

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 9 日現在

機関番号：17401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24657035

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

研究課題名(英文)Establishment for usage of plant parasitic nematode

研究代表者

澤 進一郎 (Sawa, Shinichiro)

熊本大学・自然科学研究科・教授

研究者番号：00315748

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円、(間接経費) 930,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、植物感染性センチュウを用いた分子遺伝学的研究手法の確立を行った。さらに、センチュウ感染過程における、植物細胞の脱分化、多核化、再分化過程における分子機構に焦点を当て、その分子機構にせまるべく、エフェクタータンパク質のプロテオーム解析、また、候補遺伝子を用いたY2Hスクリーニングを行った。

研究成果の概要(英文)：In order to establish the plant parasitic nematode as a model organism for the analysis of plant-nematode interaction, we have tried to culture the nematode, to sterilize the nematode, and to perform whole mount in situ hybridization test, to identify effector proteins by using proteome technique. Further, by using effector protein candidates, we performed Y2H screening, and identified some effect or protein binding proteins.

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：nematode arabidopsis

## 1. 研究開始当初の背景

植物感染性センチュウは、農業的に大きな損害を与えるために、これまでに、農学的研究が行われてきた。国内では、農作物におけるセンチュウ被害報告をうけて、その原因となるセンチュウを同定し、再分類する研究が精力的に行われている。また、作付け時期の改良等によるセンチュウ感染被害軽減に関する研究が行われている。一方、海外では、そのセンチュウ感染過程における分子機構の解析も行われている。これまでに、センチュウ感染耐性を示すトマトから、Mi 遺伝子が単離され、NB-LRR 遺伝子をコードすることが明らかとなっている。また、センチュウ感染に伴って、植物側の遺伝子発現の変化をジーンチップ等のオーム解析により明らかにし、植物側の応答因子に関する知見も得られている。さらに、センチュウ感染に伴い、センチュウから、様々なイフェクタータンパク質が植物細胞に注入されるが、それらの因子についても、徐々に、情報が蓄積しつつある。

しかし、センチュウを培養するためにはトマトなどの作物に感染させる必要があり、センチュウの培養、維持が難しいという難点があった。また、センチュウを滅菌するためには、次亜塩素酸ナトリウムなどの薬剤を用いることができず(センチュウの飲害)、1匹ずつ毛針で釣り上げる必要があり、大量の滅菌センチュウを用意するのは困難であった。このために、**センチュウ感染耐性植物のスクリーニング等を滅菌状態で行う事は不可能であり、これまでに、そのような、網羅的分子遺伝学的解析が行われた例はなかった。**

## 2. 研究の目的

これまでに、高等植物のモデル生物とし

てシロイヌナズナが爆発的に普及した。また、根粒形成を行うマメ科植物ではミヤコグサ、陸上基部植物ではゼニゴケが、その他単子葉植物としてのイネやクラミドモナスなど多くのモデル植物により、植物の様々な生理的局面における分子機構が明らかとなってきた。

一方、植物の進化、植物の生長を考える上で、多細胞動物と植物との相互作用に関する研究は余り多くない。これまでに、花粉を媒介する昆虫を利用した生態学的解析等が行われているが、様々な分子メカニズムを解析するためのモデル実験系は存在しなかった。多細胞動物と多細胞植物の相互作用研究は、特殊な発生変化や生理応答を引き起こすため、植物の遺伝子機能のさらなる解析も期待できる。

本研究では、**植物感染性センチュウを用いた分子遺伝学的研究手法の確立**を行った。さらに、センチュウ感染過程における、**植物細胞の脱分化、多核化、再分化過程における分子機構**に焦点を当て、その分子機構の全体像を明らかにし、植物遺伝子の新たな機能に関する知見を得ることを目的とした研究を展開した。

## 3. 研究の方法

### 24年度

現在のところ、感染実験は50%の確率でしか成功しない。初年度は、センチュウ培養・滅菌技術の確認を行う。また、多大なる労力が必要であるので、簡略化できるように効率化を図った。また、技術確認と平行し、様々なシロイヌナズナの突然変異体を利用し感染効率を測定し、様々なGFP等マーカーラインを利用し、センチュウ感染初期のGiant Cell形成時にどのような分子イベントが起きているかを調査した。また、スクリーニングにより既に得ているセンチュウ

