

令和 2 年 7 月 10 日現在

機関番号：81101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K07684

研究課題名(和文)モモシクイガの食害で誘導されるリンゴ果実の防御応答機構に関する研究

研究課題名(英文)Inducible defense mechanisms of apple fruits damaged by the peach fruit moth, *Carposina sasakii*

研究代表者

石栗 陽一 (ISHIGURI, Yoichi)

地方独立行政法人青森県産業技術センター・農林部門・研究管理員

研究者番号：80502963

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：鱗翅目昆虫に対して樹上のリンゴ幼果は様々な誘導性防御物質を産生する。本研究は「ふじ」幼果において食害で誘導されるトリテルペン類とクロロゲン酸類に着目し、鱗翅目昆虫に対する生理活性を調べた。リンゴを寄主植物とするスペシャリストや花卉野菜を食害する広食性ジェネラリストなど複数の鱗翅目害虫に対して、これら誘導性化合物はそれぞれ異なる活性を示した。特に重要害虫のモモシクイガに対してp-coumaroyl quinic acidは生育阻害だけでなく致死性も示した。化合物の誘導パターンや食入頭数(密度)と幼虫の死亡率には相関があり、着果でのみ観察される致死性防御応答のメカニズムの全体像を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

リンゴは重要な国産果実でありながら、慣行農法ではその生産に多量の農薬散布を必要とし、環境負荷など多くの課題を抱えている。本研究は重要害虫であるモモシクイガ幼虫に対して「ふじ」の幼果が致死性の防御応答を示すことに着目し、そのメカニズムを分子レベルで明らかにした。今回明らかになった防御応答は他の品種や多種害虫にも当てはまり、今後の品種改良に極めて重要な特性といえる。さらに樹上の果実における生理反応として防御応答が今後の化学生態学・植物生理学的にも注視される。

研究成果の概要(英文)：Young apple fruits produced a variety of inducible defensive substances against lepidopteran insects. This study focused on triterpenes and chlorogenic acids, induced in 'Fuji' young fruits by feeding damage, and investigated their bioactivity against lepidopteran insects. These inducible compounds showed different activities against several lepidopteran pests, including oligofagous insects that live on apple fruits and/or leaves and polyfagous generalists that feed on a wide range of plants. In particular, p-coumaroyl quinic acid showed not only growth inhibition but also lethality against the important apple pest, the peach fruit moth larvae. The larval mortality had a correlation to the induction pattern of these compounds and density of larvae. The research revealed the overall mechanism of the lethal defense response observed only in on-tree apple fruits.

研究分野：植物保護科学

キーワード：リンゴ モモシクイガ 誘導防御 生理活性

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

モモシクイガ *Carposina sasakii* はリンゴ、モモ、ナシなどのバラ科果樹の重要害虫であり、幼虫が果実の内部を食害する。リンゴは本種の主要な寄主植物であるが、果実に食入した幼虫のうち、発育を完了して老熟幼虫として果実を脱出できる個体の割合は極めて低く、発育を完了するまでの幼虫期間にも著しいばらつきが見られる (Ishiguri and Toyoshima, 2006)。幼虫の生存率低下や発育遅延は、樹に着果している果実でのみ観察され、樹から切り離れた状態の果実では生存率が高く、発育遅延も起こらないことから、モモシクイガ幼虫の食害に対する誘導防御反応によるものであると考えられるが、どのような物質が発育阻害をもたらしているか明らかになっていない。

幼虫の発育阻害は、‘ふじ’をはじめとした多くのリンゴ品種で観察されるが、総ポリフェノール含量が少なく、ポリフェノール酸化酵素の活性も低いことで難褐変性品種として知られる ‘あおり 27’ (千雪) (Holderbaum, 2010) では、着果においても幼虫生存率が高く、発育遅延程度も小さいことが明らかになっており、ポリフェノールに関連した物質がリンゴ果実の防御物質として機能している可能性がある。

