

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 26 日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07294

研究課題名(和文) 植物間の情報伝達からコンパニオンプランティングの科学的有効性を検証する

研究課題名(英文) Studying the scientific bases of companion planting as a plant-to-plant signaling.

研究代表者

吉田 理一郎 (YOSHIDA, Riichiro)

鹿児島大学・農水産獣医学域農学系・准教授

研究者番号：70301786

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、トマトとバジルとの混植をモデルとした植物間情報伝達機構に注目し、バジル地上部から放出される揮発性物質が細胞内シグナル伝達因子であるMAPキナーゼやROS(活性酸素)産生遺伝子の発現を促進し、傷害応答に関わるジャスモン酸のシグナルを強化することが示唆された。また、バジル精油を処理したトマト植物体は、ハスモンヨトウの食害を軽減させる効果が認められた。一方、タイムの精油では、サリチル酸のシグナルを強化する結果が得られ、トマトの病害抵抗性を誘導することが示唆された。

研究成果の概要(英文)：In this study, I have focused on the mixed-planting of tomato/basil as a means of elucidating molecular mechanisms of plant-to-plant signaling. Using this system, I found that volatiles released from upper part of basil induces the expression of several signaling factor of MAP kinases and ROS-related genes, and significantly enhances wound responsive jasmonic acid signaling in tomato plants. Tomato plants exposed to basil essential oil alleviated the feeding damage of *Spodoptera litura*. On the other hand, essential oil derived from thyme potentiated salicylic acid signaling and induced disease resistance to tomato.

研究分野：環境応答

キーワード：環境ストレス応答 植物ホルモン 遺伝子発現 傷害ストレス 植物間相互作用 揮発性化学シグナル

## 1. 研究開始当初の背景

コンパニオンプランティングは、互いに異なる種の作物を混植することにより相互のあるいは片方の生育においてプラスの影響を与える農法として認識されてきた。歴史は非常に古く、始まりはアメリカインディアンによる Three Sisters (トウモロコシ、カボチャ、インゲンマメの混植) に遡る。これは、植物間の相性の良し悪しに由来すると推測されるが、その科学的な根拠は殆ど明らかにされていない。

研究代表者は、植物間の情報伝達からその根拠を検証するため、トマトとバジルとの混植をモデルとした実験系を開発し、バジルがトマトへ何らかの影響を与えていることを以下の研究成果から明らかにしていた。

- ア) 混植がトマトの傷害応答を強化した (プライミング効果)。
- イ) 混植の効果がバジルの地上部から放出される揮発性物質に起因した。
- ウ) 傷害応答のみではなく、高温ストレス応答に対してもプライミング効果を誘導した。
- エ) トマト果実の発達に伴う揮発性物質の生成に関与する遺伝子の発現に影響を与えた。

以上のように、バジルがトマトへ与える影響は予想以上に多岐に富んでいることが明らかとなり、また、その効果はバジルから放出される「香り」に由来する可能性が示唆された。

研究代表者は、この効果に環境負荷を低減した農法、機能性物質の蓄積、生産物の品質改善等応用面へのポテンシャルが高いと判断し、そのための基礎的な足掛かりを得たいと考えた。

## 2. 研究の目的

研究代表者は、トマトとバジルとの混植をモデルとした植物間相互作用の存在、有効性を明らかにし、コンパニオンプランティングの化学的根拠を明らかにすること、得られた知見を環境保全型農業、高付加価値農産物生産への応用、普及、発展に寄与することを目的とした。

具体的な研究項目として、以下の5つを計画した。

- A) バジルがトマトの傷害ストレスおよび高温ストレス適応においてプライミング効果を誘導する機構を明らかにする。
- B) プライミング効果を誘導する候補因子を検索する。
- C) 他の環境ストレス応答におけるプライミング効果の有無を検討する。
- D) バジルとの混植によるトマトの病害虫抵抗性、耐暑性への影響を調査する。
- E) バジルとの混植によるトマト果実内の揮

