

令和 3 年 5 月 2 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17H01462

研究課題名(和文) コムギいもち病菌の強病原化・パンデミック化機構の解明と持続的抵抗性遺伝子の同定

研究課題名(英文) Mechanisms of evolution of hypervirulent isolates of the wheat blast fungus and identification of resistance genes against it

研究代表者

土佐 幸雄 (TOSA, Yukio)

神戸大学・農学研究科・教授

研究者番号：20172158

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 32,400,000円

研究成果の概要(和文)：コムギいもち病は、1985年にブラジルで発生したのち、南米周辺諸国に広がり、さらに2016年にユーラシア大陸(バングラデシュ)、2017-2018年にアフリカ大陸(ザンビア)とその分布を拡大している重要病害である。本研究ではまず、コムギいもち病菌の病原性増強に関わる因子を2つ同定した。次に、世界中から収集された在来品種約520系統をスクリーニングし、本病に強度抵抗性を示す系統GR119を見出した。遺伝解析の結果、この系統は、Rmg8、RmgGR119という2つの抵抗性遺伝子を持つことが判明した。これらの遺伝子はバングラデシュで分布を拡大している菌系に対し有効であることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

コムギいもち病は、最初ブラジルで発生し周辺諸国に広がった後、2016年バングラデシュ、2017-2018年にザンビアと、世界に拡大し始め、パンデミック病となる様相を呈している。本研究では、すでに同定していた抵抗性遺伝子Rmg8が、バングラデシュで有効であることを示した。また、新規抵抗性遺伝子RmgGR119を同定することができた。これらの遺伝子は本病害の抑制に極めて有効であると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Wheat blast is a devastating disease that first arose in Brazil in 1985, then spread to neighboring countries in South America, to Asia (Bangladesh) in 2016, and to Africa (Zambia) in 2018. In the present study, we identified two factors involved in the development of hypervirulent isolates. Also, we screened about 520 local landraces of common wheat collected worldwide, and found a highly resistance line, GR119. Genetic analyses revealed that GR119 carried two resistance genes. One was Rmg8 which was previously identified in our laboratory, but the other was a new gene. The new gene was tentatively designated as RmgGR119. These two genes operated additively, and were effective against wheat blast isolates prevailing in Bangladesh.

研究分野：植物病理学

キーワード：Pyricularia oryzae Magnaporthe oryzae wheat blast wheat effector resistance gene

1. 研究開始当初の背景

いもち病菌 *Pyricularia oryzae* は、イネ菌、アワ菌、シコクビエ菌等、宿主植物属を異にするいくつかの菌群に分化しているが、今もなお新しい菌群を生み出し続けている。1985年、ブラジルにおいてコムギ属を特異的に侵すコムギ菌 (*Triticum isolates*) が突如出現した (Urashima et al. 1993)。本菌はその後南米の周辺諸国に広がり、コムギ栽培の脅威となった (Ceresini et al. 2018)。そのような中、南米ボリビアで、極めて病原性の強い強病原力菌 (Bolivian strain) が発生し、コムギ栽培に、より深刻な打撃を与えるようになった。さらに、2016年2月には、バングラデシュで突如コムギいもち病が発生し、瞬く間にバングラデシュ各地に広がった (Callaway 2016)。これは、アジアおよびユーラシア大陸における初めてのコムギいもち病の outbreak であった。このバングラデシュにおけるコムギいもち病菌のゲノムを調べたところ、上記強病原力菌とほぼ同一であった (Islam et al. 2016; Malaker et al. 2016)。このことから、バングラデシュにおけるコムギいもち病の outbreak は、種子伝染によって南米から伝播した菌系によって引き起こされたと推測された。

2. 研究の目的

上述のように、コムギいもち病は南米からバングラデシュに飛び火し、パンデミック化の様相を呈している。それを引き起こしているのは、強病原化した菌系である。本研究では、この病原力増強がどのような過程で起こったかを解析するとともに、この病害に対抗するため、抵抗性遺伝子を同定し、その南米ならびにバングラデシュにおける効果を評価することを目的とした。

3. 研究の方法

供試菌系としては、コムギいもち病発生初期にブラジルで採集された菌系 (Br 菌系) ならびに、最近バングラデシュで採集された菌系 (T 菌系) を用いた。Br 菌系の代表として用いたのは、1992年に採集された Br48 である。

