

機関番号：14303

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23580091

研究課題名(和文) 乳管細胞の新規な抗病原体・抗害虫タンパク質遺伝子の網羅的単離と機能解析

研究課題名(英文) Studies on novel pesticidal protein of plant laticifers by mRNA-seq and proteomic analysis.

研究代表者

北島 佐紀人 (Kitajima, Sakihito)

京都工芸繊維大学・工芸科学研究科・准教授

研究者番号：70283653

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円、(間接経費) 1,020,000円

研究成果の概要(和文)：本研究においては、植物の乳管細胞が、植物種・器官ごとに多様な抗病原体・殺虫タンパク質を高生産しているとのアイデアに基づき、乳管細胞が高生産する新規な抗病原体・殺虫タンパク質を、次世代DNAシーケンス技術とプロテオーム技術を駆使して網羅的に探索し、それらの機能を組み換え技術等を用いて生化学的・昆虫遺伝学的・植物生理学的に解明した。本研究の最終的なゴールは、Btトキシン組込みGM作物の抵抗性害虫出現に備えて、これに替わる抗病原体・抗害虫遺伝子として国際社会に提供することである。

研究成果の概要(英文)：In this study, we hypothesized the laticifer cells in various organs of various plant species produce unique anti-insect or anti-microbial proteins and identified them by next-generation sequencing technology and proteome analysis. Then biochemical or physiological roles of these proteins were studied using native or recombinant proteins. Aim of this study is to provide new pesticidal gene, taking the place of Bt gene in transgenic crops.

研究分野：植物生化学・分子生物学

科研費の分科・細目：農芸化学・植物栄養学・土壌学

キーワード：クワ 乳液 乳管細胞 プロテオーム mRNA-seq 殺虫 抗菌

1. 研究開始当初の背景

動向と位置づけ；植物の乳管細胞は珍しい性質を有する。例えばクワ科植物では、わずか数個の始源細胞が、細胞分裂を伴わずに（核は分裂するので多核細胞になる）他の細胞の隙間をぬって細長く伸長・分枝して、植物体全体に乳管細胞ネットワークを張り巡らす（下図）。細胞内圧力が高いため、植物体が損傷してネットワークの一部が切断されるとその細胞内成分（“乳液”と呼ばれる）が大量に漏出する。乳液には抗昆虫・抗カビ成分が多く含まれることから、乳管細胞は食草昆虫や微生物に対する防御に特化した細胞であると考えられる。我々は、クワの葉柄の乳管細胞の乳液にもっとも多く含まれる 2 種類のタンパク質(LA-a および LA-b)が強い殺虫作用をもつことを初めて明らかにし、さらにこれらが、同じくクワの乳液から見出された MLX56 (Wasano et al. 2009) に類似した新規キチナーゼ様タンパク質であることを示した (Kiajima et al. BMC Biochemistry, 2010)。一方、木化した幹の乳管細胞では上記の結果とことなり、抗カビタンパク質キチナーゼ(LA-c)が最も多く蓄積していた。

推定 40 科 20,000 種もの植物が乳管細胞を持つが、アラビドプシスやイネ等のモデル植物には乳管細胞が存在しない上に、乳管細胞を有する有用作物の多くは非欧米地域で栽培される。例えば、パラゴムノキ（乳液は天然ゴムの原料。東南アジア諸国で栽培）、パイア（熱帯地域）、ケシ（乳液はモルヒネの原料。インド）、クワ（東アジア）、イチジク（日本、中東）などである。このため、そのユニークな特性にも関わらず、乳管細胞の分子レベルの研究は世界的に乏しい。さらに、乳管細胞に限らず、殺虫タンパク質の報告自体が少ない。

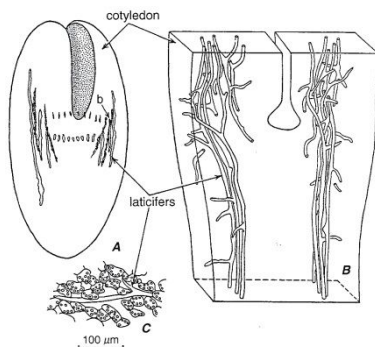


図 1. キョウチクトウの胚における乳管細胞(laticifer)。数個の始源細胞が細胞分裂をせずに伸長・分枝してネットワークになる。(Esau's Plant Anatomy 第3版)

