

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 23 日現在

機関番号：14101

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23580062

研究課題名(和文)オミックス解析によるイネのいもち病侵入抵抗性関連因子の探索

研究課題名(英文)Omics analysis of factors involving penetration resistance to blast fungus in rice

研究代表者

小林 一成 (KOBAYASHI, Issei)

三重大学・生命科学研究支援センター・教授

研究者番号：90205451

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：イネといもち病菌の相互関係において、侵入は宿主特異性を決定する最も重要な段階である。イネの侵入抵抗性は重要な防御応答であるが、その機構には不明な点が多い。本研究では、イネに対して病原性および非病原性のいもち病菌のゲノム構造を次世代シーケンサー解析により比較し、いもち病菌を接種したイネのトランスクリプトームおよびプロテオームを比較解析した。この結果、我々はいくつかの重要因子候補を特定することに成功した。これらの成果は、イネに強力な耐病性を付与するための基礎的知見となることが期待される。

研究成果の概要(英文)：The penetration stage during infection process is the most determinate stage for host specificity between rice and blast fungi. Though penetration resistance of rice is an important defense response, it remains poorly understood. In this study, genome structures of pathogenic and nonpathogenic blast fungi were investigated with next-generation sequencer, and proteome and transcriptome of rice was compared, when rice were inoculated with either pathogenic or nonpathogenic blast fungus. Here, we succeeded to determine several important candidate factors involving with penetration resistance. These results will contribute to basic knowledge for breeding of blast-resistance rice.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農学・植物病理学

キーワード：いもち病菌 イネ 侵入抵抗性 宿主特異性 オミックス解析

1. 研究開始当初の背景

イネいもち病は、イネ栽培にとって最大の脅威の1つであり、収量の11~30%が毎年失われるとされる重要病害である。本病は、*Magnaporthe oryzae* によって引き起こされる糸状菌病であり、*M. oryzae* がイネにとって生来の防壁である細胞壁を破って細胞に直接侵入し、細胞内に菌糸を伸長させることによって感染が成立する。植物には糸状菌の直接侵入を阻止するための防御機構(侵入抵抗性)が存在することから、イネを宿主とする *M. oryzae* はイネの侵入抵抗性機構を何らかの方法で回避することにより感染に成功すると考えられる。興味深いことに、イネいもち病菌と同種でイネ以外の植物を宿主とする非病原性いもち病菌を接種すると、いずれの菌もイネ細胞への侵入に失敗するが、この際に過敏反応は全く誘導されないことが、以前の我々の研究から明らかになった。これらのことから考えて、イネの侵入抵抗性は、過敏反応とは異なる機構によりイネへのいもち病菌の感染成否を決定する極めて重要な防御応答であると言える。

我々は、以前から植物の侵入抵抗性に注目し、この機構にアクチン細胞骨格が中心的役割を果たすことを示し、このトピックに関して先導的な研究を進めてきた。さらに、最近、モデル植物であるシロイヌナズナの各種変異体を用いた遺伝学的探索により、植物の感染防御の分子機構は飛躍的に理解が深まってきた。しかしながら、シロイヌナズナにおいてさえ侵入抵抗性関連因子はほとんど明らかにされておらず、うどんこ病菌に対する侵入抵抗性関連因子として *Pen1~3* が単離されたのみである。このように、植物の強力な防御応答である侵入抵抗性の分子基盤は、未だほとんど未解明のままであると言える。

2. 研究の目的

以上に述べてきたように、その重要性にもかかわらず、侵入抵抗性に関与する因子がほとんど同定されていないのは、これらを遺伝学的に解明することが極めて困難なためである。先に述べた *Pen1~3* の単離は、数千の突然変異体に菌を接種し、1つ1つの植物を顕微鏡観察することによって成し遂げられたものである。この方法は多大な時間と労力を必要とするのみでなく、イネといもち病菌を含む他の重要作物-病原体関係にそのまま適用することは極めて困難であると考えられる。

一方、近年の分析機器の進歩は目覚しく、次世代シーケンサーや高性能質量分析装置を用いることにより、核酸やタンパク質を精密かつ網羅的に解析するオミックス的手法が一般に用いられるようになってきた。これらの手法は、従来では考えられないほど容易で安価に使えるようになったことから、特に医学分野では、遺伝学的には同定困難なバイオマーカーが既に数多く単離されている。

