

令和 4 年 8 月 25 日現在

機関番号：34419

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2021

課題番号：18K14441

研究課題名（和文）昆虫ホルモンによる植物耐塩性機構の解明

研究課題名（英文）Functional analysis of salt stress tolerance by insect hormone in plants

研究代表者

佐古 香織（Sako, Kaori）

近畿大学・農学部・助教

研究者番号：60722395

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：塩害は、世界の灌漑農地の約20%で発生しており、農作物の収量に深刻な被害をもたらす環境ストレスである。持続的な食糧供給実現のために植物の高塩応答機構を解明し、耐塩性作物および肥料を開発することは急務の課題である。本研究によって昆虫ホルモンを外生的に投与することによってシロイヌナズナの耐塩性を強化できることを発見した。遺伝学的解析ならびにトランスクリプトーム解析の結果、昆虫ホルモンは根のバリア機能として機能するスベリン合成を促進することによって塩の取り込みを阻害し、耐性を強化する可能性を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、植物に化合物を処理することで、植物が持つ環境ストレス応答能力を強化し、ストレス耐性を付与する手法、ケミカルプライミングに注目が集まっている。本手法は遺伝子組換えを伴わないことや、様々な植物に適用可能であるといった利点が挙げられる。こうした状況で申請者は昆虫ホルモンを外生的に投与することによってシロイヌナズナの耐塩性を強化できることを発見した。昆虫ホルモンは哺乳類への影響が少ないことから殺虫剤成分として実用化されている。従って、本研究の推進は殺虫効果と耐塩性を兼ね備えた安全性の高い農薬開発に繋がることが期待できる。

研究成果の概要（英文）：More than 20% of irrigated land is affected by soil salinization worldwide. High-salinity stress is one of the major limiting factors of crop productivity and growth. Chemical priming is a promising approach to improving salinity stress tolerance in plants. I found that exogenous treatment of insect hormone enhanced salt stress in *Arabidopsis thaliana*. Insect hormones have been put to practical use as insecticide ingredients because it showed low cytotoxicity on mammals. Therefore, this research will be able to produce agricultural chemical that demonstrate pesticide effect and improve salt tolerance.

研究分野：植物環境応答

キーワード：高塩ストレス 昆虫ホルモン

1. 研究開始当初の背景

動くことのできない植物は高塩・高温・低温・乾燥など様々な環境ストレスにさらされている。なかでも塩害は、世界の灌漑農地の約 20% で発生しており、農作物の成長や収量に深刻な被害をもたらす環境ストレスである。2050 年には世界人口が 97 億人を突破すると試算されていることから、持続的な食糧供給実現のために植物の高塩応答機構を解明し、耐塩性作物および肥料を開発することは危急の課題である。

現在まで環境ストレス耐性作物の開発は、育種によるストレス耐性品種の選抜が主流となっている。育種はストレス耐性作物作出において強力な手法であるが、品種の開発に時間がかかるという課題がある。また、遺伝子組換え技術もストレス耐性として有力な手法であるものの、遺伝子組換えを忌避する国が多いことが課題となっている。これらの課題を克服する新たな技術として化合物を活用した“ケミカルプライミング”の研究が注目を集めている (Sako et al. *Plant Cell Physiol.* 2020)。ケミカルプライミングとは、ストレスが発生する前に植物に化合物を処理することによって、植物が本来持っているストレス耐性機構を活性化し、植物が実際にストレスを受けた際に早く、強く耐性を発揮できるようにする手法である。本手法は遺伝子組換えを伴わないことや、様々な植物に適用可能であるといった利点が挙げられる。さらに、多くの場合 1 種類の化合物処理によって複数の環境ストレス耐性を強化できることや、多様な作物種の耐性を強化できることといったメリットが挙げられる。自然環境下では乾燥と高温など複合的なストレスが同時に発生することから、ケミカルプライミングは農場において多様な作物種の様々な環境ストレス耐性を強化できる有望な技術となることが期待されている。

これまでに我々はケミカルプライミング剤の研究を実施し、化合物を処理することによって、植物の高塩ストレス耐性を強化できることを報告してきた。具体的にはヒストン脱アセチル化酵素阻害剤がナトリウムイオンのアンチポーターである AtSOS1 の遺伝子発現を増加させることによって植物の高塩ストレス耐性を強化できることを報告した (Sako et al. *Plant Cell Physiol.*, 2016)。また、外生エタノールを処理することによって、活性酸素除去酵素の遺伝子発現ならびに酵素活性が増加し、高塩ストレス耐性を強化できることを明らかにした (Huong et al. *Front Plant Sci.*, 2017)。さらに、ケミカルスクリーニングによって得られた新規化合物 FSL0260 がミトコンドリア電子伝達系 I の阻害剤であること、この阻害によって活性酸素の発生が抑制され、高塩ストレス耐性を強化できることを報告した (Sako et al. *Sci. rep* 2020)。これら化合物によるストレス耐性を研究するなかで、昆虫ホルモンを外生的に投与することによってシロイヌナズナの耐塩性を強化できることを発見した。既存の研究から植物においても昆虫ホルモンが合成され、食害応答に関与することが報告されているが、その分子メカニズムは不明である。また、環境ストレス応答との関連性は報告がない。

2. 研究の目的

そこで本研究では、昆虫ホルモンによる植物高塩ストレス耐性強化の分子メカニズム解明を目的として、シロイヌナズナを用いた遺伝学的解析ならびに生化学的解析を実施した。

3. 研究の方法

(1) 昆虫ホルモン処理時のトランスクリプトーム解析

昆虫ホルモンによる高塩ストレス応答の分子メカニズムを解明するために、昆虫ホルモン処理ならびに高塩ストレス処理時のマイクロアレイ解析を実施した。

(2) 昆虫ホルモン合成酵素の解析

昆虫ホルモンによる耐塩性機構の解明を目指して、シロイヌナズナを用いて、昆虫ホルモン合成酵素のノックアウト変異体ならびに過剰発現体を作成し、高塩ストレス試験を実施し、評価した。さらに、マイクロアレイ解析の結果得られた遺伝子の発現変動を、これら変異体を用いて qPCR によって検証した。

(3) 昆虫ホルモン関連タンパク質の探索

昆虫ホルモンによる高塩ストレス応答機構を解明するために、昆虫ホルモン関連タンパク質の探索を実施した。具体的には EMS 変異原処理したシロイヌナズナを用いて、昆虫ホルモンを処理しても塩ストレス耐性を示さない変異体の探索を実施した。得られた変異体を次世代シーケンサーで解析することによって、昆虫ホルモン非感受性を示す原因遺伝子の同定を目指した。

4. 研究成果

外生昆虫ホルモンによって高塩ストレス耐性が強化されたことから、内生昆虫ホルモンによる高塩ストレス応答を検証するため、シロイヌナズナ昆虫ホルモン合成酵素の過剰発現体ならびにゲノム編集を用いたノックアウト変異体を作製した。これらを用いて耐塩性試験を実施した結果、過剰発現体が耐塩性を、ノックアウト変異体が高塩感受性を示すことを明らかにした。本結果は外生昆虫ホルモン処理の結果と一致しており、内生昆虫ホルモンも植物の高塩ストレス耐性強化に機能する可能性が示唆された。

さらに、昆虫ホルモンによる高塩ストレス応答機構を解明するため、昆虫ホルモン処理時シロイヌナズナを用いたトランスクリプトーム解析を実施した。その結果、昆虫ホルモン処理によって 236 遺伝子、昆虫ホルモンと高塩ストレス処理時に 357 遺伝子の発現が上昇することが明らかになった（図 1）。これらのうち、高塩ストレスと昆虫ホルモン処理時に発現が上昇する遺伝子として、根のバリア機構として機能するスベリンの合成酵素の遺伝子発現が上昇することを見出した。

そこで次に、高塩ストレス時のスベリン染色を行った。その結果、昆虫ホルモン合成酵素のノックアウト変異体ではスベリン領域の減少が、過剰発現体ではスベリン領域の拡張が生じることが確認された。これらの結果から、高塩ストレスにさらされると、昆虫ホルモンはスベリンを増加させることによって塩の取り込みを阻害し、耐塩性を強化する可能性が示唆された。

