

極微弱光の測定による植物のストレス応答の検出

静岡県農業試験場 伊代住浩幸・稲垣榮洋・影山智津子*・加藤公彦

*現 静岡県柑橘試験場

はじめに

細菌から植物、哺乳類にいたる様々な生物は、特殊な発光機構を介さず極微弱な光を放射している(渡辺, 稲場1991(1)(2), Slavinski 1988)。この発光現象は、極微弱生体発光(ultra-weak bioluminescence)あるいは、バイオフォトン放射(biophoton emission)と呼ばれている(Abels 1986, Popp 1988)。 10^4 光子数/秒/ cm^2 以下と発光強度が弱い(図-1)。

機器による測定は光電子増倍管(Photo multiplier tube)を用いた単一光子計数法が登場するまで待たなければならなかった。1950年代になって、Colliらによりコムギ、レンズマメなど植物の黄化幼苗における可視光域の発光が初めて報告され(Colli et al. 1955), それ以降, 多くの研究者により, 様々な生物の個体・組織・細胞などでの微弱発光現象が報告されるようになった(Popp et al. 1992, Belousov et al.

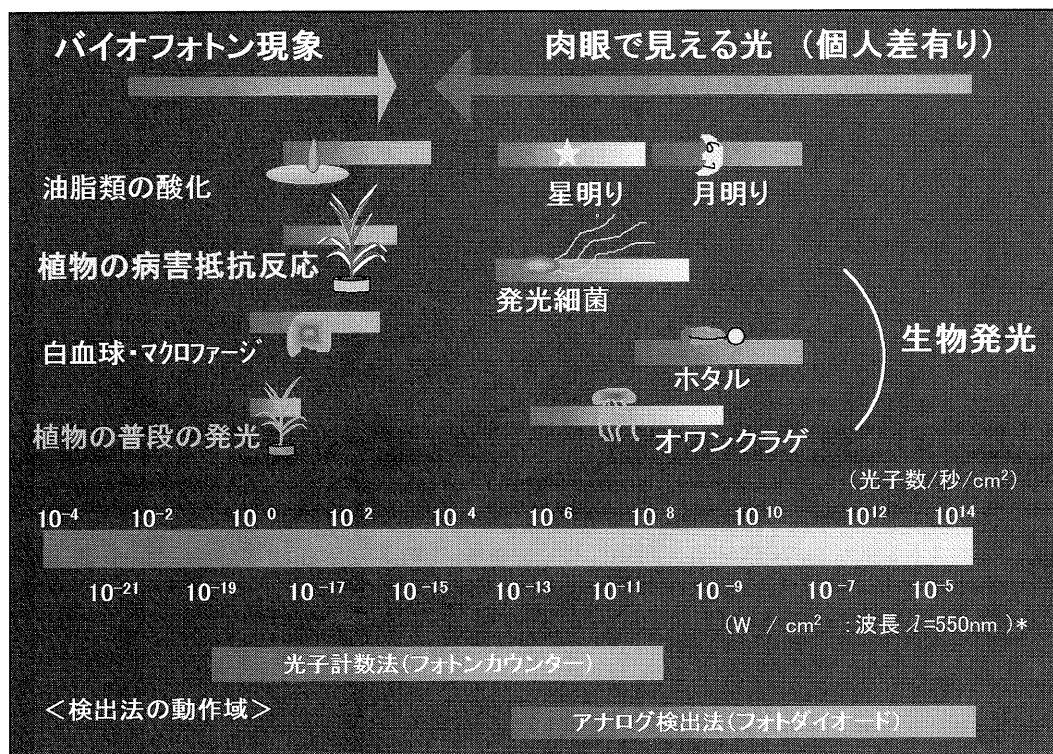


図-1 生体極微弱発光(バイオフォトン)の明るさ

2000)。

生体の極微弱発光現象は自家発光と光誘導(遅延)発光に分類されるが、共に生化学反応あるいは、光励起反応で生体内に生じる励起種により発光する。特に自家発光は恒常的に、幅広い波長域(紫外域～近赤外域)で観察され、生体の活動レベルの変化や外部からの刺激によって量や波長組成が変化することが知られている。発光のソースとして、活性酸素種により周囲の蛍光性物質(不飽和脂肪酸、核酸、アミノ酸、ポリフェノール他)が過酸化を受けて励起する場合や、励起カルボニルなどからの蛍光性物質へのエネルギー移行の他、一重項酸素そのものの発光、DNA分子の巻き戻しなども推定されている(Abels 1986, Slavinski 1988, 渡辺, 稲場1991(1)(2))。つまり、生物発光におけるルシフェリン-ルシフェラーゼシステムのように発光に特化したものではなく、生体内で別の働きを持つ物質・酵素などが生体微弱発光に関与すると考えられている。ただし、発光強度の弱さと発光波長の幅広さが生体中の発光分子種の同定を困難にしている。わずかな成功例として、腎不全症患者の血漿における極微弱発光の発光前駆物として、indoxyl- β -D-glucuronideが同定されている(Agatsuma *et al.* 1994)。