抵抗性遺伝子の探索には、普通系コムギ在来品種約 520 系統を用いた。これらは、岡山大学加藤謙司博士から分譲して頂いた。

4. 研究成果

(1) コムギいもち病抵抗性遺伝子の探索と同定

本プロジェクト開始前年度までに、我々の研究室では、コムギいもち病抵抗性遺伝子を普通系コムギ品種 S-615 に見出し、これを *Rmg8* と命名していた (Anh et al. 2015)。さらに新規コムギいもち病抵抗性遺伝子を同定するため、世界中から集められた普通系コムギ在来品種約 520 系統をコムギいもち病菌 Br48 でスクリーニングしたところ、18 の抵抗性系統を見出した。これらのうち 17 系統の抵抗性は既知の遺伝子 *Rmg8* のみに支配されていたが、残る 1 系統 GR119 は、2 つの抵抗性遺伝子を保有していた。AVR-*Rmg8* (*Rmg8* に対する非病原力遺伝子, Anh et al. 2018) の破壊株が GR119 に中度の病原性を示すことから、2 遺伝子のうち 1 つは *Rmg8* であることが判明した (図 1)。また、もう一つは新規抵抗性遺伝子であった。この新規遺伝子を、暫定的に *RmgGR119* と命名した (Wang et al. 2018)。GR119 の強度抵抗性は、*Rmg8* と *RmgGR119* の相加的作用によるものであった (図 2)。

バングラデシュから菌株を入手し、GR119 に接種したところ、GR119 は、幼苗期のみならず穂においても、また高温下でも、強度の抵抗性を示した。このことから、GR119 の持つ 2 つの遺伝子は、バングラデシュにおけるコムギいもち病抵抗性育種に極めて有用であることが示唆された (Horo et al. 2020)。

(2) 病原力増強のメカニズムの解析

まず、コムギいもち病菌の進化過程 (コムギに対する病原性の獲得過程) を解析した。その結果、PWT3 という非病原力遺伝子の機能喪失により、ライグラス菌がコムギに病原性を獲得し、コ

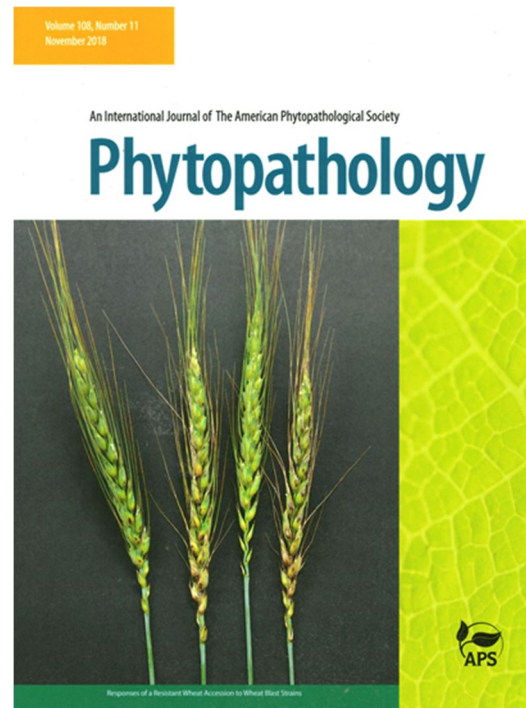


図 1. コムギいもち病強度抵抗性品種 GR119 のいもち病菌に対する反応。接種菌系は左から、コムギ菌 Br48, AVR-*Rmg8* 欠失実験室内系統 200R54, 200R54 に AVR-*Rmg8* を導入した形質転換体, Br48 の AVR-*Rmg8* 破壊株。GR119 が *Rmg8* に加えて他の抵抗性遺伝子を持つことにより強度抵抗性となっていることがわかる。(Wang et al. 2018. 米国植物病理学会誌 Phytopathology 2018 年 11 月号表紙)

ムギ菌に進化したことが示唆された (Inoue et al. 2017)。

次に、もう一段遡り、*P. oryzae*の原始型に近いとされるシコクビエ菌からコムギ菌への進化にはどのような遺伝子変異が必要かを解析した。その結果、少なくとも *PWT3*を含めて5つの非病原力遺伝子の変異が必要であることが示唆された (Asuke et al. 2020)。

一方、コムギ菌成立後の強病原化のメカニズムについて、次のような仮説を立てた。「Br48の非病原力遺伝子 *PWT3*は、塩基置換のために抵抗性遺伝子産物との結合が完全ではないながらも、ある程度抵抗性遺伝子に認識される。これが完全破壊されれば強病原性となる。」これを検討するため、Br48の *PWT3*を破壊し、得られた破壊株をコムギ第1葉に接種した。しかしながら、病原性の増強を検知することは出来なかった。また、Br48に見出された弱い非病原力遺伝子A2のクローニングを試みた。しかし、作用が微弱なゆえに微妙な病原性判定が難しく、座乗領域を絞り込むことが出来なかった。

