

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 9 月 16 日現在

機関番号：23803

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2020～2021

課題番号：20K22568

研究課題名(和文) マイクロトムを用いたシストセンチュウ孵化促進化合物の生合成経路・遺伝子の解明

研究課題名(英文) Elucidation of the biosynthetic mechanism of solanoeclepinA, cyst nematode hatching inducer

研究代表者

岡本 拓実 (Okamoto, Takumi)

静岡県立大学・薬学部・研究支援員

研究者番号：90885245

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：Solanoeclepin Aの生合成遺伝子・経路を解明するために、ナス科植物のモデル植物であるMicro-Tomを用いたジャガイモシストセンチュウ孵化活性試験系を確立した。また、Micro-Tomの変異誘導系統群に対する孵化活性試験を行ったところ、野生株と同程度の孵化活性を示した高孵化系統群を15系統、ネガティブコントロールと同程度の孵化活性を示した低孵化系統群を20系統見出すことに成功した。これら2系統群の網羅的なゲノム比較解析を行ったところ、低孵化系統群特異的に変異が導入されている遺伝子155個を見出すことに成功した。さらに、生合成重要中間体の推定に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ジャガイモシストセンチュウはナス科植物特異的に寄生する植物寄生性線虫の一種である。これは世界中のナス科植物へ多大な被害を及ぼしており、日本においても多くの被害が報告されている。Solanoeclepin Aはジャガイモシストセンチュウの強力な孵化誘因物質として同定されているが、植物体から単離すること、有機化学的な全合成どちらも非常に困難であることが知られている。そのため、生合成遺伝子・経路を解明することは、様々な面において有意義となる。そこで、本研究はsolanoeclepin Aの生合成研究の礎となりうる結果が得られたことから、植物保護などに対して大きな一歩となると考えられる。

研究成果の概要(英文)：To elucidate the biosynthetic gene and pathway of Solanoeclepin A, we established a potato cyst nematode hatching activity test system using Micro-Tom, a model eggplant plant. We also tested the hatching activity of mutation-induced lines of Micro-Tom, and succeeded in finding 15 lines with high hatching activity comparable to that of WT and 20 lines with low hatching activity comparable to that of the negative control. Comprehensive comparative genomic analysis of these two groups of strains revealed 155 genes that were specifically mutated in the low-hatching group. In addition, we succeeded in the estimation of important biosynthetic intermediates.

研究分野：植物天然物化学

キーワード：ジャガイモシストセンチュウ 天然物化学 マイクロトム バイオインフォマティクス

1. 研究開始当初の背景

ジャガイモシストセンチュウ (**Potato Cyst Nematode, PCN**) はナス科植物特異的に寄生する植物寄生性線虫の一種である。日本では地域限定的ではあるが、**1970** 年代から **PCN** による被害が確認されており、多大な被害がもたらされている。対して、多くの研究者が **PCN** の防除法の開発に尽力しているが、**PCN** の特徴でもあるメスの死骸からできるシストと呼ばれる強固な殻が原因で完全な防除が達成されていない。

PCN の強力な孵化誘因物質として、**solanoeclepin A** という化合物がジャガイモの根から単離された。しかしながら、それは **700** 株のジャガイモを使った抽出物から **245 μg** しか単離できなかったため、生合成の解明、または有機化学的な全合成の達成が期待された。そのような中、北海道大学の谷野らによって **solanoeclepin A** の有機化学的な全合成が達成された。しかしながら、その必要工程数は **52** 工程、最終収率は **0.18%** と非常に困難な全合成となったため、この手法を用いた **solanoeclepin A** の供給は現実的ではないとされている。さらに、生合成研究に関しては、生合成中間体だけでなく、関与していると考えられる酵素においても未だに発見されていない。

2. 研究の目的

ナス科植物のモデル植物である **Micro-Tom** を植物材料にして、*in silico* 解析を用いた網羅的ゲノム解析を行うことによって、**solanoeclepin A** の生合成遺伝子・経路を推察し、最終的には同定する。

3. 研究の方法

植物材料としては、実験室環境でも管理しやすく、水耕栽培が可能である点を考慮し、ナス科植物のモデル植物である **Micro-Tom** を用いた。しかしながら、**Micro-Tom** を用いた **PCN** 孵化実験は報告例がないため、水耕栽培の後に得られる水耕液を用いた孵化実験系の確立を試みた。また、エチルメタンサルホン酸によって変異誘導された **Micro-Tom** を用いた孵化実験によって、**PCN** を孵化させる点において評価を行った。さらに、ここで選抜された系統群のバルク DNA を用いて **HiSeq X** による網羅的なゲノム解析を実施した。得られたシーケンスデータを **QTL-seq** 法に供することによって、特定の **SNPs** を見出し、**PCN** の孵化ひいては **solanoeclepin A** の生合成に関わっている遺伝子の選抜を行った。

