

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6月12日現在

機関番号：82107

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2009～2011

課題番号：21710241

研究課題名（和文）揮発性物質を介したアブラナ科植物－植食者－捕食者間相互作用の導出機構の分子基盤

研究課題名（英文）Molecular basis of mechanisms underlying volatile-mediated tritrophic interactions among Brassicaceae plants, herbivores, and parasitoids

研究代表者

釘宮 聡一 (KUGIMIYA SOICHI)

独立行政法人農業環境技術研究所・生物多様性研究領域・主任研究員

研究者番号：10455264

研究成果の概要（和文）：コナガサムライコマユバチはアブラナ科植物を食害するコナガ幼虫に寄生する。この寄生蜂は食害植物が放出する揮発性成分を手掛かりに用いて寄主を探索している。本課題では、主にアブラナ科モデル植物のシロイヌナズナが食害時に放出する揮発性成分を化学分析で明らかにし、その生産に関わる遺伝子を操作した植物に対する寄生蜂の選好性を行動試験で調べ、植物－植食者－寄生捕食者の三者間相互作用が導出される仕組みを追究した。

研究成果の概要（英文）：The parasitic wasp, *Cotesia vestalis*, oviposits on larvae of the diamondback moth, *Plutella xylostella*, a pest of Brassicaceae plants. It is known that the female parasitoids search for host larvae through volatile organic compounds (VOCs) released by host-infested plants. To investigate molecular basis of mechanisms underlying VOC-mediated tritrophic interactions among Brassicaceae plants, herbivores, and parasitoids, we carried out chemical analysis of VOCs released by *Arabidopsis thaliana* infested by *P. xylostella* larvae, then genetically manipulated the VOC biosynthesis in *Arabidopsis* plants, and examined behavioral responses of parasitoids to the transgenic plants.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
2011年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：生物分子科学・生物分子科学

キーワード：生物間相互作用・情報化学物質・植食者誘導性植物揮発性物質・植物誘導防衛・間接防衛・シロイヌナズナ・寄生蜂・コナガサムライコマユバチ

1. 研究開始当初の背景

(1) 植物は昆虫等の植食者の被害を受けると、健全な状態とは異なる組成の揮発性物質（匂い）を放出する。植食者の天敵である捕食者は、こうした植食者誘導性の植物揮発性

成分（Herbivore-induced plant volatiles: HIPVs）を手掛かりに用いて、餌となる植食者を探していることが明らかになってきた。このように、植物が生産する揮発性成分は
① 天敵を誘引する[間接防衛]だけでなく、

② 昆虫忌避成分や抗菌成分として〔直接防衛〕の手段にもなると考えられる。さらに、③ 未被害の植物が、被害植物の放出した揮発性成分を感受して事前に防衛を開始する〔プライミング効果〕も報告されている。生態系に放出される HIPVs は、未知の機能を含めて、これらの生態学的役割を担っていると推測される。

(2) 本研究では、アブラナ科植物ーコナガ(植食者)ーコナガサムライコマユバチ(捕食寄生者)の三者系に注目した。本寄生蜂はコナガ幼虫(寄主)が食害した植物の HIPVs を利用して効率よく寄主を探索する。しかし、モデル植物のシロイヌナズナの HIPVs 組成が不明なために、食害応答に伴う HIPVs の誘導生産機構の詳細な研究を阻み、天敵誘引に関わる情報化学物質を未解明にしていた。主な原因は、シロイヌナズナの HIPVs 放出量が極微量なために化学分析が困難な点と、植物による微量成分の持続的な放出を人工的に模倣できず、寄生蜂の誘引性を適切に試験できない点にあった。そこで、シロイヌナズナ HIPVs の簡便な捕集・分析手法を開発し、モデル植物の豊富な遺伝子情報・ツールとともに活用することで、天敵誘引に関わる成分を解明し、HIPVs を介した三者間相互作用の導出機構を追究することとした。

2. 研究の目的

シロイヌナズナーコナガーコナガサムライコマユバチ三者関係をモデルケースとして、植物の揮発性成分を介した間接防衛に注目し、この三者系で働く情報化学物質を解明するとともに、その生産に関与する遺伝子を明らかにする。これらを通して、複雑な生物間相互作用が導出されるメカニズムを解き明かす分子基盤の構築を目指す。

3. 研究の方法

(1) Stir bar sorptive extraction (SBSE) の方法でシロイヌナズナの揮発性成分を吸着し、加熱脱着した成分を GC-MS で化学分析した。

(2) 健全株よりもコナガ食害株から多く放出される揮発性成分 (HIPVs) のうち、生合成遺伝子が既知の一成分に注目し、その遺伝子が破壊された HIPV 欠損変異株を選抜した。

