

生物防除微生物Pythium oligandrum施用トマトの病害抵抗性誘導における -シアノアラニンの役割

誌名	日本植物病理學會報 = Annals of the Phytopathological Society of Japan
ISSN	00319473
著者名	長谷,修 竹中,重仁 高橋,翔 中保,一浩 河村,陽子 生井,恒雄
発行元	日本植物病理學會
巻/号	78巻4号
掲載ページ	p. 309-312
発行年月	2012年11月

農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council
Secretariat



生物防除微生物 *Pythium oligandrum* 施用トマトの病害抵抗性誘導における β -シアノアラニンの役割

長谷 修^{1,3*}・竹中 重仁²・高橋 翔³・中保 一浩⁴・河村 陽子³・生井 恒雄¹

ABSTRACT

HASE, S.^{1,3*}, TAKENAKA, S.², TAKAHASHI, S.³, NAKAHO, K.⁴, KAWAMURA, Y.³ and NAMAI, T.¹ (2012). Role of β -cyanoalanine in induced resistance mediated by *Pythium oligandrum* in tomato. Jpn J. Phytopathol. 78: 309–312.

In tomato, induced resistance mediated by *Pythium oligandrum* (PO) is accompanied by enhanced production of ethylene and expression of a gene encoding β -cyanoalanine synthase (β -CAS), which catalyzes the detoxification of cyanide to β -cyanoalanine. We analyzed the activity of β -CAS in tomato after treatment with PO and the defence reactions by examining gene expression of tomato treated with β -cyanoalanine. The β -CAS activity significantly increased in tomato roots treated with an oospore suspension of PO, and the β -cyanoalanine treatment activated the expression of the jasmonic acid (JA)-related defence gene, *LePR6*. Increased activity of β -CAS and subsequent production of β -cyanoalanine may thus activate the JA-dependent defence reaction in PO-treated tomato plants.

(Received March 19, 2012; Accepted June 4, 2012)

Key words: induced resistance, β -cyanoalanine, tomato, *Ralstonia solanacearum*, ethylene, jasmonic acid

Pythium oligandrum (以下、PO と略す) は、菌間寄生能力や、作物根圏での栄養物や空間の競合能力を有する生物防除微生物である (Al-Rawahi and Hancock, 1997; Benhamou *et al.*, 1999; Martin and Hancock, 1987)。また、本菌は病害抵抗性を誘導する能力もあり、細胞壁タンパク質画分 (Cell wall protein fraction; CWP) がエリシターとして機能することを、Takenaka *et al.* (2003) はテンサイやコムギを用いた解析により見出している。CWP は、その後の研究によりトマト、ジャガイモ、シロイヌナズナなど複数の植物において抵抗性を誘導することが明らかにされている (Hase *et al.*, 2008; Ikeda *et al.*, 2012; Kawamura *et al.*, 2009)。

PO の CWP による抵抗性誘導のシグナル伝達系は、青枯病菌 (*Ralstonia solanacearum*) に対して抵抗性誘導が認められたトマトやシロイヌナズナで解析が進められている。PO の卵孢子懸濁液や CWP を処理したトマトでは、エチレン (ET)

量が一過的に上昇すると共に、ET 受容体や ET 応答性転写因子をコードする遺伝子ならびに ET 応答性防御関連遺伝子の発現上昇が報告されている (Hase *et al.*, 2006; Takahashi *et al.*, 2006)。また、ジャスモン酸 (JA) の生合成酵素の遺伝子や JA シグナル伝達系で機能する遺伝子、ならびにプロテアーゼ II をコードする JA 応答性の防御関連遺伝子 (*LePR6*) も発現上昇することが明らかとなっている (Takahashi *et al.*, 2006)。*LePR6* は、トマト品種 ‘マイクロトム’ の JA 非感受性の変異体 *jai1-1* (Li *et al.*, 2004) では、PO の卵孢子懸濁液や CWP を処理しても発現が誘導されず、また青枯病も抑制されない (Hase *et al.*, 2008)。すなわち、PO 施用トマトの青枯病に対する抵抗性誘導は JA シグナル伝達系の活性化に依存している。一方、PO 施用トマトでは、*LePR1a* と *LePR2a* などのサリチル酸 (SA) のシグナル伝達に関連する遺伝子の発現誘導は認められない (Hase *et al.*, 2008; Takahashi *et al.*,