発性二次代謝産物への影響を調査する。

## 3. 研究の方法

本研究では、以下の研究内容を計画した。

- (1) バジルを介したトマトのプライミング誘導機構の解明とシグナル伝達物質の探索
- (2) バジルによるトマト果実成分への影響
- (3) プライミング効果によるトマトの環境ストレス適応能の変化

具体的には以下の研究を計画した。

- (1) バジルを介したトマトのプライミング誘導機構の解明とシグナル伝達物質の探索

・既に確立した無菌栽培条件下での実験系を用いて、バジルによるトマト傷害および高温ストレス応答におけるプライミング効果の分子機構解明と、シグナル候補因子の探索を行う。

JA シグナルとの関連性

これまでの解析により、バジルがトマト植物体における傷害ストレスの JA 応答に関してプライミング効果を誘導する結果を得ている。そこで、JA による関与を明確化するため、トマト JA 非感受性変異体である *jai1-1* を用いた解析を行う。

傷害応答性 MAP キナーゼによる影響

バジルとの混植においてトマト傷害ストレス時の MAP キナーゼの活性化においてもプライミング効果が認められるかについて特異的抗体等を用いて調査する。

Hsf 遺伝子の発現制御とプライミング効果との関連性

高温ストレス応答に関与するトマト転写因子遺伝子 *Hsf2A* の発現に対してもバジルによるプライミング効果が認められた。そこで、バジルからのシグナルが HsfA1 あるいは HsfA1/HsfA2 複合体に及ぼす影響を生化学的および目的遺伝子の組換え植物体を用いた分子生物学的な観点から調査する。

バジルから放出される揮発性物質とプライミング効果との関連性

バジルからトマトへの作用は、バジル地上部に由来する結果を得ている。そこで、バジルから抽出した精油およびそれに含有する既知の揮発性物質を用いて、トマトのストレス応答に対するプライミング効果を調査する。この場合、数種の成分に関して単独、ブレンドによる効果を検討する。

- (2) バジルによるトマト果実成分への影響
- ・GC-MS 装置を用いて実際にトマト果実から放出される揮発性成分のプロファイルを検査する。

バジルがトマト果実から放出される揮発性成分のプロファイルに変化を齎すか？バジルがトマトの味覚に関わる香り成分のプロファイルにどのような影響を及ぼ

すかについて GC-MS 装置を用いて調査する。

geraniol によるトマト果実揮発性成分の変化

バジルとの混植および geraniol の人為的な投与がトマト果実中に内在する geraniol 誘導体物質の蓄積に及ぼす影響を GS-MS を用いて調査する。

味認識装置を用いた解析

バジルとの混植によるトマト果実の味覚の変化を、味覚センサーにより調査する。

(3) プライミング効果によるトマトの環境ストレス適応能の変化

・バジルによるプライミング効果が、実際にトマトの環境ストレスに対する適応能にどのような影響を与えるかを確認する。

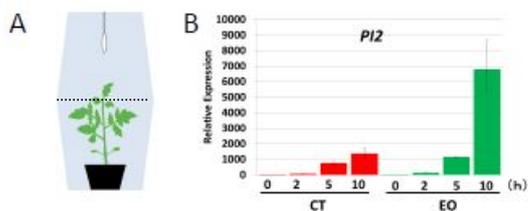
バジルとの混植がトマト傷害応答性遺伝子をより早く、強く誘導することを確認している。そこで、実際にトマトの食害性害虫(タバコガ、ハスモンヨトウなど)に対する防御効果を確かめる。

バジルとの混植がトマト植物体の HSP 遺伝子の発現に関してもプライミング効果を誘導した。そこで、バジルとの混植がトマトの高温ストレス下における結実性および花粉粘性の改善に寄与するかを調査する。

