

令和 5 年 6 月 8 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20H03274

研究課題名（和文）植物免疫ホルモンであるサリチル酸の生合成を制御する情報伝達経路の解明

研究課題名（英文）Elucidation of signal transduction pathways that regulate the biosynthesis of a plant immune hormone salicylic acid

研究代表者

多田 安臣（Tada, Yasuomi）

名古屋大学・遺伝子実験施設・教授

研究者番号：40552740

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 13,600,000円

研究成果の概要（和文）：病原菌、オゾンやUVなど多様なストレスに共通して発現する327遺伝子のプロモーター上に有意に出現するシス配列とこれを認識する転写因子（SBR1、2および3）を選抜した。SBRはSA合成関連遺伝子ICS1やPBS3を発現誘導することを確認した。また、SBRの発現上昇に応じて、SA合成を担う転写因子CBP60gやSARD1、さらにはICS1とPBS3の発現誘導が確認された。加えてChIP-seq解析から、SBRはSA合成関連遺伝子群のプロモーター上に分布することが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

病原菌、オゾンやUVなど多様なストレスを感知し、サリチル酸の合成を開始する転写因子SBRを同定した。SBRは生物学的あるいは非生物学的ストレス応答に重要な役割を担っていると考えられ、ストレス応答の中核因子であると言える。これまで、各ストレスからサリチル酸合成に至る情報伝達経路は未解明であったため、個別の情報伝達経路の理解にも多大な貢献をなすと考えられる。一因子が多くのストレスに対して耐性を付与できることから、分子育種上の重要因子として捉えることができる。

研究成果の概要（英文）：We selected cis-elements that are enriched on the promoters of 327 genes that are commonly expressed in response to various stresses such as pathogenic bacteria, ozone, and UV. Then, we identified three transcription factors (SBR1, 2, and 3) that recognize these cis-elements. We confirmed that SBRs induce the expression of SA synthesis-related genes ICS1 and PBS3. We generated dexamethasone (DEX)-inducible SBR plants (pDEX:SBR-GFP) and confirmed that the expression of the transcription factors CBP60g and SARD1, responsible for SA synthesis as well as ICS1 and PBS3. SA was significantly accumulated in leaves treated with DEX. RNA-seq analysis demonstrated that SBRs induce the expression of defense-related genes and SA synthesis-related genes. In addition, ChIP-seq analysis showed that SBR is distributed on the promoters of SA synthesis-related genes.

研究分野：植物病理

キーワード：サリチル酸 植物免疫 疾病防除 生物学的ストレス 非生物学的ストレス

1. 研究開始当初の背景

植物は、寄生菌やウイルスなどの病原体を認識すると、植物ホルモンのサリチル酸 (SA) を生合成し、SA 応答性の免疫機構を活性化することで寄生関係の樹立を阻害する。SA は、SA 受容体である NPR3 および NPR4 によって認識され、鋳転写補助因子である NPR1 の蓄積を誘導する。NPR1 は核へと移行し、鋳転写制御因子群と相互作用することで SA 応答性遺伝子の発現調節を行う。申請者は、これまでに SA 受容体の同定や¹⁾、NPR1 タンパク質の活性化機構および SA 応答性遺伝子の NPR1 依存的な発現制御機構の解明において世界に先駆ける研究を展開してきた^{1,2,3)}。一方、UV、低温やオゾンに曝露された植物個体も同様に SA を蓄積し、これら非生物学的ストレスに対応する⁴⁾。実際、SA 生合成経路の変異体はこれらのストレスによって大きな被害を受けることが知られている。この SA 生合成の最終過程である、イソコリスミ酸から SA の合成を触媒する酵素は長く不明であったが、PBS3 が責任酵素として特徴付けられ⁵⁾、SA 生合成経路の理解は飛躍的に進んだ。したがって、SA シグナルにおける最重要課題の一つは、ストレス受容後に活性化する「SA 生合成の発現調節経路 (SAB 経路: SA Biosynthetic signaling pathway)」の解明である。シロイヌナズナにおいては、鋳転写制御因子である CBP60g や SARD1 が SA 生合成酵素群の発現に関与することが示唆されているが^{6,7)}、その制御機構には不明な点が多く、SAB 経路は十分に理解されていないと言っても過言ではない。

引用: 1. Fu et al., Nature 486, 228-232, 2012; 2. Tada et al., Science 321, 952-956, 2008; 3. Spoel et al., Cell 137, 860-872, 2009; 4. Herrera-Vásquez et al., Front. Plant Sci. 6, 171, 2015; 5. Rekhter et al., Science 365, 498-502, 2019; 6. Zhang et al., PNAS 107, 18220-18225, 2010; 7. Wang et al., Plant J. 67, 1029-1041, 2011

