

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 3 年 4 月 6 日現在

機関番号：11501

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K14397

研究課題名(和文) アミンを介したイネの食害応答の解明

研究課題名(英文) Amine-mediated regulation of responses to herbivory in rice

研究代表者

網干 貴子 (Aboshi, Takako)

山形大学・農学部・准教授

研究者番号：20746705

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：昆虫に食害されたイネでは、イソペンチルアミンが増加することを見出した。イソペンチルアミンを吸収させたイネをトビイロウンカに与えたところ、3日以降の生存率が低下したため、本化合物は、吸汁性昆虫の生存率を低下させ、防御物質として働いている可能性がある。また、ジャスモン酸経路が欠損したイネの変異体を用いて、イソペンチルアミンがジャスモン酸経路の活性化により誘導されることを明らかにした。日本晴とカサラスの染色体断片置換系統などを用いた実験から、10番染色体に生合成に関与する遺伝子が存在することが分かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

植物は昆虫に食害されると、体内で防御反応を起こし、被害の増大を抑えることが知られている。しかしながら、植物体内には多様な代謝物が存在し、構造未知の化合物も多く存在するため、防御反応の分子メカニズムは不明な点が多い。本研究では、昆虫に食害されたイネから、初めてイソペンチルアミンが誘導されることを見出し、防御物質として働いていることが示唆された。今後、生合成に関与する遺伝子の同定を進めることで、害虫抵抗性の品種開発に寄与する可能性がある。

研究成果の概要(英文)：We identified isopentylamine as a novel type of herbivory induced compound in rice leaves, which was derived from the amino acid leucine in stable isotope labelling experiments. Accumulation of isopentylamine increased during herbivory by *Nilaparvata lugens* and *Mythimna loreyi*, as well as in response to treatment with the plant hormone, jasmonic acid. Likewise, isopentylamine accumulation was compromised in rice jasmonate biosynthesis mutants, *hebiba* and *Osjar1*. In bio assays, BPH insects feeding on rice seedlings submerged in 50mg/L isopentylamine solution had a higher mortality compared with BPH feeding on seedlings submerged in water. Notably, the rice leaves submerged in 50mg/L solution showed the endogenous concentrations of isopentylamine similar to that induced by BPHs. These results suggest that isopentylamine functions as a new type of plant defence metabolite that is rapidly induced by herbivore attack and deters insect herbivores in rice.

研究分野：生物有機化学

キーワード：イネ イソペンチルアミン 日本晴 誘導性防御 ジャスモン酸

1. 研究開始当初の背景

植物と植食性昆虫は「食べる 食べられる」の関係にある。この競争関係の過程で、植物は植食性昆虫に対する多様な防御機構を進化させてきた。植物が持つ多様な防御機構を解明し、抵抗性の高い品種の開発や害虫制御の新たな手法を開発することが、省資源型農業の実現のために重要である。最近では、ストレス処理を与えた植物における遺伝子や代謝物の変化の網羅的解析が進められており、多くの遺伝子や代謝物の動きが明らかとなりつつあるが、一方で、構造未知の代謝物も多く、遺伝子の下流にある分子メカニズムは未だ不明な点が多い。

イネでは、植食性昆虫に対する防御物質として oryzacystatin などのプロテアーゼインヒビターが知られている。また、食害により誘導され、トビイロウンカの致死率を増加させる物質としてフェノール性アミドが報告されたが、その他の化合物の昆虫に対する直接的影響は判然としない。植食性昆虫に対するイネの防御機構の分子メカニズムの解明は、継続的に取り組むべき重要な課題である。

2. 研究の目的

申請者は、イネ葉から鱗翅目幼虫の食害に対して大きく誘導される化合物としてイソペンチルアミンを新たに同定した。本化合物は、健全なイネからはほとんど検出されないためか、生合成経路や誘導を制御するメカニズムは全く不明である。植物では非生物学的ストレス耐性に、プトレシン、スペルミジン、スペルミンなどのポリアミンやポリアミンの代謝により生成する H₂O₂ が関与することが示されている。イネの食害応答においてもアミンが関与していると期待されるが、近年のイネの防御代謝物の研究はファイトアレキシンが中心であり、シンプルな構造にも関わらず、アミンの研究はほとんど行われていない。そこで本研究では、イネの食害応答におけるイソペンチルアミンの生合成経路、制御機構、機能の解明を行う。

3. 研究の方法

(1) 植物代謝物の分析

イネは日本晴を用い、代謝物の分析は LC/MS を用いて行った。イソペンチルアミンを含むアミンやアミノ酸の分析は、6-aminoquinolyl-*N*-hydroxysuccinimidylcarbamate によるアミノ基の誘導体化処理後に行った。

(2) 生合成遺伝子の推定

安定同位体標識化合物をイネ幼苗に注射し、イソペンチルアミンに取り込まれるかを LC/MS で調べた。また、日本晴とカサラスの染色体断片置換系統 (CSSL) と組換え自殖系統 (RIL) を用いて、イソペンチルアミンの蓄積量を測定し、QTL 解析により生合成遺伝子が存在する染色体領域を推定した。