そこで本研究では、イネに病原性および非病原性のいもち病菌のゲノム構造を次世代シーケンサー解析により比較した上で、病原性を異にし、ゲノム構造が類似したいもち病菌を接種したイネのトランスクリプトームおよびプロテオームを解析することとした。これらのオミックス情報は、マイクロアレイおよびMALDI-TOF-TOF質量分析装置を用いて徹底的に比較解析し、イネのいもち病侵入抵抗性に深く関与する因子を探索することとした。いもち病菌は接種後24時間以内にイネの細胞内に侵入して菌糸を伸長させることから、本菌の侵入成否を決定するイネの抵抗性関連因子は感染初期の段階に既に発現していると考えられる。したがって、オミックス解析は接種後24時間以内のごく限られたステージを標的とした。さらに、候補因子をノックアウトあるいはノックダウンしたイネを用いて逆遺伝学的解析を行い、候補因子の重要性を検証することとした。

本研究により、イネの侵入抵抗性に関与する重要因子を単離できれば、イネいもち病菌がイネの侵入抵抗性を回避する機構の理解にも繋がると考えられ、強力な耐病性イネを作出するための基礎的知見となることが期待される。

3. 研究の方法

(1)いもち病菌のゲノム構造解析：いもち病菌5菌群(*Magnaporthe oryzae*; イネ菌、アワ菌、キビ菌、シコクビエ菌および *M. grisea*; メヒシバ菌)の6菌株からDNAを抽出し、超音波処理によって断片化後、次世代シーケンサー解析用ライブラリーを調製した。DNAライブラリーはSOLiD4(ライフテクノロジー、米国)を用いてリード長50bp、カバレッジ×100以上の解析を行い、マッピングソフト(LifeScope、ライフテクノロジー、米国)を用いてマッピングした。産出されたbamファイルをIntegrative Genome Viewer(Broad Institute、米国)を用いて各遺伝子座について個別に解析するとともに、SNV解析によりゲノム全体の類似性を算出した。

(2)イネ菌あるいはアワ菌を接種したイネのオミックス解析：イネ菌あるいはキビ菌をイネ葉鞘間隙に接種し、蛍光顕微鏡によって菌の感染行動をチェックしながら、24時間後まで経時的にmRNAおよび全タンパク質を抽出する。抽出したmRNAを用いてマイクロアレイによるトランスクリプトーム解析を行った。さらに、イネ菌およびキビ菌接種時のオミックス解析データをGeneSpringGXソフトウェアにより統合的に解析し、侵入抵抗性が働くアワ菌接種時に特異的な発現変動を示す因子を探索した。一方、プロテオームは、抽出した全タンパク質を二次元電気泳動と質量分析計によるタンパク質スポットの同定により行った。二次元電気泳動によるタ

ンパク質スポットの分離後、蛍光染色して画像を取り込み、二次元ゲルイメージ解析ソフト (Progenesis PG200、アナテック) を用いてイネ菌接種あるいはキビ菌接種時に特異的に発煙するタンパク質スポットを同定した。特異的と同定されたスポットをゲルピッカー (8mm) を用いて切り取り、ゲル内トリプシン消化後、ABI4800plus MALDI-TOF-TOF 質量分析計 (AB Sciex、米国) を用いて MS/MS 測定後、ProteinPilot3 ソフトウェア (AB Sciex、米国) を用いて解析し、タンパク質を同定した。

(3) 宿主特異的侵入抵抗性の制御因子候補の探索：イネ菌およびキビ菌と、これらの宿主であるイネおよびキビの宿主特異性を明らかにする過程において、この特異性が打破されつ特別な条件があることが判明した。すなわち、イネあるいはキビ葉鞘を縦に切断して二分し、内表皮に非病原性いもち病菌を接種すると、通常は全く侵入できない非病原性いもち病菌が非宿主細胞内に侵入可能となることが明らかになった。この要因を明らかにするため、傷害応答に関与するエチレンおよびジャスモン酸、病害応答に関与するサリチル酸およびその他の植物ホルモンであるオーキシン、ABA およびサイトカイニンの関与について検討した。プラスチックトレイで栽培した 4 週齢イネ実生を水を入れたプラスチックカップに移し、カップ内の水にそれぞれのホルモンを加えるとともに、葉面に噴霧することにより処理した。ホルモン処理 24 時間後、葉鞘内皮に GFP 発現いもち病菌孢子懸濁液を接種し、48 時間後に蛍光顕微鏡下で観察するとともにデジタルカメラにより写真撮影した。写真中の菌糸伸長量は、ImageJ ソフトウェア (NIH、米国) を用いて測定した。

