

令和 5 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：2019～2022

課題番号：19K05961

研究課題名(和文) 抵抗性蛋白質ペアによる病原体認識と抵抗性発現機構の解明

研究課題名(英文) Analysis of resistance and recognition mechanisms against pathogens in a resistance protein pair, RPS4 and RRS1

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・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) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：アブラナ炭疽病菌を含む複数の病原菌を認識するデュアルR蛋白質システムは、RPS4とRRS1が協調して病原菌に対する抵抗性を誘導する。この作業仮説ではRRS1がRPS4の制御因子として機能すると推察した。そこで、RRS1のC末端領域に変異を導入して、アブラナ炭疽病菌およびトマト斑葉細菌病菌に対する応答反応を調査した。その結果、C末端領域のアミノ酸置換によって両病原菌に対して感受性となる領域や、過剰に抵抗性が誘導される領域が存在することが明らかとなった。本研究により、RRS1のC末端領域が多様な病原体の認識機構に関わり、病原菌を認識するために重要な役割を担っていることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

動物と植物が生存するためには、病原体を認識し、排除するシステムが不可欠である。これまで、個々のR蛋白質はそれぞれ単独で機能し、病原体と1対1で対応すると考えられていた。このため、シロイヌナズナのゲノム上に存在するわずか150個のR遺伝子で、数十万の病原微生物にどのように対応しているのか説明が困難であった。しかし、本研究成果により、わずかなR遺伝子で無数の病原体に対応するメカニズムを解明し、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。

研究成果の概要(英文)：We previously reported that the dual R-protein system, which recognizes multiple pathogens including *Colletotricum higginsianum*, induces resistance through the collaboration between RPS4 and RRS1. In this hypothesis, we suggest that RRS1 functions as a regulatory factor for RPS4. Therefore, we investigated the response to *C. higginsianum* and *Pseudomonas syringae* by introducing mutations in the C-terminal region of RRS1. The results showed that amino acid substitutions in the C-terminal domain conferred susceptibility to both pathogens, as well as regions that led to excessive resistance. This study revealed the involvement of the C-terminal region of RRS1 in the recognition mechanism of diverse pathogens.

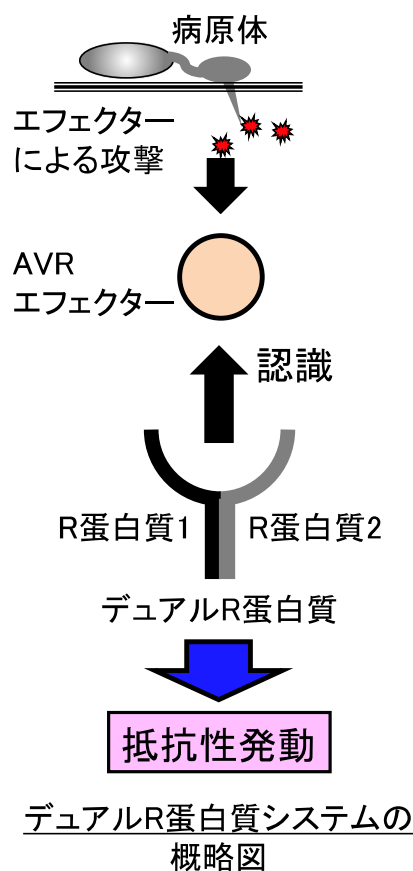
研究分野：植物病理学

キーワード：抵抗性蛋白質 エフェクター アブラナ科炭疽病菌 シロイヌナズナ 植物免疫

### 1. 研究開始当初の背景

植物病原系状菌のゲノム上には、宿主植物の防御応答を阻止するために発達させた 1000 種以上の分泌蛋白質遺伝子(以下、エフェクターとする)の存在が推定され、これらのエフェクターを宿主植物細胞内に分泌することで、感染を成立させると考えられている。これに対して、植物は R 蛋白質を介して病原菌のエフェクター(特に、AVR エフェクターという)を認識し、抵抗反応を発動させることで対抗している。私たちは、シロイヌナズナのゲノム上で隣接する 2 つの R 蛋白質(RPS4 と RRS1)がセットで、異なる 5 種の病原体(アブラナ科野菜類炭疽病菌:以降、アブラナ炭疽病菌と略す、ウリ類炭疽病菌、トマト斑葉細菌病菌、青枯病菌、黒腐病菌)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 R 蛋白質システム”を提唱した<sup>1, 2)</sup>。これまでの私たちの研究から、RPS4 および RRS1 が協調的に働いて複数の病原体に対する抵抗反応に関与すること、また、RRS1 が本システムの制御因子であり、病原体を認識していることが示唆されている。さらに、R 遺伝子(蛋白質)は植物の科(family)を超えては機能しないという植物病理学の定説を覆し、シロイヌナズナ由来のデュアル R 遺伝子を異なる科の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<sup>3)</sup>。

