

科学研究費助成事業（基盤研究（S））公表用資料
〔令和4（2022）年度 中間評価用〕

令和4年3月31日現在

研究期間：2020年度～2024年度
課題番号：20H05681
研究課題名：イネ NLR 抵抗性遺伝子の機能と進化の解明

研究代表者氏名（ローマ字）：寺内 良平 (TERAUCHI Ryohei)
所属研究機関・部局・職：京都大学・大学院農学研究科・教授
研究者番号：50236981

研究の概要：

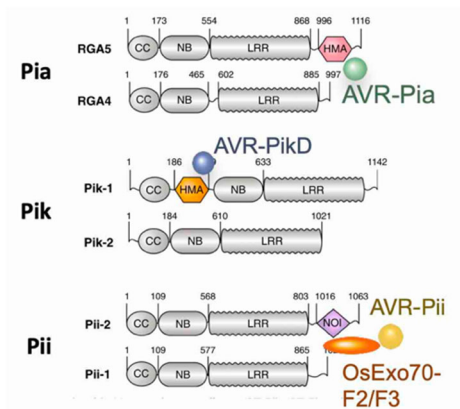
イネは、世界人口の50%以上を支える主食である。子囊菌類いもち病菌によるイネいもち病はイネの最重要病害であり、その防除に最も有効な手法は、イネの抵抗性遺伝子の利用である。本課題は、イネの NLR 型抵抗性タンパク質によるいもち病菌エフェクター認識の分子機構を解明し、NLR のエンジニアリングにより耐病性を向上するとともに、植物抵抗性遺伝子と病原菌エフェクター遺伝子の共進化機構を明らかにする。

研究分野：植物病理学、遺伝育種学、進化学

キーワード：抵抗性遺伝子、エフェクター、共進化、ゲノム

1. 研究開始当初の背景

私たちは、いもち病抵抗性の増強を目的として、イネの病害抵抗性分子機構の解明に向けた研究を続けている。3種類のいもち病菌 AVR エフェクター、AVR-Pia、AVR-Pik、AVR-Pii と3種類のイネ抵抗性遺伝子 *Pia*、*Pik*、*Pii* 産物の分子間相互作用を研究対象とし、それらの共通性と特異性の解明を進めて来た。これらのイネ抵抗性遺伝子は、全て密接に連鎖した一対の Nucleotide-binding Leucine-rich repeat Receptor (NLR) 遺伝子（ペア-NLR）から構成され、一方は病原菌エフェクターを認識するセンサー-NLR、もう一方は抵抗性信号を伝達するヘルパー-NLR と総称される。センサー-NLR には、NLR タンパク質に共通の CC、NBS、LRR ドメインに加えて、付加ドメイン (Integrated Domain: ID) が見られ、*Pia*(RGA5) と *Pik*(*Pik*-1) では HMA ドメイン、*Pii*(*Pii*-2) では NOI ドメインが挿入されている。いもち病菌の AVR-Pia と AVR-Pik は、それぞれイネの RGA5 と *Pik*-1 の HMA ドメインに直接結合することにより認識されること、AVR-Pii はイネの Exo70 タンパク質 OsExo70-F2/F3 を介して *Pii*-2 に認識されることが示された。これらの ID は、病原菌エフェクターの宿主標的タンパク質の一部が進化過程で NLR に取り込まれて成立したと推測される。

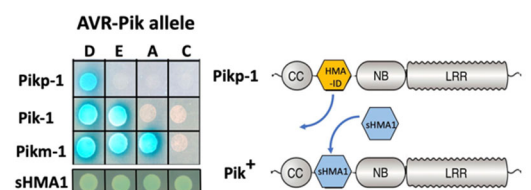


2. 研究の目的

これまでに得られたイネ NLR といもち病菌 AVR 分子間相互作用の知見、および新規に同定された *Pias* 抵抗性遺伝子と AVR-*Pias* エフェクターの相互作用を基盤として、本研究では、(1) *Pik* NLR の ID のエンジニアリングによる抵抗性遺伝子認識特異性の拡大、(2) *Pias*/*Pia* NLR の機能と進化の解明 (3) NLR ネットワークの機能解明、(4) AVR と宿主標的因子の相互作用の解明、(5) 新規イネ NLR-いもち病菌 AVR の単離とイネ (*Oryza*) 属 Pan NLR-ome の解明に取り組む。これらを通じてイネ耐病性増強に貢献する。

3. 研究の方法

(1) AVR-Pik には、AVR-Pik-D、-E、-A、-C など多数の変異型が存在する。*Pik* にも *Pikp*、*Pik*、*Pikm* など多数の対立遺伝子が存在し、*Pik*-1 の ID である HMA ドメインの変異によって認識する AVR-Pik 変異型が異なる。一方、全ての AVR-Pik 変異型は、宿主標的因子である sHMA1 タンパク質に結合する (右図)。そこで、*Pikp*-1 の ID の HMA 配列を sHMA1 タンパク質の HMA 配列と交換し、全ての AVR-Pik 変異型を認識可能な人工 NLR *Pik*⁺ を



