

平成 30 年 5 月 31 日現在

機関番号：17401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K18557

研究課題名(和文)植物感染性線虫の誘引物質の単離・同定

研究課題名(英文) Isolation and characterization of attractant of phytonematode

研究代表者

光増 可奈子 (Mitsumasu, Kanako)

熊本大学・大学院先端科学研究部(理)・特別研究員(PD・RPD)

研究者番号：00711839

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：生物間相互作用のなかでも、特に多細胞動物と多細胞植物間の相互作用に関する分子機構の解析を目的として、サツマイモネコブセンチュウをもちいて、植物側から分泌される誘引物質の単離・同定を目指した。センチュウが誘引される植物の根と種子を材料として用いた。根由来の誘引物質の精製・構造解析を進めた結果、活性成分に含まれるペプチド鎖の部分構造を明らかにした。また、種子由来の誘引物質は、種子ムシゲルの放出に付随して活性が発現すること、ムシゲルの溶出の際に露出される多糖成分の他に、タンパク質成分も必要であることなどがわかった。

研究成果の概要(英文)：In this study we attempted to identify attractants for a phytonematode, *Meloidogyne incognita*, from roots and seeds of host plants. We used "Super Roots (SR)" isolated during the root culture of *Lotus corniculatus* for purification of root attractants. The fractions of the SR culture obtained through several chromatographic separation processes were evaluated by the attractant activity, and the structural analysis was carried out with the fraction that showed high attractant activity. In the result, a partial peptide sequence was determined as a candidate of the attractant from roots. On the other hand, we found that at least one of the attractants from seeds exerts its activity following the release of seed coat mucilage, and that the attractant is indicated to be composed of polysaccharide and protein.

研究分野：分子生理学

キーワード：サツマイモネコブセンチュウ 誘引物質 単離・同定 根 種子

## 1. 研究開始当初の背景

自然界の生き物はどれも、他の生物とかわらずに生きていくことはできない。動物は生きていくために他の生物を摂食する。植物は自ら光合成を行うことができるが、その資源を目当てに昆虫や草食獣に摂食される。また、生物同士の関係には助け合いも多く、生物は、種間関係を通じて多様な形質を進化させてきた。生物の形や色、行動、生理メカニズムなど、個々の生物を特徴付けている形質の多くが、他の生物とのかかわりの中で進化してきたと考えられる。

生物間相互作用の研究は、生物学の研究そのものと同じくらい長い歴史を持つが、今でも、様々な種間相互作用の発見が続々となされている。特に、多細胞生物間相互作用は、エレガントであり、かつ複雑で、その分子機構に関しては、ほとんど未知の領域である。生物間相互作用の分子レベルでの解析については、微生物-植物相互作用に関して、共生や病害応答といった局面において多くの知見が得られつつある。しかし、多細胞動物-多細胞植物間での相互作用についての知見はほとんどないのが現状である。

我々は、この問題にアプローチするために、植物感染性センチュウの植物寄生に関する分子機構の解析を行っている。そのなかでも、特に、ネコブセンチュウの植物認識の仕組みを明らかにすることを目的としている。ネコブセンチュウは、土壤中で植物の根を認識し、根端分裂組織と根の伸張領域の間から根に侵入する(下図左、右)。ネコブセンチュウは根のカスパリー線を通過することができないので、カスパリー線が未発達な根端部から侵入する必要があると考えられている。これらのことなどから、センチュウが根の根端領域を何らかの形で認識し、誘引されていると考えられているが、その誘引物質は未だ単離されておらず、その分子機構は未解明である。

我々は、宿主特異性の低いサツマイモネコブセンチュウを用いて、モデル生物であるシロイヌナズナや、栽培種であるダイズ、エンドウを宿主としたセンチュウ感染系を利用し、その誘引物質の単離に向けた研究を行っている。



## 2. 研究の目的

我々の研究室では、これまでに、サツマイモネコブセンチュウの誘引・忌避行動を評価

できるマイクロデバイスを開発し、ケミカルライブラリーの探索などから、サツマイモネコブセンチュウが糖類に誘引されることを明らかにしてきた(西山ら、未発表)。本研究では、糖類がセンチュウ誘引物質であるという仮説のもとに、2つのアプローチにより、その誘引物質の同定を試みることを目的としている。

植物の根端領域からはムシゲルと呼ばれる粘性多糖類が分泌されていることが知られているため、そのムシゲルとセンチュウ誘引との関わりを調べてきた。まず、エンドウやダイズ、トウモロコシの根端部のムシゲル分泌領域にサツマイモネコブセンチュウが誘引されることが観察できた(下図)。ムシゲルはペクチンを主成分とし、マンナン等の糖類を含め様々な化合物が含まれていることが知られている。本研究の第一目標は、このような植物の根端部から、誘引物質を抽出・精製し、化学構造を同定することにある。



