

令和 6 年 5 月 30 日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20H02994

研究課題名(和文)植物による線虫認識機構の解明

研究課題名(英文)The molecular basis of the recognition of nematodes by plants

研究代表者

門田 康弘(Kadota, Yasuhiro)

国立研究開発法人理化学研究所・環境資源科学研究センター・専任研究員

研究者番号：80548975

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究により、線虫種で高度に保存されたオリゴ糖分解酵素の基質結合部位にMAMPとして植物免疫の誘導活性があることが明らかとなった。さらに、遺伝学的手法を用いてこのペプチドの認識に必要な受容体キナーゼが単離された。受容体キナーゼの多重遺伝子欠損変異体を作成してMAMPペプチドへの応答性を調べるとともに受容体キナーゼの細胞外領域とMAMPペプチドとの結合を検証して、国際論文に投稿する予定である。植物による線虫の認識機構は謎に包まれていたが、本研究により植物と線虫の相互作用において働くMAMPsとその認識に必須な受容体キナーゼが同定され、これが世界で最初の報告になると期待される。

研究成果の学術的意義や社会的意義

植物寄生線虫は世界で最も被害額の大きな病原体の1つであるが、植物による線虫の認識機構については研究が進んでいなかった。本研究により、線虫由来のMAMPsとその認識に必須な植物の受容体キナーゼが同定された。この受容体を足掛かりとして、線虫に対する植物免疫機構の解明や、受容体の活性化を抑制する病原性機構等、様々な研究の発展が期待できる。また、この受容体を作物に導入することにより、線虫認識能力を付与できる可能性もあり、応用研究への発展も期待できる。

研究成果の概要(英文)：This study revealed that the peptide containing the substrate-binding site of Oligosaccharide degrading enzyme from nematodes can induce immunity as MAMP (microbe-associated molecular patterns) in Arabidopsis. The peptide sequence exhibits remarkable conservation among nematode species, including plant parasitic nematodes. Through comprehensive genetic analyses, we have successfully identified a receptor-like kinase as the specific plant receptor for this peptide. Although nematode-derived MAMPs and their recognition systems in plants had been unclear for a very long time, this study shed light on the understanding of the molecular mechanism of nematode recognition by plants.

研究分野：植物免疫

キーワード：植物寄生線虫 PAMP 植物免疫

1. 研究開始当初の背景

植物寄生線虫は世界で最も被害額の大きな病原微生物の1つであり、新規防除法の開発は急務である。しかし、線虫に対する植物の免疫機構について分子レベルの研究が進んでおらず、特に植物がどのように線虫を認識するのかわかっていない。その理由として挙げられるのは、植物寄生線虫の増殖に膨大な時間と労力がかかること、そして、免疫反応は線虫の感染部位で局所的に起こるため高精度の解析が難しいことである。

2. 研究の目的

本研究では植物が認識する線虫の物質を単離するとともに、遺伝学的アプローチにより、植物の受容体の同定を目指す。これにより、植物による線虫の認識機構を分子レベルで解明する。

