

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 11 日現在

機関番号：13701

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23570021

研究課題名(和文) サビキン有性生殖期の昆虫誘引における宿主植物利用

研究課題名(英文) Host plant utilization in insect attraction in the reproductive stage of rust fungi

研究代表者

三宅 崇 (Miyake, Takashi)

岐阜大学・教育学部・准教授

研究者番号：00380569

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円、(間接経費) 1,260,000円

研究成果の概要(和文)：サビキンは植物に絶対寄生する菌であるが、寄主利用における詳細は明らかでない。植物上で、有性生殖における配偶子運搬のために蜜を分泌して昆虫を誘引するという、植物の花のような機能において、植物をどのように利用しているのかを、化学生態学的、分子遺伝学および形態学的手法により調べた。その結果、材料とした種では昆虫誘引における揮発性物質の役割は重要ではないこと、蜜分泌において寄主植物の花の蜜腺形成時にみられる遺伝子CRABS CLAWが精子器付近で発現していること、その一方で、蜜前駆物質はサビキン細胞内に蓄積がみられることがわかった。これらから、蜜分泌に寄主植物が関与している可能性が考えられた。

研究成果の概要(英文)：Rust fungi are obligate parasites on plants. Little is known in detail about how they use their host plants. They attract insects by secreting nectar and use them as vectors of their gametes in reproduction, which is quite similar to the function of flowers. I investigated how rust fungi use their host plants in this stage using chemical ecological, genetic and morphological approaches. Our results suggested that volatiles emitted from spermatogonia of the investigated species are not important in insect attraction, that CRABS CLAW, the gene which is expressed in the nectary developmental stage in host plants, is expressed around spermatogonia during the nectary developmental stage, and that nectar precursors are found in fungus cells. These results imply the possibility that host plants function in nectar secretion in rust fungus reproduction on plants.

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学、生態・環境

キーワード：進化生態 生物間相互作用 昆虫誘引 蜜腺形成 柄子蜜 精子器 ナシ赤星病 CRABS CLAW

## 1. 研究開始当初の背景

生態系は様々な生物が関わり合って成り立っている。中でも陸上生態系において、大きなバイオマスを占めている植物、昆虫、菌類の間の相互作用は、現在見られる生物多様性の創出と維持において重要な役割を担ってきた。

担子菌の1つの目を形成するサビキノは、世界で7000種以上の報告があり、すべて植物に寄生する絶対寄生菌である。これまで、分類学的見地から、それぞれのサビキノ種が寄主特異性を持っており、多様な植物分類群に適応してきたこと、生活史が多様なこと（異種寄生性や、複数の胞子期）などが明らかにされている。一方で、寄主認識や、寄主利用に必須な生理学的なメカニズムは明らかとなっていなかった。

## 2. 研究の目的

サビキノの多くは、精子器形成期に蜜を分泌して媒介昆虫を誘引する。また、*Puccinia monoica* や *P. arrhenatheri* では、同時期に花のような匂いを出しており、この揮発性物質も昆虫誘引に関与している。本研究では、サビキノが精子器形成期に香りや蜜を分泌して媒介昆虫を誘引する機構を、植物の花に見られる送粉者誘引機構のアナロジーとしてとらえ、サビキノの交配における昆虫誘引のメカニズムを探る。そこで、以下の3つのアプローチにより研究をすすめた。

(1) サビキノの精子器形成期における昆虫誘引性揮発性成分を化学生態学レベルで明らかにする。具体的な問題設定は以下の通りである。

- ①寄主植物の花香と共通した成分が存在するか？
- ②寄主植物が異なるサビキノ種間で共通した成分が存在するか？

(2) サビキノが、精子器における昆虫誘引において寄主植物を利用しているかを、分子遺伝学レベルで検証する。具体的には、蜜分泌において寄主植物の蜜生合成系を利用している

