

令和 6 年 5 月 23 日現在

機関番号：32658

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K05416

研究課題名(和文)ダイズシストセンチュウ防除を目指した宿主認識行動制御技術の確立

研究課題名(英文)Regulation of host recognition for soybean cyst nematode control

研究代表者

伊藤 晋作(Ito, Shinsaku)

東京農業大学・生命科学部・准教授

研究者番号：70608950

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000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の根に寄生する植物寄生線虫の一種である。ダイズシストセンチュウはどのようにして宿主を認識しているのかを明らかにするため、*C. elegans*で化学走性関連遺伝子として知られている遺伝子群に関してRNAiによる機能解析を行った。TAX1, GPA, GCY, GPCRについて検討したところ、これらのシストセンチュウホモログの一部が宿主認識に関与していることを見出した。特にGCYはダイズシストセンチュウだけでなく、ジャガイモシストセンチュウやサツマイモネコブセンチュウにも存在し、宿主認識に機能していることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究ではダイズシストセンチュウの宿主認識機構の解析を行った。これまでに宿主認識にはインゲンが生産するグリシノエクレピンが関与し、ダイズシストセンチュウの孵化を促進することが知られているが、センチュウ側がどのように宿主植物を認識しているかの研究は行われてこなかった。本研究では宿主認識の中でも根への誘引機構に着目し、それに関わる遺伝子の同定を行った。見出した遺伝子はダイズシストセンチュウのみならずジャガイモシストセンチュウやサツマイモネコブセンチュウにも保存されており、様々な植物寄生線虫の宿主認識攪乱剤創製の標的遺伝子となりうる。

研究成果の概要(英文)：Soybean cyst nematode is one of the harmful pests for soybean production. Host root recognition of soybean cyst nematode is strictly regulated by chemicals produced and released from host roots. We used RNAi method to analyze genes related to chemotaxis to identify host recognition genes by soybean cyst nematode, and found some chemotaxis related genes. Especially, GCY is involved in host recognition not only in soybean cyst nematode, but also in potato cyst nematode and root knot nematode.

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 植物寄生線虫 宿主認識 GCY GPCR TAX2 GPA

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

ダイズシストセンチュウは大豆などのマメ科植物を宿主とする植物寄生線虫の一種である。ダイズ生産上最大の減収要因の一つとしても知られており、通常は土壤中で休眠しているため防除の難しい害虫である。ダイズシストセンチュウはダイズなどのマメ科植物が植えられると宿主が生産する物質によって孵化し、根へと移動する。しかし、ダイズシストセンチュウがどのようにして宿主を認識しているのかは明らかとなっていない。我々は、ダイズシストセンチュウが宿主を認識する際に変動する遺伝子を RNAseq により取得してきた。そこでモデル線虫である *Caenorhabditis elegans* において化学走性に関与する遺伝子の一つであるグアニル酸シクラーゼ (GCY) 遺伝子のホモログが宿主認識時に発現上昇すること、RNAi により発現抑制することで宿主への誘引が低下することを見出した。

### 2. 研究の目的

本研究ではダイズシストセンチュウの宿主認識行動を制御することによる新規防除法の確立を目指して、宿主認識に関わる遺伝子の同定およびその機能解析を行うことを目指している。

### 3. 研究の方法

#### (1) RNAi による発現抑制ダイズシストセンチュウの作製

ダイズシストセンチュウ 2 期幼虫より total RNA を抽出後、逆転写し、cDNA を合成した。目的遺伝子配列およそ 500bp 領域を PCR で増幅後 pUC19 にクローニングした。これを鋳型として SP6 promoter 配列を付加したプライマーで PCR 後、in vitro transcription により dsRNA を合成した。合成した dsRNA は 1 mg/mL に希釈し、ソーキングに用いた。ソーキング後の 2 期幼虫から RNA を抽出し、qRT-PCR により遺伝子の発現抑制を確認した。ネガティブコントロールとしては gfp の dsRNA を処理したダイズシストセンチュウを用いた。

#### (2) 誘引試験

根への誘引試験では 6 ウェルプレートに 23% PF-127 ゲルを添加後、根端から 1 cm の根を設置し、ダイズシストセンチュウをそこから 1 cm 離れた地点に接種した。根に接触したダイズシストセンチュウ数を経時的に観察した。硝酸イオンへの誘引試験ではアガロースゲルと PF-127 ゲルを用いて行った。0.8%アガロースゲルを各ウェルに注いだ後、各ウェルの中心から 1.0 cm 離れた平行線の間からアガロースゲルを切り出し、そこに PF-127 ゲルを加えて固化させた。アガロースゲル部の一端に硝酸カリウムを、もう一端に滅菌水を加えた後、ダイズシストセンチュウを接種し移動した数を計測した。

