

令和 3 年 6 月 1 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K05459

研究課題名(和文)シストセンチュウ孵化促進物質の生合成の解明

研究課題名(英文)Elucidation of biosynthesis of hatching factors for cyst nematode eggs

研究代表者

水谷 正治 (Mizutani, Masaharu)

神戸大学・農学研究科・准教授

研究者番号：60303898

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：ジャガイモシストセンチュウは、ナス属作物の根に寄生し甚大な被害をもたらす重大害虫である。線虫卵の孵化は宿主根から分泌される孵化促進物質(Hatching Factor: HF)であるソラノエクレピン A (SEA) により誘導される。本課題の目的は、(1) 植物自身が HF を生合成していることを実証する、(2) HF の精製方法を確立する、(3) HF の生合成系を解明する、である。(1) HF はジャガイモ根から分泌される物質であることが明らかとなった。(2) ジャガイモ水耕液から HF 精製法を確立し、水耕液中には SEA 以外の HF の存在が示唆された。(3) HF 生合成に関与する酵素を候補として選抜した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、シストセンチュウ孵化促進物質という新しい視点からの防除方法、すなわち、孵化促進物質を作らないジャガイモを分子育種するという、全く新しい線虫防除法を提案する。さらに、新奇 HF および SEA の情報を利用して、HF アナログをデザイン合成し、自殺孵化物質(寄主植物がないときに孵化させて餓死根絶する)として機能する新奇な殺線虫剤の開発にも役立つ。また、植物とシスト線虫のユニークな相互作用に関する学術的・科学的な問いに対して、本課題は非常に重要な成果となる。

研究成果の概要(英文)：Potato cyst nematodes (PCNs) are plant parasitic nematodes which cause serious losses of crop production of potato or tomato. The hatching of PCN eggs occurs in response to the host-derived hatching factors (HFs) in root diffusates. So far, solanoeclapin A (SEA) has been identified as a hatching factor in the root diffusates, but it is unclear whether SEA is certainly secreted from host plants. The objectives of this research are (1) demonstration that the plant itself biosynthesizes HF, (2) establishment of a purification method for HF, and (3) elucidation of HF biosynthesis in potatoes. (1) Strong HF activity was observed in the culture medium of sterile potato roots, demonstrating that HF is a substance secreted from potato roots. (2) An HF purification method was established, and the presence of HFs other than SEA in potato hydroponic solution was suggested. (3) the involvement of some enzymes in HF biosynthesis is suggested.

研究分野：植物天然物化学

キーワード：シストセンチュウ 孵化促進物質 ジャガイモ トマト

## 1. 研究開始当初の背景

シストセンチュウはジャガイモやダイズなどの根に寄生して大幅な減収を引き起こす最重要害虫の一つである。シストセンチュウの雌成虫は自身の体内に産卵し数百の卵を抱えた「シスト(包囊)」となり土壤中に定着する。このシストは低温や乾燥に耐性があり10年以上も休眠状態で長期生存可能であるため、一度圃場にシストセンチュウが侵入すると根絶は困難である。シスト内の卵は宿主植物から分泌される「孵化促進物質」に反応して孵化し、シストから幼虫が遊出し根に侵入定着して栄養を奪って肥大化し、雌の成虫となって根の外に出てくる。シストセンチュウには宿主特異性が存在し、ジャガイモやトマトに寄生するジャガイモシストセンチュウ (potato cyst nematode: PCN)、ダイズやインゲンに寄生するダイズシストセンチュウ (soybean cyst nematode: SCN) がある。宿主植物の根から分泌される孵化促進物質 (以下、Hatching Factor, HF と省略) として、インゲンマメからグリシノエクレピン A (GEA)、グリシノエクレピン B (GEB)、グリシノエクレピン C (GEC) が1980年初頭に北大グループにより単離同定され、ジャガイモからソラノエクレピン A (SEA) が1999年にヨーロッパのグループにより単離同定された。これら HF 類は宿主植物によって生合成されて根から分泌されると推定されるが、HF 類に関する植物化学的あるいは分析化学的情報は皆無である。さらに、HF 類は構造的特徴からトリテルペノイドであると推定されるが、生合成系については全く不明である。また、植物がなぜ多様で非常に複雑な構造をもつ HF 類を生合成するのか、その植物生理的役割についても全く不明である。

## 2. 研究の目的

本課題の目的は、

- (1) 植物自身が HF 類を生合成していることを分析化学的に実証する。
- (2) HF 類の精製方法を確立する。
- (3) HF の生合成系を解明する。

HF 類の発見および有機合成は日本発の重要な研究成果であり、その成果を発展させて線虫防除に役立てることは世界の農業にとって非常に意義は大きい。本課題により HF 類を植物体から検出定量できれば世界初の成果となり、さらに新規活性物質の単離同定も期待できる。

HF 類がトリテルペノイド経路により生合成されることを実証できれば、学術的にも意義は大きい。本課題の成果を応用することで、代謝工学的に HF 類を大量調製することも可能になる。また、生合成遺伝子に変異を入れることで孵化促進物質を分泌しない(線虫を孵化させない)新規なシストセンチュウ抵抗性作物を育種することも可能となる。さらに、HF 類を欠損した植物を解析することにより、その植物生理学的役割を解明できると期待できる。

## 3. 研究の方法

- (1) 植物自身が HF 類を生合成していることを分析化学的に実証する。

HF 類はインゲンマメおよびジャガイモから天然物化学的に単離精製され構造決定されたが、根浸出液あるいは植物体から分析化学的に検出された報告例はない。本課題では、シストセンチュウの被害が甚大なトマトおよびジャガイモを材料として、無 HF 活性を検出する。また、既知 HF である SEA の合成品と物理化学的な性質を比較解析する。

- (2) HF 類の精製方法を確立する。

水耕液および毛状根培養液を材料として、溶媒分画およびカラムクロマトグラフィーを組み合わせて各試料を分画精製する。各フラクションに対して、ジャガイモシストセンチュウ (PCN) の孵化バイオアッセイを行う。

- (3) HF の生合成を解明する。

HF 類はその構造的特徴 (炭素骨格および複数の酸素原子の存在) からトリテルペノイド経路で生合成されると推定されるが、実験的に立証されていない。そこで、毛状根にトリテルペノイド生合成系の各種酵素に特異的な阻害剤を投与し、孵化促進活性への影響を調べる。

また、HF 類の構造は複雑であり多段階の環化・酸化酵素の関与が予想され、中間体の構造も不明であるため、酵素活性を指標とした従来の生合成遺伝子探索は困難である。そこで、本課題ではゲノム編集により生合成候補遺伝子の特異的に破壊し、HF 欠損の表現

型( 孵化促進活性の減少および活性物質の減少 )を指標として生合成遺伝子を探索同定する。

#### 4 . 研究成果

(1) 植物自身が HF 類を生合成していることを実証する。

ジャガイモ (*Solanum tuberosum*) のメークインを用いて毛状根を作成し実験材料として使用した。毛状根は無菌で扱えるだけでなく、生育が早く安定しているという利便性がある。毛状根培養液の孵化活性の評価は、PCN 卵に適宜希釈した培養液サンプルを投与するバイオアッセイ法で行った。毛状根を振とう培養した培養液を毛状根滲出液として孵化活性評価試験に供したところ、希釈した毛状根培養液は PCN に対して 80% 以上の高孵化活性を示した。無菌毛状根の培養液中に高い孵化活性を検出できたことから、HF はジャガイモの根から分泌される物質であることが確認され、毛状根は HF を抽出精製する実験系として有効であることが明らかとなった。トマトから誘導した無菌毛状根の培養液についても同様の結果が得られた。

つぎに、毛状根の培養液中の HF と SEA 合成品の物理的性質 (pH および温度安定性) を比較解析した。培養液は 0.1N 塩酸中で 80°C1 時間加熱後でも活性を維持していたことから、HF がタンパク質などではないということが推定された。また、培養液中の HF はアルカリ性に弱いことから、SEA と類似した物性であることが明らかとなった。

一方、ナス属植物の二次代謝産物であるステロイドグリコアルカロイドは、SEA と同じトリテルペノイドに属することから、毛状根培養液が示す孵化促進活性におけるステロイドグリコアルカロイドの寄与を調べた。 $\alpha$ -ソラニンを含むいくつかのステロイドグリコアルカロイドで有意な孵化促進活性が確認できた。一方、各アグリコンであるソラニジンやトマチジンには全く活性はなく、また、各ステロイドグリコアルカロイドとオリゴ糖部分は共通なステロイドサポニンにも全く活性がなかった。これらの結果からステロイドグリコアルカロイドが示す孵化促進活性にはオリゴ糖部分とアルカロイドの両方の性質が必要であることが明らかとなった。一方、ステロイドグリコアルカロイド生合成遺伝子のノックアウト毛状根培養液の孵化促進活性は全く低下しなかったことから、ステロイドグリコアルカロイドは毛状根培養液中に存在する HF 活性にはほとんど寄与していないことが明らかとなった。

