

研究終了報告書

「植物－病原体－環境ネットワークの解明による気候変動対応型病害抵抗性の分子設計」

研究期間： 2017年10月～2021年3月

(新型コロナウイルス感染症の影響を受け2021年9月まで延長)

研究者： 峯 彰

1. 研究のねらい

病原体による農作物の減収は5億人以上の食料に相当すると試算され、食料の安定供給を脅かす世界的な課題となっている。植物病害の発生は、植物の自然免疫系と病原体によるその攪乱のせめぎ合いだけで決まるわけではなく、環境要因が大きな影響を与えることが知られている。このことから、地球規模での気温上昇やそれに伴う降水量の増加などの気候変動により、病原体による農作物への被害がさらに拡大すると懸念されている。事実、高温期に発生する植物病害は数多く存在する。また、細菌感染が原因となる植物病害などは、主に降雨後の高湿度環境で発生する。したがって、「気候変動時代の食料安定確保」を実現するためには、高温／高湿度に対応した植物保護技術の開発が必要不可欠である。そのためには、高温／高湿度が植物病害の発生を助長する仕組みを分子レベルで理解することが肝要である。

病原細菌 *Pseudomonas syringae* は、トマトなどの多くの作物だけでなく、モデル植物であるシロイヌナズナにも感染し病気を引き起こす。私は、高温／高湿度環境下では、シロイヌナズナにおける *P. syringae* の感染が促進されることを見出した。本研究では、高温／高湿度環境下におけるシロイヌナズナと *P. syringae* の両者の時系列トランスクリプトーム応答を解析することにより、高温／高湿度によるシロイヌナズナの免疫抑制、あるいは、*P. syringae* の高病原性化を引き起こす鍵となる遺伝子を見つけ出し、その機能を改変することで、高温／高湿度による免疫抑制と *P. syringae* の高病原性化の無効化を試みた。

2. 研究成果

(1) 概要

本研究では、高温／高湿度環境下におけるシロイヌナズナと *P. syringae* の両者の時系列トランスクリプトームデータのネットワーク解析から、高温／高湿度による植物免疫の抑制、あるいは、細菌の高病原性化の仕組みの解明を目指した。

次世代シーケンサーを用いた RNA シーケンシング (RNA-seq) により、シロイヌナズナのトランスクリプトームデータを取得・解析し、高温と高湿度では免疫活性化に伴う遺伝子発現変動に与える影響が異なることを突き止めた。さらに、種々のネットワーク解析を駆使して、高温／高湿度による免疫抑制の原因となる遺伝子を推定した。これらの遺伝子の機能改変が高温／高湿度による免疫抑制の回避に繋がるかどうかを評価するには、植物体内における細菌量の増減を定量する必要がある。細菌増殖の定量に用いられる従来法は、労力がかかるうえにスループットも低い。そこで、恒常的に発光する細菌を簡便に作出し、その発光を指標として細菌増殖をハイスループットに定量する技術を開発した。この手法を用いて、部分的にはあるが、高湿度による免疫抑制を遺伝学的に相殺できることを示した。また、

免疫の高温耐性化に必要な植物の遺伝子を同定した。

細菌の RNA-seq 解析に必要なサンプル調製は煩雑かつ高コストであり、本研究のような大規模解析への大きな障壁となっている。そこで、細菌の RNA-seq 解析のローコスト・ハイスループット化を実現する技術を開発した。この技術を用いて、感染植物における *P. syringae* のトランスクリプトームデータを取得することに成功した。得られたデータの共発現ネットワーク解析から、高温と高湿度は *P. syringae* の特定の生理機能に関わる遺伝子群の発現に影響を与えることを突き止めた。さらに、これら遺伝子群の発現制御に関わる遺伝子を推定し、その中から *P. syringae* の病原性に関与する遺伝子を発見した。

新型コロナウイルス感染症の影響を受け6ヶ月間研究期間を延長し、高温・高湿度による植物免疫抑制と *P. syringae* の高病原性化に関わる遺伝子の更なる探索と機能解析を実施した。その成果として、高温による免疫調節に関与する新たな遺伝子を発見した。また、高温・高湿度における *P. syringae* の高病原性化に関わる転写因子によって制御される遺伝子群を明らかにした。さらに、発光を指標として細菌増殖をハイスループットに定量する技術を原著論文として公表した。

