

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 18 日現在

機関番号：24403

研究種目：基盤研究(A)

研究期間：2011～2014

課題番号：23248005

研究課題名(和文) トマト研究基盤を活用した植物寄生に伴う組織接続機構の研究

研究課題名(英文) Analysis of formation of parasitic tissue connection using genomics infrastructure for tomato

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(系)・教授

研究者番号：30344021

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 25,000,000円

研究成果の概要(和文)：次世代型シーケンサーを利用した遺伝子発現解析の基盤としてデータベースTOMATOIMICSとPlant Omics Data Centerを構築した。それを活用し、非モデル寄生植物の寄生部位遺伝子発現解析を実施した。茎寄生植物ネナシカズラと寄主ダイズの境界組織では、細胞壁修飾酵素遺伝子、維管束形成遺伝子、細胞増殖因子遺伝子などの寄生寄主間での協調的発現が見られた。根寄生植物オロバンキからは液体組織培養系を確立し培養組織が寄生能をもつ物もたない物に分化することが明らかになった。

研究成果の概要(英文)：We first established NGS-based genomic infrastructure by constructing databases TOMATOMICS and Plant Omics Data Center. We investigated the mechanisms how parasitic plants establish cellular connection to host plants. To this end, we used a stem parasitic plant, *Cuscuta japonica*, and a root parasitic plant, *Orobancha aegyptiaca*. Differentially expressed genes in the parasitic interface tissue formed between *C. japonica* and soybean were identified. We developed a bioinformatics method to classify RNA-Seq reads to either the parasite or the host, and analyzed gene expression profiles of the parasite and the host simultaneously. We discovered unforeseen coordination of gene expression between parasite and host plants, such as sequential expression of cell-wall degrading enzyme genes and cell-wall reconstitution genes. By using *O. aegyptiaca* parasitizing to tomato, we found that liquid-cultured callus segregated to parasitism-competent state and parasitism-incompetent states.

研究分野：応用ゲノム科学

キーワード：寄生植物 ネナシカズラ ヤセウツボ トマト 維管束接続 細胞壁 トランスクリプトーム

1. 研究開始当初の背景

トマト (*Solanum lycopersicum*) は重要な野菜が多数属するナス科のモデル植物であり、トマト全ゲノム配列が 2010 年に公開され (<http://solgenomics.net/>)、日本でもモデルトマト品種「マイクロトム」の研究リソース整備がナショナルバイオリソースプロジェクトにより進められている。我々はこれまで共同研究者とともに変異誘発系統整備 (Matsukura et al., 2008, Curr. Genomics 9:436-43)、完全長 cDNA の解読と情報整備 (Aoki, Yano et al., 2010, BMC Genomics 11:210)、大規模遺伝子発現解析 (Ozaki et al., 2010, DNA Res. 17:105-16)、メタボロミクス解析 (Iijima et al., 2008, Plant J. 54:949-62) とトマトゲノミクス研究の基盤構築に貢献してきた。これからのトマト研究は、これらのリソースを活用して重要形質を効率的に研究するポストゲノムの段階へと入って行くのが必然的流れである。

トマトの重要形質の研究は、これまでは果実・耐病性に研究活動が集中する傾向があった。果実・耐病性研究に於いてトマトは従来からモデル植物と見なされ、形・登熟・色等様々な果実形質を決める分子機構、および各種病原生物感染への応答機構が研究されてきた。これらの研究はアメリカ・イスラエル・ヨーロッパの研究グループが世界をリードしている。我々も遺伝子発現と代謝物分析を統合した解析により、果実フラボノイド合成や病害抵抗性に関わる遺伝子群の同定を進めてきた (Ozaki et al., 2010, DNA Res. 17:105-16)。

これに対し、トマトの地下部・根に関する研究は一步遅れている感がある。この理由は、先行モデル植物シロイヌナズナから得られた知識を外挿すれば十分と思われたからであった。しかし根の研究に於いてもトマトが必要な課題がある。その例として線虫の感染機構研究が挙げられ、現在北海道大学の後藤デレク博士が上述のトマト変異体リソースを用いて研究を進めている。

こうした国内外の情勢を俯瞰すると、トマト研究基盤を活用した根の研究には未開のチャンスがあると言えた。申請者は線虫・病害・形態形成等これまで研究の盛んであった領域の他に、根寄生性植物研究にトマトが有効活用可能であると考えた。根寄生性植物は南ヨーロッパ・中近東・アフリカでは虫害等を凌ぐ脅威となっている (Dominguez 1999, in Resistance to Orobanche)。この分野の研究では、根寄生性植物は宿主植物が放出する化合物を利用して宿主認識と発芽を行なう事が明らかにされている (Umehara et al., 2009, Nature 455:195-200 等)。寄生の次段階で、根寄生性植物は吸器を伸張し宿主植物通導組織との間に連絡を形成するが (Aly et al., 2009 Plant Biotechnol. J. 7:487-98)、この寄生植物と宿主植物の通導組織接続を形成させるメカニズムは未だに解明されて

いない。そこで我々は、トマトとそれに着生可能な寄生植物を用いて、それらがトマトと物質交換可能な接続構造をつくる分子機構を調べようと考えた。

2. 研究の目的

研究期間中に、寄生による通導組織接続が成立するのに必要な寄主植物および寄生植物の遺伝子群を絞り込むことを目的とした。

具体的には以下の計画項目について分子機構を明らかにすることを目指した。

- (1) 分子機構研究の基盤としてゲノミクスデータベースの構築。
- (2) 矮性トマト品種マイクロトムを宿主とし茎寄生性植物ネナシカズラ *Cuscuta japonica* が寄生する際の RNA-seq 法による遺伝子発現解析。
- (3) マイクロトムに根寄生植物 *Orobanche aegyptiaca* が寄生成立する際の、RNA-seq 法による遺伝子発現解析。
- (4) 根寄生植物 *O. aegyptiaca* の組織培養系確立と形質転換系の確立。

3. 研究の方法

研究目的を達成するために、大別して
・RNA-Seq 法により遺伝子発現を評価するためのツールの作成

・遺伝子発現解析による寄生成立に関与する寄主および寄生植物遺伝子の候補選定

・*O. aegyptiaca* 組織培養系の確立を行なう。

トマトのモデルとしては *Solanum lycopersicum* cv Micro-Tom を用いる。トマトへの寄生のモデルとして根寄生性植物 *O. aegyptiaca* を用いる。選定理由は、*O. aegyptiaca* とトマトとの間での寄生成立および siRNA・ウイルス移行が確認されており (Fernandez-Aparicio and Rubiales, 2009 Ann. Bot. 103:423-31; Aly et al., 2009 Plant Biotechnol. J. 7:487-98; Gal-On et al., 2009 Virology 99:1321-9)、かつ EST 解析結果が利用可能だからである (Parasitic Plant Genome Project, <http://ppgp.huck.psu.edu/>)。また地上部へ寄生する対照植物とし *C. japonica* を用いる。選定理由は、寄主範囲が広くほぼ植物種を選ばずに寄生すると言われているからである。

研究項目としては以下を設定する。

- (1) RNA-seq データに基づいた遺伝子発現データベースの構築。
- (2) 茎寄生植物 *C. japonica* が寄生する際の、寄生寄主両植物遺伝子の RNA-Seq 法による発現解析。
- (3) 根寄生植物 *O. aegyptiaca* が寄生する際の、寄生寄主両植物遺伝子の RNA-Seq 法による発現解析。
- (4) 発芽直後の *O. aegyptiaca* から、液体培養法による組織培養系の確立。

