

令和 5 年 5 月 19 日現在

機関番号：16401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K06075

研究課題名(和文)植物の誘導抵抗性における蓄積物質の機能解明：耐虫性の発現に寄与するのか？

研究課題名(英文)The functional elucidation of accumulating chemicals on induced resistance in plants: do they contribute to the development of resistance against insects?

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農学部門・教授

研究者番号：70325405

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：誘導抵抗性による「害虫防除技術は開発可能か？」という応用研究上の疑問を解決するために「植物-刺激-昆虫」の組み合わせを探索し、スイートピーにジャスモン酸(JA)を処理することでハスモンヨトウへの抵抗性を誘導できることを見出すとともに、この種の反応は比較的普遍的であることも見出した。詳細な研究からこの誘導性抵抗性因子が2-cyanoethyl-isoxazolin-5-one (2-CEIX)であることを突き止めるとともに、この誘導抵抗性はJAにサリチル酸を混用することで増強されることと、2-CEIXに幅広い農業害虫に対する殺虫活性があることを見出し、実用化への道を開いた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

スイートピーにジャスモン酸(JA)を処理することで抵抗性因子(2-CEIX)が誘導蓄積され、それが実際にハスモンヨトウへ抵抗性を示すことを見出すとともに、この種の抵抗性誘導反応は比較的普遍的であることを確認した。これまで実証が脆弱であった誘導蓄積物質が「その濃度で、その植物の害虫に抵抗性を示す」ことを明らかにでき、誘導抵抗性研究のフレームワークを完全に学術的に大きく貢献できた。

さらに、この誘導抵抗性の特性解析や2-CEIXの殺虫スペクトル解析の結果から、リード化合物としての農薬開発や誘導抵抗性型農薬の開発に貢献できることが期待され、社会実装への道が開かれた。

研究成果の概要(英文)：Through screening examination, it was found that jasmonic acid (JA) treatment of sweet pea (*Lathyrus odoratus*) can induce resistance against the tobacco cutworm (*Spodoptera litura*) larvae, as well as indicating that this type of response is relatively universal in the plant-pest-elicitor relationship. Spectroscopic analysis identified 2-cyanoethyl-isoxazolin-5-one (2-CEIX) as the antifeedant with a half-maximal effective concentration of 33.6 μmol/g fr. wt., i.e., exogenous JA treatment induced antifeeding activity due to the accumulation of 2-CEIX. Furthermore, this induced resistance is enhanced by mixing JA with salicylic acid, and that 2-CEIX has insecticidal activity against a wide range of agricultural insect pests. Therefore, 2-CEIX was concluded to be a suitable target for induced resistance on sweet pea plant or a lead compound for insecticide development.

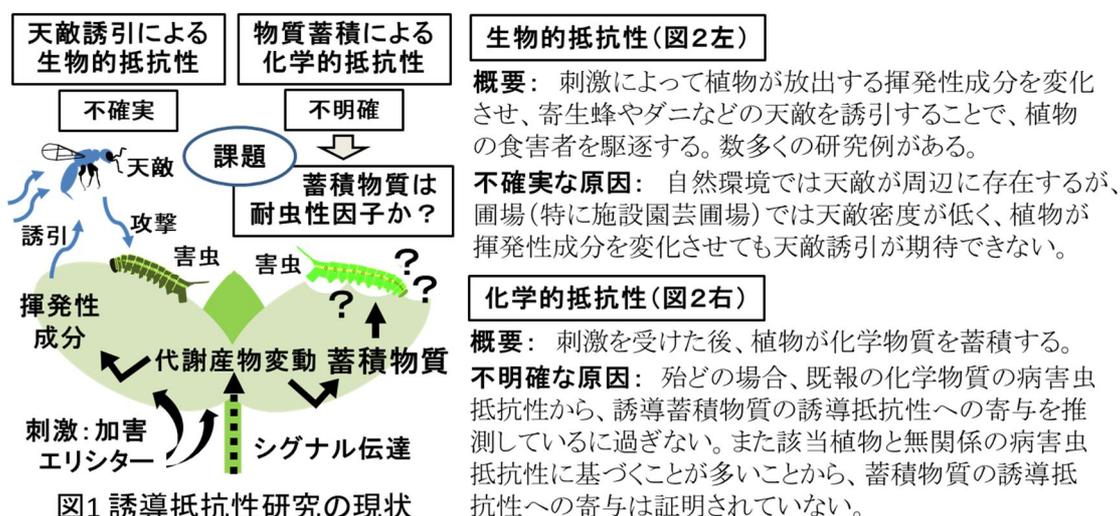
研究分野：化学生態学

キーワード：ジャスモン酸 誘導抵抗性 スイートピー ハスモンヨトウ 摂食阻害 isoxazolin サリチル酸-アミノプロピオニトリル

## 1. 研究開始当初の背景

植物の誘導抵抗性では、病害虫の加害が様々なシグナル伝達を刺激し、最終的に何らかの抵抗性因子が耐性に寄与している。特に耐病性発現については刺激の契機となる物質(エリシター)情報伝達経路、最終的な抵抗性因子について精力的に研究が行われ、各種の抵抗性因子が耐病性に寄与することが確認されている(D. Walters, 2014)。さらに応用研究の結果、プロペナゾールやチアニジルなどがエリシター作用を示す抵抗性誘導型殺菌剤として開発されてきた(F. Gozzo, 2012)。ところが、殺虫剤の開発にはいまだ成功しておらず、ここに「害虫をターゲットにした抵抗性誘導型農薬は開発可能か?」という化学生態学における応用研究上の大きな疑問が生じている。

勿論、エリシターにより耐虫性を誘導させる研究も数多くなされている(A. Schaller, 2010)。しかし、一部の例外を除けば抵抗性因子と耐虫性の相関は実証実験が脆弱であった(図1)。特に防除への応用研究のカギとなる「化学物質の蓄積」については、単に化学物質の蓄積を確認し、耐虫性発現を推測するにとどまっている。そのため、蓄積した化学物質が「その濃度で、その植物の害虫に抵抗性を示すかどうか」は不明で、誘導抵抗性研究の「空白地帯」になっており、これを埋めることは植物の誘導抵抗性のフレームワーク完成させられることが求められていた。



## 2. 研究の目的

誘導抵抗性に基づく害虫防除技術は実用化出来なかったのは、図1に示すように「最終的に耐虫性を発現する抵抗性因子が不確実・不明確であること」に起因する。天敵誘引による生物的抵抗性の発現が安定しない以上、化学的抵抗性に基づいて防除技術を開発する必要がある。本来、エリシター処理により耐虫性を誘導できれば、その蓄積物質自体が不明であっても、理論的には防除技術として利用可能である。しかし、農薬開発において、登録申請(許認可)や普及の過程では防除機構についての説明責任が生じる。本研究において誘導蓄積物質の耐虫性への寄与が確認できれば害虫に対する防除の根拠となる。誘導抵抗性を利用した害虫防除技術の創造に大きく貢献する。このように重要な蓄積物質と耐虫性の相関の検証が割愛されてきたのは、昆虫の食餌選好性から可食植物は限られているため蓄積物質の耐虫性評価が、以下の理由により遂行困難な実験であるためである。

- ・害虫が該当植物を寄主とする場合: 植物の蓄積物質に対してその植物の害虫は抵抗性を示し加害出来るため、植物の抵抗性は増加したことになる。
- ・害虫が該当植物を寄主としない場合: 植物の蓄積物質が自身を加害しない昆虫に抵抗性を示しても、害虫への抵抗性が誘導されたとは言えない。

そこで本研究では、ある昆虫が加害可能な植物に、刺激を与えることで、その昆虫が該当植物を加害出来なくなるような「植物-刺激-昆虫」の組み合わせの探索をし、この3要素の組み合わせモデルにおいて誘導される耐虫性と化学因子との相関の解明をすることを目的とする。さらには、誘導物質の害虫に対する作用スペクトルや作物へ誘導特性の解析を行い、実効性評価を行うことを目的とする。

## 3. 研究の方法

### 3-1 誘導抵抗性評価モデルの探索

12 種の花弁植物を誘導抵抗性スクリーニングに供試した。スイートピー、パンジー、ナデシコ、ユーストマおよびニゲラは種子から育苗し、カスミソウ、ナデシコ、コギク、ガーベラ、シクラメン、キキョウ、デージーおよびバラは苗を園芸店より購入し鉢上げ後に1箇月以上栽培した後に使用した。ハスモンヨトウは、住化テクノサービスから購入した個体群あるいは高知大学物部キャンパス内で採集したハスモンヨトウ成虫から採卵し、実験室内で孵化させサツカイモ葉で飼育した幼虫を用いた。供試植物は葉を切断後、蒸留水でのフローティング耐性試験(48h)を実施後、ハスモンヨトウ2齢幼虫への被食試験(24h)を行い、摂食可能であった植物についてはフローティング法にてエリシター処理を行い、ハスモンヨトウ2齢幼虫による被食試験、或いは植物成分のHPLC分析(カラム: Inertsil ODS-4, 4.6 mm i.d. × 150 mm, 検出波長: 210-390 nm)を行った。

### 3-2 JA 処理によりスイートピーに誘導される抵抗性因子の解明

スイートピーにJA処理した際に蓄積する抵抗性物質Xを単離精製するために、スイートピー地上部(136g)をメタノールで抽出し抽出物を水に転用後、n-hexane、diethyl etherで順次液-液分配分画を行い、物質Xをdiethyl ether画分に回収した。この画分をODSカラムで水-メタノール系の溶媒にて繰り返し精製し、289mgの物質Xを単離した。物質XはNMR(JMN-ECA600, D2O)、UV(JASCO V-630BIO, MeOH)、およびLC-ESI-MS(Shimadzu LCMS-8040)で分析した。

### 3-3 Cyanoethyl-isoxazolin-5-one (2-CEIX)の活性スペクトル評価

チョウ目害虫2種、セミ目害虫6種、軟甲類害虫2種の計9種の害虫に対する殺虫活性をディッピング法にて行った。ハスモンヨトウ、トビイロウンカ、ツマグロヨコバイは住化テクノサービスから購入した個体群を用い、モンシロチョウ幼虫、タイワンヒゲナガアブラムシ、ソラマメヒゲナガアブラムシ、マメアブラムシ、マメカメムシ、ワラジムシ、ダンゴムシは高知大学物部キャンパス内にて採集した個体群を用いた。

## 4. 研究成果

### 4-1 抵抗性誘導植物のスクリーニング

害虫をターゲットにした抵抗性誘導型農薬は開発にむけた基礎知見を得るために、まず適切な「植物-刺激-昆虫」の組み合わせスクリーニングを行った。3者すべてをスクリーニング対象にすることは膨大な数の試験が必要になるため、昆虫は広食性の野菜や花卉作物の害虫として知られているハスモンヨトウ幼虫を対象にした。植物は日本国内で人気がある花卉12種をスクリーニングに供試した。その結果、バラは水に浮かべるだけで萎凋することから研究に不適と判断し対象から除外した。一方、ハスモンヨトウ幼虫の供試植物に対する摂食性を調べると、被験植物の約半数はハスモンヨトウに対して抵抗性を示した(表1)。ハスモンヨトウに感受性であったスイートピー、カスミソウ、ナデシコ、およびパンジーの葉を各種エリシターで処理した後に抵抗性の誘導を調べると、いずれの植物も何らかのエリシター処理にて抵抗性が誘導されることが確認された。このとき物質の蓄積を確認するとスイートピーへのJA処理にて物質Xが蓄積することが判明したことから本研究ではこの物質Xの解析を進めた。尚、抵抗性が誘導されたにもかかわらず蓄積物質の検出は確認できなかったその他の試料は、今後、分析条件を変更することで抵抗性物質を検出できるものと考えられ、今後の研究が期待される。

**表1 花卉植物に対する誘導抵抗性のスクリーニング結果**

供試植物	水処理の影響	昆虫の摂食性	エリシター処理による変化 抵抗性誘導	物質蓄積
スイートピー	良好	摂食可能	JA** 誘導 CK** 誘導されず CuCl <sub>2</sub> ** 誘導されず	蓄積確認 減少確認 蓄積確認
カスミソウ	良好	摂食可能	JA 誘導されず CK 誘導 CuCl <sub>2</sub> 誘導	未確認 未確認 未確認
ナデシコ	良好	摂食可能	JA 誘導されず SA** 誘導されず ABA** 誘導 CK 誘導されず CuCl <sub>2</sub> 誘導	未確認 未確認 未確認 未確認 未確認
パンジー	良好	摂食可能	JA 誘導 SA 誘導されず ABA 誘導されず CK 誘導されず CuCl <sub>2</sub> 誘導	未確認 未確認 未確認 未確認
コギク	良好	少し摂食		
ユーストマ	良好	摂食不可		

ガーベラ	良好	摂食不可
ニゲラ	良好	摂食不可
シクラメン	良好	摂食不可
キキョウ	良好	少し摂食
デージー	良好	摂食可能
バラ	萎凋	*

\* : 未試験

\*\*JA: Jasmonic acid, CK: Cytokinin(benzyl adenine, zeatin, 又は isopentenyladenine),  
CuCl<sub>2</sub>: 塩化銅, SA: Salicylic acid, ABA: abscisic acid

植物葉片を蒸留水上に 48 時間浮かべ観察した。

植物葉片をハスモンヨトウ 2 齢幼虫に与え 24 時間後に摂食状況を観察した。

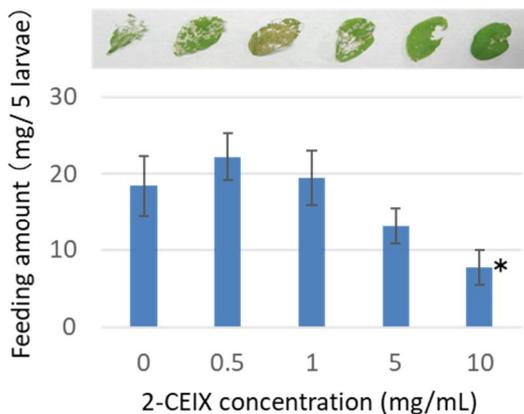
植物葉片を各種エリシター溶液に 48 時間浮かべた後, ハスモンヨトウ 2 齢幼虫に与え 24 時間後に摂食程度を観察した。摂食量が有意に減少した場合に抵抗性が誘導されたものと判断した。(JA: 100 $\mu$ M, BA: 500 $\mu$ M(Benzyl), CuCl<sub>2</sub>: 500 $\mu$ M)

エリシター処理した葉片のメタノール抽出液を HPLC で分析し検出ピークの増加・減少を解析した。(使用カラム: Inertsil ODS-4, 4.6 mm i.d.  $\times$  150 mm, 検出波長: 210-390 nm)

#### 4-2 ジャスモン酸によりスイートピー葉に誘導される抵抗性物質

誘導蓄積物質 X は、微量ながらスイートピー地上部にも含まれていたことから、大量のスイートピー地上部をメタノールで抽出し、これから物質 X の単離同定を試みた。粗抽出物は液液分配分画、および複数回の逆相系クロマトグラフによって活性物質を単離した。これを、NMR と MS、UV で分析した結果、物質 X を 2-cyanoethyl-isoxazolin-5-one(2-CEIX) と同定した。X の摂食阻害活性は図 2 (a) に示すようにハスモンヨトウ幼虫に対して濃度依存的に摂食阻害活性を示し、10 mg/mL 溶液での処理にて有意な摂食阻害活性を示した。さらに 2-CEIX を直接ハスモンヨトウ幼虫に塗布すると明らかな致死活性を示し、LD50 は 33.6  $\mu$ mol/g fr. wt. であった。一方で、JA のスイートピーへの処理濃度を上昇させると、2-CEIX の誘導蓄積量が増大することも判明した。以上のことから、2-CEIX は JA によって誘導されるスイートピーの抵抗性物質であると結論された。本物質は比較的安定であることから害虫に対する植物保護剤として利用することが可能であるものと予想された

(a) Effect of 2-CEIX dipping concentration



(b) Effect of JA concentration

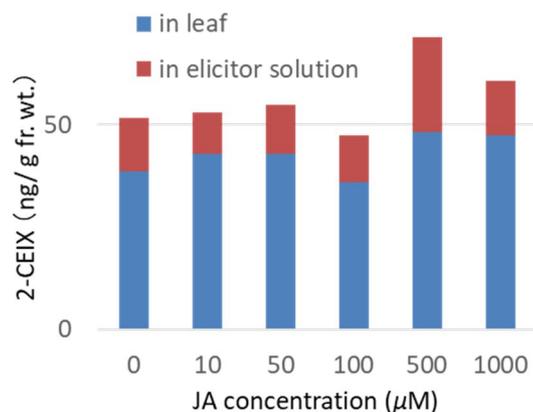


図2 2-CEIXのハスモンヨトウ幼虫に対する摂食阻害活性とJA処理濃度と誘導蓄積量の相関

#### 4-3 2-CEIX の殺虫活性スペクトルの評価

2-CEIX にはハスモンヨトウ幼虫に対する摂食阻害活性が確認されたため、より直接的な植物保護剤としての利用のために、殺虫活性の評価を行った。評価方法はディッピング邦敏、評価対象にはハスモンヨトウの他、マメ科植物を加害出来る害虫を用いた。その結果(表2) ハスモンヨトウ幼虫に対しては 1%濃度の薬液の処理にて 90%を超える致死活性が確認され、さらにマルカメムシを除く 5 種の半翅目害虫に対しても 80%以上の致死活性を示した。一方で、マルカメムシには約 30%、不快害虫であるワラジムシに対しては 70%の致死活性しか示さず、ダンゴムシに至っては全く致死活性を示さなかった、以上のことから 2-CEIX を利用した植物保護剤開発においては、比較的小さく外皮の薄い害虫を対象にすることが望ましいものと判断された。

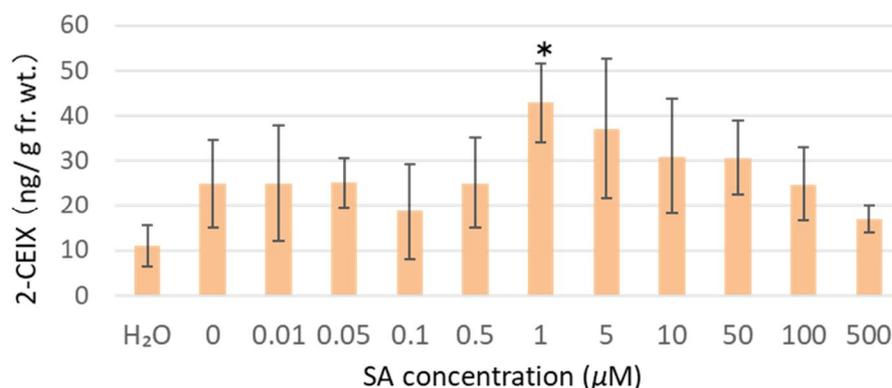
**表2 各種害虫への2-CEIX致死活性**

供試害虫	致死率(%)
ハスモンヨトウ	91.7
マメアブラムシ	83.3
ソラマメヒゲナガアブラムシ	82.4
タイワンヒゲナガアブラムシ	85.7
マルカメムシ	33.3
トビイロウンカ	85.7
ツマグロヨコバイ	100.0
ダンゴムシ	0.0
ワラジムシ	72.7

4-4 誘導抵抗性の実用化試験

JAによる誘導抵抗性を害虫防除に応用利用するためにはより強く抵抗性を誘導させる必要があった。そこで、JAと相乗的に働く植物ホルモンを予備的に探索したところJAとSAの混合液に共力作用が確認された。そこで両ホルモンの2-CEIX蓄積への濃度依存活性を調べると、JA処理では100 $\mu$ M以上の処理で2-CEIX蓄積量が2倍以上に増加したものの500 $\mu$ M以上では葉害も確認された。一方、SA処理では2-CEIX蓄積量は全体的に減少した。そこで100 $\mu$ MをJA濃度に設定し、様々な濃度のSAを混合することで2-CEIX蓄積への混用の影響を調査した結果、JA(100 $\mu$ M)とSA(1 $\mu$ M)の混合液で2-CEIX量がJA(100 $\mu$ M)に対して1.6倍以上に増加することを見出した(図3)。この混合試料をポット栽培

のスイートピーに施用すると5日間隔3回処理にて2-CEIXは有意に誘導蓄積した。さらにJAに代わってジャスモン酸メチルやプロヒロロキシジャスモンを用いても同様の効果が得られることも判明した。



**図3 100 $\mu$ MJAに混用するSA濃度と2-CEIXの誘導蓄積量**

以上のことから2-CEIXを利用した植物保護技術の展開においては、スイートピーを対象にした誘導抵抗性による植物保護の他、直接施用による幅広い農業害虫に対する開発が期待できるものと考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2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 Tebayashi Shinichi、Moriyama Ruri、Arakawa Ryo、Sato Masashi	4. 巻 84
2. 論文標題 Induction of 2-cyanoethyl-isoxazolin-5-one as an antifeedant against the tobacco cutworm (Spodoptera litura) by jasmonic acid in sweet pea leaf	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry	6. 最初と最後の頁 1105 ~ 1112
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/09168451.2020.1724072	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 -

1. 著者名 手林慎一・森山瑠璃	4. 巻 55(8)
2. 論文標題 植物の誘導抵抗性と害虫防除	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 昆虫と自然 2020年7月号	6. 最初と最後の頁 33-36
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

高知大学農林海洋科学部 化学生態学研究室: ジャスモン酸で誘導されるスイートピーの抵抗性 <a href="http://www.cc.kochi-u.ac.jp/~tebayasi/plants.html">http://www.cc.kochi-u.ac.jp/~tebayasi/plants.html</a> 高知大学農林海洋科学部化学生態学研究室 研究紹介 <a href="http://www.cc.kochi-u.ac.jp/~tebayasi/plants.html">http://www.cc.kochi-u.ac.jp/~tebayasi/plants.html</a>
--

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
研究協力者	森山 瑠璃  (Moriyama Ruri)		

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
研究協力者	荒川 良  (Arakawa Ryo)		
研究協力者	佐藤 正資  (Sato Masashi)		

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