

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 3 日現在

機関番号：32660

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24770019

研究課題名(和文)植物の食害応答を制御する糖エリシターの受容機構の解明

研究課題名(英文)Characterization of herbivore elicitor receptor kinases in plants

## 研究代表者

有村 源一郎 (ARIMURA, GEN-ICHIRO)

東京理科大学・基礎工学部・准教授

研究者番号：60505329

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：植物-昆虫間相互作用の分子メカニズムの解明は、次世代の農作物生産体系を確立する上で非常に重要な研究課題である。本研究では、植物の防御応答を誘導する、害虫唾液成分(エリシター)の受容体タンパク質の同定を試みた。ダイズ受容体候補遺伝子(HERK：16クローン)を恒常的に発現させた遺伝子組換えシロイヌナズナを作出した。これらの組換え株および野生株の葉に、機械傷とハスモンヨトウ幼虫唾液を処理し、食害誘導性防御遺伝子であるPDF1.2の発現レベルを定量したところ、5組換え株において野生株より高い発現量が認められた。今後、HERKの分子機能を細解き、当該遺伝子を利用した生産システムの開発基盤を構築する。

研究成果の概要(英文)：Upon herbivore attack, plants respond to elicitors included in saliva injected. Despite the characterization of several insect salivary elicitors in the last decade, none of pattern recognition receptors have been identified so far. In the current study, we assessed 16 soybean genes that are homologous to an Arabidopsis CERK1 (Chitin Elicitor Receptor Kinase) gene, in order to isolate and characterize Herbivore Elicitor Receptor Kinase (HERK), involved in the recognition of oral secretions (OS) from *Spodoptera litura* larvae as ligand.

We produced transgenic Arabidopsis lines, expressing the respective of CERK1-like kinase. In leaves treated with mechanical wounding plus *S. litura* OS, the five transgenic lines induced the expression of a defense gene PDF1.2, more drastically than that in the wild-type plants. We will reveal the molecular mechanisms underlying the GmCLK-based elicitor recognition in plants.

研究分野：植物分子生物学

キーワード：エリシター 植食者 ダイズ シロイヌナズナ 受容体型キナーゼ

### 1. 研究開始当初の背景

植物の食害応答は、害虫の唾液成分(エリシター化合物)を認識することで、シグナル伝達機構が活性化され、防御遺伝子の発現誘導および二次代謝物質(防御物質、情報化学物質)を介した植物の直接・間接防衛作用が促進される。植物の防御機構を誘導する害虫由来のエリシター化合物は、ヨトウガ幼虫の吐き戻し液に含まれるポリシチン(アミノ酸と脂肪酸によって構成されるエリシター)が報告され(Alborn et al., 1996)、以降、様々な害虫種から複数のエリシター分子(ペプチド、酵素、脂肪酸など)が発見されている。中でも、ヨトウガ幼虫から beta-galactofuranose polysaccharide (オリゴ糖)が、近年、新規エリシター分子として発見され、このオリゴ糖エリシターの「防御遺伝子の発現」、「活性酸素類の生成」、「傷害ホルモンであるジャスモン酸の生産誘導」といったエリシター作用(植物の防御系シグナル伝達ネットワークの活性化)が示されている(Bricchi et al., 2012)。このように害虫由来のエリシター化合物が様々な害虫種から発見される一方、エリシターの認識に関わる受容体タンパク質は未だ同定されていない。

### 2. 研究の目的

本研究では、広食性害虫であるハスモンヨトウ(*Spodoptera litura*)幼虫の唾液中に含まれるエリシターの認識に関わるダイズ受容体タンパク質(Herbivore Elicitor Receptor Kinase [HERK])の単離および機能解明を試みた(図1)。

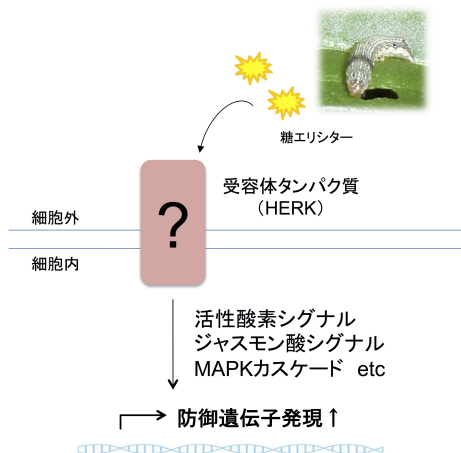


図1 害虫唾液中の糖エリシターをリガンドとする受容体タンパク質(HERK)

### 3. 研究の方法

(1) ハスモンヨトウ幼虫の唾液中に含まれるオリゴ糖類エリシターをリガンドとするHERK遺伝子を単離するため、病原性カビ由来エリシターのキチンオリゴ糖の受容体であるCERK1(Chitin Elicitor Receptor Kinase)のホモログ遺伝子をダイズcDNAデータベースを用いて同源性検索した。シロイヌナズナCERK1遺伝子に同源性をも

