

令和元年9月12日現在

機関番号：81202

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K15212

研究課題名(和文)新規いもち病菌Avr遺伝子およびイネ罹病性遺伝子の単離

研究課題名(英文) Isolation of novel R-Avr gene pair for blast resistance in rice and susceptibility gene in rice

研究代表者

清水 元樹 (Shimizu, Motoki)

公益財団法人岩手生物工学研究センター・ゲノム育種研究部・研究員

研究者番号：90734343

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、新規のイネいもち病抵抗性遺伝子および、その認識を受けるいもち病菌側因子(AVR)の単離を行い、最終的にAVRの宿主標的因子として罹病性遺伝子を同定することを目標とした。これを達成するため、新規のイネペア抵抗性遺伝子(Pias: Pias-1, Pias-2)とPiasに認識されるいもち病菌側因子であるAVR-Piasの単離に成功した。Piasは本研究で開発した「RalDeN法」により同定した。本技術は、基準配列を必要とせず迅速に候補抵抗性遺伝子を選抜できることから、極めて有用性が高いと考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究において、イネいもち病に対する新規のイネペア抵抗性遺伝子(Pias: Pias-1, Pias-2)およびその相互作用因子であるイネいもち病菌因子(AVR-Pias)の単離に成功した。また、Piasの単離によって抵抗性遺伝子の進化に関わる重要な知見が得られた。さらに、抵抗性遺伝子を迅速に同定する方法として「RalDeN法」を考案し、実際に新規抵抗性遺伝子としてPiasの単離を行ったことで本手法の有効性が示された。

研究成果の概要(英文)：The aim of this research is to isolate a novel blast resistance gene in rice and its cognate AVR gene, that is recognized by the resistance gene, and finally to identify a susceptibility gene; a host plant target factor for AVR gene. In order to achieve these objectives, we successfully isolated a novel pair of rice blast resistance gene (Pias-1, Pias-2) and AVR-Pias; a fungal/pathogen factor that is recognized by Pias. In this study, we developed and employed a fast and easy method of resistance gene identification called "RalDeN" for identification of Pias.

研究分野：遺伝育種科学

キーワード：抵抗性遺伝子 AVR遺伝子 次世代シーケンサー

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

農業生産の現場において、病原菌によって引き起こされる病害は、生産量や品質を低下させる最大要因の一つである。病害防除には主に農薬等が用いられるが、環境への負荷や生産コストの軽減を考慮すると、抵抗性品種の育種が最も効果的である。現在行われている抵抗性育種の多くは、植物が持つ抵抗性遺伝子を利用している。多くの抵抗性遺伝子産物は病原菌が分泌する非病原力因子 (AVR) を認識することで抵抗性反応を引き起こす。この認識機構は非常に特異性が高く抵抗性遺伝子と AVR 遺伝子には 1 対 1 の対応関係が存在する。植物は自身が持つ抵抗性遺伝子に対応する AVR 遺伝子を持つ病原菌に対して強力な抵抗性を示すが、一方で病原菌は抵抗性遺伝子からの選択圧により、AVR 遺伝子の変異/欠失によりレースを分化させる。従って、育種上、新規レースの出現に応じて新たな抵抗性遺伝子を探索し続ける必要があるが、遺伝子の資源には限界があるため、抵抗性遺伝子を利用した抵抗性育種は、常に崩壊の危険性に曝されている。そこで、病原菌が宿主に感染するために必要な宿主因子の機能を低下させることができれば、広範囲の病原菌レースに対する抵抗性を宿主植物に付与することができると考えられている。こうした宿主因子をコードする遺伝子を、罹病性遺伝子と呼ぶ。罹病性遺伝子の利用は、持続的な抵抗性をもたらすことが期待されるが、罹病性遺伝子の同定に関する報告例は少ない。

