

# 研究終了報告書

## 「植物と昆虫の共生・寄生の分子メカニズムを解く」

研究期間:2020年 12月～2024年 3月

研究者: 平野 朋子

### 1. 研究のねらい

虫こぶ誘導昆虫は、自身の住居や餌場獲得のために、植物に、通常の植物の生活環では現れない「虫こぶ」の形成を誘導する。「虫こぶ」は、外部者の昆虫が、植物の可塑性を利用して、植物の遺伝子発現を操作することによる、植物形態形成の「延長された表現型」であり、数世紀も前から、研究対象として注目されてきた。

昆虫が植物に形成誘導する、「虫こぶ」は、単なる細胞の塊ではなく、最外層にリグニン化した堅い二次細胞壁が発達し、内側に幹細胞を形成し、この間を維管束が張り巡らせ、中央に昆虫の住む空洞がある、という4つの特徴的な構造をもっている。このような高度に組織化された、特殊な「器官」が、どのように形成されるか、まったく謎であった。

そこで、私たちは、組織染色、RNAseq 解析、in situ ハイブリダイゼーションなどの解析を行い、虫こぶ器官は、葉が脱分化後、花器官と果実形成の発生プログラムを部分的に使用し、元の葉とは全く異なった果実を応用した器官として再分化して出来上がったことを証明した。

次に、虫こぶ誘導昆虫の破碎液を、モデル植物シロイヌナズナに作用させると、虫こぶ様構造が誘導されることを発見し、虫こぶ形成メカニズムを分子生物学的に解析する新手法、Ab-GALFA (Arabidopsis-based Gall Formation Assay) 法を開発した。

この Ab-GALFA と RNAseq 解析、in silico の解析から、虫こぶ形成因子として、種間で広く保存されたタンパク質である Cysteine-rich secretory proteins, Antigen5, and pathogenesis-related 1 proteins (CAP)、プロセシング酵素、プロセシング酵素活性化酵素を同定にした。

本研究のねらいは、上記の結果を利用して、高度な共生・寄生の代表例「虫こぶ」現象の分子メカニズムを解明することにある。具体的には、①虫こぶ形成に関わる分子として同定した「昆虫キー分子 CAP ペプチド」の生成メカニズムを解析し、②植物側受容体との結合とその下流経路の解析を行い、③虫こぶ形成のモデル系を開発し、異種高等生物間相互作用研究のベースを創生することである。

### 2. 研究成果

#### (1) 概要

虫こぶ形成に必要な最小因子が CAP ペプチドと植物ホルモンであるオーキシン、サイトカイニンであることを証明した。また、虫こぶ形成昆虫から分泌される CAP ペプチドは、CAP タンパク質、そのプロセシング酵素、その活性化酵素により効率よく生成されることを明らかにした。また、CAP ペプチドが結合する植物側の CAP 受容体 (CAPR) として、シロイヌナズナに 42 個、ムシクサに 22 個を同定した。さらに、CAP ペプチドの入力から始まるシグナル伝達経路において、CAPR キナーゼファミリーを同定し、CAPR との結合性と共局在性を確認した。

最終的に、特定の濃度の CAP ペプチド、オーキシン、サイトカイニンによって、虫こぶ形成

植物ムシクサの芽生えや葉の断片から人工的な虫こぶの構成に成功した。この人工虫こぶは、天然に存在する虫こぶと比較して、構造や遺伝子発現プロファイルの観点において、完全に「虫こぶ」のアイデンティティを有していることを確認した。

ムシクサについて、人工虫こぶ作製法の確立、ゲノム解読、遺伝子操作法の確立により、「他者の遺伝子発現操作によって延長された表現型」を示す、あるいは、「高度な異種高等生物同士の共生」である「虫こぶ形成」のモデル化に成功した。

