

平成 29 年 6 月 16 日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K14543

研究課題名(和文)環境応答性転写因子の高精度同定法の確立

研究課題名(英文)High-performance identification of transcription factors involved in environmental responses

研究代表者

多田 安臣(Tada, Yasuomi)

名古屋大学・遺伝子実験施設・教授

研究者番号：40552740

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,400,000円

研究成果の概要(和文)：植物免疫を活性化する、サリチル酸の合成及び応答に関与する可能性のある遺伝子群を多様な発現解析をもとに同定した。さらに、選抜遺伝子群のプロモーター配列に有意に濃縮されるシス配列候補を同定した。選抜遺伝子群に含まれる22転写因子タンパク質を合成し、シス配列候補との結合能を調査した結果、LST1転写因子が得られた。

研究成果の概要(英文)：We performed transcriptome analysis on environmental responses in Arabidopsis and identified candidate genes that could be involved in SA biosynthetic pathway and/or SA response. Using the promoter sequences of upregulated genes, a statistically enriched cis-regulatory element has been detected. We successfully identified a transcription factor, LST1, that binds to the element.

研究分野：植物病理学

キーワード：植物ホルモン 転写制御因子

### 1. 研究開始当初の背景

サリチル酸(SA)はシグナル伝達物質であり、植物免疫、発芽、老化、UVや低温応答、最近では生長制御機構にも関与することが報告されている。しかし、SAの合成、シグナル受容から下流の情報伝達機構は未だ不明な点が多く、同シグナル伝達系を体系的に理解するためには、多様な生命現象に共通して機能する、SAシグナル伝達系の中核因子群の同定が肝要である。例えば、SAはシキミ酸経路から生成されるコリスミ酸が、イソコリスミ酸合成酵素及びサリチル酸合成酵素に触媒され生成されるが、サリチル酸合成に介在する酵素や転写因子等は不明である。

申請者は現在までに、SA受容体及び鍵転写補助因子であるNPR1の機能解析を推進している。植物は病原菌を認識すると局所的或いは全身的にSAを合成し、細胞内酸化還元状態(レドックス)を変動させることでNPR1を蓄積・活性化する。NPR1欠損変異体は、極めて強い免疫不全の形質を示すが、NPR1との相互作用因子は数種のTGA転写因子が同定されたに留まる。以上のように、SAシグナルはその合成経路から下流に至るまで、不明な点が多く、順遺伝学的手法や酵母two-hybrid法などとは異なる新規な制御遺伝子同定法の確立が望まれる。

### 2. 研究の目的

サリチル酸(SA)は植物免疫系を活性化するシグナル伝達物質であり、その制御因子の多くは順遺伝学的手法により同定されたが、SAシグナルの全体像を説明するには十分でない。そこで本研究では、SA依存的シグナル伝達に必須の転写因子群を同定するために、新規方法論を構築する。まず、マイクロアレイやRNA-seq等から、SA合成と関連付いた遺伝子群を選抜し、高精度プロモーター解析により高頻度に出現するシスエレメント候補を検出する。同シスエレメントを認識する転写因子を同定するために、無細胞タンパク質合成系を用いてシロイヌナズナの転写因子cDNAライブラリーから網羅的にタンパク質を合成する。シスエレメントと結合する標的転写因子を同定し、ChIP解析や遺伝子破壊株から当該転写因子を特徴付け、SAシグナル伝達系の最新モデルを構築する。

### 3. 研究の方法

SAシグナル伝達系を制御する転写因子群を同定するために、1)SA合成系を活性化する、多様なストレスを負荷したシロイヌナズナ由来の発現プロファイルを解析し、共通して発現誘導される遺伝子群を選抜する。2)同遺伝子群をプロモーター解析プログラムに供試し、高頻度に濃縮されるシスエレメント候補配列を同定する。3)申請者が開発した無細胞タンパク質合成系を用い、転写因子タンパク質を網羅的に合成し、実験項目2で同定したシスエレメントとの相互作用を

AlphaScreen systemを用いて調査する。シスエレメントの競合実験から、その相互作用が特異的であると判断された転写因子に関しては、T-DNA破壊株と過剰発現株の病原性細菌に対する抵抗性誘導能を検討する。SAシグナルに関与すると結論付けられた転写因子に関しては、ChIP-PCRを行い、in vivoにおいて標的シスエレメントと結合するかを評価する。

一方、選抜した遺伝子群に関し、特にSA合成が行われる葉緑体で機能する遺伝子、転写制御因子や代謝に関与すると考えられる遺伝子群に関しては、T-DNA破壊株を取得し、それらのUV応答に対する表現型を調査する。

### 4. 研究成果

多様なトランスクリプトームデータから、SA合成やSAの初期認識に関与する可能性のある遺伝子群を選抜した。解析に供試した発現データは、1)4週齢の野生型シロイヌナズナ(Col-0)葉に病原性細菌であり、強いSA依存的免疫機構を活性化する*P. syringae* *avrRpt2*を接種したものの、2)同病原菌をNPR1欠損変異体である*npr1*植物葉に接種したものの、3)播種後12日目のCol-0葉に病原性糸状菌である*Hyaloperonospora arabidopsidis*を接種したものの、4)同齢のCol-0葉に細菌の鞭毛成分である*flg22*を処理し、免疫系を活性化したものの、5)4週齢のCol-0葉にUV-Bを曝露したものの、6)同齢のCol-0葉にオゾン曝露したものの、7)同じくCol-0葉に一酸化窒素を処理したものの、そして、8)SA合成系を活性化する、SAアナログのBTHを処理した4週齢の葉を用いた。各刺激においてSAが合成されることは確認している。各刺激に応答して有意に発現上昇している遺伝子を選抜し、各発現プロファイルの全てにおいて陽性を示した約350遺伝子をSA合成関連遺伝子群とした。

