

令和 3 年 6 月 21 日現在

機関番号：85301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K05666

研究課題名(和文)ナス近縁野生種が有する青枯病抵抗性遺伝子の同定

研究課題名(英文)Identification of bacterial wilt resistance genes in solanaceous plants

研究代表者

向原 隆文 (Mukaihara, Takafumi)

岡山県農林水産総合センター生物科学研究所・その他部局等・専門研究員

研究者番号：80344406

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)：青枯病はナス科作物の重要病害であるにも関わらず、抵抗性遺伝子に関する知見が少ない。ナス属植物が持つ青枯病抵抗性遺伝子の同定を目的に世界各地から収集されたナス系統を探索し、強度青枯病抵抗性を持つナスNo. 98系統を見出した。No. 98系統はナス青枯病菌(phylo type I)の特定のAvrエフェクターを認識し、強度抵抗性を発揮していた。また、ナスが認識するジャガイモ青枯病菌(phylo type IV)Avrエフェクターの同定にも成功した。交配解析から、本研究で見出した2つの青枯病抵抗性遺伝子はいずれも優性1遺伝子支配であり、NBS-LRR抵抗性タンパク質遺伝子である可能性が強く示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

青枯病はナス科作物の重要病害であるにも関わらず、抵抗性遺伝子に関する知見がほとんど無い。本研究ではナス青枯病菌(phylo type I)及びジャガイモ青枯病菌(phylo type IV)を材料に、これら菌株を認識する(抵抗性遺伝子を持つ)ナス系統と認識しない(抵抗性遺伝子を持たない)ナス系統をそれぞれ見出し、抵抗性系統が認識するAvrエフェクターの同定にも成功した。現在作成中の交配後代集団を利用して抵抗性遺伝子をクローニングできる可能性が極めて高い。また、No. 98系統が持つ抵抗性遺伝子は既存ナス品種に交配で容易に導入できると考えられ、育種利用価値が非常に大きいと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Although bacterial wilt is an important disease of solanaceous crops, there is little knowledge about resistance genes. We searched for eggplant lines collected from worldwide for bacterial wilt resistance, and found the eggplant line No. 98 with strong bacterial wilt resistance. The No. 98 line recognized an Avr effector from phylo type I *Ralstonia solanacearum* and exhibited strong resistance. We also succeeded in identifying an Avr effector from phylo type IV *Ralstonia solanacearum* that is recognized by eggplant and induces hypersensitive responses. Crossing experiments strongly suggested that the two bacterial wilt resistance genes found in this study were both dominant and considered to be NBS-LRR resistant protein genes.

研究分野：植物病理学

キーワード：青枯病 抵抗性 エフェクター NBS-LRR抵抗性タンパク質 ナス

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

植物と病原菌の相互作用において、感染の成立は両者のパワーバランスによって決定される。植物は病原菌由来の非特異エリシター (PAMP) や非病原力 (Avr) エフェクターを感知して病害抵抗応答を誘導し、病原菌はエフェクターをはじめとする病原性因子でこれを抑制する。ナス科作物の最重要病害「青枯病」の原因細菌 *Ralstonia solanacearum* (青枯病菌) の場合も、この関係は同じと考えられている。

ナス・トマトの食用品種は青枯病に大変弱く、青枯病抵抗性を持つ野生種や近縁種を台木に用いた接木栽培が病害防除に利用されている。生産者からは低温伸張性や果実収量に優れ、且つ強度病害抵抗性の台木が求められているが、これらの形質はいずれも複数遺伝子支配であり、ナス台木の効率的な交配育種は大変困難である。また、トマトでは自然界に青枯病強度抵抗性系統が無く、生産者は常に本病害の脅威にさらされている。このような問題を打破するため、(1) ナス科野生種が持つ青枯病抵抗性 (R) 遺伝子の探索 (2) Avr エフェクターを利用した性格付けと分類 (3) 有用抵抗性遺伝子の同定 (4) 育種利用 (エフェクター応答や DNA マーカーを指標とした抵抗性遺伝子ピラミディングや遺伝子組換え台木による次世代育種) という「エフェクター支援育種」に大きな期待が寄せられている。

植物が持つ青枯病抵抗性 (R) 遺伝子については、研究開始当初、アブラナ科シロイヌナズナにおいて RipP2 エフェクターを認識する「RRS1-RPS4 抵抗性遺伝子ペア」が唯一同定されているのみであった。一方、青枯病菌の自然宿主となるナス科植物では、タバコ属植物が認識する RipAA やタバコ属及びペチュニア属植物が認識する RipP1 等の Avr エフェクターが同定されていたものの、これらを認識する抵抗性遺伝子はいずれも未解明であった。ゲノム解読が終了したナス科植物では RRS1 や RPS4 のホモログがゲノム上に存在しないことも示されており、「ナス科植物が持つ青枯病抵抗性遺伝子の実体」に大きな関心が寄せられている。

