

令和 5 年 6 月 12 日現在

機関番号：14301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2021～2022

課題番号：21K20582

研究課題名(和文) eQTL解析によるイネ免疫応答転写制御の解明

研究課題名(英文) Elucidation of transcriptional regulation by rice immune response using eQTL analysis

研究代表者

堺 俊之 (Sakai, Toshiyuki)

京都大学・農学研究科・助教

研究者番号：50911682

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,900,000円

研究成果の概要(和文)：イネのひとつめぼれ系統は、抵抗性遺伝子であるPii遺伝子を持ち、イネいもち病菌に対し抵抗性を示す。しかし、Pii遺伝子によって抵抗性反応が活性化される際、どのような下流遺伝子が関与しているのかは未だ分かっていない。本研究課題では、Pii遺伝子によって活性化される抵抗性反応において、重要と考えられる遺伝子の発現制御関係を特定した。具体的には、遺伝子の発現量を対象とするeQTL解析を行い、Pii遺伝子による抵抗性反応が活性化された際に、イネの持つWRKY型転写因子の1つであるOsWRKY77が10個の抵抗性に関与する遺伝子の発現を制御している事が明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

植物免疫システムにおいて、NLRタンパク質は病原菌のエフェクタータンパク質を認識し、細胞死を誘導することで植物に病害抵抗性を付与している。しかしNLRタンパク質がどのように細胞死を誘導しているのかは明らかになっていない。

本研究では、NLRタンパク質の1つであるPiiがイネの抵抗性反応を活性化する際に、どのような遺伝子が発現制御関係にあるのかを解明した。本研究成果はNLRタンパク質が細胞死を誘導するまでに、どのような遺伝子が発現し、機能しているかを解明するための重要な情報となる。

研究成果の概要(英文)：One of the rice cultivar "Hitomebore" has Pii gene, which is a resistance gene, and shows resistance to rice blast fungus. However, it is still unknown what genes are important and involved when the Pii gene activates the resistance response. In this research project, we identified the regulatory relationship of genes that are considered to be important in the resistance response activated by the Pii gene. Specifically, we conducted an eQTL analysis targeting gene expression levels and found that OsWRKY77, one of the WRKY-type transcription factors in rice, was found to induce the expressions of 10 genes related to resistance responses when the Pii gene was activated.

研究分野：Forward genetics

キーワード：eQTL解析 発現差異解析

1. 研究開始当初の背景

植物は、NLR (Nucleotide binding-Leucine rich Repeat) のような細胞内受容体により、病原菌エフェクターを直接または間接的に認識し、免疫応答を誘導する。近年、多くの NLR において、複数の分子が相互作用する事により抵抗性を付与する例が報告されている (Adachi et al., 2019)。イネのひとめぼれ系統においては、ペアとして働く NLR である Pii-1 と Pii-2 を持ち、エフェクターである AVR-Pii を保有するイネいもち病菌株に対して抵抗性を示す事が報告されている (Takagi et al., 2017)。しかし、Pii-1 と Pii-2 がどのように相互作用し細胞死を誘導するのか、特に NLR 活性化後の下流遺伝子の発現制御やシグナル伝達機構がどうなっているのかは明らかになっていない。そこで、本研究では eQTL 解析によるこれらの問いの解明に取り組む。

2. 研究の目的

本研究では、イネの RIL (Recombinant Inbred Line) 系統を利用した eQTL (expression Quantitative Trait Loci) 解析に基づく遺伝子発現制御関係の同定手法を開発することで、Pii 遺伝子による免疫システム下流の遺伝子制御機構を解明することを目的とする。

eQTL 解析はある特定の遺伝子の発現量の変動に強く関与している遺伝子座を同定する解析手法である。つまり、ある遺伝子の発現量を制御している遺伝子座を同定することが出来る。本研究では、いもち病菌接種後、Pii 遺伝子の活性化による抵抗性反応を示しているイネの各遺伝子の発現量を形質として eQTL 解析を行う事により、免疫応答に関わる遺伝子の制御関係を特定する。

