

機関番号 : 10101

研究種目 : 基盤研究 (C)

研究期間 : 2008~2010

課題番号 : 20580043

研究課題名 (和文) イネいもち病菌の AVR-Pia 遺伝子の解析と病原性判別システムの構築

研究課題名 (英文) Analysis of AVR-Pia gene of trice blast fungus and its application for the pathogenicity differentiation

研究代表者

曾根 輝雄 (SONE TERUO)

北海道大学・大学院農学研究院・准教授

研究者番号 : 00333633

研究成果の概要 (和文) : イネいもち病菌の非病原性遺伝子 AVR-Pia の単離と同定に成功した。AVR-Pia 遺伝子は中国産菌株を使って解析されたものと同じ遺伝子であった。AVR-Pia 遺伝子はイネいもち病菌のイネ感染時にのみ発現し、親和性相互作用ではその産物はイネ細胞内の侵入菌糸の BIC から宿主細胞へと分泌されていることが示唆された。また、Ina168m95-1 における AVR-Pia 遺伝子の欠失は、2 コピーのトランスポゾン *Occan* 間の相同組換えであることが示唆された。日本菌株においては、AVR-Pia の有無を PCR で調べることにより病原性の判定が可能であることがわかった。

研究成果の概要 (英文) : Successful molecular cloning and identification of AVR-Pia avirulence gene from *Magnaporthe oryzae* was demonstrated in this study. AVR-Pia gene was located at the same position as the locus which was genetically analyzed using Chinese isolates. AVR-Pia was expressed only during infection, and the product was found to be secreted into compatible host cells, through BICs of the infection hyphae. Mechanism of gene deletion in the mutant Ina168m95-1 was elucidated to be the homologous recombination between two adjacent copies of the DNA transposon *Occan*. PCR amplification of the gene is effective way to determine the pathogenicity toward rice cultivar with *Pia* R gene.

交付決定額

(金額単位 : 円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2009年度	800,000	240,000	1,040,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野 : 農学

科研費の分科・細目 : 植物病理学

キーワード : (1) いもち病菌 (2) *Magnaporthe oryzae* (3) PCR (4) イネ (5) 非病原性遺伝子 (6) エフェクター (7) 突然変異 (8) 病原性

1. 研究開始当初の背景

いもち病はイネの最重要病害である。本病害の防除のために数多くのイネのいもち病真性抵抗性遺伝子が解析され、抵抗性品種の育成が行われ、実際に圃場でも防除効果をあ

げている。しかし、その効果は恒久的なものではなく、イネいもち病菌 (*Magnaporthe grisea*) の病原性変異により品種のいもち病抵抗性の崩壊の歴史が繰り返されてきた (浅賀, 1987)。現在では種々の真性抵抗性遺伝

子をもつ同質遺伝子系統によるマルチラインを使用することで、いもち病の防除効果を上げている(新潟県農林水産部ホームページ)が、これらの抵抗性が恒久的に崩壊しないという保証はない。その持続的利用のためには、イネといもち病菌の宿主特異性の分子的基盤を明らかにし、さらにその病原性の変異機構を解明することが必要不可欠である。

いもち病菌とイネの宿主特異性は *gene-for-gene* 説に従うことが知られている(Orbach ら, 2000)。つまり、真性抵抗性遺伝子(R 遺伝子)を持つイネに、その真性抵抗性遺伝子に特異的に対応する優性の非病原性遺伝子(AVR 遺伝子)をもついもち病菌が感染行動を起こすと、イネ側に過敏反応が誘導され、病原菌の感染は抑制される。従って、前述の病原性変異は、R 遺伝子に対応した AVR 遺伝子の変異の結果と考えられる。病原性変異の詳細な知見を得るためには、AVR 遺伝子の詳細な解析が不可欠である。これまでにクローニングされている非病原性遺伝子は *PWL2*, *AVR-Pita*, *AVR1-CO39*, *ACE1* の4例あり、日本のイネ品種に導入されている抵抗性遺伝子に対応するものに *Pi-ta* に対応する *AVR-Pita* があるが、マルチラインの持続的利用を目指した宿主特異性の分子機構や変異機構の解明には、さらに多くの異なる AVR 遺伝子を単離し、詳細に解析する必要がある。

