

令和 5 年 6 月 27 日現在

機関番号：14303

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K05768

研究課題名(和文) 乳管細胞を緒にして植物の新規な生体防御タンパク質を発見し作用機構を解明する

研究課題名(英文) Discovering novel plant defense proteins and elucidating their mechanisms of action in plants with laticifers as a beginning.

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) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：昆虫と微生物に対する植物の防御システムは多種多様で、解読された多くの植物のゲノム中にも未知の抗昆虫・抗微生物タンパク質遺伝子が多く存在すると思われる。防御に特化した細胞である乳管細胞は、それらの発見を促す強力な研究材料である。イチジクとミドリサングの乳管で高発現する機能未知の転写物・タンパク質より約20種を選び、一過的発現系を用いて害虫ハスモンヨトウに対する抗昆虫活性を示す複数の新奇なタンパク質を見出した。組換えタンパク質とトランスクリプトーム解析等を通じてそれらの抗昆虫の分子機構を提案した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

防御機能に特化した乳管細胞を足掛かりにして新奇な抗昆虫タンパク質遺伝子を発見するという独自のアイデアに基づき複数の新奇な抗昆虫タンパク質を発見した。本成果は、植物と昆虫の異種生物間相互作用、植物の生体防御機構の多様性の理解という植物科学の大きな興味に新しい知見を提供した。この成果を可能にした技術的要因のひとつは、簡単迅速低コスト省スペースで複数遺伝子の並行解析に適した一過的発現系を独自に開発したことにある。本技術は、タンパク質・遺伝子の機能解析を試みる多くの研究にも応用可能である。本研究が発見した抗昆虫タンパク質遺伝子は、化学農薬不要の環境と消費者に優しい農業の実現に応用可能である。

研究成果の概要(英文)：Plant defense systems against insects and microbes are diverse and there are likely to be many unknown anti-insect and anti-microbial protein genes in the genomes of many plants that have been decoded. Laticifers, cells specialized for defense, are a powerful research resource for their discovery. We selected about 20 transcripts and proteins of unknown function that are highly expressed in fig or euphorbia laticifers and found several novel proteins that exhibit anti-insect activity against the pest *Spodoptera litura* using a newly improved transient expression system. We proposed the molecular mechanism of their anti-insect activity through recombinant proteins and transcriptome analysis.

研究分野：農芸化学 植物生理学

キーワード：乳液 乳管細胞 防御 農業 抗昆虫 GM植物

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

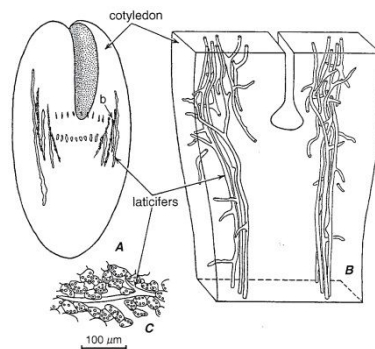
1. 研究開始当初の背景

背景：昆虫と微生物に対する植物の防御システムは多種多様で、解読された多くの植物のゲノム中にも未知の抗昆虫・抗微生物タンパク質遺伝子が多く存在すると思われる。外敵に対する防御に特化した組織・細胞は、それらの発見を促す強力な研究材料である。この着想の下、申請者らは、防御に特化した細胞である乳管細胞に着目する。

動機：乳管細胞で高発現する機能未知遺伝子群の中から新規な抗昆虫・抗微生物タンパク質を多数発見し、それを緒として、多くの植物のゲノム中にコードされるそれらのホモログもまた抗昆虫・抗微生物タンパク質であるかを検証し、さらにその作用機構を解明する。これにより外敵に対する植物の防御システムの知識を大きく拡張する。

2. 研究の目的

植物の乳管細胞は、植物体中を伸長・分枝して、サイトゾル(“乳液”とよぶ)が長く連結した乳管細胞の網を張り巡らす(図1)。昆虫等により植物体が損傷して乳管細胞網が切断されると、乳液が大量に漏出し、その成分が昆虫・微生物等を攻撃する。防御タンパク質・mRNAが乳液の主成分なので、乳管細胞が防御に特化した細胞であることは明白である。申請者らは、既知の防御タンパク質・mRNAに加え、植物種・器官ごとに多様な機能未知のタンパク質・mRNAも乳液に大量に含まれることを見出した。これらは新規防御タンパク質遺伝子の有力候補である。それらのひとつ、PLATタンパク質が昆虫に対する毒性をもつこと、アラビドプシスのホモログの一つも強い殺虫活性を持つことを発見した。



