

平成21年 6月19日現在

研究種目： 若手研究（スタートアップ）  
 研究期間： 2007～2008  
 課題番号： 19810031  
 研究課題名（和文） ヤナギ類における植物間ケミカルコミュニケーション機構の解析  
 研究課題名（英文） Chemical and biological analyses of inter- and intra-plant communication via volatiles in willow tree  
 研究代表者  
 釘宮 聡一（Kugimiya Soichi）  
 独立行政法人農業環境技術研究所・生物多様性研究領域・任期付研究員  
 研究者番号：10455264

研究成果の概要： 植物は、植食性昆虫の攻撃を受けると揮発性物質（匂い）を放出し、それを受容した健全植物が防衛機構を発現するという現象（プラントトーク）が知られている。本研究では、ジャヤナギの防御関連遺伝子発現を指標に、室内トーク実験で植物の匂い応答の検出を試みた。ヤナギは匂い受容のみでは遺伝子を発現しないが、匂い受容植物上でハムシの成育が低下することから、匂いのプライミング効果によって食害時に迅速かつ強力な抵抗性を発揮すると考えられる。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,370,000	0	1,370,000
2008年度	1,350,000	405,000	1,755,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,720,000	405,000	3,125,000

研究分野：複合新領域

科研費の分科・細目：生物分子科学・生物分子科学

キーワード：プラントトーク、植物-昆虫間相互作用、ヤナギルリハムシ、植物揮発性物質、植物誘導防衛、昆虫食害応答、情報化学物質

## 1. 研究開始当初の背景

植物の多くは植食者による食害を受けると、1) 毒や忌避物質を誘導生産する〔直接防衛〕、2) 捕食者である天敵の誘引物質を放出する〔間接防衛〕等、積極的な防御手段で対抗している。また、近年では、3) 隣接する被害植物から放出された揮発性物質を受容した未被害の植物が予め直接・間接の防衛を開始する事象〔プラントトーク〕が国内外で明らかにされつつある。これら植物誘導防衛に関する現象面の研究は特に生態学の分野で発展してきた。生態学における誘導防衛の主

な検出法は、植物体上の生物群集の変動や、昆虫の行動・パフォーマンス（体サイズや発育日数、産卵数等）の変化の観測である。しかし、これらの観察はむしろ植物が誘導防衛を行った後の結果の記述であり、それらの変化がなぜ起こるのかという因果関係を明らかにするものではない。一方、植物生理学等の分野では病原菌感染や他の環境ストレスに対する植物の応答機構が細胞・分子レベルで詳細に研究されてきたが、その帰結としての生態学的インパクトに関して多くは不問であった。こうした分野間に横たわるギャップ

プを埋めるためには、植物誘導防衛の研究に生態学と分子生物学の両アプローチで取り組むことが希求される。

ヤナギリハムシ (*Plagioderia versicolora*) は主にヤナギ類を寄主としている植食性昆虫である。滋賀県野洲川河畔に生息するヤナギ群落上の昆虫群集の調査結果では、カメノコテントウ (*Aiolocaria hexaspilota*) による補食がハムシ幼虫の主要な死亡要因となっていた。ハムシ食害を受けたヤナギは揮発性物質を放出してハムシの天敵を誘引することで、効率の良い間接防衛を行っているものと推測されたが、こうした木本植物を巡る三者間相互作用の詳細な研究は世界的にも立ち遅れていた。そこで、絶えず氾濫に曝される河畔でいち早く成長を遂げるヤナギが挿し木でクローン増殖可能なことに注目し、これを材料に用いて木本植物を巡る三者間相互作用の研究に取り組むこととした。

プラントトーク (植物間ケミカルコミュニケーション) はヤナギとポプラで初めて報告された (Rhoades, 1983; Baldwin and Schultz, 1983)。いずれも隣接する被害植物から出た匂い (いわば“植物フェロモン”) を受容した未被害の植物が予め防御物質を誘導生産したと結論づけられたが、その植物フェロモン様活性を有する匂い物質の正体は解明されていなかった。また、草本植物におけるプラントトークの実証的研究は国内外で 2000 年以降に本格化した (Arimura et al., 2000)、研究開始当初の木本植物における分子機構の研究例は数少なかった。草本植物とはサイズも生活様式も全く異なる木本植物では、トークの様相も異なることが予想され、新規な知見が得られるものと期待された。