4. 研究成果

(1) RNA-seq データに基づいた遺伝子発現データベースの構築

トマトの RNA-Seq データを解析し、他の植物種での遺伝子発現と比較解析を支援するために TOMATOMICs (<http://bioinf.mind.meiji.ac.jp/tomatomics/>) と Plant Omics Data Center (<http://bioinf.mind.meiji.ac.jp/podc>) というデータベースの構築を行なった (図 1)。

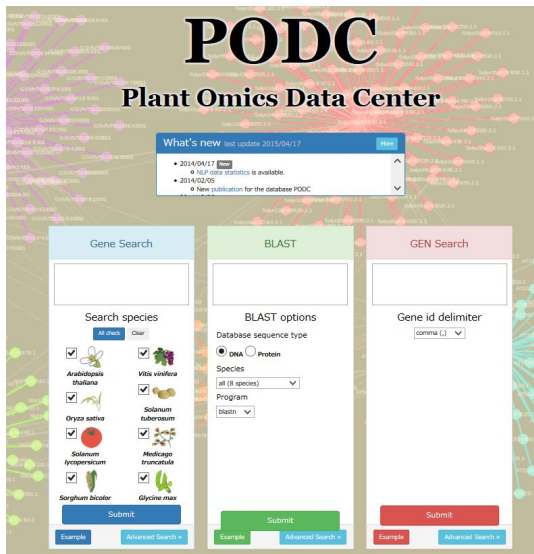


図 1 . Plant Omics Data Center (PODC)のトップページ。

PODC ではトマトの他にシロイヌナズナ、イネ、ソルガム、ブドウ、ジャガイモ、タルウマゴヤシ、ダイズの遺伝子発現データが使用された。異種植物間でどの遺伝子とどの遺伝子が同じ機能を持つものであるか、遺伝子発現がどのようなネットワークによって制御されているか、それぞれの遺伝子に対してこれまでどのような文献の報告があるか、等が網羅的に解析され、視覚的に把握しやすい形で各遺伝子に付随する情報が得られるようになっている (図 2)。

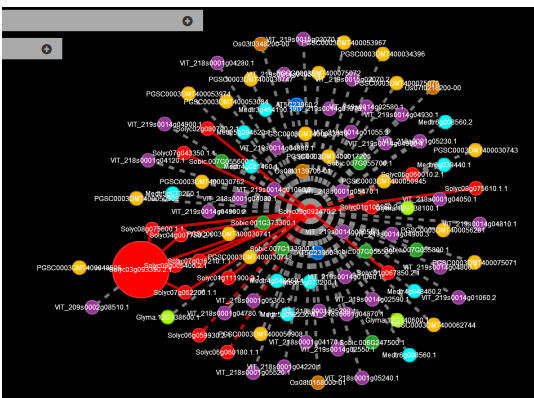


図 2 . Gene Expression Network の表示例。トマトの細胞壁タンパク質 Expansin が中心のネットワーク。

(2) 茎寄生植物 *C. japonica* が寄生する際の、寄生寄主両植物遺伝子の RNA-Seq 法による発現解析

これまでの「ネナシカズラ *C. japonica* はほとんどの植物を寄主とする」という報告と異なり、ネナシカズラがトマトには効率的に寄生しないことが明らかとなった。

そこで残念ながら寄主植物を変更し、過去寄主として研究に用いられた実績のあるホウセンカ *Impatiens balsamina* を最初に使用した。寄生部位で発現しているネナシカズラとホウセンカ両者の遺伝子を、同時に、しかもどちらの植物の遺伝子が区別して解析するために以下のような新手法を開発した。寄生部位からはネナシカズラとホウセンカ両方の組織が混じった寄生組織をサンプリングし、RNA-Seq 法による発現遺伝子解析を行なう。得られたリードを (i) 寄生していないネナシカズラとホウセンカの組織 (ii) ネナシカズラの近縁種の EST 配列 (iii) 同じ科に属する植物由来の EST 配列、に段階的に類似性検索をかけることで、ネナシカズラ由来のリードとホウセンカ由来のリードとを区別し、区別したリードから2つの植物の発現全遺伝子配列を再構築した (図 3)。さらに「リード区別がもし不正確だった場合、寄生によって発現が増加している遺伝子の見積もりにどの程度の誤りが出るか」に関する評価も実施し、この方法でリードを区別した場合、誤りは最大 0.2% 程度となると見積もられた。これは寄生によって発現量が増減する遺伝子数を見積もるには十分な精度であった。