研究代表者は、日本産イネいもち病菌 Ina168 株を用いて、イネ品種愛知旭に由来するいもち病抵抗性遺伝子 *Pia* に対応する非病原性遺伝子 *AVR-Pia* に関する解析を進め、Ina168 株の *AVR-Pia* 領域を 1199bp までに絞り込むことに成功していたが、その領域内のどこに *AVR-Pia* があるかは、既存のタンパク質と相同性を示す配列が存在せず、現在のところ未同定であった。

2. 研究の目的

本研究では、AVR 遺伝子 *AVR-Pia* を単離し、その遺伝子産物の特徴を明らかにするとともに、病原性変異を起こす主要な遺伝子変異の機構を明らかにすることを目標とする。また、農業現場で応用可能な病原性判別システムを構築する。

3. 研究の方法

AVR-Pia 遺伝子の単離：1199bp 領域の中より AVR-Pia の cDNA を特定することにより推定し、イネへの接種を行うことで最終的に単離する。推定 cDNA にフレームシフト変異などを導入して検討した。また、他の菌株で解析された AVR-Pia と同一であることを、中国産

菌株の遺伝子解析で明らかにした。

AVR-Pia 遺伝子の発現の特徴付け：AVR-Pia 遺伝子の発現を定量 PCR 法をもちいて解析し、さらに GFP 融合タンパク質をもちいてその産物の挙動を明らかにした。

Ina168m95-1 における突然変異機構の解明：AVR-Pia を欠失した変異株である

Ina168m95-1 株において、AVR-Pia と共に欠失した DNA 領域の両端を Ina168 由来のコスミドクローンの塩基配列解析と、PCR、サザン解析を用いた m95-1 株と Ina168 株の構造の比較により明らかにした。これにより、変異機構の推定を行った。

病原性判定システムの構築：圃場分離株における配列の解析から、PCR を用いた簡便な病原性判定システムを構築した。

4. 研究成果

AVR-Pia 遺伝子の単離

Ina168 株由来の 1199 bp の DNA 領域(領域 Vm)に、AVR-Pia が存在すると考えられていた。DNA 領域 Vm を 5'末端から欠失させた 702 bp の領域(領域 Vq)を PCR により増幅し、愛知旭に対して病原性をもつ Ina168m95-1 株に形質転換した。愛知旭に対する接種試験の結果、この領域 Vq は非病原性を相補した。本領域内には大小 14 の ORF が存在しており、これらに対して 1 塩基挿入によるフレームシフトを 6 箇所導入した。そして、形質転換体を作成し、接種試験を行った結果、最大長である 255 bp の ORF が AVR-Pia であると証明した。

一方、安田伸子氏(中央農業総合研究センター)より、AVR-Pia の遺伝解析(Yasuda et al., 2006)に用いた中国産菌株の交配後代を分譲していただき、日本産菌株と中国産菌株の AVR-Pia が同一であるか、本研究で得た AVR-Pia 領域をプローブとした RFLP と愛知旭への病原性の後代における分離の比較を行った。その結果、両者が一致し、Ina168 の AVR-Pia と中国産菌株の AVR-Pia は同一の遺伝子であることが示された。

AVR-Pia 遺伝子の発現の特徴付け

定量 RT-PCR を用いて、感染過程での AVR-Pia 遺伝子の発現を解析した。その結果、親和性の組み合わせ、非親和性の組み合わせに関わらず、接種後 24 時間後に発現が見られた。親和性の組み合わせでは、その後 AVR-Pia 遺伝子の発現が継続して上昇していくのに対し、非親和性の組み合わせでは、24 時間後以降、発現は減少し、42 時間後にはほとんど発現が見られなくなった。以上のことから、AVR-Pia はいもち病菌の付着器形成～イネへの侵入時に発現することが明らかとなった(図1)。

