

リンゴ果実における昆虫の食害に対する化学的防御応答の解明

大畑勇統

緒言

農林水産省から発表された「みどりの食料システム戦略」(2021年)では、食料・農林水産業の生産力向上と持続可能な両立が求められ、特に化学農薬の低減を目的とする研究開発が2025年までの達成目標となっている。しかし、リンゴは無農薬で栽培するとその収量は3%以下に低下するほど化学農薬に大きく依存する作物である。中でも、モモシクイガは幼虫が果実を食害し、害虫防除経費の50%を占めるリンゴ栽培のキーペストである。さらに、日本のリンゴ輸出最大の相手である台湾への輸出における検疫害虫としても重要視されている。これを解決する糸口としてリンゴの一部品種(‘ふじ’, ‘ジョナゴールド’)においてモモシクイガ幼虫の果実内死亡率が著しく高い現象に注目した。この現象は果実が樹に実った状態(着果)でのみ確認され、樹から摘み取った果実(摘果)では幼虫は正常に生育する(Fig. 1)。本研究では、この新現象を以下の2点の観点から解明し、本来の抵抗性を利用した省農薬化リンゴ栽培への応用を目指す。

モモシクイガの着果における高い死亡率

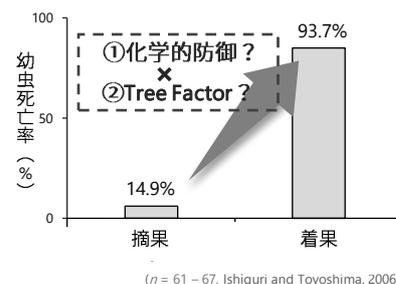


Fig.1 着果と摘果内でのモモシクイガ幼虫の死亡率。着果内での死亡率が顕著に高く、果実の化学的防御とTree Factorの関与が示唆された。

① リンゴ果実の化学的防御機構

上記のモモシクイガに対する抵抗性は果実の化学的防御であると推測した。しかし、これまで貯蔵器官とみなされてきた果実の防御応答はほとんど知られていない。

② 着果と摘果の違い

着果のみで抵抗性が発現することから着果に特異的な生理制御因子(Tree Factor)がはたらくと考えられる。本研究では師管液成分に着目し、師管液が抵抗性発現にかかわるかを調べる。

① リンゴ果実の化学的防御機構の解明

①-1 モモシクイガの食害により果実に誘導される代謝物の分析

植物の葉は一般的に昆虫の食害に応答し、様々な二次代謝物を誘導、蓄積する。リンゴ果実においてもモモシクイガの食害に応答して誘導される二次代謝物があると推測し、LCMS分析と主成分分析をカップリングさせた網羅的代謝物分析を行った。その結果、幼虫の食害で誘導される二次代謝物としてフェニルプロパノイド類縁体であるクロロゲン酸類2種(chlorogenic acid, CGA; *p*-coumaroylquinic acid, CoQA)とトリテルペン類3種(eriobotric acid, pomaceic acid, euscaphic acid)の計5種の化合物を同定した(Fig. 2, 3)。クロロゲン酸やトリテルペン類は植物の防御物質として知られ、リンゴ果実もモモシクイガに対する防御物質としてこれら化合物を誘導すると推測した。

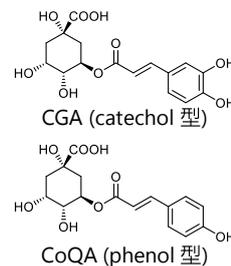


Fig. 2 食害で誘導されたクロロゲン酸類

①-2 トリテルペン類の生理活性

Fig. 3 のトリテルペン類 3 種の生理活性を調べるため、モモシクイガを含む鱗翅目幼虫 5 種にこれらを摂食させた。その結果、リンゴ果実を宿主とする種 (モモシクイガ, ナシヒメシクイ) に対して生理活性は認められなかったが、リンゴ果実を宿主としない広食性種 (ハスモンヨトウ, オオタバコガ, リンゴコカクモンハマキ) に対して摂食阻害活性を示した (Fig. 4)。リンゴ果実は昆虫の食害を防ぐためにトリテルペン類を誘導するが、モモシクイガなど果実を専門に食べる種はこの防御応答に適応してきた可能性がある。

