

研究終了報告書

「シストセンチュウ孵化促進物質生合成の解明と新奇防除法への応用」

研究期間：2021 年 10 月～2024 年 3 月

研究者：秋山 遼太

1. 研究のねらい

植物の根に寄生して栄養分を奪い生育する植物根寄生性線虫は作物の大幅な減収を引き起こすため、世界中で農業に深刻な被害を与えており、その被害額は年間 800 億米ドルにのぼると試算されている。その中で、特に甚大な被害をもたらしている線虫種としてシストセンチュウが挙げられる。シストセンチュウは他の線虫種と比べ宿主特異性が高く、ダイズシストセンチュウ (Soybean Cyst Nematodes: SCNs) の宿主はダイズ、アズキ、インゲンにほぼ限られ、ジャガイモシストセンチュウ (Potato Cyst Nematode: PCN) はジャガイモやトマトなどのナス属植物に寄生する。PCN はジャガイモの最重要害虫であり、PCN の被害により世界中のジャガイモの総生産量の 10% もの損失が起こっていると試算されている。しかしながら、シストセンチュウの特徴的な生活史のため有効な防除法は確立されていない。持続可能な開発目標 (SDGs) の達成にはシストセンチュウ被害の克服は必須である。しかしながら、PCN の独特な生活環が防除を困難にしている (図 1)。寄生後、成熟した雌成虫は交尾を終えると自身の体内に数百個の卵を産み、死亡後に外皮が硬化してシスト (硬い殻) となります。このシストは低温や乾燥、殺線虫剤などに高い耐性を有しており、宿主植物が枯死した後も土壤中に留まり続ける。この安全なシストの中で卵は宿主相手の植物が近くに現れるまで 10 年以上休眠状態のまま生き続ける。宿主植物が現れると、その根から分泌される孵化促進物質 “Hatching Factor (HF)” に応答して一斉に孵化し、寄生を達成する。この HF は PCN 防除の鍵となるため、古くから研究が行われてきた。例えば、人工的に合成あるいは収集した HF を使って宿主作物が無い時期に線虫を孵化させ、餓死させる方法や、宿主作物における HF 生産を制御することで、栽培中に孵化が起こらないようにする防除法が考えられる。しかし、HF の天然の存在量は非常に微量なためにその研究は難航し、1990 年代に HF としてソラノエクレピン A (SEA) が発見されて以降、HF の検出の報告例さえ存在しなかった。本研究では HF 生合成遺伝子を同定し、HF 生合成経路を明らかにすること、さらにその知見を発展させ、HF を分泌しない (線虫を孵化させない) 新奇防除技術の開発に応用することを目的としている。

2. 研究成果

(1) 概要

研究開始時点で、以下の3点を明らかにしていた。①ジャガイモ水耕液中から HF の精製を行ない、SEA とは異なる新規孵化促進物質が存在することを明らかにした。②トマト毛状根培養液からは比較的容易 (100 ml 程度の培地から) に上記の新規孵化促進物質が検出できることを明らかにした。③トマト毛状根を用いて HF 生合成への関与が示唆される遺伝子を 5 つ単離した。本研究期間において新規深促進物質の構造を決定し、ソラノエクレピン B (SEB) と命名した。また、トマト毛状根を用いて上記 5 つの遺伝子が SEB の生合成に関与することを明らかにし、これらの遺伝子をノックアウトすることによりシストセンチュウの孵化を抑制できることを実証した。さ

らに、SEB 純品を用いて SEB が土壌微生物によって SEA へと変換されることを明らかにした。以上の内容について、2023 年 3 月に Science Advance 誌にて報告し(主な研究成果リスト 1)。続いて、HF 生産が変動する条件を明らかにするためにトマト毛状根および水耕トマトにおいて各種の植物ホルモンの投与や様々な栄養条件での栽培を行った。その結果、トマト毛状根ではジャスモン酸、オーキシシン、アブシジン酸それぞれの処理によってこれまでに同定した HF 生合成遺伝子の発現量が低下すること明らかになった。研究代表者はこれまでに 5 つの HF 生合成遺伝子を同定しているが、まだ数多くの未同定な生合成遺伝子が存在すると予想される。そこで、HF 生産が増減するような各種条件の比較とランスクリプトームを行い、候補遺伝子を選抜した。それらの遺伝子のノックアウト毛状根を作成し、HF の分析を行った結果あらたに 6 つの遺伝子を生合成遺伝子として同定した。

