

令和 3 年 6 月 6 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2020

課題番号：19K16227

研究課題名(和文)アブラナ科植物における地上部と地下部の化学防御物質の分配様式とその分子機構

研究課題名(英文)Optimal defence allocation and its molecular mechanisms in Brassica rapa

研究代表者

角田 智詞 (Tsunoda, Tomonori)

京都大学・フィールド科学教育研究センター・研究員

研究者番号：30747936

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)：最適防御理論は、植物は最も価値が高く、攻撃に対して最も脆弱である器官に最も多くの資源が投入されると予測している。アブラナ科の植物では、根が食害されると、地下部で最も価値の高い器官である主根にグルコシノレート(GSL)が蓄積される。GSLの蓄積は、食害に応答した局所的な生合成と、他の器官からの輸送により生じていると考えられるが、それらがどの程度貢献しているかは明らかでない。本研究では、Brassica rapaのGSL誘導において、輸送と生合成の動態を調べる実験を行った。自然災害やコロナ禍により研究が制約されたため、GSL誘導の分子メカニズムを包括的に理解するには、より詳細な実験も必要である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

陸上植物は、天敵に攻撃されても移動して逃げることはできません。しかし、植物は様々な部位を天敵に攻撃される可能性があり、それに対抗する必要があります。植物の対抗手段の一つに、化学防御物質があります。この防御にはコストがかかるため、植物は攻撃された時にのみ防御物質の濃度を高くする誘導防御応答を取ります。いつ・どこで生じるか分からない攻撃に対する植物の柔軟な対応策が誘導防御で、多様な生物から植物が身を守る術と考えられてきました。本研究では、この誘導防御の分子メカニズムの理解を目指しました。植物自身が備える防御機構を理解することにより、農薬使用を減らした作物生産への応用も可能になると考えています。

研究成果の概要(英文)：The optimal defence theory predicts that plants invest most energy in those organs that have the highest value, but are most vulnerable to attacks. In Brassica species, root-herbivory leads to the accumulation of glucosinolates (GSLs) in the taproot, the most valuable belowground plant organ. Accumulation of GSLs can result from local biosynthesis in response to herbivory. In addition, transport from distal tissues by specialized GSL transporter proteins can play a role as well. GSL biosynthesis and transport are both inducible, but the role these processes play in GSL accumulation during root-herbivory is not yet clear. To address this issue, I performed experiments to study the dynamics of transport and biosynthesis in local and distal tissues of Brassica rapa.

研究分野：生態学

キーワード：誘導防御応答、グルコシノレート(からし油配糖体)、植物と植食性昆虫の相互作用、植物の食害応答
最適防御理論、植物-微生物-昆虫相互作用

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、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

植物の地上部と地下部は、分け隔てられ研究されることが多かった。この理由は、植物が獲得する資源は地上部では光、地下部では水や栄養塩と異なり、それぞれの側面に着目して研究が発展してきたからである。しかし、天敵に着目すると、地上部も地下部も病虫害の攻撃を同様に受けている。このため、植物防御に関して、個体全体に適用できる規則があり、天敵からの攻撃に対して、個体全体で応答していると考えられる (Soler et al. (2013) *Trends Plant Sci.*, **18**, 149–156; Tsunoda et al. (2017) *J. Ecol.*, **105**, 1256–1266)。葉や根など一部の器官だけでなく個体全体において、複数の天敵に対する植物の防御応答機構の分子機構を明らかにすることが、本研究の目的である。本研究課題では、「さまざまな天敵に対する植物の防御応答の分子機構に個体全体に適用できる規則はあるか？」という問いを検討した。