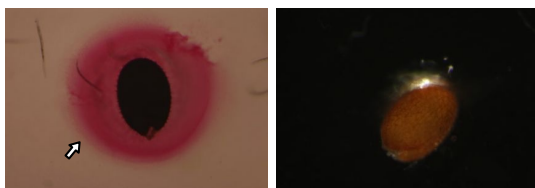
一方、遺伝学的解析が容易なシロイヌナズナにもサツマイモネコブセンチュウは感染できるが、その感染効率はきわめて低い。これは、シロイヌナズナの根にはムシゲルが無い(認識できない)ことに起因すると考えられる。しかし、シロイヌナズナの種子からは、ムシゲルが分泌されることも知られている。

我々は、これまでに、シロイヌナズナの種子にもセンチュウが誘引されること(右図上)種子からムシゲルを除去すると、その誘引活性が無くなること、種子ムシゲルがない *yip, gl2* 等の突然変異体では、センチュウ誘引が見られないこと(右図中; *yip*) それらの突然変異体に野生型のムシゲルを添加すると誘引活性が回復すること(右図下)を明らかにしてきた。さらに、野生型の種



子ムシゲルを抽出し、マンナーゼで処理すると、そのセンチュウ誘引活性が低下することもわかっている。また、市販のグルコマンナンにも誘引活性が確認された。これらのことは、マンナン関連化合物が、センチュウ誘引に必要であることを示している。

シロイヌナズナのマンナン合成酵素の *csla2/3/9* 三重突然変異体では、種子ムシゲルの主成分であるペクチンは下図左の矢印で示したように合成されるが、マンナン量が低下することが知られている。この突然変異体の種子には、センチュウ誘引活性がなかったこと（下図右）から、やはりマンナン関連化合物が誘引物質である可能性が高いと考えられる。



本研究の第二の目標は、シロイヌナズナの種子のムシゲルに含まれるマンナン化合物を含めた、誘引活性を示す種子由来成分について、さらなる遺伝学的、生化学的、免疫組織化学的解析を進め、誘引活性化合物の同定を目指すことにある。

本研究により、サツマイモネコブセンチュウの誘引物質が明らかになると、生物間相互作用の基盤の一端が明らかとなると共に、農業的な応用の足がかりにもなると考えられる。

### 3. 研究の方法

植物の根からの誘引物質単離・同定；エンドウ、ダイズ等の作物種を用いて、生化学的な精製を試みた。まず、エンドウ、及び、ダイズをレカトンで生育させた実生の根端を純水に浸潤して得た溶出液を PF127 ゲルに添加すると、その溶出液にセンチュウが誘引される行動がみられる。そこで、この生物活性を指標にして、生化学的精製を進めた。セファデックス G25 ゲル濾過クロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、逆層クロマトグラフィーにより精製を進め、得られた精製画分を質量分析などによって解析し、誘因活性成分の構造決定を試みた。同時に、誘因活性成分の精製に際して、より大量の試料を準備できる利点を持つ生物材料である、セイヨウミヤコグサ由来スーパールート (SR) を用いた精製も試みた。

シロイヌナズナ種子ムシゲルからの同定；誘引物質の一つはマンナン関連化合物と想定し、生化学的に構造決定を進めた。種子に誘引物質の活性化能があるため、種子から分泌される酵素を中心に、その活性化機構を調査した。また、シロイヌナズナの種子ムシゲルの生成や放出にかかわる種々の変異体

を用いた遺伝学的解析を行い、種子由来誘引物質の性状を解析した。加えて、シロイヌナズナ以外の種の種子ムシゲルからも、センチュウ誘引物質の精製を進めた。

### 4. 研究成果

植物の根からの単離・同定；まず、インゲンの根由来のサツマイモネコブセンチュウの誘引物質の探索を行った。インゲン根抽出物を水溶性画分、脂溶性画分に分離したところ、誘引物質は水溶性画分に分離された。さらに限外濾過、ゲル濾過による活性成分の分離を試みたが、これらの方法では誘引物質を効果的に分離できなかった。また、インゲンの培養に用いたレカトン自体から、誘因活性成分が滲出することが判明したため、誘引物質の精製に用いる材料と調製方法を見直した。シロイヌナズナ根からの誘引物質の精製を試みたが、植物体が小さく、精製に供試できるだけの試料を得ることが困難であった。セイヨウミヤコグサの培養根から単離されたスーパールート (Super Root, SR) を、液体培養して得られる培養液にセンチュウ誘因活性が見られたので、培養液中に分泌された誘引物質の精製を進めた。SR 培養液の誘引活性を指標に、限外濾過、脱塩、ゲル濾過、陽イオン交換クロマトグラフィー、逆相 HPLC による分離によって、活性を示すフラクションを絞り込むことができた。絞り込まれた活性画分をプロテインシーケンサーや MS によって分析し、活性画分に含まれるペプチド鎖の部分配列を同定した。同定された配列の予測分子量と実際の誘引物質の分子量には差異があった。同定された配列を人工合成した未修飾ペプチドを用いて、誘引活性試験を行ったところ、センチュウは誘引されなかった。これらのことから、誘引活性ペプチドには何らかの修飾が施されていることが示唆された。また、同定したペプチド断片の配列がコードされている遺伝子を検索し、当該遺伝子の宿主根における発現についても解析を進めている。同様に、ダイズの根を出発材料として、SR と同様に誘引活性画分の分離・精製、構造決定、遺伝子の探索を進めた。

