

# 生体防御応答におけるバイオフィトンと 抵抗性誘導農薬のスクリーニング

静岡県病害虫防除所 <sup>まき</sup> 牧 <sup>の</sup> 野 <sup>たか</sup> 孝 <sup>ひろ</sup> 宏

## はじめに

2005年度に、「食料・農業・農村基本計画」が見直され、食料の安定的供給の確保、食の安全と消費者の信頼の確保、また、我が国農業全体のあり方について環境保全を重視したものに転換するとしている。我々は、30年以上前から「生物的防除技術」に注目し、環境負荷の少ない病害防除研究を進めてきた。植物が放出する極微弱発光（バイオフィトン、後述）現象に関する研究も、その一環として、約20年前に有効微生物を効率的にスクリーニングする手法として着想し、研究に着手したものである。微生物農薬の開発は、いかに優れた菌株を探し出すかにかかっていることから、効率的で的確な選抜法は極めて重要な基盤技術となる。これまで筆者らは、文部科学省放射線関連交付金および静岡県単独プロジェクトなどにより、植物および動物細胞の生理的状態とバイオフィトン放射との関連について検討を進めてきた。その結果、バイオフィトンが生体防御応答と深く関連して放射されること、また、放射の要因として生体防御に深く関連するリポキシゲナーゼやパーオキシダーゼなどの酸化酵素が関連していることが知見として得られた。植物免疫システムの活性化により放射されるバイオフィトンの極微弱な光のパターン解析を通じて、全身獲得抵抗性（SAR）あるいは抵抗性誘導（ISR）物質の評価方法を、病害抵抗性品種、微生物の選抜方法に先行してほぼ確立したのでその概略を紹介したい。

## I バイオフィトンの測定方法

生物は、その生命活動によって常に極微弱な光を放出している。この極めて微弱な光は、しばしばバイオフィトン（Biophoton）と呼ばれ、光量子にして約  $10^3$  photons/sec/cm<sup>2</sup>、発光強度にしておよそ  $10^{-16}$  W/cm<sup>2</sup>（1光子 =  $10^{-18}$  W）である。特に生長点など代謝の著し

い部分は、バイオフィトンの放射が比較的容易に観察される。図-1は、タケノコからのバイオフィトンを累積して観察したものである。バイオフィトンの波長域は、可視光から近赤外域までかなり幅が広いが、紫外領域の放射はほとんど見られない。また、生物発光として知られるルシフェリン・ルシフェラーゼ反応や発光タンパク質によるものと比べて、発光エネルギーは約10,000～1,000,000分の1以下と小さく、特定の収率の高い発光過程に基づく現象とは区別される。

このように極微弱な発光を観察するためには特別な装置が必要となる。このため、浜松ホトニクス(株)が特別に設計した2インチ光電子倍增管を内蔵した16チャンネルのフォトンカウンターMSPCシリーズを使用した。また、バイオフィトンを映像としてとらえる装置として浜松ホトニクス(株)製のアルガス50を使用した。

実際の実験では、ダイコン根部組織あるいはサツマイモの塊根を横に切断し、厚さ7～8mm、直径5cm程度のディスクを作成し、滅菌したろ紙を敷いた6cmのプラスチックペトリ皿（栄研）にセットして計測する。イネ培養細胞を用いる場合は、25℃、暗黒下で1週間程度振とう培養した1mm以下の細胞塊をペトリ皿全体に分散させて用いる。

## II 非病原性 *Fusarium oxysporum* を接種したダイコンディスクでのバイオフィトンの放射

非病原性 *Fusarium oxysporum* (NPF) は、いくつか

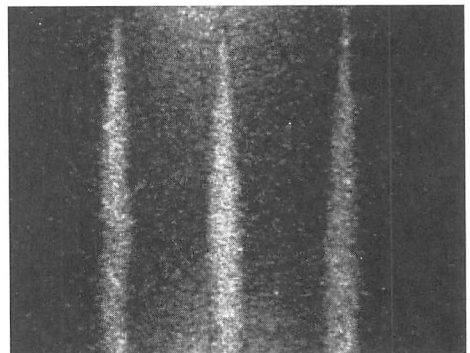
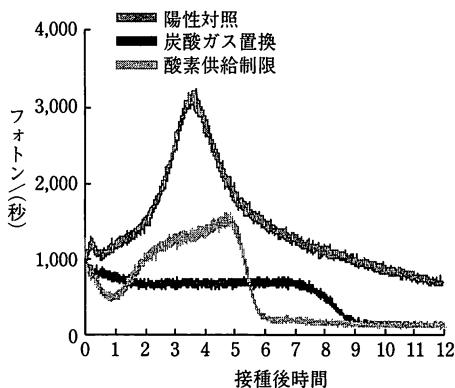