かについて、植物の蜜腺形成時に見られる遺伝子である CRABS CLAW (CRC) の発現を精子器付近で調べる。

(3) サビキノの精子器での蜜分泌に寄主植物がどのように関わっているかを、形態学的に明らかにする。蜜腺および精子器の切片を透過電子顕微鏡で観察し、柄子蜜の蓄積部位や蜜腺に特徴的な構造がどこにみられるかを明らかにする。

## 3. 研究の方法

### (1) 研究材料

本研究では、サビキノとして以下の2つの系に着目した。

1つ目は、*Puccinia recondita* とキンポウゲ科センニンソウである。本サビキノ種はコムギ赤さび病を発病させる植物病原菌として知られる。精子・胞子 (0, I) 世代にはキンポウゲ科植物を寄主とし、夏胞子・冬胞子 (II, III) 世代にはイネ科コムギ属植物を寄主とする異種寄生性を有する。センニンソウへのサビ病感染の初期症状 (精子器形成) は、5月頃からみられ、葉表上に柄子蜜を形成する。

2つ目は、*Gymnosporangium asiaticum* とナシ亜科の系である。本サビキノ種はナシ赤星病を発病させる植物病原菌である。精子・胞子 (0, I) 世代にはナシ亜科を寄主とし、冬胞子 (III) 世代にはヒノキ科ビャクシン属植物を寄主とする異種寄生性を有する。サビ病感染の初期症状 (精子器形成) は、6月頃からみられ、葉表上に柄子蜜を形成する。

### (2) 花および精子器の香りの分析

センニンソウの花、ナシの花、それぞれに感染したサビキノの精子器部位を含む感染葉、健康葉をそれぞれ岐阜県内の調査地にて採集後保冷剤を入れた発砲スチロール製の保冷箱に入れて大学に持ち帰り、実験室内で揮発性物質採集を行った。花、感染葉ともに、揮発性物質採集日の前日に台所用水切りネットを園芸用ビニールタイを用いて固定して袋がけ処理を行い、昆虫などの媒介者が訪れないようにした。

実験室では、揮発性物質吸着装置 (Twister ; GERSTEL 社) に揮発性物質を 2 時間吸着させて採集した。その後 GC-MS (6890 and 5973, アジレント) を用いて分析した。

### (3) 遺伝子発現解析

センニンソウおよびナシのゲノム DNA を抽出し、CRC 遺伝子のユニバーサルプライマーとして、dCRC-ZnF; 5'-CDG TRA CRG TGA AAT GYG GYC ATT GYR GYA-3', dCRC-YB; 5'-AIG CGA TGG RAG YCT STG YTT CTT CTC RGG-3' (Lee et al. 2005) を用いて PCR 増幅産物を得た。この増幅産物の塩基配列を得て、同科植物の既知の mRNA 配列 (EU189852, AY854797) と共にアラインメントし、mRNA 上に種特異的なプライマーを作成した。

2012 年には野外で感染した葉 (センニンソウ、ナシ) のみから RNA 抽出を行った。2013 年には、4 月にビャクシンの葉上に形成される冬孢子堆を採集し、実験室内で担子胞子を誘導して、ナシ、ボケ、カリンの葉に人為的に接種して形成された精子器を用いた。また、ポジティブコントロールとして、それぞれの寄主植物の蕾を用いた。

RNA 抽出には、RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) を用い、Transcriptor Universal cDNA Master (Roche) あるいは ReverTra Ace® qPCR RT Master Mix with gDNA Remover (TOYOBO) を用いて cDNA 合成を行った。cDNA を鋳型とした PCR は、TaKaRa Ex Taq (TaKaRa) を用いた。比較として、アクチン遺伝子の発現の検出も行った。また、人為接種試料を用いた際には、One Step SYBR® PrimeScript® RT-PCR Kit II (Perfect Real Time) (TaKaRa) を用い、リアルタイム PCR により発現量を測定した。

### (4) 電子顕微鏡観察

ナシの花の蜜腺とサビキンの精子器を、経断面を観察できるように切り、2% パラホルムアルデヒド、2% グルタルアルデヒドを含む 0.05M カコジル酸緩衝液で固定した。その後 2% 四酸化オスミウムを含む 0.05M カコジル酸緩衝液で固定し、Quetol-651 で包埋し、