AVR-Pia と GFP の間にスペーサーとなるアミノ酸配列(GGS)を入れ、それぞれの機能を

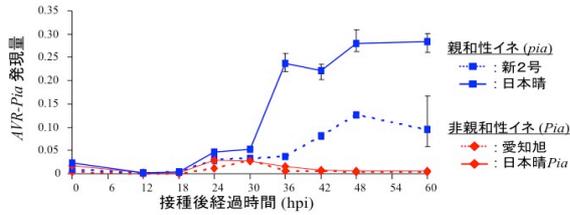


図1. AVR-Pia発現は親和性イネ上で継続する
18時間後から転写が始まり、親和性イネ上では転写が継続的に起こる。一方、非親和性イネ上では発現が減少する。

阻害しないように工夫したベクターを作成し、Ina168m95-1 に形質転換で導入した。スパーサーを 12 アミノ酸にしたところ、AVR-Pia の機能が相補された。この形質転換体を親和性イネである新2号に非切断葉鞘裏面接種し、蛍光顕微鏡観察を行った。その結果、AVR-Pia タンパク質は接種後 24 時間以降、侵入菌糸で検出された。まず、付着器形成後の初期侵入菌糸の先端に、その後侵入菌糸が球状に分化した後は、BIC (Biotrophic interfacial complex) に局在することが明らかとなった。一方、シグナル配列を除去した AVR-Pia タンパクは侵入菌糸全体に分布した。いもち病菌の他のエフェクターは BIC を介してイネ細胞に分泌されることが知られていることから、AVR-Pia も BIC を介して分泌され、さらにシグナル配列が BIC への局在と分泌に重要であることが示唆された (図 2, 3)。

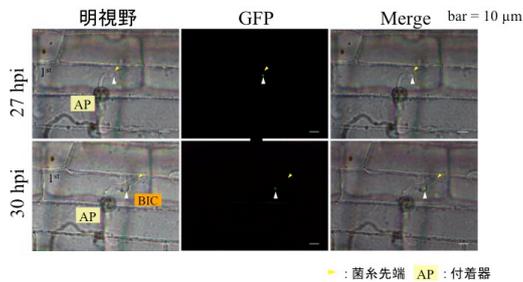


図2. AVR-Piaは侵入菌糸上のBICに局在、イネ細胞に分泌される

27時間後に侵入菌糸先端に見られたGFPのシグナルは30時間後には菌糸先端ではなく球状菌糸の一部分に局在した(白矢印)。

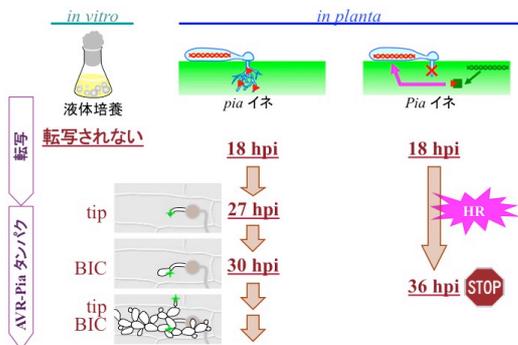


図3. AVR-Piaの発現のまとめ

また、Yeast two hybrid 解析の結果、AVR-Pia はイネ Pia 遺伝子である RGA4, RGA5 の産物とは相互作用しないが、AVR-Pia タンパク分子間の相互作用があることが明らかとなった。

Ina168m95-1 における突然変異機構の解明：

サザン解析、パルスフィールドゲル電気泳動の結果、Ina168 株中には合計3コピーの AVR-Pia 遺伝子が同一染色体上にあり、変異株 Ina168m95-1 では全てのコピーが欠失していることがわかった。

AVR-Pia 遺伝子を含むより広いDNA領域を取得するために、クローン 46F3 に隣接したコスミドクローン 9E12 を得た。配列を決定したところ、9E12 は 46F3 の 5' 側に位置し、両者を併せて 53kb にわたる領域が明らかになった。9E12 中には、トランスポゾン Occan 全長と、レトロトランスポゾン MINE が含まれていた。この AVR-Pia の 3' 領域の DNA 塩基配列から、トランスポゾンなどの反復配列以外の部分について、PCR により存在の有無を解析した。その結果、AVR-Pia の 3' 側に存在する DNA 型トランスポゾン Occan の 3' 側はすべて Ina168m95-1 株に存在することが確認された。これにより、Ina168m95-1 株における AVR-Pia の欠失に Occan が関与したことが示唆された。

