

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 27 日現在

機関番号：12101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24580035

研究課題名(和文) 熱ショックが園芸作物に誘導する抗菌反応のメカニズム解明

研究課題名(英文) Mechanism identification of antifungal reaction induced by heat shock in horticultural crops

研究代表者

佐藤 達雄 (Sato, Tatsuo)

茨城大学・農学部・准教授

研究者番号：20451669

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では作物に熱ショック処理を施すことにより病害に対する抵抗性が誘導できることを明らかにし、Heat shock-induced resistance (HSIR)と命名した。HSIRは少なくともサリチル酸の集積や熱ショックタンパク質、熱ショック転写因子によって発現が誘導・制御される独立した複数のシグナル伝達系から成る。その抵抗性は多面的な抗菌反応の相加的効果によって作用すると考えられる。

研究成果の概要(英文)：In this study, it was clarified that heat shock treatment induced disease resistance against pathogens. This mode of action was named as "Heat shock-induced resistance" (HSIR). HSIR involved some independent signaling pathway regulated by accumulation of salicylic acid, heat shock proteins and heat shock transcriptional factors, and so on. It was suggested that this resistance includes additive effect of multifaceted antifungal reaction.

研究分野：園芸学

キーワード：植物免疫 熱ショック 獲得抵抗性 ストレス交差耐性 抗菌物質

## 1. 研究開始当初の背景

### (1) 研究開始までの取り組み

ここでは園芸作物を数時間から数秒、生育限界温度を超える場合も含むような高温に遭遇させる処理を「熱ショック処理」と呼ぶ。課題提案者らはこれまで様々な作物に対して温湯浸漬や内気温管理などで熱ショック処理を行うことにより作物に多面的な生理的变化を誘導できることを明らかにしてきた。その結果、本来、高温ストレスに対する耐性が弱い作物にも高温耐性を付与できること、葉菜類の成分、品質を改変できること、作物の獲得免疫を活性化させ、病害抵抗性を誘導できることを明らかにした。さらに、で誘導される病害抵抗性については全身獲得抵抗性(Systemic Acquired Resistance; SAR)のメカニズムが関与していることも解明したが、SARでは説明不可能な現象も見いだした。例えば、SARにより発現した抵抗性は一般に長時間持続するとされているのに対し熱ショックにより誘導された抵抗性は数日で消失すること、灰色かび病のようなSARの効果が現れにくい腐生性病害に対しても抵抗性が得られること、SARのシグナル伝達に関わるサリチル酸の集積よりも先に抵抗性が誘導されることなどである。熱ショックにより、サリチル酸集積量は数日のスパンで上下動を繰り返すことが多くの作物で認められており、フィードバック機構や複数の反応が並列的に起こる可能性が示唆されている。また、SARのマーカータンパク質として利用されているPRタンパク質遺伝子の中には開始コドン上流に熱ショックエレメントと推定される領域があり、SAR以外のシステムで発現する可能性が示唆されている。感染防御機構についても、サリチル酸やテルペン類などの低分子からタンパク質など高分子までの様々な物質がこれに関わっていることが明らかになっている。

一方、実用面において、当グループは温湯を用いた熱ショック処理の実用技術の開発に取り組んできた。その結果、キュウリやイチゴなどで温湯を植物体に散布し、植物体の一部分を数十秒間、50程度に保つことによってうどんこ病や炭疽病に対する病害抵抗性を全身的に誘導できることを明らかにし、処理装置について特許を出願するとともに実用に供しうる温湯散布装置を製作し

た。このことから、熱ショックにより誘導される病害抵抗性は実用レベルで利用可能な強さがあり、今後の改良、発展のためメカニズムの解明が期待された。

## 2. 研究の目的

以上の知見から、植物の病害に対する獲得抵抗性の誘導には複数の反応系が相互に作用しながら作用している可能性が高いことが示唆されており、これを解明し、栽培現場において有効に活用するための知見とすることを目的とする。このため、これまでの取り組みを足がかりとしてメカニズム解明の作業をより深く掘り下げ、熱ショック処理後のSAR以外の反応系の存在を明らかにし、植物が病原菌に感染した際の初期反応である、組織内における活性酸素種生成以降の代謝反応を解明するとともに具体的な抗菌物質の分離・同定を試みた。

