

令和元年6月25日現在

機関番号：24403

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H04875

研究課題名(和文)大規模変異体集団を活用した根寄生植物抵抗性トマト系統の同定

研究課題名(英文) Exploration for tomato lines resistant against root parasitic plants using a large mutagenized population

研究代表者

青木 考 (Aoki, Koh)

大阪府立大学・生命環境科学研究科・教授

研究者番号：30344021

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,100,000円

研究成果の概要(和文)：地中海沿岸、南米を中心としてトマトに大きな被害をもたらしている根寄生植物 *Phelipanche aegyptiaca* に対して発芽後抵抗性を示すトマト系統を、EMS突然変異系統、野生近縁種、変異固定系統から探索した。この中で野生近縁種の中から *Solanum pennellii* に抵抗性が見出され、近親交配系統を用いた解析により11ゲノム領域に原因遺伝子が散在していることがわかった。さらに原因遺伝子の特定を進めている。また発芽を抑制することで寄生を減少させられるであろうと推定されていた *ccd8* 変異系統に対して *P. aegyptiaca* 寄生試験を実施し、実際に寄生率が減少することを実証した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

根寄生植物によるトマトの被害は世界中で大きな問題となっている。これに抵抗性を示すトマト系統は、根寄生植物の発芽刺激物質であるストリゴラクトン生合成欠損系統に限られていた。本研究では、従来の抵抗性とは異なり、発芽後寄生植物がトマトに付着した後の段階で発揮される抵抗性を探索し、野生近縁種 *S. pennellii* の中にその性質があることを見出し原因遺伝子同定への歩を進めた。この発芽後抵抗性は、発芽を抑制することによる抵抗性と併せて、根寄生植物へのより強固な抵抗性保持につながると考えられ、世界各地でのトマト生産を助けるものとなると思われる。

研究成果の概要(英文)：We explored new resistance of tomato against a root parasitic plant, *Phelipanche aegyptiaca*, which causes serious damage to tomato production, by using EMS-mutagenized population, fixed mutant lines and tomato wild relative species. Among these variations, *P. aegyptiaca* showed significantly lower parasitic rate to one wild relative species, *Solanum pennellii*. This lead us to use established introgression lines of *S. pennellii* x *S. lycopersicum*, consisting of 76 lines, to identify genomic region responsible for the post-germination resistance. Analysis of introgression lines revealed that putative responsible genes are dispersed in 11 genomic regions. We are currently attempting to identify individual genes responsible for the resistance. Additionally, we tested *ccd8* mutant defective in strigolactone biosynthesis. We verified that parasitic rate of *P. aegyptiaca* to *ccd8* mutant actually lower than to normal *S. lycopersicum*.

研究分野：植物生化学・分子生物学

キーワード：寄生植物 トマト 発芽後抵抗性 *Phelipanche*

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

寄生植物は、宿主となる植物に地上部で寄生する種類と、地下部で寄生する種類に分けられる。地上部で寄生する寄生植物にはヤドリギ(*Nuytsia*)、ネナシカズラ(*Cuscuta*)などがあり、一方、地下部に寄生する寄生植物にはストライガ(*Striga*)、トリフィザリア(*Tryphysaria*)、オロバンキ(*Orobanch*)などがある。地上部、地下部いずれに寄生した場合も、付近にある宿主表面に付着した後、寄生根を宿主内に侵入させて維管束との接続を作る。これにより宿主からの養水分の収奪を行なうようになる。

このなかで、宿主地下部に寄生するタイプの *Orobanchae aegyptiaca* はヨーロッパ南部原産といわれ、オーストラリア、地中海沿岸諸国、アフリカ、アジアを中心にトマトを含むナス科の作物生産に大きな被害を与えている。*O. aegyptiaca* の寄生過程は大きく4段階に分けられる。第一段階は、宿主の根から分泌される発芽刺激物質を受容し発芽する段階、第二段階は幼根を宿主根表面に付着させる段階、第三段階は宿主の維管束に向かって寄生根を伸長させる段階、そして第四段階は寄主維管束組織細胞と接続を形成する段階である。*O. aegyptiaca* の寄生に対する宿主作物の抵抗性を考えた時、この四つの段階のどこを阻止できるのかが問題となる。

