

平成 30 年 6 月 21 日現在

機関番号：32658

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K18695

研究課題名(和文)植物寄生性センチュウによる宿主認識行動の化学的制御

研究課題名(英文)Chemical regulation of host recognition in plant parasitic nematode

研究代表者

伊藤 晋作(Ito, Shinsaku)

東京農業大学・生命科学部・助教

研究者番号：70608950

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)：ダイズシストセンチュウはマメ科植物生産に被害を与える害虫である。その生活環は宿主植物の分泌する化学物質によって制御されているがその制御機構は不明である。そこで申請者はダイズシストセンチュウの行動を制御する分子を探索した。その結果、孵化促進物質として新たに1,10-phenanthroline及びその誘導体を、誘引物質として硝酸イオンとそのアナログ類を見出すことができた。また、孵化促進物質、誘引物質応答遺伝子をRNAseqによって見出すことができた。

研究成果の概要(英文)：Soybean cyst nematode (SCN) *Heterodera glycines* Ichinohe, a plant parasitic nematode, is one of the most serious pests for soybean production. In order to regulate the SCN behavior, we screened for the chemicals that stimulate the SCN hatching and attraction. We found 1,10-phenanthroline and nitrate as novel hatching stimulant and attractant, respectively.

研究分野：生物有機化学

キーワード：ダイズシストセンチュウ 植物寄生性線虫 孵化促進物質 誘引物質

1. 研究開始当初の背景

植物寄生性センチュウは世界中で農作物生産に甚大な被害を及ぼす害虫として知られている。その中でも、ダイズシストセンチュウ (soybean cyst nematode; SCN) は大豆、インゲン、小豆などの主要なマメ科植物に寄生する根寄生センチュウである。SCN は普段は土壤中でシストと呼ばれる殻に守られて休眠しており、宿主であるマメ科植物が植えられた時のみ、宿主植物が生産する孵化促進物質に応答して孵化する。その後、同じく宿主植物が分泌する誘引物質によって根を認識し寄生する。寄生後は植物内で栄養を奪いながら成長する、という特徴的な性質を有している。シストの状態では様々なストレスに耐性を持つため、完全な防除は困難であり、防除には長期間が必要とされている。これまでに孵化促進物質としてグリシノエクレピン類が同定されている。しかしながらその他に孵化促進物質の報告はない。また、誘引物質に関してはこれまでに全く報告がされていない。

現在、ダイズシストセンチュウの防除法として抵抗性品種の育種や殺線虫剤の使用などが行なわれている。この他にも宿主植物のいない状態で孵化促進物質を処理し防除する方法や、誘引物質によって SCN の感染を攪乱する方法など、SCN の行動を制御する方法が考えられるが、上述のように SCN の行動制御物質はほとんど見出されておらず、唯一同定されているグリシノエクレピン類は複雑な構造から大量合成は難しく実用化には大きな障害があった。また、SCN の行動機構の解明は、新規 SCN 行動制御剤の創製のためにも必要不可欠であるが、SCN のゲノム配列は公開されておらず、行動に関する遺伝子もほとんど見出されていない。

2. 研究の目的

本研究では植物寄生線虫の孵化や誘引行動といった行動制御機構を明らかにすることを目指し、今回は化合物ライブラリーから SCN 新規孵化促進物質、誘引物質のスクリーニング及びその作用メカニズムの解明を行った。また、見出した化合物を用いて RNAseq を行うことで孵化や誘引時の変動遺伝子の取得を目指した。

3. 研究の方法

(1) SCN 孵化促進物質のスクリーニング

SCN 汚染土壌は北海道農業研究センターの串田篤彦博士より分与されたものを培養し、使用した。SCN の培養には大豆 (キタムスメ) を用いた。発芽した大豆に約 4000 の SCN 二期幼虫を接種し、三ヶ月生育させた。生育した土壌中のシスト数を測定し、十分なシストが存在する土壌を汚染土壌とした。

