

令和 4 年 5 月 31 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K05558

研究課題名(和文)植物細胞壁損傷の感知による植食性昆虫食害の認識機構

研究課題名(英文)Sensing of herbivores by damaged-cell wall recognition in plants

研究代表者

新屋 友規(Shinya, Tomonori)

岡山大学・資源植物科学研究所・准教授

研究者番号：80514207

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：植物の植食性昆虫認識において、食害部位に残置される昆虫の吐き戻し液に含まれる分子が重要な役割を果たすことが知られている。本研究では、イネを食害するクサンロキヨトウの吐き戻し液の解析により、イネの食害認識に関わり防御応答を活性化する植物細胞壁由来の糖鎖を同定した。さらに当該糖鎖の産生機構の解析したところ、当該糖鎖の産生に関わる細胞壁分解酵素がクサンロキヨトウ腸内細菌に由来する可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

植物の植食性昆虫食害認識に関わるリガンド分子の報告が限られているなか、植物細胞壁を由来とする新規リガンド分子を同定するとともに、食害時の細胞壁損傷の分子機構の一端を明らかにした。このような植物の昆虫食害認識機構を明らかにしていくことは、環境中の植物-昆虫間相互作用の分子レベルでの理解に寄与するだけでなく、新しい植物保護アプローチを考える手掛かりとなることも期待される。

研究成果の概要(英文)：Molecules in insect oral secretions, which are deposited at the feeding area on plant leaves, play an important role in the recognition of herbivores by plants. In this study, we identified a plant cell wall derived-saccharide in the oral secretion of rice armyworm (*Mythimna loreyi*) larvae. The saccharide triggered an array of defense responses in rice-cultured cells. Further analysis implied that the cell wall degrading enzymes involved in the saccharide release is derived from the gut microbes of *M. loreyi* larvae.

研究分野：農学

キーワード：植物-昆虫間相互作用 植物免疫 細胞壁 イネ 植食性昆虫 腸内細菌

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

植物は外敵となる植食性昆虫や植物病原菌に対する様々な防御機構を有している。これらの防御機構を活性化し、外敵に対して抵抗性を示す上で、外敵による攻撃の認識は重要なステップとなる。植物免疫活性化において、外敵固有の分子や外敵攻撃時に特異的に産生する植物内性の分子は、外敵認識における重要な役割を担うことが知られており、これらの分子をデンジャーシグナルと呼んでいる (Gust et al., 2017)。本研究で注目する植物の植食性昆虫認識においては、食害時の傷害に加え、食害部位に存在するデンジャーシグナルが重要であると考えられていた (Duran-Flores and Heil, 2016)。しかしながら、植食性昆虫認識に関わるデンジャーシグナルの同定例は、微生物認識系と比べて限られていた。また、病原菌と異なり、移動しながら食害することが出来る植食性昆虫に対して、植物がどのような分子を感知する認識系を獲得してきたのか、植物-昆虫間相互作用を含む植物免疫分野で興味深い課題となっていた。

2. 研究の目的

植物の植食性昆虫認識において、食害部位に残置される昆虫の吐き戻し液に含まれる分子が重要な役割を果たすことが知られている。これまでの研究で、イネを食害するクサシロキヨトウの吐き戻し液の解析から、複数のデンジャーシグナルが吐き戻し液に含まれていることを明らかにしてきた (Shinya et al., 2016)。主要な活性画分には細胞壁分解物と推定される糖鎖が多く含まれており、細胞壁分解産物がデンジャーシグナルとして機能する可能性を見出した。そこで本研究では、クサシロキヨトウの吐き戻し液に含まれるデンジャーシグナル糖鎖を同定するとともに、食害時のデンジャーシグナル糖鎖産生機構にせまることを目的とした。本研究による吐き戻し液中の糖鎖デンジャーシグナルの解析を通して、植物細胞壁分解物を介した植食性昆虫認識機構の実像に分子レベルで迫ることを目指す。

3. 研究の方法

(1) クサシロキヨトウ吐き戻し液中のデンジャーシグナル糖鎖の同定

クサシロキヨトウ吐き戻し液の糖組成解析より、候補となる細胞壁由来糖鎖を絞り込んだ。候補となる細胞壁糖鎖をイネ培養細胞に処理し、実際に防御応答を誘導するエリシター活性を有するかどうか解析を行った。応答解析はイネにおける食害応答性の二次代謝物であるフェノールアミドに注目して行った。エリシター活性が認められた糖鎖を特異的に加水分解する酵素に注目し、クサシロキヨトウ吐き戻し液に処理し、吐き戻し液のエリシター活性への影響が認められるかどうか確認をした。

