

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 14 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：2014～2015

課題番号：26892015

研究課題名(和文) トランスクリプトーム関連解析によるコムギうどんこ病菌非病原力遺伝子の網羅的単離

研究課題名(英文) Identification of avirulence genes

研究代表者

吉田 健太郎 (Yoshida, Kentaro)

神戸大学・先端融合研究環・助教

研究者番号：40570750

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：うどんこ病菌の宿主特異性を決める遺伝子を同定するために、コムギに感染するうどんこ病菌(コムギ菌)とカモジグサに感染するうどんこ病菌(カモジグサ菌)をいろいろな種類の栽培コムギと野生コムギの葉に接種し、感染の有無を調査した。ほとんどのコムギ系統において、コムギ菌とカモジグサ菌に対して感染を許さなかったが、一粒系コムギの *Triticum urartu* と野生コムギ *Aegilops umbellulata* では、コムギ菌とカモジグサ菌に対する抵抗性と罹病性が分離した。F1菌系を感染したコムギ葉のRNAシークエンシングをおこない、F1菌系間の転写産物の比較解析から宿主特異性を決める候補遺伝子を絞り込んだ。

研究成果の概要(英文)：The host specificity of grass powdery mildew *Blumeria graminis* f.sp. *tritici* and *B. graminis* f.sp. *agropyri* is determined by combination of pathogen avirulence genes and host resistance genes. Our research purpose is identification of avirulence effectors involved in host specificity. At first, host specificity of these two species against wheat species was investigated. Susceptible and resistant phenotypes against these isolates were segregating in *T. urartu*, *Ae. umbellulata*, and *Ae. ventricosa*. Next, RNA sequencing of host leaves infected by F1 isolates derived from *B. graminis* f.sp. *tritici* and *B. graminis* f.sp. *agropyri* was performed. To identify transcripts that were unique to F1 isolates, short reads from the wheat powdery mildew were filtered out and then de novo assembly was conducted. Comparing the assembled transcripts, we identified transcripts encoding secreted proteins and being unique to F1 isolates. They are effector candidates involved in the host specificity.

研究分野：植物病理学、植物遺伝学

キーワード：コムギ うどんこ病菌 エフェクター RNAシークエンシング

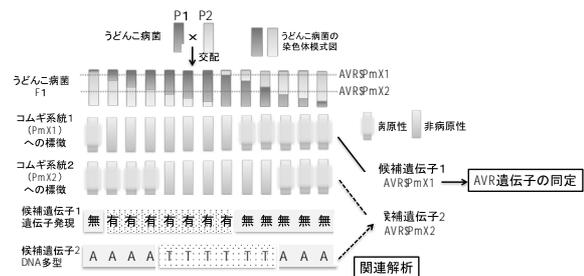
### 1. 研究開始当初の背景

エフェクター研究は、植物と病原微生物のダイナミックな分子レベルの攻防、進化を明らかにし (Win et al. 2012 Cold Spring Harbor Symp Quant Biol)、新たな遺伝子改変技術 TALENs を提供した (Sebastian et al. 2013 Annu Rev Phytopathol)。AVR 遺伝子を単離することによって、マップベースクローニングが困難な抵抗性遺伝子を単離可能にしてきた (Vleeshouwers et al. 2011 Annu Rev Phytopathol, Okuyama et al. 2011 Plant J)。AVR 遺伝子と抵抗性遺伝子の相互作用を利用して、多数の AVR 遺伝子を認識できる抵抗性遺伝子を生物工学的に改変することも行われるようになってきた (Segretin et al. 2014 MPMI)。エフェクター研究の重要性が増し、国内外の研究者によって、様々な病原性微生物の新規エフェクターの単離が試みられている。しかし、糸状菌のエフェクター遺伝子単離は、多くの時間と多額の費用を必要とするうえ、成功しない場合も多く、費用対効果は高くない。本研究では、その状況を打破すべく、低コストかつ比較的短時間に AVR 遺伝子を網羅的に単離する手法を提案する。研究代表者等は、日本のイネいもち病菌株のゲノム配列を解読し、関連解析によって、いもち病菌の新規 AVR 遺伝子を単離することに成功した (Yoshida et al. 2009 Plant Cell)。また、これまでのエフェクター研究から、多くのエフェクターは、(1)感染時に発現誘導される。(2)小さな分泌タンパク質遺伝子である。(3)遺伝的多型が検出される。といった特徴があることがわかっている。また、研究代表者等は、イネの突然変異系統の交配分離集団と高速シーケンサーを用いて、迅速に表現型に寄与する DNA 変異を同定する「Mutmap」法の開発に携わった (Abe, Kosugi, Yoshida et al. 2012 Nat Biotechnol)。これらの経験と知見を踏まえ、関連解析、遺伝子発現、交配分離集団を組み合わせることによって、AVR 遺伝子を網羅的に単離する方法の着想に至った。本研究で使用する植物病原菌は、神戸大学植物遺伝学研究室で、維持されているムギ類うどんこ病菌である。ムギ類うどんこ病菌は、交配が容易であり、宿主に対する標徴は、はっきりしており、遺伝学的材料として最適である。加えて、コムギうどんこ病菌のゲノム配列は、解読されており (Wicker et al. 2013 Nature Genetics)、解析する際の参照ゲノム配列として利用できる。また、コムギの重大病害であり、世界的に抵抗性のコムギ育種が求められている (Dean et al. 2012 Mol Plant

