

研究成果報告書

事業名(補助金名) : 基盤的研究開発育成事業 (若手研究補助金)
研究開発テーマ名 : 植物寄生線虫の孵化制御技術の開発
研究代表者名 : 得字 圭彦【国立大学法人帯広畜産大学／助手】

背景・目的

ダイズシストセンチュウ(図1)は、世界中の冷涼な気候の地域（国内では東北、北海道など）で発生し、ダイズ、アズキなどマメ科作物に寄生し、植物体から栄養を奪い取り、年間約25億ドルもの被害をもたらしている。この線虫の卵は宿主がない時にはシストという固い外殻の中で休眠するため、低温や乾燥、農薬に対して耐性を持ち、防除が非常に困難である。シスト内の卵は、マメ科植物の根が出す孵化促進物質を感受すると孵化し、根圏で爆発的に増殖する。この孵化を促進する物質グリシノエクレピンはインゲンから発見され、構造が決定されている(Masamune, 1982)。しかし、その作用機構や情報伝達については明らかになっていない。

本研究では、現在未解明であるシストセンチュウ孵化誘導の分子メカニズムを明らかにするとともに、その成果をもとにして人為的な孵化制御による新たな線虫駆除法を開発することを目的としている。まず、孵化を誘導する根分泌物に応答して線虫卵で発現が消長する遺伝子を網羅的に収集し、塩基配列を決定し、データベースに対して相同性検索を行う。また、RT-PCRやホールマウント *in situ* ハイブリダイゼーションにより発現パターンを解析する。さらに単離した遺伝子の二本鎖RNAをインビトロで合成し、この遺伝子を標的としたRNA干渉実験を行うことにより、機能を阻害した時の線虫の孵化に対する影響を調べる。以上の研究結果を、全ゲノムが解析されているモデル線虫

Caenorhabditis elegans の塩基配列、発現パターン、変異体の表現型などの情報データベースと比較しながら、孵化に関わる情報伝達経路を明らかにする。また、単離されたの中から線虫孵化に必須の遺伝子を見出し、マメ科作物に対する遺伝子導入によりこの遺伝子と相同的な塩基配列のヘアピン状二本鎖RNAを発現させ、異生物間のRNA干渉を起こさせることにより孵化を効率的に制御する方法を確立することを目指す。



図1 ダイズシストセンチュウの生活環

研究材料と方法

1) ディファレンシャルディスプレイによる孵化液応答性遺伝子の単離

殺菌したダイズシストセンチュウの卵に孵化液（インゲンの根の浸出液）を加えて24時間静置した卵、滅菌水を加えて24時間静置した卵、未処理の卵の各試料から、Total RNAを抽出した。これらのTotal RNAを鑄型とし、オリゴdTプライマーと SuperScript II reverse transcriptase (Gibco BRL) を用いて逆転写を行い、cDNAを合成した。各cDNAをランダム10merのプライマーを用いたPCRを行い、産物を1.5%アガロースゲル電気泳動に供した。泳動終了後、差異の見られたバンドを切りだして精製し、pGEM-T-Easyベクター (Promega) とライゲーション反応後、大腸菌コンピテントセル (*Escherichia coli* XL1-Blue) に形質転換し、クローン化した。各クローンについてコロニーPCRで増幅し、ダイレクトシーケンス法によって塩基配列を決定した。得られた配列をもとにNCBI-Blastを使って相同性検索を行った。

2) RT-PCRによる遺伝子発現量の定量

線虫卵に孵化液を加えてから経時的に採取し、抽出したTotal RNAを鑄型として、オリゴdTプライマーと SuperScript II reverse transcriptaseを用いて逆転写を行い、cDNAを合成した。cDNAを鑄型としてSYBR-Green ROX mix (ABgene)と各遺伝子の配列特異的プライマー対を用いたPCRを7300 Real time PCR system (ABI)によって行った。発現量の標準化はアクチン遺伝子の発現量を基準に行った。