② 種子ムシゲルからの単離・同定；シロイヌナズナ種子ムシゲル由来の誘引物質の一つは、マンナン関連化合物である可能性が考えられていた。そこで、種々のムシゲル構成成分を用いた誘引試験を行ったところ、グルコマンナンに強い誘因活性が認められた。グルコマンナン中の活性中心の構造を明らかにするために、構成糖であるグルコースやマンノースを含む種々のオリゴ糖を用いて誘引試験を行った。その結果、誘因活性を持つには、グルコースとマンノースの両方を含む構造が必要であることが分かった。一方で、シロイヌナズナの種子ムシゲルの生合成に関与する種々の遺伝子の変異体を用いて、セ

ンチュウの誘引活性を評価した。その結果、センチュウの誘引と種皮からのムシゲルの溶出との間に正の相関関係が見られた。そこで、種子ムシゲル、および、種子ムシゲルの放出に付随して露出する種皮由来の化合物に注目して、誘引物質の抽出と、その性状の解析を進めた。種子をセルラーゼやプロテアーゼで処理し、センチュウ誘引活性への影響を調査した。いずれの場合もセンチュウ誘引活性は有意に低下したことから、活性の発現にはムシゲルの溶出の際に露出される多糖成分の他に、タンパク質成分も必要であることがわかった。さらに、作物の原種や様々な植物の種子についても誘引試験を行い、シロイヌナズナ以外の植物の種子からも誘引物質が分泌されていることを確認した。アマ種子のムシゲルがセンチュウ誘引活性を示すことが確認できたので、アマ種子由来の誘引物質の解析も進めた。アマ種子由来の抽出物をゲル濾過クロマトグラフィーによって分画したところ、誘引活性は主に初期の画分で観察された。また、活性を示した分画を疎水性クロマトグラフィーによって更に分画したところ、複数の画分で誘引活性が見られたことから、複数種類の誘引物質が存在することがわかった。

#### 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 5件)

1) Shimizu N, Ishida T, Yamada M, Shigenobu S, Tabata R, Kinoshita A, Yamaguchi K, Hasebe M, Mitsumasu K & Sawa S (2015) BAM 1 and RECEPTOR-LIKE PROTEIN KINASE 2 constitute a signaling pathway and modulate CLE peptide triggered growth inhibition in Arabidopsis root. *New Phytologists* 208, 1104-1113.(査読有)

2) Mitsumasu K, Seto Y & Yoshida S (2015) Battles over cell walls in plant-parasite interactions. *Frontiers in plant science* 14 Aug; doi: 10.3389/fpls.2015.00617.(査読有)

3) 光増 可奈子, 川崎 努, 澤 進一郎 (2015) 植物細胞壁の情報処理システム 6 -外界との接点としての細胞壁- *化学と生物* 53, 535-541.(査読有)

4) Li YC, Mitsumasu K, Gou ZX, Gou M, Tang YQ, Li GY, Wu XL, Akamatsu T, Taguchi H & Kida K. (2016) Xylose fermentation efficiency and inhibitor tolerance of the recombinant industrial *Saccharomyces cerevisiae* strain NAPX37. *Appl Microbiol Biotechnol.* 100, 1531-1542.(査読有)

5) Ohta H, Mitsumasu K, Yaginuma T, Tanaka

Y & Asaoka K (2017) Functional characterization of dopamine and neuropeptide G protein-coupled receptors from the silkworm *Bombyx mori* by aequorin bioluminescence-based calcium assay. *ACS Book: "Advances in Agrochemicals: G Protein-Coupled Receptors (GPCRs) and Ion Channels as Targets for Pest Control."* 1265,109-126; doi: 10.1021/bk-2017-1265.ch006 (査読有)

[学会発表](計 2件)

1) 光増 可奈子, 豊島 主峰, 山口 泰華, 石田 喬志, 澤 進一郎. サツマイモネコブセンチュウの巨大細胞過程におけるエフェクターたんぱく質 MjD15 の機能解析. 日本農芸化学会大会 2017 年度大会, 2017 年 3 月 17 日-20 日, 京都女子大学(京都府)

2) 光増 可奈子, 澤 進一郎, 太田 広人. 植物寄生性線虫の生体アミン受容体の単離と解析. 日本農芸化学会大会 2018 年度大会, 2018 年 3 月 15 日-18 日, 名城大学(愛知県)

[図書](計 0件)

[産業財産権](計 0件)

[その他](計 0件)

#### 6. 研究組織

(1)研究代表者

光増可奈子 (MITSUMASU KANAKO)

熊本大学大学院 先端科学研究部 特別研究員 (学術振興会 RPD)

研究者番号: 00711839