

平成 21 年 4 月 24 日現在

研究種目：若手研究 (B)
 研究期間：2006～2008
 課題番号：18780032
 研究課題名(和文) RNA干渉を用いたマツノザイセンチュウにおける植物細胞壁分解酵素の役割解明
 研究課題名(英文) Analysis of cell wall degrading enzymes of *Bursaphelenchus xylophilus* using RNA interference
 研究代表者 菊地 泰生 (Kikuchi Taisei)
 独立行政法人森林総合研究所・森林微生物研究領域・研究員
 研究者番号：20353659

研究成果の概要：マツノザイセンチュウからセルラーゼ、ベータ 1,3 グルカナーゼおよびペクチン分解酵素など、数種類の細胞壁分解酵素遺伝子を単離した。組み替えタンパクを大腸菌または酵母を用いて作成し精製した後、生化学的な性質を明らかにした。また、マツノザイセンチュウへの RNA 干渉法を検討し、有効な誘導法についての知見を得た。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	1,300,000	0	1,300,000
2007年度	1,100,000	0	1,100,000
2008年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	300,000	3,700,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：植物病理学

キーワード：遺伝子

1. 研究開始当初の背景

植物細胞壁は微生物が会う最初の障壁であり、それゆえ細胞壁を分解する酵素は植物への寄生に重要な役割を果たしていると考えられる。近年、植物寄生線虫からセルラーゼ、ペクチン分解酵素などの遺伝子がクローニングされ、線虫が植物細胞壁分解酵素を生産することが明らかとなった(Smant et al. 1998) (Qin et al. 2004)。そのほかにも expansin や xylanase など、植物寄生線虫の細胞壁分解酵素について熱心な研究がなされており、線虫の寄生メカニズムあるいは寄生能力の進化を考える上で大変興味深い結果が得られてきている。しかしながらこれま

での研究はネコブセンチュウ・シストセンチュウといった定着性の寄生線虫に限られており、マツノザイセンチュウのような移動性の植物寄生線虫では行われてこなかった。マツノザイセンチュウは *Aphelenchus avenae* などの菌食線虫と近い関係にあり、これまでの植物寄生線虫とは系統的にも離れている。また、木部に寄生する点も細胞壁分解酵素を考えると興味深い特質である。申請者はこれまでマツノザイセンチュウにおいて植物への寄生・病原性に関する遺伝子(寄生遺伝子)を探索する研究を先駆的に行ってきた。申請者は網羅的な遺伝子解析(EST 解析)により、マツノザイセンチュウ

からセルラーゼ、ペクチン分解酵素、1,3-グルカナーゼなどの酵素遺伝子を発見した。このうち、セルラーゼはこれまで知られていた線虫のセルラーゼとは異なるタイプで糸状菌のセルラーゼに高い類似性を持つことが明らかとなった(Kikuchi et al. FEBS Lett 2004)。また、1,3 グルカナーゼはこれまでいかなる線虫からも見つかっておらず線虫類で初めての発見となった(Kikuchi et al. Biochemical J 2005)。このように、申請者グループの研究により、マツノザイセンチュウが他の植物寄生線虫とは異なる細胞壁分解酵素を持ち、ユニークな植物寄生戦略を使っていることが分子レベルで見えてきている。一方で、植物寄生線虫では遺伝子破壊株の作成が技術的に困難であるため、遺伝子の役割解明には重大な障壁が存在した。RNA 干渉 (RNAi: RNA interference) は2本鎖のRNAによりそれと同じ配列を持つ遺伝子の発現を抑制する方法で、遺伝子破壊によらず発現を抑制できるため、植物寄生線虫の遺伝子解析においても大変有用であると注目される手法である。RNAi法の植物寄生線虫への適用にはこれまで、いくつかの技術的な問題が存在したが、近年これらを解決する手法が考案された(Urwin et al. 2002)。

2. 研究の目的

本研究課題ではマツノザイセンチュウの持つ植物細胞壁分解酵素について、RNAi法を用いて遺伝子発現を抑制した線虫の表現形を解析し、並行して酵素の生化学的な特性を明らかにすることによって、これらの酵素が線虫の植物寄生に果たす役割を解明することを目的とする。

3. 研究の方法

これまでにクローニングしたセルラーゼ(β -1,4-glucanase)、ペクチン分解酵素(Pectate lyase)および1,3グルカナーゼ(endo- β -1,3-glucanase)についてマツノザイセンチュウでの役割を明らかにするため、以下の解析を行う。