3) ホールマウント *in situ* ハイブリダイゼーションによる mRNA の局在解析

無菌処理した線虫または卵を 2% パラホルムアルデヒド、M9 バッファー (6 g/l Na₂HPO₄、3 g/l KH₂PO₄、5 g/l NaCl、0.25 g/l MgSO₄·7H₂O) 内で 5°C 18 時間、その後 22°C で 4 時間固定した。0.1× 固定液で再懸濁し、剃刀でセンチュウを切断した後、プロテアーゼ K を加え、22°C で 22 分間インキュベートした。試料をドライアイス上で 20 分間冷凍した後、そのままドライアイス上でメタノールで 1 分間、アセトンで 1 分間処理した。遠心分離でペレット状にし、20% アセトンで 22°C で 20 分間再水和した。固定した試料にハイブリダイゼーションバッファー [50% 脱イオンホルムアミド、4× SSC、2% SDS、1% blocking reagent、0.1× マレイン酸バッファー {10 mM マレイン酸、15 mM NaCl (pH 7.5)}、1× デンハルト液、1 mM EDTA、0.2 mg/ml サケ精子 DNA、0.15 mg/ml yeast tRNA] を加え、55°C で 1 時間プレハイブリダイゼーションを行った。各 cDNA を鋳型とし、DIG-UTP と T3 または SP6 RNA ポリメラーゼを用いたインビトロ転写反応を行い、DIG 標識 RNA プローブを作成した。DIG 標識 RNA プローブをハイブリダイゼーションバッファーで希釈し、250 μl 加え再懸濁し、55°C で一晩ハイブリさせた。4× SSC で 55°C で 15 分間洗浄を 3 回行った後、NTE バッファー {0.5 M NaCl、10 mM Tris-HCl、1 mM EDTA (pH 8.0)} を加え、37°C で 10 分間洗浄した。NTE バッファーで希釈した 60 μg/ml RNase A を加え、37°C で 1 時間静置させた。そして 0.1× SSC と 0.1% SDS を加え、55°C で 20 分間洗浄を 3 回行った。マレイン酸バッファーで洗浄後、blocking solution (1% blocking reagent を含むマレイン酸バッファー) で 22°C、30 分間処理した。750 mU/ml AP 標識抗ジゴキシゲニン抗体断片を含む blocking solution を加え、22°C で 2 時間ラベルした。0.05% Tween 20 を含むマレイン酸バッファーを加え、22°C で 15 分間洗浄を 3 回行った。検出バッファー {0.1 M Tris-HCl (pH 9.5)、0.1 M NaCl、50 mM MgCl₂} で短時間洗浄した後、染色液 (337 μg/ml Nitroblue tetrazolium chloride、175 μg/ml 5-bromo-4-chloro-3-indolyl-phosphate を含む検出バッファー) を加え、室温で 8 時間インキュベートした。発色を確認したら、2 回滅菌水で洗浄し、反応を止め、ノマルスキーメン干渉顕微鏡で観察した。

4) RNA 干渉実験

各 cDNA を鋳型とし、T3 または SP6 RNA ポリメラーゼを用いたインビトロ転写反応を行い、二本鎖 RNA 作成した。Wizard SV カラム (Promega) で精製した後、エタノール沈澱で濃縮し根浸出液を含む M9 バッファーに 0.01、0.1、1 μg/ml になるように二本鎖 RNA を溶解する。線虫卵を二本鎖 RNA 溶液に浸し、25°C で培養し、実体顕微鏡による観察で孵化への影響を調べた。

5) ヘアピン状二本鎖 RNA 発現ダイズの作出

pIG121Hm ベクターの GUS 遺伝子を取り除いたものに、各遺伝子の逆方向反復配列と GUS のイントロンを含む DNA を挿入したコンストラクトを作成し、エレクトロポレーションによって *Agrobacterium rhizogenes*

LBA1334 に導入した。ガンボーグの B5 寒天培地で発芽させた線虫感受性品種ダイズ北見白の根を切り出し、形質転換用のアグロバクテリア菌液を接種し、B5 培地上で 3 日間共培養した。カルベニシリンを含む液体 B5 培地で除菌した後、カルベニシリンと選抜用マーカーのハイグロマイシンを含む B5 培地に移し、1ヶ月間培養して形質転換毛状根を得た。

