

## 進行型擬似病斑形成変異イネを利用した過敏感細胞死誘導機構の解析

荒瀬 榮

## はじめに

アポトーシスとは発生分化、環境ストレス、病原菌感染により起こる遺伝的にプログラムされた自発的な細胞死であることが動物において報告されている (Afford ら 2000)。植物と病原菌の関係においてもアポトーシスが誘導されることが明らかになり、それが病原菌感染によりおこる抵抗反応である過敏感細胞死と同時に起こっており (Yao ら 2002)、植物のアポトーシス誘導には活性酸素種が関与していることが報告された (Jabs 1999)。

最近、擬似病斑を形成する変異体が強い病害抵抗性を持つことが報告されるようになった (Hu ら 1998; Walter ら 1993; Dietrich ら 1994; Arase ら 2000)。イネにおいてもそのような擬似病斑を形成する2つのタイプの変異体が発見されている。1つは褐点類似の擬似病斑を形成する開始型変異イネで、もう一方は病斑類似の擬似病斑を形成する進行型変異イネと呼ばれるものである。これまでに開始型変異イネにおいては擬似病斑形成により核の DNA 崩壊が起こることが報告されている (Takahashi ら 1999) が、進行型変異イネである関口病斑形成変異イネにおいてはそのような報告はない。そこで本研究では関口病斑形成が DNA 崩壊や DNase 活性の増加を伴ったアポトーシス反応であることを報告する。

## 材料及び方法

イネいもち病菌胞子をイネ品種関口朝日に噴霧接種し、湿室・光条件下及び暗黒条件下に所定の時間保った後、イネ葉を採取し、以下の実験に用いた。

DNA 抽出は Tanaka ら (2001) の方法で行った。抽出 DNA は蒸留水に溶解後、260nm と 280nm の吸光度を測定して、その濃度を算出した。DNA (10 $\mu$ g) に 1/10 量の Dye を加えた後、2% 泳動用アガロースゲルのウェルに流し込み 100V 定電圧で泳動した。ゲルは、エチジウムブロマイド (最終濃度 0.5 $\mu$ g/ml) による染色と蒸留水による脱色を行った後、紫外線照射により DNA の崩壊を観察した。

DNase 活性は Xu and Hanson (2000) の方法に従って検出した。

アポトーシス検出のために ApopTag<sup>®</sup>R-fluorescein in situ apoptosis detection kit (Intergen, Purchase, NY, USA) を用いた。イネ葉は 1% パラホルムアルデヒド溶液を含む PBS バッファー (50mM sodium phosphate, 200mM NaCl, pH

7.4) で固定した。5 分間 PBS バッファーで洗浄後、室温で少なくとも 10 秒間は組織を Equilibration buffer に浸漬させた。その後、組織は Working strength terminal deoxynucleotidyl transferase (TdT) enzyme に浸漬させて 37 $^{\circ}$ C で 1 時間培養した。培養後、反応を止めるために stop/wash buffer 中で 15 秒間浸漬・振とうさせた。10 分間室温で培養後、anti-digoxigenin conjugate に浸漬させて、室温、暗黒区で 30 分間培養した。最後に PBS で 4 回洗浄し、1.0  $\mu$ g/ml の DAPI (Wako) で染色後、蛍光顕微鏡でアポトーシスの有無を観察した。

## 結果

イネいもち病菌接種葉に関口病斑形成が誘導される光照射区では DNA の崩壊は接種 6–12 時間までは認められなかったが、接種 12–24 時間から崩壊が観察されるようになり、接種 48–72 時間には明瞭なラダー様の DNA 崩壊が観察された。しかし、いもち病菌形成が誘導される暗黒区や蒸留水処理区では調査したいずれの時間においても DNA 崩壊は認められなかった。さらに DNase 活性は、光照射区の接種葉では経時的に増加し、それは約 56 kD の特異的な DNase バンドとして観察されたが、暗黒区の接種葉ではこの特異的なバンドは検出されなかった。また、34kDa の DNase も接種葉では認められたが、これは光条件に関係なく観察された。さらに、蒸留水処理葉では光照射区及び暗黒区共に両 DNase の活性は認められなかった。

イネ細胞のアポトーシス反応を TUNEL 法を用いた核 DNA の崩壊の有無により調査した。その結果、イネいもち病菌接種葉を 72 時間光条件下に保ち、関口病斑を形成させた組織細胞では核の DNA 崩壊を示す白い斑点状の DPI 染色核が観察された。しかし、イネいもち病菌接種葉を暗黒区に保ち、いもち病菌が形成された組織では DPI 染色核は観察されなかった。蒸留水処理葉においても光照射区及び暗黒区共に、DPI 染色核は観察されなかった。

タンパク質合成阻害剤シクロヘキシミドとクロラムフェニコールあるいは熱処理を行った関口朝日における関口病斑形成、トリプタミン蓄積、酵素活性及びアポトーシス反応を調査した。その結果、蒸留水前処理葉ではイネいもち病菌接種後 48 時間で光依存的に関口病斑が形成され、トリプタミンも約 140  $\mu$ g/g 生葉重の蓄積が認められ

