

令和 5 年 6 月 30 日現在

機関番号：81202

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2021～2022

課題番号：21K20586

研究課題名（和文）イネいもち病抵抗性タンパク質の有する病原菌エフェクター認識部位の機能解析

研究課題名（英文）Functional analysis of pathogen effector recognition site of rice blast resistant protein

研究代表者

宮路 直実（Miyaji, Naomi）

公益財団法人岩手生物工学研究センター・ゲノム育種研究部・研究員

研究者番号：60908383

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）：本研究は抵抗性タンパク質が持つ付加ドメインの機能解明を目標に、イネいもち病抵抗性タンパク質といもち病菌エフェクターの関係に着目した。抵抗性タンパク質とエフェクターの相互作用解析により、エフェクター認識に重要だと予想される抵抗性タンパク質の領域を明らかにした。また、遺伝子発現解析と活性酸素種生産量の測定法を用いてエフェクターのイネ免疫応答への作用を調べたところ、いもち病菌エフェクターがイネ免疫応答を抑制することを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、エフェクターの認識には抵抗性タンパク質の複数の領域が重要である可能性が示唆された。また、本研究で着目したいもち病菌エフェクターがイネの免疫応答を抑制する機能を持つことが示された。イネといもち病菌の相互作用メカニズムは未解明な部分が多い。本研究で得られた成果は、宿主と病原菌の相互作用メカニズムを今後解明する上で重要な知見となる。

研究成果の概要（英文）：This work aims to elucidate the function of the integrated domain of the resistance protein. I focused on the relationship between the rice blast resistance protein and the rice blast effector. Analysis of the interaction between the resistance protein and the effector identified the region of the resistance protein expected to be important for effector recognition. I also investigated the effect of the effector on the rice immune response using gene expression analysis and reactive oxygen species (ROS) production measuring method, and found that the rice blast effector suppressed the rice immune response.

研究分野：遺伝育種科学

キーワード：抵抗性遺伝子 Integrated Domain エフェクター イネ いもち病

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

イネといもち病菌は多様な分子を介して攻防を繰り返している。イネはいもち病菌の構成成分などを細胞膜にあるパターン認識受容体で認識し、パターン誘導免疫 (PTI) を誘導する。一方でいもち病菌はイネ細胞内にエフェクターを分泌し PTI を抑制する。PTI の抑制に対応し、イネは NB-LRR (Nucleotide-binding Leucine-rich repeat) を持つ NLR 型タンパク質のような抵抗性タンパク質でエフェクターを認識し、エフェクター誘導免疫 (ETI) を誘導する。

本研究で着目するイネいもち病抵抗性遺伝子 *Pias* は、*Pias-1* と *Pias-2* の 2 個の NLR で構成されるペア NLR 型抵抗性遺伝子である (参考文献 1)。*Pias* はいもち病菌エフェクター AVR-*Pias* を認識し、ETI を誘導する。*Pias-2* はエフェクターを認識する「センサー-NLR」として、*Pias-1* は抵抗性誘導の実行因子である「ヘルパー-NLR」として機能する。*Pias-2* は NLR の他に、付加ドメイン (ID; integrated domain) として DUF761 を持つ。ID は、進化過程でエフェクター認識性の他の宿主タンパク質から獲得したと考えられていることから、*Pias-2* の ID である DUF761 はエフェクターの認識に関わると予想される。

*Pias-2* 対立遺伝子の ID はイネ属の種や系統により異なる (参考文献 1)。最も近年に出現した A ゲノム種に属する系統のみが、ID として DUF761 (Domain of unknown function 761) を持つことが明らかにされている。ゆえに A ゲノム種の出現以前において、DUF761 を *Pias-2* の ID として獲得したことが病害抵抗性において重要であった可能性が予想された。しかし DUF761 は機能未知のドメインであり、A ゲノム種の *Pias-2* 対立遺伝子のみが DUF761 を持つことの進化的・機能的意義は明らかにされていない。

