

令和 4 年 6 月 13 日現在

機関番号：16201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K06054

研究課題名(和文) 自己免疫現象に基づいたRNAエキソソームによる植物免疫制御機構の解明

研究課題名(英文) Elucidation of RNA exosome-mediated regulation in plant immune system based on an Arabidopsis autoimmune mutant

研究代表者

市村 和也 (Ichimura, Kazuya)

香川大学・農学部・教授

研究者番号：70321726

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SMN2遺伝子を同定しました。本遺伝子はRNAヘリカーゼをコードしており、核におけるRNAの品質管理機構に重要な核エキソソームの標的決定因子であることが分かりました。SMN2は、トマト斑葉細菌病菌の病原性因子HopA1に対する細胞内免疫受容体をコードするSMN1/RPS6遺伝子から生じる異常なRNAの分解を通して、SMN1/RPS6遺伝子の正常な発現に関わることが明らかになりました。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、常に矮性と自己免疫を示すシロイヌナズナの遺伝子組換え体をもとに、矮性を示さなくなった復帰変異体を単離し、原因遺伝子を同定しました。その結果、SMN2と名付けた原因遺伝子を同定しました。その後の研究で、植物病原細菌に対する免疫受容体遺伝子SMN1/RPS6が機能をする際に、SMN2が関与するRNA品質管理による制御が重要であることが明らかにされました。この研究成果は、植物の免疫と大きさのバランスを制御する仕組みの解明に役立つことが期待されます。

研究成果の概要(英文)：In this study, we identified the SMN2 gene encoding an RNA helicase. The SMN2 is a target determinant of nuclear RNA exosomes, which are important for RNA quality control in the nucleus. SMN2 is involved in proper expression of the SMN1/RPS6 gene, which encodes an immune receptor for the HopA1 effector in *Pseudomonas syringae*, through the degradation of abnormal RNA generating from 3' region of the SMN1/RPS6 gene.

研究分野：植物病理学

キーワード：植物免疫 自己免疫表現型 核RNAエキソソーム 転写後調節

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

シロイヌナズナにおける MAP キナーゼ経路、MEKK1(MAPKKK) MKK1,2 (MAPKKs) MPK4 (MAPK) 経路は、flg22 などの MAMPs により活性化し、パターン誘導免疫に関連する防御反応を正に制御する。(EMBO J. 27: 2214, 2008)。

一方、*mekk1* 変異体をはじめ上記経路構成因子の遺伝子欠損により自己免疫表現型を示す (Ichimura, et al., J. Biol. Chem. 281: 36969, 2006; Qiu et al., Plant Physiol., 2008) 。中でも最も強い表現型を示す *mekk1* 変異体に申請者は着目し、本変異体のサプレッサー変異体を単離、さらに原因遺伝子 *SMN1* と *SMN2* の同定に成功した。*SMN1* は *Pseudomonas syringae* の非病原性遺伝子である *hopA1* を認識する *R* 遺伝子 *RPS6* と同一だった (Takagi, Ichimura et al. Plant Cell Physiol. 60: 778, 2019) 。*SMN2* は RNA ヘリカーゼとして機能する DEAD-box タンパク質をコードする *HEN2* と同一だった。以上より、*SMN2* が植物免疫システムにおいて何らかの機能を有する可能性が示された。

SMN2 は核内 RNA 品質管理機構で重要な核 RNA エキソソーム複合体の RNA 分解特異性を決定する因子である。同一の遺伝学的スクリーニングで単離されたことから *SMN1* と *SMN2* は機能的に関連すると思われる。これらの遺伝学的相互作用を中心に植物免疫における *SMN2* の機能を解明すべく研究を実施することとした。

