

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 8日現在

機関番号：82112

研究種目：基盤研究（A）

研究期間：2008 ～ 2011

課題番号：20248007

研究課題名（和文）

植物乳液中に含まれる耐虫防御タンパク質・物質の耐虫生発現分子機構解明と応用

研究課題名（英文） Defense proteins and substances in plant latex and other exudates: elucidation of their structures and functions.

研究代表者

今野 浩太郎 (KONNO KOTARO)

独立行政法人農業生物資源研究所・加害・耐虫機構研究ユニット・主任研究員

研究者番号：00355744

研究成果の概要（和文）：クワ科植物・イチジク属植物の乳液の耐虫性物質は同一科・属中の植物間でも非常に多様であることが判明した。同じイチジク属植物でも耐虫性物質として cysteine protease を持つものと phenanthroindolizidine alkaloids (PIA) を持つものがあった。乳液同様に茎から滲出するウリ科篩管液も耐虫性を担っていることが明らかになりトウガン篩管滲出液から顕著な耐虫性を示す新規タンパク質である BPLP の精製と遺伝子をクローニングに成功した。クワ乳液から発見されたキチン結合性耐虫性タンパク質 MLX56 は昆虫の囲食膜の生成が阻害された状態では耐虫性を発現しないことが判明し、MLX56 が囲食膜を昆虫にとって有害な構造に変化させて対虫性を発現していることが示された。MLX56 を agroinfiltration の手法で遺伝子を導入させた植物は鱗翅目幼虫に耐虫性を示し、MLX56 遺伝子・タンパク質を用いた耐虫性植物育種の可能性が示された。

研究成果の概要（英文）：

Defense substances in latex were diverse even among species belonging to same the family or the same genus. Latex of some Ficus species contained cysteine protease as defense substance while that of other Ficus species contained phenanthroindolizidine alkaloids (PIAs) as defense substances. The phloem exudates of cucurbitaceous plants that exude from leaf veins as well as plant latex also exerted defensive activities against herbivorous insects, and a novel defense protein, BPLP, was purified from the phloem exudate of wax gourd, *Benincasa hispida*, and its gene has been cloned. Defense activity of MLX56, a defense protein purified from mulberry latex, decreased when the formation of the peritrophic membrane is inhibited. This and further result indicated that MLX56 exert defensive activity by modifying the peritrophic membrane to a structure that is harmful to insect herbivores. Introduction of *mlx56* gene into tomato and *Arabidopsis* by agroinfiltration methodology resulted in increased defensive activity in these plant species against lepidopteran larvae, suggesting the possibility of establishing insect-resistant crops using *mlx56* gene.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	9,900,000	2,970,000	12,870,000
2009年度	8,800,000	2,640,000	11,440,000
2010年度	8,700,000	2,610,000	11,310,000
2011年度	8,700,000	2,610,000	11,310,000
年度			
総計	36,100,000	10,830,000	46,930,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農学・応用昆虫学

キーワード：植物乳液・滲出液、耐虫性タンパク質・物質、クワ科植物、ウリ科植物、MLX56、BPLP、鱗翅目幼虫、植物-昆虫間相互作用

1. 研究開始当初の背景

植物乳液が植物の耐虫性を担っているという議論は以前からなされていたが、それらの議論では乳液の耐虫性は乳液の物理性すなわち粘着性によるとされていた。ところが研究代表者の今野の先駆的な研究によりパイアイチジク乳液に含まれるシステインプロテアーゼがこれら植物の顕著な耐虫性を担っていることしめし、乳液が耐虫性タンパク質を含む植物の耐虫性組織であることを明らかにした。今野らはクワにおいても糖類似アルカロイドや耐虫性タンパク質が含まれることを明らかにした。以上のことから植物乳液が耐虫性タンパク質・物質の宝庫であることが判明したが、この分野の研究は緒についたばかりで乳液に含まれる耐虫性物質の分布・構造・作用機構・役割の詳細に関しては未解明のてんが多かった。

