

令和 3 年 6 月 15 日現在

機関番号：32658

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K05657

研究課題名(和文) イネいもち病抵抗性NLRタンパク質による病原菌エフェクター認識の分子機構の解明

研究課題名(英文) Rice blast resistance-inducing mechanisms via effector recognition by NLR immune receptors.

研究代表者

齋藤 宏昌 (SAITOH, Hiromasa)

東京農業大学・生命科学部・教授

研究者番号：20414336

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)：いもち病を防除するアプローチとして、細胞内免疫受容体をコードするイネ抵抗性遺伝子を用いた抵抗性品種の利用が実施されている。植物のNLRsに組み込まれている特殊な領域(ID)は、病原体から分泌されたエフェクターを直接認識し、免疫反応を誘導する。イネの免疫受容体ペアであるPik-1/Pik-2とRGA5/RGA4はいずれもIDとしてHMA領域を持ち、この領域でいもち病菌エフェクターAVR-PikとAVR-Piaをそれぞれ認識する。本研究では、Pikp-HMA領域がAVR-Piaと結合し、Pikp-1/Pikp-2はミスマッチのAVR-Piaに対して免疫反応を誘導す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

植物耐病性研究において、宿主NLRによる病原菌AVRエフェクターの認識は最も重要な研究課題の一つである。以前に研究代表者は、病原菌AVRが植物NLRに組み込まれている特殊な領域(ID)に直接結合することを示し、AVR/NLR複合体結晶構造を世界で初めて明らかにした。本研究では、一つのNLRがIDを介して複数のエフェクターを認識することを見出し、それにより植物NLRのIDと病原体エフェクター相互作用の適応性が示唆された。この成果は多様なエフェクターを認識できる免疫受容体の人工設計の可能性を示すものであり、将来的に植物免疫受容体の機能の理解や病害抵抗性エンジニアリングへの展望を開くものと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Unconventional integrated domains in plant intracellular immune receptors of the nucleotide-binding leucine-rich repeat (NLRs) type can directly bind translocated effector proteins from pathogens and thereby initiate an immune response. The rice immune receptor pairs Pik-1/Pik-2 and RGA5/RGA4 both use integrated heavy metal-associated (HMA) domains to bind the effectors AVR-Pik and AVR-Pia, respectively, from rice blast fungal pathogen. Here, using plant cell death and pathogenicity assays and protein-protein interaction analyses, we show that the rice NLR pair Pikp-1/Pikp-2 triggers an immune response leading to partial disease resistance toward the "mis-matched" effector AVR-Pia in planta and that the Pikp-HMA domain binds AVR-Pia in vitro. The results of our work indicate that a single NLR immune receptor can bind multiple pathogen effectors via an integrated domain, insights that may enable engineering plant immune receptors with extended disease resistance profiles.

研究分野：植物病理学

キーワード：イネいもち病 細胞内免疫受容体 抵抗性遺伝子 NLRs エフェクター ID HMA AVR

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

(1) 子のう菌のいもち病菌 (*Magnaporthe oryzae*) によって引き起こされるイネいもち病は、世界中のイネの減収をもたらす最重要病害である。いもち病によるイネの国内被害額は年間約 100 億円と言われており、日本の主食であるコメの安定供給にとって脅威となっている。いもち病を防除するアプローチとして、NLRs (Nucleotide-Binding [NB] Leucine Rich Repeat [LRR] Receptor) として知られる細胞内免疫受容体をコードするイネ抵抗性遺伝子が利用されている。NLRs の多くは、N 末端に Coiled-Coil (CC) または TOLL/Interleukin-1 受容体領域、中央に NB、C 末端に LRR 領域を含む多領域構造で構成されている。NLRs がペアを組んでセンサー NLR とヘルパー NLR として病害抵抗性機能を果たす例が報告されており、これらのペアの遺伝子は染色体上で密接に連鎖していることがある。

