

令和元年6月27日現在

機関番号：85301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K08152

研究課題名(和文) ペア抵抗性蛋白質複合体を構成するRRS1の機能解析と複数の病原体認識機構の解明

研究課題名(英文) Functional analysis of RRS1 protein on Arabidopsis dual resistance protein system

研究代表者

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・その他部局等・特別流動研究員

研究者番号：80376847

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)：デュアル抵抗性蛋白質システムを構成するRRS1はTIR領域、p-loopモチーフ、ロイシンリッチリピート配列といった抵抗性蛋白質特有のモチーフに加えて、遺伝子発現制御に関わるWRKY、ロイシンジッパー、核移行シグナルといった特徴的なモチーフを有している。本研究では、これらモチーフに変異を導入することで、これらの機能の解明を試みた。その結果、RRS1のC末端領域にアミノ酸置換を導入したシロイヌナズナ形質転換体は、恒常的に抵抗反応が誘導された。以上より、RRS1の機能に重要な構造の変化はデュアル抵抗性蛋白質RPS4/RRS1複合体に影響を与え、恒常的な抵抗反応を誘導することが示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

病害による作物生産量の損失は甚大であり、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の開発が求められている。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つの異なる抵抗性蛋白質による病原体の認識機構(デュアル抵抗性蛋白質システム)”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。本成果を活用して新たな病害虫管理技術の開発が期待できる。

研究成果の概要(英文)：Previously, we showed that a pair of Arabidopsis thaliana TIR-NLR proteins, RRS1 and RPS4, function together in disease resistance against multiple pathogen isolates. Although both RPS4 and RRS1 are TIR-type NLRs, RRS1 contains a leucine zipper motif and a WRKY domain at the C-terminus. The paired NLRs interact with each other physically to form a hetero-complex. In this study, we showed that modification of the C-terminal region of RRS1 protein triggers activation of NLR complex and thus, initiates the immune response. We also showed that dual R proteins, RRS1 and RPS4, from A. thaliana ecotype Wassilewskija confer resistance to anthracnose in transgenic cucumber crops. For practical applications, this novel finding will provide strategies for development of disease-resistant transgenic plants and novel approaches for plant genome manipulation.

研究分野：植物生理学

キーワード：抵抗性蛋白質 シロイヌナズナ RRS1 RPS4 モチーフ

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19 (共通)

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、2つの作業仮説が提唱されている。一つは、Flor氏が唱えた遺伝子対遺伝子説により、植物の抵抗性遺伝子(病原体の攻撃を認識するための植物側の受容体)と、対応する病原体の非病原性(Avr)遺伝子の1対1の組み合わせによって決定されるという説である。もう一つは、Danglらが唱えたガード説により、抵抗性蛋白質は病原体が放出する病原性因子を直接認識するのではなく、病原性因子が攻撃するターゲット分子をモニターする(ガードすること)により、病原性因子を間接的に検出するという説である。一方で、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の詳細は不明である。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つの抵抗性遺伝子(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、RPS4またはRRS1単独では抵抗反応を起動せず、両蛋白質がセットで存在することが重要であることが示唆され、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発動していることを分子レベルで明らかにした。さらに、抵抗性遺伝子(蛋白質)は植物の科(family)を超えて機能しないという植物病理学の常識を覆し、シロイヌナズナ由来のデュアル抵抗性遺伝子を作物へ導入することで病害抵抗性作物を創製できることを世界で初めて実証した(Narusaka M. et al. PLOS ONE 2013; Plant Signal Behav 2014)。

最近、デュアル抵抗性蛋白質システムを構成するRRS1のC末領域に存在するWRKYモチーフが病原体の病原性因子に対する“おとり”になり、抵抗性が発揮されるというdecoy(おとり)モデルが提唱された(Roux et al. Cell 2015; Sarris et al. Cell 2015)。しかしながら、デュアル抵抗性蛋白質システムを構成する因子およびその機能の詳細や、本システムが複数の病原体を認識する機構については全く解明されていない。

