

植物と昆虫の共生・寄生の分子メカニズムを解く

平野 朋子^{1,2}

¹ 京都府立大学生命環境科学研究科
〒606-8522 京都市左京区下鴨半木町 1-5

² 科学技術振興機構・さきがけ
〒102-0076 東京都千代田区五番町 7

Elucidation of the molecular mechanisms of symbiosis and parasitism between plants and insects

Tomoko Hirano^{1,2}

¹ Graduate School of Life and Environmental Sciences, Kyoto Prefectural University,
1-5, Shimogamo-nakaragi-cho, Sakyo-ku, Kyoto, 606-8522, Japan

² JST・PRESTO, Goban-cho 7, Chiyoda-ku, Tokyo, 102-0076, Japan

Keywords: Ab-GALFA, Host plant, Insect Gall, Parasite, Symbiosis

DOI: 10.24480/bsj-review.15a5.00258

1. はじめに

「虫瘤（むしこぶ）」は、植物に共生・寄生する昆虫が、自身の住居や餌場獲得のために、植物に誘導して作らせる特殊器官である（図1, 2）。植物と共生する多くの昆虫が、捕食や送粉、営巣など「植物のそこに在る姿をそのまま」利用するのに対し、植物に虫瘤をつくらせる昆虫（虫瘤形成昆虫）は、「異種である植物に、潜り込み（エンドパラサイト）、植物の発生プログラムを外部から操作することで、植物には本来存在しない虫瘤器官を創生」する。

従って、虫瘤形成現象は、高次元の共生関係現象であり、植物が自身の遺伝子型にない表現型を示す「延長された表現型」の代表例であると考えられる（Dawkins 1982）。

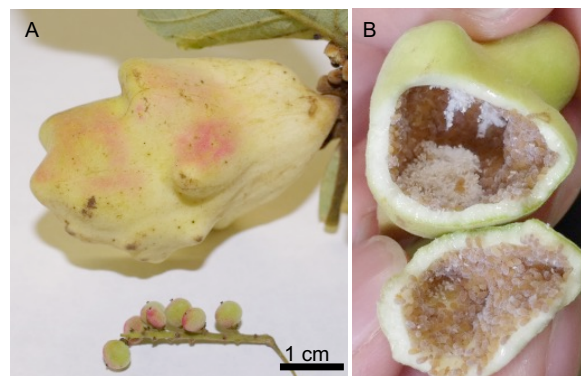


図1. ヌルデの虫こぶ (A 上) は、ヌルデの果実 (A 下) に色や形態は似ているが、大きさが異なる。ヌルデの虫こぶを割ると、数千個体ものヌルデシロアブラムシが観察される (B)。

虫瘤形成昆虫は、タマバエやタマバチ、フシダニ、アブラムシなど、2万から20万種類以上と推定されており (Price et al. 1987; Espirito-Santo and Fernandes 2007) , 宿主植物との組み合わせによって、多種、多様な形の虫瘤が作り出されることが知られている (Mani 1964; Felt et al. 1918) 。通常、多細胞生物は、一度分化した器官が別の器官に変化することはないが、虫瘤形成では、分化した「葉」や「茎」の細胞から、植物の通常の発生過程には発現しない「虫瘤」器官が再生される。

虫瘤形成昆虫はどのようにして宿主植物に虫瘤形成を誘導するのか? 多様な形態の虫瘤はどうしてできるのか? こうした問いをはじめ「虫瘤」は、何世紀にもわたり多くの研究者を魅了し、数多くの行動学や組織学の研究や (Gätjens-Boniche 2019) , 虫瘤形成に関与する多くの候補遺伝子が報告されてきた (Chen et al. 2008; Zhao et al. 2015; Yang et al. 2018; Wang et al. 2018; Eitle et al. 2019; Cambier et al. 2019; Takeda et al. 2021; Wei et al. 2022; Schultz et al. 2019) 。しかしながら、昆虫側の虫瘤誘導因子について、また植物側の虫瘤誘導因子の受容体・シグナル伝達因子についても、分子レベルでの解明はされておらず、虫瘤形成メカニズムはほとんど未解明のままである。そのため、虫瘤形成は高次元の共生関係現象であるが、共生関係のうち、相利共生、片利共生、寄生のどれであるかを判別することは困難である。