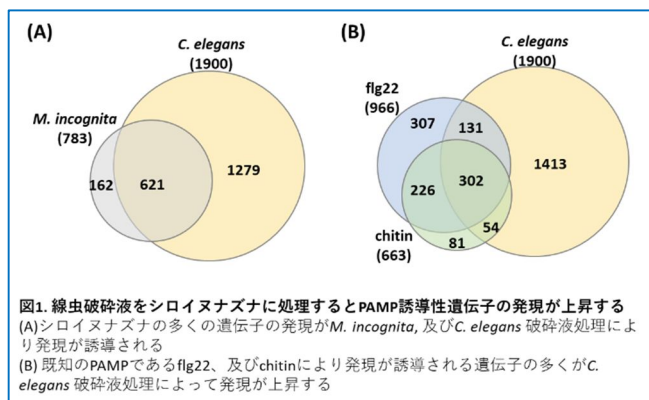
3. 研究の方法

植物寄生線虫は培養に多大な労力がかかり、生化学的手法による MAMP の探索に十分な量の線虫を確保することは技術的に大変難しい。例えばネコブ線虫をトマト 1 個体に接種して 2 ヶ月後に得られる線虫量は数 mg 程度である。そこで、研究代表者は植物寄生線虫の代わりにモデル線虫である *Caenorhabditis elegans* を MAMP 同定の材料とすることを考えた。その理由は、これまで同定された細菌、糸状菌由来の MAMPs の多くは病原微生物だけでなく、微生物一般に保存されていること、そして *C. elegans* は 1 世代が約 3 日と短く増殖が容易であることにある。そこで研究代表者は *C. elegans* の大量培養システムを構築し、これまでに 1 kg 以上を集めた。そして大量の *C. elegans* を用いて、クロマトグラフィーによる MAMP の精製をおこなった。モデル植物であるシロイヌナズナの遺伝学的手法を用いて、同定した MAMP の認識を担う受容体の探索を行った。

4. 研究成果

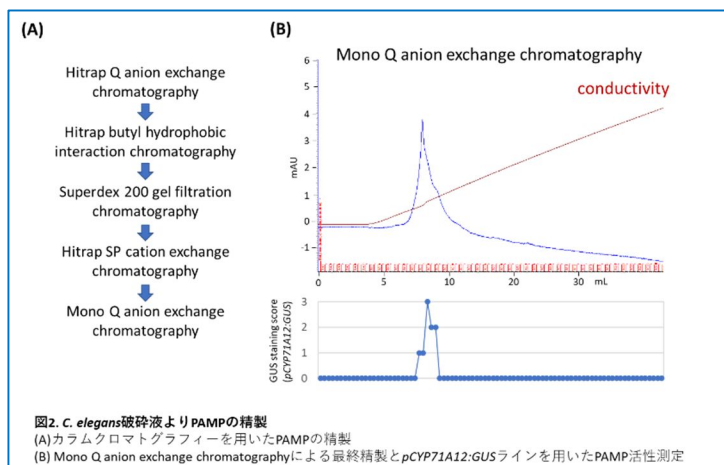
(1) *C. elegans* 破砕液には MAMP 活性がある

ネコブセンチュウである *Meloidgyne incognita* の破砕液にはシロイヌナズナの免疫反応を誘導することが報告されている (*New Phytologist*, 211, 276-287)。そこで、*M. incognita* の破砕液、及び *C. elegans* の破砕液をシロイヌナズナの芽生えに処理して網羅的遺伝子発現解析を行った。すると、両方の破砕液処理により 621 遺伝子の発現が共通に上昇した (図 1A)。また、この 621 遺伝子について Gene ontology 解析を行ったところ、免疫関連遺伝子 (defense response (GO:0006952)、defense response to fungus (GO:0050832) 等) が多く含まれていた。さらに、既知の MAMP である細菌のフラジェリン由来のペプチド flg22 や Chitin 処理により発現が誘導される遺伝子群と比較したところ、多くの遺伝子が *C. elegans* の破砕液処理によっても発現が上昇した (図 1B)。よって、*M. incognita* の破砕液と同様に、*C. elegans* の破砕液にもシロイヌナズナに免疫関連遺伝子の発現を誘導させる MAMP 活性があることが示唆された。



(2) *C. elegans* 破砕液からの MAMP 精製

C. elegans 破砕液には MAMP 活性があることが確認できたので、クロマトグラフィーにより MAMP 精製を試みた (図 2A)。MAMP 活性の測定にはマーカー遺伝子である *CYP71A12* のプロモーターに *GUS* 遺伝子を融合したカセットを発現したシロイヌナズナ (*pCYP71A12::GUS*) を用いて、根における発現を簡便に調べるシステムを構築した。*CYP71A12* はインドールグルコシノレート系の抗菌性物質の合成に関わる酵素であり、MAMP 活性画分処理により、根、特に根端部位で強い発現が誘導される。このシ



ステムを用いて、性質の異なるカラムクロマトグラフィーを用いて精製を繰り返し(図 2A)、最終的にタンパク量と MAMP 活性のピークが一致する画分を得た(図 2B)。