### 2. 研究の目的

モモシクイガ幼虫によって食害を受けたリンゴ果実に誘導される化合物を同定し、それらの生理活性や果実内における動態を明らかにすることで、モモシクイガに対するリンゴ果実の誘導防御メカニズムの解明を行うことを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) 被害果の作成

蛇腹状に折ったパラフィン紙を産卵場所として成虫の飼育容器に入れ、モモシクイガの卵を得た。パラフィン紙に産みつけられた卵を、適当な数になるように切り分けて、果実への接種源とした。青森県産業技術センターりんご研究所の殺虫剤無散布圃場に植栽されているリンゴの果実に卵を接種し、ふ化幼虫を食入させて被害果を作成した。

#### (2) 果実に誘導される化合物の分析

健全な幼果と食害果の果肉約 0.4 g を切り出し、アセトン 1.2 ml とともにビーズクラッシャーで破碎した。破碎液上清 60  $\mu$ l を窒素気流下で乾固し、蒸留水に再溶解したものを抽出液として適宜希釈したものを LCMS 分析に供した。逆相カラム (Mightysil RP-18 GP 50\*2.0 mm, 関東化学) を接続した島津 LCMS2020 において、0.08% 酢酸入りアセトニトリル及び 0.05% 酢酸入り蒸留水を 2-97% の濃度勾配で 0.2 ml/min で送液した。インターフェース 350、DL 250、ヒートブロック 200、ネブライザーガス 1.5 ml/min、乾燥ガス 15 l/min、カラムオープン 60 に設定した。検出は ESI-positive モードで 0.05 mg/ml glycyrrhetic acid を内部標準として定量分析した。

#### (3) 果実に誘導される化合物の生理活性

生理活性を評価する生物試験にはモモシクイガ、ハスモンヨトウ *Spodoptera litura*、ナシヒメシクイ *Grapholita molesta*、リンゴコカクモンハマキ *Adoxophyes orana fasciata* のそれぞれ継代飼育系統を用いた。

試験に供する化合物または抽出物のメタノール溶液に寒天粉末 80 mg を攪拌し、エバポレーターで濃縮乾固した。この寒天粉末に昆虫飼育用人工飼料インセクタ LFS (日本農産工業株式会社) 200 mg と蒸留水 2 ml を混合し、電子レンジで 500W 20 秒間加熱した。放冷後、この寒天飼料をプラスチックシャーレ (90 x 15 mm) に入れ、幼虫一頭を入れて 24  $\pm$  1 で 4 日間飼育した。寒天飼料は 12 時間ごとに与え、その間の摂食量を測定した。また幼虫の体重は 24 時間毎に秤量した。

#### (4) 幼虫の食入密度と発育阻害程度

果実の防御反応による幼虫の発育遅延程度は個体によって異なり、発育遅延がほとんど起こらず、ふ化幼虫の果実食入から 20 日前後で老熟幼虫として脱出するものから、発育の完了に数か月を要するものまで、ばらつきが大きい。予備試験の結果、モモシクイガ幼虫の食害によって誘導される二次代謝物の果実内分布は一樣ではなく、食害部近傍に偏在することが明らかになっているが、幼虫は果実内を縦横に食い進むため、食害を受けてから誘導される防御物質の蓄積が幼虫の食害に追いつかない場合があるのではないかと考えた。その場合、発育遅延程度が個体によって異なる要因の一つとして、幼虫の食入密度が影響すると想定される。すなわち、果実内の幼虫の密度が高いほど、他個体によってあらかじめ二次代謝物が誘導された部位を幼虫が摂食する確率が高まり、二次代謝物の累積摂取量が増加すると考えられる。そこで、食入密度と発育阻害程度の関係进行调查するため、品種 ‘ふじ’ の着果を供試し、果実当たり 1 個または数十個の卵を接種して、食入密度の異なる被害果を作成した。ふ化幼虫が食入した後、果実にナイロン製の網袋をかけ、野生虫による産卵を防ぐとともに、発育を完了して果実を脱出した老熟幼虫が袋の底に落下して計数できるようにした。1 果当たり 1 個体の幼虫が食入した果実と、10 個体以上の幼虫が食入した果実 (範囲: 10~29 個体、平均食入数: 16.1 個体) に分けて、老熟幼虫

