

疫病菌に対するジャガイモの防御反応： 塊茎ミクロソーム画分における活性酸素生成成分の単離の試み

古市尚高・加藤美紀・高村則子・寺田恵都子・加藤武司

Naotaka FURUICHI, Miki KATO, Noriko TAKAMURA, Etsuko TERADA
and Takeshi KATO : Potato defense response to *Phytophthora infestans* :
Isolation of proteins related to generation of active oxygen species
in the microsomal fraction of potato tubers.

Summary

In this study, we have observed that the microsomal fractions from potato tuber cells reacted with elicitor of *Phytophthora infestans* by producing superoxide anion (O_2^-) generation. It was showed that Ca^{2+} treatment (100 μ M) strongly stimulated the O_2^- generation in microsomal fractions. In addition with Ca^{2+} and Mg^{2+} treatments, the simultaneous treatment caused the O_2^- generation in the fractions more strongly. For the analysis of the O_2^- generation, we have used FPLC system (anion-exchange column). We have determined the O_2^- generation activity in the fractionated samples of the potato microsomal fractions. From these observations, it was suggested that the O_2^- generation was effectively regulated by Ca^{2+} and Mg^{2+} . It was also suggested that several proteins from potato microsomal fraction were involved in the generation of O_2^- .

緒 言

植物の病原体に対する防御（抵抗）反応では、過敏細胞死（Hypersensitive cell death）やファイトアレキシン（Phytoalexin）の合成、蓄積が起こる。これらの防御反応を誘導する因子は、エリシター（Elicitor）⁷⁾と呼ばれ、逆に、防御反応を抑制する因子はサプレッサー（Suppressor）^{16,7)}と報告された。これらの防御反応では、宿主細胞内の信号の伝達が重要である。この信号伝達を担う物質の一つとして活性酸素種が知られている⁵⁾。

ジャガイモ疫病菌（*Phytophthora infestans* (Mont.) de Bary）とジャガイモ、トマトなどのナス科植物の系において、非親和性レースが感染した直後の細胞、あるいは菌体壁成分エリシターを処理した直後の植物組織^{13,9)}あるいはプロトプラスト⁹⁾で活性酸素が急速に生成されることが知られてきた。また、活性酸素生成が全身獲得抵抗性の誘導に関与していると考えられている⁵⁾。本研究では、ジャガイモの防御反応誘導における信号伝

達物質としてスーパーオキシド (O_2^-) に注目し、ジャガイモミクロソーム画分に対する Ca^{2+} 、 Mg^{2+} の影響を調べた。また、宿主細胞膜の活性酸素生成成分の解明を目的とし、活性酸素の測定にはウミホタルルシフェリン誘導体（CLA）を用いた。CLA 化学発光反応は O_2^- と一重項酸素 (1O_2) に特異的であり¹⁰⁾、この化学発光を測定した。

材料および方法

1. 供試植物と供試菌

供試品種は、ダンシャク（ r -遺伝子）とエニワ（ R_1 -遺伝子）である。ジャガイモ塊茎からミクロソーム画分を抽出した。

供試菌は、ジャガイモ疫病菌（*Phytophthora infestans*）レース0を使用した。菌体壁成分（エリシター）はレース0より抽出した。

2. ジャガイモ塊茎膜抽出法^{9,11,12)}

ジャガイモ塊茎を磨砕緩衝液（35mM トリス（ヒドロキシメチル）アミノメタン [Tris]、0.25M サッカロース、2.3mM グリコールエーテルジエチレンジアミン四酢酸 [EGTA]、0.4% ポリビニルピロリドン [PVP]、pH8.0）100ml、2-メルカプトエタノール 100 μ l、ジチオトレイトール

[DTT] 61mg およびフェニルメチルサルフォニルフルオリド (Phenylmethylsulfonyl fluoride, [PMSF]) 25 μ l を加えて磨砕し、ガーゼで濾過後、4 $^{\circ}$ C下で10,000rpm, 15分間遠心分離した。この上清を再び4 $^{\circ}$ C下で27,000rpm, 90分間遠心分離し、沈殿物を懸濁緩衝液 (1mM Tris-MES, 0.25M サッカロース, 0.15%DTT, pH7.2) で懸濁し、マイクロソーム画分とした。

