

平成 30 年 5 月 17 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07220

研究課題名(和文) 植物の匂い受容による当代・次世代のプライミング伝達のメカニズムの解明

研究課題名(英文) Volatile-Mediated Memory of Plant Defense in the Eavesdropping Plants

研究代表者

小澤 理香 (Ozawa, Rika)

京都大学・生態学研究センター・研究員

研究者番号：90597725

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：食害された植物から放出される匂い物質を受容することで、植物が植食者に対する防衛の準備を始める「匂い受容による防衛応答のプライミング現象」が近年見出されている。しかし、匂い受容の効果の持続性やそのメカニズムは明らかではない。本研究では、成長初期あるいは中期に揮発性モノテルペン「ベータ・オシメン」化合物に曝されたシロイヌナズナにおいて、成長後期(最長20日のブランク)のハスモンヨトウ幼虫に対する防御力が高まることを明らかにした。さらに、変異体を用いた解析から、これらの分子基盤にはヒストン脱アセチル化酵素による制御が重要な役割を担うことを示した。

研究成果の概要(英文)：Plant-plant communication is a kind of plant defense strategy against herbivores. This communication allows damaged plants to send volatile infochemicals and the undamaged neighboring plants to receive the signals and boost their defense responses in advance. However, it remains unclear as to the appropriate time scale and mode of priming sustainability. In the current study, we report that Arabidopsis plants which is exposed to acyclic monoterpene (E)-beta-ocimene for 6 days by an array of developmental stages, sustained the priming mode for defense responses for up to 20 days. It appeared that molecular mechanisms underlying these priming responses were linked to the function of histone deacetylases.

研究分野：化学生態学

キーワード：シロイヌナズナ 揮発性物質 植物間コミュニケーション プライミング エピジェネティクス ハスモンヨトウ トマト (E)-beta-ocimene

1. 研究開始当初の背景

植物は、生物的ストレスに対して多種多様な防衛戦略を進化させてきた。食害を受けた植物は、被害部分での病原菌の進入を防いだり、植食者の天敵である捕食者を誘引して間接的に防衛したりするために食害特異的な「匂い」を生産し、大気中に放出する。一方、周囲の健全な植物はこれらの匂いを「立ち聞き」し、将来予測される食害に対する防衛の準備を開始する。また植物が一度食害や感染のストレスにさらされると、次のストレス応答の感度が高まったり、応答が早くなったりする、動物の免疫作用に似た現象が知られている。このような現象は「プライミング」と呼ばれているが、最近、植物の「立ち聞き」におけるプライミング現象が見出されつつある。この現象は「匂い受容による防衛応答のプライミング」と言える。すなわち、匂いの情報が、それを受容した植物において、あたかも「記憶」のように保持され、将来いつ侵入してくるのかわからない植食者に対して、防衛戦略を効率的に展開していると考えられる。食害は、植物における主要な生物ストレスの一つであり、「匂い受容による防衛応答のプライミング」研究は、植物の防衛戦略をより深く理解する上で、非常に重要な課題と考えた。我々の先行研究において、匂い受容による防衛応答のプライミングにエピジェネティック制御が関与している可能性を見出しはいるものの、その因果関係は未解明であった。故に、本研究ではエピジェネティック制御をターゲットにメカニズムの解明を試みた。

2. 研究の目的

植食者による食害を受けていない植物は、食害を受けている周囲の植物から放出される匂いを受容することにより、事前に防衛活性を高めることができる。この現象は、植物の植食者に対する防衛戦略を考える上で注目すべきものであるが、この「匂い受容による防衛応答のプライミング」の持続性および次世代への伝達の有無を実証した研究はこれまでに無い。また、植物のプライミングに関する分子機構は未だ不明な点が多いが、遺伝子発現におけるエピジェネティック制御の関与が予測されている。そこで本研究では、様々な成長段階の植物に被害植物由来の匂いを曝露し、その植物が、(1) どの成長段階からどの程度の期間防衛活性を高めるのか、(2) 次世代に防衛プライミング応答を伝えることができるかについて検証し、さらに、これらの結果を踏まえて、(3) ヒストン修飾の変異体を用いて、プライミング現象を検証することにより、その分子メカニズムを解析することを目的とした。

3. 研究の方法

植物は変異体の入手可能なシロイヌナズナ(アブラナ科)とトマト(ナス科)を、植食者は、広食性のチョウ目昆虫であるハスモンヨトウの幼虫を用いた。

(1) 匂い物質の植物への曝露

植物(シロイヌナズナ、トマト)をガラス容器内に静置し、匂い物質(-ocimene、(Z)-3-hexen-1-yl acetate: 0.2 mg)をそれぞれ0.1 gのtriethyl citrate (TEC)に溶かしたものをバイアルに入れ、そのガラス容器内に置いた。コントロールには、TECをバイアルに入れたものを用いた。匂い物質の希釈液は容器内の濃度を維持するために、2日ごとに新しいものに取り換えた。それぞれ6日間匂い物質を受容させたのち、1日あるいは20日間、匂い物質なしで維持し、(2)の防御応答試験に供した。