## 2. 研究の目的

本研究では、昆虫による植物への攻撃が引き金となって起こる植物間ケミカルコミュニケーションの分子機構と、それらが植物上の生物間相互作用に及ぼす生態機能とを、モデル植物と近縁な野生種において、遺伝子・代謝産物・個体・群集レベルで多角的に明らかにし、将来的には自然生態系で生物が相互作用する動的な有り様を野外で直接に捉えることを構想している。本課題では、その前段階として、

(1) 木本のモデル植物であるポプラに近縁なヤナギ類を主な材料に用い、室内での操作実験等によって、匂いを受容した植物や昆虫食害を受けた植物が発現する防御関連遺伝子群を明らかにし、植物のストレス応答を簡便に検出するための分子マーカーとして利用することを模索する。

(2) また、植物のケミカルコミュニケーション機構を解析するなかで、それらの分子マ-

ーカーの発現を、“植物フェロモン” 様機能を有する情報化学物質の特定のためにも利用することを試み、その有効性を検証することにした。

## 3. 研究の方法

### (1) 材料となるヤナギのポット植えの準備

木本植物における誘導防衛やプラントトークの研究例が少なかった理由としては、個体サイズの大きい木本植物を使って野外で匂い捕集や生物操作実験を行うことの技術的限界や、それに伴う再現性の低下、良質な植物材料を十分に準備することの困難等の問題点が挙げられる。そこで、ジャヤナギ (*Salix eriocarpa*) の一年枝を採集し、挿し木によって均一の遺伝的背景を持った健全ヤナギ個体の供給系を確立した。これらのヤナギ株そのものを材料に用いて、昆虫が示す反応や植物同士の化学交信を調べるための操作実験や化学分析および分子生物学実験を行った。

### (2) ハムシ被害ヤナギが放出する揮発性成分の特定

ジャヤナギのハムシ幼虫食害株と健全株との間でテントウ成虫の選好性を Y 字型オルファクトメータで試験したところ、テントウは食害株を有意に好むことという知見を既に得ていた。また、食害株が放出する揮発性成分は健全株が放出するそれと異なることを定性的に明らかにしていた。それらの成分は植物間ケミカルコミュニケーションにも関与する可能性が高い。そこで、

① さらに詳細な化学分析を進め、ハムシ食害時にのみ質的・量的に特異な成分を特定することにした。

② また、カメノコテントウ成虫はハムシの幼虫が食害した株と成虫が食害した株を識別することから、幼虫食害株と成虫食害株の間で揮発性成分を分析比較した。

③ ハムシ食害ヤナギから放出される揮発性成分については、ポット植えのまま株ごと設置したチャンバー内から吸引して吸着担体 (Tenax<sup>®</sup>) に捕集した試料を、加熱脱着および冷却濃縮を経てガスクロマトグラフ-質量分析計 (GC-MS) へ導入して分析した。

### (3) 匂い (揮発性成分) 受信植物の準備

本研究の予備実験として、風洞装置内で食害株の風下に健全株を設置して人工的にプラントトーク処理を行い、匂い受信株を準備した。また、健全株の風下で同様に処理したものを対照株として準備した。各々の植物上で飼育したハムシのパフォーマンスを比較すると、受信株上では生存率や蛹重が低下し、成長期間が長くなると共に、食害面積も減少

するという知見を既に得ていた。このことから、食害で誘導される揮発性物質が新たに隣接植物の防衛を誘導することが強く示唆された。そこで、匂い受容による誘導防衛の発現機構を明らかにするために、同様の方法でトーク処理を行って匂い受信株と対照健全株を準備し、後述の防御関連遺伝子の発現パターンを比較解析した。

