

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 24 日現在

機関番号：16401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2014

課題番号：23580074

研究課題名(和文) アブラムシによる寄主植物の栄養条件改善機構の解明：アミノ酸の選択的蓄積

研究課題名(英文) Elucidation of the nourishment condition improvement mechanism of the host plant by infestation of an aphid: Selective accumulation of the amino acid

研究代表者

手林 慎一 (Tebayashi, Shinichi)

高知大学・自然科学系・准教授

研究者番号：70325405

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,300,000円

研究成果の概要(和文)：アブラムシがイネ根に寄生すると植物体中に特定のアミノ酸が選択的に蓄積されることから、この蓄積機構の分子レベルでの解明を目指した。その結果、アブラムシがイネ幼根に寄生するとイネ中のアミノ酸の代謝および生合成に関連する遺伝子の20-30%で転写量が有意に変動した。植物全体では遺伝子発現量はほぼ一定であるものの、各アミノ酸の生合成代謝においては、主経路の転換やフラックス・バランスの変動が生じていることが判明した。これらのことから、アブラムシはイネの遺伝子発現を調節することにより、アミノ酸の選択的蓄積を引き起こし、自身の生存により適した栄養状態を作り出している可能性を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Asparagine and Glutamine, which were important nutritions for Buchnera, were selectively accumulated in a root of rice plant seedling which was infested with aphids (Rhopalosiphum rufiabdominale). The change of transcription level was observed in 20-30% of amino acid biosynthetic pathway genes, when a root was infested with aphids. So it was presumed that this change result in the selective accumulation of amino acids. Actually, the transcription of biosynthetic genes, Glutamate synthase, Asparagine synthase, and Tryptophan synthase, was increase to 2.4, 3.0, and 17.1-fold, respectively, at 5 day after infection of aphids. On the other hand the transcription of Tryptophan decarboxylase, which could promote conversion from tryptophan to tryptamine, was increase to 32-fold. Thus a modification of a flux balance on metabolism pathway and/or a change of main pathway were occurred. So it was thought that these changes would lead to the selective accumulation of the amino acids.

研究分野：植物保護

キーワード：aphid rice amino acid tryptophan serotonin Rhopalosiphum rufiabdominale

1. 研究開始当初の背景

食植性昆虫の寄主選択には寄主植物の化学的、物理的性質やフェノロジーなど、様々な要因が関連するが、寄主植物がその昆虫種に対して栄養生理学的に満足させることが必須条件となる。食植者にとって、寄主植物の栄養状態は季節変動が大きく、一般的に夏季の栄養状態は食植者にとって至適でない場合が多い。この夏季におけるアブラムシの生存戦略は、寄主転換、夏休眠、ゴール(虫瘤)形成、幹からの吸汁、の4つに大別される。これらの中でゴール形成はアブラムシにとって乾燥や天敵から身を守るシールドとしての役割のほか、葉で同化された栄養素を本来の貯蔵場所から流転させるための栄養素の受け皿としての役割を果たすと考えられてきた。申請者はこれらの一種オカボノクロアブラムシ (*Tetraneura fusiformis*) がアキニレ (*Ulmus. parvifolia*) 上に形成する閉鎖型ゴールにおいて、アブラムシの栄養となるアミノ酸蓄積量はゴールの形成とともに増大するものの、幹母の死亡に伴うゴールの放棄に伴い減少する事実を突き止め、ゴールにおけるアミノ酸の蓄積は一過性の現象であり、アミノ酸の蓄積継続にはアブラムシの存在が必要であることを見出した。同様にオカボノアカアブラムシ (ヤサイネアブラムシ: *Rhopalosiphum rufiabdominale*) も一次寄主であるサクラ葉上に形成する開放型のゴールにおいて同様の現象を引き起こすことを確認した。さらにこのオカボノアカアブラムシが二次寄主(夏寄主)であるイネの幼根に寄生すると、寄生部位においてアスパラギンをはじめ数種のアミノ酸が増加する事実を発見した。興味深いことにアミノ酸が一樣に増加するのではなく特定のアミノ酸(アスパラギン、アスパラギン酸、グルタミン、グルタミン酸)が選択的に蓄積され、アスパラギンが主成分となる点はゴールにおけるアミノ酸の蓄積現象と類似していた。このようなことからイネの根におけるオカボノアカアブラムシによるアミノ酸の蓄積はゴールにおけるそれと同様に栄養状態の改善現象と考えられ、ゴール形成のような植物形態の変化を伴うことなく昆虫は寄主植物における栄養環境を変化させる能力を持つことを見出した。

