

令和 6 年 6 月 20 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2023

課題番号：19K06070

研究課題名(和文) チョウ目昆虫が植物の防衛機構を回避するシステムの解明

研究課題名(英文) Do herbivorous caterpillars suppress plant defense responses with the enzyme from their silk glands?

研究代表者

小澤 理香 (Ozawa, Rika)

京都大学・生態学研究センター・研究員

研究者番号：90597725

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)：本研究では、我々がカイコで見出した「みどりの香り生合成の抑制酵素」が、チョウ目幼虫による食草の防衛回避に関与しているという仮説を立て、その検証を行った。その結果、植食者の食性のみどりの香りによる直接防衛に負の影響を与える可能性や、複数のチョウ目幼虫の絹糸腺にみどりの香り抑制活性が存在することを見出し、その普遍性を確認した。また、「みどりの香りの抑制酵素」をノックアウトしたアワヨトウを作成して、本酵素が直接防衛の回避に重要であることを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

多くの植物が放出するみどりの香りの機能について、これまで知られていなかったチョウ目幼虫に対する食害抵抗性に関わることを明らかにした。また、チョウ目昆虫であるアワヨトウがもつ酵素(FHD)が、みどりの香りによる植物の抵抗性を回避する機能を持つことを示した。チョウ目幼虫の多くは食葉性であり、葉菜などの農作物に対する害虫となっている。今回明らかにしたみどりの香りの成長抑制活性を利用することで安心安全な害虫管理への応用が期待できる。

研究成果の概要(英文)：We have already identified the enzyme, fatty acid hydroperoxide dehydratase (BmFHD), in the silk glands of the silkworm that inhibits the production of green leaf volatiles. We found that the enzyme plays a role in the avoidance of the indirect defense of mulberry plants by silkworms. We also found similar sequences of the BmFHD gene in other lepidopteran species. Based on these findings, we proposed that FHD in caterpillars may act to suppress plant defense responses in general. To test this hypothesis, we generated FHD-knockout (FHD-KO) armyworms and studied the effects of armyworm's FHD on the avoidance of direct and indirect defenses in maize plants. We compared the growth of FHD-KO and wild-type armyworms on maize plants. Further, we examined the response of parasitoid wasps to maize plants infested by either FHD-KO or wild-type armyworms. The results showed that FHD was involved in the avoidance of direct defense mechanisms of maize plants against armyworms.

研究分野：化学生態学

キーワード：みどりの香り (GLVs) チョウ目幼虫 直接防衛 間接防衛 絹糸腺 寄生蜂

様式 C-19、F-19-1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

植物は食害を受けると防衛反応を誘導する。防衛反応には毒物質の蓄積のような直接植食者に影響を与える「直接防衛」のほか、被食応答により植物が放出する揮発性物質に誘引された植食者の天敵が植食者を排除する「間接防衛」が知られている。植食者が持つ防衛反応を抑制する物質について、近年注目され始めているが(総説 Stahl et al. 2018)、その実体と生態学的機能を明らかにした研究は、タバコガの仲間

(*Hericoverpa zea*) の唾液中に存在する glucose

oxidase (GOX) の研究のみであった (Musser et al. 2002)。

この論文では唾液中の GOX がタバコのニコチンの生合成を抑制することで、タバコガの幼虫がタバコのニコチンによる直接防衛を回避していることが報告されている。

最近我々は、カイコが唾液中の酵素により、クワが放出する「みどりの香り (green leaf volatiles; GLVs)」を特異的に抑制し、カイコの天敵である寄生バエ (*Zenillia dolosa*) の誘引—すなわちクワによる間接防衛—を回避していることを見出した。そしてこの酵素を同定し、*Bombyx mori* fatty acid hydroperoxide dehydratase (BmFHD) と名付けた (Takai et al. 2018; 図1)。さらに、FHD 相同性遺伝子がチョウ目昆虫のゲノムに広く存在することも明らかにした。しかし、カイコ以外のチョウ目昆虫で、FHD 酵素活性が存在するか、FHD が GLVs による直接防衛や間接防衛の回避に関わっているかは明らかではなかった。この点を明らかにするとともに、植物の葉を摂食するチョウ目に保存性の高い FHD 遺伝子配列には、何らかの適応的意義があると考え、FHD 酵素をカギとした植食性昆虫が植物の誘導防衛を回避する戦略をあきらかにしようと発想した。

2. 研究の目的

これまでに、カイコでは唾液中の酵素 (FHD) による GLV の抑制が間接防衛の回避に関わることを明らかにした。この成果を踏まえ、本研究では、①カイコ以外のチョウ目幼虫で FHD 酵素の存在と機能を明らかにすること、また、②FHD が食草によるどのような被食防衛の回避に関与しているかの全体像を明らかにすることを目的とし、植物の被食防衛を回避するチョウ目幼虫に共通するシステムの解明を目指す。

3. 研究の方法

(1) チョウ目幼虫の絹糸腺における GLVs 生産抑制活性の確認

コナガ (*Plutella xylostella*) およびハスモンヨトウ (*Spodoptera litura*) の終齢幼虫について、絹糸腺を取り出し、シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) の葉片とホモジナイズすることで発生する GLVs をヘッドスペース法で捕集し、ガスクロマトグラフ-質量分析法にて定量を行った。

傷害でみどりの香りが放出されるが
カイコの食害では放出されない

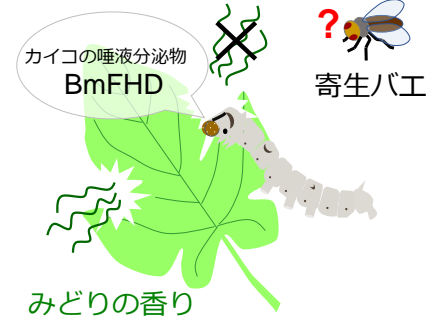


図1 本研究の基本概念：
摂食時のみどりの香りの抑制

(2) GLVs による直接防衛能の検証

GLVs の生産量を抑えたシロイヌナズナ (GLV 抑制株) を用いて、チョウ目幼虫のパフォーマンスに与える影響を調べた。GLV 抑制株は、GLVs 生合成酵素の 1 つである hydroperoxide lyase (HPL) をアンチセンス方向に挿入することにより、HPL 活性を抑制した形質転換体である。コナガの孵化幼虫ならびに、ハスモンヨトウ 2 令幼虫が GLV 抑制株を摂食したときと、野生型のシロイヌナズナを摂食したときの成長とを比較した。

(3) アワヨトウ (*Mythimna separata*) の FHD 遺伝子の探索と発現部位の解析

アワヨトウ 5 - 6 令幼虫の絹糸腺から mRNA を抽出し、RNA-seq 解析により、*BmFHD* の配列との相同性から、アワヨトウのゲノムに FHD 様遺伝子が 5 個存在することを見出した。これらの配列について、RT-qPCR により、体の各部位における遺伝子発現解析を行った。

(4) ゲノム編集によるアワヨトウの FHD ノックアウト系統の作出

アワヨトウの FHD 様遺伝子の 1 つである *MsFHDL1* の配列をターゲットとし、guideRNA をデザインした。CRISPR/Cas9 システムにより、FHD 遺伝子をノックアウトしたアワヨトウの作出を行った。

(5) アワヨトウにおける FHD 酵素活性

アワヨトウ 6 令の絹糸腺の破碎液の上清を粗酵素液とし、Linolenic acid 13-hydroperoxide を基質として、FHD の活性を測定した。

(6) FHD 酵素の直接防衛に及ぼす影響

まず、作出したアワヨトウの FHD ノックアウト系統 (FHD-KO) と野生型の 3 令幼虫の体重を測定した。これらを 1 頭ずつトウモロコシ (*Zea mays*) 1 株に乗せ、3、6、9 日後、アワヨトウの体重と摂食面積の測定を行った。

