

平成 30 年 6 月 29 日現在

機関番号：85301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07321

研究課題名(和文) 複数の病原体ゲノムと相互作用するデュアル抵抗性蛋白質システムの分子基盤の解明

研究課題名(英文) Characterization of a dual R protein RPS4/RRS1 complex that confers resistance to multiple pathogens

研究代表者

鳴坂 義弘 (Narusaka, Yoshihiro)

岡山県農林水産総合センター生物科学研究所・その他部局等・専門研究員

研究者番号：20335459

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：植物は病気から身を守るため、病原体が放出する分泌蛋白質(Avrエフェクター)を抵抗性蛋白質により直接的または間接的に認識して病原体の存在を感知し、病原体に対する抵抗性を発揮している。私たちは、“2つの異なる抵抗性(R)蛋白質による病原体の認識機構”を発見し、これを用いた病害抵抗性作物の分子育種技術の構築に成功した。本課題では、炭疽病菌から網羅的に分泌蛋白質を取得するとともに、Avrエフェクターとこれら2つのR蛋白質の相互作用を解析し、植物ゲノムと、異なる4種の病原体ゲノム(アブラナ科野菜類炭疽病菌、ウリ類炭疽病菌、青枯病菌、斑葉細菌病菌)の生物間相互作用による適応共進化の謎に迫った。

研究成果の概要(英文)：Plant disease resistance, known as gene-for-gene relationship, requires a resistance (R) gene in the host plant and a cognate avirulence (Avr) gene in the insect, pest, or pathogen. The R-gene product detects the corresponding Avr gene product and initiates signal transduction to confer resistance.

A pair of Arabidopsis thaliana resistance proteins, RPS4 and RRS1, recognizes the cognate Avr effector from the bacterial pathogens *Pseudomonas syringae* pv. tomato expressing avrRps4 (*Pst*-avrRps4), *Ralstonia solanacearum*, and the fungal pathogen *Colletotrichum higginsianum* and leads to defense signaling activation against the pathogens. We investigated whether RPS4 is physically associated with RRS1, and how Avr effectors function with RPS4/RRS1.

In conclusion, our data indicated that RPS4/RRS1 is required for active defence responses, and some structural domains that constitute these R proteins contribute to the interaction of RPS4 with RRS1.

研究分野：植物保護科学

キーワード：抵抗性遺伝子 抵抗性蛋白質 分泌蛋白質 炭疽病菌 シロイヌナズナ エフェクター 青枯病 斑葉細菌病

1. 研究開始当初の背景

植物の病原体に対する抵抗反応は、Flor氏が唱えた遺伝子対遺伝子説により、植物の抵抗性(R)遺伝子と、対応する病原体の非病原力(Avr)遺伝子の1対1の組み合わせによって決定されると考えられている。しかし、シロイヌナズナのゲノム上には約150の抵抗性遺伝子しか存在せず、地球上に存在する10万種以上の多様な微生物に対する抵抗性はどのようなメカニズムによって発揮されているのかは不明である。

私たちは、シロイヌナズナのゲノム上で隣接する異なる2つのR遺伝子(RPS4とRRS1)がセットで、異なる4種の病原体(アブラナ科野菜類炭疽病菌 *Colletotrichum higginsianum*、ウリ類炭疽病菌 *Colletotrichum orbiculare*、トマト斑葉細菌病菌 *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* DC3000 expressing *avrRps4*、青枯病菌 *Ralstonia solanacearum*)の攻撃を認識して抵抗反応を起動することを世界に先駆けて発見し、植物による病原体の認識と応答反応における新説“デュアル抵抗性(R)蛋白質システム”を提唱した(Narusaka M. et al. Plant J. 2009)。本研究により、植物の免疫系も動物と同様に少ない遺伝子を組み合わせることにより多様な病原体を認識して防御系を起動していることを分子レベルで明らかにした。

