

令和 3 年 6 月 8 日現在

機関番号：11201

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2020

課題番号：18K05568

研究課題名（和文）アブラナ科植物の相補的に機能する病害抵抗性遺伝子の単離と育種基盤の整備

研究課題名（英文）Cloning of the responsible genes complementary for clubroot resistance and improving of the resistance breeding base

研究代表者

畠山 勝徳（Hatakeyama, Katsunori）

岩手大学・農学部・准教授

研究者番号：60355625

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,400,000円

研究成果の概要（和文）：ハクサイ根こぶ病抵抗性遺伝子座Crr1bとCrr2は共存したときのみ抵抗性を誘導し、これらの推定座乗領域には2つのORFが存在する。候補ORFを様々な組合せでもつ形質転換シロイヌナズナを作出し、抵抗性に寄与する遺伝子の同定を試みた。Crr1bの2つのORFをもつ個体では過敏感反応による黄化症状が認められたことから、これらはペアで機能する遺伝子である可能性が示唆された。黄化はハクサイ（*B. rapa*）に由来するNLR遺伝子をシロイヌナズナに導入したことが起因していると考えられたことから、候補ORF導入個体の根こぶ病抵抗性の評価は*B. rapa*の遺伝背景で行う必要があることが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

病害抵抗性の向上は品種改良において重要な目標の一つである。本研究では、ハクサイの根こぶ病抵抗性遺伝子座Crr1bに存在する2つのNLR遺伝子をシロイヌナズナに導入すると過敏感反応が誘導されることが明らかになった。これらのNLR遺伝子はシロイヌナズナには存在せず、ハクサイが新たに獲得した遺伝子であると考えられる。本研究で得られた結果は、NLR遺伝子の進化を理解する上で重要な知見となる。また、Crr1bの2つのNLR遺伝子がペアで機能する可能性を示唆する知見が得られた。これらの知見は、DNA情報を利用した効率的な選抜技術の開発に有用であると考えられる。

研究成果の概要（英文）：Brassica rapa clubroot resistance locus, Crr1b, confers resistance only in combination with another locus, Crr2, and each locus has two candidate ORFs. To identify the responsible genes for each locus, we produced transgenic Arabidopsis harboring a single ORF and crossed with each line to stack ORFs. We found that necrosis caused by autoimmunity was found in the transgenic lines harboring two ORFs from Crr1b. We produced the stacking line harboring two ORFs from Crr1b and one of ORFs from Crr2, and inoculated clubroot isolates. All the stacking line showed necrosis and did not show clear resistance to clubroot. These results suggests that two ORFs of Crr1b work in pairs and introgression of *B. rapa* genes to Arabidopsis background would results in NLR mis-regulation and autoimmunity.

