

APPLICATION NOTE

共焦点レーザー顕微鏡システム A1 R, AX/AX R+水浸対物レンズ

微分干渉および共焦点による、イネいもち病菌感染関連形態形成イメージング

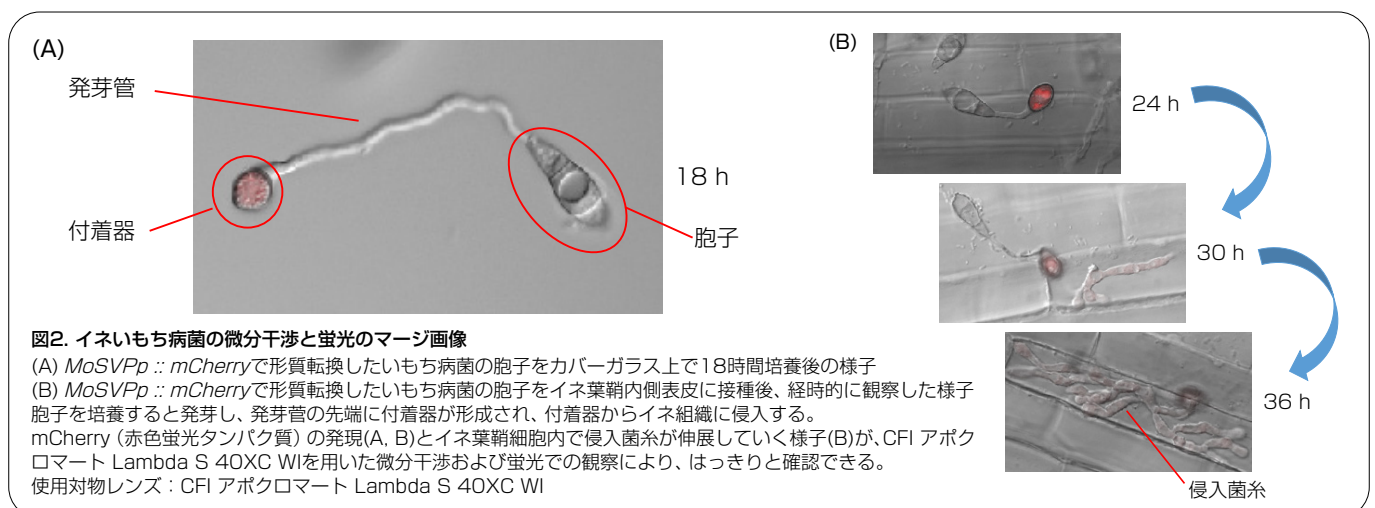
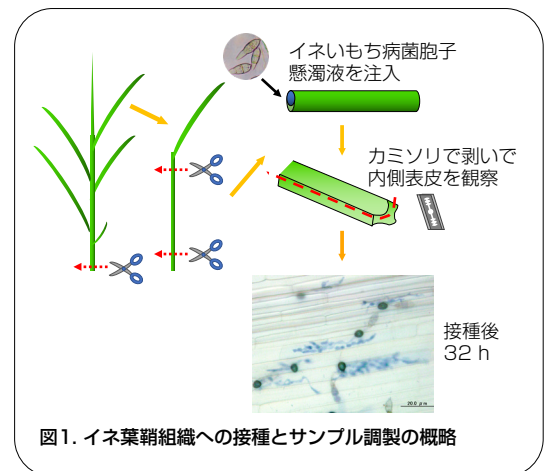
いもち病はイネの最も深刻な病害である。子囊菌門の一種であるイネいもち病菌 (*Magnaporthe oryzae*) はイネいもち病を引き起こす半活物寄生性病原体として知られており、いもち病菌がイネの葉、茎、穂に感染すると米の収量の大幅な低下を引き起こす。この病害に対する新たな防除法の確立や耐性のあるイネ品種の開発を目指すためには、いもち病菌とイネの間の遺伝子間およびタンパク質間相互作用の詳細を明らかにすることが重要である。本アプリケーションノートでは、東京農業大学の齋藤宏昌先生らによって報告された、植物-病原菌相互作用中の差別的遺伝子発現評価手法を用いた新規病原性遺伝子の同定に関する論文における、CFI アポクロマート Lambda S 40XC WI対物レンズを用いた微分干渉と共焦点によるイメージングの活用事例について紹介する。