・RNAi手法の確立

マツノザイセンチュウにおける効果的なRNAi手法を確立する。申請者はこの技術がマツノザイセンチュウに適用可能なことは既に確認しているが、この研究ではより効率的にRNA干渉を起こす手法、干渉が起きていることを確認する手法を確立する(効果的な二本鎖RNA導入法、二本鎖RNAの長さや状態の最適化、1頭の線虫からのmRNAの定量法など)。この作業ではESTプロジェクトで得られている大量の遺伝子配列情報を有効に活用する。

・組換えタンパク質の作成

個々の酵素について組換えタンパク質の発現系を構築し、発現・純化する。これまでに大腸菌での発現系は構築済であるが、糖鎖の付加など、よりネイティブに近い組換えタンパク質を獲得するため、真核細胞を利用した系(酵母または昆虫細胞)を用いて発現を行う。

4. 研究成果

cDNAの網羅的な解析(EST解析)によって作成されたマツノザイセンチュウESTデータベースを用いて、細胞壁分解酵素をコードする遺伝子を探索した。探索により、マツノザイセンチュウからセルラーゼ、1,3グルカナーゼ、キチナーゼ、ペクチン分解酵素を発見し、クローニングをおこなった。これらの遺伝子を大腸菌あるいは酵母において発現し、細胞壁分解活性をもつ機能的な酵素をコードしていることを明らかにした。またゲノム内の遺伝子構造を解析し、これらの遺伝子がマルチジーンファミリーを構成していることを明らかにした。また発現部位解析により線虫の食道腺で特異的に発現していることを明らかにした。

マツノザイセンチュウでのRNA干渉誘導手法を確立するため、以下の2点について検討を行った。1. 遺伝子発現量の定量法。遺伝子発現定量法を検討し、効率的な方法を確立した。線虫表皮をタンパク質分解酵素で溶解し、液層分離を用いてRNAを抽出する。抽出RNAから、RT-PCRでcDNAを合成した後、リアルタイムPCR装置と適切なプライマー対を用いて定量PCRを行うことで、短時間で効率よく発現量を推測できた。2. 線虫による二本鎖RNAの腸内への取込み。取込み量の最大化のため、蛍光標識した二本鎖RNAを線虫に取込ませ、腸内を蛍光顕微鏡での観察評価して、取込み法を検討した。モデル生物である*C. elegans*や他の植物寄生性線虫と比較して、マツノザイセンチュウ腸内への取込みは、やや難しいが二本鎖RNAを含む適切なバッファーに浸すことで、腸内へRNAを取込ませることが可能であることが明らかになった。

近年の研究により、モデル線虫*C. elegans*以外の多くの線虫は、外環境からの二本鎖RNAの取り込み能力と体内でのRNAiシグナルの増幅能力が欠損しており、RNAi誘導が難しいことが明らかとなってきた。これは植物寄生線虫マツノザイセンチュウにおいてもあてはまり、RNAiの誘導には条件、手法を十分に検討する必要がある。マツノザイセンチュウにおけるRNAi誘導条件を検討するため、まず、ターゲットとする遺伝子を選択した。この選択には、①これまで植物寄生線虫、動物寄生線虫で、明らかな効果が見られた報告があるもの、②モデル線虫*C. elegans*においてその遺伝子の役割がクリアに判明している

ものを基準とした。また、①遺伝子発現部位における影響を検討できるよう発現部位の異なるもの、②発現量による影響を検討できるよう発現量の異なるものを含めることにも留意した。以上の基準から、食道腺で特異的に発現している細胞壁分解酵素、性腺で発現している Major sperm protein、全身で発現しているハウスキーピング遺伝子等を含む12遺伝子をターゲットとして選択した。これらのターゲットに対してソーキング法を用いてRNAi誘導を試みた。しかし、ほとんどの遺伝子について発現量の明らかな減少、表現形の明確な変化を観察することはできなかった。2本鎖RNAの体内への取り込みは効率よく行われていることは蛍光標識を用いて確認済みであるので、取り込み後にRNAi誘導を阻害している案件があると思われる。これを検討するため、誘導に使用する2本鎖RNAの長さ、RNA濃度、ソーキングの期間を変更して解析を行った。インキュベーション時間を長くすることによって発現量の減少がより効果的に起こることが明らかとなったが、ソーキング法による誘導の欠点は、液中での長期間インキュベーションによる生体活性の低下が起り、長期間に及ぶ影響を調べるのに適していないことである。そこでフィーディング法によりRNAi誘導を行うため、マツノザイセンチュウの食餌となる糸状菌を用いることを発案した。線虫の増殖と二本鎖RNAの発現に双方に適した菌を選抜を行うため、各種菌類上でのマツノザイセンチュウの増殖試験、ならびに各種菌類の形質転換法および発現プロモーターの検討を行った。また、ピキアを用いてマツノザイセンチュウのセルラーゼの組換え酵素を作成し、生化学的な性質を明らかにした。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計7件)