(3)MAMP 活性画分から同定されたオリゴ糖分解酵素由来のペプチドは MAMP 活性を持つ

カラムクロマトグラフィーにより精製された画分に含まれるタンパク質を LCMSMS で同定したところ、オリゴ糖分解酵素が同定された。オリゴ糖分解酵素はオリゴ糖を分解する反応を触媒する加水分解酵素であり、線虫はオリゴ糖を分解してエネルギーとして使っていると思われる。オリゴ糖分解酵素は N 末端に Signal peptide を持つ分泌タンパク質であり、様々な線虫の Secretome 解析で分泌タンパク質として同定されている。興味深いことに、昆虫寄生線虫はオリゴ糖を直接吸収することができないために分泌型のオリゴ糖により、Glucose へ分解して吸収することが報告されている。植物寄生線虫が同様に分泌型オリゴ糖を用いて、オリゴ糖を Glucose に分解して吸収しているかは明らかにされていないが、この分泌型オリゴ糖分解酵素は植物寄生線虫を含めた様々な線虫で高度に保存されている。そこで、*C. elegans* と植物寄生線虫のオリゴ糖分解酵素の配列を比較したところ、特に配列保存性が高い領域が 5 つあった。タンパク質由来の MAMP の多くは高度に保存された領域が認識されることから、この 5 つの高度に保存された領域の配列をペプチド合成し、シロイヌナズナに処理して *CYP71A12* の発現を調べた。その結果、基質結合部位由来の 24 アミノ酸ペプチド(Ce24)が *CYP71A12* の発現を劇的に誘導した(図 3)。

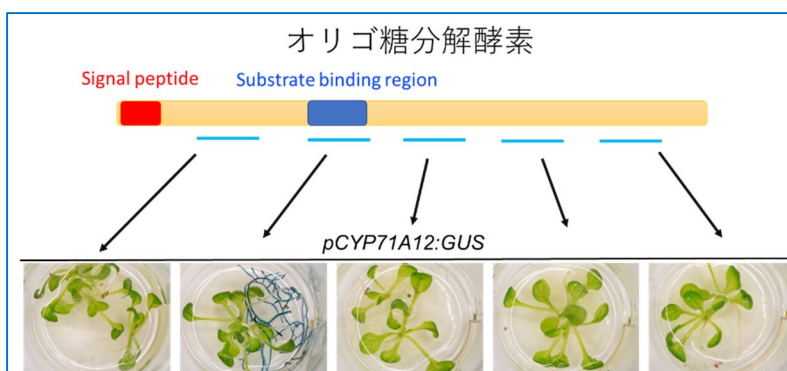


図3. オリゴ糖分解酵素由来のペプチド Ce24 はシロイヌナズナの *CYP71A12* の発現を強く誘導する PAMP 画分で同定されたオリゴ糖分解酵素において、植物寄生線虫との間で高度に保存された領域のペプチドを作成してシロイヌナズナに処理したところ、1つのペプチド(Ce24)が *CYP71A12* の発現を強く誘導した。

(4)植物寄生線虫由来のペプチド(Rkn31)は *CYP71A12* の発現を強く誘導する

植物寄生線虫における Ce24 の保存性をしらべたところ、この配列は非常によく保存されていた。Ce24 よりネコブセンチュウ(Root knot nematode)由来の 31 アミノ酸のペプチド(Rkn31)の MAMP 活性の方が高かったため、以降の実験には Rkn31 を使用した。この Rkn31 は Ce24 と同様に根の先端に非常強い *CYP71A12* の発現を誘導し(図 4 A)、また根全体に茶色物質の蓄積を誘導することが分かった(図 4B)。根の茶色化は、植物寄生線虫を抵抗性植物に接種した時に見られる現象と酷似しており、線虫に対する防御応答に寄与していると思われる。

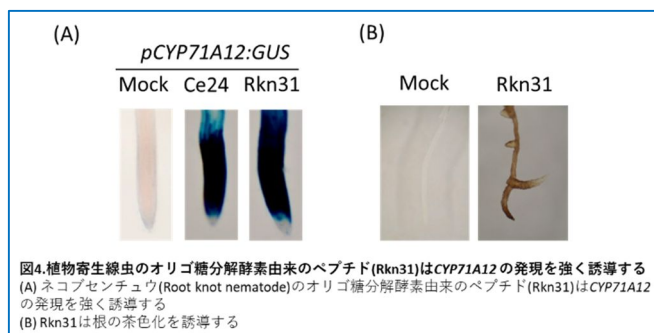


図4.植物寄生線虫のオリゴ糖分解酵素由来のペプチド(Rkn31)は *CYP71A12* の発現を強く誘導する (A) ネコブセンチュウ(Root knot nematode)のオリゴ糖分解酵素由来のペプチド(Rkn31)は *CYP71A12* の発現を強く誘導する (B) Rkn31は根の茶色化を誘導する

