

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月31日現在

機関番号:14301

研究種目:基盤研究(S)

研究期間:2007~2011

課題番号:19101009

研究課題名(和文) 植物の間接防衛の誘導機構解明と防除への応用

研究課題名(英文) Induced indirect defense of plants against herbivores and its application in pest control

研究代表者

高林 純示(TAKABAYASHI JUNJI)

京都大学・生態学研究センター・教授

研究者番号:10197197

研究成果の概要(和文):本研究では(1)植物の香りの生合成経路であるフィトオキシリピン経路の間接防衛に果たす役割の全体像の解明とその応用の研究から、みどりの香りの生態機能に関する多くの新知見を得た。とくに除虫菊の研究から新たな植物防衛の機構が明らかになった。また(2)植物の揮発性物質が生態系の生物間相互作用ネットワークに及ぼす影響の解明とその応用に関する研究では、相互作用・情報ネットワークの概念を確立するとともに、揮発性物質の利活用による害虫防除法を発見した。

研究成果の概要(英文): In the study on the role of the phyto-oxilipin pathway on the plant indirect defense, we found several novel eco-physiological functions of green leaf volatiles which was produced in the phyto-oxilipin pathway. Especially, in the study of biosynthetic pathway of pyrethrin, we found the novel defense pathways that can be applicable to plants. In the study of ecological interaction networks, we established the concept of interaction/information networks. Further, we found the novel approach to control pest insects by using plant volatiles in agroecosystems.

交付決定額

(金額単位:円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	21,200,000	6,360,000	27,560,000
2008年度	15,900,000	4,770,000	20,670,000
2009年度	15,900,000	4,770,000	20,670,000
2010年度	15,900,000	4,770,000	20,670,000
2011年度	15,700,000	4,710,000	20,410,000
総計	84,600,000	25,380,000	109,980,000

研究分野:複合新領域

科研費の分科・細目:生物分子化学・化学生態学

キーワード:遺伝子学、昆虫、植物、生態学、発現制御

1. 研究開始当初の背景

研究代表者らは天敵を誘引する誘導間接防衛の分子レベルでのアプローチで多くの知見を得ており、また天敵の行動制御による害虫防除の技術開発に関して多くの独創的な研究成果を得ている。それらは世界的に見ても最先端に位置する成果である。しかし、これらの知見はまだ植物の間接防衛の誘導

機構解明と防除への応用という氷山の一角であると考えられ、さらなる統合的な研究が不可欠である。特に植物間のコミュニケーションの分子レベルでの解明、天敵誘引性を向上させた植物の作出は、我々のグループがオリジナリティーを持って推進すべき重要課題である。

2. 研究の目的

植物は害虫に食われたとき、害虫の種特異的な匂いを食害誘導的に生産・放出する。この「匂い（揮発性の化学情報）」は食害している害虫特異的な天敵を誘引する機能がある。この現象は、食害を受けた植物が「SOS」信号を出して、天敵をボディーガードとして雇っているという図式と考えることができる。従って、これは植物の「誘導的間接防衛戦略」と位置づけられている。本研究ではこの誘導的間接防衛戦略に注目する。アウトプットとして環境に優しい安全、安心な持続的農業技術生産に寄与する事を共通目的として、植物の誘導的間接防衛の解析を主要な作物が属するアブラナ科、イネ科、マメ科を用いて行う。次の2項目に焦点を絞って推進する。

(1) 植物の香りの生合成経路であるフィトオキシリピン経路の間接防衛に果たす役割の全体像の解明とその応用

(2) 植物の揮発性物質が生態系の生物間相互作用ネットワークに及ぼす影響の解明とその応用

3. 研究の方法

(1) 植物の香りの生合成経路であるフィトオキシリピン経路の間接防衛に果たす役割の全体像の解明とその応用 本研究項目では、植物としては、遺伝子情報が完備しているシロイヌナズナ、トマトを用いて分子生物学的手法と人工気象室内および遺伝子組み換え対応温室でのフィトオキシリピン経路の生産物の防衛機能の評価を行った。またジョチュウギクをモデル植物として、プレスリンの生合成経路とフィトオキシリピン経路とのネットワークを解明した。

