

イネ培養細胞におけるエリシター応答発光の
メカニズムに関する研究*

Studies on the mechanisms of the elicitor-responsive photon emission
from rice cells

影山智津子

Chizuko KAGEYAMA

* 岐阜大学大学院連合農学研究科審査論文 2007年(平成19年)

目 次

第1章 緒 言	1
第2章 エリシターの種類とエリシター応答発光の発光パターン	3
第1節 エリシターの種類による発光パターンの違い	3
第2節 エリシターの種類とエリシター応答発光のスペクトル解析	5
第3節 考 察	6
第3章 エリシターの種類と抵抗性誘導物質によるエリシター応答発光の プライミング効果	7
第1節 細胞増殖に用いた培地の種類とエリシター応答発光のプライミング効果	7
第2節 抵抗性誘導物質の処理時間とエリシター応答発光のプライミング効果	8
第3節 重合度の異なるキチンオリゴ糖エリシターとプライミング効果	8
第4節 エリシターの種類、濃度とプライミング効果	10
第5節 抵抗性誘導物質の種類とエリシター応答発光のプライミング効果	13
第6節 考 察	14
第4章 活性酸素種の生成とそのエリシター応答発光への関与	16
第1節 エリシター処理による過酸化水素の生成とエリシター応答発光との相関	16
第2節 外生的に処理した ROS がエリシター応答発光に与える影響	16
第3節 阻害剤による ROS の抑制がエリシター応答発光に与える影響	18
第4節 ROS の生成や分解に関与する酵素が培地中の過酸化水素濃度と エリシター応答発光に与える影響	19
第5節 考 察	21
第5章 エリシター応答発光に至るシグナル伝達経路	23
第1節 PA によって誘導されるバイオフィトン放射の特性	23
第2節 防御応答のシグナル伝達経路に関与する反応の阻害がエリシター応答発光と PA 誘導発光に及ぼす影響	24
第3節 エリシター応答発光における PA の役割	25
第4節 6量体キチン及びPAが誘導するエリシター応答発光のスペクトル特性	26
第5節 6量体キチンエリシターは過敏感細胞死を誘導しない	27
第6節 考 察	27

第 6 章 総合考察	29
摘 要	32
Summary	34
謝 辞	36
引用文献	37

第1章 緒 言

バイオフィトンとは生物が放射する極微弱な光のことである。バイオフィトン放射は、生命活動に伴って細胞内で行われる生化学反応に付随して行われるものであり、ホタルやホタルイカなどのような発光を目的とした強い光とは基本的に異なる。その発光強度は1秒間あたり1平方センチメートルあたり数百フォトンまでで、そのスペクトルは200～800nmの波長域にある(Abeles, 1986)。バイオフィトンが発生する基本原理は、生物の生化学反応によって生じた励起分子が基底状態に戻るときに光を放出することにあるが、酸素がない状態ではフォトンが放出されないことから、酸化代謝反応と深く関わっており、活性酸素種(reactive oxygen species: ROS)が原動力の一つと考えられている。

生物を始め植物も恒常的にバイオフィトンを放出しているが、その放射量は一定ではなく、生長に伴って変化する(Kai *et al.*, 1994)。また、塩害や乾燥などの環境ストレス(大矢ほか, 1998, 2000; Ohya *et al.*, 2000)や病原菌の感染(Makino *et al.*, 1996)によってバイオフィトンが上昇することが報告されている。著者らのグループでは、植物生育促進菌類(plant growth-promoting fungi: PGPF)の培養液をイネ(*Oryza sativa*)葉鞘及びイネ培養細胞に処理したり、様々な防御応答誘導物質(エリシター)をイネ培養細胞に処理したりするとバイオフィトン放射が急激に上昇することを見出し(Iyozumi *et al.*, 2005; 影山ほか, 2004)、これらのバイオフィトン放射は植物の病害抵抗反応に伴って発生量が増加することを報告した。

植物は病原菌を様々なレベルで認識し防御応答を誘導するシステムを持っており、その中で最も基本的なものは微生物細胞表層に共通した分子パターン(pathogen-associated molecular patterns: PAMPs)を認識する系で、基礎的抵抗性との関わりが深いと考えられている。糸状菌に共通の細胞壁構成成分で、PAMPsの一つである*N*-アセチルキトオリゴ糖(*N*-acetylchitooligosaccharide)(以下、キチンオリゴ糖)類は、*N*-アセチル-D-グルコサミンが β -1,4結合した少糖類で、数種の植物の重要なエリシターであることが知られている(Felix *et al.*, 1993; Kaku *et al.*, 1997)。キチンオリゴ糖エリシターは、トマト(*Lycopersicon esculentum*)の懸濁培養細胞におい

て、培地のアルカリ化とタンパク質のリン酸化を誘導(Felix *et al.*, 1993)し、オオムギ(*Hordeum vulgare*)の懸濁培養細胞においてもグルカナーゼ遺伝子の発現を誘導する(Kaku *et al.*, 1997)。さらに、イネの懸濁培養細胞を用いた実験系では多くの研究が行われ、キチンオリゴ糖エリシターの処理により、細胞膜の脱分極化(Kikuyama *et al.*, 1997; Kuchitsu *et al.*, 1993)、イオンフラックス(Kuchitsu *et al.*, 1997)、細胞質の酸化、迅速なタンパク質のリン酸化(He D-Y *et al.*, 1998)、ROSの生成(Kuchitsu *et al.*, 1995)、防御関連遺伝子の発現(He D-Y *et al.*, 1998; Minami *et al.*, 1996; Nishizawa *et al.*, 1999)、ファイトアレキシンの生合成(Nojiri *et al.*, 1996; Yamada *et al.*, 1993)を引き起こすことが報告された。また、キチンオリゴ糖エリシターに特異的に結合する受容体分子がイネ培養細胞の原形質膜に存在することが明らかになり、この結合タンパク質が単離精製され、遺伝子クローニングに成功している(Kaku *et al.*, 2006)。さらに、キチンオリゴ糖エリシターがイネ培養細胞に認識された後のシグナル伝達系におけるリン脂質代謝系の役割についても研究が進んでいる。キチンオリゴ糖エリシターをイネ培養細胞に処理すると2峰性のROSの生成が見られる。このROS生成に至るシグナル伝達経路では、まず、キチンオリゴ糖エリシター分子が認識されることにより、処理の1時間以内にフォスホリパーゼが活性化される。活性化したフォスホリパーゼC(PLC)によってジアシルグリセロール(DAG)がリン脂質から放出され、さらにこれがジアシルグリセロールキナーゼ(DGK)によってフォスファチジン酸(PA)に変換される。あるいは活性化したフォスホリパーゼD(PLD)によってリン脂質からPAが直接作り出される。このPAは外生的にイネ培養細胞に処理するとROSが生成されることも明らかにされている(Yamaguchi *et al.*, 2003)。このように、*N*-アセチルキトオリゴ糖が誘導するROS生成過程において、PAはセカンドメッセンジャーとして機能すると考えられている。さらに、ROSの最初の生成にはPLC及びPLDの両者が関わっているが、ROSの2相目の生成にはPLDのみが関与していることが示された(Yamaguchi *et al.*, 2005)。このように、キチンオリゴ糖エリシターによっ

てイネ培養細胞に誘導される防御応答に関する研究が詳細になされていることから、エリシターが誘導するバイオフォトン放射の研究において、イネ培養細胞とキチンオリゴ糖エリシターの実験系はバイオフォトン放射に至るシグナル伝達経路の解析に適すると考えられた。

著者らのグループではこれまでに、植物の病害抵抗反応に伴って発生量が増加するバイオフォトン (Iyozumi *et al.*, 2002) や害虫の食害に伴うバイオフォトン (Yoshinaga *et al.*, 2006) の特性について解明した。さらに、病害抵抗反応を誘導する PGPF 由来のエリシターの処理により発生するバイオフォトン (ここでは以下、エリシター応答発光) は、病害抵抗性誘導物質の作用によりプライミングを受け、増強することも明らかにしている (Iyozumi *et al.*, 2005)。病害抵抗反応におけるプライミングとは、植物が微生物や抵抗性誘導物質により病害抵抗性が誘導されている状態では、次に病原菌が感染した時の病害抵抗反応が病害抵抗性が誘導されていない状態よりも強く、かつ早く起きることである (Conrath *et al.*, 2002)。ここで言う病害抵抗反応には過敏細胞死、細胞壁の強化、オキシダティブバースト等に関連する様々な防御関連遺伝子の発現が含まれる。また、異なる抵抗性誘導物質は、イネ培養細胞において、一部の共通点はあるものの異なるプライミング効果を示し、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 (伊代住ほか, 2006)。エリシター応答発光が病害抵抗性誘導物質の作用によりプライミングを受けるという事実は、病害抵抗反応とバイオフォトン放射との関連性を強く示唆するものである。また、シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) において、病害抵抗反応である過敏細胞死に関連してバイオフォトンが強く放射されると報告されており (Bennett *et al.*, 2005)、このことは、著者らが明らかにしたエリシター応答発光のプライミング現象とともに、病害抵抗反応を解析する手段としてのバイオフォトンの重要性を示すものと考えられる。しかしながら、病害抵抗反応とエリシター応答発光との相関を示す科学的な解析は不十分で、全体像は明らかになっていない。

そこで、本研究では、植物のエリシター応答発光の特性を解明するため、異なるエリシターが誘導するエリシター応答発光とエリシター応答発光のプライミング現象について調査した。また、病害抵抗性反応におけるシグナル伝達経路との相関を調べるため、薬理学的手法を用いてエリシター応答発光に至るシグナル伝達経路の解明を試みた。なお、本論文に用いた実験結果の一部は、Kageyama *et al.* (2006)、影山ほか (2007a)、影山ほか

(2007b) として公表している。

第2章 エリシターの種類とエリシター応答発光の発光パターン

著者らはこれまでに、エリシター応答発光がPGPFの培養ろ液など様々なエリシターによって誘導されることを報告した(影山ほか, 2004)。しかし、これらのエリシター応答発光は、同じ生化学反応に基づいて放射されているのかは明らかとなっていない。そこで、本章では、各種エリシターが誘導するエリシター応答発光のパターンと発光スペクトルを比較した。高等植物の組織や培養細胞に病害抵抗反応を誘導するエリシターは、糖タンパク質、ペプチド、脂質、オリゴ糖などの宿主植物や病原菌に由来する生物学的エリシターと、重金属や紫外線などの非生物学的エリシターとに分類される。これらのエリシターは、植物に様々な病害抵抗反応を引き起こすことが報告されているが、これらのエリシターの中で、試薬として入手可能な生物学的エリシター2種と非生物学的エリシター2種を比較検討した。

キチンオリゴ糖エリシターは、糸状菌の構成成分であり、イネに強いエリシター活性を持つことが知られている(Shibuya and Minami, 2001)。キシラナーゼは、微生物に含まれ、植物の細胞壁構成成分であるキシランをキシロースに分解する酵素であるが、タバコ(Lotan and Fluhr, 1990)やトマト(Raz and Fluhr, 1992)において、PRタンパクを誘導する。キシラナーゼは酵素としての機能を持っていなくても、キシラナーゼ自身がエリシターとして作用していることが報告されている(Enkerli *et al.*, 1999)。非生物学的エリシターであるリン酸水素二カリウムはイネ植物体への噴霧や土壌かん注により、いも

ち病に対する抵抗性を誘導すること(Manandhar *et al.*, 1998)が、また、塩化銅(II)はイネ植物体への処理により、ファイトアレキシンを誘導すること(Rakwal *et al.*, 1996)が報告されている。キシラナーゼ以外はいずれもイネに病害抵抗反応を誘導することから、エリシター応答発光の特性を調査する材料として適当と考えられた。

第1節 エリシターの種類による発光パターンの違い

生物学的エリシター2種と非生物学的エリシター2種の処理によるイネ培養細胞からのエリシター応答発光の時間的変化を比較検討した。

第1項 材料及び方法

1. 供試細胞

エリシター応答発光の特性を研究する材料として何を使用するかは研究を進める上で重要であるが、植物全体を使用することはフォトン測定装置の大きさを考慮すると不適である。そのため、今までの研究では植物体の一部や培養細胞を用いてきた(Iyozumi *et al.*, 2005)。イネ培養細胞は材料を常時準備可能で、取扱いが容易なため、実験にはすべて、イネの懸濁培養細胞を用いた。イネ(品種:金南風)の種子を、2mg/l 2,4-Dと0.4%ゲランガムを含むUM固体培地(Uchimiyama and Murashige, 1974)に置床し、24℃、暗条件でカルスを誘導した。このカルスは同じ培地で、約1~1.5ヶ月ごとに継代、維持した。

Table 1. Effects of the variety of culture medium on the proliferation and browning of callus. Suspension-cultured rice cells (13 g, fresh weight) were suspended in 100 ml of each medium in 300 ml volume of Erlenmeyer flask. Cells were cultured with rotary shaker at 120 rpm, 25 °C. After 10 days the cells were weighed and checked. 1/2 UM: half concentrations of all salts of UM medium, 1/2 MS: half concentrations of all salts of MS medium.

Culture medium	concentration of 2,4-D (mg/l)	Proliferation of callus (times/10D)	Browning of callus
UM	2	1.0	++
1/2 UM	1	1.5	+
1/2 MS	1	2.3	±
Modified N6	1	2.0	-

懸濁培養細胞は、同じ組成の液体培地で、25℃、暗条件下、120rpmで振とう培養し、10日間隔で継代した。しかし、培養細胞は継代培養を長期に亘り継続すると細胞が褐変しやすくなった。これを解決するためにイネ培養細胞の培養条件を検討したところ、Table 1のとおり、1mg/l 2,4-Dを含む改変N6培地(Kuchitsu *et al.*, 1993)で培養することにより、細胞は増殖が良く、褐変もしなくなった。1/2濃度のMS(Murashige and Skoog, 1962)培地では増殖は良いが継代を継続すると褐変が認められた。このため、実験は、1mg/l 2,4-Dを含む改変N6培地で10日間培養した細胞を、10日後に1mg/l 2,4-Dを含む1/2 MS培地に移植し、培養7日後のものを用いた。1/2 MS培地に移植する理由は、エリシター応答発光がより強く検出されるからである。実験には、同時期に培養した同じロットの細胞を用いた。

2. 供試エリシター

実験に用いたエリシターは、生物学的エリシターとして *N*-acetylchitohexaose (6量体キチン) (生化学工業) 及びキシラナーゼ (由来 *Trichoderma viride*) (シグマ化学工業)、非生物学的エリシターとして、リン酸水素二カリウム (K_2HPO_4) (和光純薬工業) 及び塩化銅(II)($CuCl_2$)

(和光純薬工業)を用いた。各エリシターは、蒸留水に処理濃度の20倍に溶解し、使用まで5℃で保存した。

3. バイオフィトン放射の測定装置

バイオフィトン放射は、光電子増倍管(R329P、検出波長域：240-630nm)を備え、24試料を連続的に自動測定可能な光子計測システム(光子カウンター：CCSPC I、浜松ホトニクス)を用いた。光子カウンターは26℃に温度調整された恒温室に設置し、実験中の暗箱の温度は $26^\circ C \pm 0.5^\circ C$ で、暗条件下での光電子増倍管の平均ノイズは1平方センチメートル当たり1秒当たり2.6カウントであった。

4. イネ培養細胞からのエリシター応答発光の測定

直径60mmのプラスチックシャーレにイネ懸濁培養細胞2.5g(生重)と1/2 MS培地3.5mlを入れ、光子カウンター内に置いた。イネ培養細胞からのバイオフィトン放射を光子カウンターで観察し、バイオフィトン放射が安定した後、エリシターの保存液を所定濃度になるように1/20量添加した。その後、10時間に亘ってバイオフィトン放射を10秒ずつ計測した。用いた各エリシターの濃度は、6量体キチン：10, 1 μ M, 100nM, キシラナーゼ：100, 10, 1mg/l, リン酸水素二カリウム：

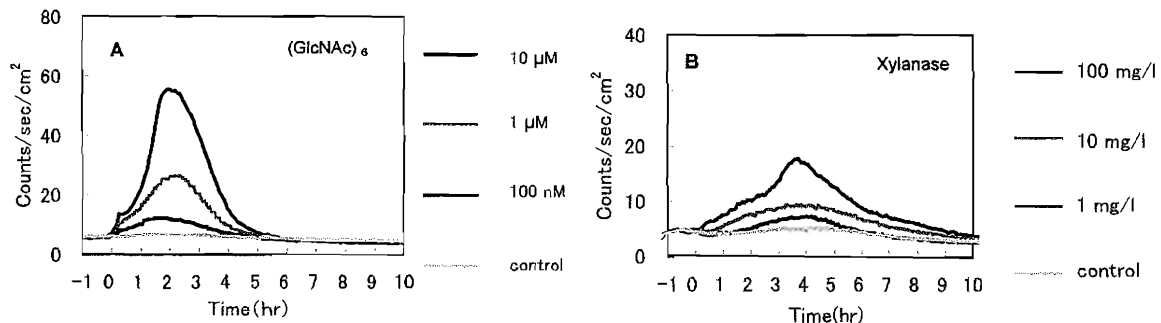


Fig. 1. Biotic elicitor-responsive photon emissions from rice cells. 2.5 g of suspension-cultured rice cells were suspended in 3.5 ml of cultured medium and incubated for two hours. At 0 hour, each concentration of elicitors, A: (GlcNAc)₆, B: Xylanase, was treated to the samples. Biophoton emissions were counted with a photon counter. Values represented the average obtained from triplicate experiments.

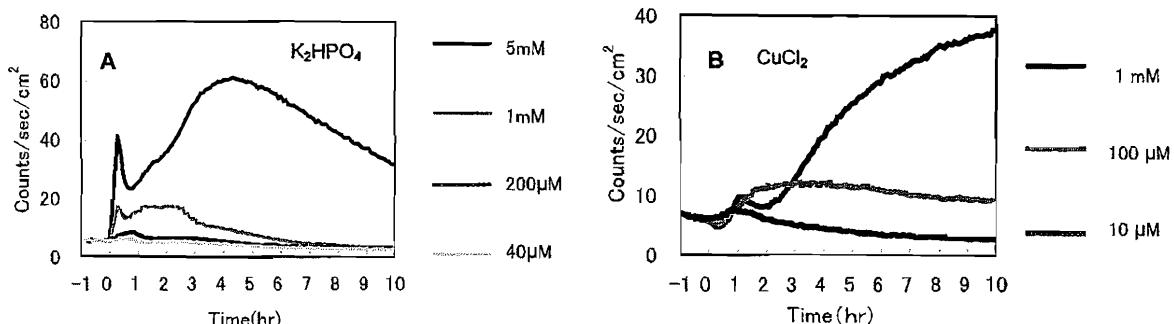


Fig. 2. Abiotic elicitor-responsive photon emissions from rice cells. 2.5 g of suspension-cultured rice cells were suspended in 3.44 ml of cultured medium and incubated for two hours. At 0 hour, each concentration of elicitors, A: K_2HPO_4 , B: $CuCl_2$ was treated to the samples. Biophoton emissions were counted with a photon counter. Values represented the average obtained from triplicate experiments.

