

令和 6 年 6 月 29 日現在

機関番号：92672

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2023

課題番号：20K15498

研究課題名（和文）低分子RNA制御を介した植物免疫プライミング機構の解析

研究課題名（英文）Systemic defense gene priming via small RNA in plants

研究代表者

田島 由理 (Tajima, Yuri)

株式会社 R h e l i x a (研究開発部)・受託事業部・シニアサイエンティスト

研究者番号：80771154

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）：植物は病原体認識部位だけでなく、全身で防御応答を活性化させる。この際に一部の防御応答遺伝子は二次感染に対して鋭敏に反応可能なプライミング状態となる。分子制御基盤の探索のため逆遺伝学的解析を行った。その結果、低分子RNA生成経路の変異体植物では、病原体感染葉での防御応答は野生型植物と同程度であったのに対し、防御応答マーカー遺伝子のプライミングについては野生型植物よりも低下していた。このことから、低分子RNAを介した経路が防御応答のプライミングを正に制御することが示唆された。また、プライミング誘導時に低分子RNA経路の標的となる候補遺伝子リストを得るためにトランスクリプトーム解析を実施している。

研究成果の学術的意義や社会的意義

食糧問題が取り沙汰される中、病原菌感染による農作物の減収は解決すべき重要な農業課題の一つである。古くから行われている対策の一つに、病害抵抗性遺伝子を標的とした育種があるが、その抵抗性はわずかな変異により打破されやすい。また、一般に防御応答を増強することにより、植物バイオマスが低下することが知られていることから、他の対策も必要になると考えられる。本研究で着目した防御応答のプライミングは、植物生長を維持しながら、必要な時に防御応答を増強・誘導可能であることから、有望な対策の一つとなりうる。プライミング制御に関わる分子基盤の一端を明らかにすることにより、持続可能な農業生産の一助になると考えられる。

研究成果の概要（英文）：In plants, local defense activation at pathogen recognition sites leads to systemic acquired resistance (SAR). During SAR activation, subsets of defense-related genes are primed for faster and/or greater activation upon subsequent infection, a process known as systemic defense priming. Our previous research indicated that several epigenetic regulations might play a role in defense priming and SAR. To identify additional mechanisms underlying defense priming regulation, we conducted reverse genetics analysis using Arabidopsis mutant plants. We found that mutant plants with defects in small RNA biosynthesis exhibited lower defense priming, suggesting that the small RNA biosynthesis pathway positively regulates systemic defense priming. To identify the target genes primed in a small RNA-dependent manner, we are currently conducting transcriptome analysis using WT and mutant plants induced for systemic defense priming.

研究分野：植物病理学

キーワード：植物免疫 シロイヌナズナ 防御応答 全身獲得抵抗性 プライミング

## 1. 研究開始当初の背景

植物は、周辺環境や他の生物等からもたらされる様々な外的ストレスに対し、適切に応答することにより生育する。その際、多数のストレス応答遺伝子の発現が上昇するだけでなく、一部の遺伝子についてはその発現誘導が「記憶」されることにより、再び同様のストレスにさらされた場合に、より早くあるいは強く応答することができるようになる。例えば、植物が病原体を認識すると、その認識部位において防御応答遺伝子の発現が活性化し、一連の防御応答が誘導される。加えて、病原体認識部位から全身にシグナルが伝達されることにより、病原体が存在していない部位も含めた全身での防御応答が誘導される。全身での防御応答遺伝子の発現誘導ならびに防御応答の活性化は記憶され、二次感染に対する抵抗性が高まった状態（全身獲得抵抗性を発揮している状態）となる。全身獲得抵抗性が発揮されている際、種々の防御応答関連遺伝子の誘導性が高まっており、二次感染に対してこれら遺伝子の発現がより早くあるいはより強く応答できるプライミング状態となっていることが知られている。防御応答のプライミング成立時や全身獲得抵抗性発揮時に活性化される経路については明らかになりつつあるものの、それら活性化の制御に関わる分子基盤について、その大部分は謎に包まれたままである。

