

< 2 > 新規産業開発研究

< 2 - b > 地域産業育成探索 / 実証研究

小テーマ：農業 植物の病害抵抗性誘導剤の開発

研究従事者：静岡県農業試験場 加藤公彦、影山智津子、稲垣栄洋、伊代住浩幸
静岡県林業技術センター 山口 亮（兼務）

研究の概要

植物の培養細胞を用いて、培養細胞から発生する微弱発光の変化を指標とした抵抗性誘導活性の評価方法を確立し、抵抗性誘導剤の効率的な選抜方法の開発を行う。さらに、開発した選抜方法を用いて新しい抵抗性誘導剤の開発を行う。

研究の独自性・新規性

抵抗性が誘導された植物のエリシター応答発光（植物が病害抵抗性反応を示すときに発生する微弱発光）が高まる現象は、本プロジェクト研究が発見した現象であり、この現象を用いた抵抗性誘導剤の選抜方法に関する研究は唯一である。

研究の目標

- 1) 抵抗性誘導剤のスクリーニング方法の開発では、エリシター応答性が良く、抵抗性誘導活性を容易に判別できる植物を選び、応答発光を安定させる培養条件を明らかにし、効率よくスクリーニングする方法を開発する。
- 2) 抵抗性誘導剤の開発では、開発したスクリーニング方法により、新しい抵抗性誘導剤の基本骨格となる化合物を探索し、それを基に抵抗性誘導剤を開発する。
- 3) 抵抗性誘導剤の作用メカニズムの解析では、抵抗性誘導剤が有効な植物及び病害の種類を明らかにし、病害抵抗性に関連する遺伝子を解析する。

平成15年度から次の研究項目を実施している。

1. 抵抗性誘導剤のスクリーニング方法の開発

（加藤公彦、影山智津子、稲垣栄洋、伊代住浩幸）

1 - 1 スクリーニングに用いる植物種の選択とその植物細胞の培養条件

- ・ イネ培養細胞の培養齢がエリシター応答発光に及ぼす影響
- ・ 液体培養で発生する褐変細胞の発光特性
- ・ イネ（金南風）の培地の種類が発光に与える影響
- ・ スクリーニングに適した培養細胞の選定

1 - 2 抵抗性誘導活性の判別方法の最適化及び簡略化

- ・ エリシターの種類と濃度
- ・ 6量体キチンの処理濃度と処理時期
- ・ 既存の抵抗性誘導剤を用いた発光パターンの検証
- ・ エリシター応答発光の増強程度と抵抗性誘導活性

1 - 3 スクリーニングの基本メカニズムの解析

- ・ 防御関連遺伝子の発現とエリシター応答発光増強現象との関係
- ・ 抵抗性誘導マーカー検出方法の確立
- ・ 植物体でのエリシター応答発光の増強
- ・ エリシター応答発光の抑制剤を用いた解析
- ・ エリシター応答発光の増強と病害抵抗性遺伝子のプライミング

2 . 抵抗性誘導剤の開発 (加藤公彦、影山智津子、稲垣栄洋、伊代住浩幸、山口 亮)

2 - 1 抵抗性誘導剤のための新しい基本骨格の探索

- ・ 抵抗性誘導活性を持つキノコの探索
- ・ 化合物のスクリーニング
- ・ 天然物質のスクリーニング

3 . 抵抗性誘導剤の作用メカニズムの解析

(加藤公彦、影山智津子、稲垣栄洋、伊代住浩幸、山口 亮)

3 - 2 病害抵抗性に関連する遺伝子の発現状況調査

研究小課題名：1 抵抗性誘導剤のスクリーニング方法の開発
研究項目：1-1 スクリーニングに用いる植物種の選択とその植物細胞の培養条件
(1) イネ培養細胞の培養齢がエリシター応答発光に及ぼす影響
担当者：稲垣栄洋 協力・分担関係：クミアイ化学・日本曹達・浜松ホトニクス
研究期間：平成15年度～17年度

1 目的

抵抗性誘導剤のスクリーニングのためには安定的なエリシター応答発光の検出が必要である。しかし、エリシター応答発光量には測定間で差異が見られる。そこで、ここでは、細胞の培養齢が発光量に及ぼす影響について検討する。

2 方法

- (1) 供試材料：イネ培養細胞(品種‘金南風’)
- (2) 培養方法：100ml フラスコに2.4-D濃度2ppmのUM(Uchiyama-Murashige)液体培地20mlを分注し、培養細胞2gを25、暗黒条件下で懸濁培養した。
- (3) 発光の測定方法：生鮮重3.5gのカルス直径60mmのプラスチックシャーレに入れて、3.5mlのアシベンゾラル-S-メチル(以下、ASM)水溶液あるいは蒸留水を添加した。処理4時間後にエリシターとしてPhoma(GS12-2)の培養ろ液350 μ lを加え、発光を経時測定した。ASMの終濃度は200 μ とした。
- (4) 調査方法：培養1日目から31日目まで3日ごとに、細胞の増殖率、ASM処理と無処理におけるエリシター応答発光を調査した。

3 結果の概要・要約

- (1) 細胞の増加量から、培養4日目から13日目までを対数期とする増加曲線を得た(第1図)。定常期の16日目以降、エリシター応答発光の著しい高まりが観察されたが、ASM処理と無処理との間の差異は明確ではなかった。
- (2) エリシター応答発光の増強現象は培養7日目から13日にかけて、強く認められた(第1図)。すなわち、ASM処理では7日目から13日目の間で600~700カウントで安定した発光を示したのに対し、無処理では400カウント以下で推移し、7日目から13日にかけて発光量の低下が認められた。
- (3) エリシター応答発光の増強は培養1日目では認められなかったが、4日以降で検出可能であった(第2図)。増強程度は、細胞増殖の対数期で培養齢の増加に伴って高まり、対数期後期の13日目で最大となった(第2図)。その後、定常期では増強程度は著しく低下し、16日以降はほとんど認められなかった。

以上より、培養齢は、エリシター応答発光の増強程度に大きな影響を及ぼすことが明らかとなった。スクリーニングには、対数期後期の細胞を用いることが適切であると考えられた。

4 結果 (データを入れた詳細結果)

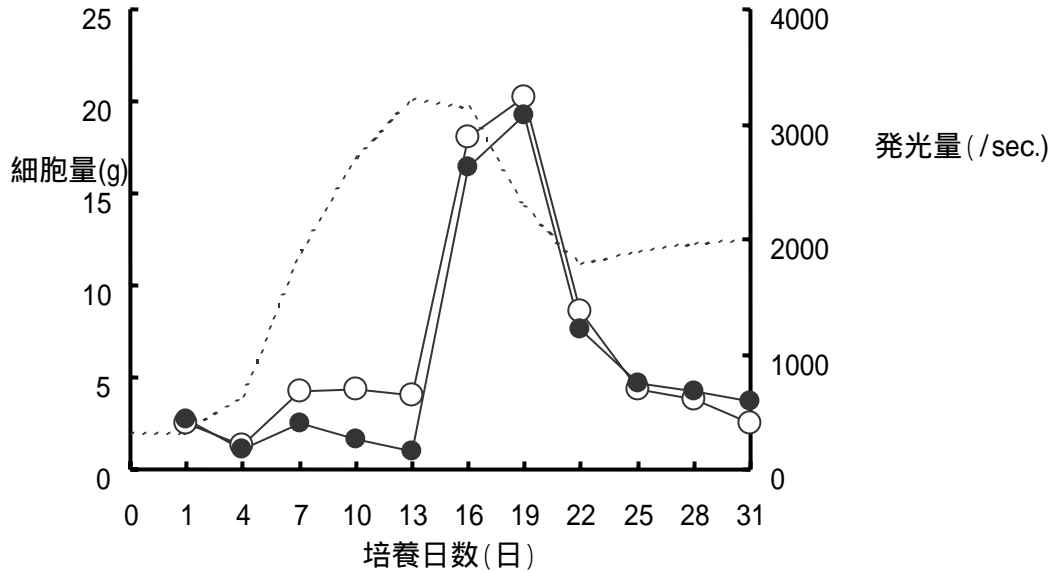


図1 培養齢が発光量に及ぼす影響

.....カルス重量 —○—ASM 処理 —●—無処理

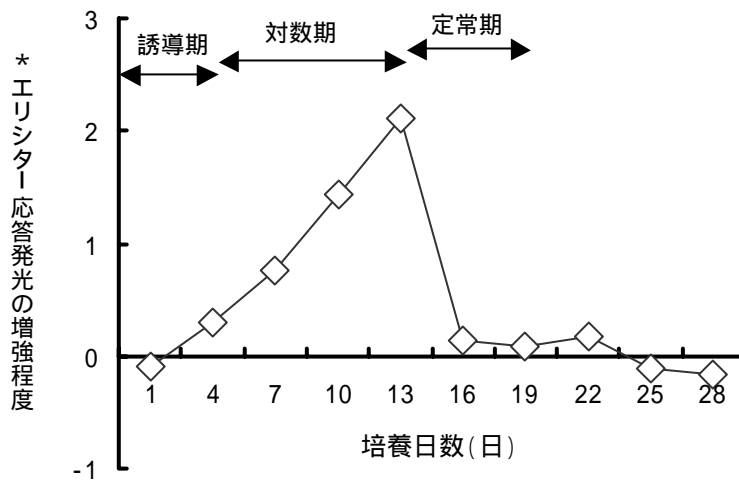


図2 培養日数とエリシター応答発光の増強程度

*2を底とした誘導剤処理/無処理の対数值

5 残された課題と解決方法

なし

研究小課題名：1 抵抗性誘導剤のスクリーニング方法の開発
研究項目：1-1 スクリーニングに用いる植物種を選択とその植物細胞の培養条件
(2) 液体培養で発生する褐変細胞の発光特性
担当者：稲垣栄洋 協力・分担関係：クマイ化学・日本曹達・浜松ホトニクス
研究期間：平成15年度～17年度

1 目的

イネ培養細胞をUM液体培地で継代・増殖し続けると、褐変した細胞が出現し、問題となった。そこで、褐変した細胞の発光の特性について確認するとともに、褐変を抑制する液体培地を検討した。

2 方法

【試験1】イネ培養細胞の褐変化が発光に及ぼす影響

- (1) 供試材料：UM 液体培地で培養し、褐変したイネ培養細胞(品種‘金南風’)と正常な培養細胞。
- (2) 測定方法：生鮮重 3g のカルス直径 60mm のシャーレに入れて培地 3.65ml を添加し、さらに終濃度 200 μ M となるようにアシベンゾラル-S-メチル 200 μ (以下、ASM) 水溶液 0.35ml を加えた。ASM 水溶液の代わりに蒸留水 0.35ml を加えたものを対照とした。処理 2 時間後にエリシターとして終濃度 1 μ M となるように 350 μ l のキチン(chitohexaose)水溶液を加え、発光量の変化を経時測定した。
- (3) 試験構成：
 - 1) 褐変した細胞と正常な細胞で、エリシター応答発光を比較。
 - 2) 正常細胞の培地と褐変が見られた細胞の培地をそれぞれ正常細胞へ添加し、エリシター応答発光を比較。
- (4) 調査項目：ASM 処理と無処理についてエリシター応答発光の調査。

【試験2】異なる培地がイネ培養細胞の褐変および発光に及ぼす影響

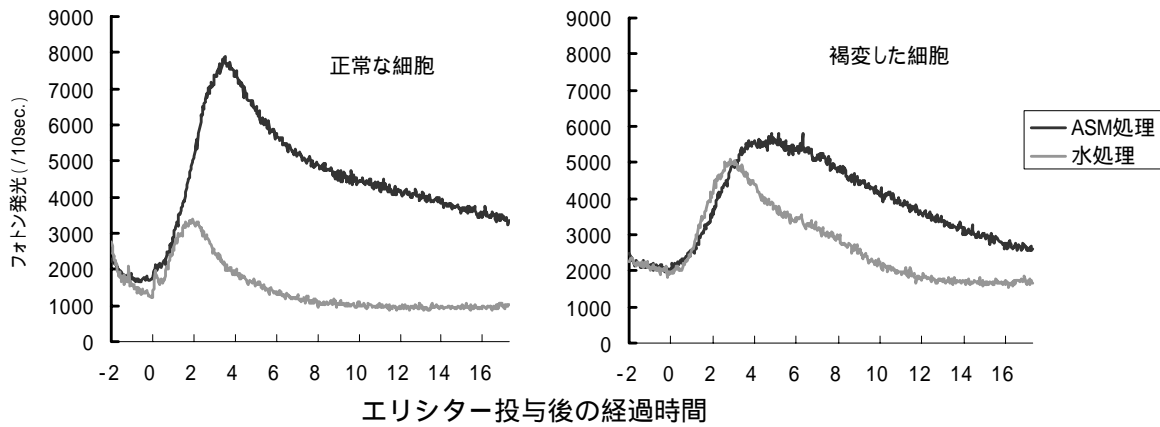
- (1) 試験構成：UM (Uchiyama-Murashige) 培地、シヨ糖濃度は 3%とし、その他は 1/2 濃度とした 1/2UM培地、N6 改変培地の 3 区。
- (2) 試験方法：300ml フラスコに各培地 100ml を分注し、培養細胞 8g を 25℃、暗黒条件下で懸濁培養した。7日から10日ごとに継代し、褐変細胞の出現の有無を観察した。

3 結果の概要・要約

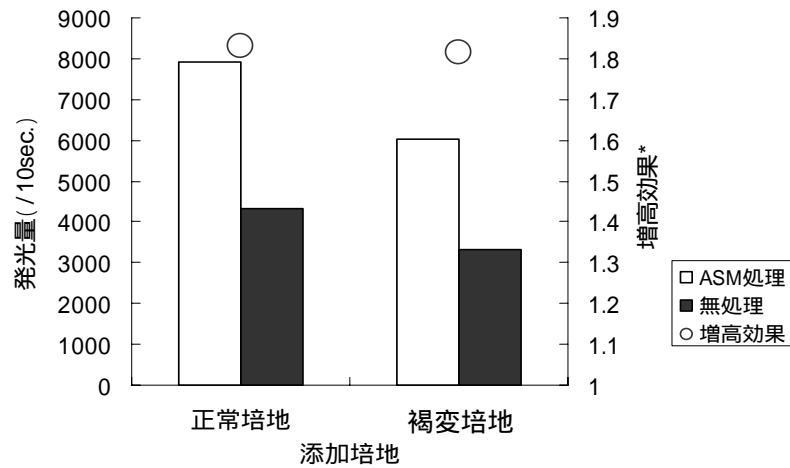
- (1) 褐変した細胞は増殖能を有するものの、エリシター応答発光はASM 処理に対しては低下する一方で、水処理に対して高まる傾向にあり、エリシター応答発光の増強効果は著しく低下した(第1図)。
- (2) 正常な細胞の測定時に褐変した細胞の培地を添加したところ、ASM 処理、無処理ともに発光量が低下する現象が認められた(第2図)。
- (3) UM 培地では褐変細胞が高率で出現した。一方、塩類濃度の低い 1/2UM 培地では褐変細胞の出現は低率であり、N6 改変培地では褐変細胞が観察されなかった(第1表)。
- (4) 異なる培地間における細胞の増殖率は、スクリーニングを行う上で問題となるような明確な差異は認められなかった(図表省略)。