¹ 現 : 山形大学農学部 (〒 997-8555 山形県鶴岡市若葉町 1-23) Faculty of Agriculture, Yamagata University, 1-23, Wakaba-machi, Tsuruoka, Yamagata 997-8555, Japan

² 農業・食品産業技術総合研究機構 (〒 305-8517 茨城県つくば市観音台 3-1-1) National Agriculture and Food Research Organization, 3-1-1 Kannondai, Tsukuba, Ibaraki 305-8517, Japan

³ 東北大学大学院農学研究科 (〒 981-8555 宮城県仙台市青葉区堤通雨宮町 1-1) Graduate School of Agricultural Science, Tohoku University, 1-1, Amamiya-machi, Tsutsumidori, Aoba-ku, Sendai, Miyagi 981-8555, Japan

⁴ 中央農業総合研究センター (〒 305-8666 茨城県つくば市観音台 3-1-1) National Agricultural Research Center, 3-1-1 Kannondai, Tsukuba, Ibaraki 305-8666, Japan

* Corresponding author (E-mail: s.hase@tds1.tr.yamagata-u.ac.jp)

2006). これらの解析から、PO 施用トマトにおける抵抗性誘導には、CWP による ET と JA のシグナル伝達系の活性化が関与していると考えられた。

CWP を処理したトマトでは、ET や JA 応答性遺伝子の発現上昇の他に、 β -シアノアラニン合成酵素 (β -CAS) をコードする遺伝子 (*LeCAS*) が顕著に発現上昇することを Takahashi *et al.* (2006) は見出している。 β -CAS はシアンとシステインから β -シアノアラニンを生成する反応を触媒する酵素であり、動植物に有毒なシアンの代謝に関与している (Miller and Conn, 1980). 高等植物におけるシアンの生成には ET の生合成過程で副産物として生成される経路があるが、シアンは β -CAS によって直ちに解毒されて β -シアノアラニンに代謝されるため植物体には蓄積されず、植物の生命には影響がないと考えられている (Yip and Yang, 1988).

LeCAS の発現は、CWP の他に ET の前駆体である 1-アミノシクロプロパンカルボン酸と、プロベナゾールやバリダマイシン A などの植物防御活性化剤 (PA) に対して誘導性が認められるが、傷などの非生物学的ストレスに対する誘導性は低い (Takahashi *et al.*, 2006). *LeCAS* は、転写レベルでは ET で誘導されるとともに、病害防御応答の過程で特異的に誘導され、応用面では PA の活性を検出できる遺伝子マーカーとして活用できる可能性が期待される。しかしながら、転写後の β -CAS の合成や β -CAS の代謝産物が防御反応の発現に対してどのような役割を担っているのかについては解析されていない。そこで、本研究では、PO 施用トマトにおける抵抗性誘導に対する β -CAS や β -シアノアラニンの関連性を明らかにすることを目的として、PO 卵胞子懸濁液に浸漬処理したトマトにおける β -CAS 活性と、 β -シアノアラニンの標品を処理したトマトの防御応答について解析した。

PO 施用トマトの β -CAS 活性 CWP 処理トマトにおける *LeCAS* の発現は、品種 ‘マイクロトム’ の根に処理して 4 時間目で顕著に上昇する (Takahashi *et al.*, 2006)。そこで、同じ条件で育成した ‘マイクロトム’ を供試して、卵胞子数 5×10^5 個/ml に調整した PO 卵胞子懸濁液と対照の蒸留水に根部を浸漬処理し、6 時間後における根での β -CAS 活性量を比較した。供試 PO 菌株は Takenaka *et al.* (2003) が北海道芽室町のダイズ畑作土壌から分離した NITE P-619 (MMR2) を用い、PO 卵胞子懸濁液は Hase *et al.* (2008) に従って作成した。 β -CAS 活性の定量は Han *et al.* (2007) の報告に準じ、 β -CAS の酵素反応によって生成される H_2S 量を求めることにより行った。その結果、PO 卵胞子懸濁液処理区では、1 mg の粗タンパク質量に 10.5 nmol/min の β -CAS 活性があり、対照区の 1.6 倍に上昇した (Fig. 1)。このことから、PO 卵胞子懸濁液に浸漬処理したトマトでは、 β -CAS 活性が上昇するこ

