

「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、植物に異なる防衛反応を誘導する同種のハダニ 2 系統、及びシロイヌナズナの匂いの生合成遺伝子の形質転換体を用いて、食害で誘導される天敵誘引物質の定量や天敵の反応の比較を行った。ポリアミンの膜電位と細胞内カルシウム濃度への影響の比較、植食者の行動が光よりもむしろ植物の匂いにより規定されるという事実の発見、植物の誘導防衛反応の新たな検出系の創出等を行った。今後は防衛反応の誘導の異なる植物や植食者について、食害誘導性の揮発性物質の生産やその生合成に関わる遺伝子の発現を比較・解析していく予定である。

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、G 蛋白質遺伝子の T-DNA 挿入変異株を取得し、アポイクオリンを導入したシロイヌナズナを用いて、植物の匂いに暴露した時の細胞内 Ca^{2+} 濃度の変動を測定した。G 蛋白質シグナルの伝達物質を特異的に阻害する薬剤で処理したにもかかわらず Ca^{2+} 濃度は上昇したので、植物の匂い受容には GCPR が関わっていない可能性が高い。一方、GPCR がアブシジン酸の受容に関与して可能性についても調べている。昆虫の性フェロモン受容体候補遺伝子のクローニングに成功した。植物と動物における匂い受容の違いについて比較する予定である。

被害植物が生産するエリシターの分子機構の解明グループでは、リママメ葉の食痕を赤くするとともに酸性キチナーゼを誘導するカンザワハダニのエリシターの分析を進めた。食痕が白色を示し、酸性キチナーゼを誘導しない系統のカンザワハダニ抽出物と比較分析した結果、赤色系統と白色系統で量的に差異のある成分を 3 種類認めた。それらを精製し、構造解析したところ、いずれもクロロフィル分解物と推定された。クロロフィル分解物の酸性キチナーゼ誘導活性を調べる予定である。

植物の匂い応答関連遺伝子探索グループでは、種々のシロイヌナズナ信号伝達系変異体を用いて検討を進めた結果、ジャスモン酸、エチレンを介した信号伝達系がみどりの香り処理により活性化されることを実証できた。更に、グルタチオンを介した信号伝達経路がこうした匂い受容に必須であることを初めて示した。シロイヌナズナ培養細胞にレポーター遺伝子を組み込むことにより、匂い受容の効果的なレポーターシステムを構築すること

ができた。

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。植物の揮発性物質が天敵以外の生物にどのような影響を与えるのかを調査する。

方法：植物に異なる防御反応を誘導するカンザワハダニの2系統を用い、これらの食害を受けたリママメの揮発性成分を比較した。新たなシグナル因子と考えられるポリアミン数種をそれぞれリママメに処理したときの膜電位およびカルシウム濃度を比較した。また、シグナル伝達物質と匂い物質両方の生合成に関わる酵素遺伝子を過剰発現したシロイヌナズナについて、被害植物の揮発性物質と天敵寄生蜂の反応を調べた。植物の揮発性物質の天敵以外の生物への影響については、トウモロコシから放出される揮発性物質が、アワヨトウ（植食者）の行動に及ぼす影響を観察した。

結果：カンザワハダニの2系統の食害による揮発性物質の成分比と防御遺伝子の発現パターン、シグナル伝達物質の量の比較から、ジャスモン酸経路とサリチル酸経路による揮発性成分の成分比の制御が行われていることが示された。ポリアミンは膜の脱分極と細胞内カルシウム濃度の上昇を引き起こした。LOX 過剰発現植物は、緑のかおりと2種類のテルペン化合物の生産量が野生型より多量で、しかも野生型より寄生蜂を誘引し、寄生率も高まった。また、アワヨトウの日周行動は、植物揮発性物質により決定されるという結果が得られた。この活性を持つ揮発性物質の特定を進めている。

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用いて、匂いや植物ホルモンのシグナル伝達への関与を検討する。また、アポイクオリン導入シロイヌナズナを用いて匂い応答の初期のシグナル伝達について検討する。

方法：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つ選抜し、その T-DNA 挿入変異体を得て、匂い及び植物ホルモン応答を調べた。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(AQ 株)に種々の匂いを暴露したところ、細胞質 Ca²⁺ 濃度が一過的に上昇することを確認した。G タンパク質シグナル伝達阻害剤を用いた薬理学的実験を行い、植物の匂い応答の初期段階について検討を行った。

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クローニングを行い、性フェロモン受容機能の測定を行った。

結果：AQ 株を用いて食害で発生する代表的な匂いであるオシメンを暴露した時に細胞質 Ca²⁺濃度が一過的に上昇するが、この上昇は cAMP 合成酵素の阻害剤や IP₃ 合成酵素の阻

害剤で抑制されなかったので、オシメンによる Ca^{2+} 濃度上昇のシグナル伝達経路には、GPCR が関わっていないと推定した。これらの匂いによる Ca^{2+} 上昇はオルガネラからの Ca^{2+} の放出が原因であると考えられる。E-2-hexenal の場合は、細胞外からの Ca^{2+} 流入が上昇の原因であることが明らかとなり、シグナル伝達経路が異なることを明らかにした。

シロイヌナズナ GPCR 候補遺伝子 GPCR1~5 について、これまでに変異体 gpcr2、5 ではアブシジン酸による発芽抑制効果が野生型 Col-0 と比較して抑えられ、また gpcr2 ではジベレリン存在下での発芽率が Col-0 よりも上昇する傾向があった。現在、各変異体のアブシジン酸、ジベレリン応答についてさらなる実験を行っている。