以上の結果から、懸濁培養中に発生する褐変細胞は、スクリーニングに用いることができないことが明らかとなった。さらに、褐変細胞が高率に出現するUM培地は継代に不適であり、褐変細胞の出現を回避する観点からはN6改変培地が適していると考えられた。

4 結果（データを入れた詳細結果）



第1図 細胞の褐変によるエリシター応答発光の増強効果の喪失



第2図 添加培地の差異が発光量に及ぼす影響

* ASM 処理の発光量 / 無処理の発光量

第1表 異なる培地における褐変細胞の出現事例の最大値^{z)}

培地	継代数 (本)	褐変数 (本)	左率 (%)
UM ^{y)}	15	13	86.7
1/2UM ^{x)}	15	2	13.3
N6改変	15	0	0.0

z)2003年10月28日～2004年1月20日の培養期間中に褐変細胞が出現したフラッシュ数と出現率の最大値。培地量100ml、細胞8gで7～10日間ごとに継代。

y)Uchiyama-Murashige培地

x)シヨ糖濃度を3%とし、全ての塩類濃度、植物ホルモンを1/2濃度としたUM改変培地

5 残された課題と解決方法

細胞の褐変化を誘起する原因の解明。継代維持とエリシター応答発光がより安定的な培地条件の探索

研究小課題名：1 抵抗性誘導剤のスクリーニング方法の開発

研究項目：1-1 スクリーニングに用いる植物種の選択とその植物細胞の培養条件
(3)イネ（金南風）の培地の種類が発光に与える影響

担当者：影山智津子 協力・分担関係：クミアイ化学、日本曹達、浜松ホトニクス

研究期間：平成15年度～17年度

1 目的

現在使用しているイネカルス（品種：金南風）は、UM培地での継代を継続すると褐変細胞が発生し、抵抗性誘導剤の識別に問題が生じるようになった。そこで、継代しても褐変が少なく、エリシター応答発光が正常に行われる培地及びエリシター処理濃度を選定する。

2 方法

(1)試験区

1)培地の種類：1/2 濃度 UM 培地、N 6 改変培地

2)6 量体キチン濃度：1 μ M、500nM、100nM、50nM

(2)試験方法 1 mg/L 2,4-D 及び 3%ショ糖を含む 1/2 濃度 UM 液体培地で、イネカルス（品種：金南風）を 23、120rpm、暗条件で 7 日間振とう培養し、実験に供試した。2.5g のイネカルスと培地 4.43ml をプラスチックシャーレに入れ、それに抵抗性誘導剤としてアシベンゾラル-S-メチル（ASM）及びカルプロパミド（CRP）を 2%ツイーン 20 を含むジメチルフォルムアミド（DMF）に溶解し、200 μ M となるように 0.07ml 処理し、発光の測定を行った。抵抗性誘導剤処理の 2 時間後にエリシター 0.35ml を処理し、発光を継続測定した。

(3)調査方法 対照として、抵抗性誘導剤の代わりに 2%ツイーン 20 を含む DMF を 0.07ml 処理した区と、発光パターン及び発光量を比較した。

3 結果の概要・要約

(1)カルスの褐変程度は、1/2UM 培地より N 6 改変培地の方が少なく、増殖率も良かった。

(2)エリシター処理濃度が低いほど発光は弱くなったが、抵抗性誘導剤処理区に比べ対照区でより発光が低下するため、結果としてエリシター応答発光の増強効果が大きくなり、抵抗性誘導活性の識別が容易となった。以前の試験では、エリシター処理濃度として 0.8 μ M (1mg/L) が最適であるとしたが、細胞の状態により最適なエリシター濃度は変化することが判明した。

(3)N 6 改変培地より 1/2UM 培地で、エリシター応答発光の増強効果が幅広いエリシター処理濃度で認められた。

(4)以上の結果より、カルスは N 6 改変培地で継代し、発光の測定に用いる時のみ 1/2UM 培地を使用する方法が良いと考えられた。

4 結果 (データを入れた詳細結果)

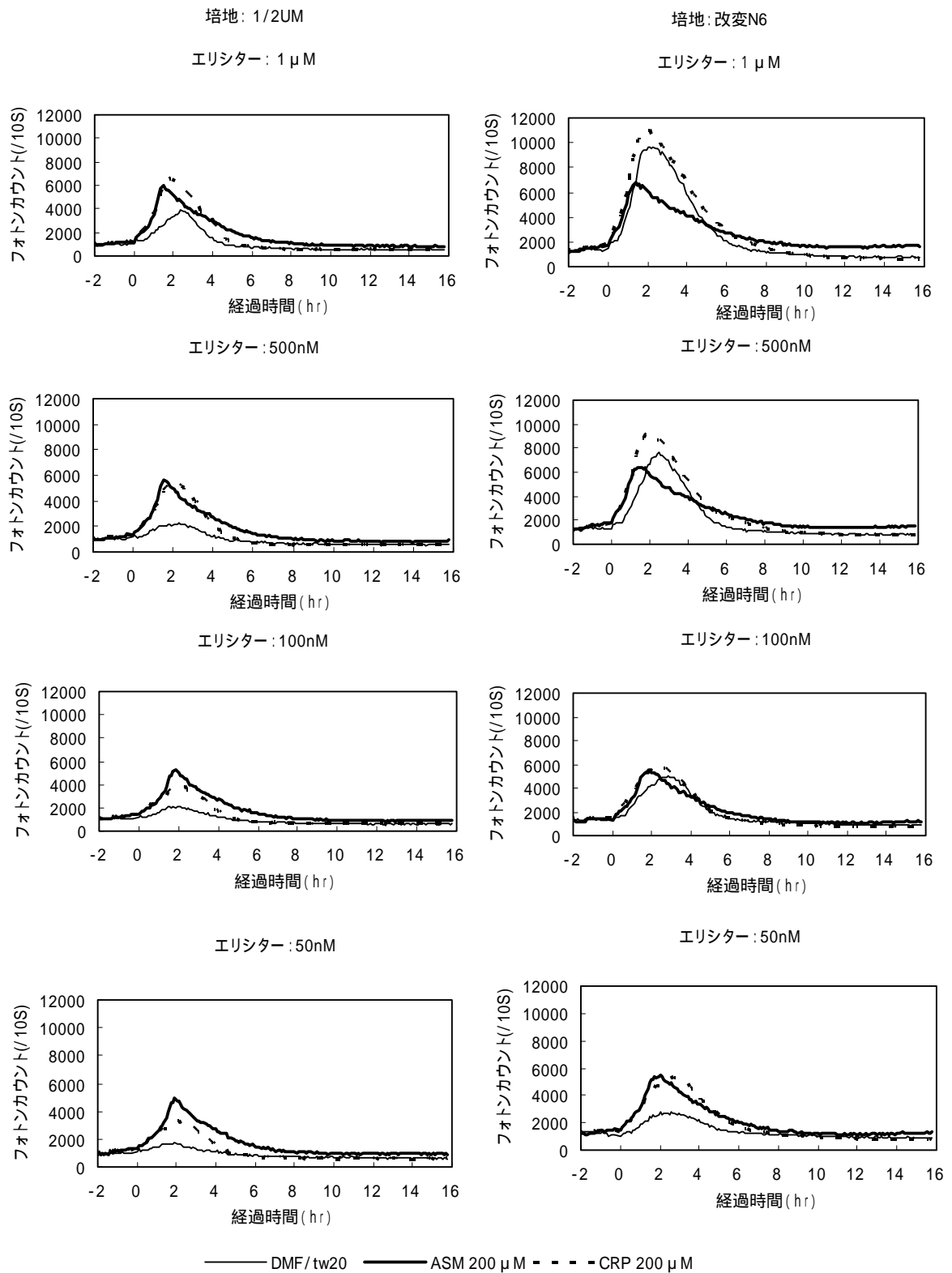


図 培地の種類とエリシター濃度が光子発光に与える影響
供試エリシター: 6 量体キチン

5 今後の課題と予定 なし

研究小課題名：1 抵抗性誘導剤のスクリーニング方法の開発

研究項目：1-1 スクリーニングに用いる植物種の選択とその植物細胞の培養条件
(4) スクリーニングに適した培養細胞の選定

担当者：稲垣栄洋 協力・分担関係：クミアイ化学・日本曹達・浜松ホトニクス

研究期間：平成15年度～17年度

1 目的

エリシター応答発光は、品種や培養細胞によって異なることから、効率の良いスクリーニングを実施するためには、スクリーニングに適した培養細胞の選定が必要となる。

ここでは、収集したイネ培養細胞のエリシター応答発光の増強効果を比較し、スクリーニングに適した培養細胞の選定を行った。

2 方法

- (1) 供試細胞：‘金南風’、‘日本晴’（日t系統、Nh系統、農試保有系統）、‘黄金晴’及び‘キタアケ’の培養細胞
- (2) 培養方法：300ml フラスコに液体培地 100ml を分注し、培養細胞 6～9g を 25℃、暗黒条件下で懸濁培養し、7日から10日間の間隔で継代した。
- (3) 測定方法：生鮮重 3g のカルスを直径 60mm シャーレに入れて培地 3.65ml を添加し、さらに終濃度 50ppm でアシベンゾラル-S-メチル（ASM）水溶液 0.35ml または蒸留水を加えた。その処理 2 時間後にエリシターとして 2 μ M（‘黄金晴’は 20 μ M）のキチン（chitohexaose）水溶液、または Phoma（GS12-2）の培養ろ液 350 μ L を加えて、発光の変化を経時測定した。
- (4) 調査項目：ASM 処理と無処理について、エリシター応答発光量を調査した。

3 結果の概要・要約

- (1) ‘日本晴’農試保有系統と‘黄金晴’を除き、エリシター応答発光と ASM 処理による増強効果が認められた（表 1）。ただし、増強効果は培養細胞によって異なり、さらに同じ培養細胞でも培地の種類によって発光量や増強効果は異なった。
- (2) ‘日本晴’日t系統及びNh系統では増強効果が認められたものの、その程度はやや低かった（表 1）。「キタアケ」は明確な増強効果が認められたものの、増殖率が低いことから、スクリーニングには適しないと判断された。また、「日本晴」農試保有系統及び「黄金晴」はエリシター応答発光がまったく見られなかった。
- (3) 1/2UM 培地で増殖を行った‘金南風’はエリシター応答発光が高く、増強効果も高かったことから、スクリーニング用の細胞として極めて優れていると考えられた（図 1）。

以上の結果から、エリシター応答発光の増強効果が最も高かった‘金南風’がスクリーニングに最適であると判断された。

4 結果（データを入れた詳細結果）

表1 各培養細胞の発光量とASM処理による増高効果

品種	系統	培地	エリシター	2段階処理の発光量 ^{z)}	増高効果 ^{y)}	増殖 ^{x)}	総合評価 ^{w)}
金南風	KI	N6 改変 ^{v)}	キチン0.1μM	5486	1.10	×	×
		1/2UM	キチン0.1μM	6761	2.86		
	農試保有	UM	Phoma	- ^{u)}	- ^{u)}	×	×
日本晴	日 ^t	N6	キチン0.1μM	2623	1.47	×	
		1/2UM	キチン0.1μM	3592	1.70		
	Nh	N6 改変 ^{v)}	キチン0.1μM	5053	1.48	×	
		1/2UM	キチン0.1μM	6314	0.99	×	×
黄金晴	Os-1	AA ^{v)}	キチン1μM	- ^{u)}	- ^{u)}	×	×
キアケ	-	N6	キチン0.1μM	4313	1.96	×	×
		1/2UM	キチン0.1μM	4764	0.89	×	×

z)ASM処理+エリシター処理による発光量

y)ASM処理+エリシター処理による発光量/エリシターのみに対する発光量，
増高が2倍以上のものを○，1.5倍～2倍のものを△，1.5倍以下のものを×とした。

x)10日間の増殖率が2倍以上のものを○，2倍以下のものを×とした。

w)スクリーニングに適しているものを○，用いることが可能であるものを△，適さないものを×とした。

v)N6の改変培地

u)発光の高まりによるピークが見られない。

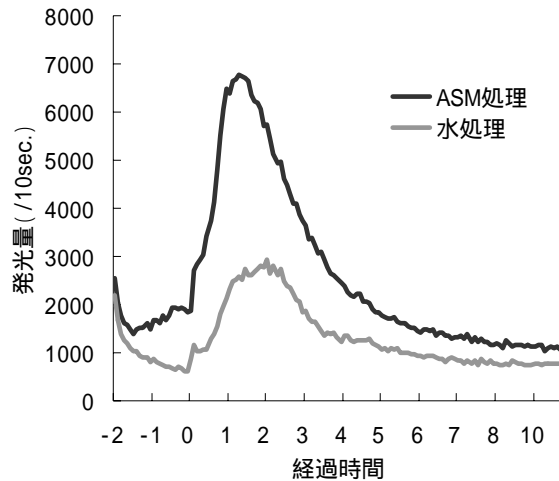


図1 ‘金南風’培養細胞のエリシター応答発光の増強

5 残された課題と解決方法

‘金南風’培養細胞を用いたスクリーニング法の最適化の検討。

研究小課題名：1 抵抗性誘導剤のスクリーニング方法の開発

研究項目：1-2 抵抗性誘導活性の判別方法の最適化及び簡略化

(1) エリシターの種類と濃度

担当者：影山智津子 協力・分担関係：クミアイ化学、日本曹達、浜松ホトニクス

研究期間：平成15年度～17年度

1 目的

スクリーニングの基本メカニズムは、抵抗性誘導状態でエリシターを処理するとエリシター応答発光が増強される現象に基づいている。各種のエリシターの中から、発光の増強を顕著に示すものを選び、適正処理濃度を検討する。

2 方法

(1)試験区

供試エリシター		処理濃度
ケイ酸カリ水溶液 ($\text{KO}_2 / \text{SiO}_2$)		10 ~ 500 mM
リン酸水素2カリウム (K_2HPO_4)		10 ~ 500 mM
塩化第一鉄 (FeCl_3)		0.1 ~ 200 mM
キトサン		2.5 ~ 5 %
PGPF(植物生育促進根圏糸状菌) 8系統		5 %
キチンオリゴ糖	Hexa- N- acetyl-chitohexaose (6量体)	10 mM
	Tetra- N-acetyl-chitotetraose (4量体)	
	Di- N-acetyl-chitobiose (2量体)	