(5)Rkn31 は線虫破碎液、または MAMP 処理により誘導される遺伝子の多くの発現を誘導する

Rkn31 をシロイヌナズナの芽生えに処理して網羅的遺伝子発現を行った(図 5)。Rkn31 により誘導される遺伝子群と *C. elegans*, *M. incognita* 破碎液処理により誘導される遺伝子群を比較すると、線虫破碎液により誘導される遺伝子群のうち非常に多くの遺伝子が Rkn31 により発現誘導されることが分かった(図 5A)。次に GO 解析を行ったところ、Rkn31 により誘導される遺伝子群には生物ストレス、防御関連遺伝子に関連する遺伝子が多く含まれていた(“response to external biotic stimulus(GO:0043207)”, “response to other organism(GO:0051707)”, “response to biotic stimulus(GO:0009607)”, “defense response to other organism(GO:0098542)”, “defense response(GO:0006952)”等)。そこで、flg22、及び chitin 誘導性遺伝子群と比較したところ、MAMP 誘導性遺伝子群のうち非常に多くの遺伝子の発現が Rkn31 により発現誘導されることが分かった(図 5B)。

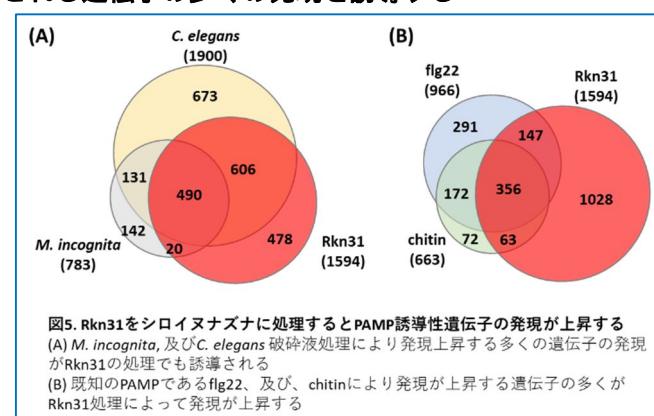


図5. Rkn31をシロイヌナズナに処理するとPAMP誘導性遺伝子の発現が上昇する (A) *M. incognita*, 及び *C. elegans* 破碎液処理により発現上昇する多くの遺伝子の発現がRkn31の処理でも誘導される (B) 既知のPAMPであるflg22、及び、chitinにより発現が上昇する遺伝子の多くがRkn31処理によって発現が上昇する

(6)シロイヌナズナのエコタイプ Cvi-0 は Rkn31 に非感受性である

Rkn31 に対する感受性をシロイヌナズナの様々なエコタイプで比較したところ、Cvi-0 は Rkn31 に非感受性であることが分かった。Rkn31 感受性である Col-0、及び Cvi-0 の芽生えに Rkn31 を処理して *CYP71A12* の発現を調べたところ、Rkn31 は Col-0 に *CYP71A12* の発現を誘導したが、Cvi-0 に *CYP71A12* の発現を誘導しなかった(図 6)。一方、DAMP(Damage-associated molecular pattern)である Sccop12 ペプチドは Col-0、Cvi-0 に *CYP71A12* の発現を誘導した。そこで、Col-0 と Cvi-0 を用いて Rkn31 の認識に必要な遺伝子の探索を行うことにした。

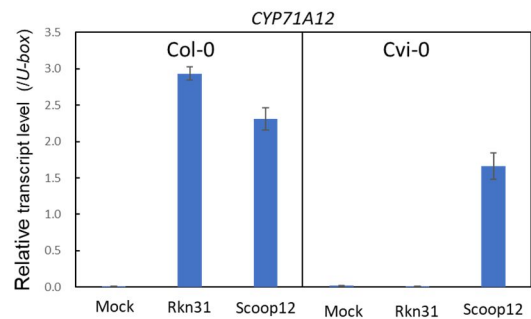


図6. シロイヌナズナのエコタイプCvi-0はRkn31を処理しても*CYP71A12*の発現を誘導しないシロイヌナズナのエコタイプCol-0とCvi-0の芽生えにRkn31、及びScoop12ペプチドを処理し、*CYP71A12*の発現をqRT-PCRにより調べたところ、Scoop12は両エコタイプにおいて*CYP71A12*の発現を誘導したが、Rkn31はCvi-0に*CYP71A12*の発現を誘導しなかった。

