

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和元年5月29日現在

機関番号：17401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2018

課題番号：16K14757

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) Establishment of molecular genetic methods for plant parasitic nematodes.

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) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、植物感染性線虫の感染過程において、線虫側で働く遺伝子を同定するために必要な分子遺伝学的解析技術を確認すると共に、新しい線虫培養法の確立も目指した。これまで、線虫培養にトマトをエサとして用いていたが、トマトは大型である事などから、野生型線虫1系統のみを維持するにとどまっていた。本研究では、閉鎖系(プレート内)で線虫が培養、維持できる新しい系を確立した。一方、本研究では、線虫遺伝子解析の為、線虫内でのノックダウンや過剰発現等の遺伝子操作に加え、線虫突然変異体のスクリーニングを可能にする系を確立し、線虫側の遺伝子機能解析を行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

今回、本研究では、植物感染性線虫の感染過程において、線虫側で働く遺伝子を同定するために必要な分子遺伝学的解析技術を確認すると共に、新しい線虫培養法の確立も目指した。これまで、トマト等の大型の作物を用いて培養していた植物感染性センチュウを、滅菌プレート内で培養し、ライフサイクルをまわすことが可能となった。このことは、小スペースで様々なセンチュウを培養可能にすることから、センチュウの様々な系統を維持することが可能となり、様々なセンチュウ研究に供することが可能となった。また、センチュウ遺伝子の解析のため、RNAi技術を開発した。このことから、遺伝子ノックアウトによる機能会関が可能となった。

研究成果の概要(英文)：In order to examine molecular mechanisms of plant parasitic nematodes on successful plant infection, we have tried to develop two kind of new technologies;
1 New plant parasitic nematode culture system: Previously, we could grow nematodes only using tomato or other crops (big plants), and it need space to culture. In order to grow nematode in a small space, we have developed new method to culture in vitro, sterilized plates. In the plates, plant root was artificially cultured, and *M. incognita* was infected to the sterilized root in petri dish. We have confirmed that the *M. incognita* successfully migrate into the root, induce gall formation, and egg mass formation, indicating that we could grow the nematode throughout their life cycle in petri dish. Now, we can culture and maintain many kind of nematodes in a small space.
2 New method to manipulate gene expression levels of plant parasitic nematodes: We established RNAi technology, and we could knock down RNA levels in nemtadoes.

研究分野：植物動物間相互作用

キーワード：植物感染性センチュウ

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

1. 研究開始当初の背景

本研究では、植物感染性線虫の感染過程において、線虫側で働く遺伝子を同定するために必要な分子遺伝学的解析技術を確立すると共に、新しい線虫培養法の確立も目指す。これまで、線虫培養にトマトをエサとして用いていたが、トマトは大型で無菌栽培できず、培養中の線虫のコンタミの恐れもあるため、野生型線虫1系統のみを維持するにとどまっていた。また、センチュウ側の遺伝子機能解析の為、植物感染性センチュウを用いた分子遺伝学的解析の手法の確立が求められていた。そこで、本研究では、これらの課題に迫ることとした。

2. 研究の目的

本研究では、植物感染性センチュウの分子遺伝学的解析をセンチュウ側から促進するために、以下の2つの技術開発を行う事を目的とした。

スクリーニングなどにより得る多系統の線虫を維持・管理する必要があるため、大型トマトを使わず、閉鎖系(プレート内)で線虫が培養、維持できる新しい系を確立することを目的とした。

さらに、本研究では、センチュウ側の遺伝子機能解析の為線虫遺伝子の線虫内でのノックダウンや過剰発現等の遺伝子操作に加え、線虫突然変異体のスクリーニングを可能にする系を確立し、線虫側の遺伝子機能解析を行うことを目的とした。

3. 研究の方法

；沢山のセンチュウ系統を小スペースで培養・系統維持するために、植物の根を無菌寒天培地上で培養し、培地上で植物感染性センチュウを根に感染させ、ライフサイクルがまわるかどうか、検証した。

；線虫内でノックアウトや過剰発現することで、その遺伝子機能を評価可能であるか、検証した。

4. 研究成果

閉鎖系(プレート内)での線虫培養、維持を可能とする新技術の開発

シロイヌナズナ・トマト・大豆を無菌的にプレート内で培養し、その根にセンチュウを感染させ、ライフサイクルがまわるかを検証した。これまでに、プレート内でセンチュウの感染が起こることは確認出来ている。その後、センチュウが卵塊を作り、幼虫が孵化できるかを観察した。その結果、試験した全ての植物を利用して、サツマイモネコブセンチュウがライフサイクルを完結し、新たな幼虫が生まれることを確認した。