5, 1mM, 200, 40 μ M 及び塩化銅(II): 1mM, 100, 10 μ M であった。全ての実験は3反復で行った。

第2項 結 果

1. 生物学的エリシターによるエリシター応答発光

エリシターを処理しないコントロール区では、バイオフォトンの上昇は全く認められなかった (Fig.1 A, B)。これに対して6量体キチン処理では、キチンの処理直後から濃度依存的に、エリシター応答発光の上昇が見られた (Fig.1 A)。6量体キチン処理区の1 μ Mと10 μ M 処理では、処理の約20分後に弱いショルダーピークがあり、その後、約2時間後に大きなピークを迎え、5時間後にはほぼ元のレベルまで下降した。キシラナーゼ処理では、フォトン放射量は全体的に低く上昇速度も遅いが、6量体キチン処理と同様に濃度依存的にエリシター応答発光の上昇が見られた (Fig.1 B)。

2. 非生物学的エリシターによるエリシター応答発光

リン酸水素二カリウム処理によるエリシター応答発光は明瞭な2つのピークが特徴で、高濃度処理ほど発光が高まったが、200 μ M 以下の低処理濃度では発光は弱く1つのピークのみが認められた (Fig. 2A)。

塩化銅(II)では処理濃度の違いにより、発光パターンが大きく異なり、100 μ Mと10 μ M 処理では1峰性の発光であったのに対して、1mM 処理では2峰性の発光を示し、2番目の発光は10時間以上継続した (Fig. 2B)。また、1mMと100 μ M の処理濃度では、塩化銅(II)の処理直後にエリシター応答発光がわずかに減少し、その後上昇するという他のエリシターにはない特徴的なパターンを示した。塩化銅(II)1mMを処理したイネ培養細胞には、実験終了後に他のエリシター処理では見られない褐変が観察された。

第2節 エリシターの種類とエリシター応答発光のスペクトル解析

バイオフォトン放射のスペクトルは発光分子種を反映するので、4種類のエリシター応答発光の原因となる発

光分子種を比較するため、エリシター応答発光の波長別のスペクトル解析を行った。

第1項 材料及び方法

1. 供試細胞

イネ培養細胞は、1mg/l 2,4-Dを含む改変N6液体培地で10日間振とう培養したものを新しい改変N6培地に移して4時間振とうし、実験に供試した。なお、実験には同時期に培養した同じロットの細胞を供試した。

2. 供試エリシター

実験に用いたエリシターは、第1節と同様に6量体キチン、キシラナーゼ、リン酸水素二カリウム及び塩化銅(II)である。各エリシターは、蒸留水に処理濃度の20倍に溶解し、使用まで5°Cで保存した。

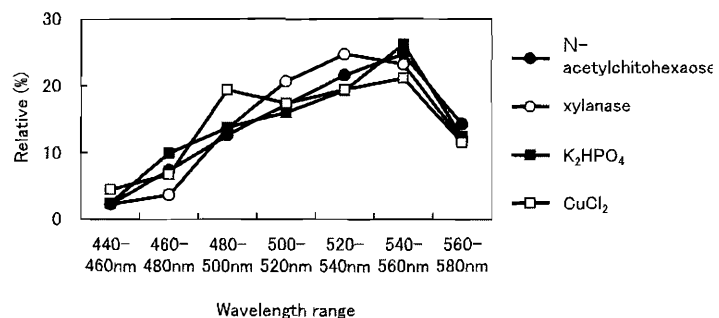
3. エリシター応答発光のスペクトル解析

スペクトル解析は、Iyozumiら(2002)の方法により測定した。しかし、この実験においては、440-580nmのスペクトル範囲を20nm幅でカバーするように組み合わせたカットオフフィルターを用いた。直径60mmのプラスチックシャーレに3.5mlの培地と、生重2.5gのイネ懸濁培養細胞を入れ、フォトンカウンター(MSPC II, 浜松ホトニクス)内に置いた。フォトン放射が安定するまで待ち、6量体キチン: 5 μ M, キシラナーゼ: 100mg/l, リン酸水素二カリウム: 5mM, 塩化銅(II): 1mMの濃度となるように各エリシターを処理し、26°Cで5秒ずつフォトン測定した。各エリシター応答発光が最大発光値を示した時の前後5回の測定の平均値をスペクトル解析に用いた。全ての実験は3反復で行った。

第2項 結 果

各エリシター応答発光を20nm幅でスペクトル解析すると、どのエリシター応答発光も440-580nmにわたる幅広いスペクトルを示しており、単一の発光分子種による発光ではないと考えられた (Fig.3)。波長域の割合を比較すると、キシラナーゼは520-540nmの割合が、また残りの3種のエリシターでは540-560nmの割合が最

Fig.3. Spectral compositions of the maximum photon emission induced by each elicitor from rice cells. Suspension-cultured rice cells were incubated with 5 μ M *N*-acetylchitohexaose, 100mg/l xylanase, 5 mM K_2HPO_4 or 1 mM $CuCl_2$. Comparisons were made at the point of maximum emission. Values represented the average obtained from triplicate experiments.



も高かった。また、塩化銅(II)は他のエリシターよりも480-500nmの波長域の割合がやや高かった。塩化銅(II)を除き、各エリシター応答発光は、全体的には良く似たスペクトルを示した。

第3節 考 察

懸濁培養細胞は増殖が容易で、季節を問わず材料の準備ができ、実験材料として極めて優れている。しかし、原因は不明であるが、培地条件により細胞が褐変するために増殖が悪化し、適切なエリシター応答発光が得られなくなる。このため、安定的に適切なエリシター応答発光が得られるような培養系を検討し、塩類や2,4-D濃度を低くした1/2 MS培地や改変N6培地を使用している。その結果、エリシター応答発光が安定して得られたため、これらの培地で培養したカルスはエリシターに対する反応を適切に示しているものと判断した。

これらの培地により増殖した細胞を用いて、エリシターの種類の違いによるエリシター応答発光の特徴を調査した。エリシターに起因する応答発光は、エリシターの種類による特徴を持ったパターンとなった。糸状菌由来のエリシターである6量体キチンにより誘導されるエリシター応答発光は、エリシター処理濃度依存的で、処理20分後に不明瞭なショルダーピークと2時間後に最大ピークを持つ2峰性のパターンを示した。細胞壁分解酵素であるキシラナーゼは、放射量は低いが3~4時間後に最大ピークを迎える1峰性のパターンであった。しかし、キシラナーゼも高濃度では2時間後に不明瞭なショルダーピークがあり、6量体キチンの1 μ Mにおけるパターンとピークの時間は異なるがパターンは類似していた。一方、非生物のエリシターのリン酸水素二カリウムは低濃度では不明瞭であるが、高濃度では明瞭な2峰性の発光パターンを示し、塩化銅(II)はエリシター処理の直後にバイオフィトン放射がわずかに減少し、その後増加するパターンであった。このように、今回使用した4種のエリシターが培養細胞に誘導するエリシター応答発光の特性は、同一ではないが、いずれのエリシター処理によってもバイオフィトンの上昇が起きることは同じであった。各エリシター応答発光の特性が異なるのは、エリシターによりバイオフィトン放射が誘導されるメカニズムが異なることを反映していると考えられるが、その詳細は不明である。

異なるエリシターが誘導するエリシター応答発光のスペクトル解析の結果は、ある波長域のバイオフィトンが放出されるのではなく、440-580nmにわたる幅広い発光が認められることを示していた。このことは、単一の発

光分子種のみによりエリシター応答発光が起因するものではないことを示唆した。また、440-580nmの波長域では塩化銅(II)を除き、各エリシター応答発光は、全体的には良く似たスペクトルで、このことは発光における生化学的バックグラウンドが類似していることを示すものと考えられた。

塩化銅(II)を1mMでイネ培養細胞に処理すると、0.1mM処理とはエリシター応答発光の特徴が大きく異なり、エリシター処理2時間後より増加した光子放射は、10時間後でも減少しなかった。この特徴は他のエリシターが誘導する応答発光には認められないものであった。高濃度の銅は細胞毒性を示すことが知られているが、この反応も、銅の毒性に起因する可能性が考えられる。つまり、塩化銅(II)1mMが誘導するバイオフィトン放射は、高濃度の銅に対するストレス応答反応とも考えられる。発光スペクトルの解析結果も塩化銅(II)1mMだけがやや異なることから、エリシター応答発光とはやや異なる反応を含む可能性が示唆された。

実験終了後に、塩化銅(II)1mM処理区では細胞の褐変が観察されたが、塩化銅(II)の低濃度処理区や6量体キチン、キシラナーゼ、リン酸水素二カリウム処理区では細胞の褐変が見られなかった。このことから、今回調査したエリシター応答発光は細胞死とは相関しないと考えられる。一方で、細胞死を伴う過敏感反応とバイオフィトン放射が相関するというBennettほか(2005)の報告がある。細胞と植物という材料の差はあるものの、肉眼的に観察できるような著しい細胞死の発生がなくてもバイオフィトン放射が起こる場合もあることを本実験結果は示した。

第3章 エリシターの種類と抵抗性誘導物質による エリシター応答発光のプライミング効果

エリシター応答発光のプライミング効果とは、病害応答の場合と同様に、抵抗性が誘導されている状態では、エリシター応答発光が早く強く起きることである。イネ培養細胞に抵抗性誘導物質を前処理し、PGPFの培養液を処理するところの現象が起こる (Iyozumi *et al.*, 2005)。この現象がエリシターの種類によってどう異なるのか、その特性を調査した。

第1節 細胞増殖に用いた培地の種類と エリシター応答発光のプライミング効果

イネ細胞を増殖するために用いている培地の種類が、エリシター応答発光のプライミング効果に与える影響を調査した。

第1項 材料及び方法

1. 供試細胞と供試培地

イネ培養細胞は、1mg/l 2,4-Dを含む改変 N6 液体培地で10日間振とう培養したものを1mg/l 2,4-Dを含む新しい培地に移して7日間培養したものを用いた。新しい培地として1/2濃度のMS培地及び改変 N6 培地を用いた。

2. 抵抗性誘導物質

抵抗性誘導物質は、アシベンズラル-S-メチル (ASM) 及びカルプロバミド (CRP) を用いて、2% Tween20を含むジメチルフォルムアミド (DMF) に100倍濃度で溶解して使用まで4℃で保存した。なお、コントロールとして用いた0.02% Tween20 + 1% DMF はイネ培養細

胞のエリシター応答発光に影響を与えないことを確認している。

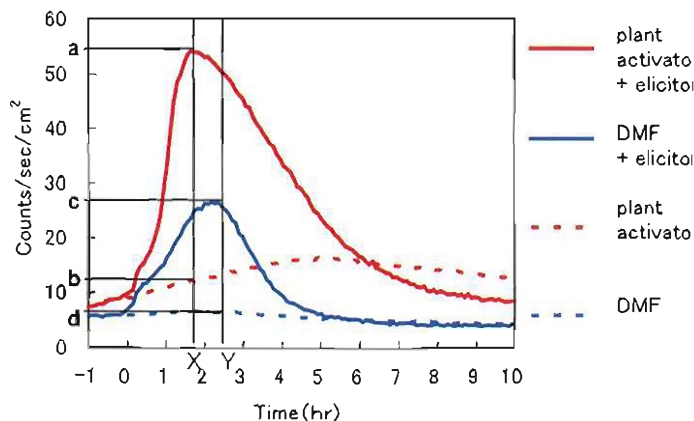
3. エリシター応答発光の測定

イネカルス 2.5g (生重) をプラスチックシャーレに入れ、培地 3.44ml と抵抗性誘導物質を 200 μ M となるように 0.06ml 処理し、フォトンカウンター (CCSPC I) でバイオフィオンの測定を行った。抵抗性誘導物質処理2時間後に6量体キチンエリシターを 0.05, 0.1, 0.5 または 1 μ M の濃度で処理し、測定を継続した。コントロールとして、抵抗性誘導物質の代わりに 2% Tween20 を含む DMF を 0.06ml 処理した区を同様に測定した。実験は 3 反復で行った。

4. エリシター応答発光の増強程度の算出

エリシター応答発光の増強程度は、Kohler ほかの方法 (Kohler *et al.*, 2002) を参考に、Fig.4 のように算出し、3 反復の平均値で示した。エリシター応答発光の増強程度は、次式 $(a - b) / (c - d)$ で示され、式中の a, b, c, d は以下である。a: 抵抗性誘導物質の前処理後、エリシターを処理した時のエリシター応答発光の最大フォトンカウント数 (この最大発光を示す時間を X 時とする)、b: 抵抗性誘導物質処理のみによる発光の X 時におけるフォトンカウント数、c: 2% Tween20 含有 DMF の前処理後、エリシターを処理した時のエリシター応答発光の最大フォトンカウント数 (この最大発光を示す時間を Y 時とする)、d: 2% Tween20 含有 DMF 処理のみの発光の Y 時におけるフォトンカウント数。フォトンカウント数は 1 秒あたりに換算した値を用いた。

Fig. 4. The method for calculating the degree of enhancement of elicitor-responsible photon emission by plant activators. The degree of enhancement was calculated as: $(a - b) / (c - d)$. (a) Max photon count of plant activator + elicitor treatment. (X) Time of (a). (b) photon count of plant activator treatment at time of X. (c) Max photon count of DMF + elicitor treatment. (Y) Time of (c). (d) photon count of DMF treatment at time of Y.



第2項 結果

改変 N6 培地は増殖が良く安定した細胞が得られるが、エリシター濃度が高いとプライミング効果が明確に認められなくなった (Table 2)。しかし、1/2 MS 培地で培養した細胞では、抵抗性誘導物質の ASM, CRP の前処理において、6 量体キチンエリシターの濃度を変化させても、プライミング効果が認められ、その効果が安定していることが明らかとなった。

第2節 抵抗性誘導物質の処理時間とエリシター応答発光のプライミング効果

抵抗性誘導物質が培養細胞に作用して、エリシター応答発光をプライミングさせるが、それに必要な誘導時間については明らかにされていない。そこで、エリシター応答発光のプライミング効果を誘導するために必要な誘導時間を調査した。

第1項 材料及び方法

1. 供試細胞

1mg/l 2,4-D を含む改変 N6 液体培地で継代した懸濁培

Table 2. Effects of the variety of culture medium and the concentration of elicitors on the degree of enhancement of elicitor-responsible photon emission. Suspension-cultured rice cells (2.5 g) were suspended in 3.44 ml of cultured medium and incubated with plant activator, 200 μ M ASM and 200 μ M CRP for two hrs. After that, each concentration (0.05, 0.1, 0.5, 1 μ M) of *N*-acetylchitohexaose was treated to the samples. Concentrations of were. Biophoton emissions were counted with a photon counter. Degree of enhancement was calculated according to the method described in Material and Method of III-4. Values represented the average obtained from triplicate experiments.

Culture medium	Concentration of elicitor (μ M)	Degree of Enhancement	
		ASM	CRP
1/2 MS	0.05	5.4	3.2
	0.1	3.7	2.6
	0.5	3.8	3.6
	1	1.7	2.0
Modified N6	0.05	2.7	2.7
	0.1	1.1	1.2
	0.5	0.8	1.2
	1	0.6	1.2

養細胞を、1mg/l 2,4-D を含む 1/2MS 液体培地で振とう培養して 10 日後のものを供試した。

2. 抵抗性誘導物質

抵抗性誘導物質として、ASM を用いた。ASM は、2% Tween20 含有の DMF に 20mM の濃度で溶解し、100 倍濃度の保存液とした。

3. バイオフィトン放射の測定

バイオフィトンは光電子増倍管 (R329P, 検出波長域: 240-630nm) と 16 試料を測定する暗箱を備えたフォトンカウンター (MSPC II: 浜松ホトニクス) を用いて、26°C で測定した。

4. 抵抗性誘導物質の処理時間とエリシター応答発光のプライミング効果

イネ培養細胞 2.5g (生重) と培地 4.43ml をプラスチックシャーレに入れ、抵抗性誘導物質として ASM を 200 μ M の濃度で処理し測定を行った。抵抗性誘導物質処理の 0, 2, 4, 6 時間後に 1 μ M 6 量体キチンを処理し、フォトン測定を継続した。コントロールは、溶媒のみ (2% Tween20 含有 DMF) を前処理し、0, 2, 4, 6 時間後に 1 μ M 6 量体キチンを添加した。実験は 3 反復で行った。

第2項 結果

抵抗性誘導物質 ASM の処理時間を 0 ~ 6 時間としてエリシター応答発光のプライミングを比較すると、0 時間処理では、エリシター処理 1 時間後よりエリシター応答発光が上昇し、3.5 時間後に最大となる発光パターンを示した (Fig.5)。これに対して、ASM の 2, 4, 6 時間処理では、エリシター処理直後からエリシター応答発光が上昇し、2.3 ~ 2.5 時間後に最大となった。このとき ASM の処理時間が短いほどエリシター応答発光の最大値は高くなる傾向にあったが、エリシター処理直後の上昇曲線は類似していた。ASM の処理時間が 0 時間では、2 ~ 6 時間処理に比較してエリシター応答発光の上昇が約 1 時間遅れた。

これらのことから、ASM を 2 時間以上処理するとエリシター応答発光のプライミング効果がほぼ同等に現れることから、ASM の処理時間は 2 時間で十分であると考えられた。

第3節 重合度の異なるキチンオリゴ糖エリシターとプライミング効果

N-アセチル-D-グルコサミンが 6 分子重合した 6 量体キチンは安定してエリシター応答発光のプライミング効果を示すことが明らかになったが、キチンオリゴ糖エリシターは重合度が高いほど、低濃度でもイネ培養細胞の

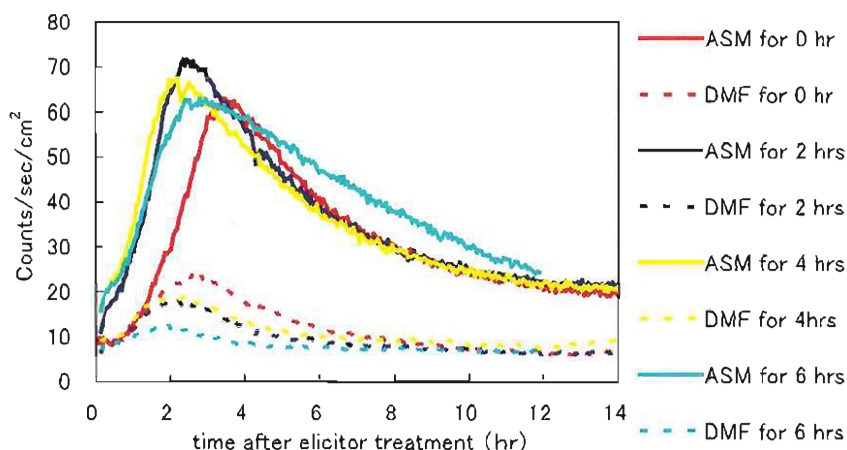


Fig.5. Effects of duration of plant activator treatment before elicitation on the priming of elicitor-responsive photo emission. Suspension-cultured rice cells (2.5 g) were suspended in 4.43 ml of cultured medium and incubated with 200 μ M ASM (solid line) or only solvent (dotted line). After 0, 2, 4, 6 hrs, 1 μ M α -acetylchitoheptaose elicitor was treated to the samples. Biophoton emissions were counted with a photon counter (MSPC II). Values represented the average obtained from triplicate experiments.