の脱出数を毎日観察し、幼虫期間と生存率を調査した。

#### 4. 研究成果

##### (1) 食害を受けたリンゴ果実に誘導される化合物

これまでの研究で、モモシクイガの幼虫が食入したリンゴの果実には、トリテルペン類とクロロゲン酸類が誘導されることを明らかにしている。このうちトリテルペン類として 2,19-dihydroxy-3-oxo-12-ursen-28-oic acid (3-oxo-TA) をすでに同定していたが、同じく果実に誘導される類縁体について新たに構造解析を行い、2,3,3,25-epoxy-2,3,19-trihydroxy-urs-12-en-28-oic acid (pomaceic acid) であることを明らかにした。両化合物ともモモシクイガの幼虫による食害だけでなく、機械的な傷害によっても誘導された。また、着果だけでなく、樹から切り離れた摘果でも誘導された。誘導量の経時変化を調査した結果、3-oxo-TA が食害を受けてから 24 時間以内にすみやかに増加したのに対し、pomaceic acid はやや遅れて 48 時間後に増加が認められた。

幼虫の食害によって誘導されるクロロゲン酸類として、これまでに chlorogenic acid (CGA) 及び *p*-coumaroylquinic acid (*p*-CQA) を同定している。これらの化合物はトリテルペン類と異なり、機械的な傷害だけでは誘導が認められず、モモシクイガ幼虫の食害に反応して誘導された。また、樹から切り離れた摘果に比べて、樹に成っている着果で顕著に誘導が起ることから、着果でのみ発現するモモシクイガ幼虫の発育阻害に関与している可能性が考えられた。そこで、クロロゲン酸類の誘導量とモモシクイガ幼虫に見られる発育阻害の程度との相関を調べるために、1つの果実に1個体の幼虫を食入させ、「初期死亡果実」(食入後、すみやかに幼虫が死亡した果実)、「発育阻害果実」(幼虫がある程度発育しているが、発育遅延により発育を完了できず、果実を脱出するまで至っていない果実)及び「幼虫脱出果実」(幼虫が発育を完了して、老熟幼虫として果実を脱出した果実)に分けて、CGA 及び *p*-CQA の誘導量を測定した。その結果、「初期死亡果実」では、「幼虫脱出果実」と比較して、食入孔付近における CGA の濃度が有意に高く、*p*-CQA の濃度についても統計的な有意差はないものの高い傾向が認められた。「発育阻害果実」と「幼虫脱出果実」では、食入孔付近におけるクロロゲン酸類の濃度は差が認められなかったが、果実内部では CGA 及び *p*-CQA とともに「発育阻害果実」で「幼虫脱出果実」に比較して濃度が高かった。これらの結果から、幼虫の発育阻害程度にはクロロゲン酸類の誘導量が関与することが示唆され、食入孔付近で誘導量が多い場合には食入間もない段階で幼虫が死亡し、食入孔付近で誘導量が少ない場合、果実内部で誘導量が多ければ発育遅延をもたらすが、果実内部でも誘導量が少ない場合には、幼虫が脱出まで至ると考えられた。

##### (2) 誘導性化合物の生理活性

モモシクイガが食入したリンゴ果実で誘導されるトリテルペン類及びクロロゲン酸類の生理活性を明らかにするために、モモシクイガを含む数種の植食性昆虫を供試して、飼料への添加による飼育実験を行った。

