

「植物-微生物の見えない相互作用を観る：現在と未来」 企画にあたって

永野惇¹, 佐藤昌直²

¹龍谷大学農学部

520-2194 大津市瀬田大江町横谷1番5

²北海道大学大学院農学研究院

060-8589 札幌市北区北9条西9丁目

Introduction to “Realizing invisible plant-microbe interactions: current and future perspectives”

Atsushi J. Nagano¹, Masanao Sato²

¹Faculty of Agriculture, Ryukoku University, Yokotani 1-5, Seta Ohe-cho, Otsu, Shiga 520-2194, Japan

²Department of Agriculture, Hokkaido University, Kita 9 Nishi 9, Kitaku, Sapporo, Hokkaido 060-8589, Japan

Key words: plant-microbe interactions, next generation sequencing, imaging

DOI: 10.24480/bsj-review.8a1.00106

1. はじめに：なぜ今、植物-微生物相互作用研究か？

現代の生物学研究はミクロ・マクロの両方向に展開され、分子生物学的研究から生態学的研究まで広く発展している。その中で生物学的にはミクロな存在でありながら、時として生態系におけるマクロな現象にも影響を及ぼす多くのウイルス・微生物の存在に注目が集まっている。植物にとって植物内外に存在するウイルス・微生物は動的な環境要因であり、それらとどのように相互作用しているかをミクロ・マクロな様々な視点から明らかにすることが植物の理解に欠かせない。植物を取り巻くウイルス・微生物の研究はこれまでに行われてきたが、近年それに特に注目が集まっている背景には以下のポイントがあると考えられる。

第一に、特定のプライマー・プローブ配列に頼らない網羅的な塩基配列決定機器、次世代シーケンサの登場・発達によって、標的を絞らない微生物検出が可能となったことが大きい。加えて、従来のシーケンス法で必要だったDNAクローニング技術からの解放、それによる解析スループットの劇的な向上が個々のウイルス・微生物ゲノムの同定だけでなく、集団としての微生物ゲノム情報の収集を可能とした。さらに実験手法として比較的簡便・安価になったことで、実験室内のみならず、野外圃場・自然環境下のサンプルの解析にも次世代シーケンサが用いられるようになった。

第二に、従来より広い視点で植物-微生物相互作用を捉えようという潮流がある(Bulgarelli,D.*et al.* 2012; Lundberg D.S. *et al.* 2012; Stobole, A.H. & Roossinck, M.J., 2014)。植物研究（特に植物病理学）におけるウイルス・微生物研究は主に作物に病害を引き起こすウイルス・微生物を研究対象としたものが主流だった。一方で、菌根菌や根粒菌と植物の関係に代表される共生系が古くから研究されてお

A. J. Nagano & M. Sato -1

BSJ-review 8:1 (2017)

り、近年では、ウイルス-真菌-植物の三者系相互作用による植物への乾燥耐性の付与 (Márquez, LM, et al. 2007) や、病原体である炭疽病菌と近縁の糸状菌が環境条件依存的に植物に有益な働きをすることも明らかとなってきている (Hiruma et al. 2016)。また、次世代シーケンサの登場以後には、植物への影響の有無を問わず植物内・周辺細菌叢を構成する微生物のレパートリーも明らかになりつつあり (Bulgarelli, D. et al. 2012; Lundberg D.S. et al. 2012)、植物を取り巻くウイルス・微生物研究は急展開を迎えている。

これら 2 つのポイントに加え、企画者らはこれから展開が期待される第三のポイントを挙げたい。シーケンス技術に加え、種々のイメージング技術、分子生物学的技術の発達により、植物とウイルス・微生物の相互作用を、その現場でより深く研究できる可能性がある。ここで言う現場には 2 通りの意味がある。1 つ目は相互作用を細胞あるいはそれ以下のレベルで高い時間分解能で調べることに対応する。例えばライブイメージング技術の発達によって、植物とウイルス・微生物の相互作用の現場を高い時空間分解能で観察することが可能となる。2 つ目は相互作用が本来起こってきた環境である野外圃場や自然生育地という意味での現場である。RNA-Seq など網羅的解析技術が広く利用できるようになっており、野外圃場や自然生育地においても、感染しているウイルス・微生物の種類・量だけでなく、宿主植物がそれらに対してどのように応答をしているか、どのような状態にあるかまで網羅的に読み解くことが可能となった。

2. 植物-微生物相互作用研究における新展開

自然界では我々には「見えない」ことから窺い知れなかった、複数微生物による複雑な感染や感染する・される生物間のダイナミックな相互作用が起きていると想像される。現在、植物-微生物相互作用研究は盛り上がりを見せているが、実際には上記 3 つのポイントに関連して未だ様々な課題が残されており、多くの研究者の取り組みを待っている状況にある。著者らが今回企画したシンポジウムでは、これらの課題の解消に取り組み、新たな展開を生み出している研究者に「『見えない』ものを観る」という視点で話題提供をお願いした。「見えない」という問題は技術的・生物学的な様々な理由で存在する。現在汎用されている方法の原理・網羅性の制約から「見えない」(検出できない)だけなく、実験室内での限られた観察だけから推定できない、野外の様々な状態における植物-微生物相互作用(生態学的なマクロな現象として捉えないと生物学的意義が理解できない相互作用)や、個体の適応度を左右するにも関わらず、時空間的に局所で起きるため「見えない」相互作用(相互作用の時間・場所が限られるため観察できない相互作用)がある。本特集では次世代シーケンサやイメージングによって見えない相互作用に光を当てた研究、植物-微生物相互作用の研究にこれまで利用されていない最先端技術を紹介する。

関根らの総説では、2 本鎖 RNA 結合タンパク質を用いたウイルスの濃縮・検出の法の説明と、それを用いて農業現場での病害の原因ウイルスの同定を行った研究が紹介される。また、携行可能な小型の高速リアルタイム PCR 装置といった、現場で必要とされる技術の開発の展望についても述べられている。

神谷らの総説では、感染植物で必ずしも病徵を示さないウイルスも含めた、野生植物からの網羅的なウイルス検出・宿主トランスクリプトームの同時解析の試みと、そこから明らかになった宿主の自然生育地でのウイルス-ウイルス間、ウイルス-植物間の相互作用について紹介される。

大津らの総説では、最先端のイメージング技術を植物-微生物相互作用の研究に応用した例として、シストセンチュウが感染によって宿主植物細胞から誘導する合胞体の透明化技術・二光子励起顕微鏡をもちいた深部イメージングの結果が紹介される。また、感染過程のライブイメージングに向けた展望についても述べられている。

佐藤らの総説では、器官・組織レベルの広域に渡る透過電顕像を得るために「広域透過電顕像取得システム」と、蛍光タンパク質で標識した対象の超微形態を高分解能走査電顕で可視化する「GFP-走査電子相関顕微鏡法」の開発について紹介される。これらの技術は植物体内の局所で起こる植物-微生物相互作用の現場を広域に走査し、且つ電顕の解像度で捉える強力なツールとなる。

なお、シンポジウムではこれらに加えて、別役らによって、病原微生物の感染時の葉における免疫応答の時空間ダイナミクスをライブイメージングで明らかにした研究の紹介が行われた。

以上の研究から、様々な「見えない」相互作用の片鱗を垣間見ることが出来た。しかしながら、片鱗が見えたことによって、逆に見えない部分の大きさに気付いたとも言える。読者の皆さんには、まずは本特集から「見えない」相互作用を見る楽しさを感じていただければと思う。さらには、もし本特集が皆さんにとって大きな見えない部分に挑むアイディアを練っていただく切っ掛けとなれば、企画者として存外の幸せである。

Bulgarelli,D., Rott,M., Schlaeppi,K., Ver Loren van Themaat,E., Ahmadinejad,N., Assenza,F., Rauf,P., Huettel,B., Reinhardt,R., Schmelzer,E., Peplies,J., Gloeckner,F.O., Amann,R., Eickhorst,T., & Schulze-Lefert,P. (2012). Revealing structure and assembly cues for *Arabidopsis* root-inhabiting bacterial microbiota. *Nature*, 488: 91-95.

Hiruma,K., Gerlach,N., Sacristán,S., Nakano,R.T., Hacquard,S., Kracher,B., Neumann,U., Ramírez,D., Bucher,M., O'Connell,R. & Schulze-Lefert,P. 2016. Root endophyte *Colletotrichum tofieldiae* confers plant fitness benefits that are phosphate status-dependent. *Cell* 165, 464-474

Lundberg,D.S., Lebeis,S.L., Herrera-Paredes,S., Yourstone,S., Gehring,J., Malfatti,S., Tremblay,J., Engelbrekston,A., Kunin,V., Glavina del Rio,T., Edgar,R., Eickhorst,T., Ley,R.E., Hugenholtz,P., Tringe,S.G., & Dangl,J.L. 2012. Defining the core *Arabidopsis thaliana* root microbiome. *Nature* 488, 86-90.

Márquez,L.M., Redman,R.S., Rodriguez,R.J., & Roossinck,M.J. 2007. A virus in a fungus in a plant: three-way symbiosis required for thermal tolerance. *Science* 315:513-515.

Stobble,A.H. & Roossinck,M.J. 2014. Plant virus metagenomics: what we know and why we need to know more. *Front Plant Sci.* 5: 150.

効率的な植物ウイルス検出技術の開発

関根 健太郎¹, 柳澤 広宣^{2,3}, 永井 秀典⁴

¹琉球大学農学部

〒903-0213 沖縄県中頭郡西原町千原1

²農研機構 中央農業研究センター

〒305-8666 茨城県つくば市觀音台2-1-18

³岩手大学大学院連合農学研究科

〒020-8550 岩手県盛岡市上田3-18-8

⁴産業技術総合研究所

〒563-8577 大阪府池田市緑丘1-8-31

Ken-Taro Sekine¹, Hironobu Yanagisawa^{2,3}, Hidenori Nagai⁴

Development of efficient diagnostic methods detecting plant viruses

Key words: *deep sequencing, metagenomics, plant virus, virus diagnosis, virus hunting*

¹University of the Ryukyus, Nishihara, Okinawa, 903-0213, Japan

²Central Region Agricultural Research Center, National Agriculture and Food Research Organization (NARO), Tsukuba, Ibaraki, 305-8666, Japan

³The United Graduate School of Agricultural Sciences, Iwate University, Morioka, Iwate, 020-8550, Japan

⁴Biomedical Research Institute, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST), Ikeda, Osaka, 563-0026, Japan

DOI: 10.24480/bsj-review.8a1.00107

1. はじめに

農作物に病害を起こす原因是、害虫による食害や、糸状菌、細菌、ウイルスなどの病原微生物の感染や無生物的ストレスによる生理障害が挙げられる。長い農業の歴史から、頻発する病害についての原因が明らかにされ、耐病性作物の育種や防除技術の開発が進められてきた。近年は、大飢饉のような大規模被害は見られなくなっているが、栽培作物の多様化によって、病害も多様化しており、国際化により地球規模で対策しなければならない病害も増えている。このような病害に対する最も有効な防除手段は、早期に発見し、未然に蔓延を防ぐこと、すなわち『病害診断』である。特に多年生の花きや果樹における病害は、その翌年以後にまで影響を及ぼし、中でも感染後の治癒が不可能なウイルスによる病害は壊滅的な被害を起こしかねない。糸状菌や細菌は光学顕微鏡レベルの観察で発見できるのに対し、ウイルスは電子顕微鏡レベルの観察が必要であり、診断の指標となる病徵についても生理障害との区別が非常に難しい。従来、ウイルス病の診断は、個々のウイルスの基本骨格である核酸またはタンパク質を特異的な検出方法（例えば PCR や ELISA など）を用いて検知するものであり、限られた病害情報をもとに、病原ウイルスを類推して検定を行う。このため、想定外のウイルスや未知のウイルスが感染していた場合には、その病原ウイルスを検出することはできない。未知のウイルスを同定するためには、ウイルス

ゲノム配列を決定する必要があり、粒子の単離精製など専門的な知識・技術、多大な時間と労力を要する。したがって、これまで主要作物の重要病害を中心に原因ウイルス究明がなされており、マイナーフロップや、栽培作物以外の植物に感染するウイルスについての知見は非常に限定されていた。一方で、分子生物学のめざましい発展とともに、網羅的なウイルス検出技術が様々に開発されてきた (Kobayashi et al. 2012)。近年では、次世代シーケンシング技術を用いてウイルスの感染が疑われる宿主（または環境中など）の大量の遺伝子配列情報中に含まれるウイルスゲノム配列情報の探索が行われている (Barba et al. 2014, Roossinck et al. 2015)。言い換えれば、遺伝子情報のビッグデータを扱うことで比較的簡単にウイルスを見出すことが可能となった。読者の中でも、植物のゲノム解析やトランスクリプトーム解析において、期せずしてウイルスの配列が検出された経験を持つ方も少なくないのではないだろうか。また、このようなゲノム解析研究から、メガウイルス、パンドラウイルスなどのそれまでウイルスと認識されていなかった巨大ウイルスの存在も明らかにされている。未だ知り得ぬウイルスの姿が、今後さらに明らかにされていくことが予想される。本稿では、植物病原ウイルス探索の現状と課題、並びに今後の展望について、主として農学、特に植物保護の観点から議論したい。

2. 植物ウイルスの網羅的検出技術

ウイルスの感染を疑い、種を同定するためには、ウイルスのゲノム配列情報を得ることが最も重要である。ウイルスの粒子の観察や感染性、伝搬性を調べることでウイルス種を類推することは可能であるが、ゲノム配列情報を得なければ、種を特定できないからである。網羅的なウイルス検出技術とは、ウイルスの核酸やタンパク質に対して、種特異的に検出するプライマーや抗体を用いる方法とは異なり、一回の検定によって、ウイルスのゲノム配列やタンパク質のアミノ酸配列を直接解析することで、感染ウイルス種の回答を得る技術である。ウイルスの分類における「属」間で保存された遺伝子配列がある場合には、この属に含まれるウイルス種を包括的に検出可能なユニバーサルプライマーを用いた PCR による検定方法が開発されているが (Okuda & Hanada 2001, Vlugt & Berendsen 2002)，全ウイルスを対象とする PCR 検定法は確立されていない。仮に微生物相解析で用いられているような種を特定可能な遺伝子領域（ミトコンドリア COI 領域やリボソーム ITS 領域など）があれば、シーケンシングによって種を判別可能であるが、残念ながら全てのウイルスゲノムに共通するようなコンセンサス配列が見つかっていないためである。一方、植物ウイルスの多くはゲノム情報を RNA として有し、その感染サイクルの中で 2 本鎖 RNA (dsRNA) の状態を必ずつくり、いわば dsRNA の蓄積はウイルス感染マーカーとして利用できる。すなわち dsRNA を特異的に抽出することで、ウイルスのゲノム RNA の存在を効率的に検出することが可能である (Atsumi et al. 2015a, Okada et al. 2015)。著者らは、NGS が今ほど普及する以前に、サンガーシーケンサーの利用を前提として開発された網羅的ウイルス検出技術「DECS 法」の実用化を推進してきた (Kobayashi et al. 2009)。DECS 法は、植物の dsRNA 結合タンパク質を用いてウイルス由来の dsRNA を抽出し、この逆転写産物を網羅的に増幅した後、クローニングしてシーケンス解析（サンガーフラス）することで、得られた塩基配列情報を用いてウイルス種を特定、または、類推する技術である（図 1）。DECS 法を用いて植物ウイルスとウイロイドを検出した実績を表 1 にまとめた。最近では、次世代シーケンシング (NGS) 解析と組合せることでウイルス検出効率を飛躍的に高めた DECS-C 法を活用して、*Blueberry shoestring virus* のゲノム配列全長を決定した (Yanagisawa et al. 2016)。