(2) 詳細

研究テーマ A 「新規孵化促進物質の構造決定」

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出発材料として HF の分画・精製を行った。分画したサンプルをジャガイモシストセンチュウ卵に処理し、孵化が確認されたサンプルをさらに分画するバイオアッセイを繰り返し、HF を精製していった。その結果、最終的に二つの HF の精製に成功し、その一方が SEA であることを明らかにした。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、SEA に匹敵する高いジャガイモシストセンチュウ孵化促進活性を有していた。このことから、この化合物を SEA に次ぐ二番目のジャガイモシストセンチュウ孵化促進物質としてソラノエクレピン B(SEB)と命名した(図 1)。

研究テーマ B 「HF 生合成遺伝子ノックアウトによる孵化促進活性低下の実証」

研究開始時点で HF 生合成への関与が示唆されていた 5 つの遺伝子について、ゲノム編集にノックアウトしたトマト毛状根を作出し、培養液の分析を行った。その結果、5 つの遺伝子 (*SOLA1*~*SOLA5*) 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*~*SOLA5* が SEB 生合成遺伝子であることを明らかにした。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ジャガイモシストセンチュウに対する孵化促進活性が顕著に低いことが確認された。以上のことから、世界で初めて HF の生合成遺伝子を同定し、これらの遺伝子を制御することでシストセンチュウの孵化を抑制し、被害を軽減

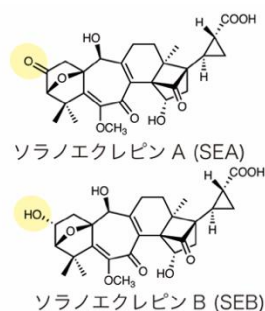


図 1. 孵化促進物質の構造
構造の異なる部分を黄色で示している

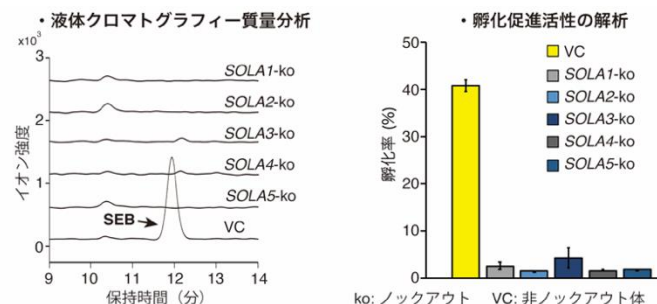


図 2. SOLA 遺伝子ノックアウト毛状根の解析

SOLA1-SOLA5 は申請者が同定した生合成遺伝子。各遺伝子のノックアウト (ko) 毛状根培地では SEB の消失 (左図) とシストセンチュウに対する孵化促進活性の低下 (右図)。

減できる可能性が示された (図 2)。

研究テーマ C 「HF の土壌微生物による代謝の発見」

申請者は無菌培養を行ったトマト毛状根からは SEB のみが検出されることを見出した。一方、開放系で栽培したトマトとジャガイモ水耕液から SEA と SEB の両方を検出し、また、他グループから土耕したトマトの根滲出液からの SEA 検出が報告されている。この結果から、申請者は SEB までは植物自身で生合成され、根から放出された後に土壌による酸化や微生物などの外的要因によって SEA へと変換されると考えた。そこで、SEB 純品を土壌に加え 7 日間静置したところ、SEB が SEA へと変換された。また、 γ 線で滅菌した土壌ではこれらの変換が起こらないことから、土壌中微生物がこの変換に関与することが明らかとなった。

研究テーマ D 「HF 生産誘導条件の発見」

同じ生物学的機能に関与する遺伝子群は、同じ転写制御機構のもとで同調的に発現している可能性がある。つまり、HF 生産が上限する条件を明らかにすれば遺伝子共発現解析から生合成遺伝子を一網打尽に同定できる可能性がある。本項目ではまず初めに、トマト毛状根培養液にオーキシシン、ジベレリン、ジャスモン酸などの各種植物ホルモン投与を行い、SEB 生産に及ぼす影響を調査した(図 1)。方法としては、各処理を施した毛状根から RNA を抽出し、リアルタイム PCR を行うことで、これまでに同定した生合成遺伝子の発現の上昇や減少が見られるかどうかを調査した。その結果、ジャスモン酸、オーキシシン、アブシジン酸それぞれの処理によってこれまでに同定した HF 生合成遺伝子の発現量が低下すること明らかになった。さらに、これらの処理によってこれまでに同定した全ての HF 生合成遺伝子の発現が低下していたため HF 生合成遺伝子は共通の発現制御を受けていることが示唆された。

