

光によって制御される植物の新規な病害抵抗性機構

株式会社三井業際植物バイオ研究所 ^{しらの ゆ み こ} 白野由美子・^{しばた だいすけ} 柴田 大輔

はじめに

植物は菌の感染に対して様々な抵抗性反応を示し、多くの遺伝子の発現を誘導することが知られている。これらの遺伝子産物が菌の生育を抑制する物質を合成したり、直接菌に作用すること等によって植物が病害抵抗性を示すと考えられる。最近になり、植物の病害抵抗性を決定している幾つかの遺伝子がクローニングされるようになった。しかし、感染シグナルの応答や過敏感死等の病害抵抗性機構の重要な部分についてはまだ不明な部分が多い。

植物の病害抵抗性機構の一つとして脂肪酸酸化酵素系が関与していると考えられる。不飽和脂肪酸であるリノール酸やリノレン酸から誘導される各種の酸化型不飽和脂肪酸がいもち病菌の生育を抑制する物質としてイネ葉から単離、同定されている（加藤ら, 1985 の総説を参照）。これらの抗菌性物質はいずれもリポキシゲナーゼ (LOX) 経路によって合成されると考えられ、実際、OHTA ら (1991) は非親和性のいもち病菌を接種して抵抗性を示しているイネの葉でリポキシゲナーゼ活性が上昇することを示している。一方、健全葉と親和性菌を接種した葉ではリポキシゲナーゼ活性の上昇がみられない。病原菌の感染によってリポキシゲナーゼ活性が誘導されることは他の植物においても報告されている (YAMAMOTO and TANI, 1986; Ocampo et al., 1986; PEEVER and HIGGINS, 1989; CROFT et al., 1990; KOCH et al., 1992; KATO et al., 1992; AVDIUSHKO et al., 1993; FOURNIER et al., 1993)。さらに、リポキシゲナーゼ反応の産物である過酸化脂肪酸を抗菌性物質へと変換する酵素 (パーオキシゲナーゼ, エポキシゲナーゼ) の存在がいくつかの植物で示されている (OHTA et al., 1990; BLEE and SCHUBER, 1990; HAMBERG and FAHLSTADIUS, 1992)。また、リポキシゲナーゼ経路によって合成される生理活性物質であるジャスモン酸 (VICK and ZIMMERMAN, 1984) が、シグナル伝達物質として植物の病害抵抗性機構に関与することが最近報告されるようになった (GUNDLACH et al., 1992; CHOI et al., 1994; REINBOthe et al., 1994)。

筆者らはイネ葉でいもち病抵抗性発現時に特異的に発

現するリポキシゲナーゼに注目し、この遺伝子をクローニングすることに成功した。本稿では、筆者らが提唱している光と葉緑体が関与する植物の新規な病害抵抗性機構について紹介する。

I 病害抵抗性機構に関与するリポキシゲナーゼ遺伝子

筆者らはいもち病菌に抵抗性を示すイネ葉からリポキシゲナーゼ遺伝子のクローニングを試み、全長 cDNA の単離に成功した (PENG et al., 1994)。当初は、ダイズのリポキシゲナーゼ cDNA をプローブとしてイネの cDNA ライブラリーをスクリーニングしたが、リポキシゲナーゼクローンを得ることができなかった。この結果はイネとダイズのリポキシゲナーゼ遺伝子間では塩基配列レベルでの相溶性が低いことを示している。そこで、植物のリポキシゲナーゼ間でアミノ酸配列が強く保存されている領域からオリゴヌクレオチドを合成してプローブとした。これを用いてイネの cDNA ライブラリーのスクリーニングを行った結果、ポジティブなクローンを得ることができ、最終的に約 3 kb のリポキシゲナーゼ cDNA の単離に成功した。

このリポキシゲナーゼ遺伝子は他の植物リポキシゲナーゼ遺伝子とは異なる特徴を示し、新しいタイプに分類される (SHIBATA et al., 1994)。この遺伝子から推定されるアミノ酸配列は他の植物のリポキシゲナーゼとの間では最も相溶性が低く、進化的に双子葉植物と単子葉植物が分かれる以前に他のリポキシゲナーゼ遺伝子から分化したと推定される (図-1)。

