

称号及び氏名 博士(応用生命科学) 清水 皇稀

学位授与の日付 2021年3月31日

論文名 茎寄生植物ネナシカズラにおける吸器維管束の形成と
RNA 移行に関する研究

論文審査委員 主査 青木 考
副査 太田 大策
副査 高野 順平

論文要旨

寄生植物は、経済的に重要な作物を含む幅広い植物種に寄生することが知られている。この寄生植物は宿主となる植物から水、無機養分、光合成産物をはじめとする有機化合物を吸収することで生育する。寄生植物は一般に宿主に付着し、吸器とよばれる根状の特殊な器官を形成することで宿主の維管束から物質を効率的に吸収することを可能にしている。寄生植物の一種である茎寄生植物ネナシカズラ(*Cuscuta* 属)は生育を宿主に完全に依存する全寄生植物であり、茎寄生植物のモデル植物として近年研究が進められている。しかしながら、ネナシカズラの寄生メカニズムについて未だ不明な点が数多く存在する。そこで本研究では、茎寄生植物ネナシカズラについて、第一章ではネナシカズラの茎から形成される器官である吸器での維管束の形成メカニズムについて、第二章ではネナシカズラが吸器を経由して宿主とやりとりしている物質の一つである mRNA のネナシカズラへの移行の役割について明らかにすることを目的に研究を行った。

第一章 ネナシカズラの吸器における維管束形成メカニズム

茎寄生植物ネナシカズラの一種である *Cuscuta japonica* は宿主となる植物から水や栄養分を収奪するために根状の器官である吸器を自身の茎より形成する。*C. japonica* は吸器の細胞を維管束細胞へとリプログラムすることで宿主の維管束との結合を可能にしている。しかしながら、吸器における維管束分化についての報告がほとんどされていない。

このことから本章ではまず、ネナシカズラ-宿主の寄生部における維管束細胞タイプ特異的なマーカー遺伝子の時間的および空間的な発現プロファイルを取得した。寄生誘導処理後、0 時間、24 時間、48 時間、72 時間、96 時間、120 時間でのネナシカズラ-宿主の寄生部全体および、寄生誘導処理後、72 時間、96 時間、120 時間の宿主茎内に挿入された吸器から抽出した RNA を用いて、維管束細胞で特異的に発現することが知られている遺伝子の逆転写定量 PCR(qRT-PCR)を行った。対象とした遺伝子については *ALTERED PHLOEM DEVELOPMENT (APL)*、*SIEVE ELEMENT OCCULSION-RELATED 1 (SEOR1)*、*WUSCHEL-RELATED HOMEODOMAIN 4 (WOX4)*、*TRACHEARY ELEMENT DIFFERENTIATION-RELATED 7 (TED7)* の *C. japonica* ホモログをそれぞれ篩管伴細胞、形成過程の篩部要素、前形成層細胞、形成過程の道管細胞のマーカー遺伝子として取得し、定量した。本章における *C. japonica* ホモログは先行研究で示されたトランスクリプトームデータから生成されたコンティグを Rapid amplification of cDNA ends (RACE) 法により CDS 領域を確認したのちに利用した。これらの維管束細胞で特異的に発現する遺伝子について吸器内での発現が確認でき、寄生進行過程において *CjAPL*、*CjSEOR1* については減少していた。*CjWOX4* については道管形成の直前の段階において一過的に発現が増加し、その後減少していた。*CjTED7* については道管形成の過程と同調して増加していた。

さらに DIG システムを用いた *In situ* hybridization による *CjWOX4* 転写物の局在性解析を実施したところ、前形成層細胞のマーカー遺伝子である *CjWOX4* は吸器先端に近

づくにつれ吸器側面に向かって伸長している細胞での発現が確認された。このことは、遺伝子発現パターンと併せて、吸器内で前形成層細胞が存在することを示している。光学顕微鏡で確認された吸器内道管の位置および 5-carboxyfluorescein diacetate によって確認された吸器内篩管の位置と比較すると、前形成層細胞はこれらと隣接した領域にあることが示唆された。このことは吸器において道管領域と篩管および前形成層領域の分化が起きていることを示唆している。

次に、前形成層細胞の分化運命制御に関わる経路として知られている Tracheary element Differentiation Inhibitory Factor(TDIF)から TDIF RECEPTOR (TDR)を経由して GLYCOGEN SYNTHASE KINASE 3(GSK3)をリン酸化する経路に関わる遺伝子である *CLAVATA3/EMBRYO SURROUNDING REGION-RELATED 41(CLE41)*、*CjGSK3*、*BRI1-EMS-SUPPRESSOR 1(BES1)*の *C. japonica* ホモログの発現パターンについて調べた。その結果、TDIF のホモログをコードする *CjCLE41* の発現は吸器において寄生誘導後 72 時間から 96 時間にかけて増加しており、これは *CjWOX4* と同様に一過的に増加していた。また、*GSK3* のホモログである *CjGSK3* は 72 時間から 96 時間にかけて減少し、120 時間でも低い発現レベルを示した。経路の下流でリン酸化された *GSK3* により発現が制御される *CjBES1* については 72 時間から 120 時間にかけて増加していた。これらのことから、吸器内において TDIF-TDR-GSK3 が活性化していることが示唆された。また、興味深いことに、吸器で *CjCLE41* のナチュラルアンチセンス転写物 (*natCjCLE41*)の存在が確認された。*natCjCLE41* の発現は 72 時間から 96 時間にかけて増加するという、センス転写物 *CjCLE41* の発現と同じ消長のパターンを示した。このことから *natCjCLE41* はセンス鎖の *CjCLE41* の発現を制御している可能性があることを示唆している。

