

平成 30 年 6 月 26 日現在

機関番号：82111

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04464

研究課題名(和文) シュウ酸カルシウム針状結晶と他の耐虫性物質の相乗的耐虫機構の解明とその原理の応用

研究課題名(英文) Researches on synergistic defensive function of raphides and other defensive substances

研究代表者

今野 浩太郎 (Konno, Kotaro)

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・生物機能利用研究部門・上級研究員

研究者番号：00355744

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,800,000円

研究成果の概要(和文)：シュウ酸カルシウム針状結晶(長さ0.1mm前後の鋭利な結晶、以下針状結晶)を含む複数の植物で針状結晶が他の耐虫性物質や酵素の耐虫効果を強める相乗的耐虫効果(植物の植食昆虫に対する防御効果)の有無を調べた結果、ヤマノイモ、ブドウ類、ポトス(サトイモ科)の葉で針状結晶と葉成分に相乗的耐虫効果を検出した。ヤマノイモでは針状結晶と相乗的耐虫効果を示す画分がキチナーゼ画分と一致し微生物キチナーゼも針状結晶の存在下で耐虫活性が32倍強まるなど、ヤマノイモ等植物でキチナーゼが針状結晶と相乗的耐虫効果を示すことが判明した。ポトスでは針状結晶と葉成分が相乗的耐虫効果で顕著な摂食拒否反応を誘起することが判明した。

研究成果の概要(英文)：We analyzed synergistic anti-insect defensive effects between raphides (needle-crystals made of calcium oxalate) and plant defense substances and/or enzymes using several plant species. As a result, we detected synergistic defensive effects against insect herbivores in plants such as wild yam (*Dioscorea japonica*), grapes (*Vitaceae*), and potos (*Araceae*). In yam leaves, the fraction that show synergistic defensive effects with raphides always coincided with fractions with chitinase activities. Further, bacterial chitinases showed synergistic defensive effects (including growth inhibition and mortality against insects) with raphides. These results showed that in plants including wild yam, chitinase and raphides generally show synergistic defensive function against insect herbivores. Further, in potos (*Araceae*), raphides and unknown leaf substance synergistically induced unusual intense feeding refusal behavior in insect herbivores.

研究分野：昆虫植物相互作用、植物防御機構、化学生態学

キーワード：シュウ酸カルシウム針状結晶 相乗的耐虫効果 ヤマノイモ キチナーゼ ポトス

1. 研究開始当初の背景

キウイ、パイナップル、サトイモ科植物、ブドウ科植物を初めとする多くの植物がシュウ酸カルシウムからなる微細(0.1mm内外)かつ鋭利な針状結晶を葉、果実などの組織内に多量に保持していることが知られていた。その植物にとっての役割としては当初から植物を食害する動物や昆虫などに対する防御であると言われていたが、植物から回収した針状結晶を餌に混ぜて昆虫に摂食させる実験において昆虫に対する防御効果が強く出る場合と出ない場合があり、本当に針状結晶が昆虫などの植食動物に対する防御効果があるかどうか不明であり議論が多かった。最近になり研究代表者の今野はキウイフルーツにおいて、単独では、共に昆虫に対する毒性が弱くほとんど成長阻害・致死効果が見られない針状結晶とシステインプロテアーゼが共存すると顕著な致死毒性を示すこと、すなわち針状結晶と他の耐虫性物質であるシステインプロテアーゼが相乗的耐虫効果を示すことが判明した(Konno K et al., PLoS ONE e91341(2014))。共存物質が針状結晶の強い耐虫活性に必須であるという知見は、これまでシュウ酸カルシウム針状結晶に関しての疑問を一気に解明する発見であった。

