

令和 6 年 6 月 7 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21H02132

研究課題名（和文）ジャガイモシストセンチュウに対する新奇孵化促進物質の同定と生合成の解明

研究課題名（英文）Identification of a novel hatching factor for potato cyst nematode and characterization of its biosynthesis

研究代表者

水谷 正治（Mizutani, Masaharu）

神戸大学・農学研究科・教授

研究者番号：60303898

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,400,000円

研究成果の概要（和文）：ジャガイモシストセンチュウ（PCN）は、世界中で甚大な作物被害をもたらしている。PCN卵の孵化には、宿主植物の根から分泌される孵化促進物質（HF）が必要である。ジャガイモから単離されたソラノエクレピンA（SEA）は、PCNに対して最も活性なHFであるが、その生合成は全く不明であった。我々は、新規HFとしてソラノエクレピンB（SEB）を単離構造決定し、SEBが植物体内で生合成され、土壌微生物によりSEAへ変換されることを示した。さらに、トマトから5つのSEB生合成遺伝子を同定した。各遺伝子を破壊したトマト毛状根からの滲出液はSEBを含まず、PCNに対する孵化刺激活性も低かった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により孵化促進物質を生産せずシストセンチュウを孵化させない新たな品種の育成への道を切り開くことができる。またさらに生合成遺伝子を明らかにすることで、孵化促進物質を多量に異種生産させることが可能となり、宿主不在時にシストセンチュウを孵化させて餓死させる自殺孵化剤として利用できる可能性がある。本研究成果は、地球規模で食糧生産を損なっているジャガイモシストセンチュウ類による被害を軽減し、作物の生産能力を十分に発揮させる研究へと発展できると期待される。

研究成果の概要（英文）：Potato cyst nematode (PCN) causes extensive crop losses worldwide. Because the hatching of PCN eggs requires host-derived molecules known as hatching factors (HFs), regulating HF production in host plants helps to control this harmful pest. Solanoeclipin A (SEA), isolated from potato, is the most active HF for PCN; however, its biosynthesis is completely unknown. We discovered a novel HF named solanoeclipin B (SEB) and showed that it was biosynthesized in the plant and converted to SEA outside the plant. Moreover, we identified five SEB biosynthetic genes from tomato. Exudates from tomato hairy roots in which each of the genes was disrupted contained no SEB and had low hatch-stimulating activity for PCN. These findings will help to breed crops with a lower risk of PCN infection.

研究分野：植物天然物化学

キーワード：シストセンチュウ ジャガイモ トマト 孵化促進物質 ソラノエクレピン ノルトリテルペノイド

1. 研究開始当初の背景

植物寄生性線虫は最も有害な害虫の一つであり、作物生産に与える被害額は年間 800 億米ドルと推定されている。Globodera と Heterodera からなるシストセンチュウは、根寄生線虫の中で最も経済的に重要な種の一つである。ネコブセンチュウなど他の植物寄生性線虫が様々な植物種に寄生するのに対し、シストセンチュウの多くは寄主範囲が限られている。例えば、ジャガイモやトマトなどのナス科植物にのみ寄生するジャガイモシストセンチュウ (PCN : *Globodera rostochiensis* および *Globodera pallida*) や、マメ科植物にのみ寄生するダイズシストセンチュウ (SCN : *Heterodera glycines*) などがある。PCN は世界のジャガイモ生産の9%に影響を与えると推定され、SCN は年間 15 億米ドル以上の収量損失をもたらす。シスト線虫の被害を克服する能力は、安定した持続可能な農業生産に必要なである。

シストセンチュウの生活環 (図1) は、宿主植物のライフサイクルと非常に同調している。シストセンチュウの生活環は4つの幼虫期と1つの成虫期に分けられ、これらの段階は脱皮によって区切られる。第2段階の幼虫 (J2) は唯一の感染ステージである。J2 は土壌中を移動して宿主植物の根に寄生する。宿主植物から養分を奪って成長し、第3幼虫期 (J3)、第4幼虫期 (J4) と脱皮を繰り返し、成熟した成虫期に達する。受精後、雌は死んで体が硬化し、

