

自己評価報告書

平成 23 年 5 月 17 日現在

機関番号：82112

研究種目：基盤研究 (A)

研究期間：2008 ~ 2011

課題番号：20248007

研究課題名 (和文) 植物乳液中に含まれる耐虫防御タンパク質・物質の耐虫生発現分子機構
解明と応用研究課題名 (英文) Anti-insect defense proteins and chemicals in plant latex and
their molecular modes of action

研究代表者

今野 浩太郎 (KONNO KOTARO)

独立行政法人農業生物資源研究所 昆虫-昆虫・植物間相互作用研究ユニット 主任研究員

研究者番号：00355744

研究分野：植物-昆虫間相互作用、化学生態学

科研費の分科・細目：農学・応用昆虫学

キーワード：植物乳液・滲出液・耐虫性2次代謝物質・耐虫防御タンパク質・植物被食防衛

1. 研究計画の概要

本研究計画では、農業上必要な耐虫性植物育種の素材として種々の植物が傷口から出す白色の乳液やそれに類似した滲出液が含む耐虫性タンパク質・物質を特定しその耐虫性発現機構の解明を行う。特に乳液を持つ代表的な植物で種類も多いクワ科植物各種 (イチジク属・クワ属) の乳液に含まれる耐虫性因子 (2次代謝物質・タンパク質) の同定を目指す。中でもクワ乳液に関しては、乳液に含まれる新規耐虫性タンパク質 MLX56 に関してその耐虫性メカニズムの解明を目指す。さらに、他の植物の乳液や乳液に類似した滲出液 (ウリ科植物篩管滲出液等) に関して耐虫活性の検定と耐虫性物質の同定を行う。

2. 研究の進捗状況

乳液を出す種を多く含むクワ科イチジク属植物のうち沖縄に自生する種や栽培植物役10種の乳液の耐虫活性と活性原因物質をエリサンを用いたバイオアッセイや酵素活性測定・阻害剤による阻害・HPLCによる精製と質量分析NMRによる同定等の手法で検定したところ、ハマイヌビワ、ホソバムクイヌビワ、イチジク、ベンジャミナ等ではシステインプロテアーゼ活性が高く、この活性が耐虫性の原因であったが、同じイチジク属植物でもオオバオヌビワ・アカメイヌビワ・ギランビワ等は乳液が耐虫性に重要であるが、乳液中にシステインプロテアーゼは検出されず、前2種の乳液では耐虫性物質として10ppmの微量でも顕著な昆虫毒性を示すantofine等のphenanthroindolizine alkaloid(PIA)が0.5%以上の濃縮した状態で存在し昆虫の食害時に昆虫の目の前に滲出し強い耐虫性の原因となっていた。

クワ乳液に含まれるMLX56タンパク質が示す強い耐虫性の原因に関してはこれまでのところ以下のことが判った。まずMLX56はトリプシンや鱗翅目昆虫幼虫の消化液に耐性で消化を受けないうえにMLX56は鱗翅目幼虫消化液に見られるアルカリ条件でも、キチンと強固に結合し、MLX56は鱗翅目昆虫消化液中でも安定に機能しうる前提条件を満たしていた。さらに、予備的ではあるが、MLX56の強い耐虫活性において、昆虫消化管に存在しキチンを成分とする囲食膜の存在が不可欠であることを示唆する結果が得られ、囲食膜とMLX56の反応の重要性が示唆された。また、MLX56の耐虫性は餌にタンパク質やアミノ酸などの栄養素が存在しない場合も顕著であることから、タンパク質用栄養素の消化吸收の阻害はMLX56の耐虫活性の最初の原因ではないことが判明した。

トウガン篩管滲出液から新規耐虫性タンパク質の精製と遺伝子のクローニングに成功した。ウリ属の滲出液 (篩管液) とくにトウガン *Benincasa hispida* の滲出液は顕著な耐虫性 (成長阻害活性) を示した。そこで、トウガン篩管液に含まれる耐虫性因子の精製を試み、篩管液を陰イオン交換カラムに供したところ、非吸着画分および複数の吸着ピークに活性が認められ、本因子は複数の成分で構成されていた。単離した、陰イオン交換カラムの非吸着画分に含まれる成分はタンパク質であり、一次構造を解析・決定した。この一次構造はBlast検索の結果ウリ科の篩管液の凝固に関与するPPIIタンパク質 (Phloem Protein II) に相同性を示す一方でPPIIではPPIと反応し凝固するに当たって必須なシステイン残基を1つも含まないなどPPIIとは顕著な相違点を持ち、本耐虫性