### 2. 研究の目的

研究代表者は青枯病抵抗性のナス近縁野生種トルバム・ビガーが RipAX2 エフェクターを認識して抵抗性を発揮することをこれまでに報告している。また、ナスと異種交雑可能なナス近縁野生種ヒラナスも RipAX2 を認識して青枯病抵抗性を発揮することを見出している。本研究ではこれら独自の知見を踏まえ、トルバム・ビガー及びヒラナスから「RipAX2 を認識する新規な青枯病抵抗性遺伝子」を同定する。また、新規 Avr エフェクターの同定はこれを認識する抵抗性遺伝子の同定に直結するため、上記以外の青枯病菌 ナス系統の組み合わせで新規 Avr エフェクターが同定可能な場合はこれを実施する。

### 3. 研究の方法

ナス近縁野生種ヒラナスはナスとの異種間交配で F1 雑種植物を得ることが可能である。得られた F1 雑種植物の青枯病抵抗性を評価し、RipAX2 を認識する新規な青枯病抵抗性遺伝子の性格付けを行う。次に、F1 雑種個体をナスと戻し交雑し、F2 後代集団を取得する。個々の F2 後代植物が持つ青枯病抵抗性を評価し、RipAX2 を認識する抵抗性遺伝子が座乗する染色体領域を絞り込む。また、RipAX2 以外の新規 Avr エフェクターを探索するために、青枯病抵抗性のナス系統を探索し、分子遺伝学的手法で抵抗性ナス系統に認識される Avr エフェクターを同定する。新規 Avr エフェクターについても、ヒラナスの系と同様に、青枯病感受性ナス系統との交配解析から青枯病抵抗性遺伝子が座乗する染色体領域を絞り込む。

### 4. 研究成果

Phylotype I 青枯病菌抵抗性遺伝子の同定：ナス近縁野生種ヒラナスはナスと種間交配により、種子数はごく少ないものの F1 雑種種子を得ることができる。F1 雑種植物を生育させたところ、姿形はヒラナスとナスの中間の姿形を示した。この F1 雑種植物の青枯病抵抗性を調べたところ、全てがヒラナスと同程度の青枯病抵抗性を示した。この結果から、ヒラナスが持つ青枯病抵抗性は優性遺伝子により支配されていることが明らかとなった。このことは、ヒラナスの青枯病抵抗性が RipAX2 エフェクターを認識して発揮されるという事実とよく一致し、この優性遺伝子が NBS-LRR 抵抗性遺伝子であることが強く示唆された。次に、ヒラナスとナスの F1 雑種植物をナスと戻し交配し、抵抗性遺伝子マッピングに向けた交配後代集団の準備に取り組んだ (連携研究者が実施)。しかしながら、この組み合わせの交配では多大な労力を費やしても得られる種間戻し交雑種子は極々わずかであった。わずかながら得られた 26 の雑種植物では青枯病抵抗性が分離していたが、各種マーカーを用いた解析で抵抗性遺伝子が座乗する領域を絞り込むには圧倒的に数が少ないこと及び今後の育種利用が種間交雑では困難と考えられたため、ヒラナスとナスの系で解析を続けることを断念した。

ナスと異なる種から青枯病抵抗性遺伝子を探索することが技術的に困難が大きいことから、ナス (*Solanum melongena*) 系統から青枯病抵抗性遺伝子を探索する研究に注力することとし、世界各地から収集された約 100 系統のナスを材料に青枯病抵抗性を示す系統を探索した。その結果、青枯病菌 RS1002 株 (phylotype I sequevar 15 biovar 4) に強度抵抗性を示す系統を 1

つ (No. 98) 高度耐性を示す系統を 5 つ (No. 41, 53, 54, 77, 80) 見出すことに成功した。エフェクター変異株シリーズを用いた抵抗性調査から No. 98 系統の強度抵抗性は Avr エフェクター認識であることが確認された。また、No. 98 系統と青枯病感受性ナスとの交配で得られた F1 植物は全て No. 98 系統と同程度の強度青枯病抵抗性を示した(図 2)。このことから、No. 98 系統は NBS-LRR 抵抗性遺伝子を持つことが強く示唆される。ナス属植物では青枯病抵抗性に関与する抵抗性遺伝子はヒラナスやトルパム・ピガー等のナス近縁種でしか報告が無く、強度青枯病抵抗性遺伝子を持つナスは No. 98 系統が最初の例である。No. 98 系統と青枯病感受性ナスの交配ではごく容易に F1 種子が取得できるため、今回見出された青枯病抵抗性遺伝子は既存の様々なナス品種に導入可能と考えられ、青枯病抵抗性ナス品種の開発に大きく寄与すると期待される。遺伝子マーカーを作出して効率的な育種選抜に利用する目的で、No. 98 系統が持つ青枯病抵抗性遺伝子の同定を上記ヒラナスの系で予定していた手法で進めている。

