

第6回研究助成

## 揮発性物質による植物間情報伝達と早期病害ストレス検出基盤構築

研究代表者:

木下 奈都子 筑波大学

共同研究者:

戒能洋一 筑波大学

Chua Nam-Hai Rockefeller University

研究協力者:

別役 重之 筑波大学

杉田 あき 総合研究大学院大学

Mathieu Bruggeman University of Strasbourg



キューガーデンにおける講演  
(写真: 新明由美)



研究室における木下(左端)、インターン、杉田(右端)  
(写真: 渡辺政隆氏)



ブルキナファソ農業・環境省における講演



中学校における植物分子生物学のワークショップ  
者)



地元中学校におけるワークショップ(中央奥が筆者)

## 1. 研究の背景と達成目標

世界的な人口増加により 2050 年までに食糧生産を倍増する必要があると試算されている。同時に、農業は世界の淡水資源の 8 割を消費し、リン酸鉱石を枯渇する勢いで化学肥料を生産・投入している。このように大量の資源を投入したにも関わらず、潜在収量の 25%が害虫・病気ストレスによって損失されている(図1)。日本での害虫被害は、年間約 1 兆円である。この資源のロスを防ぐために、世界では年間 4 兆円(300 万トン)の農薬が投入されている。化学農薬と病害虫耐性を付与された遺伝子組換え作物は一時的に目覚ましい効果を上げた。しかし、この手法では既に抵抗性害虫が出現している。そのため、病害虫から作物を保護する新しい技術が求められている。

本研究では、植物が害虫に曝されると、揮発性物質を放出して近隣の植物へ情報伝達するという植物の防御機構に着目した。この揮発性物質には免疫活性化作用があり、これに反応して周りの植物の免疫系も活性化される。この植物間コミュニケーションを可視化することで害虫被害をいち早く検知し、ピンポイントで処理を行う予防型の精密農業の基盤開発を目的とする。達成目標は、被害植物からの香り物質を手掛かりに、バイオイメージングを利用した周辺の健全植物による害虫被害の検知システムの開発、イメージングに関する定量データの取得とモデル化、モニターシステムの効率化である。

