

令和 6 年 6 月 14 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20H02988

研究課題名(和文) ペアNLR免疫受容体の進化と活性化機構の解明

研究課題名(英文) Evolution and activation mechanism of Paired NLR Immunoreceptors

研究代表者

河野 洋治 (Kawano, Yoji)

岡山大学・資源植物科学研究所・教授

研究者番号：00406175

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,900,000円

研究成果の概要(和文)：植物のNLR遺伝子がどのような進化の過程を経て新しい機能を獲得し、植物免疫に貢献しているかは十分に理解されていない。本研究により、イネいもち病菌に対するNLR型免疫受容体Pit1と、そのパラログPit2では、「パラログ抑制」と「新機能獲得」と呼ばれる遺伝子重複後に見られる特徴的なイベントが起きたことが示唆された。この2つのイベントにより、Pit1とPit2は、ペアNLRタンパク質として一つの免疫受容体として働くことが示唆された。本研究により、植物免疫の中心的なシステムの一つであるペアNLR型免疫受容体が生み出された進化過程の理解が進んだ。

研究成果の学術的意義や社会的意義

NLRは、病原菌だけにとどまらず、害虫やウイルスの認識にも関わる重要な受容体であり、本研究で得られる基礎的な知見は、育種学、植物病理学、害虫学に渡る農学研究に広く意義のある成果が得られることが期待される。本研究が推進されれば、より多くの病原菌を認識する人工センサーNLRの開発が可能となり、病害虫による食糧に対する被害を最小限にし、人類の健康の増進に貢献できる。

研究成果の概要(英文)：It is not well understood what evolutionary process plant NLR genes have gone through to acquire new functions and contribute to plant immunity. This study indicates that the rice blast fungus NLR immune receptor Pit1 and its paralog Pit2 underwent characteristic events known as "paralog suppression" and "neofunctionalization" that are seen after gene duplication. These two events suggest make Pit1 and Pit2 function as a paired NLR protein serving as a single immune receptor. This study has advanced the understanding of the evolutionary process that gave rise to paired NLR immune receptors, which are a central system of plant immunity.

研究分野：植物保護学

キーワード：NLR免疫受容体 イネ 進化 遺伝子重複

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

限られた植物ゲノムでどのように多様な病原体を認識し、免疫を誘導するかは十分に理解されていない。植物は、動物とは異なり獲得免疫を持たない。したがって、植物は動物とは異なる方法で自然免疫を発達させてきた。実際に、自然免疫の中心的な細胞内受容体である NLR は、ヒトでは約 20 遺伝子しか存在しないが、イネでは約 500 遺伝子も存在することが知られている。植物では、遺伝子重複によって多くの *NLR* 遺伝子が生み出され、この遺伝子数の増加は免疫の強化に貢献していると推測されている。しかしながら、増加した *NLR* 遺伝子がどのように新しい機能を獲得し、植物免疫に関与するかは十分に明らかにされていない。本研究では、遺伝子重複により生まれた NLR タンパク質をコードするいもち病菌抵抗性遺伝子 *Pit1* とそのパラログ *Pit2* を分子基盤として、遺伝子重複後の 2 つの *NLR* 遺伝子の進化の過程を解明することにより、ペア NLR 型免疫受容体による免疫機構の理解を深める。

