

令和 3 年 6 月 14 日現在

機関番号：82111

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17K07678

研究課題名(和文)植物栄養代謝に関わるSnRK1によるいもち病抵抗性獲得の分子基盤解明

研究課題名(英文)Molecular mechanism of rice blast resistance acquisition by SnRK1 involved in plant nutrition metabolism

研究代表者

林 長生 (Hayashi, Nagao)

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・生物機能利用研究部門・再雇用職員

研究者番号：90391557

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：陸稲品種の「戦捷」に由来するいもち病抵抗性遺伝子pi21は、葉いもち病に安定した抵抗性を付与する。実験の正確性をきすために、pi21の相互作用因子についてゲノム編集個体を作成して解析を行うと、pi21の抵抗性が著しく落ちることはなかったが、SnRK1は抵抗性が落ちる傾向にあった。抵抗性および罹病性系統にいもち病菌を接種し、炭素および窒素のラジオアイソトープを取り込ませた実験では、炭素の流れには影響はなかったが、窒素ではいもち病病斑の周辺葉鞘側に窒素のシグナルが多く見られ、特に罹病性品種で大きなシグナルが観察された。抵抗性に関わるタンパク質を発現させ、様々な条件下で相互作用の確認を行っている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

圃場抵抗性であるpi21の抵抗性機構を明らかにするために、タンパク質の相互作用因子に着目し本研究を行った。pi21はSnRK1と相互作用するが、SnRK1の特性から栄養との関連性を検証することで、いもち病圃場抵抗性は窒素栄養と深く結びついていることを明らかにした。古くからいもち病罹病には、窒素栄養が深く関わっているとされており、その分子生物学的な一端を明らかにしたことは意義深い。同時に、pi21抵抗性が今後広く普及するために科学的な知見として利用される。

研究成果の概要(英文)：The rice blast resistance gene pi21, derived from the upland rice variety Sencho, confers stable resistance to leaf blast in rice. pi21-dependent blast resistance was significantly reduced when SnRK1, a factor that interacts with pi21, was repressed (RNAi) in rice plants carrying pi21. In experiments in which resistant and susceptible cultivars were inoculated with blast fungi and allowed to take up C13 and N14 radioisotopes, carbon flow was unaffected. On the other hand, for nitrogen, the nitrogen signals were observed on the leaf sheath side around the blast lesions, especially strong signals were observed in the susceptible variety. To confirm this phenomenon, we used fluorescently labeled infected rice plant and observed signals extending outward from the blast lesions in both resistant and susceptible varieties. This suggests that the blast fungus acquires some nutrients by extending its hyphae not only to the lesion but also to the area around the lesion.

研究分野：植物微生物相互作用

キーワード：育種学 菌類 シグナル伝達 植物 圃場抵抗性

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

陸稲品種の「戦捷」に由来するいもち病抵抗性遺伝子 *pi21* は、イネの葉においてどの菌系に対しても病斑拡大が葉脈間に限定される針状型の病斑を形成することで安定した抵抗性を付与する。抵抗性 *pi21* は罹病性 *Pi21* の特定の二ヶ所の配列が in frame に欠失することによって生じていた(Fukuoka *et al.*, 2009)。この特徴的な欠失により抵抗性 *pi21* タンパク質が有する相互作用因子との結合ドメインの構造が変化し、抵抗性を獲得したという仮説を立てた。これを検証するために、Yeast two-hybrid 法(Y2H)を用いて、*pi21* と相互作用する因子の単離を試みたところ、植物の栄養状態や糖の転流に重要な役割を果たすタンパク質リン酸化酵素である SnRK1 を構成する 2 つのサブユニット SnRK1 と SnRK1 を *pi21* 相互作用因子として同定した。

2. 研究の目的

いもち病圃場抵抗性遺伝子 *pi21* は、菌系特異性が無く安定した抵抗性を付与できることから、実用的な育種利用が進んでいる。遺伝学的手法を用いて単離された *pi21* は機能未知のタンパク質であり(Fukuoka *et al.*, 2009)、抵抗性の発現機構は不明であった。予備の結果から、植物栄養に関連するタンパク質リン酸化酵素 SnRK1 及び SnRK1 と *pi21* が相互作用すること、これらの遺伝子をノックダウンすると、*pi21* に依存したいもち病抵抗性が低下することが明らかにされた。このことから、*pi21*-SnRK1 複合体を起点としていもち病抵抗性が制御されると推定されるが、その抵抗性の実態は不明である。本研究では *pi21* 抵抗性に特徴的な針状型いもち病病斑の形成を通して *pi21*-SnRK1 複合体を介した、いもち病抵抗性発現機構の分子基盤を理解することを目的とした。