#### 4. 研究成果

本研究では、コンパニオンプランティングにおける科学的検証について、トマトとバジルとの組み合わせを実験系とした解析を行った。以下に、得られた成果を列記する。

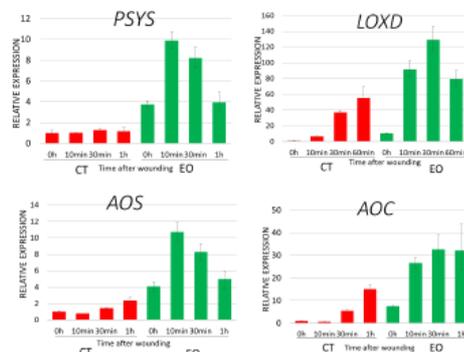
(1) バジルのトマトへの効果はバジル地上部から放出される揮発性成分に起因することより、本研究ではバジル葉由来の精油(Basil essential oil: BEO or EO)をトマト植物体に処理することにより、混植の効果を安定的に再現するか否かを調査した。図1AのようにBEO 5 μl を含ませた綿棒をプラントボックスの上部に取り付け、トマト植物体(cv. Micro-Tom)を密封状態で15時間処理した後、傷害ストレスを付与した。その結果、BEO 処理を施したトマトでは、対照区と比較して傷害で誘導される *PI2* 遺伝子の発現が顕著に増加することが明らかとされた(図1B)。この結果より、BEO が混植と同様の効果を誘導することが確認できた。



(図1) バジル精油(BEO)による傷害応答の強化

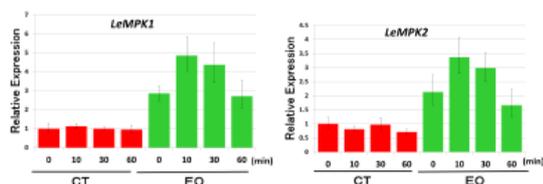
(2) 傷害による *PI2* の発現誘導および BEO によるその発現のプライミング効果は、トマトのジャスモン酸(JA)非感受性変異体 *jai1-1* で殆ど認められなかったことから、BEO は、トマト植物体の JA シグナルを強化することにより、傷害応答を強化することが示唆された。

(3) JA 生合成および感受性に関わる遺伝子の発現について調査したところ、*LoxD* (lipoxygenase D)、*AOS* (allene oxide synthase)、*AOC* (allene oxide cyclase) の発現においても、BEO によるプライミング効果が認められた(図2)。特に、全身抵抗性シグナル伝達の初発因子であり、傷害時における JA 生合成を促すシステミンの前駆体 Prosystemin (*PSY*) 遺伝子に関しては、BEO により直接的に発現が誘導されていた。また、JA シグナル伝達のハブとして機能する転写因子遺伝子 *MYC2* の発現についても発現におけるプライミング効果が確認された。

