

植物進化の戦略分子

西谷 和彦

神奈川大学理学部理学科
〒221-8686 神奈川県横浜市神奈川区六角橋 3-27-1

Strategic Molecules in Plant Evolution

Kazuhiko Nishitani

Faculty of Science, Kanagawa University,
3-27-1 Rokkakubashi, Kanagawa-ku, Yokohama, Kanagawa 221-8686, Japan

DOI: 10.24480/bsj-review.15a1.00254

地球の海で生命が生まれたのは約 40 億年前で (Tashiro et al. 2017) , 約 20 億年前には陸上植物の祖先である淡水棲のアーケプラスチダ (Archaeplastida) が生まれたと推定されている (Sánchez-Baracaldo et al. 2017) 。しかし, そのアーケプラスチダの子孫が陸上に進出し始めるのは 5 億年前で, 被子植物が多様化して多彩な陸上生命圏を作り始めるのは、漸く 1 億年前になってからのことである (Benton et al. 2022) 。つまり、生命誕生以来 35 億年の間、地球の陸地は生命を寄せ付けない不毛の地であったことになる。この事実は、陸上環境が生命の生存にとって如何に過酷であるかを如実に物語ると同時に、陸上進出を果たし、陸上で多様化した祖先の末裔である現生の陸上植物は、過酷な陸上環境を克服するために祖先が獲得した貴重な遺伝子を継承していると推定できる。

パイオニアとして陸上に生命圏を作り上げた陸上植物の祖先は、淡水環境に最適化した独自の多細胞体制を単細胞から作り上げ、多様化と大型化の方向に進化してきたことが、ゲノムから窺える (Harholt et al. 2016 ; Bowman et al. 2017 ; Nishiyama et al. 2018) 。その結果、現生の陸上植物は、地球上の全バイオマス量の 80%以上を占めるに至っている (Bar-On et al. 2018) 。その炭素量は現在の地球大気二酸化炭素量の半分以上に及ぶ (IPCC 2013) 。ここで注目すべき点は、この植物バイオマスを構成する炭素化合物の殆どが、陸上環境への適応のために陸上植物が独自の代謝経路を進化させて作り出した「戦略分子」の側面を持つことである。それら植物固有の炭素化合物の種類や、それを作るための代謝経路は、植物種毎に多様で、その種類は膨大な数に上ることは容易に想像できる。これらの炭素化合物を、我々人類は、これまでエネルギー資源や、食料、素材、医薬など、様々な用途に利用していることから、「植物資源はすでに十分に解明され、利用し尽くされている」と思いがちである。しかし、実際のところは、我々人類がこれまで利用してきた植物起源の炭素化合物の総量は、炭素換算にして、高々年間 2Pg/y (20 億トン炭素/年) で、陸上での年間純生産量 60Pg の数% にすぎない (Pauly and Keegstra 2008 ; IPCC 2013) 。つまり、我々人類が理解し、利用していると思っている植物由来の炭素資源は、バイオマス全体の極一部に過ぎず、残りの大部分は今尚、未解明・未利用で、人類の目に触れることもなく、炭素循環の過程を経て最終的には微生物により酸化され、二酸化炭素となり大気に戻っているわけである。こ

れら未知の膨大な炭素化合物の生物機能の解明やその利活用は、基礎科学の視点からも、資源利用の視点からも、非常に魅力的な未踏の研究領域であると言える。

2020 年発足の JST さきがけ領域「植物分子の機能と制御」では、上記の観点から植物起源の炭素化合物に着眼し、植物由来の化合物及びその関連遺伝子を「植物分子」と定義し、その分子そのものの機能や、それを作り出す代謝系、更に、分子機能が発揮される仕組みに焦点を当て、分子・細胞から生態系までを俯瞰できる視点で、未知の生命現象の解明を目指してきた。同時に、植物分子の有効利用に資する基礎的知見の創出と革新技術の構築に向けた研究を進めてきた。

その成果公開の一環として、日本植物学会第 87 回大会（2023 年 9 月）において、日本植物学会と JST さきがけとの共催で「植物進化の戦略分子」というテーマでシンポジウムを開き、4 つの演題で講演をおこなった。本総説集はその講演内容を元にして、（1）植物に特徴的なゲノム倍化が植物の「新機能」を創出するメカニズム解明に向けたゲノム科学からのアプローチを赤木剛士が、（2）植物固有の二次代謝系であるフェニルプロパノイド代謝に普遍的に見られる収斂進化の具体例の解明と代謝工学への応用の可能性を棟方涼介が、

（3）種子植物が花粉の特性を巧みに利用した戦略的 RNA 利用法の進化について元村一基が、（4）植物に寄生してその発生過程を操り、虫瘤という器官を植物に作らせ、そこに住み着く昆虫の分子戦略を平野朋子が、それぞれ、書き下ろしたものである。これまで注目されることの少なかった「植物進化の戦略分子」という切り口で、植物科学への新しいアプローチを拓くヒントになれば幸いである。

最後に、BSJ-Review への寄稿の機会を与えてくださいました日本植物学会電子出版物編集委員の皆様には感謝申し上げます。

引用文献

- Bar-On YM, Phillips R, Milo R. (2018) The biomass distribution on Earth. PNAS 115: 6506–6511. doi: 10.1073/pnas.1711842115
- Benton MJ, Wilf P, Sauquet H. (2022) The angiosperm terrestrial revolution and the origins of modern biodiversity. New Phytologist 233: 2017–2035. doi.org/10.1111/nph.17822
- Bowman JL, Kohchi T, Yamato KT, Jenkins J, Shu S, Ishizaki K, Yamaoka S, Nishihama R, Nakamura Y, Berger F et al. (2017) Insights into land plant evolution garnered from the *Marchantia polymorpha* genome. Cell 171: 287–304. doi: 10.1016/j.cell.2017.09.030
- Harholt J, Moestrup Ø, Ulvskov P. (2016) Why plants were terrestrial from the beginning. Trend Plant Science 21: 96–101. doi: 10.1016/j.tplants.2015.11.010
- IPCC (2013) The Physical Science Basis. Chapter 6, Carbon and other biochemical cycle p 6. <https://www.ipcc.ch/report/ar5/wg1/>
- Nishiyama T, Sakayama H, de Vries J, Buschmann H, Saint-Marcoux D, Ullrich K, Haas F, Vanderstraeten L, Becker D, Lang D et al. (2018) The chara genome: secondary complexity and implications for plant terrestrialization. Cell 174: 448–464. doi: 10.1016/j.cell.2018.06.033
- Sánchez-Baracaldo P., Raven JA, Pisani D, Knoll AH. (2017). Early photosynthetic eukaryotes inhabited low-salinity habitats. PNAS 114: E7737–E7745. doi: 10.1073/pnas.1620089114

- Tashiro T, Ishida A, Hori M, Igisu M, Koike M, Méjean P, Takahata N, Sano Y, Komiya T. (2017)
Early trace of life from 3.95 Ga sedimentary rocks in Labrador, Canada. *Nature* 549: 516–518.
doi: 10.1038/nature24019
- Pauly K and Keegstra K (2008) Cell-wall carbohydrates and their modification as a resource for
biofuels. *Plant J.* 54: 559–568. doi: 10.1111/j.1365-3113X.2008.03463.x

ゲノム倍化が創出する植物の「新機能」

赤木 剛士^{1, 2}

¹岡山大学 学術研究院 環境生命自然科学学域

〒700-8530 岡山市北区津島中 1-1-1

²科学技術振興機構・さがけ

〒102-0076 東京都千代田区五番町 7

Neofunctionalization triggered via genome-duplications in plants

Takashi Akagi^{1, 2}

¹Graduate School of Environmental Life and Natural Science, Okayama University,

1-1-1 Tsushima-naka, Kita-ku, Okayama, 700-8530, Japan

²JST・PRESTO, Goban-cho 7, Chiyoda-ku, Tokyo, 102-0076, Japan

Keywords: adaptation, *cis*-evolution paleoploidization, polyploidization, positive selection

DOI: 10.24480/bsj-review.15a2.00255

植物は特別：多すぎるゲノムの倍化

私たちが口にする「作物」の多くは倍数体、すなわちゲノム倍化を経由したものであることをご存じだろうか？コムギやジャガイモ・バナナなどの主要作物に限らず、イチゴ・コーヒーマ・ワタ（綿花）・カキ・ブルーベリーなどと言った果菜類・嗜好品においても多くのものが倍数体である（Salman-Minkov et al. 2016）。もっとも、作物に倍数体が多いということは半ば周知の事実のようであり、一般には「倍数体はサイズが大きいから」と解釈されるもののようなのである。しかし、倍数体が選ばれてきた理由は必ずしもそんな単純なものでは無く、実は作物に限らず、植物では極めてゲノム倍化した種が多いことが分かっている（Akagi et al. 2022a）。一般に倍数体と呼ばれるものは、最近になってゲノム倍化が生じ、サブゲノム化がまだ生じていない種のことを指すが、この時間軸を広げてみると、数百～数千万年ほど前に「古ゲノム倍化」と呼ばれるゲノム倍化を経験し、今は二倍体種として定着した種も多く存在している（図1）。興味深いことに、被子植物では現存種の7-8割程度がこの「古ゲノム倍化」を経験したものであることが示唆されており（Van de Peer et al. 2017）、この割合は動物界の系統群と比較しても明らかに「異常値」である。では、なぜこのような「ゲノム倍化」に特化した進化を植物は遂げてきたのだろうか？一つの可能性として「植物は動けない」という特性があるだろう。上述の古ゲノム倍化であるが、そのほとんどが大量絶滅期に起きたことが示唆されており、K-Pg境界と呼ばれるおよそ6,600万年前の最終大量絶滅期において最も多くの古ゲノム倍化が生じたと考えられている（Van de Peer et al. 2017）。動けない植物は、この絶大な環境変化に耐えることが出来ないが、ごく一部のものがゲノム倍化を起こし、運よく何らかの新機能を手にして現在まで生き残っていると考えることが出来る。実際、被子植物でありながら水中で暮らすアマモ（*Zostera marina*）などは、最終大量絶滅期をゲノム倍化で獲得した潜水能によって生き抜いたことが示唆されている（Olsen et al. 2016）。

遺伝子重複：困る？それとも助かる？

ゲノム倍化によって遺伝子が増えたら予備が出来てラッキー、と思われるかもしれないが、進化学的に見ればこれは危険度を増す行為に他ならない。潜在的な害悪変異をゲノム内に集積することが可能であり、古典的な考え方に基づけば、速やかに排除 (pseudogenization) もしくは、増えた遺伝子間でオリジナルの機能を分担 (subfunctionalization) することが望ましい。後者に関しては古くは1970年に大野乾博士によって提唱された「遺伝子重複説」(Ohno 1970) を主とする概念であり、生物における進化の原動力の一つとしてゲノム・遺伝子倍化が挙げられる所以でもある。一方、この遺伝子重複説の中にも書かれているように、倍化遺伝子のいくつかは、その冗長性ゆえに既存の選択圧から逃れて「新しい機能を獲得する (neofunctionalization)」ことも可能である。図1に示すように (幾つは後で詳しく紹介するが) 古ゲノム倍化は、その種を代表するような新形質獲得を駆動していることが多々あり、近年のゲノム解読論文では往々にしてこの系統特異的形質獲得と種特異的ゲノム倍化の関係性を論じているものがとにかく多い。さて、遺伝子の倍化現象に伴う新機能では、二つの単位「発現パターン」と「タンパク質機能」という独立した観点から起こりえる事象を観察する必要があるが、古典的な研究ではあるが、動植物の倍化遺伝子群について俯瞰的に見れば、圧倒的に「遺伝子発現のパターン」が倍化後の早急な応答として表れているようである (Lynch and Conery 2000)。

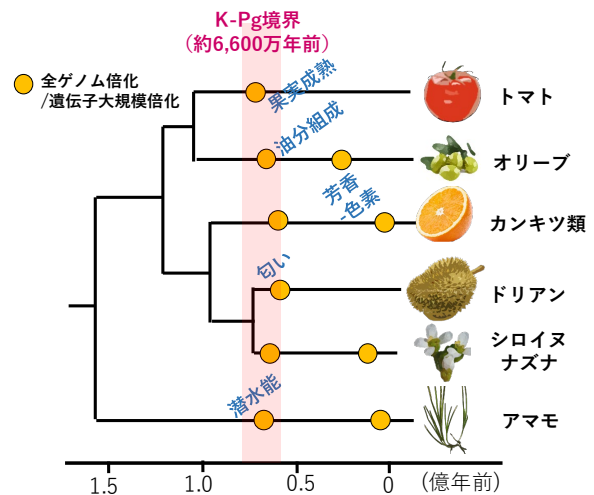


図1. 植物における古ゲノム倍化とそれを起点とした種を代表する新形質の獲得

重複遺伝子における新規発現パターンの獲得

ゲノム倍化後に早急に表れると考えられている遺伝子発現パターンの変化であるが、これは転写因子の機能変化に伴うネットワークの変化ではなく、主に「*cis* 進化 (プロモーター領域の変化)」として捉えられているものである。例えば、近年になってゲノム倍化を経験しているダイズでは、ゲノムワイドな重複遺伝子 (パラログ) 間における機能変化を *trans/cis* 機能の両観点から吟味しているが、ここでも圧倒的に *cis* 進化の方が早いという結論に至っている (Roulin et al. 2013)。私たちの身近なところ言えば、トマトが良い例だろう。トマトは「果実形質のモデル」として長きにわたって扱われてきた種であるが、その果実成熟の鍵となる遺伝子群、例えば *RIPENING INHIBITOR (RIN)* などが他果実種に適用できないケースが多く、多くの疑問があった (しかし、ネガティブデータは世に出ないことが多いため、その多くは無視されてきた)。この疑問に対しての一つの答えは、トマトの果実成熟遺伝子の多くが「トマト系統に特異な古ゲノム倍化で生まれた重複遺伝子」であり、この特異なゲノム倍化とその後の (主として) 発現パターン変化を経験していない他種では同じ機能を発揮できない、というものである (Tomato Genome Consortium 2012)。このような古ゲノム倍化の

重複遺伝子における新規発現獲得の例は、他にも、オリーブにおける油成分構成遺伝子群 (Unver et al 2017) , ドリアンの強烈な匂いを構成する遺伝子群 (Teh et al. 2017) , キウイフルーツの性決定遺伝子 (Akagi et al. 2018) などが相当しており、いずれもその種に特異的な形質獲得へと繋がっている。他方、これらの *cis* 機能変化メカニズムは十分には明らかにされていない。後述するように、ゲノム・エピゲノムワイドな再編における発現変化もあり得るが、プロモーター領域からの遺伝子発現決定要因の予測は極めて難しく、これには、遺伝子発現決定における *cis-trans* 相互作用寄与の「曖昧性」や「複雑性」が関与している。つまり、ある遺伝子に着目した際に、その遺伝子発現を単一の転写因子 (*trans* 因子) やその結合モチーフ (*cis* 因子) の画一的な位置から決定することは極めて難しく、これに対応した統計学もそれほど発達していない。複数の *cis* モチーフの組み合わせという概念から発現有意差を定義するツールや、曖昧性を考慮する機械学習・深層学習を活用した *cis* モチーフからの遺伝子発現予測ツールも次第に開発されてきており (Meng et al. 2021, Akagi et al. 2022b) , これらの活用によって、重複遺伝子における *cis* 進化を定義できる可能性は今後広がっていくだろう。

重複遺伝子における新規タンパク質機能の獲得

「起こりやすい」と考えられてきた *cis* 進化に対して、重複遺伝子におけるタンパク質機能の新機能獲得は思ったほど起こっていない…と考えられがちである。これは、かの中立進化説にもあるように、新規のタンパク質機能に対して正の選択圧が見られることが比較的稀であることから支持されるものかもしれない。しかし、これを最新の考え方・技術で見直してみるとどうだろう？正の選択圧、すなわち進化速度の上昇にしても、現存アレル情報の単純比較において遺伝子全体像で見た際に有意な進化速度上昇が見られるものはごく一部のものに過ぎないだろう (図 2a) 。実際は、遺伝子の一部領域のみが改変を受け、部分的かつ進化の過程で一過的にのみ適応的選択を踏む (図 2b) というのが現状だろう。幸いにして、最近 (というわけでもないが) ではこの概念を検出可能な解析法は幾つか存在する。古くは PAML による枝一サイトモデル (Yang 2007) を活用したもの、最近のものでは著者が多用している BUSTED (Murrell et al. 2015) などはこの「一過的な正の選択圧 (episodic positive selection) 」の検出に有効であろう。

実際に一過的正の選択圧を経験し、新機能を獲得した重複遺伝子というのはどれほど存在するのだろうか？「新機能の証明」というのはなかなか壁が高いことが多いが、実際に証明が行われた例としては、イネにおけるジベレリンレセプター *GID1* (Yoshida et al. 2018) やカキの性決定遺伝子 *MeGI* (Akagi et al. 2020) などが例として挙げられる。いずれも、重複遺伝子機能が根本的に変化したわけでは無く、立体構造における最適化や、ヘテロダイマーを形成する相互作用部位の変化など、ごく細かい領域の変化が適応進化として選択を受けた形跡が見て取れる。実は被子植物のモデルとして扱われるシロイヌナズナなども良い例を示しているかもしれない。というのも、詳しくは後述するが、シロイヌナズナは近年になってゲノムの古六倍体化を経験した種であり、二倍体化はしているものの、遺伝子機能には冗長性が高く、一方でこの古六倍体化に起因したパラログ間において一過的な正の選択圧が検出され