これまでに、イネいもち病菌が持つ数種の AVR 遺伝子の単離が報告されている。一例として、いもち病菌因子 AVR-Pik はイネの抵抗性遺伝子産物である Pik に認識され抵抗性を誘導してしまう。しかし、Pik が存在しない状況では逆に宿主 (罹病性) 因子と相互作用することで病原性を増大させると予想される。そこで、イネ抵抗性遺伝子に対応するイネいもち病菌 AVR 遺伝子を単離し、AVR タンパク質の宿主における相互作用因子を同定することにより効率的に罹病性遺伝子が単離できると考えた。

2. 研究の目的

本研究では、イネ-イネいもち病菌相互作用の実験系を用い、外国稲由来の新規抵抗性遺伝子と、それに対応するイネいもち病菌 AVR 遺伝子を単離し、AVR 遺伝子産物の宿主における標的因子を同定する事により、罹病性遺伝子を獲得することを目標とする。

3. 研究の方法

新規抵抗性遺伝子の単離

本研究では、報告者が考案した新技術、「RaIDeN 法」によって新規のイネいもち病抵抗性遺伝子を同定・単離する。「RaIDeN 法」は以下の点を考慮に入れて開発を進めた。(A) 現在までに単離されている抵抗性遺伝子の約 90% が Nucleotide-binding Leucine rich repeat protein (NLR), Receptor like kinase protein (RLK), Receptor like protein (RLP) を含む Resistance Gene Analog (RGA) に分類される。とりわけ病原菌が分泌するエフェクターを認識して強度抵抗性を誘導する NLR 遺伝子の単離報告が最も多い。(B) NLR 遺伝子は、抵抗性遺伝子の有力な候補となり得るものの、変異に富み保存性が低いため、公開されている基準配列を基に解析を進めても目的とする抵抗性遺伝子の単離に至らない可能性がある。(C) 近年、次世代シーケンサーにかかる費用が下がり続けていることを受け、抵抗性親系統のゲノム配列をコンティグ (*De novo* assembly) で得られる配列断片群) レベルで独自に決定することが可能となった。こうした状況を受けて、「RaIDeN 法」を開発した。「RaIDeN 法」は、(1) 独自に決定した抵抗性親系統のゲノム配列を基準配列として RNA シークエンスを使って遺伝子予測を行い、その中から RGA 候補を選抜する、(2) 予測された RGA 遺伝子群を対象として、抵抗性親系統と感受性親系統および感受性後代系統が共通した差異 (SNP、Presence/Absence) を持つ遺伝子を候補遺伝子として同定する方法である。同定された候補遺伝子は、遺伝子ノックダウン (RNAi) および遺伝子ノックアウト (CRISPR/CAS9) 系統を作出後、接種検定に用いたイネいもち病菌株を接種することで機能を確認する。

AVR 遺伝子の単離

イネいもち病菌の全ゲノム連関解析に加え、遺伝子発現情報を利用することで、候補 AVR 遺伝子を迅速に選抜する。これまでに、感受性宿主感染時の経時的な RNA シークエンスを実施し、イネいもち病菌の全遺伝子発現情報から、遺伝子発現パターンの分類を行った。得られた遺伝子発現パターンから、既知の AVR 遺伝子 (AVR-Pik、-Pia、-Pii、-Pig、-Pib) の発現パターンが類似していた。よって、新規 AVR 遺伝子も同様の発現パターンに分類される可能性が高い。イネいもち病菌の AVR 遺伝子の探索には、複数のいもち病菌レースに対する宿主側の抵抗性反応と菌のゲノム上の変異との連関解析が用いられてきたが、本研究では、さらに罹病性宿主に感染したいもち病菌側の遺伝子発現情報を加えることにより、候補遺伝子をごく少数までに絞りこむ。得られた候補遺伝子は、目的とする AVR 遺伝子を持たないイネいもち病菌株に形質転換後、対応する抵抗性遺伝子を持つイネ系統に接種試験を行うことでその機能を確認する。