(3) 昆虫に対する影響の評価

イネ幼苗の茎を切断し、切断部をイソペンチルアミン水溶液に浸けて吸わせた。これをトビイロウンカ (*Nilaparvata lugens*) やクサシロキョトウ (*Mythimna loreyi*) に与え、数日間観察した。

4. 研究成果

(1) イネ幼苗におけるイソペンチルアミンの誘導

イネにおけるイソペンチルアミンの誘導は、鱗翅目昆虫の幼虫の食害以外にも起きるのかを調べた。トビイロウンカに数日間吸汁させたイネ葉を分析したところ、吸汁させていないイネよりもイソペンチルアミンの蓄積量が有意に増加した (図1)。イソペンチルアミンは、アワヨトウやクサシロキョトウなどの咀嚼性昆虫だけでなく、吸汁性昆虫によっても蓄積が誘導されることが明らかとなった。また、イネ幼苗の葉にハサミで切込みを入れ、24 時間後に傷害葉を分析すると、イソペンチルアミンが増加した。切込みを入れた同じ個体の非傷害葉ではイソペンチルアミンの有意な増加は確認されず、本化合物の誘導は全身応答ではなく、傷害部付近における局所的な反応であることが判明

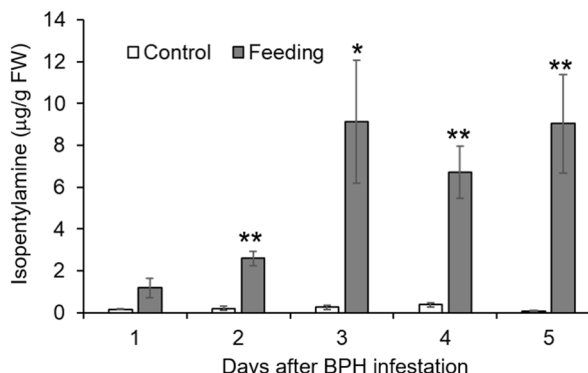


図1 トビイロウンカの吸汁によるイソペンチルアミンの誘導 (n=5, mean±/sem). Student's *t*-test **p*<0.05, ***p*<0.01.

した。

(2) ジャスモン酸によるイソペンチルアミンの誘導

イネ幼苗にジャスモン酸を噴霧し、3 時間おきにイネ葉に含まれるイソペンチルアミン量を測定した。噴霧して3, 6 時間後はほとんど増加しないが、9, 12 時間後から増加が確認され、15 時間後以降に大きく増加した。本化合物はジャスモン酸処理から増加までに半日程度を要することが明らかとなった。また、ジャスモン酸以外の植物ホルモンの影響を調べるために、アブシジン酸、1-アミノシクロプロパン-1-カルボン酸、サリチル酸の 1 mM 水溶液をイネ幼苗に噴霧し、24 時間後のイソペンチルアミンを定量した。いずれにおいても、イソペンチルアミンの増加は確認されなかった。ジャスモン酸は傷害時に増加する植物ホルモンであることから、イネ葉では傷害によりジャスモン酸の増加を経て、イソペンチルアミンが増加すると考えられた。そこで、ジャスモン酸経路欠損変異体の *hebiba* と *jar1* に、クサシロキヨトウによる食害処理や吐き出し液の塗布を行うと、イソペンチルアミンの誘導量が減少したことから、イソペンチルアミンの蓄積はジャスモン酸経路の活性化により誘導されることが明らかとなった。

(3) イソペンチルアミン生合成に関する遺伝子の探索

イネ幼苗に[1,2-¹³C]ロイシンを注射し、1 mM ジャスモン酸水溶液を噴霧して、24 時間後に葉を分析した。イソペンチルアミンは誘導体化により *m/z* 258 のイオンで検出されるが、¹³C 標識ロイシンを注射したイネでは *m/z* 258 に対する 259 の相対強度が有意に増加した(図2)。 *m/z* 259 はアミノ基に隣接する炭素が ¹³C で標識されたイソペンチルアミンに相当すると考えられる。また、イネ葉を酢酸ナトリウムバッファー中で破碎し、これにロイシンとピリドキサルリン酸を加えて 2 時間室温で静置したところ、ロイシン無添加のコントロール区と比較して有意にイソペンチルアミンの増加を確認した。したがって、イネではロイシンの脱炭酸反応によりイソペンチルアミンが生じると示された。

