

植物の感染応答, 特に活性酸素について

名古屋大学大学院生命農学研究科資源生物機能学講座 かわ きた かず ひと
川 北 一 人

はじめに

植物は病原菌の感染のみならず, 虫害, 傷害, 高温・低温, 乾燥, 光・紫外線といった様々な環境ストレスに絶えずさらされている。植物は自ら環境を選択できないだけに, これら環境ストレスをいかに察知し, 迅速に应答して適応するかということが, 植物にとっては被害を回避し個体を維持するために必須である。察知から应答に至る過程は, いくつもの重層的な段階から成り立っていると推定される。

病原菌の感染の場合を例にとると, 病原菌やエリシター分子の認識, 情報シグナルの細胞内への変換, 細胞内での情報シグナルの伝達, 应答 (抵抗性) 関連遺伝子の発現調節, 抵抗性関連物質の生成・蓄積といった一連の反応機構が考えられる。しかし, この機構に関与する個々の因子の解明については, あたかも暗闇の舞台に登場人物の顔だけがスポットライトを浴びて浮かび出ただけという状態であり, 互いの因果関係や調節機構など, まだまだ不明な点が多い。

I 活性酸素生成

近年, 上記のような様々なストレスを受けた植物組織において, 急激な活性酸素生成という現象 (オキシダティブバースト) が相次いで報告されている (道家, 1996)。このオキシダティブバーストは, 動物の好中球, マクロファージなどが病原菌の感染や異物の侵入を認識し, 貪食作用を示すときにも起こる現象であり, 生物種を越えた生体防御機構の一環として広く注目されるようになってきた。

1 活性酸素とは

活性酸素とは, 大気中に存在する分子状酸素に比べて活性化された酸素分子種であり, スーパーオキシドアニオン (O_2^-), 過酸化水素 (H_2O_2), ヒドロキシラジカル ($\cdot OH$), 一酸化窒素 (NO), ペルオキシ亜硝酸イオン ($ONOO^-$) などが含まれる。いずれも動物細胞においては数々の疾病, すなわち, がん, 糖尿病, 動脈硬

化, 炎症性疾患, 神経性疾患などのかかわりが知られており, さらには活性酸素と老化やアポトーシスとの関連性もわかってきた。

2 動物細胞における活性酸素生成機構

活性酸素種の最上流には O_2^- が位置する。動物細胞では O_2^- は通常キサンチン酸化酵素により生成するが, 白血球やマクロファージでは, NADPH 酸化酵素により生成する。この O_2^- はスーパーオキシドジスムターゼ (SOD) により消去 (不均化) され, H_2O_2 に変換される。さらに H_2O_2 はカタラーゼやグルタチオンペルオキシダーゼによって水 (H_2O) に還元無毒化される。また H_2O_2 は, 遊離の鉄や銅といった遷移金属の関与するフェントン反応と呼ばれる反応により, 最も反応性の高い活性酸素である $\cdot OH$ へと変換される。一方, NO はアルギニンを基質として NO 合成酵素により生成する。 NO と O_2^- から $ONOO^-$ を生じる。

II 植物の感染応答における活性酸素生成

1 糸状菌感染・エリシター処理時の生成

植物組織におけるオキシダティブバースト現象についての報告 (表-1) は, 1983 年の道家の報告例をもってこうしとする。ジャガイモ植物にジャガイモ疫病菌 (*Phytophthora infestans*) の非親和性菌を接種した場合に, 植物の生体防御反応として知られる過敏細胞反応が起こる。この過敏細胞反応に先立って O_2^- 生成が起こることを, シトクロム *c* 還元活性あるいはニトロブルーテトラゾリウム (NBT) 還元活性を測定することにより示した (DOKE, 1983a)。SOD 添加により, 還元活性が抑制されるとともに過敏細胞反応も阻害され, O_2^- 生成が一連の抵抗反応を誘導するシグナルとし

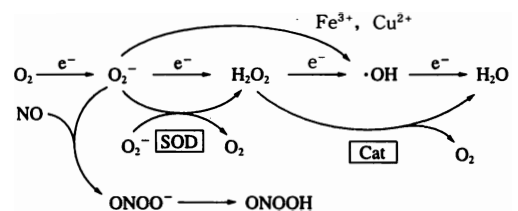


図-1 活性酸素種の生成

SOD: スーパーオキシドジスムターゼ, Cat: カタラーゼ

Production of Active Oxygen Species for Elicitation of Defence Reaction in Plants. By Kazuhito KAWAKITA