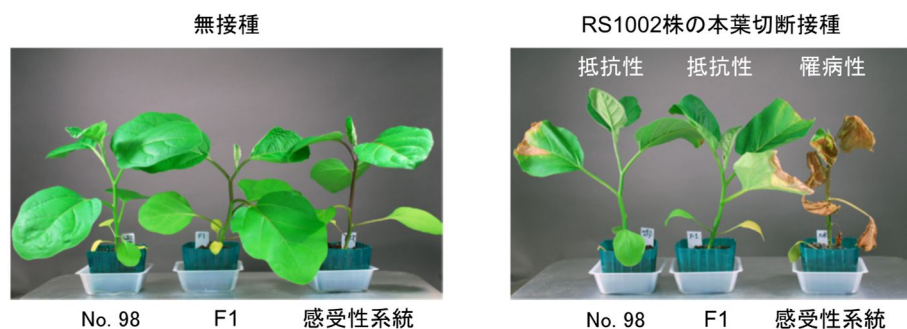


図 1. No. 98 系統と青枯病感受性系統の F1 雑種植物の青枯病抵抗性植物の本葉を青枯病菌に浸漬したハサミで切断して接種。写真は接種 7 日後。

Phylotype IV 青枯病菌 Avr エフェクターの同定： ナス (*Solanum melongena*) は国内ジャガイモ産地で問題となっている phylotype IV の青枯病菌に強度抵抗性を示すことが知られている。Hrp タイプ III 分泌系を欠損した phylotype IV 青枯病菌 PW1001 株の  $\Delta hrpB$  変異株や  $\Delta hrpY$  変異株はナス HR 誘導活性を完全に消失する (データ示さず) ことから、ナスは phylotype IV 青枯病菌の何らかのエフェクターを認識して HR を誘導していると推察された。本研究では、ナスに認識される Phylotype IV 青枯病菌 Avr エフェクターの探索を行った。PW1001 株のゲノム DNA 断片をナス青枯病菌 RS1085 株\* (ナス HR 非誘導) に導入し、HR 誘導活性の付与を指標に *avr* 遺伝子を探索した。青枯病菌では薬剤選択が無い植物内でプラスミドが容易に脱落するため、他の植物病原細菌で一般的なコスミドベクターを用いた *avr* 遺伝子スクリーニングを適用することができない。この問題を打破するため、本研究では青枯病菌のゲノム中に組み込まれるコスミドベクター SuperCosT を作出し、Avr エフェクター遺伝子をスクリーニングした。約 1,400 のコスミド導入青枯病菌株を作出し、ナス本葉への HR 誘導活性を調べたところ、本来はナスに HR を誘導しない RS1085\* 株が HR 誘導活性を示すようになったコスミド導入株が得られた (図 3)。最終的に、ナス HR 誘導活性を示す 15 のコスミド導入菌株が得られ、これら菌株が持つコスミド (HR-1~HR-15) の解析から、全ての HR 誘導コスミドに共通する 10.8 kb の領域が見出された。内部にコードされる ORF の相同性検索からこの領域内にタイプ III エフェクターをコードする *hopBF1* 遺伝子が見出された。ナス青枯病菌 RS1002 株に *hopBF1* を導入すると、ナスに対する HR 誘導活性が付与されると同時に、ナスに対する病原性が完全に消失した (図 4)。この結果から、PW1001 株の HopBF1 エフェクターはナスに認識され、強い抵抗反応を誘導する Avr 因子であることが証明された。我々は、HopBF1 に対する HR 誘導能を消失した (HopBF1 を認識する抵抗性遺伝子機能が失われた) ナス系統を見出している。本系統を利用することで HopBF1 を認識する抵抗性遺伝子が座乗する染色体領域を絞り込むことが可能であり、青枯病抵抗性遺伝子の同定を進めている。

