

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 30 年 6 月 18 日現在

機関番号：14603

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2013～2017

課題番号：25711019

研究課題名(和文) 寄生性高等植物における寄生の分子メカニズム解明

研究課題名(英文) Molecular mechanisms of plant parasitism

研究代表者

吉田 聡子 (Yoshida, Satoko)

奈良先端科学技術大学院大学・研究推進機構・特任准教授

研究者番号：20450421

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 20,200,000円

研究成果の概要(和文)：ハマウツボ科根寄生植物であるストライガやオロバンキは主要な穀物や野菜に寄生し、アフリカ地域を中心に甚大な農業被害をもたらしている。しかし、植物寄生のメカニズムはまだほとんど解明されておらず、その根本的な防除法は確立していない。本研究では、遺伝学的アプローチを用いて寄生植物の寄生の分子メカニズムの解明を試みた。ハマウツボ科条件的寄生植物コシオガマを用いて規制成立に異常を生じる変異体を単離し、その機能解析を行った。また、コシオガマのゲノムを解読し、変異体の原因遺伝子を特定する方法を開発した。

研究成果の概要(英文)：Parasitic plants in Orobanchaceae are noxious agricultural pests that affects millions of people's life. However the genetic programs that control plant parasitism remain unknown. In this study, we aimed to elucidate molecular mechanisms underlying plant parasitism using a model parasitic plant *Phtheirospermum japonicum*. We have screened *P. japonicum* mutants that have defects in host interaction and haustorium formation. The genome of *P. japonicum* was sequenced and re-sequencing of the mutant lines successfully identified the responsible gene for the phenotype. This study provide us new tools to identify key genes in host and parasitic plant interaction.

研究分野：分子植物生理学

キーワード：寄生植物 遺伝学 変異体 ハマウツボ科 ゲノム 次世代シーケンサー

1. 研究開始当初の背景

多くの高等植物は自ら光合成により有機栄養をつくりだして生活するが、寄生植物は他の植物から栄養を奪って生育する特殊な生存戦略を獲得している。寄生植物は吸器と呼ばれる宿主への侵入器官を発達させ、宿主の根や茎に付着・侵入し、維管束系をつなげて栄養を吸収する。寄生植物には独立栄養でも生育できる条件的寄生植物と宿主なしでは生育できない絶対寄生植物があり、中でも、ハマウツボ科絶対寄生植物であるストライガやオロバンキは穀物や野菜に寄生するため、甚大な農業被害をもたらしている。しかし、植物寄生の分子メカニズムはまだほとんど明らかになっていない。

寄生植物は宿主根の近傍で、宿主から分泌される誘導物質に応答して吸器を形成する。吸器誘導物質として、2,6-Dimethoxy-1,4-benzoquinone (DMBQ) に代表されるキノン・フラボノイド類が知られており、この応答は絶対寄生植物および条件的寄生植物と同様に確認できる。吸器形成の際には、吸器毛と呼ばれる根毛状細胞の伸長や表皮細胞および皮層細胞の膨張、細胞分裂の活発化が確認される。吸器は宿主の細胞を壊しながら宿主根に侵入し、導管を連結させることにより宿主から水や養分を奪うことができるようになる。吸器形成は、独立栄養状態から従属栄養への転換点であり、この時点で寄生生活へのリプログラミングが起こると考えられるが、寄生の成立に必須な遺伝子は未だ同定されていない。

植物寄生の鍵遺伝子の同定には、遺伝学的な解析が有用と考えられるが、独立栄養で育つことのできない絶対寄生植物は遺伝学的研究には不向きである。申請者は、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位置づけ、分子遺伝学的研究を進めている。コシオガマは、研究室で独立栄養栽培が容易、世代期間が短く、自家受粉で繁殖するなど遺伝学に適した材料である。

2. 研究の目的

本研究では、植物寄生に関わる遺伝子機能の包括的理解と重要遺伝子の単離を目指す。寄生が出来ない変異体・寄生形質に変異が生じた変異体を単離する。これまでに得られている吸器毛の発達変異体および吸器の形状変異体とともに、詳細な表現型解析に供し、寄生に関わる遺伝子の機能を解明する。変異体を親株と掛け合わせ、F2 世代をシーケンスすることで、変異体原因遺伝子を同定する方法を確立し、寄生に必須な遺伝子の機能を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 寄生過程に異常が生じるコシオガマ変異体をスクリーニング