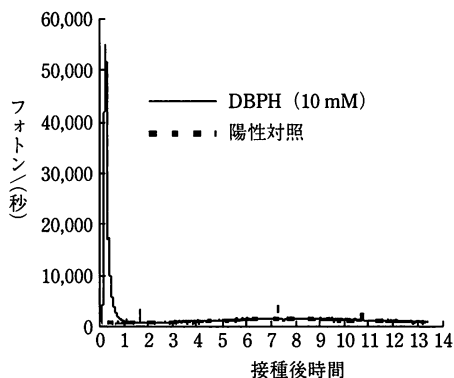
図-1 タケノコ(チゴザサ)のバイオフィトン放射アルガス50により1時間累積。

Biophoton in Plant Defense Response and Screening of Systemic Acquired Resistance (SAR) Substances with Biophoton Emission.  
By Takahiro MAKINO

(キーワード: バイオフィトン, 植物生体防御, スクリーニング, 全身獲得抵抗性, Biophoton, Plant defense, Screening, SAR substances)



(a) NPF処理による光子放射と密封処理による酸素供給制限および炭酸ガス置換による光子放射の抑制



(b) 活性酸素種増感剤の光子放射に対する効果

図-2 非病原性 *Fusarium oxysporum* (NPF) の接種によるダイコンのバイオフィオンの放射

の植物種において病害抵抗性を誘導することが知られている。NPFをジャガイモ・デキストロース液体培地で3～4日間培養し、ガーゼでろ過して菌体を取り除き、滅菌水に分散させて得た約  $10^7$  cells/mlの胞子懸濁液をダイコンのディスク上に接種してバイオフィオンの放射を経時的に追ってみると、図-2(a)に示したcontrolのように、処理後10分以内に小さなピークが現れ、3時間を過ぎたところで大きなピークが検出された。次に、ペトリ皿をパラフィルムで覆って酸素供給を制限すると、第1ピークおよび第2ピークともに低下し、特に第2のピークは著しく抑制された。さらに、炭酸ガスで置換すると、光子放射は全体に強く抑制され、ピークは観察されなくなった。このことから、バイオフィオンの放射には、酸素の供給が重要と考えられる。

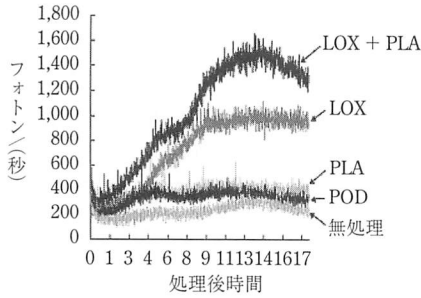
次いで、ピークが二つ見られたことから、その由来を明らかにするために、細胞壁または細胞膜に水素結合し、過酸化水素や活性酸素種に対して中性付近で増感作用をもつ化学発光試薬4-(5,6-dimethoxybenzothiazolyl)phthalhydrazide (DBPH)を10 mMとなるように添加して光子放射を計測した。その結果、図-2(b)に示したように第1のピークは著しく増光したが、第2のピークは全く影響されなかった。このことから、第1のピークと第2のピークは、異なるメカニズムによって光子放射が起こっているものと考えられる。DBPHは、細胞膜などにトラップされて細胞内に浸透できないとされることから、第2のピークは細胞内部からのバイオフィオンである可能性が高いと考えられる。

### III バイオフィオンのソースについて

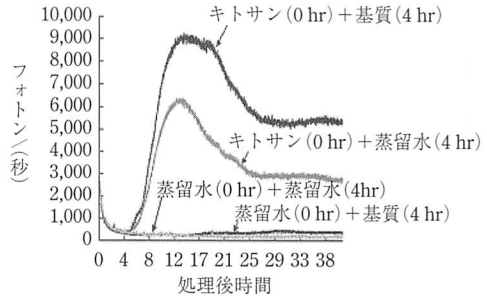
バイオフィオンは、一般に植物体内で起こる呼吸、脂質の酸化、蛍光分子へのエネルギー移動、DNAの構造的変化等、生命活動により生成される活性酸素種やフリーラジカルなどが主な起源と考えられている。生体防御応答では、下記に示すように酸化反応が誘導され、様々な励起分子が生成されることから、バイオフィオン放射の要因となる多くのことが起こると考えられる。

