

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 14 日現在

機関番号：82112

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25292037

研究課題名(和文) 病害虫抵抗性におけるカロテン関連物質の重要性の解明

研究課題名(英文) Analysis of mechanisms of action of carotenoids in plant resistance to herbivores

研究代表者

瀬尾 茂美 (Seo, Shigemi)

国立研究開発法人農業生物資源研究所・国立研究開発法人農業生物資源研究所 植物・微生物間相互作用研究ユニット・主席研究員

研究者番号：80414910

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：報告者らは害虫抵抗性誘導剤を開発するべく、害虫抵抗性誘導活性を示す植物成分として同定したロリオライド(モノテルペンラク톤の1種)の作用機作の解明を目的として研究を行った。ロリオライド処理はナミハダニ、ハスモンヨトウ、ミカンキロアザミウマの生存率を低下させた。ロリオライド自体には殺虫活性がなかった。ロリオライド応答性遺伝子としてスクロース代謝酵素をコードする遺伝子を同定した。害虫加害後3～6時間目で内生ロリオライドが蓄積された。以上の結果から、害虫による食害を受けた植物が蓄積するロリオライドがスクロース代謝(防御に必要なエネルギー生産)を活性化させ、防御にあたっていると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Plant activators are known as chemicals that protect crops from diseases by activating the plant's immune system. The use of the chemicals has been paid attention, as a new technology for overcoming drug resistant pathogens. Most of the previously identified plant activators target plant diseases. However, plant activators for herbivores are limited. We isolated a substance that induces resistance against multiple herbivores and identified it as loliolide, a monoterpene lactone. Microarray analysis identified a cell wall-type invertase gene as one of the loliolide-responsive tomato genes. Quantification analysis of endogenous loliolide indicated that levels were increased in tomato leaves after feeding by *Spodoptera litura*. These results suggest that tomato produces loliolide in response to herbivore attack, which results in induction of defense-related genes such as invertases.

研究分野：植物保護

キーワード：カロテン関連物質 病害虫抵抗性 プラントアクティベーター シグナル伝達 ジャスモン酸

1. 研究開始当初の背景

作物の収量低下を招く病害虫を防除するために様々な技術が用いられているが、それらの中でも殺菌剤・殺虫剤などの化学農薬が多用されている。しかし、不適切な使用方法による生態系への影響や長期使用による薬剤抵抗性を持った菌や害虫の出現の問題が懸念されている。また、環境保全や消費者の安全志向の観点から、化学農薬の低減が求められている。そのようなニーズに呼応して減農薬農業が実施されているが、通常使用量では顕在化しなかった病害の発生が問題となっている。抵抗性品種もよく使われている防除法であるが、抵抗性を打破する病原菌やバイオタイプが出現する恐れがあることから、近年では抵抗性が崩壊することなく安定的に持続する特性を有する品種が求められている。このような状況のなか、近年注目を集めているのが抵抗性誘導物質である。

抵抗性誘導物質は殺菌剤や殺虫剤と大きく異なる特性を有する。殺菌剤・殺虫剤は病原菌や害虫の生体構造や代謝等に直接作用することで生育や増殖を抑える作用を示し、即効的である。これに対して、抵抗性誘導物質は直接的な殺菌効果や殺虫効果はなく、植物の免疫を活性化することによって防除効果を発揮する。

植物に感染する病原体はその生存様式により、生きた植物細胞から栄養を得る活物寄生性病原体と植物細胞を殺して栄養にする殺生性病原体の2つに大別できる。植物は、前者の病原体に対してストレスホルモンであるサリチル酸の経路を、後者の病原体や昆虫の食害に対して植物ホルモンであるジャスモン酸やエチレンの経路をそれぞれ活性化することで抵抗性を示す。なお、いもち病菌は両者の中間的な振る舞いを示す病原体であるが、その抵抗性反応にサリチル酸が関与することが示されている。現在市販されているオリゼメート等の抵抗性誘導剤はサリ