(2)試験方法 2mg/L 2,4-Dを含むUM液体培地で、イネカルス(品種：金南風)を23、120rpm、暗条件で7~13日間振とう培養し、実験に供試した。2.5gのイネカルスと培地3.8mlをプラスチックシャーレに入れ、それに終濃度200 μM の抵抗性誘導剤を0.7ml処理し、発光の測定を行った。抵抗性誘導剤処理の4時間後にエリシター0.35mlを処理し、発光を継続測定した。

(3)調査方法 対照として、抵抗性誘導剤の代わりに蒸留水0.7mlを処理したものと、発光パターン及び発光量を比較した。

3 結果の概要・要約

(1)それぞれのエリシターについて濃度別の発光を調査したところ、ケイ酸カリでは75mM、リン酸カリでは100mMにおいて、対照区との発光量の差が最も大きかった。

(2)キトサンでは5%の濃度で僅かな発光量の差が見られたが、塩化第一鉄では、どの濃度でも差が認められなかった。

(3)PGPFの培養液には、phoma(GS12-2)型とpenicillium(GP17-2)型の2種類の発光パターンが見られたが、いずれも対照区との発光量の差が認められた。

(4)キチンでは、6量体キチンにおいて最も強い発光が見られた。6量体キチンは、対照区との発光量の差が調査したエリシターの中では最も大きく、エリシター応答発光の増強が容易に判断できると考えられた。このことから、6量体キチンはスクリーニング用のエリシターとして最も有望であると判断された。

4 結果 (データを入れた詳細結果)

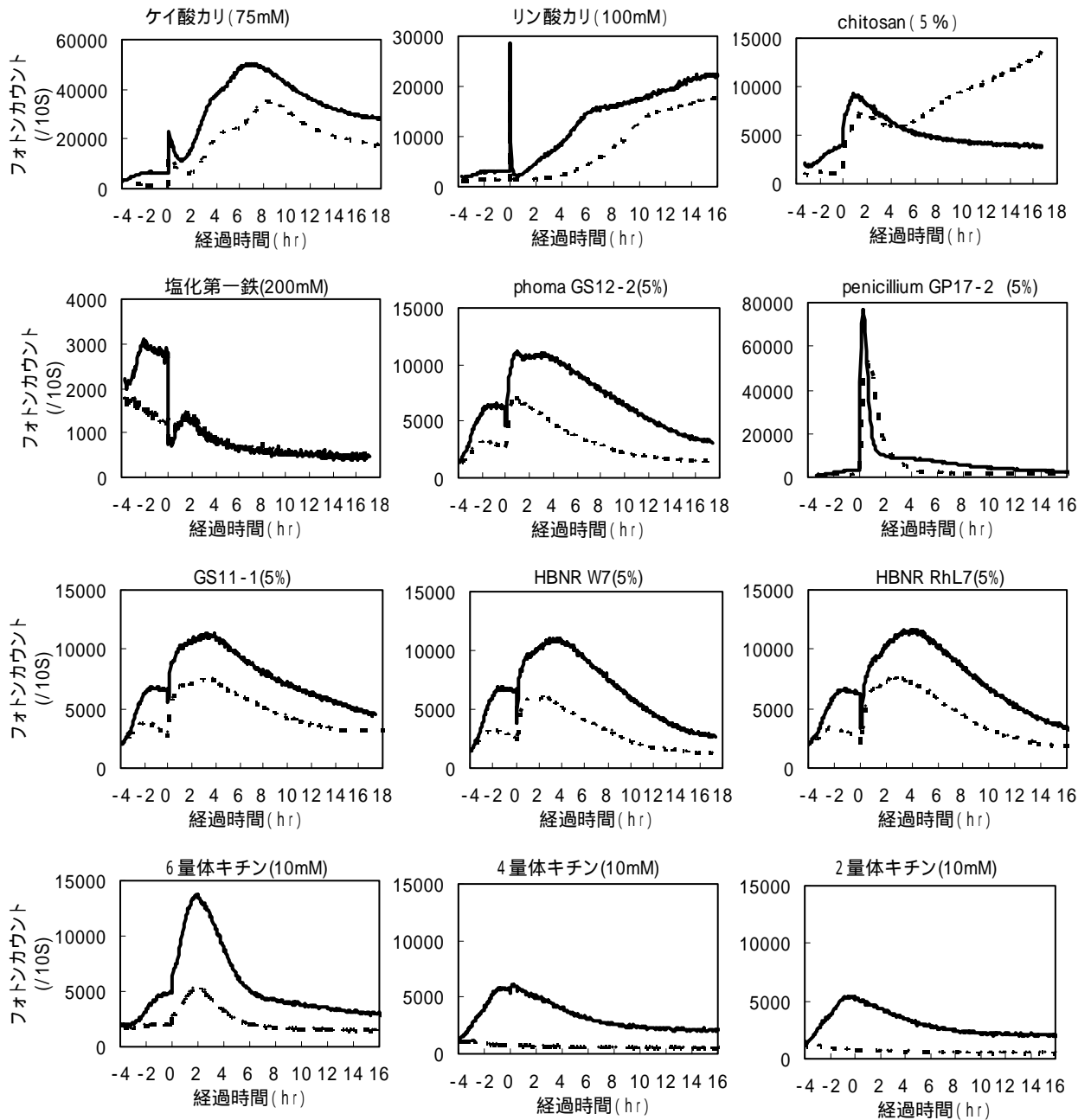


図1 異なるエリシター処理による発光パターンの比較
経過時間 - 4時に抵抗性誘導剤を処理、
経過時間0時にエリシターを処理した。

— ASM 処理
- - 水処理

5 今後の課題と予定 なし

研究小課題名：1 抵抗性誘導剤のスクリーニング方法の開発

研究項目：1-2 抵抗性誘導活性の判別方法の最適化及び簡略化

(2) 6 量体キチンの処理濃度と処理時期

担当者：影山智津子 協力・分担関係：クミアイ化学、日本曹達、浜松ホトニクス

研究期間：平成15年度～17年度

1 目的

スクリーニングの基本メカニズムは、抵抗性誘導状態でエリシターを処理するとエリシター応答発光が増強される現象に基づいている。各種のエリシターの中から、発光の増強を顕著に示すものとして、6 量体キチンを選定した。さらに、一人で年間、15,000サンプルが扱えるように、エリシターの濃度や化合物とエリシターの処理時期を検討する。

2 方法

(1)試験区 1)エリシター(6 量体キチン)の処理濃度：1, 5, 10 mg/L

2)エリシターの処理時期：抵抗性誘導剤処理の0, 2, 4, 6 時間後

(2)試験方法

1)エリシターの処理濃度

2mg/L 2,4-D を含むUM液体培地で、イネカルス(品種:金南風)を23℃、120rpm、暗条件で9~10日間振とう培養し、実験に供試した。2.5gのイネカルスと培地3.8mlをプラスチックシャーレに入れ、それに終濃度200µMの抵抗性誘導剤を0.7ml処理し、発光の測定を行った。抵抗性誘導剤処理の4時間後にエリシター0.35mlを処理し、発光を継続測定した。

2)エリシターの処理時期

エリシターの処理濃度の実験と同様にイネカルスを培養し、シャーレに分配して抵抗性誘導剤を処理した。抵抗性誘導剤を処理して所定の時間が経過した時点で、エリシター0.35mlを処理し、発光を継続測定した。

(3)調査方法 対照として、抵抗性誘導剤の代わりに蒸留水0.7mlを処理したものと、発光パターン及び発光量を比較した。

3 結果の概要・要約

(1)6 量体キチンの濃度別の発光を検討したところ、1~10 mg/Lの範囲では、濃度が高いほど発光も高かったが、対照区の発光も高くなった(図1)。

(2)抵抗性誘導剤処理区と対照区との発光量の比は1 mg/Lで最も大きく、識別が容易であった。

(3)エリシターの処理を抵抗性誘導剤処理と同時(0時間)に行うと、発光のピークまでの時間が長くなった(図2)。抵抗性誘導剤処理の2~6時間後にエリシターを処理すると、発光のピークまでの時間と発光量はほぼ同じであった。スクリーニングの効率を上げるためには、エリシターの処理時期は抵抗性誘導剤処理の2時間後が適切であると考えられた。

(5)以上のことから、本スクリーニングに用いるエリシターは、6 量体キチンの1 mg/Lを抵抗性誘導剤処理の2時間後に処理することが、最も適切であることが明らかとなった。

4 結果 (データを入れた詳細結果)

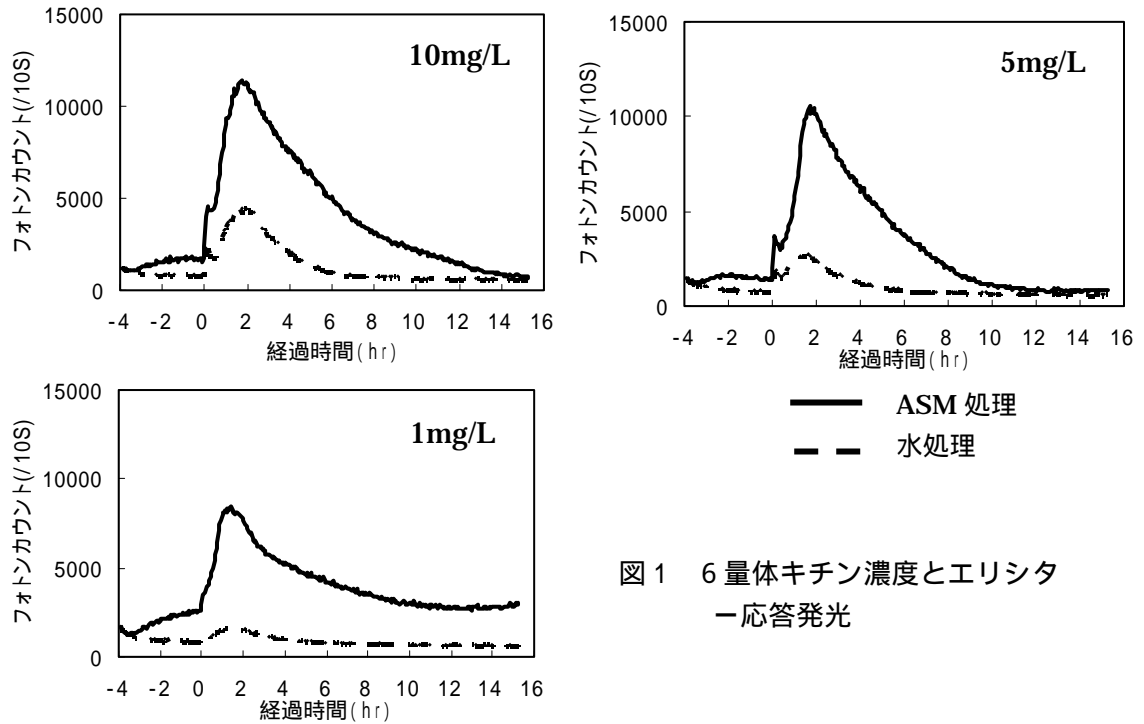


図1 6量体キチン濃度とエリシター
— 応答発光

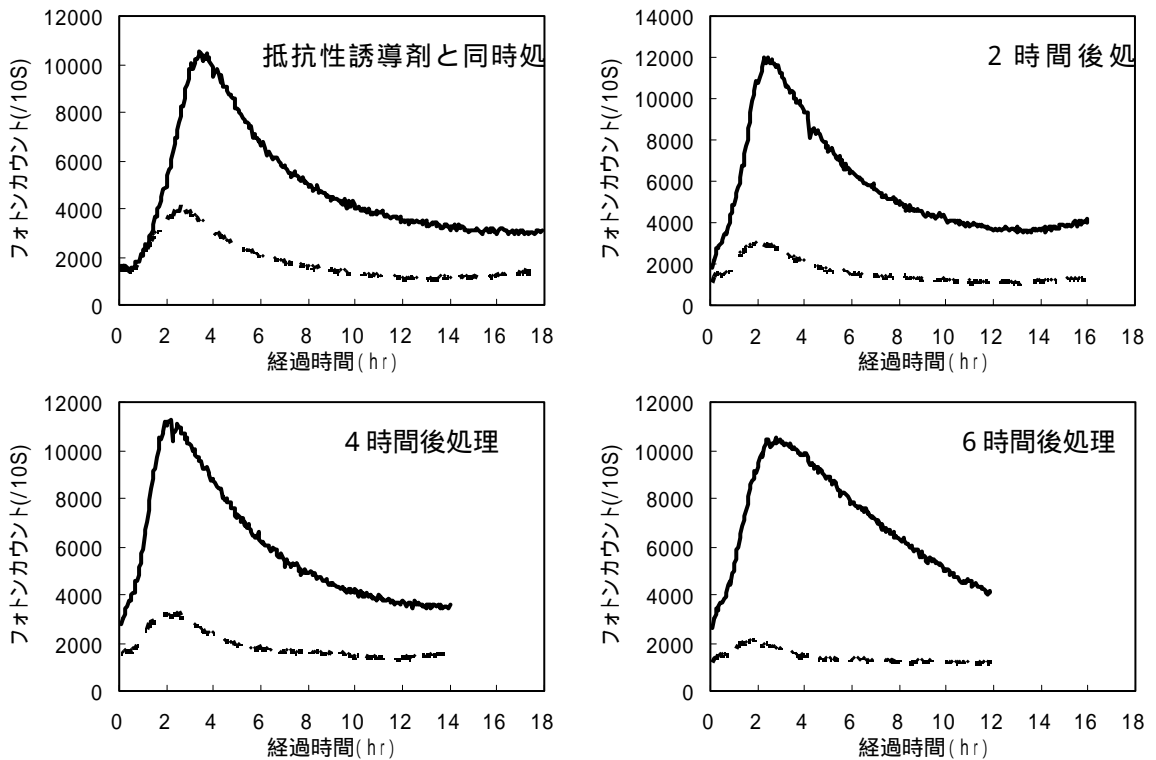


図2 エリシターの処理時期とエリシター応答発光
供試エリシター：6量体キチン 1mg/L

5 今後の課題と予定 なし

研究小課題名：1 抵抗性誘導剤のスクリーニング方法の開発
 研究項目：1-2 抵抗性誘導活性の判別方法の最適化及び簡略化
 (3) 既存の抵抗性誘導剤を用いた発光パターンの検証
 担当者：影山智津子 協力・分担関係：クミアイ化学、日本曹達、浜松ホトニクス
 研究期間：平成15年度～17年度

1 目的

抵抗性誘導剤をスクリーニングする新しい方法を開発するために、最適エリシターとその処理方法を決定した。そこで、本エリシターを用いたスクリーニング方法で、既存の抵抗性誘導剤の識別が可能かを検証する。