(2) 詳細

A. 高温／高湿度環境下におけるシロイヌナズナの時系列トランスクリプトーム解析

P. syringae pv. *tomato* DC3000 (*Pto*)はシロイヌナズナに病原性を示すが、*Pto* AvrRpt2 と *Pto* AvrRpm1 は ETI と呼ばれる強力な抵抗性を誘導するため、病原性を発揮できない。しかしながら、高温条件では *Pto* AvrRpt2 に対する抵抗性は崩壊し、高湿度条件では *Pto* AvrRpt2 と *Pto* AvrRpm1 の両者に対する抵抗性が崩壊することを発見した。高温／高湿度による免疫抑制を介在する遺伝子を見つけ出すことを目的に、シロイヌナズナの時系列トランスクリプトーム解析を行った。時系列解析では、解析対象とする生物応答の時間変化を捉えられるサンプリング時点を設定することが極めて重要である。先行した解析から、*Pto* に対しては接種後 9–24 時間、*Pto* AvrRpt2 と *Pto* AvrRpm1 に対しては接種後 3–9 時間において植物の遺伝子発現が大きく変化することを見出した (Mine et al., 2018)。この発見をもとに、高温／高湿度条件下における *Pto*、*Pto* AvrRpt2 および *Pto* AvrRpm1 に対する応答の時間変化をカバーする時系列トランスクリプトームデータを取得した。得られた 432 サンプルのデータに対して種々のネットワーク解析を適用し、高温／高湿度条件下では、平常条件と比べて、遺伝子発現パターンや、推定される遺伝子間の制御関係が大きく変化することを明らかにした。特に、高温と高湿度では、免疫関連遺伝子の発現変化に与える影響が異なることを明らかにできたのは大きい。この結果から、高温と高湿度は異なるメカニズムで免疫を抑制していると考えられた。さらに、ネットワーク解析を糸口に、高湿度による免疫抑制に関わるシグナルを同定するとともに、植物免疫の高温耐性に関わるエピジェネティック制御因子を発見した。

コロナ延長期間中において、高温・高湿度による植物免疫抑制に関わる遺伝子の更なる探索を実施し、高温条件において免疫応答を調節するエピジェネティック制御因子を新たに同定した。

B. 発光レベルを指標とした細菌増殖定量法の開発

LuxCDABE は自然発光する細菌が持つ、ルシフェラーゼとその基質を産生するオペロンである。このオペロンを、ゲノム上の特定位置へ挿入することで恒常的な発光を示す細菌へと形質転換させるプラスミドベクター“pBJ”を開発した。このベクターを用いて、自然発光する *Pto* (*Pto-lux*) を作出した(図1A)。*Pto-lux* の発光レベルは、従来法で測定した細菌増殖数と高い相関を示したことから(図1B)、発光レベルを指標として *Pto* の増殖を定量できる実験系を構築できた。本技術を用いることで、従来法に比べて実験操作が大幅に簡略化できただけでなく、結果を得る

までに必要な時間を数日から数時間へと短縮することができた。これは、研究項目 A の推進の為に役立った。さらに、本技術は、モデル宿主であるシロイヌナズナだけでなく、作物であるタバコやトマト、さらには、植物-病原体相互作用の進化を探るために欠かせないモデル植物であるゼニゴケにおいても利用できることを示した。加えて、本技術を用いて、感染植物内での増殖に対する *Pto* の遺伝子の寄与も評価できることを示した。これは、研究項目 D を推進するのに役立った。

