

令和 2 年 6 月 2 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17H03709

研究課題名(和文)植物の化学防御機構の進化を疑似体験させた昆虫の化学情報認知と適応行動

研究課題名(英文)Plant-insect interaction around evolution of chemical defence

研究代表者

尾崎 まみこ(Ozaki, Mamiko)

神戸大学・理学研究科・教授

研究者番号：00314302

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,600,000円

研究成果の概要(和文)：進化系統的に古い防除システムにおいては、イソチオシアネートの代わりに致死毒性を持つシアン化合物が生成される。他方、アブラナ科植物は、食害されると、イソチオシアネートを生成して身を守る。食植性昆虫に対するこの化学物質の防御効果を調べるために、シロイヌナズナの実生のホモジネートの味または匂いの存在下で、ショ糖に対するハエの食欲を測定した。シロイヌナズナの実生のホモジネートの味または匂いのいずれもがハエの食欲を抑える効果を示した。イソチオシアネートを生産できないシロイヌナズナ突然変異体ではそのような食欲抑制効果は見られなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の成果として、食植性昆虫に対する植物の防除システムの進化の方向が、致死毒によって双方が死ぬシステムから、不味い味や匂いによって双方が死なずにすむシステムへと変化したことが明らかとなった。このことは、植物-昆虫の共進化の観点から学術的に大きな意義がある。また、このような進化のしくみを理解することは、社会的にも害虫防除や農事効率を考える上で意義があると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Brassicaceae plants defend themselves against herbivores by producing isothiocyanates in the wounded tissues. To examine the defensive efficacy of this compound against feeding motivation of insects, we adopted the PER test in the blowfly toward sucrose in the presence of taste or odor of the seedling homogenate of *Arabidopsis thaliana*, a model plant of Brassicaceae. We found that either the taste or odor of the homogenate exhibited negative effect on the fly feeding motivation, so that the PER threshold concentration of sucrose was significantly increased. However, some *Arabidopsis* mutants that could not produce isothiocyanate did not have such a negative effects. Instead, odor of the homogenate of *Lotus japonicus* that produces a cyanide, phylogenetically older defensive compound having oral toxicity, did not suppress feeding motivation in the fly.

研究分野：動物行動・生理

キーワード：化学防除 食植性昆虫 アブラナ科植物

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 植物は、様々な二次代謝物を合成・蓄積して昆虫の食害に備えているが、進化の過程で、“毒性物質を合成し食べられて昆虫を殺す戦略”から、“嫌悪・忌避物質を合成し食べられずに昆虫を遠ざける戦略”を獲得したと考えられる。これらの植物の戦略に昆虫がどのように対応し安全に食物を確保してきたかは、共進化を考える上で核心的な問題である。しかし、昆虫に植物の“進化”を体験させ、実験をすることができない限り、事実上、実証不可能と考えられてきた。それだけに、進化的に遡って古い形の化学防御戦略をもつ植物を遺伝子操作で作製し、新旧の戦略をもつ植物を昆虫に提示することで“植物の進化を疑似体験”させる本研究のアイデアは斬新なものであり、全く新しい、遺伝子操作を利用した実験的進化研究の試みとして、共進化の理解を格段に進めるブレイクスルーと位置づけることができる。

(2) 連携研究者らは、環境や病虫害ストレスに対する植物応答の細胞学的研究を国際的に牽引してきた。中でも、食害防御機構として発達してきた植物の二次代謝物合成経路とその鍵となる酵素の細胞内局在や遺伝子について蓄積した知識と形質転換植物作製技術は、本研究の遂行に不可欠なものとなっている。研究代表者は、昆虫の味覚・嗅覚受容、化学情報処理の脳神経機構、食嗜好や食欲などの研究に携わり、その間、行動観察のみならず、感覚神経の応答や脳神経の活動など昆虫側の対応を多面的に測定・評価する基盤を培ってきた。研究代表者と協力・連携研究者の成果を含め、植物の二次代謝物合成系に関する細胞・分子機構の研究や、昆虫の味覚や嗅覚といった化学感覚の神経機構に関する個別研究は数多く行われてきた。しかし植物 - 昆虫相互の化学戦略の観点から一方の進化にともなって他方の対応がどう変化するかを実験的に問うた研究はない。本研究では双方の研究者が緊密な連携を組み、“植物の進化の疑似体験”という独創的発想でこの問題に取り組む。