そこで、原点に戻りBr48等ブラジルにおける発生直後の菌と現在バングラデシュに広がっている強病原性株との直接的比較を行うことにした。これらをコムギの幼苗ならびに穂に接種して病徴の進展を比較したところ、抵抗性遺伝子を持たない品種に対する病原性の程度は、バングラデシュ菌の方が強いことが判明した。一方、*Rmg8* 保有品種に対しては、バングラデシュ菌がすべて非病原性を示したのに対し、ブラジル菌の中には、中度の病原性を示すものが混在した (図3)。これは、*AVR-Rmg8*の変異によるものであった。*Rmg8*保有品種がブラジルで広く栽培された記録はないので、この変異は、*Rmg8*に対する適応ではない。そのようなバリエーションの中から、*Rmg8*に強く認識される*AVR-Rmg8*アレルを持つ菌株がバングラデシュへ伝播したことは、不幸中の幸いであったということになる。以上のことから、バングラデシュ菌は、病原性の程度においては増強されているが、*Rmg8*には適応しておらず、これが*Rmg8*のバングラデシュにおける有効性の理由であると考えた (Horo et al. 2020)。

さらに、*PWT2*のクローニングに成功した、*PWT2*は、もともとイネ菌等のコムギに対する非病原力遺伝子と考えていたものであるが、クローニングの結果、そうではなく、コムギ菌の病原力遺伝子であることが判明した。コムギ菌、アワ菌、シコクビエ菌の本遺伝子を破壊すると、それぞれの宿主であるコムギ、アワ、シコクビエに対する病原性、ならびに共通宿主であるオオムギに対する病原性が低下した。病原性の低下は、病斑数の減少となって表れた。一方、本遺伝子に機能欠損のあるイネ菌に、本遺伝子を導入すると、オオムギに対する病原性が向上した。以上のように、病原性の強化にかかわる遺伝子を1つクローニングすることができた。

一方、上述の*Rmg8*保有17系統 (Br48に抵抗性) に、Br48 + *PWT4* (Br48にエンバク菌のコムギに対する非病原力遺伝子*PWT4*を導入した形質転換体) を接種したところ、感受性となる系統をいくつか見いだした。このことから、*PWT4*は、*Rmg8*の抵抗性を抑制する機能を持っていると考えた (Inoue et al. 2021)。ここに、病原力強化に関わるエフェクター遺伝子を一つ同定す

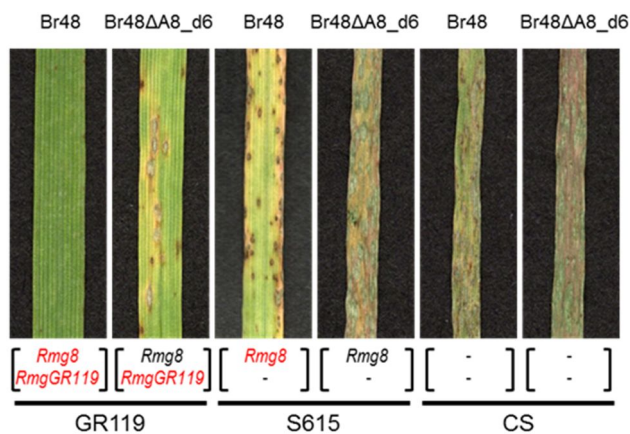


図2. *Rmg8* と *RmgGR119* の相加的効果 (Wang et al. 2018)。コムギ品種 GR119 (両遺伝子保有) ならびに S-615 (*Rmg8* 単独保有) に、コムギ菌 Br48 ならびにその *AVR-Rmg8* 破壊株 (Br48 A8_d6) を接種し、25°C で培養した。赤字は、反応に関与している抵抗性遺伝子を示す。CS は感受性コントロール Chinese Spring。

