

「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、ナミハダニで腸内共生微生物由来のエリシターの関与を示した。また主要な共生微生物として酵母様微生物(*Pseudozyma* SP.)一種を同定した。ハダニ共生微生物と植物との高次の共生関係の可能性が考えられる。ミヤコグサの  $\beta$ -ocimeneの合成酵素遺伝子の同定を行い、ストレスに応答した転写活性と放出量の比較を行った。転写後制御の可能性が示唆された。ジャスモン酸処理によるトウモロコシ株での匂い生産誘導と天敵誘引能力向上を実証した。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。

植物の害虫誘導性の間接防衛機能の解明グループでは、シロイヌナズナの匂い応答変異株やG蛋白質共役型受容体やG蛋白質の遺伝子挿入変異株を取得し、匂い応答を発現形質や遺伝子発現の変化として観察した。ある種の匂いによって根細胞の分化や伸長の異常が見られ、多くの遺伝子について発現パターンが変化することがわかった。また、匂い応答に伴って細胞内Ca<sup>2+</sup>濃度に変動を生じることを測定することに成功した。また比較として、昆虫(カイコガ)による性フェロモン受容体遺伝子の探索をおこない、クローニングに成功した。これらの結果を総合的に解析することによって、植物における匂い受容の同定とそのシグナル伝達機構の特異性を明らかにする予定である。

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では、ナミハダニの食害を受けたリマメ葉で生じる揮発成分誘導物質(エリシター)を明らかにすることを目的とした。今回は、食害葉そのものの抽出物のエリシター活性を測定したが、大量調製した食害葉抽出液には活性が認められなかった。水分ストレスに応じて増加する植物ホルモン・アブシシン酸(ABA)の内生量変化や揮発成分の誘導活性を調べた結果、食害葉では水耕液中のABAが増加すること、ABAにエリシター活性があることが判明した。今後、ABAのエリシターとしての可能性を追求する予定である。

植物の匂い応答関連遺伝子探索グループでは、これまでに植物が匂い物質を受容して防

御応答反応を行うことを実証してきた。ただ、これまでの検討は純品な化学物質による処理であり、必ずしも自然界での現象を反映していないことが考えられた。そこで、実際に機械傷、あるいはコナガ食害を与えた植物から放散される揮発成分で無傷の植物を処理し、これらの処理でも多くの防御関連遺伝子が誘導されることを見出した。同時にそれぞれの処理によって誘導プロファイルが異なり、こうした匂いに対する応答が複雑な機構の統合として観察されていることが示唆された。また、今年度は植物の匂い受容機構解明のためレポーター遺伝子を用いたリアルタイム、あるいは破壊的計測法を確立した。また、植物-植物コミュニケーションにオキシリピン、テルペノイド、アミン類のどれが重要かを明らかにする一環として脂肪酸由来の短鎖アルデヒド生成能に変異を有するモデル植物を開発した。これらのモデル系にランダムに変異を導入し、応答不全変異体を単離しつつある。

## 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、植物が害虫に食害を受けた際に、どのような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している。

方法：昨年度までに、植食者の共生微生物が害虫由来のエリシターの一つとして食害応答性の匂い生産に影響を与えている可能性を示した。本年度は通常飼育したナミハダニから、原因となる共生微生物の単離を試みた。ハダニにパラフィルムを介して培地を摂食させることにより、ハダニ体内の微生物の分離を行った。

また、天敵誘引揮発性物質の生産制御メカニズムについて、トウモロコシ-アワヨトウ-寄生蜂の三者相互作用系および、マメ科のモデル植物であるミヤコグサを用いて解析した。トウモロコシの系では植物分子であるジャスモン酸、リノレン酸を植物に処理することにより、これらの分子の天敵誘引性揮発性物質の生産への関与について調べた。さらに、この寄生蜂の誘引に関与する揮発性分子についても詳細に解析した。ミヤコグサについては天敵誘引揮発性物質の一つである  $\beta$ -ocimene の合成酵素遺伝子の同定を行い、ストレスに応答した転写活性と放出量の比較を行った。