NLR タンパク質は、病原体によって分泌されるエフェクタータンパク質を認識する細胞内免疫受容体として機能し、エフェクター誘導免疫と呼ばれる強い免疫応答を誘導する。一般に NLR は、3 つのドメインで構成され、中央に nucleotide-binding (NB-ARC) ドメイン、C 末端に leucine-rich repeat (LRR) ドメインを有する。N 末端の違いから coiled-coil (CC) と Toll/ Interleukin-1/Resistance-protein (TIR) に分類される。NB-ARC ドメインは ADP と ATP に結合し、このアデニンヌクレオチドの状態が NLR タンパク質の活性状態を規定する。15 年程前までは、単一の NLR タンパク質が、病原体エフェクターの認識と免疫応答の誘導という 2 つの役割を担っていると考えられていた。近年、申請者らを含む幾つかのグループの研究により、2 つの異なる NLR 型タンパク質が協調して、病原体エフェクターの認識と免疫応答の誘導を行う「ペア NLR タンパク質」が発見された (Cesari et al., EMBO J 2014, Eitas and Dangl, COPB 2010)。非常に興味深いことに、ペア NLR タンパク質はそれぞれ機能が分化しており、免疫を誘導する免疫誘導型 NLR と、リガンドである病原体由来のエフェクターを認識するセンサー型 NLR に分類される。センサー型 NLR は、免疫誘導型 NLR の免疫誘導活性を抑制する機能があることも見出している。世界で初めて NLR 型の抵抗性遺伝子が同定されてから四半世紀以上が経過しているが、**進化の過程で、NLR タンパク質がどのような分子メカニズムで免疫誘導型とセンサー型 NLR に分化したかは未だ不明であり、植物免疫を理解する上で核心をなす問いである。**

2. 研究の目的

我々は、いもち病菌に対する抵抗性遺伝子 *Pit1* とそのパラログ *Pit2* が遺伝子複製により生み出されたことを発見した。非常に興味深いことに、*Pit1* と *Pit2* タンパク質は直接結合し、ペア NLR タンパク質として機能していることを見出した (Li et al., Nat Commun 2024)。様々な解析から、*Pit1* が免疫を誘導する免疫誘導型 NLR、*Pit2* が *Pit1* の免疫誘導を抑制し、リガンドである病原体由来のエフェクターを認識するセンサー型 NLR として機能している可能性が高いと考えられた。*Pit1* と *Pit2* の高い相同性を利用したドメインスワッピング実験の結果から、*Pit1* と *Pit2* 間の運命決定残基を同定した。*Pit1* は単独発現で免疫を誘導し、*Pit2* は *Pit1* による誘導免疫を抑制する。この機能の違いは、*Pit2* の NB-ARC ドメインに存在する P300 と F415 の 2 つの変異によって生じることを明らかにした。実際に、*Pit2* に存在するこの 2 つの変異を *Pit1* 型に変更すると、*Pit2* が *Pit1* として機能することも明らかにした。*Pit2* としての機能を規定する 2 残基の機能や進化の過程を解析することにより、一つの祖先 *NLR* 遺伝子から遺伝子重複の後に、免疫誘導型とセンサー型 NLR が生まれる過程を明らかに出来る可能性が高い。ペア NLR タンパク質の運命決定残基を特定していることから、これまで不明であったペア NLR タンパク質の拮抗するメカニズムや進化の過程を解明できる独走的な研究になる可能性が高い。

3. 研究の方法

本研究では、ペア NLR タンパク質による植物免疫を理解するために、ペア NLR タンパク質 *Pit1* と *Pit2* による植物免疫の誘導機構を理解する。*Pit1* は恒常的に免疫を誘導するが、*Pit2* は *Pit1*

の活性を抑制する。[達成目標 1] *Pit1* と *Pit2* の機能の違いがどのようなタンパク質活性の差異によるものか明らかにする。*Pit1* と *Pit2* は、相同性が高いことから、単一遺伝子から遺伝子重複して生み出された可能性が高い。ペア NLR 遺伝子の進化過程は全く不明であり、*Pit1* と *Pit2* がどのような進化の過程で生み出されたかは大変興味深い。[達成目標 2] 野生イネと栽培イネの高精度ゲノム情報を用いて、*Pit1* と *Pit2* の多型解析を行い、進化の過程を明らかにする。