## 2. 研究の目的

(1) 植物 - 昆虫間の相互戦略の共進化は生物学の重要課題であるにも関わらず、植物学と動物学が緊密に連携してこれに取り組んだ例は少ない。本研究では、共進化を駆動する植物側の化学防御機構と防御物質を察知する昆虫側の化学情報認知機構の攻防に着目する。特色は、遺伝子操作で植物側の化学防御機構を先祖返りさせ、新旧の化学防御機構に対する昆虫側の対応を神経行動学的な手法で比較検討する点にある。独創的な“植物の進化を模して昆虫に疑似体験させる実験”を通し、植物 - 昆虫間の化学的相互戦略の進化について理解を深めることが本研究の目的である。

(2) 「植物は、“食べられて昆虫を殺す戦略”から“食べられずに昆虫を遠ざける戦略”を選んで進化した。この時、毒性物質でなく嫌悪・忌避物質を合成することで、昆虫の感覚や嗜好をターゲットに食欲を減退させる能力を獲得した」のではないかと、この仮説を検証するため、アブラナ科植物の進化途上で現実起こり得た二次代謝物合成経路の変化に着目し、昆虫に植物の“進化”を疑似的に“体験”させる。

## 3. 研究の方法

(1) 植物材料：アブラナ科の植物モデルとして、シロイヌナズナの野生型 col と qKO (グルコシノレートを持たない突然変異体) bglu ( $\beta$ グルコシダーゼ欠損突然変異体) nail (実生特異的な細胞内小器官欠損突然変異体) を用いる。一方、進化的に古い化学防除システムをもつ植物モ

デルとしてマメ科のミヤコグサを用いる。昆虫材料：味覚嗅覚実験のモデル昆虫としてクロキンバエを用いる。

(2) 昆虫の食害を受けるとグルコシノレートはミロシナーゼ酵素により脱糖され実効化合物イソチオシアネートになる。そこで、前述の各系統の実生のホモジネートか味の匂い、さらに、シロイヌナズナに含まれ、かつ市販品として入手可能なイソチオシアネート類を用いて、クロキンバエの電気生理実験と行動実験を以下のように行う。( )味覚・嗅覚の感覚神経応答の測定、脳神経活動の観測、誘引・忌避効果の測定、( )摂食・拒食行動の評価、食欲減退・回復の評価、致死効果・耐性の評価。クロキンバエ味覚器の電気生理学的な応答インパルス調べ、既知の嫌悪応答のインパルスを参照してイソチオシアネートを感知する受容神経の同定を行う。また、味覚・嗅覚を通して刺激したときの誘引・忌避行動や食行動ないし食嗜好性を評価し、刺激時に活動する食欲減退/増進調節の脳神経回路を同定する。

#### 4. 研究成果

##### (1) 味覚受容神経応答の測定

実生ホモジネートを用いた味覚・嗅覚の電気生理実験は、イソチオシアネート以外の夾雑物の影響が大きく、応答記録の分析が難しいため、野生型シロイヌナズナ実生のホモジネートから生成される主要なイソチオシアネートであるエルシンを用いて実験を行ったところ、エルシンは高濃度では摂食行動を抑制する苦味の受容神経を活性化すること、低濃度では、摂食行動を促進する甘味の受容神経活動を阻害することが明らかになった。

##### (2) 脳神経活動の観測

外部刺激によってリン酸化される抗 pERK 抗体 - 蛍光標識コンジュゲートを用いて、クロキンバエの触角を野生型シロイヌナズナ実生のホモジネートの匂いで活性化される脳領域を探索した。その結果、嗅覚一次中枢(触角葉)の特定の糸球体が蛍光標識された(図1)。

