

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 16 日現在

機関番号：22701

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2010～2013

課題番号：22580009

研究課題名(和文)コムギとフザリウム菌の遺伝子発現クロストーク解析による赤かび病抵抗性の解明

研究課題名(英文) Transcriptome analysis of wheat and Fusarium graminearum for Fusarium head blight resistance in wheat.

研究代表者

坂 智広 (Ban, Tomohiro)

横浜市立大学・付置研究所・教授

研究者番号：80343771

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円、(間接経費) 1,050,000円

研究成果の概要(和文)：赤かび毒素の生合成に関わるTri遺伝子は植物感染時に強烈に発現する。フザリウム菌が赤かび病抵抗性程度が異なる5品種のコムギに感染した際の3つ遺伝子(Tri5、Tri6、Tri10)の発現量解析し、コムギ遺伝子型が感染した赤かび病菌Tri遺伝子の発現量に影響を与えることを明らかにした。成熟したコムギ穀粒内のDON蓄積量はFHB抵抗性品種では少なく罹病性品種で多いが、感染初期の段階ではむしろ抵抗性品種生でTri遺伝子群が早期に高発現し罹病性品種では9日後でも誘導されないことから、Tri遺伝子発現誘導に関わるコムギ因子の反応速度の違いが初期感染時のFHB抵抗性に関係していることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Fusarium graminearum causes a critical wheat disease Fusarium head blight (FHB) produces mycotoxin such as DON and NIV with highly expression of Tri genes during their initial infection to wheat spikes. We analyzed the three Tri genes expression (Tri5, Tri6 and Tri10) by RT-PCR in the infected spikes of five wheat varieties with different level of HB resistance. The Tri genes expression was influenced by the wheat genotype which was highly induced resistance varieties in the early stage of infection and no induction in the susceptible varieties along with their FHB resistance level. It revealed that FHB resistance wheat genotype has active defense mechanism to cross-talk with Fusarium gene expressions.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農学・育種学

キーワード：赤かび病抵抗性 遺伝子発現 マイコトキシン QTL マイクロアレイ

1. 研究開始当初の背景

(1) コムギ赤かび病 (FHB) は、腐生性の *Fusarium* 属菌によって引き起こされる病害で、コムギの品質や収量の低下だけでなく、人畜に有害な毒素であるトリコテセン系 Deoxynivalenol (DON) をはじめとするマイコトキシンがコムギの穀粒中に蓄積することから世界中で深刻な問題になっている。しかしこの腐生的病原菌に対して、コムギをはじめ麦類に赤かび病に免疫的な抵抗性は認められず、世界各地で抵抗性遺伝子の探索や抵抗性メカニズム解明のため遺伝育種学的研究が進められているが、未だ十分な学術的情報が得られていない。

(2) 現在までにフザリウム菌の DON/NIV 生合成経路の遺伝子 (*Tri* 遺伝子) 群は研究されてきたが、コムギに感染した赤かび病菌の *Tri* 遺伝子発現とコムギの抵抗性/罹病性に関連する遺伝子型との関係は明らかになっておらず、コムギの毒素低蓄積メカニズムは解明されていない。

2. 研究の目的

(1) コムギの遺伝子型が腐生性フザリウム菌の病原性及びマイコトキシン産生量にどのように調節するかについて、菌の細胞増殖関連遺伝子と *Tri* 遺伝子発現量の消長をパネルとしてマルチプレックス PCR 発現解析を行い宿主-病原菌間のクロストークを解析し、コムギの赤かび病抵抗性メカニズムとマイコトキシンを蓄積しにくいコムギの遺伝子型を解析する。

(2) *Fusarium* 菌の遺伝子発現パターンをパネルにして、クロストーク解析により菌に病原性・毒素産生性を発揮させないコムギの遺伝子型と条件を検索し、菌の病原・毒素産生性を抑えることのできるコムギの遺伝子発現をプロファイリングする。これによりコムギ抵抗性・毒素低蓄積性に係る感染・毒素特異的反応遺伝子を検索する。

1. 研究の方法

(1) フザリウム菌が、遺伝子型の異なるコムギに感染した際の遺伝子発現の変化を比較して、フザリウム菌の遺伝子発現パターンの変化をパネルにして、菌に病原性・毒素産生性を発揮させにくいコムギの遺伝子型と感染・発病条件を解析する。

