

令和 5 年 6 月 1 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K06045

研究課題名（和文）植物免疫のプライミングを制御するクロマチン構造と転写因子の関係

研究課題名（英文）Relationship between chromatin structure and transcription factors regulating defense priming of plants

研究代表者

安藤 杉尋（Ando, Sugihiro）

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） 3,300,000円

研究成果の概要（和文）：シロイヌナズナのRNAサイレンシング関連因子AGO2のBTHによるプライミング機構を明らかにするため、プライミング時にヒストン修飾が変化するAGO2プロモーター領域に結合する転写因子の探索を行ったところ、WRKY25とAtHMGB9が候補として単離された。WRKY25遺伝子はBTH処理によってプライミングされ、変異体ではAGO2のプライミングとキュウリモザイクウイルス（CMV）抵抗性が増強された。反対に、AtHMGB9はBTH処理で発現が減少し、変異体ではAGO2のプライミングとCMV抵抗性が減衰した。本研究によりAGO2遺伝子のプライミングを正と負に制御する転写因子の存在が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

エピジェネティックな遺伝子発現制御の理解は生物の遺伝子発現制御を理解する上で非常に重要である。ヒストン修飾やDNAのメチル化がエピジェネティックな遺伝子発現制御に重要な役割をもつことは知られているが、個々の遺伝子の発現制御に関わる転写因子との相関性については不明な点が多いのが現状といえる。本研究はAGO2遺伝子のプライミング現象に着目し、プライミング誘導時にヒストン修飾が変化するプロモーター領域に結合する転写因子としてWRKY25とAtHMGB9を同定し、それぞれプライミングを正と負に制御する可能性を示唆した。ヒストン修飾変化と転写因子の関連を解析するツールとして本研究の成果は意義がある。

研究成果の概要（英文）：To elucidate the mechanism of BTH-induced priming of the Arabidopsis RNA silencing-related factor AGO2, we searched for transcription factors that bind to the AGO2 promoter region, where histone modifications are altered during priming. As a result, WRKY25 and AtHMGB9 were isolated as candidates. The WRKY25 gene was primed by BTH treatment, and the mutant exhibited enhanced AGO2 priming and cucumber mosaic virus (CMV) resistance. Conversely, AtHMGB9 expression was decreased by BTH treatment, and AGO2 priming and CMV resistance were attenuated in the mutants. This study suggested the presence of transcription factors that positively and negatively regulate AGO2 gene priming.

研究分野：植物病理学

キーワード：植物免疫 病害抵抗性 プライミング エピジェネティクス

1. 研究開始当初の背景

発展途上国を中心とした人口増加に加え地球規模の気候変動によって、我々の食料の安定供給は危ぶまれている。植物病害による農産物の減収は依然として大きな問題であり、地球温暖化などにより、更に深刻化していくことが懸念されている。また持続可能な社会の実現に向け、農業分野でも化学農薬のみに頼らない環境に配慮した農業システムの構築が急務となっている。このような背景から、プラントアクティベーターと呼ばれる植物自身の免疫システムを活性化することによって病害の発生を抑制する薬剤の開発やその作用メカニズムの解明の重要性が高まっている。プラントアクティベーターによる植物免疫の活性化の一つにプライミング現象が関わっていることが知られている。植物免疫がプライミングされた植物は、病原体等の感染刺激に対して通常よりも強く速く応答することが可能になる。プライミングにはエピジェネティックな遺伝子発現制御が関与しており、ヒストン修飾や DNA のメチル化の状態が変化することが多くの研究によって示されているが、その詳細なメカニズムについては未だ不明な点が多い。

我々は、シロイヌナズナの RNA サイレncing 関連因子である AGO2 の遺伝子発現がプラントアクティベーターである BTH 処理によってプライミングされることを見出した。その際の AGO2 プロモーター領域のヒストンのメチル化 (H3 の第 4 リジンのトリメチル化: H3K4me3) を解析したところ、転写開始点付近においてメチル化が増加することが明らかになった。さらに、転写開始点から 1 kb 上流の領域にも H3K4me3 が特徴的に上昇する領域が検出された。転写開始点から離れた領域における H3K4me3 の機能についてはあまり理解されていないが、この領域が AGO2 のプライミング制御に重要な役割をもつことを想定し、この領域に結合する転写因子を探索した結果、WRKY25 と AtHMGB9 の 2 つの DNA 結合タンパク質が見出された。