エンジニアする。(2) *Pias* は *Pia* の対立遺伝子で、センサー-NLR の ID として DUF761 ドメインを保有する。*Pias/Pia* 遺伝子座の進化と多様性を理解するとともに、*Pias* と AVR-*Pias* 相互作用を解明する。(3) 同定されたペアー-NLR がそれ以外の NLR と相互作用してネットワークを形成しているかを検討する。(4) 単離されたいもち病菌 AVR エフェクターとイネの標的因子との相互作用とその機能を明らかにする。(5) イネ野生種を含む多数のゲノム解析から NLR 配列を抽出し、イネ NLR の進化を解明するとともに、新規の NLR-AVR の組を同定して機能解明を進める。

4. これまでの成果

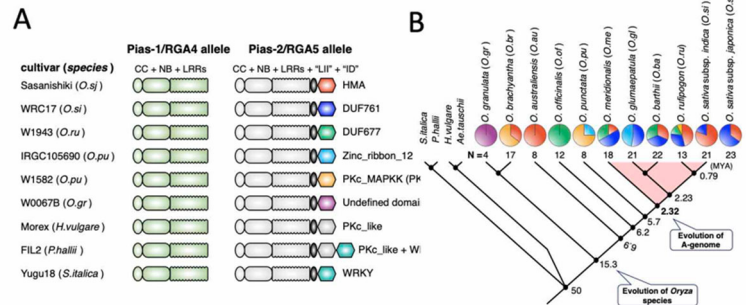
(1) *Pikp-1* 遺伝子の ID 配列を sHMA1 タンパク質の配列と交換した上、auto-activity を回避するアミノ酸置換を導入した人工 NLR *Pik+* によりイネ品種「日本晴」を形質転換した。この植物に多様な AVR-*Pik* 対立遺伝子を有するいもち病菌を接種したところ、既知の *Pik* 対立遺伝子が認識不能であった AVR-*Pik-C*、AVR-*Pik-F* を新たに認識できることが判明した。本結果は、病原菌エフェクターの宿主標的配列を NLR の ID に挿入した人工 NLR により認識特異性を拡大した画期的成果である。

(2) *Pias/Pia* 遺伝子座のセンサー-NLR は多様性が高く、C-末の ID 領域に様々な宿主断片が挿入されている (図A)。栽培イネを含むイネ属 A ゲノム種 (図Bの系統樹右端部分) では、ID に HMA と DUF761 をもつ系統が同じ程度の頻度 (円グラフ) で見られた。一方ヘルパー-NLR は保存されており、*Pias* のヘルパー-NLR と *Pia* のセンサー-NLR の組により AVR-*Pia* を認識して抵抗性を誘導することが示された。ペアー-NLR のモジュール構造の機能解明により、多様な病原菌エフェクターを認識する NLR エンジニアリングが可能である。

(3) *Pia* を構成する *RGAS5* センサー遺伝子のノックアウト個体は正常に生育した。*Pia* 近傍の他の NLR による制御が推定される。

(4) いもち病菌エフェクター AVR-*Pia*、AVR-*Pik* が標的とするイネ sHMA タンパク質の機能解明を進めた。AVR-*Pik* は sHMA に結合して安定化する。AVR-*Pik* が結合する sHMA の一部の遺伝子をノックアウトするとイネの罹病性が低下した。これから、イネ sHMA はいもち病感染に重要な因子であり、AVR-*Pik* はこれに結合して安定化し、感染性に寄与することが示された。さらに *Pii*、OsExo70-F2/F3、AVR-*Pii* の分子間相互作用の詳細な解析を進めた。*Pii* センサーは、NOI ID を介して通常イネタンパク質 OsExo70-F2/F3 と結合しており、その状態が AVR-*Pii* 結合により変化することにより抵抗性が誘導されるモデルが提唱された。

(5) NLR 候補およびこれらが認識する AVR 遺伝子を新規に 3 組同定した。



5. 今後の計画

(1) *Pik* および *Pias/Pia* NLR の ID を任意のエフェクター標的因子断片と交換して、それらと結合する病原菌エフェクターを認識して抵抗性を誘導する実験系を確立する。

(2) *Pias* と AVR-*Pias* の分子間相互作用を解明し、*Pias/Pia* センサー-NLR の多様な ID と相互作用するエフェクターを探索する。

(3) 多数の NLR の CC ドメインを介した結合を Y2H 法で解析し、NLR ネットワークを明らかにする。

(4) sHMA タンパク質のイネにおける機能を解明する。OsExo70-F2/F3 が相互作用するイネ RIN4 タンパク質の機能と AVR-*Pii* の病原機能を解明する。

(5) 野生種を含めたイネ NLR の多様性と進化を解明する。新規 NLR-AVR の相互作用を解明する。

(1)-(4) を通じて複合体構造解析を進める。これら結果を総合して、イネ NLR の機能と進化の全貌に迫る。

6. これまでの発表論文等 (受賞等も含む)

A genetically linked pair of NLR immune receptors show contrasting patterns of evolution. Shimizu M, 2 名略, Abe A(4), 7 名略, Banfield MJ, Kamoun S, Terauchi R (14) (2021) *bioRxiv* DOI: 10.1101/2021.09.01.458560

The blast pathogen effector AVR-Pik binds and stabilizes rice heavy metal-associated (HMA) proteins to co-opt their function in immunity. Oikawa K, Fujisaki K, Shimizu M, 11 名略, Banfield MJ, Kamoun S, Terauchi R (17) (2020) *bioRxiv* DOI: 10.1101/2020.12.01.406389

7. ホームページ等

<http://www.crop-evolution.kais.kyoto-u.ac.jp>

<https://www.ibrc.or.jp>