

令和 6 年 6 月 3 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究

研究期間：2022～2023

課題番号：22K14893

研究課題名(和文)免疫受容体ネットワークの遺伝子発現を制御する転写因子の同定

研究課題名(英文) Identification of transcription factors involved in regulating expression of plant immune receptor genes

研究代表者

安達 広明 (Adachi, Hiroaki)

京都大学・農学研究科・特定助教

研究者番号：60909513

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)：植物細胞には、NLR免疫受容体があり、病原体由来分子を認識し免疫システムを活性化させる。近年、機能分化した複数のNLRが協調してはたらき、免疫誘導するNLRネットワークモデルが報告されている。しかし、それらNLR遺伝子が転写レベルでどのように制御されるかは多くが未解明である。本研究では、ナス科植物を用いてNLR遺伝子の組織特異的発現を調査し、転写制御因子を探索することを目的とした。根または葉で発現するNLR遺伝子をリスト化し、それらプロモーター領域に特徴的に存在するシス配列候補を抽出した。候補シス配列の情報から、NLR遺伝子発現制御に関わる転写因子の同定を試みたが、期間中には達成できなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

植物NLR免疫系では、細胞死を伴う免疫反応を誘導することから、植物細胞にとってリスクとなり得る。しかし、植物NLR免疫系の制御機構については、未解明な点が多い。特に、複数のNLRが機能するNLRネットワークは、それぞれのNLR分子がどのように制御され、協調的に機能するのか明らかになっていない。本研究では、ナス科植物がもつNLR遺伝子の発現を制御する転写因子の探索を目的とした。研究成果として、根と葉で発現するNLR遺伝子のプロモーター領域に高頻度で存在するシス配列を同定した。今後、NLR遺伝子の転写制御機構の解明に繋がると期待される。

研究成果の概要(英文)：Plant cells possess NLR immune receptors, which recognize pathogen effector molecules and activate the plant immune system. An emerging model suggests that multiple functionally specialized NLRs participate in NLR immune receptor networks. However, the transcriptional regulation governing the co-expression of these cooperative NLRs in plant tissues remains largely unknown. Here, we focused on the NLR immune receptor networks in the Solanaceae family and analyzed the tissue-specific expression of NLR genes to identify potential transcriptional regulators. We compiled a list of NLR genes expressed in leaf and/or root tissues and extracted cis-elements enriched in their promoter regions. Despite our efforts over the past two years, we have yet to identify transcription factors that regulate the expression of plant NLR immune receptor genes.

研究分野：植物免疫学

キーワード：植物免疫 免疫受容体 NLRタンパク質 転写因子

1. 研究開始当初の背景

植物の病害抵抗性形質は、植物細胞が病原体を認識し、免疫機構を活性化できるかどうかで決まる。これまで同定された病害抵抗性遺伝子の多くは、NLR (Nucleotide binding-leucine rich repeat protein) 免疫受容体をコードし、植物種・系統ごとに多種多様な NLR 遺伝子がある。NLR は、病原体の病原性因子 (エフェクター) を認識し、過敏反応細胞死を伴う強固な免疫応答を誘導する。

近年の植物免疫学研究により、複数の NLR タンパク質が、受容体ペアまたはネットワークをとして機能することが分かってきた (図1)。この NLR ペアおよびネットワークは、病原体認識に特化した“センサーNLR”と、免疫シグナル誘導に関わる“ヘルパーNLR”によって構成される。これまで報告されている NLR ペアは、ゲノム上で head-to-head 遺伝子ペアをつくり (図1) 共通のプロモーターを利用することで、センサーNLR とヘルパーNLR が共発現し、ペアとして機能する。しかし、NLR ネットワークを構成するセンサーNLR とヘルパーNLR は、異なる染色体に座上している (図1)。協調的に機能する複数のセンサーNLR とヘルパーNLR がどのように転写レベルで制御され、共発現しているかは明らかになっていなかった。