4. 研究成果

(1) いもち病菌のゲノム構造を明らかにする目的で、いもち病菌 5 菌群 (*Magnaporthe oryzae*; イネ菌、アワ菌、キビ菌、シコクビエ菌および *M. grisea*; メヒシバ菌) の 6 菌株について次世代シーケンサーを用いたリシーケンス解析を行った。リファレンスであるイネ菌 (70-15) と比較して、メヒシバ菌を除き、いずれの菌群においてもゲノムの構造は比較的良く保存されていた (Figure 1)。一方、SNP の割合は菌群間で大きく異なっていた (Figure 2)。イネ菌株 84-10B、KEN53-33 では、CDS 上に SNP を含む遺伝子の割合がそれぞれ全遺伝子の 19.0、19.6%であったのに対し、キビ菌 (51.6%)、アワ菌 (56.5%) では SNP の割合が高く、シコクビエ菌 (85.4%)、メヒシバ菌 (90.2%) では極めて多くの遺伝子に SNP が確認された。また、アミノ酸変異を伴う SNP の割合も同様の傾向を示し、従来の分子系統解析による類縁関係とも矛盾しなかった。一方、病原性に関わる遺伝子の 1 つである *Avr-Pita* はイネ菌ではゲノム上の

位置が保存されていたのに対して、他の全ての菌群でその位置から欠失していた。これらの結果から、病原性に関わる遺伝子はいもち病ゲノムにおいて他の遺伝子とは異なる進化を遂げた可能性が示唆された。以上の結果から、イネ菌とキビ菌およびアワ菌は、病原性を異にするがゲノム構造は比較的類似していると考えられた。また、欠失などにより大きく変化した遺伝子に既知のエフェクター遺伝子が含まれていたことから、いもち病菌がイネの侵入抵抗性を回避する機構を解明するための有力な手がかりが得られた。

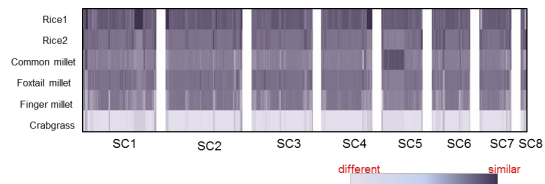


Figure 1. Heat maps of sequence similarity between each *Magnaporthe* isolates and a rice isolate 70-15 genome.

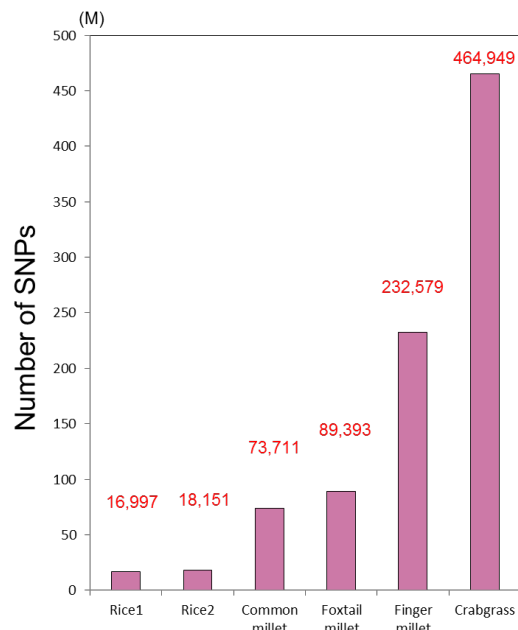


Figure 2. Number of SNPs in *Magnaporthe* isolates comparing with a rice isolate 70-15 genome.

(2) ゲノム構造が酷似しているにもかかわらず宿主特異性が厳密に決まっているイネいもち病菌 (イネ菌) とキビいもち病菌 (キビ菌) をイネに接種し、プロテオームおよびトランスクリプトーム解析を行った。この結果、イネ菌あるいはキビ菌を接種したイネにおけるトランスクリプトームの比較により、宿主因子である可能性が知られているトランスポーターのホモログの 1 つに関して、遺伝子発現がイネ菌接種により上昇する事が明らかになった (Table 1)。いもち病菌接種におけるこの遺伝子発現の変化を real-time PCR により定量的に確認したところ、イネいもち病菌を接種した時のみ発現が有意に上昇することが確認された。この結果から、この輸送タンパク質は本来の機能に加えて、

Table 1. Differentially expressed genes in rice inoculated with rice blast or common millet blast fungus