次世代については、匂い物質を受容した植物から得られた種子を播種し、30日間栽培したのち、防御応答試験に供した。

(2) 植物の防御応答の評価 ハスモンヨトウの成長率の測定

体重測定後のハスモンヨトウ(3令幼虫)を匂い物質を受容した植物にのせ、シロイヌナズナでは4日間、トマトでは5日間維持した(24度、16L)。その後幼虫の体重を測定し、体重増加量を算出した。コントロール(TECを受容したもの)の植物上の体重増加量を100%として、匂い受容植物上の体重増加率を算出した。図1に匂い物質の曝露と防御応答試験のタイムスケジュールを示した。

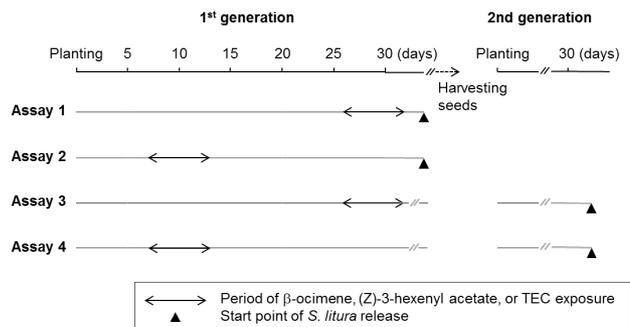


図1 匂い物質の曝露と防御応答試験のタイムスケジュール

(3) ヒストン修飾変異体におけるプライミング効果

塩、高温、低温ストレスに曝された植物では、ヒストン修飾(アセチル化、メチル化)することで、ストレス抵抗性に関わる遺伝子群の転写制御を行うことが知られている。本研究では、ヒストン修飾が匂い物質を受容した植物の防御力の持続性に関わる分子メカニズムの一つであると考え、ヒストン修飾酵素に欠損をもつシロイヌナズナ変異体(変異体A、変異体B)を用いて、(1)(2)を実施

した。

(4) シロイヌナズナにおける防御系遺伝子の発現解析

防御応答にかかわるジャスモン酸シグナル伝達系の活性化を調べるため、防御系遺伝子の発現解析を行った。ハスモンヨトウ3令幼虫3頭を匂い物質を受容したシロイヌナズナに摂取し、4,8,24時間後に、葉をはさみで切り取り80℃で保存した。RNAを抽出し防御系遺伝子の発現量を調べた。ACT8遺伝子の発現量を基準として標準化した。

4. 研究成果

(1) 異なる成長段階で匂いを受容した当代(第1世代)および次世代(第2世代)の植物における防衛応答のプライミング能の評価

異なる時期に匂い物質を受容した際の防御応答を調べることにより、匂い受容の記憶の持続期間について検証した。匂い物質の受容による防御応答の誘導(立ち聞き現象)における匂いシグナルとして実証されている化合物であるβ-ocimeneと(Z)-3-hexen-1-yl acetateを用いた。以下、化合物ごとに結果を示す。

β-ocimene

シロイヌナズナでは、β-ocimeneを初期(Assay2)と中期(Assay1)のいずれに受容させた場合も、受容植物を摂食させたハスモンヨトウ幼虫の体重増加率は、匂いを受容しなかったコントロール植物を摂食したものより少なかった(図2)。一方、トマトのβ-ocimene受容の場合は、後期(Assay1)の場合のみで体重増加率の差異が認められた(図2)。

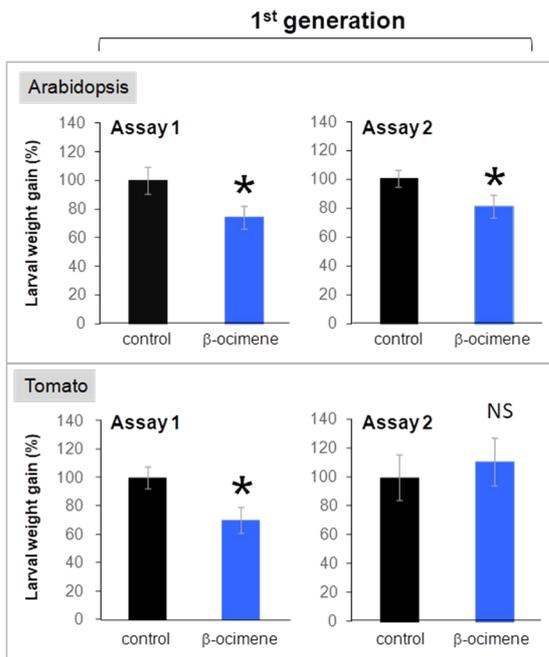


図2 β-ocimeneを受容したシロイヌナズナとトマトの第1世代におけるハスモンヨトウに対する防御力(幼虫の体重増加率)