(7) FHD 酵素の間接防衛に及ぼす影響

カリヤサムライコマユバチ (*Cotesia kariyai*; 以下 寄生蜂) は、アワヨトウに対する幼虫寄生蜂である。まず、トウモロコシ株を FHD-KO 系統または野生型に摂食させた。次に、寄生蜂に食害株と健全株、または異なる植食者の摂食した食害株どうしを選択させた。寄生蜂がどちらの株に先にランディングするか観察し、それぞれの株を選んだ寄生蜂の個体数をカウントした。また、異なる植食者の摂食した葉片に対する寄生蜂の反応も解析した。

4. 研究成果

(1) チョウ目幼虫の絹糸腺における GLVs 生産抑制活性

絹糸腺と葉片のホモジナイズから発生する GLVs は、葉片のみのものと比較して少なかった。特にハスモンヨトウでは絹糸腺の量が増えるにつれて、GLVs が減少していた。これらの

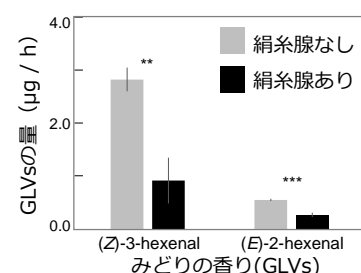


図2 コナガの絹糸腺のGLVs抑制活性

結果から、コナガとハスモンヨトウの幼虫においても、カイコと同様に、絹糸腺に GLVs の抑制活性が存在することが明らかとなった（図 2 にコナガの結果を示す）。

(2) GLVs による直接防衛能の検証

GLVs が植食者の天敵を誘引し、植食者を排除する間接防衛機能を持つことは知られているが、チョウ目幼虫に対する直接的な防衛機能を持つという報告はない。GLV 抑制株上の幼虫の体重は、アブラナ科のスペシャリストであるコナガでは、野生株上のものより多かったが、ゼネラリストのハスモンヨトウでは、野生株上のものと有意な差はなかった（図 3）。

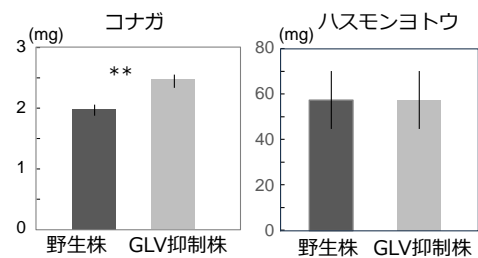


図 3 シロイヌナズナ上のコナガ（5日目）とハスモンヨトウ（6日目）の体重 (mg)

またコナガでは、蛹までの期間と蛹重は、GLV 抑制株と野生株で育てたもの間に有意な差はなかった。これらの結果から、GLVs の直接防衛としての効果は、チョウ目幼虫の種や成長時期によって異なる可能性が示された。

(3) アワヨトウの FHD 遺伝子の探索と発現部位の解析

アワヨトウのゲノムに存在する 5 個の FHD 様遺伝子について、*MsFHDL1-5* と名付けた。これらの遺伝子について、頭部 (H)、絹糸腺前部 (MA)、絹糸腺後部 (MM)、中腸 (G)、後腸 (PG)、マルピーギ管 (MT)、脂肪体+真皮 (F) における発現を確認したところ、主に、絹糸腺前部・後部で高い発現が認められた（図 4）。特に *MsFHDL1* は発現量が高く、また、RNA-seq の FPKM 値から、

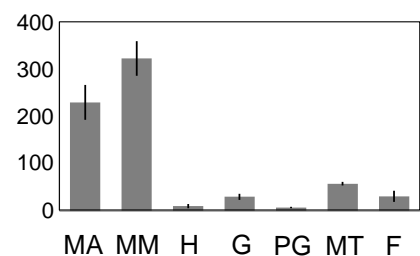


図 4 *MsFHDL1* の発現量 (レファレンス遺伝子の発現量を 1 とした時の相対量)