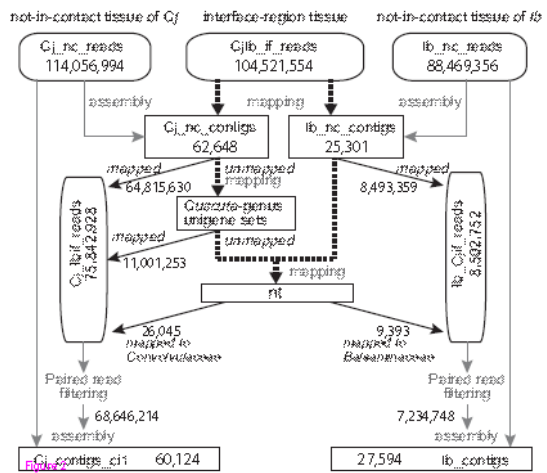


図 3 . ネナシカズラとホウセンカのリードを区別する手順。

ここで開発した手法を利用して、寄主をダイズ *Glycine max* に変更し、寄生成立のタイムコースを追って遺伝子発現を調べた。ダイズを用いたのは、ホウセンカよりも寄生進行のばらつきが少なかったからである。ネナシカズラをダイズ第一節間に接触させたのち、24、48、72、96、120 時間後までの 5 段階から寄生部位サンプルを得て、ネナシカズラとダイズの組織が混じった寄生組織から RNA を

抽出し RNA-Seq シークエンシングライブラリーを作製した。得られたリードに対して上で述べたようなリード区別を行なったうえで、ネナシカズラとダイズそれぞれの参照配列に対してリードマッピングを行ない遺伝子発現量の評価を行なった。

各段階で増減の見られた遺伝子に関して、まず Gene Ontology アノテーションをもとに大別してみたところ、色々な機能カテゴリーにおいて、寄生植物側と寄主植物側で同じような遺伝子が異なった寄生段階で発現していることがわかってきた (図 4)。

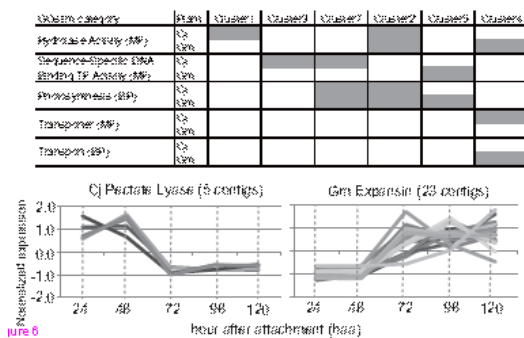


図 4 . ネナシカズラ (Cj) とダイズ (Gm) 遺伝子の寄生段階別発現パターン (上図)。ネナシカズラペクチンリアーゼ遺伝子群とダイズエクспанシン遺伝子群の発現パターン (下図)。

特にネナシカズラとダイズの境界となる細胞壁に関して、まず早い段階にネナシカズラ側のペクチンリアーゼなど細胞壁分解酵素遺伝子が発現を高めるがやがて減少する。いっぽう遅い段階ではダイズ側のエクспанシン遺伝子など細胞壁の弛緩と再構成に関わる遺伝子の発現が高まっている (図 4)。このことは寄生部位でネナシカズラによる細胞壁分解とダイズの細胞壁再構成が特定の順序で起こることを示唆している。また転写因子遺伝子など遺伝子発現制御をつかさどる遺伝子群の中からも、*ERF BUD ENHANCER* という細胞増殖を促進する遺伝子がネナシカズラでは早い段階で、ダイズでは遅い段階で発現していることが明らかになってきた。我々の開発した手法により寄生部位で寄生寄主双方の遺伝子を同時に見ることが可能となり、このような寄生 寄主間での遺伝子発現レベルでの相互作用の存在が明らかになった。

