

博士論文

寄生植物ストライガにおける吸器誘導物質の作用機構の解析

Action mechanism of haustorium inducing factors on parasitic plant *Striga hermonthica*

和田 将吾

奈良先端科学技術大学院大学

バイオサイエンス領域 植物共生学研究室

(吉田 聡子 教授)

提出 令和 3 年 5 月 12 日

目次

第0章 序論.....	4
0-1. 寄生植物.....	4
0-2. ハマウツボ科寄生植物と農業被害について.....	4
0-3. ストライガの発芽誘導.....	5
0-4. 寄生植物の寄生器官、吸器.....	6
0-5. 吸器誘導物質.....	7
0-6. 本研究の目的.....	8
第一章 ケミカルスクリーニングによる吸器誘導物質および吸器形成阻害物質の探索	10
1-1. 背景および目的.....	10
1-2-0. 材料と方法.....	12
1-2-1. 植物材料と植物種子の滅菌処理および発芽処理.....	12
1-2-2. ケミカルライブラリーを用いたスクリーニング.....	12
1-2-3. 統計処理.....	12
1-2-4. 使用したケミカルライブラリーとスクリーニング方法.....	13
1-3-0. 結果.....	14
1-3-1. 新規吸器誘導物質の探索を目的としたスクリーニング.....	14
1-3-2. 吸器形成阻害物質の探索を目的としたスクリーニング.....	15
1-4-0. 考察.....	17
1-4-1. 吸器誘導物質の構造とその活性について.....	17
1-4-2. 吸器形成阻害物質の構造とその活性について.....	18
第二章 吸器誘導における ROS の役割.....	31
2-1. 背景と目的.....	31
2-2. 材料と方法.....	33
2-2-1. 植物材料と植物の発芽処理.....	33
2-2-2. 活性酸素種の可視化.....	33
2-2-3. 吸器誘導物質と阻害剤の処理.....	33
2-2-4. イネの根の抽出液の調整.....	34
2-2-5. ペルオキシダーゼを用いた吸器誘導実験.....	34
2-2-6-0. トランスクリプトーム解析.....	34
2-2-6-1. ストライガの RNA 抽出および RNA-seq 用のライブラリーの作成.....	34
2-2-6-2. データ解析.....	35

2-3-0. 結果	36
2-3-1. カタラーゼと SOD による吸器形成阻害効果の検証.....	36
2-3-2. 活性酸素種の可視化	36
2-3-3. 吸器誘導物質と ROS 阻害剤.....	37
2-3-4. 吸器形成におけるペルオキシダーゼの影響	39
2-3-5-0. ストライガ吸器誘導時のトランスクリプトーム解析	40
2-3-5-1. データの調整および DEG の検出	40
3-10-2. SOM(Self-organizing maps)クラスター解析および GO エンリッチメント解析	41
2-4-0. 考察	43
2-4-1. 吸器誘導における ROS の役割.....	43
2-4-2. 吸器誘導におけるペルオキシダーゼの役割	44
2-4-3. 吸器誘導時の継時的トランスクリプトーム解析	45
第三章ストライガの DMBQ 溶液培養により生成される未知吸器誘導物質の探索....	73
3-1-0. 背景と目的	73
3-2-0. 材料と方法	74
3-2-1. 植物材料と植物の発芽処理	74
3-2-2. DMBQ およびシリリング酸培養液サンプルの調整.....	74
3-2-3. HPLC-PDA および LC-MS/MS による解析	74
3-2-5. 分液操作によるサンプルの分離	76
3-2-6. 固相カラムによるサンプルの分離	77
3-2-7. タンパク質消化酵素処理試験	77
3-2-8. サイズ分画	77
3-3-0. 結果	79
3-3-1. HPLC による DMBQ とシリリング酸の検出.....	79
3-3-2. LC-MS/MS を用いた DMBQ およびシリリング酸の検出.....	79
3-3-3. LC-MS/MS を用いた DMBQ の検出限界と吸器誘導活性.....	80
3-3-4. ストライガ培養による培養液中の DMBQ とシリリング酸量の継時的な変動.....	80
3-3-5. 吸器形成後のストライガに含まれる DMBQ の量.....	81
3-3-6-0. 未知の吸器誘導物質の物性解析	81
3-3-6-1. 分液操作	81
3-3-6-2. タンパク質消化処理およびサイズ分画	82
3-3-6-3. 未知の吸器誘導物質が有する活性の持続性	83
3-3-7. プロテオーム解析	84
3-4-0. 考察	86
3-4-1. 未知の吸器誘導物質の存在意義	86
3-4-2. 未知の吸器誘導物質の同定	86

第4章 総論.....	111
第5章 謝辞.....	113
第6章 参考文献.....	114

第0章 序論

0-1. 寄生植物

植物は様々な方法で自身の成長に必要な水分や養分を獲得する。一般的な高等植物は、葉を広げて光合成を活発に行い、根や葉から取り入れた水分を用いて有機栄養を生産することができる。しかし寄生植物は、一般的な高等植物とは異なり、宿主となる他の植物から栄養や水分を獲得する。現在、約 4,500 種類の寄生植物が存在すると言われている(Yoshida et al., 2016)。世界最大級の花を咲かせるラフレシア、万葉集の和歌に出てくるナンバンギセルなど、寄生植物は私たちの身の回りに存在している。寄生植物の宿主依存度は種ごとに異なり、条件的寄生、絶対半寄生、絶対全寄生の3つに分けることができる。条件的寄生植物は自身の光合成活性を持つため自然条件下で宿主なしでも生活環を全うすることができ、周囲に宿主植物が存在すると寄生を行う植物のことを指し、ハマウツボ科のコシオガマ (*Phtheirospermum japonicum*)などが代表的である。絶対半寄生植物は自身に光合成能力を有するが、宿主依存度が高く宿主なしでは生存できない植物を指し、同じくハマウツボ科のストライガ(*Striga hermonthica*)やビャクダン科のヤドリギ (*Viscum album*)などが含まれる。絶対全寄生植物はさらに宿主依存度が高く、機能的な葉緑体を持たない植物であり、ヒルガオ科のネナシカズラ(*Cuscuta* spp.)やハマウツボ科ヤセウツボ(*Orobancha minor*)などが代表的である。また、寄生植物は寄生する宿主の器官によって、茎寄生植物と根寄生植物に分けることができる。ネナシカズラやヤドリギは茎寄生植物であるが、ハマウツボ科の寄生植物は全て宿主の根に寄生する根寄生植物である。このように寄生植物は多様な系統分類群にまたがって存在し、その寄生様式も様々であるが、全ての寄生植物は吸器と呼ばれる寄生器官を形成する点で共通している。宿主の中に侵入した吸器は維管束をつなげて、水や栄養分を獲得できるようになる。寄生植物は少なくとも 12 回の独立した進化により生じたと推定されており、植物の寄生形質は収斂進化により獲得されたと考えられる (Westwood et al., 2010)。

0-2. ハマウツボ科寄生植物と農業被害について

ハマウツボ科植物は 3 属を除いて全ての種が寄生性であり、宿主の根に寄生する根寄生植物で構成される。ハマウツボ科には、条件的寄生から、絶対半寄生および絶対全寄生までの幅広い寄生能を持つ植物種が属している。中でも、ハマウツボ科の絶対寄生植物のいく種かは、作物種に寄生し農業被害を及ぼすことで知られている。絶対全寄生植物であるオロバンキ属(*Orobancha* spp)やフェリパンキ属植物 (*Phelipanche* spp) はニンジンなどの野菜類や、ソラマメやクローバーなどのマメ科作物に寄生し、地中海沿岸を中心に多くの被害をもたらしている (Parker, 2009)。

ストライガ属植物(*Striga* spp)は、マメ科に寄生する *Striga gesnerioides* を除き、イネ科植物に寄生する。ソルガム、トウモロコシやイネなどの主要な穀物に寄生し、宿主の生育を著しく阻害するため、アフリカ半乾燥地域で莫大な農業被害が確認されている (Westwood et al., 2010)。その被害額は年間数十億ドル以上と推定される (Spallek et al., 2013)。

この農業被害を減らすための防除法の研究が行われている。ストライガやオロバンキの種子は 200 μm 以下と非常に小さく、一植物あたり 5~10 万粒の種子ができる。土壤に混じった種子は宿主植物が周囲に存在しない環境では発芽しないという特徴を持ち、宿主が近傍に存在しない限り数十年間も休眠することができる。このような特性をもっているため、これらの絶対寄生植物の駆除は極めて困難である。しかし、宿主がない条件で発芽したストライガは宿主植物に寄生できず、そのまま枯死することが知られている。この性質を利用して、作物を播種する前に発芽誘導物質を土壤に混ぜ込む、もしくはストライガの発芽誘導能を持つ非宿主植物を間作することにより、ストライガの自殺的発芽を誘導する方法が考案されている。それ以外にも、除草剤耐性遺伝子を持つ作物の種子に除草剤をコーティングすることで、作物を枯死させずに種子付近で発芽したストライガを防除する方法や(Kanampiu and Friesen, 2004)、ストライガに耐性を持つ陸稲の育種が行われている(Samejima et al., 2016)。

0-3. ストライガの発芽誘導

ストライガ属植物(*Striga* spp.)はアフリカや東南アジアに自生する一年生のハマウツボ科の絶対半寄生植物であり、約 30 種の植物を含む。ストライガの種子は非常に小さく、発芽には宿主由来の発芽誘導物質が必要である (Spallek et al., 2013)。ストライガの発芽誘導物質として、植物ホルモンの一種であるストリゴラクトン類が知られている (Uraguchi et al., 2018)。ストリゴラクトンは 1960 年代にワタの根の滲出液からストライガの発芽誘導物質として単離された (Cook et al., 1966)。ストリゴラクトンは土壤中で不安定な物質で、根の周囲にのみ存在するため、ストライガは根の近傍のみで発芽することができる。近年になり、ストリゴラクトンが相互共生菌であるアーバスキュラー菌根菌の菌糸分裂の活性化物質であること (Akiyama et al., 2005) や、植物の枝分かれや葉の老化などの成長を制御を担う植物ホルモンであることが報告され (Gomez-Roldan et al., 2008; Umehara et al., 2008)、注目を集めている。シロイヌナズナやイネなどのモデル植物を用いた遺伝学的な研究が行われ、ストリゴラクトンの生合成経路やシグナル伝達経路が明らかになった。その過程において、ハマウツボ科寄生植物のストリゴラクトンの受容体がカリキニンシグナルに関わる KAI2 (Karrikin insensitive 2) タンパク質であることが報告された (Conn et al., 2015)。さらに、ストライガを含めたハマウツボ科植物が有する KAI2 タンパク質は多様なストリゴラクトンに対して結合できる様な基質結合部の立体構造を持ち、シロイヌナズ

ナやイネとは異なることが報告された(Toh et al., 2015; Tsuchiya et al., 2015)。ストライガはゲノム上にストリゴラクトン受容体遺伝子を重複して持っており、ストライガのストリゴラクトン認識の多様性と感受性に寄与していると考えられる(Yoshida et al., 2019)。ケミカルスクリーニングにより、ゲノム中の特定のストリゴラクトン受容体に対する高い親和性を持ち、低濃度でストライガの発芽を誘導するが、枝分かれや菌根菌相互作用に対して影響を与えない化合物が単離され、ストライガ防除法の確立に向けて研究が進んでいる(Uraguchi et al., 2018)。

0-4. 寄生植物の寄生器官、吸器

ストライガをはじめとする寄生植物は宿主植物に寄生する際に吸器と呼ばれる特殊な器官を形成する(Yoshida et al., 2016)。ストライガやコシオガマを含むハマウツボ科の寄生植物は、根に吸器を形成する。ストライガは吸器を形成する際に、主根の成長が止まり、細胞分裂と細胞肥大を伴いながら根端が膨らみ、同時に吸器表面の表皮細胞が吸器毛へと変化する(O'Malley and Lynn, 2000)。吸器の形成は宿主由来の化合物によって誘導されることが知られており、それらの化合物は吸器誘導物質と呼ばれる。発芽させたストライガに吸器誘導物質を添加すると 24 時間後には完成した吸器を観察することができる(O'Malley and Lynn, 2000)。条件的寄生植物コシオガマは、ストライガとは異なり、根端ではなく側根や主根の側面に吸器を形成するため、根端成長を維持しながら複数の吸器を形成することができる(Yoshida et al., 2016)。コシオガマの吸器形成過程の初期において、オーキシン生合成遺伝子 *YUCCA3* が働くことにより、吸器形成部位の表皮細胞におけるオーキシンの合成が吸器形成に必須であることが報告されている(Ishida et al., 2016)。また、吸器表面を覆う吸器毛は、宿主への付着を助けることで寄生成立に寄与することが報告されている(Cui et al., 2016)。宿主に付着した吸器は、その表皮細胞を長細い形状を持つ侵入細胞へと変化させ、宿主根に侵入する。宿主の維管束に到達すると、吸器内の細胞が道管へと分化し、宿主と道管を連結させることによって水や栄養分を奪えるようになる(Yoshida et al., 2016)。

吸器誘導にはキノン酸化還元酵素が重要な働きをすることが知られている。このキノン酸化還元酵素には Quinone Oxidoreductase 1 (QR1) と Quinone Oxidoreductase 2 (QR2) の 2 つのタイプが存在している。QR1 は 1 つの電子の移動を行い、QR2 は 2 つの電子の移動を行うと考えられている。例えば、キノンは QR1 によりセミキノンに、QR2 によりヒドロキノンにそれぞれ還元される。2010 年に、ハマウツボ科の条件的寄生植物である *Triphysaria versicolor* において、QR1 が吸器誘導に重要な役割を果たすことが報告された(Bandaranayake et al., 2010)。吸器誘導に伴う QR1 の発現上昇によってひとつの電子が還元されることでキノンはセミキノンに変わり、活性酸素を産出すると考えられる。この報告では、産出された活性酸素種やセミキノンが吸器形成を誘導するシグナルになる可能性が示された(Bandaranayake et al.,

2010)。また、2017年には条件的寄生植物であるコシオガマで QR2 が吸器誘導に重要な役割を果たすことが報告され(Ishida et al., 2017)、ハマウツボ科寄生植物の吸器形成におけるキノン酸化還元酵素の重要性が示された。

近年では、吸器の宿主侵入メカニズムの一端もコシオガマを用いた研究により明らかになってきている。通常、コシオガマの吸器は誘導後、宿主の根に向かって伸長し、宿主に到達すると侵入を開始する。しかし、吸器誘導後、宿主の根に向かって伸長するが、宿主に侵入せず伸長し続ける変異体が単離された。これら変異体はエチレンシグナルに関わる遺伝子である *ETHYLENE RESPONSE 1 (ETR1)* と *ETHYLENE INSENSITIVE 2 (EIN2)* に変異を生じていた。この解析により、コシオガマの宿主への侵入には、エチレンが重要な役割を担うことがわかった(Cui et al., 2020)。このように、吸器は寄生植物が宿主植物に寄生するための極めて重要な器官であり、その形成機構について遺伝子レベルでの研究が進展中である。

0-5. 吸器誘導物質

1986年に、Chang と Lynn はストライガの吸器誘導物質として、2,6-dimethoxy-1,4-benzoquinone (DMBQ) をソルガムの根の抽出液から単離した(Chang and Lynn, 1986)。また、類似の構造を持つキノンやフラボノイド類も吸器形成を誘導することが報告されていた(Albrecht et al., 1999; Goyet et al., 2019) (Fig. 0.1)。しかし、これらの吸器誘導物質の産生経路に関する知見は十分ではない。DMBQ の産生経路として Kim ら(1998)は細胞壁を構成するフェノール酸類の一種であるシリング酸がペルオキシダーゼによって酸化されることで DMBQ へ変換されることを報告した(Kim et al., 1998)。シリング酸は、宿主の細胞壁に含まれるリグニンが分解すると生じるため、細胞壁の分解産物がストライガ由来の活性酸素種 (Reactive Oxygen Species: ROS) やペルオキシダーゼによって DMBQ へ酸化されると考えられる。しかし、吸器誘導活性を持つシロイヌナズナの根の滲出液には DMBQ はごく微量しか含まれておらず(Wang et al., 2020)、実際にストライガによって DMBQ が産生されたという報告はされていない。DMBQ やその前駆体は細胞壁の構成成分であるリグニンモノマーと構造類似性をもっており、リグニンモノマーの重合時に副産物として DMBQ が産生されることが知られている。リグニンモノマーは芳香環に1つのヒドロキシル基と0から2つのメトキシ基を持っており、メトキシ基の数によって3つのタイプに分類される。寄生植物の吸器誘導はリグニンモノマーのタイプにより異なり、メトキシ基を1つ持つ G タイプのリグニンモノマーはストライガの吸器を誘導し、メトキシ基を2つ持つ S タイプのリグニンモノマーではストライガとコシオガマの吸器を誘導することが報告された(Cui et al., 2018)。リグニン組成を改変した宿主では、吸器の誘導率が変化することが確かめられており、宿主由来の吸器誘導物質の一部はリグニン代謝経路に依存していることが示唆されている(Cui et al., 2018)。

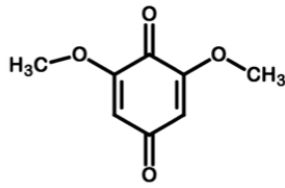
吸器誘導物質のシグナル伝達経路については、ほとんど解明されていないが、吸器誘導物質はある一定の酸化還元電位の範囲に入ることが知られており、吸器誘導にはレドックスシグナルが関与していることが示唆されている(Smith et al., 1996)。最近、シロイヌナズナを用いた実験により、DMBQ応答を制御する受容体として細胞膜局在型の受容体様キナーゼである **CANNOT RESPOND TO DMBQ 1 (CARD1)** が同定された(Laohavisit et al., 2020)。CARD1のリガンド認識には、細胞外ドメインのシステイン残基が必要であり、システイン残基の酸化がシグナル伝達に関与すると考えられている。CARD1は細胞外 H₂O₂の受容体として報告された hydrogen-peroxide-induced Ca²⁺ increases (HPCA)と同じタンパク質であり(Wu et al., 2020)、DMBQのシグナル伝達経路が ROS シグナル伝達と関連する可能性が示唆されている。

また、絶対寄生植物である *Phelipanche ramosa* では、植物ホルモンと知られるサイトカイニンが吸器誘導に関与することが報告がされ(Goyet et al., 2017)、リグニン構成成分以外にもストライガの吸器誘導物質が存在すると考えられる (Fig. 0.1)。

0-6. 本研究の目的

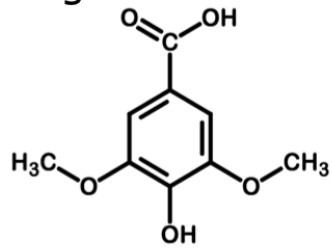
このように、寄生植物の吸器誘導物質の作用機構は未解明なことが多く残されている。そこで、本研究は、寄生植物ストライガの吸器誘導物質の性質とその作用機構を明らかにすることを目的とする。これまでの先行研究で、DMBQとは異なる吸器誘導物質が存在している可能性が示された。そこで、1) ケミカルスクリーニングを行ない、DMBQとは異なる構造を持つ新規の吸器誘導物質の単離と吸器形成阻害物質の探索を試みた。これらの新しく見出された化合物の構造とその活性の相関を調べ、吸器誘導機構の解析を目指した。さらに、吸器形成阻害物質の単離により、吸器形成をターゲットとした新しい農薬への応用の可能性を探った。次に、吸器誘導には ROS が関与している可能性が考えられるため、2) 吸器誘導にはどのような ROS が重要なのかを ROS 阻害剤を用いて調べた。最後に、DMBQとシリリング酸へのストライガの影響を調べる過程において、ストライガと DMBQ の培養液には DMBQとは異なる吸器誘導物質が含まれることを明らかにした。そこで、3) このストライガと DMBQ の培養液に含まれる未知の吸器誘導物質の物性を調べた。

Quinone



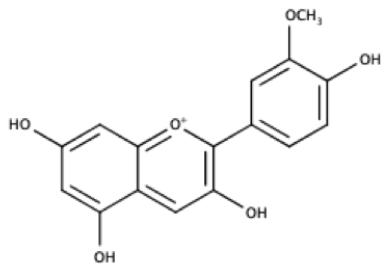
DMBQ

Lignin unites



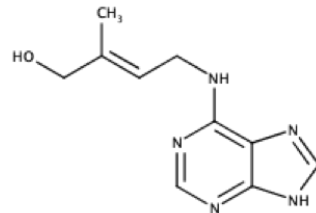
Syringic acid

Flavonoid



Peonidin

Cytokinin



Zeatin

	半寄生			全寄生
	<i>Triphysaria</i>	<i>Phtheirospermum</i>	<i>Striga</i>	<i>Phelipanche</i>
Quinone	○	○	○	×
Lignin unites	○	○	○	×
Flavonoid	○	○	○	×
Cytokinin	△	-	△	○

条件的寄生

絶対寄生

Fig. 0.1 寄生植物の吸器誘導物質

これまでに報告されている寄生植物の種類と吸器誘導物質の関係を示した。○は吸器を誘導された報告があることを示す。△はその吸器誘導物質によって吸器様の構造が報告されたことを示す。×は吸器が誘導されなかった報告があることを示す。(Goyet, et al, 2019 より、改変)

第一章 ケミカルスクリーニングによる吸器誘導物質および吸器形成阻害物質の探索

1-1. 背景および目的

ストライガの吸器は、宿主植物の近傍にいるときにのみ誘導されるため、宿主由来の吸器誘導物質の存在は古くから知られていた。1986年に宿主であるソルガム (*Sorghum bicolor*)の根抽出液からストライガの吸器誘導物質としてキノンである DMBQ が単離された(Chang and Lynn, 1986)。しかし、DMBQ が主要な宿主由来の吸器誘導物質なのかどうかは疑問が残っている。Chang and Lynn (1986) の報告では、ソルガムの滲出液からは DMBQ は検出されておらず、最近まで DMBQ は宿主の滲出液から検出することが困難であった。2020年になって、Wang らはシロイヌナズナの滲出液を解析し、ごく微量の DMBQ を検出することに成功した(Wang et al., 2020)。しかし、その濃度は 15 nM と低く、滲出液に含まれる DMBQ は吸器誘導を起こすには十分ではないと考えられる。実際、Wang ら (2020)の報告において、条件的寄生植物 *Triphysaria versicolor* の吸器誘導には最低でも 3 μ M の DMBQ が必要とされている。私の実験でも、ストライガにおいて吸器誘導を起こすためには、1 μ M 以上の DMBQ が必要であった(Wada et al., 2019)。シロイヌナズナの滲出液は *T. versicolor* に対してもストライガに対しても吸器を誘導することができるため、滲出液には DMBQ 以外の吸器誘導物質が含まれていることが予想される。

ストライガの吸器誘導物質として DMBQ 以外にも、Peonidin をはじめとするフラボノイド類、シリンガ酸などのフェノール類が報告されている。その中でも、シナピル酸やフェルラ酸などは植物細胞壁の構成成分の 1 つであるリグニンを構成するモノマーである。リグニンモノマーには、芳香環上にヒドロキシル基(-OH)が付加され、そのオルソ位に付加するメトキシ基(-OCH₃)の数によって H 型、G 型と S 型の 3 つのタイプに分別される。メトキシ基が付加されないものは H 型、1 つ付加するものは G 型、2 つ付加するものは S 型と分別される。代表的な例として、H 型は *p*-Coumaric acid や *p*-Coumaraldehyde、G 型は Ferulic acid や Coniferyl alcohol、S 型は Sinapic acid や Sinapyl alcohol などが挙げられる。リグニンモノマーが寄生植物の吸器を誘導する活性を持つことから、リグニン構造と吸器誘導能の関係性が調べられた(Cui et al., 2018)。その過程において、メトキシ基の数が吸器誘導能に影響することが報告された。1 つのメトキシ基を有する G 型リグニンモノマーは、ストライガの吸器を誘導するがほとんどの場合コシオガマの吸器を誘導することができず、2 つのメトキシ基を有する S 型リグニンモノマーは、ストライガとコシオガマの両者の吸器を誘導することが示された(Cui et al., 2018)。また、リグニン合成遺伝子改変植物を用いた実験により、リグニン組成の変化が吸器誘導に影響を与えることも示された。これにより、宿主における吸器誘導物質がリグニン合成経路に由来すること、リグニンモノマーの構造の違いによって吸器誘導される植物種が異なることが示された。一方で、G 型、S 型を産生しないリグニン合成遺伝子改変植物でも吸器

誘導が起きたことから、リグニン代謝経路に依存しない吸器誘導物質の存在も示唆された(Cui et al., 2018)。また、絶対寄生植物である *Phelipanche ramosa* において吸器誘導にサイトカイニンが関与していることが報告されており(Goyet et al., 2017)、リグニン構成成分以外にも寄生植物の吸器誘導物質が存在すると考えられる。

ストライガは、作物に寄生し毎年甚大な被害を及ぼすことが報告されている。有効な防除方法の開発を目的に、発芽現象を標的としたケミカルスクリーニングが行われている(Holbrook-Smith et al., 2016; Uraguchi et al., 2018)。これらケミカルスクリーニングによって 10^{-15}M レベルで発芽が誘導できる非常に強い吸器誘導物質 Sphynolactone-7(SPL7)が単離された。さらに、この SPL7 を用いた土壌試験により自殺的発芽を誘導できることが報告され、実用化の期待が高まっている(Uraguchi et al., 2018)。

絶対植物であるストライガにおいて、吸器誘導は寄生成立に必須な過程であるにも関わらず、吸器誘導を標的としたスクリーニングはほとんど報告されていない。これまでの研究では、DMBQ や既知の吸器誘導物質のアナログ化合物や酸化還元に関わる化合物を標的とした小規模なスクリーニングで誘導物質や阻害物質の単離が報告されているのみである(Albrecht et al., 1999; Wang et al., 2019)。新規な吸器誘導物質が単離されれば、吸器形成過程を幅広く理解できると考えられる。そのためにも、大規模なケミカルスクリーニングが必要である。また、吸器形成を阻害する様な化合物が単離されれば、寄生雑草防除法の開発に役立つと考えられる。

本章では、新規な吸器誘導物質の探索を目的にケミカルスクリーニングを行った。吸器誘導活性に必要な化学構造を同定するために、スクリーニングで得た新規吸器誘導物質の化学構造と吸器誘導活性の関連性を調べた。また、吸器形成阻害物質を同定することができれば、より吸器誘導や吸器形成をより深く理解することができると考え、DMBQ の吸器誘導能を阻害する、吸器形成阻害物質のスクリーニングも行った。

1-2-0. 材料と方法

1-2-1. 植物材料と植物種子の滅菌処理および発芽処理

ストライガ(*Striga hermonthica*)種子はスーダン ハルツーム National Research Center の Abdel G. T. Babiker 教授より分与していただいた。ストライガ種子約 50-100 mg を 1.5 ml チューブに量りとり、20%ハイター(花王)液 1 ml を加えボルテックスを用いて混合し、しばらく静置したのちに上澄み液を捨てた。これを 5~10 回繰り返した。さらに、クリーンベンチ内で滅菌水 1 ml を用いて 10 回洗浄を繰り返し、種子を滅菌した。次に、滅菌水 1 ml に懸濁した滅菌種子を、ガラス繊維ろ紙(GE ヘルスケア)を敷いた 9 cm シャーレへ移し、滅菌水を 9 ml 加えて全量を 10 ml とし、サージカルテープで封をした。滅菌したストライガ種子をアルミホイルで遮光し 25°C で 7 日吸水処理を行った。試験開始時の 1 日前に終濃度が 10 nM になるようにストリゴール加え、25°C 暗所に静置し発芽誘導を行った。ストリゴールは森謙治東京大学名誉教授より分与していただいたものを用いた (Fig. 1.1 A)。

1-2-2. ケミカルライブラリーを用いたスクリーニング

発芽誘導 1 日後に実体顕微鏡下を用いて発芽を確認し、発芽しているストライガのみを実験に用いた。新規吸器誘導物質のスクリーニングでは、96 well プレートの各 well に滅菌水 99 μ l とケミカルライブラリー (濃度 1 mM) 1 μ l ずつを加え、ケミカルライブラリーの終濃度を 10 μ M とした。吸器形成阻害物質のスクリーニングでは、96 well プレートの各 well に 10 μ M DMBQ 99 μ l とケミカルライブラリー (濃度 1 mM) 1 μ l ずつを加えた。ライブラリーを入れた Well に各々にストライガを 1 well あたり約 10 粒ずつ蒔いた。プレート全体をアルミホイルで遮光し 25°C で 1 日置いたのち、実体顕微鏡を用いて各 well の吸器形成したストライガと全体の数を計測した。吸器形成したストライガの数を各 well 内のストライガ全体の数で割り、吸器形成率を算出した。

1-2-3. 統計処理

1 次スクリーニングでは 1 反復の、2 次スクリーニングでは 3 反復の実験をおこなった。2 次スクリーニングに関しては、平均値と標準誤差を算出した。R を用いた Tukey HSD 検定により有意差 ($p < 0.05$) が検出されたものを異なるアルファベットで示した。

1-2-4. 使用したケミカルライブラリーとスクリーニング方法

本実験では、共同研究者である名古屋大学の土屋 雄一郎准教授から情報提供を受けた、他目的のスクリーニングによって得られた吸器誘導活性が疑われる 11 種類の化合物と、名古屋大学 ITbM から供与を受けた 2 種類のケミカルライブラリーを用いてスクリーニングを行った。ITbM のケミカルライブラリーは酸化還元に関わる化合物を含んだレドックスライブラリー(96 化合物)と、天然有機化合物を含む化合物群のファーマコフォアとその構造類似体を含むライブラリー(9,920 化合物)を用いた。また、アナログを用いた解析では、Chem bridge 社から入手し解析を行った。レドックスライブラリーと ITbM ケミカルライブラリーを用いたスクリーニングでは、ライブラリーの化合物数が多いため、2 段階に分けてスクリーニングを行った。1 次スクリーニングでは、活性の有無を確認する定性試験を、2 次スクリーニングでは 1 次スクリーニングの候補化合物の再現性の確認および吸器形成率を測定する定量試験を行い、目的化合物の探索を行った。

1-3-0. 結果

1-3-1. 新規吸器誘導物質の探索を目的としたスクリーニング

新規吸器誘導物質の探索では 10,042 の化合物に対するスクリーニングを行った。吸器誘導には酸化還元反応に関わることが示唆されているため、酸化還元に関わる化合物を含んだレドックスライブラリー(96 化合物)、名古屋大 ITbM から供与を受けたケミカルライブラリー(9920 化合物)、および名古屋大学の土屋 雄一郎准教授から情報提供いただいた発芽誘導物質のスクリーニングをした際に吸器の誘導が確認できた 11 種類の化合物を用いた (Fig 1.1 A)。

レドックスライブラリーの一次スクリーニングの結果、RED-A5 と RED-C7 を新規吸器誘導物質の候補として見出した (Fig. 1.2 A)。この 2 化合物に対し、2 次スクリーニングを行った。吸器誘導能の強さを測定するために 0.01 μM から 10 μM まで濃度を変えて吸器形成率を測定した。RED-A5 では全ての濃度において吸器形成率は 0% だった。RED-C7 は 10 μM で 10 μM DMBQ とほぼ同等の吸器形成率を示した。さらに、低い濃度での吸器形成率を測定したところ、1 μM で 20% の吸器形成率を示し、0.1 μM 以下では 0% だった (Fig. 1.2 A)。また、RED-C7 はウコンなどの植物に含まれるポリフェノール化合物であるクルクミンであり、DMBQ よりもやや低いものの、クルクミンが吸器誘導活性を持つことがわかった。

次に、ITbM ケミカルライブラリーを用いた新規吸器誘導物質のスクリーニングを行った。その結果、1 次スクリーニングで、吸器誘導物質の候補化合物として、15 化合物を見出すことができた。これら候補化合物に対して 2 次スクリーニングを行ったところ、34:A11、1119:H1、65:H4 と 114:B11 の 4 種類が 10 μM で 80% 以上の吸器形成率を示し DMBQ と同等の吸器誘導活性を有することが示された。一方で、75:G5 と 23:B2 は約 20% の吸器形成率を示し、弱い吸器誘導活性を示した (Fig. 1.3 A)。これらの新規吸器誘導物質に着目すると、吸器形成率がほぼ 100% を示す 4 種類のうち 3 種類の化合物は芳香環にヒドロキシル基が付加し、その隣にメトキシ基が付加する構造を有していた (Fig. 1.3 B)。また、これら 3 種類のヒドロキシル基のパラ位に位置する構造は異なってもその吸器誘導活性に変化は見られなかった。これは、芳香環上にヒドロキシル基、その隣にメトキシ基が付加する構造が吸器誘導活性に重要であるが、ヒドロキシル基のパラ位に位置する構造は吸器誘導活性にあまり関与しないことを示唆している。

次に、他目的のスクリーニングによって得られた吸器誘導活性が疑われる 11 種類の化合物が吸器を誘導するかどうかを確認した (Fig. 1.4)。その結果、11 種のうち、No. 10 のみが DMBQ やシリング酸と同程度の高い吸器形成率を示した (Fig. 1.5)。それ以外の化合物による吸器形成率はいずれも 20% 以下であった。そこで、No.10 のどの構造が吸器誘導に重要なのかを調べるために、少しずつ構造の異なる 15 種類のアナログを入手し、吸器形成率を調べた (Fig. 1.6 A)。その結果、10-3 が 50% 程度の

吸器形成率を示し、10-13、10-14 は約 80%の吸器形成率を示した (Fig. 1.6 B)。一方で、10-2、10-9 や 10-10 と同様に芳香環にヒドロキシル基とメトキシ基を持つものの、メトキシ基がヒドロキシル基の隣に配置していない化合物は吸器誘導能を持たなかった。以上から、吸器誘導にはヒドロキシル基とメトキシ基の二つの官能基の位置関係および数が非常に重要であると考えられた。

1-3-2. 吸器形成阻害物質の探索を目的としたスクリーニング

吸器形成阻害物質の探索を目的として、合計 10,030 化合物に対してスクリーニングを行った。まず、酸化還元に関わる化合物を含んだレドックスライブラリーを用いて、発芽したストライガに 10 μ M DMBQ と同時に化合物を暴露することにより、吸器形成阻害物質のスクリーニングを行った (Fig. 1.2 B)。その結果、1 次スクリーニングにより、RED-B3、RED-G9、RED-H7 を吸器形成阻害物質の候補として見出した (Fig. 1.7 A)。さらに、これらの物質について、二次スクリーニングを行った (Fig. 1.7 A)。RED-B3 は 10 μ M DMBQ 存在下で 10 μ M 加えると 40%まで吸器形成率が低下したが、それ以下の濃度では阻害効果は見られなかった。また、RED-G9、RED-H7 は 10 μ M DMBQ による吸器形成を阻害しなかった (Fig. 1.7 A)。以上の結果より、RED-B3 が新たな吸器形成阻害物質として見出された (Fig. 1.7 B)。さらに、RED-B3 は台湾ヒノキから抽出された化合物ヒノキチオール (Hinokitiol) であることがわかった。

次に、名古屋大学 ITbM から供与を受けたケミカルライブラリーを用いて吸器形成阻害物質のスクリーニングを行った。1 次スクリーニングを行い、候補化合物として 213 化合物を見出した。さらに、これら 213 化合物に対して 2 次スクリーニングを行った。その結果、41:G5 と 55:F11 によって吸器形成率が 20%以下にまで減少した。49:D3、81:H3 及び 104:A8 によって吸器形成率が約 50%までに減少した (Fig. 1.8)。結果として、このライブラリーからは、吸器形成阻害能を有する化合物を 5 種類見つけ出すことができた (Fig. 1.8 B)。

次に、吸器誘導活性の有無が疑われる 11 種類の化合物について、吸器形成阻害効果を持つかどうかを調べた。DMBQ やシリング酸と 11 種類の化合物を同時に発芽したストライガに暴露し、吸器形成率を測定することで、吸器形成阻害能を調べた (Fig. 1.9)。No. 1 は DMBQ と同時に暴露すると約 60%まで吸器形成率が低下し、No. 4 はシリング酸と同時に暴露すると約 80%まで低下したが、いずれも統計的な差は検出されなかった。No. 6 は DMBQ やシリング酸と同時に暴露すると各々 50%、80%まで吸器形成率が低下した (Fig. 1.9)。No.6 と DMBQ を同時に暴露した結果は、コントロールの DMBQ のみの吸器形成率と統計的に有意差が認められた。次に、No. 6 のアナログ 3 種類を用いて吸器形成阻害能との構造活性相関を調べた (Fig. 1.10 A)。6-1 はシリング酸と同時に暴露しても、吸器形成率に変化は見られなかったが、DMBQ と同時に暴露すると 60%まで吸器形成率が下がった (Fig. 1.10 B)。6-2 や

6-3は10 μ M DMBQや10 μ M シリンガ酸と同時に暴露しても、吸器形成率は下がらなかった。以上の結果から、ストライガにおける吸器形成阻害物質を単離することができた。

1-4-0. 考察

1-4-1. 吸器誘導物質の構造とその活性について

本章では、ストライガの新規吸器誘導物質および吸器形成阻害物質の単離を目的として、複数のケミカルライブラリーを用いてスクリーニングを行った。本章で試験した化合物の総数は 10,045 化合物となった。このスクリーニングによって新規吸器誘導物質として 11 化合物を得ることができた。得られた新規吸器誘導物質のうち 8 化合物は、芳香環に一つのヒドロキシル基(-OH)を持ち、一つまたは二つのメトキシ基(-OCH₃)がヒドロキシル基を挟むように配置していることがわかった。そして、メトキシ基を一つ有する化合物は約 50%の吸器形成率を、二つ有する化合物はほぼ 100%の吸器形成率を有していたことから、吸器誘導活性はメトキシ基の数によって変化することが示唆された。芳香環上に付加するメトキシ基は共鳴し電子供与性を持つため電子が押し出されると考えられる。押し出された電子は近くにあるヒドロキシル基に付加し、オキシ基に酸化され吸器誘導が開始されると考えられる。また、メトキシ基の付加する数によって吸器形成率が変化した。これは、芳香環上のメトキシ基による共鳴による酸化反応がメトキシ基の数によって促進される度合いが異なるからだと考えられる。この知見は、メトキシ基を二つ持つ S 型リグニンモノマーが条件的寄生植物コシオガマと絶対寄生植物ストライガの吸器を誘導し、メトキシ基が一つの G 型リグニンモノマーがストライガの吸器を誘導するがコシオガマの吸器は誘導しないという知見(Cui et al., 2018)と一致しており、メトキシ基が二つの化合物はより誘導活性が高いと考えられる。吸器誘導物質は一定の酸化還元電位を持つ物質に限られると報告されており (Smith et al., 1996)、メトキシ基の数が化合物の酸化還元電位に影響を与えていると考えられる。また、得られた吸器誘導物質やアナログの構造と活性の関連から、ヒドロキシル基のパラ位に位置する構造は吸器誘導にあまり関与しないことが示唆された。このことから、芳香環のヒドロキシル基とメトキシ基の位置関係が吸器誘導において、最も重要であると考えられる。

興味深いことに、今回のスクリーニングによって 65:H4 や 23:B2 のようなメトキシ基を含まない、これまでの報告されてきた吸器誘導物質とは異なる化合物を単離することができた。65:H4 は合成サイトカイニン的一种であるチジアズロンと一部共通する構造を持っており、チジアズロンは絶対寄生植物 *Phlipanche ramosa* やストライガの吸器を誘導できる(Goyet et al., 2017 青木、修士論文 2021)。これらの共通構造が吸器誘導に関わっている可能性がある。また、65:H4、23:B2 ともに 3 つ以上のカルボニル基(O=C)を持っている。カルボニル基中の酸素原子が電子求引性を示すため、カルボニル炭素は弱い正電荷をおびて反応しやすい状態になる。これらの領域がなんらかの反応を引き起こすことにより、吸器誘導が起こっている可能性も考えられる。

1-4-2. 吸器形成阻害物質の構造とその活性について

本研究では、吸器形成阻害剤の単離を目的にスクリーニングを行い、6化合物を見出すことができた。これまでに、*Striga asiatica* において、吸器誘導阻害剤として Tetrafluorobenzo-1, 4-quinone (TFBQ) や Cyclopropyl benzoquinone (CPBQ) が知られている (Ryan, 2000; Wang et al., 2019)。TFBQ や CPBQ は電子の受け渡しによってパラ位に位置するカルボニル基の電子の位置が変わることが知られており、CPBQ ではさらにシクロプロパン環が電子の受け渡しによって開裂する (Keyes et al., 2000)。

104:A08 には CPBQ と同様に、芳香環上にシクロプロパン環が付加されていたことから、104:A08 のシクロプロパン環も電子の受け渡しによって開裂し、DMBQ の作用を阻害する可能性が考えられる。他の吸器形成阻害物質では、酸素原子が多く含まれていた。6-1 や 055:F11 は2つのカルボニル基を持つ構造をしていた。カルボニル基は求核剤と反応しやすいため、DMBQ の持つカルボニル基の反応を阻害する可能性も考えられる。興味深いことに、6-1 は DMBQ とシリング酸で異なる阻害能を示しており、この化合物がカルボニル基を持つ DMBQ とは競合するが、ヒドロキシ基を持つシリング酸とは競合しない可能性を支持している。055:F11 では、DMBQ のみの試験しか行なっていないため、今後は、シリング酸による吸器誘導時の吸器形成阻害能を調べる必要があると考えられる。また、吸器誘導阻害活性を示した 041:G05、081:H03 および 049:D03 はいずれもスルホアミド構造を持っている点で共通している。スルホアミドに含まれるスルホニル基は高い電子求引性を示すため、これらの化合物も酸化還元反応を攪乱することで吸器誘導を阻害している可能性がある。また、スルホアミド化合物はシロイヌナズナの免疫応答のプライミング剤として働くことが報告されており (Noutoshi et al., 2012)、スルホアミド化合物はこれまでに知られていない植物への生理活性を持っていることも考えられる。

本研究で新規の吸器形成阻害物質として同定した RED-B3 は台湾ヒノキから抽出された化合物ヒノキチオール (Hinokitiol) であった。ヒノキチオールは鉄のキレーターであることが知られているが (Baba et al., 1998; Inamori et al., 1999; Kim et al., 2004; Tanaka et al., 1999)、近年の研究から、鉄に結合して膜を透過させる化合物であることが明らかとなっている (Grillo et al., 2017)。この性質から、ヒノキチオールの添加は鉄輸送タンパク質を欠損した酵母や哺乳類細胞の鉄吸収を回復させることが知られている (Grillo et al., 2017)。ストライガにおいても、ヒノキチオールを添加することにより、鉄が膜を透過できるようになったため、鉄勾配が形成されず吸器形成に影響を及ぼした可能性が考えられる。また、*In vitro* で、ペルオキシダーゼや鉄イオンを介するフェントン反応により産生される ROS によってイネや大豆から抽出した細胞壁多糖類が分解されることが報告されている (Schweikert et al., 2002)。これらのことから、RED-B3 が鉄の勾配を緩和することで ROS の発生を抑え、細胞壁分解に影響を与えたことにより、吸器形成を阻害している可能性がある。

ストライガは、イネ科作物に寄生する病害雑草であり、農業分野に多大な被害を及ぼしている。今回のスクリーニングにより、新規な吸器誘導物質や吸器形成阻害物質を得ることができた。これらの化合物をより詳細に解析し、また構造活性相関解析を行うことにより、吸器の誘導機構が明らかになると考えられる。また、得られた阻害剤は農薬への応用が視野に入る。そのためには、これらの化合物の土壌中での安定性、宿主植物への影響の有無や化合物が残留した際の環境の影響などを評価すべきだと考える。

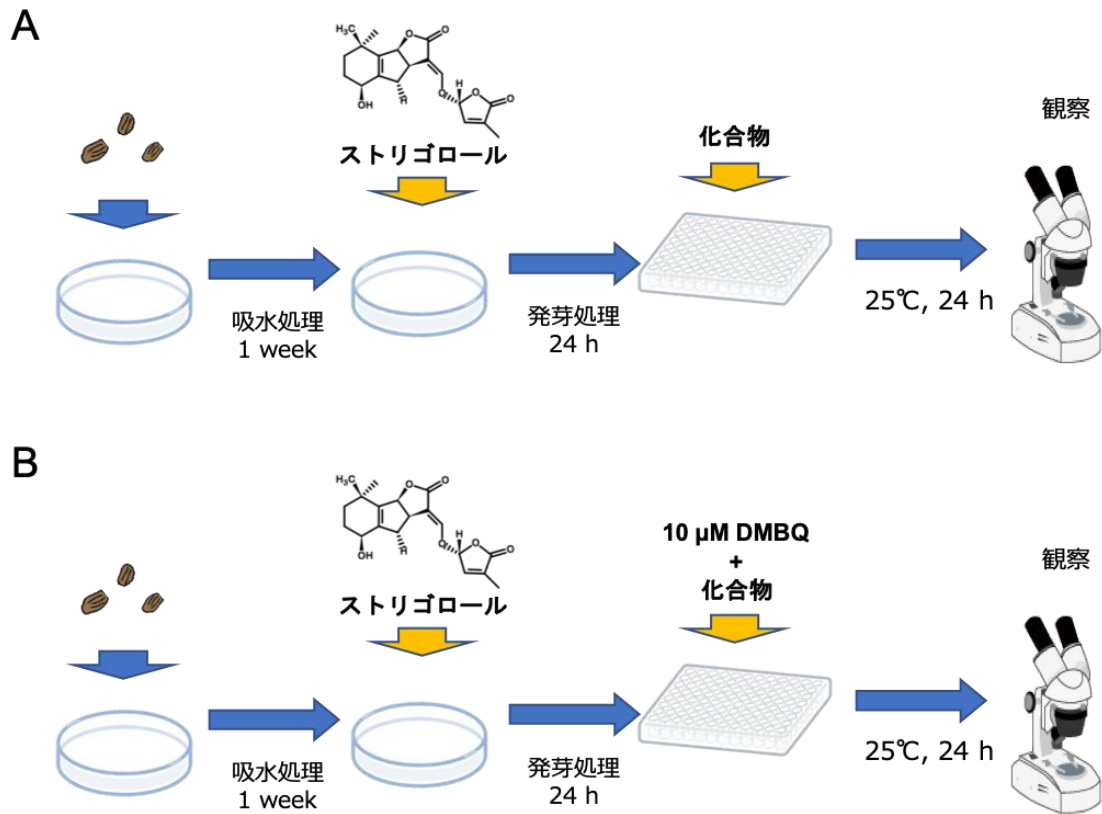
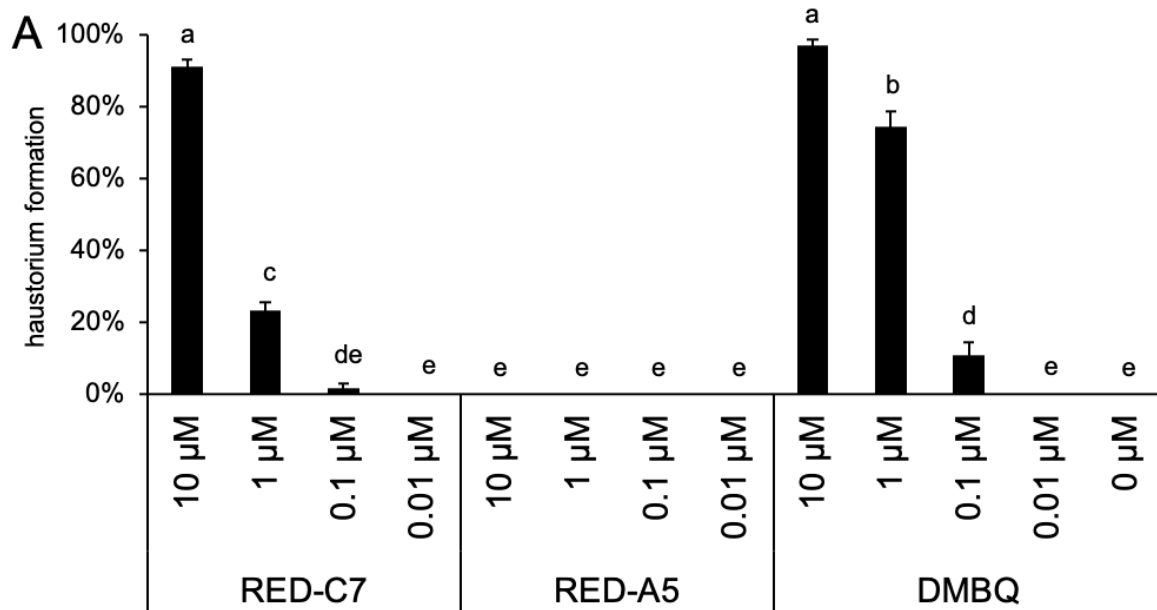
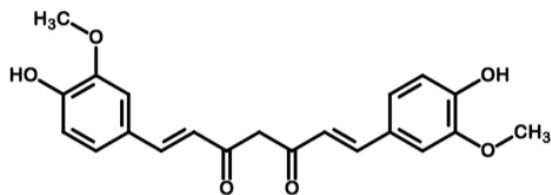