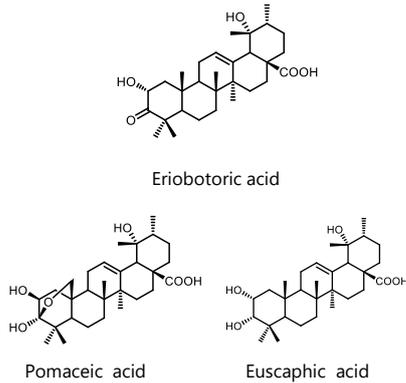


Fig. 3 リンゴ果実の食害誘導性トリテルペン類

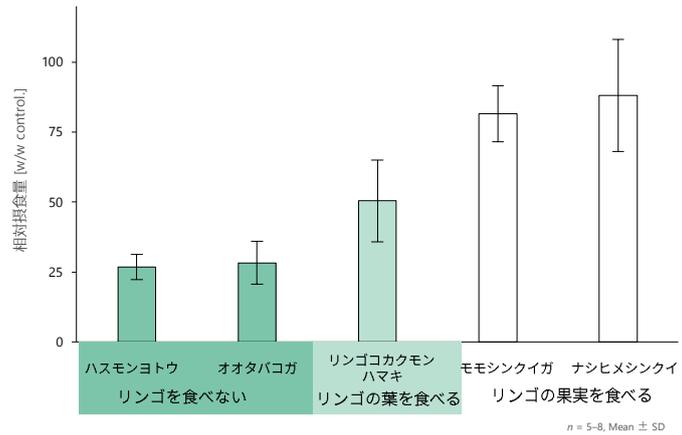


Fig. 4 食害誘導性トリテルペン類の摂食阻害活性

①-3 クロロゲン酸類の生理活性

クロロゲン酸類と POD の生育抑制活性

食害部で誘導された CGA と CoQA は単体でモモシクイガに摂食させても生育に影響はなかった。従来の研究で、CGA (catechol 型) は peroxidase (POD) と反応して昆虫の生育を抑制する報告があり、リンゴ果実内でも同様の機構で作用すると推測された。しかし、catechol 構造を持たない CoQA (phenol 型) の昆虫への生理活性は調べられてこなかった。そこでこれらと POD の酵素反応物をモモシクイガ幼虫に摂食させ、生育を調べた。摂食試験の結果、CGA と CoQA の POD 反応物はいずれも幼虫の生育を抑制した (Fig. 5)。よって CoQA は新規の機構でモモシクイガ幼虫の生育を抑制すると推測した。