表1 単離された孵化液応答性遺伝子

Clone	Homology	Function
<i>Hg-kat-1</i>	3-Ketoacyl-CoA thiolase (<i>C. elegans</i>)	β-Oxidation
<i>Hg-dhs-6</i>	Dehydrogenase,short chain (<i>dhs-6C</i>) (<i>C. elegans</i>)	
<i>Hg-lrp-1</i>	LDL receptor-related protein (<i>C. elegans</i>)	Cholesterol uptake
<i>Hg-exc-7</i>	Excretory canal abnormal EXC-7,ELAV type RNA binding protein (<i>C. elegans</i>)	Canal formation
<i>Hg-cm-1</i>	Chorismate mutase (<i>H. glycines</i>)	Shikimate pathway

結果と考察

1) 孵化誘導時に発現変動する遺伝子の単離

線虫卵は、根浸出液に浸されると、5 日程度でほとんどが孵化する。未処理卵、水処理の卵（対照区）、

根浸出液処理（孵化誘導）の卵の間でディファレンシャル・ディスプレーを行い、孵化誘導時にだけ発現変動する遺伝子を単離した。10種類のランダムプライマーを用いて *Hg-kat1*, *Hg-dhs6*, *Hg-lrp1*, *Hg-exc7*, *Hg-cm* の5種類の孵化特異的遺伝子を単離することができた（表1）。

2) 孵化関連遺伝子の構造と発現

塩基配列の相同性から、単離された遺伝子の機能を予想した。また、RT-PCR およびホールマウント *in situ* ハイブリダイゼーションにより、線虫の発達過程や根浸出液に応答した発現パターンを解析した。*Hg-kat1* は脂肪酸の β 酸化に関わる 3-ケトアシルCoAチオラーゼをコードしていた。モデル線虫 *C. elegans* の *Kat1* とはアミノ酸配列で 45%一致していた。*Hg-kat1* の mRNA は根浸出液処理 24 時間に発現し始め、48 時間でピークを向かえた後は急激に減少した（図2）。2 齢幼虫にはほとんど発現していなかった。*Hg-dhs6* は同じく脂肪酸の β 酸化に関わる短鎖脂肪酸デヒドロゲナーゼをコードしていた。発現時期は *Hg-kat1* とほぼ同時期の 24 時間に確認され、48 時間でピークを向かえた後は緩やかに減少した（図3）。2 齢幼虫では低い発現が見られた。*Hg-lrp1* はコレステロールの吸収に関する LDL レセプターをコードする遺伝子で、根浸出液処理 72 時間後から発現が見られ、2 齢幼虫でも発現していた（図4）。頭部近くの食道腺、分泌腺の収束する部位に mRNA の局在が見られた（図5）。以上の 3 遺伝子はいずれも脂質の分解・輸送に関連する遺伝子であり、孵化に先立って β 酸化によるエネルギー生産や、コレステロールの輸送が活発になることが推察された。その他には、ELAV ファミリーの RNA 結合タンパク質をコードする *Hg-exc7* が単離された。*Hg-exc7* は根浸出液処理 6 時間後から 72 時間目まで低いレベルで発現し、96 時間にピークを迎えた。2 齢幼虫でも発現が見られ（図6）、その mRNA の局在は食道管や分泌腺に見られた（図7）。*C. elegans* の *exc7* が欠損した変異体では、細胞骨格タンパク質の β スペクトリンの欠損変異体のように分泌腺形成が異常になる。*Hg-exc7* は β スペクトリンの転写後調節を介して、分泌腺に重要な役割を果たすと考えられる。シキミ酸経路に関わるコリスミ酸ムターゼをコードする *Hg-cm* は寄生時に発現する遺伝子としてすでに Bekal ら (2003) が報告しているが、この遺伝子もまた根浸出液によって発現が誘導された（図8）。

Hg-cm mRNA は分泌細胞である背部腺細胞に局在していた。線虫自身はシキミ酸経路を持っていないが、この酵素を植物細胞に分泌することによって、植物のホルモンバランスを搅乱するのではないかと予想している。

3) 試験管内 RNA 干渉による遺伝子機能の解析

試験管内転写により二本鎖 RNA を合成し、その中に線虫卵を浸して（ソーキング法）これをトリガーとした RNA 干渉を起こさせ、孵化関連遺伝子の機能を抑制しその影響を調べた。遺伝子の機能を抑制し、その影響を調べた。その

