

ダイズシストセンチュウ孵化促進物質応答遺伝子の解析

伊藤 晋作*

東京農業大学応用生物科学部

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 pests of soybean, parasitizes the roots of legumes. Hatching of soybean cyst nematode is initiated by recognition of hatching factor produced by legumes. One of the hatching factors, glycinoclepins (GEs), has been identified in roots of kidney beans (Honkintoki and Benikintoki) as hatching stimulants of soybean cyst nematode. However, their biosynthetic pathway(s) has not been uncovered. In addition, there are no reports that detect GEs except for kidney beans. In this study, to analyze the hatching stimulants of soybean cyst nematodes, we performed hatching assay by using the ethyl acetate extract of root exudates, and found the possibility that the major hatching factors in legumes are different from known GEs except for kidney beans, Honkintoki. *Soy Protein Research, Japan* **18**, 171-174, 2015.

Key words : soybean cyst nematode, glycinoclepin, hatching assay

ダイズシストセンチュウは植物寄生性線虫の一種として知られており、ダイズをはじめとしたマメ科植物の根に寄生する。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45億Lものダイズが損害を受けており、換算すると13億\$に及んでいるという報告もある¹⁾。これはダイズ生産上、病虫害による減収量の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いる。さらに様々な要因が重なることでダイズシストセ

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ため、ダイズシストセンチュウは世界のダイズ生産上最も有害な害虫と考えられている。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。

ダイズシストセンチュウは以下に記すように非常に特徴的な生活環を有している。ダイズシストセンチュウの卵は土壤中にシストと呼ばれる殻に守られて存在しており、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

*〒156-8502 東京都世田谷区桜丘1-1-1

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チュウは増殖を繰り返し、土壌を汚染していく。土壌中のシストは、環境等によるストレスに強く、そのため一度シストセンチ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チュウ抵抗性品種の育成と輪作による土壌中のセンチ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、現在までにGEA, GEB, GECの三種類がインゲン (本金時および紅金時) より単離されている (Fig. 1)^{5~7)}。これらの化合物は、数pg/mLという低濃度でダイズシストセンチチュウの孵化を促進する。昨年度、我々はこのGEsのうち、グリシノエクレピンA (GEA) を処理したミヤコグサを用いて次世代

シーケンサーによるRNA-seq解析を行うことでいくつかのGEA応答遺伝子を同定した。そこで本年度ではこれらの遺伝子の発現抑制体の作製を行った。加えて、GEAはこれまでにインゲン (本金時および紅金時) でのみ見いだされていることから、その他のマメ科植物の生産するダイズシストセンチチュウ孵化促進物質の解析を行った。

方 法

使用した植物と生育条件

インゲン (本金時およびうずら豆)、アズキ、ミヤコグサ、ササゲ、ゲンゲ、アカクローバー、イネを用いた。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。その後、500 mL褐色瓶を用いて水耕栽培を行い、水耕栽培4週間後の水耕液を回収した。回収した水耕液は酢酸エチルを用いて溶媒分画し、それぞれ酸性、中性、塩基性画分へと分画した。

遺伝子発現抑制体の作製

RNA-seqにより、有意に遺伝子発現に変動のあった遺伝子の中でフラボノイド合成に関わる遺伝子をPCRにて増幅した。増幅した断片をpDONR/Zeo (Invitrogen) に導入し、配列を確認した。確認できたクローンに関してはpBI-RNAi-GW (IN PLANTA INNOVATIONS) に導入した。これをAgrobacterium

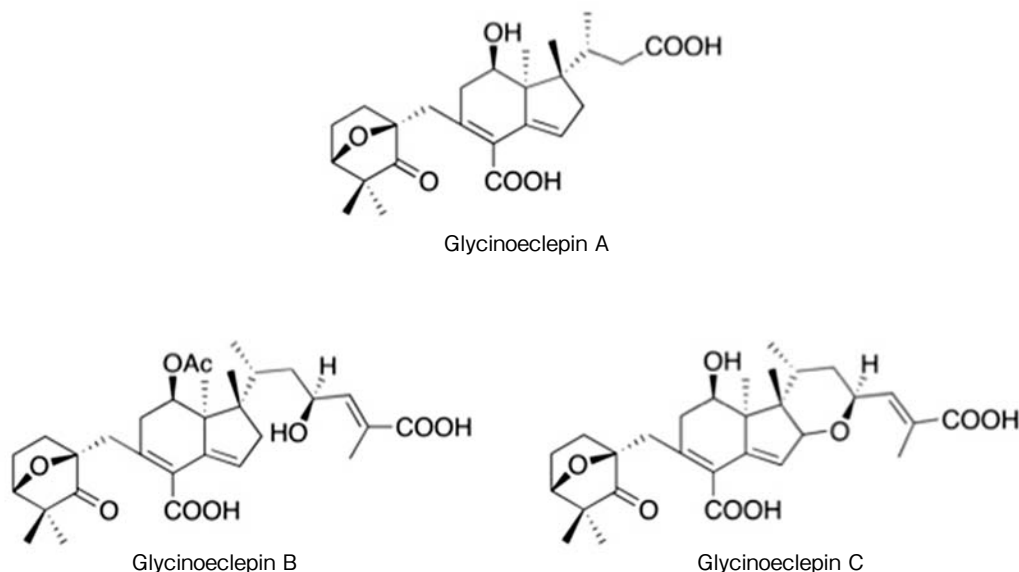


Fig. 1. Structures of Glycinoeclepins.

rhizogenesに導入後、ミヤコグサおよびダイズへの形質転換を試みた。

ダイズシストセンチュウ孵化試験

北海道より入手したダイズシストセンチュウ汚染土壌をピーカーにとり、葉さじを用いてよく攪拌した。上清をメッシュを用いてろ過し、シストを単離した。注射針を用いてシストを割り、卵を取り出した。96穴プレートに約50～100の卵を分注し、サンプルを処理した。暗所、25℃にて2週間静置し、孵化した線虫数を測定した。

結果と考察

フラボノイド生合成遺伝子発現抑制体の作製

昨年度の研究により、マメ科のモデル植物の1つであるミヤコグサにおいて、GEAを処理することでフラボノイド合成に関与する遺伝子の発現量が大きく変化することが明らかとなった。そこで、本年度の研究ではこれらの遺伝子の孵化促進物質生合成への関与を明らかにするため、RNAiによる遺伝子発現抑制体の作製を試みた。まず、変化していた遺伝子をクローニング後、バイナリーベクターへの導入を確認した。その後、*Agrobacterium rhizogenes*を用いて毛状根形質転換を行った。現在は形質転換体の遺伝子抑制の確認等を行っている。今後、これらの形質転換体を用いて孵化物質量の測定や、ダイズシストセンチュウ感染試験を行うことでこれらの遺伝子の孵化促進物質生合成への関与が明らかになると考えられる。

ダイズシストセンチュウ孵化促進物質の解析

前述のようにダイズシストセンチュウの孵化促進物質にはGEAをはじめとした3種類がインゲンより単離されている。ダイズシストセンチュウは様々なマメ科植物を宿主として認識しているにも関わらず、インゲ

ン以外からGEsを検出した例はない。そこでLC-MS/MSによるGEsの検出を試みた。GEsは酸性化合物であるため、水耕栽培したアズキの水耕液をSep-Pak SilicaおよびOasis MAX Cartridgeを用いて精製後、AB SCIEX TripleTOF 5,600システムを用いてGEAの検出を試みたものの、検出することができなかった。そこで、アズキがGEs以外の孵化促進物質を生産している可能性を考え、アズキ水耕液の精製を行い、ダイズシストセンチュウを用いて精製画分の孵化促進活性を検定した。その結果、アズキ水耕液中に含まれる孵化促進物質は酸性物質ではなく中性および塩基性物質であることが明らかとなった。また、アズキ以外のマメ科植物も同様に水耕液中の孵化促進物質量を測定した結果、インゲン（本金時）では報告の通り酸性画分に孵化促進活性が示されたものの、インゲン（うずら豆）、ササゲ、ゲンゲ、アカクロバーでは中性、もしくは塩基性に孵化促進活性を有し、酸性画分に孵化促進活性を示さなかった（Table. 1）。以上の結果から、マメ科植物は多様な構造の孵化促進物質を生産、分泌している可能性が示唆された。今後、これらの植物から孵化促進物質を精製、単離することで新規孵化促進物質の存在が明らかになると考えられる。

Table 1. Soybean cyst nematode hatching activity of root exudates

	Acidic fraction	Neutral fraction	Basic fraction
<i>Phaseolus vulgaris</i> (Honkintoki)	○	×	×
<i>Oryza sativa</i>	×	×	×
<i>Phaseolus vulgaris</i> (Uzuramame)	×	○	×
<i>Vigna angularis</i>	×	○	○
<i>Pisum sativum</i> L.	×	○	○
<i>Vigna unguiculata</i>	×	○	×
<i>Astragalus sinicus</i>	×	○	×
<i>Trifolium pratense</i>	×	×	○

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つとして知られている。シストセンチュウは土壤中にシストの状態が存在し、マメ科植物が分泌する孵化促進物質に応答して孵化し、宿主の根へ寄生し、宿主植物の栄養を奪い成長する。本研究では、昨年度RNAseqにより得られたダイズシストセンチュウ孵化促進物質応答遺伝子のうち、孵化促進物質の生合成に関与する可能性のある遺伝子に着目し、RNAiによる発現抑制体の作製を行うとともに、新規孵化促進物質の探索を行った。ダイズシストセンチュウ応答遺伝子配列をcDNAより増幅し、配列確認後植物導入用ベクターに導入した。現在、ダイズおよびミヤコグサの毛状根へ形質転換を行っている。また、既知の孵化促進物質であるグリシノエクレピンの水耕液抽出物からの検出をLC-MS/MSにより試みたところ、ダイズやアズキからはグリシノエクレピンに相当する化合物を検出できなかった。そこでこれらの植物がグリシノエクレピンと異なる孵化促進物質を合成している可能性を考え、水耕液抽出物を溶媒分画し、孵化活性を測定したところ、検討した5種のマメ科植物全てでグリシノエクレピンとは異なる画分で孵化活性を示し、これらのマメ科植物はグリシノエクレピン以外の物質を合成している可能性が明らかとなった。

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 Management Network.
- 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 Dis*, **85**, 760-766.
- 3) Koenning SR (2004): Resistance of soybean cultivars to field populations of *Heterodera glycines* in North Carolina. *Plant Dis*, **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, Katsui N (1982): Isolation of a natural hatching stimulus, glycinoeclepin A, for the soybean cyst nematode. *Nature*, **297**, 495-496.
- 6) Fukuzawa A, Matsue H, Ikura M and Masamune T (1985): Glycinoeclepins B and C, nortriterpenes related to glycinoeclepin A. *Tetrahedron Letters*, **26**, 5539-5542.
- 7) Masamune T, Fukuzawa A, Furusaki A, Ikura M, Matsue H, Kaneko T, Abiko A, Sakamoto N, Tanimoto N and Murai A (1987): Glycinoeclepins, natural hatching stimuli for the soybean cyst nematode, *Heterodera glycines*. II. Structural elucidation. *Bull Chem Soc Jpn*, **60**, 1001-1014.