

<平成 26 年度助成>

アブラナ科植物における揮発性物質を用いた 新規環境・病害ストレス耐性誘導技術の基盤構築

木下 奈都子

(筑波大学 生命環境系)

背景

アブラナ科は世界中の食文化に深く関わり、特に香辛料としては西洋ワサビ、マスタード、ルッコラなどが存在する。和食を代表する香辛料であるワサビもアブラナ科である。

しかし栽培農場では、軟腐病やモンシロチョウ、コナガのような特異的な害虫から、ハスモンヨトウやアブラムシ類など病害虫の被害が著しい中で、ワサビの適用農薬は非常に少ないのが現状である。このような背景から、農薬の適用拡大が要望されている。しかし現時点でほとんどのワサビは水耕で栽培されているため、水系への影響の懸念からこの取り組みは難航している。さらに、ワサビ栽培には冷涼な温度管理と豊富な水資源が不可欠であるが、温暖化や水資源の不足から、今後ワサビの栽培適地の減少が予測される。この現状の突破口として、分子育種や新規な栽培法・生物的防御法によるアブラナ科香辛料作物の生産安定化に期待が寄せられる。

一方で、近年の DNA シークエンス技術と転写産物解析の進歩に伴い、バックグラウンド「ノイズ」だと考えられてきた非コード RNA (long intergenic non coding RNA; lincRNA) が真核生物の転写制御において重要な役割を担っていることが明らかになった。例えば哺乳類においては、lincRNA がヒトの疾患や病態生理に関する原因遺伝子として単離されている。

本研究では、生物ストレスと環境ストレスに抵抗性のあるアブラナ科の栽培法・生物的防除法の開発を目的として、長鎖非コード RNA によるアブシジン酸とジャスモン酸を介した病害抵抗性反応を解明す

ることを目的とする。具体的には、アブラナ科モデル植物を用いて、1) 非コード RNA を介した環境ストレス応答メカニズムと、2) 生物ストレス応答において中心的な役割を果たす植物ホルモンについての生物ストレス応答機構の可視化と、メカニズム解明のための基盤研究を行った。モデル植物において、ストレス応答機構を解明することで、直接ワサビを含むアブラナ科に適用することができる。

結果

1. アブラナ科植物におけるモデル植物を用いた新規環境ストレス応答機構の探索

lincRNA とは通常 (1) 200 塩基以上、(2) 100 アミノ酸以上をコードする ORF を含まない、(3) 既知の遺伝子から少なくとも 500 塩基以上離れていると定義される。我々の研究グループは、塩・乾燥などの環境ストレス下で機能する lincRNA を同定することを目的とし、研究室内外のデータベースをスクリーニングし、塩ストレスで誘導される lincRNA である *NPC60* (*NON PROTEIN CODING 60*) に焦点を当てた。

まず、ノザン解析で期待される長さの RNA が検出されることを確認した (図 1A)。塩ストレスは、高浸透圧ストレスや水ストレスホルモンであるアブシジン酸 (ABA) の経路と重なっていることから、ABA や高浸透圧ストレスにおける *NPC60* レベルの変化を解析した。その結果、*NPC60* の RNA レベルは塩・高浸透圧ストレスおよび ABA に応答して急上昇することを確認した (図 1B)。この結果から *NPC60* は、塩・高浸透圧ストレスおよび ABA に共通して応答する lincRNA だと考えられた。次に

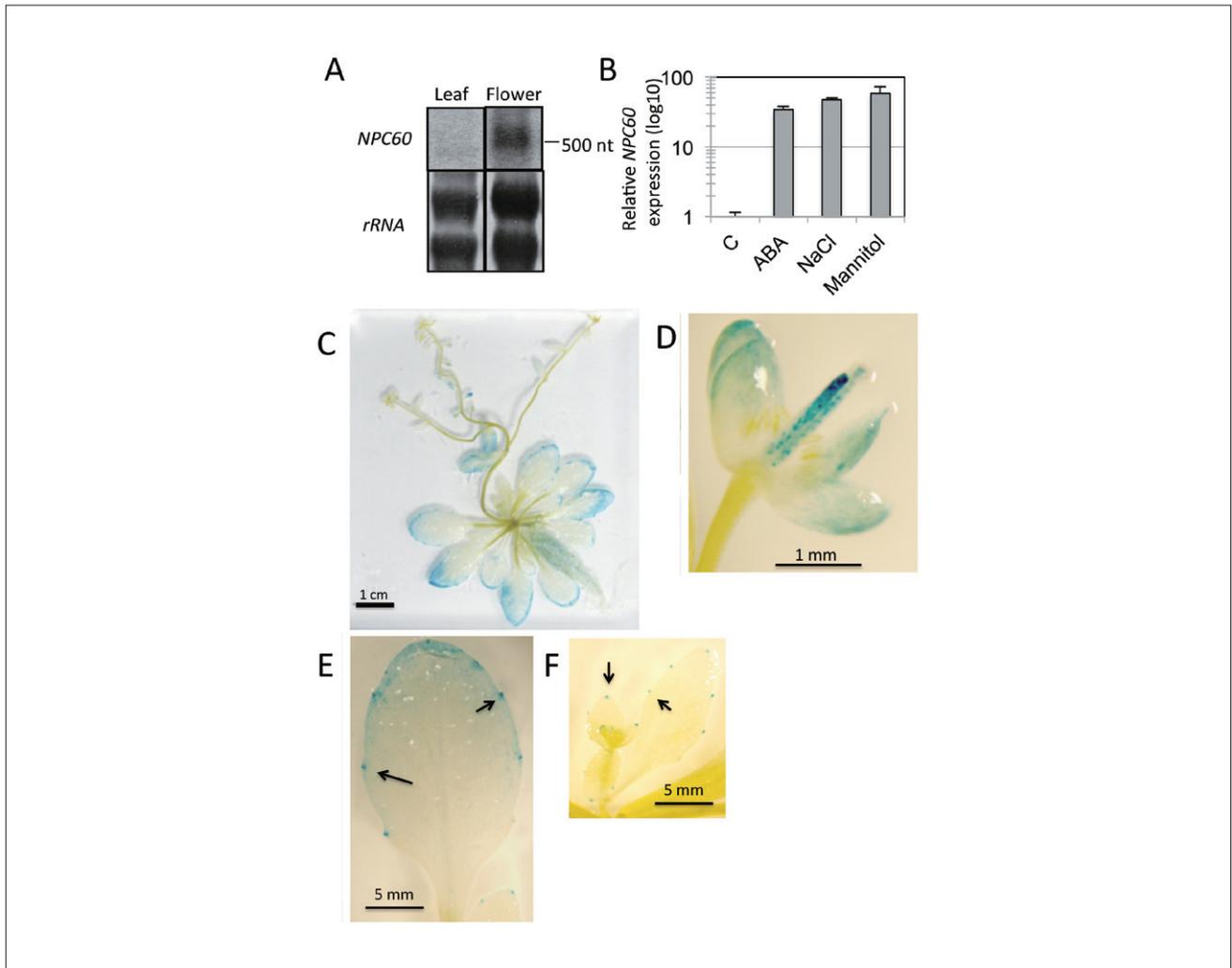


図1 NPC60 RNAの発現レベルはABAや高浸透圧ストレスにも応答して上昇し、登熟種子で高発現している。A, 葉、花芽組織由来のRNAを使用したノザン解析によるNPC60 RNAの検出。B, ABA、NaCl、高浸透圧ストレス(0.3M Mannitol)処理によるNPC60 RNAのレベルの変化をRT-qPCRによって解析した。C-F, NPC60のプロモーター下流のβGUS活性によるNPC60発現部位の解析。C、全個体レベル(Bar=1cm); D, 花芽; E-F、葉におけるNPC60発現組織。矢印: 排水構造(塩腺)。Bar=5mm。右、花芽組織における発現部位。Bar=1mm。

NPC60がどの組織で発現しているのかを調べるために、NPC60のプロモーター下でβ-グルクロニダーゼ(GUS)を発現する形質転換植物を作出し、GUS活性を検出した。その結果、NPC60は葉と花芽で発現し、葉では維管束の先にある排水構造(hydathode)でプロモーター活性が検出された(図1C-F)。

発芽は植物のライフサイクルの中で最も乾燥に弱い時期の一つである。そこでは、まわりの水分環境が発芽に適しているかどうかを判断するチェックポイントが存在する。仮に乾燥ストレスが感知された場合、植物はABA依存的に生長を停止する。この生長停止状態の芽生えは高いストレス耐性を保持する。

我々はまず、NPC60がこのチェックポイントに機

能しているという仮説を立て、発現レベルの異なるNPC60形質転換系統を用いて表現型を解析した。その結果、通常生育条件下ではどの系統も同様に発芽するのにもかかわらず、NPC60ノックアウトおよびRNAiによるノックダウン株は野生株に比べてABA依存的チェックポイントに過剰に応答し、過剰発現系統は非感受性を示した。よってNPC60はチェックポイントに関する負の因子であることが分かった(図2A, B)。これは我々の知る限り、低分子RNAに直接作用しないlincRNAとしては、植物で先駆的に表現型レベルで機能が確認された数少ない例の一つである。次にこの表現型を利用して、果たしてNPC60はRNAとして機能しているのか、それとも

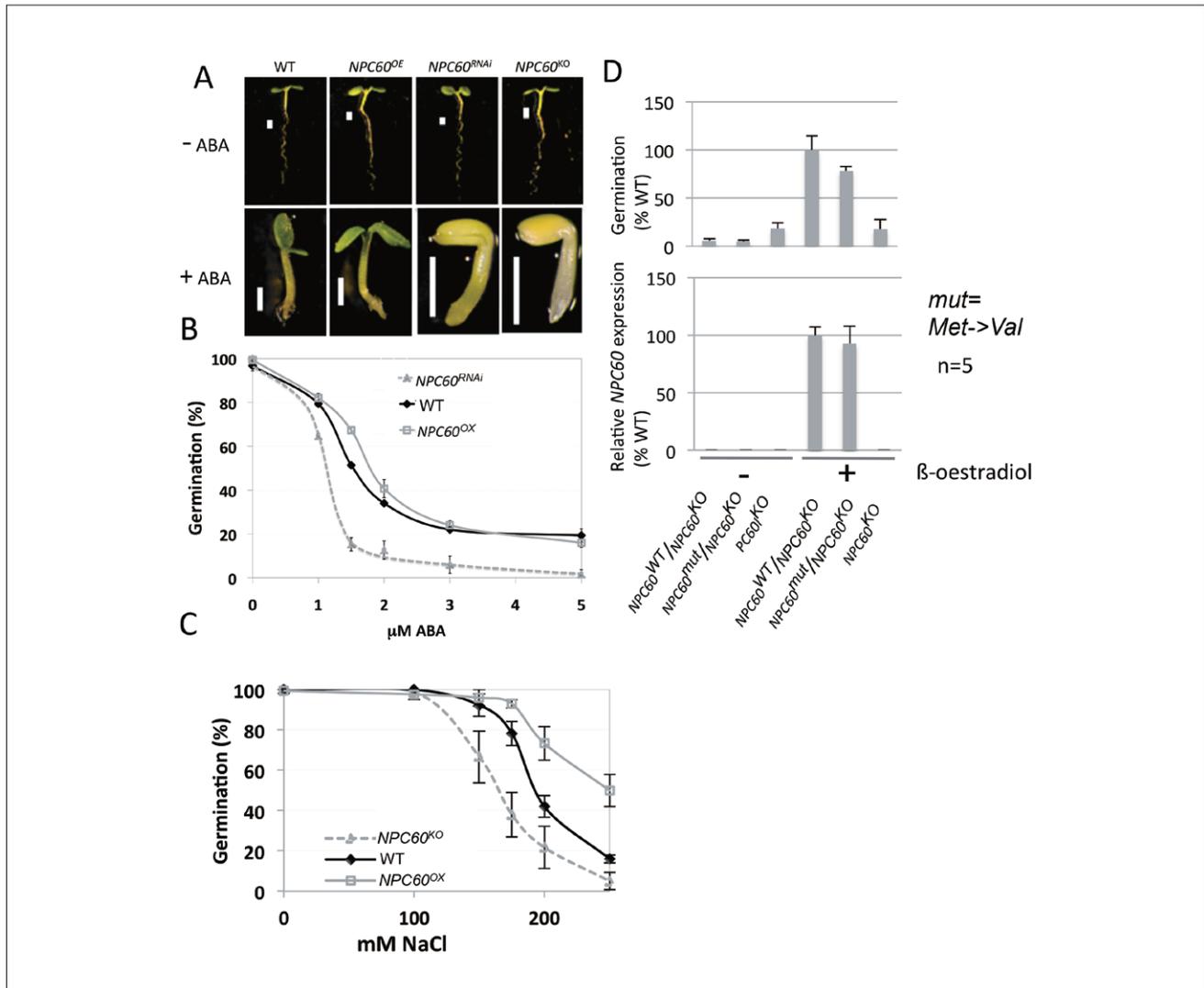


図2 NPC60はABA依存的な発芽時の水分チェックポイントを負に制御している

A, ABA依存的な生長停止に関する応答を野生型、過剰発現系統 (OX)、ノックダウン (RNAi)、ノックアウト (KO) ラインにおいて解析した。写真は播種後7日後に撮影された。Bar: 0.5 mm. B, 発芽時チェックポイントの表現型の定量化。C, NPC60ノックアウト系統に野生型と変異型 (Met->Val) NPC60を誘導型プロモーター制御下で発現し、相補実験を行った。上、野生型と変異型 NPC60で相補したノックアウト系統のABA依存的な発芽率。+、-は β エストラジオールによる発現誘導のあり・なし。

短いペプチドとして機能しているのか、変異型 NPC60 (Met->Val) を用いた相補実験を行った。その結果、変異型 NPC60 と野生型 NPC60 では優位な差が認められなかったため、NPC60 は RNA として機能していることが示唆できた (図 2D)。

これらの結果から、NPC60 は種子発芽期の水ストレス下で、登熟種子と同様の乾燥ストレス耐性に関するプログラムを制御していることが分かったので、実際に種子登熟期の発現パターンを解析した。NPC60 の RNA レベルは S3 期 (受粉後 11-15 日) にピークに達し、その後減少していた (図 3A)。

一方、発芽時のチェックポイントにおける正の鍵

因子は ABI5 である。このため NPC60 とは対称的である。すなわち ABI5 ノックアウト系統は発芽時のチェックポイントに関して ABA に非感受性で、過剰発現系統は野生型よりも過敏に反応する。ABI5 の mRNA レベルは NPC60 と同様に、塩・乾燥または ABA によって誘導される。NPC60 と ABI5 の発現パターンを詳細に解析するために、登熟段階別と発芽時における発現パターンを比較した。種子登熟段階においては、NPC60 レベルが減少する S4 期 (受粉後 16-20 日) に ABI5 のレベルがピークに達していた (図 3A)。発芽時では両遺伝子の発現レベルは ABA によって上昇する。しかし登熟期では、NPC60

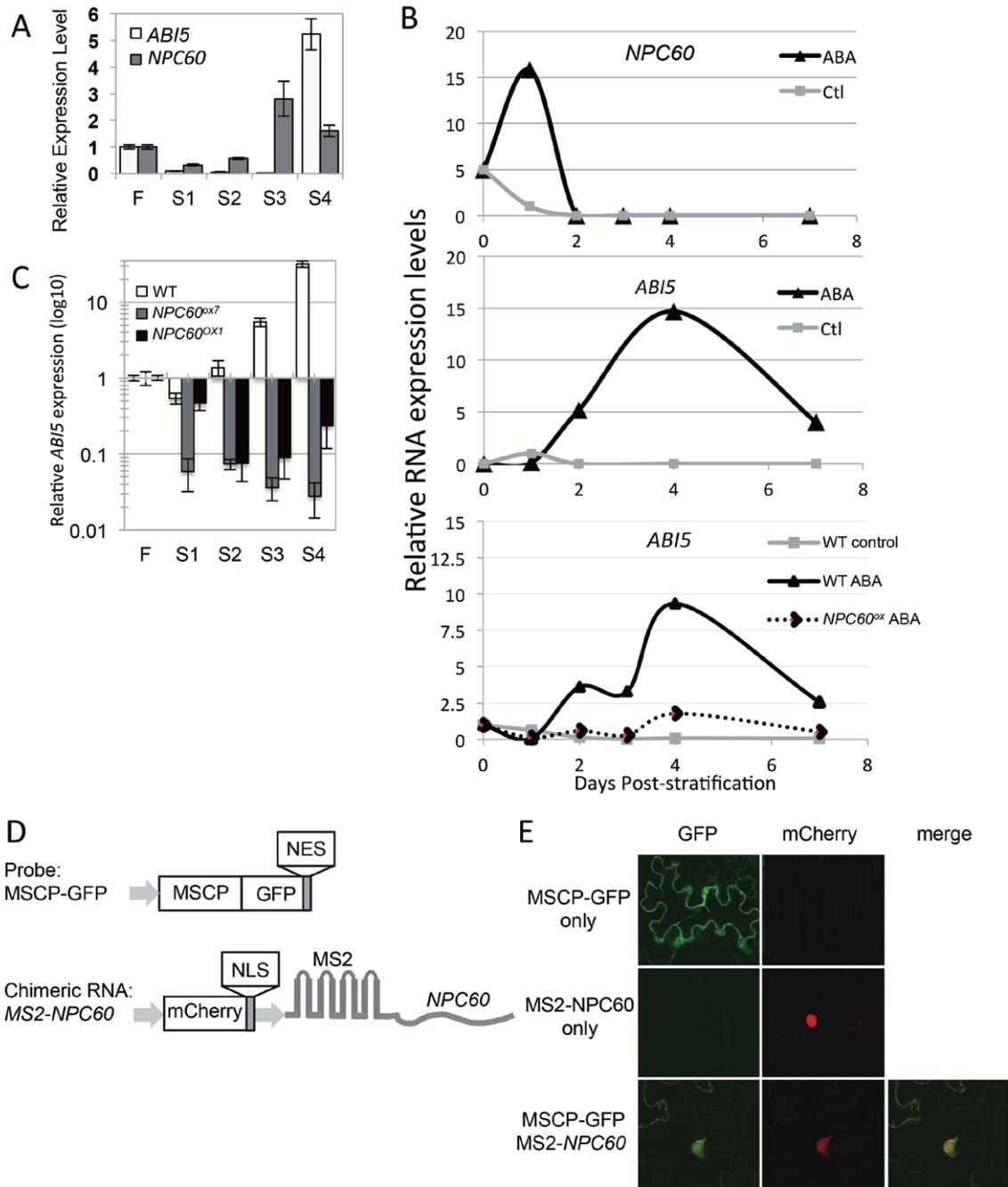


図3 NPC60とABI5の発現レベルは負の相関を示す

A, 胚発生時におけるNPC60およびABI5 RNAレベルの変化。F, 花芽。S1, 受粉後1-5日(DPA; days post anthesis)。S2, 6-10 DPA。S3, 11-15 DPA。S4, 16-20 DPA。B, RT-qPCRによる発芽時におけるABA処理後のNPC60とABI5 RNAレベルの経時的変化。Ctl, コントロール、0 uM ABA; ABA, 3uM ABA。C, RT-qPCRを利用したNPC60過剰発現系統における胚発生段階におけるABI5 mRNA蓄積量の解析。COL.0, 野生型コントロール; OE1, NPC60過剰発現系統1; OE7, NPC60過剰発現系統7。D, 核局在性RNAのin vivo検出メソッドに用いるツール。E, 上, NPC60に結合しているMS2 RNA配列に親和性を持つMSCPはNES(nuclear exporting signal)を付与したGFPに結合しているためMS2配列が存在しない場合は核外に局在し、GFPで検出できる。中, MS2-NPC60を発現している細胞はmCherryで識別できるとともにmCherryはNLS(Nuclear Localizing Signal)を付与しているため核のマーカでもある。下, MSCP-GFPとMS2-NPC60が共発現されるとGFPシグナルは核で検出されるので、NPC60 RNAは核に局在すると考えられる。

のピークは *ABI5* のピークに先行して 1 日目にピークに達し、その後 *NPC60* の mRNA レベルが減少する。追隨して *ABI5* mRNA レベルが上昇し、そのピークは 4 日目に達するという現象が観察された (図 3B)。

これらの結果から、(1) *ABI5* が正の制御因子として機能する発芽時のチェックポイントに関しては、遺伝解析から *NPC60* が負の制御因子として機能していること、(2) この正と負の因子は共に ABA によって誘導されるものの、*ABI5* mRNA レベルの上昇は *NPC60* の RNA レベルの減少とともに起こることが明らかになった。そこで我々は、*NPC60* が *ABI5* mRNA 蓄積量を負に制御することによって負の因子として機能しているのではないかという仮説を立て、*NPC60* 過剰発現系統における *ABI5* mRNA レベルを解析した。その結果、過剰発現系統では、*ABI5* mRNA レベルが著しく減少していることが分かった (図 3B-C)。つまり、*NPC60* は *ABI5* mRNA を負に制御し、その結果チェックポイントで負の因子として機能していると考えられた。さらに両遺伝子は別々の染色体上に存在し明確な相同性もないことから、*NPC60* は *ABI5* にトランスに作用していると推測される。*ABI5* は転写因子として自己の転写をポジティブにフィードバックしているので、*NPC60* はクロマチンレベル、または RNA、タンパク質レベルで *ABI5* を制御していることが示唆された。

これらの結果を受けて、我々は *NPC60* RNA の細胞内局在性を解析した。方法としては、既存する細胞質局在性の *in vivo* RNA 可視化法 (Schonberger et al., 2012) を改変して、高感度な解析法を考案した。この改変型メソッドを利用した場合、*NPC60* の RNA は核で検出された。よって *NPC60* にコードされる RNA の核局在性は、下流で作用する転写因子 *ABI5* と同様であることが明らかになった (Kinoshita et al., 2018)。これは両遺伝子の関係とも合致する (図 3D-E)。

2. 生物ストレス応答において中心的な役割を果たす植物ホルモン、ジャスモン酸とサリチル酸について、個体内と個体間を介した生物ストレス応答機構の可視化とメカニズム解明のための基盤研究

ジャスモン酸、サリチル酸、それぞれの発現調節領域によって制御される蛍光タンパク質が導入されたシロイヌナズナ (筑波大学・別役氏) を用い、コナガの食害に対する応答を解析した。その結果、食害に応答して食害部位とその周辺の細胞で蛍光シグナルが検出された。この結果を受けて、傷害ストレスと害虫からの唾液などに応答した特異的な反応を調べるために、ハスモンヨトウの唾液を単離し、唾液応答反応と傷害ストレスを切り離して解析できる実験系を確立した (図 4)。その結果、サリチル酸経路がジャスモン酸経路より先行して反応するが、24 時間後にはジャスモン酸経路が強力に応答していることが、タイムラプス実験から明らかになった (Kinoshita and Betsuyaku, 2018; Kinoshita et al., 2019)。

さらに、揮発性物質を介した生物ストレス耐性誘導型栽培法の技術基盤として、揮発型のサリチル酸 (メチルサリチル酸) とジャスモン酸 (メチルサリチル酸) に対するそれぞれの組み替え植物の応答を解析した。その結果、低濃度の揮発性植物ホルモンに対して、特異的に反応していることが分かった (図 5)。

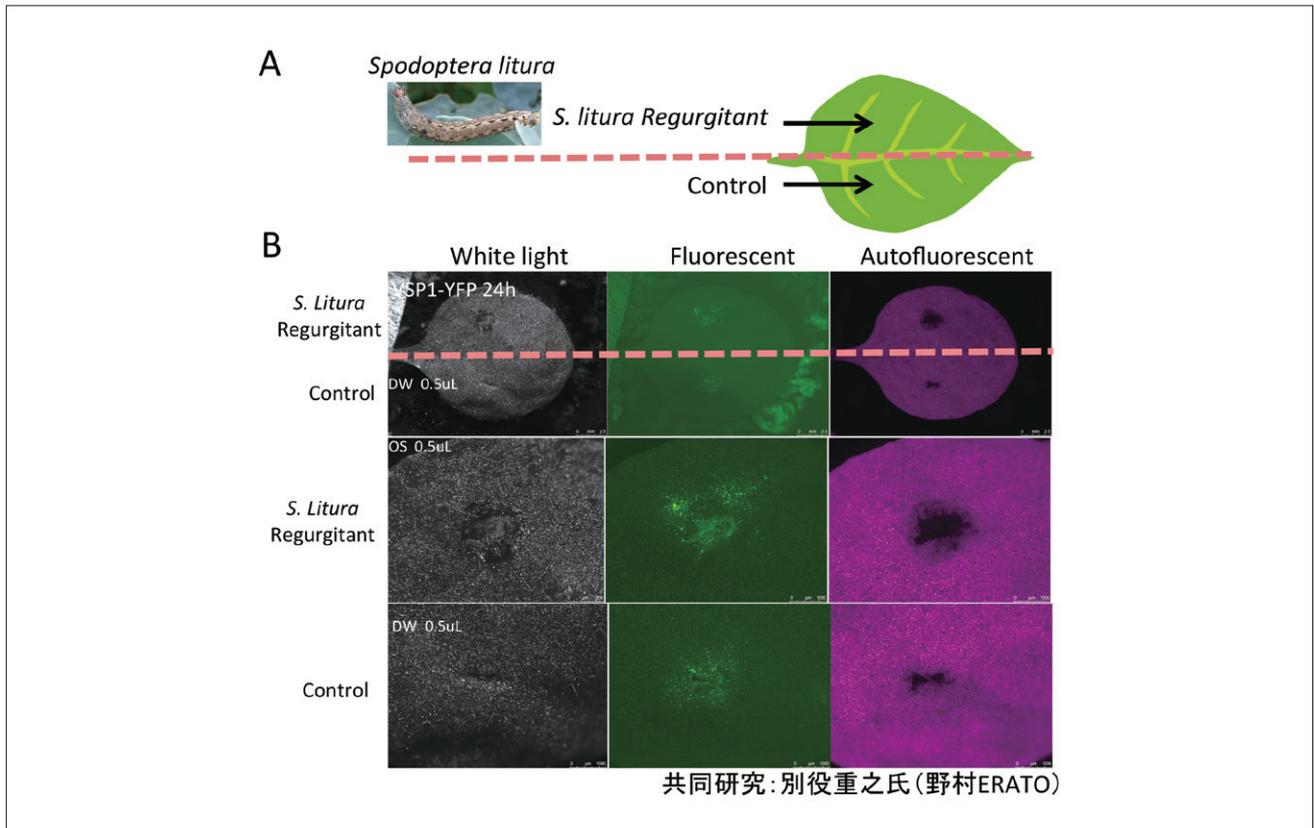


図4 ハスモンヨトウ吐き出し液に対するシロイヌナズナのジャスモン経路とサリチル酸経路の活性化
 A、ハスモンヨトウの吐き出し液を用いた生物ストレス実験系の模式図
 B、上) ジャスモン酸応答経路の活性化に応じて蛍光を発する形質転換植物を用いたハスモンヨトウ吐き出し液に対する応答
 中) 吐き出し液区画の拡大図
 下) 傷害ストレスのみの対照実験区の拡大

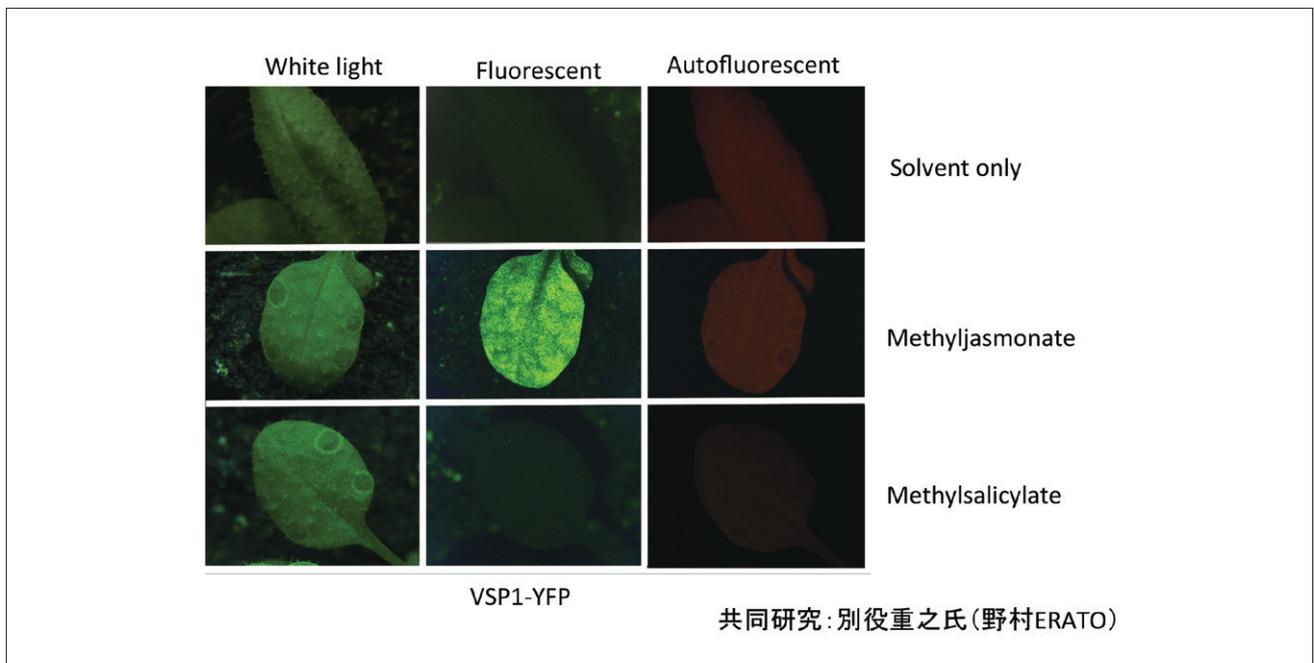


図5 モニター植物を用いた揮発性物質の感知
 ジャスモン酸に応じて蛍光 (Yellow Fluorescent Protein) を発する形質転換植物を用いた
 上) 溶媒のみの対象区、中) ジャスモン酸メチル、下) サリチル酸メチル
 左) 白色光、中) 蛍光シグナル、右) 自家蛍光

最後に、実際に食害を受けた植物から放散される揮発性物質に応答し、隣接する植物の免疫応答が活性化することを独自に開発したシステムで示すことができた。この系では、目視で確認するのが困難な微細な食害に反応することが分かった。このことから、早期な害虫被害を発見して予防型の農業を可能にする技術でもあることが分かった。早期に被害を検知することで省農薬を可能にする持続型農業に貢献するだけでなく、自動的に微細な害虫被害を検知することができるため、超高齢化している日本の農業現場にも対応できる技術である（特願 2017-205564; 国際特許出願; PCT/JP2018/180576）。

謝 辞

本研究を進めるにあたり、公益財団法人 浦上食品・食文化振興財団から多大な助成金を賜りました。厚く感謝を申し上げます。

参考文献

- Kinoshita, N., Arenas-Huertero, C., and Chua NH. "Visualizing nuclear-localized RNA using transient expression system in plants" *Genes Cells* 23, 105–111 (2018)
- Kinoshita N., and Betsuyaku, S. "The effects of Lepidopteran oral secretion on plant wounds: A case study on the interaction between *Spodoptera litura* and *Arabidopsis thaliana*" *Plant Biotechnology* 35, 237–242 (2018)
- Kinoshita, N., Sugita, A., Lustig, B., Betsuyaku S., Fujikawa T., Morishita T. "Automating measurements of fluorescent signals in freely moving plant leaf specimens" *Plant Biotechnology* 36, 7–11 (2019)
- 木下奈都子「画像処理装置、画像処理システム及び画像処理プログラム」特許出願 2017-205564 2017年10月 国際特許出願 PCT/JP2018/180576 2018年10月

Developing Novel Environmental and Biological Stress Tolerance Inducing Technology

Natsuko KINOSHITA

Faculty of Life and Environmental Sciences, University of Tsukuba

Brassicaceae, which is also known as the mustard family, is an important genus for food culture. In addition to mustard, this family contains white mustard and horseradish, as well as wasabi, which is one of the most important spices in Japanese food culture.

Despite a large loss of wasabi produce due to biological threats such as pathogens and insects, very few pesticides are currently available for use in protecting this valuable crop. In particular, wasabi plants are farmed using running water systems, and wasabi farming requires an abundance of cold water. However, due to global warming and a lack of fresh water resource, we predict a significant reduction in wasabi yields in the near future. Accordingly, to develop new molecular breeding technologies that enable more stable supplies of Brassicaceae spices and other vegetables (1) we investigated environmental stress responses mediated by a new category of transcript, long non-coding RNA (lncRNA). In addition, (2) we also expanded the development of our toolbox towards biological stress response using transgenic plants that express fluorescent signals in response to biological stress and volatile compounds emitted by crops under biological stress caused by pathogens and pest insects.

- (1) lncRNAs are transcriptome products with regulatory importance. Human lncRNA has been associated with diseases (Gupta, *et al.*, 2010; Hu, *et al.*, 2011; Zhu, *et al.*, 2011; Cabianca, *et al.*, 2012). However, it has been difficult to assess lncRNA function using phenotypes at the whole organism level in mammalian systems. Here, we explored whole plant level phenotypes and undertook a characterization of possible downstream mechanisms regarding a salt stress induced lncRNA (Kinoshita *et al.*, 2018).
- (2) Using transgenic plants that expose fluorescent signals in response to the activation of major phytohormone pathways, we clarified the local and systemic cellular responses with two-dimensional resolution. In addition, we also analyzed the specificity of the transgenic responses to volatile compounds that are emitted by damaged plants (Kinoshita and Betsuyaku, 2018; Kinoshita *et al.*, 2019). Finally, we were to demonstrate that the transgenic plants responded to nearby plants that were infested with insects. We were able to detect early stages of the infestation (Kinoshita, 2017; Kinoshita, 2018). The results indicate their potential to be employed as monitor plants for early detection and preventative agriculture, for Brassicaceae species and other economically important crops.

References

Kinoshita, N., Arenas-Huertero, C., and Chua NH. "Visualizing nuclear-localized RNA using transient expression system in plants" *Genes Cells* 23, 105–111 (2018)

Kinoshita N., and Betsuyaku, S. "The effects of Lepidopteran oral secretion on plant wounds: A case study on the interaction between *Spodoptera litura* and *Arabidopsis thaliana*" *Plant Biotechnology* 35, 237–242 (2018)

Kinoshita, N., Sugita, A., Lustig, B., Betsuyaku S., Fujikawa T., Morishita T. "Automating measurements of fluorescent signals in freely moving plant leaf specimens" *Plant Biotechnology* 36, 7–11 (2019)

Kinoshita, Natsuko 「画像処理装置、画像処理システム及び画像処理プログラム」特許出願 2017-205564 2017年10月 国際特許出願 PCT/JP2018/180576 2018年10月

Acknowledgement

This research was supported with generous funding by the Urakami Foundation for Food and Food Culture Promotion.