

令和元年6月3日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K07307

研究課題名(和文)植物免疫におけるRNAサイレンシング機構のプライミング

研究課題名(英文)Primed activation of RNA silencing in plant immunity

研究代表者

安藤 杉尋 (Sugihiro, Ando)

東北大学・農学研究科・准教授

研究者番号：10442831

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：ウイルス抵抗性に関与するサイレンシング関連因子AGO2のBTH処理によるプライミング機構におけるmiRNAとヒストン修飾の関与を解析した。BTH処理によるmiRNAの変動を解析した結果、miR403 (AGO2制御)やmiR168 (AGO1制御)の蓄積量が上昇した他、RNA-seqによりmiRNAの変動が検出された。また、miRNAの機能欠損変異体ではAGO2の恒常的なプライミングが認められた。一方、ヒストン修飾の解析では、AGO2の転写開始点とその上流2kb付近では、H3K4me3レベルが上昇することが確認された。また、RNAPIIの結合性の変化やこの領域に結合する転写因子候補が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、植物免疫のプライミング機構においてウイルス抵抗性の主要機構であるRNAサイレンシングが抵抗性誘導剤処理によって複雑な転写制御を介してプライミングされることを示した。遺伝子発現のプライミング機構へのmiRNAの関与についてはほとんど知見がなく、学術的に重要な知見といえる。また、ヒストン修飾などエピジェネティックな制御がプライミングに重要な役割をもつことは知見が蓄積しつつあるが、ヒストン修飾に関連づけたRNAPIIの結合性や転写因子の解析は十分にされていないのが現状といえる。従って、本研究の成果は植物免疫のプライミング機構に新たな視点を与えるものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Changes in miRNA accumulation and chromatin modification were analyzed during primed activation of AGO2 transcription by BTH treatment in *Arabidopsis thaliana*. RNA-seq analysis revealed that BTH treatment affected miRNA levels. The increased accumulation of miR403 and miR168 were also confirmed by northern blotting. The expression of AGO2 was constitutively primed in hyl1-2 and hst15 mutants. We also confirmed that the level of H3K4me3 was increased at transcription initiation point and -2,000 bp region of AGO2 promoter by BTH treatment. Binding activity of RNAPII was decreased at transcription initiation point of AGO2 in BTH-treated plants. Finally, we identified WRKY25 and AtHMGB9 as candidates of transcription factor which regulate primed activation of AGO2.

研究分野：植物病理学

キーワード：プライミング RNAサイレンシング

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

我々人類は食糧生産の安定化、効率化を目的に多くの努力を重ねてきたが、植物病害による減収は依然として大きな問題である。病原体から作物を守るためには、植物が本来もつ抵抗性を利用する手法が有効であり、その一つとして、Plant activator などの薬剤の利用が挙げられる。一般に Plant activator は植物免疫をプライミングすることで病害抵抗性を向上させることが知られている。プライミング状態では、防御応答は活性化されていないが二次的な感染 (Challenge stress) などに対し、迅速で強い防御応答が可能となる。

これまでの研究では、WRKY 防御関連転写因子など転写や MAP キナーゼの活性がプライミング時に Challenge stress によって速く強く誘導されることが報告されている。我々はこれまでに、RNA サイレンシング関連因子である Argonaute (AGO) 2 及び AGO3 の遺伝子発現が Plant activator の一つであるアシベンゾラル S メチル (BTH) 処理によってプライミングされることを見出した。RNA サイレンシング機構はウイルスに対する主要な防御システムであるだけでなく、糸状菌類や細菌類に対する抵抗性にも関与することが報告されている。

### 2. 研究の目的

本研究は、植物免疫における RNA サイレンシングのプライミングの確立機構および作用機構の解明を目的としている。我々はこれまでに、RNA サイレンシング関連因子 AGO2 及び AGO3 の遺伝子発現が BTH 処理等によるキュウリモザイクウイルス抵抗性誘導時にプライミング制御を受けることを明らかにした。本計画ではプライミング誘導時の宿主 miRNA の蓄積量の変化、その際の AGO2 遺伝子のクロマチン構造の変化、を明らかにすることで、サイレンシング機構のプライミングの仕組みと意義に迫る。本研究の成果によって、プライミングにおける遺伝子発現の迅速制御に新たな制御システムの存在を示唆できるものと考えられる。

### 3. 研究の方法

#### (1) プライミング時の miRNA 蓄積量の変動

プライミングされたサイレンシング機構が内生の miRNA の産生に影響する可能性と miRNA がサイレンシング機構のプライミングを制御している可能性の 2 点について 検討するため miRNA-Seq によって、プライミングに関わる miRNA の蓄積量の変動を把握する。さらに、プライミング応答時の miR403 と miR168 の発現変動をノーザン法によって解析する。

