

平成 30 年 5 月 22 日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K18820

研究課題名(和文)植物-植食性昆虫間相互作用における分子パターン認識の役割

研究課題名(英文)Functional role of molecular pattern recognition in plant-herbivore interactions

研究代表者

新屋 友規 (Shinya, Tomonori)

岡山大学・資源植物科学研究所・助教

研究者番号：80514207

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：植物が植食性昆虫による食害時に効果的に防御応答を誘導するためには、「分子パターン」と呼ばれる植食性昆虫由来あるいは食害に生じる分子の認識が重要な過程となる。植食性昆虫による食害の現場では、傷害とともに複数の分子パターンを植物が同時に認識すると想定されるが、複数の分子パターンを同時に扱った研究は非常に少ない。本研究では、イネにおいてクサシロキヨトウの食害認識に關与する複数の分子パターンを見出した。さらに、イネがこれら分子パターンを同時に認識することで、より強固で効果的な防御を誘導することを示唆した。

研究成果の概要(英文)：Plants detect herbivory through the recognition of molecular patterns derived from herbivores and themselves, however little is known about the molecular interactions of such co-existing signals during insect attack. In this study, we show that rice can simultaneously recognize several molecular patterns from rice armyworm (*Mythimna loreyi*) larvae. These findings suggest that a concurrent perception of diverse molecular patterns in rice may be required for a more efficient activation of its defense against herbivores.

研究分野：農学

キーワード：植物-昆虫間相互作用 植物免疫 植食性昆虫 イネ 分子パターン シグナル伝達 異物認識

1. 研究開始当初の背景

植物が外敵となる植食性昆虫や微生物に対して、効果的に抵抗性を示すには、植物が植食性昆虫や微生物を異物として認識することが重要なステップとなる。微生物感染時の異物認識では、微生物由来あるいは感染時に生じる植物由来の特異的リガンド、いわゆる分子パターンをパターン認識受容体を介して認識することで植物免疫機構が活性化される。現在までに微生物認識に関わる複数の分子パターンと対応する受容体の発見やそれらの解析成果は、植物-外敵のインターフェースでの攻防を分子レベルで理解する上で重要な切り口の一つである (Ronald *et al.*, 2010 Science, Spoel *et al.*, 2012 Nature Rev)。

一方で植物の植食性昆虫認識に関する研究についても多くの研究者により注目されており、食害時の傷害や、傷害部位で植物と接触する昆虫の唾液(吐き戻し液)中に含まれるエリシターや共生微生物が重要な役割を示すことが知られている。実際の食害現場では複数分子パターンの認識により、特異的で効果的な植食性昆虫に対する防御機構を誘導していると考えられているが、植物の防御応答を誘導する分子パターンの同定例は、微生物由来分子パターンの報告数と比べ限られており、同定されたパターン認識受容体は未だない。代表的な分子パターンとして、食害時に昆虫の吐き戻し液に検出される FACs (fatty acid amino acid conjugates) は 1997 年に発見以来、精力的に研究されてきた。しかし植物の FACs 認識分子機構に関しては FACs 結合蛋白質の存在が 2004 年に示唆されたのみであった (Alborn *et al.*, 1997 Science, Christopher *et al.*, 2004 Plant Cell)。そのため、植物の植食性昆虫認識に関わる新規分子パターンや受容体の同定が強く求められていた。

2. 研究の目的

植食性昆虫による食害時には、「傷害」に加え、「植食性昆虫由来分子パターン」および「食害にともない産生する植物由来の分子」や「昆虫の共生微生物由来の分子」といった複数の異なる分子パターンが、植物によ

り認識されることで効果的な防御応答を誘導すると考えられる。この問題の詳細な解析を行う上で、1組の植物-昆虫間相互作用に関わる複数の分子パターンを同時に用いた解析が必要になるが、このような実験系は限られていた。

本研究ではイネとイネを食害する植食性昆虫であるクサシロキヨトウ (*Mythimna loreyi*) に注目し、食害認識に関与するクサシロキヨトウや植物由来の分子パターンの同定を行う。さらに、本研究で見出した複数の分子パターンを用いて、複数分子パターンを同時認識した際の詳細な防御応答の解析を行うことを目的とした。