研究代表者らの研究の結果、ヒストン修飾因子を介したエピジェネティックな遺伝子発現制御が防御応答のプライミングならびに全身獲得抵抗性を正に制御することが示された。その結果を受け、他のエピジェネティックな制御経路についても防御応答プライミングや全身獲得抵抗性の制御に重要な役割を担うのではないかと考えて、本研究を計画した。

## 2. 研究の目的

防御応答遺伝子のプライミングや全身獲得抵抗性の制御基盤の探索に向け、種々の変異体植物を用いた順遺伝学的解析を予備的に実施した。その結果、プライミング誘導時に、低分子 RNA 生成に関与する遺伝子の変異体植物においてプライミングのマーカとなる遺伝子の発現が低下していた。このことから、低分子 RNA 生成遺伝子あるいは低分子 RNA が防御応答遺伝子のプライミングの制御に関係することが示唆された。そこで、低分子 RNA を介した防御応答遺伝子のプライミング制御機構の一端を明らかにすることを目的として、本研究を実施した。

## 3. 研究の方法

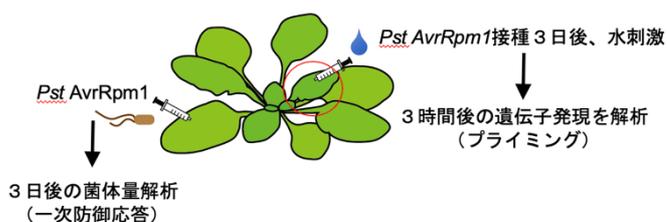


図1 実験系

モデル植物としてシロイヌナズナを、防御応答を誘導する一次刺激としてトマト斑葉細菌病菌 *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 *AvrRpm1* (*Pst AvrRpm1*) をそれぞれ用いて以下の実験を行った (図1)。

### 【一次防御応答】

シロイヌナズナの成熟葉に対し、針なしのシリンジを用いて *Pst AvrRpm1* を注入接種し、一次防御応答を誘導した。一次防御応答については、接種3日後の接種葉における *Pst AvrRpm1* 存在量により評価した。

### 【防御応答遺伝子のプライミング】

上述の方法で *Pst AvrRpm1* を接種して3日後、未接種のシステミック葉に対して二次刺激として水刺激を与えた。二次刺激から3時間後にシステミック葉を回収し、既知のプライミングマーカ遺伝子の発現を RT-qPCR 解析により調べることで、プライミングが成立しているかを評価した。なお、プライミングが成立していない場合には二次刺激を与えても発現が誘導されず、プライミングが成立している葉のみ発現が誘導される遺伝子をマーカーとして用いた。

### 【プライミング標的遺伝子の探索】

低分子 RNA を介した制御を受けるプライミング標的遺伝子の探索については、野生型植物および低分子 RNA 制御経路の変異体植物を用い、上述の方法でプライミングを誘導したシステミッ

ク葉から total RNA を抽出し、RNA-seq 解析に供した。

#### 4. 研究成果

システミック葉における防御応答遺伝子のプライミングの成立には、1. 接種葉での一次防御応答、2. 接種葉から全身へのシグナル伝達、3. 全身での記憶化の 3 ステップが必要である (図 2)。