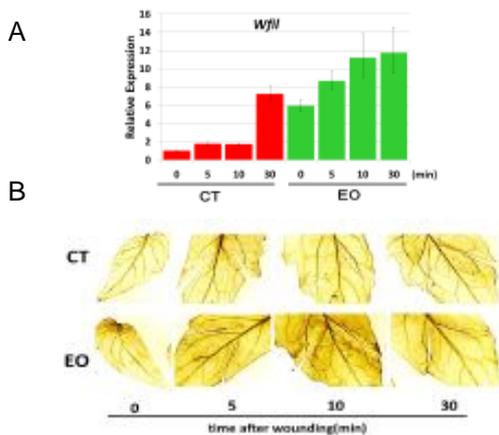


(図2) BEOによるJA合成系遺伝子の発現変動

(4) 傷害応答には、活性酸素(ROS)およびMAPキナーゼがシグナルメディエーターとして機能することが報告されている。そこで、トマトのROS生成に関与するNADPH酸化還元酵素遺伝子である *Wfi1*、MAPキナーゼ遺伝子である *LeMPK1*、*LeMPK2*、*LeMPK3* の発現を調査した。その結果、*Wfi1*、*LeMPK1*、*LeMPK2* においては、BEOによる直接的な発現誘導が確認され、傷害後1時間以内の早いタイミングで顕著に発現していた(図3)。一方、*LeMPK3* は傷害誘導性が認められ、BEOによるプライミング効果が認められた。プライミングの誘導機構の一因として、先行刺激による細胞内シグナルメディエーターの蓄積が報告されていることから、本研究で得られた結果は、その仮説を強く裏付けるものとして注目される。また、BEOは傷害後のROSの蓄積についても促進する効果が認められた(図4)。



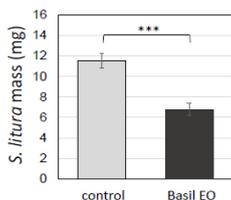
(図3) BEOによるMAPキナーゼ遺伝子の発現変動



(図4) BEOの活性酸素(ROS)生成関連遺伝子の発現(A)および傷害後に蓄積するROSへの影響

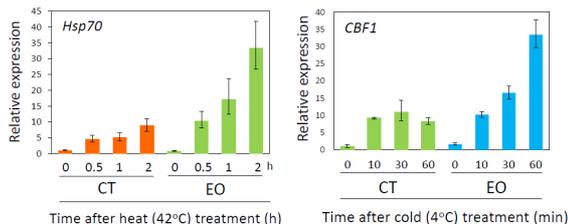
(5) BEOには多種の揮発性化合物が含まれているが、どの物質が傷害応答のプライミング誘導に関わるかについて検討した。本研究では、linalool、chavicol、 $\alpha$ -terpineol、eugenol、(Z)-3-hexenolの5つをBEOを構成する代表的な揮発性化合物として解析に用いた。上記5つの化合物をそれぞれトマト植物体に暴露後、傷害ストレスを付与し、*PI2*遺伝子の発現誘導を調査した。その結果、短時間暴露(0.5時間)では、linalool、eugenolが、長時間暴露(15時間)では、linalool、chavicolにおいてプライミング効果が認められた。興味深いことに、eugenolの長時間暴露は、逆に*PI2*の発現を抑制した。一方、JAシグナルの誘導に関与することが報告されている(Z)-3-hexenolについては、傷害ストレスを強化する効果は認められなかった。揮発性化合物のブレンドによる効果およびその比較に関しては検討を行わなかったが、個々の化合物においても傷害ストレスを強化する可能性が示唆された。

(6) 傷害ストレスにより誘導される*PI2*遺伝子は、タンパク質分解阻害の活性を持つことから、BEOによるその発現誘導の強化は、食害昆虫に対して消化不良を誘導する効果が期待される。そこで、実際にその効果を検証するため、ハスモンヨトウ幼虫を用いた解析を行った。3齢幼虫にBEOを暴露したトマトの葉を一定期間与えた結果、対照と比較して生重量が約40%低下することが明らかとされた(図5)。この結果は、BEO暴露したトマト植物体が食害昆虫に対して強い抵抗性を誘導することを示唆している。このような間接的な効果のみでなく、BEOは1~3齢の若齢幼虫に対して直接的な殺虫効果を持つことが明らかにされた。

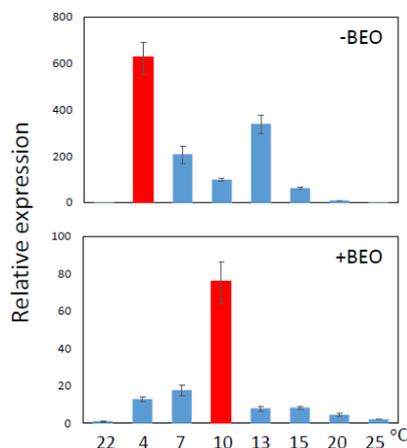


(図5) BEOによるハスモンヨトウ幼虫の生育抑制

(7) BEOは傷害ストレス応答を強化することが明らかにされたが、トマト花芽における高温ストレス応答、トマト植物体における低温ストレス応答においてもプライミング効果を誘導することが明らかにされた(図6)。また、低温ストレス応答においては、発現応答に必要な温度帯を6程度プラス側にシフトさせる効果が確認された(図7)。

