

令和元年6月11日現在

機関番号：12605

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K19260

研究課題名(和文)植物免疫応答解析における葉面熱流変動測定法の確立と利用

研究課題名(英文) Establishment and utilization of measuring heat flow change on leaf surface for analysis of plant immunity response

研究代表者

佐々木 信光 (Sasaki, Nobumitsu)

東京農工大学・学術研究支援総合センター・准教授

研究者番号：70431971

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、熱電対付きの熱流センサを用いて植物葉面の温度と熱流の変動を同時に測定し、植物の外部刺激に対する応答(病原体に対する植物の防御反応である細胞死誘導)を非破壊的に検出することが可能か検証した。密閉可能なアクリルケース内で外部環境の変化が小さい測定環境を整え、連続明条件で病原体(青枯病菌)を浸潤したタバコ葉で安定的に熱流と温度の変動を測定できるようになった。細胞死を誘導する葉面において、温度と熱流の変動パターンが同時に変動する特徴的な変動パターンが存在することを示唆するデータを得た。これらの結果は、熱流と温度の測定が植物の防御反応を判断する新しい解析方法となることを意味している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、通常、建築住宅設備や電気機械製品の熱の流れを測定するために用いている熱流センサを植物の環境応答に利用して新しい研究方法を開発することを目指した。アクリルケースで作った密閉可能な測定空間を作り、温度と熱流を同時に測定できるセンサを用いて、病原体(青枯病菌)に対して防御反応(細胞死を誘導する反応)を起こしているタバコの葉で温度と熱流が同時に変化する特有の変動パターンを検出することができるようになった。今後、温度と熱流の測定法をさらに改良し、植物の防御反応の進行段階や進行度合いを非破壊的に判断する新しい解析方法として活用することが期待される。

研究成果の概要(英文)：In this study, we examined the possibility that we could detect nondestructively plant responses against external stimuli by measuring the fluctuations of the temperature and the heat flow on the plant leaf surfaces simultaneously. We have succeeded to make an openable measurement acrylic box where there are few changes in environmental factors and measure under constant light conditions the fluctuations of the temperature and the heat flow on the tobacco leaf that is infiltrated with a pathogen (*Ralstonia solanacearum*). We have also obtained the suggestive data that there are characteristic patterns of the temperature and the heat flow, both of which fluctuate simultaneously, on the leaf where the cell death is induced. Our data mean that the measurements of the temperature and the heat flow of the leaf surface can be a novel indicator that helps us judge the stages of the plant defense responses.

研究分野：植物病理学

キーワード：熱流変化 植物免疫 細胞死 温度変化 ウイルス 細菌 抵抗性

様式 C - 19, F - 19 - 1, Z - 19, CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

過敏反応とは、病原体の侵入に対し、植物が様々な防御反応を誘導して病原体の増殖を抑制し、最終的に細胞死を引き起こす現象である。これまでの研究の中で、同じ環境や条件で実験を行っても植物の生理状態に差異があり、結果としてデータにばらつきや誤差が生じてしまうことに悩まされる場面が多々あった。そこで、植物がいつ反応を開始したのか、また解析時の組織が反応のどの段階にあるのかを推定できる非破壊的な連続モニタリングシステムを構築することが重要であった。

サーモグラフィーを用いた画像解析から、過敏反応を誘導している葉組織一帯では、温度の上昇が確認されるという報告がある。このことから、葉温の変化は、過敏反応の進行状態を推定する指標として利用可能であると考えられている。この報告を踏まえ、葉組織の温度変化とは異なる植物応答の指標として『葉面の熱流変動』を利用するというアイデアを思いついた。熱流センサを利用すると、熱の移動である熱流(熱流束: W/m^2)が測定でき、熱流の波形データからは、熱流の方向(放熱・吸熱)や熱の移動量が分かる。熱電対センサやサーモグラフィーを用いた温度測定と比較して、熱流測定の方が植物免疫応答による植物体温の調節変化を早期かつ高感度に検知できる点が最大の利点である。さらに、最近の熱流センサは柔軟性が向上し、凹凸のある植物の葉でも測定可能であること、また測定ロガーも小型化・高性能化しており閉鎖環境下での熱流測定が容易になっていることが分かった。そこで、市販の熱流センサのデモ機を利用して過敏反応を誘導しているタバコの熱流を測定する予備実験を行ったところ、その有用性を確認することができた。この予備実験の結果を踏まえ、植物葉面の熱流を経時的にモニタリングする方法を確立し、熱流変動測定を新しい植物免疫応答解析法として利用する可能性について検証することにした。