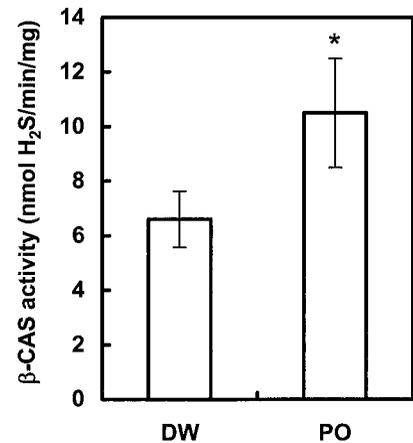


Fig. 1. β -Cyanoalanine synthase (β -CAS) enzyme activity in tomato roots treated with an oospore suspension (5×10^5 ml $^{-1}$ water) of *Pythium oligandrum* (PO) or distilled water (DW). Error bars indicate standard errors of four independent experiments, each using 50 μ g of total protein extracted from 100 mg root sample; asterisk (*) indicates a statistically significant difference between treatments (Welch's *t*-test, $P < 0.05$).

とも明らかとなった。CWP や PO 卵胞子懸濁液を処理したトマトでは、処理後 2 時間から 12 時間目にかけて一過的に ET の生成量が増加し、ET 生成量は最大で 1 時間あたり 0.01 ~ 0.015 μ mol/g [新鮮重] に達していることが明らかになっている (Hase *et al.*, 2006)。高等植物では、ET の生成に伴って等モルのシアンが生成され、そのシアンから直ちに等モルの β -シアノアラニンが生成される (Yip and Yang, 1988)。本実験では β -シアノアラニン量の測定は行えなかったが、PO 施用トマトによる ET 生成量から、新鮮重 1 g を水 1 ml に換算すると、0.01 ~ 0.015 mM の β -シアノアラニンが生成されると推定された。

β -シアノアラニン処理トマトにおける防御関連遺伝子の発現解析 蒸留水で調整した 0.001 ~ 0.1 mM の β -シアノアラニン (Sigma-Aldrich 製) 溶液を用いて ‘マイクロトム’ の根を 6 時間浸漬処理し、根における防御関連遺伝子の発現解析をノーザン法により行った。全 RNA 抽出、RNA の電気泳動、プロベナゾール、ハイブリダイゼーションおよび検出は Hase *et al.* (2008) に示した条件で行った。プローブの鋳型 DNA は Hase *et al.* (2008) と Kawamura *et al.* (2009) が報告したプラスミド DNA を用いた。その結果、メチルジャスモン酸 (MeJA) や PO 卵胞子懸濁液処理で発現誘導が確認されている *LePR6* の発現は、0.01 mM 以上の β -シアノアラニン溶液の処理で明らかに上昇した (Fig. 2a)。0.01 mM の β -シアノアラニン濃度は、上述の PO 施用トマトから推定される濃度に一致した。また、*LePR6* は、*jai1-1* 変異体では、 β -シ