2. 研究の目的

シュウ酸カルシウム針状結晶はキウイフルーツに限らず広い分類群の多様な植物に含まれている。また、キウイフルーツやパイナップルの様にシステインプロテアーゼと共存している例もあるがシュウ酸カルシウム針状結晶がプロテアーゼと共存しない例も多い。そこでシュウ酸カルシウム針状結晶と他の耐虫性物質が示す相乗的耐虫効果の一般性、すなわち、1. どのような植物で相乗的耐虫効果がみられるか、2. そのような植物で針状結晶と相乗的に耐虫効果を示している成分は何なのか、3. 相乗的耐虫効果を示したときの耐虫効果はどのような効果なのかなどを、ヤマノイモ、ブドウ、ポトスなど種々のシュウ酸カルシウム針状結晶の存在が報告されている植物を用いて明らかにすることを旨とする。

2. 研究の方法

(1) シュウ酸カルシウムを含むヤマノイモ・ブドウ・ポトス(サトイモ科)の葉をホモジェナイズしたものを遠心分離しシュウ酸カルシウム針状結晶などの葉固形物からなる沈殿を除去した上清を、針状結晶を除去した葉抽出液として回収した。この葉抽出液および抽出液をさらに限外濾過やNativePAGE電気泳動等の手法で分画した画分、あるいは市販のキチナーゼなどの酵素を、それぞれ単独、精製したシュウ酸カルシウム針状結晶との共存下、シュウ酸カルシウム単独でヒマの葉に塗布しエリサンに食べ

させることで耐虫性(致死効果、成長阻害効果)をバイオアッセイした。実験に用いたシュウ酸カルシウム針状結晶は、組織が柔らかく周年入手可能なキウイフルーツをホモジェナイズし塩化セシウムの汁液を用いて分離精製したものをを用いた。

(2) キチナーゼ活性の検出はNativePAGEで泳動したものを可溶性キチン類縁物質を含んだゲルに転写し、そのゲルをカルコフラワールというキチン結合性蛍光色素で染色したものを蛍光発色させ検出した(キチナーゼ活性部は蛍光発色しない黒色バンドとして検出)。

(3) 耐虫活性が検出されたNativePAGEゲル抽出画分に含まれる蛋白性物質の分析はnanoLC-MS/MS分析等の分析手法を用いて行った。

(4) ポトスの葉における葉抽出液とシュウ酸カルシウム針状結晶の相乗的耐虫効果の分析は、ポトス葉をそのまま或いは水系緩衝液抽出液中でホモジェナイズを行った瞬間に活性が失われてしまうことが判明したため、他の種々の手法を試みたが、ヘキサミンあるいはヘプタンなどの有機溶媒中でポトス葉をホモジェナイズ、洗浄し回収した針状結晶をバイオアッセイに供した。

4. 研究成果

(1) シュウ酸カルシウム針状結晶を含む植物の生葉をエリサン幼虫に食べさせるバイオアッセイを行ったところ、エリサンは寄主でない多くの植物を食べるのにもかかわらず、エビヅル、ブドウ、ノブドウ、ヤマブドウ、ヤマノイモ、オニドコロ、サトイモ、ポトス、シンゴニウム、ディフェンバキア、キウイフルーツ、ツククサなど針状結晶を含む植物はほとんど食べなかった。特にこの効果はポトス、シンゴニウム、オニドコロ、アジサイなどで顕著であった。

(2) ヤマノイモ・ヤブガラシ・ノブドウ・ヤマブドウそれぞれの抽出液(針状結晶を除いたもの)とシュウ酸カルシウムの針状結晶の間に顕著な相乗的成長阻害作用を検出した(ヒマ葉にこれら2因子を同時塗布したものを摂食させたエリサンの成長は顕著に遅かった)。同じ量のシュウ酸カルシウム針状結晶単独あるいは抽出液単独では成長阻害作用は成長阻害作用は認められないか非常に弱かった。この結果は、シュウ酸カルシウム針状結晶を含むヤマノイモ・ヤブガラシ・ノブドウ・ヤマブドウのいずれにおいてもシュウ酸カルシウム針状結晶と何らかの耐虫性物質の相乗的耐虫効果の現象の存在を示していた。

(3) ヤマノイモの葉においてシュウ酸カルシウム針状結晶と相乗的耐虫効果を示す物質の特定を試みた。ヤマノイモの抽出液をNativePAGE電気泳動しゲルの各部位からタンパク質を抽出して画分とし、各画分の耐