2. 研究の目的

本研究課題の目的は、外的刺激に応答する植物の生理状態をより正確に把握する非破壊的方法として、植物葉面における熱流測定法を確立し、植物免疫応答(過敏反応)の進行過程において生じる熱流変動パターンを詳細に調べること、さらに、熱流変動パターンの変化を過敏反応の進行段階や進行度合いの判断指標としての活用性、また植物免疫応答研究における新規解析法としての有効性について検証することである。

3. 研究の方法

(1) 葉面熱流測定法の確立

熱流センサの葉面への接着するテープや熱流センサのサイズの検討、実験室の対流による熱流への影響を抑えるための防風対策、葉面や実験環境の温湿度の測定法、および葉面変化の記録方法の検討を行った。

(2) 細胞死誘導

アグロインフィルトレーション法を用いて、タバコモザイクウイルス(TMV)由来の細胞死誘導因子(p50)の発現用アグロバクテリウムをTMV抵抗性のタバコ(*Nicotiana tabacum* cv Samsun NN)の葉に浸潤して細胞死を誘導した。あるいは、タバコの葉に非病原性青枯病菌(*Ralstonia solanacearum*)の8107株(Rs8107)を浸潤して細胞死を誘導した。細胞死を誘導しない対照実験区には、前者の場合、EV(empty vector)をもつアグロバクテリウム、後者の場合はR0水を浸潤した。また、アグロバクテリウムの菌懸濁液の濁度を0.5、Rs8107の菌懸濁液の濁度(OD600値)を0.5あるいは0.01になるように調整して浸潤した。

(3) 熱流・温湿度の記録と解析

ロガーに記録された葉面の熱流と温度およびアクリルケース内の温湿度のデータはエクセル形式に変換し、データ解析ソフトOriginを用いて解析した。

4. 研究成果

(1) 葉面熱流測定法の確立

タバコの葉面の熱流を測定する実験環境について検討した(図1)。

熱流センサの葉面への接着方法

熱伝導性両面テープ(HIOKI製)を用いてセンサを葉面に貼り付けることで接着が安定した。長さがSサイズ(9.1mm)とMサイズ(31.6mm)の熱流センサの2種類を用意し、感度の比較を行った結果、Mサイズの方がデータの振れ幅が小さく安定であった。ただし、実験に用いる葉が小さい場合や葉脈に重ならないように測定したい場合にはSサイズのセンサの方が適しており、実験材料の大きさに合わせて使い分けると良いことが分かった。現在市販で入手できるセンサでは、ロガーと繋ぐケーブルの可塑性が低く、センサを付けた葉が捻れやすい傾向があった。可塑性の高い柔軟なケーブルが望ましいことが分かった。

防風対策

植物の栽培環境中における防風対策として、開閉式アクリルケース(45cm x 80cm x 50cm)を特注により作製した。測定機器類をケース内で使用するため、背面に密閉式のコード穴を設けた。表面のアクリル板が完全に閉まらなると温度や湿度の変化が激しくなることが分かった。そこで粘着フックを利用して、ケースが密閉状態になるようにすることで、ケ

ース内の温湿度が安定するようにした。

葉面温度や実験環境の温湿度の記録
葉面温度を記録するため、熱流と温度を同時に測定できる熱電対付きの特注熱流センサ（HIOKI 製）を用いた。アクリルケース内の温湿度はワイヤレス温湿度ロガー（HIOKI 製）を用いて記録した。

細胞死誘導にともなう葉面の変化は当初目視のみによる記録によって行っていたが、経時的な変化を詳細に記録するためタイムラプスカメラ（Brinno 製）を用意し、5分間隔での記録を行った。

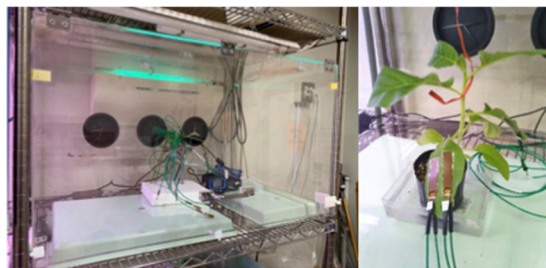


図1. 熱流測定用ケース(左)とセンサを付けたタバコ(右)