2. 宿主植物に形成される虫瘤の共通性を抽出する

2-1. 虫瘤は、高度に組織化した器官である

前述のとおり、虫瘤の形態は多様であるが、私たちは、虫瘤形成に共通する分子メカニズムが存在すると考え、まず、虫瘤形態に共通した特徴を抽出した。

ヌルデシロアブラムシの宿主植物は、ウルシ科の落葉高木であるヌルデである。その葉の翼葉に形成される虫瘤は、(1) 中央に昆虫の居住空間があり、これを取り囲む組織は、(2) 昆虫の食料となる幹細胞化した内部構造と、(3) 非常に堅い木質化した層状の外殻構造でできる層状構造、そして、(4) 水分や養分を送り込むために張り巡らされた維管束、といった4つの特徴的な構造をもっている (図2, Hirano et al. 2020) 。これは、アグロバクテリウムが作る秩序のない腫瘍状の組織「クラウンゴール」とは異なり、高度に組織化した複雑性を有している (Gätjens-Boniche 2019) 。

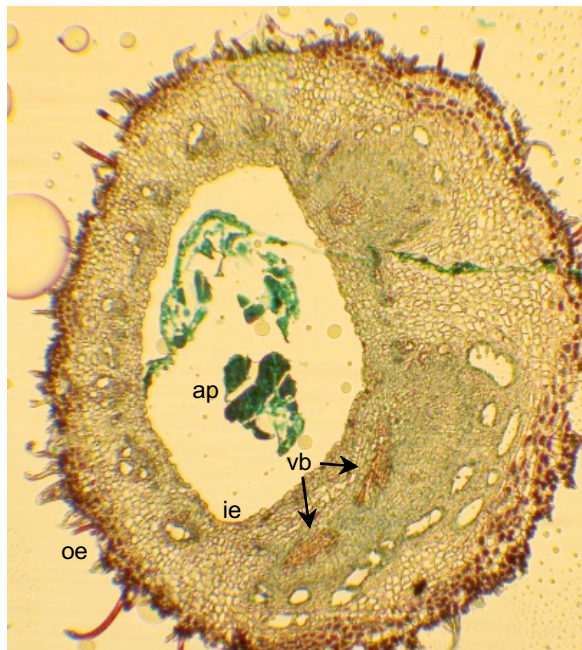


図2. ヌルデシロアブラムシがヌルデに作る虫こぶ「五倍子」の構造. 外部にはリグニン化した硬い外殻構造 (oe) , 内部には柔らかい構造 (ie) と維管束構造 (vb) が発達しており、内部の空洞部分に、ヌルデシロアブラムシ (ap) が生息している (文献 Hirano et al. 2020 より引用) 。

2-2. 虫癭形成は、花器官形成プログラムをハイジャックし、ソース器官をシンク器官へ変える

私たちは、ヌルデの、虫癭形成初期の虫癭、葉、花、果実について、網羅的遺伝子発現解析である RNA sequencing (RNA-seq) 解析を行い、ヌルデの虫癭では、花器官形成遺伝子や果実形成遺伝子、病害応答・抵抗性遺伝子が顕著に発現変動していることを明らかにした (Hirano et al. 2020)。