網羅的ウイルス検出技術は、主としてオミックス技術を用いて、既報のウイルスゲノム情報を用いて、ウイルス種を同定するため、対象となるウイルス種はデータベースにゲノム情報が登録されている

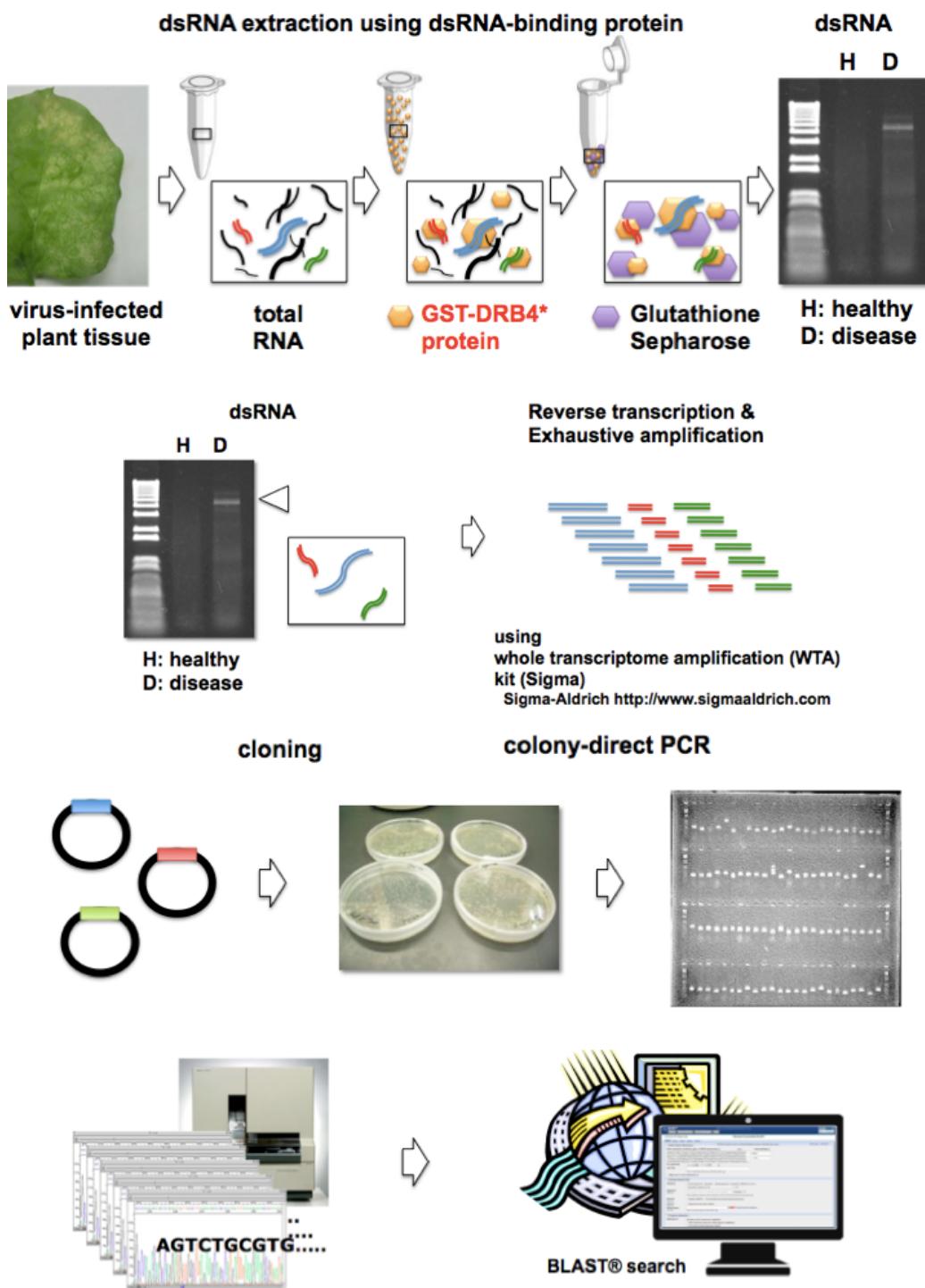


図 1. 網羅的 RNA ウィルス検出技術 DECS 法の実験の流れ

感染植物から全 RNA を抽出し、GST-DRB4*タンパク質と 2 本鎖 RNA (dsRNA) を結合させる。Glutathione sepharose と GST-DRB4*を結合させて、dsRNA を回収する。この一連の流れは Plant dsRNA enrichment kit として株式会社医学生物学研究所 (MBL) より販売されている。アガロース電気泳動により dsRNA の存在の有無を確認。得られた dsRNA を Whole transcriptome amplification kit (Sigma) を用いて逆転写および、網羅的に増幅する。この cDNA 断片を大腸菌へクローニングして、シーケンシングを行う。得られた遺伝子配列情報を BLAST 検索にかけ、ウィルス様配列を検出する。

表1 DECS 法によるウイルス検出事例(学会発表を含み公表されたものに限る)

host	virus	references
bell pepper	bell pepper endornavirus	
blueberry	BSSV, Blueberry virus A	Yanagisawa et al. 2016
chrysanthemum	CSVd	
eustoma	IYSV, LNRV	Shimomoto et al. 2014, 菅ら 2016
gentian	BBWV2, GeMV, GKaV, GORV	Atsumi et al. 2015b, Kobayashi et al. 2013
hop	AMV, HLV	
tobacco	BBWV2, CMV, PMMoV, PVX, TMV, ToMV	Kobayashi et al. 2009
tomato	CMV, TSWV	

BSSV: *Blueberry shoestring virus*, CSVd: *Chrysanthemum stant viroid*, IYSV: *Iris yellow spot virus*, LNRV: *Lisanthus necrotic ringspot virus*, BBWV: *Broad bean wilt virus 2*, GeMV: *Gentian mosaic virus*, GKaV: *Gentian kobo-sho associated virus*, GORV: *Gentian ovary ringspot virus*, AMV: *Apple mosaic virus*, HLV: *Hop latent virus*, HLVd: *Hop latent viroid*, CMV: *Cucumber mosaic virus*, PMMoV: *Pepper mild mottle virus*, PVX: *Potato virus X*, TMV: *Tobacco mosaic virus*, ToMV: *Tomato mosaic virus*, TSWV: *Tomato spotted wilt virus*

全ウイルスであり、感染植物からウイルス由来のペプチド断片をプロテオーム解析によって検出する方法や、DNA や RNA の塩基配列情報を網羅的に解析し、ウイルスゲノム配列を探索する方法などが挙げられる。既知ウイルスのアミノ酸配列又はゲノム配列情報との相同性から新規ウイルスの存在を見出すことも可能である。上述の DECS-C 法同様、NGS の普及とともに、メタゲノミクス手法を用いた網羅的ウイルス検出技術は、世界中で様々に活用されており、既に多くのウイルスの発見に貢献している (Hadidi et al. 2017)。DECS 法では dsRNA を出発材料としているが、全 DNA または全 RNA を用いた解析がある。特に small RNA を用いた NGS 解析では、RNA ウィルスだけでなく DNA ウィルスも同時に検出できることから、「網羅的」という目的には、より合致した手法であるといえる。NGS 解析の一回のランで得られる出力データ量は、年々増加しているため、ウイルスの検出効率（ウイルス由来リード数／総リード数）が低くとも、総データ量を増やすことで検出感度を上げられる。反対に、解析に用いるデータ量が多くなると、そこからウイルス由来のリードを検出する解析にかかる計算量が増えるため、解析時間が増大するという課題もある。検出感度が上がると、擬陽性（感染しているか疑わしいウイルスの断片が検出される）やコンタミネーションのリスクが増える。また、ウイルス様配列を検索するために用いるリファレンスデータベースの信頼性の精査も課題である（公のデータベースであっても懐疑的な配列が登録されている場合がある）。データ解析のアルゴリズムを変えることで、ウイルス検出効率、信頼性や計算速度が変わるため、以上の課題を克服すべく、最適化していく必要がある。相同性検索により新規ウイルス配列の検出限界、すなわち新種／新属／新科のどこまでのウイルスを検出可能な解析アルゴリズムを構築できるかという挑戦は続いている。新規ウイルス探索という観点からは、既知ウイルスとのゲノム配列相同性に依存しない新たなウイルス検出法開発への期待も大きい (Wu et al. 2015)。また、DECS 法を用いて病原ウイルスを早期に発見し、病害発生現場での防除に成功した事例（病害発見より 2 週間以内に防除対策ができた）があるが（菅ら, 2016），初動対応の迅速さは病害防除の成否を左右するため、想定外の既知病原ウイルスを早期に発見するという目的では、解析時間の早さと解析精度が、病害診断に携わる現場のニーズとして挙げられることも忘れてはならない。

3. 病原ウイルスの探索

網羅的ウイルス検出技術などで、罹病植物から新規ウイルスの存在を見出したとしても、病原体としての証明が次の課題となる。植物ウイルスは、ウイルスとして最初に見つかったタバコモザイクウイルスをはじめとして、接種や病徵再現などの種々の知見の上で病原体の存在が示唆され、その原因究明の

中で発見してきた。病原体は、コッホの原理によって、1) 病原体を単離、2) 健全植物へ接種、3) 病徴を再現、4) 再び病患部より病原体が単離できることと定義付けられている。ウイルスについても同様に、感染・発症の生理学的な知見からその存在が示唆された後、単病斑分離によってウイルスを純化し、ウイルス粒子を精製した上で、接種による病徴再現試験、加えて、粒子に含まれるゲノム配列情報を決定することが、典型的なウイルス種の同定過程である。したがって、ウイルスを接種によって増殖できない場合、粒子を単離しにくい場合や、病徴が顕著に現れない場合などは、同定が困難となる。著者らは、30年以上原因が分かっていない病害であるリンドウこぶ症の罹病株より、DECS 法を用いてリンドウこぶ症関連ウイルス (*Gentian kohu-sho associated virus; GKaV*) を発見している (Kobayashi et al. 2013; Atsumi et al. 2013a)。GKaV については、人工的な接種方法は接木のみ成功しているが、粒子の単離には成功しておらず、また病徴発現までに数年かかるなどの理由から、コッホの原理を満たすことができないため、病原体であることの証明が非常に困難である。国内の様々な栽培地から採集したこぶ症発病株と健全株について、GKaV 感染の有無を検定した結果、発症との強い相関が認められたことから、こぶ症の病原体である可能性は非常に高いが、実験的に如何に証明するかは大きな問題である。同様に DECS 法を用いて発見した新規ウイルスのリンドウ子房輪紋ウイルス (*Gentian ovary ringspot virus; GORV*) は、粒子の単離、接種試験も可能であったが、花粉を介してウイルスが感染した後に、子房に輪紋症状を呈するため、病徴の再現に多大な苦労を要した (Atsumi et al. 2015b)。どちらもリンドウから新規ウイルスを発見した事例であるが、これ以外にいくつかのウイルス性病害と疑われるリンドウについて、ウイルス探索を実施したものの、明確な結果が得られなかつた事例についても紹介したい。リンドウまだら退色症状については、DECS 法の結果、ソラマメウイルトウイルス (*Broad bean wilt virus 2; BBWV2*) およびリンドウモザイクウイルス (*Gentian mosaic virus; GeMV*) が検出された。これらのウイルスはフィールドの大部分のリンドウに潜在感染（無病徴感染）しており (Atsumi et al. 2013b)，どちらのウイルスについても、まだら退色症状の発症との相関が見られず、病害への関与はないものと判断した。ウイルス以外の原因を追求した結果、生理障害である可能性が高いと考えられた (Takahashi et al. in press)。他の未解決のリンドウ病害においても BBWV2 および GeMV は高い確立で検出されており、厄介なことに、これらのウイルスはリンドウで病害を誘起する系統が報告されているため、病害への関与を完全に否定はできないのである。また、リンドウも含め多年生の花きや果樹で DECS 法を用いると、複数のウイルスが同時に検出されることが多い。この場合は、個々のウイルスを病原体の候補として考えるのみならず、複数のウイルスの感染の結果、病害が激症化している可能性についても考慮しなければならない。したがって、個々のウイルスの病原性、宿主応答など、病理学的研究の重要性は、ウイルス検出技術がいくら進歩しても何ら変わらない。

4. おわりに

網羅的ウイルス検出法の結果、病原ウイルスの候補が得られた場合に、まず行うことは、実際にその結果を検証するため、元のサンプルからこのウイルスが検出されるか検定する。その次に病徴とウイルス感染の有無について相関が見られるかを確認する。したがって、個別ウイルスの検定方法が必要となる。対象とするウイルスに対して、既製品の抗体など確立された検定方法が手元にあるとは限らないため、個別の検定方法を短期間に確立しなければならない。網羅的ウイルス検出法の利点は、ウイルスの遺伝子配列情報を取得するため、対象とするウイルスを特異的に検出するための PCR プライマーが即時に設計できることである。個別のウイルス検定に必要なことは、迅速性と正確性である。特に農業生

産現場で検定可能なイムノクロマトグラフィー法や LAMP 法などは大いに活用されている。最近, Furutani et al. (2016) は、携行可能な小型の高速リアルタイム PCR 装置を開発した。マイクロ流路を利用して 2 種類の温度間を反応液が往復する送液型のサーマルサイクル反応を採用しており、送液時に検出器によってリアルタイムで PCR 産物量を測定するため、高速化と装置の小型化を実現している（図 2）。リアルタイム PCR では、目的とする遺伝子配列の特異性を上げるだけではなく、プライマーとプローブのデザインの仕方で、複数種のウイルスをターゲットとする汎用的な検出も可能である (Yanagisawa et al. in press)。また、蛍光を複数利用した複数のウイルス種を同時に判別するマルチプレックス化など可能性は広がる。網羅的ウイルス検出法と高速ウイルス検出法の開発によって、病原ウイルスの探索が効率化できると考えられ、また、これらの技術は植物の遺伝子発現解析などに広く応用されていくものと期待される。さらに、新たに発見されたウイルスも遺伝子資源としての活用も期待できる。上述の BBW2 は、リンドウに無病徵感染する特性を利用した遺伝子発現ベクターとして応用され、花芽形成機構などの基礎的な植物生理学研究のツールとして利用されている (Tasaki et al. 2016)。また、GCRV は、ウイルスの花粉伝染機構解明のモデル材料として活用されている (Isogai et al. 2017)。本稿で紹介した技術などによって、ウイルスの検出が比較的に容易になったものの、病害の防除には、病原ウイルスとしての病原性の証明、ウイルスの性状解析、伝染経路の探索や植物の病徵発現機構、植物の持つ病害抵抗性機構を理解する必要がある。今後の病害防除に向けた植物ウイルス研究の進展により得られる分子生物学的な知見や関連技術の応用は、植物保護の分野に留まらず、植物科学全般の研究推進に大いに貢献するものと期待される。