(2) 赤かび病に感染・発病した際の抵抗性/罹病性それぞれのコムギ遺伝子の発現変化を RT-PCR 法でプロファイリング比較する。

(3) 感染・発病時における菌とコムギとの遺伝子発現に変化に基づくクロストーク解析から、菌の病原性・毒素産生性を抑えるコムギの抵抗性・毒素低蓄積性に関連する遺伝子を探る。

4. 研究成果

本研究ではコムギの遺伝子型および特定の遺伝子が、麦類赤かび病を起こす腐生性のフザリウム菌の病原性の誘導やマイコトキシン産生量にどのように影響するかを病原菌-宿主双方の遺伝子発現量によりクロストーク解析し、赤かび病抵抗性や毒素低蓄積性に係るコムギの遺伝子を探る。

(1) 開花期のコムギ 5 品種にフザリウム菌の分生胞子を接種し 9 日後 (9DAI) における罹病率 3 反復分をスコア化 (%) し比較した結果 (図 1)、抵抗性品種である延岡坊主小麦、蘇麦 3 号、Frontana (No, Su, Fr) では病徴が 10%前後に留まり、罹病性の Chinese Spring、Gamenya (CS, Ga) は 40%以上の有意な病徴を示した (Tukey-Kramer 法による多重比較検定)。

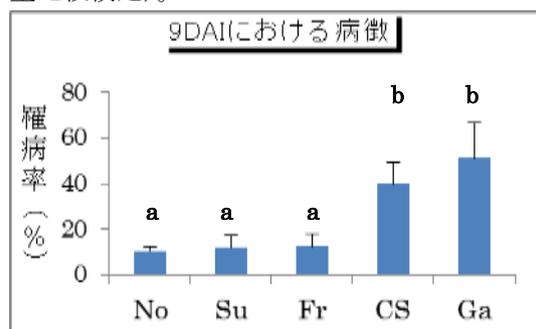


図 1 コムギ 5 品種のフザリウム菌接種後 9 日目 (9DAI) における赤かび病の罹病率

(2) フザリウム菌の遺伝子発現パターンをパネルにして、菌に病原性・毒素産生性を発揮させないコムギの遺伝子型と条件解析を行った。赤かび病菌の生合成に関わる *Tri* 遺伝子は、植物感染時に強烈に発現することから、フザリウム菌が赤かび病抵抗性程度が異なる 5 品種のコムギに感染した際の 3 つの赤かび毒素生合成 *Tri* 遺伝子 (*Tri5*, *Tri6*, *Tri10*) の発現量を RT-PCR で解析した結果、コムギの遺伝的背景の違いが感染した赤かび病菌 *Tri* 遺伝子の発現量に影響を与えることを明らかになった (図 2)。

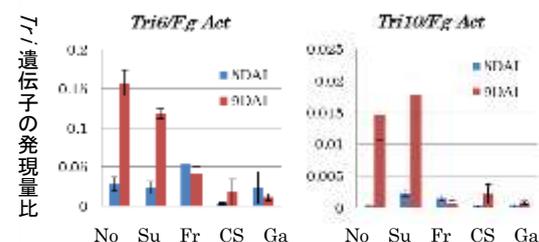


図 2 コムギ 5 品種のフザリウム菌接種後 5 日及び 9 日目 (5, 9DAI) における *Tri* 遺伝子発現量 (対 *Actin* 遺伝子発現量比)

(3) *Tri* 遺伝子の発現パターンは、コムギの赤かび抵抗性が極強、強、弱の品種に感染した際の3パターンに分けることができ、極強品種の延岡坊主小麦では感染後3日目で最も早く *Tri5*, *Tri6*, *Tri10* が高発現して、5日目には減少するのに対し、抵抗性強の蘇麦3号と Frontana では7日目以降徐々に *Tri6* と *Tri10* の発現量が高くなった。また弱品種の Chinese Spring と Gamanya の生体内では力に誘導されることはなかった。これらの結果から、転写因子である *Tri6* と *Tri10* は抵抗性品種ほど早期に高発現することが分かった。このことから、*Tri* 遺伝子発現誘導に関わるコムギ因子の反応速度の違いが FHB 抵抗性程度と関係していると考えられる。