一方、基礎研究の成果を応用研究につなげた。CAP ペプチドが植物の潜在能力を引き出して、生物・非生物ストレスに耐性を与えることを発見し、新規バイオスティミュラントとしてのCAP ペプチドの実用化を進めた。具体的には、世界8か国に対する権利化、大規模圃場試験の実施、販売を担う農薬企業との協業、CAP ペプチドの生物生産についての共同研究が進行中である。

また、さきがけ共同研究を2件行った。村上慧博士との共同研究では、村上慧博士が合成したアンモニウム塩化合物ライブラリーから、著しく塩耐性付与効果をもつ分子を見つけ、新規バイオスティミュラントとして特許出願を行うとともに、論文投稿中である。関本奏子博士との共同研究では、機械刺激により野生種トマトの葉から放出される揮発性物質 2-Tridecanone, 2-Undecanone, 1-Heptyne, 2-Dodecanone について、放出のタイミング、放出量、放出維持の時間が異なっていることを見出したほか、新規に、1-Heptyne が 昆虫に対し忌避作用をもつことを発見し、特許出願をした。

## (2) 詳細

### 植物と昆虫の共生・寄生の分子メカニズムを解く

#### (研究項目1) 昆虫キー分子 CAP ペプチド生成プロセスの解明

CAP タンパク質のプロセシング酵素、その活性酵素を同定した。

全長 CAP タンパク質がプロセシング酵素によって切断されて CAP ペプチドが生成することを、それぞれ、大腸菌と昆虫無細胞系で生成・精製したヌルデシロアブラムシの CAP タンパク質とプロセシング酵素を用いて、in vitro 切断アッセイとウェスタンブロットニングによって確かめた。また、ペプチドシーケンスによって、CAP タンパク質の切断部位を特定した。さらに、その切断部位の切断量と蛍光強度を対応させた実験系により、プロセシング酵素活性化酵素の同定とプロセシング酵素により CAP タンパク質の切断を確かめた。

#### (研究項目2) シロイヌナズナを用いた CAP 受容体とこれに相互作用する分子の探索と機能解析

CAP ペプチド処理条件での Ab-GALFA アッセイの結果と in silico スクリーニングにより、CAP 受容体(CAPR)と CAPR キナーゼの候補遺伝子ファミリーを見つけ、CAP と CAPR との結合性、CAPR と CAPR キナーゼとの結合性を確かめた。

また、シロイヌナズナにおいて、CAP と CAPR の組織的局在、細胞内局在を観察し、これらの多重変異体が、根、シュート、果実の各器官で、同様な成長阻害が起きることを確かめた。

#### (研究項目3) 虫こぶ誘導昆虫と宿主植物のモデル化による虫こぶ誘導エフェクター分子の解

析

(1) 虫こぶ誘導昆虫ムシクサコバンゾウムシ(*Gymnaetron miyoshii Miyoshi*)の解析

ムシクサコバンゾウムシの RNAseq.を行い, GmCAP, GmCP, GmGULT を同定した.

(2) 宿主植物ムシクサ(*Veronica peregrina*)の RNA, ゲノム解析

ムシクサの全ゲノム配列を解読し, 野生型 (Sakai03;6 倍体) を決定した. さらに, ムシクサのゲノム配列とトランスクリプトの配列を照合し, ムシクサの全遺伝子を同定し, 非モデル生物であった正確なトランスクリプトーム解析に成功した.

(3) 虫こぶの再構成;人工虫こぶの形成

ムシクサを用いて, 特定の濃度の CAP ペプチド, オーキシシン, サイトカイニンの組み合わせよって, 人工的に虫こぶ様構造を構成することに成功した.

さらに, ムシクサにおいて, 人工的に構成した虫こぶ様構造, 天然に存在する虫こぶ, ロゼッタ葉, シュートメリステム, 花について, 網羅的遺伝子発現解析を行い, これらムシクサ器官の比較, 評価を行った. その結果, 人工的に構成した虫こぶ様構造は, 葉, 花, などの器官よりはるかに天然の虫こぶに近い発現プロファイルだった.

以上の結果から, CAP ペプチド, オーキシシン, サイトカイニンは, 虫こぶ形成昆虫が分泌する虫こぶ形成因子として, 必要十分であることが証明された.

最終的に, ムシクサについて, ①全ゲノム配列を取得し, ②遺伝子を同定し, ③形質転換法を確立し, ④虫こぶ形成昆虫なしで人工虫こぶの誘導法を確立したことから, 虫こぶ形成のモデル化に完全に成功した.

(応用研究) CAP ペプチドの作用とその利用

- (1) 虫こぶ形成を誘導するエフェクターの一つとして同定した CAP ペプチドは異なる濃度で, 植物に対し, 「幹細胞の誘導」, 「成長促進作用」, 「病害抵抗性の付与」, 「塩耐性の付与」, 「浸透圧耐性の付与」, 「乾燥耐性の付与」を引き起こす. これを利用し, CAP ペプチドが植物の潜在能力を発揮させるバイオスティミュラントとして使用できることを確かめ, 国内特許(特願 2020-156361)を申請し, 現在公開されている. また, PCT 国際出願も申請し, さらに, 米国, EU, カナダ, ブラジル, 中国, インド, オーストラリア, 日本の 8 か国の各国移行を進めた.
- (2) バイオスティミュラントとして販売を希望する企業が複数現れたため, 以下のとおり, 安全性試験・非 GLP 試験を行った.
- (3) マウスを用いる CAP ペプチドの簡易版 Local Lymph Node Assay, ②ウサギを用いる CAP ペプチドの皮膚刺激性試験, ③細菌を用いる CAP ペプチドの復帰突然変異試験, ④マウスを用いる CAP ペプチドの急性経口毒性試験. いずれの試験においても, CAP ペプチドの安全性が保障された.
- (4) CAP ペプチドの微生物による生産について, 日本曹達, 神戸大学・石井純博士らのグループとの共同研究が進行中である.

(さきがけ共同研究1) アンモニウム塩化合物の植物生理活性作用の探索 (さきがけ研究者・

#### 村上慧博士との共同研究)

- (1) 村上慧博士の合成したアンモニウム塩化合物 120 種類について、植物の成長を促進または抑制する作用があるか検討した。その結果、Control に比べて 2~2.5 倍までシロイヌナズナ芽生えの成長を促進させるアンモニウム塩化合物 10 種以上を同定した。
- (2) また、塩耐性を付与するアンモニウム塩化合物 10 種以上を同定した。このうち、tac131, tac141, tac444 (tac534) について、特許出願を行った。
- (3) 本研究についての論文は、現在、Nature Communications にて、査読の過程にある。

#### (さきがけ共同研究2) 植物が発する特異的な揮発性物質の同定と機能解析(さきがけ研究者・関本奏子博士との共同研究)

野生種トマト *Lycopersicon hirsutum* の葉に機械刺激を与えると、栽培種トマトにはない複数種類の揮発性物質 VOC として、2-Tridecanone, 2-Undecanone, 1-Heptyne, 2-Dodecanone を放出し、それぞれ、放出のタイミング、放出量、放出維持の時間が異なっていることを見出した。また、新規に、1-Heptyne が 昆虫に対し忌避作用をもつことを発見し、特許出願をした。

### 3. 今後の展開

#### 3-1. 基礎研究

虫こぶ形成昆虫は、植物の器官形成メカニズムを操作し、分化した組織・器官である葉を脱分化後再分化させて、果実に似た「虫こぶ」を形成させる。本さきがけ研究において、虫こぶ形成因子として、昆虫が分泌する昆虫 CAP ペプチドを発見し、昆虫 CAP ペプチドと植物ホルモンのみで人工虫こぶの形成に成功した。

CAP ペプチドの前駆体である CAP タンパク質をコードする遺伝子が植物を含めて広く真核生物に保存されていることから、そもそも、植物 CAP ペプチドが、植物の幹細胞化と再生の指令の本体であり CAP ペプチドの濃度差で説明できると着想した。