2 方法

(1)試験区

供試抵抗性誘導剤	処理濃度
アシベンゾラル-S-メチル (ASM)	200 μM
プロベナゾール (PBZ)	200 μM
カルプロパミド (carpropamide)	200 μM
バリダマイシン A (validamycin A)	200 μM
メチルジャスモン酸 (MeJM)	2 mM
2,6-ジクロロイソニコチン酸 (INA)	200 μM
-アミノ酪酸 (BABA)	20 mM
ハーピン(harpin)	100 nM

(2)試験方法 2mg/L 2,4-Dを含むUM液体培地で、イネカルス(品種:金南風)を23、120rpm、暗条件で10日間振とう培養し、実験に供試した。2.5gのイネカルスと培地3.8mlをプラスチックシャーレに入れ、それに所定の濃度で抵抗性誘導剤を0.7ml処理し、発光の測定を行った。抵抗性誘導剤処理の4時間後にエリシター0.35mlを処理し、発光を継続測定した。

(3)調査方法 対照として、抵抗性誘導剤の代わりに蒸留水0.7mlを処理したものと、発光パターン及び発光量を比較した。

3 結果の概要・要約

(1)抵抗性誘導剤あるいは抵抗性を誘導することが知られている薬剤を処理すると、ハーピンを除くといずれも対照区に比較して、エリシター応答発光の増強が認められた。

(2)本スクリーニング方法により、既存の抵抗性誘導剤が識別できることが確認された。

4 結果 (データを入れた詳細結果)

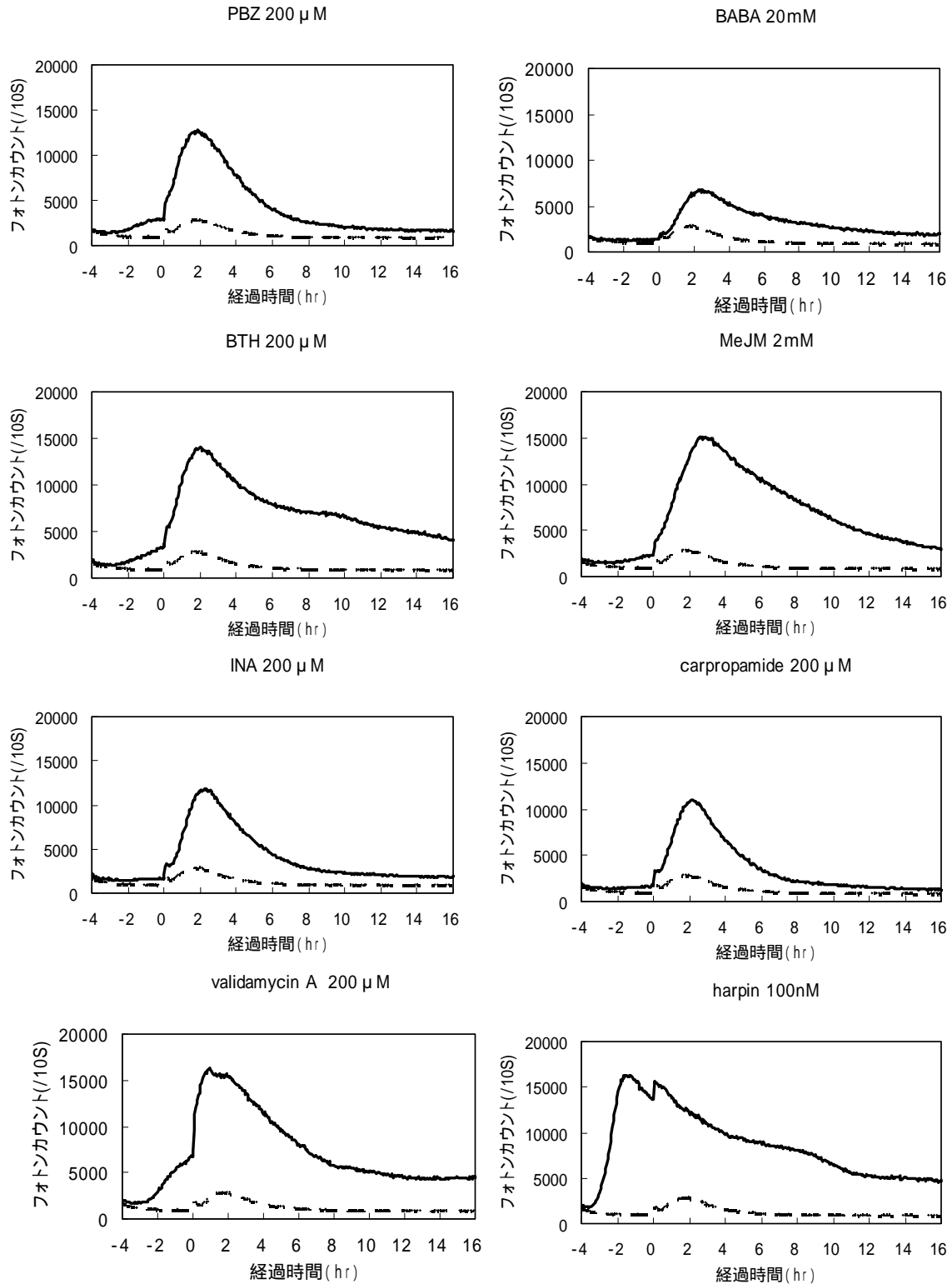


図1 各種抵抗性誘導剤処理とエリシター応答発光
 供試エリシター：6量体キチン 1mg/L
 — 抵抗性誘導剤処理
 - - 水処理

5 今後の課題と予定

抵抗性誘導活性の強弱を類別する方法の検討

研究小課題名：1 抵抗性誘導剤のスクリーニング方法の開発
研究項目：1-2 抵抗性誘導活性の判別方法の最適化及び簡略化
1-2-1 エリシター応答発光の増強程度と抵抗性誘導活性
担当者：加藤公彦・稲垣栄洋
協力・分担関係：クミアイ化学・日本曹達・浜松ホトニクス
研究期間：平成15年度～17年度

1 目的

これまで抵抗性が誘導されているとエリシター応答発光が増強される現象を明らかにし、抵抗性誘導活性の有無の判定が可能であることを明らかにしてきた。ここではさらに、エリシター応答発光の増強程度と抵抗性誘導活性の強弱との相関について検討を加える。

2 方法

【実験1】

(1) 試験構成

抵抗性誘導剤 Probenazole (PBZ) と Acibenzolar-S-methyl (ASM) を 1mM、200 μ M、40 μ M、8 μ M、1.6 μ M の各濃度でイネ培養細胞に処理した。

(2) 試験方法

N6 改変液体培地で10日間培養したイネ細胞 2.5g を直径 60mm のプラスチックシャーレに入れ、所定濃度の抵抗性誘導剤を含有する培養液 3.5ml を添加した。さらにエリシターとしてキチン 1 μ M を加え、発光を経時測定した。

【実験2】

(1) 供試化合物：イネ植物体とイネいもち病菌を用いた植物検定において PBZ と同程度の強い抵抗性誘導活性が認められた 48 剤

(2) バイオフィオンの測定：

MS 改変液体培地で7日間懸濁培養したイネ培養細胞「金南風」2.5g と培地を含む培養物 6ml に対し、終濃度 50ppm で化合物を処理した。化合物処理の2時間後にエリシターとしてキチン 6 量体を添加し、フォトンカウンターを用いてエリシター応答発光を測定した。

3 結果の概要・要約

(前年度までの結果) 抵抗性誘導活性物質はエリシター応答発光を必ず増強させることが判明した。

(1) PBZ と ASM とともに 40 μ M の処理濃度から、エリシター応答発光の顕著な増強が認められ、処理濃度が高まるほど応答発光の増強が強くなった(図1、2)。しかし、1mM の処理濃度では 200 μ M (実用濃度) に比較して大幅な増強は認められなく、実用濃度で頭打ちの傾向が認められた。このことから、同一薬剤内ではエリシター応答発光の増強程度と抵抗性誘導程度には相関があると考えられた。

(2) PBZ と同程度の強い抵抗性誘導活性が認められた化合物について、エリシター応答発光の増強程度の分布を図3に示した。いずれの化合物もイネ植物体では同程度の強い抵抗性誘導活性を示すが、エリシター応答発光の増強程度は広い範囲に分布していた。

以上から、同一薬剤内ではエリシター応答発光の増強程度と抵抗性誘導程度には相関が認められるものの、同程度に強い抵抗性誘導活性を示す薬剤は必ずしも強いエリシター応答発光の増強を誘導しないことが判明した。このことから、発光増強の強弱と抵抗性誘導活性の強弱との間には明確な相関はないと考えられた。

4 結果 (データを入れた詳細結果)

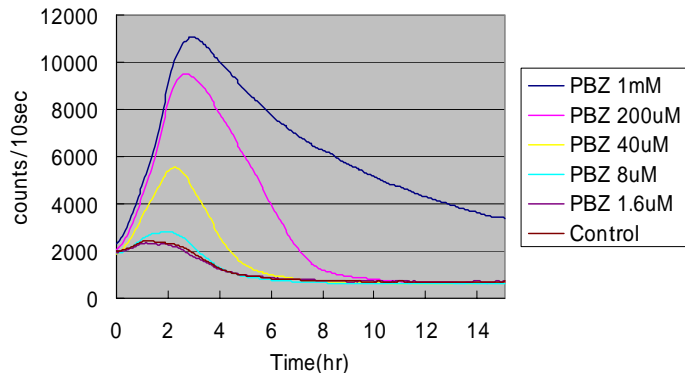


図1 Probenazole (PBZ)の処理濃度とエリシター応答発光の増強

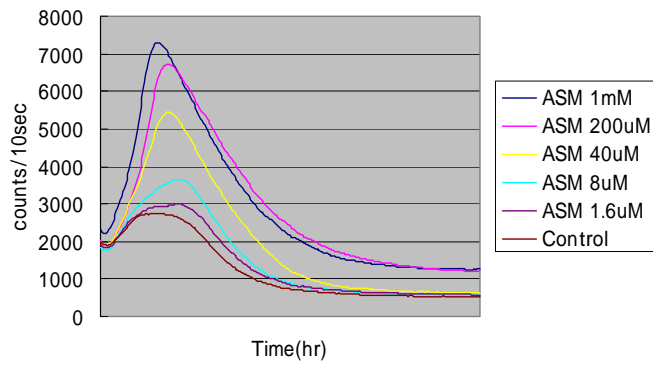


図2 Acibenzolar-S-methyl (ASM)の処理濃度とエリシター応答発光の増強

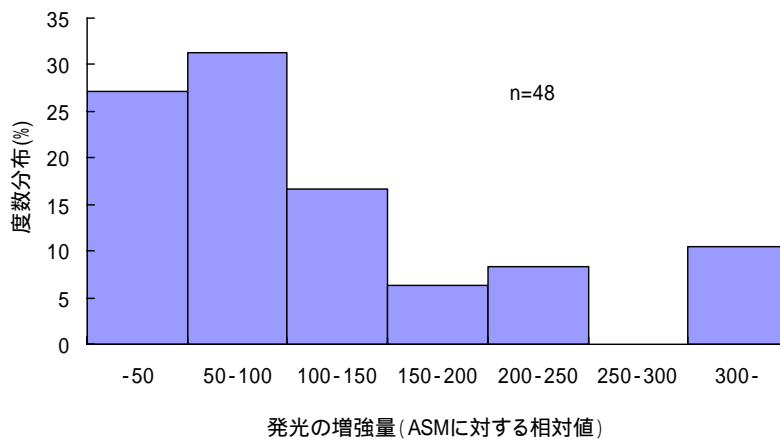


図3 抵抗性誘導活性が確認された化合物の発光強度の度数分布

5 残された課題と解決方法 特になし

研究小課題名：1 抵抗性誘導剤のスクリーニング方法の開発
研究項目：1-3 スクリーニングの基本メカニズムの解析
(1) 防御関連遺伝子の発現とエリシター応答発光増強現象との関係
担当者：伊代住浩幸 協力・分担関係：クミアイ化学・日本曹達・浜松ホトニクス
研究期間：平成15年度～17年度

1 目的

病害抵抗性誘導物質による植物培養細胞の前処理でエリシター応答発光が増強される現象は、本スクリーニング方法の基礎となっているが、防御関連遺伝子の発現解析を行うことにより、エリシター応答発光の増強現象と抵抗性誘導活性との相関を解析する。

2 方法

(1) 防御関連遺伝子のノーザン検出用プローブの作成

既知の配列情報に従い、RT-PCRで得たcDNAクローンから化学発光標識(DIG)したノーザン検出用のプローブを作成した。作成したプローブはPBZ1とRPR1(抵抗性誘導剤プロベナゾール処理で発現)、Os_PAL1(ファイトアレキシン合成に関与)、Os_Rac1(活性酸素種生成に関与)、EL2(キチンエリシター処理で発現)の検出用である。

(2) エリシター応答発光の増強時における防御関連遺伝子の発現

エリシター応答発光の増強効果が認められた9種類の化合物(第1図、その内の7種類は抵抗性誘導剤)を終濃度200uM(BABAは10mM)で60mmシャーレに分注したイネ培養細胞(品種：金南風)3gに処理した。その2時間後に培養細胞から全RNAを抽出し、防御関連遺伝子のノーザンプロット解析を行った。

同様に化合物を培養細胞に処理し、その2時間後にエリシターとして終濃度0.5uMで6量体キチン水溶液を混入し、エリシター応答発光の増強効果を溶媒処理を対照として測定した。

3 結果の概要・要約

(1) 供試した全ての化合物の前処理により、程度の違いはあるが、エリシター応答発光の増強が確認された(表1)。

(2) 調査した5種類の遺伝子の内、RPR1とOs_Rac1は溶媒処理で強く発現していて、抵抗性誘導のマーカー遺伝子としては不適であった。各種化合物の処理によりOs_PAL1、PBZ1及びEL2の3種類の遺伝子は、溶媒処理に比べて発現量が増加していた(表1、図1)。このことから、供試した全ての化合物の処理により培養細胞に抵抗性が誘導されたと考えられた。