3. 陰イオン交換クロマトグラフィーによるマイクロソーム画分の分画

マイクロソーム画分を陰イオン交換クロマトグラフィー (FPLC, カラム Resource-Q, 0.64 \times 3cm, 1ml; Pharmacia) を用いて分画した。溶出は、流速2ml/分で、緩衝液A (20mM N-2-Hydroxyethylpiperazine-N'-2-ethanesulfonic acid [HEPES] - NaOH, 0.01% 3-[(3-Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate [CHAPS], pH7.4) と緩衝液B (20mM HEPES-NaOH, 0.5M NaCl, 0.01%CHAPS, pH7.4) で行った。分析中の緩衝液Bの濃度は0-100% (0%; 2.5分間, 0-60%; 5分間, 100%; 2.5分間, 0%; 2.5分間) とした。

4. 活性酸素の測定¹⁰⁾

マイクロソーム画分 (200 μ g タンパク質当量/ml) および陰イオン交換クロマトグラフィー分画の活性酸素生成量の測定はウミホタルルシフェリン誘導体 (CLA, 東京化成) を用いて行った。試験管に39mM HEPES, pH7.0; 385.5 μ l, 試料; 25 μ l, 10mM MgCl₂ または10mM CaCl₂; 5 μ l, 10mM EGTA; 5 μ l, 10mM グアノシン三リン酸 (GTP) - γ -S; 1.5 μ l, 500 μ M CLA; 15 μ l を入れ、37 $^{\circ}$ Cの条件下で2分間インキュベート後、ジャガイモ疫病菌菌体壁成分 (エリシター, 2.5mg/ml) を40 μ l 入れた。更に、同じ条件下でひきつづき1分間インキュベート後、3.3mM NADPH を23 μ l 加えた直後、発光量 (15秒間の発光数) を光検出装置 (ルミネッセンスリーダー, Aloka) を用いて測定した。測定後の試験管は遮光し、5分間隔で経時的に装置に入れ測定した。

5. SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法 (SDS-PAGE)

陰イオン交換クロマトグラフィー分画を試料とし、SDS-PAGEを行い、ゲルを銀染色 (Oakley, Kirsch, Morrisの方法)⁹⁾ した。

6. ジャガイモ疫病菌エリシター抽出法¹¹⁾

ライ麦液体培地で2週間、菌体を培養し、菌体1g 当たり2mlの50mM 酢酸ナトリウム緩衝液, pH4.5を加えながら磨砕し、氷上で超音波磨砕を行った。これを12,000rpm, 20分間遠心分離し、沈殿物に0.1M ホウ酸

緩衝液, pH8.8を試料の2倍量加え、氷上でポリトロンで磨砕した。その後、オートクレーブ処理 (120 $^{\circ}$ C, 10分間) し、試料を氷上で冷却し、12,000rpm, 10分間遠心分離を行った。この上清を回収し、沈殿物は再び2倍量の0.1M ホウ酸緩衝液を加え、ポリトロンで磨砕し、オートクレーブ処理 (121 $^{\circ}$ C, 10分間) した。この試料を氷上で冷却し、12,000rpm, 10分間遠心分離し、上清を回収した。2回の遠心分離で得られた上清を混合し、4 $^{\circ}$ C下で超純水に対して透析を一晩行い、凍結乾燥を行った。

結 果

1. ジャガイモマイクロソーム画分におけるCa²⁺とMg²⁺の活性酸素生成への影響

マイクロソーム画分にCa²⁺およびMg²⁺ (最終濃度100 μ M) の単独または重複処理を行った。両品種の活性酸素生成量は、Ca²⁺・Mg²⁺処理区は無処理区と比較して高まった。品種ダンシャクにおいてCa²⁺処理区と重複処理区ではほぼ同じ生成量で、測定開始後、無処理区と比較して約40%、またMg²⁺処理区では約15%高まった (Fig. 1 a)。品種エニワにおいては、Mg²⁺処理区で約15%、Ca²⁺処理区で約30%、重複処理区で約50%、活性酸素生成量は高まった (Fig. 1 b)。

2. 陰イオン交換クロマトグラフィー分画の活性酸素生成量

マイクロソーム画分を陰イオン交換クロマトグラフィーによって分画し、各分画で活性酸素生成量を測定した。品種ダンシャクでは、分画番号1, 2, 10, 12, 13, 17, 21, 23 (Fig. 2 a)、品種エニワでは、分画番号1, 2, 10, 11, 12, 17, 19, 22で活性酸素生成量が高まった (Fig. 2 b)。

3. 陰イオン交換クロマトグラフィー分画のSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動法による解析

マイクロソーム画分を分画した陰イオン交換クロマトグラフィー分画中、活性酸素生成量の高かった分画をSDS-PAGEによって解析を行った。

品種ダンシャクで分画番号2, 12, 品種エニワで2, 12, 17で分子量約35kDのバンドが検出された。また、両品種で分画番号2, 17は約17kDから約120kDまでのタンパク質バンドが検出された (Fig. 3)。