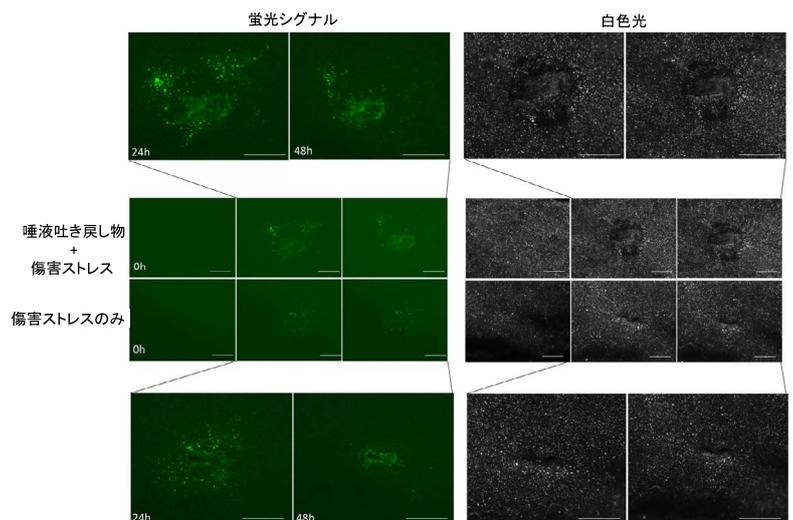
## 2. 主な研究成果と社会、学術へのインパクト

- ・害虫から被害を受けた植物が放散する揮発性成分に反応して、隣接する植物が蛍光を発することに より早期な段階で害虫被害を検出できる技術基盤を構築した。
- ・早期な段階でピンポイントで害虫被害を特定することで、被害を最小限に止めることができるだけでなく、農薬の使用量を軽減することができる。資源の枯渇に対応できる持続的な農業方法の基盤技術である。
- ・揮発性物質を介した植物間コミュニケーションは、生態学分野における知見の蓄積があるものの、分子レベルでの理解は進んでいなかった。非破壊的手法を用いて、分子レベルでの反応を経時的に解析することで、3次元での情報伝播のデータが得られる。分子レベルでの特異的な反応を定量化することで、植物間コミュニケーションを数理モデル化することができる。
- ・圃場での揮発性物質を介した危険情報の伝播を数理モデル化することで、害虫のリスクを回避する農業方法の開発が可能になる。
- ・バイオイメージングの分野における定量はこれまで、マイクロなスケールが主なターゲットであった。このため自動的な定量方法も細胞レベルに限られていた。我々は、個体レベルでのシグナルを自動的に定量するメソッドを確立した。これまでマクロレベルでのイメージングの定量は手動で行われることが多いが、マニュアルによる解析は時間と労力という問題の上にヒューマンエラーが含まれる。イメージング分野におけるマニュアル解析でのヒューマンエラーは最大で 400%にも昇ることが報告されている。新しく開発した方法は、解析速度と労働時間を削減できるだけでなく、ヒューマンエラーを軽減し、再現性が高い定量メソッドである。

## 3. 研究成果

化学生態学で知られる立ち聞き現象 植物が害虫による被害を受けると揮発性免疫活性物質(香り)を放ち、周辺植物の免疫系を活性化する を可視化するためのプローブとして免疫経路下流で免疫活性と共に発現レベルが顕著に上昇するマーカー遺伝子のプロモーターと蛍光タンパク質を結合したキメラ DNA が導入された組み換え植物を用いた。

この植物を用いて、まず傷害ストレスと唾液吐き戻し物を害虫による食害ストレスのモデルとし、この場合の被害植物における免疫経路の活性化を確認した。傷害ストレスのみでも蛍光シグナルを検出したものの、傷害ストレスに唾液吐き戻し物が加わるとより強いシグナルが得られ、唾液吐き戻し物に植物の免疫系を活性化させる化合物が存在することが示唆された。



次に、免疫系を活性化することから知られる合成の揮発性物質を用いて健全な植物における免疫系の活性化具合を調べた。その結果、物質特異的な感度・部位において免疫系が活性化していることが明らかになった。

実際に被害植物に隣接する植物において、前者から放出された揮発性物質によって後者の免疫活性が上昇しているかどうか、解析した。この実験では、複数の高等植物体からなる、集団レベルにおけるタイムラプスイメージングを行うための新規な実験系の立ち上げを行った。この独自の実験系を用いて、スペシャリスト害虫とジェネラリスト害虫による食害を受けた被害植物に反応して周辺の健全植物で免疫系が活性化されていることをイメージングで捉えることができた。

物理的な固定によるストレスを排除した長時間におけるイメージングでは、他のストレスにより副作用やノイズを軽減し、植物間のコミュニケーションを特異的に観察することができた。しかし、データを定量化する際に、植物がダイナミックに動くことがわかった(図2上)。イメージングデータにおける定量化は、これまで動く単細胞や固定された限られた数の細胞を主な対象としていた。このため、動く多細胞を定量化するためには、サンプルが動く範囲全てを定量化範囲として選択する必要があった(図2下)