ところで、自家発光を測定する場合、測定自体では対象に干渉することが全くないため、非常に高い非侵襲性が得られるという利点がある。また、測定システムがシンプルであるため、生体の酸化的ストレス状態の指標として用いられるほか(稲場 1983)、腫瘍細胞の判別(Musumeci *et al.* 1992)、脳活動のモニタリング(Kobayashi 1999)、腎不全の判別(Agatsuma *et al.* 1992)などへの適用も試みられるなど、生理変化の指標としての応用が盛んに行われてきている。

植物でも古くから各種の刺激に応答して極微弱発光が観察されているが、近年、測定・解析機器の進歩に伴い、植物のストレス応答を極微弱光測定により捉える試みが増えている。本稿では、極微弱光測定による植物のストレス応答検出の事例を紹介する。併せて、著者らが取り組む病虫害抵抗反応の検出と、その実用技術への応用の可能性について紹介する。

1 植物のストレス応答に伴う極微弱発光

1. 無傷の植物の発光

上述の通り、生体極微弱発光の測定は植物の芽生えで最初に成功した。その後、高感度光子計数カメラによる測定で、細胞分裂が活発な根端や、胚軸において、より強く発光することが明らかになった(Usa *et al.* 1988, Ichimura *et al.* 1989)。高温・高湿度で保存され、発芽勢が低下したダイズ種子を給水後に測定すると、適切に保存された種子に比べ、むしろ発光量が増加することが報告されているが(Saeki *et al.* 1990)、これは、発芽を開始する前の種子で、種子に含まれる脂質、アミノ酸等が劣化(過酸化)したことによる化学発光が原因と考えられる。また、同じ時期の芽生えでも暗黒で黄化させたものと、緑化させたものでは、発光波長に違いが有り、コムギでは黄化したもので黄色から橙色なのに対して、緑化したものでは赤色光のみが観察される(Slavinski *et al.* 1981)。根の発光は両者とも黄色から橙色であったことから、緑化芽生えではクロロフィルにエネルギー転移が起こり、赤色のクロロフィル蛍光が生じると考えられている。一方で、ミトコンドリアと並び、葉緑体はそれ自体が発光することも明らかにになっている(Hideg *et al.* 1991, Hideg and Inaba 1991)。

