

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とその生合成の解析
Identification of a novel hatching factor for potato cyst nematode and investigation of its biosynthesis

清水宏祐

神戸大学大学院農学研究科（現、株式会社エス・ディー・エス バイオテック）

植物寄生性線虫であるジャガイモシストセンチュウ (potato cyst nematode; PCN) は、ナス科の重要作物であるジャガイモ (*Solanum tuberosum*) やトマト (*S. lycopersicum*) の根に特異的に寄生し、作物収量の大幅な減収を引き起こす害虫であり、世界中で甚大な被害を与えている。PCN 雌成虫は自身の体内に産卵し数百の卵を抱えたシスト (硬い殻) を形成する。シスト内の PCN 卵は、宿主不在時には土壌にて卵の状態を維持し、20 年以上宿主の到来を待つことが可能である。PCN 混入土壌に宿主が作付けられると、PCN 卵は宿主の根滲出液中のふ化促進物質に特異的に反応してふ化する。すなわち、ふ化促進物質とは、宿主植物が能動的に生合成し、根から分泌する特化代謝産物であるが、寄生者である PCN によって宿主認識のシグナル分子として利用されている化合物である。これまでに、ジャガイモ水耕液から solanoeclipin A が高活性な PCN ふ化促進物質として唯一単離・構造決定されている。一方、ナス科植物の代表的な特化代謝産物であるステロイドグリコアルカロイド (steroidal glycoalkaloids; SGAs) も弱いふ化促進活性を有することが報告されている。しかし宿主植物の根滲出液から分析化学的に solanoeclipin A を検出した報告例はなく、solanoeclipin A 生産量が明らかでないため、根滲出液中における主要なふ化促進物質の正体は不明なままであった。また、分析化学的な解析が困難であるが故、生合成に関する解析はなされていなかった。本研究では、根滲出液中に含まれるふ化促進物質を分析化学的に明らかにし、ふ化促進物質の生合成に関する解析を開始することを目的とした。

1. SGAs が示す PCN 卵に対するふ化促進活性

初めに、ジャガイモ・トマト毛状根培養液中における SGAs のふ化促進物質としての寄与を調べた。無菌培養した毛状根培養液を PCN の一種である *Globodera rostochiensis* の卵に対するふ化試験に供した結果、高いふ化促進活性が確認され、ふ化促進物質は確かに植物が生合成・分泌する化合物であることが明らかとなった。次に、毛状根培養液中に分泌された SGAs を LC-MS 分析に供した結果、ジャガイモ毛状根培養液からは α -solanine と α -chaconine、トマト毛状根培養液からは α -tomatine がそれぞれ検出された。毛状根培養液中における最も濃度が高い SGA は α -tomatine で 2.9 μ M であり、また、標品を用いたふ化試験では各 SGA は 1 μ M からふ化促進活性が確認された一方、毛状根培養液は 1000 倍以上の希釈時でもふ化促進活性を示すことから、SGAs はふ化促進物質としては影響しないことが示唆された。また、SGAs が示すふ化促進活性の構造活性相関を調べた結果、C3 位の水酸基に結合した糖鎖およびアルカロ

イドとしての特性が必要であり、かつ、アグリコンの立体構造が活性の強さに影響することが明らかとなった^[1]。

2. 新規 PCN ふ化促進物質の同定

ジャガイモ・トマト毛状根培養液は強いふ化促進活性を示すが、LC-MS/MS 分析では solanoeclepin A は検出できなかったことから、毛状根培養液中には solanoeclepin A とは異なる新規ふ化促進物質が存在することが示唆された。そこで、新規ふ化促進物質の同定を試みた。毛状根を大規模に培養することは困難であったため、ジャガイモ水耕液を出発材料に用いた。水耕設備に合成吸着剤を設置してふ化促進物質を吸着回収し、メタノールで溶出した画分をふ化試験に供した結果、強いふ化促進活性が確認された。そこで、この画分を液相分配、4 段階のオープンカラムクロマトグラフィーおよび 2 段階の分取 HPLC に供して精製を行なった結果、2 つの活性画分 Fr-A および Fr-B を得た。LC-MS 分析の結果、Fr-B からは既知の solanoeclepin A が検出された一方、Fr-A には新規ふ化促進物質と推定される化合物が含まれることが明らかとなった。各種 NMR 解析の結果、新規ふ化促進物質は solanoeclepin A と類似した構造であることが推定され、solanoeclepin B と命名した。さらに、トマト毛状根培養液においては solanoeclepin A は検出されないが solanoeclepin B は検出されたことから、毛状根培養液中の主要なふ化促進物質は solanoeclepin B であることが示唆された。そこで、トマト毛状根培養系を利用して、PCN ふ化促進物質の生合成を解析することとした。

3. トマトにおける solanoeclepin B 生合成遺伝子の同定

Solanoeclepin A および B は高度に酸化されたトリテルペノイドであることから、その生合成経路には複数段階にわたる酸素添加酵素が触媒する反応ステップがあると予想された。そこで、トマト毛状根に対する酸化酵素阻害剤の投与実験を行なった結果、PCN ふ化促進物質の生合成には酸素添加酵素が関与することが示唆された。また、水耕栽培したトマトの各組織を抽出し、ふ化試験に供した結果、ふ化促進活性は根および根滲出液に強く確認されたため、生合成遺伝子の発現は根で特異的であると推定した。これらを踏まえ、根で特異的に発現している酸素添加酵素に着目して候補生合成遺伝子を選抜した。次に、CRISPR/Cas9 ゲノム編集システムを用いて、各候補遺伝子に対するノックアウト毛状根を作出し、ふ化促進活性を指標にスクリーニングを行った。その結果、遺伝子破壊することによりふ化促進活性が顕著に低下する組換え毛状根を獲得した。さらに LC-MS 分析の結果、ノックアウト毛状根培養液では solanoeclepin B が消失していた。以上の結果より、標的とした候補遺伝子をふ化促進物質生合成遺伝子として同定した。

本研究を進めるにあたり、ご指導して下さった諸先生方とご支援を賜りました共同研究者の皆様に厚く御礼申し上げます。

関連文献

1. Shimizu et al. (2020) *Plant Biotechnology* 37 (3), 319-325