(3) 発光増強程度と調査した防御関連遺伝子の発現量との間には明瞭な相関は認められなかった(表1)。

以上より、エリシター応答発光の増強現象と抵抗性誘導とは正に相関することが明らかとなった。

4 結果（データを入れた詳細結果）

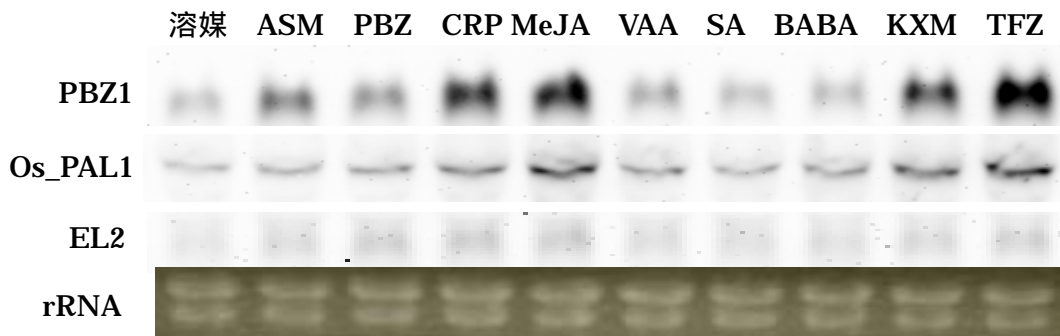


図1 各種化合物で2時間処理した培養細胞における防御関連遺伝子の発現状況

溶媒：2%Tween20含有DMF、ASM：Acibenzolar-S-methyl、PBZ：Probenazole、
 CRP：Carpropamide、MeJA：Jasmonic acid methyl-ester、VAA：Valido-xyl amine、
 SA：Salicylic acid、BABA：-amino butyric acid、KXM：Kresoxym-methyl、
 TFZ：Triflumizole
 rRNAの量で使用したRNA量の均一性を確認した。

表1 各種化合物処理によるイネ防御関連遺伝子の発現量とエリシター応答発光増強程度の比較

	各種化合物処理間における相対的な防御遺伝子発現量 ^x									
	溶媒	ASM	PBZ	CRP	MeJA	VAA	SA	BABA	KXM	TFZ
PBZ1	1.00	3.14	2.18	6.34	6.98	1.73	1.23	1.36	4.92	9.01
Os_PAL1	1.00	1.29	1.45	2.13	3.91	1.84	1.52	2.03	3.00	3.91
EL2	1.00	1.46	1.89	1.83	1.77	1.27	1.29	1.31	1.52	1.66
相対的 発光増強 ^y	1.00	4.96	6.45	1.36	1.09	2.18	2.65	2.96	5.96	3.82

x:溶媒処理区の遺伝子発現量を1とした化合物処理区における相対的遺伝子発現量 y:化合物処理区におけるエリシター応答発光量 / 溶媒処理区におけるエリシター応答発光量

5 残された課題と解決方法

発光増強程度と強い相関がある細胞の生理的变化を明らかにするため、今回使用しなかったストレス応答遺伝子群の動きを調査するとともに、生物発光に強く関ると考えられる励起分子種の生成について調査する。

研究小課題名：	1 抵抗性誘導剤のスクリーニング方法の開発
研究項目：	1-3 スクリーニングの基本メカニズムの解析 (2) 抵抗性誘導マーカー検出方法の確立
担当者：	伊代住浩幸 協力・分担関係： クミアイ化学、日本曹達、浜松ホトニクス
研究期間：	平成 15 年度～17 年度

1 目的

植物培養細胞においてエリシター応答発光の増強が認められる前処理条件下で、既知の病害抵抗性誘導マーカーの発現状況を調査し、エリシター応答発光を増強させる作用と病害抵抗性誘導作用の関連について解析する。ここではマーカーとして PR タンパク遺伝子の発現と、ファイトアレキシン類の蓄積状況を効率的に調査するための手法を確立する。

2 方法

(1)PR タンパク遺伝子 mRNA の発現解析

Northern blot hybridization 用プローブの作成

タバコ：酸性 PR-1a、キュウリ：class chitinase

NCBI 等の遺伝子データベースで公開されている配列情報を元に PCR 用のプライマーを設計し、標的領域をクローニングした。配列確認後、PCR DIG probe synthesis kit(Roche)でプローブを作成し、抵抗性誘導物質を処理した植物体から抽出した Total RNA を用いて、Northern blot 解析を行った。

(2)ファイトアレキシン類の蓄積量調査

イネのフェノール化合物の HPLC による定量解析

いもち病菌感染時及びいもち菌培養濾液処理時に蓄積するフェノール化合物 5 種(図 2)の定量を目的に各化合物の HPLC による同時検出条件を検討した。カラム温度は 40、移動相は Acetonitrile - 蒸留水 (TFA で pH3 に調整)を用い、濃度勾配について条件を決定した。ピーク検出には 273nm の吸光度を用いた。

3 . 結果の概要・要約

(1)タバコ酸性 PR-1a、キュウリ class chitinase のプローブを作成し、全身的抵抗性誘導物質である ASM (アシベンゾラル S メチル) を前処理した植物体において標的遺伝子の発現が検出された。標的遺伝子が誘導されないとされるメチルジャスモン酸 (MeJA), 蒸留水 (DW) 処理では、発現は検出されないかごく弱く、発現の特異性が確認された (図 1)。

(2)0min - 20min で溶出液中の Acetonitrile 濃度を 10% - 40%で変化させる条件において各化合物のピークが明瞭に分離した (図 2)。

以上より、一部のマーカーについては検出方法が明らかになった。

4. 結果 (データを入れた詳細結果)

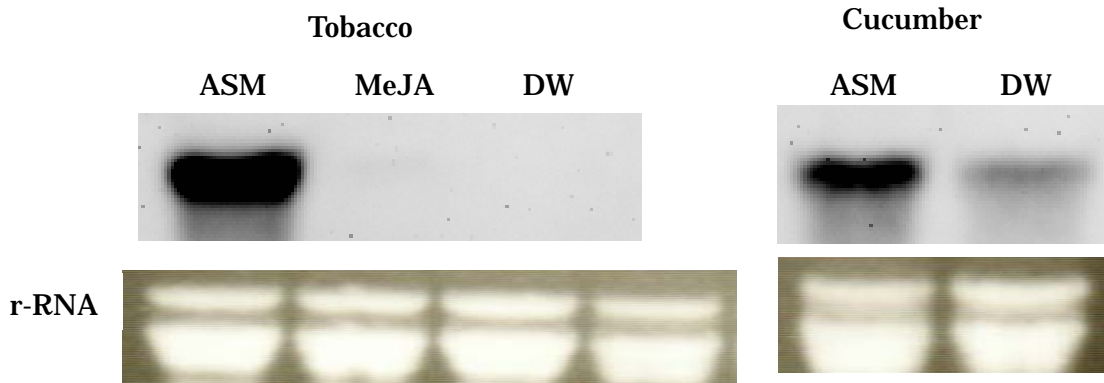


図1 タバコ酸性 PR-1a (左) およびキュウリ class chitinase(右) mRNA の検出
10 週齢のタバコ (品種 BY-2) の第 7 葉あるいは 2 週齢のキュウリの第 1 葉を 200 μ M の ASM、MeJA あるいは蒸留水に 5 秒間浸漬し、一日間温室に置いた後、接種葉を回収して検出に供試した。RNA 量は 15 μ g/レーン、アニ - リング温度は 50 、検出は Alkaline phosphatase-CDPstar 化学発光で行った。

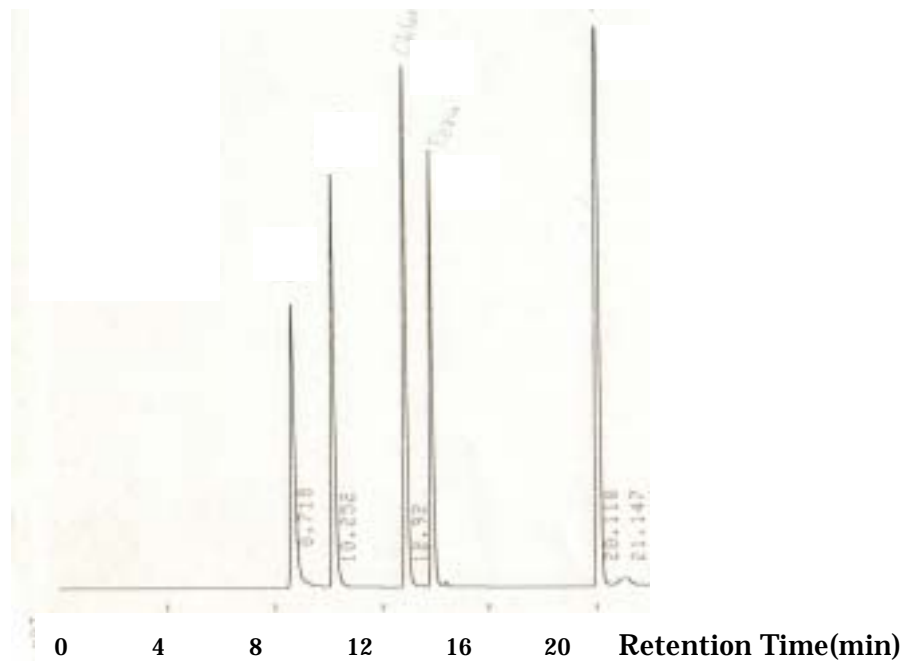


図2 HPLC イネのファイトアレキシン類 (フェノール化合物群) 検出条件の決定
0 - 20min で溶出液中の Acetonitrile 濃度を 10% - 40% で変化させた。図中のピークはそれぞれ Vanillic acid Coumaric acid Chlorogenic acid Ferulic acid *t*-cinnamic acid。各化合物を 1 mM 含むエタノール溶液を 10 μ l 注入した。

5. 今後の課題と予定

- (1) キュウリとタバコで抵抗性誘導活性とエリシター応答発光の増強効果との相関解析を行う。
- (2) 抵抗性誘導剤処理をしたイネ培養細胞からファイトアレキシンを検出する。

研究小課題名：1 抵抗性誘導剤のスクリーニング方法の開発
研究項目：1-3 スクリーニングの基本メカニズムの解析
1-3-1 植物体でのエリシター応答発光の増強
担当者：伊代住浩幸
協力・分担関係：クミアイ化学、日本曹達、浜松ホトニクス
研究期間：平成15年度～17年度

1 目的 イネ培養細胞を用いた培養細胞で観察される、抵抗性誘導剤の前処理によるエリシター応答発光の増強が、植物体でも共通して起こるか調査する。

2 方法

(1) イネ葉におけるエリシター応答発光現象の観察

イネ（品種：日本晴、6-7週齢）の最上位展開葉を1cm長に切り分け、10切片を滅菌水に浮かべた。26℃暗所で12時間維持した後、滅菌水をエリシターと交換し、直後から微弱発光をPCX-

100フォトンカウンター（浜松ホトニクス）で26℃、12時間以上測定した。エリシターにPGPF（植物生育促進菌類）GP17-2株の培養ろ液を使用した。このエリシターはイネ培養細胞に应答

発光を誘導し、根部への処理によるイネいもち病軽減効果が確認されている。対照にはPGPF用の液体培地（PDB）を用いた。バックグラウンドとして、培地、エリシター、イネ葉切片（滅菌水上）それぞれ単独での発光を測定した。

(2) 抵抗性誘導物質の前処理がエリシター応答発光に与える影響の評価

葉片10枚を、イネに病害抵抗性を誘導するProbenazole（PBZ）、Methyl jasmonate（MeJA）、Carpropamid（CRP）、Acibenzolar-S-methyl（ASM）の20,100,200 μM水溶液にそれぞれ浮かべた。

対照には1%DMF水溶液を用いた。26℃暗所で12時間維持した後、前処理液をエリシターと交換し、直後から、26℃、12時間以上、微弱発光を測定した。

3 結果の概要・要約

（前年度までの結果）イネ培養細胞にPGPF（GP17-2）エリシターを与えると、1-2時間後にピークを持つ応答発光が生じ、各種抵抗性誘導物質の前処理により、応答発光ピークが高まった。

20-200 μMの前処理では、各剤とも200 μMでもっとも増強効果が高く2-3倍の増強を示した。

(1) イネ葉切片にPGPFエリシターを与えると、6-8時間後にピークを持つ発光の増加が認めら

れた（図1A）。また、各々単独では、顕著な発光増加は認められなかった（図1B）。

(2) 各種抵抗性誘導剤の前処理により、エリシター応答発光のピークが高まった。PBZ、MeJA、CRPでは20 μM、ASMでは100 μMでもっとも増強効果が高く、1.2-1.3倍の増強が認められたが、200 μMでは、むしろ効果が低かった（図2）。

以上より、エリシター及び抵抗性誘導剤に対する反応性に差異があるものの、イネ植物体でも培養細胞と同様にエリシター応答発光が生じ、抵抗性誘導剤の前処理により、応答発光の増強が起こることが明らかになった。

4 結果 (データを入れた詳細結果)

