

令和元年6月21日現在

機関番号：82105

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07798

研究課題名(和文) サクラ類こぶ病に対する抵抗性を光で誘導する条件と生理的メカニズムの解明

研究課題名(英文) Elucidation of detailed condition and physiological mechanism of light induced resistance to bacterial gall disease in cherry tree

研究代表者

石原 誠 (Ishihara, Makoto)

国立研究開発法人森林研究・整備機構・森林総合研究所・主任研究員 等

研究者番号：90353581

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：抵抗性の誘導条件について、サクラに紫外光を付加的に照射することによって強い抵抗性が発揮されることが分かった。生理的メカニズムについて、強光下増生組織と細胞壊死範囲が縮小し、組織内細菌数も減少したことから、過敏細胞死が起こって感染の拡大が封じ込められていると推定された。阻害剤処理によって光合成が抵抗性の発揮に必要であり、新規のタンパク合成は増生組織の形成に必要であることが分かった。光照射と菌接種に関連してサリチル酸合成遺伝子や、感染特異的タンパク質遺伝子群の転写は促進されず、サリチル酸伝達は関与していなかった。ジャスモン酸処理による抵抗性の発現が確認され、ジャスモン酸伝達の寄与が考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

木本植物の細菌性こぶ病に対して「光」による誘導抵抗性現象が存在すること、また、その現象の詳細条件やメカニズムの一端を解明できたことは、前例がほとんどなく、評価に値する。このことは、現実に光が不足しがちな自然条件下における自生サクラの保全や、植栽サクラの健全な管理育成に向けて重要な示唆を与えるものである。学術的にも、半活物寄生性菌に対する光誘導抵抗性にジャスモン酸が寄与することや、UVB領域の紫外光が作用することが明らかになったことは目新しく、木本植物では初となるプラントアクチベーター開発への端緒を開くものである。

研究成果の概要(英文)：With regard to induction condition of resistance, it has been found that strong resistance is exhibited by the additional irradiation of ultraviolet light. With regard to the physiological mechanism, under strong light condition, the area of hyperplastic tissue and necrotic cells both decreased, and the number of bacteria in the tissue decreased as demonstrating that hypersensitive cell death occurred and the containment of bacteria was succeeded. It was found that by inhibitor treatment, photosynthesis contributes to the development of resistance. We considered that salicylic acid pathway did not work because transcription of salicylic acid biosynthesis genes and some pathogen-related protein genes was not promoted in relation to light irradiation and bacterial inoculation. The development of resistance by jasmonic acid treatment confirmed. It was clarified that the signal pathway by jasmonic acid contributes to the light-induced resistance.

研究分野：植物病理学 森林科学 植物生理学

キーワード：光誘導抵抗性 ‘染井吉野’ サクラ類こぶ病 紫外光 組織解剖 阻害剤 光合成 ジャスモン酸

## 1. 研究開始当初の背景

「サクラ類こぶ病」はシュードモナス属細菌の感染によって起こされ、栽培品種‘染井吉野’の枝上に球状のこぶ病巣を多数形成する病気とされているが、実際のこぶ病の被害は自生するヤマザクラに集中し、植栽された‘染井吉野’はあまり罹患しないことから、抵抗性を有すると考えられた。ところが、抵抗性と思われた‘染井吉野’でも、野外でこぶ病菌を接種すると発病しないが、施設内で接種するとこぶを形成することから、強い光を受けることで、サクラはこぶ病への抵抗性を発揮すると考えられた。後の予備的実験により、この抵抗性は摘葉すると失われること、また、光の強さだけでなく、光質を変えた時でも抵抗性が強くなることから、抵抗性要因として光合成および同化産物の影響と共に、高エネルギーの光が非生物的なストレス刺激として葉に作用することで、葉から何らかのシグナルが伝達され、全身または病患部に抵抗性が誘導されたとの仮説が立てられた。

## 2. 研究の目的

‘染井吉野’は野外環境下において、こぶ病の発病が抑制されることから、こぶ病に対する抵抗性が「光」によって誘導されていると考えられる。本応募課題では、‘染井吉野’の挿木、接ぎ木によるクローン苗を供試し、人工気象室の照明下でこぶ病菌の接種を行うような、コンパクトかつ再現性の高い実験系を用いることで、発現する病徴の過程を詳細に分析・観察し、サクラ類こぶ病における「光」による抵抗性誘導現象について、詳細な誘導条件とその生理的メカニズムを解明する。この解明によって樹木類の病気では今まで試みられなかった光による誘導抵抗性研究の先駆けとする。