3. 研究の方法

- (1) *pi21* 及び *Pi21* による、SnRK1 の自己リン酸化能への影響があるか、*pi21* 及び *Pi21* を共存させることで、大腸菌で発現させた SnRK1 タンパク質の自己リン酸化能が変化するかどうかを調べた。また、同様の方法で、SnRK1 により *Pi21* や *pi21* がリン酸化されるかどうかを調べた。*Pi21* と *pi21* でリン酸化されるアミノ酸残基に差がある場合には、そのアミノ酸残基を変異させた変異型 *pi21* の組換え体イネを作製し、いもち病抵抗性検定を行った。
- (2) *pi21* イネにいもち病を接種する際に観察される特徴的な針状型病斑は、*pi21* の抵抗性に関わる相互作用因子の遺伝子発現の組織局在性との関係があると考えられた。これを検証するために、いもち病病斑周辺における *pi21* 相互作用因子の遺伝子発現をレポーター遺伝子を用いることで可視化し、病斑の形成のメカニズムを解析した。また、蛍光発現いもち病を接種して、リアルタイムに病斑形成と抵抗性関連遺伝子の発現を顕微鏡下で観察した。
- (3) 糖濃度を 0.05% から 2% に改変した培地を作成し、*pi21*-SnRK1 および *Pi21*-SnRK1 の結合能が変化するか否かを調べた。相互作用を確認するため、大腸菌や小麦胚芽あるいはイネプロトプラストで発現させたタンパク質で、GST pull down 法や免疫沈降法を実施した。
- (4) いもち病菌の糖の利用形態の違いを調べるため、炭素源を除いた最小培地に、グルコース、ショ糖、可溶性デンプン、不溶性デンプンを炭素源として加え、それにいもち病菌を培養し、生育に差があるかどうかを検証した。
- (5) ゲノム編集には、CAS9 による遺伝子欠損の方法を利用した。ガイド RNA は SnRK1 のそれぞれに特異的な配列三カ所を用いた。得られたゲノム編集個体に関して、ゲノム DNA を抽出し PCR と適当な制限酵素によって、変異の導入を確認した。
- (6) 量子研究機構高崎研究所の協力を得て、炭素および窒素のラジオアイソトープの取り込み実験を行った。イネ系統は Q1 (*pi21* 愛知旭 NIL、抵抗性) と愛知旭 (*Pi21*、罹病性) を用いた。いもち病菌接種後日数の異なるイネの地上部を切断して、ラジオアイソトープが含まれる培養液に浸すことで吸収させた。植物への吸収後、イメージングプレートを用いてそれぞれの元素の移行を可視化・定量することで吸収量を算定した。
- (7) 病斑の組織観察は *pi21* イネ品種 (*pi21* コシヒカリ NIL) と *Pi21* イネ品種 (コシヒカリ) において、病斑が形成された葉身を脱ケイ酸処理し、パラフィン包埋後横断切片を作成し、染色後

顕微鏡下で観察した。

(8) いもち病菌のイネへの接種試験は、いもち病菌系 Kyu89-246 (レース、003.0) の孢子懸濁液をガーゼで濾過し、濃度を $0.1 \sim 5 \times 10^4$ 個/ml に調整後、全体に噴霧した。恒温高湿の接種槽 (24.5) に 20 時間置き、その後ガラス温室で発病させた。抵抗性の評価は、接種 10~12 日後に孤立病斑の型や接種時展開上位 2 葉の病斑面積割合を調査することで行った。

4. 研究成果

(1) pi21/Pi21-SnRK1 複合体の分子レベルでの差異

抵抗性である pi21 および罹病性の Pi21 との複合タンパク質によって、いもち病抵抗性の発動を制御することが考えられた。これらの複合体を、大腸菌、および小麦胚芽のシステムを用いて、複合体タンパク質を作成した。この複合タンパク質に、32P を用いて自己リン酸化能を調査した。しかし、自己リン酸化能は確認することが出来なかった。

(2) 遺伝子発現の組織局在性と病斑形成

各 SnRK1 および の遺伝子に関して上流配列を取得し、それぞれレポーター遺伝子であるグルクロニダーゼ遺伝子に連結したコンストラクトをイネに導入した。その結果、抵抗性および罹病性品種、およびいもち病接種に関わらず、維管束の師部および原生導管が染色され、また、葉肉細胞が薄く染色されたが大きな組織局在性の変化は見られなかった。