今後は、毛状根など、根を大量に形成するような実験系で、より効率的にセンチュウが培養出来るかを確認したいと考えている。

プレート内でセンチュウのライフサイクルが回せるということは、狭い空間でもセンチュウを維持する事が可能で有るということであり、凍結保存技術と共に、センチュウ研究に大きく貢

献出来る技術であると考えている。

凍結技術も、本研究内で検討し、グリセロールを用いることで凍結融解に耐えるセンチュウ維持が可能であったが、凍結融解を繰り返すと、加速度的に死亡率が上昇したことから、グリセロールの濃度や、凍結の方法などの検討が必要であると考えられる。

サツマイモネコブセンチュウの分子遺伝学的基盤の確立と応用

神経伝達物質阻害剤であるカテコール溶液を用いて、線虫の口針運動を促進し、無理矢理摂食行動を誘導することを可能とした。これまでも、口針運動が促進されることは報告されていたが、適切な濃度や時間について、検討を行い、最適解を得た。この情報を基に、このカテコール溶液を用いて、RNAi 実験を行い、線虫遺伝子 MjCLE1~MjCLE5 遺伝子のノックダウン個体を作成した。以前の研究結果では、目的の RNA 蓄積量の変化が、RNAi 処理後、50%強の発現量までの減少が最高であったが、条件検討を行った結果、70%強の減少まで確認することができた。このことから、センチュウ側遺伝子のノックダウンによる遺伝子機能解析が可能となると考えている。一方で、少量の遺伝子発現量で、十分機能できる遺伝子も多数存在するため、来れに引き続き、減少率アップのための改良や、他のノックダウン方法を組み合わせた、新たな技術開発が必要であると考えている。

ノックダウンだけでなく、過剰発現、及び、蛍光物質のセンチュウへの取り込みなど、様々な遺伝子操作、化学的操作が可能となった。これらの技術を組み合わせると、センチュウの個別遺伝子解析が多面的に行えると考えている。

一方、遺伝子操作を行った場合、系統化は出来ていない。多数のセンチュウを処理し、バルクで発現量を確認しているだけなので、全ての個体で mRNA 量が 70%減になっているのか、どの程度減少率が個体毎にばらつくのかはわかって折らず、今後の課題である。

VIGS 等の、新しい技術の導入が必要であると考えられる。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 8 件)(全て査読あり)

1. Hirakawa, Y., and Sawa, S. (2019) Connecting cells with metro: diverse function of peptide hormones in plant development. *Curr. Opin. Plant Biol.* In Press.
2. Hirakawa, Y., Uchida, N., Yamaguchi, Y., L., Tabata, R., Ishida, S., Ishizaki, K., Nishihama, R., Kohchi, T., Sawa, S# and Bowman, J. L. (2019) Control of haploid organ size by CLE peptide signaling in *Marchantia polymorpha*. *PLOS Genet.* In Press #Corresponding author.
3. Tsai, A, Y-L., Higaki, T., Nguyen, C-N., Perfus-Barbeoch, L., Favery, B., and Sawa, S. (2019) Regulation of Root-Knot Nematode Behavior by Seed-Coat Mucilage-Derived Attractants. *Mol. Plants.* 12, 99-122.
4. Furumizu, C., Hirakawa, Y., Bowman, J. L., and Sawa, S. (2018) 3D Body Evolution:

Adding a New Dimension to Colonize the Land. *Curr. Biol.* 28, R838-840.

5. Ishida, T., Yamaguchi, Y., Yoshimura, M., Imamura, Y., Shimaoka, C., and Sawa, S. (2017) A collection of mutants for CLE-peptide-encoding genes in *Arabidopsis* generated by CRISPR/Cas9 mediated gene targeting *Plant Cell Physiol.* 58. 1848-1856.
6. Yamaguchi, Y., Suzuki, R., Cabrera J., Nakagami, S., Sagara, T., Ejima C., Sano, R., Aoki, Y., Olmo, R., Kurata, T., Obayashi T., Demura, T., Ishida, T., Escobar, C., and Sawa, S. (2017) Root-knot and cyst nematodes activate procambium-associated genes in *Arabidopsis* roots. *Frontiers in Plant Science*, 8: 1195.
7. Oota, M., Gotoh E., Endo M., Ishida, T., Matsuhita, T., and Sawa, S. (2017) Netagive phototaxis in *M. incognita*. *Int. J. Biol.* 9, 51-55,
8. Yamaguchi, Y., Ishida, T, and Sawa, S. (2016) CLE peptides and their signaling pathways in plant development. *J. Exp. Bot.* 67.4813-4826

〔学会発表〕(計 22 件)

