

令和 6 年 6 月 17 日現在

機関番号：14501

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2022～2023

課題番号：22K20580

研究課題名（和文）ムギ類-いもち病菌間特異性を支配する抵抗性遺伝子の病原菌認識機構の解明

研究課題名（英文）Molecular mechanisms of resistance genes from wheat and barley recognizing the blast fungus

研究代表者

足助 聡一郎 (Asuke, Soichiro)

神戸大学・農学研究科・助教

研究者番号：90882514

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,200,000円

研究成果の概要（和文）：オオムギのいもち病抵抗性遺伝子Rmo2とコムギの抵抗性遺伝子Rwt7は共にprotein kinaseをコードしており、それぞれ非病原力遺伝子PBY2およびPWT7を認識する。Rmo2とRwt7のN末端にはHMAドメインが存在し、エフェクター認識の役割を果たすと考えられた。そこでドメインスワップコンストラクトを用いたプロトプラストアッセイを試みたところ、Rmo2-HMAはPBY2を、Rwt7-HMAはPWT7を特異的に認識することが明らかになった。また、イネおよびアワいもち病菌のエフェクターを立体構造に着目して選抜したところ、Rmo2によって認識されるエフェクターを一つ見出すことに成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

NBS-LRR型抵抗性遺伝子に見られるintegrated domainによるエフェクター認識メカニズムが明らかにされる中、本研究では、protein kinase型抵抗性遺伝子における同ドメインのエフェクター認識機構の一端を解明した。その結果、統合ドメインによる認識拡張が、分子種に依存せず抵抗性遺伝子の分子機能進化において重要な役割を果たすことが示唆された。この認識機構を応用することで、新たなエフェクターを標的としたムギ類の分子抵抗性育種技術の開発が期待される。

研究成果の概要（英文）：The barley blast resistance gene Rmo2 and the wheat resistance gene Rwt7 recognize the avirulence genes PBY2 and PWT7, respectively. It was hypothesized that the integrated domain at the N-terminus of Rmo2 and Rwt7 plays an important role in effector recognition. Using protoplast assays with domain swap constructs, it was revealed that the integrated domain of Rmo2 specifically recognizes PBY2, while the integrated domain of Rwt7 specifically recognizes PWT7. Additionally, by screening the effectors of rice and foxtail millet blast fungi based on the three-dimensional structure, we successfully identified an avirulence effector gene recognized by Rmo2.

研究分野：植物病理学

キーワード：いもち病菌 抵抗性遺伝子 オオムギ コムギ

1. 研究開始当初の背景

イネ科植物いもち病菌 *Pyricularia oryzae* は、植物属特異的寄生菌群に分化している。オオムギのいもち病菌菌群に対する抵抗性は、7H 染色体上に座乗する単一の遺伝子座 *Rmo2* によって支配されており、この座には異なる菌群を認識する複数のアレルが存在する(図1)。抵抗性品種 Russian No.81 と感受性品種 Nigrate の交配系を用いて詳細遺伝地図を作成したところ、*Rmo2* 候補遺伝子を 1 遺伝子に絞り込むことに成功した。候補遺伝子を導入したオオムギ形質転換体にいもち病菌を接種したところ、抵抗性を示したため、候補遺伝子が *Rmo2* であると証明された。一方、同様の構造を有するオーソログ遺伝子がコムギ 7AS, 7DS 染色体上に座乗しており、7DS 上のオーソログについてマーカーを作成し、マッピングを試みたところ、エンバク菌、ライグラス菌、シコクビエ菌に共通に保有されている *PWT7* に対応する抵抗性遺伝子 *Rwt7* と完全連鎖した。*Rwt7* 候補遺伝子を導入したオオムギ形質転換体を作成し、Br48+PWT7 (コムギ菌 Br48 に PWT7 を導入した形質転換体)を接種したところ、抵抗性を示したため、候補遺伝子が *Rwt7* であると証明された。以上から、*Rmo2* 及びそのコムギオーソログは、オオムギ、コムギにおいていもち病菌を認識する基幹的な抵抗性遺伝子であることが示唆された。単離に成功した *Rmo2*, *Rwt7* は receptor-like protein kinase 型の抵抗性遺伝子であり、その N 末端側に heavy metal associated (HMA) domain を有していることが判明し、対応する非病原性 (AVR) 遺伝子産物が HMA ドメインによって直接認識され特異性が成立している可能性が浮上した。