チル酸経路を活性化することが知られている。これらの剤の有効性が確認された病害の種類はイネいもち病など一部に限られており、害虫に効果のある抵抗性誘導剤は市販されていない。

2. 研究の目的

報告者らは、先行研究において、害虫に効く病害抵抗性誘導物質を見つけるべく、植物の過敏反応に着目し、当該反応が誘起された植物体から害虫抵抗性誘導物質候補としてロリオライド(カロテン関連物質の1種)を同定した。そこで本研究では、カロテン関連物質の病害虫に対する防除効果の調査並びにその抵抗性誘導の作用機構の解明を行うとともに、植物の病害抵抗性に果たす役割についても明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

・病害虫スペクトラムの調査

ロリオライド及びその類縁化合物について、加害様式の異なる害虫(ナミハダニ、ハスモンヨトウ、アザミウマ)に対する抵抗性誘導の有無を検証した。具体的には、各種濃度の供試化合物をトマト等植物の葉に散布もしくは蒸気処理もしくは浸漬処理し、一定期間培養後、幼齢虫を接種し、一定期間培養後の生存数、死亡数もしくは産卵数をカウントした。殺虫活性の有無を検証するために、供試化合物を混合させた人工飼料を餌として与えるかもしくは供試化合物を含む水溶液中に浸漬し、生存数をカウントした。タバコモザイクウイルス抵抗性に対する誘導効果の有無を調べるために、各種濃度の供試化合物をタバコ葉に処理し、当該ウイルスを接種し、一定期間培養後のウイルス量を定量した。

・作用機構の解析

ロリオライドに応答する遺伝子を特定するために、当該化合物を処理したトマト葉を用いてマイクロアレイ解析を実施した。発現上

昇が見られた遺伝子について、定量 PCR による確認を行った。同定した応答性遺伝子について、ロリオライド及び他植物ホルモン（ジャスモン酸など）に対する濃度及び処理時間に因る応答性の違いを明らかにするための発現解析を定量 PCR により行った。害虫抵抗性に果たすロリオライドの役割を明らかにするために、当該化合物の生産が低下したシロイヌナズナ変異株の害虫抵抗性を検定するとともに、加害後の内生ロリオライドの量的変動を機器分析により調べた。

4. 研究成果

餌植物に処理することでナミハダニの生存数を低下させる物質としてモノテルペンラクトンの1種であるロリオライドを同定した（図1参照）。

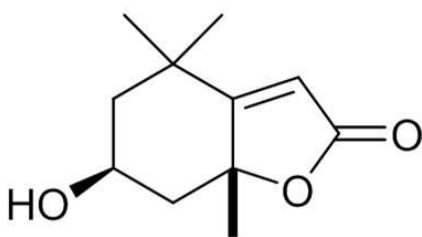


図1. ロリオライドの構造

当該化合物を処理したトマトにナミハダニを接種したところ、生存数の低下が見られた（図2）。また、別種の害虫であるハスモンヨトウ（図3）、ミカンキイロアザミウマ（図4）の生存率も低下させることが判明した。

