

平成 22 年 5 月 28 日現在

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2007～2009

課題番号：19580162

研究課題名（和文） 癌腫病菌カバノアナタケに感染したシラカンバ植物体における全身獲得抵抗性機構の解明

研究課題名（英文） Clarifying the mechanism on systemic acquired resistance in Japanese birch plants infected with a canker-rot fungus, *Inonotus obliquus*

研究代表者

横田 信三 (YOKOTA SHINSO)

宇都宮大学・農学部・准教授

研究者番号：60210613

研究成果の概要（和文）：カンバ類の癌腫病菌であるカバノアナタケ IO-U1 株に感染したシラカンバ幼植物体 No.8 に生成する、感染初期における菌感染特異的タンパク質の検出・同定を行った。その結果、菌感染した幼植物体 No.8 において、オキシダティブバーストと全身獲得抵抗性(SAR)機構が防御反応として生じていることが判明した。また、IO-U1 株に感染した2種類の幼植物体 No.8 及び東北について、組織学・組織化学的観察を行った。その結果、菌感染した2種類の幼植物体において、フェノール性化合物の堆積とその重合物の堆積、及びスベリン化した壊死感染防御周皮の形成が、菌糸の生育を抑制していることが示唆された。続いて、ペルオキシダーゼのアイソザイム分析を行った。その結果、菌感染幼植物体においては、ペルオキシダーゼのアイソザイムが、フェノール性化合物の重合に、より特化していることが推測された。更に、全身獲得抵抗性(SAR)を誘導することが知られているサリチル酸を、幼植物体 No.8 に投与し、植物体内で SAR が生じるかどうかプロテオーム解析を用いて調べた。その結果、サリチル酸投与により、幼植物体 No.8 内に SAR が誘導されることが明らかになった。また、幼植物体 No.8 においては、カバノアナタケ菌による感染とサリチル酸投与の場合とでは、生じる抵抗性機構が異なることが示唆された。

研究成果の概要（英文）：The fungal infection specific proteins were detected and identified for the Japanese birch plantlets No.8 infected with a canker-rot fungus of birch trees, *Inonotus obliquus* IO-U1 strain at the early stage of their fungal infection. As a result, it was found that oxidative burst and systemic acquired resistance occur as the protective reactions in the plantlets No.8 infected with the fungus. In addition, anatomical and histochemical observations were performed for the two kinds of plantlets, No.8 and Tohoku, infected with IO-U1 strain. Consequently, it was suggested that deposition of phenolic compounds and their polymerized substance, and the formation of suberized necrophylactic periderm inhibit the growth of the fungal hyphae in the two kinds of plantlets infected with the fungus. Furthermore, isozyme analysis of the peroxidases produced in the plantlets No.8 was carried out. In consequence, it was indicated that the peroxidase isozymes of the infected plantlets are specialized for polymerization of phenolic compounds. Moreover, it was investigated by using proteome analysis whether systemic acquired resistance (SAR) occurs in the plantlets No.8 to which the SAR-inducing compound, salicylic acid was artificially administered. As a result, it was indicated that administration of salicylic acid to the plantlets No.8 induces SAR in the plantlets. In addition, it was suggested that the occurring resistance mechanisms are different between the case of the fungal infection and that of administration of salicylic acid to the plantlets.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	700,000	210,000	910,000
2008年度	800,000	240,000	1,040,000
2009年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	2,300,000	690,000	2,990,000