研究分野：植物育種学

キーワード：病害抵抗性遺伝子 ハクサイ 根こぶ病 形質転換

1. 研究開始当初の背景

根こぶ病は絶対寄生性の病原体 *Plasmodiophora brassicae* によって引き起こされ、ハクサイ (*Brassica rapa*)、キャベツ (*B. oleracea*) などのアブラナ科野菜の栽培において重要な土壌伝染性病害である。ハクサイでは、ヨーロッパに由来するカブ品種の中に抵抗性の素材が見出され、根こぶ病抵抗性 (以下、CR) 品種の育種が進められており、今日ではハクサイ品種のほとんどが CR を有している。しかし、土中には異なる病原型の菌系が混在しているため、病原型分化により CR 品種が発病する事例が報告されており、より高度な抵抗性を示す品種の育成が求められている。CR 系統 G004 において同定された *Crr1* と *Crr2* は、異なる病原型を示す菌系を用いた QTL 解析によって同定された CR 遺伝子座である。ハクサイ染色体 A08 上の *Crr1* は単独で抵抗性を示すものの、より広宿主性の菌系には抵抗性を示さない。A01 上の *Crr2* は単独では根こぶ病抵抗性を発揮せず、*Crr1* と共存すると広宿主性の菌系に対しても抵抗性を発揮する (Suwabe et al. 2006)。これらのことから、*Crr1* は病害抵抗性の主動遺伝子であり、*Crr2* は病原型特異性を高める modifier 遺伝子あると考えられていたが、*Crr1* のクローニングを進めていく過程で、*Crr1* 座には単独でグループ 2、4 の菌系に抵抗性に寄与する *Crr1a* と、*Crr2* と共にグループ 1、2、4 の菌系に対する抵抗性に寄与する *Crr1b* の 2 つの遺伝子が存在することが明らかになった。*Crr1a* については、CR 系統 G004 と罹病性系統 A9709 の交雑後代の組換え個体を用いて座乗領域の絞り込みとシロイヌナズナを用いた相補性試験によって NLR (Nucleotide-binding and leucine-rich repeat receptor) タンパク質をコードする 1 つの ORF が責任遺伝子であることを証明した (Hatakeyama et al. 2013)。次に我々は相補的に機能する *Crr1b* と *Crr2* の責任遺伝子の同定を進めることとした。これまでに *Crr1b* 座をカバーする BAC クローンの単離・整列化を行い、その座乗領域を約 55kb まで絞りこむことができています。この領域内に推定されている 4 つの ORF (*Crr1b_ORF1* ~ *ORF4*) のうち、NLR タンパク質をコードし、A9709 ゲノムに存在しない *Crr1b_ORF2* と *Crr1b_ORF4* が見いだされている。この 2 つの ORF は head to head で存在していた。一方 *Crr2* については、その座乗領域を約 12kb まで絞りこんでおり、この領域内には NLR とは異なるタンパク質をコードする 2 つの *Crr2_ORF3* と *Crr2_ORF4* が推定されている。

2. 研究の目的

相補的に機能する 2 つの根こぶ病抵抗性遺伝子座 *Crr1b* と *Crr2* には計 4 つの候補 ORF が存在するが、これらがどのような組み合わせにより根こぶ病菌グループ 1、2、4 に対して抵抗性を誘導するのかが明らかになっていない。本研究では、2 つの抵抗性遺伝子座に見いだされた ORF を導入した形質転換体を作成し、それらを交雑することにより遺伝子を集積した系統を作成することによってそれぞれの遺伝子座の責任遺伝子を同定することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 導入遺伝子の構築、ORF の集積系統の作出

Crr1b_ORF2 と *Crr1b_ORF4* については、全長のゲノム DNA 断片を既報の *Crr1a* のプロモーターに連結したコンストラクトを作成し、シロイヌナズナに形質転換した。*Crr2_ORF3* および *Crr2_ORF4* については、プロモーター、コード領域、3'非翻訳領域を含むゲノム DNA 断片を挿入したベクターを構築し、シロイヌナズナに形質転換した。形質転換体の自殖後代から 4 つの ORF を単独で有するホモ系統を作成し、それらを交雑して *Crr1b* の 2 つの ORF を有する系統、*Crr2* の 2 つの ORF を有する系統、*Crr1b* の 2 つの ORF と *Crr2* の 1 つの ORF をもつ系統を作成した。導入遺伝子の検出は、CTAB 法で抽出した DNA を鋳型にして PCR によって行った。

(2) トリパンブルー染色による細胞死の検出

トリパンブルー染色は、Koch and Slusaerenko (1990) および Rate ら (1999) の方法を参考にして行った。シロイヌナズナのロゼット葉を 1 個体につき 1~2 枚切り取り、1.5 ml のエッペンチューブに入れた。チューブに 1 ml の trypan blue 溶液をロゼット葉が完全に漬かるように注いだ後、100°C で 5 分間インキュベートし、8~9 時間室温で静置した。その後、慎重に trypan blue 溶液のみをデカントした。チューブに抱水クロロラル水溶液を 1.0 ml 加え、Micro Mixer E-36 (タイテック株式会社) の中程度のスピードで 10 分程振盪し、サンプルよりしみ出た染色液により着色した抱水クロロラル水溶液を新たなものに置換した。サンプルをスライドガラスに置き、抱水クロロラル水溶液を 30 µl 程たらしカバールガラスで封入し実体顕微鏡で観察した。