さらに、m95-1 株の AVR-Pia 欠失部位の両端の配列を得ることが出来た。新たに得られた 5' 側の配列は、Ina168 においても保存されていた。詳細な解析の結果、m95-1 株における 3 コピーの AVR-Pia の欠失は、AVR-Pia の両側に位置する 2 コピーの Occan の間での相同組換えによって起こったことが明らかとなった (図 4)。

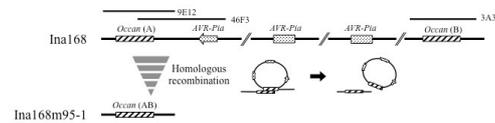


図4. Ina168の3コピーのAVR-Piaは相同組換えによって欠失した。

配列情報から考えられる模式図。3コピーのAVR-Piaの両側にあるトランスポゾンOccan(A)(B)の間で相同組換えが起こり、欠失したと考えられる。

病原性判定システムの構築：イネ品種愛知旭に病原性のいもち病菌圃場分離株よりDNAを抽出し、AVR-Piaをプローブとしたサザン解析を行った。当研究室に保存されていた圃場分

離株と、新たに北海道空知管内の圃場から分離した愛知旭に病原性の株からは、*AVR-Pia* の配列が増幅されなかった。以上の解析結果より日本産菌株における*AVR-Pia*の存在形態には点変異は存在せず、野生型コピーを保有するか、しないかの2通りであることが示唆された。*AVR-Pia*を増幅するプライマーによるPCR方が病原性判定システムとして使用できると考えられた。

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3件)

- ①曾根輝雄, イネいもち病菌エフェクターと宿主 R 遺伝子の微妙な関係, 化学と生物, **49**, 292-294 (2011) 査読無
- ②Y. Okuyama, H. Kanzaki, A. Abe, K. Yoshida, M. Tamiru, H. Saitoh, T. Fujibe, H. Matsumura, M. Shenton, D. C. Galam, J. Undan, A. Ito, T. Sone, and R. Terauchi. A multi-faceted genomics approach allows the isolation of rice *Pia*-blast resistance gene consisting of two adjacent NBS-LRR protein genes. *Plant Cell*, **66**, 467-479 (2011) 査読有
- ③S. Miki, K. Matsui, H. Kito, K. Otsuka, T. Ashizawa, N. Yasuda, S. Fukiya, J. Sato, K. Hirayae, Y. Fujita, T. Nakajima, F. Tomita, and T. Sone. Molecular cloning and characterization of the *AVR-Pia* locus from a Japanese field isolate of *Magnaporthe oryzae*. *Mol. Plant Pathol.*, **10**, 361-374 (2009) 査読有

[学会発表] (計24件)

- ①三木慎介ら, イネいもち病菌の非病原性遺伝子 *AVR-Pia* の *in planta* 発現解析, 平成 23 年度日本植物病理学会大会, 2011/3/28, 東京農工大学 (府中市)
- ②佐藤佑樹ら, イネいもち病菌の非病原性タンパク質 *AVR-Pia* の分子間相互作用の解析, 平成 23 年度日本植物病理学会大会, 2011/3/28, 東京農工大学 (府中市)
- ③三木慎介ら, イネいもち病菌の非病原性遺伝子 *AVR-Pia* の変異機構の解明, 平成 23 年度日本植物病理学会大会, 2011/3/28, 東京農工大学 (府中市)
- ④三木慎介ら, イネいもち病菌の非病原性遺伝子 *AVR-Pia* の変異機構の解明, 日本農芸化学会 2011 年度大会, 2011/3/26, 京都女子大学 (京都市)
- ⑤Yuki Satoh et al., Protein Interaction Analysis of *AVR-Pia* of *Magnaporthe oryzae* by Yeast Two Hybrid Assay 26th Fungal Genetics

Conference, 2011/3/19, Asilomer Conference Grounds (Pacific Grove, CA, USA)