これまでにR遺伝子を利用した分子育種が試みられてきたが、(1)現在までに発見されたR遺伝子は植物の科(family)を超えて機能しない(2)作物へのR遺伝子の単独の導入により矮化または抵抗性の機能不全を生じ病害抵抗性作物の分子育種に利用できないことが問題であり、モデル植物で得た知見を実用植物へ応用することが困難であった。そこで私たちは、シロイヌナズナ由来の2つのR遺伝子(RPS4とRRS1)を、アブラナ科、ナス科およびウリ科作物に同時に導入した結果、これら形質転換体は正常に生育し、かつ、複数の病害に抵抗性を示すことを明らかにした(国際特許登録番号: 5516993 (JP)等、Narusaka M. et al. PLOS ONE 2013)。これに対して、それぞれ単独でのR遺伝子の導入では抵抗性を付与できなかった。これはシロイヌナズナ由来のデュアルR遺伝子を作物へ導入し、病害抵抗性作物を創製できた世界初の事例である。また最近、Williamsらにより、二つのR蛋白質RPS4とRRS1が相互作用することが示唆された(Science 2014)。しかしながら、デュアルR蛋白質システムを構成する2つのR蛋白質の機能、デュアルR蛋白質による病原体の認識機構および、デュアルR蛋白質をコアとする病害防御応答シグナル伝達ネットワークは未解明の部分が多い。

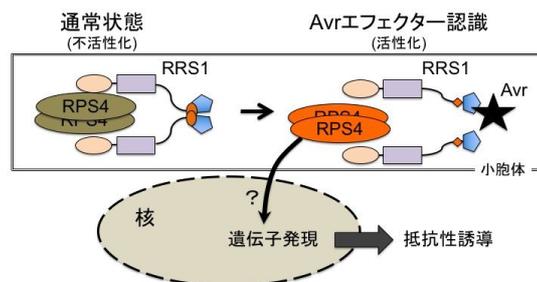
このようなR遺伝子セットはシロイヌナズナゲノム上に少なくとも9セット存在し、これら遺伝子セットも同様な機能を有する

ことが期待され、本システムの普遍性を示唆している。また、他のグループにより、これまでにゲノムが解読された植物種においてもデュアルR遺伝子セットが発見されている。本メカニズムを明らかにすることは、モデル植物において蓄積された植物免疫の知見が様々な植物において応用可能となり、かつ、様々な植物に存在するデュアルR遺伝子セットを活用することで耐病性育種のための遺伝子資源が豊富になる。また、生物間相互作用による適応共進化の謎を明らかにすることで、新規な抵抗性育種法の開発に貢献する。

2. 研究の目的

病原細菌は数十種、病原糸状菌は千種以上の分泌蛋白質遺伝子をゲノム上に有していると推定され、これらの膨大な分泌蛋白質(エフェクターと呼ばれる)を駆逐することで、植物細胞および組織の破壊を行い、植物が本来発揮すべき抵抗性を妨害してその感染を成立させている。これに対して、植物はR蛋白質により病原体が放出する分泌蛋白質(特にAvrエフェクターという)を認識し病原体に対する抵抗性を発揮している。本課題では、このAvrエフェクターとR蛋白質(デュアルR蛋白質)の相互作用を解析し、植物ゲノムと、病原体ゲノムの生物間相互作用による適応共進化の謎に迫る。

デュアルR蛋白質システムにおける抵抗性発現モデル



3. 研究の方法

私たちは、これまでにシロイヌナズナのゲノム上で隣接する異なる2つのR遺伝子(RPS4とRRS1)がセットで、異なる4種の病原体の攻撃を認識して抵抗反応を起動する“デュアルR蛋白質システム”を発見したが、その仕組みの詳細は不明である。私たちがデュアルR蛋白質システムを提唱して以来、他の研究グループからも複数の植物種において2つのR遺伝子が病原体の認識に関与していることが報告されており、本システムが植物の抵抗性発現に普遍的なシステムであることを示唆している。本課題では、デュアルR蛋白質システムの分子基盤を明らかにするために、未同定の炭疽病菌のAvrエフェクターの同定を試み、さらに、異なる4種の病原体のAvrエフェクタ

ーとデュアル R 蛋白質の相互作用を比較解析することで Avr エフェクターの認識蛋白質およびその認識ドメイン、認識機構の解明を試みた。

(1) デュアル R 蛋白質システムが認識するアブラナ科野菜類炭疽病菌 Avr エフェクターの探索

共同研究により、複数の炭疽病菌のゲノムを解読して、細胞膜を透過するためのシグナルペプチドを N 末端に有する分泌蛋白質をコードする遺伝子 (エフェクター) を推定し、アブラナ科野菜類炭疽病菌のエフェクター候補遺伝子の網羅的なクローニングを試みた。次いで、これらリソースを用いて Avr エフェクターの同定を試みた。