## 3. 研究の方法

### (1) こぶ病誘導条件の詳細解明

#### ①抵抗性誘導条件

‘染井吉野’を対象樹種にして、光合成および同化産物の影響という観点から、光の事前照射による順化処理の必要性、光源特性、枝の成熟度などの関連因子の影響について条件を変えながら人工気象室内で接種試験を行い、抵抗性を誘導するための最適条件を検討した。また、野外で光条件のそれぞれに異なる‘染井吉野’の当年生枝に接種試験を行って、野外条件下で実際に抵抗性誘導が発現するかについても確かめて、メカニズム解明に向けた実験への準備とした。

#### ②高エネルギー光関与の可能性

ガラス温室内での抵抗性の低下現象から、紫外光の関与を疑い、人工光（白色光）に付加する形で、各波長の紫外光（wideband, narrow band の各 UVA と UVB）の照射を太陽光レベルの強度で行い、青色光を上回るこれらの高エネルギー光を照射した際に、抵抗性が誘導されるか、実験的に確かめた。

### (2)生理的メカニズムの解明

#### ①挿し木クローン苗を用いたコンパクト実験系の確立

既存の研究では、受光部位と罹病部位が同一組織で起きる葉枯病を対象に、シャーレ内の切葉で接種と光照射実験がなされてきた。こぶ病の場合はこれと異なり、葉と離れた枝上のこぶ病組織で抵抗性の発現を観察しなければならない。多年生実生苗を使用する場合、光照射は枝葉を多く持つ苗全体に及び、照射量の均一化や葉量等の苗の受光態勢、実生苗の遺伝的感受性を一定に保つことなどに困難が予想された。そこで、抵抗性を有する‘染井吉野’を供試植物として、切枝の挿し木クローン苗と光を制御可能な人工気象室を用いるコンパクトな実験系を構築し、条件を整えて実験を行うことを着想した。すなわち、挿し木発根苗の作成を試み、人工気象室内で2年生接ぎ木苗同様、抵抗性が発現されるか確かめた。

#### ②抵抗性誘導時の病患部の観察

抵抗性誘導時の病患部の変化について、採取した病患部標本を固定後、パラフィン包埋切片を作成してサフラニン・ファストグリーン<sup>®</sup>の2重染色法にて組織変化を検鏡観察した。同時に走査型電子顕微鏡を用いて、病患部断面や表面の変化を観察した。

#### ③阻害剤処理下における抵抗性誘導実験

光が光受容体を介して作用する場合、光受容体から何らかのシグナルが病患部（または全身）へ伝達され、感染組織に作用して防御応答を強めると考えられる。一方で、光合成による同化産物が過敏感反応死など迅速な防御応答に利用される場合も考えられる。シクロヘキシミド（タンパク合成阻害剤）、DCMU（光合成阻害剤）などの阻害剤と、抵抗性誘導に関与するとされる植物ホルモン類（サリチル酸、ジャスモン酸）を茎葉に噴霧処理しながら、光抑制下の接種試験を行って抵抗性誘導の発現（こぶの肥大率等）を調べることで、シグナル伝達機構や光合成による同化産物利用の関与について検討した。

#### ④遺伝子発現解析に基づく防御応答とシグナル伝達による抵抗性発現の検証

‘染井吉野’の枝から全 RNA を効率よく抽出できる条件の検討を行った。検討条件は、基本的に樹木葉で一般的に採用されている CTAB 法であるが、試料の破碎条件として乳鉢乳棒を用いて液体窒素下で粉碎する方法と、ブドウの枝で考案された方法で、抽出バッファーをサンドペーパー上に置いて生枝を摩砕してから抽出する方法の2つであった。