4. 研究成果

(1) 迅速な病害抵抗性遺伝子同定法「RaIDeN 法」の確立とそれを用いた新規ペア抵抗性遺伝子 (Pias) の単離

イネいもち病菌‘2012-1 菌株’に対して抵抗性を示すインディカ系統‘Ib3’と感受性を示す‘ひとめぼれ’とその後代 Recombinant Inbred Lines (RILs) を植物材料として用いた。RILs 68 系統に対して‘2012-1 菌株’を接種したところ抵抗性個体と感受性個体が 60(7.5) : 8(1) の頻度で分離した。この分離比から、抵抗性親系統である‘Ib3’の‘2012-1 菌株’に対する抵抗性形質は少なくとも 2 つ以上の抵抗性遺伝子によって決定付けられていることが示唆された。そこで、本研究で考案した「RaIDeN 法」によって‘Ib3’が持つ複数の抵抗性遺伝子の同定が実際に可能か調査した。特に、単離されているイネいもち病抵抗性遺伝子の大半が NLR 遺伝子であることから NLR 遺伝子に注目した。解析の結果、13 の NLR 遺伝子が抵抗性親系統‘Ib3’と感受性親系統‘ひとめぼれ’および感受性を示す RILs の間において共通した配列上の差異 (SNP、Presence/Absence) を示した。更に、13 候補遺伝子に対して‘Ib3’と‘ひとめぼれ’の配列の違いを利用して遺伝子マーカーを個々に設計し、植物材料として用いた RILs について遺伝子型解析および連鎖解析を行った。連鎖解析の結果、13 候補遺伝子は、2 つの抵抗性遺伝子座 (*Pi-Ib3-1*: 11 遺伝子、*Pi-Ib3-2*: 2 遺伝子) に分かれた。抵抗性を示した RIL の特徴として、*Pi-Ib3-1*、*Pi-Ib3-2* の一方、または両方を持つことから、この 2 遺伝子座が‘2012-1 菌株’に対する抵抗性系統‘Ib3’が持つ抵抗性形質の原因領域であると結論づけた。

Pi-Ib3-1、*Pi-Ib3-2* の原因遺伝子を以下の方法で単離した。

Pi-Ib3-1 (*Pias*) の単離

RILs から *Pi-Ib3-1* のみを持つ系統 (HW-RIL7) を選抜しそれぞれの候補遺伝子のノックダウン (RNAi) 系統を作出し、‘2012-1 菌株’を接種したところ、隣接関係にある *CNL-69*、*CNL-70* の RNAi 系統が明らかな感受性を示した。さらに、*CNL-69*、*CNL-70* の遺伝子ノックアウト系統を作成後、‘2012-1 菌株’を接種したところ明らかな感受性を示した (図 1)。

CNL-69、*CNL-70* は既知のペア抵抗性遺伝子 *Pia* (*RGA4* と *RGA5* の 2 遺伝子からなる) の相同領域に位置していた。ここで、*CNL-69* を *Pias-1*、*CNL-70* を *Pias-2* にそれぞれ改名した。*RGA4* と *Pias-1* は高い相同性を示すのに対して、*RGA5* と *Pias-2* には明らかな配列の差異がみられた (図 2)。 *RGA5* は、NLR の他に Integrated domain (ID) として HMA (Heavy-metal associated)

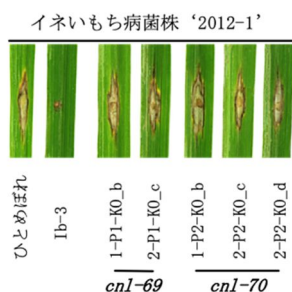


図1 *CNL-69*および*CNL-70*の遺伝子ノックアウト系統の接種試験

ドメインを有しており、イネいもち病菌因子である AVR-*Pia* が HMA ドメインと結合することで *RGA4* を介した強度の抵抗性を誘導することが明らかになっている。本研究で単離した *Pias-2* には、ID として DUF (Domain of Unknown Function) 761 が組込まれ、イネいもち病菌因子である AVR-*Pias* の結合領域として考えられる。興味深いことに、*RGA5* 対立遺伝子 (*RGA5*、*Pias-2* など) の遺伝子群は、ID を多様化することで、種々の病原菌に対する適応度を高めるように進化したと考えられる。

