

# 合成ペプチドを用いた大豆シスト線虫防御に関する基礎研究

澤 進一郎\*

東京大学大学院理学系研究科

## Basic Analysis for the Defense of Soybean Cyst Nematodes by Using Synthetic Peptides

Shinichiro SAWA

Graduate school of Science, University of Tokyo, Tokyo 113-0033

### ABSTRACT

Because of the agricultural importance, the soybean cyst nematode *Heterodera glycines* that infect soybean (*Glycine max*) has emerged as primary research models to understand the signaling, perception, and response events during plant-nematode interactions. The recent advances in our understanding of the cellular, physiological, and molecular basis of legume-nematode interactions are merging at the crossroads of plant-microbe interactions and plant developmental biology. On the other hand, Intercellular communication is a fundamental mechanism for coordinating the development of complex bodies of multicellular organisms such as plants and animals. In plant morphogenesis, *CLAVATA* (*CLV*) genes are key players for meristem formation. *CLV1*, *CLV2*, and *CLV3* encode a leucine-rich repeat receptor-like kinase (LRR-RLK), a LRR receptor-like protein without the kinase domain, and a putative peptide, respectively. *CLV3* belongs to the *CLV3/ESR*-related (*CLE*) gene family that shares significant homology in 14 amino acids at the C-terminal region and has 31 *CLE* members in the *Arabidopsis* genome. *CLV3* and other *CLE* peptides are suggested to function in plant morphogenesis as intercellular signaling molecules. We have identified that tracheary element differentiation inhibitory factor (TDIF) and *CLV3* encode dodecapeptides with two hydroxy proline residues, regulating vascular development and meristem formation, respectively by using *in situ* MULDI-TOF-MS method. Chemically synthesized TDIF and *CLV3* peptides also function in our *in vitro* bioassay systems. Next, we chemically synthesized various length of peptide by using putative *CLE* domain sequence of nematode gene. As a results, some of the peptides induced short root phenotype, and some of the others induced long

\* 〒113-0033 文京区本郷7-3-1

root phenotype. We will improve the peptide sequence, and will try to develop effective chemicals for the defence of nematode infection to crops. *Soy Protein Research, Japan* **11**, 40-43, 2008.

Key words : nematode, soybean, CLE, peptide

大豆は、世界中で食糧として利用される重要な作物の一つである。日本でも北海道を中心に栽培が行われているが、シスト線虫等による線虫被害により、連作は容易ではなく、線虫対策が急務である。線虫による大豆の被害は年間10億ドルにも上るというオーストラリア政府の試算も出されているほどだ。そのような状況のなかで、形質転換体を用いずに線虫感染を防御し、大豆自身の生産性にも影響を与えない技術の開発は、大豆の安定供給にも繋がる重要なテーマであると考えられる。本研究では、シスト線虫が大豆に感染する際に放出し、植物の根の形態形成を変化させ、線虫の感染を手助けすると示唆されているCLEペプチドに焦点を当てた。CLE遺伝子は、植物の形態形成に関わる因子としてもともと単離されていた<sup>1)</sup>。これまでに、我々は生体内における機能的なCLEペプチドの構造を決定し、12アミノ酸からなるペプチドで、二つのプロリンがヒドロキシル化を受けていることを示してきている<sup>2,3)</sup>。また、化学合成したペプチドが、生体内でその機能を反映出来るようなバイオアッセイシステムも開発しており、合成ペプチドの利用が可能となってきている。本研究では、改変型合成ペプチドの作製により、線虫がもつペプチドが、大豆への感染にどのような効果を与えるかを検討した。本研究結果を応用すれば、最終的には、大豆シスト線虫の大豆への感染抑制系を開発することが可能であると考えている。本研究による応用系では、形質転換体を用いずに線虫感染を防御でき、また大豆だけでなくイネやジャガイモを含めた他の作物の線虫被害対策にも応用可能であるため、幅広い効果が期待できると考えている。

## 実験方法

実験に用いた合成ペプチドは、オペロンバイオテクノロジー株式会社に委託し、95%以上の精製率を確保して納品してもらった。精製したCLV3ペプチドは-80℃で保存し、50%アセトニトリルで5 mMに溶解後は-5℃で保存した。