- ① Kikuchi, T., Karim, N., Masuya, H., Ota, Y., and Kubono, T. (2009). An inexpensive high-throughput method to extract high yields of good quality DNA from fungi. *Molecular ecology resources* 9, 41-45.
- ② Shibuya, H., and Kikuchi, T. (2008). Purification and characterization of recombinant endoglucanases from the pine wood nematode *Bursaphelenchus xylophilus*. *Biosci Biotechnol Biochem* 72, 1325-1332.
- ③ Jones, J. T., Moens, M., Mota, M., Li, H., and Kikuchi, T. (2008). *Bursaphelenchus xylophilus*: opportunities in comparative genomics and molecular host-parasite interactions. *Molecular Plant Pathology* 9.
- ④ Aikawa, T., and Kikuchi, T. (2007). Estimation of virulence of *Bursaphelenchus xylophilus* (Nematoda: Aphelenchoididae) based on its reproductive ability. *Nematology* 9, 371-377.
- ⑤ Kikuchi, T., Aikawa, T., Kosaka, H., Pritchard, L., Ogura, N., and Jones, J. T. (2007). Expressed sequence tag (EST) analysis of the pine wood nematode *Bursaphelenchus xylophilus* and *B. mucronatus*. *Mol Biochem Parasitol* 155, 9-17. 査読有
- ⑥ Aikawa, T., Kikuchi, T., and Kosaka, H. (2006). Population structure of *Bursaphelenchus xylophilus* within single *Pinus thunbergii* trees inoculated with two nematode isolates. *Forest Pathology* 36, 1-13. 査読有
- ⑦ Kikuchi, T., Shibuya, H., Aikawa, T., and Jones, J. T. (2006). Cloning and characterization of pectate lyases expressed in the esophageal gland of the pine wood nematode *Bursaphelenchus xylophilus*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 19, 280-287. 査読有

[学会発表] (計5件)

- ① Karim, N., and Kikuchi, T. (2008). EST analysis of the fungivorous nematode *Aphelenchus avenae*, Paper presented at: 5th International Congress of Nematology (Brisbane, Australia).

- ② Karim, N., Okada, H., and Kikuchi, T. (2008). Analysis of expressed sequence tags (ESTs) of the fungivorous nematode *Aphelenchus avenae*, Paper presented at: 16th Annual Meeting of the Japanese Nematological Society (Tsukuba).
- ③ Kikuchi, T. (2008). EST Analysis of the Pine Wood Nematode *Bursaphelenchus xylophilus* and Functional Analysis of Parasitism Genes in this Species, Paper presented at: 5th International Congress of Nematology (Brisbane, Australia).
- ④ Kikuchi, T. (2007). Parasitism genes of the pinewood nematode, Paper presented at: International symposium on Pine Wilt Disease in Asia (Kyoto, Japan).
- ⑤ Kikuchi, T., Shibuya, H., Aikawa, T., and Jones, J. T. (2006). マツノザイセンチュウのペクチン分解酵素遺伝子, Paper presented at: 第117回日本森林学会大会.

[図書] (計1件)

- ① Kikuchi, T. (2008). Parasitism Genes of the Pine Wood Nematode, In Pine Wilt Disease, B. G. Zhao, K. Futai, J. Sutherland, and Y. Takeuchi, eds. (Springer), pp. 67-80.

[産業財産権]

○出願状況 (計 件)

名称：
 発明者：
 権利者：
 種類：
 番号：
 出願年月日：
 国内外の別：

○取得状況 (計◇件)

名称：
 発明者：
 権利者：

種類：
 番号：
 取得年月日：
 国内外の別：

[その他]
 ホームページ等
 ForestGen
<http://forestgen.ffpri.affrc.go.jp/ja/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

菊地 泰生 (Kikuchi Taisei)
 独立行政法人森林総合研究所・森林微生物
 研究領域・研究員
 研究者番号：20353659

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：