Kobe University Repository : Kernel

PDF issue: 2025-07-04

Identification of a novel hatching factor for potato cyst nematode and investigation of its biosynthesis

清水，宏祐

(Degree)
博士（農学）

(Date of Degree)
2022-03-25

(Date of Publication)
2024-03-25

(Resource Type)
doctoral thesis

(Report Number)
甲第8370号

(URL)
https://hdl.handle.net/20.500.14094/D1008370

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。

別紙様式３（博士論文審査等内規第２条関係）

博士論文内容の要旨

氏　　名　清水　宏祐

専攻・講座　生命機能科学専攻・応用生命化学講座

論文題目（外国語の場合は，その和訳を併記すること。）

Identification of novel hatching factor for potato cyst nematode and investigation of its biosynthesis

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

指導教員　水谷　正治

植物は、種ごとに固有の、多様な構造の特化代謝産物を生産する。特化代謝産物は抗菌活性や共生者の誘引活性、病害虫の忌避効果など様々な生理活性を有している。そのため特化代謝産物は他の生物との生物間相互作用や外界環境の変化に対する応答機構において重要な役割を果たすと考えられている。土壌環境、特に根を中心とした根圏と呼ばれる領域には多様な特化代謝産物が分泌されており、例えばマメ科植物は低窒素環境では根粒菌との共生関係を構築するために、シグナル分子としてフラボノイドを生合成・分泌している。一方で、特化代謝産物を介した生物間相互作用には植物側にとっては不利益な場合もあり、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) と宿主植物であるジャガイモ (*Solanum tuberosum*) の関係はその典型である。

序章では、本論文で研究対象とする PCN 卵に対するふ化促進物質に関するこれまでの知見について詳しく論じている。PCN は、ナス科の重要作物であるジャガイモやトマト (*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 の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）となる。シスト内の PCN 卵は、宿主不在時には土壌にて卵の状態で休眠を維持し、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トリテルペノイドに分類される solanoeclepin A が $1 \times 10^{-8} \sim 1 \times 10^{-10}$ g ml^{-1} の濃度域でふ化促進活性を示す高活性な PCN ふ化促進物質として唯一単離・構造決定されている。また、構造決定には至っていないが、solanoeclepin A とは異なるふ化促進物質の存在も示唆されている。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 solanoeclepin A を検出した報告例はなく、solanoeclepin A 生産量は明らかでないため、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る。また、分析化学的な解析が困難であるが故、生合成に関する研究はなされていなかった。そこで、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研究を開始することを試みた。

第一章では、ジャガイモやトマトの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。まず、無菌条件で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してい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-chanonine、トマト毛状根培養液からは α-tomatine が検出され、

それらの濃度はそれぞれ 0.14 μM、0.07 μM、2.9 μM であった。各 SGA 標品はそれぞれ 1 ~ 5 μM の濃度域でふ化促進活性が確認でき、α-chanonine が最も強く、5 μM でふ化率 48.6% であった。一方、毛状根培養液が示すふ化促進活性は 1000 倍希釈時でふ化率 80% 以上を示すことから、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、各種 SGAs を用いてふ化促進活性の構造活性相関を調べた結果、SGAs が示すふ化促進活性には 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、かつアグリコン部分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。一方、高活性なふ化促進物質である solanoeclepin A にはそのような特徴はないため、PCN 卵側のふ化促進物質受容機構が異なることが示唆された。

第二章では、ジャガイモ水耕液から新規 PCN ふ化促進物質の同定を行なった。ジャガイモおよびトマト毛状根の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。新規ふ化促進物質を探索するにあたり、毛状根を大規模に培養することは困難であったため、出発材料に北海道種苗管理センターに設置された大規模なジャガイモ水耕設備の水耕廃液を使用することとした。ジャガイモ水耕設備に合成吸着剤 SP207 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。^{1}H-NMR や ^{13}C-NMR、各種二次元 NMR の解析により構造を決定し、新規ふ化促進物質を solanoeclepin B と命名した。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 であることが明らかとなった。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。

第三章では、PCN ふ化促進物質の生合成遺伝子の同定を行なった。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酵素阻害剤の投与実験を行なった結果、シトクロム P450 (CYP) 阻害剤である uniconazole P や 2-オキソグルタル酸依存性ジオキシゲナーゼ (DOX) の処理により、ふ化促進活性が有意に低下した。この結果から、PCN ふ化促進物質の生合成には CYP や DOX 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ことが示唆された。これらを踏まえ、根で特異的に発現している *CYP*