(2) 植物の揮発性物質が生態系の生物間相互作用ネットワークに及ぼす影響の解明とその応用 本研究項目では、三栄養段階相互作用ならびに植物間ケミカルコミュニケーションの解析のためにシロイヌナズナ、トマトを用い人工気象室内および遺伝子組み換え対応温室での相互作用ネットワークの評価を行った。

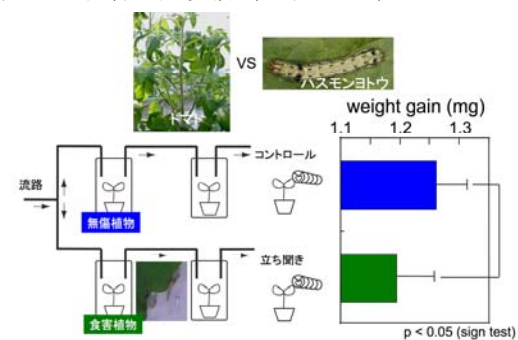
4. 研究成果

みどりの香りの受容機構

ハスモンヨトウ食害を受けたトマトから放出される食害特異的揮発性化合物群を健全トマトに曝露すると曝露されたトマトでハスモンヨトウ抵抗性が高まることを確認した。揮発性物質曝露による抵抗性誘導機構を明らかにするため、網羅的代謝物解析(メタボローム)を実施したところ、約 8000 化合物のうち、わずかにひとつだけが顕著に誘導蓄積していた。この化合物を単離、精製し、NMR 解析によりヘキセノール配糖体であるこ

とを明らかにした。ヘキセノール配糖体を人工飼料に練り込むとハスモンヨトウ幼虫の生育抑制が確認された。そのため、食害特異的揮発性化合物のうち、フィトオキシリピンであるヘキセノールが植物-植物相互作用を担っており、受け手の植物がヘキセノールを取り込み、配糖体化することで抵抗性を高めることが明らかとなった。この抵抗性誘導にはジャスモン酸信号伝達系は関与していなかった。一方、食害特異的揮発性物質曝露により発現誘導される遺伝子群をマイクロアレイ解析により検討すると、ジャスモン酸信号伝達経路支配下にある遺伝子群が誘導されていることが明らかとなった。実際揮発性物質曝露によりトマト植物内でジャスモン酸の蓄積が認められた。

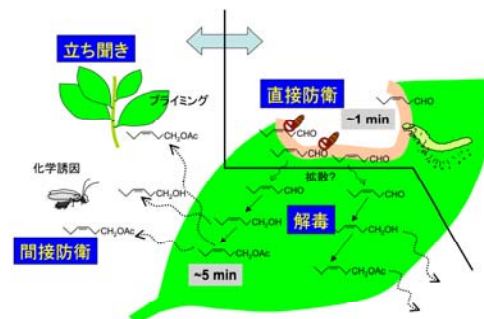
一方、リマメメ-ナミハダニの系では揮発性物質曝露した健全リマメメでキチナーゼ遺伝子の顕著な発現誘導が見られ、キチナーゼ



食害特異的VOCによる無傷トマト植物の抵抗性誘導:立ち開き

を練り込んだ人工飼料上ではナミハダニの産卵数が減ることを明らかにした。誘導されるキチナーゼのプロモーター配列解析から本キチナーゼがジャスモン酸信号伝達系の支配下にあることが示唆された。

シロイヌナズナを用いた検討では、健全シロイヌナズナを揮発性フィトオキシリピン類のうち、ヘキセノール蒸気に曝すとヘキセノールを直ちに取り込み、ヘキセノールへと還元することを明らかにした。これはヘキセノ



