

令和元年6月10日現在

機関番号：16401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15H04462

研究課題名(和文) イネにおけるセロトニン蓄積の抑制機構の解明：アブラムシによる抵抗性の抑制と利用

研究課題名(英文) Elucidation of the mechanism of serotonin accumulation in rice root; A suppression of serotonin concentration during a primary stage.

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農学部門・准教授

研究者番号：70325405

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,000,000円

研究成果の概要(和文)：オカボノアカアブラムシがイネ根に寄生すると誘導抵抗性として褐変が生じる。しかしアブラムシは褐変前駆体であるセロトニン濃度を低く抑え、これを利用して生育を促進しているため、このアブラムシの適応戦略の制御メカニズムを追究した。アブラムシ由来のイソペンテニルアデニンがWRKY26を一定量発現させることで低濃度のセロトニン蓄積が生じ、そのWRKY14が一過的に発現し、WRKY26と協奏的にTDC発現を増大させることで高濃度のセロトニンを蓄積させていた。このようにアブラムシは寄生初期にWRKY14の発現を抑制することでセロトニンを低濃度に抑制し、自身に有利な栄養状態を構築していることを解明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

昆虫-植物相互作用においてアブラムシがイネの防御反応を意図的に抑制することで抵抗性を弱めるばかりか、さらにこの抵抗性物質を逆手にとり自身の増殖に積極的に利用していることを見出し、その制御機構を解明することに成功した。このように食植者が寄主植物の栄養状態を改善するメカニズムは、昆虫-植物の寄主選択に新たな概念となり意義深い。また現在まで昆虫に散発的に存在するサイトカニン類の機能は不明であったが、今回の成果はその答えの一つとなり、昆虫由来サイトカニンの機能解明の端緒となり、これが普遍的な現象であれば昆虫-植物の相互作用のメカニズムに新たな常識を確立することが出来る。

研究成果の概要(英文)：The rice root aphid, *Rhopalosiphum rufiabdominalis*, can suppress a serotonin concentration during a primary stage, although a high amount serotonin was normally induced by a pathogen attacking. The serotonin production by tryptophan decarboxylase could be regulated by both of transcription factor WRKY26 and WRKY14. When an aphid attacked a rice root, isopentenyladenine provided by an aphid would induce WRKY26 but suppress WRKY14 on the root attacked by an aphid, resultingly serotonin would be kept at a low concentration. On the other hand, a coexpression of WRKY26 and WRKY14 would lead a high concentration of serotonin at a middle phase.

研究分野：化学生態学

キーワード：rice aphid

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 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、寄主植物の栄養成分がその昆虫種に対して栄養生理学的に充分であ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。このような生理状態の植物は食植性昆虫の寄主となりえないと考えられてきたが、アブラムシは植物に寄生することにより寄生部位にアブラムシが必要とするアミノ酸を選択的に蓄積させる能力を持つことを申請者らは見出し、さらに、このアミノ酸の選択的な蓄積が寄生部におけるアミノ酸合成経路の全体の活性化によるものであることを解明してきた。これに対してイネはセロトニンを生産することで、オオカボノアカアブラムシの寄生に対して二段階(図1第I期におけるセロトニン蓄積による化学的抵抗性機構と第II期における褐変による物理的抵抗性機構)の誘導抵抗性を発現することで生体防御を行っていることも明らかにしてきた。ところがイネの抵抗性発現のカギとなるセロトニンの蓄積が、アブラムシ寄生時には不自然に遅延し、アブラムシの寄生2~4日間は低い濃度にとどまることを見出した(第I期)。このセロトニンは低濃度ではアブラムシの生育を促進することから、アブラムシはイネの防御反応を抑制することで抵抗性を弱めるばかりか、さらにこの抵抗性物質を逆にとり自身の増殖に積極的に利用している可能性が示唆されていた。

