

令和 5 年 4 月 23 日現在

機関番号：12401

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K15878

研究課題名（和文）害虫唾液内共生菌による植物防御応答の制御機構の解明

研究課題名（英文）Phytohormone-dependent defense signaling network regulated by oral bacteria of *Spodoptera litura*

研究代表者

上村 卓矢 (Uemura, Takuya)

埼玉大学・理工学研究科・その他

研究者番号：80847179

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：害虫の唾液内に生息する共生微生物は、寄主植物のシグナル伝達経路に作用することで、植物の防御応答を制御し害虫の食害効率を向上させる可能性が近年示唆されてきたものの、当該応答の詳細な分子メカニズムは明らかにされていなかった。そこで本研究では無菌唾液を作製し、唾液内共生菌が植物防御機構に及ぼす影響について評価したところ、共生菌は様々な植物ホルモンシグナル伝達経路を活性化することで、虫害抵抗性反応を間接的に阻害していることが明らかになった。また当該応答を担う共生菌を単離することに成功した。本研究の成果は多様な植物-昆虫間相互作用の一端を明らかにするものである。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでの植物-昆虫間相互作用研究は害虫唾液内に含まれるエリシターとそれに応答する植物分子に関する知見が蓄積し、最近になって唾液内共生菌の寄与についても示唆されてきたが、共生菌がどのように当該相互作用に影響しているのかは不透明だった。本研究によって、共生菌が植物内の多様なホルモンシグナル経路を活性化し、経路間のクロストークを介して害虫抵抗性ホルモン経路の活性化を抑制するという新規モデルを打ち立てた。本研究の成果は生態系における3者間（植物、昆虫、微生物）の新たな関係性を示唆するとともに、農業に依存しない新たな有機農法の開発につながることを期待される。

研究成果の概要（英文）：Plants can induce defense responses against herbivory by perceiving elicitor present in oral secretion (OS). On the other hand, it has been suggested that microbes in OS of herbivorous arthropods have the activity to suppress host plant defense signaling, which leads to increase the herbivore performance. However, little is known about the detailed molecular mechanism. Using bacteria-free OS of *Spodoptera litura*, we explored the effect of oral bacteria in phytohormone signaling-dependent defense responses in *Arabidopsis*. Moreover, we identified an anaerobic staphylococcus responsible for the suppression of phytohormone signaling in host plant.

研究分野：植物分子生物学

キーワード：共生菌 ハスモンヨトウ シロイヌナズナ

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 害虫に食害された植物は、害虫の唾液内に存在するエリシター化合物を66認識し、下流のシグナル伝達経路を活性化させることで虫害抵抗反応を誘導することができる。一方、害虫も植物による抵抗性反応を抑制し、植物免疫に対するフィットネスを向上させることが近年の研究により明らかになってきた(エフェクター作用)。共生微生物は宿主生物の恒常性の維持に必要な不可欠な存在であるが、最近になって、害虫吐き戻し液(OS: Oral Secretion)内の共生微生物が植物の虫害抵抗反応の制御に関与する可能性が示唆されてきた。例えば、コロラドハムシの唾液内共生菌がトマトの食害誘導性防御応答を抑制し、結果的にハムシの食害効率を向上させることが報告されている(Chung SH et al.)。しかしながら、共生菌がどのように寄主植物に作用し、防御応答の阻害を実現するのかという分子メカニズムはほとんど理解されておらず、また昆虫と植物の組み合わせによって異なる研究結果が得られるケースも報告されており、昆虫-植物共生菌間相互作用研究の包括的な理解には至っていない。そこで本研究では、モデル植物であるシロイヌナズナと広食性農業害虫であるハスモンヨトウ幼虫を使用し、唾液内共生菌の植物防御機構における役割の解明を目指した。

(2) ハスモンヨトウ幼虫を無菌条件下で育成するシステムを確立しており、無菌育成幼虫から無菌OSの採取に成功していた。この無菌OSをシロイヌナズナ葉に処理すると、通常の有菌OSと比較し、食害応答性ホルモンであるジャスモン酸(JA)シグナルをより強く誘導することを明らかにしていた。

(3) 次世代シーケンス解析によって、ハスモンヨトウ幼虫OS内には少なくとも69種の共生菌が存在することを先行的に明らかにしていた。

2. 研究の目的

(1) ハスモンヨトウ幼虫OS内共生菌群から、シロイヌナズナの防御応答シグナル経路に作用する責任共生菌の単離およびOS内における共生菌濃度の決定を目指す。

(2) 共生菌によるシロイヌナズナ食害誘導性防御応答の調節作用機序を理解し、植物のシグナル伝達経路におけるOS内共生菌の作用点を分子レベルで明らかにすることで、植食者-植物共生微生物の三者間相互作用における新規モデルの提唱を目指す。