(3) DAB (四塩酸 3,3'-ジアミノベンジジン) 染色

葉柄を長く保持残した葉をシロイヌナズナのロゼット葉を 12 ウェルプレートに 1 個体につき 1~3 枚入れ、0.1 % DAB 溶液を 2 ml 入れた。バキュームで真空状態を 5 分間維持し、0.1 % DAB 溶液を葉に浸透させた後、12 ウェルプレートをアルミホイルで包んで遮光し、4~5 時間室温で静置した。室温で静置後、サンプルのみを注意深く取り出し、15 ml チューブに移した。15 ml チューブに 2 ml の bleaching solution (エタノール : 酢酸 : グリセロール = 3:1:1) を注ぎ、70°C に温めたウォーターバスで 30 分間インキュベートし、葉に含まれるクロロフィルの脱色を行った。スライドガラスにサンプルを置き、30 µl 程 bleaching solution をたらしカバールガラスで封入し

実体顕微鏡を利用して観察した。

(4)根こぶ病菌の接種検定

病原型グループ4のAno-01のストックを滅菌水で約 10×10^6 胞子/mlに希釈した懸濁液を作製し、本葉が展開した播種より8~9日後のシロイヌナズナの株元に懸濁液を1ml灌注して行った。根部病徴は接種より21日後に0、1、2、2.5、3の5段階の病徴指数(0=病徴なし、根部にこぶが着生せず細い根が伸長する、1=根部の顕著な肥大は認められないが、主根下部に細長い根が複数伸長していない、2=中間の形質、主根に大きなこぶが着生する、2.5=主根基部が大きく肥大しているが、主根下部に細長い根が複数伸長する、3=主根基部が大きく肥大する)により評価した。

4. 研究成果

(1)候補ORFを単独、2つ有する系統の根こぶ病抵抗性

*Crr1b*と*Crr2*の候補ORFを単独で有する系統を選抜し、根こぶ病を接種したが、いずれの系統も主根に根こぶが形成され、罹病性であると判断された。次に*Crr1b*と*Crr2*のORFを1つずつもつ系統に根こぶ病菌を接種したところ、全ての系統で根こぶが形成され、罹病性であると判断された。以上のことから、*Crr1b*と*Crr2*のORFを1つずつ持たせても抵抗性は誘導されないと考えられた。

(2)*Crr1b*の2つのORFを持つ系統の解析

*Crr1b_ORF2*と*Crr1b_ORF4*をホモでもつ系統間の交雑により育成した両ORFをヘテロで有するF₁系統は、土に移植後数日で葉の黄化が認められた。系統の中には枯死してしまうものもあった。そのため、この黄化症状について詳細に解析することとした。この黄化症状が*Crr1b_ORF2*と*Crr1b_ORF4*の2つのORFを持つことにより生じる現象なのかどうかを確認するために、比較的症状の軽い系統からF₂種子を採種し、表現型と導入遺伝子の有無を調査した。F₂では黄化が見られる個体と野生型の個体が分離し(図1)PCR解析により黄化した全ての個体において2つのORFの導入が確認された。このことから、黄化は*Crr1b_ORF2*と*Crr1b_ORF4*をもつことにより生じていることが示唆された。F₁個体を用いて、黄化と過敏反応の関係を検証した。F₁個体の葉を用いてトリパンブルー染色とDAB染色を行ったところ、野生型に比べてF₁では顕著な細胞死と過酸化水素水の蓄積が認められた(図2)。