(3) また、同じ遺伝子を導入されて常に発現している HIPV 過剰発現株を作出した。

(4) これら HIPV 欠損変異株や過剰発現株と野生株との間の選択実験で寄生蜂の行動を調べた。

(5) 遺伝子操作によって植物自身に成分の放出を制御させる一方、人工合成品による成分放出の模倣も試みた。揮発性成分に徐放性を付与するため triethyl citrate を溶媒に用い、市販で入手した各 HIPV 成分について一連の希釈溶液を塗布した濾紙を健全株に添えて行動試験を行った。

(6) HIPVs の天敵を誘引する間接防衛の機能の他に、直接防衛の機能として考えられる抗菌性の評価を試みた。揮発性成分のみが気相を拡散できるような2分割シャーレの片側に上記 HIPV 過剰発現株や野生株、そのコナガ食害株を培養し、残る片側にはコナガ飼育時に発生するクモノスカビの仲間 *Rhizopus sp.* の菌糸懸濁水溶液を塗布したペーパーディスクを培地上に置いて、カビの生育を比較観察した。

(7) 実験モデル植物であるシロイヌナズナ以外に、栽培作物のコマツナでも寄生蜂の誘引に関わる HIPVs の解明を試みた。コナガによる食害開始後やコナガ除去後の揮発性成分の放出動態を化学分析で明らかにし、寄生蜂の誘引性との関係を調べた。

4. 研究成果

(1) コナガに食害されたシロイヌナズナが放出する HIPVs を SBSE 法によって吸着し、そのまま GC-MS で分析する簡便な技術を開発した。

(2) 選抜した HIPV 欠損変異株の揮発性成分を SBSE 法で捕集・分析し、破壊遺伝子に対応する揮発性成分が、コナガに食害されても誘導生産されていないことを確認した。

(3) また、作出した HIPV 過剰発現株の揮発性成分を SBSE 法で捕集・分析し、導入遺伝子に対応する成分だけが、健全な状態でも常に多く放出されていることを確認した。

(4) HIPV 欠損変異株と野生株をコナガ幼虫に食害させて行動試験に供したところ、寄生蜂は野生株に対して有意な選好性を示した。一方、HIPV 過剰発現株と野生株を健全な状態で行動試験に供したところ、寄生蜂は過剰発現株に対して有意な選好性を示した。従って、この HIPV 成分がコナガの天敵である寄生蜂を誘引する間接防衛の役割を担っていることが強く示唆された。

(5) 本 HIPV 成分の人工化合物を triethyl citrate で希釈した溶液を添えた処理株と、溶媒のみを添えた対照株とを行動試験に供したところ、寄生蜂は処理株に対して濃度依存的に選好性を示した。この結果は、前述した同じ HIPV 成分の過剰発現株に対する選好性と一致していた。一方、寄生蜂は他の HIPV 成分に対して調べた濃度範囲で選好性を示さなかった。植物の遺伝子操作によって HIPV 成分の放出を制御する以外に、人工の化合物で成分放出を模倣することによって寄生蜂を誘引できることは、応用的な見地からも望ましい。

(6) 2 分割シャーレ内に前述の HIPV 過剰発現株が存在する場合と野生株が存在する場合で、カビの生育に顕著な差異は認められなかった。また、野生型の食害株が存在する場合でも同様であった。シロイヌナズナが実際に放出している微量の濃度では、離れた場所に発生した高密度のカビの生育を十分に抑制できないと推測される。

(7) コマツナでは、ベンジルシアニドとジメチルトリスルフィドの放出量がコナガ食害の経過とともに増加し、コナガ除去後には減少することを明らかにした。一方、複数のテルペン類も食害に伴って放出量が増加したが、コナガ除去後にも放出され続けていた。人工の化合物を用いた行動試験で、寄生蜂は上記 2 成分に対して濃度依存的に選好性を示したが、他の成分に対してはいずれの濃度でも選好性を示さなかった。コナガサムライコマユバチは、これら 2 成分を感知することで、寄主が存在しているコマツナを効率良く発見できると考えられる。

(8) 尚、これらの研究成果に付随して、行動試験に使用するのに適した寄生蜂の条件を検討する過程で、寄生蜂の HIPVs に対する反応が生理条件に依存的であり、特に、未交尾時や空腹時には食害株に対する選好性が低下するという新知見を得た。

(9) また、寄生蜂は寄主を探索する以外に、餌の探索でも植物の揮発性成分（花香成分など）を利用しており、双方で化学情報を使い分けている可能性を示唆する興味深い観察結果が得られた。

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 5 件)

