

令和 2 年 6 月 30 日現在

機関番号：32658

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2019

課題番号：18K14400

研究課題名(和文)植物寄生センチュウによる宿主認識機構の解明

研究課題名(英文)Host recognition mechanism in soybean cyst 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に寄生し収量を減少させる害虫として知られている。ダイズシストセンチュウによる宿主の認識には化学物質が関与することが明らかとなっているが、どのように宿主を認識しているかは明らかとなっていない。そこで申請者はこれまでに見出してきた行動制御物質を用いることでシストセンチュウの孵化や誘引といった宿主認識に関わる過程に関与する遺伝子群を探索し、その遺伝子の機能解析を行った。その結果、宿主への誘引時に重要な遺伝子を見いだすことができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ダイズシストセンチュウはマメ科植物の根に寄生し栄養を奪うことで植物の生長を阻害する害虫である。ダイズシストセンチュウは宿主植物が分泌する化学物質を認識して孵化や宿主への誘引、感染が起こることが知られていたが、どのような機構で起こるかは知られていなかった。本研究ではセンチュウの誘引時における遺伝子の発現変動を解析し、候補遺伝子の解析を行うことで、宿主への誘引に神経伝達関連遺伝子が関与することを見出した。

研究成果の概要(英文)：Soybean cyst nematode (SCN) is one of the most serious pests for soybean production. Hatching and attraction in SCN are important steps to establish the infection to the host plants. In this study, we performed RNAseq analysis to find the hatching and attraction related genes in SCN. We identified one gene that regulates the attraction to the host roots.

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 植物寄生センチュウ 孵化促進物質 誘引物質

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

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被害を及ぼす害虫である。その中でもダイズシストセンチュウ (SCN) はダイズ生産上最大の減収要因として知られている。SCN は卵を内包したシストの状態では土壌中に存在し、宿主植物が近傍に植えられると、宿主由来の孵化促進物質を認識し、孵化する。その後宿主へ移動し根から寄生するが、この誘引過程にも宿主由来の物質が存在することが知られている。これまでに宿主由来孵化促進物質としてグリシノエクレピンが知られているが、その他の孵化物質は見出されておらず、宿主由来誘引物質については見出されてもいなかった。さらに、グリシノエクレピン類は合成が非常に困難であるため大量に使用した機能解析は行われていない。また由来を問わず孵化機構や誘引機構を解析するのに使用可能な化合物も少ないことからの SCN がいかにして宿主由来の物質を認識しているのか？行動が制御されているのか？という点は解析されておらず、孵化、誘引現象を制御する遺伝子群の存在も全く明らかとなっていない。申請者らは、SCN の孵化、誘引機構を解明することを目指し、本研究の予備実験で SCN の行動を制御できる化合物の取得を試みた。その結果、ケミカルスクリーニングにより孵化促進物質として phenanthroline 類 (Nonaka et al., 2016) を、誘引物質として硝酸イオンとそのアナログ類 (Hosoi et al., 2017) を見出すことができた。それらの化合物の作用機序を解析したところ、どちらも宿主由来の物質とは異なる作用機序で孵化または誘引現象を引き起こしていることが明らかとなった。

2. 研究の目的

本研究では、これまでに見出されている宿主由来孵化促進物質グリシノエクレピンに加えて、申請者が見出してきた孵化促進物質や誘引物質を用いて、SCN の孵化機構、誘引機構を遺伝子レベルで明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) グリシノエクレピン応答時期の解析

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、SCN 感受性ダイズ(キタムスメ)を宿主として培養したものを使用した。培養により得られた汚染土壌中のシスト数を測定し、十分な密度のシストが存在する土壌を使用した。孵化試験には得られた汚染土壌を半年ほど 4℃ で保存し、休眠状態となった SCN を使用した。

休眠状態となった SCN を含む汚染土壌より分離したシストを顕微鏡下で注射針を用いて卵を取り出した。滅菌水、次亜塩素酸ナトリウムで洗浄後、96 ウェルプレートに1ウェルあたり60-100個程度ずつ分注した。25℃、暗所にてインキュベートし、任意の時間後にグリシノエクレピン A を最終濃度 0.1 nM となるように加えた。孵化したセンチュウ数を毎日計測し、孵化率を算出した。

(2) コンディショニング期間に変動する遺伝子の解析

(1)の結果グリシノエクレピン A 処理前に 25℃、暗所にて3日間インキュベートすることでグリシノエクレピンへの応答が上昇したため、4℃で保存することで休眠状態となったシストから卵を分離後、25℃、暗所にてインキュベートすることをコンディショニングと名付けた。汚染土壌より分離した SCN 卵を 0, 1, 2, 3 日間コンディショニングを行い、RNA を抽出した。バイオアナライザーで RNA の品質をチェック後、市販のキットを用いてライブラリー作成、シーケンシングを行なった。

(3) 誘引時に応答する遺伝子の解析

6 ウェルプレートに寒天培地を加え、そこに硝酸ナトリウムで作った寒天玉もしくは宿主根を設置した。設置場所より 1cm 程度離れた位置に SCN 二期幼虫をまき、根または寒天玉に移動する SCN をサンプリングし RNA 抽出を行なった。その後バイオアナライザーで RNA の品質をチェック後、市販のキットを用いてライブラリー作成、Nextseq によりシーケンシングを行なった。