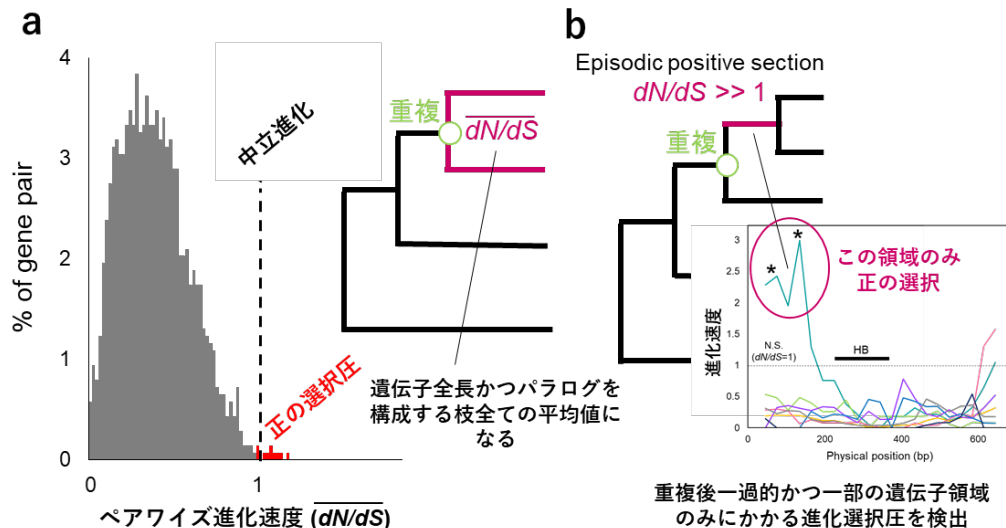


図2. 重複遺伝子にかかる進化選択圧の概念

- 古典的な進化速度計算：パラログ間において非同義置換 (dN) と同義置換 (dS) の比から算出される進化速度 (dN/dS) を「遺伝子全長」かつ「比較パラログ間を構成する枝全体 (マゼンタ色の枝全て)」で平均化するため、有意な差異がほとんど検出されない。
- 遺伝子重複後、進化速度 (dN/dS) が変化し、適応したアレルが成立する前までの進化枝 (マゼンタ色の枝) において、遺伝子内部の特異的な領域の進化速度変化を読み取る。アステリスク (*) に表すように一部の領域のみが進化速度の急上昇を示すことが多い。

るものも少なくない (赤木・未発表)。往々にして「別の遺伝子」として扱われている例も多いが、他種植物種を含む系統樹において俯瞰すれば、それらがシロイヌナズナ系統での特異的な遺伝子重複であり、何らかの機能分化、あるいは新機能獲得を起こしていることは明白である。

タンパク質の新機能推定という、思いつくものの一つは深層学習による立体構造予測かもしれない。最近では AlphaFold2 (Jumper et al. 2021) があまりに有名であるが、安易な利用によって間違った解釈をされている研究例が極めて多いのでここで付記しておく。現在使われている深層学習 (正確には **transformer** というモデル) ベースの予測モデルは、いずれも「アミノ酸残基間の繋がり (**attention**)」を使って「既出のタンパク質構造における進化の連続性」を学習したものである。これは内部で使われているアルゴリズム自体が「**evoformer**」と名付けられていることからもうかがえる。言い換えると、多少の外挿予測は可能であれ、全く新規の「進化の連続性外」にある構造を予測するものではない。つまり、つい最近生じたランダムな新しい残基変異や、これまで例がないパターンの残基組み合わせから成る新規構造には理論的には対応できない。幸いにして、内部的な **attention map** (AlphaFold2 の場合ではアミノ酸残基間の関連性・繋がりを示したもの) から「正しく予測できたか・できなかったか」をうかがい知ることは可能である。AlphaFold2 は時として新規変異群の立体構造をぴしゃりと当てているが、それらの各例を **attention map** の観点からよく見ると、新規変異が既学習の (どこか別のタンパク質ファミリー内で起こった) 変異 (配列内残基組み合わせ) を再現しているだけであるということに気づく。タンパク質構造というものの自体にある一定の進化の可動

域もしくは制約性がある以上、自然選択下で残存した変異にファミリーを超えた一定のパターンが存在するのは、ある意味理にかなっているものかもしれない。

全ゲノムレベルでの新機能獲得

これまではゲノム倍化を、ゲノム内の個々のユニット、すなわち遺伝子単位に落とし込んだ内容を紹介したが、ゲノム全体として起こる再編成というものも当然重要な役割を帯びてくる。染色体単位という観点で言えば、ゲノム倍化（異質倍数化）に応じて起こると考えられているサブゲノムドミナンスという現象が新しい制御ネットワークや遺伝子機能の可塑性を生む可能性が示唆されている。一方のサブゲノムのみの保存性・貢献度が上がり、他サブゲノムでは早急に不活化や新規再編が行われるものである。トランスポゾンの寄与やエピゲノム再編成など、多くの要因が推察されているがその理由は明確ではない。身近な植物の柔軟な進化にも寄与しているものであり、アブラナ科のカブ・ハクサイの分化 (Wang et al. 2022) や食虫植物であるウツボカズラの遺伝子新機能進化においても議論されている (Saul et al. 2023)。また、おそらく

サブゲノムドミナンスにも関わるのだが、ゲノム倍化に関わるより幅広い概念として「ゲノムショック」というものがある。二つのゲノムが融合した際に起こりえる未定義の変化全てがゲノムショックなのかもしれないが、具体的にはエピゲノムの再編やそれに伴うであろうトランスポゾン類の爆発などを意味することが多い。ワタにおいて研究が進んでおり、両親ゲノムと比較した際の非相加的なトランスポゾン蓄積や、DNA メチル化のパターン変化、それらに伴

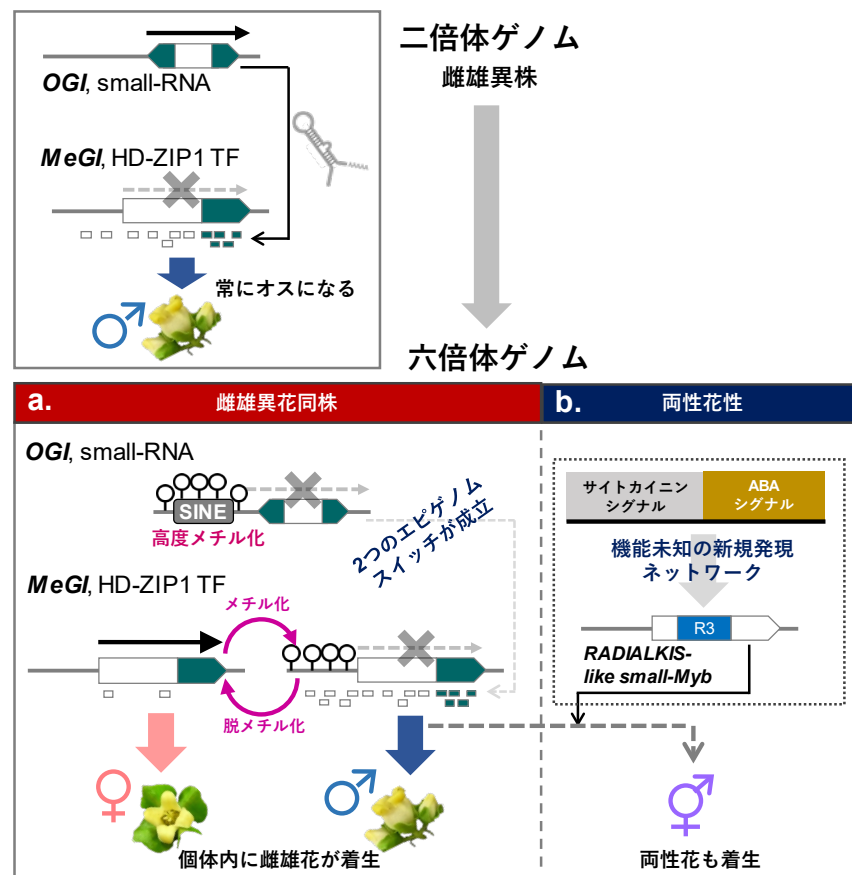


図3. 二倍体から六倍体カキにおける性決定システムの変化

う euchromatin/heterochromatin 領域や非組み換え領域の変化などが対象になっている (Chen et al. 2020)。また、六倍体のカキでは性決定システムに対してその中間鍵因子として機能する *MeGI* に対して新規エピゲノムスイッチが成立しているが、これは二倍体近縁種では検出する

ことが出来ない (図 3a, Akagi et al. 2016)。このように、倍数体特異的なエピゲノム制御が成立しているケースは多々あるように思われるが、これまでに具体的な発生メカニズムについては全く知見が無い。フロンティアとして価値は高いものの、何が原因となって起こりえる現象であるのか、その起点という観点から極めて問題設定が難しい課題でもあるように思う。

ゲノム倍化による定向性進化はあり得るのか？

遺伝子・ゲノム、それぞれについて倍化に応じて起こりえる応答を挙げてきたが、ゲノム倍化の結果として何か方向性を持った進化が行われるか？という問いがよく挙げられる。一般には、環境耐性付与や生殖システムの変化などが見て取れるが (Comai 2005)、これはあくまでも「環境要因に依存した適応進化を踏んだ後」の話であって、ゲノム倍化自身が引き起こす形質変化は基本的にはランダムであり、その後の自然選択によって環境に応じた方向性が生まれてくるとする理論が多い (Soltis et al. 2015)。例えば、オランダイチゴ属 (*Fragaria* 属) では多様な倍数化現象が見られ、主に北アメリカ大陸を中心として広い分布を持っているが、ゲノム倍化自体における各形質の変化の方向性はバラバラであり、「ゲノム倍化によって最初から決まった運命などなく、結果としてそう見えているだけ」という結論を出している (Wei et al. 2019)。なお、これはフランス文学者 D. Didrot の作品「Jacques the fatalist and his master (運命論者ジャックとその主人)」になぞらえた仮説として「Jack & his master theory」という名前で提唱されている。この概念は遺伝子制御という観点からも一定の支持を受けており、遺伝子重複における制御系の変改においてその方向性を定義したものは無く「予期しない何らかの非相加的調節」が行われる可能性が古くから提唱されている (Flagel & Wendel 2009)。

一方、農業分野の経験的知見から見るとどうだろう？育種的な目的から人為的に作出された倍数体は明らかにサイズが大きくなるケースが多い。例えばキウイフルーツを見ても、人為四倍体は果実サイズが大きくなるし (Wu et al. 2012)、高次倍数体になれば単為結果性も倍数性依存的に発生する可能性が示唆されている (Kataoka et al. 2010)。また、私たちが口にするカキ (*Diospyros kaki*) は六倍体であるが、二倍体では雌雄異個性 (dioecy) を基本とするものの、六倍体では雌雄異花同株 (monoecy) となり (図 3a で例示)、さらに両性花の着生も見られる (図 3b)。この両性花の着生は *RADIALIS* 様遺伝子の新規発現獲得によるものであり、栽培ガキ特異的に成立したものであるが (Masuda et al. 2022)、全く異なるカキ属系統群の複数の六倍体種においても両性花の着生が確認されることが分かっており、これは明らかな倍数性依存的な収斂進化である。

ゲノム倍化における系統特異性からの警鐘

さて、ここで私たちが気を付けなくてはいけないのが「モデル」という枠の考え方である。私自身、シロイヌナズナのデータベースにはいつもお世話になっており、基本的な遺伝子の構造や推定機能は、やはりシロイヌナズナに頼らざるを得ない。しかし、一方で、植物はシロイヌナズナを起点として進化したわけではない。実際、進化学の観点から見るとシロイヌ

ナズナ（もしくはアブラナ科）はかなり特異な倍化進化を辿っており、双子葉植物共通の古ゲノム倍化 (γ)、アブラナ科共通の古ゲノム倍化 (β) に加えて、シロイヌナズナはつい最近の六倍体化 (α) を経験している。具体的な証明例は無いが、単系統構造を示す遺伝子の系統樹においていつもシロイヌナズナでは 3 つセットでパラログが出現するイメージがある。Triple mutant まで作らないと形質変化が現れないのも納得である。また、古ゲノム倍化 β などを起点として正の選択圧検出を行ってやると、相応の数の遺伝子が適応進化した可能性が得られる。つまり、アブラナ科に特化した遺伝子機能もそれなりにはありそうということである。また、上述したトマトの果実成熟遺伝子などは良い例であり、*RIN* 遺伝子の報告 (Vrevalov et al. 2002) 以来、世界中の研究者が他植物種で *RIN* オーソログを研究したにもかかわらず、*RIN* オーソログが果実成熟において鍵となっているという結果のデータはほとんど得られていない。これらの話から、ゲノム倍化だらけの植物においてはそもそも、動物研究で成立しているような「モデル」という概念は通用せず、「十人十色」こそが本質では無いか？と思う瞬間が往々にしてあるのだが、かといって、モデル植物の知見無しでは何もできないのも事実である。要は、モデル推進・非推進に偏らず、正しい理解のもとで「いい塩梅でモデル・各論を使い分ける」ことなのだと理解している。

引用文献

- Akagi T, Henry IM, Kawai T, Comai L, Tao R. (2016) Epigenetic regulation of the sex determination gene *MeGI* in polyploid persimmon. *Plant Cell* 28: 2905–2915. doi.org/10.1105/tpc.16.00532
- Akagi T, Henry IM, Ohtani H, Morimoto T, Beppu K, Kataoka I, Tao R. (2018) A Y-encoded suppressor of feminization arose via lineage-specific duplication of a cytokinin response regulator in kiwifruit. *Plant Cell* 30: 780–795. doi.org/10.1105/tpc.17.00787
- Akagi T, Shirasawa K, Nagasaki H, Hirakawa H, Tao R, Comai L, Henry IM. (2020) The persimmon genome reveals clues to the evolution of a lineage-specific sex determination system in plants. *PLoS Genet* 16: e1008566. doi.org/10.1371/journal.pgen.100884
- Akagi T, Jung K, Masuda K, Shimizu KK. (2022a) Polyploidy before and after domestication of crop species. *Curr Opin Plant Biol* 69: 102255. doi.org/10.1016/j.pbi.2022.102255
- Akagi T, Masuda K, Kuwada E, Takeshita K, Kawakatsu T, Ariizumi T, Kubo Y, Ushijima K, Uchida S. (2022b) Genome-wide *cis*-decoding for expression design in tomato using cistrome data and explainable deep learning. *Plant Cell* 34: 2174–2187. doi.org/10.1093/plcell/koac079
- Chen ZJ, Sreedasyam A, Ando A, Song Q, De Santiago LM, Hulse-Kemp AM, Ding M, Ye W, Kirkbride RC, Jenkins J. et al (2020) Genomic diversifications of five *Gossypium* allopolyploid species and their impact on cotton improvement. *Nature Genet* 52: 525–533. doi.org/10.1038/s41588-020-0614-5
- Comai L. (2005) The advantages and disadvantages of being polyploid. *Nature Rev Genet* 6: 836–846. doi.org/10.1038/nrg1711
- Flagel LE, Wendel JF. (2009) Gene duplication and evolutionary novelty in plants. *New Phytol* 183: 557–564. doi.org/10.1111/j.1469-8137.2009.02923

- Jumper J, Evans R, Pritzel A, Green T, Figurnov M, Ronneberger O, Tunyasuvunakool K, Bates R, Žídek A, Potapenko A. (2021). Highly accurate protein structure prediction with AlphaFold. *Nature* 596: 583–589. doi.org/10.1038/s41586-021-03819-2
- Kataoka I, Mizugami T, Kim JG, Beppu K, Fukuda T, Sugahara S, Tanaka K, Satoh H, Tozawa K. (2010) Ploidy variation of hardy kiwifruit (*Actinidia arguta*) resources and geographic distribution in Japan. *Scientia Horti* 124: 409–414. doi.org/10.1016/j.scienta.2010.01.016
- Lynch M, Conery JS. (2000) The evolutionary fate and consequences of duplicate genes. *Science* 290: 1151–1155. doi: 10.1126/science.290.5494.1151
- Masuda K, Ikeda Y, Matsuura T, Kawakatsu T, Tao R, Kubo Y, Ushijima K, Henry IM, Akagi T. (2022) Reinvention of hermaphroditism via activation of a *RADIALIS*-like gene in hexaploid persimmon. *Nature Plants* 8: 217–224. doi.org/10.1038/s41477-022-01107-z
- Meng X, Liang Z, Dai X, Zhang Y, Mahboub S, Ngu DW, Roston RL, Schnable JC. (2021) Predicting transcriptional responses to cold stress across plant species. *Proc Nat Acad Sci USA* 118: e2026330118. doi.org/10.1073/pnas.2026330118
- Murrell B, Weaver S, Smith MD, Wertheim JO, Murrell S, Aylward A, Eren K, Pollner T, Martin DP, Smith DM et al. (2015) Gene-wide identification of episodic selection. *Mol Biol Evol* 32: 1365–1371.
- Ohno (1970) *Evolution by gene duplication*. SpringerVerlag, New York.
- Olsen JL, Rouzé P, Verhelst B, Lin YC, Bayer T, Collen J, Dattolo E, De Paoli E, Dittami S, Maumus F. et al. (2016) The genome of the seagrass *Zostera marina* reveals angiosperm adaptation to the sea. *Nature* 530: 331–335. doi.org/10.1038/nature16548
- Roulin A, Auer PL, Libault M, Schlueter J, Farmer A, May G, Stacey G, Doerge RW, Jackson SA. (2013) The fate of duplicated genes in a polyploid plant genome. *Plant J* 73: 143–153. doi.org/10.1111/tpj.12026
- Saul F, Scharmann M, Wakatake T, Rajaraman S, Marques A, Freund M, Bringmann G, Channon L, Becker D, Carroll E. (2023). Subgenome dominance shapes novel gene evolution in the decaploid pitcher plant *Nepenthes gracilis*. *Nature Plants* 9: 2000–2015. doi.org/10.1038/s41477-023-01562-2
- Salman-Minkov A, Sabath N, Mayrose I. (2016) Whole-genome duplication as a key factor in crop domestication. *Nature Plants* 2: 1–4. doi.org/10.1038/nplants.2016.115
- Teh BT, Lim K, Yong CH, Ng CCY, Rao SR, Rajasegaran V, Lim WK, Ong CK, Chan K, Cheng VKY et al. (2017) The draft genome of tropical fruit durian (*Durio zibethinus*). *Nature Genet* 49: 1633–1641. doi.org/10.1038/ng.3972
- Tomato Genome Consortium. (2012). The tomato genome sequence provides insights into fleshy fruit evolution. *Nature* 485: 635. doi: 10.1038/nature11119
- Unver T, Wu Z, Sterck L, Turktas M, Lohaus R, Li Z, Yang M, He L, Deng T, Escalante FJ et al. (2017) Genome of wild olive and the evolution of oil biosynthesis. *Proc Nat Acad Sci USA* 114: E9413–E9422 doi.org/10.1073/pnas.1708621114
- Van de Peer Y, Mizrachi E, Marchal K. (2017) The evolutionary significance of polyploidy. *Nature Rev Genet* 18: 411–424. doi.org/10.1038/nrg.2017.26