結果：通常飼育したナミハダニからは酵母様微生物 (*Pseudozyma* SP.) が検出されたが、これは無菌飼育したものからは検出されなかった。

また、ジャスモン酸の生合成前駆体であるリノレン酸は植物にジャスモン酸とは異なる揮発性物質の生産を誘導したが、どちらの分子を処理した場合も天敵寄生蜂は誘引された。しかしながら誘引に寄与している化合物は異なっていると考えられた。

今回ミヤコグサから同定した遺伝子は (E) 体の特異的 (E:Z=98:2) に生産する酵素をコードしていた。ナミハダニ食害された場合、転写活性が増加すると  $\beta$ -ocimene の放出量も増加したが、機械傷の場合はその関係が顕著ではなかった。両者で異なる制御機構が存在する可能性が示唆された。

#### 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やG蛋白質遺伝子にT-DNAが挿入された変異株を取得する。また、EMS ランダム変異株およびT-DNA挿入変異株から匂い応答変異株を選抜する。これら変異株を用いて、匂い受容やシグナル伝達機構の解析を行うことを目的とする。昆虫の嗅覚受容体として、カイコガの性フェロモン受容体候補遺伝子の単離と同定をおこなう。

方法：植物の匂い成分であるテルペン類を暴露した時の根の伸長や分化、根毛発生などの形態変化を指標にEMS ランダム変異株・T-DNA挿入変異株から匂い応答変異株を選抜する。これら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。オスのカイコガ触角でだけ特異的に発現している遺伝子の探索をおこなう。

結果：テルペン bornyl acetateとborneol の暴露による根の形態変化を指標として、それぞれEMS ランダム変異株 45,000とT-DNA挿入変異株50,000 から3株ずつ匂い応答変異株を得た。現在それらの原因遺伝子の同定および匂い応答を詳細に調べている。また、G蛋白質遺伝子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計6株取得した。それらの株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19種の匂い物質に対する細胞内Ca<sup>2+</sup>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<sup>2+</sup>の上昇が観察された。動物の嗅覚受容の場合でもCa<sup>2+</sup>上昇が起こることが知られており、観察された現象はこれと似ている。今後、G蛋白質欠損株にイクオリンを導入したシロイヌナズナも取得したので、匂いシグナル受容機構の解析に利用する予定である。さらにカイコガのオス触角で特異的に発現する嗅覚受容体遺伝子を取得した。フェロモン結合タンパク質と同じ嗅覚受容神経細胞だけで発現していることがわかった。

#### 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：マメ科植物-食植性ダニ-捕食性ダニの三者系では、マメの葉が食植性ダニに被害を受けると、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、その作用によって被害葉の中で生じ、健全葉にも揮発成分を誘導する被害葉由来のエリシターの存在が示唆されている。本研究は、主に後者の被害葉由来のエリシターを調べることを目的とした。

方法と結果：ナミハダニの被害を受けたリマメ葉で生じる揮発成分誘導物質（エリシター）を明らかにするために、これまでリマメ葉の水耕液のエリシター活性を測定してきた。しかしながら、水耕液のエリシター活性は弱く水耕液からエリシターを精製することは困難と考えられた。そこで今回は、被害葉そのものの抽出物のエリシター活性を測定した。予備実験では、被害葉抽出物の揮発成分誘導活性は、健全葉抽出物によりも有意に高かったが、大量に調製した被害葉抽出物の活性は健全葉抽出物の対照とほとんど変わらず、有意な活性を認めることができなかった。この原因として、抽出物中に含まれる