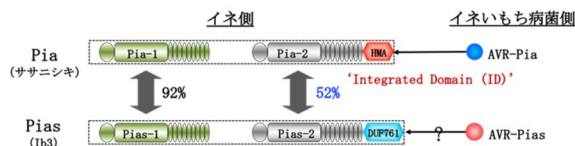


図2 *Pia*と*Pias*の構造の比較

Pi-Ib3-2 の同定

Pi-Ib3-2 の候補遺伝子には既知の抵抗性遺伝子 *Pita* の splice variant である *NL-3* が含まれていた。抵抗性遺伝子 *Pita* の相互作用因子であるいもち病菌因子 AVR-*Pita* がすでに単離されている。そこで、*Pi-Ib3-2* のみを持つ RIL (HW-RIL6) に対して感受性を示すいもち菌株 (Ao92-06-2) を材料にして‘2012-1 菌株’が持つ AVR-*Pita* 遺伝子を導入した形質転換菌株を作出し、同 RIL 系統に接種試験を行ったところ抵抗性が誘導された。この結果から、*NL-3* が *Pita* であることが強く示唆された。

本研究で開発した「RaIDeN 法」は、従来実施されてきた QTL (quantitative trait loci) 解析、大規模集団による遺伝子領域の絞込み (ファインマッピング) などを省略し、少ない手順で候補遺伝子を選抜できたことから、極めて有用性が高いと考えられる。今後、本手法を活用する

ことで、病害抵抗性遺伝子の単離が飛躍的に容易になると推察される。

(2) AVR-Pias の単離

まず、所属機関が維持している複数のイネいもち病菌株を *Pias* のみを持つ RIL (HW-RIL7) に対して接種試験を行った。その結果、HW-RIL7 に感染することのできるイネいもち病菌株が 8 菌株選抜された。これら 8 菌株は AVR-Pias を持たないと考えられる。これまでに単離された AVR 遺伝子の発現が感受性宿主感染後、24 時間および 48 時間に上昇する傾向があることが示されている。そこで、'2012-1 菌株' を感受性宿主に感染後 24 および 48 時間後の感染葉から RNA 抽出を行った。その後、RNA シークエンスを行い、得られたリードを '2012-1 菌株' ゲノム配列にアライメントし、宿主由来リードを除いた。'2012-1 菌株' ゲノム配列は Illumina Miseq によってシークエンスを行い、リードを獲得後 'DISCOVAR De novo' ソフトウェアによって構築した。同様の方法で AVR-Pias を持たないと考えられる 8 菌株のゲノム配列を決定した。'2012-1 菌株' にアライメントされたリードを AVR-Pias を持たない菌株に次々とアライメントすることで、'2012-1 菌株' 特異的なリードを選抜した。次に '2012-1 菌株' 特異的リードを用いてアセンブルを行うことで '2012-1 菌株' にユニークに存在する遺伝子を構築した。これら遺伝子から以下の基準でさらに AVR-Pias の候補遺伝子を 3 遺伝子 (STRG.181、STRG.257、STRG.271) に絞

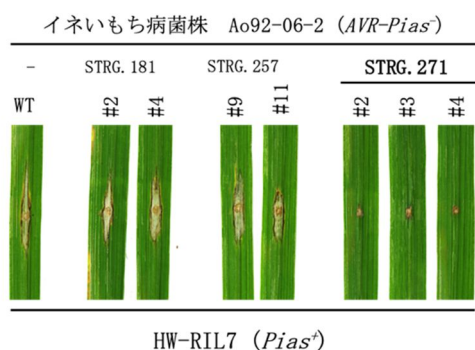


図3 AVR-Pias 候補遺伝子の機能解析

り込んだ。宿主感染後 24 時間の遺伝子発現量が高い (FPKM > 200)。分泌タンパク質をコードする遺伝子である。150 アミノ酸以下のサイズを持つ。候補遺伝子の機能を証明するために、AVR-Pias を持たない菌株 (Ao92-06-2) に導入し、HW-RIL7 への接種試験を行い抵抗性が誘導されるか調査した。その結果、STRG.271 を導入した菌株を接種した場合において、明らかな抵抗性が誘導された (図 3)。よって、STRG.271 が AVR-Pias であることが強く示唆された。AVR-Pias は 91 アミノ酸残基からなる分泌タンパク質である。今後、*Pias* と AVR-Pias の相互作用機構を明らかにする。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 8 件)