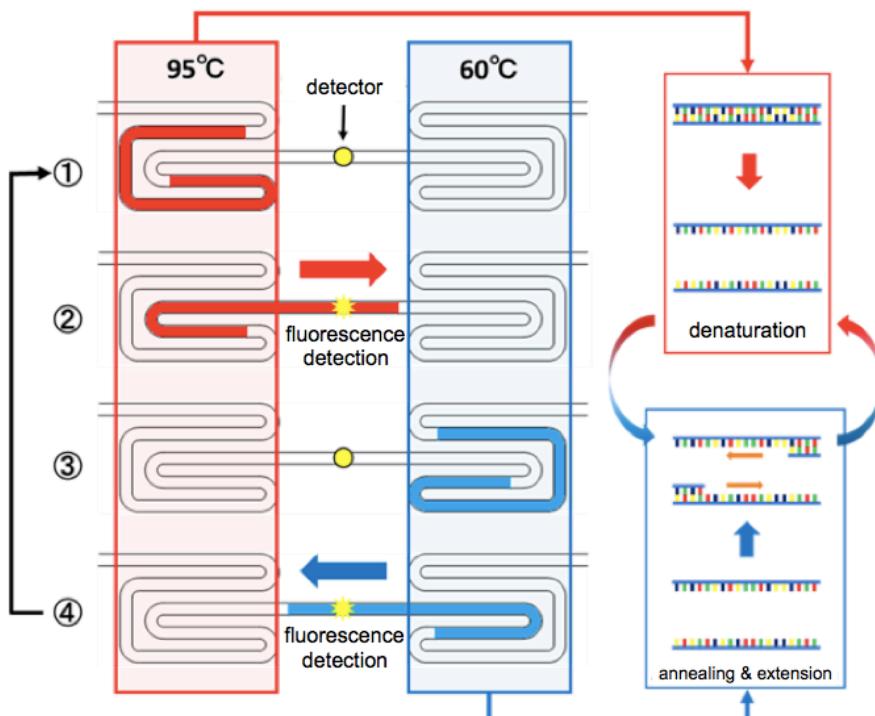


図 2. 高速リアルタイム PCR の原理

① 2 本鎖 DNA を 1 本鎖に分離、②高温部から低温部へ送液、③1 本鎖を 2 本鎖に複製、④低温部から高温部へ送液（①に戻る）、①～④を繰り返すことで遺伝子を増幅する。RNA の場合には、①の前に逆転写反応に適した温度の部位を用意することで、逆転写反応をしてから①へ送液することで RT-PCR も可能である。

5. 謝辞

本稿で紹介した著者らの研究は、「農林水産省革新的技術創造促進事業（異分野融合共同研究事業）理学・工学との連携による革新的ウイルス対策技術の開発」および「農林水産省革新的技術開発・緊急展開事業（うち地域戦略プロジェクト）マイナーコロップにおける高速ウイルス診断技術の実証研究」により行われたものである。

6. 引用文献

- Atsumi, G., Tomita, R., Kobayashi, K., & Sekine, K.-T. 2013a. Prevalence and genetic diversity of an unusual virus associated with Kobu-sho disease of gentian in Japan. *J. General Virol.* 94: 2360-2365.
- Atsumi, G., Tomita, R., Kobayashi, K., & Sekine, K.-T. 2013b. Establishment of an agroinoculation system for broad bean wilt virus 2. *Arch. Virol.* 158: 1549-1554.
- Atsumi, G., Sekine, K.-T., & Kobayashi, K. 2015a. New method to isolate total dsRNA. *Methods in Molecular Biology* 1236: 27-37.
- Atsumi, G., Tomita, R., Yamashita, T., & Sekine, K.-T. 2015b. A novel virus transmitted through pollination causes ring-spot disease on gentian (*Gentiana triflora*) ovaries. *J. General Virol.* 96: 431-439.
- Barba, M., Czonsnek, H., & Hadidi, A. 2014. Historical perspective, development and applications of next-generation sequencing in plant virology. 6: 106-136.
- Furutani, S., Naruishi, N., Hagihara, Y., Nagai, H. 2016. Development of an on-site rapid real-time polymerase chain reaction system and the characterization of suitable DNA polymerases for TaqMan probe technology. *Anal. Bioanal. Chem.* 408: 5641-5649
- Hadidi, A., Flores, R., Candresse, T., & Barba, M. 2017. Next-generation sequencing and genome editing in plant virology. *Front. Microbiol.* 8: 45 doi: 10.3389/fmicb.2016.01325
- Isogai, M., Kamata, Y., Ando, S., Kamata, M., Shirakawa, A., Sekine, K.-T. & Yoshikawa, N. 2017. Horizontal pollen transmission of *Gentian ovary ring-spot virus* is initiated during penetration of the stigma and style by infected pollen tubes. *Virology* 503: 6-11.
- 菅広和・佐藤美和子・白川明日佳・関根健太郎 2016. 岩手県における網羅的 RNA ウィルス検出技術を用いた植物ウイルス病診断・防除の取り組み. *植物防疫* (70): 19-22.
- Kobayashi, K., Atsumi, G., Iwadate, Y., Tomita, R., Chiba, K., Akasaka, S., Nishihara, M., Takahashi, H., Yamaoka, N., Nishiguchi, M., and Sekine, K.-T. 2013. Gentian Kobu-sho-associated virus: a tentative, novel double-stranded RNA virus that is relevant to gentian Kobu-sho syndrome. *J. Gen. Plant Pathol.* 79: 56-63.
- Kobayashi, K., Atsumi, G., Yamaoka, N., & Sekine, K.-T. 2012. Sequencing-based virus hunting and virus detection. *Japan Agr. Res. Quart.* 46:123-128.
- Kobayashi, K., Tomita, R. & Sakamoto, M. 2009. Recombinant plant dsRNA-binding protein as an effective tool for the isolation of viral replicative form dsRNA and universal detection of RNA viruses. *J. Gen. Plant Pathol.* 75: 87-91.
- Okada, R., Kiyota, E., Moriyama, H., Fukuhara, T., & Natsuaki, T. 2015. Simple and rapid method to purify viral dsRNA from plant and fungal tissue. *J. Gen. Plant Pathol.* 81:103-107.

- Okuda, M., & Hanada, K. 2001. RT-PCR for detecting five distinct Tospovirus species using degenerate primers and dsRNA template. *J. Virol. Methods* 96: 149-156.
- Roossinck, M.J., Martin, D.P., & Roumagnac, P. 2015. Plant virus metagenomics: advances in virus discovery. *Phytopathology* 105: 716-727.
- Shimomoto, Y., Kobayashi, K., & Okuda, M. 2014. Identification and characterization of Lisanthus necrotic ringspot virus, a novel distinct tospovirus species causing necrotic disease of Lisanthus (*Eustoma grandiflorum*). *J. Gen. Plant Pathol.* 80: 169-175.
- Takahashi, H., Abe, H., Fujita, K. & Sekine, K.-T. in press. The use of metabolome analysis to identify the cause of an unexplained disease of Japanese gentians (*Gentiana triflora*). *Metabolomics* DOI: 10.1007/s11306-017-1192-0
- Tasaki, K., Atsumi, G., Nishihara, M., & Sekine, K.-T. 2016. Development of a *Broad bean wilt virus* 2-based expression vector for gentian. *Scientia Horticulture* 201: 279-286.
- Yanagisawa, H., Tomita, R., Katsu, K., Uehara, T., Atsumi, G., Tateda, C., Kobayashi, K., & Sekine, K.-T. 2016. Combined DECS analysis and next-generation sequencing enable efficient detection of novel plant RNA viruses. *Viruses* 8: 70.
- Yanagisawa, H., Shiki, Y., Matsushita, Y., Ooishi, M., Takaue, N., & Tsuda, S. in press. Development of a comprehensive detection and identification molecular based system for eight pospiviroids. *Eur. J. Plant Pathol.* DOI 10.1007/s10658-017-1157-1
- Vlugt, R.A.A., & Berendsen, M. 2002 Development of a general potexvirus detection method. *Eur. J. Plant Pathol.* 108: 367-371.
- Wu, Q., Ding, S.W., Zhang, Y., & Zhu, S. 2015. Identification of viruses and viroids by next-generation sequencing and homology-dependent and homology-independent algorithms. *Annu. Rev. Phytopathol.* 53: 425-444

野生植物とウイルスの見えない相互作用を RNA-Seq で観る

神谷麻梨¹, 永野惇², 本庄三恵¹, 工藤洋¹

¹ 京都大学生態学研究センター,

〒520-2113 滋賀県大津市平野2丁目509-3,

² 龍谷大学農学部

〒520-2194 滋賀県大津市瀬田大江町横谷1番5

RNA-Seq reveals hidden-interactions between wild plants and viruses

Mari Kamitani¹, Atsushi J. Nagano², Mie N. Honjo¹ and Hiroshi Kudoh¹

¹Center for Ecological Research, Kyoto University,

Hirano 2-509-3, Otsu, 520-2113, Japan

²Faculty of Agriculture, Ryukoku University, Yokotani 1-5, Otsu, 520-2194, Japan

Key words: *plant viruses, RNA-Seq, virus ecology*

DOI: 10.24480/bsj-review.8a1.00108

1. はじめに

植物にとってウイルスは、その感染によって生理的な変化をもたらし、時に大量死を引き起こす重要な存在である。しかし、植物ウイルスの研究はこれまで主に農作物の病害を対象に行われてきたため、野生植物の自然生育地における知見はごく限られている。植物ウイルスはタンパク質とおよそ数千塩基ほどゲノムから成り、その性状は、ゲノムが RNA であるか DNA であるか、ゲノムが複数本に分節するか非分節であるか、ゲノム 3'末端の polyA-tail の有無などによって区別される (Hull, 2014)。現在 900 種以上の植物ウイルスが知られているが、そのほとんどは農作物から発見されたものである (Wren *et al.*, 2006)。一方、古くから、農作物の大量枯死において見られるような激しい病徵を伴う感染は、自然条件下では植物にとってもウイルスにとっても適応的でないと考えられてきた (May & Anderson, 1983, Remold, 2002)。実際、植物の見た目の病徵（外部病徵）のない感染の存在は知られており、近年では、植物に対し中立的もしくは有益な影響を与えるウイルス感染の報告が増えてきている (Fraile & Garcia-Arenal, 2016)。また野生植物集団はジェノタイプや生育環境が多様であること、ウイルスとの相互作用の進化的歴史が長いということを考えると、農作物で見つかっているものとは異なるウイルスの種構成や相互作用が期待される。これまで見過ごされてきた野生植物におけるウイルス感染やウイルス-宿主間、ウイルス種間相互作用を明らかにすることは、ウイルスの自然生息地でのふるまいを理解するうえで重要である。本総説では、自然生育地での植物ウイルス研究の意義や、具体的手法、著者らの研究で得られた結果について議論したい。

M. Kamitani *et al.*-1

BSJ-review 8:12 (2017)

2. 自然環境下におけるウイルス叢の解析

近年、これまで見過ごされてきた自然環境下におけるウイルスの多様性解明を目指した研究が盛んに行われており、地球上の隠されたウイルス叢 (Virome) への注目が高まっている (Suttle, 2005, Brum *et al.*, 2015, Paez-Espino *et al.*, 2016, Nishimura *et al.*, 2017)。ウイルス叢とは、ある生物あるいは環境下に存在する全ウイルスのゲノムの集合のことである。自然環境下においては、感染しているウイルスの候補を前もって絞ることはできないため、ウイルスの網羅的な同定手法が必要になる。真菌類や細菌類では rRNA の配列に基づく種の探索・同定が用いられるが、ウイルスにはそのような全種をカバーする共通保存配列が存在しないため、網羅的な探索は困難である。特定のウイルス種を対象とした水圏環境における先行研究により、自然環境下にはウイルスが普遍的かつ大量に存在すると考えられてきた (Breitbart & Rohwer, 2005)。近年の次世代シークエンシング技術の発展に伴い、メタゲノミクスの手法を用いた対象を絞らないウイルスの解析が多く行われるようになり、実際に新種を含む多くのウイルスを報告している (Edwards & Rohwer, 2005, Culley *et al.*, 2006, Kristensen *et al.*, 2010, Nishimura *et al.*, 2017)。環境中から見つかるウイルスの殆どは細菌を宿主とするウイルス (ファージ) であるが、それらは宿主の個体数制御や多様性の維持、物質循環などにおいて重要な役割を果たしていると考えられている (Thingstad, 2000, Suttle, 2007)。また節足動物宿主における研究では、ウイルスの複製酵素の配列に基づいたウイルスの探索同定により、一宿主内のウイルス種数を 1~20 種ほどと見積もっている (Shi *et al.*, 2016)。植物においてもウイルスが普遍的に感染しているのではないかと考えられているが、その多様性や、一宿主内のウイルス種数を調べた研究はまだ殆どない。

3. 見えないウイルスを網羅的にとらえる

野生植物では、外部病徵を伴わないウイルス感染が多くみられるため、病徵によらないウイルスの検出方法が必須である。上述のようにウイルスには全種をまたぐ共通保存配列が存在しないため、網羅的な探索が困難である。そのため野生植物を対象とした研究では、ウイルスの粒子や核酸の性状に基づく検出手法が様々に用いられている (Roossinck, 2012)。とりわけ、ウイルスの殆どが増殖時に宿主内で二本鎖 RNA (dsRNA) を合成することに着目し、それを単離して解析する手法は、ウイルスの網羅的同定に有力な手段として期待されている。実際この手法により、新種のウイルスが多く報告されている (Roossinck *et al.*, 2010, Li *et al.*, 2016, Urayama *et al.*, 2016)。

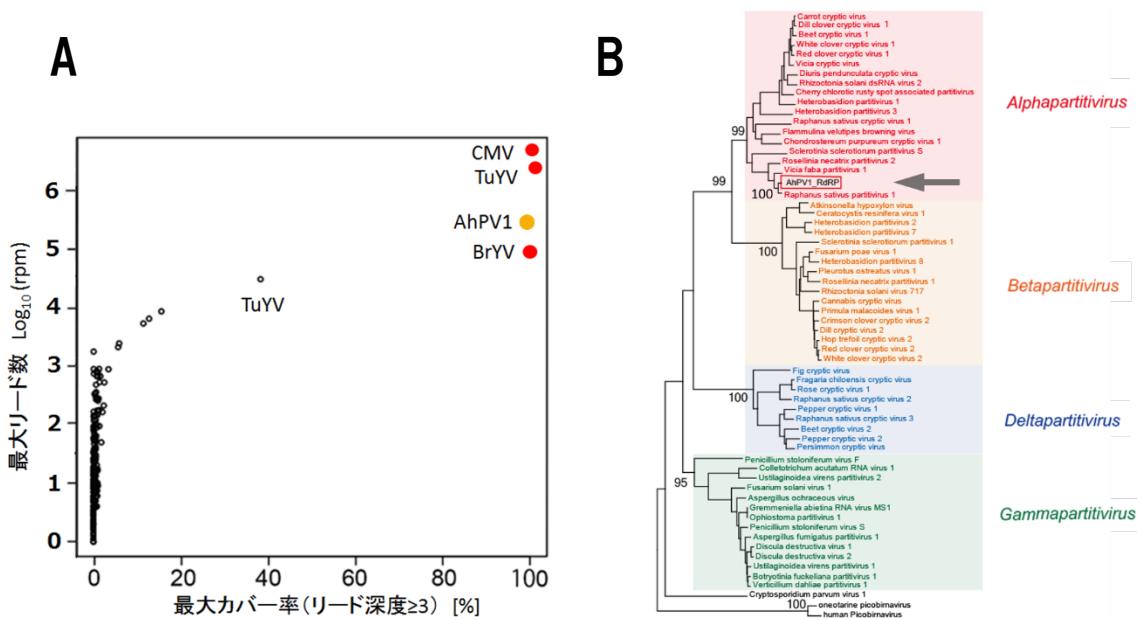
一方で、dsRNA の単離・濃縮などを経ずにウイルスの網羅的同定を行う試みもなされている。例えば、筆者らは、ウイルス感染の検出とともに宿主トランスクリプトームを解析可能な RNA-Seq を用い、ウイルスと植物との相互作用を明らかにした。植物ウイルスは RNA ゲノムと DNA ゲノムを持つものが存在するが、DNA ゲノムのウイルスも増殖の段階で相補鎖の RNA を合成するため、RNA-Seq では両者を検出することが可能である。また通常の RNA-Seq では oligo-dT による精製を行うためゲノム末端に polyA-tail のないウイルスを捕捉することができないが、これを rRNA の選択的分解に代えた RNA-Seq (Morlan *et al.*, 2012,