(3) 糖による pi21 及び Pi21 と SnRK1 の結合性の違い

(1) で示したが、抵抗性である pi21 および罹病性の Pi21 との複合タンパク質によって、いもち病抵抗性の発動を制御することが考えられた。そこで、これらの複合タンパク質をそれぞれ作成し、その抵抗性の発動する条件を模索した。糖の影響が考えられたが、GSP-pull down によってその差異を見出すには至らなかった。

(4) 糖代謝、糖といもち病菌の生育

上記、(3) で使用した、糖、および窒素源を用いた培地によって生育調査を行ったが、大きな変化は見られなかった。

(5) ゲノム編集イネなどのいもち病抵抗性検定

SnRK1 および SnRK1 を用いた実験は、遺伝子抑制システムを用いて、pi21 抵抗性が落ちることを確認していたが、これを確認するためにゲノム編集個体を作成して、抵抗性が喪失するかを検証した。その結果、pi21 の抵抗性が著しく落ちることはなかったが、SnRK1 は抵抗性が落ちる傾向にあった。現在、実験の再現性を確認している。

(6) 炭素および窒素の取り込み

抵抗性および罹病性イネ系統にいもち病菌を接種し、炭素および窒素のラジオアイソトープを取り込ませた実験では、炭素の流れには影響はなかった。一方、窒素ではいもち病病斑周辺の葉鞘側に窒素のシグナルが多く見られ、特に罹病性品種で大きなシグナルが観察された (図 1)。このことから抵抗性系統の病斑部では根から運ばれた窒素が少ないと考えられた。この現象を確認するために、蛍光標識をしたいもち病菌で確認すると、抵抗性および罹病性品種ともにいもち病病斑から維管束に沿って葉鞘側方向へ伸びる菌体が観察された (図 2)。いもち病菌は、病斑部分だけではなく、病斑周辺領域へも菌糸を伸ばし、窒素を獲得していることが示唆された。

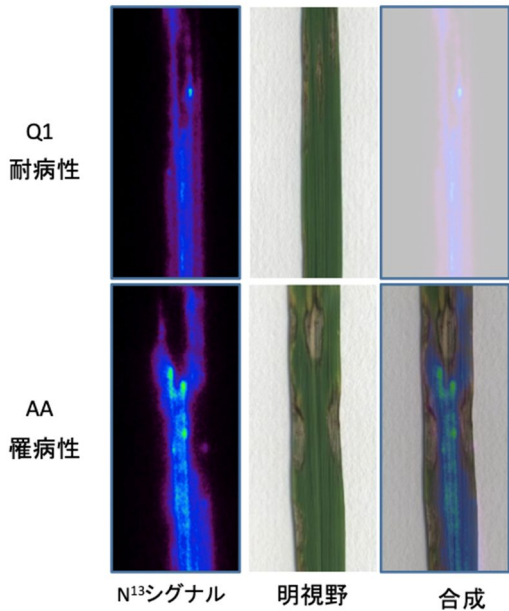


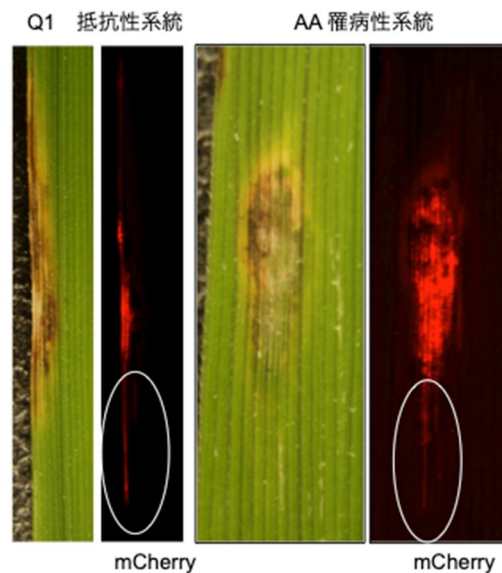
図1. いもち病病斑周辺での窒素 N^{13} のシグナルの分布
シグナルは罹病性で強く、抵抗性系統で弱く検出された。抵抗性系統で窒素供給の制限が示唆された。

