イネ培養細胞における病害抵抗性誘導物質の違いによるプライミング効果の差異

伊代住浩幸¹・加藤 公彦^{1*}・影山智津子¹・稲垣 栄洋¹・古瀬 勝美²・馬場 康司³・土屋 広司⁴

ABSTRACT

IYOZUMI, H.¹, KATO, K.^{1*}, KAGEYAMA, C.¹, INAGAKI, H.¹, FURUSE, K.², BABA, K.³ and TSUCHIYA, H.⁴ (2006). Elicitor-responses in rice cells are differentially potentiated by plant defense activators. Jpn. J. Phytopathol. 72: 195–199.

We examined the priming effects of four plant defense activators (probenazole [PBZ], methyl jasmonate [MeJA], acibenzolar-S-methyl [ASM], and carpropamid [CRP]) in rice cells. Activators potentiated the elicitor-responsive expression of *Chl-1* gene by 4- to 7-fold. MeJA greatly activated *PBZ1* and *Os PAL1* gene expression by over 50-fold, and CRP also enhanced *PBZ1* gene expression to the same degree. On the other hand, activators accelerated the elicitor-responsive photon emission and augmented its peak intensity by 2- to 3-fold. These results indicated that each elicitor response was potentiated by plant defense activators in different but overlapping manners. Among elicitor responses, photon emission can be a useful marker for priming because of its sensitivity to various kinds of activators and a simple strategy for its estimation.

(Recived October 5, 2005, Accepted March 16, 2006)

Key words: plant defense activator, priming, elicitor-responsive photon emission, *Oryza sativa*.

壊死病斑を誘導する病原体や、病害抵抗性を誘導する物質、生育促進根圏細菌などに植物が前もって曝されると、エリシターや病原菌に対する応答が通常に比べて迅速かつ強く誘導される現象が知られ、プライミング (priming) と呼ばれている。プライミングは各種の抵抗性誘導に共通して認められる現象で、抵抗性誘導の有用な指標となっている (Conrath *et al.*, 2002)。

最近、著者らは植物生育促進菌類 (PGPF) エリシターに応答してイネ葉および培養細胞から検出される極微弱発光 (バイオフォトン) が、プライミングにより増強されることを明らかにした (Iyozumi *et al.*, 2005)。イネ培養細胞で認められる PGPF エリシター応答発光は、エリシター処理後、数分から増加し始め、2 時間前後でピークを迎えた後に漸減する比較的早期に認められる応答反応である。さらに抵抗性誘導物質の前処理によって、このエリシター応答発光の立ち上がりが早まり、かつ、そのピーク発光強

度が増強される。エリシター応答発光の測定は、極微弱光測定装置のみにより蛍光・化学発光プローブ等を使用せずに行なえる。以上のことから、本方法によって測定されるエリシター応答発光の増強程度は、非侵襲的かつ簡易に評価可能な、抵抗性誘導の指標として期待される (Iyozumi *et al.*, 2005)。

従来、イネでは、防御関連遺伝子・タンパク質の発現 (Minami *et al.*, 1996; Nishizawa *et al.*, 1999; Umemura *et al.*, 2002)、活性酸素種 (Nishimura *et al.*, 2001) やファイトアレキシンの生成 (Nojiri *et al.*, 1996; Umemura *et al.*, 2002) などを指標に、エリシターや病原体に対する応答機構が盛んに研究されている。しかしながら、一部の抵抗性誘導物質を除いて、イネではプライミング効果に着目した抵抗性誘導の研究は行われていない (Iwata *et al.*, 1980; Araki and Kurahashi, 1999)。そこで今回、作用性が異なると考えられる抵抗性誘導物質で前処理したイネ培養細胞において、

¹ 静岡県農業試験場 (〒438-0803 静岡県磐田市富丘678-1) Shizuoka Agricultural Experiment Station, 678-1 Tomigaoka, Iwata, Shizuoka 438-0803, Japan

