

学位（博士）論文要旨  
(Doctoral thesis abstract)

論文提出者 Ph. D. Candidate	生物システム応用科学府 共同先進健康科学専攻 (博士課程) 平成 27 年度入学(Your Entrance Fiscal Year) 氏名 阿波連 功 (Your Name(Family, First) and Seal)				
主指導教員 氏名 Chief Advisor's Name	稲田 全規	副指導教員 氏名 Vice Advisor's Name		副指導教員 氏名 Vice Advisor's Name	
論文題目 Title	植物寄生性線虫による植物および線虫捕食菌との相互作用の解析 Investigation of plant-parasitic nematode interaction with plant and nematophagous fungus				
<p>論文要旨 (和文要旨(2000 字程度)または英文要旨(500words))          ※欧文・和文どちらでもよい。但し、和文の場合は英訳を付すこと。          Write a summary in Japanese (2000 characters) or in English (500words).          If the abstract is written in Japanese, needed to translate into English.</p> <p>【第一章 緒論】          植物寄生性線虫は世界中に生息しており、トマトやナス、砂糖大根（テンサイ）への寄生による収量の減少が問題となっている。一方、植物は自身の成長や老化、病原菌の感染、環境ストレスに対して、過酸化水素などの活性酸素種 (Reactive Oxygen Species : ROS) を用いたシグナル経路によって自身を防御している。しかし、植物や土壌微生物との相互作用における、植物寄生性線虫内の ROS 関連因子の詳細な役割は未だ明らかになっていない。そこで、本研究では、まず植物 - 線虫の相互作用について、シロイヌナズナとテンサイシストセンチュウ (<i>Heterodera schachtii</i>) を用いて、線虫の植物への寄生時における、抗酸化因子グルタチオンペルオキシダーゼ (GPx) の機能について検討した。次に、線虫 - 真菌の相互作用について、サツマイモネコブセンチュウ (<i>Meloidogyne incognita</i>) と、その天敵微生物である線虫捕食菌 (<i>Purpureocillium lilacinum</i>) を用いて、<i>M. incognita</i> の存在下における、<i>P. lilacinum</i> の分泌タンパク質の解析を実施した。同様に、<i>P. lilacinum</i> 存在下における <i>M. incognita</i> 内の遺伝子発現解析も実施した。</p> <p>【第二章 植物寄生性線虫の寄生におけるグルタチオンペルオキシダーゼの関与】          まず、BLASTp 解析により、<i>H. schachtii</i> において、ジャガイモシストセンチュウ (<i>G. rostochiensis</i>) の GPx 遺伝子と 88%の相同性を持つ配列の存在が明らかとなり、これを HsGPx とした。次に、HsGPx の <i>H. schachtii</i> 内の発現を検討したところ、in situ hybridization により、食道の腺細胞における発現が認められた。また、qRT-PCR による各成長段階における発現検討の結果、J3 期において最も発現量が多かった。さらに、HsGPx の二本鎖 RNA の遺伝子組み換え株を用いて、<i>H. schachtii</i> の寄生への影響を検討したところ、雌の線虫と融合細胞の大きさが有意に小さくなった。以上の結果より、HsGPx が植物細胞に分泌され、寄生後の雌の線虫および植物の融合細胞の大きさを制御することが示唆された。</p> <p>【第三章 <i>M. incognita</i> の分泌物存在時における、<i>P. lilacinum</i> のタンパク質発現解析】          次に、<i>M. incognita</i> の応答を誘導する線虫捕食菌の因子を同定するため、<i>P. lilacinum</i> の培養上清を用いて、質量分析を実施した。まず、寒天培地で維持していた <i>P. lilacinum</i> の胞子を回収し、二群に分けてフラスコ内で液体培地に 10 日間培養した。この際、一方の群には培養 3 日目に <i>M. incognita</i> の培養上清 (NemaWater) を処理した。10 日間の培養後、培養上清を回収、濃縮し、SDS-PAGE、質量分析を行った。その結果、<i>P. lilacinum</i> の培養上清に、キチナーゼ等の線虫の捕食において重要な因子が含まれていることが明らかとなった。一方これら因子は、<i>M. incognita</i> の NemaWater 処理により、発現が変化しなかった。また、ヒスチジン酸ホスファターゼ、Tat pathway signaling sequence を含む因子、phosphoglucomutase、Hsp70 の発現が有意に変化した。これにより、真菌の生体物質である細胞壁や糖タンパク質の産生の抑制、タンパク質の輸送の抑制する方向に機能すると考えられる。したがって、<i>M. incognita</i> の培養</p>					