(2) NLRs の多くは、病原体から分泌されたエフェクター (宿主の生理作用を操作することによって感染を助長するタンパク質) の存在あるいはその活性を認識し、多くの場合、強度の免疫反応や局所的細胞死を引き起こし、病気を抑制する。研究代表者らの研究により、いもち病菌の非病原力エフェクター (AVRs) の一部は、NLRs に組み込まれている特殊な領域 (Integrated Domain: ID) に直接的に結合し、抵抗性 (免疫反応) を誘導することが明らかになっている。

(3) 研究代表者らは、いもち病菌のゲノム解析により 3 種類の AVR 遺伝子、AVR-Pik、AVR-Pia、AVR-Pii の単離同定に成功した。そのうち、AVR-Pik と NLR ペア Pik-1/Pik-2 の相互作用の詳細な研究から、進化の過程で Pik-1 に挿入されたと考えられる Heavy Metal Associated (HMA) 領域に AVR-Pik が直接結合して、細胞死を伴う強い抵抗性が誘導されることを見出した。さらに、AVR-Pik の D アリル (AVR-PikD) と Pik-1 のアリルである Pikp-1 の HMA 領域からなる複合体の結晶構造解析に成功した。一方、AVR-Pia と AVR1-CO39 は、Pia を構成する RGA5 に含まれる HMA 領域に結合して免疫反応を誘導する。興味深いことに、イネいもち病菌エフェクター AVR-PikD、AVR-Pia、AVR1-CO39 と AvrPizt は、互いのアミノ酸配列において相同性がみられないにもかかわらず、これらの 3 次元構造は類似している。

2. 研究の目的

イネいもち病は、世界のイネ生産にとって最も大きな生物学的脅威である。研究代表者らの研究により、いもち病菌の AVRs の一部は、NLRs に組み込まれている ID に直接的に結合し、抵抗性 (免疫反応) を誘導することが明らかになっている。そこで本研究では、

(1) いもち病菌 AVR とそれを認識するイネ NLR タンパク質との相互作用によるタンパク質複合体の動態変化、およびそれによって誘導されるイネの防御反応の分子機構を解明する。

(2) 植物の NLR に含まれる ID が、どのようにして共通の構造を持つエフェクターに結合するのかを解明することにより、免疫受容体機能の理解や病害抵抗性エンジニアリングへの展開を目指す。

3. 研究の方法

(1) モデル植物である *Nicotiana benthamiana* の葉を用いたアグロインフィルトレーション法により、目的のタンパク質を一過的に発現させ、UV 照射下の自家蛍光として細胞死を定量化する。

(2) Pik-HMA 領域と AVR-Pia が複合体を形成するか定性的に確認するためにゲル濾過クロマトグラフィーを活用し、結合親和性を測定するために表面プラズモン共鳴を用いる。

(3) Pikp-HMA と AVR-Pia の間で形成された結合接点を可視化し、AVR-Pik との結合接点と比較するために、これらのタンパク質間の複合体を精製し、X 線結晶構造解析により 1.9 Å の解像度で構造を決定する。

4. 研究成果

「イネいもち病菌の異なるエフェクターに対するイネ NLR 免疫受容体の交差反応は部分的な抵抗性をもたらす」

イネの免疫受容体ペアである Pik-1/Pik-2 と RGA5/RGA4 は、いずれも ID として HMA 領域を持ち、この HMA 領域でイネいもち病菌エフェクター AVR-Pik と AVR-Pia をそれぞれ認識する。AVR-Pik と AVR-Pia は MAX (Magnaporthe Avrs and ToxB-like) エフェクターファミリーに属し、主要な立体構造は保存されている。どのようにして ID が構造的に類似した異なるエフェクターを特異的に認識するのかについて解析した。

