

平成 27 年 5 月 20 日現在

機関番号：21401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24780114

研究課題名(和文) 昆虫食害が引き起こす植物の誘導抵抗反応に着目したアミノ酸由来ニトリル生合成の解明

研究課題名(英文) Insect-feeding induced nitrile biosynthesis from amino acids in plants

研究代表者

野下 浩二 (Noge, Koji)

秋田県立大学・生物資源科学部・助教

研究者番号：40423008

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：植物は様々な二次代謝産物を生産するが、中でもニトリルの生産は珍しく、その生合成や生物学的意義はよくわかっていない。昆虫食害を受けたオオイトドリとアレチマツヨイグサにおいて、ニトリル生産が誘導されることに着目し、その生合成経路と生合成酵素の解明に取り組んだ。本研究により、ニトリルは、フェニルアラニンやロイシンといったアミノ酸からアルドキシムを経由して生合成されること、また原料のアミノ酸の生合成も連動して誘導されることが明らかとなった。ニトリル生合成に関わる酵素の同定には至らなかったが、これまで十分わかっていなかった植物ニトリルの生物活性について、天敵昆虫を誘引する活性を新たに見出した。

研究成果の概要(英文)：Plants are known to produce various secondary metabolites. Of these metabolites, nitrile formation as an end product is uncommon in plants and information about its biological roles and biosynthesis is limited. I found two plant species, *Fallopia sachalinensis* and *Oenothera parviflora*, emit nitriles when they are infested by herbivores. Using this induction response, the biosynthetic pathway of plant nitrile was determined. I found that nitriles are synthesized from their corresponding amino acids via aldoximes and that production of the precursor amino acids is also induced by insect-feeding and methyl jasmonate (MeJA). There were some proteins induced by MeJA in plant leaves, but the enzymes involved in nitrile production have not yet been fully defined in this study. Isovaleronitrile found from the infested *O. parviflora* leaves was identified as an attractant for a natural enemy of herbivores.

研究分野：生物有機化学

キーワード：ニトリル 生合成 アミノ酸代謝 昆虫食害 ジャスモン酸 誘導抵抗反応

1. 研究開始当初の背景

植物は昆虫の食害から身を守るために様々な防御戦略を発達させてきた。近年、昆虫食害を受けた植物葉で、昆虫の消化酵素を阻害するプロテアーゼインヒビターや、天敵昆虫を誘引する特徴的な匂い成分が誘導的に生産されることが明らかになってきた。このような昆虫食害が引き金となる植物の誘導抵抗反応の解明は、昆虫 - 植物の相互作用における植物の巧妙な生存戦略を知るばかりか、植物が潜在的に持つ防御能の農業への利用という点で非常に興味深い。

研究代表者は、昆虫食害が誘導する匂い成分として極めて珍しいニトリルを生成する植物を発見した。すなわち、農地周辺の主要雑草のひとつであるオオイタドリ (タデ科) が、コガネムシの食害によりフェニルアセトニトリルを、また、ハムシの食害を受けたアレチマツヨイグサ (アカバナ科) が、イソバレロニトリルを生成・放出することを見出した。微生物のニトリル生合成を参考にすると、植物のニトリルは、対応するアミノ酸からアルドキシムを経て生合成されると推定されるが、植物のニトリル生成自体が珍しく、その生合成に関する知見はほとんどなかった。

2. 研究の目的

本研究では、昆虫食害によるニトリル生合成誘導を利用して、植物体内でニトリルがどのように生合成されるか、その仕組みの解明を目指した。中でも、前駆体と考えられるアミノ酸やその代謝物の解析からニトリル生合成経路の特定とその生合成に関わる酵素の同定に取り組んだ。

3. 研究の方法

まず、オオイタドリとマツヨイグサを材料に、重水素標識したアミノ酸の取り込み実験と、生合成中間体と考えられるアミンやアルドキシムなどアミノ酸由来代謝物の分析を行い、代謝物レベルでニトリル生合成経路を調べた。さらに、アミノ酸生合成阻害剤で処

理した植物葉に、生合成中間体と予想されるアミンやアルドキシムを外部から与え、その代謝変換を調べることで、生合成経路の裏付けを行った。また、原料となるアミノ酸の供給元を調べるために、植物葉中のアミノ酸をGC-MS を用いて経時的に分析した。次に、昆虫食害で誘導されるタンパク質中に、ニトリル生合成に関わる酵素があると予想し、昆虫食害特異的に誘導されるタンパク質の探索を行った。なお、実験には、昆虫に食害させた植物と、昆虫食害の作用をミミックするジャスモン酸メチル (MeJA) で処理した植物の両方を用いた。

4. 研究成果

まず、マメコガネ食害や MeJA 処理によりフェニルアセトニトリルを放出するオオイタドリでは、フェニルアセトニトリルが L-フェニルアラニン (L-Phe) から生合成されること、またニトリル生合成の原料となる L-Phe の生合成も昆虫食害や MeJA により誘導されることを明らかにした。非天然型の D-フェニルアラニンはニトリルへ代謝されにくく、オオイタドリにおけるニトリル生合成は立体選択的な反応を含むと考えられる。さらにフェニルアラニン生合成阻害剤であるグリホサートであらかじめ処理したオオイタドリを MeJA 処理してもニトリル生成が認められないことを利用し、原料である L-Phe や生合成中間体と考えられるフェネチルアミンとフェニルアセトアルドキシムを外から投与し、その代謝変換を調べた。その結果、L-Phe の投与でニトリル生成が確認でき、フェネチルアミンの投与ではその約半分、フェニルアセトアルドキシムでは L-Phe 投与時と同程度のニトリル生成が確認できた。MeJA 処理したオオイタドリからは、ニトリル生合成の中間体と考えられるフェニルアセトアルドキシムは検出されないものの、微生物やごく一部の植物と同様に、アミノ酸からアルドキシムを経由するニトリル生合成