キーワード：微分干渉、共焦点レーザー顕微鏡システム、水浸対物レンズ、病原菌（カビ）、植物

研究概要

イネいもち病菌孢子懸濁液を接種したオオムギ子葉のRNA-Seq解析を行なった結果、接種後12、24時間目（付着器形成、付着器侵入時）に発現が上昇してピークに達した後、36、48時間目に低下していくいもち病菌の予想分泌タンパク質遺伝子群が同定された。これらのうち7個の遺伝子について、破壊したいもち病菌の作出および接種試験を行なった結果、病原性が著しく低下した破壊株が見出され、その遺伝子を*MoSVP*と名付けた。

*MoSVP*の発現時期と局在を調べるため、*MoSVP*プロモーターの下流に*mCherry*を挿入したレポータープラスミド (*MoSVPp :: mCherry*) で、または恒常的発現コントロールとしていもち病菌*Ribosomal protein 27*遺伝子のプロモーターの下流に*mCherry*を挿入したレポータープラスミド (*Rp27p :: mCherry*) で、いもち病菌の形質転換を行った。各形質転換体の孢子懸濁液をカバーガラス上で培養、またはイネ葉鞘内側表皮に接種（図1）後、いもち病菌感染関連形態形成を微分干渉および共焦点で経時的に観察した（図2）。