Nagano *et al.*, 2015) を行うことで、ゲノム末端の形状に寄らずウイルスを網羅的に検出できる。しかしながら、次世代シーケンシングを用いる手法で得られる多量の配列データからウイルスを検出する際には、実際のデータ解析手法が重要になる。次節で実際のデータを例として、RNA-Seq データからより正確にウイルスの在・不在判定を行うための工夫について紹介する。

4. 野生植物ハクサンハタザオにおけるウイルス感染の例

著者らは野生のアブラナ科植物ハクサンハタザオ (*Arabidopsis halleri* subsp. *gemmaifera*) の自然集団において 68 個体から採集した葉のサンプルを対象に RNA-Seq を行った。ハクサンハタザオはモデル植物のシロイヌナズナに近縁な野生種であるため、高品質のリファレンスゲノム配列やアノテーションが使用可能である。植物側の解析と同時に、既知のウイルスを種レベルで同定するため、NCBI にゲノム全長が登録されている全ウイルス種の配列に対し RNA-Seq のリードをマッピングし、感染有無を判断した。ウイルスは部分的に植物と似た配列を持つことや、近縁な種間では局所的に保存配列をもつ場合があるため (Antczak *et al.*, 1982, Mertens & Sangar, 1985, Anzola *et al.*, 1987), マッピングされたリードのウイルスゲノムに対するカバー率を考慮することで、部分的な相同性による誤検出のリスクを除いた、より正確な同定を試みた。さらに残りのリードの *de novo* assembly を行うことで、新規ウイルスの探索を行った。

マッピングの結果、ウイルスゲノムのほぼ 100%の範囲の配列が検出されるウイルス（感染）と、そうでないウイルス（非感染）を明瞭に区別できることが示された（図 1）。感染とみなされる 3 種のウイルス *Turnip mosaic virus* (TuMV), *Cucumber mosaic virus* (CMV), *Brassica yellows virus* (BrYV) と、*de novo* assembly で同定された 1 種の新規ウイルス *Arabidopsis partitivirus1* (AhPV1) の計 4 種のウイルスが検出された。水圏のウイルス叢の研究では大量のウイルスが見つかることがあるため、一見少なくも感じられるが、1 種の宿主植物を対象にしたものでは同等の種数が先行研究で報告されている。例えば、上述の dsRNA の解析手法による先行研究では、栽培種 2 種、野生種 1 種からそれぞれ 1~3 種のウイルスが検出されている (Blouin *et al.*, 2016)。検出された 4 種の感染率は 26%~82% で、AhPV1 が最も多くの宿主に感染していた。それぞれのウイルスの感染個体中で外部病徵のない感染の割合は、AhPV1 が 55% で最も高かった (Kamitani *et al.*, 2016)。



(図 1) 感染ウイルスの同定 **A** 各ウイルス種のゲノムにマップされたリード数(縦軸)と各ウイルスゲノムのリードによるカバー率(横)。縦軸の rpm は宿主の total mRNA 量(10^6)を分母として計算している。各丸点がウイルス種を表す。赤い丸は既知ウイルスの CMV, TuMV, BrYV。オレンジの丸は *de novo assembly* で見つかった新規ウイルス AhPV1。これら 4 種はほぼ 100% のカバー率を示した。TuYV (*Turnip yellows virus*) は 38% のカバー率を示したが BrYV と非常に近縁で配列の 80% 以上が相同なため、BrYV の配列が一部マッピングされたと判定した。**B** 複製酵素のアミノ酸配列に基づく AhPV1 の系統解析。AhPV1(矢印部)はパーティティウイルスの中で Alphapartitivirus 属に属する。Kamitani *et al.* 2016 改変。

5. 自然環境下における植物とウイルスの相互作用

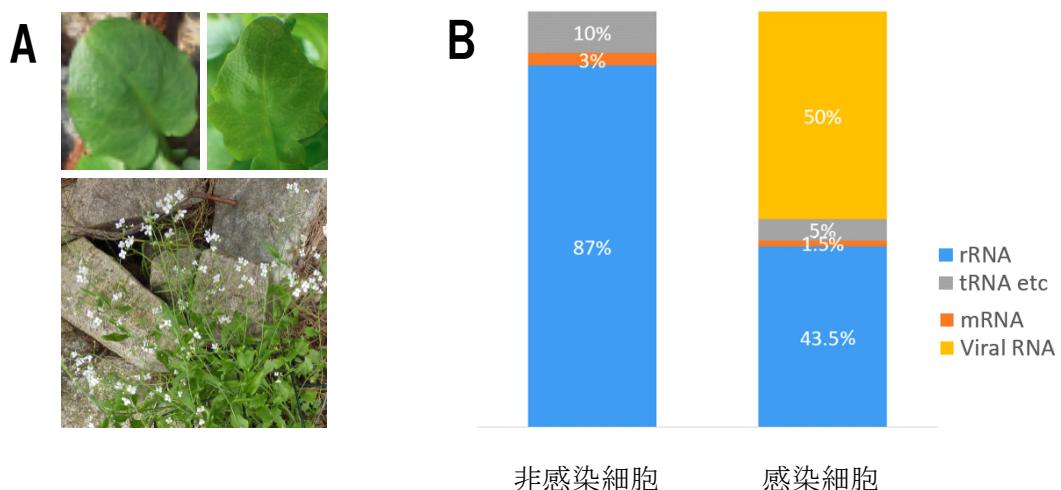
野生植物におけるウイルス多様性の解明と共に、生態系におけるウイルスの役割にも注目が集まっている。“病害”としてだけでなくウイルスの新しい見方が広がっている (Roossinck, 2011)。例えば、農作物に被害をもたらすウイルスでも、その周辺の野生植物では外部病害なく感染しうることや (Rist & Lorbeer, 1989), ウィルス感染が宿主のストレス条件下で有益に働く例が報告されている (Remold, 2002, Xu *et al.*, 2008)。たとえば、CMV に感染したビートは凍結・乾燥ストレスに対し非感染植物個体よりも耐性を持つことが報告されている (Xu *et al.*, 2008)。また、病原性の弱いウイルスの感染は、病原性の強い近縁なウイルスの感染を防ぐワクチン効果がある事が知られている (Fulton, 1986, Goic & Saleh, 2012)。

自然環境下における野生植物とウイルスの相互作用を調べた研究はまだほとんどないが、実験室レベルでは多くの先行研究がある。ウイルスは種によって多様な遺伝子を持ち、それらが宿主への病原性を決定する要素となる (García & Pallás, 2015)。植物側も、遺伝子対遺伝子抵抗性 (gene-for-gene resistance, Flor, 1971, Greenberg, 1997, Hatsugai *et al.*, 2004, Jones & Dangl, 2006)、全身獲得抵抗性 (systemic acquired resistance, Ryals *et al.*, 1996)、RNA サイレンシング (RNA-silencing, Baulcombe, 2004) など様々な防御機構を備えている。植物の RNA サイレンシングは、ウイルスの RNA によって誘導される重要な防御機構であるが、いくつ

かのウイルスのグループは、植物の RNA サイレンシングを阻害するサプレッサーを生産しこれを抑制するカウンターディフェンス機構を持つ(Anandalakshmi *et al.*, 1998)。今後、このような仕組みによって、自然環境下ではどのような相互作用が成立しているのかを明らかにする必要がある。また、実際の野外条件においては、植物—ウイルスの関係は植物と他の生物との相互作用の影響も受ける。植物とウイルスだけでなく、昆虫などの媒介生物や菌類を含めた3者間の相互作用も近年注目されている。ウイルスの多くは伝播を媒介者に依存しており、その中でも昆虫は主要な媒介者である(Hogenhout *et al.*, 2008)。これらの昆虫が、非感染植物個体よりもウイルスに感染した植物個体に対しより多く惹きつけられることが報告されている(Moreno-Delafuente *et al.*, 2013, Blanc & Michalakis, 2016, Shalileh *et al.*, 2016)。この観察は、宿主植物により多く媒介者が訪れることで、ウイルスにとっての伝播機会が増加することを示唆している。また、植物の内生菌に感染するウイルスの存在が、高温環境にさらされる宿主植物の熱耐性に不可欠である例も報告されている(Marquez *et al.*, 2007)。

6. 宿主とウイルスの見えない攻防を観る

現時点の先行研究の多くは特定のウイルスに着目して行われているが、今後次世代シークエンシングの技術を活用した網羅的なウイルスの多様性解析・植物—ウイルス間相互作用の解析が進むことで、自然環境下での植物とウイルスの新しい関係が明らかになることが期待される。例えば、上述の筆者らのハクサンハタザオを用いた研究(Kamitani *et al.*, 2016)では、感染葉の透過型電子顕微鏡解析からはウイルスの複製時に特異的な封入体構造が観察され、ウイルスの活発な増殖が示唆されたが、ハクサンハタザオにおけるウイルスの感染は外部病徵のないもののが多かった(図2A)。ウイルスのリード数は最大で宿主の全 mRNA リード数の33倍にも達していた。これは即ち、もし非感染植物細胞内の rRNA, mRNA, その他の低分子 RNA が 87%, 3% 10% の割合で存在すると仮定すると, rRNA/mRNA の比が一定な場合、感染細胞ではウイルス RNA が細胞内全 RNA の 50% を占める計算になる(図2B)。

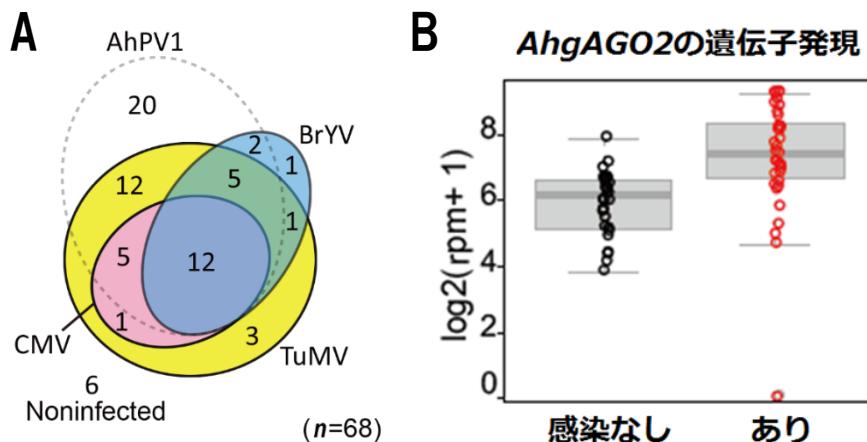


(図 2) A 野外で見られるハクサンハタザオにおけるウイルスの外部病徵のない感染。

上の2枚は複数のウイルスに感染した葉の拡大写真、下は TuMV 感染個体の開花の様子。**B** 非感染細胞と感染細胞における各 RNA 種と、感染ウイルス由来 RNA の計算上の割合のイメージ。

農作物や実験条件下においては、複数のウイルスの重複感染時に、宿主の病徵が激化することが知られている (Pruss *et al.*, 1997, Wintermantel, 2005, Tatineni *et al.*, 2010, Xia *et al.*, 2016)。しかし野外のハクサンハタザオにおいては、最大4種による重複感染が見られたものの外部病徵のない感染が多く観察された。重複感染は TuMV の感染葉に有意に多く観察された (図 3 A)。実験室での先行研究では TuMV は宿主の主要な対ウイルス防御機構である RNA サイレンシングのサプレッサータンパク質 (HC-Pro) をコードする遺伝子を持ち (Anandalakshmi *et al.*, 1998), 宿主内に重複感染した他のウイルスの増殖を促進することが報告されている (Pruss *et al.*, 1997, Fukuzawa *et al.*, 2010, Syller, 2012)。このため野外で見られた TuMV 感染葉への重複感染の偏りは、HC-Pro が宿主防御を抑制することにより他種のウイルスの侵入・感染を促進しているためではないかと考えられる。

宿主のトランスクリプトーム解析において、ウイルス感染葉で *AGO2* オーソログの発現が上昇した (図 3 B)。*AGO2* は、宿主の RNA サイレンシング経路においてウイルスゲノムの認識・分解を担う複合体 (RNA-induced silencing complex, RISC) のコンポーネントとして働くタンパク質であり (Schuck *et al.*, 2013), 発現上昇からは宿主のウイルス感染への応答が示唆される。一方で前述の TuMV による抑制はタンパク質レベルで RISC に対して働く (Kasschau & Carrington, 1998, Ivanov *et al.*, 2016)ため、宿主の発現レベルでの応答は起こっているものの、タンパク質レベルで HC-Pro がその働きを抑制していると示唆される。



(図 3) A それぞれのウイルスに感染したハクサンハタザオの個体数とその重複。各色の円がウイルスの種を表し、数字が植物の個体数を表す。B TuMV の感染／非感染サンプルにおける *AGO2* オーソログの発現。縦軸がリード数を表す。Kamitani *et al.* 2016 改変。

7. おわりに

RNA-Seq では、上述したウイルスの種数だけでなくゲノム配列も同時に解析可能である。実際に、筆者らのデータでも宿主葉サンプル内にウイルスの多型が確認されており、1つのウイルス種についても、宿主の中に多様性が潜んでいる可能性がある。本研究では、葉1枚～個体、集団レベルでのウイルス感染と宿主—ウイルス、ウイルス種間相互作用に着目したが、より小さなスケールや、他科の植物、地理的分布を含めた大きなスケールでの相互作用解析も興味深いテーマである。また、宿主のトランスクリプトーム解析についてもまだ改良の余地がある。トランスクリプトームはある時点における植物の状態の縮図であり、ウイルス感染に対する宿主応答の情報を含むと同時に、植物に内在するウイルスにとっての“環境”としての情報を含んでいる。これと同時にウイルス側の病原性の決定要素となるゲノム配列情報を合わせて得ることができる RNA-Seq は、野外におけるウイルス研究において非常に有用なツールである。今後、野外環境の様々なノイズを除くより洗練された解析により、野外における隠された植物—ウイルス相互作用が明らかにされていくことに期待する。さらに、シークエンシング技術の発展に伴い、ナノポア DNA シーケンサー (MinION) による、調査現場地でのリアルタイムのウイルス同定や、1細胞シークエンシングによる植物細胞スケールでの相互作用解析なども、近い将来に現実のものとなると考えられる。

