

植物と病害虫との戦い：活性酸素戦略(1)

東京農業大学総合研究所 ^{みつ} 満 ^い 井 ^{たかし} 喬

植物は病害虫の攻撃に対して、①二次代謝産物の生産、②活性酸素の発生、③プロテアーゼ・インヒビターのような遺伝子産物の合成などによって応戦し、今日の多様な植物種を進化させてきた。現在でも熱帯雨林に繁茂する原生植物の多くは、昆虫ばかりでなく大型の哺乳動物がこれを摂食すると毒に当たったり、消化不良を起こしたりする。栽培植物は、外敵の攻撃に対する防御を人間に託し、自衛力は弱まっているが、潜在的防御機能は持っており、病害虫に襲われたときにこれを発揮すると考えられる。

ここでは、植物の活性酸素の発生による病害虫防御戦略について概要を述べよう。

植物が病害虫の攻撃を受けると、植物組織に生化学的変化が生じ、これを撃退するが、植物自体も影響を受けて葉の奇形などを生ずることは古くから観察されていた。例えば、サトウダイコンやハクサイにマキバメクラガメ (*Lygus disponsi*) が食害を与えると、フェノール物質や酸化酵素活性が増す (HORI and ATALAY, 1980)。また、レモンにダニ (citrus bud mite, *Aceria sheldoni*) が寄生した場合にもフェノール物質や酸化酵素活性が増し、その結果これらの植物は、もはや害虫にとっては好みの食草ではなくなると同時にオーキシシン活性が低下するため、植物の生長は劣ってくる (ISHAAYA and STERNLICHT, 1971)。

しかし、そのメカニズムについては不明の点が多かった。最近、そのメカニズムの分子レベルでの研究が進んでいる。特に植物と病原微生物との関係で進展が著しいので、まず植物の病原微生物防御戦略について MEHDY (1994) を引用して概略を述べよう。

I 植物の病原微生物防御戦略

1 植物の病原菌耐性

植物が、病原菌に対して耐性であるか感受性であるかの第一段階は、感染初期にカビ、細菌、ウイルスなどの

*: 生体の一部 (器官, 組織, 細胞) の死のことで、植物では褐変または乾燥症状を示す (農業科学用語事典, 日本植物防疫協会, 1994)。

Active Oxygen Species in Plant Defense against Pathogens and Insects (1). By Takashi MITSUI

(キーワード: 活性酸素, 過敏感反応, Oxidative burst, Lipoxygenase (LOX), 酸化ストレス)

病原体を認識し得るか否かにかかっている。植物は微生物の感染が起こるとすぐに、感染部位の組織にネクロシス (壊死)* を起こし、病原体から栄養を奪ったり、毒性物質を放出したりして、病原体の生長をごく小さい領域に閉じこめてしまう。これが病原体に対する耐性で、これを過敏感反応 (HR: Hypersensitive Response) と呼ぶ。ところが、ある種の病原体は、特定の植物による認識を逃れる能力を発達させ、ネクロシスを全く起こさせることなく、またはネクロシスを起こすのを遅らせるなどして、植物全体にまん延して生長する。この場合、植物は感受性で、病気は広がり重大なダメージを受ける。進化の過程において、植物は、この病原体を認識して過敏感反応を起こし、病原体に反撃する術を獲得した。逆に、この過敏感反応を逃れる病原体も現れ、植物と微生物との果てしない戦いにより共進化が進んできた。

植物が病原体を認識すると、これが引き金となって、植物の防御機構が働き、病原菌に対抗する。感染を受けた部位で誘導される反応には、①抗菌物質、ファイトアレキシン、の合成、②病原体を攻撃する加水分解酵素の合成、③細胞壁構造タンパクの変化により病原体にバリアを作る、などがある。これらの反応の多くは、植物が備え持つ遺伝子、防御遺伝子あるいは防御関連遺伝子、の転写を活性化することによって生じる。防御遺伝子の発現調節については、植物—病原菌の *in vivo* での相互作用と植物細胞懸濁液にエリシター** を処理する *in vitro* のモデルシステムの両面から研究が進められている。

過敏感反応から遺伝子発現に至る過程において、まず起こる反応は、植物体内物質の活性化で、活性酸素 (AOS, Active Oxygen Species) の放出が原因の一つである。これを Oxidative burst という。

活性酸素 (AOS) は、毒性のある中間体で、分子状酸素 (O₂) の還元によって生ずる。植物—病原体の相互関係で見られるものには、スーパーオキシド・アニオン (O₂⁻)、過酸化水素 (ハイドロゲン・パーオキシド)