このリポキシゲナーゼ遺伝子は病害抵抗性反応を示す葉で特異的に発現し、しかも、いもち病菌の感染の初期の段階で発現することが明らかとなった (PENG et al., 1994)。イネの葉に親和性と非親和性のいもち病菌を接種後、葉から mRNA を調製してノーザン分析を行った。その結果、この遺伝子は非親和性のいもち病菌を接種した葉 (抵抗性を示す葉) で特異的に発現が誘導された。健全葉では全く発現がみられず、また、親和性菌を接種した葉では少し発現がみられるが、非親和性菌の場合と比較すると明らかに発現量が少なかった (図-2)。非親和性菌を接種したイネの葉でのこの遺伝子の発現を経時的に調べたところ、発現はいもち病菌の接種 15 時間後から認

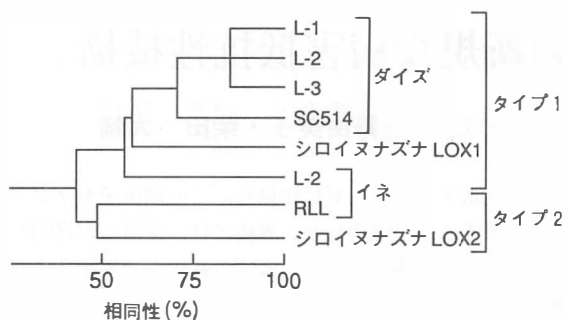


図-1 植物リポキシゲナーゼ間の相同性

RLL: イネ葉で発現するリポキシゲナーゼ遺伝子

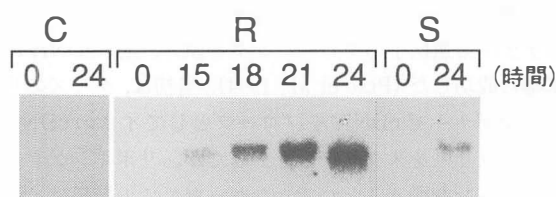


図-2 いもち病菌接種イネ葉でのリポキシゲナーゼ遺伝子の発現

C: 水処理コントロール, R: 非親和性菌接種, S: 親和性菌接種

められ、30 時間前後まで発現の増大が見られた (図-2)。発現が始まる時期はいもち病菌が付着器を形成してイネの細胞に侵入を開始する時期と一致する。つまり、このリポキシゲナーゼは抵抗性反応の初期の段階で機能していると考えられる。また、このリポキシゲナーゼの抗体を作製してもいもち病菌を接種したイネ葉のウエスタン分析を行ったところ、ノーザン分析と同様の結果が得られた。この結果からこのリポキシゲナーゼの発現は転写レベルで制御されていることも明らかとなった。

このリポキシゲナーゼ遺伝子は光を受けた組織でしか発現しないことも明らかとした。このような光依存性の発現は病害抵抗性機構に関与すると考えられている他の遺伝子の発現とは異なることから、緑葉に特異的な新規な病害抵抗性機構が存在する可能性が考えられる。抵抗性反応を引き起こすことが知られている各種の物質でイネの培養細胞を処理してこの遺伝子の発現を調べたが、培養細胞では全く発現が認められなかった。暗所で育てた黄化葉についても同様に調べたが、やはりこの遺伝子の発現は認められなかった。しかし、イネの緑葉ではこのような物質で処理することによってこの遺伝子の発現が誘導された (図-3) (SHIRANO and SHIBATA, 投稿中)。従来から研究されてきた病害抵抗性機構とこの遺伝子の関