## 3. 研究の方法

### (1) 全身獲得抵抗性(SAR)と同時に誘導される別経路の病害抵抗性が存在する可能性の検証

既往の知見として、HSP90やsmHSPが病害感染時の抵抗性誘導のシグナリングに関係しているとの報告や、熱ショック転写因子による活性酸素種消去関連遺伝子の発現調節などが報告されている。ここでは熱ショックと誘導抵抗性の直接的な因果関係を明らかにする。病害抵抗性関連遺伝子のプロモーター領域の解析により、SAR以外の病害抵抗性発現機構で遺伝子の発現調節がなされる可能性を明らかにした。中でも熱ショックエレメントは熱ショック転写因子の結合サイトであり、その活性化には複数の熱ショックタンパク質が関与している。熱ショックタンパク質は様々な生物種において広く類似した機能を持つことが知られ、その調節はヒトの発ガン機構との関係も深いことから、現在では様々な阻害剤が開発されている。そこで、最初にこれら各種薬剤が熱ショックによる抵抗性誘導におよぼす影響を明らかにした。また、サリチル酸集積を經由する既知の抵抗性誘導反応(SAR)との干渉についても、プラントアクティベーターとの組み合わせにより検討した。

### (2) 熱ショックにより葉面に分泌される低分子抗菌物質の検索と同定

これまでいくつかの作物で、熱ショック処理後、糸状菌の孢子発芽を抑制したり菌糸が死滅したりするほどの抗菌活性が葉面に現れることを見いだしてい

る。これらは葉面に分泌される比較的低分子の物質によるものと仮定し、LC-MS/MS や GC-MS により葉面洗浄液に含まれる水溶性物質や葉面から揮散する揮発性物質の検出と定性を行うとともに、同定終了後、抗菌活性の評価を行った。

(3) 熱ショックにより葉内に生成する高分子抗菌物質の抽出と同定

熱ショックは病原感染特異的 (Pathogenesis related; PR) タンパク質等、高分子抗菌物質も誘導することが判明している。そこで、熱ショック処理後の葉での PR タンパク質の消長を解明しその抗菌活性への関与を解明した。

#### 4. 研究成果

(1) 全身獲得抵抗性 (SAR) と同時に誘導される別経路の病害抵抗性が存在する可能性の検証

メロンにおいて、熱ショック処理後の継続的なサリチル酸の増減や病害感染特異的タンパク質のマーカ―遺伝子発現を調べたところ、サリチル酸の集積がピークを迎える処理 24 時間後より前の処理 12 時間目には既にマーカ―遺伝子の発現量がピークに達していた。また、熱ショック処理によって誘導される灰色かび病抵抗性は、プラントアクティベーターである BIT により誘導される SAR である抵抗性よりも協力であった。このことから、熱ショックによる誘導抵抗性は SAR を含むが、SAR よりも早期に別の反応が起きており、複数の反応から成り立っている可能性が示唆された。このことから、熱ショックにより誘導される病害抵抗性を、SAR を含む多面的な反応 Heat shock-induced resistance (HSIR) と命名して発表した。

熱ショックタンパク質が上記の非 SAR の反応に関与していると考え、熱ショックとプラントアクティベーターならびに熱ショックタンパク質阻害剤を植物体に処理し、病害抵抗性の誘導やマーカ―遺伝子の発現に及ぼす影響を調査した。その結果、それらの特定の組み合わせにより病害抵抗性や遺伝子発現が変化することが判明した。この結果から、植物の誘導抵抗性には熱ショックタンパク質の関与が強く示唆された。

いくつかの PR タンパク質について、その遺伝子の上流域の解析を行った。その結果、いくつかの PR タンパク質では、上流域に熱ショックエレメントの存在が認められた。これら遺伝子の発現解析を行ったところ、上記の矛盾しない結果を得た。

