

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年5月31日現在

機関番号：82401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2012

課題番号：23657044

研究課題名（和文） 植物寄生の分子機構解明のための遺伝学的アプローチ

研究課題名（英文） Genetic approaches to understanding molecular mechanisms of plant parasitism

研究代表者

吉田 聡子（YOSHIDA SATOKO）

独立行政法人理化学研究所・植物免疫研究グループ・上級研究員

研究者番号：20450421

研究成果の概要（和文）：

ストライガやオロバンキなどの寄生雑草による農業被害は世界的な課題であるが、植物寄生の分子メカニズムは未だほとんど解明されていない。本研究では、日本に自生する寄生植物コシオガマをモデル実験系として用い、寄生の分子メカニズムの遺伝学的アプローチによる解明を試みた。コシオガマの純系ラインに変異源処理を施し、変異体種子プールを作成した。吸器誘導物質を用いた簡易スクリーニング系を立ち上げ、吸器の数や形状に異常のある変異体ラインを単離した。さらに、異なる生態型のコシオガマ植物における多型解析をおこなった。

研究成果の概要（英文）：

The parasitic plants in Orobanchaceae are among world most devastating weed pests; however, the molecular mechanisms of plant parasitism remain largely unknown. To understand plant parasitism, I have developed a model analysis system using the facultative parasite *Phtheirospermum japonicum*, which is native in Japan. *P. japonicum* seeds were mutagenised by EMS treatment and M2 seeds were screened for abnormal formation of lateral haustoria. I found several mutant lines which show defects in haustorium morphology.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学・植物分子生物・生理学

キーワード：遺伝学、寄生植物、変異体、遺伝地図、コシオガマ

1. 研究開始当初の背景

ストライガやオロバンキなどの根寄生雑草はアフリカや中近東を中心に繁殖し、主要な穀物や野菜に寄生しその収量を減らすため、農業上の大きな脅威となっている。

しかしながら、寄生植物の寄生メカニズムはほとんど解明されておらず、根本的な防除法は確立していない。

ハマウツボ科のほとんどの種は寄生植物であるが、その寄生の程度は種ごとに異なる。

主に病害雑草となっているものは種子が小さい絶対寄生植物であり、独立栄養でも生育できる条件的寄生植物は日本でも山野草として親しまれている。全てのハマウツボ科寄生植物では共通して、根における吸器の形成がおこる。吸器は寄生しない高等植物には認められない器官であり、寄生植物に特異なものである。吸器の形成は2,6-dimethoxy-p-benzoquinone(DMBQ)に代表されるキノン・フラボノイド類により人工的に誘導できることが報告されている。DMBQによる吸器誘導はストライガなどの絶対寄生植物でも *Triphysaria* や *Phtheirospermum* などの条件的寄生植物でも同様に観察されるため、ハマウツボ科に共通して保存されたメカニズムがあると考えられている。

これまで、寄生植物の分子レベルでの研究が進んでこなかった要因として、適切なモデル実験系が存在しなかったことがあげられる。ストライガやオロバンキは種子が小さく扱いにくい上、単独では生活環を全う出来ない絶対寄生植物であり、遺伝学的解析にはむいていない。我々は、寄生植物の遺伝学的研究を進めるために、日本に自生する条件的寄生植物コシオガマ (*Phtheirospermum japonicum*) をモデル寄生植物として用いている。コシオガマは、研究室内で独立栄養栽培が容易、一世代3ヶ月程で、自家受粉で繁殖するなど遺伝学に適した材料である。さらに申請者らはコシオガマの形質転換系を確立し、遺伝子機能解析が容易にできることを確認した。本研究では、コシオガマを用いた遺伝学的アプローチにより、植物寄生、特に吸器形成を制御する分子メカニズムの理解に挑む。

2. 研究の目的

本研究では、日本に自生する寄生植物コシオガマをモデル実験系として用いて、寄生植物の寄生の分子メカニズムを包括的に理解することを目指した。吸器形成および宿主への侵入ができない変異体をスクリーニングすることにより、寄生植物の吸器形成から寄生成立に至る過程に関わる寄生植物因子の性質を明らかにする。コシオガマ変異体の表現型解析をおこなうことによって、寄生の成立に必要な寄生植物遺伝子の機能を推測する。また、マーカーの開発と遺伝地図の作成をお