虫活性のバイオアッセイを行ったところ、シュウ酸カルシウム針状結晶と相乗的に耐虫活性を示す画分を特定できた。ヤマノイモはイモにキチナーゼ活性が報告されているが、葉抽出液にもキチナーゼ活性が観測された。そこでヤマノイモ葉抽出液中の針状結晶と相乗的耐虫効果を示す成分がキチナーゼか検討した。ヤマノイモ葉水抽出液中に含まれる耐虫成分を NativePAGE 電気泳動により分離し、バンドを切り出し、ヒマの葉に針状結晶と共に塗布しエリサンに食べさせることにより、相乗的耐虫活性のバイオアッセイを行った。一方、電気泳動したゲルを可溶化キチン含有アガロースゲルに転写し、キチンに結合して蛍光を発するカルコフラワーで染色し紫外線照射を行い光らず黒いバンドとして残る部分をキチナーゼ活性部分として特定した。その結果、ゲル上方に存在する非常に細いキチナーゼ活性を示すバンドと針状結晶と相乗的耐虫効果をエリサンバイオアッセイで示す画分が完全に一致した(図1)。このことからヤマノイモにおいて、葉のシュウ酸カルシウム針状結晶とキチナーゼが相乗的耐虫効果を表すことが判明した。本結果は植物においてキチナーゼと針状結晶が初めて示すとともに、植物キチナーゼが顕著な耐虫効果を示す植物の耐虫性タンパクであることを明示した数少ない例でもある。

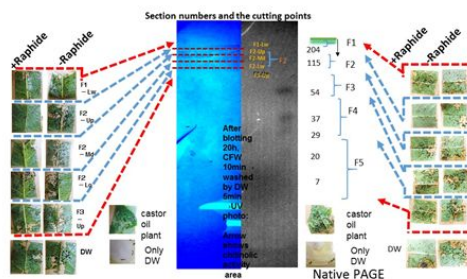


図1. ヤマノイモ葉中に存在するシュウ酸カルシウム針状結晶と相乗的耐虫活性を示す因子としてのキチナーゼの特定

シュウ酸カルシウム針状結晶をふくむヤマノイモの葉抽出液からシュウ酸カルシウム針状結晶と相乗的耐虫効果(成長阻害)を示す因子を Native-PAGE 電気泳動ゲルで酵素アッセイやバイオアッセイを行ったところ相乗的耐虫活性とキチナーゼ活性が一致する事が判明した。この結果からヤマノイモでは葉に共存して含まれるシュウ酸カルシウム針状結晶とキチナーゼが相乗的耐虫効果を示していることが判明した。

(4) さらに、ヤマノイモにおいて針状結晶と相乗的耐虫効果を示すキチナーゼ活性を示す因子について分子の性質を詳細に調べた。ヤマノイモ葉抽出液から調製した画分を SDS-PAGE (DTT、熱処理なし)で電気泳動し、

同ゲルから 50,40,33,28,24kDa の 5 画分を切り出し bioassay 及び MALDI-TOF 分析(nanoLC-MS/MS)を試みた。結果は MALDI-TOF 分析で 33kDa 画分に endchitinase (エンドキチナーゼ)が同定され、また bioassay でも 24kDa 画分以外の画分で耐虫活性が、また 50~33kDa の 3 画分では殺虫活性(特に 40kDa では 58.3%)が発現することが分かった。一方 chitinase 活性染色法でも 40、33kDa の 2 画分に活性バンドが可視化され、この 33、40kDa 画分中のキチナーゼ様タンパクが本現象に関与する重要な因子であることが判明した。