2. 付傷に伴う発光

植物を傷つけると、その部位から周囲よりも強い極微弱発光が一過的に観察される。付傷に伴う活性酸素種の生成とそれによる膜脂質の過酸化は、発光に強く関わりとされている。一重項酸素 (1O_2) は、それ自身が発光する唯一の活性酸素で、脂質過酸化の際に生成する (宮澤1988)。また、重水中で半減期が大幅に延長されることが知られており、付傷の際に溶媒を軽水から重水に置換ると発光が顕著に高まることから、付傷に伴う発光における一重項酸素 (1O_2) の関与が示唆されている (Saline & Bridges 1981, Chen *et al.* 2003)。しかしながら、 1O_2 の消去実験の結果はそれぞれの報告で一致せず、直接的な発光分子であるかは不明である。生育中のシロイヌナズナをノルフルラゾンで処理して、クロロフィルの合成阻害により葉を部分的に白化させると、同じように付傷しても白化部分からは発光が認められなかった。このことから、緑化組織では付傷に伴う発光にも、クロロフィルへのエネルギー転移が強く関わりとされている (Flor-Henry *et al.* 2004)。一方、タケノコの切断面で観察される発光は、染み出てくる白い液体に含まれるチロシン、バイチロシンが、同様に含まれるペルオキシダーゼと切断傷害で生じる H_2O_2 により酸化・

励起されて直接発光すると考えられている (Totsune *et al.* 1993)。

3. 温度変化に伴う発光

温度変化は、主に酸素と脂質の反応をコントロールすることで発光の増減引き起こすと考えられる。植物にとって致命的な高温では、劇的な発光の増加が認められる (Havaux 2003)。また、付傷部位における発光は、十分な温度がないと認められない (Flor-Henry *et al.* 2004)。一方、急激な温度低下によっても一時的な発光の増加が認められ、凍霜害に対する耐性検定への応用も試みられている (Agaverdiyev *et al.* 1965)。これらとは別に、著者らは、サツマイモ塊根切片を 30°C から 20°C へ2時間程度かけて比較的緩やかに温度変化させた場合に、温度低下に伴って発光量が減少する一方で、一過的に波長組成が短波長側にシフトする現象を発見している (図-2)。メカニズムの詳細は不明であるが、温度低下に反応して顕著な生理変化生じていることが示唆された。

4. 塩処理・乾燥処理に伴う発光

アズキの芽生えにNaCl溶液処理を処理した場合、1 M程度までは発光が減少するが、4.5 M (飽和濃度) では逆に発光を増加させることが

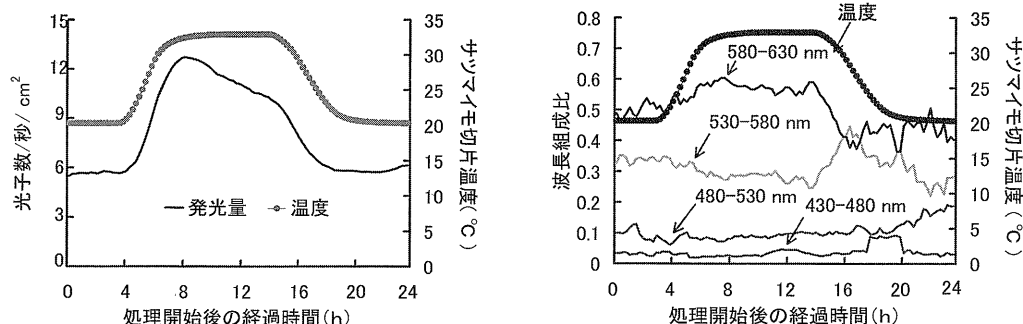


図-2 温度変化によって誘導される発光量 (左) と波長組成 (右) の変化

報告されている。低濃度での発光減少は、体内ABA濃度の上昇の結果であり（ホルモン処理の項参照）、飽和濃度での発光増加は高濃度のイオンによる細胞障害（ミトコンドリアからの電子漏洩による活性酸素発生）に起因すると推測されている（大矢ら1998）。一方、乾燥によっても緩やかな発光の増加が認められるが、長時間の乾燥処理後に再給水すると、非常に強い一過性の発光増加が認められる（大矢ら2000）。この現象は、乾燥で傷ついた細胞から給水によって流出したオキシダーゼ類により、細胞成分の酸化分解反応が劇的に進んだ結果だと推測されている。