研究期間における本研究の目的は、PLATタンパク質の殺虫機構を知ること、そして、これをパイロットスタディとして、他の機能未知の多数の乳液タンパク質と他植物のホモログの抗昆虫・抗微生物活性を検証し、それらの作用機構を解明することである。

3. 研究の方法

本研究の遂行のために、申請者らは、下図に示すように、カイワレダイコンのスプラウトを宿主とする簡単・迅速・省スペース・低コストの一過的組換えタンパク質生産法を開発し、また遺伝子組換え植物の作出と選抜を簡便・迅速化する新たなベクターを開発した。これらにより、初めて数十種に及ぶ抗昆虫・抗微生物タンパク質候補を見出し、効率的に解析することが可能となった。抗昆虫細胞毒性の検証には、上記に加えて、当該遺伝子を導入した組換えショウジョウバエも用いる。抗微生物活性の検証にあたっては、分担者の平良が独自開発した高精度抗カビ活性定量法を使用して新規抗微生物タンパク質の発見を確実とする。以上の手法を駆使して、以下のよう

(A) PLATタンパク質遺伝子ファミリーから特に強い抗昆虫活性を有する遺伝子を探索するため、コケから双子葉・単子葉植物に至るまでのPLATタンパク質遺伝子(概ね10種類を目安とする)をカイワレダイコン・スプラウトにて一過的に発現させ、その子葉をハスモンヨトウ幼虫に食餌させて、その死亡率と成長度により毒性を定量評価する。北島

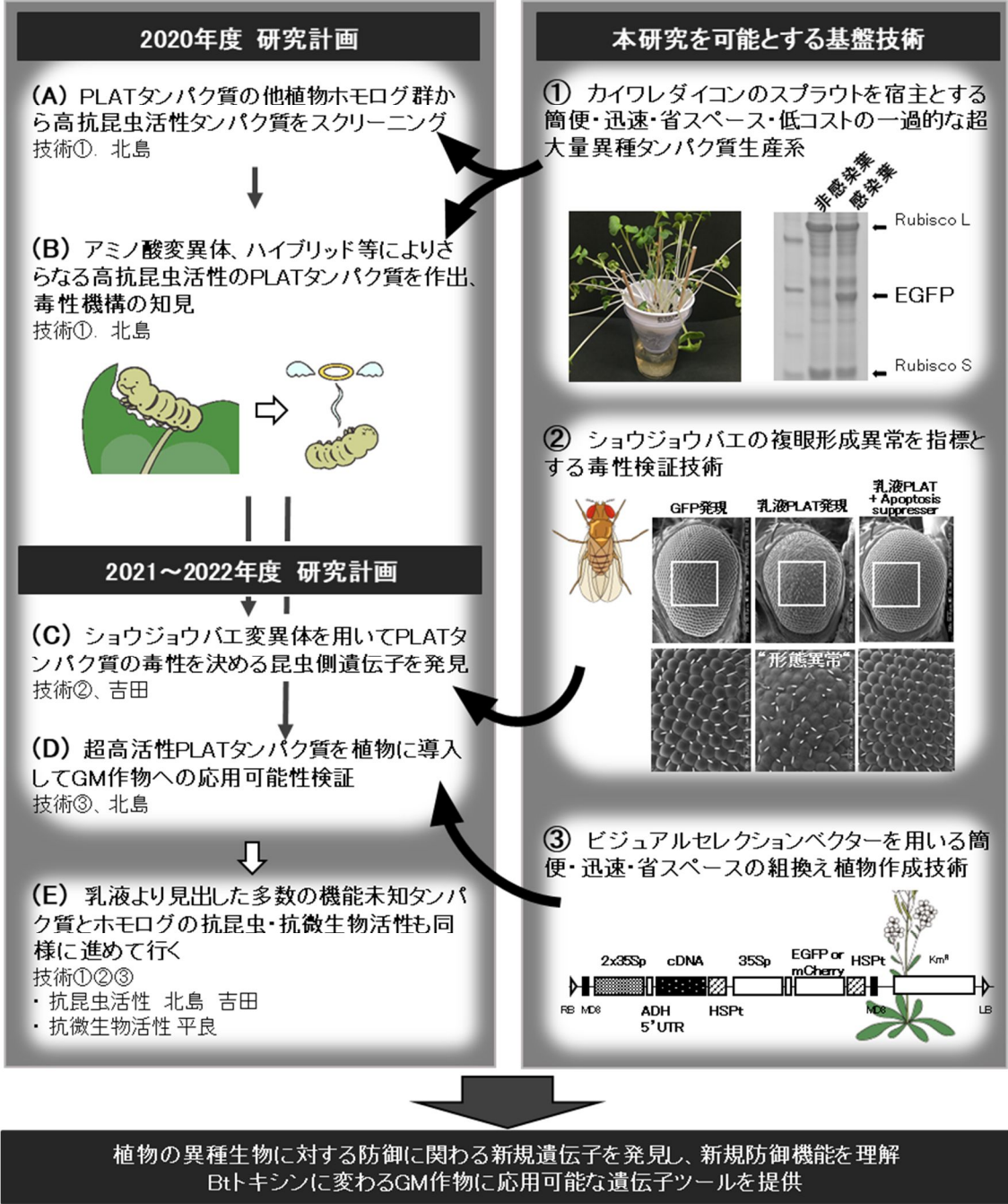
(B) 上記Aにより選ばれた高活性PLATタンパク質の配列比較に基づきアミノ酸変異体を、あるいは低活性ホモログとのハイブリッドを作出して同様に毒性評価する。これにより毒性機構の知見を得るとともに、さらなる高活性変異体への改良を図る。北島