Fig. 1.1 実験手順

滅菌したストライガ種子をシャーレに蒔き、一週間の吸水処理を行った。ストリゴロールを加え、24時間の発芽誘導を行った。さらに、96 wellプレートに各種化合物と発芽した種子を加え、1日25°C暗所に置いたのち、実体顕微鏡で吸器形成率を測定した。新規吸器誘導物質のスクリーニングでは、ライブラリーのみを加え吸器形成率を測定した(A)。吸器形成阻害物質のスクリーニングでは、10 μM DMBQとライブラリーを加え吸器形成率を測定した(B)。



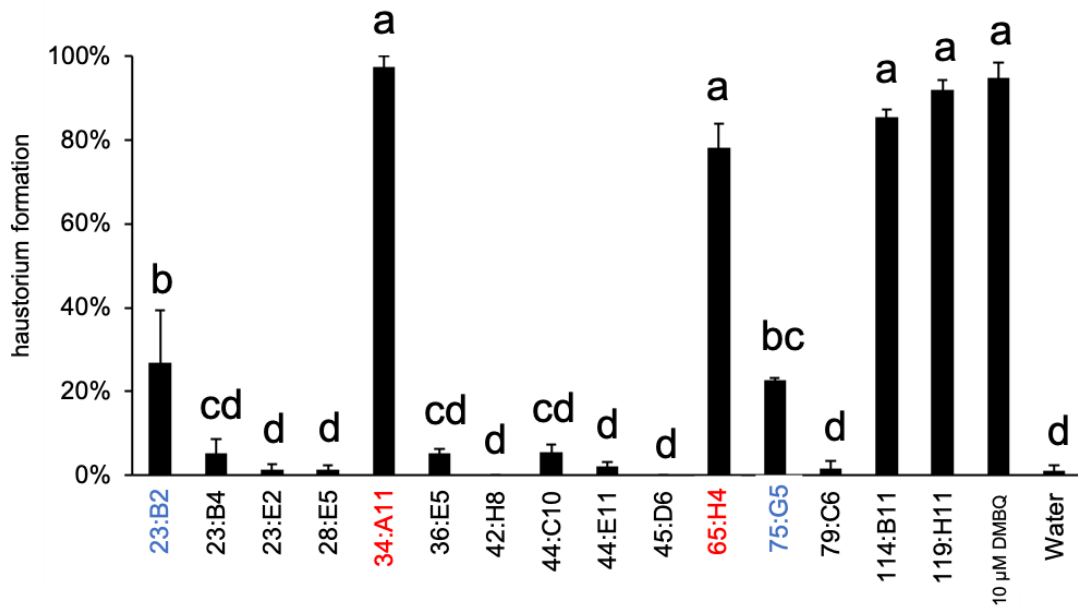
B



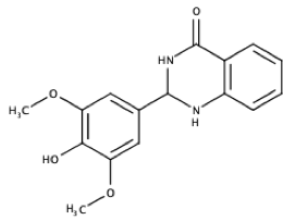
RED-C7

Fig. 1.2 レドックスライブラリーからの新規吸器誘導物質候補スクリーニング
 1次スクリーニングから得られた候補化合物の各濃度における吸器形成率(A)。RED-C7の化学構造(B)。エラーバーはSEを示す。n=3。Tukey HSD検定により有意差(p < 0.05)が検出されたものを異なるアルファベットで示す。

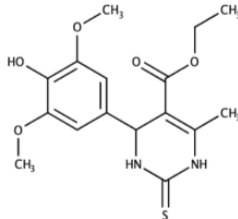
A



B

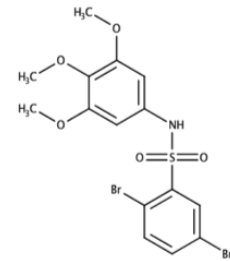


34:A11

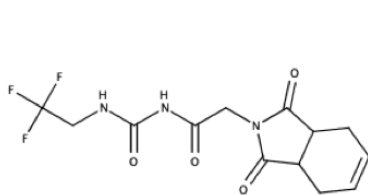


119:H11

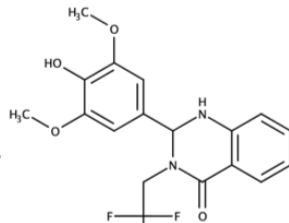
C



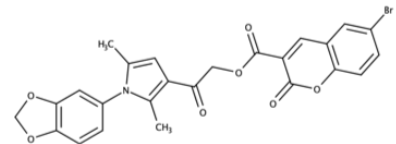
75:G5



65:H4



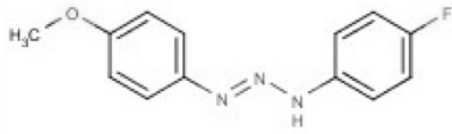
114:B11



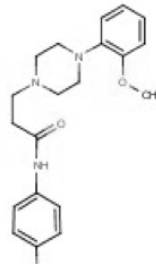
23:B2

Fig. 1.3 新規吸器誘導物質の2次スクリーニング

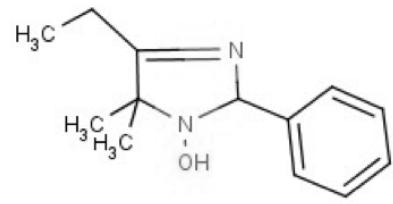
ITbMライブラリーを用いて新規吸器誘導物質の探索を目的とした1次スクリーニングを行い、候補化合物の吸器形成率を調べた。DMBQと同等の活性を持つ化合物を赤字で、DMBQと比較して弱い活性を持つ化合物を青字で示した(A)。DMBQと同等の活性を持つ化合物の構造式(B)。DMBQと比較して弱い活性を持つ化合物の構造式(C)。エラーバーはSEを示す。n=3。Tukey HSD検定により有意差(p < 0.05)が検出されたものを異なるアルファベットで示す。



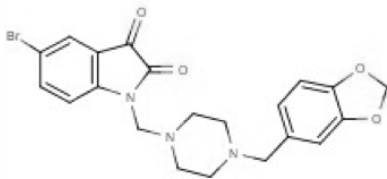
No. 1



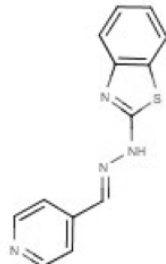
No. 2



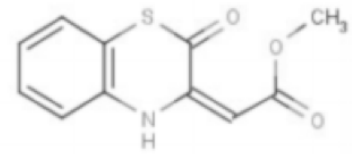
No. 3



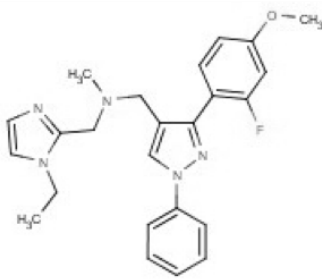
No. 4



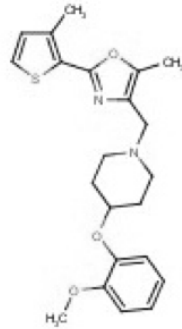
No. 5



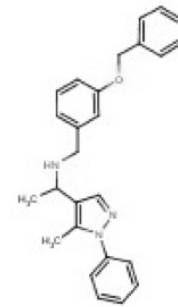
No. 6



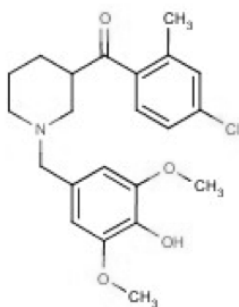
No. 7



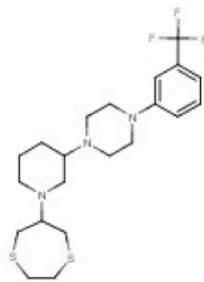
No. 8



No. 9



No. 10



No. 11

Fig. 1.4 スクリーニングに用いた11種類の化合物の構造
ケミカルスクリーニングに用いた化合物の構造。

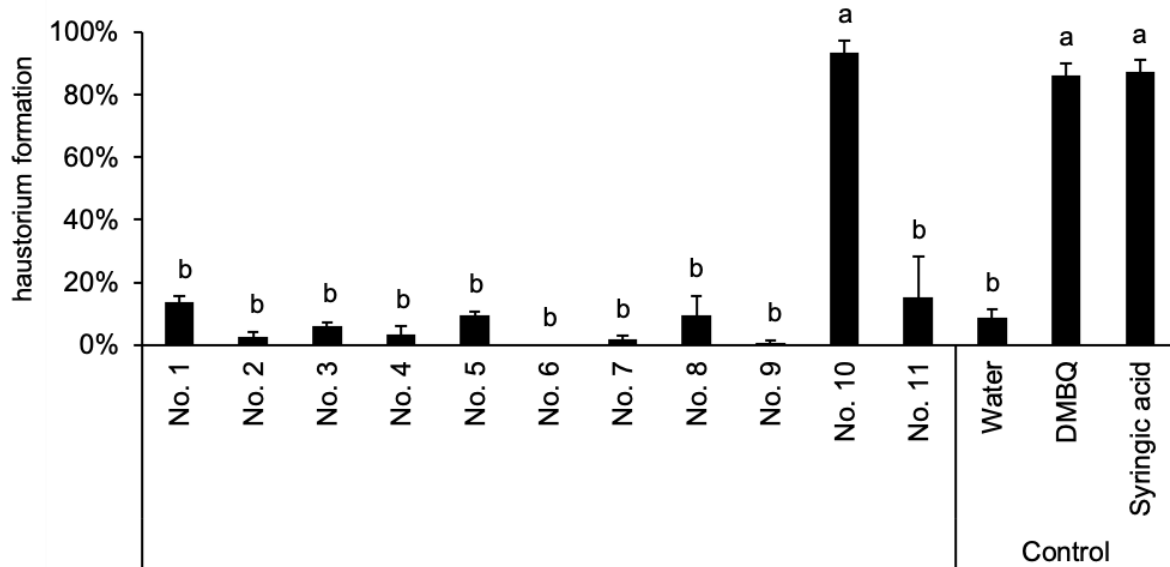


Fig. 1.5 吸器誘導物質の候補のスクリーニング

ケミカルスクリーニングの化合物を発芽したストライガに暴露し24時間後、吸器形成率を測定した。ポジティブコントロールとして10 μ M DMBQと10 μ M シリンガ酸を、ネガティブコントロールとして滅菌水を用いた。エラーバーはSEを示す。n=3。Tukey HSD検定により有意差(p < 0.05)が検出されたものを異なるアルファベットで示す。

A

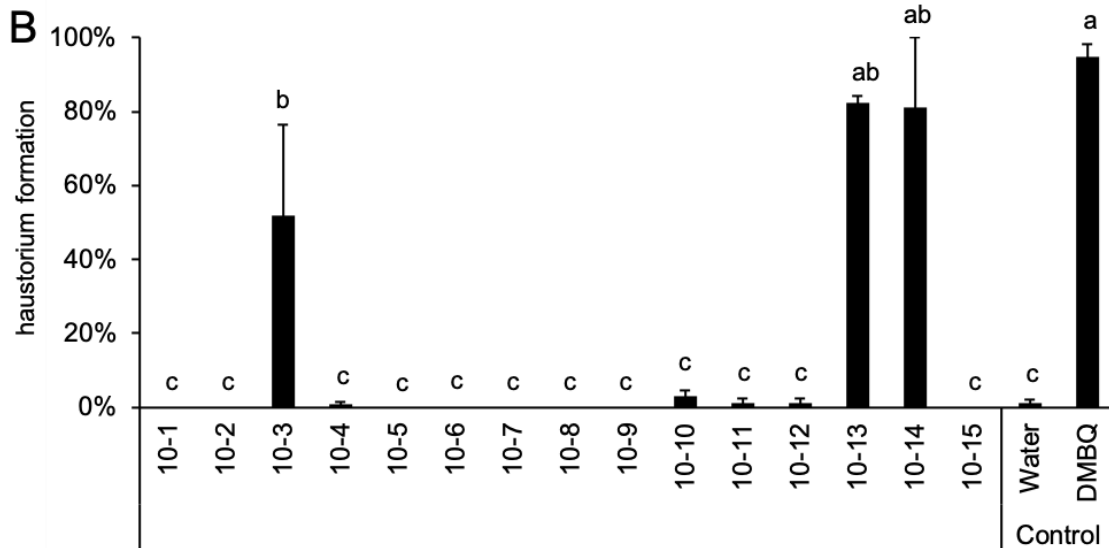
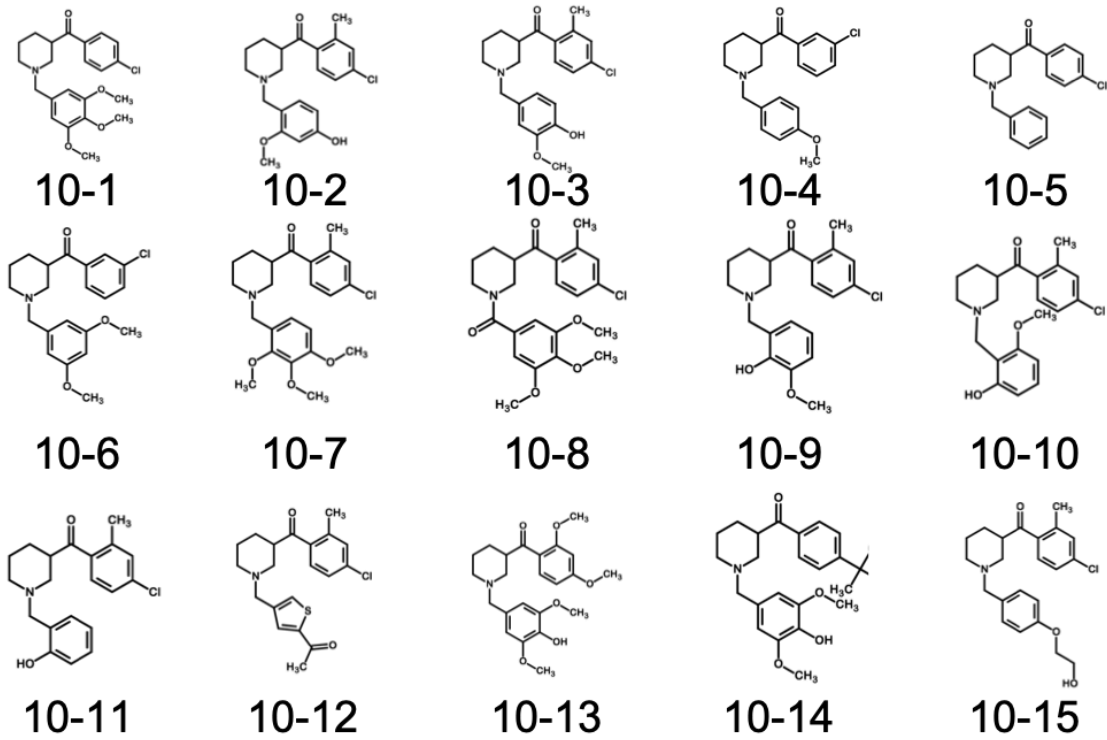
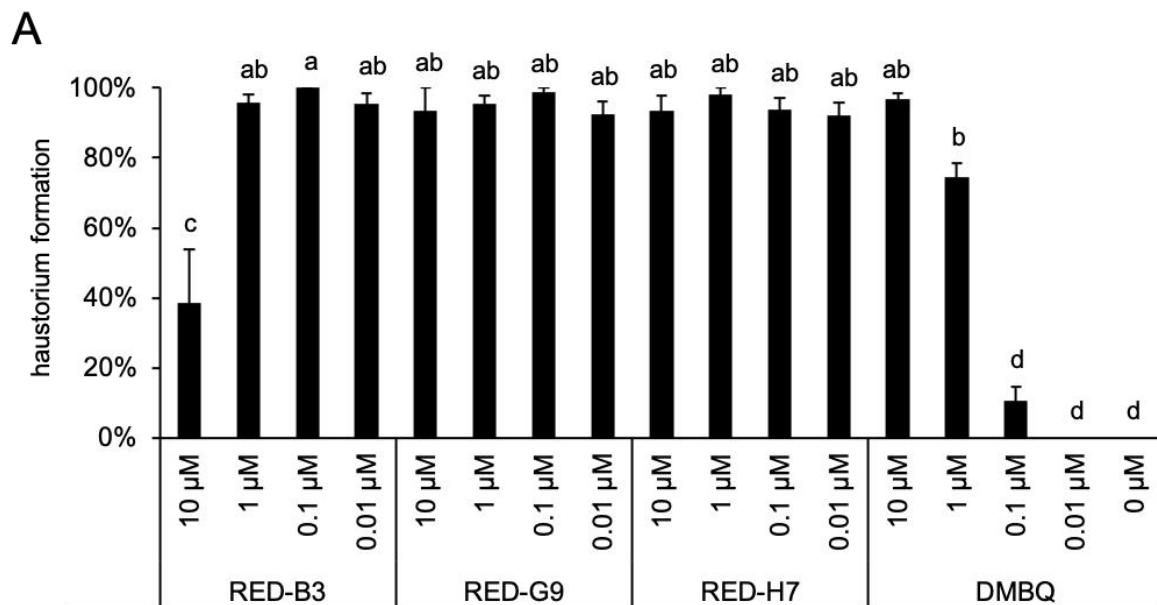
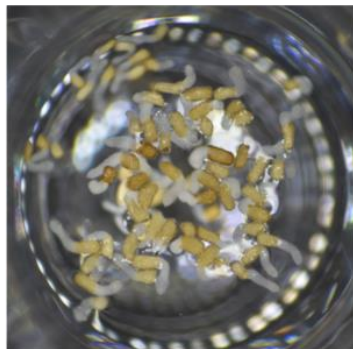


Fig. 1.6 No. 10のアナログ

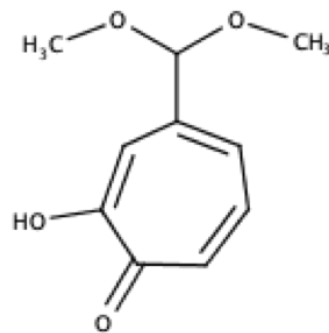
No. 10のアナログの化学構造(A)と吸器形成率(B)。コントロールとして10 μ M DMBQとWaterを用いた。エラーバーはSEを示す。n=3。Tukey HSD検定により有意差(p < 0.05)が検出されたものを異なるアルファベットで示す。n=3。



B



RED-B3



RED-B3

Fig. 1.7 レドックスライブラリーの吸器形成阻害剤物質の候補

1次スクリーニングで得られた候補化合物を10 μM DMBQと共にストライガに処理し、吸器形成率を測定した。吸器形成率(A)。RED-B3の化学構造(B)。エラーバーはSEを示す。n=3。Tukey HSD検定により有意差(p < 0.05)が検出されたものを異なるアルファベットで示す。

A

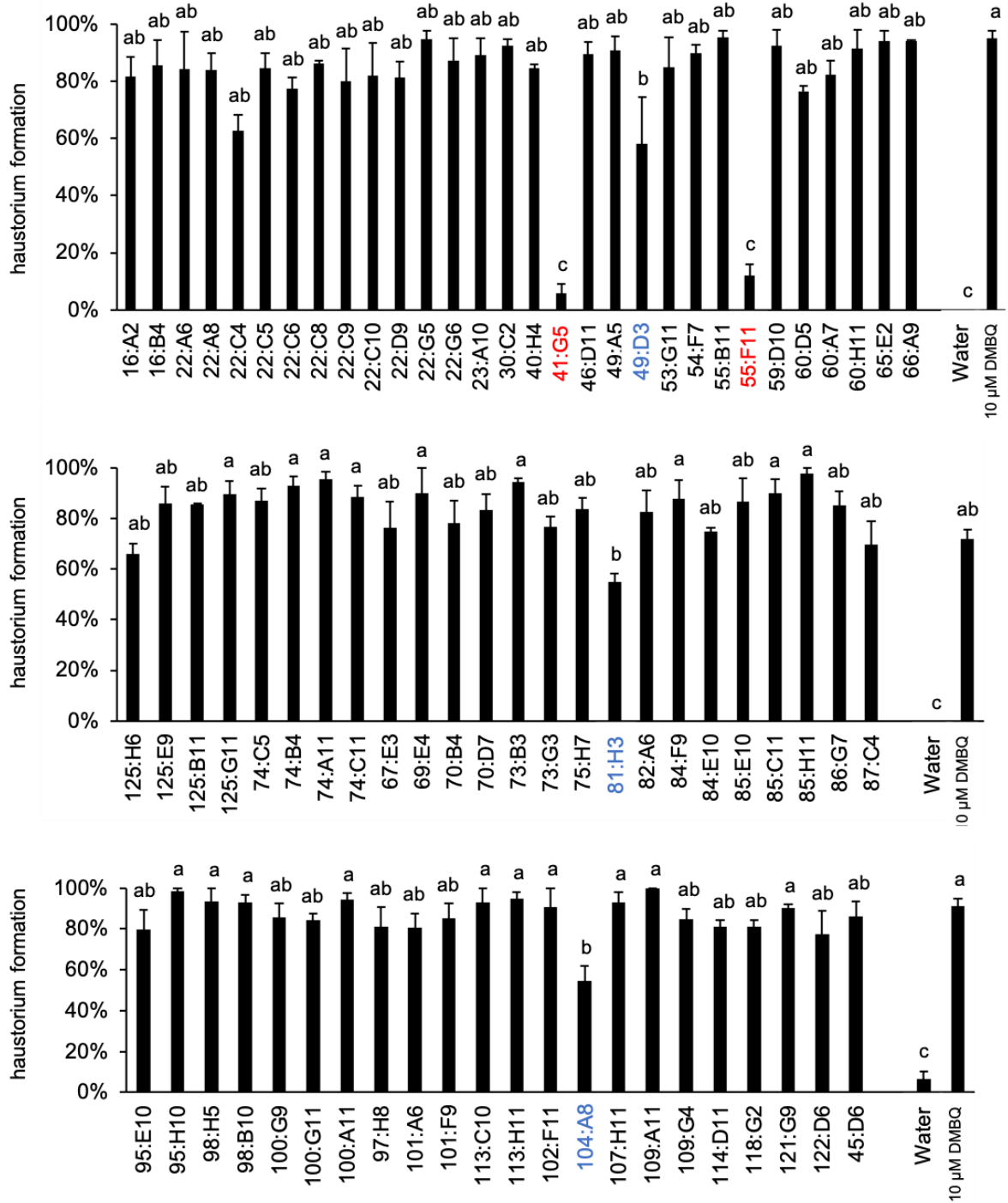
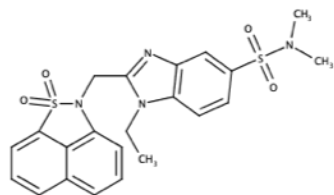


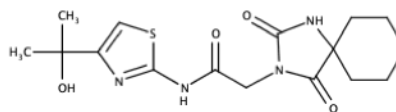
Fig. 1.8 A 吸器形成阻害物質の2次スクリーニング

ITbMライブラリーを用いて吸器形成阻害物質の探索を目的とした1次スクリーニングを行い、候補化合物の抽出した強い吸器形成阻害能を示すものを赤字で、弱い吸器形成阻害能を示すものを青字で示した(A)。エラーバーはSEを示す。n=3。Tukey HSD検定により有意差(p < 0.05)が検出されたものを異なるアルファベットで示す。

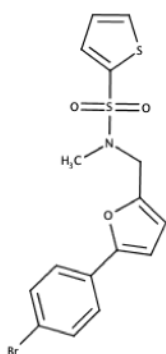
B



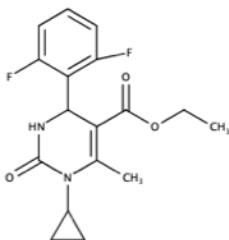
041:G05



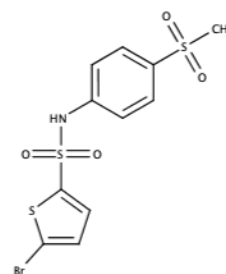
055:F11



081:H03



104:A08



049:D03

Fig. 1.8 B 吸器形成阻害の2次スクリーニング
41:G5、55:F11が強い吸器形成阻害活性を示し、81:H3、104:A8弱い吸器形成阻害活性を示した。これら化合物の構造式(B)。

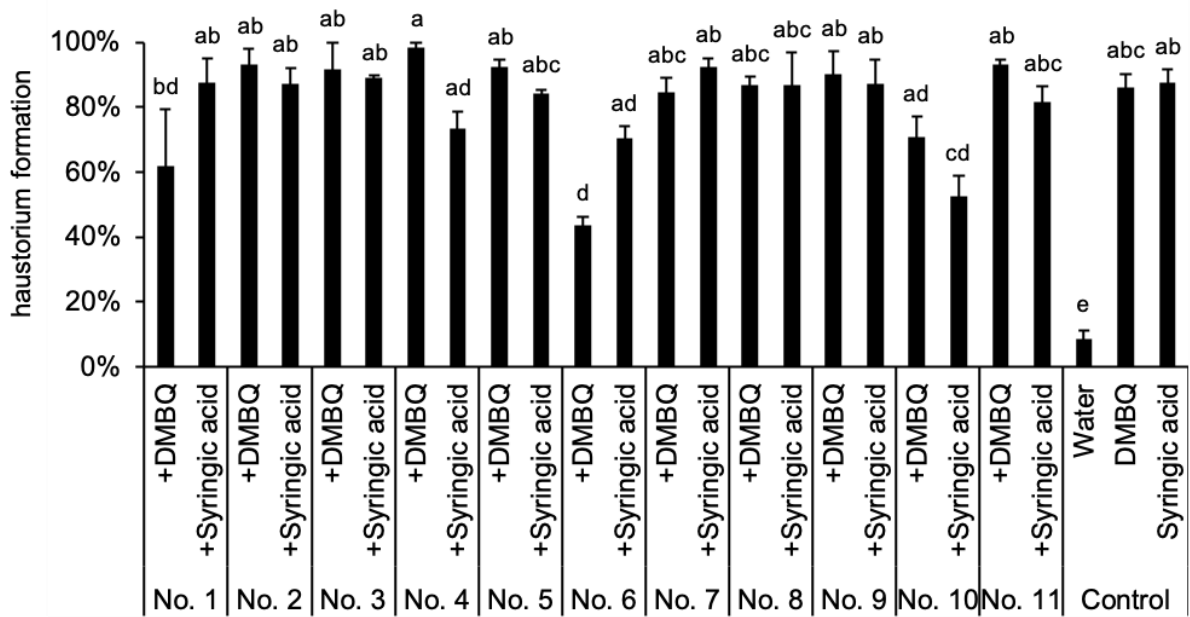
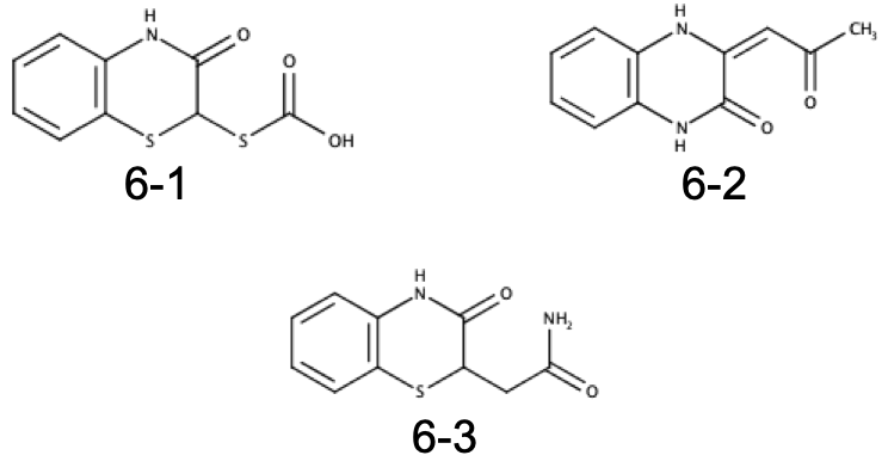


Fig. 1.9 吸器形成阻害物質候補のスクリーニング

ケミカルスクリーニングの化合物と同時に10 μ M DMBQや10 μ M シリンガ酸を発芽したストライガに暴露し24時間後、吸器形成率を測定した。ポジティブコントロールとして10 μ M DMBQと10 μ M シリンガ酸を、ネガティブコントロールとして滅菌水を用いた。エラーバーはSEを示す。Tukey HSD検定により有意差($p < 0.05$)が検出されたものを異なるアルファベットで示す。n=3。

A



B

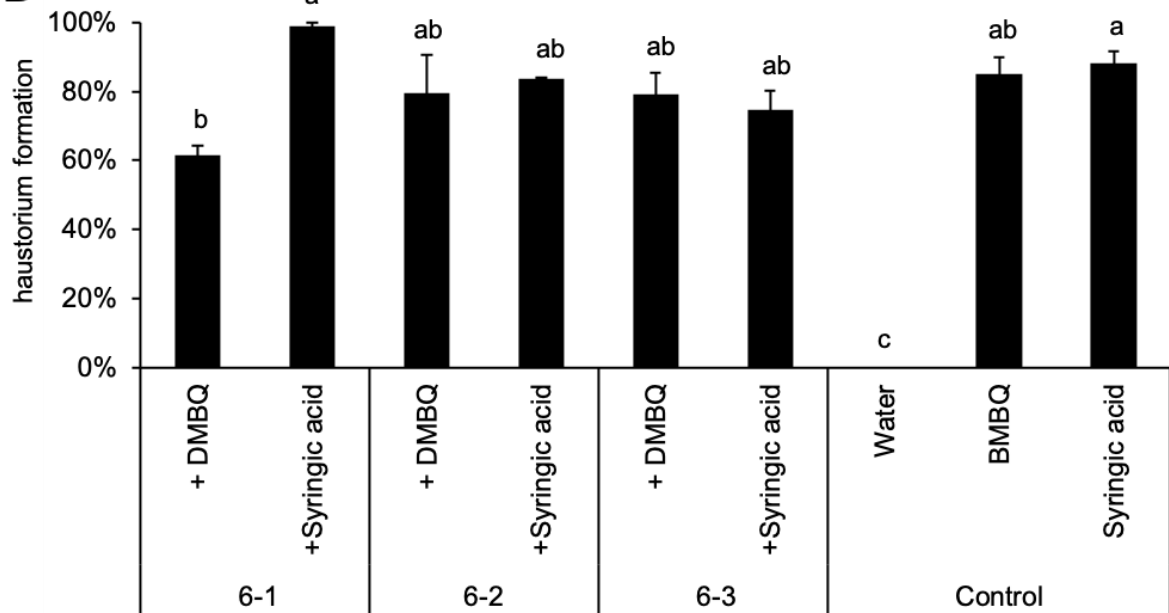


Fig. 1.10 No. 6のアナログ

No. 6のアナログの化学構造(A)と10 μ M DMBQ及び10 μ M シリンガ酸を同時に暴露した吸器形成率(B)。コントロールとして10 μ M DMBQとWaterを用いた。エラーバーはSEを示す。n=3。Tukey HSD検定により有意差(p < 0.05)が検出されたものを異なるアルファベットで示す。n=3。

第二章 吸器誘導における ROS の役割

2-1. 背景と目的

寄生植物の吸器形成は宿主植物への寄生の成立に必須な過程である。吸器は宿主植物由来の低分子化合物によって誘導されることが知られており、ストライガにおける吸器誘導物質として DMBQ が宿主ソルガムの根の抽出液から単離された。しかし、宿主の根の滲出液からは DMBQ は 15 nM と極めて微量な量しか検出されておらず(Wang et al., 2020)、寄生植物が DMBQ をどのように産生・作用するかは未解明な部分が多い。DMBQ などのキノン類は通常、シキミ酸生合成経路を通じて産生されたフェノール化合物の酸化や、細胞壁構成成分の分解、リグニンモノマーの重合時における副産物として産生される(Bandaranayake et al., 2010)。その中で、DMBQ は、シリング酸やシナピル酸などのリグニンの分解産物がペルオキシダーゼやラッカーゼによって酸化されることで生じる(Keyes et al., 2000)。実際に、*In vitro* でシリング酸をペルオキシダーゼで処理すると DMBQ が生じることや、ペルオキシダーゼをコードする遺伝子の発現量がストライガの吸器形成時に上昇することが報告されている(Kim et al., 1998; Yoshida et al., 2019)。Keyes ら(2000)は、 H_2O_2 の分解酵素であるカタラーゼをシリング酸と同時にストライガに暴露すると吸器形成率が低下し、DMBQ と同時に暴露した場合には吸器形成率は低下しないことを見出した(Keyes et al., 2000)。この結果から、ストライガの吸器誘導は宿主植物の根の細胞壁を構成するフェノール酸類が、ストライガが放出するペルオキシダーゼや H_2O_2 によって酸化されることで DMBQ が産生され、吸器が誘導されるというモデルが提唱された(Keyes et al., 2001)。また、吸器誘導物質は一定の酸化還元電位を持っており、レッドックスシグナルが吸器誘導に重要であることが示唆されている(Smith et al., 1996)。ハマウツボ科条件的寄生植物の *Triphysaria* では、キノン酸化還元酵素である QR1 (Quinone Oxidoreductase) のノックダウンにより吸器形成率が低下することが報告され、QR1 による吸器誘導物質の電子の移動によって ROS シグナルや吸器形成シグナルが発生すると考えられている(Bandaranayake et al., 2010)。また、コシオガマでも同様に、QR2 遺伝子のノックダウンにより吸器形成率が低下することが報告され (Ishida et al., 2017)、酸化還元反応が吸器形成に関与することが示唆されている。

ROS は大気中の酸素と比べ反応生が高い不安定な酸素原子を含む化合物の総称で、スーパーオキシド(O_2^-)、ヒドロキシラジカル(HO^\cdot)、過酸化水素、一重項酸素(1O_2)が代表的である。その反応性の高さから、蓄積すると酸化ストレスとなり生物に悪影響を及ぼすことが知られている (Mittler, 2017)。しかし、植物では適度な ROS の存在は正常な生長に必要であり、環境ストレスに対する防御応答を誘導するシグナルとしての働きも担う。さまざまな ROS の阻害剤をシロイヌナズナに処理すると、根の成長阻害がおこることが報告されている(Dunand et al., 2007)。また、植物の病原菌への免疫応答においても ROS は重要なシグナルとして働くことが報告され

ている(Mittler, 2017)。病原菌感染時には植物細胞膜に存在する受容体によって病原菌が認識され、カルシウムチャネルの活動によって細胞内にカルシウムイオンの流入が生じる。カルシウム依存性キナーゼによって NADPH オキシダーゼが活性化され H_2O_2 の産生が活発化し免疫応答がおこることが知られている(Qi et al., 2017)。

このように、吸器誘導においても ROS は重要な役割をしていると考えられるが、その詳細は不明である。そこで、本章では、ROS に着目し、吸器誘導物質と ROS の関係性を調べた。まず、Keyes ら (2000) が行った H_2O_2 を消化するカタラーゼを用いた実験の検証を行った。次に、様々な ROS やペルオキシダーゼをターゲットとする阻害剤を用いてどのような ROS が吸器誘導・吸器形成に寄与するのかを調べた。また、ペルオキシダーゼによるストライガへの影響を調べた。さらに、トランスクリプトーム解析を行い吸器誘導物質による ROS 関連遺伝子の発現変動を調べた。

2-2-0. 材料と方法

2-2-1. 植物材料と植物の発芽処理

本章ではストライガ(*Striga hermonthica*)とイネ(*Oryza sativa*)の種子を用いた。ストライガの発芽処理は1-2-1章と同様に行った。イネの品種は日本晴とコシヒカリを用い、以下の方法で滅菌処理を行った。イネの種子を数え、花えい、外花えいを取り、ファルコンチューブに入れた。滅菌水を入れ転倒混和し上澄み液を取り除いた。さらに、70% エタノールを入れ転倒混和し上澄み液を取り除いた。20%ハイター液を入れ、10分間置いた。クリーンベンチ内でハイター液を取り除き、滅菌水を用いて5回洗浄した。滅菌水15 mlを入れ、ろ紙を敷いたシャーレに蒔き、25°Cで一週間置いた。

2-2-2. 活性酸素種の可視化

H_2O_2 、 O_2^- 、 NO^- 、 HO^\cdot の4種類の活性酸素種(ROS)について、それぞれCarboxy-H₂DFFDA (ThermoFisher)、Nitroblue tetrazolium chloride (NTB:Roche)、Diaminofluorescein-2 diacetate (DAF-2DA:五稜化学)、Aminophenyl fluorescein (AFP:五稜化学)を用いて可視化した。試薬の濃度は各々、Carboxy-H₂DFFDAは20 μMに、NTBは0.5 mg/mlに、AFPとDAF-2DAは10 μMに調整して実験に用いた。

滅菌したストライガ種子をストリゴールにより発芽誘導し、24時間後に種子が発芽していることを実体顕微鏡下で用いて観察した後、1 wellあたりに20-30粒になるように、ピンセットを用いて96 wellプラスチックプレートに分注した。1 wellあたり100 μlの滅菌水と最終濃度10 μMのDMBQ (Sigma-Aldrich)またはシリンガ酸 (Sigma-Aldrich)をくわえ、サージカルテープを用いて封をし、暗所25°C条件下に置いた。24時間後、Well中の液を捨て、20 μMに濃度を調整した後述の蛍光標識試薬を100 μl加え常温に30分置いた。その後、滅菌水で数回洗浄したのちにスライドガラスの上に置き滅菌水を加えカバーガラスを載せプレパラートを作成した。共焦点顕微鏡 (Leica TCS SP5)や光学顕微鏡を用いて観察した。観察には励起波長460 nm、蛍光波長508 nmを用いた。

2-2-3. 吸器誘導物質と阻害剤の処理

ストリゴールによる発芽誘導24時間後、ストライガ種子が発芽していることを実体顕微鏡下で用いて観察した後、1 wellあたりに20-30粒になるように、ピンセットを用いて96 wellプラスチックプレートに分注した。1 wellあたり100 μlの滅菌水と最終濃度10 μMのDMBQまたはシリンガ酸および各種活性酸素阻害剤を加え、サ

ージカルテープを用いて封をし、暗所 25°C条件下に置いた。24 時間後に実体顕微鏡を用いて吸器の有無を観察した。吸器形成率は吸器を形成したストライガ植物体数を実験に用いた植物体数で割ることにより導いた。統計的解析は、R を用いた Tukey HSD 検定をおこない、有意差 ($p < 0.05$) が検出されたものを図中に異なるアルファベットで示した。なお、活性酸素阻害剤は Salicylhydroxamic acid (SHAM: 東京化成工業)、Potassium iodide (KI: 和光)、Potassium benzoate (和光純薬)、L-Ascorbic acid (和光純薬)、Diphenyleneiodunium (DPI: フナコシ)、Umbelliferone (東京化成工業)、6,7-dihydroxycoumarin (Esculetin: Sigma-Aldrich)、Superoxide dismutase (SOD: ナカライテスク)、Catalase (和光純薬)、Phenylarsine oxide (PAO: Sigma-Aldrich)、Diethyldithiocarbamate trihydrate (DDC: Sigma-Aldrich) の 12 種類を使用した (Fig 2.6 A)。

2-2-4. イネの根の抽出液の調整

滅菌処理をして発芽させたイネを 1 週間 25°C で生育させ、根をハサミで切り取って集めた。集めた根の水分を拭き取り、重さを測ってから液体窒素の中に入れて急速凍結した。乳鉢と乳棒を用いてすり潰し粉末状にし、5% (w/v) になるように滅菌水を乳鉢に加えた。乳鉢の溶液を 15 ml または 50 ml のファルコンチューブに回収し 10 分間小型攪拌培養器で攪拌混合した。混合した液を 10,000 rpm で 10 分遠心し、上澄みをメンブレンフィルター (Saritorius) を用いて滅菌することでイネ抽出液を得た。

2-2-5. ペルオキシダーゼを用いた吸器誘導実験

ストリゴールによる発芽誘導 24 時間後、ストライガ種子が発芽していることを実体顕微鏡下で用いて観察した後、1 well あたりに 20-30 粒になるように、ピンセットを用いて 96 well プラスチックプレートに分注した。1 well あたり 100 μ l の滅菌水と最終濃度 10 μ M の DMBQ またはシリング酸および Horseradish peroxidase (HRP: 和光純薬) を加えサージカルテープを用いて封をし、暗所 25°C 条件下に置いた。24 時間後に実体顕微鏡を用いて吸器の有無を観察した。吸器形成率は吸器を形成したストライガ植物体数を実験に用いた植物体数で割ることにより算出した。

2-2-6-0. トランスクリプトーム解析

2-2-6-1. ストライガの RNA 抽出および RNA-seq 用のライブラリーの作成

発芽したストライガに 10 ppm DMBQ (約 59 μ M) または 10 ppm シリング酸 (約 50 μ M) で吸器誘導を行い、0、1、3、6、12、18、24 時間後に植物体を 2 ml チューブに

回収し、RNA 抽出するまで -80°C 下で保管した。LBB 溶液(100 mM Tris-HCl、1 M LiCl、10 mM EDTA、1% SDS、5 mM DTT、1.5% antifoam A)に 5 $\mu\text{l/ml}$ 3-mercapto-1,2-propanediol を加え、Lysate buffer とした。ストライガサンプルを液体窒素で凍結し、5 mm ジルコニアビーズを入れ、Tissue lyser (Qiagen)用いて 20 frequency/s の速度で 1 分の破碎を 2 回行い粉末状にした。Lysate buffer 溶液を 400 μl 加え、ボルテックで混和したのち、再度破碎機にかけ室温で 5 分静置した。チューブを転倒混和し、15,000 rpm で 10 分遠心し上清を別の 1.5 ml チューブに移し、サンプル抽出液とした。RNA-seq ライブラリーの作成は理化学研究所植物-微生物共生研究開発チームに委託し、Breath Adapter Directional sequencing (BrAD-seq)を用いた full transcript coverage shotgun タイプの strand-specific RNA-seq ライブラリーを作成した(Townsend et al., 2015)。ライブラリーのインデックス配列は表 1 に示した。作成したライブラリーをシーケンス用に二つのプールに分け 1 プールあたり 10 nM 100 μl になる様に調整し、HiseqX (illumina 社)を用いて paired-end で 150 bp をシーケンスした。

2-2-6-2. データ解析

得られたシーケンスデータのクオリティチェックを FastQC (<https://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc/>)を用いて行なった。これらの配列にはアダプター配列などの余分な配列が含まれていたため、Trimmomatic ver 0.39 (Bolger et al., 2014)を用いて各リードのクオリティコントロールをおこなった。各リードの先頭から最初の 9 塩基を除去し、リードの先頭と後尾のクオリティスコアが 30 以上を満たすまで塩基を除去し、かつ、残った配列が 50 塩基未満のリードを除去した。再度、クオリティチェックを行いこれらの配列が除かれていることを確認した。次に、クオリティコントロールされたリードを用いて Trinity ver 2.9.1 (Grabherr et al., 2013)による *de novo* アセンブリを行なった。各々のサンプルごとに Bowtie2 ver 2.4.1 (Langmead and Salzberg, 2013)を用いて *de novo* アセンブル配列にマッピングを行なった。マッピングデータをもとに eXpress ver 1.5.1 (Roberts and Pachter, 2013)を用いて発現量の正規化を行なった。次に、DEG (Differential Expressed Genes)の検出を Edge R を用いて行った。コントロールと吸器誘導処理区(DMBQ や シリンガ酸)を比較し、 $\log_2\text{FC} > 1$ かつ $\text{FDR} < 0.05$ を満たすコンティグ配列を DEG として抽出した。抽出した DEG の処理区での違いを web ツールである Draw Venn Diagram (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/>)を用いてベン図を描いた。Kohonen を用いて R ver 3.6.1 で SOM (*Self-organizing maps*)クラスター解析を行った。遺伝子配列の相同性検索は blast ver.2.7.1+で行った。Gene Ontology (GO) 解析は、AgriGO (<http://systemsbiology.cau.edu.cn/agriGOv2/>)を用いて行った (Tian et al., 2017)。

2-3-0. 結果

2-3-1. カタラーゼと SOD による吸器形成阻害効果の検証

吸器誘導物質である DMBQ は ROS の働きでシリング酸から酸化されると考えられている。そこで、吸器誘導における ROS の役割を調べた。まず、ストライガに吸器誘導物質と ROS の分解酵素を同時に暴露し、吸器形成率が減少するかどうかを確認した。H₂O₂ の分解酵素であるカタラーゼを用い、発芽したストライガに DMBQ やシリング酸とカタラーゼを同時に暴露し、24 時間後に吸器形成率を測定した。DMBQ とカタラーゼを処理した際は、カタラーゼの濃度が 10³ U/ml よりも低い濃度では吸器形成率はほぼ 100% を示したが、10⁴ U/ml では吸器形成率が 60% までに減少した。同様に、シリング酸とカタラーゼを同時にストライガに暴露し、吸器形成率を測定した。10³ U/ml よりも低い濃度では吸器形成率は 100% を示したが、10⁴ U/ml では吸器形成率が 60% までに減少した (Fig. 2.1 A)。これらの結果から、カタラーゼによる H₂O₂ の除去が吸器誘導物質による吸器形成率を減少させることがわかった。また、カタラーゼの影響において DMBQ とシリング酸に対する違いは見られなかった。

次に、O₂ を除去する酵素である SOD を DMBQ やシリング酸と同時にストライガに暴露し、吸器形成率を調べた。DMBQ およびシリング酸ともに SOD の濃度に依存して吸器形成率は減少した。10⁴ U/ml では DMBQ は 60% まで、シリング酸では 70% にまで減少した (Fig. 2.1 B)。これらの結果から、ストライガの吸器形成に O₂ が関与している可能性が示唆された。また、カタラーゼの結果と同様に、DMBQ とシリング酸に対する SOD の影響に大きな違いは見られなかった。これらの結果から、DMBQ やシリング酸による吸器誘導において H₂O₂ と O₂ は重要な働きを担っていると考えられる。

2-3-2. 活性酸素種の可視化

分解酵素の実験から、ストライガの吸器形成に ROS が関与していることがわかった。そこで、吸器形成時の植物体内における ROS の蓄積を調べた。DMBQ やシリング酸を用いて吸器形成を誘導したストライガで、種々の活性酸素種を蛍光色素または染色により可視化し、その局在の違いを調べた。まず、Carboxy-H₂DFFDA を用いて H₂O₂ の可視化を試みた。Carboxy-H₂DFFDA は植物細胞内に取り込まれ、H₂O₂ と内在性のエステラーゼによって活性化されることにより緑色の蛍光を長時間発する (Godfrey et al., 2012)。発芽後 24 時間のストライガを DMBQ またはシリング酸で吸器誘導し、24 時間後に Carboxy-H₂DFFDA で染色した。コントロールとして、同条件で水に浸したストライガを用いた。吸器誘導を行っていないストライガでは、根の表皮細胞に強く H₂O₂ が蓄積していたが、根端に蓄積は観察できなかった (Fig.