### 2. 研究の目的

*Pias-2* の ID (DUF761) の機能解明を目標に、以下の疑問を明らかにすることを目的とした。

- ① *Pias-2* と AVR-*Pias* は相互作用するのか？  
*Pias-2* の ID はエフェクター認識に関わると予想されるが、*Pias-2* と AVR-*Pias* の相互作用は不明である。*Pias* による AVR-*Pias* 認識機構を明らかにしたい。
- ② AVR-*Pias* は PTI を抑制するのか？ AVR-*Pias* 相互作用因子は？  
エフェクターは宿主の PTI を抑制すると考えられているが、AVR-*Pias* に PTI 抑制機能があるかは明らかにされていない。PTI 抑制機能があるならば、AVR-*Pias* の相互作用因子とその機能を明らかにすることで、イネの PTI 分子機構の解明に繋げたい。

### 3. 研究の方法

- ① *Pias-2* と AVR-*Pias* は相互作用するのか？  
*Pias-2* の各ドメインと AVR-*Pias* の相互作用を Yeast two hybrid (Y2H) 法で検証した。また、*Pias* に認識されない AVR-*Pias* アリルを同定するため、各種アリルをいもち病菌に形質転換した。形質転換いもち病菌株を *Pias* 保有イネ系統に接種することで、*Pias* によって認識されるかを検証した。同定した *Pias* に認識されない AVR-*Pias* アリルを用いて、*Pias-2* との相互作用を検証した。
- ② AVR-*Pias* は PTI を抑制するのか？ AVR-*Pias* 相互作用因子は？  
アフィニティータグを付加しても *Pias* に認識される構造を持つ AVR-*Pias* を同定するため、アフィニティータグ付加型 AVR-*Pias* をいもち病菌に形質転換した。形質転換いもち病菌株を *Pias* 保有イネ系統に接種することで、*Pias* によって認識され抵抗性が誘導されるかを検証した。次にアフィニティータグ付加型 AVR-*Pias* を *Pias* 非保有イネ系統に形質転換した培養細胞を作出した。AVR-*Pias* の PTI への作用を明らかにするため、培養細胞にエリクターを処理し、処理に伴う免疫応答遺伝子の発現変化と ROS 生産変化を測定した。

### 4. 研究成果

- ① *Pias-2* と AVR-*Pias* は相互作用するのか？  
*Pias-2* は CC (Coiled-coil)、NB、LRR、ID (=DUF761) を持つ NLR である。*Pias-2* の各ドメインと AVR-*Pias* の相互作用を Y2H 法で検証したところ、*Pias-2* の CC と ID が AVR-*Pias* と相互作用する可能性が示された。  
AVR-*Pias* のアリルである AVR-*Pias*-D は、AVR-*Pias* アミノ酸配列との相同性が 72.2% のタンパク質である。AVR-*Pias*-D を形質転換したいもち病菌株を *Pias* 保有イネ系統に接種したところ、抵抗性は誘導されず感染が成立した。ゆえに AVR-*Pias*-D は *Pias* に認識されないアリル

であると考えられた。AVR-Pias-D と Pias-2 の各ドメインとの相互作用を Y2H 法で検証したところ、Pias-2 の ID とは相互作用した一方で、Pias-2 の CC との相互作用は確認されなかった。ゆえに、Pias-2 による AVR-Pias 認識には Pias-2 の CC と ID の両方が必要である可能性が示唆された。

② AVR-Pias は PTI を抑制するのか？ AVR-Pias 相互作用因子は？

AVR-Pias に FLAG タグを付加し、AVR-Pias 非保有いもち病菌株に形質転換した。Pias 保有イネ系統に形質転換いもち病菌株を接種したところ抵抗性が誘導されたことから、AVR-Pias-FLAG は Pias に認識されることが示された (図 1)。

