Kobe University Repository : Kernel

PDF issue: 2025-07-08

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。

別紙様式３（博士論文審査等内規第２条関係）

博士論文内容の要旨

氏　　名　藤田健太郎

専攻・講座　生命機能科学専攻・応用機能生物学講座

論文題目（外国語の場合は，その和訳を併記すること。）

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

指導教員　乾秀之

第I章　総合緒論

殺虫剤ディルドリンやダイオキシンなどは、残留性有機汚染物質 (POPs) に含まれ、高い毒性を有し、現在では使用が禁止されている。ウリ科作物は、土壌中に残留していたPOPsを葉や果実などの地上部に高濃度に蓄積する。そのため、ウリ科作物から残留基準値を超えて、POPsが検出される事例が後を絶たない。これには、ウリ科作物ズッキーニから同定されたタンパク質であるMajor latex-like protein (MLP) が関与する。MLPは土壌中のPOPsと根で結合し、結合した状態で導管へ移行する。その結果、MLPを介して、POPsは地上部に輸送され、蓄積する。すなわち、MLPはウリ科作物におけるPOPsの輸送因子である。

第II章　*MLP*遺伝子の発現制御による汚染低減化

温度や日長などの環境要因によって、*MLP*遺伝子の発現量は変動し、それに伴い地上部に輸送される有機汚染物質の量が変化する。これは、ウリ科作物を取り巻く環境要因によってMLP量の制御が可能であることを示唆する。そこで、環境要因として作物栽培に欠かせない農薬に着目した。農薬の散布によって、*MLP*遺伝子の発現を抑制し、MLPを介して地上部に輸送されるPOPs量の減少を試みた。ウリ科作物に対して適用のある農薬から、*MLP*遺伝子の発現を抑制する農薬として、殺菌剤ダコニールを選抜した。殺菌剤ダコニールの散布により、根と導管液におけるMLP量は低下し、導管液中のPOPs濃度は低下した。よって、殺菌剤ダコニールの散布は、*MLP*遺伝子の発現抑制を介して、ウリ科作物におけるPOPs蓄積を抑制することが明らかになった。

第III章　MLPの結合制御による汚染低減化

ウリ科作物におけるPOPs汚染の第一の段階として、MLPとPOPsの結合が挙げられる。そこで、MLPとPOPsの結合を、作物栽培に欠かせない農薬による阻害を試みた。化合物ライブラリーからMLPと高い結合親和性を有する化合物を選抜したところ、殺虫剤コルトの原体と共通する構造を有する化合物が複数存在した。また、殺虫剤コルトの原体は、*in vitro*において、MLP-GR3とPOPsの結合を競合的に阻害した。さらに、殺虫剤コルトの散布により、導管液中のPOPs濃度は低下した。よって、殺虫剤コルトの散布は、MLPとPOPsの結合阻害介して、ウリ科作物におけるPOPs蓄積を抑制することが明らかになった。

第IV章　MLPによる病害抵抗性の亢進

MLP は感染時特異的タンパク質クラス 10 (PR-10) と同じファミリーに属するタンパク質である。PR-10 は、生物的ストレスや非生物的ストレスに応答し、それらに対する耐性を植物に付与する。そこで、MLP も PR-10 と同様にストレス耐性を付与すると考え、ズッキーニ由来 MLP-PG1 の病害抵抗性への関与を評価した。タバコ野火病菌 (*Pseudomonas*

syringae pv. *tabaci*) の接種により、*MLP-PG1* 遺伝子の転写が活性化されたものの、MLP-PG1 には PR-10 が示すような RNase 活性を *in vitro* で有していなかった。そこで、PR-10 のような RNase 活性を示すのではなく、MLP は病害抵抗性遺伝子の誘導により、間接的に病害抵抗性に関与すると考えた。*MLP-PG1* 遺伝子を過剰発現させたタバコを RNA-sequencing に供したところ、*PR-2* 遺伝子、*PR-5* 遺伝子といった病害抵抗性に関与する遺伝子が高発現していた。また、*MLP-PG1* 遺伝子を過剰発現させたタバコでは、灰色カビ病菌 (*Botrytis cinerea*) の病斑面積が減少していた。よって、MLP-PG1 は *PR* 遺伝子の発現誘導を介して、ズッキーニに病害抵抗性を付与することが示された。

第V章　*MLP*遺伝子の発現制御機構の解明

ズッキーニには、*ovifera* 亜種と *pepo* 亜種が存在し、*pepo* 亜種では、*Zinc finger-protein* (*ZFP*) 遺伝子が高発現するだけでなく、POPs が地上部に高濃度で蓄積する。そこで、ズッキーニ *pepo* 亜種では、ZFP が転写因子として機能することで、MLP 遺伝子の発現が誘導され、POPs を高濃度に蓄積すると考えた。ズッキーニ由来の *ZFP* 遺伝子を過剰発現させたタバコにおいて、*MLP-GR3* 遺伝子の転写が活性化された。また、*ovifera* 亜種よりも *pepo* 亜種は *MLP-GR3* 遺伝子の転写活性化が促進されていた。よって、*pepo* 亜種では、*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 蓄積が促進されることが明らかになった。

