

令和元年 7 月 30 日

海外特別研究員最終報告書

独立行政法人 日本学術振興会 理事長 殿

採用年度 平成 29 年度

受付番号 551

氏 名 安達 広明

(氏名は必ず自署すること)

海外特別研究員としての派遣期間を終了しましたので、下記のとおり報告いたします。

なお、下記及び別紙記載の内容については相違ありません。

記

1. 用務地（派遣先国名）用務地： セインズベリー研究所 （国名： 英 国 ）

2. 研究課題名（和文）※研究課題名は申請時のものと変わらないように記載すること。

病原菌エフェクターを認識する NLR タンパク質ネットワークの分子機構の解明3. 派遣期間：平成 29 年 7 月 1 日 ～ 令和 元年 6 月 30 日

4. 受入機関名及び部局名

The Sainsbury Laboratory, Sophien Kamoun group5. 所期の目的の遂行状況及び成果…書式任意 **書式任意 (A4 判相当 3 ページ以上、英語で記入も可)**

(研究・調査実施状況及びその成果の発表・関係学会への参加状況等)

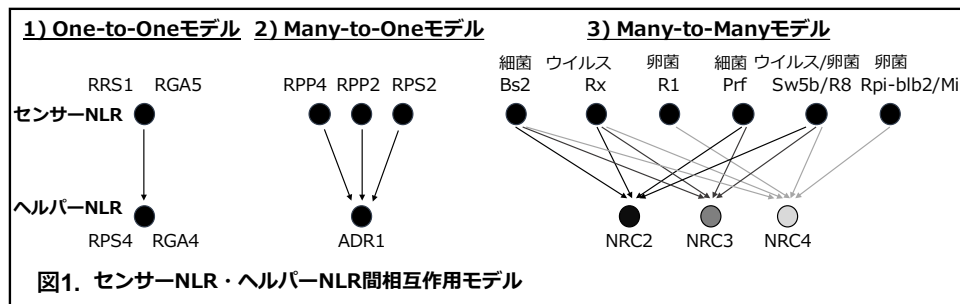
(注)「6. 研究発表」以降については様式 10-別紙 1~4 に記入の上、併せて提出すること。

研究実施状況

(研究目的)

植物は、病原菌の感染から身を守るため、2つの病原菌認識システムを発達させている。1つは、細胞膜受容体が病原菌の基本的な分子パターンを認識する場合であり、pattern-triggered immunity (PTI) と総称される免疫応答を誘導する。しかし、植物病原菌は進化の過程で多種多様なエフェクター分子を獲得し、PTI を誘導するシグナル伝達機構を抑制することで感染を成立させてきた。一方で、植物は病原菌エフェクターを認識する細胞内受容体を獲得し、effector-triggered immunity (ETI) と総称される免疫応答を誘導することを可能にしている。ETI は、過敏反応 (HR) 細胞死を伴うことが知られており、PTI と比較してより強固な応答である。しかしながら、それら細胞内受容体の活性制御ならびに下流シグナル伝達機構は、ほとんど明らかになっていない。

NLR (Nucleotide binding-leucine rich repeat) タンパク質は、動物から植物まで広く保存された細胞内免疫受容体ファミリーである。これまでの報告から、植物の個々の NLR タンパク質は、病原菌エフェクターを直接または間接的に認識し、HR 細胞死を伴う ETI を誘導することで病害抵抗性を付与すると考えられてきた。しかし、近年、機能を特化させた幾つかの NLR タンパク質がペアとして機能することが報告された。NLR ペアは、2つの NLR から構成され (図 1, One-to-One モデル)、1つの NLR がエフェクターを認識し、もう一方の NLR は HR と病害抵抗性の誘導に寄与する。これらの報告は、植物が進化の過程で“センサー”と“ヘルパー”のそれぞれ機能を特化させた NLR タンパク質を獲得したことを示している。それら NLR タンパク質間の詳細な相互作用機構は、現在多くの研究グループによって解析が進められており、センサー-NLR とヘルパー-NLR が1つの受容体複合体として機能することが報告されている (図 1, One-to-One モデル)。また、シロイヌナズナにおける遺伝学的解析により、1つのヘルパー-NLR が複数のセンサー-NLR のシグナル拠点となる Many-to-One モデルが提唱されている (図 1)。