従って、今後の研究では、「植物形態形成の肝である幹細胞化と再生の操作」の全貌解明のため、修飾を含めた CAP ペプチドの完全同定と生成過程を完全に解明し、CAP ペプチドによるシグナル伝達経路に関わる分子をすべて同定する予定である。

#### 3-2. 本研究の成果による将来的な社会実装

「(延長研究) 昆虫のもつ植物ホルモンと CAP ペプチドの作用とその利用」の記述のとおり、CAP ペプチドの実用化に向けて、世界 8 か国に対する権利化、大規模圃場試験の実施、販売を担う農薬企業 8 社との契約・協業、CAP ペプチドの生物生産についての共同研究が進行中である。

また、2024 年 4 月から、京丹後地域をモデルに、新規バイオスティミュラント CAP ペプチドを用いることで、「人にも環境にも安全、かつ、生産性が高く、時間的経済的コストの低い農業スタイル」の創生プロジェクトを始動した。具体的には、京丹後地域の先進的農家である株式会社野木源とのコラボレーションにより、CAP ペプチドの簡便な使用法の確立を行い、効果実証をリアルタイムで社会にアピールする。バイオスティミュラント CAP ペプチドによる京丹後地域まるごとの地域活性化が実証宣伝につながると考える。

#### 4. 自己評価

##### 4-1. 研究目的の達成状況

さきがけの研究期間が2020年12月から2024年3月までで約3.5年であったが、2022年10月頃に、ムシクサ人工虫こぶの構成と全遺伝子の発現解析を終え、虫こぶ形成因子を完全に証明することができ、早い時期に実質の目標を達成することができた。

##### 4-2. 研究の進め方(研究実施体制及び研究費執行状況)

さきがけ研究は、平野、実験補助員、大学院生、学部生により進めた。学生の指導も十分行うことができ、基礎研究の面でも、社会実装の面でも、大きな収穫を得ることができた。

##### 4-3. 研究成果の科学技術及び社会・経済への波及効果

CAPペプチドは大きな社会・経済への利益を生むと予想され、波及効果は大きく期待ができる。

#### 5. 主な研究成果リスト

##### (1) 代表的な論文(原著論文)発表

研究期間累積件数: 件

1. **Hirano T**, Ebine K, Ueda T, Higaki T, Watanabe-Nakayama T, Konno H, Takigawa-Imamura H, Sato MH. The SYP123-VAMP727 SNARE complex delivers secondary cell wall components for root hair shank hardening in Arabidopsis. *Plant Cell*. (2023) Sep 15:koad240.

植物の根毛は、細長い形状を維持しながら伸長する。これは、先端が伸長すると同時に、根毛側面部分は、二次細胞壁が形成されることで、その膨張が抑制されるためである。しかしながら、根毛側面に二次細胞壁成分を輸送する分子機構については、全く不明だった。本研究において、モデル植物シロイヌナズナを用いて、根毛の側面部分に二次細胞壁成分を輸送し、根毛側面を硬くすることで、根毛が細長く真っ直ぐ伸びながら、その形を維持する仕組みを解明した。

2. **Hirano T**, Okamoto A, Oda Y, Sakamoto T, Takeda S, Matsuura T, Ikeda Y, Higaki T, Kimura S, Sato MH. Ab-GALFA, A bioassay for insect gall formation using the model plant Arabidopsis thaliana. *Sci Rep*. (2023) Feb 13;13(1):2554.

モデル植物シロイヌナズナの芽生えは、虫こぶ形成昆虫の破砕液に浸漬、一晚培養すると、細胞分裂と細胞成長を促進する、という発見から、植物と他者の共生・寄生の分子メカニズムの新規解析手法として、Ab-GALFA法を開発した。本研究は、Ab-GALFA法の方法と評価を示し、未知の虫こぶ形成誘導分子の探索に有効であることを明らかにした。

3. Takeda S, **Hirano T**, Ohshima I, Sato MH. Recent Progress Regarding the Molecular Aspects of Insect Gall Formation. *Int J Mol Sci*. (2021) Aug 30;22(17):9424.