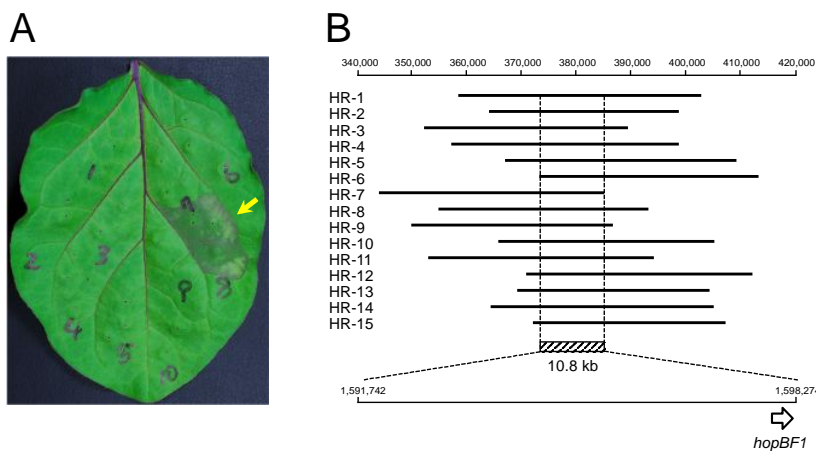
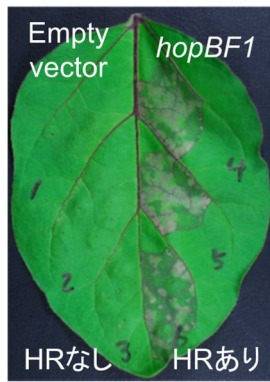


図 2. ナスに HR を誘導する PW1001 遺伝子の同定 (A) ナスに HR を誘導する PW1001 コスミド導入菌株の単離。写真は接種 24 時間後。(B) ナスに HR を誘導するコスミドが持つ PW1001 ゲノム領域。

A



B

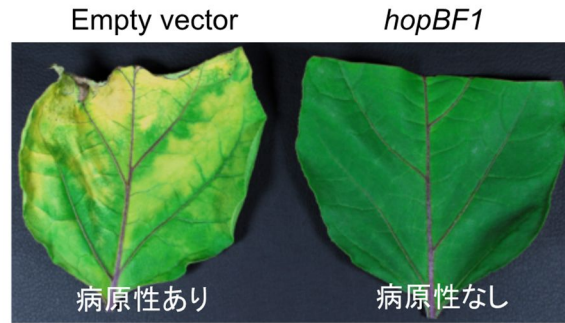


図3 *hopBF1* を導入したナス青枯病菌 RS1002 株の表現型

(A) ナスに対する HR 誘導活性。写真は接種 24 時間後。(B) ナスに対する病原性。植物の本葉を青枯病菌に浸漬したハサミで切断して接種。写真は接種 7 日後。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Nakano, M. and Mukaiharu, T.	4. 巻 20
2. 論文標題 The type III effector RipB from <i>Ralstonia solanacearum</i> RS1000 acts as a major avirulence factor in <i>Nicotiana benthamiana</i> and other <i>Nicotiana</i> species.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Molecular Plant Pathology	6. 最初と最後の頁 1237-1251
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/mpp.12824	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 Nakano, M. and Mukaiharu, T.	4. 巻 20
2. 論文標題 Comprehensive identification of PTI suppressors in type III effector repertoire reveals that <i>Ralstonia solanacearum</i> activates jasmonate signaling at two different steps.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 5992
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms20235992	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 Nakano, M. and Mukaiharu, T.	4. 巻 59
2. 論文標題 <i>Ralstonia solanacearum</i> type III effector RipAL targets chloroplasts and induces jasmonic acid production to suppress salicylic acid-mediated defense responses in plants	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Plant and Cell Physiology	6. 最初と最後の頁 2576-2589
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/pcp/pcy177	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 Nakano Masahito, Ichinose Yuki, Mukaiharu Takafumi	4. 巻 61
2. 論文標題 <i>Ralstonia solanacearum</i> Type III Effector RipAC Targets SGT1 to Suppress Effector-Triggered Immunity	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Plant and Cell Physiology	6. 最初と最後の頁 2067 ~ 2076
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/pcp/pcaa122	査読の有無 無
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4件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 中野真人、向原隆文
2. 発表標題 ナス科植物に認識される新規な青枯病菌エフェクターの同定
3. 学会等名 平成31年度日本植物病理学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中野真人、向原隆文
2. 発表標題 植物ホルモン情報伝達経路を標的とする青枯病菌エフェクターの探索と機能解析
3. 学会等名 平成30年度日本植物病理学会関西支部会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 向原隆文
2. 発表標題 ゲノム情報を活用したナス科作物の青枯病抵抗性遺伝子の探索
3. 学会等名 岡山県立研究機関協議会第11回研究交流発表会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 中野真人、向原隆文
2. 発表標題 ナス科植物に認識される新規な青枯病菌エフェクターの同定
3. 学会等名 平成31年度日本植物病理学会大会
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
--	---------------------------	-----------------------	----

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