上清に含まれる分泌物により、*P. lilacinum* の恒常性や病原性が減少すると考えられる。

【第四章 *P. lilacinum* の分泌物存在時における、*M. incognita* のトランスクリプトーム解析】

次に、*P. lilacinum* のタンパク質存在下における、*M. incognita* のトランスクリプトーム解析を行った。まず、*M. incognita* の mRNA データベースに対して、自由生活線虫の *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) で同定されている免疫関連タンパク質の配列を用いて BLAST 解析を実施した。その結果、p38 MAPK 経路、TGF- $\beta$  経路、インスリン様受容体経路を構成するタンパク質が保存されていることが明らかとなった。次に、*P. lilacinum* の培養上清を *M. incognita* の幼虫に処理し、RNA を回収して RNA-seq を実施した。その結果、8500 の *M. incognita* のコンティグ配列がアSEMBルされた。そのうち、*P. lilacinum* の培養上清処理により、217 のコンティグ配列の発現が有意に上昇し、44 のコンティグ配列の発現が有意に減少した。さらにこれらコンティグ配列を用いた blast 解析により、発現が上昇したコンティグ配列は、神経伝達や筋肉の運動や表皮の代謝に関連する因子と高い相同性を示した。また、NADH dehydrogenase のサブユニット等、ROS 産生に関与する複数の遺伝子も発現が上昇した。以上より、*M. incognita* は、*P. lilacinum* の分泌物を受容体で感知して神経細胞を介して伝達し、ROS 関連因子を含む遺伝子発現を増加させ、真菌の接触に備えていたと推測できる。

【第五章 結語】

第二章の結果より、HsGPx が植物細胞内の ROS を除去することで、ROS による線虫体への傷害の抑制、および植物の免疫シグナル伝達の抑制に寄与すると考えられる。また、第三章の結果より、線虫の存在により、線虫捕食菌の病原性が低下する可能性が示唆された。そして、第四章の結果より、線虫が真菌の存在を感知して神経細胞を介して伝達し、ROS 関連因子を含む遺伝子発現を増加させ、真菌の接触に備えていることが示唆された。本研究より、植物と植物寄生線虫、植物寄生線虫と線虫捕食菌の相互作用の一端が明らかとなり、植物寄生線虫内の ROS 関連因子を含む因子が植物寄生線虫防除の重要な標的となりうるということが示唆された。

(英訳) ※和文要旨の場合(300 words)

If the abstract is written in Japanese, needed to translate into English.(300 words)

Plant parasitic nematodes (PPNs) inhabit all over the world and reduce the yield of crops by damage crop roots. Plants utilize Reactive oxygen species (ROS) to protect themselves against various stresses. Then, lots of soil microbes exist underground. However, molecular interaction of PPNs against plants and soil microbes is not clear. Therefore, we analyzed the role of antioxidants in PPNs response to plants and microbes.

First of all, we analyzed the effect of HsGPx on parasitism. In situ hybridization and qRT-PCR analysis revealed the expression of HsGPx in the juvenile nematode and the silencing of HsGPx reduced the size of female and syncytia. These results indicate that HsGPx has a role of helping *H. schachtii* for infection to plants.

Next, we performed mass spectrometry analysis using culture supernatant of *P. lilacinum* treated with culture supernatant of *M. incognita*. As a result of the analysis, two proteins were significantly upregulated by treated with the culture supernatant of *M. incognita*. From the result, we hypothesized that *P. lilacinum* recognize the secretion of *M. incognita* and upregulate certain proteins for infection.

Next, we predicted immune related factors in *M. incognita* by BLAST analysis Then, we performed transcriptome analysis of *M. incognita* treated with supernatant of *P. lilacinum*. As a result, upregulated contigs were annotated such as neural transduction and muscle contraction. These contigs include ROS producing factors as well. From the result, we hypothesized *M. incognita* recognize the secretion of *P. lilacinum* and upregulate certain genes to evade or deal with the fungus.

The 3rd chapter shows that no ROS related genes was upregulated with exposed to secretion of *M. incognita* probably because this was the very initial response of *P. lilacinum*. The 4th chapter shows that *M. incognita* might produces lots of ROS during infection by microbes probably to induce immune system and to repel microbes. This research indicated that ROS can be a crucial target to protect crops from PPNs.