and protein-synthetic inhibitors on the Sekiguchi lesion formation by *Magnaporthe grisea* in rice cv. Sekiguchi-asahi. *J Phytopathol* 145: 31-35.
- Arase S, Fujita K, Uehara T, Honda Y, Isota J. (2000) Light-enhanced resistance to *Magnaporthe grisea* infection in the rice Sekiguchi lesion mutants. *J Phytopathol* 148: 197-203.
- Bradford MM. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* 2: 248-254.
- Imaoka, A, Ueno M, Kihara J, Arase S. (2006) Role of Chloroplasts in Light-Dependent Sekiguchi lesion formation. *Jpn J Phytopathol* 72: 69 (Abstr).
- Ueno M, Shibata H, Kihara J, Honda Y, Arase S. (2003) Increased tryptophan decarboxylase and monoamine oxidase activities induce Sekiguchi lesion formation in rice infected with *Magnaporthe grisea*. *Plant J* 36: 215-228.