



# ズッキーニ由来Major latex-like proteinの生物機能の解明

藤田, 健太郎

---

(Degree)

博士 (農学)

(Date of Degree)

2022-09-25

(Date of Publication)

2023-09-01

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲第8471号

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/0100477897>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



博士学位論文

ズッキーニ由来Major latex-like proteinの生物機能の解明

藤田健太郎

2022年7月7日

## 目次

### 第I章 総合緒論

### 第II章 MLP遺伝子の発現制御による汚染低減化

II-1. 概要

II-2. 緒論

II-3. 材料と方法

II-4. 結果

II-5. 考察

### 第III章 MLPの結合制御による汚染低減化

III-1. 概要

III-2. 緒論

III-3. 材料と方法

III-4. 結果

III-5. 考察

### 第IV章 MLPによる病害抵抗性の亢進

IV-1. 概要

IV-2. 緒論

IV-3. 材料と方法

IV-4. 結果

IV-5. 考察

## **第V章 MLP遺伝子の発現制御機構の解明**

V-1. 概要

V-2. 緒論

V-3. 材料と方法

V-4. 結果

V-5. 考察

## **第VI章 ズッキーニゲノムにおけるMLP遺伝子の同定**

VI-1. 概要

VI-2. 緒論

VI-3. 材料と方法

VI-4. 結果

VI-5. 考察

## **第VII章 総合考察**

出版論文

謝辞

参考文献

## 第1章

### 総合緒論

本章は以下の出版物を参照にされたい。

**Fujita K.**, Inui H. (2021)

Review: Biological functions of major latex-like proteins in plants

*Plant Science* 306, 118506.

**Fujita K.**, Inui H. (2021)

How does the Cucurbitaceae family tale up organic pollutants (POPs, PAHs, and PPCPs)?

*Reviews in Environmental Science and Bio/Technology* 20(3), 751-779

## **I-1. ウリ科作物の有機汚染物質蓄積における分子基盤**

有機汚染物質は世界中に広く存在し、環境を汚染しており (Wania and MacKay, 1996; Shen et al., 2013)、半減期が長いこと、分解されにくく、環境中に残留する (Mattina et al., 1999; Sarma et al., 2019)。有機汚染物質による汚染は農環境も例外ではなく、これによる作物の汚染は深刻な問題となっている。残留基準値を超える作物が検出された場合、農家は同じ農地で栽培されている全ての作物を廃棄する必要がある。そのため、農家が被る経済的損失は甚大である。また、有機汚染物質は発がん性 (Abdur Rehman et al., 2017) や神経毒性 (Pessah et al., 2019; Shi et al., 2019) などの人体への毒性を示し、汚染された作物の摂取は深刻な疾病を引き起こす。このような理由から、作物の有機汚染物質による汚染は、近年の作物生産において喫緊の課題となっている。作物汚染に關与する有機汚染物質のうち、疎水性が高いものとして残留性有機汚染物質 (POPs)、多環芳香族炭化水素 (PAH)が挙げられる。

POPsには、有機塩素系殺虫剤 (クロルデン、ジクロロジフェニルトリクロロエタン [DDT]、ドリリン [アルドリリン、エンドリン、ディルドリン]、ヘキサクロルシクロヘキサン [HCH])、工業製品 (ポリ塩化ビフェニル [PCB])、非意図的生成物 (ポリ塩化ジベンゾ-*p*-ダイオキシン [PCDD]、ポリ塩化ジベンゾフラン [PCDF]) などがある。2020年までに、181ヶ国でPOPsの使用並びに生産が禁止されている。特に農環境では、有機塩素系殺虫剤が、使用禁止になるまで農地に大量に散布された (Namiki et al., 2018)。

PAHはPOPsと異なり、非意図的に発生し、農地に放出されてきた。PAHは、農地での植物の成長を促進するために焼却された藁の不完全燃焼やバイオチャー処理によって生成される (Jenkins et al., 1996; Fabbri et al., 2013)。PAHもPOPs同様に分解されにくいため、農地におけるPAH量は増加の一途をたどっている。

地上部 (果実、葉、茎) を食用とする作物の多くでは、地上部に疎水性有機汚染物質が蓄積されることは、ほとんどない。しかし、キュウリ、メロン、カボチャ、ズッキーニなどのウ

リ科作物の地上部には高濃度の疎水性有機汚染物質が検出される (Otani et al., 2007)。

作物における疎水性有機汚染物質の取り込み機構は (1) 可溶化、(2) 吸収、(3) 移行、(4) 輸送の4段階から成る。

- (1) 土壤中の疎水性有機汚染物質は土壤有機物に結合し、その生物学的利用能は低い。しかし、根滲出液に含まれる有機酸は、土壤有機物と疎水性有機汚染物質の結合を破壊し、疎水性有機汚染物質を可溶化させる。
- (2) 可溶化された疎水性有機汚染物質は根に吸収され、根組織に取り込まれた後、その物理化学的性質に従って根組織内に局在する。
- (3) 疎水性有機汚染物質は根 (特にカスパリー線の内側) から導管に移行する。
- (4) 導管に移行した疎水性有機汚染物質は、水の凝集力による導管液の流れにより、地上部に輸送される (Pockman et al., 1995; Chunfang et al., 1999)。

#### (1) 可溶化

有機汚染物質は根圏で可溶化され、植物にとっての生物学的利用能が向上する。土耕栽培されたズッキーニでは、地上部におけるダイオキシンの蓄積は、水耕栽培よりもはるかに低い (Inui et al., 2008; Inui et al., 2011)。これは、土壤成分からダイオキシンを放出するには、根からの滲出物による可溶化が必要であることを示唆している。根は糖、有機酸、アミノ酸、二次代謝産物、炭水化物、タンパク質を滲出し、栄養分の取り込みや根間の情報伝達を行う (Walker et al., 2003; Preece and Peñuelas, 2020; Wang et al., 2020)。特に、有機酸は金属イオンの取り込みに寄与している (Dakora and Phillips, 2002; Chen et al., 2017)。根圏に放出された有機酸は土壤中のカチオンと結合し、キレート作用により、金属イオンを溶解して養分とするため、金属イオンの生物学的利用能が向上する。従って、金属イオンの取り込みに有機酸は深く関与する (Yang et al., 2001; White and Kottler, 2002; White et al., 2003; Luo et al., 2006; White et al., 2006)。しかし、有機酸は根圏に副次的な影響も与える。有機酸は腐植有機化合物-金属

イオン-ミネラル間の結合を破壊するので (Yang et al., 2001; White and Kottler, 2002; White et al., 2003; Luo et al., 2006; White et al., 2006)、有機汚染物質が脱離し、可溶化されて根に取り込まれる。

根圏での有機汚染物質の生物学的利用能を促進する有機酸として、クエン酸やシュウ酸が候補に挙げられた。これらの酸はPAH (Subramaniam et al., 2004; Yoshihara et al., 2014)、*p, p'*-DDE (White et al., 2003)、*p, p'*-DDT (Luo et al., 2006) を土壤有機物から脱離させて可溶化する。しかし、シュウ酸はキュウリとズッキーニの根圏では検出されないため、クエン酸がウリ科作物の根滲出液中の有機汚染物質の生物学的利用能を促進する有機酸として考えられる (Wang et al., 2004)。クエン酸はウリ科作物の地上部におけるペリレン (Yoshihara et al., 2014)、PCB (White et al., 2006)、*p, p'*-DDE (White et al., 2003) の蓄積を促進する。また、キュウリの根圏におけるクエン酸の量はズッキーニのよりも多く、キュウリの*p, p'*-DDEの根への吸収効率はズッキーニよりも高いことと一致する (Wang et al., 2004)。これは、クエン酸の量が有機汚染物質の根への取り込み量と相関することを明確に示している。しかし、ズッキーニの地上部における*p, p'*-DDEの蓄積はキュウリよりも遥かに高いので、クエン酸は地上部への有機汚染物質の取り込みには、決定的な役割を果たすことはないと考えられる (Wang et al., 2004)。また、クエン酸は非ウリ科作物における*p, p'*-DDEの根への取り込みも促進する (White and Kottler, 2002)。ズッキーニの根の滲出液は雑草 (*Bidens cernua*, *Chenopodium album*, wild carrot, broad-leaved plantain, curly dock) におけるPCBの根への吸収効率を増大させる (Ficko et al., 2011)。従って、クエン酸は有機汚染物質の生物学的利用能と根からの吸収を促進するが、ウリ科作物が有機汚染物質を地上部に蓄積する主因にはならない。

## (2) 吸収

有機汚染物質は、根の周辺から維管束に輸送される。図I-1は典型的な双子葉植物の根の構造であり、外表面は根毛細胞を持つ表皮で覆われている。外側から、根は主に表皮、皮層、



内皮、内鞘、維管束 (導管と篩管) に分かれる (Banda et al., 2019)。化合物は、アポプラスト経路、シンプラスト経路、トランスメンブレン経路のいずれかで維管束にまで到達する (Ramakrishna and Barberon, 2019)。アポプラスト経路では、化合物は細胞壁や細胞間の細胞外空間を通過する受動拡散によって輸送されるが、リグニンによって形成されたカスパリー線によってその輸送が阻害される (Roppolo et al., 2011)。カスパリー線の細胞膜は細胞間壁に付着しているため、内皮では化合物の拡散バリアとして機能する (Ma and Peterson, 2001)。シンプラスト経路では内皮から内鞘にかけて隣接する細胞間の原形質連絡を介して、細胞から細胞へ化合物が輸送される (Ma and Peterson, 2001)。これは、細胞膜を介した極性流入・流出又は拡散勾配に依存し、その輸送はスベリンラメラによって阻害される (Barberon et al., 2016; Doblus et al., 2017)。

疎水性有機汚染物質のような非イオン性化合物は、細胞膜を介して受動的に維管束に輸送される (Collins et al., 2006)。蛍光を有し、疎水性を示すPAHであるペリレンは、細胞膜で受動的に拡散し、原形質連絡により、根中心部へ輸送される (Yamazaki et al., 2015)。ペリレンの輸送はカスパリー線によって阻害されず、内皮と内鞘の細胞膜に局在している。このように、ペリレンは細胞膜を経由してシンプラスト経路で輸送される。また、ズッキーニ *ovifera* 亜種 (POPs低蓄積性) とズッキーニ *pepo* 亜種 (POPs高蓄積性) では、有機汚染物質の根組織への吸収に違いはない (Yamazaki et al., 2015)。従って、ウリ科作物における有機汚染物質の取り込みには、吸収が影響しない。

### (3) 移行

ウリ科作物における有機汚染物質の取り込みには、導管への有機汚染物質の移行が重要な要因となる。ペリレンはズッキーニ *ovifera* 亜種とズッキーニ *pepo* 亜種ともに、内皮と内鞘に局在しているため、ウリ科作物における有機汚染物質の吸収には、特異な移行メカニズムが存在すると考えられる (Yamazaki et al., 2015)。クロルデン及びヘプタクロルエキソエポキシ

ド (HEPX) は、キュウリ及びズッキーニにおいて、根から導管を介して地上部に輸送される (Mattina et al., 2004)。導管液は根からの水分で構成されており、疎水性有機汚染物質を可溶化することは困難である。タンパク質不活性化処理により、導管液の疎水性有機汚染物質の可溶化活性は低下したため、ウリ科の導管液には有機汚染物質を可溶化する活性を示すタンパク質が含まれていると考えられた (Murano et al., 2010; Inui et al., 2013)。

ズッキーニ9品種の導管液に含まれる17 kDaのタンパク質は、PAHの一つであるピレンの可溶化活性を示した。また、PCBの地上部における蓄積のしやすさと17 kDaのタンパク質量には、有意な正の相関があった。この17 kDaのタンパク質は、major latex-like protein (MLP) と同定された (Inui et al., 2013)。MLPは、1985年にケシから初めて同定され (Nessler et al., 1985)、ウリ科作物としてキュウリ (Iwabuchi et al., 2020)、西洋カボチャ (Iwabuchi et al., 2020)、日本カボチャ (Iwabuchi et al., 2020)、ヘチマ (Iwabuchi et al., 2020)、メロン (Aggelis et al., 1997)、ズッキーニ (Inui et al., 2013)、非ウリ科作物としてシロイヌナズナ (Lytle et al., 2009)、ワタ (Chen and Dai, 2010)、チョウセンニンジン (Choi et al., 2015)、ブドウ (Zhang et al., 2018)、モモ (Ruperti et al., 2002)、ダイズ (Strömvik et al., 1999) から同定されている。MLPは、病害抵抗性 (Yang et al., 2015; Gai et al., 2018; Song et al., 2020; Fujita et al., 2022)、塩ストレス耐性 (Wang et al., 2016)、葉の形成 (Litholdo et al., 2016)、酵素活性 (Lichman et al., 2020)、植物ホルモン応答 (Ruperti et al., 2002; Sun et al., 2010; Li et al., 2013; Zhang et al., 2018) など様々な生理機能を示す。MLPの最も顕著な構造的特徴は、タンパク質内部の疎水性キャビティである。これによって疎水性化合物と結合することができる (Lytle et al., 2009; Fernandes et al., 2013)。例えば、ズッキーニ由来の組換えMLPは、17 $\beta$ -エストラジオール (Goto et al., 2019)、4-hydroxy-2',3,3',4',5'-pentachlorobiphenyl (4OH-PeCB106) (Inui et al., 2013)、4-*t*-オクチルフェノール (Goto et al., 2019)、ディルドリン (Goto et al., 2019; Fujita et al., 2020b)、ピレン (Fujita et al., 2020b) などの疎水性有機汚染物質と結合する。従って、有機汚染物質はMLPとの結合により、導管液中で可溶化される。MLP遺伝子は主に根で発現していることから (Goto et al.,

2019)、MLPは内皮や内鞘の細胞膜で有機汚染物質と結合し、MLP-有機汚染物質複合体は導管に移行する (図I-2)。

#### (4) 輸送

導管に移行した有機汚染物質は、水の凝集力による導管液の流れによって地上部に輸送される (Pockman et al., 1995; Chunfang et al., 1999)。篩管もその経路となりうるが、導管液と篩管液はそれぞれ酸性と塩基性であり、MLPは酸性条件下で有機汚染物質と結合するため、導管がより重要な輸送経路である (Inui et al., 2013; Goto et al., 2019; Fujita et al., 2020b; Iwabuchi et al., 2020) (図I-3)。

また、ウリ科作物では、有機汚染物質の蓄積能に差異が存在する。ズッキーニの地上部のディルドリンとエンドリンの濃度は、ヘチマに比べて2倍以上高い (Otani et al., 2007)。この違いは、MLPとの結合親和性により、説明が可能である。ヘチマ由来のMLPはPeCB106に結合しないが、ズッキーニ由来のMLPは結合する (Inui et al., 2013; Iwabuchi et al., 2020)。これは、ヘチマ由来のMLPのキャビティが疎水性が低く、疎水性有機汚染物質に対するMLPの結合親和性が相対的に低いことを示唆する。その結果、ヘチマにおける有機汚染物質の蓄積量は少ないと考えられる。

これまでの研究により、ウリ科作物間の交配が有機汚染物質の蓄積量に影響することが示されている (White, 2010; Isleyen et al., 2013; Sugiyama et al., 2013; Sugiyama et al., 2016)。ズッキーニ *pepo* 亜種とズッキーニ *ovifera* 亜種を交配したF1雑種では、親である *pepo* 亜種に比べて、地上部における有機汚染物質濃度は低かった。また、F1戻し交雑体の濃度は、親とF1植物の中間に位置していた (White, 2010; Isleyen et al., 2013; Sugiyama et al., 2013; Sugiyama et al., 2016)。これらの結果は、単一遺伝子あるいは単一遺伝子座が、メンデル分離に従って有機汚染物質の取り込みを制御することを示唆している。すなわち、遺伝子の発現量が蓄積能の差異を生むと考えられる。一方、近年では、蓄積能の遺伝に関して、2つ又は3つの異なる優

性遺伝子に関わるモデルが提案されている (Sugiyama et al., 2016)。その候補遺伝子は、*MLP* 遺伝子の他に *ZFP* (*zinc finger protein*) 遺伝子が挙げられる。*ZFP*は*MLP*と同様に、ウリ科作物の有機汚染物質の蓄積に関与する (Inui et al., 2015)。*ZFP*は、ジンクフィンガーモチーフがDNAに結合することにより、転写因子として機能する。ズッキーニ *pepo* 亜種の *ZFP* 遺伝子の発現量はズッキーニ *ovifera* 亜種よりも高く、*ZFP* 遺伝子の発現は形質転換タバコの地上部における 3,3',4,4',5-pentachlorobiphenyl (PeCB126) の蓄積を促進することが明らかになった。これらの結果は、*ZFP*が*MLP*遺伝子のプロモーター領域に結合し、*MLP*遺伝子の発現を誘導することを示唆する。しかし、タバコでは、これまでFB7-4という単一の*MLP*遺伝子しか同定されていない (Neale et al., 1990)。従って、*ZFP*は、*MLP*遺伝子以外の有機汚染物質の蓄積に関わる遺伝子を誘導していると考えられる。

## **I-2. MLPの生理的性質**

MLPのホモログは、MLP、Bet v 1、PRファミリーの一つであるpathogenesis-related proteins class 10 (PR-10) の3群に分けられる (Fernandes et al., 2013)。Bet v 1は1983年にカバノキ花粉のアレルゲンとして初めて同定された (Ipsen and Löwenstein, 1983)。PR-10は1986年にパセリ培養細胞で*Phytophthora megasperma*を接種した際に誘導される遺伝子として初めて同定された (Somssich et al., 1986)。PR-10には、サイトカイニン特異的結合タンパク質 (CSBP) (Fujimoto et al., 1998) やアレルゲンとしてセロリ Api g 1 (Breiteneder et al., 1995)、ピーナッツ Ara h 8 (Mittag et al., 2004) などが含まれる。そのため、Bet v 1、PR-10に関する知見は、主にアレルゲンの観点から、すなわち医学的見地から発展してきた。PR-10の中には、Bet v 1 特異的IgEと交差反応を起こし、口腔アレルギー症候群などの原因となるアレルゲン性を示すものがある (Geroldinger-Simic et al., 2011)。そのため、Bet v 1とPR-10を用いた多くの医学的研究が行われてきた。例えば、X線結晶解析により立体構造を明らかにし、交差反応性エピトープ領域が同定された (Gajhede et al., 1996)。

MLPの理解は、アレルゲンであるMLPがキウイアレルゲンAct d 11しか同定されていないこともあり、遅々として進んでいない (D'Avino et al., 2011)。しかし、近年の研究により、MLPの広範な生理機能が明らかにされつつある。

MLPの特徴として、生物的・非生物的ストレスに対する応答が挙げられる。MLP遺伝子の発現が植物ホルモン (アブシジン酸 [ABA]、エチレン [ET]、ジャスモン酸 [JA]、サリチル酸 [SA]) によって制御されることはよく知られている (Yang et al., 2015; Wang et al., 2016; Gai et al., 2018; Zhang et al., 2018; Song et al., 2020)。MLP遺伝子のプロモーター領域には、ストレス応答に関与するシスエレメントが含まれている (Chen and Dai, 2010; Song et al., 2020; Yuan et al., 2020)。MLP遺伝子の発現はストレス因子によって制御されストレス耐性に結び付くと示された (Chen and Dai, 2010; Yang et al., 2015)。また、MLPはPR-10とは異なる病害抵抗性をもたらすと考えられている。PR-10遺伝子は病原菌の感染により誘導され、植物ホルモンの

シグナル伝達経路が活性化される (Deng et al., 2011)。PR-10は、グリシンリッチループが病原菌のRNAと結合することにより、RNase活性を示す (Xie et al., 2010)。その結果、PR-10は直接的な抗菌活性を示す。しかし、MLPはグリシンリッチループを持つが、MLPのRNase活性に関する報告はない (Choi et al., 2015; Fujita et al., 2022)。MLPは、PR遺伝子の誘導 (Yang et al., 2015; Gai et al., 2018; Fujita et al., 2022) や全身性獲得抵抗性 (SAR) (Li et al., 2013; Carella et al., 2016) に関与する。特に、MLP遺伝子では、病原菌の感染によって篩管液中で誘導され、病原菌を接種した葉から離れた葉において、抵抗性が亢進する (Li et al., 2013; Carella et al., 2016)。これは、長距離輸送されたMLPによるSARの誘導を示唆する。従って、MLPは間接的な抗菌活性を示すことになる。

MLPのホモログであるBet v 1の構造は、1996年に初めてX線結晶構造解析によって決定された (Gajhede et al., 1996)。その後、PR-10 (Biesiadka et al., 2002) 及びMLP (Lytle et al., 2009; Choi et al., 2015) の構造が決定された。アミノ酸配列の同一性は低いものの、これらの構造は、非常に高い類似性を示す。二次構造として、MLPのホモログは、3つの $\alpha$ ヘリックス (短い $\alpha 1$ 、 $\alpha 2$ と長く柔軟な $\alpha 3$ )、7つの $\beta$ シート ( $\beta 1$ - $\beta 7$ )、9つのループ (L1-L9) を持つ。MLPホモログの最も顕著な構造的特徴は、内部のY字型の疎水性キャビティであり (Gajhede et al., 1996; Fernandes et al., 2008)、これは $\beta 1$ - $\beta 7$ が長い $\alpha 3$ の周りに巻きついて作られたものである。この折りたたみは、L1-L9、 $\alpha 1$ 、 $\alpha 2$ によって完成し、 $\alpha 3$ のV字型の支持体を形成する (Śliwiak et al., 2016)。チョウセンニンジン由来のMLP151のキャビティは、 $\alpha 1$  (Phe24)、 $\beta 2$  (Ile39)、 $\beta 3$  (Trp58、Tyr60)、 $\beta 4$  (Ala69、Glu71)、 $\beta 5$  (Phe85)、L7 (Leu92)、 $\beta 6$  (Phe101)、 $\beta 7$  (Trp116)、 $\alpha 3$  (Tyr133、Phe136、Leu137、Val140) により形成されており、。キャビティ内のアミノ酸はMLPのホモログでよく保存されている (Choi et al., 2015)。キャビティは閉じておらず、いくつかの入口を持つ (Seutter von Loetzen et al., 2012)。Bet v 1のキャビティには3つの入り口があり、グリシンリッチループに隣接する1つの入口と、長い $\alpha 3$ の両側にある2つの入口である (Mattila and Renkonen, 2009)。黄花ルピナス (*Lupinus luteus*) 由来のLIPR10. 2Bの最大の入り

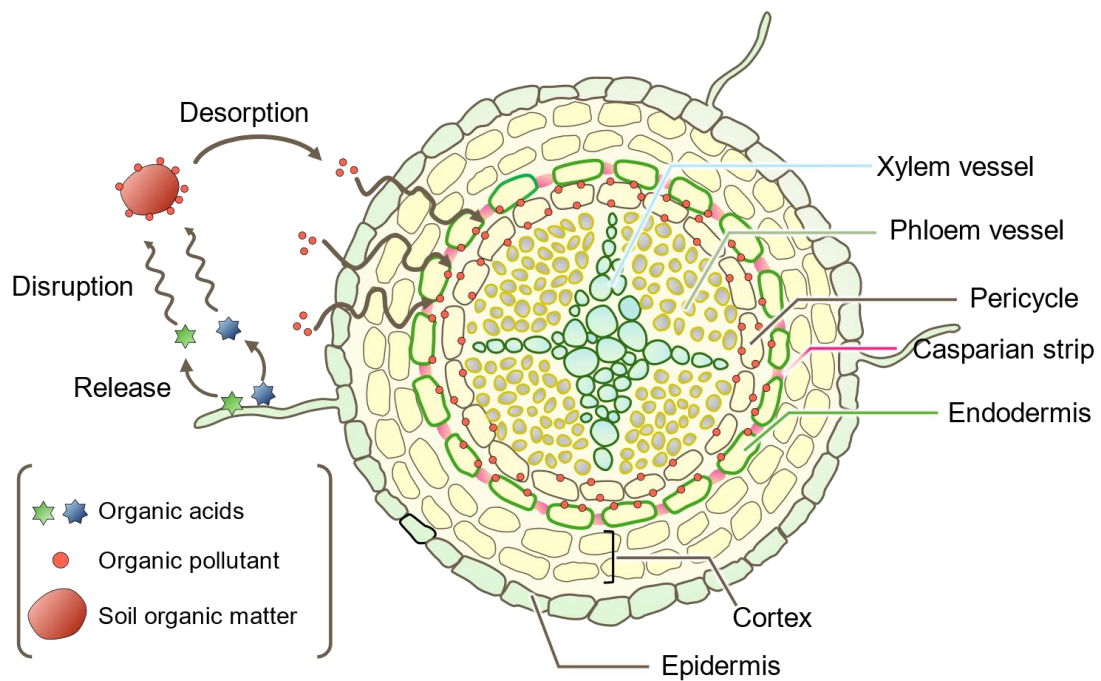
口は、グリシンに富むループに部分的に形成され、 $\alpha 3$ 、L3、L5、L7の間に位置しており、Arg38とGlu59間の塩橋によって繋がれている (Fernandes et al., 2008)。LIPR10. 2Bの別の入口は、 $\beta 5$ 、L7、 $\beta 6$ の間に位置している。この開口部は、逆平行 $\beta$ シート構造が崩れることで拡大する (Fernandes et al., 2008)。キャビティの容積はMLPのホモログ間でかなり異なるが、これは長い $\alpha 3$ が $\beta$ シートコアに向かった傾きと、長いループが存在するためである (Pasternak et al., 2005; Fernandes et al., 2008; Lytle et al., 2009)。例えば、GLP (316 Å<sup>3</sup>) (Choi et al., 2015) とAct d 11 (399 Å<sup>3</sup>) (Choi et al., 2015) のキャビティ容積は、Bet v 1 (1500 Å<sup>3</sup>) (Gajhede et al., 1996)、LIPR10. 1A (3500 Å<sup>3</sup>) (Pasternak et al., 2005)、MLP28 (2193 Å<sup>3</sup>) (Choi et al., 2015) よりかなり小さなものであった。LIPR10. Bのキャビティの容積は、100-200 Daの化合物を保持するのに十分な大きさである (Biesiadka et al., 2002)。MLPホモログにおけるリガンド結合部位は、グリシンリッチループとキャビティの入口の $\alpha 1$ - $\alpha 2$ 接合部の間に同定された (Biesiadka et al., 2002)。

第二の構造的特徴は、 $\beta 2$ と $\beta 3$ を結ぶグリシンリッチループL4である (Fernandes et al., 2013)。MLPホモログのモチーフの配列は非常に多様であるが、グリシンリッチループは高度に保存されており、立体構造はほとんど同一である (Biesiadka et al., 2002; Pasternak et al., 2005)。グリシンリッチループはリン酸結合ループあるいはP-ループとも呼ばれる (Saraste et al., 1990)。しかし、*B. verrucosa*のPR-10cはATPを結合しないので、MLPホモログのグリシンリッチループはすべて典型的なP-ループと見なすことはできない (Koistinen et al., 2005)。グリシンはタンパク質の構造を柔軟にする傾向があるが、グリシンに富んだループは高い剛性を示している。その理由の一つは、グリシンリッチループの水素結合である (Biesiadka et al., 2002; Pasternak et al., 2005)。LIPR10. 2Aの水素結合は、Thr51 O、Gly47 N、Gly48 O、Gly48 Nの原子間で形成されている (Pasternak et al., 2005)。

第三の構造的特徴は、ヒトでも確認されているSteroidogenic acute regulatory protein-related lipid-transfer (START) ドメインである (Mogensen et al., 2002)。哺乳類や線虫もsteroidogenic

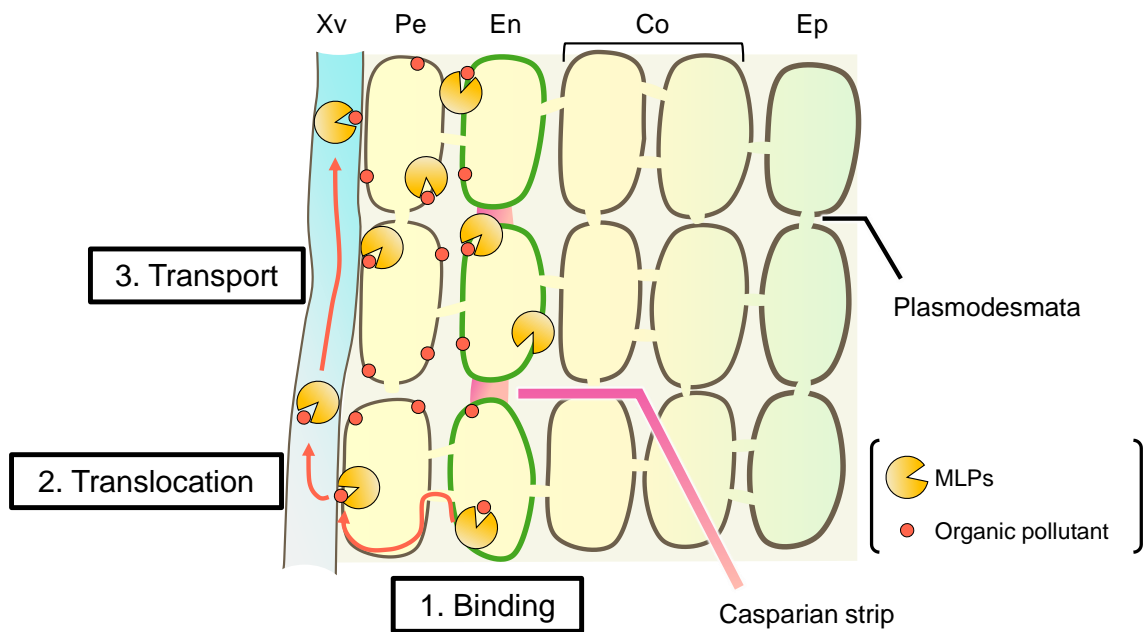
acute regulatory protein (StAR) を持つことが知られている (Watari et al., 1997)。StARとそのホモログであるmetastatic lymph node 64はSTARTドメインを介してコレステロールと結合するので、MLPホモログも植物ステロイドを結合できることが示唆される (Tsujishita and Hurley, 2000)。このドメインは植物、無脊椎動物、脊椎動物に保存されていることから、生命の維持に重要な役割を担うことが示唆される。STARTドメインは、PYR/pyrabactin resistance-like (PYL)/regulatory component of ABA receptors (RCAR) ファミリーの一員であるABA受容体でも発見されている (Park et al., 2009)。また、PYR/PYL/RCARファミリーの一員であるシロイヌナズナ由来のRCAR1は、Bet v 1aとの構造的類似性を有している (Ma et al., 2009)。これらのことから、MLPのホモログはABAと結合し、ABAシグナル伝達経路に関与していることが示唆される。





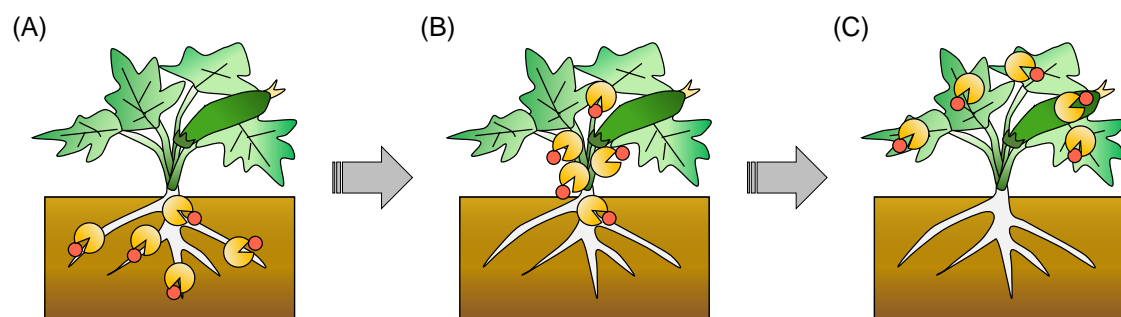
**図I-1. 根細胞における有機汚染物質の吸収**

有機汚染物質は、根圏で土壌有機物と結合する。有機酸は根滲出液として放出され、土壌有機物と有機汚染物質の結合を破壊する。脱離した有機汚染物質は可溶化し、生物学的利用能が向上する。根に吸収された有機汚染物質は、根細胞の細胞膜を介して拡散され、原形質連絡により、内皮や内鞘に輸送される。根の断面図については過去の報告を参照した (Miller et al., 2016)。



**図I-2. MLPとの結合による有機汚染物質の導管への移行**

根細胞で合成されたMLPは、内皮と内鞘の細胞膜で有機汚染物質と結合する。MLP-有機汚染物質複合体は、導管に移行し、地上部に輸送される。その結果、ウリ科作物では有機汚染物質が蓄積する。Xv, 導管; Pe, 内鞘; En, 内皮; Co, 皮層; Ep, 表皮。



**図I-3. ウリ科作物における有機汚染物質の輸送**

MLPは根で有機汚染物質と結合し (A)、導管へと移行した後 (B)、有機汚染物質は地上部に輸送される (C)。

## 第II章

### **MLP遺伝子の発現制御による汚染低減化**

本章は以下の出版物を参照されたい。

**Fujita K.**, Haga Y, Yoshihara R, Matsumura C, Inui H. (2020)

Suppression of the genes responsible for transporting hydrophobic pollutants leads to the production of safer crops

*Science of the Total Environment* 741, 140439.