(2) p50の一過的過剰発現による細胞死誘導での熱流計測

p50 を発現した葉では EV を発現した葉と比較して、計測直後から細胞死誘導前後において持続的に葉の表および裏側の両方の温度が高い状態が続くことが分かった。熱流の変化は温度の変化に比べて数分程度早く生じていることが分かった。表側では常に吸熱方向の動きであったが p50 の方が EV よりも程度が弱い傾向があった。一方で、裏側では、主に放熱方向の動きであったが p50 の方が EV よりも程度が弱い傾向があった。これらの結果から、p50 を一過的発現させた葉では浸潤直後から発熱状態になっていることが示唆された。ただし、本実験を行った際には、ケース内の密封性が不十分であったこと、また、夜間に植物育成室内を消灯する設定であったためケース内の温湿度の変化が急激であったことが原因で葉面の温度と熱流の変動が激しく、細胞死誘導に特異的な温度や熱流の変動パターンの違いを決定することが困難であった。また、細胞死誘導に1日以上かかり、その誘導の程度やタイミングにもバラツキがあったため、安定した実験結果を得るには至らなかった(図2)。

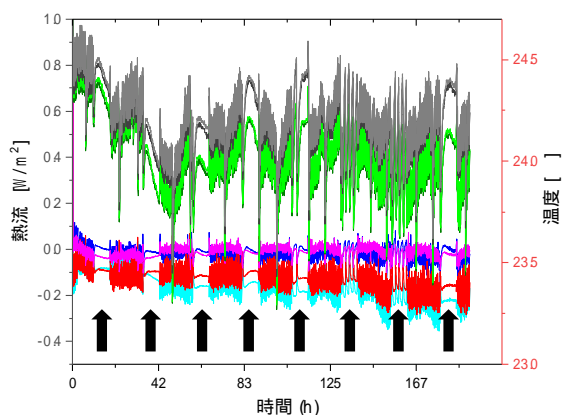


図2. p50による細胞誘導時の葉面の熱流と温度の変動
上部と下部の波形はそれぞれ温度と熱流を示す。
矢印は消灯時(夜間時)を示す。

(3) Rs8107の浸潤による細胞死誘導での熱流測定

Rs8107 を 0.5 あるいは 0.01 の濁度で浸潤した結果、いずれの場合でも1日後には明瞭な壊死斑を形成した。ケースをしっかりと密閉し、育成室内の照明を常時点灯させ(消灯させず)、葉の裏面の温度と熱流を24時間測定した。上記条件下では、RO水を注入した葉(対照実験区)では熱流の動きは常時放熱方向で、かつ、その変動幅が小さかったが、Rs8107を浸潤した葉では細胞死誘導の過程において放熱方向から吸熱方向へと熱流が大きく変動する様子が見られた。また、温度の変動について、細胞死誘導前の時点で、熱流の放熱方向への大きな変動後に対照実験区よりも高くなることが確認できた(図3)。この結果は、Rs8107に対する細胞死誘導の際に葉が発熱すること、細胞死誘導の有無によって熱流の変動に大きな差異があることを示唆する。また、Rs8107浸潤区と対照実験区との間で温度と熱流の差異を計算しグラフ化した(図4)。その結果、細胞死が視認できるタイミング(浸潤8時間前後)において、熱流の放熱方向から吸熱方向への大きな変動と葉面温度の増減が起こっていることが確認できた。