汚染土壌より分離したシストから、顕微鏡下、注射針を用いて卵を取り出した。滅菌水で洗浄後 96 ウェルプレートに卵 60-100 程度ずつ分注し、DMSO に溶解させた試験溶液を加えた。25℃ 暗所にてインキュベートし、経時的に孵化した線虫数を計測した。試験には購入可能な化合物を用いた。

(2) SCN 誘引物質のスクリーニング

(1) と同様の方法で分離した SCN 卵にグリシノエクレピン A を 1 nM となるように加え、25℃ 暗所にて 5 日間インキュベートした。滅菌水を用いてグリシノエクレピン A を洗い、孵化した SCN 二期幼虫を得た。孵化試験は 6 ウェルプレートを用いて行った。6 ウェルプレートに 5 mL の 10 mM Tris-HCl (pH7.2) 寒天培地を加え、その上に試験化合物の入った 2%寒天玉及び入っていない寒天玉を置いた。両寒天玉からおよそ 17.5 mm の位置に SCN 二期幼虫を 50 程度まき、25℃ 暗所にてインキュベートした。インキュベート後経時的に寒天玉の周囲 5 mm 以内に入っていた SCN を誘引された SCN としてカウントし、誘引率を算出した。

根への誘引試験は、6 ウェルプレートに 5 mL の 10 mM Tris-HCl (pH7.2) 寒天培地を加え、プレート中央付近に根端およそ 10 mm を置いた。根端より 10 mm の位置に SCN 二期幼虫を 50 程度まき、25℃ 暗所にてインキュベートした。インキュベート後経時的に根端の周囲 5 mm 以内に入る SCN を誘引された SCN とし、誘引率を算出した。

(3) RNAseq による孵化促進物質、誘引物質応答遺伝子の探索

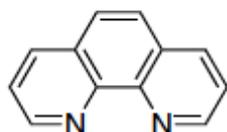
RNAseq は Illumina 社の HiSeq2500 を用いて行った。孵化促進物質を処理した SCN 卵及び硝酸塩を処理した SCN 二期幼虫より RNA を抽出した。バイオアナライザーにより RNA の品質をチェックした後、抽出した RNA は市販のキットを用いてライブラリーを作成し、シーケンスを行った。データの解析は CLC genomic workbench を用いて有意に変動する遺伝子の抽出を行った。

4. 研究成果

(1) SCN 新規孵化促進物質の探索

市販の化合物を用いて孵化促進物質を探索した。その結果、1,10-phenanthroline (Phen) が SCN の孵化を促進することを見出した (図)。Phen による孵化促進活性は処理後 1 日目から観察される一方でグリシノエクレピン A による孵化は処理後 3 日目以降にのみ観察されたことから Phen による孵化促進機構はグリシノエクレピンによるものとは異なっている、もしくはグリシノエクレピンによる孵化促進機構のかなり下流に作用していることが明らかとなった。グリシノエクレピンと Phen を共処理したところ孵化活

性の向上が観察された。また、Phen の誘導体を購入し、孵化試験を行ったところ、bipyridine 骨格が孵化促進活性に必須であることを見出した。Phen は主に 2 価金属イオンのキレート剤として知られており、bipyridine 骨格はそのキレート作用に必須であるため、Phen による孵化促進効果がキレート作用によるものかを検討した。二価金属と Phen の共処理時の孵化促進活性を測定したところ、Phen による孵化促進活性は消失した。一方で、二価金属とグリシノエクレピン A との共処理では孵化促進活性の消失は観察されなかったことから、Phen による孵化促進活性には Phen のキレート能が強く影響している可能性が示唆された。