5. 嫌気処理に伴う発光

一般的に、植物の極微弱発光は酸素供給を絶つと減少することが知られているが、ホウレンソウやハイビスカスの葉において、雰囲気を N_2 やアルゴンなどの不活性ガスに置換することで、一時的に発光量が増加することが確認されている（Roschger *et al.* 1992）。この現象は分離した葉緑体や、UV照射でダメージを受けた葉などでは観察されなかった。また、少量の酸素供給でもキャンセルされることから、健全な葉の嫌気条件における生理変化、おそらくは嫌気条件特異的な励起種の生成を反映していると推測

されている。この発光の波長組成がクロロフィル蛍光に似ることから、ここでもクロロフィルへのエネルギー転移が行われているらしい。

6. ホルモン応答に伴う極微弱発光

アズキの芽生えに根の成長を促進する濃度（ $10^{-6}M$ ）のジベレリン（GA₃）を与えると、わずかなではあるが無処理に比べて発光が増加することが報告されている（Kai *et al.* 1995）。発光は根冠部分で特に強く、生育の促進とリンクした発光だと推測されている。これに対して、同濃度で根の成長を抑制するアブシジン酸（ABA）を与えた場合には、発光は強く抑制されており、これはABAにより誘導されるストレス応答により活性酸素種生成の抑制、あるいは消去機能の亢進が起きたと推測されている。

一方、著者らは合成オーキシシン（2,4-D）をサツマイモ塊根切片に約 $10^{-5}M$ で与えると、一過的に発光が増強することを認めている（図-3）。このとき、発光波長は無処理に比べて短波長側にシフトしており、病害抵抗反応に伴う発光（図-4中）に類似したものであった。2,4-Dによって細胞伸長成長が誘導される時には、ヒドロキシラジカル（ $\cdot OH$ ）による細胞壁のルーゼニングが起きるという報告もあり（Schopfer *et al.* 2001）、病害抵抗反応時と励起種の種類

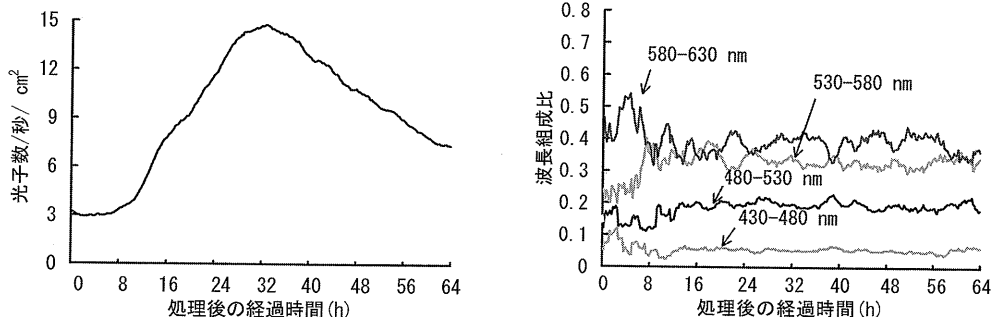


図-3 2,4-D処理により誘導される発光量（左）と波長組成（右）の変化

や発生部位が類似している可能性がある。

7. 病虫害応答に伴う極微弱発光

近年、著者らは、トウモロコシの葉がタバコガの幼虫に食害される際に発光が増加することを明らかにした。この発光は、幼虫の吐出し液が被害部に接触することで誘導されることから、吐出し液が一種のエリシターとして働いている可能性がある (Yoshinaga *et al.* 2006)。同様の現象はカンザワハダニによるインゲンマメの食害においても報告されている (川畑ら 2004) が、こちらはエリシター成分の有無は不明である。