(7)Rkn31 は線虫破碎液、または MAMP 処理により誘導される遺伝子の多くの発現を誘導する

Col-0 と Cvi-0 を掛け合わせた F1 植物は全て Rkn31 感受性となり、F2 植物では Rkn31 感受性と非感受性がおよそ 3:1 に分離した。そこで、F2 植物で非感受性を示す個体を集めてゲノム DNA を精製し、それらをプールしてゲノムシーケンスを行った。得られたシーケンスデータより、感受性系統と非感受性系統のシロイヌナズナに存在する SNP の割合を調べ、非感受性系統が持つ SNP の偏りがある染色体領域を探索した。すると、3 番染色体の末端付近でほとんどの SNPs が Cvi-0 のものに置換した領域が存在した(図 7)。

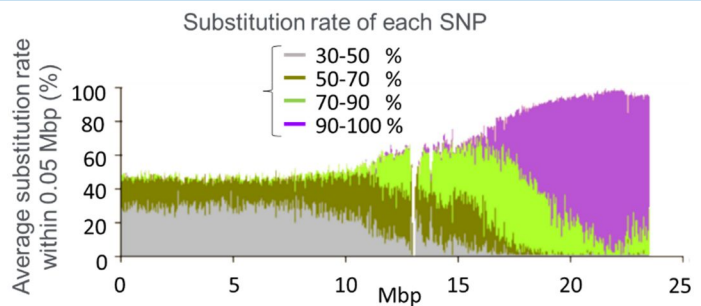


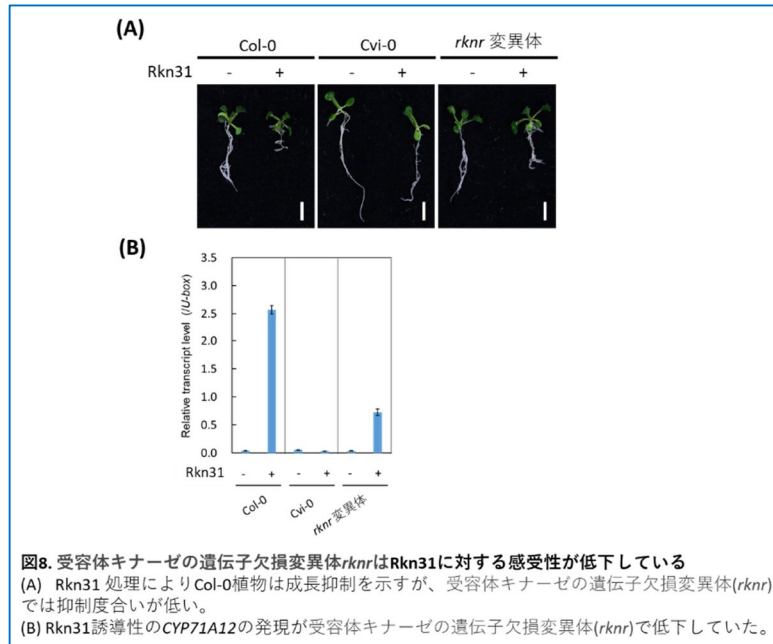
図7. Rkn31の認識に重要な染色体領域の絞り込み

Rkn31感受性であるCol-0と非感受性であるCvi-0のF2個体のうちRkn31非感受性を示す個体のゲノムをプールしてゲノムシーケンスを行い、各SNPsの置換率(substitution rate)を調べた。すると、Cvi-0由来のSNPが集中して存在する染色体の領域を発見した。次にCol-0とCvi-0のInbred linesを用いて調べたところ、原因遺伝子の近傍にあるマーカを発見した。

よって、Col-0のゲノムのこの領域に Rkn31 感受性に必須な遺伝子が存在すると思われる。これと並行して、Col-0 と Cvi-0 を交配して作成された組み換え近交系(Recombinant Inbred Line: RIL)を用いて、それぞれの RIL ラインの Rkn31 感受性を調べたところ、ゲノムシーケンスで絞り込まれた領域に存在するマーカーの近傍に Rkn31 感受性に必須な遺伝子が存在することが分かった。さらに、このマーカーの近傍で組換えが起こった RIL を用いてその組換え位置を調べることによりさらなる絞り込みを行ったところ、最終的に 20 遺伝子が存在する領域まで絞り込むことに成功した。