(2) デンジャーシグナル糖鎖により誘導される防御応答の解析

同定したデンジャーシグナル糖鎖のさらなる応答解析として、一連の防御応答(防御関連遺伝子発現誘導、MAPキナーゼ活性化、植物ホルモン応答)を行った。また、食害応答に関わる他のデンジャーシグナルと同時処理時の応答解析を行った。デンジャーシグナルとしてクサシロキヨトウ食害認識に関わる植物内生ペプチド OsPEP3 を用いた (Shinya et al., 2018)。一方で、エリシター同定実験の際に指標としたフェノールアミド誘導を制御する細胞内シグナル伝達機構の解析として、植物ホルモンの一種であるジャスモン酸やその前駆体である OPDA に注目して行った。

(3) 食害にともなうデンジャーシグナル糖鎖産生機構の解析

食害時のデンジャーシグナル糖鎖の産生機構の理解にむけて、クサシロキヨトウ吐き戻し液中に当該糖鎖を遊離する細胞壁分解酵素が存在するかどうかを解析した。クサシロキヨトウ吐き戻し液の酵素画分を硫酸沈殿により回収し、酵素反応の基質としてデンジャーシグナル糖鎖の由来となる多糖分子を用いて酵素活性を測定した。酵素活性の評価は、反応後の糖鎖還元末端の定量を行うと同時に、実際にエリシター活性を有するオリゴ糖が産出されるかどうか、HPLC 分析によるオリゴ糖を検出により行った。さらに、デンジャーシグナル糖鎖の産生に関わる酵素の由来としてクサシロキヨトウの腸内細菌に注目した。クサシロキヨトウの腸管液を回収し、デンジャーシグナル糖鎖の由来となる多糖分子を炭素源とした寒天培地に塗布し、腸内細菌を培養した。さらにクサシロキヨトウ腸内細菌を単離し、得られた腸内細菌がデンジャーシグナル糖鎖を産生する可能性を調べた。また、クサシロキヨトウの腸管液を用いた菌叢解析をあわせて行った。

4. 研究成果

(1) クサシロキヨトウ吐き戻し液中のデンジャーシグナル糖鎖の同定

クサシロキヨトウ吐き戻し液の糖組成の解析より、イネの細胞壁組成と比較して存在比が増加

していると推定された細胞壁糖鎖に注目し、調製した可溶性多糖やオリゴ糖のエリシター活性を測定した。その結果、1種のオリゴ糖に顕著なエリシター活性が認められた(図1)。当該オリゴ糖を産生可能なエンド型の糖加水分解酵素を入手し、吐き戻し液や当該オリゴ糖に処理したところ、エリシター活性に変化が認められた。共同研究により当該オリゴ糖を化学合成し、イネ培養細胞に処理し、防御応答を解析したところ、エリシター活性が認められた。以上の結果より、クサシロキヨトウ吐き戻し液に存在する植物細胞壁由来のデンジャーシグナル糖鎖を同定したと考えた。

(2) デンジャーシグナル糖鎖により誘導される防御応答の解析

同定したデンジャーシグナル糖鎖により誘導されるイネの防御応答解析を行った。その結果、イネ培養細胞において、フェノールアミドの蓄積に加え、複数の防御応答関連遺伝子の発現誘導が確認された。また、防御応答を制御する細胞内シグナル伝達系として、MAPキナーゼ活性化やジャスモン酸イソロイシンの蓄積誘導が認められた。実際の食害認識において、植物は複数のデンジャーシグナルを認識し、防御応答を誘導することが想定される。そこで、クサシロキヨトウ食害に関わるデンジャーシグナルとして以前に同定していた OsPep3 (Shinya et al., 2018) に注目し、本オリゴ糖と同時にイネ培養細胞に処理したところ、相加/相乗的に防御応答を活性化することを明らかにした。