防御反応を強く誘導することが示されている (Yamada *et al.*, 1993)。そこで重合度の異なるキチンエリシターを用いて、防御反応の誘導性の違いが抵抗性誘導物質によるエリシター応答発光のプライミング程度に及ぼす影響について調査した。

第1項 材料及び方法

1. 供試細胞

懸濁培養細胞は、1mg/l 2,4-Dを含む改良N6液体培地で、25°C、暗条件下、10日間隔で継代培養したものを、さらに1mg/l 2,4-Dを含む1/2 MS培地で7日間培養し供試した。実験に用いた細胞は、同時期に培養した同じロットの細胞である。

2. 供試エリシター

N-アセチル-D-グルコサミンがそれぞれ2,4,6分子重合した2量体キチン((GlcNAc)₂)、4量体キチン((GlcNAc)₄)、6量体キチン((GlcNAc)₆) (いずれも生化学工業)を用いた。これらは、カニ殻キチンを塩酸加水分解し、活性炭カラムで分画することによって精製されたものである。いずれも滅菌水に処理濃度の20倍に溶解し、使用まで5°Cで保存した。

3. イネ培養細胞からのエリシター応答発光の測定

直径60mmのプラスチックシャーレに2.5g(生重)のイネの懸濁培養細胞と3.34mlの培地を入れ、フォトンカウンター(CCSPC I)内に置いた。抵抗性誘導物質としてASMを200 μ Mの濃度で処理し測定を行った。

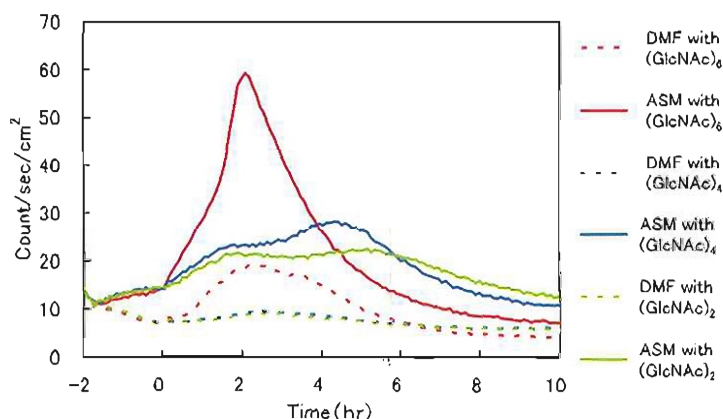


Fig. 6. Effects of *N*-acetylchitoooligosaccharide polymers on elicitor-responsive photon emission from rice cells and its priming of induced by a plant activator. Suspension-cultured rice cells (2.5 g) were suspended in 3.34 ml of cultured medium and incubated with 200 μ M ASM (solid line) or 1% DMF+0.02% Tween 20 (dotted line) for two hours. At 0 hour, each elicitor was treated to the samples. All *N*-acetylchitoooligosaccharides were adjusted to the concentration of 1 μ M. Biophoton emissions were counted with a photon counter (CCSPC I). Values represented the average obtained from triplicate experiments.

2時間後、各キチンの保存液を1 μ Mの濃度になるように0.3mlずつ添加し、10時間に亘ってバイオフィトン放射を計測した。コントロールとして溶媒のみを処理し、その2時間後にキチンを処理した区もそれぞれ設定した。実験は全て3反復で行った。

第2項 結 果

コントロールの溶媒のみを前処理し、その2時間後にエリシターを処理すると、供試した1 μ Mの濃度では、6量体キチンの処理によりエリシター応答発光が高まったが、4及び2量体キチンの処理ではほとんど上昇は見られなかった (Fig.6 点線)。抵抗性誘導物質 ASM を前処理し、その2時間後にキチンを処理すると、6量体キチン処理では処理直後からエリシター応答発光が早く強く上昇した (Fig.6 実線)。ASM 前処理後に4量体キチンを処理すると、エリシター応答発光が少しずつ上昇し、最初のピークが1.7時間後、2番目のピークが4.3時間後に観察され、6量体キチンと比較して、遅く低い上昇であった。ASM 前処理後に2量体キチンを処理すると、最初のピークが1.6時間後、2番目のピークが5.1時間後と、4量体キチンよりもさらに遅く低い上昇となった。これらのことから、防御反応の誘導能力が低い2量体と4量体キチンでは、エリシター応答発光がほとんど発生しないことが明らかとなった。しかし、ASMの作用によるエリシター応答発光のプライミングでは、6量体キチンには及ばないものの、2量体と4量体でも明瞭なプライミングが観察された。さらに、2量体と4量体の応答発光のプライミングには差が認められ、4量体キチンの方が高かった。このことは、エリシター応答発光の誘導能力が低いエリシターでも、ASMにより病害抵抗性が誘導されている細胞では、プライミングを受けて強いエリシター応答発光を誘導できることを意味する。さらにプライミングを受けた応答発光では、エリシター活性の僅かな差 (2量体と4量体キチンの間の差) が増幅されるため、その僅かな差も検出できている。

第4節 エリシターの種類、濃度とプライミング効果

エリシターの種類の違いにより、抵抗性誘導物質によるエリシター応答発光のプライミング効果が異なるのかどうかについて、第2章で用いた生物学的エリシター2種と非生物学的エリシター2種で比較検討した。

第1項 材料及び方法

1. 供試細胞

懸濁培養細胞は、1mg/l 2,4-Dを含む改変N6液体培地で、25°C、暗条件下、10日間隔で継代培養したものを、さらに1mg/l 2,4-Dを含む1/2MS培地で7日間培養し、供試した。すべての実験は、同時期に培養した同じロットの細胞を用いて行った。

2. 供試エリシター

実験に用いたエリシターは、生物学的エリシターとして6量体キチン及びキシラナーゼ、非生物学的エリシターとして、リン酸水素二カリウム及び塩化銅(II)である。各エリシターは、蒸留水に処理濃度の20倍で溶解し、使用まで5°Cで保存した。

3. イネ培養細胞からのエリシター発光の測定

直径60mmのプラスチックシャーレにイネ懸濁培養細胞2.5g(生重)と1/2MS培地3.44mlを入れ、フォトンカウンター(CCSPC I)内に置いた。イネ培養細胞に2% tween20含有DMFに溶解した抵抗性誘導物質ASMの保存液を200 μ Mになるように0.06ml添加した。イネ培養細胞からのバイオフィトン放射をフォトンカウンターで観察し、バイオフィトン放射が安定した後、エリシターの保存液を所定濃度になるように1/20量添加した。その後、10時間に亘ってバイオフィトン放射を10秒ずつ計測した。用いた各エリシターの濃度は、6量体キチン:10, 1, 0.1 μ M, キシラナーゼ:100, 10, 1 mg/l, リン酸水素二カリウム:5, 1, 0.2mM, 及び塩化銅(II):10, 1, 0.1, 0.01mMである。全ての実験は3反復で行った。エリシター応答発光の増強程度は前述した方法により算出した。

第2項 結 果

1. 生物学的エリシターによるエリシター応答発光とASMによるプライミング効果

DMF単独処理区とASM単独処理区では、バイオフィトンの上昇は全く認められないか、または、僅かな上昇を示した (Fig.7 A)。

ASM前処理+キチン後処理区では、いずれのキチン処理濃度でも、DMF前処理+キチン後処理区に比較して、強くエリシター応答発光が起こり、ASMによるプライミング効果が認められた (Fig.7 A-C)。さらに、エリシター処理直後の発光パターンを比較すると、ASM前処理+キチン後処理区では、DMF前処理+キチン後処理区に比較して急激に上昇していることから、エリシター応答発光が早く起こっていることが明らかで、この点でもASMによるプライミング効果が認められた。

同様にASM前処理+キシラナーゼ後処理区で、いずれのキチン処理濃度でも、DMF前処理+キシラナーゼ

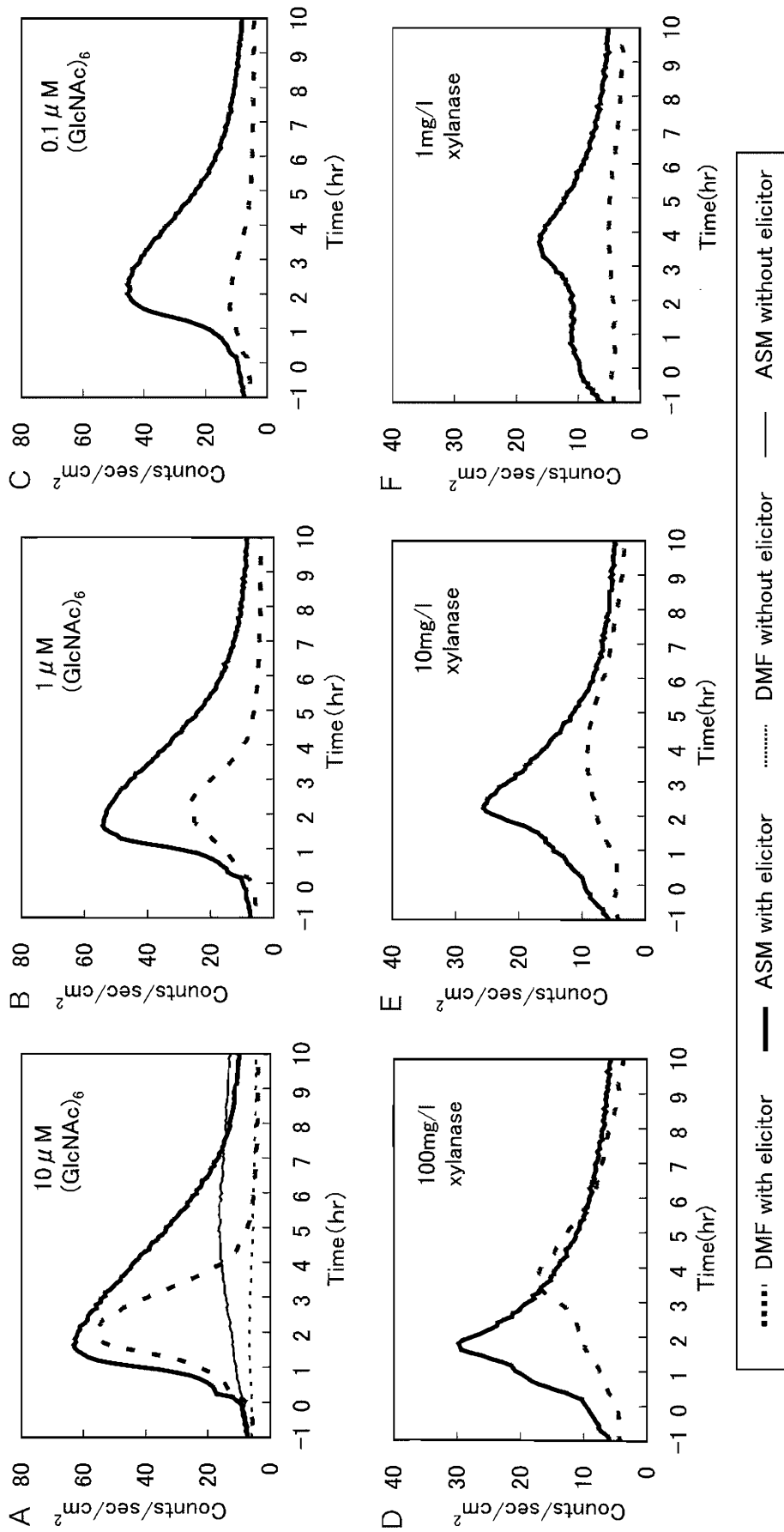


Fig. 7. Biotic elicitor-induced photon emissions from rice cells pretreated with and without each of plant defense activators, ASM. 2.5 g of suspension-cultured rice cells were suspended in 3.44 ml of cultured medium and incubated with 0.06 ml of ASM (final conc. 200 μM) (solid line) or DMF+2% Tween 20 (dotted line) for two hrs. At 0 hr, each of elicitors was treated to the samples. *N*-acetylchitohexaose ((GlcNAc)₆) was adjusted to the concentrations of (A) 10 μM and (C) 0.1 μM and those of xylanase were (D) 100 mg/l, (E) 10 mg/l and (F) 1 mg/l. Biophoton emissions were counted with a photon counter. Values represented the average obtained from triplicate experiments.

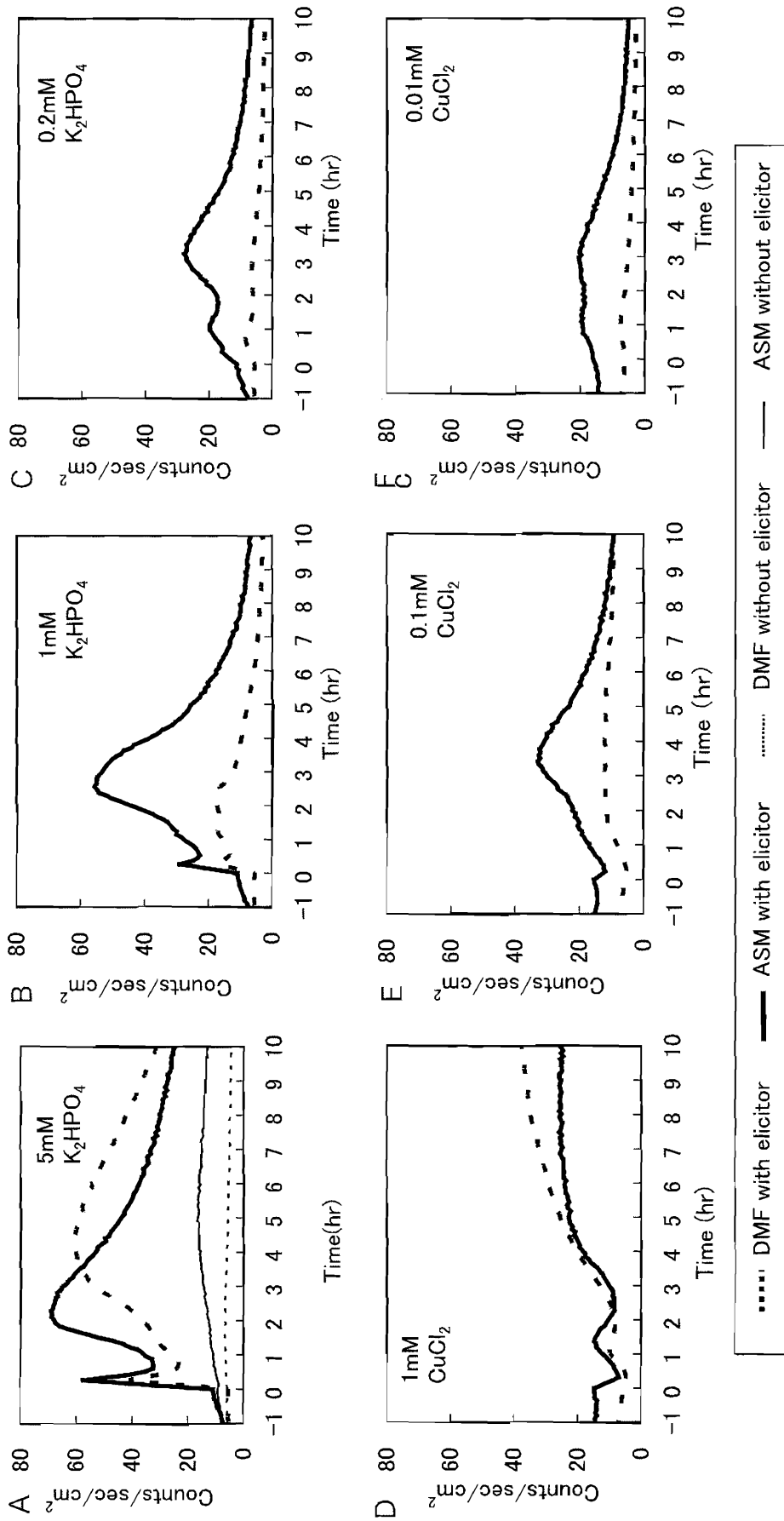


Fig.8. Abiotic elicitor-induced photon emissions from rice cells pretreated with and without each of plant defense activators, ASM. 2.5 g of suspension-cultured rice cells were suspended in 3.44 ml of cultured medium and incubated with 0.06 ml of ASM (final conc. 200 μ M) (solid line) or DMF+2% Tween 20 (dotted line) for two hrs. At 0 hr, each of elicitors was treated to the samples. Dipotassium hydrogenphosphate was adjusted to the concentrations of (A) 5 mM, (B) 1 mM and (C) 0.2 mM while copper chloride to those of (D) 1 mM, (E) 0.1 mM and (F) 0.01 mM. Biophoton emissions were counted with a photon counter. Values represented the average obtained from triplicate experiments.

Table 3. Comparative enhancement of the maximum photon emissions induced by elicitors. Enhancement was calculated as described in Materials and Methods in Fig.4. Values represent the mean and standard deviation of triplicate experiments.

Elicitor	Concentration	Enhancement
N-acetylchitohexaose	10 μ M	1.0 \pm 0.0
	1 μ M	2.3 \pm 0.8
	0.1 μ M	5.9 \pm 1.2
xylanase	100mg/l	1.3 \pm 0.1
	10mg/l	3.6 \pm 1.0
	1mg/l	5.1 \pm 0.7
K ₂ HPO ₄	5mM	1.0 \pm 0.1
	1mM	3.8 \pm 0.4
	0.2mM	5.4 \pm 1.1
CuCl ₂	1mM	0.3 \pm 0.0
	0.1mM	3.3 \pm 0.3
	0.01mM	2.3 \pm 0.5

後処理区に比較して、強く早くエリシター応答発光が起こり、ASMによるプライミング効果が認められた (Fig. 7 D-F)。

2. 非生物学的エリシターによるエリシター応答発光とASMによるプライミング効果

リン酸水素二カリウム処理においても、ASMの前処理により両ピークとも発光が高まり、プライミング効果が明らかで、5mMの高濃度処理では第2ピークの出現時間が2時間早まった (Fig. 8 A-C)。

塩化銅 (II) ではASMの前処理により、1mM処理の時の2番目の発光を除きエリシター応答発光は高まった (Fig. 8 D-F)。また、塩化銅 (II) の処理直後のエリシター応答発光の低下もASM処理により増幅された。0.01mMと0.1mMの処理濃度では、ASM前処理によるプライミング効果が顕著であった。塩化銅 (II) 1mMを処理したイネ培養細胞には、実験終了後に他のエリシター処理では見られない褐変が観察された。

ASMによるエリシター応答発光の増強程度を Table 3 に示したが、どのエリシターにおいてもエリシターの低濃度処理ほど増強程度が高まった。中でも0.1 μ M 6量体キチンと200 μ M リン酸水素二カリウムが最も高い増強程度を示した。ASM前処理区のエリシター応答発光の発光強度は、いずれのエリシターでも処理濃度が高濃度ほど高くなるが、対照区の発光強度も高くなるため増強程度は反対に低くなった。

第5節 抵抗性誘導物質の種類とエリシター応答発光のプライミング効果

イネに病害抵抗性を誘導する5種類の抵抗性誘導物

質を用いて、エリシター応答発光のプライミング効果を検討した。ASM、プロベナゾール (PBZ)、CRP及びメチルジャスモン酸 (MeJA) は、200 μ Mの濃度で、イネにおいて、抵抗性誘導の指標の一つとして報告されている (Midoh and Iwata, 1996) *PBZ1* の転写を増加させる (Iyozumi *et al.*, 2005)。また、チアジニル (TDL) は、イネ植物体に200 μ Mで浸根処理した時、葉身中に生成するTDLの活性本体濃度は、いもち病に対する防除効果を発現しうる濃度である (八十川, 未発表)。これらのことから、この5種類の抵抗性誘導物質を用いることとした。

第1項 材料及び方法

1. イネ懸たく培養細胞

イネ培養細胞は、1mg/l 2,4-Dを含む改変N6液体培地を用いて、10日間隔で継代培養した。その継代培養細胞を、1mg/l 2,4-Dを含む1/2MS培地で7日間培養し実験に供試した。すべての実験に用いた細胞は、同時期に培養した同じロットの細胞を用いて行った。

2. 病害抵抗性誘導物質

ASM, PBZ, CRP, TDL及びMeJAを病害抵抗性誘導物質として用いた。ASM, PBZ, CRP, TDLは和光純薬工業より、MeJAはシグマ化学工業より入手した。それぞれを、2% Tween20含有DMFに20mMの濃度で溶解し、100倍濃度の保存液とした。培養細胞には、すべて200 μ Mの濃度で処理した。

3. 各種病害抵抗性誘導物質によるエリシター応答発光のプライミング効果

プラスチックシャーレに培養細胞25g, 1/2 MS培地

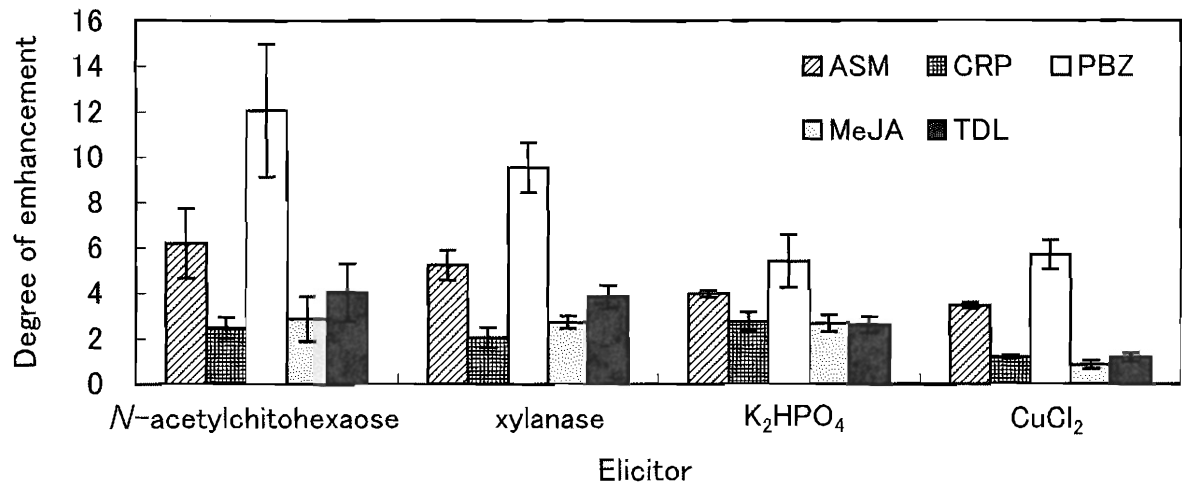


Fig.9. The enhancement of elicitor-induced photon emissions from plant defense activator-pretreated rice cells. Plant defense activators, ASM: acibenzolar-S-methyl, CRP: carpropamid, PBZ: probenazole, MeJA: methyl jasmonate and TDL: tiadinil, were treated at the concentrations of 200 μ M in 1 % DMF containing 0.02 % Tween 20. N-acetylchitohexaose, Xylanase, K₂HPO₄ and CuCl₂ were adjusted to the concentrations of 0.1 μ M, 30 mg/l, 500 μ M and 50 μ M, respectively. Degree of enhancement was calculated according to the method described in Material and Method in Fig.4.