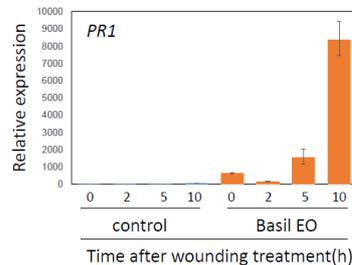


(図6) BEOが温度ストレス応答に与える影響



(図7) BEOが低温応答性遺伝子*CBF1*の発現に対する温度感受性に与える影響

(8) バジルと同じシソ科のタイムから得られた精油(Thyme essential oil: TE0)においても同様な調査を行った結果、傷害による*PI2*遺伝子の発現が抑制された。そこで、サリチル酸(SA)シグナルのマーカー遺伝子である*PR1*遺伝子の発現を調査した結果、顕著なプライミング効果が認められた(図8)。TE0は、SA生合成系遺伝子の発現に関しては影響しなかったが、SAの感受性を高める効果が確認された。



(図8) タイム精油による病害応答の強化

以上のように、本研究では植物から放出される揮発性化合物が免疫誘導シグナルとして機能し得る可能性を導き出した。これらの結果は、コンパニオンプランティングの効果

を具体的に示す明確な科学的根拠として注目される。

バジルおよびタイム精油による免疫応答の強化は、乾燥種子に処理することによっても誘導される結果を得ている。この現象は、エピジェネティックな制御機構が関与する可能性が高く非常に興味深い。この分子メカニズムの解明はもちろんのこと、今後、種子に安定的に免疫機能を誘導させる条件が確立されれば、既存の品種・系統のストレス耐性を付与することが可能になる。

また、精油成分が、植物の温度感受性を変える可能性が得られたことは、細胞膜の流動性や膜タンパク質の構造変化等に何らかの影響を与える可能性も考えられる。植物における温度受容・認識メカニズムに関しては、動物で認められているような温度受容体の存在有無も明らかにされていない。本研究で得られた知見は、その解明に向けた突破口を開くきっかけを与えてくれるものと期待している。

本研究では、BEO および TEO がトマトだけではなく、モデル植物であるシロイヌナズナでも同様に機能することを確認している。今後、遺伝子機能欠損変異体等、リソースが充実しているシロイヌナズナを用いることにより、揮発性分子シグナリング解明に向けた更なる発展を目指す。

#### 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 0件)

〔学会発表〕(計 3件)

・ Shoma Taguchi, Chihiro Wakita, Riichiro Yoshida, Effect of basil plant on the controlling wounding response in tomato plant. 日本植物生理学会 2017年3月(鹿児島)

・ 田口翔麻, 脇田千尋, 吉田理一郎, バジルがトマトの傷害ストレス応答に与えるプライミング効果について, 日本植物学会 2016年9月(沖縄)

・ 脇田千尋, 田口翔麻, 吉田理一郎, トマト傷害応答のプライミング効果を誘導するバジル成分の探索, 日本植物学会 2016年9月(沖縄)

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

名称:

発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:  
国内外の別:

取得状況(計 0件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
取得年月日:  
国内外の別:

〔その他〕  
ホームページ等

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

吉田 理一郎 (YOSHIDA Riichiro)  
鹿児島大学・農水産獣医学域農学系・准教授  
研究者番号: 70301786

##### (2) 研究分担者

なし

研究者番号:

##### (3) 連携研究者

なし

研究者番号:

##### (4) 研究協力者

なし