3. 研究の方法

(1) イネを食害する植食性昆虫の分子パターンの解析

実験材料としたクサシロキヨトウはイネを食害する害虫であるが、その幼虫の吐き戻し液中に新規物質を含めた複数の分子パターンが含まれていることを見出している。これら分子パターンを同定するために、各種精製法を用いてエリシターの分離・同定を試みた。また、LC-MS を用いて FACs の存在確認を行った。一方でイネを食害する植食性昆虫であるイチモンジセセリ (*Parnara guttata*) 幼虫の吐き戻し液に含まれる分子パターンについて比較解析を行った。

(2) 複数分子パターン同時認識により誘導される防御応答の解析

見出された分子パターンの同時処理により、相加・相乗的にイネの防御応答誘導されるのかどうか、また個々の分子パターンに役割分担がみられるかどうか、防御応答の解析を行った。複数分子パターン同時処理時の応答の解析には、迅速・簡便にアッセイ可能なイネ培養細胞の応答解析系を用いることで効率的に進めた。応答として、防御応答関連遺伝子の発現解析や、二次代謝物の蓄積、植物ホルモンの蓄積誘導解析を行った。

(3) クサシロキヨトウ食害認識に関与する植物由来分子パターンの解析

植物由来分子パターンとして、イネの内性ペプチドである OsPeps と、その前駆体タンパク質である OsPROPEPs に注目して解析を行った。既に報告のあるシロイヌナズナやトウモロコシの PROPEP のアミノ酸配情報を元に、イネ OsPROPEPs の候補遺伝子を見出した。6 個の候補遺伝子の中で、傷害やクサシロキヨトウ吐き戻し液によって発現誘導される遺伝子に注目した。OsPeps の合成ペプチドを用いて、エリシター活性を測定するとともに、クサシロキヨトウ由来吐き戻し液との同時処理時の防御応答解析を行った。

4. 研究成果

(1) イネを食害する植食性昆虫の分子パターンの解析

植物の植食性昆虫認識に関わる分子パターンの情報を蓄積するために、イネの害虫であるクサシロキヨトウおよびイチモンジセセリを用いて、新規な、または別種昆虫で報告のある分子パターンの探索を試みた。まず、クサシロキヨトウおよびイチモンジセセリの幼虫より吐き戻し液を回収し、イネ培養細胞に対してエリシター活性を示すかどうか測定を行ったところ、いずれの吐き戻し液も高いエリシター活性を示し、活性酸素種産生や防御関連遺伝子発現の誘導、二次代謝産物の蓄積を誘導が認められた。そこで、クサシロキヨトウの吐き戻し液に含まれる分子パターンの解析を行ったところ、防御応答誘導能を有する複数の分子パターンを含むことを明らかにした。その中には、代表的な植食性昆虫由来エリシターである FACs を含んでいることを明らかにした。また、エリシター活性を有する高分子の分子パターンが存在した。一方で、イチモンジセセリの吐き戻し液では典型的な FACs は検出されず、解析した 2 種の植食性昆虫の間で分子パターンの組成が異なることを明らかにした (Shinya *et al.*, 2016 Sci Rep, 発表論文)。興味深いことに、食害時に放出される揮発性物質の量がクサシロキヨトウとイチモンジセセリの間で異なることを明らかにしている (Sobhy *et al.*, 2017 J Chem Ecol, 発表論文)。イネ揮発性物質の放出誘導において、植食性昆虫の吐き戻し液に含まれる分子

パターンの違いが寄与しているかどうかを明らかにすることは今後の課題である。

(2) 複数分子パターン同時認識により誘導される防御応答の解析

クサシロキヨトウ吐き戻し液に含まれる複数の分子パターンを同時に認識することによって、より強い防御応答が誘導されるかどうかを明らかにするために、高分子エリシターと FACs に注目して解析を行った。その結果、2 つの分子パターンの同時認識により、相加的あるいは相乗的に誘導される防御応答が複数見出された。また、これら応答において、高分子エリシター画分に主要なエリシター活性成分が含まれていることが示唆された。一方で、FACs 自体のエリシター活性は弱い、高分子エリシターとの同時処理により、防御応答を促進することを明らかにした (Shinya *et al.*, 2016 Sci Rep, 発表論文)。このように 1 種の昆虫に存在する複数の分子パターンの関係について解析した例は少ない。