植物に病原体が感染すると、最初に *oxidative burst* (OXB) が起こり、MAPKカスケードにより転写因子が活性化して、防御応答に関連する様々な遺伝子の発現が誘導される。細胞内では生体防御に関連する様々な物質が合成され、その結果、多くの活性酸素種が生成される。エリターや病原菌の侵入に対して誘導されることが知られている、主な生体防御関連酵素としてフェニールアラニン・アンモニアリアーゼ (PAL)、パーオキシダーゼ (POD)、リポキシゲナーゼ (LOX)、キチナーゼ、グルカナーゼ、NADPHオキシダーゼ (NADPH)、一酸化窒素合成酵素 (NOS)、硝酸還元酵素 (NR) などがある。これら8種について、それぞれフェニールアラニン、コニフェリール・アルコール、リノレイン酸、エチレン・グリコール・キチン、エチレン・グリコール・キトサン、NAPDPH、L-アルギニンおよび亜硝酸ナトリウムを基質として光子放射を調査した。その結果、LOX、PODの2種の酵素反応で光子放射が認められた。

*in vitro* 実験で光子放射の認められたPODおよびLOXを、緩衝液に溶解してサツマイモディスクの表面

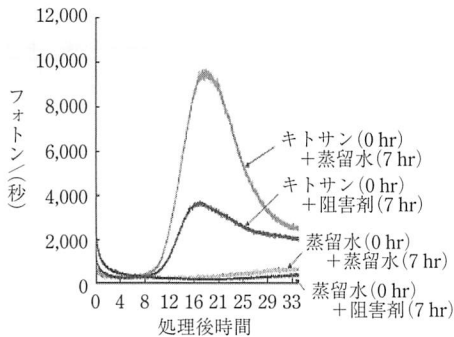


(a) サツマイモディスクに各種酵素液 (PLA : 10 mg/ml, LOX : 10 mg/ml, PLA + LOX : 10 mg/ml, POD : 0.05 mg/ml) を処理したときのバイオフィトン放射

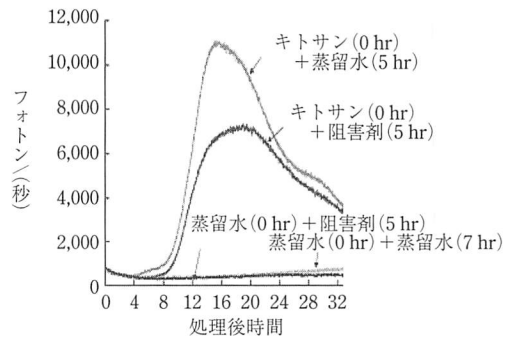


(b) サツマイモディスクにエリシター (キトサン 0.2%) 処理 4 時間後に、2 mM リノレイン酸を処理したときのバイオフィトン放射

図-3 生体防御関連酵素を基質と反応させたときおよび生体に処理したときの光子放射



(a) エリシター (キトサン) 処理 7 時間後に 1 mM カフェ酸を処理



(b) エリシター処理 5 時間後に 50 μM メタバナジン酸ナトリウムを処理

図-4 酵素阻害剤によるバイオフィトン放射の抑制

に滴下して、酵素処理、基質添加の影響および酵素阻害剤処理の影響を調査した。その結果、図-3(a)に示したように、LOX を処理することによって明らかな光子放射の増加が認められ、特に膜脂質を分解するホスホリパーゼ (PLA) と同時に処理することで、光子放射量が増加した。しかし、POD 処理では、光子放射の増加は認められなかった。

サツマイモディスクに、エリシターとしてキトサンを処理すると、一過性のバイオフィトンの放射が見られた。経時的に LOX 酵素活性を調べた結果、エリシター処理 14 時間後まで急激に活性が高まり、その後なだらかに上昇した。しかし、バイオフィトンの放射は 16 時間前後から低下した。図-3(b)に示したように、LOX の基質であるリノレイン酸を 4 時間後に加えると、光子放射の顕著な高まりが認められるので、光子放射の低下は、基質不足が一つの原因になっていると考え