2. 研究の目的

申請者らのこれまでの研究から、乳管細胞は、それらが由来する器官（葉柄、幹、さらには植物種）ごとに、想定される外敵に応じた多様な防御タンパク質を大量に生産すると推定された。乳管細胞のこの特徴を生かし、本課題では、複数種の植物と器官の乳管細胞か

ら、多種多様かつ新規な抗病原体・殺虫タンパク質候補を網羅的に探索し、機能解析を図ることを目的とした。

3. 研究の方法

本課題遂行の最大の問題点は、このような非モデル植物のゲノム情報が無いため、網羅的研究が不可能な事であった。この困難を克服するために我々は、最先端技術である次世代 DNA シーケンサーを駆使して、乳管細胞中で高発現する mRNA 配列を網羅的に取得し、さらにそれらを配列データベースとして、質量分析による高蓄積タンパク質群のプロテオーム解析を実施することを試みた。このようにして見出される乳管細胞高蓄積タンパク質は、生体防御を担う抗病原体・殺虫タンパク質の最有力候補である。

4. 研究成果

平成 23 年度

次世代 DNA シーケンサー-GS-FLX (Roche 社) を用いる mRNA-seq 解析により見出したクワ乳管細胞の高発現遺伝子 mRNA は、PR (pathogenesis-related) タンパク質、レクチン様タンパク質、プロテアーゼ様ドメインを持つ機能未知の新規タンパク質、機能予測不可な新規タンパク質等であった。新規なタンパク質群の機能を明らかにすべく、それらの全長 ORF の cDNA を RT-PCR クローニングし、大腸菌およびピキア酵母での発現系を構築した。多くの遺伝子の組み換えタンパク質は大腸菌内で不溶化したが、ピキア酵母においては、少量ながら可溶性タンパク質を細胞外に分泌させることに成功した。

平成 24 年度

前年度までに生産に成功した組換えタンパク質を用いて、これらの大腸菌あるいはショウジョウバエに対する毒性を検定した。また、P00050 と名付けた機能未知な新規タンパク質においては特異的ポリクローナル抗体を作出し、植物体におけるタンパク質蓄積様式の解析を行った。これらの解析を進める中で、乳管細胞における mRNA 蓄積量とタンパク質蓄積量は必ずしも対応しないことが示されたので、乳管細胞タンパク質のプロテオーム解析を実施した。クワ乳管細胞においては、キチナーゼ LA-c あるいはキチナーゼ様タンパク質 LA-a とそのホモログ LA-b が最も多く、次いで PR タンパク質とレクチン様タンパク質がタンパク質レベルで特に高蓄積していた。一方プロテアーゼ様ドメイン含有タンパク質の蓄積は低く、P00050 タンパク質は検出限界以下であった。したがってクワの乳管細胞による生体防御は、主に LA-a, b, c タンパク質、PR タンパク質及びレクチンが担っていると結論された。また、若い非木化部位と木化部位の乳管細胞でタンパク質の成分は異なっていた。抗病原体・殺虫タンパク質の有力候補をより

広く求めるため、クワに加えてさらに2つの植物種の乳管細胞を用いて、次世代シーケンサーHiSeq2000(イルミナ社)によるmRNA-seq解析を行った。HiSeq2000は、少量のRNAで実験可能である一方、出力される配列長が短いためde novoアセンブリによる全長配列の再現は困難を極めたが、各種のアセンブリソフトウェアと計算条件の検討の結果、比較的精度の高いアセンブリを得た。得られた配列データベースは質量分析によるプロテオーム解析に使用可能であった。

