

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 5 月 4 日現在

機関番号：14501

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2010～2011

課題番号：22658014

研究課題名（和文） イネいもち病菌非病原力遺伝子はなぜ彷徨するかーメヒシバ菌貯蔵庫仮説の検証

研究課題名（英文） Why do avirulence genes of the rice blast fungus undergo multiple translocation? - A hypothesis that crabgrass plays a role as their repository

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）：

いもち病菌の非病原力遺伝子が、雑草を介して水平移動してきたことを示す証拠がないかどうか検討した。まず、*Pita*に対応する*AVR-Pita*について検討したところ、その同一ホモログ（*AVR-Pita2*）がキビ菌とメヒシバ菌に存在することを見出した。さらに、*Pii*に対応する*AVR-Pii*について検討したところ、ホモログの一つ*AVR-Pii2*がイネ菌と*Cenchrus*菌（*Pyricularia* sp.）に、他のホモログ*AVR-Pii3*がコムギ菌と*Cenchrus*菌（*Pyricularia* sp.）に存在することを見出した。これらのことから、いもち病菌の非病原力遺伝子は、一般的性質として種を超えて水平移動しうると考えた。

研究成果の概要（英文）：

We examined distribution of avirulence genes in *Pyricularia* populations. *AVR-Pita2*, a homolog of the *AVR-Pita* avirulence gene family corresponding to the *Pita* resistance gene, was found in *Panicum* isolates of *P. oryzae* and *Digitaria* isolates of *P. grisea*. *AVR-Pii2*, a homolog of the *AVR-Pii* family corresponding to the *Pii* resistance gene, was found in *Oryza* isolates of *P. oryzae* and *Cenchrus* isolates of *Pyricularia* sp. *AVR-Pii3*, another homolog of the *AVR-Pii* family, was present in *Triticum* isolates of *P. oryzae* and *Cenchrus* isolates of *Pyricularia* sp. These results suggest that horizontal transfer of avirulence genes are not rare event in the blast fungi.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,800,000	0	1,800,000
2011年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	390,000	3,490,000

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

Pyricularia oryzae (完全世代 *Magnaporthe oryzae*) は、イネの最重要病害、いもち病を引き起こす病原糸状菌である。イネいもち病菌には、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が、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。この素早い病原性変異の機構を明らかにすることは、抵抗性育種戦略を構築する上で、きわめて重要である。

レース—品種間特異性は、Gene-for-gene theory によって説明される。それに従えば、抵抗性遺伝子に対する病原菌の適応は、対応する非病原力遺伝子の変異によって説明される。そこで、我々は非病原力遺伝子 *AVR-Pita* (イネ品種ヤシロモチの持つ抵抗性遺伝子 *Pita* に対応) のいもち病菌集団における分布ならびに座乗染色体を調べた。その結果、*AVR-Pita* はいずれの菌株においてもサブテロメアに座乗するという共通項をもつものの、その座乗染色体が菌株ごとに大きく異なることを見出した。このことから、*AVR-Pita* は様々な染色体のサブテロメア間を頻繁に移動してきたと考え、この現象を multiple translocation と呼ぶことにした。同様の現象は、*AVR-Pia* (イネ品種愛知旭の持つ抵抗性遺伝子 *Pia* に対応) ならびに *AVR-Pii* (イネ品種石狩白毛の持つ抵抗性遺伝子 *Pii* に対応) についても認められた。

非病原力遺伝子はなぜ multiple translocation を起こすのであろうか。我々は (1) 病原菌が抵抗性遺伝子に対応する最も一般的な方法は非病原力遺伝子の欠失である (2) 抵抗性遺伝子が使われなくなれば菌は非病原力遺伝子を再獲得する (3) この再獲得の際、当該非病原力遺伝子をもとあった染色体部位に戻す必要はないと考えた。サブテロメアであればどの染色体でもよい、と

いう再獲得様式をとっているのであれば、結果として非病原力遺伝子は multiple translocation の様相を示すはずである。しかしながら、この仮説が成立するためには、水田周辺に非病原力遺伝子の reservoir がなければならない。イネいもち病菌は現在ではほぼ種子伝染病害であると言われている。このことは、イネ菌が日本の野外では越冬できないことを示している。非病原力遺伝子は、対応する抵抗性遺伝子が当該地域に広く栽培されている間どこに存在しているのだろうか。

興味深いことに、*AVR-Pita*, *AVR-Pia*, *AVR-Pii* のいもち病菌集団における分布を調べたところ、別種であるメヒシバ菌 (*P. grisea*, 完全世代 *M. grisea*) がこれらすべての非病原力遺伝子を保有していることが明らかとなった。このことから、我々は、メヒシバ菌がその reservoir としての役割を果たしているのではないかと考えた。