4. 研究成果

[達成目標 1] *Pit1* と *Pit2* の機能の違いがどのようなタンパク質活性の差異によるものか明らかにする

最近、申請者らは、いもち病菌に対する抵抗性遺伝子 *Pit1* の隣に遺伝子重複で生まれ、進化の過程で機能が変化したパラログ *Pit2* 遺伝子が存在することを発見した。非常に興味深いことに、*Pit1* と *Pit2* タンパク質は直接結合し、ペア NLR タンパク質として機能していた。様々な解析から、*Pit1* が免疫誘導型 NLR であること、*Pit2* が *Pit1* の免疫誘導を抑制することを発見した(図 1: Li et al., Nat Commun 2024)。*Pit1* と *Pit2* のドメインスワップ実験の結果から、*Pit1* と *Pit2* 間の運命決定残基を同定し、機能の違いは、*Pit2* の NB-ARC ドメインに存在する P300 と F415 の 2 つの変異に起因することを見出した。*Pit2* に存在するこの 2 つの変異を *Pit1* 型に変更すると、*Pit2* が *Pit1* として機能した。*Pit2* の機能を規定する 2 残基の機能や進化の過程を解析することにより、祖先 NLR 遺伝子から遺伝子重複後に、免疫誘導型とセンサー型 NLR が生まれる過程を明らかに出来た。

遺伝子重複により生み出された二つの遺伝子は多くの場合、2 つのうち一方の遺伝子に機能破壊する変異が入り偽遺伝子化してしまう。このような偽遺伝子化を防ぐ機構として、「パラログ抑制」が知られている (Panchy et al., Plant Physiol 2016)。ホモダイマーを形成するタンパク質では、遺伝子重複で生まれたパラログタンパク質が祖先タンパク質の機能の一部を失い、ドミナントネガティブとして働く(パラログ抑制)。我々は、*Pit1* と *Pit2* がこのパラログ抑制の関係にあるのではないかと考えた。*Pit1* と *Pit2* の細胞内局在を調べた際に、*Pit1* は細胞膜上に局在し免疫を誘導できるが、*Pit2* は細胞質に留まり免疫誘導できないことが分かった。非常に興味深いことに、*Pit1* と *Pit2* を共発現すると *Pit1* の細胞膜局在が失われ、細胞質に留まることを発見した。我々はこれまでに、*Pit1* が正しく細胞膜に局在し免疫スイッチタンパク質 *OsRac1* と相互作用することが *Pit1* の免疫誘導に必須であることを見出している (Kawano et al., J Biol Chem 2014; Wang et al, Plant Cell Environ 2022)。したがって、*Pit2* が *Pit1* の細胞膜局在を抑制することでドミナントネガティブとして働いているのではないかと考えた。

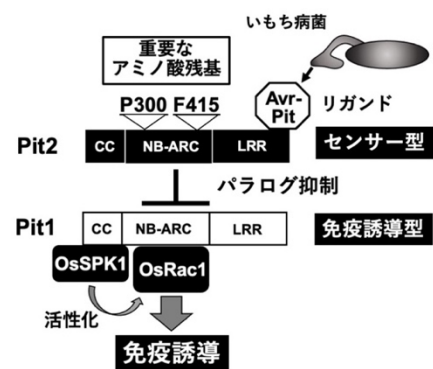
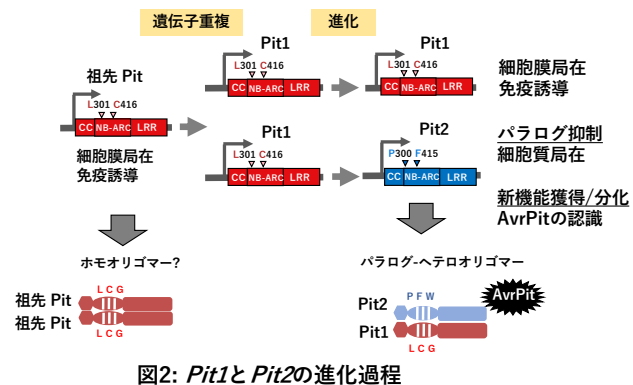