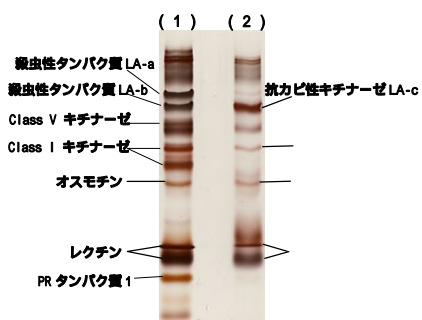


図2. クワの乳管細胞の細胞内タンパク質。レーン(1)、非木化部位の乳管細胞。レーン(2)木化部位の乳管細胞。乳管細胞の細胞内成分(乳液)に含まれるタンパク質の大半は抗昆虫あるいは抗カビタンパク質である。写真はクワの乳液のSDS-PAGE。(Kitajima et al. Planta, 2012)

平成 25 年度

前年度に実施した2種の植物種の mRNA-seq 解析に引き続き、乳管細胞タンパク質の2次元電気泳動と高発現スポットの質量分析による網羅的同定を行った。mRNA-seq の de novo アセンブリを配列データベースとしてマスコット検索したところ、分析対象としたスポットのほぼ 100%が同定され、非モデル植物材料における、イルミナ次世代シーケンサーの mRNA-seq とプロテオーム解析の高い親和性が示された。これらの2種の植物の乳管細胞においては、クワのそれらでは見出されなかったタンパク質が高蓄積しており、いくつかは機能未知な新規タンパク質であった。組換えタンパク質による機能解析のため、RT-PCR クローニングを行い、大腸菌での生産を試みた。平成 25 年度末時点で、それらの可溶性はまだ成功していない。次年度以降、発現系の検討により可溶性組換えタンパク質を得て機能解析を進める。それに並行して、モデル植物アラビドプシスに遺伝子導入しその効果を検証する。カビあるいは突然変異ショウジョウバエ幼虫等も用いて、それらの毒性機構も検討する。

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)

Sakihito KITAJIMA, Yoshihiro YAMAMOTO, Kiyoo HIROOKA, Chihaya TAKI, Susumu HIBINO, Laticifers in mulberry

exclusively accumulate defense proteins related to biotic stresses. Plant Biotechnology, 30:399-402 (2013)

Tomotsugu Koyama, Haruka Nii, Nobutaka Mitsuda, Masaru Ohta, Sakihito Kitajima, Masaru Ohme-Takagi, Fumihiko Sato, A Regulatory Cascade Involving Class II ETHYLENE RESPONSE FACTOR Transcriptional Repressors Operates in the Progression of Leaf Senescence. Plant Physiology 2013, 162:991-1005

Sakihito Kitajima, Toki Taira, Kenji Oda, Katsuyuki T. Yamato, Yoshihiro Inukai, Yusuke Hori, Comparative study of gene expression and major proteins' function of laticifers in lignified and unlignified organs of mulberry. Planta Volume 235, Number 3, 589-601 (2012)

[学会発表](計 3件)

クワとイチジクの乳管細胞に蓄積する mRNA とタンパク質群の器官間比較。日比野進 1・瀧智早 1・矢野晴菜 1・廣岡青央 2・山本佳宏 2・北島佐紀人 1 (1 京都工繊大・2 京都市産技研) 平成 26 年度蚕糸・昆虫機能利用学術講演会 2014 年 3 月 日本大学

植物の乳管細胞の機能を主要タンパク質成分から探る。北島佐紀人 第 29 回植物バイオテクシンポジウム 京都府立大学 2013 年 9 月

クワの乳液に蓄積する mRNA とタンパク質群の器官間比較。日比野進 1・瀧智早 1・廣岡青央 2・山本佳宏 2・北島佐紀人 1 (1 京都工繊大・2 京都市産技研) 日本蚕糸学会合同支部大会 2012 年 11 月 信州大学

[図書](計 件)

[産業財産権] 出願状況(計 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 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

北島佐紀人 (Kitajima Sakihito)
京都工芸繊維大学・工芸科学研究科・准教授
研究者番号：70283653

(2) 研究分担者

山口政光 (Yamaguchi Masamitsu)
京都工芸繊維大学・工芸科学研究科・教授
研究者番号：00182460

(3) 連携研究者

()

研究者番号：