

令和 4 年 6 月 6 日現在

機関番号：12605

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K06047

研究課題名(和文) ウイルス抵抗性遺伝子Nのエリシター応答性におけるイントロンの未知機能の解明

研究課題名(英文) Unknown mechanism of introns in the elicitor response of the viral resistance gene N

研究代表者

佐々木 信光 (Nobumitsu, Sasaki)

東京農工大学・(連合)農学研究科(研究院)・准教授

研究者番号：70431971

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、タバコのウイルス抵抗性遺伝子Nのイントロンの役割を解明することを目的とし、アグロインフィルトレーション法を用いて、組み合わせの異なるイントロンがN遺伝子の転写物量・細胞死誘導・ウイルス増殖抑制作用・エリシター応答性の遺伝子誘導に与える影響を調べた。その結果、N遺伝子に含まれる4つのイントロンの内、イントロン1と2が転写の活性化やウイルス抵抗性の誘導において協同的な役割をもつことが示された。また、イントロン1と2の作用はN遺伝子のエキソン配列に特異的であることが示唆された。以上の結果は、イントロンの未知機能がN遺伝子の抵抗性誘導において重要な役割を果たしていることを意味している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、タバコのもつウイルス抵抗性遺伝子Nを研究対象とし、いまだ機能が十分に理解されていない植物遺伝子のイントロンの役割について解明を試みたものである。N遺伝子には4つのイントロンが含まれているが、その中のイントロン1と2が転写物量の増加(転写活性化)や効率的なウイルス抵抗性誘導に必要であり、2つのイントロンが協同的な機能をもつことを明らかにできた。このような機能にはイントロン以外の配列(エキソン)や挿入位置が重要であることが示唆された。今後はイントロンの機能に関する詳細な分子機構を解明することにより、イントロン配列を利用した新しい遺伝子発現制御技術の開発に繋がることが期待される。

研究成果の概要(英文)：This study aimed to elucidate the role of introns in the virus resistance gene N of tobacco. Using the agroinfiltration method, I investigated the effects of different combinations of introns on the transcript level of the N gene, cell death induction, inhibition of viral amplification, and elicitor-responsive gene induction. The results showed that introns 1 and 2 out of the four introns in the N gene have a cooperative function in activating transcription and inducing viral resistance. As the effects of introns 1 and 2 were not observed in the GFP sequence, these introns may specifically act to the exon sequence of the N gene. These results show that the unknown function of introns plays an important role in the induction of the N gene-mediated resistance.

研究分野：植物保護学

キーワード：植物ウイルス 過敏反応 N遺伝子 イントロン エリシター 細胞死 細胞間移行 植物病理学

## 1. 研究開始当初の背景

植物の病害抵抗性遺伝子の発現制御に関わる分子メカニズムの解明は、植物病理学上の重要課題の一つである。タバコ (*Nicotiana tabacum*) の *N* 遺伝子は、最も有名なウイルス抵抗性遺伝子である。*N* 遺伝子をもつタバコ品種 (NN タバコ) にタバコモザイクウイルス (TMV) が感染すると、過敏反応 (HR) と呼ばれる抵抗性が誘導され、TMV の感染は局所的に封じ込められる。また、ウイルスエリシター (N タンパク質に認識される TMV の非病原力因子) は、複製酵素のヘリカーゼドメイン (p50) であることが証明されている。アグロバクテリウムを用いた一過的遺伝子発現法によって、NN タバコの葉で p50 を発現させたり、*N* 遺伝子をもたないタバコ品種 (nn タバコ) の葉で p50 と N タンパク質を共発現させたりすると HR と似た細胞死を誘導することができる。*N* 遺伝子の特徴的な発現様式として TMV の感染または p50 の一過的発現によって特異的に転写物量が増加する (エリシター応答性を示す) ことが挙げられる。抵抗性遺伝子を常時発現させることはフィットネスクストの面から植物にとって不利であり、病原体の感染に応じて抵抗性遺伝子を発現させる方が合理的である。病原体の認識後に遺伝子発現が上昇するという性質は、すべての抵抗性遺伝子に当てはまるわけではなく、*N* 遺伝子を含む特定の抵抗性遺伝子が病原体との攻防において有利に働くように獲得してきた形質であると考えられている。*N* 遺伝子を含み、エリシター応答性の抵抗性遺伝子発現および抵抗性誘導の分子メカニズムおよびその抵抗性誘導における生物学的な意義は未解明のままである。