遺伝子発現解析では、研究項目(1)で確立した実験系を利用して、光の事前照射量の異なる接

ぎ木クローン苗を材料に、こぶ病菌の接種に対するサリチル酸合成関連遺伝子ならびに感染特異的タンパク質遺伝子群の発現解析を行った。材料は、当年生枝に物理的な傷をあて、速やかにこぶ病菌を接種した (n=3)。接種後 1 日目に試料を採取して凍結保存した。全 RNA の抽出は CTAB 法で行った。mRNA 量の定量は、量的リアルタイム PCR 法で行った。解析を行った遺伝子は、サリチル酸の合成経路にある酵素遺伝子 *ICS1*、および感染特異的タンパク質遺伝子である *PR1*、*PR2*、*PR3*、*PR5* であり、リファレンス遺伝子は *EIF-1A* であった。プライマーの設計には、‘染井吉野’のゲノム公開データベース (DBcherry, <http://cherry.kazusa.or.jp/>) にある塩基配列を用いた。目的遺伝子の塩基配列の選抜には、シロイヌナズナ (Tair, <https://www.arabidopsis.org/>) の各遺伝子のアミノ酸配列を基準にして、‘染井吉野’のデータベースから BlastP を用いて対立遺伝子の配列が異なる可能性や遺伝子重複の可能性を考慮しながら選抜した。プライマーの設計には Primer3 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>) を用いた。

#### 4. 研究成果

##### (1) こぶ病誘導条件の詳細説明

###### ① 抵抗性誘導条件

光源の違いについて検討した結果、ピーク波長で構成される LED 光源に比べて帯域的な分光特性を持つ従来型の蛍光管の方が、より少ない光量で抵抗性を発揮する点で優れること、事前の光照射による順化处理の効果は明瞭ではなく、実験手法上必ずしも行う必要がないこと、同じ当年生枝でも、未熟な緑枝では、抵抗性の発現が弱い傾向にあることなど、光合成エネルギーの利用や光受容体の関与など、誘導条件の解明に有用な知見が得られた。また、野外植栽‘染井吉野’の光条件の異なる当年生枝へのこぶ病菌の接種試験によって、日陰条件下の枝のこぶ肥大率の増大が観察されたことから、野外条件下においても、こぶ病に対する光誘導抵抗性現象が実際に起きていることが確認された。

###### ② 高エネルギー光関与の可能性

人工気象室内で‘染井吉野’苗に対して紫外光を付加照射しながら、こぶ病菌を接種して発現する病徴を計測した結果、紫外光の付加照射によってより強い抵抗性が発揮されること、野外環境下の‘染井吉野’の抵抗性を再現するためには、可視光が一定強度以上必要であり、これに加えて紫外光も必要であることが分かった。紫外光では narrow band UVB 領域の紫外光が最も効果が優れ、解剖観察においても病巣組織、細胞の壊死範囲共に縮小したことから、抵抗性がより強く現れており、サクラこぶ病に対する光誘導抵抗性に紫外光が寄与していることが分かった。一方で、UVA 領域と UVB 領域の紫外光を個別に総時間として長く照射した場合、接種部位が大きく肥大し、発現されるはずの抵抗性を喪失する現象が認められた。このことは、紫外光がストレス刺激として作用しており、過剰な紫外光が‘染井吉野’のこぶ病への抵抗性を崩壊に導いている可能性を示している (図-1)。