(2) HF 類の精製方法を確立する。

まず、ジャガイモ根滲出液中に含まれる SEA の検出を試みた。北海道大学理学部谷野教授より供与いただいた SEA 合成標品を用いて有機溶媒を用いた液液抽出により SEA は酢酸エチルで抽出されることを確認し、さらに LC-MS/MS により分析法を確立した。次に、ジャガイモ根滲出液を液液抽出分画し、孵化促進活性を評価した結果、酢エチ相と水相の両方に活性が確認された。酢エチ相をカラムにより部分精製して LC-MS/MS 分析した結果、SEA を検出することに成功した。一方、検出される SEA は総活性の数% にしか相当しないことから、酢エチ相には SEA 以外の活性物質が存在することが示唆された。さらに、水相にも親水性の高い活性物質の存在が示唆された。同様に、トマトおよびジャガイモの毛状根由来の培養液についても SEA 以外の孵化促進活性物質の存在が示唆された。

(3) HF の生合成を解明する。

SEA および関連化合物は多段階にわたる酸化的修飾を受けて生合成されると考えられるため、生合成に関与する酵素ファミリーを検討するために阻害剤投与による HF 活性への影響を検討した。具体的には、HMG-CoA 還元酵素阻害剤、スクアレンエポキシダーゼ阻害剤、シトクロム P450 阻害剤、2 オキソグルタル酸依存性ジオキシゲナーゼ (DOX) 阻害剤などをトマト毛状根培養系に投与し、数日培養した後、培養液をバイオアッセイに供試した。その結果、阻害剤投与により孵化促進活性が有意に低下した。すなわち、これら酵素が孵化促進物質の生合成に関与することが示唆された。

次に、HF 類の構造は複雑であり多段階の環化・酸化酵素の関与が予想され、中間体の構造も不明であるため、酵素活性を指標とした従来の生合成遺伝子探索は困難である。そこで、本課題ではゲノム編集により生合成候補遺伝子を特異的に破壊し、HF 欠損の表現型( 孵化促進活性の減少および活性物質の減少 )を指標として生合成遺伝子を探索した。具体的には、トマトを材料として、CRISPR/Cas9 ゲノム編集ベクターを導入した *Agrobacterium rhizogenes* を用いて形質転換したノックアウト組換えトマト毛状根を作成した。根で発現する酵素を候補遺伝子としてゲノム編集を行った結果、遺伝子破壊毛状根において HF 活性の有意な低下が認められたことから、これら候補とした酵素遺伝子の一部が HF 生合成に関与することが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 0件）

|  |                         |
|--|-------------------------|
| 1. 著者名<br>Shimizu Kosuke, Kushida Atsuhiko, Akiyama Ryota, Lee Hyoung Jae, Okamura Yuya, Masuda Yuki, Sakata Itaru, Tanino Keiji, Matsukida Seiji, Inoue Tsutomu, Sugimoto Yukihiro, Mizutani Masaharu | 4. 巻<br>37              |
| 2. 論文標題<br>Hatching stimulation activity of steroidal glycoalkaloids toward the potato cyst nematode, <i>Globodera rostochiensis</i>   | 5. 発行年<br>2020年         |
| 3. 雑誌名<br>Plant Biotechnology  | 6. 最初と最後の頁<br>319 ~ 325 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>10.5511/plantbiotechnology.20.0516a  | 査読の有無<br>有              |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難   | 国際共著<br>-               |

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>清水宏祐、秋山遼太、坂田至、串田篤彦、谷野圭持、松木田聖士、井上勉、杉本幸裕、水谷正治   |
| 2. 発表標題<br>Analysis of hatching stimulation activity for potato cyst nematodes by steroidal glycoalkaloids |
| 3. 学会等名<br>Terpnet 2019  |
| 4. 発表年<br>2019年  |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>清水宏祐、増田裕貴、秋山遼太、坂田至、串田篤彦、谷野圭持、刑部 敬史、刑部 祐里子、杉本幸裕、水谷正治 |
| 2. 発表標題<br>トマトにおけるジャガイモシストセンチュウ孵化促進物質の生合成遺伝子の探索                |
| 3. 学会等名<br>植物化学調節学会第54回大会                                      |
| 4. 発表年<br>2019年  |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>清水宏祐、増田裕貴、秋山遼太、坂田至、串田篤彦、谷野圭持、刑部 敬史、刑部 祐里子、杉本幸裕、水谷正治 |
| 2. 発表標題<br>ジャガイモシストセンチュウ孵化促進物質の生合成に関与する酸化酵素の探索                 |
| 3. 学会等名<br>第37回植物細胞分子生物学会京都大会                                  |
| 4. 発表年<br>2019年  |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>清水宏祐、増田 裕貴、李 榮宰、秋山遼太、串田 篤彦、奈良部 孝、谷野 圭持、松木田聖土、井上勉、杉本 幸裕、水谷 正治 |
| 2. 発表標題<br>グリコアルカロイドのジャガイモシストセンチュウ孵化促進活性の解析                             |
| 3. 学会等名<br>植物化学調節学会   |
| 4. 発表年<br>2018年   |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

| 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号) | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号) | 備考 |
|---------------------------|-----------------------|----|
|---------------------------|-----------------------|----|

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|
|---------|---------|