

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 6 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26292025

研究課題名(和文)いもち病菌のホストジャンプ機構とコムギ特異的菌群の全進化過程の解明

研究課題名(英文)Mechanisms of host jump and evolution of *Pyricularia oryzae* Triticum pathotype

研究代表者

土佐 幸雄 (TOSA, Yukio)

神戸大学・(連合)農学研究科(研究院)・教授

研究者番号：20172158

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,300,000円

研究成果の概要(和文)：ペレニアルライグラスいもち病菌のコムギに対する非病原力遺伝子PWT3、エンバクいもち病菌のコムギに対する非病原力遺伝子PWT3, PWT4を破壊したところ、破壊株は全コムギ品種に対する病原性を獲得した。このことから、非病原力遺伝子の機能喪失により、コムギいもち病菌が進化しうることが示唆された。現存のコムギ菌のPWT3にどのような変異が入っているかを調べたところ、トランスポゾンの挿入や塩基置換が認められた。一方、シコクビエ菌のコムギに対する非病原性の遺伝解析を行ったところ、5つの非病原力遺伝子が関与していることが判明した。そのうちのひとつをクローニングし、PWT6と命名した。

研究成果の概要(英文)：Lolium isolate TP2 (pathogenic on ryegrass) and Avena isolate Br58 (pathogenic on oat) of *P. oryzae* gained virulence on common wheat through disruption of their avirulence gene(s), PWT3 and PWT3/PWT4, respectively, suggesting that loss of function of these avirulence genes leads to the emergence of the wheat blast fungus (*Triticum* isolates). The current *Triticum* isolates had mutations in PWT3 - insertion of transposable elements or nucleotide substitutions. The avirulence of Eleusine isolate MZ5-1-6 (pathogenic on finger millet) on common wheat was controlled by five genes. One of them was cloned and designated as PWT6.

研究分野：植物病理学

キーワード：Pyricularia oryzae コムギいもち病菌 ホストジャンプ

1. 研究開始当初の背景

Pyricularia oryzae は、一般にはイネいもち病菌として知られているが、イネ以外の主要穀物にも深刻な被害を引き起こす。1985年、ブラジルにおいてコムギを特異的に侵すいもち病菌 (*Triticum* isolates) が突如出現し、コムギ栽培に大打撃を与えた。本菌は、*P. oryzae* の別菌群であることが判明した。コムギいもち病はその後瞬く間に南米全域に広がり、コムギ栽培の脅威となった。米国では本菌群の北米への伝播が懸念されていたが、2011年5月、ケンタッキー大学園場のコムギにいもち病斑が発見された。分離された病原菌は Kentucky strain と名付けられた。ゲノム解析の結果、この菌は南米のコムギ菌とは系統的に異なり、北米で1970年代から知られていた annual ryegrass gray leaf spot 病菌(いもち病菌の1菌群)と極めてよく似ていることが判明した。このことから、Kentucky strain は南米から伝播したものではなく、土着の annual ryegrass 菌が host jump を起こして進化・出現した新系統であると結論された。このように、*P. oryzae* は現在もホストジャンプを起こし、新菌群を生み出し続けている。

なお、研究開始後、コムギいもち病が新たなステージに入った。2016年2月、バングラデシュでコムギいもち病が発生し、コムギ生産に大打撃を与えた。これはユーラシア大陸において初めてのコムギいもち病の outbreak であった。さらに、2017年2月には、世界第2位のコムギ生産国である隣国インドに飛び火した。いまや、コムギいもち病は pandemic disease になりつつある。

2. 研究の目的

ブラジルで発生したコムギいもち病菌、ならびに北米で最近新規に発生した Kentucky strain のホストジャンプ機構を、遺伝子レベルで解明する。また、「いもち病菌の菌群分化過程は、非病原性遺伝子の段階的喪失過程である」という仮説を検証するため、ペレニアルライグラス菌、エンバク菌のコムギに対する非病原性遺伝子を破壊して、コムギに対する病原性を獲得するか否かを調べる。さらに、*P. oryzae* のコムギに対する病原性獲得の全過程の解明するため、*P. oryzae* の祖先型に近いと考えられているシコクピエいもち病菌のコムギに対する非病原性の解析を行う。

