

令和 5 年 6 月 9 日現在

機関番号：82111

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2022

課題番号：18K05665

研究課題名(和文) イネにおけるETI誘導制御に必須なシグナル因子の同定と機能解析

研究課題名(英文) Identification and functional analysis of essential factors for ETI induction in rice

研究代表者

高橋 章 (Takahashi, Akira)

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・グループ長補佐

研究者番号：20414914

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)：植物の真性抵抗性遺伝子(R遺伝子)の活性化により誘導されるETI(effector-triggered immunity)の発動制御因子の特定及びその分子機構の解明を目指し、イネいもち病菌に対するETIの誘導が不完全なイネ変異体3系統について、原因遺伝子の単離を進めた。本研究期間中に、3つの変異体の原因遺伝子が特定され、そのうち2つは同一遺伝子の異なるアリル変異であることが明らかとなった。これらの遺伝子は、いもち病菌に対するR遺伝子“Pish”によるETI制御に関与しており、Pishと直接的な相互作用をする可能性があるタンパク質をコードしてい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

植物は免疫専門の細胞を持たないが、独自の免疫システムを進化させてきた。Rタンパク質は植物が病原微生物由来の病原性因子を認識する受容体タンパク質であり、非常に高い保存性を持っているが、その免疫応答の誘導機構はほとんど解明されていない。そこで、我々はRタンパク質の下流で機能する新たなシグナル因子の同定に取り組んだ。本研究では、イネの遺伝解析により、2つの新たなRタンパク質の下流で機能する因子を特定することに成功した。今後の解析により、これらの因子がRタンパク質による免疫応答の誘導にどのように貢献しているかが明らかになり、植物の免疫システムの分子機構の解明につながることを期待される。

研究成果の概要(英文)：To identify the specific factors responsible for activating effector-triggered immunity (ETI) and analyze the molecular mechanisms, we isolated three rice mutant lines which exhibited incomplete induction of ETI against rice blast fungus. We successfully identified the causal genes for all three mutants, revealing that two of them have different allelic variations of the same gene. These genes are involved in the control of ETI mediated by an R gene "Pish" against rice blast fungus. We demonstrated the possibility that these proteins may directly interact with Pish, acting as potential interacting factors.

研究分野：植物保護

キーワード：イネ 抵抗性遺伝子 ETI

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

植物は動物とは異なり、免疫専門の細胞を持たない。しかし、細胞膜上の受容体が微生物の構成成分 (PAMP : pathogen-associated molecular pattern, 病原微生物関連分子パターン) を検出することで抵抗性を誘導する PAMP 誘導免疫 (PAMP-triggered immunity : PTI) を持つ。病原微生物は宿主の PTI 応答を阻害するためにエフェクターと呼ばれるタンパク質を宿主の細胞内へ分泌することで感染を成立させる。これに対抗するため、植物はエフェクターの細胞内受容体として抵抗性タンパク質 (Resistance protein ; R タンパク質) を進化させており、これによって非常に強い免疫応答 (effector-triggered immunity : ETI) を誘導する。さまざまな植物種から多くの R 遺伝子が単離されており、その多くが NBS-LRR 型のタンパク質をコードすることが明らかになっている。しかしながら、その構造の類似性にも関わらず、R タンパク質による認識機構ならびに下流のシグナル活性化機構が明らかになっているものはまだ少ない [Jones et al., Science 2016]。イネにおいても、イネいもち病菌や白葉枯病菌に対する R 遺伝子が多数報告され、イネいもち病菌に対する R 遺伝子は 20 以上単離されてきた [Miah et al. Mol. Biol. Rep. 2013]。イネいもち病菌に対する R タンパク質もそのほとんどが NBS-LRR 型のタンパク質であり、共通したシグナル経路の存在が示唆されている。しかしながら、イネにおいて R タンパク質の下流で機能するシグナル因子については、まだほとんど報告されていない。

2. 研究の目的

本研究では、我々がこれまでに単離したイネいもち病菌に対する ETI の誘導が不完全なイネ変異系統 (tissue-culture triggered mutation : *ttm* 変異体) を用いて、イネにおける ETI 誘導を制御するシグナル因子を特定するとともに、遺伝学的な解析により ETI 特異的シグナル伝達機構について明らかにすることを目的とする。

3. 研究の方法

(1) 解析の対象とする *ttm* 変異体はイネ品種「日本晴」由来の変異系統群であることから、遺伝背景が異なりかつゲノム情報が整備された「コシヒカリ」と交配し後代種子を得た。得られた F2 及び F3 世代約 90 個体を用いて接種検定を行うとともに、日本晴/コシヒカリゲノム間における多型検出 179 マーカーによるタイピングアレイを実施し連鎖解析を行った。さらに、原因遺伝子の候補領域の絞り込みに向け、*ttm* 変異系統のゲノムを次世代シーケンサー (HiSeq および PacBio) で解読した。

(2) 候補遺伝子の相補試験に向け、CRISPR/Cas9 システムを用いてノックアウト (KO) 系統と相補系統を作成した。得られた形質転換イネは隔離温室内で生育させ、いもち病菌に対する表現型を解析した。また、異なるいもち病菌に対する R 遺伝子を持つイネ品種「ハマアサヒ」を用いて、KO 系統を作成した。

(3) いもち病菌は日本晴のもつ R タンパク質“Pish”に認識される菌株 (非親和性菌) として、「Kyu77-07A」を、親和性菌として「稲 093-03」を使用した。

4. 研究成果

解析の対象とするイネの変異体 3 系統 (*ttm5*、*ttm11*、*ttm13*) の交配後代を用いた連鎖解析により、*ttm5* では第 3 染色体の約 1.3Mbp、*ttm13* では第 9 染色体上約 20Mbp の範囲内に候補遺伝子を絞り込むことに成功した。一方、*ttm11* では変異体の表現型と明瞭に連鎖する染色体領