(キーワード: 活性酸素種, 感染応答, オキシダティブバースト, NADPH 酸化酵素)

表-1 各種植物の感染応答における活性酸素生成例

刺 激	植 物	活性酸素 分子種	測定法	文 献
非親和性菌接種 エリシター処理	ジャガイモ塊茎	O_2^-	シトクロム <i>c</i> 還元活性 NBT 還元活性	DOKE, 1983 a
エリシター処理	ジャガイモプロトプラスト	O_2^-	シトクロム <i>c</i> 還元活性	DOKE, 1983 b
非親和性菌接種 エリシター処理	イネ葉 イネ懸濁培養細胞	O_2^-	NBT 還元活性	SEKIZAWA et al., 1987
エリシター処理	ダイズ懸濁培養細胞	H_2O_2	蛍光色素消光	APOSTOL et al., 1989
エリシター処理	インゲン懸濁培養細胞	O_2^-	化学発光(ルミノール)	ANDERSON et al., 1991
エリシター処理	トマト懸濁培養細胞	O_2^-	シトクロム <i>c</i> 還元活性 化学発光(ルミノール)	VERA-ESTRELLA et al., 1992
エリシター処理	トウヒ懸濁培養細胞	H_2O_2	化学発光(ルミノール)	SCHWACKE and HAGER, 1992
エリシター処理	トマト懸濁培養細胞 タバコ懸濁培養細胞 ピーマン懸濁培養細胞	O_2^- , H_2O_2	化学発光(ルミノール)	SANCHEZ et al., 1993
エリシター処理	バラ懸濁培養細胞	H_2O_2	化学発光(ルミノール)	AUH and MURPHY, 1995
非病原菌接種 エリシター処理	エンドウ葉 ササゲ葉	O_2^-	NBT 還元活性	KIBA et al., 1996
非親和性細菌接種	タバコ葉	O_2^-	NBT 還元活性	ADAM et al., 1989
非親和性細菌接種	タバコ懸濁培養細胞	O_2^- , H_2O_2	化学発光(ルミノール)	KEPPLER et al., 1989
非親和性細菌接種	ダイズ懸濁培養細胞	O_2^- , H_2O_2	化学発光(ルミノール)	GLAZENER et al., 1991
エリシター処理	タバコ懸濁培養細胞	O_2^- , H_2O_2	化学発光(ルミノール)	BAKER et al., 1993
エリシター処理	アラビドプシス懸濁培養細胞	O_2^- , H_2O_2	化学発光(ルミノール)	DESIKAN et al., 1996
ウイルス接種	タバコ葉	O_2^-	シトクロム <i>c</i> 還元活性 NBT 還元活性	DOKE and OHASHI, 1988
ウイルス接種	ササゲ葉	O_2^-	NBT 還元活性	EL-MOSHATY et al., 1993

て働くことを示唆している。 O_2^- 生成は、ジャガイモ塊茎組織に疫病菌菌体壁成分（HWC）エリシターを処理した場合や、ジャガイモプロトプラストに HWC エリシターを処理した場合など、過敏細胞反応を引き起こすいずれの系でも認められた（DOKE, 1983b）。

また、ジャガイモ葉にエリシターを処理してから 10 数時間経過すると、エリシター処理していない別の葉でも二次的なオキシダティブバーストが観察される。この組織では菌の感染に対する抵抗性が認められる（CHAI and DOKE, 1987）。

その後、ジャガイモ植物の場合と同様の現象が他の系でも報告された。イネいもち病菌（*Pyricularia oryzae*）を接種したイネ葉においては、親和性菌の場合と比べ、非親和性菌を接種した場合に速やかに活性酸素生成が見られた（SEKIZAWA et al., 1987）。トマト葉かび病菌（*Cladosporium fulvum*）非親和性菌由来の特異的エリシターで処理したトマト懸濁培養細胞においても、活性酸素の生成が認められた（VERA-ESTRELLA et al., 1992）。また、ダイズやインゲンの懸濁培養細胞を非特異的エリシターで処理した場合にも、 O_2^- 生成が示された（APOSTOL et al., 1989；ANDERSON et al., 1991）。

