

令和 6 年 6 月 25 日現在

機関番号：23903

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2023

課題番号：19K06711

研究課題名(和文) 植物の長鎖非コードRNAが関わる感染防御機構：RNA結合因子からのアプローチ

研究課題名(英文) Defense mechanisms involving long non-coding RNAs in plants: an approach from RNA-binding factor study.

研究代表者

湯川 泰 (Yukawa, Yasushi)

名古屋市立大学・大学院理学研究科・教授

研究者番号：70381902

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：細胞中のRNAのうちmRNA以外は非コードRNA(ncRNA)と呼ばれ、特に200塩基を超える長いRNA(lncRNA)の機能は不明な点が多い。シロイヌナズナから発見されたAtR8 lncRNAは、感染防御とストレス応答に関与しているらしく、このRNAに結合するタンパク質を明らかにした。その結果、機能がまだよくわかっていない熱ストレス蛋白質(HSP70)の一種がこのRNAと結合することが判明した。やはりストレスとの関連が深く、さらに詳細な機能解析を進めている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

植物は生育場所を変更できないため、様々な環境変化に適応する必要があり、優れたストレス応答や感染防御の仕組みを持っている。タンパク質に比べて、感染防御に対処するRNAのことはよく分かっていない。アブラナ科植物から発見されたAtR8 lncRNAはタンパク質と結合してストレス耐性や感染防御を示す。本研究ではその結合タンパク質を明らかにした。本研究で、RNAの関わる感染防御が解明できれば、将来的な植物の利用に活用できる。

研究成果の概要(英文)：Noncoding RNAs (ncRNAs) are cellular RNAs which are not classified with mRNAs. Especially, longer version of ncRNA is called as lncRNA, and which functions are not clear. AtR8 lncRNA was discovered in Arabidopsis seems to be involved in defense and stress response, and we have identified proteins that bind to this RNA. For example, a kind of heat stress protein (HSP70), whose function is not yet well characterized, binds to this RNA. The protein is also closely related to stress, and more detailed functional analysis is now ongoing.

研究分野：植物分子生物学

キーワード：長鎖非コードRNA シロイヌナズナ 感染防御 RNAポリメラーゼIII ストレス応答 サリチル酸 熱ショックタンパク質 RNA結合タンパク質

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、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

多細胞生物のゲノムから作られる転写物の大半が、タンパク質をコードしない非コード RNA (ncRNA) である。miRNA など小分子 RNA の発見が生命科学に新たな展開と実用価値をもたらしたのに対し、200 塩基長を超える長鎖非コード RNA (lncRNA) については不明な点が多い。しかし、ダイズの根粒形成に関わる *EVOD40* RNA のように、lncRNA 機能解明の一端は確実に従来からの生物学的概念を拡張した。申請者は、約 20 年前にシロイヌナズナから RNA ポリメラーゼ III で転写される *AtR8* lncRNA を見つけ、この RNA が細胞内に極めて多量に蓄積していたことから重要な生理機能を紐解く手がかりを得た (Wu *et al.*, 2012)。260 塩基の長さがあり、5' キャップやポリ (A) 尾部を持たず、根の細胞質に長いまま多量に存在した。

AtR8 lncRNA はサリチル酸で発現抑制され、類似の RNA はキャベツなどのアブラナ科内にも存在した。*AtR8* lncRNA の欠損は、根の伸長抑制、種子形成不全、発芽率低下を示し、同時に WRKY 転写因子群が高発現する。対して過剰発現体はよく育ち、種子の発芽率が高い。特に、*AtR8* lncRNA はタンパク質と結合して細胞質に安定に存在する。その発現はサリチル酸で抑制され、*AtR8* lncRNA は「非 mRNA 型」としては植物初の感染防御に関与する lncRNA であった。

2. 研究の目的

AtR8 lncRNA は蓄積量が多く、感染を含め広くストレスに応答するが、その詳細な機能と作用機序は不明であった。サリチル酸の誘導に必要な濃度がかかなり低いことから、既知の感染防御機構とは異なっていた。そこで「植物には、大規模なタンパク質合成カスケードを伴わない、lncRNA によるシンプルな免疫機構が秘められている」と仮定して研究を進めることにした。現に、*AtR8* lncRNA の過剰発現体は強く育つため、*AtR8* lncRNA の関わる感染防御機構が明らかにできれば、強靱な植物を作るための新たなアプローチが可能になると考え、以下の研究目的を立てた。

- 目的① *AtR8* lncRNA の感染防御機構に関わる機能を、その結合タンパク質から解明する
- 目的② *AtR8* lncRNA 遺伝子の発現制御機構を解明する