アブラムシにおいて寄主植物の篩管から吸収された各種アミノ酸は体内で消費・代謝されたのち不要なアミノ酸類は、腸内で腸内共生菌ブフネラにより利用・代謝される。その後ブフネラにより菌体外に放出されたアミノ酸は再度アブラムシに利用されている。このようにブフネラにより必須アミノ酸が再供給されことから、植物に含まれるアミノ酸種の意義についてはあまり関心がもたれてこなかった。ゴールや篩管中にアスパラギン等が多い事実については「篩管液やゴールの特質としてアスパラギン等が多い」だけと

考えられ、「そのような植物側の状態に適応するためにアスパラギン等を利用するブフネラを適応的に共生させた」と考えられてきた。

2. 研究の目的

申請者は、アブラムシは寄主植物に寄生することにより寄生部位に必要なアミノ酸を選択的に蓄積させる能力を持つことが示唆され、ある種のアブラムシでは不要とされたアスパラギン酸を単に利用するのみでなく、さらに進化して積極的にアスパラギン等を選択的に蓄積させている可能性を見出した。この事実自体は学術上極めて興味深く、さらにアスパラギン等がどのように選択的に蓄積されるのかについての知見は全くない。そこで本研究ではオカボノアカアブラムシがイネの幼根に寄生したときにアスパラギン等が選択的に蓄積される現象を分子レベルで解明するために、オカボノアカアブラムシがイネ幼根に寄生したときの発現遺伝子変動をマイクロアレイにて解析することで選択的蓄積機構を推定し、予想された機構に関連して発現する遺伝子の RT-PCR 解析および酵素の活性発現解析をアブラムシの寄生から経時的に追跡することでこれを確認し、選択的蓄積機構を解明することを目的とした。

3. 研究の方法

3-1 供試植物と供試昆虫:

オカボノアカアブラムシ (*R. rufiabdominalis*) は2009年春に高知大学農学部構内のモモの木に発生した個体群を採集し、実験室内でイネ幼苗(日本晴: J A 南国市より購入)を用いて飼育した(27±3, 16L:8D)。

3-2 メタボローム解析:

植物試料のメタノール抽出物は水とヘキサンの液-液分配し、得られた水層 15nL を CE-TOFMS によるメタボローム解析に供した。CE-TOFMS 分析は Agilent LC/MSD TOF system, Agilent CE-MS adapter, A Agilent CE-ESI-MS sprayer kit, Agilent CE capillary electrophoresis system および Agilent ChemStation software から構成されるシステムにキャピラリー(50 μm i.d. x 100 cm) カラムを接続して測定した。分析には 1M ギ酸緩衝液(カチオン)もしくは 20 mM ギ酸アンモニウム水溶液(アニオン)を泳動液として用い、内部標準として、カチオン分析では reserpine ([M+H]⁺, m/z = 609.2806) およびメタノール 2 量体イオン ([2M+H]⁺, m/z = 65.0597) を用い、アニオン分析では reserpine ([M-H]⁻, m/z = 607.2661) およびギ酸 2 量体イオン ([2M-H]⁻, m/z = 91.0037) を用いて測定した。

3-3 遺伝子発現分析:

採取されたイネ幼根から、RNeasy Plant Mini Kit(キアゲン)を用いて TotalRNA を抽

出・調製した。メタボローム解析のために純度を計測した後にイネ オリゴ DNA マイクロアレイ 44K (Agilent) を用いた DNA マイクロアレイ分析を行った。DNA マイクロアレイは Low Input Quick Amp Labeling Kit (Agilent) によりターゲット製作 (Low Input Quick Amp Labeling Kit, Agilent) ハイブリダイゼーション (Gene Expression Hybridization Kit, Agilent) および洗浄 (Gene Expression Wash Buffers Pack, Agilent) を行った。データは Agilent Feature Extraction で解析した。

また定量解析のために、先に調整した total-RNA と逆転写酵素 (High Capacity RNA-to-cDNA Kit, ABI) を用いて cDNA ライブラリーを作製した。これをテンプレートとして Thunderbird qPCR Mix (TOYOBO) と各遺伝子のプライマーを用いて cDNA を合成し、その増加曲線から RNA の転写量を測定した。プライマーは定法により設計し、内部標準として Actin 1 の遺伝子発現量を計測した。

4. 研究成果

メタボローム解析の結果、84 種のアニオン化合物と 95 種のカチオン化合物の解析に成功した。アニオン化合物はアブラムシ接種 5 日後にかけて減少し、その後 8 日目にかけて増加する傾向が観察され、カチオン化合物は逆に接種 5 日後にかけて増加し、その後 8 日目にかけて減少する傾向が観察された (表 1)。特にリン酸化合物では接種 5 日後の存在量が極端に減少しており、何らかの代謝系が活性化されエネルギー消費がなされているものと考えられた。一方でアミノ酸やアミンは接種 5 日後には 2 倍以上に上昇していることからイネの抵抗性機構が発現していることが示唆された。

表 1. アブラムシの寄生による代謝産物の変動

	対無処理比	
	5day	8day
Anion (84)	0.77	0.90
Organic acid (50)	0.77	0.90
Phosphorylate (13)	0.15	0.92
Cation (95)	2.04	0.70
Amino acid (30)	1.84	0.63
Amine (32)	2.36	0.76

これらの中で、特にアミノ酸に注目し詳細に解析すると (表 2)、寄生 1 日後にはアミノ酸蓄積量が一旦減少し、その後 3 日目にかけて蓄積量が最大となり、再度減少する傾向が確認された。特にアブラムシ共生細菌 *ブネラ* が生合成できずアブラムシ由来の主要な栄養源であると考えられているアスパラギンやグルタミンは 2.0-1.7 倍にも上昇しており、アブラムシにとっての栄養改善がなされていることを裏付けた。

表 2. アブラムシの寄生によるアミノ酸の変動

処理後 日数(日)	アミノ酸蓄積量 (対無処理比)				
	1	2	3	4	5
Ala	0.59	0.92	1.42	0.72	0.95
Arg	0.68	0.79	1.84	0.60	0.71
Asn	0.84	1.08	2.04	0.63	0.63
Asp	0.57	1.25	1.43	0.71	0.65
Glu	0.51	1.23	1.96	0.72	0.62
Gln	0.78	1.00	1.70	0.60	0.53
Gly	1.17	1.03	1.06	0.85	0.89
His	0.81	1.11	1.50	0.64	0.67
Ile	0.70	1.03	1.28	0.68	0.65
Leu	0.50	0.98	1.05	0.68	0.63
Lys	0.99	1.04	1.51	0.66	0.82
Met	0.20	0.77	0.78	0.32	0.15
Phe	0.61	1.07	1.31	0.85	0.86
Pro	0.46	1.09	0.92	0.51	0.36
Ser	0.87	1.12	1.40	0.71	0.77
Thr	0.78	1.00	1.42	0.61	0.73
Trp	1.17	1.75	1.46	0.43	0.71
Tyr	0.66	1.00	1.01	0.77	0.77
Val	0.66	1.04	1.35	0.70	0.66