8. 謝辞

ウイルスの研究を進めるにあたってご助言をいただきました、佐藤昌直博士(北海道大学)、厚見剛博士 (AIST) に、この場をお借りして御礼申しあげます。また、本稿で紹介した著者らの研究は、基盤 S (工藤洋, 26221106), JST さきがけ (永野惇), 日本学術振興会 特別研究員奨励金 (神谷麻梨, 15J00628) の支援を受けて行わされました。

9. 引用文献

- Anandalakshmi, R., Pruss, G.J., Ge, X., Marathe, R., Mallory, A.C., Smith, T.H. & Vance, V.B. 1998. A viral suppressor of gene silencing in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 95: 13079-13084.
- Antczak, J.B., Chmelo, R., Pickup, D.J. & Joklik, W.K. 1982. Sequences at both termini of the 10 genes of reovirus serotype 3 (strain Dearing). *Virology* 121: 307-319.
- Anzola, J.V., Xu, Z., Asamizu, T. & Nuss, D.L. 1987. Segment-specific inverted repeats found adjacent to conserved terminal sequences in wound tumor virus genome and defective interfering RNAs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 84: 8301-8305.
- Baulcombe, D. 2004. RNA silencing in plants. *Nature* 431: 356-363.
- Blanc, S. & Michalakis, Y. 2016. Manipulation of hosts and vectors by plant viruses and impact of the environment. *Curr. Opin. Insect Sci.* 16: 36-43.
- Blouin, A.G., Ross, H.A., Hobson-Peters, J., O'Brien, C.A., Warren, B. & MacDiarmid R. 2016. A new virus discovered by immunocapture of double-stranded RNA, a rapid method for virus M. Kamitani *et al.* - 7

- enrichment in metagenomic studies. *Mol. Ecol. Resour.* 16: 1255-1263.
- Breitbart, M. & Rohwer, F. 2005. Here a virus, there a virus, everywhere the same virus? *Trends Microbiol.* 13: 278-284.
- Brum, J.R., Ignacio-Espinoza, J.C., Roux, S., et al. 2015. Patterns and ecological drivers of ocean viral communities. *Science* 348: 1261498.
- Culley, A.I., Lang, A.S. & Suttle C.A. 2006. Metagenomic analysis of coastal RNA virus communities. *Science* 312: 1795-1798.
- Edwards, R.A. & Rohwer, F. 2005. Viral metagenomics. *Nature Rev. Microbiol.* 3: 504-510.
- Flor, H.H., 1971 Current status of the gene-for-gene concept. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 9: 275-296.
- Fraile, A. & Garcia-Arenal, F. 2016. Environment and evolution modulate plant virus pathogenesis. *Curr. Opin. Virol.* 17: 50-56.
- Fukuzawa, N., Itchoda, N., Ishihara, T., Goto, K., Masuta, C. & Matsumura, T. 2010. HC-Pro, a potyvirus RNA silencing suppressor, cancels cycling of Cucumber mosaic virus in Nicotiana benthamiana plants. *Virus Genes* 40: 440-446.
- Fulton, R.W. 1986. Practices and precautions in the use of cross protection for plant virus disease control. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 24: 67-81.
- García, J.A. & Pallás, V. 2015. Viral factors involved in plant pathogenesis. *Curr. Opin. Virol.* 11: 21-30.
- Goic, B. & Saleh, M.C. 2012. Living with the enemy: viral persistent infections from a friendly viewpoint. *Curr. Opin. Microbiol.* 15: 531-537.
- Greenberg, J.T. 1997. Programmed cell death in plant-pathogen interactions. *Annu. Rev. Plant Biol.* 48: 525-545.
- Hatsugai, N., Kuroyanagi, M., Yamada, K., Meshi, T., Tsuda, S., Kondo, M., Nishimura, M. & Hara-Nishimura, I. 2004. A plant vacuolar protease, VPE, mediates virus-induced hypersensitive cell death. *Science* 305: 855-858.
- Hogenhout, S.A., Ammar, el-D., Whitfield, A.E. & Redinbaugh M.G. 2008. Insect vector interactions with persistently transmitted viruses. *Annu. rev. phytopathol.* 46: 327-359.
- Hull, R. 2014. *Plant virology*. Elsevier Academic Press.
- Ivanov, K.I., Eskelin, K., Basic, M., De, S., Lohmus, A., Varjosalo, M. & Makinen, K. 2016. Molecular insights into the function of the viral RNA silencing suppressor HCPro. *Plant J.* 85: 30-45.
- Jones, J.D.G. & Dangl, J.L. 2006. The plant immune system. *Nature* 444: 323-329.
- Kamitani, M., Nagano, A.J., Honjo, M.N. & Kudoh, H. 2016. RNA-Seq reveals virus-virus and virus-plant interactions in nature. *FEMS Microbiol. Ecol.* 92: 11.
- Kasschau, K.D. & Carrington, J.C. 1998. A Counterdefensive Strategy of Plant Viruses. *Cell* 95: 461-470.
- Kristensen, D.M., Mushegian, A.R., Dolja, V.V. & Koonin, E.V. 2010. New dimensions of the virus M. Kamitani et al.-8

- world discovered through metagenomics. *Trends Microbiol.* 18: 11-19.
- Li, L., Liu, J., Zhang, Q., Fu, R., Zhu, X., Li, C. & Chen, J. 2016. Seed-borne viral dsRNA elements in three cultivated *Raphanus* and *Brassica* plants suggest three cryptoviruses. *Can. J. Microbiol.* 62: 287-295.
- Marquez, L.M., Redman, R.S., Rodriguez, R.J. & Roossinck, M.J. 2007. A virus in a fungus in a plant: three-way symbiosis required for thermal tolerance. *Science* 315: 513-515.
- May, R.M. & Anderson, R.M. 1983. Epidemiology and genetics in the coevolution of parasites and hosts. *Proc. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 219: 281-313.
- Mertens, P. & Sangar, D. 1985. Analysis of the terminal sequences of the genome segments of four orbiviruses. *Virology* 140: 55-67.
- Moreno-Delafuente, A., Garzo, E., Moreno, A. & Fereres, A. 2013. A Plant Virus Manipulates the Behavior of Its Whitefly Vector to Enhance Its Transmission Efficiency and Spread. *PLoS ONE* 8: e61543.
- Morlan, J.D., Qu, K. & Sinicropi, D.V. 2012. Selective Depletion of rRNA Enables Whole Transcriptome Profiling of Archival Fixed Tissue. *PLoS ONE* 7: e42882.
- Nagano, A.J., Honjo, M.N., Mihara, M., Sato, M. & Kudoh, H. 2015. Detection of plant viruses in natural environments by using RNA-Seq. *Methods Mol. Biol.* 1236: 89-98.
- Nishimura, Y., Watai, H., Honda, T., et al. 2017. Environmental Viral Genomes Shed New Light on Virus-Host Interactions in the Ocean. *mSphere* 2.
- Paez-Espino, D., Eloe-Fadrosh, E.A., Pavlopoulos, G.A., Thomas, A.D., Huntemann, M., Mikhailova, N., Rubin, E., Ivanova N.N. & Kyrpides, N.C. 2016. Uncovering Earth's virome. *Nature* 536: 425-430.
- Pruss, G., Ge, X., Shi, X.M., Carrington, J.C. & Bowman, V.V. 1997. Plant viral synergism: the potyviral genome encodes a broad-range pathogenicity enhancer that transactivates replication of heterologous viruses. *Plant Cell* 9: 859-868.
- Remold, S.K. 2002. Unapparent virus infection and host fitness in three weedy grass species. *J. Ecol.* 90: 967-977.
- Rist, D.L. & Lorbeer, J.W. 1989. Occurrence and overwintering of cucumber mosaic virus and broad bean wilt virus in weeds growing near commercial lettuce fields in New York. *Phytopathology*. 79: 65-69.
- Roossinck, M.J. 2011. The big unknown: plant virus biodiversity. *Curr Opin Virol* 1: 63-67.
- Roossinck, M.J. 2012. Plant virus metagenomics: biodiversity and ecology. *Annu. Rev. Genet.* 46: 359-369.
- Roossinck, M.J., Saha P., Wiley G.B., Quan J., White J.D., Lai H., Chavarria F., Shen G. & Roe B.A. 2010. Ecogenomics: using massively parallel pyrosequencing to understand virus ecology. *Mol. Ecol.* 19: 81-88.
- Ryals, J.A., Neuenschwander, U.H., Willits, M.G., Molina, A., Steiner, H.Y. & Hunt, M.D. 1996. Systemic acquired resistance. *Plant Cell* 8: 1809.

- Schuck, J., Gursinsky, T., Pantaleo, V., Burgyán, J. & Behrens, S.E. 2013. AGO/RISC-mediated antiviral RNA silencing in a plant *in vitro* system. *Nucleic Acids Res* gkt193.
- Shalileh, S., Ogada, P.A., Moualeu, D.P. & Poehling, H.M. 2016. Manipulation of *Frankliniella occidentalis* (Thysanoptera: Thripidae) by *Tomato Spotted Wilt Virus* (Tospovirus) Via the Host Plant Nutrients to Enhance Its Transmission and Spread. *Ecol. Entomol.* 45: 1235-1242.
- Shi, M., Lin, X.D., Tian, J.H., et al. 2016. Redefining the invertebrate RNA virosphere. *Nature* advance online publication.
- Suttle, C.A.. 2005. Viruses in the sea. *Nature* 437: 356-361.
- Suttle, C.A. 2007. Marine viruses - major players in the global ecosystem. *Nat. Rev. Micro.* 5: 801-812.
- Syller, J. 2012. Facilitative and antagonistic interactions between plant viruses in mixed infections. *Mol. Plant. Pathol.* 13: 204-216.
- Tatineni, S., Graybosch, R.A., Hein, G.L., Wegulo, S.N. & French, R. 2010. Wheat Cultivar-Specific Disease Synergism and Alteration of Virus Accumulation During Co-Infection with Wheat streak mosaic virus and Triticum mosaic virus. *Phytopathology* 100: 230-238.
- Thingstad, T.F. 2000. Elements of a theory for the mechanisms controlling abundance, diversity, and biogeochemical role of lytic bacterial viruses in aquatic systems. *Limnol. Oceanogr.* 45: 1320-1328.
- Urayama, S.I., Takaki, Y. & Nunoura, T. 2016. FLDS: A Comprehensive dsRNA Sequencing Method for Intracellular RNA Virus Surveillance. *Microbes Environ.* 31: 33-40.
- Wintermantel, W.M. 2005. Co-infection of Beet mosaic virus with Beet Yellowing Viruses Leads to Increased Symptom Expression on Sugar Beet. *Plant Dis.* 89: 325-331.
- Wren, J.D., Roossinck, M.J., Nelson, R.S., Scheets, K., Palmer, M.W. & Melcher, U. 2006. Plant Virus Biodiversity and Ecology. *PLoS Biol.* 4: e80.
- Xia, Z., Zhao, Z., Chen, L., Li, M., Zhou, T., Deng, C., Zhou, Q. & Fan, Z. 2016. Synergistic infection of two viruses MCMV and SCMV increases the accumulations of both MCMV and MCMV-derived siRNAs in maize. *Sci. Rep.* 6: 20520.
- Xu, P., Chen, F., Mannas, J.P., Feldman, T., Sumner, L.W. & Roossinck, M.J. 2008. Virus infection improves drought tolerance. *New. Phytol.* 180: 911-921.

イメージング技術を駆使して植物寄生性線虫の感染を捉える

大津 美奈¹, 栗原 大輔¹², 東山 哲也¹²³

¹名古屋大学大学院 理学研究科

〒464-8602 愛知県名古屋市千種区不老町

²JST・ERATO 東山ライブホロニクスプロジェクト

〒464-8602 愛知県名古屋市千種区不老町

³名古屋大学 トランスフォーマティブ生命分子研究所

〒464-8601 愛知県名古屋市千種区不老町

In planta deep-imaging of plant - plant-parasitic nematode interaction
using cutting edge imaging methods

Mina Ohtsu¹, Daisuke Kurihara¹², Tetsuya Higashiyama¹²³

¹Graduate School of Science, Nagoya University, Furo-cho, Chikusa-ku, Nagoya, Aichi 464-8402,
Japan

²Higashiyama Live-Holonics Project, ERATO, JST, Furo-cho, Chikusa-ku, Nagoya, Aichi 464-8602,
Japan

³Institute of Transformative Bio-Molecules (ITbM), Nagoya University, Furo-cho, Chikusa-ku, Nagoya,
Aichi 464-8601, Japan

Key words: plant-parasitic nematode, *in planta* deep imaging, two-photon excitation microscopy,
plant-microbe interaction

DOI: 10.24480/bsj-review.8a1.00109

1. はじめに

微生物の感染によって、宿主植物内部の組織では驚くような変化が起きている。その一例として、植物の根に寄生する植物寄生性線虫ネコブセンチュウが誘導する「巨大細胞」や、シストセンチュウが誘導する「合胞体」の形成が挙げられる(図1)。これらの線虫によって誘導され形成される組織は、根の内部に形成されるため、外部から観察することは非常に難しく、これまでの研究では主に切片を用いた観察が行われていた。しかし、その形態や形成メカニズムを詳細に理解するためには、感染組織の時間的、空間的な情報が必要不可欠である。しかしながら、植物細胞の形状の違いによる光の屈折や散乱、また励起光や蛍光を遮る様々な内在性化合物の存在などにより、植物の深部を観察するのは非常に困難である。近年、植物組織に最適化した透明化試薬 ClearSee や TOMEI の開発により、植物深部イメージングは大幅に進歩している(Kurihara et al. 2015, Hasegawa et al. 2016)。さらに、植物の深部観察を行うために、低浸襲性や深部到達性といった生体イメージングに適した特徴を持つ、2光子励起顕微鏡が活用されている。本稿では、最新鋭の植物深部イメージング技術を駆使した、植物寄

生性線虫が誘導する巨大細胞や合胞体のホールマウントイメージングやライブイメージングについて紹介したい。

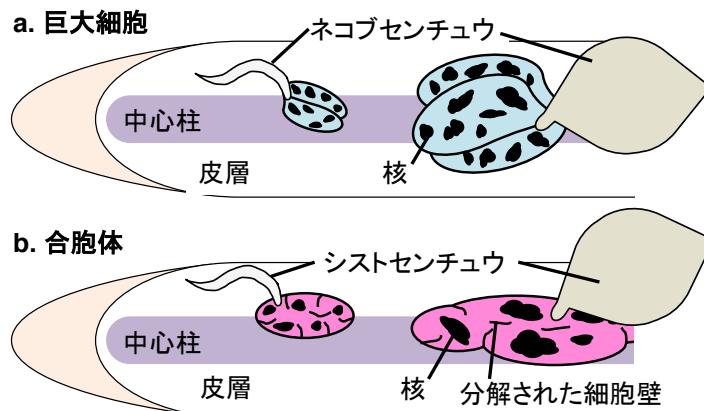


図1 巨大細胞と合胞体

- a. ネコブセンチュウは、宿主の根に侵入すると、柔細胞に細胞質分裂を伴わない核分裂を複数回起こさせ、巨大細胞の形成を誘導する。巨大細胞には巨大化した核が多数含まれる。
- b. シストセンチュウは、宿主の根に侵入すると、皮層や中心柱内部の細胞の細胞壁を部分的に分解させ、隣合う細胞同士を細胞融合させることによって、合胞体の形成を誘導する。多核の巨大な細胞である。合胞体にも巨大化した核が多数含まれる。