植物体の無菌栽培は以下の通り行った。まず種子を滅菌液 [1% sodium hypochlorite, 0.1% (w/v) Triton X-100] に10分間浸漬し、その後滅菌水で5回すすい

だ。次にこれらをGMA培地 [2.3 g/L Murashige and Skoog plant salt mixture, 10 g/L sucrose, 3 mg/L thiamine hydrochloride, 5 mg/L nicotinic acid, 0.5 mg/L pyridoxine monohydrochloride, 20 g/L Bacto Agar, 0.5 g/L 2-morpholinoethanesulfonic acid monohydrate (MES, pH 5.7)] 上に播種し、22℃、30~50  $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ 連続白色光下で育成した。

GMA培地へのペプチド添加時には滅菌水に希釈後、75℃で10分間処理することにより低温殺菌を行い、無菌的環境で培地に添加した。バイオアッセイには、シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) Col 野生型系統を用いた。シロイヌナズナ種子は、Ohio state universityに設置されている、Arabidopsis Biological Resource Center (<http://www.biosci.ohio-state.edu/~plantbio/Facilities/abrc/abrchome.htm>) より分与して頂いた。

## 結果と考察

線虫において、細胞外に分泌されると考えられている、あるたん白質<sup>4)</sup>の予想アミノ酸配列において、植物のCLEドメインと相同性を示す領域付近について、様々な長さのペプチドを化学合成した (Fig. 1)。これらの合成ペプチドを1  $\mu\text{M}$ 含む寒天培地上でシロイヌナズナを11日間生育させたところ、根の長さに違いが観察された。Fig. 2に示すように、コントロール処理 (バッファー処理) の野生型は約10 cmの根長を示したのに対し、ペプチド2、ペプチド3を処理した物は、約3 cmから4 cmと根の伸長が阻害されていた。一方、ペプチド5、ペプチド6を処理した場合には、根長が約10 cmと、伸長効率の増大が観察された。ペプチド1、ペプチド4に関しては、特に効果は観察されなかった。これまでに、当該遺伝子を植物で過剰発現させると、植物の根の伸長が促進されるということが示唆されている<sup>5)</sup>。このことから、ペプチド5、もしくは、ペプチド6は機能的なペプチドである可能性が示唆される。ペプチド5のほうがペプチド6よりも短いために、こちらが線虫のCLEペプチドの機能的な最終産物である可能性も考えられるが、今後、*in situ* MULDI-TOF-MS法等での組織からの直接的な検出などによる

検証が必要となってくると考えられる。一方、ペプチド2、ペプチド3処理を行った植物は、根の伸長が抑制されていた。このことは、これらのペプチドが、機能的なペプチドと、その受容体の結合に関して拮抗的に働き、機能的なペプチドの機能を抑制した可能性が考えられる。このことから、ペプチド6と、他のペプチドを組み合わせる植物に対する添加実験を行った。もし、ペプチド2やペプチド3が拮抗的に機能するのであれば、ペプチド6の機能を阻害し、根長が短くなることが期待出来る。そこで、ペプチド6を1 $\mu$ Mの

- 1 ; **GKKPSGPNPGGNN**
- 2 ; **KKPSGPNPGGNN**
- 3 ; **KPSGPNPGGNN**
- 4 ; **KPSGPNPGGN**
- 5 ; **KKPSGPNPGGN**
- 6 ; **GKKPSGPNPGGN**

Fig. 1. Synthetic nematode peptides. Various length of CLE peptides were chemically synthesized.

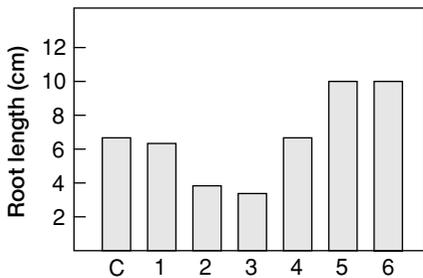


Fig. 2. Effect of various peptide on wild-type root length development. Main root length was measured after 11 days of growth on media containing peptides (n=3). Mean value was shown. Numbers means peptide number, and C means control treatment.