最近、デュアル R 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 AVR エフェクターに対する“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。しかしながら、デュアル R 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十分に分かっていない。また、アブラナ炭疽病菌の AVR エフェクターの同定には至っていない。

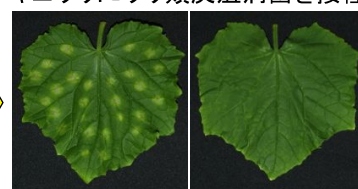


### 2. 研究の目的

病害抵抗性育種では、R 遺伝子を発見し、作物に導入することが伝統的に行われてきた。しかし、R 遺伝子を異なる「科」の作物に単独で形質転換しても、抵抗性が安定的に発揮できない例が数多く報告されており、これは植物の「科」間ゲノムのコンフリクトと捉えることができる。



キュウリにウリ類炭疽病菌を接種



野生型 病気に弱い      RPS4/RRS1導入 炭疽病に抵抗性

しかし、私たちはゲノム上で隣接したデュアル R 遺伝子セットを同時に異なる「科」の植物に導入した場合、抵抗性が付与され、生育も正常であることを明らかにした(図参照)。私たちが独自に開発した網羅的なモチーフ・ドメイン検索プログラム Ex-DOMAIN (exhaustive domain and motif annotator using InterProScan)<sup>4)</sup>により、このような R 遺伝子セットはシロイヌナズナのゲノム上に少なくとも 46 セット、キュウリのゲノムには 10 セット存在した。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し、新規な抵抗性育種法の開発に貢献する。本研究の成果は、病害抵抗性作物の創製や、植物の抵抗性発動を標的とした次世代型の病害防除剤であるプラントアクティベーター(植物免疫賦活剤)の開発に寄与する。

AVR エフェクターの探索については、これまでに 3 種の炭疽病菌のゲノムを解読し、約 300 種のエフェクター遺伝子をクローニングした。これらの遺伝子についてデュアル R 遺伝子を導入した *Nicotiana benthamiana* に対する応答を解析することで、アブラナ炭疽病菌の AVR エフ

エクターを同定する。

本課題では、デュアル R 蛋白質システムを構成する 2 つの R 蛋白質(RPS4/RRS1)のうち RRS1 について、RRS1 の各モチーフおよび C 末端領域の多様性が病原体 ( AVR エフェクター ) の認識とどのように関わっているのかを明らかにすることで、デュアル R 蛋白質システムによる多様な病原体の認識機構の全貌を解明する。

### 3. 研究の方法

#### (1) アブラナ炭疽病菌の AVR エフェクターの同定

デュアル R 蛋白質 ( RPS4/RRS1 ) は、アブラナ炭疽病菌が分泌する AVR エフェクターを認識することで抵抗性を発動すると考えられることから、本 AVR エフェクターを発見することでデュアル R 蛋白質システムの全貌を解明できる。これまでにアブラナ炭疽病菌の約 300 種のエフェクター遺伝子をクローニングした。 *N. benthamiana* はアグロバクテリウムを用いて葉へ遺伝子を注入し、葉の一部のみにおいて一過的に遺伝子を発現させて解析することが可能なシステムである。このシステムを用いて、デュアル R 遺伝子を形質転換した *N. benthamiana* に約 300 種のエフェクター遺伝子を注入し、抵抗反応である過敏感細胞死を指標として選抜することで、AVR エフェクターを同定する。

#### (2) R 蛋白質 RRS1 に特徴的なモチーフおよび C 末端領域の多様性と病原体認識機構の解明

私たちは RRS1 が RPS4 の制御因子と予想しており、RRS1 の機能を解明することで、2 つの R 蛋白質の相互作用を明らかにする。RRS1 の各モチーフおよび C 末端領域にアミノ酸置換を導入し、RPS4 との相互作用を生化学的解析および、 *N. benthamiana* のシステムを用いて細胞レベルの実験系により解析し、病原体認識に関わるドメインを特定する。