コロナ延長期間中において、本研究成果を原著論文として公表した (Matsumoto et al., 2021)。

C. ローコスト・ハイスループットな細菌の RNA-seq ライブラリ作製法の開発

細菌の RNA-seq ライブラリの調製は、リボソーム RNA (rRNA) の選択的除去を必要とする。rRNA 除去用のキットは市販されているが、それらは高価であり、また、作業工程も煩雑である。私は、細菌の rRNA を選択的に除去するための独自の方法を開発した。この技術に、ローコスト・ハイスループットな RNA-seq ライブラリの作製法である BrAD-seq (Townley et al., 2015) を組み合わせ、細菌の RNA-seq 解析のローコスト・ハイスループット化を実現するライブラリ作製法「BrAD-seq-3R」を開発した。BrAD-seq-3R を用いた RNA-seq は、ある市販キット

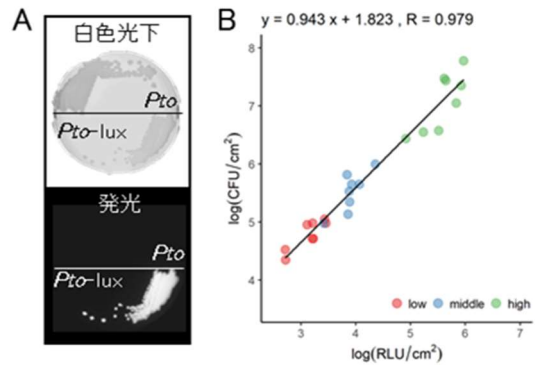


図1. 発光レベルを指標とした細菌増殖定量法の開発
A. 自然発光する *Pto* (*Pto-lux*)
B. 異なる濁度の接種源 (low, middle, high) を接種し、2日後の細菌増殖量。*Pto-lux* の発光レベル (RLU/cm²) は、従来法で測定した細菌数 (CFU/cm²) と高い相関を示す。線形回帰式とピアソン相関係数を図上に示した。

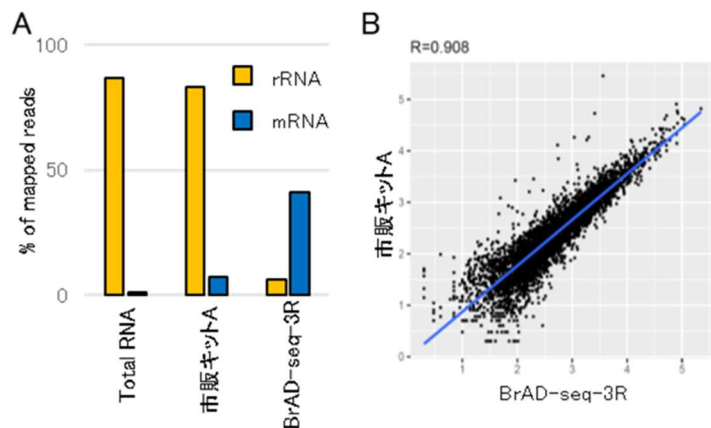


図2. BrAD-seq-3Rによる細菌のRNA-seq解析
A. BrAD-seq-3Rは市販キットAよりも効率よくrRNAを除去し、mRNAにマップされるリード数を増加させる。
B. BrAD-seq-3Rと市販キットAによるRNA-seqデータは高い相関を示す。

よりも効率よく rRNA を除去し、より多くのリードを *Pto* の mRNA 配列にマップさせることができた(図 2A)。また、BrAD-seq-3R と市販キットによる RNA-seq データは高い相関を示した(図 2B)。加えて、BrAD-seq-3R は、*Pseudomonas* 属に属する *Pto* だけでなく、*Xanthomonas* 属や *Ralstonia* 属の細菌の RNA-seq 解析にも利用できることを示した。

D. 高温／高湿度環境下における *Pto* の時系列トランスクリプトーム解析

BrAD-seq-3R を拡張し、シロイヌナズナと *Pto* の rRNA を同時に除去することで、感染植物における *P. syringae* のトランスクリプトーム応答を解析することに成功した。合計 162 サンプルの RNA-seq データの解析から、高温／高湿度に応答する *Pto* の遺伝子を明らかにした。これらの中には、細菌の病原性に関与する III 型分泌装置 (T3SS) やエフェクタータンパク質をコードする遺伝子などに加えて、機能未知の遺伝子が多数含まれていた。細菌細胞では、共通の転写因子によって制御される複数のオペロンが“regulon”と呼ばれるユニットとして共発現することが知られている。そこで、共発現ネットワーク解析を利用して、regulon とその発現を調節する転写因子の推定を試みた。T3SS 関連遺伝子群とそれらの発現を制御するマスター転写因子 *hrpL* の共発現を上手く検出できたことから、本手法によって転写因子と標的遺伝子の関係性を予測することが可能であると考えられた。この解析から推定された転写因子の中から、高温あるいは高湿度による *Pto* の高病原性化に必要な転写因子を同定した。