(8)受容体キナーゼ遺伝子欠損変異体では Rkn31 に対する感受性が低下する

遺伝学的な解析によって絞り込まれた 20 遺伝子の遺伝子欠損変異体を用いて Rkn31 感受性を調べたところ、受容体キナーゼ(Rkn31 receptor: RknR)をコードする遺伝子の破壊株が Rkn31 に対して低感受性を示した(図 8A)。この変異体では Rkn31 処理により誘導される成長抑制、及び根の茶色化が部分的に抑制されていた。また、*CYP71A12* の発現について調べたところ、*rknR* 変異体では Rkn31 誘導性の *CYP71A12* の発現が顕著に低下していた(図 8B)。



(9)まとめ

本研究によって、線虫種で高度に保存されたオリゴ糖分解酵素の基質結合部位に MAMP 活性があることが明らかとなった。さらに、遺伝学的手法を用いてこのペプチドの認識に必要な受容体候補として RknR が単離された。この RknR の遺伝子の周辺には配列のよく似た受容体キナーゼをコードする遺伝子が複数個存在している。これら受容体キナーゼも Rkn31 の認識に働いている可能性を考え、多重遺伝子欠損変異体を作成している。また、RknR の細胞外領域のリコンビナントタンパクを作成して Rkn31 との結合を検証する。これまで植物による線虫の認識機構は謎に包まれていたが、本研究により、植物と線虫の相互作用において働く MAMPs とその認識に必須な受容体キナーゼが同定された。この受容体を導入することにより作物に線虫認識能力を付与できる可能性もあり、今後の研究のさらなる発展も期待できる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Sato Kazuki, Uehara Taketo, Holbein Julia, Sasaki-Sekimoto Yuko, Gan Pamela, Bino Takahiro, Yamaguchi Katsushi, Ichihashi Yasunori, Maki Noriko, Shigenobu Shuji, Ohta Hiroyuki, Franke Rochus B., Siddique Shahid, Grundler Florian M. W., Suzuki Takamasa, Kadota Yasuhiro, Shirasu Ken	4. 巻 12
2. 論文標題 Transcriptomic Analysis of Resistant and Susceptible Responses in a New Model Root-Knot Nematode Infection System Using Solanum torvum and Meloidogyne arenaria	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Plant Science	6. 最初と最後の頁 680151
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fpls.2021.680151	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Murata Gaku, Uehara Taketo, Lee Hyoung Jae, Mizutani Masaharu, Kadota Yasuhiro, Shinmura Yoshimi, Saito Takeo, Uesugi Kenta	4. 巻 170
2. 論文標題 <i>Solanum palinacanthum</i> Dunal as a potential eggplant rootstock resistant to root knot nematodes	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Phytopathology	6. 最初と最後の頁 185 ~ 193
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jph.13067	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Bender Kyle W., Couto Daniel, Kadota Yasuhiro, Macho Alberto P., Sklenar Jan, Derbyshire Paul, Bjornson Marta, DeFalco Thomas A., Petriello Annalise, Font Farre Maria, Schwessinger Benjamin, Ntoukakis Vardis, Stransfeld Lena, Jones Alexandra M. E., Menke Frank L. H., Zipfel Cyril	4. 巻 118
2. 論文標題 Activation loop phosphorylation of a non-RD receptor kinase initiates plant innate immune signaling	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences	6. 最初と最後の頁 e2108242118
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.2108242118	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計11件（うち招待講演 1件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 佐藤 一輝、門田 康弘、Gan Pamela、植原 健人、横 紀子、Mukhtar Shahid M.、白須 賢
2. 発表標題 ネコブセンチュウエフェクターによる植物免疫抑制機構の解析
3. 学会等名 令和4年度日本植物病理学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Sato Kazuki, Uehara Taketo, Holbein Julia, Sasaki-Sekimoto Yuko, Gan Pamela, Bino Takahiro, Yamaguchi Katsushi, Ichihashi Yasunori, Maki Noriko, Shigenobu Shuji, Ohta Hiroyuki, Franke Rochus B., Siddique Shahid, Grundler Florian M. W., Suzuki Takamasa, Kadota Yasuhiro, Shirasu Ken
2. 発表標題 Transcriptomic analysis of resistant and susceptible responses in a new model root-knot nematode infection system using <i>Solanum torvum</i> and <i>Meloidogyne arenaria</i>
3. 学会等名 2021 IS-MPMI Congress: eSymposia Series (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 佐藤 一輝、植原 健人、Gan Pamela、榎 紀子、鈴木 孝征、門田 康弘、白須 賢
2. 発表標題 新規モデル感染システムを用いた線虫抵抗性・感受性応答のトランスクリプトーム解析
3. 学会等名 日本線虫学会 第28回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Kazuki Sato, Yasuhiro Kadota, Pamela Gan, Taketo Uehara, Takahiro Bino, Katsushi Yamaguchi, Yasunori Ichihashi, Hideaki Iwahori, Noriko Maki, Shuji Shigenobu, Takamasa Suzuki, Bruno Favery, Shahid M. Mukhtar, Ken Shirasu
2. 発表標題 Molecular insights into an interaction of resistant plant <i>Solanum torvum</i> and virulent/avirulent root-knot nematodes
3. 学会等名 7th International Congress of Nematology (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 佐藤 一輝、門田 康弘、Gan Pamela、植原 健人、榎 紀子、Mukhtar M. Shahid、白須 賢
2. 発表標題 ネコブセンチュウエフェクターによる植物免疫抑制機構の解析
3. 学会等名 日本線虫学会 第29回大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Erika Iino, Yasuhiro Kadota, Ken Shirasu
2. 発表標題 Exploring the mechanism of nematode recognition in plants
3. 学会等名 International Symposium on Plant Development and Biotic Interaction (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Pok Man Ngou, Yasuhiro Kadota, Ken Shirasu
2. 発表標題 Exploring Pathogen-Associated Molecular Patterns and their Receptors in Plants
3. 学会等名 International Symposium on Plant Development and Biotic Interaction
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Kazuki Sato, Yasuhiro Kadota, Pamela Gan, Taketo Uehara, Noriko Maki, M. Shahid Mukhtar, Ken Shirasu
2. 発表標題 Understanding the molecular basis of plant and root-knot nematode interaction
3. 学会等名 International Symposium on Plant Development and Biotic Interaction
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 後藤 幸久, 松井 英謙, Jan Sklenar, Paul Derbyshire, Frank L.H. Menke, 中神 弘史, Darrell Desveaux, Cyril Zipfel, 門田 康弘, 白須 賢
2. 発表標題 PAMP受容体の新規制御因子KIN7の同定と、KIN7と相互作用する細菌由来のエフェクターの解析
3. 学会等名 令和5年度 日本植物病理学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 佐藤 一輝, 門田 康弘, Gan Pamela, 植原 健人, 横 紀子, Mukhtar M. Shahid, 白須 賢
2. 発表標題 RNA結合タンパク質を標的とするネコブセンチュウエフェクターによる免疫抑制機構の解析
3. 学会等名 令和5年度日本植物病理学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Kazuki Sato, Yasuhiro Kadota, Pamela Gan, Taketo Uehara, Takahiro Bino, Katsushi Yamaguchi, Yasunori Ichihashi, Hideaki Iwahori, Noriko Maki, Shuji Shigenobu, Takamasa Suzuki, Shahid M. Mukhtar, Ken Shirasu
2. 発表標題 Screening for the root-knot nematode effectors that suppress plant immunity
3. 学会等名 第62回日本植物生理学会大会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

理化学研究所 環境資源科学研究センター 植物免疫研究グループ http://plantimmunity.riken.jp/

6. 研究組織			
	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	植原 健人 (Uehara Taketo) (30355458)	国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・中日本農業研究センター・産学連携コーディネーター (82111)	

6. 研究組織（つづき）

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	加藤 大明 (Kato Hiroaki) (70642635)	京都大学・農学研究科・特定研究員 (14301)	
研究分担者	望田 啓子 (桑田啓子) (Keiko Mochida) (70624352)	名古屋大学・トランスフォーマティブ生命分子研究所・特任講師 (13901)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関