複数種の植物に形成された虫こぶの網羅的発現解析を比較し、『虫こぶ形成昆虫は、葉を脱分化させた後、花器官と果実形成遺伝子を使用して、葉、根、花、果実などの器官とは異なる特殊器官「虫こぶ」を再分化させる』という虫こぶ形成の共通メカニズムを示し、虫こぶ形成に共通して重要な遺伝子を提唱した。

(2) 特許出願

研究期間全出願件数：3 件(特許公開前のものは件数にのみ含む)

1	発 明 者	平野朋子, 佐藤雅彦, 大島一正, 木村成介
	発 明 の 名 称	植物幹細胞誘導作用及び植物病害虫抵抗性誘導作用を有するペプチド
	出 願 人	京都府公立大学法人, 学校法人京都産業大学
	出 願 日	2021/9/16
	出 願 番 号	PCT/JP2021/034176
	概 要	<p>Cysteine-Rich Secretory Protein, Antigen 5, and Pathogenesis-Related 1 (CAP)の保存領域からなる合成ペプチドを含む溶液に植物を短期間浸すだけで分化細胞を幹細胞化できるという知見を得た。さらに、当該ペプチドを含む溶液に植物を浸すこと、及び当該ペプチドを含む溶液を植物に塗布することにより、凍結耐性、乾燥耐性、病害虫抵抗性を向上させた植物を作り出すことができることも見出した。また、当該ペプチドを含む溶液に植物種子を浸すことにより発芽を促進させることができ、当該ペプチドの存在下で植物の形質転換を行うことで形質転換効率を向上させることができ、当該ペプチドを含む溶液を植物に塗布することにより植物の成長を促進させることができることも見出した。</p> <p>したがって、本発明は、植物幹細胞誘導作用、植物の環境ストレス耐性向上作用、植物病害虫抵抗性誘導作用、発芽促進作用、植物の形質転換効率向上作用及び植物成長促進作用を有するペプチド、並びに該ペプチドを含む植物幹細胞誘導剤、環境ストレス向上剤、植物病害虫抵抗性誘導剤、発芽促進剤、形質転換効率向上剤及び植物成長促進剤を提供することを目的とする。また、本発明は、上記ペプチドを利用した植物幹細胞の製造方法、植物体の環境ストレス耐性を向上させる方法、植物病害虫の防除方法、植物種子の発芽を促進させる方法、植物体を形質転換する方法、及び植物体の成長を促進させる方法を提供することを目的とする。</p>
2	発 明 者	平野朋子, 村上慧, 榊原陽太
	発 明 の 名 称	植物賦活剤及び植物の育成方法
	出 願 人	京都府公立大学法人, 学校法人関西学院
	出 願 日	2023/9/27
	出 願 番 号	特願 2023-166311
	概 要	<p>本発明は、植物の成長促進作用及び植物のストレスに対する抵抗性を向上させる作用などの植物の賦活作用を有する植物賦活剤を提供する。</p> <p>本発明の植物賦活剤は、式(1)及び式(2)：</p> <p>中、R1、R2 及びR3 はそれぞれ、置換若しくは非置換のアルキル基であり、R4 は、置換若しくは非置換のアリール基、置換</p> <div style="text-align: center;"> <p>(1)</p> </div> <div style="text-align: center;"> <p>(2)</p> </div>