さらに詳細な昆虫ホルモンによる高塩ストレス応答機構を解明するため、植物体内で昆虫ホルモンと結合する受容体様タンパク質の探索を実施した。昆虫ホルモンに対して非感受性を示す変異体の原因遺伝子が受容体との関連性が考えられるため、スクリーニングを行った結果、2 変異体を非感受性変異体として同定した。これら変異体について次世代シーケンサーによって原因遺伝子の探索を行った。現在、これら変異体の原因遺伝子の同定を目指して解析を実施中である。

昆虫ホルモンは哺乳類への影響が少ないことから殺虫剤成分として実用化されている。従って、本研究の推進は殺虫効果と耐塩性を兼ね備えた安全性の高い農薬開発に繋がることが期待できる。

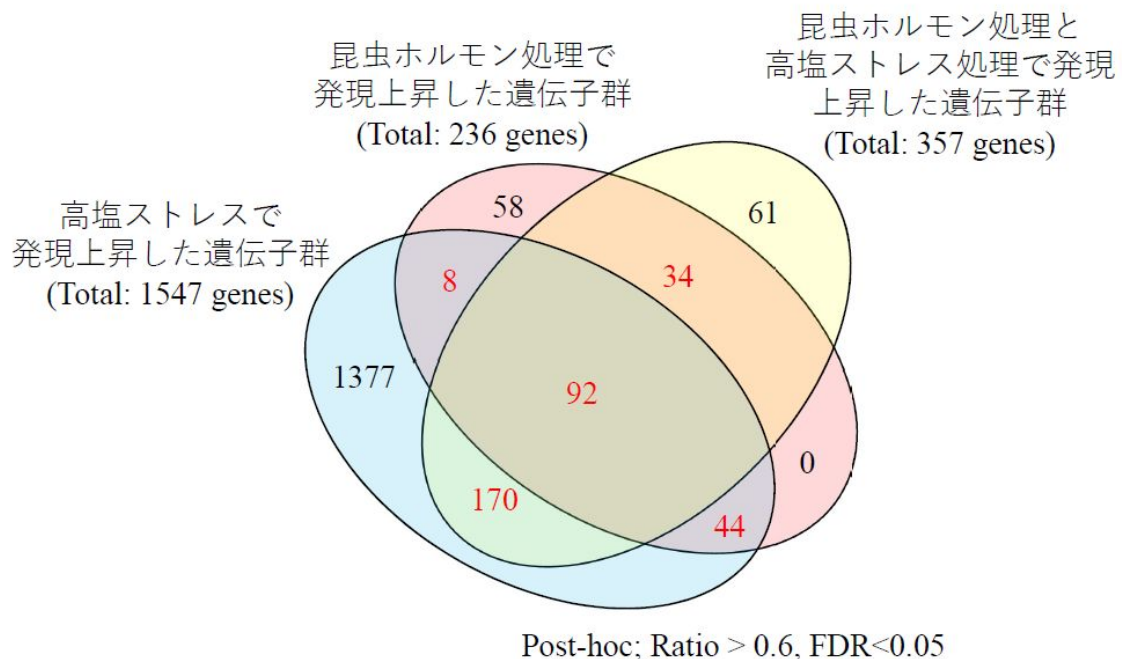


図1 昆虫ホルモン処理時のマイクロアレイ解析

また、化合物によるストレス耐性の研究を推進するなかで、化合物ライブラリーより得られた Natolen128 が高塩ストレス耐性を強化することも見出した。Natolen128 と類似した構造を持つものの、高塩ストレス耐性示さない化合物 Necolen124 を同定した。これら 2 種の化合物を用いてトランスクリプトーム解析を実施した結果、Nato1en128 は一酸化窒素に関連する遺伝子発現が上昇することが示された。一酸化窒素はストレス耐性を強化することが示唆されていることから、蛍光プローブを用いて一酸化窒素の検出を実施した。その結果、Natolen128 は一酸化窒素を誘導することが示された。以上の結果から、新規耐塩性化合物 Natolen128 は一酸化窒素を

