

令和 4 年 6 月 20 日現在

機関番号：34303

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2020～2021

課題番号：20K22584

研究課題名(和文)ダイズが持つハスモンヨトウ抵抗性機構の生理解析

研究課題名(英文)Physiological analysis of the resistant mechanisms of soybean for *Spodoptera litura*

研究代表者

中田 隆 (Nakata, Ryu)

京都先端科学大学・バイオ環境学部・講師

研究者番号：90882548

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：ダイズが持つハスモンヨトウ抵抗性の作用機構を明らかにするため、ダイズ品種「ヒメシラス」を摂食したハスモンヨトウ幼虫体内の生理的な変化を明らかにし、その変化をもたらす因子を探索した。中腸内の消化酵素活性に着目し、中腸内のpHを正確に測定した上で酵素活性を測定し、プロテアーゼの活性低下が認められた。そこで、ヒメシラスの葉からプロテアーゼインヒビターを抽出する適切な条件を検討した。その上でプロテアーゼ阻害活性を指標に精製を進めたところ、ヒメシラスに特徴的な成分を認められた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでの、ダイズの抵抗性遺伝子の特定が重視され抵抗性の作用機構に関する研究はあまり進んでいない。本研究ではハスモンヨトウ幼虫の生理的な変化に着目し、抵抗性の作用機構の解明を目指した。本研究成果により、ダイズ品種「ヒメシラス」を摂食したハスモンヨトウ幼虫において中腸内のプロテアーゼ活性が低下することが明らかになり、その原因物質(阻害剤)がヒメシラスに含まれることが明らかになった。この成果は、抵抗性の作用機構の理解に基づいた有用な強抵抗性品種の開発に繋がると期待される。

研究成果の概要(英文)：In order to elucidate the resistant mechanisms of soybean for *Spodoptera litura*, the physiological changes within the body of the larvae of *S. litura* fed on the soybean variety "Himeshirazu" were clarified, and the factors that cause these changes were investigated. Focusing on digestive enzyme activity in the midgut, we measured enzyme activity after accurately measuring pH in the midgut, and found a decrease in protease activity. Therefore, we examined the appropriate conditions for extracting protease inhibitors from the leaves of Himeshirazu. Then, we proceeded with purification using protease inhibitory activity as an indicator, and found a component characteristic of Himeshirazu.

研究分野：化学生態学

キーワード：ダイズ ハスモンヨトウ 抵抗性 作用機構 プロテアーゼインヒビター

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

ハスモンヨトウ *Spodoptera litura* はダイズ *Glycine max* の主要な害虫のひとつである。幼虫がダイズの葉を食い荒らすため、抵抗性を持つダイズ品種が求められている。しかし、現在栽培されている高品質 (良質かつ多収) の育成品種は抵抗性を持たず、抵抗性を付与した新品種の開発が必要である。

これまでの研究では、既知の抵抗性品種から抵抗性遺伝子や代謝物を特定することが重視されてきた。まず強抵抗性品種から複数の抵抗性遺伝子が見つけれ、それら遺伝子を導入した品種は中程度の抵抗性を示したことが報告されている。また、これまでに研究代表者はハスモンヨトウの摂食行動を阻害する複数の代謝物を見出し、抵抗性に関わるダイズの新規ゲノム領域を明らかにした。このようにダイズが持つ抵抗性遺伝子や代謝物の知見は多いが、未だ高品質な強抵抗性品種は開発されていない。

2. 研究の目的

本研究では抵抗性機構の解明を目指し、抵抗性ダイズ品種を加害したハスモンヨトウ幼虫の生理的变化に着目する。まず抵抗性品種を加害した幼虫において、消化酵素活性などの生理の変化を定量する。そして、活性が低下する生理を特定し、その原因となるダイズの抵抗性代謝物を明らかにして抵抗性機構を分子レベルで解明することを目指す。本研究により抵抗性機構の分子レベルでの理解を深めることで、その知見に基づいた高品質な強抵抗性品種の開発につながると期待される。

3. 研究の方法

(1) ダイズおよびハスモンヨトウの生育条件

ダイズは抵抗性品種「ヒメシラズ」と感受性品種「フクユタカ」を用い、培養土に播種して植物栽培用 LED 照明で V3 ステージまで生育させて実験に供試した。ハスモンヨトウはインキュベーター内で人工飼料を与えて継代飼育し、5 齢幼虫を実験に供試した。

