

## 平成 30 年度育英費受給者

野澤 俊介（玉川大学大学院農学研究科博士課程後期・指導教員：渡辺 京子）  
研究テーマ『長崎県の広義 *Pestalotiopsis* 属菌によるビワ果実腐敗の伝染経路の解明』  
『広義 *Pestalotiopsis* 属菌の分類学的研究』

松川すみれ（鳥取大学大学院持続性社会創生科学研究科博士前期課程・指導教員：上中  
弘典）  
研究テーマ『既知の受容体を介さない新たな植物のキチン応答メカニズムの解明』

大崎 晴菜（弘前大学大学院農学生命科学研究科修士課程・指導教員：山尾 僚）  
研究テーマ『宿主植物の競争環境が植食者の餌選択に与える影響の解明』

富田 啓介（東京大学大学院農学生命科学研究科博士課程・指導教員：岡田 憲典）  
研究テーマ『アレロパシー物質モミラクトンの生物活性と耐性の分子機構』

疋田 麻衣（近畿大学大学院農学研究科博士前期課程・指導教員：松田 一彦）  
研究テーマ『ネオニコチノイド系殺虫剤と昆虫のニコチン性アセチルコリン受容体との  
選択的相互作用の分子メカニズムに関する研究』

### 長崎県の広義 *Pestalotiopsis* 属菌によるビワ果実腐敗の伝染経路の解明

本研究では、長崎県で問題となっている広義 *Pestalotiopsis* 属菌によるビワ果実腐敗の伝染経路の解明を試みた。果実腐敗の病原菌、灰斑病菌（ビワ葉の病原菌）、健全な花からの分離菌を長崎県で採集し、これらの果実と葉への病原性を接種試験にて調査した。さらに、分子系統解析により分離菌間の遺伝的類縁性を調査した。その結果、広義 *Pestalotiopsis* 属による果実腐敗の原因菌は、複数種の *Neopestalotiopsis* 属菌と狭義 *Pestalotiopsis* 属菌であり、所属する属ごとに伝染経路が異なった。果実腐敗の病原菌のうち *Neopestalotiopsis* 属に所属する病原菌は、灰斑病の罹病葉から花に伝染、潜在感染し果実腐敗を引き起こすことが明らかになった。一方、狭義 *Pestalotiopsis* 属菌に所属する病原菌は、花へ潜在感染することが明らかになったが、伝染源は不明であった。

### 広義 *Pestalotiopsis* 属菌の分類学的研究

広義 *Pestalotiopsis* 属菌は、我が国の植物病だけでも 90 件以上の報告がある植物病理学上重要な菌である。本菌群の分類体系は 2019 年に整理されたが、現行の分類体系では種同定できない例がある。本研究では、この分類体系の問題を顕在化し、再構築するうえで重要な菌株を得ることを目的とした。現行の分類法に従いチャ輪斑病菌の種の再検討、アセビ葉枯病（新病害）の病原菌の同定を行ったところ、分子系統樹上で類似した形態の分生子を形成する菌株が多系統になり同定できないという、本分類体系における問題点が顕在化した。また、ミャンマー産、ベトナム産の菌株から、本菌群中で最も種数の少ない *Pseudopestalotiopsis* 属に所属する新種として *Ps. dawaina*、*Ps. kawthaungina*、*Ps. vietnamensis*、*Ps. myanmarina* を見出した。その後 *Ps. myanmarina* は *Ps. elaeidis* のシノニムになったが、*Ps. myanmarina* 設立時の基準標本由来菌株は有性生殖を行う希少なもので、分類体系を整理するうえで重要な菌株であると位置づけた。

## 既知の受容体を介さない新たな植物のキチン応答メカニズムの解明

鳥取大学大学院 持続性社会創生科学研究科博士前期課程 松川すみれ

キチンは天然の高分子多糖であり、植物に処理することで病害抵抗性の誘導や成長促進といった効果が得られることが知られている。当研究室では、鳥取大学で製造技術が開発されたキチンを高分子のまま均一な液状で利用可能な素材であるキチンナノファイバー(NF)を用いることで、高分子キチンに対する植物の認識・応答機構について調査することが可能となった。また、これまでにキチン処理した植物における病害抵抗性の誘導には、リシンモチーフ(LysM)ドメインを細胞外領域にもつ LysM 型受容体が関与していることが報告されているが、変異体を用いた先行研究により、植物には既知の受容体に非依存的な応答機構が存在することが明らかとなっている。そこで本研究では、モデル植物であるシロイヌナズナとイネを用いて、トランスクリプトーム解析と複数の LysM 型受容体の機能欠損変異体でのキチンによる影響評価を行うことで、植物のキチンに対する応答機構の全体像の解明を試みた。その結果、LysM 型受容体であるシロイヌナズナの LYK2 もしくは LYK3、およびイネの OsCERK1 もしくは OsCEBiP を欠損した変異体ではキチン処理により植物体の成長が顕著に抑制された。このため、植物にはキチンを認識することで成長を負に制御する LysM 型受容体が存在し、そのメカニズムが広く保存されていることが示唆された。また、LYK2 もしくは LYK3 変異体ではキチン NF 処理による病害抵抗性誘導能の指標となる活性酸素種の生成がみられなかったため、これらは高分子キチンの認識に関与していると考えられる。さらに、トランスクリプトーム解析の結果、シロイヌナズナではキチン NF 処理によってジャスモン酸や防御応答に関連した遺伝子群の発現が誘導されることが明らかとなった。これらの植物に対するキチンの機能に関する基礎知見を利用することで、今後のキチンの農業分野での更なる利用促進が期待される。

## 宿主植物の競争環境が植食者の餌選択に与える影響の解明

弘前大学農学生命科学研究科修士課程 大崎晴菜

植物の生育密度は、競争環境の変化をもたらし、植物の化学的形質を変化させる。このような葉の成分の変化は、植物を利用する植食者の餌利用や分布にも影響を与えることが予測される。私は、これまでの研究により、外来雑草であるエゾノギシギシでは、生育密度の高い環境で、葉に含まれる二次代謝産物の含有量が高く、実験条件下においてコガタルリハムシに選択的に摂食されることを明らかにしてきた。修士課程の1年目として今年度は、野外における実際のエゾノギシギシとコガタルリハムシの分布について調査などをおこなった。その結果、野外のエゾノギシギシ群落においても生育密度の高いところにおいて、コガタルリハムシは集中的に分布していた。このため、植物の競争環境の変化が植食性昆虫の餌選択に影響をもたらすという現象は、野外においても、植物の生育密度と植食性昆虫の分布の関係として反映されていると考えられた。さらに、ニホンジカとニホンジカの不嗜好性植物として知られるシロヨメナという全く異なる分類群でも検証をおこなった。その結果、シロヨメナ生育密度が高い環境では、生育密度の低い環境よりも、葉に含まれる総フェノール含有量が高く、ニホンジカに忌避されることがわかった。今年度の研究成果により、植物の競争環境の変化が植食者に与える影響は、様々な分類群で一般的に観られる現象であることが示唆された。今後もさらに、本研究を推し進めることにより、外来雑草の生物的防除や農作物の害虫防除において植物の曝されている競争環境の効果を明らかにしたいと考えている。

## アレロパシー物質モミラクトンの生物活性と耐性の分子機構

東京大学大学院 農学生命科学研究科 応用生命工学専攻 博士課程 富田 啓介

モミラクトン (ML) はイネが作り出す特化代謝産物であり、抗菌活性や周囲に生育する植物の生育を抑制するアレロパシー活性を持ち、イネの化学防御に重要な役割を果たしている。しかし、ML が持つ生物活性の分子メカニズムは明らかになっていない。また、イネ等の ML 生産植物は ML に対し耐性であることも報告されているが、これについてもメカニズムは未解明である。そこで私は、ML の作用機序及び耐性のメカニズム解明を目的として、真核細胞のモデル生物である分裂酵母を用い、ML の生物活性及び耐性に寄与する遺伝子や分子を網羅的に解析している。

本年度はまず、分裂酵母遺伝子破壊株ライブラリーからの ML 感受性変化株のスクリーニングを行った。その結果、細胞分離や微小管形態形成、翻訳に関与する遺伝子の破壊により ML 感受性が変化しており、ML が細胞分離や微小管構造に実際に影響を与えていることを確認した。加えて、EMS を用いたランダムな変異導入による ML 耐性株のスクリーニングを行うことで複数の ML 耐性株を取得し、戻し交配を行った後にシーケンスに供した。現在、ML 耐性に寄与する変異点および変異が導入された遺伝子について解析を行っている。