#### (4) ヤナギ防御関連遺伝子と発現比較解析

Science 誌でのポプラ・ゲノム報告 (2006) によって、木本植物における誘導防衛の分子機構解明の気運が世界的に高まった。そこで、① ヤナギの *farnesyl pyrophosphate synthase (FPPS)* 遺伝子の部分配列を決定した。また、フラボノイドやタンニン等のフェノール性化合物の生合成に関与する *phenylalanine ammonia-lyase (PAL)*、*polyphenol oxidase (PPO)*、*dihydroflavonol reductase (DFR)*、傷害ホルモンとして知られるジャスモン酸の生合成に関わる *lipoxigenase (LOX)*、消化酵素阻害剤である *trypsin inhibitor (TI)* に加えて、*cellulase* や *chitinase* 等の一連の防御関連遺伝子の部分配列を決定した。

② これらのうち、いずれの遺伝子が食害処理やトーク処理によって発現が誘導され、指標となり得るのかを調べた。室内で各処理を行った受信植物から採取した葉の *totalRNA* を抽出し、*RT-PCR* により上記遺伝子群の発現を比較した。

③ 化学分析で明らかにした植物揮発性物質のなかから、特に幼虫食害で顕著に放出される青葉アセテートと  *$\beta$ -ocimene* に対するヤナギの匂い応答性を調べた。両者の希釈液を塗布した濾紙片とともに健全ヤナギをチャンバー内に設置した後、経時的に葉を採集して防御関連遺伝子の発現を *RT-PCR* 法で検出した。その際、生きたヤナギが放出するのと同様となるよう成分の徐放性を長時間維持するため、*triethyl citrate* に混濁して処理した。

#### (5) ヤナギの食害誘導防衛に関わるシグナル伝達系の解析

植物の誘導防衛の発現に関わる植物ホルモンとしてサリチル酸 (*SA*) とジャスモン酸 (*JA*) が知られている。ヤナギの昆虫食害誘導防衛に関わるシグナル伝達系を明らかにするため、健全株にサリチル酸メチル (*MeSA*) およびジャスモン酸メチル (*MeJA*) を局所的にスプレー処理し、*RT-PCR* によって防御関連遺伝子の発現を調べた。

#### (6) 植物揮発性物質が全身獲得抵抗性を誘導すること—*auto-signaling*—の検証

食害で誘導される揮発性物質が他の健全個体の防衛を誘導するのであれば、被害部位

から放出された揮発性物質が植物体外を飛散し、同一個体の未被害部位に防衛を誘導すること (*auto-signaling*) も十分に考えられる。個体選択の観点に立ってみると、プラントトークは情報の受信者にとって適応的であっても、送信者にとって植物他個体にシグナルを送ること自体は適応的ではない。むしろ、木本植物では体内で *JA* や *SA* 等を介した長距離・長時間のシグナル伝達を行う不利を補うべく、揮発性物質による *auto-signaling* に意義が生まれ、そこから近傍の他の植物個体が同じ情報を利用するようになった、というプラントトーク進化のひとつの道筋が考えられる。

揮発性物質を介した全身獲得抵抗性の誘導を検証するため、傷処理した葉に袋をかけて1日後に、同一個体内の無処理の葉を採集した。同様に、対照として無傷のポット植え株から葉を採集した。これらから *total RNA* を抽出し、*RT-PCR* によって防御関連遺伝子の発現を比較した。

#### 4. 研究成果

##### (1) ハムシ被害ヤナギが放出する揮発性成分の特定

① ハムシ食害ヤナギから放出される揮発性成分の *GC-MS* 分析の結果、青葉アルコールや青葉アセテート、青葉アルデヒド、サリチルアルデヒド、 *$\beta$ -ocimene*、(*E,E*)- *$\alpha$ -farnesene* 等がハムシ食害時に特異的に放出されていることを相対定量で明らかにした。

② Y字型オルファクトメータを用いた選択試験では、カメノコテントウ成虫はハムシ幼虫食害株と成虫食害株を識別することから、さらに、両者の間で揮発性成分を化学分析で比較したところ、上記の成分のうち特に、青葉アルデヒド、 *$\beta$ -ocimene*、(*E,E*)- *$\alpha$ -farnesene* が幼虫食害株において成虫食害株よりも有意に多く放出されていた。