以上、本章の結論として細胞タイプ特異的に発現する遺伝子とその分化制御に関わる遺伝子の発現プロファイルにより道管形成阻害を阻害することにより急速な道管形成を起こすという方法により、ネナシカズラ吸器内において吸器の細胞から維管束細胞へのリプログラムを制御していると考えられる。

第二章 茎寄生植物ネナシカズラへの宿主 mRNA の移行と翻訳

ネナシカズラは吸器を介して宿主の茎に巻きつき宿主の維管束組織と接続する。水や栄養分、二次代謝産物に加え、多くの mRNA がネナシカズラ-宿主寄生部の吸器を経由して双方向に移行していることが知られている。この mRNA の移行において移行先の植物種において分子的な機能を保持しているかということについて不明であった。この長距離移行 mRNA が翻訳されている可能性について説明するために、先行研究によって植物での mRNA の長距離移行を促進することが示された transfer RNA(tRNA)様構造(TLSs)を利用した。ネナシカズラの宿主には *GUS* レポーターのみもしくは *GUS-tRNA* 融合レポーターを発現するシロイヌナズナを使用した。

CMV35S プロモーターで駆動する *GUS* のみ、もしくは *GUS-tRNA* 融合転写物を発現するシロイヌナズナ形質転換体を宿主としたときに、ネナシカズラ内で *GUS* タンパ

ク質による活性が確認されるか検証するために GUS 染色による組織学的染色を行った。結果として、*GUS-tRNA* のうち *GUS-tRNA^{Met}*、*GUS-tRNA^{Met-dDT}*、*GUS-tRNA^{Gly}*、*GUS-tRNA^{Ile}* をそれぞれ発現するシロイヌナズナに寄生させたネナシカズラ内で GUS の酵素活性が検出され、*GUS* のみ、および *GUS-tRNA^{Met-dAT}* を発現するシロイヌナズナを宿主とした場合は検出されなかった。これは各形質転換体を宿主としたネナシカズラの茎のみから抽出した RNA を用いた RT-PCR を行った結果として、*GUS* 転写物が *GUS-tRNA^{Met}*、*GUS-tRNA^{Met-dDT}*、*GUS-tRNA^{Gly}*、*GUS-tRNA^{Ile}* を発現するシロイヌナズナを宿主とした場合はネナシカズラ内で検出され、*GUS* のみを発現するシロイヌナズナを宿主とした場合はネナシカズラ内で検出されなかったことについて一致した。

次に、検出された GUS タンパク質の活性がネナシカズラ内での局在について調べるために、アニリンブルーによるカロース染色を利用して篩管内構造の一つである篩板の可視化を行った。その結果、*GUS-tRNA^{Met}*、*GUS-tRNA^{Met-dDT}*、*GUS-tRNA^{Gly}* を発現するシロイヌナズナ形質転換体をそれぞれ宿主としたネナシカズラ内において、GUS 活性は篩板が確認された細胞列と隣接した細胞列に存在していた。また、これは道管とは明らかに異なる位置であった。このことから、ネナシカズラ内における GUS 活性は篩部要素に隣接した篩管伴細胞もしくは篩部柔細胞にあることが示された。

さらに DIG システムを用いた *in situ* hybridization による *GUS-tRNA^{Met}*、*GUS-tRNA^{Gly}* 転写物のネナシカズラ内での局在性解析を実施した。結果として、*GUS* 転写物のシグナルがネナシカズラ茎内の道管とは異なる位置かつ GUS 染色で得られた結果と類似した位置で確認された。このことから宿主から移行した *GUS* 転写物はネナシカズラの篩管周辺に存在していることが示唆された。

以上、本章の結論として、宿主由来 *GUS* 転写物はネナシカズラ内で翻訳され、TLSs の修飾は宿主-ネナシカズラ間における mRNA の移行性を促進させる。また、宿主由来 *GUS-tRNA* 転写物は修飾される TLSs の種類に関係なく篩管を経由して篩管伴細胞もしくは篩部柔細胞まで到達したのち、翻訳されると考えられる。

本研究では、まず茎寄生植物ネナシカズラの吸器における維管束形成メカニズムについて、吸器組織が維管束幹細胞にリプログラムされているとともに、道管形成を促進する方向に維管束分化制御遺伝子が発現していることが確認された。次に吸器を介して宿主からネナシカズラへ移行する物質の一つである mRNA がネナシカズラ内の特定の細胞で翻訳されることが確認された。以上、本研究によって得られた知見は、今後の寄生植物-宿主相互作用の理解を深めるための重要な基盤になると思われる。