EMS 処理により不作為的に変異を導入したコシオガマラインを 10 μ M DMBQ 培地上で 3 週間生育させ、吸器の形成や形態に異常が生じる変異体をスクリーニングする。単離した変異体は次世代種子を集め、再びスクリーニングにかけることにより、結果の再現性を確かめる。さらに野生型親株と掛け合わせることで、遺伝型を同定する。

(2) 寄生過程に異常が生じる変異体の表現型解析

上記(1)で得られた変異体の詳細な表現型解析をおこなう。変異体を、宿主に感染させ、吸器の形状や吸器の数を観察するなど詳細な表現型解析をおこなう。さらに、寄生時に発現する遺伝子の発現を確認することにより、寄生のどのステージに影響が出ているのかを解析する。

(3) 変異体の原因遺伝子同定

変異体を親株にかけ合わせ、F2 世代をシーケンサーで解析することにより、原因遺伝子を同定する。原因遺伝子同定のためのシーケンサーの解析条件、バイオインフォマティクスパイプラインの検討を行う。得られた原因遺伝子候補について、相補試験を行うことによって原因遺伝子であることを証明する。

4. 研究成果

(1) 変異体のスクリーニング

5 回以上自家受粉を繰り返したコシオガマ (岡山系統) に EMS 処理による変異限処理を加えた。M1 植物の自家受粉によって得られた M2 種子約 8 万粒を DMBQ 培地上でスクリーニングした。その結果、根毛および吸器毛形成に異常が生じる変異体、吸器の形態が異常に長くなる変異体、吸器を形成しない変異体が単離された。それぞれの遺伝型を確認したところ、吸器が長くなる変異体は優性遺伝であることが確認されたが、他の変異体は劣勢一遺伝子による変異であることが明らかとなった。

(2) 変異体の表現型解析

上記で得られた変異体の詳細な表現型解析を行った。特に根毛と吸器毛ができなくなる変異体について解析した。この表現型の変異体は 3 系統単離され、そのうち 2 系統はアレル変異体であることがわかった。これらの変異体を *hhd* (*haustorial hair deficient*) 1 および *hhd2* と命名した。*hhd1* および *hhd2* 変異体では根毛がほとんど形成しない表現型を示すが、ところどころ短い根毛が発生する。*hhd1* では、吸器の表面にできる吸器毛が全く形成しないのに対し、*hhd2* では吸器表面に短い吸器毛の形成が見られた。このことから、

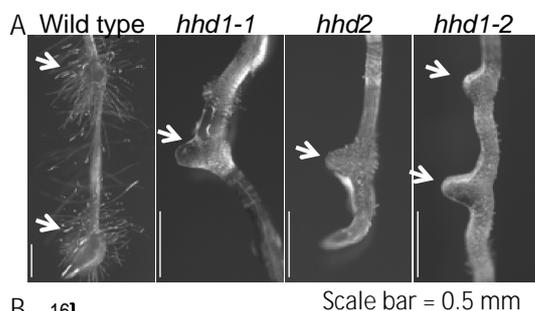


図1 *hhd* 変異体の表現型. A)DMBQ 培地で生育させた *hhd1* 変異体. 変異体では吸器毛の正常な発達が起らない. 矢印が吸器を示す B)*hhd* 変異体の宿主植物への感染率 *:p<0.05 (student's t-test)

hhd1 が吸器毛の発生に関わるのに対し、*hhd2* は吸器毛の伸長に関わる因子であることが推測された。寄生における吸器毛の役割を検証するために、これらの変異体を用いて宿主への感染実験を行った。イネに感染させた場合、これらの変異体では、感染率が有意に下がることが明らかとなった。すなわち、効率的な寄生の成立には吸器毛が重要な役割を果たしていると考えられる。吸器毛はこれまで、宿主への付着の役割を果たすと考えられたため、プラスチックのスリットを用いて物理的に宿主と寄生植物の根の密着を促した。その結果、感染率が野生型と同程度に戻ったため、吸器毛が宿主への付着に役立っていることが明らかとなった。また、吸器が宿主内に侵入する際に、侵入細胞と呼ばれる細長い表皮細胞由来の細胞層が形成される。*hhd* 変異体では、侵入細胞の形成に異常は見られなかったため、侵入細胞の伸長には根毛伸長とは異なる遺伝プログラムが使われていることが示唆された(Cui et al. 2016 Plant Physiol. 文献9)。これらの結果により、変異体を用いて寄生における吸器毛の生理学的役割を明らかにすることができた。