MsFHDL1 は全体の 70% を占めるくらいに発現していることが推定された。この結果より、ゲノム編集のターゲットを *MsFHDL1* とした。

(4) アワヨトウの FHD ノックアウト系統

Cas9 と guideRNA をマイクロインジェクションした卵から約 4.5% の割合で *MsFHDL1* 欠失個体 (G1) を得た。G1 成虫を野生型と交配し、欠失対立遺伝子が G2 に固定された。G2 成虫をシブリングクロスし、G3 でホモ接合体ノックアウト系統 (FHD-KO) の 2 系統を樹立した。これらの系統は、それぞれ 119bp あるいは 120bp の配列が欠失していた。得られた FHD-KO 系統と野生型について、FHD の活性を比較した。その結果、FHD-KO 系統では 2 系統とも野生型に比べて FHD 活性がほとんど失われており、FHD 活性の抑制された系統を得ることができた。以下の実験は、得られた 2 系統のうち 1 系統を用いて行った。

(5) FHD 酵素の直接防衛に及ぼす影響

作出した FHD-KO 系統と野生型にそれぞれトウモロコシ葉を摂食させ、3、6、9 日目の体重を比較した。その結果、FHD-KO 系統の体重は、6 日目および 9 日目に、野生型のアワヨトウの体重に比べて有意に少なかった。また摂食量も、9 日目に FHD-KO 系統で、野生型よりも有

意に少なかった。つまり、FHD 活性の抑制が幼虫の成長に影響を与えること、ひいては、FHD 酵素が直接防衛に関与していることを明らかにできた。

GLVs は傷害を受けた植物の葉緑体のチラコイド膜から切り出されたりノレン酸を原料に生合成される。本研究で注目した FHD 酵素はこの GLVs の生合成過程を阻害する。GLVs は緑色植物に普遍的に存在する化合物群であることから、本研究で初めて、FHD が直接防衛の回避に関わることを明らかにできた意義は大きい。

(6) FHD 酵素の間接防衛に及ぼす影響

健全なトウモロコシ株と食害株を提示された寄生蜂は、野生型と FHD-KO 系統のどちらの植食者が食害しても、健全株よりも食害株を選好する傾向があった。一方で、野生型アワヨトウが食害した株と FHD-KO 系統が食害した株とでは、FHD-KO 食害株を選好する傾向が見られた。また、野生型アワヨトウと FHD-KO 系統が摂食した葉片に対する寄生蜂の反応を調べたところ、葉片上の滞在時間は、未被害と比較して、FHD-KO が摂食した場合は滞在時間が長かったが、野生型が摂食した場合は変わらなかった。すなわち、FHD 活性の抑制により、寄生蜂の反応が正の方向に変化したことを意味しており、FHD が間接防衛の回避にも関与する可能性を示した。

当初想定していなかったゲノム編集技術による FHD-KO 系統を用いることで、FHD がアワヨトウによる食草の直接防衛の回避に関わることを明確に示すことができた。

今後は、今回得られた知見である「みどりの香りによるチョウ目幼虫の成長抑制活性」が、野外で機能するかを調べることで、害虫防除への応用が期待できる。具体的には、野外に徐放性を保つ状態でみどりの香りを設置し、作物の被害度や害虫の発生状況を調査していく。

引用文献 : Stahl et al. (2018) *Plant J.*,93; Musser et al. (2002) *Nature*, 416; Takai et al. (2018) *Scientific Reports*, 8:

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Kohjiro Tanaka, Rika Ozawa, Junji Takabayashi, Masanori Ochiai, Yoichi Hayakawa	4. 巻 80
2. 論文標題 Booklice <i>Liposcelis bostrychophila</i> are efficiently attracted by the combination of 2,3,5,6 tetramethylpyrazine and ultraviolet light.	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Pest Management Science	6. 最初と最後の頁 426 ~ 432
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/ps.7773	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 Rim Hojun, Uefune Masayoshi, Ozawa Rika, Takabayashi Junji	4. 巻 18
2. 論文標題 Uninfested eggplants exposed to volatiles from conspecific plants infested by omnivorous mirids exhibit jasmonic acid priming and enhanced defenses against herbivores	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Arthropod-Plant Interactions	6. 最初と最後の頁 205 ~ 210
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s11829-023-10010-z	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 Yoneya Kinuyo, Nishimori Satsuki, Yano Eizi, Yamaguchi Kei, Tsumoto Matsuri, Ozawa Rika, Takabayashi Junji, Kandori Ikuo	4. 巻 69
2. 論文標題 Olfactory responses of <i>Nesidiocoris tenuis</i> to uninfested or conspecific-infested banker plants and <i>Thrips palmi</i> -infested eggplants	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 BioControl	6. 最初と最後の頁 19 ~ 28
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10526-023-10234-1	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9件（うち招待講演 0件/うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Rika Ozawa, Ryohei Fujita, Takuma Nakao, Yuka Ohno, Wataru Ota, Kaori Shiojiri, Kyutaro Kishimoto, Kenji Matsui, Junji Takabayashi
2. 発表標題 Functions of Green Leaf Volatiles in Direct and Indirect Defense of Plants against Herbivores
3. 学会等名 the 33rd International Conference on Arabidopsis Research (ICAR2023)(Chiba) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Rika Ozawa, Ryohei Fujita, Takuma Nakao, Yuka Ohno, Wataru Ota, Kaori Shiojiri, Kyutaro Kishimoto, Kenji Matsui, Junji Takabayashi
2. 発表標題 Direct and Indirect Defenses against Insects in Plants Associated with Green Leaf Volatiles
3. 学会等名 CNRS International Research Network France-Japan Frontiers in Plant Biology 2023 Kyoto Symposium (Kyoto) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 小澤理香、塩尻かおり、大田航、大野裕香、藤田涼平、中尾拓磨、白井雄、大門高明、田中萌菜、松井健二、高林純示
2. 発表標題 チョウ目幼虫の絹糸腺由来の酵素は植物の防衛機能を抑制しているか
3. 学会等名 第55回種生物学シンポジウム (岡崎)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 小澤理香、塩尻かおり、大田航、大野裕香、藤田涼平、中尾拓磨、白井雄、大門高明、伊達みのり、松井健二、高林純示
2. 発表標題 植物のみどりの香りをういたチョウ目幼虫に対する防衛機能
3. 学会等名 日本昆虫学会第84回大会 第68回日本応用動物昆虫学会大会 合同大会 (仙台)
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 Rika Ozawa, Yoshitsugu Ohara, Kaori Shiojiri, Toru Uchida, Kazumasa Kakibuchi, Kota Sano, Masayoshi Uefune, Junji Takabayashi
2. 発表標題 Synergistic effects of uninfested plants and honey on the attractiveness of the synthetic host-infested plant volatiles to parasitoid wasps
3. 学会等名 XXVI International Congress of Entomology, Helsinki (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 小澤理香、上船雅義、高林純示
2. 発表標題 殺虫剤の摂食がコナガの次世代数に与える影響
3. 学会等名 第67回 日本応用動物昆虫学会大会 (大阪)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 小澤理香、塩尻かおり、大田航、大野裕香、白井雄、大門高明、田中萌菜、松井健二、高林純示
2. 発表標題 アワヨトウ絹糸腺由来の酵素による植物の防衛機能の抑制
3. 学会等名 第66回 日本応用動物昆虫学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 小澤理香、塩尻かおり、中尾拓磨、藤田涼平、松井健二、高林純示
2. 発表標題 植物のみどりの香りがコナガ幼虫の成長を抑制する
3. 学会等名 第65回 日本応用動物昆虫学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 大西真由、後藤智哉、塩尻かおり、小澤理香
2. 発表標題 みどりの香りの生合成抑制とその生態学的意義
3. 学会等名 第31回新春技術講演会
4. 発表年 2020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
研究 分担者	塩尻 かおり (Shiojiri Kaori) (10591208)	龍谷大学・農学部・教授 (34316)	
研究 分担者	松井 健二 (Matsui Kenji) (90199729)	山口大学・大学院創成科学研究科 ・教授 (15501)	

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
---------	---------