研究テーマ E 「遺伝子共発現解析を用いた HF 生合成遺伝子の単離同定」

研究代表者が見出した上記の HF 生産が増減する処理を行ったトマト毛状根のトランスクリプトーム解析を行った。さらに公開されている様々な部位および処理を行なったトマトの次世代シーケンスデータを用いてトランスクリプトーム解析を行った。それらのトランスクリプトームデータを統合し、遺伝子共発現解析を行った。その結果、既知の HF 生合成遺伝子と共発現する 99 遺伝子を見出した(図 3)。これらの遺伝子の塩基配列から予測されるアノテーションをからシクロローム P450 や 2-オキシグルタル酸依存性ジオキシゲナーゼ、O-メチルトランスフェラーゼをコードする遺伝子を候補遺伝子として選抜した(図 3)。CRISPR/Cas9 を用いたゲノム編集により候補遺伝子のノックアウト毛状根を作出し、得られた毛状根の培地を粗精製し、LC-MS/MS 分析に供した。その結果、5 つの遺伝子においてノックアウト毛状根では SEB の生産が消失していた(図 4)。以上の結果から、これら 5 つの遺伝子を新規 HF 生合成遺伝子として同定した。

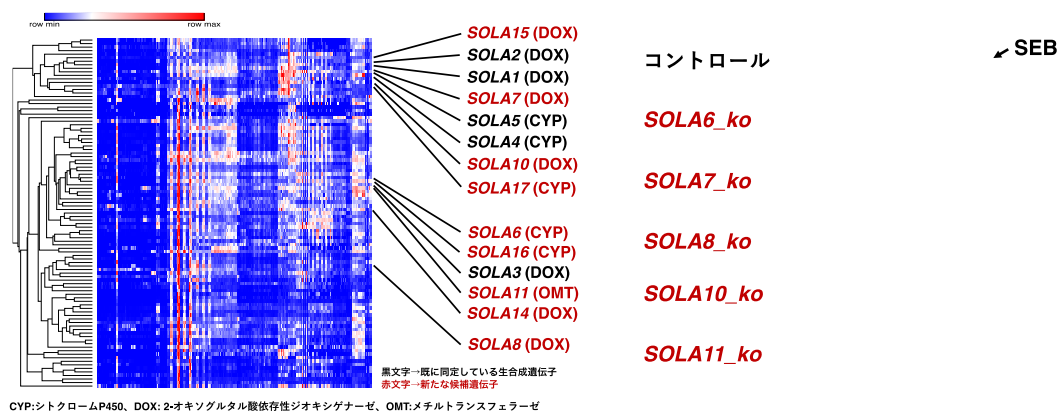


図3. 既知のHF生合成遺伝子と共発現する遺伝子

図4. ノックアウト毛状根のLC-MS/MS分析

3. 今後の展開

本研究期間において、HF 生合成遺伝子を複数同定し、それらの機能を遮断することでシストセンチュウの孵化という作物生産を脅かすリスクを低減できることを示した。現在合計 10 個の HF 生合成遺伝子を同定している。HF は構造的な特徴からトリテルペノイドに分類される。トリテルペノイドは 2,3-オキシスクアレンがオキシスクアレン環化酵素 (OSC) によってさまざまな様式で閉環した基本炭素骨格に種々の修飾反応を受けて生合成される。構造的な特徴から SEB は環化産物から 15 段階程度の反応で生合成されると予想される。研究テーマ F で示した、候補遺伝子の中にはまだ解析を行っていないものも存在するため、今後はそれらの遺伝子の解析を行うことで 5 年以内に全ての生合成遺伝子を同定したい。また、全ての生合成遺伝子が同定できれば将来的には大腸菌、酵母やベンサミアナタバコを用いた異種発現系で HF を大量生産し、自殺孵化剤 (宿主作物が無い時期にシストセンチュウを孵化させ、餓死させる) として農業利用できる基盤を構築したい (およそ 7 年後)。

