

合成ペプチドを用いた大豆シスト線虫・根瘤線虫防御に関する基礎研究

澤 進一郎*

熊本大学大学院自然科学研究科

Basic Analysis of Defenses Against Nematode Infection in Plants

Shinichiro SAWA *

Graduate school of Science and Technology, Kumamoto University, Kumamoto 860-8555

ABSTRACT

Because of their agricultural importance, the soybean cyst nematode *Heterodera glycines*, which infects soybean (*Glycine max*), and *Meloidogyne incognita*, which infects many crops, have emerged as good 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 bases of legume-nematode interactions are merging at the crossroads of plant-microbe interactions and plant developmental biology. On the one hand, the CLE peptide hormone is the molecule responsible for the control of plant meristem activity, and CLE genes are conserved in many plants. On the other hand, in the animal kingdom, only nematodes that are infective of plants have the CLE gene. This CLE gene of nematodes is likely to be functional in the plants. Once nematodes infect roots, they redifferentiate root cells into multinucleated giant cells, as source of nutrition, by injection of various effector proteins including the CLE peptides of nematodes. In this study, to elucidate the molecular mechanism of the infection process of nematodes, nematode infection experiments with Arabidopsis mutant and marker transgenic plants were performed. The rate of nematode infection suggests that genes related to dedifferentiation, redifferentiation, the auxin signaling pathway and the cyclin signaling pathway are required for nematodes to infect plants. *Soy Protein Research, Japan* **15**, 21-25, 2012.

Key words : nematode, Arabidopsis, CLE, peptide, molecular mechanism

* 〒860-8555 熊本市中央区黒髪2-39-1

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。線虫による作物被害は年間数十億ドルとも試算されている。そのような状況のなかで、線虫感染耐性作物も存在するが、完全に耐性を示すわけではない上に、作物が高温にさらされると、その感染耐性が打破されてしまうことが知られている。このようなことから、線虫感染の分子機構を明らかにし、その感染被害抑制の対策を急がなければならないと考えられる。

我々は、以前、様々な合成ペプチドを用いて、線虫の植物への感染効率を低下させるペプチドを見いだした¹⁾。その解析において、CLEペプチドが線虫感染に重要な機能を果たすことを明らかにした。本研究では、その成果を受け、さらに発展させ、線虫の植物感染メカニズムの解析を目指した。その目的のために、我々は、植物への線虫感染過程における分子機構の解明のため、主に関東以南で猛威をふるっているサツマイモネコブセンチュウのシロイヌナズナへの感染系を確立した。現在のところ、液体培養系を組み合わせ、3日に100万頭の線虫を得ることが可能となり、また、フィルター滅菌などによる線虫の滅菌も可能となった。シロイヌナズナの突然変異体を利用した感染効率を検定した結果、細胞分裂やペプチドホルモン、再分化やオーキシンシグナルに関与する遺伝子の突然変異体はセンチュウ感染耐性を示すことが明らかになった。また、レポーターラインを使った解析から、それらの遺伝子が線虫感染時に機能することも明らかとなった。

さらに、シロイヌナズナのEMS処理による突然変異プールを利用して、線虫感染過剰突然変異体のスクリーニングを開始した。

今後、このような遺伝子群の機能調節を行う事で、線虫感染耐性作物の作出へつながることが期待される。

方 法

実験生物系統

本研究では、九州沖縄農研で培養されているネコブセンチュウ (Root-Knot Nematode; 以下, RKN) のサツマイモネコブセンチュウ (*Meloidogyne incognita*; 以下, *M. incognita*) を用い、その培養にはトマト (*Solanum lycopersicum*) の栽培品種であるブリッツ (カネコ種苗株式会社) を用いた。また、シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) の野生型 (以下,