第VI章　ズッキーニゲノムにおける*MLP*遺伝子の同定

シロイヌナズナ、ブドウ、リンゴなどの双子葉類において、そのゲノム中に 10 以上の *MLP* 遺伝子を有している。しかし、これまでにウリ科作物において *MLP* 遺伝子のゲノム内における同定が行われたことはない。従って、POPs の蓄積に寄与しうる *MLP* 遺伝子を看過している可能性がある。そこで、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、これまでに同定した *MLP-GR3* 遺伝子の方が POPs 蓄積への寄与は大きいと結論付けられた。

第VII章　総合考察

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、POPs 蓄積の抑制を証明することができた。また、MLP の生理機能を、遺伝学・植物病理学・構造生物学の点から洞察を与え、ゲノム・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 が関与する生物機能を複合的に捉えることができた。

（別紙１）　　論文審査の結果の要旨

氏名	藤田健太郎		
論文題目	ズッキーニ由来 Major latex-like protein の生物機能の解明		
審査委員	区　分	職　名	氏　　名
	主　査	准教授	乾秀之
	副　査	教授	土佐幸雄
	副　査	教授	中屋敷均
	副　査	准教授	水谷正治
	副　査	教授	宇野雄一

要　　旨

キュウリやカボチャ、ズッキーニなどを含むウリ科作物は、世界中で広く栽培されている。しかしながら、40年以上も前に使用が禁止されたにもかかわらず、土壌に残留していた殺虫剤がウリ科作物の果実から残留基準値を超えて検出され、問題となっている。これら殺虫剤は、生物濃縮性や毒性が高いなどの性質を持つことから、残留性有機汚染物質 (POPs) として知られている。これまでに、POPsによるウリ科作物の汚染の原因因子として、Major latex-like protein (MLP) が同定され、MLPは根でPOPsと結合し、MLP-POPs複合体として導管を経由して果実に輸送され、POPs汚染が引き起こされることが明らかになっている。そこで、POPsによる作物汚染を低減し、安全な作物を栽培する技術の開発が必要である。本研究は、MLPを介したPOPs汚染を防止するための新しい技術を開発するために、安全な作物の栽培に資する基礎的知見を得ること、さらにMLPの本来の機能を明らかにすることを目的として実施した。学位論文はChapter Iの総合緒論から始まり、Chapter IIからChapter VIの研究成果とChapter VIIの総合考察からなる。

Chapter II　*MLP*遺伝子の発現制御による汚染低減化

温度や日長などの環境要因によって、*MLP*遺伝子の発現量は変動し、それに伴い地上部に輸送される有機汚染物質の量が変化する。これは、ウリ科作物を取り巻く環境要因によってMLP量の制御が可能であることを示唆する。そこで、環境要因として作物栽培に欠かせない農薬に着目した。農薬の散布によって、*MLP*遺伝子の発現を抑制し、MLPを介して地上部に輸送されるPOPs量を減少させることを試みた。初めに、疎水性有機汚染物質ペリレンを汚染させた土壌においてズッキーニを栽培し、ウリ科作物に対して適用のある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それぞれ散布した。導管液中のペリレン濃度を定量し、濃度を低下させる農薬としてベンレートとダコニールを選抜した。特に、ダコニールの活性成分であるTPNは、*MLP*遺伝子のプロモーター活性を抑制した。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。これらの結果から、ダコニールの散布は、*MLP*遺伝子の発現抑制を介して、ウリ科作物におけるPOPs蓄積を抑制することを明らかにした。

Chapter III　MLPの結合制御による汚染低減化

ウリ科作物におけるPOPs汚染の一つの段階として、MLPとPOPsの結合が挙げられる。そこで、MLPとPOPsの結合を、農薬のMLPへの競合的な結合によって阻害することで、地上部に蓄積するPOPsを低減させることを試みた。2万種を超える化合物が塗布されたアレイに組換えMLPを処理し、MLPと高い結合活性を有する化合物を数百種選抜した。選抜した化合物の中には、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が多く存在することが明らかになった。そこで、このような構造の一部を持つ農薬を市販農薬から探索したところ、殺菌剤アミスルブロムと殺虫剤ピリフルキナゾンがこれに該当した。*in vitro*でMLPとピレン及びディルドリンの結合実験を行ったところ、これら農薬はこの結合を阻害した。アミスルブロムとピリフルキナゾンを原体として含む殺菌剤ライメイと殺虫剤コルトをピレン並びにディルドリン汚染土壌で栽培するズッキーニに散布したところ、導管液中のピレン、ディルドリン濃度が低下した。これらの結果から、両農薬の散布は、MLPとPOPsの結合阻害を介してウリ科作物におけるPOPs蓄積を抑制することを明らかにした。

氏名	藤田健太郎

Chapter IV　MLP による病害抵抗性の亢進

ズッキーニ由来のMLPは、疎水性有機汚染物質の体内輸送因子として同定されているが、その生理機能は依然として不明である。MLPは、感染時特異的タンパク質クラス10 (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ことが知られ、PR-10は生物的ストレスや非生物的ストレスに応答し、それらに対する耐性を植物に付与することが報告されている。そこで、MLPもPR-10と同様にストレス耐性に関与すると考え、ズッキーニ由来MLP-PG1の病害抵抗性への関与を評価した。タバコ野火病菌 (*Pseudomonas syringae* pv. *tabaci*) の接種により、*MLP-PG1*遺伝子のプロモーター活性が誘導されたものの、MLP-PG1にはPR-10が示すようなRNase活性を*in vitro*で有していなかった。そこで、PR-10のようなRNase活性を示すのではなく、MLPは病害抵抗性遺伝子の誘導により、間接的に病害抵抗性に関与すると考えた。*MLP-PG1*遺伝子を過剰発現させた形質転換タバコをRNA-sequencingに供したところ、*PR-2*遺伝子、*PR-5*遺伝子といった病害抵抗性に関与する遺伝子が高発現していた。そこで、*MLP-PG1*遺伝子を過剰発現させたタバコに灰色カビ病菌 (*Botrytis cinerea*) を感染させたところ、病斑面積が有意に減少していた。よって、MLP-PG1は*PR*遺伝子の発現誘導を介して、間接的にズッキーニに病害抵抗性を付与することを明らかにした。

Chapter V　*MLP*遺伝子の発現制御機構の解明

ズッキーニには、*ovifera* 亜種と *pepo* 亜種が存在し、*pepo* 亜種では POPs が地上部に高濃度で蓄積するとともに、*Zinc finger protein* (*ZFP*) 遺伝子が高発現している。そこで、ズッキーニ *pepo* 亜種において、ZFP が転写因子として機能することで、*MLP* 遺伝子の発現が誘導され、POPs を高濃度に蓄積すると考えた。これまでの研究で、ズッキーニ由来の *ZFP* 遺伝子を過剰発現させた形質転換タバコの地上部において、ダイオキシン類濃度が増加することが明らかにされている。しかし、ZFP によって促進されるダイオキシン類の蓄積メカニズムは不明であった。ZFP-GFP の細胞内局在が核であることが判明したことから、ZFP が転写因子として働くことが推測された。*ZFP* 遺伝子を過剰発現した形質転換タバコでは、*PR-10* 遺伝子が発現し、この PR-10 は POPs の一種ポリ塩化ビフェニルと結合した。さらに、*MLP-GR3* 遺伝子のプロモーターが ZFP により活性化された。また、*ovifera* 亜種よりも *pepo* 亜種は *MLP-GR3* 遺伝子のプロモーターを活性化させた。よって、*pepo* 亜種では、*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 蓄積が促進されることを明らかにした。

Chapter VI　ズッキーニ ゲノムにおける*MLP*遺伝子の同定

シロイヌナズナ、ブドウ、リンゴなどの双子葉類において、それらゲノムは 10 以上の *MLP* 遺伝子を有している。しかし、これまでにウリ科作物において *MLP* 遺伝子のゲノム内における同定が行われたことはない。したがって、POPs の蓄積に寄与しうる *MLP* 遺伝子を看過している可能性がある。そこで、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ける *MLP* 遺伝子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。これら MLP は Bet v 1 モチーフを有し、ほとんどは細胞質に局在すると予想された。一方、プロモーター領域には多数の植物ホルモン応答に関わるシスエレメントが存在した。RNA-sequencing により、各 *MLP* 遺伝子の発現量を比較したところ、これまでに同定した *MLP* 遺伝子の発現量の方が高かった。これら結果と MLP 内のリガンド結合キャビティの疎水性と体積の推定結果から、POPs 蓄積への寄与を評価したところ、これまでに同定した MLP の POPs 蓄積への寄与が極めて大きいと結論付けた。

Chapter VII　総合考察

以上の結果より、MLP の遺伝子発現抑制や POPs との結合抑制を農薬を利用した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、ウリ科植物における POPs 汚染の低減化技術を開発することができた。また、MLP の生理機能を遺伝学・植物病理学・構造生物学の観点から洞察を与え、MLP が関与する生理機能を捉えることができた。

以上、本研究では、ウリ科植物において POPs による作物汚染の原因因子である MLP に着目し、分子レベルの汚染メカニズムを利用することによる作物汚染の低減化技術を開発した。汚染のない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たとともに、病原菌の防除資材としての農薬を、本来の目的のための利用にとどまらない、農薬の未知の機能を明らかにした研究である。市販されている農薬を活用できるため、農業現場での利用が簡便で、安全性の高い技術となりうる。さらには、これまで明らかとなっていなかった MLP の植物における機能の一端を明らかにしたことで、安全な作物を栽培するために必要となる基礎的知見を提供したことから、今後の作物保護に関わる技術開発に大いに貢献できるものと認める。

よって、学位申請者の藤田健太郎は、博士（農学）の学位を得る資格があると認める。