ダイズ植物組織を H_2O_2 で処理すると、細胞壁構成成分であるプロリントリパシドの架橋が促進され、またグルタチオン-S-トランスフェラーゼやグルタチオンペルオキシダーゼ遺伝子の発現が誘導されることから、活性酸素種、特に H_2O_2 の過敏反応誘導における役割が指摘された（TENHAKEN et al., 1995）。

ジャガイモ塊茎組織に NO 生成剤（NOC-18）を処理し、リシチン生成を指標として抵抗性の誘導を調べたところ、リシチンの生成・蓄積が認められた。このリシチン生成は NO 消去剤（carboxy-PTIO）を加えることにより抑制されるのに対し、HWC によるリシチン生成は NO 消去剤で阻害されない（NORITAKE et al., 1996）。このことは NO 刺激の場合の情報伝達経路と HWC 刺激の場合の O_2^- を介した情報伝達経路とは異なることを示唆している。植物組織に NO 生成系が存在するかどうかは今のところ不明であるが、NO を介した情報伝達経路と O_2^- を介した情報伝達経路とが互いに影響し合う可能性もあり、興味深い。

2 細菌・ウイルス感染時の生成

糸状菌感染の場合に認められたオキシダティブバースト現象は、非親和性細菌の感染においても報告されてい

る (ADAM et al., 1989; KEPPLER et al., 1989; GLAZENER et al., 1991)。タンパク質性エリシターであるハーピンを生産する *Erwinia amylovora* は、タバコ懸濁培養細胞の活性酸素生成を誘導したのに対し、ハーピン非生産変異株は活性酸素生成を引き起こさなかった (BAKER et al., 1993)。また、アラビドプシス懸濁培養細胞のハーピン処理でも活性酸素生成が認められ、この生成はプロテインキナーゼ阻害剤により抑制された (DESIKAN et al., 1996)。

一方、ウイルス感染の場合の報告例もある。抵抗性発現に関与する *N* 遺伝子を持つタバコ植物にタバコモザイクウイルス (TMV) が感染すると、局部死斑が形成されてそこに TMV は局在化する。この過敏反応は温度依存性であり、30°C の条件下では TMV の全身感染が起こり死斑形成は認められない。これを 20°C に戻すと死斑形成が始まり、ほぼ同時に O_2^- 生成反応が認められ、その後時間経過に伴い周期的に O_2^- 生成量が変動した (DOKE and OHASHI, 1988)。また、タバコ輪点ウイルスを接種したササゲ葉では局部死斑形成に先立ち、脂質過酸化と O_2^- 生成が認められた (EL-MOSHATY et al., 1993)。

カタラーゼ活性を阻害した形質転換タバコ植物を用いた実験より、活性酸素種である H_2O_2 を介したサリチル酸の作用機構が提唱された。サリチル酸はカタラーゼやアスコルビン酸ペルオキシダーゼを阻害することにより H_2O_2 濃度を上昇させ、その H_2O_2 が PR タンパク質の発現や抵抗性を誘導すると考えられる (高橋, 1996)。

III 植物細胞における活性酸素生成機構

動物細胞の NADPH 酸化酵素の活性化機構については、ヒト好中球における研究が進んでいる。好中球の NADPH 酸化酵素によって生成する O_2^- やその産物である活性酸素種は抗菌活性を持っている。したがって、好中球の NADPH 酸化酵素やその活性化に異常をきたすと、 O_2^- を生成できず、重症で難治性の細菌感染症を繰り返す慢性肉芽腫症となる。本酵素は複合酵素系であり、少なくとも五つの成分、すなわち原形質膜結合酵素シトクロム b_{558} の構成成分である分子量 91 kDa の糖タンパク質 (gp 91-phox) と 22 kDa のタンパク質 (p 22-phox)、細胞質因子である 47 kDa のタンパク質 (p 47-phox) と 67 kDa のタンパク質 (p 67-phox)、低分子量 GTP 結合タンパク質 Rac から成る。p 47-phox がプロテインキナーゼ C によりリン酸化されて p 67-phox と結合し、ともに膜に移行し、シトクロム b_{558} との間で集合体を形成して活性型酵素系となる。細胞質の五炭糖リン酸回路より供給された NADPH から FAD とヘム結合二価鉄を通して電子が伝達され、最終的に酸素が一電子還元されて O_2^- が生成する。