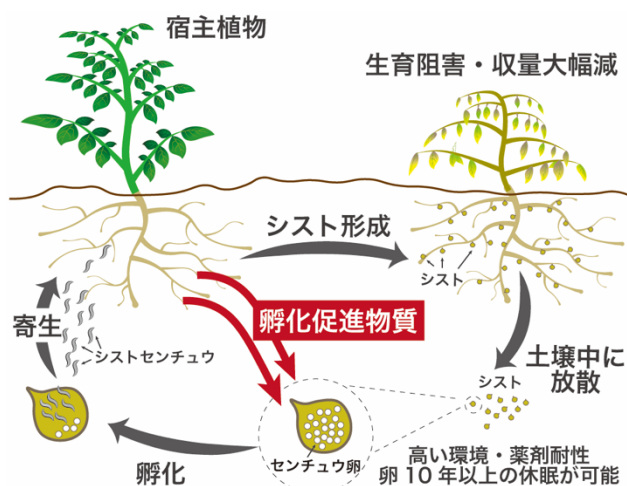


図1. シストセンチュウの生活環

数百個の次世代卵を包むシストを形成する。これらのシストはやがて根から離れ、作物が収穫された後も土中に残る。シスト内の卵の中で第1段階の幼虫 (J1) が発育し、脱皮して J2 に達し、次の宿主植物が近くに現れるまで休眠する。シストは卵を乾燥、寒冷、殺虫剤から守るため、J2 幼虫は休眠状態で最長 20 年間孵化せずに生き延びることができる。宿主植物が近くに生育すると、宿主の根から分泌される孵化因子 (HF) と呼ばれる特定の化合物に反応して卵の中の J2 が孵化し、次のサイクルが始まる。このように、孵化はシストセンチュウの生活環における重要なイベントであり、HF はシストセンチュウ防除の重要な標的となっている。

HF に応答して孵化するという現象を 1982 年に初めて化学的に証明したのが北海道大学の正宗らである。正宗らは 100 キログラム以上のインゲン豆の乾燥根から SCN に対する HF としてグリシノエクレピン A (GEA) を単離・構造決定した。1985 年に GEA と構造の類似したグリシノエクレピン B (GEB) とグリシノエクレピン C (GEC) が単離構造決定された。ソラノエクレピン A (SEA) は、1990 年代にジャガイモの根滲出液から単離された PCN に対する高活性 HF である。2011 年に北海道大学の谷野らによって SEA の不斉全合成が達成され、1 ppb レベルのごく低濃度で PCNs の孵化を誘導するきわめて高活性な HF であることが証明された。さらに最近では、ジャガイモのほか、トマトなどいくつかのナス科植物の根滲出液から SEA が同定された。対照的に、水耕栽培されたトマトや土壌栽培されたジャガイモの研究では、SEA だけでは PCN の孵化刺激活性のすべてを説明できないことが示されている。このように、HF には不明な点が多い。

2. 研究の目的

シストセンチュウ孵化促進物質の発見および全合成は日本発の重要な研究成果であり、その成果を本研究により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。本研究は、天然物化学的手法と分子生物学的手法の2つの手法を同時並行して進めることにより、以下の2つの目的を達成することである。

目的① ジャガイモシストセンチュウに対する新奇 HF を単離精製し構造決定する。

目的② HF 生合成遺伝子を同定し、HF 生合成経路を明らかにする。

さらに、上記2つを達成することにより、以下の発展的な目的の達成を目指す。

目的③ これらの情報を PCN に対する新奇防除技術の開発に応用する。

目的④ 植物自身に対する HF 化合物の生理機能を解明する。

本課題は、目的①新奇 HF の単離同定と目的②生合成系の解明を同時に達成することを目指す挑戦的な課題である。また、生合成酵素を遺伝子破壊して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（目的③）。さらに、孵化促進物質を欠損した植物を解析することにより、植物自身に対する植物生理学的役割の解明が期待できる（目的④）。

3. 研究の方法

ジャガイモ水耕栽培の条件

様々な品種のジャガイモ約 5,000 株を北海道種苗管理センターの水耕栽培施設で栽培した。

シストセンチュウ卵の孵化アッセイ

G. rostochiensis 病原型 Ro 1 または *G. pallida* 病原型 Pa 3 のシスト卵の懸濁した懸濁液 1ml をガラスバイアルに加え、濃度の異なる各サンプル 1ml を加えた。各バイアルは 18°C で約 2 週間培養した後、各バイアルから 1ml を取り出し、シラキユースディッシュに移し、孵化した幼虫と未孵化卵を双眼顕微鏡でカウントした。陰性対照には蒸留水、陽性対照には合成 SEA を用いた。

孵化促進物質の精製

様々な品種のジャガイモ約 5,000 株を上記の水耕栽培施設に 3 L の Sepabeads SP207（三菱化学株式会社）をプラスチックカラムに入れて設置し、活性物質を吸着した約 60 L の SP207 を回収した。SP207 からメタノールで活性物質を溶出し、各種カラムクロマトグラフィーにより部分精製した活性画分（48 mg）を得た。これを 100 μ l の 5%(v/v)アセトニトリル水溶液に溶解し、逆相 HPLC に供試した。HF は2つの画分に回収され、さらに、順相 HPLC に供試し、最終的に、新規 HF 化合物を精製し、その分子式は C₂₇H₃₂O₉ と決定された。さらに再度精製を行い、最終的に NMR により構造を決定した。

