

令和 3 年 5 月 31 日現在

機関番号：32665

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K06069

研究課題名(和文)植物の記憶消去メカニズムの解明；忘れられない変異体に着目して

研究課題名(英文) Mechanistic analysis of plant memory erasure using a mutant with unforgettable stress experience

研究代表者

土屋 徳司 (TSUCHIYA, Tokuji)

日本大学・生物資源科学部・講師

研究者番号：80758459

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：植物は環境ストレスを一度経験すると、経験していない植物と比較した場合に、2度目のストレス時により強い耐性を発揮できる。このように、植物は病原体の感染などの環境ストレスを記憶し、2次的なストレスに備える能力を持つ。一方で、不必要な記憶の長期保持は、適応にはらうコストを増加させる。したがって、植物環境適応には記憶の形成と消去のバランスが適切に制御される必要があると考えられる。本研究では、植物が病原体感染時に形成する記憶を、適宜消去する際に必要となる遺伝子の機能を解析した。その結果、UTF1と名付けた遺伝子が記憶消去に重要な役割を果たすことが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

植物が環境ストレスを記憶する事例は、植物の形態や成長速度などの表現型レベルでは古くから知られていた。しかし、遺伝子機能などの分子レベルでの研究は世界的に見ても未だ創生期にある。数少ない研究例としては、冬(低温)や高温ストレスを記憶する際の遺伝子レベルでの機能解析が挙げられる。しかしながら、本研究で着目する免疫記憶消去メカニズムの報告例はない。本研究で解析したUTF1が機能しなければ、病原体非感染時にも常にコストを払う必要が生じるため、植物個体は矮化し、作物においては収量が低下すると考えられる。よって、UTF1の機能解析は安定した農作物の生産にも貢献すると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Once a plant experiences environmental stress, it can exhibit greater tolerance during a second stress, compared to a plant that has not. In this way, plants have the ability to memorize environmental stresses such as pathogen infections and prepare for secondary stresses. On the other hand, long-term retention of unnecessary memory increases the cost of adaptation. Therefore, it is considered necessary to properly control the balance between memory formation and erasure in order to adapt to the environment. In this study, I analyzed the function of genes required to appropriately erase the memory formed by plants during pathogen infection. As a result, it was shown that the gene named UTF1 plays an important role in memory erasure.

研究分野：植物環境適応

キーワード：植物の記憶 エピジェネティクス 転写制御 シロイヌナズナ

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

植物は環境ストレスを一度経験すると、経験していない植物と比較した場合に、2度目のストレス時により強い耐性を発揮できる。このように、植物は乾燥などの環境ストレスを記憶し、2次的なストレスに備える能力を持つ。一方で、不必要な記憶による長期間にわたる恒常的な耐性発現は、適応にはらう犠牲(フィットネス・コスト)を増加させる。したがって、植物環境適応には記憶の保持と消失のバランスが適切に制御される必要があると考えられるが、記憶の形成および消失に関する分子メカニズムには不明な部分が多い。

2. 研究の目的

これまでの一連の研究において、シロイヌナズナの推定クロマチンリモデリング因子 **UTF1 (Unable to forget 1)** の機能欠損変異体は、いったん形成された環境ストレスの記憶を生涯保持したまま失わない、つまり忘れることができないことを見出した。

本研究では、この変異体に着目し、植物の環境ストレス記憶保持における UTF1 の作用メカニズムを分子レベルで解き明かすことを目的とした。

3. 研究の方法

(1) UTF1 が2度目のストレス応答時に特異的に転写制御される遺伝子群の同定

研究開始当初は、*utf1* 機能欠損変異体の乾燥ストレスへの応答に着目する予定であったが、その後の研究により、病原性ラン菌 (*Hyaloperonospora arabidopsidis*; *Hpa*) に対する応答により明確な表現型が観察された。よって、UTF1 の機能解析には病原性ラン菌による生物的ストレスを用いることとした。

UTF1 により2度目の *Hpa* 感染時特異的に発現誘導される遺伝子群が *utf1* 変異体においてフィットネス・コストの増大を引き起こし、消去されるべき植物免疫記憶を形成していると考えられる。これらの遺伝子群は、従来から知られている耐病性応答性遺伝子群なのか、それとも、記憶特有の遺伝子群なのかを調べた。

ここでは、1度目の *Hpa* 感染時および2度目の *Hpa* 感染時にある野生型と *utf1* 変異体から RNA を抽出し、次世代シーケンサーを用いてトランスクリプトームのプロファイリングを行った。トランスクリプトームデータを解析し、以下の条件①②を同時に満たす遺伝子群を抽出する。

- ① 1度目の *Hpa* 感染時において野生型と *utf1* 変異体で発現レベルに差がない。
- ② 2度目の *Hpa* 感染時において *utf1* 変異体で発現レベルに差がある。

(2) UTF1 が直接結合するゲノム領域の同定

(1) で抽出された遺伝子群の中には、EML1 がクロマチン領域へ直接結合して転写制御を行なっているもの、あるいは、間接的に影響を受けているものがあると推察される。遺伝子群の中でも、UTF1 が物理的に結合し、直接的に発現を制御する遺伝子が、植物記憶遺伝子ネットワークのより上流に位置しており、機能的に重要な遺伝子であると考えられる。