(C) 上記AあるいはBにより得られた高活性PLATタンパク質をショウジョウバエに遺伝子導入し、GAL4/UASシステムにより複眼原基にて特異的に発現させる。その形態異常を指標としてPLATタンパク質の昆虫細胞毒性を評価する。各種のショウジョウバエ変異体との交配により細胞毒性を決定づける昆虫側の遺伝的要因を特定する。吉田

(D) その高活性PLATタンパク質をアラビドプシスに遺伝子導入し、害虫耐性並びに、RNA-seq解析による宿主植物自身への影響を評価する。これらによりPLATタンパク質のGM作物への応用可能性を検証する。北島

(E) クワ、イチジク、ミドリサンゴの果実、葉柄、幹の乳液中より見出した多数の機能未知タンパク質・mRNA(概ね20種類を目安とする)と他の植物ホモログの抗昆虫・抗微生物活性をPLATタンパク質と同様に評価する。抗微生物活性評価については、病原性微生物あるいはその近縁種(アスペルギルス、フザリウム、トリコデルマ等)を対象とする。北島 平良 吉田

前年度まで：
クワ・イチジク・ミドリサンゴ乳液より多数の機能未知タンパク質・mRNAを見出した。
それらのひとつ、PLATタンパク質は新規な抗昆虫タンパク質であった。



4. 研究成果

A. PLAT タンパク質について

我々は以前、イチジク (*Ficus carica*) の乳管細胞に、キチナーゼに匹敵するレベルで PLAT タンパク質が蓄積していること、またトウダイグサ (*Euphorbia tirucalli*) の乳管細胞のトランスクリプトームにおいて、もう一つの PLAT ドメイン含有タンパク質である AT3 の転写レベルが最も高いことを見いだした。本研究では、PLAT ドメイン含有タンパク質が昆虫に対する防御に関与しているかどうかを調べた。鱗翅目害虫ハスモンヨトウ (*Spodoptera litura*) の幼虫は、発現ベクター-pBYR2HS を用いてアグロインフィルトレーションにより導入したイチジク PLAT またはミドリサンゴ AT3 遺伝子を発現する *Nicotiana benthamiana* の葉を食べると、成長遅延を示した。これらの葉のトランスクリプトーム解析から、エチレンおよびジャスモン酸シグナル伝達が活性化され、PR-1、-1,3-グルカナーゼ、PR5 およびトリプシンインヒビターの遺伝子発現が増加することが示され、宿主植物における PLAT および AT3 誘導抵抗性の間接的なメカ