- Vrebalov J, Ruezinsky D, Padmanabhan V, White R, Medrano D, Drake R, Schuch W, Giovannoni J. (2002) A MADS-box gene necessary for fruit ripening at the tomato *ripening-inhibitor* (*rin*) locus. *Science* 296: 343–346. doi: 10.1126/science.1068181
- Wang Z, Yang J, Cheng F, Li P, Xin X, Wang W, Yu Y, Zhang D, Zhao X, Yu S (2022). Subgenome dominance and its evolutionary implications in crop domestication and breeding. *Hort Res* 9: uhac090. doi.org/10.1093/hr/uhac090
- Wei N, Cronn R, Liston A, Ashman TL. (2019) Functional trait divergence and trait plasticity confer polyploid advantage in heterogeneous environments. *New Phytol* 221: 2286–2297. doi.org/10.1111/nph.15508
- Wu JH, Ferguson AR, Murray BG, Jia Y, Datson PM, Zhang J. (2012) Induced polyploidy dramatically increases the size and alters the shape of fruit in *Actinidia chinensis*. *Ann Bot* 109: 169–179. doi.org/10.1093/aob/mcr256
- Yang Z. (2007) PAML 4: phylogenetic analysis by maximum likelihood. *Mol Biol Evol* 24: 1586–1591. doi.org/10.1093/molbev/msm088
- Yoshida H, Tanimoto E, Hirai T, Miyanoiri Y, Mitani R, Kawamura M, Takeda M, Takehara S, Hirano K, Kainosho M et al. (2018) Evolution and diversification of the plant gibberellin receptor GID1. *Proc Nat Acad Sci USA* 115: E7844–E7853. doi.org/10.1073/pnas.1806040115

フェニルプロパノイド代謝の進化

棟方 涼介^{1,2}

¹ 京都大学 生存圏研究所

〒611-0011 京都府宇治市五ヶ庄 京都大学 生存圏研究所 森林圏遺伝子統御分野

² 科学技術振興機構・さがけ

〒102-0076 東京都千代田区五番町 7

Evolution of phenylpropanoid metabolism

Ryosuke Munakata^{1,2}

¹ Research Institute for Sustainable Humanosphere, Kyoto University

Gokasho, Uji 611-0011, Japan

² JST·PRESTO, Goban-cho 7, Chiyoda-ku, Tokyo, 102-0076, Japan

Keywords: furanocoumarins, phenylpropanoid, plant secondary (specialized) metabolism

DOI: 10.24480/bsj-review.15a3.00256

1. はじめに

植物が生産する代謝産物は 100 万種に及ぶとされ (Afendi et al. 2012), この化学構造の多様性の大部分を占めるのは, 植物系統特異的に獲得されてきた二次代謝産物 (特化代謝産物) である。中でも, フェノール類はテルペノイドやアルカロイドに並ぶ主要なグループであり, その多くはケイ皮酸/モノリグノール経路から生じるフェニルプロパノイドである。“二次”代謝産物といってもフェニルプロパノイドの起源は古く, 初発酵素の phenylalanine ammonia lyase (PAL) は陸上植物で広く保存されている (Barros and Dixon 2020)。

植物体の物理的支持の役割を果たすリグニン (Tobimatsu and Schuetz 2019), 紫外線からの防御物質となるフラボノール類, 必須微量元素である鉄吸収に寄与するクマリン類 (Tsai and Schmidt 2017), そのほか, 病原菌や捕食者といった生物的ストレスに対する防御物質も多種報告されている。さらにマメ科では窒素欠乏時に分泌されるイソフラボンなどが根粒形成のシグナル分子として機能するなど (Munakata et al. 2019a), フェニルプロパノイドが果たす機能は実に多様であり, 植物の生存を多面的に支えている。

また, フェニルプロパノイドは我々人の生活にも密接にかかわっている。例えば, メギ科植物が生産するポドフィロトキシンは高い抗腫瘍活性を示すことから, その誘導体であるエトポシドは抗がん剤として用いられている (Suzuki and Umezawa 2007) ムラサキ科ムラサキが生産する赤色色素のシコニン is 古くから天然の染料として用いられてきた他, シコニンは抗炎症作用を始めとした種々の薬理活性を有する (Yazaki 2017)。本稿では, フェニルプロパノイドの生合成を俯瞰しながら, その分子進化や, 合成生物学を用いた代謝工学について, 近年の例を紹介する。

2. フェニルプロパノイド生合成経路 (図 1)

フェニルプロパノイドの化学構造上の特徴は、炭素 6 個から成る芳香環と、それに結合した炭素 3 個のプロパン鎖 (C6-C3) のユニットである。このグループはフェニルアラニンやチロシンに由来し、これらの芳香族アミノ酸はシキミ酸経路によって供給される。図 1 に示すように、フェニルアラニンやチロシンはケイ皮酸／モノリグノール経路に入り、フェニルアラニンやチロシンのアミノ基の脱離反応を担う初発酵素 PAL/Tyrosine ammonia lyase (TAL) によって、ケイ皮酸や *p*-クマル酸が生成する (Barros and Dixon 2020)。その後、芳香環については水酸化やメチル化、プロパン鎖については CoA エステル化、還元反応、炭素脱離反応など種々の酵素反応を受けて化学構造が多様化していく。その過程で、フラボノイドやクマリン類を始めとした種々の代謝物グループの前駆体となる化合物が生じる (水谷ら 2019)。

いくつかの代謝物グループの主要経路を説明すると、クマリン類はフェニルプロパン酸の CoA エステル体が前駆体となって、一段階の水酸化が生じたのち、プロパン鎖が環化することで基本骨格となるベンゾピロン環が生じる (Bourgaud et al. 2014)。高分子のリグニンについては、フェニルプロパン酸のプロパン鎖が還元され、モノマーとなるモノリグノール類 (*p*-クマリルアルコール、コニフェリルアルコール、シナピルアルコール) が作られる。一方で、C3 のプロパン鎖に対する炭素脱離反応によって C6-C2 や C6-C1 といった新たな骨格が生じる。このような化合物種の中には香気成分が多く、バニラの香り成分であるバニリンなどが含まれる (Dötterl and Gershenzon 2023)。また、フェニルプロパノイドで最大のグループを形成するフラボノイドは、C6-C3-C6 を基本骨格となり、C6 が一つ多い。これは *p*-クマル酸の CoA エステル体 (C6-C3) と、ケイ皮酸/モノリグノール経路とは別の代謝経路から生じるマロニル CoA が 3 分子 (C2×3) 縮合反応することで C6-C3-C6 骨格を持つナリングニンカルコンが生成することに由来する (Nakayama et al. 2019)。

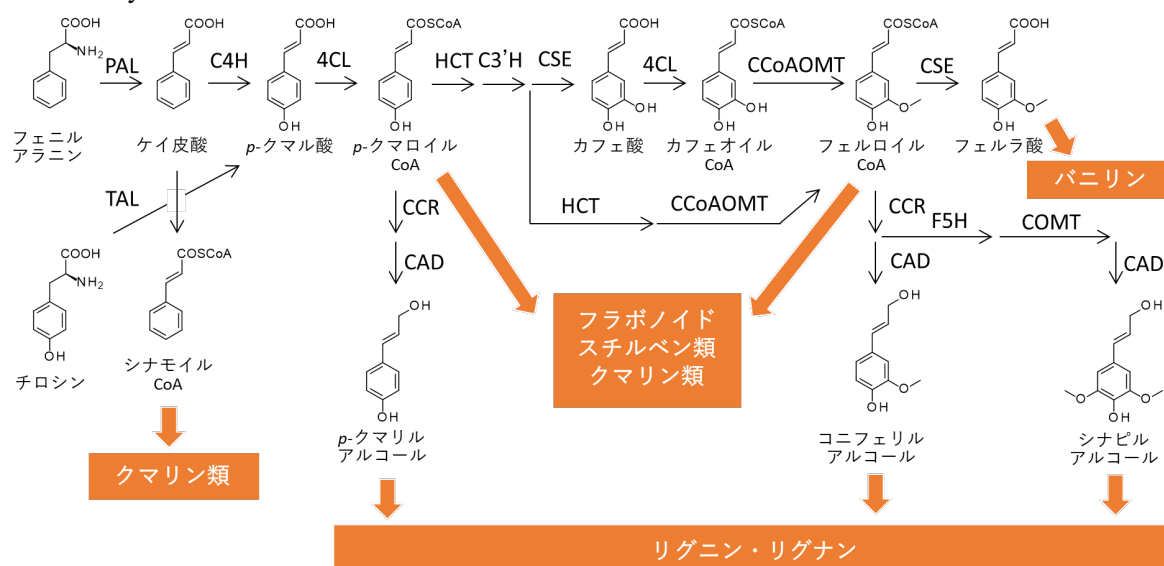


図 1. ケイ皮酸・モノリグノール経路と派生するフェニルプロパノイド類の例
水谷ら「基礎から学ぶ植物性化学」より編集。酵素略称: 4CL, 4-coumaroyl CoA ligase; C3'H, *p*-coumaroyl shikimate/quinic acid 3-hydroxylase; C4H, cinnamate 4-hydroxylase; CAD, cinnamyl alcohol dehydrogenase; CCoAOMT, caffeoyl CoA *O*-methyltransferase; CCR, cinnamoyl CoA reductase; COMT, caffeate *O*-methyltransferase; CSE, caffeoyl shikimate esterase; F5H, ferulate 5-hydroxylase; HCT, hydroxycinnamoyl CoA: shikimate hydroxycinnamoyl transferase; PAL, phenylalanine ammonia lyase; TAL, tyrosine ammonia lyase.

これらの他にも、特定の植物科のみで見られる代謝経路が多数生じている。その中には、最終産物が産業上有用であるものや、最終産物の化学構造式から生合成経路や関わる酵素種を予測しにくいものも多い。このような面で解明しがいがあるなど、（私も含め）植物代謝の研究者の興味を引き、植物二次代謝研究において、多様な生合成経路を遺伝子レベルで解明する研究は長年メインストリームの1つである。

3. フェニルプロパノイドの収斂進化

代謝の多様性とは対照的だが、植物分類上は遠縁ながら、同じ代謝産物を生産するという現象があることも古くから知られている。その中には、生産機構が植物系統毎に独自に獲得された例が頻繁にみられ、これは収斂進化の一種といえる (Pichersky and Lewinsohn 2011) (図 2)。最も有名な例はアルカロイドのカフェインである。カフェインはアカネ科コーヒーノキやツバキ科チャノキ、またミカン科の柑橘類など複数の植物系統で生産する。生合成経路上は複数段階の *N*-メチル化酵素が存在するため、それらの分子進化的解析を行った結果、それぞれの植物系統で独立にカフェイン生合成経路が獲得されたことが分かった (Huang et al. 2016)。特に近年、次世代シーケンサーや質量分析といった成分分析技術の発展に伴い、フェニルプロパノイドを始め、収斂進化の例が新たな代謝産物、新たな植物系統で報告されてきた。

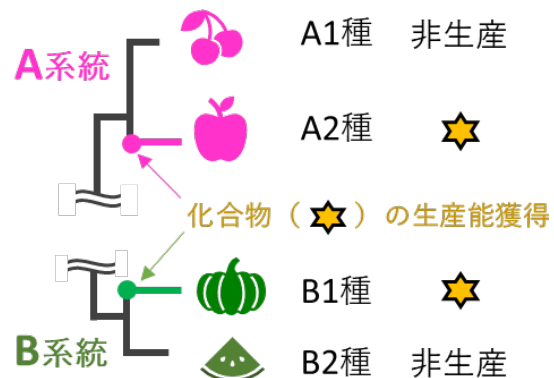


図 2. 植物二次代謝産物の生合成能の収斂進化
A 系統と B 系統は互いに独立に同じ化合物の生産能を獲得。

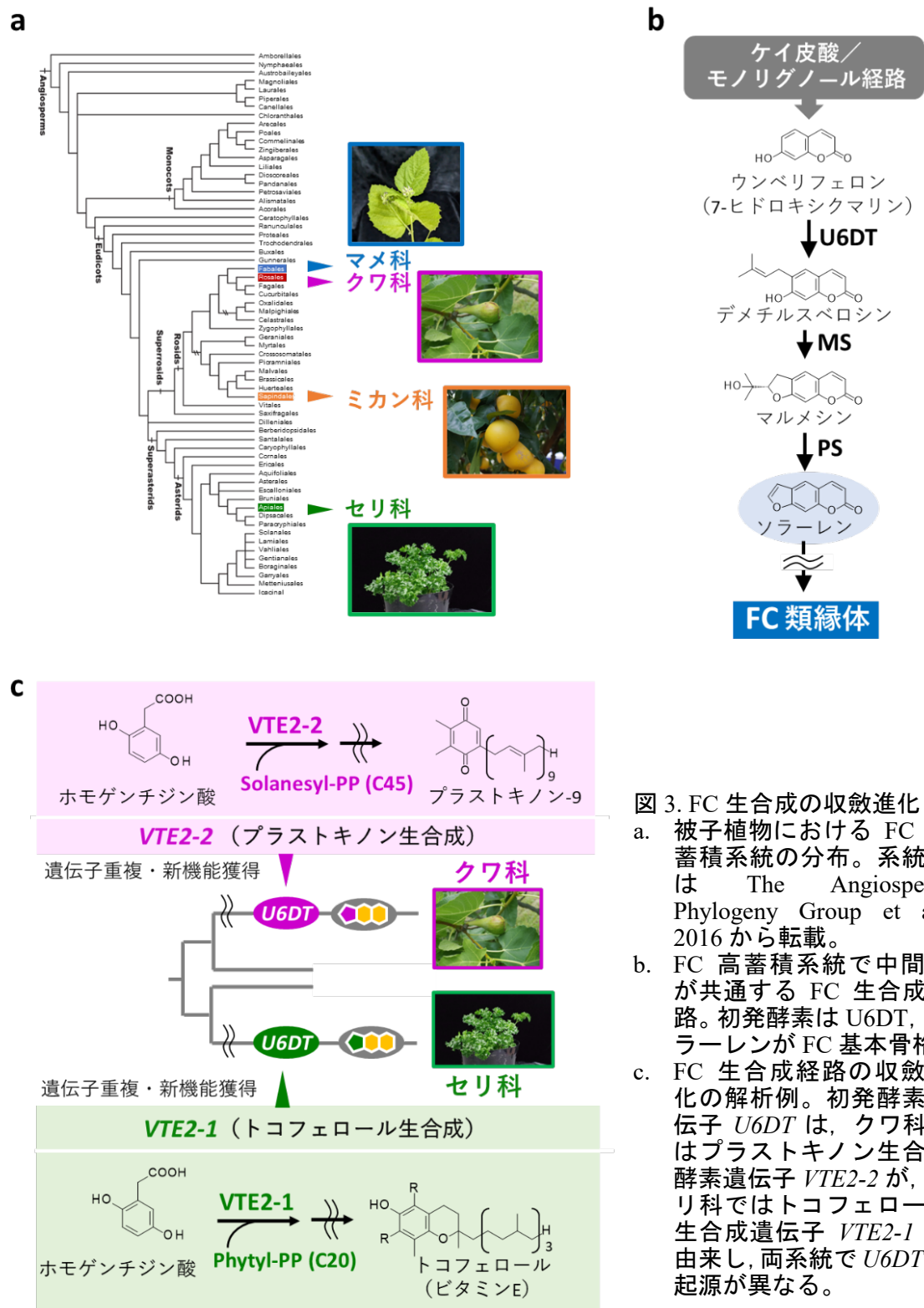
3-1. フラノクマリン生合成の収斂進化

フラノクマリン (Furanocoumarin : FC) 類はクマリン骨格にフラン環が結合した三環性の化合物群であり、主に病虫害や食植性昆虫といった生物的ストレスに対する化学防御を担う