2.2 A)。それに対し、DMBQ やシリング酸によって吸器誘導を行なったストライガでは吸器上に形成される根毛様細胞である吸器毛に強い蛍光が観察された (Fig. 2.2 B C)。次に、吸器形成時の H_2O_2 の蓄積を経時的に調べるために、蛍光染色したストライガを用いて吸器を誘導し 30 分間隔で 24 時間連続観察を行った。吸器誘導開始 7 時間後から吸器毛の発達と根端の肥大化が観察され、吸器形成が始まったが、この時点で H_2O_2 の蛍光は観察されなかった。誘導開始 14 時間後には、形成した吸器毛に H_2O_2 が蓄積し始めた。特に、吸器毛の先端部分に強い緑色蛍光が観察された (Fig. 2.3)。

次に、 O_2 の可視化を試みた。DMBQ またはシリング酸による吸器誘導を行った、またはコントロールとして水に浸したストライガを NBT により染色した。吸器誘導を行っていないストライガは全体に薄く O_2 が染色されており、根端が強く染まっていた (Fig. 2.4 A)。DMBQ やシリング酸によって吸器を誘導したストライガはコントロールと同様に植物体全体に薄く染色が見られ、根端が強く染色された (Fig. 2.4 B C)。このように、ストライガにおける O_2 の分布は、吸器誘導物質処理によって大きな違いは見られなかった。

次に、蛍光試薬を用いて $\text{NO}\cdot$ と $\text{OH}\cdot$ の可視化を試みた。 $\text{NO}\cdot$ の可視化では、吸器形成後に根端および吸器毛に弱い蛍光が観察された (Fig. 2.5 A - C)。 $\text{OH}\cdot$ の可視化では、吸器誘導の有無に関わらず、蛍光は観察されなかった (Fig. 2.5 D-F)。よって、 $\text{NO}\cdot$ は吸器形成後にごくわずかに存在し、 $\text{OH}\cdot$ は検出感度以下にしか存在していないと考えられる。

2-3-3. 吸器誘導物質と ROS 阻害剤

7 種類の ROS 阻害剤または ROS 関連酵素の阻害剤を用いて、吸器形成における活性酸素種やその関連酵素の重要性を調べた (Fig. 2.6 A)。それぞれの薬剤を $10\ \mu\text{M}$ 、 $100\ \mu\text{M}$ および $1\ \text{mM}$ の濃度で、吸器誘導物質とともにストライガに加え、吸器形成率を測定した。NADPH オキシダーゼの阻害剤である DPI は $10\ \mu\text{M}$ の濃度で強い吸器形成阻害を示し、吸器形成率が 0% にまで減少した。この濃度では、他の薬剤は吸器形成率に影響を及ぼさなかった。ペルオキシダーゼの阻害剤である SHAM とペルオキシダーゼのモジュレーターである Umbelliferone は $1\ \text{mM}$ 濃度で添加した際に吸器形成率が 0% になった。また、抗酸化作用を持つアスコルビン酸は $1\ \text{mM}$ の濃度で、60% まで吸器形成率が減少した。これらの薬剤の効果は DMBQ でもシリング酸でも同様に確認された (Fig. 2.6 B)。なお、Esculetin は、 $1\ \text{mM}$ で処理すると根端が茶色に変色することが観察された (Fig. 2.7) ため、 $1\ \text{mM}$ での吸器形成率は測定しなかった。また、 $1\ \text{mM}$ の濃度で溶媒に溶解することが困難だった Potassium benzoate も高い濃度での試験には供しなかった (Fig. 2.6 図中 NT で示す)。

Potassium iodide (KI) に関しては $1\ \text{mM}$ では影響が見られなかったが、KI の阻害効果がより高い濃度で報告されていたため、 $5\ \text{mM}$ における影響を調べた。 $5\ \text{mM}$ KI

は DMBQ と同時に暴露した場合では吸器形成率を 20% にまで減少させ、吸器形成阻害効果を示した。シリング酸の場合でも同様の結果が観察された (Fig. 2.8 A)。また、1 mM で 100% の阻害効果を示した SHAM について、より詳細に 100 ~ 1000 μ M の濃度での阻害効果を調べた。100 μ M の DMBQ とシリング酸はともに 100% の吸器形成率を示した。250 μ M 以上では、DMBQ の吸器形成率は 20% にまで減少し、吸器形成阻害を示した。シリング酸の場合でも同様の結果が観察された (Fig. 2.8 B)。

次に、もっとも強い吸器形成阻害活性が得られた DPI について、低い濃度での吸器形成率への影響を調べた。1 μ M DPI は、DMBQ やシリング酸による吸器形成率を 50% まで低下させたが、0.1 μ M で添加するとコントロールとの差は見られなくなった (Fig. 2.9 A)。DPI は NADPH オキシダーゼの阻害剤として知られており、NADPH オキシダーゼは内在性の H_2O_2 の産生に関わっていることから、外部から H_2O_2 を加えることによって DPI の阻害効果を軽減できるかどうかを調べた。DMBQ と 1 μ M DPI を同時に暴露すると 30% の吸器形成率を示したが、これに H_2O_2 を加えても吸器形成率は回復しなかった。10 μ M シリング酸でも同様に 1 μ M DPI と同時に加えると 20% まで吸器形成率が低下したが、 H_2O_2 によって吸器形成率を回復させることはできなかった (Fig. 2.9 B)。また、同じく NADPH オキシダーゼ阻害剤である PAO でも吸器形成を阻害することが確認された。PAO を 1 μ M よりも低い濃度で点火した場合には、吸器形成率は 100% のままで阻害効果は見られなかったが、10 μ M では吸器形成率は 10% にまで低下した。シリング酸の場合でも同様の結果を観察することができた (Fig. 2.10 A)。これらの結果は、吸器形成に NADPH オキシダーゼが関与することを示している。外部から与えた H_2O_2 が吸器形成率を回復できなかったことから、吸器形成には内在性の ROS もしくは NADPH オキシダーゼ活性が重要であると考えられる。

NADPH オキシダーゼは O_2 を産生し、 O_2 が SOD により触媒されて H_2O_2 になることが知られている。そこで、 O_2 と H_2O_2 のどちらが吸器誘導に必要なかを調べるため、SOD の阻害剤である DDC を用いた。DDC と DMBQ を同時に暴露した場合、DDC の濃度が 100 μ M 以下では吸器形成に対する阻害効果は見られなかった。しかし、150 μ M では吸器形成率は 20% にまで減少した (Fig. 2.10 B)。これらの結果から、 H_2O_2 の産生が吸器形成に重要だと考えられた。

次に、DPI をはじめとする ROS 阻害剤の効果について宿主植物による吸器誘導にも同様に効果があるかどうかを調べた。ストライガ抵抗性品種である日本晴と罹病生品種であるコシヒカリの抽出液に ROS 阻害剤を添加して吸器形成率を測定した。発芽したストライガ種子をイネ抽出液に ROS 阻害剤と同時に暴露すると、DMBQ やシリング酸の場合と同様に、低い濃度の DPI、高い濃度の SHAM と Umbelliferone、アスコルビン酸により阻害されるという結果を得た (Fig. 2.11)。イネの根の抽出液による吸器誘導は DMBQ やシリング酸による吸器誘導と同様の機構で起こっていると考えられる。

これらの実験から、ストライガの吸器形成には NADPH オキシダーゼを介した自身の H_2O_2 の産生が重要な役割を担っていることが示唆された。また、高濃度の阻害剤を与えた実験の結果からペルオキシダーゼも吸器形成に関わっていることが考えられた。

2-3-4. 吸器形成におけるペルオキシダーゼの影響

阻害剤の実験からペルオキシダーゼが吸器形成に関わっていることが示唆された。そこで、ペルオキシダーゼ添加実験をおこない、吸器形成に対するペルオキシダーゼの影響を調べた。ペルオキシダーゼはシリンガ酸を DMBQ に変換する役割を持つと考えられているため、まず、DMBQ とシリンガ酸の濃度による吸器形成率の違いを調べた。DMBQ により吸器を誘導した場合には、 $10\ \mu\text{M}$ で 90% 以上の高い形成率を示し、 $1\ \mu\text{M}$ では 60%、 $0.1\ \mu\text{M}$ では 20%、 $0.05\ \mu\text{M}$ では 10% の形成率を示した。一方、シリンガ酸は $1\ \mu\text{M}$ では 40% の吸器形成率を示し、 $0.1\ \mu\text{M}$ 以下では吸器形成率はほとんど 0% であった (Fig. 2.12)。このことから、DMBQ はシリンガ酸より吸器誘導活性が高いことが示された。このシリンガ酸と DMBQ の濃度による吸器誘導能の違いを利用して、吸器誘導におけるペルオキシダーゼの関与を調べた。もし、ペルオキシダーゼによってシリンガ酸が DMBQ に酸化されるのであれば、吸器形成率は上昇すると考えられる。シリンガ酸と低濃度(終濃度 $0.01\ \text{U}/\mu\text{l}$) のペルオキシダーゼ (horse radish peroxidase, HRP) を同時に加えると、全ての濃度において吸器形成率が向上し、同濃度の DMBQ と同程度の吸器形成率を示した。しかし、その基質である H_2O_2 を同時に加えても吸器形成率に変化は見られなかった (Fig. 2.13 A)。これらの結果は、シリンガ酸がペルオキシダーゼにより DMBQ へ酸化されたことにより吸器誘導活性が上昇した可能性を示唆しており、これまでの仮説を支持すると考えられる。また、基質としての H_2O_2 は、ストライガ内在性のものが十分存在している可能性が考えられた。次に、異なる濃度の DMBQ にペルオキシダーゼを加えて吸器形成率を調べた。その結果、DMBQ に $0.01\ \text{U}/\mu\text{l}$ HRP を加えるとより吸器形成率が上昇することが分かった。また、基質である H_2O_2 を加えても吸器形成率は上昇しなかった (Fig. 2.13 B)。これらの結果は、ペルオキシダーゼが DMBQ そのものまたは下流経路に作用して吸器誘導活性を上昇させていることを示唆している。また、この濃度 ($0.01\ \text{U}/\mu\text{l}$) のペルオキシダーゼは吸器誘導物質を与えていないストライガの吸器形成率に影響を与えなかった (Fig. 2.13 B)。しかし、吸器誘導物質を与えていないストライガに高濃度 $0.1\ \text{U}/\text{ml}$ HRP を加えると 20% の吸器誘導率を示した。このことから、高濃度のペルオキシダーゼ処理はストライガ自身から吸器誘導物質を産出させる可能性やストライガの吸器形成経路の下流に作用して吸器誘導を起こす可能性が示唆された。

2-3-5-0. ストライガ吸器誘導時のトランスクリプトーム解析

2-3-5-1. データの調整および DEG の検出

吸器誘導物質がストライガに与える影響を調べるために、DMBQ およびシリンガ酸に暴露したストライガの遺伝子発現変動を RNA-sequencing 法によって解析した。ストライガをシリンガ酸または DMBQ 溶液中で培養し、0、1、3、6、12、18、24 時間後のストライガ植物体をサンプルとし、滅菌水とストライガを培養したものをコントロールとした。Illumina シーケンサーで取得したシーケンス配列を fastQC を用いてクオリティチェックを行ったのち (Fig. 2.14 A)、アダプター配列やクオリティスコアが低い配列を除外した (Table 2.1、Fig. 2.14 B)。次に、Trinity を用いて *de novo* アセンブリを行い、648,550 個のコンティグ配列を得た。得られたコンティグ配列にリードのマッピングを行った。アセンブリ配列に対し、全てのサンプルのリードは 70~80% 程度マップされた (Table 2.2)。次に、各々のタイムポイントごとに吸器誘導を行っていないコントロール区と DMBQ やシリンガ酸処理区を比較し、2 倍かつ FDR < 0.05 を満たすコンティグ配列を DEG (Differential Expressed Genes) として抽出した。すべての処理区で抽出を行い、合計 3,815 個の DEG が検出された。抽出された DEG を、DMBQ 処理区とシリンガ酸処理区に特異的な DEG および共通の DEG に分類し、その数を表とベン図で示した (Fig. 2.15 A)。DMBQ 処理に特異的な DEG は 1990 個、シリンガ酸処理に特異的な DEG は 407 個検出された。両方の処理に共通した DEG は 1418 個検出された。次に、各時間ごとに抽出された DMBQ 処理区とシリンガ酸処理区に特異的な DEG と共通の DEG の数の変化を図で示した (Fig. 2.15 B)。DMBQ に特異的な DEG の数は吸器形成が進むにつれ減少した。DMBQ 処理で発現上昇するコンティグは処理後 1 時間目には 1300 個以上検出されるが、12 時間後には約半分まで減少した。これは、DMBQ 処理 1 時間後には DMBQ 応答に関する初期遺伝子が発現するが、6 時間以降では、DMBQ の応答に関する遺伝子とは異なる吸器形成に関わる遺伝子が発現し、DMBQ に特異的な DEG は減少したと考えられる。その一方で、シリンガ酸に特異的に見られる DEG の数は、処理後 1 時間目には 0 であるが、その後、吸器形成が進むにつれ徐々に上昇した。異なる吸器誘導物質によって誘導初期にはその物質に応答に関する特異的な遺伝子が働くと考えられる。さらに、DMBQ 処理やシリンガ酸処理両方ともに発現される DEG は 6 時間を境にして増加した。吸器の形態変化は誘導後 7 時間ころから観察されるため (Fig. 2.3; Wada et al., 2019)、これら共通に確認される DEG には吸器形成に関する遺伝子が含まれていると考えられる。

2-3-5-2. SOM(*Self-organizing maps*)クラスター解析および GO エンリッチメント解析

次に、すべての処理区で検出された 3815 個の DEG に対し SOM クラスター解析を行った。まず、主成分分析を行った (Fig. 2.16)。その結果、PC1 で 36.6%、PC2 で 16.7%、PC3 で 9.9%、PC4 で 7.1%、PC5 で 7.1%の寄与率を示し、累計寄与率は PC5 までで 81.1%になった。PC1、PC2、PC3 は時間経過による遺伝子の変化を表し、PC4、PC5 は DMBQ 処理とシリング酸処理による遺伝子の変化を反映していた (Fig. 2.16)。これらの結果から、吸器誘導による遺伝子の変化は主に誘導物質の種類ではなく、暴露後の時間によって説明されると考えられる。次に、得られた DEG のサンプルについての SOM クラスター解析を行った (Fig. 2.17)。遺伝子の発現パターンをもとに 150 個のグループに分類し (Fig. 2.17 A)、これらのグループの関係性を dendrogram として表示し、クラスター数を 10 個に決定した (Fig. 2.17 B)。SOM クラスターリングの結果を 10 クラスターに色分けすると (Fig. 2.17 C)、近い属性を示すグループが同じクラスターに分類された。それぞれの DEG をクラスター分類に基づいた色分けを行うと、主成分解析で近い属性にあるコンティグが同じクラスターに分類されていることがわかり、発現パターンによるクラスターリングが成功したことが示された (Fig. 2.18)。

次に、各々のクラスターの遺伝子の発現パターンをヒートマップで示した (Fig. 2.19, Fig 2.20, Fig. 2.21)。数値は、コントロール区に対する発現変動 (fold change) を \log_2 値に変換したものを正規化した値を用いた。これらのクラスターを、発現パターンに着目して吸器誘導初期 (吸器誘導後 1~3 時間)、吸器誘導後中期 (吸器誘導後 3~18 時間) および吸器誘導後期 (吸器誘導後 18~24 時間) に遺伝子発現量が最大になるようなグループに分類し、各クラスターに対して Gene Ontology (GO) エンリッチメント解析を行った。GO タームは大きく生物学的プロセス、分子機能、細胞の構成要素の 3 つのカテゴリに分けられており、そのクラスターの特色を見ることができ。吸器誘導初期に発現上昇するグループにはクラスター 6、7 と 9 が、吸器誘導中期に発現上昇するグループにはクラスター 3、4、5 と 10 が、吸器誘導後期に発現上昇するグループにはクラスター 1、2 と 8 が含まれた。吸器誘導初期~中期に含まれるクラスターでは DMBQ 処理やシリング酸処理で異なる遺伝子発現パターンを示し (Fig. 2.19, Fig. 2.20)、吸器誘導後期に含まれるクラスターでは DMBQ 処理やシリング酸処理で同じような発現パターンを示していた (Fig. 2.21)。吸器誘導初期に発現上昇するグループに含まれるクラスター 6、7 の遺伝子は、DMBQ 処理により発現量が上がるが、シリング酸処理では発現量が変化しないパターンを示した。これらのクラスターには、DMBQ のみに応答する遺伝子が含まれていると考えられる。これらのクラスターでエンリッチメントが確認された GO タームは、生物学的プロセスとして oxidation-reduction process が、分子機能として chaperone binding、oxidoreductase activity が含まれていた (Fig. 2.19 A B)。これらのことから、吸器誘導初期では、DMBQ にのみ応答する酸化還元反応に関わる遺伝子が働いていることが

わかった。吸器誘導中期に発現上昇するグループに含まれるクラスター5では DMBQ 処理による変化が確認されるがシリング酸処理による遺伝子発現量の変化は確認されず、クラスター3、4と10は DMBQ 処理とシリング酸処理で同じような発現パターンを示していた。DMBQ とシリング酸に共通して発現上昇する吸器誘導中期のグループには、phosphorelay signal transduction system などのシグナル伝達に関わるタームや oxidoreductase activity、disulfide oxidoreductase activity のような酸化還元に関わる GO タームが確認できた。DMBQ 特異的に発現上昇するクラスターでは、response to oxidative stress、oxidation-reduction process、また oxidoreductase activity、peroxidase activity などの酸化還元に関わる GO タームに加えて、cell wall organization や cell wall modification、cell wall や cell periphery などの細胞壁に関わる GO タームがエンリッチされていた (Fig. 2.20 A B)。吸器誘導後期に発現上昇するグループに含まれるクラスターは DMBQ 処理やシリング酸処理でも類似した発現パターンが確認された。確認された GO タームは、生物学的プロセスとして、oxidation-reduction process、response to oxidative stress のような酸化還元プロセスに関わるような GO タームが検出された。他にも、cell wall organization or biogenesis、cell wall modification などの細胞壁に関わる GO タームもエンリッチされていた。分子機能として、吸器誘導中期と同様に oxidoreductase activity、peroxidase activity や hydroxy methyl glutaryl-CoA reductase (NADPH) activity などの GO タームが、細胞の構成要素の GO タームとして、cell wall や cell periphery が確認された (Fig. 2.21 A B)。この様に、吸器誘導初期、中期と後期で発現上昇する各グループにおいて酸化還元反応に関わる GO タームが常に確認された。このことから、酸化還元反応は吸器誘導初期のみだけでなく、長期的に必要な働きをすることが考えられる。また、吸器誘導中期以降では、細胞壁に関する遺伝子が働いていた。これらの遺伝子は活発な細胞分裂と細胞拡大によってもたらされる特徴的な吸器の形づくりに寄与していると考えられる。

2-4-0. 考察

本章では、ROS 検出試薬による染色や阻害剤を用いて寄生植物ストライガの吸器形成における ROS やペルオキシダーゼの役割を調べた。また、DMBQ とシリング酸を処理したストライガの継時的なトランスクリプトーム変動を解析した。これらを元にして ROS と吸器誘導の関係について考察する。

2-4-1. 吸器誘導における ROS の役割

本研究では、吸器誘導における ROS の役割を、ROS 分解酵素処理、ROS 阻害剤処理および ROS の局在解析により明らかにした。ROS 分解酵素処理実験により、カタラーゼ処理や SOD 処理はシリング酸による吸器形成率だけではなく、DMBQ による吸器形成率も減少させることが明らかとなった。これは、ROS がシリング酸から DMBQ への酸化で必要であるという従来の説(Keyes et al., 2001)に加え、DMBQ によって引き起こされる吸器形成過程においても重要な役割を果たすことを示唆している。シロイヌナズナでは、 H_2O_2 は根の先端、特に分化ゾーンの表皮細胞と根毛の表面に蓄積し、 O_2 は根の分裂組織と伸長ゾーンにさらに蓄積すると報告されている(Dunand et al., 2007)。ストライガの吸器誘導時における H_2O_2 および O_2 の挙動観察では、 H_2O_2 の蓄積は吸器の先端では観察されず、吸器毛に多く検出された。その一方で、 O_2 は植物体全体に低レベルで検出され、特に、幼根先端に高レベルで検出された。吸器誘導時の H_2O_2 の挙動をタイムラプス撮影すると、吸器形成時に見られる根端の膨張は H_2O_2 の蓄積の前に観察され、誘導後 10 時間以上経過した後に吸器毛に H_2O_2 の蓄積が観察された。シロイヌナズナでは根毛に H_2O_2 蓄積が見られることから(Dunand et al., 2007)、同様に吸器毛でも H_2O_2 が蓄積すると考えられる。吸器毛は寄生植物にみられる特殊な根毛であると報告されており(Cui et al., 2016)、形成過程は根毛と共通していると考えられる。吸器形成の後期に観察される H_2O_2 蓄積は、細胞成長における機能を担っている可能性が考えられる。*S. asiatica* を用いた先行研究では、 H_2O_2 は小根先端に強く蓄積し、誘導物質処理の約 2 時間後に消失したことが報告された(Fuller et al., 2017; Keyes et al., 2007)。しかし、本研究では、吸器誘導処理前の幼根の先端での H_2O_2 の蓄積はほとんど観察されず、吸器誘導の 10~15 時間後に H_2O_2 蓄積が見られた。この違いは *S. asiatica* と *S. hermonthica* の種間の相違、または実験系の違いによる検出感度の相違を示している可能性も考えられる。

様々な ROS 阻害剤を用いた実験では、NADPH オキシダーゼ阻害剤である DPI と PAO が、DMBQ とシリング酸による吸器誘導を強く阻害した。さらに、SOD 阻害剤である DDC による処理もまた、吸器形成を阻害した。これは、 O_2 ではなく、 H_2O_2 産生が吸器形成に関与していることを示唆している。しかし、DPI による吸器形成阻害能は、外部から H_2O_2 を添加しても回復できなかったため、内因性 H_2O_2 または NADPH オキシダーゼ活性が、吸器形成に重要であることを示唆している。こ

の NADPH オキシダーゼは、原形質膜または葉緑体膜のいずれかに局在する膜タンパク質であり、シロイヌナズナでは 10 個の *Respiratory Burst Oxidase Homolog (RBOH)* 遺伝子によってコードされている。*RBOH* 遺伝子はさまざまな組織で発現することが知られており、その中でも *RBOH A~C, G, I* は根の伸長領域で特異的に発現する(Sagi and Fluhr, 2006; Zimmermann et al., 2004)。Liang ら(2016)は、*S. asiatica* において、*RBOH* 遺伝子の 1 つ (SaNOX1) の発現が、根の先端で H_2O_2 の減少に伴って吸器発達の初期段階 (~2 時間) で減少したことを報告した(Liang et al., 2016)。*S. hermonthica* トランスクリプトーム解析からは複数の *RBOH* 遺伝子が検出されている(Yoshida et al., 2019)。また、GO エンリッチメント解析の結果より、吸器形成中期以降では NADPH アクティビティや hydroxymethylglutaryl-CoA reductase (NADPH) の GO タームが検出されており、吸器誘導には NADPH を介した酵素活性が活発化していると考えられる。将来的に、ストライガでの吸器形成過程における各 *RBOH* 遺伝子の機能を検証することが必要であろうと考えられる。

2-4-2. 吸器誘導におけるペルオキシダーゼの役割

本研究により、DMBQ の吸器誘導活性はシリンガ酸よりも高く、ペルオキシダーゼ (HRP) 処理によりシリンガ酸の吸器形成率が DMBQ と同程度に増加することがわかった。この結果は、ペルオキシダーゼによりシリンガ酸が DMBQ へ酸化されることで活性型の吸器誘導物質となるモデル(Kim et al., 1998) を支持していると考えられる。しかし、DMBQ に対しても HRP 処理により吸器形成率が増加した。この結果から、DMBQ がより高い吸器誘導能を有する吸器誘導物質へ変換されている可能性が考えられる。もしくは、ペルオキシダーゼは、ストライガからの吸器誘導物質の分泌を促進するか、ストライガの吸器誘導物質に対する感受性を高めるような作用を有することが考えられる。本実験で用いたペルオキシダーゼ (HRP) は反応時に H_2O_2 を必要とするが、ペルオキシダーゼを用いた実験結果では、 H_2O_2 の添加によってその吸器形成率は変化しなかった。発芽したストライは H_2O_2 を蓄積していることが報告されており(Keyes et al., 2001)、ストライガ自身の H_2O_2 を HRP が反応に使用したため、 H_2O_2 を外部から加えても吸器形成率は変化しなかったと考えられる。高濃度なペルオキシダーゼ (0.1 U/ml HRP) の処理により、ストライガは吸器誘導物質の非存在化で約 20% の吸器形成率を示した。高濃度のペルオキシダーゼにより、ストライガの細胞壁の分解を引き起こし、少量のキノンおよびフェノール類などの吸器誘導能を有した化合物の産生を促した可能性が考えられる。実際に、リグニンポリマーがリグニン分解酵素によって分解されると *S. hermonthica* の吸器誘導活性が上昇することが知られている (Cui et al., 2018)。また、*Triphysaria* でも根にペルオキシダーゼやラッカーゼを加えると吸器が誘導されることが報告されている(Wang et al., 2020)。その他の可能性として、HRP が吸器誘導物質のシグナル伝達経路に干渉する可能性が考えられる。ペルオキシダーゼの阻害剤である SHAM や Umbelliferone は

高濃度で吸器形成阻害を示した。また、吸器誘導時の GO エンリッチメント解析でもペルオキシダーゼに関する GO タームが吸器誘導中期のクラスター5 と吸器誘導後期のクラスター2 に確認された。このことから、吸器形成時にペルオキシダーゼが活性化されることが必要であると考えられ、外部からペルオキシダーゼを加えることによりシグナル伝達経路の活性化が起こった可能性がある。本研究の結果は、吸器誘導においてペルオキシダーゼは非常に重要な役割を担っていることを示唆している。

2-4-3. 吸器誘導時の継時的トランスクリプトーム解析

今回の解析により、吸器誘導物質の処理後 24 時間以内に、DMBQ 処理に特異的に発現誘導される遺伝子が多く確認された。さらに、DMBQ 処理 1 時間後でも多くの DEG が検出された。その一方で、処理後 1 時間では、シリング酸処理で特異的に発現上昇する DEG はみつからなかった。また、DMBQ により初期に発現する DEG では酸化還元反応に関する GO タームのエンリッチメントが確認されており、DMBQ がストライガ細胞内で酸化還元反応を引き起こすと考えられる。シロイヌナズナにおいて、吸器誘導物質である DMBQ に応答しない変異体の原因遺伝子として、*lucine rich repeat receptor-like kinase* をコードする *CARD1* が単離された (Laohavisit et al., 2020)。*CARD1* は、DMBQ による細胞内カルシウムイオン濃度の上昇に関与するが、シリング酸応答には関与しない。さらに、シロイヌナズナに DMBQ を処理した際には、免疫応答や酸化ストレス応答に関する GO タームが発現変動する遺伝子群にエンリッチされることとして検出されており、DMBQ は *CARD1* を介してストレス応答を誘導すると考えられる。ストライガで、DMBQ 処理とシリング酸処理とで発現変動する遺伝子が異なるのは *CARD1* ホモログを介したストレス応答の誘導と関係がある可能性が考えられる。同様に、DMBQ とシリング酸に対する応答の違いは GO エンリッチメント解析において確認することができる。DMBQ による吸器誘導初期(処理後 1 時間、Fig. 2.19 A)に発現上昇し、酸化還元に関わる GO タームが確認されたクラスター6、7 に属する遺伝子群は、シリング酸処理では発現量の上昇は見られなかった。一方で、同じく初期グループに属するクラスター9 ではシリング酸処理、DMBQ 処理共に、遺伝子発現量のピークが見られたが、エンリッチされた GO タームは確認できなかった。このような DMBQ 処理とシリング酸処理の遺伝子の発現パターンの違いは、吸器誘導物質の作用機構の違いを表していると考えられる。吸器誘導後 3 時間目以降には、細胞壁に関わる GO タームが確認された。先行研究で、ストライガがイネに感染・寄生する過程におけるトランスクリプトーム解析が行われた。この解析では、発芽後のストライガとイネに感染して 1 日、3 日、7 日目のサンプルを扱っており、吸器誘導物質処理のみのサンプルは含まれていない。この解析では、*hydrolase activity*、*transport* や *signal transduction*、*cell wall*、*cell cycle* などの GO タームを持つ遺伝子が発現変動するが、酸化還元反応に

関わる GO は確認されなかった (Yoshida et al., 2019)。本 GO エンリッチメント解析においても、吸器誘導後 3 時間以降から、細胞壁に関する GO タームが確認された。これは、酸化還元反応は、吸器形成の初期に重要であり、宿主への侵入時には細胞壁の分解などが重要であることが考えられる。

ハマウツボ科で宿主依存度が異なる寄生植物種である *Phelipanche*、*Triphysaria* とストライガをターゲットにしたトランスクリプトーム解析が行われており、3 種類に共通した発現遺伝子の解析が行われている (Wickett et al., 2011; Yang et al., 2015)。細胞壁の分解酵素などが 3 種共通の転写産物として報告されており、今回の解析で確認された発現変動遺伝子も他の寄生植物種でも確認されるかどうかを調べることで、種を超えて共通した吸器誘導の仕組みが明らかになると考えられる。

2-4-4. 本研究から得られたストライガの吸器誘導モデル

本研究により、吸器誘導、吸器形成と ROS の関係性について知見を深める事ができた。先行研究により、宿主植物の細胞壁を構成するフェノール類がストライガ由来の H_2O_2 のような ROS やペルオキシダーゼによる酸化によって DMBQ が産生されることで吸器が誘導されるモデルが提案されている (Fig. 2.21 A)。シリング酸からの DMBQ への化学変化はペルオキシダーゼを用いた実験結果から示されており、本研究でもシリング酸に HRP を添加した実験結果により支持されている。しかし、DMBQ にペルオキシダーゼを添加しても吸器形成率が上昇したことから、ペルオキシダーゼが DMBQ へ影響し吸器誘導活性が高い化合物へ変換される可能性も考えられる。ROS 阻害剤を用いた実験結果から、ストライガ体内の NADPH オキシダーゼによる H_2O_2 産生が吸器形成に重要な役割を担っている事が示唆された。さらに、トランスクリプトーム解析、GO エンリッチメント解析により、吸器誘導において酸化還元に関わる遺伝子が働いていることがわかった。このように、吸器誘導と ROS の関係性はこれまで考えられてきたことよりも、複雑に影響し合っていることが示された (Fig. 2.22 B)。

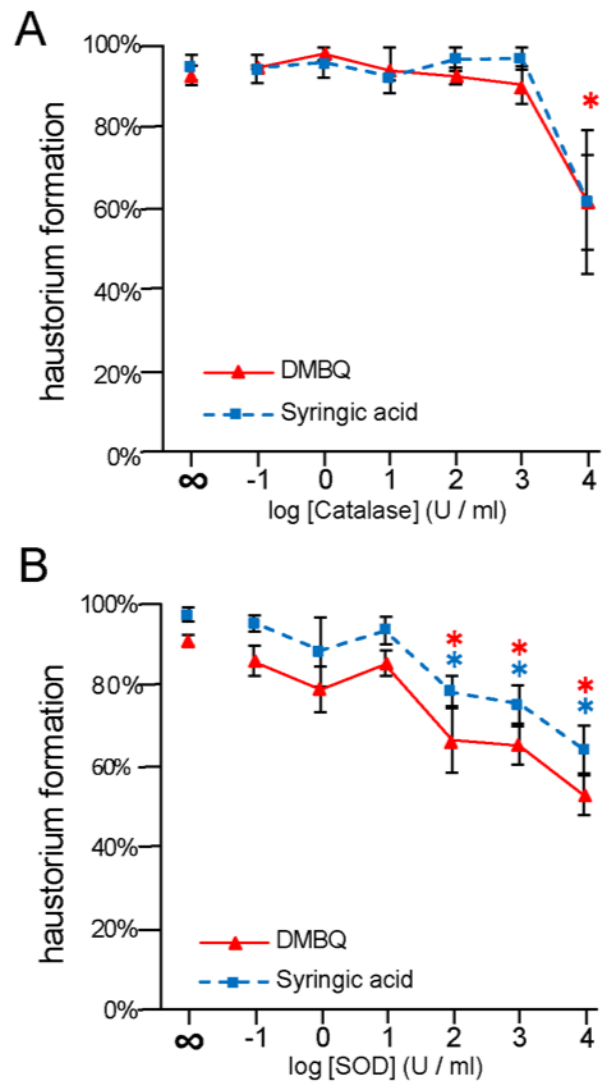


Fig. 2.1 吸器誘導におけるROS分解酵素の影響

H_2O_2 の分解酵素であるカタラーゼ(A)と O_2^- の分解酵素であるSOD(B)をDMBQまたはシリング酸と同時に暴露し、24時間後の吸器形成率を計測した。赤線はDMBQ、青い点線はシリング酸を示す。エラーバーはSEを示す。n=3。

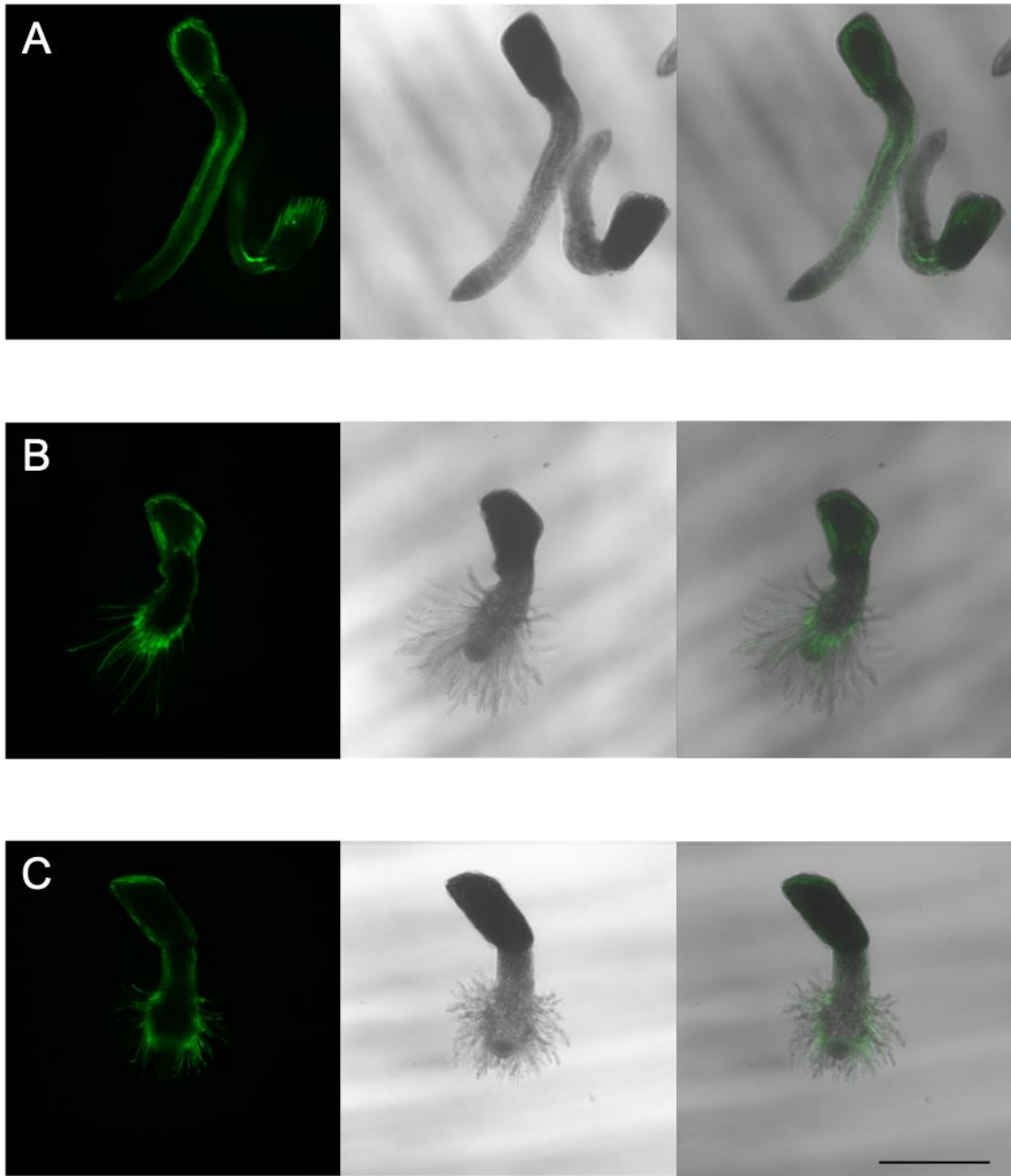


Fig. 2.2 H₂O₂の可視化

Carboxy-H2DFDAを用いてH₂O₂の可視化を行なった。吸器誘導処理を行っていないコントロール(A)、10 μM DMBQ(B)や10 μM シリンガ酸(B)を用いて吸器誘導を行い、24時間後のストライガを観察した。左から、蛍光観察画像、明視野像及び、重ね合わせ画像。スケールバーは500 μm。

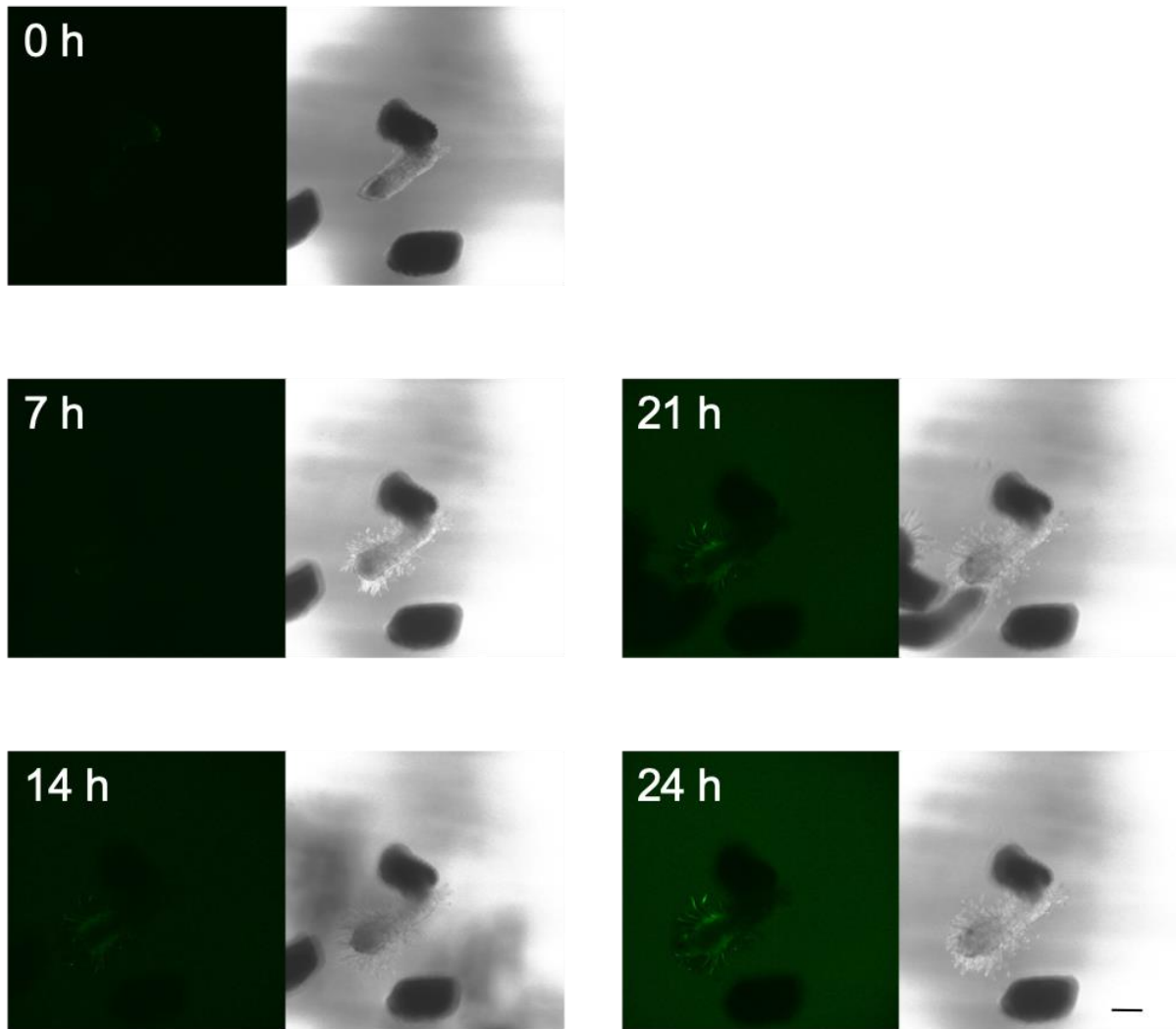


Fig. 2.3 H₂O₂局在の継時的な変化

Carboxy-H2DFFDAを用いて吸器誘導を行ったストライガのH₂O₂の局在の変化を継時的に観察した。左上から、0時間後、7時間後、14時間後、右上から21時間後、24時間後の様子である。左は蛍光画像、右は明視野像。写真は違いが明確になるようにコントラスト調整を全て同じように施した。スケールバーは200 μm。

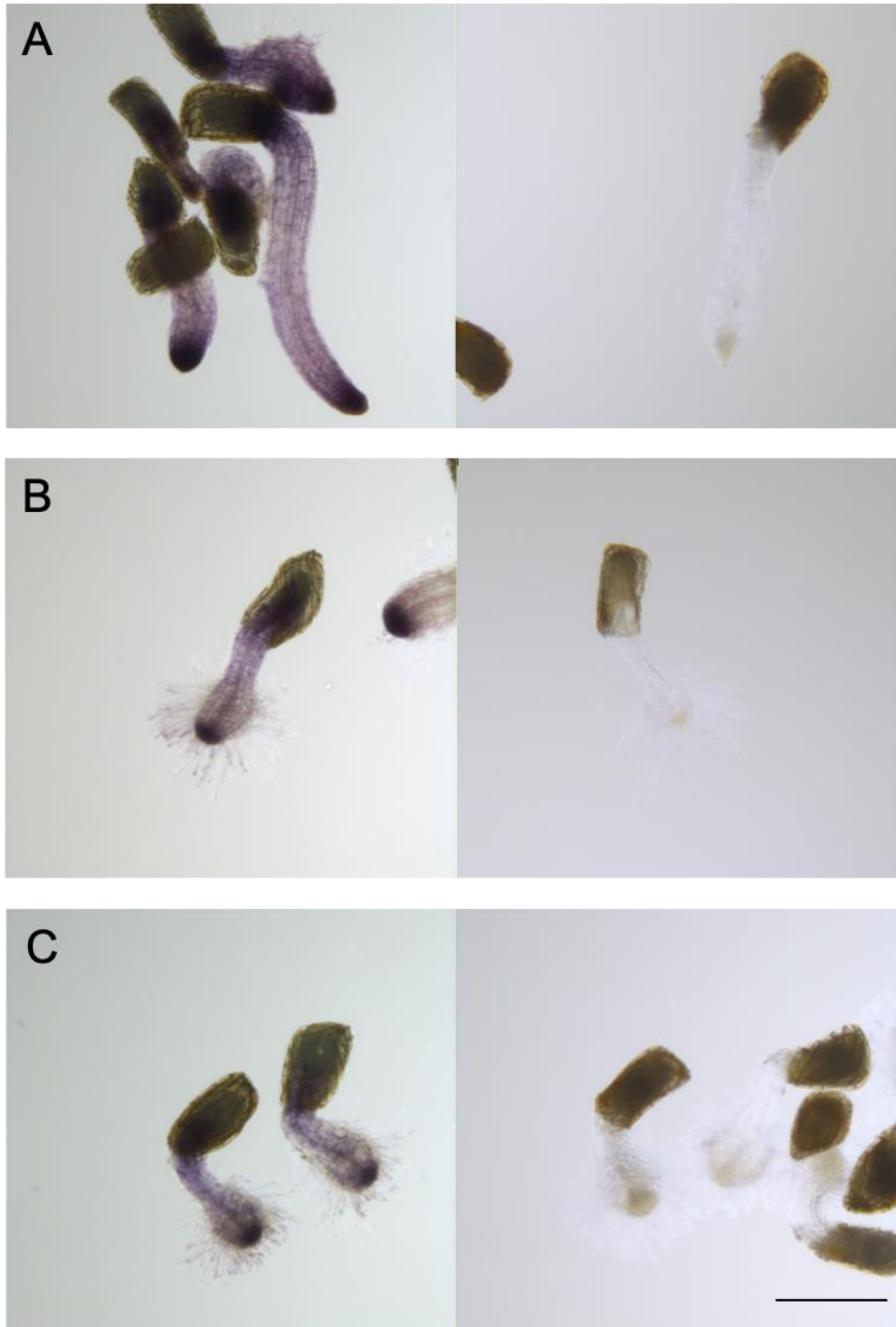


Fig. 2.4 O_2^- の可視化

NTBを用いて H_2O_2 の可視化を行なった。吸器誘導処理を行っていないコントロール(A)、 $10 \mu M$ DMBQ(B)および $10 \mu M$ シリンガ酸(C)を用いて吸器誘導を行い、24時間後のストライガを示す。左は、染色を行なったストライガ、右は染色を行っていないストライガの写真。スケールバーは $500 \mu m$ 。