つ、ダイズLysM型RLK(Receptor-Like Kinase)遺伝子をBLAST解析により検索した。ダイズ完全長cDNAライブラリー遺伝子クローンを用いて、植物過剰発現用プラスミドを作成し、モデル植物であるシロイヌナズナにアグロバクテリウム法を用いて遺伝子導入した(CaMV35Sプロモーター制御)。

(2) HERK候補遺伝子とオリゴ糖エリシターの分子間相互作用を定量分析するために、無細胞タンパク質合成システムによって合成されたキチン受容体(AtCERK1)とキチンの結合解析を、「BIACOREシステム」を用いたモデル実験を行った(愛媛大学プロテオサイエンスセンター・澤崎達也教授と共同研究)。

### 4. 研究成果

(1) BLAST同源性検索により、シロイヌナズナCERK1遺伝子と同源性の高い、ダイズLysM型RLK(Receptor-like kinase)遺伝子16種を同定した(HERK候補遺伝子)。ダイズ完全長cDNAライブラリー遺伝子クローンを用いて、植物過剰発現用ベクターを構築し、モデル植物であるシロイヌナズナにアグロバクテリウム法を用いて導入した(現在までに、13組換え株ホモライン系統を取得済み)。

HERK過剰発現株および野生株の葉に機械傷とハスモンヨトウ幼虫吐き戻し液(Oral Secretion [OS])を処理し、ジャスモン酸誘導型の防御遺伝子PDF1.2の発現量を解析したところ、少なくとも5ラインのHERK過剰発現株において、野生株よりも強くPDF1.2発現が誘導されることが見出された(図2)。現在、機械傷のみを施した場合と、機械傷+OS処理を施した場合の、HERK過剰発現株における防御遺伝子の発現量、活性酸素類(Reactive Oxygen Species [ROS])の生産量、ジャスモン酸類の生産量の解析を進めている。

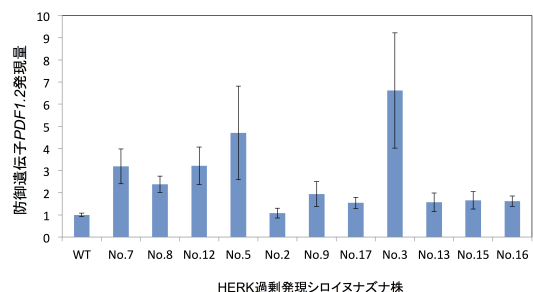


図2 機械傷+OS処理を施したHERK過剰発現株および野生株におけるPDF1.2の発現量

(2) CERK1とキチン化合物の分子間結合実験を、BIACOREシステムを用いて実施し、システムの構築を目指した。同システムを用いた解析の結果、CERK1タンパク質

とキチン化合物の相互作用がキチン濃度依存的に検出された。現在、HERK タンパク質とオリゴ糖エリシターの分子間相互作用についての網羅的な評価を、同システムを用いて検討している。

本研究目標の達成において、これまで実施された実験項目には未完遂な項目も含まれるものの、HERK の機能解析のための土台は十分に構築されたと言える。今後、HERK の分子機能の詳細な解明および、HERK 遺伝子を利用した農業生産システムの開発基盤の構築を目指す。

## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 13 件)

Okada K., Abe H., Arimura G., Jasmonates induce both defense responses and communication in monocotyledonous and dicotyledonous plants, *Plant and Cell Physiology*, 査読有、56 巻、2015 年、16-27

DOI:10.1093/pcp/pcu158

Cascone P., Iodice L., Maffei ME, Bossi S., Arimura G., Guerrieri E., Tobacco overexpressing beta-ocimene induces direct and indirect responses against aphids in receiver tomato plants, *Journal of Plant Physiology*, 査読有、173 巻、2014 年、28-32

DOI:10.1016/j.jplph.2014.08.011

Mitsunami T., Nishihara M., Galis I., Alamgir K.M., Hojo Y., Fujita K., Sasaki N., Nemoto K., Sawasaki T., Arimura G., Overexpression of the PAPI transcription factor reveals a complex regulation of flavonoid and phenylpropanoid metabolism in *Nicotiana tabacum* plants attacked by *Spodoptera litura*, *PLoS One*, 査読有、9 巻、2014 年、e108849

DOI:10.1371/journal.pone.0108849

Tahmasebi Z., Mohammadi H., Arimura G., Muroi A., Kant M.J., Herbivore-induced indirect defense across beans cultivars is independent of their degree of direct resistance, *Experimental and Applied Acarology*, 査読有、63 巻、2014 年、217-239

DOI:10.1007/s10493-014-9770-6

**有村源一郎, 西原昌宏, 下田武志, 植物の香りと色の代謝工学が拓く新時代、バイオサイエンスとインダストリー**, 査読無、72 巻、2014 年、197-202

[http://www.jba.or.jp/pc/archive/2014/copy\\_vol71\\_no3.html](http://www.jba.or.jp/pc/archive/2014/copy_vol71_no3.html)