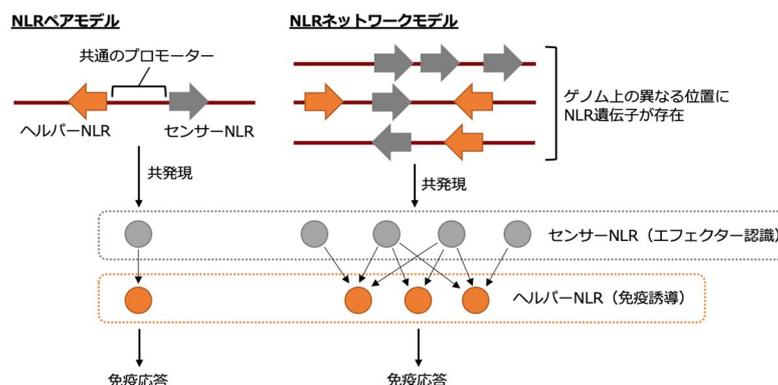


図1. ゲノム上の異なる位置に存在するNLRがネットワークとして機能する

2. 研究の目的

本研究では、ナス科植物がもつ NLR 遺伝子群に着目し、葉と根における NLR 共発現ネットワークを制御する転写因子を同定することを目的とした。これまで、モデル植物であるシロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) を用いた研究で、単独の NLR 遺伝子の発現制御機構の解析が行われ、WRKY 型転写因子が転写制御に関わることが示唆されている。本研究は、アブラナ科植物であるシロイヌナズナではなくナス科植物を用いる点、単独の NLR 遺伝子ではなく、NLR 遺伝子群全体の転写制御機構の解明を目的とする点で、これまでの研究と異なる。本研究では、NLR 遺伝子群が転写因子による制御を受け、葉と根で異なる免疫受容体ネットワークを形成するという仮説を立てた (図2)。

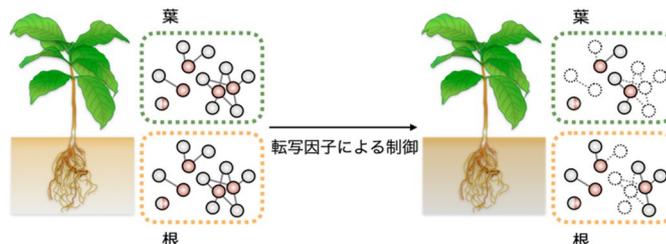


図2. 植物の葉と根で異なる免疫受容体ネットワークが機能する

3. 研究の方法

(1) ナス科植物の葉と根において NLR 発現制御に関するシス配列の予測

ナス科植物のベンサミアナタバコ (*Nicotiana benthamiana*) およびトマト (*Solanum lycopersicum*) の葉および根を用いた RNA-seq 解析から、葉および根で発現する NLR 遺伝子群リスト化を行った。さらに、葉および根で発現する NLR 遺伝子の上流 2 kbp のプロモーター配列を網羅的に抽出し、葉または根で発現する NLR 遺伝子のプロモーター領域に高度に保存された 8 bp の塩基配列を、シス配列候補とした (図3)。このシス配列の探索法は、機能的な転写因子結合領域の同定手法として用いられている。このプロモーター解析により、どの転写因子ファミリーが NLR 遺伝子群の発現制御に関わるかを調べた。

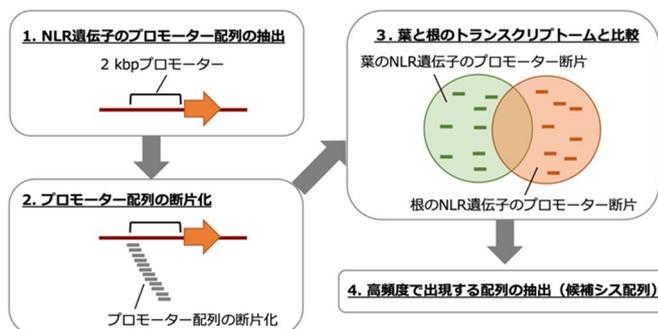


図3. トランスクリプトーム情報を活用したシス配列の同定法

(2) 葉と根の NLR 遺伝子発現制御に關与する転写因子の遺伝学的スクリーニング

關与が示唆された特定の転写因子ファミリーに着目し、既に得ているトランスクリプトームデータから、葉と根で NLR 遺伝子群と共発現する遺伝子をリスト化した。これら転写因子を対象に、ベンサミアナタバコを用いてウイルス誘導型遺伝子サイレンシング実験を行った。転写因子をノックダウンした植物の葉と根から RNA を抽出し、定量的 RT-PCR により、葉と根で NLR 遺伝子群の発現制御に關与する転写因子の同定を目指した。

