

令和 3 年 6 月 2 日現在

機関番号：34315

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06738

研究課題名(和文) 昆虫由来のエリシターを利用したセリ科薬用植物の機能性強化に関する研究

研究課題名(英文) Studies on the induction of secondary metabolites in medicinal plants of the Apiaceae family using insect-derived elicitors

研究代表者

田中 謙 (Tanaka, Ken)

立命館大学・薬学部・教授

研究者番号：60418689

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：セリ科植物に特有の害虫であるキアゲハの幼虫が含有するエリシター化合物を検索するため、その吐き戻し液を詳細に分析して、リノレン酸が多量に濃縮されていることを明らかにした。セリ科薬用植物であるポウフウ葉に刻みを入れ、リノレン酸を塗布してエリシター活性を検証したところ、リノレン酸投与後  $\alpha$ -pineneなどの植物の間接防御に關与する揮発性成分の放出が確認された。さらに、リノレン酸を長期に投与した植物で falcarinol や bergapten の含有量が増加することが明らかとなった。これらの結果から、キアゲハ幼虫とセリ科植物の特徴的な化学生態学的関係が明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでアゲハ属のチョウ類の幼虫が含有するエリシター化合物は特定されていなかった。そこで、種々のセリ科植物を食害しているキアゲハ幼虫の吐き戻し液を採取し、含有成分を網羅的に検索して、キアゲハ幼虫が有するエリシター化合物を明らかにした。さらに、このエリシター化合物がセリ科薬用植物の有用な二次代謝物の産生を誘導することを明らかにし、高品質の薬用植物を効率的に増産するための新たな栽培法として、植物の化学生態学的応答を利用した方法を提示することができた。

研究成果の概要(英文)：Papilio machaon hippocrates larvae are pests of plants of the family Apiaceae. LC-MS analysis of the regurgitant of P. machaon hippocrates larvae revealed a great increase in  $\alpha$ -linolenic acid ( $\alpha$ -LA) in the regurgitant compared with the FAs contained in the leaves. After  $\alpha$ -LA treatment to leaves, induced defensive reactions, i.e., release of volatile compounds such as  $\alpha$ -pinene (possible induced indirect defense) and the accumulation of secondary metabolites such as falcarinol and bergapten (possible induced direct defense) were observed. These findings highlight the role of  $\alpha$ -LA in the interaction between P. machaon hippocrates larvae and Apiaceae host plants.

研究分野：天然物化学

キーワード：化学生態学

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

これまでに本申請に関連して行った研究では、セリ科植物特有の害虫であるキアゲハ幼虫に食害を受けたトウキ葉で、caryophyllene、butylidene phthalide などの含有量が増加し、根では、falcarinol など polyacetylene 類の含有量が増加することを見出した。これらの化合物に関しては、昆虫などに対する様々な生物活性が報告されており、植物体中で感染防止や防御に重要な役割を担っていることが明らかになっている。それと同時に、これらの化合物は、人が薬用成分として利用しうる有用な物質でもある。このことから、植物の化学生態学的防御応答機能を利用することで、薬用植物中の活性成分含有量を高めることが可能であると考えられた。しかしながら、これまで、植物の化学生態学的防御応答機能を利用して、薬用植物の機能性を向上させるといった観点からの研究は行われていなかった。

### 2. 研究の目的

#### (1) セリ科植物特有の害虫であるキアゲハの幼虫が含有するエリシター化合物の同定

これまでに、鱗翅類の幼虫が放出するエリシター化合物として種々の脂肪酸 - アミノ酸結合体が報告されている。特に、volicitin (*N*-(17-hydroxylinolenoyl)-L-glutamine)は、多くの鱗翅類から報告されており、鱗翅類が持つ主要なエリシター化合物として知られている。近年さらに、*N*-linolenoyl-L-glutamine や *N*-linolenoyl-L-glutamic acid が同様に強力なエリシター活性を有することが明らかにされ、鱗翅類の中での分布が研究されているが、アゲハ属のチョウ類からはこれらのエリシター化合物は見出されていない。そこで、種々のセリ科植物を食害しているキアゲハ幼虫の吐き戻し液を採取し、LC-MS により含有成分を網羅的に検索して、キアゲハ幼虫が有するエリシター化合物を明らかにする。