(3)原因遺伝子の同定

hhd 変異体について、親株と掛け合わせ、F2 世代を得た。F2 世代種子を DMBQ 培地上で生育させ、表現型を示す株について、葉をサンプリングし、ゲノム DNA を抽出した。ゲノム DNA を次世代シーケンサーでシーケンスし、野生型のリファレンス配列にマッピングをおこなった。コントロールのゲノム DNA を同様に抽出し、リファレンス配列にマップすることにより非特異的な SNPs を除外し、かつタンパク質配列に変異を生じさせる SNPs を同定したところ、原因遺伝子候補を数個に絞り込むことができた。*hhd1* についてはアレル変異が単離できていた為、両変異体に共通する遺伝子を同定したところ、一つに絞り込む

ことができた。候補遺伝子の野生型ゲノム DNA をクローニングし、変異体に遺伝子導入したところ、変異体の表現型を相補できたため、コシオガマ変異体からの原因遺伝子の特定に成功したと結論づけた。

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 16 件)

- 1) Cui S, Wada S, Tobimatsu Y, Takeda Y, Saucet SB, Takano T, Umezawa T, Shirasu K, Yoshida S. (2018) Host lignin composition affects haustorium induction in the parasitic plants *Phtheirospermum japonicum* and *Striga hermonthica*. *New Phytol.* 218(2):710-723 doi: 10.1111/nph.15033 (原著論文、査読あり)
- 2) Cui, S., Suzaki, T., Tominaga-wada, R., Yoshida, S. (2017) Regulation and functional diversification of root hairs. *Sem. Cell. Dev. Biol. In press* doi:10.1016/j.semcdb.2017.10.003 (総説、査読あり)
- 3) Ichihashi Y, Kusano M, Kobayashi M, Suetsugu K, Yoshida S, Wakatake T, Kumaishi K, Shibata A, Saito K, Shirasu K.(2017) Transcriptomic and Metabolomic Reprogramming from Roots to Haustoria in the Parasitic Plant, *Thesium chinense*. *Plant Cell Physiol.* 59(4):724-733. doi: 10.1093/pcp/pcx200. (原著論文、査読あり)
- 4) Ishida JK, Yoshida S, Shirasu K. (2017) Quinone oxidoreductase 2 is involved in haustorium development of the parasitic plant *Phtheirospermum japonicum*. *Plant Signal Behav.* 12:e1319029 doi: 10.1080/15592324.2017.1319029. (原著論文、査読あり)
- 5) Ishida JK, Yoshida S, Shirasu K. (2017) Haustorium Induction Assay of the Parasitic Plant *Phtheirospermum japonicum*. *Bio-protocol* 7: 5/5/2017 doi: 10.21769/BioProtoc.2260 (原著論文、査読あり)
- 6) Spallek, T., Melnyk, C. W., Wakatake, T., Zhang, J., Sakamoto, Y., Kiba, T., Yoshida, S, Matsunaga, S., Sakakibara, H., Shirasu, K. (2017) Inter-species hormonal control of host root morphology by parasitic plants, *PNAS*, 114:5283-5288. doi: 10.1073/pnas.1619078114. (原著論文、査読あり)