*O. aegyptiaca* の寄生に対して抵抗性を持つようなトマトは、これまでに SL-ORT1 という一つの系統が見つかった (Dor et al., 2010)。トマトの近縁野生種にも *O. aegyptiaca* に抵抗性を示す種は無かったため、高速中性子線突然変異誘発システムをスクリーニングしたところ、抵抗性系統として SL-ORT1 が単離された。抵抗性をもたらしていたのは発芽刺激物質であるストリゴラクトンという植物ホルモンの生合成に関わる *SICCD7* 遺伝子の変異であり、すなわちこの系統は *O. aegyptiaca* の発芽を誘導する植物ホルモン生合成が不全なため発芽を抑制することで抵抗性を示していた。しかしストリゴラクトンが欠如している SL-ORT1 系統は、同時に側枝の発生が多くなるという望ましくない形態変化も示していた。そのため、ストリゴラクトン生合成経路とは別な箇所でも寄生を防ぐことができる系統が求められた。*O. aegyptiaca* と近縁の *O. minor* について、抵抗性宿主と感受性宿主の中での寄生根挙動を調べたところ、抵抗性宿主では根の内鞘組織で寄生根侵入がブロックされていたという報告がある (Kubo et al., 2009)。このことはトマトにおいても寄生根の侵入を防ぐような抵抗性があり得ることを示唆している。しかしながら、寄生根の侵入や接続の段階で抵抗性を示すトマト系統は見出されていない。

そこで本研究では抵抗性をもたらすメカニズムが SL-ORT1 系統とは全く違う、新たなタイプの抵抗性をもったトマト系統の発見を目的とした研究を実施する。これを実現するために、選抜の対象としてはナショナルバイオリソースプロジェクト(トマト)が配布しているマイクロトム突然変異誘発システムを用いる (Saito et al., 2011)。またストリゴラクトン生合成系の変異系統を選抜してしまうことを防ぐために、発芽段階を迂回して、寄生可能な状態となった *O. aegyptiaca* 培養組織を人工接種することにより寄生試験を行なう。この試験では単一個体のクローン組織片を用いるため、抵抗性が *O. aegyptiaca* 側の遺伝子型によりばらつくことを抑えて、トマト側の遺伝子型による違いを見分けることができるようにするメリットが生じる。この幼根からのカルス誘導系は申請者の研究グループにおいて既に確立され継代維持されているのでこれを速やかに使用することができる。以上の背景から、申請者の準備研究やナショナルバイオリソースを用いることで、発芽とは異なる段階で寄生抵抗性を示すトマトの選抜が可能であると考え、本申請の着想に至った。

### 2. 研究の目的

土壌生育条件下で寄生根侵入もしくは接続を阻害するようなトマト変異体を単離し、原因遺伝子を同定したうえで抵抗性の原因を説明可能とすることを目標にする。具体的には以下の中間目標を達成して行く。

- i) 発芽段階を抑制する宿主トマト変異体を選抜することを避けるため、*O. aegyptiaca* 液体培養細胞カルス断片を用いた人工接種によるスクリーニングを行なう。研究期間内に EMS 突然変異誘発マイクロトム系統 12,000 個体の一次スクリーニングを行なう。
- ii) 選抜された個体に対して、土壌と *O. aegyptiaca* 種子を用いた二次スクリーニングを実施する。
- iii) 二次スクリーニングで抵抗性を示したマイクロトム変異体について、ゲノムリシーケンシングにより原因遺伝子の同定を行なう。
- iv) 同定された遺伝子の寄生における役割を説明するために、変異系統の相補実験、野生型マイクロトムの遺伝子機能欠損株の作製を行ない、寄生効率の評価を行なう。

### 3. 研究の方法

寄生植物抵抗性変異体のうち、寄生植物種子発芽抑制とは異なる抵抗性を持つ系統を見出すために、根圏観察の可能なライゾトロン内で *O. aegyptiaca* 液体培養細胞組織片をマイクロトム EMS 突然変異誘発システムの根に人工接種する方法で一次スクリーニングを実施する。寄生率が野生型と比べて低い個体を選抜し採種し、土壌内で寄生抵抗性を確認するための二次スクリーニングを実施する。二次スクリーニングで寄生抵抗性が確認された個体の葉からゲノム DNA リシーケンシングを実施し、マイクロトム参照配列にマッピングすることにより、原因変異箇