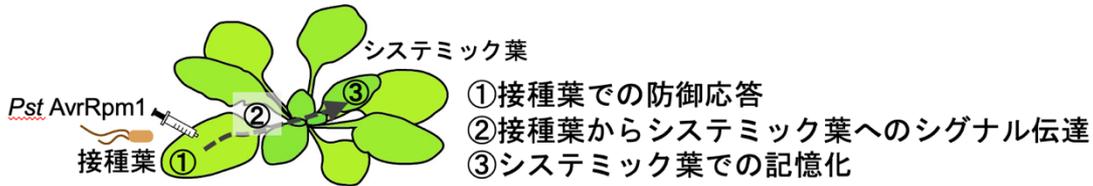


図 2 システミック葉でのプライミング成立に至るまでのステップ

先行研究から、ヒストン修飾因子によってシステミック (全身) での防御応答遺伝子のプライミングおよび全身獲得抵抗性が正に制御されることが示唆された。一方で、接種葉からシステミック葉にどのようなシグナルが伝わることでプライミングや全身獲得抵抗性が成立するのかについての詳細は掴めていなかった。そこで、予備実験として、新規プライミング制御因子の同定に向け、プライミングの応答が低下する変異体を逆遺伝学的に探索した。その結果、低分子 RNA の生成に寄与する *DICER-LIKE PROTEIN (DCL) 2/3/4* の三重変異体植物 (*dcl* 変異体) ではプライミングが低下していることを示唆するデータを得た。DCL は二本鎖 RNA (dsRNA) を 20-30 塩基程度の small RNA (低分子 RNA) に分解する。シロイヌナズナに 4 遺伝子存在する DCL のうち DCL2/3/4 は 22-24 塩基長の低分子 RNA を生成し、それらは主に抗ウイルス免疫やストレス応答に寄与する。また、生成された低分子 RNA は翻訳抑制だけでなく DNA のメチル化の制御を行うことが知られている。これらのことから、低分子 RNA (あるいは RNA サイレncing 機構や DNA のメチル化) を介したプライミング制御機構が存在することが考えられた。そこで、プライミングおよび全身獲得抵抗性における DCL の役割について着目して研究をおこなった。

まず、システミック葉における防御応答遺伝子のプライミングにおける DCL の機能解析を行った。野生型植物および *dcl* 変異体植物にプライミングを誘導した結果、*dcl* 変異体植物では野生型植物よりもプライミングマーカー遺伝子の発現が低下していた。このことから、DCL は防御応答遺伝子のプライミングを正に制御することがわかった。また、防御応答遺伝子のプライミングの低下と相関し、*dcl* 変異体植物では *Pst AvrRpm1* 接種後に誘導される全身獲得抵抗性が低下していることがわかった。このことから、DCL によって防御応答遺伝子のプライミングならびに全身獲得抵抗性が制御されていることが示唆された。一方で、一次防御応答を調べたところ、*dcl* 変異体植物の接種葉での *Pst AvrRpm1* 量は野生型植物と同程度であったことから、DCL は病原体認識部位での局所的な防御応答ではなく、その後起こる長距離シグナルの生成から非感染のシステミック葉での防御応答遺伝子のプライミング成立 (防御応答の記憶化) に到るまでのいずれかのステップで機能することが示唆された。

DCL の標的となりプライミングされる遺伝子を網羅的に同定するため、野生型植物および *dcl* 変異体植物のシステミック葉にプライミングを誘導し、RNA-seq 解析を実施した。その結果については、現在データ解析を行なっている最中である。得られたデータを解析することにより、DCL により正の制御を受けてプライミングされ、抵抗性に寄与する遺伝子の絞り込みを行いたい。加えて、*dcl* 植物を用いて得られた RNA-seq 解析データと研究代表者がすでに所有するヒストン修飾因子変異体植物でのプライミング誘導時の RNA-seq 解析データと比較することによって、RNA サイレncing 経路や DNA メチル化による遺伝子発現制御経路とヒストン修飾を介した遺伝子発現制御経路が重複するのかについても情報を得る予定である。また、それぞれの経路特異的な標的遺伝子の絞り込みや、両者の制御を受ける標的遺伝子について共通する DNA シス配列の探索などを通じ、それぞれの経路の制御に関わる新規因子の同定につなげたいと考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 Loo Eliza P.-I., Tajima Yuri, Yamada Kohji, Kido Shota, Hirase Taishi, Ariga Hiroataka, Fujiwara Tadashi, Tanaka Keisuke, Taji Teruaki, Somssich Imre E., Parker Jane E., Saijo Yusuke	4. 巻 35
2. 論文標題 Recognition of Microbe- and Damage-Associated Molecular Patterns by Leucine-Rich Repeat Pattern Recognition Receptor Kinases Confers Salt Tolerance in Plants	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Molecular Plant-Microbe Interactions	6. 最初と最後の頁 554 ~ 566
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1094/MPMI-07-21-0185-FI	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0件

〔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
---------	---------