

令和元年6月3日現在

機関番号：14303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07641

研究課題名(和文)植物の乳管細胞の防御機能に関する比較マルチオミクスと昆虫フェノミクス

研究課題名(英文)Comparative multiomics of latex-mediated defense of plant laticifers.

研究代表者

北島 佐紀人 (Kitajima, Sakihito)

京都工芸繊維大学・応用生物学系・准教授

研究者番号：70283653

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：植物体に張り巡らされる乳管細胞は、抗害虫・微生物防御に特化した細胞である。本研究では、国内で栽培の容易なクワ、イチジク、ミドリサングを研究対象とし、比較マルチオミクス解析を駆使して、乳管細胞の防御機能の分子の実体と多様性を研究した。(1)乳管細胞内容物である乳液には抗微生物タンパク質と抗昆虫・動物タンパク質候補が大量に発現・蓄積していた。(2)植物種および器官ごとに異なる外敵が想定されるために多分それに適応して、各種・各器官の乳液は互いに異なる防御タンパク質・化合物を蓄積していた。(3)ホモロジー検索から機能予測できなかった乳液タンパク質XXもまた抗昆虫毒性を有した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

新規な毒性タンパク質の探索に、乳液は有力な研究材料であることを示した。研究成果は、天然ゴム産生植物等の乳管細胞生理学の知見を拡大するとともに、Bt毒素に代わるGM作物の新たな抗害虫遺伝子の開発に活用される。

研究成果の概要(英文)：Laticifer cells, running through plant body, are cells specialized for defense against pests and microbes. In this study, using mulberry, fig tree, and Euphorbia, we conducted comparative multiomics and intended to reveal molecular basis of the laticifer-mediated defense and its inter-/intra-species diversity. We found (1) latex, contents of laticifer, contains large amount of anti-pest or anti-microbe proteins and chemicals. (2) These proteins and chemicals are highly variable among plant species and organs, possibly as a result of their adaptation to potential enemies, which are different among plant species and organs. (3) Proteins XX of unknown function, due to no similarity found in sequence databases, also had anti-insect activity.

研究分野：農芸化学

キーワード：乳液 乳管細胞 植物 オミクス 防御 抗菌 抗昆虫

1. 研究開始当初の背景

植物の乳管細胞は、植物体の他の細胞の間隙をぬって細長く伸長・分枝して、植物体全体に乳管細胞ネットワークを張り巡らす(図1)。乳管細胞の内容物を乳液と呼び、そこには、天然ゴムの主成分ポリイソプレンに加えて、抗昆虫・抗微生物タンパク質(図2)あるいは化合物が大量に含まれる。細胞内圧が高いため、食草昆虫等により植物体が損傷して乳管細胞ネットワークの一部が切断されると、乳液が大量に漏出し、昆虫・微生物等の外敵を攻撃する。乳管細胞は、推定40科20,000種もの植物に存在するが、アラビドプシスやイネ等のモデル植物には存在しないため基礎研究は大きく立ち遅れている。パラゴムノキ(トウダイグサ科)は、その乳液が天然ゴムの工業原料であるため国家戦略上重要な研究対象であるが、産地国による持出し規制と気候条件の問題のため日本で栽培できない。このことは、日本における乳液あるいは乳管細胞研究の致命的な障壁となっていた。

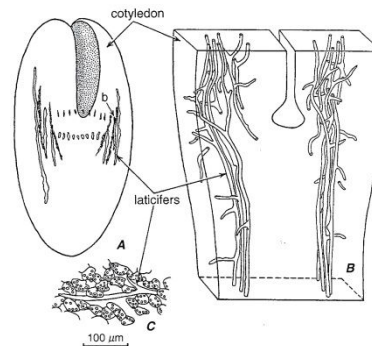


図1. キョウチクトウの胚における乳管細胞(laticifer)。数個の始原細胞が細胞分裂をせずに伸長・分枝してネットワークになる。(Esau's Plant Anatomy 第3版)