考 察

品種ダンシャク、エニワのマイクロソーム画分において、Ca²⁺処理区 (100 μ M)、Mg²⁺処理区 (100 μ M) および重複処理区は無処理区と比較して活性酸素生成量が高まった。特にCa²⁺処理区と重複処理区でこの傾向が顕著に見られた。疫病菌の感染の場面で、活性酸素生成が

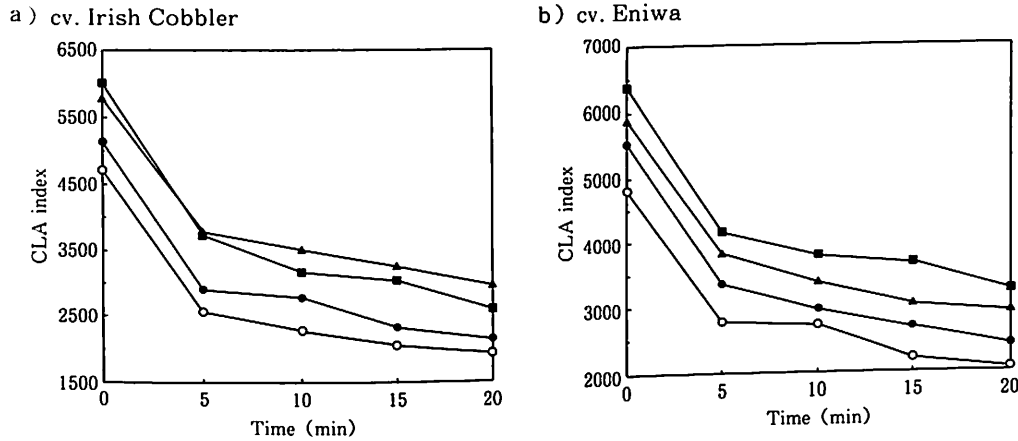


Fig. 1 Effect of Ca²⁺ and Mg²⁺ treatments on the generation of active oxygen species in potato microsomal fractions.

▲, Ca²⁺ treatment (100 μM); ●, Mg²⁺ treatment (100 μM); ■, Ca²⁺ and Mg²⁺ treatment (100 μM); ○, control.

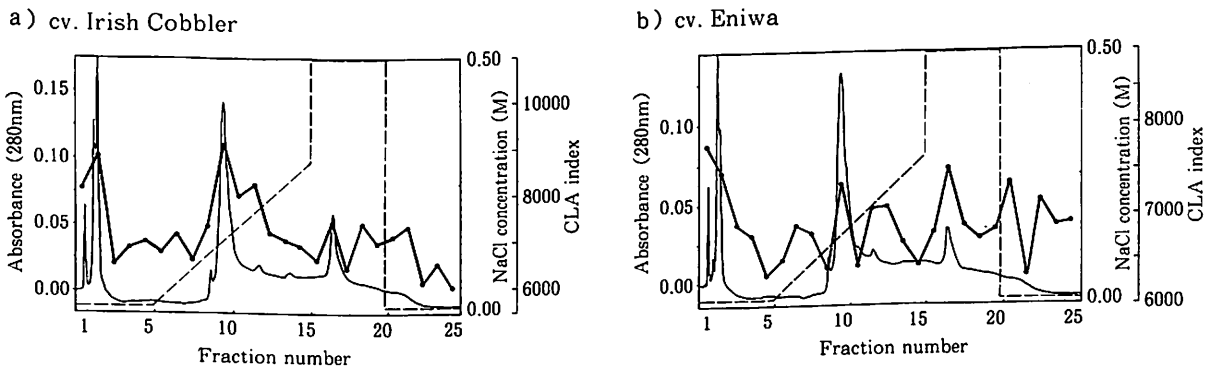


Fig. 2 Anion-exchange chromatogram of potato microsomal fraction and generation of active oxygen species of the fractions.

Absorbance 280nm (—), NaCl (M) (---), CLA index (generation of active oxygen species) (●—).