#### (2) キアゲハ幼虫のエリシター化合物によるセリ科植物からの揮発成分放出誘導の分析

食害を受けた植物は、寄生した害虫に対する天敵を誘引して間接的に防御するためや、植物間で情報を伝達するため揮発性化合物を放出することが知られている。そこで、キアゲハ幼虫の吐き戻し液から同定したエリシター化合物をセリ科植物に投与し、セリ科植物の間接防御について分析する。

#### (3) キアゲハ幼虫のエリシター化合物によるセリ科植物の二次代謝物蓄積量の分析

植物が生合成する多くの二次代謝物は、植物の直接的防御に関与していることが知られている。そこで、キアゲハ幼虫の吐き戻し液から同定したエリシター化合物をセリ科植物に投与して二次代謝物量の変動を網羅的に解析し、キアゲハ幼虫とセリ科植物の化学生態学的関係を明らかにする。

#### (4) キアゲハ幼虫のエリシター化合物投与によるセリ科植物のジャスモン酸生合成に関する遺伝子発現量の変動解析

植物の二次代謝物の生合成は、ジャスモン酸誘導体によって活性化されることが知られている。そこで、エリシター化合物投与したセリ科植物のジャスモン酸生合成に関する遺伝子発現量の変動を解析し、エリシター化合物の作用機構を明らかにする。

### 3. 研究の方法

(1) トウキまたはハマボウフウを食害しているキアゲハ幼虫から吐き戻し液と食害している植物の葉を採取した。試料は、採集後液体窒素で凍結し、-80℃で保存した。採集した植物試料は、メタノールで抽出し、LC-MS で含有成分を網羅的に分析した。吐き戻し液は、メタノールで希釈後、ろ過して LC-MS で含有成分を網羅的に分析し、一部は、溶媒を留去した後、ジアゾメタンでメチル化して GC-MS で分析した。

(2) ボウフウ、ミツバ、パセリなどセリ科植物を SPME 用捕集容器中で無菌培養した。キアゲハ幼虫の吐き戻し液からエリシター化合物として同定したリノレン酸を培養植物葉の切断面に塗布し、塗布後 30 分から経時的に容器内に放出された化合物を SPME-GC-MS で分析した。対照として、エゴマ、セイタカアワダチソウなどセリ科以外の植物を同様に無菌培養し、リノレン酸処理を行って揮発成分を経時的に分析した。

(3) 無菌培養したボウフウ及びエゴマに対し、キアゲハ幼虫の吐き戻し液からエリシター化合物として同定したリノレン酸を培養植物葉の切断面に 5 日間連続的に塗布し、植物体に蓄積された二次代謝物を LC-MS 及び GC-MS で網羅的に分析した。

(4) ボウフウ及びエゴマの RNA-seq データを元に、それぞれの植物に対してジャスモン酸生合成に関する遺伝子 (*13-LOX*, *AOS*, *AOC*, *OPR3*, *OPCL1*) のプライマーを作成した。リノレン酸を培養植物葉の切断面に塗布し、塗布後 30 分から経時的に葉を採取し、遺伝子発現量を測定した。