2. 研究の目的

植物免疫のプライミングにおいてヒストン修飾や DNA のメチル化といったエピジェネティックな遺伝子発現制御が重要な役割をもつことについては多くの知見が蓄積してきたが、プライミングに関する具体的な転写制御機構については殆ど理解されていないのが現状である。本研究では、AGO2 遺伝子のプライミングに係るヒストン修飾変動による制御と転写因子による転写制御の関係について新たな知見を得ることを目的とし、WRKY25 と AtHMGB9 の AGO2 プライミングへの機能の解析を行った。

3. 研究の方法

(1) BTH 処理による AGO2 遺伝子のプライミング誘導時の WRKY25 および AtHMGB9 遺伝子の発現挙動を qRT-PCR を用いて解析した。

(2) wrky25 および athmgb9 変異による AGO2 遺伝子のプライミングへの影響を qRT-PCR を用いて解析した。

(3) BTH 処理によるプライミング誘導時の CMV 抵抗性の増強に対する wrky25 および athmgb9 変異の影響を、ELISA を用いた接種 2 日後の CMV 外被タンパク質の蓄積量の解析によって評価した。

4. 研究成果

AGO2 遺伝子のプライミング誘導時にそのプロモーター領域に結合する WRKY25 と AtHMGB9 遺伝子の発現がどのような挙動を示すか解析するため、BTH 処理後の両遺伝子の発現の経時変化を解析した。AGO2 は BTH 処理後一過的に発現誘導され、72 時間後までに mRNA 蓄積量が定常レベルに戻ることによってプライミング状態になることが分かっている (図 1)。

この際、WRKY25 は AGO2 と同様の発現変動を示し、一過的に発現誘導されたあと、72 時間後には定常レベルまで発現が減少した (図 1)。さらに、72 時間後に展開葉に水を浸潤させ、水ストレスを与えると、AGO2 と同様に BTH 処理した植物で対照区に比べて強い発現誘導が認められたことから、WRKY25 も BTH 処理によってプライミング誘導されることが明らかになった (図 2)。

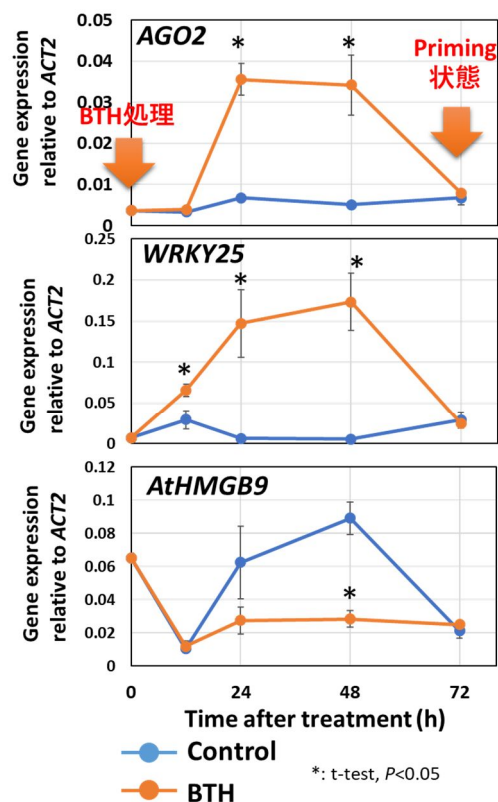


図 1. BTH 処理後の WRKY25 と AtHMGB9 遺伝子の発現変化

WRKY 転写因子は一般に植物病害抵抗性において重要な役割をもつことが示唆されており、**WRKY6**, **WRKY29**, **WRKY53**も同様に **BTH** 処理によってプライミングされることが報告されている (Jaskiewicz et al., 2011, *EMBO Rep*12: 50–55)。この他に、我々は **WRKY26**, **WRKY33**, **WRKY46**, **WRKY70** など **BTH** 処理によってプライミングされることを確認している。特に **WRKY26** と **WRKY33** は **WRKY25** と機能的に一部重複していることが知られていることから、**AGO2** のプライミング制御への関与も考えられる。