3. 研究の方法

(1) 目的①を達成するため、*AtR8* lncRNA の結合タンパク質を単離同定した

シロイヌナズナ MM2d 培養細胞は、常にストレスを受けている状態のため *AtR8* lncRNA を高レベルに発現している。植物の培養細胞は安価に大量の細胞を調製することが可能である。*AtR8* lncRNA は細胞質に局在していることが判明していたので、細胞質画分から RNA-タンパク質複合体を精製した。精製方法は、複合体を壊さない手法を組み合わせ、疎水相互作用クロマトグラフィー、ゲル濾過クロマトグラフィー、グリセロール密度勾配遠心を採用した。分離後に RNA のピーク画分を同定し、その画分に含まれるタンパク質を質量分析で同定した。

(2) 目的②を達成するため、*AtR8* lncRNA 遺伝子のサリチル酸依存的発現制御機構を調べた

AtR8 lncRNA と感染防御に関連する WRKY70 転写因子との間には発現の逆相関性があり、WRKY70 が誘導する「本格的な免疫」と *AtR8* lncRNA が誘導する「低コスト免疫」をスイッチしていると予想された (図 1)。その転写制御機構をタバコの *in vitro* 転写系および *in vivo* 系を用いて検証した。

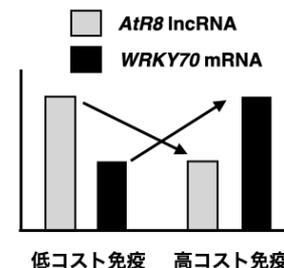


図1 *AtR8* lncRNA と WRKY mRNA の発現は逆相関する

4. 研究成果

(1) *AtR8* lncRNA の結合タンパク質を単離同定した

シロイヌナズナ MM2d 培養細胞の細胞質画分から、疎水相互作用クロマトグラフィー、ゲル濾過クロマトグラフィー、グリセロール密度勾配遠心による分離後に LC-MS/MS 質量分析 (Q Exactive plus) によって、*AtR8* lncRNA に結合する 61 種類のタンパク質候補を同定した (図 2)。さらにその中から、感染防御に関わるヒートショックタンパク質 (AtHSP70) とグリシンリッチタンパク質 (AtGRP8) に着目し解析をすすめた。特に、HSP70 は生物に広く保存

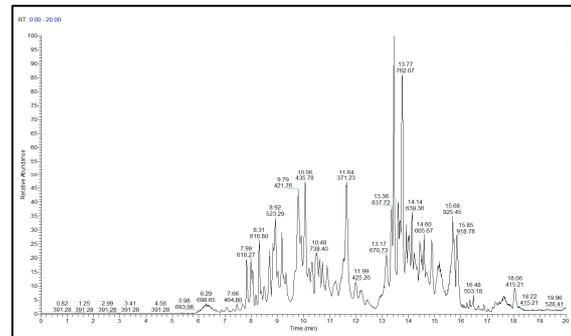


図 2 *AtR8* RNA 結合タンパク質の質量分析

される熱ストレス誘導性タンパク質で、最も研究されている。最近、植物ではその感染防御に関わる機能が注目されており、*AtR8* lncRNA に結合するのは細胞質に局在する AtHSP70-3 (変異体入手済) であった。精製過程の非特異的結合を考慮する必要があったが、少なくとも HSP70 抗体を使った RNA 免疫沈降で *AtR8* lncRNA が共沈することを確認した (論文準備中)。また、細胞内の共局在を確認するため、蛍光タンパク質融合 HSP70 およびアプタマー融合 *AtR8* を作製した。長鎖非コード RNA が関わる未知の感染防御機構が解明できれば、植物強韌化の手段を増やすことができる。

(2) *AtR8* lncRNA 遺伝子のサリチル酸依存的発現制御機構

AtR8 lncRNA は RNA ポリメラーゼ III で転写される非コード RNA であり、*WRKY70* 遺伝子からは RNA ポリメラーゼ II で mRNA が転写される。この両遺伝子の発現は共にサリチル酸で制御されるが、その制御は正反対である。この制御はサリチル酸応答に中心的に働く NPR1 (Nonexpresser of Pathogenesis Related genes 1) 因子が、両遺伝子の 5' 近傍にあるサリチル酸応答配列 *as-1* (activation sequence-1) に作用して起きると推測する仮定した (図 5)。そこで、*AtR8* 遺伝子および *WRKY70* 遺伝子の *as-1* 配列に変異を導入し、タバコの *in vitro* 転写系および *in vivo* 系を用いて転写制御を検証し、上記の仮定を証明することができた。