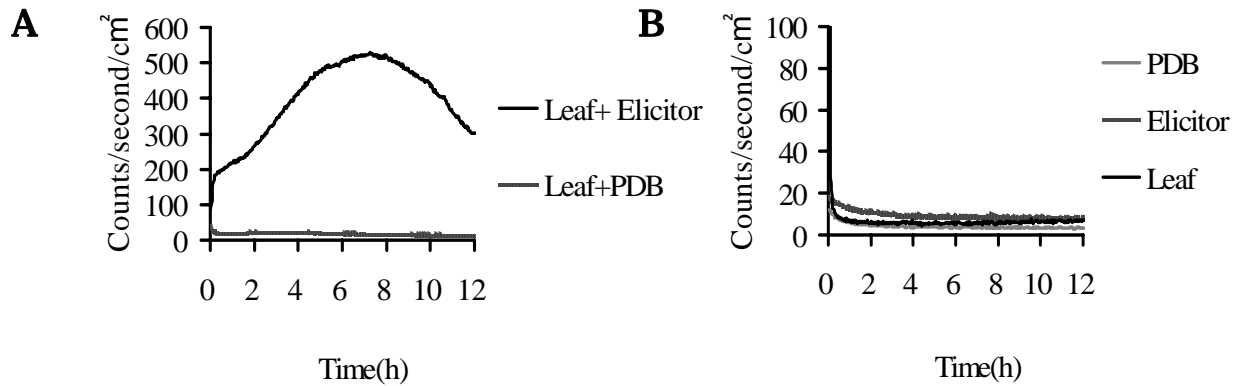


図1 イネ葉切片のエリシター応答発光 (A) と、葉切片およびエリシター単独の発光 (B)
A: 図中0hで滅菌水を除きエリシターを加えた。

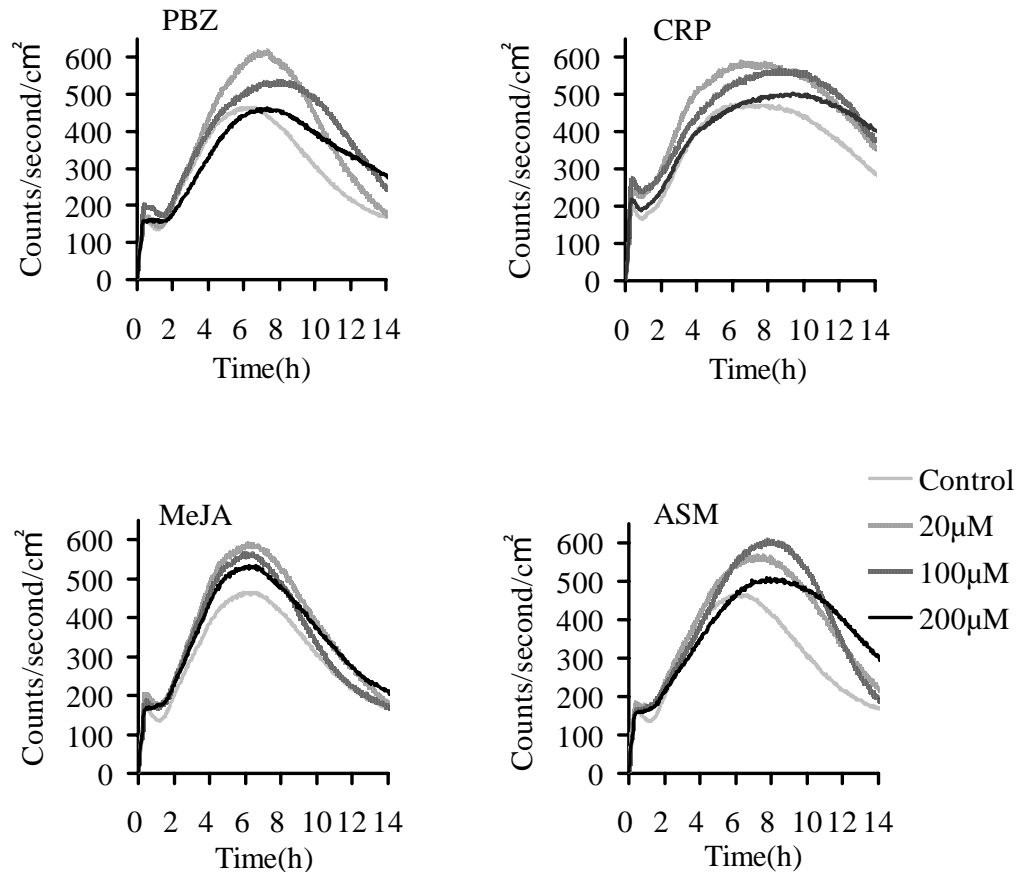


図2 各種抵抗性誘導剤の前処理によるイネ葉片のPGPF エリシター応答発光の増強
図中0hで前処理液を除去し、エリシターを加えた。

5 残された課題と解決方法

- (1) 植物体におけるエリシター応答発光の増強メカニズムについて、培養細胞のマイクロアレイデータ等を基に検証する。実際の防除効果に寄与と思われる遺伝子発現と、応答発光増強に関わる遺伝子発現の関連付けをする。

研究小課題名：1 抵抗性誘導剤のスクリーニング方法の開発

研究項目：1-3 スクリーニングの基本メカニズムの解析

1-3-2 エリシター応答発光の抑制剤を用いた解析

担当者：影山智津子

協力・分担関係：クミアイ化学、日本曹達、浜松ホトニクス

研究期間：平成15年度～17年度

1 目的

スクリーニングの基本メカニズムは、抵抗性誘導状態でエリシターを処理するとエリシターに起因する発光が増強される現象に基づいている。細胞がエリシターを感知してから始まる病害抵抗性誘導のシグナル伝達経路のどの部分において発光現象が起こっているかを、抑制剤を用いて検討する。

2 方法

(1) 試験区 供試阻害剤等及び供試濃度は表1のとおり。

(2) 試験方法 1mg/L 2,4-Dを含む改変N6液体培地で、イネカルス(品種：金南風)25、120rpm、暗条件で振とう培養し、継代10日後実験に供試した。カルスを新しい培地で3～4時間振とう培養し、0.5g(生重)のイネカルスを径35mmプラスチックシャーレに入れ、培地1mlを加えた。各種阻害剤等はDMSO(100倍)あるいは水(20倍)に溶解し、所定濃度になるように処理し、10分後6量体キチンまたはフォスファジン酸(PA)をそれぞれ1または100 μ Mとなるように処理し、光子を測定した。

(3) 調査方法 コントロールとして、DMSOまたは水処理のみ、あるいはDMSOまたは水処理の10分後に6量体キチンのみまたはPAのみを処理し、発光パターン及び発光量を比較した。

3 結果の概要・要約

(1) 6量体キチンによって誘導される発光は、カルシウムイオン、鉄イオン、塩素イオンチャンネル、パーオキシダーゼ、ラジカルを阻害すると、強く阻害された。また、タンパク質のリン酸化を阻害すると初期発光が強く阻害され、NADPHオキシダーゼを阻害すると53%の発光が阻害された。

(2) これらは、いずれも病害抵抗性誘導に伴って起こるシグナル伝達経路と関連のある酵素および成分であることから、エリシター応答発光もシグナル伝達経路に沿って起こっていることが示唆された。

(3) ラジカルのスカベンジャーであるタイロン処理により97%の発光が阻害されたことから、発光に関与する物質として、生物発光で報告されているラジカルの存在が示唆された。

(4) PLA₂の特異的阻害剤3種類を処理したところ、発光の阻害が見られなかったことから、シグナル伝達経路のうち、PLA₂の下流は発光に関与していないと考えられた。

(5) PLA₂、PLC及びPLCのGプロテイン阻害剤であるU73122を処理しても、6量体キチンによる発光は阻害されず、PA処理と同様の発光であったことから、6量体キチンによる発光にはPLCの下流は関与していないと考えられた。

(6) 6量体キチンの代わりにPAを処理すると同様の発光パターンが見られ、各種阻害剤による阻害程度もキチンに類似していた。このことから、PAの下流は発光に関与する主要な経路であると考えられた。

4 結果（データを入れた詳細結果）

表1 6量体キチン及びPA（フォスファチン酸）が誘導する発光に対する阻害剤の影響

	主な阻害サイト	阻 害 剤 等	濃 度	阻害率(%) ^a	
				キチン	PA
阻 害 有 り	タンパク質リン酸化酵素	K252a	10 μ M	49 (100 ^b)	58 (100 ^b)
		ラベンダスチンA	30 μ M	6 (92 ^b)	40 (96 ^b)
	カルシウムイオンチャネル	ランタンクロライド ^d	20mM	100	67 ^c
	カルシウムイオン	EGTA	5mM	100	100
	塩素イオンチャンネル	DIDS	500 μ M	73	74
	NADPHオキシダーゼ	DPI	100 μ M	53	53
	過酸化水素	カタラーゼ ^e	2000U/ml	12	16
	鉄イオン	DTPA	1mM	90	79
	パーオキシダーゼ(POX)	SHAM	1mM	90	100
	ラジカル	タイロン	1mM	97	100
阻 害 無 し	タンパク質脱リン酸化酵素	カリクリンA	300nM	-531	-126
		オクタ酸	300nM	-174	-45
	スーパーオキシド	SOD	200U/ml	-8	14
	フォスホリパーラーゼ A ₂ (PLA ₂), LOX	DEDA	2 μ M	-3	-15
	PLA ₂ , リポキシゲナーゼ (LOX)	ETYA	10 μ M	-11	-52
	PLA ₂	BEL	50nM	-54	-8
	PLA ₂ , フォスホリパーラーゼ C(PLC)	U73122	100 μ M	-6	3
MAPキナーゼ	アピゲニン	200 μ M	-43	-67	

^a; 阻害率：水またはDMSOのみの発光をベースラインとし、水または1%DMSOに1 μ M 6量体キチンまたは100 μ M PA処理区の最大発光量に対する阻害剤処理区の最大発光量の減少の割合を示す

^b; 初期ピークの阻害率

^c; 処理濃度 1mM

5 今後の課題と予定

(1) エリシター応答発光の原因となる化学反応及び物質をさらに詳細に解析する

<p>研究小課題名：1 抵抗性誘導剤のスクリーニング方法の開発 研究項目：1-3 スクリーニングの基本メカニズムの解析 1-3-3 エリシター応答発光の増強と病害抵抗性遺伝子のプライミング 担当者：伊代住浩幸 協力・分担関係： 研究期間：平成15年度～17年度</p>

1 目的 抵抗性誘導時に認められる、防御関連遺伝子発現のプライミング(早期化・増強)現象と、エリシター応答発光の増強との関連を明らかにする。

2 方法

(1) イネ培養細胞のエリシター応答発光の測定と RNA 抽出用サンプルの採取

イネ培養細胞(品種:日本晴)を改変 N6-D 液体培地で 12 日間振とう培養して供試した。2 g の細胞を含む 6 ml の懸濁液に、イネに抵抗性を誘導する Probenazole (PBZ)、Methyl jasmonate (MeJA)、Carpropamide (CRP)、又は、Asibenzolar-S-methyl (ASM) を DMF に溶かしたストック溶液を 6 μ l 加え、終濃度を 200 μ M とした。対照には等量の DMF を添加した。処理開始から 4 時間後に、エリシターとして PGPF 菌株 GP17-2 の培養液を終濃度 5 % で加えた。エリシター添加直前及び、添加 30 分後に各サンプルから約 100mg の細胞を採取し、吸引除水後、速やかに遠心チューブに入れて液体窒素中で凍結させた。微弱発光は、MSPC フォトンカウンターで、前処理時から 12 時間以上測定した。

(2) RNA の抽出とリアルタイム定量 RT-PCR によるイネ防御遺伝子発現の調査

凍結した細胞(約 50mg)から RNeasy® Plant Mini Kit 及び RNase Free DNase Kit を用いてトータル RNA を抽出・精製した。トータル RNA 500ng から random 6mer をプライマーに cDNA を合成し、得られた cDNA を 40 倍希釈して、1 μ l を SYBR® Premix Ex Taq™ による PCR 反応に供試した。防御関連遺伝子として *Cht-1* (キチナーゼ)、*Os_PAL1* (PAL)、*PBZ1*、*EL2* を標的とし、特異的プライマーセットを用いて 95 \cdot 60sec \times 1 サイクル + (95 \cdot 5sec - 64 \cdot 30sec) \times 40 サイクルで増幅した。標準曲線及び、各サンプルにおける内部標準遺伝子ポリユビキチン (RUBQ1) の発現量をもとに、各標的遺伝子の発現量を正規化し解析に供した。

3 結果の概要・要約

(1) 発光増強が確認されていたエリシター添加 30 分後の時点で、プライミング現象が認められたのは *PBZ1* 遺伝子発現のみであった。(図 1)。

(2) 各種抵抗性誘導物質の前処理による、エリシター応答性 *PBZ1* 遺伝子発現の増強程度は、Control に対して 6.3 - 117.7 倍で、2.3 - 3.4 倍であったエリシター応答発光の増強と強い相関を持つものでは無かった(表 1)。

以上より、エリシター応答発光と関連の強い遺伝子発現の変化は確認できなかった。しかしながら、抵抗性誘導物質によりイネ細胞がプライミングを受けている状態で、エリシター応答発光の増強が起きていることが明らかになった。

4 結果 (データを入れた詳細結果)

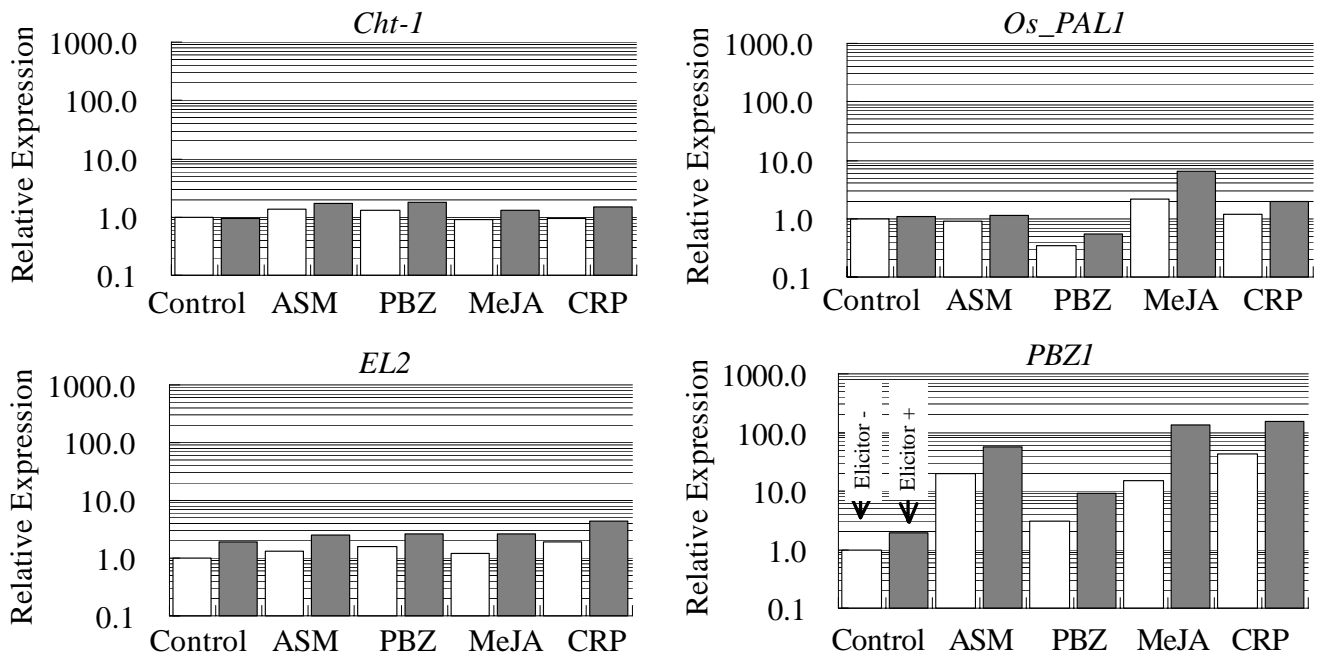


図1 各種抵抗性誘導物質の前処理によるエリシター応答性 PBZ1 遺伝子発現の増強効果
縦軸は常用対数表示。白色：エリシター無、灰色：エリシター有

第1表 防御遺伝子発現の増強効果と応答発光増強効果の比較

前処理	増強程度	
	PBZ1 発現 ^a	応答発光 ^b
PBZ	6.3	3.3
MeJA	117.7	2.1
CRP	111.9	3.2
ASM	36.5	3.4
Control	1.0	1.0

^a 処理区: [(エリシター有)-(エリシター無)] / Control: [(エリシター有)-(エリシター無)]

^b 処理区: [(応答発光最大)-(0h 値)] / Control: [(応答発光最大)-(0h 値)]

5 今後の課題と予定

エリシター応答発光増強と強く関連する遺伝子発現の増減について、遺伝子の種類、変化の起こる時期等を DNA マイクロアレイ及びリアルタイム定量 RT-PCR による解析で明らかにする。

