

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 4 月 30 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究（A）

研究期間：2008～2011

課題番号：20248005

研究課題名（和文） SAGE 法を用いたもち病菌非病原力遺伝子の網羅的クローニングと変異性の比較解析

研究課題名（英文） Cloning of avirulence genes in *Pyricularia* spp. using super SAGE and comparative analysis of their instability.

研究代表者

土佐 幸雄（TOSA YUKIO）

神戸大学・大学院農学研究科・教授

研究者番号：20172158

研究成果の概要（和文）：

イネいもち病菌の持つ非病原力遺伝子 *AVR-Pita*, *AVR-Pia*, *AVR-Pii*, *AVR-Pik* の座乗染色体を調べたところ、菌株ごとに異なることが判明した。さらに、その周辺構造を調べたところ、多数の転移因子に囲まれていることが明らかとなった。これらのことから、これら非病原力遺伝子は、抵抗性遺伝子との相互作用の過程でトランスポゾンを経由して頻りに座乗染色体を変えてきたと考えた。この現象を multiple translocation と呼ぶことにした。一方、multiple translocation を起こしていない非病原力遺伝子も見出した。これらのことから、非病原力遺伝子の安定性を、座乗染色体の比較解析により評価できると考えた。

研究成果の概要（英文）：

We found that *AVR-Pita*, *AVR-Pia*, *AVR-Pii*, *AVR-Pik*, avirulence genes of the rice blast fungus, are highly variable in its genome location, occurring in chromosomes 1 through 7 and supernumerary chromosomes. They were flanked by retrotransposons, which presumably contributed to their “multiple translocation” across the genome during the course of evolution in response to corresponding resistance genes. We also found an avirulence gene that has not undergone multiple translocation. We suggest that the stability of avirulence genes is predictable on the basis of the their chromosomal locations.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	10,900,000	3,270,000	14,170,000
2009年度	9,100,000	2,730,000	11,830,000
2010年度	7,700,000	2,310,000	10,010,000
2011年度	8,100,000	2,430,000	10,530,000
年度			
総計	35,800,000	10,740,000	46,540,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：植物病理学

キーワード：いもち病、非病原力遺伝子

## 1. 研究開始当初の背景

*Magnaporthe oryzae* は、イネをはじめとするイネ科栽培植物にいもち病を引き起こす病原糸状菌である。本菌は、イネに寄生す

るイネ菌のほか、アワに寄生するアワ菌、キビに寄生するキビ菌、コムギに寄生するコムギ菌等、植物属に対する寄生性を異にするいくつかの菌群に分化している。さらに、イネ菌群には、品種に対する病原性を異にする多

数のレースが存在することが知られている。

このレース・品種間特異性が非常に不安定であることはよく知られている。1960年代初頭、長年の育種事業の結果完成した抵抗性主働遺伝子保有新品種が、それを侵す新レースの出現により感受性品種に転落するという「抵抗性の崩壊」が次々起こった。同様の現象は、ムギ類さび病等の病害でもよく知られている。一方、主働抵抗性遺伝子であればすべて新レースにすぐに侵されるかというところでもなく、中には農家圃場ヘリリース後、長期間にわたって効力を維持する遺伝子も存在する。さらに、菌群-植物属間特異性に至っては一般的にきわめて安定で、たとえばキビ菌がイネを侵すように変異を起こすことはない。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、このような安定性の相違が何によるのかを明らかにすることである。レース-品種間特異性は Gene-for-gene theory に従うことが証明されている。この説に従えば、抵抗性遺伝子を侵す方向への病原菌の変異は、その抵抗性遺伝子に対応する非病原力遺伝子の変異で説明される。我々は、durable な抵抗性遺伝子とそうでない抵抗性遺伝子の相違は、対応する非病原力遺伝子の fitness への関与の程度のみならず、それらの染色体座乗領域の安定性の相違により説明できるのではないかと考えた。

この仮説を検証するため、まず、日本のイネいもち病レース判別品種が保有する抵抗性遺伝子に対応する非病原力遺伝子のクローニングを試みた。つぎに、それらのいもち病菌集団における分布、座乗染色体、機能損失の様相について検討した。

さらに、菌群-属間特異性の安定性の原因を明らかにするために、それに関与する非病原力遺伝子のクローニングも試みた。

## 3. 研究の方法

(1) 日本産イネいもち病菌 Ina168 の全ゲノムシーケンシングを行い、その中から分泌シグナルを持つ遺伝子をピックアップした。いくつかの代表菌系について、それら分泌シグナル遺伝子の有無と非病原力遺伝子の有無との相関を調べ、相関が認められたものについては、形質転換によりそれらが実際に非病原性を付与するかどうかを検討した(寺内)。

