

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 9 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2010～2014

課題番号：22380068

研究課題名(和文)植物の誘導抵抗反応に対する昆虫の対抗適応の分子基盤

研究課題名(英文)Molecular basis of insect counter adaptation to plant induced defense responses

研究代表者

森 直樹 (Mori, Naoki)

京都大学・(連合)農学研究科(研究院)・准教授

研究者番号：30293913

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,000,000円

研究成果の概要(和文)：植物の昆虫に対する防御応答機構を解明するには、同時に昆虫の対抗適応メカニズムを知ることが重要である。本研究では、植物の間接防御応答を誘導する鱗翅目昆虫由来エリシター(volicitin)に注目し、その類縁体の構造とエリシター活性の相関を明らかにすることで、寄主植物の防御機構を掻い潜ろうと様々な分子種を作り出してきた昆虫と、それに併せて害虫識別機構を発達させてきた植物の攻防を分子レベルで明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Plant defense mechanism against insects can not be fully studied without knowing how the insects can develop counter adaptation and overcome it. This project focused on lepidopteran insect elicitor, volicitin, that induces plant indirect defense mechanism. The structure-activity-related studies about volicitin analogs on various plants revealed the molecular basis of cat-and-mouse game between the insects that develop new molecular species to circumvent the system and the plants that customize its "IFF" system to its own pests.

研究分野：化学生態学

キーワード：counter adaptation 対抗適応 植物防御反応 間接防御応答 elicitor 構造活性相関 昆虫

1. 研究開始当初の背景

(1) 近年、植物保護の新しいコンセプトとして植物本来の免疫システムが注目されている。植物の免疫システムには、植食性昆虫の食害に対し、ニコチンやタンパク質分解酵素阻害剤が蓄積する直接防御と、特異な揮発成分の放出により寄生蜂が介在する間接的防御が知られている。しかしながら一方で、これら植物の防御機構を植食性昆虫がどのように克服しているか、すなわち昆虫の“対抗適応”については世界的にもほとんど研究が進んでいない。植物本来の免疫システムを植物保護に応用するには、植物だけではなく昆虫も含めた双方向のアプローチが必要であり、植物の抵抗性に対する昆虫側の対抗適応の分子メカニズムが注目されている。

(2) トウモロコシは間接防御応答としてテルペン等の揮発成分を放出するが、この反応を誘導するエリシターが鱗翅目幼虫の唾液から同定され、volicitin と命名された。食害を受けた植物傷口にこのエリシターが付着すると、シグナル伝達により植物体全身で揮発成分生合成遺伝子が活性化され、インドールやテルペンなどの揮発成分が de novo 合成される。このような化合物を幼虫自身が持つ理由は明らかになっていなかったが、我々のこれまでの研究で、volicitin 及びその類縁体が幼虫体内の窒素代謝の効率化に寄与していることを明らかにした。しかしながら、何故こうした類縁体が昆虫の中で派生したのかはわかっていない。また、これら類縁体がトウモロコシに対して異なるエリシター活性を示すことは既に報告したが、その生態学的意義はわかっていなかった。

2. 研究の目的

植物の間接防御応答を誘導するエリシター volicitin 類に対する植物の応答は極めて再現性が高く、その認識から遺伝子発現に至るシグナル伝達経路も含めて堅牢なシステムであると言える。昆虫が何故 volicitin 及びその類縁体を作るようになったのかを明らかにするため、鱗翅目以外の昆虫にも視野を広げ、volicitin 類の生合成経路を解明する。また同時に、それら類縁体に対する植物側の応答を精査し、昆虫と植物のいたちごっことも言えるべき攻防を化学分子レベルで明らかにすることを本研究の目的とする。