- ⑥Miki Shinsuke et al., *In planta* expression of *Magnaporthe oryzae AVR-Pia*, 26th Fungal Genetics Conference, 2011/3/19, Asilomer Conference Grounds (Pacific Grove, CA, USA)
- ⑦佐藤佑樹ら, Yeast Two Hybrid assayによるイネいもち病菌の非病原性遺伝子*AVR-Pia*のタンパク質相互作用の解析, 第10回糸状菌分子生物学コンファレンス, 2010/11/19, 広島大学 (東広島市)
- ⑧三木慎介ら, イネいもち病菌の非病原性遺伝子 *AVR-Pia* の変異機構の解明, 第 10 回糸状菌分子生物学コンファレンス, 2010/11/19, 広島大学 (東広島市)
- ⑨Sato Yuki et al. Protein Interaction Analysis of *AVR-Pia* Derived from *Magnaporthe oryzae* by Yeast Two Hybrid Assay, International Rice Blast Conference, 2010/8/12, Peabody Hotel (Little Rock, AR, USA)
- ⑩Miki Shinsuke et al. *AVR-Pia* of *Magnaporthe oryzae* is expressed during appressorium formation and in invasive hyphae, International Rice Blast Conference, 2010/8/12, Peabody Hotel (Little Rock, AR, USA)
- ⑪Miki Shinsuke et al. *AVR-Pia* of *Magnaporthe oryzae* is expressed during appressorium formation and in invasive hyphae, International Mycological Congress, 2010/8/2, Edinburgh Conference Centre (Edinburgh, UK)
- ⑫大塚圭輔ら, イネいもち病菌の非病原性遺伝子 *AVR-Pia* のコピー数および変異の解析, 平成 22 年度日本植物病理学会大会, 2010/4/19, 京都国際会館 (京都市)
- ⑬佐藤佑樹ら, Yeast Two Hybrid assay によるイネいもち病菌の非病原性遺伝子 *AVR-Pia* のタンパク質相互作用の解析, 平成 22 年度日本植物病理学会大会, 2010/4/19, 京都国際会館 (京都市)
- ⑭三木慎介ら, イネいもち病菌の非病原性遺伝子 *AVR-Pia* の発現時期の解析, 平成 22 年度日本植物病理学会大会, 2010/4/19, 京都国際会館 (京都市)
- ⑮三木慎介ら, イネいもち病菌の非病原性遺伝子 *AVR-Pia* の発現時期の解析, 日本農芸化学会 2010 年度大会, 2010/3/29, 東京大学 (東京都)
- ⑯三木慎介ら, イネいもち病菌の非病原性遺伝子 *AVR-Pia* の発現解析とその遺伝子座の解析, 第 9 回糸状菌分子生物学コンファレンス, 2009/11/18, 東京大学 (東京都)
- ⑰Sone Teruo, Toward the elucidation of the mutational mechanism of AVR genes in the rice blast fungus, Tongguk Univ. Symposium, 2009/8/14, Tongguk University, Seoul, Korea
- ⑱ Miki Shinsuke et al., *AVR-Pia* of *Magnaporthe oryzae* encodes a protein with a

secretion signal sequence, IS-MPMI, 2009/7/19, Quebec City, Quebec, Canada

⑳三木慎介ら, イネいもち病菌 *AVR-Pia* 遺伝子とその周辺領域の解析, 2009年度 日本農芸化学会大会, 2009/3/29, マリンメッセ福岡(福岡市)

㉑三木慎介ら, イネいもち病菌の *AVR-Pia* 遺伝子のクローニング, 2009年度 日本農芸化学会大会, 2009/3/29, マリンメッセ福岡(福岡市)

㉒三木慎介ら, イネいもち病菌の *AVR-Pia* 遺伝子のクローニング, 平成21年度 日本植物病理学会大会, 2009/3/27, 山形大学(山形市)

㉓ Miki Shinsuke et al., *AVR-Pia* of *Magnaporthe oryzae* encodes a protein with a secretion signal sequence, 25th Fungal Genetics Conference, 2009/3/20, Asilomer Conference Centre (Pacific Grove, CA, USA)

㉔三木慎介ら, イネいもち病菌 *AVR-Pia* 遺伝子とその周辺領域の解析, 第8回糸状菌分子生物学コンファレンス, 2008/11/18, 石川県文教会館(金沢市)

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

曾根 輝雄 (SONE TERUO)

北海道大学・大学院農学研究院・准教授

研究者番号: 00333633

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし