

令和元年6月10日現在

機関番号：16401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2018

課題番号：16K15069

研究課題名(和文) イネ根におけるアミノ酸の選択的な蓄積機構の解明：アブラムシ由来の新奇エリシター

研究課題名(英文) Elucidation of the mechanism of selective accumulation of amino acids; identification of elicitor from the rice root aphid.

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) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：オカボノアカアブラムシは自己の増殖のために寄主であるイネの栄養状態を改変するためにアミノ酸やセロトニンを選択的に蓄積する機構をもつ。本研究ではこの昆虫-植物相互作用の契機となる、アブラムシ由来のエリシターの探求を行い、アブラムシ自身が植物ホルモンであるイソペンテニルアデニンを保持しエリシターとして利用することを見出した。さらに、イソペンテニルアデニンはアブシシン酸と協奏的に作用し *de novo* でセロトニンを生合成する機構を誘導することを突き止めた。同時に、セロトニンの重合・褐変には別のエリシターとサリチル酸によって制御されることも解明した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

昆虫-植物相互作用の契機となるエリシターの研究はその困難さから数が少なく、現在まで数種の化合物が報告されているにすぎない。特に寄主昆虫が有利に働く因子の報告例は今回が初めてであり、学術的にも意義深い。また、近年、昆虫にサイトカイニンであるイソペンテニルアデニンとゼアチンが散発的に存在することが報告されているものの、その存在意義は不明なままであった。今回の研究では昆虫が寄主植物の栄養状態を改善するために植物ホルモン自体を利用している可能性が示され、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ものとなり、植物生理・昆虫生理の両分野のマイルストーンとなる。

研究成果の概要(英文)：The rice root aphid, *Rhopalosiphum rufiabdominalis*, can induce a mechanism to accumulate amino acids and serotonin in a rice root and utilizes these nourishments for their growth and reproduction. Isopentenyladenine was identified as an elicitor from the rice root aphid itself. An exogenous isopentenyladenine treatment to a root could induce an accumulation of serotonin, and then it was concluded that isopentenyladenine could act as a trigger of the mechanism to modify a nutritional condition in a rice root.

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

従来、アブラムシの寄主植物にアスパラギン(Asn)やグルタミン(Gln)が多い事実は単に「該当植物の特質として Asn や Gln が多い」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。しかし申請者はオカボノアカアブラムシ(以下アブラムシ)のイネ根への寄生を契機に、アスパラギン等を選択的に蓄積させていることを見出した。このアミノ酸組成がブフネラの活動に最適化されていることから、アブラムシはブフネラを共生させるにとどまらず、さらに積極的にブフネラが必要とする栄養分を蓄積させて利用しているものと考えられた。さらに、この現象が遺伝子の発現レベルで制御され、アミノ酸の生合成系が活性化する一方、代謝系は変化しないという、フラックス・バランスの変動により生じることも解明してきた。このようにアブラムシがイネの遺伝子発現の制御を行っている事実は、今までの昆虫生理学・植物生理学で見出されてこなかった事象であり、高い注目を集めていた。

2. 研究の目的

オカボノアカアブラムシが自己の増殖のために植物の栄養状態を改変するためにアミノ酸を選択的に蓄積する機構のアウトラインは見出したものの、その詳細は未解明のままである。このようなイネで生じる遺伝子や化学物質の発現変動を詳細に解明するためには、まずはこの現象を引き起こす因子(エリシター)を解明が必要である。申請者はアブラムシ水懸濁液をイネに塗布することでこの現象の一部を再現することに成功しているため、この生物試験系を指標としてアブラムシに起因するアミノ酸の選択的蓄積機構を誘導するエリシターを分子レベルで解明することを第一の目的とする。さらに同定後にはエリシターによるイネ根における遺伝子発現の誘導/抑制を解析し、アミノ酸の選択的蓄積機構の全容解明を目指すことを目的として研究を行った。

3. 研究の方法

3-1 エリシター活性評価方法の確立

アブラムシがイネ根に寄生した際に生じる褐変が、単なる物理刺激ではなく、化学物質(エリシター)の介在により引き起こされることを確認するため、アブラムシの抽出物の褐変促進活性を調査した。即ち、アブラムシの水もしくは MeOH との懸濁液を調整し、水懸濁液はそのまま、MeOH 懸濁液は溶媒を減圧下で留去した後に水に懸濁し、イネ断片に塗布して 27°C に保持した。褐変程度を色見本帳をもとに 5 段階(0~4)に評価した。これに併せて、エリシターの濃度依存活性と安定性評価を行った。即ち、各種濃度に希釈したアブラムシ水懸濁液の褐変活性および、60°C で 2 時間および 90°C で 2 時間の加熱処理、凍結後 - 20°C での保存および解凍処理による褐変誘導活性の変化を調べた。さらに処理されたイネ根中の成分を分析するために、イネ根断片を 100 μ L の MeOH で抽出し、蛍光検出器を装備した HPLC にて分析した。

3-2 エリシターの精製

少量のアブラムシの水懸濁液を用いて予備精製試験を行った。即ち、アブラムシ水懸濁液を遠心分離した上清を Hexane ,Diethyl ether ,Ethyl acetate ,1-Butanol で順次液-液分配分画を行い、各画分を減圧下で濃縮・乾固し水に転溶したのち褐変活性を調べた。また、各種精製カートリッジ(CM、Q、ODS、Florisil、Silicagel、NH)を用いてアブラムシ水懸濁液の予備精製を行った。次にアブラムシ(627mg)を水 1.8mL と均一化した後に、遠心分離(18000rpm x 30min)にて上清を分離し粗抽出液とした。これを Hexane , Diethyl ether , Ethyl acetate との間で順次液-液分配分画し、得られた Ethyl acetate 層を ODS カラム (Sep-pak, 500mg) を用いて、H₂O 画分、20% MeOH-H₂O 画分、60% MeOH-H₂O 画分、MeOH 画分に分画した。各画分は生物試験および化学分析に供試した。

3-3 機器分析方法

セロトニン分析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-H₂O 系の溶媒を用いて逆相系カラム (Cadenza CD-C18, ϕ 4.6mm x 150mm, Intact) を用いて分析を行った。質量分析は LC30AD system (Shimadzu)を装備した LCMSMS8030(Shimadzu)を用いて行った。分析には MeCN-H₂O 系の溶媒を用いて、逆相系カラム (Inertsil ODS-4, ϕ 4.6mm x 150mm, GL Science) を用いて行った。各種標準物質は市販品を購入し使用した。

3-4 遺伝子発現分析方法:

マイクロアレイ解析のために、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評価した。Hybridization cocktail は RIN 値 8.5 以上の純度の totalRNA から GeneGrip 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。イネは播種 3 日後にサリチル酸 (50 μ M) を処理した後、翌日(播種 4 日後)にアブラムシを摂取し、接種後 4 日目

のイネ根を試験に供試した。

4. 研究成果

4-1 アブラムシ由来のエリシターの探索

研究に先立ち、エリシターの特性解析を行った。濃度依存活性を調べると水懸濁液では濃度 25 mg fr wt/mL まで強い活性を示したのに対して、MeOH では濃度 25 mg fr wt/mL では中程度の褐変活性(+)しか示さなかったことから、エリシターの抽出には MeOH よりも水が適していることが判明した。また、エリシターの安定性評価を行うと、90°C 2 時間加熱処理では活性の顕著な低下が確認され、60°C 2 時間加熱処理では若干の活性の低下が確認された。一方で、凍結後 - 20°C での保存および解凍処理では活性の低下は確認されなかった。このことから通常の精製操作は可能であると判断された。また、アブラムシ水懸濁液で処理したイネ根を HPLC で分析するとセロトニンを含む複数のピークの減少が観察された。このことからアブラムシ由来のエリシターがイネに様々な抵抗性反応を引き起こすことが示唆された。

さらに、液-液分配画による精製の各画分の褐変誘導活性を評価すると、褐変活性は Ethyl acetate 層、1-Butanol 層、水層に確認され、エリシターは比較的高極性の物質であることと複数成分からなることが示唆された。また、小型カラムを用いたエリシターの予備精製のための極性試験を行うと(表 1)、活性物質は弱陽イオン交換樹脂には活性物質は吸着されないものの、強陰イオン交換樹脂には一部活性が吸着することから、主要な活性物質はアニオン性物質あるいは弱塩基(或いはその両方)であることが判明した。さらに順相系のフロリジルカラムでは一部の活性のみが MeOH で溶出されたことから、一部の活性物質が非酸性であることも判明した。また、ODS カラムで活性が水で溶出されることと、シリカゲルカラムや NH カラムでは MeOH で活性が溶出されたことから、活性物質が高極性物質であることが再確認された。以上のことからエリシターは陰イオン性の、高極性であることが明らかになった。以上のことからアブラムシに由来する褐変誘導エリシターは高極性物質であり、複数存在することが判明した。さらにその一部は塩基性物質である可能性が示唆された。

表 1 エリシターの極性試験

各処理	褐変程度	
水懸濁液 無処理	++	++
	(H ₂ O溶出)	(MeOH溶出)
陰イオン交換樹脂	+	+
陽イオン交換樹脂	++	-
ODS	++	±
	(MeOH溶出)	(H ₂ O溶出)
フロリジル	+	-
シリカゲル	++	±
NHカラム	+	±