一方で、植物はなぜ自身の生育の不利となるような HF を生産するのだろうか？ SEB や SEA は複雑な構造を有しており、その生合成には多段階の反応を要する。また、進化的にナス科と遠縁なマメ科でも SEB や SEA と構造の類似した化合物がダイズシストセンチュウに対する HF として単離されている。このように、植物は HF をわざわざ生合成し、その生合成系は進化の過程で保存されている。このことから、HF は植物の生存戦略上有益な役割を果たしていると考えられるが、その機能は全くの不明である。近年、植物は根から多様な生物活性物質を分泌し、それらは根圏に生息する微生物の増殖を正あるいは負に制御する化学シグナルとして利用していることが明らかになってきている。今後 1 年で HF がシグナル分子として機能するのかを解析し、植物にとって有益な機能を果たしていることを実証したい。また、上記で同定した生合成遺伝子を遮断すれば様々な HF 生合成中間体を蓄積する植物体が生産可能である。将来的にはシストセンチュウ孵化リスクは低減させるが、HF 本来の有益な機能を維持した作物の作出が可能になると期待される (およそ 10 年後)。

4. 自己評価

本研究は HF 生合成遺伝子を同定し、HF 生合成経路を明らかにすること、さらにその知見を発展させ、HF を分泌しない (線虫を孵化させない) 新奇防除技術の開発に応用することを目的とした。研究代表者は合計で 10 個の生合成遺伝子を同定し、植物体の解析は終了しな

かったが、毛状根において HF 生合成遺伝子の遮断によりシストセンチュウの孵化リスクを低減できることを実証した。以上の点から、研究開始当初の目標を大部分は達成できたと考えられる。HF 本来の機能として土壌微生物とのコミュニケーション分子であると期待される。将来的に HF 生産を改変することによるシストセンチュウ防除のみならず、HF を活用して根圏微生物叢を調節し、持続可能な農業の実現に貢献することが期待される。以上を踏まえて、当初の計画以上に進展したと言える。

5. 主な研究成果リスト

(1) 代表的な論文(原著論文)発表

研究期間累積件数: 1件

1. Kosuke Shimizu[#], **Ryota Akiyama[#]**, Yuya Okamura, Chihiro Ogawa, Yuki Masuda, Itaru Sakata, Bunta Watanabe, Yukihiro Sugimoto, Atsuhiko Kushida, Keiji Tanino, Masaharu Mizutani. “Solanoeclepin B, a novel hatching factor for potato cyst nematode” *Science advances* 9(11) eadf4166 (2023) 【#共同筆頭著者】

(2) 特許出願

研究期間全出願件数: 0 件(特許公開前のもも含む)

(3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

【学会発表】

1. “Solanoeclepin B, a novel hatching factor for potato cyst nematode” **Ryota Akiyama**, Kosuke Shimizu, Itaru Sakata, Bunta Watanabe Yukihiro Sugimoto, Atsuhiko Kushida, Keiji Tanino, Masaharu Mizutani. The 24th International Conference on Plant Growth Substances. July, 2023, KOREA (口頭発表)
2. “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ソラノエクレピン B の同定とその生合成の解析” **秋山 遼太**, 清水 宏祐, 坂田 至, 串田 篤彦, 渡辺 文太, 谷野 圭持, 杉本 幸裕, 水谷 正治 第 64 回日本植物生理学会年会 2023 年 3 月 (口頭発表)
3. “Exploration of novel hatching factor for potato cyst nematode” **Ryota Akiyama**, Kosuke Shimizu, Atsuhiko Kushida, Keiji Tanino, Bunta Watanabe, Yukihiro Sugimoto, Masaharu Mizutani. The XVII International Conference on the Plant Family of Solanaceae (SOL2022). November, 2022, Greece (ポスター発表)
4. “トマト毛状根を用いたジャガイモシストセンチュウ孵化促進物質生合成遺伝子の解析” **秋山遼太** 清水宏祐、増田裕貴、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 第 39 回日本植物バイオテクノロジー学会 2022 年 9 月 (口頭発表)

【プレスリリース】

1. ジャガイモシストセンチュウ類の孵化を促進する新規化合物「ソラノエクレピン B」を発見～新たな害虫防除法の開発に道、作物の生産能力向上へ～、2023 年 3 月 6 日(主要な研究業績欄の代表的な論文についてプレスリリースを行った。)