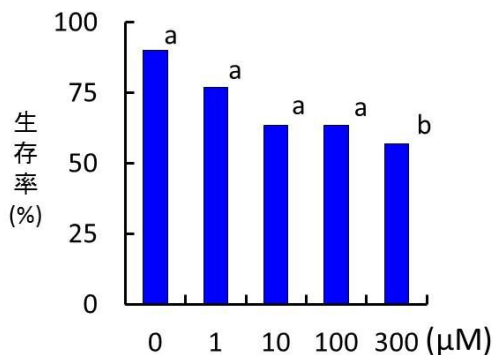


図2. ナミハダニ生存数に対するロリオライドの効果

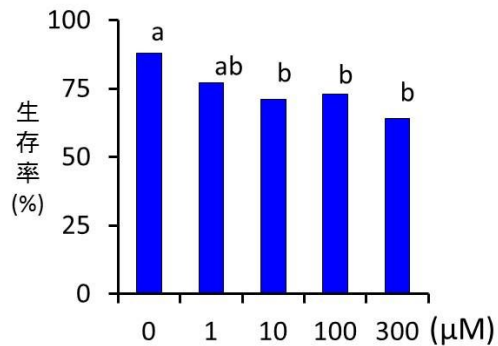


図3. ハスモンヨトウ生存数に対するロリオライドの効果

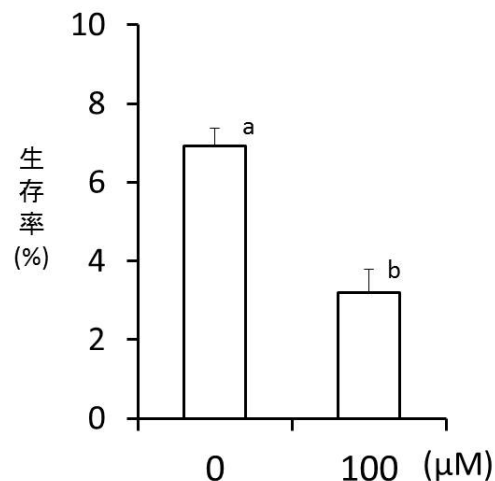


図4. アザミウマ生存数に対するロリオライドの効果

一方、ロリオライド自体にはナミハダニやハスモンヨトウに対する直接的な殺虫活性はなかった。なお、ロリオライドはタバコモザイクウイルスに対しては抵抗性誘導活性は示さなかった。これらの結果は、観察された害虫生存数の低下は殺虫活性に因るものではなく、ロリオライドを処理した植物で誘起・亢進された防御反応に因るものであることが示唆された。そこで、ロリオライドによって誘導される防御に関わる植物因子を明らかにすることを目的に、当該化合物処理により発現が誘導される遺伝子の同定をマイ

クロアレイ解析による試みた。ロリオライド処理したトマト葉において処理特異的に発現が誘導される遺伝子が 15 個同定された。そのうち、発現誘導が高く、防御に関連すると推測される遺伝子はスクロース代謝酵素をコードする遺伝子 (Lin 遺伝子) のみであった。残りの遺伝子は機能未知であった。そこで、トマト lin 遺伝子に着目し、害虫加害後やジャスモン酸等薬剤処理後の発現様相などを調べた。Lin 遺伝子は、ハスモンヨトウ加害により数時間以内に転写産物の蓄積が見られた。興味深いことに、lin 遺伝子は、害虫抵抗性の重要なシグナル伝達物質であるジャスモン酸の処理には応答しなかった。ロリオライドのシグナル伝達物質としての可能性を検証するため、ハスモンヨトウ加害後の内生量を定量したところ、加害後 3~6 時間目で蓄積されることが判明した。ほぼ同時期にジャスモン酸の蓄積も認められた。ジャスモン酸処理は内生ロリオライド量を増加させる効果はなかった。ロリオライド量が低下したシロイヌナズナ変異株はミカンキイロアザミウマに対する感受性が高まっていた。以上の結果から、ナミハダニやハスモンヨトウなどの害虫による食害を受けた植物が蓄積するロリオライドがスクロース代謝 (防御に必要なエネルギー生産) を活性化させ、防御にあたっていると考えられる。このロリオライドによって誘導される抵抗性へのジャスモン酸の寄与は小さいことが示唆される。

カロテン関連物質の構造活性相関に関する知見を得ることを目的として、類縁化合物の病害虫に対する抵抗性誘導能の有無をトマト等を用いて検証した。具体的には、市販品の複数の類縁化合物 (β-cyclocitral 等) について、トマト葉に処理し、重要害虫であるミカンキイロアザミウマを接種し、生存数を計測したところ、ある特定の化合物処理区で対照区と比較して有意に生存数

