

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：平成 18 年度～平成 20 年度

課題番号：18580053

研究課題名（和文）植物の化学的防御に対する害虫の対抗適応に関する分子基盤的研究

研究課題名（英文）Molecular basis of counter adaptation of insect pests against chemical defense of plants

研究代表者 刑部 正博 (OSAKABE MASAHIRO)

京都大学・大学院農学研究科・准教授

研究者番号：50346037

研究成果の概要：植物が持つ化学的生体防御機構を人為的に補助・補強する技術の開発を目指し、ハダニ類およびチョウ目咀嚼性昆虫が持つ対抗適応機構を分子レベルで調べた。その結果、ハダニのカンキツへの寄生の可否には、カンキツ葉中の微極性の複数成分が関与することが示唆された。また、チョウ目咀嚼性昆虫において、UDP-グルコシルトランスフェラーゼ (glucosyltransferase) が、植物二次代謝物質の解毒酵素として重要な働きを持つことが示唆された。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	2,200,000	0	2,200,000
2007 年度	600,000	180,000	780,000
2008 年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	390,000	3,890,000

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：共進化機構、二次代謝物質、寄生性分化、DIMBOA、チトクロム P450、UV、ハダニ、チョウ目

## 1. 研究開始当初の背景

植物は、元来、植食者に対して物理的、化学的あるいは生態的にさまざまな生体防御機構を保有している。近年の誘導抵抗性に関する研究は、いわゆる共進化機構あるいは軍拡競争として知られているように、植物自身が進化の過程において獲得してきた生体防御機構としての二次代謝物質が、自然生態系での植物の生存競争に重要な役割を果たし

てきたことを示唆している。

カンキツ科やセリ科植物にはフラノクマリン類やテルペン類などの、またイネ科植物にはベンゾキサジノイド類などの生体防御物質が含まれている。カンキツ科やセリ科に特異的に適応したアゲハチョウ科のチョウでは、チトクロム P450 の CYP6 family がフラノクマリン類の代謝に関与している。

ミカンハダニ *Panonychus citri* はカンキツ類をはじめ、ナシ、モモなどを加害する狭

食性の害虫である。一方、ミカンハダニの同胞種であるクワオオハダニ *P. mori* はナシやモモでは発育できるが、カンキツ類では発育できない。ミカンハダニではカンキツ類を食べた際に非特異的エステラーゼ活性が増大し、産卵数が減少する。また、カンキツ葉へのチトクロム P450 阻害剤の塗布により、殆どの幼虫が死亡する。このことから、ミカンハダニのカンキツへの寄生が、酵素によるカンキツの二次代謝物質の代謝に依存し、その代謝に適応コストが掛かることを示唆している。しかし、その物質および生理的基盤に関しては殆ど知見がなかった。

また、植物防御物質に対する咀嚼性昆虫の代謝酵素として、現在までに、チトクロム P450 やグルタチオン S-トランスフェラーゼが注目されているが、非フェノール性水酸基の代謝酵素として、UDP-glucosyltransferase に関しては殆ど知見がなかった。

## 2. 研究の目的

植物が持つ化学的生体防御機構を人為的に補助・補強する技術の開発を目指し、ハダニ類およびチョウ目咀嚼性昆虫が持つ対抗適応機構を分子レベルで解明することを目的とした。

(1) ハダニ類については、カンキツ類の持つ生体防御物質のうち、ミカンハダニとクワオオハダニの寄生性の分化に関わる物質を解明する。しかし、ハダニ類の発育や生存に影響を及ぼす植物の生体防御物質に関する具体的な知見は殆どない。そこで、本研究では、バイオアッセイを通じて、カンキツ葉の抽出物からこれらのハダニの寄生性分化に関与する成分を調べた。また、それに対する対抗適応機構として誘導されると考えられるミカンハダニの遺伝子を解析し、適応機構の解明を目指した。

(2) イネ科植物の持つベンゾキサジノイド類と呼ばれる防御物質の一種 DIMBOA は、非フェノール性水酸基のヘミアセタール構造を持ち、この部分の開環により、数種の昆虫に対して毒性を示す。これに対して、イネ科植物を食害する鱗翅目ヤガ科アワヨトウは DIMBOA の毒性を回避できる。そこで、ヘミアセタール部分の水酸基に注目し、アワヨトウにおける DIMBOA の代謝物を調べた。

## 3. 研究の方法

(1) ミカンハダニのカンキツ上での発育を特異的に阻害するチトクロム P450 阻害剤(P

ペロニルブトキサイド; PBO) 処理が、代謝阻害を引き起こしていることを確認するため、処理の有無によるミカンハダニ体内の代謝産物の変化を LC/MS および LCMS-IT-TOF により分析した。また、一般的に防御機構として働いていると考えられるフラノクマリン類(バーガプテン、キサントキシン)をミカンハダニとクワオオハダニの共通の寄主植物であるナシまたはクワ葉に塗布し、ハダニ幼虫への影響を調べた。