### 4. 研究成果

#### (1) ダイズシストセンチュウ TAX-2 遺伝子の機能解析

*C. elegans* においてさまざまな遺伝子が化学走性に関与していることが知られている。そこで *C. elegans* の化学走性を含むさまざまな行動を制御する TAX-2 遺伝子に着目し、そのダイズシストセンチュウでの機能解析を行った。既存のデータベースでは TAX-2 遺伝子は見つからなかったため、ダイズシストセンチュウゲノムシーケンス (GCA\_004148225) からタンパク質コード領域を推定し、*C. elegans* の TAX-2 と同源性の高いダイズシストセンチュウ TAX-2 (*Hg-tax-2*) 遺伝子配列を得た。RNAi 法により *Hg-tax-2* 遺伝子の発現抑制個体を作製し宿主根への誘引活性と感染率、硝酸イオンへの誘引活性、高温忌避活性を確認したところ、どれも *Hg-tax-2* 遺伝子抑制により、活性が低下していたことから、*Hg-tax-2* はさまざまな化学走性や温度走性を制御する遺伝子であることが明らかとなった。また、*C. elegans* において TAX2 は TAX4 遺伝子と複合体を形成することが示唆されているため、*Hg-tax-4* も RNAi による機能解析を試みたものの、発現抑制が確認できなかった。そのため TAX2 や TAX4 などの cyclic nucleotide-gated (CNG) channel の阻害剤である *L-cis-diltiazem* (LCD) を用いて同様の解析を行なったところ、LCD 処理により *Hg-tax-2* 発現抑制体と同様の表現形であったこと、*Hg-tax-2* 発現抑制体に LCD を処理しても誘引に対する大きな変化はなかったことから、少なくとも *Hg-tax-2* はダイズシストセンチュウの中で化学走性や温度走性に主に働く CNG channel であること、*Hg-tax-4* が化学走性や温度走性に関与する場合、*Hg-tax-2* と同じ経路で機能していることが明らかとなった。

#### (2) ダイズシストセンチュウ GPA 遺伝子の機能解析

GPA も *C. elegans* において化学走性に重要な遺伝子であることから、(1) と同様にダイズシストセンチュウ GPA 遺伝子の機能解析を RNAi により行った。*Hg-GPA* の発現抑制は宿主根への誘引活性、宿主根への寄生や硝酸イオンへの誘引活性を低下させたものの、高温に対する忌避行動には大きな影響を与えなかった。GPA は複数のホモログが存在しているため、クローニングを行い、RNAi によりそれらの解析も行っている。

### (3) ダイズシストセンチュウ GCY 遺伝子の機能解析

これまでの研究により Hg-GCY の発現抑制により、宿主根への誘引が低下することが明らかとなっていた。そこで Hg-GCY 発現抑制体の硝酸イオンへの誘引活性および温度走性への影響を評価した。その結果、Hg-GCY 発現抑制は硝酸イオンへの誘引や温度走性に影響を及ぼさないことが明らかとなった。Hg-GCY は相同性の高い遺伝子が4つ存在するためそれらも RNAi により機能解析を行ったが、Hg-GCY 以外に宿主への誘引活性に影響を及ぼすものはなかった。今後すべての遺伝子を同時に発現抑制することで機能解析を行っていく予定である。

ジャガイモシストセンチュウとサツマイモネコブセンチュウ GCY のオルソログを見出し、RNAi による機能解析を行ったところ、どちらも宿主根への誘引が有意に低下していた。サツマイモネコブセンチュウはこれまでにさまざまな誘引物質が同定されている。そこでこれらの誘引物質の認識における GCY 遺伝子の機能を *Mi-GCY* 発現抑制体を用いて行ったところ、塩や糖、植物ホルモンに対する誘引活性には大きな影響は確認されなかったものの、根から分泌されることが知られている、ポリアミンの一種であるカダベリンへの誘引が大きく阻害された。以上の結果から、サツマイモネコブセンチュウの GCY 遺伝子はポリアミンの認識に関与していることが示唆された。

### (4) Hg-GCY 遺伝子発現細胞の作製と Hg-GCY アゴニストの選抜

Hg-GCY は受容体型グアニル酸シクラーゼをコードしている。受容体型グアニル酸シクラーゼは創薬標的としても知られており、受容体部位にリガンドが結合することでグアニル酸シクラーゼが活性化し、細胞内の cGMP 量が増加する。Hg-GCY は宿主認識には機能するものの、硝酸イオンへの化学走性や高温に対する温度走性には影響しないことから、Hg-GCY の機能制御は宿主認識攪乱剤として利用できると考えた。そこで *Hg-GCY* を動物細胞で高発現させ、cGMP 量を変動させる化合物のスクリーニングを行うこととした。HEK293 および CHO 細胞に *Hg-GCY* を導入し、安定発現株の選抜を行ったところ、HEK293 細胞に *Hg-GCY* を導入した株で安定発現が確認できた。そこで cGMP 量を変化させる化合物の選抜を行った。現在 2000 化合物を選抜したところであるが、細胞内 cGMP 量を変動させる複数の化合物を見出すことができた。これらの化合物は通常の HEK293 細胞やヒト受容体型グアニル酸シクラーゼを過剰発現させた HEK293 細胞の cGMP 量は変化させないことから Hg-GCY に対して作用していると予想された。今後得られた化合物のダイズシストセンチュウ誘引活性などを検討していく。