SEB 生合成候補遺伝子の選抜およびゲノム編集による破壊

SEB 生合成には多数の酸素添加酵素が関与すると推定されたため、根で特異的に発現するジオキシゲナーゼ（DOX）およびシトクロム P450（CYP）を選抜した。さらに CRISPR/Cas9 法によるゲノム編集によりこれらの候補遺伝子を破壊したトマト毛状根を作成し、その培養液の孵化活性を評価するとともに、SEB を分析した。

土壌中での SEB 代謝変

SEB 標品およびトマト毛状根培養液を土壌中で 1 週間放置し、その滲出液を LCMS により分析した。

4. 研究成果

まず初めに、ジャガイモ根滲出液中に SEA が存在することを確認するとともに SEA 以外の HF の存在を明らかにすることを目的として研究を進めました。約7万リットルのジャガイモ水耕栽培廃液を合成樹脂に通過させ、吸着された化合物を様々な手法で分画・精製していきましました。分画したサンプルを PCN 卵に処理し、孵化が確認されたサンプルをさらに分画するというバイオアッセイを繰り返り、HF を精製していきましました。最終的に二つの HF の精製に成功し、そのうち一つが SEA であることが明らかになりました。

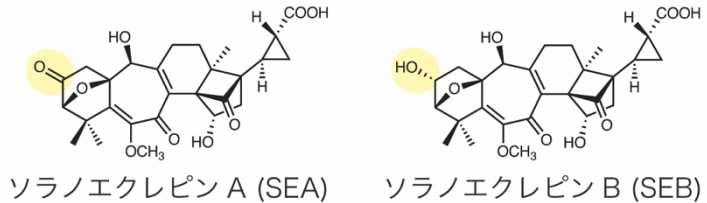


図 2. 孵化促進物質の構造

もう一方の HF を精密質量分析および NMR を用いて構造解析を行った結果、SEA と類似した構造であることが明らかとなり、その化合物をソラノエクレピン B (SEB) と命名しました (図 2)。さらに、SEB は土壤中の微生物により SEA へ変換されることを明らかにしました。

次に、培養および形質転換が容易なトマト毛状根を使って HF の分析を行いました。その結果、トマト毛状根の培養液中には SEA は検出されず SEB のみが検出されました。無菌のトマト毛状根培養液から SEB が検出されることから、SEB は植物自身が生合成する化合物であることを明らかにしました。そこで、トマト毛状根を用いて SEB 生合成遺伝子を探索することにしました。トマト毛状根を様々な条件で培養し、HF 生産量が変化する条件を複数見出し、その変化と遺伝子発現が同調する遺伝子を候補遺伝子として選抜しました。ゲノム編集技術を用いてそれらの遺伝子のノックアウト毛状根を作成し、培養液中の SEB の分析を行った結果、5 つの遺伝子 (SOLA1~5) のノックアウト毛状根培養液中からは SEB が検出されなかったことから、SOLA1~5 が SEB 生合成遺伝子であることを明らかとしました

(図 3)。さらに、これらの遺伝子ノックアウト毛状根の培養液は非ノックアウト体と比べて PCN に対する孵化促進活性が顕著に低いことが確認されました (図 3)。本研究から、SEB 生合成酵素遺伝子をノックアウトすることにより、PCN の孵化を抑制し、被害を軽減できる可能性が示されました。