一方で、イネの食害応答の一つであるフェノールアミド蓄積の制御機構の解析として植物ホルモンの関与を解析した。変異体を用いた解析から、ジャスモン酸経路がフェノールアミド蓄積制御に関与することが明らかになった。さらに、防御反応誘導能が知られているジャスモン酸やジャスモン酸イソロイシンをイネ培養細胞に処理したところ、フェノールアミド誘導が認められなかったのに対して、ジャスモン酸前駆体である OPDA はフェノールアミドを誘導した (Shinya et al., in press)。これらの結果からイネにおける OPDA を介した、ジャスモン酸非依存的な防御応答制御機構の一端が明らかになった。

(3) 食害にともなうデンジャーシグナル糖鎖産生機構の解析

同定したデンジャーシグナル糖鎖の産生分子機構を明らかにするため、クサシロキヨトウ吐き戻し液中の細胞壁分解酵素の評価を行った。その結果、注目したオリゴ糖分子を細胞壁糖鎖から産生するうえで重要と考えられるエンド型の糖加水分解酵素が吐き戻し液に存在することを示した。この酵素がクサシロキヨトウの腸内に存在する細菌が産生していると考え、クサシロキヨトウ腸内細菌の単離・同定および菌叢解析を行った。その結果、当該酵素遺伝子を有している複数の腸内細菌が存在することが明らかになった。これらの結果より、イネを食餌したクサシロキヨトウの腸内において、腸内細菌が産生する細胞壁分解酵素がイネ細胞壁よりデンジャーシグナルとなるオリゴ糖を産生し、このオリゴ糖が吐き戻し液に混在することで、クサシロキヨトウ食害時のイネの害虫認識や防御応答誘導に影響することが示唆された(図2)。

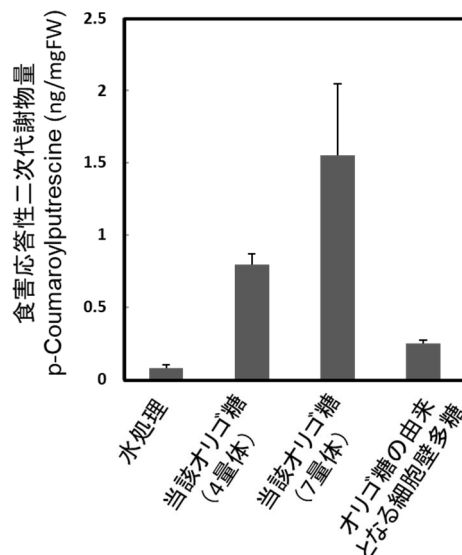


図1. 細胞壁由来オリゴ糖によるイネの防御応答の解析

イネ培養細胞にオリゴ糖またはオリゴ糖の由来となる細胞壁多糖を処理し、食害応答性のフェノールアミドの1種である p-Coumaroylputrescine の蓄積誘導を測定した。

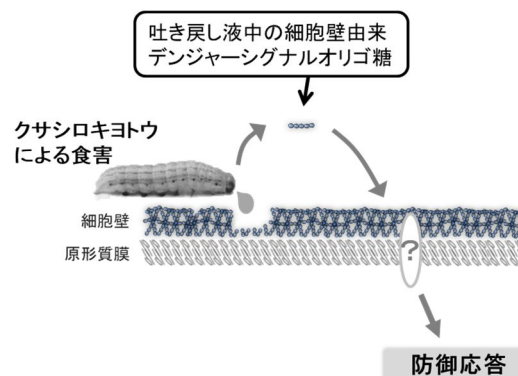


図2. 食害時に生じる細胞壁断片を介した植食性昆虫認識機構

吐き戻し液に含まれる細胞壁由来デンジャーシグナルオリゴ糖が植物の細胞表面の受容体で認識され、一連の防御応答が誘導されると考えられた。細胞壁からのデンジャーシグナルオリゴ糖産生には、腸内細菌由来の糖加水分解酵素の関与が示唆された。

< 引用文献 >

Duran-Flores D, Heil M. Sources of specificity in plant damaged-self recognition. *Curr Opin Plant Biol.* 2016 32:77-87.

Gust AA, Pruitt R, Nürnberger T. Sensing danger: Key to activating plant immunity. *Trends Plant Sci.* 2017 22:779-791.

Shinya T, Hojo Y, Desaki Y, Christeller JT, 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.* 2016 6:32537.

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 herbivore-associated molecular pattern signaling amplifies anti-herbivore defense responses in rice. *Plant J.* 2018 94:626-637.