経路が存在すると考えられる。また、MeJA 処理したオオイタドリ葉中ではフェネチルアミンの生成誘導が確認されるが、これまで報告のないアミンを経由したニトリル生合成経路も存在することが示唆された。アミンとアルドキシムが同一の生合成経路上に存在するか現段階では不明である。

一方、ハムシに食害されたアレチマツヨイグサでは、ロイシンの生合成が誘導され、そのロイシンからイソバレロニトリルが生合成されること、またその生合成中間体として 3-メチルブチルアルドキシムの存在を、重水素標識したロイシンの取り込み実験とアミノ酸分析から明らかにした。さらに、ロイシンから生合成される代謝物として、3-メチル-1-ニトロブタンと 3-メチルブチル 3-メチルブチレートと同定した。これらはイソバレロニトリルもしくは 3-メチルブチルアルドキシムからの代謝物と推察され、ニトリルが最終産物であるオオイタドリとは異なり、アレチマツヨイグサではさらに複雑な代謝経路の存在が示唆された。また、MeJA 処理したアレチマツヨイグサの匂いやその一成分であるイソバレロニトリルに対して、ハムシを捕食する天敵カメムシが強い選好性を示すことも明らかとなった。この天敵カメムシは餌探索に食害を受けた植物の特徴的なにおいを利用していると考えられる。

次に、MeJA 処理したオオイタドリ葉中に蓄積していくフェネチルアミンの存在から、フェニルアラニンフェネチルアミンへと代謝する PLP 依存型の脱炭酸酵素の存在を予測し、その遺伝子クローニングを試みた。候補遺伝子が 1 つ得られたが、その塩基配列を決定したところ、PLP 依存型のメチオニン γ リアーゼであることがわかった。当初の予想と既知の反応機構から、本リアーゼはフェネチルアミンの生成に関与しないことが示唆されるが、現段階では、その詳細は明らかでない。また、アレチマツヨイグサについ

ては、MeJA 処理により特異的に誘導されるタンパク質の解析を行い、ニトリル生合成に関わる酵素の探索を行った。その結果、MeJA 処理によりマツヨイグサ葉中で複数の膜結合型タンパク質が誘導されることを見出した。その一部について、ペプチドマスフィンガープリンティング法によりタンパク質同定を試みたところ、P450 と相同性を示すタンパク質が 2 つ得られた。これら MeJA 誘導型のタンパク質の詳細な構造と機能を明らかにするには至らなかったが、本研究期間中にドイツのグループがポプラから見出したニトリル生合成に関わる P450 の情報を参考にすると、アレチマツヨイグサから見出された P450 と相同性のあるタンパク質もニトリル生合成に関与する可能性が考えられる。植物のニトリル生合成は先のポプラの報告などごく限られる。また、今回ニトリルに天敵を誘引する活性が明らかとなったが、植物がなぜニトリルを生合成するのか、その生物学的意義も十分にわかっていない。さらに研究を進めることで、どの植物グループがニトリル生合成能を持つかなど、ニトリル生合成系の特異性と普遍性、またその意義を理解できると考える。

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1件)

Noge K, Tamogami S. Herbivore-induced phenylacetonitrile is biosynthesized from de novo-synthesized L-phenylalanine in the giant knotweed, *Fallopia sachalinensis*. FEBS Lett. 587, 1811–1817 (2013) 査読あり

[学会発表](計7件)

野下浩二「匂いがつなぐ植物と昆虫の世界」国際植物の日、平成 26 年 5 月 18 日、筑波大学(茨城県・つくば市)(招待講演)

野下浩二、阿部誠、田母神繁「昆虫食害

で誘導されるオオイタドリ由来フェニルアセトニトリルの生合成中間体」日本農芸化学会 2014 年度大会、平成 26 年 3 月 27-30 日、明治大学（神奈川県・川崎市）
Noge K, Abe M, Tamogami S
“Herbivore-induced leucine-derived nitrile in the evening primrose attracts the predatory shield bug” International Chemical Ecology Conference 2013, August 19-23 2013, Melbourne (Australia)

野下浩二、阿部誠、田母神繁「ジャスモン酸メチルで誘導されるアレチマツヨイグサの揮発成分とタンパク質」日本農芸化学会 2013 年度大会、平成 25 年 3 月 24-27 日、東北大学（宮城県・仙台市）

野下浩二、阿部誠、田母神繁「昆虫食害が誘導するアレチマツヨイグサ揮発成分の天敵誘引活性と生合成」日本農芸化学会東北支部第 147 回大会、平成 24 年 10 月 6 日、弘前大学（青森県・弘前市）

野下浩二「昆虫食害が誘導する植物のニトリル生産～その生合成と機能解明に向けて～」ERATO 浅野プロジェクト講演会・生物工学研究セミナー、平成 24 年 9 月 18 日、富山県立大学（富山県・射水市）(招待講演)

Noge K, Abe M, Tamogami S “Biosynthesis of leucine-derived nitrile in the evening primrose, *Oenothera* sp. (Onagraceae) by insect-feeding” 28th Annual Meeting of the International Society of Chemical Ecology, July 22-26 2012, Vilnius (Lithuania)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.akita-pu.ac.jp/stic/souran/scholar/detail.php?id=241>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

野下 浩二 (Noge, Koji)

秋田県立大学・生物資源科学部・助教

研究者番号：40423008