

令和 6 年 6 月 7 日現在

機関番号：12102

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20H02983

研究課題名(和文)ハマキガの産卵による誘導現象—寄主卵由来因子に応答する茶葉防衛機構の解明—

研究課題名(英文) Induced defense of tea leaf by tortricid moth oviposition

研究代表者

戒能 洋一 (Kainoh, Yooichi)

筑波大学・生命環境系・研究員

研究者番号：20183775

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,200,000円

研究成果の概要(和文)：ハマキガ類の寄生性天敵ハマキコウラコマユバチの寄主発見において、寄主チャノコカクモンハマキの産卵による茶葉の誘導が化学的な変化を引き起こし、この化学的刺激が寄主周辺の手がかりとして重要であることがわかった。分子生物学的なアプローチから、寄主ハマキガの生殖器官由来の物質がエリシターとなり茶葉の誘導を引き起こし、防御遺伝子として知られているジャスモン酸およびエチレンシグナル遺伝子を含む複数の防御関連遺伝子が発現していることがわかった。これら遺伝子の発現によって誘導される揮発性化合物がハマキコウラコマユバチを茶葉に定着させていると思われる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、卵-幼虫寄生蜂のハマキコウラコマユバチは、寄主卵塊を発見するために寄主チャノコカクモンハマキが産卵した茶葉における誘導物質を手がかりにしていることが明らかになった。この誘導現象は、幼虫寄生蜂や卵寄生蜂では既に報告があるが、卵-幼虫寄生蜂においてはまだ報告されていない。また、分子生物学的なアプローチから、この誘導現象には、茶葉中の複数の防御遺伝子が関わっており、その遺伝子発現が葉表面の化学成分の変化を引き起こし、その結果天敵を引き付けることが示唆された。今後、他の植物においても防御遺伝子を操作することができれば、天敵により好まれる作物を品種改良できる可能性を示している。

研究成果の概要(英文)：In the host finding of *Ascogaster reticula*, we found that the induction of tea leaves by the egg-laying of the host moth causes chemical changes that are important as a cue to find host's surroundings. From a molecular biological approach, we found that elicitor derived from the reproductive organs of the host moth elicited induction in tea leaves and altered tea leaves as a result of expression of JA and ET signaling genes, which are known as defense genes. These results indicate that induction by host oviposition helps *A. reticulata* to find the hosts.

研究分野：化学生態学

キーワード：三者系 卵-幼虫寄生蜂 誘導 防御遺伝子 探索行動

## ハマキガの産卵による誘導現象—寄主卵由来因子に応答する茶葉防御機構の解明

### 1. 研究開始当初の背景

植物にとって、昆虫などの植食者の存在は脅威である。植物が昆虫に食われ始めると同時に唾液中成分のエリシターに反応し、植物体内で誘導が引き起こされ、葉から HIPVs を放出し天敵昆虫を誘引して植食者から身を守る例(間接防衛)が知られている。これに対して、消化阻害物質や忌避物質が生産され植食者を撃退する例(直接防衛)がある。前者の場合には、咀嚼性のチョウ目幼虫に摂食された植物が幼虫寄生蜂を誘引する三者系の事例が多いが、昆虫の産卵により植物側に誘導が引き起こされ、卵寄生蜂が誘引あるいは探索を刺激される例が数種の昆虫で知られている。幼虫寄生蜂に関しては、1980 年後半から三者系の現象が知られており、ポリシチンや  $\beta$ -グルコシダーゼなど誘導を引起すエリシターの化学構造も解明されている。また、食害による誘導によって植物から放出される HIPVs の種類や化学構造に関しても多くの研究が存在する。一方、本研究で扱う卵-幼虫寄生蜂は、幼虫寄生蜂とは生活史が異なっており、寄主卵期に産卵寄生し、寄主幼虫時期にかけて内部寄生する特徴がある。また、卵寄生蜂や卵-幼虫寄生蜂に関しては現在のところ数種類の系でしか研究例は存在せず、エリシターの化学構造や誘導の分子機構はほとんど解明されていない。

### 2. 研究の目的

我々研究グループは、チャ(茶)とその害虫であるチャノコカクモンハマキ(チョウ目:ハマキガ科)(以下ハマキガ)、その卵塊に産卵して寄生する卵-幼虫寄生蜂、ハマキコウラコマユバチ(ハチ目:コマユバチ科)(以下コマユバチ)の三者系(図1)に注目し研究を行ってきた。