病原体感染時の植物の発光についても近年報告されている。ササゲはCMVに感染した際に一過性の発光増加を示す (江原1994)。また最近、シロイヌナズナと非病原性遺伝子 (avr) を有する病原菌の組み合わせで、非親和性応答に伴う過敏反応 (HR) に先立って観察される極微弱発光について詳細に報告されている (Benett *et al.* 2005)。この事例では、 $\cdot O_2^-$ の生成や過酸化脂質は発光に関与せず、 $NO\cdot$ が発光に強く関与していると推測されている。また、発光のイメージングの結果から、時間と共に接種部位から周辺に発光が波のように広がることが明らかになっている。

一方、著者らはサツマイモが非病原性フザリウム菌との相互作用により防御応答に伴う強い発光を示すことを報告している (Makino *et al.* 1996, Iyozumi *et al.* 2002)。この発光は無処理の発光から波長組成が短波長側に大きくシフトしており、定常状態とは質的にも異なる発光現象であることが示された (図-4)。また、タバコの野火病抵抗性品種と罹病性品種の発光パターンによる識別 (伊代住ら 1998)、あるいは

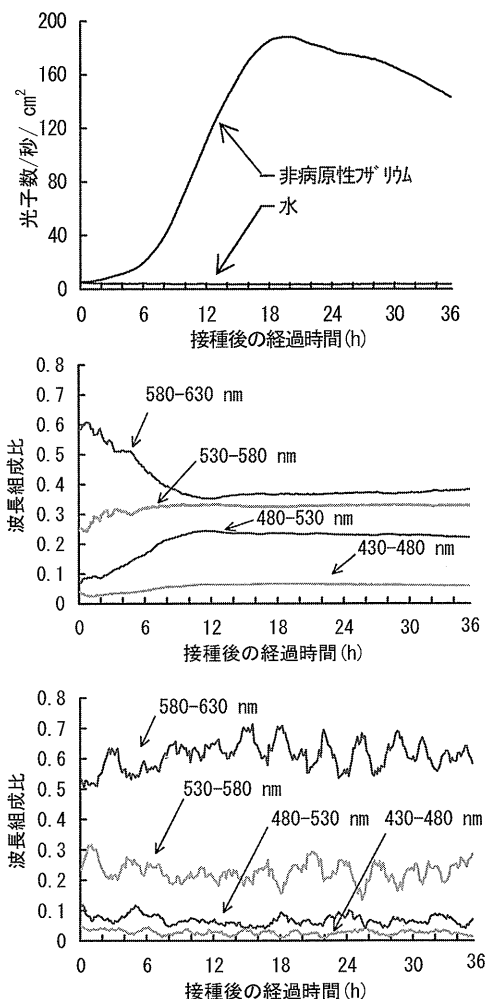


図-4 非病原性フザリウム菌接種により誘導される発光量 (上) 及び、波長組成 (中) の変化と、水処理 (下) との比較

はマツノザイセンチュウとの相互作用によるクロマツ新梢の発光現象 (袴田ら 2004) などについても明らかにし、植物の防御反応の指標としての微弱発光の可能性について論じてきた。

II 植物の極微弱発光測定の実用技術への応用

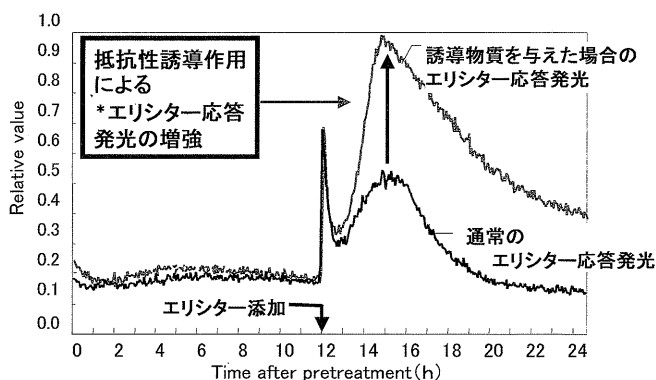
1. 極微弱発光の測定による病害抵抗性誘導の評価

植物が持つユニークなストレス応答として、病害抵抗性誘導がある。もともとは、斑点を生じさせる病原体に先に感染していると、それ以

降, 同じ病原体のみならず広いスペクトラムで抵抗性を発揮する現象から発見された (Ryals *et al.* 1994)。病害抵抗性誘導の重要な作用として, 本作用についての研究が進み, 生体内におけるサリチル酸の重要性が明らかになると, それを基にして, より強力に, 安定的に抵抗性を誘導する物質として, アシベンゾラル-S-