そこで、*AVR-Pia* についてさらに詳しく解析した。まず、日本産菌株についてそのレース番号とサザンシグナルの有無をつき合わせたところ、抵抗性遺伝子 *Pia* に非病原性の菌株はシグナルを有するが病原性の菌株はこれを持たないという 100%一致が認められた。このことから、いもち病菌が *Pia* を侵すように変異するための一般的な方法は、*AVR-Pia* の完全欠失であることが判明した。次に、これら日本産イネ菌非病原性菌株の (機能を持つ) *AVR-Pia* をシークエンスしたところ、菌株間で 100%一致した。さらに、他の菌株のホモログをシークエンスしたところ、メヒシバ菌が、上記のイネ菌 functional *AVR-Pia* と 100%塩基配列が同じ *AVR-Pia* を保有することが判明した。これは、遺伝子の種を超えた移動を示すもので Horizontal transfer の範疇に入るが、供試メヒシバ菌がすべてこの「イネ菌と 100%同じ遺伝子」を持っていたことから、その移動の方向は「メヒシバ菌→イネ菌」であると考えた。

2. 研究の目的

メヒシバは水田周辺にごく普通に見られる雑草であり、その上にはほぼ例外なくいもち病斑が認められる。したがって、reservoirとしての条件は満たしている。本研究は、メヒシバ菌の持つ非病原性遺伝子とイネ菌の持つ非病原性遺伝子を、塩基配列・周辺構造の点から比較検討し、上記仮説を検証することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 日本産イネ菌株の中の functional *AVR-Pia* はすべて同じ塩基配列を持っていたが、外国産菌株の保有する *AVR-Pia* においては、国ごとに若干の塩基配列のバリエーションが認められた。我々はこの事象を、仮説の証明に利用できるのではないかと考えた。もし仮説が正しいならば、各国で採集したメヒシバ菌とイネ菌に存在する非病原性遺伝子には、塩基配列レベルでの特異的一致が認められるはずである。これを確かめるため、ベトナム・イタリアにて、メヒシバ菌とそれぞれの隣接水田または近隣地域におけるイネ菌の採集を試みた。

(2) メヒシバ菌が非病原性遺伝子の reservoir としての役割を果たしている証拠を分子レベルで得るため、*AVR-Pia* に加えて *AVR-Pita*, *AVR-Pii* のホモログの塩基配列ならびに周辺構造を詳細に比較検討した。

4. 研究成果

(1) 分子データ（後述）に基づき、非病原性遺伝子の「貯蔵庫」の候補として、メヒシバに加え *Cenchrus* 属植物も加えることとし、菌株の採集を開始した。ベトナム国南部ホーチミン市・メコンデルタ、中部ダナン市、北部ハノイ市の水田を歩き、イネとその周辺雑草のいもち病斑を採集した。総計20地点のイネ・メヒシバ・*Cenchrus* 属植物・その他イネ科畦畔雑草から56サンプルを得た。

さらに、ドイツローベンハイム大学を拠点に、イタリアにていもち病に罹病したイネならびにメヒシバ等水田周辺の雑草を採集した。これらをローベンハイム大学に持ち帰り、単孢子分離を行い、計63菌株を得た。現在これらは、同大学で保存されている。これを日本に輸入するため、神戸植物防疫所を通して農林水産省に輸入許可（文部科学省大臣許可）申請を行っているところである。

(3) 本研究の立案時点で、*AVR-Pia* がいもち病菌種間（イネ菌 *P. oryzae* とメヒシバ菌 *P. grisea* 間）を水平移動したことを示唆する結果を見出していた。そこで、他の非病原性遺伝子にも、水平移動の証拠がないかどうか検討した。