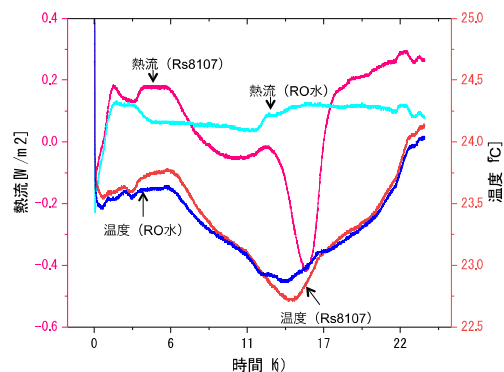


図3. Rs8107による細胞死誘導時の葉面の熱流と温度の変動

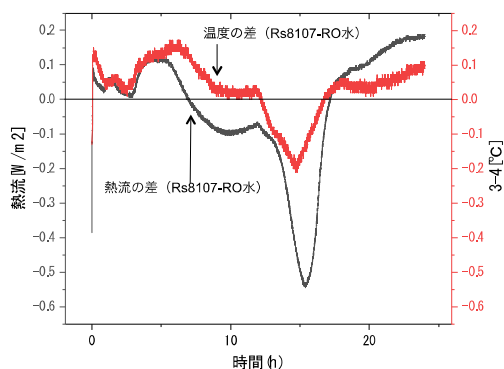


図4. Rs8107による細胞死誘導時の葉面の熱流と温度の変動

(4) 外部環境と葉面の熱流と温度の関係

本研究では、アクリルケース内の温度と湿度を同時に計測していた。その結果、アグロバクテリアウムや Rs8107 の浸潤の有無に関わらず、タバコの葉面の温度は常にケース内の気温よりも低く維持されている傾向が認められた(図なし)。また、湿度の変化(図なし)や照明の有無(図2)が葉面の熱流や温度の変動に影響を与えている様子が見られた。これらのことから、葉面の熱流や温度の変動の測定を安定的に行うには外部環境の変化を最小限にする必要があることが分かった。

(5) 熱流測定に用いた葉面からの RNA 調製

熱流測定に用いた葉面からの RNA 調製するためには葉面に接着した両面テープを剥がす必要がある。そこで、両面テープが付着した葉を切り出し、液体窒素を用いて凍結させた。その結果、両面テープを綺麗にはがすことができた。その後は TRI Reagent あるいはカラムを用いた抽出法で RNA を抽出できること、さらにリアルタイム RT-PCR により遺伝子発現解析ができることを確認した(図なし)。

(6) 総括

植物葉面における熱流測定法の確立については、アクリルケースを十分に密封し、消光時間を設けない条件において Rs8107 を浸潤することでほぼ安定した測定結果を得ることができるようになった。細胞死が誘導される葉において対照実験区よりも葉面温度が高くなる傾向があったが、その変動パターンは安定していないことが多いが、熱流の変動パターンと組み合わせることにより特徴的な変動パターンが存在することを示唆するデータを得ることができた。これは熱流測定が細胞死誘導の新しい指標となることを意味していると考えられる。今後はさらに実験データを積み重ね、葉面変化の動画解析とも組み合わせ、細胞死が視認できる前後での熱流・温度の変動パターンを定型化していきたい。また、その変動パターンに基づいて細胞死誘導に関わる重要な時期を推測し、それらの時期における遺伝子発現解析や細胞学的解析を行っていくことにより細胞死誘導の分子メカニズムの解明に繋がることを期待される。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計2件)

Taku, K., Sasaki, N., Matsuzawa, K., Okamura-Mukai, A., Nyunoya, H. Introns of the tobacco resistance gene *N* play important roles in elicitor-responsive upregulation and efficient induction of defense responses. *Journal of General Plant Pathology*, 査読有, 84, 73-84 (2018).

DOI: 10.1007/s10327-018-0762-y

Sasaki, N., Takashima, E., Nyunoya, H. Altered Subcellular Localization of a Tobacco Membrane Raft-Associated Remorin Protein by Tobamovirus Infection and Transient Expression of Viral Replication and Movement Proteins. *Frontiers in Plant Science*, 査読有, 9, 619 (2018).

DOI: 10.3389/fpls.2018.00619

[学会発表](計3件)

白井梨花子・丹生谷博・松下保彦・佐々木信光, ウイルス抵抗性遺伝子 *N* のイントロン 4 に由来する small RNA の推定標的遺伝子の解析, 平成 31 年度日本植物病理学会大会, 2019 年

鈴木 新・仁藤史乃・曳地康史・松浦恭和・池田陽子・丹生谷博・松下保彦・佐々木信光, 過剰発現タバコを用いた Dof 型転写因子 BBF2 の病害抵抗性における機能の解析, 平成 31 年度日本植物病理学会大会, 2019 年

吉本菜苗, 丹生谷博, 松下保彦, 佐々木信光, ウイルス抵抗性遺伝子 *N* の選択的ポリアデニル化シグナルの機能解析, 第 41 回日本分子生物学会年会, 2018 年

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。