

令和 4 年 5 月 25 日現在

機関番号：37409

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2021

課題番号：17K08199

研究課題名(和文)植物寄生性サツマイモネコブセンチュウの寄生機構の解明

研究課題名(英文)Studies of the parasitic mechanism of the Meloidogyne incognita

研究代表者

山口 泰華 (Yamaguchi, Yasuka)

熊本保健科学大学・保健科学部・研究員

研究者番号：90448522

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本実験計画では、線虫の誘導する幹細胞系植物細胞(多核細胞)の細胞系譜解析法の構築と線虫遺伝子を破壊できるsg-RNAを発現する植物の作出をめざした。しかし、本研究代表者は、初年度に研究拠点を移転したため、当初の計画を変更して進め、まず線虫の小規模回収システムを構築した。細胞系譜解析を遂行するために外注した抗体は出来が悪く使えなかったため、まず、蛍光物質で光る線虫の植物内でのライブイメージングを成功させ、実験計画を一部変更して、タグ付きのエフェクタータンパク質を発現する遺伝子改変線虫の作成を新たに計画して進めた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本実験計画では、植物寄生性線虫の寄生機構の解明のため、線虫遺伝子を破壊できるsg-RNAを発現する植物の作出と線虫の誘導する植物幹細胞の細胞系譜解析法の構築を行う事をめざした。これらの研究成果により、農業分野においては、線虫の食害を抑制できる新規のコンパニオンプランツを作出することが可能になるとともに、基礎研究の分野においては、宿主植物-線虫間の線虫の寄生戦略と宿主の攻防について明らかになる。

研究成果の概要(英文)：In this plan, we aimed to construct a cell lineage analysis system for multinucleate gall cells induced by nematodes and to create plants expressing sg-RNA capable of disrupting genes of nematodes parasitizing plants. However, since I moved to the current university in the first year, I had changed my research plan and had been planning to construct the new nematode culture system to have enough nematodes for the experiment. For the cell lineage analysis, since the antibody showed a low specificity and then not to be useful, so we next constructed a live imaging system of nematodes glowing with fluorescent substances in plants. Then, we performed to create the transgenic nematode that expresses the fluorescent tagged effector protein.

研究分野：発生生物学

キーワード：植物 線虫

1. 研究開始当初の背景

植物寄生性線虫は非寄生性線虫である *C. elegans* と比較して、飼育や遺伝子操作などの技術が困難なため研究が遅れている。近年、植物に発現させた RNAi を線虫に与える線虫遺伝子の抑制法(ノックダウン)が開発され、幾つかの線虫遺伝子とその寄生に必須であることが示された。しかし、ノックダウンで効果の出にくい遺伝子が多く、解析可能な遺伝子は非常に少ない。申請者はこれまで、シロイヌナズナと植物寄生性線虫である *M. incognita* を材料に網羅的な RNA-Sequence を行ない、両生物において寄生時に発現する遺伝子を同定した。本研究課題では、同定した線虫遺伝子群を標的に、CRISPR 法によるゲノム編集技術を応用して、ノックアウト線虫を誘導する植物株の樹立を目指す。本研究は植物寄生性線虫の寄生機構の解明につながる。

2. 研究の目的

第一の目標 *M. incognita* の標的遺伝子の同定と sg-RNA 発現植物の作出

候補遺伝子は以下の3種類である。(図1参照)

i) *M. incognita* の根瘤から RNA-Seq 法を用いて単離した、感染初期の線虫に優位に発現する、セリン・スレオニンキナーゼなど6つの候補遺伝子

ii) 感染後期の線虫に優位に発現する 遺伝子 (単離予定)

この実験に必要な RNA-Seq 法とデータ解析は、東北大学のバイオインフォマティクスの上級生である倉田哲也助教と共同研究で行っており、確実にデータは積み上げられる。

iii) *M. incognita* での機能が期待できる *C. elegans* のホモログ遺伝子

線虫類の中で、最も遺伝学的解析が進んでいる *C. elegans* は、非寄生性線虫であるが、*M. incognita* と同様に、孵化後すぐの L1 幼虫から、脱皮を4回繰り返して産卵可能な成虫へと成長する過程は類似している(図1参照)。また、幼虫致死に関わる遺伝子や卵巣の不妊を示す遺伝子群がデータベース化されている。これらの遺伝子は、*M. incognita* の生存や卵形成の関連遺伝子として種間をこえて保存されている可能性がある。

これらの候補遺伝子から、合計で約30種類程度の遺伝子を選び、CRISPR 法を用いて、sg-RNA を発現する植物を作成する。植物には、線虫感染実験が確立しているシロイヌナズナを利用する。線虫感染への影響(根瘤数、根瘤サイズ、卵塊数)を調査し、影響のあった標的遺伝子を分類する。