** : 植物の防御反応を誘導する物質、狭義にはファイトアレキシンの合成を誘導する病原菌成分、広義には植物の過敏感反応、リグニン化、細胞壁の修飾などの抵抗反応に関連する現象を誘導する物質 (農業科学用語事典, 日本植物防疫協会, 1994)。

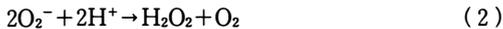
ド、 H_2O_2), ハイドロキシ・ラジカル ($\cdot\text{OH}$) である。このような活性酸素の発生は、過敏反応と関連しており、病原耐性の重要な要因である。

2 活性酸素の化学 (IMALAY, et al., 1988)

活性酸素は、葉緑体やミトコンドリアの電子伝達系、細胞構成成分の酸化還元に関与する酵素などによって、低レベルではあるが、植物細胞中に生じる。部分的に還元された酸素であるため、非常に不安定で生物に対して重大な脅威を与える。病原体が誘導する oxidative burst の最初の反応は、酸素分子の一電子還元で、これによってスーパーオキシド・アニオン (O_2^-) を生じる。

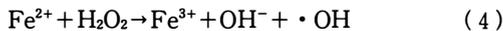


水溶液中では、 O_2^- は連続した還元を受けてのように H_2O_2 を発生する。



この反応は、細胞質、葉緑体、ミトコンドリアに存在する superoxide dismutase (SOD) によって触媒される。

O_2^- は、また金属イオンを還元する。金属がたとえタンパクやキレート化合物との複合体であっても還元される。還元の結果、過酸化水素依存性の $\cdot\text{OH}$ を生ずる。



式(4)の反応を Fenton 反応という。 $\cdot\text{OH}$ は、反応性が非常に高く、しかも細胞内で形成されるので (O_2^- や H_2O_2 は細胞外で生じ、後者は細胞膜を透過できるが、前者はできない)、これが活性酸素のうちで最も有害で、これによって高分子物質の変性や細胞のダメージが生じると考えられている。 $\cdot\text{OH}$ は脂質の過酸化、酵素タンパクの不活化、DNA の分解等、種々の反応を引き起こす。これに対して、 O_2^- や H_2O_2 は $\cdot\text{OH}$ に比して弱い酸化作用を持つが、 O_2^- は、 Fe-S_4 クラスターやヘムタンパクと反応し、 H_2O_2 はタンパクやグルタチオン (GSH) のチオールグループを攻撃するなど、生体的に重要な分子を破壊する。また、 H_2O_2 は、病害に抵抗する防御反応物質生産の引き金としても重要である。

3 植物の防御反応における活性酸素の発生

病原菌が植物に感染したとき、活性酸素が発生することは、ジャガイモ疫病 (potato blight fungus, *Phytophthora infestans*) に感染したジャガイモ塊茎で初めて観察された。DOKE (1983) は、potato discs で過敏反応を起こさせる系統のカビを培養し、Cyt. C と nitroblue tetrazolium の色素還元が高まることを発見した。この系に superoxide dismutase を加えると反応は阻害

される。他方、過敏反応を起こさせない系統では、cyt. C の還元は高まらない。これらの結果から、 O_2^- 発生は、植物の過敏反応によって生ずることが明らかとなった。

トマトと葉かび病 (*Cladosporium fulvum*) の関係でも同様に活性酸素発生が見られる。過敏反応を起こしている感染葉から得られたアポプラスト液 (細胞外液で、導管内液) をトマト細胞懸濁液に加えると、2分以内に活性酸素が発生する。しかし、感染していない葉や過敏反応を示さない葉のアポプラスト液では、活性酸素は発生しない。

カビの産生するエリシターも oxidative burst の引き金を引くことも示されている。2種の非特異的エリシターをダイズ細胞懸濁液に処理すると、2分以内に活性酸素を生じる。

細菌でも活性酸素発生が報告されている。*Pseudomonas syringae* pv *syringae* に感染したタバコは、過敏反応を示し、 O_2^- の発生と脂質の過酸化が高まる。これと反対に、*Pseudomonas syringae* pv *phasiolicola* のトランスポゾン変異体は、過敏反応誘導能を失っており、上のような変化を起こさない。

最近、harpin というタンパク質が、*Erwinia amylovora* によるタバコ過敏反応のエリシターとして同定された。Harpin を作る *E. amylovora* は、タバコ細胞懸濁液で、2時間後に活性酸素生産を誘導するが、このトランスポゾン変異体は、harpin を作らないし、活性酸素誘導もない。さらに、harpin の遺伝子を発現している *Escherichia coli* のセルフリー抽出液を加えると、活性酸素発生は5~10分で起こる。