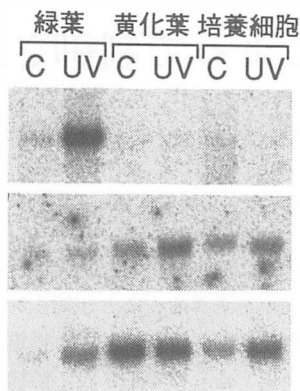


図-3 紫外線照射処理後の病害抵抗性関連遺伝子の発現

C: コントロール, UV: 紫外線照射処理

上段: リポキシゲナーゼ遺伝子, 中段: キチナーゼ遺伝子, 下段: PAL 遺伝子の発現を示す。

係を明らかにするために、キチナーゼ遺伝子とフェニルアラニンアンモニアリアーゼ (PAL) 遺伝子についてその発現を調べたところ、これらの遺伝子はリポキシゲナーゼ遺伝子と同様に緑葉で発現が誘導されたが、培養細胞や黄化葉でも遺伝子の発現がみられた (図-3)。培養細胞は取り扱いやすいことから植物の病害抵抗性機構の研究に多く用いられているが、培養細胞を材料とする研究ではこのリポキシゲナーゼが関与するような緑葉に特異的な病害抵抗性機構の可能性については見落とされてきたといえる。

II 光によって制御される病害抵抗性機構

このリポキシゲナーゼ遺伝子に最も特徴的なことは、このリポキシゲナーゼが葉緑体に移行するためのトランジットペプチド配列を有することである。このペプチドは約 90 のアミノ酸からなり、トランジットペプチドとしては長いことから、このリポキシゲナーゼは葉緑体の中でもその内腔に移行すると推定される。最近、筆者らはこのリポキシゲナーゼが実際に葉緑体に移行することを示すデータを得ている。このような特徴は他の多くの植物リポキシゲナーゼには見いだされないが、シロイヌナズナではトランジットペプチドと考えられる配列を持つリポキシゲナーゼ遺伝子がクローニングされている (Bell and Mullet, 1993)。しかし、そのトランジットペプチド配列は短く、イネのリポキシゲナーゼとは葉緑体中での局在部位が異なると考えられる。また、シロイヌナズナのリポキシゲナーゼと病害抵抗性との関係は不明である。

この緑葉に特異的に発現するリポキシゲナーゼの葉緑

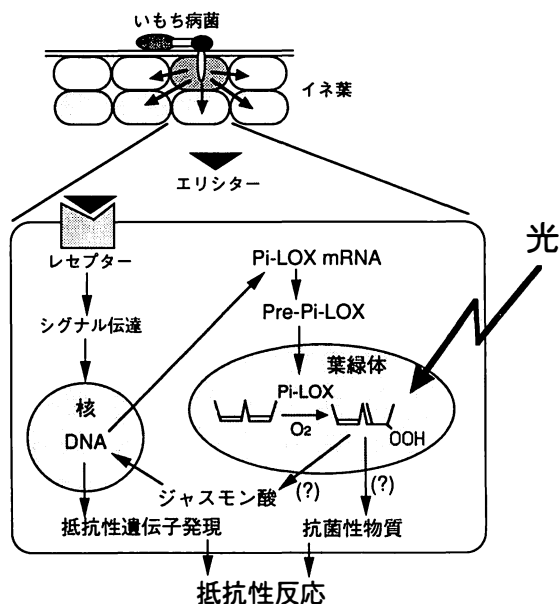


図-4 光が関与する新規な病害抵抗性機構

Pi-LOX；イネ葉で発現するリポキシゲナーゼ

体内での機能を解明していく過程で、筆者らはこのリポキシゲナーゼは葉緑体内で光スイッチによってその活性が制御されているという仮説を提唱した (SHIBATA and AXELROD, 1995)。単離した cDNA を大腸菌内で活性を有する状態で発現させ、このリポキシゲナーゼの性質を詳細に調べたところ、このリポキシゲナーゼの至適 pH は 5~6 の間にあり pH 7 以上では全く活性が認められなかった。葉緑体の内腔では光合成が行われているときに pH が酸性側に傾くことから、このリポキシゲナーゼが働くためには光が必要であり、光によってその活性が制御されていると考えられる。つまり、内腔での pH の変化がリポキシゲナーゼ反応の on/off を行う光スイッチになっている (図-4)。植物が病原菌に対して抵抗性反応を伴う過敏感死を起こす場合には光が必要であるという例が多く報告されており (Guo et al., 1993)、植物の病害抵抗性機構に光が重要な役割を果たしているという点で、この報告は筆者らの考えと一致する。