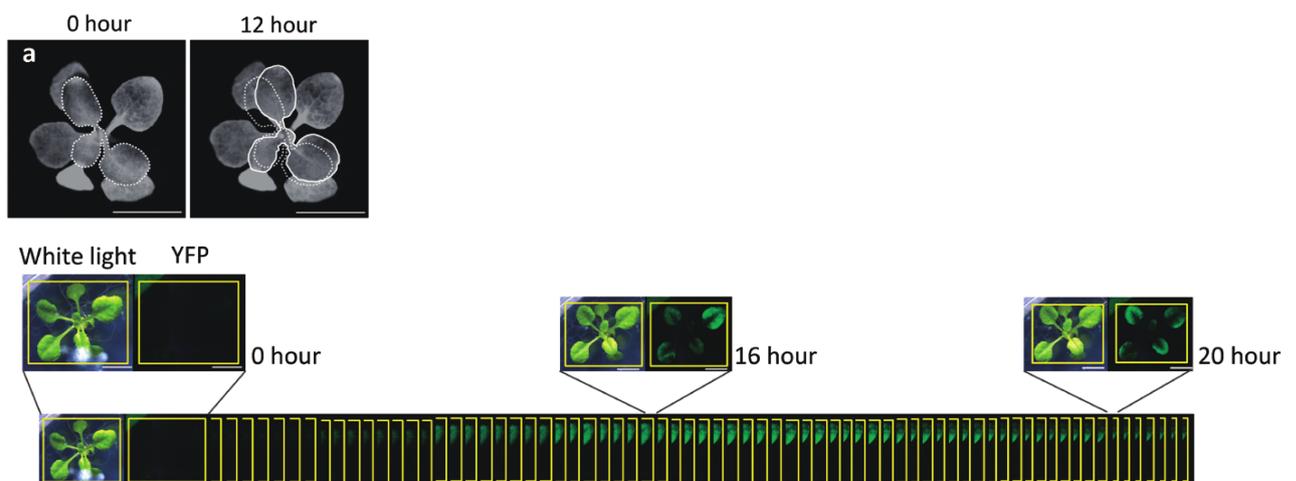


図2 タイムラプス中に大きく動く植物 (Kinoshita et al. 2019 より引用)

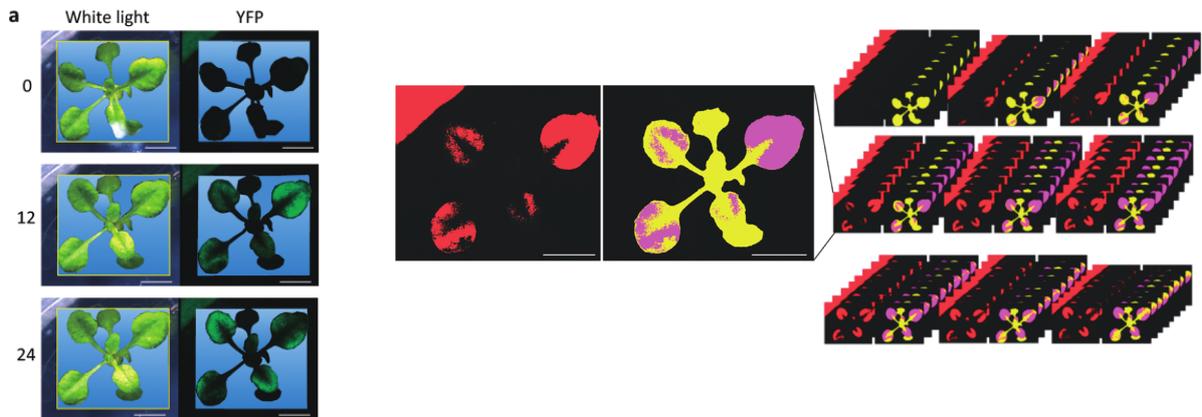


図3 植物の輪郭を認識することでバックグラウンドに由来するノイズを軽減し(左)、抽出した輪郭に特異的なシグナルを自動的に定量するメソッドである。(Kinoshita et al. 2019 より引用)

サンプルが任意の位置の選択はこれまで主にマニュアルで行われてきたが、長時間にわたるタイムラプス解析における動画には多数のフレームが含まれている。このため、マニュアルによるサンプルの輪郭の認識は労力・時間だけでなく、ヒューマンエラー・再現性という観点でも現実的ではない。本研究では、植物個体の輪郭を認識し、その上にシグナルを重ね合わせることでサンプルに特異的なシグナルのみを定量する手法を開発した。植物の輪郭の認識とシグナルを重ねる作業を自動的に行うため、労力・時間・再現性といった面で効率が良いメソッドである。この手法は、非侵襲的なイメージング法を用いたリアルタイム画像解析を定量的な解析へ広く応用することができる。蛍光・発光タンパク質を用いた遺伝子工学によって、細胞・組織と言ったマイクロなレベルでの分子的な動態が明らかになっているものの、個体が高次に協調して機能するマクロな生態系レベルでは遺伝子工学を用いたイメージング解析はほとんど皆無であった。我々は、遺伝子工学と非侵襲的な画像解析を組み合わせ、個体間におけるコミュニケーションを可視化するシステムを構築し、シームレスな自動定量法を開発した。物理的に固定されずに「ゆらゆらと動く植物」の輪郭を自動的に認識し、そこへ目的とする蛍光シグナルを重ね合わせるプログラミングを行うことで、タイムラプス解析における多数のフレームを一度に解析する。新しく考案された方法では、(1)物理的に植物を固定するといったバックグラウンド・ストレスによるノイズを軽減、(2)定量作業における労力・時間の削減、(3)マニュアル作業によるヒューマンエラーを減らすことができる手法である。