2. 植物寄生性線虫感染組織の3次元イメージング

2-1. ネコブセンチュウが誘導する巨大細胞の3次元イメージング

ネコブセンチュウが誘導する巨大細胞は、3~10個の柔細胞が細胞質分裂を伴わない核分裂を複数回起こすことにより形成される、細胞質に富んだ多核の大きな細胞である (Bird 1961)。これまでに、感染組織の切片観察によってネコブセンチュウの巨大細胞には、アメーバ状に肥大化した核が多数存在すること、また核分裂を伴わずにDNA增幅が起こるエンドレデュプリケーションが頻繁に起こることが明らかになっている (Bird 1961, de Almeida Engler et al. 2012)。これまでに、シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*)において、エンドレデュプリケーションのエンハンサーをコードする CCS52 のノックダウン、またはサプレッサーをコードする *KRP4* の過剰発現は、サツマイモネコブセンチュウ (*Meloidogyne incognita*) が誘導する巨大細胞の肥大化を阻害することが知られており、巨大細胞の細胞体積の増加にはエンドレデュプリケーションのようなDNA增幅機構が関与していることが示唆されている (de Almeida Engler et al. 2012, Vieira et al. 2011, Vieira et al. 2012)。

これまでに、ホールマウント mRNA ハイブリダイゼーションの技術を応用したイメージング技術によって、巨大細胞の核とそれを誘導するネコブセンチュウの身体を捉えられるようになり、これまで切片観察では難しかった各々の巨大細胞を誘導しているネコブセンチュウの成長ステージを容易に同定することが可能になっている (Vieira et al. 2012)。さらに、近年、透明化試薬 TOMEI を用いて、サツマイモネコブセンチュウの感染によってシロイヌナズナの根に誘導された、巨大細胞の細胞膜および核のホールマウントイメージングが行われた (Hasegawa et al. 2016)。TOMEI は、固定した組織を高屈折率をもつ 2,2'-チオジエタノールにより組織を置換し、透明化する手法である。細胞膜と核のホールマウントイメージングによって、3次元で巨大細胞内構造を観察することができるため、DNA含量と細胞体積の定量解析を行うことが可能となり、核内のDNA含量が細胞の体積と正の相関関係にあるということが初めて検証された (Hasegawa et al. 2016)。シロイヌナズナにおいて、分裂細胞は主に細胞質量の増加を介して細胞伸長が起こるが、分化した細胞では液胞容積の増加を介して細胞が伸長することが知られている (Sablowski & Carnier Dornelas 2014)。これまでの切片観察の結果から、発達した

巨大細胞では、大きく発達した液胞は見られず、小さい液胞が散在しており、電子密度の高い細胞質が多くの割合を占めることが明らかになっている (Bird 1961)。従来の切片観察と3次元イメージングを組み合わせることによって、ネコブセンチュウはデンプンなどの養分を効率よく貯蔵できるように、液胞を膨張させるのではなく、細胞質を増加させるエンドレデュプリケーションによって細胞体積を増加させる可能性が示唆された。

2-2. シストセンチュウが誘導するパルテノン神殿様細胞壁の3次元イメージング

一つの細胞が発達して形成される巨大細胞とは違い、シストセンチュウが誘導する合胞体は、宿主根の細胞壁が部分的に分解され、隣り合う細胞同士が細胞融合することによって形成される、多核の巨大な細胞である (Golinowski et al. 1996)。これまでに、合胞体の細胞壁分子構造を理解するため、細胞壁成分を標識する複数の抗体を用いた合胞体切片の免疫染色が行われており、テンサイシストセンチュウ (*Heterodera schachtii*) がシロイヌナズナの根に誘導する合胞体の細胞壁には、メチル化されたペクチンやアラビノガラクタンタンパク質など通常の細胞壁とは異なる成分が含まれることや、二次細胞壁の成分であるキシランが含まれないことなどが明らかになっている (Davies et al. 2012)。しかしながら、細胞壁の部分的な分解により形成された合胞体細胞壁の三次元構造については、ほとんど明らかとなっていなかった。

著者らは最近、シストセンチュウにより部分的に分解された細胞壁の三次元構造を調べるため、植物用の透明化試薬である ClearSee (Kurihara et al. 2015) と深部イメージングに適した2光子励起顕微鏡を用いて、詳細な顕微鏡観察を行った。2光子励起顕微鏡は、光源として組織透過性の高い近赤外レーザーを用いるため、深部観察に優れている。また、ClearSee は固定した組織を、界面活性剤・尿素・キシリトールからなる混合液に置換することによって、クロロフィルを取り除き、透明化する手法である。これらを組み合わせることによって、シロイヌナズナでは 400 μm を超えるめしへのような器官でも丸ごとの観察が可能である (Kurihara et al., 2015, 栗原 2016)。ダイズシストセンチュウ (*Heterodera glycines*) が宿主となるレンゲ (*Astragalus sinicus*) に感染した根を ClearSee により透明化し、誘導された合胞体の細胞壁を2光子励起顕微鏡により三次元的に解析したところ、合胞体を構成する細胞は肥厚した柱状の細胞壁に取り囲まれており、パルテノン神殿のような形態であることが示された (図 2)。また、合胞体の細胞壁を様々な角度から観察したところ、この柱状の細胞壁は、植物の生長方向に対して平行な細胞壁には見られるが、植物の生長方向に対して垂直な細胞壁には見られないことから、シストセンチュウは一定のパターンで細胞壁の分解と再

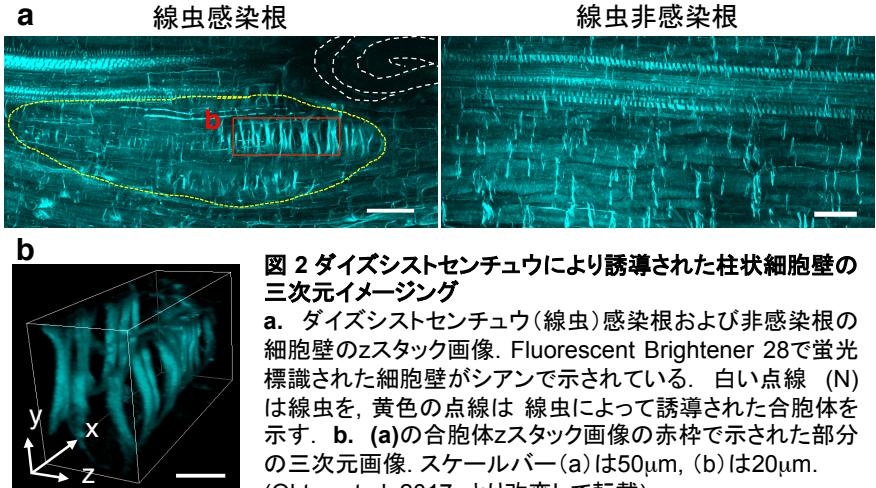


図 2 ダイズシストセンチュウにより誘導された柱状細胞壁の3次元イメージング
a. ダイズシストセンチュウ(線虫)感染根および非感染根の細胞壁のzスタック画像。Fluorescent Brightener 28で蛍光標識された細胞壁がシアンで示されている。白い点線 (N) は線虫を、黄色の点線は 線虫によって誘導された合胞体を示す。b. (a)の合胞体zスタック画像の赤枠で示された部分の三次元画像。スケールバー(a)は50 μm , (b)は20 μm 。
(Ohtsu et al. 2017aより改変して転載)

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 (Ohtsu et al. 2017a)。合胞体の細胞壁三次元イメージングによって捉えられた柱状の細胞壁構造は、導管要素に特徴的な細胞壁のパターンに似通っている (図2)。植物の導管要素の網目状やリング状の独特的なパターンは、表層微小管によって決定されている (Paredes et al. 2006)。実際に、これまでに微小管関連遺伝子が合胞体の周辺で高発現していることや、微小管の重合阻害剤であるタキソール処理によって、合胞体の拡大が抑制されることが報告されており (de Almeida Engler et al. 2004)，柱状の細胞壁の形成には、導管要素と同様に表層微小管の配向が関与する可能性が考えられる。しかしながら、並層の細胞壁にのみ柱状細胞壁が存在すること、また合胞体の細胞壁には、導管要素の細胞壁に多く含まれる二次細胞壁の要素であるキシランなどが含まれないことが示されている (Davies et al. 2012)。さらに、篩部に形成される篩孔と同様に、初期の合胞体ではプラズモデスマータが広がることで細胞壁に穴が生じ、細胞同士が融合すると示唆されている (Golinowski et al. 1996)。以上のことから、シストセンチュウは合胞体を形成するために、導管要素や篩部のパターン形成メカニズムを部分的にハイジャックすることで、合胞体形成に必須な細胞壁の部分的な分解、そして細胞融合を誘導する可能性が示唆された。

3. 植物寄生性線虫の感染過程のライブイメージング

上記で述べてきた透明化試薬による3次元イメージングは、固定組織を用いた観察であり、高い空間分解能を有しているが、時間情報を失ってしまっている。そのため、宿主植物感染時の植物寄生性線虫の感染行動や宿主組織のダイナミックな変化をリアルタイムに捉えるために、植物組織深部のライブイメージングが試みられてきた。

植物寄生性線虫は蛍光色素を体内に取込む特性があるため、生体の細胞質中で蛍光を発する蛍光色素FDAを用いて染色した線虫を感染させて、根の内部に侵入した線虫の可視化が行われている (Goto et al. 2010)。さらに、植物寄生性線虫を脂質親和性の蛍光色素PKH26で標識し、特殊なチャンバー内のシロイヌナズナの根に感染させ、その感染行動を観察できる非破壊イメージングシステムが確立されている (Dinh et al. 2014)。この方法により、3種類の植物寄生性線虫、キタネグサレセンチュウ (*Pratylenchus penetrans*)、コロンビアネコブセンチュウ (*Meloidogyne chitwoodi*) およびテンサイシストセンチュウの宿主根内部での感染行動が観察され、線虫の長期にわたる非破壊的な観察に成功している (Dinh et al. 2014)。しかしながら、モデル植物の代表といえるシロイヌナズナの細い根においても、共焦点顕微鏡では根の深部の線虫を明瞭に観察することは容易ではない。

植物寄生性線虫の感染過程をより明瞭にライブイメージングするためには、まず植物寄生性線虫を強く蛍光標識できる蛍光色素が必要である。以前から用いられているFDAやPKH26は、植物寄生性線虫を染色することは可能だが (Goto et al. 2010, Dinh et al. 2014)，線虫の身体がスポット状に染色される。著者らは最近、細胞膜染色色素FM4-64およびDNA染色色素SYBR Green Iを用いることで、ダイズシストセンチュウの全身もしくは頭部が強く蛍光標識できることを見いたした (Ohtsu et al. 2017b)。ネコブセンチュウやシストセンチュウは、頭部にある口針を細胞に突き刺して感染組織形成を開始するため (Bird 1961, Wyss & Zunke 1986)，巨大細胞や合胞体はシストセンチュウの頭部付近から形成されると考えられる。また、植物の機能をかく乱するエフェクター因子は口針を介して分泌されるため (Haegeman et al. 2012, Hewezi & Baum 2013)，植物寄生性線虫の頭部を観察することは非常に

重要である。

植物組織深部のライブイメージングでは、深部の蛍光シグナルが微弱なため、励起光を長期間照射する必要があり、植物寄生性線虫に重篤なダメージを与えててしまう恐れがある。多光子励起システムと近赤外パレスレーザーを使用する2光子励起顕微鏡は、植物組織においても低侵襲で深部イメージングが可能なため (Mizuta et al., 2015, 栗原 2016), 植物寄生性線虫への損傷を最小限に抑え、植物組織の深部イメージングに適していると考えられた。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2光子励起顕微鏡で観察した結果、シロイヌナズナより太いレンゲの根の深部に感染するシストセンチュウをリアルタイムで明瞭に観察できることが明らかとなった (Ohtsu et al. 2017b, 図3)。シロイヌナズナにおいて、シストセンチュウが誘導する合胞体で高発現する遺伝子のプロモーターにより蛍光タンパク質を発現させる、合胞体レポーターを用いた解析が行われている。この解析法は、生きた根における合胞体の位置の特定や合胞体の有無の判別するために用いられており、細胞壁の部分的な分解など合胞体内部の構造変化は観察できていない (Juergensen et al. 2003, Siddique et al. 2015)。今後は、合胞体レポーターを発現させた植物体に蛍光標識したシストセンチュウを感染させ、2光子励起顕微鏡を用いて観察することによって、感染部位の同定だけでなく、シストセンチュウによって誘導される核や細胞壁の形態的変化をリアルタイムに観察することが可能になると考えられる。

4. 展望

植物寄生性線虫と植物の相互作用に限らず、植物と微生物の相互作用を理解するためには、感染過程をリアルタイムに捉えるライブイメージング、および感染部位を全体的に捉えられるホールマントイメージング、すなわち時空間的イメージングシステムが必要不可欠である。しかしながら、微生物の感染部位は植物内部であることが多い、時空間的イメージングを行うことは非常に難しい。

本稿で紹介した2光子励起顕微鏡や透明化試薬を用いる深部イメージング技術は、植物—微生物間相互作用の現場を深部イメージングにより可視化する手法を提示したモデルケースとなる研究である。これらのイメージング技術を駆使することで、薄層切片を用いた解析では難しかったネコブセンチュウの肥大化した核の三次元構造が明らかになった。また、シストセンチュウが誘導する合胞体の細胞壁の3次元的な構造を捉えることで、合胞体の持つ形態的特徴から合胞体形成メカニズムに迫ることが可能になった。さらに、2光子励起顕微鏡と蛍光色素を用いることでマメ科植物の根の深部に寄生する植物寄生性線虫を生きたまま長時間観察することに成功している。これらのイメージング技術を駆使することで、植物寄生性線虫と植物との相互作用のみならず、他の様々な生物と植物との相互作用における感染組織の3次元構造や、感染過程のダイナミックな変化に関する新たな知見が得られる

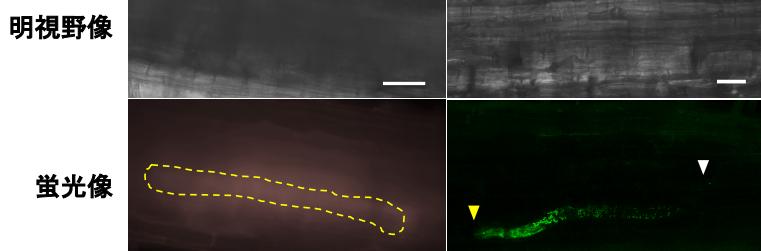


図3 レンゲの根における1光子顕微鏡像と2光子顕微鏡像
ダイズシストセンチュウ(線虫)を、SYTOX Orangeまたは、SYBR Green Iを用いて暗所で一晩染色した後、レンゲの根に接種した。接種から2日後、レンゲの根の深部に感染した線虫を1光子顕微鏡および2光子顕微鏡を用いて観察した。黄色い点線は線虫を示している。黄色い矢尻は線虫の頭部を、白い矢尻は尾部を示している。スケールバーは、50 μm. (Ohtsu et al. 2017b より改変して転載)