全ての天敵に対して防御強度を高めると、植物の成長や繁殖への投資が減少する。このため、植物は、最も攻撃を受けやすい部位や攻撃を受けると最もダメージが大きい部位に、より多くの防御物質を分配する (最適防御理論; Iwasa et al. (1996) *Theor. Popul. Biol.*, **50**, 124–148; van Dam et al. (1996) *Funct. Ecol.*, **10**, 128–136)。研究代表者によるこれまでの研究から、地上部と地下部の両方の恒常防御と誘導防御は、最適防御理論と矛盾しないことが明らかとなった (図 1; Tsunoda et al. (2017) *J. Ecol.*, **105**, 1256–1266; Tsunoda et al. (2018) *Funct. Ecol.*, **32**, 2127–2137)。つまり、食害がない時、茎や主根で化学防御物質 (グルコシノレート, glucosinolate, 以下 GSL) の濃度が恒常的に高かった。また、食害が生じると、茎や主根で、GSL の濃度上昇が顕著だった。GSL の濃度上昇は、新たな生合成と食害を受けていない部位からの輸送により生じていると考えられる。従って、地上部と地下部双方で生じた病虫害の攻撃に対し、地上部と地下部間の防御物質のやりとりに着目し、植物の防御応答機構を評価する必要がある。

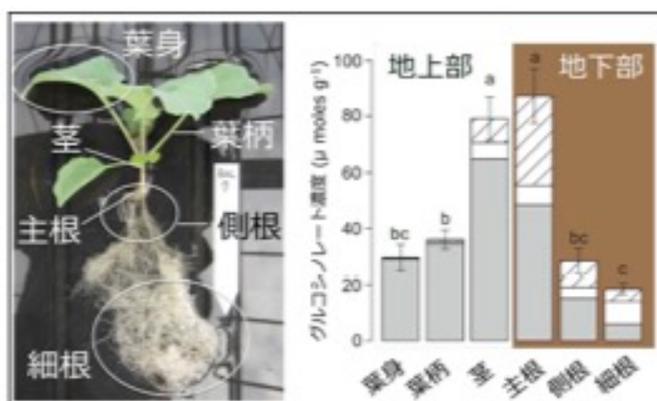


図 1. 植物の各器官 (左) とカブの恒常グルコシノレート (GSL) 濃度 (右)。植物体の中心である茎や主根で GSL 濃度が最も高く、よく防御されている。灰色, 脂肪族 GSL; 白, インドール GSL; 斜線, 芳香族 GSL。

2. 研究の目的

本研究では、GSL 誘導防御の分配様式を作り出す機構を、GSL の生合成・輸送関連遺伝子の発現と GSL の組成・濃度の評価により明らかにする。植物を攻撃する昆虫と病原菌の両方を用いて、各条件における病虫害と植物のパフォーマンスを定量し、誘導防御の機能性を評価する。これら一連の評価を地上部と地下部双方で行い、さまざまな攻撃に対する植物の防御機構の共通性と相違性及び、誘導防御反応における地上部と地下部の連携を明らかにする。

GSL は、インドール GSL (I-GSL) と芳香族 GSL、脂肪族 GSL に大別され、I-GSL は病原

菌への防御に、その他は植食性昆虫への防御に特に有効である (Fan et al. (2011) *Science*, **331**, 1185-1188)。また、それぞれ生合成と輸送の遺伝子がそれぞれ同定されている (Jørgensen et al. (2015) *Trends Plant Sci.*, **20**, 508–514)。そのような材料を用いて、最適防御理論と矛盾しない誘導防御の分子機構を明らかにする点が、本研究の学術的独自性である。特に、地上部と地下部の間の物質輸送は、植物体の一部だけを評価してきた多くの先行研究が見逃してきた点である。

地上部と地下部を攻撃する昆虫と病原菌を材料とすることにより、植物の複雑な防御応答の共通性と相違性を明らかにする点が創造的である。最適防御理論と矛盾しない防御物質分配は地上部と地下部双方で見られたため、この分配様式を作り出す共通したパターンが、地上部と地下部双方に存在すると予測している。一方、GSLの種類とその機能に着目すると、地上部と地下部で相違点があると考えられる。地下部では I-GSL が恒常的に多く (図 1)、病原菌の攻撃が多いことを示唆している。このため、攻撃が生じた際、地下部では I-GSL の輸送が顕著だが、地上部ではそれ以外の GSL の輸送が顕著だと予測していた (図 2 参照)。

