

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 6 月 19 日現在

機関番号：81202

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26850029

研究課題名(和文) Pii依存的真性抵抗性をモデルとした、イネの病原菌認識機構と耐病性発現機構の解明

研究課題名(英文) Pii-dependent resistance, as a model to elucidate molecular mechanism of effector-triggered immunity and pathogen recognition.

研究代表者

藤崎 恒喜 (Fujisaki, Koki)

公益財団法人岩手生物工学研究センター・園芸資源研究部・主任研究員

研究者番号：30626510

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：植物の免疫レセプターには病原体因子と直接結合する外来の挿入ドメイン(ID)を進化的に獲得することで、病原体を認識し、宿主植物に耐病性を誘導する機能を持つものが知られ、IDは宿主-病原体間相互作用を理解する上で重要な情報として近年注目されている。本研究ではイネの免疫レセプター、Piiの解析を通じ、PiiのIDが病原体因子との結合ではなく、病原体因子が作用する宿主因子の監視に重要な役割を果たす可能性を示した。これはID機能の推測範囲を広げる結果であり、IDの配列情報から、宿主-病原体因子間ネットワークを予測する国際的な試みに大きな波及効果を与えるものである。

研究成果の概要(英文)：Currently, it has been known that plant NLR type immune receptors have integrated domains (IDs) derived from other host proteins. Some reports showed that IDs bind to pathogen effectors and enable NLRs to recognize pathogen effectors, directly. Therefore, IDs are regarded as important information to understand host-pathogen interactions. In this study, we found the ID of rice NLR, Pii, and showed that the Pii-ID did not contribute to direct binding to cognate fungal effector, AVR-Pii. On the other hand, Pii-ID had crucial roles in the interaction with OsExo70-F3, an AVR-Pii-interactor required for Pii-dependent resistance, and in the recognition of AVR-Pii. These results indicate that Pii-ID may function by detecting host accessory protein targeted by pathogen effectors. This finding is different from the known ID function as pathogen effector-interacting domain, and may expand speculated functions of NLR-ID.

研究分野：植物病理

キーワード：ETI Exo70 Pii イネ いもち病菌 Integrated domain

### 1. 研究開始当初の背景

(1) 病原菌に対する植物の真性抵抗性は、一般的には植物の NLR 型抵抗性タンパク質が病原菌の非病原性因子 (AVR) を直接的もしくは間接的に認識して誘起される。このうち間接的認識機構は、イネをはじめとする単子葉植物ではよく知られておらず、認識に介在する宿主因子の報告もない。

(2) 申請者らはイネの NLR 型抵抗性タンパク質 Pii とそれに認識されるイネいもち病菌の非病原性因子 AVR-Pii を解析し、Pii と AVR-Pii は直接相互作用しないが、AVR-Pii はイネの OsExo70-F2/F3 と相互作用し、OsExo70-F2/F3 はこの Pii 依存的抵抗性に特異的かつ必須の役割を果たすことを示した。これらの結果は Pii が OsExo70-F2/F3 を介して、間接的に AVR-Pii を認識する可能性を示している。

### 2. 研究の目的

(1) 本研究では、ユニークな AVR 認識機構が期待される Pii 依存的抵抗性を単子葉植物でのモデルとし、抵抗性関連因子の同定とそれらの相互作用解析を通じ、植物の病原体認識機構、抵抗性発現機構の未知の側面を解明することを目指す。

### 3. 研究の方法

(1) イネのノックアウト及びノックダウン株を作出することで OsExo70-F2 もしくは OsExo70-F3 のどちらが Pii 依存的抵抗性に主要な役割を果たしているのかを明らかにする。

(2) Pii、AVR-Pii、OsExo70-F2/F3 の 3 者間相互作用を酵母ツーハイブリッド法 (Y2H) や共免疫沈降法 (co-IP) などを用いて検討する。加えて、AVR-Pii の存在が OsExo70-F2/F3 の局在、修飾等の性状に変化をもたらすのかどうか調査し、変化が見いだされた時は 3 者間相互作用への影響も調査する。同時にその逆の作用である、OsExo70-F2/F3 の存在が AVR-Pii に及ぼす影響も調べる。

(3) Pii、OsExo70-F2/F3 と相互作用する宿主因子を探索し、Pii 依存的抵抗性への関与を調べる他、Pii を持つイネ品種「ひとめぼれ」の EMS 変異体集団から抵抗性に関連する因子の順遺伝学的同定を試みる。これらにより、Pii による AVR-Pii 認識に関わる因子の同定を目指す。

### 4. 研究成果

(1) イネのノックダウン株を用いた解析から、特に OsExo70-F3 が Pii 依存的抵抗性に主要な役割を果たしていると考えられた。

(2) Pii を持つイネ品種「ひとめぼれ」の EMS

変異体集団から Pii 依存的抵抗性が変化した変異体をスクリーニングにより単離し、順遺伝学的解析を行った。原因遺伝子として同定されたものは lesion mimic を引き起こす P450 遺伝子と 2 つの Pii 遺伝子 (Pii-1 と Pii-2) であり、Pii が隣接する 2 つ paired NLR 遺伝子により構成されていることが、遺伝学的に証明された。

(3) Pii および OsExo70-F3 と相互作用するイネ因子を co-IP や Y2H で探索した。Pii-1/Pii-2 の様々な領域を用いた探索からは、OSK1 等のキナーゼを含む因子が、OsExo70-F3 を用いた探索からは Syntaxin 等の小胞輸送系に関わる因子を含むインタラクターが見出され、Pii および OsExo70-F3 共通の相互作用因子として Inositol phosphatase が同定された。次に、それらを発現抑制し、Pii 依存的抵抗性への影響を調べたが、抵抗性への明瞭な関与は認められなかった。

(4) Exo70 は他の因子とともに exocyst complex を形成し、細胞の小胞輸送を制御することが知られている。そこで、OsExo70-F3 がイネの exocyst complex の構成メンバーと相互作用するかを調べたところ、Y2H で SEC8 や SEC15 との相互作用が認められ、exocyst complex を形成しうると考えられた。次に、それら exocyst complex の構成メンバーの発現抑制を試みた。多くのものは発現抑制が困難で致死遺伝子と考えられたが、いくつかのメンバーでは発現抑制に成功した。しかし、Pii 依存的抵抗性への影響は認められず、OsExo70-F3 が exocyst complex の機能を介して Pii 依存的抵抗性に関与するという証拠は得られていない。

(5) 遺伝学的に抵抗性への関与が示されている Pii、AVR-Pii、OsExo70-F3 に関してその相互作用の詳細について解析を行った。AVR-Pii は Pii との直接的な相互作用は認められないが、OsExo70-F3 と相互作用することは以前に示している。本研究ではまず、AVR-Pii に様々な変異を加え、OsExo70-F3 との相互作用を調べたところ、いくつかの変異で相互作用が阻害され、それらの変異体はいずれも Pii 依存的抵抗性の誘導能を失っていた。これは抵抗性誘導における AVR-Pii と OsExo70-F3 間相互作用の重要性を支持する結果である。

(6) AVR-Pii と OsExo70-F3 間相互作用がそれぞれの性状に与える影響について検討を行った。性状解析の結果、両タンパク質はそれぞれ 2~3 量体を形成していると考えられたが、AVR-Pii-OsExo70-F3 間相互作用はこの多量体形成に影響しなかった。この他、タンパク質の切断/修飾の有無の電気泳動レベルでの評価や可溶性画分/生体膜画分への分画パターンについて、AVR-Pii-OsExo70-F3

間相互作用の影響を調べたが、相互作用による性状変化を捉える結果を得るにはいたっていない。

(7) AVR-Pii と Pii との直接的相互作用は検出できない。そこで本研究では OsExo70-F3 と Pii (Pii-1 と Pii-2) との相互作用について解析した。Y2H の結果、OsExo70-F3 は Pii-2 の C 末端領域と相互作用することが示された。この領域には NOI ドメインのコアモチーフ (PxFGxW) が存在することが分かった (Fig.1)。これはシロイヌナズナの抵抗性制御因子である RIN4 タンパク質に保存され、AvrRpt2 cleavage site として知られるモチーフである。近年、植物の NLR 型免疫レセプターは外来因子に由来する配列をイレギュラーに持つことが知られ、Integrated domain (ID) と呼ばれている。近年の解析ではこの ID が病原体の因子と直接結合し、NLR の病原体認識に中核的な役割を果たすことが知られているが、Pii においてはこの PxFGxW モチーフが ID に相当すると考えられる。

NOI core	:	PxFGxW
AtRIN4-N	:	-----NVPKFGNWEAEENVPTAYFDKA
AtRIN4-C	:	PEKVTIVPKFGDWDENNPPSADGYTHIF
		*** ** *
Pii-2	:	EDEL <del>MV</del> VPPFG <del>EW</del> DHSPTLRKSDFR
Pii-2-CSm		AA AA A
Pii-2-CS-VA		A
Pii-2-CS-PA		A
Pii-2-CS-FA		A
Pii-2-CS-GA		A
Pii-2-CS-WA		A

Fig.1 Pii-2のID (NOI core motif)への変異導入

(8) Pii-2 に認められる NOI ドメインのコアモチーフに変異を導入したところ (Fig.1)、OsExo70-F3 との相互作用が阻害されることが分かった (Fig.2)。さらに、前述の「ひとめぼれ」EMS 変異体集

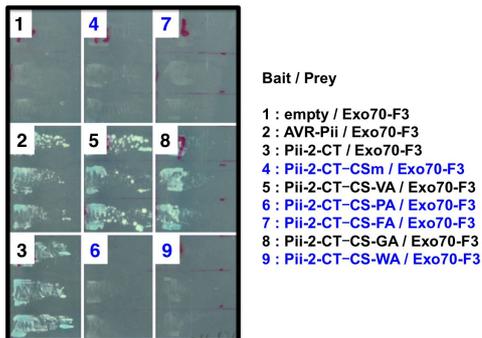


Fig.2 Pii-2のID (NOI core motif)への変異のOsExo70-F3相互作用への影響

団より得られた Pii-2 のノックアウトラインにおいて、NOI ドメインのコアモチーフに変異を導入した変異 Pii-2 遺伝子を発現させたところ、野生型の Pii-2 の発現の場合とは異なり、Pii-2 ノックアウトラインの形質が相補されず、抵抗性は回復しなかった (Fig.3)。これはコアモチーフへの変異によって Pii-2 遺伝子の機能が失われたと考えられた。

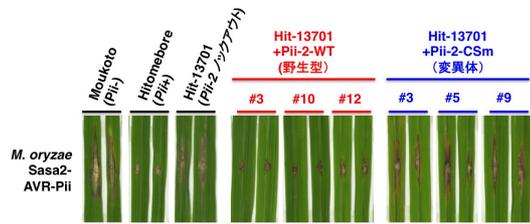


Fig.3 Pii-2のID (NOI core motif)への変異はPii-2の機能を破壊する

(9) PxFGxW モチーフは Pii 以外の様々なイネのタンパク質にも認められる。イネにおいても同モチーフを持つタンパク質として RIN4 様タンパク質のほか、RIN4 とは大きく構造が異なるタンパク質が複数見出された。Y2H の結果、OsExo70-F3 はイネ RIN4 様タンパク質と特異的に結合することが分かった。

以上の結果は Pii が RIN4 に由来すると思われる PxFGxW モチーフを ID として持つこと、それが Pii の OsExo70-F3 との相互作用、および AVR-Pii 認識に重要な役割を果たすことを示している。これは NLR 型免疫レセプターが ID を介して、病原体因子のみならず、OsExo70-F3 の様な宿主因子の監視にも寄与するという、新規の認識機構の可能性を示すものである。

## 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 3 件)

Terauchi, R., Kanzaki, H., Fujisaki, K., Takagi, H., Abe, A., Yoshida, K., Okuyama, Y., Tamiru, M and Saitoh, H. (2016) Whole genome sequencing approached to understand Magnaporthe-*rice* interactions. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 95: 4-7 (査読有) DOI: 10.1016/j.pmpp.2016.03.007

斎藤宏昌・神崎洋之・藤崎恒喜・高木宏樹・吉田健太郎・寺内良平「イネいもち病抵抗性NLR免疫受容体によるエフェクターの認識と抵抗性誘導機構」(2016) *日植病報* DOI: 10.3186/jjphytopath.82.296

Fujisaki, K., Abe, Y., Ito, A., Saitoh,

H., Yoshida, K., Kanzaki H., Kanzaki, E., Utsushi, H., Yamashita, T., Kamoun, S. and Terauchi, R. Rice Exo70 interacts with a fungal effector, AVR-Pii and is required for AVR-Pii-triggered immunity. (2015) *Plant J.* 83, 875-887. DOI: 10.1111/tpj.12934

〔学会発表〕(計 3 件)

藤崎恒喜・阿部善子・神崎英子・神崎洋之・齋藤宏昌・寺内良平「イネいもち病抵抗性NLR免疫受容体Pii-2に存在するNOI/RIN4 ドメインは Pii 依存的抵抗性に必要な OsExo70-F3 と結合する」平成 29 年度日本植物病理学会 2017 年 4 月 26 日「盛岡アイーナ(岩手・盛岡)」

Koki Fujisaki, Yoshiko Abe, Hiromasa Saitoh, Hiroyuki Kanzaki, Hiroki Takagi, Eiko Kanzaki, Aiko Uemura, Sophien Kamoun and Ryohei Terauchi 「The NOI/RIN4 integrated domain of the rice NLR Pii-2 binds to OsExo70-F3, an accessory protein required for Pii-dependent resistance. 」 International congress of Molecular Plant-Microbe Interaction, 2016 年 8 月 3 日「Portland (USA)」

藤崎恒喜・吉田健太郎・阿部善子・神崎洋之・齋藤宏昌・寺内良平「イネいもち病菌の非病原性因子 AVR-Pii の亜鉛結合モチーフは AVR-Pii の安定な機能的構造形成に必須の役割を果たす」平成 28 年度日本植物病理学会 2016 年 3 月 22 日「岡山コンベンションセンター」(岡山・岡山)

〔図書〕(計 1 件)

齋藤宏昌・神崎洋之・藤崎恒喜・阿部陽・高木宏樹・寺内良平 2015 (平成 27 年) 感染生理談話会論文集 感染と防御をめぐる新潮流「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」日本植物病理学会 50, 41-46, ISSN 1345-8086 No.50

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

特になし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤崎 恒喜 (FUJISAKI, Koki)  
公益財団法人 岩手生物工学研究センター  
園芸資源研究部 主任研究員  
研究者番号：30626510

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：

(4) 研究協力者

( )