本研究の成果は、ペアとして NLR が働く際の発現制御機構解明の鍵となる情報を提供することができる。

3. 研究の方法

本研究で扱う RIL 系統は、Pii 遺伝子のペアを持つひとめぼれ系統と、Pii 遺伝子を持たない KALUHEENATI 系統の交配由来である。半数の RIL は Pii を保有するが、それ以外の領域は両親のゲノムがモザイク状になっている。この RIL 系統群を用いて、AVR-Pii を保有するいもち病菌接種後、RNA-seq を実施し各遺伝子の発現量を形質として eQTL 解析を行う事により、免疫応答に関わる遺伝子の制御関係を特定する。詳細は成果の項目で述べる。

4. 研究成果

(1) イネは約 4 万の遺伝子を持ち、その全ての遺伝子に対して eQTL 解析を行うことは時間的なコストを考えると難しい。そのため、まずは DEG (differentially expressed gene) 解析により着目する遺伝子を選抜した。Pii 遺伝子を持つひとめぼれ系統に対し、AVR-Pii を保有するいもち病菌と AVR-Pii を持たないいもち病菌、Mock として水をそれぞれ接種し、24 時間後に RNA-seq を行い遺伝子発現量を測定した。

その結果、AVR-Pii を保有するいもち病菌を接種した際に特異的に発現量が変化した遺伝子が 1,009 遺伝子、保有しないいもち病菌を接種した際に発現量が変化した遺伝子が 1,353 遺伝子検出された。1,009 遺伝子の中で、AVR-Pii を保有しないいもち病菌を接種した際に発現量が変化しなかった遺伝子は 575 遺伝子存在していた (図 1)。この 575 遺伝子は AVR-Pii の存在によってのみ発現量が特異的に変化する遺伝子だと考えられ、Pii 遺伝子によって AVR-Pii が認識されることで発現変動が起きたと考えられる。よって本研究ではこの 575 遺伝子に着目して eQTL 解析を進めることとした。

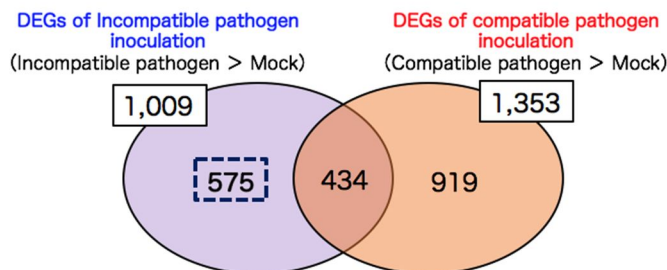


図 1 AVR-Pii により特異的に発現量が上がる遺伝子の数

(2) 次に、DEG 解析によって検出された 575 遺伝子の RIL 系統における発現量データを用いて、eQTL 解析を実施した。ひとめぼれ系統と KALUHEENATI 系統の交配から作成した

RIL 集団に対し、AVR-Pii を保有するいもち病菌を接種し、24 時間後に RNA-seq を行い測定された遺伝子発現量データの中で、Pii 遺伝子を保有している 108 系統のデータを eQTL 解析には用いた。その結果、ゲノム上の 1,789 の領域が eQTL として検出され、これらの領域の遺伝子型が 575 遺伝子の発現量と関連があると検出された。eQTL は形質として用いた遺伝子の近傍に検出されるものを cis-eQTL、異なる染色体上や遠い位置で検出されるものを trans-eQTL として分類する。trans-eQTL は着目している遺伝子の発現量と関連している別の遺伝子を検出するのに重要な情報となる。今回検出された 1,789 領域のうち、1,677 の領域が trans-eQTL として検出された。更に、その内の 3 つの領域(chr8, 19008397-19008397bp; chr1, 22705298- 227478459bp; chr04, 19393158-19398266bp)はそれぞれ 10 個以上の遺伝子の発現量と関連しており、多数の遺伝子の発現を制御するハブ遺伝子が位置する可能性が示唆された(Barabasi and Oltvai. 2004)。