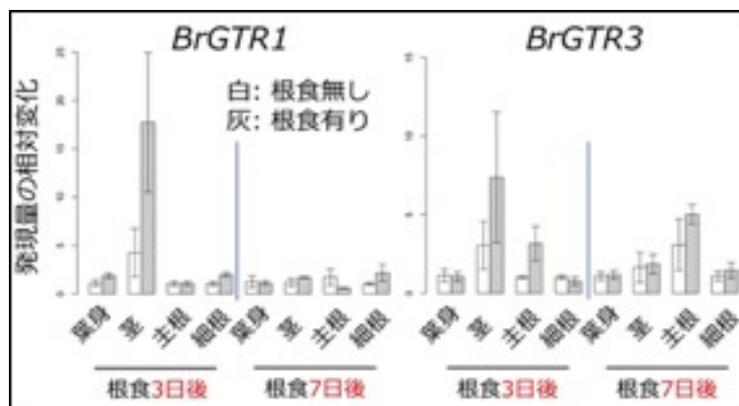


図 2. 主根食害後の GSL 輸送関連遺伝子の発現量変化 (予備実験結果)。脂肪酸 GSL の輸送に関わる *BrGTR1* は、地上部で直ちに発現した。I-GSL の輸送に関わる *BrGTR3* は、地下部で長期的に発現した。このことから、地上部と地下部で輸送される GSL の種類が異なると考えている。

本研究では、GSL の生合成と輸送に関わる遺伝子が同定されているアブラナ科 *Brassica* 属を材料とし、二つの課題を行う。これまでの研究・予備実験では地下部の昆虫と植物の関係しか評価できなかったが、示唆に富む結果が得られている。その結果をもとに、ポットで栽培した植物に病害虫を接種し、植物の防御応答の分子機構を評価する本研究計画を立案した。課題 1 では、地下部の昆虫と病原菌に対する GSL の誘導防御の分子機構と機能性を評価する。課題 2 では、地上部と地下部の昆虫と病原菌による攻撃の応答を評価する。評価項目や扱う生物群が多いが、必要に応じて共同研究者から協力を得られる。

3. 研究の方法

根食昆虫の準備

根食昆虫とするドウガネブイブイ幼虫は、6月中旬から7月中旬にかけて、東京都多摩市の多摩川河川敷で成虫を採集し、それが産卵した卵から準備した。2019 年度は問題なく成虫を採集し、実験に用いられた。しかし、2020 年度は、前年の 2019 年 10 月 12 日に関東・東海地方に上陸した令和元年東日本台風の洪水によりドウガネブイブイの食草のみならず、土壌そのものが流出し、ドウガネブイブイを採集できなかった。また、コロナ禍で他地域における採集も制限されたため、十分量のドウガネブイブイ幼虫を用意できなかった。これにより、計画していた実験の変更を余儀なくされ、今後につなげる予備的な実験しか行えなかった。



写真 1.ドウガネブイブイの採集地点の多摩川河川敷 (左) 2018 年 6 月; (右) 2019 年 11 月。2019 年 10 月の令和元年東日本台風の洪水により植物と表土が流出し、ドウガネブイブイの採集が困難となってしまった。

アブラナ科植物に感染する病原菌の準備

ポテトデキストロース寒天培地で累代培養されてきたアブラナ科炭疽病菌が、*Brassica rapa* に感染するか確かめた。本アブラナ科炭疽病菌は、シロイヌナズナへの感染が確認されているものである。Tsunoda et al. (2018. *Funct. Ecol.*, **32**, 2127–2137)で材料としたカブ (Horti Tops, the Netherlands) を本実験でも用いる予定だったが、本アブラナ科炭疽病菌は、このカブ品種に病斑を形成せず、感染が確認できなかった。このため、国内で容易に入手できた *Brassica rapa* の 10 品種 (小松菜, 野沢菜など) について、感染の有無をスクリーニングしたが、いずれの品種においても病斑は確認できなかった。このため、野外で生育するカラシナ *Brassica juncea* に感染した病原菌 (未同定) を 2020 年度に見出し、これを今後の実験で使用予定である。

