

「異種植物間ネットワーク解析による植物間相互作用の理解」

研究期間：2019年10月～2023年3月

研究者：吉田 聡子

1. 研究のねらい

多細胞生物の細胞は隣り合う細胞によりその運命が決定される。一個体の生体内では、多様な低分子化合物や移動性因子によって細胞間のコミュニケーションが生じ、細胞の分化が制御されることが知られている。しかし、他の生物と隣接した時の細胞の運命がどのように決定されるかはほとんど知られていない。本研究では、異種植物である宿主に侵入し、細胞を隣接させながら細胞のアイデンティティを変遷させて寄生を成立させる寄生植物に着目し、異種植物間におけるシグナル伝達の実態を明らかにすることを目的とする。寄生植物の寄生器官である吸器は、宿主由来のシグナルを感知してその根に寄生器官である吸器を形成し、宿主へ侵入、栄養輸送細胞である維管束同士を連結させる。この寄生成立の各段階における異植物間相互作用を、研究者が独自に発展させたモデル寄生植物コシオガマと、広く使われているモデル植物シロイヌナズナを用いた感染系を使うことにより、宿主-寄生側の両者から分子レベルで明らかにすることを目指した。まず、内部細胞層のアイデンティティの定義が曖昧な寄生植物吸器の内部細胞に対し、トランスクリプトーム解析からマーカー遺伝子を同定し、それぞれの細胞層の空間配置を可視化しアイデンティティの明確化をおこなう。さらに、研究者らは、宿主への侵入ができない寄生植物変異体と、寄生植物の道管細胞を分化させない宿主変異体を単離している。これらの変異体を用いて、宿主による寄生植物細胞の分化決定のシグナル因子を同定する。さらに、時系列トランスクリプトームと single cell トランスクリプトーム解析により、接着する二種類の植物のトランスクリプトームを取得し、共発現ネットワーク解析を用いて宿主と寄生植物をつなぐ制御モジュール遺伝子の単離を目指す。得られた結果を他の寄生植物種と比較することにより、寄生植物の進化を考察する。

2. 研究成果

(1) 概要

本研究では、異種植物である宿主植物に侵入し、維管束をつなげるハマウツボ科寄生植物の吸器形成における細胞のアイデンティティ変遷の理解と植物間シグナル伝達の解明を目指す。まず、吸器内部細胞の空間配置を理解するために、薄切り連続切片画像からの三次元再構築をおこない、吸器の内部細胞を形と細胞内構造によって分類し、宿主感染時の空間配置を明らかにした。絶対寄生植物ストライガの道管細胞は宿主道管の内部に入り込んで接続することが、条件的寄生植物の道管細胞は宿主道管に巻きつく様に配置することを明らかにした。また、マーカー遺伝子を確立し、吸器内部での発現を調べることにより、各細胞層の発達過程を可視化した。これまで、吸器内部に師管細胞があるかどうかはわかっていなかったが、本解析によって吸器の師部細胞は寄生植物の根の維管束近傍にのみ存在し、吸器中心部や宿主との接続部位には存在しないことが明らかになった。

次に、宿主への侵入の際に形成される侵入細胞分化のシグナルを明らかにした。宿主への侵入ができない変異体の原因遺伝子を同定し、植物ホルモンであるエチレンのシグナル経路が侵入細胞の分化に必須であることを明らかにした。侵入細胞マーカーを確立し、侵入細胞の形成過程を可視化した。

さらに、寄生植物の道管細胞分化が宿主によって制御されていることを見出した。シロイヌナズナの維管束形成変異体に感染したコシオガマでは、吸器内の道管を正常に分化できず、宿主との道管連結が著しく遅延した。これらの結果から、宿主の維管束の正常な発達が、寄生植物の道管形成に重要であることが示唆された。変異体に感染したコシオガマ吸器の時系列トランスクリプトームおよびシングルセルトランスクリプトーム解析をおこなったところ、宿主および寄生植物の両方で維管束幹細胞の分化に関わる遺伝子やオーキシン関連因子の発現が減少していた。これらの結果から、オーキシンとサイトカイニンにより制御される宿主の維管束分化シグナルが寄生植物吸器内の維管束幹細胞分化を制御していることが示唆された。

(2) 詳細

研究テーマ1「寄生植物細胞の空間的配置とアイデンティティ」

寄生植物が宿主植物に侵入すると、もともとの根の細胞層が分化転換をおこない、寄生植物特有の細胞種に変化することが知られている。しかし、細胞種ごとの空間配置とそのアイデンティティについては明らかになっていなかった。本研究では、寄生植物の各細胞の空間配置とアイデンティティの確立を目指した。