みどりの香りの存在理由

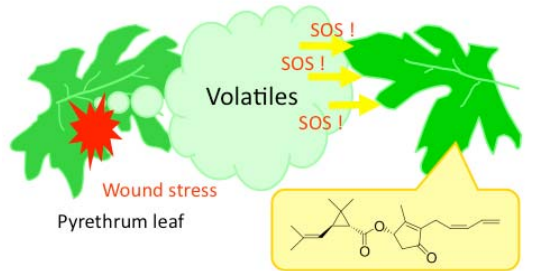
ールの毒性を緩和するため植物が獲得した能力だと考えられた。

先のヘキセノール配糖体化の事例と考え併せると、植物の揮発性物質官能は動物の嗅覚

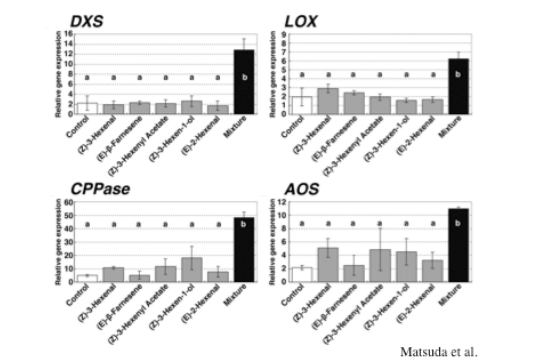
と明らかに異なり、揮発性物質の体内への取り込み、生化学的変換が大きく寄与していることが明らかとなった。

ジョチュウギクのケミカルコミュニケーション

ジョチュウギクは天然殺虫剤ピレトリンを対昆虫防御物質として生合成する。本研究では、ピレトリンの生合成がジョチュウギクに傷害を与えることで生じる揮発性分子によって調節されるのか、ジョチュウギクの幼苗を用いて検討した。物理的に傷害を与えたジョチュウギクの幼苗の隣に無傷の幼苗を置くと、無傷の幼苗のピレトリン含量が有意に増加した。物理的に傷害を与えたときに誘導的にジョチュウギク幼苗から生じる揮発性分子をGC-MSで同定した結果、みどりの香りと呼ばれる(*Z*)-3-hexenal、(*E*)-2-hexenal、(*Z*)-3-hexen-1-ol、(*Z*)-3-hexenyl acetateに加えて(*E*)- β -farneseneが主成分として放出されることが明らかとなった。これらの成分のそれぞれについて、傷害を与えた幼苗に隣接する無傷の幼苗が被爆する量を定量してブレンドした。そして、このブレンドを無傷の幼苗に気体として処理したところ、ピレトリン生合成に関わる4種の遺伝子群の発現量が上昇するとともに、ピレトリン量も増大した。



Wound-induced VOCs act as a mixture

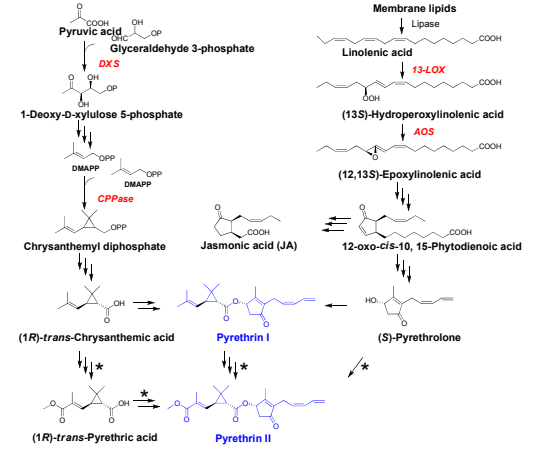


ピレトリン生合成活性化作用と、傷害誘導性揮発性分子のブレンドの濃度との関係について調べた結果、傷害を受けたピレトリンに隣接する位置で観測される濃度で揮発性分子のブレンドを処理したとき、ピレトリンの生合成は最も活性化され、それより濃度を上げて下げて活性化作用は見られなかつ