誘導することによって、高塩ストレス耐性を強化することが明らかになった。本結果を *Plants* 誌に発表した (Sako et al. *Plants* 2021)。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Sako Kaori, Nagashima Ryutaro, Tamoi Masahiro, Seki Motoaki	4. 巻 38
2. 論文標題 Exogenous ethanol treatment alleviates oxidative damage of <i>Arabidopsis thaliana</i> under conditions of high-light stress	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Plant Biotechnology	6. 最初と最後の頁 339 ~ 344
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.5511/plantbiotechnology.21.0715a	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Sako Kaori, Van Ha Chien, Matsui Akihiro, Tanaka Maho, Sato Ayato, Seki Motoaki	4. 巻 10
2. 論文標題 Transcriptome Analysis of Arabidopsis thaliana Plants Treated with a New Compound Natolen128, Enhancing Salt Stress Tolerance	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Plants	6. 最初と最後の頁 978 ~ 978
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/plants10050978	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Sako Kaori, Futamura Yushi, Shimizu Takeshi, Matsui Akihiro, Hirano Hiroyuki, Kondoh Yasumitsu, Muroi Makoto, Aono Harumi, Tanaka Maho, Honda Kaori, Shimizu Kenshirou, Kawatani Makoto, Nakano Takeshi, Osada Hiroyuki, Noguchi Ko, Seki Motoaki	4. 巻 10
2. 論文標題 Inhibition of mitochondrial complex I by the novel compound FSL0260 enhances high salinity-stress tolerance in Arabidopsis thaliana	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 8691
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-020-65614-9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -
1. 著者名 Sako Kaori, Nguyen Huong Mai, Seki Motoaki	4. 巻 61
2. 論文標題 Advances in Chemical Priming to Enhance Abiotic Stress Tolerance in Plants	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Plant and Cell Physiology	6. 最初と最後の頁 1995 ~ 2003
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/pcp/pcaa119	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Sako Kaori, Sunaoshi Yuji, Tanaka Maho, Matsui Akihiro, Seki Motoaki	4. 巻 13
2. 論文標題 The duration of ethanol-induced high-salinity stress tolerance in Arabidopsis thaliana	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Plant Signaling & Behavior	6. 最初と最後の頁 e1500065
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/15592324.2018.1500065	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 佐古香織	4. 巻 60
2. 論文標題 ケミカルブライミングによる植物の環境ストレス耐性強化	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 化学と生物	6. 最初と最後の頁 110-112
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 上田 実, 佐古 香織, 伊藤 昭博, 吉田 稔, 関 原明	4. 巻 56
2. 論文標題 ヒストン脱アセチル化酵素が担う植物の環境ストレス応答制御 植物をストレスに強くする標的タンパク質の発見	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 化学と生物	6. 最初と最後の頁 797-803
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 佐古香織、平野弘之、Sheena C Li, 八代田陽子, 長田裕之、関原明
2. 発表標題 新規耐塩性化合物HTD0011は液胞型H ⁺ -ATPase制御に機能する
3. 学会等名 第62回日本植物生理学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 佐古香織、二村友史、清水猛、松井章浩、平野裕之、近藤義光、室井誠、青野晴美、田中真帆、本田香織、清水謙志郎、川谷誠、中野雄司、長田裕之、野口航、関原明
2. 発表標題 新規ミトコンドリア阻害剤FSL0260は植物に耐塩性を付与する
3. 学会等名 日本農芸化学会2020大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 高見和弘、田茂井政宏、佐古香織
2. 発表標題 シロイヌナズナ高塩ストレス応答性ユビキチンリガーゼの同定
3. 学会等名 第61回日本植物生理学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 佐古香織、チエン・バン・ハ、松井章浩、田中真歩、佐藤綾人、関原明
2. 発表標題 Chemical screening of compounds enhancing salinity stress tolerance
3. 学会等名 第60回日本植物生理学会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 Ueda Minoru, Kaori Sako, Motoaki Seki	4. 発行年 2018年
2. 出版社 Springer	5. 総ページ数 326
3. 書名 Salinity Responses and Tolerance in Plants, Volume 2	

1. 著者名 佐古香織、戸高大輔、Zarnab Ahmad、Khurram BASHIR、関原明	4. 発行年 2022年
2. 出版社 エヌ・ティー・エス	5. 総ページ数 500
3. 書名 バイオスティミュラントハンドブック	

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------