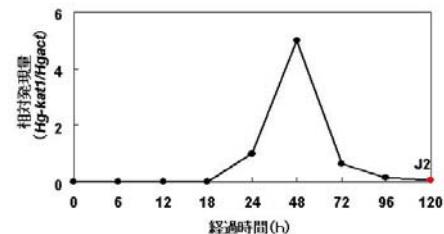


図2 孵化誘導時の *Hg-kat1* の発現

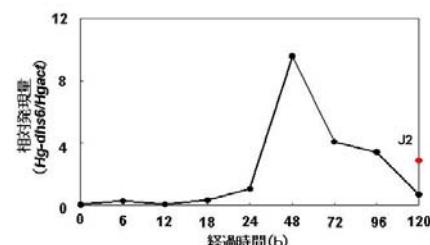


図3 孵化誘導時の *Hg-dhs6* の発現解析

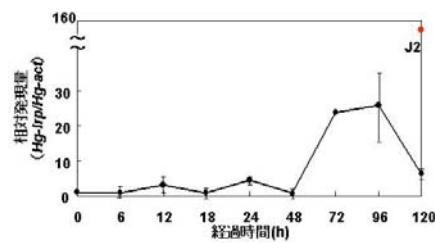


図4 孵化誘導時の *Hg-lrp1* の発現解析

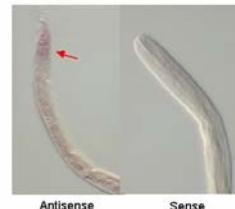


図5 *Hg-lrp-1* の mRNA 局在

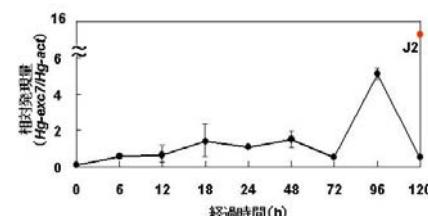


図6 孵化誘導時の *Hg-exc7* の発現解析

結果、線虫卵の孵化に対してはまったく影響が見られなかった。可能性としては、これらの遺伝子は孵化には関わるが必須というほど重要ではないのか、同じ機能の遺伝子が重複していると考えられる。また、線虫卵の殻の中に二本鎖 RNA が取り込まれていない可能性も考えられる。

4) 植物内での RNA 干渉による線虫孵化の制御

標的遺伝子の逆方向反復配列の RNA を発現するようなベクターを作成し、毛状根菌 *Agrobacterium rhizogenesis* を介してダイズへ導入した。現在、マーカーの抗生物質ハイグロマイシン耐性を指標に形質転換体を選抜を行っている。形質転換毛状根では標的遺伝子の配列を持つ二本鎖 RNA が多量に存在し、これをトリガーとした RNA 干渉が起こると予想される。今後この形質転換毛状根に対する線虫接種実験を行い、孵化への影響を明らかにする予定である。

まとめと今後の展望

今回の研究では、孵化を促進する植物の根浸出液に応答して脂肪酸代謝関連遺伝子の発現が高まることわかった。今後はこれら遺伝子の上流域を解析し、転写を調節している因子を同定することにより、孵化シグナル伝達の理解がさらに深まるだろう。また、孵化関連遺伝子を標的とした RNA 干渉を起こさせるような形質転換毛状根を作成した。これを使って線虫の接種試験を行い、孵化が制御できるかを評価していく予定である。現在、モントリオール議定書により、これまで有効であった殺線虫剤臭化メチルが使用できなくなったことから、新たな線虫の制御法が求められている。本研究の発展により、線虫の孵化メカニズムの理解が進むと同時に、RNA 干渉のような技術が臭化メチルに代わる有効な制圧方法となることが期待される。

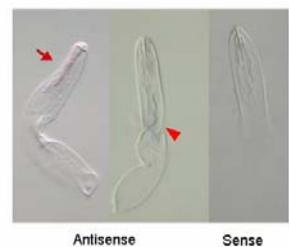


図7 *Hg-exc-7*のRNAの局在

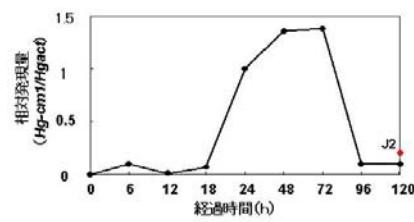


図8 孵化誘導時の*Hg-cm1*の発現解析