(Bourgaud et al. 2014)。植物界においては、セリ科、ミカン科、マメ科、クワ科で多く報告されている (図 3a)。不思議であったのは、これらの植物系統は互いに遠縁であるにもかかわらず、共通した生合成中間体から構成される生合成経路を有していることであった (図 3b)

(Brown and Steck 1973; Murray et al. 1982; The Angiosperm Phylogeny Group et al. 2016)。そこで、FC 生合成経路がどの様にして植物界で発生したのかを明らかにするため、セリ科やクワ科の FC 生合成関連遺伝子が複数同定され、その分子進化的解析が行われた (Munakata et al. 2020, 2021; Villard et al. 2021)。その結果、各生合成段階が植物系統毎に独立に獲得されたことがわかり、FC 生合成能が収斂進化によって獲得されたことが判明した (図 3c)。FC 類は UV 照射下で二本鎖 DNA にインターカレートする遺伝毒性 (Kitamura et al. 2005)、また広い生物種のシトクロム P450 酵素を不活性化することが示されており (Gravot et al. 2004)、あらゆる外敵生物に有効となりうる毒性を持つ。これが一因となって、複数の植物系統が独立して FC 類を獲得するに至ったという可能性が考えられる。

また、FC 生合成経路の収斂進化は生態学的な観点でも興味深い。チョウ目昆虫の一部はセリ科やミカン科の天敵であり、これらは FC 類の分解酵素を獲得している (Ozaki et al. 2023)。かつ、チョウ目昆虫は種分化の過程でミカン科からセリ科に宿主を転換させたと考えられている。これらの知見は、FC 類の解毒酵素の存在がこの食草転換の要因の一つとなった、つまりフェニルプロパノイドの収斂進化が食植性昆虫の種分化に貢献した可能性を示している。



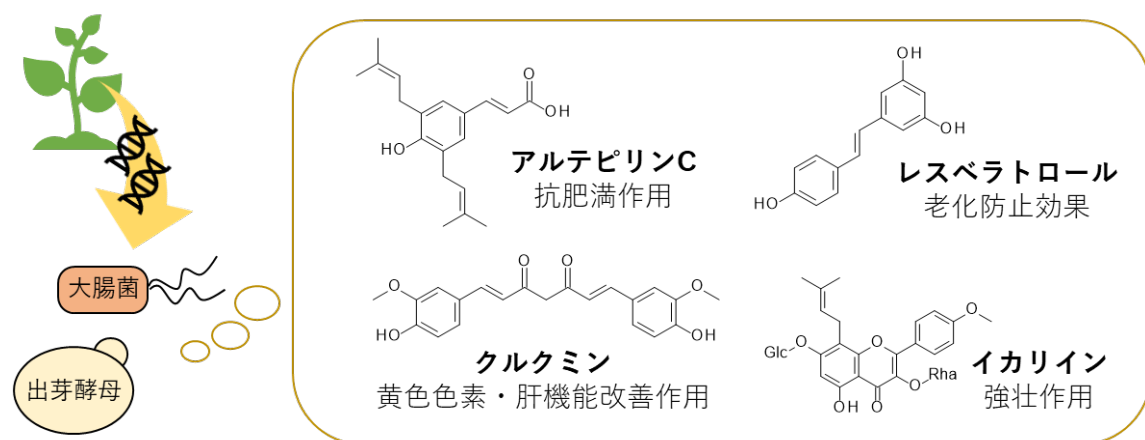
3-2. イソフラボン生合成の収斂進化

イソフラボンはマメ科において病原菌の感染により生産が誘導されるほか、地下部においては根粒形成のシグナル分子、また根圏微生物叢の形成にも寄与する (Sugiyama 2019)。Polturak らは、コムギもイソフラボンを有することから、本種のイソフラボン生合成を解析し、コムギはマメ科とは進化的系譜が異なるイソフラボン生合成経路を有することが示された (Polturak et al. 2023)。イソフラボンは機能性成分としても知られるため、この新規のイソフラボン生合成遺伝子をターゲットとした育種で、コムギもイソフラボンの摂取源として利用できる可能性がある。またコムギとマメ科で共通してイソフラボンが病原菌感染に応答する点も興味深い。マメ科ではイソフラボンは地下部において顕著な機能を有する。そのため、今後コムギにおいても地下部でのイソフラボンの役割が理解され、環境適応上、イソフラボン生産能獲得が植物系統間でどれほど共通した意義があるのかについても理解が進むと期待される。

4. 代謝工学と収斂進化

植物特化代謝産物の中には薬理活性が高い成分、また機能性成分や香料といった人の生活を支える化合物も多い。しかしながら、その中には生産植物体内の含量が低い、また特異的な条件下でのみ蓄積する、大規模栽培が困難などの理由から、大量生産が困難な化合物が散見される。そこで近年活発に研究されているのが、合成生物学を活用した異種生産である (Cravens et al. 2019)。

このアプローチを簡潔に説明すると、目的成分の生産種から生合成遺伝子群を同定し、その遺伝子群を異種生物において機能的に発現させることで、生産能を付与する、というものである。生育の速さや培養の容易さ、また分子生物学的手法の多彩さから、発現のホストには大腸菌や出芽酵母といったモデル微生物種が最もよく使用される。この手法を用いて、フェニルプロパノイドも含め様々な植物特化代謝産物の微生物生産が報告されてきた (図 4) (Li et al. 2015; Liu et al. 2019; Munakata et al. 2019b; An et al. 2023; Utomo et al. 2024)。しかしながら、生合成酵素遺伝子を導入しただけでは、目的成分が生産されない、また生産されたとしてもごく微量である場合



が多く、目的成分の生産性向上のためには様々な工夫が必要である。その1つが、目的代謝経路への代謝フラックスを増大させるといったホスト種の内生の代謝改変である。これに関して、様々なフェニルプロパノイド種の共通中間体となる *p*-クマル酸の高生産酵母株が作出されている (Liu et al. 2019)。近年はホスト種のバリエーションも多彩になり、安価なメタノールを炭素源にできるメタノール資化性酵母 (Kumokita et al. 2023)、また光合成能を持つ藻類や光合成細菌など様々な種が植物二次代謝産物の生産ホストとして検討されている (Moses et al. 2017)。さらには、酵素発現との相性や基質供給力等を考慮して、複数ホスト種に代謝経路を分けて導入し、共培養によって目的成分を生産するといった報告もみられる (Thuan et al. 2022)。

意外かもしれないが、前項で紹介した収斂進化も生産系改良のためのアプローチとして有望である。二つの植物系統間で収斂進化によって獲得された生合成経路について、各酵素反応段階を細かく比較してみる。すると、ある反応ステップの変換効率が片方の系統が優れている一方で、別のステップでは他方が優れているといった系統間の差異が認められる。実際に、収斂進化によって獲得された酵素間では、同じ反応は触媒するものの、その効率が 50 倍異なる (Dick et al. 2012)、副反応の有無の差が存在するといった報告がある (Karamat et al. 2014; Munakata et al. 2020)。合成生物学の場合、両系統の生合成酵素遺伝子を好きなように織り交ぜて導入できる。そのため、収斂進化が持つ多様性を活用して、単一の植物系統由来の酵素遺伝子群だけでは達成できない高生産が期待できる (図 5)。

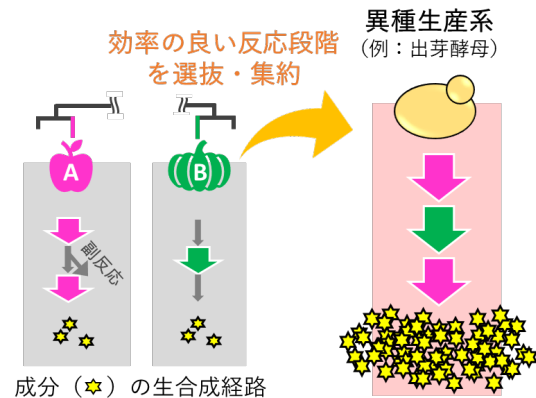


図 5. 収斂進化の代謝工学への応用

5. おわりに

フェニルプロパノイドは植物の環境適応を支えるだけでなく、多様な薬理活性も持つ化合物群である。様々な植物系統で生合成経路の解明が進む中で、収斂進化が植物二次代謝において普遍的に存在する現象であることも認識されつつある (Ono and Murata 2023)。植物二次代謝の収斂進化について考えると、生合成機構が植物系統間でどこまで異なる／似るのか、また同じ化合物でも植物系統が異なると生存戦略上の役割は共通するのかなど、非常に興味深い疑問が生まれる。これに加え、収斂進化の裏に潜む生合成機構の多様性を理解・活用することは、物質生産への高い応用可能性を秘めているため、収斂進化は植物二次代謝の基礎・応用研究の両面での展開を加速させると期待される。

引用文献

Afendi FM, Okada T, Yamazaki M, Hirai-Morita A, Nakamura Y, Nakamura K, Ikeda S, Takahashi H, Altaf-Ul-Amin M, Darusman LK, et al. (2012) KNApSAcK family databases: integrated metabolite–plant species databases for multifaceted plant research. *Plant Cell Physiol* 53: doi: 10.1093/pcp/pcr165

- An T, Lin G, Liu Y, Qin L, Xu Y, Feng X, Li C. (2023) *De novo* biosynthesis of anticarcinogenic icariin in engineered yeast. *Met Eng* 80: 207–215. doi: 10.1016/j.ymben.2023.10.003
- Barros J, Dixon RA. (2020) Plant phenylalanine/tyrosine ammonia-lyases. *Trends Plant Sci* 25: 66–79. doi: 10.1016/j.tplants.2019.09.011
- Bourgaud F, Olry A, Hehn A. (2014) Recent advances in molecular genetics of furanocoumarin synthesis in higher plants. In: Jacob C, Kirsch G, Slusarenko A, et al. (eds) *Rec Adv Redox Active Plant Microbial Prod*. Springer Netherlands, Dordrecht, pp 363–375. doi: 10.1007/978-94-017-8953-0_14
- Brown SA, Steck W. (1973) 7-Demethylsuberosin and osthenoil as intermediates in furanocoumarin biosynthesis. *Phytochemistry* 12: 1315–1324. doi.org/10.1016/0031-9422(73)80558-8
- Cravens A, Payne J, Smolke CD. (2019) Synthetic biology strategies for microbial biosynthesis of plant natural products. *Nat Commun* 10: 2142. doi: 10.1038/s41467-019-09848-w
- Dick R, Rattei T, Haslbeck M, Schwab W, Gierl A, Frey M. (2012) Comparative analysis of benzoxazinoid biosynthesis in monocots and dicots: independent recruitment of stabilization and activation functions. *The Plant Cell* 24: 915–928. doi: 10.1105/tpc.112.096461
- Dötterl S, Gershenzon J. (2023) Chemistry, biosynthesis and biology of floral volatiles: roles in pollination and other functions. *Nat Prod Rep* 40: 1901–1937. doi: 10.1039/d3np00024a
- Gravot A, Lariat R, Hehn A, Lievre K, Gontier E, Goergen JL, Bourgaud F. (2004) Cinnamic acid 4-hydroxylase mechanism-based inactivation by psoralen derivatives: cloning and characterization of a C4H from a psoralen producing plant—*Ruta graveolens*—exhibiting low sensitivity to psoralen inactivation. *Arch Biochem Biophys* 422: 71–80. doi: 10.1016/j.abb.2003.12.013
- Huang R, O'Donnell AJ, Barboline JJ, Barkman TJ. (2016) Convergent evolution of caffeine in plants by co-option of exapted ancestral enzymes. *Proc Natl Acad Sci USA* 113: 10613–10618. doi: 10.1073/pnas.1602575113
- Karamat F, Olry A, Munakata R, Koeduka T, Sugiyama A, Paris C, Hehn A, Bourgaud F, Yazaki K. (2014) A coumarin-specific prenyltransferase catalyzes the crucial biosynthetic reaction for furanocoumarin formation in parsley. *The Plant J* 77: 627–638. doi: 10.1111/tpj.12409
- Kitamura N, Kohtani S, Nakagaki R. (2005) Molecular aspects of furocoumarin reactions: Photophysics, photochemistry, photobiology, and structural analysis. *Journal of Photochemistry and Photobiology C: Photochem Rev* 6: 168–185. doi: 10.1016/j.jphotochemrev.2005.08.002
- Kumokita R, Yoshida T, Shirai T, Kondo A, Hasunuma T. (2023) Aromatic secondary metabolite production from glycerol was enhanced by amino acid addition in *Pichia pastoris*. *Appl Microbiol Biotechnol* 107:7391–7401. doi: 10.1007/s00253-023-12798-5
- Li M, Kildegaard KR, Chen Y, Rodriguez A, Borodina I, Nielsen J. (2015) *De novo* production of resveratrol from glucose or ethanol by engineered *Saccharomyces cerevisiae*. *Met Eng* 32: 1–11. doi: 10.1016/j.ymben.2015.08.007
- Liu Q, Yu T, Li X, Chen Y, Campbell K, Nielsen J, Chen Y. (2019) Rewiring carbon metabolism in yeast for high level production of aromatic chemicals. *Nat Commun* 10: 4976. doi: 10.1038/s41467-019-12961-5

- Moses T, Mehrshahi P, Smith AG, Goossens A. (2017) Synthetic biology approaches for the production of plant metabolites in unicellular organisms. *J Exp Bot* 68: 4057–4074. doi: 10.1093/jxb/erx119
- Munakata R, Kitajima S, Nuttens A, Tatsumi K, Takemura T, Ichino T, Galati G, Vautrin S, Berges H, Grosjean J et al. (2020) Convergent evolution of the UbiA prenyltransferase family underlies the independent acquisition of furanocoumarins in plants. *New Phytol* 225: 2166–2182. doi: 10.1111/nph.16277
- Munakata R, Larbat R, Duriot L, Olry A, Gavira C, Mignard B, Hehn A, Bourgaud F. (2019a) Polyphenols from plant roots: An expanding biological frontier. In: Halbwirth H, Stich K, Cheynier V, Quideau S (eds) *Rec Adv Polyphenol Res*, 1st edn. Wiley, pp 207–236. doi: 10.1002/9781119427896.ch8
- Munakata R, Olry A, Takemura T, Tatsumi K, Ichino T, Villard C, Kageyama J, Kurata T, Nakayasu M, Jacob et al. (2021) Parallel evolution of UbiA superfamily proteins into aromatic *O* -prenyltransferases in plants. *Proc Natl Acad Sci USA* 118: e2022294118. doi: 10.1073/pnas.2022294118
- Munakata R, Takemura T, Tatsumi K, Moriyoshi E, Yanagihara K, Sugiyama A, Suzuki H, Seki H, Muranaka T, Kawano N et al. (2019b) Isolation of *Artemisia capillaris* membrane-bound di-prenyltransferase for phenylpropanoids and redesign of artemipillin C in yeast. *Commun Biol* 2: 384. doi: 10.1038/s42003-019-0630-0
- Murray RDH, Méndez J, Brown SA (1982) *The natural coumarins*. New York, USA: Wiley & Sons.
- Nakayama T, Takahashi S, Waki T (2019) Formation of flavonoid metabolons: functional significance of protein-protein interactions and impact on flavonoid chemodiversity. *Front Plant Sci* 10: 821. doi: 10.3389/fpls.2019.00821
- Ono E, Murata J (2023) Exploring the evolvability of plant specialized metabolism: uniqueness out of uniformity and uniqueness behind uniformity. *Plant and Cell Physiol* 64: 1449–1465. doi: 10.1093/pcp/pcad057
- Ozaki K, Matsumoto N, Kotera M (2023) Swallowtail butterflies' initial stage of speciation is influenced by adaptation to plant-defensive substances. *Researchsquare*. doi: 10.21203/rs.3.rs-2863301/v1.
- Pichersky E, Lewinsohn E (2011) Convergent evolution in plant specialized metabolism. *Annu Rev Plant Biol* 62: 549–566. doi: 10.1146/annurev-arplant-042110-103814
- Polturak G, Misra RC, El-Demerdash A, Owen C, Steed A, McDonald HP, Wang J, Saalbach G, Martins C, Chartrain L et al. (2023) Discovery of isoflavone phytoalexins in wheat reveals an alternative route to isoflavonoid biosynthesis. *Nat Commun* 14: 6977. doi: 10.1038/s41467-023-42464-3
- Sugiyama A (2019) The soybean rhizosphere: Metabolites, microbes, and beyond—A review. *J Adv Res* 19: 67–73. doi: 10.1016/j.jare.2019.03.005
- Suzuki S, Umezawa T (2007) Biosynthesis of lignans and norlignans. *J Wood Sci* 53: 273–284. doi: 10.1007/s10086-007-0892-x
- The Angiosperm Phylogeny Group, Chase MW, Christenhusz MJM, Fay MF, Byng JW, Judd WS, Soltis DE, Mabberley DJ, Sennikov AN, Soltis PS et al. (2016) An update of the Angiosperm Phylogeny Group classification for the orders and families of flowering plants: APG IV. *Bot J Linn Soc* 181: 1–20. doi: 10.1111/boj.12385

- Thuan NH, Tatipamula VB, Canh NX, Van Giang N (2022) Recent advances in microbial co-culture for production of value-added compounds. 3 Biotech 12: 115. doi: 10.1007/s13205-022-03177-4
- Tobimatsu Y, Schuetz M (2019) Lignin polymerization: how do plants manage the chemistry so well? Curr Opin Biotechnol 56: 75–81. doi: 10.1016/j.copbio.2018.10.001
- Tsai HH, Schmidt W (2017) Mobilization of iron by plant-borne coumarins. Trends Plant Sci 22: 538–548. doi: 10.1016/j.tplants.2017.03.008
- Utomo JC, Barrell HB, Kumar R, Smith J, Brand MS, Siegler HSLH, Ro DK. (2024) Reconstructing curcumin biosynthesis in yeast reveals the implication of caffeoyl-shikimate esterase in phenylpropanoid metabolic flux. Met Eng 82: 286–296. doi: 10.1016/j.ymben.2024.02.011
- Villard C, Munakata R, Kitajima S, Velsen RV, Schranz ME, Larbat R, Hehn A. (2021) A new P450 involved in the furanocoumarin pathway underlies a recent case of convergent evolution. New Phytol 231: 1923–1939. doi: 10.1111/nph.17458
- Yazaki K (2017) *Lithospermum erythrorhizon* cell cultures: Present and future aspects. Plant Biotechnol 34: 131–142. doi: 0.5511/plantbiotechnology.17.0823a
- 水谷正治, 土反伸和, 杉山暁史 (2019) 基礎から学ぶ植物代謝生化学. 羊土社. ISBN 978-4-7581-2090-6.