## II-1. 概要

疎水性有機汚染物質は、世界中に広く存在している。農業の観点においては、土壌から作物への疎水性有機汚染物質の移行や蓄積は、食の安全を脅かし、ヒトに対する多くの疾病に繋がる。ウリ科作物は、地上部に高濃度の疎水性有機汚染物質を蓄積する。ウリ科作物には、疎水性有機汚染物質の輸送因子としてMLPが存在する。MLP遺伝子は根で発現し、MLPは疎水性有機汚染物質と結合し、導管を介して地上部に輸送する。本研究では、農薬散布により根におけるMLP遺伝子の発現を抑制し、MLP量を減少させ、疎水性有機汚染物質の蓄積の抑制を試みた。まず、疎水性有機汚染物質ペリレンのズッキーニ導管液中の濃度を低下させる農薬として、殺菌剤ベンレートと殺菌剤ダコニールを選抜した。特に、殺菌剤ダコニールは、根におけるMLP遺伝子の転写活性を抑制した。殺菌剤ダコニールの散布により、ズッキーニの根及び導管液中のMLP量が減少し、導管液中の疎水性有機汚染物質ピレン及びディルドリン濃度が有意に減少した。本研究は、より安全な農作物の生産に貢献に資するものである。

## II-2. 結論

POPsやPAHなどは、工業製品や農薬として意図的に使用され、非意図的に排出された。その毒性が明らかにされて以降、その使用や生産が世界的に禁止された。しかし、有機汚染物質による汚染は、未だに世界中で確認されている (Bartrons et al., 2016)。疎水性の有機汚染物質は生物濃縮能が高いため、ヒトなどの食物連鎖の最上位に位置する生物は、高濃度に蓄積する。農地の土壌は、バイオチャー散布 (Fabbri et al., 2013)、藁の不完全燃焼 (Jenkins et al., 1996) やディルドリン、DTT、 $\beta$ -HCHなどのPOPsに分類される殺虫剤の散布 (Namiki et al., 2013) によって有機汚染物質で汚染されている。有機汚染物質の人体への蓄積は、呼吸器症候群 (Bortey-Sam et al., 2017)、消化管がん (Abdur Rehman et al., 2017)、アルツハイマー病 (Yan et al., 2016) など多くの疾病をもたらす。従って、食物連鎖の生産者である作物の有機汚染物質の取り込みの抑制は、ヒトにおける有機汚染物質の蓄積量を減少させるうえで重要である。

キュウリ、カボチャ、ズッキーニ等のウリ科作物は、果実に高濃度の有機汚染物質を蓄積する (Parrish et al., 2006; Otani et al., 2007)。例えば、ウリ科作物は、高濃度のドリリン (ディルドリン、エンドリン) (Otani et al., 2007)、PCB (Inui et al., 2008)、DDE (Lunney et al., 2004)、クロルデン (Mattina et al., 2004)、ピレン (Parrish et al., 2006) などを蓄積する。有機汚染物質の作物への蓄積の抑制に向けて、土壌浄化による汚染低減を目指した様々なアプローチが試みられてきた。それには、POPsの活性炭への吸着 (Murano et al., 2009)、POPs分解微生物のスクリーニング (Yamazaki et al., 2014) が挙げられる。しかし、そのPOPs除去効率は、期待されたものよりも低く、実用的ではなかった。

ウリ科作物では、POPsの蓄積にMLPが重要な役割を果たすことが報告されている (Inui et al., 2013)。MLPはBet v 1ファミリーに属し (Fernandes et al., 2013)、病害抵抗性 (Yang et al., 2015) や内部の疎水性キャビティを介した疎水性化合物のトランスポーター (Fujita and Inui, 2021) として機能する。MLP遺伝子はウリ科作物の根に高発現し、MLPは根と導管液に検出される

(Goto et al., 2019)。MLPは、内部の疎水性キャビティを介して根細胞内で有機汚染物質と結合する (Goto et al., 2019)。その結果、MLP-有機汚染物質複合体は導管に移行し、有機汚染物質は地上部に輸送される。従って、ウリ科作物では、根におけるMLP遺伝子の発現が汚染の重要なステップとなる。

そこで、本研究では、植物機能を利用し、汚染土壤であっても、汚染レベルが低い作物を生産するという新しいアプローチを開発する。根におけるMLP遺伝子の発現に着目した。ズッキーニにおけるMLP量は、栽培温度や日長などの環境要因によって減少し、それに伴い、ピレン濃度も減少する (Inui et al., 2020)。よって、MLP量の減少により、ウリ科作物の有機汚染物質汚染の低減が可能であると考えられる。そこで、農薬の散布により、根におけるMLP遺伝子の発現の抑制を試みた。農薬は農業に不可欠な化学物質であり、安全性試験も行われている。本研究では、MLP遺伝子の発現を抑制し、ウリ科作物のPOPs蓄積を抑制する農薬を選抜した。

### II-3. 材料と方法

#### 植物材料及び農薬

ズッキーニ *pepo* 亜種の 'Magda' (MG) 品種及び 'Raven' (RA) の種子を Johnny's Selected Seeds から購入した。殺虫剤ガードベイト (サンケイ化学株式会社)、殺虫剤スタークル (北興化学工業株式会社)、殺虫剤ダイアジノン (サンケイ化学株式会社)、殺菌剤ベンレート (住化アグロテック株式会社)、殺菌剤ダコニール (クミアイ化学工業株式会社) については市販品を購入した。

#### 導管液の採取

土壌 (ハイポネックスジャパン株式会社) を120°Cで15分間オートクレーブした後、完全に乾燥させた。次に、乾燥土壌1 kgに対してアセトンに溶解させた2.5 mM ペリレン、2.5 mM ピレン、又は25 µM ディルドリン 500 mLを添加し、アセトンを完全に蒸発させた。MG品種及びRA品種の種皮を除去し、4°Cで一晩、水道水に浸した。汚染土壌200 gを添加したガラス瓶に2-3粒播種した。26°C、16/8時間の明暗サイクルで栽培し、播種後1週間前後で健全な苗を1本選び、他の苗は取り除いた。栽培期間中、農薬は通常施用回数、通常施用量又は通常施用量の3倍を散布した。殺虫剤ガードベイト、殺虫剤スタークル、殺虫剤ダイアジノン、殺菌剤ベンレートの粉剤を散布し、殺菌剤ダコニールは水道水で1000倍に希釈した後、散布した。27日後、既報と同様に導管液を採取した (Inui et al., 2013)。茎を子葉の下1 cmで切断した。アセトン又はヘキサンで洗浄したガラス管を茎に押し込み、約500 µLの導管液を採取し、使用するまで4°Cで保存した。導管液の採取後、根を水道水で洗浄することにより、土壌粒子を除去し、使用するまで-80°Cで保存した。

#### MLP遺伝子のプロモーター領域のクローニング

MLP-GR3遺伝子のプロモーター領域は、TAIL (Thermal asymmetric interlaced)-PCR によりク



ローニングした (Liu and Whittier, 1995)。まず、*MLP-GR3* 遺伝子の 751 bp 上流領域をランダムプライマーと iPCR-*MLP-as1* を用いて増幅した。他の 2 つの特異的アンチセンスプライマー、TAIL-*MLP-P-as2* 及び TAIL-*MLP-P-as3* は、751 bp の領域を参照して設計し、さらに上流領域を増幅した (補足表 II-1)。ズッキーニ *ovifera* 亜種 'Patty Green (PG)' 品種から抽出したゲノム DNA を鋳型として、2xQuick Taq HS DyeMix (東洋紡株式会社) を用いて PCR 反応を行った。TAIL-PCR の反応条件は過去に記載された PCR 条件を踏襲したが (Liu and Whittier, 1995)、ランダムプライマーと特異的プライマーのアニーリング温度をそれぞれ 33°C と 53-56°C に変更した。

MG 品種の 1 ヶ月齢の葉をサンプリングし、Isoplant キット (ニッポンジーン社) を用いてゲノム DNA を抽出した。*MLP* 遺伝子のプロモーター領域を含む DNA 断片は、100 ng のゲノム DNA とプライマー MG-Pro-s 及び MG-Pro-as を用いて、KOD FX Neo polymerase (東洋紡株式会社) により、94°C で 5 分間、94°C で 30 秒; 56°C で 30 秒; 72°C で 2 分間の 32 サイクル、72°C で 7 分間の条件で増幅させた (補足表 II-1)。増幅された断片は、Gel/PCR DNA Isolation System (VIOGENE BIOTEK Co.) を用いて精製した。最終的に 2,005 bp の断片を増幅し、In-Fusion HD Cloning Kit (タカラバイオ株式会社) を用いて *Hind* III と *Xba* I で切断したベクター pBI221 に挿入した。配列決定後、*Hind* III と *Sac* I で切断した *MLP* 遺伝子プロモーターと  $\beta$ -グルクロニダーゼ (*GUS*) 遺伝子を含む断片を、両方の制限酵素で切断した植物発現ベクター pGWB402 $\Omega$  (島根大学・中川博士提供) とライゲーションした (Nakagawa et al., 2007)。

#### タバコの形質転換

*MLP* 遺伝子プロモーターと *GUS* 遺伝子を含む植物発現プラスミド (*MLP-GR3 pro::GUS*) を *Rhizobium radiobacter* LBA4404 株に導入し、リーフディスク法により形質転換タバコを作製した (Horsch et al., 1985)。この形質転換タバコの T4 世代を、農薬処理での *GUS* アッセイに使用した。

### GUSアッセイ

*MLP-GR3 pro::GUS*を含む形質転換タバコの種子をMurashige and Skoog (MS) 培地に播種し、4°C、暗所で1日静置した。その後、24°Cで16/8時間の明暗サイクル下で栽培した。2週間後、苗を水道水に移し、さらに24°Cで1日栽培した。そして、0.22  $\mu$ M、0.43  $\mu$ M、0.58  $\mu$ M ベノミル (殺菌剤ベンレートの原体) (和光純薬工業株式会社)、0.019  $\mu$ M、0.038  $\mu$ M、0.11  $\mu$ M tetrachloroisophthalonitrile (TPN) (殺菌剤ダコニールの原体) (和光純薬工業株式会社) を含む水に移植し、16/8時間の明暗サイクル、24°Cで栽培した。2日後、各植物の根を採取し、液体窒素で凍結し、使用するまで-80°Cで保存した。根をタンパク質抽出用バッファー (50 mM リン酸ナトリウムバッファー [pH7.0], 10 mM EDTA [pH8.0], 0.1% [v/v] Triton X-100, 0.1% [w/v] *N*-lauroylsarcosine sodium salt, 0.072% [v/v] 2-mercaptoethanol) でホモジェナイズした。4°C、20,700 $\times$ gで5分間遠心分離した後、上清を回収し、再度同条件で遠心分離を行った。上清は既報の通り、GUSアッセイに供した (Kodama et al., 2007)。

### ウェスタンブロット分析

MG品種の根を液体窒素中で粉碎し、根タンパク質を抽出した (Goto et al., 2019)。導管液中のタンパク質濃度及び抽出した根タンパク質の濃度は、ブラッドフォード法 (Bradford, 1976) を用いて定量した。SDS-PAGE用還元試薬を含むサンプルバッファー溶液 (ナカライテスク株式会社) を加え、15%アクリルアミドゲルでSDS-PAGEを行った。ウェスタンブロット分析は、既報の通り、抗MLP-PG1抗体及び抗MLP-GR3抗体を用いて行った (Goto et al., 2019)。バンド強度はImageJを用いて定量した (Schneider et al., 2012)。

### ペリレン、ピレン、ディルドリンの定量

導管液 50  $\mu$ LとDMSO 50  $\mu$ Lを96ウェル黒色マイクロプレートで混合した。この混合液をマ

マイクロプレートリーダー (マイクロプレートリーダーSH-9000、コロナ株式会社) を用いてスキャンした。ペリレンとピレンの蛍光は、それぞれ励起波長410 nm、発光波長445 nm、励起波長330 nm、発光波長390 nmで測定した。

導管液 250  $\mu$ Lに、東北緑化環境保全株式会社 (日本、仙台市) から提供された50 ng/mL  $^{13}\text{C}$ -ラベル化ディルドリン (Cambridge Isotope Laboratories, Inc.) を加えた。ディルドリンはヘキサン1 mLで2回抽出した。硫酸ナトリウムで脱水後、ノナン50  $\mu$ Lを加え、窒素ガスを用いて35°Cで全量を約100  $\mu$ Lになるまで濃縮した。ディルドリン濃度は、高分解能ガスクロマトグラフ・高分解能質量分析装置 [HRGC/HRMS] により定量した。DB-5MS カラム (関東化学、東京) を装着した高分解能ガスクロマトグラフ・高分解能質量分析装置 [HRGC/HRMS: GC, 6890 N (Agilent Technologies); MS, JMS-800D (日本電子株式会社)] を用いて定量した。

#### 統計解析

有意差の判定にはDunnettの多重比較検定を適用した。

## II-4. 結果

### 導管液中のペリレン濃度を減少させる農薬の選抜

ウリ科作物に適用可能な農薬として、殺虫剤ガードベイト、殺虫剤スタークル、殺虫剤ダイアジノン、殺菌剤ベンレート、殺菌剤ダコニールを選抜した。導管液中のペリレン濃度は、供試したどの農薬散布でも有意に低下しなかったが、殺菌剤ベンレート及び殺菌剤ダコニール散布では低下する傾向にあった (図II-1A)。ペリレン濃度は、殺虫剤ダイアジノン、殺菌剤ベンレート及び殺菌剤ダコニールの3倍量散布で有意に低下した (図II-1B)。MLP遺伝子の発現を抑制する可能性がある農薬として、殺菌剤ベンレート及び殺菌剤ダコニールを選抜した。

### MLP遺伝子の転写活性の抑制

ベノミル処理した根のGUS活性は有意に低下しなかったが、0.43  $\mu\text{M}$  ベノミル処理後は低下する傾向にあった (図II-1C)。一方、GUS活性は0.019  $\mu\text{M}$ 及び0.11  $\mu\text{M}$ TPN処理により、それぞれ45%及び36%の有意な低下を示した (図II-1C)。このように、MLP遺伝子を抑制する農薬として殺菌剤ダコニールを選抜した。

### 根及び導管液中のMLP量の減少

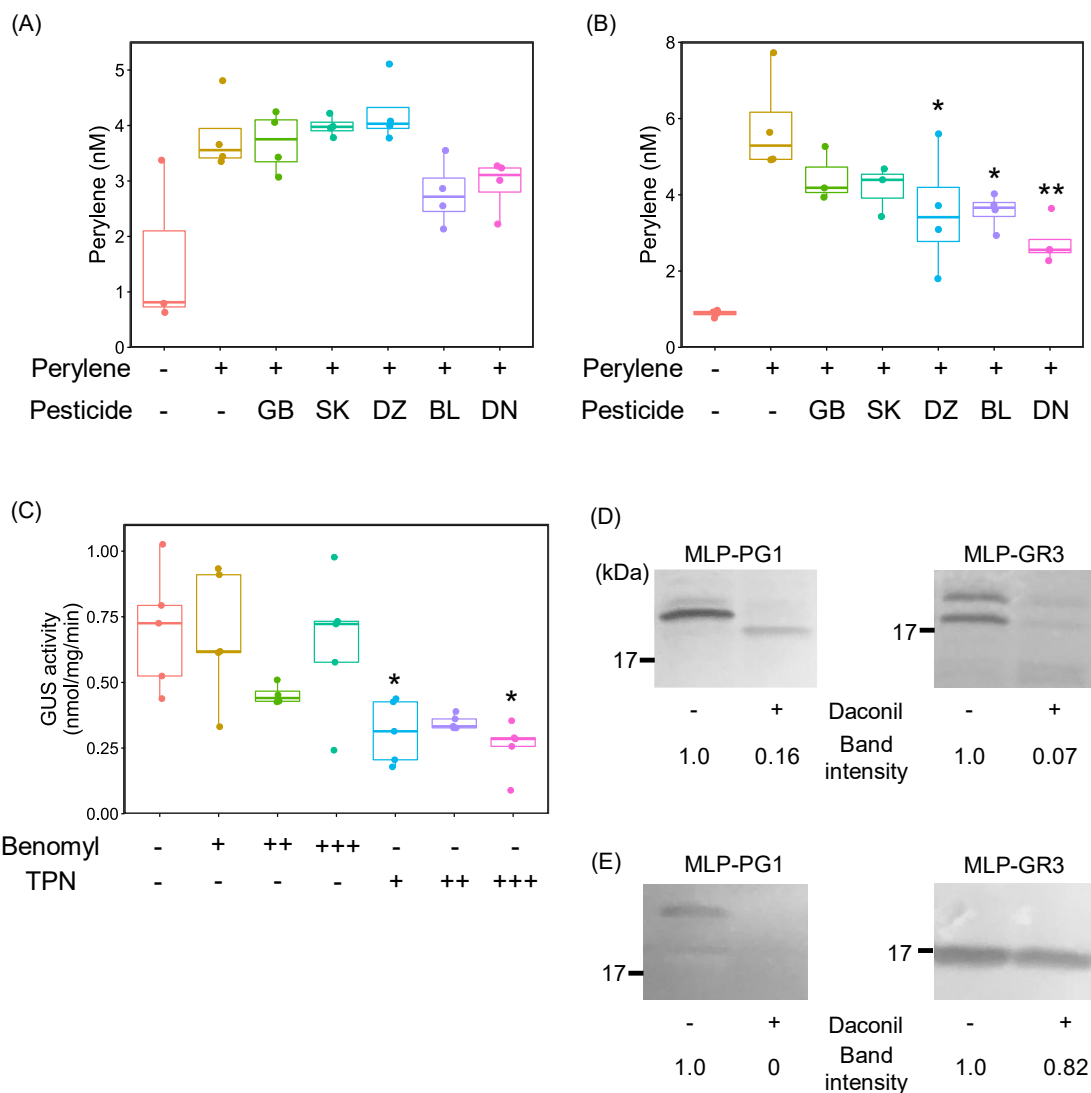
根では、抗MLP-PG1抗体との反応後、17 kDaのバンドが検出された。殺菌剤ダコニール散布では、MLP-PG1の相対バンド強度が84%減少した (図II-1D)。根では、抗MLP-GR3抗体との反応後、17 kDaのバンドが2本検出された。殺菌剤ダコニール散布では、両方のバンド強度が減少し、MLP-GR3の下側のバンドの相対バンド強度が93%減少した (図II-1D)。抗MLP-PG1抗体との反応後、導管液中に17kDaの2つのバンドが検出された。殺菌剤ダコニール散布では、両方のバンドが消失した (図II-1E)。抗MLP-GR3抗体との反応後、導管液中に17 kDaのバンドが検出されたが、殺菌剤ダコニール散布では、MLP-GR3の相対バンド強度が18%減

少しした (図II-1E)。

#### 導管液中のピレン濃度、ディルドリン濃度の低下

ピレン汚染土壌でMG品種を栽培し、殺菌剤ダコニールを散布した。通常量の殺菌剤ダコニール散布では、導管液中のピレン濃度が36%と有意に低下した (図II-2A)。

RA品種をディルドリン汚染土壌で栽培し、殺菌剤ダコニールを散布した。3倍量の殺菌剤ダコニール散布では、ディルドリン濃度が52%と有意に低下した (図II-2B)。通常量の殺菌剤ダコニール散布では、有意な低下は見られなかったが、13%低下した (図II-2B)。



図II-1. 殺菌剤ダコニールによるMLP遺伝子の発現抑制を介したMLP量の減少

(A) (B) 通常量 (A) 及び3倍量 (B) で農薬散布した際のズッキーニMG品種の導管液のペリレン濃度

1.25 mmol/kg ペリレンで汚染された土壌で、16/8時間の明暗サイクル、26°Cの条件でMG品種を栽培し、農薬を散布した。27日後、導管液を採取し、励起波長410 nm、蛍光波長445 nmの蛍光の測定により、ペリレン濃度を定量した。-はペリレンで汚染されていない土壌での栽培又は農薬散布無し、+はペリレンで汚染された土壌での栽培、GB、SK、DZ、BL、DNはそれぞれ殺虫剤ガードベイト、殺虫剤スタークル、殺虫剤ダイアジノン、殺菌剤ベンレート、

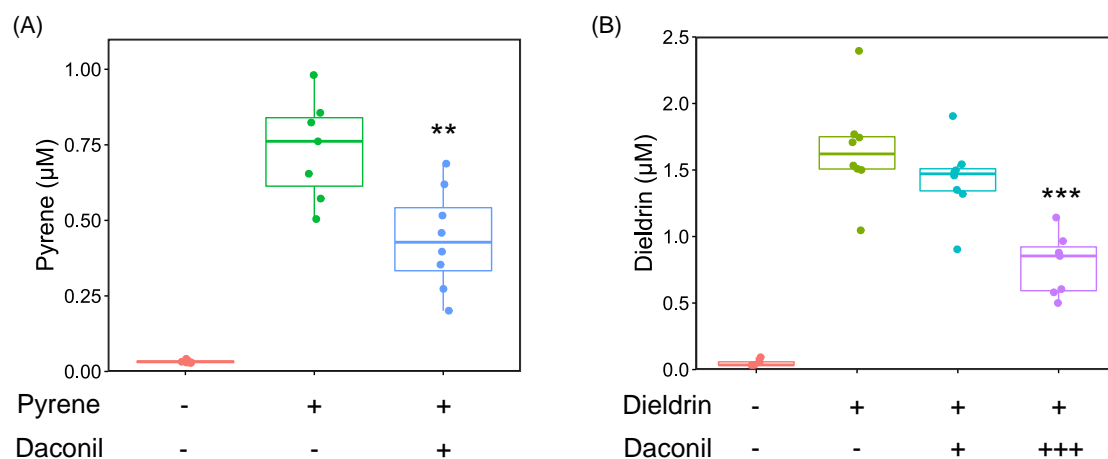
殺菌剤ダコニールの散布。アスタリスクは、農薬散布を行わずペリレンで汚染された土壌で栽培したサンプルのペリレン濃度と比較して有意差があることを示す (\*,  $p<0.05$ ; \*\*,  $p<0.01$ )。

(C) 農薬原体で処理した形質転換タバコの根におけるレポーター遺伝子の発現

MLP-GR3遺伝子プロモーターの下流でGUS遺伝子を発現する2週齢のタバコを、24°Cで16/8時間の明暗サイクル下で0.22  $\mu\text{M}$  (+)、0.43  $\mu\text{M}$  (++)、0.58  $\mu\text{M}$  (+++) ベノミル又は0.019  $\mu\text{M}$  (+)、0.038  $\mu\text{M}$  (++)、0.11  $\mu\text{M}$  (+++) TPNを含む水で2日間栽培した。根からタンパク質を抽出し、GUSアッセイを行った。アスタリスクは、農薬未処理の場合のサンプルのGUS活性と比較して有意差があることを示す (\*,  $p<0.05$ )。

(D) (E) 殺菌剤ダコニール散布時の根 (D) 及び導管液 (E) におけるMLP量

1.25 mmol/kg ペリレンで汚染された土壌で、16/8 時間の明暗サイクル、26°Cの条件でMG品種は栽培し、殺菌剤ダコニールを通常量で散布した。27日後、根と導管液を採取し、根に含まれるタンパク質を抽出した。根のタンパク質抽出液と導管液をSDS-PAGEに供した。MLP-PG1及びMLP-GR3は、それぞれ抗MLP-PG1抗体及び抗MLP-GR3抗体を用いたウェスタンブロット分析により検出した。-は殺菌剤ダコニール散布無し、+は殺菌剤ダコニール散布。バンド強度はImageJで定量した。



図II-2. 殺菌剤ダコニールによる導管液における有機汚染物質濃度の低下

(A) (B) 殺菌剤ダコニール散布時の導管液中のピレン (A) 又はディルドリン (B) 濃度

1.25 mmol/kg ピレン又は12.5 µmol/kg ディルドリンで汚染された土壌で、16/8時間の明暗サイクル、26°Cの条件でMG品種を栽培し、殺菌剤ダコニールを散布した。27日後に導管液を採取し、励起波長330 nm、発光波長390 nmの蛍光の測定により、ピレン濃度を定量した。一方、HRGC/HRMSでディルドリン濃度を定量した。-はピレン又はディルドリンで汚染されていない土壌での栽培、又は殺菌剤ダコニール散布無し、+はピレン又はディルドリンで汚染された土壌での栽培、通常量での殺菌剤ダコニール散布。+++は、3倍量での殺菌剤ダコニール散布。アスタリスクは、ピレンで汚染された土壌で栽培した際のピレン又はディルドリン濃度と比較して、殺菌剤ダコニール散布で有意差があることを示す (\*\*,  $p < 0.01$ ; \*\*\*,  $p < 0.001$ )。



補足表II-1. プライマー配列

Primer name	Sequence
MG-Pro-s	5'-TGATTACGCCAAGCTTAAGCATTCAATAAGTTGTT-3'
MG-Pro-as	5'-CCGGGGATCCTCTAGTTTCTTTTCGATGTGATACAA-3'
iPCR-MLP-as1	5'-CCTAAAATCTTCTCCAGAGA-3'
TAIL-MLP-P-as2	5'-ATCTTGTCTCCCTCTCCAAC-3'
TAIL-MLP-P-as3	5'-CTTCGTGAACTAAATGGGGC-3'

## II-5. 考察

本研究の目的は、*MLP*遺伝子の発現の抑制により、有機汚染物質による作物汚染を低減することである。ウリ科作物のPOPs汚染は、根の*MLP*によるPOPsの結合が重要なステップである (Inui et al., 2013; Goto et al., 2019)。従って、根における*MLP*遺伝子の発現の抑制は、汚染の低減に結び付く。まず、*MLP*遺伝子の発現を抑制する農薬を選抜した。農薬は作物栽培に広く使用されており、植物に生理的变化をもたらすものも存在する。本研究では、農薬の新規利用法として汚染低減を提案する。

本研究では、ウリ科作物に適用可能な5種類の農薬から、*MLP*遺伝子の発現抑制能を有する農薬を選抜した。殺虫剤ダイアジノン、殺菌剤ベンレート、殺菌剤ダコニールは、3倍量散布で導管液中のペリレン濃度を有意に低下させた (図II-1B)。また、殺菌剤ベンレート及び殺菌剤ダコニールは、通常量であっても導管液中のペリレン濃度を低下させる傾向にあった (図II-1A)。従って、これらの農薬をさらなる分析に使用した。農薬には、殺虫・殺菌作用を有する原体、展着剤、界面活性剤などが含まれている。*MLP-GR3*遺伝子のプロモーターの下流に*GUS*遺伝子を発現する形質転換タバコに原体を処理し、原体による*MLP*遺伝子の発現の抑制を確認した。殺菌剤ダコニールの原体であるTPNは、根における*GUS*活性を有意に低下させた (図II-1C)。この結果は、TPNによる*MLP*遺伝子の転写の抑制を明確に示している。しかし、*MLP*遺伝子の発現抑制のメカニズムは明らかにされていない。この転写抑制の詳細なメカニズムの解明は、より安全な農作物の生産に寄与する可能性があるため、今後、解明する必要がある。

農薬が植物の遺伝子の発現量を変化させたという報告は、これまでに複数ある (Lu et al., 2016)。TPNは、トマトの葉において、*CYP*遺伝子やグルタチオン-S-トランスフェラーゼ遺伝子など500以上の遺伝子を誘導し、400以上の遺伝子を抑制する (Zhou et al., 2015)。また、農薬の中には、病原体に対する抵抗性に関わる遺伝子の発現を誘導するものがある。例えば、殺菌剤プロベナゾールはイネのUDPグルコースサリチル酸グルコシルトランスフェラーゼ

遺伝子、殺菌剤ベンゾチアジアゾールは*WRKY45*遺伝子をそれぞれ誘導する (Shimono et al., 2007; Umemura et al., 2009)。MLPは、シロイヌナズナ (Lytle et al., 2009)、ダイズ (Strömvik et al., 1999)、ワタ (Chen and Dai, 2010)、ブドウ (Zhang et al., 2018)、クワ (Gai et al., 2018) など多くの植物で同定されてきた。従って、様々な植物種におけるMLP遺伝子の発現は、農薬により制御可能である。

本研究より根のMLP-PG1量が減少すると、根から移行する導管液のMLP-PG1量の減少が明確に示された (図II-1D & E)。しかし、導管液中のMLP-GR3量の減少は微々たるものであった一方で、根のMLP-GR3量は顕著に減少した (図II-1D & E)。これは、導管液中ではMLP-GR3の安定性が比較的高く、一方でMLP-GR3遺伝子の発現量は低いことが考えられる (Goto et al., 2019)。導管液中の2つのMLPが相加的に減少することで、ピレンとディルドリンの濃度が大きく減少したものと考えられる (図II-2A & B)。

これらの結果から、殺菌剤ダコニール散布により、根におけるMLP遺伝子の転写が抑制され、根におけるMLP量の減少が明らかになり、根から導管に移行するMLP量も減少した。その結果、ズッキーニの導管液中の有機汚染物質の濃度が著しく低下した。導管は植物の根と地上部を繋ぐ主要な経路であるため、果実中のこれら汚染物質の濃度も低下すると考えられる。農薬を用いたMLP遺伝子の発現抑制により、作物汚染を低減させた報告は今回が初めてであり、本研究は、農薬の新規利用法を提案する。農薬の散布は、簡便かつ低コストであるため、生物学的、化学的、物理的な方法による過去の土壌浄化法に取って代わる。農家が汚染された土壌であっても作物を栽培し、農薬で安全な作物を生産できることは特筆すべきことである。

### 第III章

#### MLPの結合制御による汚染低減化

本章は以下の出版物を参照にされたい。

**Fujita K.** Kondoh Y, Honda K, Haga Y, Osada H, Matsumura C, Inui H. (2020)

Pesticide treatment reduces hydrophobic pollutant contamination in *Cucurbita pepo* through competitive binding to major latex-like proteins

*Environmental Pollution* 266, 115179.

### III-1. 概要

農地の土壌には、現在でもなお疎水性有機汚染物質が残留している。ウリ科作物は根を介して、疎水性有機汚染物質をその地上部に蓄積する。ウリ科作物のMLPは、疎水性有機汚染物質と結合することで、汚染に重要な役割を果たす。これまでのところ、疎水性有機汚染物質の濃度が低い安全な作物を生産するための効率的な栽培方法は開発されていない。ここでは、MLPと結合する農薬の散布により、根の疎水性有機汚染物質ピレン及びディルドリンへのMLPの結合を競合的に阻害した。化合物ライブラリーを用いてスクリーニングを行った結果、MLPはインドールおよびキナゾリンに類似した構造を持つ化合物と結合することが明らかになった。このような構造を持つ市販の農薬であるアミスルブロムとピリフルキナゾンは、*in vitro*でMLPとピレン及びディルドリンの結合を阻害した。1.25 mmol/kg ピレンおよび 12.5  $\mu$ mol/kg ディルドリン汚染土壌でズッキーニを栽培したところ、導管液中のピレン及びディルドリン濃度は、それぞれ有意に30%及び15%低下した。これは、MLPに結合する農薬が、根におけるMLPとピレン及びディルドリンの結合を競合的に阻害し、汚染を低減したことを示している。本研究は、安全な作物を栽培するための新しいアプローチを提案し、農薬の未知の機能の活用を進めるものである。

### III-2. 結論

POPsやPAHなどの有機汚染物質による農作物の汚染は、食の安全や品質の面で深刻な問題になっている。例えば、POPsに分類される殺虫剤ディルドリンや殺虫剤ヘプタクロルは、40年以上前に使用が禁止されたにも関わらず、東京都の農地で栽培されたキュウリから残留基準値を超えて検出された (Hashimoto, 2005)。POPsは、残留性、長距離移行性、生物濃縮性、毒性などの理由から、各国で使用が禁止されている。しかし、POPsと判定された殺虫剤の使用による農地土壌の汚染や、野焼き後の藁の不完全燃焼によるPAHの生成により、有機汚染物質は今もなお作物から検出される (Shen et al., 2013)。有機汚染物質は、発がん性 (Bortey-Sam et al., 2017) や神経毒性 (Shi et al., 2019) を示すので、汚染された作物の摂取は、人体に多くの疾患をもたらす可能性がある。

キュウリ、メロン、カボチャ、スイカ、カボチャ、ズッキーニなどのウリ科作物は、地上部にPOPsを蓄積する (Otani et al., 2007)。従って、POPsに汚染されたウリ科作物を摂取すれば、健康に悪影響を及ぼす。また、作物から残留基準値を超えるPOPsが検出された場合、農家は同じ農地で栽培されている作物を全て廃棄する必要があり、莫大な経済的損失が生じる。このため、微生物によるPOPsの分解 (Xiao et al., 2011)、活性炭によるPOPsの吸着 (Murano et al., 2009) など、作物の汚染を低減するための多くのアプローチが試みられてきた。しかし、これらの方法は効率が悪く、長い時間と高いコストがかかる。従って、安全な作物を効率的に生産するための新技術の開発が極めて重要である。

ウリ科作物における有機汚染物質の蓄積は、主に有機汚染物質が地上部に輸送されることに起因している。ウリ科作物では、クロルデンなどのPOPsが根から導管を介して地上部へ輸送される (Mattina et al., 2004)。ディルドリンのウリ科作物による取り込みに関する別の研究では、ディルドリン結合タンパク質が導管液において、ディルドリンを可溶化し、地上部へディルドリンを輸送することが明らかになった (Murano et al., 2010)。そのディルドリン結合タンパク質として、ズッキーニからMLPが同定された (Inui et al., 2013)。

MLPはBet v 1ファミリーに属し (Radauer and Breiteneder, 2007)、PR-10 (Fernandes et al., 2013)、CSBP、キウイアレルギーAct d 11 (D'Avino et al., 2011)、イチゴアレルギーFra a (Ishibashi et al., 2017) などが含まれる。このファミリーのタンパク質は類似した立体構造を有しており、3つの $\alpha$ ヘリックスと7つの $\beta$ シートを保有する(Choi et al., 2015)。これらのタンパク質は、植物ホルモンや二次代謝産物のような化合物と結合することを可能にする大きな疎水性キャビティを形成する (Fernandes et al., 2013)。例えば、Bet v 11 (Bet v 1の天然型アイソフォーム) はブラシノステロイドと結合し (Markovic-Housley et al., 2003)、Fra aはケルセチン、ミリセチン、カテキンのようなフラボノイドと結合する (Casañal et al., 2013)。ズッキーニから同定されたMLP-PG1及びMLP-GR3は、PCB、ディルドリンなどの有機汚染物質に対して結合する (Goto et al., 2019)。

本研究では、農薬を用いた有機汚染物質の低減をウリ科作物で試みた。MLPと結合する農薬の散布により、MLPとPOPsの結合を競合的に阻害し、導管の有機汚染物質量が減少し、地上部への有機汚染物質の輸送が低減される。このアプローチは、処理剤が市販の農薬であるため、実用的な有機汚染物質の低減法を提案する。我々の知る限り、MLPと有機汚染物質の結合の競合的な阻害によって、汚染の低減に焦点を当てた研究は今回が初めてである。

### III-3. 材料と方法

#### ケミカルアレイスクリーニング

ケミカルアレイスクリーニングは、MLPとの結合に陽性を示す化合物を同定するために行った。アレイは既報の方法で作製し (Kondoh et al., 2015)、ケミカルライブラリーとして理研NPDepoの22,097化合物をスクリーニングに使用した。C末端にHisタグを融合した組換えMLP-PG1及びMLP-GR3は、大腸菌より精製した (Inui et al., 2013)。非特異的結合を防ぐために、アレイをTBS-T (10 mM Tris-HCl [pH 8.0], 150 mM NaCl, 0.05% [v/v] Tween 20) 及び1%BSAのブロッキング溶液中で室温にて1時間インキュベートした。TBS-Tとリン酸カリウムバッファー (20 mM リン酸カリウムバッファー [pH 5.6], 100 mM KCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.2 mM EDTA) で洗浄後、リン酸カリウムバッファー中の4 µMの組換えMLP-PG1又はMLP-GR3をアレイ上に滴下して30°C、1時間インキュベートした。リン酸カリウムバッファーとTBS-Tで再度洗浄した後、アレイを抗His抗体 (GE Healthcare) とインキュベートし、続いてCy5蛍光色素 (Thermo Fisher Scientific) で標識した二次抗体 (ヤギ抗マウスIgG) を加えた。最後に、マイクロアレイスキャナーGenePix 4300A (Molecular Devices) を用いて、励起波長を635 nm、蛍光波長を655-695 nmに設定してCy5チャンネルでアレイのスキャンを行った。MLP結合化合物の構造検索は、SciFinder (<https://www.cas.org/products/scifinder>) で行った。

#### 植物材料、栽培条件、導管液の採取

ズッキーニ*pepo*亜種 (MG品種及びRA品種) の種子は Johnny's Selected Seedsから購入した。土壌は、ハイポネックスジャパン株式会社から購入し、120°Cで15分間オートクレーブした後、完全に乾燥させた。非汚染土壌 (乾燥土壌1 kgにアセトン500 mLを混合) と、汚染土壌 (乾燥土壌1 kgに2.5 mM ピレン又は25 µM デイルドリンを含むアセトン500 mLを混合) の2種類を用意した。その後、土壌からアセトンを蒸発させた。ズッキーニ*pepo*亜種の2品種の種子の種皮を除去した後、水道水中で4°C、1晩静置し、非汚染土壌又は汚染土壌200 gを入



れたガラス瓶に播種した。

26°Cで16/8時間の明暗サイクルの下で27日間培養した後、導管液を採集した (Inui et al., 2013)。子葉の下1cmで茎を切断し、地上部の重量を測定した。アセトン又はヘキサンで洗浄したガラス管を、導管液の量が約500 µLになるまで静置した。採取した導管液は、使用時まで4°Cで保存した。

選抜した殺菌剤ライメイ (日産化学工業株式会社) 及び殺虫剤コルト (クミアイ化学工業株式会社) を2種類の用量 (通常量、通常量の3倍量) で推奨される時期に散布し、その効果を調査した。

#### ピレン及びディルドリンの定量

96ウェル黒色マイクロプレートに、得られた導管液50 µLをDMSO 50 µLと混合した。試料中のピレンの蛍光は、マイクロプレートリーダーSH-9000を用いて、励起波長を330nm、発光波長を390nmに設定して測定した。

導管液250 µLに、内部標準物質として200 ng/mL <sup>13</sup>C-ラベル化ディルドリン (Cambridge Isotope Laboratories, Inc.) を加えた。1 mLのヘキサンで2回洗浄し、ディルドリンを抽出した。無水硫酸ナトリウムで脱水後、ノナン50 µLを加え、35°Cで窒素ガスにより総量が約100 µLになるまで濃縮した。ディルドリン濃度は、HRGC/HRMSで定量した。

#### 結合競合アッセイ

組換えMLPをリン酸ナトリウムバッファー (50 mM リン酸ナトリウムバッファー [pH 7.0], 200 mM NaCl, 150 mM イミダゾール) で0.2 mg/mLに希釈した。DMSOに溶解した2種類の濃度 (5 mM, 10 mM) のアミスルブロム (和光純薬工業株式会社) 及びピリフルキナゾン (和光純薬工業) を、それぞれ25 µM又は50 µMの終濃度でMLP溶液に添加した。最後に、DMSOに溶解したピレン (1 mM) を終濃度10 µMで溶液に添加した。これらの溶液を20°Cで1時間

回転させながらインキュベートした。各溶液100  $\mu$ L中のピレンの蛍光を、前述と同様にマイクロプレートリーダーSH-9000を使用して測定した。

ジメチルホルムアミド (DMF) に溶解したディルドリン (200 mM) を、エポキシビーズ (多摩川精機株式会社、長野県) 1 mgに製造元の指示に従い結合させた。ディルドリン結合ビーズを分散させ、スピンドウンした後、磁性分離を行って上清を除去し、結合バッファー (50 mMリン酸カリウムバッファー [pH 5.6], 100 mM KCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.2 mM EDTA, 10% [v/v] グリセロール, 0.1% [v/v] Nonidet P-40, 1 mM dithiothreitol, 0.2 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 0.1% Triton X-100, 0.1% *N*-lauroylsarcosine sodium salt) を添加し、洗浄を3回行った。組換えMLP-PG1又はMLP-GR3を結合バッファーで、各MLPを終濃度0.1 mg/mLに希釈した。この溶液を4°Cで20,700 $\times$ g、30分間遠心分離し、上清を回収した。次に、DMSOに溶解した20 mMのアミスルブロム及びピリフルキナゾン溶液中に終濃度0.2 mMとなるように添加した。インキュベーション後、溶液200  $\mu$ Lをビーズ0.25 mgに加え、4°Cで4時間インキュベートした。磁性分離を行い、上清を除去し、結合バッファーを加えた。結合バッファーによる洗浄を8回繰り返した。結合バッファー35  $\mu$ LとSDS-PAGE用還元試薬入りサンプルバッファー (ナカライテスク株式会社) 7  $\mu$ Lを加え、ビーズと上清を98°Cで5分間加熱した。磁性分離後、15%アクリルアミドゲルでSDS-PAGEを行い、ゲルは銀染色キット (和光純薬工業) を用いて染色した。バンド強度は、ImageJソフトウェアを用いて定量した (Schneider et al., 2012)。

#### 統計解析

処理間の有意差の判定にDunnettの多重比較検定を適用した。

### III-4. 結果

#### MLPに結合する化合物の選抜と農薬の選抜

MLPと結合する化合物を同定するために、ケミカルアレイスクリーニングを実施した。理研NPDepoの22,097化合物のうち、166化合物と176化合物が、それぞれ組換えMLP-PG1とMLP-GR3に対して異なる蛍光強度で陽性シグナルを示した (表III-1)。陽性シグナルを持つ化合物の総数は242個であり、100個の化合物が両方のMLPに対して陽性シグナルを示した。この242化合物からSciFinderにより植物ホルモンや二次代謝産物などの植物関連化合物が30個選ばれ、インドール様骨格を持つ2化合物が選抜された (表III-2)。最終的にインドール様骨格を含む農薬としてアミスルブロムが選抜された (図III-1A)。

両方のMLPで++又は+++の陽性シグナルを示した化合物を選抜した。その中で、キナゾリン様、キノキサリン様、キノリン様骨格を持つ10化合物が同定された (表III-3)。最終的にキノゾリン様骨格を持つ農薬としてピリフルキナゾンが選抜された (図III-1B)。

#### 農薬の競合的結合阻害活性

ピレンをMLPとインキュベートすると、ピレンの蛍光が劇的に増加した (図III-1C & D)。MLP-PG1では、50  $\mu$ Mのアミスルブロムを添加すると、農薬無添加の場合と比較して、ピレンの蛍光が24%減少した (図III-1C)。25  $\mu$ M及び50  $\mu$ Mピリフルキナゾンを添加した場合、ピレンの蛍光はそれぞれ26%及び61%減少した (図III-1C)。MLP-GR3では、25  $\mu$ M及び50  $\mu$ Mアミスルブロムを添加すると、農薬無添加の場合と比較して、ピレンの蛍光が50%及び40%減少した (図III-1D)。同様に、25  $\mu$ M及び50  $\mu$ Mピリフルキナゾンを添加した場合、ピレンの蛍光はそれぞれ32%及び28%減少した (図III-1D)。