#### (3) デュアル R 蛋白質システムによる複数の病原体認識機構の解明

既に同定済みの病原細菌が分泌する AVR エフェクター ( AvrRps4、PopP2 ) と、アブラナ炭疽病菌が分泌する AVR エフェクターを認識する RRS1 の認識ドメインとの結合実験および、 *N. benthamiana* のシステムを用いて細胞レベルの実験系により解析し、本ドメインによる多様な病原体の認識機構を明らかにする。

### 4. 研究成果

#### (1) アブラナ炭疽病菌の AVR エフェクターの同定と AVR エフェクター - RRS1 間相互作用の解明

当初に想定された通り、AVR エフェクターの同定は非常に困難であった。現在までに、アブラナ炭疽病菌が有する 1000 種以上の推定エフェクターのうち、約 500 遺伝子について評価したが、1 次選抜で取得したエフェクター候補遺伝子では過敏感反応を誘導するエフェクターが高い確率で認められたのに対して、3 次選抜以降では、その確率は低下した。これはエフェクターを予測するアプリケーションの精度に起因すると考えられた。また、低発現系では AVR エフェクター特有の抵抗反応が認められる候補遺伝子が得られたが、高発現系では顕著な特異性が認められなかった。現時点では、デュアル R 蛋白質システムが特異的に認識する AVR エフェクターの同定には至っていないが、R 蛋白質を介さず、インフィルトレート接種のみで過敏感反応を誘導するエフェクターが数種類得られており、これらが宿主植物に対して、感染時に機能する可能性が示唆された。これらのエフェクターについて、インフィルトレート条件を検討し、デュアル R 蛋白質システムの AVR エフェクターとしての機能を検討する。

次いで、アブラナ炭疽病菌にランダムな変異を導入し、炭疽病菌に抵抗性を示すシロイヌナズナ生態型 Ws-2 に感染する変異株の探索を行った。本実験は、目的とする AVR エフェクター遺伝子が破壊されたことで、デュアル R 蛋白質システムが炭疽病菌の侵入を認識できなくなり、感染が成立することが想定されることによる。4315 個の変異株をスクリーニングした結果、弱い感染を示す変異株が得られたものの、感染が成立した変異株の取得には至らなかった。以上により、炭疽病菌のゲノム上に存在する AVR エフェクターは単独ではなく、複数種存在する可能性が示唆された。

#### (2) R 蛋白質 RRS1 に特徴的なモチーフおよび C 末端領域の多様性と複数の病原体認識機構の解明

デュアル R 蛋白質システムを構成する RRS1 蛋白質の C 末端領域が病原菌の認識に関わっているとの作業仮説を立てた。そこで、RRS1 の C 末端領域の機能を明らかにするため、本領域にアミノ酸置換を導入し、その機能を解析した。C 末端に変異を導入した変異型 RRS1 遺伝子を、RRS1 遺伝子が欠損しアブラナ炭疽病菌およびトマト斑葉細菌病菌に対して感受性を示す *rrs1-1* シロイヌナズナ変異体へ導入し、T3 ホモラインを作製した。次いで、本形質転換体に両病原菌を接種して感受度検定を行った。アミノ酸を置換した領域が病原菌の認識に関与しない場合は、機能相補により病原菌に対して抵抗性を示すようになる。その結果、変異型 RRS1 遺伝子を導入した形質転換体のうち、機能相補しないアミノ酸領域が明らかとなり、RRS1 の C 末端領域の 18 アミノ酸が両病原菌の認識に関与する重要な領域であることが示唆された。一方で、RRS1 の C 末端領域の 6 アミノ酸への変異は、植物に恒常的な抵抗性を誘導し、かつ、奇形葉

を生じるとともに生育の抑制が認められた。このことは、本アミノ酸領域が RPS4 の制御に関与していることを示唆している。また、C 末端領域からさらに上流の 3 ヶ所のアミノ酸において、その置換によりアブラナ炭疽病菌に対して感受性となる領域が認められた。以上により、RRS1 の構造が複数の病原菌を認識するために重要な役割を担っていることが示唆された。