Takahashi S, Osabe K, Fukushima N, Takuno S, Miyaji N, Shimizu M, Takasaki-Yasuda T, Suzuki Y, Dennis ES, Seki M and Fujimoto R, Genome-wide characterization of DNA methylation, small RNA expression, and histone H3 lysine nine di-methylation in *Brassica rapa* L (2018), DNA research: 25: 511-20 査読有

Shea DJ, Tomaru Y, Itabashi E, Nakamura Y, Miyazaki T, Kakizaki T, Naher TN, Shimizu M, Fujimoto R, Fukai E and Okazaki K, The production and characterization of a *BoFLC2* introgressed *Brassica rapa* by repeated backcrossing to an F1 (2018), Breeding Sci: 68: 316-25 査読有

Shea DJ, Shimizu M (equally contributed), Itabashi E, Miyaji N, Miyazaki J, Osabe K, Kaji M, Okazaki K and Fujimoto R, Genome re-sequencing, SNP analysis, and genetic mapping of the parental lines of a commercial F1 hybrid cultivar of Chinese cabbage (2018), Breeding Sci: 68: 375-80 査読有

Takahashi S, Fukushima N, Osabe K, Itabashi E, Shimizu M, Miyaji N, Takasaki T, Suzuki Y, Seki M and Fujimoto R, Identification of DNA methylated regions by using methylated DNA immunoprecipitation sequencing in *Brassica rapa* (2018), Crop & Pasture Science: 69: 107-20 査読有

Miyaji N, Shimizu M (equally contributed), Miyazaki J, Osabe K, Sato M, Ebe Y, Takada S, Kaji M, Dennis ES, Fujimoto R and Okazaki K. Comparison of transcriptome profiles by *Fusarium oxysporum* inoculation between *Fusarium* yellows resistant and susceptible

lines in *Brassica rapa* L (2017), Plant Cell Rep: 36: 1841-1854 査読有

Shea DJ, Shimizu M, Nishida N, Fukai E, Abe T, Fujimoto R and Okazaki K, IntroMap: a signal analysis based method for the detection of genomic introgressions (2017), BMC genet: 18: 101 査読有

Hoque M, Shea DJ, Asada M, Doullah MA, Shimizu M, Fujimoto R, Fukai E and Okazaki K, QTL mapping for tuberous stem formation of kohlrabi (*Brassica oleracea* var. *gongylodes* L.) (2017), Mol Breed: 37: 109 査読有

Tamiru M, Natsume S, Takagi H, White B, Yaegashi H, Shimizu M (equally contributed), (以下26名省略), Genome sequencing of the staple food crop white Guinea yam enables the development of a molecular marker for sex determination (2017), BMC biology: 15: 86 査読有

〔図書〕(計1件)

Terauchia R, Fujisaki K, Shimizu M, Oikawa K, Takeda T, Takagi H, Abe A, Okuyama, Yoshida K, Saitoh H. Using genomics tools to understand plant resistance against pathogens: A case study of Magnaporthe-rice interactions (2019) Applied Plant Biotechnology for Improving Resistance to Biotic Stress, Elsevier

6. 研究組織

(1)研究代表者

清水 元樹 (SHIMIZU MOTOKI)

所属研究機関名：公益財団法人岩手生物工学研究センター

部局名：ゲノム育種研究部

職名：研究員

研究者番号(8桁)：90734343

(2)研究協力者

平淵 亜紀子 (HIRABUCHI AKIKO)

所属研究機関名：公益財団法人岩手生物工学研究センター

部局名：ゲノム育種研究部

職名：研究技術員

神崎 英子 (KANZAKI EIKO)

所属研究機関名：公益財団法人岩手生物工学研究センター

部局名：ゲノム育種研究部

職名：研究技術員

佐藤恵美子 (SATO EMIKO)

所属研究機関名：公益財団法人岩手生物工学研究センター

部局名：ゲノム育種研究部

職名：研究技術員