

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 5 月 29 日現在

機関番号：17401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2013～2014

課題番号：25891021

研究課題名(和文) 根瘤線虫の植物感染過程における分子機構の解析

研究課題名(英文) analysis of molecular mechanisms underlying root-knot nematode infection in plant

研究代表者

光増 可奈子 (Mitsumasu, Kanako)

熊本大学・自然科学研究科・特別研究員

研究者番号：00711839

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：植物感染性センチュウの感染過程における、植物細胞の応答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。センチュウ感染過程における植物細胞の脱分化、再分化過程に関わる可能性のある因子に対する、シロイヌナズナの種々の突然変異体やマーカーラインを用いてセンチュウ感染効率の測定、および空間的発現パターンを調査した。その結果、感染効率の低下が見られたCLEシグナル伝達系関連、および側根形成関連因子や、ネコブでの発現上昇が認められた脱分化関連、および細胞分裂関連因子が、センチュウ感染過程に関与していることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Various mutants and marker lines of *Arabidopsis thaliana* involved in the CLE signaling pathway, dedifferentiation, cell division, immune response, strigolactone synthesis, glucosinolate metabolism, lateral root formation and phytohormone signaling pathway were infected with a root-knot nematode, *Meloidogyne incognita* to elucidated molecular mechanisms of host plant responses during infection of plant-parasitic nematodes and induction of giant cells, where the site of nematode feeding and maturation. The root-knot nematode infection was suppressed in mutants involved in the CLE signaling pathway and lateral root formation. In addition, expressions of genes involved in dedifferentiation and cell division were enhanced in nematode-induced galls. These results suggested that factors implicated in the pathway or events play roles in the process of nematode infection and gall formation.

研究分野：分子生理

キーワード：シロイヌナズナ ネコブセンチュウ Giant Cell 形成 突然変異体

## 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、国内では、農学的研究が行われてきた。例えば、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盛んに行われている。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、様々なエ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、感染実験に必要な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。

これまでに、我々は、センチュウをシロイヌナズナに無菌状態で感染させる実験系を確立してきた(上図)。我々は、トマトを用いて、1日に約20万頭のサツマイモネコブセンチュウを回収することが可能であるセンチュウ液体培養系を構築した。この系を用いることによって、従来は1日に数十頭の効率

であったのに対して、1日に約千頭の滅菌センチュウを用意できるようになった。さらに、このセンチュウを用いて、シロイヌナズナに無菌状態で感染させ、その感染状態を観察し、感染効率を評価できる系を確立した。

植物感染性センチュウは、植物の根に感染すると根の中心柱を移動し、維管束の前形成細胞にエフェクタータンパク質を注入する。その後、既に分化していたその細胞は脱分化し、多核化が起こる。さらに、細胞質がリッチになり、豊富なタンパク質や栄養分を保持するようになり、センチュウの摂食細胞である巨大細胞(Giant Cell, GC)となる(下図)。



センチュウの植物への感染時に、センチュウは CLE タンパク質(ペプチド構造などは分かっていない)をエフェクタータンパク質として植物細胞に注入することが示唆されている(Mitchum et al., 2007, Curr. Opin. Plant Biol.). CLE 遺伝子は、これまでに調べられた全ての多細胞植物が持っているが、動物界では、現在のところ、植物感染性センチュウからしか見つかっていない。また、シロイヌナズナの CLV3 ペプチドホルモンの受容体である clv2 及び sol2 突然変異体がセンチュウ感染に耐性を示すことが報告されている(Replogle et al., 2010, Plant J.). 加えて、LMD とジーンチップ解析を組み合わせた実験により、センチュウ感染時に発現上昇する植物の因子が知られており、オーキシン等の植物ホルモンも感染過程に関与することが知られている。

本研究では、我々がこれまでに確立した感染効率評価系を利用し、センチュウ感染時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の解明を目指す。

## 2. 研究の目的

本研究では、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ている。これまでの知見を基に、本研究では、主に CLV3 シグナル伝達系に関するシロイヌナズナの因子やその他植物ホルモンに関わると示唆されている遺伝子群が、センチュウ感染時に機能するか否かを調査する。具体的には、これらの突然変異体を用いてセンチュウ