#### 4. 研究成果

(1) トウキ葉またはハマボウフウ葉及びそれらを食害したキアゲハ幼虫の吐き戻し液中の成分を LC-MS で網羅的に分析した。その結果、volicitin、*N*-linolenoyl-L-glutamine や *N*-linolenoyl-L-glutamic acid などの脂肪酸 - アミノ酸結合体は全く検出されず、リノレン酸、リノール酸、オレイン酸、パルミチン酸など脂肪酸を多量に含有していることが明らかとなった。一般に鱗翅類の幼虫は、寄生している植物に由来する脂肪酸を体内に多く含有していることが報告されているが、蓄積している脂肪酸の種類は、昆虫の種及び寄生している植物の種によって大きく異なっている。今回、キアゲハ幼虫の吐き戻し液中に検出された脂肪酸量と食害されている植物の脂肪酸量を比較すると、リノレン酸の濃縮率が最も高く (34~49 倍)、オレイン酸及びパルミチン酸の濃縮率は低い傾向にあった。エリシター活性を有する volicitin、*N*-linolenoyl-L-glutamine や *N*-linolenoyl-L-glutamic acid では、リノレン酸を基本とするアミノ酸結合体のみが活性を有することが報告されており、キアゲハ幼虫の吐き戻し液では、リノレン酸自体が活性を担っていることが推定された。一方、植物の種によっては、リノレン酸のみではエリシター活性を示さないことも報告されており、セリ科植物におけるリノレン酸に対する化学応答を検証することとした。

(2) 無菌培養したボウフウ、ミツバ、パセリなどセリ科植物の葉を切断し、断面にリノレン酸を塗布して、葉から放出される揮発性成分を経時的に分析した。その結果を図 1 に示す。

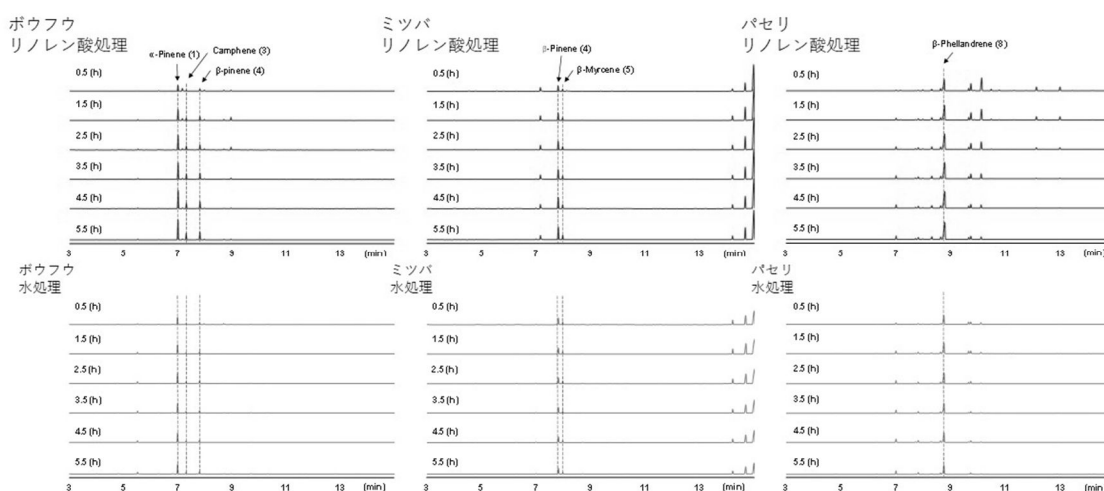


図 1 セリ科植物の -リノレン酸や水処理による揮発成分の誘導の経時変化

その結果、ボウフウ、ミツバ、パセリなどセリ科植物では、葉の断面にリノレン酸を塗布した後 1 時間から  $\alpha$ -pinene、camphene 及び  $\beta$ -pinene の放出量が増加していたが、他科の植物ではリノレン酸処理によって揮発成分の放出量の増加は認められなかった。これまでに、 $\beta$ -pinene などのモノテルペン類が寄生バチの誘引に参与していることが報告されており、これらの結果からセリ科植物の間接防御の誘導にリノレン酸が関与していることが示された。

(3) 無菌培養したボウフウ及びエゴマに対し、リノレン酸を培養植物葉の切断面に 5 日間連続的に塗布し、植物体に蓄積された二次代謝物を LC-MS 及び GC-MS で網羅的に分析した。その結果を図 2 に示す。