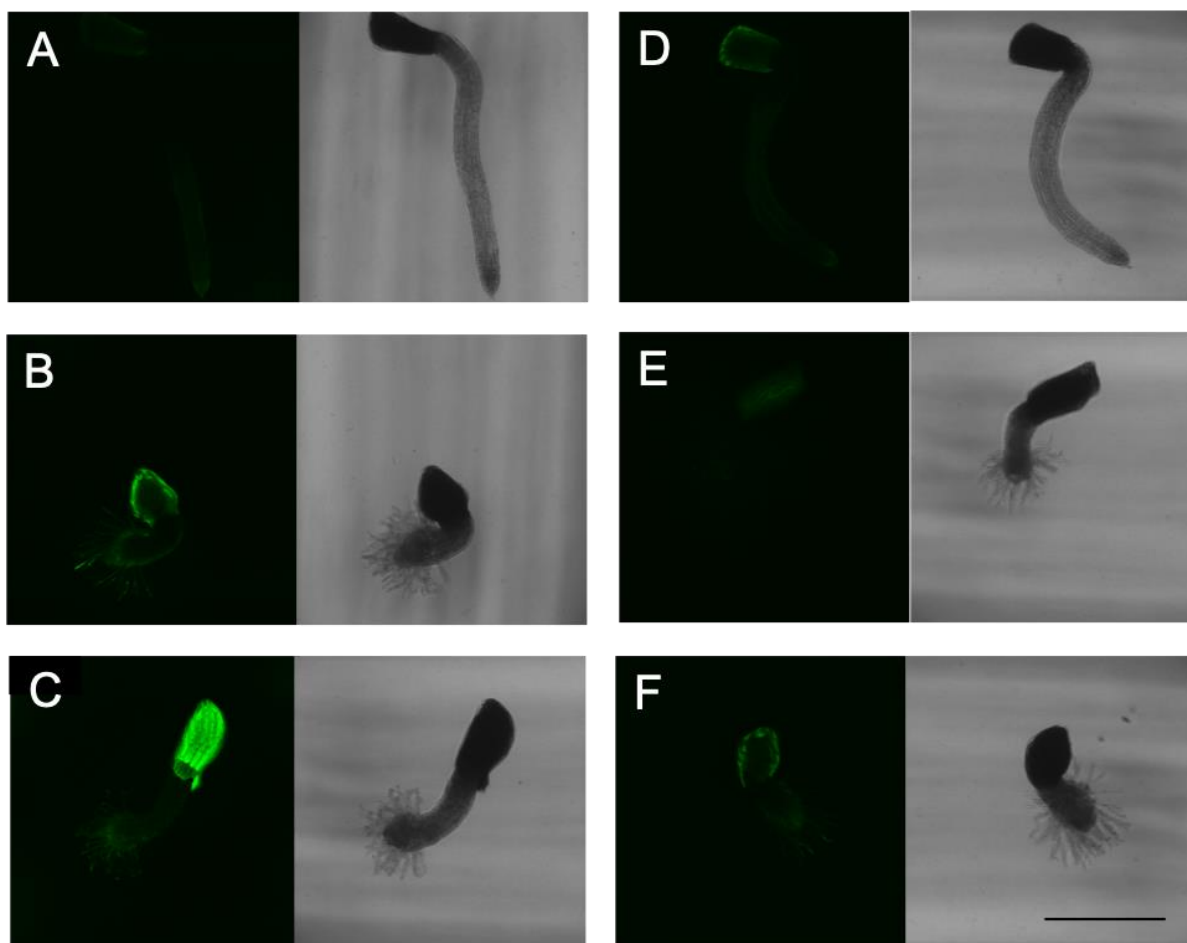


Fig. 2.5 NO⁻及びOH[·]の可視化

DAF2-DAとAFPを用いてNO⁻(A~C)とOH[·](D~F)の可視化を行なった。吸器誘導処理を行なっていないコントロール(A、D)、10 μM DMBQ(B、E)や10 μM シリンガ酸(B、F)を用いて吸器誘導を行い、24時間後のストライガを観察した。左は蛍光画像、右は明視野像。スケールバーは500 μm。

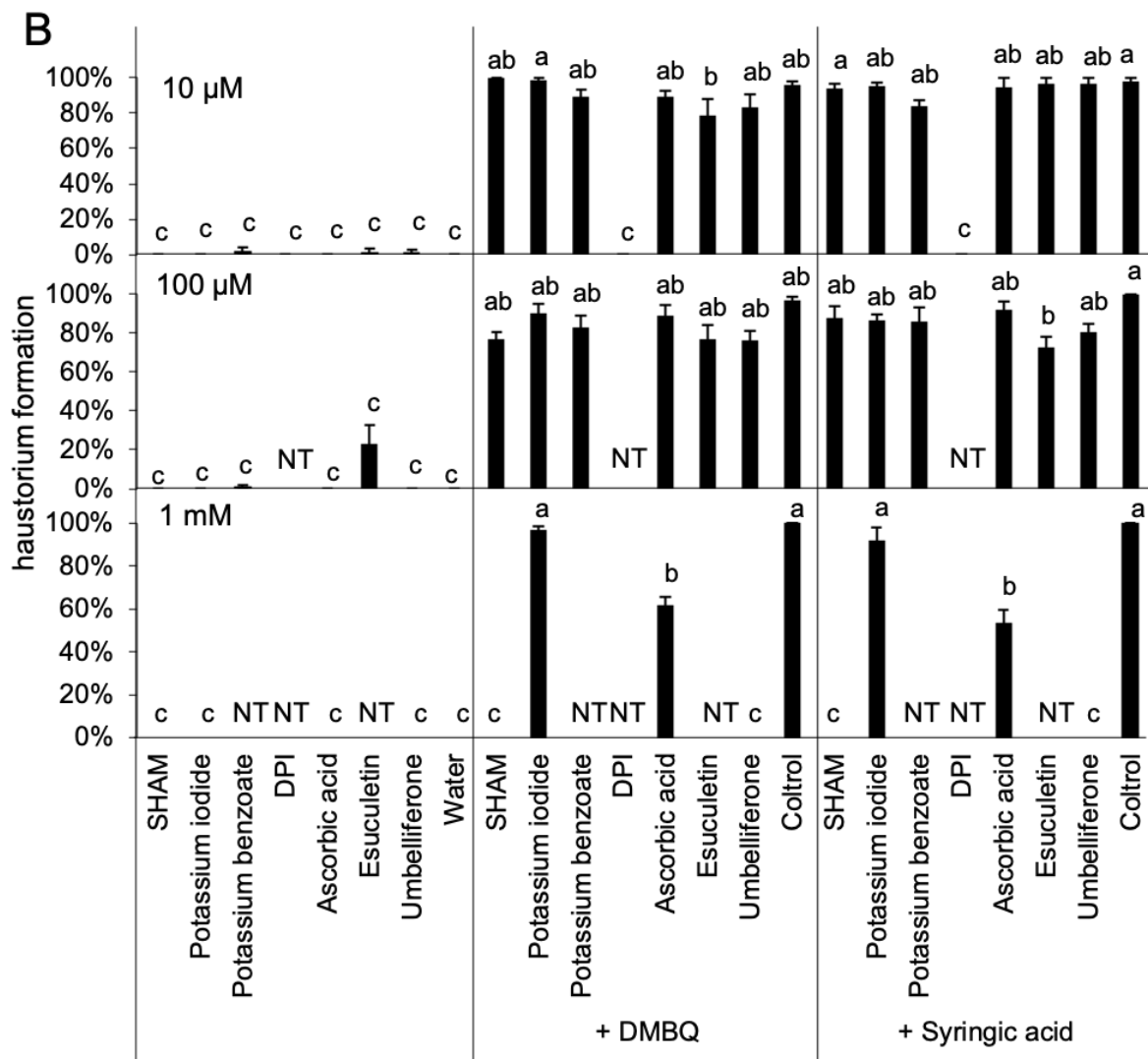
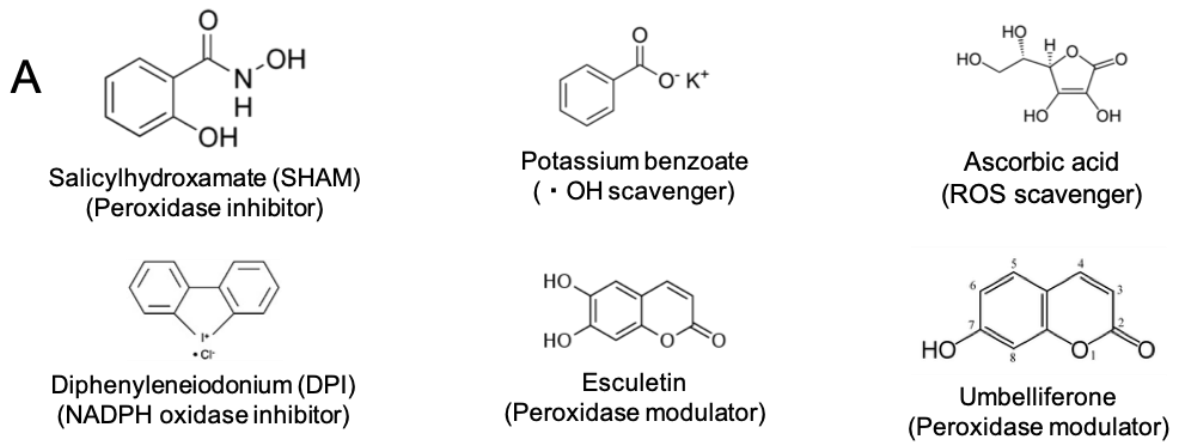


Fig. 2.6 吸器誘導におけるROS阻害剤の影響

6種類のROS阻害剤の化学構造(A)と吸器形成率への影響(B)を示す。グラフのROS阻害剤の濃度は上から10 μ M、100 μ M、1 mM。エラーバーはSEを示し、NTは実験を行っていないものを示す。Tukey HSD検定により有意差(p < 0.05)が検出されたものを異なるアルファベットで示す。n=3。

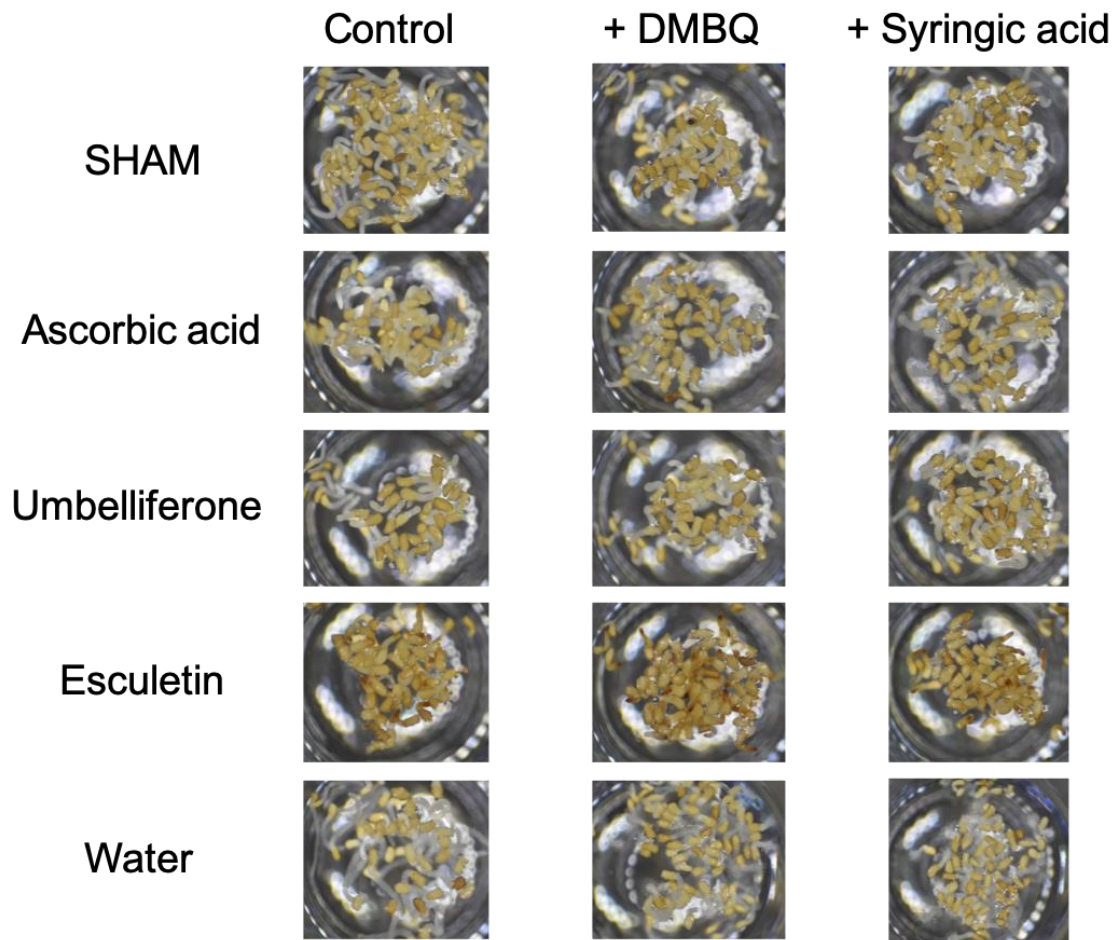


Fig. 2.7 高濃度でのROS阻害剤の植物体への影響

1 mM ROS阻害剤と吸器誘導物質を発芽したストライガに暴露し、24時間後に観察した。上から、SHAM、Ascorbic acid、Umbelliferone、Esculetin、コントロールとして水を加えた。

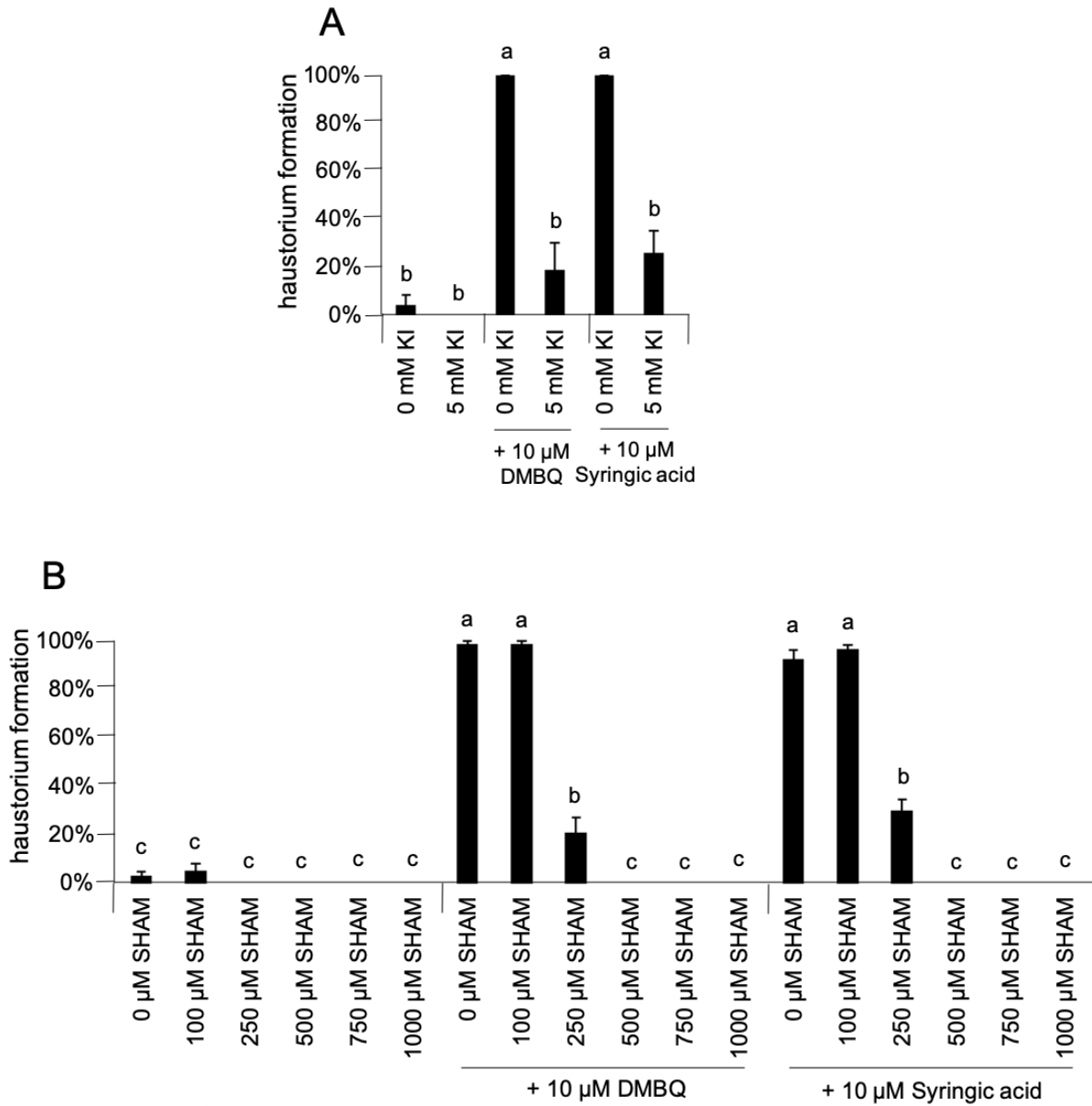


Fig. 2.8 KIとSHAMの吸器形成への影響

濃度の高いKI (A) とSHAM (B) の吸器形成阻害を調べた。KI とSHAM を外部から加え、吸器形成率が阻害されるかを調べた。エラーバーはSEを示す。Tukey HSD 検定により有意差 ($p < 0.05$) が検出されたものを異なるアルファベットで示す。n=3。

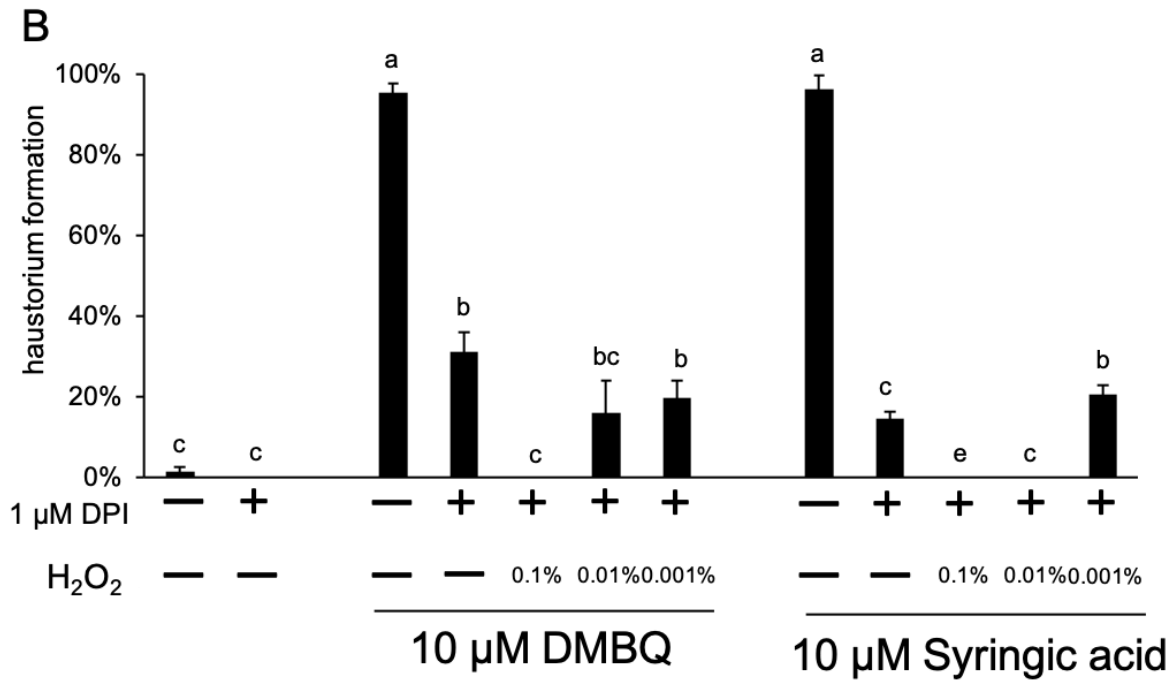
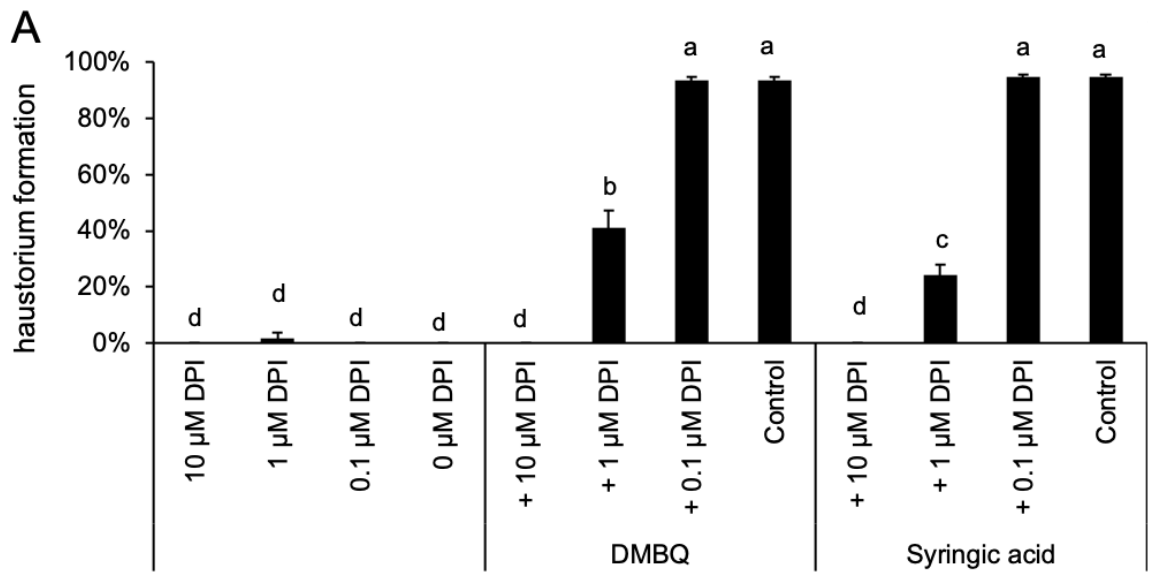


Fig. 2.9 DPIの吸器形成阻害効果

DPIの低い濃度での吸器形成阻害を調べた(A)。DPIとH₂O₂を外部から加え、吸器形成率が回復するか調べた(B)。エラーバーはSEを示す。Tukey HSD検定により有意差(p < 0.05)が検出されたものを異なるアルファベットで示す。n=3。

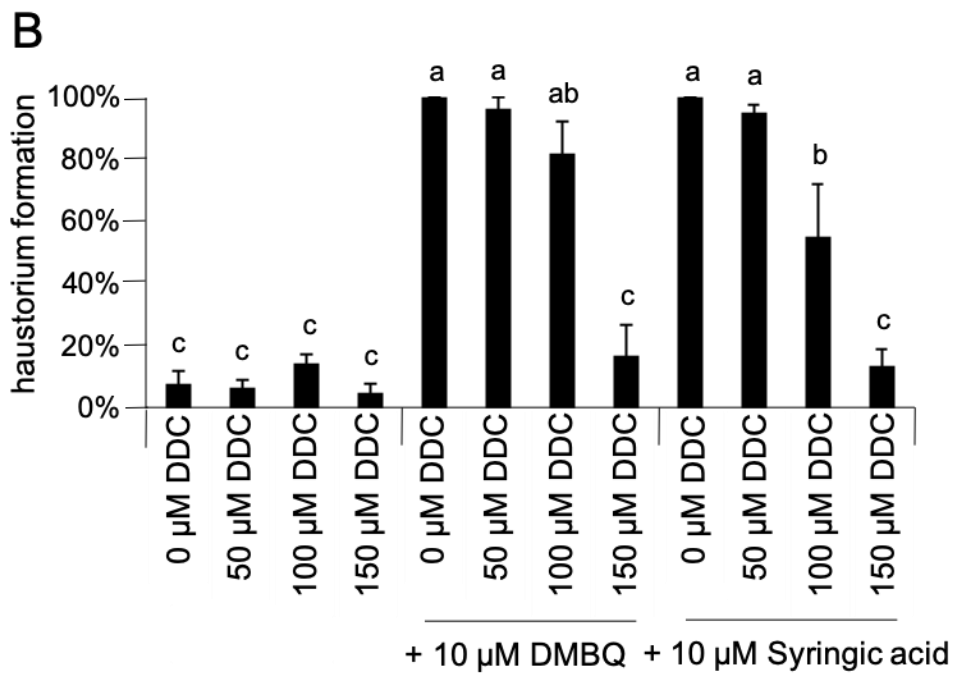
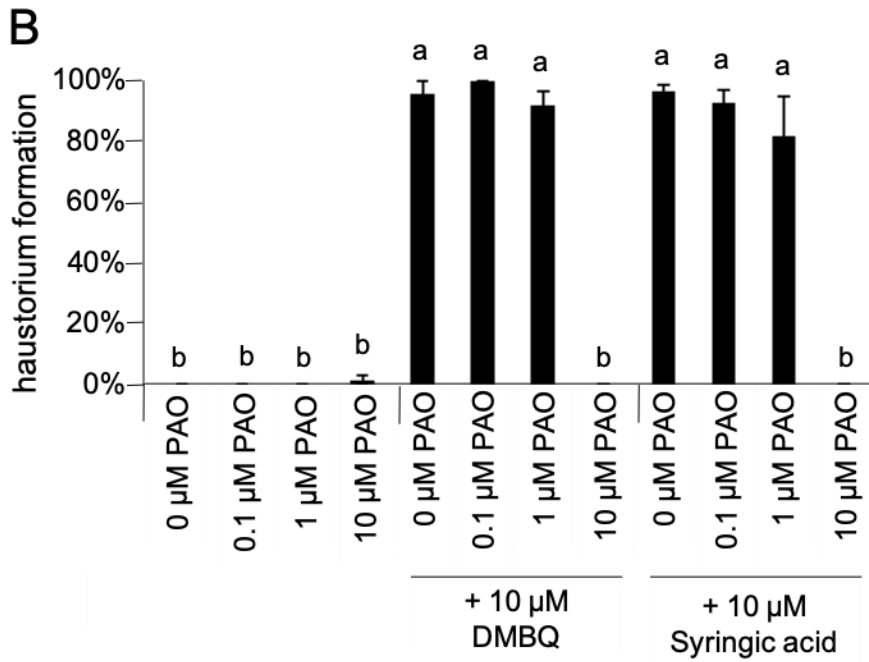


Fig. 2.10 PAOとDDCの吸器形成阻害効果

濃度の高いPAO(A)とDDC(B)の吸器形成阻害を調べた。PAOとDDCを外部から加え、吸器形成率が回復するか調べた(B)。エラーバーはSEを示す。Tukey HSD検定により有意差($p < 0.05$)が検出されたものを異なるアルファベットで示す。n=3。

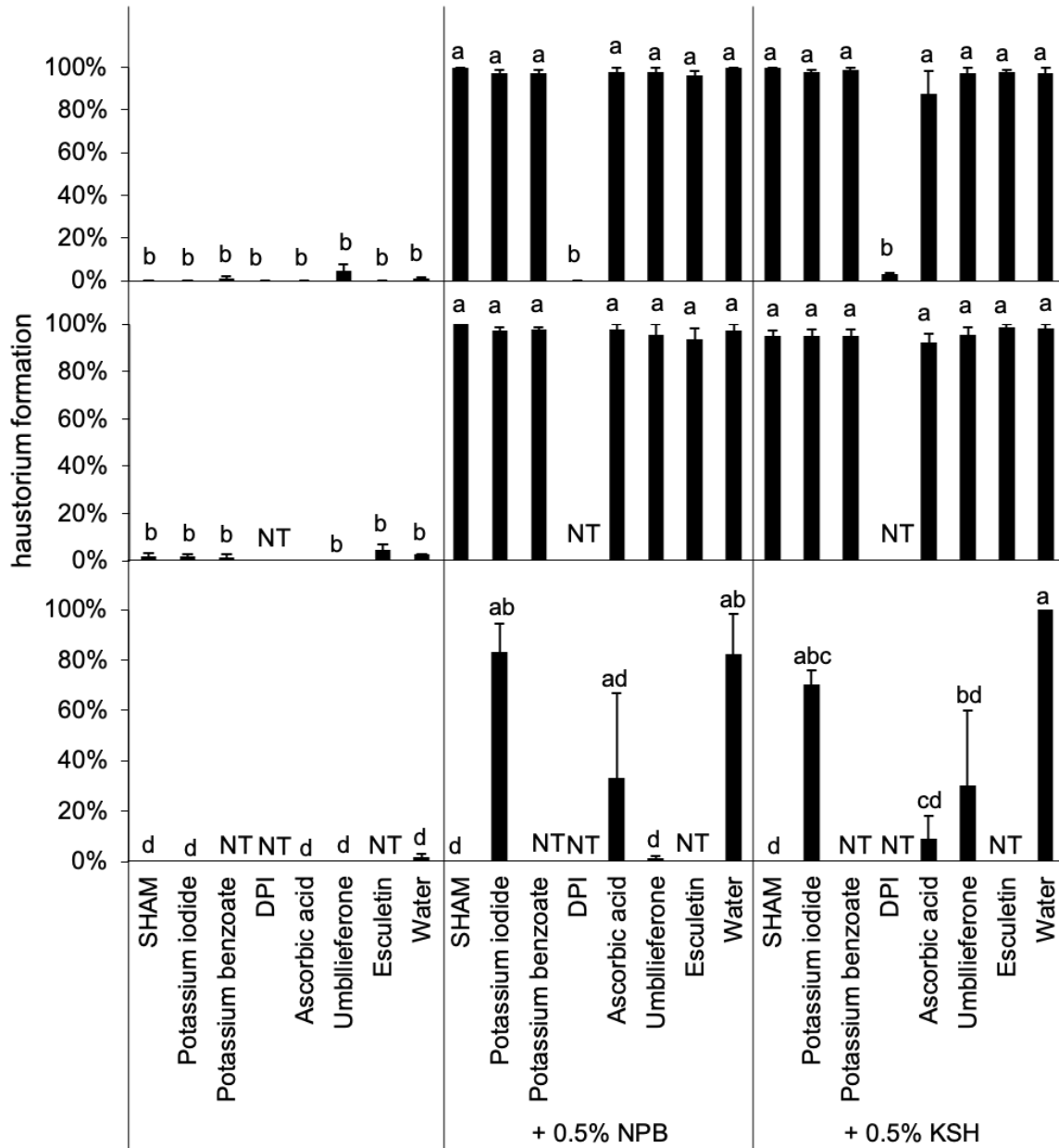


Fig. 2.11 イネの抽出液でのROS阻害剤の効果

日本晴れ(NPB)とコシヒカリ(KSH)の根の抽出液を用いてROS阻害剤による吸器形成への影響を調べた。ROS阻害剤の濃度は上から10 μ M、100 μ M、1 mMである。エラーバーはSEを示し、NTは実験を行っていないものを示す。Tukey HSD検定により有意差($p < 0.05$)が検出されたものを異なるアルファベットで示す。n=3。

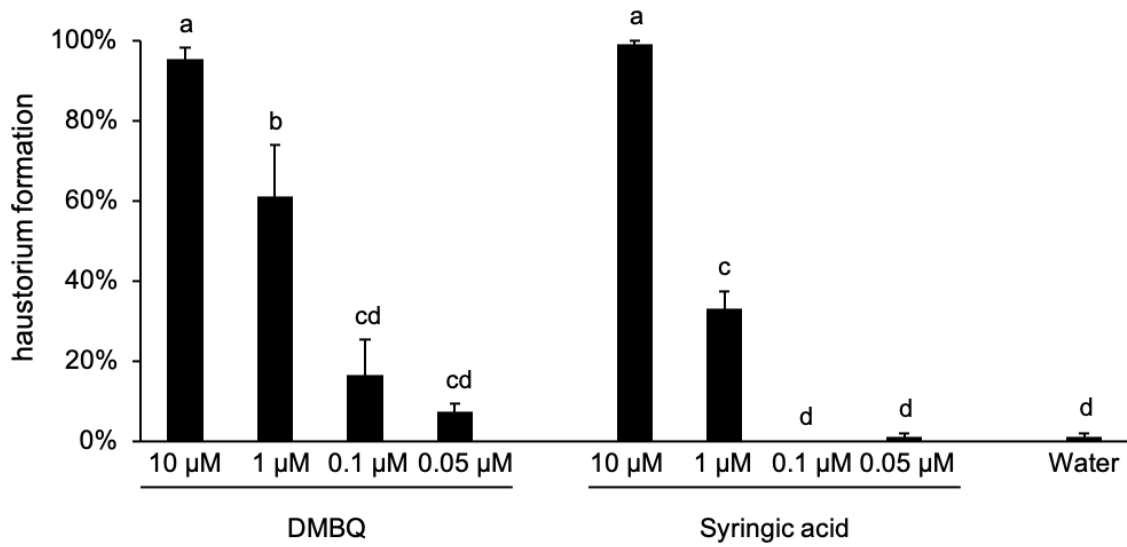


Fig. 2.12 DMBQとシリンガ酸の吸器誘導能の違い

DMBQとシリンガ酸の濃度依存的な吸器誘導能を調べた。ストライガを10 μM、1 μM、0.1 μM、0.05 μMのDMBQ及びシリンガ酸に暴露し、24時間後に測定した。エラーバーはSEを示す。Tukey HSD検定により有意差(p < 0.05)が検出されたものを異なるアルファベットで示す。n=3。

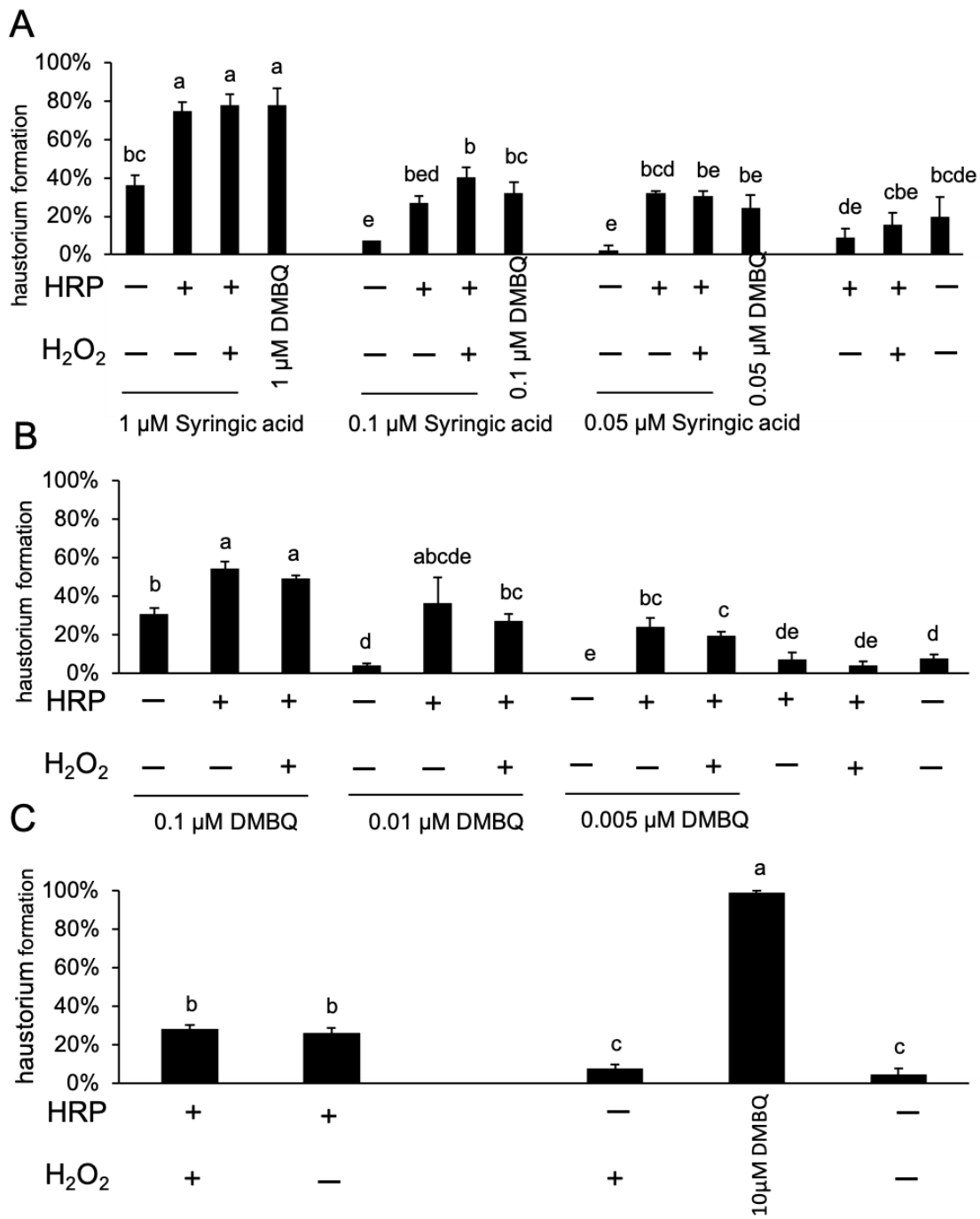
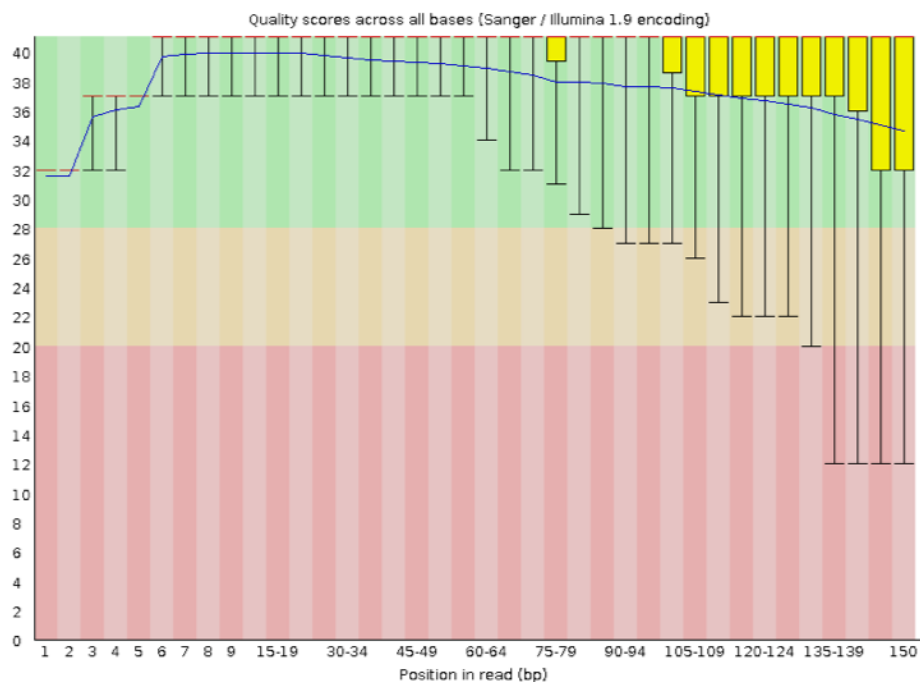


Fig. 2.13 ペルオキシダーゼによる吸器誘導能の向上
 シリンガ酸(A)やDMBQ(B)に0.01 U/μMのペルオキシダーゼ(HRP)や0.001%のH₂O₂を同時に加え吸器形成率を調べた。0.1 U/μlのペルオキシダーゼを加え、吸器形成率を調べた(C)。エラーバーはSEを示す。Tukey HSD検定により有意差(p < 0.05)が検出されたものを異なるアルファベットで示す。n=3。

A



B

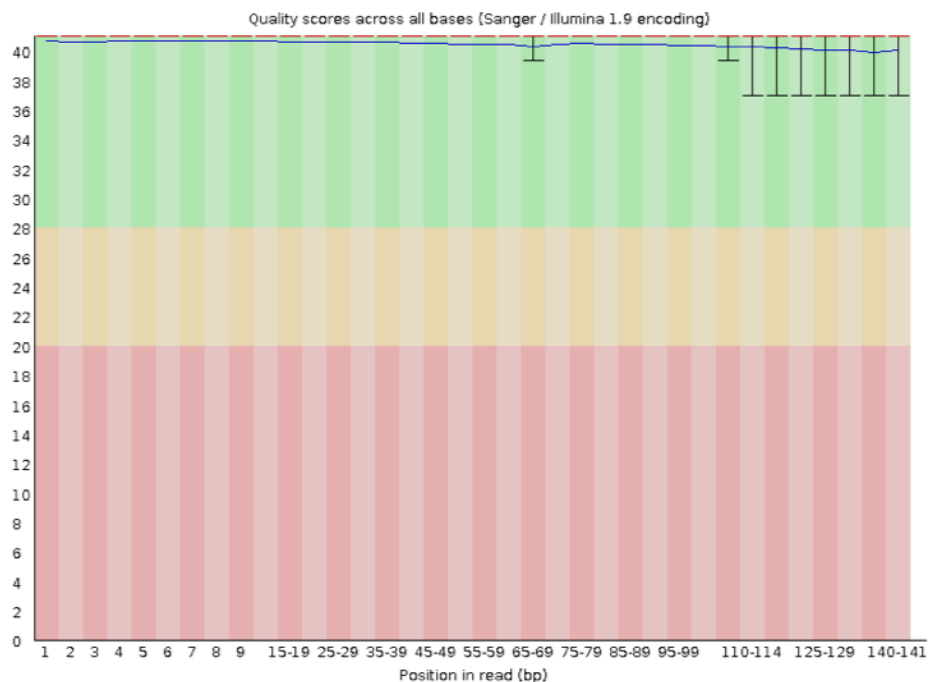


Fig. 2.14 得たリードのクオリティチェック

得られたリードのをFastQCを用いてクオリティチェックを行った。トリミングを行う前(A)と行った後(B)のリードの各塩基ごとのクオリティスコアを示す。図では、例として、0時間のコントロール区のリードにおけるクオリティスコアを示し、トリミング後のクオリティチェックでクオリティスコアが36以上であることを確認している

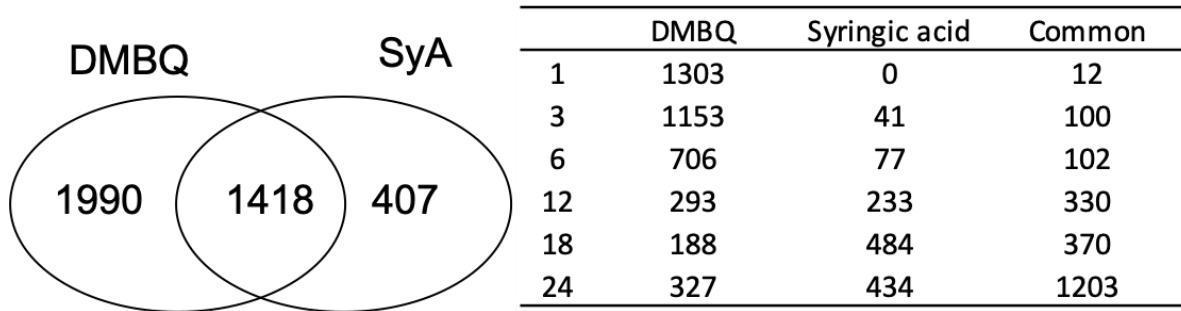
Table. 2.1 トリミングの結果

ID	Input Read Pairs	Both Surviving	Forward Only Surviving	Reverse Only Surviving	Dropped
Index00h_Cont_1	28293910	17290659 (61.11%)	5620643 (19.87%)	1432077 (5.06%)	3950531 (13.96%)
Index00h_Cont_2	10441888	6611540 (63.32%)	1855197 (17.77%)	532786 (5.10%)	442365 (13.81%)
Index00h_Cont_3	5763167	3450139 (59.87%)	1154704 (20.04%)	293038 (5.08%)	865286 (15.01%)
Index01h_Cont_1	4983844	2727329 (54.72%)	1286572 (25.81%)	242759 (4.87%)	727184 (14.59%)
Index01h_Cont_2	10660588	6417986 (60.20%)	2408045 (22.59%)	508707 (4.77%)	1325850 (12.44%)
Index01h_Cont_3	14131378	8092016 (57.26%)	3151980 (22.30%)	751013 (5.31%)	2136369 (15.12%)
Index01h_DMBQ_1	5042649	3051790 (60.52%)	1121264 (22.24%)	241070 (4.78%)	628525 (12.46%)
Index01h_DMBQ_2	5756151	15897251 (61.72%)	4989885 (19.37%)	1319919 (5.12%)	3549096 (13.78%)
Index01h_DMBQ_3	10647506	6583401 (61.83%)	2327763 (21.86%)	524094 (4.92%)	524094 (4.92%)
Index01h_SyA_1	4948558	2936211 (59.33%)	1139905 (23.04%)	230210 (4.65%)	642232 (12.98%)
Index01h_SyA_2	3424966	2094795 (61.16%)	769124 (22.46%)	168560 (4.92%)	392487 (11.46%)
Index01h_SyA_3	19768121	11999906 (60.70%)	3876688 (19.61%)	1044662 (5.28%)	2846865 (14.40%)
Index03h_Cont_1	8740222	5267577 (60.27%)	2013462 (23.04%)	422920 (4.84%)	1036263 (11.86%)
Index03h_Cont_2	11488002	6924623 (60.28%)	2645147 (23.03%)	490927 (4.27%)	1427305 (12.42%)
Index03h_Cont_3	11035695	6856513 (62.13%)	2184665 (19.80%)	547801 (4.96%)	1446716 (13.11%)
Index03h_DMBQ_1	1224273	6943010 (61.86%)	2488102 (22.17%)	545668 (4.86%)	1247493 (11.11%)
Index03h_DMBQ_2	9644731	5814498 (60.29%)	2196781 (22.78%)	450016 (4.67%)	1183436 (12.27%)
Index03h_DMBQ_3	16765212	10620811 (63.35%)	2974496 (17.74%)	900207 (5.37%)	2269698 (13.54%)
Index03h_SyA_1	5481044	3052679 (55.70%)	1360620 (24.82%)	269293 (4.91%)	798452 (14.57%)
Index03h_SyA_2	13561325	7682286 (56.65%)	3255687 (24.01%)	643930 (4.75%)	1979422 (14.60%)
Index03h_SyA_3	17159185	10526414 (61.35%)	3329113 (19.40%)	883494 (5.15%)	2420164 (14.10%)
Index06h_Cont_1	769577	5119394 (58.38%)	2059460 (23.48%)	414912 (4.73%)	1175811 (13.41%)
Index06h_Cont_2	12298389	7334379 (59.64%)	2882222 (23.44%)	556618 (4.53%)	1525170 (12.40%)
Index06h_Cont_3	13422931	8393140 (62.53%)	2529896 (18.85%)	684928 (5.10%)	1814967 (13.52%)
Index06h_DMBQ_1	9077095	5232524 (57.65%)	2138821 (23.56%)	415996 (4.58%)	1289754 (14.21%)
Index06h_DMBQ_2	11869025	7592100 (63.97%)	2356953 (19.86%)	577455 (4.87%)	1342517 (11.31%)
Index06h_DMBQ_3	15580039	9256646 (59.41%)	3208735 (20.60%)	785166 (5.04%)	2329492 (14.95%)
Index06h_SyA_1	10163034	5614109 (55.24%)	2538376 (24.98%)	466133 (4.59%)	1544416 (15.20%)
Index06h_SyA_2	10994347	6878954 (62.57%)	2284227 (20.78%)	531664 (4.84%)	1299502 (11.82%)
Index06h_SyA_3	17960961	10617289 (59.11%)	3607845 (20.09%)	974096 (5.42%)	2761731 (15.38%)
Index12h_Cont_1	10314072	6327125 (61.34%)	2276326 (22.07%)	481440 (4.67%)	1229181 (11.92%)
Index12h_Cont_2	10708237	6190767 (57.81%)	2606160 (24.34%)	484336 (4.52%)	1426974 (13.33%)
Index12h_Cont_3	16070919	10317676 (64.20%)	2777774 (17.28%)	829135 (5.16%)	2146334 (13.36%)
Index12h_DMBQ_1	6596212	3952452 (59.92%)	1523830 (23.10%)	312280 (4.73%)	807650 (12.24%)
Index12h_DMBQ_2	8760699	5046630 (57.61%)	2114246 (24.13%)	393698 (4.49%)	1206125 (13.77%)
Index12h_DMBQ_3	13146236	8152562 (62.01%)	2568360 (19.54%)	690711 (5.25%)	1734603 (13.19%)
Index12h_SyA1	12478437	7362375 (59.00%)	2934079 (23.51%)	577446 (4.63%)	1604537 (12.86%)
Index12h_SyA_2	10887143	6549697 (60.16%)	2475602 (22.74%)	510571 (4.69%)	1351273 (12.41%)
Index12h_SyA_3	20737524	12449108 (60.03%)	4103426 (19.79%)	1043347 (5.03%)	3141643 (15.15%)
Index18h_Cont_1	11662321	6959705 (59.68%)	2579176 (22.12%)	547965 (4.70%)	1575475 (13.51%)
Index18h_Cont_2	8585696	5035144 (58.65%)	1959752 (22.83%)	398296 (4.64%)	1192504 (13.89%)
Index18h_Cont_3	10532714	6317910 (59.98%)	2124090 (20.17%)	569913 (5.41%)	1520801 (14.44%)
Index18h_DMBQ_1	12601123	6468440 (51.33%)	3379870 (26.82%)	637914 (5.06%)	2114899 (16.78%)
Index18h_DMBQ_2	12715005	7229600 (56.86%)	3154911 (24.81%)	575094 (4.52%)	1755400 (13.81%)
Index18h_DMBQ_3	23868439	13886869 (58.18%)	5052248 (21.17%)	1180181 (4.94%)	3749141 (15.71%)
Index18h_SyA_1	9106903	5189540 (56.98%)	2262789 (24.85%)	408881 (4.49%)	1245693 (13.68%)
Index18h_SyA_2	15286961	8916715 (58.33%)	3578909 (23.41%)	680415 (4.45%)	2110922 (13.81%)
Index18h_SyA_3	24684646	14120168 (57.20%)	5472146 (22.17%)	1160710 (4.70%)	3931622 (15.93%)
Index24h_Cont_1	8136851	5208442 (64.01%)	1615599 (19.86%)	412360 (5.07%)	900450 (11.07%)
Index24h_Cont_2	9309796	5754656 (61.81%)	1998168 (21.46%)	450198 (4.84%)	1106774 (11.89%)
Index24h_Cont_3	9178501	5362096 (58.42%)	1956964 (21.32%)	478257 (5.21%)	1381184 (15.05%)
Index24h_Cont_4	8629499	5214762 (60.43%)	1701226 (19.71%)	432192 (5.01%)	1281319 (14.85%)
Index24h_Cont_5	7582529	4603953 (60.72%)	1586102 (20.92%)	359918 (4.75%)	1032556 (13.62%)
Index24h_DMBQ_1	14811651	8352520 (56.39%)	3593508 (24.26%)	663695 (4.48%)	2201928 (14.87%)
Index24h_DMBQ_2	13567279	7651487 (56.40%)	3391141 (24.99%)	617736 (4.55%)	1906915 (14.06%)
Index24h_DMBQ_3	18728571	10990690 (58.68%)	3868043 (20.65%)	913084 (4.88%)	2956754 (15.79%)
Index24h_DMBQ_4	10219685	5926308 (57.99%)	2145502 (20.99%)	476869 (4.67%)	1671006 (16.35%)
Index24h_DMBQ_5	10937533	6454226 (59.01%)	2407016 (22.01%)	523663 (4.79%)	1552628 (14.20%)
Index24h_SyA_1	11020691	6202405 (56.28%)	2665365 (24.19%)	498717 (4.53%)	1654204 (15.01%)
Index24h_SyA_2	15172355	8814507 (58.10%)	3613564 (23.82%)	697675 (4.60%)	2046609 (13.49%)
Index24h_SyA_3	22703420	13546118 (59.67%)	4620847 (20.35%)	1108348 (4.88%)	3428107 (15.10%)
Index24h_SyA_4	10015135	5914083 (59.05%)	2232456 (22.29%)	475312 (4.75%)	1393284 (13.91%)
Index24h_SyA_5	8429055	4926895 (58.45%)	1828325 (21.69%)	395226 (4.69%)	1278609 (15.17%)