2段階でなされており、過敏細胞死が誘導される。第1段階では、接種後2-3時間で活性のピークが見られ、第2段階では、接種後4時間でその後徐々に活性が高まるという現象が、ジャガイモ葉の切断切片に疫病菌を接種した場合に観察された²⁾。ミクロソーム画分での活性酸素生成はCa²⁺の影響を考えると第2段階での生産と相関している。

したがって、Ca²⁺とMg²⁺は、ミクロソームあるいは細胞膜に存在する活性酸素生成酵素タンパク質の活性を制御している可能性があると考えられた。特にCa²⁺はこの制御機構に深く関わっていると考えられた。

陰イオン交換クロマトグラフィー分画のうち、各品種で活性酸素生成量が高まった分画が複数存在したため、活性酸素生成に関わる成分は複数の分画に存在すると考えられた。また、SDS-PAGEの結果、分子量約35kDの成分や、多種のタンパク質バンドが検出された分画が存在した。

活性酸素の生成や消去に関わる酵素タンパク質にはNADPHオキシダーゼやカタラーゼなど複数存在し、反応も複雑である。今後、活性酸素生成成分を特定する実験を行う必要がある。

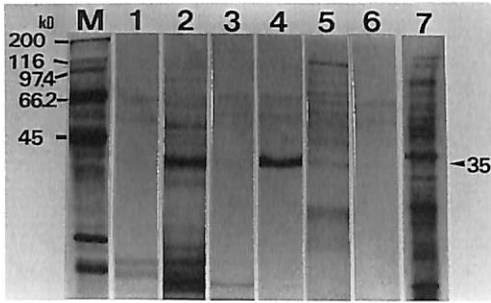


Fig. 3 SDS-PAGE of the fractions from anion-exchange chromatography which were loaded by potato microsomal fraction.

cv. Eniwa.

M, marker; lane 1, No 1; lane 2, No 2; lane 3, No 10; lane 4, No 12; lane 5, No 17; lane 6, No 19; lane 7, microsomal fraction (100 μ g protein/ml).

摘 要

1. エリシターを処理したジャガイモミクロソーム画分において、 $Ca^{2+} \cdot Mg^{2+}$ 処理および重複処理は無処理と比較して活性酸素生成量が高まった。特に Ca^{2+} 処理と重複処理でこの傾向が顕著に見られた。活性酸素生成成分を Ca^{2+} (100 μ M), Mg^{2+} (100 μ M) が制御する可能性が示唆された。

2. 陰イオン交換クロマトグラフィーによる各分画の活性酸素生成量の測定と SDS-PAGE の結果、活性酸素生成には複数の酵素タンパク質が関与していると考えられた。

謝 辞

本研究を行うにあたって、CLA のご分譲と測定法に関してご助言を頂いた東京大学医科学研究所土屋朋子博士、また疫病菌をご分譲いただいた北海道農業試験場加藤雅康博士に厚く御礼申し上げます。

引用文献

- 1) Chai, H. B. and Doke, N. (1987) Superoxide anion generation: a response of potato leaves to infection with *Phytophthora infestans*. *Phytopathology* 77: 645-649.
- 2) Chai, H. B. and Doke, N. (1987) Activation of the potential of potato leaf tissue to react hypersensitively to *Phytophthora infestans* by cystospore germination fluid and the enhancement of this potential by calcium ions. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 30: 27-37.
- 3) 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.
- 4) Doke, N. (1983) Generation of superoxide anion by potato tuber protoplast upon the hyper sensitive response to the hyphal wall components of *Phytophthora infestans* and specific inhibition of the reaction by suppressores of hypersensitivity. *Physiol. Plant Pathol.* 23: 359-367.
- 5) 道家紀志・三浦由雄・朴海準・則武智哉・Sanchez, L.M.・川北一人 (1995) 植物の感染防御応答における活性酸素生成と寄生戦略. 平成7年植物感染生理談話会, 86-97.
- 6) Furuichi, N. and Suzuki, J. (1989) Isolation of proteins related to the β -lectin from potato which bind to hyphal wall components of *Phytophthora infestans*. *J. Phytopathol.* 127: 281-290.
- 7) Garas, N. A., Doke, N. and Kuć, J. (1979) Suppression of the hypersensitive reaction in potato tubers by mycelial components from *Phytophthora infestans*. *Physiol. Plant Pathol.* 15: 117-126.
- 8) Harlow, E. and Lane, D. (1988) *Antibodies*. 651-652, Cold Spring Harbor Laboratory, New York.
- 9) Miura, Y., Yoshioka, H. and Doke, N. (1995) An autophotographic determination of the active oxygen generation in potato tuber discs during hypersensitive response to fungal infection or elicitor. *Plant Sci.* 15: 45-52.
- 10) 中野 稔 (1988) 活性酸素の化学発光による検出法. 蛋白質 核酸 酵素 Vol.33, No.16: 2699-2707.
- 11) 高村則子 (1996) ジャガイモ疫病菌エリシターのジャガイモ膜画分に対する相互作用: 活性酸素生成に対するタンパク質リン酸化の影響. 新潟大学 卒業論文: 1-57.
- 12) 吉田静夫・上村松生 (1987) 細胞膜の分離法. 蛋白質 核酸 酵素 別冊 No.30: 48-53.

(1997年5月6日受領)