MLP-PG1、MLP-GR3では、ディルドリン結合ビーズを添加するとバンドが検出された (図III-1E & F)。アミスルブロムの添加により、MLP-PG1ではバンド強度は、ほとんど減少しなかったが、MLP-GR3では49%減少した (図III-1E)。一方、ピリフルキナゾンを添加した場合、

バンド強度はMLP-PG1で19%、MLP-GR3で78%減少した (図III-1F)。ディルドリン無添加のビーズではバンドは検出されなかった (図III-1E & F)。

#### 汚染土壌で栽培したズッキーニにおける汚染の低減

ピレン及びディルドリン汚染を低減する農薬として、アミスルブロムを原体として含む殺菌剤ライメイとピリフルキナゾンを原体として含む殺虫剤コルトを選抜した。殺菌剤ライメイ散布では、ピレン濃度が3倍量散布で40%有意に低下したが、通常量散布では低下しなかった (図III-2A)。殺虫剤コルト散布では、ピレン濃度は3倍量散布で有意に低下しなかったが、通常量散布では30%有意に低下した (図III-2B)。

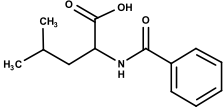
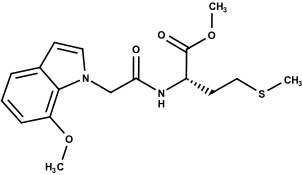
ディルドリン汚染土壌での殺菌剤ライメイ散布では、3倍量を散布してもディルドリン濃度は有意に減少しなかった (図III-2C)。殺虫剤コルト散布では、3倍量散布によりディルドリン濃度が15%有意に低下し、通常量散布でも低下する傾向にあったが、有意な低下は認められなかった (図III-2C)。

表III-1. ケミカルアレイスクリーニングでMLPと結合した化合物

MLP	Structure			Total
	Intensity			
	+	++	+++	
MLP-PG1	98	48	20	166
MLP-GR3	99	55	22	176

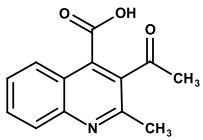
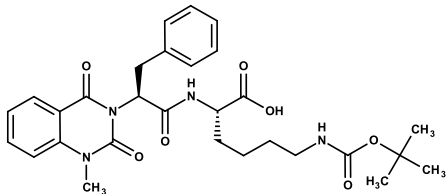
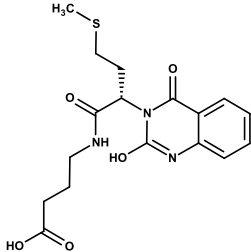
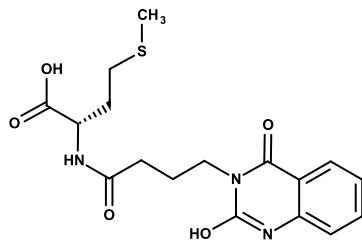
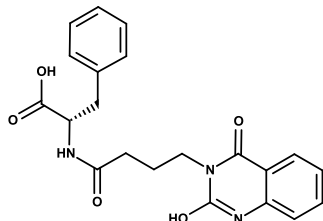
ケミカルアレイは、4  $\mu$ M 組換えMLP-PG1及びMLP-GR3、抗His抗体、Cy5で標識した二次抗体とインキュベートし、Cy5の蛍光を検出した。リファレンスアレイについては、化合物アレイを抗His抗体とCy5で標識した二次抗体のみでインキュベートした。MLP処理アレイとリファレンスアレイの各スポットの蛍光強度の差のZスコアを算出した (Kondoh et al., 2015)。Zスコア>1、>2、>3をそれぞれ+、++、+++とマークした。

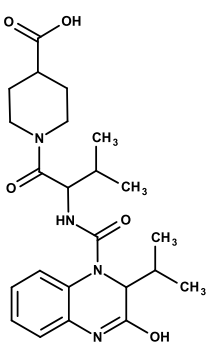
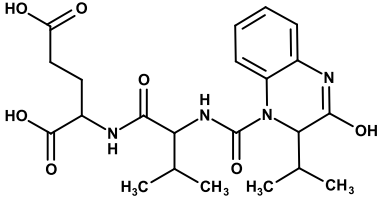
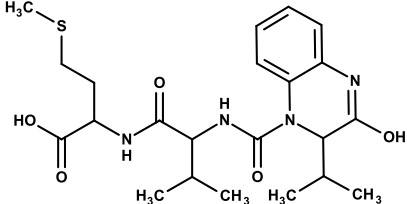
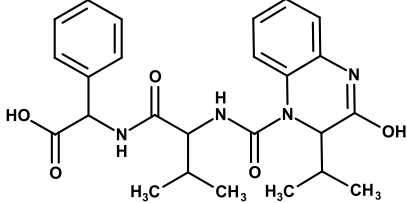
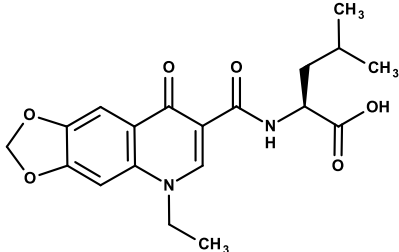
表III-2. MLPと結合するインドール様骨格の化合物

Compound	Structure	Intensity	
		MLP-PG1	MLP-GR3
NPD9013		+	+
NPD14496		+	+++

ケミカルアレイスクリーニングにより、242種類のMLPと結合する化合物の候補が同定された。選抜した化合物に関する文献をSciFinderで検索し、植物ホルモンや二次代謝作物など、植物に関連する30種類の化合物を同定した。表III-1の凡例に+、+++の記号の意味を記載した。

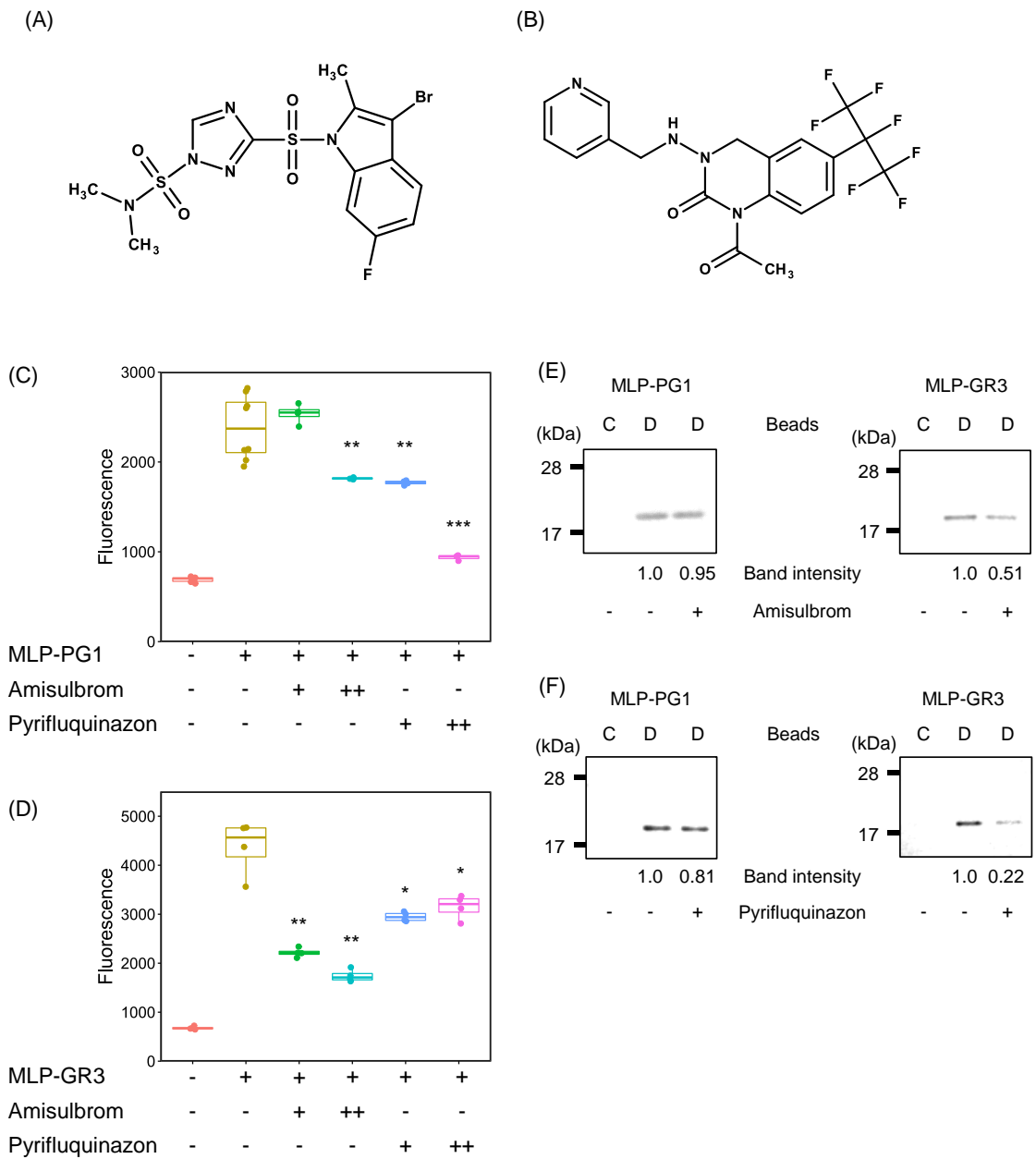
表III-3. MLPと高い結合親和性を示すキノゾリン様、キノキサリン様、キノリン様骨格を有する化合物

Compound	Structure	Intensity	
		MLP-PG1	MLP-GR3
NPD8605		++	++
NPD12285		++	++
NPD13698		+++	++
NPD13699		++	++
NPD13700		+++	+++

NPD13711		+++	++
NPD13717		++	+++
NPD13718		++	+++
NPD13719		+++	+++
NPD13995		++	++

ケミカルアレイスクリーニングにより、MLPに結合する242の化合物が同定された。その中から、両方のMLPに対して結合親和性の高い(++)又は(+++)化合物を選抜し、キナゾリン様、キノキサリン様、キノリン様骨格を持つ化合物が10個あった。++と+++の記号の意味は表III-1の凡例に記載した。





図III-1. アミスルブロムとピリフルキナゾンによるMLPと有機汚染物質の結合の競合的阻害活性

(A)(B). アミスルブロム (A) とピリフルキナゾン (B) の構造

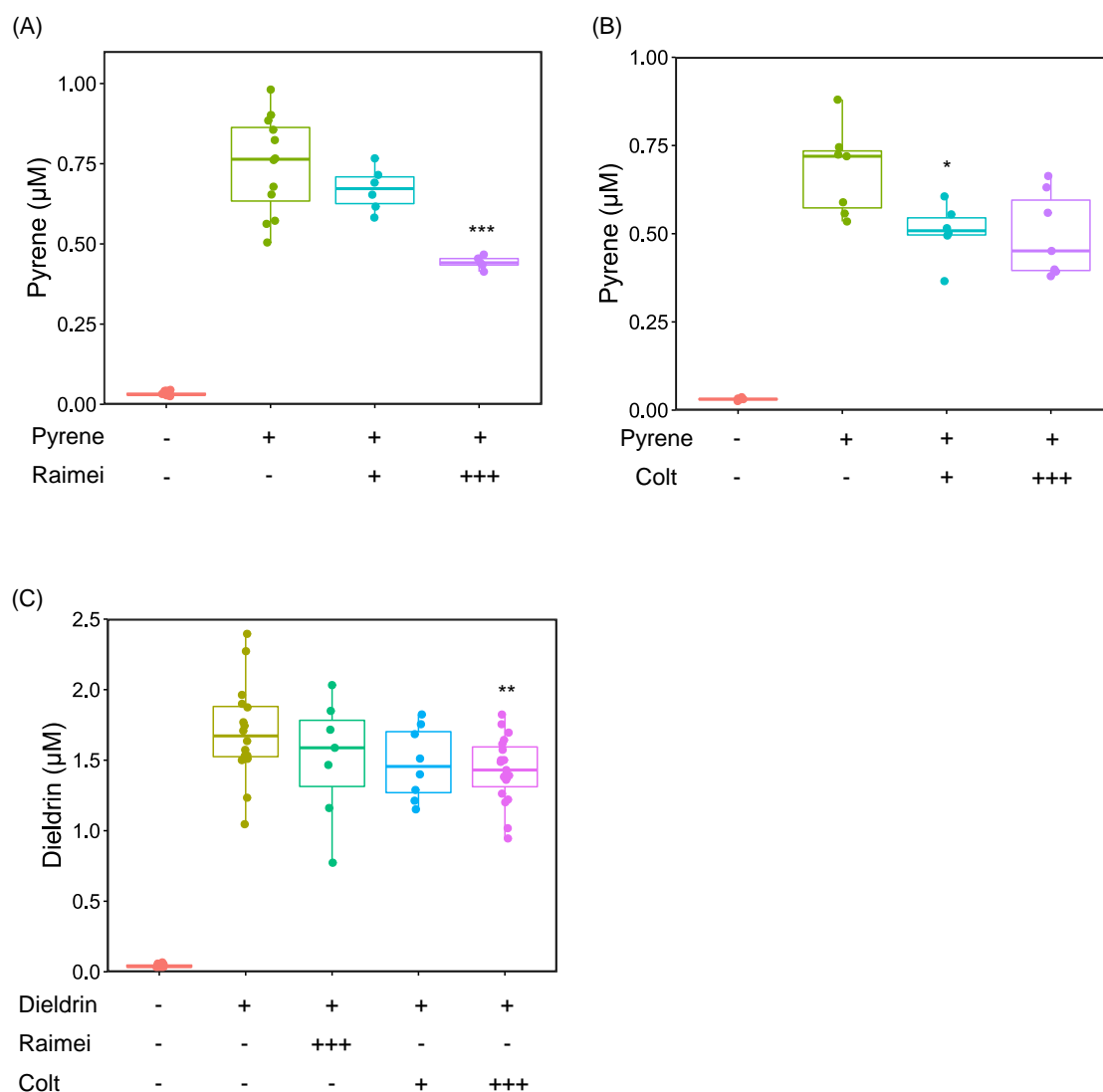
(C)(D) アミスルブロムとピリフルキナゾンによるMLPとピレンの結合の競合的阻害

0.2 mg/mL MLP-PG1 (C) 及びMLP-GR3 (D) をピレン、アミスルブロム又はピリフルキナゾンと共に20°Cで1時間インキュベートし、ピレンの蛍光を測定した。-, MLP又は農薬なしの

インキュベーション; +, 0.2 mg/mL MLP又は25  $\mu$ M 農薬とのインキュベーション; ++, 50  $\mu$ M 農薬とのインキュベーション。アスタリスクは、農薬を含まないMLPとインキュベートした蛍光と比較した有意差を示す (\*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$ ; \*\*\*,  $p < 0.001$ )。

(E) (F) アミスルブロム (E) 及びピリフルキナゾン (F) によるMLPとディルドリンの結合の競合的阻害

0.1 mg/mL 組換えMLPを0.2 mM アミスルブロム (E) 及びピリフルキナゾン (F) と共に4°Cで2時間インキュベートした。100 mM ディルドリンを結合した磁性ビーズを加え、4°Cで4時間インキュベートした。熱溶出後、サンプルをSDS-PAGEに供し、銀染色によりMLPを検出した。C, ディルドリンを含まないビーズ; D, ディルドリン結合ビーズ; -, ディルドリンと結合していない又は農薬を含まない磁性ビーズとのインキュベーション; +, ディルドリンと結合した磁性ビーズ又は0.2 mM 農薬を含む磁性ビーズとのインキュベーション。バンド強度はImageJで定量した。



図III-2. 殺菌剤ライメイと殺虫剤コルトによるウリ科作物の汚染低減

(A) (B) 殺菌剤ライメイ (A) と殺虫剤コルト (B) を散布したズッキーニの導管液中のピレン濃度

1.25 mmol/kg ピレンを含む汚染土壌で、ズッキーニMG品種を26°C、16/8時間明暗サイクルで27日間栽培した。殺菌剤ライメイ及び殺虫剤コルトを通常量又は3倍量で散布し、導管液を採取した後、蛍光の測定によりピレン濃度を定量した。-, ピレンを含まない土壌での栽培又は農薬無散布; +, ピレン汚染土壌での栽培又は通常用量での農薬処理; +++, 3倍用量での農薬処理。アスタリスクは、ピレン汚染土壌で栽培し、農薬未散布の場合のピレン濃度と比較して有意差があることを示す (\*,  $p < 0.05$ ; \*\*\*,  $p < 0.001$ )。

(C) 殺菌剤ライメイと殺虫剤コルトを散布したズッキーニの導管液中のディルドリン濃度  
12.5  $\mu\text{mol/kg}$  ディルドリンを含む汚染土壌で、ズッキーニRA品種を16/8時間の明暗サイク  
ルの下、26°Cで27日間栽培した。殺菌剤ライメイ及び殺虫剤コルトを通常量又は3倍量で散  
布し、導管液を採取した後、HRGC/HRMSでディルドリン濃度を定量した。-, ディルドリン  
で汚染されていない土壌での栽培又は農薬未散布; +, ディルドリン汚染土壌での栽培又は  
通常量での農薬散布; +++, 農薬3倍量での農薬処理。アスタリスクは、ディルドリン汚染土  
壌で栽培し、農薬未散布の場合のディルドリン濃度と比較して有意差があることを示す (\*,  
 $p < 0.05$ )。

### III-5. 考察

MLPは、ウリ科作物の疎水性有機汚染物質の汚染における重要な因子である。MLPは根で疎水性有機汚染物質と結合し、導管を經由して果実に運ばれる (Goto et al., 2019)。8-アニリノ-1-ナフタレンスルホン酸やケルセチンなどの疎水性化合物が、Bet v 1ファミリーに属するピーナツアレルゲンAra h 8と競合的に結合することが報告されている (Hurlburt et al., 2013)。そのため、MLPが疎水性有機汚染物質の結合の競合的な阻害により、農作物の汚染低減に向けた新しいアプローチに結び付くと考えた。本研究では、農業現場で散布されている農薬を用いて、MLPと有機汚染物質との結合の競合的な阻害に成功した。

ケミカルアレイスクリーニングは、真菌毒素の生産を担う合成酵素の阻害剤を得ることに成功したように、MLPとの結合能の高い化合物を同定するのに適した方法であると考えた (Maeda et al., 2017)。本研究で使用したMLPは、化合物アレイ上の242化合物に結合した (表III-1)。ほぼ全ての化合物が芳香環を有しており、MLPは疎水性が高い化合物に結合することが示唆された。また、MLPと類似の立体構造を持つAct d 11がインドール様骨格を持つ化合物と結合することが報告されている (Chruszcz et al., 2013)。そのため、MLPがインドール様骨格を持つ化合物と結合する可能性があると考えた。インドール様骨格を持つ化合物は2種類あり (表III-2)、有機汚染物質に対してMLPの結合を競合的に阻害する化合物として、アミスブルロムを選抜した (図III-1A)。MLPとの結合親和性が高い化合物 (蛍光強度が++又は+++ ) は37化合物あり、キナゾリン様、キノキサリン様、キノリン様骨格を持つ化合物が10種類あった (表III-3)。そこで、キナゾリン様骨格を持つピリフルキナゾンを選抜した (図III-1B)。キナゾリン様、キノキサリン様、キノリン様骨格を持つ化合物との結合親和性がMLPは高いことを発見したのは、初めての報告である。殺菌剤ライメイや殺虫剤コルトはウリ科作物に対して適用があり、これらの農薬の散布は有機汚染物質の低減に向けた実用的な方法であると言える。

アミスブルロムはMLPのピレン及びディルドリンへの結合を*in vitro*で競合的に阻害した。阻

害活性はMLP-PG1よりもMLP-GR3で高かった (図III-1C, D, & E)。この結果は、ケミカルアレイスクリーニングの結果からも支持された。MLP-GR3は、MLP-PG1よりもインドール様骨格を持つ化合物に対する結合親和性が高かった (表III-2)。また、ピリフルキナズンもMLPのピレン及びディルドリンへの結合を競合的に阻害した (図III-1C, D, & F)。ピリフルキナズンは、MLP-GR3よりもMLP-PG1のピレンに対する結合の阻害に対して高い活性を示した (図III-1C & D)。これらの結果は、MLPには、構造の違いから、特定の化合物に対する結合優先性があることを示唆する。アミスブロムとピリフルキナズンは、いずれもウリ科作物の有機汚染物質による汚染の低減に適用可能であると考えられる。

有機汚染物質ペリレンは、主に根組織の内皮と内鞘の細胞膜に局在する(Yamazaki et al., 2015)。従って、根細胞で合成されたMLPは、これらの組織の細胞膜上で有機汚染物質と結合し、MLP-有機汚染物質複合体は、導管に移行する (Goto et al., 2019)。アミスブロムとピリフルキナズンの $\log K_{ow}$ はそれぞれ4.4と3.12であり、高い疎水性を示す (<https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/>)。これらの結果から、これらの農薬も内皮や内鞘の細胞膜に局在し、MLPと有機汚染物質との結合を競合的に阻害すると考えられる。

導管液中のピレン濃度は殺菌剤ライメイと殺虫剤コルトの散布により、有意に低下したことから、アミスブロムとピリフルキナズンが根におけるMLPのピレンへの結合を競合的に阻害したと考えられる (図III-1C & D)。導管液と地上部のPOPs濃度は正の相関があることから、果実中のピレン濃度も低下すると言える (Goto et al., 2019) (図III-2A & B)。植物に散布したピリフルキナズンのモル数はアミスブロムの1/425倍であったが、ディルドリン濃度は殺虫剤コルト散布で有意に低下し、殺菌剤ライメイ散布では低下しなかった (図III-2C)。この理由の一つとして、アミスブロムとピリフルキナズンの競合阻害活性の違いが挙げられる。ピリフルキナズンのMLPのディルドリンに対する結合阻害活性は、アミスブロムのMLPのディルドリンに対する結合阻害活性よりも高い (図III-1E & F)。コルトの活性が高いもう一つの理由は、水への溶解度の差異である。ピリフルキナズンの溶解度は、アミス

ブロムの10倍以上である。そのため、ピリフルキナズンは根圏に拡散しやすく、根に取り込まれやすい。化合物の疎水性は、結合親和性の違いを説明する上で重要な要素である。しかし、ピレンとディルドリンの $\log K_{ow}$ はそれぞれ5.18 (Miller et al., 1985) と5.20 (Namiki et al., 2018) であり、水溶性はほぼ同じである。このことから、ズッキーニにおけるこれらの化合物はほぼ同濃度で蓄積することが示唆される。一方、PCBなどの有機汚染物質では、高高さの違いがズッキーニへの蓄積に大きな違いをもたらした。2,3',4,4',5-pentachlorobiphenyl (CB118) のようなオルト位に塩素を含む嵩高いPCBのズッキーニ植物への蓄積量は、CB126 などのようなオルト位に塩素を含まない平面性PCBの数倍だったが、これらの $\log K_{ow}$ はほぼ同じだった (Matsuo et al., 2011)。ピレンは平面性構造であるが、ディルドリンは嵩高い構造である。従って、本研究では、MLPはピレンよりもディルドリンに対する結合能が高いことが示唆された。従って、殺菌剤ライメイ散布では、ピレン濃度は有意に低下したが、ディルドリン濃度は有意に低下しなかったと考えられる。導管液中のディルドリン濃度を有意に低下させる効果があったのは、殺虫剤コルトの3倍量散布のみであった。

本研究では、MLPと結合親和性を有する農薬の散布により、ズッキーニの有機汚染物質による汚染を低減し。選抜した農薬はMLPと有機汚染物質の結合を競合的に阻害し、導管液中の有機汚染物質の濃度を低下させ、果実の汚染を低減させる可能性を明らかにした。選抜した農薬は安全性試験によりリスク評価されているため、人体への安全性も担保される。本研究は、有機汚染物質の取り込みにおける分子基盤に基づき、作物汚染を低減させた最初の報告である。これまでの研究では、安全な作物を生産するために、物理的・化学的手法による農地土壌の浄化が試みられてきた。ズッキーニ、カボチャ、キュウリなどのウリ科作物はすべて有機汚染物質と結合するMLPを持つため (Iwabuchi et al., 2020)、この方法は多くのウリ科作物に適用可能である。MLPと結合する農薬を散布することで、汚染された土壌でも安全な作物を生産することが可能になる。さらに、農薬の未知の機能の活用を進めることができる。

## 第IV章

### MLPによる病害抵抗性の亢進

本章は以下の出版物を参照されたい。

**Fujita K**, Asume Y, Isono E, Yoshihara R, Uno Y, Inui H. (2022)

MLP-PG1, a major latex-like protein identified in *Cucurbita pepo*, confers resistance through the induction of pathogenesis-related genes

*Planta* 255, 10



#### IV-1. 概要

ズッキーニ由来のMLPであるMLP-PG1が、疎水性有機汚染物質の輸送因子として同定された。MLPは、PR-10と同様にBet v 1ファミリーのメンバーである。しかし、MLPの生理機能は依然として不明である。ここでは、MLP-PG1がPR遺伝子の発現を誘導し、病害抵抗性を間接的に促進することを明らかにした。形質転換タバコの葉におけるMLP-PG1遺伝子プロモーターの活性は、*Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*の接種によって有意に増加した。しかし、MLP-PG1はRNase活性を介した直接的な抵抗性を示さなかった。そこで、MLP-PG1が間接的に抵抗性に関与している可能性を検討し、MLP-PG1が防御関連遺伝子の発現を誘導することを発見した。MLP-PG1遺伝子を過剰発現させた形質転換タバコの葉において、PR-2遺伝子及びPR-5遺伝子の発現が著しく上昇し、*Botrytis cinerea*による病変面積が有意に減少した。この結果は、MLP-PG1がPR遺伝子の誘導を介して、植物病原菌に対する間接的な抵抗性に関与することを示す。本研究は、MLP遺伝子の発現によるPR遺伝子の誘導をRNAシーケンシングから明らかにし、MLP-PG1が抵抗性に関与していることを示した。

## IV-2. 結論

MLPは、ケシのラテックスに含まれる乳腺特異的結合タンパク質として初めて同定された (Nessler et al., 1985)。現在までに、シロイヌナズナ (Wu et al., 2008)、ワタ (Yang et al., 2015)、キュウリ (Suyama et al., 1999)、ブドウ (Zhang et al., 2018)、タバコ (Song et al., 2020)、ズッキーニ (Inui et al., 2013) といった双子葉植物で主に同定されている。MLPは、PRファミリーの一つであるPR-10等と同様にBet v 1ファミリーに含まれる (Fernandes et al., 2013)。

MLPホモログの最も顕著な特徴は、内部の疎水性キャビティを介した疎水性化合物への結合である。シロイヌナズナのMLPであるAt1g24000.1や黄花ルピナス (*Lupinus luteus*) のLIPR-10.2Bはプロゲステロンや合成サイトカニンにそれぞれ結合する (Fernandes et al., 2009; Lytle et al., 2009)。他の特徴は、生物学的ストレスに対する応答である。MLPホモログは、その二次構造中のグリシンリッチループが、病原菌由来のRNAとの相互作用により、病原体に対する抵抗性に重要な役割を果たす (Chadha and Das, 2006)。また、ワタ由来のGh-MLPは、*Verticillium dahliae*の毒素によって誘導されるシスエレメントとして、エリシター応答性エレメントを含む (Chen and Dai, 2010)。さらに、MLP遺伝子の発現は、ET (Aggelis et al., 1997) やJA (Chen and Dai, 2010) など、病害抵抗性に関わる植物ホルモンによって制御される。ETによって誘導されるワタ由来のGhMLP28はエチレン応答因子と相互作用し、*V. dahliae*に対して抵抗性を示す (Yang et al., 2015)。*N. benthamiana*由来のNbMLP28とクワ由来のMuMLPL329はJAシグナル経路を介し、それぞれポテトウイルスY及びファイトプラズマに対して抵抗性を示す (Gai et al., 2018; Song et al., 2020)。従って、MLP遺伝子の発現は、植物ホルモンのシグナル伝達経路を介することにより、病害抵抗性を亢進すると考えられる。

ウリ科作物から同定されたMLPは、疎水性有機汚染物質の輸送因子を担っている (Inui et al., 2013; Goto et al., 2019; Iwabuchi et al., 2020)。MLPは根細胞内で疎水性有機汚染物質と結合し、その複合体は導管に移行する。その結果、疎水性有機汚染物質は果実に輸送される (Goto et al., 2019)。我々のこれまでの研究では、MLP遺伝子の発現の抑制により、疎水性有機汚染物

質の蓄積を抑制することで、安全な作物生産に結び付くことが実証された (Fujita et al., 2020a; Inui et al., 2020)。しかし、ウリ科作物におけるMLPの生理機能については、これまでに研究が進んでいない。

本研究では、ズッキーニから同定したMLP-PG1の生理機能を、病害抵抗性に着目して解明した。*Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* (*Pst*) の接種により、*MLP-PG1*遺伝子のプロモーターが活性化することを明らかにした。しかし、*MLP-PG1*はグリシンリッチループを保有しているにもかかわらず、直接的な抗菌活性を示さなかった。一方、*MLP-PG1*遺伝子を過剰発現させると、*PR-2*遺伝子及び*PR-5*遺伝子の発現量が増加し、*Botrytis cinerea*に対する抵抗性が亢進された。従って、本研究は、*MLP-PG1*により間接的な抗菌活性への関与を明確に示している。

### IV-3 材料と方法

#### 植物材料

ズッキーニ *ovifera* 亜種の PG 品種の種子を Johnny's Selected Seeds から購入した。種皮を除去した後、種子を水道水中で 4°C、一晩培養し、ガラス瓶に入れた滅菌土壌 (ハイポネックスジャパン株式会社) に播種した。この苗を 26°C、16/8 時間の明暗サイクルで栽培した。各器官 (蕾、花、葉、茎、根) を液体窒素で粉砕し、使用時まで -80°C で保存した。

滅菌した形質転換タバコの種子を、24°C、16/8 時間明暗サイクル下で MS 培地に播種した (Murashige and Skoog, 1962)。2 週間後、9 cm プラスチックポットに入れた滅菌土壌 (ハイポネックスジャパン株式会社) に苗を移し替えた。

#### 植物ホルモン処理

PG 品種の苗を水道水にて 26°C、16/8 時間明暗サイクルで栽培した。2 週間後、0.1 mM メチルジャスモン酸 (MeJA)、0.1 mM 1-aminocyclopropane-1-carboxylic acid (ACC)、又は 0.1 mM SA を含む水溶液に移し替えた。植物ホルモン処理後 0 時間、1.5 時間、3 時間後に根を採取し、液体窒素で凍結した後、粉砕して使用時まで -80°C で保存した。

#### 発現解析

RNA 抽出及び qRT-PCR は、我々の既報に従って実施した (Inui et al., 2020)。ズッキーニの器官及び形質転換タバコの葉から TRIzol (Thermo Fisher Scientific Inc.) を用いて RNA を抽出した。ReverTra Ace qPCR RT Master Mix with gDNA Remover (東洋紡株式会社) を加えてゲノム DNA を除去した後、RNA を RT Master Mix で処理し、cDNA を合成した。qRT-PCR は Thunderbird SYBR qPCR Mix (東洋紡株式会社) とプライマー (補足表 IV-1) を用いて、Light Cycler 480 II (Roche Applied Science) を用いて、95°C で 1 分; 95°C で 15 秒、60°C で 30 秒の 40-60 サイクル; 95°C で 5 秒; 65°C で 1 分の条件で行った。各遺伝子の相対発現量は  $\Delta\Delta\text{CT}$  法により算出し、内部コン

トロールにはアクチンの発現量を用いた。

### RNAシーケンス (RNA-seq)

6週齢の *MLP-PGI* 遺伝子を過剰発現させた形質転換タバコの葉から、Plant Total RNA Extraction Miniprep System (Viogene-Biotek Corp) を用いて、RNAを抽出した。RNA-seq解析は、マクロジェン・ジャパン株式会社に委託した。

### *MLP-PGI* 遺伝子のプロモーター領域のクローニング

*MLP-PGI* 遺伝子のプロモーター領域は、以前の報告に従ってTAIL-PCRによってクローニングされた (Liu et al., 1995; Fujita et al., 2020a)。まず、3つのプライマーAD1-AD3、TAIL-specific1-asからTAIL-specific3-asを用いてTAIL-PCRを実施した。他の9つの特異的アンチセンスプライマー、TAIL-specific4-asからTAIL-specific12-asは、さらに上流領域を増幅するために、クローン化した配列を参照して設計した。ズッキーニPG品種から抽出したゲノムDNAを鋳型とし、2xQuick Taq HS DyeMix (東洋紡株式会社) を用いてPCR反応を行った。TAIL-PCRの反応条件は過去の報告のPCR条件に従ったが (Liu and Whittier, 1995)、プライマーと特異的プライマーのアニーリング温度をそれぞれ30-44°C、64-65°Cに変更した。

PG品種の1ヶ月齢の葉をサンプリングし、Isoplantキット (ニッポンジーン社) を用いてゲノムDNAを抽出した。*MLP-PGI* 遺伝子のプロモーター領域を含むDNA断片は、100 ngのゲノムDNAとプライマーPG-PG1-P-s1及びPG-PG-P-asを用いて、以下の条件でKOD FX Neo polymerase (東洋紡株式会社) により、94°Cで5分間; 94°Cで30秒、56°Cで30秒、72°Cで2分間の32サイクル; 及び72°Cで7分間の条件で増幅した。増幅された断片をGel/PCR DNA Isolation System (Viogene-Biotek Corp) を用いて精製した。最終的に2075 bpの断片を増幅し、In-Fusion HD Cloning Kit (タカラバイオ株式会社) を用いて、*Hind* IIIと*Xba* Iで切断したベクターpBI221に挿入した。配列決定後、*Hind* IIIと*Sac* Iで切断した*MLP-PGI* 遺伝子プロモーターと*GUS* 遺

伝子を含む断片を、両方の制限酵素で消化した植物発現ベクターpGWB402Ω(島根大学・中川博士より提供)とライゲーションした。

#### 形質転換タバコの作製

カリフラワーモザイクウイルス35Sプロモーター (35S) により、*MLP-PGI* 遺伝子を過剰発現する形質転換タバコを作製した (Stoykova and Inui, 2021)。*MLP-PGI*(AB753855) (Inui et al., 2013) を含むプラスミド pTMLP-PG1-2 を植物発現ベクター pGWB502Ω (Nakagawa et al., 2007) と反応させ、pGWB-MLP-PG1 が構築された。

*MLP pro::GUS* 及び *35S::MLP-PGI* を含む植物発現プラスミドを *R. radiobacter* LBA4404 株に導入し、リーフディスク法を用いてトランスジェニック系統を作出した (Horsch et al., 1985)。

#### 形質転換タバコへの病原菌の接種

*Pst* MAFF No.301612 (農業・食品産業技術総合研究機構) を King's B 液体培地 (1% [w/v] peptone, 0.15% [w/v]  $K_2HPO_4$ , 1.5% [w/v] glycerol, 0.015% [w/v]  $MgSO_4$ ) で 30°C、一晩培養した。遠心分離後、沈殿を 10 mM  $MgCl_2$  で希釈した。6週齢の形質転換タバコを、20  $\mu$ L の細菌懸濁液 ( $5 \times 10^6$  cells/mL) を針の無いシリンジで葉の表面に接種した。*B. cinerea* No. 712108 (農業・食品産業技術総合研究機構) をポテトデキストロース寒天培地 (0.4% [w/v] バレイシヨ, 2% [w/v] グルコース, 1.5% [w/v] アガロース) 上で 20°C、5日間培養した。ブラックライトブルー照射下で3日間孢子を形成させた。1%ペプトンを含む滅菌水中の孢子懸濁液 ( $2 \times 10^5$  cells/mL) を6週齢の形質転換タバコの葉に散布した。接種した植物をトレイに移し、蓋をして湿度を100%に保ち、23°C暗黒条件下で24時間培養した後、蓋を取り、病斑が形成されるまで12/12時間明暗サイクルで23°Cにて培養した。接種4日後の葉と病斑の面積を ImageJにより定量した (Schneider et al., 2012)。

### RNase活性アッセイ

3週齢のズッキーニの根を水道水で洗浄し、液体窒素中で粉砕した。RNAは、前述の通り、根の試料から抽出した。Tris-HCl (pH7.0) 中のRNA 9.5 µg及び組換えMLP-PG1 10 µgを含む反応混合物 (合計50 µL) を、25°Cで0.5時間、1時間、2時間インキュベートした。煮沸した組換えMLP-PG1をネガティブコントロールとして使用した。反応混合物からRNAを単離した後、エタノール沈殿によりRNAを沈殿させ、1%アガロースゲルで電気泳動を行った。

### GUSアッセイ

*Pst*接種後、0時間、12時間、24時間、48時間で接種点のリーフディスクを採取した。葉身は液体窒素で凍結し、タンパク質抽出用バッファー (50 mM リン酸ナトリウムバッファー [pH7.0], 10 mM EDTA [pH8.0], 0.1% [v/v] Triton X-100, 0.5% [w/v] *N*-lauroylsarcosine sodium salt, 0.072% (v/v) 2-mercaptoethanol) で混和し、遠心分離した。4°C、20,700×g、5分間の遠心分離後、上清を既報に従ってGUSアッセイに供した (Fujita et al., 2020a)。

### 塩基配列の解析

MUSCLE tool (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/muscle/>) を用いてアライメントを行い、ESPrint 3.0を用いて保存残基と二次構造を作成した。MLP-PG1の立体構造は、SWISS-MODELを用いてキウイアレルゲンAct d 11 (PDB: 4IHR) を鋳型として構築した (Arnold et al., 2006)。MLP-PGI遺伝子のクローニングされた2075 bpのプロモーター領域は、Plant *cis*-acting regulatory DNA elements (PLACE) データベースによって解析した (Higo et al., 1999)。

