

平成 26 年 5 月 28 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23380024

研究課題名(和文) イネのいもち病抵抗性の分子メカニズム～2つの生物間で何が起きているのか～

研究課題名(英文) Elucidation of molecular mechanism of rice blast resistance

研究代表者

曾根 輝雄 (Sone, Teruo)

北海道大学・(連合)農学研究科(研究院)・准教授

研究者番号：00333633

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,700,000円、(間接経費) 4,410,000円

研究成果の概要(和文)：いもち病はイネの最重要病害である。いもち病の防除は主に農薬と抵抗性品種を使って行われている。しかし、抵抗性品種がどのようにしてその抵抗性を発揮するかについて、まだ完全に理解されていない。本研究はイネのいもち病抵抗性遺伝子Piaの抵抗性発現のメカニズムについて、いもち病菌のAVR-Pia遺伝子との相互作用を詳細に明らかにしようとしたものである。本研究の結果、いもち病菌はイネに侵入する前からAVR-Pia遺伝子を発現し始めること、分泌後AVR-Piaタンパクは二量体を形成し、イネのPiaタンパク質と相互作用することがわかった。これらの知見は、いもち病抵抗性を理解するのに役立つものと期待される。

研究成果の概要(英文)：Rice blast is the most important disease of rice. Blast is usually controlled by agrochemicals and resistant cultivars, but knowledge about molecular mechanisms of rice resistance toward blast is limited. This study aimed to elucidate the molecular mechanism of rice blast resistance by analyzing interaction of rice blast resistance gene Pia and blast virulence gene AVR-Pia. Results of this study indicated that AVR-Pia gene is started to be expressed before the penetration into rice cells, and after the secretion, AVR-Pia protein forms homodimer, and detected by rice Pia gene product. This study will contribute to further understanding of rice-rice blast interaction, which is the first step of resistance induction.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農学・植物病理学

キーワード：いもち病 イネ 抵抗性 非病原性遺伝子

## 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。いもち病の防除には、抵抗性品種の有効活用と適切な薬剤による管理が有効とされているが、イネのいもち病抵抗性遺伝子の働きを十分に引き出すことが出来れば、減農薬と安定的な防除体系を再構築することが出来ると考えられる。

植物における病原菌への抵抗性、すなわち免疫システムの遺伝的背景は

「gene-for-gene」説に従うことが知られている。具体的には、AVR 遺伝子を持つ病原菌が宿主植物に感染を試み、AVR 遺伝子産物を産生したとき、宿主の R 遺伝子産物によって認識され、宿主における抵抗性反応（過敏反応、HR）を誘導するというものである。このような知識を実際の作物生産につなげるために最も重要でかつ未解明な部分は、AVR 遺伝子産物を R 遺伝子産物が認識する機構である。この部分を分子レベルで理解することが出来れば、作物の持つ R 遺伝子産物の働きを誘導するための分子の動きをコントロールすることが可能になる。イネ-イネいもち病菌間においても、R 遺伝子、AVR 遺伝子のクローニングが進んでいる。しかし、R 遺伝子産物による AVR 遺伝子産物の認識については、分子レベルでの理解は進んでいない。

## 2. 研究の目的

本研究では、イネの持ついもち病抵抗性遺伝子 *Pia* の働きを分子レベルで解明するために、*Pia* による抵抗性反応の誘導に必須であるイネいもち病菌の AVR-*Pia* タンパク質と、その他の未知のタンパク質との相互作用を、時間的、空間的、タンパク質構造的な面から解析を行う。具体的には、上記のタンパク質相互作用について、構成要素の解明、時間・空間的位置の特定、構造解析に基づく理解を行う。については、*Pia* タンパク質が実際に何を認識しているのかを明らかにする。AVR-*Pia* タンパク質のイネ内におけるターゲット分子である可能性が高い。については、上記の相互作用がいつ、どこで起こるのかを顕微鏡を用いて明らかにする。については、上記の相互作用をタンパク質構造解析し、それぞれの分子がどのように相互作用するかを分子レベルで明らかにする。

以上のことにより、イネのいもち病抵抗性の分子メカニズムを明らかにし、あらたないもち病防除法の確立につなげる。

## 3. 研究の方法

(1) 「*Pia*/AVR-*Pia*相互作用の時間・空間的位置の特定」

組換えAVR-*Pia*によるイネの病斑様斑点の誘導は、イネ葉身をペーパーディスクを装着したペンチで圧迫し、そこにタンパク質溶液を滴下することにより行った。DAB染色は、処理葉をDABで染色し、アルコール脱色を行った。イネPR1遺伝子の発現は、SYBR Green法によるReal-Time PCRを用いて定量した。*Pis*遺伝子の破壊はpDEST (Abe et al., Curr. Microbiol., 52, 210-215 (2006))を用いて行った。EGFP蛍光は蛍光顕微鏡を用いて観察した。