Table. 2.2 マッピング

ID	paired	0 times	exactly_1_time	>1_times
Index00h_Cont_1	17290659(100.00%)	4988943(28.85%)	1821967(10.54%)	10479749(60.61%)
Index00h_Cont_2	6611540(100.00%)	1570490(23.75%)	803972(12.16%)	4237078(64.09%)
Index00h_Cont_3	3450139(100.00%)	1060573(30.74%)	368549(10.68%)	2021017(58.58%)
Index01h_Cont_1	727329(100.00%)	902934(33.11%)	354728(13.01%)	1469667(53.89%)
Index01h_Cont_2	6417986(100.00%)	1622027(25.27%)	838311(13.06%)	3957648(61.66%)
Index01h_Cont_3	8092016(100.00%)	3000876(37.08%)	814241(10.06%)	4276899(52.85%)
Index01h_DMBQ_1	3051790(100.00%)	733586(24.04%)	384039(12.58%)	1934165(63.38%)
Index01h_DMBQ_2	6583401(100.00%)	1530886(23.25%)	938142(14.25%)	4114373(62.50%)
Index01h_DMBQ_3	15897251(100.00%)	4580702(28.81%)	1654110(10.41%)	9662439(60.78%)
Index01h_SyA_1	2936211(100.00%)	781200(26.61%)	365818(12.46%)	1789193(60.94%)
Index01h_SyA_2	2094795(100.00%)	516953(24.68%)	297307(14.19%)	1280535(61.13%)
Index01h_SyA_3	1999906(100.00%)	3516748(29.31%)	1288388(10.74%)	7194770(59.96%)
Index03h_Cont_1	5267577(100.00%)	1371197(26.03%)	757920(14.39%)	3138460(59.58%)
Index03h_Cont_2	6924623(100.00%)	1567846(22.64%)	900626(13.01%)	456151(64.35%)
Index03h_Cont_3	6856513(100.00%)	2010251(29.32%)	770122(11.23%)	4076140(59.45%)
Index03h_DMBQ_1	6943010(100.00%)	1634422(23.54%)	1125873(16.22%)	4182715(60.24%)
Index03h_DMBQ_2	814498(100.00%)	1464297(25.18%)	693515(11.93%)	3656686(62.89%)
Index03h_DMBQ_3	10620811(100.00%)	2830210(26.65%)	1261548(11.88%)	6529053(61.47%)
Index03h_SyA_1	3052679(100.00%)	995456(32.61%)	357502(11.71%)	1699721(55.68%)
Index03h_SyA_2	7682286(100.00%)	2284786(29.74%)	942674(12.27%)	4454826(57.99%)
Index03h_SyA_3	10526414(100.00%)	2986749(28.37%)	1185589(11.26%)	6354076(60.36%)
Index06h_Cont_1	5119394(100.00%)	1382584(27.01%)	680394(13.29%)	3056416(59.70%)
Index06h_Cont_2	7334379(100.00%)	1875139(25.57%)	1022556(13.94%)	4436684(60.49%)
Index06h_Cont_3	8393140(100.00%)	2310946(27.53%)	959510(11.43%)	5122684(61.03%)
Index06h_DMBQ_1	5232524(100.00%)	1544036(29.51%)	681724(13.03%)	3006764(57.46%)
Index06h_DMBQ_2	7592100(100.00%)	1499767(19.75%)	1172045(15.44%)	4920288(64.81%)
Index06h_DMBQ_3	9256646(100.00%)	3094910(33.43%)	987771(10.67%)	5173965(55.89%)
Index06h_SyA_1	5614109(100.00%)	1818682(32.39%)	793205(14.13%)	3002222(53.48%)
Index06h_SyA_2	6878954(100.00%)	1458080(21.20%)	1122706(16.32%)	4298168(62.48%)
Index06h_SyA_3	10617289(100.00%)	3536196(33.31%)	1119628(10.55%)	5961465(56.15%)
Index12h_Cont_1	6327125(100.00%)	1514249(23.93%)	849975(13.43%)	3962901(62.63%)
Index12h_Cont_2	6190767(100.00%)	1782232(28.79%)	771469(12.46%)	3637066(58.75%)
Index12h_Cont_3	10317676(100.00%)	2503068(24.26%)	1241920(12.04%)	6572688(63.70%)
Index12h_DMBQ_1	3952452(100.00%)	1065803(26.97%)	501421(12.69%)	2385228(60.35%)
Index12h_DMBQ_2	5046630(100.00%)	1421211(28.16%)	651114(12.90%)	2974305(58.94%)
Index12h_DMBQ_3	8152562(100.00%)	2500397(30.67%)	924809(11.34%)	4727356(57.99%)
Index12h_SyA_1	7362375(100.00%)	1997356(27.13%)	1018271(13.83%)	4346748(59.04%)
Index12h_SyA_2	6549697(100.00%)	1774800(27.10%)	794888(12.14%)	3980009(60.77%)
Index12h_SyA_3	12449108(100.00%)	3881576(31.18%)	1375348(11.05%)	7192184(57.77%)
Index18h_Cont_1	6959705(100.00%)	1744003(25.06%)	1086218(15.61%)	4129484(59.33%)
Index18h_Cont_2	5035144(100.00%)	1275493(25.33%)	569437(11.31%)	3190214(63.36%)
Index18h_Cont_3	6317910(100.00%)	2006362(31.76%)	746380(11.81%)	3565168(56.43%)
Index18h_DMBQ_1	6468440(100.00%)	2505878(38.74%)	844020(13.05%)	3118542(48.21%)
Index18h_DMBQ_2	7229600(100.00%)	2142652(29.64%)	910865(12.60%)	4176083(57.76%)
Index18h_DMBQ_3	13886869(100.00%)	5023034(36.17%)	5023034(36.17%)	7390844(53.22%)
Index18h_SyA_1	5189540(100.00%)	1516686(29.23%)	722265(13.92%)	2950589(56.86%)
Index18h_SyA_2	8916715(100.00%)	2294643(25.73%)	1180686(13.24%)	5441386(61.02%)
Index18h_SyA_3	14120168(100.00%)	5261318(37.26%)	1588837(11.25%)	7270013(51.49%)
Index24h_Cont_1	5208442(100.00%)	1024824(19.68%)	688233(13.21%)	3495385(67.11%)
Index24h_Cont_2	5754656(100.00%)	1296520(22.53%)	698471(12.14%)	3759665(65.33%)
Index24h_Cont_3	5362096(100.00%)	1860402(34.70%)	575790(10.74%)	2925904(54.57%)
Index24h_Cont_4	214762(100.00%)	1456339(27.93%)	695120(13.33%)	3063303(58.74%)
Index24h_Cont_5	4603953(100.00%)	1397427(30.35%)	525453(11.41%)	2681073(58.23%)
Index24h_DMBQ_1	8352520(100.00%)	2345864(28.09%)	1170161(14.01%)	4836495(57.90%)
Index24h_DMBQ_2	7651487(100.00%)	2286964(29.89%)	904193(11.82%)	4460330(58.29%)
Index24h_DMBQ_3	5926308(100.00%)	1918255(32.37%)	1140041(19.24%)	2868012(48.39%)
Index24h_DMBQ_4	10990690(100.00%)	3763957(34.25%)	1207208(10.98%)	6019525(54.77%)
Index24h_DMBQ_5	4926895(100.00%)	1607681(32.63%)	679329(13.79%)	2639885(53.58%)
Index24h_SyA_1	6202405(100.00%)	1711479(27.59%)	861355(13.89%)	3629571(58.52%)
Index24h_SyA_2	8814507(100.00%)	2354552(26.71%)	1120469(12.71%)	5339486(60.58%)
Index24h_SyA_3	13546118(100.00%)	4239197(31.29%)	1520098(11.22%)	7786823(57.48%)
Index24h_SyA_4	5914083(100.00%)	1911021(32.31%)	3105460(52.51%)	3105460(52.51%)
Index24h_SyA_5	4926895(100.00%)	1607681(32.63%)	679329(13.79%)	2639885(53.58%)

A



B

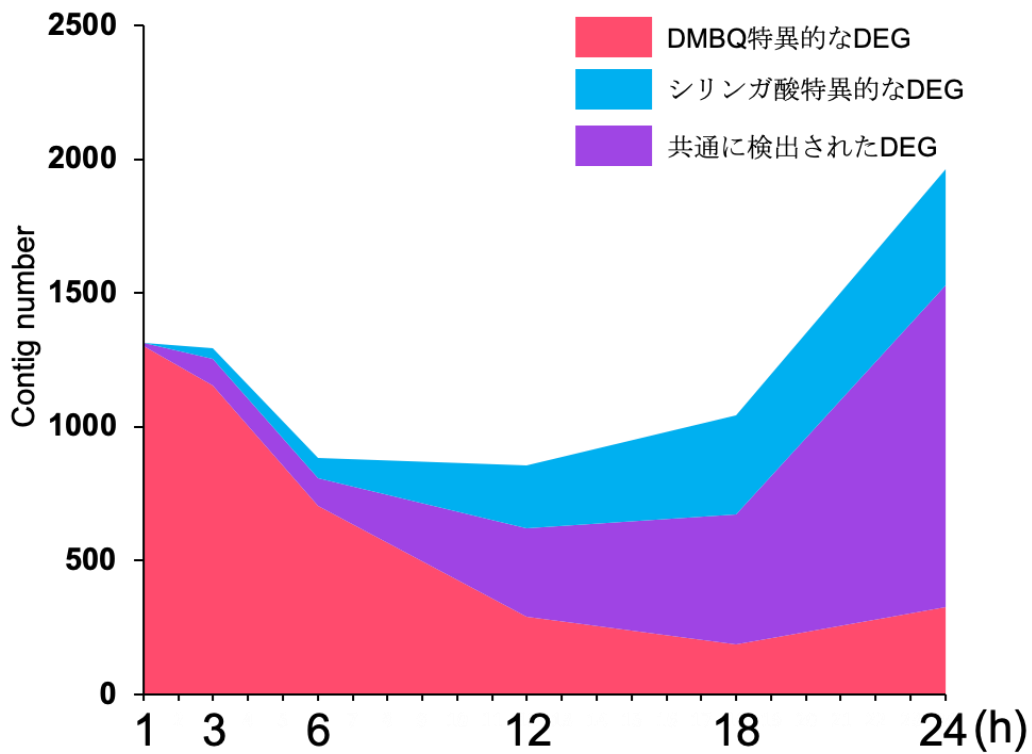


Fig. 2.15 検出されたDEGの比較

コントロールと比較してDMBQ、シリンガ酸(Syringic acid)およびその両方(Common)で発現量が上昇したコンティグ(DEG)の数を示す(A)。これら3つのDEGの数の変化を経時的に示した。赤色をDMBQ処理に特異的に見られたDEG、青色をシリンガ酸処理に特異的に見られたDEG、DMBQやシリンガ酸にともに見られるDEGを紫色で示した(B)。

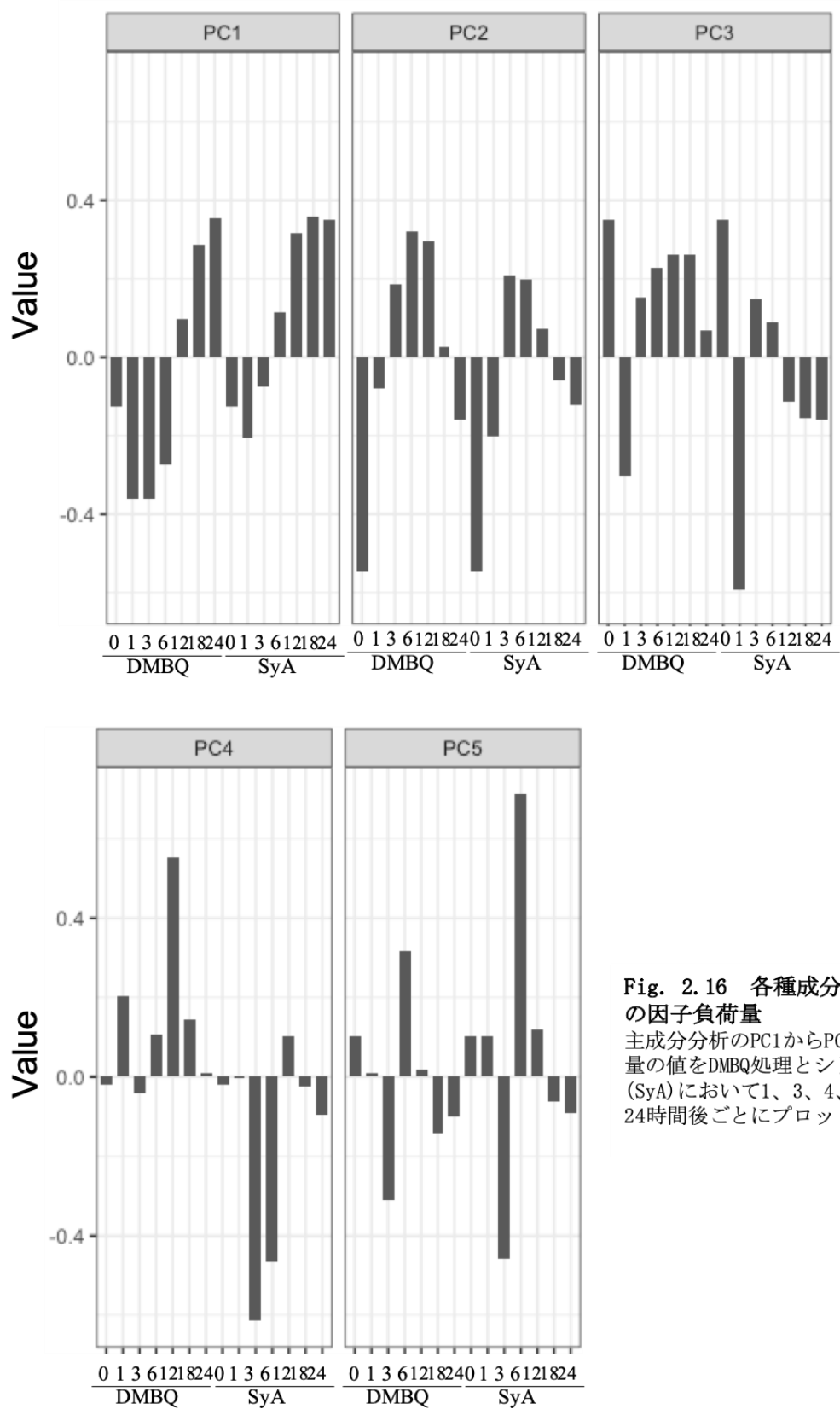


Fig. 2.16 各種成分のサンプルごとの因子負荷量
 主成分分析のPC1からPC5までの因子負荷量の値をDMBQ処理とシリル酸処理(SyA)において1、3、4、5、6、12、18、24時間後ごとにプロットした。n=3~5

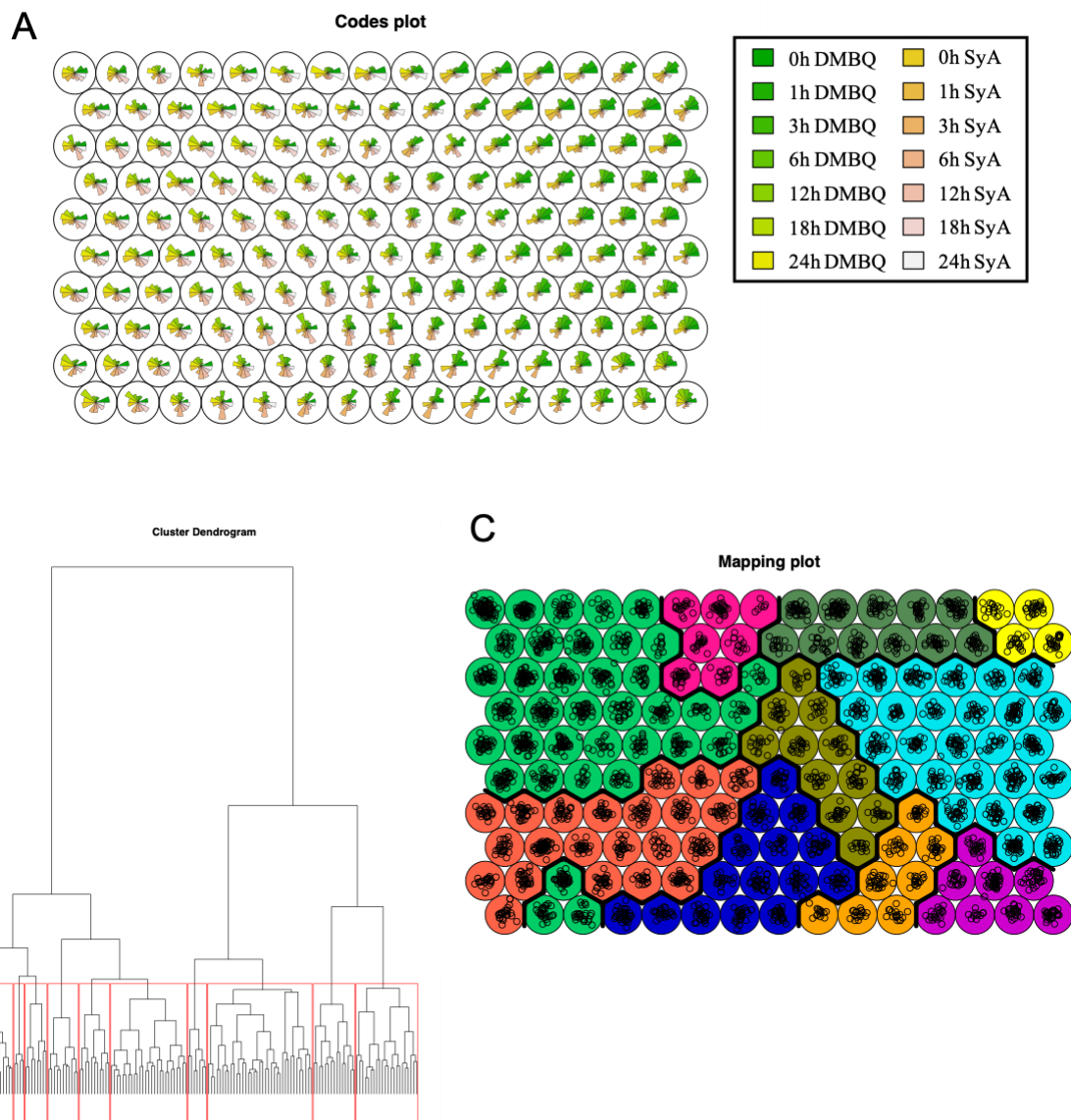


Fig. 2.17 抽出したDEGのSOMクラスター解析

得られたDEGのSOMクラスター解析を行った。得られたDEGを遺伝子パターンをもとに150個のグループに分けた(A)。分けた150グループの関係性をdendrogramとして表示した。これら150グループのdendrogramをもとに10グループに分けた(B)。SOMクラスターの結果を10クラスターに色分けした(C)。

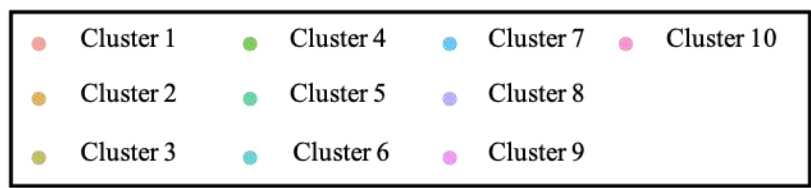
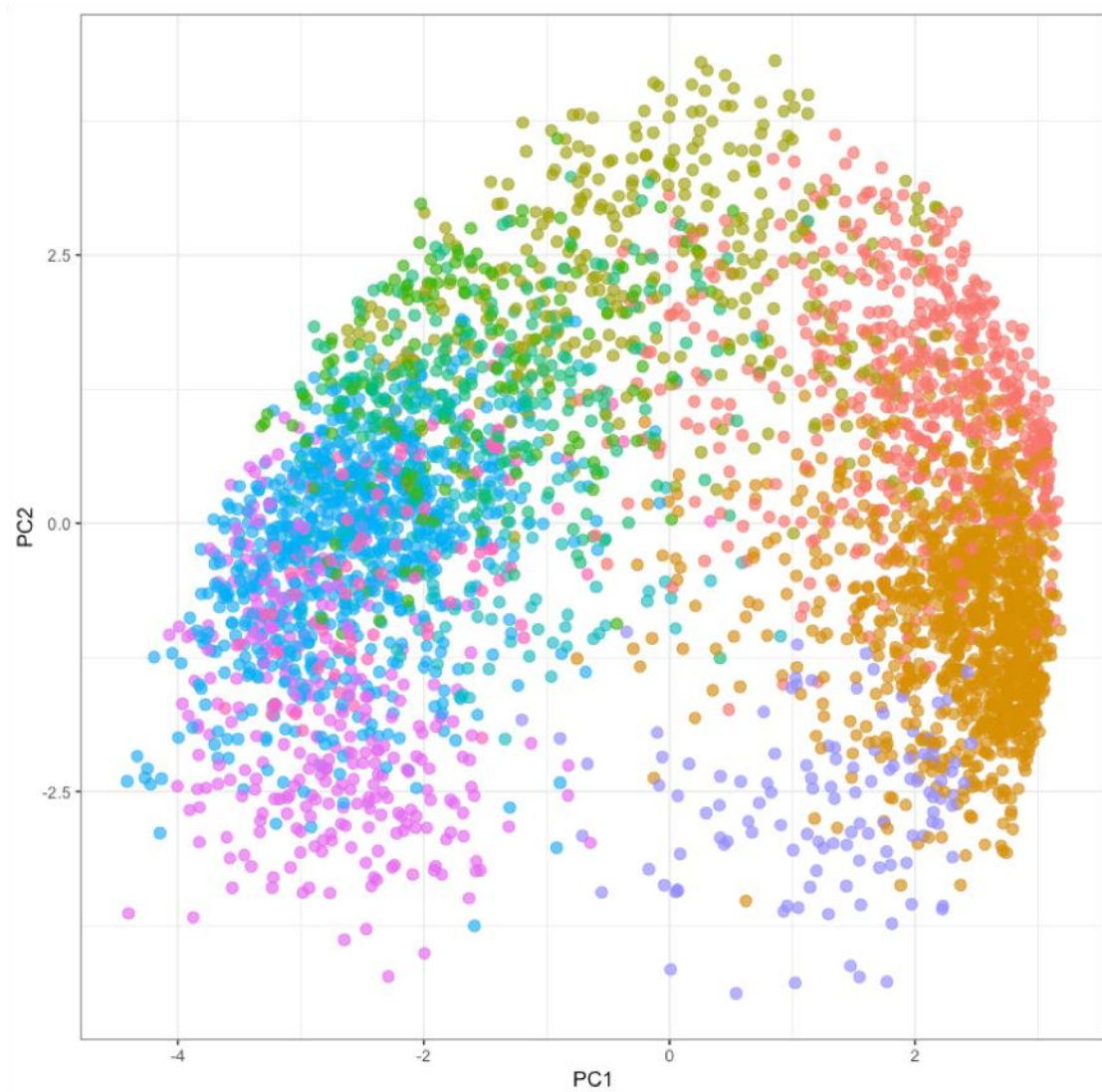
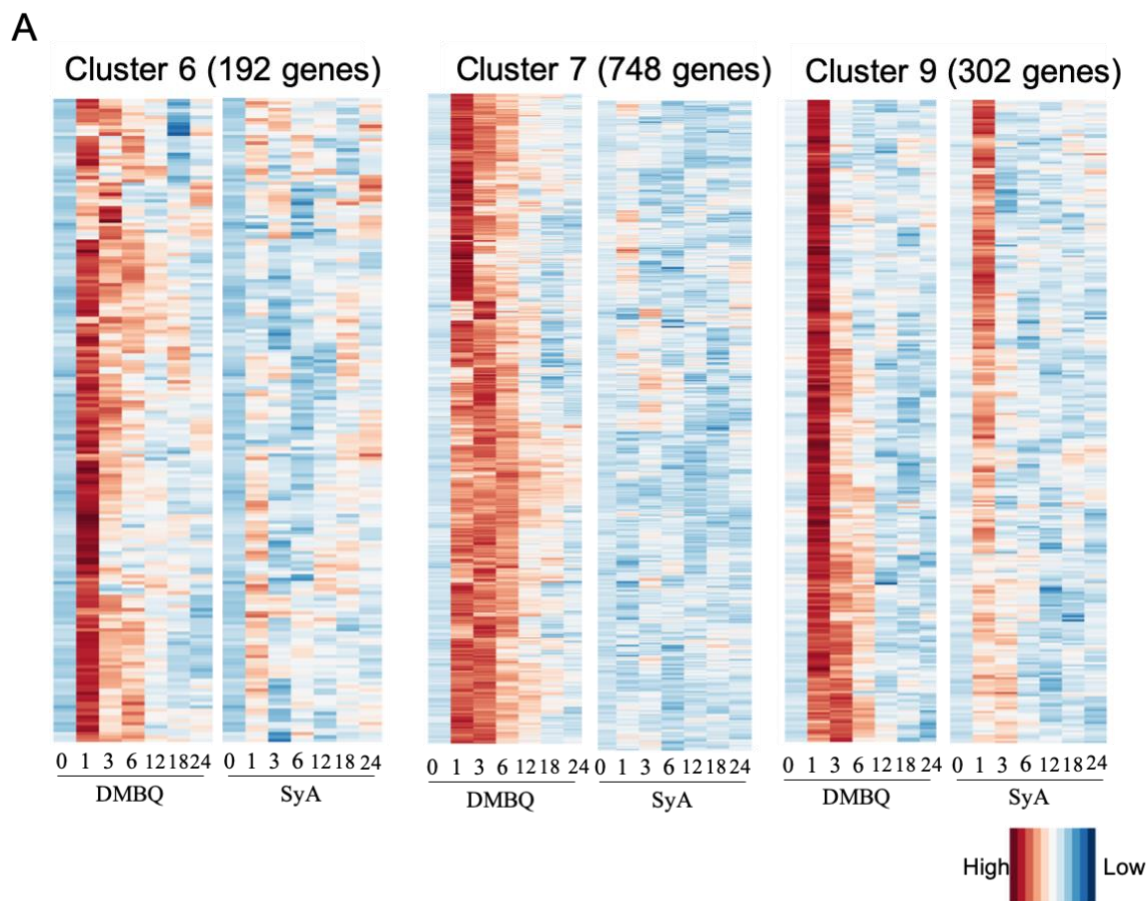


Fig. 2.18 クラスタリングされたDEGの主成分分析
 抽出されたDEGのPCA解析を行った。SOMクラスター解析により分けられた10クラスターごとに色付けを行った。



B

Cluster	GO term	Ontology	Description
Cluster 6	GO:00551	P	oxidation-reduction process
Cluster 7	GO:00510	F	chaperone binding
	GO:00510	F	unfolded protein binding
	GO:00166	F	oxidoreductase activity, acting on diphenols and related substances as donors, oxygen as acceptor
Cluster 9	-	-	-

Fig. 2.19 吸器誘導初期に発現するクラスターとGOターム
 吸器誘導初期に発現するクラスター(A)とそれらクラスターが有するGOターム
 (B)

A

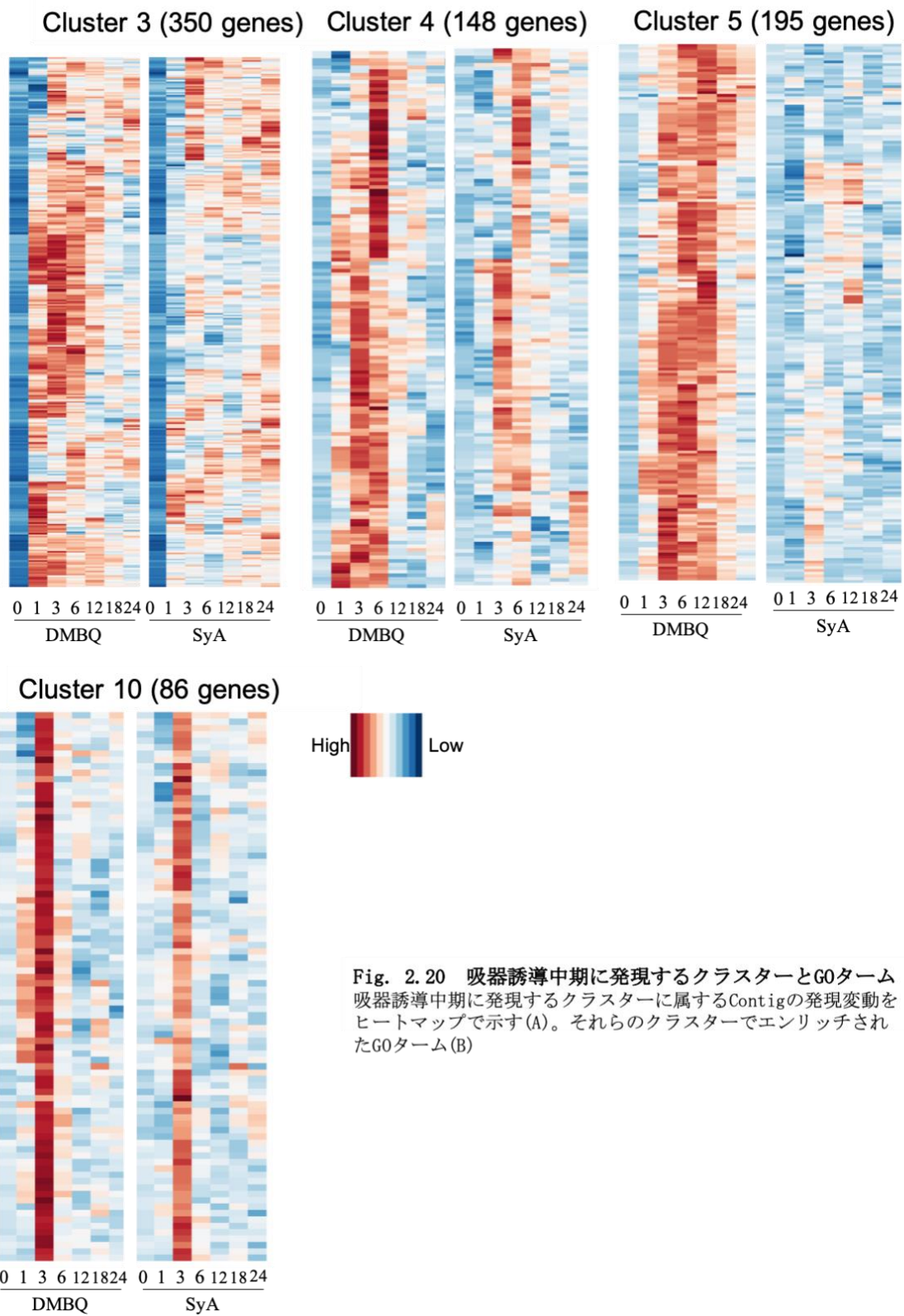


Fig. 2.20 吸器誘導中期に発現するクラスターとGOターム
 吸器誘導中期に発現するクラスターに属するContigの発現変動を
 ヒートマップで示す(A)。それらのクラスターでエンリッチされ
 たGOターム(B)

Fig. 2.20 B

Cluster	GO term	Ontology	Description
Cluster 3	GO:00001	P	phosphorelay signal transduction system
	GO:00355	P	intracellular signal transduction
	GO:00507	P	regulation of cellular process
	GO:00507	P	regulation of biological process
	GO:00167	F	transferase activity, transferring hexosyl groups
	GO:00435	F	sequence-specific DNA binding
	GO:00167	F	transferase activity, transferring glycosyl groups
Cluster 4	GO:00150	F	protein disulfide oxidoreductase activity
	GO:00150	F	disulfide oxidoreductase activity
	GO:00001	P	phosphorelay signal transduction system
Cluster 5	GO:00355	P	intracellular signal transduction
	GO:00164	F	oxidoreductase activity
	GO:00715	P	cell wall organization or biogenesis
	GO:00715	P	cell wall organization
	GO:00452	P	external encapsulating structure organization
	GO:00425	P	cell wall modification
	GO:00069	P	response to oxidative stress
	GO:00551	P	oxidation-reduction process
	GO:00045	F	hydrolase activity, hydrolyzing O-glycosyl compounds
	GO:00167	F	hydrolase activity, acting on glycosyl bonds
	GO:00305	F	pectinesterase activity
Cluster 10	GO:00046	F	peroxidase activity
	GO:00166	F	oxidoreductase activity, acting on peroxide as acceptor
	GO:00162	F	antioxidant activity
	GO:00987	F	molecular function regulator
	GO:00048	F	enzyme inhibitor activity
	GO:00526	F	carboxylic ester hydrolase activity
	GO:00044	F	hydroxymethylglutaryl-CoA reductase (NADPH) activity
	GO:00480	F	cofactor binding
	GO:00302	F	enzyme regulator activity
	GO:00164	F	oxidoreductase activity
	GO:00303	C	external encapsulating structure
GO:00056	C	cell wall	
GO:00719	C	cell periphery	

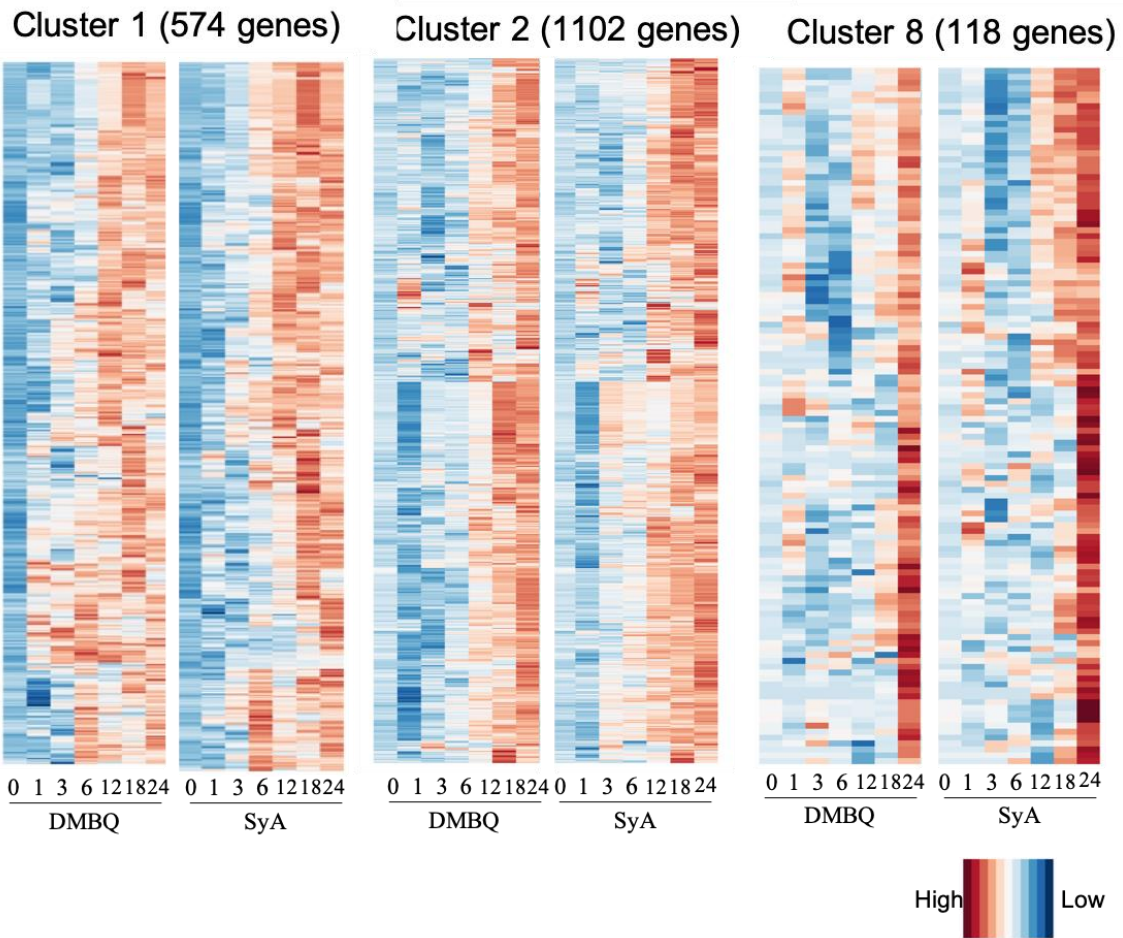


Fig. 2.21 吸器誘導後期に発現するクラスターとGOターム
 吸器誘導後期に発現するクラスターに属するContigの発現変動を
 ヒートマップで示す(A)。それらのクラスターでエンリッチされ
 たGOターム(B)

Fig. 2.21 B

Cluster	GO term	Ontology	Description	
Cluster 1	GO:00150	P	DNA integration	
	GO:00551	P	oxidation-reduction process	
	GO:00435	F	sequence-specific DNA binding	
	GO:00164	F	oxidoreductase activity	
	GO:00200	F	heme binding	
	GO:00469	F	tetrapyrrole binding	
	GO:00167	F	transferase activity, transferring hexosyl groups	
	GO:00046	F	peroxidase activity	
	Cluster 2	GO:00715	P	cell wall organization or biogenesis
		GO:00715	P	cell wall organization
		GO:00452	P	external encapsulating structure organization
GO:00425		P	cell wall modification	
GO:00069		P	response to oxidative stress	
GO:00551		P	oxidation-reduction process	
GO:00045		F	hydrolase activity, hydrolyzing O-glycosyl compounds	
GO:00167		F	hydrolase activity, acting on glycosyl bonds	
GO:00305		F	pectinesterase activity	
GO:00046		F	peroxidase activity	
GO:00166		F	oxidoreductase activity, acting on peroxide as acceptor	
GO:00162	F	antioxidant activity		
GO:00987	F	molecular function regulator		
GO:00048	F	enzyme inhibitor activity		
GO:00526	F	carboxylic ester hydrolase activity		
GO:00044	F	hydroxymethylglutaryl-CoA reductase (NADPH) activity		
GO:00480	F	cofactor binding		
GO:00302	F	enzyme regulator activity		
GO:00164	F	oxidoreductase activity		
GO:00303	C	external encapsulating structure		
GO:00056	C	cell wall		
GO:00719	C	cell periphery		
Cluster 8	-	-	-	

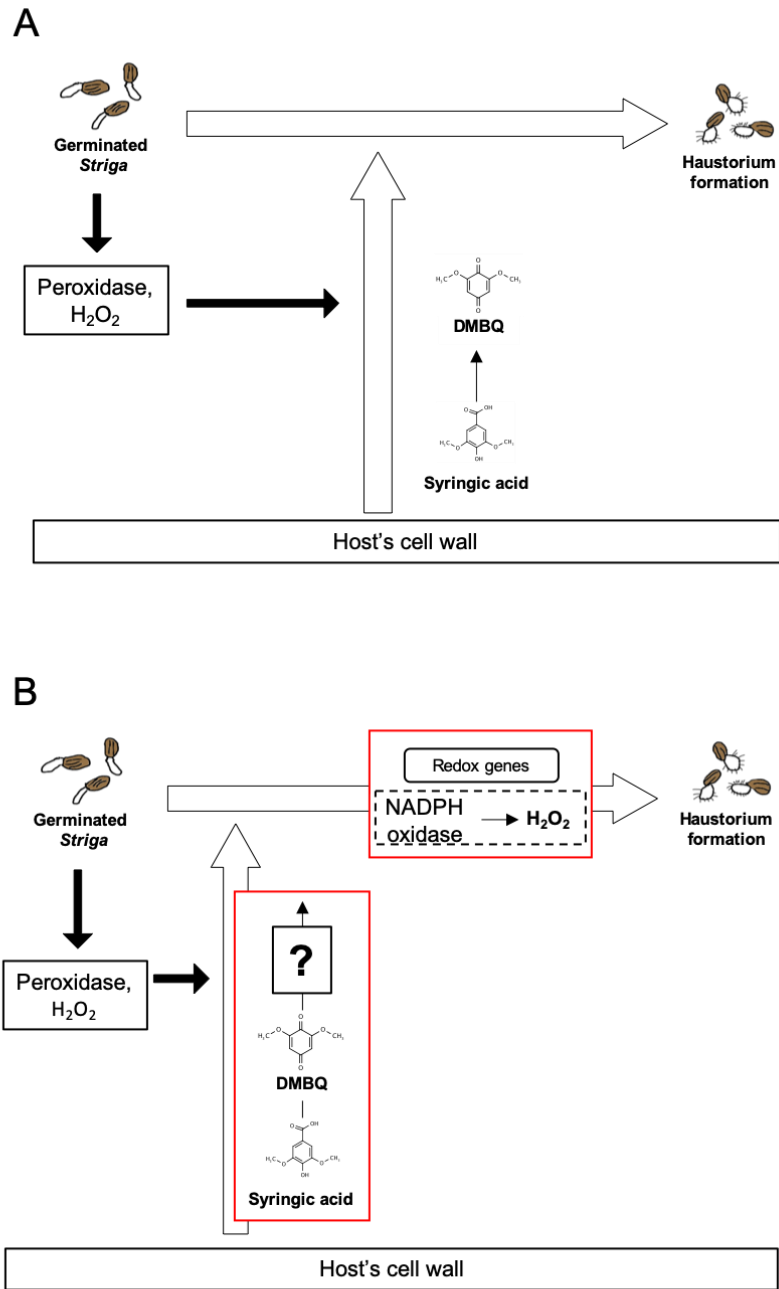


Fig. 2.22 本研究から得られたストライガの吸器誘導モデル

これまで考えられてきたストライガの吸器誘導モデル(A)。本研究によって、宿主由来のシリング酸からDMBQが産生される。さらにDMBQよりも吸器誘導活性へ変化される。さらに、ストライガのNADPHオキシダーゼやレドックスに関わる遺伝子が吸器形成に関与する。本研究で明らかになった部分を赤い四角で示した(B)。

第三章 ストライガの DMBQ 溶液培養により生成される未知吸器誘導物質の探索

3-1-0. 背景と目的

ハマウツボ科の寄生植物の吸器誘導物質として、DMBQ などのキノン類やシリンガ酸を含むフェノール類が知られている。DMBQ はリグニンポリマーの重合時に副産物として生成される他、宿主の植物細胞壁リグニンの構成成分であるシナピル酸や分解産物であるシリンガ酸などが酸化されることで産生される。実際に、試験管内でシリンガ酸とペルオキシダーゼを加えると DMBQ へ変換されることが報告されている(Kim et al., 1998)。しかし、ストライガなどの寄生植物によってシリンガ酸から DMBQ への変換が起こるとい報告はなされていない。第二章の研究では、カタラーゼの処理がシリンガ酸および DMBQ による吸器誘導をどちらも阻害し、さまざまな ROS や ROS 関連酵素の阻害剤の処理は、シリンガ酸と DMBQ の両者の効果を同様に阻害することを示した。この結果から、シリンガ酸と DMBQ の両者の下流で ROS シグナルが重要であると考えられたが、シリンガ酸が ROS やペルオキシダーゼによって DMBQ に変化することが吸器誘導にとって必須であるという証拠は得られなかった。さらに、DMBQ とペルオキシダーゼを同時にストライガに加えると吸器形成率が上昇したため(Wada et al., 2019)、DMBQ がさらに他の物質に変化する可能性が考えられた。第二章のトランスクリプトーム解析から、DMBQ 処理とシリンガ酸では吸器誘導後 3 時間までの遺伝子発現パターンが異なることが明らかになった。さらに、シロイヌナズナにおける DMBQ 応答を制御する受容体様キナーゼである CARD1 は、DMBQ 応答に必要であるが、シリンガ酸応答には関与しないことが報告されている(Laohavisit et al., 2020)。このことから、DMBQ とシリンガ酸は異なる化合物として受容される可能性が考えられる。さらに、シロイヌナズナの根の抽出液に含まれる DMBQ はごく微量な量しか検出されておらず(Wang et al., 2020)、宿主植物由来の吸器誘導物質の実体は未だ不明である。

そこで本章では、ストライガによってシリンガ酸が DMBQ に変化するかどうか確かめるために、HPLC や LC-MS/MS を用いて、溶液中の化合物の量的変化を調べた。興味深いことに、研究を進める過程において、DMBQ とストライガを培養すると、培養液中 DMBQ の量が著しく減少するが、吸器誘導活性が保持されていることが明らかになった。このことから、ストライガと DMBQ を培養した培養液には、DMBQ やシリンガ酸とは異なる性質を有する吸器誘導物質が存在する可能性を見出した。この得られた培養液の解析を通して、吸器誘導メカニズムの解明を目指した。