(2) クローニングされた遺伝子について、さまざまな菌株における座乗染色体を、分離分析ならびにパルスフィールドゲル電気泳動解析によって検討した。(土佐・草場)。

(3) さらに、菌群-属間特異性に関与する非病原力遺伝子のクローニングを試みた。アワ菌のコムギに対する非病原力遺伝子 *PWT1* については、マッピング、クロモソームウオーキング、ならびに SuperSAGE 法を用いた候補遺伝子の探索を行った。エンバク菌のコムギに対する非病原力遺伝子 *PWT4* については、バルクシーケンスを試みた(寺内、土佐)。

## 4. 研究成果

(1) Ina168 の全ゲノムシーケンスから予測された分泌タンパク質遺伝子と非病原力遺伝子との association を検討した結果、イネの抵抗性遺伝子 *Pia*, *Pii*, *Pik* に対応する非病原力遺伝子 *AVR-Pia*, *AVR-Pii*, *AVR-Pik* と密接に相関して存在する遺伝子を見出した。形質転換実験の結果、これらがそれら非病原力遺伝子本体であることを確認した。

(2) すでにクローニングされている非病原力遺伝子 *AVR-Pita* を含めた4遺伝子についていもち病菌集団における分布を検討した。

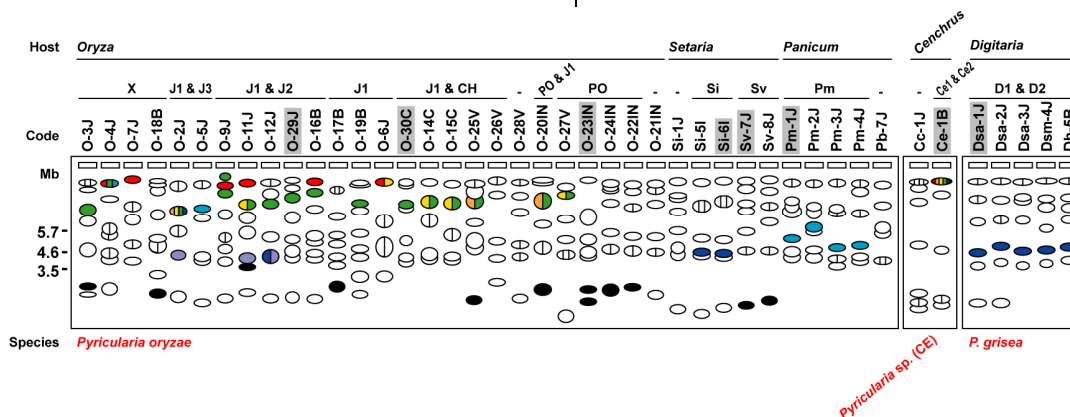


図1. *AVR-Pita* の座乗染色体。CHEF 電気泳動で分離した各いもち病菌の染色体バンドのうち、*AVR-Pita* プロブにハイブリしたものを色塗りした。赤, 第1染色体; 黄, 第2染色体; 橙, 第3染色体; 緑, 第4染色体; 水色, 第5染色体; 藍色, 第6染色体; 薄紫, 第7染色体; 黒, 過剰染色体。

その結果、いずれも病原性レースにおいては おおむね欠失していること、*M. oryzae/grisea* species complex においてパッチ状のまだらな分布を示すことが判明した。

(3) 次にそれらの座乗染色体を調べたところ、菌群（メヒシバ菌群、キビ菌群、アワ菌群等）ごとに異なることが判明した（図1）。さらに、イネ菌群においてはそのバリエーションが顕著で、菌株ごとに異なる様相を呈した。この現象を **multiple translocation** と呼ぶことにした。この、イネ菌群における際立った座乗染色体の変異は、イネ菌とイネの長い相互作用の歴史を反映していると考えた。興味深いことに、*AVR-Pik* では多コピーのホモログが過剰染色体に集中して座乗する傾向にあることが判明した。*Pik* は 1960 年代に、最も大規模に、素早いレース変異による崩壊を被った抵抗性遺伝子として知られている。このことは、その座乗染色体（過剰染色体）と密接に関係している可能性がある。

(4) また、それぞれの非病原性遺伝子の座乗位置を調べたところ、サブテロメアに座乗する傾向があることが判明した。その周囲には多くの転移因子がクラスターをなして存在していた（図2）。非病原性遺伝子の **multiple translocation** には、これら転移因子が関与していると考えた。