たことから、揮発性分子によるコミュニケーションには最適濃度が存在することが明らかとなった。さらに、傷害誘導性揮発性分子が単独でもピレトリン生合成を活性化できるのか、ブレンドしたときにしか活性化できないのか生合成遺伝子の活性を指標として調べた結果、ブレンドから一つでも揮発性分子の要素を欠落させると、ピレトリン生合成は活性化されないことが明らかとなった。すなわち、傷害誘導性揮発性分子は、ブレンドとしてかつ傷害を受けた幼苗に隣接する幼苗に対してのみ、ピレトリン生合成を活性化するシグナルとしてはたらくことが分かった。

ピレトリンのエステル結合の形成に寄与する酵素の発見

ピレトリンは、非メバロン酸経路によりつくられる酸部(菊酸)と phyto-oxylipin 経路によりつくられるアルコール部(レスロロン)が縮合することで生合成される。



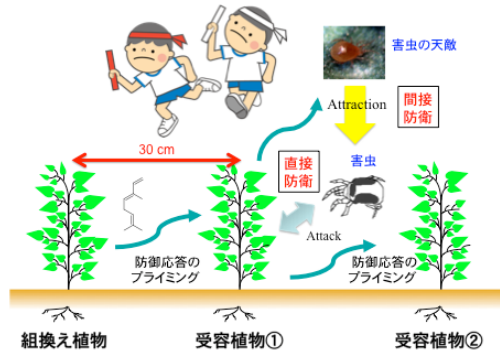
この最終ステップを触媒するアシル基転移反応を触媒する酵素をジョチュウギクの蕾から精製し、遺伝子をクローニングした。遺伝子の配列を解読した結果、驚くべきことが明らかとなった。大腸菌で発現させた本酵素は、基質の絶対配置、すなわちアシル部の(1*R*, 3*R*)配置とアルコール部の(1*S*)配置を厳密に認識した。また、ジョチュウギクの各部位での本酵素遺伝子の発現量は、当該部位でのピレトリン含量と関連したことから、ピレトリンの生合成に重要な役割を果たしていることが示唆された。さらに、酵素は細胞外に分泌されることや、加水分解触媒機能を有することも初めて明らかとなった。

植物間コミュニケーションの有効距離と感度の検出

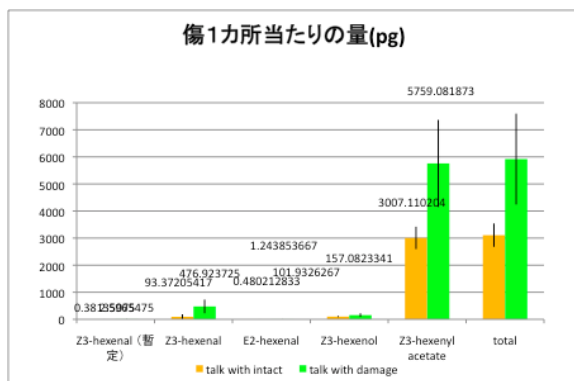
植物間コミュニケーションの有効距離に関しては、オシメン合成酵素遺伝子を組み換えたタバコ、トレニアを用いて検討を行った。

遺伝子組み換え対応温室における解析により、組み換えタバコとリママメ株間のコミュニケーション距離は 30cm 程度と推定された。しかし、組み換え植物を起点として、3 植物間のコミュニケーションが観測され、隣接植物のみならず植物群集への影響を検出することができた。

組換え植物を起点とした3植物間のコミュニケーション



植物間コミュニケーションの感度の検出は、シロイヌナズナ野生型と hpl 遺伝子欠損ミュータントを用いて行った。シロイヌナズナに 5 ミリの傷を 5 カ所に与え、そこから放出されるみどりの香りの効果を調べた所、断続的に 3 週間の受容で、匂い受容株における揮発性物質生産能力と天敵誘引能力が向上した。下図は匂いを受容した場合（黄緑）と受容していない場合（黄色）におけるシロイヌナズナのみどりの香り生産能の比較である。受容することで生産性が向上していることがわかる。5 カ所の 5 ミリの傷から放出される揮発性物質は概ね 140pptV であり、動物の嗅覚応答に匹敵する感度であることが明らかになった。植物間のケミカルコミュニケーションの最高感度を検出したのは、本研究が初めてである。



植物間相互作用ネットワークの応用
被害を受けた株から放出される揮発性物質により隣接する植物の防衛能力が高まる点に注目し、応用研究を行った。兵庫県立農林水産技術総合センターのダイズ圃場において、周辺雑草の刈り取りと設置による揮発性成分暴露ダイズ圃場と対象区（揮発性物質を

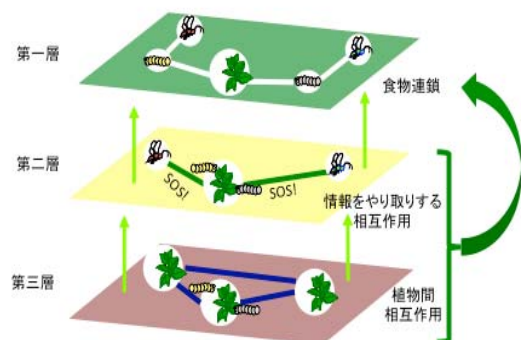
暴露しない圃場）において、ダイズの生産性等を調査した。その結果、暴露圃場において種子数の増加と被害葉率の低下が認められ、草刈りが起点となる植物間相互作用ネットワークを利用した病虫害防除の可能性を示すことができた。

また害虫被害植物が放出する天敵誘引性揮発性物質の応用に関する研究を行った。アブラナ科、コナガ幼虫、コナガ幼虫天敵（コナガサムライコマユバチ）の系において人工的にブレンドした天敵誘引物質の設置でコナガ被害を低減できることを、雨よけハウスのみならず露地でも実証することができた。また、上記天敵誘引物質をセンター内実験圃場に設置したところ、クズとセイタカアワダチソウの群集構造に影響を与えた。

研究期間終了後も、上記の応用に関する研究を継続し、実用化を目指す。

生態系情報・相互作用ネットワーク

基盤 S の成果を総合することにより、生態系情報・相互作用ネットワーク概念を構築した。植物上で繰り広げられる食物連鎖は、多様に進化している。下図の第一層（一番上の層）は、その例として植物-植食性昆虫-捕食性昆虫の食物連鎖を示した。この連鎖において、植物は植食性昆虫（害虫）に食われたとき、植食性昆虫の種特異的な匂いを食害誘導的に生産・放出する。この「匂い（揮発性の化学情報）」は食害している昆虫特異的な天敵を誘引する機能がある（情報をやり取りする関係：第二層）。この現象は、食害を受けた植物が揮発性の SOS シグナルを出して、天敵をボディガードとして雇っているという防衛戦略と考えることができる。研究代表者、分担者らは、さらに揮発性物質による植物間の相互作用層（第三層）を見いだした。目に見えない第二層、第三層は、食物連鎖の第一層に大きな影響を与える重要な層であることを明らかにした。3つの層を視覚化した下図は、生物間相互作用の新たな基本概念といえる。



5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 62 件)

