

令和元年6月26日現在

機関番号：10105

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07615

研究課題名(和文) TALENにより異なるゲノム環境に導入されたいもち病菌AVR遺伝子の変異頻度比較

研究課題名(英文) Comparison of mutation frequency of the avirulence gene AVR-Pia introduced to different genomic region of *Pyricularia oryzae*.

研究代表者

中馬 いづみ (Chuma, Izumi)

帯広畜産大学・畜産学部・准教授

研究者番号：90628926

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：イネいもち病菌非病原力遺伝子AVR-Piaの変異頻度比較実験を行った。イネ菌野生株(AVR-Pia非保有)に対し、AVR-Piaを転移因子の多い領域に導入したta#126と転移因子の少ない領域に導入したzt#1を作成し、Pia保有抵抗性イネ品種に対する接種試験を行った。抵抗性品種の葉上に形成された病原性獲得変異菌由来の病斑数より変異頻度を比較したところ、ta#126の方がzt#1より頻度が高かった。分離した変異菌における変異機構は、いずれも導入したAVR-Piaの欠失変異で、欠失領域の両端には転移因子が存在していた。欠失領域の大きさは転移因子間の距離が一因となっていることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

世界のイネの最重要病原体のひとつであるイネいもち病菌は、イネ品種に対する病原性変異が多様であり、この変異メカニズムの解明と変異リスクの予測は、抵抗性育種への応用にも繋がる。いもち病菌が宿主に対する病原性の決定を担っているのが非病原力遺伝子であるが、これらの遺伝子の重要な変異機構としてゲノムからの欠失が挙げられる。本研究結果は、非病原力遺伝子が欠失するか否かを決定するのが周辺に存在する転移因子であり、転移因子頻度の高いゲノム領域に存在する非病原力遺伝子は欠失するリスクの高い状態にあることを示唆するものである。

研究成果の概要(英文)：We compared frequency of mutation of the avirulence gene AVR-Pia which was introduced to repeat rich (RR) and repeat poor (RP) regions of rice blast fungus, *Pyricularia oryzae*. Resistant rice cultivar Aichi-asahi (Pia) were inoculated with transformants ta#126 which has AVR-Pia in RR region and zt#1 which has AVR-Pia in RP region. When compared mutants isolated from susceptible lesions of inoculated rice leaves, mutation frequency of ta#126 was higher than that of zt#1. Mutation mechanism of all mutants were deletion of introduced AVR-Pia. The deleted region were surrounded by transposable elements and its size depends on the distance between transposable elements.

研究分野：植物病理学

キーワード：イネ科植物いもち病 いもち病菌 非病原力遺伝子 病原性変異機構

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

Pyricularia oryzae によって引き起こされるイネいもち病は世界の稲作地域における最重要病害のひとつである。本病害防除を目的とした抵抗性育種は古くから展開されてきたが、その結果完成したいもち病高度抵抗性品種が農家圃場に導入されるや否や罹病化するという「抵抗性崩壊」が1960年代に次々と起こった。抵抗性崩壊は、その抵抗性遺伝子(以下R遺伝子)を侵す新レースの出現によるものであるが、この現象は宿主植物が持つR遺伝子に対応する菌の非病原力遺伝子(以下AVR遺伝子)の変異で説明される。近年多くの植物病原菌類においてAVR遺伝子がクローニングされ、これらの大半が分泌タンパク質遺伝子であり、病原菌の感染時に役立つエフェクターをコードしていることが明らかにされている(Kamoun 2007)。