花粉における戦略分子 RNA —特に細胞間を移行する RNA に焦点を当てて—

元村 一基^{1,2}

¹立命館大学 総合科学技術研究機構
〒525-8577 滋賀県草津市野路東 1-1-1

²科学技術振興機構・さがけ
〒102-0076 東京都千代田区五番町 7

RNA as a Strategic Molecule in Pollen -Special Focus on mobile RNAs-

Kazuki Motomura^{1,2}

¹Research Organization of Science and Technology, Ritsumeikan University, Kusatsu, Shiga
525-8577, Japan

²JST, PRESTO, Goban-cho 7, Chiyoda-ku, Tokyo, 102-0076, Japan

Keywords: intercellular communication, mobile RNA, plant reproduction, pollen

DOI: 10.24480/bsj-review.15a4.00257

1. はじめに

生物学の講義では、RNA はセントラルドグマにおいて遺伝情報を伝達するものであると学ぶ。しかし、多細胞生物における RNA は遺伝子発現の単なる中間体にとどまらず、その機能や役割は複雑かつ多様である。特に固い細胞壁に囲まれ、細胞が動けない植物にとって、細胞間コミュニケーションの手段として RNA が果たす役割は重要である。事実、発生や環境応答など様々な生命現象において、細胞間を移行する複数の RNA が発見されている（本論文では「モバイル RNA」と呼称する）。small interfering RNA (siRNA) などの small RNA (sRNA) は、モバイル RNA の代表例である。ウイルスに感染した植物では、siRNA が細胞間を移行し、維管束を通じて運ばれることで植物全体でウイルス防御反応を引き起こす（Lopez-Gomollon and Baulcombe 2022）。また、mRNA もモバイル RNA として働き、その細胞間移行は植物の正確な遺伝子発現には欠かせない。たとえば、FLOWERING LOCUS T (FT) はタンパク質自身に加えて、mRNA が葉から頂端部へ移動し、花成を調節するのではないかと考えられている（Li et al. 2011, Yu et al. 2021）。RNA が遠く離れた細胞へ移行するためには、まず RNA が隣接する細胞へ移行する必要がある。これまでの研究から、隣接する細胞への RNA 移行経路として、原形質連絡（Plasmodesmata）を介したシンプラスト経路や、エクソソーム様の細胞外小胞を介したアポプラスト経路が見つかってきている（Liu and Chen 2018; Maizel et al. 2020; Wang and Dean 2020）（図 1）。しかし、これまで機能的なモバイル RNA は数えるほどしか見つかっておらず、その選択性など未解明な点が多く残されている。

近年、被子植物の生殖組織「花粉」においても、RNA が細胞間を移行することが報告されてきている（Wu and Zheng 2019）。花粉は細胞が入れ子構造になった珍しい組織である。

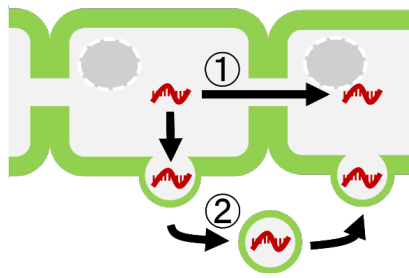


図 1. 予想されるモバイル RNA の移行経路

これまで植物の体細胞研究で見つかってきたモバイル RNA (赤色) の多くは、①原形質連絡を通して運ばれるか、あるいは②細胞外小胞に乗って隣の細胞へと輸送されるか、どちらかの経路で隣接細胞へと移行すると考えられている。

シロイヌナズナの花粉を例にすると、2 個の精細胞がまるでオルガネラのように栄養細胞の内部に存在する。これら 2 つの精細胞は、栄養細胞に由来する生体膜である内部形質膜に包まれている (Motomura et al. 2021; Sugi et al. 2023)。そして、片方の精細胞から伸びた尻尾状の構造が栄養細胞の核、すなわち栄養核と強固に結びつき複合体を形成している (Mogensen 1992; McCue et al. 2011) (図 2)。2 つの精細胞は雌しべ奥深くの胚珠へと運ばれ、卵細胞と中央細胞の間に放出され、重複受精することで種子を形成する (Hamamura et al. 2011; Higashiyama and Takeuchi 2015; Sugi et al. 2023)。近年、この花粉を舞台に、RNA が様々な形で戦略分子として機能し、それが種子植物の繁栄を支えていることが明らかになってきた。そこで本論文では、シロイヌナズナ花粉を材料とした最新の研究成果を中心に、戦略分子として機能する RNA の代表例として、モバイル RNA の発見の歴史と、その役割や、予想される輸送機構について紹介する。またモバイル RNA 以外にも、花粉が RNA をどのように戦略分子として活用しているかについての例を紹介し、最後に、進化的観点も含めたその役割や今後の研究展開について論じる。

2. 花粉におけるモバイル RNA の発見

被子植物の花粉の中で、精細胞は栄養細胞に取り囲まれており、受精の直前まで外界環境と接することがない。また精細胞はその大部分が核に占められ、細胞質領域は非常に限られている。そのため以前から、唯一の隣接細胞である栄養細胞との間で、物質のやり取りを行う可能性は議論されていた (McCue et al. 2011)。精細胞と栄養細胞間のモバイル RNA として最初に報告されたのは、transposable element (TE) 由来の siRNA であった。哺乳類やショウジョウバエでは、PIWI-interacting RNA (piRNA) と呼ばれる小分子 RNA が生殖細胞で TE の発現を抑制することで生殖組織のゲノムを保護する (Brennecke et al. 2007, 2008; Wang et al. 2023b)。一方、植物においても生殖細胞ゲノムの保護は必須であると考えられるが、被

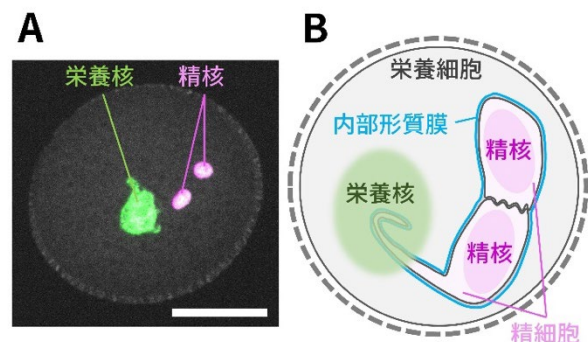


図 2. (A) シロイヌナズナ花粉の蛍光顕微鏡写真。緑は花粉細胞 (栄養細胞) の核である栄養核で、マゼンタは精細胞の核である精核。Bar: 10 μ m。 (B) シロイヌナズナ花粉の模式図。2 つの精細胞は内部形質膜に包まれている。一方の精細胞からは尻尾状の突起が伸び、栄養核に物理的に巻き付いて複合体を形成している。

子植物はゲノム上に piRNA に関与する遺伝子群を持たず、どのように生殖細胞の TE 発現を抑制するのかは分かっていなかった。Slotkin らは 2009 年、植物でも動物と類似の機構が存在することを提唱した (Slotkin et al. 2009)。この論文では、栄養細胞で DNA メチル化酵素である DDM 1 の遺伝子発現が消失することで栄養細胞中で TE の発現が活性化し、この TE を材料に siRNA の一種である epigenetically activated siRNAs (easiRNAs) が作られ、精細胞へ移行することで精細胞内における TE 発現を抑制するモデルが提唱された (図 3)。植物ではウイルスやトランスポゾンなどを材料に、二次的な siRNA を生成する機構が備わっている (Vaucheret and Voinnet 2024)。受精してゲノムが次世代に伝わる精細胞と異なり、栄養細胞のゲノムは次世代には伝わらない。その栄養細胞が自己犠牲のような形で TE に対する siRNA を生産して、生殖細胞である精細胞を守るというこのモデルは、動物が体細胞から piRNA を送り込む現象と類似しており、進化的にも魅力的かつ現実的な説であった。

ところが、2013 年にこれを否定する研究が報告された。前述した 2009 年の論文では、sRNA が精細胞へ移行する根拠として、栄養細胞に特異的な *LAT52* プロモーターにより GFP を発現抑制する人工的な micro RNA (miRNA) を発現させたところ、精細胞に移行して GFP の発現を抑制した現象を報告していた (Slotkin et al. 2009)。しかしながら、2013 年の論文では、*LAT52* プロモーター下流の遺伝子が精細胞でも弱く発現することを指摘しており、*LAT52* プロモーターによって精細胞で発現した siRNA が、精細胞の GFP 蛍光を低下させた可能性を論じた (Grant-Downton et al. 2013)。それを支持する証拠として、真に栄養細胞特異的な遺伝子である *VCK1* プロモーターで同じ miRNA を発現させても、精細胞の GFP 発現は抑制されることが分かった。

混沌とした状況に一つの決着をつけたのは、2016 年に Slotkin らが“TAS 経路”を利用して栄養細胞由来の siRNA により精細胞での遺伝子発現の抑制を実現したという論文である。TAS 経路は、生合成機構がよく知られる植物の sRNA 合成経路の一つである。シロイヌナズナにおいて、ゲノム上に存在する *TAS* と呼ばれる遺伝子から RNA が転写されると、この *TAS* RNA と相補的な miRNA (miR173 や miR390 が該当する) を

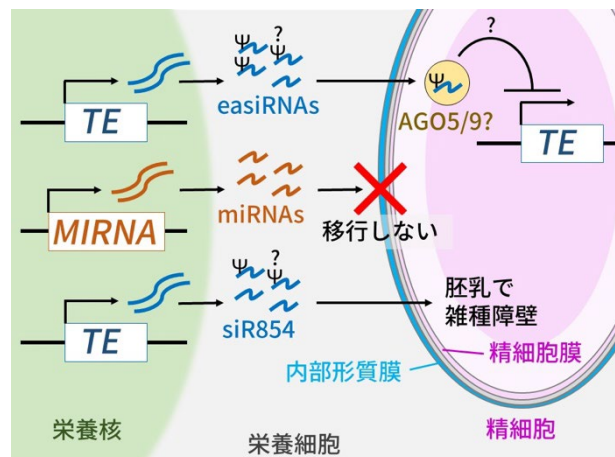


図 3. 幾つかの研究から予想される選択的な sRNA の精細胞への移行・メカニズムとその役割のモデル図

TE に由来する easiRNA はシュードウリジン化 (Ψ) され、選択的に精細胞へ移行する。そして AGO5 や AGO9 に取り込まれ、精細胞で TE 発現を抑制する可能性が提唱されている。一方、ゲノム上の *MIRNA* 遺伝子から転写され、その転写物がステムループ構造を取ることで生成される miRNA については精細胞には移行しないことが想定されている。また、TE に由来する siRNA の一つである siR854 も精細胞へ移行するが、その役割は受精後の胚乳で *UBP1B* という遺伝子発現を抑制することで、2 倍体植物と 4 倍体植物の雑種を防ぐことだと考えられている。

取り込んだ Argonaute (AGO) に認識される。その結果、RNA 二本鎖化酵素である RDR6 により TAS RNA が二本鎖化されたのち、DCL4 によって 21 塩基長の複数の sRNA へとプロセシングされ、sRNA が産生される (de Felippes et al. 2011)。Slotkin らは前述した *VCK1* プロモーターの制御下で、miR173 結合配列に GFP 遺伝子配列の一部を繋いだ mRNA を発現させた。この mRNA の miR173 結合配列を AGO が認識すると、TAS 経路を利用して GFP 発現を抑制する siRNA が生成する。こうしてできた栄養細胞由来の siRNA は、精細胞の GFP 発現を抑制することが分かった (Martínez et al. 2016)。更に別の研究では、TAS 経路を利用した人工的な siRNA に限らず、miR845 という miRNA の効果により産生される、内在性 easiRNA も精細胞へ移行することが報告された (Borges et al. 2018)。これらの実験から、栄養細胞で作られた sRNA が精細胞に移行して機能することは確かなようである。またこれらの実験とは独立して、アブシシン酸を負に制御する酵素 ABA-hypersensitive germination3 (AHG3) をコードする mRNA も精細胞へ移行することが報告され、sRNA だけでなく mRNA も精細胞へ移行しうることが明らかとなった (Jiang et al. 2015)。mRNA については、AHG3 以外にはまだ花粉におけるモバイル mRNA の報告例は筆者の知る限り無く、花粉の機能に關与するモバイル mRNA の報告が待たれる。

3. 花粉のモバイル RNA の機能

花粉において栄養細胞から精細胞への移行が確認されたモバイル RNA は、TE 由来の siRNA や AHG3 mRNA など数えるほどしかない。しかしながら TE の発現抑制以外にも、モバイル RNA が關与しないと説明がつかない、重要な生殖現象が報告されている。TE に由来する siRNA の一つである siR854 は栄養細胞で産生され、おそらく精細胞へ移行したのち、重複受精を経て胚乳へ運ばれる。そして胚乳において *UBP1B* という遺伝子を制御することで胚乳発達を制御する。胚乳は胚発生に必須の栄養を貯蔵する種子内の組織であり、この正常な発達は胚発生に必須である。しかしながら siR854 や *UBP1B* の発現量は絶妙なバランスで制御されており、この siR854 や *UBP1B* の存在比が 2 倍体の種親と 4 倍体の種親の交配によって破綻すると (ゲノム中の遺伝子数の違いが影響すると考えられている)、雑種障壁が引き起こされる。このように siR854 の働きによって、3 倍体植物ができることを防ぐ “triploid block” が起きることが示唆されている (Martínez et al. 2018; Wang et al. 2018) (図 3)。この例を始めとして、花粉におけるモバイル RNA はゲノム保護や染色体総数の制御など、進化的な側面において鍵を握る現象を制御する例が多いようである。

栄養細胞と精細胞の間の RNA 細胞間移行に加えて、花粉は体細胞組織からもモバイル RNA を受容する。例えば、葯の中の表皮組織やタペート層で作られたモバイル sRNA が、発生途中の花粉母細胞へ細胞間移行すると考えられている (Long et al. 2021)。これは、イネやトウモロコシの花粉母細胞において、体細胞で発現する特定の siRNA の前駆体がほとんど発現しないにも関わらず、成熟 siRNA が大量に存在することなど、幾つかの状況証拠があることから想定された説である (Zhai et al. 2015; Dukowic-Schulze et al. 2016)。siRNA が作れない変異体の解析から、これらのモバイル siRNA はエピジェネティックな制御を通じて、花粉の発生に寄与することが示唆されている (Nonomura et al. 2007; Teng et al. 2020; Tamotsu et al. 2023)。

体細胞組織から花粉へ移行するモバイル RNA については複数の植物種で報告があることから、植物にとって種を超えて重要な分子であることが想定されるが、それに関連した報告例はまだ両手で数えられるほどに限られている。花粉に関連したモバイル sRNA の機能については近年でも多くの総説が書かれている。詳細についてはそちらを参照されたい (Martinez and Köhler 2017; Nonomura 2018; Chow and Mosher 2023; Zhan and Meyers 2023)。

4. 花粉において予想されるモバイル RNA の移行経路

精細胞は、自身の細胞膜に加えて、栄養細胞由来の生体膜である内部形質膜に覆われている。そのため他の組織の細胞間と同様に、2つの細胞の細胞質の間には、2枚の細胞膜と細胞壁が存在すると考えられる (図2, 3)。実際にアブラナやテッポウユリの花粉では、プロテオグリカン的一种であるアラビノガラクトナンタンパク質が精細胞周辺に存在することが報告されており、精細胞周辺には何らかの細胞壁様構造が存在することが予想される (Southworth and Kwiatkowski 1996)。多くの植物組織において、異なる細胞への物質移行は、主に細胞と細胞の間を繋ぐ原形質連絡を通して行われる (Lucas and Lee 2004; Kitagawa et al. 2023) (図1)。しかしながら、花粉中の栄養細胞と精細胞の間では、原形質連絡の有無についてははっきりしていない。例えば、二細胞性の花粉を持つ *Nicotiana tabacum* の花粉の電子顕微鏡像から、精細胞前駆体である雄原細胞と栄養細胞の間に、複数の原形質連絡様のチャンネルが発見された (Cresti et al. 1987)。しかしながら、花粉が発芽した後のサンプルでは、この原形質連絡様のチャンネルは発見されなかった (Cresti et al. 1987)。他にも様々な植物種の花粉が電子顕微鏡で観察されてきたものの、原形質連絡様のチャンネルの有無についてははっきりしていない (Russell 1984; Charzyńska et al. 1988; Weber 1988; Akita et al. 2021)。一つ言えることは、体細胞組織において原形質連絡形成に重要な役割を果たす“カロース”が精細胞周辺に存在しないことから、少なくとも精細胞に典型的 (一般的) な原形質連絡は存在しないのだろう (Motomura et al. 2021)。このように現在まで、精細胞の周辺の原形質連絡の存在の有無については決着がついていない。

