

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 7 日現在

機関番号：17401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2016

課題番号：26650102

研究課題名(和文)植物感染性線虫を用いた分子遺伝学的研究手法の確立と展開

研究課題名(英文)Development of model system to understand nematode infection mechanisms.

研究代表者

澤 進一郎(Sawa, Shinichiro)

熊本大学・大学院先端科学研究部(理)・教授

研究者番号：00315748

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、植物感染性線虫を用いた分子遺伝学的研究手法の確立と展開を行っている。特に、線虫感染過程における、植物細胞の脱分化、多核化、再分化過程における分子機構と線虫誘因・忌避物質に焦点を当て、その分子機構の全体像を明らかにし、植物遺伝子の新たな機能に関する知見を得ることを目的としている。

線虫感染時の分子機構の解明を行う為に、巨大細胞形成過程において、どのような遺伝子群が発現しているか、明らかにするために、根瘤を用いてRNA seq解析を行った。線虫感染後3, 5, 7日後の植物の根からRNAを回収し、植物と線虫の両方のcDNA情報を得て、線虫感染に機能する遺伝子の推定を行った。

研究成果の概要(英文)：Developmental plasticity is one of the most striking features of plant morphogenesis, as plants are able to vary their shapes in response to environmental cues. Root-knot nematodes (RKNs) are known to parasitize multiple species of rooting plants and to induce characteristic tissue expansion called galls or root-knots on the roots of their hosts by perturbing the plant cellular machinery.

In this study, we deciphered the molecular mechanism of gall formation with an in vitro infection assay system using RKN *Meloidogyne incognita*, and the model plant *Arabidopsis thaliana*. By taking advantages of this system, we performed next-generation sequencing (NGS)-based transcriptome profiling to know molecular mechanisms of nematode infection mechanisms, and found many categories of gene signaling are responsible for nematode infection steps.

研究分野：植物分子遺伝発生学

キーワード：植物感染性線虫 感染機構 *M. incognita* *A. thaliana*

1. 研究開始当初の背景

植物感染性線虫は、農業的に大きな損害を与えるために、これまでに、農学的研究が精力的に行われてきた。国内では、農作物における線虫被害報告をうけて、その原因となる線虫を同定し、再分類する研究が精力的に行われている。また、作付け時期の検討や土壌改良等による線虫感染被害軽減に関する研究が行われている。一方、海外では、その線虫感染過程における分子機構の解析も行われている。これまでに、線虫感染耐性を示すトマトから、Mi 遺伝子が単離され、NB-LRR 遺伝子をコードすることが明らかとなっている。また、線虫感染に伴って、植物側の遺伝子発現の変化をジーンチップ等のオーム解析により明らかにし、植物側の応答因子に関する知見も得られている。さらに、線虫感染に伴い、線虫から、様々なイフェクタータンパク質が植物細胞に注入されるが、それらの因子についても、徐々に、情報が蓄積しつつある。しかし、線虫を培養するためにはトマトなどの作物に感染させる必要があり、線虫の培養、維持が難しいという難点があった。また、線虫を滅菌するためには、次亜塩素酸ナトリウムなどの薬剤を用いることができず(線虫の飲害)、1匹ずつ毛針で釣り上げる必要があり、大量の滅菌線虫を用意するのは困難であった。このために、線虫感染耐性植物のスクリーニング等を滅菌状態で行う事は不可能であり、これまでに、そのような、網羅的分子遺伝学的解析が行われた例はない。

我々は、23年度までにトマトを用いたサツマイモネコブ線虫液体培養系を構築し、24,25年度に行った挑戦的萌芽研究にて、線虫培養系を改良し、3日で数千頭の線虫を用意できるようになった。また、抗生物質を使った新たな滅菌法の開発により、効率的な滅菌手法も確立した。一方、線虫感染効率の検定方法に関して試行錯誤した結果、ある程度

の検定は可能となり、シロイヌナズナの *clv1* 突然変異体が明らかに線虫感染耐性であることを示したが(未発表)、多くの突然変異体に関しては、未だに安定的な結果を得ることは出来ないため、感染効率検定法についてさらなる改良が求められる。

一方、線虫は、植物個体(根)からの誘引物質と、感染細胞からの誘引物質の2種類の誘引物質により、的確に植物を発見し、感染細胞を発見することで感染できるが、現在のところ、植物の線虫誘引物質は報告されていない。これまでに、線虫の行動の検定方法も報告されていないのが現状であった。

2. 研究の目的

本研究では、線虫の分子遺伝学的解析を可能とするため、線虫感染効率の検定方法の改良と線虫行動検定方法の確立と展開という二つの新技術開発を行い、植物細胞の脱分化、多核化、再分化過程における分子機構の解析と線虫誘因・忌避物質の単離・同定を目指す。

3. 研究の方法

線虫感染効率検定法と培養技術の改良;根瘤の数を数えるのではなく、卵塊の数を数えることで感染効率の評価が行えるか否か検証した。さらに、感染系の改良について検討した。また、その研究の発展系として、線虫感染過程に関わる CLE 遺伝子群の分子遺伝学的解析を行った。

線虫行動検定方法の確立にむけたマイクロ流路デバイスの改良と展開のため、PFゲルを用いた線虫誘引活性の検定法を検証した。

4. 研究成果

卵塊の数を数えて、感染抵抗性の評価を行うことは可能であり、卵塊数が多いほど、抵抗性が低いと判断できた。

また、これまでに当研究室で線虫感染抵抗性と確認されている *clv1* 突然変異体においても、有意に卵塊数が低下しており、非常によい評価方法だと考えられる。さらに、卵塊

の観察を行う為、染色剤を用いることで、卵塊が容易に判断でき、感染抵抗性の評価効率が上がることもわかった。

一方、CLE 遺伝子群の分子遺伝学的解析の為に、線虫側遺伝子の MiCLE1-MiCLE5 までの 5 つの遺伝子について、シロイヌナズナで過剰発現、及び、RNAi 過剰発現株の作成を行った。それぞれ、5 つの独立の系統を作成したが、特に表現型は得られなかった。植物の形態形成も、野生型と同様であったうえに、線虫感染抵抗性についても、野生型と変わらなかった。

線虫行動検定方法の改良のために、PF-127 ゲルを用いた方法を開発、検討した。その結果、寒天に比べ、かなりはっきりとした線虫行動検定が可能である事がわかった。この検定法により、線虫の誘引物質、忌避物質、さらに、行動活性抑制物質の探索が可能となった。マイクロデバイスを用いた検定方法と比べると、これまでは、1 スライドガラスで 1 化合物の検証が出来るだけだったが、24 穴のシャーレで検定できるため、従前よりもかなりのハイスループットで、線虫行動が評価出来るようになった。さらに、線虫行動が抑制される化合物のスクリーニングも可能なため、農薬の開発にも応用できることが明らかとなった。

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 3 件; 全て査読有り)

1. Hida, H., Nishiyama, H., Sawa, S., Higashiyama, T., Arata, H. (2015) Chemotaxis assay of plant-parasitic nematodes on a gel-filled microchannel device. *Sensors and Actuators B*, 221,1483-1491
2. Nishiyama, H., Ngan, B. T., Nagakami, S., Ejima, C., Ishida, T., and Sawa, S. (2015) Protocol of

root-knot nematode culture by hydroponic system and nematode inoculation to Arabidopsis. *Nematological research*, 45, 45-50.

3. Nishiyama, H., Nakagami, S., Todaka, A., Arita, T., Ishida, T., and Sawa, S. (2014) Light-dependent green gall formation induced by *Meloidogyne incognita*. *Nematology*, 16, 889-893

[学会発表](計 13 件)

1. 2017.3.18 澤進一郎 “植物感染性線虫の誘引物質の探索” 日本農芸化学会 2017 年度大会 京都女子大
2. 2017.3.20 澤進一郎 “植物感染性線虫の感染過程における細胞壁成分の機能と役割” 第 58 回日本植物生理学会年 鹿児島大
3. 2016.8.29 “EFC7 and EFC15 of *Meloidogyne incognita* are responsible for infection steps in *Arabidopsis*” 32nd Symposium European Society of Nematologists, Porto, Portugal
4. 2016.6.22 “SOL1 and other peptidases are responsible for CLE peptide processing mechanisms” 22nd International Conference on Plant Growth Substances, Tront, Canada
5. 2015.3.19 澤進一郎 “線虫感染過程における CLAVATA シグナル伝達系の関与” 第 56 回日本植物生理学会年会 岩手大
6. 2014.3.15 澤進一郎 “植物感染性線虫の感染分子機構の解析” 日本農薬学会 京都大
7. 2014.3.19 澤進一郎 “線虫感染過程における CLAVATA シグナル伝達系の関与” 第 55 回日本植物生理学会年会 富山大
8. 2014.5.30 SAWA “Comprehensive genetic analysis of CLV3 downstream pathway in *Arabidopsis*.” 第 47 回日本発生生物学会 WINC AICHI
9. 2014.9.16 澤進一郎 “ネコブセンチュウの誘引物質の解析” 2014 年度日本線虫学会大会 文科省研究交流センター
10. 2013.7.30 S.SAWA “Analysis of CLE peptide signaling in *Arabidopsis thaliana*” 21ST Conference of the International Plant Growth Substances Association Vancouver, Canada
11. 2013.4.12 澤進一郎 “シロイヌナズナの幹細胞活性を規定する CLV3 ペプチドホルモンシグナル伝達因子の順遺伝学による網羅的探索” 日本生化学会大会 パシフィコ横浜

- 12.2013.12.4 澤進一郎 “CLE peptide-LRR-RLK 型受容体による根の伸長制御機構の解析” 第36回日本分子生物学会年会 神戸
- 13.2012.9.16 澤進一郎 “細胞外インテリジェント空間における細胞間・生体間情報伝達機構の解析” シンポジウム「植物の細胞外インテリジェントシステム」という新しい概念 日本植物学会第76回大会 兵庫県立大

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0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 0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
<http://www.sci.kumamoto-u.ac.jp/~sawa/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

澤進一郎 (SAWA SHINICHIRO)
熊本大学 大学院先端科学研究部・教授
研究者番号：00315748

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()