

平成 22 年 11 月 30 日現在

研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19780041
 研究課題名 (和文) 害虫の加害が誘導するイネの抵抗性機構の解明：
 セジロウンカ由来の新規エリシター
 研究課題名 (英文) Induced resistance mechanisms of rice plant by insect pest:
 a novel elicitor from white-backed rice plant hopper
 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・准教授
 研究者番号：70325405

研究成果の概要：既に開発しているイネ苗を用いた生物試験を基にして、セジロウンカからイネに対する Benzyl benzoate 誘導を引き起こすエリシターの単離・同定を試みた。セジロウンカ成虫の磨砕物の水懸濁液を遠心分離し得られた上清を ODS カラムで H₂O 画分、20%MeOH/H₂O 画分、60%MeOH/H₂O 画分、80%MeOH/H₂O 画分、MeOH 画分、EtOH 画分に分画すると、主活性は MeOH 画分に活性が確認された。この画分を逆相系 HPLC にて繰り返し精製と生物試験を行うことで活性化合物 A を単離した。NMR の測定結果から化合物 A の構造は 1,2-Diacyl Phosphatidylcholine と判断された。試料を加水分解後のメチル化し GC-MS で分析した結果、構成脂肪酸はリノール酸と結論され、化合物 A を 1,2-Dilinoleoyl Phosphatidylcholine と同定した。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,200,000	0	2,200,000
2008 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	360,000	3,760,000

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：セジロウンカ, イネ, エリシター, 生物有機化学, 植物保護

1. 研究開始当初の背景

近年、消費者の無農薬作物への嗜好の変化や農薬抵抗性害虫の出現により、殺虫剤散布以外の害虫防除技術の確立が生産者・消費者から求められている。このような中、「薬剤により害虫密度を直接調節する」という従来の手法から、「植物自身が備えている防御機能を利用して虫害を軽減する」という新たな害虫防除技術の開発がはかられ、これに関す

る研究が様々な分野で行われている。植物の病原微生物に対する抵抗性に関しては、植物自身が予め蓄えている抗菌活性二次代謝産物などのような常在性の防御機構の他、病原微生物の侵入を受けて初めて蓄積されるファイトアレキシンのような誘導性の防御機構が古くから数多く研究されている。さらに近年では病原誘導性の糖鎖・蛋白質・酵素・遺伝子などの解析や、様々な誘導抵抗性を解発する因子の解明が進んでいる。ところが、

植物の昆虫に対する抵抗性に関しては、植物が予め蓄えている植物毒や摂食阻害物質など常在性の防御機構に関する研究はなされているものの、誘導抵抗性に関する研究は極めて少ない。

稲作における重要害虫であるセジロウンカが特定品種のイネを加害すると、産卵された部位は液浸化しセジロウンカに対して抵抗性を示すこと、さらに、その液浸化した部分に殺卵活性物質として Benzyl benzoate が誘導・蓄積されることが既に報告されている。しかし、Benzyl benzoate 自体を散布してもイネ植物体中に浸透移行しないため防除への利用には成功しておらず、申請者はこのイネのセジロウンカに対する誘導抵抗性を害虫防除技術へ応用することを目指し、抵抗性機構の詳細な解明を行うこととした。現在までに予備的な試験を行い以下のことを解明している。

- I Benzyl benzoate はヒメトビウンカやツマグロヨコバイの卵に対しても殺卵活性を示す。
- II ヒメトビウンカやツマグロヨコバイが抵抗性品種であるナツヒカりに産卵すると、痕跡量の Benzyl benzoate が誘導・蓄積される。
- III セジロウンカが感受性品種であるトヨニシキに産卵すると、抵抗性品種であるナツヒカリの 10-30% 程度の Benzyl benzoate が誘導・蓄積される。

すなわち、感受性品種は Benzyl benzoate の誘導蓄積量が不十分であるために抵抗性を示さないだけであり、またヒメトビウンカやツマグロヨコバイの産卵では Benzyl benzoate が誘導されないためにこれらの害虫には抵抗性を示さないだけである。農林水産省の研究グループは、このイネの誘導抵抗性は昆虫の産卵行動、すなわち産卵管挿入による物理的なイネ細胞の破壊が引き金になっていると予想している（引用文献3）が、彼らの研究では抵抗性の確認を液浸化現象の確認のみで行っており、Benzyl benzoate の誘導を確認していない。申請者はこれに関しても追求を行い以下の事実を見出した。

- IV イネは針による傷害で液浸化を起こす。
- V 液浸化部位には痕跡程度の Benzyl benzoate しか誘導蓄積されない。
- VI セジロウンカの磨砕メタノール抽出物を傷害を与えたイネ葉に塗布すると Benzyl benzoate が強く誘導される

すなわち、イネにおける液浸化は物理的な傷害によって生じるが、この部位への Benzyl benzoate の誘導・蓄積はセジロウンカの産卵

行動に伴ってもたらされる何らかの化学物質により引き起こされることが判明した。この Benzyl benzoate の誘導を解発する化学物質（エリシター）が解明されれば、これをイネに過剰に施用することで、感受性品種にも十分量の Benzyl benzoate の誘導蓄積が可能であると同時に、感受性・抵抗性品種を問わずヒメトビウンカやツマグロヨコバイなどに対する抵抗性も獲得でき、新たな害虫防除技術へと繋がる。

2. 研究の目的

セジロウンカは東アジア地域に局在するが、一旦、侵入すれば重要害虫となりうることから世界中の研究者によって研究が行われている。しかしながらイネにおいて Benzyl benzoate の誘導を解発するエリシターに関する研究は国内外を問わず全く行われていない。これは、基礎研究が先行する欧米諸国においては未侵入の外来昆虫の飼育は法的・物理的な制約があるためであり、特に虫体自体を大量に必要とするセジロウンカに由来するエリシターの化学的研究の遂行は事実上不可能であり、行われていない。一方、国内では農林水産省を中心として、抵抗性品種の開発や遺伝的な解析などの応用研究が基礎研究に先立って行われ、誘導抵抗性の研究は行われていない。

そこで、申請者は既に確立したセジロウンカの加害による抵抗性誘導を再現する In vitro での生物試験系を指標として殺卵物質 Benzyl benzoate の誘導を引き起こすエリシターを精製・単離し、その構造を分子レベルで解明することを最重要課題とする。さらにこのエリシター物質のイネに対する施用方法や量・時期と Benzyl benzoate 誘導能との相関関係を研究室レベルで調査することでエリシターの特性解析を行い、害虫防除技術への応用利用の道を開くことを目的とする。

3. 研究の方法

材料： セジロウンカは研究室にて累代飼育している個体群を用いることを基本とし、申請者の負担軽減を図るため非常勤の研究補助員を雇用し飼育にあてる。現有施設での飼育可能数はおおよそ 40 万頭/年程度であるが、この量でエリシターの解析に不十分である場合は野外で発生している個体を捕獲し試料に充てる。この際、高知県農業技術センターにセジロウンカの発生情報の伝達を依頼し、多発生時には速やかな対応を予定する。

生物試験： 試行錯誤を繰り返した結果、現在までに図 1 に示す生物試験方法を確立している。すなわち直径 9cm のポットに育苗

用培土を入れ発芽イネ種子（ナツヒカリ）を播種し、6週間ビニールハウス内で畑状態にて栽培した後、湛水状態に変更し7日後に生物試験に供する。生物試験は、播種後7週目のイネの地上から5cmの部位に針で傷害を与え、その部位に試料水溶液0.2mLを塗布し、温室内で5日間湛水状態に保ち、処理部位を切り取りメタノールで抽出する。抽出物はODSカラムで精製した後、高速液体クロマトグラフィー（HPLC）で Benzyl benzoate の誘導量を定量する。生物試験においては植物体の生理状態のコントロールが極めて重要であり、処理1週間前よりイネを湛水状態におく事で安定した誘導に成功している。



図1 イネ育成および生物試験スキーム

抽出及び精製： セジロウンカ成虫を低温処理（4℃，15分間）により麻酔後、乳鉢にてすり潰し、80%MeOH/H₂Oに浸漬させた。24時間静置後、綿ろ過し、ろ液を減圧乾固し、セジロウンカの粗抽出物を得た。これをODSオープンカラムを用いてH₂O画分、20%MeOH/H₂O画分、60%MeOH/H₂O画分、80%MeOH/H₂O画分、MeOH画分、EtOH画分に分画した。MeOH画分はさらにHPLCにより繰り返し精製を行なった。

機器分析： 核磁気共鳴スペクトルはJeol JNM-AL400（日本電子）を用いて内部標準としてテトラメチルシラン(TMS)を利用した。ガスクロマトグラフィーはHEWLETT PACKARD HP6890 series GC SystemにHP-5 (Crosslinked 5% PH ME Siloxane: 30m×0.32mm×0.25μm Film Thickness)を設備し、キャリアーガスとしてHeを用い、水素炎検出器にて化合物を検出した。質量分析はJEOL JMS-600W（日本電子）にHEWLETT PACKARD HP6890を接続し化合物を導入し、電子衝撃法（70eV）で分析した。高速液体ク