さらに、hy11-2 や ago1-45 などの miRNA 産生に関わる変異体を用いた AGO2 等の発現解析や CMV 抵抗性試験などの解析を行い、プライミングへの miRNA の関与について示す。

#### (2) AGO2 遺伝子のクロマチン修飾の変動

クロマチン構造変化が RNA サイレンシング機構のプライミングの確立に関与するか、ヒストン修飾の変動とヌクレオソーム密度の観点から解析する。AGO2 遺伝子についてプロモーター領域やタンパク質コード領域のヒストン修飾の変動を修飾特異的ヒストン抗体 (メチル化、アセチル化等) を用いたクロマチン免疫沈降法 (ChIP) により、ヌクレオソーム密度を FAIRE 法 (Formaldehyde-Assisted Isolation of Regulatory Elements) によって解析し、クロマチン構造が RNA サイレンシングのプライミング確立に関与するか明らかにする。

### 4. 研究成果

我々はこれまでに、RNA サイレンシング関連因子である AGO2 及び AGO3 の遺伝子発現がプライミング誘導剤 BTH 処理によってプライミングされること、すなわち通常の状態に比べ、刺激に対して強く早く発現誘導される状態になっていることを明らかにした。一方で、AGO2 および AGO3 は AGO1 を介して miRNA による発現制御を受けること知られているため、AGO2 及び AGO3 のプライミングに対する miRNA の関与を検討した。まず、AGO2 および AGO3 をターゲットとする miRNA である miR403 と AGO1 をターゲットとする miR168 の蓄積量をノーザンプロット法によって解析した結果、BTH 処理によるプライミング誘導時に両 miRNA の蓄積量が増加すること、さらに miR168 についてはプライミング誘導後のストレス処理によって、さらに増加することが明らかになった (図 1)。そこで、miR403 の AGO2 プライミングへの関与を示すため、miR403 のターゲット配列を欠失した AGO2 ゲノム配列を (プロモーター約 2kb とターミネーター約 500bp を含む) を ago2-1 変異体に形質転換し、AGO2 のプライミングについて解析を行った。その結果、AGO2 の Basal な発現が野生型や、コントロールとして野生型の AGO2 ゲノム配列を形質転換した系統と比較して上昇するが、BTH 処理によるプライミングを示す発現パターンは維持された。このことから、miRNA が AGO2 の Basal な発

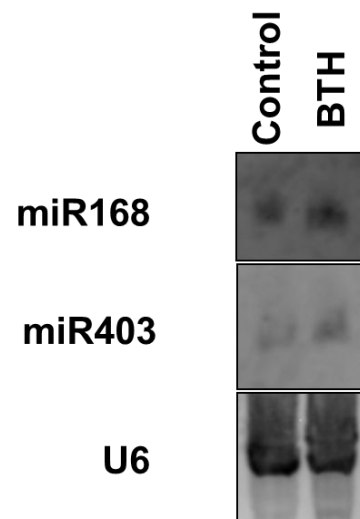


図 1. BTH 処理による miR168 と miR403 の蓄積量の変化

このことから、miRNA が AGO2 の Basal な発

現制御を介してプライミング制御に係わる可能性が考えられた。そこでさらに、プライミング誘導時の miRNA の変動を miRNA-seq によって明らかにすることを試みた。シロイヌナズナに BTH をスプレー処理し、3 日後にストレス処理としてロゼット葉の細胞間隙に水を浸透させ、3 時間後にサンプリングした。コントロールとしては BTH 非処理区と水ストレス非処理区を設けた。それぞれの処理区のサンプルから RNA を抽出し small RNA 画分を濃縮後 cDNA 合成し、MiSeq を用いた miRNA-Seq を行った。その結果、miR398b, miR447a, miR3932b, miR1888b などが BTH 処理及び水ストレスを与えた区で多く蓄積する傾向があった。また、BTH 処理によって miR841a や miR172b が蓄積する傾向なども認められた。

また、miRNA 生合成が異常な *hyl1-2* および *hst15* 変異体では、ウイルス抵抗性が亢進し (図 2)、さらに *AGO2* および *AGO3* の発現が恒常的にプライミング状態になることが明らかになった。このことから、これらの変異体における miRNA の機能異常が *AGO2* などのプライミングを促進し、その結果ウイルス抵抗性が亢進される可能性が考えられた。一方で miRNA を取り込み RNA の分解に関わる *AGO1* の変異体 *ago1-45* ではウイルス抵抗性の亢進は認められなかった (図 2)。これは *AGO1* 自体もウイルス抵抗性に重要な役割をもつことが報告されていることと関連があると考えられる。