3-2-0. 材料と方法

3-2-1. 植物材料と植物の発芽処理

本章ではストライガ種子を用いた。ストライガの発芽処理は 1-2-1 章と同様に行った。

3-2-2. DMBQ およびシリंगा酸培養液サンプルの調整

ストリゴールによる発芽誘導 24 時間後、ストライガ種子が発芽していることを実体顕微鏡下で用いて観察した後、1 well あたりに 50 粒になるように、ピンセットを用いて 24 well プラスチックプレートに分注した。1 well あたり 1 ml の滅菌水と 10 ppm DMBQ(約 59 μ M)またはシリंगा酸(約 51 μ M)を加えサージカルテープを用いて封をし、暗所 25°C 条件下に置いた。24 時間後に実体顕微鏡を用いて吸器の有無を観察した。Well の液 500 μ l を 1.5 ml チューブに移し、10,000 rpm で 5 分間遠心し、上清を別の 1.5 ml チューブに移した。各サンプル 200 μ l に 500 ppm Naringenin を 10 μ l 加え内部標準とした。遠心エバポレーターで溶液を飛ばし、100 μ l メタノールを加え、ボルテックスで激しく混和した。沈殿物を除くため、遠心器で 15,000 rpm で 10 分遠心し上澄み液 90 μ l を新しい 1.5 ml チューブに分け、これを解析用のサンプルとした。これを以下に示す通り、HPLC 及び、LC-MS/MS で検出した。

3-2-3. HPLC-PDA および LC-MS/MS による解析

HPLC-PDA (High-performance liquid chromatography photodiode array)

10 ppm DMBQ および 10 ppm シリंगा酸を検量線用の標準液として用いた。各サンプル 10 μ l ずつ用いて以下の条件で検出した。HPLC-PDA 解析には Water2695 Separation Module と Waters2996 Photodiode Array Detector を用いた。分離カラムとして Agilent posroshell 120 C18 カラム(Agilent: 内径 3.0 mm、長さ 50 mm、粒子径 2.7 μ m) を用いた。流路 A として 0.1%ギ酸水、流路 B として 0.1%ギ酸を含むアセトニトリルを使用した。流速は 0.5 ml/min で一定に設定し、グラジエント条件は以下を用いた。検出は 200 nm から 550 nm までの範囲で解像度 1.2 nm でおこなった。

Table. 3.0.1 流速・グラジエント

時間 (分)	流速 (ml/min)	B%	曲線
-	0.5	2.0	6
2.00	0.5	2.0	6
9.50	0.5	39.0	6
9.51	0.5	98.0	6
12.50	0.5	98.0	6
12.51	0.5	2.0	6
16.00	0.5	2.0	6

LC-MS/MS (liquid chromatography-tandem mass spectrometry)

SRM (Select reaction monitoring)モードで DMBQ とシリング酸の検出の最適化を行った。DMBQ 及びシリング酸を 10 ppm の濃度で 50%アセトニトル+0.1%ギ酸に溶解した。DMBQ はポジティブイオンモード、シリング酸はポジティブ&ネガティブイオンモードでフラグメントイオンを検出した。DMBQ は $m/z = 169$ および 141、シリング酸は $m/z = 199$ および 140 で最適化した。各サンプル 5 μ l ずつを用いて検出した。

LC には AMR Paradigm MS4 を使い、Zorbax Eclipse XDB C18 カラム (Agilent, 長さ 50 mm) を使用した。流路 A に 0.1%ギ酸を使い、流路 B に 0.1%ギ酸を含むアセトニトリルを用いた。流速は 0.2 ml/min で以下のグラジエント条件で分離した。

Table. 3.0.2 グラジエント条件

min	B%
1.5	2
20	20
20.1	100
25	100
25.1	2
30	2

MS/MS 検出には、TSQ Vantage(Thermo)を使い、イオン源は HESI-II を用いた。イオン化条件および検出条件は以下の表の通りである。

Table. 3.0.3 イオン化条件

Spray Voltage	4800 V
Vaporizer Temp.	20 °C
Sheath Gas Press.	20 psi
Ion Sweep Gas Press.	0.5 psi
AUX Gas Press.	7 psi
Capillary Temp.	300 °C

Table. 3.0.4 MS/MS 検出条件

	Parent (<i>m/z</i>)	Center (<i>m/z</i>)	Width (<i>m/z</i>)	Time (sec)	CE (kV)	Q1 PW (<i>m/Z</i>)	Q3 PW (<i>m/z</i>)	S-Lens level
DMBQ	169	141.049	0.01	0.5	5	0.7	0.7	78
シリंगा酸	199	140.087	0.01	0.5	6	0.7	0.7	78

3-2-4. ストライガと DMBQ 培養液の作成

ストリゴールによる発芽誘導 24 時間後、24 well プレート 1 well あたり、発芽したストライガ約 80 粒と 10 ppm (約 59 μ M) DMBQ 1.5 ml を加え、24 時間 25°C で培養した。顕微鏡下で吸器形成の有無を確認し、培養液を 1,400 μ l を新しい 1.5 ml チューブに回収した。誤って混入したストライガなどの異物混入を防ぐために、孔が 0.45 μ m のメンブレンフィルター(ミニザルト、直径 26mm、膜材質: 酢酸セルロース、Sartorius)で濾過した。これを *Striga*-DMBQ 培養液と呼称する。プロテオーム解析には、*Striga*-DMBQ 培養液を濃縮しサンプルとした使用した。

3-2-5. 分液操作によるサンプルの分離

分液操作にはブタノールと酢酸エチルの 2 種類の有機溶媒を使用した。ブタノールは同量の滅菌水を加え、一日静置し、上層を水飽和ブタノールとして実験を行った。15 ml ファルコンチューブに *Striga*-DMBQ 培養液と同量の酢酸エチルを加え、ボルテックスなどで激しく混濁した後、2,000 rpm で 5 分遠心した。上層を酢酸エチル層、下層を水層として新しい 15 ml ファルコンチューブに移した。酢酸エチルの水層に水飽和ブタノールを同量加えボルテックスなどで激しく混濁した後、2,000 rpm で 5 分遠心し、上層をブタノール層、下層を水層とした。このように、酢酸エチル層、ブタノール層、水層を得た。また、酢酸エチルやブタノールのみでも分液を行なった。有機溶媒(酢酸エチルおよび水飽和ブタノール)と同等量の *Striga*-DMBQ 培養液を加えボルテックスで 10 分混濁した後、2,000 rpm で 5 分遠心した。上層を有機溶媒(酢酸エチルおよびブタノール)層として、下層を水層とした。回収したサンプルを遠心エバポレーター (TOMY) で乾燥させ、滅菌水 1 ml に溶かし、ストライガの吸器形成率を調べた。

3-2-6. 固相カラムによるサンプルの分離

固相カラム Strata-X (粒子径 33 μm 、充填量 60 mg、カラム容量 3 ml、島津ジーエルシー)を用い、サンプルの分離を行なった。メタノール 1 ml をカラムに加え、コンディショニングを行ったのち、滅菌水 1 ml を加え平衡化し、サンプルをロードした。溶出液として濃度の異なるメタノール(20%、40%、60%、80%、100%)500 μl を 2 回に分けて 1 ml ずつ溶出した。最後に 2%ギ酸を含んだメタノールを 500 μl を 2 回に分けて完全に溶出した。画分サンプルをエバポレーターで乾燥させ、滅菌水 1 ml に溶解した。得られた溶液に発芽したストライガを加え、吸器形成率を調べた。

3-2-7. タンパク質消化酵素処理試験

タンパク質消化酵素として、トリプシン(和光純薬)とキモトリプシン(ナカライテスク)を用いた。*Striga*-DMBQ 培養液にトリプシン (0.1 U/ μl と 0.01 U/ μl)、キモトリプシン (0.01 U/ μl と 0.001 U/ μl) を加え、37°C で 1 時間処理したのち、95°C で 1 時間処理し酵素を失活させた。コントロールとして DMBQ のみの溶液およびストライガを水で 24 時間培養した溶液を用意した。タンパク質消化酵素処理した溶液を発芽したストライガを加え吸器形成率を調べた。また、サンプルの煮沸処理は 95°C で 20 分間の条件で処理し、吸器形成率が低下するかどうかを調べた。

3-2-8. サイズ分画

限外ろ過フィルター(Amicon Ultra, Merck)を用いて *Striga*-DMBQ 培養液のサイズ分画を行なった。このフィルターは、カラムの下部に小さなポケットがあり、公称分画分子量(NMWL)よりも大きい分子量を持つ物質はフィルター内のポケットに残り、小さい物質はろ液とともに排出される。NMWL が 100 kDa、50 kDa、30 kDa、10 kDa、3 kDa のフィルターを用い、大きい NMWL サイズのフィルターのろ液を小さい NMWL サイズのフィルターにかけることを繰り返し、液中の物質サイズを分画した。サンプルとして *Striga*-DMBQ 培養液 8 ml をエバポレーターで乾燥させ、滅菌水 4 ml を加え、2 倍濃縮をしたものを用いた。各々のフィルターの溝に残った溶液と一番小さい 3 kDa フィルターのろ液をエバポレーターで乾燥させ、滅菌水 1 ml を加えた。これによって、質量数が 100 kDa 以上の分画、100~50 kDa の分画、50~30 kDa の分画、30~10 kDa の画分、10~3 kDa の画分と 3 kDa 以下の画分を得た。各々の画分を発芽したストライガに暴露し、吸器形成率を算出した。

3-2-9. *Striga*-DMBQ 培養液のフェノール抽出およびプロテオーム解析

用意した *Striga*-DMBQ 培養液 50 ml をエバポレーターを用いて約 20 ml にまで濃縮し、15,000 rpm で 10 分間遠心し沈殿物を除いた。50 ml ファルコンチューブに 1% エチルモルフォリン(NEM)水溶液 10 ml と *o*-クロロフェノール 20 ml を加え 5 分間激しく混和した。これを 1% NEM 飽和 *o*-クロロフェノールとし、アミル箔で遮光し使用するまで 4°C で保存した。濃縮した *Striga*-DMBQ 培養液約 20 ml に NEM を終濃度 1% になる様に加えた。1% NEM 飽和 *o*-クロロフェノール 10 ml 加え 1 分間激しく混和した。室温で 10,000 g で 20 分間遠心し、*o*-クロロフェノール層(下層)を新しいファルコンチューブに分注した。それぞれに共沈剤としてフィコールを終濃度 0.1% で加えた。さらに、約 5 倍量のアセトンを加え、-20°C で一晩静置したのち、10,000 g で 10 分間遠心し沈殿を回収した。沈殿はアセトンで 2 回洗浄した後に自然乾燥し、滅菌水 500 μ l にソニケーションによって融解した。13,000 rpm で 30 分間遠心し、不溶性の沈殿物を除いた上清を回収した。次に、限外ろ過フィルターを用いて連続的にサイズ分画を行なった。分子量が 3 kDa 以下の画分を回収し、エバポレーターによって乾燥させ、滅菌水 1 ml を加えた。DTT および IAA で還元アルキル化処理をし、夾雑物除去のために C18 sep-Pak で固相抽出をした。処理したサンプルを以下の条件で LC-MS に供与した。還元アルキル化処理と LC-MS 解析は奈良先端科学技術大学院大学の倉田技術員にご協力いただいた。

Table. 3.0.5 LC-MS の検出条件

trap column	L-column ODS 5 μ m 0.3 \times 5 mm PEEK (CERI)
nano column	L-column ODS 3 μ m 0.075 \times 150 mm PEEK (CERI)
flow rate	300 nL/min
gradient	5-35% ACN(0.1%FA) 74 min and 35-65% ACN(0.1%FA) 8 min
spray voltage	2.0 kV
capillary temp.	200°C
scan ranges	m/z 450-1500
collision energy	35 kV
exclusion time	30 sec

得られたデータを MASCOT によって解析した。

3-3-0. 結果

3-3-1. HPLC による DMBQ とシリング酸の検出

ストライガとの共培養によりシリング酸が DMBQ へと変化するのかどうかを確かめるために、HPLC を用いた検出を試みた。まず、HPLC における DMBQ とシリング酸の検出限界を調べるため、10 ppm (DMBQ 59.47 μ M, シリング酸 50.49 μ M)、1 ppm、0.1 ppm、0.01 ppm の標品を作成し、これを HPLC で解析した。DMBQ では、10 ppm、1 ppm とともに保持時間約 17 分の所にピークがあらわれた。しかし、0.1 ppm と 0.01 ppm ではピークは見られず、1 ppm が検出限界であることが分かった。シリング酸では、10 ppm、1 ppm のサンプルで約 20 分の所にピークが現れ、0.1 ppm では同じ所に小さいピークが現れた (Fig. 3.1)。次に、ピークが検出できた 10 ppm と 1 ppm の濃度の DMBQ とシリング酸にストライガを入れ 24 時間培養した溶液の HPLC 解析を行い、ピークが変化をするかどうかを調べた。コントロールとして、ストライガを加えずに 24 時間静置したサンプルを用いた。DMBQ とストライガを培養すると 10 ppm および 1 ppm の両濃度において、DMBQ のピークが検出できなくなった。10 ppm シリング酸にストライガを加えると、加えないものと比べてピークの高さが低くなり、ピーク面積は 30% 程度となった。1 ppm シリング酸とストライガを培養した場合には、シリング酸のピークは検出限界以下になった (Fig. 3.2)。DMBQ、シリング酸ともに、24 時間ストライガと培養することで、量が著しく減少することが明らかになった。また、シリング酸とストライガを共培養した液からは DMBQ に相当するピークを検出することができなかつたため、この実験系では、シリング酸が DMBQ に変化する様子を捉えることはできなかつた。

3-3-2. LC-MS/MS を用いた DMBQ およびシリング酸の検出

そこで、より高感度な LC-MS/MS 解析を用いて検出を試みた。まず、DMBQ およびシリング酸の標品を MS/MS 解析した。そのフラグメンテーションパターンから、DMBQ は $m/z = 169$ のプリカーサーイオンに対し、 $m/z = 141$ のフラグメントイオンを、シリング酸は $m/z = 199$ のプリカーサーイオンに対し、 $m/z = 140$ のフラグメントイオンを検出する設定で SRM モードを用いて解析し MS クロマトグラムを得た (Fig. 3.3)。その結果、DMBQ に相当すると考えられるピークが保持時間約 9 分の所に、シリング酸に相当するピークが保持時間約 11 分のところに検出された (Fig. 3.4 3.5)。次に、DMBQ およびシリング酸 10 ppm、1 ppm 濃度の溶液中でストライガを 24 時間培養し、DMBQ、シリング酸のピークの増減を確かめた。その結果、シリング酸溶液に含まれるシリング酸のピークは、ストライガを培養することによってピーク高が約半分に低くなった。DMBQ 溶液ではシリング酸のピークはストライガ有無にかかわらず、検出することはできなかつた (Fig. 3.4)。一方、シリング酸溶液中

で DMBQ を検出するとストライガの有無に関わらず DMBQ のピークが検出された (Fig. 3.5)。シリング酸は水に溶解すると微量ではあるが酸化され、DMBQ へ変換されると考えられる (Fig. 3.5)。興味深いことに、DMBQ 溶液でストライガを培養すると、培養液中の DMBQ のピークを検出することはできなくなった (Fig. 3.5)。これにより、DMBQ がストライガによって、吸収されたもしくは別の化合物へ代謝されたことが考えられた。この培養液を今後、*Striga*-DMBQ 培養液と呼称する。

3-3-3. LC-MS/MS を用いた DMBQ の検出限界と吸器誘導活性

LC-MS/MS における DMBQ の検出限界と吸器誘導活性の限界を調べた。その結果、DMBQ の検出限界は $0.1 \mu\text{M}$ であることがわかった (Fig. 3.6)。次に、DMBQ の濃度依存的な吸器誘導活性を調べた。その結果、 $0.5 \mu\text{M}$ 以上では、100%に近い吸器形成率を示し、 $0.1 \mu\text{M}$ では吸器形成率は約 50%を示した (Fig. 3.6 A)。このことから、LC-MS/MS で検出できない $0.1 \mu\text{M}$ 以下の DMBQ では、約 50%以下の吸器形成率を示すと考えられた (Fig. 3.8 A)。次に、上記実験で DMBQ が検出限界以下にまで減少したことが判明した *Striga*-DMBQ 培養液が、吸器誘導活性を有しているのかを調べた。その結果、*Striga*-DMBQ 培養液はほぼ 100%の吸器形成率を示した (Fig. 3.7)。*Striga*-DMBQ 培養液には $0.1 \mu\text{M}$ 以下の DMBQ しか含まれないにも関わらず、ほぼ 100%の吸器形成率を示すことから、*Striga*-DMBQ 培養液には DMBQ とは異なる未知の吸器誘導物質が含まれていることが考えられた。または、*Striga*-DMBQ 培養液には DMBQ の吸器誘導能を上昇させるエンハンサーのような物質も含まれる可能性も考えられた。

次に、*Striga*-DMBQ 培養液に含まれる未知の吸器誘導活性が DMBQ の濃度に依存するのかを調べた。様々な濃度の DMBQ 溶液でストライガを 1 日培養し、その培養液の吸器形成率を調べた。その結果、培養開始前の DMBQ の濃度が下がるにつれて、*Striga*-DMBQ 培養液の吸器形成率は減少することがわかった (Fig. 3.8 B)。これらの *Striga*-DMBQ 培養液では HPLC で DMBQ は検出されておらず、この吸器誘導活性は未知の吸器誘導物質由来であると考えられる。このことから、*Striga*-DMBQ 培養液に含まれる未知の吸器誘導物質の活性は培養開始前の DMBQ の濃度に依存して産生されると考えられる。

3-3-4. ストライガ培養による培養液中の DMBQ とシリング酸量の継時的な変動

未知の吸器誘導活性がいつ生じるのかを調べるため、ストライガの培養による培地中のシリング酸や DMBQ の量の変化と培養液の有する吸器誘導活性の継時的な変化を解析した。培養開始から 1、3、6、12、18 および 24 時間後の培養液を回収し、HPLC を用いて DMBQ およびシリング酸の量をそれぞれ定量した。シリング酸の培養液では、シリング酸量はストライガ培養によって 24 時間かけて徐々に減少した

が、24 時間後においても約 16 μM のシリング酸が含まれていた(Fig. 3.9 A)。この溶液における吸器形成率はストライガの有無に関わらず全ての時間において 100%を示した (Fig. 9 B)。残存しているシリング酸の量から、これらの吸器形成はシリング酸によって誘導されたと考えられる。一方、DMBQ 溶液中でストライガを培養した場合には、培養液に含まれる DMBQ の量は、培養開始 1 時間後に半分にまで、12 時間以降には検出限界以下にまで減少した (Fig. 3.10 A)。この培養液における吸器形成率はどの時間でも 100 %の活性を保っていた (Fig. 3.10 B)。また、ストライガを入れていない DMBQ 溶液では DMBQ の量はほとんど減少していないにも関わらず、吸器形成率は 24 時間後に 60%に減少することがわかった。すなわち、含まれる DMBQ の量と吸器誘導活性には相関が見られなかった。これらの結果から、DMBQ は培養後 12 時間以内にストライガによって吸収または代謝されており、未知の吸器誘導物質が産生していると考えられた。

3-3-5. 吸器形成後のストライガに含まれる DMBQ の量

培養液中の DMBQ が著しく減少することから、ストライガに吸収されている可能性が考えられた。そこで、ストライガが吸器誘導によって DMBQ を吸収し、植物体内に蓄積しているのかを調べた。その方法として、59.4 nmol DMBQ で吸器を誘導し、培養 24 時間後のストライガ植物体を回収した。回収した植物体を液体窒素下で粉碎し、その粉末を滅菌水、60% メタノールや 100% メタノールに溶出し、HPLC を用いて DMBQ の定量化を行った。その結果、滅菌水で抽出した溶液に 0.9 nmol の DMBQ が検出されたが、他の抽出方法では検出することができなかった (Fig. 3.11)。植物体内にほとんど DMBQ が検出されなかったことから、ストライガは培養液中の DMBQ を他の物質に変換または分解している可能性が考えられる。もしくは、植物体が DMBQ を吸収したのちに、体内で別の化合物へと代謝されている可能性がある。

3-3-6-0. 未知の吸器誘導物質の物性解析

3-3-6-1. 分液操作

Striga-DMBQ 培養液内に生じた未知の吸器誘導物質の性質を解明するために、固相カラムや分液を用いて *Striga*-DMBQ 培養液の性質の解析を行った。まず、*Striga*-DMBQ 培養液と DMBQ 溶液を固相カラムによって分画し、吸器誘導活性を持つ画分を調べた。実験に用いた固相カラムは、芳香環を有する化合物を吸着することができる逆相カラムを用いた。DMBQ 溶液をカラムに通しメタノールの希釈系列を用いて溶出し、HPLC を用いて定量化すると、60%メタノール溶出画分にのみ DMBQ が溶出することが分かった (Fig. 3.12 A)。次に、*Striga*-DMBQ 培養液を固相カラムに

通してメタノールで溶出してフラクションを回収し、各フラクションの吸器形成率を調べた。結果として、60%メタノールのフラクションにのみ、吸器誘導活性を確認することができた (Fig. 3.12 B)。これらの結果から、固相カラムでは未知の吸器誘導物質は DMBQ と同じ 60%メタノール画分に溶出されることが分かった。

次に、分液操作により *Striga*-DMBQ 培養液の分画を行った。酢酸エチルと水飽和ブタノールを用いて分液を行い、酢酸エチル層、ブタノール層とブタノール水層の3つの画分を得た (Fig. 3.13 A)。DMBQ 溶液を分液し HPLC で測定した結果、DMBQ は酢酸エチル層に多く分離された (Fig. 3.13 B)。次に、*Striga*-DMBQ 培養液を分液した画分の吸器誘導活性を調べた。その結果、酢酸エチル層、ブタノール層、ブタノール水層全てに、吸器誘導活性が認められたが、ブタノール水層の画分が、他2つのフラクションと比べ高い吸器形成率を示した (Fig. 3.13 C)。また、DMBQ のみの溶液を分液したところ、全ての画分において 100%の吸器形成率を示した (Fig. 3.13 D)。これは、今回実験用いた DMBQ 濃度が高く、分液後においても各々の画分に含まれる DMBQ 濃度が一定以上残っていたため、吸器形成率が 100%を示したと考えられる。また、この方法では、吸器誘導活性が著しく減少してしまったため、それぞれの有機溶媒を使って別々に分液を試みた。まず、DMBQ と *Striga*-DMBQ 培養液を酢酸エチルのみで分液した。DMBQ の多くは酢酸エチル層に分配されたが、*Striga*-DMBQ 培養液では、酢酸エチル層では 0%の吸器形成率を示し、酢酸エチル水層では 40%の吸器形成率を示した (Fig. 3.13 D)。さらに、水飽和ブタノールのみで分液を行なった。DMBQ はブタノール層に多く検出されたが、*Striga*-DMBQ 培養液を分液するとブタノール層では 10%の吸器形成率を示し、水層では 20%の吸器形成率を示した (Fig. 3.13 E)。これらの結果から、未知の吸器誘導活性は水層に分離することが示され、未知の吸器誘導物質は DMBQ よりも極性が高い分子であると考えられた。

3-3-6-2. タンパク質消化処理およびサイズ分画

極性の高い化合物としては、糖や核酸、タンパク質などが考えられる。そこで、*Striga*-DMBQ 培養液がタンパク質またはペプチドである可能性を調べるためにタンパク質消化酵素処理や煮沸処理による吸器誘導活性への影響を調べた。煮沸処理を行なった *Striga*-DMBQ 培養液および DMBQ 溶液では、吸器形成率は共に減少しなかった (Fig. 3.14 A)。しかし、プロテアーゼ K 処理により *Striga*-DMBQ 培養液における吸器形成率は約 60%までに減少した (Fig. 3.14 A)。次に、トリプシンやキモトリプシンによるタンパク質消化処理を行なった。0.01 U/ μ l、0.001 U/ μ l のキモトリプシン処理により、それぞれ 18.5%、5.7%に吸器形成率が減少した。0.1 U/ μ l、0.01 U/ μ l のトリプシン処理でも、各々 25.8%、3.5%に吸器形成率が減少した。コントロールの DMBQ 溶液では、これらタンパク質消化酵素による吸器形成率の減少は認められ

なかった (Fig. 3.14 B)。これらの結果から、未知の吸器誘導物質はタンパク質またはペプチドであると考えられる。

未知の吸器誘導物質のサイズを調べるため、限外濾過フィルターを用いたサイズ分画を行なった。複数の限外濾過フィルターを用いてサイズの異なる画分を得、それぞれ吸器形成率を求めた。*Striga*-DMBQ 培養液では、3 kDa 以下の画分にはほぼ 100%の吸器形成率を示した。しかし、それ以外の画分では吸器形成率は 0%を示した (Fig. 3.15)。DMBQ 溶液の場合でも、同様の結果を得た。これらの結果から、未知の吸器誘導物質は 3 kDa 以下のペプチドであると考えられる。

3-3-6-3. 未知の吸器誘導物質が有する活性の持続性

これまでの結果から、ストライガを DMBQ 溶液中で培養すると、ペプチド性の未知の吸器誘導物質が産生すると考えられた。この未知の吸器誘導物質はストライガの寄生においてどのような役割があるのであろうか。ストライガの実生近傍の DMBQ は、ストライガによって吸収もしくは代謝されることで速やかに減少するため、DMBQ の吸器誘導活性は短時間失われると考えられる。しかし、この未知の吸器誘導物質が産生することにより、より長い時間吸器誘導活性が保たれる可能性がある。この仮説を検証するために、*Striga*-DMBQ 培養液の吸器誘導活性がストライガと培養することにより減少するのかを調べた。まず、*Striga*-DMBQ 培養液中で、新たに発芽したストライガを培養し、その培養液を回収した。さらにその培養液で新たなストライガ実生を培養し、培養液を回収し、それぞれの吸器誘導活性を調べた。DMBQ とストライガを 24 時間培養した培養液を SD Media (*Striga*-DMBQ 培養液と同等のもの)、SD Media とストライガを 24 時間後培養した培養液を SD2 Media、さらに SD2 Media とストライガを培養し 24 時間後の培養液を回収したものを SD3 Media とした。コントロールとしてストライガを滅菌水で培養した培養液を SW Media、SW Media でストライガを培養した培養液を SW2 Media、SW2 Media でストライガを培養した培養液を SW3 Media とし、各々の吸器形成率を調べた (Fig. 3.16 A)。その結果、SD Media、SD2 Media、SD3 Media は 10 μ M DMBQ と同等の吸器形成率を示した。これは、*Striga*-DMBQ 培養液で生じる未知の吸器誘導物質の活性はストライガの培養によって減少しないことを示している (Fig. 3.16 B)。すなわち、未知の吸器誘導物質は DMBQ よりも安定的であるか、または、ストライガとの培養によって新たに生産される可能性が考えられる。興味深いことに、コントロールである SW Media では、継代される度に吸器形成率が上昇し、SW3 Media 約 20%の吸器形成率を示した (Fig. 3.16 B)。これは、培養を継代する操作中にストライガの細胞壁成分が溶出した可能性が考えられる。これらから、未知の吸器誘導物質は DMBQ よりも安定した吸器誘導能を持つ吸器誘導物質であると考えられる。

3-3-7. プロテオーム解析

Striga-DMBQ 培養液にはペプチド性の吸器誘導物質が存在することが示唆されたため、プロテオーム解析による分泌ペプチドの同定を試みた。*Striga*-DMBQ 培養液とコントロールとしてストライガと滅菌水の培養液から、*o*-クロロフェノールを用いてタンパク質画分を抽出し、限外濾過カラムにより 3 kDa 以下のペプチドを単離し、LC-MS/MS 解析を行った。再現性を取るために 3 回実験を行った。ペプチド配列の同定は、前章のトランスクリプトーム解析の際に作成したアSEMBルデータを用いて Mascot によるサーチを行なった。Mascot データから総合スコアが 25 以上のペプチドを候補ペプチドとし、3 回分のデータを抽出した。*Striga*-DMBQ 培養液では 54 配列のペプチドが、コントロールでは 130 配列のペプチドが検出された (Fig. 3.17)。検出された *Striga*-DMBQ 培養液のペプチド配列に対応する核酸配列 (Contig 配列) を blast x サーチにかけ、既知配列との比較により予想されるタンパク質配列と Mascot で検出されたペプチドのフレームが一致しているものを抽出した。吸器誘導物質をコードするペプチドは、*Striga*-DMBQ 培養液にのみ検出され、前章のトランスクリプトーム解析において mock に比べて有意に発現上昇しており、且つ、フレームシフトは起こしていないものである可能性が高いと考え、この基準に基づいて得られたペプチド配列を解析した。コントロールで検出されず、*Striga*-DMBQ 培養液に特異的なペプチド配列は 47 配列検出された。この中から、トランスクリプトーム解析で DEG として検出された配列は 11 配列、フレームシフトを起こしていない配列は 8 配列あり、二つの条件の両方に当てはまる配列は 4 配列であった (Fig. 3.17)。この 4 配列から、Contig 配列上に Mascot でヒットしたペプチド配列に対応する核酸配列内に開始コドンが存在するのかを調べた。その結果、クラスター 2 に属する TRINITY_DN19359_c0_g2_i19 (IACS DNSPCK) と TRINITY_DN5744_c0_g1_i4 (AACHEEPE) とクラスター 6 に属する TRINITY_DN98283_c0_g1_i5 (TMPPNPSPSTI) がペプチドの上流に開始コドンを確認することができた (Table. 3.1)。TRINITY_DN28227_c0_g1_i6 (PDARGQPGGP) はヒットしたペプチド配列の上流に開始コドンが見つからなかった。これは上流の開始コドンまでシーケンシングができていなかったためと考えられる。TRINITY_DN19359_c0_g2_i19 は polygalacturonase、TRINITY_DN5744_c0_g1_i4 は uncharacterized protein、TRINITY_DN98283_c0_g1_i5 は retrovirus-related Pol polyprotein のアミノ酸配列と相同性があるペプチドであることがわかった (Table 3.1)。TRINITY_DN98283_c0_g1_i5 に関しては、2 回の解析について確認することができた。次に、これら 3 配列の発現パターンを調べた。TRINITY_DN19359_c0_g2_i19 は、吸器誘導後常に発現量が上昇するパターンをとった。TRINITY_DN5744_c0_g1_i4 はコントロールとほぼ同じパターンを持っていた。TRINITY_DN98283_c0_g1_i5 は DMBQ 処理による吸器誘導後 6 時間後まで上昇しその後、減少した (Fig. 3.18)。

未知の吸器誘導物質は活性が培養液で検出されることから、分泌ペプチドである可能性が高いと考えられる。*Striga-DMBQ* 培養液から検出された候補ペプチドを含む前駆体タンパク質が分泌シグナルを持っているのかを SignalP-5.0 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP-5.0/>)を用いて調べた。その結果、TRINITY_DN19359_c0_g2_i19 のみ、sec/SPI が 0.9927 を示し、このタンパク質は 23 番目と 24 番目に切断されるシグナルペプチドを有する可能性が高いことがわかった (Fig. 3.19)。この候補ペプチドは polygalacturonase 配列の C 末端側に位置していた (Fig. 3.20)。

3-4-0. 考察

3-4-1. 未知の吸器誘導物質の存在意義

本章では、ストライガによるシリング酸や DMBQ の量的な変化を調べた結果、ストライガを DMBQ と 24 時間培養した *Striga*-DMBQ 培養液では、DMBQ の濃度が検出限界以下であるにも関わらず、ほぼ 100% の吸器形成率を示すことを明らかにした。このことから、*Striga*-DMBQ 培養液には DMBQ とは異なる吸器誘導物質が含まれると考えられた。さらに、分液やタンパク質消化酵素消化の実験により、未知の吸器誘導物質は 3 kD 以下のペプチドである可能性が高いことが分かった。この未知の吸器誘導物質は約 30 残基以下のアミノ酸残基を持つ短いペプチドであると予測される。ペプチド様の吸器誘導物質の吸器誘導活性はストライガとの培養により安定的に保持されることも明らかになった。これは、あるストライガ集団の全てのストライガが吸器誘導物質を認識する必要がなく、ごく一部のストライガが吸器誘導物質を認識することで、集団全体で吸器誘導が起こりうるということが考えられる。植物に関連するペプチドとしては、細胞間の情報伝達を担う CLE (CLAVATA3/EMBRYO SURROUNDING REGION-related) ペプチドファミリーのようなペプチド (Meng et al., 2010) や、防御機能を活性化させる長距離シグナルとして機能するシステミン (Ryan and Pearce, 2003) など数多く報告されている。このシステミンはホルモンペプチドとして知られ、200 残基からなる前駆体を持ち、プロセッシングを受けることで生じる 18 残基のペプチドホルモンである (Ryan, 2000)。植物におけるペプチドシグナルは、このように前駆体ペプチドからプロセッシングによって切り出されることで作用することが知られている。ペプチド様の吸器誘導物質もプロセッシングをうけることで、吸器誘導されていないストライガへの長距離シグナルとして機能する可能性も考えられる。この様なペプチド様の吸器誘導物質があることで、一度により多くのストライガが宿主に寄生し子孫を残しやすいと考えられ、ストライガの生存戦略に貢献している可能性が考えられる (Fig. 3.21)。

3-4-2. 未知の吸器誘導物質の同定

プロテオーム解析により、*Striga*-DMBQ 培養液に含まれるペプチド様の吸器誘導物質の同定を試みた。ストライガからは吸器誘導に関わらず、多数のペプチドを放出していることが分かった。コントロールと比べて特異的なペプチドは 54 個あったが、多くはコンティグがコードすると予想されるタンパク質とは異なるフレームで翻訳されたペプチド配列であった。その中で、フレームが一致し吸器誘導時に遺伝子発現が上昇することが確認された候補ペプチドが 3 配列あり、そのうち Polygalacturonase のみ細胞外に分泌される可能性が高いことが分かり、有力な候補ペプチドであると考えられた。この Polygalacturonase はペクチンを切断するペクチナ

ーゼの一種である(Osteryoung et al., 1990)。トランスクリプトーム解析から、Polygalacturonase が属するクラスターには cell wall のエンリッチメントが確認されている。このタンパク質は宿主の植物壁に含まれるペクチンを分解すると考えられる。Polygalacturonase は細胞壁に含まれるペクチンを分解し、その構造を脆くさせることで、宿主に進入しやすく働きをすると推測される。この Polygalacturonase の候補ペプチドを人工合成し、発芽したストライガに暴露し、吸器誘導能の有無を調べたが、吸器誘導を確認することはできなかった。吸器誘導能を有するペプチドは今回のプロテオーム解析で検出されなかった可能性が考えられる。また、同様に他のペプチド候補も人工合成し、吸器誘導活性の確認を行うべきだと考えられる。さらに、今回用いた方法とは別に、HPLC を用いて濃縮した *Striga*-DMBQ 培養液の分画操作などの別の方法も模索すべきだと考えられる。

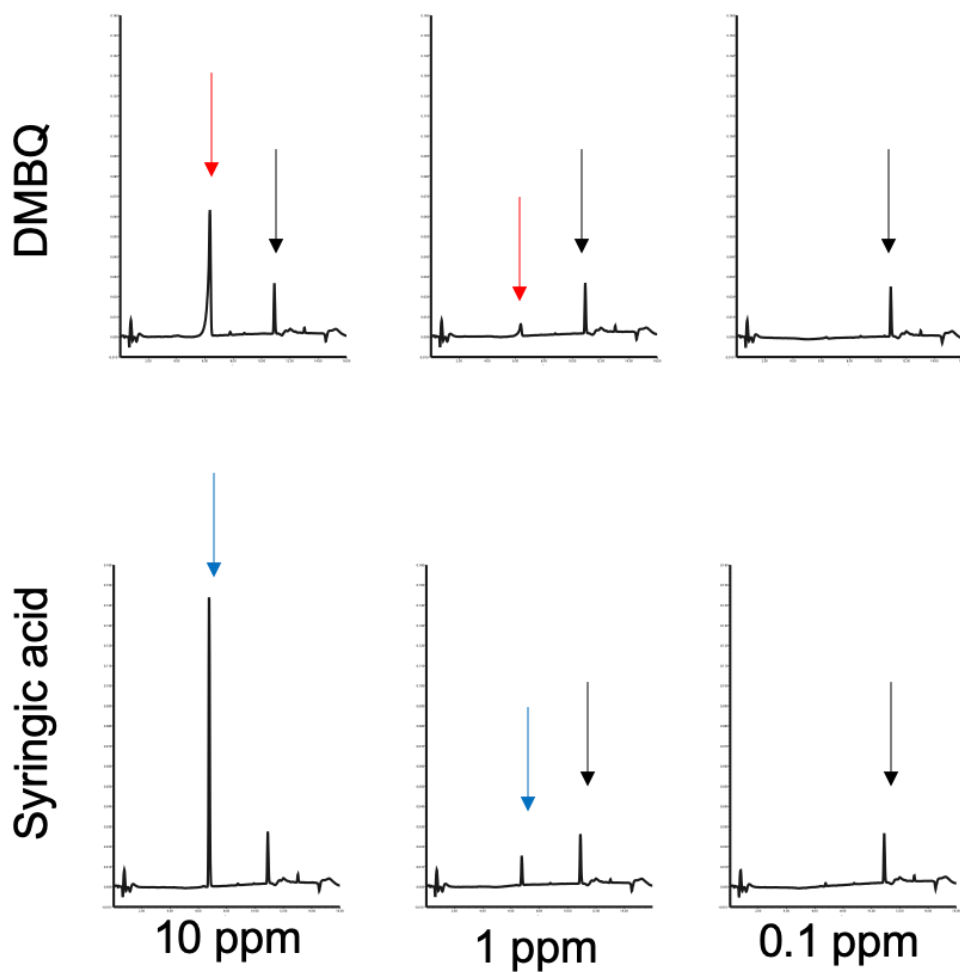


Fig. 3.1 HPLCによるDMBQ及びシリンガ酸の検出

HPLCを用いてDMBQとシリンガ酸の検出限界を調べた。上段がDMBQ、下段がシリンガ酸である。左から10 ppm、1 ppm、0.1 ppmのクロマトグラムを示す。黒色の矢印は内部標準としてのナリンゲニンを、赤い矢印はDMBQを、青い矢印はシリンガ酸のピークを示す。

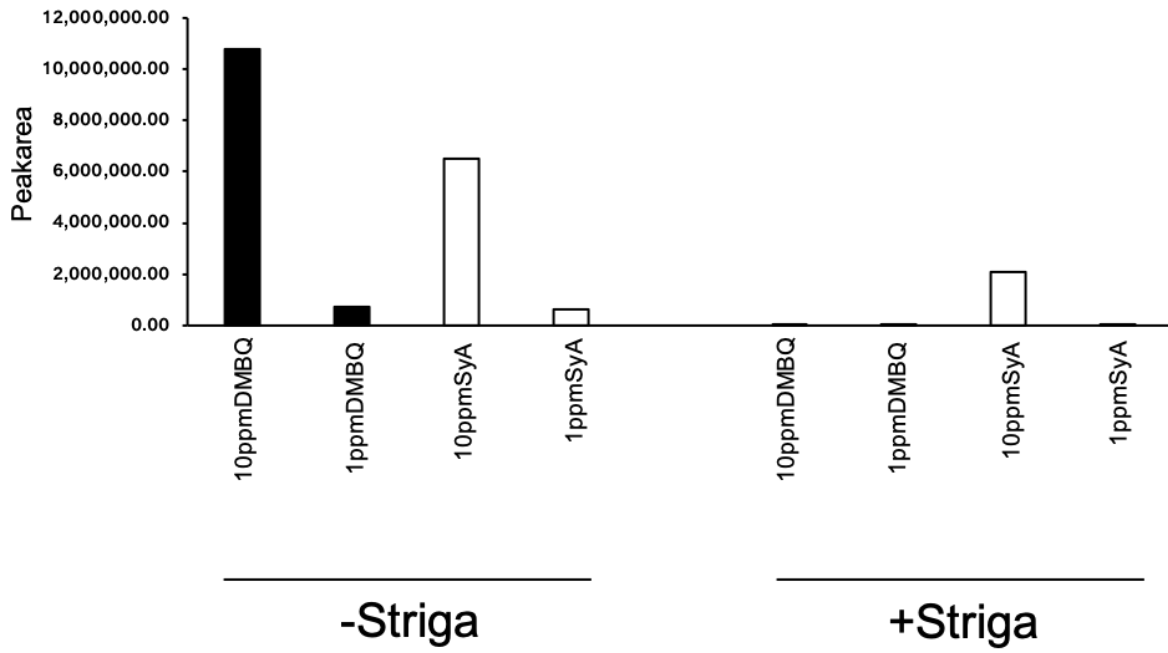


Fig. 3.2 ストライガによるDMBQとシリンガ酸の濃度の変化
 DMBQやシリンガ酸に暴露し24時間後のストライガの滲出液をHPLCにかけ、各々の濃度の変化をみた。ピークの面積をDMBQは黒色のバー、シリンガ酸は白色のバーで示した。

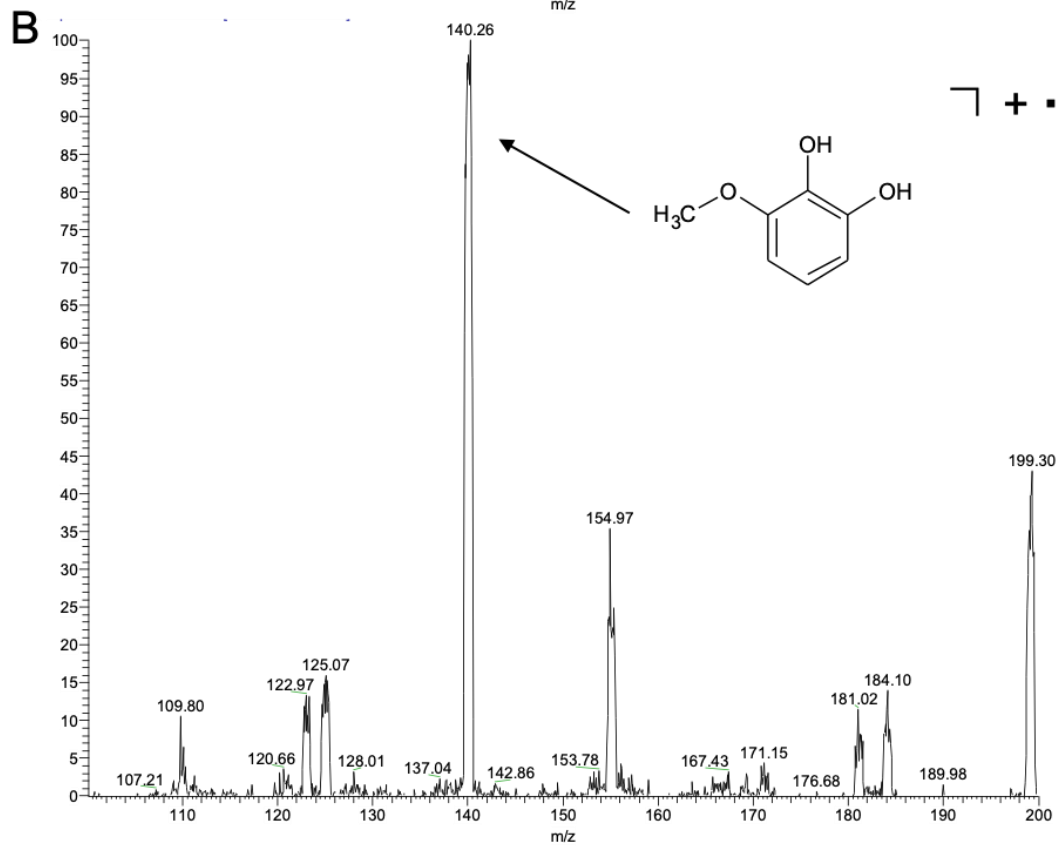
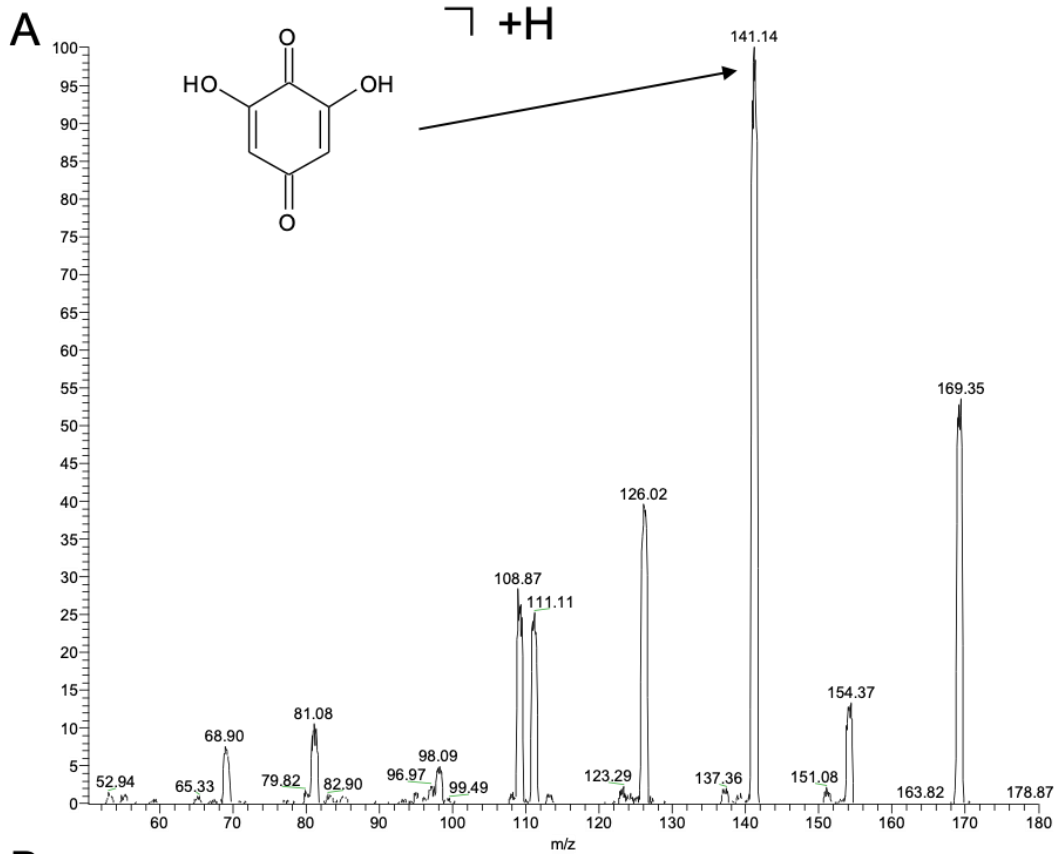