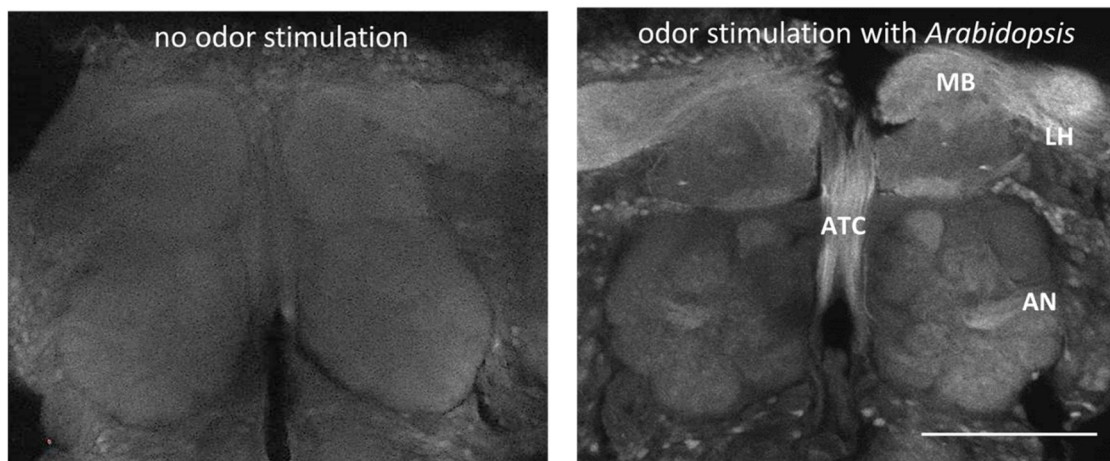


図1 野生型シロイヌナズナ実生ホモジネートの匂い刺激を受けないハエの脳(左)と受けたハエの脳(右)の pERK 染色結果。活性化される部位が白く光って見える。

##### (3) 誘引・忌避効果の測定

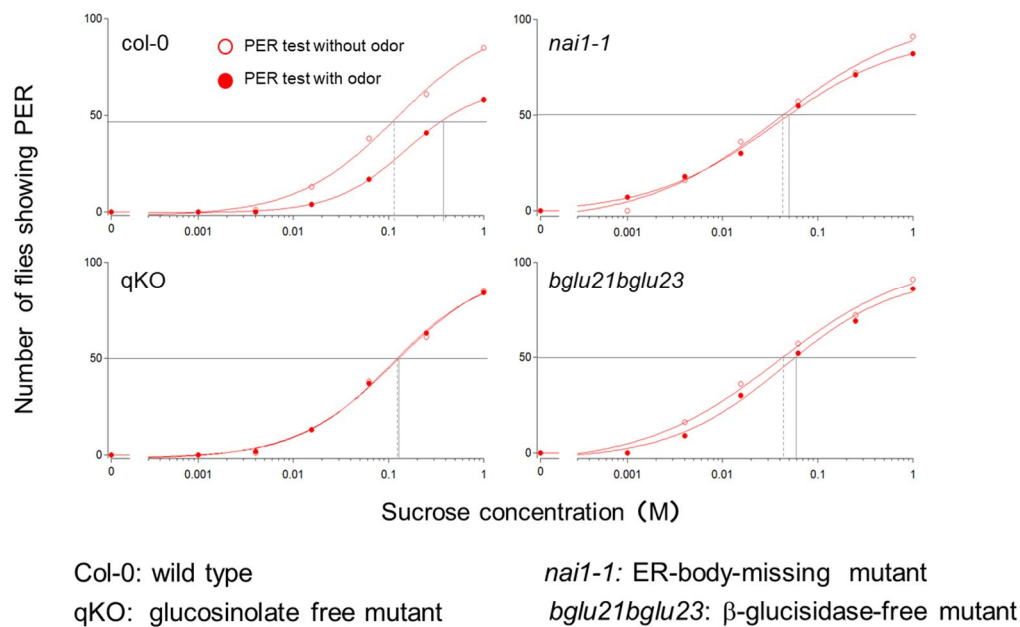
シロイヌナズナ野生型と突然変異体の実生のホモジネートの匂いを用いて、クロキンバエの走化性を測定したが、誘引・忌避どちらの走化性も見られなかった。

#### (4) 摂食・拒食行動の評価

野生型シロイヌナズナ実生のホモジネートで味覚器を刺激すると摂食を拒絶する嘔吐反射行動が見られた。嗅覚器の匂い刺激にはそのような作用はなかった。

#### (5) 食欲減退・回復の評価

野生型シロイヌナズナ実生のホモジネート上清を混入させたショ糖溶液に対して、クロキンバエの食欲が有意に減退することが分かった。野生型の代わりに突然変異体を用いると、そのような効果は見られなかった。野生型シロイヌナズナ実生のホモジネートの匂い存在下でショ糖溶液に対するクロキンバエの食欲を測定すると、有意に減退することが分かった。野生型の代わりに突然変異体を用いると、そのような効果は見られなかった(図2)。