感染効率を測定するだけでなく、種々の GFP 等マーカー形質転換体を利用し、センチュウ感染過程における植物細胞の脱分化、再分化過程に関わる植物側の因子を同定し、植物細胞の分化状態を規定する分子シグナルについての知見を得る。

その目的のために、本研究では大きく3種類のアプローチをとる。(1) CLE 等、センチュウ感染過程に関与しうる既知の因子の突然変異体を用いたセンチュウ感染耐性調査を行う。(2) センチュウ感染初期に機能する遺伝子を同定するために、上記のような既知の因子の GFP マーカーライン等を用いて、どのような因子が感染過程でどのような空間的な発現パターンを示すのか検証する。(3) センチュウ感染過程に機能する因子単離のために、センチュウ感染過剰突然変異体のスクリーニングを行う。

本研究では、シロイヌナズナを利用することで様々な突然変異体のスクリーニングが可能となっている。しかし、現在の技術では、センチュウ感染実験を行うためには多大な労力がかかり、50%の確率で細菌によるコンタミが起り、研究効率は悪く、一般化するのは、まだまだ難しいのが現状である。さらに、全てのシロイヌナズナ個体が感染するわけではないので、現在のところ、センチュウ感染耐性突然変異体を単離する事はできない。そこで、我々は、現在、センチュウ過剰感染突然変異体の単離に向けたスクリーニングを行っている。既に第1スクリーニングで複数の候補を得ている。この原因遺伝子は、植物の脱分化を抑制する機能があると考えており、植物細胞の分化状態を規定する分子シグナルについての新たな知見が得られると考えている。

### 3. 研究の方法

様々なシロイヌナズナ突然変異体の感染効率を測定するとともに、種々の GFP 等マーカーラインを利用して、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、センチュウ過剰感染突然変異体の原因遺伝子の単離を試みた。

(1) 既存の突然変異体を利用した感染効率の測定

センチュウ感染初期に起こる Giant Cell 形成時の分子機構の解析では、関連遺伝子の形質転換体でセンチュウ感染耐性度合いを評価した。これまでに、我々は CLE 受容体の突然変異体は感染効率が低いことを示している(Replogle et al., 2010 Plant J.)。また、海外の研究者により、オーキシンやサイクリンが Giant Cell 形成に関与することが、ジーンチップ等の解析により示唆されている。このことから、関与が想定されうる遺伝子の突然変異体を利用し、感染効率の確認を行った。利用する突然変異体としては、CLE

シグナル伝達系関連、脱分化に関わる遺伝子関連、免疫応答関連、細胞分裂関連、グルコシノレート代謝関連、ストリゴラクトン合成関連、オーキシン等の植物ホルモン関連、側根形成関連の突然変異体である。

(2) 既存の GFP 等マーカーラインを利用した空間的発現解析

CLE シグナル伝達関連、脱分化関連、細胞分裂関連、オーキシン関連、根の形態形成関連等の、通常根の細胞では発現していないマーカーラインを用いて、センチュウ感染時の初期過程において、発現誘導されるものを明らかにした。解析結果を基に、どのような分子イベントが行われているか予想し、特定のシグナル伝達系が推定できた場合はさらに、より多くの種類の突然変異体やマーカーラインを準備し、感染実験を行った。

(3) センチュウ過剰感染突然変異体の原因遺伝子の単離とさらなるスクリーニング

我々は、既にシロイヌナズナのスクリーニングを行い、センチュウが過剰に感染する(ネコブが過剰に形成される)突然変異体を得ている。その原因遺伝子の単離を試みた。次世代シーケンサーにより、8種類の候補突然変異体のゲノム解読を行っており、データ解析により、原因遺伝子を推定する。有望な SNP が得られた場合は、ストックセンターよりタグラインをとりよせ、その表現型を確認する。有望な SNP が同定できない場合は、ラフマッピングを行い、原因遺伝子の同定を目指す。

一方で、さらなるセンチュウ過剰感染突然変異体のスクリーニングも継続して行っており、さらなるセンチュウ感染耐性突然変異体の取得を目指す。現在のところ、野生型に関しても 100%の感染効率を示すわけではないので、センチュウ感染耐性突然変異体のスクリーニングは、現時点では行えない。そこで、耐性突然変異体のスクリーニングに備えるために、感染効率を可能な限り 100%に近づけた実験系の確立を試みた。