Shinya T, Miyamoto K, Uchida K, Hojo Y, Yumoto E, Okada K, Yamane H, Galis I. Chitooligosaccharide elicitor and oxylipins synergistically elevate phytoalexin production in rice. *Plant Mol Biol.* in press.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計16件（うち査読付論文 15件／うち国際共著 6件／うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Andama Joackin B., Mujiono Kadis, Hojo Yuko, Shinya Tomonori, Galis Ivan	4. 巻 43
2. 論文標題 Nonglandular silicified trichomes are essential for rice defense against chewing herbivores	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Plant, Cell & Environment	6. 最初と最後の頁 2019 ~ 2032
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/pce.13775	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 該当する
1. 著者名 Mujiono Kadis, Tohi Tilisa, Sobhy Islam S, Hojo Yuko, Ho Nhan Thanh, Shinya Tomonori, Galis Ivan	4. 巻 71
2. 論文標題 Ethylene functions as a suppressor of volatile production in rice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Experimental Botany	6. 最初と最後の頁 6491 ~ 6511
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jxb/eraa341	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 該当する
1. 著者名 Shinya T., Shibuya N., Kaku H.	4. 巻 2132
2. 論文標題 Affinity Labeling and purification of plant chitin-binding LysM-receptor with chitin octasaccharide derivatives, Lectin Purification and Analysis, Springer Nature, edited by Jun Hirabayashi	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Method Mol Biol	6. 最初と最後の頁 401-412
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/978-1-0716-0430-4_39	査読の有無 無
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 -
1. 著者名 Shinya Tomonori, Yasuda Shigetaka, Hyodo Kiwamu, Tani Rena, Hojo Yuko, Fujiwara Yuka, Hiruma Kei, Ishizaki Takuma, Fujita Yasunari, Saijo Yusuke, Galis Ivan	4. 巻 94
2. 論文標題 Integration of danger peptide signals with herbivore-associated molecular pattern signaling amplifies anti-herbivore defense responses in rice	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 The Plant Journal	6. 最初と最後の頁 626 ~ 637
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/tpj.13883	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 -

1. 著者名 Mujiono Kadis, Tohi Tilisa, Sobhy Islam S., Hojo Yuko, Shinya Tomonori, Galis Ivan	4. 巻 44
2. 論文標題 Herbivore induced and constitutive volatiles are controlled by different oxylipin dependent mechanisms in rice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Plant, Cell & Environment	6. 最初と最後の頁 2687-2699
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/pce.14126	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 該当する

1. 著者名 Shinya Tomonori, Miyamoto Koji, Uchida Kenichi, Hojo Yuko, Yumoto Emi, Okada Kazunori, Yamane Hisakazu, Galis Ivan	4. 巻 -
2. 論文標題 Chitooligosaccharide elicitor and oxylipins synergistically elevate phytoalexin production in rice	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Plant Molecular Biology	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) 10.1007/s11103-021-01217-w	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 4件 / うち国際学会 4件)

1. 発表者名 新屋友規
2. 発表標題 植物の昆虫食害認識機構から探る耐虫性作物作成への展望
3. 学会等名 日本農芸化学会中四国支部 支部創立20周年記念 第33回 若手研究者シンポジウム「農芸化学応用研究の新潮流」(招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 新屋友規・小竹敬久・Galis Ivan
2. 発表標題 植物の自己損傷感知による昆虫食害認識機構
3. 学会等名 日本農薬学会第47回大会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 新屋友規
2. 発表標題 植物はどのような分子を認識することで昆虫食害を感知するのか？
3. 学会等名 おやまバイオアクティブ研究会 第56回シンポジウム(招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Shinya, T.
2. 発表標題 Sensing of herbivores by plants - self damage and insect elicitors
3. 学会等名 35th IPSR International Symposium and 11th Symposium on Plant Stress Science (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 新屋友規・藤原由佳・兵頭究・吉見圭永・原克弥・円谷陽一・小竹敬久・Gal is Ivan
2. 発表標題 イネの植食性昆虫認識に関わる細胞壁由来エリシターの解析
3. 学会等名 第60回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

岡山大学 資源植物科学研究所/大学院環境生命科学研究所 植物-昆虫間相互作用グループ
<http://www.rib.okayama-u.ac.jp/PII/>

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	小竹 敬久 (Kotake Toshihisa) (20334146)	埼玉大学・理工学研究科・教授 (12401)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関