(1) *N. benthamiana* の葉において、**Pikp-1 + Pikp-2 + ①AVR-PikD**、**②AVR-Pia**、および別の **Pik** アリルである **Pikm-1 + Pikm-2 + ③AVR-PikD**、**④AVR-Pia** の組み合わせで一過的に共発現させ、UV 照射下の自家蛍光として細胞死を定量化した結果、①と③で強い過敏反応 (**HR**)、②で弱い **HR** が検出され、④では **HR** が認められなかった。

(2) ゲル濾過クロマトグラフィーと表面プラズモン共鳴を用いて、**Pik-HMA** 領域と **AVR-Pia** の複合体形成の確認と結合親和性を測定した結果、**Pikm-HMA** と **AVR-Pia** の間では結合が認められず、**Pikp-HMA** は **AVR-Pia** と結合することが示され、**in vitro** での相互作用が **in planta** での反応と相関することが確認された。

(3) X 線結晶構造解析により、**Pikp-HMA** と **AVR-Pia** の間で形成された結合接点を視覚化した結果、**Pikp-HMA/AVR-Pia** 複合体と **Pikp-HMA/AVR-Pik** 複合体において主要な折りたたみ構造は同一であったが、**Pikp-HMA** と **AVR-Pia** の結合接点は、**AVR-Pik** との結合接点と完全に異なっていた。

以上の結果から、イネの **NLR** ペア **Pikp-1/Pikp-2** がミスマッチのエフェクターである **AVR-Pia** に対して **in planta** で免疫反応を誘導し、**Pikp-HMA** 領域は **in vitro** で **AVR-Pia** と結合することが明らかになった。**AVR-Pia** と結合した **Pikp-HMA** の結晶構造は、**AVR-Pik** エフェクターとの結合と比較して異なる結合接点を示し、この結果は **ID/エフェクター** 相互作用の適応性を示唆する。この研究成果により、一つの **NLR** が **ID** を介してどのように複数のエフェクターを認識するのかが見出され、多様なエフェクターを認識できる免疫受容体の人工設計の可能性が示された (**Varden et al., 2019**)。

「イネ **NLR** ペア **Pikp-1/Pikp-2** は負の制御ではなく受容体の強調した働きによって細胞死を誘導する」

植物においてペアで機能する **NLR** 免疫受容体は、一般に平常状態では **NLR** ペアの片方がもう片方の **NLR** の活性を抑制しており、病原体エフェクターの認識によってこの抑制が解除されて免疫反応が誘導されると考えられている。しかしながら、この機構が全ての **NLR** ペアに共通しているかは分かっていなかった。そこで本研究では、**AVR-PikD** エフェクターを発現するイネいもち病菌に対して抵抗性を付与するイネ **NLR** ペア **Pikp-1/Pikp-2** の、エフェクターによる活性化に、両 **NLR** が協調して機能することが重要であり、それによって免疫反応が誘導されることを明らかにした。

Pikp-1/Pikp-2 活性化の機構を調査するために、これ等のタンパク質の欠失変異体と **NLR** 配列に共通するモチーフの突然変異体を作製した。**Pikp-1** と **Pikp-2** のどの領域が欠失しても、**AVR-PikD** の存在下で *N. benthamiana* 葉において **HR** が誘導されなかったことから、全ての領域が植物免疫反応の活性化に必要とされることが明らかとなった。さらに、**Pikp-1** または **Pikp-2** のどの領域を発現させても *N. benthamiana* 葉において **HR** を生じないことも示された。**Pikp-1** と **Pikp-2** に含まれる **NLR** 共通の **P-loop** と **MHD** 配列モチーフにおける変異によって細胞死誘導が失われていたことから、これらのモチーフは **NLR** の機能に重要であることが証明された。また、**Pikp-1** と **Pikp-2** は **AVR-PikD** の非存在下において **in planta** でホモおよびヘテロ複合体を形成し、**AVR-PikD** との共発現ではエフェクターが **Pikp-1** と結合して三者間の複合体を形成した。