4. 研究成果

(1) 孵化活性試験系の確立

Micro-Tom を実験室環境で水耕栽培するために、**50 mL** の遠沈管にて水耕栽培を行った。その際、水中における藻の発生を抑えるために、遠沈管をアルミホイルで遮光し、植物体の支持体としてスポンジを用いた。**Micro-Tom** の水耕栽培期間を **1** 週間と **2** 週間、**PCN** の水耕栽培液中での培養期間を **1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8** 週間の計 **16** パターンについて **PCN** の孵化率を測定した。その結果、栽培 **1** 週間の水耕液を用いた際は **PCN** の培養期間を長くしても孵化率の上昇は見られないのに対して、栽培 **2** 週間の水耕液を用いた際には、**PCN** を **2** 週間水耕液で培養した時に孵化率が急激に上昇し、その後は変化が見られなかった。そのため、本研究課題では **Micro-Tom** を **2** 週間水耕栽培し、その際に得られる水耕液を使用して、**PCN** を **2** 週間培養することで簡便に **PCN** の孵化活性を測定できる系を確立した。

(2) 変異誘導系統を用いた孵化活性試験および網羅的なゲノム解析

(1) で見出した実験系を用いてエチルメタンサルホン酸によって変異誘導された系統を用いた孵化実験を試みた。その結果、ポジティブコントロールである **WT** と同程度の孵化率を示し、ネガティブコントロールである水道水の孵化率に対して有意な差を示した **15** 系統を見出し、水道水の孵化率と同程度であり、**WT** に対して有意に孵化率が低下している **20** 系統を見出した。これらをそれぞれ高孵化系統群、低孵化系統群とし、**2** つの系統群のバルク DNA を網羅的に解析し、それらを比較することで、低孵化系統群特異的に存在している変異領域が **solanoeclepin A** の生合成に関与していると考え、**HiSeq X** または **QTL-seq** 法に供した。その結果、**166** 個の変異領域とそれに伴う **155** 個の候補遺伝子を見出すことに成功した。

(3) **solanoeclepin A** 生合成遺伝子・経路の推定

Solanoeclepin A はその構造的特徴から植物ステロイドを経由して生合成されていると考えられる。植物の中で生合成されているステロイドの重要出発化合物として **2, 3-oxidosqualene** が知られており、そこから **lanosterol, cycloartenol, -amyrin** の **3** つに生合成が分岐する。つまり、**solanoeclepin A** のこの **3** つのうちどれかを経由していると考えられる。**Solanoeclepin A** は植物体の根で生産されていると考えられているので、根における **lanosterol, cycloartenol, -amyrin** のそれぞれの生合成遺伝子の発現解析を行った。その結果、**cycloartenol** の生合成遺伝子である **CAS1** が最も根での発現が強かった。また、先行研究において、**cycloartenol** を用いた有機化学的な合成研究によって、**solanoeclepin A** の化学骨格の特徴でもある部分の合成に成功

している。これらのことから、**solanoclepin A** は **cycloartenol** を経由して生合成されていることが示唆された。また、**cycloartenol** から **solanoclepin A** へ生合成されるのに妥当な生合成中間体を予測し、それらに関わるであろう遺伝子の推定にも成功した。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 岡本拓実、岸本真治、渡辺賢二
2. 発表標題 シストセンチュウ孵化誘引物質solanoeclepinAの生合成機構の解明
3. 学会等名 日本生薬学会 第67年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 岡本拓実、岸本真治、渡辺賢二
2. 発表標題 シストセンチュウ孵化誘引物質solanoeclepinAの生合成機構の解明
3. 学会等名 第23回天然薬物の開発と応用シンポジウム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 岡本拓実
2. 発表標題 Elucidation of the biosynthetic mechanism of solanoeclepinA, cyst nematode hatching
3. 学会等名 第17回日本ナス科コンソーシアム年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 岡本拓実、岸本真治、渡辺賢二
2. 発表標題 網羅的ゲノム解析によるシストセンチュウ孵化誘引物質solanoeclepinA生合成機構の解明
3. 学会等名 日本農芸化学会 2022年度京都大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 岡本拓実、岸本真治、渡辺賢二
2. 発表標題 網羅的ゲノム解析によるシストセンチュウ孵化誘引物質solanoeclepinA生合成機構の解明
3. 学会等名 日本薬学会 第142年会
4. 発表年 2022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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------