タバコとタバコウイルスの関係でも、過敏反応が進んでいる葉で O_2^- は検出されるが、感染を受けていない葉や全身に感染が進んでいる葉では、 O_2^- はほとんど検出できない。すなわち O_2^- 生産は、ネクロシスが起る場所のみに出現する。

4 活性酸素発生の分子機構

Oxidative burst の原因となる酵素やその酵素を活性化する分子の同定が最近進んでいる。過敏反応における細胞外活性酸素発生のモデルを図-1に示した。

エリシターと結合する植物のエリシター・レセプターは、細胞膜に存在する。ダイズでは、植物細胞壁が出す polygalacturonic acid とカビの細胞壁が出す carbohydrate または (glyco) protein が、oxidative burst を刺激することが知られている。そして、それらのレセプターは、細胞膜に見られる。

エリシター・レセプターは、G-タンパクと共役して

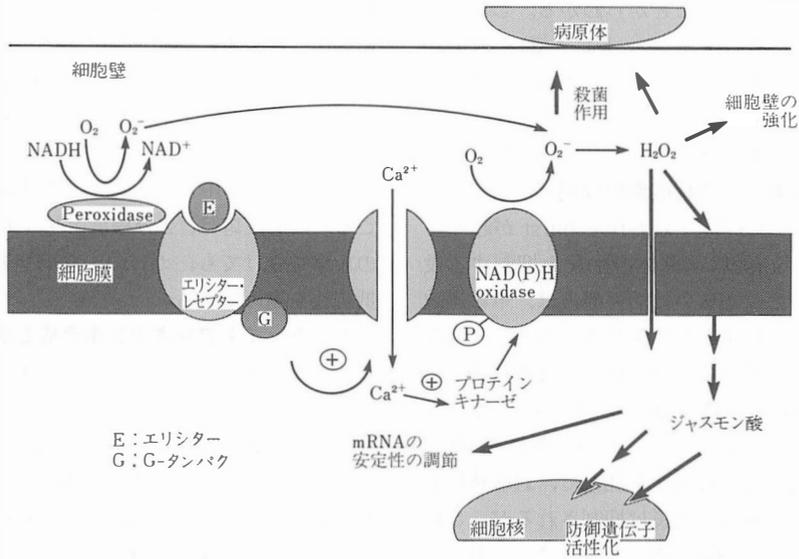


図-1 活性酸素発生のメカニズム, (MEHDY, 1994)

エリシター・レセプターは、G-タンパクを介して活性酸素発現と共役していると思われる。レセプターにエリシターが結合すると、Ca²⁺チャネルが開いてCa²⁺が流入し、細胞内Ca²⁺濃度が高まる。それによって、プロテインキナーゼが活性化され、膜のNAD(P)H oxidaseをリン酸化して活性化する。それとは別に、エリシター・レセプターがふさがると、メカニズムはわからないが、膜のperoxidaseが刺激され、その結果O₂⁻を生ずる。O₂⁻は連続した還元を受けて、H₂O₂になり、これは、膜を通過し得る。O₂⁻とH₂O₂はともに病原体を殺す作用を持つ。H₂O₂は、細胞壁タンパクの修飾にも、ホストの遺伝子発現の調節にも働く。

いることは、動物で広く知られているレセプターと同じである。したがって、エリシターの有無にかかわらず、G-タンパクに作用する物質は、活性酸素発生を増加させることがダイズの細胞で明らかにされている。

活性酸素の発生は、細胞内Ca²⁺濃度とプロテイン・キナーゼ活性の増大に依存している。培養液中からCa²⁺を取り除くと、カビのエリシターの誘導する活性酸素発生は、抑制され、Caイオノホアー(A 23187)は、活性酸素発生を誘導する。また、Caチャネル・ブロッカーであるLa³⁺は、タバコの細菌エリシターが誘導する活性酸素発生を阻害することが明らかとなっている。

プロテイン・キナーゼ阻害剤(staurosporineとK 252 a)は、エリシター誘導活性酸素発生を抑制することも認められている。

結論として、エリシター・レセプターは、G-タンパクに共役しており、これがCa²⁺の細胞内流入を導き、Ca²⁺依存性プロテイン・キナーゼを活性化させ、それによりNAD(P)H oxidaseがリン酸化されて活性化