図2. RFP導入いもち病菌の*pi21*抵抗性、罹病性系統での増殖

接種後8日目に、実体蛍光顕微鏡で観察した。

(1) 菌糸は病斑の上方（葉身先端）より下方（葉身基部、葉鞘側）へ維管束に沿って伸びた。窒素分布の実験結果と一致した。病斑の上下の様相の違いは窒素の分布を反映したものと考えられる。

(2) 抵抗性系統では、褐変化により菌糸の横への広がりが制限されていた。縦方向の伸長程度は抵抗性、罹病性両系統に違いはなく、*pi21*抵抗性の根底には横への菌糸伸長を阻害する機構（物質）の存在が強く示唆される。



(7) 病斑の組織観察

感受性の*Pi21*イネ系統ではいずれにも褐変が見られなかったが、抵抗性の*pi21*系統では、導管、維管束鞘及びその間の細胞にいもち病菌の菌糸が見られた。篩管には見られなかった。また、導

管及び師管の周辺細胞が褐変していた。抵抗性反応のひとつのリグニン化と考えられた。細胞壁の肥厚化については判断できなかった。

<引用文献> : Fukuoka *et al.* , 2009. Loss of function of a proline-containing protein confers durable disease resistance in rice. *Science* 325:998-1001.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Fukuta, Y., Telebanco-Yanoria, M. J., Hayashi, N., Yanagihara, S., Machungo, C. W., Makihara, D.	4. 巻 103
2. 論文標題 Pathogenicities of rice blast (<i>Pyricularia oryzae</i> Cavara) isolates from Kenya	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Plant Disease	6. 最初と最後の頁 3181-3188
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1094/PDIS-04-19-0870-RE	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 Nguyen T. M. Nguyet, Hoang H. Long, Nguyen B. Ngoc, Nguyen T. Nhai, Nguyen T. T. Thuy, Nagao Hayashi, and Yoshimichi Fukuta	4. 巻 104
2. 論文標題 Diversity and distribution of rice blast (<i>Pyricularia oryzae</i> Cavara) races in Vietnam	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Plant Disease	6. 最初と最後の頁 381-387
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1094/PDIS-05-19-1008-RE	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 X Liu*, H Inoue*, X Tang, Y Tan, X Xu, C Wang, CJ Jiang *contribution equally	4. 巻 21
2. 論文標題 Rice OsAAA-ATPase1 is Induced during Blast Infection in a Salicylic Acid-Dependent Manner, and Promotes Blast Fungus Resistance	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 1443
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms21041443	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 Haruhiko Inoue and Nagao Hayashi	4. 巻 53
2. 論文標題 The panicle blast resistance mechanism of qPbm11 in the rice cultivar, Miyazaki-mochi is independent from that of Pb1.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 JARQ	6. 最初と最後の頁 289-293
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.6090/jarq.53.289	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 -

1. 著者名 Kitazawa, N., Shomura, A., Mizubayashi, T., Ando, T., Nagata, K., Hayashi, N., Takahashi, A., Yamanouchi, U., and Fukuoka, S.	4. 巻 69
2. 論文標題 Rapid DNA-genotyping system targeting ten loci for resistance to blast disease in rice	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Breeding Science	6. 最初と最後の頁 68-83
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1270/jsbbs.18143	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 Yoshihisa Ueno, Akane Matsushita, Haruhiko Inoue, Riichiro Yoshida, Chang- Jie Jiang & Hiroshi Takatsuji	4. 巻 12
2. 論文標題 WRKY45 phosphorylation at threonine 266 acts negatively on WRKY45-dependent blast resistance in rice	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Plant Signaling & Behavior	6. 最初と最後の頁 1559-2324
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/15592324.2017.1356968	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 Haruhiko Inoue, Mitsuru Nakamura, Tatsumi Mizubayashi, Akira Takahashi, Shoji Sugano, Shuuichi Fukuoka and Nagao Hayashi	4. 巻 10
2. 論文標題 Panicle blast 1 (Pb1) resistance is dependent of at least four QTLs in rice genome	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Rice	6. 最初と最後の頁 36
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12284-017-0175-0	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 -

〔学会発表〕 計1件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 林長生、山内歌子、安藤露、福岡修一、高橋章
2. 発表標題 北海PL9に見いだされたイネいもち病真性抵抗性遺伝子Pit-h
3. 学会等名 日本育種学会第136回講演会
4. 発表年 2019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
研究 分担 者	井上 晴彦 (Inoue Haruhiko) (10435612)	国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・生物機能利用研究部門・上級研究員 (82111)	

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
---------	---------