続いて、虫癭の外観が、単に少し膨らんだだけのヒサカキ虫癭、これより膨らみが目立つカンコノキ虫癭、立体的なブドウ虫癭、そして、幹細胞や二次細胞壁などの高次構造がはっきりしているヨモギやヌルデの虫癭など、異なる数種類の虫癭の RNA-seq 解析を比較した (Takeda et al. 2019)。その結果、すべての虫癭で共通して、CLE44, BAM3, WOX ファミリーなど、幹細胞を維持または誘導する遺伝子群の顕著な発現変動が見られ、虫癭形成過程において、細胞の幹細胞化が促進されることを明らかにした (Takeda et al. 2021)。さらに、虫癭で、花器官形成の ABCE モデル (図 3 B) の遺伝子群の特徴的な発現パターンも見いだした (Takeda et al. 2021)。

1991 年に Meyerowitz や Coen のグループによって提唱された ABC モデル (Coen and Meyerowitz 1991) とその後の研究により確立された、花器官形成の ABCE モデルは、「がく、花弁、雄しべ、雌しべの 4 種の花器官は、クラス A, B, C, E の 4 種類の遺伝子の発現によって決まる；すべての花器官の形成に必要とされるクラス E 遺伝子 (SEP1, SEP2, SEP3, SEP4) が発現し、その上でクラス A 遺伝子 (AP1, AP2) が働くと、花器官の一番外側のがくが形成され、クラス A とクラス B 遺伝子 (PI, AP3) の両方が働くとその内側の花弁が、クラス B 遺伝子とクラス C 遺伝子 (AG) の両方が働くとその内側の雄しべが、クラス C 遺伝子が働くと、中心の雌しべが形成される」というモデルである (図 3 B)。

虫癭器官で見られる花器官形成遺伝子の特徴的な発現パターンとは、次のようであった。ヨモギやヌルデの虫癭のように、非

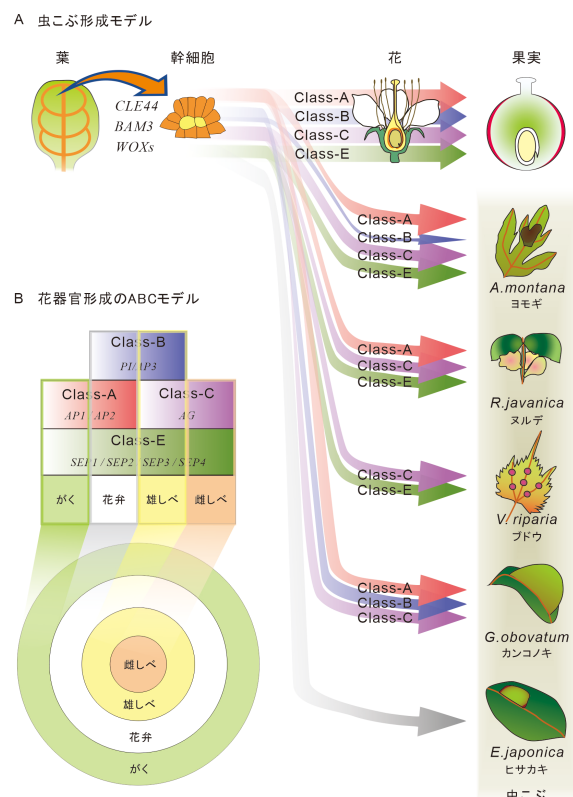


図 3. (A) 虫癭形成モデル；幹細胞誘導遺伝子の発現の後、花器官形成のクラス A, B, C 遺伝子の発現組み合わせによって虫癭の形態が決まる。(B) 花器官形成の ABC モデル；クラス E 遺伝子をベースに、クラス A 遺伝子が働くとがくが、クラス A, B 遺伝子が働くと花弁が、クラス B, C 遺伝子が働くと雄しべが、クラス C 遺伝子が働くと雌しべが形成される (文献 Takeda et al. 2021 を改変)。