2. 研究の目的

本研究では、植物の耐虫防御に特化した仕組みである植物乳液やそれに類似で透明や有色の滲出液に存在する耐虫性タンパク質・物質を同定しその耐虫性発現機構を分子レベルで解明する。また、それらの耐虫性タンパク質の耐虫植物育種等への利用及び解明された耐虫性発現メカニズムを利用した新規の害虫制御技術の開発に結びつける。さらに、これらの植物乳液中の耐虫性タンパク質・物質が植物-昆虫間の攻防的共進にいかに関わっているか解明する。我々はクワ乳液中から顕著な耐虫性を有するタンパク質を同定しアミノ酸配列を決定することに成功したが、このタンパク質がいかなる作用メカニズムで耐虫性を発現しているか解明すると共に、農業において害虫防除の技術に応用可能か検討する。さらに、クワ以外の多くの乳液を分泌する植物の乳液（白色不透明なもの）や類似の滲出液（無色透明なものや有色なもの）に関してどのような物質（タンパク質・有機化合物など）が存在するかを調べ、それらの乳液物質が植物の昆虫に対する防御に果たす役割および、植物昆虫間の攻防的な共進化に如何に関わっているか調べる。

3. 研究の方法

(1)乳液・滲出液中の耐虫性物質に関しては耐虫性（物質）の存在の検定と精製を行うために、乳液・滲出液およびその耐虫性物質を人工飼料にまぜをエリサン（ヤママユガ科）幼虫に摂食さす毒性・成長阻害活性を検出した。耐虫性物質やタンパク質はカラムクロマト

グラム（HPLC、FPLC）の手法で種々の分離カラムを用いれ行いった。精製された耐虫性2次代謝物質はNMRスペクトルの測定等の手法を用い構造決定を行った。また精製された耐虫性タンパク質に関してはプロテアーゼで部分消化したものから内部アミノ酸配列を求め、その情報をもとに遺伝子のクローニングを行い耐虫性タンパク質の一次構造の決定を行った。

(2)クワ乳液由来耐虫性タンパク質の応用可能性と耐虫性発現メカニズムに関して、クローニングした *m1x56* 遺伝子をアグロバクテリウム系のベクターに組み込みアグロインフィルトレーションの手法でトマトシロイヌナズナなどに導入し耐虫性が植物体に付与されたか確認を行うことで、将来 *m1x56* 遺伝子を用いた耐虫性作物の作製可能性の有無を検討した。また、キチン結合性耐虫剤 MLX56 の耐虫性発現メカニズムと中腸囲食膜の関係を調べるために、囲食膜の形成を阻害をすることが知られているキチン合成阻害剤をエリサンに摂食させたとき MLX56 の耐虫性を検定した。また、MLX56 のタンパク質の消化との関連を調べるため、タンパク質を除去した人工飼料を摂食させたときの MLX56 の毒性効果の検定を行った。

4. 研究成果

(1)

①沖縄産のクワ科イチジク属の乳液に含まれる耐虫性分の検定を行った。ホソバイヌビワやハマイヌビワでは乳液中に含まれるシステインプロテアーゼがこれらの種の持つ強い耐虫性（毒性）を担っていることが判明した。しかし、同様に乳液の毒性が強いオオバイヌビワ (*Ficus septica*) の乳液は顕著な昆虫毒性を示すがシステインプロテアーゼ活性は全く検出されなかった。そこで、オオバイヌビワの耐虫性原因物質を HPLC で精製を行い ¹H-NMR, ¹³C-NMR で種々の測定法で測定した結果や紫外線吸収ピーク測定や分子量測定を用いた原因物質特定の結果、数種の Phenanthroindolizidine alkaloid 類 (PIA) が昆虫毒性の主因であり、最も寄与度の大きい成分は antofine (図1) であることが判明した。乳液中の antofine 濃度は 0.67% と高く、葉中平均濃度 0.014% の約 50 倍に達し、antofine は乳液中に高度に濃縮していた。Antofine は極めて低濃度で顕著な成長阻害活性を示し、人工飼料中濃度でカイコやヨトウガ幼虫で 3ppm エリサンでも 30ppm で