次に、接種 3 日後のイネ根部における遺伝子発現を DNA マイクロアレイを用いて網羅的に解析した。その結果、表 3 に示したようにアミノ酸の代謝に関連する遺伝子 68 個と生合成に関わる遺伝子 30 個の動態が確認でき、代謝・生合成ともに 20-30% の遺伝子発現がそれぞれ活性化・不活性化され、40% 強の遺伝子では発現に差は確認できなかった。全体としては遺伝子発現量はあまり変動していないものの、個々のアミノ酸の生合成代謝においては主経路の変化やフラックス・バランスの変動が生じていることがうかがえた。さらにアミノ酸に関するアミノ基転移酵素もほぼ同様の変動が生じていたことから、アミノ酸代謝経路同士のクロストークも複雑に変動していることが確認できた。

これらの中で、アブラムシの寄生により最も多く蓄積量が増大したアスパラギン、グルタミンの代謝動態について詳細に検討を行った。その結果 (図 1)、寄生 1 日後から *Glutamate synthase 1-1 (GS1-1)*, *Glutamate synthase 1-2 (GS1-2)*, *Asparagine synthase (AS)* の転写量の増大が確認され、*GS1-1* と *AS* ではその後も常に無処理区に対して遺伝子発現量が高く *Asn* および *Gln* の生合成が活性化されていることが裏付けられた。*GS1-2* は寄生 5 日後には処理区の遺伝子発現量は無処理区に比べて低いものの一次的な逆転現象であることや、*GS1-2* の遺伝子発現量は *GS1-1* のその半分以下であることから、蓄積現象に対する影響は無視できるものと判断された。さらにグルタミンの生合成遺伝子は寄生後 5 日目にかけて転写量が増大しその後減少するのに対して、アスパラギンの生

合成遺伝子の転写量は寄生後常に増大し続ける傾向が見られた。このような遺伝子の発現動態の違いが、Asn や Gln などの選択的な蓄積を引き起こすものと考えられた。

表3 . アブラムシの寄生によるアミノ酸生合成遺伝子および代謝遺伝子の発現動態数

	代謝			合成		
	+	±	-	+	±	-
Ala	1	0	2	3	1	2
Arg	0	2	2	0	0	0
Asn	0	2	0	1	0	1
Asp	1	2	4	0	0	0
Glu	1	4	3	2	1	2
Gln	2	2	2	1	5	2
Gly	0	2	3	0	0	0
His	0	0	0	0	0	1
Ile	0	0	0	0	0	0
Leu	1	1	0	0	0	0
Lys	3	2	1	0	0	0
Met	2	3	1	0	2	0
Phe	2	2	1	0	0	0
Pro	0	0	0	0	0	0
Ser	3	6	1	0	0	0
Thr	0	0	0	0	1	1
Trp	2	1	0	0	3	0
Tyr	0	1	0	1	0	0
Val	0	0	0	0	0	0

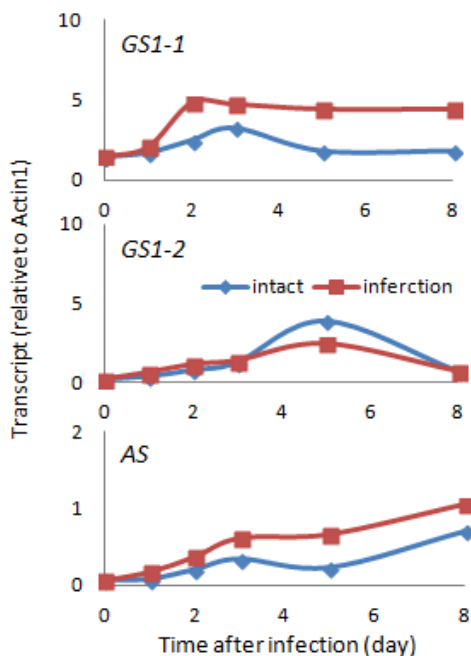


図1. アブラムシの寄生によるイネ根の遺伝子発現の変動, GS1-1: Glutamate synthase 1-1, GS1-2: Glutamate synthase 1-2, AS: Asparagine synthase