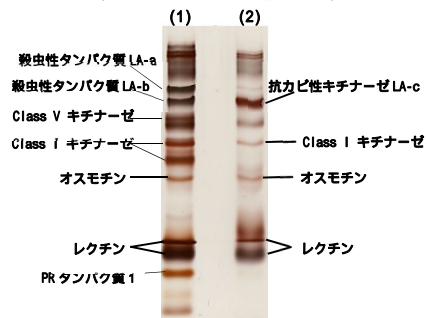


図2. クワの乳管細胞の細胞内タンパク質。レーン(1)、非木化部位の乳管細胞。レーン(2)木化部位の乳管細胞。乳管細胞の細胞内成分(乳液)に含まれるタンパク質の大半は抗昆虫あるいは抗カビタンパク質である。写真はクワの乳液のSDS-PAGE。(Kitajima et al. Planta, 2012)

申請者らは、上記の困難を克服して乳管細胞生理の理解を飛躍的に向上させるため、パラゴムノキの代わりに、国内でも栽培と乳液採取の容易なクワとイチジク(クワ科)、ミドリサング(パラゴムノキと同じトウダイグサ科)をモデル材料に選んだ。これまで、乳管細胞の高度に特化した防御機能に着目し、その分子生理のオミックスおよび生化学研究に取り組んできた。クワの非木化部位の乳液に2種の主要タンパク質(LA-aとLA-b、図2)を見出し、それらが殺虫性の新規キチナーゼ様タンパク質であることを明らかにした(北島ら BMC Biochem 2010)。一方、木化部位の乳液にはそれらは全く存在せず、抗カビ性キチナーゼ LA-c が最も多かった(図2、北島ら Planta 2012, Plant Biotech 2013)。一方、イチジクの乳液ではシステインプロテアーゼ・フィシンとトリプシンインヒビター(ともに昆虫に毒性があるとされている)、ミドリサングでは、それらとは異なる別のタンパク質が多かった。

2. 研究の目的

このような申請者が得た植物種間・器官間で乳液の防御タンパク質が全く異なるという新たな知見は、それぞれの乳管細胞がそれぞれに想定される外敵に適応して、最も効果的な防御システムを敷いていることを示唆する。そこで、これまでの成果を踏まえて以下の研究を実施した。

3. 研究の方法

(1) 種間・器官間の比較マルチオミクスによる乳管細胞の防御機能の統合的な理解

トランスクリプトーム、プロテオーム、二次代謝物のメタボロームを実施する。これにより、乳管細胞の防御機能の分子実体と生理の種間・器官間差異を統合的に理解する。

(2) 抗昆虫・抗微生物活性の検証

機能未知で高度に蓄積しているタンパク質・二次代謝物については、すでに明らかにしたタンパク質同様に抗昆虫・抗微生物防御に関わると期待できるので、精製品あるいは組換えタンパク質を用いて、その機能を明らかにする。

4. 研究成果

(1) イチジクの未熟果実、若い葉柄、木化した幹の各器官から乳液を採取して、プロテオーム、トランスクリプトーム、水溶性成分のメタボローム解析を実施し、それらの相違を調べた。

トリプシンインヒビターは葉柄乳液で最も高濃度に存在したが、未熟果実と幹の乳液に於いてはフィシン(システインプロテアーゼの一種)が最も多かった。防御化合物と推定されるガロイルグリセロールはすべての器官の乳液で高濃度に存在した。抗菌性タンパク質として知られる PR タンパク質 mRNA は幹の乳液で特に多かった。鱗翅目昆虫の幼虫等に食餌されやすい果実あるいは葉柄と異なり、幹の主要な外敵は傷口から侵入する微生物と考えられるので、このことは理にかなった発現様式である。一方、未熟果実と葉柄は一見互いに類似の外敵が想定されるが、生物活性が報告されているセスキテルペノイド生成と毒性物質フラノクマリン生産につながるフェニルプロパノイド生成に関連する mRNA は後者の乳液で際立って多かった。この相違は、葉柄(および葉)は食餌から守るべきであるが、果実においては受粉と種子散布のために防御一辺倒ではないことを反映していると考えられた。詳細な比較トランスクリプトーム解析は、さらにこれらの発現様式の相違を制御する転写因子候補を提示した。