こない、寄生植物の分子遺伝学解析基盤を立ち上げることにより、今後の寄生植物研究への応用の間口を開く。

3. 研究の方法

1) 研究に用いた材料

コシオガマ野生型株種子は岡山大学榎本敬博士より分与頂いた。5回の自家受粉をおこない純化ラインを作成した後、0.5%EMS (Ethylmethane Sulphonate) 処理により、変異を導入した。約1800独立M1個体から次世代種子(M2)を採取し、スクリーニングに用いた。

2) 変異体のスクリーニング

スクリーニングにはDMBQを用いて吸器誘導におけるスクリーニングとリゾトロンを用いた宿主侵入におけるスクリーニングを2段階でおこなった。コシオガマM2種子を、DMBQを含むアガー上で生育させ、吸器を作らない変異体を選抜し、次に、リゾトロンシステムに移し、宿主への侵入が起こらない変異体をスクリーニングする。一次スクリーニングで得られた変異体候補株は、培養土に移し、自家受粉により種子を結実させ、次世代を同様のスクリーニングにより選抜した。

3) 変異体の詳細な表現型解析

単離されたコシオガマ変異体に対して、詳細な表現型の観察をおこなった。コシオガマは多様な宿主に寄生することができる。これらの宿主に対する反応を調べ、原因遺伝子の一般性を確認した。さらに、DMBQ以外にも還元型キノン類は一般的に吸器誘導活性があるため、種々のキノン・フラボノイド類を処理し、吸器誘導の活性を調べた。宿主侵入の変異体については、宿主根との接触部位における寄生根の変化を、光学切片をつくり顕微鏡下で詳細に観察した。

4) コシオガマPCRマーカーの開発

コシオガマを分子遺伝学的なモデル植物にするために、ゲノム位置情報を得るためのマーカーを作成した。(Simple Sequence Repeats) SSRマーカーは多型の検出には非常に優れており、現在数あるマーカーの中で最も簡便で頻繁に使われている。コシオガマのEST配列からSSRを検出し、SSR配列を含む短いPCR増幅断片を得られるようにプライマ

一を設計し、コシオガマのエコタイプ間での多型を検出した。

5) エコタイプ間の多型の検出と遺伝子連鎖地図の作成

SSR マーカーを用いて、コシオガマエコタイプ間での多型を検出した。8つの日本の各地域から採取したコシオガマの種子の純系を作成し、シーケンス解析により、野生型として用いた岡山株との多型率を調べた。

4. 研究成果

1) コシオガマ変異体スクリーニング系の確立

野生型コシオガマ種子をスクリーニングする系を確立した。コシオガマ種子を DMBQ を含むアガー上で生育させ、経時的に観察をしたところ、3週間目には、野生型ではほぼ100%のコシオガマにおいて、吸器毛の形成と吸器部分の膨らみから、実体顕微鏡下の観察において吸器の形成が認められた。DMBQ 無のコントロール培地においては、吸器の形成は認められなかった。この系を用いて吸器形成変異体のスクリーニングをおこなった。スクリーニング上では、プレートによる静電気により、根が浮いてしまう問題が発生したが、静電気防止スプレーを使用することにより、その問題を回避した。

一次スクリーニングにおいて、吸器の形成に異常が見られた株について、播種後1週間目のイネとともにリゾトロンチャンバーに移し、さらに3週間経過観察した。その中でイネに対する吸器形成に異常が見られたものを選抜し、土に移植し、短日条件で育てることにより次世代種子を採取した。

次世代種子に関して同様に、DMBQ 培地およびリゾトロンにて生育させ、表現型が確認されるかを調べた。

その結果、吸器毛形成に異常のある変異体が3ライン、吸器形状に異常のある変異体を2ライン、吸器が小さく、宿主への侵入に異常のある変異体を1ライン単離した。また、吸器形成とは異なるが、胚軸が伸長する表現型を示すラインおよび重力屈性に異常を生じた変異ラインをそれぞれ数ラインずつ単離した。

2) 吸器毛異常変異体の解析

変異体スクリーニングにより単離した吸器

毛異常変異体について詳細な表現型解析をおこなった。まず、掛け合わせ実験により、得られた3ラインの内2ラインはアレリックな変異であることが判明した。また、これら変異体はいずれも、劣勢変異であった。吸器毛異常変異体は、根毛の伸長が著しく阻害されており、根毛が短くなる表現型を示した(図1A)。このことから、吸器毛の発生プログラムは根毛の発生プログラムによって制御されていることが示唆された。