	Fold change	Description
	132.6	Similar to transporter
	97.1	Glutathione transferase (EC 2.5.1.18).
	30.2	Harpin-induced 1 domain containing protein.
	29.9	Similar to Tfm5 protein
	27.3	Similar to Plasma membrane associated protein-like
	18.2	AWPM-19-like family protein.
	17.5	Photosystem II 10 kDa polypeptide, chloroplast precursor.
	16.1	Cupredoxin domain containing protein
	15.6	Cytochrome b561 / ferric reductase transmembrane domain containing protein.
Upregulation by rice blast infection	14.9	Similar to H0502B11.4 protein
	14.5	Ubiquitin-conjugating enzyme E2-17 kDa 11 (EC 6.3.2.19) (Ubiquitin-protein ligase 11) (Ubiquitin carrier protein 11).
	13.8	Harpin-induced 1 domain containing protein.
	11.9	Similar to D-mannose binding lectin family protein, expressed
	10.9	Glutathione S-transferase GSTF15.
	8.2	Embryonic abundant protein 1.
	7.5	Embryonic abundant protein 1.
	6.3	Similar to hydrolase, hydrolyzing O-glycosyl compounds
	4.2	Transferase family protein.
	3.3	Metal transporter Nramp6 (ATNramp6).
Upregulation by common millet blast infection	11.0	Similar to Protease inhibitor/seed storage/LTP family protein
	8.3	Plant lipid transfer protein/Par allergen family protein.
	5.1	Similar to Protease inhibitor/seed storage/LTP family protein

病原菌によって発現誘導され、感染に必要な栄養源を獲得するために利用される宿主因子である可能性が強く示唆された。さらに、イネ菌あるいはキビ菌を接種したイネよりタンパク質を抽出し、二次元電気泳動によって発現するタンパク質を比較するプロテオーム解析を行ったところ、高い再現性で発現に顕著な差異のあるタンパク質が少なくとも16個見出された。このうち、4つは同一遺伝子由来のペプチド断片を含むタンパク質であり、根粒菌の共生関係成立に重要な役割を果たすことが知られている膜タンパク質であることが明らかになった。このタンパク質は、いずれの菌を接種した場合にも発現が変動し、二次元電気泳動により異なるスポットとして同定されることから、何らかの修飾を受けていると推定された。このタンパク質の機能は今後さらに詳細に検討する必要がある。

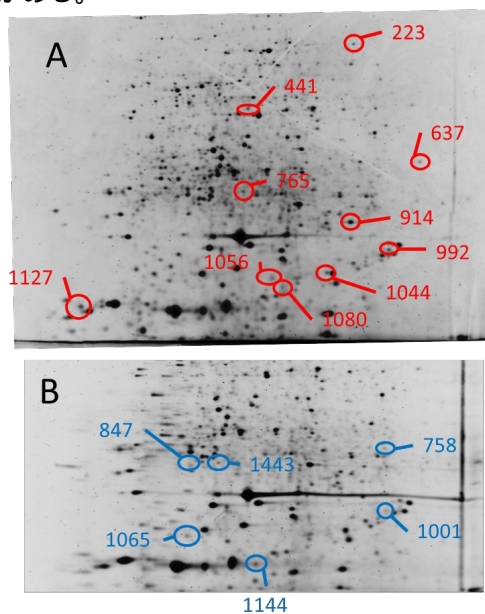


Figure 3. 2-D gel images of protein spots in rice inoculated with rice blast (A) or common millet blast fungus. Numbered circles show upregulated protein spots by inoculation.

以上に述べてきたように、宿主特異性を決定するイネの侵入抵抗性に関与するとみられる候補因子が多数同定され、これまでにイネの非宿主抵抗性に関与することが知られていない多くの遺伝子とタンパク質がキビ菌接種によって特異的に発現上昇あるいは発現低下することが明らかになった。個々の遺伝子やタンパク質の機能は今後さらに詳細に検討する必要があるが、将来の耐病性育種標的となりうる因子が多数見出され得たことには大きな意味があると言える。

(3)以上に述べてきた結果から、イネ菌とキビ菌はゲノム構造が酷似しているにもかかわらず、宿主特異性は厳密に決まっており、その特異性決定には感染初期に多くの因子がかかわる可能性が示唆された。ところが、この厳密な宿主特異性が、意外な条件により簡単に打破されることが明らかになった。イネ葉鞘を長軸方向に切断処理すると、約20%のキビ菌が侵入可能となり、イネ組織内に感染菌系を進展させることが本研究の過程で偶然明らかになった。この現象には傷害刺激関連ホルモンが関与すると推定し、傷害応答に関与するエチレンの前駆体 (ACC) およびジャスモン酸とともに、その他植物ホルモンがイネへのキビ菌侵入を可能にする作用を有するか否かを検討した。