および *DOX* に着目して候補生合成遺伝子を選抜し、各遺伝子を CRISPR/Cas9 ゲノム編集システムにより遺伝子破壊した形質転換毛状根を作出した。得られた遺伝子破壊毛状根の培養液をふ化試験に供し、ふ化促進活性を指標にスクリーニングを行った結果、*DOX60*、*DOX70*、*DOX80* を遺伝子破壊することによりふ化促進活性が顕著に低下した。さらに LC-MS/MS 分析の結果、野生型毛状根培養液では検出される solanoeclepin B が、遺伝子破壊毛状根の培養液では消失していた。従って、これら遺伝子をふ化促進物質生合成遺伝子として同定した。次に、得られた生合成遺伝子の遺伝子発現挙動を解析、3 つの *DOX* 遺伝子と共発現する遺伝子を選抜した。その結果、*CYP-19* および *CYP-20* の遺伝子破壊毛状根の培養液では、ふ化促進活性の顕著な低下が確認されたため、これら遺伝子をさらに生合成遺伝子として同定した。

以上のように、ナス科植物が生産する PCN ふ化促進物質について、ふ化促進物質そのものに関する植物化学的な解析と、その生合成に関する分子生物学的解析という二つの観点から研究を進めることで、新規物質である solanoeclepin B の同定とその生合成遺伝子の同定を達成した。PCN は卵のふ化プロセスを宿主作物に同調させることで、効率的に寄生・増殖することに成功している反面、ふ化促進物質を検知しない限りはふ化・寄生が達成されないと予想される。近年、特定の標的遺伝子に対して変異を導入する CRISPR/Cas9 ゲノム編集技術は新たな分子育種の手法として注目を集めている。本研究により同定した生合成遺伝子をマーカー遺伝子とした、ふ化促進物質を生産しない作物の分子育種は有効な防除法となる可能性を秘めている。

（別紙１）

論文審査の結果の要旨

氏名	清水　宏祐
論文題目	Identification of a novel hatching factor for potato cyst nematode and investigation of its biosynthesis （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）

審査委員	区　分	職　名	氏　　名
	主　査	准教授	水谷　正治
	副　査	教授	杉本　幸裕
	副　査	教授	宇野　知秀
	副　査		
	副　査		

要　　旨

植物は、多様で複雑な構造の二次代謝産物を生産している。植物二次代謝産物には抗菌活性や共生生物の誘引活性、病害虫の忌避効果など様々な生理活性があり、二次代謝産物は他の生物との生物間相互作用や外界環境の変化に対する応答機構において重要な役割を果たしている。特に、根を中心とした根圏と呼ばれる領域には多様な二次代謝産物が植物の根から分泌されている。例えば、マメ科植物は低窒素環境では根粒菌との共生関係を構築するために、シグナル分子としてフラボノイドを生合成・分泌している。一方、二次代謝産物を介した生物間相互作用には植物側にとっては不利益な場合もあり、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) と宿主植物であるジャガイモ (*Solanum tuberosum*) の関係はその典型である。

学位申請者である清水宏祐は、ナス属作物であるジャガイモやトマトの根から分泌される二次代謝産物がPCNのシスト内の卵のふ化を促進することに着目し、本博士研究を行った。序章では、PCNおよびPCN卵のふ化促進物質（HF）についてこれまでの知見を概説した。第一章では二次代謝産物ステロイドグリコアルカロイドのふ化促進活性、第二章ではジャガイモ水耕液から新奇ふ化促進物質の単離精製、第三章ではふ化促進物質の生合成について論じ、さらに、これらの結果について総合的に考察している。

序章では、本論文で研究対象とする PCN 卵に対するふ化促進物質に関するこれまでの知見について詳しく論じている。PCN は、ナス科の重要作物であるジャガイモやトマト (*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 の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）となる。シスト内の PCN 卵は、宿主不在時には土壌にて卵の状態で休眠を維持し、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トリテルペノイドに分類される solanoeclepin A が $1\times10^{-8}\sim1\times10^{-10}$ g ml^{-1} の濃度域でふ化促進活性を示す高活性な PCN ふ化促進物質として唯一単離・構造決定されている。また、構造決定には至っていないが、solanoeclepin A とは異なるふ化促進物質の存在も示唆されている。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 solanoeclepin A を検出した報告例はなく、solanoeclepin A 生産量は明らかでないため、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る。また、分析化学的な解析が困難であるが故、生合成に関する研究はなされていなかった。そこで、ナス属作物の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、さらに、ふ化促進物質の生合成系を明らかにすることを目的として、本研究を行った。

第一章では、ジャガイモやトマトの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。まず、無菌条件で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している化合物であることを明らかにした。次に、毛状根培養液中に分泌された SGAs を LC-MS により分析し、ジャガイモ毛状根培養液には 0.14 μM α-solanine と 0.07 μM α-chanonine、トマト毛状根培養液には 2.9 μM α-tomatine を検出した。各 SGA 標品はそれぞれ 1 ~ 5 μM の濃度域でふ化促進活性が確認でき、α-chanonine が最も強く、5 μM でふ化率 48.6% であった。