(3) クサシロキヨトウ食害認識に関与する植物由来分子パターンの解析

クサシロキヨトウ食害認識に関わる植物由来分子パターンの解析として、イネの内性ペプチドである OsPeps に注目して解析を行った。6 種の OsPep ペプチドを合成し、エリシター活性を測定したところ、いずれも防御応答を誘導した。この中で、OsPep3 の前駆体タンパク質をコードする *OsPROPEP3* が傷害やクサシロキヨトウ吐き戻し液により発現誘導されたことから、OsPep3 に注目して、吐き戻し液由来分子パターンの同時認識時の応答を解析した。その結果、OsPep3 と吐き戻し液の同時認識により、複数の防御応答および防御応答の制御に関わるシグナル伝達因子が相加的あるいは相乗的に活性化、蓄積誘導されることを明らかにした。さらに OsPep3 の受容体と推定される *OsPEPR1* 過剰発現体において、クサシロキヨトウ吐き戻し液に対する感受性や傷害応答が高まることを示した。以上の結果より、イネが食害を受けた際に、昆虫由来分子パターンに加え植物由来分

子パターンを同時に認識し、より強固な防御応答を誘導することが推察され、これら研究成果を学術雑誌に発表した (Shinya *et al.*, 2018 Plant J, 発表論文)

植物が害虫に対して防御応答を誘導する際、食害する植食性昆虫種により、応答の質 (種類) や応答の量 (強さ) が異なる場合があることが知られている。植物がどのように害虫種の違いを識別し、どのように防御応答の質・量が決まり適切な防御機構を活性化することができるのか、今後、本研究を進展させることで、詳細な分子メカニズムに迫ることが期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計10件)

Shinya T., Yasuda S., Hyodo K., Tani R., Hojo Y., Fujiwara Y., Hiruma K., Ishizaki T., Fujita Y., Saijo Y., Galis I., Integration of danger peptide signals with HAMP signaling amplifies the anti-herbivore defense responses in rice. *Plant J.* 94: 626-637 (2018), doi: 10.1111/tpj.13883, 査読有

Sobhy I., Miyake A., Shinya T., Galis I. Oral secretions affect HIPVs induced by generalist (*Mythimna loreyi*) and specialist (*Parnara guttata*) herbivores in rice. *J Chem Ecol.* 43: 929-943 (2017), doi: 10.1007/s10886-017-0882-4, 査読有

Shinya T., Hojo Y., Desaki Y., Christeller J.T., Okada K., Shibuya N., Galis I., Modulation of plant defense responses to herbivores by simultaneous recognition of different herbivore-associated elicitors in rice. *Sci Rep.* 6: 32537 (2016), doi: 10.1038/srep32537, 査読有

Tanabe T., Hojo Y., Shinya T., Galis I. Molecular evidence for biochemical diversification and evolution of phenolamide biosynthesis in rice plants. *J Integr Plant Biol.* 58, 903-913 (2016), doi: 10.1111/jipb.12480, 査読有

Alamgir K.M., Hojo Y., Christeller J.T., Fukumoto K., Isshiki R., Shinya T., Baldwin I.T., Galis I. Systematic analysis of rice (*Oryza sativa*) metabolic responses to herbivory. *Plant Cell*

Environ. 39, 453-466 (2016), doi: 10.1111/pce.12640, 査読有

Shinya T., Nakagawa T., Kaku H., Shibuya N., Chitin-mediated plant-fungal interactions: Catching, hiding and handshaking. *Curr Opin Plant Biol.* 50, 64-71. (2015), doi: 10.1016/j.pbi.2015.05.032, 査読有

新屋友規, 渋谷直人, 植物免疫と細胞壁, 植物の生長調節, Vol.50, 76-82 (2015), doi: 10.18978/jscrp.50.1_76, 査読有

〔学会発表〕(計33件)

新屋友規・北條優子・宮本皓司・内田健一・山根久和・岡田憲典・Galis Ivan: イネの防御応答における OPDA シグナルによるフェノールアミド生成制御, 第59回日本植物生理学会年会, 札幌コンベンションセンター, 札幌, 3月28-30日, 2018.

高橋弘輝・Andama Joackin B.・北條優子・新屋友規・中谷容子・Galis Ivan: イネにおけるフェノールアミド生成および制御に関わる新規遺伝子の同定, 第59回日本植物生理学会年会, 札幌コンベンションセンター, 札幌, 3月28-30日, 2018.

Galis Ivan・福元華織・北條優子・中谷容子・新屋友規: Phytohormone levels and associated gene expression in developing rice panicles, 第59回日本植物生理学会年会, 札幌コンベンションセンター, 札幌, 3月28-30日, 2018.

