

「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、食害誘導性の天敵誘引物質生産に関わるエリシターの探索と誘導メカニズムの解明を進めている。エリシター解析でハダニ食害による誘導反応に関与する腸内酵母様微生物の存在を明らかにし、誘導メカニズムについては、植物に異なる反応を誘導するハダニ系統の選抜を行い、解析を進めているほか、シロイヌナズナを用い、匂いの生合成酵素遺伝子の組み換えが、天敵誘引物質の生産におよぼす影響を解析している。今後は、さらに詳細なメカニズム解析を行う。

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、シロイヌナズナのG蛋白質共役型受容体やG蛋白質遺伝子のT-DNA挿入変異株を取得し、匂い応答を観察した。G蛋白質の挿入変異株は匂いに対して野生株と同様にCa²⁺濃度が上昇したので、植物の匂い応答にはG蛋白質が関与していないと結論した。今後、匂いの受容応答シグナル伝達が可能な他の経路について解析する。また、昆虫(カイコガ等)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。植物-植物間および植物-食植者間における匂い受容とそのシグナル伝達機構の特異性を明らかにする。

被害植物が生産するエリシターの分子機構の解明グループでは、ハダニに食害されたりマメが生産するエリシターの化学的解明を試みた。昨年度アブシシン酸(ABA)にエリシターの可能性が認められた。今年度実験を繰り返した結果、ABAに再現性のあるエリシター活性を検出することはできなかった。ただし、条件によってはABAがエリシター活性を有する可能性が残されている。活性検出法を再検討するとともに、ハダニ由来のエリシター検出にも再度取り組む。

植物の匂い応答関連遺伝子探索グループでは、植物に機械傷や昆虫の食害処理をほどこすことで産生される匂い物質を植物が受容し、種々の防御応答が誘導され、菌類病抵抗性が高まることを実証した。C6-アルデヒドやアルコール類の植物体内における生成をアンチセンス技術で抑制すると、菌類病抵抗性が低下することが示され、植物の匂い物質が、植物体内の内因性防御応答シグナルとして機能しうることを示した。揮発性シグナル物質の探索や、匂い物質に応答性のレポーター遺伝子を導入した組換え植物を用いての匂い物質受容因子の探索を進めている。

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：昨年度までに構築した無菌実験系により、無菌条件下でハダニを飼育し、このハダニに食害されたリママメ葉の天敵誘引性を評価した。また、植物に異なる食害応答を誘導するハダニ系統の選抜を行い、各系統の生物学的性質や、各系統に食害を受けたリママメ葉のシグナル伝達物質量の測定および病害応答性遺伝子（PR-gene）の発現解析を行った。さらに、シロイヌナズナの匂い物質生産系の変異体および組み換え体について、天敵寄生蜂の誘引性を野生型と比較し、匂い物質生合成系と天敵誘引性の関連について解析した。

結果：無菌条件飼育ダニの食害では、リママメ葉の天敵誘引性が変化した。これはハダニを無菌化することにより食害誘導性の匂いブレンドが変化することに起因すると考えられる。

また、同種でありながら植物に異なる反応を誘導するハダニの系統は、ジャスモン酸あるいはサリチル酸を介したシグナル伝達系を異なる様式で活性化している可能性が示唆された。シロイヌナズナの突然変異体・形質転換体に対する天敵の反応を解析することにより、天敵誘引における、みどりの香り生合成系の重要性を明らかにした。

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、カイコガをはじめとする数種の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：動物の嗅覚受容体はG蛋白質共役型受容体（GPCR）であることが判っているので、我々はシロイヌナズナからGPCR候補遺伝子を匂い受容体の候補として6つ（*GPCR1-6*）選抜し、その遺伝子の発現様式をRT-PCRで調べ、さらにT-DNA挿入変異株をそれぞれ得て匂い応答解析を行った。

動物では匂いを受容すると細胞質Ca²⁺濃度上昇が起こることが知られている。Ca²⁺濃度依存的に発光する蛋白質であるアポイクオリン遺伝子を組替えたシロイヌナズナに匂いを暴露したところ、細胞質Ca²⁺濃度が一過的に上昇した。次に、アポイクオリン導入株とヘテロ三量体G蛋白質αサブユニット欠損変異体 *gpa1* とを掛け合わせてアポイクオリン導入 *gpa1* 欠損株を作製し、匂いに対する細胞質Ca²⁺濃度上昇を調べ、G蛋白質が関与しているかどうか調べた。