Fig. 3.3 フラグメンテーションパターン
 DMBQ(A)とシリンガ酸(B)のフラグメンテーションパターン及びその予想される化学構造。

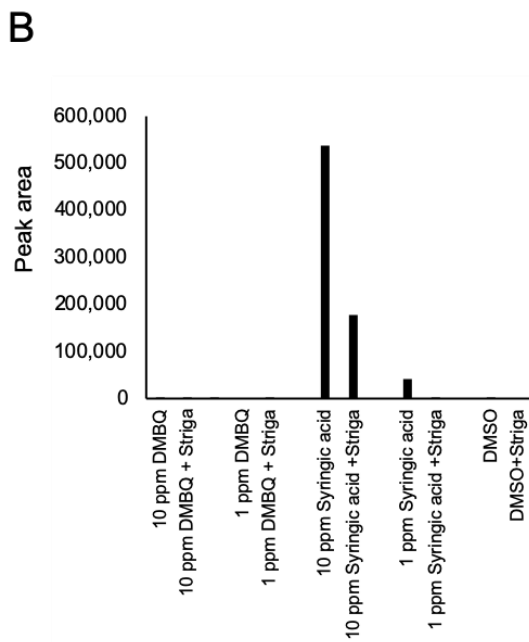
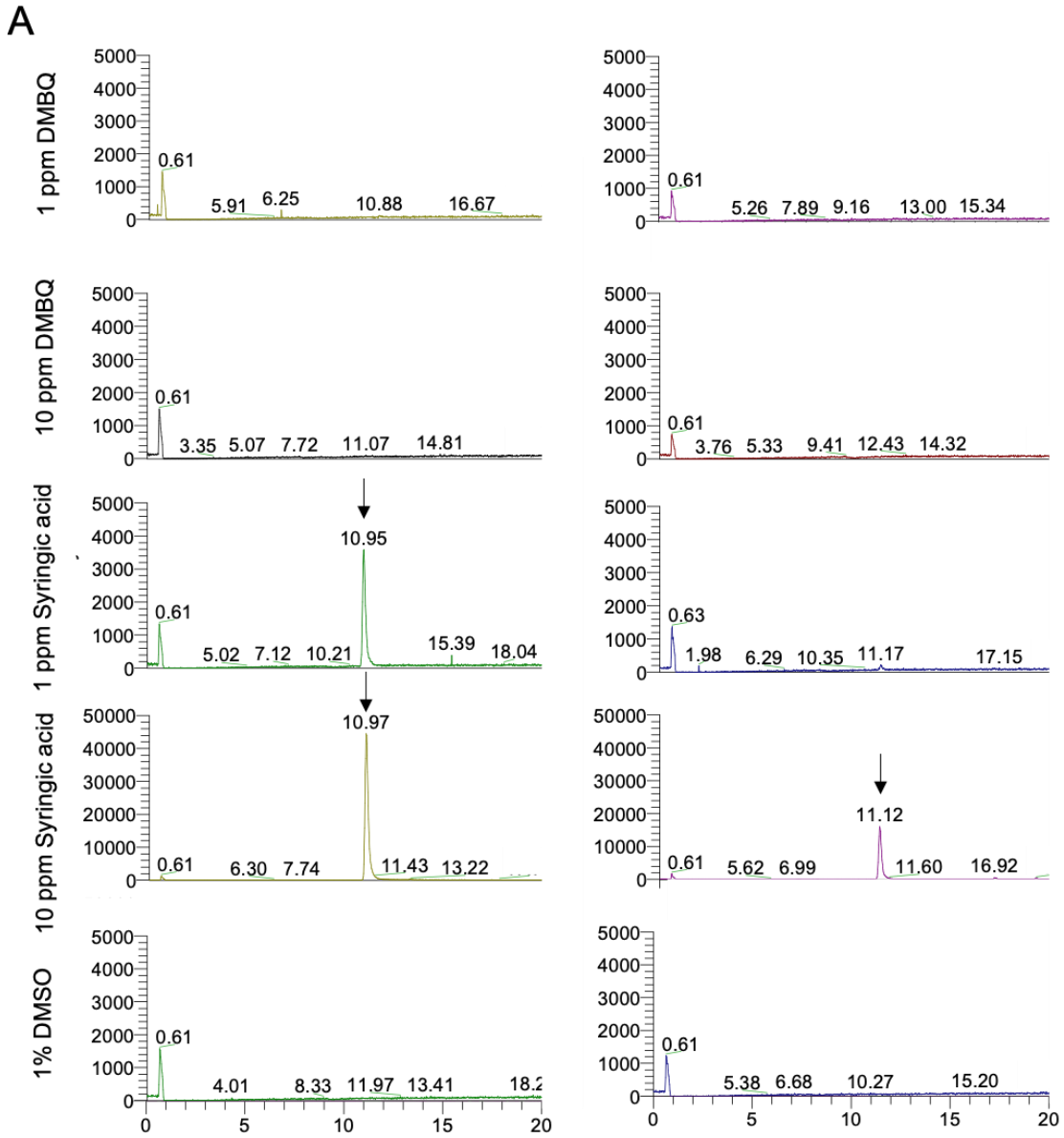


Fig. 3.4 シリンガ酸のMS/MS分析
 $m/z = 140$ に最適化した条件でMS/MS分析をした。各々のサンプルのクロマトグラム(A)を示した。左はストライガを加えていないもの、右はストライガを加えたサンプルを表す。Y軸はピークの強さを示す。DMBQのピーク面積のグラフ(B)を示す。コントロールとして1% DMSOを用いた。

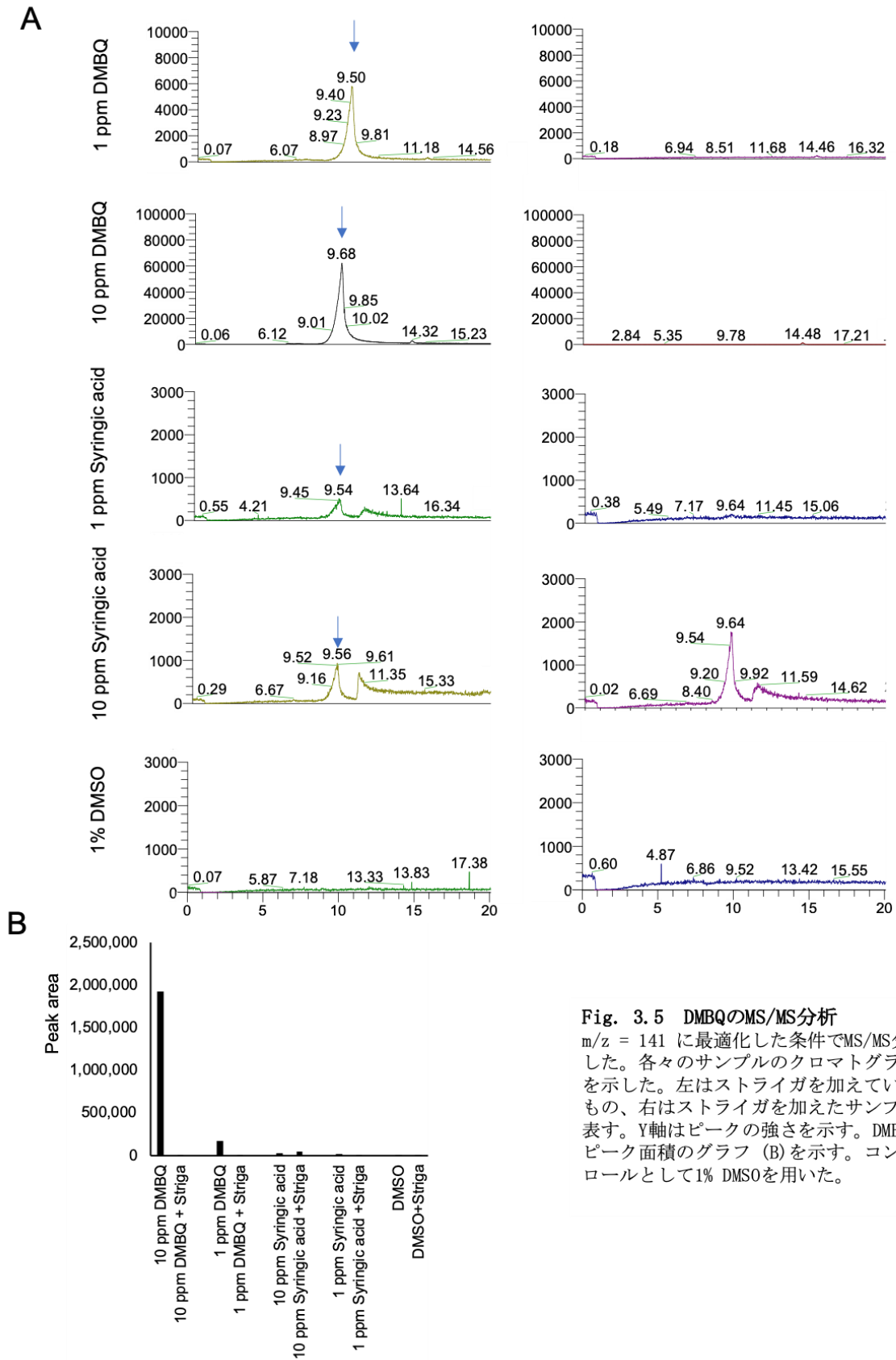


Fig. 3.5 DMBQのMS/MS分析

$m/z = 141$ に最適化した条件でMS/MS分析をした。各々のサンプルのクロマトグラム (A) を示した。左はストライガを加えていないもの、右はストライガを加えたサンプルを表す。Y軸はピークの強さを示す。DMBQのピーク面積のグラフ (B) を示す。コントロールとして1% DMSOを用いた。

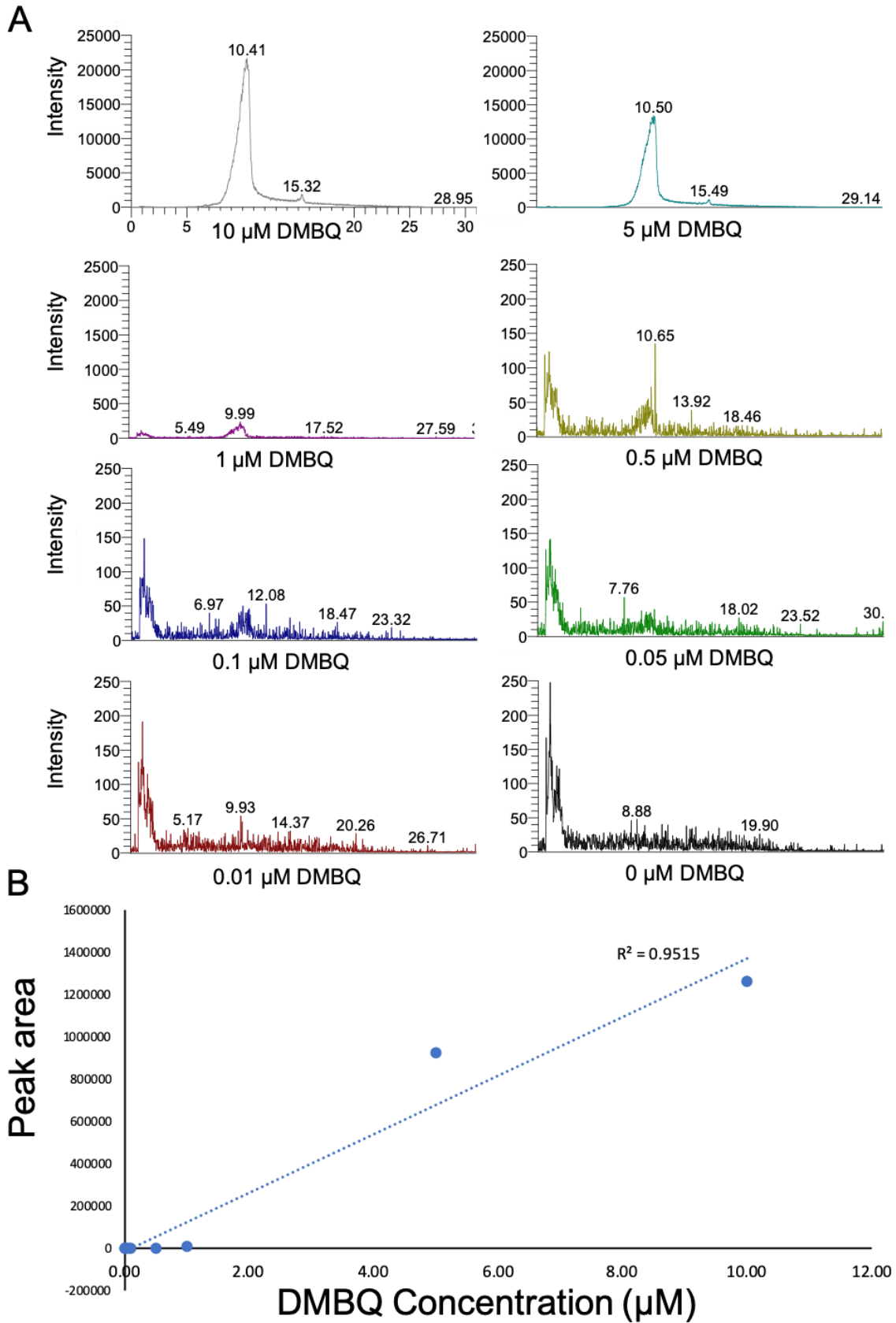


Fig. 3.6 LC-MS/MSによるDMBQの検出限界
 複数の濃度のDMBQ溶液をLC-MS/MSを用いて測定した。クロマトグラム(A)と検量線(B)。n=1

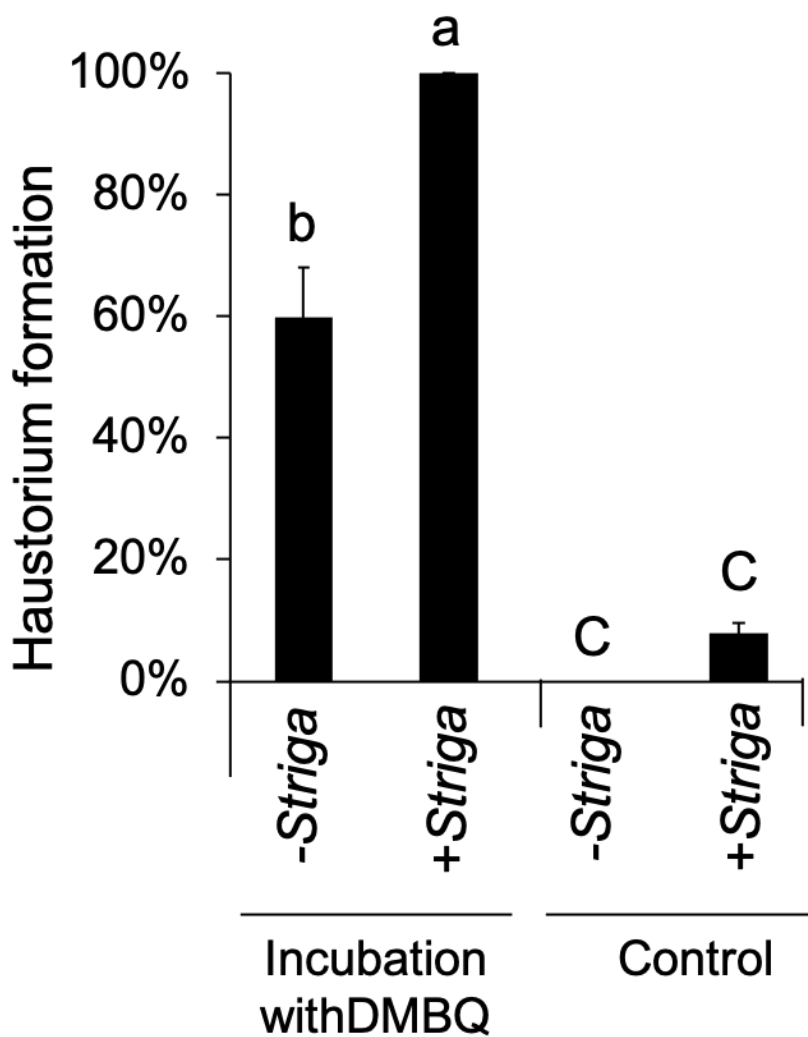


Fig. 3.7 *Striga*-DMBQ培養液の吸器誘導能

発芽したストライガに*Striga*-DMBQ培養液を加え、吸器誘導能を有するかを調べた。エラーバーはSEを示す。TukeyHSD検定により有意差($p < 0.05$)が検出されたものを異なるアルファベットで示す。n=3。

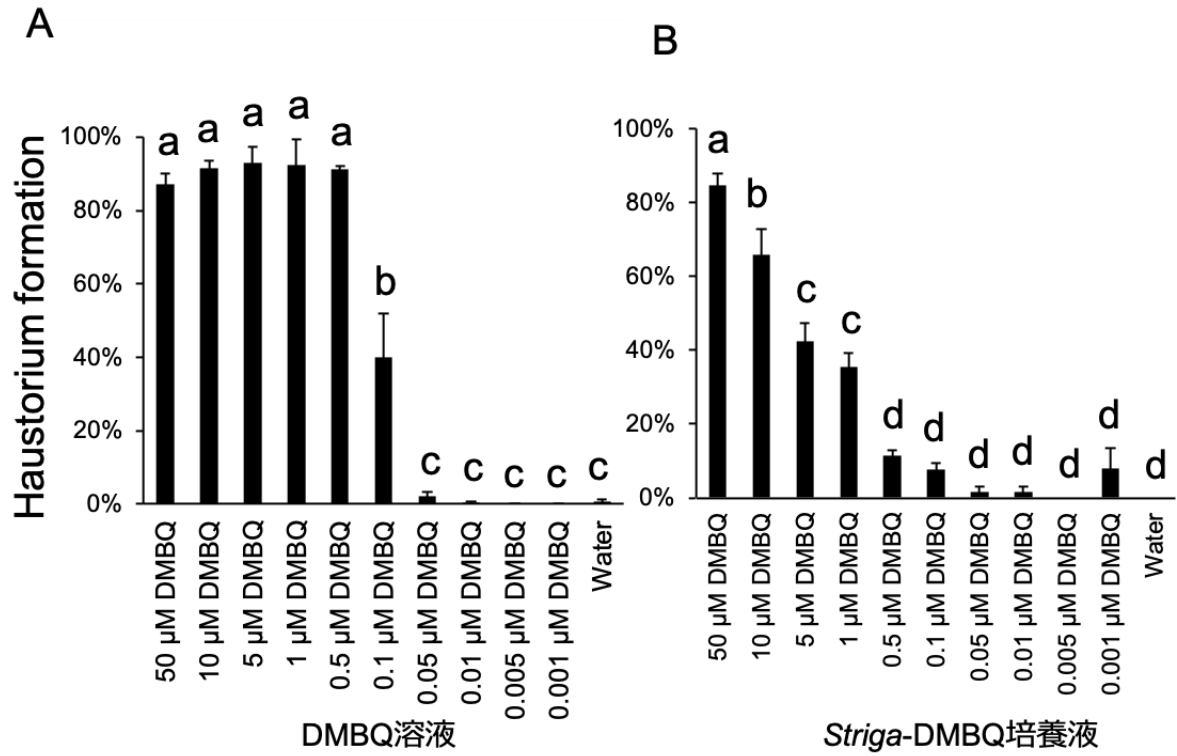


Fig. 3.8 DMBQ溶液と*Striga*-DMBQ培養液の濃度依存的な吸器形成率
 DMBQ溶液の濃度依存的な吸器形成率(A)と各々の濃度のDMBQを用いて作成した
Stria-DMBQ培養液の吸器形成率(B)を調べた。エラーバーはSEを示す。
 TukeyHSD検定により有意差($p < 0.05$)が検出されたものを異なるアルファベッ
 トで示す。n=3

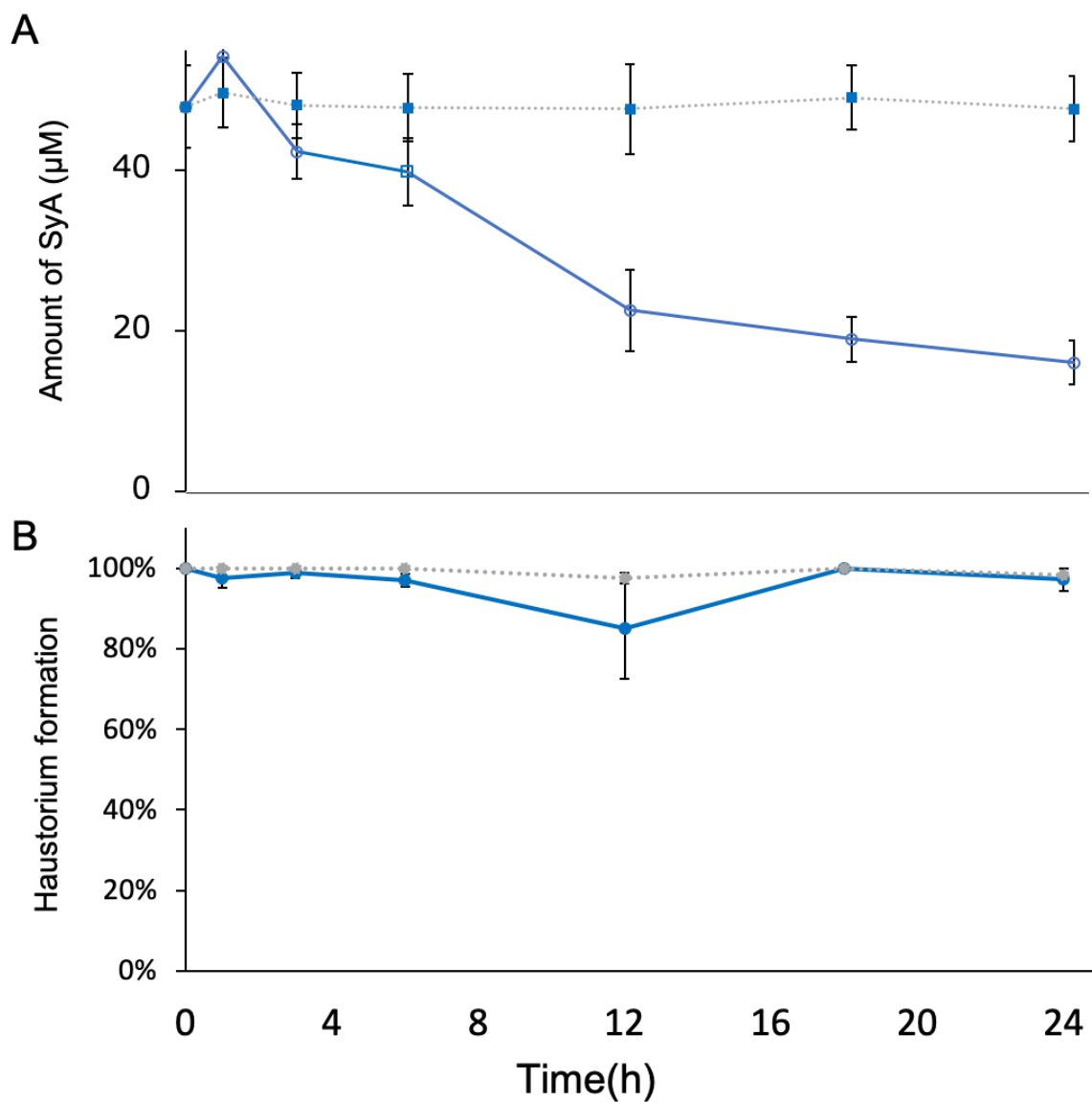


Fig. 3.9 ストライガによるシリング酸の濃度の変化と吸器形成率
 ストライガとシリング酸溶液を共培養した溶液(青い実線)とストライガを入れずにシリング酸溶液を同じ条件下で培養した(グレーの点線)に含まれるシリング酸をHPLCにより測定した(A)。溶液の吸器形成率を測定した(B)。エラーバーはSEを示す。TukeyHSD検定により有意差($p < 0.05$)が検出されたものを異なるアルファベットで示す。n=3

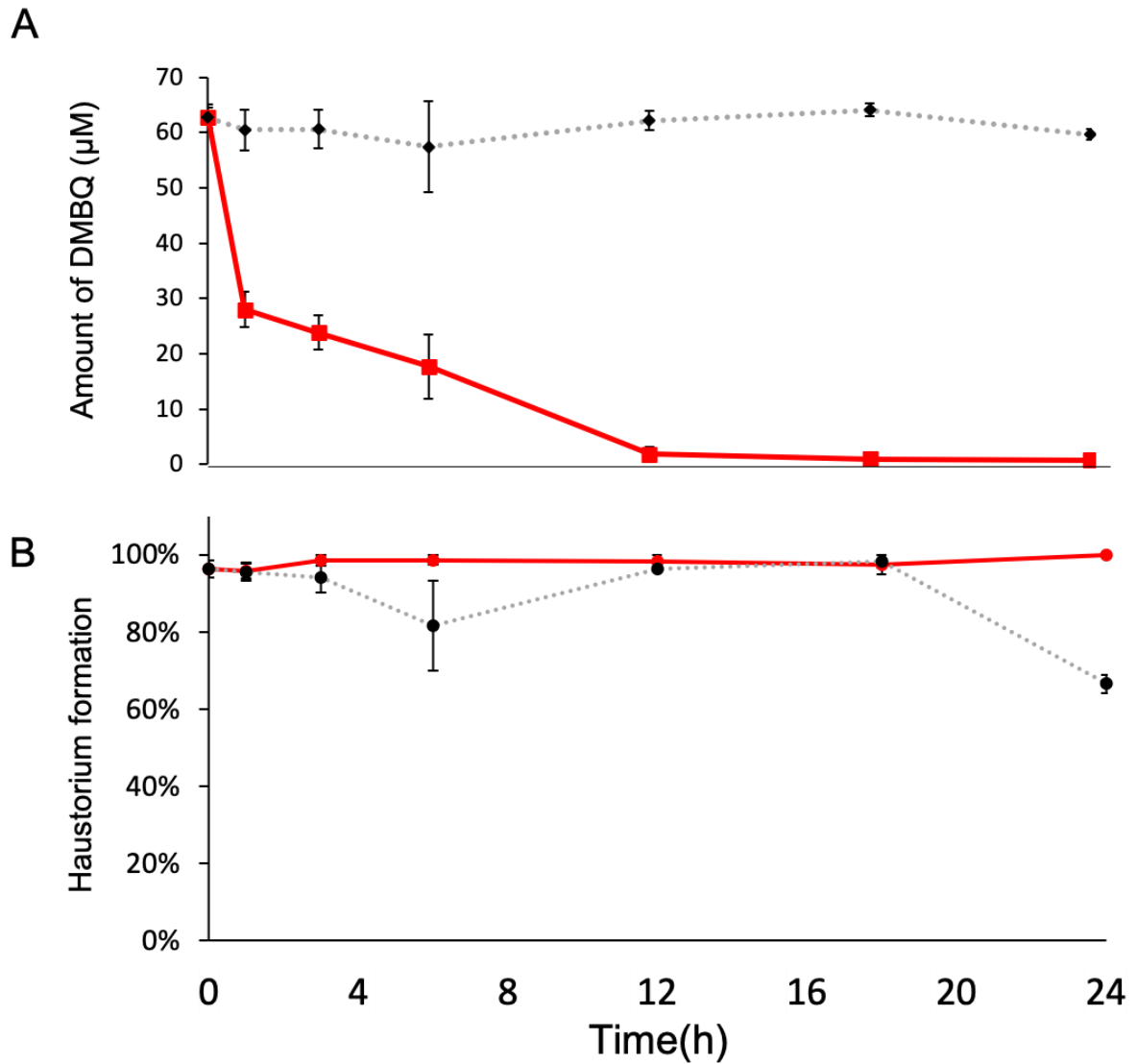


Fig. 3.10 ストライガによるDMBQの濃度の変化と吸器形成率
 ストライガとDMBQ溶液を共培養した溶液(赤い実線)とストライガを入れずにDMBQ溶液を同じ条件下で培養した(グレーの点線)に含まれるDMBQをHPLCにより測定した(A)。溶液の吸器形成率を測定した(B)。エラーバーはSEを示す。TukeyHSD検定により有意差($p < 0.05$)が検出されたものを異なるアルファベットで示す。n=3

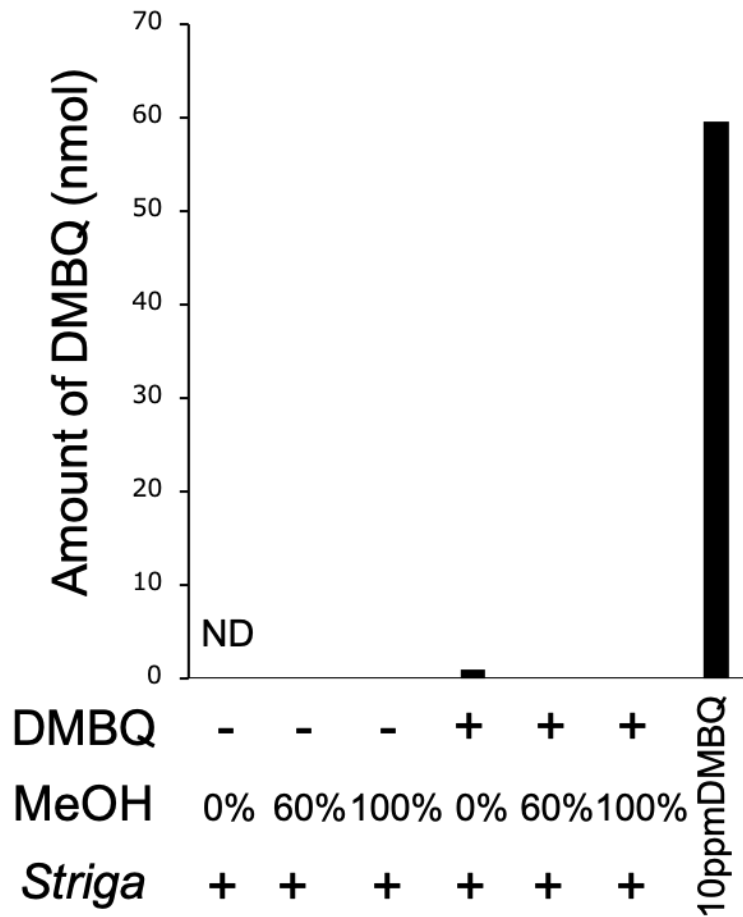


Fig. 3.11 ストライガ植物体内に含まれるDMBQの量

DMBQにより吸器誘導を行った後のストライガ植物体に含まれるDMBQの量を示す。ストライガを破碎し100%メタノール、60%メタノールと滅菌水によりDMBQを溶出し、HPLCによりDMBQを測定した。n=1

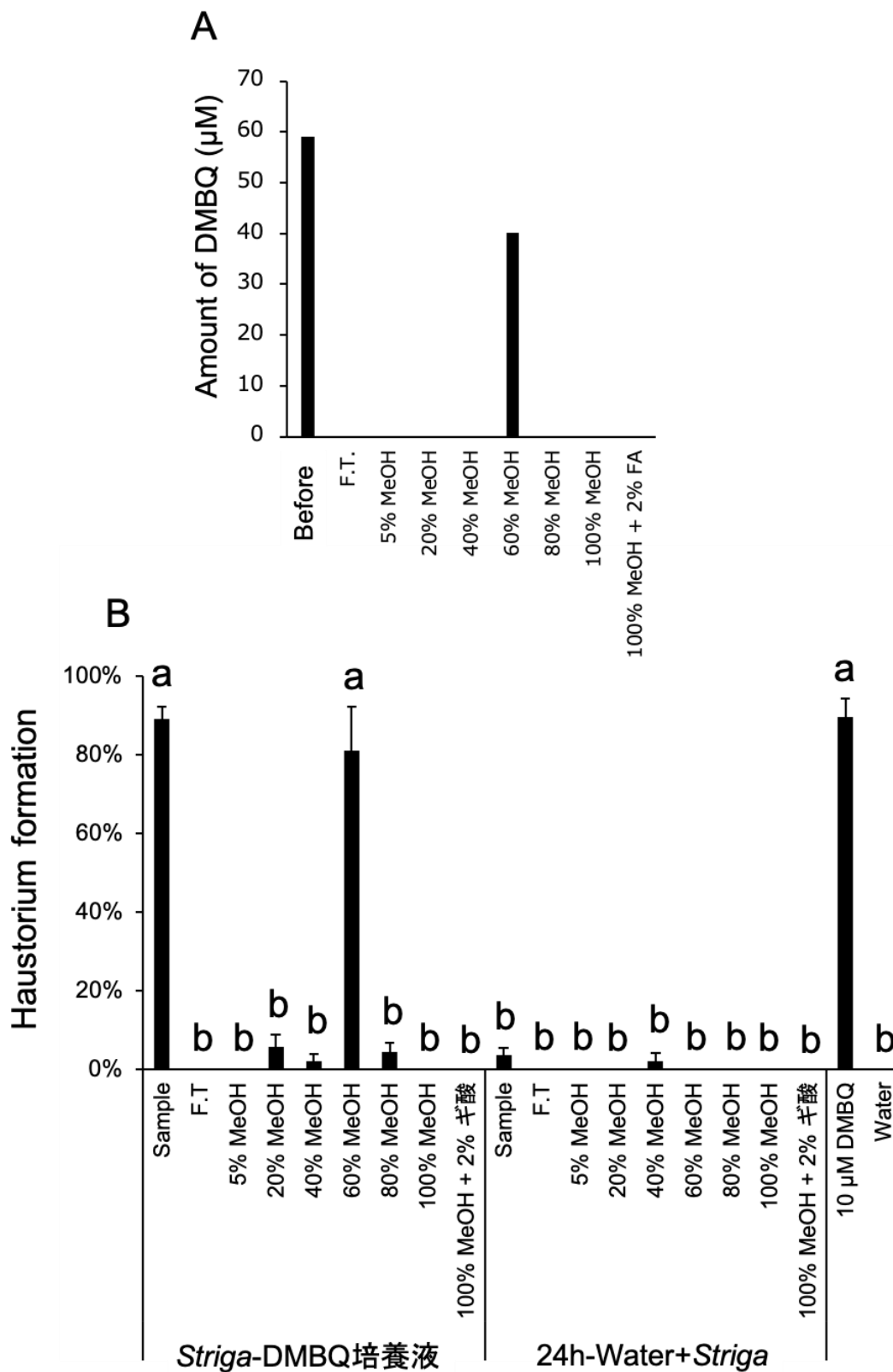


Fig. 3.12 固相カラムを用いた未知の吸器誘導物質の物性解析
 DMBQとサンプルを固相カラムを用いて分離した。各々の得られた画分に含まれるDMBQの濃度をHPLCを用いて調べた(A)。固相カラムで得られた画分の吸器形成率を調べた(B)。エラーバーはSEを示す。TukeyHSD検定により有意差($p < 0.05$)が検出されたものを異なるアルファベットで示す。n=3

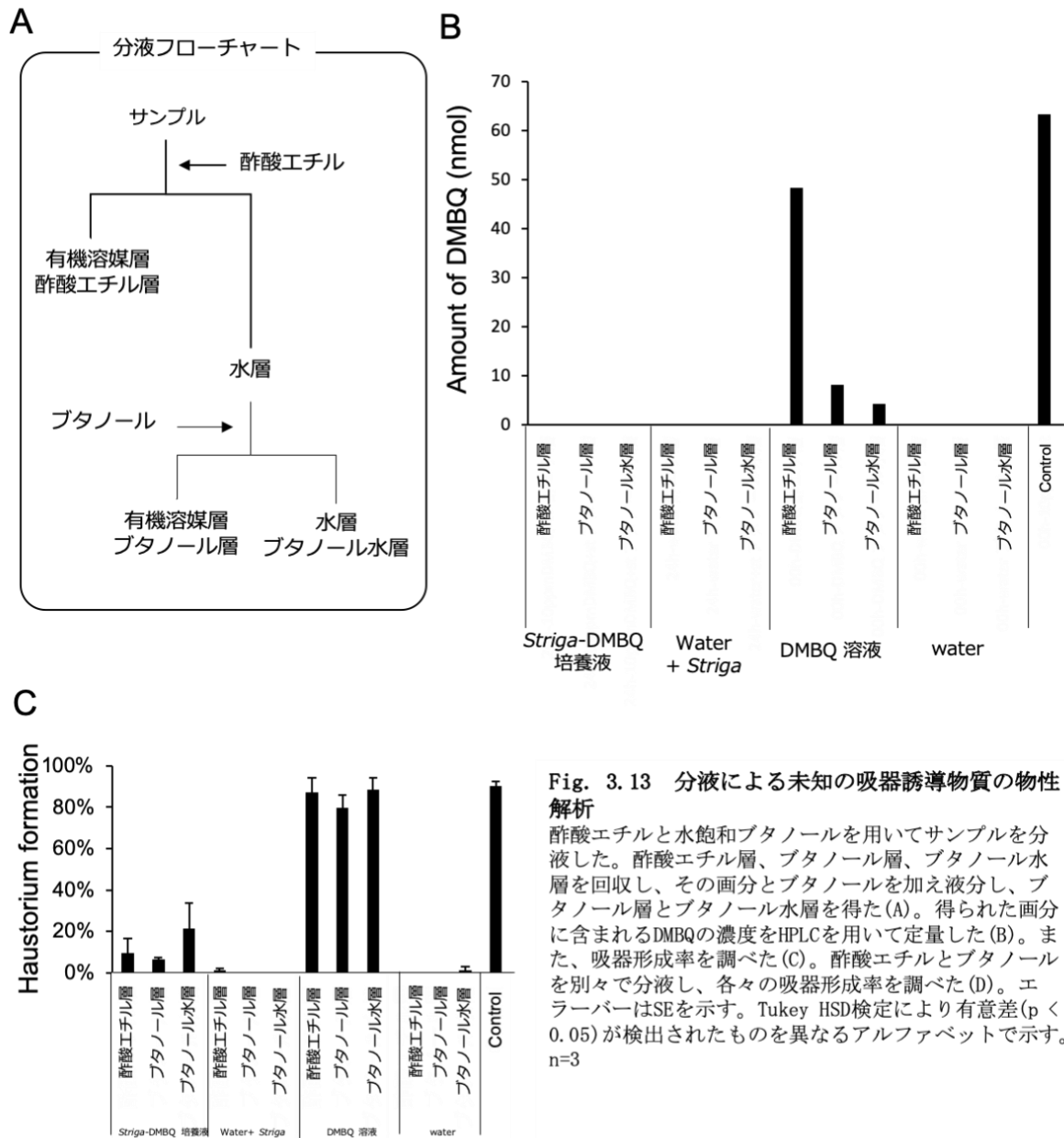
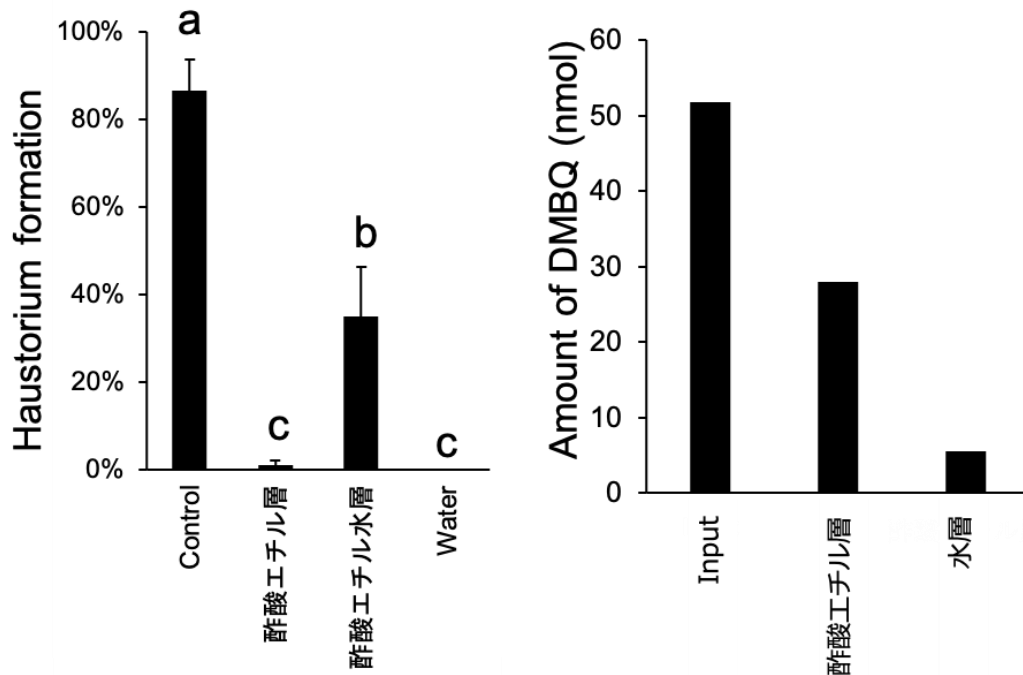


Fig. 3.13 分液による未知の吸器誘導物質の物性解析
 酢酸エチルと水飽和ブタノールを用いてサンプルを分液した。酢酸エチル層、ブタノール層、ブタノール水層を回収し、その画分とブタノールを加え液分し、ブタノール層とブタノール水層を得た(A)。得られた画分に含まれるDMBQの濃度をHPLCを用いて定量した(B)。また、吸器形成率を調べた(C)。酢酸エチルとブタノールを別々で分液し、各々の吸器形成率を調べた(D)。エラーバーはSEを示す。Tukey HSD検定により有意差(p < 0.05)が検出されたものを異なるアルファベットで示す。n=3

D



E

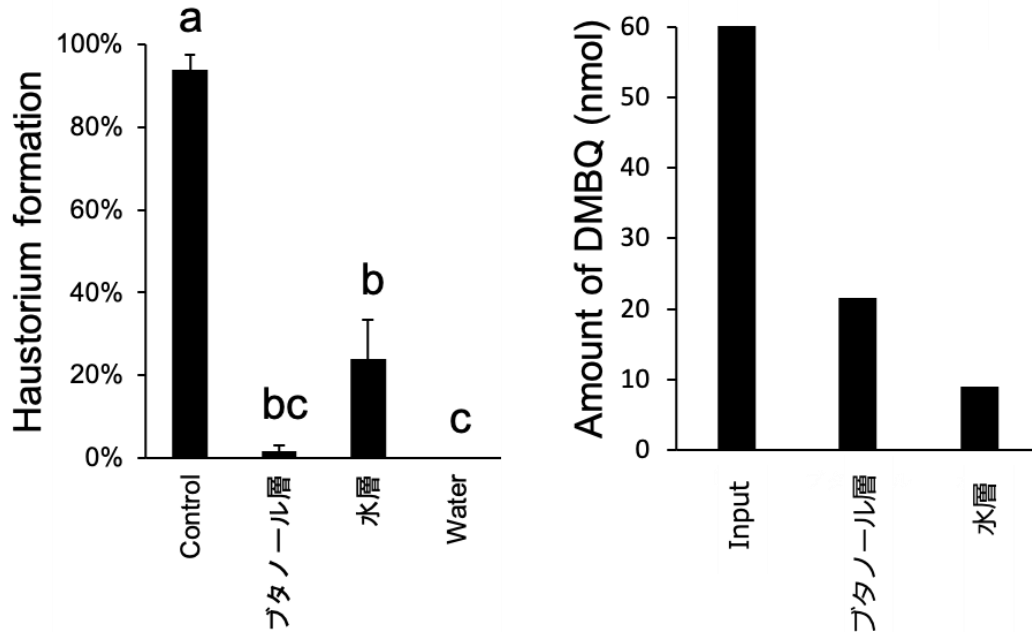


Fig. 3.13 分液による未知の吸器誘導物質の物性解析

酢酸エチルと水飽和ブタノールを用いてDMBQや*Striga*-DMBQ培養液の分液操作を行った。サンプルと酢酸エチルの分液を行い、得られた画分のDMBQの定量と*Striga*-DMBQ吸器形成率を調べた(D)。サンプルとブタノールの分液を行い、得られた画分のDMBQの定量と吸器形成率を調べた(E)。エラーバーはSEを示す。TukeyHSD検定により有意差($p < 0.05$)が検出されたものを異なるアルファベットで示す。n=3

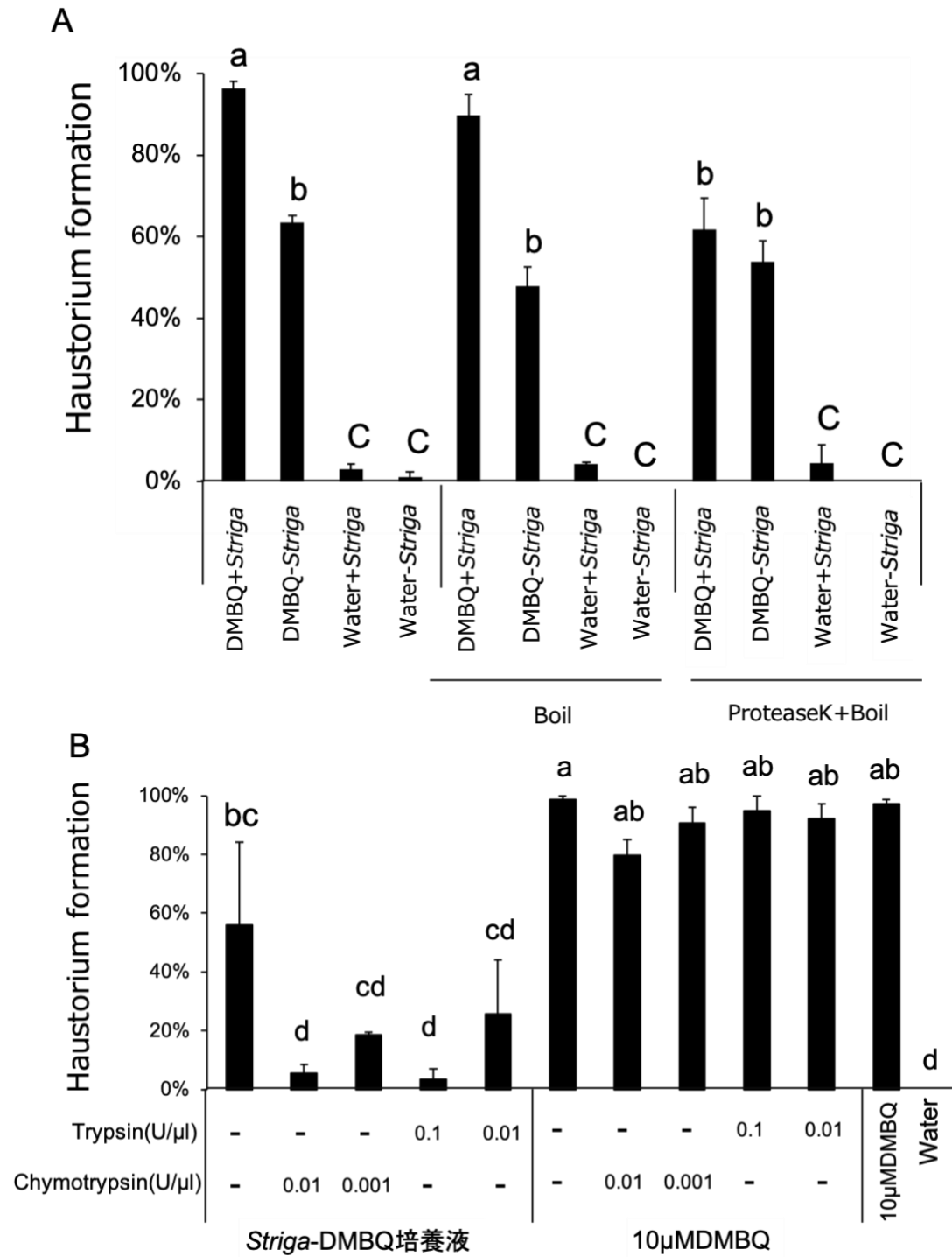


Fig. 3.14 タンパク質消化酵素による消化処理
Striga-DMBQ培養液を煮沸処理またはプロテアーゼKによるタンパク質消化処理を行い、吸器形成率を調べた(A)。トリプシンやキモトリプシンを用いてタンパク質消化処理を行い吸器形成率を調べた(B)。エラーバーはSEを示す。TukeyHSD検定により有意差($p < 0.05$)が検出されたものを異なるアルファベットで示す。n=3