(3) 根寄生植物 *O. aegyptiaca* が寄生する際の、寄生寄主両植物遺伝子の RNA-Seq 法による発現解析

根寄生植物オロバンキ *O. aegyptiaca* はトマト根に寄生する。このため、地中海諸国やオーストラリアではトマト生産に大きな被害を与えている。

オロバンキはトマト根から滲出する発芽刺激物質を受けて地中で発芽し、幼根がトマト根に付着すると寄生根を侵入させて、トマ

ト維管束組織と接続を作り、小塊茎が多数の不定混様突起を作るころには水や養分の吸収を始める。我々はこの寄生段階を (i) 幼根が根に付着した段階 (ii) 寄生根を侵入させている段階 (iii) 接続を形成し小塊茎が成熟した段階、と三つに大別し、オロバンキとトマトが混合した組織から RNA を得て、RNA-Seq 法によって発現遺伝子の配列取得を行なった。リードは、トマトゲノム配列情報とオロバンキ参照遺伝子配列情報に基づいてマッピングを行ない、遺伝子発現量の解析を実施した。

特に (ii) 寄生根侵入段階で、寄生接続成立に先駆けて発現している遺伝子に注目した。不可避免的にストレス応答性遺伝子群の上昇が見られたほかに、オロバンキでは分裂組織の制御に関わる転写因子遺伝子群や花成抑制に関与する転写因子群や細胞外分泌性タンパク質をコードする遺伝子群の発現が一過的に増加していた。一方寄主トマトのほうでもエチレン応答性転写因子群や二次代謝関連酵素遺伝子群が増加していた。これらの結果に基づき、現在寄生接続形成に関与すると思われる候補遺伝子を選定し個別解析を実施している。

(4) 発芽直後の *O. aegyptiaca* から、液体培養法による組織培養系の確立

幼根が出たばかりのオロバンキ芽生えをシヨ糖添加 MS 培地で液体培養することにより、小塊茎状の組織を継代培養する系を確立した。この培養組織は、自然状態で発生する小塊茎に似た根状の突起をもつ細胞塊と、針状にならない不定形カルス様の表面を持った細胞塊に液体培養中で分離する。培養組織を断片化しトマト根への寄生能を調べてみると、根状突起を持つものは寄生率 20% 程度で寄生成立が見られたのに対し、カルス状表面を持つものには寄生成立が見られなかった (図 5)。

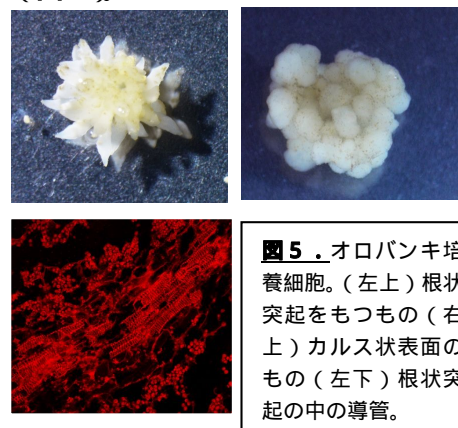


図 5 . オロバンキ培養細胞。(左上) 根状突起をもつもの (右上) カルス状表面のもの (左下) 根状突起の中の導管。

興味深いことに、根状突起部分には既に維管束組織が分化していることが確認された (図 5)。現在、寄生能をもたないカルス様の細胞塊から、寄生能をもつ根状突起細胞塊が形成される過程に着目し、寄生能獲得に関わる遺伝子群の探索を試みている。