濃度で、また、その他のペプチドも1 $\mu$ Mの濃度で同時に寒天培地に添加し、シロイヌナズナの種子を播種し、11日間生育させた後、根長を測定し、各ペプチドの効果を検証した。その結果、Fig. 3に示すように、ペプチド6を単独で添加したときはバッファー処理の場合に比べて、やはり根長が長くなり、ペプチド1、ペプチド4を加えたときは、それに対し、ほとんど効果はなく、ペプチド6を単独で投与したときと似た根長を示した。一方、ペプチド5、ペプチド6を加えた場合は、若干、ペプチド6単独の場合に比べて根長が長くなっていった。このことは、ペプチド濃度が高くなる事による、相加的な効果ではないかと考えられる。さらに、ペプチド2、ペプチド3を加えて培地に添加した場合は、根の伸長が抑制され、ペプチド6の機能が抑圧された。このことから、ペプチド2、ペプチド3は、やはり拮抗的に機能しうる可能性が示唆された。今後、これらのペプチドが線虫感染効率が抑制出来ないか等の検討を行うことで、より農業への応用も期待出来ると考えられる。

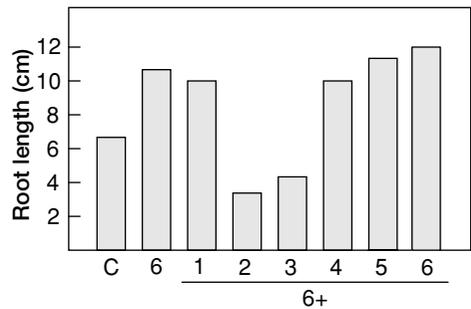


Fig. 3. Effect of various peptide on wild-type root length development. Main root length was measured after 11 days of growth on media containing peptides (n=6). Mean value was shown. Numbers means peptide number, and C means control treatment.

## 要 約

本研究では線虫が持つCLEペプチドを化学合成し、その植物への効果を検討した。遺伝子の過剰発現では根の伸長が促進されることが分かっているが、6種類の合成ペプチドのうち、ペプチド5、ペプチド6の2種類が根の伸長を促進し、ペプチド2、ペプチド3の2種類が抑制することが示唆された。また、根の伸長を促進するペプチド6に対し、全ての合成ペプチド（ペプチド1～6）をそれぞれ同時に投与した結果、ペプチド2、ペプチド3は、やはり根長を短くする効果を持つことから、これらのペプチドはペプチド6に対して拮抗的に作用することが示唆された。今後、この拮抗作用を持つペプチドをもとに、線虫感染抑制に関する研究がより加速すると考えられる。

## 文 献

- 1) Sawa S, Kinoshita A, Nakanomyo I and Fukuda H (2006): CLV3/ESR-related (CLE) Peptides as Intercellular Signaling Molecules in Plant. *The Chemical Record*, **6**, 303-310.
- 2) Kondo T, Sawa S, Kinoshita A, Mizuno S, Kakimoto T, Fukuda H and Sakagami Y (2006): A Plant Peptide Encoded by *CLV3* Identified by In Situ MALDI TOF-MS Analysis. *Science*, **313**, 845-848.
- 3) Ito Y, Nakanomyo I, Motose H, Iwamoto K, Sawa S, Dohmae N and Fukuda H (2006): Dodeca-CLE peptides as suppressors of plant stem cell. *Science*, **313**, 842-845.
- 4) Huang G, Dong R, Allen R, Davis EL, Baum TJ and Hussey RS (2006): A root-knot nematode secretory peptide functions as a ligand for a plant transcription factor. *MPMI*, **19**, 463-470.
- 5) Huang G, Allen R, Davis EL, Baum TJ and Hussey RS (2006): Engineering broad root-knot resistance in transgenic plants by RNAi silencing of a conserved and essential root-knot nematode parasitism gene. *Proc Natl Acad Sci*, **103**, 14302-14306.