今回、利用した発現マーカ―のうち、ペルオキシダーゼについては病原菌感染や根圏微生物により発現量が上昇することを確認した。

(2) 熱ショックにより葉面に分泌される低分子抗菌物質の検出と同定

イチゴを用い、熱ショック処理後の葉を密閉容器に封入し、ヘッドスペースガスを採取して揮散した低分子物質を採取し、GC-MS で分析したところ、少なくとも 3 種類のセスキテルペン類の揮散量が顕著に増加していることが明らかになり、それらの同定に成功した。このうちの一つは *α*-cedrene であり、標品を用いた培養試験の結果から灰色かび病菌の孢子発芽ならびに菌糸の伸長を抑制することが確認された。他方は稀少種であり、抗菌活性を評価することはできなかった。これらのことから、植物に熱ショック処理を施すことにより揮発性有機化合物 (BVOC; Biogenic Volatile Organic Compound) の葉からの揮発が増加し、病原菌の感染を抑制する可能性が示唆された。

より BVOC を多く含むハーブ類であるタイムを用いて上記と同様の調査を行ったところ、熱ショックによりモノテルペン類である *p*-cymene ならびに *α*-terpinene の揮発量が増加することが明らかになった。したがって植物種によって熱ショックにより影響を受ける BVOC の種類は異なることが明らかになった。ケース内での栽培試験ならびに標品を使った培養試験により、*p*-cymene や *α*-terpinene は灰色かび病菌の菌糸伸長抑制効果を有することが明らかになった。一方、孢子の発芽に及ぼす影響は判然としなかった。これらの合成系の遺伝子発現解析の結果、熱ショックによって遺伝子発現量が上昇しており、熱ショックによって合成が促進されたモノと考えられた。また、これらはタイムの体内で最終産物 thymol を合成する経路での中間生成物であるにも関わらず thymol の揮発量は増えなかったことから、thymol 合成が熱ショックによって抑制された可能性も合わせて考えられた。圃場においてその効果を確かめるための栽培試験を行ったが灰色かび病の発生が少なく、効果は判然としなかった。

(3) 熱ショックにより葉内に生成する高分子抗菌物質の抽出と同定

灰色かび病の感染に対して初期段階で有効な活性酸素種を調節する酵素としてアスコルビン酸ペルオキシダーゼ (APX)、スーパーオキシドディスムターゼ (SOD)、カタラーゼの 3 種に着目した。

熱ショック処理後の時間経過に伴う植物体内における活性消長を調査した。その結果、これらはサリチル酸や他のマーカー遺伝子と同様、熱ショック処理後に活性が大きく上下することが明らかになった。しかしながら直接的な抗菌活性は認められなかった。また、パセリにおいて熱ショック処理で発現量が上昇するリボヌクレアーゼについてはパセリや他作物で知られるパンアレルゲンである可能性が高かった。

#### 5. 主な発表論文等

##### [雑誌論文](計 5件)

Yumi Eguchi, Ani Widiastuti, Hiromitsu Odani, Yufita Dwi Chinta, Maki Shinohara, Hideyuki Misu, Haruna Kamoda, Tomofumi Watanabe, Morifumi Hasegawa, Tatsuo Sato. Identification of terpenoids volatilized from *Thymus vulgaris* L. by heat treatment and their *in vitro* antimicrobial activity. *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 94: 83-89. 2016. 査読有

Yufita Dwi Chinta, Yumi Eguchi, Ani Widiastuti, Makoto Shinohara, Tatsuo Sato. Organic hydroponics induces systemic resistance against air-borne pathogen, *Botrytis cinerea* (gray mold). *Journal of Plant Interactions* 10: 243-251. 2015. 査読有

佐藤達雄. 施設園芸における高温処理を利用した病害虫防除技術. *農業および園芸*. 89: 149-156. 2014. 査読無

Ani Widiastuti, Mioko Yoshino, Morifumi Hasegawa, Youji Nitta, Tatsuo Sato. Heat shock-induced resistance increases chitinase-1 gene expression and stimulates salicylic acid production in melon (*Cucumis melo* L.). *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 84: 86-91. 2013. 査読有