研究小課題名：2 抵抗性誘導剤の開発
研究項目：2-1 抵抗性誘導剤のための新しい基本骨格の探索 (1) 抵抗性誘導活性を持つキノコの探索
担当者：山口亮・加藤公彦 協力・分担関係：クミアイ化学・日本曹達
研究期間：平成15年度～17年度

1 目的

キノコ等の天然物質の中から、新しい抵抗性誘導物質を探索する。本年度は、野外で採集したキノコの中から、強い抵抗性誘導活性を有するものを選抜する。

2 方法

浜北森林公園、小笠山、桶ヶ谷沼、天竜の森、獅子が鼻公園及び兜塚公園で、306サンプルのキノコを採集し、種名を同定すると共に写真撮影を行った。キノコの子実体1gを秤量し、それを抵抗性誘導活性の評価に用いた。

抵抗性誘導活性の1次スクリーニングはキュウリ（相模半白）の子葉を用いて行った。キノコを10倍量の蒸留水中で磨砕し、それを子葉の表裏になすりつけた。処理の1～2日後に炭そ病菌の孢子懸濁液（ 10^6 cells/ml）を子葉に十分に噴霧接種した。それを25℃、温室、暗黒状態に24時間保ち、その後、25℃、16時間日長の環境制御室で発病を観察した。この試験で効果の認められたものは、同様に子葉に処理した後に、今度は本葉に炭そ病菌を接種して、抵抗性誘導活性を調査した（2次スクリーニング）。

3 結果の概要・要約

- (1) 採集したキノコの中で、種が同定できたものは多くはなかった。
- (2) 306サンプルの内、1次スクリーニングで選抜されたものは26サンプルであった。
- (3) 1次スクリーニングで選抜されたものの中で、2次スクリーニングで比較的強い抵抗性誘導活性が確認されたものは2サンプルであった。
- (4) 2次スクリーニングで選抜されたキノコの1種から、活性成分の同定をクミアイ化学との共同研究で実施している。

4 結果（データを入れた詳細結果）

第1表 生物検定の結果

採集場所	1次スクリーニング (陽性数 / 検定数)	2次スクリーニング (陽性数 / 検定数)
浜北森林公園	2 / 58	1 / 2
小笠山、桶ヶ谷沼	10 / 70	1 / 10
浜北森林公園	2 / 65	0 / 2
天竜の森 獅子が鼻公園	1 / 26	0 / 1
兜塚公園	1 / 16	0 / 1
天竜の森	10 / 71	0 / 10

5 残された課題と解決方法 キノコの活性成分の同定

研究小課題名：2 抵抗性誘導剤の開発

研究項目：2-1 抵抗性誘導剤のための新しい基本骨格の探索

2-1-1 化合物のスクリーニング

担当者：加藤公彦・影山智津子・稲垣栄洋・伊代住浩幸

協力・分担関係：クミアイ化学・日本曹達・浜松ホトニクス

研究期間：平成15年度～17年度

1 目的

抵抗性誘導剤のための新規の基本骨格を有する化合物を探索する。ここでは、農薬メーカーが保有する化合物から、イネ細胞のエリシター応答発光の増強を指標に抵抗性誘導活性を有すると思われる化合物を選抜し、類縁化合物の合成展開に供する。

2 方法

(1) 供試化合物：クミアイ化学(クミカ)および、日本曹達(日曹)保有の化合物。

(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(フォトンアッセイ)：

MS 改変液体培地で7日間懸濁培養したイネ培養細胞‘金南風’2.5gと培地を含む培養物6mlに対し、終濃度50ppmで化合物を処理した。処理後2時間後にエリシターとしてキチン6量体を添加し、フォトンカウンターを用いてエリシター応答発光を測定した。イレギュラーな発光を示したものを除き、ASMの発光増強を100として30以上の発光増強が認められた化合物を選抜した。

(3) イネを用いた植物検定：

フォトンアッセイで選抜した化合物を合成展開した117化合物を供試した。直径9cmの白磁鉢に1.5葉期の水稲‘愛知旭’稚苗を3茎ずつ4カ所に移植し、2.5葉期に水和剤を有効成分濃度が10アールあたり300gになるように鉢に水面施用処理をした。処理3週間後に、イネいもち病菌の分生孢子懸濁液を噴霧接種し、接種5日後に接種時の最高位葉の病斑数を調査した。

(4) キュウリを用いた植物検定：

フォトンアッセイで選抜した化合物を100ppm濃度でキュウリの子葉に塗布し、3日間の誘導期間後、キュウリ炭そ病菌の孢子懸濁液(1×10^6 cells/ml)を噴霧接種し、25-16時間蛍光灯照明下で発病面積を調査した。試験は1薬剤に対し、2ポット6個体で行った。

3 結果の概要・要約

(前年度までの結果)イネの培養細胞のエリシター応答発光を用いた抵抗性誘導活性物質のスクリーニング方法を確立した。

(1) フォトンアッセイの結果、供試した4421点の化合物のうち、1135点(選抜率25.7%)を選抜した(表1)。

(2) イネの植物検定では、合成展開した化合物の多くは高い抵抗性誘導活性を示し、このうち48化合物は既存の誘導剤であるPBZ(プロペナゾール)と同程度の高い抵抗性誘導活性を示した(表2)。このうち、特に2化合物を抵抗性誘導剤の候補として選抜した。(クミアイ化学)

(3) キュウリの植物検定では、3化合物が既存の誘導剤であるアシベンゾラルSメチル(ASM)、カルプロパミド(CRP)と同程度の高い抵抗性誘導活性を示した(表3)。このうち、特に活性の強かった1化合物が有望と考えられた。

以上の結果から、抵抗性誘導活性を有する有望な化合物が選抜された。今後、引き続き化合物のスクリーニングを行うとともに、これらの有望化合物について確認試験を行う予定である。

4 結果（データを入れた詳細結果）

表1 エリシター応答発光の増強による選抜結果

供試数	供試数	選抜数
クマイイ化学	1006	456
日本曹達	3415	679
計	4421	1135

表2 合成展開した化合物のイネ植物体を用いた植物検定の結果

化合物群	化合物数	抵抗性誘導活性				
		~	~ x	x		
a	15	11	2	1	0	1
b	43	27	12	0	4	0
c	17	7	3	4	2	1
d	23	3	5	7	5	3
e	5	0	2	1	1	1
その他	14	0	1	3	1	9
計	117	48	25	16	13	15

:PBZと同程度, ~ :同程度から1/3, :PBZの1/3程度, ~ x :PBZの1/3以下, x :低い効果 ~ 効果なし

表3 キュウリ植物体を用いた植物検定の結果

化合物数	抵抗性誘導活性		
350	1	2	8

:ASMと同程度, :CRP以上, :CRPと同程度

5 今後の課題と予定

- ・抵抗性関連遺伝子発現の確認および抵抗性誘導効果の実証試験

研究小課題名：2 抵抗性誘導剤の開発

研究項目：2-1 抵抗性誘導剤のための新しい基本骨格の探索

2-1-2 天然物質のスクリーニング

担当者：山口亮・稲垣栄洋・加藤公彦・影山智津子・伊代住浩幸

協力・分担関係：クミアイ化学・日本曹達・浜松ホトニクス

研究期間：平成15年度～17年度

1 目的

きのこ等の天然物質の中から、新しい抵抗性誘導物質を探索する。本年度は、保存菌株の培養菌糸体及び富士山・小笠山等で収集した野生きのこの子実体から、強い抵抗性誘導活性を有するものを選抜する。

2 方法

(1) 供試材料

きのこ菌糸体：林業技術センター保存菌株109株、NBRC（旧IFO）分譲菌株78株、信州大学農学部分譲菌株46株の計233株を培養し、それらの菌糸体を培養液15ml中で磨砕した。

きのこ子実体：富士山・小笠山・県民の森・森林公園等で収集したきのこの子実体987検体（H15年度に実施した306検体を含む）を10倍量の蒸留水中で磨砕した。

植物：各地で収集した高等植物71科403種575検体から生鮮重で2gを切り取り、蒸留水10ml中で磨砕した。

(2) 生物検定試験

各試料をキュウリ（相模半白）の子葉または本葉第1葉に塗布し、2～5日間の誘導期間後、キュウリ炭そ病菌の孢子懸濁液（ 10^6 cells/ml）を処理葉及び上位葉に噴霧接種した。それを25℃、湿室、暗黒状態に24時間保ち、その後、25℃、16時間日長の蛍光灯照明下で発病を観察した（1次スクリーニング）。この試験で活性の認められた一部のものについて、同様の試験を規模を拡大して行い、抵抗性誘導活性を確認した（2次スクリーニング）。

3 結果の概要・要約

（前年度までの結果）

きのこ子実体306検体についてスクリーニングを行った結果、26検体で炭そ病の発病抑制活性があり、2種が有望と考えられた。

- (1) 菌糸体スクリーニングの結果、供試した233菌株から、10種を選抜した（表1）。これらの中で、炭そ病の発病を強く抑えたものは1種であった。
- (2) 子実体スクリーニングの結果、112検体（H15年度の実施結果26検体を含む）が活性を示した。これらの中、種が同定され、中程度以上の活性を示し、子実体の大量収集が行える可能性がある20種（H15年度実施結果2種を含む）を選抜した（表2）。20種の中、本年度に子実体の収集が可能であった7種について、抵抗性誘導活性を確認したところ、1種で強い活性が認められた（表2）。
- (3) 植物スクリーニングの結果、575検体から活性の高い8種を選抜した（表3）。この8種は2次スクリーニングで、効果の確認を行っている。

4 結果（データを入れた詳細結果）

表1 菌糸体試料の生物検定結果

使用菌株	1次スクリーニング (陽性数 / 検定数)	選抜種数 ^{a)}
林業技術センター保存菌株	13 / 109	9
NBRC分譲菌株	4 / 78	1
信州大学農学部分譲菌株	3 / 46	0

a)活性の高い種の中で培養の比較的容易なものを有望種として選抜した。

表2 子実体試料の生物検定結果

使用サンプル	スクリーニング結果 (陽性数 / 検定数)	選抜種数 ^{a)}
きのこ子実体 (1次スクリーニング)	112 / 987	20
選抜種の子実体 (2次スクリーニング)	1 / 7	1

a)活性が中程度以上で、種が同定でき、子実体の大量収集が可能なものを有望種として選抜した。

表3 植物試料の生物検定結果

検体数 ^{a)}	科数	調査種数	選抜種数
597	71	407	8

a)採取地や品種、変種の違いによる種の重複を含む。

5 残された課題と解決方法

- (1) 2次スクリーニング未実施の種について試料の培養や収集を行い、スクリーニングを実施する。
- (2) 選抜された種について、抵抗性誘導関連遺伝子の発現を調査する。
- (3) 有望種について、有効成分の安定性の確認及び同定を行う。

研究小課題名：3 抵抗性誘導剤の作用メカニズムの解析
研究項目：3-2 病害抵抗性に関連する遺伝子の発現状況調査
担当者：山口亮・加藤公彦・稲垣栄洋・影山智津子・伊代住浩幸
協力・分担関係：クミアイ化学・日本曹達・浜松ホトニクス
研究期間：平成16年度～17年度

1 目的

化合物や天然物質のスクリーニングから得られた有望試料について、病害抵抗性遺伝子の発現を調査し、遺伝子レベルでの抵抗性誘導の確認を行うと共に、植物に対する作用メカニズムを推定する。今年度は、有望試料について遺伝子レベルでの抵抗性誘導の確認を行う。

2 方法

- (1) 供試試料：きのこのスクリーニング結果から、強い病害抵抗性誘導活性を有することが明らかとなった2種を供試した。
- (2) 試験方法：きのこの磨砕液をキュウリ（相模半白）の子葉の表裏になすりつけた。処理の1日後及び4日後に上位葉である本葉第1葉を採取し、直ちに-85℃で凍結した。凍結した葉から全RNAを回収し、アクチン遺伝子を内部標準遺伝子としたリアルタイム定量RT-PCRを行い、病害抵抗性遺伝子であるPOD遺伝子及びキチナーゼ遺伝子の発現量を測定した。

3 結果の概要・要約

- (1) 処理1日後のPOD遺伝子発現量は、水処理を1としたとき、きのこAで57.1、きのこBで187.5と非常に高く、両試料ともPOD遺伝子が強く発現していることが分かった（図1）。なお、抵抗性誘導剤ASMのPOD遺伝子発現量は処理3日後の処理葉で1053、上位葉で327であった。
- (2) 処理4日後ではPOD遺伝子の発現は低いことから、処理後数日で本遺伝子の発現量は低下することが分かった（図1）。
- (3) 処理1日後のキチナーゼ遺伝子発現量は、水処理を1としたとき、きのこAで3.8、きのこBで3.2であった。
- (4) POD遺伝子とキチナーゼ遺伝子の発現量を比較すると、きのこA、BともにPOD遺伝子の発現量が高かった。このため、有効成分の単離・同定にはPOD遺伝子をマーカーとすることが望ましいと考えられた。
- (5) 以上より、きのこAとBの磨砕液はキュウリに病害抵抗性を誘導すると考えられた。

4 結果(データを入れた詳細結果)