### 4. 研究成果

まず、既存の突然変異体を利用した感染効率の測定を行った。その結果、CLE シグナル伝達に関連する遺伝子の突然変異体で感染効率が変動する結果が得られた。すなわち、clv1、clv2 突然変異体では、有意に感染効率の低下が認められ、一方、clv3、bam1 突然変異体では感染効率が上昇することが明らかとなった。しかしながら、その他の突然変異体では、その感染効率が安定せず、有意な結果が得られなかった。このことから、高精度な感染効率の検定法の確率を目指し、検定法の改良を行った。感染効率の検定に最適なセンチュウの接種数、接種後の培養条件を検討した結果、大多数の変異株で安定して感染効率を比較できる条件を決定し、検定法を確立すること

ができた。この方法を用いて感染効率を検定したところ、新たに側根形成に關与する遺伝子の突然変異体 slr-1 で感染効率が低下することを見出すことができた。現在も検定法の改良、および他の変異体を用いた感染効率の測定を続けている。

一方、種々のマーカーラインを用いて、センチュウ感染初期の Giant cell 形成過程において、発現誘導される遺伝子の空間的発現パターンを調査に関して、当初は GFP ラインを用いた解析を試みた。しかしながら、巨大細胞でのシグナル観察が難しいことが判明したので、GUS レポーター遺伝子を用いた解析に切り替えた。その結果、CLE シグナル伝達に關連する CLV3 の発現はネコブで特徴的なパターンを示すことが分かった。また、脱分化に關わる WIND1 遺伝子、細胞分裂に關わる CYCB2、CDT1 遺伝子の発現がネコブ領域で上昇することが分かった。さらに、上記のように slr-1 で感染効率が低下することが見出されたので、この遺伝子の下流因子である ARF7 のネコブでの発現を、GUS マーカーラインを用いて調査したが、顕著な発現の上昇は認められなかった。

センチュウ過剰感染突然変異体の原因遺伝子の単離は、現在進行中である。5 種類の突然変異体に対してゲノム配列を決定した。今後、原因遺伝子の同定が急がれる。原因遺伝子が単離できたら、その過剰発現シロイヌナズナを作製し、感染耐性が付与されるかを確認する。

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關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。

#### 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

1. 光増可奈子, 西山 英孝, 中上 知, 金丸由実, 澤 進一郎 細胞外空間(細胞壁)に注目した植物寄生性線虫の感染分子機構 日本農薬学会誌(査読有) 40, 44-51 (2015)

2. Ishida T, Tabata R, Yamada M, Aida M, Mitsumasu K, Fujiwara M, Yamaguchi K, Shigenobu S, Higuchi M, Tsuji H, Shimamoto K, Hasebe M, Fukuda H, & Sawa S Heterotrimeric G proteins control stem cell proliferation through CLAVATA signaling in Arabidopsis. EMBO Rep. (査読有) 15, 1202-1209 (2014) doi: 10.15252/embr.201438660

〔学会発表〕(計 3 件)

1. 光増可奈子, 相良 知実, 中上 知, 山口

泰華, 佐野 亮輔, 倉田 哲也, 後藤 デレック, 深尾 陽一郎, 澤 進一郎 サツマイモネコブセンチュウのエフェクターたんぱく質 MSP7 の機能解析 日本農芸化学会 2015 年度大会 2015 年 3 月 27 日 岡山大学(岡山県)

2. 澤進一郎, 光増可奈子 植物感染性線虫の感染分子機構の解析 日本農薬学会第 39 回大会(招待講演) 2014 年 3 月 15 日 京都大学(京都府)

3. 豊島主峰, 相良知美, 光増可奈子, 江島千佳, Bui Thi Ngan, 澤進一郎 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 日本線虫学会第 21 回大会 2013 年 9 月 5 日-6 日 唐津市民交流プラザ(佐賀県)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕(計 0 件)

〔その他〕(計 0 件)

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

光増可奈子 (MITSUMASU KANAKO)

熊本大学大学院 自然科学研究科 研究員

研究者番号: 00711839