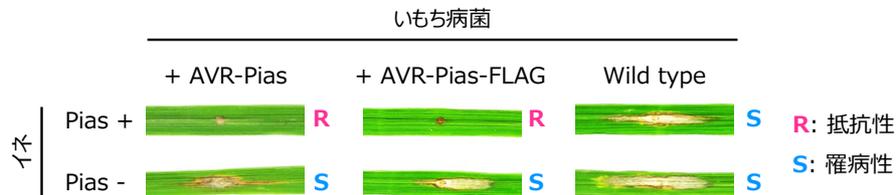


図1 AVR-Pias-FLAGはPiasによって認識される

次に、AVR-Pias-FLAG を Pias 非保有イネ系統に形質転換した培養細胞を作出し、AVR-Pias-FLAG タンパク質が正常に蓄積していることを確認した。野生型培養細胞と AVR-Pias-FLAG 発現培養細胞をエリシターで処理し、処理に伴う免疫応答関連遺伝子 (*Pathogenesis-related protein 10*; *PR10*, *Phenylalanine ammonia-lyase 1*; *PAL1*) の発現変化を qRT-PCR で調べた (図 2a)。AVR-Pias-FLAG 発現培養細胞では、処理時における *PR10* と *PAL1* の発現量が野生型培養細胞と比較して有意に低かった。また、エリシター処理に伴う ROS 生産量の変化を調べたところ、同様の結果が得られた (図 2b)。以上より、AVR-Pias はエリシター処理によって誘導される PTI を抑制することが示唆された。

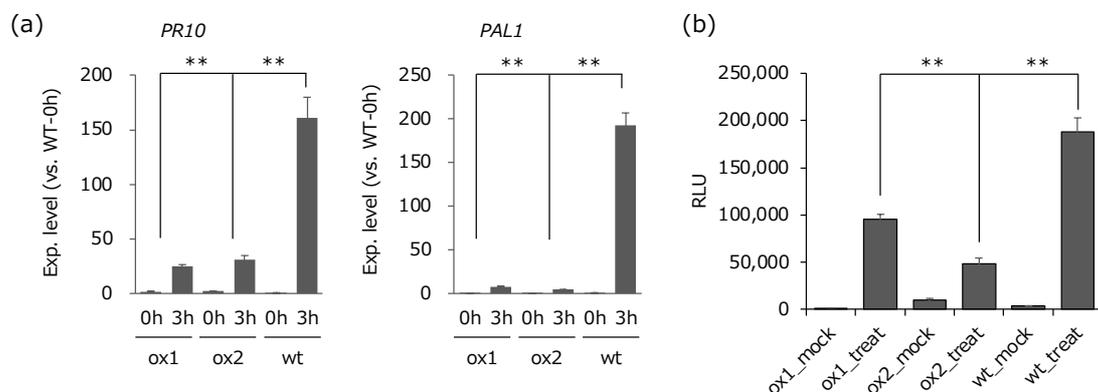


図2 AVR-Pias-FLAGはイネの基礎的免疫応答を抑制する

(a) エリシター処理前 (0h) と処理後3時間 (3h) の *PR10* と *PAL1* の発現量。(b) エリシター処理後180分における ROS 生産量。ox1, ox2; AVR-Pias-FLAG 過剰発現、wt; 野生型。\*;  $p < 0.01$

AVR-Pias が相互作用するイネ PTI 関連因子を同定するため、Co-IP-MS 法を実施したところ、複数の AVR-Pias 相互作用因子候補が得られた。候補因子と AVR-Pias の相互作用を Y2H 法と *Nicotiana benthamiana* 葉における *Agrobacterium* を用いた一過的発現系を利用して検証したが、AVR-Pias と結合する因子の同定には至らなかった。実験条件の再検討が必要であると考えられたことから、現在、条件検討を実施している。

参考文献

1. M. Shimizu *et al.* A genetically linked pair of NLR immune receptors shows contrasting patterns of evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 119, e2116896119 (2022)

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Akter Mst. Arjina, Mehraj Hasan, Miyaji Naomi, Takahashi Satoshi, Takasaki-Yasuda Takeshi, Seki Motoaki, Dennis Elizabeth S., Fujimoto Ryo, Osabe Kenji	4. 巻 8
2. 論文標題 Transcriptional Association between mRNAs and Their Paired Natural Antisense Transcripts Following Fusarium oxysporum Inoculation in Brassica rapa L.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Horticulturae	6. 最初と最後の頁 17
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/horticulturae8010017	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 Tirnaz Soodeh, Miyaji Naomi, Takuno Shohei, Bayer Philipp E., Shimizu Motoki, Akter Mst. Arjina, Edwards David, Batley Jacqueline, Fujimoto Ryo	4. 巻 13
2. 論文標題 Whole-Genome DNA Methylation Analysis in Brassica rapa subsp. perviridis in Response to Albugo candida Infection	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Plant Science	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/fpls.2022.849358	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

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------	---------