栽培実験

2019 年度に、食害部位を操作した実験を行い、これに対する誘導防御応答とグルコシノレート関連遺伝子の発現を定量した。

グルコシノレート分析

グルコシノレートを抽出できるシステムを構築した。手順は、Grosser & van Dam (2017. *Journal of Visualized Experiments*, **121**, e55425)と同等だが、日本で入手できない物品もあったため、若干の改訂を加えたプロトコルを作成した。改訂版のプロトコルは、私が共同編集の種生物学研究 (2022 年 12 月に出版予定) で和文で発表し、国内での分析の利便性を促進する予定である。

抽出したグルコシノレートは、共同研究者の Dr. Henriette Uthe と Prof. Nicole van Dam (両者とも German Centre for Integrative Biodiversity Research (iDiv) Halle-Jena-Leipzig, Germany) に分析委託し、濃度と組成を HPLC で決定した。

遺伝子発現解析

Oñate-Sánchez & Vicente-Carbajosa (2008. *BMC Res Notes*, **1**, 93)を改変したプロトコルで RNA を抽出するシステムを構築した。リアルタイム PCR により、特定の遺伝子の相対発現量を評価した。

4. 研究成果

図3に示す通り、主根への食害により、*Brassica rapa* の主根において、芳香族 GSL とインドール GSL の濃度が有意に上昇し、先行研究と矛盾しない結果が得られた。地上部器官の GSL 濃度は有意に変化しなかったため、図には示していない。

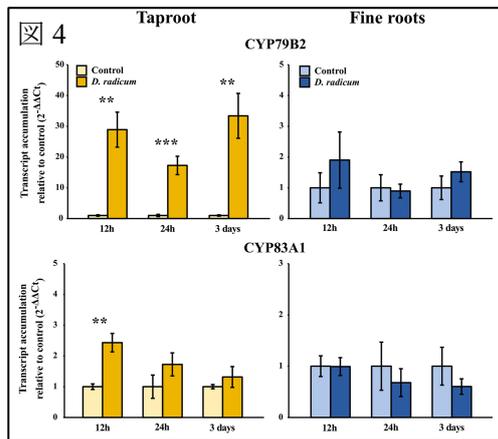
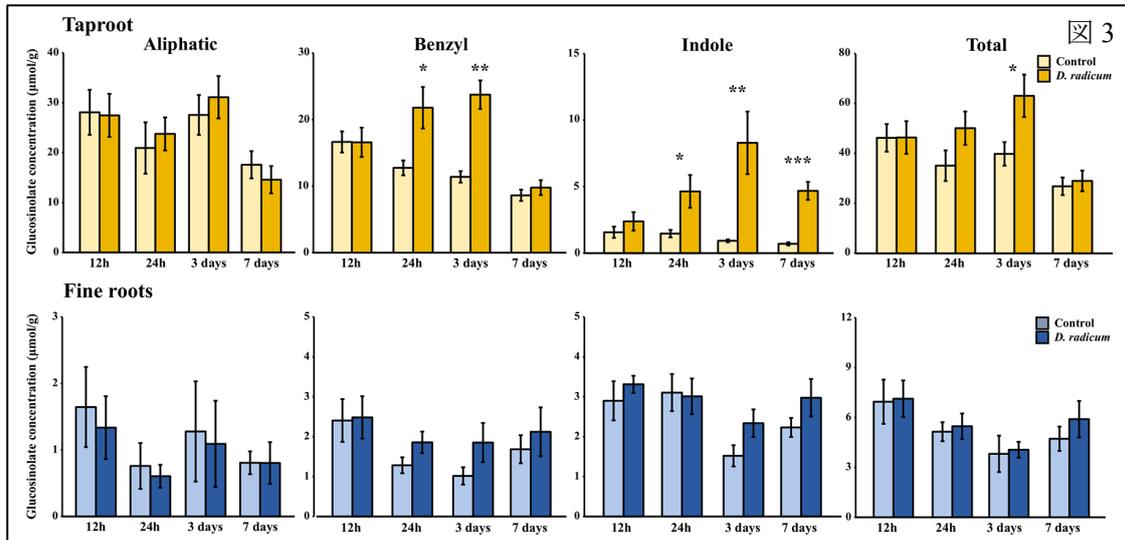