以上の結果から、**Pikp-1/Pikp-2** **NLR** ペアは抑制/活性化の負の制御機構ではなく、受容体が協調して **AVR-PikD** の認識によって活性化され、**in planta** でのシグナリングには **P-loop** と **MHD** 様配列を含む全長タンパク質が必要とされることが明らかとなった (**Zdrzalek et al., 2020**)。

「糸状菌エフェクター **AVR-Pik** の複数の変異体はイネタンパク質 **OsHIPP19** の **HMA** 領域と結合する」

植物病原微生物は、宿主組織を操作して感染を助長するエフェクタータンパク質を分泌する。一方、植物細胞内の **NLR** 受容体にエフェクターが認識された場合、免疫反応が誘導される。イネいもち病菌の **AVR-Pik** エフェクターは、イネの **NLR** 受容体ペア **Pikp-1** と **Pikp-2** によって認識される。**Pikp-1** には **HMA** 領域が含まれており、この **HMA** 領域によって **AVR-Pik** が認識され、植物の防御反応が誘導される。

本研究では、**AVR-Pik** の宿主標的因子として、**HMA** 領域を含むタンパク質 **Heavy-metal-associated Isoprenylated Plant Proteins (HIPPs)** と **Heavy-metal-associated Plant Proteins (HPPs)** が同定された。その中で **OsHIPP19** と名付けた **HIPP** は、**AVR-Pik** の 5 つのアリル (**A, C, D, E, F**) と相互作用することが明らかとなった。そこで、**AVR-Pik** と **OsHIPP19** の生化学的および構造基盤を解明し、**AVR-Pik** と **Pikp-HMA** の間の相互作用と比較した。大腸菌

で生産し、精製した組換えタンパク質についてゲル濾過解析と表面プラズモン共鳴を行った結果、**AVR-PikC** と **AVR-PikF** は **OsHIPP19** と結合するが、これらは現在同定されているすべての **Pik-1** アリルとは結合しないことが明らかとなった。以上の結果から、**Pikp1** の **HMA** 領域を操作することで、既報の **Pik-1** アリルには認識されない **AVR-Pik** アリルを認識可能な **Pik-1** を設計し、将来、多様な菌株に対して病害抵抗性を示すイネ品種を作出するための基礎的知見が得られた (**Maidment et al., 2021**)。

<引用文献>

Varden, F.A., Saitoh, H., Yoshino, K., Franceschetti, M., Kamoun, S., Terauchi, R., Banfield, M.J. Cross-reactivity of a rice NLR immune receptor to distinct effectors from the rice blast pathogen *Magnaporthe oryzae* provides partial disease resistance. Journal of biological chemistry, 294 巻、2019、13006-13016

Zdrzalek, R., Kamoun, S., Terauchi, R., Saitoh, H., Banfield, M.J. The rice NLR pair *Pikp-1/Pikp-2* initiates cell death through receptor cooperation rather than negative regulation. PLOS ONE, 15 巻、2020、e0238616

Maidment, J.H.R., Franceschetti, M., Maqbool, A., Saitoh, H., Jantasuriyarat, C., Kamoun, S., Terauchi, R., Banfield, M.J. Multiple variants of the fungal effector AVR-Pik. Journal of biological chemistry, 296 巻、2021、100371