### 統計解析

Rstudioバージョン1.3.1073 (<http://www.rstudio.com>) を用いて、処理間の有意差の判定にDunnettの多重比較検定を適用した。

#### IV-4. 結果

##### MLP-PG1とMLPオルソログの塩基配列のアライメント

MLP-PG1の配列は、比較したMLPオルソログと類似していた (図IV-1A)。MLP-PG1とそのMLPオルソログは、 $\beta 2$ と $\beta 3$ の間のグリシンリッチループをGXXXXXGモチーフとして含んでいた (図IV-1A)。MLP-PG1の予測される立体構造は、3つの $\alpha$ ヘリックスと7つの $\beta$ シートという典型的な二次構造を示していた (図IV-1B)。

##### MLP-PGI遺伝子の発現プロファイル

ズッキーニPG品種の地上部 (蕾、花、葉、茎) におけるMLP-PGI遺伝子の発現量は、非常に低かった (図IV-1C)。しかし、MLP-PGI遺伝子は根で極めて高い発現量を示した (図IV-2.A)。そこで、MeJA、ACC、SAで処理したズッキーニの根におけるMLP-PGI遺伝子の発現量を解析し、MLP-PG1と防御関連植物ホルモンの介在を検討した。MeJA処理では、MLP-PGI遺伝子の発現が誘導される傾向があった (図IV-1D)。一方、ACC及びSA処理では、MLP-PGI遺伝子の発現が抑制される傾向及び変化しない傾向がそれぞれ見られた (図IV-1D)。

##### MLP-PGI遺伝子のプロモーター活性の誘導

生物的ストレス応答に関連するシスエレメントには、GT-1、WRKY結合部位、ELREなどがあった (表IV-1)。Pstを接種した形質転換タバコにおいて、MLP-PGI遺伝子の転写活性を調査した。空ベクター (VC) を発現する形質転換タバコでは、接種によりGUS活性は上昇しなかった (図IV-2A)。一方、MLP-PGI *pro:: GUS*を発現する形質転換タバコでは、接種後48時間でGUS活性が有意に上昇した (図IV-2B)。コントロールとして、両植物への10 mM MgCl<sub>2</sub>処理では、GUS活性の増加は見られなかった (図IV-2A & B)。

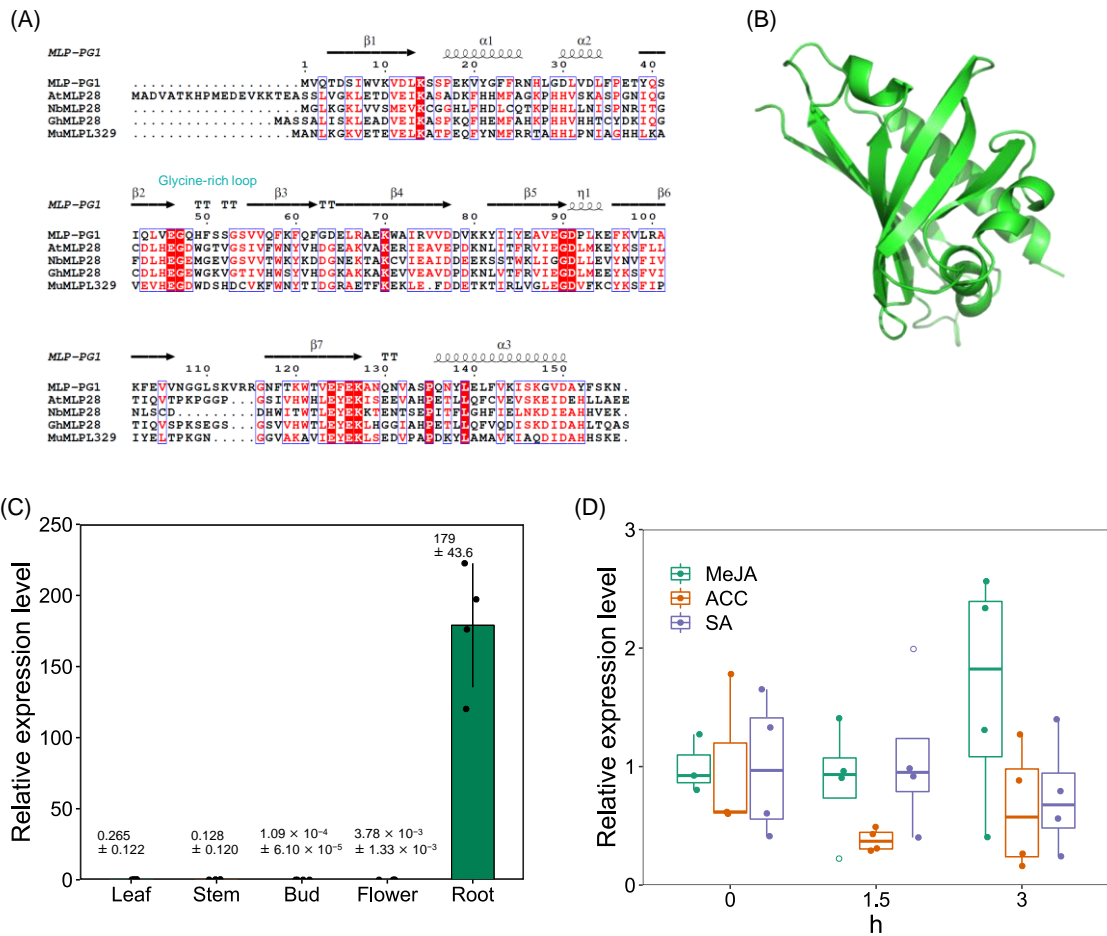
##### MLP-PGI遺伝子を過剰発現する形質転換タバコにおいて特異的に発現する遺伝子



組換えMLP-PG1を大腸菌から精製し、ズッキーニの根から得たRNAを基質としてMLP-PG1のRNase活性を検討した。MLP-PG1による処理では、煮沸したMLP-PG1と同様にRNAのバンドは移行せず、MLP-PG1がRNase活性を有していないことが示された (図IV-2C)。次に、*MLP-PGI*遺伝子を過剰発現させた形質転換タバコの葉のRNA-seq解析を行い、防御関連遺伝子の誘導を調査した。*MLP-PGI*遺伝子を過剰発現させた形質転換タバコの葉において、*VC*と比較して発現量が増加した上位10遺伝子を表IV-2に示す。上位2つの遺伝子は、グルカンエンド-1,3-β-グルコシダーゼ遺伝子 (LOC107823411及びLOC107801151)であった (表IV-2)。これらの転写産物は85.6倍及び82.1倍で誘導された。オスモチン様遺伝子 (LOC107794478、LOC107794479、LOC107787819) も上位10遺伝子に含まれた (表IV-2)。これらの転写産物は56.9倍、43.4倍、36.5倍で誘導された。*PR-2*遺伝子と*PR-5*遺伝子はそれぞれグルカンエンド-1,3-β-グルコシダーゼとオスモチンをコードしているので、RNA-seqの結果を検証するために、*MLP-PGI*遺伝子を過剰発現させた形質転換タバコで*PR-2*遺伝子と*PR-5*遺伝子の発現解析を行った。*PR-2*遺伝子は165倍、*PR-5*遺伝子は87.1倍と有意に誘導された (図IV-3A)。

#### *MLP-PGI*遺伝子を過剰発現させた形質転換タバコにおける*B. cinerea*による反応の減少

ズッキーニの形質転換は技術的に困難であったため、*MLP-PGI*遺伝子を過剰発現させた形質転換タバコを使用した。野生型 (WT)、空ベクター (*VC*) を発現する形質転換タバコ、*MLP-PGI*遺伝子を過剰発現する形質転換タバコ (#13及び#28) に*B. cinerea*の接種を行った。これは、*PR-2*遺伝子と*PR-5*遺伝子が*B. cinerea*の接種により誘導されるためである (Hatmi et al., 2014)。接種4日後、WT及び*VC*の葉に多くの壊死性病斑が形成された (図IV-3B)。しかし、*MLP-PGI*遺伝子を過剰発現する形質転換タバコの両系統の病斑面積は、WT及び*VC*の病変面積と比較して有意に減少した (図IV-3C)。WT及び*VC*では、病斑面積に有意な変化は無かった (図IV-3C)。



図IV-1. MLP-PG1の構造と遺伝子発現プロファイル

(A) MLPのアラインメント

MLP-PG1 (AB753855)、AtMLP28 (AT1G70830)、NbMLP28 (MK780769)、GhMLP28 (DQ123838.1)、MuMLPL329 (MG871460) のアミノ酸配列。全タンパク質と一部のタンパク質で保存されている残基をそれぞれ白抜きと赤字で記載した。ηとTTはそれぞれ3<sup>10</sup>-helixとβ-turnを表す。

(B) MLP-PG1の推定立体構造

SWISS-MODEL (Arnold et al., 2006) を用いてキウイアレルゲンAct d 11 (4IHR) をテンプレートとして構築し、図はPyMOLにより作成した (Delano, 2005)。

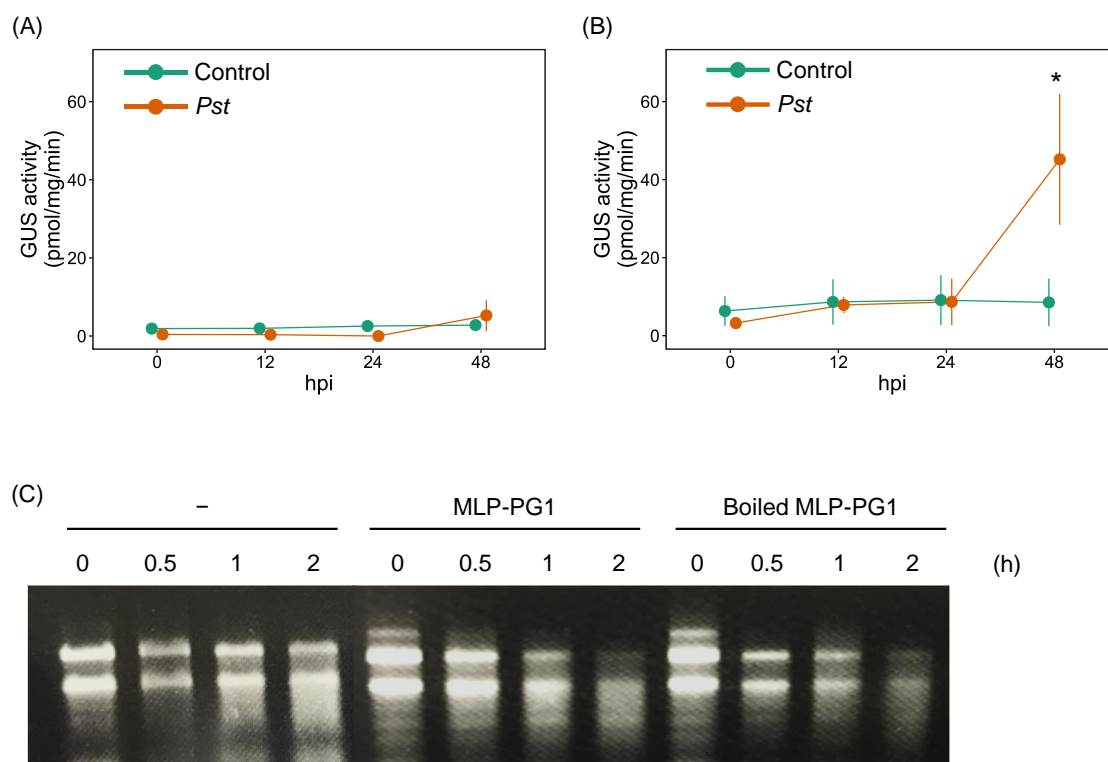
(C) ズッキーニの器官におけるMLP-PG1遺伝子の発現量

ズッキーニPG品種を26°Cで16/8時間の明暗サイクルの下で栽培した。2週齢のズッキーニ植

物から葉、莖、根を採取した。蕾と花は、形成後に採取した。RNAを抽出し、qRT-PCRに供した。エラーバーは標準偏差を示す ( $n = 4$ )。プライマーの配列を補足表IV-1に示す。

(D) MeJA、ACC、SAで処理したズッキーニの根における*MLP-PGI*遺伝子の発現量

ズッキーニPG品種の苗を26°C、16/8時間の明暗サイクルで水耕栽培した。2週間後、苗を0.1 mM MeJA、0.1 mM ACC、0.1 mM SAを含む水に移し替えた。根を0時間、1.5時間、3時間で回収し、RNAを抽出した後、qRT-PCRに供した。各処理における発現量は、0時間処理時の発現量との相対値で算出した。プライマーの配列を補足表IV-1に示す。



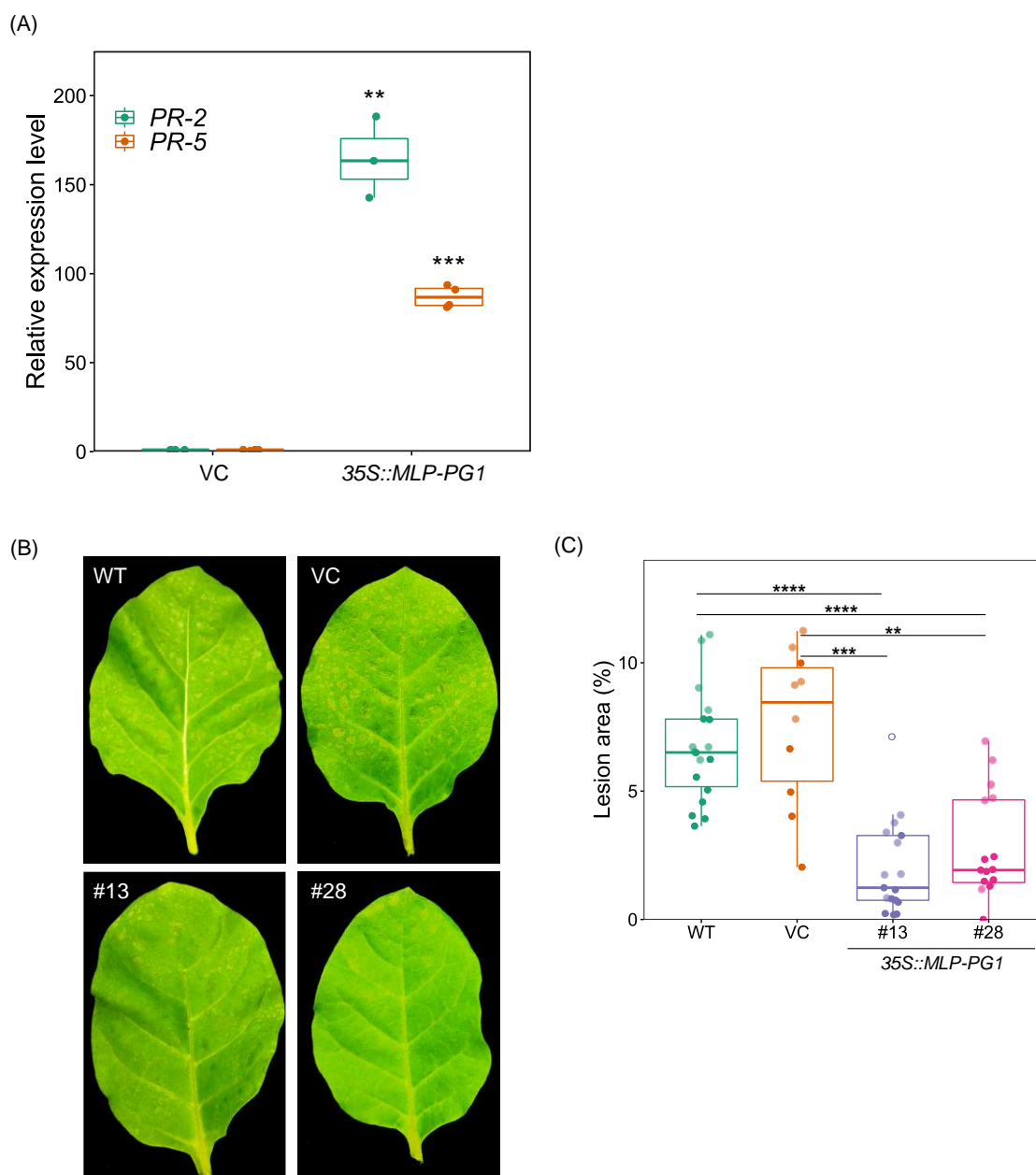
図IV-2. 病原菌感染に対するMLP-PG1の応答

(A) (B) *Pst*を接種した形質転換タバコの葉におけるレポーター遺伝子の発現誘導

VC (A) 及びMLP-PG1 *pro::GUS* (B) を発現する7週齢の形質転換タバコに、 $5 \times 10^6$ 個/ml *Pst*を16/8時間明暗サイクル、24°C下で接種した。各植物の葉タンパク質を抽出し、GUSアッセイを行った。エラーバーは標準偏差を示す ( $n=3-4$ )。コントロールとして、10 mM MgCl<sub>2</sub>を接種した。アスタリスクは、*Pst*接種前 (0時間) のMLP-PG1 *pro::GUS*を発現する形質転換タバコのGUS活性と比較した有意差を示す (\*,  $p < 0.05$ )。hpi; 接種後時間。

(C) MLP-PG1のRNase活性

組換えMLP-PG1 10 µgを3週齢のズッキーニの根から抽出したRNAと25°Cで0.5、1、2時間インキュベートした。反応物からRNAを抽出、精製し、1%アガロースゲルで電気泳動を行った。-は、組換えMLP-PG1非存在下でTris-HCl緩衝液中でインキュベートしたRNAを表す。組換えMLP-PG1を100°Cで10分間煮沸したものをネガティブコントロールとして使用した。



図IV-3. *PR*遺伝子の発現誘導を介したMLP-PG1が示す病害抵抗性

(A) *MLP-PG1*遺伝子を過剰発現した形質転換タバコの葉における*PR*遺伝子の発現解析

*MLP-PG1*を過剰発現した形質転換タバコを、24°Cで16/8時間の明暗サイクルのもとで栽培した。6週間後、葉を回収した。RNAを抽出し、qRT-PCRに供した。プライマーの配列を補足表IV-1に示す。アスタリスクは、*VC*を発現する形質転換タバコの葉における相対発現量と比較した有意差を示す (\*\*,  $p < 0.01$ ; \*\*\*,  $p < 0.001$ )。

(B) (C) *MLP-PG1*遺伝子を過剰発現させた形質転換タバコにおける*B. cinerea*に対する抵抗性

*MLP-PGI*遺伝子を過剰発現した形質転換タバコを16/8時間の明暗サイクルで24°Cにて栽培した。6週間後、孢子懸濁液 ( $2 \times 10^5$  cells/mL) を葉に噴霧することにより、*B. cinerea*を接種し、4日後、葉を回収した。代表的な葉を示し (B)、葉の病斑面積をImageJにより定量した (C)。プロットの色濃さは、異なる実験を示す。アスタリスクは、WT及びVCの葉の病変領域と比較した有意差を示す (\*\*,  $p < 0.01$ ; \*\*\*,  $p < 0.001$ , \*\*\*\*,  $p < 0.0001$ )。

表IV-1. ストレス応答に関わるMLP-PGI遺伝子プロモーターに存在するシスエレメント

Site	Amount	Sequence	Function
GT-1	16	GAAAAA	Response to light, pathogens, and salt
ARR1	15	NGATT	Response to cytokinin
WRKY binding site	12	TGAC	Response to pathogens
MYB binding site	4	CNGTTR	Response to water stress
ACGT	3	ACGT	Response to dehydration
BBF binding site	3	ACTTTA	Response to auxin
Inr	2	YTCANTYY	Response to light
MYC binding site	2	CANNTG	Response to dehydration
MYB binding site	2	YAACKG	Response to dehydration
ELRE	2	TTGACC	Elicitor Responsive Element
LTRE	1	CCGAC	Low temperature-responsive element
SURE	1	GAGAC	Response to auxin
GARE	1	TAACAGA	Gibberellin-responsive element

クローニングしたMLP-PGI遺伝子のプロモーター領域をPLACEにより解析した。

表IV-2. *MLP-PG1*遺伝子を過剰発現する形質転換タバコの葉において誘導された上位10の

遺伝子

Gene symbol	Fold change (35S:: <i>MLP-PG1/VC</i> )	Transcript
LOC107823411	85.9	<i>glucan endo-1,3-β-glucosidase, basic vacuolar</i>
LOC107801151	82.4	<i>glucan endo-1,3-β-glucosidase, basic vacuolar</i>
LOC107773727	74.0	<i>auxin-binding protein ABP19a-like</i>
LOC107794478	57.0	<i>osmotin-like protein</i>
LOC107815767	50.6	<i>14 kDa proline-rich protein DC2.15-like</i>
LOC107806690	49.8	<i>auxin-binding protein ABP19a-like</i>
LOC107794479	43.4	<i>osmotin-like</i>
LOC107787819	36.6	<i>osmotin</i>
LOC107794480	36.5	<i>proteinase inhibitor I-B</i>
LOC107768773	28.8	<i>carbonic anhydrase, chloroplastic</i>

*MLP-PGI*遺伝子を過剰発現させた形質転換タバコを、16/8 時間の明暗サイクル、24°Cで栽培した。6週間後、葉からRNAを抽出し、RNA-seqを行った。*MLP-PGI*遺伝子を過剰発現させた形質転換タバコで発現が誘導された上位10遺伝子をリストアップした。



補足表IV-1. プライマー配列

Primer	Sequence
NtActin/qPCR-s	5'-ATTACCATCGGTGCTGAACG-3'
NtActin/qPCR-as	5'-CCAATCATTGAAGGTTGGAAA-3'
NtPR-2/qPCR-s	5'-GACATGACCTTGATTGGAAACTC-3'
NtPR-2/qPCR-as	5'-AAACCACCTAGCATCGTTCC-3'
NtPR-5/qPCR-s	5'-TGGTGGAGTCCTACAATGCAC-3'
NtPR-5/qPCR-as	5'-AATGCGTATTCGGCCAAG-3'
CpActin/qPCR-s	5'-TCCAGGCCGTTTTATCTC-3'
CpActin/qPCR-as	5'-CAGAATCCAACACAATACCTGT-3'
MLP-PG1/qPCR-s	5'-ATTCAAAGTGCTAAGAGCAAAT-3'
MLP-PG1/qPCR-as	5'-CCTTTTCAAACCAACAGTCCA-3'
MLP-GR3/qPCR-s	5'-AATTCAAAGTGCTTAGAGCAAAGG-3'
MLP-GR3/qPCR-as	5'-TGCCTTTTCAAACCAATAGTCAA-3'
TAIL-specific1-as	5'-GGTCAACCTTTACCCAAATGCTATC-3'
TAIL-specific2-as	5'-CTCCCAAATGGTTCCTGAAGAACCC-3'
TAIL-specific3-as	5'-CAGGAAACAAGTCCACCAAATCTCCC-3'
TAIL-specific4-as	5'-GTTGCGAGGGTTTGTGTCCAAACTAG-3'
TAIL-specific5-as	5'-GCATAAATGTGAGATCGCATATCGATTGG-3'
TAIL-specific6-as	5'-CGATTGGAGAGGGAAATGAAATGTTCC-3'
TAIL-specific7-as	5'-TCGAGCCCCGAAAATTCTCCACGGTA-3'
TAIL-specific8-as	5'-GGTGGTGGGATGGAGGAAGACATCTC-3'
TAIL-specific9-as	5'-CGAGTATTAGAAGATAGCATAGAAGG-3'
TAIL-specific10-as	5'-GGCTAACAGCTTCCATCAATAATCCC-3'
TAIL-specific11-as	5'-CCCTTTATTGCACTAAATTAAGCATAC-3'
TAIL-specific12-as	5'-CTAATGTCATCTTACAGGTTGGGTAGG-3'
AD1	5'-NGTCGASWGANAWGAA-3'
AD2	5'-GTNCGASWCANAWGTT-3'
AD3	5'-WGTGNAGWANCANAGA-3'
PG-PG1-P-s1	5'-TGATTACGCCAAGCTTAACATTACTTTACACATCTT-3'
PG-PG1-P-as	5'-CCGGGGATCCTCTAGTTTCTTTTGTGATGTGATGCAA-3'

#### IV-5. 考察

本研究の目的は、生物的ストレスに関連するMLP-PG1の生理機能を解明することである。調査したズッキーニの器官の中で、*MLP-PGI*遺伝子は根で最も高い発現量を示した (図IV-1C)。*MLP*遺伝子には根で高発現するものもあるが (Yang et al., 2015; Song et al., 2020)、*MLP-PGI*遺伝子は他の植物の*MLP*遺伝子と比較して顕著に高い根での発現量を示した。*MLP-PGI*遺伝子のプロモーター領域には、病原菌の感染によって誘導されるシスエレメントを含んでおり (表IV-1)、*MLP-PGI*遺伝子のプロモーター活性は、*Pst*の接種によって増加した (図IV-2A & B)。これまでの報告で、MLPが土壌伝染性病原体に対する抵抗性を付与することが示されている (Yang et al., 2015; Holmquist et al., 2020)。このことから、MLP-PG1が*Didymella bryoniae*のような土壌伝染性病原体に対する抵抗性に特化していることが示唆された。*MLP-PGI*遺伝子の発現はMeJA処理で誘導される傾向にあったが、ACC処理で抑制された (図IV-1D)。従って、*MLP-PGI*遺伝子はJA処理によって誘導され、necrotrophicな病原菌の抵抗性経路が活性化されると考えられる。SA処理は*MLP-PGI*遺伝子の発現に影響を与えなかった。一方、*PR-10*遺伝子はSAシグナル伝達経路の下流に位置し、SA処理により誘導され、biotrophicな病原菌の抵抗性経路が活性化される (McGee et al., 2001; Ma et al., 2018)。従って、*MLP-PGI*遺伝子を過剰発現する形質転換タバコは、*B. cinerea*のようなnecrotrophicな病原体に対して抵抗性を示す (Williamson et al., 2007)。また、植物には*MLP*遺伝子と*PR-10*遺伝子の両方を持つものがあり (Pühringer et al., 2000; Lebel et al., 2010; Zhang et al., 2018; Yuan et al., 2020)、それぞれnecrotrophicな病原体やbiotrophicな病原菌に対する防御に重要な役割を担っていると考えられる。しかし、*PR-10*遺伝子はズッキーニでは同定されていない。従って、ズッキーニでは、MLPが両方のタイプの病原体に対する防御に重要な役割を担っていると考えられる。

*PR-10*は、グリシンリッチループを介して植物病原菌に対してRNase活性を発揮する (Flores et al., 2002; Chadha and Das, 2006)。本研究では、MLP-PG1はグリシンリッチループを持ちな

がら、RNase活性を示さなかった (図IV-2C)。そこで、MLP-PG1が病害抵抗性遺伝子の誘導による間接抵抗性に関与していると考えた。RNA-seqの結果、MLP-PGI遺伝子を過剰発現させた形質転換タバコでは、PR-2遺伝子とPR-5遺伝子が発現量上位10遺伝子に含まれていることが判明した。PR-2遺伝子は $\beta$ -1,3-グルカナーゼをコードし、PR-5遺伝子はオスモチン、タウマチン、ゼアマチンをコードしている (Nawrath and Métraux, 1999; Liu et al., 2016; Zhang et al., 2019)。これらのタンパク質は塩基性で抗菌活性を示し、塩基性PR遺伝子はJAによって誘導される (Niki et al., 1998)。よって、MLP-PGI遺伝子を過剰発現させた形質転換タバコでは、PR-2遺伝子及びPR-5遺伝子の発現により、*B. cinerea*による病斑面積が著しく減少することが示唆された (図IV-3C)。MLP遺伝子とPR-5遺伝子は、リンゴ (Shi et al., 2014) とブドウ (Davies and Robinson, 2000) の果実や、テンサイの根で発現している (Kloos et al., 2002)。また、タバコでは、MLP遺伝子、PR-2遺伝子、PR-5遺伝子が花芽形成時に誘導される (Neale et al., 1990)。さらに、GhMLP28はエチレン応答性因子6 (ERF6) と相互作用し、PR-5遺伝子のプロモーター領域へのERF6の結合能を高めることでPR-2遺伝子とPR-5遺伝子を誘導する (Yang et al., 2015)。MLPがその相互作用タンパク質の誘導により、抵抗性を高めていると考えられる。今回の結果は、過去の報告と合わせて、MLPがズッキーニの生殖成長及び病原菌感染時にPR-2遺伝子及びPR-5遺伝子を誘導することを示唆する。

MLP-PG1の最も顕著な特徴は、根から導管を經由して葉に至る長距離輸送を行うことである (Goto et al., 2019)。従って、MLP-PG1は全身獲得抵抗性 (SAR) にも関与すると考えられる。根での病原菌の感染によってMLP-PGI遺伝子が誘導された後、MLP-PG1は根から地上部に輸送され、葉でPR-2遺伝子やPR-5遺伝子を誘導する可能性がある。篩管液中のMLP遺伝子は、病原菌の感染によって誘導される (Carella et al., 2016; Gai et al., 2018)。また、Bet v 1ファミリーのタンパク質は内部に疎水性のキャビティを持ち、MLP-PG1は疎水性化合物に結合する (Fernandes et al., 2013; Goto et al., 2019)。このことから、MLP-PG1はデヒドロアビエチナルなどの疎水性のSARシグナル分子を葉に輸送し、SARを誘導するとも考えられる

(Chaturvedi et al., 2012; Carella et al., 2016)。従って、MLP-PG1の長距離輸送能は、SARシグナル分子の輸送により、ズッキーニの葉のPR遺伝子の誘導に寄与すると考えられる。しかし、SAR経路はSAシグナル経路によって活性化されるが (Choudhary et al., 2007)、MLP-PG1遺伝子はMeJAによって誘導される (図IV-1D)。そのため、MLP-PG1は、JAシグナル伝達経路を介して根圏微生物によって活性化される誘導全身抵抗性 (ISR) に関与している可能性がある (Romera et al., 2019)。塩基性PR遺伝子はJAによって誘導され (Niki et al., 1998)、ISRも塩基性PR遺伝子を誘導すると考えられている。RNA-seqにより、MLP-PG1が塩基性タンパク質である $\beta$ -1,3-グルカナーゼをコードするPR-2遺伝子とオスモチンをコードするPR-5遺伝子を誘導した (Niki et al., 1998) (表IV-2)。MLP-PG1遺伝子は根で高発現しており(図IV-1C)、導管を介して輸送される (Goto et al., 2019)。従って、MLP-PG1はSARよりもむしろISRにおいて中心的な役割を果たす可能性が高いと考えられる。

本研究では、ウリ科作物において疎水性有機汚染物質の輸送を担うMLP-PG1の生理機能に焦点を当てた。RNA-seqにより、MLP-PG1遺伝子の過剰発現はPR-2遺伝子及びPR-5遺伝子を誘導することを示した。さらに、MLP-PG1遺伝子を過剰発現させた形質転換タバコでは、*B. cinerea*による病斑面積が有意に減少した。これらの結果は、MLP-PG1がPR遺伝子を誘導し、ズッキーニの病害抵抗性の亢進を示唆する。しかし、MLP-PG1によるこれらの遺伝子の誘導のメカニズムはまだ不明であり、今後の研究が必要である。

## 第V章

### MLP遺伝子の発現制御機構の解明

本章は以下の出版物を参照されたい。

**Fujita K**, Yoshihara R, Hirota M, Goto J, Sonoda C, Inui H. (2022)

AN1/A20 zinc-finger proteins positively regulate major latex-like proteins, transporting factors for dioxin-like compounds in *Cucurbita pepo*

*Chemosphere* 305, 135536

## V-1. 概要

ウリ科作物は、果実にダイオキシシン様化合物を高濃度に蓄積する。我々は以前、ダイオキシシン様化合物を高濃度に蓄積するズッキーニ *pepo* 亜種において、*A20/AN1 zinc finger protein (ZFP)* 遺伝子が高発現することを明らかにした。*A20/AN1 ZFP* 遺伝子を過剰発現させた形質転換タバコは、地上部にダイオキシシン様化合物を蓄積した。しかし、*A20/AN1 ZFP* によって制御されるダイオキシシン様化合物の蓄積のメカニズムは不明であった。本研究では、*A20/AN1 ZFP* がタバコとズッキーニの *MLP* とそのホモログ遺伝子の発現を誘導することを明らかにした。*MLP* は、ズッキーニの根から地上部へのダイオキシシン様化合物の輸送に関与している。タバコで *A20/AN1 ZFP* 遺伝子を過剰発現させると、ダイオキシシン様化合物に対する結合能を持つ *PR-10* 遺伝子の発現が上昇した。したがって、*A20/AN1 ZFP* は *in vivo* で *MLP* 遺伝子を誘導すると考えられた。すなわち、*A20/AN1 ZFP* はタバコおよびズッキーニの *MLP* とそのホモログ遺伝子を誘導し、ダイオキシシン様化合物の蓄積をもたらすことが明らかとなった。

## V-2. 結論

ダイオキシン様化合物は、食物連鎖を介した生物濃縮によりヒトに蓄積される。ダイオキシン様化合物の摂取は、発がん性や神経毒性など、人体への高い毒性をもたらす。そのため、陸上生態系における生産者である植物へのダイオキシン様化合物の取り込みの抑制は重要である。しかし、廃棄物処理場からのダイオキシン様化合物の流入により、農地からダイオキシン様化合物が検出された (Shen et al., 2009)。そのため、作物のダイオキシン様化合物による汚染が懸念されている。キュウリ、メロン、ズッキーニなどのウリ科作物は、他の作物と比較して、地上部にダイオキシン様化合物を蓄積する (Otani et al., 2007)。特に、ズッキーニはダイオキシン様化合物を高濃度に蓄積する (Hülster et al., 1994; Inui et al., 2008; Inui et al., 2011)。

ズッキーニ9品種の導管液タンパク質において17 kDaのタンパク質に量的な差が認められ、17 kDaタンパク質のバンドの強度とダイオキシン様化合物の蓄積のしやすさには、有意な正の相関があった (Inui et al., 2013)。17kDaのタンパク質は、Bet v 1ファミリーのタンパク質であるMLPと同定された。MLPはケシのラテックスから最初に発見され (Nessler et al., 1985)、その後に複数の植物で同定されている (Fujita & Inui 2021)。MLPは、病害抵抗性の向上 (Fujita et al., 2022) や乾燥耐性 (Wang et al., 2016) に関与する。MLPの特徴は、疎水性のキャビティと長距離輸送能である。MLPは、ステロイド (Lytle et al., 2009) や長鎖脂肪酸 (Choi et al., 2015)に結合する。また、導管 (Goto et al., 2019; Iwabuchi et al., 2020) や篩管 (Gai et al. 2018; Li et al. 2013) から検出される。これらの結果は、MLPが疎水性化合物を長距離輸送することを示唆する。ウリ科作物のMLPは、*in vitro*でダイオキシン様化合物と結合し、根や導管液中に検出される (Goto et al. 2019; Inui et al. 2013; Iwabuchi et al. 2020)。そのため、MLPが根でダイオキシン様化合物と結合し、MLP-ダイオキシン様化合物複合体が導管を介して地上部に輸送される。

ズッキーニはダイオキシン様化合物の蓄積において亜種間差を示し、ズッキーニ*pepo*亜種は

ズッキーニ *ovifera* 亜種より高濃度にダイオキシン様化合物を蓄積する (Inui et al., 2008)。  
*A20/AN1 zinc finger protein (ZFP)* 遺伝子は *pepo* 亜種の根に高発現している。また、*A20/AN1 ZFP* 遺伝子には2種類存在する。*pepo* 亜種で発現するBGタイプと *ovifera* 亜種と *pepo* 亜種で発現するPBGタイプである (Inui et al., 2015)。ZFP-BGとZFP-PBGはA20/AN1ドメインを持ち、*A20/AN1 ZFP* 遺伝子はシロイヌナズナ、キイロタマホコリカビ、ヒト、マラリア原虫など、様々な真核生物に存在する (Giri et al., 2013)。A20/AN1 ZFPは、細胞伸長 (Liu et al., 2011)、乾燥耐性 (Kang et al., 2017)、病害抵抗性 (Liu et al., 2019) などの幅広い生理機能を示す。マウスのアリル炭化水素受容体 (AhR) のDNA結合ドメイン、細菌の抑制タンパク質LexA、ウイルス由来のVP16の転写活性化ドメイン、*GUS* 遺伝子を8×LexA-46プロモーターの制御下で導入し、*AhR* 遺伝子を過剰発現する形質転換タバコが作製された (Kodama et al., 2009)。この形質転換タバコは、根からダイオキシン様化合物を取り込み、AhR-ダイオキシン様化合物複合体が形成され、*GUS* 遺伝子の転写を活性化する。そのため、GUS活性の測定により、ダイオキシン様化合物の蓄積量を評価できる (Inui et al., 2012)。  
*AhR* 遺伝子と *A20/AN1 ZFP* 遺伝子を過剰発現させた二重形質転換タバコは、ダイオキシン様化合物を含む固体培地で培養すると、GUS活性の上昇を示した (Inui et al., 2015)。これは、*A20/AN1 ZFP* がダイオキシン様化合物の蓄積に関与していることを示している。しかし、*A20/AN1 ZFP* 遺伝子の発現を介した蓄積メカニズムは、未だ不明である。従って、*A20/AN1 ZFP* の機能の解明は、ズッキーニにおけるダイオキシン様化合物の蓄積機構を理解する上で極めて重要なパズルのピースの1つである。  
本研究では、*A20/AN1 ZFP* がズッキーニ及び形質転換タバコにおいて、*MLP* 及びそのホモログ遺伝子のプロモーター領域と結合することで *MLP* 遺伝子を誘導し、ダイオキシン様化合物の蓄積を促進することを明らかにした。



### V-3. 材料と方法

#### 系統樹の構築

*NtPR-10*遺伝子の配列は、UniProtのデータベース (<https://www.uniprot.org/>) から、*MLP-PGI* 遺伝子 (AB753855) のDNA配列を適用して得た。系統樹の再構成は、GenomeNet (<https://www.genome.jp/tools/ete/>) に実装されているETE3 v3.1.1 (Huerta-Cepas et al., 2016) (<https://www.genome.jp/tools/ete/>) の"build"を用いて実行した。系統樹はFastTree v2.1.8を用い、デフォルトのパラメータで構築した (Price et al., 2009)。

