

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。

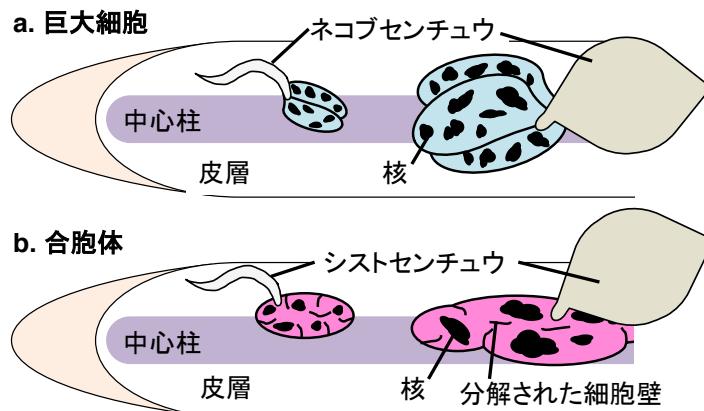


図1 巨大細胞と合胞体

- 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

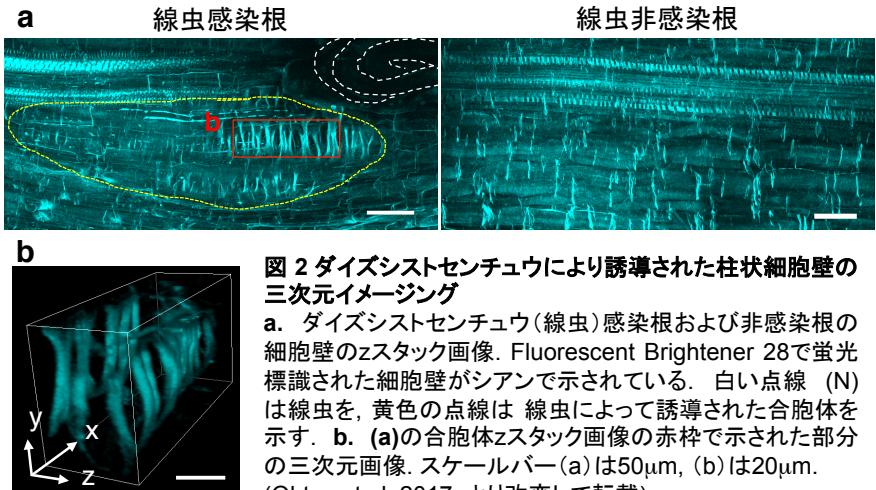


図 2 ダイズシストセンチュウにより誘導された柱状細胞壁の3次元イメージング
a. ダイズシストセンチュウ(線虫)感染根および非感染根の細胞壁のzスタック画像。Fluorescent Brightener 28で蛍光標識された細胞壁がシアンで示されている。白い点線 (N) は線虫を、黄色の点線は 線虫によって誘導された合胞体を示す。b. (a)の合胞体zスタック画像の赤枠で示された部分の三次元画像。スケールバー(a)は50 μm , (b)は20 μm 。
(Ohtsu et al. 2017aより改変して転載)

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テム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、システム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テム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、システム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く、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、システム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

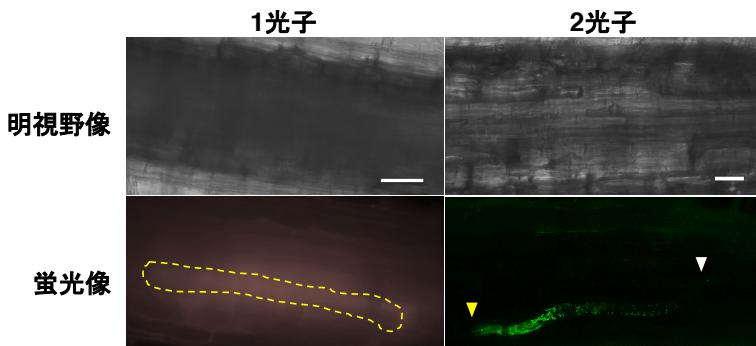


図 3 レンゲの根における1光子顕微鏡像と2光子顕微鏡像
ダイズセンチュウ(線虫)を、SYTOX Orangeまたは、SYBR Green Iを用いて暗所で一晩染色した後、レンゲの根に接種した。接種から2日後、レンゲの根の深部に感染した線虫を1光子顕微鏡および2光子顕微鏡を用いて観察した。黄色い点線は線虫を示している。黄色い矢尻は線虫の頭部を、白い矢尻は尾部を示している。スケールバーは、50 μm. (Ohtsu et al. 2017b より改変して転載)

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.