3.44ml 及び各抵抗性誘導物質保存液 0.06ml を入れ、2 時間保持した後、エリシターを処理した。エリシターの処理濃度は、前節での実験結果及び予備実験結果から、より効果的にプライミング効果が現れる濃度とし、6 量体キチン: 0.1 μ M, キシラナーゼ: 30mg/l, リン酸水素二カリウム: 500 μ M 及び塩化銅(II): 50 μ M を用いた。フォトンカウンター (CCSPC I) によるバイオフォンの測定は、培養細胞への病害抵抗性誘導物質の処理直後より開始し、26°C で、10 時間に亘って行った。3 反復の実験結果から、前述の方法によりエリシター応答発光の増強程度を算出した。

第 2 項 結 果

ASM の前処理によって顕著にプライミング効果が現れたエリシター濃度を用いて、各病害抵抗性誘導物質により、各エリシター応答発光がプライミングを受ける程度を Fig.9 に示した。キチン、キシラナーゼ及びリン酸水素二カリウムエリシターでは、すべての抵抗性誘導物質の前処理によってエリシター応答発光が増強し、抵抗性誘導物質によるプライミング効果が認められた。しかし、塩化銅(II)エリシターでは、MeJA と TDL によるプライミング効果が見られず、CRP についても極めて弱いプライミング効果であった。また、どのエリシターにおいても、供試した病害抵抗性誘導物質の中で、PBZ が最も強いプライミング効果を示し、次は ASM であった。

第 6 節 考 察

2 種類の培地で増殖したカルスを用いてエリシター応答発光や抵抗性誘導物質による数値やエリシター応答発光のプライミング効果を検討したところ、1/2 MS 培地で増殖した細胞の方がエリシター応答発光のプライミング効果を強く示すことが明らかになった。液体培地で培養した細胞は、培地条件の影響を強く受けて、それがエリシター応答発光のプライミングにも強く影響を与えることが明らかとなった。ホルモンとして 2,4-D を使用しているため、長期間の継代によって遺伝子の変異も懸念される (Pavlica *et al.*, 1991) が、それについては調査しなかったため明らかではない。しかし、本研究により適当と判断された培地を用いて研究を継続したところ、細胞の褐変もなく、エリシター応答発光が安定していたため実験上の問題はないと考えられた。

キチンオリゴ糖類は、大きな重合体ほど低濃度で強く防御応答を誘導することが知られている (Yamada *et al.*, 1993)。N-アセチル-D-グルコサミンが 2, 4, 6 分子重合したキチンと比較すると、エリシター応答発光においても大きな重合体ほど強く発光を誘導した。さらに、抵抗性誘導物質 ASM を用いてキチンオリゴ糖類のエリシター応答発光のプライミングを調査すると、同様に大きな重合体ほどプライミング効果が高いことが明らかとなった。これらのことは、エリシター応答発光が防御応答と強く結びついていることを支持する結果と言える。

エリシター応答発光のプライミングを誘導するために必要な時間を調査すると、ASM では 2 時間以内に誘導されていることが明らかとなった。さらに、一度誘導さ

れたプライミング効果は誘導時間を長くしても増強されないことから、エリシター応答発光のプライミング効果の有無を判定するための誘導時間は2時間とすることとした。植物体では、抵抗性誘導物質が植物に十分に抵抗性を誘導するのみ必要な時間は数日であると考えられている。それに比べると2時間の誘導時間は短い、病害抵抗性関連遺伝子のプライミングでも培養細胞ではこの短い誘導時間で認められており (Iyozumi *et al.*, 2005)、抵抗性誘導物質は植物体よりも培養細胞には早く作用すると思われる。

病害抵抗性誘導物質の作用による病害抵抗性関連遺伝子のプライミングの特徴は、遺伝子発現の早期化と増強である (Conrath *et al.*, 2002)。しかし、Katz ほか (1998) は、*Phytophthora megasperma* f. sp. *Glycinea* エリシターを処理したパセリの培養細胞において、エリシターのみでの処理では高濃度ほど PAL 遺伝子が強く発現するために、逆に抵抗性誘導物質による PAL 遺伝子発現によるプライミング効果は、抵抗性誘導物質処理後のエリシター処理濃度が高いと顕著ではないと報告している。ASM の前処理により各エリシター応答発光はプライミングし、エリシター処理直後の発光がより急速に高まる現象が見られた。また、どのエリシターにおいてもエリシター処理濃度が低いほど増強程度が高くなった。このように、ASM の作用による各エリシター応答発光のプライミングの特徴は、病害抵抗性関連遺伝子のプライミングの特徴に一致していた。

生物学的エリシターの6量体キチン及びキシラナーゼと非生物学的エリシターのリン酸水素二カリウムでは、供試した全ての抵抗性誘導物質によってエリシター応答発光がプライミングを受けたが、非生物学的エリシターの塩化銅 (II) では ASM と PBZ を除いて、エリシター応答発光のプライミング効果は無いが、あっても顕著ではなかった。抵抗性誘導物質により塩化銅 (II) のエリシター応答発光のプライミング効果が現れにくい原因は明らかにできなかったが、他の3種のエリシターでは、供試した全ての病害抵抗性誘導物質によるエリシター応答発光のプライミング効果が認められたため、本現象はある程度共通した現象であると考えられた。

第4章 活性酸素種の生成とそれのエリシター応答発光への関与

エリシターがROSの生成（オキシダティブバースト）を誘導することは多くの植物系で報告されている（Doke, 1997）。イネ培養細胞においてもキチンオリゴ糖エリシターの処理によって、ROSが生成される（Kuchitsu *et al.*, 1995）。一方、フォトン放射とROSの生成が関連するという多くの報告があり、エリシター応答発光とROSとの相関が示唆される。そこで、植物におけるバイオフォトン放射を生化学的に解明するため、生体内で起こる酸化的代謝反応の中で、特にROSとの関わりについて研究を進めた。ROSは、植物の病害応答の初期段階で生成され、NADPHオキシダーゼ（Doke, 1985）やペルオキシダーゼ（POX）（Bolwell *et al.*, 2002）が関与していることが知られている。ここでは、エリシター処理によって誘導されるROS生成とエリシター応答発光との関与について、ROSの外生的な処理及びROS生成を抑制する阻害剤を用いて解析した。

第1節 エリシター処理による過酸化水素の生成とエリシター応答発光との相関

ROSのうち反応性が比較的緩やかで測定しやすい過酸化水素の生成とエリシター応答発光との相関を検討した。過酸化水素は植物の細胞膜で生成され、懸濁培養細胞では溶液中に溶け込む。そこで、6量体キチンエリシターを処理したイネ懸濁培養細胞の溶液中の過酸化水素濃度を測定し、エリシター応答発光と時間的推移を比較した。

第1項 材料及び方法

1. 供試細胞

イネ培養細胞は、1mg/l 2,4-Dを含む改変N6液体培地で10日間振とう培養したものを新しい改変N6液体培地に移して4時間振とうしたものを用いた。なお、実験には同時期に培養した同じロットの細胞を供試した。

2. 供試エリシター

6量体キチンを用い、滅菌水に処理濃度の20倍に溶解し、使用まで5℃で保存した。

3. イネ培養細胞からのエリシター応答発光の測定

培養細胞1gと培地2mlを直径60mmのプラスチック

クシャーレに入れ、フォトンカウンター（PCX-100、浜松ホトニクス）を用いて、26℃の恒温室内で、10秒間ずつ継続的にバイオフォトン放射の測定を行った。バイオフォトン放射が安定した後、各クシャーレに6量体キチンを終濃度5μMで処理し、引き続きバイオフォトン放射を測定した。測定結果は、すべて1cm²当り、1秒当りのフォトンカウント数に換算し、3反復の平均値で示した。

4. イネ培養細胞から生成する過酸化水素濃度の測定

バイオフォトン測定と同様の方法で準備した同じイネ培養細胞を用いて行った。すなわち6量体キチンをイネ培養細胞懸濁液に終濃度5μMで処理し、15、30、60、90、120、180、240分後における培地中の過酸化水素濃度の変化をルミノール法（Schwacke and Hager, 1992）で測定した。測定は試薬添加10秒後から30秒間行い、二次元フォトン測定装置（ARGUS、浜松ホトニクス製）を用いて発光強度を測定し、予め作成した検量線から培地中の過酸化水素濃度に換算した。測定は6回ずつ行い、平均値を示した。

第2項 結果

イネ培養細胞に6量体キチンエリシターを処理した時のバイオフォトン放射と培地中の過酸化水素濃度の時間的推移をFig.10に示した。どちらも、コントロールの滅菌水処理では僅かな上昇しか見られないのに対し、エリシター処理では、処理30分後にシヨルダーピークが認められ、2時間前後で最大となりその後次第に減少するという良く似た推移が見られた。時間的推移がほぼ一致することから、過酸化水素の生成とエリシター応答発光との間には何らかの相関があると考えられた。

第2節 外生的に処理したROSがエリシター応答発光に与える影響

エリシター応答発光において細胞内で内生的に生成された過酸化水素とバイオフォトン放射との経時的な相関が認められたため、イネ培養細胞に外生的にスーパーオキシド及び過酸化水素を直接処理し、活性酸素種処理がバイオフォトン放射に与える影響を調査した。

第1項 材料及び方法

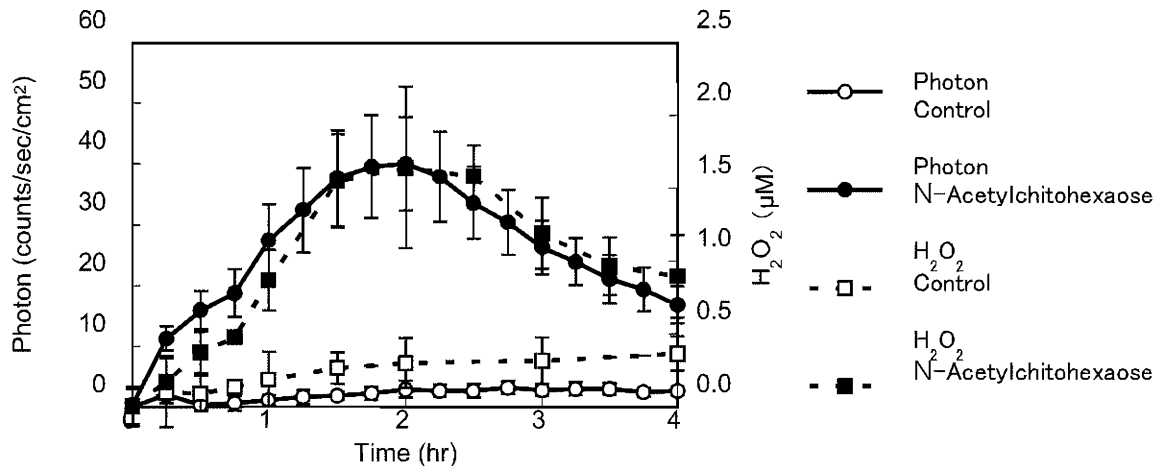


Fig. 10. Time course of hydrogen peroxide accumulation in the medium and elicitor-responsive photon emission from suspension-cultured rice cells induced by *N*-acetylchitohexaose. Suspension-cultured rice cells (1 g) were suspended in 2 ml of modified N6 medium and treated with 5 μ M *N*-acetylchitohexaose. Biophotons were counted with a photon counter. The concentration of hydrogen peroxide in the medium was estimated by measuring the chemiluminescence of luminol using a photon imaging analyzer. The values for photon emission are means \pm standard deviations of triplicate experiments. The values of hydrogen peroxide are the means \pm standard deviations of six experiments.

1. 供試細胞

イネ培養細胞は、1mg/l 2,4-D を含む改変 N6 液体培地で 10 日間振とう培養したものを供試した。

2. スーパーオキシダの処理とバイオフィトン放射の測定

スーパーオキシドは、キサンチン/キサンチンオキシダーゼ反応系により生成させた。キサンチンオキシダーゼ、キサンチン及び過酸化水素水は和光純薬工業より購入した。直径 60mm のプラスチックシャーレに 3ml の培地と、生重 2g のイネ懸濁培養細胞を入れ、フォトンカウンター (CCSPC I) 内に置いた。コントロールとして細胞を含まない培地のみの区を設けたイネ培養細胞からのバイオフィトン放射は 26°C で 10 秒ずつ測定した。イネ培養細胞はバイオフィトン放射が安定するまで 90 分間静置し、その後、10mM キサンチン (25mM の水酸化ナトリウムに溶解) を 150 μ l と 0.05U/ml のキサンチンオキシダーゼを処理し、バイオフィトン放射を 6 時間以上計測した。

3. 過酸化水素の処理とバイオフィトン放射の測定

同様に直径 60mm のプラスチックシャーレに 3ml の培地と、生重 2g のイネ懸濁培養細胞を入れ、対照として細胞を含まない培地のみのサンプルも準備した。サンプルはフォトンカウンター内に置き、2 秒ずつバイオフィトン放射を 26°C で計測し、90 分後、300 μ M または 100 μ M の過酸化水素を培地に処理し、すぐにバイオフィトン計測を再開した。実験は 3 反復で行った。

第 2 項 結 果

1. スーパーオキシダの処理がバイオフィトン放射に与える影響

培地に外生的にスーパーオキシドを処理すると、処理直後からフォトン放射の急上昇が見られ、15 時間後にはほぼ元の放射量に戻った (Fig. 11)。これに対し、細胞を含む試料では培地のみの試料に比べ、スーパーオキシド処理直後のフォトン放射が強くその後の放射の持続時間も長く、3.5 時間後まで続いた。細胞を含む試料では、もともとのバイオフィトン放射が約 5 カウント高く、これは細胞が常に放出しているバイオフィトン放射と考えられるが、この分を差し引いてもスーパーオキシドを処理した細胞を含む試料でフォトン放射が高く長く発生していた。これらのことから、外生的に与えたスーパーオキシドは細胞にバイオフィトンを誘導することは明らかである。スーパーオキシド処理直後のフォトン放射の急上昇は、外生的に処理したスーパーオキシドそのものか、あるいはその後の反応によって生成された分子が培養細胞から発生するフォトン放射の原動力となっていることを示している。

2. 過酸化水素の処理がバイオフィトン放射に与える影響

培地に過酸化水素を処理すると処理直後に急激なフォトン放射の上昇が見られ、300 μ M では 115 カウント、100 μ M では 93 カウントまで上昇し、その後徐々に

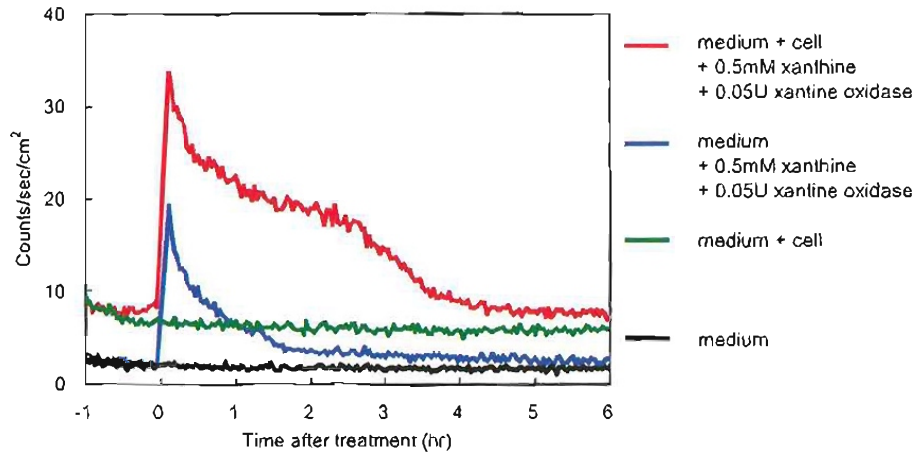


Fig. 11. Photon emissions from rice cells induced by exogenously applied superoxide. Culture medium (3 ml) with suspension-cultured rice cells (2 g) or culture medium without cells was treated with 0.5 mM xanthine and 0.05 U/ml xanthine oxidase at 0 hr. Values represent the average of triplicate experiments.

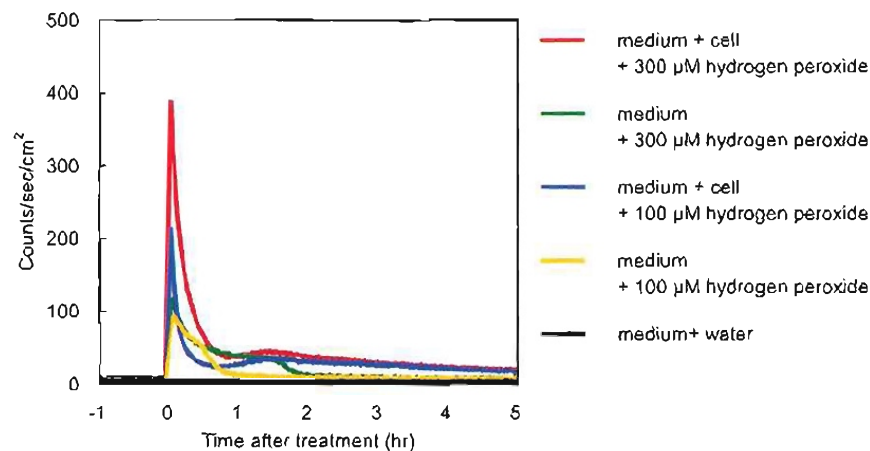


Fig. 12. Biophoton emissions from rice cells induced by H_2O_2 treatments. Culture medium (2 ml) with suspension-cultured rice cells (1 g) or culture medium without cells was treated with 300 μM or 100 μM H_2O_2 at 0 hr. Values represent the average of triplicate experiments.

に下降した (Fig.12)。細胞を含む培地に過酸化水素を処理すると、フォトン放射は細胞を含まない試料に比べ著しく上昇し、300 μM では386カウント、100 μM では212カウントと2倍以上の値であった。このことから、培養液中には過酸化水素と反応してバイオフォトンを生産する物質が存在することは明らかであるが、同時に過酸化水素は細胞に作用して、バイオフォトン強く誘導することが判明した。過酸化水素は細胞からのフォトン放射を濃度依存的にかつ急激に上昇させたことから、過酸化水素そのものか、またはその後の反応によって生成された分子がフォトン放射の原動力となっていると考えられる。

第3節 阻害剤による ROS の抑制がエリシター応答発光に与える影響

植物の病害応答におけるスーパーオキシドの生成には、NADPH オキシダーゼ (Doke, 1985) やペルオキシダーゼ (POX) (Bolwell *et al.*, 2002) が関与していることが知られている。発生したスーパーオキシドは、自発的な反応またはスーパーオキシドディスムターゼ (SOD) の作用により過酸化水素に変換される。さらにこの過酸化水素はフェントン反応によりヒドロキシラジカルになることが知られている。6 量体キチンエリシターを処理したイネの細胞でもスーパーオキシド、過酸化水素、ヒドロキシラジカルが発生する (Kuchitsu *et al.*, 1995) ことが報告されている。エリシター応答発光と ROS の

経時的な発生解析や外生的な ROS 投与による解析から、エリシター応答発光への ROS の強い関与の可能性が得られたため、阻害剤を用いてこれらの ROS の生成を抑制し、それがエリシター応答発光に与える影響を調査した。

第1項 材料及び方法

1. 供試細胞

イネ培養細胞は、1mg/l 2,4-D を含む改変 N6 液体培地で10日間振とう培養したものを新しい改変 N6 液体培地に移して4時間振とうし供試した。

2. 供試阻害剤

ROS のスカベンジャーとしてピロカテコール-3,5-ジスルホン酸二ナトリウム塩 (Tiron: 東京化成工業) を用いた。Tiron は滅菌水に100倍の濃度に溶解し0.1, 0.5, 1mM の濃度で供試した。ペルオキシダーゼの阻害剤として2-ヒドロキシベンズヒドロキサム酸 (SHAM: シグマ化学工業) を、NADPH オキシダーゼの阻害剤としてジフェニレンヨードニウム (DPI: シグマ化学工業) を用いた。Tiron は蒸留水に、その他はジメチルスルホキシド (DMSO) に100倍の濃度で溶解し、Tiron は0.1, 0.5mM, SHAM は0.5, 1mM, DPI は20, 50, 100 μ M の濃度で供試した。

3. 活性酸素種の阻害とバイオフィトン放射の測定

0.5 g のイネ培養細胞を1ml の培地とともに直径35mm のプラスチックシャーレに入れ、フォトンカウンター (PCX-100) に静置した。イネ培養細胞からのバイオフィトン放射は26°C で10秒ずつ測定した。それぞれのサンプルからのバイオフィトン放射が安定した後、10 μ l の阻害剤保存液を前処理した。さらに10分後、1 μ M の6量体キチンを処理し、フォトン計測を続けた。実験は3反復で行った。

第2項 結果

ROS のスカベンジャーである Tiron は、多くの植物種で効果があることが示されている (Hirasawa *et al.*, 2005; Jiang and Zhang, 2002; Kaku *et al.*, 1997; Mori *et al.*, 2001; Sanchez *et al.*, 1993)。本研究では、Tiron は濃度依存的にイネ培養細胞のエリシター応答発光を阻害し、0.5mM ではほぼ完全な阻害を示した (Fig.13A)。ペルオキシダーゼ阻害剤の SHAM も同様に濃度依存的にエリシター応答発光を阻害し、1 mM で完全に阻害した (Fig.13B)。さらに、NADPH オキシダーゼの阻害剤である DPI は、100 μ M でエリシター応答発光を強く阻害した (Fig.13 C)。

第4節 ROS の生成や分解に関与する酵素が培地中の過酸化水素濃度とエリシター応答発光に与える影響

バイオフィトン放射と活性酸素種との関与をさらに明らかにするため、ROS の生成や分解に関与する酵素を用いた解析を試みた。植物が病原菌を認識した後、初期の病害応答としてスーパーオキシドが細胞のアポプラストに生成される。このスーパーオキシドは、細胞に存在する SOD により過酸化水素と酸素に変化し、その後カタラーゼにより水と酸素に分解される。これら一連の活性酸素種の生成と消去がエリシター応答発光に与える影響を調査した。

第1項 材料及び方法

1. 供試細胞

イネ培養細胞は、1mg/l 2,4-D を含む改変 N6 液体培地で10日間振とう培養したものを新しい改変 N6 液体培地に移して4時間振とうし供試した。実験には同時期に培養した同じロットの細胞を供試した。

2. 供試エリシター

6量体キチンは、滅菌水に処理濃度の20倍に溶解し、使用まで5°C で保存した。

3. ROS 生成を阻害する阻害剤の処理がエリシター応答発光と培地中の過酸化水素濃度に与える影響

ROS の生成と消去を触媒する酵素として、SOD (シグマ化学工業) 及びカタラーゼ (和光純薬工業) を用いた。これらは使用直前に処理濃度の20倍に滅菌水で希釈して原液とした。イネ培養細胞1g と培地2ml を直径60mm のプラスチックシャーレに入れ、バイオフィトン放射はフォトンカウンター (PCX-100) を用いて、26°C の恒温室内で、10秒間ずつ継続的に測定した。バイオフィトン放射が安定した後、各シャーレに200 U/ml SOD 及び2000 U/ml カタラーゼを処理した。その10分後、5 μ M の濃度で6量体キチンを処理し、バイオフィトンを引き続き測定した。測定結果は、すべて1 cm² 当たり、1秒当りのフォトンカウント数に換算し、3反復の平均値で示した。同様の処理において、エリシター処理2時間後の培地中の過酸化水素濃度をルミノール法で測定した。測定結果は3反復の平均値で示した。

第2項 結果

SOD とカタラーゼをイネ培養細胞に処理し、6量体キチンエリシターを処理した時のエリシター応答発光の時間的推移を Fig.14 に示した。SOD を処理した後にエリシターを処理した時のバイオフィトン放射は、エリシ

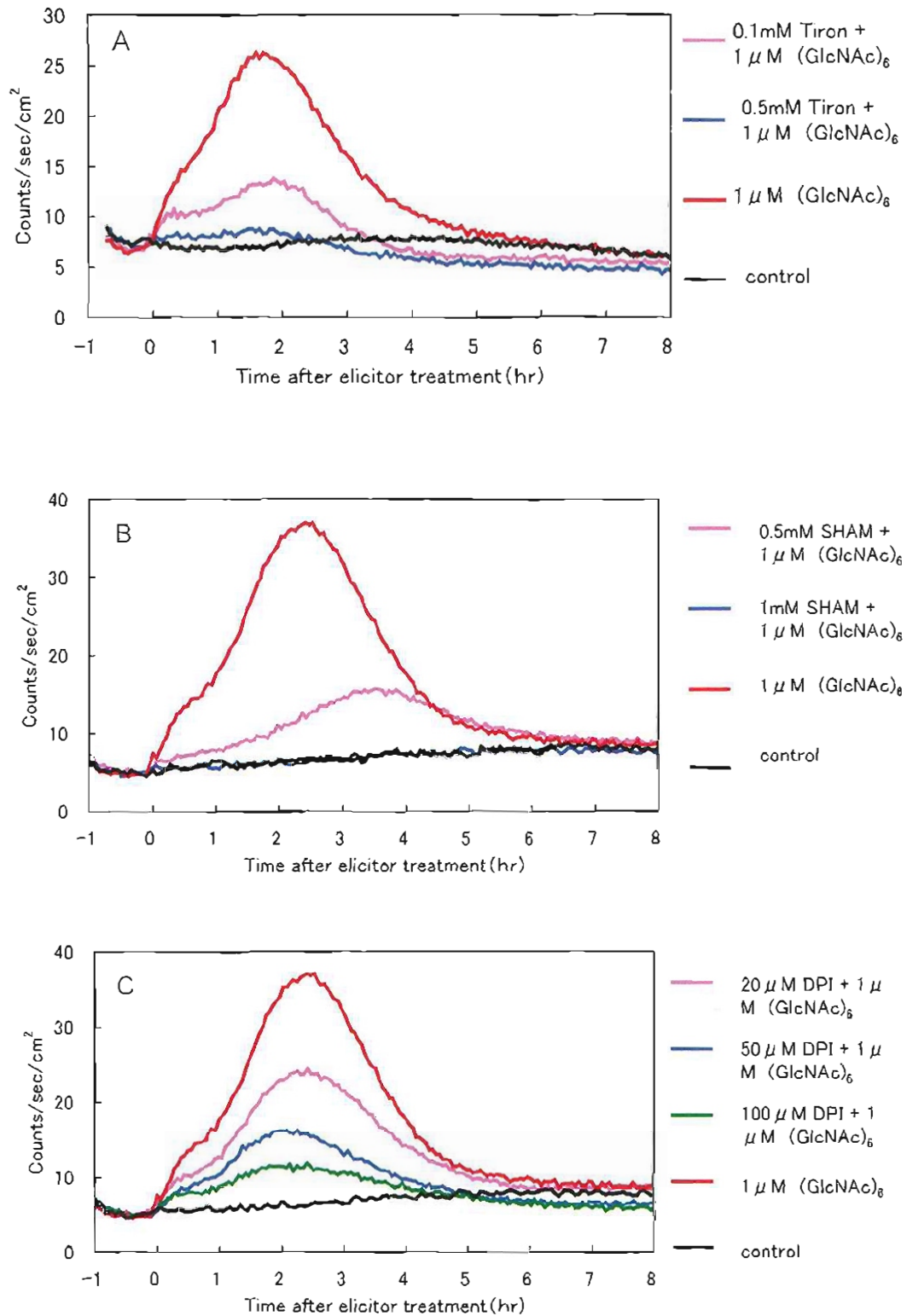


Fig. 13. Effects of inhibitors, Tiron (A), SHAM (B) and DPI (C) on the photon emissions of rice cells induced with *N*-acetylchitohexaose. Suspension-cultured rice cells were incubated with $1 \mu\text{M}$ *N*-acetylchitohexaose. Inhibitors were added to the culture medium 10 min before the elicitor treatment. The concentrations of inhibitors were 0.1, 0.5mM (Tiron), 0.5, 1mM (SHAM), 20, 50, 100 μM (DPI). Values represent the average of triplicate experiments.

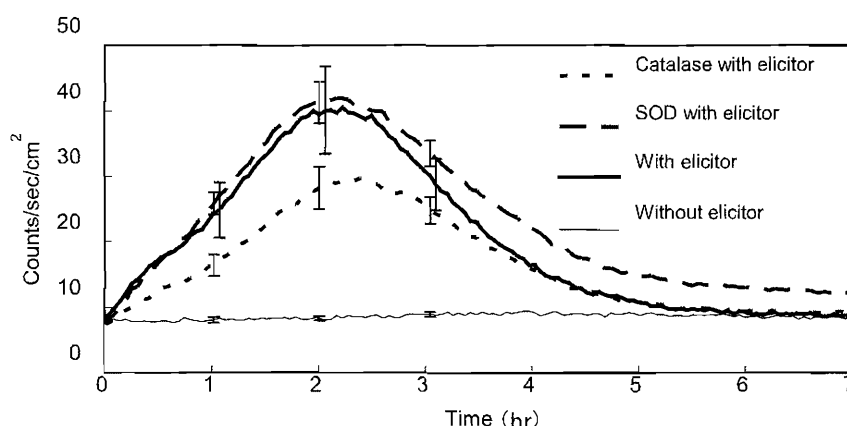


Fig. 14. Effects of reactive oxygen species (ROS) inhibitors on photon emissions from suspension-cultured rice cell induced by *N*-acetylchitohexaose. Suspension-cultured rice cells (1 g) were suspended in 2 ml of modified N6 medium. A ROS inhibitor (either 2000 U/ml catalase or 200 U/ml SOD) were added to the culture medium 10 min before addition of the elicitor (5 μ M *N*-acetylchitohexaose). Biophotons were counted with a photon counter. Value are means \pm standard deviations for triplicate experiments.

Table 4. Effect of reactive oxygen species-quenching enzymes in the medium on the generation of hydrogen peroxide and emission of photons from suspension-cultured rice cells induced by *N*-acetylchitohexaose elicitor. Suspension-cultured rice cells (1 g) were suspended in 2 ml of modified N6 medium. The ROS inhibitors, 2000 U/ml catalase or 200 U/ml SOD were added to the culture medium respectively 10 minutes before addition of the elicitor (5 μ M *N*-acetylchitohexaose). Relative values were counted at 2 hours after elicitor treatment. +: with elicitor, -: without elicitor or without enzymes. One hundred percent of relative value in H_2O_2 concentration was equal to 1.07 μ M. Values represent the mean for triplicate experiments.

enzymes	elicitor	Relative H_2O_2 concentration(%)	Relative photon emission(%)
SOD	+	121 \pm 19	105 \pm 22
catalase	+	0 \pm 0	62 \pm 10
-	+	100	100
-	-	0	0

ターのみを処理した場合と比較して僅かに高い値で推移したが、その発生パターンは類似していた。これに対し、カタラーゼを処理するとエリシター処理のみより常に弱い放射で推移した。エリシター処理2時間後のエリシター応答発光の増加量を、エリシター処理のみを100とした相対値で比較すると、SOD + エリシター処理区では105%と僅かに増加したが、カタラーゼ + エリシター処理区では62%に減少した (Table 4)。同様の処理において、エリシター処理2時間後の培地中の過酸化水素濃度は、SOD + エリシター処理区で、エリシター処理区に比較して121%に増加し、カタラーゼ + エリシター処理区では0%に減少した (Table 4)。

第5節 考察

バイオフィトン放射は分子が励起状態から安定な基底

状態に戻るときに放出され (Ables, 1986)、バイオフィトン放射には細胞内でのROSの生成が必要であると考えられている。トコフェノール欠乏のネズミの細胞では、バイオフィトン放射はフリーラジカル反応を含む一重項酸素の生成と直接結びついていた (Miyazawa *et al.*, 1981)。発癌性物質を与えたハエから放出される一過性のバイオフィトンは、フリーラジカルスカベンジャーや活性酸素の消去剤の添加によって抑制された (Sato *et al.*, 1991)。

植物が病原菌を認識すると、初期応答としてオキシダティブバーストと呼ばれるスーパーオキシドの急激な生成が見られる (Doke, 1983)。病原菌の代わりにエリシターを処理した場合にも同様の生成が見られる (Doke, 1997)。スーパーオキシドは、細胞内のSODにより過酸化水素と酸素となる。フォトン放射の原動力

の一つは ROS であると考えられている (Abeles, 1986) ことから、植物の細胞にエリシターを処理したときの応答に伴う発光と ROS との関わりを検討したところ、イネ培養細胞に 6 量体キチンを処理したときのエリシター応答発光と細胞懸濁液中の過酸化水素濃度の時間的推移がほぼ一致した。どちらもエリシター処理 30 分後に小さなショルダーピークがあり、2 時間後に最大ピークとなる 2 峰性の発生パターンであった。さらに、外生的にスーパーオキシドと過酸化水素を処理し光子放射を計測したところ、細胞から強い光子放射が認められた。スーパーオキシドの生成に関与すると考えられている NADPH オキシダーゼとペルオキシダーゼを阻害する阻害剤、DPI, SHAM を用いて、エリシター応答発光に与える影響を調査したところ、DPI では 100 μ M で著しく放射が抑制され、SHAM では 1mM で完全に放射が抑制された。ROS のスカベンジャーである Tiron の処理でも 0.5mM で完全に放射が阻害された。以上の 3 つの実験結果は、エリシター応答発光と ROS には強い相関があることを支持すると考えられる。

スーパーオキシドから過酸化水素を生成する酵素 SOD と、過酸化水素を消去するカタラーゼを細胞に処理すると、処理 2 時間後の培地中の過酸化水素濃度は、この反応と一致するように増減した。一方、エリシター応答発光は、SOD の処理で僅かに上昇し、カタラーゼ処理では無処理区と比較して約 4 割減少した。ここでも、過酸化水素の増減とエリシター応答発光の増減は一致しており、この結果もエリシター応答発光と ROS の相関を示している。SOD を処理してスーパーオキシドを消去してもエリシター応答発光は大きく変化しなかったことから、スーパーオキシドがエリシター応答発光の直接的な原因とは考えにくい。キチンエリシターが誘導するエリシター応答発光と過酸化水素濃度の時間的推移が一致することや過酸化水素処理により発生するエリシター応答発光が強いことから、エリシター応答発光を発生させる原動力は過酸化水素である可能性が示唆される。しかし、一方で培地中の過酸化水素濃度が完全に消去されるようなカタラーゼ処理においても、エリシター応答発光は低下するにしろ認められている。培地中の過酸化水素濃度は、細胞における過酸化水素の生成量と一致しているとは限らないため、過酸化水素のエリシター応答発光への強い関与を否定するにはこの点の検証が必要である。過酸化水素以外でエリシター応答発光の原動力になりうると考えられる ROS には、一重項酸素とヒドロキシラジカルがある。ヒドロキシラジカルは過酸化水素の生成と平行して生成されていると考えられる

が、本論文ではエリシター応答発光への関与を明らかにできなかった。一重項酸素については、イネにおける報告ではないが、最近、オタネニンジンにエリシターを処理すると生成されることが報告された (Xiaojie *et al.*, 2005)。一重項酸素は、そのものに蛍光性があるため、バイオフィトンとして放射されている可能性がある。発光スペクトルではその波長は 1,270nm をピークとする赤外線が主体であるが、強度が弱い 762, 703, 635, 580, 520, 480nm の発生も認められる (Cadenas *et al.*, 1981; 宮沢 1989)。本実験系で使用した検出器は 400nm から 600nm が感度域であることから、一重項酸素の発光を検出している可能性がある。また、広い意味での ROS の一つである一酸化窒素は、病原菌の感染により発生し (Foissner *et al.*, 2000)、病害抵抗反応に関与していることが知られており (Durner *et al.*, 1998)、さらに Bennett ほか、(2005) は、シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) の植物体を用いた実験系でバイオフィトン放射への一酸化窒素の関与を示唆していることから、これも候補の一つと言える。

今回の研究により、イネ培養細胞にキチンエリシターを処理した時のエリシター応答発光には、過酸化水素が関与する可能性が示唆された。しかし、他の ROS がエリシター応答発光に関与する可能性もあるため、ヒドロキシラジカル、一重項酸素や一酸化窒素の生成とエリシター応答発光との相関など、さらに研究を進めていく必要がある。

第5章 エリシター応答発光に至るシグナル伝達経路

イネ培養細胞からのエリシター応答発光は、細胞内に病害抵抗性が誘導されているときにプライミングを受け、強く早く上昇することが明らかになっている。しかし、病害抵抗反応とエリシター応答発光との生化学的な相関関係はまだ明らかになっていない。キチンオリゴ糖エリシターが細胞に認識されると、フォスホリパーゼが活性化され、それにより生成したフォスファチジン酸 (PA) をセカンドメッセンジャーとして、NADPH オキシダーゼが活性化して、次に ROS が生成される (Yamaguchi *et al.*, 2003)。そこで、キチンオリゴ糖エリシターが誘導するイネ培養細胞からのエリシター応答発光が、この防御応答におけるリン脂質代謝系によるシグナル伝達経路とどのように関連するのかを解明するため、研究を行った。

また、バイオフィトン放射には過敏細胞死が関連している (Bennett *et al.*, 2005) と報告されているが、キチンオリゴ糖エリシターは、データは示されていないものの過敏細胞死を誘導しないと報告されている (Umemura *et al.*, 2002)。そこで、このことについて確認するための実験も行った。

第1節 PA によって誘導されるバイオフィトン放射の特性

N-アセチルキトオリゴ糖が誘導する ROS 生成過程において、PA はセカンドメッセンジャーとして機能すると考えられているため、エリシター応答発光における PA の役割について調査した。

第1項 材料及び方法

1. 供試細胞

イネ培養細胞は、1mg/l 2,4-D を含む改変 N6 液体培地で10日間振とう培養したものを新しい改変 N6 液体培地に移して4時間振とうし、実験に供試した。

2. PA によって誘導されるバイオフィトン放射の測定

PA として 1,2-dioctanoyl phosphatidic acid (シグマ化学工業) を用いた。6量体キチンは蒸留水に、PA は 200 μ M のデオキシコール酸ナトリウムにそれぞれ処理濃度の20倍で調整し、5°C で使用まで保存した。0.5 g のイネ培養細胞を 1ml の培地とともに直径 35mm のプラスチックシャーレに入れ、フォトンカウンター (CCSPC I) に設置した。イネ培養細胞からのバイオフィトン放射は 26°C で 10秒ずつ測定した。サンプルからのバイオフィトン放射が安定した後に 2 μ M 6量体キチンと 40 μ M PA を添加した。PA の処理濃度は 2 μ M 6量体キチンによるエリシター応答発光の強さと同程度になるように調整した。測定結果は3反復の平均値で示した。

第2項 結果

N-アセチルキトオリゴ糖を処理したイネ培養細胞では、フォスホリパーゼが活性化され、その結果 PA が蓄積される (Yamaguchi *et al.*, 2003)。外生的に処理した PA はイネ培養細胞に ROS の生成を誘導し、さらにエリシター依存的な遺伝子を発現させる (Yamaguchi *et al.*, 2005)。PA は ROS 生成に至る防御応答のシグナル

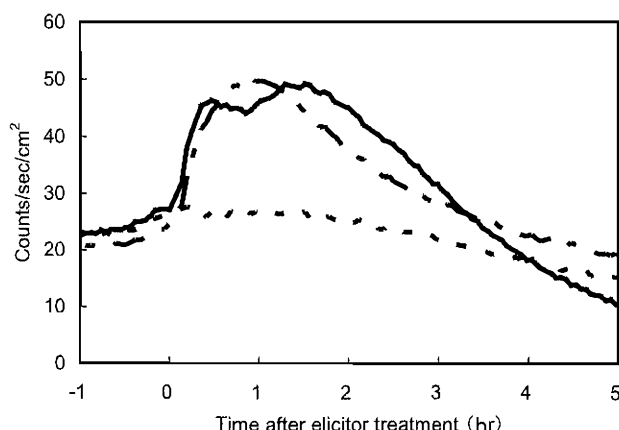


Fig. 15. Photon emissions from rice cells induced by PA. Suspension-cultured rice cells were incubated with 40 μ M PA (dashed line), 2 μ M N-acetylchitohexaose (unbroken line), or water (dotted line) at 0 h r . Values represent the average of triplicate experiments.