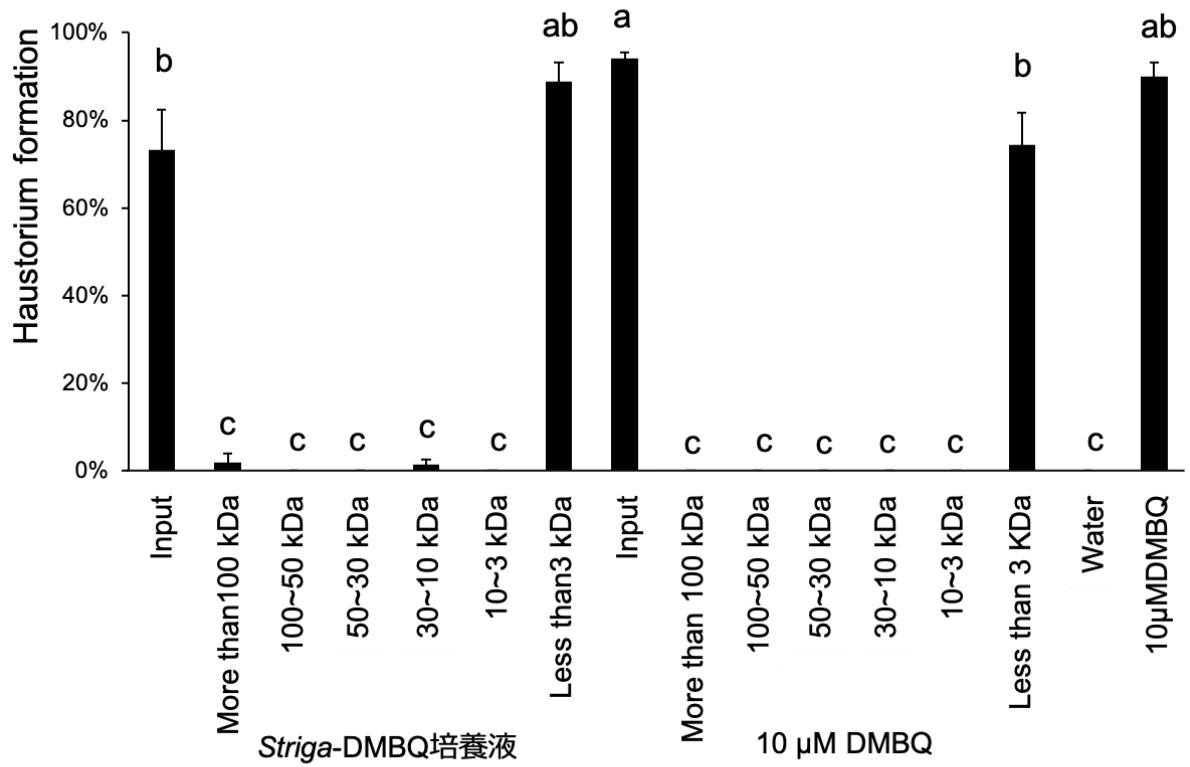


Fig. 3.15 サイズ分画
Striga-DMBQ培養液を複数の限外ろ過フィルターを用いてサイズ分画を行なった。各々の得られた画分の吸器形成率を調べた。

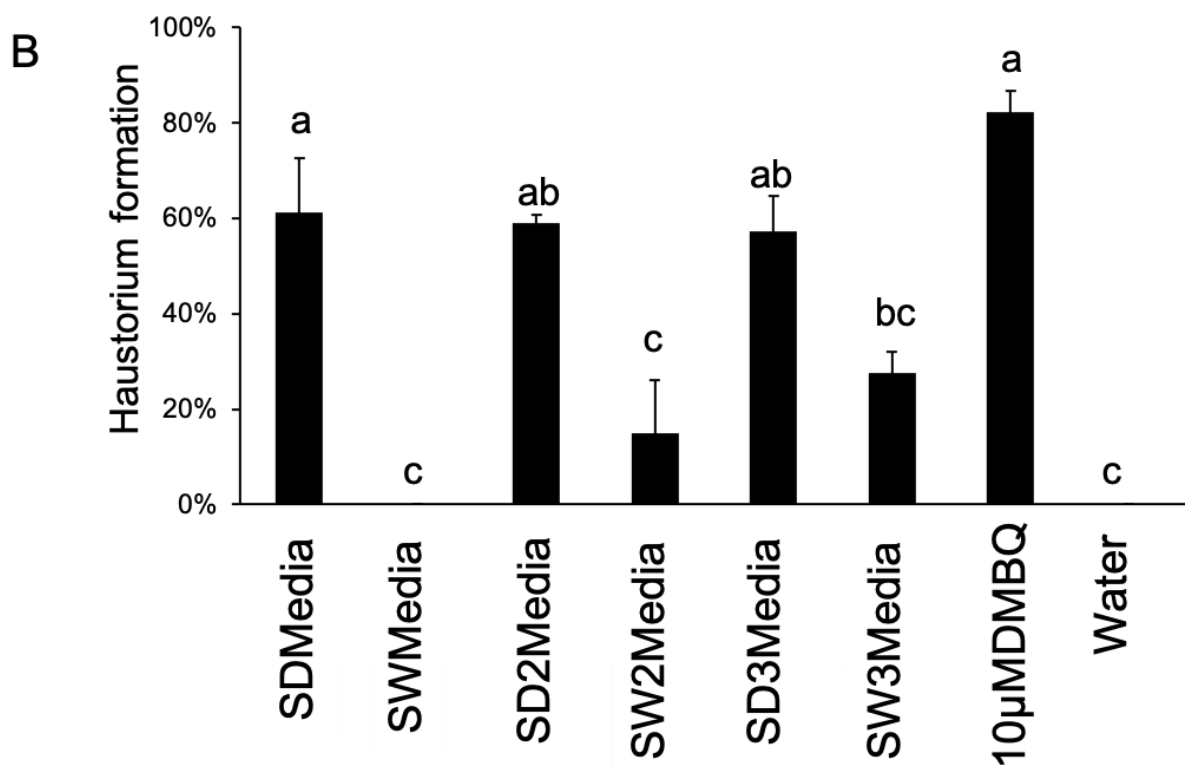
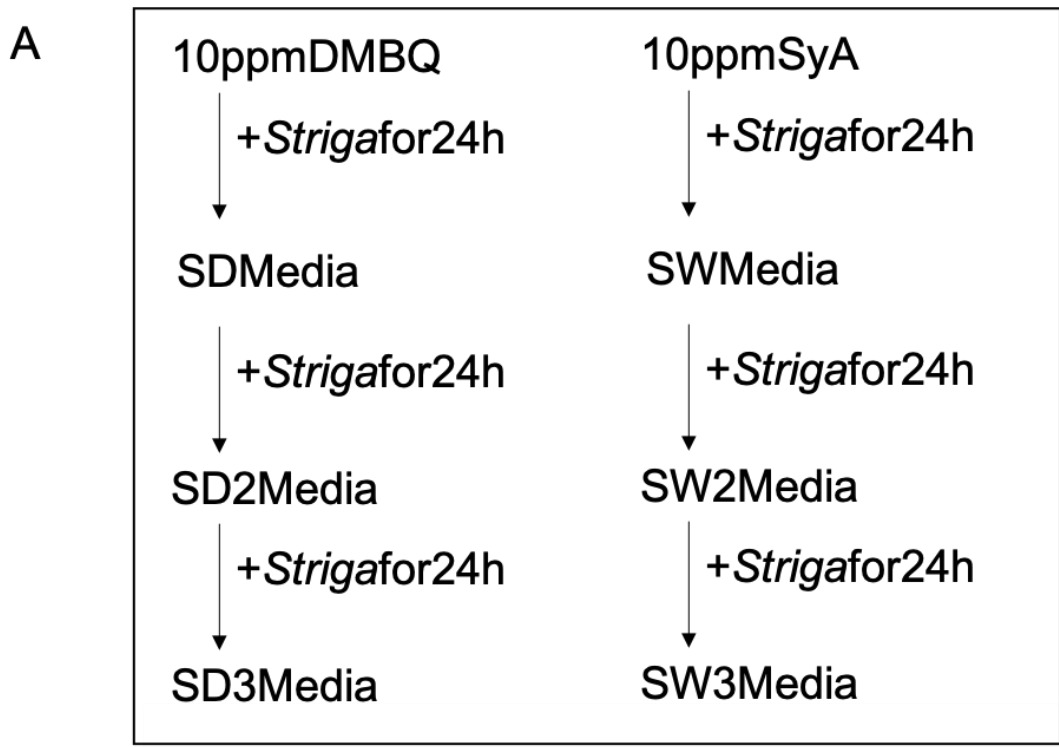


Fig. 3.16 未知の吸器誘導物質の吸器誘導能
Striga-DMBQ培養液とストライガを共に加え、SD2培養液を作成した。さらに、SD2培養液とストライガを共に加え、SD3培養液を作成した。同様に水でも作成した(A)。作成した培養液の吸器形成率を調べた。

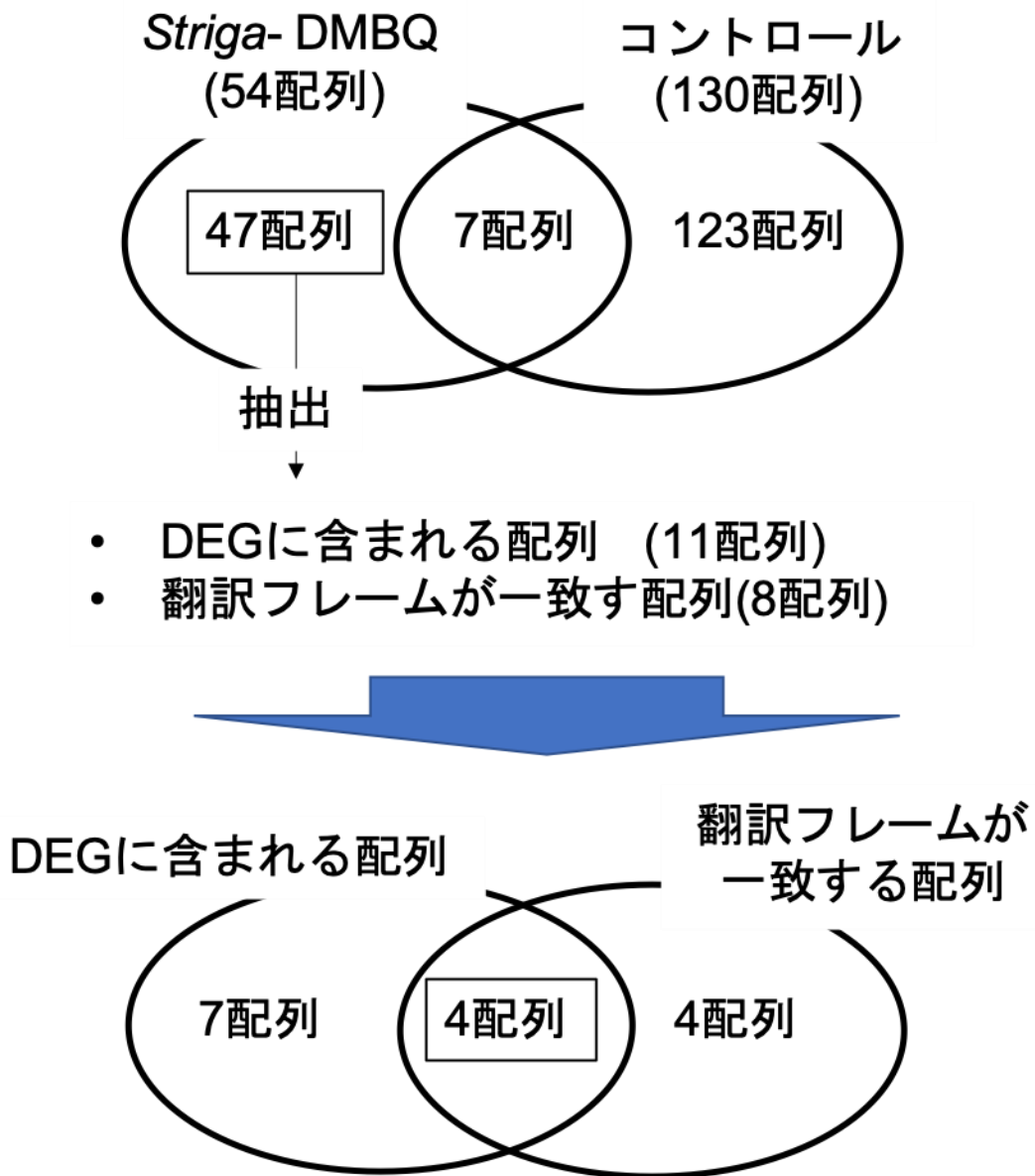


Fig. 3.17 プロテオーム解析の概要

Striga-DMBQ培養液に含まれるペプチドから候補ペプチドの抽出を行った。*Striga*-DMBQ培養液に含まれるペプチドからストライガと滅菌水の培養液に含まれるペプチド配列を除いた。残った配列からDEGに含まれる配列と翻訳フレームが一致する配列を抽出した。その中から、翻訳フレームが一致し、DEGに含まれる配列を候補ペプチドとした。

Table. 3.1 候補ペプチドの配列

Contig ID	Hit times	Sequence	Mol.	Cluster no.	Description	Origin
TRINITY_DN19359_c0_g2_i19	1	IACSDNSPCK	1037	2	polygalacturonase	Sesamum indicum
TRINITY_DN28227_c0_g1_i6	1	PDARGQGGP	951	6	DEAD-box ATP-dependent RNA helicase	Striga asiatica
TRINITY_DN5744_c0_g1_i4	1	AACHEPE	885	2	uncharacterized protein LOC105161463	Sesamum indicum
TRINITY_DN98283_c0_g1_i5	2	TMPPPNPSPTI	1238	6	retrovirus-related Pol polyprotein from transposon TNT 1-94	Trifolium medium

候補ペプチドとして3配列を抽出することができた。Contig IDはMascotでヒットしたペプチドのIDを示した。Hit timesは3回行ったトランスクリプトーム解析のうち何回その配列がヒットしたのを示した。Sequenceは解析されたペプチド配列を示す。Mol. は解析されたおおよその分子量を示す。Cluster no. は、トランスクリプトーム解析においてどのクラスターに属したのかを示す。DescriptionとOriginはblast検索の結果を示した。

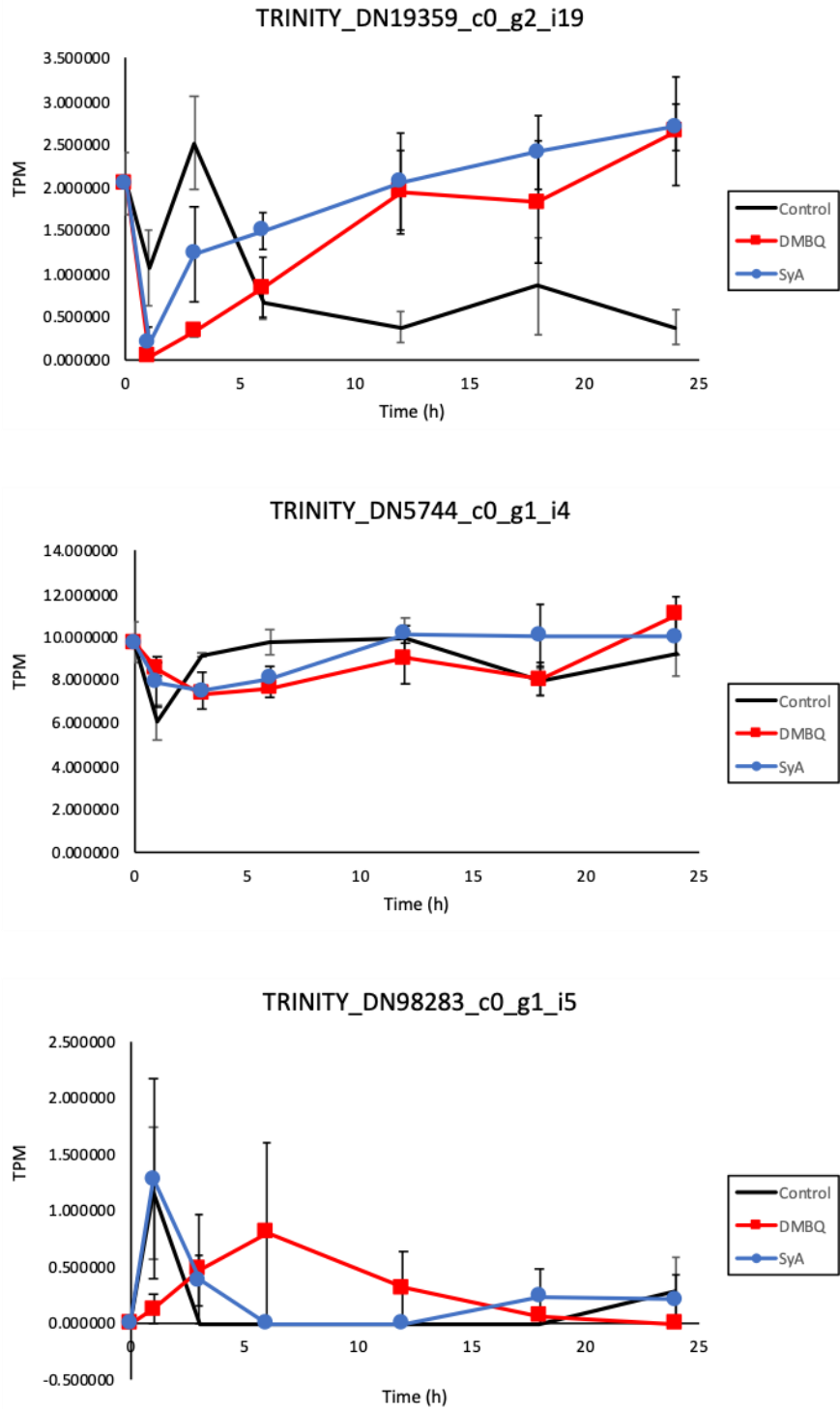


Fig. 3.18 候補ペプチドの遺伝子発現パターン
Striga-DMBQ培養液の候補遺伝子の発現量を示す。発現量として transcriptpermillion (tpm) を用いて平均値をだした。黒いバーはコントロールを、赤色はDMBQ処理を、青いバーはシリング酸を示す。エラーバーはSEを示す。n=3

>TRINITY_DN19359_c0_g2_i19
MKFRIVIPFLFFILSSHMISSYAKKHKRKLKPKPAPSPNNSNYYSKTFNVMDYGAAGDGK
TDDTNAFENAWLDACKAGNSEVLVPADYTFLLGPLDLSVQCNNIIFQLNGNLLASTSSSAW
KGNLLQWLNFRYVTDLRIQGTGRIDGQGLAWWNKKNGFSTAPTALRVADVKGSTVVGISFV
NSAKAHLKFDNCDGVLVDTISIQSPGESPNTDGIHLQNSVNVEIRESKISSGDDCISIQTG
CENVFIDRVACGPSHGISIGGLGKNGEKATVSGVIVQDSTITSSMTGTRIKTWQGGSGAVS
NVSFTNIRVSKVDTPIVIDQYYSDEGHTQNKTSAVAITDISFVKIQGTYNQKAVS **IACSDN**
SPCKGVTLNIGLNSASLETESPLCYRAYVSVEDPVSPSINCKG*

Fig. 3.20 候補ペプチドのアミノ酸配列
候補ペプチドのアミノ酸配列を示した。プロテオーム解析で検出された配列を赤く示した。

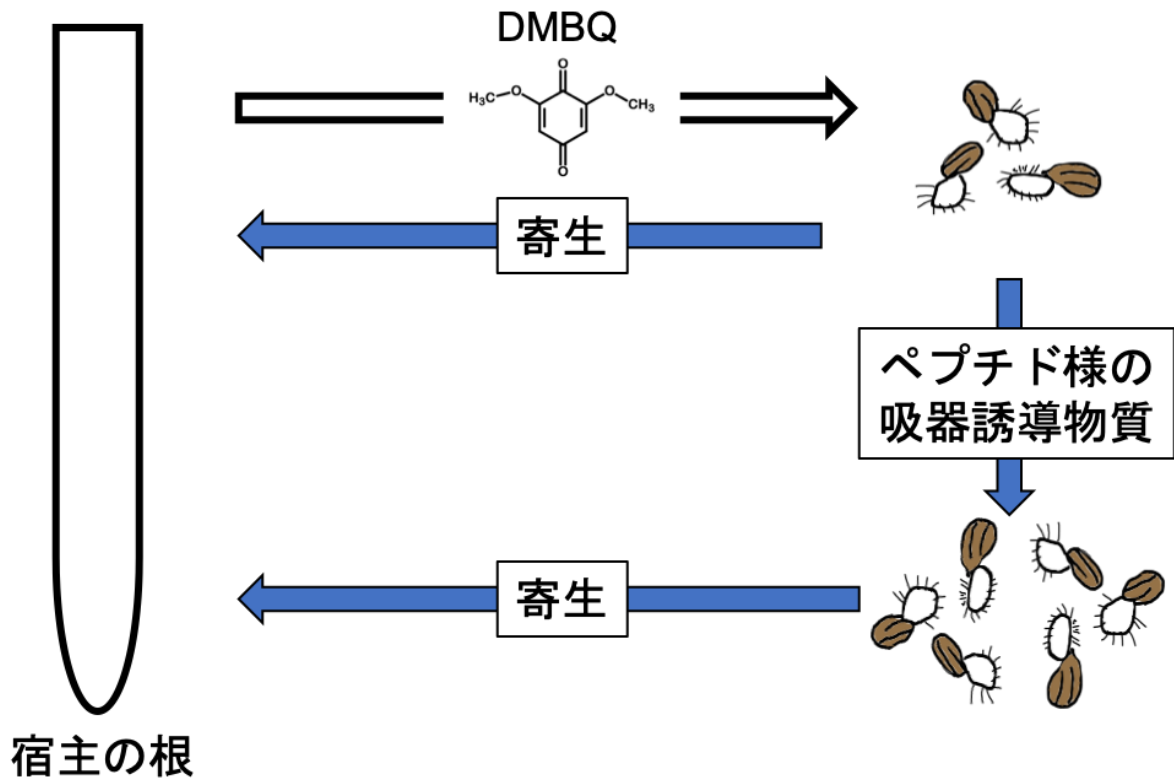


Fig. 3.21 ペプチド様の吸器誘導物質の役割

ペプチド性の吸器誘導物質はDMBQを認識することでペプチド用の吸器誘導物質を分泌される。周囲のストライガも吸器誘導ができるため、より多くの吸器を誘導することができ、宿主へ寄生できる確率が上昇する。

第4章 総論

アフリカに自生する寄生植物ストライガは、イネ科作物に寄生するため年間甚大な被害を及ぼしており、その効果的な防除法の開発が望まれている。本研究では、ストライガの吸器誘導に焦点を当て、吸器誘導物質の性質の解明とその作用機構を明らかにすることを目的とした。第一章では、新規吸器誘導物質や吸器形成阻害物質の単離を目的としたケミカルスクリーニングを行い、新規吸器誘導物質として11化合物を吸器形成阻害物質として6化合物を見出すことができた。新たに単離された化合物の構造とその活性の相関解析から、吸器誘導には芳香環上のヒドロキシル基と、それを挟む様に配置する一つまたは二つのメトキシ基が重要であることがわかった。メトキシ基とヒドロキシル基の間の電子の移動が吸器誘導に関与すると考えられた。吸器阻害物質においても、カルボニル基やスルホアミド基を含む物質、また鉄のキレーターが見出され、吸器誘導において酸化還元が重要な役割を果たすと考えられた。これらの物質に関しては、さらに詳細な構造活性相関解析をおこなうことで、吸器誘導の機構が明らかになると考えられる。第二章では、吸器誘導とROSの関連性をしらべ、吸器形成には内因性のNADPHオキシダーゼを介した H_2O_2 産生が重要であることを示した。さらに、ペルオキシダーゼはシリンガ酸からDMBQへの変換の促進のみならず、DMBQそのものまたは下流経路に作用して吸器誘導活性を上昇させていることを明らかにした。また、トランスクリプトーム解析により、吸器誘導時に多くの酸化還元に関わる遺伝子が働いていることを明らかにした。第三章では、ストライガをDMBQ溶液で培養することにより、DMBQ以外の未知の吸器誘導物質が生産されることを示唆する結果を得た。ストライガをDMBQで培養した培養液に含まれる未知の吸器誘導物質は、3 kDa以下のペプチド性の吸器誘導物質であると考えられ、今後、単離同定を進めていきたい。この未知の吸器誘導物質の活性は、ストライガとの培養により安定的な活性を示したため、ストライガが近傍にいるストライガに対して誘導シグナルを伝播させるために使われている可能性がある。

本研究から、ストライガにおける吸器誘導のモデルが考えられた (Fig. 4.1)。宿主由来のシリンガ酸または他のリグニンモノマーがストライガから放出されるペルオキシダーゼにより、DMBQへ酸化されストライガに認識されることで、吸器が形成が開始する。レドックスに関する遺伝子や内因性のNADPHオキシダーゼを介した H_2O_2 産生により吸器が形成される。吸器形成と並行して、ペプチド様の未知の吸器誘導物質が放出される。このペプチド様の吸器誘導物質は周囲のストライガの吸器誘導を促進することで、多くのストライガが宿主に寄生し子孫を残しやすいと考えられ、ストライガの生存戦略に貢献している可能性が考えられる (Fig. 4.1)。

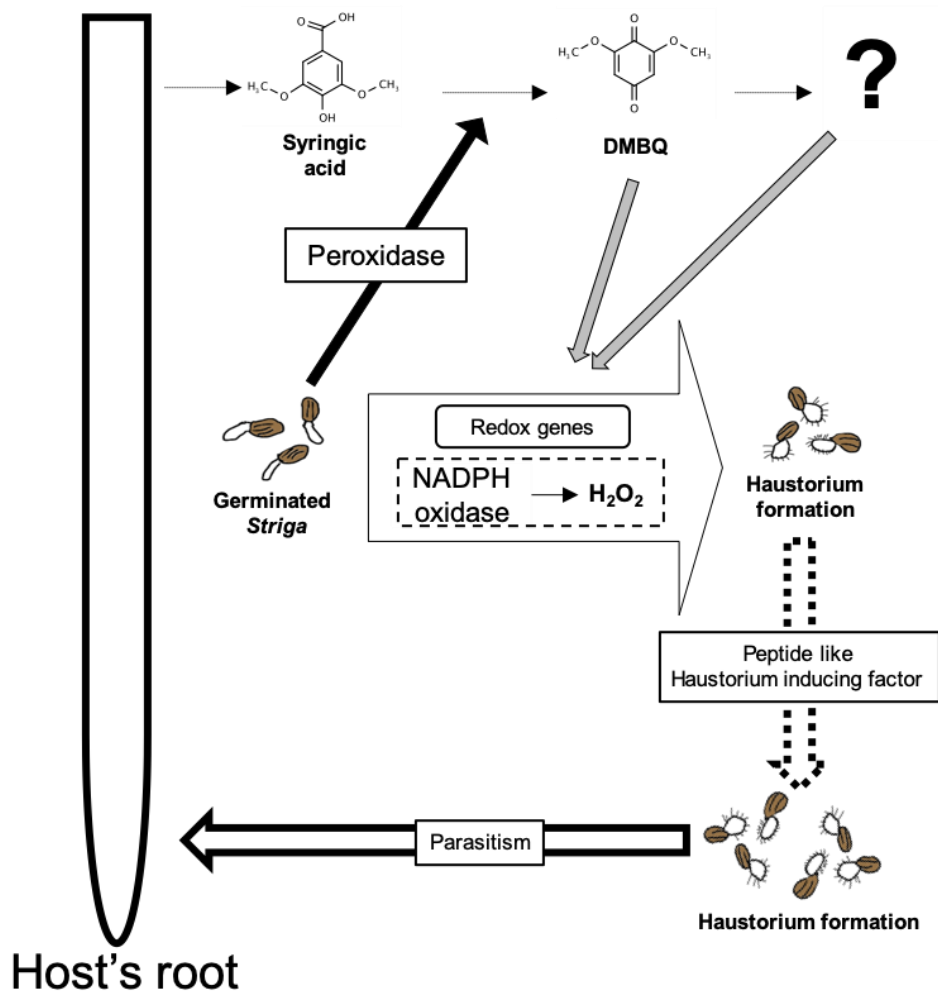


Fig. 4.1 本研究から得られたストライガの吸器誘導モデル
 ストライガにおける吸器誘導のモデルが考えられる。宿主由来のシリング酸はストライガから放出されるペルオキシターゼにより、DMBQへ酸化されストライガに認識されることで、吸器が形成される。レドックスに関する遺伝子や内因性のNADPHオキシダーゼを介した一定レベルのH₂O₂産生が働くことで吸器が形成される。吸器が形成されと並行して、ペプチド様の吸器誘導物質が放出される。このペプチド様の吸器誘導物質は周囲のストライガの吸器誘導を促進することで、多くのストライガが宿主に寄生し子孫を残しやすいと考えられる。

第5章 謝辞

本研究を行うにあたり、絶えず熱心なご指導と適切な助言を頂いた吉田聡子教授に心から感謝いたします。また、実験を指導し、アドバイスをいただいた Songkui Cui 助教および奈良先端科学技術大学院大学の植物共生学研究室の皆様にご感謝申し上げます。ストライガ種子の供与をしていただきました A.G.Banbiker 教授、ストリゴールの供与をしていただきました森讓治東京大学名誉教授に感謝いたします。HPLC および LC-MS/MS の測定をしていただいた植物二次代謝研究室の清水崇史助教、および峠隆之准教授に心から御礼申し上げます。ケミカルスクリーニングのデータを供与していただきました名古屋大学の土屋雄一朗特任教授、ケミカルライブラリーを供与していただきました同じく佐藤綾人特任准教授に感謝いたします。プロテオーム解析では、奈良先端科学技術大学院大学の倉田技術員にお世話になりました。御礼申し上げます。実験の方針についてアドバイスいただきました、大阪府立大学の秋山康紀教授、新潟大学の岡本暁助教、名古屋大学 松林嘉克教授に感謝いたします。また、実験の方針に適切なアドバイスをいただきました橋本隆教授、出村拓教授に感謝いたします。

第 6 章 参考文献

- Akiyama, K., Matsuzaki, K. I., and Hayashi, H. (2005). Plant sesquiterpenes induce hyphal branching in arbuscular mycorrhizal fungi. *Nature* 435, 824–827. doi:10.1038/nature03608.
- Albrecht, H., Yoder, J. I., and Phillips, D. A. (1999). Flavonoids promote haustoria formation in the root parasite *Tiriphsaria versicolor*. *Am. Soc. Plant Physiol.* 119, 585–591. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC32135/pdf/585.pdf> [Accessed December 1, 2017].
- Baba, T., Nakano, H., Tamai, K., Sawamura, D., Hanada, K., Hashimoto, I., et al. (1998). Inhibitory Effect of β -Thujaplicin on Ultraviolet B-induced apoptosis in mouse keratinocytes. *J. Invest. Dermatol.* 110, 24–28. doi:10.1046/j.1523-1747.1998.00078.x.
- Bandaranayake, P. C. G., Filappova, T., Tomilov, A., Tomilova, N. B., Jamison-McClung, D., Ngo, Q., et al. (2010). A single-electron reducing quinone oxidoreductase is necessary to induce haustorium development in the root parasitic plant *Triphysaria*. *Plant Cell* 22, 1404–1419. doi:10.1105/tpc.110.074831.
- Bolger, A. M., Lohse, M., and Usadel, B. (2014). Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics* 30, 2114–2120. doi:10.1093/bioinformatics/btu170.
- Chang, M., and Lynn, D. G. (1986). The haustorium and the chemistry of host recognition in parasitic angiosperms. *J. Chem. Ecol.* 12, 561–579. doi:10.1007/BF01020572.
- Conn, C. E., Bythell-Douglas, R., Neumann, D., Yoshida, S., Whittington, B., Westwood, J. H., et al. (2015). Convergent evolution of strigolactone perception enabled host detection in parasitic plants. *Science (80-.)*. 349, 540–543. doi:10.1126/science.aab1140.
- Cook, C. E., Whichard, L. P., Turner, B., Wall, M. E., and Egley, G. H. (1966). Germination of witchweed (*striga lutea* Lour.): Isolation and properties of a potent stimulant. *Science (80-.)*. 154, 1189–1190. doi:10.1126/science.154.3753.1189.
- Cui, S., Kubota, T., Nishiyama, T., Juliane, K., Shigenobu, S., Shibata, T. F., et al. (2020). Ethylene signaling mediates host invasion by parasitic plants. *Sci. Adv.* 6. doi:10.1126/sciadv.abc2385.
- Cui, S., Wada, S., Tobimatsu, Y., Takeda, Y., Saucet, S. B., Takano, T., et al. (2018). Host lignin composition affects haustorium induction in the parasitic plants *Phtheirospermum japonicum* and *Striga hermonthica*. *New Phytol.* 218, 710–723. doi:10.1111/nph.15033.
- Cui, S., Wakatake, T., Hashimoto, K., Saucet, S. B., Toyooka, K., Yoshida, S., et al. (2016). Haustorial hairs are specialized root hairs that support parasitism in the facultative parasitic plant *Phtheirospermum japonicum*. *Plant Physiol.* 170, 1492–503. doi:10.1104/pp.15.01786.
- Dunand, C., Crèvecoeur, M., and Penel, C. (2007). Distribution of superoxide and hydrogen peroxide in *Arabidopsis* root and their influence on root development: possible interaction with peroxidases. *New Phytol.* 174, 332–341. doi:10.1111/j.1469-

8137.2007.01995.x.

- Fuller, A. W., Young, P., Pierce, B. D., Kitson-Finuff, J., Jain, P., Schneider, K., et al. (2017). Redox-mediated quorum sensing in plants. *PLoS One* 12, e0182655. doi:10.1371/journal.pone.0182655.
- Godfrey, R., Arora, D., Bauer, R., Stopp, S., Müller, J. P., Heinrich, T., et al. (2012). Cell transformation by FLT3 ITD in acute myeloid leukemia involves oxidative inactivation of the tumor suppressor protein-tyrosine phosphatase DEP-1/ PTPRJ. *Blood* 119, 4499–4511. doi:10.1182/blood-2011-02-336446.
- Gomez-Roldan, V., Fermas, S., Brewer, P. B., Puech-Pagès, V., Dun, E. A., Pillot, J. P., et al. (2008). Strigolactone inhibition of shoot branching. *Nature* 455, 189–194. doi:10.1038/nature07271.
- Goyet, V., Billard, E., Pouvreau, J.-B., Lechat, M.-M., Pelletier, S., Bahut, M., et al. (2017). Haustorium initiation in the obligate parasitic plant *Phelipanche ramosa* involves a host-exudated cytokinin signal. *J. Exp. Bot.* 68, 5539–5552. doi:10.1093/jxb/erx359.
- Goyet, V., Wada, S., Cui, S., Wakatake, T., Shirasu, K., Montiel, G., et al. (2019). Haustorium Inducing Factors for Parasitic Orobanchaceae. *Front. Plant Sci.* 10, 1–8. doi:10.3389/fpls.2019.01056.
- Grabherr, M. G. ., Brian J. Haas, Moran Yassour Joshua Z. Levin, Dawn A. Thompson, Ido Amit, Xian Adiconis, Lin Fan, Raktima Raychowdhury, Qiandong Zeng, Zehua Chen, Evan Mauceli, Nir Hacohen, Andreas Gnirke, Nicholas Rhind, Federica di Palma, Bruce W., N., and Friedman, and A. R. (2013). Trinity: reconstructing a full-length transcriptome without a genome from RNA-Seq data. *Nat. Biotechnol.* 29, 644–652. doi:10.1038/nbt.1883.Trinity.
- Grillo, A. S., SantaMaria, A. M., Kafina, M. D., Cioffi, A. G., Huston, N. C., Han, M., et al. (2017). Restored iron transport by a small molecule promotes absorption and hemoglobinization in animals. *Science (80-.)*. 356, 608–616. doi:10.1126/science.aah3862.
- Holbrook-Smith, D., Toh, S., Tsuchiya, Y., and McCourt, P. (2016). Small-molecule antagonists of germination of the parasitic plant *Striga hermonthica*. *Nat. Chem. Biol.* 12, 724–729. doi:10.1038/nchembio.2129.
- Inamori, Y., Shinohara, S., Tsujibo, H., Okabe, T., Morita, Y., Sakagami, Y., et al. (1999). Antimicrobial activity and metalloprotease inhibition of hinokitiol-related compounds, the constituents of *Thujopsis dolabrata* S. and *Z. hondai* MAK. *Biol. Pharm. Bull.* 22, 990–993. doi:10.1248/bpb.22.990.
- Ishida, J. K., Wakatake, T., Yoshida, S., Takebayashi, Y., Kasahara, H., Wafula, E., et al. (2016). Local auxin biosynthesis mediated by a YUCCA flavin monooxygenase regulates austerium development in the parasitic plant *Phtheirospermum japonicum*. *Plant Cell* 28, 1795–1814. doi:10.1105/tpc.16.00310.

- Ishida, J. K., Yoshida, S., and Shirasu, K. (2017). Quinone oxidoreductase 2 is involved in haustorium development of the parasitic plant *Phtheirospermum japonicum*. *Plant Signal. Behav.* 12, e1319029. doi:10.1080/15592324.2017.1319029.
- Kanampiu, F., and Friesen, D. (2004). Striga weed control with herbicide-coated maize seed. *CIMMYT*.
- Keyes, W. J., O'Malley, R. C., Kim, D., and Lynn, D. G. (2000). Signaling organogenesis in parasitic angiosperms: xenognosin generation, perception, and response. *J. Plant Growth Regul.* 19, 217–231. doi:10.1007/s003440000024.
- Keyes, W. J., Palmer, A. G., Erbil, W. K., Taylor, J. V., Apkarian, R. P., Weeks, E. R., et al. (2007). Semagenesis and the parasitic angiosperm *Striga asiatica*. *Plant J.* 51, 707–716. doi:10.1111/j.1365-313X.2007.03171.x.
- Keyes, W. J., Taylor, J. V., Apkarian, R. P., and Lynn, D. G. (2001). Dancing together. social controls in parasitic plant development. *Plant Physiol.* 127, 1508–12. doi:10.1104/pp.010753.1508.
- Kim, D.-S., Park, S.-H., Kwon, S.-B., Li, K., Youn, S.-W., and Park, K.-C. (2004). (–)-Epigallocatechin-3-gallate and hinokitiol reduce melanin synthesis via decreased MITF production. *Arch. Pharm. Res.* 27, 334–339. doi:10.1007/BF02980069.
- Kim, D., Kocz, R., Boone, L., Keyes, W. J., and Lynn, D. G. (1998). On becoming a parasite: evaluating the role of wall oxidases in parasitic plant development. *Chem. Biol.* 5, 103–117. doi:10.1016/S1074-5521(98)90144-2.
- Langmead, B., and Salzberg, S. (2013). Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nat. Methods* 9, 357–359. doi:10.1038/nmeth.1923.Fast.
- Laohavisit, A., Wakatake, T., Ishihama, N., Mulvey, H., Takizawa, K., Suzuki, T., et al. (2020). Quinone perception in plants via leucine-rich-repeat receptor-like kinases. *Nature* 587, 92–97. doi:10.1038/s41586-020-2655-4.
- Liang, L., Liu, Y., Jariwala, J., Lynn, D. G., and Palmer, A. G. (2016). Detection and adaptation in parasitic angiosperm host selection. *Am. J. Plant Sci.* 07, 1275–1290. doi:10.4236/ajps.2016.78123.
- Meng, L., Ruth, K. C., Fletcher, J. C., and Feldman, L. (2010). The roles of different CLE domains in arabidopsis CLE polypeptide activity and functional specificity. *Mol. Plant* 3, 760–772. doi:10.1093/mp/ssq021.
- Mittler, R. (2017). ROS are good. *Trends Plant Sci.* 22, 11–19. doi:10.1016/j.tplants.2016.08.002.
- Noutoshi, Y., Ikeda, M., Saito, T., Osada, H., and Shirasu, K. (2012). Sulfonamides identified as plant immune-priming compounds in high-throughput chemical screening increase disease resistance in *Arabidopsis thaliana*. *Front. Plant Sci.* 3. doi:10.3389/fpls.2012.00245.
- O'Malley, R. C., and Lynn, D. G. (2000). Expansin message regulation in parasitic

- angiosperms: marking time in development. *Plant Cell* 12, 1455–1465.
doi:10.1105/tpc.12.8.1455.
- Osteryoung, K. W., Toenjes, K., Hall, B., Winkler, V., and Bennett, A. B. (1990). Analysis of tomato polygalacturonase expression in transgenic tobacco. *Plant Cell* 2, 1239–1248.
doi:10.2307/3869342.
- Parker, C. (2009). Observations on the current status of orobanche and striga problems worldwide. *Pest Manag. Sci.* 65, 453–459. doi:10.1002/ps.1713.
- Qi, J., Wang, J., Gong, Z., and Zhou, J. M. (2017). Apoplastic ROS signaling in plant immunity. *Curr. Opin. Plant Biol.* 38, 92–100. doi:10.1016/j.pbi.2017.04.022.
- Roberts, A., and Pachter, L. (2013). Streaming fragment assignment for real-time analysis of sequencing experiments. *Nat. Methods* 10, 71–73. doi:10.1038/nmeth.2251.
- Ryan, C. A. (2000). The systemin signaling pathway: Differential activation of plant defensive genes. *Biochim. Biophys. Acta - Protein Struct. Mol. Enzymol.* 1477, 112–121.
doi:10.1016/S0167-4838(99)00269-1.
- Ryan, C. A., and Pearce, G. (2003). Systemins: A functionally defined family of peptide signals that regulate defensive genes in Solanaceae species. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100, 14577–14580. doi:10.1073/pnas.1934788100.
- Sagi, M., and Fluhr, R. (2006). Production of Reactive Oxygen Species by Plant NADPH Oxidases. *PLANT Physiol.* 141, 336–340. doi:10.1104/pp.106.078089.
- Samejima, H., Babiker, A. G., Mustafa, A., and Sugimoto, Y. (2016). Identification of *Striga hermonthica*-Resistant Upland Rice Varieties in Sudan and Their Resistance Phenotypes. *Front. Plant Sci.* 7, 1–12. doi:10.3389/fpls.2016.00634.
- Schweikert, C., Liskay, A., and Schopfer, P. (2002). Polysaccharide degradation by fenton reaction- or peroxidase generated hydroxyl radicals in isolated plant cell walls. *Phytochemistry* 61, 31–35.
- Smith, C. E., Rutledge, T., Zeng, Z., O'Malley, R. C., and Lynn, D. G. (1996). A mechanism for inducing plant development: the genesis of a specific inhibitor. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93, 6986–6991. doi:10.1073/pnas.93.14.6986.
- Spallek, T., Mutuku, M., and Shirasu, K. (2013). The genus *Striga*: A witch profile. *Mol. Plant Pathol.* 14, 861–869. doi:10.1111/mpp.12058.
- Tanaka, T., Satoh, T., Onozawa, Y., Kohroki, J., Itoh, N., Ishidate, M., et al. (1999). Apoptosis during iron chelator-induced differentiation in F9 embryonal carcinoma cells. *Cell Biol. Int.* 23, 541–550. doi:10.1006/cbir.1999.0407.
- Tian, T., Liu, Y., Yan, H., You, Q., Yi, X., Du, Z., et al. (2017). AgriGO v2.0: A GO analysis toolkit for the agricultural community, 2017 update. *Nucleic Acids Res.* 45, W122–W129.
doi:10.1093/nar/gkx382.
- Toh, S., Holbrook-Smith, D., Stogios, P. J., Onopriyenko, O., Lumba, S., Tsuchiya, Y., et al. (2015). Structure-function analysis identifies highly sensitive strigolactone receptors in

- Striga*. *Science (80-)*. 350, 203–207. doi:10.1126/science.aac9476.
- Townsley, B. T., Covington, M. F., Ichihashi, Y., Zumstein, K., and Sinha, N. R. (2015). BrAD-seq: Breath Adapter Directional sequencing: a streamlined, ultra-simple and fast library preparation protocol for strand specific mRNA library construction. *Front. Plant Sci.* 6, 1–11. doi:10.3389/fpls.2015.00366.
- Tsuchiya, Y., Yoshimura, M., Sato, Y., Kuwata, K., Toh, S., Holbrook-Smith, D., et al. (2015). Probing strigolactone receptors in *Striga hermonthica* with fluorescence. *Science (80-)*. 349, 864–868. doi:10.1126/science.aab3831.
- Umehara, M., Hanada, A., Yoshida, S., Akiyama, K., Arite, T., Takeda-Kamiya, N., et al. (2008). Inhibition of shoot branching by new terpenoid plant hormones. *Nature* 455, 195–200. doi:10.1038/nature07272.
- Uraguchi, D., Kuwata, K., Hijikata, Y., Yamaguchi, R., Imaizumi, H., AM, S., et al. (2018). A femtomolar-range suicide germination stimulant for the parasitic plant *Striga hermonthica*. *Science (80-)*. 362, 1301–1305. doi:10.1126/science.aau5445.
- Wada, S., Cui, S., and Yoshida, S. (2019). Reactive Oxygen Species (ROS) Generation is indispensable for haustorium formation of the root parasitic plant *Striga hermonthica*. *Front. Plant Sci.* 10, 1–12. doi:10.3389/fpls.2019.00328.
- Wang, Y., Murdock, M., Lai, S. W. T., Steele, D. B., and Yoder, J. I. (2020). Kin recognition in the parasitic plant *Triphysaria versicolor* is mediated through root exudates. *Front. Plant Sci.* 11. doi:10.3389/fpls.2020.560682.
- Wang, Y., Steele, D., Murdock, M., Lai, S., and Yoder, J. (2019). Small-molecule screens reveal novel haustorium inhibitors in the root parasitic plant *Triphysaria versicolor*. *Phytopathology* 109, 1878–1887. doi:10.1094/PHYTO-04-19-0115-R.
- Westwood, J. H., Yoder, J. I., Timko, M. P., and dePamphilis, C. W. (2010). The evolution of parasitism in plants. *Trends Plant Sci.* 15, 227–235. doi:10.1016/j.tplants.2010.01.004.
- Wickett, N. J., Honaas, L. A., Wafula, E. K., Das, M., Huang, K., Wu, B., et al. (2011). Transcriptomes of the parasitic plant family orobanchaceae reveal surprising conservation of chlorophyll synthesis. *Curr. Biol.* 21, 2098–2104. doi:10.1016/j.cub.2011.11.011.
- Wu, F., Chi, Y., Jiang, Z., Xu, Y., Xie, L., Huang, F., et al. (2020). Hydrogen peroxide sensor HPCA1 is an LRR receptor kinase in *Arabidopsis*. *Nature* 578, 577–581. doi:10.1038/s41586-020-2032-3.
- Yang, Z., Wafula, E. K., Honaas, L. A., Zhang, H., Das, M., Fernandez-Aparicio, M., et al. (2015). Comparative transcriptome analyses reveal core parasitism genes and suggest gene duplication and repurposing as sources of structural novelty. *Mol. Biol. Evol.* 32, 767–790. doi:10.1093/molbev/msu343.
- Yoshida, S., Cui, S., Ichihashi, Y., and Shirasu, K. (2016). The Haustorium, a Specialized Invasive Organ in Parasitic Plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* 67, 643–667.

doi:10.1146/annurev-arplant-043015-111702.

Yoshida, S., Kim, S., Wafula, E. K., Tanskanen, J., Kim, Y.-M. M., Honaas, L., et al. (2019).

Genome sequence of *striga asiatica* provides insight into the evolution of plant parasitism. *Curr. Biol.* 29, 3041-3052.e4. doi:10.1016/j.cub.2019.07.086.

Zimmermann, P., Hirsch-Hoffmann, M., Hennig, L., and Gruissem, W. (2004).

GENEVESTIGATOR. Arabidopsis microarray database and analysis toolbox. *PLANT Physiol.* 136, 2621–2632. doi:10.1104/pp.104.046367.