- ① Kugimiya S., Shimoda T. and Takabayashi J. (2011) Timing matters: release of plant volatiles that are attractive to parasitoids. *Journal of Plant Interactions* 6: 187-188. 査読有
DOI: 10.1080/17429145.2010.543475
- ② Kugimiya S., Shimoda T., Uefune M. and Takabayashi J. (2010) Orientation of the parasitic wasp, *Cotesia vestalis* (Haliday) (Hymenoptera: Braconidae), to visual and olfactory cues of field mustard flowers, *Brassica rapa* L. (Brassicaceae), to exploit food sources. *Applied Entomology and Zoology* 45: 369-375. 査読有
DOI: 10.1303/aez.2010.369
- ③ Kugimiya S., Shimoda T., McNeil J.N. and Takabayashi J. (2010) Females of *Cotesia vestalis*, a parasitoid of diamondback moth larvae, learn to recognise cues from aphid-infested plants to exploit honeydew. *Ecological Entomology* 35: 538- 541. 査読有
DOI: 10.1111/j.1365-2311.2010.01207.x
- ④ Kugimiya S., Shimoda T., Tabata J. and Takabayashi J. (2010) Present or past herbivory: a screening of volatiles released from *Brassica rapa* under caterpillar attacks as attractants for the solitary parasitoid, *Cotesia vestalis*. *Journal of Chemical Ecology* 36: 620- 628. 査読有
DOI: 10.1007/s10886-010-9802-6
- ⑤ Kugimiya S., Shimoda T., Wajnberg J., Uefune M. and Takabayashi J. (2010) Host-searching responses to herbivory-associated chemical information and patch use depend on mating status of female solitary parasitoid wasps. *Ecological Entomology* 35: 279 - 286. 査読有
DOI: 10.1111/j.1365-2311.2010.01194.x

[学会発表] (計 7 件)

- ① 釘宮聡一, 安部洋, 下田武志, 上船雅義, 高林純示「コナガ食害誘導性植物揮発性成分に対するコマユバチ 2 種の反応—モデル植物シロイヌナズナを用いた生物間相互作用解析—」第 56 回日本応用動物昆虫学会大会. 2012 年 3 月 29 日, 近畿大学.
- ② 安部洋, 富高保弘, 立石剣, 下田武志, 瀬尾茂美, 釘宮聡一, 大西純, 櫻井民人, 津田新哉, 小林正智「アザミウマ、ハモグリバエ抵抗性解明を目指した実験植物シロイヌナズナの利用」第 56 回日本応用動

物昆虫学会大会. 2012年3月29日, 近畿大学.

- ③ Kugimiya S., Shimoda T., Uefune M. and Takabayashi J. “Physiology-dependent use of plant volatile infochemicals by parasitoids” 14th Symposium on Insect-Plant Interactions. 2011年8月15日, Wageningen University, Netherland.
- ④ 釘宮聡一, 安部洋, 下田武志「コナガ食害誘導性植物揮発性成分に対するコナガサムライコマユバチの選好性—モデル植物シロイヌナズナを用いた三者間相互作用解析—」第55回日本応用動物昆虫学会大会. 2011年3月28日, 九州大学.
- ⑤ Kugimiya S., Shimoda T. and Takabayashi J. “Past or present: parasitoid attractants from *Brassica rapa* under caterpillar attacks” 26th Annual Meeting of International Society of Chemical Ecology, 2010年8月4日, Tours, France.
- ⑥ 釘宮聡一, 下田武志, 高林純示「コナガの食害即時的に放出される植物揮発性成分に対するコナガサムライコマユバチの選好性。」第54回日本応用動物昆虫学会大会, 2010年3月26日, 千葉大学.
- ⑦ Kugimiya S., Uefune M., Shimoda T. and Takabayashi J. “Mating dependent plasticity in use of herbivore-associated chemical information by foraging parasitoid wasps.” 25th Annual Meeting of International Society of Chemical Ecology, 2009年8月27日, Neuchâtel University, Switzerland.

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

ホームページ等

http://www.niaes.affrc.go.jp/researcher/kugimiya_s.html 【独立行政法人 農業環境技術研究所 研究者情報 (釘宮 聡一)】

6. 研究組織

(1) 研究代表者

釘宮 聡一 (KUGIMIYA SOICHI)
独立行政法人農業環境技術研究所・
生物多様性研究領域・主任研究員
研究者番号: 10455264

(2) 研究協力者

下田 武志 (SHIMODA TAKESHI)
独立行政法人農業・食品産業技術総合研究
機構・中央農業総合研究センター病害虫研
究領域・主任研究員
研究者番号: 20370512

安部 洋 (SHIMODA TAKESHI)
独立行政法人理化学研究所・バイオリソー
スセンター・研究員
研究者番号: 90360479