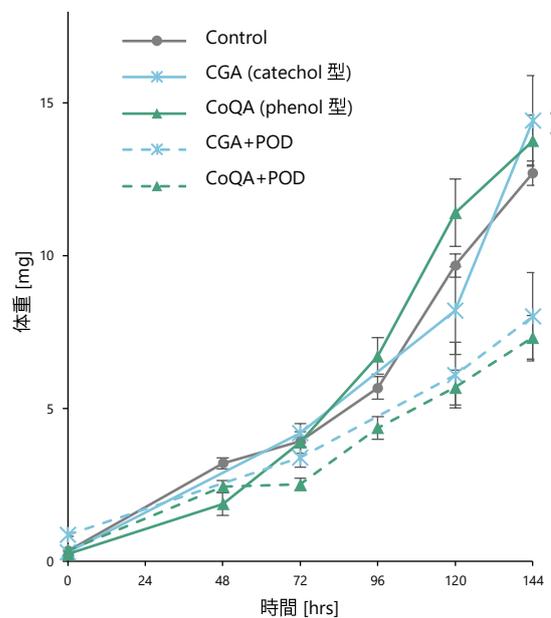


Fig. 5 クロロゲン酸類とそのPOD反応物をモモシクイガ幼虫に摂食させた時の生育曲線。

作用機作の解明

CGA (catechol 型) は POD と反応して *o*-quinone を生成し、これが幼虫の腸管内タンパク質を非特異的に攻撃し、生育を抑制するメカニズムが知られている。まず *o*-quinone の生成を確認するため、酵素反応物を *o*-phenylenediamine と反応させ、quinoxaline 誘導体化を行った。その結果、誘導体化物を LC/MS と NMR で確認した。次に、CGA と POD の反応物を摂食させた幼虫の腸管内タンパク質量と主要な消化酵素である proteinase の活性を測定した。その結果、対照区に比べタンパク質量は有意に低下し、proteinase 活性も低下していた (Fig. 6)。以上の結果から、CGA は POD との反応で *o*-quinone を生成し、これが幼虫の腸管内タンパク質を攻撃し、消化不良を起こして生育を抑制すると結論した (Fig. 8 上段)。

一方、CoQA (phenol 型) と POD の酵素反応物を摂食させた場合、モモシクイガ幼虫の腸管内タンパク質量に影響はなかった。そこで、昆虫特有の血糖であるトレハロースに着目した。体液中のトレハロース量を酵素処理により定量した結果、CoQA と POD の酵素反応物を摂食した場合に顕著にトレハロース濃度が減少した (Fig. 7)。よって CoQA と POD の反応で生じる化合物がトレハロース代謝系に作用し、エネルギー貯蔵体である体液トレハロース濃度を低下させることで生育を抑制すると推測した (Fig. 8 下段)。また、CoQA と POD の酵素反応物を分析した結果、主成分として CoQA 2 分子がラジカル反応により結合した化合物が生成していた。

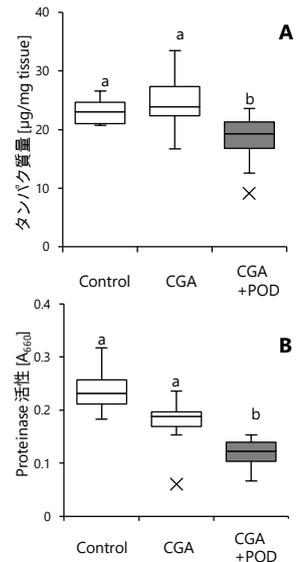


Fig. 6 CGAとそのPOD反応物を摂食したモモシクイガ幼虫の腸管内タンパク質量 (A) とプロテアーゼ活性 (B)