所の推定を行なう。変異箇所が見られたトマト遺伝子のノックダウンなどを行ない、それが寄生抵抗性に寄与する遺伝子であることを確認する。

#### 4. 研究成果

抵抗性系統の選抜のための寄生方法を、*Phelipanche*(研究期間中に *Orobanche* から分類が再検討され *Phelipanche* となった) *aegyptica* 培養組織片を用いることから、発芽を誘導した実生を用いることに方針転換し、より再現性の高い人工寄生系で選抜を行なった。選抜のための集団として、当初計画で中心に据えていた NBRP トマト EMS 突然変異誘発系統集団のほかに、やはり NBRP トマトが保有するトマト野生近縁種およびエチレン受容体変異体を選抜に加えた。EMS 突然変異誘発系統 4000 個体をスクリーニングし、一次選抜後に候補個体から採種し次世代 40 個体で二次スクリーニングを実施した。この二段階スクリーニングの結果二系統が抵抗性候補系統として残った。しかしながら、栽培条件をより実際の土壌栽培を模した三次テストで、これら二系統とも抵抗性を再現性良く示すことはなかった。次にトマトエチレン受容体 ETR1 の変異固定系統の抵抗性を調査したが、この系統にも抵抗性はなかった。第三の選抜集団としてトマト野生近縁種をテストしたところ、*Solanum pennellii* と *Solanum peruvianum* に、栽培種 *Solanum lycopersicum* と比較して優位に高い抵抗性、すなわち寄生を抑制する性質を持つことがわかった。そこでこのうち *S. pennellii* に関して、*S. lycopersicum* との間で作製された近親交配系統 (IL) 76 系統を用いて、抵抗性に関わるゲノム領域の絞り込みを実施した。この結果寄生初期段階で根への付着を阻止するような抵抗性、寄生が進んだ段階で寄生植物の壊死を誘発するような抵抗性があることが明らかとなり、付着低下性について 5 領域、壊死誘発について 6 領域が候補化された。これらの絞り込まれた領域から個別に原因遺伝子の同定を進めている。発芽の後の段階で *Phelipanche aegyptiaca* 寄生を抑えることのできる遺伝子の初の同定に近づいたと言える。

またこれら新規抵抗性の探索と共に、発芽刺激物質ストリゴラクトンの生合成を抑えることで寄生率を下げると言われているトマト *ccd8* 変異体の *Phelipanche aegyptiaca* を用いた抵抗性実証試験を行ない、この根寄生種に対して抵抗性を本当に示すことを実証した。

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計4件)

- 1) Hasegawa S, Tsutsumi T, Fukushima S, Okabe Y, Saito J, Katayama M, Shindo M, Yamada Y, Shimomura K, Yoneyama K, Akiyama K, Aoki K, Ariizumi T, Ezura H, Yamaguchi S, Umehara M. (2018) Low Infection of *Phelipanche aegyptiaca* in Micro-Tom Mutants Deficient in CAROTENOID CLEAVAGE DIOXYGENASE 8. *Int J Mol Sci.* 2018 Sep 6;19(9). pii: E2645. doi: 10.3390/ijms19092645. 査読有り.
- 2) Kohki Shimizu, Koh Aoki (2018) Differentiation of vascular elements in haustoria of *Cuscuta japonica*. *Plant Signal Behav.* 13:e1445935. doi: 10.1080/15592324.2018.1445935. 査読有り.
- 3) Kohki Shimizu, Akitaka Hozumi, Koh Aoki (2018) Organization of vascular cells in the haustorium of the parasitic flowering plant *Cuscuta japonica*. *Plant Cell Physiol.*, 59:715-723. doi: 10.1093/pcp/pcx197. 査読有り.
- 4) Minako Ekawa, Koh Aoki (2017) Phloem-conducting cells in haustoria of the root-parasitic plant *Phelipanche aegyptiaca* retain nuclei and are not mature sieve elements. *Plants*, 6: 60. doi:10.3390/plants6040060. 査読有り.

[学会発表](計6件)

- 1) Junna Saito, Koh Aoki (2018) Exploration of new resistance of tomato to a root parasitic plant, *Phelipanche aegyptiaca*. The 15th Solanaceae Conference, September 30-October 4, Chiang Mai, Thailand.
- 2) Minako Ekawa, Junna Saito, Koh Aoki (2018) Connecting interface of tomato with a root parasitic plant *Phelipanche aegyptiaca* can be a potential target for post-haustorial resistance. The 15th Solanaceae Conference, September 30-October 4, Chiang Mai, Thailand.
- 3) Koh Aoki (2017) Symplasmic connection between *Orobanche aegyptiaca* and tomato. 14th Solanaceae and 3rd Cucurbitaceae joint conference 2017, September 3-6, Valencia, Spain.
- 4) 宮脇礼佳、青木考 (2019) 寄生植物と宿主植物の相互作用における細胞内膜輸送の関与. 第60回日本植物生理学会年会, 3月13-15日, 名古屋.
- 5) 斉藤純奈、青木考 (2019) トマト Introgression lines を用いた根寄生植物 *Phelipanche aegyptiaca* の発芽後抵抗性を示す遺伝子の同定. 第60回日本植物生理学会年会, 3月13-15日, 名古屋.
- 6) 江川美菜子, 青木考 (2017) 根寄生植物 *Orobanche aegyptiaca* と宿主植物間のシンプラスミクな接続形成. 第35回日本植物細胞分子生物学会大会, 8月29日~31日, さい

たま .

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕  
出願状況(計0件)

〔その他〕  
ホームページ等  
<https://www.kohaokilab.com/>

## 6 . 研究組織

(1)研究分担者  
(なし)

(2)研究協力者  
研究協力者氏名：斉藤純奈  
ローマ字氏名：Saito、Junna

研究協力者氏名：宮脇礼佳  
ローマ字氏名：Miyawaki、Reika

研究協力者氏名：江川美菜子  
ローマ字氏名：Ekawa、Minako

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。