RNA 細胞間移行経路の2つ目の候補として、近年植物の体細胞研究で報告された、動物のエクソソームと類似した細胞外小胞がある (Cai et al. 2018; Betti et al. 2021) (図1)。動物細胞では、細胞外小胞は Multivesicular body (MVB) と呼ばれる複数の小胞を包む後期エンドソームの一種から放出される。最近の研究から、灰色カビ病をもたらす植物感染性糸状菌に対して、植物細胞が MVB を介して mRNA や sRNA を送り込むことで防御応答を行う可能性が報告された (Wang et al. 2023a)。これらの報告から植物は細胞外小胞を利用して別の細胞へと選択的にモバイル RNA を輸送できる可能性が明らかとなったが、花粉において同様の細胞外小胞が存在するかどうかについては不明である。精細胞と栄養細胞の間の物質移行経路の第3の可能性として、栄養核と精細胞を繋ぐ尻尾構造がある (図2)。この構造により精細胞は栄養核と直接繋がっていることから、この尻尾構造を通じて栄養核から直接精細胞に RNA が送り込まれる可能性が想定されている。この尻尾構造については複数の植物種で電子顕微鏡像が報告されており、この尻尾構造は栄養核を貫くわけではなく、核に巻き付いた状態で存在するようである (Russell 1984; Yu et al. 1989; McCue et al. 2011)。仮にこの尻尾構造

を通過して RNA が移行するとしても、何らかの手段で内部形質膜や精細胞膜を通過する必要があると考えられる。一つ言えることとして、これまで精細胞で作られた RNA が栄養細胞へ移行する例は発見されておらず、モバイル RNA の移行には方向性が存在しているようである。モバイル RNA の移行メカニズムがその方向性を決めているのかもしれない。いずれにしても RNA 移行経路のうちどれが実際に寄与しているのか（あるいは複数の経路が存在するのか）は、まだ当該分野の大きな研究課題として残されている。

5. 花粉におけるモバイル RNA の選択性や移行メカニズムの考察

体細胞組織のモバイル RNA 長距離移行に目を向けると、量が多く安定性の高い RNA が受動的に流れていく“非選択的な移行”も存在する一方で、特定の RNA が積極的に輸送される“選択的な移行”があることが想定されている。この選択的な移行を決めるファクターとして、主に配列や構造などの関与が報告されてきている (Maizel et al. 2020)。例えば、同じ長さの miRNA と siRNA を比較すると、siRNA のほうが他の細胞への移行能力が高いことが分かっている (de Felippes et al. 2011)。この傾向は花粉でも同様であり、同じプロモーターで発現しているにも関わらず、人工 miRNA は精細胞で遺伝子発現を抑制できなかったのに対して、人工 siRNA や TE 由来の easiRNA は精細胞で遺伝子発現を抑制することができた (Grant-Downton et al. 2013; Martínez et al. 2016) (図 3)。このように、体細胞と花粉では何らかの共通のメカニズムが存在しており、特に sRNA は生合成の際にモバイル RNA として機能するかどうかの運命が決められるのかもしれない。複数の研究グループにより、前述した TAS 経路を利用して作らせたモバイル siRNA の実験系を利用することで、sRNA を取り込んで標的を切断する働きを持つ酵素 AGO など、幾つかのタンパク質がモバイル RNA の精細胞での機能に関与することが分かっている (Martínez et al. 2016; Wu et al. 2020)。類似した報告として、イネにおいても特定の AGO タンパク質がタペート組織から花粉への輸送に関与することが示唆されており、少なくとも sRNA は AGO タンパク質を利用して細胞間移行を行う可能性が高い (Tamotsu et al. 2023)。今後は前述した人工 siRNA 実験系を利用したスクリーニングなどによって、これまで未知であった花粉における RNA 輸送メカニズムの詳細が明らかになることが期待される。

モバイル RNA の選択性を決める別の例として、接ぎ木を用いた研究から、長距離移行する RNA には tRNA 様構造 (TLS) を持つものが多く含まれることが明らかとなった (Zhang et al. 2016)。TLS を繋いだ RNA が長距離輸送されることを利用して、接ぎ木により台木から穂木へと Cas9 mRNA とガイド RNA を移行させ、遺伝子組換え無しでゲノム編集を行う技術も実現され始めている (Yang et al. 2023)。また、構造ではなく RNA を修飾することで移行能力が上昇する例もあり、5-methylcytosine (m5C) 修飾がモバイル RNA で多数発見されている (Yang et al. 2019)。2023 年には、栄養細胞において miRNA の一つ、miR845 が切断した TE を材料に産生される二次的 siRNA である easiRNA の多くが、シュードウリジン (Ψ) 修飾を受けていることが報告された (Herridge et al. 2023)。この Ψ 修飾された easiRNA は精細胞特異的な AGO タンパク質である AGO5 や AGO9 に取り込まれていたことから、Ψ 修飾は精細胞に移行するモバイル sRNA の目印になりうるのかもしれない (図 3)。体細胞のモバイル

RNA については、原形質連絡と細胞外小胞のどちらの経路においても、RNA 結合タンパク質が特定のモバイル RNA の運び屋として関与する可能性が報告されている (Maizel et al. 2020; He et al. 2021; Kitagawa et al. 2022)。恐らく花粉においても、RNA の修飾などを目印に特異的な RNA 結合タンパク質が RNA 移行を助けることが想定され、その発見が今後の研究の方向性の一つになるだろう。

6. 細胞間コミュニケーション以外の RNA の戦略的役割

ここまでモバイル RNA について議論してきたが、本項ではそれ以外の、花粉における戦略的な RNA 利用法について紹介する。自身の花粉を受容しない他殖の植物では、他の植物の雌蕊へと花粉が運ばれ受精する。このとき、成熟した花粉は脱水され休眠状態にあり、細胞活動はある意味休止した状態である。この脱水状態の花粉は数週間、あるいは植物種により一年以上も発芽能力を維持していると言われており、非常に頑健な機構を持つと考えられる (Mayer and Gottsberger 2000; Song and Tachibana 2007)。その頑健性と相反して、いったん雌蕊と出会い吸水した花粉は、数時間で発芽して伸長し続ける (Motomura et al. 2020)。この長期に渡る生命維持機構と素早い発芽への切り替えスイッチとして、mRNA が寄与しているようである。転写阻害剤実験などから、花粉の発芽には新たな転写は不要であり、翻訳さえできれば発芽には十分であることが知られている (Honys and Twell 2004; Hao et al. 2005)。恐らく花粉は、mRNA を安定化させて保持することで生命活動を維持しており、転写をスキップすることで素早い翻訳を実現しているのだと想定される。また興味深いことに、花粉管伸長中においても、新規の転写はさほど必要ではないことが分かってきた (Motomura et al. 2021, 2022)。花粉管のもつ重要かつ、伸長という特徴的な機能の維持のため、植物は構造的にシンプルな RNA の利点を活かして、戦略的な利用をしていることが推察される。これら花粉における mRNA レベルでの遺伝子発現制御の詳細については別途総説を執筆しているので、詳しくはそちらを参照されたい (Motomura 2024)。

7. おわりに

本論文では、被子植物の花粉において近年発見された、モバイル RNA の動態と機能に焦点を当て、これらが植物の生殖プロセスにどのように関わるのか、その可能性について紹介した。体細胞組織でモバイル RNA が多数報告されているのと同様に、花粉においても戦略分子としてモバイル RNA が様々な役割を持っている可能性は高い。特に花粉においては easiRNA に代表されるように、生殖プロセスに関連した植物種間の隔離など、種の繁栄や進化と密接に関わるような現象に関与する例が多い。実際にモバイル sRNA である siR854 は、種間の遺伝的隔離を促進し、種の多様化に重要な役割を果たしていることが示唆される (図 3)。また別の RNA の戦略的な利用法として、競争が激しい環境下において、迅速な発芽や転写に依存しない花粉管の伸長など、生存戦略を支える重要な要素にもなりうるということが明らかとなってきた。このようなメカニズムは、植物が生態系内での競争に適応し、生存と繁栄を確保するための進化的戦略の一環として発展してきたことが推察される。

植物細胞におけるモバイル RNA の存在自体は、ウイルス RNA の移行などにより半世紀近く前より認知されていたものの、移行の詳細などについては長らく不明であった。しかし次世代シーケンサーの発展などにより、この 15 年程度での当該分野の発展は目覚ましい。花粉におけるモバイル RNA 研究も同様に、これらの発見を土台として今後飛躍的に発展することが期待される。今後は、モバイル RNA の種間での機能的な違い、あるいは発展的な研究として siR854 などに代表される生態系内での生物種間での動態を解明することが、植物生物学に新たな視点をもたらすであろう。

引用文献

- Akita K., Takagi T., Kobayashi K., Kuchitsu K., Kuroiwa T., Nagata N. (2021). Ultrastructural characterization of microlipophagy induced by the interaction of vacuoles and lipid bodies around generative and sperm cells in Arabidopsis pollen. *Protoplasma* 258, 129–138. doi: 10.1007/s00709-020-01557-2.
- Betti F, Ladera-Carmona MJ, Weits DA, Ferri G., Iacopino S, Novi G, Svezia B, Kunkowska AB, Santaniello A, Piaggese A, et al. (2021). Exogenous miRNAs induce post-transcriptional gene silencing in plants. *Nat Plants* 7, 1379–1388. doi: 10.1038/s41477-021-01005-w.
- Borges F, Parent J-S, van Ex F, Wolff P, Martínez G, Köhler C, Martienssen RA. (2018). Transposon-derived small RNAs triggered by miR845 mediate genome dosage response in Arabidopsis. *Nat. Genet.* 50, 186–192. doi: 10.1038/s41588-017-0032-5.
- Brennecke J, Aravin AA, Stark A, Dus M, Kellis M, Sachidanandam R, Hannon GJ. (2007). Discrete small RNA-generating loci as master regulators of transposon activity in Drosophila. *Cell* 128, 1089–1103. doi: 10.1016/j.cell.2007.01.043.
- Brennecke J, Malone CD, Aravin AA, Sachidanandam R, Stark A, Hannon GJ. (2008). An epigenetic role for maternally inherited piRNAs in transposon silencing. *Science* 322, 1387–1392. doi: 10.1126/science.1165171.
- Cai Q, Qiao L, Wang M, He B, Lin FM, Palmquist J, Huang S-D, Jin H. (2018). Plants send small RNAs in extracellular vesicles to fungal pathogen to silence virulence genes. *Science* 360, 1126–1129. doi: 10.1126/science.aar4142.
- Charzyńska M, Ciampolini F, Cresti M. (1988). Generative cell division and sperm cell formation in barley. *Sex. Plant Reprod.* 1, 240–247. doi: 10.1007/BF00189159.
- Chow HT, Mosher RA. (2023). Small RNA-mediated DNA methylation during plant reproduction. *Plant Cell*. doi:10.1093/plcell/koad010.
- Cresti M, Lancelle SA, Hepler PK. (1987). Structure of the generative cell wall complex after freeze substitution in pollen tubes of Nicotiana and Impatiens. *J. Cell Sci.* 88, 373–378. doi: 10.1242/jcs.88.3.373.
- de Felippes FF, Ott F, Weigel D. (2011). Comparative analysis of non-autonomous effects of tasiRNAs and miRNAs in Arabidopsis thaliana. *Nucleic Acids Res.* 39, 2880–2889. doi: 10.1093/nar/gkq1240.

- Dukowic-Schulze S, Sundararajan A, Ramaraj T, Kianian S, Pawlowski WP, Mudge J, Chen C. (2016). Novel Meiotic miRNAs and Indications for a Role of PhasiRNAs in Meiosis. *Front. Plant Sci.* 7, 762. doi: 10.3389/fpls.2016.00762.
- Grant-Downton R, Kourmpetli S, Hafidh S, Khatab H, Le Trionnaire G, Dickinson H, Twell D. (2013). Artificial microRNAs reveal cell-specific differences in small RNA activity in pollen. *Curr. Biol.* 23, R599–601. doi: 10.1016/j.cub.2013.05.055.
- Hamamura Y, Saito C, Awai C, Kurihara D, Miyawaki A, Nakagawa T, Kanaoka MM, Sasaki N, Nakano A, Berger F, et al. (2011). Live-cell imaging reveals the dynamics of two sperm cells during double fertilization in *Arabidopsis thaliana*. *Curr. Biol.* 21, 497–502. doi: 10.1016/j.cub.2011.02.013.
- Hao H, Li Y, Hu Y, Lin J. (2005). Inhibition of RNA and protein synthesis in pollen tube development of *Pinus bungeana* by actinomycin D and cycloheximide. *New Phytol.* 165, 721–729. doi: 10.1111/j.1469-8137.2004.01290.x.
- He B, Cai Q, Qiao L, Huang C-Y, Wang S, Miao W, Ha T, Wang Y, Jin H. (2021). RNA-binding proteins contribute to small RNA loading in plant extracellular vesicles. *Nat Plants* 7, 342–352. doi: 10.1038/s41477-021-00863-8.
- Herridge RP, Dolata J, Migliori V, de Santis Alves C, Borges F, Van Ex F, Lin A, Bajczyk M, Leonardi T, Hendrick A, et al. (2023). Pseudouridine guides germline small RNA transport and epigenetic inheritance. *bioRxiv*, 2023.05.27.542553. doi: 10.1101/2023.05.27.542553.
- Higashiyama T, Takeuchi H. (2015). The mechanism and key molecules involved in pollen tube guidance. *Annu. Rev. Plant Biol.* 66, 393–413. doi: 10.1146/annurev-arplant-043014-115635.
- Honys D, Twell D. (2004). Transcriptome analysis of haploid male gametophyte development in *Arabidopsis*. *Genome Biol.* 5, R85. doi: 10.1186/gb-2004-5-11-r85.
- Jiang H, Yi J, Boavida LC, Chen Y, Becker JD, Köhler C, McCormick S. (2015). Intercellular communication in *Arabidopsis thaliana* pollen discovered via AHG3 transcript movement from the vegetative cell to sperm. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 112, 13378–13383. doi: 10.1073/pnas.1510854112.
- Kitagawa M, Tran TM, Jackson D. (2023). Traveling with purpose: cell-to-cell transport of plant mRNAs. *Trends Cell Biol.* doi:10.1016/j.tcb.2023.05.010.
- Kitagawa M, Wu P, Balkunde R, Cunniff P, Jackson D. (2022). An RNA exosome subunit mediates cell-to-cell trafficking of a homeobox mRNA via plasmodesmata. *Science* 375, 177–182. doi: 10.1126/science.abm0840.
- Li C, Gu M, Shi N, Zhang H, Yang X, Osman T, Liu Y, Wang H, Vatish M, Jackson S, et al. (2011). Mobile FT mRNA contributes to the systemic florigen signalling in floral induction. *Sci. Rep.* 1, 73. doi: 10.1038/srep00073.
- Liu L, Chen X. (2018). Intercellular and systemic trafficking of RNAs in plants. *Nat Plants* 4, 869–878. doi: 10.1038/s41477-018-0288-5.