常に立体的で複雑性の高い虫瘤では、花器官形成のベースにあるクラス E 遺伝子とクラス A, C 遺伝子が高発現し、クラス B 遺伝子の発現は低く保たれていた。そして、虫瘤の立体性や器官としての複雑性が低くなるほど、クラス A 遺伝子やクラス E 遺伝子の発現が相対的に低くなっていた (図 3 A)。この結果から、虫瘤は、クラス E, A, C 遺伝子の高発現およびクラス B 遺伝子が低発現することで「がくと雌しべの発達と、花弁と雄しべの退化」を誘導し、がくが硬化した外殻と、雌しべが変化した組織を基本として形成される、つまり、虫瘤形成とは、虫瘤形成昆虫によって、花器官形成遺伝子群が操作されたことで、花器官形成および果実形成が変形させられた結果であると、示唆された。

以上を総合して、私たちは、虫瘤形成では、その初期においては、あらゆる虫瘤に共通の遺伝子発現の誘導で、葉などの分化した器官から幹細胞化が促進され、そしてその後の花器官形成遺伝子の発現量の組み合わせによって、虫瘤形態のバリエーションが生まれると考えた。

3. 寄生昆虫が分泌する虫瘤形成因子を探る

3-1. 虫瘤形成昆虫, ヌルデシロアブラムシ

ヌルデの虫瘤形成昆虫であるヌルデシロアブラムシ (*Schlechtendalia chinensi*) は、5, 6 月頃に、幹母と呼ばれる 1 匹の雌が一次ホストであるヌルデの翼葉に潜り込み、直径 1 mm ほどの虫瘤を形成し、無性生殖で「胎生雌虫」を産む。その後、単為生殖を繰り返して、9 月頃までヌルデシロアブラムシの「無翅型」コピーが増産され、それにつれて虫瘤は直径 3 ~ 6 cm ほどまで急速に成長する。その虫瘤のサイズは、2 か月ほど維持され、11 月頃に、虫瘤の中で成長した翅を持つ「有翅型」が虫瘤に穴を開けて飛び出し、二次ホストであるコケ植物 (チョウチンゴケ類) に移動する。そこで、無性生殖で産まれた幼虫が越冬し、翌春に有翅虫となって再びヌルデに移動すると、無性生殖で雌と雄が生まれ、有性生殖によって、新たな幹母が生まれる。

3-2. 虫瘤形成昆虫は植物ホルモンを生成する

ヌルデシロアブラムシによる虫瘤形成には、「幹母がヌルデの葉の葉脈近傍に何らかの物質 (エフェクター) を注入」することが必要であり、その注入部分が陥没して、周囲が隆起し、幹母を包み込むことで初期の虫瘤が形成する (図 1 A, B) と予想されてきた。一方、虫瘤形成昆虫は、植物ホルモンを合成しているとの報告もあり

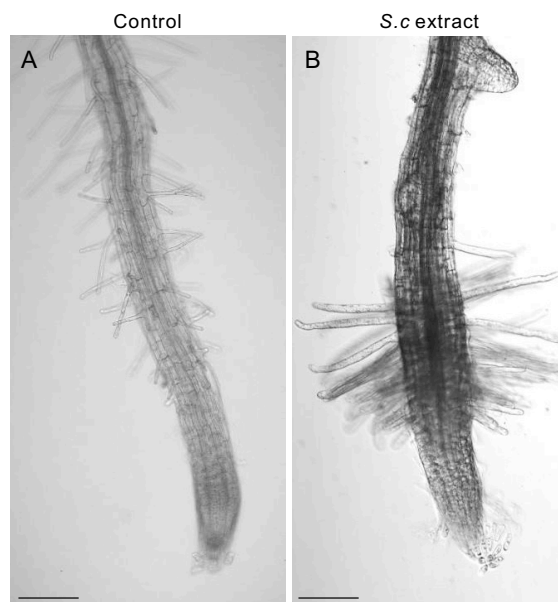


図 4. シロイヌナズナは、ヌルデシロアブラムシ虫体の破碎液 (*Sc. extract*) に浸漬すると (B), 異常な細胞分裂と細胞伸長が起こり、水に浸漬したとき (A) と比較して、形態が大きく変化した (文献 Hirano et al. 2023 より改変)。