3. 研究の方法

(1) 新規 volicitin 類縁体の同定
タバコスズメ *Manduca sexta* 終齢幼虫の腸管内容物を採取し、50%MeOH で抽出した上清を LCMS-IT-TOF で分析し、未同定の volicitin 類縁体を発見した。脱プロトン分子イオンから本化合物が脂肪酸の 18 位が水酸化された新規の volicitin 類縁体であることが推測されたため、既に報告した volicitin の合成方法を応用して 18 位水酸

化体を合成し、本化合物の同定を試みた。

(2) 様々な volicitin 類縁体の植物に対するエリシター活性比較

Volicitin、18 位が水酸化された volicitin 異性体、水酸基のない *N*-linolenoyl-L-glutamine 及び *N*-linolenoyl-L-glutamic acid をそれぞれ合成した。v3 ステージまで栽培したトウモロコシ B73 系統幼苗、あるいは 6-7 週間栽培したナス Black beauty、タバコ K326 をアッセイに用い、それぞれ傷口に 1 nmol の volicitin 類縁体を処理して放出される揮発成分を吸着剤で捕集し GC 及び GCMS で分析した。

(3) Volicitin 類縁体の生合成機構の解明

鱗翅目 5 種 (ハスモンヨトウ *Spodoptera litura*、アワヨトウ *Mythimna separata*、カイコ *Bombyx mori*、タバコスズメ *Manduca sexta*、オオスカシバ *Cephonodes hylas*) の終齢幼虫、タイワンエンマコオロギ *Teleogryllus taiwanemma* の成虫及びショウジョウバエ *Drosophila melanogaster* 幼虫における volicitin 類縁体の in vitro 生合成を行い、生合成機構の比較を行った。ショウジョウバエは幼虫虫体全体を、それ以外の昆虫はそれぞれ中腸組織を取り出しイミダゾールバッファーで酵素画分を抽出し、基質のリノレン酸 Na とグルタミンもしくはグルタミン酸溶液と混和して一定時間インキュベートした後、生成物を LCMS で分析した。

(4) Volicitin 生合成酵素の精製と構造決定

カイコ終齢幼虫 300 匹を解剖して中腸組織を取り出し、ミクロソーム画分を得た。この粗酵素液を AKTA に接続した TOYO Pearl phenyl (疎水性相互作用)、Sephadex (ゲルろ過) 及び MonoQ (イオン交換) 等各種カラムを用いて分画し、volicitin 類の in vitro 生合成活性を指標に精製した。最終精製画分のトリプシン消化物を TMT 試薬でラベルした後、Orbitrap-MS で分析し MSMS データベースサーチにより活性画分と挙動が同じタンパク質を同定した。