図4に示す通り、インドール GSL の生合成に関わる CYP79B2 と脂肪族 GSL の生合成に関わる CYP83A1 の相対発現量は、食害を受けた主根のみで有意に上昇した。CYP83A1 の発現量は、時間と共に減少した。食害した昆虫に対して防御効果がある脂肪族 GSL よりも、病原菌に対して防御効果があるインドール GSL の方が、より長く生合成され続けると考えられた。

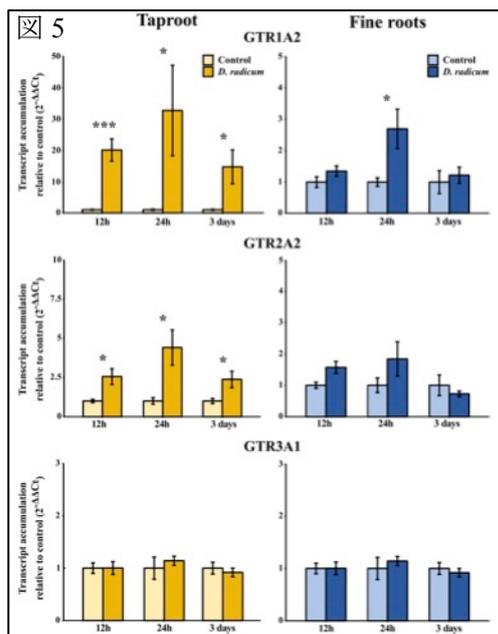


図5に示す通り、脂肪族と芳香族 GSL の輸送に関わる GTR1A2 と GTR2A2 の相対発現量は、食害を受けた主根で顕著に増加し、細根でも増加した。一方、インドール GSL の輸送に関わる GTR3A1 の発現量は、食害に影響されなかった。このことから、植物を攻撃している昆虫に防御効果がある脂肪族と芳香族の GSL のみ、すでに生合成されて他器官に分配されているものが、輸送されてくると考えられた。

今回の実験では、食害の12時間後にはすでに遺伝子発現量の変化が見られ、GSL濃度も24時間後には変化が見られ、素早い植物の応答が生じていた。誘導防御のメカニズムの理解には、この間の時間と12時間後以前についても細かく検討することが必要と考えられた。

主根への食害のみならず、防御値が異なる部位への食害に対する誘導防御の分子機構に関するデータも、現在解析中である。結果がまとまり次第、適宜研究発表する。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 Touw, A.J., Mogen, A.V., Maedicke, A., Sontowski, R., van Dam, N.M. & Tsunoda, T.	4. 巻 10
2. 論文標題 Both biosynthesis and transport are involved in glucosinolate accumulation during root-herbivory in <i>Brassica rapa</i>	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Plant Science	6. 最初と最後の頁 1653
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fpls.2019.01653	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 該当する

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 1件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 van Dam, N.M., Touw, A., Sontowski, R. & Tsunoda, T.
2. 発表標題 Belowground battles in Brassicaceae. Molecular mechanisms of optimal glucosinolate allocation in roots under herbivore attack
3. 学会等名 The 26th International Conference of Entomology（国際学会）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 角田智詞
2. 発表標題 植物の化学物質から読み解く植物と昆虫の相互作用
3. 学会等名 第43回日本土壌動物学会大会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 角田智詞
2. 発表標題 地下部も含めて考える植物防衛研究の行方:地上部と地下部の共通点と相違点、その連携
3. 学会等名 第52回種生物学シンポジウム
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 角田智詞
2. 発表標題 土壌食物網における脂肪酸情報の利用
3. 学会等名 第68回日本生態学会大会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔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		
ドイツ	iDiv		