(2) 中腸の pH 測定

V3 ステージのヒメシラズとフクユタカを不織布袋中で 5 齢のハスモンヨトウ幼虫に 24 時間摂食させた。その後幼虫を解剖して中腸内容物を取り出して前部・中央部・後部の 3 つに分割した。それぞれをプレパラートに乗せ、半導体センサ pH 電極 (フラット ISFET pH 電極; HORIBA) を用いて pH を測定した。

(3) 中腸のプロテアーゼ活性測定

中腸の粗酵素抽出液の調製

(2)と同様にして得た中腸全体の内容物に PBS バッファーを加えて磨砕し、遠心して上清 (粗酵素抽出液) を調製した。タンパク質量を BCA 法で測定し、適当な濃度に希釈して酵素活性測定に用いた。

プロテアーゼ活性測定

CHES-NaOH バッファー (pH 9.5) 中で Azocasein を基質に用いてプロテアーゼ活性を測定した。酵素反応および後処理終了後の溶液は 96 ウェルマイクロプレートリーダーで吸光度 (ABS₄₄₀) を測定して酵素活性を比較した。

(4) ヒメシラズ由来のプロテアーゼインヒビターの抽出および精製

ダイズ葉の抽出および阻害活性測定

ヒメシラズおよびフクユタカの葉をヘキサン、酢酸エチル、アセトン、メタノールの順で逐次抽出し、各抽出段階で抽出物を得てそれぞれのプロテアーゼ阻害活性を測定した。(3)- で得た粗酵素抽出液と抽出物をプレインキュベートし、そのあと(3)- と同様にして吸光度を測定した。それぞれの吸光度から阻害活性を計算した。

活性画分の精製

で活性が認められた画分をシリカゲルカラムクロマトグラフィーで分画した。酢酸エチル、アセトン、メタノールの順で溶出し、各画分のプロテアーゼ阻害活性を(4)- と同様にして測定した。活性が確認された画分はさらに ODS カラムクロマトグラフィーで分画した。0%、50%、100%MeOH の順で溶出し、各画分のプロテアーゼ阻害活性を(4)- と同様にして測定した。

(5) 活性画分の LC-MS 分析と比較解析

(4)- で得た活性画分を LC-MS (LCMS-2020; Shimadzu) で分析し、解析ソフトウェア (Profiling solution; Shimadzu) でデータ処理・比較解析した。LC-MS 分析では PFPP カラムを

用い、水/アセトニトリルで溶出して網羅的に分析した。その後、検出されたピークを網羅的に比較し、ヒメシラズで特徴的に多く検出されたピークを見出した。

4. 研究成果

ハスモンヨトウを含む鱗翅目幼虫の中腸の pH は 10 程度の強塩基性であることが知られている。しかしながら、正確な pH の値は代表的な種や大型種など限られた種についてのみ報告されている。その理由としては、小型種では中腸内容物が微量で取り扱いが難しい上、微量サンプルの pH の測定に特別な器具を用いる必要があったからである。一方で、自身の実験条件下で実際にどの程度の pH かを把握するのは難しいが、酵素活性などを測定する場合には本来正確に測定する必要がある。本研究では、HORIBA 製の半導体センサ pH 電極(フラット ISFET pH 電極)を用い、微量の腸管内容物の pH を測定することができた。ヒメシラズおよびフクユタカの葉を摂食したハスモンヨトウの中腸の pH は、前部および後部で約 9.1、中央部で約 9.5 であった。この結果は、鱗翅目幼虫の中腸の中央部では pH が高くなる先行研究例と一致する。

続いて、ヒメシラズおよびフクユタカを摂食したハスモンヨトウ幼虫の中腸から粗酵素抽出液を調製し、CHES-NaOH バッファー(pH 9.5)中で Azocasein を基質に用いてプロテアーゼ活性を測定した。その結果、ヒメシラズを摂食したハスモンヨトウ幼虫のプロテアーゼ活性は有意に低下し、約 10%の活性低下が認められた(図 1)。

ヒメシラズおよびフクユタカの葉をヘキサン、酢酸エチル、アセトン、メタノールの順で逐次抽出し、各抽出段階で抽出物を得てそれぞれのプロテアーゼ阻害活性を測定した。その結果、アセトン抽出物に活性が認められた。次にアセトン抽出物をシリカゲルカラムクロマトグラフィーで分画したところ、アセトン溶出画分に活性が認められた。続いて、アセトン溶出画分を ODS カラムクロマトグラフィーで分画したところ、100%MeOH 溶出画分に活性が認められた(図 2)。

