

「植物の機能と制御」

平成13年度採択研究代表者

高林 純示

(京大大学生態学研究センター 教授)

## 「植物の害虫に対する誘導防衛の制御機構」

### 1. 研究実施の概要

植物の害虫誘導性の間接防衛機能の解明グループでは、植物の間接防衛機能を誘導する害虫由来のエリシターを解明するために、害虫とその腸内共生微生物との関連を調べている。ナミハダニでは、腸内共生微生物由来のエリシターの関与が認められた。また、アワヨトウの絹糸腺に匂いの抑制活性物質を認めた。さらに、シロイヌナズナの $\beta$ -オシメン合成酵素遺伝子を解明した。これらの成果は、害虫食害特異的な匂い物質生産メカニズムの解明につながる。

植物間コミュニケーションの分子機構解明グループでは、匂い物質受容応答機構を解明するために、シロイヌナズナ匂い応答変異株や膜貫通蛋白質遺伝子の挿入欠損株を取得し、それらの匂いに対する生理学的・分子生物学的応答を解析した。この成果は植物間コミュニケーションの解明につながるものである。

被害植物が生産するエリシターの分子機構解明グループでは、食植性ダニによって食害されたマメ葉の中で生じ、健全葉に揮発成分を誘導する食害葉由来のエリシターの分析を試みた。食害葉水耕液には、主成分として乳酸カルシウムが約0.2 ppm含まれていることが分かった。しかし、乳酸カルシウムが揮発性分の誘導活性を示す濃度は1000 ppmであったことから、これが活性成分とは考えにくい。現在、高活性試料調製のため、食害葉浸出物の直接採取を検討中である。

植物の匂い応答関連遺伝子探索グループでは、防御遺伝子数種について半定量的RT-PCRにより匂い曝露後の発現誘導をみた。その結果、これらの遺伝子の誘導が種々の匂い成分で誘導されるが、その誘導様式は、遺伝子と匂い物質の組み合わせで大きく変わることが明らかとなった。今後、マイクロアレイによる網羅的解析、組み換え植物を用いたレポーターアッセイを進めることで匂い受容システムの解明を目指す。

### 2. 研究実施内容

植物の害虫誘導性の間接防衛機能の解明グループ

目的：植物の間接防衛機能を誘導する害虫由来のエリシターを解明する。さらに、植物が害虫の食害を受けた際に、どのような分子メカニズムで天敵を誘引する揮発性の化学情報

を誘導的に生産するのかを解明することを目的とする。

方法：植食性の節足動物は腸内に共生微生物を持っている。それらは葉の表面に存在する微生物相と同一の場合が多い。害虫由来のエリシターの起源として共生微生物由来である可能性について検討した。植物の無菌栽培方法をリママメ、トウモロコシで確立した。エタノールと次亜塩素酸で種子を滅菌後、滅菌処理したパーミキュライトまたは培地に播種し無菌状態で栽培する。ナミハダニの卵は同様にエタノールと次亜塩素酸で滅菌した後、無菌植物に接種しコロニーを得た。アワヨトウの卵も同様に処理する。無菌害虫が無菌植物を食害した場合、あるいはどちらか一方が無菌の場合での匂い成分の比較を行う。

害虫由来のエリシターを同定する目的で、アワヨトウの絹糸腺（下唇腺）の抽出物をトウモロコシに処理し生産する匂い成分の分析を行った。

シロイヌナズナのテルペン合成酵素の中のAtTPS03を大腸菌で発現させ基質を与えることで生合成されるテルペンを同定した。

結果：無菌飼育のハダニでも食害特異的な匂い成分の生産は認められるものの、量は通常の生産より大きく減少した。ハダニの場合、腸内微生物が大きく関与していると考えられた。アワヨトウでも、無菌飼育の場合、有菌飼育に比べて明らかに生産量が低下する化合物と、変化しない化合物に分かれた。これらの結果は、食害特異的な匂い物質生産に腸内微生物が大きく関与していることを示している。

アワヨトウの絹糸腺には、トウモロコシのみどりの香りを抑制する活性物質が含まれることが明らかとなった。

AtTPS03遺伝子がコードする蛋白は(E)- $\beta$ -ocimene (94%), (Z)- $\beta$ -ocimene (4%), myrcene (2%)を生産し、(E)- $\beta$ -ocimene特異的合成酵素であることを明らかにした。

#### 植物間コミュニケーションの分子機構解明グループ

目的：シロイヌナズナの受容体候補遺伝子の挿入欠失株を取得する。また、EMS ランダム変異株から匂い応答変異体を選抜するためのスクリーニング系を開発する。このようにして得られた変異体を用いて、匂い受容やシグナル伝達機構の解析をおこなうことを目的とする。

方法：EMS ランダム変異株から匂い受容体やシグナル伝達に関わる遺伝子の変異体を選抜するためにスクリーニング系を開発し、匂い受容変異株を取得する。このようにして取得した変異株について匂い応答やシグナル伝達機構を詳細に解析する。

結果：発芽直後に hexenal やテルペン bornyl acetate、borneol を暴露すると、根の伸長や分化、根毛発生などの形態変化を生ずることを見つけた。これを指標として、EMS ランダム変異株 30,000 の匂い応答を調べ、2 株の匂い応答変異株を得た。現在それらの原因遺伝子を同定している。また、G蛋白質遺伝子変異株や受容体候補遺伝子に T-DNA がホモで挿入された変異株を 2 株取得した。それらの個体について匂い応答を遺伝子発現レベルで解析しているところである。さらに、テルペンやE-2-hexenal等10種の匂い物質の水溶液に対する細胞内Caの変動をイクオリンが導入されたシロイヌナズナで観察した