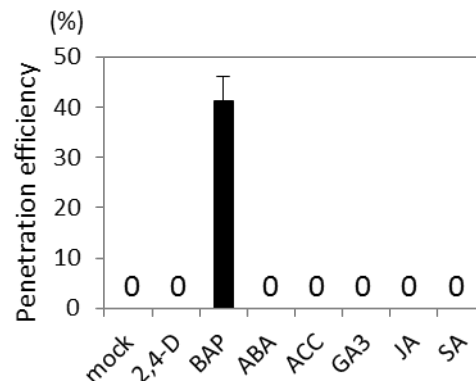


Figure 4. Penetration efficiencies of the common millet isolate to hormone-treated rice cells. Penetration efficiencies of the common millet isolate after various hormones.

この結果、傷害応答関連ホルモンは全く効果を示さなかったにもかかわらず、意外なことにサイトカイニンがこの効果を示すことが明らかになった。これらの結果から、サイトカイニンがイネへのいもち病菌侵入を助長する可能性があると考え、イネ菌あるいはキビ菌を接種18時間後のイネにおけるトランスクリプトームを解析し、サイトカイニン関連遺伝子の発現変化を検討した。この結果、サイトカイニンの1つである cis-zeatin の不活化に関わる cis-zeatin O-glucosyl-transferase をコードする遺伝

子(*cZOGT*)がイネ菌接種時特異的に発現誘導されることが明らかになった。さらに、いもち病菌がイネに侵入可能となる条件下(イネ菌接種、切断処理および *cis*-zeatin 処理)において、いずれの場合にも同様に *cZOGT* の発現が顕著に誘導されることが明らかになった。以上の結果から、サイトカイニンは、いもち病菌の侵入を助長する作用を持ち、イネ菌およびキビ菌の宿主特異性を決定する因子の1つである可能性が高いと考えられた。

以上に述べてきたように、3年間の研究から得られた知見は、いずれもイネいもち病を感染初期段階で阻止する強力な耐病性をイネに付与できる技術に発展する可能性を秘めており、耐病性イネ作出のための有力な方策となることが期待される。

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2件)

Kobayashi Y., Kobayashi I., (2013) Microwounding is a pivotal factor for the induction of actin-dependent penetration resistance against fungal attack. *Planta*, 査読有, 237, 1187-1198
DOI: 10.1007/s00425-013-1837-9

[学会発表](計14件)

Furihata T., Kobayashi, Y., Yamada K., Kobayashi I., Genome-wide changes of DNA methylation in regenerated rice lines. 第55回日本植物生理学会年会, 2014, Mar 18-20, Univ. Toyama, (Toyama)
漆崎慎吾、小林裕子、小林一成、サイトカイニンはいもち病菌の宿主選択性を決定する、平成25年度日本植物病理学会大会、2013年3月27日~29日(岐阜市)

Odani A., Kobayashi Y., Urushizaki S., Kobayashi I., Omics Analysis of nonhost resistance to blast fungi in rice. Third International Workshop on Regional Innovation Studies (IWRIS2012), 2012, Oct 11-12, Mie Univ. (Tsu)

Maeda M., Kobayashi Y., Urushizaki S., Kobayashi I., Activation of defense pathways by artificial manipulation of actin cytoskeleton in rice. Third International Workshop on Regional Innovation Studies (IWRIS2012), 2012, Oct 11-12, Mie Univ. (Tsu)

Urushizaki S., Kobayashi Y., Kobayashi

I. Comparative genome structure analysis and screening of pathogenicity related genes of *Magnaporthe* isolates by SOLiD4 whole genome resequencing. XV International Congress of Molecular Plant-Microbe Interactions, 2012, July 29-Aug 2, Kyoto International Conference Center (Kyoto)

Urushizaki S., Kobayashi Y., Kobayashi I., Comparative genome structure analysis of *Magnaporthe* isolates by SOLiD whole genome resequencing. 第34回日本分子生物学会年会, 2011, Dec. 14, (Yokohama)

漆崎慎吾、小林裕子、小林一成、次世代シーケンサーを用いたいもち病菌非宿主抵抗性関連遺伝子の探索、平成23年度日本植物病理学会関西支部会、2011年10月2日、(高松市)

[図書](計0件)

該当なし

[産業財産権]

出願状況(計0件)

該当なし

取得状況(計0件)

該当なし

[その他]

該当なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

小林 一成 (KOBAYASHI, Issei)

三重大学・生命科学研究支援センター・教授
研究者番号: 90205451

(2)研究分担者

なし

(3)連携研究者

なし