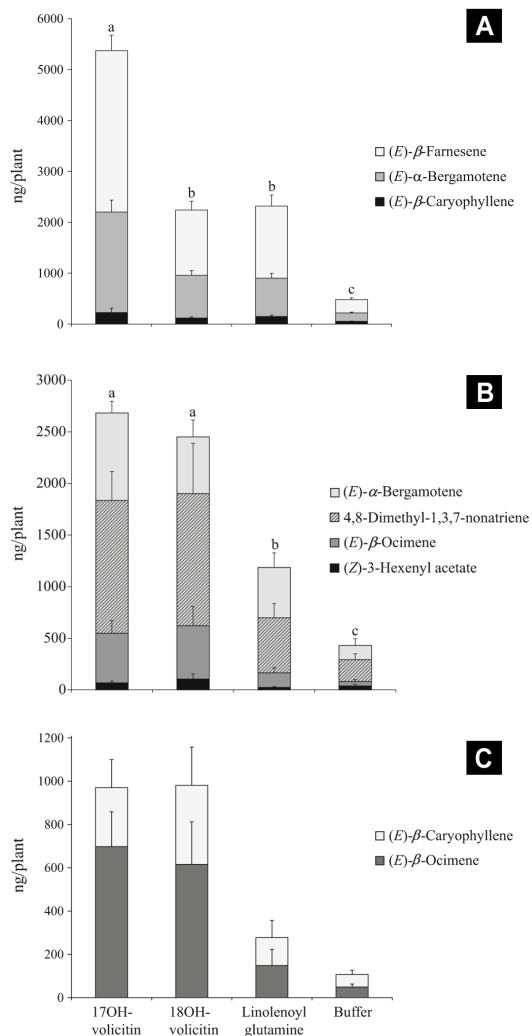
4. 研究成果

(1) 新規 volicitin 類縁体の同定
タバコスズメ幼虫の腸管から採取した新規 volicitin 類縁体が 18-Hydroxylinolenoyl glutamine であることを、合成し NMR 及び LCMS 分析により確認した。またタバコスズメ幼虫から分取した天然物の 18OH-volicitin をメタノリシスした後 GC 分析したところ、17 位が水酸化された脂肪酸由来のフラグメントは検出されなかったことから、タバコスズメ幼虫は通常の

volicitin を持たない、すなわち他の鱗翅目幼虫とは全く異なるルートで 18 位水酸化体の volicitin を作る事が明らかとなった。さらに、LCMS-IT-TOF 分析によりフラグメントイオンを詳細に調べたところ、日本産の鱗翅目ではタバコスズメの近縁種であるメンガタスズメ幼虫だけが 18 水酸化体と思われる volicitin を持つことが明らかとなった。

(2) 様々な volicitin 類縁体の植物に対するエリシター活性比較

トウモロコシ幼苗に対して 17 位水酸化体の volicitin のエリシター活性は水酸化基のない linolenoyl glutamine のそれより 3 倍強いことは既に報告していたが、18 位が水酸化された volicitin は予想に反して、水酸化基のない場合と同程度のエリシター活性しか示さなかった (図 1-A)。これに対し、ナス科植物であるナス (図 1-B) やタバコ (C) では、18 位水酸化体に対する反応は 17 位水酸化体とほぼ同程度であることが明らかとなった。この結果は、タバコスズメ (及びメンガタスズメ) はナス科の害虫



であり、
図 1 Volicitin 類縁体をそれぞれ処理し

た植物から放出される揮発成分量の比較トウモロコシは食草としない点を考慮すると極めて示唆深い。植物が何故 linolenoyl glutamine よりも水酸化型の volicitin に強く反応するのかはわかっていないが、水酸化型は鱗翅目の中でも大型鱗翅目 (Macrolepidoptera) に属する種からしか見つかっていないことを既に報告している。主な農業害虫のほとんどがこのグループに属しており、暴食性を示す種が多いことを考えれば、食害のシグナルとして植物が水酸化型エリシターにより強く応答を示すことはリーズナブルである。さらに、ナス科植物はタバコスズメやメンガタスズメが食草とすることから、18 位水酸化型に強く応答を示すのに対し、これらの幼虫が食草としないトウモロコシにとって 18 位水酸化型は未知のエリシターであった可能性が考えられる。すなわち、植物はそれぞれの害虫に合わせた volicitin 応答メカニズムを作ってきたと考えられる。

(3) Volicitin 類縁体の生合成機構の解明

Volicitin 類を持つ種の全てがグルタミン型類縁体を持つことから、グルタミン型がオーソドックスであり、グルタミン酸型は後に派生したという見方がある。トウモロコシに対するエリシター活性は、グルタミン酸型はグルタミン型よりも弱いことから、昆虫の対抗適応の一種ではないかと考えられてきた。一方で、我々はコオロギやショウジョウバエからグルタミン酸型を含む volicitin 類を同定しており、昆虫の祖先種からの遺伝形質としてグルタミン酸型を含む volicitin 類をこれら昆虫が持っているという可能性もある。生合成機構を比較した鱗翅目 5 種のうちタバコスズメのみがグルタミン酸型類縁体を持ち、量も多い。In vitro での生合成能を比較したところ、しかしながら、5 種のいずれにおいてもグルタミン型類縁体が優占し、グルタミン酸型は微量しか生成しなかった。この傾向はショウジョウバエとも共通していた。一方、コオロギ由来の粗酵素液では、グルタミンを基質としながら、グルタミン型のみならずグルタミン酸型類縁体の生成が高い割合で検出された。グルタミン型類縁体からグルタミン酸型類縁体への直接的な変換が示唆されたことから、¹⁵N ラベル体の linolenoyl glutamine を合成してコオロギ成虫に摂食させたところ、ラベル化されたグルタミン酸型類縁体の生成が in vivo で確認できた。このような直接変換は鱗翅目幼虫やショウジョウバエでは見られなかったことから (図 2)、昆虫における volicitin 類が共通祖先からの遺伝形質である点はまだ否定できないものの、少なくともコオロギは独自の volicitin 生合成ルートを確立してきたことが示唆された。