一方、**AtHMGB9** は定常レベルの発現に変動があるものの、**BTH** 処理によって発現が抑制される傾向が認められた (図 1)。同様に **BTH** 処理 72 時間後に水ストレスを行ったところ、**AtHMGB9** の発現は影響を受けず、プライミング誘導はされないことが示唆された (図 2)。

次に、*wrky25* と *athmgb9* 変異体における **AGO2** のプライミングの解析を行った。その結果、*wrky25* 変異体では、野生株 (WT) に比べて **BTH** 処理した植物において水ストレスに対して **AGO2** の発現が有意に強く発現誘導されることが明らかになった (図 3)。すなわち、*wrky25* 変異体では **AGO2** のプライミングが増強されており、**WRKY25** は **AGO2** のプライミングを負に制御する因子である可能性が示唆された。**WRKY25** と相同性が高く、一部機能の重複が報告されている **WRKY33** はジャスモン酸 (JA) シグナルを介した抵抗性応答において重要な役割をもつと考えられている。一般に **JA** はサリチル酸 (SA) を介した抵抗性応答に対して拮抗的に働くことが知られている。**BTH** はサリチル酸のアナログであることから、**WRKY25** が **BTH** による **AGO2** のプライミングを負に制御することは、これまでの知見とも矛盾しないように思われる。**WRKY25** は **AGO2** のプライミングのネガティブフィードバック制御に関わる可能性が高い。

一方、*athmgb9* 変異体では **BTH** 処理による **AGO2** のプライミングが認められなくなった (図 3)。**AtHMGB9** はクロマチン構造の調節に関与する