た。また、クロラムフェニコール前処理葉においても蒸留水前処理葉と同様に関口病斑が形成され、トリプタミンも約 120  $\mu\text{g/g}$  生葉重の蓄積が認められた。しかし、シクロヘキシミドや熱前処理葉では接種後 48 時間でも関口病斑形成は著しく抑制され、トリプタミン蓄積も蒸留水前処理葉に比べて 1/3–1/10 に抑制されていた。また、TDC 活性は蒸留水やクロラムフェニコール前処理葉では接種後 48 時間でそれぞれ高い値を示し、2.15 と 1.75  $\text{nmol/mg protein/h}$  であったが、シクロヘキシミドや熱前処理葉でのそれはそれぞれ 0.02 と 0.03  $\text{nmol/mg protein/h}$  となり、蒸留水前処理葉のそれに比較して著しく抑制されていた。さらに、MAO 活性もシクロヘキシミドや熱前処理葉 (0.74–0.84  $\text{nmol/mg protein/h}$ ) では蒸留水やクロラムフェニコール (2.18–2.36  $\text{nmol/mg protein/h}$ ) 前処理葉のそれに比較して値が 1/2–1/3 に減少していた。シクロヘキシミドや熱処理により関口病斑形成が抑制されたイネ葉では、DNA 崩壊や DNase 活性も対照である蒸留水前処理葉のそれと比較して著しく抑制された。また、TUNEL による核 DNA の崩壊を示す核の DPI 染色も陰性反応を示した。しかし、関口病斑形成が抑制されなかったクロラムフェニコール前処理葉では対照の蒸留水処理区と同程度の DNA 崩壊や DNase 活性が観察されただけでなく、TUNEL による核染色も陽性反応を示した。

### 考 察

DNA の崩壊や DNase 活性の増加を伴った自発的な細胞の死はアポトーシスと呼ばれている。アポトーシスは形態形成、変態、組織の恒常性及び病原菌感染で重要な役割を果たしており、その誘導には活性酸素種が関与していることが報告されている (Afford and Randhawa 2000, Jabs 1999)。活性酸素種の 1 つである過酸化水素は、病原菌感染植物における過敏感細胞死の誘導に重要な働きをしていることはよく知られている。最近、Yao ら (2002) は動物細胞で起きているアポトーシス同様の反応がエンバク冠さび病菌の非親和性レースに感染したエンバクにおいても起こっており、過敏感細胞死とアポトーシス反応がほぼ同時に起こっていることを報告した。イネいもち病菌に対する関口朝日の光依存的抵抗性を示す関口病斑の形成部位では DNA 崩壊や DNase 活性の増加が観察された。一方、細胞質のタンパク質合成阻害剤であるシクロヘキシミドや熱前処理により関口朝日葉の光依存的関口病斑形成やトリプタミン経路の発現を抑制する

と DNA 崩壊、DNase 活性や核 DNA の崩壊はいずれも抑制された。このことは、シクロヘキシミドや熱はトリプタミン経路の特異的阻害因子ではないが、関口朝日での光依存的な関口病斑形成がトリプタミン経路に依存したアポトーシス様の反応である可能性を示した。

### 引用文献

- Afford, A. and Randhawa, S. (2000) Apoptosis. *Mol. Pathol.* 53, 514–521.
- Arase, A., Zhao, C., Akimitsu, K., Yamamoto, M. and Ichii, M. (2000) A Recessive lesion mimic mutant of rice with elevated resistance to fungal pathogens. *J. Gen. Plant Pathol.* 66, 109–116.
- Dietrich, O.D., Delaney, T.P., Uknes, S.J., Ward, E.R., Ryals, J.A. and Dangel, J.L. (1994) Arabidopsis mutants stimulating disease resistance response. *Cell* 77, 565–577.
- Hu, G., Yalpain, N., Briggs, S.P. and Johal, G.S. (1998) A porphyrin pathway impairment is responsible for the phenotype of a dominant disease lesion mimic mutant of maize. *Plant Cell* 10, 1095–1105.
- Jabs, T. (1999) Reactive oxygen intermediates as mediators of programmed cell death in plants and animals. *Biochem Pharmacol.* 57, 231–245.
- Takahashi, A., Kawasaki, T., Henmi, K., Shii, K., Kodama, O., Satoh, H. and Shimamoto, K. (1999) Lesion mimic mutants of rice with alterations in early signaling events of defense. *Plant J.* 4, 327–341.
- Tanaka, N., Nakajima, Y., Kaneda, T., Takayama, S., Che F.S. and Isogai, A. (2001) DNA laddering during hypersensitive cell death in cultured rice cell induced by an incompatible strain of *Pseudomonas avenae*. *Plant Biotech.* 18, 295–299.
- Xu, Y. and Hanson, M.R. (2000) Programmed cell death during pollination-induced petal senescence in petunia. *Plant Physiol.* 122, 1323–1333.
- Walter, M., Hollricher, K., Salamini, F. and Schulze-Lefert, P. (1993) The mlo resistance alleles to powdery mildew infection in barley trigger a developmentally controlled defense mimic phenotype. *Mol. Gen. Genet.* 239, 122–128.
- Yao, N., Imai, S., Tada, Y., Nakayashiki, H., Tosa, Y., Park, P. and Mayama, S. (2002) Apoptotic cell death is a common response to pathogen attack in oats. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 15, 1000–1007.