褐変活性の確認された前述のエリシターの特性解析および極性試験の結果をもとにエリシターの精製を行った。その結果、粗抽出物に確認された褐変活性は、液-液分配画において Ethyl acetate 層と水層に回収され、Ethyl acetate 層を ODS カラムで分析すると 60%MeOH-H₂O 画分に活性は溶出した(図 1)。そこで活性の確認された 3 画分を LCMSMS で分析すると共通の成分としてサイトカイニンであるイソペンテニルアデニン(8.33 pmol/g fr wt)とゼアチン(97.0 pmol/g fr wt)が存在することが判明し、両化合物がアブラムシ由来の褐変誘導エリシターの候補物質であると考えられた。

そこで次に、病害応答に関与する植物ホルモンとしても知られるイソペンテニルアデニンとゼアチンをイネ根断片に処理すると、いずれも処理でも褐変は確認されなかった。しかし、イソペンテニルアデニンの処理ではセロトニンの蓄積量が無処理区における 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。即ち、オカボノアブラムシに由来するイソペンテニルアデニンがエリシターとして働きイネにおける抵抗性機能の前半部分であるセロトニンの蓄積を誘導することが解明できた。近年、昆虫にサイトカイニンであるイソペンテニルアデニンとゼアチンが散発的に存在することが報告されているものの、その存在意義は不明なままであった。今回の研究では昆虫が寄主植物の栄養状態を改善するためにイソペンテニルアデニンを利用している可能性が明らかになり、昆虫-植物の相互作用のメカニズムに新たな知見を与えるものとなった。

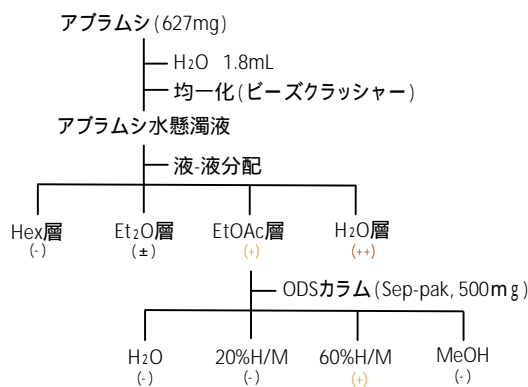


図 1 エリシターの精製工程

4-2 褐変機構の制御メカニズムの解明

アブラムシ由来のエリシターを精製する過程で、イネ根に褐変を誘導するエリシターは複数存在し、それらはイネ根の褐変過程において、異なる事象に影響を与えることが判明した。即ち、イソペンテニルアデニンはセロトニン生合成経路にかかわる部分を誘導し、水層に含まれるエ

リシターはセロトニンの重合による褐変を誘導することが判明した。そこでイネの抵抗性発現機構の前半部分（セロトニン蓄積による「化学抵抗性」と後半部分（褐変による「物理抵抗性」）に関わる植物ホルモンの追及することで制御メカニズムの解明を目指した。その結果、試験したすべての植物ホルモンで褐変の発生は確認できなかったものの、イソペンテニルアデニン以外でもアブシシン酸処理ではセロトニン蓄積量が約2倍に上昇することが判明し、両者は協調的あるいは補完的に、イネの抵抗性発現機構における前半部分であるセロトニン蓄積に作用する可能性が示唆された。また、サリチル酸処理下では褐変は起こらないものの、同時にアブラムシを処理すると褐変が早期に生じ、その強度も増大することが判明し、褐変にはサリチル酸が寄与することが強く示された。

このようにイネの抵抗性発現機構の前半部分（セロトニン蓄積）にはイソペンテニルアデニンとアブシシン酸が、後半部分（褐変）にはサリチル酸が関与することが判明した。そこで未明な点の多い抵抗性機構の後半部分であるセロトニンによる褐変機構のメカニズムを解明するためにマイクロアレイによる遺伝子発現の網羅的解析を行った。その結果、サリチル酸処理では無処理に対して50遺伝子がアップレギュレーションを受け、347遺伝子がダウンレギュレーションを受けていた。アブラムシ処理でも同様に83遺伝子がアップレギュレーションを受け、345遺伝子がダウンレギュレーションを受けており、作用の類似性が予想された。ところが両者の同時処理では754遺伝子がアップレギュレーションを受け、1662遺伝子がダウンレギュレーションを受けており、遺伝子発現が極めて大きく変動することが確認できた。また、アブラムシ処理とサリチル酸処理を比較すると3遺伝子の発現量が増大し、6遺伝子の発現量が減少するのみであったことから、両者のイネ根への影響は極めて類似することが再確認された。一方で、アブラムシの寄生したイネ根では褐変が生じるものの、サリチル酸処理のみでは褐変が生じないことから、両処理における遺伝子発現の違いが褐変に直接つながるものと想定された。そこでアブラムシ処理とサリチル酸処理におけるわずかな遺伝子発現の差を詳細に検討した。