(2) ミドリサングを対象として、乳管細胞とその周囲の茎との間で比較トランスクリプトーム、プロテオーム解析を実施した。Illumina RNA-seq データとサンガー法による EST とのハイブリッド de novo アセンブリを実施し、26,447 のユニジーンを得た。乳液では、アラビドプシスの PLAT ドメインタンパク質の一種 embryo-specific protein 3 (AT5G62200)、ラバー伸長因子に相同性のあるタンパク質の mRNA が最も高レベルに発現していた。LC-MS によるプロテオーム解析では、161 のタンパク質が検出され、そのうち 107 は茎プロテオームからは検出されなかった。ジーンオントロジー(GO)解析により、それら 107 の乳液特異的タンパク質はタンパク質分解、脱リン酸化酵素、防御関連、脂質代謝に関わるタンパク質に富むことがわかった。2次元電気泳動ベースのプロテオーム解析ではレクチン、リシン(ただし N 末端のリボース不活性化ドメインを欠く)、キチナーゼ、パーオキシダーゼが特に多く蓄積していた。以上により、防御の主要タンパク質因子はレクチンとキチナーゼで、それ以外の防御関連因子がこれらに協同して生体防御にあたりと推定された。ホモロジー解析から機能予測できなかったタンパク質あるいは mRNA も多く蓄積していたので、これらも防御関連の新規因子であると期待された。

(3) 上記 1, 2 より見出された、機能未知だが防御機能が期待される乳液タンパク質を対象

に、それらが毒性を有するかを検証した。各種の発現システムにてこれらタンパク質の生産を試み、困難を極めたが最終的に筑波大学で開発された改良アグロインフィルトレーション法が有効であった。対象とした数種の乳液タンパク質のうち、2つはハスモンヨトウ幼虫に有意な成長阻害活性を示すことを認めた。また、昆虫細胞内でこれらを発現させると強い細胞毒性を示した。これらのことは、これらの乳液タンパク質もまた乳液を介する防御を担う毒性タンパク質である可能性を強く支持する。本研究成果は、また、新規な毒性タンパク質の探索に乳液が有望な研究材料であることを示している。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 3 件)

1. Kitajima, S., Aoki, W., Shibata, D., Nakajima, D., Sakurai, N., Yazaki, K., Munakata, R., Taira, T., Kobayashi, M., Aburaya, S., Savadogo, E.H., Hibino, S., Yano, H. Comparative multi-omics analysis reveals diverse latex-based defense strategies against pests among latex-producing organs of the fig tree (*Ficus carica*). (2018) *Planta*, 247 (6), pp. 1423-1438. DOI: 10.1007/s00425-018-2880-3

2. Yokota, S., Suzuki, Y., Saitoh, K., Kitajima, S., Ohya, N., Gotoh, T. Cloning and Aggregation Characterization of Rubber Elongation Factor and Small Rubber Particle Protein from *Ficus carica* (2018) *Molecular Biotechnology*, 60 (2), pp. 83-91. DOI: 10.1007/s12033-017-0051-6

3. Kitajima, S., Miura, K., Aoki, W., Yamato, K.T., Taira, T., Murakami, R., Aburaya, S. Transcriptome and proteome analyses provide insight into laticifer's defense of *Euphorbia tirucalli* against pests (2016) *Plant Physiology and Biochemistry*, 108, pp. 434-446. DOI: 10.1016/j.plaphy.2016.08.008

[学会発表] (計 2 件)

1. Eric Hyrmeya Savadogo, Kazufumi Yazaki, Ryosuke Munakata, Masamitsu Yamaguchi, Hideki Yoshida, Takanari Umegawachi, Ryo Tanaka, Dan Ngoc Anh Suong, Toki Taira, Sakihito Kitajima Identification and evaluation of toxic proteins accumulated in *Ficus carica* and *Euphorbia tirucalli* latexes. 日本農芸化学会 2019 年 3 月

2. 塩見 祐生、秋野 順治、三浦 謙治、Savadogo Eric、北島 佐紀人 アグロインフィルトレーションによる 植物の乳液タンパク質の生産と抗昆虫活性の検討 日本農芸化学会 2019 年 3 月

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名: 山口 政光

ローマ字氏名: Yamaguchi Masamitsu

所属研究機関名: 京都工芸繊維大学

部局名: 応用生物学系

職名: 教授

研究者番号(8桁): 00182460

(2)研究分担者

研究分担者氏名: 小林 優

ローマ字氏名: Kobayashi Masaru

所属研究機関名: 京都大学

部局名: 農学研究科

職名: 准教授

研究者番号(8桁): 60281101