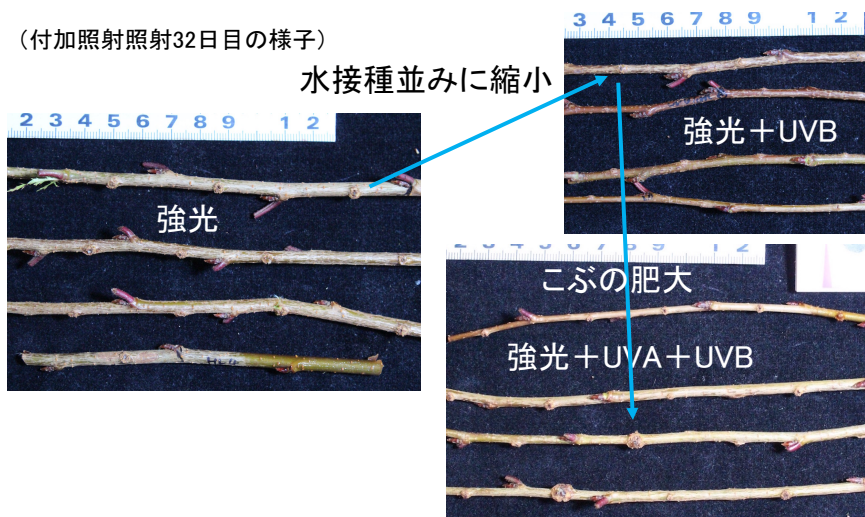


図-1. 強光下での紫外光付加照射による接種部位の変化

##### (2) 生理的メカニズムの解明

###### ① 挿し木クローン苗を用いたコンパクト実験系の確立

挿し木発根苗の作成を試み、接ぎ木 2 年生苗同様、光照射下で抵抗性が発現するか確かめた。その結果、‘染井吉野’挿し穂の発根は発根促進剤の処理と、緑枝をミスト挿しすることで達成されるが、オオヤマザクラに比べて育成温度を高く保った方が、発根と芽の伸長が共に良好であり、狭い人工気象室で光量管理下の接種試験を行うのに適した、コンパクトで且つ、必要な枝長と葉数を持つ供試苗の短期間での準備が可能となった。作成した挿し木苗は、強い光条件下でこぶ病

菌を接種したところ、こぶ病徴が縮小する傾向があったことから、抵抗性が発現していることが確認されたが、その程度は接ぎ木2年生苗の方が明瞭であったことから、以後の実験では接ぎ木苗を供試することとなった。

### ②抵抗性誘導時の罹病組織変化の観察

人工気象室内で‘染井吉野’接ぎ木苗にこぶ病菌を接種した後、高、中間、弱強度の異なる白色光下または、中間強度の青色光下で生じた病患部の解剖学的観察を実施した。中間または弱い強度の白色光下で生じたこぶ病患部の大きさは、高強度の白色光下や中間の強度の青色光下のそれらよりも大きく、前者では接種部以外の枝組織全体に細胞の壊死が広がり、また、こぶの肥大につれ、カルス化細胞数も増大した。これに対して後者では、組織の壊死が接種部とその周辺に限定され、こぶの大きさも小さくなり、組織中の細菌数も減少していた。後者で細胞の壊死が広がらなかったのは、過敏細胞死が起こって、病原細菌の封じ込めに成功し、病巣が拡大できなかったと考えられる。異なる光強度、光質でこのような違いが生じたことから、光条件が本病の発生とこぶの発達に大きく影響していることが、改めて示された。

### ③阻害剤処理下における抵抗性誘導実験

生理的メカニズムについて、既知の阻害剤や抵抗性誘導剤の処理をしながら、光照射下での接種試験を行って解明を試みた。光合成阻害剤DCMU処理による抵抗性の低下がこぶの肥大として強光、弱光の両条件下で現れ、光合成反応および同化産物の利用が抵抗性の発揮に必要なと考えられた。一方で、タンパク合成阻害剤シクロヘキシミドの処理ではこぶ肥大率の弱光下の値が低下し、強光、弱光の両条件下の差は縮小した(表-1)。従って、宿主内での増生組織の形成(感受性の発現)に新規のタンパク合成が必要と考えられ、その影響もあって、光誘導抵抗性への関与は判然としなかった。その後行った抵抗性誘導剤(植物ホルモン)処理試験では、サリチル酸処理によって強光下でこぶが肥大するという負の効果が現れたことから、サリチル酸とクロストークするジャスモン酸の関与が疑われた。そこでジャスモン酸の処理を試みたところ、強光、弱光の両条件下でこぶが縮小した(図-3、4)。また、ジャスモン酸の生合成阻害剤処理によるこぶの肥大が強光、弱光の両条件下で確認されたことから、半活物寄生性のシュードモナス属細菌による増生病に対する光誘導抵抗性においては、ジャスモン酸によるシグナル伝達機構が寄与していると推定された。

表-1. 異なる強度の光照射下における、阻害剤処理に伴うこぶ肥大率の変化

	阻害剤なし		DCMU処理		Cycloheximide処理	
	弱光	強光	弱光	強光	弱光	強光
こぶ肥大率 <sup>1)</sup>	0.40	0.24	0.50	0.33	0.29	0.24
△肥大率(弱光-強光)	0.16		0.17		0.05	