過剰感染突然変異体の単離を試みた。

25 年度

大量培養・滅菌が可能となるように、システムを構築し、検証した。一方、センチュウ感染初期の Giant Cell 形成時の分子機構の解析を続け、関連遺伝子の形質転換体の評価を行った。さらに、センチュウ過剰感染突然変異体の原因遺伝子の同定を目指した。

#### 4. 研究成果

本研究では、まず、培養技術と滅菌技術の改良を行った。これまで用いていた密度勾配遠心による精製を省き、フィルター濾過を用いた手法の導入により、簡素化が図れた。さらに、滅菌作業において、抗生物質を導入することで、より長期間の線虫培養(1ヶ月程度)においても、無菌状態を保てることが明らかとなった。

さらに、このような滅菌線虫を用いることで、シロイヌナズナの様々な突然変異体やマーカーラインを利用して、その線虫感染過程の分子機構を調査した。感染効率検定は、現在のところ、まだ、不安定であるが、clv1 突然変異体は、安定して線虫感染耐性を示すことがわかった。また、マーカーラインを用いることで、オーキシン、エンドサイクル等に関わる遺伝子群が、感染領域で発現常勝していることが明らかとなった。

また、線虫に過剰感染を示すシロイヌナズナのスクリーニングをおこない、多くの候補突然変異体を得た。また、これを用いて、次世代シーケンサーによる全ゲノム配列の決定を行った。さらに、マッピングも進めているが、現在のところ、原因遺伝子の特定にはいたっていない。

一方、J2 ステージの植物感染前の線虫をカテコールに浸潤させ、エフェクタータンパク質をはき出させることにより、エフェクタータンパク質を集め、プロテオーム解析を行った。その結果、様々な因子が単離出来たが、

その中でも、MSP7 に注目した解析も展開した。MSP7 は機能未知のタンパク質であるが、Y2H スクリーニングにより、B3 型転写因子と結合することが明らかとなった。また、B3 遺伝子は線虫感染領域で発現が上昇することが、RT-PCR と GUS マーカーラインを用いた解析からわかった。さらに、whole mount in situ により、MSP7 が Pre-J2 ステージから、J3 stage まで、唾液腺付近で発現していることも明らかとなり、エフェクタータンパク質として機能していると考えられる。さらに、B3 転写因子の過剰発現株を用いて RNA seq を行い、GO 解析の結果、多くのデフェンスや環境応答因子の発現が上昇していることが明らかとなった。これらのことから、MSP7 は、植物のデフェンス能力を抑制することで線虫感染過程をサポートしていることが示唆された。

#### 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 10 件)

1. Nishiyama, H., Nakagami, S., Todaka, A., Arita, T., Ishida, T., and Sawa, S. (2014) Light-dependent green gall formation induced by *Meloidogyne incognita*. Nematology In press.

査読有り

2. Bidadi, H., Matsuoka, K., Sage-Ono, K., Fukushima, J., Pitaksaringkarn, W., Asahina, M., Yamaguchi, S., Sawa, S., Fukuda, H, Matsubayashi, Y., Ono, M., Satoh, S. (2014) CLE6 expression recovers gibberellin deficiency to promote shoot growth in Arabidopsis. Plant J. 78.241-252.

DOI: 10.1111/tpj.12475

査読有り

3. Araya, T., Miyamoto, M., Mibowo, J., Suzuki, A., Kojima, S., Tsuchiya, Y. N., Sawa, S., Fukuda, H., Wiren, N., Takahashi, H. (2014) CLE-CLAVATA1 peptide-receptor signaling module regulates the expansion of plant root systems in a nitrogen-dependent manner. Proc. Natl. Acad. Sci. In press.

査読有り

4. Fukunaga, H., Sawa, Y., and Sawa, S. (2014) Identification of Japanese Lecanorchis (Orchidaceae) Species in Fruiting Stage Int. J. Biol. 6. In Press. DOI: 10.5539/ijb.v6n2p1

査読有り

5. Miyawaki, K., Tabata, R., and Sawa, S. (2013) Evolutionarily conserved CLE peptide signaling in plant development, symbiosis, and parasitism. Curr. Opin. Plant Biol. 16.598- 606.