まず、寄生植物と宿主植物細胞の空間的関係性を明らかにするために、シロイヌナズナに寄生したコシオガマおよびイネに寄生したストライガを用いて、1 μm 厚の連続切片を作成し、細胞種ごとにカラーラベルを行い、画像を重ね合わせることで三次元的な再構築を行なった。コシオガマの侵入細胞が宿主の維管束細胞に巻き付くように配置する一方で、ストライガは宿主の道管内に侵入細胞を侵入させ *oscula* 構造をつくること、ストライガのヒエリンボディ細胞は、*xylem bridge* 周辺の *Procambium-like* 細胞を取り囲むようにドーナツ状に配置するが、コシオガマにはヒエリンボディ細胞が存在せず、道管連結 (*Xylem bridge*) の周りに一層の細胞からなる *Paratracheal parenchyma* が存在することが明らかとなった(図1)。また、存在が疑問視され

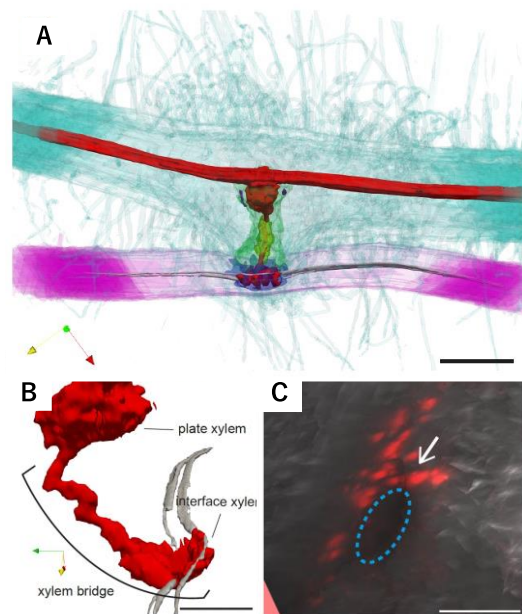


図1 コシオガマ吸器の立体再構築
A. 全体図、B. 宿主道管に巻きつくように配置する吸器道管、C. 師部マーカー遺伝子の発現

ていた吸器内部の師部細胞について、寄生植物の根の維管束の近くに分化した師部細胞が存在しているものの、吸器の中心部や宿主との連結部には存在せず、コシオガマやストラ

イガの師部は宿主とは連結しないことを示した(図1)。これらの結果は、本研究開始前にある程度進めていたものであるが、本研究により内部細胞の電子顕微鏡観察などの詳細な解析をすすめて、論文として報告した(Masumoto et al. 2021, *Plant Physiol.*)。

寄生植物に特殊な細胞層のアイデンティティの変遷を観察するために、各細胞層のマーカ―遺伝子の確立をおこなった。侵入細胞のマーカ―遺伝子は、レーザーマイクロディセクションを用いて RNA-seq 解析を行い、侵入細胞特異的な遺伝子を同定した。同定された侵入細胞遺伝子のプロモーター領域の制御下で蛍光タンパク質を発現させると、感染2日目以降の侵入細胞で特異的に蛍光が観察されたため、今後の解析でマーカ―遺伝子として使用した(Ogawa et al. 2021, *Plant Physiol.*)。また、師部細胞のマーカ―遺伝子をシロイヌナズナの情報からオルソログ遺伝子を同定し、プロモーターを単離して発現解析を行なった。師部特異的なマーカ―遺伝子の中には、上記の3次元解析で同定した吸器内の師部のみで発現するものと、吸器の中心部の前形成層様細胞で発現が観察されるものがあった。このことから、吸器中心部の前形成層様細胞は、部分的に師部としてのアイデンティティをもち、炭素化合物の輸送に関わることが推定された。

研究テーマ2「宿主侵入時の植物間シグナル伝達」

寄生植物が宿主に侵入する際には、吸器先端部の細胞が活発な分裂を行うメリステム様細胞から、細長く宿主の細胞間を侵入できる能力を持つ侵入細胞に変化する。研究代表者らは、宿主への侵入ができないコシオガマ変異体を単離し、その原因遺伝子として、エチレンのシグナル伝達の鍵遺伝子を同定していた。本研究では、寄生植物の細胞分化誘導因子としてエチレンがどのように働くのかを解析した。寄生植物は近傍に宿主が存在しないが、吸器誘導シグナル(土壌中のキノンやフェノール化合物)が存在する条件下では、吸器の形成を開始するものの2日後には吸器の伸長を停止する。しかし、エチレンシグナル伝達因子の変異体コシオガマでは、吸器は宿主の非存在下でも伸長し続ける。すなわち、寄生植物は宿主が近傍に「存在しない」という

