

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 6 月 5 日現在

機関番号：23401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K06057

研究課題名(和文)植物の概日時計による組織特異的な非宿主抵抗性制御機構の解明

研究課題名(英文)Regulation of tissue-specific nonhost resistance by the circadian clock in plants

研究代表者

石川 敦司 (Ishikawa, Atsushi)

福井県立大学・生物資源学部・教授

研究者番号：70264687

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、シロイヌナズナの概日時計による組織特異的な非宿主抵抗性制御について下記の3つの成果を得た。(1)概日時計 CCA1 がイネいもち病菌に対する非宿主抵抗性において正の制御因子として機能している。(2)葉の表皮細胞の CCA1 が組織特異的に非宿主抵抗性を制御している。(3)葉の表皮細胞の CCA1 が PMR5 遺伝子の発現制御を通して非宿主抵抗性を制御している。以上の結果より、シロイヌナズナのイネいもち病菌に対する非宿主抵抗性において CCA1-PMR5モジュールが組織特異的かつ時間特異的の制御に関わることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、シロイヌナズナのイネいもち病菌に対する非宿主抵抗性においては、概日時計CCA1が葉の表皮細胞特異的にPMR5 遺伝子の発現を制御することにより非宿主抵抗性を組織特異的かつ時間特異的に制御していることが示唆された。この成果は、時刻および植物組織を選んで植物防除の効果を最大限引き出す技術(組織特異的な概日時計を標的とした農薬の開発および遺伝子組み換え作物の創出等)の開発につながると期待される。

研究成果の概要(英文)：Nonhost resistance (NHR) is the most robust and durable resistance in plants, but its spatiotemporal regulation is poorly understood. The circadian clock functions in a tissue-specific manner and regulates individual physiological processes in plants. Using mutant and RNA-seq analyses, we revealed a role of CCA1 in tissue-specific and time-of-day-specific regulation of NHR to *Pyricularia oryzae* in *Arabidopsis*. Targeted perturbation of CCA1 function in epidermis compromised time-of-day-specific regulation of NHR to *P. oryzae* in *Arabidopsis*. RNA-seq analysis showed that *P. oryzae* inoculation alters the transcriptome in *pen2* plants and identified PMR5 as a candidate gene of direct targets of CCA1. Time-of-day-specific penetration resistance to *P. oryzae* was reduced in *Arabidopsis pen2 pmr5* mutant plants. These findings suggest that epidermal CCA1 and PMR5 contribute to the establishment of time-of-day-specific NHR to *P. oryzae* in *Arabidopsis*.

研究分野：植物保護科学

キーワード：シロイヌナズナ イネいもち病菌 非宿主抵抗性 組織特異性 概日時計 CCA1

## 1. 研究開始当初の背景

研究開始当初、シロイヌナズナの非宿主抵抗性制御遺伝子として4種の *PENETRATION* 遺伝子 (*PEN1*、*PEN2*、*PEN3*、*PEN4*) が同定されていた。申請者は、シロイヌナズナのイネいもち病菌に対する非宿主抵抗性について解析し、非宿主抵抗性は侵入抵抗性と伸展抵抗性に分けられ、*PEN2* (ミロシナーゼ)、*AGB1* (三量体 G タンパク質  $\beta$  サブユニット)、*PMR5* (アシルエステラーゼファミリー)、*ML02* (膜タンパク質)、*MPK6* (MAP キナーゼ)、*AtRbohF* (NADPH 酸化酵素) が非宿主抵抗性を制御していることを見いだしていた。また申請者は、シロイヌナズナのイネいもち病菌に対する非宿主抵抗性は病原菌の接種時刻および植物個体の葉位によって変動することも明らかにしていた。さらに当時、植物の概日時計が日長変化のみならず環境ストレスや病原菌感染に対する生理応答において重要な制御因子として機能していることが明らかとなってきた。

## 2. 研究の目的

シロイヌナズナのイネいもち病菌に対する非宿主抵抗性が病原菌の接種時刻によって変動したことから、シロイヌナズナの概日時計が非宿主抵抗性制御に関与する可能性が示唆された。そこでさまざまな概日時計変異体における非宿主抵抗性を解析したところ、シロイヌナズナの概日時計 *CCA1* が非宿主抵抗性を制御していることが明らかとなった。

