

突然変異イネを用いたレース特異的抵抗性誘導機構の解明

上野 誠

目 的

植物疾病の特異性は、品種・レース間における病原菌の非病原性遺伝子と、それに対する植物の抵抗性遺伝子により支配されている「遺伝子対遺伝子説」で説明されている。イネいもち病におけるイネの抵抗性及び感受性も品種とレースの組み合わせにより決定され、その特異性が上記の遺伝子対遺伝子説で説明できることが知られている。しかし、本病ではそれを説明できるような物質レベルでの同定には至っていない。一方、我々は進行型擬似病斑形成変異イネ（品種：関口朝日）がイネいもち病菌に対して特異的な反応を示すことを明らかにしている。すなわち、親和性いもち病菌レース（罹病性）を接種するといもち病斑が多数形成されるのに対して、非親和性いもち病菌レース（抵抗性）を接種すると野生型イネで形成される抵抗反応を示す褐点病斑とは異なる大型不整形の関口病斑が形成され、病斑内での孢子形成や菌の侵入菌糸の伸展もいずれも認められないことを明らかにしている。このことは、関口病斑形成が品種・レース間における遺伝子対遺伝子説に基づいたレース特異的な抵抗反応の産物であることを示している。最近、我々は関口病斑内にはインドール系化合物の1つであるトリプタミンが蓄積し、トリプタミンが関口病斑形成に関与していることを明らかにした（Arase et al. 2001, Ueno et al. 2003）。そこで本研究は、これまで非親和性いもち病菌レース感染で形成された小さな褐点病斑で起こる抵抗性反応を進行型擬似病斑形成変異イネが形成する大型の抵抗性病斑である関口病斑を用いて解明するために①イネいもち病菌接種による関口病斑形成、トリプタミン蓄積及びその関連酵素活性の調査、②イネいもち病菌孢子発芽液中のエリシター探索を行った。

材料及び方法

イネいもち病菌には親和性イネいもち病菌（長69-150菌株：レース007）及び非親和性イネいもち病菌（O-181菌株：レース031）を用いた。それぞれのイネいもち病菌の孢子懸濁液（ 5×10^5 spores/ml）をイネ品種関口朝日に噴霧接種した。接種イネは24時間・湿室・暗黒条件下のプラスチックボックスに保ち、その後はガラス室へ移動させて、一定時間後に接種イネ葉を採取し、関口病斑形成、トリプトファン脱炭酸酵素（TDC）活性、モノアミン酸

化酵素（MAO）活性、DNA崩壊の実験に用いた。

TDCの活性は $[^{14}\text{C}]$ トリプトファンとTDCが反応し、1時間当たりに生成されるmgタンパク質当たりの $[^{14}\text{C}]$ トリプタミンの量で表した（De Luca et al. 1988）。

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時間当たりに生成されるmgタンパク質当たりの4-hydroxyquinolineの量で表した（Naidu 1989）。

DNA崩壊はそれぞれのイネ葉からCTAB法でDNAを抽出して2%アガロースゲルで電気泳動することにより調査した。

イネいもち病菌の孢子発芽液（SGF）は作成した孢子を 5×10^5 spores/mlに調整し、プラスチックバット内に一定時間保ち、回収した液を1/100に濃縮して実験に用いた。親和性及び非親和性いもち病菌レースから作成したSGFは関口朝日の切り取り葉に5 μl ずつ滴下し、24時間・暗黒下、48時間・光照射下に保ち、関口病斑形成及びトリプタミン蓄積を調査した。

結 果

親和性及び非親和性イネいもち病菌接種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

イネいもち病菌接種後に経時的な関口病斑形成及びトリプタミン蓄積を調査した。その結果、親和性イネいもち病菌接種葉では接種96時間までトリプタミンの蓄積は対照である蒸留水処理区と同程度で低い値を示し、関口病斑の形成もほとんど観察されなかった。一方、親和性イネいもち病菌接種葉では接種24時間以降にトリプタミン蓄積の急激な増加が認められ、48時間以降には関口病斑の形成が確認された。また、TDC及びMAO活性についても調査を行った結果、非親和性イネいもち病菌接種葉では24時間以降にトリプタミン蓄積や関口病斑形成に伴って増加していた。一方、親和性イネいもち病菌接種葉や蒸留水処理葉ではそのような増加は96時間まで認められなかった。さらに経時的なDNA崩壊についても調査を行った。その結果、蒸留水処理葉や親和性イネいもち

病菌接種葉では96時間までDNAの崩壊は観察されなかったが、非親和性イネいもち病菌接種葉では接種48時間以降に関口病斑形成に伴ってDNAの崩壊が観察された。そこで次に親和性及び非親和性イネいもち病菌のSGFを関口朝日のイネ葉に滴下処理して関口病斑誘導とトリプタミン蓄積について調査した。その結果、親和性イネいもち病菌のSGF及び蒸留水処理葉では関口病斑の誘導は見られず、非親和性イネいもち病菌のSGF処理のみで関口病斑の誘導が見られた。トリプタミン蓄積についても同様の結果が得られた。

考 察

イネいもち病菌接種した関口朝日葉では非親和性イネいもち病菌接種葉で関口病斑の形成が顕著に誘導され、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、親和性イネいもち病菌接種葉では、それらは蒸留水処理区と同程度であった。さらに、トリプタミン合成酵素であるTDCやトリプタミン酸化酵素であるMAOの活性とDNA崩壊も非親和性イネいもち病菌接種葉において関口病斑形成やトリプタミン蓄積と共に増加し、親和性イネいもち病菌接種葉や蒸留水処理葉ではそれらの増加は見られなかった。これらの結果は関口朝日における関口病斑形成やトリプタミンとその関連酵素活性がイネいもち病菌のレース特異的に増加することを示した。そこで次にこれらイネいもち病菌のSGFを用いた場合に、非親和性イネいもち病菌特異的に関口病斑が誘導するかを調査した。その結果、関口朝日葉では親和性イネいもち病菌SGF処理葉や蒸留水処理葉では

関口病斑の誘導やトリプタミン蓄積はほとんど見られず、非親和性イネいもち病菌SGF処理葉で特異的に関口病斑の誘導やトリプタミン蓄積の増加が見られた。これらの結果よりレース特異的な関口病斑の誘導やトリプタミン蓄積にはイネいもち病菌の胞子発芽時に放出する何らかの物質が関与していることを明らかにした。

引用文献

- Arase S, Ueno M, Toko M, Honda Y, Ito K, Ozoe Y. (2001) Light dependent accumulation of tryptamine in the Sekiguchi lesion mutant infected with *Magnaporthe grisea*. *J Phytopathol* 149 : 409-413.
- 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.
- De Luca V, Alvarze-Fernandez F, Campbell D, Kurz WGW. (1988) Developmental regulation of enzymes of indole alkaloid biosynthesis in *Catharanthus roseus*. *Plant Physiol* 86 : 447-450.
- Naidu KA. (1989) Inhibition of monoamine oxidase by the fungicide metalaxyl. *J Toxicol Environ Health* 27 : 395-398.
- 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.