² クミアイ化学工業株式会社生物科学研究所 (〒439-0031 静岡県菊川市加茂3360) Kumiai Chemical Industry Co., Ltd, 3360, Kamo, Kikugawa, Shizuoka 439-0031, Japan

³ 日本曹達株式会社小田原研究所 (〒250-0280 神奈川県小田原市高田345) Nippon Soda Co., Ltd, 345, Takada, Odawara, Kanagawa 250-0280, Japan

⁴ 浜松ホトニクス株式会社中央研究所 (〒434-8601 静岡県浜松市平口5000) Hamamatsu Photonics K. K., 5000, Hirakuchi, Hamamatsu, Shizuoka 434-8601, Japan

* Corresponding author (E-mail:kimihiko1_kato@pref.shizuoka.lg.jp)

エリシター応答性遺伝子発現ならびにエリシター応答発光の変化を調査し、プライミング効果によってそれぞれがどのように増強されるかを検討した。

改変 N6 液体培地 (Kuchitsu *et al.*, 1993) で 25°C, 暗黒下, 10 日間培養したイネ細胞 (*Oryza sativa*, 品種: 日本晴) 0.5 g を含む懸濁液 1.5 ml を 50 mmφ のプラスチックシャーレに分注し, 試験に使用した。イネに病害抵抗性を誘導する物質としてプロベナゾール (Iwata *et al.*, 1980; Iwata, 2001. PBZ: 和光純薬), メチルジャスモン酸 (Schweizer *et al.*, 1998. MeJA: Sigma-Aldrich), カルプロパミド (Thieron *et al.*, 1998; Araki and Kurahashi, 1999. CRP: 和光純薬) およびアスピベンゾラル S メチル (Rohilla *et al.*, 2001. ASM: 和光純薬) の 4 種類を使用した。各物質を *N,N'*-ジメチルホルムアミド (DMF: 和光純薬) で 200 mM に調整したストック液 1.5 µl を細胞懸濁液に添加・混合し, 最終濃度 200 µM で細胞を処理した。ネガティブコントロールには, DMF を 1.5 µl 添加したものを用いた。誘導物質を添加した細胞は, 前処理のため 26°C, 4 時間, 暗黒下に維持した。エリシターには, *Penicillium simplicissimum* GP17-2 株の培養ろ液 (Koike *et al.*, 2001) を用いた。前処理終了時にエリシター原液 75 µl を添加し (5% v/v), 直後から光子カウンター PCX-100 (浜松ホトニクス K.K.) で微弱発光を測定した。このエリシターは, 根部浸漬処理により, イネいもち病を抑制することを確認している (伊代住 未発表)。

遺伝子発現調査のため, エリシター添加直前および添加 30 分後に, 各処理区から細胞 45 mg (生重量) を採取し, 即座に液体窒素中で凍結して RNeasy® Plant Mini Kit と RNase Free DNase Kit (QIAGEN) によりトータル RNA を抽出した。cDNA の合成と SYBR® Green I 法によるリアルタイム定量 RT-PCR 解析は先の論文に準じて行なった (Iyozumi *et al.*, 2005)。エリシター応答性遺伝子として, phenylalanine ammonialyase (*Os PAL1*: X16099, Minami *et al.*, 1989), chitinase (*Cht-1*: D16221, Nishizawa *et al.*, 1993), *EL2* (*EL2*: D64038, Minami *et al.*, 1996) および *PBZ1* (*PBZ1*: E12488, Midoh and Iwata, 1996) の発現量を遺伝

子特異的プライマーセット (Table 1) を用いて調査した。PCR は, ポリメラーゼ活性化 95°C 10 秒の後, DNA 変性 95°C 5 秒, アニーリング・伸長 64°C 30 秒を 40 サイクルおこなった。各遺伝子の発現量を, 同じサンプルの rice poly ubiquitin 遺伝子 (*RUBQ1*: AF184279.1, 賀来, 南 私信) の発現量で標準化し, 相対的発現量として以後の解析に用いた。*RUBQ1* の発現は, 本実験系の全ての処理区で安定していた。RNA 抽出および発光測定は 2 反復で行い, PCR も各 RNA サンプル当り 2 反復でおこなった。結果は 2 反復の平均で示した。