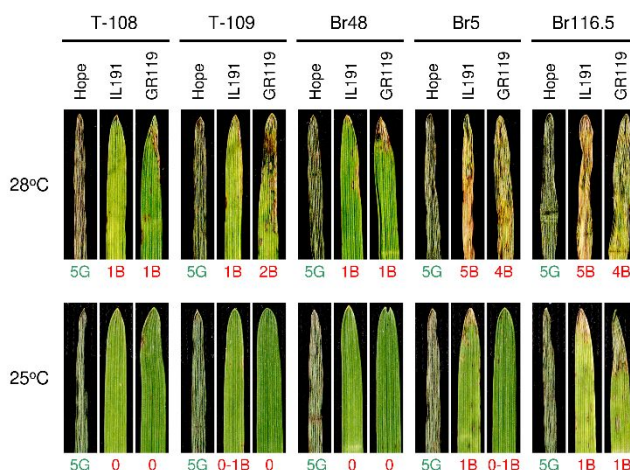


図3. 普通系コムギ品種 Hope (-/-), IL191 (*Rmg8*/-)、GR119 (*Rmg8*/*RmgGR119*) 第1葉のバングラデシュ菌株 (T-108, T-109) ならびにブラジル菌株 (Br48, Br5, Br116.5) に対する反応 (接種5日後)。パネル下に感染型を示す (赤: 抵抗性、緑: 感受性)。なお、IL191 は、*Rmg8* 保有系統の中で最も強力なアレルを持ち、その抵抗性強度は通常の *Rmg8* アレルと *RmgGR119* の2遺伝子を保有する GR119 に匹敵する。(Horo et al. 2020)

ることができた。

- Anh, V. L., Anh, N.T., Tagle, A.G., Vy, T.T.P., Inoue, Y., Takumi, S., Chuma, I. and Tosa, Y. (2015). *Rmg8*, a new gene for resistance to *Triticum* isolates of *Pyricularia oryzae* in hexaploid wheat. *Phytopathology* 105: 1568-1572.
- Anh, V. L., Inoue, Y., Asuke, S., Vy, T.T.P., Anh, N.T., Wang, S., Chuma, I. and Tosa, Y. (2018). *Rmg8* and *Rmg7*, wheat genes for resistance to the wheat blast fungus, recognize the same avirulence gene *AVR-Rmg8*. *Mol. Plant Pathol.* 19: 1252-1256.
- Asuke, S., Nishimi, S., and Tosa, Y. (2020). At least five major genes are involved in the avirulence of an *Eleusine* isolate of *Pyricularia oryzae* on common wheat. *Phytopathology* 110:465-471.
- Callaway, E. (2016). Devastating wheat fungus appears in Asia for first time. *Nature* 532: 421–422.
- Ceresini, P. C., Castroagudín, V. L., Rodrigues, F. A., Rios, J. A., Aucique-Pérez, C. E., Moreira, S. I., Alves, E., Croll, D. and Maciel, J. L. N. (2018). Wheat blast: Past, present, and future. *Annu. Rev. Phytopathol.* 56: 427-456.
- Inoue, Y., Vy, T. T. P., Yoshida, K., Asano, H., Mitsuoka, C., Asuke, S., Anh, V. L., Cumagun, C.J.R., Chuma, I., Terauchi, R., Kato, K., Mitchell, T., Valent, B., Farman, M. and Tosa, Y. (2017). Evolution of the wheat blast fungus through functional losses in a host specificity determinant. *Science* 357: 80-83.
- Inoue, Y., Vy, T.T.P., Tani, D. and Tosa, Y. (2021). Suppression of wheat blast resistance by an effector of *Pyricularia oryzae* is counteracted by a host specificity resistance gene in wheat. *New Phytol.* 229: 488-500.
- Islam, M. T., Croll, D., Gladioux, P., Soanes, D. M., Persoons, A., Bhattacharjee, P., Hossain, M. S., Gupta, D. R., Rahman, M. M., Mahboob, M. G., Cook, N., Salam, M. U., Surovy, M. Z., Sancho, V. B., Maciel, J. L. N., Nhani Júnior, A., Castroagudín, V. L., de Assis Reges, J. T., Ceresini, P. C., Ravel, S., Kellner, R., Fournier, E., Tharreau, D., Lebrun, M-H., McDonald, B. A., Stitt, T., Swan, D., Talbot, N. J., Saunders, D. G. O., Win, J. and Kamoun, S. (2016). Emergence of wheat blast in Bangladesh was caused by a South American lineage of *Magnaporthe oryzae*. *BMC Biol.* 14: 84.
- Malaker, P. K., Barma, N. C. D., Tiwari, T. P., Collis, W. J., Duveiller, E., Singh, P. K., Joshi, A. K., Singh, R. P., Braun, H.-J., Peterson, G. L., Pedley, K. F., Farman, M. L. and Valent, B. (2016). First report of wheat blast caused by *Magnaporthe oryzae* pathotype *triticum* in Bangladesh. *Plant Dis.* 100: 2330.
- Urashima, A. S., Igarashi, S. and Kato, H. (1993). Host range, mating type, and fertility of *Pyricularia grisea* from wheat in Brazil. *Plant Dis.* 77: 1211–1216.
- Wang, S., Asuke, S., Vy, T.T. P., Inoue, Y., Chuma, I., Win, J., Kato, K. and Tosa, Y. (2018). A new resistance gene in combination with *Rmg8* confers strong resistance against *Triticum* isolates of *Pyricularia oryzae* in a common wheat landrace. *Phytopathology* 108: 1299-1306.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Soichiro Asume, Shuko Nishimi, and Yukio Tosa	4. 巻 2
2. 論文標題 At least five major genes are involved in the avirulence of an Eleusine isolate of <i>Pyricularia oryzae</i> on common wheat	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Phytopathology	6. 最初と最後の頁 465-471
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1094/PHYTO-07-19-0278-R	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 -
1. 著者名 Wang Shizhen, Asume Soichiro, Vy Trinh Thi Phuong, Inoue Yoshihiro, Chuma Izumi, Win Joe, Kato Kenji, Tosa Yukio	4. 巻 108
2. 論文標題 A New Resistance Gene in Combination with Rmg8 Confers Strong Resistance Against <i>Triticum</i> Isolates of <i>Pyricularia oryzae</i> in a Common Wheat Landrace	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Phytopathology	6. 最初と最後の頁 1299 ~ 1306
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1094/PHYTO-12-17-0400-R	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 Inoue Yoshihiro, Vy Trinh T. P., Yoshida Kentaro, Asano Hokuto, Mitsuoka Chikako, Asume Soichiro, Anh Vu L., Cumagun Christian J. R., Chuma Izumi, Terauchi Ryohei, Kato Kenji, Mitchell Thomas, Valent Barbara, Farman Mark, Tosa Yukio	4. 巻 357
2. 論文標題 Evolution of the wheat blast fungus through functional losses in a host specificity determinant	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Science	6. 最初と最後の頁 80 ~ 83
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1126/science.aam9654	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
1. 著者名 Horo Jemal Tola, Asume Soichiro, Vy Trinh Thi Phuong, Tosa Yukio	4. 巻 110
2. 論文標題 Effectiveness of the Wheat Blast Resistance Gene Rmg8 in Bangladesh Suggested by Distribution of an AVR-Rmg8 Allele in the <i>Pyricularia oryzae</i> Population	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Phytopathology	6. 最初と最後の頁 1802 ~ 1807
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1094/PHYTO-03-20-0073-R	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 -