1)こぶ直径/枝直径

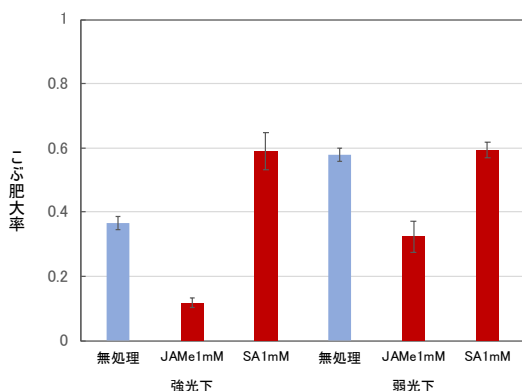


図-2. 異なる強度の光照射下における、抵抗性誘導剤処理に伴うこぶ肥大率の変化



図-3. 抵抗性誘導剤処理下における、サクラ類こぶ病菌接種部位の変化(処理量1mM,接種後15日目)

### ④遺伝子発現解析に基づく、防御応答やシグナル伝達による抵抗性発現の検証

全RNA抽出条件の検討では、一般に葉などで広く用いられている液体窒素下での乳鉢乳棒を用いて破碎する方法によって十分な抽出効率ならびに品質の全RNAを抽出することができた。サンドペーパーを利用した生枝の摩砕による抽出方法では抽出効率が低下した。

サリチル酸の生合成に関与する遺伝子 *ICS1* の mRNA 量は、いずれの処理においても検出限界に近い低いレベルであり、光前歴に関わらずこぶ病菌の接種による *ICS1* mRNA 量への影響

は認められなかった。*PR1* と *PR2* の mRNA 量は、いずれの処理においても転写が認められたが、光前歴ならびにこぶ病菌の接種による mRNA 量への影響は認められなかった。*PR3* と *PR5* の mRNA 量は、いずれの処理においても検出限界に近い低いレベルであり、光前歴に関わらずこぶ病菌の接種による *PR3* と *PR5* の mRNA 量への影響は認められなかった。以上の結果から、‘染井吉野’のこぶ病菌に対する抵抗性発現において *ICSI* 遺伝子の発現調節を介したサリチル酸経路は作用していないと考えられた。また *PR1*, *PR2*, *PR3*, *PR5* の遺伝子群には、‘染井吉野’こぶ病に対する抵抗性発現に関与する遺伝子が認められなかった。*PR1* と *PR2* の 2 つの遺伝子については、処理条件にかかわらず転写していたが、その理由はこぶ病菌の接種の際の物理的損傷に対する応答であった可能性もしくは恒常的発現の可能性が考えられた。

## 5. 主な発表論文等

〔学会発表〕（計 4 件）

- (1) Makoto Ishihara, Syuntarou Nishi, Misaki Okuda, Takefumi Ikeda, Light induced resistance to bacterial gall disease caused by *Pseudomonas syringae* pv. *cerasicola* in cherry tree (*Cerasus* × *yedoensis*), International Conference of Plant Pathology 2018.8, (Boston, USA)
- (2) 石原 誠、西井俊太郎、池田武文、市原優、サクラ類こぶ病菌の病徴発現に及ぼす紫外線の付加照射の影響、平成31年度日本植物病理学会大会、2019.3（つくば市）
- (3) 石原 誠、西井俊太郎、池田武文、紫外線によるソメイヨシノこぶ病の発病抑制効果、第129回日本森林学会大、2018.3（高知市）
- (4) 石原 誠、ソメイヨシノコンパクト苗の作出と、コンパクト苗を用いたサクラ類こぶ病に対する抵抗性崩壊の再現、第128回日本森林学会大会、2017.3（鹿児島市）

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

石原 誠 (Ishihara, Makoto)  
森林総合研究所・北海道支所・主任研究員  
研究者番号: 90353581

### (2) 研究分担者

斎藤秀之 (Saito, Hideyuki)  
北海道大学・農学院・講師  
研究者番号: 70312395

### (3) 研究協力者

市原 優 (Ichihara, Yu)  
奥田 岬 (Okuda, Misaki)  
西井 俊太郎 (Nishi, Syuntaro)  
中村 友美 (Nakamura, Tomomi)

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。