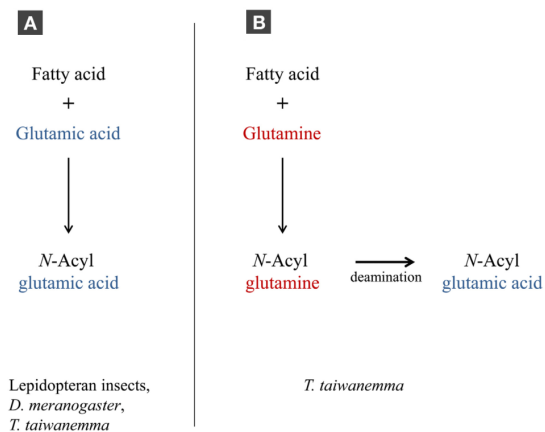


図2 昆虫における volicitin 類合成経路

(4) Volicitin 生合成酵素の精製と構造決定

TMT ラベル及び MSMS サーチにより、volicitin 類の生合成酵素の候補として aminopeptidase N ファミリーに属するタンパク質 2 種に絞りこまれた。現在、カイコを用いたゲノム編集 (TALEN) により、この候補遺伝子をノックアウトし volicitin 類の生合成能の有無の確認を試みている。

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 13 件)

- ① Naoki Mori, Naoko Yoshinaga, Function and evolutionary diversity of fatty acid amino acid conjugates in insects. *Journal of plant interactions*, 査読有, 6 巻, 2011, 103-107
DOI:10.1080/17429145.2010.544412
- ② 森直樹、網干貴子、吉永直子、桑原保正、昆虫と化学「喰う」と「喰われる」の狭間で、環境管理技術、査読無、28 巻、2010 年、20-30
- ③ Takako Aboshi, Ritsuo Nishida, Naoki Mori, Identification of plasmalogen in the gut of silkworm, *Insect Biochemistry and Molecular Biology*, 査読有, 2012, 596-601
DOI:10.1016/j.ibmb.2012.04.006
- ④ Naoko Yoshinaga, Hiroaki Abe, Sayo Morita, Tetsuya Yoshida, Takako Aboshi, Masao Fukui, James H. Tumlinson and Naoki Mori, Plant volatile eliciting FACs in lepidopteran caterpillars, fruit flies, and crickets: a

convergent evolution or phylogenetic inheritance? *Frontiers in Physiology*, 査読有, 5 巻, 2014, 121