(Yamaguchi et al. 2012) , 実際, 私たちは, ヌルデシロアブラムシの虫体から, 植物の幹細胞化や細胞増殖を促進する作用がある植物ホルモン, オーキシシンやサイトカイニンを高濃度で検出した (Hirano et al. 2020) 。

植物は, 動物に比べて高い可塑性をもち, 植物ホルモンであるオーキシシンやサイトカイニンを与えて培養すると, 分化細胞から「カルス」と呼ばれる未分化細胞が増殖し, その後の誘導で植物体に再生することが, 古くから知られている。しかし, 植物ホルモンの作用だけでは, 虫瘤のような高次構造を持った器官は形成できない。そこで私たちは, 植物ホルモンに加えて, 虫瘤形成昆虫が分泌する, 未同定の誘導物質「虫瘤誘導物質」が, 分化細胞を幹細胞化させ, 花芽や花や実を作る遺伝子を操り, 「虫瘤形成」を誘導していると推察した。

3-3. 虫瘤形成の誘導物質を探す

私たちは, 「虫瘤誘導物質」を同定するため, モデル植物シロイヌナズナを使った虫瘤形成解析法である, Arabidopsis based-gall formation assay (Ab-GALFA) を開発した。これは, ヌルデシロアブラムシを含む虫瘤形成期の虫瘤形成昆虫をすりつぶした懸濁液 (虫液) に浸したシロイヌナズナの幼植物は, 一晩でその形態が大きく変わる, という発見に基づいている (図4) 。

Ab-GALFA を用いると, ヌルデシロアブラムシの虫液は, ヌルデシロアブラムシ虫体の植物ホルモン組成を再現した溶液 (artificial hormone mix; AHM) よりはるかに著しく, シロイヌナズナの分化細胞を幹細胞化し (図5), 導管形成を多数誘導し (図6), 堅い二次細胞壁を形成させることがわかった。

また, シロイヌナズナの RNA-seq 解析において, 虫液処理で発現誘導される 1088 の発現上昇遺伝子と 1126 の発現減少遺伝子のうち, それぞれ, 43%と 32%の遺伝子は, AMH 処理で発現誘導される遺伝子と重複していた。したがって, それぞれ, 57%と 68%の遺伝子は, 植物ホルモン以外の物質による発現誘導であることが示された

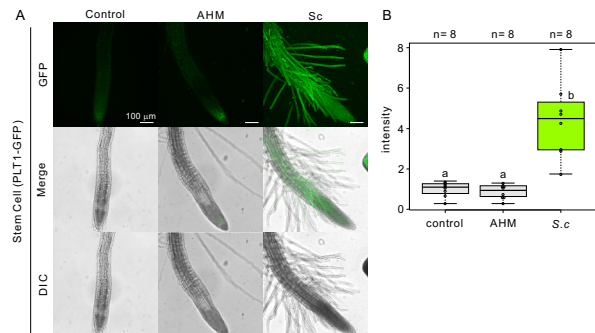


図5. PLT1-GFP を自己プロモーターの制御下で発現するシロイヌナズナ幹細胞マーカーラインを, AHM もしくは虫液 (Sc extract) に一晩浸漬したとき (A), 虫液の方がより広範囲で高い強度の蛍光を観察した (B) (文献 Hirano et al. 2023 より引用) 。