筆者は、いもち病菌AVR遺伝子*AVR-Pita*を用い、本遺伝子の*P. oryzae*とその潜在種における進化過程を検討した(Chuma et al. 2011)。本遺伝子は、*P. oryzae*(イネ菌、アワ菌、キビ菌)だけでなく*P. grisea*(メヒシバ菌)にも保有されていた。CHEFを用いた染色体の電気泳動解析の結果、本遺伝子の座乗染色体が*P. oryzae*種内の菌株ごとに異なっていることが判明した。この現象をMultiple Translocation(以下MT)と命名した(Chuma et al. 2011)。興味深いことに、イネ菌群における座乗染色体変異頻度が特に高かった。これには、イネとイネ菌の激しい相互作用の歴史が反映されていると考えた。さらに、罹病化が問題となったR遺伝子*Pia*、*Pii*、*Pik*に関して、これらに認識されるAVR遺伝子*AVR-Pia*、*AVR-Pii*、*AVR-Pik*(Yoshida et al. 2009)の変異を調べたところ、*AVR-Pita*と同様に、以下のような共通の特徴が認められた。種内の菌群、菌株においてMTが認められる。遺伝子の座乗染色体は常染色体だけでなく過剰染色体(Dispensableな染色体)にも及び、テロメア近傍に存在するものが多くみられる。また、遺伝子両側に複数の転移因子が複雑に集積している。特にイネ菌においてはAVR遺伝子を欠失させることが病原性獲得の主要な要因となっている。*P. oryzae*を含む近縁種間でhorizontal Transfer(HT)を起こした形跡が認められる。筆者はこれらの事象を総合し、「AVR遺伝子は、欠失-再獲得(それに伴うMT)のサイクルを繰り返すことで、いもち病菌集団内で維持されてきた」という仮説を提唱した(Chuma et al. 2011)。一方、上記と対極の性質を示すAVR遺伝子、*AVR-Pizt*(Li et al. 2009)も見出した。本遺伝子は上記～にあてはまらず、*P. oryzae*内で安定に第7染色体に座乗している。以上のことから、AVR遺伝子の変異様式や変異頻度を左右するのが、遺伝子の座乗する染色体領域の性質(=ゲノム環境)にあるのではないかと考えるに至った。

2. 研究の目的

イネいもち病菌のAVR遺伝子の多くは変異性が高く容易に欠失するが、稀に欠失を起こさない変異性の低いものも存在する。筆者は、この変異性の差が、当該AVR遺伝子が座乗する「ゲノム環境」に起因すると考えた。この仮説を検証するため、人工ヌクレアーゼTALENを用いてAVR遺伝子をさまざまな「ゲノム環境」条件下に挿入し、それらの変異頻度を比較検討する。その結果をもとに、どのようなゲノム環境下に座乗するAVR遺伝子が病原性変異を起こしやすいのかを解明する。さらに、変異リスクの低いAVR遺伝子を探索する。これに対応するR遺伝子は持続性があると予測できる。このようにしてR遺伝子の持続性予測システムを確立することが最終目標である。

3. 研究の方法

(1) AVR遺伝子のいもち病菌集団における分布およびゲノム環境調査

AVR遺伝子の分布は分子マーカーを用いたPCRとゲノミックサザン解析によって調査した。遺伝子周辺構造はPCRクローンまたはフォスミドクローンのDNAシークエンスデータ、全ゲノムシークエンスデータを用いて解析した。

(2) TALENによるAVR遺伝子の異なるゲノム環境への導入

イネ菌In168より*AVR-Pia*をプロモーター領域を含めてクローニングし、これをTALENによりイネ菌84R-62B(*AVR-Pia*非保有)に導入した。84R-62Bのrepeat rich領域(*AVR-Pita*が存在)に*AVR-Pia*を導入して得られた形質転換体をta#126とし、repeat poor領域(*AVR-Pizt*が存在)に導入して得られた形質転換体をzt#1とした。これらの形質転換体には導入した*AVR-Pia*とハイグロマイシン耐性遺伝子が目的の箇所に1コピー存在することをサザン解析等により確認した。

(3) AVR遺伝子の変異頻度の比較

ta#126とzt#1をMMS(DNAの二本鎖切断を誘導する変異原)を添加したPDA培地で培養した後、通常の胞子形成をさせたものを接種源とし、R遺伝子*Pia*を保有するイネ品種愛知旭に対する接種試験を行った。抵抗性品種上に形成された稀な病斑より菌を分離し、*AVR-Pia*の変異が確認された病斑を変異病斑としてカウントし、ta#126とzt#1に由来する変異病斑数を比較した。