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 7件/うちオープンアクセス 6件）

1. 著者名 Maidment J.H.R., Franceschetti M., Maqbool A., Saitoh H., Jantasuriyarat C., Kamoun S., Terauchi R., Banfield M.J.	4. 巻 296
2. 論文標題 Multiple variants of the fungal effector AVR-Pik bind the HMA domain of the rice protein OsHIPP19, providing a foundation to engineer plant defense	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 100371 ~ 100371
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.jbc.2021.100371	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
1. 著者名 Zdrzalek, R., Kamoun, S., Terauchi, R., Saitoh, H., Banfield, M.J.	4. 巻 15
2. 論文標題 The rice NLR pair Pikp-1/Pikp-2 initiates cell death through receptor cooperation rather than negative regulation.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 e0238616
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/ journal.pone.0238616	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
1. 著者名 Shimizu, M., Nakano, Y., Hirabuchi, A., Yoshino, K., Kobayashi, M., Yamamoto, K., Terauchi, R., Saitoh, H.	4. 巻 20
2. 論文標題 RNA-Seq of in planta-expressed Magnaporthe oryzae genes identifies MoSVP as a highly expressed gene required for pathogenicity at the initial stage of infection	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Molecular Plant Pathology	6. 最初と最後の頁 1682-1695
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/mpp.12869	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
1. 著者名 Varden, F.A., Saitoh, H., Yoshino, K., Franceschetti, M., Kamoun, S., Terauchi, R., Banfield, M.J.	4. 巻 294
2. 論文標題 Cross-reactivity of a rice NLR immune receptor to distinct effectors from the rice blast pathogen Magnaporthe oryzae provides partial disease resistance	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 13006-13016
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1074/jbc.RA119.007730	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

1. 著者名 Varden, F.A., Saitoh, H., Yoshino, K., Franceschetti, M., Kamoun, S., Terauchi, R., Banfield, M.J.	4. 巻 530675
2. 論文標題 Cross-reactivity of a rice NLR immune receptor to distinct effectors from the blast pathogen leads to partial disease resistance	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 bioRxiv	6. 最初と最後の頁 1-19
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1101/530675	査読の有無 無
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

1. 著者名 De la Concepcion, J.C., Franceschetti, M., Maqbool, A., Saitoh, H., Terauchi, R., Kamoun, S., Banfield, M.J.	4. 巻 4
2. 論文標題 Polymorphic residues in rice NLRs expand binding and response to effectors of the blast pathogen	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Nature Plants	6. 最初と最後の頁 576-585
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41477-018-0194-x	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 Bialas, A., Zess, E.K., De la Concepcion, J.C., Franceschetti, M., Pennington, H.G., Yoshida, K., Upson, J.L., Chanclud, E., Wu, C-H., Langner, T., Maqbool, A., Varden F.A., Derevnina, L., Belhaj, K., Fujisaki, K., Saitoh, H., Terauchi, R., Banfield, M.J., Kamoun, S.	4. 巻 31
2. 論文標題 Lessons in Effector and NLR Biology of Plant-Microbe Systems	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Molecular Plant-Microbe Interactions	6. 最初と最後の頁 34-45
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1094/MPMI-08-17-0196-FI	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3件 (うち招待講演 2件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 Hiromasa Saitoh
2. 発表標題 RNA-Seq of in planta-expressed Magnaporthe oryzae genes identifies MoSVP as a highly expressed gene required for pathogenicity at the initial stage of infection
3. 学会等名 The 6th International Conference on Agricultural and Biological Sciences (ABS 2020) (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 清水元樹、平淵亜紀子、小林光智衣、山本紘輔、寺内良平、齋藤宏昌
2. 発表標題 イネいもち病菌感染組織のRNA-seq解析によって同定された新奇病原性遺伝子MoSVP
3. 学会等名 令和2年度日本植物病理学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 齋藤宏昌
2. 発表標題 エフェクター分泌によるいもち病菌の感染および抵抗性誘導機構
3. 学会等名 第3回 植物病理を紡ぐ会（招待講演）
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Terauchi, R., Fujisaki, K., Shimizu, M., Oikawa, K., Takeda, T., Takagi, H., Abe, A., Okuyama, Y., Yoshida, K., Saitoh, H.	4. 発行年 2019年
2. 出版社 Academic Press	5. 総ページ数 355
3. 書名 Applied Plant Biotechnology for Improving Resistance to Biotic Stress	

〔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

英国	John Innes Centre	The Sainsbury Laboratory		
タイ	Kasetsart University			