カイコガ雄触角特異的に発現している遺伝子をクローニングし、in situ

hybridizationにより発現細胞を調べた。また、この遺伝子をカイコガ雌で発現させて性フェロモンに対する応答を触角電位測定 (EAG) で調べた。さらにこの遺伝子や既知の性フェロモン受容体遺伝子の配列を参考にエリサン、アワヨトウ、ウリノメイガ、コナガから雄触角特異的に発現している嗅覚受容体遺伝子の単離を行った。

結果：各遺伝子の組織・発育段階での発現を解析したところ、いずれの遺伝子も発育過程を通じて、複数の組織で発現していた。*GPCR1*と*GPCR6*は*GPA1* (三量体G蛋白質 α サブユニット遺伝子) と発現様式が類似しており、*GPCR1*と*GPCR6*は*GPA1*と関連した機能を果たしている可能性が考えられた。植物由来テルペノイドであるbornyl acetateは防御関連遺伝子である*LOX* (lipoxygenase遺伝子) の発現を誘導するが、*gpcr5*では発現誘導が抑制される傾向が見られた。一方で、bornyl acetateにより誘導されるシロイヌナズナの根の蛇行伸長は、野生型と*gpcr5*で差が無かったことから、*GPCR5*はbornyl acetateの受容に直接関与しているのではなく、下流の防御応答の段階で機能していると推定される。

野生型シロイヌナズナのアポイクオリン導入株に種々の匂いを与えると細胞内 Ca^{2+} 上昇が観察される。この現象をアポイクオリンを導入した*gpa1*欠損株で観察したところ、細胞内 Ca^{2+} 上昇が同様に見られたことから、匂いによる Ca^{2+} 上昇のシグナル伝達経路には、三量体G蛋白質やGPCRが関わっていない可能性が示唆された。

雄カイコガで得られた遺伝子は雄触角の性フェロモン受容神経細胞で発現が確認された。またこの遺伝子を強制発現させた雌では性フェロモンのボンピコールに対してEAGによる触角の応答が見られ、この遺伝子がカイコガ性フェロモン受容体遺伝子であると同定した。さらに他のガからそれぞれ雄触角特異的に発現する性フェロモン受容体候補遺伝子を単離し、分子系統樹解析を行ったところ、カイコガ性フェロモン受容体遺伝子と同じファミリーに属することが分かった。

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：ハダニに食害されたリママメが生産する揮発成分誘導物質 (エリシター) を化学的に解明することを試みた。これまでの揮発成分誘導物質検定法では、食害葉の抽出液や水耕液に、エリシター活性は検出できなかったが、予備実験で、水ストレスで誘導される植物ホルモンのアブシシン酸 (ABA) にエリシターの可能性が認められたので、その作用を追求した。また、これまでとは異なる方法で調製した水耕液のエリシター活性も調べた。

方法：リママメ芽生えより切り取った第一葉を実験に用いた。ABAとして、天然型の(+)体ならびに非天然型の(-)体を使用した。水耕液の新しい調製法として、第一葉を含水脱脂綿に置きそこへナミハダニを放して7日間食害させた後、脱脂綿より水を回収した。30mL容ガラス容器に(+)-ABAなど被験物質の水溶液を入れ、そこにリママメ第一葉を挿して24時間水耕した。無処理対照として蒸留水だけで水耕したもの、ならびに食害対照として葉を蒸留水で水耕するとともにハダニで食害させたものを用いた。ガラス容器ごと2L容のデシケーターに移し揮発成分の固相吸着剤とともに2時間インキュベーションした。吸着剤をGC-MSに導入し、ocimene、dimethylnonatoriene、trimethyltridecatetarene、