メチル, チアジニルなどの物質が合成され, 商品化されている。現在ではサリチル酸を介する経路以外にも, ジャスモン酸やエチレンを介する経路, ブラシノステロイドを介する経路なども明らかになってきている (仲下, 安田 2004)。しかしながら, これまでに販売されているのは上記2剤にプロベナゾールを加えた3剤で, しかも全てSA類似の物質である。サリチル酸経路を利用した抵抗性誘導の研究が, 最も進んでいることが原因として挙げられるが, より根本的な問題として, 旧来の接種検定法に代わりうる選抜方法が未だ存在しないことがあげられる。一般殺菌剤では一次スクリーニングに利用されている *in vitro* アッセイ法も抵抗性誘導剤では実用的なレベルに達していないため, 開発のボトルネックになっている。

ところで, 抵抗性誘導物質の重要な作用として, 病原体やエリシターに対する防御応答が早く, 強くなるよう植物細胞をコンディショニングする作用, いわゆるプライミングがある (Conrath 2002)。これまでの研究で, 著者らは, 植物の防御応答に付随する極微弱発光 (エリシター応答発光) が, 他の防御応答と同じ制御系の元で放射されており (Kageyama *et al.* in



*エリシター: 植物が病原菌として認識し, 抵抗反応を起こしてしまう物質のこと。

図-5 極微弱発光測定による病害抵抗性誘導物質評価の原理

print), プライミング効果により加速, 増強されることを明らかにした (Iyozumi *et al.* 2005)。

さらに, エリシター応答発光の増強が, 作用機作が異なるとされる様々な抵抗性誘導物質で認められることを踏まえて, 病害抵抗性誘導物質の効率的な選抜システムの確立に取り組んでいる。現在試験的に稼動しているシステムは, ①改変N6培地で維持しているイネ培養細胞を1/2MS培地で1週間振とう培養し, ②培養細胞2.5gと培養液3.5mlをシャーレに分注する。③候補物質を終濃度50ppmになるよう培養細胞に添加し, ④2時間インキュベーションして抵抗性を誘導した後, ⑤エリシターを培養細胞に添加し (キチン6量体であれば0.1~1 μ M), エリシター応答発光を2~6時間測定する。⑥エリシター応答発光の増強程度 (2倍以上が目安) を指標に候補物質の選抜を行う。以上の方法では, 特別な試薬等を必要としないため, ランニングコストは通常の接種検定法の2/3程度で済む。しかも8時間程度で終了するため, 早くても1週間~2週間程度はかかる接種検定法に比べて, 極めて迅速な方法である (図-6)。本方法では,