(2) デュアル R 蛋白質による異なる 4 種の病原体認識機構の解明

これまでに *P. syringae* pv. *tomato* DC3000 expressing *avrRps4* (*Pst-avrRps4*) が分泌する Avr エフェクター AvrRps4、*R. solanacearum* が分泌する Avr エフェクター PopP2 を取得している。さらに、*C. higginsianum* および *C. orbiculare* の Avr エフェクターを取得することで、これら 4 種の Avr エフェクターとデュアル R 蛋白質の相互作用を比較解析し、デュアル R 蛋白質システムによる異なる 4 種の病原体の認識機構を解明する。

4. 研究成果

(1) デュアル R 蛋白質システムが認識するアブラナ科野菜類炭疽病菌 Avr エフェクターの探索

アブラナ科野菜類炭疽病菌の 480 種のエフェクター候補遺伝子のクローニングに成功した。これら 480 種のエフェクター候補遺伝子を pSfinX ウイルスベクターにクローニングし、このプラスミドをアグロバクテリウムに導入した。本アグロバクテリウムをデュアル R 遺伝子を形質転換した *Nicotiana benthamiana* の葉に注入し、過敏感細胞死 (HR 細胞死) を指標にして、Avr エフェクターを探索した。

アブラナ科炭疽病菌から取得したエフェクター候補遺伝子

	比較ゲノム	配列長 (Cut off)	クローニング	SignalP4.1 D=0.34
1	Co, Ch	350	84	54
2	Ch, Co, Cg	300	28	25
3	Ch, Co	500	145	130
4	Ch, Co	500	52	44
5	Co, Ch	-	129	107
その他	プロテアーゼなど	-	42	29

Ch; アブラナ科炭疽, Co; ウリ類炭疽, Cg; イチゴ炭疽

合計480クローン

その結果、デュアル R 遺伝子を形質転換した *N. benthamiana* に特異的に HR 細胞死を

誘導する Avr エフェクター候補遺伝子を複数個得た。

上記で取得した Avr エフェクター候補遺伝子を 35S プロモーターによる高発現バイナリーベクター (pBI 系) に載せ替えた。これら遺伝子を導入したアグロバクテリウムと、デュアル R 蛋白質を高発現するコンストラクトを導入したアグロバクテリウムを混合して、*N. benthamiana* の葉に注入し、HR 細胞死を指標にして、Avr エフェクターを特定を試みた。その結果、HR 細胞死を誘発する 2 種の候補遺伝子を発見した。

これら候補遺伝子が Avr エフェクターかどうかを評価するため、本遺伝子を破壊したアブラナ科野菜類炭疽病菌を作製した。本破壊株の評価を行った結果、それぞれ単独では Avr エフェクターの機能を有していなかったが、セットで Avr エフェクターとして機能している可能性が考えられるため、2 重破壊株を作製している。

本候補遺伝子の機能を明らかにするため、これら遺伝子を過剰発現したシロイヌナズナを作製した。その結果、これらを導入したシロイヌナズナは生育異常が認められ、植物において何らかの作用を行うとの知見を得た。

本課題において、炭疽病菌の Avr エフェクターの決定的なエビデンスは得られなかったが、取得した 480 種のエフェクター候補遺伝子は病原菌の感染戦略を解明するための貴重なリソースおよびツールになる。

(2) デュアル R 蛋白質による異なる 4 種の病原体認識機構の解明

私たちは *Pst-avrRps4* が分泌する Avr エフェクター AvrRps4、*R. solanacearum* が分泌する Avr エフェクター PopP2 を取得した。

Avr エフェクターとデュアル R 蛋白質を *N. benthamiana* で一過的に発現して免疫沈降により相互作用を比較解析した結果、AvrRps4 存在下では RPS4 および RRS1 がミクロソーム画分から減ずることが明らかになった。

次いで、異なる病原体の Avr エフェクターとデュアル R 蛋白質をベンサミアータバコで一過的に発現し、HR 細胞死を指標としてデュアル抵抗性蛋白質 RPS4/RRS1 のモチーフの機能解析を行った。両 R 蛋白質のモチーフを改変して機能の変化を解析した結果、デュアル R 蛋白質の N 末端側のモチーフが病原体の認識または抵抗性誘導に重要であることを明らかにした。