以上の遺伝学的アプローチと並行して、ML のプローブ化と ML 結合タンパク質の探索を行った。まず、プローブ化に必要な ML をイネもみ殻から抽出・精製した。そして、ジアジリン導入 Sepharose ビーズを用いた光反応により、構造活性相関が明らかでない ML を官能基非依存的に固定、プローブ化した。これを用いて、分裂酵母やシロイヌナズナからの結合タンパク質の取得を目指す。

今年度行ったスクリーニングで得られた候補因子について、来年度以降更なる解析を行うことで ML の作用・耐性のメカニズムがより詳細に明らかになることが大いに期待される。

## ネオニコチノイド系殺虫剤と昆虫のニコチン性アセチルコリン受容体との 選択的相互作用の分子メカニズムに関する研究

近畿大学大学院農学研究科博士前期課程 疋田麻衣

ネオニコチノイド系殺虫剤は、昆虫のニコチン性アセチルコリン受容体 (nAChR) のリガンド結合部位に選択的に結合する。nAChR は  $\alpha$  サブユニットと non- $\alpha$  サブユニットが 2:3 あるいは 3:2 の比率で集合したヘテロ 5 量体構造をもつ。これまでの研究で、ネオニコチノイドはアセチルコリンと同様にオルトステリック部位と呼ばれる  $\alpha$  サブユニットと non- $\alpha$  サブユニットのインターフェースに結合し、アゴニスト活性を示すことが明らかにされている。しかし、昆虫の nAChR のオルトステリック部位を計算により構築し、詳細に観察したところ、オニコチノイドは隣接した  $\alpha$  サブユニット間のオルトステリック部位とも相互作用する可能性が示唆された。そこで本研究では、ショウジョウバエ  $D\alpha 1$ -ヒヨコ  $\beta 2$  ハイブリット nAChR を用いてこの問題について検討した。

ショウジョウバエ  $D\alpha 1$  サブユニットとヒヨコ  $\beta 2$  サブユニットの cRNA を 5:1 あるいは 1:5 の比率で混合してアフリカツメガエル卵母細胞にマイクロインジェクションすることにより、 $(D\alpha 1)_3(\beta 2)_2$  nAChR と  $(D\alpha 1)_2(\beta 2)_3$  nAChR を発現させた。計算により求められたオルトステリック部位を用いてネオニコチノイドとの相互作用に重要であると考えられるアミノ酸残基をヒト  $\alpha 4$  サブユニットの対応アミノ酸に置換し、これら 2 種の nAChR に対するイミダクロプロプリドとチアクロプロプリドの半数効果濃度 EC<sub>50</sub> 値および最大応答値  $I_{max}$  の変化を電気生理学的手法の一種である膜電位固定法によって測定した。その結果、 $\alpha$ - $\alpha$  サブユニット間の loop D、E および G がつくる電荷を帯びた領域もネオニコチノイドと相互作用し、本剤の昆虫選択的なアゴニストの活性の発現に貢献していることが明らかとなった。

$(D\alpha 1)_3(\beta 2)_2$  nAChR のオルトステリック部位のモデルでは loop D、E および G がつくる電荷を帯びた領域の近傍に loop C の YXCC モチーフが存在することが判明した。そこで  $D\alpha 1$  サブユニットの YSCC 配列をヒト  $\alpha 4$  サブユニットの YECC 配列に置換したところ、この場合にもネオニコチノイド選択的に  $(D\alpha 1)_3(\beta 2)_2$  nAChR と  $(D\alpha 1)_2(\beta 2)_3$  nAChR の感受性が低下し、それを loop D、E および G におけるヒト  $\alpha 4$  サブユニットで見られるアミノ酸への置換がさらに顕著なものにした。この結果から、今回対象とした 4 つの loop のアミノ酸は、隣接する  $D\alpha 1$  サブユニット間のオルトステリック部位とネオニコチノイドとの選択的な相互作用に深く関与することが明らかとなった。