- ① Shiojiri K., Ozawa R., Matsui K., Sabelis M., Takabayashi J., Intermittent exposure to traces of green leaf volatiles triggers a plant response, *Scientific Reports*, 査読有、2 巻、2012、DOI:10.1038/srep00378
- ② Matsui K., Sugimoto K., Mano J., Ozawa R., Takabayashi J., Differential metabolism of green leaf volatiles in injured and intact parts of a wounded leaf meet distinct ecophysiological requirements, *PLoS ONE*, 査読有、7 巻、e36433、2012、DOI:10.1371/journal.pone.0036433
- ③ Kikuta Y., Ueda H., Takahashi M., Mitsumori M., Yamada G., Sakamori K., Takeda K., Furutani S., Nakayama K., Katsuda Y., Hatanaka A., Matsuda K., Identification and characterization of a GDSL-lipase like protein that catalyzes the ester forming reaction for pyrethrin biosynthesis in *Tanacetum cinerariifolium* - a new target for plant protection, *The Plant Journal*, 査読有、Article first published online、2012、DOI: 10.1111/j.1365-3113.2012.04980.x
- ④ Shimoda T., Nishihara M., Ozawa R., Takabayashi J., Arimura G., The effect of genetically enriched (E)-beta-ocimene and the role of floral scent in the attraction of the predatory mite *Phytoseiulus persimilis* to spider mite-induced volatile blends of torenia, *New Phytologist*, 査読有、193 巻、2012、1009-1021、DOI: 10.1111/j.1469-8137.2011.04018.x
- ⑤ Muroi A., Ramadan A., Nishihara M., Yamamoto M., Ozawa R., Takabayashi J., Arimura G., The composite effect of transgenic plant volatiles for acquired immunity to herbivory caused by inter-plant communications, *PLoS ONE*, 査読有、6 巻、2011、e24594、DOI: 10.1371/journal.pone.0024594
- ⑥ Kikuta Y., Ueda H., Nakayama K., Katsuda Y., Ozawa R., Takabayashi J., Hatanaka A., Matsuda K., Specific regulation of pyrethrin biosynthesis in *chrysanthemum cinerariaefolium* by a blend of volatiles emitted from

artificially damaged conspecific plants, *Plant Cell Physiology*, 査読有、52 巻、588-596、2011、DOI: 10.1093/pcp/pcr017

- ⑦ Shiojiri K., Ozawa R., Kugimiya S., Uefune M., van Wijk M., Sabelis M., Takabayashi J., Herbivore-specific, density-dependent induction of plant volatiles: honest or “cry wolf” signals?, *PLoS ONE*, 査読有、5 巻、e12161、2010、DOI: 10.1371/journal.pone.0012161
- ⑧ Muroi A., Ishihara A., Tanaka C., Ishizuka A., Takabayashi J., Miyoshi H., Nishioka T., Accumulation of hydroxycinnamic acid amides induced by pathogen infection and identification of agmatine coumaroyltransferase in *Arabidopsis thaliana*, *Planta*, 査読有、230 巻、517-527、2009、DOI: 10.1007/s00425-009-0960-0
- ⑨ Choh Y., Uefune M., Takabayashi J., Diamondback moth females oviposit more on plants infested by non-parasitized than by parasitized conspecifics, *Ecological Entomology*, 査読有、33 巻、565-568、2008、DOI: 10.1111/j.1365-2311.2008.01003.x
- ⑩ Kishimoto K., Matsui K., Ozawa R., Takabayashi J., (2008) Direct fungicidal activities of C6-aldehydes are important constituents for defense responses in *Arabidopsis* against *Botrytis cinerea*, *Phytochemistry*, 査読有、69 巻、2127-2132、2008、DOI: 10.1016/j.phytochem.2008.04.023

その他 52 件

[学会発表] (計 92 件)

- ① Matsui K., Rapid absorption and conversion of green leaf aldehydes by *Arabidopsis* leaves, *Gordon Research Conferences Plant Volatiles*, 2012/2/2, Ventura, CA, U.S.A.
- ② Takabayashi J., Biological control using plant volatiles that attract specialist parasitic wasps of target pests, *Gordon Research Conferences Plant Volatiles*, 2012/1/31, Ventura, CA, U.S.A.
- ③ Ueda H., Ozawa R., Takabayashi J., Matsuda K., Microorganisms in herbivorous two spotted spider mites (*Tetranychs urticae*) regulate ecological interactions with lima bean plant, *Gordon Research Conferences Plant Volatiles*, 2012/1/31, Ventura, CA,

