

令和 6 年 6 月 10 日現在

機関番号：24302

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06234

研究課題名（和文）虫こぶを用いた植物ソース器官からシンク器官への転換機構の解明

研究課題名（英文）Source-sink switching mechanism in insect galls

研究代表者

武田 征士（Takeda, Seiji）

京都府立大学・生命環境科学研究科・准教授

研究者番号：90508053

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、ヨモギ虫こぶの形態解析、器官形成遺伝子のクローニング、形成昆虫の系統解析を行った。葉と茎に作られる虫こぶについて、組織切片とリグニン染色、及びX線マイクロCTイメージングを行い、虫こぶと宿主植物維管束のつながりと、虫こぶ内の空間的な維管束パターンを明らかにした。虫こぶRNA-sequencingで得られた配列情報を元に、器官形成に関わる5遺伝子をクローニングした。虫こぶより羽化したタマバエについてミトコンドリアCOI配列シーケンスによる系統解析を行い、虫こぶごとに違う種のタマバエであることを示した。虫こぶの腺毛に抗酸化作用があることを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

虫こぶは、虫こぶ形成昆虫が植物に作る特殊な組織で、昆虫が植物の発生システムをうまく利用して、住まいと食料源を兼ねた構造になっている。ヨモギには複数の異なる虫こぶができることから、同一宿主植物内での虫こぶの多様性・共通基盤が解明できる。また、多くの虫こぶは木本植物に作られることから、ヨモギは草本植物のモデル系として適している。本研究により、虫こぶによって異なる維管束パターンがあること、近縁別種のタマバエが全く異なる虫こぶ形態を作っていることが分かり、昆虫の能力の奥深さを改めて示した。また、ヨモギ虫こぶに抗酸化作用があることが分かり、物質生産の場としても有効であることが示唆される。

研究成果の概要（英文）：We analyzed morphology and molecular aspects of galls generated on *Artemisia indica*. We clarified the vascular connection between galls and host plants, and spatial vascular patterning in 2 galls on leaves (Eboshi and Ketama) and 2 on stems (Cobu and Wata) by histochemical sections and X-ray micro computing tomography. We cloned the genes, which are highly expressed in galls and are involved in organ development, AiAG, AiCIB3, AiFIL, AiPDF2, and AiMIXTA, based on the RNA-sequencing data. Phylogenetic analysis of gall midges emerged from galls by sequencing of the mitochondria COI gene showed that the midges from different galls were different species.

研究分野：植物生理学

キーワード：虫こぶ ヨモギ タマバエ 維管束 X線マイクロCT

1. 研究開始当初の背景

虫こぶは、虫こぶ形成昆虫が宿主植物に作る、食料と住まいを兼ねた特殊な組織・器官である。これまで行ってきたトランスクリプトーム解析から、虫こぶでは光合成をする葉などのソース器官から、花や実の性質をもつシンク器官への転換が起こっていることが示唆されてきた。多くの虫こぶは木本植物に作られるため、研究室での累代栽培・飼育や、培養や遺伝子組換えなどの解析が困難である。また、多くの研究報告は1種類の虫こぶについてのもので多く、その知見も種特異的なものである可能性が残される。

2. 研究の目的

本研究の目的は、虫こぶを用いて植物ソース器官からシンク器官への転換機構を明らかにすることである。草本植物の虫こぶ形成モデル系の確立を視野に、入手が容易であるヨモギを材料に研究を進めた。ヨモギには異なる種類の虫こぶが形成されるため、同一宿主植物で異なる虫こぶを比較することで、虫こぶ形成の共通基盤と多様性がより詳細に理解できる。

3. 研究の方法

(1) 研究材料：ヨモギの葉に作られる2種類(ヨモギハエボシフシ、ヨモギハシロケタマフシ)、茎に作られる2種類(ヨモギクキコブフシ、ヨモギクキワタフシ)、脇芽に作られる1種(ヨモギメツボフシ)を用いた。いずれの虫こぶも、申請者所属研究室の周辺(京都府精華町)で容易に見つかるもので、5月~10月の間にサンプリングを行った。

(2) 組織学とイメージング：虫こぶはFAAで固定し、エタノール置換後に70%エタノールで保存した。切片作成では、エタノール・レモゾールで置換後にパラフィンに包埋し、Leica RM2125RTSで10-20 µmの切片を作成し、脱パラフィン後に0.05%トルイジンブルーまたは3%フロログルシノールで染色した。X線マイクロCTはScanXmate-E090S1015およびScanXmate-CF110TSH320/460を用いて解析した(国立遺伝研との共同研究)。

(3) RNA-sequencing：虫こぶと比較組織(葉、茎、脇芽)からRNeasy Plant Mini Kit(QIAGEN)を用いてRNAを抽出し、次世代シーケンサーIllumina NexSeq500でシーケンスを行った(京都産業大との共同研究)。

(4) 遺伝子クローニング：RNA-sequencingによって得られたTRINITY配列を元にプライマーを設計し、虫こぶcDNAを鋳型にPCR反応によりクローニングを行った。

(5) タマバエ系統解析：採集した虫こぶをプラントボックス内で栽培し、羽化したタマバエを回収し、99.5%エタノールで保存した。DNeasy Blood and Tissue kit(QIAGEN)によってDNAを抽出し、ミトコンドリアCOI配列をPCRで増幅してシーケンスを行った。配列解析と分子系統樹はMesquiteとMEGA Xを用いた。

4. 研究成果

(1) 虫こぶの構造解析

虫こぶ構造を組織切片とリグニン染色、及びX線マイクロCTによって解析したところ、虫こぶ内の維管束パターンが明らかになった。エボシとワタでは虫室に沿って平行に維管束が作られている一方、ケタマとコブでは虫こぶ内で樹状パターンを取る事が分かった。リグニン化のパターンも維管束によって異なっており、形成される組織などにはならず、多様性に富むことが分かった。

(2) 比較トランスクリプトーム解析

RNA sequencingによって得られた配列のうち、各虫こぶで対照組織より2倍以上あるいは半分以下の発現量の遺伝子を抽出して比較した。葉の2種類、茎の2種類の発現遺伝子

を比較した結果、すべての虫こぶで共通して高発現する遺伝子が 1,321、発現低下しているものが 232 遺伝子あった。発現遺伝子の機能を Gene Ontology 解析で類推した結果、すべての虫こぶで器官形成、翻訳、非生物ストレス応答に関する遺伝子が高発現していた。また、細胞壁合成関連遺伝子は、葉では発現上昇、茎では発現低下しており、葉では光合成関連遺伝子の発現上昇が見られた。

(3) 虫こぶ発現遺伝子のクローニングと機能解析

虫こぶで高発現している遺伝子のうち、花器官形成に関わる *AiAG*, *AiCIB3*, *AiFIL*, 腺毛形成に関わる *AiPDF2*, *AiMIXTA* の cDNA をクローニングし、配列決定を行った。*AiCIB3*, *AiFIL* については、シロイヌナズナでの過剰発現株 (CaMV 35S プロモーター) を作成した。*AiCIB3* では表現型が見られなかったが、*AiFIL* 過剰発現株では葉の上偏成長が見られた。*AiAG* のゲノム配列クローニング、及び虫こぶ組織での mRNA in situ hybridization を試みたが、プライマー箇所、実験手法等と思われる問題で、うまく行かなかった。これらについては、実験手法の改良や別実験が今後必要である。

(4) タマバエの系統解析

採集した虫こぶより羽化したタマバエから DNA を抽出し、ミトコンドリア COI 配列解析による分子系統解析を行った結果、各虫こぶは異なる種のタマバエに形成されること、タマバエはいずれも近縁であるが、作られる組織と近縁度には関係が無い事が示唆された。

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Hirano Tomoko, Okamoto Ayaka, Oda Yoshihisa, Sakamoto Tomoaki, Takeda Seiji, Matsuura Takakazu, Ikeda Yoko, Higaki Takumi, Kimura Seisuke, Sato Masa H.	4. 巻 13
2. 論文標題 Ab-GALFA, A bioassay for insect gall formation using the model plant Arabidopsis thaliana	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 2554
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-023-29302-8	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 -

1. 著者名 Asagoshi Yuna, Hitomi Eri, Nakamura Noriko, Takeda Seiji	4. 巻 40
2. 論文標題 Gene-flow investigation between garden and wild roses planted in close distance	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Plant Biotechnology	6. 最初と最後の頁 283 ~ 288
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.5511/plantbiotechnology.23.0708a	査読の有無 無
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 Takeda Seiji, Hirano Tomoko, Ohshima Issei, Sato Masa H.	4. 巻 22
2. 論文標題 Recent Progress Regarding the Molecular Aspects of Insect Gall Formation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 9424 ~ 9424
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ijms22179424	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

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Seiji Takeda
2. 発表標題 Circular-agricultural system using crop plants and edible insects
3. 学会等名 The open international joint symposium between Thailand and Japan 2023（国際学会）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Sawako Ueda, Makiko Yoza, Seiji Takeda
2. 発表標題 Functional analysis of hairs generated on stem gall in Artemisia indica
3. 学会等名 The open international joint symposium between Thailand and Japan 2023 (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 竹内さくら、余座万紀子、前野哲輝、武田征士
2. 発表標題 ヨモギの虫こぶ形成の共通基盤と多様性を理解する
3. 学会等名 第39回日本植物バイオテクノロジー学会(堺)大会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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
研究協力者	前野 哲輝 (Maeno Akiteru)	国立遺伝学研究所 (63801)	

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
---------	---------