2. 研究の目的

SMN2 は核内 RNA 品質管理機構で重要な RNA エキソソームに付随する核エキソソーム標的 (NEXT) 複合体を構成する (Lange et al. PLoS Genet 2014) 。RNA エキソソームは、真核細胞の主要な 3'-5' RNA 分解機構であり、核および細胞質における RNA プロセッシング、異常 RNA 分子の監視および RNA 代謝に関与する。そして NEXT 複合体は RNA 分解における基質特異性を決定する。しかしながら、*SMN2* を含め、RNA エキソソームや付随する NEXT 複合体による、*R* 遺伝子の転写産物に対する分解制御は全く明らかにされていない。それだけでなく、植物免疫活性化に伴う大規模な転写リプログラミングにおける *SMN2* や RNA エキソソームの役割は全く解明されていない。以上より、本研究では、1) *SMN1* と *SMN2* をモデルに、RNA エキソソームがどのように *R* 遺伝子の mRNA 分解制御を介して植物免疫と機能的に関わるか、そして、2) 植物免疫活性化に伴う転写リプログラミングにおける *SMN2* の機能は何か、以上の2点を目的とした。

3. 研究の方法

(1) *SMN1* と *SMN2* をモデルに、RNA エキソソームがどのように *R* 遺伝子の mRNA 分解制御を介して植物免疫と機能的に関わるか？

smn2 変異体に対して、*SMN1* が認識する *hopA1* エフェクターを持つ *P. syringae* を接種し、病害抵抗性を解析した。本接種実験により *SMN2* が *SMN1* の機能に寄与するか明らかにした。

(2) *SMN2* が *SMN1* の機能に関与するならば、*smn1* と同様に *smn2* 変異も *mekk1* および *mpk4* の自己免疫表現型を抑制する可能性が予想された。よって、*mekk1smn2* および *mpk4smn2* 二重変異体を作製し、自己免疫表現型の指標として、1) 矮性、2) 細胞死、3) 活性酸素種蓄積の3項目について解析した。

(3) 植物免疫活性化に伴う転写リプログラミングにおける *SMN2* の機能は何か？

SMN2 は RNA 分解機構であるエキソソームの基質特異性を決定する。植物免疫活性化に伴い多数の防御関連遺伝子の発現を含む転写リプログラミングが起こるが、*SMN2* がこの現象に関与するか明らかにする必要がある。*smn2* 変異の影響を受ける遺伝子ならば、発現レベルが野生型と *smn2* で異なったり、分解されず短い RNA が蓄積したりする遺伝子 (およびその領域) が存在するはずである。これらの点を明らかにするため、シロイヌナズナ野生型と *smn2* 変異体を用いて RNA-Seq 解析を行い、発現において *smn2* 変異の影響を受ける遺伝子を同定した。

4. 研究成果

SMN1 の植物免疫における機能は、非病原性遺伝子 *hopA1* を有するトマト斑葉細菌病菌 *Pst DC3000* (*hopA1*) に対する ETI 活性化による病害抵抗性である。よってシロイヌナズナ野生型と *smn2* 変異体に対して、*Pst DC3000* (*hopA1*) を接種し、病害抵抗性を比較したところ、*smn2* 変異体は野生型より罹病性を示した。また、*SMN1* の植物免疫における機能の第2点は、MEKK1 経路の欠損による自己免疫表現型の誘導である。我々は、MEKK1 経路の変異体である *mekk1* および *mpk4* の自己免疫表現型が、*smn1* と二重変異体を作製することで抑制されることをすでに明らかにしている。*SMN2* が *SMN1* の機能に関与するならば、*smn2* も同様に *mekk1* および *mpk4* の自己免疫表現型を抑制する可能性が予想される。よって、*mekk1smn2* および *mpk4smn2* 二重変異体を作製し、自己免疫表現型の指標として、1) 矮性、2) 細胞死、3) 活性酸素種蓄積の3項目について解析した。