#### 発現解析

TRIzol (Thermo Fisher Scientific Inc.) によりRNAを抽出し、40日間生育したズッキーニの根、茎、葉のRNA 2.6 µgからReverTra Ace qPCR RT Master Mix (東洋紡株式会社) によりcDNAを合成した。DNase I処理後、製造元の指示に従い、ReverTra Ace qPCR RT Master Mix (東洋紡株式会社) を使用した。qRT-PCR (Light Cycler 480 II, Roche Applied Science,) は、Thunderbird SYBR qPCR Mix (東洋紡株式会社) を用いて、PBG型はZFP-PBG/qPCR-sとZFP-PBG及びBG/qPCR-as、BG型はZFP-BBG/qPCR-sとZFP-BBG及びBG/qPCR-asのプライマーにより実施した (補足表IV-1)。95°Cで1分、95°Cで15秒、60°Cで30秒、95°Cで5秒、65°Cで1分のサイクルを40回行った。その後、サンプルを97°Cまで加熱した後、40°Cまで冷却した。内部標準として、CpActin/qPCR-sとCpActin/qPCR-asのプライマー (補足表IV-1) を用いて、同条件でアクチン遺伝子を増幅した。

上記のようにしてRNAを抽出し、約2ヶ月齢の無菌栽培タバコの根のRNA 0.9 µgからReverTra Ace qPCR RT Master Mix with gDNA Remover (東洋紡株式会社) により、製造元の指示に従い、cDNAを合成した。qRT-PCRは、*NtPR-10A*遺伝子についてはNtPR-10A/qPCR-s及びNtPR-10A/qPCR-as、*NtPR-10B*遺伝子についてはNtPR-10B/qPCR-s及びNtPR-10B/qPCR-asをプライマーとして、上記条件にて実施した (補足表IV-1)。これらのプライマーは、*NtPR-10A*遺

伝子と-10B遺伝子の共通配列に設計されているため、*NtPR-10A*と-10Bの遺伝子の一部を認識する。内部標準として、タバコのアクチン遺伝子をNtActin/qPCR-sとNtActin/qPCR-asのプライマーを用いて同じ条件で増幅させた (補足表IV-1)。

#### タバコ由来の*NtPR-10A*遺伝子のクローニング

MS培地で約2.5ヶ月間無菌栽培した*N. tabacum* 'Samsun NN'の葉を用い、TRIzolでRNAを抽出した。ReverTra Ace qPCR RT Master Mix with gDNA RemoverでcDNAを製造元の指示のもと合成した。*NtPR-10A*の代表としてE3W9N3をプライマーE3W9P1-sIFとE3W9P1-asIFでKOD FX Neo (東洋紡株式会社) を用いてクローニングした (補足表IV-1)。その断片をIn-Fusion HD Cloning Kit (タカラバイオ株式会社) により*Nco* Iと*Xho* Iで分解したpET-28b (+) ベクターに挿入し、pET28-*NtPR-A*を得た。

#### *A20/ANI ZFP*遺伝子を発現する形質転換タバコへの*MLP pro::GUS*の導入とGUSアッセイ

*MLP-PG1 pro*及び*MLP-GR3-2 pro*は、以前の報告のようにクローニングした (Fujita et al., 2020a; Fujita et al., 2022)。*MLP-GR3 pro*及び*MLP-GR3-1 pro*は、ズッキーニ*ovifera*亜種PG品種及び*pepo*亜種MG品種からクローニングした。*MLP-GR3*遺伝子のプロモーター領域は、TAIL-PCRによってクローニングした (Liu & Whittier 1995; Liu et al. 1995)。まず、PG品種とMG品種のゲノムDNAを用いて、ランダムプライマーとiPCR-MLP-as1で*MLP-GR3*遺伝子の751 bpの上流領域を増幅した (補足表IV-1)。MG品種のゲノムDNAを用いて、さらに上流領域を増幅するために、751 bpの領域を参照し、TAIL-MLP-P-as2及びTAIL-MLP-P-as3の2つの特異的アンチセンスプライマーを設計した (補足表IV-1)。PCR反応は2xQuick Taq™ HS DyeMix (東洋紡株式会社) を用いて行った。TAIL-PCRの反応条件は過去のPCR条件を踏襲したが、ランダムヘキサマーのアニーリング温度を33°Cに、特異的プライマーのアニーリング温度を53-56°Cにそれぞれ変更した (Liu et al., 1995)。*MLP-GR3*遺伝子と*MLP-GR3-1*遺伝子

のプロモーター領域全体をクローニングした。MG-GR3-1-P-s及びMG-GR3-1-P-asを用い、先に述べたようなプライマーを用いてMG品種からクローニングした (Fujita et al., 2020a) (補足表IV-1)。MLP-GR3 proを植物発現ベクターpGWB402Ωに挿入した。

MLP pro::GUSコンストラクトを*R. radiobacter* LBA4404に導入した。LB培地で一晚培養した組換え*R. radiobacter*をMMAバッファー (10 mM 2-morpholinoethanesulfonic acid [pH5.6], 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 100 μM acetosyringone) に懸濁してOD<sub>600</sub>を1.0にした (Sainsbury and Lomonosoff, 2008)。この懸濁液を25°Cで2時間振盪培養し、A20/ANI ZFP遺伝子を発現する形質転換タバコ及び約2週間栽培したズッキーニの葉に針の無いシリンジで注入した。形質転換タバコ及びズッキーニについて、それぞれ6日及び7日間培養した後、注入した葉の5 mm四方をサンプルとして、タンパク質抽出バッファー (50 mMリン酸ナトリウムバッファー [pH7.0], 10 mM EDTA [pH 8.0], 0.1% [v/v] Triton X-100, 0.1% [w/v] *N*-lauroylsarcosine sodium salt, 0.072% [v/v] 2-mercaptoethanol) で混和した。4°C、20,700×g、5分間の遠心分離後、上清を回収し、既報に従い、GUSアッセイを実施した (Kodama et al., 2009)。

#### 組換えタンパク質の精製

*NtPR-10A*遺伝子をpET28-NtPR-10Aのプラスミドとして、大腸菌RosettaGami II株で発現させ、組換えNtPR-10Aを精製した (Inui et al., 2013)。組換え大腸菌を100 μg/mL カナマイシンと50 μg/mL クロラムフェニコールを含むLB培地で37°C、一晚培養した。イソプロピル-β-D-チオガラクトピラノシドを終濃度0.1 mMで添加した後、組換え大腸菌を20°Cでさらに一晚培養した。50 mMリン酸ナトリウムバッファー [pH 7.0] (200 mM NaCl) で洗浄し、超音波処理で細胞を破碎した。26,700×g、4°C、20 minの遠心分離後、上清を回収し、TALON<sup>®</sup> Metal Affinity Resin (タカラバイオ株式会社) と共に室温で20分インキュベートした。50 mMリン酸ナトリウムバッファーで洗浄し、カラムに負荷した。50 mMリン酸ナトリウムバッファーの150 mM イミダゾールをロードし、溶出液を回収した。

### 結合アッセイ

結合アッセイは、以前の報告に従って行った (Inui et al., 2013)。磁性エポキシビーズ (多摩川精機株式会社) に25 mMの4OH-PeCB106を結合させた。組換え大腸菌から精製した35 µg/mLの組換えNtPR-10Aを4OH-PeCB106結合ビーズとともに4°Cで4時間、結合バッファー (50mMリン酸カリウムバッファー [pH5. 6], 100 mM KCl, 1 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM CaCl<sub>2</sub>, 0.2 mM EDTA, 10% [v/v] グリセロール, 0.1% [v/v] Nonidet P-40, 1 mM dithiothreitol, 0.2 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, 0.1% Triton X-100, 0.1% *N*-lauroylsarcosine sodium salt) の中で、4°C、4時間培養した。スピンドウンと磁性分離の後、上清を除去し、ビーズを結合バッファーで8回洗浄した。ビーズに結合バッファーを35 µL、SDS-PAGE用還元試薬入りサンプルバッファー溶液 (ナカライテスク株式会社) を7 µL添加した。この溶液を分散させ、98°Cで5分間煮沸した。スピンドウンして磁性分離した後、上清を熱溶出サンプルとして回収した。このサンプルをSDS-PAGEに供し、Silver Staining Kit (和光純薬工業株式会社) によりバンドを検出した。

### ZFP:: GFPを含むプラスミドの構築

ZFP-PBG遺伝子とZFP-BG遺伝子のフラグメントは、それぞれpBI221-PBGsとPBG-GFPas、pBI221-BGsとPBG-GFPasプライマーを用いてPCRで増幅した (補足表IV-1)。GFPとZFPの融合については、GFPフラグメントをPBG-GFPs及びGFP-pBI221asで増幅した (補足表IV-1)。ZFP-PBG::GFP及びZFP-BG::GFPの構築には、GFPとZFP-PBG又はZFP-BGの混合物をテンプレートとして、それぞれpBI221-PBGsとGFP-pBI221as、及びpBI221-BGsとGFP-pBI221asというプライマーによるPCRを行った (補足表IV-1)。コントロールとしてのGFPはプライマーpBI221-GFPsとGFP-pBI221asにより増幅した (補足表IV-1)。融合断片とGFPは、In-fusionシステムを用いて、*Xba* Iと*Sac* Iで切断したpBI221に挿入した。

### 細胞内局在

*GFP*、*ZFP-PBG::GFP*、*ZFP-BG::GFP*を有するプラスミドを大腸菌に導入した。PlusgrowII medium (ナカライテスク株式会社) で37°C、一晩培養後、Maxi Plus Ultrapure Plasmid Extraction System (Viogene-Biotek Corp) でプラスミドを抽出し、1.0 µm金粒子と遺伝子導入システムPDS-1000 (Bio-Rad Laboratories, Inc.) によるパーティクルガンでタマネギ表皮細胞へ導入した。室温、暗所で一晩インキュベートした後、表皮を剥がし、200 mM NaCl を含む 50 mM リン酸ナトリウムバッファー (pH7.0) 中の 1 µg/mL 4',6-diamidino-2-phenylindole dihydrochloride (DAPI) とともに室温で5-10分インキュベートした。*GFP*とDAPIの蛍光は、蛍光顕微鏡ECLIPSE 80i (ニコン株式会社) を用いてFITC (励起フィルター, 480/30 nm; ダイクロイックミラー, 505 nm; バリアフィルター, 535/45 nm)、V-2A (励起フィルター, 400/40 nm; ダイクロイックミラー, 430 nm; バリアフィルター, 440 nm) の条件で蛍光を検出した。

### 統計解析

RStudioソフトウェアバージョン1.3.1073 (<http://www.rstudio.com>) を用いて、処理間の有意差の判定にDunnnettの多重比較検定を適用した。

#### V-4. 結果

##### ズッキーニ品種の器官におけるZFP遺伝子の発現

ズッキーニ *ovifera* 亜種5品種及びズッキーニ *pepo* 亜種4品種において、ZFP遺伝子の発現解析を行った。ZFP-PBG遺伝子は調査した全ての品種で同等に発現しており、ZFP-BG遺伝子はPG品種を除く全ての品種で同等に発現していた (図V-1.A & B)。

A20/AN1 ZFPが核に局在し、転写因子として機能するかを調査するために、ZFP::*GFP*融合コンストラクトをタマネギ表皮細胞内に導入した。GFPコンストラクトの導入により、GFP蛍光は細胞全体に分布していた (図V-1C)。一方、ZFP-PBG::*GFP*、ZFP-BG::*GFP*を導入すると、GFPの蛍光は主に核内に観察された (図V-1C)。

##### ZFP遺伝子により発現が増加したNtPR-10Aはダイオキシン様化合物と結合

*NtPR-10*遺伝子の配列は、UniProtデータベースからMLP-PGI遺伝子のDNA配列を適用して取得し、16個の*NtPR-10*遺伝子 (E3W9N3, E3W9N4, E3W9N5, E3W9N6, E3W9N7, E3W9N8, E3W9N9, E3W9P0, E3W9P1, E3W9P2, E3W9P3, E3W9P6, E3W9P7, E3W9P8, E3W9Q0, E3W9Q1) を特定した。これらの遺伝子における系統樹を構築したところ、*NtPR-10A*遺伝子と*NtPR-10B*遺伝子の2種類が存在した (図V-2A)。*NtPR-10A*遺伝子の代表としてE3W9N3、*NtPR-10B*遺伝子の代表としてE3W9P8を選び、これらの遺伝子を以下のアッセイで使用した。A20/AN1 ZFP遺伝子を過剰発現させた形質転換タバコにおいて、*NtPR-10*遺伝子の発現解析を行い、*NtPR-10*遺伝子の誘導を検討した。A20/AN1 ZFPを転写因子としてZFP-PBG遺伝子を過剰発現させた形質転換タバコでは、根における*NtPR-10A*遺伝子の発現量が3.1倍 (line #5) 及び2.6倍 (line #39)、ZFP-BGが1.2倍 (line #15) 及び6.2倍 (line #45) 上昇した (図V-2.B)。ZFP-PBG遺伝子及びZFP-BG遺伝子を過剰発現させた形質転換タバコでは、根を除き、*NtPR-10A*遺伝子は誘導されなかった (図V-2B)。一方、*NtPR-10B*遺伝子の発現は、ZFP-PBG遺伝子及びZFP-BG遺伝子を過剰発現させた形質転換タバコでは認められなかった (図V-

2C)。そこで、A20/ANI ZFPによって発現が上昇する遺伝子として*NtPR-10A*遺伝子を選抜した。

4OH-PeCB106に結合する磁性ビーズを用いて、*NtPR-10A*とダイオキシン様化合物の*in vitro*での結合を調査した。このバンドは、コントロールの磁性ビーズと反応した*NtPR-10A*の熱溶出サンプルでは、検出されなかったが、4OH-PeCB106に結合する磁性ビーズと反応した*NtPR-10A*の熱溶出サンプルで検出された (図V-2D)。

#### A20/ANI ZFPによるMLP遺伝子の誘導

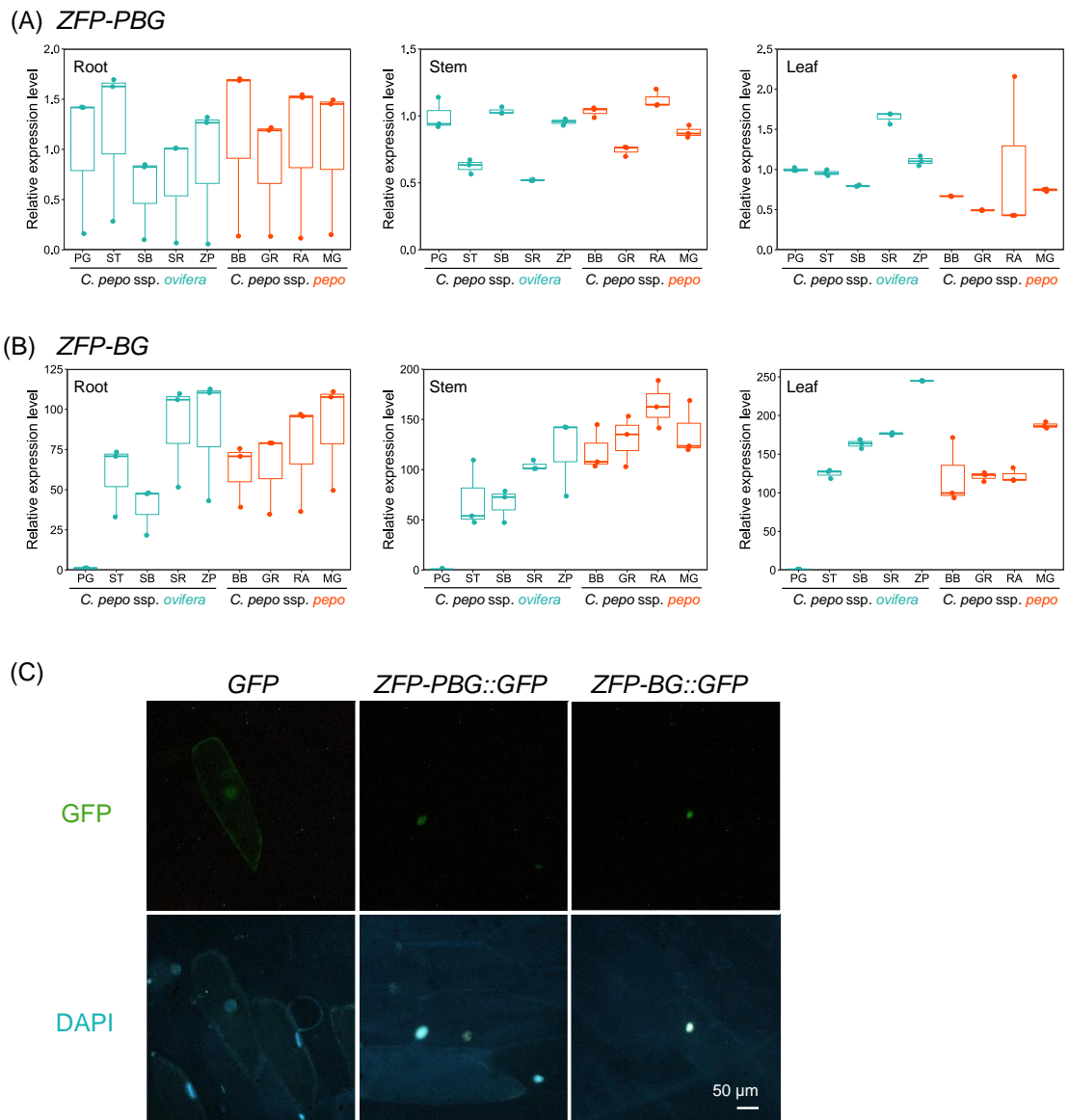
*MLP-PG1 pro* (2075 bp) 及び*MLP-GR3 pro* (2072 bp) はPG品種からクローニングし、*MLP-GR3-1 pro* (2003 bp) 及び*MLP-GR3-2 pro* (2003 bp) はMG品種 (Fujita et al., 2020a; Fujita et al., 2022) からクローニングした。*MLP-pro::GUS*コンストラクトを、*ZFP*遺伝子を過剰発現する形質転換タバコに導入した。*MLP pro::GUS*を持つ*R. radiobacter*を形質転換タバコに注入した。*VC*、*MLP-PG1 pro::GUS*、*MLP-GR3 pro::GUS*、*MLP-GR3-1 pro::GUS*の導入は、*ZFP*遺伝子を過剰発現する形質転換タバコにおけるGUS活性を増加しなかった (図V-3A)。一方、*MLP-GR3-2 pro::GUS*の導入により、*ZFP-BG*遺伝子を過剰発現する形質転換タバコのGUS活性は3.8倍 (*VC line#9*と比べて*line#9*)、2.8倍 (*VC line#11*と比べて*line#9*)、9.4倍 (*VC line#9*と比べて*line#44*)、6.9倍 (*VC line#11*と比べて*line#44*) 増加する傾向が見られた (図V-3A)。

*MLP pro::GUS*コンストラクトをズッキーニ*ovifera*亜種PG品種及びズッキーニ*pepo*亜種MG品種に導入し、*A20/ANI ZFP*遺伝子発現が*MLP*遺伝子プロモーター活性に及ぼす影響について調査した。*MLP pro::GUS*を有する*R. radiobacter*をPG品種とMG品種にMMAバッファー又は*VC*を発現する*R. radiobacter*を注入しても、GUS活性に差は認められなかった (図V-3B)。

*MLP-PG1 pro::GUS*及び*MLP-GR3 pro::GUS*を有する*R. radiobacter*を接種したPG品種では、*VC*を有する*R. radiobacter*を接種したものと比較してGUS活性が増加しなかった (図V-3B)。一方、*MLP-GR3-1 pro::GUS*及び*MLP-GR3-2 pro::GUS*を有する*R. radiobacter*を接種したMG品

種では、GUS活性がVCと比較してそれぞれ 2.6及び2.1倍有意に増加した (図V-3B)。





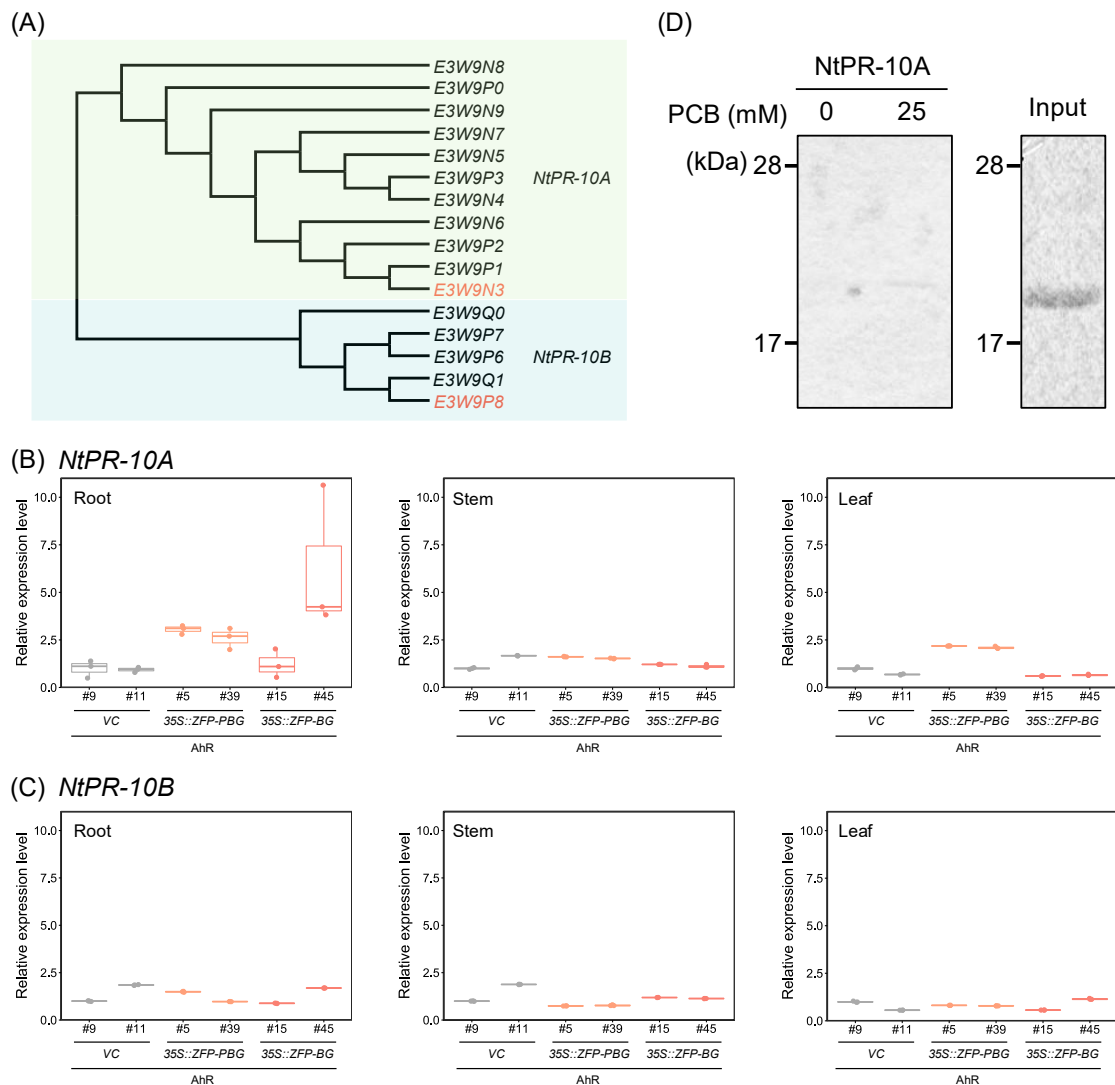
図V-1. *A20/AN1 ZFP*遺伝子の発現

(A) (B) ズッキーニの器官における*A20/AN1 ZFP*遺伝子の発現量

ズッキーニを25°Cで40日間栽培した。根、茎、葉からRNAを抽出し、qRT-PCRを行った。プライマーの配列を補足表V-1に示す。各器官における発現量は、PG品種の発現量に対する相対値で算出した。PG品種、BB品種、GR品種の発現量には過去の報告 (Inui et al., 2015) と同じデータを用いた。BB, 'Black Beauty'品種; GR, 'Gold Rush'品種; MG, 'Magda'品種; PG, 'Patty Green'品種; RA, 'Raven'品種; SB, 'Sunburst'品種; SR, 'Sunray'品種; ST, 'Starship'品種; ZP, 'Zephyr'品種を示す。

(C) A20/AN1 ZFPの細胞内局在

*GFP*、*ZFP-PBG::GFP*、*ZFP-BG::GFP*を含むpBI221ベクターをパーティクルガンによりタマネギの表皮細胞内に導入した。DAPIと共にインキュベートした後、表皮細胞におけるGFPとDAPIの蛍光を観察した。



図V-2. A20/AN1 ZFPによって誘導されるNtPR-10のダイオキシン様化合物への結合

(A) *NtPR-10*遺伝子の系統樹

*NtPR-10*遺伝子の配列は、UniProtのデータベース (<https://www.uniprot.org/>) から、*MLP-PGI* 遺伝子のDNA配列を適用して得た。系統樹の再構成は ETE3 v3.1.1の"build"を用いて行い (Huerta-Cepas et al., 2016)、系統樹はFastTree v2.1.8を用いてデフォルトパラメータで構築した (Price et al., 2009)。*NtPR-10A*遺伝子、*NtPR-10B*遺伝子からそれぞれ選抜された遺伝子を赤色で示した。

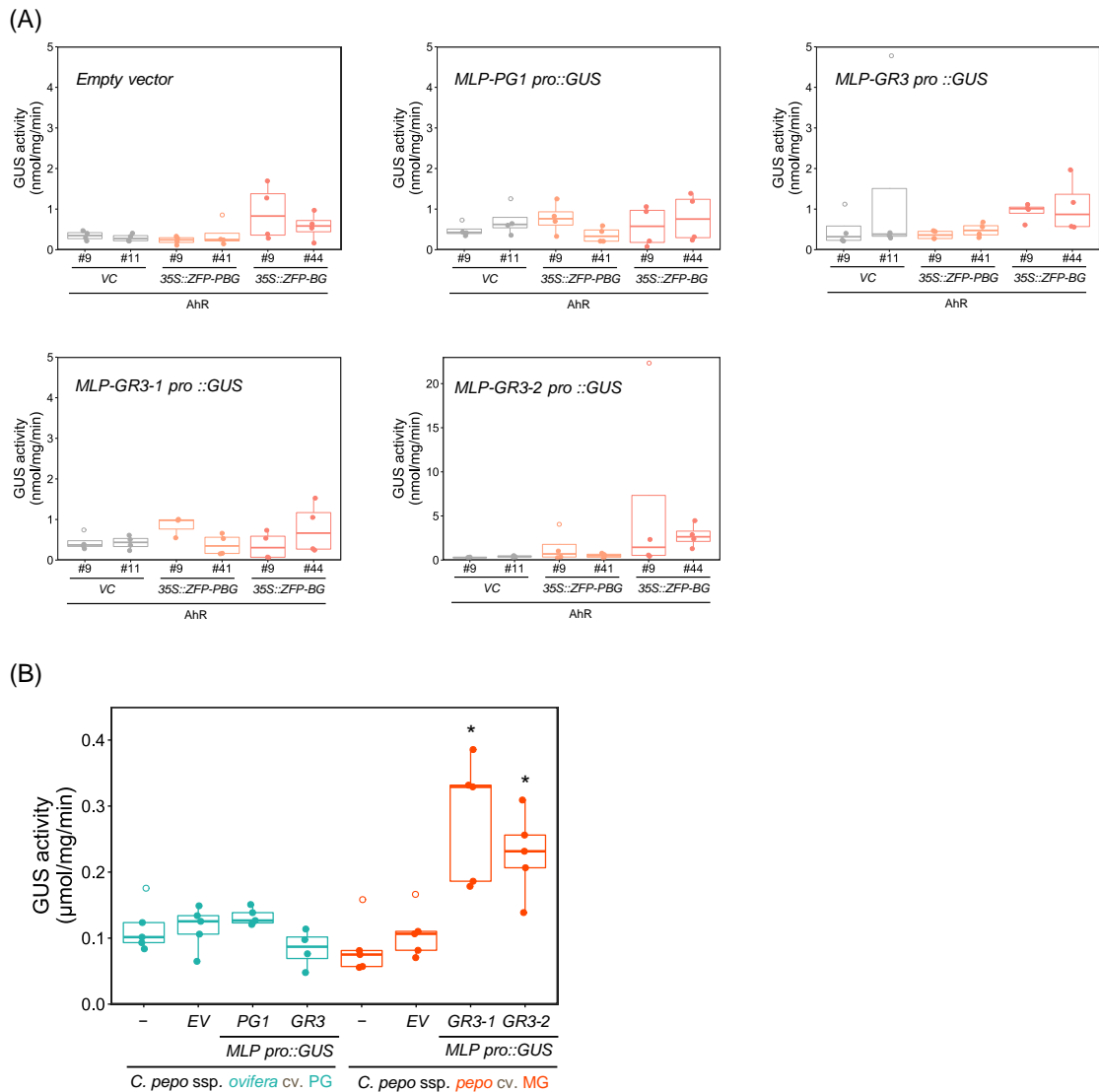
(B) (C) *A20/AN1* ZFP遺伝子による*NtPR-10*遺伝子の誘導

ZFP-BG遺伝子及びZFP-PBG遺伝子を過剰発現させた形質転換タバコを25°Cで2ヶ月間栽培

した。根、茎、葉からRNAを抽出し、qRT-PCRを行った。プライマーの配列を補足表V-1に示す。各器官における発現量は、空ベクターを発現する形質転換タバコのライン#9の発現量に対する相対値として算出した。

(D) NtPR-10AのPCBに対する結合

25 mMの4OH-PeCB106結合磁性ビーズを調製した。組換えNtPR-10Aと4OH-PeCB106結合ビーズを4°Cで4時間インキュベートし、洗浄、加熱溶出後、SDS-PAGEを行い、銀染色でバンドを検出した。



図V-3. A20/AN1 ZFPは、MLP遺伝子を誘導する。

(A) (B) *MLP-pro::GUS*を一過的に発現するA20/AN1 ZFP遺伝子を過剰発現した形質転換タバコとズッキーニのGUS活性

形質転換タバコ (A) とズッキーニ*ovifera*亜種PG品種及び*pepo*亜種MG品種 (B) を25°Cで約2週間栽培し、*MLP-pro::GUS*を導入した*R. radiobacter*を接種し、培養した。形質転換タバコ及びズッキーニについて、それぞれ6日及び7日間インキュベーションした後、GUS活性を測定した。-, バッファー; EV, 空ベクターを導入した*R. radiobacter*; VCは空ベクターで形質転換したタバコ; 35S::ZFP-PBG, ZFP-PBG遺伝子を過剰発現した形質転換タバコ; 35S::ZFP-BG,

*ZFP-BG*遺伝子を過剰発現した形質転換タバコ;AhR, アリル hidrocarbon 受容体。アスタリスクは、EVを注入した植物のGUS活性と比較して有意差があることを示す (\*, $p < 0.05$ )。

## V-5. 考察

本研究では、ダイオキシン様化合物との結合能を持つMLP及びそのホモログ遺伝子をA20/AN1 ZFPが誘導することを明らかにした。A20/AN1 ZFP遺伝子はダイオキシン様化合物を高蓄積する*pepo*亜種において高発現する (Inui et al., 2015)。MLPは根細胞でダイオキシン様化合物と結合し、その複合体は導管に移行して地上部に輸送される (Inui et al., 2013; Goto et al., 2019)。ここでは、A20/AN1 ZFPが核に局在し、ダイオキシン様化合物と結合するタンパク質をコードする*NtPR-10A*遺伝子を誘導し、*in vivo*でのMLP遺伝子のプロモーター領域への結合を明らかにした。従って、今回の結果は、ズッキーニにおけるダイオキシン様化合物の蓄積において、A20/AN1 ZFPがMLP遺伝子の誘導を介して関与することを示す。

なお、A20/AN1 ZFPによるMLP及びそのホモログ遺伝子の誘導を示した研究は、我々の知限り、今回が初めてである。A20/AN1 ZFP遺伝子は、乾燥 (Kang et al., 2017)、塩分 (Zhao et al., 2021)、病原菌 (Liu et al., 2019)、植物ホルモン (Zhang et al., 2016) という生物的・非生物学的ストレスによって制御される。A20/AN1 ZFPはABA、JA、SA応答性遺伝子を誘導する (Kang et al., 2017; Liu et al., 2019)。近年の研究では、MLPホモログもまた、生物的ストレスに応答することが示されている (Fujita and Inui, 2021; Fujita et al., 2022)。MLP43はABAシグナル伝達経路において、Sucrose nonfermenting-1-related protein kinase 2及びABA-responsive element binding factor 1との相互作用を介して乾燥耐性を向上させる (Wang et al., 2016)。MLPはET応答因子と相互作用し、PR遺伝子の誘導を介して病害抵抗性を亢進する (Yang et al., 2015; Gai et al., 2018)。従って、A20/AN1 ZFPはMLP遺伝子の誘導により、乾燥耐性や病害抵抗性を付与すると考えられる。さらに、MLPは導管や篩管に局在しており、異なる器官へ長距離輸送される (Li et al., 2013; Carella et al., 2016; Gai et al., 2018; Goto et al., 2019)。A20/AN1 ZFPがMLP遺伝子を誘導し、MLPの輸送を介して、離れた器官でストレス応答を促進している可能性がある。

PR-10は植物の二次代謝産物やホルモンに対して結合親和性を示す。黄花ルピナス由来の

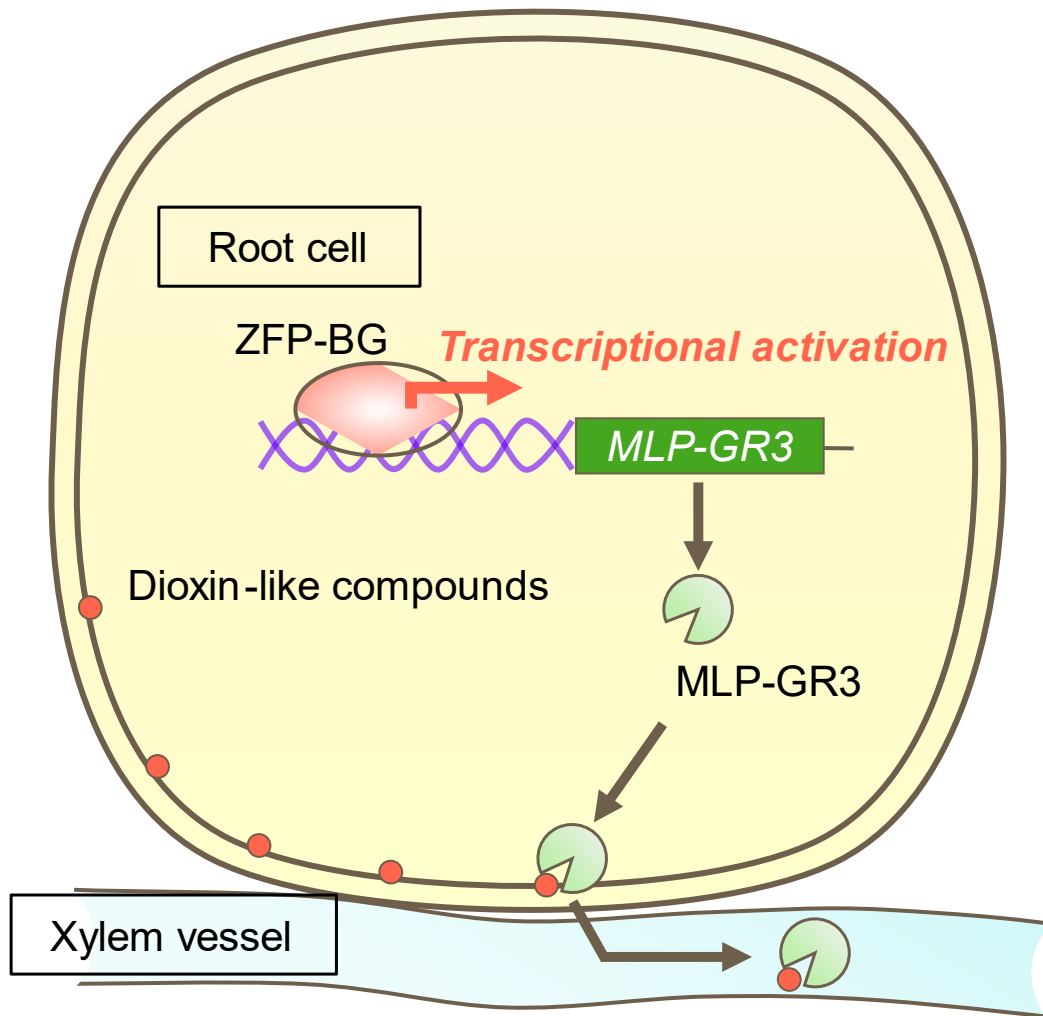
LI-PR10-2.Bは天然及び合成サイトカイニンに結合する (Fernandes et al., 2009)。PR-10のダイオキシン様化合物への結合は、これまで調査されていない。今回、NtPR-10Aは4-OH PeCB106に対して結合親和性を示した (図V-2D)。PR-10のキャビティは疎水性が高く大きいため (Pasternak et al., 2005)、NtPR-10Aはダイオキシン様化合物との結合能を持つと考えられる。したがって、ZFP-BG遺伝子を過剰発現させ形質転換タバコがNtPR-10Aを介してダイオキシン様化合物を蓄積すると示唆される (Inui et al., 2015)。

ダイオキシン様化合物を含む土壌の疎水性有機汚染物質は根に吸収され、原形質連絡を介して根の細胞内に拡散し、内皮や内鞘に局在する (Yamazaki et al., 2015)。根ではMLP遺伝子が発現し、MLP-ダイオキシン様化合物複合体が形成され、導管に移行する (Goto et al., 2019)。この過程で、A20/AN1 ZFPは、おそらく内皮と内鞘におけるMLP遺伝子の誘導に重要な役割を果たし、結果としてMLP-ダイオキシン様化合物複合体の形成を促進させる (図V-4)。