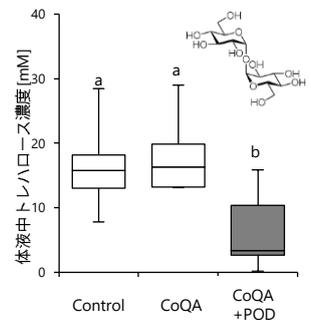


Fig. 7 トレハロースの構造 (右上) と CoQA とその POD 反応物を摂食したモモシクイガ幼虫の体液中的トレハロース濃度

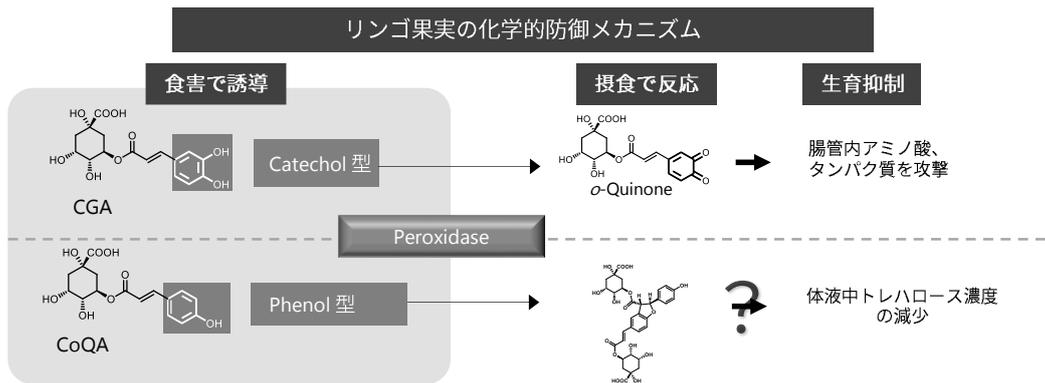


Fig. 8 クロロゲン酸類とperoxidaseの酵素反応によるモモシクイガ幼虫の生育抑制メカニズム。

②-1. クロロゲン酸類と POD の着果・摘果における食害誘導

クロロゲン酸類はリンゴ果実で食害により誘導される。この誘導は着果でのみ発現し、摘果では発現しない。また、摘果・着果にそれぞれモモシクイガ幼虫を食入させ、食害部の POD 活性を測定した結果、POD もクロロゲン酸類と同様に着果でのみ食害部局所的に誘導された (Fig. 9)。これより、クロロゲン酸類と POD の同所的な食害誘導には樹から果実に流入するシグナル因子が介在すると推測された。

②-2. 食害応答発現に対する師管液の関与

着果食害時におけるクロロゲン酸類と POD の誘導には師管液が関与すると推測した。これを検証するため、果台を環状剥皮 (師管除去) した果実へのモモシクイガ幼虫の食入実験により、一連の誘導に対する師管液流入阻害の影響を調べた。その結果、環状剥皮した果実ではクロロゲン酸類と POD の誘導量は着果に比べて有意に低下し、一連の誘導には師管液が関与すると示唆された (Fig. 9)。

要約

- ✓ リンゴ果実はモモシクイガ幼虫の食害に対してクロロゲン酸類 2 種 (CGA, CoQA) と POD を誘導し、摂食によりこれらが反応することで幼虫の生育を抑制する防御機構を発現する (Fig. 10)。
- ✓ CGA (catechol 型) は POD と反応し、*o*-quinone に変換され、これが幼虫の腸管内タンパク質を攻撃する。
- ✓ CoQA (phenol 型) と POD の酵素反応物は幼虫のトレハロース代謝系に作用すると推測された。
- ✓ クロロゲン酸類と POD の誘導には師管液が関与する。

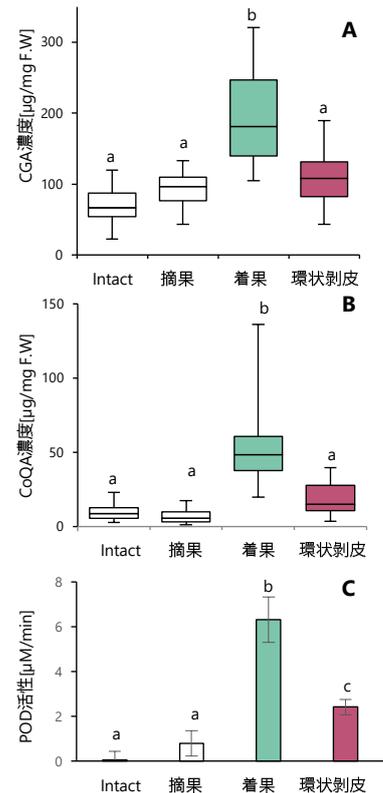


Fig. 9 モモシクイガ幼虫によるリンゴ果実食害部におけるCGA濃度 (A), CoQA濃度 (B), POD活性 (C)

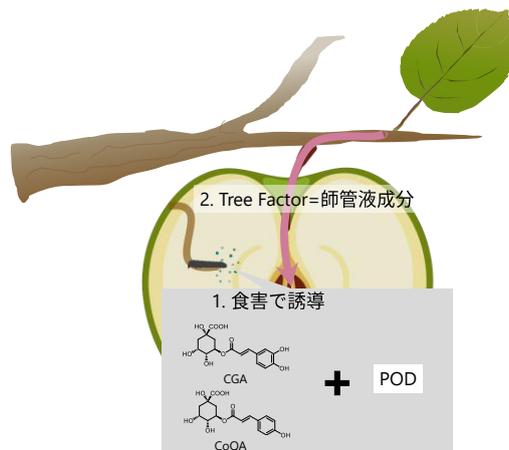


Fig. 10 リンゴ果実の食害応答モデル。1. モモシクイガ幼虫の食害により、クロロゲン酸類とPODを誘導する。2. この一連の誘導にはTree factorとして師管液成分が関与する。