続いて、検出された 3 領域に位置する遺伝子の中からハブ遺伝子の候補を検出する為、AVR-Pii を保有するいもち病菌を接種した際に特異的に発現が変動する遺伝子を調べたところ、1 番染色体の検出領域に位置する LOC_Os01g40260 (OsWRKY77) が検出され、抵抗性反応が活性化された際に、複数の遺伝子を制御する遺伝子である可能性が示唆された(図 2)。また、ひとめばれ系統を元に、OsWRKY77 のノックアウト系統を作成し、OsWRKY77 に制御されていると考えられる 10 遺伝子の発現量の変化を確認した所、9 遺伝子の発現量が顕著に低下する事が確認された。制御されていると考えられる遺伝子のうち 4 遺伝子は、抵抗性反応に関与する機能があると示唆されており、Pii 遺伝子により活性化される抵抗性反応において、OsWRKY77 の制御関係は重要な役割を持つと考えられる。

- (3) 現在、OsWRKY77 のノックアウト系統に、AVR-Pii を保有するいもち病菌を接種した際に、表現型に変化があるかを確認している。本実験が終了し次第、結果を論文としてまとめて投稿予定である。

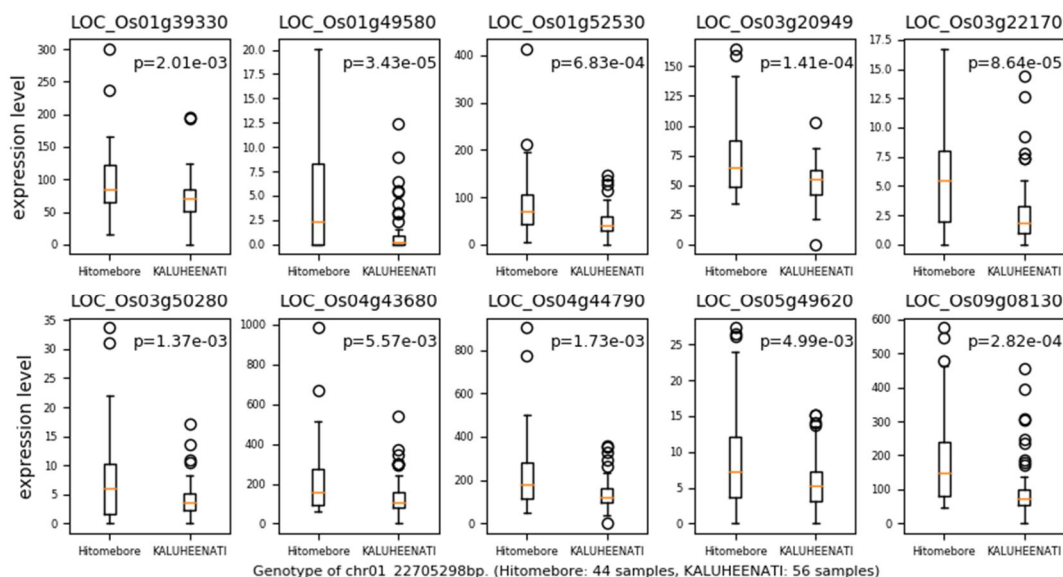


図 2 eQTL の位置する領域の遺伝子型に応じた制御遺伝子の発現量の変化

< 引用文献 >

Adachi et al. *Curr Opin Plant Biol* 50:121-131 (2019)
 Takagi et al. *bioRxiv* 1-20 (2017)
 Barabasi and Oltvai. *Nat Rev Genet* 5, 101-113 (2014)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 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
---------	---------