1. 著者名 Inoue Yoshihiro, Vy Trinh Thi Phuoug, Tani Daichi, Tosa Yukio	4. 巻 229
2. 論文標題 Suppression of wheat blast resistance by an effector of <i>Pyricularia oryzae</i> is counteracted by a host specificity resistance gene in wheat	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 New Phytologist	6. 最初と最後の頁 488 ~ 500
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/nph.16894	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 -

[学会発表] 計7件(うち招待講演 3件/うち国際学会 1件)

1. 発表者名 小泉彩子・村上翼・国信遼・足助聡一郎・庭本大輔・土佐幸雄
2. 発表標題 コムギいもち病菌のオオムギに対する非病原力遺伝子PBY2のクローニング
3. 学会等名 令和元年度日本植物病理学会関西支部会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Horo, J.T., Asume, S., Vy, T.T.P. and Tosa, Y.
2. 発表標題 Rmg8 and RmgGR119 are effective against the wheat blast fungus (<i>Pyricularia oryzae</i>) in Bangladesh
3. 学会等名 令和2年度日本植物病理学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 土佐幸雄
2. 発表標題 コムギいもち病菌の進化機構
3. 学会等名 日本植物病理学会関西支部会(招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 土佐幸雄・井上喜博・Trinh Thi Phuong Vy・寺内良平・Barbara Valent・Mark Farman
2. 発表標題 Mechanisms of evolution of the wheat blast fungus
3. 学会等名 11th International Congress of Plant Pathology (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 庭本大輔・足助聡一郎・Analiza Tagle・久野裕・佐藤和広・土佐幸雄
2. 発表標題 オオムギの各種いもち病菌に対する抵抗性遺伝子Rmo2の1アリル候補配列の機能解析
3. 学会等名 日本植物病理学会関西支部
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Wang, Shizen、足助聡一郎、Vy, T.T.P.、井上喜博、中馬いづみ、土佐幸雄
2. 発表標題 コムギいもち病菌に対する新規抵抗性遺伝子の探索
3. 学会等名 日本植物病理学会関西支部
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 土佐幸雄
2. 発表標題 越境性病害に対する取り組み - コムギいもち病を例にして
3. 学会等名 日本植物病理学会大会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

〔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
---------	---------