伝達系においてセカンドメッセンジャーとして働くと考えられる。

40 μ M の PA を外生的に処理すると 2 μ M の 6 量体キチンを処理したときとほぼ同じ強さで類似したパターンのバイオフィトン放射が誘導された (Fig.15)。しかし、PA によるバイオフィトン放射は 1 峰性であった。

第2節 防御応答のシグナル伝達経路に関与する反応の阻害がエリシター応答発光と PA 誘導発光に及ぼす影響

植物の防御応答のシグナル伝達経路については多くの報告があるので、エリシター応答発光に至るシグナル伝達経路が防御応答の経路と関連しているかを検討した。

第1項 材料及び方法

1. 供試細胞

イネ培養細胞は、1mg/l 2,4-D を含む改変 N6 液体培地で 10 日間振とう培養したものを新しい改変 N6 液体培地に移して 4 時間振とうし、実験に供試した。

2. 供試阻害剤

タンパク質リン酸化阻害剤として、K-252a (和光純薬工業) を、カルシウムシグナル阻害剤としてランタンクロライド (LaCl₃) (シグマ化学工業) 及びエチレンジトリコールビス (β -アミノエチルエーテル) *N,N,N',N'*-四酢酸 (EGTA) (同仁) を用いた。LaCl₃, EGTA は蒸留水に、K-252a は DMSO に 100 倍の濃度で溶解して用いた。Tiron, DPI, SHAM も阻害剤として使用したが、これらは第4章第3節に記載した方法と同様とした。解析に用いた阻害剤の濃度は、Tiron が 0.5, 0.1mM, SHAM が 1, 0.5mM, DPI が 0.1, 0.05, 0.02mM, K-252a が 0.01, 0.005, 0.0025mM, LaCl₃ が 5, 1, 0.5mM, EGTA が 5, 1, 0.2mM であった。

3. 阻害剤の処理とバイオフィトン放射の測定

0.5 g のイネ培養細胞を 1ml の培地とともに直径

35mm のプラスチックシャーレに入れ、フォトンカウンター (CCSPC I) に設置した。イネ培養細胞からのバイオフィトン放射は 26°C で 10 秒ずつ測定した。それぞれのサンプルからのバイオフィトン放射が安定した後、10 μ l の各阻害剤を前処理した。その 10 分後 1 μ M の 6 量体キチンまたは 100 μ M の PA を処理し、フォトン計測を継続した。阻害剤によるバイオフィトン放射の阻害率は Fig.16 のように計算した。各濃度における各阻害剤の阻害率は、3 回の実験の平均値で示した。

第2項 結果

1. エリシター応答発光に対するタンパク質リン酸化阻害剤の影響

タンパク質リン酸化阻害剤である K-252a は、*N*-アセチルキトオリゴ糖がイネ培養細胞に誘導する防御反応を阻害する (Nishizawa *et al.*, 1999)。従って、タンパク質のリン酸化は、*N*-アセチルキトオリゴ糖がイネ培養細胞に誘導する防御応答に必須である。イネ懸濁培養細胞に 0.01mM の K-252a を処理したとき、1 μ M の 6 量体キチンによって誘導されるエリシター応答発光が 49% 抑制された (Table 5 A)。この結果は、防御応答の誘導と同様に、エリシター応答発光にもタンパク質のリン酸化が必要であることを示している。

2. エリシター応答発光に対するカルシウムシグナル阻害剤の影響

カルシウムイオンは細胞表面で受け取ったシグナルを伝達する重要なセカンドメッセンジャーとしてよく知られている。細胞のカルシウムイオンの変動は、病原菌の侵入やエリシターの植物細胞への接触により防御応答が誘導されたときに起こる (Heo *et al.*, 1999; Xu and Heath, 1998)。*N*-アセチルキトオリゴ糖エリシターはダイズ細胞の細胞内のカルシウムイオン濃度の迅速な増加を誘導する (Mithöfer *et al.*, 1999)。イネ細胞では、カルシウムイオンの細胞外から細胞質への流入が細胞膜の脱分極に必要であり、これが *N*-アセチルキト

Fig.16. The method for calculating the inhibition percentage of photon emission. Inhibition percentage was calculated as: (b) \div (a) \times 100. (a) Elevated photon counts by *N*-acetylchitohexaose or PA. (b) Decreased photon counts by inhibitor.

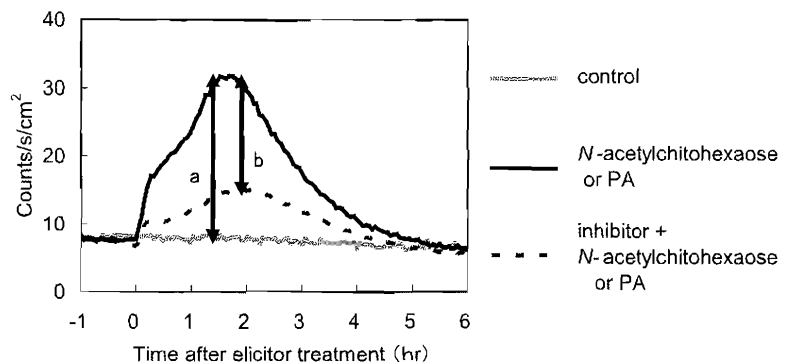


Table 5. Effects of inhibitors on the biophoton emission of rice cells with (A) *N*-acetylchitohexaose, or (B) PA. Suspension-cultured rice cells were incubated with 1 μ M *N*-acetylchitohexaose or 100 μ M PA. Inhibitors were added to the culture medium 10 min before the elicitor treatment. The concentrations of inhibitors were 0.5, 0.1 mM (Tiron), 1, 0.5 mM (SHAM), 0.1, 0.05, 0.02 mM (DPI), 0.01, 0.005, 0.0025 mM (K-252a), 5, 1, 0.5 mM (LaCl₃), and 5, 1, 0.2 mM (EGTA). Inhibition percentages were calculated as in Figure 15. Values represent the average of triplicate experiments.

A	inhibition site	inhibitor	concentration (mM)	inhibition (%)
<i>N</i> -acetylchitohexaose	ROS	Tiron	0.5	100.0 \pm 0.0
			0.1	65.5 \pm 4.3
	POX	SHAM	1	100.0 \pm 0.0
			0.5	64.4 \pm 1.2
	NADPH oxidase	DPI	0.1	82.4 \pm 8.5
			0.05	67.9 \pm 4.1
			0.02	41.3 \pm 13.9
			0.005	8.9 \pm 7.0
	Protein phosphorylation	K-252a	0.01	49.1 \pm 7.5
			0.005	8.9 \pm 7.0
			0.0025	1.4 \pm 15.6
	Ca ²⁺ channel	LaCl ₃	5	100.0 \pm 0.0
			1	98.3 \pm 7.8
0.5			56.1 \pm 14.9	
Ca ²⁺	EGTA	5	100.0 \pm 0.0	
		1	79.2 \pm 5.0	
		0.2	11.0 \pm 10.7	

B	inhibition site	inhibitor	concentration (mM)	inhibition (%)
PA	ROS	Tiron	0.5	100.0 \pm 0.0
	POX	SHAM	1	100.0 \pm 0.0
	NADPH oxidase	DPI	0.1	79.6 \pm 8.8
	Protein phosphorylation	K-252a	0.01	57.7 \pm 13.7
	Ca ²⁺ channel	LaCl ₃	1	100.0 \pm 0.0
	Ca ²⁺	EGTA	5	100.0 \pm 0.0

オリゴ糖によって誘導される防御応答の最初の引き金となる (Kikuyama *et al.*, 1997)。薬理的な解析により、カルシウムイオンキレーターである EGTA やカルシウムチャンネルブロッカーであるランタンクロライドは、*Cupressus lusitanica* の細胞へのファイトアレキシンの蓄積を阻害し (Zhao *et al.*, 2003)、イネ細胞でもファイトアレキシンの蓄積を阻害したと報告されている (Umemura *et al.*, 2002)。イネ細胞に 1mM のランタンクロライドか 5mM の EGTA を前処理すると、6 量体キチンのエリシター応答発光がほぼ完全に阻害された (Table 5 A)。このことはカルシウムイオンがエリシター応答発光を制御していることを示唆している。

3. PA によって誘導されるバイオフィトン放射に対する阻害剤の影響

100 μ M の PA によって誘導されるバイオフィトン放射に対する ROS, タンパク質リン酸化、カルシウムシグナリング阻害剤を用いた薬理的な解析結果を、Table 5B に示した。PA によるバイオフィトン放射に対する各

阻害剤の阻害率は、6 量体キチンによるものとほぼ同じであった。この解析結果から、6 量体キチンによって誘導されるエリシター応答発光と PA によって誘導されるバイオフィトン放射は、それらに至るシグナル伝達経路が類似していることが推察される。

第3節 エリシター応答発光における PA の役割

キチンオリゴ糖エリシターを処理したイネ培養細胞では、フォスホリパーゼが活性化され、その結果 PA が蓄積される (Yamaguchi *et al.*, 2003)。外生的に処理した PA はイネ培養細胞に ROS の生成を誘導し、エリシター依存的な遺伝子を発現させる (Yamaguchi *et al.*, 2005)。PA は ROS 生成に至る防御応答のシグナル伝達系のセカンドメッセンジャーとして働くと考えられる。そこで、PA の細胞内での生成阻害とその後の外生的な PA 投与が、エリシター応答発光に及ぼす影響について解析した。

第1項 材料及び方法

1. 供試細胞

イネ培養細胞は、1mg/l 2,4-D を含む改変 N6 液体培地で10日間振とう培養したものを新しい改変 N6 液体培地に移して4時間振とうし、実験に供試した。

2. エリシター及び阻害剤の処理とバイオフィトン放射の測定

イネ培養細胞は前節で述べた方法で準備し、フォトンカウンター (PCX-100) 内に設置した。バイオフィトン放射は26℃で10秒ずつ測定した。バイオフィトン放射が安定した後、50 μ M のシクロヘキシミド (CHX: タンパク合成阻害剤) を処理した。阻害剤処理の10分後に5 μ M の6量体キチンを処理し、直ちにフォトン計測を再開した。その2時間後、200 μ M のPAをイネ培養細胞に処理した。実験は3反復で行った。

第2項 結果

6量体キチンはイネに2相性のROS生成を誘導する。タンパク質合成阻害剤であるCHXはROSの2相目の生成の蓄積を完全に抑制するが、この抑制はPAの添加によって回復する (Yamaguchi *et al.*, 2005)。この現象は細胞内で生成されて生成するPLDがCHXによって阻害された結果を反映していると考えられる。

前処理した50 μ M CHXは、5 μ M の6量体キチンが誘導するエリシター応答発光をエリシター処理の15分後から抑制した (Fig.17)。6量体キチンのみを処理したポジティブコントロールにおけるバイオフィトン応答発光のピーク時には、その抑制率は58%であった。200 μ M のPAをエリシター応答発光がCHXによって抑制されているイネ培養細胞に処理すると、バイオフィ

トン放射は迅速に増加した。ROS生成の場合と同様に、エリシター応答発光もCHXによって抑制されたが、この抑制は外生的に処理したPAによって回復した。この実験結果と前節の薬理学的な解析結果から、エリシターによって活性化されたフォスホリパーゼによって細胞膜のリン脂質より生成したPAが、エリシター応答発光を誘導するセカンドメッセンジャーとして働いていることが示唆される。さらに、この実験結果から、エリシター応答発光がタンパク質合成を必要とすることも明らかである。また、ROS生成とバイオフィトン放射において、その抑制と回復の仕組みについての類似性は、それらの間の強い関連性をさらに示している。

第4節 6量体キチン及びPAが誘導するエリシター応答発光のスペクトル特性

サツマイモにおけるバイオフィトン放射のスペクトルは、定常時と病原菌の接種時では異なると報告されている (Iyozumi *et al.*, 2002)。バイオフィトンのスペクトルは生細胞の生化学反応を反映していると考えられるため、6量体キチン及びPAによって誘導されるフォトン放射のスペクトル解析を行った。

第1項 材料及び方法

1. 供試細胞

イネ培養細胞は、1mg/l 2,4-D を含む改変 N6 液体培地で10日間振とう培養したものを新しい改変 N6 液体培地に移して4時間振とうし、実験に供試した。

2. バイオフィトン放射のスペクトル解析

スペクトル解析は、第2章第2節第1項に示した方法で行った。直径60mmのプラスチックシャーレに3.5ml

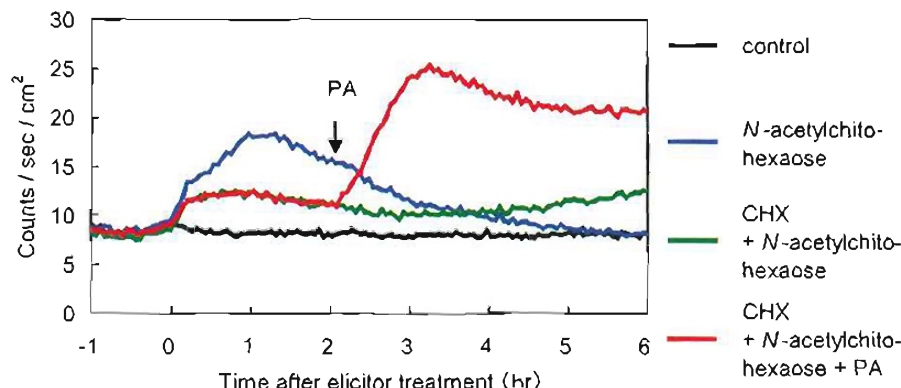


Fig. 17. Effects of inhibition of protein biosynthesis on rice biophoton emissions. Suspension-cultured rice cells were incubated with 5 μ M of the elicitor *N*-acetylchito-hexaose or water (control) at 0 hr. The CHX (50 μ M) inhibitor of protein biosynthesis was added to the culture medium 10 min before the elicitor treatment. PA (200 μ M) was added 2 hr after the elicitor treatment. Values represent the average of triplicate experiments.

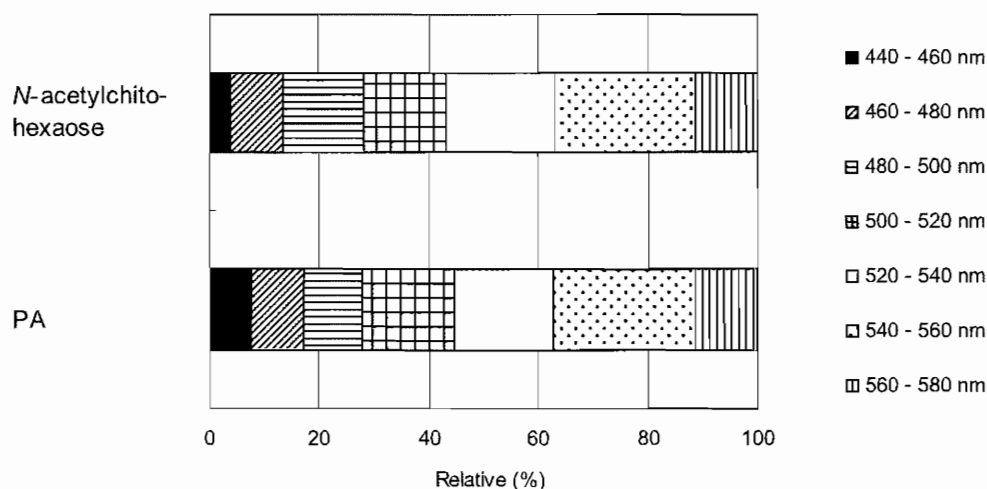


Fig.18. Spectral compositions of the maximum photon emission induced by *N*-acetylchito-hexaose or PA from rice cells. Suspension-cultured rice cells were incubated with 5 μ M *N*-acetylchito-hexaose or 200 μ M PA. Comparisons were made at the point of maximum emission.