一方、プライミング誘導時の *AGO2* プロモーターの構造変化がプライミングに影響する可能性については、ヒストン H3 タンパク質の第 4 リジンのトリメチル化 (H3K4me3; 遺伝子活性化の指標) が増加することが明らかになっていたが、さらに詳細に解析するため、より上流域のプロモーターの H3K4me3 レベルの変化を ChIP 解析によって調べたところ、転写開始点から 2kb 上流に H3K4me3 レベルが大きく上昇する領域が存在することが明らかになった。この領域には WRKY 転写因子が結合する保存配列である W-box が複数存在していたことから、この領域が *AGO2* の発現制御に重要な役割を持つと考え、この領域に結合する転写因子を酵母 One-hybrid (Y1H) スクリーニングによって探索した。その結果、DNA 結合モチーフをもつ候補因子として WRKY25 (部分配列)、AtHMGB9、AtPDCD5 (部分配列) などが得られた。Beit 配列への結合特異性を Y1H によって確認したところ WRKY25 と AtHMGB9 が特異的結合であることが示唆された。しかしながら、WRKY25 については全長配列を発現させた酵母は得られず、酵母の生育に悪影響を及ぼしている可能性が推測されたため、他の方法による確認が必要である。さらに、*wrky25* 変異体では *AGO2* のプライミングが増強されていたことから、WRKY25 は *AGO2* のプライミングを負に制御している可能性が考えられた。

さらに、*AGO2* のプロモーター領域のクロマチン密度を FAIRE 法によって解析したところ、*AGO2* の転写開始点付近は常時クロマチン密度が低く、転写可能な状態と判断された。そこで、このようなクロマチン構造が RNA ポリメラーゼ (RNAPII) のアクセシビリティに影響するか検証したところ、プロモーター領域の RNAPII 結合量が BTH 処理によって減少することが示唆され (図 3)、プロモーター領域のクロマチン密度やヒストン修飾の変化が RNAPII の結合に影響している可能性が示唆された。

また、ヒストン修飾にかかわる遺伝子の変異体を用いた *AGO2* プライミングおよびウイルス抵抗性の解析においては、ヒストン脱メチル化酵素 (LDL1, LDL2, LDL3) の三重変異体および、ヒストンメチル化酵素 (ATX1, ATX2, ATX4, ATX5) の四重変異体を作成し、キュウ

