

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 2 年 7 月 7 日現在

機関番号：21401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K07774

研究課題名(和文)植物の高機能化を志向した昆虫由来エリシターとその情報伝達系の物質的基盤

研究課題名(英文)Chemical identification of insect elicitors and their downstream signals toward enhancement of plant functions

研究代表者

野下 浩二 (Noge, Koji)

秋田県立大学・生物資源科学部・助教

研究者番号：40423008

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：植物は昆虫食害というストレスに対して、昆虫の摂食を忌避する物質の生産や天敵昆虫を誘引する物質の生産など様々な防御応答を示す。研究代表者が見出したマメコガネ食害によりオオイタドリ葉からアミノ酸由来のニトリルが生成する系は、昆虫食害によりアミノ酸が蓄積する点で、これまでの材料とは異なる目新しさがある。この系を用いて、植物の防御応答を活性する昆虫由来成分(エリシター)の解明と、アミノ酸に関連する植物の高機能化の可能性を検討した。エリシターは単離するには至らなかったが、マメコガネの糞にもエリシターが含まれること、また既知のリグニン蓄積とは別の要因で、植物の硬化がおこることを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

エリシターが失活しやすいなど、解決できなかった問題もあり、エリシターの単離には至らなかったが、タンパク質性と低分子性のエリシターを合わせ持つ例はこれまでなく、学術的には、引き続きエリシターの同定を進める価値があると考えられる。昆虫食害や雑草は、食料生産の観点から、その影響を抑える方向へと研究が進むことが一般的であるが、本研究のように昆虫食害や雑草を食と直結させようとする試みは、他にない特色のある研究になると期待していた。期間内に期待を上回る成果が得られたとは考えていないが、既知とは異なる仕組みで植物が硬くなるといった新しい可能性を見出すことができた点は、今後の発展につながる礎になると考える。

研究成果の概要(英文)：Plants show various defense responses against insect feeding, such as the production of substances that repel herbivores or attract natural enemies. The system, in which the amino acid-derived nitriles are produced from giant knotweed leaves by feeding of the Japanese beetle, found by our group, is different from the known materials in that amino acids accumulation occurs by insect feeding. Using this system, we elucidated the insect-derived component (elicitor) that activates the plant defense responses and explored the possibility of new plant functions associated with insect feeding-inducible amino acids. Although elicitor could not be isolated, it was found that the faeces of the Japanese beetle also contained elicitor, and that plant hardening occurred due to a factor other than the known lignin accumulation.

研究分野：生物有機化学、化学生態学

キーワード：情報分子 植物ホルモン ジャスモン酸 エリシター オオイタドリ アミノ酸

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

植物は昆虫食害というストレスに対して、昆虫の摂食を忌避する物質の生産や天敵昆虫を誘引する物質の生産など様々な防御応答を示す。研究代表者は、マメコガネの食害を受けたオオイタドリが、フェニルアラニン由来のフェニルアセトニトリルやテルペンの1種であるオシメンなど揮発成分を生産・放出することを見出した。これら揮発成分の生産・放出は、マメコガネ由来の化学成分(エリシター)により誘導されると考えられる。マメコガネ食害による揮発成分の生成は、植物ホルモン活性を有するジャスモン酸メチルを処理することでも再現されることがわかっていたが、ジャスモン酸メチルには植物を老化させる働きもある。そのため、エリシターを探索し、その働きを解明することで、植物の老化させることなく、植物の防御応答だけを引き起こす方法を見出すことができると考えた。このようなエリシターが解明されれば、長い年月を要とする品種改良を経ることなく、外から植物の機能をコントロールできるようになると期待できる。

一方、植物でのニトリルの生合成については、ここ数年の間にドイツの研究グループや我々の成果により、アミノ酸からアルドキシムを経てニトリルが生成すること、その生合成遺伝子が明らかになってきている。マメコガネに食害されたオオイタドリ葉では、フェニルアラニン由来と考えられるフェネチルアミンも蓄積するが、同じフェニルアラニンの代謝物として、このアミンとニトリルの生合成上の関係は定かではなかった。

また、マメコガネ食害やジャスモン酸メチル処理したオオイタドリ葉で、ニトリルの生成に先立ち、その原料となるフェニルアラニンだけでなく、ロイシンやトリプトファンなど複数のアミノ酸が蓄積することがわかっていた。この現象の詳細を解明することや、アミノ酸代謝物の動態解析を通して、必須アミノ酸を高濃度に含む植物を作り出すことや、新たに植物の機能性を向上させる手掛かりをつかむことができると考えた。秋田県など国内の一部の地域では、オオイタドリの近縁種であるイタドリの新芽を食材として利用することもあるが、一般的にオオイタドリは雑草として扱われる。昆虫食害や雑草は、食料生産の観点からすると、なるべくその影響を抑える方向へと研究が進むことが一般的であるが、昆虫食害や雑草を食へと直結させることができれば、他にない特色のある研究になると期待した。

2. 研究の目的

上記の背景をもとに、まず、オオイタドリとマメコガネを材料に、揮発成分の放出を指標として、マメコガネからエリシターの単離・同定を試み、その機能解明を目的とした。マメコガネを飼育していると、大量の糞が出てくる。研究を始める段階で、エリシター活性がマメコガネ腸管に存在することがわかっていたため、糞にもエリシター活性を有する成分が含まれると予想し、糞のエリシター活性も調べることにした。

次に、マメコガネ食害により生成・放出されるニトリルの生合成経路の全容解明を目的に、フェネチルアミンとフェニルアセトニトリルの生合成上の関係を重水素標識を用いて調べた。

また、マメコガネに食害されたオオイタドリ葉にアミノ酸が蓄積することから、新規の植物の機能性の探索を目的に、アミノ酸ないしはアミノ酸誘導体の動態解析を行った。

3. 研究の方法

まず、マメコガネ腸管から得た抽出物をゲル濾過により分子サイズをもとに分画した。分画して得られた液に、直径1cmにくり抜いたオオイタドリ葉を浸し、揮発成分が放出される量をエリシター活性の指標とした。タンパク質性のエリシターと低分子性のエリシターの2種類が存在することから、前者は硫安分画などさらに分画を行い、後者についてはイオン交換クロマトグラフィーでさらに分画を行った。また、腸管以外にエリシター活性を有するものが存在かを調べるために、マメコガネの糞のエリシター活性も同様の手法により調べた。

次に、フェネチルアミンとフェニルアセトニトリルの生合成上の関係を調べるために、重水素標識したフェネチルアミンをオオイタドリ葉に吸わせ、ジャスモン酸メチルでニトリル生合成系を活性化することで、重水素標識がニトリルに取り込まれるかをGC/MSを用いて調べた。

マメコガネ食害やジャスモン酸メチル処理によりオオイタドリ葉中でアミノ酸が蓄積するため、アミノ酸ないしはアミノ酸誘導体の動態を調べるとともに、植物体の物性の変化を評価した。

4. 研究成果

(1) マメコガネ由来のエリシター

エリシター活性を有するタンパク質画分については、硫安分画で分けたところ、60~80%に活性が局在することはわかった。粗抽出液に含まれる大半のタンパク質は0~60%画分に分かれるため、硫安分画を精製の初期段階に行うことで、精製度を上げることができるとわかったが、硫安を加えることで、目的とするタンパク質が失活しやすくなることがわかり、目的のタンパク質を単離するには至らなかった。

エリシター活性を有するもうひとつの低分子画分については、イオン交換クロマトグラフィーにより分画し、塩基性画分に活性成分が含まれることがわかった。この塩基性画分を分析したところ、プロリンやフェニルアラニン、チロシン、ヒスチジンなど複数のアミノ酸が検出された。これらアミノ酸は活性がない酸性画分からも検出されたため、目的とするエリシターではないと判断した。一方、酸性画分には含まれず、塩基性画分のみ存在する成分がひとつ検出された。

この成分をエリシターの候補としてさらに精製を進め、その構造決定を進めている。

マメコガネの糞を抽出し、腸管から得た分画液のアッセイ方法と同様に、オオイタドリ葉に処理したところ、揮発成分の生産・放出が確認され、糞にもエリシター活性があることがわかった。また、煮沸したマメコガネ糞抽出液にも活性が認められ、マメコガネ糞に含まれるエリシターは熱に耐性を持つことがわかった。腸管抽出物を煮沸すると、エリシター活性は大幅に低下するため、糞には腸管に含まれるタンパク質性のエリシターではなく、低分子性のエリシターが含まれることが示唆された。

(2) アミンとニトリルの生合成上での関係

フェネチルアミンがフェニルアセトニトリルへと変換されるのであれば、フェネチルアミンに由来する重水素がニトリルに取り込まれると予想される。しかしながら、フェネチルアミン由来の重水素はニトリルに取り込まれることは確認されなかった。したがって、オオイタドリにおけるニトリル生合成経路は、これまで提唱されている通り、アミノ酸からアルドキシムを経る経路だけであり、アミノ酸からフェネチルアミンが生成する経路は、ニトリル生合成経路とは独立したものであることがわかった。

(3) 昆虫食害を出発点とした植物の高機能化の可能性

オオイタドリ葉中で増加するアミノ酸に関わる機能として、ジャスモン酸メチル処理により、植物が硬くなることに着目した。この実験では、オオイタドリ葉ではなく、観察が容易なソバヤカイワレダイコンのスプラウトを用いた。一般に、ジャスモン酸メチル処理を行うと、リグニンが蓄積し、植物が硬くなることが知られるが、カイワレダイコンで不溶性繊維量を定量したところ、ジャスモン酸メチル処理の前後で有意な差は認められなかった。したがって、リグニンの蓄積とは別の要因で植物が硬くなることが示唆された。

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 0件）

1. 著者名 石原亨, 野下浩二, 謝肖男	4. 巻 58
2. 論文標題 農芸化学の中での化学生態学研究 - その発展と展望 - 4. 植物の化学防御: 異種間のせめぎ合い	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 化学と生物	6. 最初と最後の頁 46-53
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1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Noge, K., Tamogami, S.
2. 発表標題 Volatiles from the giant knotweed, <i>Fallopia sachalinensis</i> , induced by the Japanese beetle, <i>Popillia japonica</i> , attract conspecific females
3. 学会等名 The Joint Meeting of the 33rd Annual Meeting of the International Society of Chemical Ecology and the 9th Meeting of the Asia-Pacific Association of Chemical Ecologist (国際学会)
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