遺伝子発現制御メカニズムに関する研究では、構造遺伝子の上下流に位置する制御配列 (プロモーター、エンハンサー、リプレッサー、ターミネーター) にまずは注目することが多いが、最近の研究から、遺伝子発現調節にイントロン配列が重要な役割を果たしている事例が報告されている。転写物量を増加させる役割には、プロモーターを活性化させて mRNA 量を増大させるエンハンサー機能や、類似したものとして、イントロンが転写領域に存在する時にのみ遺伝子発現量を増加させる IME (intron-mediated enhancement) 機能が存在する。また、イントロンがもつ別の機能として、転写物の分解抑制や翻訳促進に関与しているという報告がなされている。一方で、イントロン機能の具体的な分子メカニズムはほとんど未解明の状態であり、イントロンは新しい研究対象として注目されている。

申請者は、アグロバクテリウムによる一過的遺伝子発現系を用いて *N* 遺伝子のエリシター応答性発現調節の分子メカニズムを研究するモデル実験系を構築し、*N* 遺伝子をもつ 4 つのイントロンが、エリシター応答性の遺伝子発現誘導および抵抗性誘導に重要な役割を果たしていることを明らかにしており、本研究により *N* 遺伝子のエリシター応答性や抵抗性誘導の分子機構およびイントロンの未知機能をさらに解明できる状況であった。

## 2. 研究の目的

本研究では、3 つの具体的な目的を設定した。

(1) *N* 遺伝子のエリシター応答性の遺伝子発現およびウイルス抵抗性にどのイントロンが関与しているのかを決定する。他の遺伝子のイントロンに関する研究報告に基づき、5' 端に近いイントロン 1 とイントロン 2 に着目した解析を行う。

(2) *N* 遺伝子の転写物量や N タンパク質量の調節、およびウイルス抵抗性にイントロンがどのように関与しているのかを明らかにする。

(3) イントロンの機能は *N* 遺伝子特異的なのか、また塩基配列・塩基長・挿入位置に依存しているのかを明らかにする。

## 3. 研究の方法

(1) *N* 配列の一過的発現に用いたバイナリープラスミド

アグロインフィルトレーション用バイナリープラスミドの作製には、*N* 遺伝子のプロモーター (NP2.3) あるいはカリフラワーモザイクウイルス 35S プロモーター (P35S) と ocs ターミネータ (ocsT) の間に、イントロンを含まない *N* 配列 (cN)、4 つのイントロンをすべて含む *N* 配列 (gN-Int1234) あるいはイントロンの組み合わせが異なる *N* 配列を連結させたプラスミドを利用した。イントロンの組み合わせが異なるプラスミドを表記する場合、「gN-Int」以降の数字が *N* 配列に含まれるイントロンを示す。

(2) *N* イントロンが遺伝子発現へ与える影響の解析

アグロインフィルトレーション法により、異なるイントロンの組み合わせをもつ *N* 配列を nn タバコで一過的に発現させた。一定時間後に浸潤部位から全 RNA を抽出し、RT-qPCR 法により *N* 配列の全転写物あるいは転写物前駆体を定量した。アクチン遺伝子の転写物を内部標準として用いた。エリシター応答性に関する実験では、*N* 配列と p50 を共発現させた。

(3) *N* イントロンが細胞死誘導へ与える影響の解析

アグロインフィルトレーション法により、異なるイントロンの組み合わせをもつ *N* 配列および p50 を nn タバコで一過的に共発現させた。一定時間後に浸潤葉の画像を撮影し、ImageJ 画像解析ソフトを用いて、浸潤範囲における細胞死誘導範囲の割合を算出した。エリシター応答性に

関する実験では、*N*配列と p50 を共発現させた。

(4) *N*イントロンのウイルス増殖抑制への影響

アグロインフィルトレーション法により、異なるイントロンの組み合わせをもつ *N*配列および ToMV-erGFP (erGFP 遺伝子を発現する感染性トマトモザイクウイルスクローン) をニコチアナベンサミアナで一過的に共発現させた。ウイルス抵抗性の強度は、ToMV-erGFP 感染サイズ (GFP 蛍光を放つ組織範囲) を指標として判断した。

(5) *N*イントロンが GFP 配列の発現に与える影響の解析

アグロインフィルトレーション用バイナリープラスミドとして、P35S と ocsT の間に GFP 配列をもつもの、GFP 配列内にイントロン 1 とイントロン 2 のいずれか、あるいは両方をもつものを作製した。イントロンの挿入位置は GFP 配列の上流側と下流側の 2ヶ所ある。アグロインフィルトレーション法により、異なるイントロンの組み合わせをもつ GFP 配列を nn タバコで一過的に発現させ、一定時間後に ImageJ 画像解析ソフトを用いて浸潤範囲の GFP 蛍光輝度を解析した。また、浸潤範囲からタンパク質を抽出し抗 GFP 抗体を用いて GFP 蓄積量を測定した。さらに浸潤範囲から全 RNA を抽出し、エクソン特異的プライマーセットを用いた RT-qPCR 法により GFP 配列の全転写物を定量すると同時に、イントロンを含む領域をカバーするプライマーセットを用いたエンドポイント RT-PCR 法によりスプライシングの有無を確認した。