ズッキーニpepo亜種の根はズッキーニovifera亜種の根よりMLP-GR3遺伝子の発現量が多く、ズッキーニovifera亜種の根はズッキーニpepo亜種の根よりMLP-PG1遺伝子の発現量が多い (Inui et al., 2013)。ズッキーニovifera亜種とpepo亜種の根は、ZFP-PBG遺伝子の発現量が同程度であるのに対し、ズッキーニpepo亜種は、ズッキーニovifera亜種PG品種よりもZFP-BG遺伝子の発現量が高い (図V-1.A及びB)。これらの結果を総合すると、ZFP-BG遺伝子の発現はMLP-GR3遺伝子の高発現に結び付き、この発現パターンはZFP-BG遺伝子を過剰発現した形質転換タバコにおけるMLP-GR3-2遺伝子のプロモーター活性の誘導と一致する (図V-3A) 以上より、本研究ではウリ科作物におけるダイオキシン様化合物の蓄積機構を明らかにした。A20/AN1 ZFPが生物的・非生物的ストレスによって制御され (Giri et al., 2013)、MLPがストレス耐性を付与すること (Fujita and Inui, 2021) を考えると、A20/AN1 ZFPは、元来はストレス応答向上のためにMLP遺伝子を誘導することが示唆される。また、複数の植物で見出されたMLPは病害抵抗性を示すことから (Yang et al., 2015; Gai et al., 2018; Fujita et al.,



2022)、A20/AN1 ZFP、特にZFP-BGが病害抵抗性に重要な役割を担っていることが示唆される。さらに、MLPは内部に疎水性キャビティを持つため、ダイオキシン様化合物と結合することができ、A20/AN1 ZFP遺伝子の発現によるMLP及びそのホモログ遺伝子の誘導は、ダイオキシン様化合物の蓄積促進を通じたファイトレメディエーションに繋がる (Inui et al., 2015)。



図V-4. A20/AN1 ZFPによるMLP-GR3遺伝子誘導を介したダイオキシン様化合物の蓄積

## 補足表V-1. プライマー配列

Primer	Sequence
NtActin/qPCR-s	5'-ATTACCATCGGTGCTGAACG-3'
NtActin/qPCR-as	5'-CCAATCATTGAAGGTTGAAA-3'
NtPR-10A/qPCR-s	5'-TTTCAAAGTATTGAGATAATCCATGG -3'
NtPR-10A/qPCR-as	5'-AGCAAAGTTGAATTGCTTGATG-3'
NtPR-10B/qPCR-s	5'-CCATAAAAGTTGGTTCGGTTG-3'
NtPR-10B/qPCR-as	5'-TTACAAATCTTATCTTTCCATCGTC-3'
CpActin/qPCR-s	5'-TCCAGGCCGTTTTATCTC-3'
CpActin/qPCR-as	5'-CAGAATCCAACACAATACCTGT-3'
ZFP-PBG/qPCR-s	5'-ACCATGGGAAGAAGGCT-3'
ZFP-PBG and BG/qPCR-as	5'-GATTTCTAGCTTGGTTGAGA-3'
ZFP-BG/qPCR-s	5'-GACCATGGCAAGAAGACA-3'
E3W9P1-sIF	5'-AGGAGATATACCATGGGAATTCTCACAACACTACTTA-3'
E3W9P1-asIF	5'-GTGGTGGTGGTGGTGTTCATTCGGGTTTGCCAAGA-3'
pBI221-PBGs	5'-CACGGGGGACTCTAGATGGAGCATCATAAA-3'
PBG-GFPas	5'-TGCTCACCATGATCTTGT-3'
pBI221-BGs	5'-CACGGGGGACTCTAGATGGAACATAAAAGAG-3'
PBG-GFPs	5'-ACAAGATCATGGTGAGCA-3'
GFP-pBI221as	5'-GGGAAATTCGAGCTTTACTTGTACAGCTC-3'
pBI221-GFPs	5'-CACGGGGGACTCTAGATGGTGAGCAAGGGC-3'
iPCR-MLP-as1	5'-TCTCTGGAGAAGATTTTAGG-3'
TAIL-MLP-P-as2	5'-ATCTTGTCTCCCTCTCCAAC-3'
TAIL-MLP-P-as3	5'-CTTCGTGAACATAATGGGGC-3'
MG-GR3-1-P-s	5'-TGATTACGCCAAGCTTCGTGTTGCTCTAACACATC-3'
MG-GR3-1-P-as	5'-CCGGGGATCCTCTAGTTTCTTTCGATGTGATACAA-3'

## 第VI章

### ズッキーニゲノムにおけるMLP遺伝子の同定

本章は以下の出版物を参照されたい。

**Fujita K**, Chitose N, Chujo M, Komura S, Sonoda C, Yoshida M, Inui H. (2022)

Genome-wide identification and characterization of *major latex-like protein* genes  
responsible for the crop contamination in *Cucurbita pepo*

*Molecular Biology Reports*, *accepted*

## VI-1. 概要

ズッキーニはPOPsを地上部に高濃度に蓄積し、その蓄積にはMLPが重要な役割を担う。MLPは根細胞でPOPsと結合し、MLP-POPs複合体は導管に移行し、POPsは地上部に輸送される。我々は以前、POPsの輸送因子として3つの*CpMLP*遺伝子 (*MLP-PGI*遺伝子、*MLP-GRI*遺伝子、*MLP-GR3*遺伝子) を同定した。しかし、他の研究では、複数の双子葉植物のゲノムにおいて、10以上の*MLP*遺伝子が含まれており、POPs蓄積に関わる他の*MLP*遺伝子を見落としている可能性がある。そこで、ズッキーニゲノムデータベースに対して隠れマルコフモデル検索を行い、*CpMLP*遺伝子数を調査し、器官での発現解析と*in silico*構造解析を行うことで、本研究で同定した*CpMLP*遺伝子がPOPs蓄積に与える影響を明らかにした。ズッキーニゲノムには*CpMLP*遺伝子が21個含まれており、*MLP-PGI*遺伝子や*MLP-GR3*遺伝子などいくつかの*CpMLP*遺伝子は根で高発現していた。立体構造予測から、調査した全ての*CpMLP*は疎水性キャビティを持ち、これがPOPsとの結合に寄与すると考えられる。本研究は、POPs蓄積に関わる*CpMLP*遺伝子に関する知見を提供する。

## VI-2. 結論

ウリ科はバラ類ウリ目に属し、一年草の草本と多年草のツル植物から構成され (Guo et al., 2020)、*Cucurbita*属は3つの亜種 (*fraterna*亜種、*ovifera*亜種、*pepo*亜種) からなる (Montero-Pau et al., 2018)。ズッキーニ*pepo*亜種はPOPs蓄積量が多く、ズッキーニ*ovifera*亜種はPOPs蓄積量が少ない (Inui et al., 2008)。POPsは地球上に広く存在し、その残留性により環境を汚染している (Bartrons et al., 2016)。POPsに含まれる殺虫剤 (ディルドリン、ヘキサクロロシクロヘキサン) は、使用が禁止されるまで大量に使用されたため、多くの国の農地を汚染している (Jorgenson, 2001; Vijgen et al., 2011)。POPsは神経毒性など人体への毒性が強いため (Guo et al., 2019)、安全な作物生産のためには、ウリ科作物におけるPOPs蓄積機構の解明が必須である。

根細胞に吸収されたPOPsは、MLPに結合し、MLP-POPs複合体として導管に移行した後、地上部に輸送される (Goto et al., 2019)。現在までに、MLP遺伝子はシロイヌナズナ (Wang et al., 2016)、ズッキーニ (Inui et al., 2013)、ワタ (Yang et al., 2015)、ダイズ (Guo et al., 2011)、モモ (Ruperti et al., 2002)、ブドウ (Zhang et al., 2018) などの双子葉植物において主に同定されてきた。MLPは、葉の分化 (Litholdo et al., 2016)、病原菌や乾燥に対する応答 (Yang et al., 2015; Wang et al., 2016; Fujita et al., 2022)、二次代謝産物の生合成 (Lichman et al., 2020) において重要な役割を担っていると考えられている。

MLPは、PR-10を含むBet v 1ファミリーのメンバーである (Fernandes et al., 2013)。このファミリーのタンパク質間のアミノ酸の同一性は低い、共通の二次構造として3つの $\alpha$ ヘリックスと7つの $\beta$ シートを含んでおり、類似の立体構造を示す。Bet v 1ファミリーのタンパク質の最も顕著な特徴は、長い $\alpha 3$ に $\beta 1$ - $\beta 7$ が巻きついて形成された内部の疎水性キャビティであり (Fernandes et al., 2013)、MLPはこれにより、ステロイド (Lytle et al., 2009) やPOPs (Goto et al., 2019) など様々な疎水性化合物との結合が可能である。さらに、MLPは導管液及び篩管液中から検出されており (Inui et al., 2013; Li et al., 2013; Carella et al., 2016; Gai et al., 2018)、

CpMLPが疎水性キャビティを介してPOPsと結合し、輸送することが示された。しかし、ズッキーニゲノムに存在するMLP遺伝子の数は依然として不明である。我々はこれまでに、MLP-PG1遺伝子、MLP-GRI遺伝子、MLP-GR3遺伝子を同定し (Inui et al., 2013)、MLP-PG1とMLP-GR3はPOPsとの結合親和性を示すことを明らかにした (Inui et al., 2013)。これまでのゲノムワイドな解析により、ブドウ (Zhang et al., 2018)、ナタネ (Zeng et al., 2020)、リンゴ (Yuan et al., 2020) のゲノムに10種類以上のMLP遺伝子が同定されているので、ウリ科作物において、複数のCpMLPによるPOPs蓄積への関与が示唆される。従って、ズッキーニにおけるPOPs輸送に関わるMLPは、これまで見過ごされてきた可能性がある。

本研究では、CpMLP遺伝子数を調査し、ズッキーニゲノムに存在するCpMLP遺伝子を同定した。また、系統関係、細胞内局在、ドメイン、モチーフ、遺伝子構造、シスエレメントを明らかにした。また、ズッキーニの器官におけるCpMLP遺伝子の発現量を評価した。さらに、3次元構造を予測し、キャビティの容積からキャビティがPOPsを結合するのに十分な大きさであるかを検証した。本研究は、細胞内局在、遺伝子発現、タンパク質構造の側面から、作物汚染に関連したCpMLPに関する知見を提供するものである。

### VI-3. 材料と方法

#### ズッキーニゲノム中のCpMLP遺伝子の同定

Bet v 1 (PF00407) の隠れマルコフモデル (HMM) をPfam (<http://www.pfam.xfam.org/>) からダウンロードし、ズッキーニゲノムデータベース (<http://cucurbitgenomics.org/>) に対して HMM Search (version 3.3.2) をE-value cutoff  $10^{-5}$ の条件で行った。また、先行研究 (Zhang et al., 2018) で同定された25種類のAtMLPのアミノ酸配列のクエリとしてBlastP検索 (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) をズッキーニのゲノムデータベースに対して E-value cutoff  $10^{-5}$  で実施した。ドメイン解析は SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/>) と INTERPROSCAN (<http://www.ebi.ac.uk/interpro/>) を用いて行い、候補タンパク質がBet v 1ドメインを含むことを確認し、Bet v 1ドメインを含まないものは除いた。

#### 細胞内局在の予測

CpMLPの細胞内局在は、WoLF PSORT (<https://wolfpsort.hgc.jp/>) を用いて決定した。

#### 遺伝子・タンパク質解析

25種類のAtMLPと21種類のCpMLPのアミノ酸配列に基づいた系統樹をMEGA 7.0 (<http://www.megasoftware.net/>) の近傍結合法を用いて構築し、bootstrap値を50に設定した。21種類のCpMLPのアミノ酸配列は、NCBI Conserved Domain Search (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>) を用いて解析し、Bet v 1ドメインの位置を特定した。ズッキーニゲノムデータベースからイントロンとコーディング領域を持つ遺伝子を抽出し、Gene Structure Display Server (version 2.0) (<http://gsds.gao-lab.org/>) を用いて可視化した。21個のCpMLPのアミノ酸配列中のモチーフを、MEME (version 5.4.1) (<https://meme-suite.org/meme/tools/meme>) を用いて、最大モチーフ数10、最適モチーフ幅6-50残基で解析した。21個のCpMLP遺伝子の翻訳開始位置から上流の1 kbp領域を抽出し、植物ホルモンと根



特異的発現に関連するシスエレメントをPLACEデータベースを用いて同定した (Higo et al., 1999)。

#### RNA-seq解析

ズッキーニ *ovifera* 亜種の種子 (PG品種及びST品種) と *pepo* 亜種 (GR品種及びMG品種) を Johnny's Selected Seeds から購入した。種皮を除去し、種子を水道水中で4°Cにて一晩培養し、滅菌土壌 (ハイポネックスジャパン株式会社) に播種した。この苗を26°C、16/8時間の明暗サイクルで40日間栽培した。根を回収し、液体窒素中で粉砕した後、TRIzol (Invitrogen) を用いてRNAを抽出した。cDNA Rapid Library Preparation Method Manualに従ってシーケン斯拉イブラリーを構築し、RNA-seq (GS-FLX+) (Roche, Basel, Switzerland) をタカラバイオ株式会社に委託した。

#### 発現解析

ズッキーニ *ovifera* 亜種PG品種及び *pepo* 亜種GR品種の種皮を除去した。この苗を上記と同様に26°C、16/8時間の明暗サイクル下で栽培した。13日後、器官 (葉及び根) を採取し、液体窒素中で粉砕した。RNA抽出及びqRT-PCRは、既報の通り行い、プライマーの配列は補足表VI-2に示した (Fujita et al., 2022)。

#### 立体構造の構築

CpMLPの予測構造はAlphaFold2を用いて構築した (Jumper et al., 2021)。キャビティの容積はCASTp (<http://sts.bioe.uic.edu/castp/calculation.html>) を用いて計算した。

## VI-4. 結果

### ズッキーニゲノムにおけるCpMLP遺伝子の同定

Bet v 1 (PF00407) のHMMプロファイルをズッキーニゲノムデータベースに対するクエリとしてHMM検索を行ったところ、26種類のCpMLP候補が検出された。ズッキーニゲノムデータベースに対して25種類のAtMLP (Zhang et al., 2018) をクエリーとしたBlastP検索を行ったところ、22種類のCpMLP候補が検出された。HMM検索とBlastP検索で重複するタンパク質を削除した結果、30種類のCpMLP候補を同定した。SMARTとINTERPROを用いてアミノ酸配列中のBet v 1ドメインの存在を確認し、21種類のCpMLP候補を同定した (表VI-1、補足表VI-1)。

21種類のCpMLPのアミノ酸と分子量は、DNA配列に基づいて評価した (表VI-1)。15種類のCpMLPのアミノ酸と分子量は比較的類似しており、142-205のアミノ酸配列、15,392-23,552 Daの範囲であった。CpMLP6とCpMLP10はアミノ酸が少なく、分子量も小さかった。一方、CpMLP5、CpMLP11、CpMLP13、CpMLP19はアミノ酸が多く、分子量も著しく大きかった。CpMLP遺伝子は0、1、2、3、12、14、16、17番染色体に存在していた。1番染色体には8種類のCpMLP遺伝子が存在し、そのうちの7種類はサブファミリーVIに含まれたが (図VI-1A)、アミノ酸や分子量に大きなばらつきがあることがわかった。また、2番染色体及び3番染色体に存在するCpMLP遺伝子はサブファミリーIVに、14番染色体、16番染色体及び17番染色体に存在するCpMLP遺伝子はサブファミリーIが含まれていた (図VI-1A)。

### CpMLPの系統樹

21種類のCpMLPを25種類のAtMLPと分類するために、neighbor-joining法を用いて系統樹を構築した (図VI-1A)。AtMLPとCpMLPは7つのサブファミリーに分類された。I (8種類のCpMLP)、II (AtMLPとCpMLP)、III (10種類のAtMLP)、IV (5種類のCpMLP)、V (2種類のAtMLP)、VI (7種類のCpMLP)、VII (12種類のAtMLP) の7つのサブファミリーに分類された。CpMLPはサブ

ファミリーI、IV、VIに分類され、CpMLP3のみがサブファミリーIIに分類された。AtMLPとCpMLPはサブファミリーIIを除き、クラスター化していた。

#### 細胞内局在

CpMLPの細胞内局在をWoLF PSORTを用いて予測したところ、CpMLP5、CpMLP10、CpMLP14を除く全てのCpMLPは細胞質で最も高いスコアを示し (図VI-1B)、CpMLP5、CpMLP10、CpMLP14はそれぞれ細胞膜、ミトコンドリア、核で高いスコアを得た。CpMLP5は細胞質ではスコアが確認されなかった。ほとんどのCpMLPは細胞質以外に葉緑体、細胞外空間、核でスコアを示した。

#### CpMLP遺伝子の構造と保存されたモチーフ

CpMLP遺伝子のエクソン・イントロン構造を決定したところ、全てのCpMLP遺伝子は少なくとも2つのエクソンと1つのイントロンを含んでいた (図VI-2A)。21種類のCpMLP遺伝子のうち15種類は、2つのエクソンが1つのイントロンで分割されていた。CpMLP5遺伝子、CpMLP11遺伝子、CpMLP13遺伝子は、少なくとも7つのエクソンと6つのイントロンを含み、他のCpMLP遺伝子とは異なっていた。CpMLP5遺伝子、CpMLP11遺伝子、CpMLP13遺伝子はサブファミリーVI (CpMLP5)、IV (CpMLP11、CpMLP13) に含まれていたが、これらのユニークな遺伝子構造はサブファミリーに依存しなかった。

#### CpMLPのドメインとモチーフの構造

21種類のCpMLPのうち18種類は、アミノ酸配列中に1つのBet v 1ドメインを含んでいた (図VI-2B)。CpMLP11とCpMLP19は、それぞれ3つと2つのBet v 1ドメインを含んでいた。CpMLP13は7つのBet v 1ドメインを含んでいた。モチーフ発見ツールであるMEMEを用いて、CpMLPのアミノ酸配列に保存されているモチーフを調査した。モチーフ1

(GDLFEHFKVFKVYKVVVEKGPNSCJVLTIIEYEKLEEGAAN) はCpMLPにおいて最も頻度が高く、13種類のCpMLPが配列の後部にこのモチーフを含んでいた (図VI-2C)。モチーフ7 (FKERVEFDDEKFTIVLVGLE) とモチーフ9 (PYKYJDLMNKJTKDI) は2番目に頻度が高く、12種類のCpMLPがその配列を含んでいた。CpMLP4、CpMLP5、CpMLP7、CpMLP8、CpMLP9、CpMLP10、CpMLP14、CpMLP15はこの3つのモチーフを含み、サブファミリーIV (CpMLP4とCpMLP5) 及びサブファミリーVI (CpMLP7、CpMLP8、CpMLP9、CpMLP10、CpMLP14、CpMLP15) に属することが分かった (図VI-2C)。

#### CpMLP遺伝子のプロモーター領域におけるシスエレメント

21種類のCpMLP遺伝子の翻訳開始点上流1 kbp領域をPLACEで解析し、プロモーター領域における植物ホルモンと根特異的発現に関連するシスエレメントの候補を同定した。PLACEは、植物ホルモン応答に関わる7つのシスエレメント (ABA応答性、オーキシン応答性、サイトカイニン応答性、ET応答性、ジベレリン応答性、JA応答性、及びSA応答性要素) を同定した (図VI-3A)。CpMLP4遺伝子を除くすべてのCpMLP遺伝子がABA反応性エレメントを有していた。また、すべてのCpMLP遺伝子にジベレリン応答性要素とSA応答性要素が含まれていた。一方、他の植物ホルモン (オーキシン応答性、サイトカイニン応答性、ET応答性、JA応答性) に関連するシスエレメントは、比較的少なかった。全てのCpMLP遺伝子は根に特異的なシスエレメントを含んでいた。

#### ズッキーニ亜種におけるCpMLP遺伝子の発現レベル

ズッキーニ*ovifera*亜種と*pepo*亜種の品種の根をRNA-seqに供し、高発現するCpMLP遺伝子を同定し、21種類のCpMLP遺伝子と最も相同性の高い配列を示したCpMLP遺伝子を選抜した。CpMLP6遺伝子とCpMLP12遺伝子はズッキーニ*ovifera*亜種において高いリード数を示し、MLP-PGI遺伝子と同様のパターンを示した (図VI-3B)。一方、CpMLP8遺伝子はズッキーニ

*pepo*亜種の品種において高いリード数を示し、*MLP-GR3*遺伝子と同様のパターンを示した (図VI-5.A)。*CpMLP*遺伝子のうち16種類は、ズッキーニ*ovifera*亜種と*pepo*亜種で10以下のリード数を示した。また、調査した品種には、*CpMLP3*遺伝子及び*CpMLP11*遺伝子に一致する配列はなかった。

*CpMLP4*遺伝子、*CpMLP6*遺伝子、*CpMLP8*遺伝子、*CpMLP9*遺伝子、*CpMLP12*遺伝子、*CpMLP21*遺伝子は少なくとも1品種の根で10リード以上を示したため、これらの*CpMLP*遺伝子と*MLP-PG1*遺伝子、*MLP-GR3*遺伝子の発現を調査した。*MLP-PG1*遺伝子及び*MLP-GR3*遺伝子は、ズッキーニ*pepo*亜種GR品種の根で著しく高い発現を示した (図VI-3C)。*CpMLP8*遺伝子と*CpMLP9*遺伝子は、*ovifera*亜種PG品種と比較して、*pepo*亜種GR品種の根で高発現しており、これはRNA-seqの結果と一致した。しかし、*CpMLP6*遺伝子はズッキーニ*pepo*亜種GR品種の根で高い発現を示し、RNA-seqの結果と対照的であった。*CpMLP4*遺伝子、*CpMLP12*遺伝子、*CpMLP21*遺伝子は根で全く発現していなかった。また、葉では根に比べて、全ての*CpMLP*遺伝子の発現が著しく低かった。

### CpMLPの立体構造

CpMLPの立体構造予測は、AlphaFold2を用いて行った (Jumper et al., 2021)。約17 kDaのCpMLPは、3つの $\alpha$ ヘリックスと7つの $\beta$ シートという典型的なMLPの二次構造を示していた。同じサブファミリーのCpMLPは、必ずしも同じ構造を示さなかった (図VI-4)。全てのCpMLPはキャビティ内に疎水性領域を含んでいた (図VI-4)。分子量が17 kDaの2倍のCpMLPはキャビティ容積が大きい傾向があった (表VI-2)。また、分子量が近いCpMLPは、同等のキャビティ容積を示した。また、サブファミリーVIのCpMLP7、CpMLP8、CpMLP9は同等のキャビティ容積であった。しかし、CpMLP1はCpMLP2の4倍も小さく、分子量も構造も類似するにも関わらず、異なる容積を示した。CpMLP13は構造が未解明であったため、AlphaFold2によるモデリングは行わなかった。

表VI-1. ズッキーニゲノムにおいて同定されたCpMLP

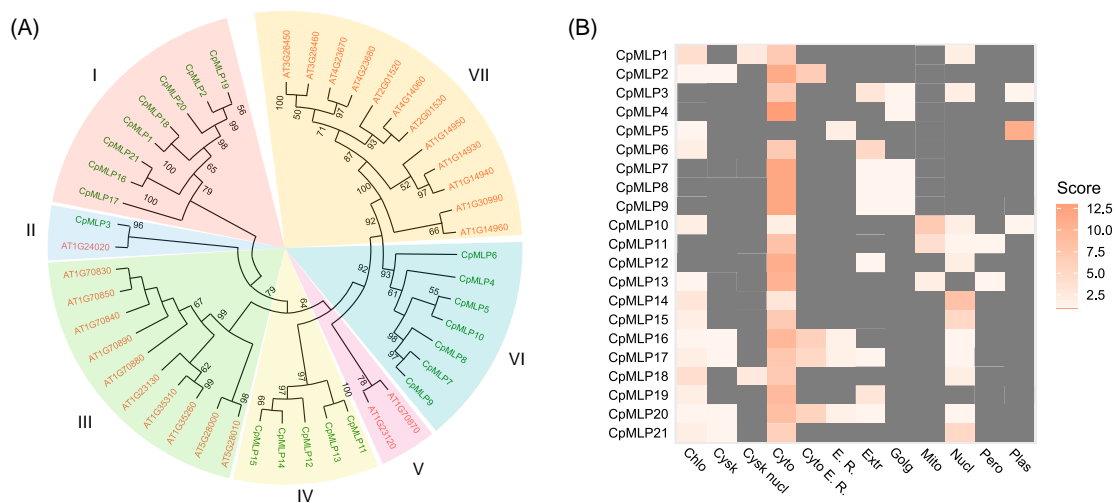
Gene	Gene ID	Amino acid	Location	Molecular weight (Da)	Subfamily <sup>a</sup>
<i>CpMLP1</i>	Cp4.1LG00g07060.1	159	Chr00: 23796116 .. 23797001 (+)	17574.13	I
<i>CpMLP2</i>	Cp4.1LG00g11610.1	160	Chr00: 34667181 .. 34668029 (-)	17574.00	I
<i>CpMLP3</i>	Cp4.1LG01g04090.1	155	Chr01: 1465294 .. 1467541 (-)	17312.57	II
<i>CpMLP4</i>	Cp4.1LG01g05720.1	151	Chr01: 525051 .. 528639 (+)	17470.33	VI
<i>CpMLP5</i>	Cp4.1LG01g07720.1	629	Chr01: 5254154 .. 5260803 (-)	70387.44	VI
<i>CpMLP6</i>	Cp4.1LG01g07730.1	104	Chr01: 5246964 .. 5247823 (-)	11787.38	VI
<i>CpMLP7</i>	Cp4.1LG01g07740.1	151	Chr01: 5269144 .. 5269890 (-)	17489.10	VI
<i>CpMLP8</i>	Cp4.1LG01g07750.1	151	Chr01: 5263963 .. 5264687 (-)	17526.90	VI
<i>CpMLP9</i>	Cp4.1LG01g07760.1	151	Chr01: 5266793 .. 5267508 (-)	17492.97	VI
<i>CpMLP10</i>	Cp4.1LG01g07770.1	109	Chr01: 5249000 .. 5249462 (-)	12496.73	VI
<i>CpMLP11</i>	Cp4.1LG02g16760.1	445	Chr02: 12551609 .. 12566618 (-)	50292.12	IV
<i>CpMLP12</i>	Cp4.1LG03g05870.1	162	Chr03: 4436896 .. 4438387 (-)	18629.32	IV
<i>CpMLP13</i>	Cp4.1LG03g05890.1	842	Chr03: 4442904 .. 4474190 (-)	108182.63	IV
<i>CpMLP14</i>	Cp4.1LG03g05900.1	150	Chr03: 4433116 .. 4433645 (-)	17051.51	IV
<i>CpMLP15</i>	Cp4.1LG03g05930.1	205	Chr03: 4439463 .. 4442277 (+)	23552.10	IV
<i>CpMLP16</i>	Cp4.1LG12g02820.1	176	Chr12: 1980900 .. 1982416 (+)	19345.30	I
<i>CpMLP17</i>	Cp4.1LG14g00140.1	160	Chr14: 4587872 .. 4588422 (-)	18115.94	I
<i>CpMLP18</i>	Cp4.1LG16g01870.1	159	Chr16: 4037155 .. 4038040 (-)	17574.13	I
<i>CpMLP19</i>	Cp4.1LG16g01890.1	294	Chr16: 4081793 .. 4092287 (-)	32341.80	I
<i>CpMLP20</i>	Cp4.1LG16g01910.1	160	Chr16: 4077476 .. 4078324 (-)	17597.09	I
<i>CpMLP21</i>	Cp4.1LG17g00490.1	142	Chr17: 293620 .. 294354 (+)	15392.50	I

<sup>a</sup>, Figure 1で示されたサブファミリーを表す

**表VI-2. CpMLPのキャビティ容積**

MLP	Volume (Å <sup>3</sup> )
CpMLP1	68.210
CpMLP2	407.627
CpMLP3	127.044
CpMLP4	64.615
CpMLP5	28575.611
CpMLP6	1057.709
CpMLP7	100.230
CpMLP8	74.714
CpMLP9	76.373
CpMLP10	224.345
CpMLP11	4854.621
CpMLP12	376.589
CpMLP14	77.109
CpMLP15	1446.632
CpMLP16	711.831
CpMLP17	239.963
CpMLP18	68.210
CpMLP19	678.856
CpMLP20	461.503
CpMLP21	1053.828
MLP-PG1	57.687
MLP-GR3	98.010





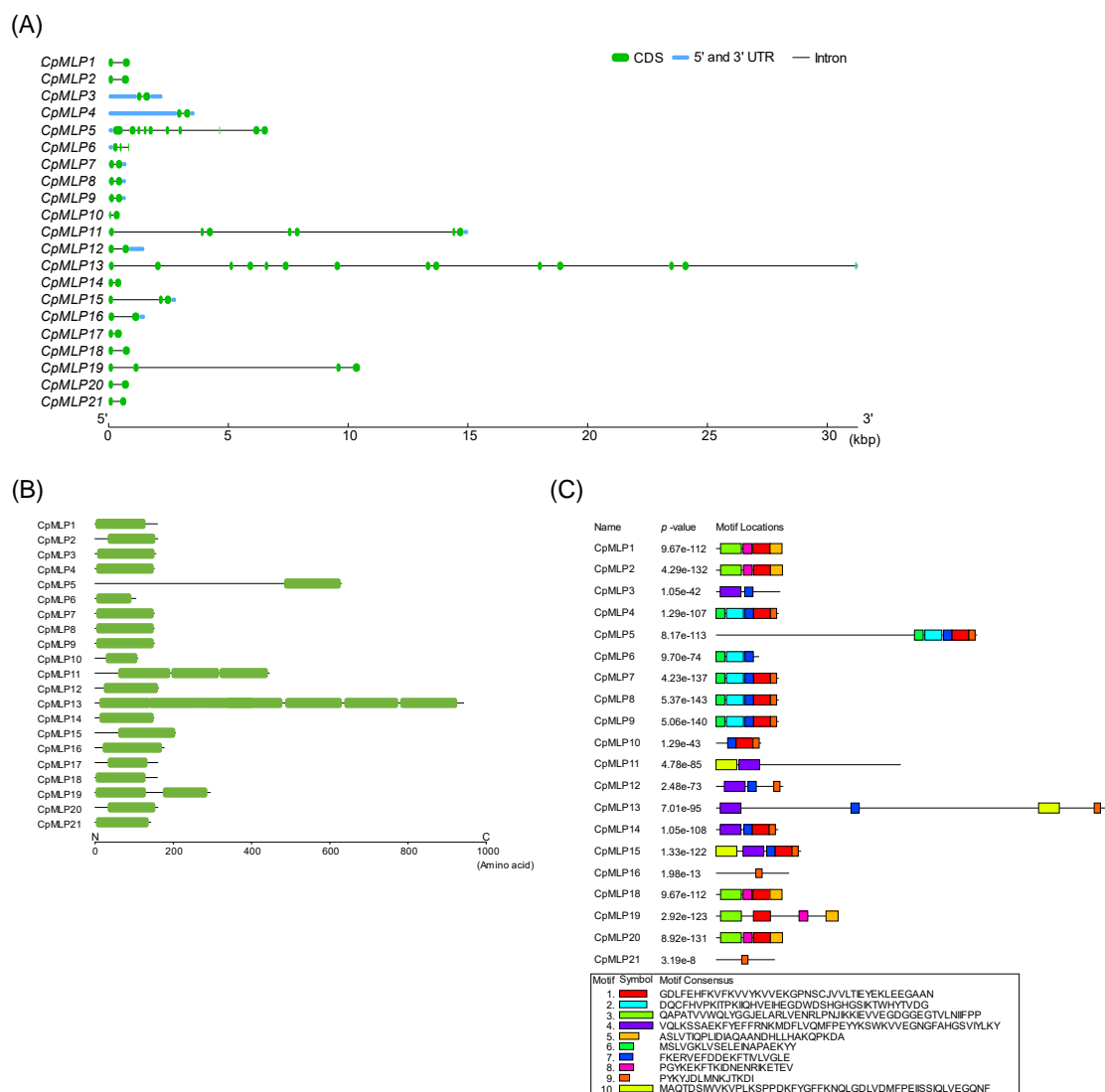
図VI-1. CpMLP遺伝子のアミノ酸配列

(A) シロイヌナズナとズッキーニのMLPの系統樹

25種類のAtMLPと21種類のCpMLPのアミノ酸配列をアラインメントし、MEGA7.0を用いてneighbor-joining法を適用して系統樹を構築した。Bootstrap値50に設定して系統樹を構築した。系統樹中の数字は信頼度を示す。赤文字と緑文字はそれぞれAtMLPとCpMLPを示す。

(B) ズッキーニのMLPの細胞内局在

CpMLPの細胞内局在をPSORTを用いて予測した。該当なし、低い、高いはそれぞれ灰色、白色、橙色で示した。Chlo, 葉緑体; Cysk, 細胞骨格; Cysk nucl, 細胞骨格及び核; Cyto, 細胞質; Cyto E. R., 細胞質小胞体; E. R., 小胞体; Extr, 細胞外; Golg, ゴルジ体; Mito, ミトコンドリア; Nucl, 核; Pero, ペルオキシソーム; Plas, 色素体。



## 図VI-2. CpMLP遺伝子とCpMLPのタンパク質構造

(A) ズッキーニ由来のMLP遺伝子のエクソン・イントロン構造

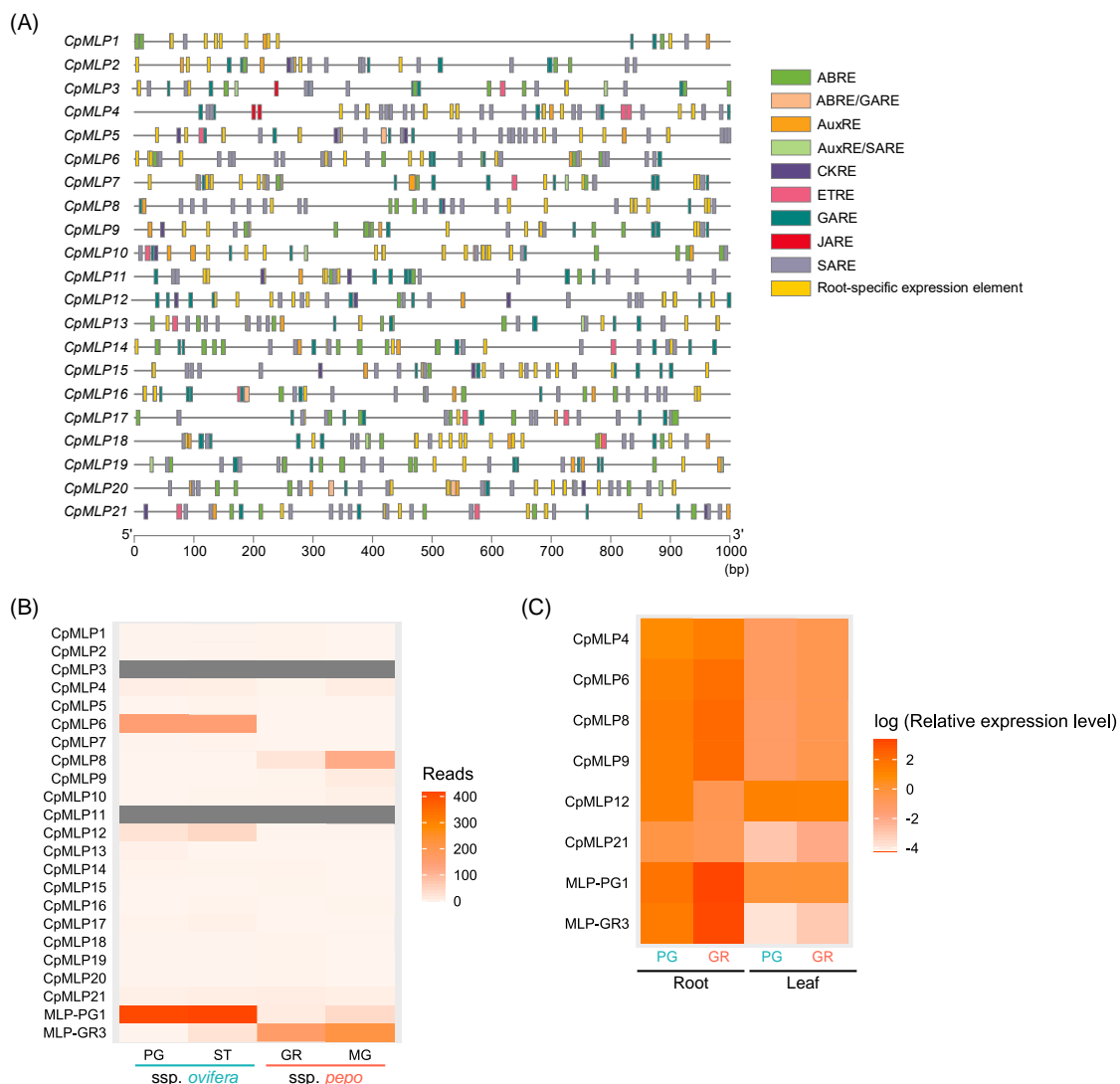
イントロンとコーディング配列を持つ遺伝子をズッキーニデータベースから抽出し、Gene Structure Display Serverを使用して可視化した。CDS, コーディング配列; UTR, 非翻訳領域。

(B) ズッキーニ由来のMLPのBet v 1ドメイン

21種類のCpMLPのアミノ酸配列中のドメインをNCBI Conserved Domain Searchで解析した。丸い緑色の長方形はBet v 1ドメインを示す。

(C) ズッキーニ由来のMLPに含まれるモチーフ

21種類のCpMLPのアミノ酸配列中のモチーフをMEME version 5.4.1を使って解析した。各色の長方形は保存されたモチーフを示す。 $p$ 値が低いMLPの典型的なモチーフはCpMLP17では検出されなかった。