(2) 「*Pia*/AVR-*Pia* 相互作用の構成要素の解明」

AVR遺伝子の一過性発現は、Okuyama et al., Plant J., 66, 467-479 (2011)の方法で行った。

(3) 「*Pia*/AVR-*Pia*相互作用の構造生化学的解明」

AVR-*Pia* タンパク質の結晶は、X線回折及び核磁気共鳴スペクトル解析によってその構造を解析した。

## 4. 研究成果

(1) 「*Pia*/AVR-*Pia*相互作用の時間・空間的位置の特定」

*Pia*とAVR-*Pia*の相互作用を解析するための抗体の有効性を担保するため、抗体作成の抗原となった組換えAVR-*Pia*タンパク質 (rAVR-*Pia*)をイネに処理し、その反応を解析した。その結果、*Pia*を保持するイネでは、rAVR-*Pia*処理後滴下位置から離れた場所に褐色斑点が見られたが、*Pia*を持たないイネ品種や、BSA・水処理ではその様な反応は見られなかった。この病斑状の斑点はDABで染色され、また、抵抗性に発現に関与するOsPR1遺伝子の転写も増大していたことから、活性酸素蓄積を伴う過敏反応であることが示唆された。以上のことから、rAVR-*Pia*は*Pia*を持つイネに認識され、抵抗性反応を誘導したと考えられ、抗AVR-*Pia*抗体の有効性が担保された。そこで、抗AVR-*Pia*抗体を用いてもいもち病菌由来のイネ中の分泌されたAVR-*Pia*を定量した結果、全可溶性タンパク質に占める割合は病斑状斑点を誘導する組換えタンパク質量より遥かに少なく、いもち病菌感染時の効率的なAVR-*Pia*認識には他の要素が介在している可能性が示唆された。

一方、AVR-*Pia*遺伝子の発現時期に関する検討を行った。AVR-*Pia*のプロモーターにGFP遺伝子を連結させたコンストラクトをいもち病菌に導入し、その発現を調べたところ、付着器及び侵入菌糸でその発現が確認された。さらにより正確に発現の開始について調べるため、付着器は形成するがイネ細胞に侵入でき

ない*pls1* 変異株を作成し、そこに同構造を導入して調べたところ、付着器内でのAVR-Pia発現が確認された。従って、AVR-Piaはイネ細胞への侵入以前にその発現を開始していることが明らかとなった。

#### (2) 「Pia/AVR-Pia 相互作用の構成要素の解明」

AVR-Piaをイネのプロトプラスト内で一過的に発現させ分画したところ、約半分は可溶性画分に蓄積していたが、残りは不溶性画分に認められた。浮遊密度勾配遠心の結果、不溶性画分のAVR-Piaは何らかの宿主生体膜成分と直接的もしくは間接的に相互作用していると考えられた。

一方、Piaを構成する2つのNBS-LRR型タンパク質遺伝子、RGA4とRGA5の機能解明について研究を実施した。Piaをもたないイネ品種のプロトプラストにおいて、RGA4の過剰発現が細胞死を誘導すること、RGA4とRGA5の共発現によってRGA4の細胞死効果が抑制される傾向が認められた。AVR-Piaは、RGA5のC-末のHeavy metal associated (HMA)領域に結合するが、Rタンパク質以外のイネ側相互作用因子は未同定である。現在、AVR-Piaのイネ側相互作用因子の探索中である。

一方、AVR-Piaタンパク質同士の相互作用を弱めた変異体を作成することに成功した。この変異体はY2HでRGA5とは相互作用するが、その変異を導入したいもち病菌はPiaイネの抵抗性誘導に変化が見られた。

#### (3) 「Pia/AVR-Pia相互作用の構造生化学的解明」

AVR-Pia結晶は形成が不安定であり、X線回折を行うことは出来なかったが、NMRにより構造解析を行った。15N、13C安定同位体ラベル化試料を作製し核磁気共鳴(NMR)法を用いて測定したところ、ピークの分離が非常に良い1H-15N HSQCスペクトルが得られ、主鎖のアミド-アミドプロトン由来の予測相関ピーク62個全てを観測することが出来、さらに構造を推測することができた。得られた構造は単量体を示しているが、yeast two hybridの結果は酵母内においてAVR-Piaが二量体以上で存在する可能性も示しているため、溶液中での構造精密化を行っている。パルスプログラムを導入したところ、最大で二量体である結果を示したが、さらに全て同位体ラベルしてある試料、あるいは同位体ラベルした標品としていない標品を巻き戻し調整時に等モル混合を行い、2量体の構造解析を行っている。