(5) さらに、*M. oryzae/grisea* species complex 内に見出されたホモログの機能を検

討したところ、非病原性遺伝子としての機能をほぼ維持していることが判明した。

(6) 一方、他の研究者によってクローニングされた *AVR-Piz1* について同様の検討を行ったところ、際立った特徴を示すことが判明した。第一に、本遺伝子は *M. oryzae* の全菌株に存在していた。第二に、その座乗染色体を調べたところ、すべての菌株が第7染色体に保有していた。すなわち、**multiple translocation** を起こしていなかった。第三に、そのホモログの系統樹を作成したところ、保有菌株の系統樹とほぼ一致した。このことから、*AVR-Piz1* は、ほぼ菌の分化と同調して分化してきたことがされた。第四に、その周辺構造を調べたところ、転移因子はまばらであることが判明した。第五に、*Piz-t* を侵す菌株において本遺伝子がどのような変異を起こしているか調べたところ、いずれもトランスポゾン挿入変異であった。このことから、本遺伝子の欠失は極めて起こりにくいことが示唆された。

(7) *Piz-t* は比較的それを侵す変異レースが出現しにくい抵抗性遺伝子として知られている。変異レースは出現はするが、それは地域的にほぼ愛知・沖縄等特定の地域に限定されており、またそれらが出現後 **population** を増やし、広がったという報告はない。これらのことから、本遺伝子は、比較的 **durable** である可能性がある。

以上のことから、非病原性遺伝子の座乗染

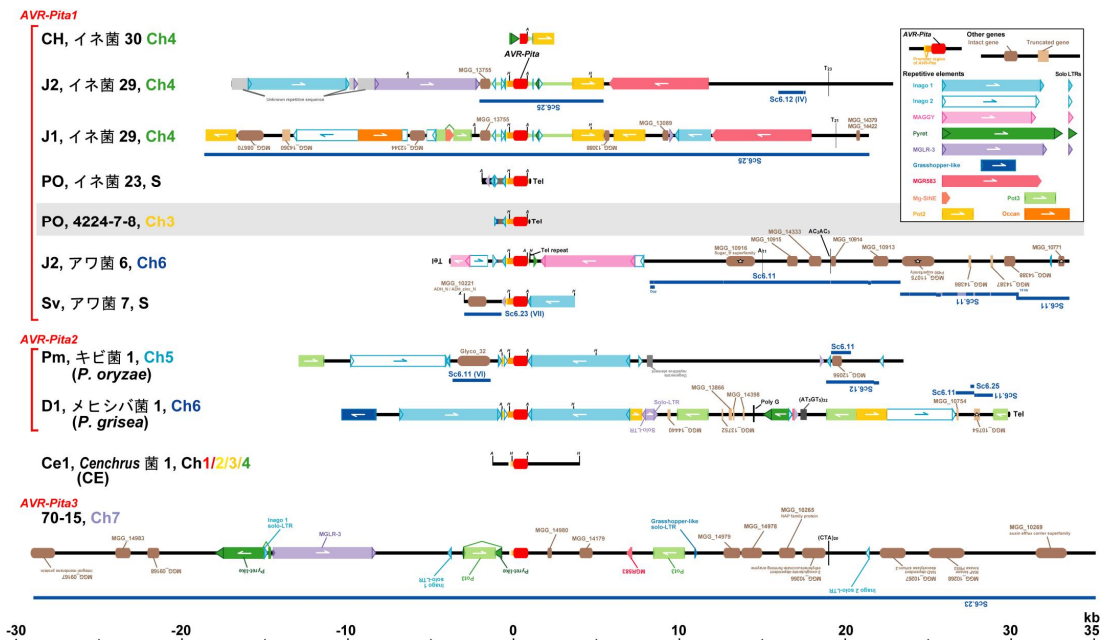


図2. *AVR-Pita* の周辺構造。中央の赤領域が *AVR-Pita*。

色体とその周辺構造を調べれば、それに対応する抵抗性遺伝子が durable であるか否かが推測できる可能性が示唆された。

(8) アワ菌のコムギに対する非病原性遺伝子 *PWT1* をクローニングするため、アワ菌 GFSII-7-2 とコムギ菌 Br48 を交雑し、ランダム F<sub>1</sub> 集団ならびに F<sub>1</sub> の一つを Br48 で戻し交雑した BC<sub>1</sub>F<sub>1</sub> 集団を作出した。これらを用いて *PWT1* をマッピングした結果、本遺伝子は rDNA と密接に連鎖していることが判明した。そこで、rDNA からセントロメア側にウオーキングを行い、約 300kb にわたるコンテイングを作成した。それらを用いた分離分析・形質転換の結果、*PWT1* はセントロメア側には存在しないことが明らかとなった。現在、テロメア側へのクロモソームウオーキングを行っている。なお、*PWT1* 分離集団をオオムギに接種した結果、本遺伝子がコムギのみならずオオムギにも作用することが示唆された。