厚さ 70 nm の切片を作成し、JEM- 1200EX で観察した。

## 4. 研究成果

### (1) 花および精子器の揮発性物質

センニンソウの花からは、(E)-3,7-ジメチルオクタ-1,3,6-トリエン、(Z)-リナロールオキサイド、(E)-リナロールオキサイド、リナロール、テトラヒドロ-2,2,6-トリメチル-6-ビニル-3-ピラノン、メチルサリチル酸が検出された。*Puccinia recondita* の精子器からは、ブタン酸、(Z)-3-ヘキセン-1-オール、酢酸 (Z) -3-ヘキセニル、トリデカン、テトラデカン、ブチルヒドロキシトルエンが検出された。センニンソウの健康葉からは、(Z)-3-ヘキセン-1-オール、酢酸 (Z) -3-ヘキセニル、アセトフェノン、トリデカン、テトラデカン、ブチルヒドロキシトルエン、(E)2-ヘキセナール、フタル酸エステル、プロトアネモニン、2,6,10,14-テトラメチルペンタデカンが検出された。センニンソウの花と精子器で共通して検出された物質はなかった。

ナシの花からは、n-ヘキサデカン、n-ドコサンが検出された。*Gymnosporangium asiaticum* の精子器からは、ブタン酸、酢酸 (Z) -3-ヘキセニルが検出された。ナシの健康葉からは、2,6,10,14-テトラメチルペンタデカン、フタル酸エステル、酢酸 (Z) -3-ヘキセニルが検出された。ナシの花と精子器から共通して検出された物質はなかった。

*Puccinia recondita* と *Gymnosporangium asiaticum* の精子器からは、ブタン酸、(Z) -3-ヘキセニルが共通して検出されたが、後者は未感染葉からも検出されているため、ブタン酸のみが 2 種のサビキンの精子器で共通してみられる特異的な物質と考えられた。

以上より、本研究に用いた種では、花と精子器で揮発性物質の類似性はみられず、精子器が花の匂いと同様の整合性経路を精子器付近で寄主植物に発現させている可能性は少ないと思われた。また、精子器およびその周辺は揮発性物質自体をあまり生産しておらず、本研究のサビキン種では、昆虫誘引における

揮発性物質はあまり重要でないと考えられた。

## (2) 蜜腺形成遺伝子の発現

センニンソウでは、ゲノム DNA の CRC 遺伝子配列をもとに、発現解析プライマー CRC-F-Ran: 5'-TCG CAA TGA GTA TCG CAA GG-3'、CRC-R-Ran: 5'-TGC AGA TGG AAG CCT GTG TT-3'を作成した。これを用いて発現解析を行ったところ、蕾 12 サンプル中 6 サンプルでは CRC 遺伝子の発現がみられたものの、センニンソウの健康葉 5 サンプル、精子器部位 5 サンプルでは、CRC 遺伝子の発現はみられなかった。

ナシでも同様にして、発現解析プライマー CRC-F-Pyrus4: 5'-ACT CTT CAG GCG GGC TGT-3'、CRC-R-Pyrus3: 5'-CGC TGC ATC TCC TCT TTC AT-3'を作成した。ナシの健康葉 5 サンプルでは CRC 遺伝子の発現はみられず、蕾 7 サンプルでは発現がみられた。精子器部位 14 サンプル中 8 サンプル (57% (8/14)) で CRC 遺伝子の発現がみられた (図 1)。