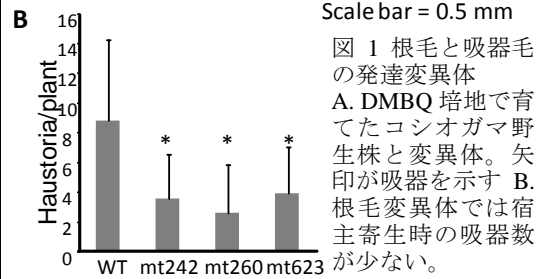
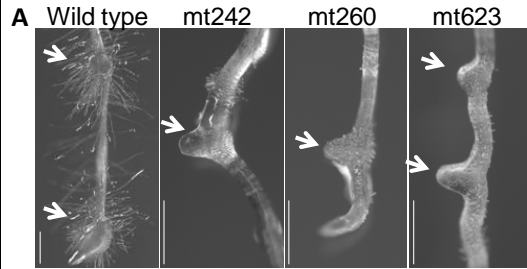


図1 根毛と吸器毛の発達変異体
A. DMBQ 培地で育てたコシオガマ野生株と変異体。矢印が吸器を示す B. 根毛変異体では宿主寄生時の吸器数が少ない。

次にこれら変異体を

宿主イネに感染させ、表現型を調べた。その結果、吸器毛異常変異体は感染過程において目立った異常を示さず、吸器毛は宿主への感染には必須な器官ではないことが示唆された。しかし、イネにおける吸器形成数は、野生型に比べて有意に少なくなることが明らかとなり、宿主を認識し吸器を形成する過程において、何らかの異常が生じていると考えられた (図1B)。

3) 吸器形態異常変異体の解析

吸器の形態異常が見られたラインについて、野生株に戻し交配をおこない、F1ラインの表現型を調べたところ、F1植物においても、表現型を観察されることが分かり、この変異は優性または半優性であることが示唆された。変異体を光学顕微鏡下で詳細に観察したところ、DMBQ 培地上で、野生株では見られない、吸器の異常な伸長と、吸器内での維管束組織の形成が確認された。また、イネに寄生させ、観察したところ、寄生は成立するが、野生型に比べて伸長した吸器が形成される

ことが明らかとなった(図 2)。この変異体では、吸器の発生に変異が生じたと考えられた。

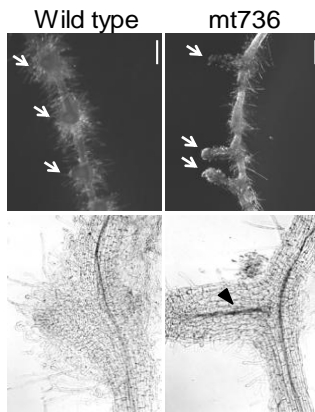


図2 吸器形状変異体の表現型
DMBQ 培地上で野生型に比べ伸長した吸器を形成する(上段、矢印)。伸長した吸器内には維管束の発達が見られる(下段、黒印)。

4) エコタイプ間の多型の検出とマーカーの開発

コシオガマのエコタイプとして日本の 8 か所から採取した種子を用意した。これらの種子について、自家受粉を繰り返し、それぞれ純系ラインを作成している。

野生型として用いた岡山株との多型を検出するために、4 エコタイプ (九州大、伊豆、横浜、草津) の植物からそれぞれ DNA を抽出し、2 Gbp ずつ illumina HiSeq2000 シーケンサーにて解析をおこなった。その結果、九州大ラインにおいて、最も多くの多型が検出された。九州大株は他のエコタイプに比べ、花芽の形成が早いことも明らかとなったため、遺伝地図作成における親株ラインとして用いることにした。

九州大株と野生型岡山株をかけあわせ、F1 株を作成し、その次世代 F2 種子を採取した。親株、F1 株、F2 株からそれぞれ DNA を単離して、コシオガマのトランスクリプトームから得られた SSR 近傍にプライマーを設計し、PCR 解析をおこなった。50-60 bp の SSR 付近にプライマーを設計したところ、約半数のプライマーが岡山株と九州大株の間に多型を検出できることが分かった。

さらに F2 植物体の数を増やして、DNA を抽出し、次世代シーケンサーと PCR マーカーの両方を使ってマーカー解析をおこない、遺伝地図の作成をおこなっている。