これまでは R 蛋白質の部分構造で解析されることが多かったが、私たちは R 蛋白質を構成するモチーフおよびドメインがそれぞれ重要な役割を担っており、R 蛋白質全長での解析が重要であることを立証した。

(3) 今後の展望

現在、作物の病害の防除は殺菌性の化学合成農薬に大きく依存しているが、病原体の薬剤耐性の発達が深刻化しており、農業および食料の安定供給が危機に瀕している。植物が本来備えている病気に対する抵抗力を活用した病害防除技術を普及することで、病害虫の薬剤抵抗性の発達を抑制し、病害による被害を抑え、作物増収が達成できれば、持続的かつ付加価値の高い作物生産を実現し、食の安全の確保、日本の国際競争力の向上に貢献する。

“デュアル抵抗性遺伝子システム”の発見により、植物の免疫系も動物と同様に少ない抵抗性遺伝子を組み合わせることで多様な病原体を認識して防御系を発動していることが明らかとなった。今後、デュアル抵抗性蛋白質システムを活用した作物保護技術の実用化を進めていきたい。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計5件)

- (1) Ahmad Azmi NS, Singkaravanit-Ogawa S, Ikeda K, Kitakura S, Inoue Y, Narusaka Y, Shirasu K, Kaido M, Mise K, Takano Y. Inappropriate expression of an NLP effector in *Colletotrichum orbiculare* impairs infection on Cucurbitaceae cultivars via plant recognition of the C-terminal region. *Mol Plant-Microbe Interact*, 31, 101-111 (2018)(査読有)
DOI: 10.1094/MPMI-04-17-0085-FI
 - (2) Narusaka M, Iuchi S, Narusaka Y. Analyses of natural variation indicates that the absence of RPS4/RRS1 and amino acid change in RPS4 cause loss of their functions and resistance to pathogens. *Plant Signal Behav*, 12(3), e1293218 (2017) (査読有)
DOI: 10.1080/15592324.2017.1293218
 - (3) Gan P, Narusaka M, Tsushima A, Narusaka Y, Takano Y, Shirasu K. Draft genome assembly of *Colletotrichum chlorophyti*, a pathogen of herbaceous plants. *Genome Announc*, 5(10), e01733-16 (2017) (査読有)
DOI: 10.1128/genomeA.01733-16
 - (4) Gan P, Narusaka M, Kumakura N, Tsushima A, Takano Y, Narusaka Y, Shirasu K. Genus-wide comparative genome analyses of *Colletotrichum* species reveal specific gene family losses and gains during adaptation to specific infection lifestyles. *Genome Biol Evol*, 8(5), 1467-81(2016) (査読有)
DOI: 10.1093/gbe/evw089
 - (5) Narusaka M, Toyoda K, Shiraishi T, Iuchi S, Takano Y, Shirasu K, Narusaka Y. Leucine zipper motif in RRS1 is crucial for the regulation of *Arabidopsis* dual resistance protein complex RPS4/RRS1. *Sci Rep*, 6, 18702 (2016) (査読有)
DOI: 10.1038/srep18702
- 〔学会発表〕(計43件)
- (1) 津島綾子, Gan P, 熊倉直祐, 鳴坂真理, 高野義孝, 鳴坂義弘, 白須賢. *Colletotrichum higginsianum* 株間のゲノム進化にトランスポソンは関与する. 平成30年度日本植物病理学会大会(2018)
 - (2) 熊倉直祐, Singkaravanit-Ogawa S, Gan P, 津島綾子, 鳴坂真理, 鳴坂義弘, 高野義孝, 白須賢. 炭疽病菌に保存されたエフェクターSRNはRNA分解ドメインを持ち, ウリ類炭疽病菌の病原性に関与する. 平成30年度日本植物病理学会大会(2018)
 - (3) 小川泰生, 井上喜博, Gan P, 海道真典, 三瀬和之, 鳴坂義弘, 白須賢, 高野義孝. ウリ類炭疽病菌の宿主特異性に関する研究: アルファルファ炭疽病菌との比較解析. 平成30年度日本植物病理学会大会(2018)
 - (4) 井上喜博, Gan P, 白須賢, 鳴坂義弘, 高野義孝. 比較ゲノム・トランスクリプトーム解析によるウリ類炭疽病菌の強病原性関連因子の探索. 平成30年度日本植物病理学会大会(2018)
 - (5) 鳴坂真理, 白須賢, 豊田和弘, 高野義孝, 白石友紀, 鳴坂義弘. デュアル抵抗性蛋白質システムを構成するRRS1およびRPS4の機能解析. 第40回日本分子生物学会年会(2017)
 - (6) 津島綾子, Gan P, 熊倉直祐, 鳴坂真理, 高野義孝, 鳴坂義弘, 白須賢. 植物病原糸状菌 *Colletotrichum higginsianum* のゲノム変異にトランスポソンは関与する.