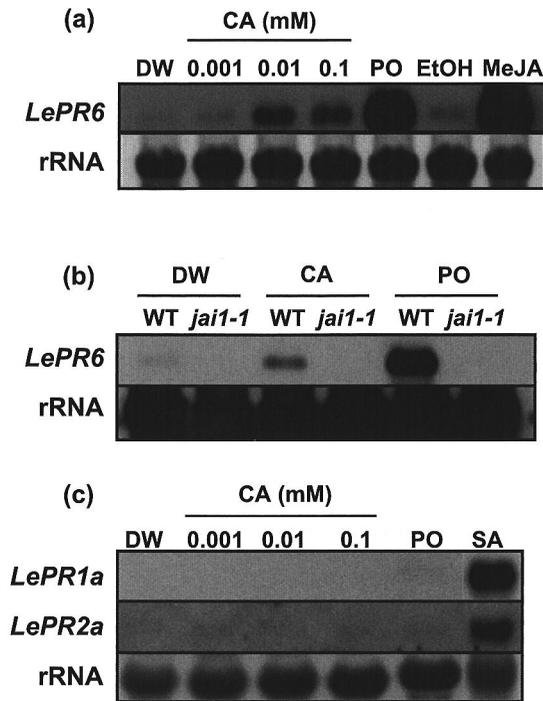


Fig. 2. Northern blot of defence-related genes expressed in roots of 'Micro-tom' tomato plants 6 h after various treatments including β -cyanoalanine (CA), oospores of *Pythium oligandrum* (PO), methyl jasmonate (MeJA) and salicylic acid (SA). (a) Transcript levels of jasmonic acid-responsive *LePR6* at 6 h after treatment with distilled water (DW), CA, 5×10^5 oospores ml^{-1} water, 0.1% of ethanol (EtOH) or 0.1 mM of MeJA. rRNA was used as an internal control. (b) Transcript levels of *LePR6* in roots of wild-type (WT) and *jai1-1* mutant (*jai1-1*) at 6 h after treatment with DW, 0.01 mM of CA or 5×10^5 oospores ml^{-1} water. (c) Transcript levels of SA-responsive *LePR1a* and *LePR2a* at 6 h after treatment with DW, CA, PO or 0.1 mM of SA.

アノアラニンを経理しても、PO 卵胞子懸濁液処理と同じく発現が誘導されなかった (Fig. 2b). *jai1-1* の変異は、SCF 型 E3 ユビキチンリガーゼを構成する F-box タンパク質と推定されるコード領域にあり、JA のシグナルは JAI1-1 のユビキチン-プロテアソーム系を介した標的タンパク質の分解によって伝達されると考えられている (Li *et al.*, 2004). したがって、 β -シアノアラニンは、JAI1-1 タンパク質の上流において JA シグナル伝達系を活性化していると考えられた。一方、*LePR1a* と *LePR2a* の発現は、 β -シアノアラニン処理により上昇しなかったことから、 β -シアノアラニンと SA のシグナル伝達系を介した防御反応との関連性はないと考えられた (Fig. 2c).

トマト青枯病に対するシアノアラニン処理の効果 1 mM の β -シアノアラニン、卵胞子数 5×10^5 個/ml の PO 卵胞子懸濁液および対照として蒸留水に浸漬処理したトマト苗そ

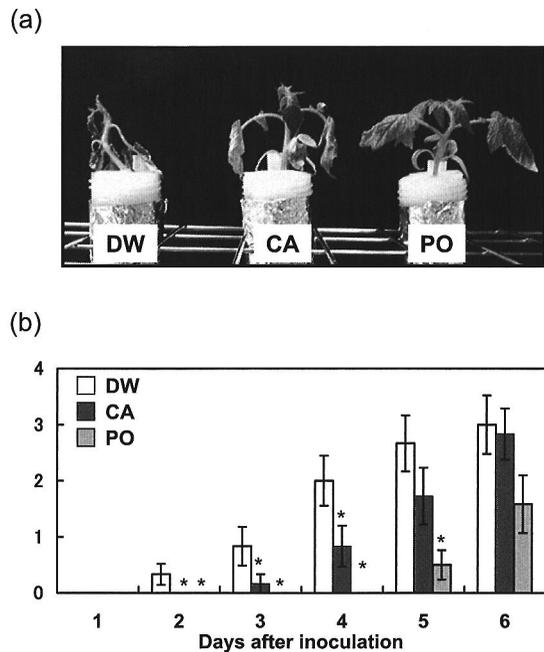


Fig. 3. Response of tomato plants after various pretreatments followed 12 h later by inoculation with 1×10^8 cfu ml^{-1} of *Ralstonia solanacearum*. (a) Typical disease severity on plants pretreated with 1 mM solution of CA, an oospore suspension of *Pythium oligandrum* (PO) (5×10^5 spores ml^{-1} water) or distilled water (DW) at 4 d after inoculation with *R. solanacearum*. (b) Quantification of disease severity at 1–6 d after inoculation. Error bars indicate standard errors for 12 plants; asterisks (*) indicate a statistically significant difference between DW and CA or PO treatments (Steel's test, $P < 0.05$). Data are from representative experiments that were repeated twice with similar results.