### (3) デュアル R 蛋白質システムによる複数の病原体認識機構の解明

RRS1 の C 末端領域は、青枯病菌 *Ralstonia solanacearum* の認識に関わっていることが報告されている<sup>5)</sup>。本課題においても、RRS1 の C 末端領域がアブラナ炭疽病菌およびトマト斑葉細菌病菌の認識に関わっていることが明らかとなった。そこで、RRS1 の C 末端領域の 24 アミノ酸配列のうち、RPS4 の制御に関与する可能性が示された 6 アミノ酸に着目した。本領域をアラニンに置換した変異型 RRS1 はアグロバクテリウムを介した実験系において、RPS4 との共インフィルトレーションにより抵抗反応である過敏感細胞死を誘導した。本検定系を用いて、RPS4 の制御に関わるアミノ酸の特定を試み、RRS1 の C 末端領域と RPS4 の作用部位が推定できた。

### (4) まとめ

エフェクターを認識する受容体 (R 蛋白質) の多くは、核酸結合ドメイン (nucleotide binding site: NB) とロイシンリッチリピートドメイン (leucine-rich repeat domain: LRR) を有しており NB-LRR 型受容体 (NB-LRR receptor: NLR) と呼ばれている。ペア NLR である RPS4/RRS1 による病原体の受容と免疫誘導は、RRS1 が有する WRKY ドメインが decoy (おとり) として機能しエフェクターを受容する。次いで、RRS1 の変化を RPS4 が認識し、免疫シグナルは EDS1/PAD4 および EDS1/SAG101 を経て、それぞれヘルパー-NLR である ADR1 および NRG1 に伝達され、過敏感反応を誘導すると考えられている<sup>6, 7)</sup>。本研究により、異なる 2 つの NLR である RPS4/RRS1 ペアがセンサー-NLR となり、複数の病原体 (異なるエフェクター) を認識することが示唆された。

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 (R 遺伝子を利用した病害抵抗性作物の育種、プラントアクチベーターなど) を普及することで、病害虫の薬剤耐性の発達を抑制し、病害虫による被害を抑えて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に貢献する。

#### < 引用文献 >

- M. Narusaka et al.: *Plant J.*, **60**, 218 (2009).
- D. Birker et al.: *Plant J.*, **60**, 602 (2009).
- M. Narusaka, et al.: *PLoS ONE*, **8**, e55954 (2013).
- M. Narusaka, et al.: *Plant Biotech.*, **35**, 177 (2018).
- H. Guo et al.: *Cell Host Microbe.*, **27**, 769 (2020).
- A. M. Bayless and M. T. Nishimura: *Front. Genet.*, **11**, 539 (2020).
- J. A. Dongus and J. E. Parker: *Curr. Opin. Plant Biol.*, **62**, 102039 (2021).

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 5件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Gan Pamela, Hiroshima Ryoko, Tsushima Ayako, Masuda Sachiko, Shibata Arisa, Ueno Akiko, Kumakura Naoyoshi, Narusaka Mari, Hoat Trinh Xuan, Narusaka Yoshihiro, Takano Yoshitaka, Shirasu Ken	4. 巻 23
2. 論文標題 Telomeres and a repeat rich chromosome encode effector gene clusters in plant pathogenic <i>Colletotrichum</i> fungi	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Environmental Microbiology	6. 最初と最後の頁 6004 ~ 6018
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/1462-2920.15490	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 Tsushima Ayako, Narusaka Mari, Gan Pamela, Kumakura Naoyoshi, Hiroshima Ryoko, Kato Naoki, Takahashi Shunji, Takano Yoshitaka, Narusaka Yoshihiro, Shirasu Ken	4. 巻 12
2. 論文標題 The Conserved <i>Colletotrichum</i> spp. Effector Candidate CEC3 Induces Nuclear Expansion and Cell Death in Plants	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Microbiology	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) 10.3389/fmicb.2021.682155	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 鳴坂真理, 鳴坂義弘	4. 巻 4(8)
2. 論文標題 デュアル抵抗性タンパク質システムによる革新的作物保護技術の開発	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 アグリバイオ	6. 最初と最後の頁 55-57
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 Gan P., Tsushima A., Narusaka M., Narusaka Y., Takano Y., Kubo Y., Shirasu K.	4. 巻 32
2. 論文標題 Genome Sequence Resources for Four Phytopathogenic Fungi from the <i>Colletotrichum orbiculare</i> Species Complex	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Molecular Plant-Microbe Interactions	6. 最初と最後の頁 1088 ~ 1090
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1094/MPMI-12-18-0352-A	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 Tsushima A., Gan P., Kumakura N., Narusaka M., Takano Y., Narusaka Y., Shiras K.	4. 巻 11
2. 論文標題 Genomic Plasticity Mediated by Transposable Elements in the Plant Pathogenic Fungus <i>Colletotrichum higginsianum</i>	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Genome Biology and Evolution	6. 最初と最後の頁 1487 ~ 1500
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/gbe/evz087	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 Gan P., Tsushima A., Hiroshima R., Narusaka M., Takano Y., Narusaka Y., Kawaradani M., Damm U., Shirasu K.	4. 巻 9
2. 論文標題 <i>Colletotrichum shisoi</i> sp. nov., an anthracnose pathogen of <i>Perilla frutescens</i> in Japan: molecular phylogenetic, morphological and genomic evidence	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 13349
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-019-50076-5	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 -