### 図VI-3. CpMLP遺伝子の発現

(A) CpMLP遺伝子のプロモーター領域のシスエレメント

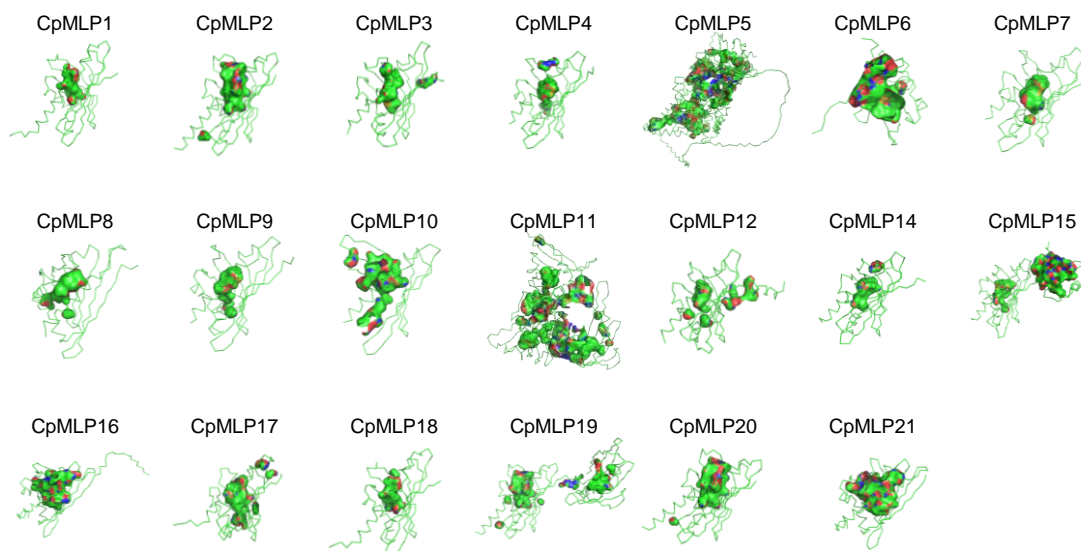
CpMLP遺伝子の翻訳開始位置上流1 kbp領域を抽出し、PLACEデータベースを用いて植物ホルモンと根特異的の発現に関連するシスエレメントを同定した。ABRE, ABA応答性エレメント; AuxRE, オーキシン応答性エレメント; CKRE, サイトカイニン応答性エレメント; ETRE, ET応答性エレメント; GARE, ジベレリン応答性エレメント; JARE, JA応答性エレメント; SARE, SA応答性エレメント。

(B) ブッキーニ*ovifera*亜種と*pepo*亜種のCpMLP遺伝子のRNA-seq解析

ズッキーニ*ovifera*亜種の品種 (PG及びST) と*pepo*亜種の品種 (GR及びMG) を26°Cで16/8時間の明暗サイクル下で40日間栽培した。根からRNAを抽出し、RNA-seqを行った。低リード数は茶、高リード数は橙で示した。*CpMLP3*遺伝子及び*CpMLP11*遺伝子と一致する遺伝子は無かったため、これらの遺伝子の列は灰色で示した。

(C) ズッキーニ*ovifera*亜種及び*pepo*亜種由来のMLP遺伝子の発現解析

ズッキーニ*ovifera*亜種のPG品種と*pepo*亜種のGR品種を26 °C、16/8 hの明暗サイクル下で13日間栽培した。葉と根からRNAを抽出し、qRT-PCRを行った。プライマー配列を補足表VI-2に示す。



#### 図VI-4. CpMLPの立体構造

21種類のCpMLPのアミノ酸配列から予測される構造をAlphaFold2を用いて構築した。キャビティは緑色の丸で表し、青色と赤色の部分はそれぞれ親水性と疎水性を示す。CpMLP13は構造が未解明であるため、AlphaFold2では構造を構築していない。

補足表VI-1. ズッキーニゲノムにおいて同定されたCpMLPのアミノ酸配列

MLP	Sequence
CpMLP1	MVTIISDQTEIPAPAAKVWALYGTIHFADFLQLHLPNIINNVELLEGDGGQG TLVLVTFAPDLGGMRYKEKFKIDNEQRKIAEMVEGGYLDLGFTVYRFCF EIIKDEESCIVKSSVEYELKEEAAANVSLASVQPLIAIAQAQAKSYFLNAQQ PTDA
CpMLP2	MLGQLSHEAAIQAPATVWQLYGGLELARLIENRPLNIKKIEVVEGDGGE GTVLNIIFFPGLGGAPGYKEKFTKIDNENRIKETEVVEGGFLDIGFTLYRVR LKIVENGDDSCIVESTIEYDIKEEDAANASLVTIQPLIDIAQAANDHLLHNKQ HKNV
CpMLP3	MASDGTLNVEVDVKSVPKFWNSMRDSTIIFPKAFPHDYKSIEVLEGDGK AVGSVRLITYSEGSSLVKDSKERIEAVDEEAMTVSYSVIEGDLLKYYKSFK GHIGVIPKEDGSGSKVKSCEFEKASEEVPDPHVIKDFVVKNFLELDDYV LQQP
CpMLP4	MALAGKLVSEVKINVAAEKYYKIWKHEVSHVPKICPKYIQKVEVHEGDWD SHGHGSVKIWHYSIDGKAGFFKERVEFDDKNMAMLLVGLDGMFEHYKS FKATYKVVPKGPNHCLVVMILKYEKL RADCPSPYKYIDLMNDLTKSLESYL Q
CpMLP5	MGASHQWSSSLQTAPIKLSIPLTSPSNFIFYCKRSRVNYSSTSRCAVC AHNSNLPRPKSTNSDARISKS VVLGDCQGHVLRISSTSIRRRKSVILSLV SLFDKRSLWRRIF FASKK VRSIILLNIVTIVYASSIPVVEEELVDPATFNAV RFAITAIPFVPLVLYKWDDVETRNAGIELGFVWVSLGYLMQAFGLLTS DAGR ASFISMLTVLVVPILDGVLGAVVPARTWFGVLM SVIGVAMLESSGSPPCVG DLLNFLSAIFFGVHMLRTEHISRTEKDKLVPLLAYEVCVVSILSMLWYFIW RWIDGTETISESWNWKTYSDWVFMFPWPALYTGLLSTGFCLWLEMGA MCDVSATETAVIYSLEPVWGG SFAWFLLGERWGLSGWIGAALVLGGS LTV QILSSSATK SCKDDRSKEVHDLG SADRSLSTSPIVLRV LAPRLRENVE GKPLG SVICKPISNRVSETMSLRGKFVSELELNAAAHKYYKLFKHQVSHIP NISPGIFKNVEVHEGDWDTHGHGSIKIWNYNIDGKDEVFKEQVEFDDEKL SVTLIGLEGDVFEHYKTFKGIYQVVPKGPEHCLAVLTLEYEKLDDGSPYPY KYLDLMNNLTRDIESHLK
CpMLP6	MSLAGKLVSEIEINVAAEKYYKVFKDQPFNVPNISP KLVQQVELDEGDWD NHGHGSVKTWKYTVDGKPEVFKEKA EFDDEKFTIIMNGLQGDVRVKINK GYPGV
CpMLP7	MSLVGKLVSELEINIPA EKYYKVFKDQCFHVPKITPKIIQHVEIHDGDWDSH

DHGSIKTWHYTVDGKSEVFKERVEFHDEKFMVVLVGLGDLFNHYKTFK  
 PVCQVVPKGPSHCLAVLTIEYEKLDGSPYPFKYIDLMNGITKDIESHLK  
 CpMPL8 MSLVGKLVSELEINAPAKEYYKVKDQCFHVPNITPKFIQHVEIHEGDWDS  
 HDHGSIKTWHYTVDGKSEVFKERVEFHDEKFTIVLVGLEGDVFNHYKTFK  
 PVYQVVPKGPSHCLAVLTIEYEKLDGSPYPYQYIDLMNGITKDIESHLK  
 CpMPL9 MSLVGKLVSELEINAPAKEYYKVKDQCFHVPKITPKIIQHVEIHDGDWDS  
 HDHGSIKTWHYTVDGKSEIFKERVEFHDEKFTVVLVGLEGDVFNHYKTFK  
 PVYQVVPKGPSHCLAVLTIEYEKLDGSPYPYKYIDLMNGITKDIESHLK  
 CpMPL10 MSLKFITATGRIIVMARSKSGITLLAEELKERVEFDDKNLVVCMIGLEGDVF  
 EHYKVFKAIFKVPKGPNSAVILILEYEKLDHGGPPYPHKYHDAMHKLAKDI  
 ESHLK  
 CpMPL11 MSQTDSIWAKLPLKSPDFTFYGFFKNQVGDVDMFPEYISSIQLAEGENF  
 APDSVMQFKYSLEKYYGFFRNHMGDMVNLLPQYFSSIQLVEGANFSPDC  
 IIQFKYSLGGGSLSAKVKIKAVDDAKKLLAYNVIEGDVLKHYKVFVMEVV  
 NGGTSKGGGGSFAKWSVFEKANENVAAPEDYLEWFKISKGFVKSPP  
 DKFYGFYRNHVGDLIDLFPQYFSSIQFVEGEKYSVIRFNIRFANIKIKA  
 VDDVKKSLVYKVIIEGDILKHYKVFELRIEAVNGGISKGGGGSFAKWSIVFE  
 KANENVGAPQGYLEWHKMHHLPQIFSKNLHSFEFLEGNDFTPGLMHW  
 SYDIVGPAKMKAKVADVDEENKSITYEAVEGDILSQYTLRSKFRAYDDVE  
 NGGAINWSFEFEKANENIPSPEAYLEFVSKISIGLDAYLAVN  
 CpMPL12 MDEHILKYLKMAQISNISHQLQLKCSGEQFYEFYRNKMDRLTQMFPKLL  
 GYKIVEGNFAGHSVVYWKYELGCILEAKQKLHMDDKNKAITLEFIEGDLF  
 KEYEMIAVKGEVSDGGSSNGISSVKWSVEYVKANEDVDPHNYLQFALEL  
 AKGVDAYLCNNN  
 CpMPL13 MSQIESIWGKVQLKSSPEKFFGFFRNHMGDLVHMFPDHFQSFHFVEGQN  
 FDDGSVHWKYHLGIPEAVKIKMKNRDEARTIIEVVEGDALKHYKVFRAK  
 LETVSGGLNKVGGSFACWTIEYEKAHENVSPETYMELALKLKSSPEKFY  
 GFFRNHMGELVHMFPDHFQSFHFLEGQNFDDGSVQWKYHLGFPEAAK  
 VRMRVMDEARTIIEVVEGDALKHYKAFRVKLETVSGDLNKVGANFAKWT  
 IEYEKAHQNVASPETYLELALQLKSSPEKFGFFRNHMGELVHMFPDHFQ  
 SFHFLEGQNFDDGSVQWKYHLGFPEAAKVRMRVMDEARTIIEVVEGD  
 ALKHYKAFRVKLETVSGDLNKVGANFAKWTIEYEKAHQNVASPETYLELA  
 LQVTKGFPEAAKVRMRVMDEARTIIEVVEGDALKHYKAFRVKLETVSGD  
 LNKVGANFAKWTIEYEKAHQNVASPETYLELALQKMGKSDSIWAKIDLKS  
 SPEKFGFFRNHLGDLVDLFPENYKSIQLVEGQHFSGGNVFLFKFQFGFG  
 HQLRVEKWAIKAVDDVKYIIEAVEGDVLKQFKVLRVKVEAVHGGSTKV



GGGNFTKWTVEFEKANQNVASPNYLELFVKISKGTMGKSDSIWAKVDL  
KSSHEKFYGFRRNHLGDLVDFPENFNSIQLVEGQHFDRGSLVLRHEHRV  
EKWVIRAVDDVKYIVYEAVEGEALKQFKVLRAKVEAVHGGSTKVGGGNF  
TKLTIEFEKANENVASPEIYLELFVKIAKGKMQTDSIWKVLDLKSSPEKVY  
GFFRNHLGDLVDFPETYQSIQLVEGQHFSSGSVQFKFQFGDELRAEK  
WAIRVDDVKYIYEAVEGDPLKEFKVLRAKFEVNGGLSKVRRGNFTK  
WTVEFEKANQNVASPNYLELFVKISKGILVDVESVQKLCGYNT

CpMLP14 MAQIAKVSQKVQLRSSGHKFYELLKNKMDVFQMFPEVYKSWKVLEGN  
GLAHGSIIYLYDVGDLSEAKERLAIDDANKSITFECLEGLDFRDFEVFKLK  
IEVVENGSSNGCSSNWSIEYVKANEDVAPPHNYLIIAAKISKGIDDYLCNK

CpMLP15 MAQNAKISRQVQLKCCGHKFYELFKNKMGCVFQMFPEICSSWKVLEGN  
EFAHVRVIHVKYVVSQEVQLRSSAPKFEFLKNKMDVFQMFPEIYKSWK  
VVEGNGYAHGSVIQLKYNVDGPSEVKERLTIDDANKSLTFECVEGDLLRD  
FEVFKMKIEVVENGSSANWSIEFVKANEDVATPHNYLLCVAKVSKGI  
DDYLCNK

CpMLP16 ISFSLFLLKLPSCEIAMGVFTYENEVTTVIPPAAFFKAFILDADRLYPKIVPH  
QPKTEVVEGDGGPGTIKITFSHGGQVKSIIKHLVDVDEKSLTYKYTVLEG  
ELLSDNIDQISKELKVTDGPDGGSILKSVSIYHTKGDHQIDEQKLKIGEEKG  
LGLLKAAEAYLLANPAEYN

CpMLP17 MVTKEAKAEAKLGVETLWKALAKDLRFIIPQLMPDVEKIELLHGDGGV  
GSILLFHLVHKEEAMRSQKERIVEVDETRHELVIQVLEGNVLKRGFSSFKT  
TFKLSSLSEKESLVDIKVAYETEKDGEDEQARMDAIATAPPLYFFQLLEKFL  
LPTSNT

CpMLP18 MVTIISDQTEIPAPAAKVVWALYGTIHFADFLQLHLPNIINNVELLEGDGGQG  
TLVLVTFAPDLGGMRYKEKFKIDNEQRKIAEMVEGGYLDLGFVYRFCF  
EIIKDEESCIVKSSVEYELKEEAAANVSLASVQPLIAIAQAQAKSYFLNAQQ  
PTDA

CpMLP19 MLGKLSHETVIQAPATVAWQLYGGLELARLVENRFSNLIQKIEVVEGDGGE  
GTVLNLIFPPGVGRFSSFKFKTRIDNENRIKETEIVEGGFLDIGFTLYRVC  
LKIVENGDDSCIVESTIEYEIKEEAAANASLMLGQLSHEAAIQAPATVAWQL  
YGGLELARLVENRSLNLIQKIEVVEGNGGEGTVLNLIFLPLGGAPSYKEK  
FTKIDNENRIKETEVEGGFLDIGFTLYRVRLKIVENGDDSCIVESTIEYEIK  
EEAAANASLVTLQPLIDIAQAANDHLLHYKQLKDA

CpMLP20 MLGHLSHEAVIQAPATVWVWLYGGLELARLVENRPLNLIKIEVVEGDGGE  
GTVLNIIFPPGLGGAPGYKEKFTKIDNENRIKETEVEGGFLDIGFTLYRVR  
LKIVENGDDSCIVESTIEYDIKEEDAANASLVTIQPLIDIAQAANDHLLHNKQ

HKNV

CpMLP21 MGVFTYENEVASVIPPEKFFKAFILGADQLYPKIVPNQPQSVLEGDGGPG  
TIKTISFSVASRTYKYTVLEGELLSDAIDKISKEIKVVEGPPSGGSILKSTSVY  
HTKGDHQIDEKLSGEQKGLALLKAAEAYLLANPNEFN

---

補足表VI-2. プライマー配列

Primer	Sequence
CpActin-s	5'-TCCAGGCCGTTTTATCTC-3'
CpActin-as	5'-CAGAATCCAACACAATACCTGT-3'
CpMLP4-s	5'-TGGCCATGGCTCAGTCAAGA-3'
CpMLP4-as	5'-CCAATCCAACCAAAGCATTGCC-3'
CpMLP6-s	5'-TGGTCGGGAAACTGGTGAGC-3'
CpMLP6-as	5'-TGAATCTCAACGTGCTGGATGA-3'
CpMLP8-s	5'-AGCGAGTGGAATTCACGACG-3'
CpMLP8-as	5'-ATGGCTAGGACCCTTTGGCA-3'
CpMLP9-s	5'-CCTGGCATTACACAGTTGATGGG-3'
CpMLP9-as	5'-GGCACAACCTGATATACCGGC-3'
CpMLP12-s	5'-TCGGGTGCATACTAGAGGCA-3'
CpMLP12-as	5'-TGCCATTGCTCCCACCATCA-3'
CpMLP21-s	5'-ACGAAAACGAAGTGGCGTCG-3'
CpMLP21-as	5'-ACGGATTGAGGCTGATTTGGC-3'
MLP-PG1 -s	5'-ATTCAAAGTGCTAAGAGCAAAAT-3'
MLP-PG1 -as	5'-CCTTTTCAAACCTCAACAGTCCA-3'
MLP-GR3-s	5'-AATTCAAAGTGCTTAGAGCAAAGG-3'
MLP-GR3 -as	5'-TGCCTTTTCAAACCTCAATAGTCAA-3'

## VI-5. 考察

本研究の目的は、ズッキーニゲノム中の*CpMLP*遺伝子を同定し、それらがPOPsの蓄積に与える影響について考察することである。ズッキーニ*pepo*亜種は、地上部にPOPsを高濃度に蓄積する (Inui et al., 2008)。我々はこれまでに、3種類の*CpMLP*をその蓄積の重要な因子として同定した (Inui et al., 2013)。過去の研究で、双子葉植物のゲノムには10個以上の*MLP*遺伝子が存在することが示されているが (Zhang et al., 2018)、POPs蓄積に関与する*CpMLP*遺伝子数はまだ不明である。そこで、ズッキーニゲノムデータベースから*CpMLP*遺伝子の数を調査し、POPs蓄積に与える影響を予測した。

HMM検索とBlastP検索の結果、ズッキーニゲノムには、単一又は複数のBet v 1ドメインを持つ*CpMLP*が21種類含まれていた (図VI-2A)。これまでの研究で、ナタネ、リンゴ、ブドウのゲノムには、それぞれ31、36、14種類の*MLP*遺伝子を有することが示されている (Zhang et al., 2018; Yuan et al., 2020; Zeng et al., 2020)。植物種によって*MLP*遺伝子の数が異なるのは、ゲノムサイズ (ナタネ: 442.9 M、リンゴ: 687 M、ブドウ: 487 M) とそれぞれの生理機能に関連していると推定される (Zhang et al., 2018; Yuan et al., 2020; Zeng et al., 2020)。At*MLP*と*CpMLP*は、そのアミノ酸配列から7つのサブファミリーに分類され、サブファミリーIIを除くすべてのサブファミリーはAt*MLP*か*CpMLP*のどちらかに排他的であった (図VI-1A)。このことから、*MLP*遺伝子は、シロイヌナズナとズッキーニの種分化の後に多様化したことが示唆される。

次に、*CpMLP*の細胞内局在を予測した (図VI-1B)。ほとんどの*CpMLP*は細胞質で最も高いスコアを示した。根に吸収されたPOPsは細胞膜で拡散し、細胞間壁に形成される内皮の拡散障壁であるカスパリー線に阻害されずに内皮や内鞘に輸送される (Roppolo et al., 2011; Yamazaki et al., 2015)。従って、細胞質に局在する*CpMLP*は、細胞膜のPOPsと結合し、細胞質において可溶化する。その後、複合体は導管に移行し、地上部に輸送される。また、細胞外領域に局在する*CpMLP*は、小胞体やゴルジ体で同等のスコアを示す傾向があった (図VI-

1B)。CpMLP遺伝子は根で高発現しており、導管液と根からCpMLPが検出される。これは、CpMLPが根細胞から細胞外に分泌されることを明確に示している。植物タンパク質の分泌には、小胞体とゴルジ体が重要な役割を担っているため (Drakakaki and Dandekar, 2013)、CpMLPは小胞体やゴルジ体を経由して細胞外に分泌されると考えられる。

全てのCpMLP遺伝子のプロモーター領域には植物ホルモン応答に関連するシスエレメントが含まれており、ほとんどのCpMLP遺伝子がABA、ジベレリン、SAなどの植物ホルモンによって制御されることが明らかになった (図VI-3A)。これまでに、MLPはABAシグナル伝達経路を介して、乾燥耐性を付与することが示されている。MLP43はSnRK2及びABF1との相互作用を通じてABAの制御因子として機能する (Wang et al., 2016)。ABAはコムギで同定されたMLPであるTaSTPを抑制し、TaSTPはTaDIS1との相互作用により乾燥耐性を付与する (Lv et al., 2020)。さらに、ABA受容体はBet v 1と構造的な類似性を示す (Ma et al., 2009; Melcher et al., 2009)。従って、MLPは遺伝子発現と受容体の側面からABA応答を示す。JAはズッキーニ (Fujita et al., 2022)、クワ (Gai et al., 2018)、タバコ (Song et al., 2020) などの複数の植物でMLP遺伝子を誘導する。しかし、SAによるMLP遺伝子の誘導に関する報告はほとんど無い。CpMLP遺伝子にはSA応答エレメントが複数含まれたため、これらの結果はこれまでの報告とは異なっていた (図VI-3A)。PR-10遺伝子はSAによって誘導される傾向があり (Liu and Ekramoddoullah, 2006)、CpMLP遺伝子は典型的なMLP遺伝子ではなく、PR-10遺伝子と同様の発現誘導機構を示すことが明らかとなった。ズッキーニで同定されたMLP遺伝子 (Goto et al., 2019; Fujita et al., 2022) は、根で高発現していたため、21種類のCpMLP遺伝子のほとんどで低い発現量が観察されたのは予想外だった (図VI-3B & C)。しかし、複数の植物では、MLP遺伝子の発現が器官間で異なっている (Zhang et al., 2018; Yuan et al., 2020)。例えば、VvMLP5遺伝子とVvMLP14遺伝子は、根と葉で高発現していた。

全てのCpMLPは内部に疎水性領域を持つキャビティを有していた (図VI-4)。キャビティ容積はCpMLP間で著しく異なっていた。また、これまでに構造が明らかにされているMLPで

も、キャビティの容積に大きな違いが見られた。例えば、チョウセンニンジン由来のMLP151のキャビティ容積は、シロイヌナズナ由来のMLP28よりも6倍小さい (Choi et al., 2015)。これは、長い $\alpha 3$ がコア $\beta$ シートに向かった傾きや長いループの存在によるものである (Pasternak et al., 2005; Lytle et al., 2009)。CpMLP17とCpMLP18は類似したアミノ酸配列を持つが、異なるキャビティ容積を示した (表VI-2)。CpMLP17の $\alpha 3$ はCpMLP18よりも傾いており、キャビティ容積の違いをもたらしたと考えられる (図VI-4)。しかし、これらはCpMLPで常に見られるわけではなく、アミノ酸配列が類似するCpMLP1とCpMLP2では、 $\alpha 3$ の傾きは見られず、MLP28のような長いループも持たないが、顕著なキャビティ容積の違いが見られた (表VI-2)。CpMLP2の $\beta 2$ と $\beta 3$ の間のループはコア $\beta$ シートから伸びており (図VI-4)、CpMLP2の方がキャビティ容積が大きいことを示している。

CpMLP8と類似の配列を持つ遺伝子のみがズッキーニ*pepo*亜種の根で高発現し、他の遺伝子は高発現していなかった (図VI-3B & C)。CpMLP8遺伝子の発現パターンは、ズッキーニ*pepo*亜種においてPOPs輸送に重要な因子であるMLP-GR3遺伝子と同様の発現パターンを示している。CpMLP8は主に細胞質に局在し、細胞外に分泌されることが予測された (図VI-1B)。CpMLP8のキャビティ容積は、POPsとの結合能を持つMLP-PG1よりも大きく (表VI-2) (Goto et al., 2019)、CpMLP8はPOPsと結合するのに十分な大きさのキャビティを持つことが示唆された。以上のことから、CpMLP8遺伝子は根で発現し、根細胞の細胞質でPOPsと結合し、その複合体は細胞外に分泌されると予測され、CpMLP8はPOPの蓄積に重要な役割を担っていると考えられる。

## 第VII章

### 総合考察

POPsを始めとする疎水性有機汚染物質は、残留性の高さから、地球上の陸海を汚染しており、農環境も例外ではない。ウリ科作物は、土壤中のPOPsを高濃度に地上部に蓄積するので、ウリ科作物の汚染に伴う健康被害が懸念される。これには、ズッキーニから同定されたMLPが深く関与している。根細胞で発現したMLPは、土壤中から根に吸収されたPOPsと結合する。そして、MLP-POPs複合体として導管に移行した後、地上部へと輸送される。その結果、ウリ科作物の果実は高濃度のPOPsにより汚染される。本学位論文では、MLPの機能制御による汚染低減(第二章、第三章)、POPs輸送とは異なるMLPの本来の生理機能の解明(第四章、第五章、第六章)を図った。

MLPは根細胞で遺伝子発現し、POPsと結合する。従って、根における遺伝子発現抑制、又は根におけるPOPsとの結合阻害により、ウリ科作物におけるPOPs汚染を低減できるという着想に至った。そこで、農環境での使用が認められ、安全性が担保された低分子化合物である農薬に着目した。即ち、MLP遺伝子の発現を抑制する農薬、又はMLPとPOPsの結合を阻害する農薬の散布により、汚染低減を試みた。MLP遺伝子の発現を抑制する農薬として選抜した殺菌剤ダコニールは、根におけるMLP遺伝子の転写活性を抑制し、根並びに導管液におけるMLP量を減少させ、導管液中のPOPs濃度を低下させた。一方、MLPとPOPsの結合を阻害する農薬として選抜した殺虫剤コルトは、MLPとPOPsの結合を*in vitro*で競合的に阻害し、導管液中のPOPs濃度を低下させた。過去に行われたウリ科作物におけるPOPs汚染低減法は、土壤の浄化に着目しており、POPsを土壤から除去しない限り、安全なウリ科作物生産は困難であった。しかし、本研究では、農薬によりMLPの機能を制御することで、POPsで汚染された土壤であっても安全なウリ科作物生産を可能にする。

MLPは、PR-10と同じBet v 1ファミリーに属するタンパク質である。多くの植物は、MLPとPR-10の一方しか有していない。そのため、MLPを有する植物では、MLPがPR-10のような

RNase活性を介した病害抵抗性を示すと考えた。しかし、MLPはRNase活性を有さず、一方でPR遺伝子の発現を誘導し、病害抵抗性を示すことが明らかになった。

ズッキーニ*pepo*亜種では、*A20 AN1 ZFP*遺伝子の高発現により、*MLP-GR3*遺伝子の転写が活性化され、POPs蓄積が促進に結び付くことが明らかになった。*A20 AN1 ZFP*は、ストレス耐性に関わるタンパク質であるため、*A20 AN1 ZFP*によるMLP遺伝子の転写活性化は、MLPが関与するストレス応答経路の上流を明らかにしたと言える。

MLPの隠れマルコフモデルを作成し、ズッキーニゲノムにおいて、MLPの網羅的同定を行った。その結果、ズッキーニゲノム中には、21個のMLP遺伝子が存在していた。それぞれのMLP遺伝子の根における発現量、リガンド結合キャビティの疎水性と体積などの観点から、POPs蓄積への寄与を評価した。しかし、多くのMLP遺伝子の根における発現量は低く、過去に同定された*MLP-GR3*遺伝子の方がPOPs蓄積への寄与は大きいと結論付けた。

以上の結果より、MLPの遺伝子発現や結合制御をケミカルバイオロジー的アプローチにより達成することで、ウリ科作物におけるPOPs蓄積を抑制した。また、MLPの生理機能を、植物遺伝学や植物病理学から洞察し、遺伝子・タンパク質の観点から詳細に評価した。これにより、MLPが関与する生理機能を複合的に捉えた。しかし、MLPとPOPsの結合やMLPの導管への移行における分子基盤は明らかにされていない。また、MLPが根から地上部へと長距離輸送される生理的意義は未解明である。今後は、前述の事項の解明により、MLPによるPOPs輸送の全容解明、MLPの生理機能の解明に迫る研究を展開したい。



## 出版論文

### Research article

1. **Fujita K**, Haga Y, Yoshihara R, Matsumura C, Inui H. (2020)

Suppression of the genes responsible for transporting hydrophobic pollutants leads to the production of safer crops

*Science of the Total Environment* 741, 140439

2. **Fujita K**, Kondoh Y, Honda K, Haga Y, Osada H, Matsumura C, Inui H. (2020)

Pesticide treatment reduces hydrophobic pollutant contamination in *Cucurbita pepo* through competitive binding to major latex-like proteins

*Environmental Pollution* 266, 115179

3. **Fujita K**, Asuke Y, Isono E, Yoshihara R, Uno Y, Inui H. (2022)

MLP-PG1, a major latex-like protein identified in *Cucurbita pepo*, confers resistance through the induction of pathogenesis-related genes

*Planta* 255, 10

4. **Fujita K**, Yoshihara R, Hirota M, Goto J, Sonoda C, Inui H. (2022)

AN1/A20 zinc-finger proteins positively regulate major latex-like proteins, transporting factors for dioxin-like compounds in *Cucurbita pepo*

*Chemosphere* 305,135536

5. **Fujita K**, Chitose N, Chujo M, Komura S, Sonoda C, Yoshida M, Inui H. (2022)

Genome-wide identification and characterization of *major latex-like protein* genes responsible for the crop contamination in *Cucurbita pepo*

*Molecular Biology Reports*, in press

## Review article

1. **Fujita K**, Inui H. (2021)

Review: Biological functions of major latex-like proteins in plants

*Plant Science* 306, 110856

2. **Fujita K**, Inui H. (2021)

How does the Cucurbitaceae family tale up organic pollutants (POPs, PAHs, and PPCPs)?

*Reviews in Environmental Science and Bio/Technology* 20(3), 751-779

## 謝辞

まず、乾秀之博士 (神戸大学 バイオシグナル総合研究センター) に感謝したい。研究室配属時から今までの研究成果は、ひとえに日々のご指導の賜物である。また、ポーランドやアメリカでの学会発表や通訳等といった多くの貴重な機会を与えて頂いたことにも感謝する。

宅見薫雄博士 (神戸大学大学院 農学研究科) には、入学時から親身になって支えて頂き、研究に関する多くのご助言だけでなく、研究者としてのあるべき姿を教えてくださいましたことに感謝したい。研究者である限り、先生の言葉を胸に刻み、研究を進めたい。

土佐幸雄博士 (神戸大学大学院 農学研究科) には、植物病理学や農薬生化学の観点から、本学位論文執筆にあたり、非常に有用なご助言を頂いたことに感謝する。

中屋敷均博士 (神戸大学大学院 農学研究科) には、研究を一層発展できるような分子生物学的アプローチを数多く提案して頂いたことに感謝する。

水谷正治博士 (神戸大学大学院 農学研究科) には、タンパク質の構造生物学的観点を始めとして、今後の研究の方向性に関する多くをご教示頂いたことに感謝する。

宇野雄一博士 (神戸大学大学院 農学研究科) には、修士課程時代から、研究上のご助言だけでなく、励ましをくださったことに感謝する。

共に研究を推進して頂いた長田裕之博士 (理化学研究所 CSRS)、近藤康光博士 (理化学研究所 CSRS)、本田香織氏 (理化学研究所 CSRS)、松村千里氏 (兵庫県 環境研究センター)、羽賀雄紀博士 (兵庫県 環境研究センター)、吉原亮平博士 (埼玉大学大学院 理学研究科)、足助聡一郎博士 (神戸大学大学院 農学研究科)、古村翔也氏 (京都大学大学院 農学研究科) に感謝したい。

また、中野武博士 (大阪大学 環境安全研究管理センター)、森垣憲一博士 (神戸大学大学院 農学研究科)、杉浦真治博士 (神戸大学大学院 農学研究科)、吉田健太郎博士 (京都大学大学院 農学研究科)、Vladimir Beškoski博士 (University of Belgrade, Faculty of Chemistry)、谷本泰

士博士 (大阪公立大学大学院 理学研究科)、石橋美咲博士 (京都大学大学院 農学研究科) には、キャリアにおける数多くの貴重なご助言を頂いたことに感謝したい。

神戸大学大学院 農学研究科 乾グループ、神戸大学大学院 農学研究科 植物遺伝学研究室の皆様にも感謝する。

最後に、私を支えて頂いた全ての方々に感謝したい。

多くを学べた有意義な時間であり、自身を大いに成長させてもらった。

2022年7月7日 藤田健太郎

## 参考文献

- Abdur Rehman MY, Kamal A, Taqi MM, Malik RN** (2017) Tracing biomarker of PAH-exposure and susceptibility factor (GSTM-polymorphism) among cancer patients in Pakistan. *Chemosphere* **178**: 384–390
- Aggelis A, John I, Karvouni Z, Grierson D** (1997) Characterization of two cDNA clones for mRNAs expressed during ripening of melon (*Cucumis melo* L.) fruits. *Plant Mol Biol* **33**: 313–322
- Arnold K, Bordoli L, Kopp J, Schwede T** (2006) The SWISS-MODEL workspace: A web-based environment for protein structure homology modelling. *Bioinformatics* **22**: 195–201
- Banda J, Bellande K, von Wangenheim D, Goh T, Guyomarc'h S, Laplaze L, Bennett MJ** (2019) Lateral Root Formation in Arabidopsis: A Well-Ordered L-Rexit. *Trends Plant Sci* **24**: 826–839
- Barberon M, Vermeer JEM, De Bellis D, Wang P, Naseer S, Andersen TG, Humbel BM, Nawrath C, Takano J, Salt DE, et al** (2016) Adaptation of Root Function by Nutrient-Induced Plasticity of Endodermal Differentiation. *Cell* **164**: 447–459
- Bartrons M, Catalan J, Penuelas J** (2016) Spatial And Temporal Trends Of Organic Pollutants In Vegetation From Remote And Rural Areas. *Sci Rep* **6**: 25446
- Biesiadka J, Bujacz G, Sikorski MM, Jaskolski M** (2002) Crystal structures of two homologous pathogenesis-related proteins from yellow lupine. *J Mol Biol* **319**: 1223–1234
- Bortey-Sam N, Ikenaka Y, Akoto O, Nakayama SMM, Asante KA, Baidoo E, Obirikorang C, Saengtienchai A, Isoda N, Nimako C, et al** (2017) Oxidative stress and respiratory symptoms due to human exposure to polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) in Kumasi, Ghana. *Environ Pollut* **228**: 311–320
- Bradford MM** (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**: 248–254
- Breiteneder H, Hoffmann-Sommergruber K, O’Riordain G, Susani M, Ahorn H, Ebner C, Kraft D,**

- Scheiner O** (1995) Molecular characterization of Api g 1, the major allergen of celery (*Apium graveolens*), and its immunological and structural relationships to a group of 17-kDa tree pollen allergens. *Eur J Biochem* **233**: 484–489
- Carella P, Merl-Pham J, Wilson DC, Dey S, Hauck SM, Vlot C, Cameron RK** (2016) Comparative Proteomics Analysis of Phloem Exudates Collected During the Induction of Systemic Acquired Resistance. *Plant Physiol* **171**: 1495–1510
- Casañal A, Zander U, Muñoz C, Dupeux F, Luque I, Botella MA, Schwab W, Valpuesta V, Marquez JA** (2013) The Strawberry Pathogenesis-related 10 (PR-10) Fra a Proteins Control Flavonoid Biosynthesis by Binding to Metabolic Intermediates. *J Biol Chem* **288**: 35322–35332
- Chadha P, Das RH** (2006) A pathogenesis related protein, AhPR10 from peanut: An insight of its mode of antifungal activity. *Planta* **225**: 213–222
- Chaturvedi R, Venables B, Petros RA, Nalam V, Li M, Wang X, Takemoto LJ, Shah J** (2012) An abietane diterpenoid is a potent activator of systemic acquired resistance. *Plant J* **71**: 161–172
- Chen J-Y, Dai X-F** (2010) Cloning and characterization of the *Gossypium hirsutum* major latex protein gene and functional analysis in *Arabidopsis thaliana*. *Planta* **231**: 861–73
- Chen YT, Wang Y, Yeh KC** (2017) Role of root exudates in metal acquisition and tolerance. *Curr Opin Plant Biol* **39**: 66–72
- Choi SH, Hong MK, Kim HJ, Ryoo N, Rhim H, Nah SY, Kang LW** (2015) Structure of ginseng major latex-like protein 151 and its proposed lysophosphatidic acid-binding mechanism. *Acta Crystallogr Sect D Biol Crystallogr* **71**: 1039–1050
- Choudhary DK, Prakash A, Johri BN** (2007) Induced systemic resistance (ISR) in plants: Mechanism of action. *Indian J Microbiol* **47**: 289–297
- Chruszcz M, Ciardiello MA, Osinski T, Majorek KA, Giangrieco I, Font J, Breiteneder H, Thalassinos K, Minor W** (2013) Structural and bioinformatic analysis of the kiwifruit allergen Act

- d 11, a member of the family of ripening-related proteins. *Mol Immunol* **56**: 794–803
- Chunfang W, Tyree MT, Steudle E** (1999) Direct measurement of xylem pressure in leaves of intact maize plants. A test of the cohesion-tension theory taking hydraulic architecture into consideration. *Plant Physiol* **121**: 1191–1205
- Collins C, Fryer M, Grosso A** (2006) Plant uptake of non-ionic organic chemicals. *Environ Sci Technol* **40**: 45–52
- D'Avino R, Bernardi ML, Wallner M, Palazzo P, Camardella L, Tuppo L, Alessandri C, Breiteneder H, Ferreira F, Ciardiello MA, et al** (2011) Kiwifruit Act d 11 is the first member of the ripening-related protein family identified as an allergen. *Allergy* **66**: 870–877
- Dakora FD, Phillips DA** (2002) Root exudates as mediators of mineral acquisition in low-nutrient environments. *Plant Soil* **245**: 35–47
- Davies C, Robinson SP** (2000) Differential Screening Indicates a Dramatic Change in mRNA Profiles during Grape Berry Ripening. Cloning and Characterization of cDNAs Encoding Putative Cell Wall and Stress Response Proteins. *Plant Physiol* **122**: 803–812
- Delano WL** (2005) The case for open-source software in drug discovery. *Drug Discovery Today* **10**: 213–217
- Deng W, Bian WP, Xian ZQ, Yang YW, Li ZG** (2011) Molecular cloning and characterization of a pathogen-related protein PR10 gene in pyrethrum (*Chrysanthemum cinerariaefolium*) flower response to insect herbivore. *African J Biotechnol* **10**: 19514–19521
- Doblas VG, Geldner N, Barberon M** (2017) The endodermis, a tightly controlled barrier for nutrients. *Curr Opin Plant Biol* **39**: 136–143
- Drakakaki G, Dandekar A** (2013) Protein secretion: How many secretory routes does a plant cell have? *Plant Sci* **203–204**: 74–78
- Fabbri D, Rombolà AG, Torri C, Spokas KA** (2013) Determination of polycyclic aromatic hydrocarbons

in biochar and biochar amended soil. *J Anal Appl Pyrolysis* **103**: 60–67

**Fernandes H, Bujacz A, Bujacz G, Jelen F, Jasinski M, Kachlicki P, Otlewski J, Sikorski MM,**

**Jaskolski M** (2009) Cytokinin-induced structural adaptability of a *Lupinus luteus* PR-10 protein.

*FEBS J* **276**: 1596–1609

**Fernandes H, Michalska K, Sikorski M, Jaskolski M** (2013) Structural and functional aspects of PR-10

proteins. *FEBS J* **280**: 1169–1199

**Fernandes H, Pasternak O, Bujacz G, Bujacz A, Sikorski MM, Jaskolski M** (2008) *Lupinus luteus*

Pathogenesis-Related Protein as a Reservoir for Cytokinin. *J Mol Biol* **378**: 1040–1051

**Ficko SA, Rutter A, Zeeb BA** (2011) Effect of pumpkin root exudates on ex situ polychlorinated biphenyl

(PCB) phytoextraction by pumpkin and weed species. *Environ Sci Pollut Res* **18**: 1536–1543

**Flores T, Alape-Giron A, Flores-Diaz M, Flores HE** (2002) Ocatin. A Novel Tuber Storage Protein from

the Andean Tuber Crop Oca with Antibacterial and Antifungal Activities. *Plant Physiol* **128**: 1291–

1302

**Fujimoto Y, Nagata R, Fukasawa H, Yano K, Azuma M, Iida A, Sugimoto S** (1998) Purification and

cDNA cloning of cytokinin-specific binding protein from mung bean (*Vigna radiata*). *Eur J Biochem*

**258**: 794–802

**Fujita K, Asuke S, Isono E, Yoshihara R, Uno Y, Inui H** (2022) MLP-PG1, a major latex-like protein

identified in *Cucurbita pepo*, confers resistance through the induction of pathogenesis-related genes.