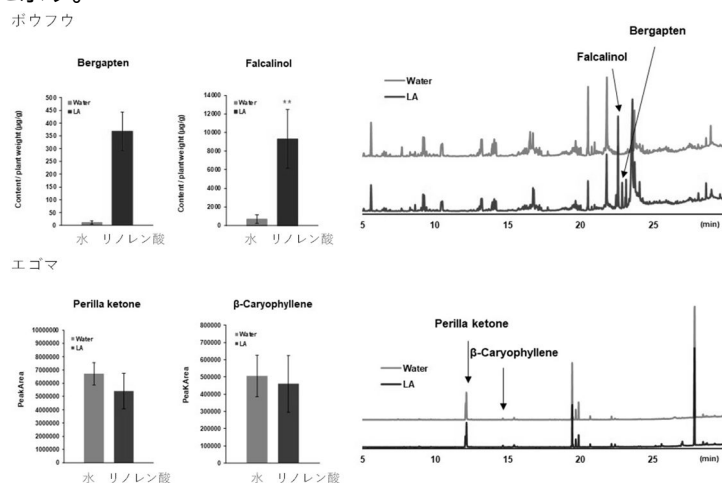


図 2 長期にわたりリノレン酸または水で処理された ボウフウ及びエゴマの二次代謝産物の蓄積と GC-MS クロマトグラム比較

その結果、リノレン酸処理したセリ科植物のポウフウでは、bergapten や falcarinol の含有量が顕著に増加するのに対し、エゴマではそのような二次代謝物量の増加は認められなかった。これらの結果から、キアゲハ幼虫が含有するリノレン酸はセリ科植物に対し、直接・間接防御物質の生合成を誘導することが明らかとなった。このことは、昆虫 - 植物相互作用の観点から両者の特徴的な関係を示すものであると考えられる。

(4) 植物の二次代謝物の生合成は、ジャスモン酸誘導体によって活性化されることが知られている。さらに、リノレン酸はジャスモン酸生合成における原料として重要であることから、無菌培養したポウフウ及びエゴマについてリノレン酸を投与し、それぞれの植物でジャスモン酸生合成に関与する遺伝子 (*13-LOX*, *AOS*, *AOC*, *OPR3*, *OPCL1*) の発現量の経時変化を測定した。その結果、ポウフウで、リノレン酸投与後 4 時間で *AOS* の発現量が増加する傾向が認められたがその他の遺伝子の発現は対照の水処理と比較して若干は上昇するものの有意差は認められなかった。ジャスモン酸の生合成に関与する *13-LOX*, *AOS*, *AOC* などは、植物組織の破壊に対処するため、もともと比較的大量に発現していることが知られており、基質として利用可能なリノレン酸量自体がジャスモン酸の生合成を制御していることが報告されている。そのため、リノレン酸投与によって顕著な遺伝子発現量の増加が確認されなかったものと考えられる。しかしながら一方で、エゴマの遺伝子発現量と比較するとポウフウでは *13-LOX*, *AOS*, *AOC* の誘導倍率が高く、セリ科植物はリノレン酸に対する感受性が高いことが明らかとなった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Yuto Nishidono, Kotaro Niwa, Aoi Kitajima, Shiro Watanabe, Yasuhiro Tezuka, Masanori Arita, Junji Takabayashi, Ken Tanaka	4. 巻 118
2. 論文標題 -Linolenic acid in Papilio machaon larvae regurgitant induces a defensive response in Apiaceae	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Phytochemistry	6. 最初と最後の頁 1-7
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.phytochem.2021.112796	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件／うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Niwa K., Kitajima A., Nishidono Y., Sawa K., Tanaka K.
2. 発表標題 Development of in vitro germination method for Apiaceae plant.
3. 学会等名 The 11th International Conference on Global Resource Conservation (ICGRC) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 丹羽浩太郎, 北嶋 葵, 西殿悠人, 澤 一輝, 有田正規, 田中 謙
2. 発表標題 昆虫 - 植物相互作用を利用した薬用植物の機能性強化に関する研究 1.
3. 学会等名 日本植物学会第84回大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 北嶋 葵, 丹羽浩太郎, 西殿悠人, 澤 一輝, 有田正規, 田中 謙
2. 発表標題 昆虫 - 植物相互作用を利用した薬用植物の機能性強化に関する研究 2.
3. 学会等名 日本植物学会第84回大会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------