さらに Asn や Gln などに比べて蓄積量は少ないものの、イネの病害抵抗性発現の鍵と考えられているトリプトファンの変態解析を

行った。その結果、TS の発現量は 17 倍にも増大しているものの、トリプトファンからトリプタミンへ変換する TDC の転写量は 32 倍に増大し、最終的にセロトニンとして蓄積することを解明できた(図2)。すなわち生合成系と代謝系の両方が活性化しているため見かけ上は Trp の蓄積が殆ど確認されないことを解明した。またセロトニンの蓄積が一過的であるのは、セロトニンを代謝するペルオキシダーゼの活性の上昇がセロトニン生合成酵素の発現に遅れて上昇することにより生じることを合わせて解明した。このセロトニンがオカボノアカアブラムシ幼虫の成育を阻害することも見出したことと併せて、イネがフラックスバランスの調整により抵抗性発現を制御していることを明らかにした。さらに、ペルオキシダーゼの上昇とともに根は褐変し硬化することを、あわせて解明できたことから、イネはアブラムシに対する抵抗性を2段階(セロトニン蓄積による幼虫生育阻害による化学防御と根の褐変硬化による物理的防御)で発現させ、自己防衛を行っていることを見出した。

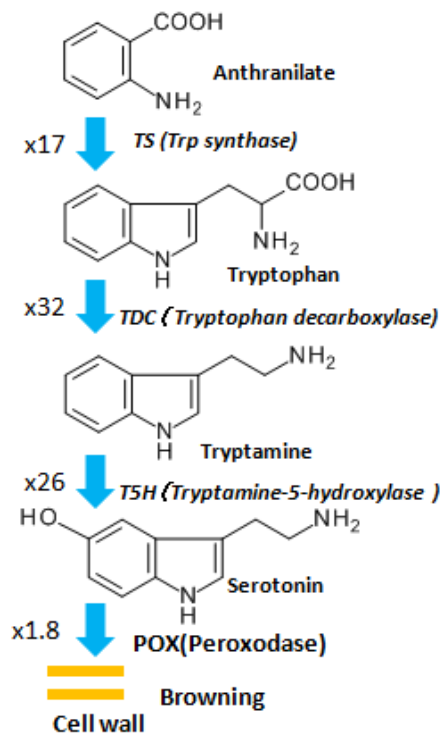


図2. アブラムシの寄生によるイネ根におけるTrp代謝経路の遺伝子発現およびペルオキシダーゼ活性の変動

このようにアブラムシは自身の生育により必要な Asn や Gln を選択的にイネに生合成させ利用することが判明したが、その一方で、イネも相手からの誘導の一部を逆に取り抵抗性機構を二重に発現させることで加害を跳ねのける能力を持つことを見出し、植物と昆虫の相互作用に新たなメカニズムを見出した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 4 件)

1. Structural determination of elicitors in *Sogatella furcifera* (Horváth) that induce Japonica rice plant varieties (*Oryza sativa* L.) to produce an ovicidal substance against *S. furcifera* eggs. Jeong-Oh Yanga, S. Tebayashi (他 3 名, 4 番目), *Biosci Biotechnol Biochem*, 査読有, 78, 937-942, 2014.

2. Browning mechanism on the roots of rice plant infested by rice root aphid, *Rhopalosiphum rufiabdominalis*, and effects of salicylic acid. S. Tebayashi, C. Sano, S. Ueda, A. Oikawa, R. Saaki, M. Uwate, H. Maseda, K. Saito, A. Ishihara, *Proceedings of the 2014 Meeting of The Plant Growth Regulation Society of America*, 査読なし, in press.

3. Elicitor(s) in *Sogatella furcifera* (Horváth) causing the Japanese rice plant (*Oryza sativa* L.) to induce the ovicidal substance, benzyl benzoate. Yang, J.-O., Tebayashi, S. (他 3 名, 4 番目), *Biosci Biotechnol Biochem*, 査読有, 77, 1258-1261. 2013.