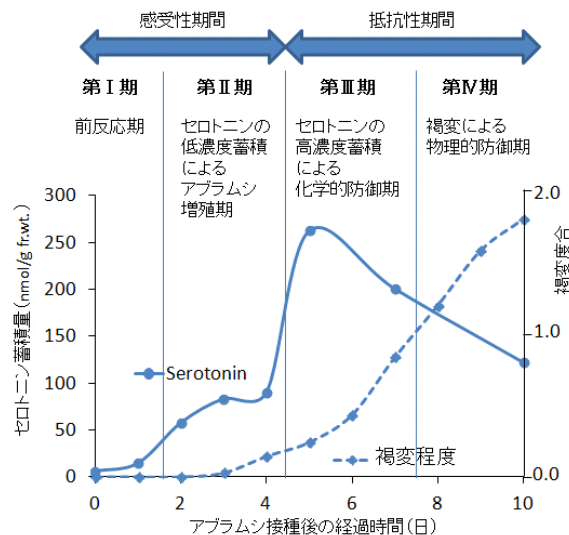


図1 アブラムシが寄生した根におけるセロトニンの蓄積量と褐変度合の変動

(褐変度合: 数値が高いほど褐変度が高い)

### 2. 研究の目的

従来、昆虫が植物の化学防御を克服するメカニズムは「毒物を回避する機構」と「摂取した毒物の無毒化機構」の二つ観点から国内外で研究されてきた。本研究は前者に該当し、これは大別すると二つの機構が知られている。一つは毒物の存在を食害者が認識し摂食を回避する方法であり、摂食阻害物質の存在などが挙げられ非常に多くの研究がなされている。もう一つは、食害者が道管や乳管などを切断し毒物質の移行を妨げるトレンチングによる毒の摂取低減であり、こちらも多く多くの昆虫で報告されている。ところが本研究で解明する機構は、食害者が寄主植物の生合成-代謝系経路を調節し毒物質の低減を図る機構であり、既知の機構とは全く異なり独創的な研究と言える。さらに、植物の化学防御の活性物質を自身の増殖促進のために、ヒトでいうならば医薬品を利用するかのように、薬理活性物質を利用する例の報告は全くなく、昆虫-植物の寄主選択に新たな概念をもたらすものである。

そこで本研究ではアブラムシがイネ幼根に寄生した際に生じる前述の抵抗性の抑制機構、すなわち、セロトニン蓄積がどのように抑制されているのかを分子レベルで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:

オオカボノアカアブラムシ (*Rhopalosiphum 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:「のうけん」より購入)を用いて飼育した(27±3℃, 16L:8D)。イネは4日間催芽後に播種し、播種4日後にアブラムシを摂取した後に、前述の環境下で栽培飼育した。必要に応じて化学分析、遺伝子解析に供するとともに、褐変程度を色見本帳をもとに5段階(0~4)に評価した。

#### 3-2 機器分析方法

セロトニン定量には温調セルを装備した蛍光検出器(Ex:277nm, Em:375, FR20A XS, Shimadzu)を装備したHPLC(Shimadzu LC20AD XR system)を用いた。分析にはMeCN-H<sub>2</sub>O系の溶媒を用いて逆相系カラム(Cadenza CD-C18, φ4.6mm x 150mm, Intact)にて分析を行った。ホルモン測定にはLC30AD system (Shimadzu)を装備したLCMSMS8030(Shimadzu)を用いて行った。分析にはMeCN-H<sub>2</sub>O系の溶媒を用いて、逆相系カラム(Inertsil ODS-4, φ4.6mm x 150mm, GL Science)でMRMモードにて測定を行った。ジャスモン酸イソロイシンは東京農業大学の須恵雅之准教授

から分与を受け、その他に各種標準物質は市販品を購入し使用した。

メタボローム解析のために植物試料のメタノール抽出物は水とヘキサンで液-液分配し、得られた水層 15nL を CE-TOFMS によって分析した。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  $\mu$ m i.d. x 100 cm) カラムを接続して測定した。分析には 1 M 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 遺伝子発現分析方法：

採取されたイネ幼根から RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen)を用いて定法により totalRNA を精製し、バイオアナライザーで純度を測定しマイクロアレイ解析に使用した。Hybridization cocktail は RIN 値 8.5 以上の純度の totalRNA から GeneGhip WT PLUS Reagent Kit を用いて調整し、Affymetrix Rice (Jn) Gene1.1 ST Array Strip にハイブリダイゼーションした。これを定法により洗浄し GeneAtlas System にて遺伝子発現を測定した。得られたデータは Expression Console (Affymetrix)および Transcriptome Analysis Console (Affymetrix)で解析した。