選抜遺伝子群をシス解析プログラムに供試した結果、WRKY転写因子が認識するW-boxやTGA転写因子が認識するTGA-boxが同定された。最も高頻度に出検されたシス配列候補はLS10と呼ばれる配列であり、現在までに対応する転写因子は未同定である。本シス配列を認識する転写因子を同定するために、選抜遺伝子群に含まれる22転写因子を無細胞タンパク質合成系を用いて合成し、AlphaScreenシステムにより、シス候補配列LS10との結合の有無を調査した。その結果、同シス候補を認識するLS10認識転写因子であるLST1を同定した。

一方、約350遺伝子群に含まれる葉緑体タンパク質、転写制御因子及び代謝に関与するタンパク質の計121遺伝子に関し、それらのT-DNA破壊株を取得した。各変異体とも、4週齢の葉に対してUV-Cを照射し、SA合成及びSA応答のマーカー遺伝子である、それぞれ*ICS1*や*PR1*などの発現量解析を行った。

その結果、大部分の変異体が、ICS1 は上昇するが PR1 は抑制される変異体群、ICS1 と PR1 の何れもが上昇或いは抑制される変異体群として同定された。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 2 件)

(1) Yamamoto YY, Ichida H, Hieno A, Obata D, Tokizawa M, Nomoto M, Tada Y, Kusunoki K, Koyama H, Hayami N., Prediction of bipartite transcriptional regulatory elements using transcriptome data of Arabidopsis, DNA Res., 0(0): 1-8, 2017. 査読有り

(2) Yamada K, Yamaguchi K, Shirakawa T, Nakagami H, Mine A, Ishikawa K, Fujiwara M, Narusaka M, Narusaka Y, Ichimura K, Kobayashi Y, Matsui H, Nomura Y, Nomoto M, Tada Y, Fukao Y, Fukamizo T, Tsuda K, Shirasu K, Shibuya N, Kawasaki T., The Arabidopsis CERK1-associated kinase PBL27 connects chitin perception to MAPK activation, EMBO J., 35(22): 2468-2483, 2016. 査読有り

〔学会発表〕(計 7 件)

(1) 東井 周・野元 美佳・板谷 知健・塚越 啓央・松下 智直・多田 安臣、フィトクロムはサリチル酸誘導性免疫を制御する、第 58 回日本植物生理学会年会(鹿児島) 3 月 16 日~18 日、2017 年

(2) 清水 琴恵・野元 美佳・福井 大和・板谷 知健・森 毅・時澤 睦朋・山本 義治・塚越 啓央・多田 安臣、転写補助因子 SNI1 と NPR1 による WRKY 転写因子を介した SA 応答性遺伝子発現制御機構の解析、第 58 回日本植物生理学会年会(鹿児島) 3 月 16 日~18 日、2017 年

(3) 板谷 知健・野元 美佳・佐藤 良勝・叶文秀・飯田 秀利・Day Brad・木下 俊則・東山 哲也・塚越 啓央・松下 智直・多田 安臣、機械刺激依存性イオンチャネルを介した植物自然免疫機構、第 58 回日本植物生理学会年会(鹿児島) 3 月 16 日~18 日、2017 年

(4) Mika Nomoto, Michael J. Skelly, Tomotaka Itaya, Hironaka Tsukagoshi, Tsuyoshi Mori, Takamasa Suzuki, Nodoka Oka, Tomonao Matsushita, Mutsutomo Tokizawa, Hitoshi Mori, Yoshiharu Y. Yamamoto, Tetsuya Higashiyama, Steven H. Spoel and Yasuomi Tada, Transcriptional context switches plant immune cofactors between

activator and repressor behavior, Cold Spring Harbor Asia conference (淡路) 11 月 29 日~12 月 2 日、2016 年

(5) Nodoka Oka, Mika Nomoto, Steven H. Spoel, Keiko Kuwata, Yoshiharu Y. Yamamoto, Hironaka Tsukagoshi, Yasuomi Tada, The immune cofactor NPR1 activates SA signaling by sensing S-glutathionylated Proteins, Cold Spring Harbor Asia conference(淡路) 11 月 29 日~12 月 2 日、2016 年

(6) 野元美佳・多田安臣、Reciprocal regulation between salicylate- and jasmonate-responsive transcription factors in plant immunity、新学術領域研究 環境記憶統合 第 2 回若手の回(熱海) 10 月 12 日~14 日、2016 年

(7) 野元美佳・板谷知健・岡 和・鈴木孝征・森 毅・塚越啓央・松下智直・時澤睦朋・山本義治・東山哲也・Steven H. Spoel・多田安臣、植物免疫系の制御因子である NPR1 と JAZ が制御する ERF1 依存的な遺伝子発現機構の解析、日本植物学会第 80 会大会(沖縄) 9 月 16 日~19 日、2016 年

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
出願年月日:  
国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:  
発明者:  
権利者:  
種類:  
番号:  
取得年月日:  
国内外の別:

〔その他〕  
ホームページ等

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

多田安臣(TADA YASUOMI)

名古屋大学・遺伝子実験施設・教授  
研究者番号：40552740

(2)研究分担者  
( )

研究者番号：

(3)連携研究者  
( )

研究者番号：

(4)研究協力者  
( )