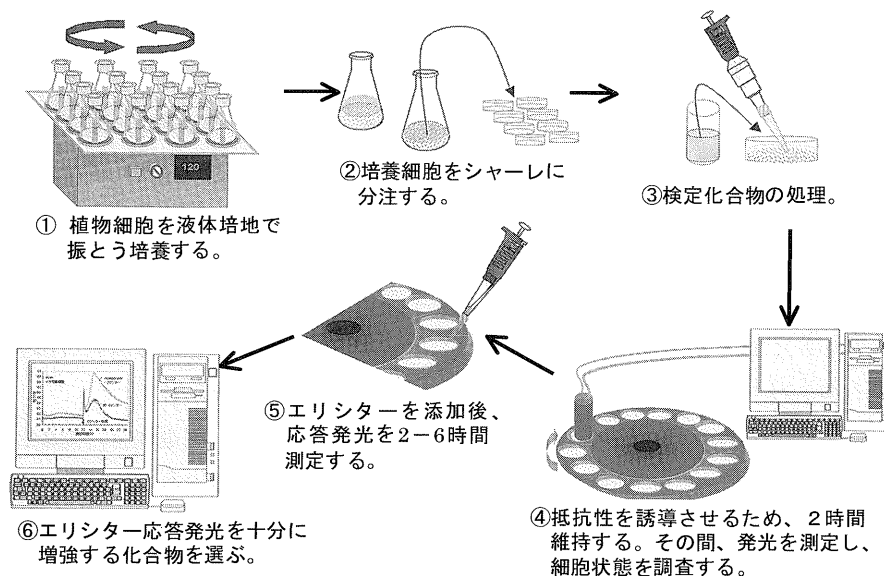


図-6 病害抵抗性誘導物質の新しい効率的な選抜システム

実際の施用場面における安定性や浸透性などは評価できないため、必ずしも植物体での効果とは一致しない点を念頭において、一次スクリーニングとしての活用を考えている。運用においては、細胞の安定管理が必須であり、現在も培養・保存方法、品質管理手法の改善が続けている。また、イネ以外の世界的に重要な作物、例えば、コムギ、ブドウ、パレイショなどについても同様のシステムの確立を目指している。

おわりに

20年前のレビュー (Abeles 1986) には、植物の極微弱発光について「現象として複雑で、解析が難しい割には、生物学的意義は取るに足らないもの (trivial) である可能性がついてまわる。しかし、生理状態、特に活性酸素種の生成に関する情報を得るための有用なテクニックとなりうる」というようなことが書かれている。今日、その予言の後半部分は実現しつつあると考える。この先、前半部分の懸念を吹き飛ばすような発見を是非したいものである。

文 献

- Abeles, FB (1986) Ann.Rev. Plant Physiol. 37:49-72.
- Agatsuma, S, Nagoshi, T, Kobayashi M, Usa M, watanabe H, Sekino, H and Inaba H (1992) Clin. Chem. 38:48-55.
- Agatsuma, S, Nagoshi, T, Kobayashi, M, Usa, H, Watanabe, H, Sekino, H and Inaba, H (1994) Clin. Chem. 40:1580-1586.
- Agaverdiyev, AS, Doskoch, YE and Tarusov, BN (1965) Biofizika 10:832-836.
- Belousov, L, Popp, FA, Voeikov V, Wijk, RV (2000) Biophotonics and Coherent Systems, Moscow University Press, Moscow
- Bennett, M, Metha, M and Grant, M (2005) Mol.Plant-Microbe Interact. 18:95-102.
- Chen, WL, Xing, Da, Tan, ShiCi, Tang, Yong Hong and He, Younghon (2003) Luminescence, 18:37-41.
- Colli, L, Facchini, U, Guidotti, G, Lonati, RD, Orsenigo, M, and Sommariva M (1955)