ここでは、3xFLAG タグ融合 UTF1 (3xFLAG-UTF1) により相補した *utf1* 形質転換体を実験材料とし、抗 FLAG 抗体を用いたクロマチン免疫沈降と定量 PCR (ChIP-qPCR) により、3xFLAG-UTF1 が直接結合するゲノム領域の検出を行った。(1) で特定した遺伝子群に含まれる遺伝子領域およびプロモーター領域を ChIP-qPCR 解析の対象とした。

(3) UTF1 による標的遺伝子座のヌクレオソーム含有率制御の検出

ヌクレオソーム構造は、転写の伸長を妨げることが知られている。UTF1 は、そのドメイン構造から、クロマチンリモデリング因子であると推定された。よって、UTF1 は2度目の *Hpa* 感染時特異的に標的遺伝子座のヌクレオソーム含有量を増加させ、耐病性獲得にポジティブに働く遺伝子、あるいはネガティブに働く遺伝子の発現を、それぞれ低下または上昇させることで記憶の消去をしているものと考えられる。

ここでは、(2) で明らかとなった UTF1 が直接結合する標的ゲノム領域において、ヌクレオソーム含有率が、2度目の *Hpa* 感染時特異的に増加あるいは減少するかどうかを調べた。ヌクレオソーム含有率の測定には、既に確立されている手法である Formaldehyde-Assisted Isolation of Regulatory Elements (FAIRE) 法 [1] を用いた。

4. 研究成果

(1) 免疫記憶消去時に UTF1 により転写レベルが制御される遺伝子群

1度目の *Hpa* 感染時において野生型と *utf1* 変異体から RNA を抽出した。同様に、2度目の *Hpa* 感染時において野生型と *utf1* 変異体からも RNA を抽出した。これらの RNA サンプルを NovaSeq6000 によりシーケンシングした。リファレンスとするゲノム DNA 配列および GTF アノテーションファイルは Ensembl (<http://ensemblgenomes.org/>) より得た。シーケンサーより得ら

れたリードデータを hisat2 [2]によりリファレンスゲノム配列へマッピングした。その後、発現量を DESeq2 [3]を用いてサンプル間で統計的に比較した。

トランスクリプトーム解析の結果、転写因子、GTPase、タンパク質リン酸化酵素をコードする遺伝子を含む遺伝子群が、*utf1* 変異体において 2 度目の *Hpa* 感染時特異的に発現上昇する遺伝子として抽出された。タンパク質コード遺伝子に加えて、非翻訳性長鎖 RNA (long non-coding RNA; lncRNA) も検出された。検出された遺伝子群の中で、免疫記憶に重要な役割を果たすと考えられる代表的な遺伝子を表 1 に示す。以上のように、免疫記憶消去時に UTF1 により転写レベルが低下される遺伝子群が同定された。

表1 トランスクリプトーム解析の結果

Gene name	Gene description	Gene model type
<i>WRKY70</i>	WRKY-type transcription factor	Protein coding
<i>NAC004</i>	NAC-type transcription factor	Protein coding
<i>ARFD1A</i>	ARF GTPase	Protein coding
<i>PBL20</i>	Protein kinase	Protein coding
Uncharacterized lncRNA	None	Long noncoding RNA

(2) UTF1 は *NAC004* および lncRNA をコードするゲノム領域に結合する

まず、ChIP 法を行うための実験系統として、*3xFLAG-UTF1* により相補した *utf1* 変異体をバックグラウンドとする形質転換体を作成した。UTF1 にはスプライスバリエーションに由来する 2 種類のタンパク質が存在する。従って、各々のスプライスバリエーション (UTF1.1 および UTF1.2) に由来する cDNA を RT-PCR によりクローニングし、*3xFLAG-UTF1.1* または *3xFLAG-UTF1.2* を発現カセットとして持つコンストラクトを構築した。構築したベクターをアグロバクテリウム菌株 GV3101 へ導入し、そのアグロバクテリウムを用いたフローラルディップ法 [4] により、*utf1* 変異体を形質転換した。得られた形質転換体から RNA を抽出し、表 1 に示された遺伝子群の RNA レベルが野生型と同等となることを指標として、*3xFLAG-UTF1* による *utf1* 変異体の相補性を評価した。その結果、*utf1* 変異は *3xFLAG-UTF1.1* により相補されるが、*3xFLAG-UTF1.2* には相補されないことが分かった。つまり、免疫記憶消去においては、UTF1.1 のみが機能していることが示された。

3xFLAG-UTF1.1 / *utf1* 形質転換体を用いて ChIP-qPCR 解析を行った。実験の対象としたゲノム領域は、表 1 に示されている遺伝子および lncRNA コード領域、また、それらのゲノム領域の上流 1kb とした。その結果、*NAC004* のプロモーター領域および lncRNA をコードするゲノム領域に強い ChIP シグナルを検出した。以上のように、免疫記憶消去時に UTF1 により転写レベルが低下される遺伝子群の中でも、転写因子である *NAC004* と機能未知な lncRNA をコードするゲノム領域の発現が、UTF1 により直接的に制御されることが分かった。これらの結果より、植物環境記憶の消去において、NAC タイプの転写因子に加えて、非コード RNA が植物免疫記憶制御ネットワークのより上流に位置しており、機能的に重要な役割を果たす可能性が示唆された。