一方、AVR-Pita、AVR-Pikに関しても大腸菌の大量発現に成功し、巻き戻し法にて精製標品を得ることに成功した。さらにAVR-Pikの結晶様固体を得ることに成功した。

#### (4) まとめ

本研究により、イネいもち病菌がいもち病抵抗性遺伝子を持つイネに感染する際のAVR遺伝子の発現、発現後のAVRタンパク質の挙動と構造、イネのR遺伝子産物の機能について理解が深まったと言える。以下の3点に要約できる。

AVR-Piaタンパク質は感染の初期、付着器形成時にはすでに発現を開始している。

発現開始後、AVR-Piaタンパク質はおそらく2量体を形成し、イネ細胞内に取り込まれる。AVR-Piaの発現量はごく微量であり、AVR-Piaを効率よく取り込むための因子が存在する。

RGA4タンパク質は細胞死誘導活性があり、RGA5タンパク質はそれを抑える役割をしている。AVR-PiaとRGA5が結合することによりRGA4による過敏反応が誘導されると考えられる。AVR-Piaの2量体化を阻害すると、RGA5との結合能は保持しているものの、過敏反応の誘導は抑えられため、AVR-Piaの2量体化による細胞死の誘導に必要な可能性がある。

これらの知見は、今後のイネいもち病菌の抵抗性相互作用の解明に貢献するものである。

#### 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)

##### [雑誌論文](計3件)

Y. Satoh, S. Miki, T. Ose, A. Oikawa, K. Maenaka, R. Terauchi, K. Asano and T. Sone. Heterologous production, purification, and immunodetection of *Magnaporthe oryzae* avirulence protein AVR-Pia. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* (in press, 2014)

Teruo Sone et al., Homologous recombination causes the spontaneous deletion of AVR-Pia in *Magnaporthe oryzae*, *FEMS Microbiology Letters*, **339**, 102-109, 2013

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

##### [学会発表](計23件)

Sornkom, W., Takeuchi, S., Miki, S., Satoh, Y., and Sone, T., Expression analysis of AVR-Pia, avirulence gene of *Magnaporthe oryzae*, 日本植物病理学会平成26年度大会 2014年6月2日,

札幌コンベンションセンター（札幌市）  
藤原志帆, 樋口裕也, 佐藤佑樹, 尾瀬農之, Thomas Croj, Nam-Soo Jwa, 浅野行蔵, 曾根輝雄, イネいもち病菌の非病原性タンパク質 AVR-Pia の多量体化と機能の関係, 日本植物病理学会平成 26 年度大会, 2014 年 6 月 2 日, 札幌コンベンションセンター（札幌市）  
樋口裕也, 佐藤佑樹, 尾瀬農之, 曾根輝雄, イネいもち病菌の非病原性タンパク質 AVR-Pia の相互作用の解析, 日本農芸化学会平成 26 年度大会, 2014 年 3 月 29 日, 明治大学生田キャンパス（川崎市）  
曾根輝雄, イネいもち病菌の病原性変異に関する分子遺伝学的研究, 日本農芸化学会北海道支部講演会（招待講演）2013 年 11 月 30 日, 北海道大学（札幌市）  
Terauchi R., Saitoh, H., Kanzaki, H., Fujisaki, K., Takagi, H., Yoshida, K., and Kamoun, S., Toward understanding evolution and function of *Magnaporthe oryzae* effectors AVR-Pia and AVR-Pik. International Rice Blast Conference（招待講演）, 2013 年 8 月 20 日, Ramada Plaza Jeju Hotel, Jeju-do, South Korea  
Sornkom, W., Takeuchi, S., Miki, S., Satoh, Y., and Sone, T., Expression analysis of AVR-Pia, avirulence gene of *Magnaporthe oryzae*, International Rice Blast Conference, 2013 年 8 月 20 日, Ramada Plaza Jeju Hotel, Jeju-do, South Korea  
Higuchi, T., Satoh, Y., Ose, T., and Sone, T., Important amino acid region for multimerization of AVR-Pia protein of *Magnaporthe oryzae*, International Rice Blast Conference, 2013 年 8 月 20 日, Ramada Plaza Jeju Hotel, Jeju-do, South Korea  
Satoh, Y., Ose, T., Kamiya, M., Terauchi, R., and Sone, T., Recombinant AVR-Pia Protein: Structure, biological activity, and application immunological detection of native AVR-Pia in *Magnaporthe oryzae*, International Rice Blast Conference, 2013 年 8 月 20 日, Ramada Plaza Jeju Hotel, Jeju-do, South Korea  
竹内紗央里, 三木慎介, 佐藤佑樹, 曾根輝雄, イネいもち病菌の非病原性タンパク質 AVR-Pia の局在解析, 日本植物病理学会大会, 2013 年 03 月 29 日, 岐阜大学（岐阜市）  
樋口裕也, 佐藤佑樹, 尾瀬農之, 曾根輝雄, イネいもち病菌の非病原性タンパク質 AVR-Pia タンパク質の多量体化に関する領域の探索, 日本植物病理学会大会, 2013 年 03 月 29 日, 岐阜大学（岐阜市）  
佐藤佑樹, 尾瀬農之, 寺内良平, 曾根輝

雄, 組換え AVR-Pia タンパクは Pia イネに HR 様反応を誘導する, 日本植物病理学会大会, 2013 年 03 月 29 日, 岐阜大学（岐阜市）  
T. Sone, S. Takeuchi, S. Miki, Y. Sato, K. Ohtsuka, A. Abe, K. Asano, Homologous recombination causes the spontaneous deletion of AVR-Pia in *Magnaporthe oryzae*, 27th Fungal Genetics Conference, 2013 年 03 月 12 日, Asilomar Conference Grounds, CA (USA)  
Y. Satoh, T. Ose, R. Terauchi, T. Sone, *Magnaporthe oryzae* AVR-Pia protein: induction of resistance reaction in Pia rice by the recombinant AVR-Pia and preparation of anti-AVR-Pia antibody, 27th Fungal Genetics Conference, 2013 年 03 月 12 日, Asilomar Conference Grounds, CA (USA)  
佐藤佑樹, 尾瀬農之, 寺内良平, 曾根輝雄, 感染中のいもち病菌が分泌する AVR-Pia タンパク質はごく微量である, 糸状菌分子生物学コンファレンス, 2012 年 11 月 12 日, ウィンクあいち(名古屋)  
Teruo Sone, Strategy of the rice blast fungus to deal with blast resistant cultivars of rice, International conference on biosciences and biotechnology, 2012 年 09 月 20 日, Udayana University, Bali (Indonesia)  
R., Terauchi, Toward understanding *Magnaporthe oryzae* effector functions, 30th New Phytologist Symposium: Immunomodulation by plant-associated organisms, 2012 年 09 月 16 日, Stanford Sierra Conference Centre, Fallen Leaf Lake, CA(USA)  
R., Terauchi, Toward understanding *Magnaporthe oryzae* effector functions, 15th IS-MPMI CONGRESS（招待講演）, 2012 年 07 月 29 日, 京都国際会議場（京都市）  
Y. Sato, T. Ose, R. Terauchi, T. Sone, *Magnaporthe oryzae* AVR-Pia protein: induction of resistance reaction in Pia rice and preparation of anti-AVR-Pia antibody, 15th IS-MPMI CONGRESS, 2012 年 07 月 29 日, 京都国際会議場（京都市）  
樋口裕也, 佐藤佑樹, 曾根輝雄, *Magnaporthe oryzae* の非病原性タンパク質 AVR-Pia の多量体化に必要な領域の探索, 日本農芸化学会北海道支部夏期シンポジウム, 2012 年 07 月 27 日, 北海道大学水産学部講堂（函館市）  
佐藤佑樹, 尾瀬農之, 寺内良平, 曾根輝雄, 組換え AVR-Pia タンパクによる Pia イネの抵抗性誘導反応と抗 AVR-Pia 抗

体の作成, 日本植物病理学会大会, 2012  
年 03 月 29 日, 福岡国際会議場

⑲ Teruo Sone, *AVR-Pia* of *Magnaporthe  
oryzae*: expression, secretion and  
immunological detection,  
Japan-Australia Symposium on Plant  
Sciences for Agriculture 2011, 2012  
年 01 月 19 日, 北海道大学農学部 (札  
幌市)

⑳ Teruo Sone, *AVR-Pia* of *Magnaporthe  
oryzae*: expression, secretion and  
mutation. IUMS2011 (招待講演), 2011  
年 09 月 8 日, 札幌コンベンションセン  
ター (札幌市)

㉑ Teruo Sone, *AVR-Pia* of *Magnaporthe  
oryzae*: expression, secretion and  
mutation. Asian Mycological Congress  
2011 (招待講演), 2011 年 08 月 10 日,  
Incheon University, Incheon, Korea.  
〔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

寺内 良平 (TERAUCHI, Ryohei)

公益財団法人岩手生物工学研究センタ

ー・生命科学研究部・研究部長

研究者番号: 50236981

### (3) 連携研究者

尾瀬 農之 (OSE, Toyoyuki)

北海道大学・大学院薬学研究院・准教授

研究者番号: 80380525