各抵抗性誘導物質により誘導される, 遺伝子発現とエリシター応答発光でのプライミング効果を評価するため, Fig. 1 の方法に従い, 各遺伝子発現とバイオフォトン放射のエリシター添加後の増加分 (Increased mass) 及び, コントロールに対する増強程度 (Relative enhancement) を求めた。

PGPF エリシターを添加する直前のイネ細胞において, *Cht-1* の mRNA 量は 4 種類の抵抗性誘導物質 PBZ, MeJA, CRP あるいは ASM の前処理により, ネガティブコントロールに対して 1.45, 0.72, 0.8 および 1.32 に変動していた。*EL2* の mRNA 量の変動は各物質で 1.57, 1.22, 1.89 および 1.29 であった。一方, *Os PAL1* 遺伝子の発現は各物質の前処理で 0.34, 2.11, 1.18 および 0.89 を示し, さらに *PBZ1* 遺伝子は 2.27, 15.72, 30.47 および 15.09 と物質間で大きな差が有り, 誘導物質単独でそれぞれ異なる発現誘導が認められた。これに対し, エリシター添加直前のバイオフォトン放射は, ネガティブコントロールで 7.8 光子数/秒/cm² であるのに対して, PBZ, MeJA, CRP あるいは ASM の前処理で, それぞれ 24.38, 9.67, 10.55, および 26.68 となり, バイオフォトン放射でも誘導物質ごとの差異が認められたが, 前述の遺伝子発現のいずれとも傾向が異なった。

PGPF エリシター添加 30 分後のエリシター応答性遺伝子発現の増加分 (Increased mass) はネガティブコントロールにおいて 0.1~2.2 であった (Table 2)。今回使用した 4 種類の抵抗性誘導物質 PBZ, MeJA, CRP, ASM の 200 µM,

Table 1. PCR primers for defense-related genes and an internal control gene

Gene	Forward primers	Reverse primers	Product size (bp)
<i>Os PAL1</i>	AGGTCAACTCCGTGAACGAC	AGGTCAGCCCCTTGTGTAG	192
<i>Cht-1</i>	TACAAGCGCTACTGCGACAT	TACAAGCGCTACTGCGACAT	201
<i>EL2</i>	CCTGACCTCACTGCACTTCA	AGCTTGGCTTGATTGCTGAT	227
<i>PBZ1</i>	GCCGAATACGCCTAAGATGA	TCACC CATTGATGAAGCAA	220
<i>RUBQ1</i>	CCAGTAAGTCCTCAGCCATGGAG	GGACACAATGATTAGGGATCACTT	237

Gene Expression

$$\text{Relative enhancement} = A / B$$

Gene expression is given as a relative value against the expression of same gene in “Elicitor -” control. Each increased mass (A, B) is expressed as the difference between gene expression at 30 min after elicitor addition (Elicitor +) and that just before elicitor addition (Elicitor -).

Photon Emission

$$\text{Relative enhancement} = C / D$$

Elicitor was added at 0 hr. An increase in mass (C, D) is expressed as the difference between the counts at the peak and those at 0 hr (just before elicitor addition).