供試昆虫として、リンゴの果実内部を加害するモモシクイガ及びナシヒメシクイ、並びにリンゴの果実内部を加害しないリンゴコカクモンハマキ及びハスモンヨトウを用いた。食害を受けたリンゴ幼果から 3-oxo-TA 及び pomaceic acid を含むトリテルペン類の画分を得て人工飼料に添加し、各種の中齢幼虫に与えたところ、ハスモンヨトウ及びリンゴコカクモンハマキに対して摂食阻害活性が認められた。また、精製した 3-oxo-TA と pomaceic acid をそれぞれ人工飼料に添加し、両種幼虫に与えたところ、ハスモンヨトウに対して 3-oxo-TA は摂食阻害活性を示したが、pomaceic acid は活性が認められなかった。リンゴコカクモンハマキに対しては、3-oxo-TA と pomaceic acid の両方に活性が認められなかったことから、トリテルペン類を含む画分で見られたリンゴコカクモンハマキに対する摂食阻害活性は、3-oxo-TA や pomaceic acid 以外の未同定のトリテルペンに由来するものであると考えられた。

一方、トリテルペン類を含む画分を添加した人工飼料をモモシクイガとナシヒメシクイに与えたところ、いずれに対しても摂食阻害活性が認められなかった。果実内部を加害するこれらの害虫種は、トリテルペン類によるリンゴ果実の防御反応に適応した結果、リンゴを餌資源として利用できるようになったと考えることができ、食性の異なる昆虫種に対するトリテルペン類の活性の差は、リンゴをとりまく各種昆虫の食性と果実の防御反応に対する適応進化の一端を示す結果と言える。

クロロゲン酸類についても *p*-CQA 及び CGA をそれぞれ人工飼料に添加し、各種害虫に与えて生理活性を検討した。*p*-CQA を添加した人工飼料を与えた場合、ハスモンヨトウ、リンゴコカクモンハマキ及びモモシクイガでは、対照の無添加人工飼料を与えた場合に比較して体重の増加率が低く、死亡に至る個体も認められた。CGA を添加した人工飼料を与えた場合、ナシヒメシクイに対する活性が認められたが、ハスモンヨトウ及びモモシクイガは正常に発育した。着果でのみ誘導される *p*-CQA のモモシクイガに対する活性は、リンゴの防御反応による幼虫の発育阻害が着果の状態でのみ認められる現象と合致し、本化合物がリンゴ果実の防御物質として関与していることを示唆するものである。

##### (3) 幼虫の食入密度と発育阻害程度

1 果当たり 1 個体が食入した果実における幼虫生存率は 58.2% (果実数 91 個、総食入数 91 個)

体、総脱出数 53 個体)であったのに対し、1 果当たり 10 個体以上が食入した果実における幼虫生存率は 18.1% (果実数 27 個、総食入数 436 個体、総脱出数 79 個体)と低く、食入密度の違いが幼虫の生存率に影響することが明らかとなった。果実内の幼虫密度は発育遅延程度にも影響し、1 果当たり 1 個体の幼虫が食入した果実では、ふ化幼虫の食入から老熟幼虫の脱出までの幼虫期間の中央値が 22 日であったのに対し、1 果当たり 10 個体以上の幼虫が食入した果実では、幼虫期間の中央値は 35 日と長かった。

リンゴの防御反応が起こらない摘果においては、着果で見られるような高密度条件下における顕著な生存率の低下や発育遅延は認められず、1 果当たりの接種卵数が 40 卵といった極めて高密度の条件下でも幼虫生存率は 50%を越え、発育遅延も 5 日程度にとどまる(川嶋, 2008)。このため、着果で見られた食入密度の高い条件における生存率の低下や発育遅延は、幼虫同士の干渉などによる悪影響ではなく、食入密度の違いが誘導防御反応を通じて、幼虫の発育に影響したと考えられる。これらの結果は、幼虫密度が高い果実において、二次代謝物が誘導された部位を幼虫が摂食する確率が高まり、防御反応の影響が強く現れるという仮説を支持するものである。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kazama Haruna, Oohata Yuuto, Takanashi Takuma, Tokoro Masahiko, Ishiguri Yoichi, Mori Naoki, Yoshinaga Naoko	4. 巻 45
2. 論文標題 Inhibitory substances contained in calcium carbonate wettable powder on the oviposition of the peach fruit moth, <i>Carposina sasakii</i>	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Pesticide Science	6. 最初と最後の頁 16～23
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1584/jpestics.D19-066	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 -

〔学会発表〕 計12件（うち招待講演 1件／うち国際学会 2件）

1. 発表者名 石栗陽一、大畑勇統、吉永直子、森直樹、戒能洋一
2. 発表標題 モモシクイガ幼虫の食入密度の違いとリンゴ果実の防御反応
3. 学会等名 第64回日本応用動物昆虫学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 大畑勇統、石栗陽一、森直樹、吉永直子
2. 発表標題 リンゴ果実における食害応答性物質とその生理活性
3. 学会等名 日本農薬学会第45回大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 大畑勇統、森田沙代、吉永直子、石栗陽一、森直樹
2. 発表標題 リンゴ果実における食害で誘導される二次代謝物の動態
3. 学会等名 日本農芸化学会2020年度大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 風間春奈、石栗陽一、細田奈麻絵、森直樹、吉永直子
2. 発表標題 炭酸カルシウム水和剤添加剤の害虫産卵抑制効果
3. 学会等名 日本農芸化学会関西・中部支部2019年度合同神戸大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 大畑 勇統, 森田 沙代, 吉永 直子, 石栗 陽一, 森 直樹
2. 発表標題 リンゴ果実における傷害応答性トリテルペン類の生理活性
3. 学会等名 日本農芸化学会2019年度大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 風間春奈, 石栗陽一, 森直樹, 吉永直子
2. 発表標題 炭酸カルシウム水和剤の対モモシンクイガ産卵抑制活性
3. 学会等名 第63回日本応用動物昆虫学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 石栗陽一
2. 発表標題 リンゴ果実の化学防御によるモモシンクイガ幼虫の発育遅延と生活史に及ぼす影響
3. 学会等名 日本昆虫学会第78回大会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名	Haruna Kazama, Takuma Takanashi, Masahiko Tokoro, Yoichi Ishiguri, Naoki Mori, Naoko Yoshinaga
2. 発表標題	Effect of inhibitory substances contained in calcium carbonate wettable powder on oviposition of peach fruit moth, <i>Carposina sasakii</i> (Lepidoptera: Carposinidae)
3. 学会等名	The joint meeting of the 33rd annual meeting of the ISCE and the 9th meeting of the APACE (国際学会)
4. 発表年	2017年

1. 発表者名	Yuuki Tetsumoto, Naoko Yoshinaga, Yoichi Ishiguri, Naoki Mori
2. 発表標題	Identification and investigation of compounds induced in apple by insect attack
3. 学会等名	The joint meeting of the 33rd annual meeting of the ISCE and the 9th meeting of the APACE (国際学会)
4. 発表年	2017年

1. 発表者名	風間春菜、高梨琢磨、所雅彦、石栗陽一、森直樹、吉永直子
2. 発表標題	モモシクイガ <i>Carposina sasakii</i> (Lepidoptera: Carposinidae) の産卵を阻害する炭酸カルシウム水和剤中の物質
3. 学会等名	第32回農薬デザイン研究会
4. 発表年	2017年

1. 発表者名	風間春菜、高梨琢磨、所雅彦、石栗陽一、森直樹、吉永直子
2. 発表標題	モモシクイガに対する炭酸カルシウム水和剤の産卵阻害活性
3. 学会等名	日本農芸化学会2018年度大会
4. 発表年	2018年

1. 発表者名 大畑勇統、森田沙代、吉永直子、石栗陽一、森直樹
2. 発表標題 リンゴの傷害応答性トリテルペン類縁体の経時変化
3. 学会等名 日本農芸化学会2018年度大会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 病害虫防除剤、病害虫の防除方法、及び、病害虫防除剤キット	発明者 江口美陽, 吉永直子, 風間春奈, 石栗陽一	権利者 物質・材料研究機構、京都大学、青森県産業
産業財産権の種類、番号 特許、2019-076936	出願年 2019年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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
研究分担者	吉永 直子  (YOSHINAGA Naoko)  (40456819)	京都大学・農学研究科・助教    (14301)	