**図2 野生型と3種類の突然変異体の実生のホモジネートの匂い存在下で様々な濃度のショ糖に対する摂食反応を示すハエの割合を調べた。曲線の右方シフトが食欲の減退を意味する**

#### (6) 致死効果・耐性の評価

進化的に新しい化学防御システムをもつシロイヌナズナ実生のホモジネートと進化的に古い化学防御システムをもつミヤコグサのホモジネートに自由に接触できる条件でクロキンバエを観察すると、ミヤコグサのホモジネートと共存したハエは死に絶えるのに対し、その同じ時間経過でシロイヌナズナホモジネートと共存したハエは殆ど死ぬことはなかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Sato K, Sakamoto H, Hirata M, Kidokoro-Kobayashi M, Ozaki M, Higashi S, Murakami T.	4. 巻 110
2. 論文標題 Relationship Among Establishment Durations, Kin Relatedness, Aggressiveness, and Distance Between Populations of Eight Invasive Argentine Ant (Hymenoptera: Formicidae) Supercolonies in Japan	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 J Econ Entomol.	6. 最初と最後の頁 1676-1684
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) Doi: 10.1093/jee/tox14	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Kouhei Shimaji, Ryo Tanaka, Toru Maeda, Mamiko Ozaki, Hideki Yoshida, Yasuyuki Ohkawa, Tetsuya Sato, Mikita Suyama and Masamitsu Yamaguchi	4. 巻 7
2. 論文標題 Histone methyltransferase G9a is a key regulator of the starvation-induced behaviors in <i>Drosophila melanogaster</i>	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) Article number: 14763	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Ueoka Ibuki, Kawashima Hitoshi, Konishi Atsushi, Aoki Mikio, Tanaka Ryo, Yoshida Hideki, Maeda Toru, Ozaki Mamiko, Yamaguchi Masamitsu	4. 巻 300
2. 論文標題 Novel <i>Drosophila</i> model for psychiatric disorders including autism spectrum disorder by targeting of ATP-binding cassette protein A	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Experimental Neurology	6. 最初と最後の頁 51-59
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.expneurol.2017.10.027	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Yusuke Takeichi, Tatsuya Uebi, Naoyuki Miyazaki, Kazuyoshi Murata, Kouji Yasuyama, Kanako Inoue, Toshinobu Suzuki, Hideo Kubo, Toshiaki Omori, Ryoichi Yoshimura, Yasuhisa Endo, Masaru K. Hojo, Eichi Takaya, Satoshi Kurihara, Kenta Tatsuta, Koichi Ozaki, Mamiko Ozaki	4. 巻 12
2. 論文標題 Putative Neural Network Within an Olfactory Sensory Unit for Nestmate and Non-nestmate Discrimination in the Japanese Carpenter Ant: The Ultra-structures and Mathematical Simulation	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Frontiers in Cellular Neuroscience	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fncel.2018.00310	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Eichi Takaya, Yusuke Takeichi, Mamiko Ozaki, Satoshi Kurihara	4. 巻 33
2. 論文標題 Semi-supervised for electron microscopy segmentation.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Proceedings of the Thirty-Third AAAI Conference on Artificial	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計22件 (うち招待講演 6件 / うち国際学会 9件)