Fig. 1. Calculation method for the relative enhancement of elicitor-responsive gene expression and photon emission

4 時間の前処理により、各エリシター応答性遺伝子はそれぞれ異なる増強程度を示した (Table 2). PGPF エリシター添加30分後の時点で、*EL2* は CRP により 2.7 倍に増強された他は 1.1~1.5 倍と変化が小さく、*Chl-1* は 4.2~6.6 倍で 4 種類の誘導物質により同程度に増強された。これに対して、*PBZ1* は MeJA および CRP により 55 倍以上に増強されたが、ASM では約 25 倍、PBZ では約 4.5 倍となり、増強程度は誘導物質ごとに大きく異なった。*Os PAL1* は MeJA による増強が約 50 倍と顕著である一方、CRP で 10 倍弱、ASM と PBZ で 2~3 倍と、誘導物質ごとに大きな差が認められたが、*PBZ1* とは傾向が異なった (Table 2)。

以上のエリシター応答性遺伝子の発現調査から、4 種類の誘導物質はイネ培養細胞において、一部共通しながらも異なるプライミング効果を示すことが明らかになり、誘導作用の違いがプライミング効果の差異として検出されたと考えられた。また、以上の結果は各誘導物質を単独で処理した場合と共通した傾向を示しており、特に *PBZ1* 及び *Os PAL1* においては病害抵抗性誘導の二重の役割 (Conrath *et al.*, 2002)、つまり直接的な抵抗反応の誘起とエリシターとの共同作用 (プライミング効果) が示されたと考えられた。今回の結果のうち、感染部位でのリグニン化に関わるとされる (Iwata *et al.*, 1980) phenylalanine ammonialyase 遺伝子のプライミングから MeJA 及び CRP の作用が推察された。但し、これ以外の chitinase, PBZ1, EL2 などのタンパク質がイネにおいて病害抵抗反応にどのように寄与しているかは不明であり、これらの遺伝子の発現を指標として検出されたプライミング効果の差異と、各誘導物質の作用性について特に関連付けられる結論は得られていない。

ネガティブコントロールのイネ細胞に PGPF エリシターを添加すると、添加数分後および約 2 時間後にピークを持つエリシター応答発光が認められた (Fig. 1 Control)。2 時間後の最大発光時の Increased mass は約 23 光子数/秒/cm² であった (Table 2)。エリシター応答発光は、4 種類の誘導物質の前処理により、ピークへの到達時間が一樣に早まり (2 時間後→1 時間後、データ省略)、さらにピーク発光強度の増強程度はネガティブコントロールの 2~3 倍で、作用性の異なる誘導物質のプライミング効果にもかかわらず、増強が同程度に認められた (Table 2)。単独処理でも放射量を増加させた ASM や PBZ では抵抗性誘導の二重の役割が示されたと考えられた。植物での病原体/エリシター応答発光は、イネ以外でも、ササゲ (江原, 1994)、サツマイモ (Makino *et al.*, 1996; Iyozumi *et al.*, 2002)、クロマツ (袴田ほか, 2004) やシロイヌナズナ (Bennett *et al.*, 2004) などで報告されており、様々な植物において一般的に観察される現象だと考えられる。現在、植物の病原体/エリシター応答発光にいたる詳細なメカニズムは明らかにされていないが、プログラム細胞死を含む動的抵抗性反応の過程において生成する励起分子種 (例えば脂質ヒドロペルオキシド) に由来する可能性が高いと考えられている (Havaux *et al.*, 2003; Bennett *et al.*, 2004)。イネのエリシター応答発光の波長組成は、550 nm 前後を中心として 400~600 nm まで広く分布するため、複数の励起分子種や発光分子種を含むことが示唆されている (Iyozumi *et al.*, 2005)。エリシター応答に含まれる幅広い生化学反応を背景に持つことで、エリシター応答発光は様々な誘導物

Table 2. Variations in elicitor-responsive defense gene expression and photon emission in rice cells pretreated with various plant defense activators

Pretreatment ^{c)}	Relative enhancement ^{a)} & (Increased mass in control) ^{b)}				
	<i>Os PAL1</i>	<i>EL2</i>	<i>Chl-1</i>	<i>PBZ1</i>	Photon emission
PBZ	2.3	1.1	6.6	4.6	3.3
MeJA	50.1	1.5	5.6	55.1	2.1
CRP	9.6	2.7	5.4	56.8	3.2
ASM	2.9	1.3	4.2	24.7	3.4
Control	(0.09)	(0.93)	(0.18)	(2.19)	(22.79)

a) Relative enhancement is expressed as the ratio of the increased mass of defense gene expressions or photon emission after elicitor application in activator treatment to that in control treatment as shown in Fig. 1. Values were rounded to one decimal place.