研究分野：森林化学

科研費の分科・細目：森林学・森林科学

キーワード：カバノアナタケ、シラカンバ、プロテオーム、樹病、サリチル酸、全身獲得抵抗性、フェノール性化合物、ペルオキシダーゼ

1. 研究開始当初の背景

(1) 全身獲得抵抗性(SAR)は、病原体感染に対する植物の抵抗性であり、病原体に侵された宿主植物細胞の自殺(過敏感反応)によって植物全体に誘導される。また、SARに伴って、PR(感染特異的)タンパク質が誘導される。PRタンパク質は17族に分類されており、タバコでは30種類以上のPRタンパク質が確認されている。過敏感反応によって病斑が形成されるのに伴い、サリチル酸、エチレン、ジャスモン酸などの様々な二次代謝産物の生成が誘導される。これらの内、サリチル酸はSARを誘導する物質と考えられている。また最近、lipid transfer proteinと相同性の高いタンパク質がlipid-basedシグナル分子を生成し、この分子がSARの移動シグナルとして作用していることが示唆されている。更に、SARの誘導に伴って活性酸素種が生成し、positive regulator protein NPR1が、防御遺伝子の発現を誘導することが明らかになっている。

(2) 植物に人為的にSAR誘導化合物、例えばアスピリンを投与した場合、PRタンパク質の生成及び病原菌に対するSARが誘導される。この様に、植物に人為的にSARを誘導することが可能になれば、作物などの新たな防疫システムとして利用することが可能となる。実際に、その例としてacibenzolar-S-methylが使用されている。

(3) これまで筆者が行って来た研究において、カンバ類の癌腫病菌カバノアナタケに感染したシラカンバ幼植物体内に、菌感染初期特異的タンパク質としてオキシダティブパーオキシドに関係すると示唆された多くのタンパク質が検出されている。また、PRタンパク質、リグニンの生合成、フラボノイドの生合成、分子シャペロン、解糖系の酵素、エチ

レン前駆体の生合成、プログラム細胞死の制御、及びカルシウムイオン結合タンパク質であると示唆されたタンパク質も検出されている。更に、lipid transfer proteinと相同性の高いタンパク質の生成も示唆されている。従って、カバノアナタケに感染したシラカンバ幼植物体において、SARの誘導が生じていると予想される。

2. 研究の目的

(1) カンバ類の癌腫病菌であるカバノアナタケ IO-U1 株に感染したシラカンバ幼植物体 No.8 に生成する、感染初期における菌感染特異的タンパク質の検出・同定を行った。これにより、感染初期のシラカンバ幼植物体 No.8 が示す、防御反応機構を解明することを目的とした。

(2) カバノアナタケ IO-U1 株に感染した2種類のシラカンバ幼植物体 No.8 と東北について、組織学及び組織化学的観察を行った。これにより、2種類の幼植物体における、組織・細胞レベルでの菌感染に対する防御反応機構を解明することを目的とした。

(3) カバノアナタケ IO-U1 株に感染したシラカンバ幼植物体 No.8 に生成する、ペルオキシダーゼのアイソザイム分析を行った。これにより、菌感染特異的なペルオキシダーゼの検出と、その特性を明らかにすることを目的とした。

(4) SAR誘導化合物であるサリチル酸を、シラカンバ幼植物体 No.8 に人為的に投与し、幼植物体内でSARが生じるかどうか、プロテオーム解析手法を用いて調べた。これにより、シラカンバ幼植物体のSAR機構を分子レベルで解明することを目的とした。

において、フェノール性化合物の堆積とその重合物の堆積、厚壁細胞の発達及びスベリン化した NP の形成が、菌糸の成長を抑制しているものと考えられる。本研究で得られたこれらの成果は、草本類では以前から知られているが、樹木については殆ど知見がない。従って、これらの成果は、国内外的にみて重要性の高いものである。今後、フェノール性化合物及びその重合物の同定、ペルオキシダーゼの特性解明を行う予定である。