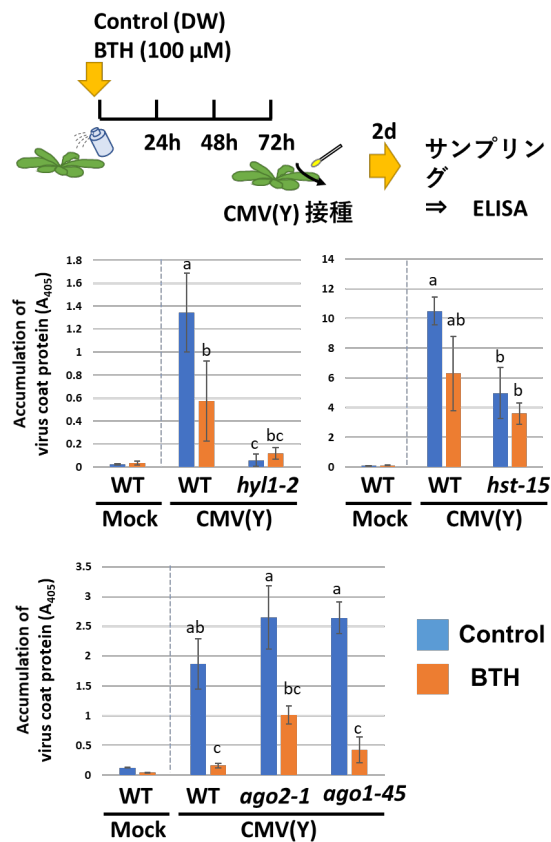


図 2. miRNA 生合成変異体および *ago* 変異体における CMV 抵抗性の亢進

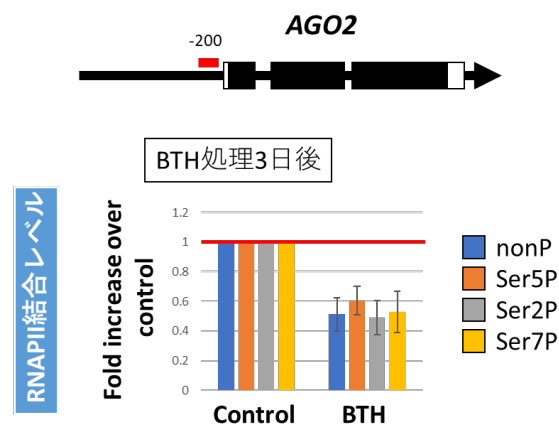


図 3. BTH 処理による *AGO2* 転写開始点付近への RNAPII の結合性の変化

リモザイクウイルス抵抗性の変化を解析した。Id1/2/3 三重変異体では、通常の状態ではウイルス抵抗性は変化しなかったが、BTH 処理によるウイルス抵抗性誘導が強化される傾向が認められた。一方、atx1/2/4/5 四重変異体は矮化や葉が変形するなどの奇形が認められたが、ウイルス増殖量は野生型に比べて抑えられており、ウイルス抵抗性が亢進していると考えられた。これらの結果は、ヒストン修飾の変動がウイルス抵抗性に関与することを示唆するものであるが、ヒストン修飾全体を大きく変えることで多くの遺伝子発現に変化が生じた結果であるため、単純な解釈はできないと考えている。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3 件)

- Ando, S., Miyashita, S., and Takahashi, H. (2019) Plant defense systems against cucumber mosaic virus: lessons learned from CMV-Arabidopsis interactions. *Journal of General Plant Pathology*, 85(3), 174-181. (査読有り) doi : 10.1007/s10327-019-00845-x
- Takahashi, H., Tian, A., Miyashita, S., Kanayama, Y., Ando, S. and Kormelink, R. (2018) Survey of the response of 82 domestic landraces of *Zea mays* to cucumber mosaic virus (CMV) reveals geographical region-related resistance to CMV in Japan. *Plant Pathology* 67: 1401-1415. (査読有り) doi: 10.1111/ppa.12848
- Sato, Y., Miyashita, S., Ando, S. and Takahashi, H. (2017) Increased cytosine methylation at promoter of the NB-LRR class R gene *RCY1* correlated with compromised resistance to cucumber mosaic virus in EMS-generated *src* mutants of *Arabidopsis thaliana*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 100: 151-162. (査読有り) doi: 10.1016/j.pmp.2017.09.007

〔学会発表〕(計 8 件)

- 安藤杉尋・小関彩恵子・宮下脩平・高橋英樹、BTH 処理による RNA サイレncing 関連因子 AGO2 のプライミングを制御する転写因子の探索、平成 31 年度日本植物病理学会大会、平成 31 年 3 月 18-20 日、つくば市
- 小関彩恵子・宮下脩平・高橋英樹・安藤杉尋、ヒストン脱メチル化酵素変異体 Id1 におけるキュウリモザイクウイルス抵抗性の解析、平成 29 年度日本植物病理学会大会、平成 29 年 4 月 26-28 日、盛岡市
- 安藤杉尋・大谷峻・宮下脩平・高橋英樹、RNA サイレncing 関連因子 AGO2 遺伝子のプライミングにおける miRNA の役割、平成 29 年度日本植物病理学会大会、平成 29 年 4 月 26-28 日、盛岡市
- Ando, S. (2016) Primed activation of RNA silencing machinery correlating with cucumber mosaic virus resistance. CFAI 2<sup>nd</sup> International symposium, July 2, Sendai, Japan
- 安藤杉尋・Jaskiewicz Michal・Conrath Uwe・宮下脩平・高橋英樹、プライミング時における RNA サイレncing 関連因子 AGO2 のプロモーター領域のクロマチン構造変化と RNA Polymerase II 結合性、平成 28 年度日本植物病理学会大会、平成 28 年 3 月 22-24 日、岡山市
- 大谷峻・定池歩美・宮下脩平・高橋英樹・安藤杉尋、miRNA による RNA サイレncing 関連因子 AGO2 及び AGO3 のプライミングの制御機構の解析、平成 28 年 3 月 22-24 日、岡山市
- 安藤杉尋・Jaskiewicz Michal・高橋英樹・Conrath Uwe、RNA サイレncing 関連因子 AGO2 遺伝子のプライミングに対するヒストン修飾機構の関与、平成 27 年度日本植物病理学会大会、平成 27 年 3 月 29-31 日、東京都
- 大谷峻・高橋英樹・安藤杉尋、DNA メチル化酵素変異体を用いた RNA サイレncing 関連因子 AGO2 のプライミングとキュウリモザイクウイルス抵抗性の解析、平成 27 年度日本植物病理学会大会、平成 27 年 3 月 29-31 日、東京都

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

取得状況 (計 0 件)

〔その他〕

特になし

## 6. 研究組織

(1) 研究分担者

なし

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：大谷 峻  
ローマ字氏名：Otani, Shun

研究協力者氏名：小関 彩恵子  
ローマ字氏名：Koseki, Saeko

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。