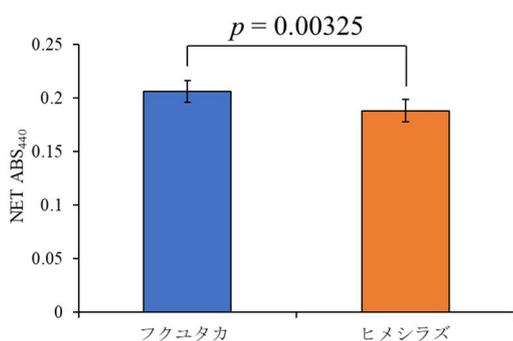


図1. ダイズを摂食したハスモンヨトウ幼虫の中腸のプロテアーゼ活性の比較。粗酵素抽出液を加えずに反応させた場合の吸光度を引いてNET ABS₄₄₀で比較した。(Welch's *t*-test, *n* = 8)

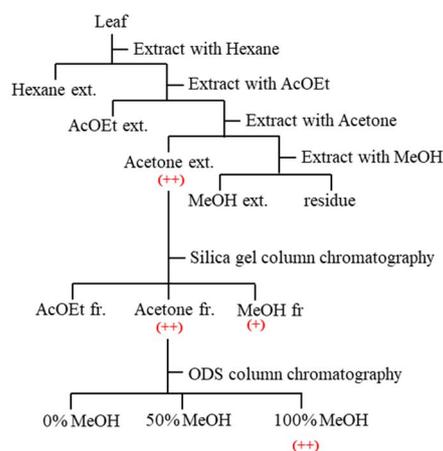


図2. ダイズ葉の抽出および分画スキーム。活性画分を(+)および(++)で示した

ヒメシラズとフクユタカから得られた 100%MeOH 画分を LC-MS 分析に供試し、検出されるピークを網羅的に比較してヒメシラズで特徴的に多く検出されたピークを探索した。その結果、ポジティブイオンモードで m/z 338 および 391 の 2 つのピークを見出した(図 3)。いずれもフクユタカにも含まれており、図 1 で大きな差が得られなかった理由だと考えられる。なお、本研究ではこれらの成分の同定には至らなかった

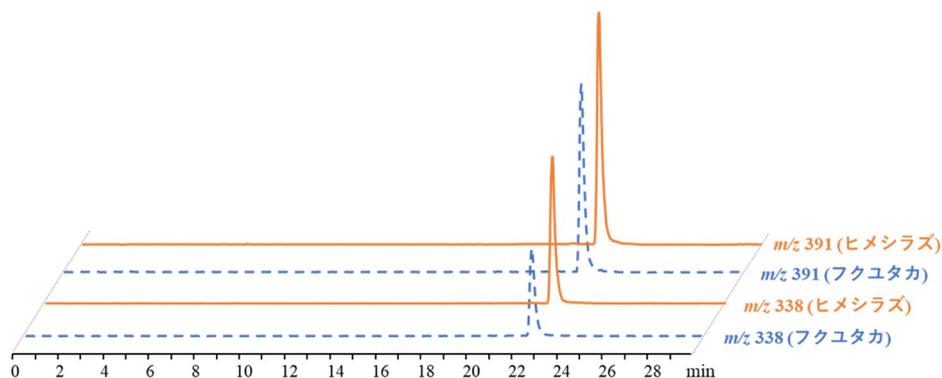


図3. ヒメシラズとフクユタカから得られた100% MeOH画分のLCMS分析および比較解析の結果、見出されたヒメシラズで特徴的に多く検出された2つのピーク。それぞれポジティブイオンモードで m/z 338, 391 で、それぞれの値のXICを示している。オレンジ色の実線はヒメシラズ、青色の点線はフクユタカのXICである。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Nakata Ryu, Yano Mariko, Hiraga Susumu, Teraishi Masayoshi, Okumoto Yutaka, Mori Naoki, Kaga Akito	4. 巻 11
2. 論文標題 Molecular Basis Underlying Common Cutworm Resistance of the Primitive Soybean Landrace Peking	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Genetics	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fgene.2020.581917	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 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 中田 隆, 矢野 まりこ, 平賀 勸, 寺石 政義, 奥本 裕, 森 直樹, 加賀 秋人
2. 発表標題 ダイズの在来種 Peking が持つハスモンヨトウ抵抗性の分子基盤
3. 学会等名 日本農薬学会第 46 回大会
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
---------	---------