さらに、基質に対して酸素が導入される位置を調べたところ、このリポキシゲナーゼはリノール酸とリノレン酸の C 13 位に非常に特異的に酸素を導入した。植物リポキシゲナーゼは基質であるリノール酸とリノレン酸の C 9 位と C 13 位に酸素を導入することができ、それぞれのリポキシゲナーゼによってその特異性が決まっている。このリポキシゲナーゼによってリノレン酸の C 13 位に酸素が導入された過酸化リノレン酸はジャスモン酸の前

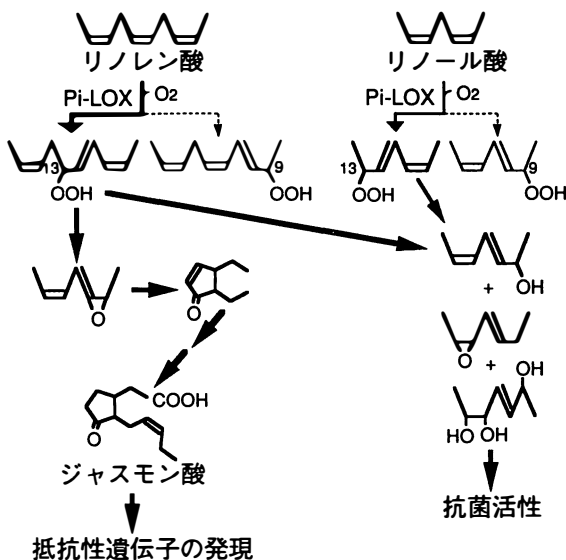


図-5 推定されるリポキシゲナーゼ経路

Pi-LOX；イネ葉で発現するリポキシゲナーゼ

駆体であり、このリポキシゲナーゼが局在すると考えられる葉緑体の内腔を形成するチラコイド膜にはリノレン酸が多く存在している。これらのことから、このリポキシゲナーゼは抗菌性物質の生合成だけではなくジャスモン酸の生合成にも関与している可能性が考えられる (図-5)。ジャスモン酸が葉緑体内で生合成されるかどうかはまだ分かっていないが、ジャスモン酸の生合成に必要な酵素であるアレンオキシド合成酵素をコードする遺伝子がクローニングされ、この遺伝子もトランジットペプチド配列を有することが明らかとなった (SONG et al., 1993)。このことから、この酵素は葉緑体内で機能していると考えられ、ジャスモン酸生合成の少なくとも一部が葉緑体内で行われているという考えをさらに支持している。

以上、筆者らが提唱している「葉緑体で光スイッチが関与する植物の新規な病害抵抗性機構」が実際に機能しているかどうかは、アンチセンス法等を用いて、今後、証明していく必要があるだろう。

文 献

- 1) AVDIUSHKO, A. S. (1993) : Physiol. Mol. Plant Pathol. 42: 83~95.
- 2) BELL, E. and J. E. MULLEN (1993) : Plant Physiol 103: 1133~1137.
- 3) BLEE, E. and F. SCHUBER (1990) : J. Biol. Chem. 265: 12887~12895.
- 4) CHOI, D. et al. (1994) : Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91: 2329~2333.