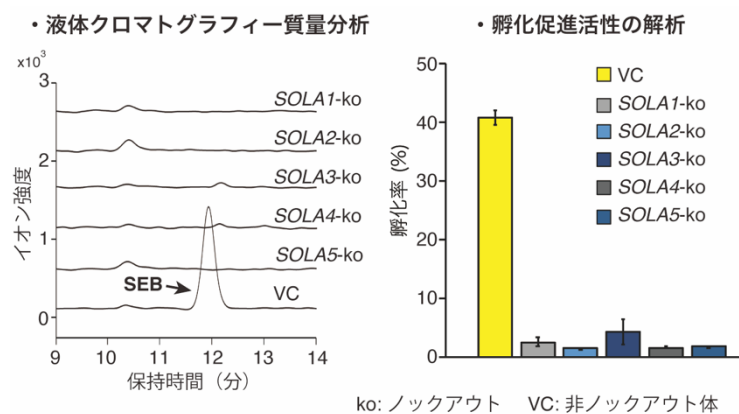


図 3. SOLA 遺伝子ノックアウト毛状根の解析

開放環境で行われた土壌栽培または水耕栽培されたトマトやジャガイモでは、SEA の検出が報告されている。一方、無菌のトマト毛状根培養液では SEA が検出されなかったことから、SEA の生成には、土壌や水耕栽培液に存在する生物学的因子が関与しているとの仮説を立てた。この仮説を検証するため、SEB 標品を土壌中で7日間培養し、その後、土壌からの水抽出物を UPLC-MS/MS にかけて。この分析の結果、土壌中で7日間培養すると、SEB は完全に消失し、SEA が検出されることがわかった (図 4)。γ線滅菌した土壌では、この

ような変化は観察されなかった。さらに、トマト毛状根の培養液を土壤中で培養すると、培養液中の SEB は消失し、代わりに SEA が検出された。これらの結果は、SEB が SEA の直接的な前駆体であり、SEB から SEA への変換には植物外の生物学的因子が寄与していることを明確に示している。

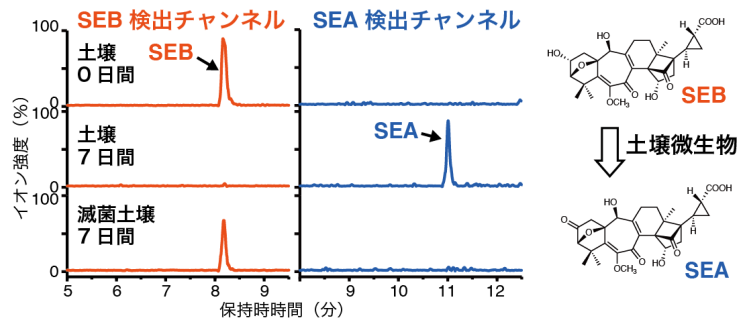


図 4. SEB の土壤中での変換実験

さらに、5つの SEB 生合成遺伝子のゲノム編集毛状根の培養液を土壤に散布し、7日間培養した後、その水抽出液を UPLC-MS/MS を用いて分析した。対照毛状根由来の抽出液からは SEA が検出されたが、5つの変異体由来の抽出液からは検出されなかった。これらの結果は、同定されたすべての遺伝子 (SOLA1-5) が土壤中の SEA 産生に関与しており、土壤培養中に SEB が生物学的因子によって SEA に変換されたことを示している (図 5)。

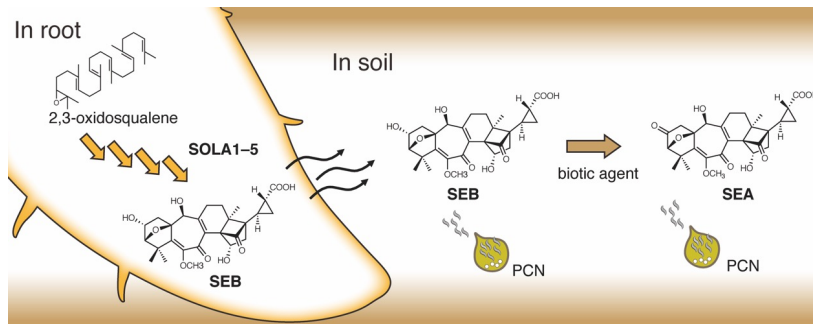


図 5. SEB 生合成と土壤微生物による SEB から SEA への代謝変換

これらの成果は、ソラノエクレピン生合成遺伝子を破壊することで、PCN の孵化を大幅に減少させることができることを示している。この研究成果は、低濃度の HF を産生する作物を育種することにより、線虫被害を防止する新たな防除法の開発を支持するものである。同時に本研究は、ノルトリテルペノイド型 HF の生合成と輸送、および、植物自身における生理的役割を研究するための基盤を提供するものである。本研究を通じて、新規 HF が発見され、生合成遺伝子が 5 つ同定された。本研究は新たな HF の同定、さらなる生合成遺伝子の同定につながると期待される。より構造の単純な HF が明らかになれば人工的に合成した HF により宿主不在時に孵化させて餓死させる自殺孵化剤の開発にも繋がる。また、HF 生合成遺伝子の改変により孵化リスク低減作物などの作出に応用できると期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Shimizu Kosuke, Akiyama Ryota, Okamura Yuya, Ogawa Chihiro, Masuda Yuki, Sakata Itaru, Watanabe Bunta, Sugimoto Yukihiro, Kushida Atsuhiko, Tanino Keiji, Mizutani Masaharu	4. 巻 9
2. 論文標題 Solanoeclepin B, a hatching factor for potato cyst nematode	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Science Advances	6. 最初と最後の頁 eadf4166
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1126/sciadv.adf4166	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 秋山遼太、水谷正治	4. 巻 81
2. 論文標題 ジャガイモシストセンチュウ孵化促進物質「ソラノエクレピンB」の発見	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 バイオサイエンスとインダストリー	6. 最初と最後の頁 414-415
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス 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 -