共存物質が活性を妨害した可能性が考えられる。

ナミハダニの食害による組織損傷のため、食害葉では水分ストレスがかかると予想される。そこで、水分ストレスに応じて増加する植物ホルモン・アブシシン酸（ABA）の内生量変化や揮発成分の誘導活性を調べ、そのエリシターとしての作用性を検討した。その結果、食害葉では、ABAは食害開始後12時間後で1.1倍、24時間後に1.3倍に増加した。また食害葉水耕液中のABAは12時間後に2.7倍に増加した。ABAをリママメ健全葉に投与したところ、1  $\mu\text{M}$ 以上の濃度で揮発性分を誘導した。ABAは傷害シグナルの伝達経路においてジャスモン酸の上流に位置していることが示唆されていることから、食害葉で生じたABAが健全葉に移動しジャスモン酸を誘導することによって揮発物質を生成している可能性がある。今後、食害葉で生じたABAの健全葉への移動を調べるとともに、健全葉におけるABAやジャスモン酸の定量を行い、ABAのエリシターとしての可能性を追求する予定である。

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：シロイヌナズナで匂いにより誘導される遺伝子に関するレポーター系を確立する。

結果：匂い処理により誘導されることが明らかな脂肪酸ヒドロペルオキシドリアーゼ遺伝子プロモーターの下流にGUS遺伝子を連結し、このキメラ遺伝子でシロイヌナズナを形質転換した。

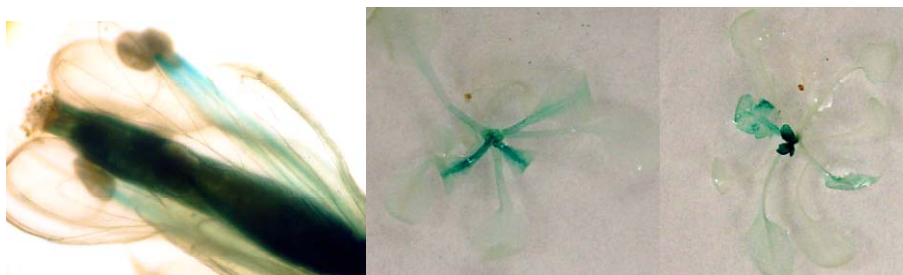


図1 脂肪酸ヒドロペルオキシドリアーゼ遺伝子プロモーター::GUS構築物で組換えたシロイヌナズナのGUS染色像。無傷な植物体ではGUS染色は葉の付け根（写真中央）や花芽（写真左）で強いGUS発現が見られる。葉に機械傷をつけると傷をつけた部位だけでなく、それ以外の器官でもGUS発現が見られるようになる（写真右：傷をつけてから24時間後。傷は写真左上の葉にピンセットで施した）。

無傷な状態ではGUSは葉の付け根や花芽等で特異的に発現していたが、葉での発現は低かった。しかし、葉に傷をつけると数時間後からGUSの発現が見られ、傷を直接つけていない他の器官でもシステム的な誘導が見られた。現在、この組換え体を揮発成分で処理しGUSの誘導プロファイルを検討しつつある。また、イギリスのJohn Turner博士より発光遺伝子、ルシフェラーゼを用いたレポーター植物を分与いただき、このものが匂いに応答して発光することを確認した。現在このものにEMSによる化学変異を導入し、匂いに応答して発光しない変異体、あるいは匂い処理しない状態で発光する変異体のスクリーニングを進めている。

### 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。
- ・匂い受容に関する変異体の単離

### 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

○ Jun-Ichiro Horiuchi; Gen-Ichiro Arimura; Rika Ozawa; Takeshi Shimoda; Junji Takabayashi; Takaaki Nishioka

A comparison of the responses of *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae) and *Phytoseiulus persimilis* (Acari: Phytoseiidae) to volatiles emitted from lima bean leaves with different levels of damage made by *T. urticae* or *Spodoptera exigua* (Lepidoptera: Noctuidae), *Appl. Entomol. Zool.*, **38**, 109-

116 (2003).

(2) 特許出願

H15年度特許出願件数：2件（CREST研究期間累積件数：3件）