- Long J, Walker J, She W, Aldridge B, Gao H, Deans S, Vickers M, Feng X. (2021). Nurse cell--derived small RNAs define paternal epigenetic inheritance in *Arabidopsis*. *Science* 373. doi:10.1126/science.abh0556.
- Lopez-Gomollon S, Baulcombe DC. (2022). Roles of RNA silencing in viral and non-viral plant immunity and in the crosstalk between disease resistance systems. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 23, 645–662. doi: 10.1038/s41580-022-00496-5.
- Lucas WJ, Lee J-Y. (2004). Plasmodesmata as a supracellular control network in plants. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 5, 712–726. doi: 10.1038/nrm1470.
- Maizel A, Markmann K, Timmermans M, Wachter A. (2020). To move or not to move: roles and specificity of plant RNA mobility. *Curr. Opin. Plant Biol.* 57, 52–60. doi: 10.1016/j.pbi.2020.05.005.
- Martínez G, Köhler C. (2017). Role of small RNAs in epigenetic reprogramming during plant sexual reproduction. *Curr. Opin. Plant Biol.* 36, 22–28. doi: 10.1016/j.pbi.2016.12.006.
- Martínez G, Panda K, Köhler C, Slotkin RK. (2016). Silencing in sperm cells is directed by RNA movement from the surrounding nurse cell. *Nat Plants* 2, 16030. doi: 10.1038/nplants.2016.30.
- Martínez G, Wolff P, Wang Z, Moreno-Romero J, Santos-González J, Conze LL, DeFraia C, Slotkin RK, Köhler C. (2018). Paternal easiRNAs regulate parental genome dosage in *Arabidopsis*. *Nat. Genet.* 50, 193–198. doi: 10.1038/s41588-017-0033-4.
- Mayer E, Gottsberger G. (2000). Pollen viability in the genus *Silene* (Caryophyllaceae) and its evaluation by means of different test procedures. *Flora* 195, 349–353. doi: 10.1016/S0367-2530(17)30993-3.
- McCue AD, Cresti M, Feijó JA, Slotkin RK. (2011). Cytoplasmic connection of sperm cells to the pollen vegetative cell nucleus: potential roles of the male germ unit revisited. *J. Exp. Bot.* 62, 1621–1631. doi: 10.1093/jxb/err032.
- Mogensen HL. (1992). The Male Germ Unit: Concept, Composition, and Significance. *International Review of Cytology*, 129–147. doi: 10.1016/S0074-7696(08)61095-5
- Motomura K. (2024). Temporal Gene Expression and Functional Acquisition in Pollen Tubes. *Plant Morphology* in press.
- Motomura K, Arae T, Araki-Uramoto H, Suzuki Y, Takeuchi H, Suzuki T, Ichihashi Y, Shibata A, Shirasu K, Takeda A, et al. (2020). AtNOT1 is a novel regulator of gene expression during pollen development. *Plant Cell Physiol.* 61, 712–721. doi: 10.1093/pcp/pcz235.
- Motomura K, Sugi N, Takeda A, Yamaoka S, Maruyama D. (2022). Possible molecular mechanisms of persistent pollen tube growth without de novo transcription. *Front. Plant Sci.* 13, 1020306. doi: 10.3389/fpls.2022.1020306.
- Motomura K, Takeuchi H, Notaguchi M, Tsuchi H, Takeda A, Kinoshita T, Higashiyama T, Maruyama D. (2021). Persistent directional growth capability in *Arabidopsis thaliana* pollen tubes after nuclear elimination from the apex. *Nat. Commun.* 12, 2331. doi: 10.1038/s41467-021-22661-8.
- Nonomura K-I. (2018). Small RNA pathways responsible for non-cell-autonomous regulation of plant reproduction. *Plant Reprod.* 31, 21–29. doi: 10.1007/s00497-018-0321-x.

- Nonomura K-I, Morohoshi A, Nakano M, Eiguchi M, Miyao A, Hirochika H, Kurata N. (2007). A germ cell specific gene of the ARGONAUTE family is essential for the progression of premeiotic mitosis and meiosis during sporogenesis in rice. *Plant Cell* 19, 2583–2594. doi: 10.1105/tpc.107.053199.
- Russell SD. (1984). Ultrastructure of the sperm of *Plumbago zeylanica*. *Planta* 162, 385–391. doi: 10.1007/BF00393450.
- Slotkin RK, Vaughn M, Borges F, Tanurdzić M, Becker JD, Feijó JA, Martienssen RA. (2009). Epigenetic reprogramming and small RNA silencing of transposable elements in pollen. *Cell* 136, 461–472. doi: 10.1016/j.cell.2008.12.038.
- Song J, Tachibana S. (2007). Loss of viability of tomato pollen during long-term dry storage is associated with reduced capacity for translating polyamine biosynthetic enzyme genes after rehydration. *J. Exp. Bot.* 58, 4235–4244. doi: 10.1093/jxb/erm280.
- Southworth D, Kwiatkowski S. (1996). Arabinogalactan proteins at the cell surface of *Brassica* sperm and *Lilium* sperm and generative cells. *Sex. Plant Reprod.* 9, 269–272. doi: 10.1007/BF02152701.
- Sugi N, Izumi R, Tomomi S, Susaki D, Kinoshita T, Maruyama D. (2023). Removal of the endoplasmic membrane upon sperm cell activation after pollen tube discharge. *Front. Plant Sci.* 14, 1116289. doi: 10.3389/fpls.2023.1116289.
- Tamotsu H, Koizumi K, Briones AV, Komiya R. (2023). Spatial distribution of three ARGONAUTES regulates the anther phasiRNA pathway. *Nat. Commun.* 14, 3333. doi: 10.1038/s41467-023-38881-z.
- Teng C, Zhang H, Hammond R, Huang K, Meyers BC, Walbot V. (2020). Dicer-like 5 deficiency confers temperature-sensitive male sterility in maize. *Nat. Commun.* 11, 2912. doi: 10.1038/s41467-020-16634-6.
- Vaucheret H, Voinnet O. (2024). The plant siRNA landscape. *Plant Cell* 36, 246–275. doi: 10.1093/plcell/koad253.
- Wang G, Jiang H, Del Toro de León G, Martinez G, Köhler C. (2018). Sequestration of a Transposon-Derived siRNA by a Target Mimic Imprinted Gene Induces Postzygotic Reproductive Isolation in *Arabidopsis*. *Dev. Cell* 46, 696–705.e4. doi: 10.1016/j.devcel.2018.07.014.
- Wang M, Dean RA. (2020). Movement of small RNAs in and between plants and fungi. *Mol. Plant Pathol.* 21, 589–601. doi: 10.1111/mpp.12911.
- Wang S, He B, Wu H, Cai Q, Ramírez-Sánchez O, Abreu-Goodger C, Birch PRJ, Jin H. (2023a). Plant mRNAs move into a fungal pathogen via extracellular vesicles to reduce infection. *Cell Host Microbe*. doi:10.1016/j.chom.2023.11.020.
- Wang X, Ramat A, Simonelig M, Liu M-F. (2023b). Emerging roles and functional mechanisms of PIWI-interacting RNAs. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 24, 123–141. doi: 10.1038/s41580-022-00528-0.
- Weber M. (1988). Formation of sperm cells in *Galium mollugo* (Rubiaceae), *Trichodiadema setuliferum* (Aizoaceae), and *Avena sativa* (Poaceae). *Plant Syst. Evol.* 161, 53–64. doi: 10.1007/BF00936012.

- Wu W, Li L, Zhao Y, Zhao Y, Jiang T, McCormick S, Zheng B. (2020). Heterochromatic silencing is reinforced by ARID1-mediated small RNA movement in Arabidopsis pollen. *New Phytol.* doi:10.1111/nph.16871.
- Wu W, Zheng B. (2019). Intercellular delivery of small RNAs in plant gametes. *New Phytol.* 224, 86–90. doi: 10.1111/nph.15854.
- Yang L, Machin F, Wang S, Saplaoura E, Kragler F. (2023). Heritable transgene-free genome editing in plants by grafting of wild-type shoots to transgenic donor rootstocks. *Nat. Biotechnol.* doi: 10.1038/s41587-022-01585-8.
- Yang L, Perrera V, Saplaoura E, Apelt F, Bahin M, Kramdi A, Olas J, Mueller-Roeber B, Sokolowska E, Zhang W, et al. (2019). m5C Methylation Guides Systemic Transport of Messenger RNA over Graft Junctions in Plants. *Curr. Biol.* 29, 2465-2476.e5. doi: 10.1016/j.cub.2019.06.042.
- Yu H-S, Hu S-Y, Zhu C. (1989). Ultrastructure of sperm cells and the male germ unit in pollen tubes of *Nicotiana tabacum*. *Protoplasma* 152, 29–36. doi: 10.1007/BF01354237.
- Yu Z, Chen W, Wang Y, Zhang P, Shi N, Hong Y. (2021). Mobile Flowering Locus T RNA - Biological Relevance and Biotechnological Potential. *Front. Plant Sci.* 12, 792192. doi: 10.3389/fpls.2021.792192.
- Zhai J, Zhang H, Arikait S, Huang K, Nan G-L, Walbot V, Meyers BC. (2015). Spatiotemporally dynamic, cell-type-dependent premeiotic and meiotic phase RNAs in maize anthers. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 112, 3146–3151. doi: 10.1073/pnas.1418918112.
- Zhan J, Meyers BC. (2023). Plant Small RNAs: Their Biogenesis, Regulatory Roles, and Functions. *Annu. Rev. Plant Biol.* 74, 21–51. doi: 10.1146/annurev-arplant-070122-035226.
- Zhang W, Thieme CJ, Kollwig G, Apelt F, Yang L, Winter N, Andresen N, Walther D, Kragler F. (2016). tRNA-Related Sequences Trigger Systemic mRNA Transport in Plants. *Plant Cell* 28, 1237–1249. doi: 10.1105/tpc.15.01056.

植物と昆虫の共生・寄生の分子メカニズムを解く

平野 朋子^{1,2}

¹ 京都府立大学生命環境科学研究科
〒606-8522 京都市左京区下鴨半木町 1-5

² 科学技術振興機構・さがけ
〒102-0076 東京都千代田区五番町 7

Elucidation of the molecular mechanisms of symbiosis and parasitism between plants and insects

Tomoko Hirano^{1,2}

¹ Graduate School of Life and Environmental Sciences, Kyoto Prefectural University,
1-5, Shimogamo-nakaragi-cho, Sakyo-ku, Kyoto, 606-8522, Japan

² JST・PRESTO, Goban-cho 7, Chiyoda-ku, Tokyo, 102-0076, Japan

Keywords: Ab-GALFA, Host plant, Insect Gall, Parasite, Symbiosis

DOI: 10.24480/bsj-review.15a5.00258

1. はじめに

「虫瘤（むしこぶ）」は、植物に共生・寄生する昆虫が、自身の住居や餌場獲得のために、植物に誘導して作らせる特殊器官である（図1，2）。植物と共生する多くの昆虫が、捕食や送粉、営巣など「植物のそこに在る姿をそのまま」利用するのに対し、植物に虫瘤をつくらせる昆虫（虫瘤形成昆虫）は、「異種である植物に、潜り込み（エンドパラサイト）、植物の発生プログラムを外部から操作することで、植物には本来存在しない虫瘤器官を創生」する。

従って、虫瘤形成現象は、高次元の共生関係現象であり、植物が自身の遺伝子型にない表現型を示す「延長された表現型」の代表例であると考えられる（Dawkins 1982）。

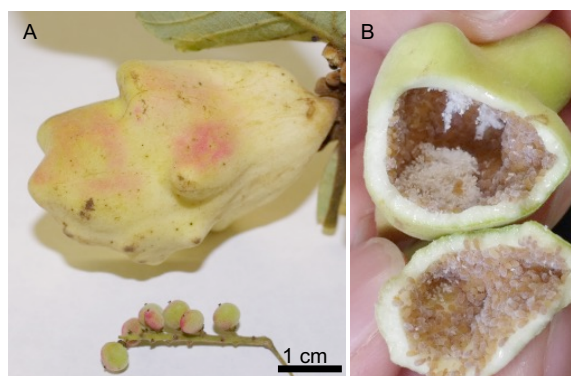


図1. ヌルデの虫こぶ（A 上）は、ヌルデの果実（A 下）に色や形態は似ているが、大きさが異なる。ヌルデの虫こぶを割ると、数千個体ものヌルデシロアブラムシが観察される（B）。

虫瘤形成昆虫は、タマバエやタマバチ、フシダニ、アブラムシなど、2 万から 20 万種類以上と推定されており (Price et al. 1987; Espirito-Santo and Fernandes 2007) , 宿主植物との組み合わせによって、多種、多様な形の虫瘤が作り出されることが知られている (Mani 1964; Felt et al. 1918) 。通常、多細胞生物は、一度分化した器官が別の器官に変化することはないが、虫瘤形成では、分化した「葉」や「茎」の細胞から、植物の通常の発生過程には発現しない「虫瘤」器官が再生される。

虫瘤形成昆虫はどのようにして宿主植物に虫瘤形成を誘導するのか？多様な形態の虫瘤はどうしてできるのか？こうした問いをはじめ「虫瘤」は、何世紀にもわたり多くの研究者を魅了し、数多くの行動学や組織学の研究や (Gätjens-Boniche 2019) , 虫瘤形成に関与する多くの候補遺伝子が報告されてきた (Chen et al. 2008; Zhao et al. 2015; Yang et al. 2018; Wang et al. 2018; Eitle et al. 2019; Cambier et al. 2019; Takeda et al. 2021; Wei et al. 2022; Schultz et al. 2019) 。しかしながら、昆虫側の虫瘤誘導因子について、また植物側の虫瘤誘導因子の受容体・シグナル伝達因子についても、分子レベルでの解明はされておらず、虫瘤形成メカニズムはほとんど未解明のままである。そのため、虫瘤形成は高次元の共生関係現象であるが、共生関係のうち、相利共生、片利共生、寄生のどれであるかを判別することは困難である。

2. 宿主植物に形成される虫瘤の共通性を抽出する

2-1. 虫瘤は、高度に組織化した器官である

前述のとおり、虫瘤の形態は多様であるが、私たちは、虫瘤形成に共通する分子メカニズムが存在すると考え、まず、虫瘤形態に共通した特徴を抽出した。

ヌルデシロアブラムシの宿主植物は、ウルシ科の落葉高木であるヌルデである。その葉の翼葉に形成される虫瘤は、(1) 中央に昆虫の居住空間があり、これを取り囲む組織は、(2) 昆虫の食料となる幹細胞化した内部構造と、(3) 非常に堅い木質化した層状の外殻構造でできる層状構造、そして、(4) 水分や養分を送り込むために張り巡らされた維管束、といった 4 つの特徴的な構造をもっている (図 2, Hirano et al. 2020) 。これは、アグロバクテリウムが作る秩序のない腫瘍状の組織「クラウンゴール」とは異なり、高度に組織化した複雑性を有している (Gätjens-Boniche 2019) 。

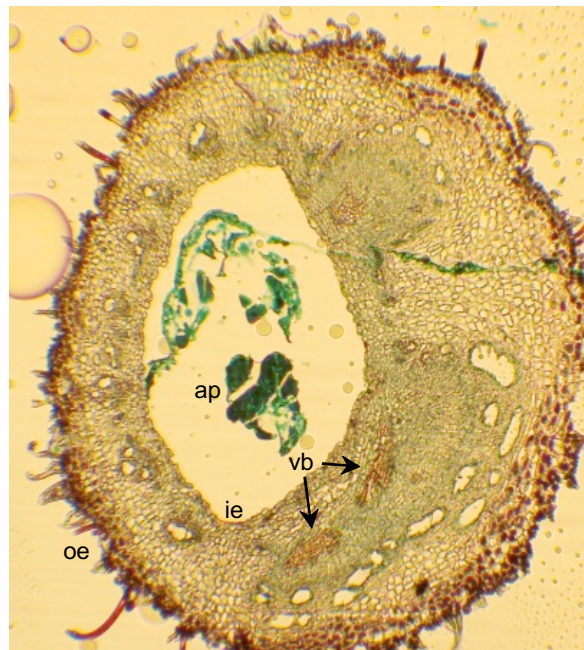


図 2. ヌルデシロアブラムシがヌルデに作る虫こぶ「五倍子」の構造. 外部にはリグニン化した硬い外郭構造 (oe) , 内部には柔らかい構造 (ie) と維管束構造 (vb) が発達しており、内部の空洞部分に、ヌルデシロアブラムシ (ap) が生息している (文献 Hirano et al. 2020 より引用) 。

2-2. 虫癭形成は、花器官形成プログラムをハイジャックし、ソース器官をシンク器官へ変える

私たちは、ヌルデの、虫癭形成初期の虫癭、葉、花、果実について、網羅的遺伝子発現解析である RNA sequencing (RNA-seq) 解析を行い、ヌルデの虫癭では、花器官形成遺伝子や果実形成遺伝子、病害応答・抵抗性遺伝子が顕著に発現変動していることを明らかにした (Hirano et al. 2020)。

続いて、虫癭の外観が、単に少し膨らんだだけのヒサカキ虫癭、これより膨らみが目立つカンコノキ虫癭、立体的なブドウ虫癭、そして、幹細胞や二次細胞壁などの高次構造がはっきりしているヨモギやヌルデの虫癭など、異なる数種類の虫癭の RNA-seq 解析を比較した (Takeda et al. 2019)。その結果、すべての虫癭で共通して、CLE44, BAM3, WOX ファミリーなど、幹細胞を維持または誘導する遺伝子群の顕著な発現変動が見られ、虫癭形成過程において、細胞の幹細胞化が促進されることを明らかにした (Takeda et al. 2021)。さらに、虫癭で、花器官形成の ABCE モデル (図 3 B) の遺伝子群の特徴的な発現パターンも見いだした (Takeda et al. 2021)。

1991 年に Meyerowitz や Coen のグループによって提唱された ABC モデル (Coen and Meyerowitz 1991) とその後の研究により確立された、花器官形成の ABCE モデルは、「がく、花弁、雄しべ、雌しべの 4 種の花器官は、クラス A, B, C, E の 4 種類の遺伝子の発現によって決まる；すべての花器官の形成に必要とされるクラス E 遺伝子 (SEP1, SEP2, SEP3, SEP4) が発現し、その上でクラス A 遺伝子 (AP1, AP2) が働くと、花器官の一番外側のがくが形成され、クラス A とクラス B 遺伝子 (PI, AP3) の両方が働くとその内側の花弁が、クラス B 遺伝子とクラス C 遺伝子 (AG) の両方が働くとその内側の雄しべが、クラス C 遺伝子が働くと、中心の雌しべが形成される」というモデルである (図 3 B)。

