

令和元年5月17日現在

機関番号：24403

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07415

研究課題名(和文)細胞核形態と病害応答時遺伝子発現の制御におけるアクチン脱重合因子の機能解析

研究課題名(英文) Roles of ACTIN DEPOLYMERIZING FACTOR in regulations of nuclear morphology and gene expression during plant response against pathogen attack.

研究代表者

稲田 のりこ (Inada, Noriko)

大阪府立大学・生命環境科学研究科・准教授

研究者番号：30432595

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：研究代表者はこれまでの研究において、シロイヌナズナのアクチン脱重合因子(ADF)が、細胞核内アクチン繊維の構造・動態制御を介して、病原体応答に関する遺伝子発現を制御している、との仮説を立てた。この仮説検証のために行った本研究課題では、以下のことを明らかにした。(1) adf変異体は細胞核構造に異常を示す。(2) ADFの欠損によって発現変化を示す遺伝子は、染色体上でクラスターを形成している。(2) うどんこ病に対して強い抵抗性の亢進を示す adf 変異体は、アブラナ科炭疽病菌にも抵抗性の亢進を示す。

研究成果の学術的意義や社会的意義

細胞表層で細胞形態や細胞内の物質輸送に働くアクチン繊維は、細胞核内にも存在することが知られていたものの、その機能は長い間謎であった。本研究では、ADFの細胞核内の働きに焦点を当てて解析を進めることにより、遺伝子発現制御という細胞核内アクチン繊維の新たな役割を示唆する結果を得た。この成果は、学術的にはアクチン繊維の新機能、遺伝子発現の新制御機構を明らかにする基盤研究としての意義を持つ。さらに本研究では、シロイヌナズナの adf 変異体が複数の病原体に対して抵抗性を亢進させることを明らかにした。これは、病原体抵抗性植物の作出という、社会的に大きな意義を持つ応用研究に直接結びつく重要な成果である。

研究成果の概要(英文)：Based on my previous study, I have proposed that *Arabidopsis thaliana* ACTIN DEPOLYMERIZING FACTOR (ADF) regulates gene expression during plant response against pathogen attack through regulation of organization or dynamics of nuclear actin microfilaments. To test this hypothesis, I conducted this study and have revealed that: (1) nuclear morphology was altered in adf mutants; (2) many genes that were differently regulated in adf mutants showed clusters in the chromosomes; (2) adf mutants shows increased resistance against *Colletotrichum* pathogen in addition to powdery mildew.

研究分野：細胞生物学

キーワード：アクチン脱重合因子 細胞核構造 ヘテロクロマチン マイクロアレイ解析 病害応答 アブラナ科炭疽病

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

アクチン脱重合因子 (Actin Depolymerizing Factor、ADF) は真核生物全体に保存されている因子であり、アクチン繊維の構造・動態制御に働いている (Inada, Journal of Plant Research 2017, 57, 1854-1864)。研究代表者は、先行研究において、シロイヌナズナの ADF 変異体が、糸状菌病原体によって引き起こされるうどんこ病に対して強い抵抗性の亢進を示すことを明らかにした。さらに、うどんこ病菌が感染する葉の表皮細胞において、*adf* 変異体の細胞表層アクチン繊維は目立った構造異常を示さないこと、ADF の細胞核局在がうどんこ病への応答に重要であることを明らかにした (Inada et al., Plant Physiology 2016, 170, 1420-1434)。また、ADF の細胞核における働きを明らかにするために行ったその後の研究において、*adf* 変異体は細胞核構造に異常を示すことを見出した (稲田、未発表)。

アクチン繊維は、細胞表層において細胞の形態や細胞内の物質輸送に働くことが知られているが、一方で、細胞核内にもアクチン繊維が存在することが以前から知られていた。また最近になって、動物培養細胞においては、細胞核内アクチン繊維が遺伝子発現や細胞核の形態制御に働くことが報告されている (Baarlink et al., Science 2013, 340, 864-867; Baarlink et al., Nature Cell Biology 2017, 19, 1389-1399)。また、細胞核内のゲノム三次元構造が遺伝子発現に重要な役割を果たしていることが、最近の研究で明らかになっている (Dekker&Mimiy Cell 2016, 164, 1110-1121)。