し、最終的にO₂⁻を発生させるというのが最も妥当な説明である。

O₂⁻の形成を触媒するNADPH依存性のoxidaseは、プロテイン・キナーゼで活性化されて、O₂⁻を発生させるが、この酵素は膜に存在し、マイクロゾーム分画で活性が高い。過敏反応を起こした細胞やエリシター処理したプロトプラストのマイクロゾーム分画で高い活性が見られる。NADPH oxidaseの膜上での構造配置は明らかではないが、酸化部位は、細胞膜中にあるかまたは細胞の外側表面にあり、O₂⁻を細胞外に放出する(O₂⁻は、膜をほとんど通らない)。

O₂⁻発生のもう一つの原因となる酸化酵素は、NADH依存性peroxidaseで、細胞膜外側表面に存在する。この酵素によるO₂⁻の発生は、健全な組織でも見られ、これによりH₂O₂を生じ、リグニン化が起こる。エリシターが誘導する活性酸素発生にもperoxidaseが関与するらしいが、そのメカニズムは明らかではない。Peroxidaseの阻害剤であるcyanideやsalicylhydroxamic acidを加えると、脂質の過酸化物質やフェノ

ール化合物の生産が減少することからわかる。しかし、これらの阻害剤は、他のターゲットにも働くので、NADH peroxidase に直接働いたという確かな証拠はない。NADH peroxidase とエリシター・レセプターとの関係は今後の研究の進展を待たなくてはならない。

5 植物の防御における活性酸素の役割

植物が病原体に感染され、oxidative burst が起こったとき、oxidative burst は病原体の生長を抑制する役割を持っているのか？あるいは活性酸素は、単に過敏反応における代謝の結果として生じるのか？という疑問が残る。これを証明するにたる確たる証拠は少ないが、活性酸素が直接病原体の活性を減ずることを示すいくつかの報告がある。タバコ細胞懸濁液に *Pseudomonas syringae* pv *tabaci* を加えて、過敏反応を起こさせると、この細菌の生長は抑制されるが、これに O_2^- スカベンジャー (掃除屋) を加えると、 O_2^- 生産、脂質の過酸化が抑えられ、細菌は回復する。カビ胞子の多くは、発芽が H_2O_2 の μM オーダーで阻害される。エリシター (polygalacturonic acid) に反応して、細胞は約 1.2 mM の H_2O_2 を生産する。したがって、カビ胞子の発芽は完全に抑えられる。

一方、過敏反応で生じる活性酸素自体や活性酸素から生じる物質は、植物自体にも毒性を示すかもしれない。そのため植物細胞には、活性酸素発生期間を短縮したり、毒性を軽減したりするメカニズムが備わっている。前者は、病原体やエリシターで誘導する活性酸素発生は、一時的なもので、一度発生すると次のエリシターに対する感度が低下する。後者は、植物中には、還元剤、抗酸化剤あるいは抗酸化酵素が豊富に存在するので、活性酸素を中和することができる。これらの代表的なものは、superoxide dismutase、細胞質やペロキシゾーム (植物細胞中にある直径 0.3~1.5 μm の小径粒) 中の catalase (CAT, H_2O_2 を分解する酵素)、ascorbate と ascorbate peroxidase、glutathione と glutathione peroxidase などがある。また、このような酸化ストレスがかかると、抗酸化システムを誘導することも知られている。例えば、アルファルファやマメの細胞にエリシターを処理するとグルタチオンのレベルが高まる。このような調節機構も働くが、oxidative burst はやはり細胞内の活性酸素を有意に増加させる。その結果、植物自体も害を受けることになる。病原体やエリシターによって起こる脂質の過酸化や脂質のフリーラジカルの発生あるいは植物細胞死は、抗酸化剤を加えることによって減少する事実からわかる。さらに、抗酸化酵素レベルが低い程、発生した活性酸素は病原体防御に多く利用さ

れるため、病原体の感染に対して耐性である。しかし、過剰の活性酸素は、植物自体を著しく傷つける。

Oxidative burst は、植物の細胞壁を強める役割も果たし、これによって病原体の攻撃に対抗する。マメやダイズの細胞懸濁液にエリシターを処理すると、構造タンパクに H_2O_2 が中だてとなる酸化的 cross-linking が起こる。この反応は、2分程度と早く起こり、その後カビの攻撃を受けても、カビの出す細胞壁分解酵素に対して抵抗性を高めている。

6 ファイトアレキシン生合成と活性酸素

活性酸素がファイトアレキシン生合成を誘導するシグナル中間体として働いている可能性が注目を引いている。DOKE (1983) は、過敏反応を起こさせるカビをジャガイモ・ディスクに接種し、これに superoxide dismutase を投与すると、 O_2^- 発生もファイトアレキシンの蓄積も共に阻害されることを示した。マメ、ダイズ、ワタなどの植物でも、抗酸化酵素やフリーラジカルの「掃除屋」が、ファイトアレキシン生産を抑制することが報告されている。このことは、ファイトアレキシンの生産調節は図-1の反応経路とは別の経路をたどってなされることを示している。しかし、活性酸素によるファイトアレキシン生産や防御の調節機構はまだよくわかっていない。