Pathol)。そこで、ムギ類うどんこ病菌を利用して、着想した単離法の概念実証をおこなう。そして、コムギなどの巨大ゲノム植物種でも抵抗性遺伝子のクローニングが容易にする系を準備する。

### 2. 研究の目的

高速シーケンサーによるトランスクリプトーム関連解析によって、コムギうどんこ病菌の非病原力エフェクター (AVR) 遺伝子を、低コストで短時間かつ網羅的に単離することである。下図のように、うどんこ病菌 F1 交配集団にお



ける遺伝子発現多型及び DNA 多型と非病原性の分離との関連を調べ、AVR 遺伝子を同定する。そして、うどんこ病抵抗性遺伝子を単離するために抵抗性が感受性に变化したコムギ変異体を選抜する。

### 3. 研究の方法

(1)高速シーケンサーとF1交配集団を用いた関連解析によるAVR 遺伝子候補の選抜

神戸大学保有の栽培コムギ・近縁野生種にうどんこ病菌を接種し、非病原性の分離を確かめる。カモジグサうどんこ病菌とコムギうどんこ病菌を交配してできたF1交配集団をコムギやその近縁野生種に接種し、非病原性の分離を明らかにする。親菌系と F1 交配集団から 選抜した2菌系のRNAシーケンシングを実施する。非病原性の分離と関連がある遺伝子発現多型又はDNA多型が検出された分泌タンパク質遺伝子を選抜し、候補AVR 遺伝子とする。更に、関連解析をF1交配集団へと拡張する。候補AVR 遺伝子のF1 菌系における候補AVR 遺伝子の遺伝子発現多型と遺伝的多型を明らかにする。そして、これらの多型情報とF1菌系における非病原性の分離との関連を調べ、最終的な候補AVR 遺伝子とする。

(2)AVR 遺伝子の同定

コムギいもち病菌にコムギうどんこ病菌のAVR 候補遺伝子を形質転換させ、対応する抵抗性遺伝子をもつコムギ系統に接種する。コムギいもち病菌の病徴が抑制されること

で、AVR候補遺伝子がAVR遺伝子であることを証明する。

### (3) コムギの抵抗性遺伝子単離の準備

福井県立大学が保有する 10000 系統の重イオンビーム一粒コムギ変異体及び京都大学が保有する 1200 系統の EMS一粒コムギ変異体の親系統に対し、一つのAVR 遺伝子をもつ F1 菌系を選抜する。選抜した菌系を一粒コムギ変異体に接種し、抵抗性が感受性に変化したコムギ変異体を選抜する。選抜した変異体を、親系統に交配し、F1種子を得る。また、新たにコムギのEMS変異体を作成する。

## 4. 研究成果

### (1) コムギうどんこ病菌とカモジグサうどんこ病菌のコムギ・野生近縁種への接種実験

コムギに感染するうどんこ病菌(コムギ菌)とカモジグサに感染するうどんこ病菌(カモジグサ菌)をいろいろな種類の栽培コムギと野生コムギの葉に接種し、感染の有無を調査した。ほとんどのコムギ系統において、コムギ菌とカモジグサ菌に対して感染を許さなかったが、一粒系コムギの *Triticum urartu* と野生コムギ *Aegilops umbellulata*, *Ae. ventricosa* では、コムギ菌とカモジグサ菌に対する抵抗性と罹病性が分離した(図1、図2)。これらの抵抗性と罹病性が分離した系統を用いることで、コムギ菌とカモジグサ菌を交配したできたF1菌系の抵抗性と罹病性を評価することが可能になった。



図1 コムギうどんこ病菌に感染する *Ae. umbellulata* accessions

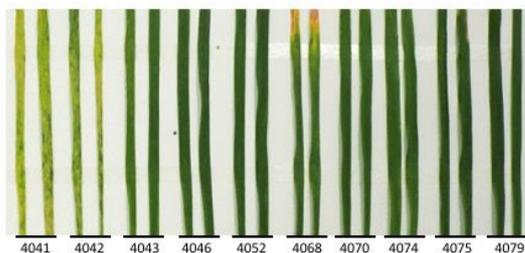


図2 カモジグサうどんこ病菌に感染する *Ae. umbellulata* accessions

### (2) 感染葉からのRNA抽出の検討

感染葉でこれらの菌系で発現している宿主特異性に関与する非病原力エフェクター遺伝子を同定するために、感染葉から RNA を抽出した。抽出するにあたって、より多くの RNA が、宿主由来でなく、菌由来にするために RNA 抽出法を検討した。

今回標的とするエフェクターは、感染初期に発現すると予想されるため、抽出した RNA のほとんどは、宿主植物由来であることが期待されるからである。そこで、F1 菌系をオオムギの裏表皮に感染させ、18 時間から 20 時間後に裏表皮細胞を剥がし、その裏表皮細胞のみを使うことで菌由来の RNA の割合を高めることができた。

### (3) イルミナ MiSeq による RNA シークエンシング

F1 菌系のうち、宿主抵抗性に関与する非病原力エフェクター遺伝子を 1 つもつ菌系 100、2 つもつ菌系 75、その F1 菌系の親であるコムギ菌 Th-1 菌系をオオムギの裏表皮に接種し、18 時間後に裏表皮細胞を剥がし、全 RNA を抽出した(図3)。



図3 18 時間後におけるオオムギ表皮におけるコムギうどんこ病菌 Th-1

300bp 両側読みのライブラリーを作成し、イルミナ MiSeq を用いて、RNA シークエンシングを実施した。Th-1, 100 菌系は、3 反復、75 については、2 反復おこなった。その結果、それぞれのサンプルについて、1,742,313 から 3,118,789 read pairs を得ることができた(表1)。そこで、これらの全リードから公開されているオオムギのゲノム配列とコムギうどんこ病菌のゲノム配列を基にオオムギ由来のリードとうどんこ病菌由来のリードにわけた。その結果、オオムギにアライメントされたリード数の割合は、36.2%から 86.7%であった。更にコムギにアライメントされたリードの割合は、4%から 24%であった。サンプル間で大きなばらつきがあった。

表1 MiSeq から得られたリード数

| 菌系名  | 反復 | Read pairs |
|------|----|------------|
| Th-1 | 1  | 3118789    |
|      | 2  | 3016041    |
|      | 3  | 2883696    |
| 100  | 1  | 3000443    |
|      | 2  | 2878754    |
|      | 3  | 1742313    |
| 75   | 1  | 2618158    |
|      | 2  | 2832489    |

(4) 遺伝子発現解析からのエフェクター候補遺伝子の絞り込み

次に、コムギうどんこ病菌で発現が確認されなかった遺伝子を同定するために、コムギうどんこ病菌にアライメントされなかったリードから、De novo assembly ソフト Trinity を用いて、転写産物配列断片を構築した。それぞれの菌系について余剰な転写産物の配列を除去するために、CD-HIT-EST ソフトを用いた。その結果、100 菌系では、52,123 個、75 菌系では、42,630 個、Th-1 では、115,027 個の転写配列断片を得ることができた。そこで、75 菌系と 100 菌系のこれら転写配列断片のうちコムギうどんこ病菌 Th-1 菌系にない転写配列断片を同定する試みをおこなった。その結果、100 菌系の転写配列断片のうち 32.5% と 75 菌系の転写配列断片のうち 38.7% が、Th-1 菌系にない転写配列断片であった。そのうちのいくつかは、分泌タンパク質をコードしており、宿主特異性を決定しているエフェクター候補遺伝子と考えられる。これら特定した遺伝子候補について、他の F1 菌系について遺伝子発現を明らかにし、表現型の関連を調べている。

(5) コムギいもち病菌を用いたコムギうどんこ病菌の AVR 遺伝子の評価系の確立  
コムギに感染するいもち病菌に候補遺伝子を形質転換し、形質転換いもち病菌を利用して非病原力エフェクター遺伝子であるかを評価する実験系を確立した。今後、表現型と関連のあった遺伝子についてこの系を用いて、実際に宿主特異性に関与するかどうかを決定する。

(6) コムギの抵抗性遺伝子単離の準備  
重イオンビーム一粒系コムギ変異体にコムギうどんこ病菌 Th-1 を接種した。重イオンビーム一粒系コムギ変異体の親系統 KU104-2 は、コムギうどんこ病菌 Th-1 菌系に対し、抵抗性を

示す。スクリーニングの結果、コムギうどんこ病菌 Th-1 に対し、抵抗性から罹病性に変化した変異体を選抜できた。この変異体を親系統と交配し、F1 種子をえた。2015年11月にこの F1 種子を植え、F2 種子を 2016 年初夏に得る。これらの F2 種子にコムギうどんこ病菌を接種し、表現型を評価し、罹病性個体を選抜する。そして、Bulk Segregant Analysis 等の方法を用いて、抵抗性から罹病性に変化した原因遺伝子に連鎖する遺伝マーカーを選抜する。加えて、コムギ品種農林 4 号に EMS 処理し、新たな変異体を作成した。これらの M2 変異個体に F1 うどんこ病菌系統 100 を接種し、宿主特異性に関与する抵抗性遺伝子を選抜する試みをおこなう予定である。

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)

[学会発表](計 1 件)

吉田 健太郎、Saunders Diane、Kamoun Sophien、  
植物病原菌と宿主ゲノムから探る攻防の歴史、植物病理学会 平成 27 年度植物感染生理談話会、2015.8.26、道後温泉メルパルク松山(愛媛県)

[その他]

ホームページ等

<http://www.lab.kobe-u.ac.jp/ans-plantgenetics/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉田 健太郎 (YOSHIDA, KENTARO)  
神戸大学・先端融合研究環・助教  
研究者番号：40570750

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：