4. 研究成果

(1) *N*イントロンが *N*遺伝子の転写物量に与える影響 (図1)

P35S 制御下で cN, gN-Int1234 あるいはイントロンの組み合わせが異なる *N*配列を用いて nn タバコで一過的に発現させ、各配列の転写物について定量解析を行った。その結果、イントロンをすべて含む gN-Int1234 の方がイントロンを含まない cN よりも著しく多くの転写物を蓄積すること、また、このイントロンの効果には、*N* タンパク質の翻訳が不要であることが示された。さらに、イントロン 1 か 2 のいずれかを含む場合 (gN-Int1 や gN-Int2 等) には cN よりも転写物量が多くなる傾向がみられる一方で、イントロン 1 と 2 の両方を含む gN-Int12, gN-Int123, gN-Int124 が gN-Int1234 と同等の転写物量を示すことが分かった。また、転写物前駆体の定量解析の結果から、gN-Int1 が gN-Int12 と gN-Int1234 の転写物量が同程度であり、gN-Int2 にはそのような効果がみられなかったことから、イントロン 1 の存在により転写が活性化される可能性が示唆された。

(2) *N*イントロンが細胞死誘導へ与える影響 (図2)

P35S 制御下で cN, gN-Int1, gN-Int2, gN-Int12 あるいは gN-Int1234 と p50 を nn タバコで共発現させ、細胞死誘導の程度について比較した。その結果、細胞死誘導能が弱い cN に対して、gN-Int1 gN-Int2 gN-Int12 は gN-Int1234 とほぼ同等の強い細胞死誘導能をもつことが示された。

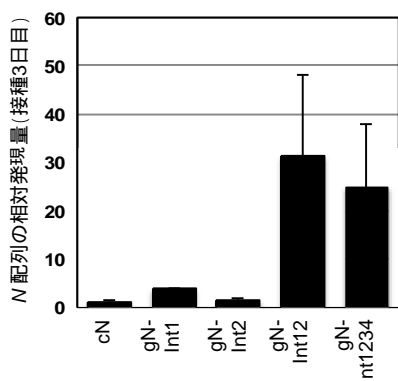


図1. イントロン1と2が転写物量に与える影響

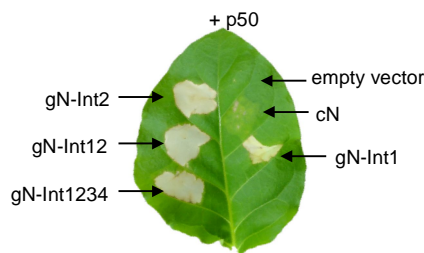


図2. イントロン1と2が細胞死誘導に与える影響

(3) *N*イントロンがウイルス増殖抑制に与える影響

P35S 制御下で cN, gN-Int1, gN-Int2, gN-Int12 あるいは gN-Int1234 と ToMV-erGFP をニコチアナベンサミアナで共発現させ、GFP 蛍光を指標としてウイルス増殖抑制の程度を比較した。その結果、cN と比較して、gN-Int1234, gN-Int12, gN-Int2, gN-Int1 の順番でウイルス増殖抑制効果が高いことが示された (ただし、gN-Int2 と gN-Int12 は同程度)。

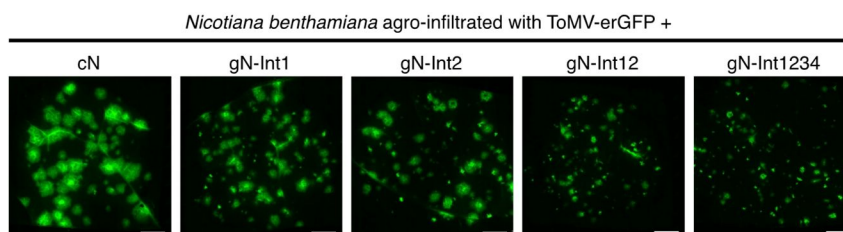


図3. イントロン1と2がウイルス増殖抑制に与える影響

(4) Nイントロンがエリシター応答性に与える影響 (図4)

NP2.3 の制御下で cN, gN-Int1, gN-Int2, gN-Int12 あるいは gN-Int1234 と P35S 制御下で p50 を nn タバコで共発現させ、転写物の定量および細胞死誘導能の比較を行った。その結果、gN-Int1 と gN-Int2 のいずれも p50 の共発現により転写物量が増加し、gN-Int12 で相加的な効果が認められた。また、エリシター存在下での細胞死は、cN よりも gN-Int1234 の方が効率良く誘導されるものの、gN-Int1, gN-Int2, gN-Int12 の方が同程度により効率良く誘導されることが示された。

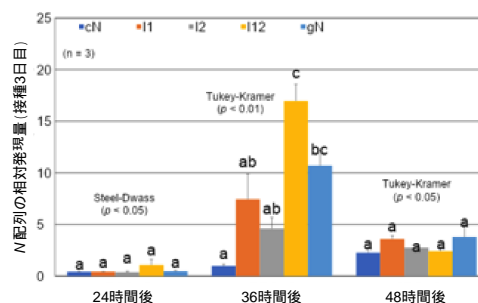


図4. イントロン1と2がエリシター応答性に与える影響

(5) Nイントロンが GFP 配列の発現に与える影響 (図なし)

N遺伝子のイントロン1と2のいずれか、あるいは両方を挿入した GFP 配列を nn タバコで発現させたところ、イントロン2を GFP 配列の上流側に挿入した場合を除いて、いずれの実験区でもイントロンを含まない GFP 配列と同程度の蛍光が観察され、GFP の蓄積量や GFP 配列の転写物量も同程度であることが分かった。一方で、上流側にイントロン2を挿入した GFP 配列では蛍光量が激減し、GFP の蓄積量と GFP 配列の転写物量もイントロンを含まない GFP 配列の半分以下に減少していることが示された。また、イントロンが挿入された GFP 遺伝子はいずれも正常にスプライシングされていることが確認された。

(6) まとめ。(1)から(3)の結果から、N遺伝子のイントロン1と2が、転写物量の増加、細胞死誘導、ウイルス増殖抑制に関して協同的に働いていることが示唆された。特にイントロン1に転写活性化機能があり、イントロン2がイントロン1の機能を促進していることが考えられた。加えて、(4)の結果から、N遺伝子のイントロン1と2がエリシター応答性の遺伝子発現調節および細胞死誘導にも協同的に関与していることが示唆された。N転写物量と細胞死・ウイルス増殖抑制作用との相関性が必ずしもみられなかったことから、イントロン1や2がタンパク質の翻訳にも関与していることが考えられる。今後の課題として、Nタンパク質の定量解析の実験系を早期に確立することが挙げられる。

(5)の結果から、N遺伝子のイントロン1と2は、N遺伝子のエキソン配列に対して特異的に転写物量を増加させる作用をもつこと、イントロン2に関しては挿入位置によって転写物量を抑制する作用をもつことが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Ikeda C, Taku K, Miyazaki T, Shirai R, Nelson R, Nyunoya H, Matsushita Y, Sasaki N.	4. 巻 11
2. 論文標題 Cooperative roles of introns 1 and 2 of tobacco resistance gene N in enhanced N transcript expression and antiviral defense responses	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 15424
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-021-94713-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Nobumitsu Sasaki, Tomoya Murakami, Nanae Yoshimoto, Ken Komatsu, Yasuhiko Matsushita, Hiroshi Nyunoya	4. 巻 87
2. 論文標題 Cell death independent antiviral response mediated by N resistance factor in Nicotiana benthamiana involves inhibited localization of tobamovirus movement protein to plasmodesmata	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of General Plant Pathology	6. 最初と最後の頁 170-177
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s10327-021-00984-0	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 鈴木 大河, 鈴木 新, 竹田 篤史, 丹生谷 博, 松下 保彦, 佐々木 信光
2. 発表標題 CRISPR/Cas9ゲノム編集によるBBF遺伝子ノックアウトタバコの作製
3. 学会等名 植物病理学会関東部会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 白井梨花子・丹生谷博・松下保彦・佐々木信光
2. 発表標題 ウイルス抵抗性遺伝子 N のイントロン 4 に由来する small RNA の推定標的遺伝子の解析
3. 学会等名 平成31年度日本植物病理学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 鈴木 新・仁藤史乃・曳地康史・松浦恭和・池田陽子・丹生谷博・松下保彦・佐々木信光
2. 発表標題 過剰発現タバコを用いた Dof 型転写因子 BBF2 の病害抵抗性における機能の解析
3. 学会等名 平成31年度日本植物病理学会大会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関		
米国	Oklahoma State University		