- Experientia 11:479-81.
- Conrath, U, Pieterse, CMJ and Mauch-Mani, B (2002) Trends Plant Sci. 7:210-216.
- 江原淑夫 (1994) ウイルス44:55-60.
- Flor-Henry, M, McCabe, TC, de Bruxelles, GL and Roberts, M (2004) BMC Plant Biol. 4:19-25.
- 袴田哲司, 加藤公彦, 牧野孝宏, 山本茂弘 (2004) 日植病報 70: 162-167.
- Hauvaux, M (2003) Trends in Plant Science 8:409-413.
- Hideg, E, Kobayashi, M and Inaba, H (1991) Biochimica et Biophysica Acta 1098:27-31.
- Hideg, E, and Inaba, H (1991) Photochem. Photobiol. 53:137-142.
- Ichimura, T, Hiramatsu, M, Hirai, N and Hayakawa, T (1989) Photochem. Photobiol. 50:283-286.
- 稲場文男 1983. 極微弱光計測技術の医学および生命科学への応用, 光学12:166-179
- Iyozumi, H, Kato, T, Makino, T (2002). Photochem. Photobiol. 75: 322-325.
- Iyozumi, H, Kato K, Kageyama, C, Inagaki, H, Yamaguchi, A, Furuse, K, Baba, K and Tsuchiya, H (2005) Physiol. Mol. Plant Pathol. 66 : 68-74
- 伊代住浩幸, 加藤公彦, 市川健, 牧野孝宏 (1998) 日植病報 64: 361-362 (講演要旨)
- Kai, S, Ohya, T, Moriya, K, and Fujimoto, T (1995) Jpn. J. Appl. Phys. 34:6530-6538.
- 川畑龍三, 三池徹, 上船雅義, 岡部弘高, 高木正見, 甲斐昌一 (2004) 応動昆48: 289-296.
- Kobayashi, M, Takeda, M., Ito, K., Kato, H., Inaba, H. (1999) J. Neurosci. Methods 93 :163-168.
- 宮澤陽夫 (1988) 生物発光と化学発光・基礎と実験, 126-151, 廣川書店, 東京.
- Musumeci, F (1992) Recent advances in biophoton research and its applications, 307-324, World Scientific, Singapore.
- 仲下英雄, 安田美智子 (2004) 植調39:203-213.
- 大矢智幸, 倉重秀昭, 甲斐昌一 (1998) 九州大学工学集報 71:15-21.
- 大矢智幸, 吉田敏, 川畑龍三, 岡部弘高, 甲斐昌一 (2000) 九州大学工学集報73:25-31
- Popp, FA, Li, KH, Gu, Q editors (1992) Recent advances in biophoton research and its applications. Singapore, World Scientific, Singapore.
- Roschger, P, Devaraj, B, Scott, RQ and Inaba, H (1992) Photochem. Photobiol. 56 :281-284.
- Ryals, J, Uknes, S and Ward, E (1994) Plant Physiol. 104:1109-1112.
- Saeki, R, Miyazawa, T, Usa, M and Inaba, H (1990) Agric. Biol. Chem. 54:1603-1605.
- Salin, ML, and Bridges, SM (1981) Plant Physiol. 67:43-46.
- Slavinski, J, Grabikowski, E and Ciesla, L (1981) J. Luminescence 24/25:791-794
- Slawinski, J (1988) Experientia 44:559-571.
- Totsune, T, Nakano, Minoru and Inaba H. (1993) Biochem. Biophysica. 194:1025-1029.
- Usa, M, Scott, RQ, Kobayashi, M, Nagoshi, T, Shopfer, P, Liskay, A, Bechtold, M, Frahy, G and Wagner, A (2002) Planta 214: 821-828
- Watanabe, N and Inaba, H (1988) Photomed. Photobiol. 10:55-68.

渡辺治夫, 稲場文男 (1991) (1) 0 plus E 143:
112-123.

渡辺治夫, 稲場文男 (1991) (2) 0 plus E 143:
139-153.

Yoshinaga, N, Kato, K, Kageyama, C,
Fujisaki, K, Nishida, R and Mori, N
— (2006) Naturwissenschaften 93:38-41.

連絡先: 〒438-0803 静岡県磐田市富丘678-1

静岡県農業試験場

副主任

伊代住浩幸

Phone: 0538-35-7211

Facsimile: 0538-37-8466

E-mail: hiroyukil_iyozumi@pref.

shizuoka.lg.jp

水田初・中期一発処理除草剤

オーグス®

フロアブル



新発売

抵抗性雑草防除の本命!!

★ 日産化学工業株式会社
〒101-0054 東京都千代田区神田錦町3-7-1 (興和一橋ビル) 03(3296)8141
<http://www.nissan-nouyaku.net/>