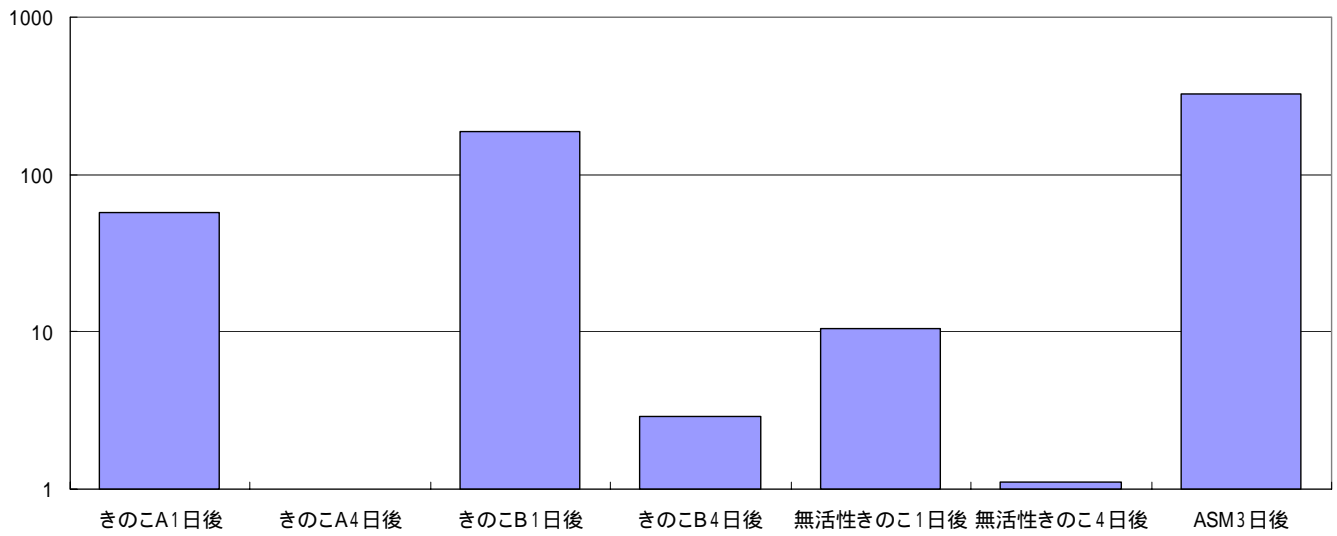


図1 POD遺伝子の発現量

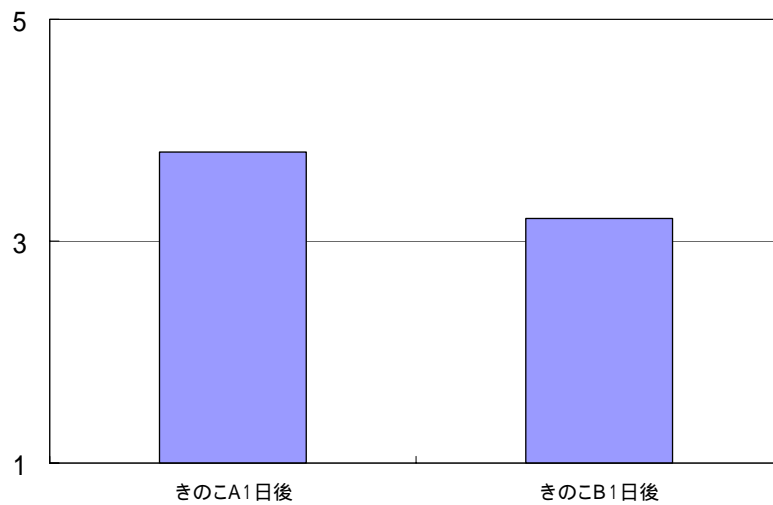


図2 キチナーゼ遺伝子の発現量

5 残された課題と解決方法

- (1) POD遺伝子の発現時期を調査し、物質同定に最適な検定系を作成する。
- (2) 他の有望種について、抵抗性誘導関連遺伝子の発現量を調査する。

現在、展開をめざしている主な成果は次のとおりである。

バイオフィオンを指標とした病害抵抗性誘導活性の評価方法

[要約] 病害抵抗反応時のバイオフィオン(生体微弱発光) 発生量が、病害抵抗性誘導剤の作用によりプライミングを受け、増大する現象を発見した。この現象に基づき、迅速、安価、簡便な病害抵抗性誘導活性の評価方法を開発した。

[背景・ねらい]

植物の病害抵抗性誘導剤は、植物が持つ病害抵抗性を高めることにより病害を防ぐことができる。そのため、抵抗性誘導剤は生物毒性が極めて低い上に、多種類の病害に有効で、農薬使用量の低減を通して農業による環境への負荷を減少させることができ、社会的に重要である。現在、物質が持つ抵抗性誘導活性の評価は、植物に病原菌を接種する方法により行われているが、より簡便で迅速な評価方法の開発が求められている。

[成果の内容・特徴]

1. 病害抵抗反応時に誘導されるバイオフィオンには、抵抗性誘導剤の作用によるプライミング現象が認められる(図1)。
2. バイオフィオンのプライミング現象の特色は、抵抗性誘導剤の種類に関わらず、同程度の増強が認められる点にある(表1)。これに対し、遺伝子のプライミングは、抵抗性誘導剤の種類により、大きな変動が見られる。
3. イネ培養細胞を用いた抵抗性誘導活性の評価方法を開発した(図2)。2.5gの培養細胞に被検物質と培養液を加え、全体を6mlとする。バイオフィオンを測定しながら培養細胞に病害抵抗性を2時間、誘導し、キチンエリシターを添加して病害抵抗反応を誘起する。ホトンカウンターでバイオフィオンのプライミング状況を調査し、抵抗性誘導活性を評価する。
4. 本評価法に必要な消耗品は培養細胞、シャーレ及びエリシターのみで、ランニングコストは安く、かつ、培養細胞さえ準備できていれば、検定に要する時間は実験準備や解析時間を含めても7時間で終了し、かなり迅速・簡便な方法と言える。

[成果の活用面・留意点]

1. イネ培養細胞は培養条件により、評価に使用できる時期(培養開始からの経過日数)が異なるので、事前に調査する。
2. イネ培養細胞のキチンエリシターに対する感受性は培養条件により大きく変動するため、バイオフィオンのプライミング現象がはっきりと認められる処理濃度を事前に調査する。
3. 被検物質自体が病害抵抗反応を強く誘起する場合には、バイオフィオンのプライミング現象が弱くなるので、被検物質の処理濃度を調整する。
4. 本評価方法により、物質の抵抗性誘導活性の有無を判定できるが、抵抗性誘導活性の強さまでは評価できない。

[具体的データ]

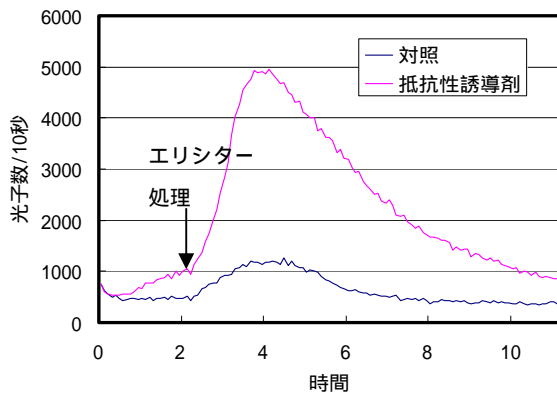


図1 バイオフィオンのプライミング
ASM はキチンエリシター処理の2時間前に、200 μ M で処理した。

表1 バイオフィオンがプライミングを受ける程度

前処理 ^{a)}	コントロールに対す増強程度 ^{b)}		
	<i>Os_PAL1</i>	<i>PBZ1</i>	バイオフィオン
PBZ	2.3	4.6	3.3
MeJA	50.1	55.1	2.1
CRP	9.6	56.8	3.2
ASM	2.9	24.7	3.4

- a) キチンエリシター添加の4時間前に、イネ培養細胞にプロベナゾール(PBZ)、メチルジャスモン酸(MeJA)、カルプロパミド(CRP)又は、アシベンゾラルSメチル(ASM)を200 μ M で与えた。
- b) エリシター添加後の増加分について、抵抗性誘導剤を前処理した区の値を、前処理なし(コントロール)の値で割ったものを増強程度とした。

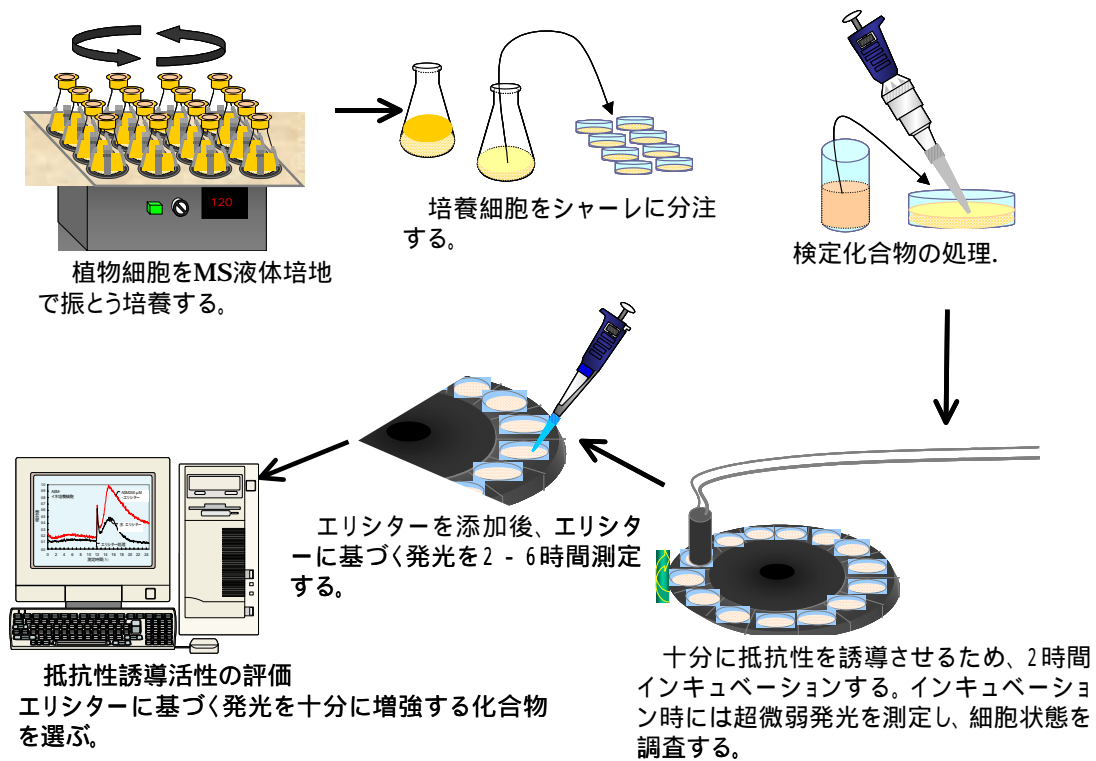


図2 バイオフィオンを指標にした抵抗性誘導活性の評価方法

イネ培養細胞の病害抵抗反応に伴うバイオフィトン放射のシグナル伝達経路

[要約] イネ培養細胞にキチンエリシターを処理したときに急激に上昇するバイオフィトン放射は、病害抵抗反応を誘起するシグナル伝達経路のりん脂質代謝系により伝達されており、タンパク質りん酸化やカルシウムも活性化に関わっていることが示唆された。

[背景・ねらい]

生物は生命活動に伴う生化学反応に基づいて、日常的に極微弱な光（バイオフィトン）を放出している。さらに、エリシター処理後の病害抵抗反応に伴う培養細胞からのバイオフィトン放射が、培養細胞に抵抗性が誘導されていると高まることを見出したため、この現象を利用した抵抗性誘導剤の選抜を試みている。しかし、この現象の基本メカニズムが明らかになっていないため、まず、エリシター刺激からバイオフィトン放射に至るシグナル伝達経路を明らかにする。

[成果の内容・特徴]

1. 6量体キチンをエリシターとしてイネ培養細胞に処理したとき急激に上昇するバイオフィトン放射には、活性酸素種及び活性酸素種を生成する NADPH オキシダーゼやペルオキシダーゼが関与する（表1）。
2. 病害抵抗反応のシグナル伝達経路で働くフォスファチジン酸をイネ培養細胞に処理すると、6量体キチンを処理した場合と類似のバイオフィトン放射が見られ、阻害剤による影響も6量体キチンとほぼ同様であった（表1）。また、フォスファチジン酸の生成抑制によるバイオフィトン放射量の低下は、外部から与えるフォスファチジン酸により回復した。バイオフィトン放射に至るシグナル伝達経路の中で、フォスファチジン酸がシグナル伝達物質として作用する。
3. 6量体キチンに反応したバイオフィトン放射には、少なくともフォスファチジン酸の下流でタンパク質りん酸化及びカルシウムイオンが関与している（表1）。
4. 結論として、6量体キチンエリシターに反応したイネ培養細胞では、図1に示す経路でシグナルが伝達され、バイオフィトン放射が起きる。

[成果の活用面・留意点]

1. 病害抵抗反応をバイオフィトン放射として捉え、解析することができる。
2. バイオフィトンの計測には、高感度な光電子増倍管を備えた光子カウンターが必要である。

表1 6量体キチン、フォスファチジン酸処理によるイネ培養細胞からの
バイオフィトン放射に対する阻害効果

阻害サイト	阻害剤	6量体キチン		フォスファチジン酸	
		阻害率 (%)	阻害率 (%)	阻害率 (%)	阻害率 (%)
活性酸素種	タイロン	100.0	± 0.0	100.0	± 0.0
ペルオキシダーゼ	SHAM	100.0	± 0.0	100.0	± 0.0
NADPH オキシダーゼ	DPI	71.7	± 17.5	79.6	± 8.8
タンパク質りん酸化	K-252a	49.1	± 7.5	57.7	± 13.7
Ca ²⁺ チャンネル	ランタンクロライド	98.3	± 7.8	100.0	± 0.0
Ca ²⁺	EGTA	100.0	± 0.0	100.0	± 0.0

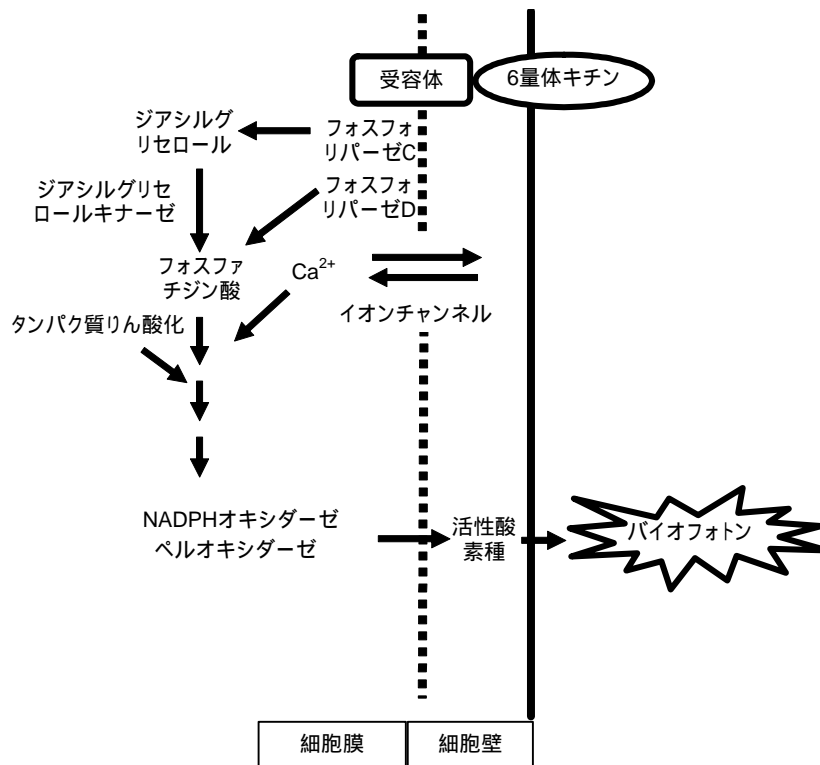


図1 6量体キチンによるエリシター刺激からバイオフィトン放射に至る経路