WT) としてColumbia (以下, Col) を用い、23種類の変異体 (*rpk2-5*, *clv2-101*, *clv2 agb1-2*, *clv1-101*, *agb1-2*, *sol3*, *pWIND-WIND1-SRDX*, *arr1 arr12*, *myb3r4*, *myb3r1 myb3r4*, *gig1 myb3r4*, *fls2*, *pen2-2*, *pen3-1*, *arf7-1 arf19-1*, *nph4-1 arf19-1*, *slr-1*, *arf7-1*, *arf19-1*, *nph4-1*, *AtrbohD D-1*, *AtrbohD D-4*, *AtrbohD D-8*) や、6種類の遺伝子マーカーライン (*pCLV3::NLS::GUS*, *CYCB1::GUS*, *pWUS::GUS*, *APC8p::APC8-GUS5*, *APC8p::APC8-GUS7*, *WIND1proGUS Kmr*) を用いた。**シロイヌナズナへの*M. incognita*感染**

まず、1.5 mLチューブに入れたシロイヌナズナ種子に滅菌液を1 mL加えて滅菌した。クリーンベンチ内でピペットマンを用いてそれぞれの培地に種子を1粒ずつ1シャーレに6粒ずつ滴下した。5°Cで2日間休眠打破を行った後、培養室に移し5日間培養 (24 h明条件 / 20°C) した。

次に、水耕栽培システムから回収した*M. incognita*のJ2sを10 μm ISOPORE メンブレンフィルター (MILLIPORE) を500 mL Sterifilホルダー (MILLIPORE) のプレフィルター上にのせた濾過システムに通し、J2sをメンブレンフィルター上に集めた。その後、800-1,000 mLの滅菌水を少しずつ流し入れ、メンブレンフィルター上のJ2sを洗った。メンブレンフィルターを取り出し、必要な量の滅菌水を入れた100 mLビーカーに移し、メンブレンフィルターを軽く洗ってJ2sを必要量の滅菌水に濃縮した。さらに、その線虫溶液を10 μm ISOPORE メンブレンフィルター (MILLIPORE) をSterifil無菌ろ過システムのプレフィルター上にのせた濾過システムに通し、J2sをメンブレンフィルター上に集めた。その後、800-1,000 mLの滅菌水を少しずつ流し入れ、メンブレンフィルター上のJ2sを洗った。次に、メンブレンフィルターを取り出し、滅菌水を少量入れた丸型シャーレに移し、メンブレンフィルターを軽く洗ってJ2sを少量の滅菌水に濃縮した。さらに、濃縮溶液を10 μm ISOPORE メンブレンフィルター (MILLIPORE) をSterifil無菌ろ過システムのプレフィルター上にのせた濾過システムに通し、J2sをメンブレンフィルター上に集めた。その後、800-1,000 mLの滅菌水を少しずつ流し入れ、メンブレンフィルター上のJ2sを洗った。

滅菌した*M. incognita*のJ2sを5日間育成したシロイヌナズナの入ったシャーレに1枚あたり約720頭 (1個体あたり約120頭) のJ2sが入った200 μLを植物体の根から約2 cm下に接種した。

結 果

播種後14日目のシロイヌナズナ（野生型，Col系統）に*M. incognita*を1個体につき120頭接種し，2週間経過後の感染過程を観察すると，*M. incognita*を接種しなかった比較対照に比べ，*M. incognita*を接種したシャーレでは，植物の根に根こぶがみられたほか，側根がよく形成され，根が様々な方向に伸長する様子が観察できた。また，*M. incognita*を接種後6週間後経過すると，根こぶが大きくなっており，根の表面に卵塊もみられた。変異体の*slr-1*は側根が出ない変異体であるが，*M. incognita*を接種して2週間後のシャーレでは側根形成が誘導されていた。*M. incognita*を接種して2週間後のシロイヌナズナの変異体について，全体で何個体の根に根こぶができていたのかを実体顕微鏡で観察し，比較対照である野生型の感染率と各変異体の感染率との比較を行った。

今回，CLEシグナル伝達因子の突然変異体として，*rpk2-5*，*clv2-101*，*clv2 agb1-2*，*clv1-101*，*sol3*，*agb1-2*，植物の脱分化・組織再生に関わる遺伝子の突然変異体として*pWIND-WIND1-SRDX*，*arr1 arr12*，細胞分裂制御に関わるサイクリンの転写促進因子の変異体として*myb3r4*，*myb3r1 myb3r4*，*gig1 myb3r4*，病害応答に関わる遺伝子の変異体として*fts2*，*pen2-2*，*pen3-1*，*AtrbohD D-1*，*D-4*，*D-8*，オーキシンのシグナルに関わり側根形成を制御する遺伝子の突然変異体として*slr-1*，*nph4-1 arf19-1*，*nph4-1*，*arf7-1 arf19-1*，*arf7-1*，*arf19-1*を選抜し，線虫感染効率を検討した。