#### 4. 今後の展開

複数のストレス応答性シグナル伝達経路の活性化を同時に解析することで、病害虫などの生物ストレスのみでなく、水分条件や栄養といった環境情報のモニタリングを同時に行いたいと考えている。さらに、土壌中の微生物環境をも可視化することで生態系の包括的なデジタル化を試みたいと考えている。これによって、今まで、主に生物種の多様性とその数で定量化されていた生態系を非侵襲的な技術で経時的に捉えることができる。環境に優しい、持続的な方法で環境をモニタリングすることで、ストレスの進行を予測することができる。これまで細胞レベルでのマイクロな解析が主流だったバイオイメージング分野において、マクロなイメージングを開拓するだけでなく、遺伝子レベルでのシグナル経路特異的な応答を生態系レベルで捉えることが可能になると考えている。

## 5. 発表実績

### 【原著論文】

Kinoshita, N.<sup>#</sup>, Sugita, A., Lustig, B., Betsuyaku, S., Fujikawa, T., Morishita, T. Automating measurements of fluorescent signals in freely moving plant leaf specimens. *Plant Biotechnology* 36:7-12(2019) <sup>#</sup>**corresponding author** 表紙へ掲載 (図4)

Kuramitsu, K.<sup>#</sup>, Ishihara, T., Sugita, A., Yooboon, T., Matsumori, Y., Yamada, H., Kinoshita, N.<sup>#</sup>  
The attraction of *Tremex apicalis* (Hymenoptera: Siricidae: Tremecinae) and its parasitoid *Ibalia japonica* (Hymenoptera: Ibaliiidae) to the fungus *Cerrena unicolor* *Journal of Hymenoptera Research* 68:37-48 (2019) <sup>#</sup>**co-corresponding author**

Kinoshita, N.<sup>#</sup>, Betsuyaku, S. The effects of Lepidopteran oral secretion on plant wounds: a case study on the interaction between *Spodoptera litura* and *Arabidopsis thaliana*. *Plant Biotechnology* 35: 237 (2018) <sup>#</sup>**corresponding author**

Kinoshita, N.<sup>#</sup>, Arenas, C., Chua, N-H<sup>#</sup>. Visualizing nuclear-localized RNA using transient expression system in plants. *Genes to Cells* 23:101-105 (2017) <sup>#</sup>**corresponding author**

### 【講演】

木下 奈都子 日本学術振興会 フォトニクス情報システム第179委員会「光学センシングの精密予防農業への応用の試み」(東京、2018年10月)

外務省「日本ブランド発信事業(多層的ネットワーク構築)」

Kinoshita, N. Stress responses in plants: from stress adaptive developmental plasticity to digitalizing interspecies communication(王立キューガーデン、イギリス、2017年7月)

Kinoshita, N. Abiotic and Biotic Plant Stress Responses: with emphasis on adaptive developmental plasticity and digitalizing interaction between plant–insect–symbiotic fungi (英国ロザムステッド研究所、イギリス、2017年7月)

Kinoshita, N. Future agriculture: from natural genetic resources to precision farming ブルキナ ファソ(アフリカ)国立農業・環境省(ブルキナファソ、2017年7月)

### 【知的財産】

木下 奈都子 「植物のストレスの検出方法及び植物における発光タンパク質の検出方法 処理装置、画像処理システム及び画像処理プログラム」国際特許出願 PCT/JP2018/039554

木下 奈都子 「画像処理装置、画像処理システム及び画像処理プログラム」特許出願 2017-205564



図4 個体レベルにおけるシグナルの定量メソッドの論文が Plant Biotechnology 誌の表紙に採用された。