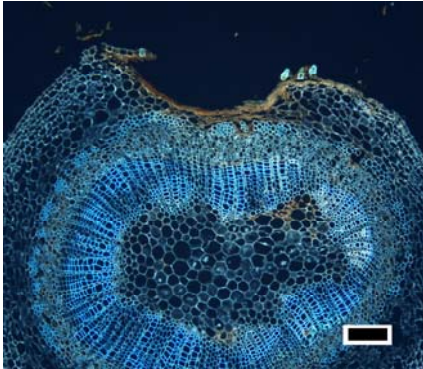


図2 幼植物体 No. 8 における 2 日目 T の蛍光顕微鏡写真

(3) カバノアナタケ IO-U1 株に感染したシラカンバ幼植物体 No. 8 に生成する、ペルオキシダーゼのアイソザイム分析を行った。その結果、T において、C1 及び C2 で見られた塩基性域の 3 つのバンドが消失していた (図 3)。塩基性ペルオキシダーゼは、リグニンの生合成においてシリングルモノマーの重合に関与していると考えられている。従って、T においては、ペルオキシダーゼのアイソザイムが、フェノール性化合物の重合により特化したのではないかと推測される。今後、このペルオキシダーゼ・アイソザイムを等電点電気泳動ゲルから切り出して抽出し、その特性を明らかにする予定である。

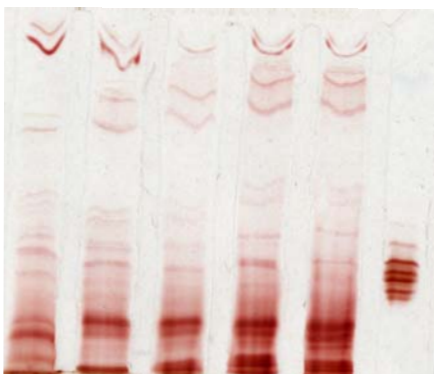


図3 ペルオキシダーゼ・アイソザイム・パターン

(4) SAR 誘導化合物であるサリチル酸を、シラカンバ幼植物体 No. 8 に人為的に投与し、

幼植物体内で SAR が生じるかどうか、プロテオーム解析手法を用いて調べた。二次元電気泳動後のゲルを画像解析した結果、C1 では 17 個、C2 では 9 個、T では 20 個、それぞれ特異的なスポットが検出された。T に特異的なタンパク質を MALDI-TOF-MS 分析した結果、8 種類のタンパク質 (non-expressor of pathogenesis related 1 (NPR1)-like protein; predicted protein; hypothetical protein; oxygen evolving enhancer protein 2 (OEE2); hypothetical or unknown protein; *Cerotodon purpureus* phytochrome photoreceptor CERPU; PHY0; 2 (CpPHY2); unknown protein; MADS-domain transcription factor (MADSdtf)) を同定した。NPR1-like protein は、NPR1 と同様に核内に移行して転写因子 TGA に作用し、PR 遺伝子発現を誘導すると考えられる。OEE2 は、抗菌性二次代謝産物の生合成及び SAR を誘導すると思われる。CpPHY2 も、SAR を誘導する可能性が考えられる。MADSdtf は、何らかのタンパク質発現を調節し、抵抗性を誘導していると予想される。これらの結果から、サリチル酸投与により、シラカンバ幼植物体 No. 8 内に SAR が誘導されることが明らかになった。これらの得られた結果は、草本類ではこれまでに多数報告されているが、樹木に関しては殆どない。従って、これらの成果は、世界的にみても高く評価されるものである。

幼植物体 No. 8 においては、カバノアナタケ菌による感染とサリチル酸投与の場合とでは、得られた二次元電気泳動パターン及び同定された特異的なタンパク質の種類が異なっていた。従って、これら 2 つの場合では、生じる抵抗性機構が異なることが示唆された。今後、これらの抵抗性機構の相違点を更に詳細に解明して行くつもりである。

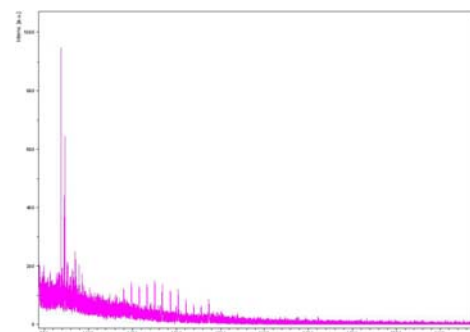


図4 NPR1-like protein の MALDI-TOF マススペクトル

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 1 件)