れぞれに、青枯病菌を接種してその発病指数を比較して青枯病の抑制効果を調べた。接種源は 8242 株 (レース 1, biovar 4, MAFF107633) を用いた (Nakaho *et al.*, 2004). 供試トマト 'マイクロトム' は、Hase *et al.* (2008) の方法に準じて石英砂を充填したポットで育成し、根を傷つけないように石英砂を洗い流してから 25°C で各処理液に根を 24 時間浸漬した。処理後、蒸留水を入れた 50 ml 容チューブに植物体を移し、6 時間静置した。続いて、根の基部から先端に向けて 4 cm の位置で根を切断し、 1×10^8 cfu/ml の細菌液を入れた 50 ml 容のチューブに移すことで接種した。接種後は、29°C の人工気象器で育成した。発病調査は、供試植物体の青枯症状の程度により、発病指数 0 ~ 4 (0 : 健全株, 1 : 青枯症状が全体の 1/4 未満, 2 : 1/4 以上 1/2 未満, 3 : 1/2 以上 3/4 未満, 4 : 3/4 以上) に設定して評価した (Roberts *et al.*, 1988). その結果、 β -シアノアラニン処理トマトは、対照に比べて発病程度が低く、接種後 2 日目から 4 日目では有意に低下した (Fig. 3). よって、 β -シアノアラニンを浸漬処理したトマト

においても、基本的に PO 卵胞子懸濁液処理と同様の青枯病に対する抵抗性誘導システムが活性化されている可能性が考えられた。しかしながら、本試験で処理した濃度は、PO 施用トマトにおける推定 β -シアノアラニン濃度より高く設定したことから、防御関連遺伝子の発現は活性化するが抵抗性発現にどの程度寄与するのかの検討が必要であると考えられた。

以上のことから、 β -CAS と β -シアノアラニンは、PO 施用トマトにおける抵抗性誘導に対して、ET 生合成過程で生成されるシアンの代謝を経て、JA シグナル伝達系を介した防御関連遺伝子の発現上昇に関わると考えられる。 β -CAS は、高等植物全般に存在しており、シアンの解毒に重要な役割を担っているが (Miller and Conn, 1980)、防御関連遺伝子の発現上昇への関与については報告例がなかった。 β -CAS が β -シアノアラニンを介して JA シグナル伝達系を活性化することは、 β -CAS の新しい生理的機能を示唆する知見であると考えられる。

これまでに、JA と ET シグナル伝達系の協調的な活性化が報告されている。シロイヌナズナではディフェンシンをコードする防御関連遺伝子の *PDF1.2* の発現が JA と ET の両シグナル伝達系の活性化を必須とする (Penninckx *et al.*, 1998)。また、生物防除微生物の *Pseudomonas fluorescens* による全身誘導抵抗性の発現も JA と ET のシグナル伝達系に依存している (Pieterse *et al.*, 1998)。 β -CAS は、PO 施用トマトに限らず防御反応における JA と ET シグナル伝達系の協調的な活性化を説明する因子の一つになる可能性が考えられる。

謝 辞

本研究を実施するにあたり、東北大学大学院農学研究科高橋英樹博士には有益なご助言を賜った。ここに感謝の意を表したい。本研究は、生物系特定産業技術研究支援センターの異分野融合研究支援事業の助成と、一部は科研費基盤 C (23580059) の助成を受けて行った。

引用文献

Al-Rawahi, A.K. and Hancock, J.G. (1997). Rhizosphere competence of *Pythium oligandrum*. *Phytopathology* 87: 951–959.
 Benhamou, N., Rey, P., Picard, K. and Tirilly Y. (1999). Ultrastructural and cytochemical aspects of the interaction between the mycoparasite *Pythium oligandrum* and soilborne plant pathogens. *Phytopathology* 89: 506–517.
 Han, S.E., Seo, Y.S., Kim, D., Sung, S-K. and Kim, W.T. (2007). Expression of *MdCAS1* and *MdCAS2*, encoding apple β -cyanoalanine synthase homologs, is concomitantly induced during ripening and implicates MdCAs in the possible role of the cyanide detoxification in Fuji apple (*Malus domestica*