これらの申請者独自の結果および最新報告をもとに、研究代表者は、「ADF は、細胞核内アクチン繊維の構造・動態制御を介してゲノムの三次元構造を制御し、遺伝子発現に影響を与えている」との仮説を立てた。

2. 研究の目的

研究代表者の最終目的は、「ADF は、細胞核内アクチン繊維の構造・動態制御を介してゲノムの三次元構造を制御し、遺伝子発現に影響を与えている」という研究代表者独自の仮説を検証することである。本研究ではその最初の段階として、ADF の欠損が定常時・病原体感染時の細胞核形態および遺伝子発現に与える影響をそれぞれ明らかにすることを目的とした。本研究は、ADF を手がかりとして、細胞核形態、細胞核内アクチン、遺伝子発現の3つをつなぐ機構を探る試みの第一歩であり、本研究成果は、遺伝子発現制御機構についての新たな知見をもたらすのみならず、植物病害の新たな防除法確立の基盤となるものである。

3. 研究の方法

シロイヌナズナのゲノム中には 11 個の ADF 遺伝子がコードされている。これら 11 個の ADF は、そのアミノ酸配列の相同性により、大きく 4 つのサブクラスに分類されている (Inada, Journal of Plant Research 2017, 57, 1854-1864)。そのうち、サブクラス I ADF には、ADF1、ADF2、ADF3、ADF4 の 4 つの ADF が含まれ、これらの ADF はすべて植物体全体で発現することがわかっている (Ruzicka et al., Plant Journal 2007 52, 460-472)。

研究代表者はこれまでに、サブクラス I ADF のうち ADF4 のノックアウト変異体がうどんこ病に対して強い抵抗性の亢進を示すこと、また、サブクラス I に含まれる 4 つの ADF をすべてノックダウンした形質転換体 (ADF1-4Ri) が、*adf4* よりも更に強い抵抗性の亢進を示すことを報告した (Inada et al., Plant Physiology 2016, 170, 1420-1434)。この先行研究を元に、本研究では、野生型、*adf4*、ADF1-4Ri の 3 種類のラインを用いて研究を進めた。

ADF が細胞核の構造制御に果たす役割を明らかにする研究では、成熟葉の表皮細胞における細胞核の形態を、共焦点レーザー顕微鏡と画像定量解析により解析した。また、遺伝子発現における ADF の機能を明らかにするための研究では、野生型、*adf4*、ADF1-4Ri における非感染葉とうどんこ病感染葉から RNA を抽出し、マイクロアレイ解析に供した。

また、本研究では、うどんこ病以外の病害に対する *adf* 変異体の応答を明らかにするため、うどんこ病と同じく糸状菌によって引き起こされる病害、アブラナ科炭疽病を用いた解析も行った。

4. 研究成果

本研究により、以下のことが明らかになった。

- (1) 細胞核内には、DAPI などの DNA 染色試薬で強く染色されるヘテロクロマチン領域と、染色の弱いユークロマチン領域がある。本研究の結果、ADF1-4Ri ではヘテロクロマチンのサイズが野生型と比較して有意に減少していることが明らかになり、ADF の欠損が細胞核構造に影響を及ぼすことがわかった。
- (2) マイクロアレイ解析の結果、*adf4* および ADF1-4Ri の両方において、遺伝子発現が大きく変化していることが明らかになった。さらに、*adf4* および ADF1-4Ri の両方で共通して発現変化を示す遺伝子を染色体上にマップしたところ、それらの遺伝子がクラスターを示すことが明らかになった。この結果は、ADF がゲノムの三次元構造を制御することにより、染色体上の特定の位置に局在する遺伝子の発現に影響を与えていることを示唆している。
- (3) うどんこ病菌は、生きている植物細胞だけに感染しうる絶対寄生菌である。一方、同じ糸状菌であるアブラナ科炭疽病菌は、感染の初期には生きている宿主植物細胞のみ

