

植物・病原菌相互作用による生物フォトンの生成

静岡県農業試験場 ^{まき} 牧 ^の 野 ^{たか} 孝 ^{ひろ} 宏

はじめに

植物体から、非常に微弱な光(生物フォトン: biophoton)が放出されていることが、1955年に COLLIER によって報告された。その後旧ソ連等で研究が進められ、1970年代に、植物病原菌の病原力や病害抵抗性検定への試みが見られる。また植物の耐冷性の研究への応用も見られる(米国特許出願に対するクレームより)。1980年代には、生物フォトンが二次元でとらえることができるようになり、浜松ホトニクスグループは、初めてダイズの発芽種子のフォトン生成状況のイメージングに成功し、発光部位を特定した(ICHIMURA, 1989)。

好氣的呼吸を行っている植物は、生体酸化機能の発現としてチトクローム系呼吸、生体成分の酸化合成反応の機能として、各種のオキシダーゼ、オキシゲナーゼが進化している。生体の活動により、体内においては物質の酸化反応が起こり、様々な励起分子が生成され、それらは基底状態に戻る時点でエネルギーを放出し、その一部は光量子収率に従って生物フォトンとして放出される。

生体から放出される生物フォトンが、どのような反応課程に由来するものか、また細胞間における情報伝達の役割を担っているものか否かは未解明の分野となっている。このため植物における生物フォトンの生成要因やその役割を明らかにし、実用的な応用分野を開拓していくとするものである。今回は、植物と(非)病原菌との相互作用に伴って観察される生物フォトンについて、二、三の知見が得られたので報告する。

I 生物フォトン計測装置

1 一次元フォトン計測装置

浜松ホトニクス社製(マルチサンプルフォトンカウンティングシステム I: 口絵写真①参照)の生物フォトン計測装置は、光(量)子 1cm^2 当たり数個/sec以下の感度があり、ホタルの光の1千万分の1から1億分の1程度の微弱光が計測可能である。検出には特別に選別された光電子倍增管を用いているため、冷却は行っていない。

Biophoton Emission Generated by Plant-parasite Interaction. By Takahiro MAKINO

(キーワード: 生物フォトン, 病原菌, 相互作用, オキシダーゼイブパースト)

い。直径 6cm^2 のペトリ皿が一度に16個セットできるように作成したので、同時に多数の試料が比較検討できる。また分光分析ができるように加工した装置もある。

2 二次元フォトン計測装置

二次元でフォトンが観測できるため、イメージングが可能である。口絵写真②は、浜松ホトニクス社の製品であるが、CCDを検出器に用いているので感度は前者に比べて低い。蛍光分析や化学発光分析に広く利用されているが、植物からの生物フォトン直接扱った報告は少ない。口絵写真③のようにノイズレベルを超えるフォトンの生成があればイメージングは可能である。

II 植物と(非)病原菌の相互作用による生物フォトンの生成

生物フォトンあるいは生物発光(bioluminescence)と呼ばれる現象は、生体内における化学発光(chemiluminescence)と考えられる。病原菌または植物体内に自然に生息している非病原菌等の侵略性病原体の植物組織への侵入は、植物体に生体防御反応を誘導し、一連の抵抗性反応を完成させる。