(5) キチナーゼとシュウ酸カルシウム針状結晶の相乗効果の一般性と針状結晶がキチナーゼの耐虫活性を何倍程度強めるか確かめるために、バクテリア *Streptomyces griseus* 由来のキチナーゼとシュウ酸カルシウム針状結晶の相乗的耐虫効果について、両者を種々の濃度でヒマの葉に塗布してエリサン孵化幼虫に摂食させ成長と致死率を測定することで解析した。その結果、シュウ酸カルシウムが単独ではほとんど成長阻害効果や致死効果など効果を示さず、キチナーゼが全く成長阻害効果を示さない濃度下でも両者が共存すると顕著な致死活性を示した。また、針状結晶の存在が、キチナーゼの耐虫効果を少なくとも 16-32 倍以上強めることが判明した(表1)。以上の結果はキチナーゼとシュウ酸カルシウム針状結晶の相乗的耐虫効果がヤマノイモのキチナーゼに限定されない一般的な現象であることを示した。

各ホウ一錠 (mg/錠)	0	5.2	10.4	41.7	83.3
0	0.0	0.0	0.0	0.0	0.0
0.014	0.0	0.0	0.0	6.3	
0.028	0.0	3.1	0.0	6.3	
0.056	4.2	21.9	27.3	15.6	
0.11	2.5	56.3	54.2	83.3	
0.22	0.0		68.8	58.3	
0.44	6.3		94.0	87.5	
0.89	18.7		100.0	95.8	

表1. シュウ酸カルシウム針状結晶とキチナーゼ(*Streptomyces griseus* 由来)の相乗的耐虫効果の数量的関係(試験開始1日後のエリサンの死亡率(%))(n=16-97)

(6) ポトスなどサトイモ科植物をヒトが嚙った場合顕著なえぐみ或いは痛みを感じるが、ポトスの葉をエリサン幼虫に摂食させた場合も、顎を開閉し頭部を持ち上げて左右に振る顕著な摂食拒否行動を示すことを発見した。その原因物質の特定に向けポトス葉からの抽出法を検討した。最初水中で葉をすりつぶす方法で活性の抽出を試みたがこの方法では活性がすぐに消失してしまい(水系の緩衝液中ですりつぶした葉自体に既に活性がない)活性の抽出に完全に失敗した。しかしポトスの葉をヘキサソール・ヘブタン等の有機

溶媒中ですりつぶして抽出し遠心で沈殿を回収することで、完全な摂食拒否行動を誘起する摂食拒否活性を抽出することに成功した。そしてこの沈殿物はほとんど針状結晶のみからなっていたため、この方法で回収した針状結晶は表面に針状結晶と共存状態で相乗的にエリサンに摂食拒否行動を有する因子を含んでいるものと考えられた。そこで、本方法で回収した活性な針状結晶に付着していると思われる物質をNMRで分析したところ複数の低分子物質の存在が確認された。また、ポトスのシュウ酸カルシウム針状結晶を走査型電子顕微鏡で観察したところ、キウイフルーツのそれが単純な円錐状の形態をしていたのに対し、ポトスの針状結晶は薄い板状の結晶が真ん中部分でくっついているが両端が二つに分かれた形状（鋭利なピンセット状の形状）をしていて（図2）、溝部分に接触拒否活性物質が含まれている可能性も示唆された。

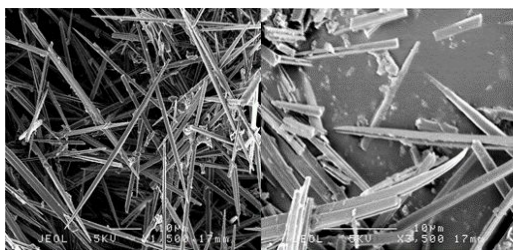


図2 サトイモ科植物のポトス葉から抽出した特異な形態のシュウ酸カルシウム針状結晶の走査電顕像

左：針全体像、右：拡大像

2枚の両端が尖った薄いピンセットの板のような形をしたものが中間部で接着されたような特異な形態をしている。2枚の板に挟まれた部分に毒を保持している毒針のようにも見える。この針を塗布した植物葉をエリサンというガの幼虫に食べさせると、しばらく食べたあと頭部を持ち上げて振りまわし、口の開閉を繰り返す顕著な摂食拒否行動を示すことが明らかになった。