4. 研究成果

(1) *AVR-Pi9*および*AVR-Pib*の変異機構

これまでに調査した非病原力遺伝子に加え、*AVR-Pi9*および*AVR-Pib*の分布を、日本、ア

ジア、イタリア等より分離したイネ菌および非イネ菌を用いて調査した。AVR-*Pi9*については、イネ菌の全ての菌株がこれを保有しており、遺伝子周辺に repeat 配列が少なく、菌株間で構造が高く保存されていた。非イネ菌においても AVR-*Pi9* は遺伝子配列および周辺構造が広く保存されていた。このことから、イネ菌は *Pi9* 保有イネ品種の大規模作付け等による強い選択圧を受けなかった可能性と、AVR-*Pi9* が本菌の病原性または生存に重要な役割を果たす可能性が考えられ、それにより AVR-*Pi9* を変異させることなく維持してきた可能性が示唆された。AVR-*Pib*については、イネ菌の1菌株が遺伝子を欠失させており、東南アジア産の1部の菌株において遺伝子 ORF に DNA 型トランスポゾンが挿入されていた。遺伝子周辺には repeat 配列は少なく、菌株間で構造が高く保存されていた。非イネ菌については、多くの菌株が高く保存された遺伝子配列と周辺構造を持っていたが、一部の菌は AVR-*Pib* を保有していなかった。自然界で AVR-*Pib* に対する何らかの選択圧が働いていた可能性があり、この遺伝子が病原力エフェクターとして重要な機能を担っている可能性が示唆された。以上のことから、今回調査した新規 AVR 遺伝子のうち、AVR-*Pi9* は AVR-*Pizt* と同様にこれまで変異を起こさなかった遺伝子であるといえる。

(2) Repeat rich 領域、repeat poor 領域における AVR 遺伝子の変異頻度および変異様式の比較

repeat rich 領域と repeat poor 領域に存在する遺伝子の変異性を比較するため、TALEN により AVR-*Pia* を repeat rich 領域に導入した ta#126 および repeat poor 領域に導入した zt#1 を作出した。変異を誘導するために2つの形質転換体を DNA 二本鎖切断を誘導する MMS 処理したものを *Pi-a* 保有愛知旭に接種し、再分離菌の AVR-*Pia* 変異様式と出現頻度を調査した。これにより、ta#126 接種葉 954 枚から 14 個、zt#1 接種葉 928 枚から 3 個の罹病性病斑が得られ、repeat rich 領域導入菌の方が、repeat poor 領域よりも変異菌の出現頻度が有意に高いという結果が得られた。両者の再分離菌における AVR-*Pia* の変異機構を調査したところ、repeat rich 領域導入菌では数 kb の AVR-*Pia* 欠失が起こっており、repeat poor 領域においては 19 個の遺伝子を含む約 92kb 以上の領域が欠失していた(図)。欠失領域の境界には DNA 型トランスポゾンが存在する傾向にあり、大規模な欠失は転移因子間の距離が一因となることが推察された。