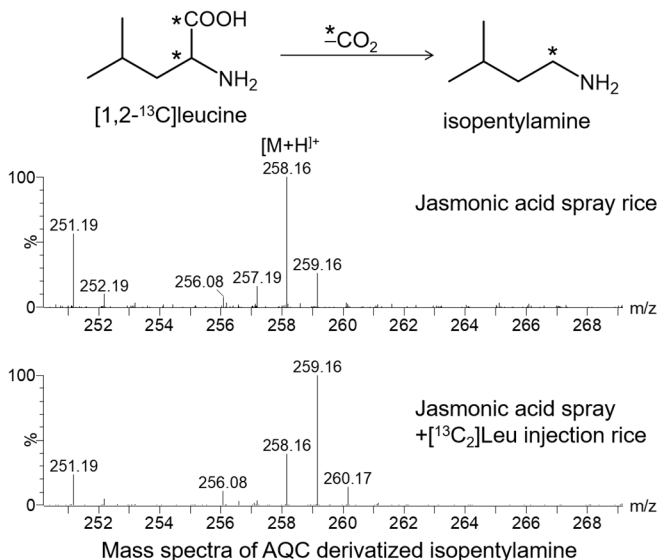


図2 イネにおける ¹³C 標識ロイシンのイソペンチルアミンへの取り込みを示すマススペクトル

イソペンチルアミンは、日本晴

ではジャスモン酸により誘導されるが、インディカ米のカサラスからは検出されない。日本晴とカサラスの CSSL や RIL を用いた実験から、10 番染色体に生合成に関する遺伝子が存在することが分かった。このうち、MSU Rice Annotation Project と RAP DB のアノテーションやジャスモン酸処理後の発現パターンなどから生合成遺伝子候補を絞り込んだ。この生合成遺伝子候補をクローニングし、大腸菌での異種発現を行ったが、発現したタンパク質が不溶化したため、機能解析することはできなかった。今後、ゲノム編集などにより、候補遺伝子の機能解析を行う必要がある。

(4) イソペンチルアミンが昆虫の生育に与える影響

イネ幼苗の茎を切断し、切断面をイソペンチルアミン溶液に浸けると、イネの葉のイソペンチ

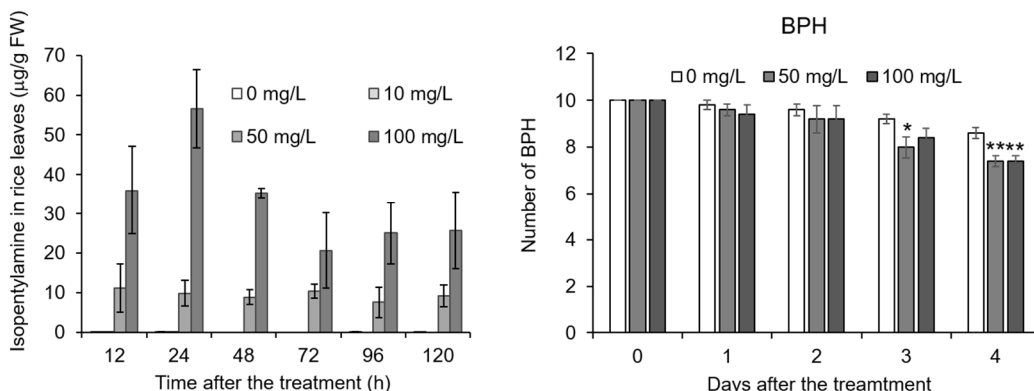


図3 イネ茎から葉へのイソペンチルアミンの吸収(左)と、イソペンチルアミンを吸収させたイネを与えたトビイロウンカの生存率(右)。

ルアミン量が増加する（図3左）。この方法によりイソペンチルアミンを吸収させたイネをトビイロウンカに与えたところ、実験開始3日目以降の生存率が低下した（図3右）。一方、クサシロキヨトウにイソペンチルアミンを添加したイネを与えても、通常のイネを与えた場合に比べて幼虫の成長や生存率の変化は確認されなかった。したがって、イネ葉におけるイソペンチミンの増加は、吸汁性昆虫の生存率を低下させ、防御物質として働いている可能性がある。

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 0件）

1. 著者名 Aboshi Takako, Iitsuka Chiaki, Galis Ivan, Teraishi Masayoshi, Kamo Marina, Nishimura Ayami, Ishihara Atsushi, Mori Naoki, Murayama Tetsuya	4. 巻 44
2. 論文標題 Isopentylamine is a novel defence compound induced by insect feeding in rice	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Plant, Cell & Environment	6. 最初と最後の頁 247 ~ 256
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/pce.13902	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5件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 網干貴子、一刀臯平、Galis Ivan、新屋友規、村山哲也
2. 発表標題 アミンを介したイネ科植物の食害応答の解析
3. 学会等名 日本農薬学会45回大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 網干貴子、飯塚 千晶、寺石 政義、森 直樹、村山 哲也
2. 発表標題 イネにおけるイソペンチルアミンの生合成
3. 学会等名 日本農薬学会第43回大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Takako Aboshi, Chiaki Iitsuka, Masayoshi Teraishi, Yutaka Okumoto, Naoki Mori, Tetsuya Murayama
2. 発表標題 Amine accumulation in rice leaves is induced by insect feeding
3. 学会等名 Plant Biology 2018（国際学会）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 飯塚 千晶、村山 哲也、網干 貴子
2. 発表標題 昆虫食害によるイネ葉のアミンとアミノ酸の変化
3. 学会等名 日本農芸化学会東北支部第153回大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 飯塚 千晶、寺石 政義、森 直樹、村山 哲也、網干 貴子
2. 発表標題 昆虫吐出し液がイネのイソペンチルアミン蓄積に与える影響
3. 学会等名 日本農芸化学会2019年度大会
4. 発表年 2018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

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