ロマトグラフィーはShimadzu LC-6ADシステムにTSK-GEL ODS-80TS（21.5mmΦ×300mm）を設備し分取を行った。

4. 研究成果

セジロウンカ抽出物はイネに対してBB誘導能を示した。応答する植物の成長段階を調査すると図2に示すように10葉期から強い誘導活性を示した。

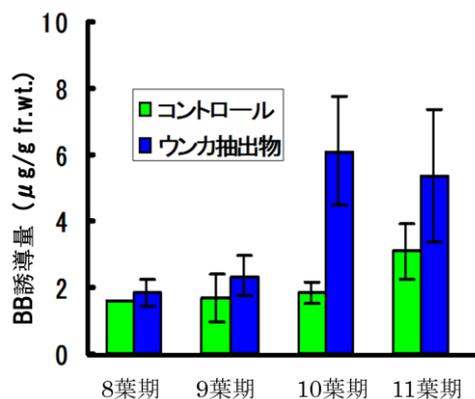


図2 セジロウンカ抽出物に対するイネの応答

セジロウンカ粗抽出物をODSオープンカラムを用いてH₂O画分、20%MeOH/H₂O画分、60%MeOH/H₂O画分、80%MeOH/H₂O画分、MeOH画分、EtOH画分に分画し、生物試験を行うと活性はMeOH画分およびEtOH画分に回収された。(表1) 主活性のMeOH画分はさらにHPLCによる分画(Fr. A, B, C, D, E)を行い活性をFr. Cに回収した。この画分をさらにHPLCで精製し活性化合物Aを単離した。

表1 各画分の Benzyl benzoate 誘導量

画分	BB蓄積量 (μg/g fr.wt.)	
	処理区	無処理区
粗抽出物	6.1	2.1
ODSカラム		
H ₂ O画分	9.1	14.6
20%MeOH/H ₂ O画分	9.2	14.6
60%MeOH/H ₂ O画分	16.8	14.6
80%MeOH/H ₂ O画分	10.8	14.6
MeOH画分	41.3	14.6
EtOH画分	20.6	14.6
HPLC分画		
Fr.A(Rt.0-25 min)	3.9	9.2
Fr.B(Rt.25-50 min)	9.1	9.2
Fr.C(Rt.50-75 min)	30.5	9.2
Fr.D(Rt.75-100 min)	8.7	9.2
Fr.E(Rt.100-125 min)	26.1	9.2

活性化合物AをNMRで分析すると29種の炭素が観測された。170ppm付近のシグナルからエステルが存在が、120-130ppmにかけてのシグナルから二重結合の存在が確認され(表

2)、さらに60-70ppmにかけてのシグナルが、デカップリング試験にも関わらず2重線に生じていた事実から本化合物にはPが含まれるものと判断された。さらに Dept135° および Dept90° の測定から各シグナルの炭素種の決定を行った(表2)。

表2 化合物Aの¹³C NMRスペクトル

CNo.	ppm
1	14.14 (q)
2	22.61 (t)
3	24.91 (t)
4	24.99 (t)
5	25.66 (t)
6	27.23 (t)
7	27.25 (t)
8	29.15 (t)
9	29.19 (t)
10	29.22 (t)
11	29.29 (t)
12	29.31 (t)
13	29.38 (t)
14	29.69 (t)
15	31.55 (t)
16	34.14 (t)
17	34.33 (t)
18	54.41 (q)
19	59.31 (t) (d, J=5.0)
20	62.98 (t)
21	63.36 (t) (d, J=5.7)
22	66.38 (t) (d, J=7.3)
23	70.48 (d) (d, J=7.4)
24	127.78 (d)
25	127.97 (d)
26	129.87 (d)
27	130.13 (d)
28	173.01 (s)
29	173.37 (s)

表3 化合物Aの¹H NMRスペクトル

HNo.	ppm
1	0.86 (6H,t, J=6.8)
2	1.31 (t, m)
3	1.31 (t, m)
4	1.55 (4H, m)
5	2.74 (4H, t, J=6.8)
6	
7	2.02 (8H, q, J=6.8, 7.2)
8	1.31 (t, m)
9	1.31 (t, m)
10	1.31 (t, m)
11	1.31 (t, m)
12	1.31 (t, m)
13	1.31 (t, m)
14	1.31 (t, m)
15	1.31 (t, m)
17	2.26 (4H, t, J=7.2)
18	3.31 (9H, s)
19	4.26 (2H, m)
20a	4.19 (1H, dd, J=7.2, 12.0)
20b	4.38 (1H, dd, J=2.8, 12.0)
21	3.87 (2H, m)
22	3.73 (2H, m)
23	5.16 (1H, m)
26	5.31 (8H, m)