Ani Widiastuti, Mioko Yoshino, Morifumi Hasegawa, Youji Nitta, Tatsuo Sato. Heat shock-induced resistance increases chitinase-1 gene expression and stimulates salicylic acid production in melon (*Cucumis melo* L.). *Physiological and Molecular Plant Pathology*. 82: 51-55. 2013. 査読有

##### [学会発表](計 7件)

武石直哉、佐藤達雄. キュウリにおける熱ショック誘導抵抗性発現と活性酸素種消去系の関係. 園芸学会平成 27 年度秋季大会. 2015. 9. 26. 徳島大学(徳島県徳島市) 田野倉 僚、Yufita Dwi Chinta、佐藤達

雄. 熱ショック処理により誘導されるパセリのうどんこ病抵抗性. 園芸学会平成 27 年度秋季大会 2015. 9. 26. 徳島大学(徳島県徳島市)

佐藤達雄. 作物の獲得抵抗性を利用した病害防除技術の開発と普及への取り組み. 園芸学会平成 27 年度秋季大会シンポジウム. 2015. 9. 26. 徳島大学(徳島県徳島市)

江口ゆみ、Yufita Dwi Chinta、長谷川守文、佐藤達雄. 高温処理によってタイム(*Thymus vulgaris*)から揮散するテルペノイドの同定および *in vitro* 抗菌活性. 2014. 9. 28. 園芸学会平成 26 年度秋季大会. 佐賀大学(佐賀県佐賀市)

佐藤達雄. 作物の高温馴化能を利用した病害抵抗性の誘導機作と応用. 日本熱帯農業学会第 113 回講演会. 2014. 3. 30. 茨城大学(茨城県稲敷郡阿見町)

佐藤達雄. 熱ショック反応を利用した病害虫防除技術の開発. 野菜茶業試験研究推進会議野菜病害虫部会 野菜病害虫研究会. 2013. 11. 21. 野菜茶業研究所(三重県津市) 三須英幸、加納一樹、深堀 優、ユフィタドゥイ チンタ、江口ゆみ、渡邊智文、篠原麻希、鴨田春菜、佐藤達雄. 熱ショックによる活性酸素種の集積が灰色かび病感染に及ぼす影響. 園芸学会平成 25 年度春期大会. 2013. 3. 24. 東京農工大学(東京都府中市)

##### [図書](計 4件)

佐藤達雄. 農山漁村文化協会. イチゴの新しい防除法. 熱ショック処理による病害抵抗性誘導. 最新農業技術. 野菜 Vol. 8. 2015.

佐藤達雄. 農山漁村文化協会. 熱ショック処理による病害抵抗性誘導. 農業技術大系 野菜編第 3 巻イチゴ. pp. +180 の 20-+188 の 28. 2015.

佐藤達雄. 農山漁村文化協会. 農薬利用と各種の防除法. DVD 病害虫防除の基本技術と実際. 第 1 巻. 2014.

新田洋司、佐藤達雄. 養賢堂. 野菜と米の科学. 農学入門 - 食料・生命・環境科学の魅力 -. pp. 102-136. 2013.

##### [産業財産権]

##### 出願状況(計 1件)

名称: 揮発性成分の放出促進方法、植物の栽培方法及び栽培システム

発明者: 佐藤達雄、長谷川守文、江口ゆみ、小谷博光

権利者: 茨城大学

種類: 特許

番号: 特願 2013-240262

出願年月日: 平成 23 年 11 月 20 日

国内外の別: 国内

〔その他〕

ホームページ等

<http://protech.agr.ibaraki.ac.jp/sub26.html>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

佐藤 達雄 (SATO TATSUO)

茨城大学・農学部・准教授

研究者番号：20451669

### (2) 研究分担者

無し

### (3) 連携研究者

無し

### (4) 研究協力者

Ani Widiastuti

ガジャ・マダ大学農学部 講師