

別紙 4

報告番号	※ 甲 第 号
------	---------

主 論 文 の 要 旨

論文題目 二光子励起顕微鏡法によるダイズシストセンチュウが誘導する
合胞体形成過程の時空間的解析

氏 名 大津 美奈

論 文 内 容 の 要 旨

植物の組織は、様々な微生物との生物間相互作用により多様な形態変化が引き起こされる。その一例として、植物寄生性線虫であるシストセンチュウが誘導する合胞体が挙げられる。シストセンチュウは、宿主根の細胞壁を部分的に分解させ、隣り合う細胞同士を細胞融合させることで多核の巨大な細胞である合胞体を作り出す。

シストセンチュウを含む植物寄生性線虫は宿主根の深部に感染するため、感染組織の形態変化を外部から捉えることは困難である。これまでに、蛍光標識により植物寄生性線虫の可視化が試みられているが、根の深部におけるシストセンチュウおよび合胞体を明瞭に観察することはできていない。その原因として、植物自身の自家蛍光や、染色による蛍光強度が不十分であることが挙げられる。従って、これまでの研究ではシストセンチュウ感染根の薄層切片を作成し、顕微鏡下で観察することで合胞体形成メカニズムの解明を進めていた。しかしながら、この方法ではシストセンチュウによって細胞壁が分解され、次々に細胞が融合するという経時的な情報や、三次元的に広がる合胞体の空間的な情報は得ることができない。

そこで本研究では、シストセンチュウの誘導する合胞体形成メカニズムを解析するための基盤技術を開発することを目的として、マメ科植物とダイズシストセンチュウ (*Heterodera glycines*) の相互作用に着目し、シストセンチュウの感染行動を捉えるライブイメージング系と、合胞体全体を鮮明に捉えるホールマウントイメージング系の開発を行った。

シストセンチュウの感染過程をライブイメージングするためには、ダイズシストセンチュウを強く蛍光染色できる蛍光色素を探索する必要がある。本研究では、FM4-64

および SYBR green I がダイズシストセンチュウの蛍光標識に適することを明らかにした。一般に、ダイズシストセンチュウの宿主としてダイズが用いられるが、根が太いため感染部位のイメージングには適していない。そこで、よりイメージングに適した宿主植物の探索を行い、非モデル植物であるレンゲ (*Astragalus sinicus*) を見出した。蛍光標識したダイズシストセンチュウをレンゲに感染させ二光子顕微鏡で観察した結果、根の深部に感染するダイズシストセンチュウをリアルタイムで明瞭に観察することに成功した。さらに、本研究では、非モデル植物であるレンゲの一過的な形質転換系を確立し、その結果、ダイズシストセンチュウによって誘導される宿主植物の細胞構造を観察することが可能になった。

植物組織は屈折率の異なる様々な物質が入り交じっているため、ホールマウントイメージングは困難である。本研究では、植物専用の透明化試薬 ClearSee と二光子顕微鏡を用いて合胞体のホールマウントイメージングを行った。その結果、これまで電子顕微鏡によってのみ観察されたダイズシストセンチュウ感染初期の細胞壁の部分的分解を、光学顕微鏡レベルで観察することに成功した。また、合胞体の細胞壁を三次元的に解析し、ダイズシストセンチュウが宿主の細胞壁をランダムに分解するのではなく、一定のパターンで細胞壁の分解と再合成を誘導し、柱状の細胞壁に作り変えることが初めて明らかとなった。さらに、ホールマウントイメージングによって、根の内部における合胞体の誘導される位置に依存して、合胞体の細胞壁パターンが異なることが示唆された。

本研究は宿主—植物間相互作用を二光子顕微鏡による深部イメージングで明らかにする手法を提示したモデルケースとなる研究であり、本研究で確立したイメージング技術を駆使することで、レンゲとダイズシストセンチュウの組み合わせのみならず、植物に感染する他の微生物と植物との相互作用における感染過程のダイナミックな変化や感染組織の三次元構造に関する新たな知見が得られるものと期待される。