## 4 . 研究成果

### 4-1 アブラムシ寄生によるホルモンの変動と褐変への影響

アブラムシ寄生後のイネ根におけるセロトニン蓄積量は第 期に比べて第 期では有意に少ない(図 1)。この原因を探るため、アブラムシ寄生後のイネ根中の植物ホルモンの動態を調査した。その結果、ジャスモン酸、ジャスモン酸イソロイシン、アブシシン酸、インドール酢酸の内生量は無処理区との間で有意な差は観察されなかったが、サリチル酸およびサリチル酸グルコシドは試験後期(10-14 日後:第 期)に無処理区に対して優位に増加していた(図 2)。このことから、サリチル酸が褐変の進行に関与する可能性が示された。

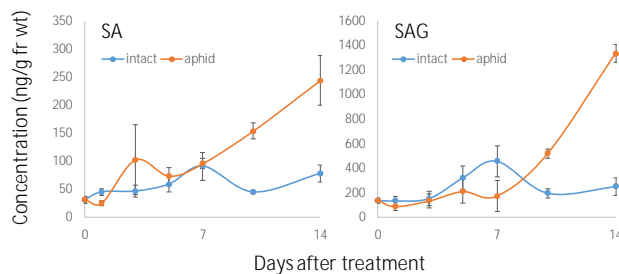


図2 アブラムシ寄生後のサリチル酸類の濃度変化

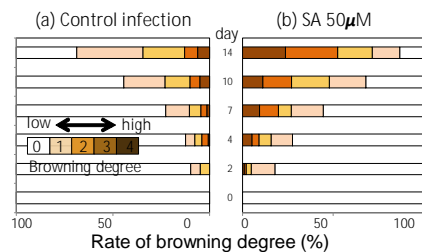


図3 アブラムシ寄生後のイネ根の褐変程度の変化

次にサリチル酸の外部投与による褐変への影響を調べた。即ち播種3日後のイネ幼苗にサリチル酸(50 $\mu$ M)を処理した後、翌日(播種4日後)にアブラムシを寄生させ、その後、飼育栽培し、褐変度合いの変化を観察した。その結果、図3に示すように無処理区(a)、SA 処理区(b)ともに接種2日後から褐変が観察され、14日後には70%以上の根域が褐変状態となったが全期間を通じて SA 処理区のほうが褐変域が大きかった。さらに褐変度3や4を示す領域は10倍程度も大きく、SA 処理が褐変を促進することが明らかになった。これらのことからイネの根ではアブラムシの加害によって第 期にサリチル酸が蓄積し、これが褐変を促進するものと結論づけることが出来た。その他の植物ホルモンは対照区との間で有意な変化は見られなかったもののジャスモン酸とジャスモン酸イソロイシンが接種5日後から10日後にかけて若干増加しており、これが第 期および第 期の抵抗性に関与している可能性が残された。そこでジャスモン酸を含む、各種植物ホルモンによるセロトニン誘導能の調査を行うことにした。

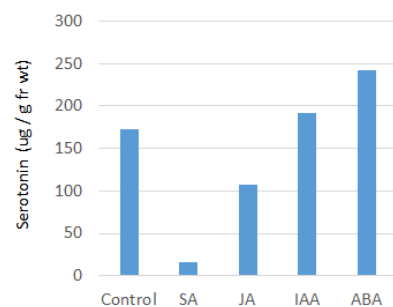


図4 植物ホルモンの外部処理によるセロトニン蓄積への影響

### 4-2 植物ホルモンによるセロトニン誘導

播種4日後のイネ幼苗にサリチル酸、ジャスモン酸、インドール-3-酢酸、アブシシン酸を処理し、3日間栽培後に、根に含まれるセロトニン量を測定した。その結果、SA処理によってセロトニン濃度は有意に減少し、ABA処理によって有意に増加した。一方で、JAおよびIAAの処理ではセロトニン濃度に有意な差は観察されなかった。SAの外部処理にてセロトニンが減少する現象はセロトニンを代謝(重合)している可能性を示し、SAが褐変を促進することを裏付ける結果となった。一方でSA処理のみでは褐変が一切観察されない事象と矛盾した。両事象を考え合わせると、SAはセロトニンを直接重合させる酵素反応系のみを制御し、他の因子によって最終的な褐変物質生産は制御されている可能性が示された。またABAの処理によってセロトニンが増加することから、褐変の前駆体であるセロトニンの生合成経路はABAの制御を受けていることが示唆された。

#### 4-3 アブラムシ寄生による遺伝子発現の変動

アブラムシ寄生後のイネ根における遺伝子の発現変動を調べるために、アブラムシ寄生後のイネの根を経時的にサンプリングしマイクロアレイによるトランスクリプトーム解析を実施した。その結果、前反応期である第1期には300-500/100-200(Up-regulation/Down-regulation)遺伝子の変動が観察されるに過ぎなかったが、第2期では1500-2000/500-1000(Up/Down)遺伝子の変動が、第3期・第4期では1500-2500/1000-1500(Up/Down)遺伝子の変動が確認され、時間とともに遺伝子の発現変動が大きくなることが判明した。このような中、まずセロトニン生合成経路のカギとなる *Tryptophan decarboxylase (TDC)* の発現動態を調べたところ、第1期から第2期に増大していた(図5)。TDCの発現を正に制御する転写因子として *WRKY14*、*WRKY26* が報告されており両者の発現を確認すると、*WRKY26* は第1期以降は常に高発現状態にあるのに対して、*WRKY14* は第1期から第2期にかけて発現が増大し、その後減少することが判明した。これらのことから *WRKY14* と *WRKY26* は相乗的に TDC の発現調整を行っている可能性が示された。即ち、*WRKY26* のみが発現する時期には TDC の発現量は低い状態にとどまり、*WRKY14* と *WRKY26* が共発現する時期に特異に TDC の発現量が高まるものと推測された。一方で、第3期には *WRKY14* と *WRKY26* が発現しているものの TDC の発現は見られなくなっている。これは誘導抵抗性を負に制御する調節因子として知られる *WRKY70* の作用により TDC の発現が停止したものと考えられた。

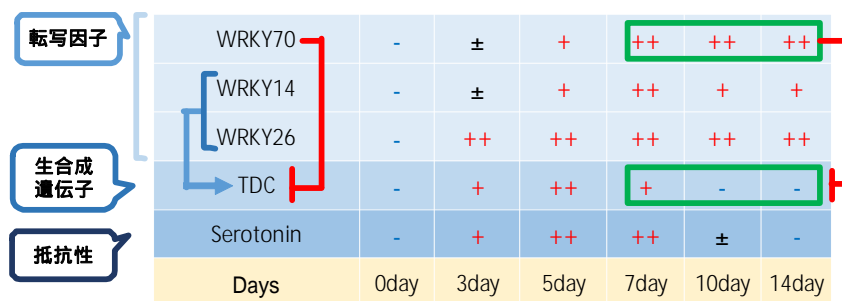


図5 セロトニン生合成遺伝子の発現調節メカニズム

#### 4-4 アブラムシ寄生による遺伝子発現への植物ホルモンの影響

植物ホルモンによるアブラムシ寄生後のイネ根における遺伝子の発現への影響を調べるために、予め植物ホルモンで処理したイネの根にアブラムシを寄生させ一定期間栽培後にマイクロアレイによるトランスクリプトーム解析を実施した。その結果、*WRKY26* は無処理に対してABA処理にて発現量が5.1倍に上昇し、アブラムシ寄生による発現量の増大(6.8倍)に匹敵する効果が確認できた。またアブラムシ寄生とABAの同時処理はアブラムシ寄生と同等の発現量増大が確認できたため、両処理は同義、即ちアブラムシの寄生によってABA制御系のもとで *WRKY26* による遺伝子調節が行われるものと推定された。また、SA処理で *WRKY26* の誘導量は変化せず、アブラムシ寄生との同時処理でも影響が確認されなかったことから *WRKY26* はSAの制御は受けないことが判明した。一方で、*WRKY14* ではアブラムシ寄生では無処理に対して弱いながらも遺伝子の発現量の増大(1.16倍)が確認されたが、ABA処理では有意な差は確認されなかった。さらにABA処理とアブラムシ寄生の同時処理においても有意な増加は確認

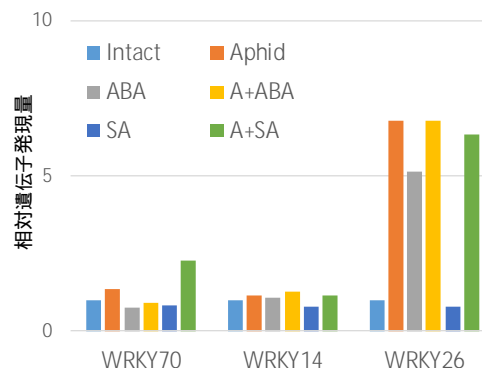


図6 ホルモン処理による転写因子の発現量の変化

できなかったことから、*WRKY14* は ABA の制御下にはないものと思われた。また SA 処理においても同様の傾向が観察されたことから *WRKY14* は SA の制御も受けないことが予想された。アブラムシ寄生後の ABA の濃度変化は無処理区と有意な差はなかったため、*WRKY26* の発現は構成的に存在する ABA によるものか、他の因子によって発現誘導されるものと考えられた。

一方、*WRKY70* は ABA 処理および SA 処理では発現量の増加は観察されないものの、アブラムシ寄生と SA 処理を同時に行うことでアブラムシ寄生以上 (2.3 倍) の遺伝発現の増大が認められた。このことは、アブラムシの加害に由来する何らかのシグナルが SA とともに *WRKY70* を正に制御すること意味した。実際に、アブラムシ寄生後の第 1 期から第 3 期にかけて SA 濃度は上昇することから、この SA とアブラムシ由来のシグナルが協奏することで *WRKY70* の高発現を引き起こし、トリプトファンデカルボキシラーゼ (TDC) の発現を負に制御することでセロトニン生産を停止しているものと考えられた。

#### 4-5 アブラムシ由来のシグナル因子の追及

イネ根におけるセロトニンの誘導蓄積動態の調節にはアブラムシ由来のシグナルが関与していることが示唆された。近年、昆虫体内に植物ホルモンであるサイトカイニンが存在することが報告されている。そこで、オカボノアブラムシに含まれるサイトカイニン量を測定した。その結果、イソペンテニルアデニンが 8.33 pmol/g fr wt、ゼアチンが 97.0 pmol/g fr wt、存在することが判明した。そこで両化合物のセロトニンの誘導能をイネ根断法にて評価した。その結果、ゼアチン処理ではセロトニン蓄積量に有意な変動は見られなかったものの、イソペンテニルアデニン処理にてセロトニンの蓄積量は無処理区における 1.19 ng/g fr wt から約 2 倍の 2.82 ng/g fr wt に上昇することが判明した。このことからイソペンテニルアデニンはアブラムシ由来のシグナル物質であり、これがセロトニン蓄積を制御する可能性が示された。

以上の結果をまとめると図 7 に示すモデルが提案できる。即ち、アブラムシがイネを加害するとアブラムシ由来のイソペンテニルアデニンがイネ根に移行し、これが *WRKY26* を正に制御することで、第 1 期から一定量の TDC を発現させセロトニン生産・蓄積を促す。その後 *WRKY14* が誘導され TDC の発現をさらに増大させ、第 2 期にはセロトニンの高濃度蓄積をもたらし、化学抵抗性の発現を生じさせる。第 3 期にはアブラムシの寄生によって増加した SA とアブラムシ由来のエリシターが協奏的に作用することで *WRKY70* を正に制御し、これが TDC の発現を負に制御することで一連の防御反応が停止するものと思われる。

このように、アブラムシはイネが抵抗性を発現するのに先駆けて、イネの抵抗性を弱く誘導することで、自身の成長に有効なセロトニンを適量摂取する機構を発展させたものと思われる。

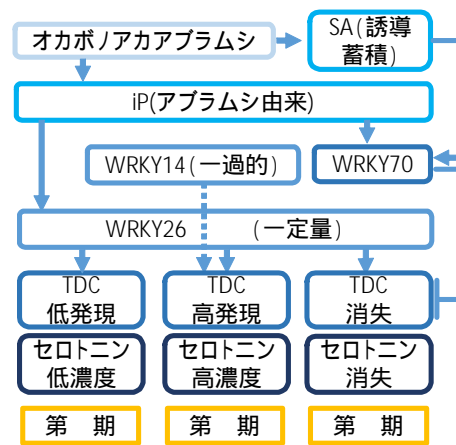


図6 セロトニン蓄積制御のモデル

#### 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3 件)

Accumulation of 9- and 13-KODEs in response to jasmonic acid treatment and pathogenic infection in rice, Sayaka Nishiguchi, Koichi Murata, Naoki Ube, Kotomi Ueno, Shin-ichi Tebayashi, Masayoshi Teraishi, Yutaka Okumoto, Naoki Mori, Atsushi Ishihara; *Journal of Pesticide Science*, 43(3), 191-197 査読有, 2018.

Distribution of the tryptophan-pathway-derived defensive secondary metabolites gramine and benzoxazinones in Poaceae. Yu Kokubo, Miho Nishizaka, Naoki Ube, Yukinori Yabuta, Shin-ichi Tebayashi, Kotomi Ueno, Shin Taketa & Atsushi Ishihara, *Biosci Biotechnol Biochem*, 81(3), 431-440 査読有, 2017.

Studies on the Probing Stimulants for the White-backed Planthopper, *Sogatella furcifera* (Homoptera: Delphacidae) in Rice Plant (*Oryza sativa* L.). Zhan, Z.-H, Matsuo, A., Oku, Y., Tebayashi, S.-I., Kim, C.-S., *Biosci Biotechnol Biochem*, 80(12), 2285-2290, 査読有, 2016.

〔学会発表〕(計 5 件)

Shinichi Tebayashi, Hayato Sumita, Akira OIKAWA, Hideaki MASEDA, Atsushi Ishihara, Induced resistance on the root of rice plant by plant hormones against root aphid. ISCE 34th Annual Meeting, Budapest, Hungary, 2018.

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アミノ酸の蓄積, 日本農芸化学会 2016 年度大会, 札幌, 2016.

Shinichi Tebayash, 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. International Chemical Ecology Conference 2015, Stockholm, Sweden, 2015.

Azusa Mori, Shinichi Tebayash, 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. The International Chemical Congress of Pacific Basin Societies (PACIFICHEM) 2015, Honolulu, Hawaii, 2015.

手林 慎一, 上田 真二, 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褐変機解明. 植物化学調節学会第 50 回記念大会、東京、2015.

〔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〕

高知大学農林海洋科学部化学生態学研究室 HP

<http://www.cc.kochi-u.ac.jp/~tebayasi/>

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名：間世田 英明

ローマ字氏名：Maseda Hideaki

所属研究機関名：国立研究開発法人産業技術総合研究所

部局名：生命工学領域

職名：上級主任研究員

研究者番号(8桁)：10372343

研究分担者氏名：及川 彰

ローマ字氏名：Oikawa Akira

所属研究機関名：山形大学

部局名：農学部

職名：准教授

研究者番号(8桁)：50442934

研究分担者氏名：石原 亨

ローマ字氏名：Ishihara Atsushi

所属研究機関名：鳥取大学

部局名：農学部

職名：教授

研究者番号(8桁)：80281103

### (2)研究協力者

研究協力者氏名：大西 慎太郎

ローマ字氏名：Oonishi Shintaro

研究協力者氏名：上田 真二

ローマ字氏名：Ueda Shinji

研究協力者氏名：山下 紗季

ローマ字氏名：Yamashita Saki

研究協力者氏名：住田 隼人

ローマ字氏名：Sumida Hayato