1. 発表者名 Mamiko Ozaki
2. 発表標題 Two topics on olfactory sensing-mediated relationships between plant and insect and between human baby and mother
3. 学会等名 Diamond seminar of MCB (招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Mamiko Ozaki
2. 発表標題 An evolutionary aspect of the chemical defense of plant: ER-body system in brassica plant decreases feeding motivation in insect via chemosensory system
3. 学会等名 International Symposium for Molecular and Neural Mechanisms on Taste and Olfactory Perception (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Toru Maeda, Shunya Habe Tomoyosi Nisimura, Mamiko Ozaki
2. 発表標題 iDifferent antennal lobe glomeruli activated by non-appetitive and appetitive odors in the fly brain.
3. 学会等名 日本比較生理生化学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Mamiko Ozaki 1, Tatsuya Uebi 1, Shunya Habe 1, Toru Maeda 2, Kenji Yamada 2, Somare Mizuho 3, Junpei Takagi 3, Ikuko Hara-Nishimura
2. 発表標題 Chemical defense in plant and avoidance behavior in insect: A model study using Arabidopsis thaliana and Phormia regina.
3. 学会等名 European Symposium of Insect Taste and Olfaction (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Shunya Habe, Toru Maeda, Tomoyosi Nisimura, Mamiko Ozaki
2. 発表標題 Non-appetitive and appetitive odor-activating antennal lobe glomeruli via different olfactory organs in the blowfly, Phormia regina.
3. 学会等名 日本比較生理生化学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 M. Ozakia*, T. Maedab, S. Mizuhoc, T. Uebia, S. Habea, K. Yamadab, M. Kuniedac, J. Takagic. I. Hara-Nishimura
2. 発表標題 ER-body system in plant is involved in production of volatile compounds to suppress feeding motivation of insect: A model study using Arabidopsis thaliana and Phormia regina
3. 学会等名 Asia and Pacific Association for Chemical Ecology (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Mamiko Ozaki
2. 発表標題 Study on the Neural Mechanism of Congenital and Acquired Food Preference
3. 学会等名 FoodPOLIS (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 尾崎 まみこ, 前田徹, 水穂そまれ, 國枝正, 高木純平, 山田健志, 西村いくこ, 上尾達也, 波部峻也
2. 発表標題 クロキンバエの化学感覚を通してみるシロイヌナズナの辛子油化学防衛戦略
3. 学会等名 日本動物学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Shunya Habe, Shigeru Matsuyama, Toshifumi Kimura, Tianbang Li, Claire Saito, Makoto Tominaga, Mamiko Ozaki
2. 発表標題 Multiple effects of the male ant substances in <i>Camponotus japonicus</i> ; Pheromone for worker ants functions as an allomone against predator birds.
3. 学会等名 日本比較生理生化学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 尾崎まみこ
2. 発表標題 昆虫社会の化学感覚と好き嫌い
3. 学会等名 日本学術会議シンポジウム 「インセクトワールド - 多様な昆虫の世界 - 」 (招待講演)
4. 発表年 2019年



1. 発表者名 Mamiko Ozaki
2. 発表標題 Peripheral modification of odor information: Ultrastructure and function of a gap junction-mediated novel neural network within an olfactory sensory unit of ant
3. 学会等名 International Symposium for Molecular and Neural Mechanisms on Taste and Olfactory Perception (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Mamiko Ozaki
2. 発表標題 Feeding preference depends on taste, odor and visual cues, but how?
3. 学会等名 International Congress of Comparative Physiology and Biochemistry (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Toru Maeda, Shunya Habe Tomoyosi Nisimura, and Mamiko Ozaki
2. 発表標題 Non-appetitive and appetitive food odors activate different antennal lobe glomeruli via different olfactory organs in the blowfly, <i>Phormia regina</i>
3. 学会等名 International Congress of Comparative Physiology and Biochemistry (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Toru Maeda
2. 発表標題 Chemical defense mechanism in plants and olfactory and gustatory reactions to it in insects: A model study using <i>Arabidopsis thaliana</i> and <i>Phormia regina</i> .
3. 学会等名 International Congress of Comparative Physiology and Biochemistry (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 前田徹
2. 発表標題 クロキンバエの2種類の嗅覚器から入力された食欲を増減する匂いは一次嗅覚中枢のどこを活性化するか：pERK抗体標識による触角葉系球体の可視化
3. 学会等名 日本動物学会近畿支部会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 尾崎まみこ
2. 発表標題 昆虫の振る舞いを見越した植物の進化戦略：アブラナ科植物が獲得した匂いによる化学防除機構
3. 学会等名 日本動物学会近畿支部会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 水穂そまれ
2. 発表標題 昆虫の嗅覚を介した摂食行動から解明するER bodyの生理学的機能
3. 学会等名 日本植物生理学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 前田徹
2. 発表標題 クロキンバエの二種類の嗅覚器を由来してそれぞれ摂食行動を左右する匂いによって活性化された系球体の可視化
3. 学会等名 日本味と匂学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 尾崎まみこ
2. 発表標題 植物が獲得した匂いによる化学防除機構の進化と昆虫の感覚・行動応答
3. 学会等名 日本味と匂学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 尾崎まみこ
2. 発表標題 Effects of floral scents and their memories on feeding preference of the fly.
3. 学会等名 国際科学生態学会アジア環太平洋化学生態学会合同大会（国際学会）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 尾崎まみこ
2. 発表標題 昆虫の化学感覚から好き嫌いの生物学を考える
3. 学会等名 日本味と匂学会（招待講演）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 前田徹
2. 発表標題 ショウジョウバエのヒストンメチル化酵素G9aは飢餓によって引き起こされる糖への摂食行動の重要な調節因子である
3. 学会等名 日本味と匂学会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
連携研究者	西村 いくこ  (Nishimura Ikuko)  (00241232)	甲南大学・理工学部・教授    (34506)	