Borkh.) fruits. *Plant Cell Rep.* 26: 1321–1331.
 Hase, S., Shimizu, A., Nakaho, K., Takenaka, S. and Takahashi, H. (2006). Induction of transient ethylene and reduction in severity of tomato bacterial wilt by *Pythium oligandrum*. *Plant Pathol.* 55: 537–543.
 Hase, S., Takahashi, S., Takenaka, S., Nakaho, K., Arie, T., Seo, S., Ohashi, Y. and Takahashi H. (2008). Involvement of jasmonic acid signalling in bacterial wilt disease resistance induced by biocontrol agent *Pythium oligandrum* in tomato. *Plant Pathol.* 57: 870–876.
 Ikeda, S., Shimizu, A., Shimizu, M., Takahashi, H. and Takenaka, S. (2012). Biocontrol of black scurf on potato by seed tuber treatment with *Pythium oligandrum*. *Biol. Control* 60: 297–304.
 Li, L., Zhao, Y., McCaig, B.C., Wingerd, B.A., Wang, J., Whalon, M.E., Pichersky, E., Howe, G.A. (2004). The tomato homolog of CORONATINE-INSENSITIVE 1 is required for the maternal control of seed maturation, jasmonate-signaled defense responses, and glandular trichome development. *Plant Cell* 16: 126–143.
 Kawamura, Y., Takenaka, S., Hase, S., Kubota, M., Ichinose, Y., Kanayama, Y., Nakaho, K., Klessig, D.F. and Takahashi, H. (2009). Enhanced defense responses in Arabidopsis induced by the cell wall protein fractions from *Pythium oligandrum* require *SGT1*, *RAR1*, *NPR1* and *JAR1*. *Plant Cell Physiol.* 50: 924–934.
 Martin, F.N. and Hancock, J.G. (1987). The use of *Pythium oligandrum* for biological control of preemergence damping-off caused by *P. ultimum*. *Phytopathology* 77: 1013–1020.
 Miller, J.M. and Conn, E.E. (1980). Metabolism of hydrogen cyanide by higher plants. *Plant Physiol.* 65: 1199–1202.
 Nakaho, K., Inoue, H., Takayama, T. and Miyagawa, H. (2004). Distribution and multiplication of *Ralstonia solanacearum* in tomato plants with resistance derived from different origins. *J. Gen. Plant Pathol.* 70: 115–119.
 Penninckx, I.A.M.A., Thomma, B.P.H.J., Buchala, A., Mettraux, J.-P. and Broekaert, W.F. (1998). Concomitant activation of jasmonate and ethylene response pathways is required for induction of a plant defensin gene in Arabidopsis. *Plant Cell* 10: 2103–2113.
 Pieterse, C.M.J., van Wees, S.C.M., van Pelt, J.A., Knoester, M., Laan, R., Gerrits, H., Weisbeek, P.J. and van Loon, L.C. (1998). A novel signaling pathway controlling induced systemic resistance in Arabidopsis. *Plant Cell* 10: 1571–1580.
 Roberts, D.P., Denny, T.P. and Schell, M.A. (1988). Cloning of the *egl* gene of *Pseudomonas solanacearum* and analysis of its role in phytopathogenicity. *J. Bacteriol.* 170: 1445–1451.
 Takahashi, H., Ishihara, T., Hase, S., Chiba, A., Nakaho, K., Arie, T., Teraoka, T., Iwata, M., Tugane, T., Shibata, D. and Takenaka, S. (2006). Bata-cyanoalanine synthase as a molecular marker for induced resistance by fungal glycoprotein elicitor and commercial plant activators. *Phytopathology* 96: 908–916.
 Takenaka, S., Nishio, Z. and Nakamura, Y. (2003). Induction of defense reactions in sugar beet and wheat by treatment with cell wall protein fractions from the mycoparasite *Pythium oligandrum*. *Phytopathology* 93: 1228–1232.
 Yip, W.-K. and Yang, S.F. (1988). Cyanide metabolism in relation to ethylene production in plant tissues. *Plant Physiol.* 88: 473–476.