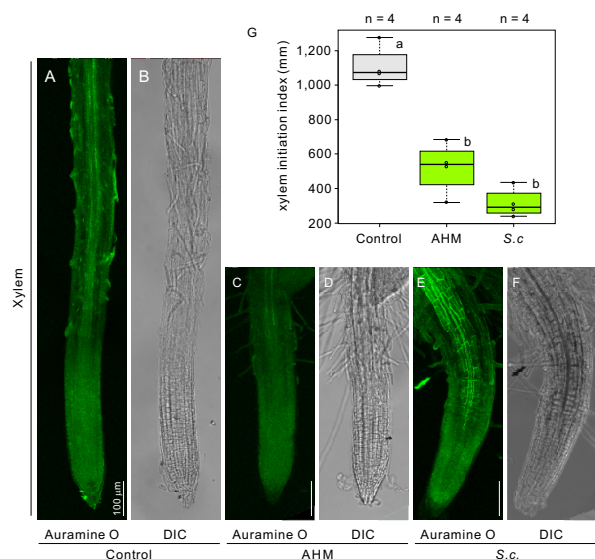


図6. 野生型シロイヌナズナを, AHM もしくは虫液 (Sc. Extract) に一晩浸漬し, 導管の構成成分であるリグニンとスベリンを Auramin O で染色すると (A, C, E), AHM より虫液処理の方が, 顕著に染色され, 導管 (xylem) 形成誘導の促進も観察された (G) (文献 Hirano et al.2023 より引用) 。

(Hirano et al. 2023)。現在、Ab-GALFA や *in silico* 解析により、「虫瘤誘導物質」の同定を試みている（論文投稿中）。

3-4. 虫瘤誘導物質で植物が強くなる

ヌルデシロアブラムシによってヌルデに虫瘤が形成されると、虫瘤は、2, 3 か月で 100 万倍の体積に成長するが、最近の研究により、宿主植物ヌルデでは、光合成効率が上昇するほか (Chen et al. 2020)、病原菌耐性遺伝子の発現が誘導されることが分かってきた (Hirano et al. 2020)。これらのことから、私たちは、虫瘤形成を誘導する物質を、成長促進作用や病害抵抗性付与作用をもつ生物賦活剤 (バイオスティミュラント) として、植物に利用する応用研究も進めている (特許出願済)。天然由来の虫瘤誘導物質は、環境にやさしく、すべての生物のエネルギーの源である植物の生産を促進し、未来型の農業や社会を助ける力になると考えている。

4. 引用文献

- Cambier S, Ginis O, Moreau SJM, Gayral P, Hearn J, Stone GN, Giron D, Huguet E, Drezen JM (2019) Gall Wasp Transcriptomes Unravel Potential Effectors Involved in Molecular Dialogues With Oak and Rose. *Front Physiol* 10: 926. doi: 10.3389/fphys.2019.00926
- Chen MS, Zhao HX, Zhu YC, Scheffler B, Liu X, Liu X, Hulbert S, Stuart JJ (2008) Analysis of transcripts and proteins expressed in the salivary glands of Hessian fly (*Mayetiola destructor*) larvae. *J Insect Physiol* 54: 1–16. doi: 10.1016/j.jinsphys.2007.07.007
- Chen X, Yang Z, Chen H, Qi Q, Liu J, Wang C, Shao S, Lu Q, Li Y, Wu H, et al. (2020) A Complex Nutrient Exchange Between a Gall-Forming Aphid and Its Plant Host. *Front Plant Sci* 11: 811. doi: 10.3389/fpls.2020.00811
- Dawkins R (1982) *The Extended Phenotype* Oxford University Press. Oxford
- Eitle MW, Carolan JC, Griesser M, Forneck A (2019) The salivary gland proteome of root-galling grape phylloxera (*Daktulosphaira vitifoliae* Fitch) feeding on *Vitis* spp. *PLoS One* 14: e0225881. doi: 10.1371/journal.pone.0225881
- Coen ES, Meyerowitz EM (1991) The war of the whorls: genetic interactions controlling flower development. *Nature* 353: 31–37. doi: 10.1038/353031a0.
- Espirito-Santo, MM., Fernandes, GW (2007) How many species of gall-inducing insects are there on earth, and where are they? *Ann Entomol Soc Am* 100: 95–99. doi: 10.1603/0013-8746(2007)100[95:HMSOGI]2.0.CO;2
- Felt EP (1918) Gall insects and their relations to plants. *Sci Mon* 6: 509–525.
- Gätjens-Boniche O (2019) The mechanism of plant gall induction by insects: revealing clues, facts, and consequences in a cross-kingdom complex interaction. *Rev Biol Trop* 67: 1359–1382 doi: 10.15517/rbt.v67i6.33984
- Hirano T, Kimura S, Sakamoto T, Okamoto A, Nakayama T, Matsuura T, Ikeda Y, Takeda S, Suzuki Y, Ohshima I et al. (2020) Reprogramming of the developmental program of *Rhus javanica* during initial stage of gall induction by *Schlechtendalia chinensis*. *Front Plant Sci* 11: 471. doi: 10.3389/fpls.2020.00471
- Hirano T, Okamoto A, Oda Y, Sakamoto T, Takeda S, Matsuura T, Ikeda Y, Higaki T, Kimura S, Sato MH (2023) Ab-GALFA, A bioassay for insect gall formation using the model plant *Arabidopsis thaliana*. *Sci Rep* 13: 2554. doi: 10.1038/s41598-023-29302-8

- Korgaonkar A, Han C, Lemire AL, Siwanowicz I, Bennouna D, Kopec RE, Andolfatto P, Shigenobu S, Stern DL (2021) A novel family of secreted insect proteins linked to plant gall development *Curr Biol* 31: 1836–1849.e12. doi: 10.1016/j.cub.2021.01.104
- Mani MS (1964) *Ecology of Plant Galls*, Springer, The Netherland
- Price PW, Fernandes GW, Waring GL (1987) Adaptive nature of insect galls. *Environ Entomol* 16: 15–24.
- Schultz JC, Edger PP, Body MJA, Appel HM (2019) A galling insect activates plant reproductive programs during gall development. *Sci Rep* 9: 1833. doi: 10.1038/s41598-018-38475-6
- Takeda S, Hirano T, Ohshima I, Sato MH (2021) Recent Progress Regarding the Molecular Aspects of Insect Gall Formation. *Int J Mol Sci* 22: 9424. doi: 10.3390/ijms22179424
- Takeda S, Yoza M, Amano T, Ohshima I, Hirano T, Sato MH, Sakamoto T, Kimura S (2019) Comparative transcriptome analysis of galls from four different host plants suggests the molecular mechanism of gall development. *PLoS One* 14: e0223686. doi: 10.1371/journal.pone.0223686
- Wang Z, Ge JQ, Chen H, Cheng X, Yang Y, Li J, Whitworth RJ, Chen MS (2018) An insect nucleoside diphosphate kinase (NDK) functions as an effector protein in wheat - Hessian fly interactions. *Insect Biochem Mol Biol* 100: 30–38. doi: 10.1016/j.ibmb.2018.06.003
- Wei HY, Ye YX, Huang HJ, Chen MS, Yang ZX, Chen XM, Zhang CX (2022) Chromosome-level genome assembly for the horned-gall aphid provides insights into interactions between gall-making insect and its host plant. *Ecol Evol* 12: e8815. doi: 10.1002/ece3.8815
- Yamaguchi H, Tanaka H, Hasegawa M, Tokuda M, Asami T, Suzuki Y (2012) Phytohormones and willow gall induction by a gall-inducing sawfly. *New Phytol* 196: 586–595. doi: 10.1111/j.1469-8137.2012.04264.x
- Yang Z, Ma L, Francis F, Yang Y, Chen H, Wu H, Chen X. (2018) Proteins Identified from Saliva and Salivary Glands of the Chinese Gall Aphid *Schlechtendalia chinensis*. *Proteomics* 18: e1700378. doi: 10.1002/pmic.201700378
- Zhao C, Escalante LN, Chen H, Benatti TR, Qu J, Chellapilla S, Waterhouse RM, Wheeler D, Andersson MN, Bao R et al. (2015) A massive expansion of effector genes underlies gall-formation in the wheat pest *Mayetiola destructor*. *Curr Biol* 25: 613–620. doi: 10.1016/j.cub.2014.12.057