- 第 17 回糸状菌分子生物学コンファレンス
(2017)
- (7) 津島綾子, Gan P, 熊倉直祐, 鳴坂真理, 高野義孝, 鳴坂義弘, 白須賢. *Colletotrichum higginsianum* のゲノム変異にトランスポゾンに関する. 平成 29 年度日本植物病理学会関東部会 (2017)
- (8) 鳴坂真理, 井上喜博, 高野義孝, 白須賢, 白石友紀, 鳴坂義弘. デュアル抵抗性蛋白質システムによる革新的作物保護技術の開発. 平成 29 年度日本植物病理学会関西西部会 (2017)
- (9) Inoue Y, Gan P, Narusaka Y, Shirasu K, Takano Y. Studies on a highly virulent strain RSCO-09-1-2 of *Colletotrichum orbiculare*. the Asian Conference on Plant Pathology 2017 (2017)
- (10) Kumakura N, Ogawa S, Gan P, Tsushima A, Narusaka M, Narusaka Y, Takano Y, Shirasu K. A novel class of conserved effectors with ribonuclease domains is involved in virulence of phytopathogenic *Colletotrichum* fungi on plants. The 5th International Conference on Biotic Plant Interactions (2017)
- (11) Tsushima A, Gan P, Kumakura N, Narusaka M, Narusaka Y, Takano Y, Shirasu K. Comparative genomics reveals structural variations in the genome of the plant pathogenic fungus *Colletotrichum higginsianum*. The New Phytologist next generation scientists (2017)
- (12) 熊倉直祐, Singkaravanit-Ogawa S, Gan P, 津島綾子, 鳴坂真理, 鳴坂義弘, 高野義孝, 白須賢. RNA 分解ドメインを持つエフェクターSRN はウリ類炭疽病菌の病原性に関与する. 平成 29 年度日本植物病理学会大会 (2017)
- (13) 井上喜博, Pamela Gan, 鳴坂義弘, 白須賢, 高野義孝. ウリ類炭疽病菌 RSCO-09-1-2 株の強病原性に関する分子機構研究. 平成 29 年度日本植物病理学会大会 (2017)
- (14) Singkaravanit-Ogawa S, Nur Sabrina AA, Ikeda K, Tanaka S, Inoue Y, Kaido M, Mise K, Narusaka Y, Shirasu K, Takano Y. Inappropriate expression of NLP effector impairs *Colletotrichum* infection on cucurbits via recognition of its C-terminal region. 平成 29 年度日本植物病理学会大会 (2017)
- (15) 津島綾子, Gan P, 熊倉直祐, 鳴坂真理, 高野義孝, 鳴坂義弘, 白須賢. *Colletotrichum higginsianum* 系統間の大規模ゲノム構造変異. 平成 29 年度日本植物病理学会大会 (2017)
- (16) Tsushima A, Gan P, Kumakura N, Narusaka M, Takano Y, Narusaka Y, Shirasu K. Comparative genomics reveals structural variations in the genome of the plant pathogenic fungus *Colletotrichum higginsianum*. 29th Fungal Genetics Conference (2017)
- (17) 鳴坂義弘. 植物免疫研究グループの研究紹介. 岡山県農林水産総合センター生物科学研究所 創立20周年記念事業 生物科学研究所創立20周年記念事業セミナー (2016)
- (18) 井上喜博, Gan P, 鳴坂義弘, 白須賢, 高野義孝. ウリ類炭疽病菌の強病原性株 RSCO-09-1-2 の強病原性化因子の探索. 平成 28 年度日本植物病理学会関西西部会 (2016)
- (19) 鳴坂真理, Gan P, 津島綾子, 熊倉直祐, 白須賢, 高野義孝, 久保康之, 白石友紀, 鳴坂義弘. アブラナ科炭疽病菌におけるエフェクター候補遺伝子の取得と