その結果，*rpk2-5*，*clv2-101*，*clv2 agb1-2*，*clv1-101*，*agb1-2*，*pWIND-WIND1-SRDX*，*arr1 arr12*，*slr-1*の感染率はWTのColへの感染率よりも低くなることがわかった。特に，*clv1-101*，*slr-1*の感染率が顕著に低下するという事が明らかとなった。一方，*sol3*，*nph4-1 arf19-1*，*nph4-1*はWTのColへの感染率よりも高くなるという結果が得られた。

*M. incognita*の感染による各種遺伝子発現パターン変化を調査するために，CLEシグナル伝達系のマーカーラインとして*pCLV3::NLS::GUS*，*pWUS::GUS*を，細胞分裂マーカーとして*CYCBI::GUS*を，脱分化・組織再生遺伝子のマーカーとして，*APC8p:APC8-GUS5*，*APC8p:APC8-GUS7*，*WIND1proGUS Kmr*を選抜した。

*M. incognita*の接種後6-11日の上記マーカーライン6種の根についてGUS染色を行い，マーカー遺伝子の空間的発現パターンを観察した。*pCLV3::NLS::GUS*について，線虫を接種しなかった個体の根では染色が

確認できなかったが，接種してから6日後以降，根こぶでの染色が確認でき，根こぶで*CLV3*が発現していることが分かった。特に，根こぶの維管束組織や内皮，内鞘部分の強い染色が観察された。*CYCBI::GUS*については，細胞分裂が盛んに行われる根の先端部分でよく染まっていた。線虫を感染させたものについては，根こぶで染まっている部分がみられ，内皮や内鞘部分で染色される細胞が確認された。*pWUS::GUS*については，線虫感染の有無にかかわらず，根でのマーカー遺伝子の発現は確認できなかった。*APC8p:APC-GUS5*については，根の先端で強い染色が確認できたが，線虫を感染させた個体では根こぶ部分でも染まり，維管束組織や内皮，内鞘での染色が確認できた。*APC8p:APC-GUS7*も*APC8p:APC-GUS5*と同様の染色パターン傾向を示したが，あまり強く染まらなかった。*WIND1proGUS Kmr*については，線虫を感染させた個体では，線虫が通過したと考えられる部分の内鞘や，根こぶ部分の内皮，内鞘での染色が確認できた。

考 察

線虫がCLEペプチドホルモン様遺伝子をもつことから，CLEペプチドの*CLV3*の受容体として知られる遺伝子の変異体である，*rpk2-5*，*clv2-101*，*clv2 agb1-2*，*clv2-101*，*agb1-2*に線虫感染実験を行った。いずれの変異体も感染率が低いという結果が得られたが，特に*clv1-101*はWTとして使用したColへの感染率の半分以下であり，線虫に対して抵抗性を示した。このことから，*clv1-101*が線虫のCLEペプチドホルモン様のエフェクター因子を受容し，giant cellの誘導に関わっていると考えられる。また，GUS染色の結果から，線虫の感染部位で*CLV3*の発現がみられることから，線虫のエフェクター因子により*CLV3*の発現が誘導され，この*CLV3*を*CLV1*が受容しているのかもしれない。しかしながら，*WUS*については，GUS染色の結果より，線虫の感染部位では発現しなかった。よって*WUS*による*CLV3*の発現誘導は行われていないと考えられる。線虫の感染部位で*CLV3*が発現していることから，giant cellの形成過程における*CLV3*の関与についてはさらなる解析が必要である。*CLV3*シグナル伝達系に関する受容体以外の変異体として*sol3*を使用した。*sol3*の原因遺伝子はユビキチンリガーゼをコードする遺伝子であり，この遺伝子は*CLV1*の分解を誘導し，*CLV3*ペプチドシグナルを伝達していると考えられている。*sol3*は線虫感染に対して高い感受性を示し，このことから，*SOL3*は線虫の感染に対して抵抗性を