第二の目標 遺伝子欠損線虫のライン化および遺伝子解析

線虫が寄生中に致死となる場合は、サンプリングして根瘤や線虫の大きさや形状を観察する。線虫が致死とならず、生活環が進む場合には、卵塊をサンプリングしてジェノタイピングを行ない、遺伝子改編が行なわれている場合はライン化する。また、これらの遺伝子の分子生物学的解析を行なう。

第三の目標 誘導された細胞の細胞運命追跡

寄生した線虫が誘導する根瘤細胞の細胞運命追跡を、抗体染色法などを用いて行なう。植物寄生性線虫は、セルラーゼを吐き出して植物細胞壁を溶解し、植物根内に侵入後、さらに植物細胞にエフェクタータンパク因子(16D10など)を吐き出し、細胞運命を変えることが知られている。このセルラーゼの分解産物の検出や、16D10 を抗体で検出することにより、標的となる植物細胞種の追跡を計画している。抗体染色は生体染色にも挑戦し、標的細胞の変化を時系的に観察する予定である。

第四の目標 sg-RNA 発現トマトの作出

本研究課題から、根に取り込まれた線虫が致死となれば、農作物のコンパニオンプランツの作出が可能となる。そこで第二の目標の遺伝子のうち、特に線虫の致死効率が高い遺伝子の sg-RNA 発現植物を、農作物を用いて作出する。トマトは線虫による被害が最も大きく、線虫の嗜好性の高い植物である一方で、根が強く感染に耐えるため、本研究に最適である。土壌改良効果をベルマン法(研究計画3年目に記述)により検定する。

3. 研究の方法

(平成 29 年度)

寄生後期遺伝子の同定は、寄生初期遺伝子を同定した方法と同様に、線虫を含んだ根瘤からの total RNA を材料にして RNA-Seq 法により行なう。

C.elegans のホモログの同定は、*C.elegans* のリスト (図 1) を元に行なう。脱皮異常は、*M.incognita* の J3 に相当する L3 幼虫で致死となることが多い。また、産卵異常(egg-laying defect) や生殖細胞の異常なども寄生性線虫にも起こりうる発生イベントである。現在、植物寄生性線虫のデータベースの中では *M. incognita* のデータベースは最も情報量が多いが、ホモロジーサーチを行なっても有用な情報は得られなかった。そこで、植物から単離した線虫から total RNA を精製し、*C.elegans* のそれぞれの遺伝子特異的なプライマーセットを用いて、標的遺伝子の増幅と配列決定により同定を計画している。

シロイヌナズナの *M.incognita* 遺伝子に対する sg-RNA を発現株の作成は、寄生初期の 6 つの遺伝子について、1 年目からスタートする。CRISPR 法により線虫遺伝子を欠損させるには、線虫細胞に sg-RNA と CAS9 タンパク質を取り込ませる必要がある。ポジティブコントロールは、RNAi で根瘤の形成不全が報告された 16D10 を利用するが、ノックアウト効果が低い場合には、sg-RNA よりも分子量の小さい sa-RNA を利用するなどの工夫を検討している。また、先行実験より、同じ遺伝子の sg-RNA 発現株であっても、そのノックアウト効率の良し悪しは、株によって大きく異なることがわかっている。そこで、同じ遺伝子の幾つかの株から、最も線虫に影響を与える効果の高い株を選抜する予定である。

(平成 30 年度)

前年に引き続き、*M.incognita* 遺伝子の sg-RNA 発現株の作成を続ける。作成済みの sg-RNA 発現株について、感染実験を行ない、根瘤数・根瘤サイズ・卵塊数から遺伝子を分類する。さらに、根瘤細胞や線虫の観察、および遺伝子の構造解析を行なう。2 年目には、30 種程度の遺伝子に対して、sg-RNA 発現株の作成と解析を終了することを目標とする。

根に取り込まれた線虫が致死となるような、農作物のコンパニオンプランツの作出を行なう。シロイヌナズナの結果から、線虫の致死効率が高い遺伝子を幾つか選び、sg-RNA 発現トマトを作出する。線虫の逸脱を防ぐため、ポットを利用し、トマト株の取り違えを防ぐためトマト 1 本/ポットで実験を行なう。土壌改良効果はベルマン法 (土壌サンプルを水に浸し、紙フィルターを通り抜ける線虫数より算出する方法) により検定する。具体的な方法は、線虫の存在する深さ 10-15 cm の土壌を 5 カ所、それぞれのポットから計 20 グラム採取し、水に浸けた状態でキムワイプを通り抜ける線虫はほぼ 100% とされるので、これを計測する。最も効率よく、土壌の線虫数を減少させるトマト株を選出して、その結果を 1 報目の論文にまとめる。

(平成 31 年度)