- その機能解析. 平成 28 年度日本植物病理学会関西西部会 (2016)
- (20) 鳴坂義弘, 井内敦子, 井内聖, 鳴坂真理. デュアル抵抗性蛋白質を構成する RPS4 のアミノ酸置換による抵抗性喪失. 平成 28 年度日本植物病理学会関西西部会 (2016)
- (21) 鳴坂真理, 白須賢, 豊田和弘, 高野義孝, 白石友紀, 鳴坂義弘. デュアル抵抗性蛋白質システムを構成する抵抗性蛋白質 RRS1 の機能解析. 第 34 回日本植物細胞分子生物学会 (上田) 大会 (2016)
- (22) Gan P, Narusaka M, Kumakura N, Tsushima A, Hiroyama R, Takano Y, Narusaka Y, Shirasu K. Comparative genomics of *Colletotrichum* fungi reveals lifestyle-adapted fungal gene gain/loss and potential virulence-associated genes. 13th European Conference on Fungal Genetics (2016)
- (23) 中前彩加, 原田賢, 鳴坂真理, 鳴坂義弘, 高野義孝, Gan P, 白須賢, 久保康之. ウリ類炭疽病菌のメタロプロテアーゼ遺伝子 *CoMEP1*, *CoMEP5* は付着器分化時に発現し, 侵入時における植物の防御応答に關与する. 平成 28 年度日本植物病理学会大会 (2016)
- (24) 井上喜博, Gan P, 鳴坂義弘, 白須賢, 高野義孝. ウリ類炭疽病菌の強病原性株 RSC0-09-1-2 に関する研究. 平成 28 年度日本植物病理学会大会 (2016)
- (25) 奥田竜太, 石塚隼也, Singkaravanit-Ogawa S, Gan P, 山田晃嗣, 鳴坂義弘, 白須賢, 高野義孝. ウリ類炭疽病菌の付着器において発現するエフェクター候補群 ECAP の機能解析. 平成 28 年度日本植物病理学会大会 (2016)
- (26) 鳴坂真理, 白須賢, 豊田和弘, 高野義孝, 白石友紀, 鳴坂義弘. デュアル抵抗性蛋白質システムを構成する抵抗性蛋白質 RRS1 のロイシンジッパーモチーフの機能解析. 平成 28 年度日本植物病理学会大会 (2016)

抗性蛋白質システムを構成する抵抗性蛋白質 RRS1 のロイシンジッパーモチーフの機能解析. 平成 28 年度日本植物病理学会大会 (2016)

(27) Narusaka M, Narusaka Y. The functional analysis of RRS1 on the immune response of *Arabidopsis* dual resistance proteins RPS4/RRS1. デュアル抵抗性タンパク質を構成する RRS1 の機能解析. 第 57 回日本植物生理学会年会 (2016)

(28) 鳴坂真理, 白須賢, 豊田和弘, 高野義孝, 白石友紀, 鳴坂義弘. デュアル抵抗性蛋白質を構成する RPS4 および RRS1 の機能解析. 平成 27 年度日本植物病理学会関西西部会 (2015)

(29) 熊倉直祐, Gan P, 津島綾子, 浅井秀太, 門田康弘, 鳴坂真理, 鳴坂義弘, 高野義孝, 白須賢. 比較ゲノム解析による炭疽病菌エフェクターの探索. 平成 27 年度日本植物病理学会関東部会 (2015)

(30) 鳴坂真理, 白須賢, 高野義孝, 鳴坂義弘. デュアル抵抗性蛋白質システムの導入による病害抵抗性作物の創製. 第33回日本植物細胞分子生物学会 (東京) 大会・シンポジウム (2015)

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.pref.okayama.jp/page/detail-79456.html>

<http://researchmap.jp/yonarusaka/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鳴坂 義弘 (NARUSAKA, Yoshihiro)
岡山県農林水産総合センター生物科学研究所・グループリーダー
研究者番号: 20335459

(2) 連携研究者

鳴坂 真理 (NARUSAKA, Mari)
岡山県農林水産総合センター生物科学研究所・流動研究員
研究者番号: 80376847