目について解析した。その結果、いずれの項目についても *smn2* 変異による抑制が明らかになったことから、*SMN2* は *SMN1* の機能と密接に関連する重要な因子であることが明らかとなった。*smn2* 変異体において、*SMN1* の 3' 領域において野生型では見られない異常な RNA の蓄積が検出された。他グループの研究により、上記のゲノム領域には TIR ドメインをコードする新奇遺伝子が存在する事が明らかとなった。これを受けて、新奇 TIR タンパク質と *SMN1*/*RPS6* の TIR ドメインを用いて結合を解析したが、結合は検出されなかった。このことから、タンパク間相互作用によらず、*smn2* 変異体で生成する異常な RNA 蓄積が *SMN1* の機能低下に関連する可能性が示唆された。

SMN1 に留まらず、植物免疫において *SMN2* の影響下にある遺伝子を同定し、*SMN2* の機能について広く知見を得るため、野生型と *smn2* 変異体を用いた RNA-seq 解析を行った。そのデータを基に GO エンリッチメント解析を実施した結果、*smn2* 変異体では多数の防御遺伝子の発現が低下していた。よって、防御遺伝子のゲノムワイドな発現において、*SMN2* が正の役割を担うことが示唆された。以上のことから、核 RNA エキソソームが *SMN2* を介して防御関連遺伝子の発現を正に制御する可能性を明らかにした。

本研究は 2020 年度でほぼ目的を達成したことから *mpk4* 変異体の解析を行うこととした。*mpk4* 変異体の自己免疫表現型は *smn1* と *summ2* 変異がそれぞれ抑制する。*summ2* 変異による *mpk4* の表現型抑制は相対的に弱いことから、*SMN1* 遺伝子の影響が顕著であると考えた。*mpk4 smn1 summ2* 三重変異体を作製したところ、*mpk4* 変異体の自己免疫表現型は完全に抑制された。よって *MPK4* の欠損による *SMN1* と *SUMM2*、2 つの *NLR* が活性化することが示された。

本研究では、*mekk1* 変異体のフェノコピーとして、常に矮性と自己免疫を示すシロイヌナズナの遺伝子組換え体をもとに、矮性を示さなくなった復帰変異体を単離し、原因遺伝子として *SMN1* と *SMN2* を同定した。本研究の中心に据える *SMN2* は、RNA ヘリカーゼをコードし、核における RNA の品質管理機構に重要な核エキソソームの標的決定因子である。本研究では、植物病原細菌に対する免疫受容体遺伝子 *SMN1*/*RPS6* が機能をする際に、*SMN2* が関与する RNA 品質管理による制御が重要であることが明らかにされた。この研究成果は、植物の免疫と大きさのバランスを制御する仕組みの解明に役立つことが期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Takagi Momoko, Iwamoto Naoki, Kubo Yuta, Morimoto Takayuki, Takagi Hiroki, Takahashi Fuminori, Nishiuchi Takumi, Tanaka Keisuke, Taji Teruaki, Kaminaka Hironori, Shinozaki Kazuo, Akimitsu Kazuya, Terauchi Ryohei, Shirasu Ken, Ichimura Kazuya	4. 巻 61
2. 論文標題 Arabidopsis SMN2/HEN2, Encoding DEAD-Box RNA Helicase, Governs Proper Expression of the Resistance Gene SMN1/RPS6 and Is Involved in Dwarf, Autoimmune Phenotypes of mekk1 and mpk4 Mutants	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Plant and Cell Physiology	6. 最初と最後の頁 1507 ~ 1516
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/pcp/pcaa071	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 -
1. 著者名 Momoko Takagi, Kohei Hamano, Hiroki Takagi, Takayuki Morimoto, Kazuya Akimitsu, Ryohei Terauchi, Ken Shirasu, Kazuya Ichimura	4. 巻 60
2. 論文標題 Disruption of the MAMP-induced MEKK1-MKK1/MKK2-MPK4 pathway activates the TNL immune receptor SMN1/RPS6	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Plant and Cell Physiology	6. 最初と最後の頁 778-787
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/pcp/pcy243	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 -
1. 著者名 Takagi Momoko, Nagai Suzuna, Kaminaka Hironori, Akimitsu Kazuya, Shirasu Ken, Ichimura Kazuya	4. 巻 17
2. 論文標題 Simultaneous mutations in SMN1 and SUMM2 fully suppress the dwarf and autoimmune phenotypes of Arabidopsis mpk4 mutant	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Plant Signaling & Behavior	6. 最初と最後の頁 e2046412
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/15592324.2022.2046412	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 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 川人恵理香、永井鈴奈、高木桃子、秋光和也、白須賢、市村和也
2. 発表標題 シロイヌナズナsmn2/hen2変異体におけるNLR遺伝子SMN1/RPS6の3 末端領域で生じる転写物と機能低下の関連について
3. 学会等名 生物系三学会（動物学会・植物学会・生態学会）合同中国支部大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 高木桃子, 岩本直樹, 久保佑太, 森本貴行, 高木宏樹, 高橋史憲, 西内巧, 田中啓介, 太治輝昭, 上中弘典, 篠崎一雄, 秋光和也, 寺内良平, 白須賢, 市村和也.
2. 発表標題 DEAD-box RNA ヘリカーゼをコードするシロイヌナズナSMN2/HEN2 はSMN1/RPS6 による病害抵抗性に必須でありmekk1及びmpk4 変異体の矮性を伴う防御反応表現型に關与する
3. 学会等名 令和2年度日本植物病理学会關西部会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 市村和也, 高木桃子, 岩本直樹, 久保佑太, 森本貴行, 萩藤孝輔, 高木宏樹, 高橋史憲, 篠崎一雄, 上中弘典, 田中啓介, 太治輝昭, 秋光和也, 寺内良平, 白須賢
2. 発表標題 DEAD-box RNA ヘリカーゼをコードするシロイヌナズナSMN2/HEN2 は抵抗性遺伝子 SMN1/RPS6 の機能に必須である
3. 学会等名 第8回植物RNAネットワークシンポジウム
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高木桃子, 岩本直樹, 久保佑太, 森本貴行, 萩藤孝輔, 高木宏樹, 田中啓介, 太治輝昭, 秋光和也, 寺内良平, 白須賢, 市村和也
2. 発表標題 DEAD-box RNA ヘリカーゼをコードする SMN2 は抵抗性遺伝子 SMN1/RPS6 の正常な発現に必要である
3. 学会等名 植物微生物研究会第29回研究交流会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 森本貴行, 瀧野康平, 高木桃子, 高木宏樹, 寺内良平, 白須 賢, 市村和也
2. 発表標題 MEKK1経路変異体の防御反応表現型に關与するRタンパク質SMN1が認識するエフェクターHopA1の機能解析
3. 学会等名 第54回植物感染生理談話会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 高木桃子, 岩本直樹, 久保佑太, 森本貴行, 高木宏樹, 田中啓介, 太治輝昭, 秋光和也, 寺内良平, 白須賢, 市村和也
2. 発表標題 シロイヌナズナSMN2はDEAD-box RNAヘリカーゼをコードし抵抗性遺伝子SMN1/RPS6の正常な発現に必要である
3. 学会等名 中国四国植物学会第76回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 秋藤孝輔, 高木桃子, 秋光和也, 市村和也
2. 発表標題 防御関連遺伝子発現における核RNA品質管理機構関連因子SOP1の關与
3. 学会等名 中国四国植物学会第76回大会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>「植物の「自己免疫」から、植物の免疫制御メカニズムの一端を解明」 https://www.kagawa-u.ac.jp/25064/ 香川大学農学部市村研究室ブログ https://www.ag.kagawa-u.ac.jp/kichimura/pg291.html 市村和也研究室 香川大学農学部植物科学領域 https://www.ag.kagawa-u.ac.jp/kichimura/</p>
--

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
研究協力者	高木 桃子 (Takagi Momoko)		

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