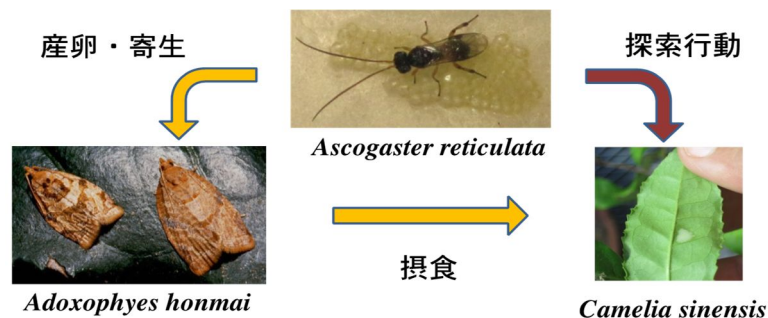


図1 チャ(*Camelia sinensis*)、チャノコカクモンハマキ(*Adoxophyes honmai*)、ハマキコウラコマユバチ(*Ascogaster reticulata*)の三者系

その結果、寄主卵塊がチャの葉裏に産み付けられると、24 時間以内に誘導が起き、その葉表に対して雌コマユバチが活発に探索行動を示すことがわかった。また、寄主卵がふ化直前になると誘導活性は低下すること(最適誘導期間)、産卵された葉と同じ枝にある付近の葉も誘導が起きたこと(全身誘導性)、腹部摩擦物を葉裏に処理すると産卵と同様の誘導が起きること(エリシターの存在)等が解明され、論文発表した(Deshpande and Kainoh, 2012)。これらの事実から、雌コマユバチの探索行動を刺激するチャ葉表面の活性物質は何か?エ

リシターの化学的性質、チャ葉における誘導の分子機構はどのようなものか？ という疑問が生じた。本研究では、寄主由来のエリシターにより引き起こされ寄生蜂の探索を刺激する物質の化学構造や、その誘導の分子機構を解明し、その成果を応用して害虫による食害を未然に防ぐ手法を開発したり、作物に天敵誘引に関わる遺伝子を導入するきっかけとなることを目的としている。

### 3. 研究の方法

(1) 茶園において、茶樹は害虫（ハマキガ）の食害にさらされる。それを寄主とする寄生性天敵（コマユバチ）は、チャ葉からの化学的な刺激で寄主生息場所の探索を行うことが知られている。しかし、卵が産み付けられた茶葉の揮発性成分に対するコマユバチの反応や、ハマキガの産卵に対する植物のシグナル伝達については、未解明であった。そこで、これまでの生物試験結果から、寄主に産卵された葉の表面に寄生蜂の寄主探索行動を活性化する産卵誘導物質が存在するという仮説をたて、産卵誘導物質の化学的性状を知る目的で産卵葉表面の短時間抽出物（リンス液）を4種類の溶媒で調製し、リンス液をろ紙に塗布して寄生蜂に提示し、その行動から、滞在時間・触角によるタッピング回数および頻度を溶媒を塗布した対照のろ紙と比較した。

(2) ハマキガの産卵によって誘導される植物の生理反応については、茶葉からの揮発性物質に対するコマユバチの反応や、同じくコマユバチの定着行動を高めるハマキガの産卵に対する茶葉のシグナル伝達機構については未解明である。そこで、ハマキガの産卵または生殖器官（RS）摩砕物で処理した茶葉の揮発性物質に対するコマユバチの反応を調べた。

(3) ハマキガの産卵によって誘導される茶葉の遺伝子発現応答についても調べた。茶葉にRS摩砕物処理し、JA（ジャスモン酸）、およびET（エチレン）シグナル遺伝子を含む複数の防御応答関連遺伝子について発現を調べた。また、非寄主植物であるシロイヌナズナのSA（サリチル酸）、JA、ET経路の遺伝子発現プロファイルについても調べた。

(4) コマユバチ以外の卵寄生蜂の寄主発見においては、寄主卵（塊）周辺の鱗粉やカイロモン以外の手がかりとして性フェロモンの存在が確認されている。この可能性を調べるために、ハマキガのモニタリング用性フェロモン・ディスペンサーを雌コマユバチに提示しその反応を観察した。

### 4. 研究成果

(1) 産卵葉表面の短時間抽出物に対して寄生蜂を放ち、滞在時間・触角によるタッピング回数および頻度を対照区と比較した結果、ジクロロメタン（DCM）リンス液に対し、対照と比べて長い滞在時間、および、タッピング回数・頻度が多いという観察結果が得られた。従って、寄主の産卵により葉の表面に低極性溶媒で抽出可能な産卵誘導物質が葉によって生成され、寄生蜂の寄主探索行動が活性化されると判断された。

(2) ハマキガの産卵または生殖器官（RS）摩砕物で処理した茶葉の揮発性物質に対するコマユバチの反応を調べた結果、雌バチは寄主卵塊やRS摩砕物の揮発性物質そのものには選好性を示さず、無処理葉の揮発性物質よりも卵塊やRS摩砕物処理した葉の揮発性物質を好んだ。これらの結果は、ハマキガの産卵による茶葉の誘導反応が揮発性物質の放出に関与し、

それがマユバチを定着させることを示している。

(3) ハマキガの産卵によって誘導される茶葉の遺伝子発現応答について調べた結果、RS 処理した茶葉では、JA シグナル遺伝子 (リポキシゲナーゼ)、ET シグナル遺伝子 (エチレン応答転写因子)、防御応答遺伝子 (ペルオキシダーゼ、キチナーゼ) およびフラボノイド 3',5'-ヒドロキシラーゼの発現が誘導された(図 2)。一方、シロイヌナズナでは、RS 処理により SA シグナル遺伝子 (PR1、PR2、および PR5) および ET シグナル遺伝子 (PDF1.2) の発現が誘導されたが、JA シグナル遺伝子 (12-oxophytodienoic acid reductase 3) の発現は低下した(図 3)。これらの結果は、JA 経路によって誘導される揮発性化合物が、コマユバチを寄主植物の茶葉に誘引または定着させている可能性を示唆している (Komatsuzaki ら, 2024)。

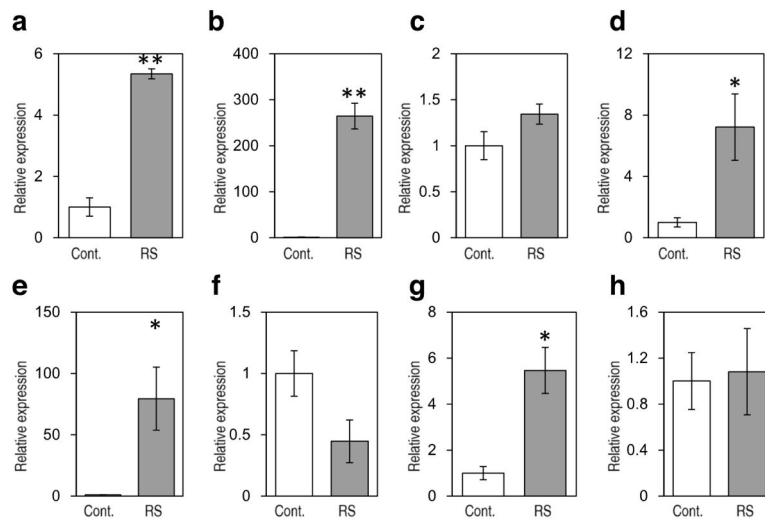


図 2. ハマキガ生殖器官(RS)摩砕物処理葉における茶葉の防御関連遺伝子の遺伝子発現プロファイル。茶葉をハマキガの生殖器官(RS)摩砕物で処理、または対照として無処理とした。24 時間後、リポキシゲナーゼ(a)、エチレン応答転写因子(b)、PAL(c)、ペルオキシダーゼ(d)、キチナーゼ(e)、カフェイン合成酵素(f)、フラボノイド 3',5'-ヒドロキシラーゼ(g)、テルペン合成酵素(h)の発現を、遺伝子特異的プライマーセットを用いたリアルタイム定量逆転写 PCR(RT-qPCR)を用いて測定

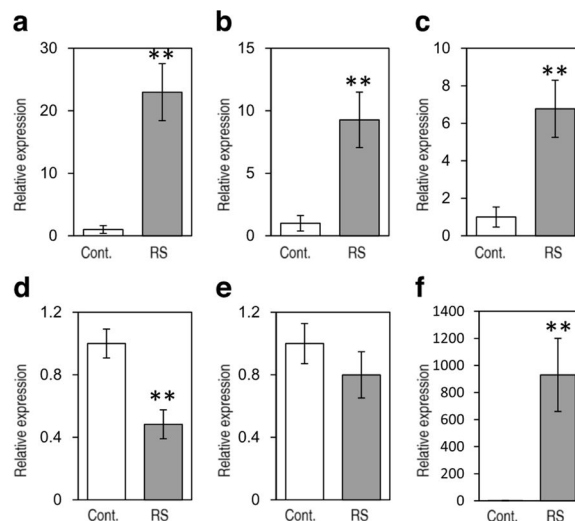


図 3. ハマキガ生殖器官(RS)摩砕物処理葉と無処理葉におけるシロイヌナズナ防御応答関

連遺伝子の遺伝子発現プロファイル。シロイヌナズナの葉を RS 摩砕物または対照として水で処理した。24 時間後、PR1(a)、PR2(b)、PR5(c)、12-oxophytodienoic acid reductase 3(d)、VSP2(e)および PDF1.2(f)の処理葉における発現を、遺伝子特異的プライマーセットを用いたリアルタイム定量逆転写 PCR(RT-qPCR)を用いて測定した。発現は AtUBQ1 を用いて正規化した。

(4)ハマキガ用の性フェロモン・ディスペンサーを雌コマユバチに与えたところ、触角での特徴的なタッピング反応が見られた。このことから、コマユバチにとってハマキガ性フェロモンが、近距離での誘引あるいは接触化学刺激として寄主発見の手がかりとなっている可能性が示唆された。

本研究により、卵-幼虫寄生蜂のハマキコウラコマユバチは、寄主卵塊を発見するために寄主チャノココクモンハマキが産卵した茶葉における誘導物質を手がかりにしていることが明らかになった。この誘導現象は、幼虫寄生蜂や卵寄生蜂では既に報告があるが、卵-幼虫寄生蜂においてはまだ報告されていない。また、分子生物学的なアプローチから、この誘導現象には、茶葉中の複数の防御応答遺伝子が関わっており、その遺伝子発現が葉表面の化学成分の変化を引き起こしていることが判明した。このことから、植物の害虫抵抗性の一つとして、防御応答遺伝子が発現し、その結果天敵を引き付け、より活発な探索行動を引き起こすことが示唆された。今後、他の植物においても防御応答遺伝子発現を操作することができれば、天敵により好まれる作物を品種改良できる可能性を示している。

#### 引用文献

- Deshpande, Sujata A. and Yooichi Kainoh (2012) Herbivore egg deposition induces tea leaves arresting the egg-larval parasitoid *Ascogaster reticulata* Watanabe (Hymenoptera: Braconidae). *Entomol. Exp. Appl.* 144:172-180. DOI: 10.1111/j.1570-7458.2012.01275.x
- Komatsuzaki, Suguru, Nanami Sakata, Giyu Usuki, Yasuhiro Ishiga, and Yooichi Kainoh (2024) Plant responses induced by *Adoxophyes honmai* oviposition in host tea plants and non-host *Arabidopsis thaliana*. *Phytoparasitica* 52: (6) <https://doi.org/10.1007/s12600-023-01117-3>

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 Komatsuzaki Suguru, Sakata Nanami, Usuki Giyu, Ishiga Yasuhiro, Kainoh Yooichi	4. 巻 52
2. 論文標題 Plant responses induced by Adoxophyes honmai oviposition in host tea plants and non-host Arabidopsis thaliana	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Phytoparasitica	6. 最初と最後の頁 1-6
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s12600-023-01117-3	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2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 小松崎優・戒能洋一
2. 発表標題 寄生蜂定着因子をチャに誘導するエリシターはチャノコカクモンハマキ雌腹部のどこにあるか？
3. 学会等名 第65回日本応用動物昆虫学会大会（島根大学）オンライン開催
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 戒能洋一・服部誠・田端純・松山茂
2. 発表標題 ハマキコウラコマユバチの寄主雌成虫性フェロモンへの反応
3. 学会等名 第68回日本応用動物昆虫学会大会（東北大学）
4. 発表年 2024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
研究分担者	松山 茂 (Matsuyama Shigeru) (30239131)	筑波大学・生命環境系・講師  (12102)	

6. 研究組織（つづき）

	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
研究 分 担 者	石賀 康博  (Ishiga Yasuhiro)  (50730256)	筑波大学・生命環境系・助教    (12102)	削除：2023年7月26日

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