られる。

次に、LOX および POD の酵素阻害剤が、バイオフィトン放射に与える影響について検討した。阻害剤は光子放射が最大となったところで処理した。カフェ酸処理により LOX を阻害するとその影響は大きく、図-4(a)に示したように、光子放射は 9,500 から 3,500 cps へと低下し、60% 以上抑制された。また、メタバナジン酸サンナトリウム処理によって、POD の活性を阻害すると、図-4(b)に示したようにバイオフィトンの放射は 11,000 cps から 7,500 cps へと低下し、30% 以上抑制された。なお、このときの酵素活性の阻害程度については、試料を破碎して、LOX および POD 活性が完全に失われていることを確認している。両者の阻害程度を合わせると 90% 以上となり、サツマイモ塊根における生体防御応答によるバイオフィトン放射のかなりの部分を説明できると考えられる。

#### IV シグナル物質および抵抗性誘導物質の処理によるバイオフィトン放射

サルチル酸は、細胞の過敏感死を誘導する物質として知られている。また、ジャスモン酸はファイトアレキシンを誘導する物質として知られ、相互に調節作用する生体防御応答に重要な生理活性物質と考えられている。図-5に示したように、イネ細胞培養(イネカルス)にサルチル酸処理すると2~3時間後にバイオフィトン放射のピークが現れた。また、ジャスモン酸を処理しても2時間後に同様なピークが見られた。プロベナゾールなど病害抵抗性誘導剤を処理しても同様な反応が見られる。しかし、銅剤、キャプタン、TPN、イミノクタジンなどSH基、呼吸、膜機能阻害を示す物質でも、強いバイオフィトンの放射が見られ、これらは、バイオフィトンによる抵抗性誘導物質スクリーニングするときのノイズとなる。そこで、抵抗性誘導剤に先に処理をして細胞を刺激しておき、数時間後にエリシターを処理するとその応答と見られるバイオフィトンの放射が見られる。抵抗性誘導農薬であるプロベナゾールや Acibenzolar-S-methyl (ASM) では、図-6(a), (b)に示したように、

エリシター処理によりバイオフィトンの相対的発光強度が強く現れるが、図-6(c), (d)のようにチオフアネートメチルやTPNなどの非抵抗性誘導農薬では、無処理と同等か無処理のほうが相対的に発光強度は強くなり、抵抗性誘導農薬と逆の状態となる。このことから、抵抗性誘導剤と非抵抗性誘導剤との区別ができるので、

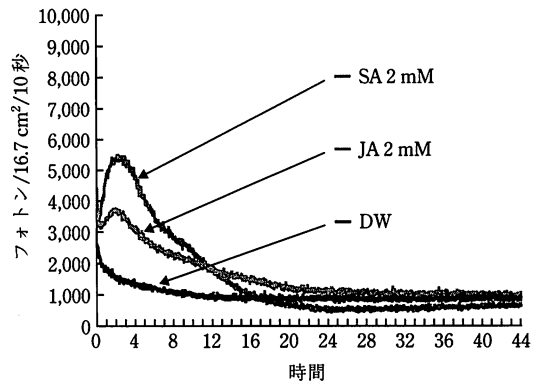
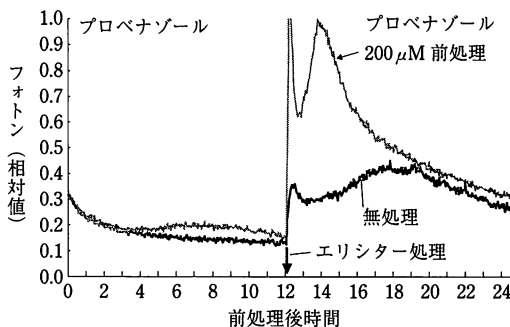
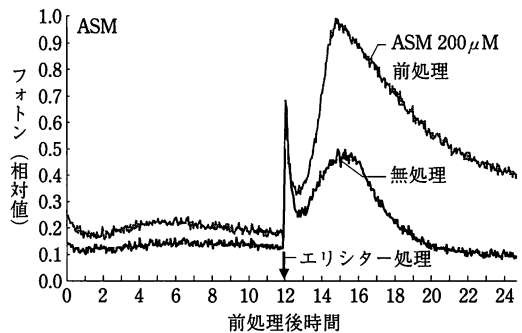


図-5 シグナル物質処理によるバイオフィトンの放射(イネカルス)

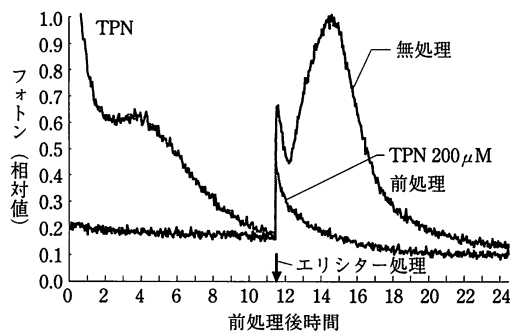
SA:サルチル酸, JA:ジャスモン酸, DW:滅菌水.



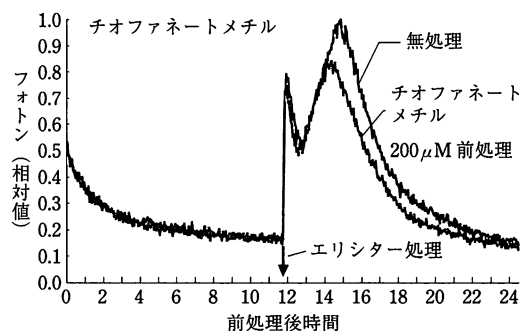
(a) プロベナゾール 200 $\mu$ M 前処理



(b) Acibenzolar-S-methyl (ASM) 200 $\mu$ M 前処理



(c) TPN 200 $\mu$ M 前処理



(d) チオフアネートメチル 200 $\mu$ M 前処理

図-6 病害抵抗性誘導剤前処理後エリシターを処理したときのイネカルスにおけるバイオフィトンの放射

実用的な抵抗性誘導農薬候補物質のスクリーニングが可能となった。現在、新たなプロジェクトにおいて、天然物や農薬メーカーの膨大なライブラリーの中からスクリーニングを行っている。

## おわりに

以上紹介したように、バイオフォトンを用いた抵抗性誘導農薬の評価は、植物の病原菌に対する防御応答シグナルを光で検出するため、自動化しやすい特徴を備えている。現在、自然界から収集した天然素材やこれまでに化学合成された膨大なライブラリーを網羅的に探索している。また、当初の目的であった有効微生物の探索、抵抗性品種の開発、さらには、広く植物に対する生理活性

物質の評価に利用できるのではないかと今後を期待をしている。

最後に、本研究を推進するに当たっては、農薬メーカー、光技術メーカー関係の皆様にご多様なご支援、ご協力をいただいている。ここに記して、深く感謝申し上げます。

## 参考文献

- 1) AOSHIMA, Y. et al. (2003): *Indian J. Exp. Biol.* 41: 494 ~ 499.
- 2) CHWIROT, B. W. (1998): *Biophotons*, Chang, J.-J. et al. eds., Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, p. 229 ~ 237.
- 3) MAKINO, T. et al. (1996): *Photochem. Photobiol.* 64: 953 ~ 956.
- 4) 牧野孝宏 (2004): *日本農薬学会誌* 29: 256 ~ 261.
- 5) ROSCHGER, P. et al. (1993): *Photochem. Photobiol.* 57: 580 ~ 583.

## 新しく登録された農薬 (20 ページから続き)

### ●クロチアニジン粒剤

21645: 協友ダントツ粒剤 (協友アグリ) 2006/2/22

クロチアニジン: 0.5%

稲: ウンカ類, ツマグロヨコバイ, カメムシ類: 収穫 14 日前まで, 稲 (箱育苗): イネミズゾウムシ, イネドロオウムシ: 移植 3 日前~移植当日, きゅうり: アブラムシ類: 育苗期後半, きゅうり: コナジラミ類, アブラムシ類, ミナミキイロアザミウマ: 定植時, すいか: アブラムシ類, ミナミキイロアザミウマ: 定植時, メロン: コナジラミ類, アブラムシ類, ミナミキイロアザミウマ, トマトハモグリバエ: 定植時, トマト, ミニトマト: コナジラミ類: 鉢上時, トマト, ミニトマト: コナジラミ類, アブラムシ類, マメハモグリバエ, トマトハモグリバエ: 定植時, なす: アブラムシ類, マメハモグリバエ, コナジラミ類: 定植時, レタス: アブラムシ類: 育苗期後半, キャベツ: モモアカアブラムシ, コナガ, アオムシ: 育苗期後半, ピーマン: アブラムシ類: 定植時, だいこん: アブラムシ類: は種時, ねぎ: ネギアザミウマ, ネギハモグリバエ: 収穫 3 日前まで, ばれいしょ: アブラムシ類: 植付時, かんしょ: コガネムシ類: 植付時, かんきつ (苗圃): ミカンハモグリガ: 育苗期, ばら: アブラムシ類, ミカンキイロアザミウマ: 発生初期, きく: アブラムシ類, マメハモグリバエ, アザミウマ類: 発生初期