- U. S. A.
- ④ Sugimoto K., Matsui K., Ozawa R., Iijima Y., Sasaki R., Akakabe Y., Akitake S., Nobuke T., Aoki K., Shibata D., Takabayashi J., Conversion of atmospheric green leaf volatiles into defensive compound in intact tomato plants for plant-to-plant signaling, Gordon Research Conferences Plant Volatiles, 2012/1/31, Ventura, CA, U. S. A.
- ⑤ Ozawa R., Ueda H., Matsuda K., Gotoh T., Maffei M., Takabayashi J., Involvement of microorganisms hosted in two-spotted spider mites (TSSMs) in the production of TSSM-induced volatiles in Lima bean plants, International Society of Chemical Ecology 26th Annual Meeting, 2010/7/31 ~8/4, Tours, France
- ⑥ Matsui K., Tasaka H., Nakashima A., Lipid hydrolysis is nonessential for green leaf volatile formation., 19th International Symposium on Plant Lipids, 2010/7/15, Cairns, Australia
- ⑦ Junji Takabayashi, Leaf volatile ecology: multitrophic interaction networks mediated by leaf volatiles. Gordon Research Conferences, Floral & Vegetative Volatiles., 2007/10/8, Les Diablerets, Switzerland
- ⑧ Matsui K., Are green leaf volatiles involved in warning neighboring cells or plants?, Gordon Research Conferences, Floral & Vegetative Volatiles., 2007/10/7 ~ 12, Les Diablerets, Switzerland
- ⑨ Matsui K., Molecular aspects of plant induced defense against insects and pathogen, The 23rd International Society of Chemical Ecology Annual Meeting, 2007/7/24, Jena, Germany
- その他 83 件

[図 書] 計 (16) 件

- ① Sato F., Matsui K., Academic Press, London, Engineering the biosynthesis of low molecular weight metabolites for quality traits (essential nutrients health-promoting phytochemicals, volatiles and aroma compounds). In Plant Biotechnology and Agriculture (Eds. Altman, A. and Hasegawa P. M. , 2012, p443-461
- ② Yamane H., Konno K., Sabelis M., Takabayashi J., Sassa T., Oikawa H., Elsevier, Oxford, Chemical defense and

toxins of plants. In Comprehensive Natural Products II Chemistry and Biology (Eds. Mander L. Lui and H. -W.), 2010, p339-385

- ③ Matsui K., Sugimoto, K. Kakumyan P., Khorobrykh, S. A., Mano J., D. Humana Press, NJ, USA., Volatile oxylipins and related compounds formed under stress in plants., In Lipidomics vol. 2 Methods and Protocols (Eds. Armstrong), 2009, p17-28

その他 13 件

[産業財産権]

該当なし

[その他]

新聞報道 (計 25 件)

テレビ放映: NHK サイエンスゼロ 2008/9/13

ラジオ放送 (計 2 件)

第 9 回バイオビジネスコンペ JAPAN 優秀賞
ホームページ:

<http://web.cc.yamaguchi-u.ac.jp/~matsui/kiban/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高林 純示 (TAKABAYASHI JUNJI)
京都大学・生態学研究センター・教授
研究者番号: 10197197

(2) 研究分担者

松井 健二 (MATSUI KENJI)
山口大学・医学系研究科・教授
研究者番号: 90199729

松田 一彦 (MATSUDA KAZUHIKO)
近畿大学・農学部・教授
研究者番号: 00199796

佐藤 雅 (SATO MASARU)
独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構・九州沖縄農業研究センター・主任研究員
研究者番号: 90355644
(H19)

松村 正哉 (MATSUMURA MASAYA)
独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構・九州沖縄農業研究センター・チーム長
研究者番号: 00370619
(H20)

五味 剣二 (GOMI KENJI)
香川大学・農学部・助教
研究者番号: 50511549
(H21~H22)