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1件)

今野浩太郎、植物は毒針で昆虫を撃退する？シュウ酸カルシウム針状化粧とシステインプロテアーゼの劇的な相乗的殺虫効果、化学と生物、査読無、54巻、2016、847-852

〔学会発表〕(計6件)

松本信弘、今野浩太郎、シュウ酸カルシウム針状結晶と相乗的耐虫効果を示すヤマノイモ由来のタンパク因子の探索について、第62回日本応用動物昆虫学会大会、

2018年3月26日、鹿児島県鹿児島市 鹿児島大学郡元キャンパス。

Nobuhiro MATSUMOTO, Kotaro KONNO, Synergistic defensive function of raphides and chitinase/chitinase-like protein from *Streptomyces griseus* and yam (*Dioscorea japonica*) leaf extract through the needle effect. The Joint Meeting of the 33rd Annual Meeting of the ISCE and The 9th Meeting of the APACE (2017 ISCE/APACE)(国際学会)、2017年8月25日、京都府京都市伏見区 龍谷大学深草キャンパス。

今野浩太郎、松本信弘、行弘文子、昆虫は痛がっているのか？ - シュウ酸カルシウム針状結晶を含むサトイモ科食物の顕著な摂食阻害活性、第61回日本応用動物昆虫学会大会、2017年3月29日、東京都小金井市 東京農工大学小金井キャンパス。

松本信弘、今野浩太郎、シュウ酸カルシウム針状結晶と相乗的耐虫効果を示す植物因子について(2)、第61回日本応用動物昆虫学会大会、2017年3月28日、東京都小金井市 東京農工大学小金井キャンパス。

今野浩太郎、松本信弘、行弘文子、ヤマノイモ・サトイモ科植物のシュウ酸カルシウム針状結晶の耐虫効果 昆虫に痛覚？、平成29年度 蚕糸・昆虫機能利用講演会 日本蚕糸学会 87回大会、2017年3月21日、茨城県つくば市 農林水産技術会議事務局筑波産学官連携支援センター。

松本信弘、今野浩太郎、シュウ酸カルシウム針状結晶と相乗効果を示す植物因子について、日本昆虫学会第76回大会・第60回日本応用動物昆虫学会合同大会、2016年3月29日、大阪府堺市 大阪府立大学中百舌鳥キャンパス。

〔図書〕(計0件)

〔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：
取得年月日：
国内外の別：

〔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)
国立研究開発法人農業・食品産業技術総合
研究機構・生物機能利用研究部門 昆虫制
御研究領域・上級研究員
研究者番号：00355744

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

小野 祐嗣 (ONO, Hiroshi)
国立研究開発法人農業・食品産業技術総合
研究機構・高度解析センター・チーム長
研究者番号：90353995

光原 一郎 (MITSUHARA, Ichiro)
国立研究開発法人農業・食品産業技術総合
研究機構・生物機能利用研究部門 植物・
微生物機能機能利用研究領域・主席研究員
研究者番号：80370683

安部 洋 (ABE, Hiroshi)
国立研究開発法人理化学研究所・バイオリ
ソースセンター・専任研究員
研究者番号：90360479

(4) 研究協力者

松本 信弘 (MATSUMOTO, Nobuhiro)
国立研究開発法人農業・食品産業技術総合
研究機構・生物機能利用研究部門 昆虫制
御研究領域・契約研究員 (当時)
研究者番号：なし

行弘文子 (YUKUHIRO, Fumiko)
国立研究開発法人農業・食品産業技術総合
研究機構・生物機能利用研究部門 昆虫制
御研究領域・研究補助員
研究者番号：なし

山崎 俊正 (YAMAZAKI, Toshimasa)
国立研究開発法人農業・食品産業技術総合
研究機構・高度解析センター・センター長
研究者番号：40360458

梶原 英之 (KAJIWARA, Hideyuki)
国立研究開発法人農業・食品産業技術総合
研究機構・高度解析センター・主席研究員
研究者番号：40370647