ものと期待される。

引用文献

- Bird, A. F. 1961. Ultrastructure and histochemistry of a nematode-induced giant cell. *J Biophys. Biochem. Cytol.* 11: 701–715.
- Davies, L. J., Lilley, C. J., Knox, P. J. & Urwin, P. E. 2012. Syncytia formed by adult female *Heterodera schachtii* in *Arabidopsis thaliana* roots have a distinct cell wall molecular architecture. *New Phytol.* 196: 238–246.
- de Almeida Engler, J., Van Poucke, K., Karimi, M., De Groodt, R., Gheysen, G., Engler, G. & Gheysen, G. 2004. Dynamic cytoskeleton rearrangements in giant cells and syncytia of nematode-infected roots. *Plant J.* 38:12-26.
- de Almeida Engler, J., Kyndt, T., Vieira, P., Van Cappelle, E., Boudolf, V., Sanchez, V., Escobar, C., De Veylder, L., Engler, G., Abad, P. & Gheysen, G. 2012. *CCS52* and *DEL1* genes are key components of the endocycle in nematode-induced feeding sites. *Plant J.* 72: 185-198.
- Dinh, P. T., Knoblauch, M. & Elling, A. A. 2014. Nondestructive imaging of plant-parasitic nematode development and host response to nematode pathogenesis. *Phytopathology* 104: 497-506.
- Golinowski, W., Grundler, F. M. W. & Sobczak, M. 1996. Changes in the structure of *Arabidopsis thaliana* during female development of the plant-parasitic nematode *Heterodera schachtii*. *Protoplasma* 194: 103–116.
- Goto, D. B., Fosu-Nyarko, J., Sakuma, F., Sadler, J., Flottman-Reid, M., Uehara, T., Kondo, N., Yamaguchi, J. & Jones, M. G. K. 2010. In Planta observation of live fluorescent plant endoparasitic nematodes during early stages of infection. *Nematological Research* 40: 15-19.
- Haegeman, A., Mantelin, S., Jones, J. T. & Gheysen, G. 2012. Functional roles of effectors of plant-parasitic nematodes. *Gene* 492: 19-31.
- Hasegawa, J., Sakamoto, Y., Nakagami, S., Aida, M., Sawa, S. & Matsunaga, S. 2016. Three-dimensional imaging of plant organs using a simple and rapid transparency technique. *Plant Cell Physiol.* 57: 462-472.
- Hewezi, T. & Baum, T. J. 2013. Manipulation of plant cells by cyst and root-knot nematode effectors. *Mol. Plant Microbe Interact.* 26: 9-16.
- Juergensen, K., Scholz-Starke, J., Sauer, N., Hess, P., van Bel, A. J. & Grundler, F. M. 2003. The companion cell-specific *Arabidopsis* disaccharide carrier AtSUC2 is expressed in nematode-induced syncytia. *Plant Physiol.* 131: 61-69.
- Kurihara, D., Mizuta, Y., Sato, Y. & Higashiyama, T. 2015. ClearSee: a rapid optical clearing reagent for whole-plant fluorescence imaging. *Development* 142: 4168-4179.
- Mizuta, Y., Kurihara, D. & Higashiyama, T. 2015. Two-photon imaging with longer wavelength excitation in intact *Arabidopsis* tissues. *Protoplasma* 252:1231-1240.
- Ohtsu, M., Sato, Y., Kurihara, D., Suzuki, T., Kawaguchi, M., Maruyama, D. & Higashiyama, T. 2017a. Spatiotemporal deep-imaging of syncytium induced by the soybean cyst nematode *Heterodera glycines*. *Protoplasma* 10.1007/s00709-017-1105-0
- Ohtsu, M., Kurihara, D., Sato, Y., Suzuki, T., Kawaguchi, M., Maruyama, D. & Higashiyama, T. 2017b. Fluorescent labeling of the cyst nematode *Heterodera glycines* for deep tissue live imaging. *Cytologia* in press.

- Paredes, A. R., Somerville, C. R. & Ehrhardt, D. W. 2006. Visualization of cellulose synthase demonstrates functional association with microtubules. *Science* 312:1491-1495.
- Sablowski, R. & Carnier Dornelas, M. 2014. Interplay between cell growth and cell cycle in plants. *J. Exp. Bot.* 65: 2703–2714.
- Siddique, S., Radakovic, Z. S., De La Torre, C. M., Chronis, D., Novák, O., Ramireddy, E., Holbein, J., Matera, C., Hütten, M., Gutbrod, P., Anjam, M. S., Rozanska, E., Habash, S., Elashry, A., Sobczak, M., Kakimoto, T., Strnad, M., Schmülling, T., Mitchum, M. G. & Grundler, F. M. 2015. A parasitic nematode releases cytokinin that controls cell division and orchestrates feeding site formation in host plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 112:12669-16674.
- Vieira, P., Danchin, E. G. J., Neveu, C., Crozat, C., Jaubert, S., Hussey, R. S., Engler, G., Abad, P., de Almeida Engler, J., Castagnone-Sereno, P. & Rosso, M. N. 2011. The plant apoplasm is an important recipient compartment for nematode secreted proteins. *J. Exp. Bot.* 62:1241-1253.
- Vieira, P., Engler, G. & de Almeida Engler, J. 2012. Whole-mount confocal imaging of nuclei in giant feeding cells induced by root-knot nematodes in *Arabidopsis*. *New Phytol.* 195: 488-496.
- Wyss, U. & Zunke, U. 1986. Observations on the behavior of second stage juveniles of *Heterodera schachlii* inside host roots. *Rev. Nématol.* 9: 153-165.
- 栗原大輔 2016. 植物研究における2光子励起顕微鏡の活用. BSJ-Review 7: 124-130.

植物と微生物の攻防を電子顕微鏡で捉えるには？

佐藤繩子, 成川篠崎苗子, 豊岡公徳

国立研究開発法人理化学研究所 環境資源科学研究中心

質量分析・顕微鏡解析ユニット

230-0045 神奈川県横浜市鶴見区末広町 1-7-22

How to take electron micrographs of fighting plants vs microbe

Mayuko Sato, Naeko Shinozaki-Narikawa, Kiminori Toyooka

RIKEN Center for Sustainable Resource Science

Suehiro-cho 1-7-22, Tsurumi-ku, Yokohama, Kanagawa 230-0045, Japan

Key words: CLEM, Electron microscopy, FE-SEM, GFP, TEM

DOI: 10.24480/bsj-review.8a1.00110

1. はじめに

光学顕微鏡技術の発達により、蛍光タンパク質や蛍光色素を用いて表皮細胞などに感染した細菌や菌、ウイルスを生きた状態で明確に捉えられるようになり、植物体への微生物の侵入経路や、植物と微生物との攻防が可視化できるようになりつつある。さらにより微細なレベルの形態を捉えるためには、電子顕微鏡法(電顕)が最適なツールである。電顕は生命現象を細胞・オルガネラレベルの高分解能で捉えることに長けている一方、器官・組織レベルの広い領域から、植物と微生物の攻防の場を探し出すことは不得手である。当研究室では、植物の細胞内生命現象を器官・組織レベルの広域に渡って高解像度で捉えるために、ミクロからマクロを繋ぐ二つの技術を開発している。この二つの技術、(1)器官・組織レベルの広域に渡る透過電顕像の取得・画像統合を可能とした「広域透過電顕像取得システム」と、(2)GFPなどの蛍光タンパク質で標識した細胞・オルガネラの超微形態を、高分解能走査電顕で可視化する「蛍光タンパク質-走査電子顕微鏡法」について解説し、植物と微生物との攻防を電顕レベルで可視化するための方法を議論したい。

2. 広域透過電顕像取得システム

これまで筆者らが植物の様々な器官・組織・細胞の電顕観察を行ってきたなかで、器官・組織全体をカバーする超微細構造の報告が少ないことが常に問題となつた。そのため、組織ごとに細胞やオルガネラの形態が大きく異なる場合の微細構造比較、野生型と変異型間での微細構造比較、また環境変化に伴うオルガネラ変化などの電顕解析が、難しいことがあつた。そのような経緯から、広域的に器官・組織・細胞の電顕像を撮影するシステムの必要性を感じていた。

近年では電動ステージやデジタルカメラが当たり前の時代になったが、2000年頃までは試料X-Yステージの移動が手動式回転ノブのみであつたり、画像撮影はフィルムカメラのみであつたりと、アナ

ログ制御の透過電子顕微鏡(TEM)が主であった。近年、電顕観察の作業の多くがデジタル制御可能になったことで、TEM像を自動撮影する環境が整った。我々が使用しているTEM(JEOL JEM-1400)は、電動X-Yステージを備え、偏向コイルで電子ビームをコントロールすることで最大縦5枚×横5枚の計25枚を撮影し、像を結合するオートモンタージュ撮影機能を標準装備している。しかし、偏向コイルによる制御のみでは、ごく限られた領域しか撮影できないため、より広い領域を撮影する場合はステージを移動させる必要がある。そこで画像情報解析を専門とする研究者と顕微鏡企業の協力により「広域TEM像自動取得システム」の開発を行った(豊岡2014)。

広域TEM像自動取得システムは、(1)広域TEM像自動撮影システムと、(2)広域TEM像タイリングプログラムで構成されている(図1)。(1)は、外部制御コンピューターによりTEM本体をスクリプト制御し、X-Yステージを動かしながら、電顕像を連続的に「自動撮影」するシステムである(図1左)

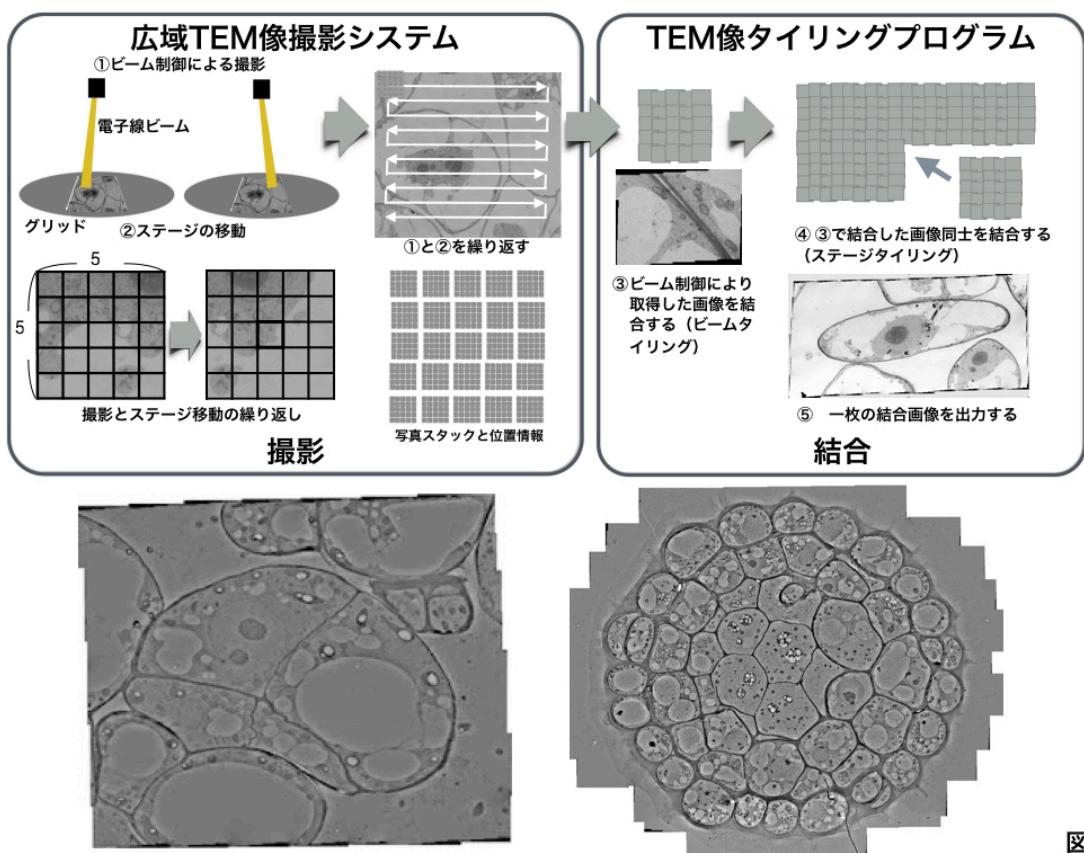


図1

上)。(2)は、撮影したこれら大量の連続画像を、位置情報とのりしろ部分の画像情報を用いて「自動結合」し、連結した1枚の大きな写真を生成するプログラムである(図1右上)。このシステムを用いて、タバコ培養細胞BY-2株やシロイヌナズナの各器官の、ギガピクセルクラスの広域TEM像取得に成功しており、例えば、BY-2株の増殖期および定常状態期におけるオルガネラの超微形態変化を明らかにしている(Toyooka et al. 2014, 2016)。また、シロイヌナズナ培養細胞(図1左下)やシロイヌナズナ根端組織(図1右下)などを広域撮影することで、細胞内オルガネラの分布の違いも分かりつつある。

近年、連続試料切削面を走査電顕で観察することにより、広域かつ3次元の電顕像が得られるようになってきた(Lidke & Lidke 2012)。しかし、非常に高価な機器が必要であり、いかに像のコントラストを上げるか、また、膨大な画像データをどのように扱うかなど問題点も多い。広域TEM像撮影シ

ステムは、CCD カメラと電動ステージを搭載した TEM であれば、我々が開発したスクリプトを実行するだけで広域に渡って TEM 画像を取得できる。また、このような広域撮影システムを搭載した TEM が各顕微鏡メーカーからも販売され始めており、高解像度かつ広域での電顕像撮影は容易になってきている。

植物と微生物の相互作用の“場”は領域が限られる。例えば、炭疽病菌の吸器が表皮細胞に侵入しているところを TEM 像として見たい場合は、通常の TEM 観察ではその“場”を探し出すことは容易ではないが、高解像度かつ広域で撮影することで、吸器と細胞が接しているその場を捉えられる可能性が高くなると期待される。また、広域で撮影することで、侵入・感染した微生物周辺の植物細胞や組織の状態を、全体的に把握することが容易となるであろう。

3. 蛍光タンパク質-走査電子顕微鏡法

近年、網羅的な解析や遺伝学による機能解析などにより様々な遺伝子が見出され、それら遺伝子産物を蛍光タンパク質で標識することで、容易にタンパク質の細胞内局在や動態を観察できるようになった。そして、既知のオルガネラ局在タンパク質との共発現解析や阻害剤等の解析により、標的タンパク質が局在するオルガネラを推定することが可能になってきている。我々は、標的タンパク質-蛍光タンパク質の融合タンパク質の細胞内局在を電顕レベルで解析したい場合、抗 GFP 抗体など蛍光タンパク質に対する抗体を用いた免疫電顕法により推定している。しかし、免疫電顕法で反応のあつた構造物が、本当に蛍光を発するものと同じ構造体であるか断定することは難しく、推定することしかできないのが実状である。“推定”から“特定”にステップアップするためには、GFP などの蛍光を観察したのと全く同じ試料を電顕観察すべきである。それを可能とする技術が、光顕像と電顕像で相關を取る光電子相関顕微鏡法(Correlative light and electron microscopy: CLEM 法)である(de Boer et al. 2015)。