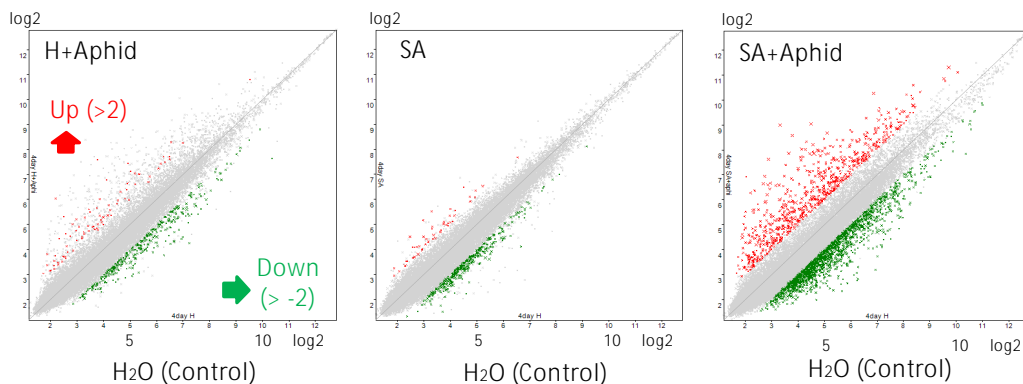


図2 イネにおける遺伝子発現解析の結果

その結果、アブラムシ処理はSA処理に対して *Pectinesterase inhibitor* と、*Haem peroxidase*、*Ornithine decarboxylase* の発現量が特異的に増大することが明らかになった。peroxidaseは重合反応を触媒することからセロトニンを重合し褐変に直接寄与する可能性が示された。また、pectinesteraseは細胞間の固着を緩和することから、これを阻害することで根組織の硬化に寄与しているものと推定され、褐変自体には直接寄与しないものの、イネの抵抗性発現の一部と考えられた。ornithine decarboxylaseは生体アミン生合成経路の出発点となる酵素であるため、何らかのシグナル応答に寄与している可能性も示された。

さらに、サリチル酸処理ではセロトニンは減少（消費）されることから、サリチル酸によってperoxidaseが誘導されていることが予想された。しかし、褐変は進行しないため、このperoxidaseは褐変を直接引き起こす多量体生産につながる酵素ではないことが予想された。即ち、セロトニンが褐変物質に変換されるためには少なくとも2段階の重合過程が必要であり、前半ではSAによって誘導されセロトニンを代謝・消費するperoxidaseが関与し、後半では別のperoxidaseによって褐変物質にまで重合されていることが判明した（図3）。

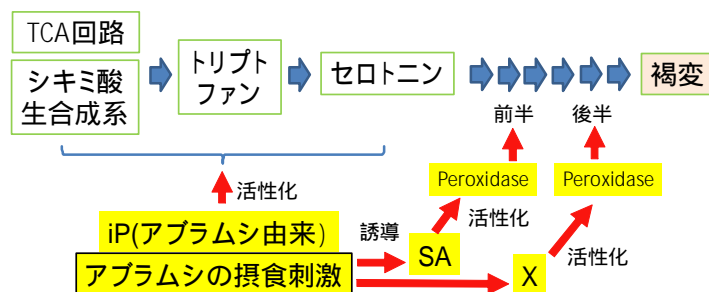


図3 アブラムシの刺激による褐変反応のメカニズム

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Induced accumulation of tyramine, serotonin, and related amines in response to *Bipolaris sorokiniana* infection in barley, Atsushi Ishihara, Rie Kumeda, Noriko Hayashi, Yukari Yagi, Nanase Sakaguchi, Yu Kokubo, Naoki Ube, Shin-ichi Tebayashi & Kotomi Ueno, *Bioscience, Biotechnology and Biochemistry*. 81(6), pp. 1090-1098 査読有, 2017

〔学会発表〕(計 2 件)

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構の解明, 日本農芸化学会 2017 年度大会, 京都, 2017.

山下 紗季, 手林 慎一, 上田 真二, 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構の解明. 植物化学調節学会第 51 回大会、高知、2016.

〔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〕

ホームページ等

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/>

6. 研究組織

(1) 研究分担者

なし

(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：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

研究協力者氏名：山田 知佳

ローマ字氏名：Yamada Chika

研究協力者氏名：間世田 英明

ローマ字氏名：Maseda Hideaki