*Planta* **255**: 10

**Fujita K, Haga Y, Yoshihara R, Matsumura C, Inui H** (2020a) Suppression of the expression of genes

responsible for transporting of hydrophobic pollutants leads to the production of safer crops. *Sci Total*

*Environ* **741**: 140439

**Fujita K, Inui H** (2021) Review: Biological functions of major latex-like proteins in plants. *Plant Sci* **306**:

110856



- Fujita K, Kondoh Y, Honda K, Haga Y, Osada H, Matsumura C, Inui H** (2020b) Pesticide treatment reduces hydrophobic pollutant contamination in *Cucurbita pepo* through competitive binding to major latex-like proteins. *Environ Pollut* **266**: 115179
- Gai YP, Yuan SS, Liu ZY, Zhao HN, Liu Q, Qin RL, Fang LJ, Ji XL** (2018) Integrated phloem sap mRNA and protein expression analysis reveals phytoplasma-infection responses in mulberry. *Mol Cell Proteomics* **17**: 1702–1719
- Gajhede M, Osmark P, Poulsen FM, Larsen JN, Neerven JJ Van, Schou C, Lwenstein H, Spangfort MD** (1996) X-ray and NMR structure of Bet v 1, the origin of birch pollen allergy. *Nat Struct Biol* **3**: 1040–1045
- Geroldinger-Simic M, Zelniker T, Aberer W, Ebner C, Egger C, Greiderer A, Prem N, Lidholm J, Ballmer-Weber BK, Vieths S, et al** (2011) Birch pollen-related food allergy: Clinical aspects and the role of allergen-specific IgE and IgG4 antibodies. *J Allergy Clin Immunol* **127**: 616–622
- Giri J, Dansana PK, Kothari KS, Sharma G, Vij S, Tyagi AK** (2013) SAPs as novel regulators of abiotic stress response in plants. *BioEssays* **35**: 639–648
- Goto J, Iwabuchi A, Yoshihara R, Kodama N, Matsui T, Hirota M, Eun H, Inui H** (2019) Uptake mechanisms of polychlorinated biphenyls in *Cucurbita pepo* via xylem sap containing major latex-like proteins. *Environ Exp Bot* **162**: 399–405
- Guo D, Wong WS, Xu WZ, Sun FF, Qing DJ, Li N** (2011) *Cis-cinnamic acid-enhanced 1* gene plays a role in regulation of Arabidopsis bolting. *Plant Mol Biol* **75**: 481–495
- Guo J, Xu W, Hu Y, Huang J, Zhao Y, Zhang L, Huang CH, Ma H** (2020) Phylotranscriptomics in Cucurbitaceae Reveal Multiple Whole-Genome Duplications and Key Morphological and Molecular Innovations. *Mol Plant* **13**: 1117–1133
- Guo W, Pan B, Sakkiah S, Yavas G, Ge W, Zou W, Tong W, Hong H** (2019) Persistent Organic Pollutants in Food: Contamination Sources, Health Effects and Detection Methods. *Int J Environ Res*

Public Health **16**: 4361

**Hashimoto Y** (2005) Dieldrin Residue in the Soil and Cucumber from Agricultural Field in Tokyo. *J Pestic Sci* **30**: 397–402

**Hatmi S, Trotel-Aziz P, Villaume S, Couderchet M, Clément C, Aziz A** (2014) Osmotic stress-induced polyamine oxidation mediates defence responses and reduces stress-enhanced grapevine susceptibility to *Botrytis cinerea*. *J Exp Bot* **65**: 75–88

**Higo K, Ugawa Y, Iwamoto M, Korenaga T** (1999) Plant cis-acting regulatory DNA elements (PLACE) database: 1999. *Nucleic Acids Res* **27**: 297–300

**Holmquist L, Dörfors F, Fogelqvist J, Cohn J, Kraft T, Dixelius C** (2020) Major latex protein-like encoding genes contribute to *Rhizoctonia solani* defense responses in sugar beet. *Mol Genet Genomics* **296**: 155–164

**Horsch RB, Fry JE, Hoffmann NL, Eichholtz D, Rogers SG, Fraley RT** (1985) A Simple and General Method for Transferring Genes into Plants. *Science* **227**: 1229–1231

**Huerta-Cepas J, Serra F, Bork P** (2016) ETE 3: Reconstruction, Analysis, and Visualization of Phylogenomic Data. *Mol Biol Evol* **33**: 1635–1638

**Hülster A, Müller JF, Marschner H** (1994) Soil–Plant Transfer of Polychlorinated Dibenzo-p-dioxins and Dibenzofurans to Vegetables of the Cucumber Family (*Cucurbitaceae*). *Environ Sci Technol* **28**: 1110–1115

**Hurlburt BK, Offermann LR, McBride JK, Majorek KA, Maleki SJ, Chruszcz M** (2013) Structure and function of the peanut panallergen Ara h 8. *J Biol Chem* **288**: 36890–36901

**Inui H, Gion K, Utani Y, Wakai T, Kodama S, Eun H, Kim YS, Ohkawa H** (2012) Assays of dioxins and dioxin-like compounds in actually contaminated soils using transgenic tobacco plants carrying a recombinant mouse aryl hydrocarbon receptor-mediated  $\beta$ -glucuronidase reporter gene expression system. *J Environ Sci Heal - Part B Pestic Food Contam Agric Wastes* **47**: 59–65

- Inui H, Hirota M, Goto J, Yoshihara R, Kodama N, Matsui T, Yamazaki K, Eun H** (2015) Zinc finger protein genes from *Cucurbita pepo* are promising tools for conferring non-Cucurbitaceae plants with ability to accumulate persistent organic pollutants. *Chemosphere* **123**: 48–54
- Inui H, Katte N, Goto J, Iwabuchi A** (2020) High temperatures promote the uptake of hydrophobic pollutants by *Cucurbita pepo* via altered gene expression levels of major latex-like proteins. *J Pestic Sci* **45**: 75–80
- Inui H, Sawada M, Goto J, Yamazaki K, Kodama N, Tsuruta H, Eun H** (2013) A Major Latex-Like Protein Is a Key Factor in Crop Contamination by Persistent Organic Pollutants. *Plant Physiol* **161**: 2128–2135
- Inui H, Wakai T, Gion K, Kim YS, Eun H** (2008) Differential uptake for dioxin-like compounds by zucchini subspecies. *Chemosphere* **73**: 1602–1607
- Inui H, Wakai T, Gion K, Yamazaki K, Kim Y-S, Eun H** (2011) Congener Specificity in the Accumulation of Dioxins and Dioxin-Like Compounds in Zucchini Plants Grown Hydroponically. *Biosci Biotechnol Biochem* **75**: 705–710
- Ipsen H, Løwenstein H** (1983) Isolation and immunochemical characterization of the major allergen of birch pollen (*Betula verrucosa*). *J Allergy Clin Immunol* **72**: 150–159
- Ishibashi M, Nabe T, Nitta Y, Tsuruta H, Iduhara M, Uno Y** (2017) Analysis of major paralogs encoding the Fra a 1 allergen based on their organ-specificity in *Fragaria × ananassa*. *Plant Cell Rep* **37**: 411–424
- Isleyen M, Sevim P, Hawthorne J, Berger W, White JC** (2013) Inheritance Profile of Weathered Chlordane and *p,p'*-DDTs Accumulation by *Cucurbita pepo* hybrids. *Int J Phytoremediation* **15**: 861–876
- Iwabuchi A, Katte N, Suwa M, Goto J, Inui H** (2020) Factors regulating the differential uptake of persistent organic pollutants in cucurbits and non-cucurbits. *J Plant Physiol* **245**: 153094

- Jenkins BM, Jones AD, Turn SQ, Williams RB** (1996) Emission factors for polycyclic aromatic hydrocarbons from biomass burning. *Environ Sci Technol* **30**: 2462–2469
- Jorgenson JL** (2001) Aldrin and Dieldrin: A Review of Research on Their Production, Environmental Deposition and Fate, Bioaccumulation, Toxicology, and Epidemiology in the United States. *Environ Health Perspect* **109**: 113
- Jumper J, Evans R, Pritzel A, Green T, Figurnov M, Ronneberger O, Tunyasuvunakool K, Bates R, Židek A, Potapenko A, et al** (2021) Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature* **596**: 583–589
- Kang M, Lee S, Abdelmageed H, Reichert A, Lee HK, Fokar M, Mysore KS, Allen RD** (2017) Arabidopsis stress associated protein 9 mediates biotic and abiotic stress responsive ABA signaling via the proteasome pathway. *Plant Cell Environ* **40**: 702–716
- Kloos DU, Oltmanns H, Dock C, Stahl D, Hehl R** (2002) Isolation and molecular analysis of six taproot expressed genes from sugar beet. *J Exp Bot* **53**: 1533–1534
- Kodama S, Okada K, Akimoto K, Inui H, Ohkawa H** (2009) Recombinant aryl hydrocarbon receptors for bioassay of aryl hydrocarbon receptor ligands in transgenic tobacco plants. *Plant Biotechnol J* **7**: 119–128
- Kodama S, Okada K, Inui H, Ohkawa H** (2007) Aryl hydrocarbon receptor (AhR)-mediated reporter gene expression systems in transgenic tobacco plants. *Planta* **227**: 37–45
- Koistinen KM, Soininen P, Venäläinen TA, Häyrinen J, Laatikainen R, Peräkylä M, Tervahauta AI, Kärenlampi SO** (2005) Birch PR-10c interacts with several biologically important ligands. *Phytochemistry* **66**: 2524–2533
- Kondoh Y, Honda K, Osada H** (2015) Construction and Application of a Photo-Cross-Linked Chemical Array. *Methods Mol Biol* **1263**: 29–41
- Lebel S, Schellenbaum P, Walter B, Maillot P** (2010) Characterisation of the *Vitis vinifera* PR10

multigene family. *BMC Plant Biol* **10**: 184

**Li P, Chen L, Zhou Y, Xia X, Shi K, Chen Z, Yu J** (2013) Brassinosteroids-Induced Systemic Stress Tolerance was Associated with Increased Transcripts of Several Defence-Related Genes in the Phloem in *Cucumis sativus*. *PLoS One* **8**: 1–8

**Lichman BR, Godden GT, Hamilton JP, Palmer L, Kamileen MO, Zhao D, Vaillancourt B, Wood JC, Sun M, Kinser TJ, et al** (2020) The evolutionary origins of the cat attractant nepetalactone in catnip. *Sci Adv* **6**: 20

**Litholdo CG, Parker BL, Eamens AL, Larsen MR, Cordwell SJ, Waterhouse PM** (2016) Proteomic Identification of Putative MicroRNA394 Target Genes in *Arabidopsis thaliana* Identifies Major Latex Protein Family Members Critical for Normal Development. *Mol Cell Proteomics* **15**: 2033–2047

**Liu C, Cheng F, Sun Y, Ma H, Yang X** (2016) Structure-Function Relationship of a Novel PR-5 Protein with Antimicrobial Activity from Soy Hulls. *J Agric Food Chem* **64**: 948–959

**Liu J-J, Ekramoddoullah AKM** (2006) The family 10 of plant pathogenesis-related proteins: Their structure, regulation, and function in response to biotic and abiotic stresses. *Physiol Mol Plant Pathol* **68**: 3–13

**Liu S, Wang J, Jiang S, Wang H, Gao Y, Zhang H, Li D, Song F** (2019) Tomato SISAP3, a member of the stress-associated protein family, is a positive regulator of immunity against *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000. *Mol Plant Pathol* **20**: 815–830

**Liu Y -G, Mitsukawa N, Oosumi T, Whittier RF** (1995) Efficient isolation and mapping of *Arabidopsis thaliana* T-DNA insert junctions by thermal asymmetric interlaced PCR. *Plant J* **8**: 457–463

**Liu Y, Xu Y, Xiao J, Ma Q, Li D, Xue Z, Chong K** (2011) OsDOG, a gibberellin-induced A20/AN1 zinc-finger protein, negatively regulates gibberellin-mediated cell elongation in rice. *J Plant Physiol* **168**: 1098–1105

- Liu YG, Whittier RF** (1995) Thermal asymmetric interlaced PCR: automatable amplification and sequencing of insert end fragments from P1 and YAC clones for chromosome walking. *Genomics* **25**: 674–681
- Lu YC, Feng SJ, Zhang JJ, Luo F, Zhang S, Yang H** (2016) Genome-wide identification of DNA methylation provides insights into the association of gene expression in rice exposed to pesticide atrazine. *Sci Rep* **6**: 18985
- Lunney AI, Zeeb BA, Reimer KJ** (2004) Uptake of weathered DDT in vascular plants: Potential for phytoremediation. *Environ Sci Technol* **38**: 6147–6154
- Luo L, Zhang S, Shan XQ, Zhu YG** (2006) Oxalate and root exudates enhance the desorption of *p,p'*-DDT from soils. *Chemosphere* **63**: 1273–1279
- Lv Q, Zhang L, Zan T, Li L, Li X** (2020) Wheat RING E3 ubiquitin ligase TaDIS1 degrade TaSTP via the 26S proteasome pathway. *Plant Sci* **296**: 110494
- Lytle BL, Song J, de la Cruz NB, Peterson FC, Johnson KA, Bingman CA, Phillips GN, Volkman BF** (2009) Structures of two *Arabidopsis thaliana* major latex proteins represent novel helix-grip folds. *Proteins Struct Funct Bioinforma* **76**: 237–243
- Ma F, Peterson CA** (2001) Frequencies of plasmodesmata in *Allium cepa* L. roots: Implications for solute transport pathways. *J Exp Bot* **52**: 1051–1061
- Ma H, Xiang G, Li Z, Wang Y, Dou M, Su L, Yin X, Liu R, Wang Y, Xu Y** (2018) Grapevine VpPR10.1 functions in resistance to *Plasmopara viticola* through triggering a cell death-like defence response by interacting with VpVDAC3. *Plant Biotechnol J* **16**: 1488–1501
- Ma Y, Szostkiewicz I, Korte A, Moes D, Yang Y, Christmann A, Grill E** (2009) Regulators of PP2C Phosphatase Activity Function as Abscisic Acid Sensors. *Science* **324**: 1064–1068
- Maeda K, Nakajima Y, Motoyama T, Kondoh Y, Kawamura T, Kanamaru K, Ohsato S, Nishiuchi T, Yoshida M, Osada H, et al** (2017) Identification of a trichothecene production inhibitor by

- chemical array and library screening using trichodiene synthase as a target protein. *Pestic Biochem Physiol* **138**: 1–7
- Markovic´-Housley Z, Massimo D, Doriano L, Edda von R-L, Stephan C, Markus S, Ferreira F, Scheiner O, Breiteneder, Heimo** (2003) Crystal Structure of a Hypoallergenic Isoform of the Major Birch Pollen Allergen Bet v 1 and its Likely Biological Function as a Plant Steroid Carrier. *J Mol Biol* **325**: 123–133
- Matsuo S, Yamazaki K, Gion K, Eun H, Inui H** (2011) Structure-selective accumulation of polychlorinated biphenyls in *Cucurbita pepo*. *J Pestic Sci* **36**: 363–369
- Mattila K, Renkonen R** (2009) Modelling of bet v 1 binding to lipids. *Scand J Immunol* **70**: 116–124
- Mattina MJ, Eitzer BD, Iannucci-Berger W, Lee WY, White JC** (2004) Plant uptake and translocation of highly weathered, soil-bound technical chlordane residues: Data from field and rhizotron studies. *Environ Toxicol Chem* **23**: 2756–2762
- Mattina MJ, Iannucci-Berger W, Dykas L, Pardus J** (1999) Impact of long-term weathering, mobility, and land use on chlordane residues in soil. *Environ Sci Technol* **33**: 2425–2431
- McGee JD, Hamer JE, Hodges TK** (2001) Characterization of a *PR-10* pathogenesis-related gene family induced in rice during infection with *Magnaporthe grisea*. *Mol Plant-Microbe Interact* **14**: 877–886
- Melcher K, Ng LM, Zhou XE, Soon FF, Xu Y, Suino-Powell KM, Park SY, Weiner JJ, Fujii H, Chinnusamy V, et al** (2009) A gate-latch-lock mechanism for hormone signalling by abscisic acid receptors. *Nature* **462**: 602–608
- Miller EL, Nason SL, Karthikeyan KG, Pedersen JA** (2016) Root Uptake of Pharmaceuticals and Personal Care Product Ingredients. *Environ Sci Technol* **50**: 525–541
- Miller MM, Wasik SP, Huang GL, Shlu WY, Mackay D** (1985) Relationships between Octanol-Water Partition Coefficient and Aqueous Solubility. *Environ Sci Technol* **19**: 522–529
- Mittag D, Akkerdaas J, Ballmer-Weber BK, Vogel L, Wensing M, Becker WM, Koppelman SJ,**

- Knulst AC, Helbling A, Hefle SL, et al** (2004) Ara h 8, a Bet v 1-homologous allergen from peanut, is a major allergen in patients with combined birch pollen and peanut allergy. *J Allergy Clin Immunol* **114**: 1410–1417
- Mogensen JE, Wimmer R, Larsen JN, Spangfort MD, Otzen DE** (2002) The Major Birch Allergen, Bet v 1, Shows Affinity for a Broad Spectrum of Physiological Ligands. *J Biol Chem* **277**: 23684–23692
- Montero-Pau J, Blanca J, Bombarely A, Ziarsoolo P, Esteras C, Martí-Gómez C, Ferriol M, Gómez P, Jamilena M, Mueller L, et al** (2018) *De novo* assembly of the zucchini genome reveals a whole-genome duplication associated with the origin of the *Cucurbita* genus. *Plant Biotechnol J* **16**: 1161–1171
- Murano H, Otani T, Makino T, Seike N** (2009) Effects of the application of carbonaceous adsorbents on pumpkin (*Cucurbita maxima*) uptake of heptachlor epoxide in soil. *Soil Sci Plant Nutr* **55**: 325–332
- Murano H, Otani T, Seike N** (2010) Dieldrin-dissolving abilities of the xylem saps of several plant families, particularly *Cucurbita pepo* L. *Environ Toxicol Chem* **29**: 2269–2277
- Murashige T, Skoog F** (1962) A Revised Medium for Rapid Growth and Bio Assays with Tobacco Tissue Cultures. *Physiol Plant* **15**: 473–497
- Nakagawa T, Suzuki T, Murata S, Nakamura S, Hino T, Maeo K, Tabata R, Kawai T, Tanaka K, Niwa Y, et al** (2007) Improved Gateway Binary Vectors: High-Performance Vectors for Creation of Fusion Constructs in Transgenic Analysis of Plants. *Biosci Biotechnol Biochem* **71**: 2095–2100
- Namiki S, Otani T, Motoki Y, Seike N, Iwafune T** (2018) Differential uptake and translocation of organic chemicals by several plant species from soil. *J Pestic Sci* **43**: 96–107
- Namiki S, Otani T, Seike N** (2013) Fate and plant uptake of persistent organic pollutants in soil. *Soil Sci Plant Nutr* **59**: 669–679
- Nawrath C, Métraux J-P** (1999) Salicylic Acid Induction-Deficient Mutants of Arabidopsis Express PR-2 and PR-5 and Accumulate High Levels of Camalexin after Pathogen Inoculation. *Plant Cell* **11**:



1393–1404

- Neale AD, Wahleithner JA, Lund M, Howard TB** (1990) Chitinase,  $\beta$ -1,3-Glucanase, Osmotin, and Extensin Are Expressed in Tobacco Explants during Flower Formation. *Plant Cell* **2**: 673–684
- Nessler CL, Allen RD, Galewsky S** (1985) Identification and Characterization of Latex-Specific Proteins in Opium Poppy. *Plant Physiol* **79**: 499–504
- Niki T, Mitsuhara I, Seo S, Ohtsubo N, Ohashi Y** (1998) Antagonistic Effect of Salicylic Acid and Jasmonic Acid on the Expression of Pathogenesis-Related (PR) Protein Genes in Wounded Mature Tobacco Leaves. *Plant Cell Physiol* **39**: 500–507
- Otani T, Seike N, Sakata Y** (2007) Differential uptake of dieldrin and endrin from soil by several plant families and *Cucurbita* genera. *Soil Sci Plant Nutr* **53**: 86–94
- Park SS-Y, Fung P, Nishimura N, Jensen DR, Fujii H, Zhao Y, Lumba S, Santiago J, Rodrigues A, Chow TFT -f. F, et al** (2009) Abscisic Acid Inhibits Type 2C Protein Phosphatases via the PYR/PYL Family of START Proteins. *Science* **324**: 1068–1071
- Parrish ZD, White JC, Isleyen M, Gent MPN, Iannucci-Berger W, Eitzer BD, Kelsey JW, Mattina MJI** (2006) Accumulation of weathered polycyclic aromatic hydrocarbons (PAHs) by plant and earthworm species. *Chemosphere* **64**: 609–618
- Pasternak O, Biesiadka J, Dolot R, Handschuh L, Bujacz G, Sikorski MM, Jaskolski M** (2005) Structure of a yellow lupin pathogenesis-related PR-10 protein belonging to a novel subclass. *Acta Crystallogr Sect D Biol Crystallogr* **61**: 99–107
- Pessah IN, Lein PJ, Seegal RF, Sagiv SK** (2019) Neurotoxicity of polychlorinated biphenyls and related organohalogenes. *Acta Neuropathol* **138**: 363–387
- Pockman WT, Sperry JS, O’leary JW** (1995) Sustained and significant negative water pressure in xylem. *Nature* **378**: 715–716
- Preece C, Peñuelas J** (2020) A Return to the Wild: Root Exudates and Food Security. *Trends Plant Sci* **25**:

- Price MN, Dehal PS, Arkin AP** (2009) Fasttree: Computing large minimum evolution trees with profiles instead of a distance matrix. *Mol Biol Evol* **26**: 1641–1650
- Pühringer H, Moll D, Hoffmann-Sommergruber K, Watillon B, Katinger H, Da Câmara Machado ML** (2000) The promoter of an apple *Ypr10* gene, encoding the major allergen Mal d 1, is stress- and pathogen-inducible. *Plant Sci* **152**: 35–50
- Radauer C, Breiteneder H** (2007) Evolutionary biology of plant food allergens. *J Allergy Clin Immunol* **120**: 518–525
- Ramakrishna P, Barberon M** (2019) Polarized transport across root epithelia. *Curr Opin Plant Biol* **52**: 23–29
- Romera FJ, García MJ, Lucena C, Martínez-Medina A, Aparicio MA, Ramos J, Alcántara E, Angulo M, Pérez-Vicente R** (2019) Induced systemic resistance (ISR) and Fe deficiency responses in dicot plants. *Front Plant Sci* **10**: 1–17
- Roppolo D, De Rybel B, Tendon VD, Pfister A, Alassimone J, Vermeer JEM, Yamazaki M, Stierhof YD, Beeckman T, Geldner N** (2011) A novel protein family mediates Casparian strip formation in the endodermis. *Nature* **473**: 381–384
- Ruperti B, Bonghi C, Ziliotto F, Pagni S, Rasori A, Varotto S, Tonutti P, Giovannoni JJ, Ramina A** (2002) Characterization of a major latex protein (MLP) gene down-regulated by ethylene during peach fruitlet abscission. *Plant Sci* **163**: 265–272
- Sainsbury F, Lomonossoff GP** (2008) Extremely high-level and rapid transient protein production in plants without the use of viral replication. *Plant Physiol* **148**: 1212–1218
- Saraste M, Sibbald PR, Wittinghofer A** (1990) The P-loop - a common motif in ATP- and GTP-binding proteins. *Trends Biochem Sci* **15**: 430–434
- Sarma H, Nava AR, Prasad MNV** (2019) Mechanistic understanding and future prospect of microbe-

- enhanced phytoremediation of polycyclic aromatic hydrocarbons in soil. *Environ Technol Innov* **13**: 318–330
- Schneider CA, Rasband WS, Eliceiri KW** (2012) NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods* **9**: 671–675
- Seutter von Loetzen C, Schweimer K, Schwab W, Rösch P, Hartl-Spiegelhauer O** (2012) Solution structure of the strawberry allergen Fra a 1. *Biosci Rep* **32**: 567–575
- Shen C, Chen Y, Huang S, Wang Z, Yu C, Qiao M, Xu Y, Setty K, Zhang J, Zhu Y, et al** (2009) Dioxin-like compounds in agricultural soils near e-waste recycling sites from Taizhou area, China: Chemical and bioanalytical characterization. *Environ Int* **35**: 50–55
- Shen H, Huang Y, Wang R, Zhu D, Li W, Shen G, Wang B, Zhang Y, Chen Y, Lu Y, et al** (2013) Global atmospheric emissions of polycyclic aromatic hydrocarbons from 1960 to 2008 and future predictions. *Environ Sci Technol* **47**: 6415–6424
- Shi X, Zha J, Wen B, Zhang S** (2019) Diastereoisomer-specific neurotoxicity of hexabromocyclododecane in human SH-SY5Y neuroblastoma cells. *Sci Total Environ* **686**: 893–902
- Shi Y, Jiang L, Zhang L, Kang R, Yu Z** (2014) Dynamic changes in proteins during apple (*Malus x domestica*) fruit ripening and storage. *Hortic Res* **1**: 6
- Shimono M, Sugano S, Nakayama A, Jiang CJ, Ono K, Toki S, Takatsuji H** (2007) Rice WRKY45 plays a crucial role in benzothiadiazole-inducible blast resistance. *Plant Cell* **19**: 2064–2076
- Śliwiak J, Dolot R, Michalska K, Szpotkowski K, Bujacz G, Sikorski M, Jaskolski M** (2016) Crystallographic and CD probing of ligand-induced conformational changes in a plant PR-10 protein. *J Struct Biol* **193**: 55–66
- Somssich IE, Schmelzer E, Bollmann J, Hahlbrock K** (1986) Rapid activation by fungal elicitor of genes encoding “pathogenesis-related” proteins in cultured parsley cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **83**: 2427–2430

- Song L, Wang J, Jia H, Kamran A, Qin Y, Liu Y, Hao K, Han F, Zhang C, Li B, et al** (2020) Identification and functional characterization of NbMLP28, a novel MLP- like protein 28 enhancing *Potato virus Y* resistance in *Nicotiana benthamiana*. *BMC Microbiol* **20**: 1–14
- Stoykova P, Inui H** (2021) Transport enhancement of hydrophobic pollutants by the expression of zucchini major latex-like protein genes in tobacco plants. *J Plant Physiol* **263**: 153464
- Strömvik M V, Sundararaman VP, Vodkin LO** (1999) A novel promoter from soybean that is active in a complex developmental pattern with and without its proximal 650 base pairs. *Plant Mol Biol* **41**: 217–231
- Subramaniam K, Stepp C, Pignatello JJ, Smets B, Grasso D** (2004) Enhancement of polynuclear aromatic hydrocarbon desorption by complexing agents in weathered soil. *Environ Eng Sci* **21**: 515–523
- Sugiyama K, Kami D, Muro T, Otani T, Seike N, Namiki S** (2016) An Inheritance Model for Heptachlor Exo-epoxide Transport in Summer Squash (*Cucurbita pepo* L.). *Hortic J* **85**: 315–321
- Sugiyama K, Kami D, Muro T, Ueno T, Seike N, Otani T** (2013) Identification and inheritance of a winter squash cultivar (*Cucurbita maxima*) with low heptachlor epoxide uptake ability. *Sci Hortic (Amsterdam)* **161**: 35–42
- Sun H, Kim MK, Pulla RK, Kim YJ, Yang DC** (2010) Isolation and expression analysis of a novel major latex-like protein (*MLP151*) gene from *Panax ginseng*. *Mol Biol Rep* **37**: 2215–2222
- Suyama T, Yamada K, Mori H, Takeno K, Yamaki S** (1999) Cloning cDNAs for Genes Preferentially Expressed during Fruit Growth in Cucumber. *J Am Soc Hortic Sci* **124**: 136–139
- Tsujishita Y, Hurley JH** (2000) Structure and lipid transport mechanism of a StAR-related domain. *Nat Struct Biol* **7**: 408–414
- Umemura K, Satou J, Iwata M, Uozumi N, Koga J, Kawano T, Koshiba T, Anzai H, Mitomi M** (2009) Contribution of salicylic acid glucosyltransferase, OsSGT1, to chemically induced disease resistance

in rice plants. *Plant J* **57**: 463–472

**Vijgen J, Abhilash PC, Li YF, Lal R, Forter M, Torres J, Singh N, Yunus M, Tian C, Schäffer A, et al** (2011) Hexachlorocyclohexane (HCH) as new Stockholm Convention POPs—a global perspective on the management of Lindane and its waste isomers. *Environ Sci Pollut Res* **18**: 152–162

**Walker TS, Bais HP, Grotewold E, Vivanco JM** (2003) Update on Root Exudation and Rhizosphere Biology Root Exudation and Rhizosphere Biology 1. *Plant Physiol* **132**: 44–51

**Wang X, Whalley WR, Miller AJ, White PJ, Zhang F, Shen J** (2020) Sustainable Cropping Requires Adaptation to a Heterogeneous Rhizosphere. *Trends Plant Sci* **25**: 1194–1202

**Wang X, White JC, Gent MPN, Iannucci-Berger W, Eitzer BD, Mattina MI** (2004) Phytoextraction of weathered *p,p'*-DDE by zucchini (*Cucurbita pepo*) and cucumber (*Cucumis sativus*) under different cultivation conditions. *Int J Phytoremediation* **6**: 363–385

**Wang Y, Yang L, Chen X, Ye T, Zhong B, Liu R, Wu Y, Chan Z** (2016) *Major latex protein-like protein 43 (MLP43)* functions as a positive regulator during abscisic acid responses and confers drought tolerance in *Arabidopsis thaliana*. *J Exp Bot* **67**: 421–434

**Wania F, MacKay D** (1996) Tracking the Distribution of Persistent Organic Pollutants. *Environ Sci Technol* **30**: 390A-396A

**Watari H, Arakane F, Moog-Lutz C, Kallen CB, Tomasetto C, Gerton GL, Rio MC, Baker ME, Strauss JF** (1997) MLN64 contains a domain with homology to the steroidogenic acute regulatory protein (StAR) that stimulates steroidogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A* **94**: 8462–8467

**White JC** (2010) Inheritance of *p,p'*-DDE phytoextraction ability in hybridized *Cucurbita pepo* cultivars. *Environ Sci Technol* **44**: 5165–5169

**White JC, Kottler BD** (2002) Citrate-mediated increase in the uptake of weathered 2,2-bis(*p*-chlorophenyl)1,1-dichloroethylene residues by plants. *Environ Toxicol Chem* **21**: 550–556

**White JC, Mattina MJI, Lee WY, Eitzer BD, Iannucci-Berger W** (2003) Role of organic acids in

enhancing the desorption and uptake of weathered *p,p'*-DDE by *Cucurbita pepo*. Environ Pollut **124**: 71–80

**White JC, Parrish ZD, Isleyen M, Gent MPN, Iannucci-Berger W, Eitzer BD, Kelsey JW, Mattina MI** (2006) Influence of citric acid amendments on the availability of weathered PCBs to plant and earthworm species. Int J Phytoremediation **8**: 63–79

**Williamson B, Tudzynski B, Tudzynski P, Van Kan JAL** (2007) *Botrytis cinerea*: The cause of grey mould disease. Mol Plant Pathol **8**: 561–580

**Wu F-Z, Lu T-C, Shen Z, Wang B-C, Wang H-X** (2008) N-Terminal Acetylation of Two Major Latex Proteins from *Arabidopsis thaliana* Using Electrospray Ionization Tandem Mass Spectrometry. Plant Mol Biol Report **26**: 88–97

**Xiao P, Mori T, Kamei I, Kiyota H, Takagi K, Kondo R** (2011) Novel metabolic pathways of organochlorine pesticides dieldrin and aldrin by the white rot fungi of the genus *Phlebia*. Chemosphere **85**: 218–224

**Xie YR, Chen ZY, Brown RL, Bhatnagar D** (2010) Expression and functional characterization of two pathogenesis-related protein 10 genes from *Zea mays*. J Plant Physiol **167**: 121–130

**Yamazaki K, Takagi K, Kataoka R, Kotake M, Yamada T, Kiyota H** (2014) Novel phosphorylation of aldrin-*trans*-diol by dieldrin-degrading fungus *Mucor racemosus* strain DDF. Int Biodeterior Biodegrad **92**: 36–40

**Yamazaki K, Tsuruta H, Inui H** (2015) Different uptake pathways between hydrophilic and hydrophobic compounds in lateral roots of *Cucurbita pepo*. J Pestic Sci **40**: 99–105

**Yan D, Zhang Y, Liu L, Yan H** (2016) Pesticide exposure and risk of Alzheimer's disease: A systematic review and meta-analysis. Sci Rep **6**: 32222

**Yang CL, Liang S, Wang HY, Han LB, Wang FX, Cheng HQ, Wu XM, Qu ZL, Wu JH, Xia GX** (2015) Cotton major latex protein 28 functions as a positive regulator of the ethylene responsive

factor 6 in defense against *Verticillium dahliae*. *Mol Plant* **8**: 399–411

**Yang Y, Ratté D, Smets BF, Pignatello JJ, Grasso D** (2001) Mobilization of soil organic matter by complexing agents and implications for polycyclic aromatic hydrocarbon desorption. *Chemosphere* **43**: 1013–1021

**Yoshihara R, Matsuo S, Iwata T, Inui H** (2014) Effect of amending soil with organic acids on perylene uptake into *Cucurbita pepo*. *J Pestic Sci* **39**: 162–164

**Yuan G, He S, Bian S, Han X, Liu K, Cong P, Zhang C** (2020) Genome-wide identification and expression analysis of major latex protein (*MLP*) family genes in the apple (*Malus domestica* Borkh.) genome. *Gene* **733**: 144275

**Zeng J, Ruan Y, Liu B, Ruan Y, Huang Y** (2020) Genome-wide identification and abiotic stress-responsive expression of *MLP* family genes in *Brassica rapa*. *Gene Reports* **21**: 100919

**Zhang N, Li R, Shen W, Jiao S, Zhang J, Xu W** (2018) Genome-wide evolutionary characterization and expression analyses of major latex protein (*MLP*) family genes in *Vitis vinifera*. *Mol Genet Genomics* **293**: 1061–1075

**Zhang SB, Zhang WJ, Zhai HC, Lv YY, Cai JP, Jia F, Wang JS, Hu Y Sen** (2019) Expression of a wheat  $\beta$ -1,3-glucanase in *Pichia pastoris* and its inhibitory effect on fungi commonly associated with wheat kernel. *Protein Expr Purif* **154**: 134–139

**Zhang Y, Lan H, Shao Q, Wang R, Chen H, Tang H, Zhang H, Huang J** (2016) An A20/AN1-type zinc finger protein modulates gibberellins and abscisic acid contents and increases sensitivity to abiotic stress in rice (*Oryza sativa*). *J Exp Bot* **67**: 315–326

**Zhao X, Wang R, Zhang Y, Li Y, Yue Y, Zhou T, Wang C** (2021) Comprehensive analysis of the stress associated protein (SAP) gene family in *Tamarix hispida* and the function of *ThSAP6* in salt tolerance. *Plant Physiol Biochem* **165**: 1–9

**Zhou Y, Xia X, Yu G, Wang J, Wu J, Wang M, Yang Y, Shi K, Yu Y, Chen Z, et al** (2015)

Brassinosteroids play a critical role in the regulation of pesticide metabolism in crop plants. *Sci Rep*

**5: 9018**