1. 著者名 秋山遼太、水谷正治	4. 巻 56
2. 論文標題 ジャガイモシストセンチュウ孵化促進物質ソラノエクレピンBおよび、その生合成遺伝子の発見	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 作物生産と土づくり	6. 最初と最後の頁 42-45
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 有
オープンアクセス 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 -

〔学会発表〕 計11件（うち招待講演 1件/うち国際学会 3件）

1. 発表者名 Masaharu Mizutani, Ryota Akiyama
2. 発表標題 Solanoeclepin B, a Novel Hatching Factor for Potato Cyst Nematode
3. 学会等名 第59回植物化学シンポジウム（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 秋山遼太、清水 宏祐、坂田至、串田 篤彦、谷野 圭持、杉本 幸裕、水谷 正治
2. 発表標題 シストセンチュウ孵化促進物質の植物生理機能解明を志向した生合成研究
3. 学会等名 植物化学調節学会第58回大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 河野結、秋山遼太、清水 宏祐、坂田至、串田 篤彦、谷野 圭持、杉本 幸裕、水谷 正治
2. 発表標題 ジャガイモシストセンチュウ孵化促進関連物質の構造解析
3. 学会等名 植物化学調節学会第58回大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 秋山遼太、清水 宏祐、串田 篤彦、谷野 圭持、杉本 幸裕、水谷 正治
2. 発表標題 トマト毛状根を用いたソラノエクレピンB生合成遺伝子の同定
3. 学会等名 第40回日本植物バイオテクノロジー学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Ryota Akiyama, Masaharu Mizutani
2. 発表標題 Solanoeclepin B, a hatching factor for potato cyst nematode
3. 学会等名 The 24th International Conference on Plant Growth Substances (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 清水宏祐、秋山遼太、増田裕貴、坂田至、串田篤彦、谷野圭持、刑部敬史、渡辺文太、杉本幸裕、水谷正治
2. 発表標題 ジャガイモシストセンチュウに対する新規孵化促進物質およびその生合成遺伝子の同定
3. 学会等名 植物化学調節学会第57回大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Ryota Akiyama, Kosuke Shimizu, Atsuhiko Kushida, Keiji Tanino, Bunta Watanabe, Yukihiro Sugimoto, Masaharu Mizutani
2. 発表標題 Exploration of novel hatching factor for potato cyst nematode
3. 学会等名 XVII International Conference on the Plant Family of Solanaceae (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 清水宏祐、増田裕貴、岡村勇哉、小川千景、秋山遼太、渡辺 文太、坂田至、串田篤彦、谷野圭持、杉本幸裕、水谷正治
2. 発表標題 ジャガイモ水耕液からのジャガイモシストセンチュウに対する新規ふ化促進物質の同定
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 小川 千景、岡村 勇哉、清水宏祐、坂田至、串田篤彦、谷野圭持、杉本幸裕、水谷正治
2. 発表標題 ジャガイモシストセンチュウふ化促進物質の 活性を増強する共力因子の解析
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 清水宏祐, 増田裕貴, 岡村勇哉, 小川千景, 秋山遼太, 渡辺 文太, 坂田至, 串田篤彦, 谷野圭持, 杉本幸裕, 水谷正治
2. 発表標題 ジャガイモ水耕液からのジャガイモシストセンチュウに対する新規ふ化促進物質の同定
3. 学会等名 日本農芸化学会2022年度京都大会
4. 発表年 2021年～2022年

1. 発表者名 小川千景, 岡村勇哉, 清水宏祐, 坂田至, 串田篤彦, 谷野圭持, 杉本幸裕, 水谷正治
2. 発表標題 ジャガイモシストセンチュウふ化促進物質の 活性を増強する共力因子の解析
3. 学会等名 日本農芸化学会2022年度京都大会
4. 発表年 2021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
研究分担者	串田 篤彦 (Kushida Atsuhiko) (40355459)	国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・北海道農業研究センター・チーム長 (82111)	
研究分担者	坂田 至 (Sakata Itaru) (80807404)	国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・北海道農業研究センター・研究員 (82111)	

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