(2) カンキツ葉からの抽出成分を分画し、ミカンハダニおよびクワオオハダニ幼虫の発育への影響に種間差異を生じる分画を調べた。また、分画に PBO 加えて処理することにより、カンキツ葉上でのミカンハダニの発育阻害と同様の効果があるかを調べた。さらに、クワオオハダニの発育を阻害する成分の部分精製を試みた。

(3) カンキツ葉で飼育した際に特異的に発現するミカンハダニの遺伝子について、3' /5' -RACE を行い、塩基配列を解析した。

(4) DIMBOA 添加飼料でアワヨトウ幼虫を飼育し、それらの糞をメタノール抽出して代謝物を分析、同定した。次に、アワヨトウを解剖して腸管を取り出して、UDP-glucose および DIMBOA とインキュベートし、代謝産物を分析した。

## 4. 研究成果

(1) カンキツ葉上での PBO 処理の有無により、陽および陰イオンの合計 16 成分でピークの顕著な相違が検出され、このうち 13 成分のフラグメント情報を得た。これにより、化合物の推定には至らなかった。

フラノクマリン類のハダニへの影響を調査した結果、ミカンハダニおよびクワオオハダニのいずれも発育に大きな影響は受けなかった。そこで、UVB 照射環境下でフラノクマリン類の光毒性の誘起を試みたところ、種に関わらず対照も含めて殆ど全てのハダニ幼虫が死亡した。このことから、これらのハダニ類は共にフラノクマリン類に耐性を持ち、これらの物質は寄生性の分化に大きな関わりを持たないことが示唆された。その一方で UVB の高い毒性が示唆された。

そこで、紫外線自体のハダニへの影響を調査した結果、UVA は生存に大きな影響を与えないが、UVB は強い致死効果を持つことが明らかになった。また、太陽光に含まれる紫外線も、ハダニ類の発育に強い悪影響を及ぼしていることが明らかになった。

(2) カンキツ葉メタノール抽出物のジクロロメタン分画は、ミカンハダニには殆ど悪影響がない(発育率 95%) 一方で、クワオオハダニの生存率を低下させた(45%)。この分画に PBO を混合するとミカンハダニの発育率が有意に低下した(発育率 66%; 対照: 94%)。これらのことから、ジクロロメタン分画には、ハダニの寄生性の分化に関与し、PBO により代謝が阻害される二次代謝物質が含まれていると考えられた。酢酸エチル分画においても、ミカンハダニ(発育率 94%)とクワオオハダニ(0.3%)で相違が見られ、この分画にも両種の寄生性の差に関与する物質が存在すると考えられた。しかし、この分画に PBO を混合してもミカンハダニの発育率は低下しなかったことから、ジクロロメタン分画の場合とは異なる代謝系の関与が示唆された。

さらに、カンキツ葉のエーテル抽出物をもとに、クワオオハダニのカンキツ利用を妨げる成分の部分精製を試み、クワオオハダニを逃亡・死亡させる活性を持つ画分を複数特定した。逃亡を引き起こす活性は複数の画分に及んでいたが、致死活性は微極性画分(15% エーテル/ヘキサソール画分)で差が大きいことが明らかになった。この画分をさらに分画した各画分間の活性の差は明らかではないことから、微極性の複数成分が活性に介在するものと推測された。

以上の結果から、カンキツ葉中の複数の化学成分とそれらに対する幾つかの代謝機構が、ミカンハダニとクワオオハダニの寄生性の分化に関わっていることが示唆された。

(3) カンキツを摂食しているミカンハダニで特異的に発現している標的遺伝子について、全予測長約 15,000bp の内、3' 末端(ポリ A テイル)から約 5,000bp について塩基配列を決定した。アミノ酸配列解析からポリプロテインと考えられたが、相同性が最も高いものでも 25% 以下であった。以上のことから、これはウイルス由来の新規配列の可能性が示唆された。

(4) DIMBOA 添加飼料で飼育したアワヨトウ糞のメタノール抽出物から、methoxy glucoside carbamate, DIMBOA-2-O-Glc, そして HMBOA-2-O-Glc の DIMBOA グルコース配糖体 3 種を同定した。これらは、DIMBOA のヘミアセタールの水酸基をグルコシル化することで、開環を防ぎ、毒性発現を抑えていると推察された。

さらに、アワヨトウを解剖して腸管を取り出し、UDP-glucose および DIMBOA とインキュベートすると、DIMBOA-2-O-Glc が検出さ

れた。

以上の結果、アワヨトウはイネ科植物の防御物質 DIMBOA を UDP-glucosyltransferases により、グルコシル化して代謝することが示唆された。したがって、チトクローム P450 やグルタチオン S-トランスフェラーゼに加え、UDP-glucosyltransferase も植物二次代謝物質の解毒酵素として重要な働きを持つことが示唆された。