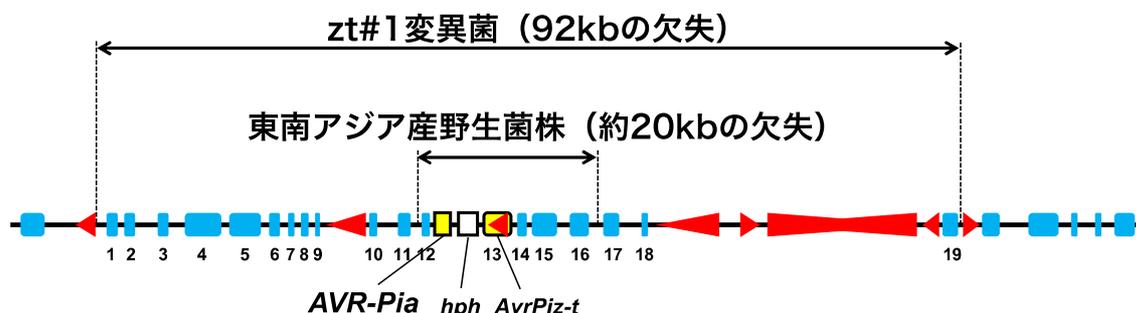


図. repeat-poor領域における欠失領域の比較
 ▶: 転移因子、■: 遺伝子、■: AVR遺伝子
 1~19: 92kbに含まれていた遺伝子の番号

(3) 大規模な欠失の自然界における分布

上記 92kb の領域の欠失領域には 2 つの非病原力遺伝子の他に約 20 個の遺伝子が含まれており、この変異を持つ菌が自然界で生存し続けられるかは疑問である。そこで、このような大規模な欠失が自然界で起こっているかを調べるために、国内外のイネおよびイネ科植物から分離したいもち病菌における当該領域の調査を行った。P. oryzae の非イネ菌(国内外産のアワ菌、キビ菌、シコクビエ菌、オヒシバ菌、エンバク菌、ベレニアルライグラス菌、コムギ菌、Brachiaria 菌)において、当該領域では AVR-*Pizt* およびこれを含む周辺 100kb の領域を欠失させた菌株は存在しなかった。日本産、中国産、ベトナム産、タイ産、フィリピン産、インドネシア産、イタリア産、ブラジル産のイネ菌野生株を調べたところ、ベトナム産、フィリピン産、タイ産菌株において、AVR-*Pizt* に加えて 4 つの ORF を含む約 20kb を欠失させた菌株が存在した(図)。欠失点周辺には DNA 型トランスポゾン配列が認められる傾向にあった。国別に見た欠失保有菌株数は、ベトナム産が 20 菌株中 8 菌株、フィリピン産が 26 菌株中 22 菌株、タイ産が 6 菌株中 3 菌株であった。非イネ菌でこのような欠失が認められなかったことから、欠失保有イネ菌が分離された地域では、抵抗性イネ品種の利用により欠失保有菌が選抜された可能性が示唆された。また、欠失領域の大きさが、野生株の方が小さかったことから、zt#1 において欠失し

た 92kb のうち、野生株で欠失しなかった領域に、病原性または生存に関与する遺伝子が含まれている可能性が考えられた (図)。

これらの研究成果は下記の論文および国内外の学会による招待講演等によって発表した。本研究は、*AVR-Pizt* が repeat poor 領域に存在しており、遺伝子変異が起こりにくい、すなわち、対応する抵抗性遺伝子 *Pizt* は持続性があるという仮説から着想したものである。当初、遺伝子周辺の repeat 配列の頻度が高いほど欠失頻度が高く、repeat 頻度が低いほど欠失頻度が低いことを立証を目的として実験を開始した。実際に実験を行うと、形質転換体 ta#126 および zt#1 の接種試験による変異頻度は予想通り ta#126 (repeat rich 領域) > zt#1 (repeat poor 領域) となった。ただし、形質転換体は接種試験前に DNA 二本鎖切断を誘導する処理を施されたものであり、それにより、両形質転換体とともに欠失変異が引き起こされたと考えられる。これらの変異を決定づけたものは、DNA 型トランスポゾンがその頻度の有無にかかわらず、周辺に存在したことである。これは、「転移因子が存在すれば repeat poor 領域においても欠失は起こりうる」ことを示唆するものである。また、ta#126 より AVR 遺伝子のみを含む 3kb の欠失領域をもつ変異菌が得られ、zt#1 より AVR 遺伝子の他に 19 の遺伝子を含む 92kb の欠失領域をもつ変異菌が得られた。このようなサイズの異なる欠失の性質については、この欠失領域が他の遺伝子を含むか否かで、その変異菌が自然界に定着し、ランダムな採集によって検出されるかどうかを左右すると説明できるのではないかと考えられた。

以上のことから、本研究の命題であった、「非病原力遺伝子の欠失の起こりやすさはゲノム環境によって決まるか否か」については、「決まる」と結論づけられる。非病原力遺伝子の欠失頻度は周辺のトランスポゾンの頻度、あるいは遺伝子頻度によって左右されうることを裏付ける知見が得られた。また、本研究で取り扱った AVR 遺伝子の中では、*AVR-Pizt* の他に *AVR-Pib* も、変異リスクが比較的低い遺伝子であると考えられた。今後は、実験により再現した大規模な欠失領域および、自然界の菌から検出された欠失領域に含まれる遺伝子の、菌の生存あるいは病原性に影響をおよぼす可能性について検討する予定である。また、このような欠失からどのようにして AVR 遺伝子を再獲得し、MT が検出されるに至るのかという、菌の生態的な視点からの変異の検証を行いたい。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文](計10件)

- Gómez Luciano, L.B., I.J. Tsai, I. Chuma, Y. Tosa, Y.H. Chen, J.Y. Li, M.Y. Li, M.J. Lu, H. Nakayashiki, W.H. Li. (2019) Blast fungal genomes show frequent chromosomal changes, gene gains and losses, and effector gene turnover. *Mol. Biol. Evol.* 36:1148-1161. doi: 10.1093/molbev/msz045. (査読あり)
- Inoue, Y., T.T.P. Vy, K. Yoshida, H. Asano, C. Mitsuoka, S Asuke, V.L. Anh, C.J. Cumagun, I. Chuma, R. Terauchi, K. Kato, T. Mitchell, B. Valent, M. Farman, Y. Tosa. (2017) Evolution of the wheat blast fungus through functional losses in a host specificity determinant. *Science* 357(6346):80-83. (査読あり)
- Yoshida, K., D.G.O. Saunders, C. Mitsuoka, S. Natsume, S. Kosugi, H. Saitoh, Y. Inoue, I. Chuma, Y. Tosa, L.M. Cano, S. Kamoun, R. Terauchi. (2016) Host specialization of the blast fungus *Magnaporthe oryzae* is associated with dynamic gain and loss of genes linked to transposable elements. *BMC Genomics* 17:370-388. (査読あり)
- Zhang, N., J. Luo, A.Y. Rossman, T. Aoki, I. Chuma, P.W. Crous, R. Dean, R.P. de Vries, N. Donofrio, K.D. Hyde, M.-H. Lebrun, N.J. Talbot, D. Tharreau, Y. Tosa, B. Valent, Z. Wang, and J.-R. Xu. (2016) Generic names in *Magnaporthales*. *IMA Fungus*. 7:155-159. (査読あり)