AVR-Pita は、ファミリーを形成していることが知られている。そのメンバーのうち、

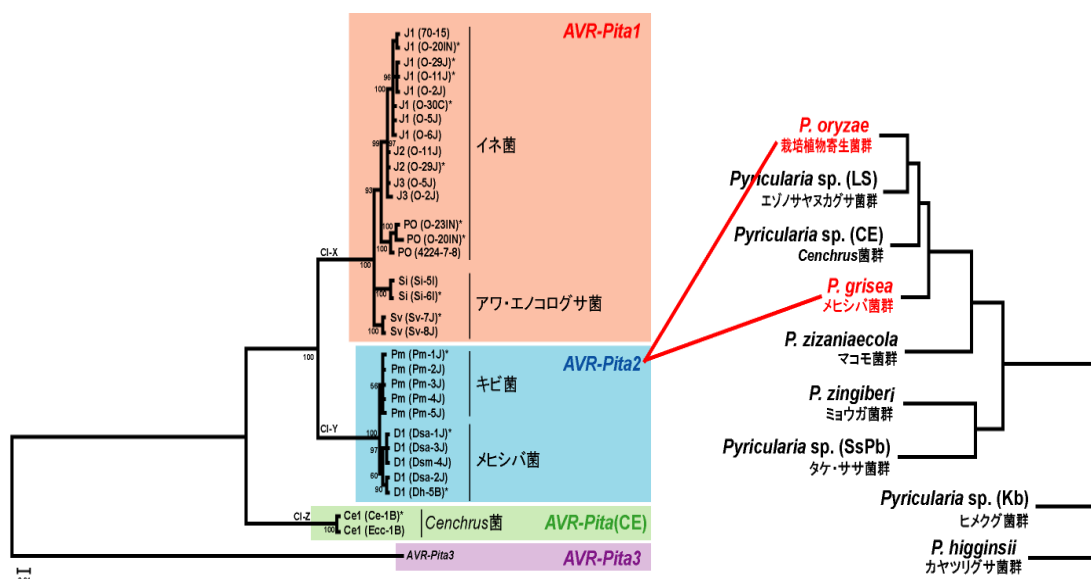


図1. *AVR-Pita* ホモログの系統関係（左）とそれらを保有するいもち病菌菌系の系統関係（右）の比較。

AVR-Pita1 は *P. oryzae* (イネ菌、コムギ菌、キビ菌等を含む栽培植物寄生菌群) に普遍的に存在する一方、*AVR-Pita2* は *P. grisea* (メヒシバ菌) に存在する。検討の結果、*AVR-Pita*の同一ホモログ (*AVR-Pita2*) がキビ菌とメヒシバ菌に存在することを見出した (図1)。さらに、*AVR-Pii2* がイネ菌と *Cenchrus*菌 (*Pyricularia* sp.) に、*AVR-Pii3*がコムギ菌と *Cenchrus*菌 (*Pyricularia* sp.) に存在することを見出した。これらのことから、いもち病菌の非病原力遺伝子は、一般的性質として種を超えて水平移動しようと考えた。

(3) さらに、キビ菌の*AVR-Pita2*を保有するフォスミドクローンを選抜・シークエンスし、メヒシバ菌のものと比較した。その結果、キビ菌の*AVR-Pita2* の3'側にはメヒシバ菌の場合と同じくfull lengthのレトロトランスポゾン Inago1 が存在することが判明した。また5' flankを詳細に検討したところ、いずれも、Inago2 solo LTRの挿入という同一の構造を有していた (図2)。これらのことから、キビ菌の*AVR-Pita2* は、メヒシバ菌から種を超えて獲得したものであると考えた。これは、非病原力遺伝子の水平移動が、*P. grisea* と *P. oryzae*の間で起こっているという強力な証拠

であると考えられる。

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1件)

- 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.

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

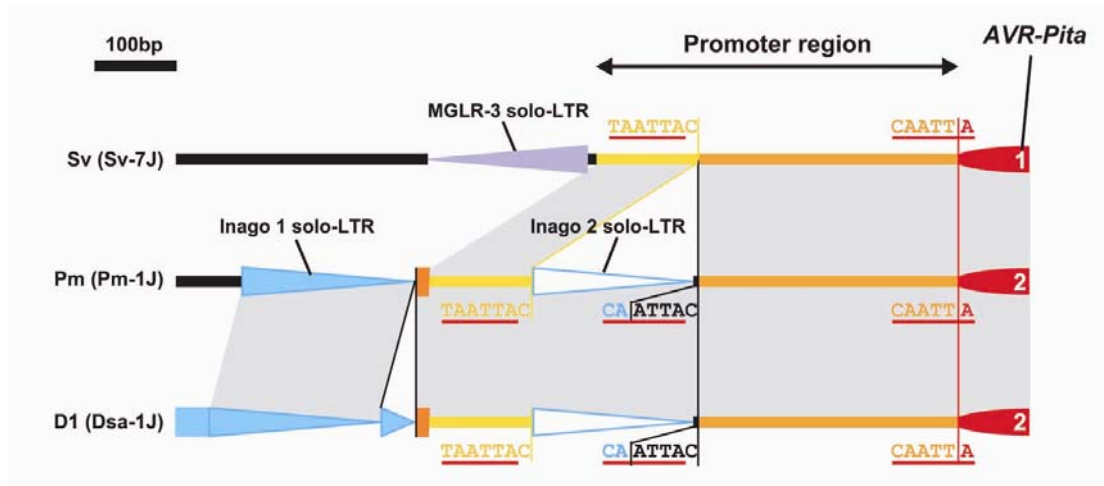


図2. メヒシバ菌 (Dsa-1J) の保有する *AVR-Pita2* (D1)、キビ菌 (Pm-1J) の保有する *AVR-Pita2* (Pm)、ならびにエノコログサ菌 (Sv-7J) の保有する *AVR-Pita1* (Sv) の 5'領域の構造比較。