道家(1996)は、植物組織が病原菌の侵入に対応して、活性酸素 O_2^- を生成することを発見し、これが植物の危機認識のシグナルとして機能していることを強く

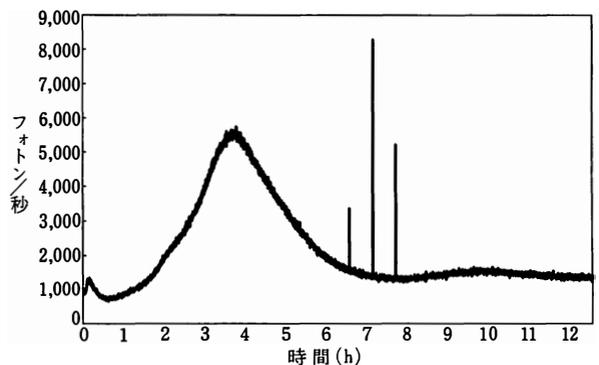


図-1 ダイコン根茎のスライスに非病原性 *F. oxysporum* を接種したときの生物フォトンの生成

ダイコン: 品種, 耐病総太り, 直径 5cm , 厚さ 8mm にスライスし, 1晩ペトリ皿内 25°C で、エイジング

供試菌株: *F. oxysporum* (レタス健全株より分離), 接種濃度: 10^6 cells/ml (分生胞子), 温度: 25°C .

示唆している。一重項の酸素は蛍光を持つので、植物体が病原体の侵入を認識して O_2^- を生成すれば、生物光子として検出が可能と考えられる。

筆者らは、ダイコン根茎およびサツマイモ塊茎のスライスを用意し、多湿条件下でエイジングした後、レタスの組織から分離した非病原性 *Fusarium oxysporum* の分生孢子懸濁液を接種して、生物フォトンの生成状況を観察した。

図-1に示したように、ダイコン-*F. oxysporum*系では、接種してから数分後に最初のピークが現れ、数時間後に第二のピークが見られた後収束した。最初のピークは図-2のように、活性酸素種の増感試薬 4-(5, 6-Dimethoxy-2-benzothiazolyl) phthoalyl-hydraize (DBPH) によって著しく増感された(牧野ら, 1998)。道家ら(1996)は、侵略性病原体の攻撃に対して、感染防御応答が始動するが、この応答の初期に活性酸素 O_2^- 生成を伴うオキシダーティブースト現象を報告しており、生物光子生成の時期とよく一致する。これらのことから第一ピークの光子生成は、活性酸素の励起エネルギーに由来するものと推定した。

第二のピークは、DBPHによって増感されなかったことから、第一のピークとは別の反応と考えられた。侵略性病原体の侵入により、植物は過敏反応を起こし、急激な細胞死やファイトアレキシンの生成、キチナーゼ、グルカナーゼなどの抗菌性酵素の生成が数時間から十数時間の間に起こる。これらの一連の反応は、相当のエネルギー消費を伴う。酸素呼吸を阻害することで生物フォトンの生成がどのように変化するか検討した。

図-3のように、試料を入れたペトリ皿の中の空気を炭酸ガスで置換すると、フォトンの生成量が全体に激減すると同時に、無処理に見られたようなピークは観察されなかった。また接種後ペトリ皿をシールして、空気との交換を絶つとやはりフォトンの生成は全体的に少なくなり、第二のピークは著しく抑制された。さらに、NADP(H)酸化酵素阻害剤を処理すると、酸素の供給を