に感染するが、その後形態を変化させ、宿主細胞を殺して感染を拡大する hemibiotroph である。本研究により、*adf4* および *ADF1-4Ri* は、アブラナ科炭疽病菌にも抵抗性の亢進を示すことが明らかになった。この結果は、アブラナ科炭疽病における ADF の機能を示すとともに、アブラナ科炭疽病感染初期の植物応答が、うどんこ病感染における応答と同様の経路で制御されていることを示唆するものである。

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 8 件)

1. Shimada, T.L., Betsuyaku, S, **Inada, N.**, Ebine, K., Fujimoto, M., Uemura, T., Takano, Y., Fukuda, H., Nakano, A. and Ueda, T. Enrichment of phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate in the extra-invasive hyphal membrane promotes Colletotrichum infection of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell&Physiology* in press.
2. **Inada, N.**, Fukuda, N., Hayashi, T., and Uchiyama, S. Temperature Imaging using Cationic Linear Fluorescent Polymeric Thermometer and Fluorescence Lifetime Imaging Microscopy. (2019) *Nature Protocols* 14, 1293-1321
3. Wong, H.L., Akamatsu, A., Wang, Q., Higuchi, M., Matsuda, T., Kosami, K., Okuda, J., **Inada, N.**, Kawasaki, T., Kaneko-Kawano, T., Nagawa, S., Tan, L., Shimamoto, K., and Kawano, Y. (2018) In vivo monitoring of plant small GTPase activation using a Förster resonance energy transfer biosensor. *Plant Methods* 14, 56
4. Uchiyama, S., Tsuji, T., Kawamoto, K., Okano, K., Fukatsu, E., Noro, T., Ikado, K., Yamada, S., Shibata, Y., Hayashi, T., **Inada, N.**, Kato, M., Koizumi, H., and Tokuyama, H. (2018, May) A Cell-Targeted Non-Cytotoxic Fluorescent Nanogel Thermometer Created with an Imidazolium-Containing Cationic Radical Initiator. *Angewandte Chemie* 57, 5413-5417
5. **Inada, N.** (2017) The plant cytoskeletons in interactions between plants and obligate biotrophs. *Cytologia* 82, 341-348
6. Uchiyama, S., Gota, C., Tsuji, T., and **Inada, N.** (2017) Intracellular temperature measurements with fluorescent polymeric thermometers. *Chemical Communications* 53, 10976-10992
7. **Inada, N.**, Ebine, K., Ito, E., Nakano, A., and Ueda, T. (2017) Constitutive activation of plant-specific RAB5 GTPase confers increased resistance against adapted powdery mildew fungus. *Plant Biotechnology* 34, 89-95
8. **Inada, N.** (2017 March) Plant Actin Depolymerizing Factor – Actin microfilament disassembly and more. *Journal of Plant Research* 130, 227-238 DOI: 10.1007/s10265-016-0899-8

〔学会発表〕(計 3 件)

1. 内山聖一、辻俊一、井門久美子、河本恭子、**稲田のりこ**「レシオ型蛍光性温度センサーによる褐色脂肪細胞の温度計測」第 78 回分析化学討論会 2018 年 5 月 27 日(宇部市、山口大学)
2. **稲田のりこ**、梅田正明「病原体応答におけるシロイヌナズナアクチン脱重合因子の機能解析」第 59 回 日本植物生理学会年会 2018 年 3 月 28 日～30 日(札幌)
3. **稲田のりこ**、坂本卓也、松永幸大、梅田正明「アクチン脱重合因子による遺伝子発現制御機構の解析」日本植物学会第 81 回大会 2017 年 9 月 8 日～10 日(千葉)

〔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：
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：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。