

日本農薬学会
農薬科学研究成果報告書
(令和 3 年度研究奨励金交付課題)

研究課題

植物免疫抑制剤 NAS1 が植物のストレス耐性や生育に与える影響の解析

筆頭研究者氏名 草島美幸

所属 東京大学大学院農学生命科学研究科

共同研究者名 (所属)

研究成果 (目的・方法・成果の順に概要を記載してください)

【目的】

病原菌感染時の植物にサリチル酸 (SA) を介して誘導される全身獲得抵抗性は、さまざまな病原体に効果を発揮する植物の免疫機構の一つである。全身獲得抵抗性を活性化するプラントアクティベーターは農薬開発を目的として多くの研究が行われてきたが、抑制剤の報告は少ない。これまで、シロイヌナズナと化合物ライブラリーを用いてサリチル酸応答遺伝子 *PRI* の発現を指標として、植物免疫抑制剤を選抜して NAS1 とした (図 1)。シロイヌナズナに対する NAS1 処理は病原体である炭疽病菌とアグロバクテリウムの感染を促進し、SA 応答性遺伝子の発現を抑制することを大会にて報告してきた (図 2)。植物免疫抑制剤 NAS1 の作用機構の解明は、植物免疫機構の理解に繋がると同時に、植物と有用微生物の相互作用に寄与することが考えられる。そのため、次世代シーケンスを用いたトランスクリプトーム解析 (RNAseq) を行い、網羅的な遺伝子発現の変化を調べた。

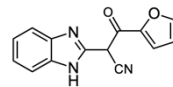


図1: NAS1

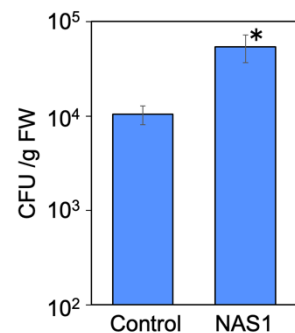


図2: アグロバクテリウムの増殖

【方法】

シロイヌナズナ (Col-0) を培養土 (ジフィーミックス : バーミキュライト, 3:1) に播種して明期 16 時間、22° C の条件下において 2 週間栽培した。NAS1 化合物を終濃度 10 μM となるように灌注処理し、3 日後に SA 1 mM を噴霧処理して 3 時間後にサンプリングを行った。セパゾール (ナカライ) を用いて RNA を抽出し、RNA の一部と ReverTra Ace qPCR RT Master Mix with gDNA Remover (TOYOBO) を用いて cDNA を合成し、TB Green Fast qPCR Mix (TaKaRa) を用いてリアルタイム PCR 解析を行った。リアルタイム PCR 解析の結果から選抜した RNA のクオリティーチェック後、BGI japan に 4 処理区 3 連 12 サンプルの RNA を送付して次世代シーケンサーを用いたトランスクリプトーム解析を依頼した。また、RNAseq 解析のパイプラインは Dr. Tom (BGI) を用いた。

【成果】

RNAseq 解析に供試する RNA サンプルを確認するため、SA を介した病害抵抗性経路のマーカー遺伝子 *PR1*、*EDS1*、*PAD4* の発現を解析した結果、コントロールと比較して SA 処理区では発現上昇が認められたが、NAS1 と SA の共処理区では発現の抑制が確認され、これらのサンプルを用いることにした (図 3)。

次世代シーケンス後、正規化したデータから発現変動遺伝子を選抜した (図 4)。その結果、コントロールと比較して NAS1 処理区では大きな発現の変化は見られず上昇が 23 遺伝子、下降が 7 遺伝子であっ