成長を阻害した。調査した石垣島自生イチジク属植物 8 種中で乳液中から antofine 類縁体を確認できた種は本種とアカメイヌビワ (*F. benguetensis*) のみで、他の 6 種 (イヌビワ・ガジュマル・ハマイヌビワ・ホソバムクイヌビワ・ギランイヌビワ・オオイタビ) の乳液中には存在しないものと考えられた。これまでに我々はハマイヌビワ、ホソバムクイヌビワ等他のイチジク属植物では乳液中のシステインプロテアーゼが、クワでは乳液中の糖類似アルカロイドと新規耐虫性タンパク質 MLX56 が耐虫性を担うことを明らかにしており、クワ科植物の乳液の多様な成分が植物-植食昆虫間生態・進化関係において重要な役割を持つことが明らかになった。イチジク属植物 (850 種) は熱帯生態系を代表する重要なキーストーン種群とみなされており、本発見は熱帯生態系における植物-植食者間相互作用の生態・進化関係の理解に寄与する発見である。

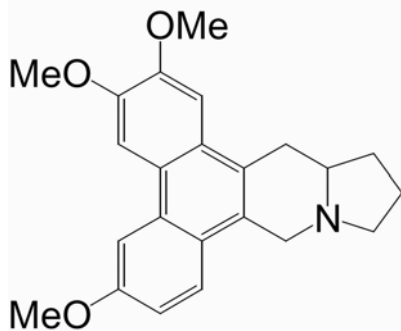


図 1 オオバイヌビワ乳液に含まれる耐虫性物質 Antofine

②ウリ属の滲出液 (篩管液) とくにトウガン *Benincasa hispida* の滲出液は顕著な耐虫性 (成長阻害活性) を示した。トウガンの葉はエリサンに対して強い毒性・成長阻害活性を示したが、細切り水洗し篩管液が滲出しなくなった葉は毒性が顕著に弱くなる一方、篩管滲出液を人工飼料に加えてエリサンに摂食させると顕著な成長阻害が観察された。そこで、トウガン篩管液に含まれる耐虫活性因子の精製を試み、陰イオン交換カラム、ゲル濾過カラム等の各種クロマトグラフィーを用いて単離した。この成分はタンパク質であったため、トウガン篩管液由来耐虫性タンパク質 (BPLP と命名 *Benincasa hispida* Phloem Lectin-like Protein) と命名し、一次構造を解析した。の完全長 cDNA (1076 塩基) をクローニングし、遺伝子・タンパク質の詳細な解析を行った。BPLP は 303 残基のアミノ酸からなり、予測される分子量は 34973.49Da は SDS-PAGE の結果から予測された 35kDa とよく一致していた。BPLP はウリ科植物篩管レクチン (PP2 ウリ科篩管液の凝固反応に関与) と 51% の相同性を示したが、BPLP は PP2

と異なり、約 150 アミノ酸残基からなるほぼ相同な配列 2 つの繰り返し配列のみからなり、PP2 では篩管液凝固機能に関与するシステイン残基を欠くため BPLP は PP2 と異なる機能を持つことが示唆された。BPLP はウサギ赤血球に対し凝集効果を示し、その効果は低濃度の N-acetylglucosamine oligomer で阻害されたため PP2 同様にキチン結合性レクチンの性質を持つことが判明した。BPLP は 70 $\mu\text{g/g}$ (0.007%) の低濃度でエリサン 1 齢幼虫に対して有意な成長阻害活性を示し、105 $\mu\text{g/g}$ では成長を完全に阻害した。また、カイコにおいても 50 $\mu\text{g/g}$ (0.005%) で成長量を半分強まで減らした。0.005-0.01% 濃度での成長阻害活性は植物由来の既知の耐虫性タンパク質と比べても極めて高く (植物のプロテアーゼインヒビターや多くの植物レクチンでは効果発現に 1% 以上の濃度が必要) 耐虫性作物の遺伝育種素材への利用可能性が高いため BPLP タンパク質・遺伝子の利用に関して特許 (日本国内 今野浩太郎・太田英司「耐虫性タンパク質及び該耐虫性タンパク質をコードする耐虫遺伝子」(特願 2011-177212)) を申請した。また、本成果はウリ科篩管液が乳液同様に植物の耐虫性を担い植物の耐虫性タンパク質を含むことをバイオアッセイや物質同定の面から初めて明確に示したという意味で世界的に見ても新規性の高い先駆的な研究である。