虫癭器官で見られる花器官形成遺伝子の特徴的な発現パターンとは、次のようであった。ヨモギやヌルデの虫癭のように、非

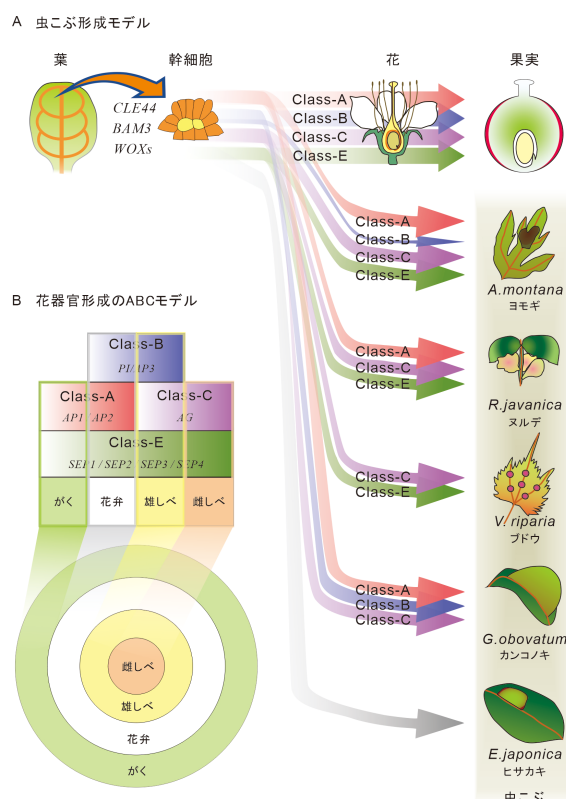


図 3. (A) 虫癭形成モデル；幹細胞誘導遺伝子の発現の後、花器官形成のクラス A, B, C 遺伝子の発現組み合わせによって虫癭の形態が決まる。(B) 花器官形成の ABC モデル；クラス E 遺伝子をベースに、クラス A 遺伝子が働くとがくが、クラス A, B 遺伝子が働くと花弁が、クラス B, C 遺伝子が働くと雄しべが、クラス C 遺伝子が働くと雌しべが形成される (文献 Takeda et al. 2021 を改変)。

常に立体的で複雑性の高い虫瘤では、花器官形成のベースにあるクラス E 遺伝子とクラス A, C 遺伝子が高発現し、クラス B 遺伝子の発現は低く保たれていた。そして、虫瘤の立体性や器官としての複雑性が低くなるほど、クラス A 遺伝子やクラス E 遺伝子の発現が相対的に低くなっていた (図 3 A)。この結果から、虫瘤は、クラス E, A, C 遺伝子の高発現およびクラス B 遺伝子が低発現することで「がくと雌しべの発達と、花弁と雄しべの退化」を誘導し、がくが硬化した外殻と、雌しべが変化した組織を基本として形成される、つまり、虫瘤形成とは、虫瘤形成昆虫によって、花器官形成遺伝子群が操作されたことで、花器官形成および果実形成が変形させられた結果であると、示唆された。

以上を総合して、私たちは、虫瘤形成では、その初期においては、あらゆる虫瘤に共通の遺伝子発現の誘導で、葉などの分化した器官から幹細胞化が促進され、そしてその後の花器官形成遺伝子の発現量の組み合わせによって、虫瘤形態のバリエーションが生まれると考えた。

3. 寄生昆虫が分泌する虫瘤形成因子を探る

3-1. 虫瘤形成昆虫、ヌルデシロアブラムシ

ヌルデの虫瘤形成昆虫であるヌルデシロアブラムシ (*Schlechtendalia chinensi*) は、5, 6 月頃に、幹母と呼ばれる 1 匹の雌が一次ホストであるヌルデの翼葉に潜り込み、直径 1 mm ほどの虫瘤を形成し、無性生殖で「胎生雌虫」を産む。その後、単為生殖を繰り返して、9 月頃までヌルデシロアブラムシの「無翅型」コピーが増産され、それにつれて虫瘤は直径 3 ~ 6 cm ほどまで急速に成長する。その虫瘤のサイズは、2 か月ほど維持され、11 月頃に、虫瘤の中で成長した翅を持つ「有翅型」が虫瘤に穴を開けて飛び出し、二次ホストであるコケ植物 (チョウチンゴケ類) に移動する。そこで、無性生殖で産まれた幼虫が越冬し、翌春に有翅虫となって再びヌルデに移動すると、無性生殖で雌と雄が生まれ、有性生殖によって、新たな幹母が生まれる。

3-2. 虫瘤形成昆虫は植物ホルモンを生成する

ヌルデシロアブラムシによる虫瘤形成には、「幹母がヌルデの葉の葉脈近傍に何らかの物質 (エフェクター) を注入」することが必要であり、その注入部分が陥没して、周囲が隆起し、幹母を包み込むことで初期の虫瘤が形成する (図 1 A, B) と予想されてきた。一方、虫瘤形成昆虫は、植物ホルモンを合成しているとの報告もあり

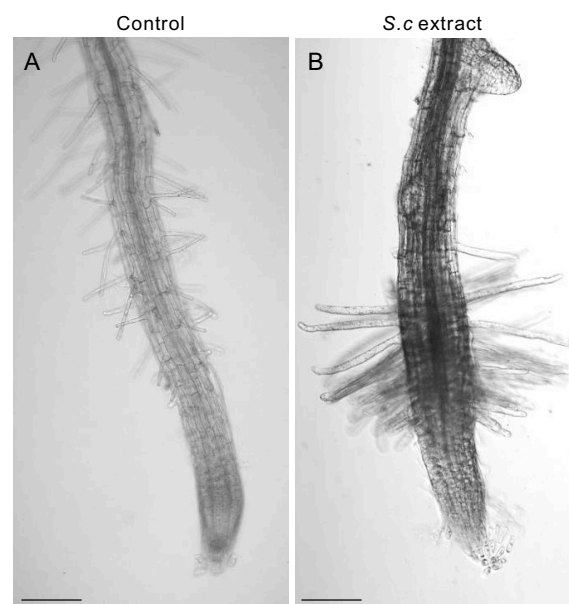


図 4. シロイヌナズナは、ヌルデシロアブラムシ虫体の破碎液 (*Sc. extract*) に浸漬すると (B), 異常な細胞分裂と細胞伸長が起こり、水に浸漬したとき (A) と比較して、形態が大きく変化した (文献 Hirano et al. 2023 より改変)。

(Yamaguchi et al. 2012) , 実際, 私たちは, ヌルデシロアブラムシの虫体から, 植物の幹細胞化や細胞増殖を促進する作用がある植物ホルモン, オーキシンやサイトカイニンを高濃度で検出した (Hirano et al. 2020) 。

植物は, 動物に比べて高い可塑性をもち, 植物ホルモンであるオーキシンやサイトカイニンを与えて培養すると, 分化細胞から「カルス」と呼ばれる未分化細胞が増殖し, その後の誘導で植物体に再生することが, 古くから知られている。しかし, 植物ホルモンの作用だけでは, 虫瘤のような高次構造を持った器官は形成できない。そこで私たちは, 植物ホルモンに加えて, 虫瘤形成昆虫が分泌する, 未同定の誘導物質「虫瘤誘導物質」が, 分化細胞を幹細胞化させ, 花芽や花や実を作る遺伝子を操り, 「虫瘤形成」を誘導していると推察した。

3-3. 虫瘤形成の誘導物質を探す

私たちは, 「虫瘤誘導物質」を同定するため, モデル植物シロイヌナズナを使った虫瘤形成解析法である, Arabidopsis based-gall formation assay (Ab-GALFA) を開発した。これは, ヌルデシロアブラムシを含む虫瘤形成期の虫瘤形成昆虫をすりつぶした懸濁液 (虫液) に浸したシロイヌナズナの幼植物は, 一晩でその形態が大きく変わる, という発見に基づいている (図4) 。

Ab-GALFA を用いると, ヌルデシロアブラムシの虫液は, ヌルデシロアブラムシ虫体の植物ホルモン組成を再現した溶液 (artificial hormone mix; AHM) よりはるかに著しく, シロイヌナズナの分化細胞を幹細胞化し (図5), 導管形成を多数誘導し (図6), 堅い二次細胞壁を形成させることがわかった。

また, シロイヌナズナの RNA-seq 解析において, 虫液処理で発現誘導される 1088 の発現上昇遺伝子と 1126 の発現減少遺伝子のうち, それぞれ, 43%と 32%の遺伝子は, AMH 処理で発現誘導される遺伝子と重複していた。したがって, それぞれ, 57%と 68%の遺伝子は, 植物ホルモン以外の物質による発現誘導であることが示された

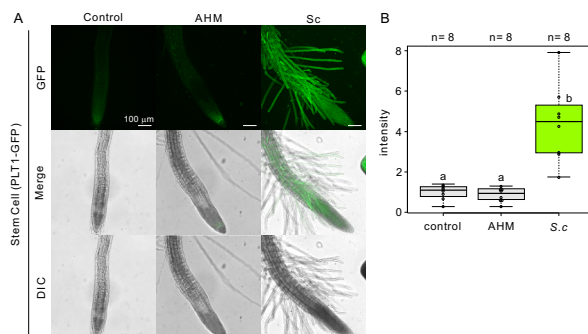


図5. PLT1-GFP を自己プロモーターの制御下で発現するシロイヌナズナ幹細胞マーカーラインを, AHM もしくは虫液 (Sc extract) に一晩浸漬したとき (A), 虫液の方がより広範囲で高い強度の蛍光を観察した (B) (文献 Hirano et al. 2023 より引用) 。

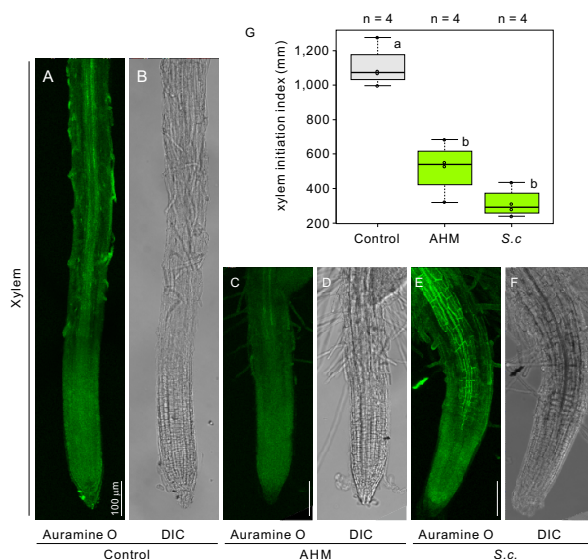


図6. 野生型シロイヌナズナを, AHM もしくは虫液 (Sc. Extract) に一晩浸漬し, 導管の構成成分であるリグニンとスベリンを Auramin O で染色すると (A, C, E), AHM より虫液処理の方が, 顕著に染色され, 導管 (xylem) 形成誘導の促進も観察された (G) (文献 Hirano et al.2023 より引用) 。

(Hirano et al. 2023)。現在、Ab-GALFA や in silico 解析により、「虫瘤誘導物質」の同定を試みている（論文投稿中）。

3-4. 虫瘤誘導物質で植物が強くなる

ヌルデシロアブラムシによってヌルデに虫瘤が形成されると、虫瘤は、2, 3 か月で 100 万倍の体積に成長するが、最近の研究により、宿主植物ヌルデでは、光合成効率が上昇するほか (Chen et al. 2020)、病原菌耐性遺伝子の発現が誘導されることが分かってきた

(Hirano et al. 2020)。これらのことから、私たちは、虫瘤形成を誘導する物質を、成長促進作用や病害抵抗性付与作用をもつ生物賦活剤（バイオスティミュラント）として、植物に利用する応用研究も進めている（特許出願済）。天然由来の虫瘤誘導物質は、環境にやさしく、すべての生物のエネルギーの源である植物の生産を促進し、未来型の農業や社会を助ける力になると考えている。

4. 引用文献

- Cambier S, Ginis O, Moreau SJM, Gayral P, Hearn J, Stone GN, Giron D, Huguet E, Drezen JM (2019) Gall Wasp Transcriptomes Unravel Potential Effectors Involved in Molecular Dialogues With Oak and Rose. *Front Physiol* 10: 926. doi: 10.3389/fphys.2019.00926
- Chen MS, Zhao HX, Zhu YC, Scheffler B, Liu X, Liu X, Hulbert S, Stuart JJ (2008) Analysis of transcripts and proteins expressed in the salivary glands of Hessian fly (*Mayetiola destructor*) larvae. *J Insect Physiol* 54: 1–16. doi: 10.1016/j.jinsphys.2007.07.007
- Chen X, Yang Z, Chen H, Qi Q, Liu J, Wang C, Shao S, Lu Q, Li Y, Wu H, et al. (2020) A Complex Nutrient Exchange Between a Gall-Forming Aphid and Its Plant Host. *Front Plant Sci* 11: 811. doi: 10.3389/fpls.2020.00811
- Dawkins R (1982) *The Extended Phenotype* Oxford University Press. Oxford
- Eitle MW, Carolan JC, Griesser M, Forneck A (2019) The salivary gland proteome of root-galling grape phylloxera (*Daktulosphaira vitifoliae* Fitch) feeding on *Vitis* spp. *PLoS One* 14: e0225881. doi: 10.1371/journal.pone.0225881
- Coen ES, Meyerowitz EM (1991) The war of the whorls: genetic interactions controlling flower development. *Nature* 353: 31–37. doi: 10.1038/353031a0.
- Espirito-Santo, MM., Fernandes, GW (2007) How many species of gall-inducing insects are there on earth, and where are they? *Ann Entomol Soc Am* 100: 95–99. doi: 10.1603/0013-8746(2007)100[95:HMSOGI]2.0.CO;2
- Felt EP (1918) Gall insects and their relations to plants. *Sci Mon* 6: 509–525.
- Gätjens-Boniche O (2019) The mechanism of plant gall induction by insects: revealing clues, facts, and consequences in a cross-kingdom complex interaction. *Rev Biol Trop* 67: 1359–1382 doi: 10.15517/rbt.v67i6.33984
- Hirano T, Kimura S, Sakamoto T, Okamoto A, Nakayama T, Matsuura T, Ikeda Y, Takeda S, Suzuki Y, Ohshima I et al. (2020) Reprogramming of the developmental program of *Rhus javanica* during initial stage of gall induction by *Schlechtendalia chinensis*. *Front Plant Sci* 11: 471. doi: 10.3389/fpls.2020.00471
- Hirano T, Okamoto A, Oda Y, Sakamoto T, Takeda S, Matsuura T, Ikeda Y, Higaki T, Kimura S, Sato MH (2023) Ab-GALFA, A bioassay for insect gall formation using the model plant *Arabidopsis thaliana*. *Sci Rep* 13: 2554. doi: 10.1038/s41598-023-29302-8

- Korgaonkar A, Han C, Lemire AL, Siwanowicz I, Bennouna D, Kopec RE, Andolfatto P, Shigenobu S, Stern DL (2021) A novel family of secreted insect proteins linked to plant gall development *Curr Biol* 31: 1836–1849.e12. doi: 10.1016/j.cub.2021.01.104
- Mani MS (1964) *Ecology of Plant Galls*, Springer, The Netherlands
- Price PW, Fernandes GW, Waring GL (1987) Adaptive nature of insect galls. *Environ Entomol* 16: 15–24.
- Schultz JC, Edger PP, Body MJA, Appel HM (2019) A galling insect activates plant reproductive programs during gall development. *Sci Rep* 9: 1833. doi: 10.1038/s41598-018-38475-6
- Takeda S, Hirano T, Ohshima I, Sato MH (2021) Recent Progress Regarding the Molecular Aspects of Insect Gall Formation. *Int J Mol Sci* 22: 9424. doi: 10.3390/ijms22179424
- Takeda S, Yoza M, Amano T, Ohshima I, Hirano T, Sato MH, Sakamoto T, Kimura S (2019) Comparative transcriptome analysis of galls from four different host plants suggests the molecular mechanism of gall development. *PLoS One* 14: e0223686. doi: 10.1371/journal.pone.0223686
- Wang Z, Ge JQ, Chen H, Cheng X, Yang Y, Li J, Whitworth RJ, Chen MS (2018) An insect nucleoside diphosphate kinase (NDK) functions as an effector protein in wheat - Hessian fly interactions. *Insect Biochem Mol Biol* 100: 30–38. doi: 10.1016/j.ibmb.2018.06.003
- Wei HY, Ye YX, Huang HJ, Chen MS, Yang ZX, Chen XM, Zhang CX (2022) Chromosome-level genome assembly for the horned-gall aphid provides insights into interactions between gall-making insect and its host plant. *Ecol Evol* 12: e8815. doi: 10.1002/ece3.8815
- Yamaguchi H, Tanaka H, Hasegawa M, Tokuda M, Asami T, Suzuki Y (2012) Phytohormones and willow gall induction by a gall-inducing sawfly. *New Phytol* 196: 586–595. doi: 10.1111/j.1469-8137.2012.04264.x
- Yang Z, Ma L, Francis F, Yang Y, Chen H, Wu H, Chen X. (2018) Proteins Identified from Saliva and Salivary Glands of the Chinese Gall Aphid *Schlechtendalia chinensis*. *Proteomics* 18: e1700378. doi: 10.1002/pmic.201700378
- Zhao C, Escalante LN, Chen H, Benatti TR, Qu J, Chellapilla S, Waterhouse RM, Wheeler D, Andersson MN, Bao R et al. (2015) A massive expansion of effector genes underlies gall-formation in the wheat pest *Mayetiola destructor*. *Curr Biol* 25: 613–620. doi: 10.1016/j.cub.2014.12.057