ニズムが示唆された。また、*Drosophila melanogaster* でこれらの遺伝子を異種発現させると、アポトーシスを介した細胞死が起こることから、PLAT と ATS3 の昆虫に対する直接的な細胞毒性も考えられた。ハスモンヨトウの幼虫は、双子葉植物の *Arabidopsis thaliana*、単子葉植物の *Brachypodium distachyon*、針葉樹の *Picea sitchensis*、およびコケ植物の *Marchantia polymorpha* の 9 つの相同遺伝子のいずれかをアグロインフィルトレーションにより発現させたカイワレダイコンの子葉を食べさせると成長遅延が起こった。これら 9 遺伝子のうち、*A. thaliana* AT5G62200 と AT5G62210 の異種発現は幼虫の死亡を有意に増加させた。これらの結果から、PLAT タンパク質ファミリーは、(乳管細胞の有無とかかわりなく) 植物界において抗昆虫活性がほぼ保存されていることが示された。

Savadogo, E.H., Shiomi, Y., Yasuda, J. et al. Gene expression of PLAT and ATS3 proteins increases plant resistance to insects. *Planta* 253, 37 (2021).
<https://doi.org/10.1007/s00425-020-03530-y>

B. 乳液タンパク質遺伝子 X について

まだ論文にしていないため詳細にここに書かないが、ミドリサンゴの乳管細胞で高発現していた遺伝子 X をアグロインフィルトレーションによりカイワレダイコンの子葉で発現させて、ハスモンヨトウ幼虫に給餌したところ成長遅延が認められた。この遺伝子のホモログは植物界に広く存在し、そのアミノ酸配列に基づいて 4 つのサブファミリーに分類される。他の植物に由来するそれらサブグループのホモログを試したところ、上記遺伝子 X と同じサブグループに属する遺伝子群だけが有意な抗昆虫活性を示した。このことにより、この遺伝子ファミリーの生理機能は別にあり、進化の過程で特定のサブグループだけが抗昆虫機能を獲得したと推定された。今後、追加のデータを取得して論文発表を目指す。

C. 乳液タンパク質遺伝子 Y について

また、上記の遺伝子 X と同様、まだ論文にしていないため詳細にここに書かないが、イチジクの乳管細胞で高発現していた別の遺伝子ファミリーに属する遺伝子 Y は、アグロインフィルトレーションによりカイワレダイコンの子葉で発現させて、ハスモンヨトウ幼虫に給餌したところ成長遅延が認められた。この遺伝子のホモログは植物界に広く存在するが、それらのうち同様の抗昆虫活性を示したのは、アミノ酸配列が遺伝子 Y に特に類似していた一部のホモログだけであった。このことにより、この遺伝子ファミリーの生理機能は別にあり、進化の過程で特定のホモログ群だけが抗昆虫機能を獲得したと推定された。今後、追加のデータを取得して論文発表を目指す。