情報を感知して吸器の成長を止める仕組みを持っており、エチレンが吸器の成長停止シグナルとして働くことを示唆する。また、エチレンシグナル因子の変異体は宿主への侵入ができないことが明らかになった。すなわち、宿主到達時にもエチレンシグナルが発生し、侵入細胞への分化転換を促進することが示唆された。吸器の先端細胞の詳細な観察を行なったところ、エチレン変異体では吸器先端細胞でオーキシン応答が恒常的に生じており、細胞分裂を停止できないことが明らかになった。また、エチレンを合成できない宿主変異体には野生型コシオガマでも侵入率が減ったことから、寄生植物の侵入細

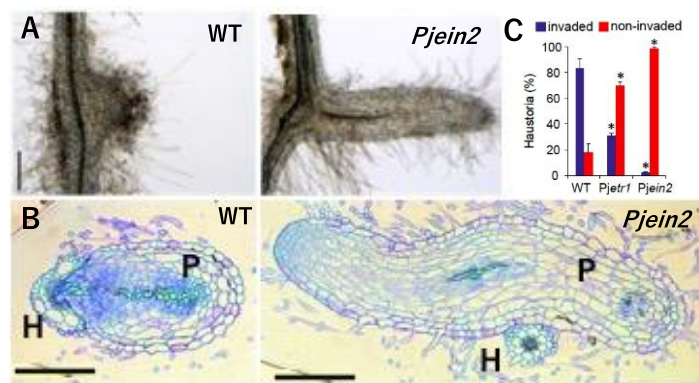


図2 エチレン変異体の表現型

A. 宿主非存在下の吸器表現型。B. 宿主に侵入できない変異体の横断切片図。C. 宿主への侵入率

胞の詳細な観察を行なったところ、エチレン変異体では吸器先端細胞でオーキシン応答が恒常的に生じており、細胞分裂を停止できないことが明らかになった。また、エチレンを合成できない宿主変異体には野生型コシオガマでも侵入率が減ったことから、寄生植物の侵入細

胞分化には宿主の生成するエチレンが重要であることが明らかとなった。これらの結果を論文として報告した(Cui et al. 2020, *Science Adv.*).

研究テーマ3「植物間共発現ネットワーク解析による維管束連結における制御因子の探索」
宿主に侵入した侵入細胞は宿主維管束に到達すると、道管細胞に分化し道管連結を成立させる。研究代表者らは、維管束形成に異常を生じるシロイヌナズナ変異体にコシオガマを感染させると道管連結に異常が生じることを見出した。様々な変異体にコシオガマを感染し、観察した結果、宿主の正常な維管束の発達が寄生植物の道管連結に必要なことが示唆された。

次に、野生型および変異体に感染したコシオガマの感染部位の RNAseq 解析を行なった。宿主による寄生植物吸器における道管細胞分化の制御機構を調べるために、野生型および変異体に感染したコシオガマを用いて RNAseq 解析を行なった。発現変動遺伝子を発現パターンの特異性をもとにクラスターに分類し、野生型と変異体で顕著に発現パターンが異なるクラスターに着目した。これらの結果を遺伝子共発現ネットワーク解析に供したところ、宿主と寄生植物の両方でオーキシンや維管束形成に関わる遺伝子群で発現変動が起きていることがわかった。オーキシンマーカおよび維管束幹細胞マーカをコシオガマに導入すると、変異体に感染したコシオガマではオーキシン応答および維管束幹細胞の分化に異常が生じることを示唆された。

さらに、さきがけ二期生の石研究員の協力を得て、single nuclear RNA sequencing を進めた。感染 7 日目の吸器を材料に VASA-seq 解析を行なった。マーカー遺伝子をマップすることにより、それぞれのクラスターに特異的な遺伝子が同定された(図3)。UMAP の結果から、変異体に感染したコシオガマでは維管束幹細胞を含むクラスターの細胞が著しく減少している様子が観察された。