① M.M. Rahman, F. Ishiguri, Y. Takashima, M.A.K. Azad, K. Iizuka, N. Yoshizawa, S. Yokota, Anatomical and histochemical characteristics of Japanese birch (Tohoku) plantlets infected with the *Inonotus obliquus* IO-U1 strain. Plant Biotechnology, 査読有, 25 (2008) 183-189

〔学会発表〕 (計 18 件)

- ① 鈴木美帆、高島有哉、石栗太、飯塚和也、吉澤伸夫、横田信三、シラカンバNo.8 幼植物体内におけるカバノアナタケ菌IO-U1 株の菌糸伸長過程と防御反応の関係. 平成 22 年度日本植物病理学会大会、2010 年 4 月 19 日、京都市、国立京都国際会館
- ② 鈴木美帆、高島有哉、石栗太、飯塚和也、吉澤伸夫、横田信三、シラカンバNo.8 幼植物体におけるサリチル酸応答性タンパク質のプロテオーム解析. 平成 22 年度日本植物病理学会大会、2010 年 4 月 19 日、京都市、国立京都国際会館
- ③ 鈴木美帆、高島有哉、石栗太、飯塚和也、吉澤伸夫、横田信三、サリチル酸投与によるシラカンバ幼植物体内でのタンパク質プロファイル変化の解析. 第 60 回日本木材学会大会、2010 年 3 月 17 日、宮崎市、宮崎市民プラザ
- ④ 鈴木美帆、高島有哉、石栗太、飯塚和也、吉澤伸夫、横田信三、カバノアナタケ菌 IO-U1 株に感染したシラカンバNo.8 幼植物体における防御反応と菌糸伸長過程の関係. 第 60 回日本木材学会大会、2010 年 3 月 17 日、宮崎市、宮崎市民プラザ
- ⑤ 鈴木美帆、高島有哉、石栗太、飯塚和也、吉澤伸夫、横田信三、シラカンバNo.8 幼植物体におけるカバノアナタケ菌IO-U1 株感染部位縦断面でのフェノール性化合物の堆積及びペルオキシダーゼ活性の経時変化. 第 54 回リグニン討論会、2009 年 10 月 29 日、静岡市、静岡県男女共同参画センター
- ⑥ 鈴木美帆、高島有哉、石栗太、飯塚和也、吉澤伸夫、横田信三、フェノール性化合物の堆積及びペルオキシダーゼ活性の経時変化の観察によるカバノアナタケ菌IO-U1 株に対するシラカンバNo.8 幼植物体の防御機構の解明. 平成 21 年度日本植物病理学会関東部会、2009 年 9 月 11 日、藤沢市、日本大学生物資源学部湘南キャンパス
- ⑦ M. Suzuki, Y. Takashima, F. Ishiguri, K. Iizuka, N. Yoshizawa, S. Yokota, Accumulation of phenolic compounds and activity of peroxidase in *Betula platyphylla* var. *japonica* No.8 plantlets infected with *Inonotus obliquus* IO-U1 strain. 7th Pacific Regional Wood Anatomy Conference, 2009 年 8 月 3 日、