## 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 5 件)

- ① Sasai H, Ishida M, Murakami K, Tadokoro N, Ishihara A, Nishida R, Mori N: Species specific glucosylation of DIMBOA in larvae of the rice armyworm. *Biosci. Biochem. Biotech.*, in press, 査読有
- ② Ohtsuka K, Osakabe Mh: Deleterious effects of UV-B radiation on herbivorous spider mites: they can avoid it by remaining on lower leaf surfaces. *Environ. Entomol.* 38, 920-929, 査読有
- ③ Yoshinaga N, Aboshi T, Abe H, Nishida R, Alborn HT, Tumlinson JH, Mori N: Active role of fatty acid amino acid conjugates in nitrogen metabolism in *Spodoptera litura* larvae. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 105, 18058-18063, 2008, 査読有
- ④ Noge K, Kato M, Mori N, Kataoka M, Tanaka C, Yamasue Y, Nishida R, Kuwahara Y: Geraniol dehydrogenase, the key enzyme in biosynthesis of the alarm pheromone, from the astigmatid mite, *Carpoglyphus lactis* (Acari: Carpoglyphidae). *FEBS J.* 275, 2807-817, 2008, 査読有
- ⑤ Takeyama K, Mori N, Osakabe Mh: Effect of cytochrome P450 inhibitor, piperonyl butoxide, on survival of *Panonychus citri* (McGregor) (Acari: Tetranychidae) on citrus leaves. *Appl. Entomol. Zool.* 41, 487-491, 2006, 査読有

[学会発表] (計 10 件)

- ① 網干貴子、小野 肇、西田律夫、森 直樹: カイコ幼虫各組織のリン脂質組成の解析。日本農芸化学会 2009 年度大会、2009 年 3 月 28-29 日、福岡

- ② 深谷 緑、上杉龍士、刑部正博：ミカンハダニ卵の赤い色素は紫外線から卵を守るのか。第53回日本応用動物昆虫学会大会、2009年3月28-30日、札幌
- ③ 酒居勇太、刑部正博：ナミハダニは太陽光の紫外線を避けるか？第53回日本応用動物昆虫学会大会、2009年3月28-30日、札幌
- ④ Yoshinaga N, Ishikawa C, Nishida R, Lait CG, Tumlinson JH, Mori N: Structure, function, and elicitor activity of fatty acid amides (FAAs) in Lepidopteran caterpillars. Entomological Society of America 2008 Annual Meeting, 16-19 November 2008, Reno, Nevada
- ⑤ Yoshinaga N, Sawada Y, Nishida R, Mori N: Importance of glutamine moiety in volicitin. The 23rd Annual Meeting of the International Society of Chemical Ecology, 22-26 July 2007, Jena, Germany
- ⑥ 深谷 緑、刑部正博：クワオオハダニの寄生を妨げるカンキツ葉の防御活性成分の探索。第52回日本応用動物昆虫学会大会、2008年3月26-28日、宇都宮
- ⑦ 大塚恵子、刑部正博：ナミハダニの生存に及ぼす紫外線の影響。第52回日本応用動物昆虫学会大会、2008年3月26-28日、宇都宮
- ⑧ Osakabe Mh, Ohtsuka K: Harmfulness of UV-B radiation for the twospotted spider mite: they can avoid it by staying on lower leaf surfaces. European Association of Acarologists, 6th European Congress, 21-25 July 2008, Montpellier, France
- ⑨ Osakabe Mh, Ohtsuka K: Deleterious effects of ultraviolet-B radiation on herbivorous spider mites and predaceous phytoseiid mites. International Symposium on Mites &

Whitefly, 9-11 October 2008, Gyeongju, Korea

- ⑩ Fukaya M, Osakabe Mh: Does red pigment protect the citrus red mite eggs from UV damage? International Symposium on Mites & Whitefly, 9-11 October 2008, Gyeongju, Korea

〔図書〕(計 1件)

森 直樹、吉永直子、網干貴子 昆虫科学が拓く未来 第Ⅱ部第1章 昆虫・植物間の攻防と植物免疫システムの“界面”、京都大学学術出版会 165-189 (2009)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

刑部 正博 (OSAKABE MASAHIRO)

京都大学・大学院農学研究科・准教授

研究者番号：50346037

(2) 研究分担者

森 直樹 (MORI NAOKI)

京都大学・大学院農学研究科・准教授

研究者番号：30293913

深谷 緑 (FUKAYA MIDORI)

京都大学・大学院農学研究科・研究員 (COE)

研究者番号：80456821

野下 浩二 (NOGE KOUJI)

京都大学・大学院農学研究科・研究員 (COE)

研究者番号：40423008

(3) 連携研究者

なし