タンパク質が新規タンパクであることを示した。陰イオン交換カラムの吸着ピークに含まれる活性因子に関しても、そのうちの1つを単離した。この成分は SDS-PAGE の結果から約 32000 程度の分子量と見積もられた。

3. 現在までの達成度

②おおむね順調に進展している。
イチジクなどクワ科植物乳液の耐虫性が極めて多様であり PIA やシステインプロテアーゼなどの顕著な耐虫性物質の存在を示すことが出来た。またクワ乳液に含まれる MLX56 タンパク質の耐虫性機構の解明も進んでいる。さらに、トウガン篩管滲出液からは強い耐虫性をもつ新規耐虫性タンパク質の精製と遺伝子のクローニングに成功するなど、将来耐虫性植物育種を通じて農業に貢献できる結果も得ることが出来た。

4. 今後の研究の推進方策

トウガン篩管液には複数の耐虫成分(耐虫タンパク質)が含まれており、これらに精製・遺伝子同定を進めるとともに、その耐虫性・有効性の検討と耐虫性発現メカニズムの解明を行っていく。MLX56 の耐虫性のメカニズムの解明も種々の生理・生化学的手法を用いて行う。また、これらの新規耐虫性タンパク質が耐虫性遺伝育種に応用可能かこれらの耐虫性タンパク質による形質転換植物の作製と耐虫効果の検定を試みる。

5. 代表的な研究成果

(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 6 件)

① Kotaro Konno, Plant latex and other exudates as plant defense systems: Roles of various defense chemicals and proteins contained therein. *Phytochemistry* (Special Issue on Plant-Insect Interactions) doi:10.1016/j.phytochem.2011.02.016
21 ページ分 (2011) 査読有

② Naoya Wasano, Kotaro Konno, Masatoshi Nakamura, Chikara Hirayama, Makoto Hattori, Ken Tateishi, A unique latex protein, MLX56, defends mulberry trees from insects. *Phytochemistry* 70:880-888 (2009) 査読有

③ Anurag A. Agrawal, Kotaro Konno, Latex: A model for understanding mechanisms, ecology and evolution of plant defense against herbivory. *The Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics* 40:311-331 (2009) 査読有

[学会発表] (計 22 件)

① Eiji Ota, Masatoshi Nakamura, Chikara Hirayama, Kotaro Konno, Purification of insect-resistant proteins from the wax gourd, *Benincasa hispida*. International Society of Chemical Ecology 26th Annual Meeting, 2010 年 8 月 2,4 日, Tours, France.

② Kotaro Konno, Masatoshi Nakamura, Naoya Wasano, Eiji Ota, Chikara Hirayama, Ken Tateishi, Khondkar E. Kabir, Makiko Takenaka, Hiroshi Ono, Keiichi Honda, Phenanthroindolizidine alkaloids: Defense chemicals found in the latex of *Ficus septica*. International Society of Chemical Ecology 26th Annual Meeting, 2010 年 8 月 2,4 日, Tours, France.

③ Kotaro Konno, Naoya Wasano, Masatoshi Nakamura, Ken Tateishi, Chikara Hirayama, Makiko Takenaka, Hiroshi Ono, Interspecific diversity of latex ingredients among Moraceae plants: Defense chemicals and proteins playing important roles in plant-herbivorous interactions. Gordon Research Conference on Plant-Herbivore Interaction, 2010 年 2 月 24 日, Galveston, Texas, USA.

[図書] (計 1 件)

① Hisakazu Yamane, Kotaro Konno, Maurice Sabelis, Junji Takabayashi, Tekeshi Sassa, Hideaki Oikawa, Elsevier, Oxford, Section 4.08 "Chemical Defence and Toxins of Plants" In "Comprehensive Natural Products II Chemistry and Biology" (Mander, L., Lui, H.-W., Eds.) (2010) 339-385.

[産業財産権]

○出願状況 (計 1 件)

①
名称: 耐虫性タンパク質及び該耐虫性タンパク質をコードする耐虫性遺伝子
発明者: 今野浩太郎・和佐野直也
権利者: 今野浩太郎・農業生物資源研究所(アメリカ以外)、今野浩太郎、和佐野直也(アメリカ)
種類: 特許
番号: PCT/JP2008/53794
出願年月日: 2009 年に諸外国に申請 (PCT から移行)
国内外の別: アメリカ、カナダ、ブラジル、インド (国内、PCT は以前に行っている)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]