4. Metabolite profiling of shoot extracts, root extracts, and root exudates of rice plant under phosphorus deficiency. Tawaraya, K., Oikawa, A. (他 5 名, 7 番目), *J Plant Nut*, 査読有, 36, 1138-1159, 2013.

〔学会発表〕(計 7 件)

1. Joint Meeting of The Plant Growth Regulation Society of America and the Japanese Society for the Chemical Regulation of Plants. 2014/07/13-17, Hilton San Francisco Financial District, San Francisco, California.. Shinichi Tebayashi, Chisato Sano, Shinji Ueda, Akira Oikawa, Ryosuke, Sasaki, Maki Uwate, Hideaki Maseda, Kazuki Saito, Atsushi Ishihara., Browning mechanism on the roots of rice plant infested by rice root aphid, *rhopalosiphum rufiabdominalis*, and effects of salicylic acid.

2. 農芸化学会 2015 年度大会、岡山、2015 年 3 月 24-27 日、手林慎一, 佐野千聡, 森梓紗, 及川 彰, 佐々木亮介, 斉藤和季, 上手麻希, 間世田英明, 石原亨; オカボノアカアブラムシのイネ根への寄生による代謝産物変動

3. 農芸化学会 2013 年度大会、仙台、2013 年 3 月 24-27 日、上田真二、手林慎一, 佐野千聡, 及川 彰, 佐々木亮介, 斉藤和季, 上手麻希, 間世田英明, 石原亨; オカボノアカアブラムシのイネ根への寄生による代謝産物変動

4. 農芸化学会中四国支部 2013 年度合同大会、広島、2013 年 9 月 5-6 日、上田真二、手林慎一, 佐野千聡, 及川 彰, 佐々木亮介, 斉藤和季, 上手麻希, 間世田英明, 石原亨; オカボノアカアブラムシの寄生によるイネ根での褐変機構

5. International Chemical Ecology Conference, Melbourne, Australia, 20130819-20130823. 2014/07/13-17, Hilton San Francisco Financial

District, San Francisco, Shinichi Tebayashi, Chisato Sano, Shinji Ueda, Akira Oikawa, Ryosuke, Sasaki, Maki Uwate, Hideaki Maseda, Kazuki Saito, Atsushi Ishihara; California., Browning on the roots of rice plant infested by rice root aphid, *Rhopalosiphum rufiabdominalis*.

6. 第 46 回植物化学調節学会大会、鶴岡、2012 年 10 月 27-28 日、手林慎一, 佐野千聡, 大西信太郎, 及川 彰, 佐々木亮介, 斉藤和季, 上手麻希, 間世田英明, 石原亨; オカボノアカアブラムシのイネ根への寄生による代謝産物変動

7. 農芸化学中四国支部第 34 回講演会、山口、2012 年 9 月 21-22 日、手林慎一, 大西信太郎, 及川 彰, 佐々木亮介, 斉藤和季, 上手麻希, 間世田英明, 石原亨; オカボノアカアブラムシの寄生によるイネ根での代謝産物変動

〔図書〕(計 1 件)

1. Amino Acids in Higher Plants, Part III Chemical Ecology, Chap.20, Tryptophan-Derived Metabolites in Defence Responses in Plants. Ed. Jpf D'mello, CABI publishing, A. Ishihara, T. Matsukawa, T. Nomura, M. Sue, A. Oikawa, Y. Okazaki, S. Tebayashi, 査読なし, 201406.

〔その他〕

高知大学農学部生理活性物質化学研究室 HP <http://www.geocities.jp/organicchemistrykochi/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

手林 慎一 (Tebayashi Shinichi)

高知大学・教育研究部自然科学系・准教授
研究者番号：70325405

(2) 研究分担者

間世田 英明 (Maseda Hideaki)

徳島大学・ソシオテクノサイエンス研究部・准教授
研究者番号：10372343

及川 彰 (Oikawa Akira)

山形大学・農学部・准教授
研究者番号：50442934