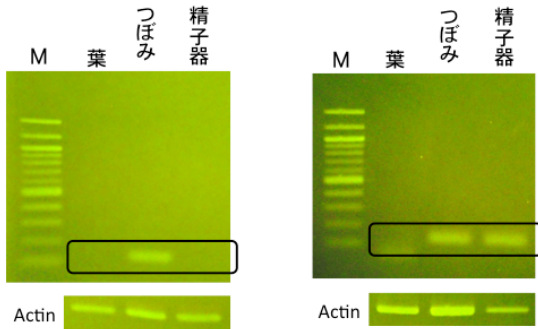


図 1. CRC 遺伝子の RT-PCR の結果 (左: センニンソウ、右: ナシ)。上部図 (CRC 遺伝子発現結果)、下部図 (アクチン遺伝子発現結果)。M: ラダーマーカー。写真内の黒枠は、期待されるバンドの位置を示す。

また、人為接種により精子器形成過程を観察したところ、以下の 5 つのステージに分けられた；①孢子侵入期：担子孢子が菌糸を葉に伸ばしている時期、②病斑出現期：病斑が出現してきた時期。まだ蜜は分泌していない。

(①の 7~10 約日後)、③蜜分泌開始期：蜜分泌が開始した時期。(②の約 1~3 日後)、④蜜分泌最盛期：蜜分泌が最も盛んな時期。(③の約 2~7 日後)、⑤蜜分泌終了期：蜜分泌が終

了した時期。(④の約 3 日後)。

ナシ、カリン、ボケの葉にできた精子器では、ナシの蕾での発現量の 1/100 と微小ではあるが、全てのステージにおいて CRC 遺伝子が発現していることが確認された (図 2)。また、各ステージの発現量については、サンプル数が少なく、さらに種によるばらつきがみられたが、ナシではステージ 2~4、ボケではステージ 3 で多かった。(図 2)。また、予想していなかったことであるが、発現していないと想定していた非感染部位でも、CRC 遺伝子の発現がみられた。ただし、非感染部位としては同じ葉の病症がみられない部位をもちいたため、実際には感染が生じておりそれにより誘導されている、という可能性は否定できない。むしろ、形態的には感染が認められない感染初期にすでに CRC 遺伝子の発現が誘導されているのかも知れない。この点に関しては、「非感染部位」として別の葉を使うなどして、今後慎重に判断する必要がある。

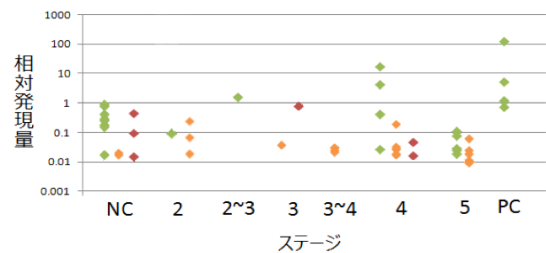


図 2. ナシ (緑)・カリン (橙)・ボケ (赤) 上に形成された *Gymnosporangium asiaticum* 精子器部位での CRC 発現量の Actin 遺伝子発現量に対する相対値。NC: 非感染部位、PC: ナシの蕾。

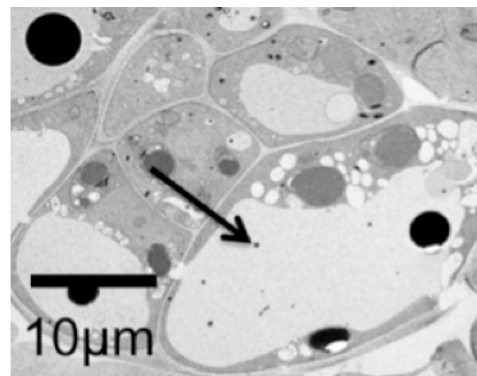


図 3. ナシ蕾の蜜腺の樹脂封埋切片の走査電子顕微鏡像。矢印は液胞を示す。黒色の円形物質は蜜の前駆物質である。

### (3) 走査電子顕微鏡観察による蜜腺部位の比較

ナシの蕾の蜜腺には、バラ科植物の蜜腺で見られる液胞の発達(図3)、蜜の前駆物質(図3)、シンプラスト、ゴルジ体存在比の増加がみられた。

一方サビキンの精子器では、精子器と融合している植物細胞において蜜腺で見られたような前駆物質やシンプラスト、ゴルジ体存在比の増加は見られなかった(図4)。一方、精子器を形作っているサビキンの細胞に、蜜腺で見られたようなこれらの特徴が見られた。