図1: *Pit1* と *Pit2* による免疫誘導モデル

[達成目標 2] 野生イネと栽培イネの高精度ゲノム情報を用いて、*Pit1* と *Pit2* の多型解析を行い、進化の過程を明らかにする

Pit1 と *Pit2* 遺伝子の進化解析を行うために、66 系統の栽培イネや野生イネのゲノム配列情報を用いて、タンパク質のアミノ酸に変化を起こさない同義置換とアミノ酸が変化する非同義置換の比 (Ka/Ks) を求めて自然選択を検討した。*Pit1* は、進化に有利でも不利でもない中立な変異が偶然に集団に広まった中立進化であった。一方、*Pit2* は、正の自然選択圧を強く受けて進化しており、遺伝的変異を集団の中に積極的に維持する平衡選択 (balancing selection) が行われていた。大変興味深いことに、非同義置換が *Pit2* の LRR ドメイン C 末端に顕著に蓄積していた。LRR ドメインは一般的にリガンドであるエフェクタータンパク質を認識する部位であることから、*Pit2* がいもち病菌由来のエフェクタータンパク質を認識するセンサーとして働くのではないかと推測している。平衡選択により多くの *Pit2* の多型が集団内で維持できれば、より広範ないもち病菌を認識することが可能となりイネの生存戦略としては非常に有利である。遺伝子重複後に、パラログ遺伝子が祖先遺伝子とは異なる新しい機能を獲得することは「新機能獲得/分化 (neofunctionalization)」と呼ばれる。我々は、*Pit2* が新たにセンサーとしての機能を獲得したか、あるいは、祖先型 *Pit* が持つ免疫誘導とセンサー機能のうちセンサー機能だけを分担したのではないかと考えている (図 2)。



最近、NLR タンパク質の全長の立体構造が次々に明らかにされた (Wang et al., Science 2019; Wang et al., Science 2019)。さらに、NLR タンパク質が Ca^{2+} チャネルとして機能することや、アデニンヌクレオチドの修飾により免疫を惹起することが原子レベルで明らかにされるなど非常に重要な知見の報告が相次いでいる (Bi et al., Cell 2021; Jia et al., Science 2022; Huang et al., Science 2022)。現在、NLR 研究は、植物科学分野において最もホットな研究領域の一つである。本研究により、抑制的に働く NLR のメカニズム、原子レベルで *Pit2* がいもち病菌由来のリガンドを認識する機構やその共進化の過程を明らかにできれば、NLR 研究をさらに加速させることが可能となる。NLR は、病原菌だけにとどまらず、害虫やウイルスの認識にも関わる重要な受容体であり、本研究で得られる基礎的な知見は、育種学、植物病理学、害虫学に渡る農学研究に広く意義のある成果が得られることが期待される。本研究が推進されれば、より多くの病原菌を認識する人工センサー-NLR の開発が可能となり、病害虫による食糧に対する被害を最小限にし、人類の健康の増進に貢献できる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計8件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 6件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Kawano Yoji	4. 巻 14
2. 論文標題 Fine-tuning ROS homeostasis by ROD1 is a battleground between rice and Magnaporthe oryzae	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Molecular Plant	6. 最初と最後の頁 1979 ~ 1981
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.molp.2021.11.005	査読の有無 有
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 該当する
1. 著者名 Jing Zihuan, Wacera W. Fiona, Takami Tsuneaki, Takanashi Hideki, Fukada Fumi, Kawano Yoji, Kajiya-Kanegae Hiromi, Iwata Hiroyoshi, Tsutsumi Nobuhiro, Sakamoto Wataru	4. 巻 11
2. 論文標題 NB-LRR-encoding genes conferring susceptibility to organophosphate pesticides in sorghum	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 19828
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-98908-7	査読の有無 有
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 Akamatsu Akira, Fujiwara Masayuki, Hamada Satoshi, Wakabayashi Megumi, Yao Ai, Wang Qiong, Kosami Ken-ichi, Dang Thu Thi, Kaneko-Kawano Takako, Fukada Fumi, Shimamoto Ko, Kawano Yoji	4. 巻 62
2. 論文標題 The Small GTPase OsRac1 Forms Two Distinct Immune Receptor Complexes Containing the PRR OsCERK1 and the NLR Pit	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Plant and Cell Physiology	6. 最初と最後の頁 1662 ~ 1675
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/pcp/pcab121	査読の有無 有
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 Wang Pingyu, Yao Shaolun, Kosami Ken ichi, Guo Ting, Li Jing, Zhang Yuanyuan, Fukao Yoichiro, Kaneko Kawano Takako, Zhang Heng, She Yi Min, Wang Pengcheng, Xing Weiman, Hanada Kousuke, Liu Renyi, Kawano Yoji	4. 巻 18
2. 論文標題 Identification of endogenous small peptides involved in rice immunity through transcriptomics and proteomics based screening	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Plant Biotechnology Journal	6. 最初と最後の頁 415 ~ 428
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/pbi.13208	査読の有無 有
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 該当する