の培地と、生重 2.5g のイネ懸濁培養細胞を入れ、5 μ M の 6 量体キチンと 200 μ M の PA を処理し、26°C のフォトンカウンター (MSPC II) 内に置いた。スペクトル解析では正確なデータを得るためにはより強いバイオフォトン放射を必要とするため、通常より高い処理濃度とした。実験は 3 反復で行った。

第 2 項 結 果

5 μ M の 6 量体キチンと 200 μ M の PA によって誘導されるフォトン放射のスペクトル (440~580nm) は、互いによく類似していた (Fig.18)。このスペクトル解析から 6 量体キチンと PA によって誘導されるバイオフォトン放射は類似した背景を持つことが示唆され、このことはその 2 つの物質がイネ培養細胞に誘導するバイオフォトン放射は、類似した生化学反応により生じていることを示している。

第 5 節 6 量体キチンエリシターは過敏細胞死を誘導しない

キチンオリゴ糖エリシターが過敏細胞死を誘導するかどうかについては、まだ正確な報告がなされていない。筆者らは、このことが防御応答に相関するエリシター応答発光の特性として極めて重要であることから、イネにおいて確認を試みた。

第 1 項 材料及び方法

1. 供試植物と供試エリシター

完全に展葉したイネ (品種: 金南風) 葉鞘の第 4 葉を 30mm の長さに切断した。エリシターとして、20 μ M

及び 200 μ M の 6 量体キチン、またはいもち病菌 (*Magnaporthe oryzae*) の培養ろ液を用いた。

2. エリシターの処理と調査方法

エリシター溶液または水を直径 60mm のシャーレに入れ、イネの切片を浮かべた。過敏細胞死は 24 時間後に観察した。全ての実験は 3 反復で行った。

第 2 項 結 果

キチンオリゴ糖エリシターが過敏細胞死を誘導するかどうかについて、イネ植物体を用いて確認を試みた。ポジティブコントロールとして用いたイネいもち病菌の培養ろ液の 5% 溶液は葉鞘の切片に過敏細胞死を誘導したが、20 μ M 及び 200 μ M の 6 量体キチンは誘導しなかった (データ未掲載)。

第 6 節 考 察

病原菌に感染した植物やエリシターを処理した植物細胞は ROS を生成することがよく知られている (Doke, 1983; Doke, 1997)。第 4 章では、エリシター応答発光と過酸化水素の発生推移解析、外生的な ROS の投与によるバイオフォンの発生調査や ROS の阻害剤を用いた薬理的解析により、エリシター応答発光はエリシター誘導性の ROS 生成と強い相関があることが示唆されている。キチンオリゴ糖エリシターはイネ培養細胞に ROS を誘導するが、その過程で PA が情報伝達物質として作用することが証明されている (Yamaguchi *et al.*, 2003)。そこで、本章では、エリシター応答発光に対する PA の役割を中心に解析を行った。

外生的に処理した PA のバイオフォトン放射への影

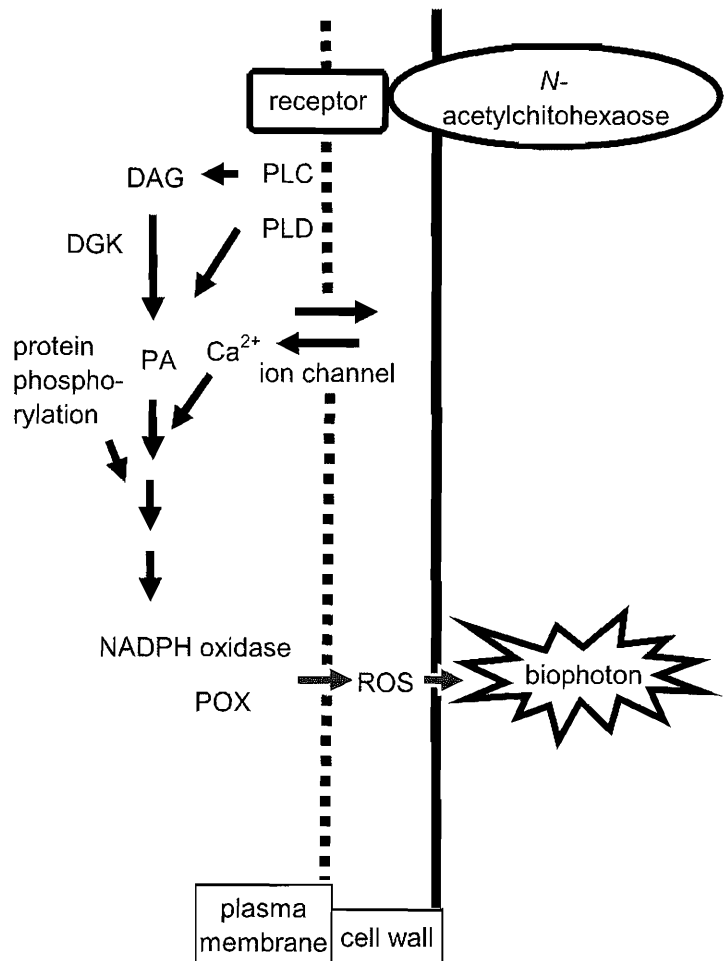
響、薬理的な解析実験から得られた結果及びバイオフィオンのスペクトル解析の結果はすべて、PAが情報伝達物質として作用してエリシター応答発光が起こっていることを示唆している。この仮説に基づいてエリシター応答発光の誘導経路をFig.19に示した。エリシター分子を認識した後に、細胞内でPLCとPLDが活性化される。PAはPLDによりリン脂質より生成するか、またはPLCによって生成されたDAGがDGKによって変換され生成する。DPIやSHAMはPAとキチンオリゴ糖によって誘導されるバイオフィオン放射を強く抑制するため、PAにより活性化されたNADPHオキシダーゼやPOXがROSを生成させて、それに関連してエリシター応答発光が発生すると考えられる。K-252a, EGTA及びランタンクロライドはPAによって誘導されるバイオフィオン放射を阻害するので、タンパク質のリン酸化やカルシウムイオンが少なくともPAのシグナル伝達経路の下流でバイオフィオン放射を制御していると考えられる。

Pseudomonas syringae pv. *Tomato* DC3000を感染さ

せたシロイヌナズナの研究で、Bennettほか(2005)はNADPHオキシダーゼを阻害してもバイオフィオン放射には影響はなかったことと、一過性のROSの生成はバイオフィオン放射を誘導しないことを報告した。しかし、その系ではバイオフィオン放射には過敏細胞死が必要であった。これに対して、筆者らの研究ではバイオフィオン放射には過敏細胞死は必須ではないが、ROSの生成は必要であった。これらの結果は、宿主と病原菌(エリシター)の組み合わせによってバイオフィオン放射のメカニズムが異なることを反映していると考えられる。

本研究において、6量体キチンによって誘導されたイネ培養細胞からのエリシター応答発光は、ROSの生成に強く関連して起こっていた。さらにエリシター応答発光へのシグナル伝達はリン脂質代謝系を通っていることが明らかとなった。しかしながら、この非破壊的に得られる生体情報であるバイオフィオンはROSの生成を伴う様々なストレス条件下で、生物の状態を検出する手段として有用であるため、バイオフィオンの発生メカニズムの完全な解明は極めて重要であると言える。

Fig.19. Putative signal transduction leading to biophoton emission by *N*-acetylchitooligosaccharide. After *N*-acetylchitohexaose is recognized, PLC and PLD are activated, and DAG and PA are produced. DAG is phosphorylated by DAG kinase and changed into PA. PA works as a second messenger, activating a ROS generating system in which NADPH oxidase and H₂O₂ take part. This is followed by photon emission.



第6章 総合考察

生物が常に放出し続けている極微弱な光であるバイオフォトン¹は、生命活動に必須である生化学反応に付随して起こるもので、発光が目的ではない。従ってバイオフォトン放射による発光量は一定ではなく、由来する生化学反応によって変化すると考えられる。筆者らのグループでは、このバイオフォトン¹を植物からの生体情報としてとらえ、利用する研究を行ってきた。特に、病原菌が植物に感染しようとする際に起こる抵抗反応との関連について、様々な角度から明らかにしてきた。本研究は、この病害抵抗反応と平行するように起こるバイオフォトン放射がどの生化学反応と結びついているのかや防御応答のシグナル伝達経路との関連について検討し、バイオフォトン放射の基本的なメカニズムを明らかにすることを目的とした。

実験を進めるに当たって、バイオフォトン放射が安定して得られる実験系を確立する必要があった。バイオフォトン¹は様々なストレスによって放出されるため、防御応答に伴うバイオフォトン放射のみが進行する実験系を検討した。植物は葉緑体を持っているが、この葉緑体は光を吸収してエネルギーに変換するため、光が当たった直後の植物体は強い光（遅延発光）を放出する。この遅延発光は次第に減衰するが、バイオフォトン放射の測定に影響がない程度になるには何時間も必要となる。そのため、葉緑体を持った植物の葉や茎は本研究の供試材料としては不適である。また、著者らのグループで今まで用いてきた植物の塊茎や根部は、部位の違いによって反応がかなり異なることや同じ材料を安定して得ることが難しく、やはり本研究の材料として不適である。そこで、培養細胞に着目しバイオフォトン放射の研究材料としての適性を検討してきた。懸濁培養細胞は増殖が容易で、季節を問わず材料の準備ができ、大きさも測定に適しているため、エリシター応答発光を調査する材料として極めて優れているといえる。そこで、イネのカルスを誘導し、液体培地により細胞を増殖して、研究材料として利用してきた。しかし、継代を長期間継続すると細胞が褐変し増殖が悪化して、適切なエリシター応答発光が得られないことがあった。このため、安定的にエリシター応答発光が得られるような懸濁培養細胞を作成するための培養条件を検討した。その結果、今まで使用してきた

UM培地より塩類や2,4-D濃度を1/2に低下させた培地で増殖が回復した。さらに、塩類組成が異なる他の培地を検討したところ、改変N6培地と1/2 MS培地で培養すると増殖が良好で、エリシター応答発光や抵抗性誘導物質によるプライミング効果が適切に認められることが明らかとなった。特に改変N6培地では細胞の褐変が少なく、1/2 MS培地ではエリシター応答発光のプライミングが良好に認められたため、1mg/l 2,4-Dを含む改変N6培地で細胞を常に継代維持しておき、エリシター応答発光のプライミング効果を検討するときには、それを1mg/l 2,4-Dを含む1/2 MS培地に移植し培養した細胞を用いることとした。また、これらの研究結果から、液体培地で培養した細胞は培地条件に極めて敏感で、それがエリシター応答発光にも強く影響を与えるため、同じ条件で培養した細胞を準備しておくことが必要であることが示唆された。

次に、エリシター応答発光を誘導するエリシターについて解析した。エリシター応答発光は、エリシターの種類により異なり、特徴を持ったパターンとなった。今回使用した4種のエリシターによるエリシター応答発光の特性は同一ではないが、いずれのエリシター処理によってもバイオフォトン¹の上昇が誘導された。各エリシター応答発光の特性が異なるのは、エリシターの種類によりエリシター応答発光が誘導されるメカニズムが異なることを反映していると考えられる。病害抵抗性誘導物質の作用による病害抵抗性関連遺伝子のプライミングの特徴は、遺伝子発現の早期化と増強であるが、これはASMの作用による各エリシター応答発光のプライミングの特徴と一致していた。4種類の生物学的エリシターと非生物学的エリシターを用いたエリシター応答発光の実験結果から、抵抗性誘導物質の作用によるエリシター応答発光のプライミング現象は、エリシターの種類にかかわらず認められる現象であると考えられた。さらに、キチンオリゴ糖類は、大きな重合体ほど低濃度で強く防御応答を誘導することが知られているが、エリシター応答発光においても同様に大きな重合体ほど低濃度で強く誘導することが明らかとなった。また、ASMによるプライミング現象も、防御応答と同様にキチンオリゴ糖類の大きな重合体ほどプライミング効果が高いことが判明した。これ

らのことは、エリシター応答発光が防御応答と強く結びついていることを補佐する結果となった。これらの研究成果やシグナル伝達経路の研究状況から、エリシター応答発光の基本的なメカニズムの研究には、イネ培養細胞と6量体キチンエリシターを用いることとした。

植物が病原菌を認識すると、オキシダティブバーストと呼ばれる2相性のスーパーオキシドの急激な生成が見られるが、植物や細胞にエリシターを処理した場合にも同様の生成が見られる。スーパーオキシドの半減期は1秒以内で、通常は非酵素的にあるいはSODによって比較的安定な過酸化水素に変換される。スーパーオキシドは反応性の高いヒドロペルオキシラジカル(HO_2^\cdot)やヒドロキシラジカル(OH^\cdot)に変換される。オキシダティブバーストに関する詳細な分子機構はまだ解明されていないが、原形質膜にあるNADPHオキシダーゼや細胞壁のペルオキシダーゼ、アポプラストにあるアミノキシダーゼ型の酵素に由来するとの報告がある(Allan and Fluhr 1997)。また、オキシダティブバーストは、タンパク質リン酸化やカルシウムにより制御されている。フォトン放射の原動力の一つはROSであると考えられていることから、植物の細胞にエリシターを処理したときの応答に伴う発光とROSとの関わりを検討したところ、生成される過酸化水素との時間的一致やROSの生成阻害剤による薬理的解析結果から、ROSとの相関が強く示唆された。過酸化水素の関与が最も強く示されたが、完全な証明はできなかった。他のROSがエリシター応答発光に関与する可能性や複数のROSが同時に関与する可能性もあるため、一重項酸素、ヒドロキシラジカルや一酸化窒素の生成とエリシター応答発光との相関など、さらに研究を進めていく必要がある。

植物の防御応答は、細胞内でシグナル伝達によって反応が伝達され制御されている。キチンエリシター分子が認識された後、フォスホリパーゼが活性化される。PLCによってDAGがリン脂質から放出され、さらにDGKによってPAに変換される。あるいはPLDによってリン脂質からPAが直接作り出される。PAは、キチンオリゴ糖が誘導するROS生成過程において、セカンドメッセンジャーとして機能すると考えられている。外生的にPAを処理するとROSが生成されるが、同様にバイオフィトン放射も起こることが今回の研究で明らかになった。また、PAを処理したときに得られるバイオフィトン放射の薬理的な解析結果は、6量体キチンのものと良く類似しており、6量体キチンによるエリシター応答発光がリン脂質代謝系のシグナル伝達経路を通して起こっていることを示唆した。Fig.19に示したよ

うに、エリシター応答発光の誘導経路は、エリシター分子を細胞が認識した後、フォスホリパーゼの活性化により生成されたPAがセカンドメッセンジャーとなって、NADPHオキシダーゼやPOXを活性化し、ROSの生成に続いて起こると推察される。バイオフィトン放射はこのROSが原動力となって発生する励起分子から放出されると考えられる。また、K-252a、EGTA及びランタンクロライドはPAによって誘導されるバイオフィトン放射を阻害するので、少なくともPAのシグナル伝達経路の下流でタンパク質のリン酸化やカルシウムイオンがバイオフィトン放射を制御していると示唆される。

筆者らの研究では、POXの阻害剤であるSHAMとNADPHオキシダーゼの阻害剤であるDPIは両方ともバイオフィトン放射を強く阻害した。しかし、供試した植物とエリシターが異なる他の研究では、NADPHオキシダーゼを阻害してもバイオフィトン放射には影響はなかったことや一過性のROSの生成はバイオフィトン放射を誘導しないという異なる結果が報告された(Bennett *et al.*, 2005)。また、バイオフィトン放射に過敏感細胞死が必要であるかどうかについても、筆者らの研究結果とは異なった。この相違は、宿主と病原菌の組み合わせによってバイオフィトン放射のメカニズムが異なることを反映しているかもしれない。あるいは、阻害剤は目的の酵素に完全な特異性を持っているとは限らないため、ROS生成に関与する他の生化学反応に間接的に影響を与えた結果として、相違が生じている可能性もある。また、6量体キチンによって誘導されたエリシター応答発光のスペクトル解析から応答発光は440から580nmの幅広いスペクトルに存在しており、このことは、複数の発光分子が関与することを示唆している。このように、バイオフィトン放射の基本メカニズムの解明にはまだまだ多くの課題が残されている。しかし、バイオフィトン放射の測定は非破壊的でリアルタイムに行うことができるため、ROSの生成を伴う様々なストレス下に存在する生物の状態を検出する手段として有用である。このため、バイオフィトン放射メカニズムの完全な解明が極めて重要であると言える。

抵抗性誘導物質は、本来植物が持っている抵抗性を強化して病害を防ぐことから、薬剤の効果低減がおきにくいと考えられることや、抗菌性を持たないため、環境負荷が低い等の長所を持っている。このため、今後開発が期待される農薬であるが、簡易なスクリーニング方法がないことが問題となり、開発があまり進んでいないのが現状である。本研究により、イネ培養細胞から放出されるバイオフィトンのブライミング現象を利用すること

で、抵抗性誘導物質のスクリーニングが可能であることが示唆された。抵抗性誘導物質のスクリーニングには、光子カウンターが必要であるが、測定が自動化されていることから、培養細胞を分注し、被検物質の処理の一定時間後にエリシターを処理すれば4～5時間後には抵抗性誘導活性の判定が可能で、極めて効率的である。バイオフィトン放射の基本メカニズムの解明を進めることにより、これ以外にも新たな利用の可能性が広がることから、今後の詳細な研究が期待される。

摘 要

バイオフィトン放射は生物の生化学反応に付随して放出される極微弱な発光であり、その発光量は生物の生育ステージにより変化しストレスを受けると急上昇する。微生物の植物への接触や細胞へのエリシターの処理により、バイオフィトン放射が急上昇する。エリシターによるバイオフィトン放射の上昇（以下、エリシター応答発光）は、病害抵抗性反応と関連していると考えられる。さらに、抵抗性誘導物質の処理により細胞に抵抗性が誘導されていると、誘導されていないときよりもエリシター応答発光が早く強く上昇する。これは、細胞に病害抵抗性が誘導されているときに起こる防御応答のブライミング現象と同様で、エリシター応答発光もブライミングを受けていることを示唆している。光子が放射される基本原理は、生化学反応によって生じた励起分子が基底状態に戻る時に光を放出することにあるが、バイオフィトン放射がどの生化学反応と結びついているのか、励起分子種や発光分子種は何かなど、基本的なメカニズムは未解明である。そこで、これらを明らかにするため本研究を実施した。

1. エリシターの種類とエリシター応答発光の発光パターン

バイオフィトン放射を年間を通じて安定して適切に誘導するため、イネ (*Oryza sativa* L.) の懸濁培養細胞を使用し、エリシターの違いによるエリシター応答発光の特性を調査した。4種類のエリシターの発光強度や時間的推移はエリシターの種類や濃度により異なったが、エリシター毎に特徴的な発光パターンを示した。発光スペクトルの解析結果から、これら4種類のエリシターによって誘導されるバイオフィトンは、発光波長の構成比が類似しており、このことからバイオフィトンは同質の反応から誘導されているものと考えられた。また、抵抗性誘導物質の前処理によるエリシター応答発光の増強程度は、エリシター処理濃度が低濃度ほど高いことが共通していた。各種抵抗性誘導物質の前処理によるエリシター応答発光の増強程度は抵抗性誘導物質の種類により異なったが、ブライミング効果は塩化銅(II)の一部を除いた全ての抵抗性誘導物質とエリシターの組み合わせで見られたことから、本現象はエリシターにある程度共通した現象であると考えられた。

2. 活性酸素種 (ROS) の生成とそれのエリシター応答発光への関与

エリシター応答発光の生化学的な解析を行った。エリシター応答発光は酸素のない状態では見られないことから、何らかの酸化反応と結びついていると考えられる。一方で、エリシターによる病害応答の初期反応としてスーパーオキシドの生成が見られることから、エリシター応答発光とROSとの相関を調査した。イネに6量体キチンを処理するとROSとして、スーパーオキシド、過酸化水素、ヒドロキシラジカルが生成していると考えられる。実験の結果、エリシター応答発光は培地中の過酸化水素濃度と時間的推移が一致していた。スーパーオキシドや過酸化水素を外生的に処理すると、細胞からの光子放射が強く上昇した。ROSのスカベンジャーであるTiron、ROSの生成に関与するNADPHオキシダーゼの阻害剤DPIやペルオキシダーゼの阻害剤SHAMを細胞に処理するとエリシター応答発光は大幅に阻害された。阻害剤は生化学反応を特異的に100%阻害するものではないことや一つの反応を阻害しても他の反応系が動き始めることもあり、阻害剤の実験で完全に解析できるわけではないが、これらの結果はROSがエリシター応答発光に関与することを示唆した。

3. 病害抵抗反応に伴うシグナル伝達経路の関与

防御応答のシグナル伝達経路の関与を薬理的に解析した。イネに6量体キチンを処理するとフォスホリパーゼが活性化される。フォスファチジン酸 (PA) はリン脂質よりフォスホリパーゼにより生成され、セカンドメッセンジャーとしてROS生成系にシグナルを伝達する。PAを外生的に処理するとバイオフィトン放射が上昇するがこの発光は各種阻害剤により、6量体キチンのエリシター応答発光とほぼ同程度に阻害された。また、シクロヘキシミドによりPAの生成を阻害するとバイオフィトン放射も抑制されるが、この抑制は外生的にPAを投与することにより回復した。これらのことから、6量体キチンによるエリシター応答発光はリン脂質代謝系のPAを通して放射されていると示唆された。タンパク質のリン酸化を阻害するK-252aやカルシウムシグナルの阻害剤であるランタンクロライドやEGTAを細胞に処理すると、エリシター応答発光が部分的または完全に

阻害されたため、PAの下流のシグナル伝達には、タンパク質リン酸化とカルシウムイオンが関与すると判明した。

バイオフィトン放射は、非破壊的にリアルタイムに測定できることから、生物の状態を把握する方法として極めて有用である。しかし、防御応答に関連する詳細な研究は始まったばかりであり、今後、更なる研究の進展が必要である。また、抵抗性誘導物質によるエリシター応答発光のプライミング現象が共通した現象であることから、この特性を利用した抵抗性誘導物質の新規なスクリーニング法が開発されることが期待される。

Summary

Biophotons are ultraweak light emissions that accompany biochemical reactions in a living body. The level or property of emissions changes during the different stages of biological development, and the emissions increase rapidly under stress conditions. Further, the emissions increase when microbes infect plants or when plant cells are treated with elicitors. Elevation of biophoton emission by elicitors (elicitor-responsive photon emission) is thought to be associated with the induction of disease protection. Elicitor-responsive photon emission is elevated rapidly and strongly when disease resistance is induced by treatment with plant activators. This result shows that elicitor-responsive photon emission is also primed as same as disease response is did when disease resistance are induced in the cells. In principle, photon emissions are produced when molecules in an electronically excited state decay to a stable ground state. However, the basic mechanisms underlying the association between biochemical reactions and biophoton emissions and the characteristics of the excited or luminescent molecules have not been elucidated. Therefore, the aim of this study is to understand these issues.

