

ダイズシストセンチュウ防除を目指したシストセンチュウ 孵化促進物質の生合成制御に関する研究

伊藤 晋作*

東京農業大学応用生物科学部

Basic Analysis of Hatching Stimulants of Soybean Cyst Nematodes

Shinsaku ITO*

Faculty of Applied Bioscience, Tokyo University of Agriculture, Tokyo 156-8502

ABSTRACT

Soybean cyst nematode, which is one of the most harmful pathogens of soybean, parasitizes the roots of legumes. Hatching of soybean cyst nematode is initiated by recognition of a hatching factor produced by legumes. One of the hatching factors, glycinoclepins (GEs), was identified in the roots of kidney beans as a hatching stimulant for soybean cyst nematode. However, the effects of GEs on legumes and their biosynthetic pathway(s) have not been determined. In this study, we performed RNA-sequence analysis using GEA-treated plants to identify the GEA-responsive genes. We identified 19 down-regulated and 51 up-regulated genes in GEA treated plants. *Soy Protein Research, Japan* **17**, 124-126, 2014.

Key words : soybean cyst nematode, glycinoclepin, RNA-seq

ダイズシストセンチュウはダイズをはじめとしたマメ科植物の根に寄生する根寄生性線虫であり、多くのマメ科作物の最も大きな減収要因として考えられている。特にアメリカにおいてはダイズシストセンチュウによって、2006年から2009年の間に年平均350万tものダイズが損害を受けており、換算すると13億\$に及んでいる¹⁾。これはダイズ生産上、病害による減収量の1/4以上がダイズシストセンチュウにより引き起こされていることを示しており、さらに様々な要因が重なることによってダイズシストセンチュウの感染により、最大で40%の減収となりうる可能性が示されている。その

ため、ダイズシストセンチュウの効率的な防除法の確立はダイズの安定生産のために非常に重要な問題であると考えられている。

ダイズシストセンチュウの卵は土壌中にシストと呼ばれる殻に守られて存在している。シスト中の卵の近くにマメ科植物が植えられると、マメ科植物が分泌する孵化促進物質に応答して孵化し、2期幼虫となりシストから脱出し、根へと感染する。感染後は宿主植物から水分や栄養分を吸収しながら寄生し、3期幼虫、4期幼虫へと成長していく。成長した雌成虫は植物より脱出し産卵後、自身の体をシストへと変化させる。以上のような生活環でシストセンチュウは増殖を繰り返す。土壌を汚染していく。土壌中のシストは、環境等

*〒156-8502 東京都世田谷区桜丘1-1-1

によるストレスに強く、そのため一度シストセンチュウに高度に汚染された土壌は、完全に防除することが難しいとされている。

これまでにダイズシストセンチュウを防除するために様々な戦略がとられてきた。その中でも最も効果をあげてきた手法としてシストセンチュウ抵抗性品種の育成と輪作による土壌中のセンチュウ密度低減がある²⁻⁴⁾。しかしながら、現在抵抗性品種にも感染可能なシストセンチュウの出現が報告されていること、先述の様にダイズシストセンチュウは宿主作物が長期間存在しない状況でも休眠状態で生存可能であるため、長期間の輪作が必要とされることから、新規防除法の確立が望まれている。

グリシノエクレピン類 (GEs) はダイズシストセンチュウの孵化促進物質としてインゲンより単離された化合物であり、数pg/mLという低濃度でダイズシストセンチュウの孵化を促進する (Fig. 1)⁵⁾。これらの化合物を宿主であるマメ科植物の存在しない土壌中に散布することによりダイズシストセンチュウの孵化を促進し自殺へと導くことができる。しかしながらGEsの構造の複雑さから、農薬としての直接の応用は非常に難しいのが現状である。そこで本研究ではマメ科植物の孵化促進物質の生合成を制御することにより、効率的な孵化促進物質生産系の確立を目指している。そこで、まずGEA生合成経路の解明の端緒とするために、GEA応答遺伝子の解析を次世代シーケンサーによるRNA-seq法で行った。

方 法

植物および化合物処理

マメ科のモデル植物であるミヤコグサ (Miyakojima) を用いた。種子を2%次亜塩素酸水溶液

で表面殺菌後、水寒天培地にて25℃、連続光下で培養した。GEAは北海道大学谷野圭持教授より御分与いただいた。14日後、5 μ MのGEAを添加し18時間培養後、根よりtotal RNAを抽出した。

cDNA library合成と次世代シーケンサーによる解析

抽出したtotal RNAはAgilent 2100 Bioanalyzerにより品質チェックをおこなった。2 μ gのtotal RNAを用いてTruSeq RNA Sample Prep kitおよびTruSeq DNA Sample Prep kitにてcDNAライブラリーを合成した。合成したライブラリーをIllumina HiSeq 2000 シーケンサーにてpaired-endシーケンスによりシーケンスを行った。得られた配列データはCLC Genomics Workbench (version 6.5) ソフトウェアを用いて解析し、GEA処理群と未処理群との比較を行い、有意に発現量の変化していた遺伝子を抽出した。

結果と考察

植物ホルモンをはじめとした多くの植物二次代謝産物の生合成経路遺伝子は、その二次代謝産物が外部から過剰に投与されると遺伝子発現レベルで発現量が減少することが知られている。GEAもマメ科植物が合成する二次代謝産物であるため、GEAの過剰処理がGEA生合成に関連する遺伝子の発現量の異常を引き起こすと考えた。そこで、GEA応答遺伝子の解析を行い、GEA生合成に関連する遺伝子の取得を試みた。今回は使用できるGEAが少量であったため、比較的個体の小さなミヤコグサを用いてGEA応答遺伝子の発現解析を行った。GEA処理群、未処理群各3サンプルよりTotal RNAを抽出し、cDNAライブラリーを作成後、次世代シーケンサーを用いてRNA-seq解析を行った結果、6600万～1億1000万readを得ることが出来た。得られたreadをかずさDNA研究所にて公開されている*Lotus japonicus* genome assembly build 2.5をゲノム配列として、gene model build 2.5をアノテーション情報として用いて解析し、発現量をRPKMとして算出した。算出した各サンプルのRPKM値をもとにt-testを行い、有意に発現変動を示した遺伝子を抽出した。その結果、GEA処理により、有意に発現量が2倍以上に増加した遺伝子を51遺伝子、有意に減少した遺伝子を19遺伝子得ることが出来た。有意に減少した遺伝子の内、多くの遺伝子がフラボノイド合成に関与する遺伝子であった。そのため、フラボノイド合成に関与する遺伝子の発現変動を再度検索したところ、フラボンやフラボノール、アントシアニン類の生合成遺伝子は減

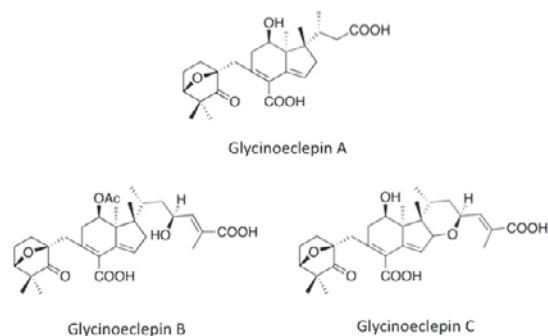


Fig. 1. Structures of Glycinoeclepins.

少していたものの、イソフラボン合成酵素遺伝子に関しては増加傾向にあることが分かった。イソフラボンはマメ科植物において根粒菌との共生シグナルとして知られており、このことからGEAが根粒菌との共生において何らかのシグナル因子として関与している可能性が考えられた。加えて、GEA処理によりこれらの遺伝子群が変化したことからフラボノイド、特にイソフラボン類がGEAの生合成を間接的に制御している可

能性も考えられた。また、GEA処理により発現量増加した遺伝子としていくつかの転写因子様の構造をコードする遺伝子が得られた。今後はイソフラボン類の処理によるダイズシストセンチュウ孵化促進物質質の変化を測定することや、得られた遺伝子の過剰発現体を作製することにより、ダイズシストセンチュウ孵化促進物質の生合成制御機構が明らかになると考えられる。

要 約

ダイズシストセンチュウはマメ科植物に寄生し、大豆生産に被害を及ぼす最も大きな要因の1つとして考えられている。シストセンチュウは土壤中にシストの状態で存在し、マメ科作物が分泌する孵化促進物質に応答して孵化し、宿主の根への寄生、栄養の収奪を行う。本研究では、ダイズシストセンチュウ孵化促進物質の植物体内での生合成およびその機能を推定するために、既に同定されている孵化促進物質の1つであるグリシノエクレピンAを植物に処理し、その応答遺伝子の解析を行った。グリシノエクレピン処理後1日後の植物根よりRNAを抽出し、cDNAライブラリー作製後、次世代シーケンサーを用いてRNAseq解析を行った結果、グリシノエクレピンA応答遺伝子として複数の遺伝子を見いだすことが出来た。その中には、フラボノイド生合成に関与すると考えられる遺伝子等も見られ、グリシノエクレピンAがフラボノイドの生合成に密接に関与している可能性が考えられた。今後は、応答遺伝子の阻害を行うことによる詳細な機能解析やフラボノイド生合成とグリシノエクレピンAとの関連を解析することで、孵化促進物質の生合成制御が可能となることが期待される。

文 献

- 1) Koenning SR and Wrather JA (2010): Suppression of soybean yield potential in the continental United States by plant diseases from 2006 to 2009. *Plant Health Prog.* http://dx.doi.org/10.1094/PHP_2010-1122-01-RS.
- 2) Chen SY, Porter PM, Oef JH, Reese CD, Stienstra WC, Young ND, Walgenbach DD, Schaus PJ, Arlt TJ and Breitenbach FR (2001): Soybean cyst nematode population development and associated soybean yields of resistant and susceptible cultivars in Minnesota. *Plant Disease*, **85**, 760-766.
- 3) Koenning SR (2004): Resistance of soybean cultivars to field populations of *Heterodera glycines* in North Carolina. *Plant Disease*, **88**, 942-950.
- 4) Warnke SA, Chen SY, Wyse DL, Johnson GA and Porter PM (2006): Effect of rotation crops on *Heterodera glycines* population density in a greenhouse screening study. *J Nematol*, **38**, 391-398.
- 5) Masamune T, Anetai M, Takasugi M and Katsui N (1982): Isolation of a natural hatching stimulus, glycinoclepin A, for the soybean cyst nematode. *Nature*, **297**, 495-496.