図、Phenanthroline の構造

(2) SCN 誘引物質のスクリーニング

(1) と同様に市販の化合物を用いて誘引物質の探索を行った。その結果、SCN は硝酸塩に有意に誘引されることが明らかとなった。また、 NO_3^- のみならず SO_3^{2-} や ClO_3^- 、 CO_3^{2-} 等の三角錐構造もしくは平面三角形構造を有する陰イオンに誘引されることを見出した。一方、高濃度の NO_3^- には SCN は誘引されなかった。サツマイモネコブセンチュウなどでは NO_3^- は誘引物質として知られているが、高濃度の NO_3^- では忌避活性を示すことが知られており、SCN も高濃度の NO_3^- を忌避している可能性が考えられた。また、寒天培地中に少量の硝酸塩を加えた場合は NO_3^- への誘引が抑制された。しかし、宿主根への誘引活性は寒天培地中の硝酸塩によって影響を受けなかったことから、硝酸塩への誘引機構は宿主根への誘引機構と異なっていることが明らかとなった。

(3) SCN 孵化物質応答遺伝子の探索

グリシノエクレピン A または Phen を SCN 卵に処理し、RNAseq を行った。処理 24 時間後の応答遺伝子を比較したところ、グリシノエクレピン A で応答した遺伝子の 9 割以上が Phen 処理でも応答していた。このことから、遺伝子発現レベルではグリシノエクレピンと Phen は共通した経路を活性化、または不活性化しており、共通して応答していた遺伝子は孵化時に変化する遺伝子であると考えられた。

硝酸塩への誘引時及び宿主根への誘引時の SCN 二期幼虫を集め、RNAseq を行った。その結果、硝酸塩、宿主根への誘引時どちらで

も変動する遺伝子として 22 遺伝子を見出すことができた。その中には宿主根への感染時に必要なエフェクタータンパク質をコードするものも含まれており、しかもその発現量は誘引時には減少していた。感染時に発現が上昇するはずのエフェクタータンパク質が誘引時に減少していたことから、SCN の感染には宿主根認識後に追加のシグナルが必要であることが考えられた。

以上の結果から、本研究により、新たにダイズシストセンチュウの孵化、誘引を化学的に制御可能な化合物を見出すことができた。またその化合物を用いることで新たに行動を制御している可能性のある遺伝子候補を見出すことができた。

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 2 件)

1) Akito Hosoi, Tsutomu Katsuyama, Yasuyuki Sasaki, Tatsuhiko Kondo, Shunsuke Yajima, Shinsaku Ito., Nitrate analogs as attractants for soybean cyst nematode. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry*, 81: 1542-1547 (2017) 査読有

2) Shiori Nonaka, Tsutomu Katsuyama, Tatsuhiko Kondo, Yasuyuki Sasaki, Tadao Asami, Shunsuke Yajima, Shinsaku Ito., 1,10-Phenanthroline and its derivatives are novel hatching stimulants for soybean cyst nematodes. *Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters*, 26: 5240-5243 (2016) 査読有

[学会発表](計 4 件)

1) 細井昂人、大木拓海、吉田ひかり、佐々木康幸、矢嶋俊介、伊藤晋作、ダイズシストセンチュウの誘引制御メカニズムの解明、日本応用動物昆虫学会大会(2018)

2) 細井昂人、森谷渉、吉田ひかり、近藤竜彦、佐々木康幸、矢嶋俊介、伊藤晋作、ダイズシストセンチュウの孵化、誘引物質の探索、日本線虫学会大会(2017)

3) 細井昂人、吉田ひかり、勝山勉、近藤竜彦、佐々木康幸、矢嶋俊介、伊藤晋作、ダイズシストセンチュウにおける硝酸イオンへの誘引、日本農薬学会第 42 回大会(2017)

4) 細井昂人、近藤竜彦、佐々木康幸、矢嶋俊介、伊藤晋作、ダイズシストセンチュウにおける硝酸イオンへの誘引、日本農芸化学会関東支部会(2016)

6 . 研究組織

(1)研究代表者

伊藤 晋作 (ITO Shinsaku)

東京農業大学・生命科学部・助教

研究者番号：70608950