次に、上記のβ-ocimeneを受容した世代(第1世代)の次の世代(第2世代)におけるシロイヌナズナにおいても防御力を評価した(Assay3とAssay4, 図3)。その結果、初期および中期にβ-ocimeneを受容した植物の第2世代におけるハスモンヨトウ幼虫の体重増加量は、β-ocimeneを受容していないコントロール植物と比べ差は認められなかった(図3)。トマトでは、防御力に有意な差が認められた中期に匂いを受容した植物の第2世代におけるハスモンヨトウ幼虫の体重増加量を評価したが、β-ocimeneを受容したものと受容しなかったものとの間に差は認められなかった(Assay3, 図3)。

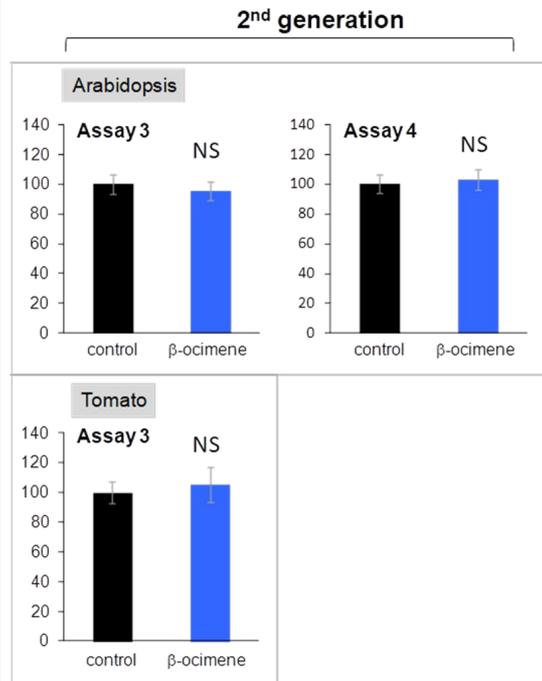
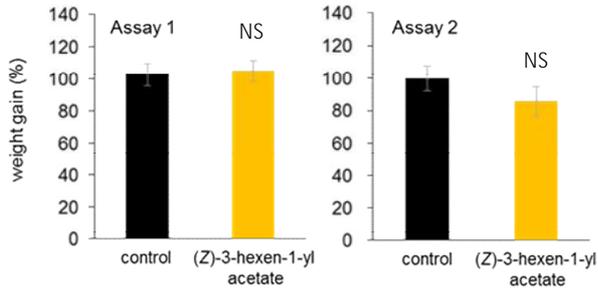


図3 β-ocimeneを受容したシロイヌナズナとトマトの第2世代におけるハスモンヨトウに対する防御力(幼虫の体重増加率)

(Z)-3-Hexen-1-yl acetate

シロイヌナズナとトマトの両方の場合において、(Z)-3-hexen-1-yl acetateは受容させるタイミング(Assay1, Assay2; 図1)に関わらず、匂いを受容していない植物と比べてハスモンヨトウの体重増加率に有意な差はなかった(図4)。先行研究では、(Z)-3-hexenyl acetateは植物間コミュニケーションにおいて生理活性をもつ匂い物質として知られるが、本研究ではプライミング効果は認められなかった。

Arabidopsis



Tomato

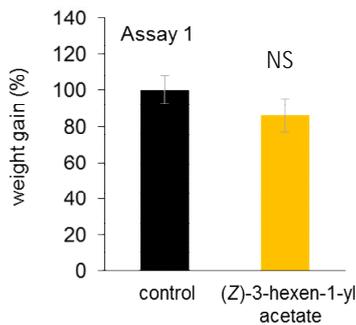


図4 (Z)-3-hexenyl acetate を受容したシロイヌナズナとトマトの第1世代におけるハスモンヨトウに対する防御力(幼虫の体重増加率)

(2) ヒストン修飾変異体におけるプライミング効果

ヒストン脱アセチル化酵素は、遺伝子の発現抑制やヘテロクロマチン構造の構築において機能するエピジェネティックな因子として知られている。シロイヌナズナにおいて、-ocimene を成長の初期あるいは中期のどちらに受容した場合も、成長後期に防御応答が認められた。そこで、ヒストン脱アセチル化酵素の変異体(欠損株)を用い、-ocimene を成長中期に暴露したときの(Assay 1, 図1)プライミングによる防御応答への影響を調べた。その結果、野生株では匂いを受容した株上のハスモンヨトウ成長率は匂いを受容していないものに比べて低かったが、変異体では匂いを受容していない植物と比較して成長率に差が認められなかった。このことから、ヒストン脱アセチル化酵素が -ocimene 受容による防御応答のプライミングに関連していることが示唆された。