氏名	清水　宏祐

一方、毛状根培養液が示すふ化促進活性は 1000 倍希釈時でふ化率 80% 以上を示すことから、SGAs はふ化促進物質としては影響しないことを明らかとした。また、各種 SGAs を用いてふ化促進活性の構造活性相関を調べた結果、SGAs が示すふ化促進活性には 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、かつアグリコン部分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。一方、高活性なふ化促進物質である solanoeclepin A にはそのような特徴はないため、PCN 卵側のふ化促進物質受容機構が異なることが示唆された。

第二章では、ジャガイモ水耕液から新奇 PCN 卵ふ化促進物質の同定を行なった。ジャガイモおよびトマト毛状根の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 とは異なる新奇ふ化促進物質が存在することが示唆された。新規ふ化促進物質を探索するにあたり、毛状根を大規模に培養することは困難であったため、出発材料として北海道種苗管理センターに設置された大規模なジャガイモ水耕設備の水耕廃液を使用した。ジャガイモ水耕設備に合成吸着剤 SP207 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 には新奇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。新奇ふ化促進物質を高分解能質量分析に供した結果、solanoeclepin A と比較して水素が 2 原子分多い $C_{27}H_{32}O_9$ という分子式が得られた。^{1}H-NMR や ^{13}C-NMR、各種二次元 NMR の解析の結果、新奇ふ化促進物質は solanoeclepin A の A 環ケトンがアルコールに還元された構造であることが推定され、solanoeclepin B と命名した。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 であることが明らかとなった。

第三章では、トマト毛状根培養系を利用して PCN 卵ふ化促進物質の生合成を解析し、ふ化促進物質の生合成遺伝子の同定を行なった。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酵素阻害剤の投与実験を行なった結果、シトクロム P450 (CYP) 阻害剤である uniconazole P や 2-オキソグルタル酸依存性ジオキシゲナーゼ (DOX) の処理により、ふ化促進活性が有意に低下した。この結果から、ふ化促進物質の生合成には CYP や DOX 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ことが示唆された。これらを踏まえ、根で特異的に発現している *CYP* および *DOX* に着目して候補生合成遺伝子を選抜し、各遺伝子を CRISPR/Cas9 ゲノム編集システムにより遺伝子破壊した形質転換毛状根を作出した。得られた遺伝子破壊毛状根の培養液をふ化試験に供し、ふ化促進活性を指標にスクリーニングを行った結果、*DOX60*、*DOX70*、*DOX80* を遺伝子破壊することによりふ化促進活性が顕著に低下した。さらに LC-MS/MS 分析の結果、野生型毛状根培養液では検出される solanoeclepin B が、遺伝子破壊毛状根の培養液では消失していた。従って、これら遺伝子をふ化促進物質生合成遺伝子として同定した。次に、得られた生合成遺伝子の遺伝子発現挙動を解析した結果、植物ホルモンである MeJA や IAA、ABA により遺伝子発現が抑制制御されることが明らかとなった。そこで、これら植物ホルモン処理時のトマト遺伝子発現挙動を RNA-seq により網羅的に解析し、3 つの *DOX* 遺伝子と共発現する遺伝子を選抜した。その結果、*CYP-A19* および *CYP-A20* の遺伝子破壊毛状根の培養液では、ふ化促進活性の顕著な低下が確認されたため、これら遺伝子をさらに生合成遺伝子として同定した。

以上のように、第一章では SGA は弱いふ化促進活性を示すこと、一方、根滲出液に存在するふ化促進物質は SGA とは異なる物質であることが示され、その結果は第二章の研究成果へとつながった。第二章、第三章を通じて、ナス科植物が生産するふ化促進物質に関する植物化学的な解析と、その生合成に関する分子生物学的解析から研究を進めることで、新奇物質である solanoeclepin B の同定とその生合成遺伝子の同定を達成した。PCN はふ化プロセスを宿主作物に同調させることにより効率的に寄生・増殖することに成功している反面、ふ化促進物質を検知しない限り、ふ化・寄生が達成されない。近年、特定の標的遺伝子に対して変異を導入するゲノム編集技術は新たな分子育種の手法として注目を集めている。本研究により同定した生合成遺伝子をゲノム編集の標的として遺伝子破壊することによる、ふ化促進物質を生産しない作物の分子育種は PCN に対する有効な防除法となる可能性を秘めている。

本研究はシストセンチュウふ化促進物質について、その化学構造と生合成について研究したものであり、植物天然物化学、植物機能化学、植物生化学について重要な知見を得たものとして価値ある集積であると認める。よって、学位申請者の清水宏祐は、博士（農学）の学位を得る資格があると認める。