- 7) Ito, S., Yamagami, D., Umehara, M., Hanada, A., **Yoshida, S.**, Sasaki, Y., Yajima, S., Kyojuka, J., Ueguchi-Tanaka, M., Matsuoka, M., Shirasu, K., Yamaguchi, S., Asami, T. (2017) Regulation of strigolactone biosynthesis by gibberellin signaling, *Plant Physiol.* 174:1250-1259. doi: 10.1104/pp.17.00301 (原著論文、査読あり)
- 8) Ishida, J.K., Wakatake, T., **Yoshida, S.**, Takebayashi, Y., Kasahara, H., Wafula, E., dePamphilis, C. W., Namba, S., Shirasu K. (2016) Local auxin biosynthesis mediated by a YUCCA flavin monooxygenase regulates haustorium development in the parasitic plant *Phtheirospermum japonicum*. *Plant Cell*, 28, 1795-1814 doi: 10.1105/tpc.16.00310. (原著論文、査読あり)
- 9) Cui, S., Wakatake, T., Hashimoto, K., Saucet, S. B., Toyooka, K., **Yoshida, S.**, Shirasu K. (2016) Haustorial hairs are specialized root hairs that support parasitism in the facultative parasitic plant, *Phtheirospermum japonicum*. *Plant Physiol.*, 170:1492-1503 doi: <https://doi.org/10.1104/pp.15.01786> (原著論文、査読あり)
- 10) **Yoshida, S.**, Cui, S., Ichihashi, Y., Shirasu, K. (2016) The Haustorium, a Specialized Invasive Organ in Parasitic Plants. *Ann. Rev. Plant Biol.* 67:643-67 doi: 10.1146/annurev-arplant-043015-111702. (総説、査読あり)
- 11) 若竹崇雅、**吉田聡子**、白須賢 (2016) 「根寄生植物の寄生メカニズム」生物の科学 遺伝 vol.70, 289-293 (日本語総説、査読なし)
- 12) 若竹崇雅、**吉田聡子**、白須賢 (2016) 「寄生植物コシオガマの吸器形成機構」BSJ-Review vol. 7, 241-249(日本語総説、査読なし)
- 13) Conn, C. E., Bythell-Douglas, R., Neumann, D., **Yoshida, S.**, Whittington, B., Westwood, J. H., Shirasu, K., Bond, C. S., Dyer, K.A., Nelson, D. C. (2015) Convergent evolution of strigolactone perception enabled host detection in parasitic plants. *Science* 349, 540-543 doi 10.1126/science.aab1140 (原著論文、査読あり)
- 14) Mutuku, J. M., **Yoshida, S.**, Shimizu, T., Ichihashi, Y., Wakatake, T., Seo, M., Takahashi, A., Shirasu, K. (2015) The WRKY45-dependent signaling pathway is required for resistance against *Striga* parasitism. *Plant Physiol.* 168, 1152-1163 doi: 10.1104/pp.114.256404. (原著論文、査読あり)
- 15) Mitsumasu, K., Seto, Y. and **Yoshida, S.** (2015) Apoplastic interactions between plants and plant root intruders. *Front. Plant Sci.* 6, 617 doi: 10.3389/fpls.2015.00617. (総説、査読あり)
- 16) Ichihashi, Y., Mutuku, J. M., **Yoshida, S.** and Shirasu, K. (2015) Transcriptomics exposes the uniqueness of parasitic plants. *Brief. Func. Genomics*, 14:275-82. doi: 10.1093/bfpg/elv001 (総説、査読あり)
- [学会発表](計 24 件)
- 1) Songkui Cui, Syogo Wada, Yuki Tobimatsu, Yuri Takeda, Toshiyuki Takano, Toshiaki Umezawa, Ken Shirasu and **Satoko Yoshida** “Host lignin composition affects haustorium induction in parasitic plants” 日本植物生理学会 2018 年
- 2) Syogo Wada, Songkui Cui and **Satoko Yoshida** “寄生植物ストライガの吸器誘導における活性酸素種の役割” 日本植物生理学会 2018 年
- 3) Songkui Cui, Ken Shirasu, **Satoko Yoshida** “Ethylene signaling controls haustorium development in parasitic plant *Phtheirospermum japonicum*” 日本植物生理学会 2018 年
- 4) Takanori Wakatake, **Satoko Yoshida**, Ken Shirasu “A yeast-one hybrid assay to explore transcription factors that initiate haustorium development in parasitic plants” 日本植物生理学会 2018 年
- 5) 小川哲史、若竹崇雅、**吉田聡子**、市橋泰範、白須賢 「寄生植物コシオガマにおける subtilase の分類と発現動態解析」日本植物生理学会 2018 年
- 6) **Satoko Yoshida** “GENOMES AND GENEYICS OF PARASITIC PLANTS IN OROBANCHACEAE” The 14th World Congress on Parasitic Plants, 2017 年 (招待講演)
- 7) Songkui Cui、重信秀治、西山智明、柴田朋子、長谷部光泰、白須賢、**吉田聡子** 「モデル寄生植物コシオガマの変異体原因遺伝子同定」2017 年
- 8) **吉田聡子** 「ハマウツボ科寄生植物の寄生器官の発生と形づくり」日本農芸化学会第 177 回中部支部会シンポジウム 2017 年
- 9) **吉田聡子** 「植物に寄生する植物：寄生植物の宿主の見つけ方」日本分子生物学会 2017 年 (招待講演)