の低下がみられた。

以上の研究を通じて、ロリオライド等のある種のカロテン関連物質は害虫抵抗性に重要な役割を演じることが示された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計0件)

[学会発表](計8件)

1) 村田未果、中井勇介、釘宮総一、望月淳、光原一郎、瀬尾茂美

新規害虫抵抗性誘導物質 TRI-1 のトマトにおける作用機構の解析

日本昆虫学会第 76 回大会・第 60 回日本応用動物昆虫学会大会合同大会 2016 年 3 月 26 日~2016 年 3 月 29 日 大阪府立大学

2) 中井勇介、村田未果、釘宮総一、望月淳、光原一郎、瀬尾茂美

新規害虫抵抗性誘導物質 loliolide の作用機構の解析

第 57 回日本植物生理学会年会 2016 年 3 月 18 日~2016 年 3 月 20 日 岩手大学

3) 中井勇介、村田未果、釘宮総一、望月淳、光原一郎、瀬尾茂美

新規害虫抵抗性誘導物質 TRI-1 の作用メカニズムの解析

第 5 回植物生理化学会シンポジウム 2015 年 9 月 12 日~2014 年 9 月 12 日 筑波大学

4) 村田未果、釘宮総一、望月淳、光原一郎、瀬尾茂美

植物の新規害虫抵抗性誘導物質 TRI-1 による抵抗性誘導機構の解明に向けて

第 59 回日本応用動物昆虫学会大会 2015 年 3 月 26 日~2014 年 3 月 28 日 山形大学

5) 田島直人、村田未果、望月淳、光原一

朗、瀬尾茂美

タバコから単離した TRI1 は、ナミハダニ、アザミウマ、ハスモンヨトウに対する抵抗性を誘導し、植物の防御遺伝子をも高める
日本農芸化学会 2014 年度大会 2014 年 3 月 29~2014 年 3 月 29 日 明治大学生田キャンパス

6) 村田未果、田島直人、洪シフォン、河津圭、石坂眞澄、望月淳、光原一郎、瀬尾茂美

植物の過敏感反応を利用した新規害虫抵抗性誘導物質の探索

第 58 回日本応用動物昆虫学会大会 2014 年 3 月 27 日~2014 年 3 月 27 日 高知大学

7) 田島直人、村田未果、望月淳、光原一郎、瀬尾茂美

タバコから単離した TRI1 は、ナミハダニ、アザミウマ、ハスモンヨトウに対する抵抗性を誘導し、植物の防御遺伝子をも高める
第 55 回日本植物生理学会年会 2014 年 3 月 20 日~2014 年 3 月 20 日 富山大学

8) Seo, S., Tajima, N., Murata, M., Fujimoto, T., Mizukubo, T., Abe, H., Mitsuhara, I., Mochizuki, A., Plant-derived terpene-related compounds that induce resistance against insect herbivores and diseases.
第 55 回日本植物生理学会年会 招待講演 2014 年 3 月 19 日~2014 年 3 月 19 日 富山大学

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 1 件)

名称 : 害虫抵抗性誘導剤、及び植物の害虫防除方法

発明者 : 瀬尾茂美、光原一郎、田島直人、望月淳、村田未果

権利者 : 同上

種類 : 2013 年 8 月 9 日

番号 : 2013 - 166598

出願年月日 : 2013 年 8 月 9 日

国内外の別 : 国内

取得状況 (計 0 件)

名称 :

発明者 :

権利者 :

種類 :

番号 :

取得年月日 :

国内外の別 :

〔その他〕

ホームページ等

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

瀬尾茂美 (SEO Shigemi)

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合

研究機構・生物機能利用研究部門・植物・

微生物機能利用研究領域・主席研究員

研究者番号 : 80414910

(2) 研究分担者

()

研究者番号 :

(3) 連携研究者

()

研究者番号 :