

## 植物感染性線虫の感染分子機構の解析

澤 進一郎\*

熊本大学大学院自然科学研究科

## Analysis of Molecular Mechanisms of Plant Parasitic Nematode Infection Steps

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* that infects soybean (*Glycine max*) and *Meloidogyne incognita* that 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 basis of legume-nematode interactions are merging at the crossroads of plant-microbe interactions and plant developmental biology. The CLE peptide hormone is the molecule responsible for the control of plant meristem activity, and CLE genes are conserved in many plants. However, in the animal kingdom, only nematodes that are infective to plants has CLE gene. This CLE gene of nematodes is likely to be functional in plants. Once nematodes infect roots, they make root cells into multinucleated giant cells, as source of nutrition, by injection of various redifferentiation factors thought to be involved CLE peptides of nematodes. Here we have performed genetic screening to isolate nematode infection resistant mutants from *Arabidopsis thaliana*. In the first screening, we isolated 25 putative nematode infection resistant mutants. We performed the resistance three times, and we have isolated four candidates for nematode infection resistant mutant of *Arabidopsis*. Furthermore, we also screened many chemicals that guide root knot nematode. We have developed devices to evaluate the nematode guidance activity, and one guidance behavior was confirmed when the nematodes are packed in a small space. If we isolate the chemical, we will be able to develop new agricultural chemicals that can defend against the nematode damage. *Soy Protein Research, Japan* **16**, 39-42, 2013.

---

\* 〒860-8555 熊本市中央区黒髪2-39-1

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

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<sup>1)</sup>。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。また、我々は、さらに、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、CLEペプチドなどを用いた感染成立に、細胞分裂やペプチドホルモン、再分化やオーキシシグナルに関与する遺伝子が関与することを明らかにした<sup>2)</sup>。

本研究では、その成果を受け、さらに発展させ、より強い感染耐性を示す作物を作出するために、線虫感染過剰突然変異体の単離を行い、5つの突然変異体の単離に成功した。今後、この原因遺伝子を同定し、過剰発現させることで、様々な作物の線虫感染耐性を獲得できると考えている。

さらに、線虫誘引物質の探索を開始した。様々なケミカルライブラリーを用いた実験では、現在のところ、候補は得られていない。しかし、その誘因活性を検出するデバイスを開発し、そのデバイスを用いた実験から、線虫がデバイスの狭所に閉じ込めたと時のみ誘引物質を放出することが明らかになった。今後、この誘引物質を同定し、化学合成することで、“線虫ホイホイ”のような、線虫を一箇所に集めて一網打尽にする農薬の開発などに応用できると考えている。

## 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*) の栽培品種であるプリッツ (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、スクリーニングに利用した。また、突然変異原としてEMS処理を利用した。

### 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℃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℃) した。

次に、水耕栽培システムから回収した*M. incognita*のJ2sを10  $\mu$ m 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、800-1000 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  $\mu$ m 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、800-1000 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  $\mu$ m 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、800-1000 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  $\mu$ Lを植物体の根から約2 cm下に接種した。

## 結 果

### シロイヌナズナの線虫過剰着生突然変異体のスクリーニング

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．この線虫感染系を用いて，線虫過剰着生突然変異体のスクリーニングを行った．まず，シロイヌナズナの野生型系統（Col）の種子に対して0.1%EMSを8時間処理し，その種子を3回洗浄した後，土に播種した．その種子から育てたシロイヌナズナの個体群を，45バッチに分けて収集した．なお，1バッチあたり，約20-30個体を含み，各バッチ1,000粒程度の種子を得た．次に，この種子を各バッチあたり100粒程度土に播種し，2週間経過後に，サツマイモネコブセンチュウを1ポットあたり1,000頭感染させた．感染は4回行い，最初に感染してから，約4週間後に，根に瘤がどの程度形成されたかをカウントした．

その結果，野生型系統に比べて顕著に線虫感染が過剰になる物を選抜した（Fig. 1 A, B）．これらの個体を，さらに土に植え替え，その後，種子を採取した．採取した種子を用いて感染実験を行い，線虫過剰着生という表現型が遺伝するかどうかを確認した．合計3世代まわし，3回確認を行った結果，5つの線虫過剰着生突然変異体が得られた．中でも，候補番号19-2は，野生型に比べ，非常に多くの根瘤が形成された（Fig. 1 A, B）．

5つの突然変異体について，世代を回して実験を3回独立に行い，その全てにおいて，根瘤過剰着生が確認できた（Table 1）．

### サツマイモネコブセンチュウの集合行動の検出

サツマイモネコブセンチュウは，作物被害をもたらす害虫としてよく知られるが，その駆除は未だ難しく，土壌改良が必要である．サツマイモネコブセンチュウの汚染土壌から，線虫を効率的に駆除するために，その行動を制御する物質の単離を目指した．

感染相手である植物の根から，化学物質が放出され，それにサツマイモネコブセンチュウが誘引される場合，根からの放出物を用いて検定すればよい．そこで，我々は，植物の根や，生育した根周辺の寒天培地成分，さらには，様々なケミカルライブラリーを用いて，誘因活性の検出を試みた．9 cmプラスチックシャーレの一端に検定物質などをスポットし，その反対側に

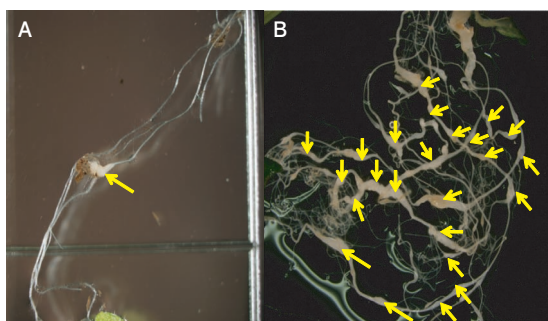


Fig. 1. Screening of excess nematode infection mutant A: Arabidopsis wild type (Col), B: candidate#19-2. arrows show root knot.