- 10) **Satoko Yoshida**, Ken Shirasu “Genome structure and gene transfer in parasitic plants” 日本植物生理学会第58回年会 シンポジウム発表 2017年
- 11) **Satoko Yoshida** “Genomics and genetics in parasitic Orobanchaceae” 奈良先端大異分野融合ワークショップ Frontiers in parasitic plant and host interactions. 2016年
- 12) Songkui Cui, Yuki Tobimatsu, Yuri Takeda, Toshiaki Umezawa, Simon Saucet, Ken Shirasu, **Satoko Yoshida** “Contribution of host lignin on haustorium induction and host defence against obligate parasitic plant *Striga hermonthica* and facultative parasitic plant *Phtheirospermum japonicum*” 第61回リゲニン討論会 2016年
- 13) Songkui Cui, Ken Shirasu and **Satoko Yoshida** “The role of ethylene signaling in the haustorium development in the facultative root parasitic plant *Phtheirospermum japonicum*” Cold Spring harbor Asia “Latest Advances in Plant Development & Environment” 2016年
- 14) **Satoko Yoshida**, Takanori Wakatake, Songkui Cui, Juliane K. Ishida, Thomas Spallek, Simon Saucet, and Ken Shirasu “Genomic and genetic analyses of haustorium formation using *Phtheirospermum japonicum* as a model parasitic plant.” The 13th World Congress on Parasitic Plants 2015年
- 15) **吉田聡子**, Musembi Mutuku, Songkui Cui, 堀千明, 清水崇, 市橋安範, 出村拓, 白須賢「寄生植物と宿主植物の細胞壁をめぐる攻防」日本植物生理学会年会 2015年 (シンポジウム発表)
- 16) Musembi Mutuku, **吉田聡子**, 清水崇史, 市橋泰範, 高橋章, 瀬尾光範, 白須賢 「寄生植物ストライガの抵抗性におけるジャスモン酸とサリチル酸シグナル経路の役割」日本植物病理学会 100周年記念大会 2015年
- 17) **吉田聡子**, Thomas Spallek, 市橋泰範, Songkui Cui, 若竹崇雅, Juliane Ishida, 白須賢「ハマウツボ科寄生植物の寄生形質獲得と適応進化」日本植物学会 2015年
- 18) **Satoko Yoshida** 「Molecular and genomic analyses of the witchweed *Striga*」29th Sept, Tsukuba Univ. Global Science Week at Tsukuba Univ. 2014年 (招待講演)
- 19) **吉田聡子**「ゲノム・トランスクリプトーム解析からみた植物の寄生」第8回細菌学若手コロッセウム 2014年(招待講演)
- 20) **吉田聡子** 「寄生植物ストライガの感染戦略と宿主植物の応答」シンポジウム「寄生・共生インシデント」2014年(招待講演)
- 21) **吉田聡子** 「Plant-plant communications in rhizosphere: Interactions and signaling between root parasites and their host plants」日本植物生理学会第55回年会 (シンポジウム: Biotic interactions mediated by plant infochemicals) 2014年(招待講演)
- 22) **吉田聡子**, Thomas Spallek, Songkui Cui, 市橋泰範, Seungill Kim, Yong-Min Kim, 真鍋理一郎, Michael Timko, Doil Choi, 白須賢「寄生植物ストライガの全ゲノム解読」日本植物学会第78回大会 2014年
- 23) **吉田聡子**「ゲノムから読み解く寄生雑草ストライガの寄生の仕組み」『未来へのバイオ技術』勉強会 2014年(招待講演)
- 24) **Satoko Yoshida**, Ri-ichiroh Manabe, Seungil Kim, Thomas Spallek, Musembi Mutuku, Michael Timko, Doil Choi, Ken Shirasu “Genome and transcriptome analyses of *Striga* spp.” 12th World Congress on Parasitic Plants. 2013年

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計1件)

名称: 吸器形成阻害剤
 発明者: 和田将吾, Songkui Cui, 吉田聡子
 権利者: 同上
 種類: 特許
 番号: 特願 2018-010715
 出願年月日: 2018年1月25日
 国内外の別: 国内

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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉田 聡子 (Yoshida, Satoko)

奈良先端科学技術大学院大学・研究推進機構・特任准教授

研究者番号：20450421

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()