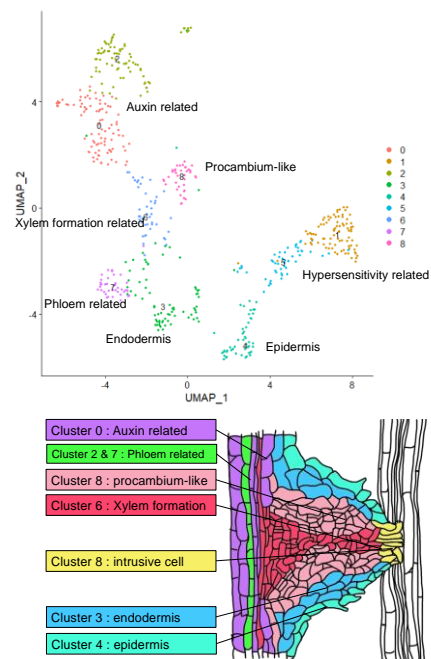


図3 シングルセル解析
UMAPにより細胞層のクラスターが同定された

研究テーマ4「植物間相互作用の進化」

ハマウツボ科の寄生植物には、コシオガマのように宿主なしでも生育できる条件的寄生植物と、生育に宿主を必要とするストライガのような絶対寄生植物がいる。また、絶対寄生植物の中には、光合成能を失った絶対全寄生植物が存在し、ヤセウツボやナンバンギセルなどがこの仲間分類される。絶対全寄生植物であるフェリパンキ(*Phelipanche ramosa*)ではサイトカイニンに反応して吸器が形成されることが報告されていたため、この経路の保存性についてストライガとコシオガマで検証した。その結果、ストライガはサイトカイニンに反応して吸器を形成できるのに対し、コシオガマは吸器を形成しなかった。一方、キノンやフェノール類はコ

シオガマとストライガの吸器を誘導するが、フェリパンキの吸器を誘導しないことが知られている。各吸器誘導物質について知られている阻害剤やマーカー遺伝子を用いた解析により、キノンによるシグナル経路とサイトカイニンによるシグナル経路は独立して存在するが、下流で共通経路を動かして形態形成を行うことが示唆された。これらのことから、条件的寄生植物から絶対全寄生植物へと変化する過程で、吸器誘導シグナルの経路がシフトしてきた様子が伺えた(Aoki et al. 2022, *Plant Cell Physiol*)。また、ストライガの吸器誘導時のトランスクリプトーム解析とコシオガマのトランスクリプトーム解析を比較すると、吸器誘導初期に共通したオーソログ遺伝子が発現していることがわかり、寄生の成立過程が進化的に保存されていることが示唆された。

3. 今後の展開

本研究により、宿主植物と寄生植物の間のシグナル伝達が明らかになってきた。その中で、植物ホルモンであるエチレンやサイトカイニン、オーキシンが植物間のシグナルとして重要な役割を果たすことが明らかとなった。しかし、植物ホルモンは異なる植物でも同様の分子種を生産することが知られており、寄生植物がどのように宿主と自分自身を区別しているのかは明らかではない。また、実際に植物間を移動するシグナルの実態がわかっていないため、植物間で移動するシグナル因子の同定が今後の課題となる。また、寄生植物内のシグナル経路が明らかではないため、条件非依存的な大規模ネットワーク解析を進めており、他のグループにより公共データベースにデポジットされたトランスクリプトームデータと *in house* データを合わせたコシオガマの大規模ネットワークデータベースの構築を進めている。さらに、データベースに他の寄生植物のオルソログ遺伝子のデータを入れ込むことにより、寄生植物の進化の様子を浮き彫りにしたいと考えている。宿主による寄生植物の細胞分化の制御機構を解明することにより、寄生されにくい作物の開発が可能になると考えられる。また、寄生植物と宿主植物の間で移動する制御因子を解明することにより、寄生植物による宿主の制御という方向性も視野に入ってくると考えられる。

4. 自己評価

本さきがけ研究を通して、今まで全く未解明であった吸器の形態形成シグナルを明らかにすることができ、一定の成果を上げることができた。これまで、形成されるかされないかのみで議論されてきた現象を、時空間解像度をあげて、細胞レベル・分子レベルで議論できるようになった点は大きいと考えている。一方で、宿主植物と寄生植物の間のシグナルの実体は未解明であり、二つの植物間における相互のシグナル伝達の解明は今後の課題である。研究の進め方は妥当と考える。本研究費を頂いたおかげで、独立した研究室を立ち上げ研究を拡大することができた。また、まだまだ高額なシングルセル解析等にも積極的に取り組むことができた。寄生植物の研究は、植物がどのように異種を認識し、自身および宿主を制御するかを解き明かすものであり、これまであまり議論されてこなかった植物の自己認識機構の解明につながる。植物を個体として捉えず、生態系の中で様々な生物とつながって生きるものと捉えることで、新たなグリーンイノベーションへつながると期待できる。また、寄生植物に限らず、複数種の生物種が含まれる現象は多くあるが、その相互作用の理解はまだ進んでいない。さらに一般的な複数生物種の相互作用の理解につなげたいと考えている。