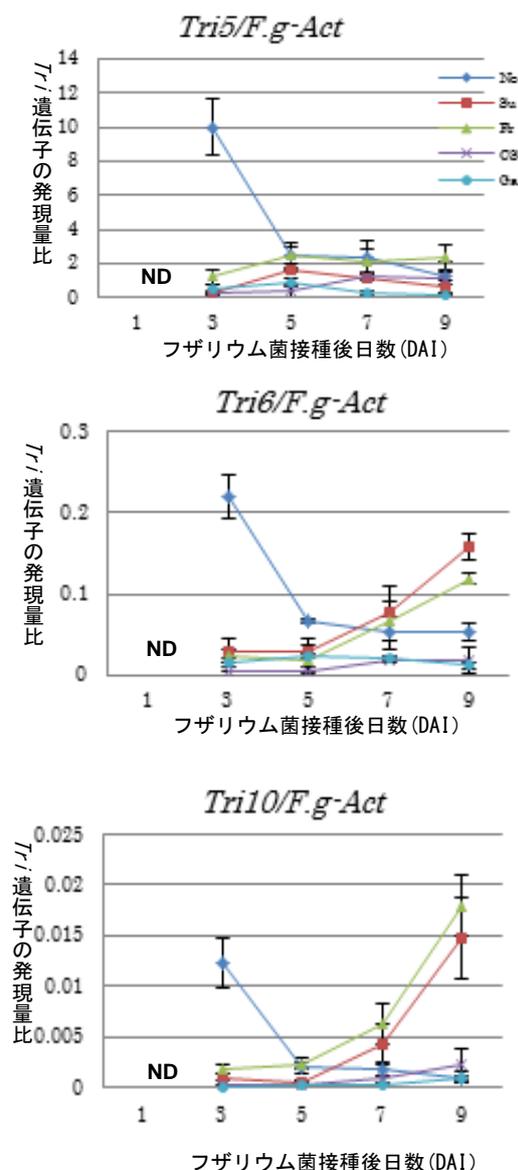


図3 コムギ生体内でのフザリウム菌の *Tri* 遺伝子の総発現量の経時的変化

(4) 抵抗性品種の蘇麦3号と罹病性品種の Gamanya において赤かび病菌接種後7日目に RNA を抽出し、RT-PCR 法を用いて菌体のバイオマスを測定した結果、Gamanya では蘇麦3

号の13倍のバイオマスが測定された。菌体のバイオマスに関する QTL 解析の結果から、赤かび病の病徴とフザリウム菌体のバイオマスの被害は、コムギの異なる抵抗性機構で制御される可能性が示唆された。

(5) そこで、コムギの抵抗性領域を限定するため、蘇麦3号 x Gamanya の半数体倍加119系統を用い FHB の病徴率、菌体のバイオマスから QTL 解析を行った結果、3A、3B、2D 染色体上に病徴率を、3B 染色体上に菌体のバイオマスを制御する有意な QTL を検出した。赤かび病の罹病率と *Tri6* 発現量には関連が認められず、罹病率病徴に関して 3BS 染色体 (*Fhb1*) 上に蘇麦3号由来の抵抗性 QTL、また 2DS (*Qfhs.kibr-2DS*) 上に Gamanya 由来の QTL が検出された (図4)。一方、*Tri6* 発現量に関して 1A、1B 染色体上に蘇麦3号由来の *Tri6* を高発現誘導する QTL が検出された (図5)。

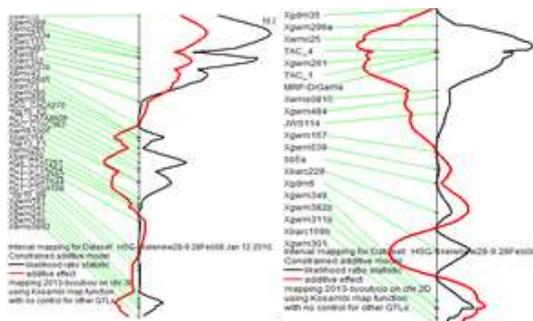


図4 フザリウム菌接種後9日目の赤かび病 (FHB) 病徴の QTL 解析  
3B 染色体上の蘇麦3号由来の抵抗性 QTL (左)、2D 染色体上の Gamanya 由来の抵抗性 QTL (右)