示す遺伝子であることが考えられる。

また、線虫感染過程に関わると考えられる様々な遺伝子の変異体への線虫感染実験を行った。pWIND-WIND1-SRDX, *arr1 arr12*は脱分化に関わる遺伝子の変異体である。WIND1はWOUND INDUCED DEDIFFERENTIATION 1の略である。植物が損傷を受けた組織を再生する際に、すでに分化した細胞を脱分化させるための遺伝子であると考えられている²⁾。WIND1の機能を抑制したWIND1-SRDX (SUPERMAN repression domain) では脱分化が抑制されるため、線虫感染において重要なイベントであるgiant cellの形成が阻害され、線虫感染に対する抵抗性が期待された。その結果、Colよりも約4分1程度感染率が低いという結果が得られた。*arr1 arr12*はARABIDOPSIS RESPONSE REGULATOR (ARR) 1遺伝子とARR12遺伝子の二重変異体であり、WIND経路を阻害すると考えられており、この変異体に関しても線虫感染への抵抗性が期待された。*arr1 arr12*はColよりも感染率が低く、pWIND-WIND1-SRDXよりも低いという結果が得られた。MYB3R1とMYB3R4は細胞周期においてG2/M期に特有の遺伝子であるCyclin-dependent kinase (CDK)などの転写制御を行うことで、細胞分裂を促進させる遺伝子である³⁾。この変異体である*myb3r4, myb3r1 myb3r4, gig1 myb3r4*は根こぶ形成を抑制すると考えられたが、Colとあまり変わらない結果となった。*fls2, pen2-2, pen3-1*はいずれも病害応答に働く遺伝子の変異体で、特にFLS2はロイシンリッチリピートをもつ受容体キナーゼであり、細菌の鞭毛の主要たん白質であるフラジェリンを認識して、病害応答を活性化する⁴⁾。*pen* (penetration) 突然変異体は、病原菌の侵入を促す変異体として単離された。いずれもColの感染率とあまり変わらなかった。*AtrbohD*は病原菌感染時に活性化し、ROSを生成する遺伝子である。*AtrbohD D-1, D-4, D-8*は、*AtrbohD*遺伝子のプロモーターの下流に、*AtrbohD*のORFをそれぞれつないだものをpBIN19にのせて導入したものである。これらの変異体は病原体感染時にROSをWTよりも多量に生成し、耐病性能が高いと期待されるもので、線虫感染に対しても耐性をしめすのではないかと考えられた。結果は、野生型よりも感染率が高いものが多く、ROSによる線虫への抵抗性はみられなかった。*arf7-1 arf19-1, nph4-1 arf19-1, slr-1, arf7-1, arf19-1, nph4-1*については、いずれもオーキシン関連遺伝子の変異体である。AUXIN RESPONSE FACTORであるARF7とARF19は側根形成を制御しており、*arf7 arf19*二重変異体は側根の大幅な減少がみられる。*nph4-1*は

*arf7*の対立遺伝子であり、*nph4-1 arf19-1*も側根形成に異常がみられる変異体である。*solitary-root(slr)-1*はオーキシンに対する感受性が弱く、側根形成が完全に欠落している。線虫の感染率はColに比べて、*slr-1*は低く、*arf7-1 arf19-1, nph4-1 arf19-1*は高いという結果になった。*slr-1*については、SLR関連のオーキシンシグナル伝達がうまくいかないために*slr-1*は線虫に抵抗性を示したことが考えられる。もしくは、線虫は根の伸長領域から侵入することが分かっており、*slr-1*では側根が生えないために線虫の感染する機会が減ることによる感染率の低下が考えられる。また、*slr-1*ではFig. 1のように線虫を感染させると側根が形成された。これは、線虫が感染したことにより他のARFが発現し、側根形成を誘導したと考えられる。また、*arf7-1 arf19-1*や*nph4-1 arf19-1*については側根形成に異常があるにも関わらず感染率は高かった。どちらもオーキシン関連因子の変異体であったが、どちらも線虫の感染した際に誘導されるオーキシン経路には関係のない遺伝子の変異体であったのかもしれない。各変異体の感染率について、大きな抵抗性を示すものは少なかった。

