

令和 5 年 6 月 8 日現在

機関番号：13901

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2022

課題番号：21K15121

研究課題名（和文）サリチル酸応答性の植物免疫における遺伝子発現調節機構の解明

研究課題名（英文）Elucidation of salicylic acid-responsive transcriptional mechanism in plant immunity

研究代表者

野元 美佳（Mika, NOMOTO）

名古屋大学・遺伝子実験施設・助教

研究者番号：70825736

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：サリチル酸応答性の遺伝子発現調節機構を明らかにするために、NPR1-SNI1複合体の解析を行った。免疫沈降法などにより、NPR1とSNI1はリプレッサーWRKY転写因子を介して複合体を形成していることを示した。SNI1-WRKYの乖離がSA応答性遺伝子の発現に重要であることを確かめるために、SNI1-WRKYの相互作用を特異的に解離させる低分子化合物を、タンパク質相互作用を指標としたケミカルスクリーニング（5020化合物）によって同定した。本研究成果は、基礎研究のみならず農業利用上も重要な形質であるため、その波及効果は大きいと考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

サリチル酸応答性免疫は農業利用上も重要な形質であるので、同定した化合物を用いて転写調節機構を人為的に操作し、効果的なタイミングでストレス耐性を植物に付与するなど、その応用可能性は大きい。さらに、本研究のアプローチは他のタンパク質-タンパク質相互作用の調節にも適応可能である。例えば、他のホルモンシグナルを制御するタンパク質-タンパク質に作用するケミカルスクリーニングを行い、ホルモン応答を効果的に調整することが可能になると考えられる。

研究成果の概要（英文）：To reveal salicylic acid-responsive transcriptional mechanism, we analyzed the NPR1-SNI1 complex and found that NPR1 and SNI1 could form a complex via the repressor WRKY transcription factor. Then, we performed chemical screening (5020 compounds) to find compounds that dissociates SNI1-WRKY interactions. Since these results are important not only for basic research but also for agricultural use, the ripple effect is expected to be large.

研究分野：植物分子・生理科学

キーワード：植物ホルモン 転写因子 植物免疫

1. 研究開始当初の背景

植物は、寄生菌の分泌するエフェクターや細胞壁構成成分などを対応する受容体によって認識すると、感染部位において自然免疫を活性化し、寄生関係の樹立を阻害する。同時に、感染葉において長距離シグナル伝達物質を生成し、全身に病原菌感染情報を伝達することで、非感染葉においても疾病防御応答を誘導する。この全身獲得抵抗性と呼ばれる二次応答は、非感染葉において植物ホルモンであるサリチル酸 (SA) が蓄積することで誘導される。SA 応答性遺伝子の90%以上は、転写補助因子である NPR1 によって制御されており、*npr1* 変異体は強い免疫不全の形質を示す¹⁾。

植物免疫の基盤となる、NPR1 依存的な SA 応答性遺伝子の発現調節機構としては、1) NPR1 が TGA 転写因子と結合し、疾病防御関連タンパク質をコードする *PR* (*pathogenesis-related*) 遺伝子群を発現誘導すること²⁾、2) SNI1 は *PR* 遺伝子のプロモーター上でリプレッサーとして機能するが、遺伝学的解析から、その脱抑制には NPR1 の機能が必要であること³⁾、3) WRKY 転写因子ファミリーは SA 応答性遺伝子発現を正或いは負に調節することが明らかになっている^{4,5)}。しかし、I) SNI1 による転写抑制機構、II) NPR1 による SNI1 の脱抑制機構、そして、III) WRKY 転写因子の制御機構は不明であるため、SA 応答性免疫の基盤分子機構は未だ明らかになっていない。

2. 研究の目的

申請者らは、NPR1 と SNI1 は DNA 結合ドメインを持たない転写補助因子であり、互いに直接相互作用しないが、両分子とも WRKY 転写因子と結合することを明らかにしている。本研究では、SA 応答性免疫における遺伝子発現調節機構を明らかにするために、SA シグナル活性化時にプロモーター上でダイナミックに変動する NPR1-SNI1-WRKY 複合体の挙動について調査する。NPR1 と WRKY タンパク質は SA に応答して蓄積するが、SNI1 は SA 非依存的に恒常的に蓄積しているため、WRKY の制御は量的制御であると考えている。そこで、WRKY を介した NPR1-SNI1 複合体の検出や、SNI1-WRKY 相互作用を解離させるケミカルスクリーニングを行うことで、3 因子の複合体制御が免疫応答の活性化に重要であるか調査する。さらに、多重変異体の欠損変異体や過剰発現体を作成し、病原細菌を接種しその表現型を調査する。