エリサン、アワヨトウ、ウリノメイガ、コナガで得られた性フェロモン受容体候補遺伝子は、雄触角の性フェロモン受容神経細胞で発現していることを確認した。コナガの性フェロモン受容体候補遺伝子を性フェロモン受容体と同定した。

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：カンザワハダニの系統にリママメ葉の食痕が赤色を呈するものと白色を呈するものがあること、赤色を呈する葉では PR タンパクの一種である酸性キチナーゼが白色を呈するものより多く発現している。このことは、赤色系統は酸性キチナーゼのエリシターを分泌しており、その分泌量は白色系統のものよりも多いことを示唆している。本年度より、このエリシターの解明を行った。

方法：RT-PCR 法によって酸性キチナーゼ量を比較検出した。赤系統抽出物の精製は、分取 TLC ならびに分取 HPLC によって行った。分取物に対し、 ^1H NMR スペクトル分析には可視紫外吸収スペクトル分析を行った。

結果：HPLC と TLC による比較分析の結果、赤色系統と白色系統で量的に差異のある成分を認めた。TLC 分析で赤色系統に明らかに多く存在する化合物 1-3 検出することができた。化合物 2 はクロロフィル a の分解物、化合物 3 はフェオフィチン a, b の分解物と一致することが判明した。これらの結果は、赤系統のカンザワハダニは白系統のものよりもクロロフィルの分解が遅いことを示唆している。今後、これらのクロロフィル分解物の構造確認を行うとともに、それらの酸性キチナーゼ誘導活性を調べる予定である。

植物の匂い応答関連遺伝子探索グループ

目的：植物の匂い応答分子機構の解明

方法：シロイヌナズナの信号伝達系変異体、jar1-1, etr1-1, pad2-1, npr1-1 をみどりの香りに曝露し、その誘導防衛反応を詳細に解析した。また、シロイヌナズナ培養細胞 T87 をカルコン合成酵素プロモーターに β -グルクロニダーゼ遺伝子を融合したレポーター遺伝子で形質転換した。

結果：防御関連遺伝子の誘導に関しては JAR1 を必須とする遺伝子、ETR1 を必須とする遺伝子、およびその両方を必須とする遺伝子がそれぞれに存在することを見出した。最低

3つの信号伝達系が活性化されていることが明らかとなった。一方、PAD2を介した信号伝達系もきわめて重要であることが明らかとなった。npr1ではその応答様式に野生株と何ら変化なく、サリチル酸を介した信号伝達系は匂い受容に関与していないことが明らかとなった。一方、誘導防衛の最終的なアウトプットとしての抗菌性発現にはやはりジャスモン酸、エチレンを介した信号伝達経路が部分的に関与していることが示されたが、PAD2を介した信号伝達系は必須であることが示された。PAD2を介した信号伝達経路にはグルタチオンが必須な因子である匂い受容に際し、グルタチオンを介した信号伝達経路が関与していることを初めて明らかにできた。一方、カルコン合成酵素プロモーター： β -グルクロニダーゼ遺伝子で形質転換したシロイヌナズナ培養細胞 T87 はみどりの香りにきわめて敏感に応答することを明らかにした。

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、教授）

②研究項目：

- ・害虫被害植物が特異的に生産する匂い成分の生産メカニズムの解明。
- ・植物揮発性成分の天敵以外の生物に対する影響の検討。
- ・植物の間接防衛機能を誘導する害虫由来のエリシターの探索。

「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、教授）

②研究項目：植物の匂いのシグナル伝達に関与している受容体や細胞内シグナル伝達経路を分子レベルで明らかにする。受容体として GPCR を仮定し、シロイヌナズナの GPCR 欠失変異体株や Ca^{2+} 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を用いて匂い応答を解明する。

「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、教授）

②研究項目：リママメに酸性キチナーゼを誘導するカンザワハダニのエリシターの解明

「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：松井 健二（山口大学、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。
- ・匂い受容応答の分子機構を解明する。

- ・匂い受容に関する構造活性相関を明らかにする。

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

- Kyutaro Kishimoto, Kenji Matsui, Rika Ozawa and Junji Takabayashi
Volatile C6-aldehydes and Allo-ocimene Activate Defense Genes and Induce Resistance against *Botrytis cinerea* in *Arabidopsis thaliana*
Plant and Cell Physiology 46(7)1093-1102(2005)
- Maolin Hou, Junji Takabayashi and Yooichi Kinoh
Effects of leaf age on flight response of a parasitic wasp *Cotesia kariyai* (Hymenoptera: Braconidae) to a plant-herbivore complex
Applied Entomology Zoology 40(1)113-117(2005)
- Taro Maeda and Junji Takabayashi
Effects of Foraging Experiences on Residence Time of the Predatory Mite *Neoseiulus womersleyi* in a Prey Patch
Journal of Insect Behavior 18(3) (2005)
- Yasuyuki Choh, Soichi Kugimiya and Junji Takabayashi
Induced production of extrafloral nectar in intact lima bean plants in response to volatiles from spider mite-infested conspecific plants as a possible indirect defense against spider mites.
Oecologia 147(3)455-460(2006)

（2） 特許出願

H17 年度出願件数：0 件（CREST 研究期間累積件数：4 件）