2. 研究の目的

これまでの研究成果は、デュアル抵抗性蛋白質システムを構成する2つの抵抗性蛋白質(RPS4とRRS1)のうち、RRS1が病原体の攻撃を認識し、かつ、本システムにおける抵抗性発現の制御に関わっていることを示唆している。RRS1はTIR領域、p-loopモチーフ、ロイシンリッチリピート(LRR)配列といった抵抗性蛋白質特有のモチーフに加えて、遺伝子発現制御に関わるWRKY、ロイシンジッパー(LZ)、核移行シグナル(NLS)といった特徴的なモチーフを有している(図1)。シロイヌナズナの20種の生態型におけるアミノ酸配列を比較した結果、RPS4は生態型間で高い相同性を示したのに対して、RRS1にはロイシンリッチリピート配列およびC末領域において生態型間の高い多様性が存在しており、RRS1が多様な蛋白質(病原性因子)を認識するための強い選択圧を受けていることを示唆している。よって、本研究ではシロイヌナズナの抵抗性蛋白質RRS1に着目し、抵抗性蛋白質による病原体の認識とこれにつづく病害防御応答シグナル伝達ネットワークを明らかにする。具体的には以下の戦略による。

(1) 複数の病原体に対して抵抗性を示すシロイヌナズナ生態型の抵抗性蛋白質RRS1に特徴的なC末領域に着目し、病原体認識および抵抗性発現に関わる領域を特定、かつ、これと相互作用する因子を探索し、その機能を明らかにする(図1、表1)。

(2) RRS1に特徴的なモチーフの機能を解析し、抵抗性発現の制御機構を明らかにする。私たちはこれまでにRRS1のロイシンジッパーモチーフに変異を導入すると恒常的に抵抗性が発現することを明らかにした。また、WRKYモチーフへの変異も植物体のわい化を引き起こす。このような数種のモチーフがデュアル抵抗性蛋白質システムをどのように制御しているのかを明らかにする。

(3) 上記研究によりデュアル抵抗性蛋白質システムにおけるRRS1の仕組みを明らかにする。本知見をもとに病害に対する免疫力を向上した植物の創製を試み、病害による作物の損失の抑制に貢献する。

図1. RRS1のモチーフおよびC末端領域

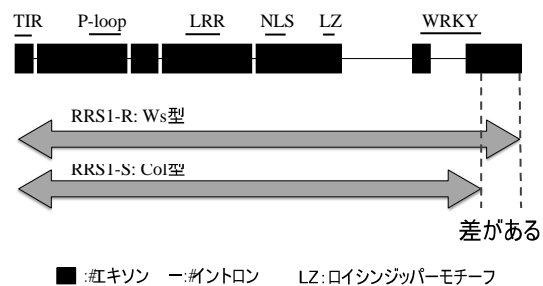


表1. シロイヌナズナ生態型の病原体に対する感受度

生態型	炭疽病菌	斑葉細菌病菌	青枯病菌
Col-0	S	R	S
Ws-2	R	R	R

S:感受性 R:抵抗性

3. 研究の方法

(1) RRS1-R に特徴的な C 末端領域の機能解析

抵抗性蛋白質 RRS1 には炭疽病、斑葉細菌病、青枯病に抵抗性を示す生態型(Ws-2)由来の RRS1-R と、炭疽病、青枯病に感受性、斑葉細菌病にのみ抵抗性を示す生態型(CoI-0)由来の RRS1-S が存在する(図 1、表 1)。両者の大きな違いは、RRS1-R の C 末端領域には RRS1-S に比して長いことである。このことから、本領域は複数の病原菌に対する認識に関わっていると考えられる。

C 末端領域への変異導入

複数の病原体に対して抵抗性を示すシロイヌナズナ生態型 Ws-2 の抵抗性蛋白質 RRS1-R に特徴的な C 末端領域に、C 末端側から順次アミノ酸置換したコンストラクトを作製する。本コンストラクトを、シロイヌナズナ RRS1 欠損変異体 *rrs1-1* に導入し、導入変異体の表現型を調べることによって、重要なアミノ酸配列を明らかにする。