- 5) CROFT, K. P. C. et al. (1990) : *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 36: 49~62.
- 6) FOURNIER, J. et al. (1993) : *Plant J.* 3: 63~70.
- 7) GUNDLACH, H. et al. (1992) : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 2389~2393.
- 8) GUO, A. et al. (1993) : *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 42: 413~425.
- 9) HAMBERG, M. and P. FAHLSTADIUS (1992) : *Plant Physiol.* 99: 987~995.
- 10) 加藤忠弘ら (1985) : *化学と生物* 24: 183~188.
- 11) KATO, T. et al. (1992) : *Biosci. Biotech. Biochem.* 56: 373~375.
- 12) KOCH, E. et al. (1992) : *Plant Physiol.* 99: 571~576.
- 13) OCAMPO, C. A. et al. (1986) : *Z. Naturforsch.* 41: 559~563.
- 14) OHTA, H. et al. (1990) : *Plant Cell Physiol.* 31: 1117~1122.
- 15) OHTA, H. et al. (1991) : *Plant Physiol.* 97: 94~98.
- 16) PEEBER, T. L. and V. J. HIGGINS (1989) : *Plant Physiol.* 90: 867~875.
- 17) PENG, Y. -L. et al. (1994) : *J. Biol. Chem.* 269: 3755~3761.
- 18) REINBOTHE, S. et al. (1994) : *Plant Cell* 6: 1197~1209.
- 19) SHIBATA, D. et al. (1994) : *Plant Mol. Biol. Reporter* 12: S 41~S 42.
- 20) SHIBATA, D. and B. AXELROD (1995) : *J. Lipid Mediators*, in press
- 21) SONG, W. -C. et al. (1993) : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 8519~8523.
- 22) VICK, R. A. and D. C. ZIMMERMAN (1984) : *Plant Physiol.* 75: 458~461.
- 23) YAMAMOTO, H. and T. TANI (1986) : *J. Phytopathology* 116: 329~337.

協 会 だ よ り

○平成 7 年度日本植物防疫協会調査研究事業等行事予定 平 成 7 年

- 5 月 26 日 総会 (虎ノ門バストラル)
- 6 月 13 日 茶・残臭審査委員会 (静岡県金谷町)
- 7 月 17~21 日 線虫研修会 (牛久)
- 8 月 29~30 日
野菜研究会現地検討会 (群馬県)
(テーマ: 大規模野菜産地における土壌病害
の発生実態と防除対策)
- 9 月 6~7 日
水稻・畑作物研究会現地検討会 (宮城県)
(テーマ: 稲こうじ病の発生, 被害の実態と
防除対策)
- 28~29 日 果樹研究会現地検討会 (静岡県)
(テーマ: 柑橘園における新しい省力防除技
術)
- 10 月 16~17 日 近畿地区植物防疫連絡協議会 (奈良県)
- 19~20 日 中国・四国地区植物防疫連絡協議会 (広島
県)
- 24~25 日 関東地区植物防疫連絡協議会 (茨城県)
- 24~25 日 リング農薬連絡試験成績検討会 (家の光)
- 25~26 日 九州地区植物防疫連絡協議会 (福岡県)
- 26~27 日 北海道・東北地区植物防疫連絡協議会 (福
島県)
- 26~27 日 茶農薬連絡試験成績検討会 (埼玉県)
- 30~31 日 東海・北陸地区植物防疫連絡協議会 (岐阜
県)
- 11 月 1 (PM)~2 (AM) 日
一般委託試験北陸地域成績検討会 (直江津)
- 6 (PM)~7 (PM) 日
一般委託試験東北地域成績検討会 (盛岡)

- 9 (AM)~10 (PM) 日
一般委託試験九州地域成績検討会 (博多)
- 13 (AM)~14 (PM) 日
一般委託試験関東・東山・東海地域成績検
討会 (ラングウッド)
- 15 (AM)~16 (PM) 日
一般委託試験北海道地域成績検討会 (札幌)
- 20 (PM)~21 (PM) 日
一般委託試験近畿中国地域成績検討会 (福
山)
- 21 (PM)~22 (AM) 日
一般委託試験四国地域成績検討会 (松山)
- 28 日 野菜病虫害防除研究会シンポジウム (家の光)
- 29 日 水稻・畑作物病虫害防除研究会シンポジウム
(家の光)

12 月

- 11/30 日~12/1 日
芝草農薬連絡試験成績検討会 (家の光)
- 4 日 果樹病虫害防除研究会シンポジウム (ラング
ウッド)
- 5~6 日
落葉果樹農薬連絡試験成績検討会 (ラングウ
ッド)
- 7~8 日
カンキツ農薬連絡試験成績検討会 (家の光)
- 13 日 ミカンキイロアザミウマ防除特別試験成績検
討会 (家の光)
- 14~15 日
一般委託試験総合判定会議 (家の光)

平 成 8 年

- 1 月 18 日 SSF-126 粒剤に関する特別連絡試験成績検
討会 (ラングウッド)
- 下旬 生物農薬連絡試験成績検討会 (東京)