3. 研究の方法

(1) ハスモンヨトウ幼虫OS内共生菌が作用するシロイヌナズナのシグナル伝達ネットワークを明らかにするために、無菌OSおよび有菌OSをシロイヌナズナに処理し、防御応答に関わる植物ホルモン[サリチル酸(SA)、アブシジン酸(ABA)]応答性マーカー遺伝子[*ICS1*(SA応答)、*GEA6*(ABA応答)]の4時間後の発現量を定量PCRシステムによって解析し、野生株と比較した。また、OS処理後の各植物ホルモンの1時間後の蓄積量をLC-MS/MSシステムによって定量した。さらに、JAを含めた各植物ホルモンの応答性変異体[*npr1*(SA応答欠損)、*abi1-1*(ABA応答欠損)、*coi1-1*(JA応答欠損)]に無菌OSおよび有菌OSを処理し、応答性を評価した。

(2) シロイヌナズナのシグナル伝達経路を制御するOS内責任共生細菌を単離するために、2xYT寒天プレートに有菌OSを塗布し、様々な条件(好気性条件、嫌気性条件、pH依存性)で培養した。嫌気性条件で培養する際はアネロパックを使用し、28℃で2日間培養した。得られたコロニーから菌体を回収し、DNAを抽出した後、シーケンス解析を行い菌種の特特定を行った。得られた菌については、菌種特異的なプライマーを設計し定量PCRシステムを用いてOS内の菌体濃度を推定した。

単離したOS内共生菌がシロイヌナズナのホルモンシグナルに作用しているかを評価するために、無菌OSに推定濃度の共生菌を加え、シロイヌナズナ葉に処理し各ホルモンのマーカー遺伝子の発現量を定量PCRシステムによって解析することで、責任共生菌の単離を目指した。

(3) 植物は、病原菌や害虫由来糖鎖およびペプチド等を細胞膜上の受容体様キナーゼ(RLKs: Receptor-like kinases)を利用受容し、外来生物の存在を認識する。その結果、下流にシグナルが伝達され、防御応答の誘導につながる(Uemura et al., Miya et al.)。OS内共生菌が、これらのシグナル伝達因子に作用することで植物内シグナル伝達経路を制御しているのかを検証するために、複数種のRLK欠損株(*cerk1-1*、*hak1*)を用いて有菌OSおよび無菌OSに対する応答性を解析した。

4. 研究成果

(1) 有菌 OS を処理したシロイヌナズナ葉では、機械傷(コントロール)処理した個体と比較し、SA 応答性遺伝子 *ICS1* および ABA 応答性遺伝子 *GEA6* の発現量が有意に上昇していた(図 1b)。同様に、SA および ABA が処理葉において有意に蓄積

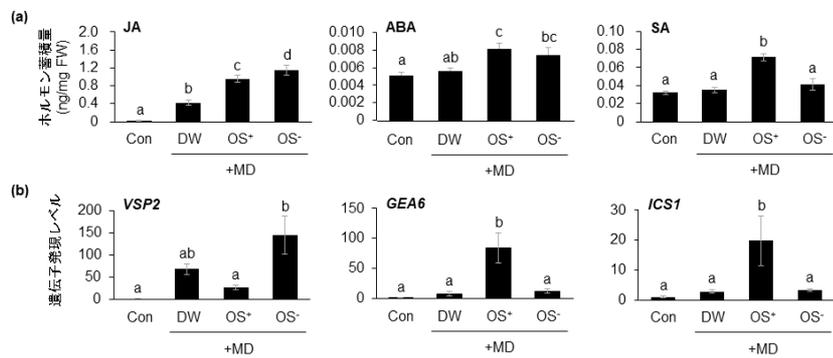


図1. 有菌 OS(OS⁺)、無菌 OS(OS⁻)処理時にシロイヌナズナ葉における植物ホルモン量(a)および防御遺伝子の発現量(b)。Con、DW はそれぞれ未処理、傷害(MD)+Mock 処理を示す。異なるアルファベットは統計的有意(P<0.05)を示す。

葉では *ICS1* および *GEA6* の発現量が低下し、ホルモン蓄積量も同様のパターンを示した(図 1a)。これらの結果から、幼虫 OS 内共生菌はシロイヌナズナにおいて JA シグナルを抑制する一方で、SA および ABA シグナル伝達経路を活性化することがわかった。

同様の手法を用いて *coil-1*、*npr1*、*abil-1* 変異体に有菌 OS および無菌 OS を処理し、各ホルモン応答性マーカー遺伝子の発現量を解析したところ、以下の事柄が明らかになった。1) *abil-1* において OS 誘導性 *VSP2* の発現が低下している。2) *npr1* や *abil-1* では有菌 OS によって誘導される *GEA6* の発現が抑制される。3) *coil-1* や *abil-1* では *ICS1* の発現が恒常的に上昇している(図 2)。これらの結果から、OS によって誘導される ABA シグナルが *VSP2* の発現に関与すること、共生菌によって活性化される SA シグナルが *GEA6* の発現量を上昇させること、また JA や ABA シグナルが *ICS1* の発現量を低下させることなどが明らかとなり、OS 内共生菌が SA および ABA 経路を活性化することで間接的に JA シグナルを阻害するというメカニズムが新たに提唱された。ここまでの研究成果を論文にまとめ発表した(Yamasaki et al.)。