(9) エンバク菌のコムギに対する非病原性遺伝子 *PWT4* をクローニングするため、これを保有するエンバク菌 Br58 と保有しないコムギ菌 Br48 のリシーケンシングを行い、全ゲノム配列を決定した。つぎに、Br58 と Br48 の F<sub>1</sub> を Br48 で戻し交雑し、*PWT4* が分離する BC<sub>4</sub>F<sub>1</sub> 集団を得た。この過程で得られた菌系のなかから *PWT4* を保有する 48 菌系を選抜、DNA を混合し、シーケンシングした。得られたゲノム断片を親菌株のゲノム配列にアライメントすることにより、*PWT4* 保有菌系が共通で持っているエンバク菌 Br58 由来の領域約 580kb を特定した。この領域の分泌タンパク質遺伝子を予測した結果、*PWT4* 候補遺伝子と考えられる 12 個の推定分泌タンパク質遺伝子が得られた。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 5 件)

1. Chuma, I., Hotta, Y., and Tosa, Y. (2011) Instability of subtelomeric regions during meiosis in *Magnaporthe oryzae*. *J. Gen. Plant Pathol.* 77:317-325.
2. Chuma, I., Isobe, C., Hotta, Y., Ibaragi, K., Futamata, N., Kusaba, M., Yoshida, K., Terauchi, R., Fujita, Y., Nakayashiki, H., Valent, B., and Tosa, Y. (2011) Multiple translocation of the *AVR-Pita* effector gene among chromosomes of the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae* and related species. *PLoS Pathogens* : e1002147.
3. Chuma, I., Zhan, S.W., Asano, S., Nga, N.T.T.,

Vy, T.T.P., Shirai, M., Ibaragi, K., and Tosa, Y. (2010) *PWT1*, an avirulence gene of *Magnaporthe oryzae* tightly linked to the rDNA locus, is recognized by two staple crops, common wheat and barley. *Phytopathology* 100: 436-443.

4. Yoshida, K., Saitoh, H., Fujisawa, S., Kanzaki, H., Matsumura, H., Yoshida, K., Tosa, Y., Chuma, I., Takano, Y., Win, J., Kamoun, S., and Terauchi, R. (2009) Association genetics reveals three novel avirulence genes from the rice blast fungal pathogen *Magnaporthe oryzae*. *Plant Cell* 21:1573-1591.
5. Kusaba, M., Luo, C.X., Hanamura, H., Misaka, M., Mochida, T., Fujita, Y., and Tosa, Y. (2008) An avirulence gene to rice cultivar K60 is located on the 1.6-Mb chromosome in *Magnaporthe oryzae* isolate 84R-62B. *J. Gen. Plant Pathol.* 74:250-253.

[学会発表]

国際学会招待講演のみ記載 (計 2 件)

1. Tosa, Y. (2011) Roles of avirulence genes of *Pyricularia* species in defining host and nonhost specificity. *Plant and Animal Genome XIX*. San Diego, CA. U.S.A.
2. Tosa, Y. and Chuma I. (2010) Genetic analyses of host species specificity of *Magnaporthe oryzae* subgroups. 10<sup>th</sup> Japan-US Seminar, Oregon State University, Oregon, U.S.A.

[図書] (計 2 件)

1. Terauchi, R., Win, J., Kamoun, S., Matsumura, H., Saitoh, H., Kanzaki, H., Yoshida, K., Shenton, M., Berberich, T., Fujisawa, S., Ito, A., Takano, Y., and Tosa, Y. (2009) Searching for effectors of *Magnaporthe oryzae*: a multi-faceted genomics approach. **In: Rice Blast** (Wang, G.-L. and Pang eds.) Springer. pp. 105-112.
2. Terauchi, R., Win, J., Kamoun, S., Matsumura, H., Saitoh, H., Yoshida, K., Shenton, M., Berberich, T., Fujisawa, S., Ito, A., Takano, Y., and Tosa, Y. (2008) A multi-faceted genomics approach toward understanding *Magnaporthe*-rice interactions. **In: Biology of Molecular Plant-Microbe Interactions** (Lorito M. ed.) Vol 6. Chapter 114.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

土佐 幸雄 (TOSA YUKIO)

神戸大学・大学院農学研究科・教授

研究者番号：20172158

(2) 研究分担者

寺内 良平 (TERAUCHI RYOHEI)

岩手生物工学研究センター・主席研究員

研究者番号：50236981

草場 基章 (KUSABA MOTOAKI)

佐賀大学・農学部・准教授

研究者番号：90304881