4. 研究成果

提案者は、ベンサミアナタバコおよびトマトの葉と根の組織を用いた RNAseq 解析により、各組織で発現する NLR 遺伝子群を見出し、リスト化した(表 1)。ベンサミアナタバコにおいては、ゲノム上にコードされる 329 遺伝子のうち、約 85%にあたる 278 遺伝子が葉または根で発現していた(表 1)。それら 278 の NLR 遺伝子のうち、12 遺伝子が葉で、42 遺伝子が根で特異的に発現しており、224 遺伝子は葉と根の両組織で発現していることが分かった。葉組織に比べ、ベンサミアナタバコの根において発現する NLR 遺伝子が多いことから、土壌感染性の病原微生物に対し、より多くの NLR 受容体が機能することが示唆される。

トマトにおいては、ゲノム情報からアノテーションした 257 の NLR 遺伝子のうち、約 72%にあたる 185 遺伝子が葉または根で発現していた(表 1)。185 の NLR 遺伝子のうち、13 遺伝子が葉で、47 遺伝子が根で特異的に発現しており、125 遺伝子が葉と根の両組織で発現していた。ベンサミアナタバコと同様に、トマトにおいても根において発現する NLR 遺伝子が多く、ナス科植物に共通して根で機能する NLR が多くと考えられる。

| The number of NLR genes | | | | | |
|------------------------------|-----------|-----------|------|------|----------------------------|
| Plant species | Total NLR | Leaf/root | Leaf | Root | Not expressed in leaf/root |
| <i>Nicotiana benthamiana</i> | 329 | 224 | 12 | 42 | 51 |
| <i>Solanum lycopersicum</i> | 257 | 125 | 13 | 47 | 72 |

表1. ベンサミアナタバコおよびトマトの根と葉におけるNLR遺伝子発現

これら根と葉の組織で発現する NLR 遺伝子群は、ベンサミアナタバコおよびトマトの染色体の様々な領域にコードされる。提案者は、ベンサミアナタバコのもつ 329 の NLR 遺伝子、およびトマトのもつ 257 遺伝子の上流 2 kbp プロモーター領域を抽出し、8 bp ずつにランダムに断片化したデータセットを構築した。本データセットと、根および葉における遺伝子発現情報を組み合わせ、各組織で発現する NLR 遺伝子のプロモーター領域に高頻度で存在する 8 bp の塩基配列を抽出し、転写因子が結合する候補シス配列とした。得られた候補シス配列には、WRKY 型転写因子が結合すると知られる w-box や、エチレン応答性転写因子が結合すると知られる GCC-box が含まれていた。候補シス配列の一例を図 4 に示す。ア

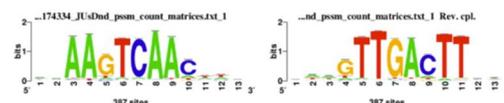


図4. NLR遺伝子のプロモーター領域から抽出された候補シス配列の例

ブラナ科植物のシロイヌナズナを対象とした先行研究で、WRKY 型転写因子が NLR である RPP8 遺伝子の発現を制御することが報告されている (Mohr et al. 2010, MPMI)。本課題で研究対象とするナス科植物においても、免疫応答に關与する転写因子が、NLR 遺伝子群の組織特異的発現制御に關与することが示唆された。

本課題では、葉と根で共発現する転写因子を対象にウイルス誘導型遺伝子サイレンシング実験を実施し、葉と根で NLR 遺伝子の発現制御に關与する転写因子を同定する予定であったが、目的とする転写因子の同定までは課題期間中に至らなかった。転写因子ファミリーは、高度な機能重複が報告されており、機能抑制実験において、機能重複する転写因子遺伝子を同時にノックダウンまたはノックアウトする必要があると考えられる。今後、取得したトランスクリプトームデータを基盤に、転写因子ファミリーの系統樹解析情報を組み合わせ、機能重複が予想される転写因子遺伝子の多重変異体を CRISPR/Cas9 により作出する予定である。本課題で得られた成果は、ナス科植物がもつ NLR 遺伝子群の遺伝子発現制御を解明する上で重要な基盤となる。

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 Adachi Hiroaki, Sakai Toshiyuki, Harant Adeline, Pai Hsuan, Honda Kodai, Toghani AmirAli, Claeys Jules, Duggan Cian, Bozkurt Tolga O., Wu Chih-hang, Kamoun Sophien | 4. 巻 19 |
| 2. 論文標題 An atypical NLR protein modulates the NRC immune receptor network in Nicotiana benthamiana | 5. 発行年 2023年 |
| 3. 雑誌名 PLOS Genetics | 6. 最初と最後の頁 e1010500 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pgen.1010500 | 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 |
|---------|---------|
|---------|---------|