

自己評価報告書

平成 23 年 3 月 23 日現在

機関番号：14501
研究種目：基盤研究（A）
研究期間：2008～2011
課題番号：20248005
研究課題名（和文） SAGE 法を用いたいもち病菌非病原力遺伝子の網羅的クローニングと変異性の比較解析
研究課題名（英文） Cloning of avirulence genes of the blast fungus using SAGE analysis and comparison of their variability
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

研究分野：植物病理学
科研費の分科・細目：農学・植物病理学
キーワード：*Magnaporthe oryzae*, avirulence gene

1. 研究計画の概要

イネ科栽培植物いもち病菌 *Magnaporthe oryzae*（不完全世代 *Pyricularia oryzae*）は、イネに寄生するイネ菌のほか、アワに寄生するアワ菌、コムギに寄生するコムギ菌等、植物属に対する寄生性を異にするいくつかの菌群に分化している。さらに、イネ菌には、イネ品種に対する病原性を異にする多数のレースが存在する。すなわち、*M. oryzae* とイネ科植物の間には、菌群－属間特異性と、レース－品種間特異性の2つの特異性が認められる。このうち、レース－品種間特異性は非常に不安定であることがよく知られている。一方、菌群－植物属間特異性はきわめて安定で、たとえばキビ菌がイネを侵す様に変異を起こすことはない。本研究では、両特異性に関与する非病原力遺伝子を網羅的にクローニングし、これらを比較することにより、両特異性の安定性の相違が何によるのかを明らかにする。

2. 研究の進捗状況

(1) レース－品種間特異性に関与する非病原力遺伝子のクローニング

日本産イネいもち病菌株 Ina168 の全ゲノムシークエンスから分泌シグナルを持つ遺伝子をピックアップし、非病原力遺伝子との association を検討した。その結果、イネの抵抗性遺伝子 *Pia*, *Pii*, *Pik* に対応する非病原力遺伝

子 *AVR-Pia*, *AVR-Pii*, *AVR-Pik* と密接に相関して存在する遺伝子を見出した。形質転換実験の結果、これらがそれらの非病原力遺伝子本体であることを確認した。*AVR-Pik* と相関する遺伝子については、*Pik*, *Pik-m*, *Pik-p* のいずれにも認識されることが判明したので、暫定的に *AVR-Pik/km/kp* とした。

(2) レース－品種間特異性に関与する非病原力遺伝子の性質の比較解析

クローニングした非病原力遺伝子の性質を比較検討した。まず、それらのいもち病菌集団における分布を調べたところ、それらはイネ菌以外にも広く存在すること、とくにイネ菌等栽培植物寄生菌 (*Pyricularia oryzae*) とは別種であるメヒシバ菌 (*P. grisea*)、*Cenchrus* 菌 (*Pyricularia* sp.) 等の特定の菌株にはほとんどまたはすべての非病原力遺伝子のホモログが集中して存在することが判明した。この結果から、これら3種の共通祖先がすべての非病原力遺伝子を保有していたと考えた。興味深いことに、*AVR-Pita*, *AVR-Pia*, *AVR-Pii* において、種の異なる菌株が塩基配列レベルで100%同一のホモログを持つ例が見いだされた。これらのことから、非病原力遺伝子はかなり頻繁に個体間を移動し、時には種を超えて水平移動していると考えた。

次に、イネ菌集団におけるそれらホモログの有無とレース番号を比較したところ、いもち病菌が *Pita*, *Pia*, *Pii* を侵すように変異する

ための一般的な方法は、対応する非病原力遺伝子の完全欠失であることが判明した。ホモログを有する場合は、ほとんどの場合それらホモログが非病原力遺伝子の機能を持つことも明らかとなった。

一方、座乗染色体について検討したところ *AVR-Pik/km/kp*, *AVR-Pita*, *AVR-Pia*, *AVR-Pii*, はさまざまな染色体に座乗していたが、*AVR-Piz-t* は調べたいずれの菌株においても第7染色体に座乗することが判明した。*Piz-t* を持つ品種は、これまで日本において大規模に栽培されたことはなく、したがって、抵抗性崩壊を経験していない。上記の座乗染色体の安定性がそのような歴史的経過の原因か結果かは今のところ不明であるが、少なくとも抵抗性崩壊の有無と座乗染色体の変異性が関連することが示唆された。

(3) 菌群一属間特異性に関する非病原力遺伝子のクローニングの試み

アワ菌のコムギに対する非病原力遺伝子 *PWT1*、エンバク菌のコムギに対する非病原力遺伝子 *PWT3*, *PWT4* をクローニングするため、*PWT1* が由来するアワ菌 *GFSI1-7-2*, *PWT3,4* が由来するエンバク菌 *Br58*、ならびにそれらを持たないコムギ菌 *Br48* の全ゲノム配列をシーケンシングした。現在これらをアセンブルしているところである。一方、*SuperSAGE*法により、それらの非病原力遺伝子を持つコムギ菌 *Br48 Near-isogenic line* において特異的に発現している遺伝子のタグを網羅的に取得した。

(4) 菌群一属間特異性に関する抵抗性遺伝子のクローニングの試み

PWT1 はコムギ品種に広く作用する。これに対する抵抗性遺伝子を同定するためには、*PWT1* を認識しない品種が必要であるが、そのような品種は普通系コムギの中に存在しなかった。一方、オオムギ品種をスクリーニングしたところ、*PWT1* を認識しない品種 *Nigrate* を見出した。これを感受性品種として分離分析を行った結果、*PWT1* に対応する抵抗性遺伝子を同定することに成功した。これを *Rmo2* と命名した。分子マッピングの結果、*Rmo2* は7H染色体に座乗することが判明した。

3. 現在までの達成度

② おおむね順調に進展している。

理由：レーサー品種間特異性に関する非病原力遺伝子は、3つクローニングすることができた。また、それらの安定性と関連する性質—染色体上の座乗位置—を見出すことができた。菌群一属間特異性に関する非病原力遺伝子については、まだクローニングには至っていないが、最終段階に入っている。総合すれば、ほぼ、当初の目的は順調に達成しつつあると考える。

4. 今後の研究の推進方策

PWT1, *PWT3*, *PWT4* を、全ゲノムシーケンス情報と発現タグ情報を組み合わせることによりクローニングする。さらに、*Rmo2* をクロモソームウオーキングによりクローニングする。

5. 代表的な研究成果

[雑誌論文] (計8件) (代表2件を記載)

① Chuma, I., Zhan, S.W., Asano, S., Nga, N.T.T., Vy, T.T.P., Shirai, M., Ibaragi, K., and Tosa, Y. (2010) *PWT1*, an avirulence gene of *Magnaporthe oryzae* tightly linked to the rDNA locus, is recognized by two staple crops, common wheat and barley. *Phytopathology* 100: 436-443. 査読有

② Yoshida, K., Saitoh, H., Fujisawa, S., Kanzaki, H., Matsumura, H., Yoshida, K., Tosa, Y., Chuma, I., Takano, Y., Win, J., Kamoun, S., and Terauchi, R. (2009) Association genetics reveals three novel avirulence genes from the rice blast fungal pathogen *Magnaporthe oryzae*. *Plant Cell* 21:1573-1591. 査読有

[学会発表] (国際学会招待講演) (計2件)

① Tosa, Y. Roles of avirulence genes of *Pyricularia* species in defining host and nonhost specificity. *Plant and Animal Genome XIX*. 2011.1.15. San Diego, California, U.S.A.

② Tosa, Y. Genetic analyses of host species specificity of *Magnaporthe oryzae* subgroups. 10th Japan-US Seminar. 2010.1.26. Corvallis, Oregon, U.S.A.