③ カメノコテントウはこれらの成分を手掛かりに好適な餌となるハムシ幼虫を探索しているものと考えられる。一方、成虫食害株で幼虫食害株より多く放出される成分は検出されなかった。食害株に隣接する健全植物にとっては、飛翔能力のあるハムシ成虫の方がより大きな驚異となるはずだが、それを区別できる揮発性シグナルは存在せず、幼虫食害でも誘導生産される共通の揮発性成分がプラントトークで働く情報化学物質であると推察される。

##### (2) ヤナギ防御関連遺伝子の発現比較解析

プラントトーク処理を行った後、食害株や匂い受信株、対照健全株における防御関連遺伝子の発現を比較したところ、食害株において *lipoxigenase* や *trypsin inhibitor* の強い誘

導発現が認められた。また、両者はハムシ食害部位だけでなく未被害な部位でも全身的に発現が誘導されることを明らかにした。しかしながら、いずれの遺伝子についても、発現量の個体差が大きいため匂い受信による微弱な誘導発現をヤナギ個体間で比較することには適しておらず、匂い受信の分子マーカーとして利用することは困難なことも明らかとなった。一方で、同じ個体内での発現比較によって揮発性成分によるシグナル伝達 (auto-signaling) を解析するための簡便なマーカーとしてなら利用できる可能性は残された (後述)。

### (3) 食害に関与するシグナルの解析

健全株に MeSA および MeJA を処理したところ、lipoxygenase は MeJA 処理によって発現が誘導されたのに対し、trypsin inhibitor はどちらの処理によっても局所的に発現が誘導された。昆虫食害に応答するジャヤナギでは JA と SA の双方を介して、防御関連遺伝子の複雑な発現制御が行われていることが示唆された。

(4) 昆虫被害部位から放出された揮発性物質が植物体外を飛散し、同一個体の未被害部位に防衛を誘導する“auto-signaling”の可能性について検証するべく、防御関連遺伝子の発現を比較したところ、

① 袋掛け無しの傷処理葉に隣接する葉では lipoxygenase と trypsin inhibitor の誘導的発現が認められた。また、袋掛けした傷処理葉の隣接葉における遺伝子発現を調べた結果、その発現強度に変化は起こらなかった。

② ハムシ食害時にヤナギが大量に放出する  $\beta$ -ocimene や (Z)-3-hexenyl acetate に対する健全株の匂い応答性を調べたところ、それらの匂い処理自体では顕著な遺伝子発現が誘導されなかった。

③ それでも、これらの結果とは対照的に、匂い受信植物上でのハムシのパフォーマンスは低下していた。このことは匂いを受信した植物の抵抗性が向上することを示唆している。

④ 以上のことから、ヤナギは匂い受容のみで防御機能を発現するのではなく、予め匂い受容した後にさらに食害を受けたとき、より強力な防衛能を解発していると推測され、揮発性成分はそうした「プライミング効果」(Engelberth et al., 2004; Frost et al., 2007) を示すと考えられる。

(5) 樹木の維管束連絡やモジュール性といった特徴を考慮すると、揮発性成分を介したシグナル伝達によるプライミング機構は対昆虫防衛において重要な生態学的意義を有しているものと思わ

れる。今後は、防御形質そのものをコードする構造遺伝子だけでなく、その発現を制御する転写因子や調節因子をコードする遺伝子群の発現動態を詳細に解析し、植物の匂い応答による抵抗性発現との関係を明らかにしていく必要があると思われる。また、そもそも植物がどのようにして匂いを認識し得るのか、その仕組みについての分子レベルでの解明が望まれる。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 1 件)

- ① Yoneya, K., Kugimiya, S., Takabayashi, J. “Do adult leaf beetles (*Plagioderma versicolora*) discriminate between odors from intact and leaf-beetle-infested willow shoots?” *Journal of Plant Interactions* (査読有), 印刷中.

[学会発表] (計 1 件)

- ① Kugimiya, S., Yoneya, K., Takabayashi, J. “Induced defensive effects of intact willow trees in response to volatiles from conspecific trees infested by willow leaf beetles” 4th Asia-Pacific Conference on Chemical Ecology (環太平洋化学生態学会議), 平成 19 年 9 月 12 日, つくば国際会議場.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

釘宮 聡一 (KUGIMIYA SOICHI)

独立行政法人農業環境技術研究所・

生物多様性研究領域・任期付研究員

研究者番号: 10455264