これらの電子顕微鏡観察結果は、サビキンが寄主植物の蜜腺形成能力を利用してそれを誘導し、精子器の蜜腺を形成する、という仮説を支持しない。しかしながら、先にみたCRC遺伝子の発現という点からは、植物とは独立にサビキンが精子器形成に伴って蜜腺を形成するというよりは、なんらかの寄主植物の関与や変化があることがうかがわれる。

以上をまとめると、遺伝子発現解析の際のネガティブコントロール(非感染部位)や、遺伝子発現と電子顕微鏡観察結果の整合性など、追加的実験や、慎重に見極めるべき結果はあるものの、匂いという送粉者誘引における“広告”においては、サビキンによる寄主植物の操作の可能性は低いと考えられた一方で、蜜という送粉者誘引における“報酬”においては、寄主植物の操作の可能性が認められた。

## 5. 主な発表論文等

[学会発表] (計2件)

- ① 本田 薫, 三宅 崇. サビキンの有性世代における媒介者誘引メカニズムについて, 日本生態学会第60回全国大会(2013年3月6日, 静岡)
- ② 本田 薫, 三宅 崇. サビキンの有性世代における媒介者誘引メカニズムについて, 第44回種生物学シンポジウム(2012年12月8日, 滋賀)

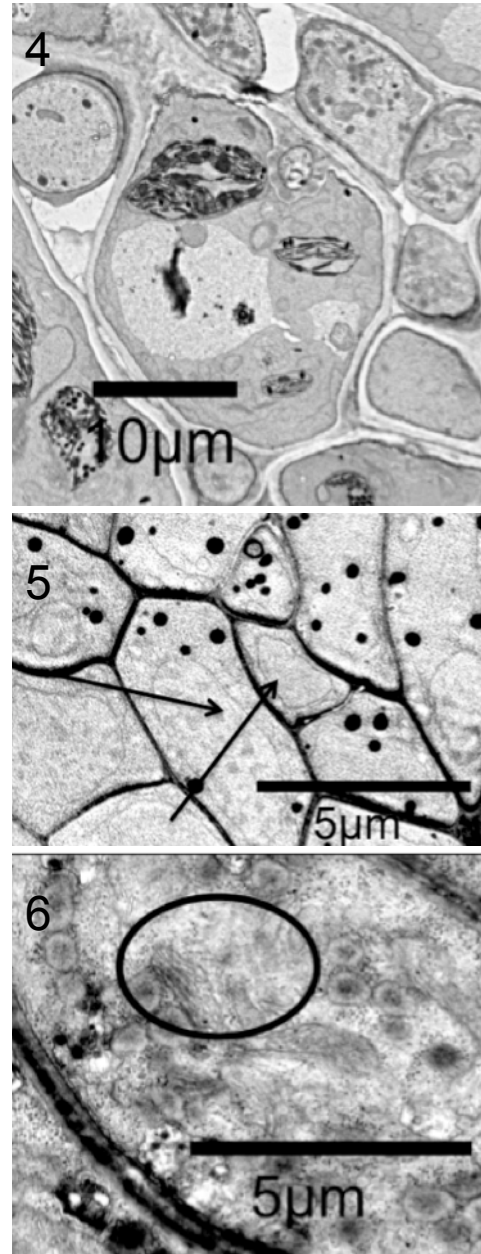


図4-6. *Gymnosporangium asiaticum* 精子器部位の切片の走査電子顕微鏡像。図4: 近傍の植物細胞, 図5, 6: 精子器を構成するサビキンの細胞, 液胞(矢印)・ゴルジ体(丸囲い)、蜜の前駆物質(黒色斑点)は植物細胞でなく、サビキン細胞でみられた。

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

三宅 崇 (MIYAKE, Takashi)  
岐阜大学・教育学部・准教授  
研究者番号: 00380569