コロナ延長期間中において実施した RNA-seq 解析から、高温・高湿度における *Pto* の高病原性化に関わる転写因子によって制御される遺伝子を網羅的に明らかにした。

3. 今後の展開

地球規模で進行する気候変動によって引き起こされる農地の高温化や高湿化は植物病害の発生を助長し、食料安定供給の脅威になると懸念されている。本研究では、高温あるいは高湿度による植物免疫の抑制に関与する遺伝子を同定した。現在は、これらの遺伝子の機能を詳細に調べ、高温／高湿度による植物免疫抑制の分子機序の全容解明に取り組んでいる。その成果を論文として公表するとともに、将来的には、高温や高湿度環境への植物の適応応答を損なうことなく、免疫抑制を回避する技術の開発へと繋げたい。

高温や高湿度が植物病害の発生を助長する原因は、植物免疫の抑制に加えて、病原体の高病原性化が考えられる。本研究において、高温や高湿度に応答する細菌の遺伝子を同定し、その中から病原性に関与する遺伝子を見出した。これらの遺伝子が細菌の病原性を高める仕組みを明らかにし、その結果と合わせて論文として公表したい。また高温／高湿度対応型の微生物防除剤の新規開発に向けて、本研究で病原性に関与することが明らかとなった遺伝子の機能を阻害する薬剤のスクリーニングに取り組んでいきたい。

4. 自己評価

本研究では、高温／高湿度による植物の免疫抑制、および、細菌の高病原性化の鍵となる遺伝子の同定を目指した。高温／高湿度による植物免疫の抑制メカニズムの一端を明らかにし、高温や高湿度に応じた細菌の高病原性化に関与する遺伝子の同定にも成功したことから、研究目的はおおむね達成できたと判断している。研究を順調に進められた背景には、発光レベ

ルを指標とした細菌増殖定量法の開発に成功し、植物免疫の抑制や細菌の高病原性化に関与すると推定された遺伝子の機能評価をハイスループット化できたことが挙げられる。加えて、領域メンバーとの研究談義から着想を得て、計画立案当初は想定していなかったローコスト・ハイスループットな細菌の RNA-seq ライブラリ作製法である BrAD-seq-3R の開発にも成功し、細菌の RNA-seq 解析を効率よく進めることができた。しかしながら、研究成果の大部分は論文文化に至っていない。同定した鍵遺伝子の機能解析の結果と合わせて論文として公表したい。

研究開始直後に、実験室で高温・高湿度を再現するために必要な人工気象器を購入するなど、研究と技術開発の進捗に合わせて必要な機器を導入し、円滑に研究を進められるように努めた。研究期間を通じて、常時 2-3 名の補助研究員とともに研究を実施した。補助研究員には、それぞれが RNA-seq のライブラリ調製や細菌の遺伝子破壊株の作出など特化した業務を担当してもらうことで、明確な役割分担を実現した。これによって技術習得が早まり、研究の進展に繋がったと考えている。また、本研究では、領域内の共同研究を含めて、合計で 800 サンプル以上の RNA-seq 解析を行った。RNA-seq ライブラリの調製は BrAD-seq や BrAD-seq-3R を用いて効率化し、次世代シーケンサーによるシーケンス解析は外注した。これによって、RNA-seq 解析にかかる時間とコストを大幅に削減できた。また、RNA-seq データの解析支援も積極的に行ってきた。微力ではあるが、領域メンバーの研究にも貢献できたと考えている。