DOI: 10.3389/fphys.2014.00121

- ⑤ Naoko Yoshinaga, Chihiro Ishikawa, Irmgard Seidl-Adams, Elizabeth Bosak, Takako Aboshi, James H. Tumlinson, Naoki Mori, N-(18-Hydroxylinolenoyl)-L-Glutamine: a newly discovered analog of volicitin in *Manduca sexta* and its elicitor activity in plants, *Journal of Chemical Ecology*, 査読有, 40, 2014, 484-490
DOI: 10.1007/s10886-014-0436-y
 - ⑥ Shinichiro Murakami, Ryu Nakata, Takako Aboshi, Naoko Yoshinaga, Masayoshi Teraishi, Yutaka Okumoto, Atsushi Ishihara, Hironobu Morisaka, Alisa Huffaker, Eric A Schmelz and Naoki Mori, Insect-Induced Daidzein, Formononetin and Their Conjugates in Soybean Leaves, *Metabolites*, 査読有, 4 巻, 2014, 532-546
DOI: 10.3390/metabo4030532
 - ⑦ Aboshi T, Ishida M, Matsushita K, Hirano Y, Nishida R, Mori N, Stage-specific quercetin sulfation in the gut of *Mythimna separata* larvae (Lepidoptera: Noctuidae). *Biosci Biotechnol Biochem*. 査読有, 78 巻, 2014, 38-40
DOI: 10.1080/09168451.2014.877835
 - ⑧ Jian Yan, Takako Aboshi, Masayoshi Teraishi, Susan R. Strickler, Jennifer E. Spindel, Chih-Wei Tung, Ryo Takata, Fuka Matsumoto, Yoshihiro Maesaka, Susan R. McCouch, Yutaka Okumoto, Naoki Mori and Georg Jander, The Tyrosine Aminomutase TAM1 Is Required for β -Tyrosine Biosynthesis in Rice, *The Plant Cell*, 査読有, 27 巻, 2015, 1-14
DOI: <http://dx.doi.org/10.1105/tpc.15.00058>
- [学会発表] (計 51 件)
- ① 森直樹、昆虫と化学—「喰う」と「喰われる」の狭間で—、日本昆虫科学連合設立記念シンポジウム、2010 年 7 月 24 日、日本学術会議講堂 (東京都・港区)
 - ② 森直樹、生体防御反応を活性化する節足動物由来物質とその応用、バイオミメティクス研究会、2010 年 8 月 9 日、北海道大学 (北海道・札幌市)

- ③ N.Mori, Identification of biosynthesis of fatty acid amino acid conjugates in *Drosophila melanogaster* larvae and adults, The 6th Asia-Pacific Conference on Chemical Ecology, 2011年10月13日, 北京 (中国)
- ④ N.Mori, Identification of biosynthesis of fatty acid amino acid conjugates in *Drosophila melanogaster* larvae and adults, The 27th International Society of Chemical Ecology, 2011年7月27日, バーナビー (カナダ)
- ⑤ N.Mori, Fatty acid amino acid conjugates diversification in Lepidopteran caterpillars, International Congress of Entomology, 2012年8月20日, 大邱市 (韓国)
- ⑥ N.Mori, Biosynthesis of plant volatile eliciting FACs in Lepidopteran caterpillars, fruit flies, and crickets, The 28th International Society of Chemical Ecology, 2012年7月24日, ヴィリニユス (リトアニア)
- ⑦ N.Mori, Insect-produced elicitors, fatty acid amino acid conjugates: insights from a physiological point of view, Spring conference of Korean Society of Applied Entomology, 2013年4月24日, Muju (韓国)
- ⑧ N.Mori, Secondary metabolites of soybean induced by gut contents of *Spodoptera litura*, International Chemical Ecology conference 2013, 2013年8月19日, メルボルン (オーストラリア)
- ⑨ 森直樹ら、昆虫に見られる FACs 生合成メカニズムの種間比較、日本農芸化学会 2014 年度大会、2014 年 3 月 27 日、明治大学 (神奈川県・生田)
- ⑩ 森直樹ら、ダイズ葉に flavonoids 類を誘導する FACs、日本農芸化学会 2015 年度大会、2015 年 3 月 26 日、岡山大学 (岡山県、岡山市)

[図書] (計 2 件)

- ① 森直樹、吉永直子、シーエムシー出版社、次世代バイオミメティクス研究の最前線、2011年、66-72

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]

ホームページ等

<http://www.chemeco.kais.kyoto-u.ac.jp/>
(京都大学農学研究科応用生命科学専攻化学生態学研究室)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

森 直樹 (MORI, Naoki)
京都大学農学研究科・准教授
研究者番号：30293913

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：