一方、植物組織における活性酸素生成の分子機構についてはほとんど明らかにされていないが、ジャガイモ植物における O_2^- 生成は、原形質膜に存在する NADPH 酸化酵素の働きによると考えられる (DOKE and MIURA, 1995)。ジャガイモ組織や懸濁培養細胞において、HWC エリシター処理により引き起こされるオキシダティブバーストは、 Ca^{2+} チャンネルブロッカー、カルモジュリン阻害剤、プロテインキナーゼ阻害剤などにより

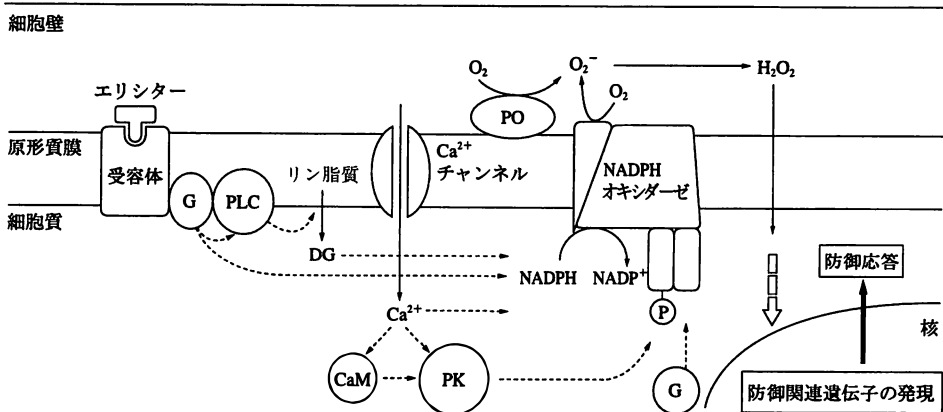


図-2 植物細胞における活性酸素生成機構の想定図

G: GTP 結合タンパク質, PLC: ホスホリパーゼC, DG: ジアシルグリセロール, CaM: カルモジュリン, PK: プロテインキナーゼ, PO: ペルオキシダーゼ

阻害され、オキシダティブバーストの過程に細胞外 Ca^{2+} の細胞内への流入と Ca^{2+} ・カルモジュリン依存性のタンパク質リン酸化が関与することが予想された (MIURA et al., 1995)。オキシダティブバーストへの、タンパク質リン酸化の関与する可能性はダイズ懸濁培養細胞でも示され (CHANDRA and LOW, 1995), また GTP 結合タンパク質の関与も推定されている (LEGENDRE et al., 1992; KAWAKITA and DOKE, 1994)。

最近、アラビドプシス懸濁培養細胞に対するヒト p 47-phox 抗体と p 67-phox 抗体を用いたウェスタン解析の結果、植物細胞においても p 47-phox と p 67-phox と類似のタンパク質が存在する可能性が示された (DESIKAN et al., 1996)。同様の結果はタバコ、ササゲ、ダイズ、ワタにおいても得られている (DWYER et al., 1996)。さらに、イネにおいて gp 91-phox 遺伝子に相当する遺伝子の単離がなされ (GROOM et al., 1996), 植物における NADPH 酸化酵素の機能解析が、今後期待される。

お わ り に

植物の感染応答において、オキシダティブバーストが広く認められることを本稿では述べた。それでは、生成された活性酸素は植物の防御機構においてどのような機能を果たしているのだろうか。現在のところ、①細胞壁構造タンパク質の架橋や細胞壁のリグニン化、②原形質膜に存在する脂質の過酸化、③細胞内情報伝達系における第二メッセンジャーとしての役割、などが考えられているが、いずれも推定の域を出ない。特に情報伝達因子としての活性酸素は、今回紹介した感染防御機構において機能するのみならず、植物体が生存していく上での多くの場面に関与している可能性もあり、今後さらに注目を集めることと思われる。