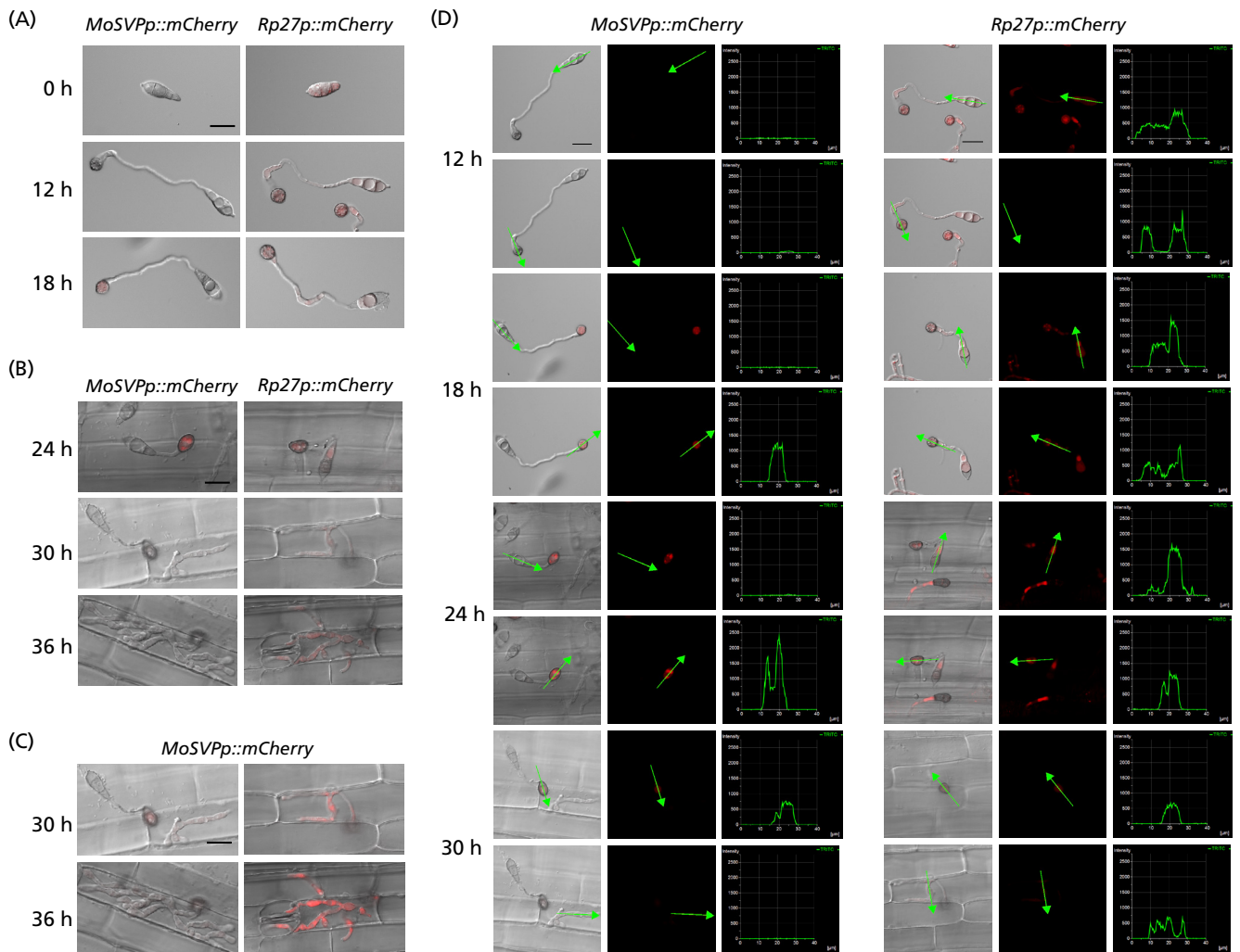


図3. レポーターとしてmCherryを用いたプロモーター解析

(A), (B), (C)および(D)左パネルは微分干渉と蛍光をマージして表示している

(A) *MoSVpp::mCherry*または*Rp27p::mCherry*で形質転換したいもち病菌の胞子をガラスガラス上で培養後、観察した

(B) *MoSVpp::mCherry*または*Rp27p::mCherry*で形質転換したいもち病菌の胞子をイネ葉鞘内側表皮に接種し、24, 30および36 hpiで観察した

(C) (B)の30, 36 hpiについてピンホールを3倍大きくし、微弱な蛍光を観察した

(D) (A), (B) 12, 18, 24, 30 hpiにおける輝度変化解析

*MoSVpp::mCherry*では、18, 24時間後の付着器でmCherry蛍光が強く検出され、その後低くなっていった。恒常的にmCherryを発現する*Rp27p::mCherry*では、付着器だけでなく胞子や発芽管でも全過程でmCherry蛍光が強く検出されたことから、*MoSVpp*プロモーターは、いもち病菌の宿主への侵入時に付着器で特異的に活性化されることが明らかとなった。

ピンホールサイズ：24.3 μm (A, B, D), 72.9 μm (C)、スケールバー：20 μm

まとめ

*MoSVpp*プロモーターの制御下でmCherryを発現する菌株を作出し、CFI アポクロマート Lambda S 40XC WI を用いて微分干渉および共焦点で経時的に観察した結果、*MoSVpp*がいもち病菌の感染初期に付着器で発現することが確認できた。

このことは、高精度の対物レンズと共焦点レーザー顕微鏡システムを組み合わせることで、局在や輝度変化を正確に捉えられることを示している。

参考文献

Molecular Plant Pathology (2019) 20(12), 1682–1695

DOI: 10.1111/mpp.12869

MOTOKI SHIMIZU, YUKI NAKANO, AKIKO HIRABUCHI, KAE YOSHINO, MICHIE KOBAYASHI, KOSUKE YAMAMOTO, RYOHEI TERAUCHI AND HIROMASA SAITOH

製品情報

共焦点レーザー顕微鏡システム AX R

生細胞への光毒性が低く光退色の少ない高速・高解像度・広視野の共焦点イメージングをサポート

- ・高速：最速毎秒720フレーム (レゾナント 2048 x 16画素)
- ・高解像度：最高8K (ガルバノ)/ 2K (レゾナント)
- ・高スループット：視野数 25mmの超広視野



CFI アポクロマート Lambda S 40XC WI

紫帯域から近赤外域までの広範囲において色収差を補正した、多色共焦点観察に最適な高NA対物レンズ

- ・NA：1.25
- ・WD：0.18 (0.20-0.16)