3. 研究の方法

SNI1 はリプレッサーとして報告されている WRKY を標的にすることを明らかにしたので、SNI1-WRKY の解離が SA 応答性遺伝子の発現に重要であるかを調査するために、ケミカルスクリーニング (5020 化合物) を行う。申請者が構築した無細胞タンパク質合成系を用いて SNI1 と WRKY を合成し、相互作用すると発光する AlphaScreen システムを用いて、SNI1-WRKY を特異的に解離させる低分子化合物を同定する。得られた候補化合物を植物に処理し、免疫応答に与える影響を調査する。

SA を処理した *35S:NPR1-GFP* 植物の ChIP-seq 解析と、SA を野生型植物 Col-0 に処理後に RNA-seq 解析を行い、NPR1 のプロモーターへの結合と標的遺伝子発現の関連を調査する。NPR1 が WRKY の DNA 結合能に与える影響を調査するために、ビオチン化した W-box をビーズに固定し、WRKY と NPR1 タンパク質を用いた *in vitro* pull-down assay を行う。

4. 研究成果

NPR1/SNI1 タンパク質と転写因子ライブラリーの相互作用スクリーニングの結果、NPR1 と SNI1 は、共に WRKY 転写因子ファミリーに属する WRKY のうちリプレッサーとして報告されている WRKY に、それぞれ N 末端とリジン・アルギニンリッチ領域に結合することが明らかになった。*snl1* 変異体と当該 *wrky* 変異体は Col-0 よりも強い免疫応答を誘導するが、*wrkysnl1* 変異体は Col-0 と *snl1* 変異体の中間の表現型を示した。本結果は、当該 WRKY は SA 応答性遺伝子発現を正と負に調節する二面性を有することを報告と矛盾しない。さらに、SNI1 が標的転写因子と解離することが免疫の活性化に重要であるか調査するために、無細胞タンパク質合成系を用いて SNI1 と WRKY を合成し、5020 化合物が SNI1-WRKY 相互作用に与える影響を AlphaScreen システムによって調査した。本実験におけるネガティブコントロールとして、AlphaScreen システムそのものに影響を与えない化合物、既知の NPR1-TGA 相互作用は解離しない化合物を選抜した。その結果、SNI1-WRKY の結合を特異的に解離させる化合物を 40 同定した。選抜した化合物を植物体に処理し、SA 応答性遺伝子の発現を誘導するかを調査した結果、5 つの化合物が *PR* 遺伝子を発現誘導した。さらに、SA を処理した *35S:NPR1-GFP* 植物の ChIP-seq 解析では、NPR1 は TGA 転写因子が結合する TGACG 上に存在するが、WRKY の認識配列である W-box 上には SA 処理の有無に関わらず検出されなかった。一方、SA を野生型植

物 Col-0 に処理した RNA-seq 解析では、SA 応答性遺伝子群のプロモーターには W-box が有意に存在することが明らかになった。NPR1 が WRKY と相互作用することの生化学的意義を明らかにするために、Biotin 化した W-box を用いて in vitro pull-down assay を行った結果、NPR1 は WRKY の W-box への結合を阻害することが示唆された。本研究成果は、SA シグナルの活性化機構の基幹分子の役割を明らかにするものであり、疾病防御応答のみならず SA が必須の役割を担う環境ストレス耐性機構の理解に大きく貢献すると考えられる。

<引用文献>

- ¹⁾Fu and Dong, Systemic acquired resistance: turning local infection into global defense, *Annu Rev Plant Biol*, 2013;64:839-63.
- ²⁾Saleh et al., Posttranslational Modifications of the Master Transcriptional Regulator NPR1 Enable Dynamic but Tight Control of Plant Immune Responses, *Cell Host Microbe*, 2015;18(2):169-82.
- ³⁾Song et al., DNA repair proteins are directly involved in regulation of gene expression during plant immune response, *Cell Host Microbe*, 2011;9(2):115-24.
- ⁴⁾Wang et al., A genomic approach to identify regulatory nodes in the transcriptional network of systemic acquired resistance in plants, *PLoS Pathog*, 2006;2(11):e123.
- ⁵⁾Li et al., The WRKY70 transcription factor: a node of convergence for jasmonate-mediated and salicylate-mediated signals in plant defense, *Plant Cell*, 2004;16(2):319-31.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔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
---------	---------