研究成果の学術的意義や社会的意義、今後の展望

防御機能に特化した乳管細胞を足掛かりにして新奇な抗昆虫タンパク質遺伝子を発見するという独自のアイデアに基づき複数の新奇な抗昆虫タンパク質を発見した。本成果は、植物と昆虫の異種生物間相互作用、植物の生体防御機構の多様性の理解という植物科学の大きな興味に新しい知見を提供した。この成果を可能にした技術的要因のひとつは、簡単迅速低コスト省スペースで複数遺伝子の並行解析に適した一過的発現系を独自に開発したことにある。本技術は、タンパク質・遺伝子の機能解析を試みる多くの研究にも応用可能である。本研究が発見した抗昆虫タンパク質遺伝子は、化学農薬不要の環境と消費者に優しい農業の実現に応用可能である。すなわち、本研究が発見した新規な抗昆虫・抗微生物タンパク質群は、Bt 作物に代わる GM 作物の開発にも活用される。Bt トキシンと異なり植物自身の遺伝子なので、当該遺伝子発現制御領域のゲノム編集等の非組換え技術により、耐性作物を作出できるかもしれない。ショウジョウバエ変異体を用いて昆虫側の感受性遺伝子も特定するので、耐性害虫出現を予防する技術の発見も期待できる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5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 Villard, C., Munakata, R., Kitajima, S., van Velzen, R., Schranz, M.E., Larbat, R., Hehn, A.	4. 巻 231
2. 論文標題 A new P450 involved in the furanocoumarin pathway underlies a recent case of convergent evolution	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 New Phytologist	6. 最初と最後の頁 1923-1939
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/nph.17458	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
1. 著者名 Takashima, T., Henna, H., Kozome, D., Kitajima, S., Uechi, K., Taira, T.	4. 巻 253
2. 論文標題 cDNA cloning, expression, and antifungal activity of chitinase from <i>Ficus microcarpa</i> latex: difference in antifungal action of chitinase with and without chitin-binding domain	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Planta	6. 最初と最後の頁 120
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00425-021-03639-8	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 Katsuyama, Y., Doi, M., Shioya, S., Hane, S., Yoshioka, M., Date, S., Miyahara, C., Ogawa, T., Takada, R., Okumura, H., Ikusawa, R., Kitajima, S., Oda, K., Sato, K., Tanaka, Y., Tezuka, T., Mino, M.	4. 巻 776
2. 論文標題 The role of chaperone complex HSP90-SGT1-RAR1 as the associated machinery for hybrid inviability between <i>Nicotiana glauca</i> and <i>N. tabacum</i> L.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Gene	6. 最初と最後の頁 145443
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.gene.2021.145443	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 Savadogo, E.H., Shiomi, Y., Yasuda, J., Akino, T., Yamaguchi, M., Yoshida, H., Umegawachi, T., Tanaka, R., Suong, D.N.A., Miura, K., Yazaki, K., Kitajima, S.	4. 巻 253
2. 論文標題 Gene expression of PLAT and ATS3 proteins increases plant resistance to insects	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Planta	6. 最初と最後の頁 0-0
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00425-020-03530-y	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 北島 佐紀人	4. 巻 60
2. 論文標題 植物の乳液成分を手掛かりに新規な抗昆虫タンパク質を探す. 抗昆虫タンパク質ATS3およびPLATとカイワレ大根スプラウトの一過的発現系	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 化学と生物	6. 最初と最後の頁 267 - 268
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6件 (うち招待講演 3件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 SAVADOGO Hyrmeya Eric, Yui Shiomi, Yasuda Junko, Akino Toshiharu, Yamaguchi Masamitsu, Yoshida Hideki, Umegawachi Takanari, Tanaka Ryo, Suong Anh Ngoc Dang, Miura Kenji, Yazaki Kazufumi, Kitajima Sakihito
2. 発表標題 Two PLAT domain-containing proteins, FcPLAT and EtATS3, increase plants resistance to insects
3. 学会等名 日本農芸化学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 北島佐紀人
2. 発表標題 植物の乳液成分を手掛かりに新規な抗昆虫タンパク質を探す ~ PLAT/ATS3 カイワレスプラウトの一過的発現系 etc ~
3. 学会等名 日本農薬学会 第 22 回農薬バイオサイエンス研究会シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Kitajima S
2. 発表標題 PLAT and ATS3 proteins in plant latexes as defense system against insect.
3. 学会等名 Japan-Italy-Vietnam Trilateral Symposium "New approaches for sustainable plant protection from parasites and pests" (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Kitajima S
2. 発表標題 A Small Talk on Plant Anti-Insect AT53 and PLAT Proteins and Transient Gene Expression in Radish Sprouts
3. 学会等名 3 rd JAPAN-ASEAN Seminar 2022 (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 谷尚樹、Eric Hyrmeva Savadogo、秋野順治、吉田英樹、三浦謙治、平良東紀、北島佐紀人
2. 発表標題 ミドリサンゴの乳管細胞で高発現する新規な抗昆虫タンパク質の探索
3. 学会等名 第39回日本植物バイオテクノロジー学会(堺)大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 谷尚樹、Eric Hyrmeva Savadogo、秋野順治、吉田英樹、三浦謙治、平良東紀、北島佐紀人
2. 発表標題 ミドリサンゴの乳管細胞で高発現する新規な抗昆虫タンパク質の探索
3. 学会等名 日本農芸化学会2023年度大会
4. 発表年 2023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
研究分担者	吉田 英樹 (Yoshida Hideki) (30570600)	京都工芸繊維大学・応用生物学系・准教授 (14303)	

6. 研究組織（つづき）

	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
研究分担者	平良 東紀 (Taira Toki) (60315463)	琉球大学・農学部・教授 (18001)	

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