b) Increased mass of each gene expression in control after elicitor addition is indicated as a relative value compared to the expression of the same gene in the control just before elicitor addition. Increased mass of photon emission in control treatment is calculated as the difference between the counts at the peak after elicitor treatment and the counts just before elicitor addition, expressed in the unit measured (counts/second/cm²).

c) Rice cells were pretreated with probenazole (PBZ), methyl jasmonate (MeJA), carpropamid (CRP) or acibenzolar-S-methyl (ASM) at 200 µM for 4 hr before elicitor application.

質によるプライミング効果を受け易くなっていると推測される。

以上のように、イネ培養細胞を用いてエリシター応答反応に対するプライミング効果を調査することで、病害抵抗性誘導を検出できる可能性が示された。しかしながら、病害抵抗反応のプライミングは、傷害や浸透圧ストレス応答のプライミングと一部重複した機構を有する可能性が指摘されている (Conrath *et al.*, 2002)。病害抵抗性誘導によるエリシター応答のプライミングを他のストレス応答のプライミングと明瞭に識別することが、今後、プライミング効果の活用を考える際には欠かせないプロセスとなる。

エリシター応答反応の中では、*PBZ1* や *Os PAL1* 遺伝子発現のように誘導作用の種類により増強程度が大きく異なるものを指標とした場合、各誘導作用に特異的な検出が可能だと考えられる。一方、*Chl-1* 遺伝子発現やエリシター応答発光のように、様々な誘導作用により同程度に増強される反応は、より汎用的な検出指標として用いることができると考えられる。特に、エリシター応答発光の場合、その検出方法の簡易性は他に類を見ないものであり、この方法の優れた特性と言える。今後、病害抵抗性誘導に加えて他のストレス誘導によるエリシター応答発光の増強の実態を明らかにする必要がある。その上で、波長情報を含めた発光プロファイルによる識別や、作用性の異なるエリシターの使用による識別などを検討することで、より高精度なスクリーニング方法の構築が期待される。

引用文献

- Araki, Y. and Kurahashi, Y. (1999). Enhancement of phytoalexin synthesis during rice blast infection of leaves by pre-treatment with carpropamid. *J. Pesticide Sci.* 24: 369–374.
- Bennett, M., Metha, M. and Grant, M. (2004). Biophoton imaging: A nondestructive method for assaying R gene responses. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 18: 95–102.
- Conrath, U., Pieterse, C. M. J. and Mauch-Mani, B. (2002). Priming in plant-pathogen interactions. *Trends Plant Sci.* 7: 210–216.
- 江原淑夫 (1994). ウイルスに対する植物の応答. *ウイルス* 44: 55–60.
- 袴田哲司, 加藤公彦, 牧野孝宏, 山本茂弘 (2004). マツノザイセンチュウを接種したクロマツから発生する微弱発光. *日植病報* 70: 162–167.
- Havaux, M. (2003). Spontaneous and thermoinduced photon emission: New methods to detect and quantify oxidative stress in plants. *Trends Plant Sci.* 8: 409–413.
- Iwata, M., Suzuki, Y., Watanabe, T., Mase, S. and Sekizawa, Y. (1980). Effect of probenazole on the activities of enzymes related to the resistant reaction in rice plant. *Ann. Phytopath. Soc. Japan* 46: 297–306.
- Iwata, M. (2001). Probenazole-a plant defence activator. *Pest. Outlook*, 2001 12: 28–31.
- Iyozumi, H., Kato, K., Makino, T. (2002). Spectral shift of ultraweak photon emission from sweet potato during a defense response. *Photochem. Photobiol.* 75: 322–325.
- Iyozumi H., Kato K., Kageyama C., Inagaki H., Yamaguchi A., Furuse K., Baba K. and Tsuchiya H. (2005). Plant defense activators potentiate the generation of elicitor-responsive photon emission in rice. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 66: 68–74.
- Koike, N., Hyakumachi, M., Kageyama, K., Tsuyumu, S. and Doke, N. (2001). Induction of systemic resistance in cucumber against several diseases by plant growth-promoting fungi:

- lignification and superoxide generation. *Eur. J. Plant Pathol.* 107: 523–533.
- Kuchitsu, K., Kikuyama, M. and Shibuya, N. (1993). *N*-acetylchitooligosaccharides, biotic elicitor for phytoalexin production, induce transient membrane depolarization in suspension-cultured rice cells. *Protoplasma* 174: 79–81.
- Makino, T., Kato, K., Iyozumi, H., Honzawa, H., Tachiiri, Y. and Hiramatsu, M. (1996). Ultraweak luminescence generated by sweet potato and *Fusarium oxysporum* interactions associated with a defense response. *Photochem. Photobiol.* 64: 953–956.
- Midoh, N. and Iwata, M. (1996). Cloning and characterization of a probenazole inducible gene for intracellular pathogenesis-related protein in rice. *Plant Cell Physiol.* 37: 9–18.
- Minami, E., Ozeki, Y., Matsuoka, M., Koizuka, N. and Tanaka, Y. (1989). Structure and some characterization of the gene for phenylalanine ammonia lyase from rice plants. *Eur. J. Biochem.* 185: 19–25.
- Minami, E., Kuchitsu, K., He, D. Y., Kouchi, H., Midoh, N., Ohtsuki, Y. and Shibuya, N. (1996). Two novel genes rapidly and transiently activated in suspension-cultured rice cells by treatment with *N*-acetylchitoheptaose, a biotic elicitor for phytoalexin production. *Plant Cell Physiol.* 37: 563–567.
- Nishimura, N., Tanabe, S., He, D. Y., Yokota, T., Shibuya, N. and Minami, E. (2001). Recognition of *N*-acetylchitooligosaccharide elicitor by rice protoplast. *Plant Physiol. Biochem.* 39: 1105–1110.
- Nishizawa, Y., Kishimoto, N., Saito, A. and Hibi, T. (1993). Sequence variation, differential expression and chromosomal location of rice chitinase genes. *Mol. Gen. Genet.* 241: 1–10.
- Nishizawa, Y., Kawasaki, A., Hibi, T., He, D. Y., Shibuya, N. and Minami, E. (1999). Regulation of the chitinase gene expression in suspension-cultured rice cells by *N*-acetylchitooligosaccharides: differences in the signal transduction pathways leading to the activation of elicitor-responsive genes. *Plant Mol. Biol.* 39: 907–914.
- Nojiri, H., Sugimori, M., Yamane, H., Nishimura, Y., Yamada, A., Shibuya, N., Kodama, O., Murofushi, N. and Omori, T. (1996). Involvement of jasmonic acid in elicitor-induced phytoalexin production in suspension-cultured rice cells. *Plant Physiol.* 110: 387–392.
- Rohilla, R., Singh, U. S. and Singh, R. L. (2001). Mode of action of acibenzolar-S-methyl against sheath blight of rice, caused by *Rhizoctonia solani* Kühn. *Pest. Manag. Sci.* 58: 63–69.
- Schweizer, P., Buchala, A., Dudler, R. and Métraux, J. P. (1998). Induced systemic resistance in wounded rice plants. *Plant J.* 14: 475–481.
- Thieron, M., Pontzen, R. and Kurahashi, Y. (1998). Carpropamide: a rice fungicide with two modes of action. *Pflanzenschutz-Nachrichten Bayer* 51: 257–278.
- Umemura, K., Ogawa, N., Koga, J., Iwata, M. and Usami, H. (2002). Elicitor activity of cerebroside, a sphingolipid elicitor, in cell suspension culture of rice. *Plant Cell Physiol.* 43: 778–784.