ファイトアレキシン生産は、第一義的には転写活性にあるので、活性酸素は終局的には遺伝子発現に影響すると考えられる (図-1)。マメの細胞懸濁液を H_2O_2 で処理すると、ファイトアレキシン生合成に必要な酵素、Phe ammonia lyase (PAL)、chalcone synthase、chalcone isomerase、endochitinase など、をコードする mRNA の蓄積が誘導される。したがって、活性酸素は、防御機構関与物質の mRNA の安定性を調節しているのかもしれない。エリシターが誘導する oxidative burst を阻害すると、これらの mRNA は減少する。これらのことから、防御関連遺伝子発現を導く経路の中間体としての活性酸素の役割が考えられるが、まだ詳しいことはよくわからない。

活性酸素が増加することによって起こる遺伝子発現を修飾する調節物質に、還元型グルタチオン (GSH) と酸化型グルタチオン (GSSG) またはその誘導体がある。GSH を外から与えると、Phe ammonia lyase と chalcone synthase の転写が増し、PAL 活性とファイトアレキシン生産を高める。

脂質と活性酸素が非酵素的に反応して生ずる過酸化脂質は、jasmonic acid 合成の前駆物質として働く。Jasmonic acid も、防御関連遺伝子の発現調節剤である。

7 SAR (Systemic Acquired Resistance)

動物では、抗原-抗体反応に基づく免疫機構が知られているが、植物でも一種の「免疫機構」が存在する。植物がネクロシスを起こさせる病原体に対して、感染後しばらくの間、その病原体あるいは他の病原体に対して耐性を増す。これをSAR (Systemic Acquired Resistance) という。最近の研究から、この耐性は salicylic acid (サリチル酸) に原因し、サリチル酸が植物体全身に移動して、PR proteins (Pathogenesis-related pro-

tein, 感染特異的タンパク質, 病原体の細胞壁を消化するキチナーゼ, グルカナーゼなどが代表例である) を生産し、耐性を獲得することが明らかとなってきた。実際に、サリチル酸を葉に処理すると耐性が高まる。これはサリチル酸が catalase を阻害し、 H_2O_2 濃度が高まる。この H_2O_2 がセカンドメッセンジャーとして働いて、遺伝子の転写活性を高め、SAR が得られると考えられている (SAR については、植物の免疫で詳しく述べる)。

本会発行のシリーズ図書：植物保護ライブラリー

各冊 B6 版 定価 1,326 円 (本体価格 1,263 円)

| | |
|------------------------------|--|
| 「イネいもち病を探る」-研究室から現場まで- | 小野小三郎 著 送料 240 円 口絵カラー 2 頁 本文 174 頁 |
| 「作物の病気を防ぐくすりの話」 | 上杉 康彦 著 本文 121 頁 送料 240 円 |
| 「虫たちと不思議な匂いの世界」 | 玉木 佳男 著 本文 187 頁 送料 240 円 |
| 「日本ローカル昆虫記」-虫の心・人の心- | 今村 和夫 著 本文 220 頁 送料 310 円 |
| 「ミクロの世界に魅せられて」-植物病原細菌の虚像と実像- | 後藤 正夫 著 本文 220 頁 送料 310 円 |

お申し込みは、直接本会出版情報グループに申し込むか、お近くの書店で取り寄せて下さい

社団法人日本植物防疫協会 〒170 東京都豊島区駒込 1-43-11 TEL: (03)3944-1561 FAX: (03)3944-2103

本 会 発 行 図 書

農林有害動物・昆虫名鑑

日本応用動物昆虫学会 編

本体 3,300 円(税別) 送料 340 円 A5 版 本文 379 ページ 並製

日本応用動物昆虫学会の創立 30 周年記念出版として刊行されたもので、害虫名の指針として広く利用されてきた、前版「農林害虫名鑑」を全面的に改訂した名鑑である。あらたに哺乳類・鳥類が加わり、収録種数も、2,450 種と大幅に増補され、一層充実した内容となっている。全体の構成は前版と同様に、第 1 部—有害動物・昆虫分類表、第 2 部—作物別有害動物・昆虫名、第 3 部—学名・英名索引となっている。簡明、便利、かつ信頼して使える有害動物・昆虫名鑑であり、植物防疫関係者にとって必携の書である。

お申し込みは前金 (現金書留・郵便振替) で直接本会までお申し込み下さい。