査読有り

6. Tamaki, T., Betsuyaku, S., Hamasaki, R., Fujiwara, M., Fukao, Y., Fukuda, H., and Sawa, S. (2013) CLE19 peptide activity is regulated by SUPPRESSOR OF LPP1 1-mediated C-terminal processing in endosomes in Arabidopsis. Plant J. 6,970-981 頁

査読有り

7. Jewaria, P. K., Hara, T., Tanaka, H., Kondo, T., Betsuyaku, S., Sawa, S., Sakagami, Y., Aimoto S. and Kakimoto, T. (2013) Differential Effects of Peptides Stomagen, EPF1, and EPF2 on Activation

of the MAP Kinase MPK6 and the SPCH Protein Level. Plant Cell Physiol. 54, 1253-1262

査読有り

8. Tabata, R., Kamiya, T., Shigenobu S., Yamaguchi K., Yamada, M., Hasebe, M., Fujiwara, T., and Sawa, S. (2013) Identification of an EMS-induced causal mutation in a gene required for boron-mediated root development by low-coverage genome re-sequencing in Arabidopsis. Plant Signaling & Behavior. 8. e22534

査読有り

9. Replogle, A., Wang, J., Paolillo, V., Smeda, J., Kinoshita, A., Durbak, A., Tax, F., Wang, X., Sawa, S., and Mitchum, M. G. (2013) Synergistic Interaction of CLAVATA1, CLAVATA2, and RECEPTOR-1 LIKE PROTEIN2 KINASE 2 in Cyst Nematode Parasitism of Arabidopsis. Mol Plant Microbe Interact. 26. 87-96

査読有り

10. Yamada, M., and Sawa, S. (2013) The function of CLE and other plant peptide hormones in root development. Curr. Opin. Plant Biol. 16. 1-6.

査読有り

〔学会発表〕(計 7 件)

1. 澤進一郎、光増可奈子、日本農薬学会、植物感染性線虫の感染分子機構の解析、京都大学、京都、2014年3月15日
2. 澤進一郎、志水法子、江島千佳、西山英孝、石田喬志、日本生化学会大会、シロイヌナズナの幹細胞活性を規定する CLV3 ペプチドホルモンシグナル伝達因子の順遺伝

- 学による網羅的探索, パシフィコ横浜,  
2013年9月11日~9月13日
3. 西山英孝,肥田博隆,戸高晃彦,江島千佳,  
相良知実,Bui Thi Ngan,澤進一郎, 日  
本線虫学会第21回大会, サツマイモ  
ネコブセンチュウに対する誘引忌避物  
質探索, 唐津市民交流プラザ, 2013年  
09月05日~2013年09月06日
4. 豊島主峰,相良知美,光増可奈子,江島千  
佳,Bui Thi Ngan,澤進一郎, 日本線虫  
学会第21回大会, サツマイモネコブ  
線虫のエフェクタータンパク質の解析,  
唐津市民交流プラザ, 2013年09月05  
日~2013年09月06日
5. Shinichiro Sawa ,  
21ST Conference of the International  
Plant Growth Substances Association ,  
Carboxypeptidase in CLE peptide matu  
ration step,and CLE signaling molecu  
les in Arabidopsis ,  
The Shanghai International Conferenc  
e Center , 2013年6月18日~6月22日
6. C.Ejima,B.T.Ngan,N.Shimizu,S.Sawa 21S  
T Conference of the International Pl  
ant Growth Substances Association ,  
Involvement of plant CLE peptide sig  
naling in nematode infection process  
,  
The Shanghai International Conferenc  
e Center , 2013年6月18日~6月22日
- 7.N.Shimizu,R.Tabata,S.Shigenobu,M.Hase  
be,K.Yamaguchi,M.Yamada,C.Ejima,S.Sawa,  
21ST Conference of the International P  
lant Growth Substances Association,  
Analysis of CLE peptide signaling in A  
rabidopsis thaliana,  
The Shanghai International Conference  
Center , 2013年6月18日~6月22日

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

取得状況(計 0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

〔その他〕

ホームページ等

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

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

澤進一郎 (SAWA Shinichiro)

熊本大学・大学院自然科学研究科・教授

研究者番号: 00315748

### (2)研究分担者

(なし)

研究者番号:

### (3)連携研究者

( なし )

研究者番号：