クアラルンプール、マレーシア

- ⑧ Y. Takashima, M. Suzuki, F. Ishiguri, K. Iizuka, N. Yoshizawa, S. Yokota, Differential protein expression and peroxidase isozyme pattern in Japanese birch No.8 plantlets infected with *Inonotus obliquus* IO-U1 strain. XIV International Congress on Molecular Plant-Microbe Interactions, 2009 年 7 月 20 日、ケベックシティ、カナダ
- ⑨ 高島有哉、M.M. Rahman、鈴木美帆、石栗太、飯塚和也、吉澤伸夫、横田信三、カバノアナタケ菌IO-U1 株に感染した 2 種類のシラカンバ幼植物体クローンにおけるフェノール性化合物の沈着とペルオキシダーゼ活性. 第 53 回リグニン討論会、2008 年 10 月 30 日、東京都文京区弥生、東京大学弥生講堂
- ⑩ M.M. Rahman, M. Suzuki, F. Ishiguri, Y. Takashima, K. Iizuka, N. Yoshizawa, S. Yokota, Defensive histochemical reactions in Japanese birch plantlets infected with *Inonotus obliquus* IO-U1 strain. 平成 20 年度日本植物病理学会関東部会、2008 年 9 月 14 日、藤沢市、日本大学生物資源学部湘南キャンパス
- ⑪ S. Yokota, Y. Takashima, F. Ishiguri, K. Iizuka, N. Yoshizawa, Proteome analysis of infection-specific proteins formed in Japanese birch plantlets by infection of *Inonotus obliquus*. 9th International Congress of Plant Pathology, 2008 年 8 月 25~28 日、トリノ、イタリア
- ⑫ S. Yokota, M.M. Rahman, F. Ishiguri, Y. Takashima, M. Satoh, K. Iizuka, N. Yoshizawa, Peroxidase activity and phenolics deposition in Japanese birch plantlets (Tohoku) infected with *Inonotus obliquus* IO-U1 strain. 8th International Peroxidase Symposium, 2008 年 8 月 20~23 日、タンペーレ、フィンランド
- ⑬ S. Yokota, M.M. Rahman, M. Satoh, F. Ishiguri, Y. Takashima, K. Iizuka, N. Yoshizawa, Anatomical and histochemical characteristics of Japanese birch Tohoku and No.8 plantlets infected with *Inonotus obliquus* IO-U1 strain. XVI Congress of the Federation of European Societies of Plant Biology, 2008 年 8 月 17~22 日、タンペーレ、フィンランド
- ⑭ 高島有哉、M.M. Rahman、石栗太、飯塚和也、吉澤伸夫、横田信三、カバノアナタケ菌IO-U1 株に感染したシラカンバ幼植物体No.8 における菌感染特異的タンパク質出のプロテオーム解析. 平成 20 年度日本

植物病理学会大会、2008年4月28日、松江市、くにびきメッセ

- ⑮ M.M. Rahman, F. Ishiguri, Y. Takashima, M. Satoh, K. Iizuka, N. Yoshizawa, S. Yokota, Histochemical reactions in Japanese birch plantlets infected with the *Inonotus obliquus* IO-U1 strain. 平成20年度日本植物病理学会大会、2008年4月28日、松江市、くにびきメッセ
- ⑯ Y. Takashima, M.M. Rahman, F. Ishiguri, K. Iizuka, N. Yoshizawa, S. Yokota, Proteome analysis of infection specific proteins from Japanese birch (*Betula platyphylla* var. *japonica* No.8) plantlets infected with *Inonotus obliquus* IO-U1 strain. International Symposium on Frontier in Plant Proteome Research, 2008年3月10日、つくば市、つくば農林ホール
- ⑰ M.M. Rahman, F. Ishiguri, Y. Takashima, M. Satoh, M.A.K. Azad, K. Iizuka, N. Yoshizawa, S. Yokota, Lignin deposition and peroxidase activity in Japanese birch plantlets (Tohoku) infected with *Inonotus obliquus* IO-U1 strain. 第52回リグニン討論会、2007年11月14日、宇都宮市、宇都宮大学・大学会館
- ⑱ M.M. Rahman、石栗太、高島有哉、M.A.K. Azad、飯塚和也、吉澤伸夫、横田信三、Histochemical changes in Japanese birch (Tohoku) plantlets infected with the *Inonotus obliquus* IO-U1 strain. 平成19年度日本植物病理学会関東部会、2007年9月13日、厚木市、東京農業大学農学部

6. 研究組織

(1) 研究代表者

横田 信三 (YOKOTA SHINSO)
宇都宮大学・農学部・准教授
研究者番号：60210613