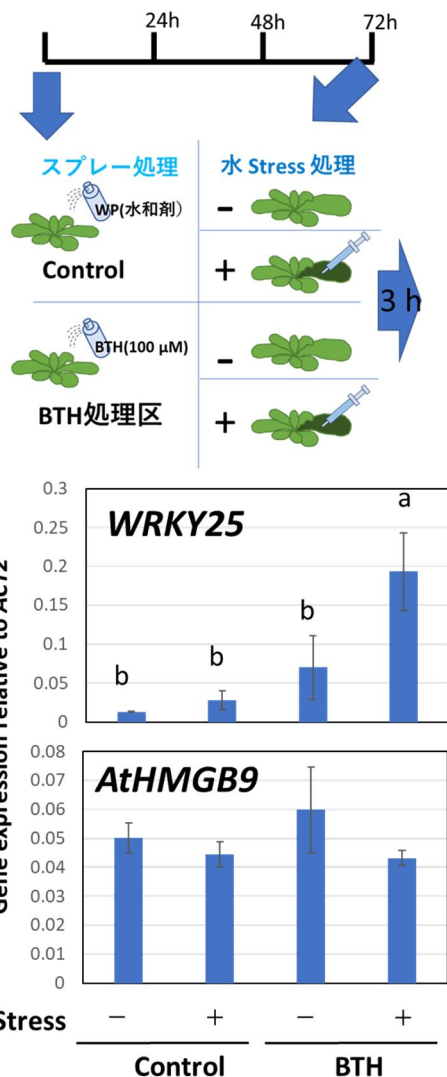


図 2. **BTH** 処理 72h 後の植物に対するストレス処理時の **WRKY25** と **AtHMGB9** 遺伝子の発現変化

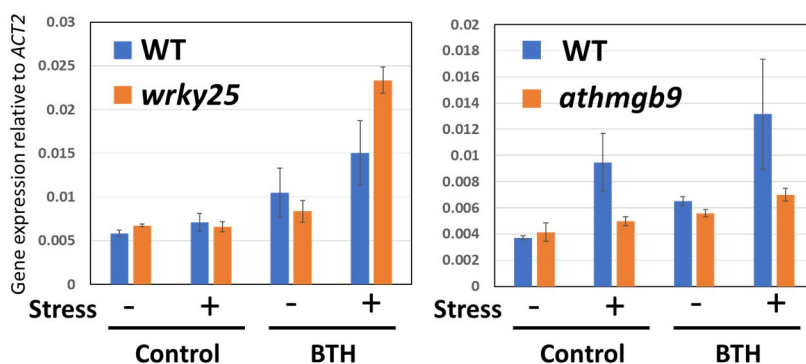


図 3. *wrky25* および *athmgb9* 変異体における、**AGO2** 遺伝子のプライミングの解析。方法は図 2 と同様に行った。

可能性や転写アクティベーターとして働く可能性が考えられることから、**AGO2** のプライミングを正に制御する因子である可能性が高いと考えられる。

さらに、*wrky25* と *athmgb9* 変異体の **CMV** 抵抗性についても解析を行った結果、*wrky25* では **BTH** 処理による **CMV** 抵抗性の増強が野生株よりも有意に亢進していた (図 4)。このことから、*wrky25* 変異による **AGO2** のプライミングの増強がウイルス抵抗性を亢進した可能性が示唆された。一方、*athmgb9* 変異体では **BTH** 処理をしない状態で **CMV** の増殖量が増加する傾向が認められ、**BTH** 処理による抵抗性誘導が認められなくなった (図 4)。このことは *athmgb9* 変異体において **AGO2** のプライミングが認められなくなったことと矛盾しない。従って、**AGO2** を介した **CMV** 抵抗性において **AtHMGB9** が重要な役割を持っていることが示唆された。シロイヌナズナのゲノム中には、**AtHMGB9** と相同性の高い遺伝子として、**AtHMGB10**, **AtHMGB11**,

*AtHMGB15*が存在する。このうち、*athmgb10*と*athmgb11*変異体について同様にCMV抵抗性を解析した結果、CMV抵抗性が弱まる傾向が認められ、特に*athmgb11*においてBTH処理による抵抗性誘導が*AtHMGB9*と同様に減衰した(図4)。このことから、*AtHMGB10*、*AtHMGB11*もプライミングの制御に関与する可能性が考えられた。

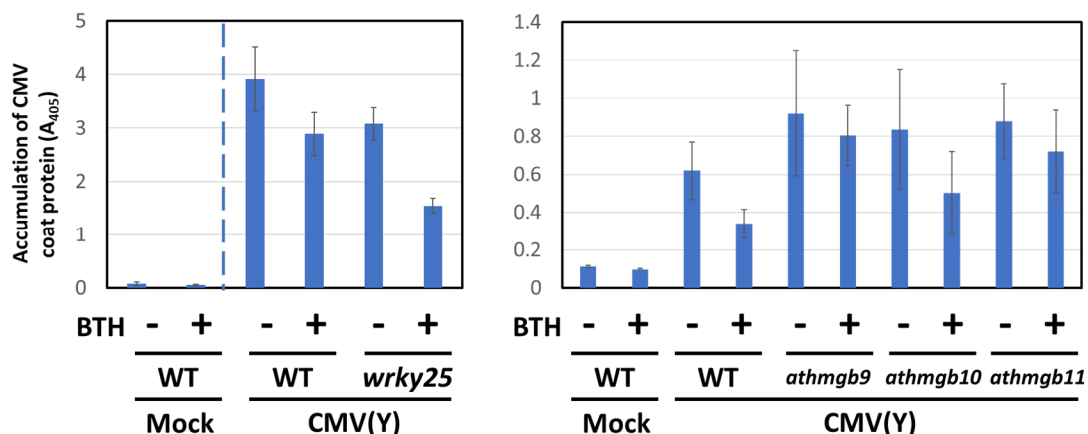


図4. *wrky25*および*athmgb9*変異体におけるCMV抵抗性の解析。BTH処理3日後の植物体にCMVを摩擦接種し、2日後の接種葉におけるCMVの増殖量を抗外被タンパク質抗体を用いたELISA法によって定量した。