5. 主な研究成果リスト

(1) 代表的な論文(原著論文)発表

研究期間累積件数:11件

1. Cui, S., Kubota, T., Nishiyama, T., Ishida, J.K., Shigenobu, S., Shibata, T.F., Toyoda, A., Hasebe, M., Shirasu, K., **Yoshida, S.** (2020) Ethylene signaling mediates host invasion by parasitic plants. *Science Advances*, 6, eabc2385

本論文では、寄生植物コシオガマから宿主に侵入できない変異体を単離しその責任遺伝子を同定することにより、寄生植物の宿主侵入におけるエチレンシグナルの重要性を明らかにした。エチレンシグナル因子が欠損した寄生植物変異体は、宿主非存在下でも吸器先端部の細胞分裂を停止できず、宿主に到達しても侵入できない表現型を示した。吸器先端細胞の分裂と分化の制御機構を明らかにした。また、寄生植物を用いた分子遺伝学的な研究として初めての報告である。

2. Masumoto, N., Suzuki, Y., Cui, S., Wakazaki, M., Sato, M., Kumaishi, K., Shibata, A., Furuta, K. M., Ichihashi, Y., Shirasu, K., Toyooka, K., Sato, Y., **Yoshida, S.** (2021) Three-dimensional reconstructions of haustoria in two parasitic plant species in the Orobanchaceae. *Plant Physiol.*, 185, 1429–1442

ハマウツボ科には、日和見的な寄生を示す条件的寄生植物と、宿主なしでは生活環を回すことができない絶対寄生植物がいるが、両者の構造的な宿主との相互作用の違いはわかっていなかった。本論文では、条件的寄生植物コシオガマと絶対寄生植物ストライガの吸器構造の違いを三次元再構築により明らかにした。ストライガが宿主の道管細胞に細胞を突き刺して寄生するのに対し、コシオガマは宿主の道管に巻きつくように細胞を配置することにより寄生を成立させていることが明らかとなった。

3. Aoki, N., Cui, S., **Yoshida, S.** (2022) Cytokinins induce prehaustoria coordinately with quinone signals in the parasitic plant *Striga hermonthica*. *Plant Cell Physiol.*, doi: 10.1093/pcp/pcac13

本論文では、植物ホルモンであるサイトカイニンが絶対寄生植物ストライガの吸器誘導物質としてはたらくことを明らかにした。サイトカイニンは、これまでに知られているキノンによる吸器誘導とは異なるシグナル経路を通じて吸器を誘導していることを、阻害剤や遺伝子発現により証明し、変異体を用いて宿主のサイトカイニンが吸器誘導に寄与していることを示した。一方で、条件的寄生植物であるコシオガマの吸器は、サイトカイニンでは誘導できなかったことから、サイトカイニンによる吸器誘導は、条件的寄生植物から絶対寄生植物への進化の過程で獲得された形質であることが示唆された。

(2) 特許出願

該当なし

(3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

吉田聡子、モデル寄生植物の解析から見た植物間相互作用、2020年11月30日、植物科学シンポジウム（招待講演）

Satoko Yoshida, Cell-cell interaction between parasitic plants and host plants, 2020, Dec 2nd, 分子生物学会ワークショップ（招待講演）

吉田 聡子, 和田 将吾, 青木 夏美, 佐藤 綾人, Songkui Cui, Diversity and specificity of haustorium inducing factors for Orobanchaceae root parasitic plants. 2021, Nov 4th, 日本生化学会, シンポジウム（招待講演、シンポジウムオーガナイザー）

Satoko Yoshida, Structural and signaling diversity of haustoria in Orobanchaceae parasitic plants, 2022, July 3-7, The 16th World Congress of Parasitic Plants, Nairobi, Kenya (Keynote lecture, Online 参加)

吉田聡子, 宿主植物との出会いによる寄生植物細胞の運命転換, 2022年9月18日, 日本植物学会シンポジウム（招待講演）