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3件)

Kobayashi M, Nagasaki H, Garcia V, Just D, Bres C, Mauxion JP, Le Paslier MC, Brunel D, Suda K, Minakuchi Y, Toyoda A, Fujiyama A, Toyoshima H, Suzuki T, Igarashi K, Rothan C, Kaminuma E, Nakamura Y, Yano K, Aoki K. Genome-wide analysis of intraspecific DNA polymorphism in 'Micro-Tom', a model cultivar of tomato (*Solanum lycopersicum*). *Plant and Cell Physiology*, 査読有, 55: 445-454, 2014. DOI: 10.1093/pcp/pct181

Ohyanagi H, Takano T, Terashima S, Kobayashi M, Kanno M, Morimoto K, Kanegae H, Sasaki Y, Saito M, Asano S, Ozaki S, Kudo T, Yokoyama K, Aya K, Suwabe K, Suzuki G, Aoki K, Kubo Y, Watanabe M, Matsuoka M, Yano K. Plant Omics Data Center: an integrated web repository for interspecies gene expression networks with NLP-based curation. *Plant and Cell Physiology*, 査読有, 56:e9, 2015. DOI: 10.1093/pcp/pcu188

Ikeue D, Schudoma C, Zhang W, Ogata Y, Sakamoto T, Kurata T, Furuhashi T, Kragler F, Aoki K. A bioinformatics approach to distinguish plant parasite and host transcriptomes in interface tissue by classifying RNA-Seq reads. *Plant Methods*, 査読有, 11:34, 2015. DOI: 10.1186/s13007-015-0066-6.

[学会発表](計5件)

Ohyanagi H, Takano T, Terashima S, Kobayashi M, Kanno M, Morimoto K, Kanegae H, Ozaki S, Kudo T, Matsumura H, Sasaki Y, Saito M, Asano S, Yokoyama K, Aya K, Suwabe K, Suzuki G, Aoki K, Kubo Y, Watanabe M, Matsuoka M, Yano K. CA Plot Viewer and Plant Omics Data Center: A GUI-based Tool for Gene Expression Network Construction and an Integrated Web Repository for Interspecies Gene Expression Networks with NLP-based Curation. 2th International Symposium on Rice Functional Genomics. November 16-19, 2014, Tucson, Arizona, USA.

池上大輔、尾形 善之、Wenna Zhang、Christian Schudoma、Dirk Walther、Friedrich Kragler、青木 考. 近縁種

を用いたネナシカズラ寄生部位における寄生・宿主植物リードの区別とその評価. 第32回日本植物細胞分子生物学会. 2014年8月21-22日, アイーナ(いわて県民情報交流センター)・岩手県・盛岡市. 池上大輔、青木 考. 茎寄生植物ネナシカズラの寄生部位における遺伝子発現解析. 第6回生命情報科学若手の会・研究会. 2014年10月29-30日, 理研神戸CDB・兵庫県・神戸市.

Ikeue D, Schudoma C, Zhang W, Ogata Y, Kragler F, Sakamoto T, Kurata T, Aoki K. Analysis of Gene Expression in the Parasitic Region of *Cuscuta japonica* and *Glycine max*. 第56回日本植物生理学会年会, 2015年3月16-19日, 東京農業大学世田谷キャンパス・東京都・世田谷区.

Odani Y, Aoki K. Development and parasitization of *Orobanche aegyptiaca* callus tissue. 第56回日本植物生理学会年会, 2015年3月16-19日, 東京農業大学世田谷キャンパス・東京都・世田谷区.

[図書](計0件)

[産業財産権]
出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

[その他]
ホームページ等
<http://www.kohaokilab.com>

6. 研究組織

(1)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: 3 0 3 4 4 0 2 1

(2)研究分担者

矢野 健太郎 (YANO, Kentaro)

明治大学・農学部・准教授

研究者番号: 0 0 4 4 6 5 4 3