Brillada C., Nishihara M., Shimoda T., Garms S., Boland W., Maffei M.E., Arimura G., Metabolic engineering of the C<sub>16</sub> homoterpene TMTT in *Lotus japonicus* through overexpression of

(*E,E*)-geranylinalool synthase attracts generalist and specialist predators in different manners, *New Phytologist*, 査読有、200 巻、2013 年、1200-1211

DOI:10.1111/nph.12442

Ali M., Sugimoto K., Ramadan A., Arimura G., Memory of plant communications for priming anti-herbivore responses, *Scientific Reports*, 査読有、3 巻、2013 年、1872

DOI:10.4161/psb.25796

Nishihara M., Shimoda T., Nakatsuka T., Arimura G., Frontiers of torenia research: innovative ornamental traits and study of ecological interaction networks through genetic engineering, *Plant Methods*, 査読有、9 巻、2013 年、23

DOI:10.1186/1746-4811-9-23

**有村源一郎, 澤崎達也, Ramadan A., 根本圭一郎, 竹田浩之, Maffei M., ダイズの食害応答を制御する糖エリシターの受容機構の解明、大豆たん白質研究**, 査読無、16 巻、2013 年、35-38

[http://www.fujifoundation.or.jp/report/pdf/034/34\\_07.pdf](http://www.fujifoundation.or.jp/report/pdf/034/34_07.pdf)

Nishimura O., Brillada C., Yazawa S., Maffei M.E., Arimura G., Transcriptome pyrosequencing of the parasitoid wasp *Cotesia vestalis*: genes involved in the antennal odorant-sensory system, *PLoS ONE*, 査読有、7 巻、2012 年、e50664

DOI:10.1371/journal.pone

Ozawa R., Nishimura O., Yazawa S., Muroi A., Takabayashi J., Arimura G., Temperature-dependent, behavioral, and transcriptional variability of a tritrophic interaction consisting of bean, herbivorous mite, and predator, *Molecular Ecology*, 査読有、21 巻、2012 年、5624-5635

DOI:10.1111/mec.12052

Muroi A., Matsui K., Shimoda T., Kihara H., Ozawa R., Ishihara A., Nishihara M., Arimura G., Acquired immunity of transgenic torenia plants overexpressing agmatine coumaroyltransferase to pathogens and herbivore pests, *Scientific Reports*, 査読有、2 巻、2012 年、68

DOI:10.1038/srep00689

Shimoda T., Nishihara M., Ozawa R., Takabayashi J., Arimura G., The effect of genetically enriched (*E*)-beta-ocimene and the role of floral scent in the attraction of the predatory mite *Phytoseiulus persimilis* to spider mite-induced volatile blends of torenia, *New Phytologist*, 査読有、193 巻、2012 年、1009-1021

DOI:10.1111/j.1469-8137.2011.04018.x

Maffei M.E., Arimura G., Mithöfer A., Natural elicitors, effectors and modulators of plant responses, *Natural Product Reports*,

査読有、29 巻、2012 年、1288-1303

DOI:10.1039/c2np20053h

有村源一郎, Ramadan A., 根本圭一郎,  
竹田浩之, 小澤理香, Maffei M., 澤崎達  
也, ダイズがもつ他生物種との対話受  
容体の同定と機能解析、大豆たん白質  
研究、査読無、15 巻、2012 年、17-20  
[http://www.fujifoundation.or.jp/report/pdf/  
033/33\\_04](http://www.fujifoundation.or.jp/report/pdf/033/33_04)

〔学会発表〕(計3件)

第15回アロマ・サイエンス・フォーラム、  
有村源一郎、植物の香りをつくる遺伝子  
と組換え植物のフロンティア、2014年12  
月12日、アルカディア市ヶ谷

明治大学科学技術研究所公開講演会：植  
物の交際術：敵と仲間，競争相手，とき  
には助っ人も、有村源一郎、植物と昆虫  
の巧妙な駆け引きを解く、2013年10月5  
日、明治大学

奈良先端未来開拓コロキウム：Deep  
Impact of Plant Metabolism; Going Beyond  
Diversity、Arimura G.、Genetic engineering  
of terpene syntheses in plants: physiological  
and ecological impacts、2013年11月22日、  
奈良先端科学技術大学院大学

〔図書〕(計1件)

有村源一郎、矢崎一史、高林純示、川北  
篤、フレグランスジャーナル社出版、植  
物アロマサイエンスの最前線 植物はな  
ぜ香りを発するのか、2014、168

〔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

<http://www.rs.tus.ac.jp/garimura/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

有村 源一郎 (ARIMURA, Gen-ichiro)  
東京理科大学・基礎工学部・准教授 研究  
者番号：60505329