審査結果の要旨

多細胞生物における生体機能統御は、これまで個々の細胞を単位とした細胞自律的な機構を基礎に考えられてきた。情報伝達は細胞間で行われるが、遺伝子を転写し、タンパク質を合成し、代謝を行い、シグナル分子を生成するという一連の過程は細胞内で完結すると考えられていた。ところが1999年に植物において、転写因子タンパク質をコードする mRNA が、根の細胞から茎頂分裂組織の細胞へと器官間長距離移行していることが見出され、転写からシグナル分子に至る経路の一部が、他の細胞から移行した分子によって非自律的に制御されることが示唆された。この発見は様々な研究にインパクトを与え、花成、塊茎形成、栄養応答、ストレス応答等に関わる長距離移行性の RNA やタンパク質の同定を導いた。動物においても、2010年代の細胞外小胞研究の発展に伴って、器官間での RNA やタンパク質の移行が実証されてきた。これらの研究から、RNA やタンパク質の長距離移行による細胞非自律的制御は生物で普遍的であることが明らかになった。

分子の長距離移行とカップリングした細胞非自律的制御は、異種生物個体間でも起こりえることが示唆されている。この代表的な例は寄生植物と宿主植物の複合体である。寄生成立後の寄生植物、宿主植物の各トランスクリプトームを比較すると、数千種類の遺伝子に由来する mRNA が二つの植物間で交換されることが明らかにされている。しかしながら、これらの mRNA がどのようにして異種生物間を移行し、相手の細胞機能を制御するのかは不明であった。そこで本研究では、寄生植物において宿主植物との分子の輸送路と考えられている維管束組織がどのように形成されるのか、ならびに長距離移行した mRNA が移行先の組織でどのように機能制御に寄与するかを明確にする研究を実施した。

第1章では、寄生植物が寄生する際に、宿主植物維管束と自身の維管束を橋渡しする維管束組織を新生することを、茎寄生植物ネナシカズラ(*Cuscuta japonica*)を用いて明らかにした。ネナシカズラは吸器と呼ばれる特殊な器官を宿主植物の茎に挿入する。モデル植物シロイヌナズナで明らかにされている、維管束の幹細胞・師管・道管の各細胞タイプに特異的な発現を示す遺伝子が、いずれも吸器内部で発現していることが示された。さらに、シロイヌナズナで機能が同定されている道管分化抑制遺伝子の相同遺伝子群、*CjCLE41* 遺伝子、*CjGSK3* 遺伝子、ならびに *CjBES1* 遺伝子の発現パターンから、これまでの道管分化モデルに加えて、更に道管分化の抑制的制御を抑制する因子の存在が推測され、*CjCLE41* 遺伝子のアンチセンス転写物がこれに相当する可能性が推定された。以上の結果から、ネナシカズラの吸器内には幹細胞・師管・道管からなる維管束組織が形成されること、ならびにその分化制御には寄生後の速やかな吸器維管束新生を可能にするような仕組みが存在することを明らかにした。

第2章では、宿主植物から寄生植物へ長距離移行した mRNA が移行先の細胞で翻訳に

供される可能性をシロイヌナズナと茎寄生植物アメリカネナシカズラ (*Cuscuta campestris*) を用いて検証した。任意の RNA に長距離移行性を付与する tRNA 様モチーフ (TLS) を付加した β -グルクロニダーゼ (GUS) mRNA を宿主植物シロイヌナズナに発現させ、アメリカネナシカズラに輸送させた。アメリカネナシカズラ内では、*TLS-GUS* mRNA 移行に依存した GUS 活性が検出された。GUS 活性が局在する細胞を詳細に同定したところ、茎維管束組織において師部の通導細胞の隣、すなわち伴細胞に局在することが明らかにされた。さらに *in situ* ハイブリダイゼーション法によって *TLS-GUS* mRNA がアメリカネナシカズラ師部に移行していることも実証された。これらのことから、TLS モチーフは mRNA に異種間での長距離移行をもたらし、mRNA 自体が移行し、移行先で翻訳装置を完備している師部伴細胞において翻訳されているモデルが示唆された。

本研究では寄生植物と宿主植物の複合体を用いて、維管束組織が寄生植物と宿主植物のインターフェイスに形成されること、また新生された師部を通じて mRNA が個体間移行し移行先で翻訳されることを明らかにした。細胞非自律的な制御を可能とするような維管束組織形成が寄生インターフェイスで実際に起こっていること、ならびに植物個体間での mRNA の移行性とその背後にある移行選択性に関する結果は新規性が高く、細胞分子生物学や植物生理学的な成果として高く評価できる。RNA の異種植物間長距離移行は、新育種技術への応用も期待される。よって本論文の審査ならびに最終試験の結果と併せて博士 (応用生命科学) の学位を授与することを適当と認める。