図1. *Crr1b*のORF2とORF4を有するシロイヌナズナF₂系統における黄化表現型の分離

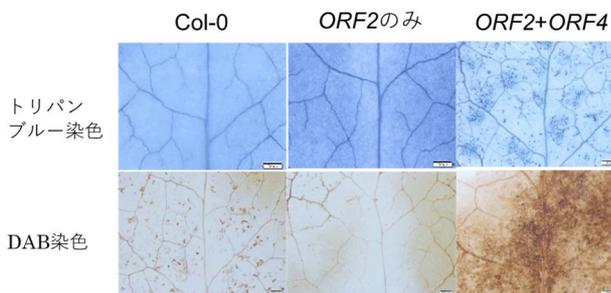


図2. シロイヌナズナ野生型、*Crr1b*のORF2のみをもつ個体、ORF2とORF4をもつ個体のロゼット葉におけるトリパンブルー染色およびDAB染色の様子

の蓄積が認められた(図2)。細胞死の発生および過酸化水素の蓄積は、植物が病原体の侵入に対しての対抗策として誘導する典型的な過敏反応である(Mur et al. 2008)。過敏反応に伴って生じる細胞死は特に過敏細胞死と呼ばれ、植物体内に侵入してきた病原体の増殖を防ぐため自発的な細胞死である。これらのことより、*Crr1b*のORF2とORF4を集積させた個体で見られた黄化や矮化表現型は、過敏反応によって生じていると考えられた。また、F₁個体を22と28で生育させると、22では黄化症状が認められるが、28では野生型と同様に生育した。同様な現象は、シロイヌナズナの*SNCI*の機能欠損変異体でも認められており(Mang et al. 2012)、*Crr1b*の2つのORFを有するシロイヌナズナではSAが介する免疫反応が起こっていると考えられる。*Crr1b_ORF3*と*Crr1b_ORF4*は、単独では過敏反応を誘導せず、2つをもつと過敏反応が誘導されることから、*Crr1b*のORF2とORF4はペアで機能する遺伝子であることが示唆された。

*Crr1b*の2つのORFは根こぶ病抵抗性系統G004から単離されたものであるが、G004では通常の栽培では黄化症状は発生しない。そのため、本研究で確認された過敏反応は、*B. rapa*の遺伝子をシロイヌナズナに導入したことによって生じたと考えられる。*B. rapa*と*A.thaliana*はどちらもアブラナ科の植物である。2種が共通祖先種から分化し、進化の過程で*B. rapa*のみが*Crr1b*のORF2とORF4を獲得したが、シロイヌナズナはこの2つの遺伝子を獲得出来なかったと仮定すると、*B. rapa*においてはこの2つの遺伝子が相互作用し、ペアで根こぶ病菌に対して抵抗性を誘導するように進化したと考えられる。シロイヌナズナはこの2つの遺伝子がコードするタンパク質を適切に制御し、病原体の侵入時のみ抵抗性を誘導するためのネットワークが存在しないため、2つの遺伝子を導入したことによって、シロイヌナズナではゲノム間で異常なネットワークが生じ、病原体の侵入に非依存的な免疫反応、過敏反応が誘導された可能性が考えられる。

(3)複数の ORF をもつ系統間の交雑後代から *Crr1b_ORF2*, *ORF4* に加えて *Crr2* の 1 つの ORF をもつ個体を選抜し、根こぶ病菌を接種すると、根こぶの形成が認められない個体が認められたが、全ての個体において黄化に伴う生育不良のために病徴評価は困難であった。シロイヌナズナの遺伝背景では過敏反応が生じてしまうため、*B.rapa* を用いた実験系を確立することにより、責任遺伝子の同定を試みる必要がある。この実験系の確立に向けて、*Crr1b* の 2 つの ORF についてコマツナへの遺伝子導入を行い、これまでに *Crr1b_ORF2* の形質転換体を得ることができた。*Crr1b_ORF4* については形質転換を継続中である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 秋田谷 茉那, 高橋 美紗子, 松元 哲, 高畑 義人, 畠山 勝徳
2. 発表標題 根こぶ病抵抗性遺伝子座Crr1bの候補ORF集積系統における致死表現型
3. 学会等名 第14回東北育種研究集会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Hatakeyam, K.
2. 発表標題 Molecular genetics of the clubroot resistant genes in Chinese cabbage (<i>Brassica rapa</i> L.).
3. 学会等名 2018 International clubroot workshop (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Hatakeyama, K., Takahashi, M., Takahata, Y., Matsumoto, S.
2. 発表標題 Molecular cloning and utilization of the clubroot resistant genes in Chinese cabbage
3. 学会等名 The 3rd International symposium on innovations in plant food sciences
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 秋田谷 茉那, 高橋美紗子, 湯澤彰太, 松元 哲, 高畑義人, 畠山勝徳
2. 発表標題 根こぶ病抵抗性遺伝子Crr1b, Crr2候補ORF導入シロイヌナズナの解析
3. 学会等名 第13回東北育種研究集会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 秋田谷茉那, 清水元樹, 高橋美紗子, 松元 哲, 殿崎薫, 畠山勝徳
2. 発表標題 ハクサイ根こぶ病抵抗性遺伝子Crr1bの候補ORFを集積したシロイヌナズナにおける過敏感反応の誘導
3. 学会等名 日本育種学会第139回講演会
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
---------	---------