Table 1. nematode infection rate of the mutants

| Plants   | Exp. 1   | Exp. 2  | Exp. 3   |
|----------|----------|---------|----------|
| WT (Col) | 3.2±1.2  | 2.1±4.6 | 2.5±1.4  |
| #19-2    | 12.3±3.9 | 8.6±4.1 | 10.2±1.5 |
| #10-6-1  | 5.8±3.2  | 6.2±1.2 | 4.6±3.3  |
| #12-4-1  | 7.1±5.1  | 5.5±3.2 | 5.7±2.5  |
| #14-4    | 4.4±3.5  | 3.9±1.8 | 6.4±2.1  |
| #24-4    | 6.7±1.8  | 5.7±3.4 | 4.1±1.1  |

Root knot number was counted after four weeks infection (n=12)

線虫をスポットし，8-12時間後に線虫が誘引されたか否かを確認した．しかし，今年度，我々は，その検定物質の全てにおいて，誘因活性検出に成功できなかった．そこで，誘因活性の効率的な検出のために，マイクロ流路デバイスを利用した．その結果，狭所にサツマイモネコブセンチュウが効率的に集合することを明らかにした．今後，この系を利用することで，線虫誘引物質の同定が可能になると考えている．

## 考 察

シロイヌナズナを用いた遺伝学的スクリーニングにより，本研究では，サツマイモネコブセンチュウの過剰着生突然変異体を単離した．5つの突然変異体が単離されたが，その耐性の強さに違いが見られることから，異なる遺伝子に変異が入ったことも考えられるが，今後，アレリズムテストなどを行う必要があると考えている．一方，これらの突然変異体の全ゲノムシーケンスを解読する予定で，既に，ゲノムシーケンスを行っている<sup>3)</sup>．今後の，ゲノム情報解析により，どの変位が線虫の過剰着生を誘導するかが明らかになると考えている．今回単離した突然変異体は，劣勢の突然変異体であることから，機能喪失型の突然変異体であるこ

とが考えられる。つまり、この原因遺伝子を単離し、過剰発現させた場合、線虫の感染による根瘤形成が抑制されることが期待できる。

今後、この原因遺伝子の単離を行い、様々な作物に導入することで、新たな分子育種が可能となり、線虫感染耐性の作物を作出することが可能になると考えている。

一方、今回、デバイスを利用して、狭所に線虫を誘引することに成功した。これまでに、ネコブセンチュウの誘因に関する有意な物質は同定されていないため、線虫の誘引物質同定に向けて、大変貴重な行動制

御に成功したと考えている。また、この誘引活性検出により、誘引物質の同定に道が開けたと考えている。今後、この誘引活性が認められた培地を用いて、その原因物質を同定することで、線虫の行動を制御できるようになると考えている。

具体的には、その物質をダイズなどの作物を生育させる畑の一角に投与し、1箇所に線虫を誘引し、一網打尽に殺虫する、もしくは、トラップを仕掛けて“線虫ホイホイ”を作成することで、土壌中の線虫量を減少させることが可能になると考えている。

## 要 約

本研究では、より強い感染耐性を示す作物を作出するために、線虫感染過剰突然変異体の単離を行い、5つの突然変異体の単離に成功した。また、マイクロ流路デバイスを用いて、線虫の行動を人工的に制御することが可能となった。この誘引活性検出により、誘引物質の同定に道が開けたと考えている。これらの成果により、以下の二つの応用が可能になると考えている。①線虫感染過剰突然変異体の原因遺伝子を同定し、過剰発現させることで、様々な作物の線虫感染耐性を獲得できると考えている。②線虫誘引物質を同定し、ダイズなどの畑に投与することで、一網打尽に殺虫する、もしくは、誘引物質とトラップを組み合わせ“線虫ホイホイ”を作成することで、土壌中の線虫量を減少させることが可能になると考えている。

## 文 献

- 1) Sawa S (2008): Basic analysis for the defense of soybean cyst nematodes by using synthetic peptides. *Soy Protein Research*, **11**, 40-44.
- 2) Sawa S (2012): Basic analysis on the defense for nematode infection in Plant. *Soy Protein Research*, Japan, **15**, 21-25.
- 3) Tabata R, Kamiya T, Shigenobu S, Yamaguchi K, Yamada M, Hasebe M, Fujiwara T and Sawa S (2013): Identification of an EMS-induced causal mutation in a gene required for boron-mediated root development by low-coverage genome re-sequencing in Arabidopsis. *Plant Signal Behav*, **8**, e22534.