

# 植物寄生線虫の孵化制御技術の開発

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はマメ科作物に寄生する。この線虫の卵は宿主不在時にはシストの中で休眠するため、防除が困難である。卵は根が出す孵化促進物質を感受して孵化するがそのメカニズムには不明な点が多い。本研究では、根分泌物に応答して発現が消失する遺伝子を収集し、塩基配列および発現パターンを解析する。さらに単離した遺伝子をRNA干渉により機能を阻害した際の、孵化に対する影響を調べる。以上をもとに、孵化に関わる情報伝達経路を明らかにする。また、線虫孵化に重要な遺伝子を標的としたRNA干渉をマメ科作物に行わせ、孵化を制御する方法を確立する。

## 内容・方法

### 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・ディスプレイを行い、孵化誘導時にだけ発現変動する遺伝子を単離した。

### 孵化関連遺伝子の構造と発現

単離した遺伝子の塩基配列を解読し、相同性検索を行う。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。

### 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、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。

### 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*を介してダイズへ導入した。形質転換毛状根では標的遺伝子の配列を持つ二本鎖RNAが多量に存在する。これに線虫を接種し、孵化に対する影響を調べた。

## 結果・成果

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・ディスプレイを行った結果、孵化誘導時にだけ発現変動する遺伝子を5種類単離した。*Hg-kat1*は脂肪酸の $\beta$ 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時間目に発現し始め、48時間でピークを向かえた後は急

激に減少した。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 $\beta$ 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時間目に確認され、48時間でピークを向かえた後は緩やかに減少した。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与する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。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。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 $\beta$ 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時間目にピークを迎えた。2齢幼虫でも発現が見られ、そのmRNAの局在は食道管や分泌腺に見られた。*C. elegans*の*exc7*が欠損した変異体では、細胞骨格タンパク質の $\beta$ 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 $\beta$ 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。*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攪乱するのではないかと予想している。

次にこれら遺伝子の機能を調べるために、試験管内で各遺伝子の二本鎖RNAを合成し、その中に線虫卵を浸して（ソーキング法）で遺伝子機能を抑制しその影響を調べた。その結果、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。おそらく、線虫卵の殻の中に二本鎖RNAが取り込まれていないためではないかと考えられた。そこで、宿主植物によるRNA干渉を起こさせ、線虫の孵化を制御することを考えた。毛状根菌*Agrobacterium rhizogenes*を介してダイズ根に二本鎖RNAを作るような遺伝子を導入、マーカーの抗生物質耐性を指標に形質転換体を選抜した。

## 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が高まることが予想された。今後はこれら遺伝子上流域を解析し、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。