生化学的手法により RRS1 と相互作用する因子の探索

標識ペプチドを融合した抵抗性蛋白質 RRS1 を用い、免疫沈降などにより相互作用する因子を同定する。特に、抵抗性蛋白質 RRS1 に特徴的な C 末端領域に着目し、本領域と相互作用する植物側および病原体側の因子を同定する。

(2) RRS1 に特徴的なモチーフの機能解析

これまでに RRS1 のロイシンジッパーモチーフに変異を導入すると恒常的に抵抗性が発現することを明らかにした。また、Noutoshi ら(2005)により WRKY モチーフへのアミノ酸付加は植物体のわい化を引き起こすことが報告されている。私たちも WRKY モチーフの改変は恒常的に抵抗性が発現することを明らかにした。

このような RRS1 に存在する数種のモチーフがデュアル抵抗性蛋白質システムをどのように制御しているのかを明らかにするために、これらモチーフに変異を導入したコンストラクトを作製する。完成したものを順次、シロイヌナズナ RRS1 欠損変異体 *rrs1-1* に導入し、炭疽病菌または斑葉細菌病菌(*Pst-avrRps4*)に対する感受度の変化を解析することで、モチーフの役割を明らかにする。

(3) RRS1 の仕組みを利用した病害に対する免疫力を向上した植物の創製

これまでに RRS1 のロイシンジッパーモチーフへの変異、アミノ酸置換により抵抗性が恒常的に発現することを明らかにした。RRS1 は抵抗性発現の制御に関わっていることが予想され、RRS1 の改変、RRS1 の RNA 転写バリエーションの活用、もしくは、相互作用する因子の改変により、免疫力を向上した植物を創製する。

4. 研究成果

デュアル抵抗性蛋白質システムを構成する RRS1 蛋白質が複数の病原体を認識することが示唆されたことより、RRS1 蛋白質による病原体認識から抵抗性誘導に至る作用機作の解明をめざした。RRS1 は TIR 領域、p-loop モチーフ、LRR 配列といった抵抗性蛋白質特有のモチーフに加えて、遺伝子発現制御に関わる WRKY、ロイシンジッパー(LZ)、核移行シグナル(NLS)といった特徴的なモチーフを有している。特に、RRS1 と共にデュアル抵抗性蛋白質システムを構成する RPS4 においては、p-loop モチーフ内の 1 アミノ酸置換または NLS 領域のアミノ酸置換により病原菌に対する耐性は失われる。p-loop モチーフはヌクレオチド結合蛋白質に共通して存在するコンセンサス配列 GXXXGKT/S であり、RRS1 にも GMPGIGKT が存在する。そこで、本モチーフをアラニン(A)に置換し、機能欠損したコンストラクトを *rrs1-1* 変異体へ導入(*rrs1-1/RRS1 pl*)し、病原菌認識の有無を解析した結果、病原菌に対する耐性は認められず、RRS1 においても本モチーフが重要な因子であることが示唆された(図 2)。一方、NLS モチーフへの変異は RRS1

を介した抵抗反応に影響を与えないことが明らかとなった。また、RRS1 の C 末端領域にアミノ酸置換を導入したシロイヌナズナ形質転換体の解析により、炭疽病菌または斑葉細菌病菌の認識に影響を与える領域が認められた。これより、RRS1 の C 末端領域における構造変化が、病原菌の認識およびデュアル抵抗性蛋白質 RPS4/RRS1 複合体の形成に影響を与え、病原菌に対する抵抗反応に変化を生じることが示唆された。