ところ、匂いに応答したCaの変動が観察された。今後、匂いシグナル受容機構の解析に利用する予定である。

#### 被害植物が生産するエリシターの分子機構解明グループ

目的：食植性ダニ-捕食性ダニの3者相互作用系は、昆虫に対する植物の防御システム解明するための好モデル系である。この系では、マメの葉が食植性ダニに食害を受けると、捕食性ダニを誘引する揮発成分を放出し、捕食性ダニにエサとなる食植性ダニの居場所を知らせる。マメの葉に揮発成分を生成させる食植性ダニ由来のエリシターや、その作用によって食害葉の中で生じ、健全葉にも揮発成分を誘導する食害葉由来のエリシターの存在が示唆されている。本年は、後者のエリシターを調べることを目的とした。

方法と結果：リママメ葉をナミハダニに食害させると揮発成分の誘導量は36 hr後に最大に達し、その後減少した。食害葉と同じ個体の健全葉では、揮発成分誘導量はいったん減少した後、被害葉と同様36 hrに最大値に達し、その後減少した。ただし、誘導量は被害葉に比べて少なく、内生エリシター活性の検出には、活性を有する試料が大量に必要と考えられた。そこで、ナミハダニ食害葉水耕液に含まれる主成分を分析した。その結果、主成分として乳酸カルシウムが約0.2 ppm含まれていることが分かった。水耕液中の乳酸は、ナミハダニ食害によって1.5倍に増加した。ただし、乳酸カルシウムが揮発性分の誘導活性を示す濃度は1000 ppmであったことから、これが活性成分とは考えにくい。高活性試料の大量調製を目的として、現在、食害葉浸出物の直接採取などを検討中である。また、ハダニ食害によって葉に水ストレスがかかると考えられるので、水ストレスによって増加する植物ホルモン・アブシシン酸の揮発成分誘導に対する作用も調べる予定である。

#### 植物の匂い応答関連遺伝子探索グループ

目的：シロイヌナズナ匂い受容系の解析を行う。

方法：シロイヌナズナでその防御応答に関連していると考えられる遺伝子8種について、短鎖オキシリピン、モノテルペンに曝露した時の誘導プロファイルを半定量的RT-PCRにより解析した。

結果：多くの遺伝子が匂い曝露によって誘導されることが明らかとなったが、その応答様式は遺伝子と匂い物質の組み合わせで大きく異なり、複数の匂い受容システムが存在することが示唆された。匂い受容から遺伝子発現に至る信号伝達系を明らかにする目的で、ジャスモン酸非感受性変異体、jar1とエチレン非感受性変異体、etr1を用いて同様の実験を行った。etr1では全ての匂いに対する応答が野生株と同様であったが、jar1は一部の匂い成分に対する応答は変わりなかったが、残りは応答が顕著に抑制されていた。そのため、一部の匂い成分の受容にはジャスモン酸が関与していることが示唆された。一方、蛋白質キナーゼ阻害剤と蛋白質フォスファターゼ阻害剤で処理した後に匂い成分を曝露したところ、全ての遺伝子発現において影響が見られた。よって匂い成分の受容系には蛋白質リン酸化が関与していることが明らかとなった。

### 3. 研究実施体制

#### 植物の害虫誘導性の間接防衛機能の解明グループ

① 研究分担グループ長：高林純示（京都大学生態学研究センター、教授）

② 研究項目：

- ・植物が害虫の食害を受けた際に、どのような分子メカニズムで天敵を誘引する揮発性の化学情報を誘導的に生産するのかを解明する。
- ・植物の間接防衛機能を誘導する害虫由来のエリシターを解明する。

#### 植物間コミュニケーションの分子機構解明グループ

① 研究分担グループ長：西岡孝明（京都大学農学研究科、教授）

② 研究項目：

- ・害虫被害植物が誘導的に生産する匂い成分を暴露した健全植物の応答の電気生理学的解析
- ・植物病原菌のエリシター受容体や植物ホルモン受容体に注目し、匂い応答の受容体との関係を調べる。

#### 被害植物が生産するエリシターの分子機構解明グループ

① 研究分担グループ長：平井伸博（京都大学国際融合創造センター、助教授）

② 研究項目：

- ・植物が害虫の食害を受けた際に、植物が二次的に生産すると予想される間接防衛に関わるエリシターを解明する。

#### 植物の匂い応答関連遺伝子探索グループ

① 研究分担グループ長：松井健二（山口大学農学研究科、助教授）

② 研究項目：

- ・匂い誘導特異的な遺伝子の同定と単離を行う。
- ・匂い受容応答遺伝子の探索を行う。

### 4. 主な研究成果の発表（論文発表および特許出願）

（1）論文（原著論文）発表

○ Jenny Fäldt, ; Gen-ichiro Arimura, ; Jonathan Gershenzon, ; Junji Takabayashi,  
Jörg Bohlmann

Function identification of AtTPS03 as (E)- $\beta$ -ocimene synthase: A new monoterpene synthase catalyzing jasmonate- and wound-induced volatile formation in *Arabidopsis thaliana*

Planta (2003年) 216巻 : p. 745-751

○ Jun-ichiro Horiuchi, ; Gen-ichiro Arimura; Rika Ozawa; Takeshi Shimoda; Marcel Dicke, Junji Takabayashi; Takaaki Nishioka

Lima bean leaves exposed to herbivore-induced conspecific plant volatiles attract herbivores in addition to carnivores

Applied Entomology and Zoology (2003年) 38巻 : p.109-116

(2) 特許出願

H14年度特許出願件数 : 1 件 (研究期間累積件数 : 1 件)