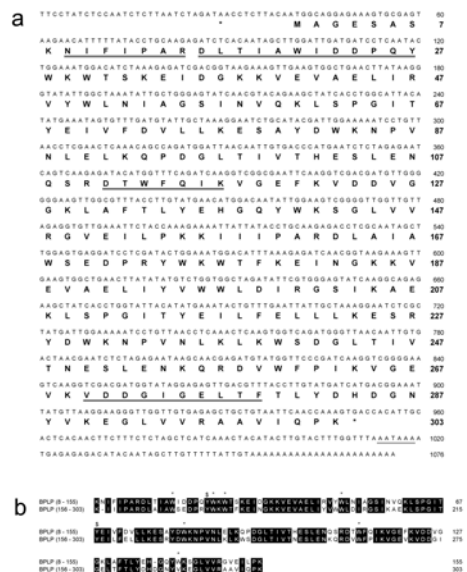


図 2 トウガン篩管液由来新規耐虫性タンパク質 BPLP の 1 次構造 (a) 決定された完全長 cDNA 配列 (上段) とそれから導かれたアミノ酸配列 (下段) (b) BPLP が有する顕著な繰り返し配列。アミノ酸 8-155 と 156-303 の配列を比較したもの。黒塗りが繰り返し配列間で一致したアミノ酸。

(2)

①クワ耐虫性タンパク質 MLX56 はキチン・囲食膜合成阻害剤の共存下で毒性が顕著に軽減されることが判明した。このことから MLX56 は囲食膜を有害なものに変換し毒性を発現している可能性が示された。クワ耐虫性タンパク質 MLX56 の耐虫性メカニズムがタンパク質等の栄養素の消化(分解・吸収)過程を阻害することが根本原因になっているか調べるため、タンパク質を全く含まないセルロース人工飼料を作り、その MLX56 を添加あるいは無添加でエリサンに摂食させ成長を比較したところ、MLX56 はセルロース飼料摂食時でも顕著な成長阻害作用を示した。このことから、栄養素の消化吸收阻害は MLX56 の耐虫性の根本原因ではないことが判明した。MLX56 はこれまで知られていない新規の作用メカニズムを持つ耐虫性タンパク質であることが示唆された。

②. MLX56 遺伝子をアグロインフィルトレーションの手法で導入し一過的に発現させたトマトおよびシロイヌナズナがハスモンヨトウ・コナガの成長量・摂食量をそれぞれ顕著に減少させた、MLX56 の耐虫性育種への可能性が示された。

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 8 件)

- ① 今野浩太郎、クワ乳液の秘密：クワとカイコの攻防関係に迫る、植物防疫、査読無、62 巻(5 号)、2008、265-271
- ② Naoya WASANO, Kotaro KONNO, Masatoshi NAKAMURA, Chikara HIRAYAMA, Makoto HATTORI, Ken TATEISHI, A unique latex protein, MLX56, defends mulberry trees from insects. *Phytochemistry*, 査読有, Vol.70, 2009, 880-888
- ③ Anurag A. AGRAWAL, Kotaro KONNO, Latex: A model for understanding mechanisms, ecology and evolution of plant defense against herbivory, *The Annual Review of Ecology, Evolution, and Systematics*, 査読有, Vol.40, 2009, 311-331.
- ④ 今野浩太郎、平山力、カイコはなぜクワを食べられるのか？分子レベルで明らかにされる植物と昆虫の攻防関係、化学と生物、査読無、47 巻、2009、298-302
- ⑤ 今野浩太郎、植物の防御機構と昆虫—植物乳液をめぐる植物と昆虫の攻防関係、