2. 研究の目的

申請者らは、SAB 経路の最上流で機能し、CBP60g、SARD1 や PBS3 などの SA 生合成関連遺伝子を直接発現誘導する鋳転写因子の候補として、WRKY ファミリーに属する鋳転写因子 SBR (SB-binding Regulator) 1、SBR2 および SBR3 を同定している。本研究では、SBR による SAB 経路の制御機構を明らかにすることを目的として、SBR 変異体や過剰発現体を作成し、病原体や UV に対する遺伝学的特徴付けを行う。さらに、GFP-SBR 植物を用いた ChIP-seq 解析を行い、SBR の直接的な制御遺伝子群を同定する。植物は、病原体や UV などのストレスを受容後に活性酸素種を共通して生成することから、その SA 生合成への関与が示唆されているが、活性酸素種による SA 生合成機構は不明である。そこで、本研究では活性酸素種の SBR 活性化に与える影響も調査する。

3. 研究の方法

SBR が SA 合成関連遺伝子群を発現誘導するかを調査するために、デキサメタゾン (DEX) 誘導性プロモーターと融合した *pDEX:SBR1*、*SBR2* および *SBR3* を作出し、DEX 処理後、経時的に変動する遺伝子群を RNA-seq によって調査する。また、DEX 処理によって実際に SA が合成されるかを定量する。さらに、SBR が標的とする遺伝子を同定するために、*pSBR1:SBR1-GFP* 植物を作成し、ChIP-seq 解析を行う。現在までに、SA 合成の正の制御因子として特徴づけられている SARD1 と CBP60g 鋳転写因子と SBR の関連を、*sard1cbp60g* 植物を用いて調査する。SA 合成は NPR1 によって負に制御されることが明らかになっているので、NPR1 の ChIP-seq データと併せて解析する。

4. 研究成果

SBR が SA 合成関連遺伝子を発現制御するかについて、まずタバコを用いたレポーター実験で調査した結果、SBR は *ICS1*、*PBS3* や *SARD1* 遺伝子の発現を誘導することが示された。*pDEX:SBR1*、*SBR2* および *SBR3* 組換えシロイヌナズナに DEX を処理し、RT-qPCR で調査した結果、同様に SA 合成関連遺伝子群の発現が確認できた。そこで、DEX 処理後 6 時間、12 時間、24 時間後の葉を用いた RNA-seq 解析を行ったところ、6 時間では ROS ストレスや病害応答関連の遺伝子群が発現し、24 時間では SA 応答性遺伝子群が濃縮され、SBR の一過的発現によって SA が蓄積することが示唆された。そこで、同組換え体に DEX 処理によって SBR 誘導後に SA の蓄積量を定量したところ、野生型植物と比較し、有意に SA が蓄積することが明らかになった。次に、SBR の間接的・直接的な標的遺伝子群を網羅的に同定するために *pSBR1:SBR1-GFP* 植物に UV を照射後、ChIP-seq 解析を行ったところ、SBR は SA 合成関連遺伝子群のプロモータ上に分布することが明らかになり、特に SBR1 は *SARD1* と *CBP60g* の上流因子として機能することが示唆された。そこで、*sard1cbp60g* 植物に UV を照射し、SA 合成関連遺伝子の発現レベルを調査したところ、*SBR1* は発現誘導されたが、*SBR2* と *SBR3* は有意に抑制された。*ICS1* 等の SA 合成関連遺伝子の発現は、SARD1 や SBR に重複して発現されると考えられる。最後に NPR1 が SA 合成の抑制因子として働くならば、SBR と同様の遺伝子群を標的にすると考え、ChIP-seq プロファイルの比較解析を行った。その結果、興味深いことに両者の結合

領域が近接するケースが多数みられ、特に SARD1 プロモーター上では NPR1 が SBR 結合領域を覆い隠すように結合することが示唆された。つまり NPR1 と SBR の DNA 結合に拮抗関係がある可能性が示唆された。

本研究の結果から、SBR は SA 合成経路において最上流に位置した転写因子であり、SA の蓄積を介した免疫応答を活性化させると考えられる。さらに先行研究の結果から、SBR は多様な環境ストレス応答の「ハブ」として働き、ストレス受容後の SA 合成や免疫応答に関連する遺伝子群を正に制御すると考えられる。本研究は、SA 合成を介した環境ストレス応答の制御機構の理解に多大な貢献を成すと言える。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 森太志
2. 発表標題 サルチル酸合成の開始を制御する転写因子の同定とその制御機構の解析
3. 学会等名 日本植物学会第 85 回
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 森太志
2. 発表標題 WRKY Transcription Factors Integrate Environmental Stress into Salicylic Acid Biosynthesis Pathway
3. 学会等名 学術変革領域 「不均一環境と植物」第1回若手の会
4. 発表年 2021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
研究協力者	野元 美佳 (NOMOTO MIKA)		

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