シロイヌナズナの感染実験のまとめを行ないながら、寄生した線虫が誘導する根瘤細胞の細胞運命追跡を、抗体染色法などを用いて行なう。植物寄生性線虫が吐き出すセルラーゼは、セルロースをグルコースとセロビオースに分解する。このグルコースを高感度に検出 (VECTASTAIN ABC-GO キットを利用予定) することができれば、線虫が働きかける植物細胞種の同定ができると考えている。また、エフェクタータンパク因子の 16D10 の蛍光抗体を作成し、顕微鏡下でタイムラプス画像を撮影して、標的となる植物細胞種を時系的に観察することを計画している。この計画には、抗体の合成やタイムラプスの条件など、準備に手間がかかることが予想される。よって、この実験の準備は初年度から始める予定である。ここまでの成果を 2 報目の論文にまとめる。

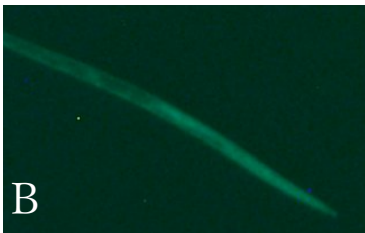
4. 研究成果

本実験計画では、線虫の誘導する幹細胞系植物細胞(多核細胞)の細胞系譜解析法の構築と線虫遺伝子を破壊できる sg-RNA を発現する植物の作出をめざした。しかし、本研究代表者は、初年度に研究拠点を移転したため、当初の計画を変更して進め、まず線虫の小規模回収システムを構築した(図 A)。



線虫の小規模培養・回収システムの一部

細胞系譜解析を遂行するために、当初計画では 16D10 に対する抗体でエフェクタータンパク質を蛍光標示し、標的の宿主細胞の細胞系譜解析を行なう予定であった。しかし、外注したエフェクタータンパク質の 16D10 に対する抗体は力価が低く使えなかった。そのため、まず、蛍光物質で光る線虫(図 B)の植物内でのライブイメージングを試し、実験系を構築した。そして、実験計画を一部変更して、タグ付きのエフェクタータンパク質を発現する遺伝子改変線虫の作成を新たに計画して進めた。



蛍光物質(DiO)を人工的に取り込ませた光る線虫(J2 ステージ)
これを宿主の根に感染させて顕微鏡下で動画を撮影した

本研究計画では、タグ付きエフェクタータンパク質の候補遺伝子として 16D10 以外に植物の細胞壁を分解する酵素である eng-1 (β -1,4-endoglucanase-1)を選んだ。16D10 などのエフェクタータンパク質は subventral glands(図 C)という構造の中に蓄積される。



anti-sense プロブを用いて検出した eng-1 の線虫生体内での mRNA の発現様式(右側が頭部)。

また、タグ付きのエフェクタータンパク質を発現する遺伝子改変線虫のライン維持のため、セルバンカー III など、動物の培養細胞を保存に使用する保存液を利用して検討を行なったが、いずれの保存液も線虫の保存には不向きで、J2 ステージの虫も卵塊も死滅したため使えなかった。遺伝子改変線虫の作成を行なうならば、実験対象の線虫をライン維持しやすいジャガイモシストセンチュウ(*Globodera rostochiensis*)などに切り替える必要があると思われる。

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Hirakawa Yuki, Uchida Naoyuki, Yamaguchi Yasuka L., Tabata Ryo, Ishida Sakiko, Ishizaki Kimitsune, Nishihama Ryuichi, Kohchi Takayuki, Sawa Shinichiro, Bowman John L.	4. 巻 15
2. 論文標題 Control of proliferation in the haploid meristem by CLE peptide signaling in <i>Marchantia polymorpha</i>	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 PLOS Genetics	6. 最初と最後の頁 e1007997
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pgen.1007997	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4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 Yasuka L. Yamaguchi, Patrick P.L. Tam, Satomi S. Tanaka
2. 発表標題 Importin13 is required for the mouse epiblast and endoderm development
3. 学会等名 第43回 日本分子生物学会年会（MBSJ2020）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Yasuka Yamaguchi, Hiroshi Kiyonari, Patrick Tam, Satomi Tanaka
2. 発表標題 Importin13 is required for the mouse embryonic development
3. 学会等名 第53回 日本発生生物学会年会（JSDB 2020）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Yasuka Yamaguchi, Reira Suzuki, Javier Cabrera, Tomomi Sagara, Satoru Nakagami, Chika Ejima, Ryosuke Sano, Yuichi Aoki, Tetsuya Kurata, Takeshi Obayashi, Taku Demura, Carolina Escobar, Takashi Ishida, Shinichiro Sawa
2. 発表標題 Plant-parasitic nematodes activate the procambium genes in the feeding site on infection
3. 学会等名 第50回 日本発生生物学会年会（JSDB 2017）
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 Yasuka L. Yamaguchi, Patrick P.L. Tam, Satomi S. Tanaka
2. 発表標題 Roles of Importin13 in mouse development
3. 学会等名 第44回 日本分子生物学会年会 (MBSJ2021)
4. 発表年 2021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
研究分担者	田中 聡 (Tanaka Satomi) (10321944)	熊本保健科学大学・保健科学部・教授 (37409)	

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