1. 澤 進一郎, ネコブセンチュウ感染抵抗性トマトの原因究明と応用, くまもと産業復興支援プロジェクトフォーラム, グランメッセ熊本, 2019.2.27.
2. 澤 進一郎, 踊る農業大捜査線 ―害虫被害を封鎖せよー, くまがい研究フェア2018, 熊本大学, 2018.12.14.
3. 澤 進一郎, キツナをつむぎ方から生き物の生き様を学ぼう, 2018 年度遺伝学研究所研究会「イネ分子遺伝学の飛躍」, 遺伝学研究所, 2018.10.13
4. 澤 進一郎, 植物規制性線虫- 植物間コミュニケーションの実態解明, 第22 回天然薬物の開発と応用シンポジウム, 熊本大学薬学部, 2018.10.7
5. 澤 進一郎, 植物構造システム形成における内生・外生 プログラムによる力学的最適化, 植物の力学的最適化戦略に基づくサステナブル構造システムの基盤創成 キックオフシンポジウム, 東京大学, 2018.09.20
6. 澤 進一郎, サツマイモネコブセンチュウの誘引物質の解析, 日本線虫学会大会公開シンポジウム, 熊本市民ホール, 2018.09.05
7. 澤 進一郎, サツマイモネコブセンチュウの誘引物質の解析, 日本線虫学会大会公開シンポジウム, 熊本市民ホール, 2018.09.05
8. 澤 進一郎, サツマイモネコブセンチュウの誘引物質の解析, 日本線虫学会大会公開シンポジウム, 熊本市民ホール, 2018.09.05
9. 澤 進一郎, 植物寄生性線虫-植物間コミュニケーションの実態解明, 科学コミュニケーションのフロンティア第3 回 公開シンポジウム, 東京大学, 2018.06.27
10. 鈴木れいら, 澤 進一郎, サツマイモネコブセンチュウの根こぶ形成におけるオーキシシンシグナリングと前形成層発生メカニズムの関与, 第59 回日本植物生理学会, 札幌コンベンションセンター, 2018.03.29
11. 澤 進一郎, 植物感染性線虫の植物感染に関わるホルモンの役割, ConBio2017, 神戸ポートアイランド, 2017.12.07

12. 澤 進一郎, 植物感染性線虫の植物感染に関わるホルモンの役割, ConBio2017, 神戸ポートアイランド, 2017.12.07
13. SAWA Shinichiro, Molecular mechanisms of gall development during plant parasitic nematode, *M. incognita* infection, GDRI meeting 2017, ENS Lyon, 2017.10.23
14. 澤 進一郎, サツマイモネコブセンチュウに対する誘引物質の探索, 日本植物学会第81回大会, 東京理科大学, 2017.09.07
15. SAWA Shinichiro, Release of novel root-knot nematode attractants through seed coat mucilage extrusion, International workshop on Plant Parasitic Nematode in Kumamoto, Aso, 2017.07.30
16. SAWA Shinichiro, Regulation of meristematic activity by CLE signaling pathway in *Arabidopsis*, Plant Cell Signaling 2017, 北九州芸術劇場, 2017.07.04
17. SAWA Shinichiro, Control of haploid organ size by CLE peptide signaling, 第58回日本植物生理学会年会, 鹿児島大学, 2017.03.16
18. 澤 進一郎, 遺伝子至上主義からの脱却, 遺伝研研究会, 国立遺伝学研究所, 2016.10.14
19. SAWA Shinichiro, Molecular mechanisms of gall formation during nematode infection, International Symposium 'Front Lines of Plant Cell Wall Research and Beyond' KKR 熱海, 2016.10.05
20. 澤 進一郎, 植物感染性線虫の感染機構の解析, 日本植物学会第80回大会, 沖縄コングレ, 2016.09.16
21. SAWA Shinichiro, EFC7 and EFC15 of *Meloidogyne incognita* are responsible for infection steps in *Arabidopsis*, 32nd Symposium European Society of Nematologists, ボルトガル, 2016.08.29
22. SAWA Shinichiro, SOL1 and other peptidases are responsible for CLE peptide processing mechanisms, 22nd International Conference on Plant Growth Substances, トロント, 2016.06.22

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 1件)

名称：植物成長抑制剤、およびそれを用いた植物成長抑制方法

発明者：石川勇人、谷時雄、澤進一郎、石田喬志

権利者：熊本大学、日本曹達株式会社

種類：特許権

番号：PCT/JP2018/004094

出願年：2018

国内外の別：国内

取得状況(計 0件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.sci.kumamoto-u.ac.jp/~sawa/>

6 . 研究組織

(1)研究分担者
なし

(2)研究協力者
なし

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。