今回の研究で、-ocimene を受容したシロイヌナズナは少なくとも20日間は匂い情報を記憶することが明らかにされた。さらにシロイヌナズナ変異株を用いた解析から、これらの分子基盤にはヒストン脱アセチル化酵素による制御が重要な役割を担うことも示された。今後、匂い受容した植物のクロマチン免疫沈降シーケンス(ChIP-Seq)解析を実施することで、ヒストン修飾によって発現が制御される制御系遺伝子(転写因子、修飾

酵素)の解明につながることを期待できる。

(3) 匂い受容植物における防御遺伝子発現の解析

植食者によって食害された植物では、ジャスモン酸シグナル伝達系の活性化により植食者に対する防御応答が誘導される。そこで、-ocimene を受容したシロイヌナズナにおける、ジャスモン酸合成系酵素遺伝子 *AOS* (allene oxide synthase) とジャスモン酸によって制御される防御遺伝子 *VSP2* (vegetative storage protein 2), *PDF1.2* (plant defensin 1.2) の発現量を解析した。シロイヌナズナの成長中期に -ocimene を受容させたとき(Assay1 図1)、1日後の葉における遺伝子発現は、コントロールの植物と比べ、いずれの遺伝子の発現量にも有意な差は認められなかった(図5)。その後、植物にハスモンヨトウ幼虫を接種したところ、接種後8時間(*AOS*, *PDF1.2*)または24時間(*VSP*)まで、遺伝子発現量の上昇は認められたが、-ocimene とコントロール間での差異は認められなかった(図5)。今回は、3遺伝子に絞った解析を行ったが、防御系遺伝子発現量の匂い受容による変化は認められなかった。今後、-ocimene を受容した植物を対象としたゲノム網羅的な遺伝子発現解析を行うことにより、ジャスモン酸シグナル伝達系とエピジェネティック制御因子が相互作用する細胞内情報伝達系を明らかにしていきたい。

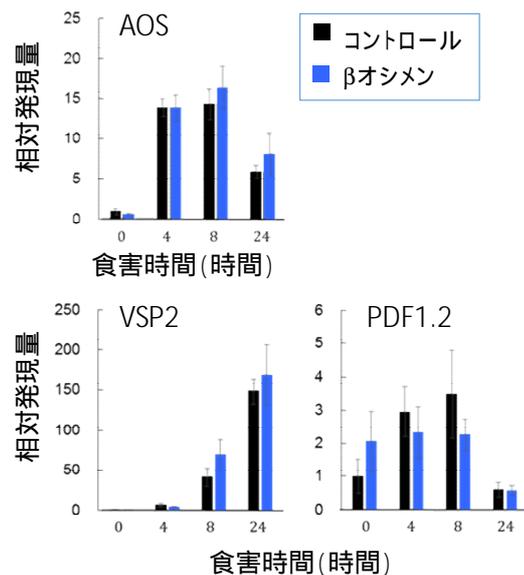


図5 -ocimene を受容したシロイヌナズナのハスモンヨトウ食害後の防御系遺伝子の発現量

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計3件)

Kazufumi Yazaki, Gen-ichiro Arimura Toshiyuki Ohnishi (2017) "Hidden" terpenoids in plants: their biosynthesis, localisation and ecological roles. 査読有, Plant and Cell Physiology, vol.58, 1615-1621. DOI:10.1093/pcp/pcx123.

Rika Ozawa, Hiroki Endo, Mei Iijima, Koichi Sugimoto, Junji Takabayashi, Tetsuo Gotoh, Gen-ichiro Arimura (2017) Intraspecific variation among Tetranychid mites for ability to detoxify and to induce plant defenses. 査読有, Scientific Reports, vol.7:43200, DOI:10.1038/srep43200.

有村源一郎(2017) 植物の香りと生物の分子エコロジー、査読無、Aroma Research、18巻、2-3.

〔学会発表〕(計1件)

有村源一郎、植物のコミュニケーションは、他生物と会話するツールである(2017)、第54回植物化学シンポジウム(招待講演)

〔図書〕(計1件)

Gen-ichiro Arimura, Ian Pearse (2017) Advances in Botanical Research vol. 82. Communication between Plants, and between Plants and Other Organisms. Elsevier, pp.3-17.

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.rs.tus.ac.jp/garimura/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

小澤 理香 (OZAWA, Rika)

京都大学・生態学研究センター・研究員

研究者番号：90597725

(2)研究分担者

有村 源一郎 (ARIMURA, Gen-ichiro)

東京理科大学・基礎工学部・准教授

研究者番号：60505329