ところで、遠藤らは、植物の概日時計は組織特異的に、半ば独立して、さまざまな生理応答を制御していることを明らかにした。それならば、非宿主抵抗性を制御している概日時計 *CCA1* に組織特異性はあるのだろうか？ また、概日時計システムによる生理応答は、外部環境の変化に応答して時刻を調節する「入力系」、その情報を処理する概日時計、そして時刻情報をさまざまな生理現象として表現する「出力系」により制御されている。そうすると、非宿主抵抗性制御において概日時計 *CCA1* の時刻情報を表現する「出力系」は何なのだろうか？ しかし、これら問題については未解明のままであった。

そこで本研究においては、シロイヌナズナのイネいもち病菌に対する非宿主抵抗性を制御する (1) 概日時計 *CCA1* の組織特異性 および (2) 概日時計 *CCA1* の時刻情報を表現する「出力系」について明らかにすることを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) 非宿主抵抗性を制御する概日時計 *CCA1* の組織特異性と機能の解析

非宿主抵抗性を制御する概日時計 *CCA1* の葉における組織特異性について明らかにするために、葉の表皮細胞や葉肉細胞などの概日時計機能をそれぞれ阻害したシステムの解析を行った。それぞれの系統にイネいもち病菌を接種後、イネいもち病菌の侵入率を解析し、組織特異的概日時計の侵入抵抗性における役割を明らかにした。

### (2) 概日時計 *CCA1* が制御する組織特異的「出力系」遺伝子の同定

申請者の先行研究により、*PEN2* 遺伝子を含むさまざまな遺伝子が非宿主抵抗性制御に関与していることが明らかとなっていた。これら既知遺伝子の中に概日時計 *CCA1* が制御する「出力系」遺伝子が存在するかを明らかにするために、*CCA1* に依存した概日リズム発現を示す遺伝子を探索し、「出力系」候補遺伝子とした。

概日時計 *CCA1* が制御する新奇な組織特異的「出力系」遺伝子を探索するために、上記(1)で使用した組織特異的に概日時計を阻害したシステムを用いた RNAseq 解析を行った。

以上の解析により、*CCA1* が制御する組織特異的「出力系」遺伝子を同定した。

## 4. 研究成果

まず初めに、*pen2* 変異体において35S プロモーターの下流に *CCA1* をつなぎ過剰発現させた *pen2 CCA1ox* 系統を作出した。この過剰発現系統においては概日時計の機能不全が起こる。この系統においてイネいもち病菌に対する非宿主抵抗性を解析すると、侵入抵抗性の顕著な低下が観察された(図1)。この結果から、シロイヌナズナのイネいもち病菌に対する非宿主抵抗性において、概日時計 *CCA1* が正の制御因子として機能していることが示唆された。

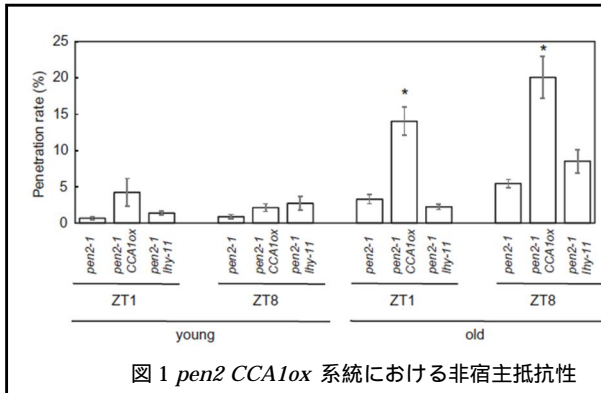


図1 *pen2 CCA1ox* 系統における非宿主抵抗性

次に、葉の表皮細胞特異的 *CER6* プロモーターの下流に *CCA1* および *TOC1* をつなぎ過剰発現させた系統(*pen2 CER6-CCA1* および *pen2 CER6-TOC1*)をそれぞれ作出した。これら系統においてイネいもち病菌に対する非宿主抵抗性を解析したところ、*pen2 CER6-CCA1* 系統において侵入抵抗性の顕著な低下が観察された(図2)。この結果から、シロイヌナズナのイネいもち病菌に対する非宿主抵抗性において、葉の表皮細胞の *CCA1* が正の制御因子として機能していることが示唆された。

*pen2* 変異体および *pen2 CER6-CCA1* 系統を用いて RNAseq 解析を行った。その結果、葉の表皮細胞において概日時計 *CCA1* が制御していると予測される遺伝子を複数同定した。これら遺