Andama B. Joackin・Osinde Cyprian・新屋友規・Galis Ivan: Characterization of herbivory resistance traits in NERICA rice varieties, 第59回日本植物生理学会年会, 札幌コンベンションセンター, 札幌, 3月28-30日, 2018.

Galis, I., Shinya, T., Alamgir, K.M., Sobhy, I., Tanabe, K., Miyake, A., Hojo, Y., Osinde, C., Sakamoto, W., Nakabayashi, R., and Saito, K., Omics everywhere: How about in chemical ecology, 33rd annual meeting of the ISCE and the 9th meeting of the APACE, Kyoto, Japan, Aug 23-27, 2017.

茂手木敦史・宮本皓司・山根久和・新屋友規・Ivan Galis・岡田憲典・野尻秀昭: イネのジャスモン酸誘導性転写因子 RERJ1 によ

るリナロール生産制御メカニズムの解明, 日本農芸化学会 2017 年度大会, 京都女子大学, 京都, 3 月 17-20 日, 2017.

新屋友規・北條優子・兵頭究・晝間敬・西條雄介・Galís Ivan: イネの傷害誘導性ペプチド OsPep3 は植食性昆虫エリシター応答を増強する, 第 58 回日本植物生理学会年会, 鹿児島大学群元キャンパス, 鹿児島, 3 月 16-18 日, 2017.

Galís I., Sobhy I., Miyake A., Tanabe K., Hojo Y. and Shinya T., Direct and indirect defense mechanisms compose efficient protective shield against insect herbivores in rice, Plant Protection Day and National Conference 2016, Universitas Padjadjaran, Bandung, Indonesia, Oct 20, 2016.

Motegi A., Miyamoto K., Yamane H., Shinya T., Galís I., Nojiri H., and Okada K., Rice JA inductive transcription factor RERJ1 regulates linalool emission in response to herbivory, 14th International Symposium on Rice Functional Genomics (ISRFG), Le Corum, Montpellier, France, Sep 26-29 2016.

Shinya T., Hojo Y., Desaki Y., Christeller J.T., Okada K., Shibuya N. and Galís I., Plant defense responses to herbivores involve recognition of independent herbivore-associated molecular patterns in rice, IS-MPMI (The International Society for Molecular Plant-Microbe Interactions) XVII Congress, Portland, Oregon, U.S.A., July 17-21, 2016.

新屋友規・Islam Sobhy・北條優子・三宅純司・出崎能丈・渋谷直人・Galís Ivan, 植食性昆虫エリシター組成に依存したイネの特異的防御応答, 平成 28 年度日本植物病理学会大会, 岡山コンベンションセンター, 岡山, 3 月 21 日-23 日, 2016.

Galís I., Sobhy I., Miyake A., Tanabe K., Hojo Y., and Shinya T., Direct and indirect defense against herbivores in rice, 第 57 回日本植物生理学会年会, 岩手大学, 盛岡, 3 月 18-20 日, 2016.

Tanabe K., Hojo Y., Shinya T., and Galís I., Herbivory induced phenolamide biosynthesis in rice, 第 57 回日本植物生理学会年会, 岩手大

学, 盛岡, 3 月 18-20 日, 2016.

Shinya T., Hojo Y., Desaki Y., Shibuya N. and Galís I., Isolation of novel plant-defense-inducing elicitors from rice herbivores, The 31st annual meeting of the ISCE, Stockholm, Sweden, 29 June 29 - July 3, 2015.

Galís I., Kabir A.M., Tanabe K., Hojo Y., Shinya T., Christeller J.T., Emerging role of phenolamides as universal plant defense metabolites, The 31st annual meeting of the ISCE, Stockholm, Sweden, 29 June 29 - July 3, 2015.

〔図書〕(計 2 件)

新屋友規、「親和性標識実験」植物細胞壁実験法 (石井忠ら編) 弘前大学出版会 (2016) 374-376.

Shinya T., Desaki Y., Shibuya N., Oligosaccharin receptors in plant immunity, Research Progress in Oligosaccharins, Springer New York, edited by Heng Yin and Yuguang Du (2016) 29-39.

〔その他〕

ホームページ等

http://www.gels.okayama-u.ac.jp/profile/kouza/ar eas14_pstress.html

6 . 研究組織

(1)研究代表者

新屋 友規 (SHINYA TOMONORI)

岡山大学・資源植物科学研究所・助教

研究者番号 : 80514207