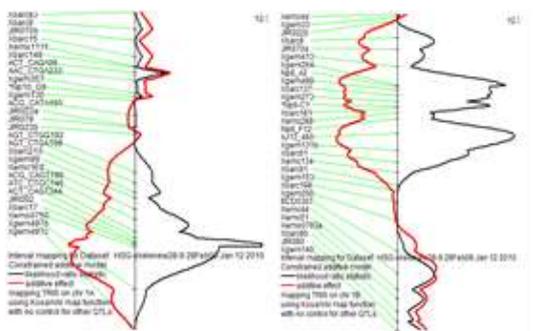


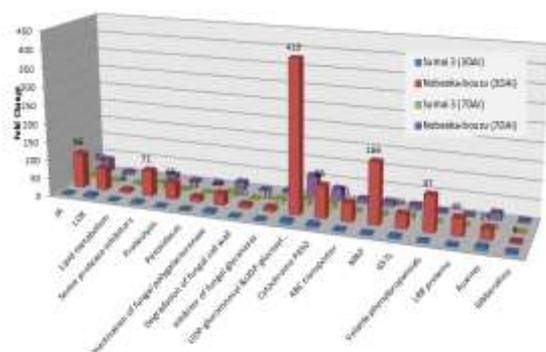
図5 フザリウム菌接種後9日目に *Tri6* 遺伝子の高発現を誘導する 1A 染色体上 (左) 及び 1B 染色体上の QTL

(6) 成熟したコムギ穀粒内の DON 蓄積量は FHB 抵抗性品種では少なく、罹病性品種で多く *Tri* 遺伝子発現量も罹病性品種で高くなると予想していたが、本研究の結果、感染初期の段階ではむしろ抵抗性品種生体内で *Tri* 遺伝子群が早期に高発現することが分かった。半数体倍加系統を用いた QTL 解析で *Tri6* 発現量を高めた蘇麦3号遺伝子型の QTL が検出された

ことから、抵抗性品種が *Tri* 遺伝子の高発現を誘導する因子を保有していると考えられる。*Tri6* 発現量と病徴の広がりに関係が見られないことから、これらの因子が直接コムギの抵抗性に関係しているかは定かではない。*Tri* 遺伝子の高発現が強力な抵抗性品種である延岡坊主小麦で最も早い時期に起こり、次いで抵抗性品種の蘇麦3号/Fronatana で発現が認められ、罹病性品種 Chinese Sprong/Gamenya では9DAIでも誘導されないことから、*Tri* 遺伝子発現誘導に関わるコムギ因子の反応速度の違いがFHB抵抗性程度と関係していると考えられる。

(7) 検出した QTL を担う遺伝子を探索するため、マイクロアレイによる延岡坊主小麦、蘇麦3号 Gamenya の、フザリウム菌接種後～1日、3日、5日、7日後の発現遺伝子の解析により、抵抗性とかび毒遺伝子誘導に関連する遺伝子群を類別し候補遺伝子を選抜した(図6)。

図6 フザリウム菌接種3日及び7日目にコムギ品種の遺伝子型に関連して発現するコムギ赤かび



病抵抗性関連遺伝子

## 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 5件)

- ① Niwa, S., Kubo K., Lewis, J., Kikuchi, R., Alagu, M., Ban, T. (2014) Variation for Fusarium head blight resistance associated with genome diversity in different sources of the resistant wheat cultivar ‘Sumai 3’. *Breeding Science* 64: 1-7. doi:10.1270/jsbbs.64.1 査読有。
- ② Insaf Bahrini, Motoki Sugisawa, Rie Kikuchi, Taiichi Ogawa, Hiroyuki Kawahigashi, Tomohiro Ban and Hirokazu Handa (2011) Characterization of a wheat transcription factor, *TaWRKY45*, and its effect on *Fusarium* head blight

resistance in transgenic wheat plants. *Breeding Science* 61(2): 121-129. 査読有

- ③ Akane Takesaki, Tomohiro Ban, Masumi Katsuta (2011) EvoTree; Software for easily drawing the pedigree chart with varietal characteristics. *Breeding Research* 13:19-24. (in Japanese)、査読有
- ④ Hao Bing Li, Guo Qiang Xie, Jun Ma, Gui Ru Liu, Shu Min Wen, Tomohiro Ban, Sukumar Chakraborty, and Chun Ji Liu (2010) Genetic relationships between resistance to Fusarium head blight and crown rot in bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *Theoretical and Applied Genetics* 121:941-950. 査読有
- ⑤ Zenta Nishio, Kanenori Takata, Miwako Ito, Masahiko Tanio, Tadashi Tabiki, Hiroaki Yamauchi, and Tomohiro Ban (2010) Deoxynivalenol Distribution in Flour and Bran of Spring Wheat Lines with Different Levels of Fusarium Head Blight Resistance. *Plant Disease* March 2010, Volume 94, Number 3 Pages 335-338, DOI: 10.1094/PDIS-94-3-0335. 査読有

〔学会発表〕(計 9件)

- ① Ayumi Kosaka, Alagu Manickavelu, Daniela Kajihara, Tomohiro Ban (2013) Molecular pathogenicity of wheat-*Fusarium graminearum* interaction. 12<sup>th</sup> International Wheat genetic Symposium. 2013年9月8日～9月14日、パシフィコ横浜(横浜市)
- ② Tomohiro Ban and Alagu Manickavelu (2014) Genomic characterization of Afghanistan wheat landraces. *Plant Genome Asia*, 2014年2月24日～2月25日、Kuala Lumpur, Malaysia、招待講演 [http://www.globalengage.co.uk/pgcasi/a/PGCA\\_Agenda.pdf](http://www.globalengage.co.uk/pgcasi/a/PGCA_Agenda.pdf)
- ③ 原田萌・坂智広 (2013) コムギ生体内における赤かび病菌 *F. graminearum* 毒素合成遺伝子の発現プロファイリング、日本育種学会第124回講演会、2013年10月13日～10月24日、鹿児島大学
- ④ Niwa S, Kikuchi R, Kubo K, Lewis J, Nitta M, Nasuda S, Handa H, Ban T. Contribution of *TaMRP-D1* allele on *Qfhs.kibr-2DS* in wheat for FHB resistance, 4<sup>th</sup> International Symposium on Fusarium Head Blight, Nanjing September 2012.
- ⑤ 丹羽紗也佳、菊地理絵、久保堅司、ルイス・ジャネット、新田みゆき、那須田周

平、半田裕一、坂智広、日本のコムギ遺伝資源コレクションにおける赤かび病抵抗性の評価、日本育種学会第 122 回講演会，京都，2012.

- ⑥ 杉澤幹起、菊地理絵、小川泰一、半田裕一、坂智広、コムギにおける TaMRP-D1 遺伝子発現が赤かび病毒素蓄積に及ぼす効果、日本育種学会第 122 回講演会，京都，2012.
- ⑦ 丹羽沙也佳、菊地理絵、久保堅司、ジャネットルイス、新田みゆき、那須田周平、半田裕一、坂智広、日本のコムギ遺伝資源コレクションにおける赤かび病抵抗性の評価、日本育種学会第 122 回講演会，京都，2012.
- ⑧ Niwa S, Kikuchi R, Handa H, Ban T (2010) Discovery of superior Sumai 3 for increasing DON tolerance combined resistance allele for multidrug resistance-associated protein (MRP) as a candidate gene for ‘*Qfhs.kibr-2DS*’ to reduce DON accumulation in wheat grains. European *Fusarium* Seminar ‘*Fusarium - Mycotoxins, Taxonomy, Pathogenicity and Host Resistance*, 2010 年 9 月 23 日、ワルシャワ (ポーランド).
- ⑨ Kikuchi R, Niwa S, Ogawa T, Handa H, Ban T (2010) Isolation of wheat multidrug resistance-associated protein gene (*TaMRP1*), a possible candidate of the multiple traits QTL for the *Fusarium* head blight resistance. European *Fusarium* Seminar ‘*Fusarium - Mycotoxins, Taxonomy, Pathogenicity and Host Resistance*’, 2010 年 9 月 23 日、ワルシャワ (ポーランド).

〔図書〕 (計 0 件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況 (計 0 件)

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

<http://pgsource.sci.yokohama-cu.ac.jp/index.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

坂 智広 (Tomohiro Ban)

横浜市立大学・木原生物学研究所・教授

研究者番号：80343771

(2) 研究分担者

( )

研究者番号：

(3) 連携研究者

( )

研究者番号：