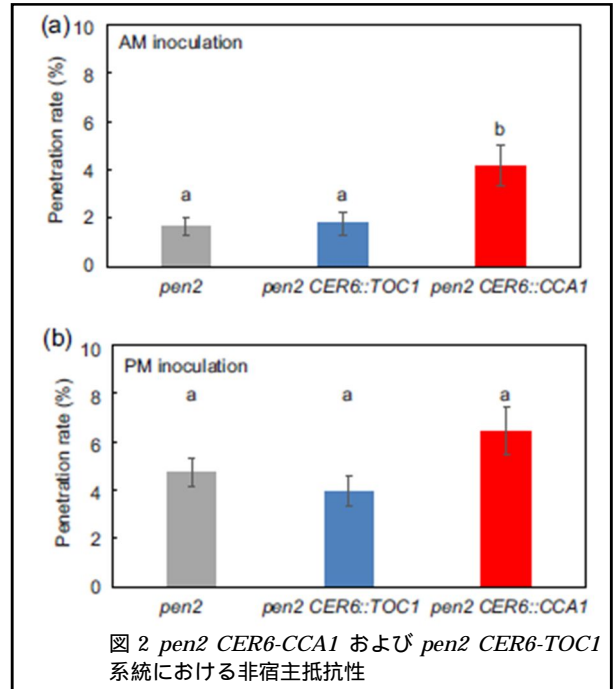


図2 *pen2 CER6-CCA1* および *pen2 CER6-TOC1* 系統における非宿主抵抗性

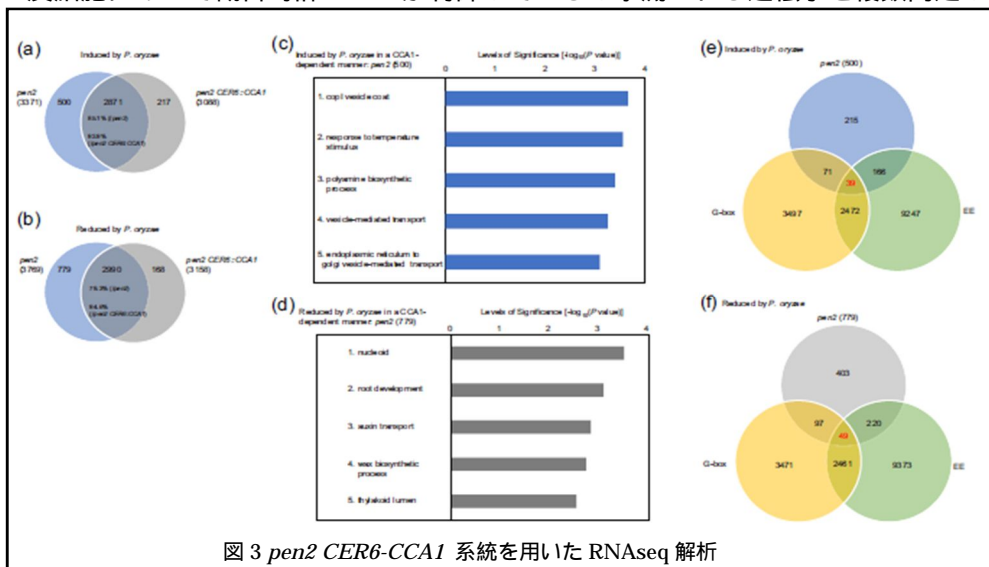


図3 *pen2 CER6-CCA1* 系統を用いた RNAseq 解析

さらに解析を行い、表皮細胞特異的 *CCA1* の「出力系」候補遺伝子中に抵抗性関連遺伝子 *PMR5* 遺伝子を見出した。*PMR5* 遺伝子のプロモーター領域には *CCA1* 結合配列が存在したことから ChIP-seq データを解析したところ、*PMR5* 遺伝子が *CCA1* の直接の標的遺伝子であることが示唆された。さらに *pen2 pmr5* 変異体および *pen2 mlo2 nahG pmr5* 変異体についてイネいもち病菌に対する非宿主抵抗性を解析したところ、コントロールに対して侵入抵抗性の顕著な低下が観察された(図4)。この結果から、*PMR5* は葉の表皮細胞において *CCA1* の下流で働く重要な非宿主抵抗性制御因子であることが示唆された。

以上の結果より、シロイヌナズナのイネいもち病菌に対する非宿主抵抗性において *CCA1-PMR5* モジュールが組織特異的かつ時間特異的の制御に関与することが示唆された。