本研究を通じて取得した大規模トランスクリプトームデータは、高温／高湿度環境下における植物および細菌の遺伝子発現応答の全体像を捉える世界に類をみないデータセットであり、植物-細菌相互作用に対する高温と高湿度の作用を対象とする研究に限らず、植物や細菌の環境応答を対象とする幅広い研究分野の発展にも寄与するものと考えている。一方で、植物免疫および細菌病原性に対する高温／高湿度の作用の分子機序に関する研究成果は、高温／高湿度対応型植物保護技術の開発に向けた基盤的な知見を提供するものであると考えている。この成果を活かして、高温／高湿度でも機能する免疫系を備えた作物の創出や高温／高湿度環境下での細菌増殖を阻む薬剤の開発へと繋げていきたい。

5. 主な研究成果リスト

(1) 代表的な論文(原著論文)発表

研究期間累積件数: 5件

1. Akira Mine, Carolin Seyfferth, Barbara Kracher, Matthias L. Berens, Dieter Becker, Kenichi Tsuda. The Defense Phytohormone Signaling Network Enables Rapid, High-Amplitude Transcriptional Reprogramming during Effector-Triggered Immunity. *The Plant Cell*. 2018, 30(6):1199-1219.

植物免疫応答は、大規模な遺伝子発現変動(転写リプログラミング)を伴うが、そのダイナミクスに注目した研究は乏しく、どの遺伝子の発現変動が、どのタイミングで起こることが、抵抗性の発揮に重要であるのか分かっていなかった。本論文では、病原体の感染初期に起こる素早い転写リプログラミングこそが抵抗性の発揮に必要なことを突き止めた。

2. Ayumi Matsumoto, Titus Schlüter, Katharina Melkonian, Atsushi Takeda, Hirofumi Nakagami, Akira Mine. A versatile Tn7 transposon-based bioluminescence tagging tool for

quantitative and spatial detection of bacteria in plants. Plant Communications, 100227.

※コロナ延長時の成果

植物－細菌相互作用の研究には、植物体内の細菌数を定量することが欠かせない。しかし、従来用いられてきたコロニーカウント法は手間と時間がかかるという問題があった。本研究において、自然発光細菌が持つシフェラーゼとその基質を産生するオペロンである *LuxCDABE* を、ゲノム上の特定位置へ挿入することで恒常的な発光を示す細菌へと形質転換させるプラスミドベクター “pBJ”を開発した。その汎用性を、自然発光する *Pseudomonas*, *Rhizobium* (*Agrobacterium*), および *Ralstonia* 属細菌を作出することによって示した。自然発光する *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 (*Pto-lux*)を用いて、発光レベルを指標とした細菌数の定量は従来法による定量と高い相関を示し、かつ、複数の植物種において植物の抵抗性レベルや細菌の病原性レベルを定量的に評価できることを示した。さらに、本手法は従来法と比較して、結果を得るまでに必要な時間を数日から数時間へと短縮することができ、感染植物における細菌増殖をマクロなレベルで可視化できるという利点があることを示した。pBJ ベクターは、発光ベースの細菌数定量系を構築するこれまでにない機会を提供し、様々な植物－細菌相互作用研究の発展に貢献するものと期待される。

(2)特許出願

研究期間累積件数：0 件(特許公開前のものも含む)

(3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

1. 峯彰 植物－病原体相互作用のシステム生物学 滋賀植物病理懇話会、草津 2018 年 1 月 17 日(招待講演)
2. Tatsuya Nobori*, Akira Mine* and Kenichi Tsuda. Molecular networks in plant-pathogen holobiont. FEBS Letters. 2018, 592(12):1937-1953. [*co-first authors] (総説)
3. 峯彰 植物と病原体のせめぎ合いの分子ネットワーク 植物感染生理談話会、高知 2018 年 8 月 22 日(招待講演)
4. Akira Mine. Multifaceted Involvement of Abscisic Acid in Plant Interactions with Pathogenic and Mutualistic Microbes. Advances in Botanical Research. 2019, 92: 219-253.(著書)
5. 峯彰 病原細菌に対する植物免疫シグナリングネットワークの動態研究 日本植物病理学会学術奨励賞 2020 年 3 月 19 日(受賞)