1 The kind of elicitors and the pattern of elicitor-responsive-photon emission

In order to stably induce biophoton emissions, suspension-cultured rice (*Oryza sativa L.*) cells were used. Elicitor-responsive photon emissions from rice cells induced with 2 biotic (*N*-acetylchitohexaose, xylanase) and 2 abiotic (dipotassium hydrogen phosphate, copper chloride) elicitors were characterized. Photon emission induced by each elicitor had its own characteristic pattern, although the changes in both the intensity and the time course differed depending on the type of elicitor and dose used. The results of spectral analysis demonstrated that the biophoton emission induced by these elicitors had similar ratios of spectrum intensities. This indicates that these emissions are derived from homogeneous reactions. When rice cells

were pretreated with plant activators, the degree of enhancement of elicitor-responsive photon emissions increased with the decrease in the concentration of the elicitor used; however, the degree of enhancement of elicitor-responsive photon emissions induced by each plant activator differed. A priming effect was observed for every combination of elicitor and plant activator. Therefore, this phenomenon is thought to be common to a certain extent for elicitors.

2 Correlation between ROS generation and elicitor responsive-photon emission

We performed biochemical analyses of elicitor-responsive photon emissions. Elicitor-responsive photon emissions are not produced in the absence of air; therefore, it is believed that chemical reactions such as oxidation are correlated with photon emission. Since the generation of superoxide is an early reaction in the disease-response pathway in plants, we examined whether this elicitor-responsive photon emission was correlated with the generation of reactive oxygen species (ROS). It was reported that the hydroxyl radical was produced when rice cells were treated with *N*-acetylchitoooligosaccharide. Therefore, superoxide, hydrogen peroxide, and the hydroxyl radical were generated in this experimental system. The strengths of the elicitor-responsive photon emissions from the cells accorded with the amount of hydrogen peroxide in the cell-cultured medium during the time course. Although exogenously applied ROS (superoxide and hydrogen peroxide) could induce photon emissions, ROS application to rice cells produced stronger biophoton emissions. Photon emissions induced by *N*-acetylchitohexaose were suppressed when cells were pretreated with the following ROS-generating inhibitors: pyrocatechol-3,5-disulfonic acid disodium salt (Tiron), diphenylene iodonium (DPI), and salicylhydroxamic acid (SHAM). Inhibitors do not ensure the complete inhibition of certain chemical reactions or the initiation of another reaction by the inhibition of one reaction. These results

suggest that ROS generation is correlated with elicitor-responsive photon emissions; however, this correlation cannot be confirmed based solely on inhibitor reactions.

3 Correlation between the signal transduction pathway of disease resistance and elicitor responsive-photon emission

The relation between elicitor-responsive photon emissions and the signal transduction of disease response were analyzed pharmacologically. The phospholipid signaling pathway in rice cells was induced when the cells were treated with *N*-acetylchitooligosaccharide. In rice cells treated with *N*-acetylchitooligosaccharide, phosphatidic acid (PA) was produced by phospholipases, and PA serves as a secondary messenger for the ROS generation system. Exogenously applied PA increased biophoton emissions. Moreover, when rice cells in which the elicitor-responsive photon emissions were inhibited by the protein synthesis inhibitor were treated with PA, the biophoton emissions were elevated again. The protein phosphorylation (K252a) and the Ca^{2+} signaling inhibitors, namely, ethylene glycol-bis (β -aminoethylether)-*N,N,N',N'*-tetraacetic acid (EGTA) and LaCl_3 , caused a partial decrease or complete inhibition of photon emissions. These results showed that the photon emissions from rice cells elicited by *N*-acetylchitooligosaccharide were generated through PA, an intermediate in phospholipid signaling; further, it is regulated by Ca^{2+} signaling and protein phosphorylation.

Since the biophoton emissions can be detected nondestructively and in real time, it is an extremely useful tool identify the conditions of organisms. However, detailed research on disease response is required and has been initiated. In addition, since the priming of the elicitor-responsive photon emissions by plant activators is a common phenomenon observed for all activators, a novel screening method of new plant activators using this phenomenon was devised. This method of identification of novel plant activators would be beneficial since many chemicals can be screened in shorter time as compared to conventional methods.

謝 辞

本研究は、平成15～17年度静岡県プロジェクト研究事業「植物の病害抵抗性誘導剤の開発」において実施した研究を取りまとめた。本研究を推進し、論文を取りまとめるに当たり、プロジェクトリーダーの加藤公彦博士には、終始、適切な御助言と御指導を頂いた。また、岐阜大学応用生物科学部教授百町満朗博士には、本論文を取りまとめるに当たり有益なる御助言と校閲を賜った。ここに謹んで感謝の意を申し上げる。さらに、本論文の校閲を賜った静岡大学露無慎二教授、岐阜大学小山博之教授、信州大学久我ゆかり准教授に深謝申し上げる。

プロジェクト研究チームの伊代住浩幸氏、稲垣栄洋博士、山口亮氏には、3年間に亘って、実験協力と励ましを頂いた。共同研究者のクミアイ化学（株）古瀬勝美氏、日本曹達（株）佐野慎亮博士、馬場康司氏、浜松ホトニクス（株）土屋広司氏には、試料の提供及び研究推進に御協力を頂いた。皆様に厚くお礼申し上げる。

明治大学農学部 渋谷直人教授、独立行政法人農業生物資源研究所 南栄一博士、明治大学農学部 賀来華江准教授には、キチンオリゴ糖エリクター及びイネ培養細胞の研究への利用について、御指導・御助言を賜った。名古屋大学 川北一人教授には、研究推進に当たって、病原菌の侵入に伴う植物の防御応答に関して御指導・御助言を賜った。研究・知識の浅い私に懇切丁寧な御指導をいただいたことを深く感謝申し上げる。

本研究の基本となるバイオフィトンの測定では、装置の設計・維持管理等に適切・迅速に対応していただいた浜松ホトニクス（株）杉江正美氏に厚くお礼申し上げる。

引用文献

- Abeles F. B. (1986) Plant chemiluminescence. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 37 : 49-72.
- Allan A. C. and Fluhr R. (1997) Two distinct sources of elicited reactive oxygen species in tobacco epidermal cells. *The Plant Cell* 9:1559-1572.
- Bennett M., Mehta M. and Grant M. (2005) Biophoton imaging: a nondestructive method for assaying R gene responses. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 18:95-102.
- Bolwell G. P., Bindschedler L. V., Blee K. A., Butt V. S., Davies D. R., Gardner S. L., Gerrish C. and Minibayeva F. (2002) The apoplastic oxidative burst in response to biotic stress in plants: a three-component system. *J. Exp. Bot.* 53:1367-1376.
- Cadenas E., Varsavsky A. I., Boveris A. and Chance B. (1981) Oxygen- or organic hydroperoxide-induced chemiluminescence of brain and liver homogenates. *Biochem. J.* 198:645-654.
- Conrath U., Pieterse C. M. J. and Mauch-Mani, B. (2002) Priming in plant-pathogen interactions. *Trends Plant Sci.* 7:210-216.
- Doke N. (1983) Involvement of superoxide anion generation in the hypersensitive response of potato tuber tissues to infection with an incompatible race of *Phytophthora infestans* and to the hyphal wall components. *Physiol. Plant Pathol.* 23:345-357.
- Doke N. (1985) NADPH-dependent O₂⁻ generation in membrane fractions isolated from wounded potato tubers inoculated with *Phytophthora infestans*. *Physiol. Plant Pathol.* 27 : 311-322.
- Doke N. (1997) The oxidative burst: roles in signal transduction and plant stress. In: *Oxidative Stress and the Molecular Biology of Antioxidant Defenses* (Scandalios J.G. ed.), pp.785-813. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Durner J., Wendehenne D. and Klessig D. F. (1998) Defense gene induction in tobacco by nitric oxide, cyclic GMP, and cyclic ADP-ribose. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95:10328-10333.
- Enkerli J., Felix G. and Boller T. (1999) The enzymatic activity of fungal xylanase is not necessary for its elicitor activity. *Plant Physiol.* 121:391-397.
- Felix G., Regenass M. and Boller T. (1993) Specific perception of subnanomolar concentrations of chitin fragments by tomato cells: induction of extracellular alkalinization, changes in protein phosphorylation, and establishment of a refractory state. *Plant J.* 4:307-316.
- Foissner L., Wendehenne D., Langebartels C. and Durner J. (2000) In vivo imaging of an elicitor-induced nitric oxide burst in tobacco. *The Plant Journal* 23:817-824.
- He D.-Y., Yazaki Y., Nishizawa Y., Takai R., Yamada K., Sakano K., Shibuya N. and Minami E. (1998) Gene activation by cytoplasmic acidification in suspension-cultured rice cells in response to the potent elicitor, *N*-acetylchitoheptaose. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 11:1167-1174.
- Heo W. D., Lee S. H., Kim M. C., Kim J. C., Chung W. S., Chun H. J., Lee K. J., Park C. Y., Park H. C., Choi J. Y. and Cho M. J. (1999) Involvement of specific calmodulin isoforms in salicylic acid-independent activation of plant disease resistance responses. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96:766-771.
- Hirasawa K., Amano T. and Shioi Y. (2005) Effects of scavengers for active oxygen species on cell death by cryptogein. *Phytochemistry* 66:463-468.
- Iyozumi H., Kato K. and 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.
- 伊代住浩幸・加藤公彦・影山智津子・稲垣栄洋・古瀬勝美・馬場康司・土屋広司 (2006) 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ブライミング効果の差異. *日植病報* 72:195-199.
- Jiang M. and Zhang J. (2002) Water stress-induced

- abscisic acid accumulation triggers the increased generation of reactive oxygen species and up-regulates the activities of antioxidant enzymes in maize leaves. *J. Exp. Bot.* 379:2401-2410.
- 影山智津子・加藤公彦・稲垣栄洋・伊代住浩幸・古瀬勝美・馬場康司・土屋広司(2004) エリシター応答発光を利用した抵抗性誘導剤の検出系に適するエリシターの選定. *日植病報* 70:242 (講要).
- Kageyama C., Kato K., Iyozumi H., Inagaki H., Yamaguchi A., Furuse K. and Baba K. (2006). Photon emissions from rice cells elicited by *N*-acetylchitooligosaccharide are generated through phospholipid signaling in close association with the production of reactive oxygen species. *Plant Physiol. Biochem.* 44:901-909.
- 影山智津子・加藤公彦・稲垣栄洋・伊代住浩幸・古瀬勝美・馬場康司(2007a) 病害抵抗性誘導物質の前処理により増強される各種エリシター応答発光の特性. *日植病報* 73:15-20.
- 影山智津子・加藤公彦・稲垣栄洋・伊代住浩幸(2007b) イネ培養細胞からのエリシター応答発光に対する過酸化水素の関与について. *日植病報* 73:300-303.
- Kai S., Mitani T. and Fujikawa M. (1994) Morphogenesis and bioluminescence in germination of red bean. *Physica A* 210:391-402.
- Kaku H., Shibuya N., Xu P., Aryan A. P. and Fincher G. B.(1997) *N*-acetylchitooligosaccharides elicit expression of a single (1 → 3)- β -glucanase gene in suspension-cultured cells from barley (*Hordeum vulgare*). *Physiol. Plantarum* 100:111-118.
- Kaku H., Nishizawa Y., Ishii-Minami N., Akimoto-Tomiya C., Dohmae N., Takio K., Minami E. and Shibuya N. (2006) Plant cells recognize chitin fragments for defense signaling through a plasma membrane receptor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103:11086-11091.
- Katz V. A., Thulke O. U. and Conrath U. (1998) A benzothiadiazole primes parsley cells for augmented elicitation of defense responses. *Plant Physiol.* 117:1333-1339.
- Kikuyama M., Kuchitsu K. and Shibuya N. (1997) Membrane depolarization induced by *N*-acetylchitooligosaccharide elicitor in suspension-cultured rice cells. *Plant Cell Physiol.* 38:902-909.
- Kohler A., Schwindling S. and Conrath U. (2002) Benzothiadiazole-induced priming for potentiated responses to pathogen infection, wounding, and infiltration of water into leaves requires the *NPRI/NJMI* gene in Arabidopsis. *Plant Physiol.* 128:1046-1056.
- 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.
- Kuchitsu K., Kosaka H., Shiga T. and Shibuya N. (1995) EPR evidence for generation of hydroxyl radical triggered by *N*-acetylchitooligosaccharide elicitor and a protein phosphatase inhibitor in suspension-cultured rice cells. *Protoplasma* 188:138-142.
- Kuchitsu K., Yazaki Y., Sakano K. and Shibuya N. (1997) Transient cytoplasmic pH change and ion fluxes through the plasma membrane in suspension-cultured rice cells triggered by *N*-acetylchitooligosaccharide elicitor. *Plant Cell Physiol.* 38:1012-1018.
- Lotan T. and Fluhr R. (1990). Xylanase, a novel elicitor of pathogenesis-related proteins in tobacco, uses a non-ethylene pathway for induction. *Plant Physiol.* 93:811-817.
- 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.
- Manandhar H.K., Jorgensen H.J.L., Mathur S.B. and Smedegaard-Petersen V. (1998) Resistance to rice blast induced by ferric chloride, di-potassium hydrogen phosphate and salicylic acid. *Crop Prot.* 17:323-329.
- Midoh N. and Iwata M. (1996) Cloning and characterization of a probenazole-inducible gene for an intracellular pathogenesis-related protein in rice. *Plant Cell Physiol.* 37:9-18.
- 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.
- Mithöfer A., Ebel J., Bhagwat A. A., Boller T. and Neuhaus-Url G. (1999) Transgenic aequorin monitors

- cytosolic calcium transients in soybean cells challenged with β -glucan or chitin elicitors. *Planta* 207:566-574.
- Miyazawa T. and Kaneda T. (1981) Extra-week chemiluminescence of organ homogenate and blood in tocopherol-deficient rats. *J. Nutr. Sci. Vitaminol.* 27:415-423.
- 宮沢陽夫 (1989) 極微弱化学発光検出による生体遊離基反応の追究と超微量過酸化脂質定量システムの開発. *Nippon Nogeikagaku Kaishi* 63:159-166.
- Mori I. C., Pinontoan R., Kawano T. and Muto S. (2001) Involvement of superoxide generation in salicylic acid-induced stomatal closure in *Vicia faba*. *Plant Cell Physiol.* 42:1383-1388.
- Murashige T. and Skoog F. (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. *Physiol. Plant.* 15:473-497.
- Nishizawa Y., Kawakami 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.
- 大矢智幸・倉重秀昭・甲斐昌一 (1998) 環境ストレスと植物の生態成長 - 光学的手法によるイオンストレスの早期検出 -. *九州大学工学集報* 71:575 - 581.
- Ohya T., Kurashige H., Okabe H. and Kai S. (2000) Early detection of salt stress damage by biophotons in red bean seedling. *Jpn. J. Appl. Phys.* 39:3696-3700.
- 大矢智幸・吉田敏・川端龍三・岡部弘高・甲斐昌一 (2000) 環境ストレスと植物の生態成長 - 光学的手法による乾燥傷害の早期検出 -. *九州大学工学集報* 73:25-31.
- Pavlica M., Papes D. and Nagy B. (1991) 2,4-Dichlorophenoxyacetic acid causes chromatin and chromosome abnormalities in plant cells and mutation in cultured mammalian cells. *Mutat Res.* 263:77-81.
- Rakwal R., Tomogami S. and Kodama O. (1996) Role of jasmonic acid as a signaling molecule in copper chloride-elicited rice phytoalexin production. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 60:1046-1048.
- Raz V. and Fluhr R. (1992) Calcium requirement for ethylene-dependent responses. *Plant Cell* 4:1123-1130.
- Sanchez L. M., Doke N. and Kawakita K. (1993) Elicitor-induced chemiluminescence in cell suspension cultures of tomato, sweet pepper and tobacco plants and its inhibition by suppressors from *Phytophthora* spp. *Plant Sci.* 88:141-148.
- Sato T., Inaba H., Kawai K., Furukawa H., Hirono, I. and Miyazawa T. (1991) Low-level chemiluminescence from *Drosophila melanogaster* fed with chemical mutagens polycyclic aromatic hydrocarbon quinones and a carcinogenic bracken fern. *Mutat. Res.* 251:91-97.
- Schwacke R. and Hager A. (1992) Fungal elicitors induce a transient release of active oxygen species from cultured spruce cells that is dependent on Ca^{2+} and protein-kinase activity. *Planta* 187:136-141.
- Shibuya N. and Minami E. (2001) Oligosaccharide signalling for defence responses in plant. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 59:223-233.
- Uchimiya H. and Murashige T. (1974) Evaluation of parameters in the isolation of viable protoplasts from cultured tobacco cells. *Plant Physiol.* 54:936-944.
- Umemura K., Ogawa N., Koga J., Iwata M. and Usami H. (2002) Elicitor activity of cerebroside, a sphingolipid elicitor, in cell suspension cultures of rice. *Plant Cell Physiol.* 43:778-784.
- Xiaojie X., Xiangyang H., Neill S.J., Jianying F. and Weiming C. (2005) Fungal elicitor induces singlet oxygen generation, ethylene release and saponin synthesis in cultured cells of *Panax ginseng* C. A. Meyer. *Plant Cell Physiol.* 46:947-954.
- Xu H. and Heath M. C. (1998) Role of calcium in signal transduction during the hypersensitive response caused by basidiospore-derived infection of the cowpea rust fungus. *Plant Cell*, 10:585-597.
- Yamada A., Shibuya N., Kodama O. and Akatsuka T. (1993) Induction of phytoalexin formation in suspension-cultured rice cells by *N*-acetylchitooligosaccharides. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* 57:405-409.
- Yamaguchi T., Minami E. and Shibuya N. (2003) Activation of phospholipases by *N*-acetylchitooligosaccharide elicitor in suspension-cultured rice cells mediates reactive oxygen generation. *Physiol. Plant.* 118:361-370.
- Yamaguchi T., Minami E., Ueki J. and Shibuya N. (2005)

- Elicitor-induced activation of phospholipases plays an important role for the induction of defense responses in suspension-cultured rice cells. *Plant Cell Physiol.* 46:579-587.
- Yoshinaga N., Kato K., Kageyama C., Fujisaki K., Nishida R. and Mori N. (2006). Ultraweak photon emission from herbivory-injured maize plants. *Naturwissenschaften.* 93:38-41.
- Zhao J. and Sakai K. (2003) Multiple signalling pathways mediate fungal elicitor-induced β -thujaplicin biosynthesis in *Cupressus lusitanica* cell cultures. *J. Exp. Bot.* 54:647-656.

平成20年12月25日 印刷

平成20年12月25日 発行

〒438-0803 静岡県磐田市富丘 678 の 1

編集兼
発行者

静岡県農林技術研究所

電話 (0538) 35-7211

静岡市清水区天神 2-2-20

印刷所

松本印刷株式会社

電話 (054) 361-0588