最近になって、受け入れ研究者である Sophien Kamoun 博士のグループは、ナス科植物の中で3つのヘルパー NLR (NRC2, NRC3, NRC4) を遺伝学的

に同定し、複数のセンサー-NLR の機能が、1 つまたは複数のヘルパー-NLR に依存することを見出した (図 1, Many-to-Many モデル)。NRC2, NRC3, NRC4 は、ナス科植物の NLR タンパク質の約 3 分の 1 にあたる巨大なクレードに属しており、NRC に依存するセンサー-NLR も全て同クレード内に属している。NRC 依存的なセンサー-NLR は、細菌、卵菌、ウイルスを含む多様な植物病原菌への病害抵抗性に関与し、農業上重要な抵抗性遺伝子として報告されている。したがって、ヘルパー-NLR である NRC2, NRC3, NRC4 は、ナス科植物が広範な病原菌に対して抵抗性を発揮する上で重要な役割を担っていると考えられる。NRC2, NRC3, NRC4 は各センサー-NLR に対して異なる特異性と重複性を示し、ナス科植物では複雑な NLR ネットワークが形成されていると予想される。しかしながら、NLR ネットワークの免疫応答誘導機構や、その制御機構は分かっていない。本研究では、新たな概念“Many-to-Many モデル”において、NLR ネットワークの免疫応答誘導機構と制御機構を分子レベルで解明することを目的とした。

(研究内容および進捗状況)

1. Mu トランスポゾンを利用したランダムトランケーション系の確立

植物の NLR タンパク質は、N 末端領域に coiled-coil (CC) または TOLL/interleukin-1 receptor (TIR) ドメインをもつことが知られる。これまで、NLR タンパク質のドメイントランケーション解析が行われ、CC および TIR ドメインは免疫応答の誘導に重要であると示されてきた。しかしながら、CC および TIR のドメインの境界が 1 アミノ酸異なるだけで、免疫応答を誘導する機能が失われることが報告されており、NLR タンパク質の N 末端ドメインに焦点を当てた解析には、適切なドメイン予測と数多くのドメイントランケーションが必要とされてきた。

生物のもつトランスポゾンは、トランスポゼースによってゲノム中やプラスミド中にランダムに組み込まれる。本研究では、Mu トランスポゾンのオリジナル塩基配列に対し終止コドンをつけた人工トランスポゾン (STOP トランスポゾン) を作製した。STOP トランスポゾンは、*in vitro* トランスポゼース反応により標的プラスミドに組み込まれ、タンパク質のコーディング領域内にランダムに終止コドンを挿入することができる。STOP トランスポゾン反応とアグロバクテリウムを用いた一過的発現系を組み合わせ、transposon-based C-terminal random truncation system を構築した。このシステムは、クローニングの作業を介さずに標的遺伝子のトランケーションライブラリを作製し、ナス科モデル植物であるベンサミアナタバコで機能を解析する非常にハイスループットなタンパク質ドメインの機能解析系である。

2. ランダムトランケーション系を用いた NRC4 の機能解析

ヘルパー-NLR である NRC4 は、N 末端に CC ドメインをもつ NLR タンパク質であり、ベンサミアナタバコ葉で HR 細胞死を誘導する。どのように NRC4 が免疫応答を誘導するか調べる目的で、上記 1. にて構築したランダムトランケーション系を用い、NRC4 のトランケーションライブラリを作製した。65 種類のトランケートタンパク質をベンサミアナタバコ葉に一過的に発現させたところ、N 末端の 1-29 アミノ酸領域が細胞死誘導活性を有することが分かった。1-29 アミノ酸は CC ドメインの一部であり、これまでに報告された細胞死誘導活性を有する最小の CC ドメイン配列と比較し、はるかに短いアミノ酸配列であった。この結果は、本研究で構築したランダムトランケーション系が、ドメイン機能を決定する最小配列の同定に有効な手法であることを示している。

3. CC ドメインに保存された細胞死誘導モチーフの同定

NRC4 の 1-29 アミノ酸領域内に免疫応答の誘導に重要なモチーフが存在するか調べるため、ベンサミアナタバコ、トマト、テンサイ、シロイヌナズナ、イネおよびオオムギのゲノムから

抽出した 988 の NLR タンパク質データセットに対し、Markov cluster algorithm と Multiple EM for Motif Elicitation (MEME) によるクラスター解析、コンセンサスモチーフ予測を行なった。その結果、NRC4 の 1-29 アミノ酸領域内に、21 アミノ酸の保存されたモチーフ (MADAxVSFxVxKLxxLLxxEx) が存在し、本研究では MADA モチーフと名付けた。

MEME により得られた 87 の NLR タンパク質に由来するアミノ酸配列を基に、MADA モチーフの Hidden Markov Model (HMM) を構築した。この HMM は HMMER 解析に用いることができ、NLR タンパク質内の MADA モチーフの有無を *in silico* で予測することができる。MADA-HMM を用いた HMMER 解析により、約 20% の CC-NLR タンパク質が MADA モチーフを N 末端領域にもつことが分かった。興味深いことに、NRC2, NRC3, NRC4 を含むヘルパー-NLR は MADA モチーフを有する一方、NRC に依存するセンサー-NLR には MADA モチーフが保存されておらず、N 末端領域のアミノ酸配列は多様化していた。いくつかのセンサー-NLR は、その N 末端領域が病原菌エフェクターの認識に必要であることが報告されている。したがって、これらの解析結果は、ヘルパー-NLR が保存された MADA モチーフを介して免疫応答を誘導すること、センサー-NLR は進化的に MADA モチーフを退化させ、ヘルパー-NLR を介して免疫応答を誘導していることを示唆している。

4. NRC4 に保存された MADA モチーフの機能解析

NRC4 に保存された MADA モチーフが、HR 細胞死の誘導に必要なかどうか調べるため、NRC4 の恒常活性型変異体の MADA モチーフに対しアラニンスキニング変異導入法を行なった。しかしながら、全てのアラニン置換変異体は HR 細胞死をベンサミアナタバコ葉に誘導した。MADA モチーフは、アラニンと同じ疎水性アミノ酸によって主に構成されていたため、アラニン変異が MADA モチーフの機能に影響を与えていない可能性が考えられた。したがって、負に荷電したアミノ酸であるグルタミン酸によるスキニング変異導入法を NRC4 の MADA モチーフに対して行なった。その結果、NRC4 の MADA モチーフにおける 9, 13, 17 番目のロイシンに変異を導入することで、NRC4 の細胞死誘導活性が抑制された。

さらに、9, 13, 17 番目のロイシンをグルタミン酸に置換した NRC4 を用いて、ベンサミアナタバコの *nrc4* ノックアウト変異体に対する相補実験を行い、ジャガイモ疫病菌に対する抵抗性を調べた。その結果、野生型の NRC4 と異なり、MADA モチーフの変異体はジャガイモ疫病菌への抵抗性が抑制された。これらの結果は、NRC4 の MADA モチーフが、HR 細胞死の誘導と病害抵抗性の両方に必要であることを示唆している。

5. 自己免疫様表現型を誘導する NRC の同定

ヘルパー-NLR である NRC ファミリーは、NRC2, NRC3, NRC4 だけでなく複数の NRC 遺伝子がベンサミアナタバコに保存されている。NRC2, NRC3, NRC4 以外の NRC ファミリーメンバーが、免疫応答においてどのような役割があるか調べるため、Virus-Induced Gene Silencing (VIGS) 法による機能抑制実験を行なった。興味深いことに、NRC2 および NRC3 と同じサブクレードに属する 1 つの NRC 遺伝子 (*NRCn*) をノックダウンすると、植物体は矮性形質を示した。また、その矮性形質は、NRC2 および NRC3 をノックダウンすることによって抑制された。このような矮性形質は、他のヘルパー-NLR のノックダウン植物において観察されておらず、NRC クレード内において、NRCn は異なる機能を有することが考えられた。このような植物の矮性形質は、免疫応答が恒常的に誘導される自己免疫様表現型として知られ、NRC2 および NRC3 の制御因子である可能性が考えられた。

6. NRCn の遺伝学的解析

VIGS 法による *NRCn* のノックダウン植物は、極度の矮性形質を示し、NRCn の機能解析に用いることができない。そこで、*NRCn* のヘアピン型 RNA をアグロバクテリウムを介してベンサミアナタバコに一過的に発現させ、*NRCn* の RNA 干渉 (RNAi) 実験を行なった。その結果、植物体の成長に影響を与えず、*NRCn* をノックダウンすることに成功した。RNAi:NRCn 区において、NRC2 および NRC3 依存的なセンサー-NLR が誘導する HR 細胞死が促進された一方、NRC4 依存的なセンサー-NLR が誘導する HR 細胞死に顕著な影響は認められなかった。この結果は、NRCn が NRC2 および NRC3 依存的な HR 細胞死を負に制御することを示唆している。

NRCn がヘルパー-NLR とセンサー-NLR のどちらを負に制御するかを調べるため、NRC2 および NRC3 の恒常活性型変異体に対する RNAi:NRCn の影響を調べた。その結果、NRC2 および

NRC3 の恒常活性型変異体が誘導する HR 細胞死は促進される一方で、NRC4 の恒常活性型変異体に対する影響は認められなかった。また、野生型の NRCn をベンサミアナタバコ葉に過剰発現させると、NRC2 および NRC3 の恒常活性型変異体が誘導する HR 細胞死が抑制された。これらの結果は、NRCn が NRC2 および NRC3 の細胞死誘導活性を負に制御することを示唆している。

7. NRCn の細胞死誘導活性の評価

ヘルパーNLR を含む典型的な NLR タンパク質は、MHD モチーフが高度に保存されており、MHD モチーフに変異を導入することによって、恒常活性を示し植物細胞に HR 細胞死を誘導する。実際に、NRC2, NRC3, NRC4 の MHD モチーフ変異体は、ベンサミアナタバコ葉に HR 細胞死を誘導した。一方で、NRCn の MHD モチーフ変異体は、ベンサミアナタバコ葉に HR 細胞死を誘導しなかった。この結果は、NRCn が通常の NLR タンパク質とは異なり、細胞死誘導活性をもたないことを示唆している。NRCn は、ヘルパーNLR クレードから獲得された新しいカテゴリの NLR “モデレイターNLR” かもしれない。今後、NRCn と他の NRC の生化学的および細胞生物学的解析を進めることで、NRCn の機能だけでなく NLR ネットワークの制御機構の分子基盤の理解を飛躍的に進めることができると期待される。

成果の発表・関係学会への参加状況

上記研究成果は、以下の学会および学会誌等で発表した。

(学会発表)

- 平成 30 年度 (第 53 回) 植物感染生理談話会, 2018 年 8 月, 優秀発表賞受賞
- 2019 International Society for Molecular Plant-Microbe Interactions XVIII Congress, 2019 年 7 月
- 令和元年度 日本植物病理学会関西西部会 若手の会 (発表予定), 2019 年 9 月

(学会誌への研究発表)

- Adachi, H., and Tsuda, K. 2019. Convergence of cell-surface and intracellular immune receptor signalling. *New Phytologist*, 221:1676-1678.
- Adachi, H., Kamoun, S., and Maqbool, A. 2019. A resistosome-activated 'death switch'. *Nature Plants*, 5:457-458.
- Adachi, H., Derevnina, L., and Kamoun, S. 2019. NLR singletons, pairs and networks: evolution, assembly and regulation of the intracellular immunoreceptor circuitry of plants. *Current Opinion in Plant Biology*, 50:121-131.
- Adachi, H., Contreras, M., Harant, A., Wu, C.-H., Derevnina, L., Sakai, T., Duggan, C., Moratto, E., Bozkurt, T., Maqbool, A., Win, J. and Kamoun, S. 2019. An N-terminal motif in NLR immune receptors is functionally conserved across distantly related plant species. *bioRxiv*, doi.org/10.1101/693291.
- Wu, C.-H., Adachi, H. (co-first author), De la Concepcion, J. C., Castells-Graells, R., Nekrasov, V., Kamoun, S. 2019. A CRISPR/Cas9 mediated 53 kb deletion of the NRC4 gene cluster of tomato does not affect bacterial flagellin-triggered immunity. *bioRxiv*, doi: <https://doi.org/10.1101/697425>.