3. 研究の方法

Kentucky strain の解析は、本菌を管理している Kansas State University の Dr. Barbara Valent、University of Kentucky の Dr. Mark Farman と共同で行った。ペレニアルライグラス菌、エンバク菌、シコクピエ菌、コムギ菌としては、それぞれ TP2 (日本産) Br58 (ブラジル産) MZ5-1-6 (日本産) Br48 (ブラジル産) を用いた。

検定品種としては、普通系コムギ農林4号 (N4, *Rwt3/Rwt4*)、Chinese Spring (CS,

Rwt3/rwt4)、Transfed (Tfed, *rwt3/Rwt4*)、Hope (*rwt3/rwt4*) を用いた。

4. 研究成果

(1) ペレニアルライグラス菌 TP2 のコムギに対する非病原性遺伝子として A1 (仮称) が同定されていたが、遺伝解析の結果、A1 は PWT3 (エンバク菌のコムギに対する非病原性遺伝子のひとつ、*Rwt3* に対応) であることが判明した。PWT3 をクローニングしたところ、141 アミノ酸からなる分泌タンパク質をコードしていた。TP2 は N4, CS の穂に非病原性を示したが、その PWT3 破壊株はそれらに対する病原性を獲得した。

(2) エンバク菌 Br58 のコムギに対する非病原性に関与する遺伝子としては PWT3, PWT4 (*Rwt4* に対応) が知られている。Br58 の PWT3 は、TP2 のそれと全く同一の塩基配列を持っていた。一方、PWT4 のクローニングしたところ、93 アミノ酸からなる分泌タンパク質をコードすることが判明した。Br58 は N4, CS, Tfed の穂に非病原性を示したが、その PWT3 破壊株は CS に、PWT4 破壊株は Tfed に対する病原性を獲得した。さらに、PWT3, PWT4 のダブル破壊株は、N4 に対する病原性を獲得した。

以上のことから、非病原性遺伝子の機能喪失により、コムギいもち病菌が進化する事が示唆された。

(3) この推測を確かめるため、コムギいもち病の発生初期 (1990~1992) に採集されたコムギ菌の PWT3 にどのような変異が入っているかを調べた。その結果、(i) ORF に13の塩基置換が入っている B タイプ、(ii) 上流に転移因子 MGR583 が挿入されている Atm タイプが認められた。Atm タイプにおいては、PWT3 の発現量が 1/10 に減少していた。興味深いことに、エンバク菌・ペレニアルライグラス菌と全く同一の PWT3 (A タイプ) をもつコムギ菌も存在した。

(4) B タイプの塩基置換が、1985年にコムギ菌が出現してから採集されるまでの5~7年間に蓄積したとは考え難い。そこで、神戸大学に保存されているさまざまな宿主由来代表100菌系をスクリーニングしたところ、1990年にブラジルで *Brachiaria plantaginea* 採集された1菌系が B タイプの PWT3 を持つことが判明した。当初、これが B タイプのコムギ菌の直接的祖先であると予想したが、系統解析の結果、当該 *Brachiaria* 菌はコムギ菌と遠縁であることが判明した。全ゲノム塩基配列の比較解析の結果、B タイプのコムギ菌は *Brachiaria* 菌から、B タイプ PWT3 を含む 1.6Mb 染色体断片を introgressive hybridization 等により獲得したことが判明した。

(5) つぎに、最近コムギから採集された菌株の PWT3 タイピングを行った。2011年に米国ケンタッキー州で採集された Kentucky strain を解析したところ、上流に転移因子 Pot3 が挿入されていることが判明した。この新規

タイプを Atp と命名した。これが、annual ryegrass 菌から Kentucky strain への進化（ホストジャンプ）の機構であると考えた。一方、2012 年にボリビアで採集された強病原性菌系 B71 は、さらに別のタイプ（Atc と命名）を有していた。これは、転移因子 Pyret と RETRO5 が PWT3 の ORF に複合的に挿入されたものであった。2016 年にバングラデシュで採集された菌系はすべてこのタイプであった。さらに、Atc タイプは、2000 年代にはすでにブラジルに広く分布すること、さらに、1990 年代初頭にもすでにブラジル南部に存在していたことが判明した。以上のことから、Atc タイプは当初マイナーなタイプとしてブラジル南部に存在していたが、2000 年代に分布域を拡大し、最終的にバングラデシュへ伝播してコムギいもち病の outbreak を引き起こしたと結論した。

(6) critical な問題は、なぜ A タイプの PWT3 を持つ菌が「コムギ菌」として採集されてきたかということである。実際に、これらのコムギ菌を N4, CS, Tfed, Hope の穂に接種したところ、Rwt3 を持つ N4, CS に非病原性を示した。このことから、コムギ菌の出現した当時、Rwt3 を持たないコムギ品種（rwt3 品種）が栽培されていたのではないかと考えた。そこでまず、世界中から収集した在来普通系コムギ系統 499 系統について、Rwt3, Rwt4 の有無を調べた。その結果、それらの保有系統の割合はそれぞれ 77%, 87% であり、両遺伝子とも持たない系統はわずか 6.6% であった。このことから、両遺伝子は地域を問わず広く世界中に分布していることが判明した。おそらく、普通系コムギが成立した当初はすべての系統が両遺伝子を保有していたと思われる。一方、ブラジルにおける改良品種について同様のアッセイをおこなったところ、1970-1980 年代の品種に興味深い変化を見出した。この当時ブラジルで最も広く栽培された品種は IAC-5（Rwt3 保有品種）であったが、1982 年頃、半矮性品種 Anahuac が導入され、農家に推奨された。この Anahuac が rwt3 品種であることが判明した。このことから、A タイプ PWT3 を持つコムギ菌は、このような rwt3 品種から採集されたものと推測した。

(7) 以上のことから、コムギ菌の進化の過程を次のように推論した。(i) rwt3 品種が導入されたことにより、PWT3 を保有するライグラス菌等がコムギに寄生できるようになった。(ii) それらの菌は rwt3 品種の上で増殖し、集団を拡大するとともに、コムギへの fine-tuning を行い、fitness を高めた。(iii) そのような集団のなかから、PWT3 に変異をもつ mutant が出現した。それらは、Rwt3 品種に対する病原性も獲得し、全コムギ品種を侵せる「コムギ菌」として成立した。

Kentucky strain は、2011 年に採集されたが、その後拡大せず消滅している。また、その病原性は比較的弱いとされている。おそらく、これは、annual ryegrass 菌が、上記 fine-tuning

のプロセスを経ることなく Rwt3 コムギ品種にジャンプしたためであろうと考えられる。

(8) 以上のモデルは、rwt3 品種が、ホストジャンプの「跳躍台」となったことを示唆している。そうすると、rwt3/rwt4 品種は、PWT3, PWT4 を持つエンバク菌がコムギにホストジャンプするために跳躍台になりうることになる。以上を総合し、コムギの栽培にあたっては、Rwt3, Rwt4 両遺伝子を持つ品種を選定することが重要であると考えた。

(9) さらに、*P. oryzae* の寄生性分化の過程の全体像を明らかにするため、本菌の祖先型に近いと考えられているシコクピエ菌の解析を試みた。シコクピエ菌 MZ5-1-6 x コムギ菌 Br48 の F₁ を N4, CS, Hope に接種したところ、非病原性菌系：病原性菌系が、N4/CS の上では 15:1~31:1 に、Hope の上では 3:1 に分離した。このことから、シコクピエ菌の N4/CS, Hope に対する非病原性には、それぞれ、4~5 遺伝子、2 遺伝子が関与していることが示唆された。また、分離パターンの比較解析から、Hope に対する 2 遺伝子は、N4/CS に対する遺伝子のうちの 2 つと同一のものであることが示唆された。

(10) 分離パターンを詳細に検討したところ、N4/CS のみに作用する非病原性遺伝子のうちのひとつが、PWT3 である可能性が示唆された。そこで、シコクピエ菌 MZ5-1-6 から PWT3 ホモログをクローニングした。本ホモログは、ORF 上流に 1 塩基の置換を有していた（A'タイプと命名）。これをコムギ菌 Br48 に導入し、得られた形質転換体を CS, Hope に接種したところ、CS 特異的に非病原性となった。このことから、PWT3 が、シコクピエいもち病菌のコムギに対する非病原性遺伝子としても作用することが判明した。以上のことから、PWT3 に対応する抵抗性遺伝子 Rwt3 は、エンバク菌・ライグラス菌・シコクピエ菌に共通に作用する極めて重要な抵抗性遺伝子であることが示唆された。

(11) 一方、逆遺伝学的手法による非病原性遺伝子のクローニングを試みた。MZ5-1-6 の全ゲノム配列から分泌タンパク質遺伝子を予測し、それらからランダムに選んだ 60 個の遺伝子のいもち病菌集団における分布を調べたところ、シコクピエ菌には広く存在するがコムギ菌には全く存在しない遺伝子を見出した。これをコムギ菌 Br48 に導入し、得られた形質転換体を CS, Hope に接種したところ、CS 特異的に非病原性となった。すなわち、N4/CS のみに作用する遺伝子のうちのひとつのクローニングに成功した。本遺伝子を PWT6 と命名した。

(12) PWT6 ホモログは、イネ菌にも認められた。そのイネ菌ホモログを Br48 に導入し、得られた形質転換体を CS に接種したところ、病斑数は減少するが、まれに形成された病斑は過敏反応を誘起することなく緑色のまま拡大した。本遺伝子は、過敏反応に関与せず、侵入時にのみ作用を示す新規タイプの

エフェクターをコードしていると考えられる。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 9 件)

足助 聡一郎、Nicole John Magculia、中馬 いづみ、土佐 幸雄、Cloning of an avirulence gene of an *Eleusine* isolate of *Pyricularia oryzae*. The 7th International Rice Blast Conference. 2016.10.10. マニラ (フィリピン).

足助 聡一郎、中馬 いづみ、土佐 幸雄、Identification of gene pairs involved in the incompatibility between *Eleusine* isolates of *Pyricularia oryzae* and common wheat. The 17th International Congress of Molecular Plant-Microbe Interactions. 2016.7.18. ポートランド (アメリカ)

足助 聡一郎、天藤 陽香、Trinh Vy、井上 喜博、中馬いづみ、土佐 幸雄、シコクビエいもち病菌が保有する *PWT3* ホモログの普通系コムギに対する非病原力遺伝子としての機能の検討、平成 28 年度日本植物病理学会大会、2016.3.21、岡山大学 (岡山県)

土佐 幸雄、井上 喜博、Trinh Vy、中馬いづみ、Genetic and molecular analyses of the incompatibility between *Lolium* isolates of *Pyricularia oryzae* and wheat, The 11th US-Japan Scientific Seminar. 2015.10.29. 高松 (香川県)

足助 聡一郎、中馬 いづみ、土佐 幸雄、シコクビエいもち病菌の普通系コムギに対する非病原力遺伝子クローニングのための BC₁F₁ 集団の作出および対応する抵抗性遺伝子の座乗候補染色体の検討、平成 27 年度日本植物病理学会関西支部会、2015.9.29、徳島あわぎんホール (徳島県)

足助 聡一郎、西見 周子、Trinh Vy、井上 喜博、中馬 いづみ、土佐 幸雄、シコクビエいもち病菌が保有する普通系コムギに対する非病原力遺伝子数の遺伝学的推定、平成 27 年度日本植物病理学会大会、2015.3.30、明治大学 (東京都)

小松 香織、森 亮太、井上 喜博、Trinh Vy、中馬 いづみ、土佐 幸雄、エンバクいもち病菌のコムギ品種 Hope に対する非親和性に関する遺伝子対の同定、平成 27 年度日本植物病理学会大会、2015.3.30、明治大学 (東京都)

井上 喜博、Trinh Vy、吉田 健太郎、寺内 良平、中馬 いづみ、土佐 幸雄、ペレニアルライグラスいもち病菌のコムギに対する非病原力遺伝子 *PWT3* のコムギいもち病菌における変異と *Rwt3* 保有

コムギ品種への適応、平成 27 年度日本植物病理学会大会、2015.3.30、明治大学 (東京都)

Trinh Vy、井上 喜博、吉田 健太郎、草場 基章、寺内 良平、中馬いづみ、土佐 幸雄、非病原力遺伝子 *PWT3* の破壊によるライグラスいもち病菌のコムギへの病原性獲得、平成 27 年度日本植物病理学会大会、2015.3.30、明治大学 (東京都)

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)研究協力者

Barbara Valent

Kansas State University

Mark Farman

University of Kentucky