1. 著者名 Wang Qiong, Li Yuying, Kosami Ken ichi, Liu Chaochao, Li Jing, Zhang Dan, Miki Daisuke, Kawano Yoji	4. 巻 45
2. 論文標題 Three highly conserved hydrophobic residues in the predicted 2 helix of rice NLR protein Pit contribute to its localization and immune induction	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Plant, Cell & Environment	6. 最初と最後の頁 1876 ~ 1890
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/pce.14315	査読の有無 有
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 該当する

1. 著者名 Wang Pingyu, Jia Huimin, Guo Ting, Zhang Yuanyuan, Wang Wanqing, Nishimura Hideki, Li Zhengguo, Kawano Yoji	4. 巻 74
2. 論文標題 The secreted immune response peptide 1 functions as a phyto cytokine in rice immunity	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Experimental Botany	6. 最初と最後の頁 1059 ~ 1073
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jxb/erac455	査読の有無 有
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 該当する

1. 著者名 Wang Qiong, Kawano Yoji	4. 巻 15
2. 論文標題 Improving disease resistance to rice false smut without yield penalty by manipulating the expression of effector target	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Molecular Plant	6. 最初と最後の頁 1834 ~ 1837
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.molp.2022.11.009	査読の有無 有
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 該当する

1. 著者名 Li Yuying, Wang Qiong, Jia Huimin, (他22名), Kawano Yoji	4. 巻 15
2. 論文標題 An NLR paralog Pit2 generated from tandem duplication of Pit1 fine-tunes Pit1 localization and function	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 4610
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-024-48943-5	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 該当する

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Pingyu Wang, Yoji Kawano
2. 発表標題 The secreted peptide IRP functions as a phytoytokine in rice immunity
3. 学会等名 IPSR International Plant Web Forum 2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Pingyu Wang, Yoji Kawano
2. 発表標題 The secreted peptide IRP functions as a phytoytokine in rice immunity
3. 学会等名 2021 IS-MPMI Congress: eSymposia Series (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 河野 洋治
2. 発表標題 ペアNLR型免疫受容体Pit1とPit2の進化解析
3. 学会等名 埼玉大学・岡山大学シンポジウム (招待講演)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 河野洋治
2. 発表標題 マルチオミクス解析を用いた植物サイトカイン の同定と機能解析
3. 学会等名 令和3年度日本植物病理学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 河野洋治
2. 発表標題 新しいイネの創造をめざして：低分子量Gタンパク質OsRac1によるイネ免疫の制御機構の解明
3. 学会等名 第37回資源植物科学シンポジウム・第13回植物ストレス科学研究シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 赤松明，藤原正幸，濱田聡，島本功，河野洋治
2. 発表標題 The Small GTPase OsRac1 Forms Two Distinct Immune Receptor Complexes Containing the PRR OsCERK1 and the NLR Pit
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 OsRac1は、PRR OsCERK1とNLR Pitを含む2つの免疫受容体複合体を形成する
2. 発表標題 赤松明，藤原正幸，濱田聡，島本功，河野洋治
3. 学会等名 令和4年度日本植物病理学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Pingyu Wang, 河野 洋治
2. 発表標題 分泌ペプチドIRP1はイネ免疫のサイトカインとして働く
3. 学会等名 令和5年度日本植物病理学会大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Yuying Li, Qiong Wang, Humin Jia, 河野洋治
2. 発表標題 遺伝子重複により形成されたNLRペア によるイネいもち病菌抵抗性の解析
3. 学会等名 令和6年度日本植物病理学会大会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 Yuying Li, Qiong Wang, Humin Jia, 河野洋治
2. 発表標題 Tandem gene duplication generates a paralog that forms an NLR pair to confer resistance to rice blast fungus
3. 学会等名 第65回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2024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		
米国	University of Arizona		