本研究では、BTHによるプライミング誘導時にヒストン修飾の変動する*AGO2*遺伝子のプロモーター領域に結合する転写因子である*WRKY25*と*AtHMGB9*について、それぞれプライミングを負と正に制御していることを示唆した。ヒストン修飾変動と相関し、これら正負の制御因子が遺伝子発現のプライミングを厳密に調整していると考えられる。今後、そのダイナミクスの全体像や普遍性が明らかにされることが期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 3件／うち国際共著 1件／うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Tsukidate Daiki, Takashima Keisuke, Sasaki Shota, Miyashita Shuhei, Kaneko Toshiro, Takahashi Hideki, Ando Sugihiro	4. 巻 17
2. 論文標題 Activation of plant immunity by exposure to dinitrogen pentoxide gas generated from air using plasma technology	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 1-21 (e0269863)
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0269863	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 -
1. 著者名 安藤杉尋・宮下脩平・高橋英樹	4. 巻 14
2. 論文標題 RNAサイレンシングのプライミング機構とそのウイルス抵抗性への関与	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 植物ウイルス病研究会レポート (PSJ Plant Virus Dis. Rept.)	6. 最初と最後の頁 54-62
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 -
1. 著者名 Ando Sugihiro, Kasahara Masami, Mitomi Naoto, Schermer Tom A., Sato Erika, Yoshida Shigenobu, Tsushima Seiya, Miyashita Shuhei, Takahashi Hideki	4. 巻 -
2. 論文標題 Suppression of rice seedling rot caused by Burkholderia glumae in nursery soils using culturable bacterial communities from organic farming systems	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Plant Pathology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s42161-022-01066-6	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 -
1. 著者名 Ando Sugihiro, Jaskiewicz Michal, Mochizuki Sei, Koseki Saeko, Miyashita Shuhei, Takahashi Hideki, Conrath Uwe	4. 巻 22
2. 論文標題 Priming for enhanced ARGONAUTE2 activation accompanies induced resistance to cucumber mosaic virus in Arabidopsis thaliana	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Molecular Plant Pathology	6. 最初と最後の頁 19~30
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/mpp.13005	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5件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Daiki Tsukidate, Keisuke Takashima, Shota Sasaki, Shuhei Miyashita, Toshiro Kaneko, Hideki Takahashi, Sugihiko Ando
2. 発表標題 Plant disease suppression through the activation of plant immunity using N2O5 gas generated from air by atmospheric-pressure plasma device
3. 学会等名 第75回気体エレクトロニクス会議 (GEC 2022) / 第11回反応性プラズマ国際会議 (ICRP-11) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 安藤杉尋・宮下脩平・高橋英樹
2. 発表標題 NA サイレンシングのプライミング機構とそのウイルス抵抗性への関与
3. 学会等名 第14回植物ウイルス病研究会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 安藤杉尋・築館大輝・高島圭介・佐々木渉太・宮下脩平・金子俊郎・高橋英樹
2. 発表標題 Activating plant immunity by exposure to N2O5 gas generated from air by an atmospheric-pressure plasma device
3. 学会等名 第31回日本MRS年次大会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 築館大輝・高島圭介・佐々木渉太・宮下脩平・金子俊郎・高橋英樹・安藤杉尋
2. 発表標題 大気圧プラズマを用いて作成した新規活性窒素種の照射による植物免疫活性化
3. 学会等名 令和3年度日本植物病理学会東北部会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 安藤杉尋・三富直人・宮下脩平・高橋英樹
2. 発表標題 Burkholderia属内生細菌のイネ実生における増殖性とイネもみ枯細菌病抑制効果
3. 学会等名 令和3年度日本植物病理学会東北部会
4. 発表年 2021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
---------	---------