(4) RNAi による遺伝子発現抑制

in vitro transcription によって作成した dsRNA を soaking 法により SCN に導入した。その後 23% F-127 ゲルを添加した 35mm プレートにレンゲ毛状根を設置し、約 1 cm 離れた場所に摂取した。根の周囲 1.5mm 以内に移動した SCN 数および根に感染した SCN 数を測定した。

4. 研究成果

(1) グリシノエクレピン応答時期の解析

グリシノエクレピンは卵に処理後 2-3 日後に孵化が観察されはじめる。高濃度のグリシノエクレピンを処理した場合でも同様に処理後翌日には孵化は全く観察されなかった。一方で phenanthroline は処理後翌日には孵化率が上昇しはじめる。このことから、グリシノエクレピンは phenanthroline に比べて孵化応答が遅いということが明らかとなった。この孵化応答の遅延は SCN が休眠状態からある程度復帰することが必要でないかと仮説を立て、コンディショニングを行なった後にグリシノエクレピンを処理し、その応答を観察したところ、コンディショニング 2 日目以降ではグリシノエクレピン処理後翌日の孵化が観察された。またコンディショ

ニングをせずにグリシノエクレピンを1日間のみ処理した場合は、SCN の孵化は見られなかった。さらに、コンディショニング期間を延ばすことでグリシノエクレピンへの応答が向上したことから、SCN の孵化に関して以下のような知見を得ることができた。

コンディショニングを行っていない SCN 卵はグリシノエクレピンに応答することができず、25 暗所で1-2日間以上インキュベート(コンディショニング)することで応答が可能となる。

休眠状態の卵はコンディショニングによってグリシノエクレピンを認識可能となるが、最適なコンディショニング期間には個体ごとにばらつきが大きいため、コンディショニング期間を延ばすことによって孵化を同調させることができる。

(2) コンディショニング期間に変動する遺伝子の解析

コンディショニングによるグリシノエクレピン応答の向上にはコンディショニング期間中の遺伝子発現変動が影響している可能性を考え、コンディショニング時における変動遺伝子の発現解析を行なった。まず、孵化直前に発現量が上昇する事が知られているプロテアーゼ遺伝子について発現量を定量したところ、コンディショニング期間を長くする事で発現量の増加が観察されたことから、コンディショニングがSCNにとって孵化に重要な過程である事が明らかとなった。また、RNAseqによりコンディショニング時に発現量が変化する遺伝子を探索した結果、100以上の遺伝子がコンディショニングにより増加していた。

(3) 誘引時に応答する遺伝子の解析

宿主への誘引行動中には宿主認識に関与する遺伝子が発動していると考えられる。しかし、同時に行動にエネルギー消費など、宿主認識とは関係なく行動に関係する遺伝子群の変動も観察されるため、その中から宿主特異的認識に関する遺伝子の取得は困難であると考えられた。そのため、宿主根への誘引時のSCNに加え、宿主認識とはメカニズムの異なる硝酸イオンへの誘引時における遺伝子発現変動を測定し、それを比較する事で宿主特異的認識に関わる遺伝子の取得を試みた。RNAseqを行なったところ宿主根誘引時には110個の上昇遺伝子、130個の減少遺伝子を、硝酸イオンへの誘引時には25個の上昇遺伝子、112個の減少遺伝子を見出すことができた。その中で宿主根誘引時のみに有意に発現上昇が起こる遺伝子に着目したところ、神経伝達に関与する遺伝子を複数見出すことができた。これらの遺伝子の中には*C.elegans*において誘引に関与する事が示されている遺伝子も含まれていた。

(4) RNAiによる遺伝子発現抑制

宿主根誘引時のみ発現上昇する遺伝子のうち、神経伝達に関わると考えられる遺伝子に関してRNAiによる遺伝子機能抑制を試みた。作成したdsRNAをSCN二期幼虫にソーキングし、発現量を確認したところ7遺伝子について発現抑制する事ができた。これらのSCN二期幼虫を用いて誘引試験を行なったところ、4遺伝子で誘引率の有意な低下を観察する事ができた。これらの遺伝子の中でもっとも誘引率を低下させた受容体型グアニル酸シクラーゼ(rGCY)についてさらに解析を行なった。まず誘引試験後、根へ侵入した個体数を確認したところ、誘引率と同様の傾向で減少していた。さらに宿主根に沿うようにSCNを接種したところ、根へ侵入した個体数に変化は見られなかったことから、誘引試験時の侵入個体の減少は根への侵入を抑制されたからではなく根への誘引が減少したためであると示唆された。また口針の突出やSCNの動きにも影響しておらず、rGCYの遺伝子発現抑制はSCNの動きや感染には直接影響せず、誘引行動のみを抑制する遺伝子である事が明らかとなった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 細井昂人、内山博允、佐々木康幸、矢嶋俊介、伊藤晋作
2. 発表標題 ダイズシストセンチュウの宿主認識に関する遺伝子の探索
3. 学会等名 2019年度日本線虫学会第27回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 青木健悟、細井昂人、矢嶋俊介、佐々木康幸、伊藤晋作
2. 発表標題 ダイズシストセンチュウにおけるGEIによる孵化応答時期の探索
3. 学会等名 2019年度日本線虫学会第27回大会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

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