これまでに CLEM 法のプロトコルや手法をまとめた多くの本が出版されている(Muller-Reichert & Verkade 2014)が、以下の手順で行われることが一般的である。まずアドレス付き格子模様のあるカバーガラス上に細胞を接着させ、蛍光顕微鏡により GFP または蛍光二次抗体の蛍光像を撮影しておく。ガラス接着したまま、細胞を固定・脱水し、エポキシ樹脂で倒立包埋する。アドレスを参考に、蛍光観察したのと同一箇所で超薄切片を作製し、TEM 撮影する方法である(Liss & Hensel 2015)。近年、CLEM 解析機器の技術革新も進み、蛍光顕微鏡ユニットが搭載された TEM や、光顕と電顕で試料ホルダーを共通化することでシームレスに相關像を得られる CLEM 機器などが、各メーカーから発売され、以前に比べ容易に CLEM 解析ができるようになってきている。しかし、これらのアプリケーションや機器の多くは、ガラスに接着しない植物組織や植物培養細胞の解析には適さないものが多い。例えば、シロイヌナズナの葉を蛍光観察したのち、観察した同じ場所を TEM で観察するためには、サンプルをスライドガラスなど何か基準となるものに対して動かないよう固定し、樹脂包埋した後に切削する必要があるが、それは困難である。

TEM は薄く切った樹脂切片を通過してくる電子線の影を観察するのに対し、走査電子顕微鏡(SEM)は、絞った電子線で試料表面上を走査し、試料から放出される電子線を検出する顕微鏡である。これまで SEM は、試料表面の微細構造観察に用いられることがほとんどで、植物研究においては、葉や茎頂など器官の形態観察に用いられることが多かった。SEM の中でも、電界放出形走査電顕(Field

emission SEM:FE-SEM)は、電界放出形(FE)電子銃を用いることにより、高分解能で数十万倍の倍率での観察が可能である。最近の FE-SEM は、20-30kV の高加速電圧で高分解能像を得られることは今までと変わらないが、0.1-1kV といった極低加速電圧条件下でも大きなプローブ電流が得られ、明るく SN に優れた画像観察が可能になった。また弱いシグナルでも検出可能な検出器も搭載され、通常の2次電子検出器・反射電子検出器の他、YAG 結晶を用いた高感度の反射電子検出器なども搭載できるようになっている。観察条件と試料調製法を工夫することで、様々な観察が可能となっている。以上のような技術革新により、生物試料の樹脂切片観察にも、SEM を応用できるようになってきた。

そこで我々は、蛍光を発する構造体の超微形態を FE-SEM で捉え相関をとる CLEM 技術「蛍光タンパク質-走査電子顕微鏡法」を考案した(図2上, 豊岡2016)。はじめに蛍光タンパク質 GFP を発現した植物試料をアルデヒド固定し、脱水・包埋後、厚さ 1μm 程度の準超薄切片を作製する。その切片をアドレス付きの格子模様が印刷されたカバーガラスに載せ、共焦点レーザー顕微鏡により蛍光像を撮影する。その後、切片を酢酸ウラニルとクエン酸鉛で電子染色する。同じ切片の蛍光像撮影箇所を FE-SEM により撮影し、蛍光像と電顕像を重ね合わせることで、蛍光を放つ細胞・オルガネラを特定する。今までの CLEM 法と大きく異なる点は、樹脂切片から蛍光タンパク質の蛍光を検出する点、TEM ではなく FE-SEM を用いる点である。TEM では、観察可能な切片サイズが制限される(最大で 1 x 2mm 程度)が、SEM ではより大きな試料でも観察可能である。また、電子線を透過させる TEM 観察法と異なり、超薄切片(厚さ 60-80nm)より厚い樹脂切片でも、容易に観察できる。これにより、

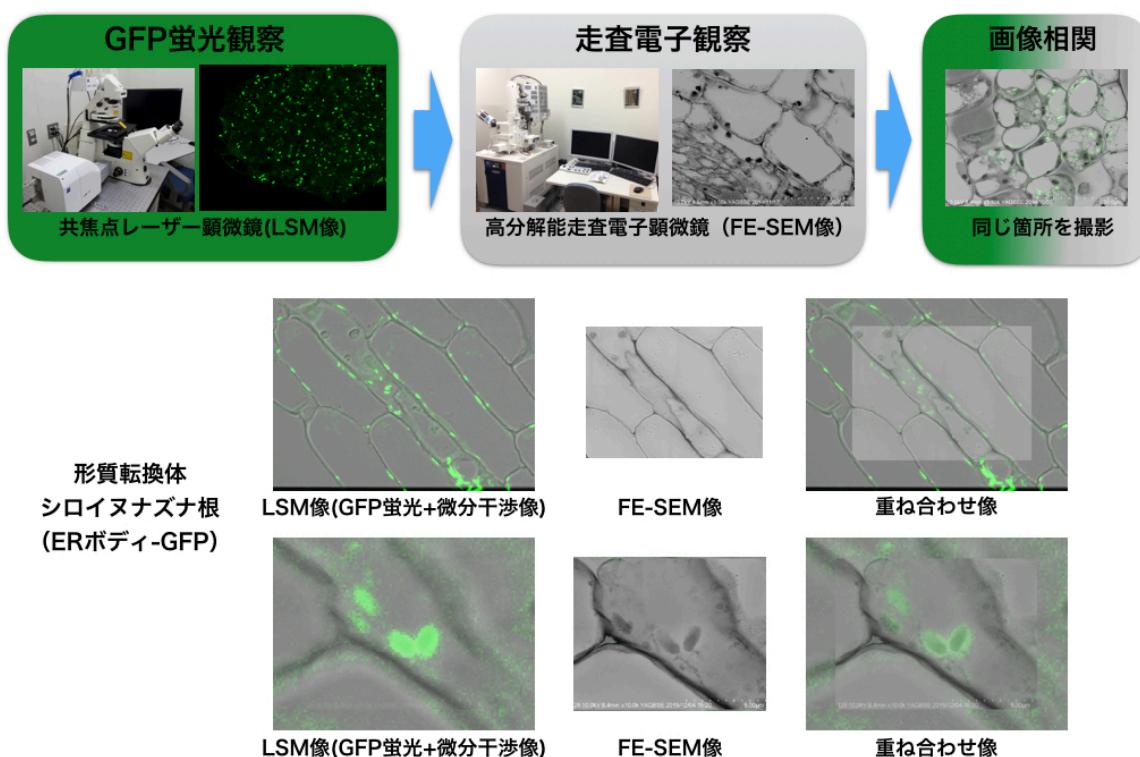


図2

十分な強度の蛍光を検出できる厚さ 1μm 以上の切片での解析が可能となっている。

これまでに我々は、広域 TEM 像自動取得システムで、野生型シロイヌナズナ側部根冠に多数の小

さな ER ボディ様の構造体があることを見出していた。しかし、それが本当に ER ボディであるかは、形態から推定するしかなかった。一方、小胞体残留シグナル HDEL 配列を C 末端に結合させた GFP を用いて、ER ボディを可視化したシロイヌナズナ株(Yamada et al. 2008)においても、小さな蛍光ドットが側部根冠に多数観察された(Toyooka et al. 2015)。この GFP 蛍光で可視化された ER ボディを CLEM 解析することで、広域 TEM 像で見られた ER ボディ様構造が本当に ER ボディであるか、特定できるのではないかと考えた。GFP-HDEL を発現するシロイヌナズナの根を固定・脱水後にアクリル系樹脂に包埋し、準超薄切片(厚さ 1 μm)を作製した。オスミウムコートしたカバーガラス(格子付き)に切片を載せ、共焦点レーザー顕微鏡 Zeiss LSM700 で蛍光像(LSM 像)を撮影した。電子染色後、同じ切片の GFP 蛍光のあった箇所を FE-SEM(Hitachi SU8220)で撮影した。その結果、側部根冠の蛍光ドットは、紡錘形の ER ボディ様構造と一致することが実証できた(図 2 下)。

このように蛍光タンパク質が局在するオルガネラの超微形態を、直接可視化できるようになってきた。本稿で紹介した CLEM 法は、免疫電顕法と比べて高度な技術を要する作業が含まれないため、比較的短時間で簡便かつ正確に GFP が局在する細胞内微細構造を特定できる。最近では、YFP や RFP など、GFP 以外の蛍光タンパク質でも CLEM 解析が可能であることが確認できている。蛍光タンパク質で微生物やウイルス、または感染に応答している植物細胞をラベルすることで、侵入しつつある微生物または防御している細胞を広大な器官・組織から探し出すことができる。さらに蛍光の見られた箇所を直接、電顕で観察することで、今までより容易に微生物と植物の攻防を捉えられるであろう。

4. 今後の展望

広域 TEM 像自動取得システムにより、難しかった広域 TEM 像を簡便かつ短時間で取得できるようになった。取得した広域 TEM 像は、器官や組織におけるオルガネラの分布解析だけでなく、微生物の感染部位のような局所的な観察にも有用であろう。そして、蛍光タンパク質-走査電顕相關顕微鏡法により、GFP 等の蛍光タンパク質でラベルした微生物や細胞を用いることで、植物の器官・組織における微生物と植物細胞の相互作用を、高分解能かつ広域に渡って捉えられるようになることが期待される。さらに、多様なバイオ画像を分類することのできるプログラム CARTA: Clustering-Aided Rapid Training Agent (Kutsuna et al. 2012) を広域 TEM 像に応用し、ミトコンドリアやゴルジ体など特定のオルガネラを半自動的に検出することも可能となってきている(Higaki et al. 2015)。近い将来、このようなプログラムを用いて、広域 TEM 像や CLEM 像から、微生物や感染部位などを自動抽出することが可能となるかもしれない。

筆者らは日立ハイテク社と共同で、光電子相關顕微鏡システム“*MicroCLEM*”を開発した。これは、FE-SEM の電動ステージに載せた試料の電顕像を観察しながら、事前に撮影済みの光顕もしくは蛍光像と、容易に位置合わせ、像の重ね合わせができる機能をもつ。今後さらなる改良を加えることで、今まで以上に簡便かつ正確な相關像を得られるようになると考えている。さらに、試料を瞬時に凍らせて固定する高压凍結技法(Toyooka et al. 2009)を、本 CLEM 技術や広域 TEM 像取得法と組み合わせることで、生きている状態により近く、蛍光標識オルガネラの広域かつ高解像度の可視化ができるようにならうと考えている。

本稿で述べた広域 TEM 像自動取得法と蛍光タンパク質-走査電顕相關顕微鏡法、その他の様々な技

法を組み合わせて多角的な視点からの超微形態観察を行うことで、微生物と植物の攻防を捉えられるだけでなく、様々な生命現象の理解に大きく貢献できると期待される。

謝辞

広域 TEM 像取得システムの開発にあたり、東京大学大学院新領域創成科学研究科の朽名夏麿 博士、桧垣匠博士、秋田佳恵博士、馳澤盛一郎博士、日本女子大学の澤木史江氏、小林恵氏、永田典子博士、理研 CSRS の持田恵一博士、吉田拓広氏、若崎眞由美氏、橋本恵博士に多大なるご協力を頂きました。CLEM システムの開発にあたり、日立ハイテクノロジーズ社科学システム設計開発本部の皆様、理研 CSRS の浜村有希博士に多大なるご協力を頂きました。また、甲南大学の西村いくこ博士、上田晴子博士に GFP 形質転換シロイヌナズナを分与頂きました。本研究は、科学研究助成金若手研究(A)24687007(代表：豊岡)、挑戦的萌芽研究23657051(代表：豊岡)による支援を受けました。

引用文献

- de Boer P., Hoogenboom J.P. & Giepmans B.N. 2015. Correlative light and electron microscopy: ultrastructure lights up!. *Nat. Methods.* 12:503-513.
- Higaki, T., Kutsuna, N., Akita, K., Sato, M., Sawaki, F., Kobayashi, M., Nagata, N., Toyooka, K. & Hasezawa, S. 2014. Semi-automatic organelle detection on transmission electron microscopic images. *Scientific Reports* 5, 7794.
- Liss, V., & Hensel M. 2015. Sample preparation for correlative light and electron microscopy (CLEM) analyses in cellular microbiology. *BioProtoc.* 5:e1612
- Kutsuna, N., Higaki, T., Matsunaga, S., Otsuki, T., Yamaguchi, M., Fujii, H. & Hasezawa, S. 2012. Active learning framework with iterative clustering for bioimage classification. *Nat Commun* 3: 1032.
- Lidke, D.S. & Lidke, K.A. 2012. Advances in high-resolution imaging—techniques for three-dimensional imaging of cellular structures. *J Cell Sci* 125: 2571-2580.
- Muller-Reichert, T. & Verkade, P. 2014. Preface. Correlative light and electron microscopy II. *Methods Cell Biol* 124: xvii-xviii.
- Toyooka, K., Goto, Y., Asatsuma, S., Koizumi, M., Mitsui, T. & Matsuoka, K. 2009. A mobile secretory vesicle cluster involved in mass transport from the Golgi to the plant cell exterior. *Plant Cell* 21: 1212-1229.
- Toyooka, K., Sato, M., Kutsuna, N., Higaki, T., Sawaki, F., Wakazaki, M., Goto, Y., Hasezawa, S., Nagata, N. & Matsuoka, K. 2014. Wide-range high-resolution transmission electron microscopy reveals morphological and distributional changes of endomembrane compartments during log to stationary transition of growth phase in tobacco BY-2 cells. *Plant Cell Physiol* 55: 1544-1555.
- Toyooka, K., Hashimoto, K., Narikawa, N., Wakazaki, M., Sato, M., Nagata, N. & Okamoto, T. 2015. The ER body in the lateral root cap is involved in mass transport of (K/H)DEL proteins to the vacuole: Using Gigapixel TEM images. *Microscopy* 64: i123.
- Toyooka, K., Sato, M., Wakazaki, M. & Matsuoka, K. 2016. Morphological and quantitative changes in mitochondria, plastids, and peroxisomes during the log-to-stationary transition of the growth phase in cultured tobacco BY-2 cells. *Plant Signaling & Behavior*. 11:e1149669
- 豊岡公徳, 佐藤繩子, 朽名夏麿, 永田典子. 2014. 高圧凍結技法を取り入れた広域透過電顕像自動取得システムの開発とその応用. *Plant Morphol* 26:3-8.

豊岡公徳.2016.光-電子相関顕微鏡法：蛍光タンパク質標識した細胞小器官を走査電子顕微鏡で捉える.*Plant Morphology* 28: 15-21.

Yamada,K.,Nagano,A.J.,Nishina,M.,Hara-Nishimura,I.& Nishimura,M. 2008. NAI2 Is an Endoplasmic Reticulum Body Component That Enables ER Body Formation in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* 20: 2529-2540.