Biophilia、査読無、6 巻、2010、51-58

- ⑥ Kotaro KONNO, Plant latex and other exudates as plant defense systems: Roles of various defense chemicals and proteins contained therein, *Phytochemistry (Special Issue on Plant-Insect Interactions)*, 査読有, Vol. 72, 2011, 1510-1530.
- ⑦ Kabir E. Khondkar, Daizo KOGA, Kotaro KONNO, Takuma TAKANASHI, Fluorescein-5 isothiocyanate conjugated-chitin-binding domain probe (FITC-CBD)-coupled detection of chitin in the peritrophic membrane of *Monochamus alternatus* (Coleoptera: Cerambycidae), *Journal of Asia-Pacific Entomology*, 査読有, 2012, DOI:10.1016/j.aspen.2012.01.009
- ⑧ Eiji OTA, Masatoshi NAKAMURA, Chikara HIRAYAMA, Kotaro KONNO, Purification and cDNA cloning of a phloem lectin-like anti-insect defense protein BPLP from the phloem exudate of wax gourd, *Benincasa hispida*, 投稿済み 査読やり取り中 (*Phytochemistry*), 査読有
- ⑨ Kei KAWAZU, Naoya WASANO, Kotaro KONNO, Yuko OHASHI, Atsushi MOCHIZUKI, Ichiro MITSUHARA, Evaluation of anti-herbivoral genes by Agrobacterium-mediated transient expression system, 投稿済み、査読の結果条件付き受理判定、(*Plant Biotechnology*).

[学会発表] (計 26 件)

- ① Kotaro KONNO, Chikara HIRAYAMA, Naoya WASANO, Masatoshi NAKAMURA, Hiroshi ONO, Mulberry defense by alkaloidal glycosidase inhibitors in latex and counteradaptation of *Bombyx mori* by inhibitor-insensitive glycosidases in midgut and other tissues, International Symposium on Insect Midgut Biology, 2008 年 4 月 9 日, Guangzhou, China.
- ② Wasano Naoya, Masatoshi NAKAMURA, Chikara HIRAYAMA, Ken TATEISHI, Makoto HATTORI, Kotaro KONNO, A novel latex protein confers insect resistance on mulberry trees: Involvement of the chitin-binding protein in larval

- toxicity in the midgut of caterpillars, International Symposium on Insect Midgut Biology, 2008 年 4 月 8 日, Guangzhou, China.
- ③ Khondkar Ehteshamul Kabir, Kotaro KONNO, *In vivo* entomotoxic and micro-morphological effects of *Serratia marcescens* chitinase of the larvae of Eri silkworm, *Samia ricini* (Lepidoptera: Saturniidae) as a biological pest control agent (BCA)(biopesticides) with special reference to its chitinolytic activity on the chitin-rich structures in the digestive system, International Symposium on Insect Midgut Biology, 2008 年 4 月 8 日, Guangzhou, China.
- ④ Kotaro KONNO, Naoya WASANO, Chikara HIRAYAMA, Ken TATEISHI, Masatoshi NAKAMURA, Hiroshi ONO. Interspecific and intraspecific diversity of latex ingredients in Moraceae plants: Chemicals and proteins with defensive roles against herbivorous insects, International Society of Chemical Ecology, 25th Anniversary Meeting, 2008 年 8 月 19 日, State College, Pennsylvania, USA.
- ⑤ 今野浩太郎、植物の耐虫性防御と昆虫の適応の分子機構—植物と昆虫の食うか食われないかのせめぎ合い、植物ストレス科学研究ネットワーク発足シンポジウム—ストレスと戦う植物の戦略と次世代作物の作出 —招待講演、2009 年 2 月 24 日、岡山県倉敷市。
- ⑥ 今野浩太郎、中村匡利、和佐野直也、平山力、小野裕嗣、竹中真紀子、大藤泰雄、クワ科植物の乳液中耐虫成分の種間多様性、平成 21 年度蚕糸・昆虫機能利用学術講演会 日本蚕糸学会 79 回大会、2009 年 3 月 24 日、東京都府中市 東京農工大学農学部。
- ⑦ 和佐野直也、中村匡利、今野浩太郎、平山力、クワ耐虫性タンパク質の諸性状、平成 21 年度蚕糸・昆虫機能利用学術講演会 日本蚕糸学会 79 回大会、2009 年 3 月 24 日、東京都府中市 東京農工大学農学部。
- ⑧ 今野浩太郎、中村匡利、和佐野直也、小野裕嗣、竹中真紀子、大藤泰雄、イチジク属植物の乳液中耐虫成分の種間多様性：オオバイヌビワにおける疎水性アルカロイドとハマイヌビワにおけるプロテアーゼ、第 53 回日本応用動物昆虫学