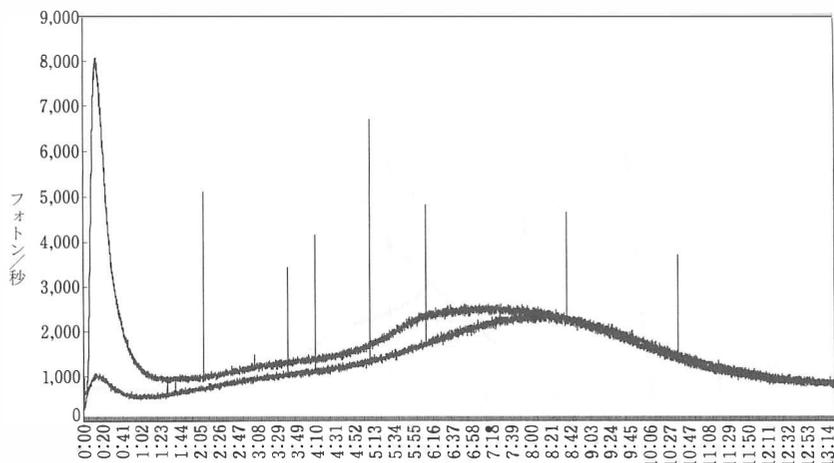


図-2 ダイコン-*F. oxysporum*系に、増感試薬 DBPH (同仁製薬) を処理 (0.1 mM) したときの生物フォトンの生成

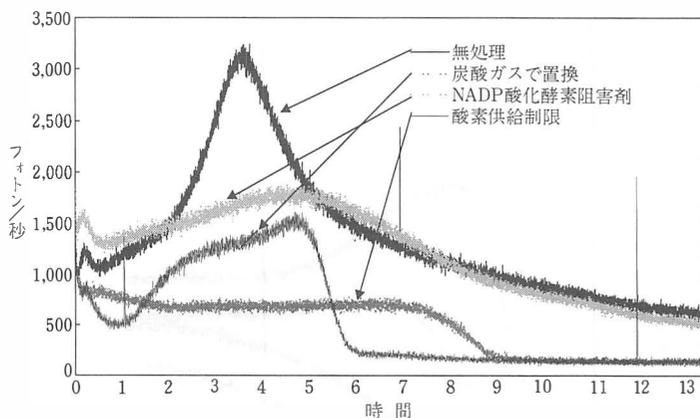


図-3 ダイコン-*F. oxysporum*系において、酸素供給を制限したときの生物フォトンの生成

制限した場合と類似した傾向を示し、第二のピークは強く抑制された(牧野ら, 1998)。このことから、第二のピークは、呼吸やエネルギー代謝に伴って生成される生物光子であろうと推定した。これらの一連の反応は、酸化酵素であるルシフェラーゼによる、基質の酸化によって発光する発光細菌やホタルの発光現象と、共通する部分があるのかもしれない(HASTINGS, 1986)。

サツマイモ-*F. oxysporum*系でもフォトンの生成はダイコンと類似したパターンであった(図-4)。異なった点として、第一ピークは観察されず、生成量がダイコン系に比べ5~10倍多かったことである。口絵写真③のように、1時間程度の積算でアルファベットのFの文字が映像化できた(牧野ら, 1998)。活性酸素種に由来すると考えられた第一ピークが観察されなかった理由は明らかでないが、生成されていても、何らかの理由で検出

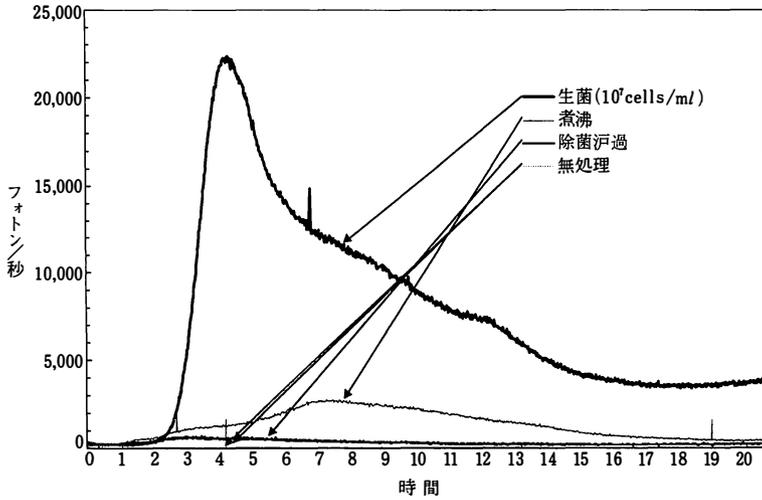
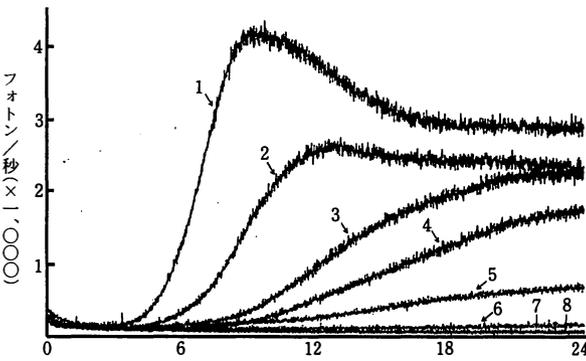


図-4 サツマイモに各種処理を行った *F. oxysporum* を接種したときの生物フォトンの生成
 品種：ペニアズマ，供試菌株：*F. oxysporum*（イチゴ健全株より分離）その他の処理は，ダイコンに同じ。



グラフ番号に対応する処理

A	B	C
1 L.	L.	1×10^7
2 L.	L.	2×10^6
3 L.	L.	5×10^5
4 L.	L.	1×10^5
5 L.	D.	1×10^7
6 L.	滅菌水	
7 D.	D.	1×10^7
8 D.	L.	1×10^7

A: サツマイモの状態
 B: 菌の状態
 C: 菌の濃度(個/ml)
 L: 生 D: 死

図-5 サツマイモ-*F. oxysporum*系における接種菌量が生物フォトンの生成に与える影響

表-1 サツマイモ-*F. oxysporum*系における菌の接種濃度が生物フォトンの生成に与える影響

No.	サツマイモの条件	<i>F. oxysporum</i>		生物フォトン		
		条件	孢子濃度 10^6 cells/ml	最大値 10^3 /sec	累積値 10^3 /24 h	最大値 到達時間
1	生	生	100	4.3	49	10
2	生	生	20	2.7	33	13
3	生	生	5	2.4	21	22
4	生	生	1	1.8	14	≥24
5	生	死	100	0.7	6.6	≥24
6	生	蒸留水	0	0.3	2.3	0*
7	死	死	100	0.4	1.7	0
8	死	生	100	0.3	1.5	0

*: ピークが認められない。

できないのか、また危機認識のシグナル伝達機構が別にあるのか、重要な問題であるので、さらに検討を進めたい。

各種処理を行った *F. oxysporum* をサツマイモに接種して、フォトンの生成を観察すると、図-4で示したように、死菌や培養濾液ではその生成はごく弱く、生菌を接種したときのみ多量のフォトンの生成が見られた。また、加熱あるいは凍結して不活化したサツマイモでは、生菌を接種してもフォトン生成の立ち上がりは見られなかった(表-1)。このことから、生物フォトン、植物体と侵略性病原体の相互作用により、植物側で生成されているものと考えられた(MAKINO et al., 1996)。

III サツマイモ塊茎の防御応答と生物フォトンの生成

サツマイモは、黒斑病菌である *Ceratocystis fimbriata* の接種により、イポメアマロンが誘導される。図-5のように、非病原性の *F. oxysporum* の接種菌量を 10^5 個/ml から 10^7 個/ml まで変えて、生物フォトンの蓄積量を見ると、接種菌量に対応して蓄積量も対数的な増加が見られた。また、非病原性 *F. oxysporum* を接種した場合もイポメアマロンの蓄積が認められた(MAKINO et al., 1996)。特に興味あるのは、接種菌量が増加すると、フォトンの生成量が増加するだけでなく、立ち上がりが早くなることである。侵略性病原体の侵入量の多少が、植物の危機認識のシグナルの強さとなり、それが感染防御応答の早さにも反映していると思われる。

IV 生物フォトンのスペクトル

植物-(非)病原菌相互作用による生物フォトンは、生成量が微弱であるため回折格子を用いた分光分析は実施されていない。しかし、フィルターを用いた波長分析では、図-6のように、紫外線に近い領域から光電子増倍管の感度限界である600 nm付近まで、広い範囲の波長域で生成が見られる(MAKINO et al., 1996)。波長域によって、強弱が認められるが、反応分子種を特定するためには、回折格子を用いた高精度な分光とともに、ESR等による解析が必要となる。

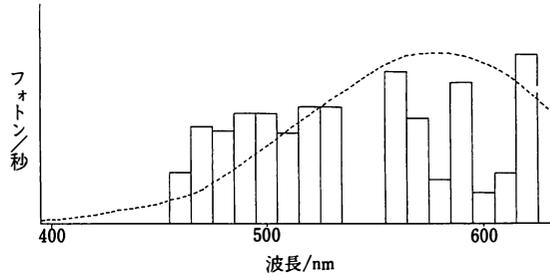


図-6 サツマイモ-F. oxysporum系で生成された生物フォトンのスペクトル

V エリシター処理による生物フォトンの生成

各種のエリシター(生体防御反応を誘導する物質)をダイコンに接種してフォトンの生成を観察すると、図-7のように、ダイコン-F. oxysporum系と同様に数分後に立ち上がりが見られ、これらは、DBPHで著しく増感されることから、活性酸素種に由来した生物光子であると推定された(牧野ら, 1998)。生菌だけでなく各種のエリシター処理によっても、生物光子が生成されることが明らかとなった。誘導抵抗性があるとされるデジトニンやキトサンで生成量が多かった。植物が病原菌に対して誘導抵抗を引き起こすエリシターの能力と生物光子の生成量との関係は明確ではないが、現在の実験系に安定性を与えることで評価するシステムが確立できるものと期待している。

おわりに

以上、植物-(非)病原菌相互作用に伴って生成される生物光子について概略報告したが、研究はまだ始まったばかりである。生物光子に関する研究は、生体の生命活動の基本となる酸(素)化反応によって生成すると考えられていることから、植物病理学以外の分野でも広く応用が期待される。

筆者らの当面の目標として、病害抵抗性やストレス耐性個体の迅速な選抜を行うための技術確立、非殺菌性殺

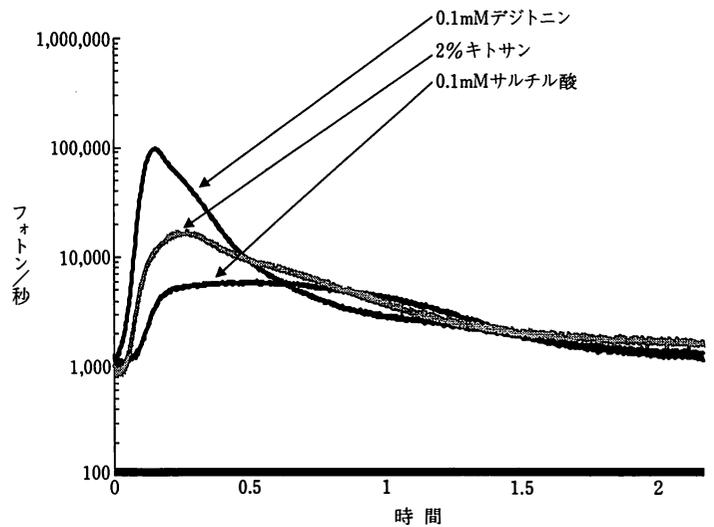


図-7 ダイコン根茎スライスに、エリシター物質を処理したときの生物光子の生成
増感剤としてDBPH 0.1 mM 添加, その他の条件は、図-1記載に準ずる。

菌剤と呼ばれる病害抵抗性を誘導する農薬の探索技術の開発、生物防除に利用する菌株の選抜や培養技術の開発などへの応用に向けた研究を進めていきたい。

引用文献

- COLLI, L. et al. (1955): *Experientia* 11: 479~481.
- 道家紀志(1996): 植物のシグナルトランスダクション, 東京化学同人, 東京, pp.108~116.
- HASTINGS, J. et al. (1986): *Light emission by plants and bacteria*, Academic Press, Inc., Orlando, Florida pp. 365~398.
- ICHIMURA, T. et al. (1989): *Phytochem. Phytobiol.* 50: 283~286.
- MAKINO, T. et al. (1996): *ibid.* 64: 953~956.
- 牧野孝宏ら(1998): 平成10年度日本植病理学会大会, 札幌.