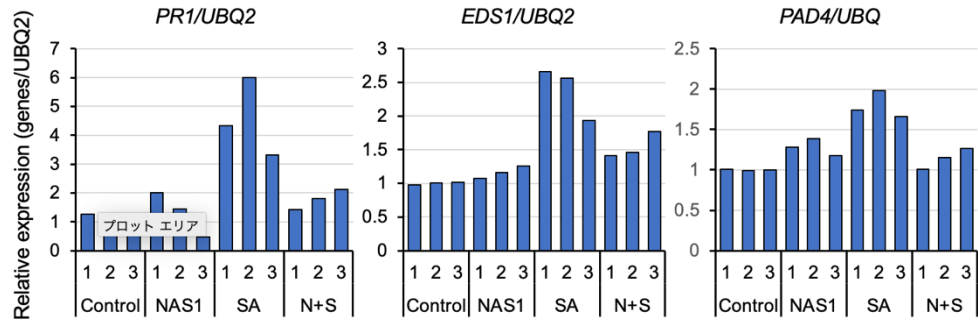


図3: SA経路マーカー遺伝子の発現

た。サンプリングのタイミングが NAS1 処理から 4 日後であったため、NAS1 早期応答性遺伝子は含まれず、変動遺伝子数が少なかった可能性が考えられる。次に、コントロールと比較して SA 処理区は 4304 個の遺伝子の発現が変化したが、NAS1 と SA の共処理区は 2567 個の遺伝子が変化し、NAS1 共処理は SA 処理時の発現変化を抑制することが示唆された。NAS1 処理の効果を推察するため、SA 処理区と比較して NAS1 と SA の共処理区において発現が上昇した 497 遺伝子を用いて biological process について Gene ontology (GO) エンリッチメント解析を行った (図 5)。バブルチャートの中でも比較的多くの遺伝子を含むプロセスとして、細胞内レドックス恒常性、光合成、オーキシン応答、サイトカニン応答、細胞壁組織化があげられる。これらのプロセスに関する遺伝子発現の向上より、NAS1 前処理によって SA 処理応答に伴う生育抑制が緩和されていることが予想される。また、オーキシン応答性遺伝子の発現はフィードバック制御も考えられるため、遺伝子発現のみでのオーキシンシグナルの考察は難しい。オーキシンシグナルが SA シグナルに及ぼす影響の報告は少ないため、今後は所属研究室に存在するオーキシン関連の変異体および阻害剤などを用い、NAS1 による植物免疫抑制効果に対するオーキシンの影響を解析する予定である。遺伝子の網羅的な発現解析から様々な情報を得ることができるが、そのみでは確実な考察は行えない。そのため、植物を用いた追加実験を行うことによって確かめ、次回の大会にて報告する予定である。

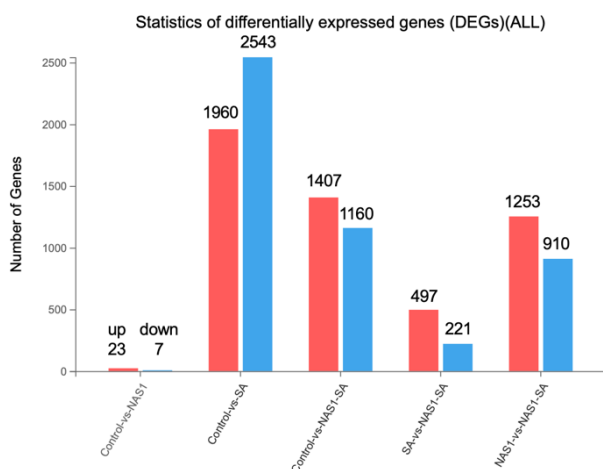


図4: 処理区ごとの発現変動遺伝子

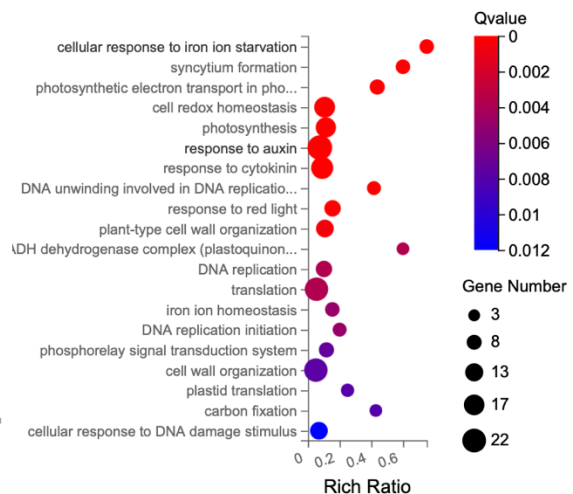


図5: GOエンリッチメント解析