引用文献

- 1) ADAM, A. et al. (1989) : *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 34 : 13~26.
- 2) ANDERSON, A. J. et al. (1991) : *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 38 : 1~13.
- 3) APOSTOL, I. et al. (1989) : *Plant Physiol.* 90 : 109~116.
- 4) AUH, C. -K. and T. M. MURPHY (1995) : *Plant Physiol.* 107 : 1241~1247.
- 5) BAKER, C. J. et al. (1993) : *Plant Physiol.* 102 : 1341~1344.
- 6) CHAI, H. -B. and N. DOKE (1987) : *Ann. Phytopath. Soc. Jpn.* 53 : 585~590.
- 7) CHANDRA, S. and P. S. LOW (1995) : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92 : 4120~4123.
- 8) DESIKAN, R. et al. (1996) : *FEBS Letters* 382 : 213~217.
- 9) DOKE, N. (1983a) : *Physiol. Plant Pathol.* 23 : 345~357.
- 10) — (1983b) : *ibid.* 23 : 359~367.
- 11) 道家紀志 (1996) : *現代化学増刊* 30 : 108~116.
- 12) DOKE, N. and Y. MIURA (1995) : *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 46 : 17~28.
- 13) DWYER, S. C. et al. (1996) : *Biochim. Biophys. Acta* 1289 : 231~237.
- 14) EL-MOSHATY, F. I. B. et al. (1993) : *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 43 : 109~119.
- 15) GLAZENER, J. A. et al. (1991) : *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 39 : 123~133.
- 16) GROOM, Q. J. et al. (1996) : *Plant J.* 10 : 515~522.
- 17) KAWAKITA, K. and N. DOKE (1994) : *Plant Sci.* 96 : 81~86.
- 18) KEPPLER, L. D. et al. (1989) : *Phytopathology* 79 : 974~978.
- 19) KIBA, A. et al. (1996) : *Ann. Physiol. Soc. Jpn.* 62 : 508~512.
- 20) LEGENDRE, L. et al. (1992) : *J. Biol. Chem.* 267 : 20140~20147.
- 21) MIURA, Y. et al. (1995) : *Plant Sci.* 105 : 45~52.
- 22) SANCHEZ, L. M. et al. (1993) : *Plant Sci.* 88 : 141~148.
- 23) SCHWACKE, R. and A. HAGER (1992) : *Planta* 187 : 136~141.
- 24) SEKIZAWA, Y. et al. (1987) : *Agric. Biol. Chem.* 51 : 763~770.
- 25) 高橋英樹ら (1996) : 植物感染生理学の現状と将来展望, 日本植物病理学会, 東京, pp. 111~120.
- 26) TENHAKEN, R. et al. (1995) : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 92 : 4158~4163.
- 27) VERA-ESTRELLA, R. et al. (1992) : *Plant Physiol.* 99 : 1208~1215.

(10 ページより続く)

横田美香氏 (総務課兼植物防疫課) は食品流通局品質課へ

○地方農政局 (4 月 1 日付)

久保田直哉氏 (神戸植物防疫所関西空港支所) は北陸農政局生産流通部農産普及課植物防疫係長に
井上政志氏 (北陸農政局生産流通部農産普及課植物防疫係長) は近畿農政局生産流通部農産普及課植物防疫係長に

小野泰樹氏 (九州農政局生産流通部農産普及課植物防疫係長) は門司植物防疫所福岡支所へ

佐々木晃氏 (近畿農政局生産流通部農産普及課植物防疫係長) は神戸植物防疫所業務部へ

(3 月 26 日付)

菅野紘男氏 (東北農試水田利用部上席研究官) は退職 [科学技術振興事業団海外派遣研究員 (ニュージーランド園芸作物研究所)]

(3 月 27 日付)

渡邊朋也氏 (九州農試地域基盤研究部害虫管理システム研主研) は退職 [上記 (オーストラリア国熱帯地域病害管理共同研究センター)]

(3 月 31 日付)

早川博文氏 (国際農林水産業研究センター畜産草地部長) は退職 [JICA (マレーシア)]

持田 作氏 (農研センター病害虫防除部主研) は退職 (37 ページに続く)