会大会、2009 年 3 月 30 日、北海道さ札幌市北海道大学。

- ⑨ 和佐野直也、中村匡利、今野浩太郎、平山力、新たなクワ耐虫性タンパク質のスクリーニング、第 53 回日本応用動物昆虫学会大会、2009 年 3 月 30 日、東京都府中市 東京農工大学農学部。

他 17 件

〔図書〕(計 1 件)

- ① Hisakazu YAMANE, Kotaro KONNO, Maurice Sabelis, Junji TAKABAYASHI, Tekeshi Sassa, Hideaki Oikawa, Elsevier, Oxford, Section 4.08 “Chemical Defence and Toxins of Plants” In “Comprehensive Natural Products II Chemistry and Biology” (Mander, L., Lui, H.-W., Eds.), 2010, pp.339-385

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 2 件)

- ①
 名称：耐虫性タンパク質及び該耐虫性タンパク質をコードする耐虫性遺伝子
 発明者：今野浩太郎、和佐野直也
 権利者：今野浩太郎・農業生物資源研究所 (アメリカ以外)、今野浩太郎、和佐野直也 (アメリカ)
 種類：特許 PCT から外国への移行 (外国出願)
 番号：PCT/JP2008/53794
 出願年月日：2009 年に順次諸外国に申請 (PCT から移行)
 国内外の別：アメリカ、カナダ、ブラジル、インド (国内、PCT は以前に行っている)
- ②
 名称：耐虫性タンパク質及び該耐虫性タンパク質をコードする耐虫遺伝子「(トウガン篩管液由来耐虫性タンパク質 BPLP に関する特許出願)」
 発明者：今野浩太郎・太田英司
 権利者：(独) 農業生物資源研究所
 種類：特許
 番号：特願：2011-177212
 出願年月日：2011 年 8 月 12 日
 国内外の別：国内

○取得状況 (計 1 件)

名称：耐虫性タンパク質及び該耐虫性タンパク質をコードする耐虫性遺伝子 (クワ乳液由来耐虫性タンパク質 MLX56 に関する)
 発明者：今野浩太郎・和佐野直也
 権利者：今野浩太郎 (5%)、(独) 農業生物資源研究所

種類：特許
番号：特許第 4865749 号
取得年月日：2011 年 11 月 18 日
国内外の別：国内

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

今野 浩太郎 (KONNO KOTARO)
独立行政法人農業生物資源研究所・加害・
耐虫機構研究ユニット・主任研究員

研究者番号：00355744

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

平山 力 (HIRAYAMA CHIKARA)
独立行政法人農業生物資源研究所・昆虫機
能研究開発ユニット・主任研究員

研究者番号：90370676

安部洋 (ABE HIROSHI)

独立行政法人理化学研究所・バイオリソー
スセンター・専任研究員

研究者番号：90360479

小野裕嗣 (ONO HIROSHI)

独立行政法人農業・食品産業技術総合研究
機構・食品総合研究所・状態分析ユニッ
ト・ユニット長

研究者番号：90353995

竹中真紀子 (TAKENAKA MAKIKO)

独立行政法人農業・食品産業技術総合研究
機構・食品総合研究所・製造工学ユニッ
ト・主任研究員

研究者番号：60353968

光原一郎 (Mitsuhara Ichiro)

独立行政法人農業生物資源研究所・植物-
微生物間相互作用研究ユニット・上級研究
員

研究者番号：80370683

(4) 研究協力者

太田英司 (OTA EIJI)
独立行政法人農業生物資源研究所・加
害・耐虫機構研究ユニット・特別研究員
(当時)

研究者番号：なし

和佐野直也 (WASANO NAOYA)

独立行政法人農業生物資源研究所・昆虫
-昆虫・植物間相互作用研究ユニット・
特別研究員 (当時)

研究者番号：00469850