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 5 件)

- 1) Satoko Yoshida, Hiromu Kameoka, Misaki Tempo, Kohki Akiyama, Mikiyama Umehara,

Shinjiro Yamaguchi, Hideo Hayashi, Junko Kyojuka, and Ken Shirasu (2012) The D3 F-box protein is a key component in host strigolactone responses essential for arbuscular mycorrhizal symbiosis. *New Phytologist* 196, 1208-1216 (査読あり)

- 2) Satoko Yoshida and Ken Shirasu (2012) Plants that attack plants: molecular elucidation of plant parasitism. *Curr. Opin. Plant Biol.* 15, 708-713 (査読あり)
- 3) Griet Den Herder, Satoko Yoshida, Meritxell Antolín-Llovera, Martina Ried and Martin Parniske (2012) *Lotus japonicus* E3 ligase SEVEN IN ABSENTIA4 destabilizes the symbiosis receptor-like kinase SYMRK and negatively regulates rhizobial infection. *Plant Cell*, 24, 1691-1707 (査読あり)
- 4) Juliane K. Ishida, Satoko Yoshida, Masaki Ito, Shigetou Namba and Ken Shirasu (2011) *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation of the parasitic plant *Phtheirospermum japonicum*. *PLoS One* 6, e25802 (査読あり)
- 5) 吉田聡子、白須賢 (2011) 「宿主植物から寄生植物への水平伝播の発見」化学と生物, 49, 518 (査読なし)

[学会発表] (計 11 件)

- 1) 吉田聡子、上野章子、真鍋理一郎、白須賢 (2013) 「寄生植物ストライガにおける寄生成立時の遺伝子発現解析」日本植物病理学会 3月27日～3月29日 岐阜大学
- 2) 吉田聡子、上野章子、真鍋理一郎、白須賢 (2013) 「寄生植物ストライガにおける寄生成立時のトランスクリプトーム解析」日本植物生理学会第54回年会 3月21日～3月23日 岡山大学津島キャンパス
- 3) 吉田聡子 (2012) 「寄生植物ストライガの解析基盤の確立と寄生機構の解析」日本植物学会第 76 回大会 9月 15 日 兵庫県立大学 (奨励賞受賞講演)
- 4) Satoko Yoshida, Ri-ichiroh Manabe, Michael P. Timko, Ken Shirasu (2012) 「Draft genome sequences of the parasitic

Striga species」 XV International Congress
of Molecular Plant-Microbial Interactions 7
月29日～年8月2日 京都国際会議場

- 5) **吉田聡子**, 真鍋理一郎, 白須賢 (2012)
「寄生植物ストライガのゲノムシー
ケンス解読」第2回 NGS 現場の会 5
月24日 ホテル阪急エキスポパーク
- 6) **吉田聡子**, 上野章子, 白須賢(2011)
「ハマウツボ科寄生植物コシオガマの
変異体解析による植物寄生における
haustorial hair の役割」日本植物生理学会
第53回年会 3月16日 京都産業大学
- 7) **吉田聡子**, Juliane K. Ishida, Claude
dePamphilis, Eric Wafula, 白須賢 (2011)
「ハマウツボ科寄生植物のトランスクリ
プトーム解析」植物微生物研究会第
21回交流会 9月21日 岡山大学
- 8) **Satoko Yoshida** (2011) Large-scale
sequencing analysis of Striga species. The
11th World Congress on Parasitic Plants
6月7日—12日 Martina Franca, Italy (招
待講演)
- 9) **Satoko Yoshida** (2011) RIKEN *Striga*
hermonthica EST database. The 11th World
Congress on Parasitic Plants. Database
workshop 6月7日—12日 Martina
Franca, Italy (招待講演)
- 10) **吉田聡子**, Juliane Ishida, 白須賢 (2011)
「ゲノミクス的アプローチによる寄生
植物ストライガの寄生機構の解析」日本
植物学会 75回大会シンポジウム 9月
17-19日 東京大学駒場キャンパス
(シンポジウム発表)
- 11) **吉田聡子**, Juliane Ishida, 白須賢(2011)
「寄生植物コシオガマの次世代シーケ
ンサーを用いた発現解析」NGS 現場の
会 第一回研究会 5月28日 静岡県
熱海市

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・植物免疫研究グ
ループ・上級研究員

研究者番号：20450421