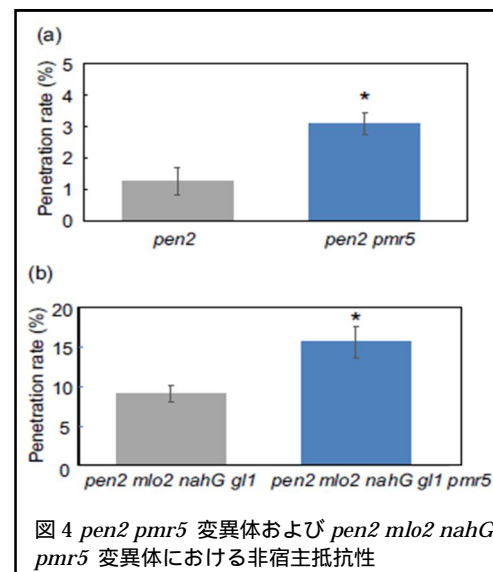


図4 *pen2 pmr5* 変異体および *pen2 mlo2 nahG pmr5* 変異体における非宿主抵抗性

伝子の中にはプロモーター領域に *CCA1* 結合配列を含む遺伝子も同定された(図3)。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Nami Maeda, Takaya Noguchi, Norihito Nakamichi, Takamasa Suzuki and Atsushi Ishikawa	4. 巻 86
2. 論文標題 Epidermal CCA1 and PMR5 contribute to nonhost resistance in Arabidopsis	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry	6. 最初と最後の頁 1623-1630
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/bbb/zbac160	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 Shimizu Sayaka, Yamauchi Yuri, Ishikawa Atsushi	4. 巻 22
2. 論文標題 Photoperiod Following Inoculation of Arabidopsis with Pyricularia oryzae (syn. Magnaporthe oryzae) Influences on the Plant?Pathogen Interaction	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 5004-5004
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms22095004	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 Ayumi Kosaka, Marta Pastorczyk, Mariola Pislewska-Bednarek, Takumi Nishiuchi, Erika Ono, Haruka Suemoto, Atsushi Ishikawa, Henning Frerigmann, Masanori Kaido, Kazuyuki Mise, Pawel Bednarek, Yoshitaka Takano	4. 巻 11
2. 論文標題 Tryptophan-derived metabolites and BRASSINOSTEROID INSENSITIVE 1-ASSOCIATED RECEPTOR KINASE 1 separately contribute to Arabidopsis postinvasive immunity against Alternaria brassicicola	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 1488
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-79562-x	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 Saaya Yamaura, Yuri Yamauchi, Motoi Makihara, Takafumi Yamashino & Atsushi Ishikawa	4. 巻 84
2. 論文標題 CCA1 and LHY contribute to nonhost resistance to Pyricularia oryzae (syn. Magnaporthe oryzae) in Arabidopsis thaliana	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry	6. 最初と最後の頁 76-84
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/09168451.2019.1660612	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5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 清水紗也佳, 山内友里, 石川敦司
2. 発表標題 イネいもち病菌接種後の日照条件はシロイヌナズナーイネいもち病菌相互作用に影響を及ぼす
3. 学会等名 日本植物病理学会関西支部会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山浦沙彩, 山内友里, 榎原基, 山篠貴史, 石川敦司
2. 発表標題 シロイヌナズナのイネいもち病菌に対する非宿主抵抗性におけるCCA1とLHYの関与
3. 学会等名 日本植物病理学会関西支部会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 野口崇哉, 石川敦司
2. 発表標題 シロイヌナズナのイネいもち病菌に対する非宿主抵抗性における概日時計の解析
3. 学会等名 北陸線植物バイオサイエンス研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 藤井歩, 石川敦司
2. 発表標題 シロイヌナズナの葉齢がイネいもち病菌に対する非宿主抵抗性におよぼす影響
3. 学会等名 北陸線植物バイオサイエンス研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 石川敦司
2. 発表標題 シロイヌナズナのイネいもち病菌に対する非宿主抵抗性
3. 学会等名 北陸線植物バイオサイエンス研究会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

福井県立大学生物資源学部生物資源学科植物病理学分野  
<https://www.s.fpu.ac.jp/fpu-bio/works5F-2.html>  
 福井県立大学生物資源学部分子生物学研究領域  
<http://www.fpu.ac.jp/biotech/kenkyu/5f.html>

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 分 担 者	仲下 英雄	福井県立大学・生物資源学部・教授	
	(Nakashita Hideo)  (70280724)	  (23401)	

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
---------	---------