		若しくは非置換のヘテロアール基、シクロアルキル基、又は、置換若しくは非置換のアミノ基であり、R5 は、置換若しくは非置換のアール基、置換若しくは非置換のヘテロアール基、シクロアルキル基、置換若しくは非置換のアミノ基、又は、水素原子であり、Xは、炭素原子又は窒素原子であり、互いに隣接する2個の実線と点線の二重線のうち、一方の実線と点線の二重線は単結合であり且つ他方の実線と点線の二重線は単結合又は二重結合であり、Q-は、対アニオンである。]で表される化合物を有効成分として含有することを特徴とする。
3	発 明 者	関本 奏子, 平野 朋子, 矢守 航
	発 明 の 名 称	害虫忌避剤及び害虫忌避方法
	出 願 人	公立大学法人横浜市立大学, 京都府公立大学法人, 国立大学法人東京大学
	出 願 日	2023/8/22
	出 願 番 号	特願2023-135001
	概 要	本発明の一態様は、以下の通りである。 (1) ヘプチン類を有効成分として含有する, 害虫忌避剤。 (2) ヘプチン類が, ヘプチンである, (1)に記載の害虫忌避剤。 (3) ヘプチンが, 1-ヘプチンである, (2)に記載の害虫忌避剤。 (4) 害虫が, アブラムシ, ダニ, 及びアザミウマから選択される少なくとも1種である, (1)~(3)のいずれか1つに記載の害虫忌避剤。 (5) 溶媒を更に含む, (1)~(4)のいずれか1つに記載の害虫忌避剤。 (6) 溶媒が油を含む, (5)に記載の害虫忌避剤。 (7) (1)~(6)のいずれか1つに記載の害虫忌避剤を適用対象物又はその周辺に付与することを含む, 害虫忌避方法。 (8) 適用対象物への付与を, 撒布, 噴霧又は塗布により行う, (7)に記載の害虫忌避方法。

(3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

(3)-1. 学会発表

- 1) 京都府立大学新自然史科学創生センター創立記念シンポジウム「おいしい家をつくる虫のすごい能力を探る」2021年8月8日(招待講演)
- 2) Symbio2021(日本共生生物学会第5回大会)「昆虫が植物を改変させて起こす寄生・共生現象「虫こぶ」の謎に迫る」2021年11月27日(基調講演)
- 3) 第63回日本植物生理学会 シンポジウム「「虫こぶ」形成の謎は解明しつつある」2022年3月23日(招待講演)
- 4) 第24回デジタル進化生物セミナー「どのように「虫こぶ」形成が起こるか?」2022年6月30日(招待講演)
- 5) ERATO 共生進化機構先端セミナー「虫こぶ形成における昆虫と植物のコミュニケーション」2022年10月24日(招待講演)
- 6) 日本植物学会一般向け講演会植物が好き! 招待講演「昆虫はどうやって植物に『虫こぶ』を

- つくらせるか？」2022年12月11日(招待講演)
- 7) ERATO 公開シンポジウム「延長された表現型の機構解明」;「ゴール形成昆虫の植物の操り方」2023/2/18(招待講演)
  - 8) 日本植物生理学会の関連集会・植物ホルモンワークショップ「虫こぶ形成のしくみ;ホルモン分析からのヒント」2023年3月14日(招待講演)
  - 9) 日本植物学会第87回シンポジウム「植物と昆虫の共生・寄生の分子メカニズムを解く」2023年9月9日(招待講演)
  - 10) 第64回植物バイテクシンポジウム「第二次みどりの革命を起こすバイオスティミュラント」2023年9月28日(オーガナイザー, 招待講演)

(3)-2. 著作物

- 1) 「植物の遺伝子を巧みに操る虫こぶ形成のしくみ」JT生命誌105(2021)平野朋子
- 2) 「昆虫が作り出す虫こぶ由来の化合物を活用して新たなバイオスティミュラント資材の実現を目指す」農耕と園芸(2022)平野朋子, 佐藤雅彦, 木村成介
- 3) 「虫こぶ由来のCAPペプチドにより植物の潜在能力を引き出す」バイオインダストリー(2022)木村成介, 佐藤雅彦, 平野朋子
- 4) 「分子の言葉で解き明かす虫こぶ形成メカニズム」日本緑化センター(2022)平野朋子
- 5) 「虫こぶ形成メカニズムの謎は解かれつつある」2023 Vol.93 No.4 岩波『科学』平野朋子
- 6) 「ヌルデの遺伝子を操って虫こぶを形成ヌルデシロアブラムシ」国立科学博物館ミルシル11月号(2023)平野朋子