これまでの私たちの研究により、デュアル抵抗性蛋白質 RPS4 および RRS1 による病原体認識後の抵抗性誘導には、EDS1 が関与することが示唆されている。そこで、ゲノム編集技術により EDS1 の破壊を試みた結果、ベンサミアータタバコに存在する EDS1 およびそのホモログを同時に破壊した植物体の作製に成功した。本破壊株を用いて、デュアル抵抗性蛋白質システムおよび EDS1 を介した抵抗性誘導機構を過敏感細胞死を指標として解析した結果、RRS1 の LZ 変異により誘発される過敏感細胞死は認められなかった。以上より、デュアル抵抗性蛋白質 RPS4 および RRS1 をコアとした病原体の認識から抵抗性発現に至る一連の防御応答機構に RRS1 の構造が大

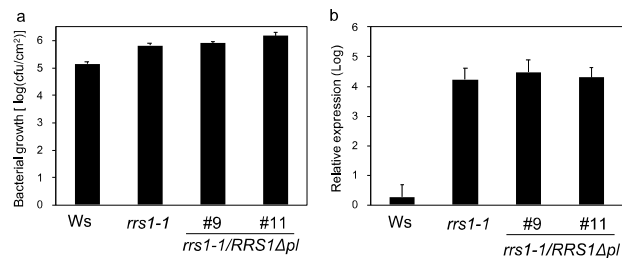


図2. RRS1蛋白質におけるp-loopモチーフの機能解析

a) トマト斑葉細菌病菌(*Pst-avrRps4*)を接種し、3日後の菌量を計測した。
b) アブラナ科炭疽病菌を接種し、5日後の菌量をリアルタイムPCRで測定した。

を介した抵抗反応に影響を与えないことが明らかとなった。また、RRS1 の C 末端領域にアミノ酸置換を導入したシロイヌナズナ形質転換体の解析により、炭疽病菌または斑葉細菌病菌の認識に影響を与える領域が認められた。これより、RRS1 の C 末端領域における構造変化が、病原菌の認識およびデュアル抵抗性蛋白質 RPS4/RRS1 複合体の形成に影響を与え、病原菌に対する抵抗反応に変化を生じることが示唆された。

きな影響を与えること、さらにその抵抗性誘導には EDS1 が関与することが示唆された。

私たちはこれまでに、シロイヌナズナ由来のデュアル抵抗性遺伝子をアブラナ科、ナス科およびウリ科作物へ導入した結果、形質転換体の取得に成功するとともに、これら形質転換体が、科の壁を超えて病原菌を認識し、病害抵抗性を誘導することを明らかにしてきた。本研究において、形質転換キュウリにおける導入遺伝子の安定性を検討した結果、ウリ類炭疽病に対して世代間 (T1~T4 世代) で持続的かつ安定的な抵抗性を示した (図 3)。また、ウリ類炭素病菌に対して安定に抵抗性を示すラインは、サザンハイブリダイゼーション解析により 1 コピーのみ導入されており、導入遺伝子は安定的にメンデル遺伝されていることが明らかとなった。これより、デュアル抵抗性遺伝子を利用した病害抵抗性作物の分子育種が可能であることが示唆された。

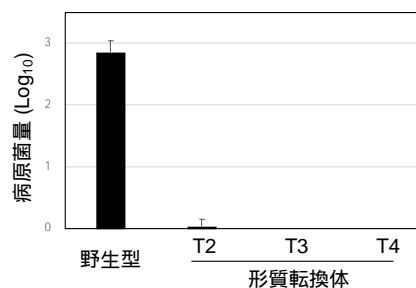


図3. キュウリ形質転換体におけるウリ類炭疽病菌の感染抑制効果

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計10件)

Narusaka M., Yunokawa H., Narusaka Y. Efficient identification of NLR by using a genome-wide protein domain and motif survey program, Ex-DOMAIN. *Plant Biotechnology*, 査読有, 35, 177-180 (2018)

10.5511/plantbiotechnology.18.0418a

鳴坂義弘, 鳴坂真理 イチゴの RNA 簡易抽出法および遺伝子診断法 -誘導抵抗性を利用したイチゴの病害防除技術の開発に向けて-. 植物防疫, 査読無, 8月号, Vol.72, 511-515 (2018)

