

令和 5 年 6 月 12 日現在

機関番号：14301

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2021～2022

課題番号：21K20583

研究課題名（和文）病原菌エフェクターを認識する植物免疫受容体ネットワークの活性化動態の解析

研究課題名（英文）Subcellular dynamics of Plant NLR immune receptor networks during receptor activation

研究代表者

安達 広明 (Adachi, Hiroaki)

京都大学・農学研究科・特定助教

研究者番号：60909513

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,400,000 円

研究成果の概要（和文）：植物細胞には、細胞内の異なる場所にNLR免疫受容体があり、病原体分子を認識し免疫システムを活性化させる。近年、機能分化した複数のNLRが機能する受容体機構（NLRネットワーク）が見出されている。しかし、植物細胞内で複数のNLRが“いつ”、“どこで”機能し、免疫システムを駆動するかは未解明である。本研究では、ナス科植物のNLRネットワークに着目し、複数のNLRタンパク質の活性化前後の細胞内局在を調べた。本解析により、病原体認識に特化したセンサーNLR、免疫誘導に関わるヘルパーNLR、およびNLRネットワークの機能制御に関わるモジュレーターNLRの活性化前後における細胞内局在変化が明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、病原体認識前後のNLRの細胞内局在パターンとその変化を明らかにした。受容体ネットワークを構成する複数のNLRの時空間的細胞内ダイナミクスの解明は、植物のNLR免疫分子機構を理解することに繋がる。NLRが活性化すると細胞死を伴う免疫応答が誘導されるため、活性化後のNLRの細胞内局在を評価することは技術的に困難であるとされる。本研究では、NLRタンパク質の細胞内安定性を損なわずに細胞死誘導能を抑制したNLR変異体を活用した細胞内局在解析系を構築した。本解析手法は、幅広い植物種のNLRに対して適応可能であり、今後、様々な植物のNLR免疫機構を分子レベルで理解することに繋がると期待する。

研究成果の概要（英文）：Plant cells have NLR immune receptors in different subcellular compartments, and the receptors recognize pathogen effector molecules and activate the plant immune system. An emerging paradigm is that multiple functionally specialized NLRs function in NLR immune receptor networks. However, spatiotemporal information when and where multiple NLRs function together and trigger immune responses are largely unknown. In this study, I focused on Solanaceae NLR immune receptor networks and analyzed subcellular localization of functionally specialized sensor NLR, helper NLR and modulator NLR before and after receptor activation. This revealed that each NLR receptor localizes to different subcellular compartments before activation and some of the NLRs show subcellular translocation after activation.

研究分野：植物病理学

キーワード：植物免疫 免疫受容体 NLRタンパク質 エフェクター 細胞内局在

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

植物も動物と同じように病気になる。植物の病気は、ウイルス、細菌、糸状菌、線虫などの様々な病原体が植物の細胞・組織に感染し引き起こされる。これらの病原体は、植物細胞内に多種多様な病原性因子 (エフェクター) を分泌し、植物細胞のもつ生理機能を攪乱することで感染を成立させる。一方で、植物は、病原体の分泌するエフェクターに対抗するため、病原体から身を守る免疫システムを構築している。この免疫システムを駆動するためには、植物の免疫受容体による病原体認識が必要不可欠である。

病原体のエフェクターを認識する細胞内の免疫受容体 NLR タンパク質は、植物において最も多様化した遺伝子ファミリーである。植物の NLR は、エフェクター認識後、細胞に局所的なプログラム細胞死を誘導し、病原菌を感染細胞に封じ込めることで感染拡大を阻止する。近年、複数の NLR タンパク質が、複雑な受容体ネットワークを形成して機能することが分かってきた。このネットワークは、病原体認識に特化した“センサーNLR”と、免疫シグナルの誘導に関わる“ヘルパーNLR”によって構成される。しかし、植物細胞内で複数の NLR タンパク質が、いつ、“どこで”活性化し免疫応答を誘導するのかという、NLR ネットワークの時空間的な動態はほとんど明らかになっていなかった。

### 2. 研究の目的

本研究では、ナス科植物に広く保存された NLR ネットワークに着目し、活性化前後のセンサーNLR とヘルパーNLR の時空間的な細胞内動態を明らかにすることを目的とした。本研究では、エフェクター認識後にセンサーNLR とヘルパーNLR の細胞内局在がダイナミックに変化するという仮説を立てた。

### 3. 研究の方法

#### (1) 活性化前後の NLR タンパク質の細胞内局在解析系の構築

これまで、NLR が活性化すると細胞死を伴う免疫応答の誘導されるため、エフェクター認識後の NLR の細胞内局在の変化を解析することは難しかった。この問題点を解決するため、ナス科モデル植物であるベンサミアナタバコを実験対象に、内在性ヘルパーNLR である *NRC2*、*NRC3* および *NRC4* 遺伝子の多重変異体植物 (*nrc2 nrc3 nrc4* 植物) を活用することとした。さらに、タンパク質の細胞内安定性を損なわず細胞死誘導能を抑制したヘルパーNLR の変異体 (*NRC2*<sup>3E</sup> および *NRC4*<sup>L9E</sup> 変異体) を作製した。本研究では、*NRC2*<sup>3E</sup> および *NRC4*<sup>L9E</sup> 変異体を *nrc2 nrc3 nrc4* 植物に発現させ、細胞死を誘導することなく活性化後のセンサーNLR とヘルパーNLR の細胞内局在を同時に可視化できる独自の実験系を構築した。

#### (2) 受容体ネットワークを構成する NLR タンパク質の細胞内局在解析

活性化前の NLR タンパク質の細胞内局在を調べるため、Agroinfiltration 法により蛍光タンパク質を融合したセンサーNLR およびヘルパーNLR 変異体を *nrc2 nrc3 nrc4* 植物に発現させ、共焦点顕微鏡下で NLR タンパク質の細胞内局在を評価した。センサーNLR として、*potato virus X* を認識する Rx を使用した。ヘルパーNLR として、*NRC2*<sup>3E</sup> および *NRC4*<sup>L9E</sup> を使用した。当初の計画には含まれていなかったが、NLR 受容体ネットワークを負に制御する因子としてモジュレーターNLR の *NRCX* 遺伝子を新たに同定したため、*NRCX* の細胞内局在も評価した。

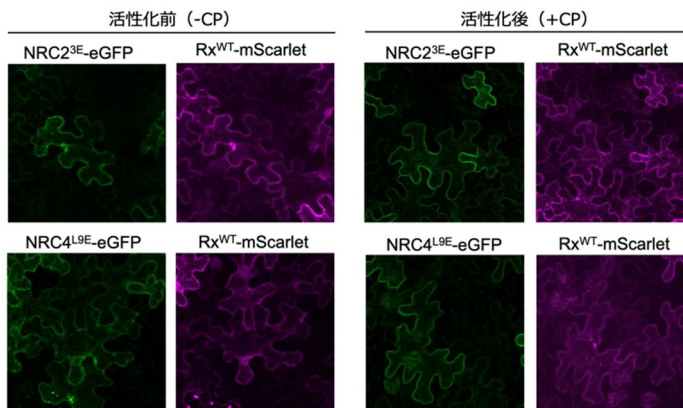
活性化後のそれぞれの NLR タンパク質の細胞内局在を調べるため、Rx が認識する *potato virus X* のコートタンパク質 (CP) を共発現させ、共焦点顕微鏡下で NLR タンパク質の細胞内局在を評価した。

### 4. 研究成果

#### (1) 活性化前後のセンサーNLR およびヘルパーNLR の細胞内局在

活性化前のセンサーNLR およびヘルパーNLR の細胞内局在を調べるため、*nrc2 nrc3 nrc4* 植物に *NRC2*<sup>3E</sup>-eGFP および *NRC4*<sup>L9E</sup>-eGFP を Rx-mScarlet と共発現させた。その結果、活性化前の条

件下で、センサー-NLR である Rx-mScarlet は、核および細胞質への細胞内局在を示した(図1)。一方で、ヘルパー-NLR である NRC2<sup>3E</sup>-eGFP および NRC4<sup>L9E</sup>-eGFP は、細胞質局在を示した。

