

氏名	さう、あどご、いるめあえりつく <b>SAVADOGO HYRMEYA ERIC</b>
学位(専攻分野)	博士(学術)
学位記番号	博甲第1010号
学位授与の日付	令和3年9月24日
学位授与の要件	学位規則第4条第1項該当
研究科・専攻	工芸科学研究科 バイオテクノロジー専攻
学位論文題目	<b>A comprehensive study of plant latex proteins for the identification of novel defence-related genes with potential application in crop improvement</b> (作物改良に応用可能な新規防御関連遺伝子同定のための植物乳液タンパク質の網羅的研究)
審査委員	(主査)准教授 北島 佐紀人 教授 鈴木 秀之 教授 半場 祐子

### 論文内容の要旨

本論文では、農業への応用を念頭に、植物の乳液が担う抗生物ストレス防御戦略の理解、並びに新規な抗生物ストレス防御遺伝子の探索とその作用機構の理解を目指した。

第1章では、植物の乳液と乳管細胞のこれまでの知見を紹介している。植物は、微生物、昆虫、動物の侵入と食害から身を守るために、毒性物質の生産から物理的な障壁まで、さまざまな防御機構を発達させてきた。乳液は粘り気のある白い液体で、多くの植物で乳管細胞と呼ばれる特殊な細胞によって生産される。植物の乳液には毒性のあるタンパク質や代謝物が多量に含まれており、昆虫あるいは動物が植物を傷つけると傷口から滲み出て、それを食するあるいは傷口から侵入を試みる微生物、昆虫、動物を攻撃すると思われる。しかし、基礎研究に用いられるモデル植物に乳管細胞が存在しないことも理由となり、乳液の組成はよくわかっていない。このような背景を踏まえ、本研究の目的は、乳液による防御戦略を理解し、そこに含まれる防御関連の機能を持つ新規タンパク質を発見し、最終的にその成果を害虫に対する作物の抵抗性の向上に利用することであると述べている。

第2章では、実験材料としてイチジク(*Ficus carica*)を選び、その未熟果実、葉柄、幹から採取した乳液を対象にトランスクリプトーム、プロテオーム、メタボロームの比較解析を実施して、器官間における防御戦略の相違を明らかにした。葉柄の乳液には抗昆虫性のトリプシンインヒビターが最も多く含まれており、未熟な果実や幹の乳液には同じく抗昆虫性のシステインプロテアゼが最も多く含まれていた。抗微生物性の病原体関連タンパク質グループ(pathogenesis-related proteins)は、他の器官に比べて幹の乳液に最も多く発現していた。防御関連の揮発性物質を生成すると思われるセスキテルペノイド経路と毒性のフラノクマリンを生成するフェニルプロパノイド経路の遺伝子、およびその他のいくつかの防御関連遺伝子は、未熟な果実の乳液では発現が少なかった。以上の結果に基づき、葉柄や果実が草食動物から植物を守る一方で、果実はおそらく受粉媒介性の昆虫との共存も図っていること、これら2つの器官に比べて幹では相対的に抗微生物防御を強化していると考えられると結論している。さらに、PLAT ドメインを有する機能未知

タンパク質が抗菌性キチナーゼと同等のレベルで乳液に蓄積されていることを見出し、このタンパク質が乳液の防御システムに関与する可能性を指摘している。

第3章では、イチジクのPLATタンパク質と、ミドリサンゴ(*Euphorbia tirucalli*)の乳液で高発現する相同タンパク質ATS3の抗昆虫機能を調べた。鱗翅目昆虫ハスモンヨトウ(*Spodoptera litura*)の幼虫は、イチジクPLATまたはミドリサンゴATS3遺伝子を一過的に発現させたベンサニアナタバコ(*Nicotiana benthamiana*)の葉を食べると成長が遅れた。これらの葉ではエチレンおよびジャスモン酸シグナルが活性化され、PR-1、 $\beta$ -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の発現が増加していたことから、宿主植物の内在的防御能力をPLATおよびATS3が向上させるという間接的機構が示唆された。一方で、ショウジョウバエ(*Drosophila melanogaster*)でPLATあるいはATS3遺伝子を異種発現させると、これらの昆虫ではアポトーシスを介した細胞死が引き起こされたことから、PLATおよびATS3の昆虫に対する直接的な細胞毒性が示唆された。また、双子葉植物シロイヌナズナ(*Arabidopsis thaliana*)、単子葉植物ミナトカモジグサ(*Brachypodium distachyon*)、針葉樹のシトカトウヒ(*Picea sitchensis*)、ゼニゴケ(*Marchantia polymorpha*)の9つの相同遺伝子を発現するハツカダイコンの子葉をハスモンヨトウの幼虫に食餌させたところ、成長阻害あるいは生存性低下が観察された。これらの結果に基づき、PLATタンパク質遺伝子ファミリーは植物界に広く保存された新規な抗昆虫防御遺伝子であると結論されている。

本研究の成果に基づいて、植物の乳液が作物の品種改良に応用可能な防御因子の供給源となる可能性が指摘された。

## 論文審査の結果の要旨

昆虫等の生物ストレスに対する植物の防御機構の理解は基礎生物学的観点だけでなく農業等の応用面からも重要な課題である。本論文では、以下にまとめられるように、植物の抗生物ストレス防御に特化した細胞である乳管細胞が作る乳液に着目し、そこに含まれる成分の網羅的比較解析に基づき乳管細胞が担う防御戦略を解明し、さらに、乳液に見いだされた機能未知タンパク質の抗昆虫機能に関する新規な基礎的知見を提供した。

1. イチジクの未熟果実、葉柄、幹より採取した乳液のトランスクリプトーム、プロテオーム、メタボロームを比較し、それぞれの器官が、想定される生物ストレスの種類に適応して互いに異なる防御成分を蓄積していることを見出した。すなわち、果実においては昆虫に対する防御と同時におそらく受粉のための昆虫との共存を図っていること、葉柄においては昆虫に対する防御機構を強く構築していること、幹においては相対的に微生物に対する防御機構を強く構築していることが示された。さらに、乳液に機能未知のPLATタンパク質が多く含まれることを見出した。
2. 植物を宿主とする新開発の一過的遺伝子発現系を用いて、上記PLATタンパク質、さらにはコケと高等植物の多くの相同タンパク質が、抗昆虫機能を有することを示した。その作用機構として、植物の内在的防御機構を活性化する間接的作用と、これらのタンパク質自身が抗昆虫

毒性を有する直接的作用の 2 つを提案した。

以上のように、申請者の研究は、乳液による植物の抗生物ストレス防御戦略の理解と新規な抗昆虫タンパク質の発見を含む、作物改良に応用可能な学術的基礎研究であると評価した。

これらの研究は、申請者が筆頭著者である 1 篇を含む、査読制度の確立した国際科学雑誌に掲載された下記の 2 篇の論文を基礎としている。

1. 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. 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>
2. Kitajima, S., Aoki, W., Shibata, D., Nakajima, D., Sakurai, N., Yazaki, K., Munakata, R., Taira, T., Kobayashi, M., Aburaya, S., Savadogo, E.H., Hibino, S., Yano, S. Comparative multi-omics analysis reveals diverse latex-based defense strategies against pests among latex-producing organs of the fig tree (*Ficus carica*). *Planta* 247, 1423–1438 (2018). <https://doi.org/10.1007/s00425-018-2880-3>