<http://ci.nii.ac.jp/naid/40021648127>

Gan P, Narusaka M, Tsushima A, Narusaka Y, Takano Y, Shirasu K. Draft genome assembly of *Colletotrichum chlorophyti*, a pathogen of herbaceous plants. *Genome Announcements*, 査読有, 5(10): e01733-16 (2017)

10.1128/genomeA.01733-16

Narusaka M., Iuchi S. and 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 Signaling & Behavior*, 査読有, 12(3), e1293218 (2017)

10.1080/15592324.2017.1293218

Gan P., Narusaka M., Kumakura N., Tsushima A., Takano Y., Narusaka Y. and Shirasu K. Genus-wide comparative genome analyses of *Colletotrichum* species reveal specific gene family losses and gains during adaptation to specific infection lifestyles. *Genome Biology and Evolution*, 査読有, 8(5):1467-1481 (2016)

10.1093/gbe/evw089

[学会発表](計37件)

津島 綾子, Pamela Gan, 熊倉 直祐, 鳴坂 真理, 高野 義孝, 鳴坂 義弘, 白須 賢, *Colletotrichum higginsianum*におけるゲノム構造の区画化、平成 31 年度日本植物病理学会大会、2019

Naoyoshi Kumakura, Suthitar Singkaravanit-Ogawa, Pamela Gan, Ayako Tsushima, Mari Narusaka, Yoshihiro Narusaka, Yoshitaka Takano, Ken Shirasu, Fungal phytopathogen-secreted ribonucleases are virulent effectors that potentiate host immune responses, 30th Fungal Genetics Conference, 2019

Ayako Tsushima, Pamela Gan, Naoyoshi Kumakura, Mari Narusaka, Yoshitaka Takano, Yoshihiro Narusaka, Ken Shirasu, Comparative genomics reveals genomic plasticity mediated by transposable elements in the fungal phytopathogen *Colletotrichum higginsianum*, 第 60 回日本植物生理学会年会、2019

鳴坂真理, 鳴坂義弘、生物のゲノム情報から有用な遺伝子を検索するプログラム Ex-DOMAIN の開発、第 41 回日本分子生物学会年会、2018

鳴坂真理, 鳴坂義弘、全ゲノム配列から蛋白質の機能を予測する網羅的な検索プログラム Ex-DOMAIN の開発、第 36 回日本植物細胞分子生物学会 (金沢) 大会、2018

津島 綾子, Pamela Gan, 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ゾンに関与する、平成 30 年度日本植物病理学会大会、2018

熊倉直祐, Suthitar Singkaravanit-Ogawa, Pamela Gan, 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、病原性に関与する、平成30年度日本植物病理学会大会、2018

Naoyoshi Kumakura, Suthitar Singkaravanit-Ogawa, Pamela Gan, Ayako Tsushima, Mari Narusaka, Yoshihiro Narusaka, Yoshitaka Takano, Ken Shirasu, Conserved effectors with a ribonuclease domain are involved in virulence of phytopathogenic *Colletotrichum* fungi、第59回日本植物生理学会年会、2018

Naoyoshi Kumakura, Suthitar Singkaravanit-Ogawa, Pamela Gan, Ayako Tsushima, Mari Narusaka, Yoshihiro Narusaka, Yoshitaka Takano, Ken Shirasu, Conserved effectors with a ribonuclease domain are involved in virulence of phytopathogenic *Colletotrichum* fungi、14th European Conference on Fungal Genetics、2018

Ayako Tsushima, Pamela Gan, Naoyoshi Kumakura, Mari Narusaka, Yoshitaka Takano, Yoshihiro Narusaka, Ken Shirasu, Transposable elements contribute to the evolution of genomic diversity between strains of the plant pathogenic fungus *Colletotrichum higginsianum*、14th European Conference on Fungal Genetics、2018

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

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支部会、2017

〔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〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究分担者

なし

(2)研究協力者

研究協力者：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

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。