(3) *NAC004* および lncRNA の RNA レベルはヌクレオソーム含有率と相関性がある

NAC004 および lncRNA をコードするゲノム領域において、2 度目の *Hpa* 感染時特異的にヌクレオソーム含有率が増加あるいは減少するかどうかを FAIRE 法により調べた。実験材料としては、野生型植物体、*utf1* 変異体、*3xFLAG-UTF1.1* / *utf1* 形質転換体を用いた。その結果、野生型植物体においては、調べたゲノム領域において、1 度目と 2 度目の *Hpa* 感染時間でヌクレオソーム含有率に有意差は認められなかった。それに対して、*utf1* 変異体においては、2 度目の *Hpa* 感染時にヌクレオソーム含有率の低下が見られた。*3xFLAG-UTF1.1* / *utf1* 形質転換体においては野生型植物体と同様の結果が得られた。以上の結果より、UTF1 は標的ゲノム領域のヌクレオソーム含有量を変化させることによって RNA レベルを制御すると考えられた。

本研究による一連の結果から、本研究で着目した推定クロマチンリモデリング因子である UTF1 は、植物の免疫獲得において、不必要な長期記憶によるフィットネス・コストの増加を抑制する際に重要な機能を果たすことが強く示唆された。

<引用文献>

- ① Omidbakhshfard et al, J Integr Plant Biol. 2014 56(6):527-38.
- ② Pertea et al, Protoc. 2016 11(9):1650-67.
- ③ Love et al, Genome Biol. 2014 15(12):550.
- ④ Bent, Methods Mol Biol. 2006 343:87-103.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 3件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Schroeder MM, Lai Y, Shirai M, Alsalek N1, Tsuchiya T, Roberts P, Eulgem T	4. 巻 9(1)
2. 論文標題 A novel Arabidopsis pathosystem reveals cooperation of multiple hormonal response-pathways in host resistance against the global crop destroyer <i>Macrophomina phaseolina</i>	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific reports	6. 最初と最後の頁 20083
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41598-019-56401-2	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

1. 著者名 Chaudhary Ritu, Peng Hsuan-Chieh, He Jiangman, MacWilliams Jacob, Teixeira Marcella, Tsuchiya Tokuji, Chesnais Quentin, Mudgett Mary Beth, Kaloshian Isgouhi	4. 巻 221
2. 論文標題 Aphid effector Me10 interacts with tomato TFT7, a 14-3-3 isoform involved in aphid resistance	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 New Phytologist	6. 最初と最後の頁 1518 ~ 1528
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/nph.15475	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Lai Yan, Cuzick Alayne, Lu Xueqing M., Wang Jianqiang, Katiyar Neerja, Tsuchiya Tokuji, Le Roch Karine, McDowell John M., Holub Eric, Eulgem Thomas	4. 巻 97
2. 論文標題 The Arabidopsis RRM domain protein EDM3 mediates race-specific disease resistance by controlling H3K9me2-dependent alternative polyadenylation of RPP7 immune receptor transcripts	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The Plant Journal	6. 最初と最後の頁 646 ~ 660
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/tpj.14148	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計6件（うち招待講演 0件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 SUKAOUN KANOKNIPA, 土屋 徳司
2. 発表標題 Pathogen challenge to Arabidopsis cotyledons sets sustained upregulation of a WRKY gene and defense priming at newly formed rosette leaves
3. 学会等名 日本植物生理学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 SUKAOUN KANOKNIPA, 土屋 徳司
2. 発表標題 Pathogen challenge to Arabidopsis cotyledons sets sustained upregulation of a WRKY gene and defense priming at newly formed rosette leaves
3. 学会等名 日本育種学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 五十嵐 寛太, 土屋 徳司
2. 発表標題 シロイヌナズナにおけるFLOWERING LOCUS Cをターゲットとしたエピゲノム編集による花成時期の制御
3. 学会等名 日本育種学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 SUKAOUN KANOKNIPA, 土屋 徳司
2. 発表標題 シロイヌナズナにおいてHyaloperonospora arabidopsidis感染により誘導されるWRKY 転写産物量の長期保持とプライミング状態の関係性
3. 学会等名 日本育種学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 渡邊亮介, 土屋徳司
2. 発表標題 シロイヌナズナにおけるエピジェネティック制御因子EDM2とその相互作用因子であるユビキチンE3リガーゼによる耐病性制御メカニズムの解析
3. 学会等名 日本育種学会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 SUKAOUN KANOKNIPA, 土屋 徳司
2. 発表標題 Relationship between defense priming and sustained upregulation of WRKY transcript levels induced by Hyaloperonospora arabidopsidis infection in Arabidopsis
3. 学会等名 日本植物生理学会
4. 発表年 2019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
---------------------------	-----------------------	----

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