(3) その他の結果

局在：細胞質内で顆粒状に点在する。主に根端分裂組織付近にあり、発芽直後に発現量が極大となる。また、未熟種子にも蓄積する (論文準備中)。キャベツにも類似性 80% の *BoNR8* lncRNA があり、アブシジン酸で発現が促進される (Wu *et al.*, 2018)。両 RNA とともに光に応答して発現するが、その応答様式は異なる (Zhang *et al.*, 2023)。

変異体の特徴：欠損変異体 (*atr8*) では、光合成関連遺伝子の発現が低下し、感染防御関連遺伝子の発現が高まる (Li *et al.*, 2020)。さらに、種子形成や発芽率が野生型に比べて低下する (論文準備中)。対して、過剰発現体 (*AtR8-0x*) は種子の発芽率が増加する。

<引用文献>

Wu *et al.*, (2012) A novel hypoxic stress-responsive long non-coding RNA transcribed by RNA polymerase III in Arabidopsis *RNA Biol.*, 9: 302-313.

Wu *et al.*, (2018) Pol III-dependent cabbage *BoNR8* long ncRNA affects seed germination and growth in Arabidopsis. *Plant Cell Physiol.*, 60: 421-435.

Li *et al.*, (2020) The Arabidopsis hypoxia inducible *AtR8* long non-coding RNA also contributes to plant defense and root elongation coordinating with *WRKY* genes under low levels of salicylic acid. *Non-coding RNA.*, 6: 8.

Wu *et al.*, (2020) The *AtGSTU7* gene influences glutathione-dependent seed germination under ABA and osmotic stress in Arabidopsis. *BBRC*, 528: 538-544.

Zhang *et al.*, (2023) RNA Polymerase III-dependent *BoNR8* and *AtR8* lncRNAs contribute to hypocotyl elongation in response to light and abscisic acid. *Plant Cell Physiol.*, 64: 646-659.

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 3件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Zhang Nan, Xu Kai, Liu Shengyi, Yan Rong, Liu Ziguang, Wu Ying, Peng Yifang, Zhang Xiaoxu, Yukawa Yasushi, Wu Juan	4. 巻 -
2. 論文標題 RNA Polymerase III dependent BoNR8 and AtR8 lncRNAs contribute to hypocotyl elongation in response to light and abscisic acid	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Plant and Cell Physiology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/pcp/pcad025	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 該当する

1. 著者名 Wu Juan, Zhang Nan, Liu Ziguang, Liu Shengyi, Liu Chunxiao, Lin Jianhui, Yang He, Li Shuang, Yukawa Yasushi	4. 巻 528
2. 論文標題 The AtGSTU7 gene influences glutathione-dependent seed germination under ABA and osmotic stress in Arabidopsis	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Biochemical and Biophysical Research Communications	6. 最初と最後の頁 538 ~ 544
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.bbrc.2020.05.153	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 Shuang Li, Saraswati Nayar, HuiYuan Jia, Sanjay Kapoor, Juan Wu and Yasushi Yukawa	4. 巻 6
2. 論文標題 The Arabidopsis hypoxia inducible AtR8 long non-coding RNA also contributes to plant defense and root elongation coordinating with WRKY genes under low levels of salicylic acid	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Noncoding RNA	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/ncrna6010008	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

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 賈慧源、吳娟、李爽、湯川泰
2. 発表標題 植物の感染防御に働く長鎖非コードRNAの結合タンパク質同定
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 HuiYuan Jia, Juan Wu, Shuang Li and Yasushi Yukawa
2. 発表標題 Identification of binding proteins of long non-coding RNA that act in plant infection defense
3. 学会等名 International Conference on Arabidopsis Research (ICAR2023) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 賈慧源、吳娟、李爽、湯川泰
2. 発表標題 植物の感染防御に働く長鎖非コードRNAの結合タンパク質同定
3. 学会等名 第46回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

湯川教授の論文が国際学術誌 Plant and Cell Physiology に掲載されました https://www.nsc.nagoya-cu.ac.jp/achievement/20230406a 湯川教授の論文が国際学術誌BBRCに掲載されました https://www.nsc.nagoya-cu.ac.jp/achievement/ 李爽さん（湯川研・博士後期課程）の論文が国際学術誌non-coding RNAに掲載されました https://www.nsc.nagoya-cu.ac.jp/achievement/li20200305/

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			
インド	University of Delhi South Campus			
中国	Northeast Forestry University			