methyl salicylateなどの揮発成分を定量分析した。

結果：初回の実験では、天然型の(+)-ABAは、ナミハダニ食害ほどは強くはないが1 μ M以上で有意な揮発成分の誘導活性を示した。葉のABA濃度が約7 μ Mであるので、ABAは実際に揮発成分の誘導に関わっている可能性が考えられた。しかし、再現性を確認するために、3回繰り返した実験では、個体差が大きく有意なABAの揮発成分誘導活性は認められなかった。生理的に不活性な非天然型の(-)-ABAにも活性は認められなかった。これらの結果より、ABAには揮発成分誘導活性がわずかに認められるものの、再現性に乏しく、内生エリシターと断定することはできなかった。食害葉を置いた含水脱脂綿より回収した水耕液にも、エリシター活性は認められなかった。今後とも、材料の調製方法や揮発物質誘導活性試験法を検討する必要がある。

植物の匂い応答関連遺伝子探索グループ

目的：匂い応答性遺伝子の植物体内における局在性の解析

方法：匂い応答性遺伝子としてアレンオキシド合成酵素 (*AOS*)、脂肪酸ヒドロペルオキシドリナーゼ (*HPL*)、栄養組織貯蔵蛋白質 (*VSP*) のプロモーターにレポーター遺伝子としてホタルルシフェラーゼ遺伝子、あるいは大腸菌 β グルクロニダーゼ遺伝子を連結し、シロイヌナズナを形質転換した。この組換えシロイヌナズナに種々の揮発性化合物を与え、そのレポーター解析を行った。

結果：

無傷な状態では、*AOS*、*VSP*の発現はほとんど認められず、低レベルの*HPL*発現が葉の縁で検出された。一方、匂い (C6-アルデヒドやジャスモン酸メチル) に応答して、*AOS*や*HPL*、*VSP*の葉における一過的な発現が認められた。特に*VSP*は、匂い処理後、出芽や分枝が見られる基部において、強い応答性を示した。匂いによって誘導されるこれらの遺伝子発現は、気孔付近やトリコームにおいて強く誘導され、これらの部位において匂いが受容されている可能性を示唆したが、ほとんどの発現応答部位は、匂い物質を液体で処理した場合と違いは認められなかった。現在、これらの組換え体に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の候補を得、解析を進めている。

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

- Takeshi Sakurai, Takao Nakagawa, Hidefumi Mitsuno, Hajime Mori, Yasuhisa Endo, Shintarou Tanoue, Yuji Yasukouchi, Kazushige Touhara, and Takaaki Nishioka
Identification and functional characterization of a sex pheromone receptor in the silkworm *Bombyx mori*.
Proc. Natl. Acad. Sci. USA **101**: 16653-16658 (2004)
- Choh Y, Ozawa R, Takabayashi J
Effects of exogenous Jasmonic acid and benzo (1,2,3) thiadiazole-7-carbothioic acid S-methyl ester (BTH), a functional analogue of salicylic acid, on the egg production of a herbivorous mite *Tetranychus urticae* (Acari: Tetranychidae). *Appl. Entomol. Zool.* 39:313-316(2004)
- Gen-Ichiro Arimura, Rika Ozawa, Sohich Kugimiya, Junji Takabayashi and Jörg Bohlmann.
Herbivory induced de novo synthesis of (E)- β -ocimene in a model legume, *Lotus japonicus*.

Plant Physiology 135 1976-1983 (2004)

- Rika Ozawa, Kairo Shiojiri, Maurice W. Sabelis, Gen-Ichiro Arimura, Takaaki Nishioka and Junji Takabayashi

Corn plants treated with jasmonic acid attract more specialist parasitoids, thereby increasing parasitization of the common armyworm.

Journal of Chemical Ecology 30 1305-1317 (2004)

- Yasuyuki Choh, Takeshi Shimoda, Rika Ozawa, Marcel Dicke and Junji Takabayashi

Exposure of lima bean leaves to volatiles from herbivore-induced conspecific plants results in emission of carnivore attractants: active or passive process?

Journal of Chemical ecology 30 1797-1808 (2004)

- Takao Nakagawa, Takeshi Sakurai, Takaaki Nishioka, and Kazushige Touhara
Insect sex-pheromone signals mediated by specific combinations of olfactory receptors.

Science **307**: 1638-1642 (2005)

(2) 特許出願

H16年度特許出願件数：1件（CREST研究期間累積件数：4件）