また、¹H NMRを測定すると80H分のシグナルが観測された(表3)。0.86ppmに三重線のシグナルが二つ観察され、1.3-2.8ppmにかけて多くのシグナルが観測されることから長鎖脂肪族の構造の存在が確認され、2.2-2.8ppmの領域に生じているシグナルが、1.3-2.2ppmの領域に生じているシグナルに比して通常の脂肪族より多いことから高度な不飽和構造を持つことが示唆された。さらにこれは4.1-5.2ppmにかけて生じている12H分のシグナルの存在からも裏付けられた。さらにHMBCおよびHMQCの測定から炭素と水素のシグナルの相関関係を測定したことから、ジエチレン構造とトリエチレン構造が1つずつ存在することが確認され、リンによる炭素のカップリングの存在から、トリエチレングリセロールにリン酸基が結合し、さらにジエチレン基が結合していることが判明した。¹H NMRの測定結果における3.31ppmに生じている9H分の一重線のシグナルは、同環境にある3個のメチル基と考えられ、ケミカルシフトから4級アンモニウムイオンの窒素に直接結合していると考えられた。これらのことからジエチレン基の末端にはトリメチルアンモニウムが結合したコリンであることが判明した。これらのことから化合物Aの構造は1,2-Diacyl Phosphatidylcholineと判断された。

アシル基の構造を特定するために定法により加メタノール分解を行いGC-MSにより分析を行った。その結果、図3に示すスペクトルが得られリノール酸メチルであることが判明した。これらのことから化合物Aを1,2-Dilinoleoyl Phosphatidylcholineと同定した。

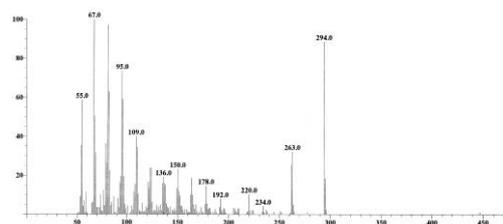


図3 化合物Aの加メタノール分解産物のマススペクトル

本研究におけるエリシターの精製過程では複数の画分に活性が認められた。これらの事実と1,2-Dilinoleoyl Phosphatidylcholineが細胞膜などの構成成分の一つであることを考え合わせると、類縁化合物にもBB誘導活性が存在することが想定された。そこでオクタン酸メチル、ミリスチン酸メチル、リノール酸メチル、パルミチン酸、ステアリン酸、オレイン酸、リノレン酸、トリパルミチン酸グリセロール、トリオ

レイン酸グリセロール、ジステアリルフォスファチジルエタノールに対するイネの応答を調べた(表4)。その結果、トリパルミチン酸グリセロールにはセジロウカ抽出物以上のBB誘導活性が確認され、ミリスチン酸メチル、オクタン酸メチル、パルミチン酸メチル、トリオレイン酸グリセロールなどにはセジロウカ抽出物とほぼ同等の活性が確認された。

表4 Dilinoleoyl Phosphatidylcholine 類縁体のBB誘導活性

化合物	反復数	誘導量 ($\mu\text{g/g fr. wt.}$)
Control	33	6.9
オクタン酸メチル	6	11.2
ミリスチン酸メチル	6	9.2
リノール酸メチル	27	5.7
パルミチン酸	6	10.6
ステアリン酸	6	3.2
オレイン酸	24	4.2
リルン酸	12	8.6
トリパルミチン	6	18.2
トリオレイン	6	10.6
DSPE	9	3.0
セジロウカ抽出物	33	13.2

このように本研究ではセジロウカからイネにおいて Benzyl benzoate 誘導を引き起こすエリシターの単離に成功し、Dilinoleoyl Phosphatidylcholine を同定した。さらに類縁体にもBB誘導活性を確認した。この発見により、あたかも動物におけるワクチン接種による病気の予防のように、「エリシターを外部から投与することで自由に害虫抵抗性物質の誘導・蓄積を調節し、害虫から植物を保護する」という、全く新たな害虫管理技術の開発が可能と考えられた。

本件研究成果による知財の確保を目指していたが科学研究費補助金データベースに研究概要が公表され、これらが先行知見となるために知財の保護が行えなかった。今後は具体的な防除技術の確立等による社会還元を行う必要があるものと考えられる。

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0件)

[学会発表] (計1件)

戸田恭平・手林慎一・金哲史；セジロウカに含まれる殺卵誘導物質の探求，日本農芸化学会関西・中四国・西日本支部2009年度合同大会，2009年10月31日，琉球大学

[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

高知大学農学生理活性物質化学研究室 HP
<http://www.geocities.jp/organicchemistrykochi/20070416.html#>

6. 研究組織

(1) 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・准教授

研究者番号：70325405

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし