

平成21年 5月29日現在

研究種目：若手研究(B)  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19780040  
 研究課題名（和文） 寄生植物ストライガのイネ寄生過程において機能する遺伝子の探索  
 研究課題名（英文） Molecular studies on the parasitism of *Striga hermonthica*  
 研究代表者 吉田 聡子 (YOSHIDA SATOKO)  
 独立行政法人理化学研究所 植物免疫研究チーム 研究員  
 研究者番号：20450421

## 研究成果の概要：

根寄生雑草ストライガはアフリカを中心とした半乾燥地域で甚大な農業被害をもたらす、病害雑草である。しかし、その寄生の分子機構に関しては未だに知見が乏しく、根本的な解決策は見つかっていない。本研究では、まず、ストライガと宿主の相互作用を理解するために、ストライガを様々な非宿主植物種に接種し、寄生成立の程度を形態学的に観察した。また、ストライガの様々な発育段階・各器官からRNAを抽出し、全長cDNAライブラリーを作製した後、EST解析をおこなった。

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,300,000	0	2,300,000
2008年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	330,000	3,730,000

## 研究分野：農学

科研費の分科・細目：農学・植物病理学

キーワード：寄生植物, ストライガ, EST, データベース, cDNA ライブラリー, 宿主特異性

## 1. 研究開始当初の背景

ハマウツボ科の絶対根寄生植物であるストライガ (*Striga spp.*) やオロバンキ (*Orobancha spp.*) は穀物や野菜の根に寄生し、アフリカやアジアなどの半乾燥地域で毎年甚大な農業被害をもたらしている。しかし、寄生植物の寄生機構に関しては未知な点が多く、根本的な解決策は見つかっていない。

根寄生植物と宿主植物はシグナル伝達物質を通じて相互を認識し、寄生を成立させる。その初期の段階は化学物質によっており、根寄生植物の発芽には宿主植物より分泌され

るストリゴラクトンが必要なことが知られている。発芽した根寄生植物の幼根は過酸化物質を生成し、宿主より分泌される2,6-dimethoxybenzoquinone (DMBQ) に代表されるキノン類によって宿主根への吸着体である吸器が誘導される。吸器は宿主根に付着し、内部に侵入、通導組織を連結させることにより、宿主の栄養分を吸い取る“寄生”が成立する。

2005年、Akiyama ら (Nature, 435, 824) はアーバスキュラー菌根菌の菌糸分岐活性化物質が、ストライガ・オロバンキの発芽誘

導物質・ストリゴラクトンであることを発見し、寄生植物が共生のシステムを巧みに利用することによって寄生を成立させている可能性を示した。しかし、アーバスキュラー菌根菌がアブラナ科などの一部の植物種をのぞいてほとんどの被子植物と共生できるのに比べ、根寄生植物はある一定の宿主特異性を示す。つまり、相互認識の不成立か宿主側の抵抗性反応の発動などによって、寄生の可否が決まると考えられる。しかし、発芽誘導物質および吸器誘導物質は、いずれも宿主特異的なものではなく広く植物一般に存在しているため、寄生の量的コントロールには影響を与えるものの、その成立を決定づける因子であるとは考えにくい。

一方、Cameron ら (*Annals Bot.*, 98, 1289, 2006) は半寄生植物の *Rhinanthus minor* が非宿主植物の根に侵入したのちに、細胞の断片化やリグニン化によって寄生の成立が妨げられることを観察した。さらに、Gurney ら (*New Phytologist*, 160, 557, 2006) は、ストライガ (*Striga hermonthica*) の宿主として、31 種・品種のイネを解析し、日本晴品種のみが抵抗性を示すことを報告した。日本晴においては、ストライガは宿主根へ侵入するが、通導組織を連結できないため寄生を成立させることができずに枯死する。これらの例から、寄生植物の宿主認識が宿主根への侵入後に制御される可能性が示唆されているが、その分子メカニズムは明らかではない。

寄生植物の分子レベルでの知見は非常に少なく、特に寄生植物の大規模な DNA 情報登録は、半寄生植物である *Triphysaria* 属植物の EST 解析が行われていたのみである (*Plant Physiol.*, 138, 1469, 2005)。寄生機構の解明には、遺伝子情報の充実とそれに基づいた分子生物学的なアプローチが必要であると考えられる。

## 2. 研究の目的

本研究では、根寄生植物ストライガの寄生過程で機能する遺伝子を探索するために、まず、1) 実験室内でのストライガの寄生系を確立し、2) 詳細な観察により、宿主認識のおこるステージを調べ、組織学的な裏付けを得る。さらに、3) ストライガの全長 cDNA ライブラリーの構築と EST 解析により、ストライガの遺伝子配列情報の解析基盤を整備する。また、逆遺伝学的機能解析に向けて、4) ストライガの形質転換系の確立を試みる。これらの結果をふまえて SAGE 法またはマイクロアレイ解析による、寄生過程の網羅的遺伝子発現解析を目指す。

## 3. 研究の方法

### (1) 研究に用いた材料

ストライガ (*Striga hermonthica*) 種子はスーダンのモロコシ畑で採取されたものを現カルトゥール大学 A.G. Babiker 博士から、発芽刺激物質(+)-Strigol は東京大学・森教授から分与していただいた。

### (2) ストライガ寄生実験

ストライガ種子は 20% に希釈したハイター (花王) 液を用いて滅菌した後、滅菌水で湿らせたガラス繊維濾紙上で 1~2 週間暗所におき、発芽前処理をおこなった。宿主 (非宿主) 植物は発芽後 1 週間経過したものをリゾトロンチャンバーに移し、さらに 2 週間育てた後、ストライガ種子の感染をおこなった。リゾトロンチャンバーは滅菌シャーレの端に両端に穴をあけ、ロックウール、ナイロンメッシュを敷き、植物を置いた後、シャーレ蓋を閉じ、垂直に置いたものである。ストライガの感染は、ストリゴール処理し 2~6 時間経過したストライガ種子を宿主植物の根に接触する様に配置することによりおこなった。

### (3) 試料の染色・観察

宿主 (非宿主) - ストライガの接触している根の一部を切り出し、FAA (10%ホルムアルデヒド・5%酢酸・5%エタノール) 液により固定し、テクノビット 7100 樹脂に包埋した。Leica ミクロトーム RM2135 により薄片を作製し、サフラニンとファストグリーンによる二重染色をおこなった。観察はキーエンス Bio-ZERO 顕微鏡を用いた。

### (4) RNA 抽出・cDNA ライブラリーの構築

ストライガの各器官からの RNA 抽出は CTAB 法により行った後に、Micro-to-Midi RNA extraction kit (インビトロゲン) を用いて精製した。

cDNA ライブラリーは DSN 法により標準化し、SMART 法を用いて構築した (Evrogen)。

### (5) シーケンス解析・EST 解析とデータベースの構築

cDNA ライブラリーから得られたクローンはワシントン大学ゲノムシーケンスセンターに塩基配列解析を依頼した。

得られた塩基配列データは EST2Uni プログラム (*BMC Bioinfo.*, 9, 5, 2008) を用いて解析し、データベース化した。クラスタリングには cap3 の標準条件を、アノテーションおよび他生物種との比較解析には NCBI BLAST プログラムを用いた。

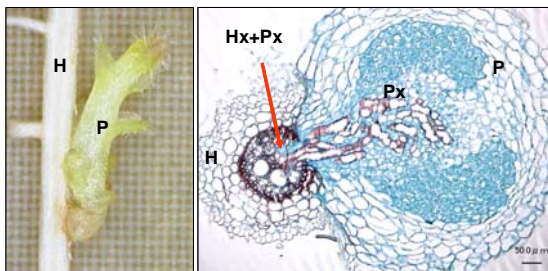
#### (6) ストライガ形質転換

ストライガ種子は GM 培地上で 1 週間前処理をし、ストリゴールにより発芽させた後、リポーター遺伝子として GFP を含むプラスミドを導入した *Agrobacterium rhizogenes* の懸濁液中でストライガ根をカミソリで切ることで感染を試みた。数日間の共培養の後、MS または B5 培地に移し、数週間様子を観察した。

#### 4. 研究成果

##### (1) リゾトロン法を用いたストライガ寄生系の確立

安定したストライガ感染系を構築するために、まず、宿主植物であるイネ・トウモロコシを用いて感染実験をおこなった。Gurneyら (*New Phytologist*, 160, 557, 2006) のリゾトロン法を用いて、植物栽培環境、栄養条件、ナイロンメッシュの種類、リゾトロンのサイズ等を検討した。その結果、ストライガ種子を感染させる前にストリゴールによる処理を2-6時間おこなうことによって、同調的な発芽を誘導することに成功し、80%以上の高い侵入率を得ることが出来た。ストリゴール処理をしない場合の、ストライガの宿主への侵入率は20%以下であった。宿主根に侵入したストライガは2週間後には宿主中心中に到達し、維



管束系の連結を成立させた(図1)。

図1. トウモロコシ(H)に寄生したストライガ(P)(左図)とその横断切片画像(右図)

Hx: 宿主木部、Px: ストライガ導管細胞

##### (2) 宿主・非宿主植物へのストライガ感染過程の観察

ストライガの宿主(非宿主)植物侵入後におこる宿主認識機構の理解を深めるために、宿主植物である、イネ・トウモロコシ、非宿主植物であるシロイヌナズナ・ササゲ・ミヤコグサにストライガを感染させ、経時的に寄生の過程を観察した。種による発芽刺激物質の分泌量の違いの影響を避けるため、ストライガはストリゴール処理により発芽させた後に感染させた。その結果、宿主・非宿主にかかわらずストライガ吸器は植物体に侵入できる

こと、ミヤコグサでは皮層細胞でストライガの侵入が停止し、サフランインで染色される茶褐色の物質が蓄積すること、シロイヌナズナ・ササゲでは維管束の連結は成立するものの、それ以上のストライガの地上部の発達が見られないことが明らかになった。これらの結果からストライガの宿主植物への侵入の過程は宿主特異的ではなく、侵入後に宿主特異性が発揮されるが、そのステージが植物種によって異なることが示唆された。

また、ストライガが、自分自身には寄生しないことに着目し、近縁種の半寄生植物にストライガが寄生できるかどうかを調べた。近縁種植物として、ハマウツボ科コシオガマ属コシオガマ(*Phtheirospermum japonicum*)を用いた。発芽したストライガの90%以上はコシオガマ根に侵入せず、先端生長を続けることが明らかになった。また、ストライガをコシオガマに感染させた時の様子をタイムラプス画像として、録画した結果、ストライガはコシオガマ根に向かって生長するが、吸器を形成せず、侵入が成立しない様子が観察された。これらの結果は寄生植物が近縁種への寄生を避ける仕組みを備えている可能性を示唆する。

##### (3) ストライガ全長濃縮cDNAライブラリーの構築とEST解析

ストライガの遺伝子情報を蓄積するために、ストライガの様々な成長ステージ、器官からそれぞれRNAを抽出し、全長濃縮cDNAライブラリーを構築した。ランダムに抽出した90クローンを用いてライブラリーの評価したところ、得られたcDNAライブラリーの全長cDNAの率は約80%であり、平均インサート長は1.4 kbであることが分かった。シロイヌナズナおよびマウスの平均全長cDNA長はそれぞれ約1.2 kbおよび1.6 kbであることが知られているので、ストライガの平均cDNA長の他の生物種に比べて極端に異なるものではないと考えられた。

また、ストライガcDNAライブラリーから得た約40,000 cDNAクローンの両端から塩基配列を決定し、クラスタリング解析の結果、重複のない約17,000の配列(Unigene)を得た。得られた配列はシロイヌナズナを含む6被子植物種、ヒメツリガネゴケ(苔類)、コナミドリムシ(藻類)のゲノム配列から予想されたタンパク質アミノ酸配列に対して、BLASTXプログラムを用いた比較解析をおこなった。また、先行してEST解析がおこなわれていたハマウツボ科半寄生植物 *Triphysaria pusilla* のEST配列に対しても、TBLASTXを用いて比較解析をおこなった。その結果、他植物種に対しては

70-80%のストライガUnigeneがホモログを持つのに対し、コナミドリムシに対しては約40%のストライガUnigeneがホモロジーを示すにとどまった。また、全てのデータベースに対して、ホモログを持たないストライガUnigeneは14%にあたる約2,400配列存在した。他の植物種にホモログを持たないが、*Triphysaria*にホモログを持つクローンも約600存在し、これらの配列は寄生植物に特異的に存在する遺伝子の配列を含む可能性がある。

これらの結果はデータベースとしてホームページ上で公開すべく、現在準備中である。

#### (4) ストライガ形質転換法の模索

恒常的発現プロモータ下で制御されたGFP遺伝子をマーカーに用いて、*Agrobacterium tumefaciens*もしくは*A. rhizogenes*を用いて、ストライガ形質転換法の確立を試みた。感染時のストライガの発育ステージ、培地栄養条件、共培養の期間などの条件を検討した。*A. tumefaciens*による形質転換には、成功しなかったが、*A. rhizogenes*を用いた形質転換に成功した。また、形質転換されたストライガ根を切り取り、宿主根のそばに置くことにより、吸器形成および侵入を確認できた。しかしながら、*A. rhizogenes*を用いた形質転換の効率は非常に低く、安定した結果を得られていない。高効率な形質転換系を確立するためにはさらなる条件検討が必要と考えられる。

#### 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2件)

①Mikihiisa Umehara, Atsushi Hanada, Satoko Yoshida et al. (12名中3番目), Inhibition of shoot branching by new terpenoid plant hormones., *Nature*, 455, 195-200 (2008), 査読有

②Satoko Yoshida, Ken Shirasu, Multiple layers of incompatibility to the parasitic witchweed, *Striga hermonthica*., *New Phytologist*, in press (2009) 査読有

[学会発表] (計6件)

①Satoko Yoshida, *Agrobacterium*-mediated transformation of *Striga hermonthica*, 9<sup>th</sup> World Congress on Parasitic Plants, 2007年6月3-7日, Charlottesville, Virginia, USA

②Satoko Yoshida, Molecular studies on the

*Striga hermonthica* parasitism, JSPS/JST International Symposium on Toward Advanced use of African resources in Plant Science, 2007年11月20日, RIKEN, Yokohama, Japan

③吉田聡子、寄生植物ストライガ (*Striga hermonthica*) の宿主認識機構に関する解析、日本植物生理学会 第49回年会、2008年20-22日、札幌コンベンションセンター

④吉田聡子、寄生植物ストライガ (*Striga hermonthica*) の宿主特異性に関する解析、植物微生物研究会 第18回交流会、2008年9月17-19日、奈良女子大学

⑤吉田聡子、寄生植物ストライガ (*Striga hermonthica*) の網羅的EST解析、日本植物学会第72回大会、2008年9月25-27日、高知大学

⑥吉田聡子、寄生植物ストライガの感染機構の分子生物学的解析基盤の構築、日本植物生理学会 第50回年会、2009年3月21-24日、名古屋大学

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉田 聡子 (YOSHIDA SATOKO)

独立行政法人理化学研究所・植物免疫研究チーム・研究員

研究者番号：20450421