〔学会発表〕 計10件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 2件)

1. 発表者名 鳴坂義弘、飛永恭兵、山口賢人、北川隆啓、齊藤太香雄、吉岡美樹、吉岡博文、鳴坂真理
2. 発表標題 ナノ粒子を用いた新規抵抗性誘導剤の開発
3. 学会等名 令和3年度日本植物病理学会関西支部会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 吉岡美樹、荒川花子、西内沙希、鳴坂義弘、鳴坂真理、北川隆啓、齊藤太香雄、安達広明、吉岡博文
2. 発表標題 病原菌に応答したベンサミアナタバコにおけるSAおよびJAシグナルの時空間的動態
3. 学会等名 令和3年度日本植物病理学会関西支部会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 鳴坂真理、鳴坂義弘
2. 発表標題 バイオスティミュラントはどのように植物保護に貢献できるか？
3. 学会等名 日本農薬学会第47回大会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Naoyoshi Kumakura, Suthitar Singkaravanit-Ogawa, Pamela Gan, Ayako Tsushima, Nobuaki Ishihama, Shunsuke Watanabe, Mitsunori Seo, Shintaro Iwasaki, Mari Narusaka, Yoshihiro Narusaka, Yoshitaka Takano, Ken Shirasu
2. 発表標題 Guanosine-specific single-stranded ribonuclease effectors of a phytopathogenic fungus potentiate host immune responses
3. 学会等名 第63回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 安達凜奈、宇津木一陽、鳴坂真理、鳴坂義弘、刑部敬史、刑部祐里子
2. 発表標題 トマト葉緑体シグマ因子相互作用タンパク質SIGMA FACTOR-BINDING PROTEIN 1のゲノム編集技術による改変と機能解析
3. 学会等名 第63回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 鳴坂真理、高野義孝、谷口伸治、藤澤英司、野口勝憲、吉岡美樹、吉岡博文、鳴坂義弘
2. 発表標題 新規植物活力剤バイオスティミュラントの開発研究
3. 学会等名 令和2年度日本植物病理学会関西支部会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Kumakura N., Singkaravanit-Ogawa S., Gan P., Tsushima A., Narusaka M., Narusaka Y., Takano Y., Shiras K.
2. 発表標題 Ribonuclease-type effectors from <i>Colletotrichum orbiculare</i> potentiate host immune responses in a catalytic residue-dependent manner
3. 学会等名 IS-MPMI XVIII congress (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Tsushima A., Gan P., Kumakura N., Narusaka M., Takano Y., Narusaka Y., Shiras K.
2. 発表標題 Genomic plasticity mediated by transposable elements in the plant pathogenic fungus <i>Colletotrichum higginsianum</i>
3. 学会等名 日本進化学会 第21回札幌大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 鳴坂真理、白須賢、高野義孝、鳴坂義弘
2. 発表標題 デュアル抵抗性蛋白質システムを活用した病害抵抗性作物の分子育種技術の開発研究
3. 学会等名 第37回日本植物細胞分子生物学会(京都)大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Gan P., Hiroshima R., Tsushima A., Masuda S., Kumakura N., Suzuki T., Trinh XH, Narusaka M., Narusaka Y., Takano Y., Shirasu K
2. 発表標題 Genome rearrangements drive evolution of virulence-related genes in the genomes of <i>Colletotrichum gloeosporioides</i> species complex
3. 学会等名 15th European Conference on Fungal Genetics (国際学会)
4. 発表年 2020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
---------	---------