### (5) 宿主誘引に機能するダイズシストセンチュウ GPCR 遺伝子の探索

*C. elegans* では多くの誘引物質は GPCR によって受容される。そこで宿主誘引に関与する GPCR の探索を行った。以前行った宿主根への誘引時に変動する遺伝子から GPCR を探索したところ、誘引時に発現上昇する遺伝子中に3つの GPCR を見出した。これらの GPCR を RNAi により機能解析を行ったところ、2種類の GPCR の発現抑制は宿主誘引に対して影響は観察されなかったものの、一つの GPCR の発現抑制で宿主誘引が有意に低下しており、硝酸イオンへの化学走性や高温への忌避活性には影響を示さなかった。現在詳細な機能を解析するために全長をクローニング後、動物細胞への発現を試みている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 0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 Saeki Yasumasa, Hosoi Akito, Fukuda Junta, Sasaki Yasuyuki, Yajima Shunsuke, Ito Shinsaku	4. 巻 682
2. 論文標題 Involvement of cyclic nucleotide-gated channels in soybean cyst nematode chemotaxis and thermotaxis	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 293 ~ 298
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2023.10.029	査読の有無 無
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18件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 伊藤晋作
2. 発表標題 植物寄生線虫のレジリエンス
3. 学会等名 日本農芸化学会2024年度大会（招待講演）
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 佐伯靖将、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を制御する受容体型グアニル酸シクラーゼ
3. 学会等名 日本昆虫学会第84回大会・第68回日本応用動物昆虫学会合同大会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 福田 純太、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TRP-Vチャネル阻害剤の探索
3. 学会等名 日本昆虫学会第84回・第68回日本応用動物昆虫学会合同大会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 佐伯靖将、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化学走性を制御するGタンパク質
3. 学会等名 日本農芸化学会2024年度大会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 福田 純太、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温度走性攪乱物質の探索
3. 学会等名 日本農芸化学会2024年度大会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 佐伯靖将、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行動を制御する遺伝子の機能解析
3. 学会等名 2023年度日本線虫学会第30回大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 福田 純太、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における温度センシング遺伝子の解析
3. 学会等名 2023年度 日本線虫学会第30回東京大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 佐伯靖将、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化学走性と温度走性を制御する環状GMP依存チャネルの機能解析
3. 学会等名 日本農芸化学会関東支部2023年度大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 福田 純太、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におけるTRP-Vチャネルの機能解析
3. 学会等名 日本農芸化学会関東支部2023年度大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 佐伯靖将、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 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 日本農芸化学会関東支部2022年度大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 佐伯靖将、細井昂人、内山博允、澤進一郎、佐々木康幸、矢嶋俊介、伊藤晋作
2. 発表標題 植物寄生線虫の宿主認識に関する遺伝子の探索と機能解析
3. 学会等名 日本線虫学会 第29回大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 佐伯靖将、清水七海、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新規孵化阻害物質の探索
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 佐伯靖将、細井昂人、内山博允、澤進一郎、佐々木康幸、矢嶋俊介、伊藤晋作
2. 発表標題 植物寄生線虫の宿主誘引に關与する遺伝子の探索
3. 学会等名 第67回日本応用動物昆虫学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 佐伯靖将、細井昂人、内山博允、澤進一郎、佐々木康幸、矢嶋俊介、伊藤晋作
2. 発表標題 植物寄生線虫の宿主誘引に關与する遺伝子の機能解析
3. 学会等名 日本農芸化学会2023年度大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 佐伯靖将、細井昂人、内山博允、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の宿主認識に關与する遺伝子の探索と機能解析
3. 学会等名 日本農芸化学会関東支部2021年度大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 佐伯靖将、細井昂人、内山博充、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と機能解析
3. 学会等名 2021年度 日本線虫学会 第28回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 佐伯靖将、細井昂人、内山博充、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の宿主認識に関する遺伝子の機能解析
3. 学会等名 日本農薬学会第47回大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 佐伯靖将、細井昂人、内山博充、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誘引に関する遺伝子の探索
3. 学会等名 日本農芸化学会2022年度大会
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
---------	---------