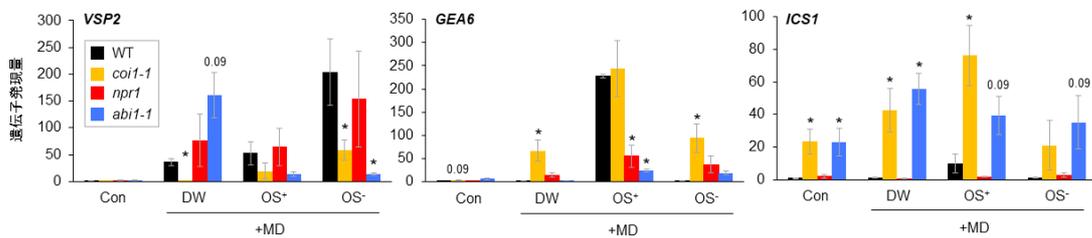


図2. ホルモン応答変異株における有菌 OS(OS⁺)、無菌 OS(OS⁻)処理時の防御遺伝子の発現量。アスタリスクは統計的有意(P<0.05)を示す。

(2) ハスモンヨトウ幼虫 OS 内に生息する共生菌の単離を独立した 3 回の実験で試みたところ、*Enterococcus mundtii* などの *Enterococcus* 属の菌種が数多く単離された。特に、嫌気性条件下で共生菌の培養を行ったところ、*Staphylococcus epidermidis* が複数回検出された。*S. epidermidis* の OS 内濃度を概算したところ、濁度換算(OD₆₀₀)で 1.0×10⁻⁵ の濃度で存在することが分かった。当該共生菌を無菌 OS に添加し、シロイヌナズナのマーカー遺伝子(*VSP2*、*GEA6*、*ICS1*)の発現量を解析したところ、有菌 OS を処理した場合と同様の発現パターンを示した(図 3)。この結果から、*S. epidermidis* が OS 内でシロイヌナズナのシグナル伝達経路に作用する責任共生細菌であることを明らかにした。一方で *E. mundtii* の OS 内濃度の測定(OD₆₀₀=0.01)およびシロイヌナズナ防御応答における役割を評価したものの、無菌 OS と同程度の応答を示したことから当該共生菌は寄主植物のシグナル伝達経路には作用しないことが示された。

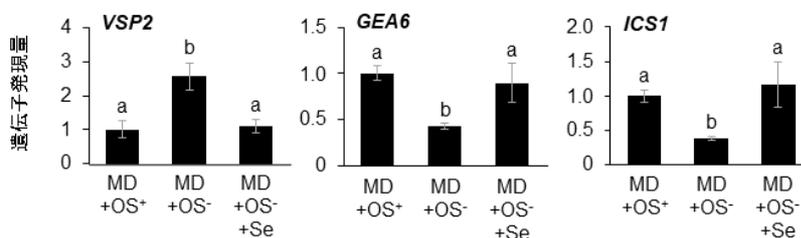


図3. 無菌 OS(OS⁻)に *S. epidermidis* (Se)を加えてシロイヌナズナ葉に処理した際に誘導された防御遺伝子の発現量。異なるアルファベットは統計的有意(P<0.05)を示す。

(3) 唾液内共生菌が植物の外来生物由来分子の認識システムに作用することで、植物内シグナル伝達経路を制御している可能性を評価するために、*cerk1* および *hak1* 変異体に無菌 OS および有菌 OS を処理し、定量 PCR システムによって防御遺伝子の発現量を解析したものの、当該変異体における防御遺伝子の発現量は有菌・無菌 OS 処理サンプル間で有意な差は観察されなかつ

た。この結果から、OS 内共生菌は既知の RLK を介した外来分子受容システムとは独立して、植物内シグナル伝達経路に作用する新規シグナル経路が存在する可能性が示唆された。

< 引用文献 >

Chung SH, et al. (2013) *PNAS* 110(39):15728-15733.

Yamasaki et al. (2021) *New Phytol.* 231:2029-2038

Uemura et al. (2020) *Commun. Biol.* 3:224

Miya et al. (2007) *PNAS* 104:19613-19618

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 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Yamasaki Yukiyo, Sumioka Hiroka, Takiguchi Mayu, Uemura Takuya, Kihara Yuka, Shinya Tomonori, Galis Ivan, Arimura Gen ichiro	4. 巻 231
2. 論文標題 Phytohormone dependent plant defense signaling orchestrated by oral bacteria of the herbivore Spodoptera litura	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 New Phytologist	6. 最初と最後の頁 2029 ~ 2038
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/nph.17444	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 瀧口麻由, 上村卓矢, 住岡裕香, 山崎廉予, 木原侑香, 新屋友規, Ivan Galis, 有村源一郎
2. 発表標題 シロイヌナズナ及びコマツナ誘導防御におけるハスモンヨトウ唾液内共生細菌による影響解明
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2021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
---------	---------