### ●クロチアニジン水溶液

21646: 協友ダントツ水溶液 (協友アグリ) 2006/2/22

クロチアニジン: 16.0%

稲: ウンカ類, ツマグロヨコバイ, カメムシ類, イネドロオウムシ: 収穫 14 日前まで, 稲 (箱育苗): ウンカ類, イネドロオウムシ, イネミズゾウムシ: 移植 3 日前~移植当日, きゅうり: ミナミキイロアザミウマ, アブラムシ類, コナジラミ類: 収穫前日まで, メロン: アブラムシ類, コナジラミ類, ミナミキイロアザミウマ, トマトハモグリバエ: 収穫前日まで, すいか: アブラムシ類, ミナミキイロアザミウマ, ウリハムシ: 収穫前日まで, なす: ミナミキイロアザミウマ, ハモグリバエ類, アブラムシ類, マメハモグリバエ, コナジラミ類: 収穫前日まで, トマト: アブラムシ類, コナジラミ類, ハモグリバエ類: 収穫前日まで,

ミニトマト: アブラムシ類, コナジラミ類, ハモグリバエ類: 収穫前日まで, だいこん: アブラムシ類: 収穫 7 日前まで, レタス: アブラムシ類, ナモグリバエ: 収穫 3 日前まで, ねぎ: ネギアザミウマ, ネギハモグリバエ: 収穫 3 日前まで, キャベツ: アブラムシ類: 収穫 3 日前まで, ピーマン: モモアカアブラムシ, ミナミキイロアザミウマ: 収穫前日まで, だいず: アブラムシ類, カメムシ類: 収穫 7 日前まで, ばれいしょ: アブラムシ類, テントウムシダマシ類: 収穫 7 日前まで, てんさい: テンサイトビハムシ: 定植前, りんご: カメムシ類, キンモンホソガ, ギンモンハモグリガ, シンクイムシ類, アブラムシ類, クワコナカイガラムシ: 収穫 7 日前まで, なし: シンクイムシ類, カメムシ類, アブラムシ類, クワコナカイガラムシ: 収穫前日まで, もも: アブラムシ類, モモハモグリガ, シンクイムシ類, カメムシ類, コガネムシ類: 収穫 7 日前まで, おうとう: オウトウショウジョウバエ, カメムシ類: 収穫前日まで, うめ: アブラムシ類: 収穫 7 日前まで, ぶどう: コナカイガラムシ類, チャノキイロアザミウマ, フタテンヒメヨコバイ: 収穫 14 日前まで, かんきつ: アブラムシ類, ミカンハモグリガ, アザミウマ類, ケシキスイ類, コアオハナムグリ, ツノロウムシ, コナカイガラムシ類, ゴマダラカミキリ, カメムシ類, アゲハ類, アカマルカイガラムシ: 収穫 7 日前まで, かき: カキノヒメヨコバイ, チャノキイロアザミウマ, カキクダアザミウマ, フジコナカイガラムシ, カキノヘタムシガ, カメムシ類: 収穫 7 日前まで, 茶: チャノキイロアザミウマ, チャノミドリヒメヨコバイ, チャノホソガ, コミカンアブラムシ: 摘採 7 日前まで, きく: ナモグリバエ, マメハモグリバエ, アザミウマ類, アブラムシ類: 発生初期, ばら: アブラムシ類, ミカンキイロアザミウマ: 発生初期, チューリップ: アブラムシ類: 発生初期  
つつじ: ツツジゲンバイ: 発生初期, さつき: ツツジゲンバイ: 発生初期, ヨシ, オギ, ススキ, セイタカアワダチソウ等の多年生雑草が優占している休耕田: カメムシ類 (42 ページへ続く)