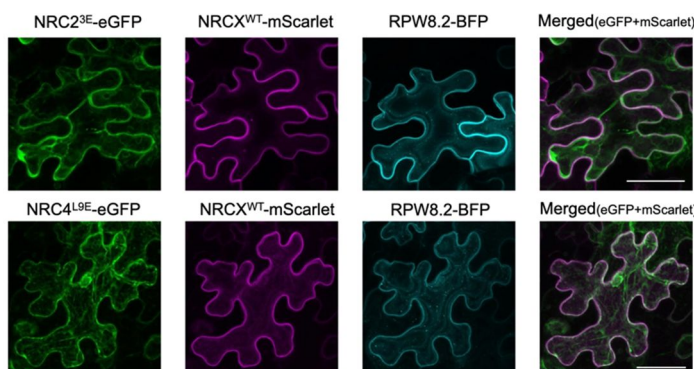


(図1) 活性化前後のNRC2、NRC4およびRxの細胞内局在

さらに、CP を共発現させることによりセンサー-NLR の Rx を活性化させると、Rx は主に細胞質局在を示し、核での蛍光はほとんど観察されなかった(図1)。ヘルパー-NLR である NRC2 および NRC4 は、細胞質局在はほとんど示さず、細胞膜と推定される局在パターンを示した。

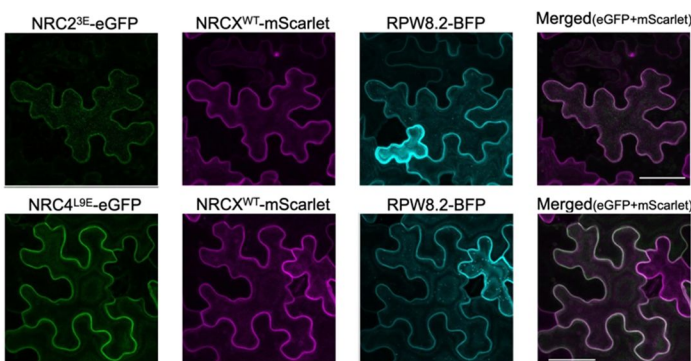
## (2) 活性化前後のヘルパー-NLR およびモジュレーター-NLR の細胞内局在

上記の項目1と同様に、*nrc2 nrc3 nrc4* 植物に NRC2<sup>3E</sup>-eGFP および NRC4<sup>L9E</sup>-eGFP を NRCX-mScarlet と共発現させた。その結果、ヘルパー-NLR である NRC2<sup>3E</sup>-eGFP および NRC4<sup>L9E</sup>-eGFP は細胞質局在を示した(図2)。一方で、モジュレーター-NLR である NRCX-mScarlet は、細胞膜マーカーである RPW8.2-BFP と重複した蛍光シグナルが観察され、NRCX が細胞膜に局在することが示された(図2)。



(図2) 活性化前のNRC2、NRC4およびNRCXの細胞内局在。

さらに、CP を共発現させることによりセンサー-NLR の Rx を活性化させると、NRC2<sup>3E</sup>-eGFP および NRC4<sup>L9E</sup>-eGFP は細胞質局在を示さず、細胞膜マーカーである RPW8.2-BFP と重複した細胞膜局在を示した。つまり、細胞質局在から細胞膜局在へと変化した(図3)。モジュレーター-NLR である NRCX は、NLR ネットワークの活性化前と変わらず、細胞膜局在が観察された(図3)。



(図3) 活性化後のNRC2、NRC4およびNRCXの細胞内局在

以上の結果から、センサー-NLR およびヘルパー-NLR は活性化前後で細胞内局在が変化すること、NLR ネットワークを負に制御するモジュレーター-NLR は活性化前後で細胞膜局在を示すことが明らかとなった。これらの結果は、複数の NLR タンパク質が機能する NLR ネットワークの分子機構を理解する上で重要な手がかりとなる。

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Adachi Hiroaki, Sakai Toshiyuki, Harant Adeline, Pai Hsuan, Honda Kodai, Toghani AmirAli, Claeys Jules, Duggan Cian, Bozkurt Tolga O., Wu Chih-hang, Kamoun Sophien	4. 巻 19
2. 論文標題 An atypical NLR protein modulates the NRC immune receptor network in Nicotiana benthamiana	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 PLOS Genetics	6. 最初と最後の頁 e1010500
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pgen.1010500	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1件（うち招待講演 1件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Hiroaki Adachi
2. 発表標題 An atypical NLR protein modulates the NLR network in Nicotiana benthamiana
3. 学会等名 12th Japan-US Seminar in Plant Pathology（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 安達広明、大津美奈、堺俊之	4. 発行年 2022年
2. 出版社 ニュー・サイエンス社	5. 総ページ数 6
3. 書名 月間「細胞」2022年5月号 植物の持つしなやかな環境適応戦略	

〔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
---------	---------