[学会発表](計20件)

- Chuma, I., T. Aoki, Y. Tosa. Molecular taxonomy and parasitic specialization in Pyriculariaceae. 2017 Taiwan-Japan Mycological Research Conference. National Taiwan University (Taipei, Taiwan), 平成 29 年 10 月 21 日 (Invited)
- Tosa, Y., Y. Inoue, T.T.P. Vy, I. Chuma (2016) Molecular Mechanisms of Host Jump of *Pyricularia oryzae*. The 7th International Rice Blast Conference. The Bellevue Manila, (Alabang, Philippines), 平成 28 年 10 月 9 日 ~ 14 日 (Invited)
- 平岡大輝, 荒添貴之, 曾根輝雄, 土佐幸雄, 中馬いづみ (2019) イネいもち病菌非病原力遺伝子の repeat-poor 領域における欠失. 平成 31 年度日本植物病理学会大会. 於つくば国際会議場. 平成 31 年 3 月 19 日.
- 富田有貴, 船引麻衣, 中馬いづみ, 浅野行蔵, 曾根輝雄 (2018) イネいもち病菌突然変異体 Ina168m95-5 株における *AVR-Pik* の欠失機構. 平成 30 年度日本植物病理学会大会. 於神戸国際会議場. 平成 30 年 3 月 25 日.
- 荒添貴之, 西田敬二, 田畑麻由良, 平岡大輝, 中馬いづみ, 土佐幸雄, 近藤昭彦 (2017) ゲ

ノムを切らずに書き換えるイネいもち病菌における新規ゲノム編集．平成 29 年度日本植物病理学会大会．於アイーナ・いわて県民情報交流センター．平成 29 年 4 月 27 日．
平岡大輝，荒添貴之，土佐幸雄，中馬いづみ (2016) TALEN により異なるゲノム領域に導入されたイネいもち病菌非病原力 (AVR) 遺伝子の変異頻度比較解析．平成 28 年度植物感染生理談話会．於シーパル須磨．平成 28 年 8 月 11 日．(ポスター発表)
富田有貴，船引麻衣，中馬いづみ，浅野行蔵，曾根輝雄 (2016) イネいもち病菌突然変異体 Ina168m95-5 株における AVR-Pik の欠失機構．平成 28 年度日本植物病理学会大会．於岡山コンベンションセンター．平成 28 年 3 月．

〔その他〕

ホームページ等

<https://www.obihiro.ac.jp/faculty-r/izumi-chuma>

6．研究組織

(1)研究協力者

研究協力者氏名：荒添貴之博士（東京理科大学）

ローマ字氏名：Dr. Arazoe Takayuki

研究協力者氏名：曾根輝雄博士（北海道大学）

ローマ字氏名：Dr. Sone Teruo

研究協力者氏名：レ・ディン・ドン博士（ベトナム・ノンラム大学）

ローマ字氏名：Dr. Le Dinh Don

研究協力者氏名：グエン・ティ・ティン・ガ博士（ベトナム・農業遺伝学研究所）

ローマ字氏名：Dr. Nguyen Thi Thin Nga

研究協力者氏名：クリスチャン・クマグン博士（フィリピン・フィリピン大学ロスバニョス校）

ローマ字氏名：Dr. Christian Cumagun

研究協力者氏名：タニー・スリーウォンチャイ博士（タイ・カセサート大学）

ローマ字氏名：Dr. Tanee Sreewongchai

研究協力者氏名：オトマー・スプリング博士（ドイツ・ホーヘンハイム大学）

ローマ字氏名：Dr. Otmar Spring

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。