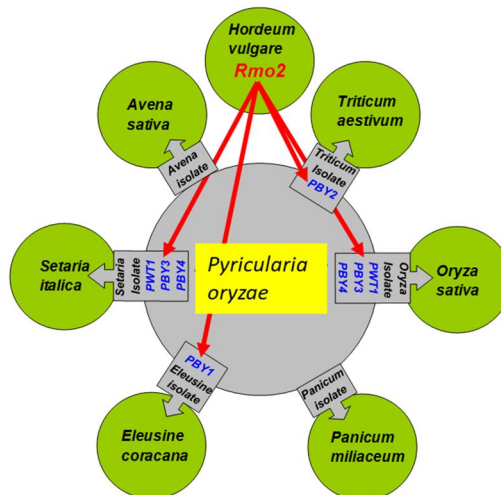


図1. オオムギの抵抗性遺伝子 *Rmo2* が認識するいもち病菌 AVR 遺伝子

2. 研究の目的

本研究の目的は“菌群 - 植物属間特異性”における HMA ドメインのエフェクター認識機構及びその遺伝子機能進化過程の解明である。*PBY2* は *Rmo2* が認識する AVR 遺伝子の一つである。*PWT7* は *Rwt7* によって認識される AVR 遺伝子である。両 AVR 遺伝子は単離に成功している。オオムギ *Rmo2* とコムギ *Rwt7* の HMA ドメインと protein kinase ドメインをスワップさせたキメラコンストラクトを作成し、それらを導入したオオムギ形質転換体、及びプロトプラストを用いて各種 AVR 遺伝子に対する反応を調査する。さらに *Rmo2* によって認識される他の AVR 遺伝子の逆遺伝学的探索を 3 項で述べるプロトプラストアッセイ法で試みる。

3. 研究の方法

(1)オオムギ *Rmo2* とコムギ *Rwt7* のドメインスワップ形質転換体を用いた AVR 認識ドメインの特定

Rmo2 と *Rwt7* の HMA ドメインをスワップしたキメラコンストラクトをそれぞれ作成し、これらをオオムギにアグロバクテリウム法を用いてそれぞれ導入した T₂ 系統を作成した。作出した T₂ 系統にいもち病菌を接種し、導入コンストラクトの機能証明を行った。

(2)ドメインの再予測とプロトプラストを用いた細胞死アッセイ

AlphaFold2, InterPro Scan を用いて *Rmo2* と *Rwt7* の HMA, protein kinase ドメインを改めて予測し直し、ユビキチンプロモーターに接続したスワップコンストラクトを構築した。それらをオオムギプロトプラストに導入し、細胞死アッセイを試みた。オオムギプロトプラストには AVR 遺伝子、抵抗性 (R) 遺伝子、Luciferase (LUC) 遺伝子の過剰発現ベクターを導入する。AVR 遺伝子と R 遺伝子が相互作用し細胞死した場合、発光値の低下が期待される。

(3) Yeast-Two Hybrid 法による AVR エフェクターと抵抗性遺伝子 HMA ドメイン間の相互作用

(2)の結果を受けて、Yeast-Two Hybrid 法による HMA ドメインと AVR エフェクターの分子間相互作用の確認を行った。

(4) *Rmo2* によって認識されるアワ菌の AVR 遺伝子の逆遺伝学的探索

先行研究において、*Rmo2* は複数のイネ菌・アワ菌 AVR 遺伝子を認識していることが示唆されている。*Rmo2* の HMA ドメインは *PBY2* 以外の MAX エフェクター構造を有するエフェクターコード遺伝子を認識していると考えられた。そこで、イネ菌 PO12-7301-2、アワ菌 GFSII-7-2 の MAX (Magnaporthe AVR and ToxB-like) エフェクター遺伝子を感染時 RNA-seq データ (接種 24 時間後と 48 時間後) と AlphaFold2, InterProScan の予測に基づき選抜した。次に、それらを過剰発現用ベクターに繋ぎ、*Rmo2* 発現ベクターとともにオオムギプロトプラストの中にトランスフェクションし、ルシフェラーゼアッセイによって細胞死の有無を検出した。*Rmo2* による認識の結果、細胞死が起こり、発光の低下を引き起こしたエフェクター遺伝子が AVR 遺伝子である(図 2)。

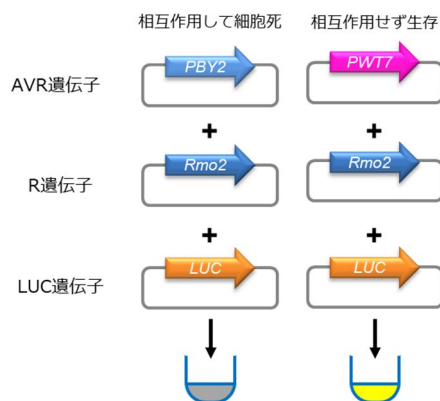


図2. プロトプラストアッセイの模式図

4. 研究成果

(1) 先行的に準備を進めていたスワップコンストラクトを導入したオオムギ形質転換体は、すべての接種組み合わせにおいて感受性を示し、期待通りの結果を得ることはできなかった。各遺伝子の配列類似性をもとにスワップコンストラクトを構築したが、その際に、抵抗性遺伝子として機能するために重要な構造を壊してしまった可能性が考えられた。そこで、改めて、ドメイン構造予測を行い、オオムギのプロトプラストアッセイを用いて、スワップコンストラクトの機能を検証することにした。