域を見出すことができなかった。さらに候補領域を絞り込むため、これらの変異系統のゲノム配列を HiSeq で解読し、変異体と野生型（日本晴）との間における多型情報を取得した。その結果、*ttn5* では、候補領域内に 5 カ所の多型が検出され、そのうちアミノ酸置換を伴う変異は 1 つのみであった。そのため、この変異が生じた遺伝子を *Ttn5* 候補遺伝子とした。*ttn13* では候補領域内に 16 箇所の多型を検出した。そのうちエキソン内の変異を持つ遺伝子は 3 個に絞られ、それぞれ、転写因子、機能未知タンパク質、レトロトランスポゾンにコードすることが予測された。このうち転写因子について変異と表現型について連鎖解析を行ったところ、非常に高い相関が明らかとなった。*ttn11* 変異体については、この時点でも明瞭に連鎖する染色体領域を特定できなかった。このため、*ttn11* の変異が大きな欠損変異の可能性を考慮し、PacBio を用いたロングリードの全ゲノム情報を得た。これまでの遺伝解析に加え、日本晴及び *ttn5*、*ttn13* のゲノム情報と比較解析したところ、*ttn11* 変異体に約 40bp の欠損変異を見出すことに成功した。興味深いことに、この欠損変異は *ttn13* 変異体の候補遺伝子と同一の遺伝子内に生じており、同一の遺伝子の独立した変異がそれぞれの変異体の表現型を引き起こしていることが示唆された。

そこで、これらの候補遺伝子について、CRISPR/Cas9 システムを用いてノックアウト (KO) 変異系統を作成した。これらの KO 系統後代種子 (T1 世代) を用いて非親和性いもち病菌に対する抵抗性を評価したところ、抵抗性に差がみられる個体が複数観察されたが表現型が不安定であった。ゲノム上の導入変異について調べたところ、評価に用いた T1 世代では T0 世代では見られなかった新たな変異が見られるもの、または変異が受け継がれていないものが複数見られた。このため、表現型が安定しない理由は、ゲノム編集 T1 世代における変異の不安定性に起因している可能性が考えられた。そこで、T2 世代個体を用いて ETI に対する応答を解析することとした。これらの T2 世代では、コントロール区に比べ ETI が減少した。このことから、これらの候補遺伝子が原因遺伝子であることが強く示唆された。しかしながら、KO 系統群による解析では T2 世代を用いても接種検定による表現型が不安定であった。これは、解析に用いている R タンパク質 Pish の抵抗性がそもそも不安定であることが原因の一つと考えられる。そのため、変異体背景への相補試験に向けた形質転換イネを作成し、今後これらの相補系統を用いてより詳細な解析を実施することとした。

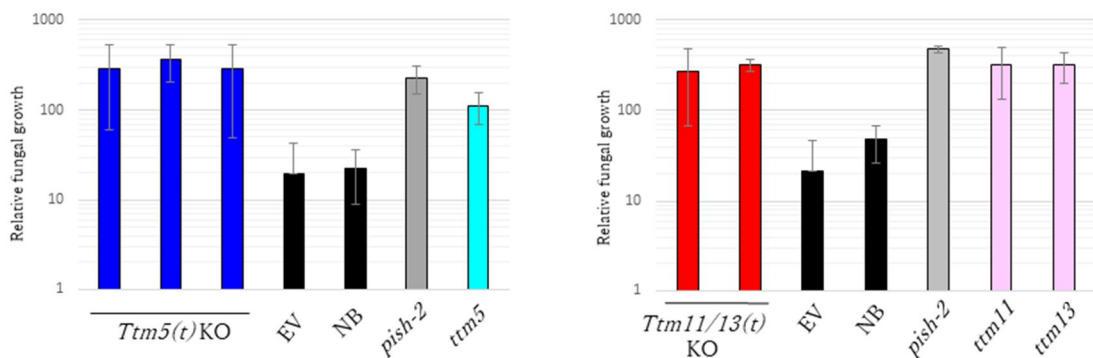


図 *Ttn5* および *Ttn11/13* 候補遺伝子の KO 系統では ETI が抑制される。
各候補遺伝子の KO 系統、ベクターのみ (EV)、日本晴 (NB)、*Pish* 変異体 (*pish-2*)、*ttn5*、*ttn11*、*ttn13* 変異体における非親和性いもち病菌の接種 7 日後の増殖程度を調べた。EV および NB では、いもち病菌の増殖が抑えられているが、KO 系統では *ttn* 変異体と同様に ETI が抑制されている。

Ttn5、*Ttn11/13* 遺伝子における変異が、さまざまな *R* 遺伝子による ETI の誘導に対して影響を与えるか解析するため、複数の異なるいもち病 *R* 遺伝子を持つ品種「ハマアサヒ」を遺伝背景として、候補遺伝子の KO 系統を作成した。3 つの *R* 遺伝子 (*Pii*, *Pik*, *Pib*) による ETI への

影響を解析したところ、いずれも顕著な ETI の抑制は見られなかった。このことから、これらの原因遺伝子は、変異体の選抜時に用いた R タンパク質 Pish に対して特異的な役割を持つことが示唆された。

我々は、本研究期間を通して、3 つの変異体の原因遺伝子を特定した。そのうち 2 つは同一の遺伝子の異なるアリル変異であった。これらの遺伝子によりコードされるタンパク質は、いもち病菌に対する R 遺伝子“*Pish*”によって誘導される ETI の制御に特異的に関与していることが示唆されたことから、これらの遺伝子がコードするタンパク質は、Pish と直接的な相互作用する因子である可能性が考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------	---------