GUS染色については、CYCB1:GUSによってサイクリン関連の遺伝子であるCYCB1の発現が根こぶでみられ、線虫がエフェクター因子を注入することで増殖が促進するといわれる内鞘や内皮でよく染まっていた。また、APC8p:APC8-GUS5, APC8p:APC8-GUS7, WIND1proGUS Kmrは再分化関連のマーカーラインであり、APC8p:APC8-GUS5, APC8p:APC8-GUS7, WIND1proGUS Kmrでは根こぶで発現がみられたため、線虫が感染したことにより再分化が起こることが確認できた。WIND1proGUS Kmrについては、根こぶ以外に線虫が通過したと思われる部分が染まっており、線虫が通過したことにより細胞が傷ついた、もしくは、線虫が通過しながらエフェクター因子を周囲の細胞に注入したことによる損傷からWIND1が発現したのかもしれない。

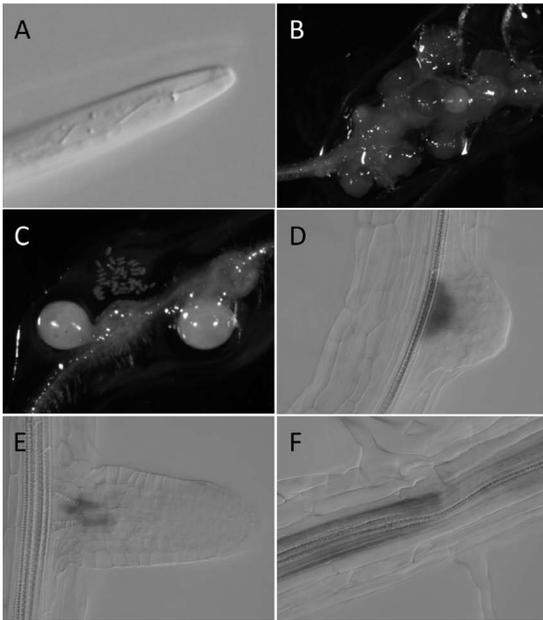


Fig. 1. Nematode infection in Arabidopsis.

A: *Meloidogyne incognita*. B: Root knot formation in Arabidopsis root. C: Egg mass of the nematode. D, E: Root of the CLV3:GUS Arabidopsis. F: Root of the pWIND1:GUS.

要 約

本研究では、植物への線虫感染に関与する遺伝子群の同定を行った。その結果、細胞分裂に関わる遺伝子群、CLEペプチドに関わる遺伝子群、植物ホルモンのオーキシシンシグナルに関わる遺伝子群、および、細胞脱分化に関わる遺伝子群が線虫感染に必要であることが明らかになった。今後は、このような遺伝子群の阻害を行う事などで線虫感染耐性作物の作出へつながることが期待される。

文 献

- 1) Sawa S (2008): Basic analysis for the defense of soybean cyst nematodes by using synthetic peptides. *Soy Protein Research, Japan*, **11**, 40-44.
- 2) Iwase A, Mitsuda N, Koyama T, Hiratsu K and Ohme-Takagi M (2011): The AP2/ERF transcription factor WIND1 controls cell dedifferentiation in *Arabidopsis*. *Current Biology* **21**: 508-514.
- 3) Haga N, Kato K, Murase M, Araki S, Kubo M, Demura T, Suzuki K, Müller I, Voss U, Jürgens G and Ito M (2007): R1R2R3-Myb proteins positively regulate cytokinesis through activation of KNOLLE transcription in *Arabidopsis thaliana*. *Development*, **134**, 1101-1110.
- 4) Gomez-Gomez L and Boller T (2000) FLS2: an LRR receptor-like kinase involved in the perception of the bacterial elicitor flagellin in *Arabidopsis*. *Mol Cell*, **5**, 1003-1011.