(2) AlphaFold2, InterProScan を用いて再度 HMA, protein kinase ドメインを予測し直したところ、*Rmo2*, *Rwt7* とともに N 末端の 77 アミノ酸が HMA ドメインであると特定し、*Rwt7* の HMA ドメイン (*Rwt7*-HMA) を *Rmo2* の Kinase に接続したコンストラクト (*H7P2*) を構築した。プロトプラストアッセイを試みたところ、*Rmo2* は *PBY2* と同時にトランスフェクションした場合のみ発光値が低下した一方、*H2P7* ではこのパターンが逆転し、*PWT7* との共発現時にのみ発光が低下した。即ち、*Rmo2*, *Rwt7* の各 HMA ドメインがそれぞれ *PBY2*, *PWT7* の認識を担うことが示唆された。

(3) 上述の 77 アミノ酸からなる *Rmo2*-HMA/*Rwt7*-HMA と、AVR 遺伝子産物である *PBY2*, *PWT7* の間の相互作用を Yeast two Hybrid 法を用いて検証した。その結果、*Rmo2*-HMA は *PBY2* と相互作用するが *PWT7* とは相互作用しないことが明らかとなった。一方、*Rwt7*-HMA は *PBY2*, *PWT7* とは共に相互作用しない結果となった。後者の原因として、HMA ドメインの N 末端側が AVR 認識に関与しており、N 末端に接続させている tag が期待する相互作用を阻害している可能性が考えられるため、C 末端側にクローニングし、再度試験する予定である。

(4) イネ菌 PO12-7301-2, アワ菌 GFSII-7-2 を感受性オオムギ品種 *Nigra* に接種し、接種 24 時間後および 48 時間後の total RNA を抽出し、RNA-seq を行った。感染時 RNA-seq データを基に構築した transcript の中から分泌シグナルを有するエフェクター遺伝子を予測し、その中から、イネ菌群、アワ菌群において保存的であり MAX エフェクター構造を持つものを 9 つ選抜した。これらを過剰発現用ベクターに繋ぎ、*Rmo2* 発現ベクターとともにオオムギプロトプラストの中にトランスフェクションし、細胞死アッセイを試みたところ、選抜したエフェクターのうちの 1 つにおいて発光の減少が観察された。このことから、当該遺伝子が *Rmo2* によって認識されるイネ・アワ菌の AVR エフェクターの一つであることが示唆された。今後、本遺伝子を導入したコムギもち病菌形質転換体を作成し、接種試験を試みる予定である。また本法が AVR エフェクターの同定に有効であることが示唆されたので、コムギの抵抗性遺伝子 *Rwt7* によって認識されるイネ・アワ菌の AVR エフェクターの探索も同様に行う予定である。

(5)、NBS-LRR 型抵抗性遺伝子に HMA が integrate し、病原菌エフェクターを認識する例はよく知られているが、本研究では receptor kinase 型遺伝子に HMA が integrate し、病原菌エフェクターを認識することが、プロトプラストアッセイ、Yeast two Hybrid 法から示唆された。病害抵抗性遺伝子は、NBS-LRR, receptor like kinase などの分子種に限らず、エフェクターをトラップするためのデコイモチーフを integrate させ、その認識範囲を拡大させる方向に進化してきていると考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Asuke Soichiro, Horie Akiko, Komatsu Kaori, Mori Ryota, Vy Trinh Thi Phuong, Inoue Yoshihiro, Jiang Yushan, Tatematsu Yuna, Shimizu Motoki, Tosa Yukio	4. 巻 36
2. 論文標題 Loss of <i>PWT7</i> , Located on a Supernumerary Chromosome, Is Associated with Parasitic Specialization of <i>Pyricularia oryzae</i> on Wheat	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Molecular Plant-Microbe Interactions?	6. 最初と最後の頁 716 ~ 725
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1094/MPMI-06-23-0078-R	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 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 3件 / うち国際学会 5件）

1. 発表者名 Soichiro Asuke
2. 発表標題 Molecular basis of the resistance in wheat and barley against the blast fungus
3. 学会等名 12th Japan-US Seminar in Plant Pathology（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Soichiro Asuke
2. 発表標題 Cloning of Rmo2, a gene for resistance in barley to various host species-specific pathotypes of the blast fungus
3. 学会等名 The third barley mutant conference (3BMC)（招待講演）（国際学会）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 M Thoihidul Islam, Soichiro Asuke, Hiroshi Hisano, Kazuhiro Sato, Yukio Tosa
2. 発表標題 A novel resistance resource found in Sv196, a Turkish accession of barley (<i>Hordeum vulgare</i>), conferring resistance against <i>Triticum</i> isolates of <i>Pyricularia oryzae</i>
3. 学会等名 The third barley mutant conference (3BMC)（国際学会）
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Soichiro Asume, Kaori Komatsu, Akiko Horie, Yuna Tatematsu, Yukio Tosa
2. 発表標題 Evolution of the wheat blast fungus through stepwise losses of function of avirulence genes partially accompanied by inter-chromosomal translocations
3. 学会等名 12th international congress of plant pathology (ICPP2023 Lyon) (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Soichiro Asume
2. 発表標題 Molecular basis of the host specificity of Pyricularia oryzae at the plant genus level
3. 学会等名 TSL seminar (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2023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
研究協力者	久野 裕 (Hisano Hiroshi)		
研究協力者	佐藤 和広 (Sato Kazuhiro)		

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			
英国	John Innes Centre	The Sainsbury Laboratory		
米国	Kansas State University			