

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 30 日現在

機関番号：81202

研究種目：新学術領域研究（研究領域提案型）

研究期間：2011～2015

課題番号：23113009

研究課題名（和文）植物-病原菌相互作用の集団ゲノミクス解析

研究課題名（英文）Population genomics of plant host-pathogen interactions

研究代表者

寺内 良平（Terauchi, Ryohei）

公益財団法人岩手生物工学研究センター・その他部局等・その他

研究者番号：50236981

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 85,600,000 円

研究成果の概要（和文）：植物と病原菌の相互作用は、互いの生物に強力な自然選択をもたらす。こうした自然選択は、それぞれの生物種のゲノム上にその痕跡を残す。近年のゲノム解読技術の進展により、生物間相互作用がもたらす自然選択をゲノム解析から明らかにすることが可能となった。本課題では、こうした技術により同定されたイネ抵抗性タンパク質といもち病菌のエフェクタータンパク質の相互作用の分子機構を解明した。さらに、イネを材料に、選択が働いた遺伝子領域をゲノムシーケンスにより迅速に同定する技術を開発した。

研究成果の概要（英文）：Strong reciprocal natural selection between a host plant and a pathogen leaves DNA signatures on the genomes of respective organisms. By employing whole genome sequencing and detecting DNA signatures of selection, we succeeded in isolating two rice resistance (R-) genes (Pia and Pii) and three Magnaporthe oryzae avirulence effector (AVR) genes (AVR-Pia, AVR-Pii, AVR-Pik). Molecular interactions between rice R-protein Pik and Magnaporthe AVR-Pik revealed that their genes are coevolving. We also have developed a series of methods including MutMap and QTL-seq to quickly detect selection signature by whole genome resequencing.

研究分野：植物遺伝学

キーワード：共進化 ゲノム解析 イネ いもち病菌 植物 病原菌 自然選択

1. 研究開始当初の背景

遺伝子間の相互作用は、生物進化の重要な要素である。しかし、解析の複雑さのために研究が遅れていた。遺伝子間相互作用は、同一遺伝子の対立遺伝子間、同じゲノム内の異なる遺伝子間、異なるゲノムの遺伝子間で生じる。遺伝子間相互作用による自然選択は、ゲノム上に痕跡を残す。近年のゲノムシーケンス技術の急速な発展により、選択がゲノム上に残した痕跡を詳細に解析することが可能となった。本課題では、異なるゲノムの遺伝子間で見られる相互作用に注目し、植物-病原菌相互作用の研究を展開した。さらに、ゲノムシーケンス技術を活用して、集団の個体に対して人為選択、自然選択の働いたゲノム領域を迅速に同定する技術開発にも取り組んだ。

2. 研究の目的

(1)植物-病原菌・寄生者相互作用のゲノム解析およびエフェクターの同定

植物病原菌は、エフェクター（病原力因子）の作用により、宿主に侵入する。エフェクターの同定は、植物-病原菌相互作用の最重要課題である。本課題では、病原菌(寄生者)のエフェクター遺伝子、宿主生物のエフェクター標的遺伝子、さらに抵抗性遺伝子を同定し、それらの機能解明を目指すとともに、生物間相互作用によるゲノム進化の法則を見いだすことを目指す。重点的に研究する実験系は、イネ-いもち病菌の相互作用である。いもち病は、イネの最重要病害であり、耐病性水稻系統の育種はイネ育種の重要な課題である。

(2) 全ゲノム解析による selective sweep 検出技術の開発と利用

生物種の全ゲノム解析を活用して、生物集団に自然、人為選択が働いた際に生じるゲノムの selective sweep を検出する一般的な手法を開発し、応用することを目指す。

3. 研究の方法

(1)植物-病原菌・寄生者相互作用のゲノム解析およびエフェクターの同定

イネ、いもち病菌両種共に 2005 年に全ゲノム配列が公表されており、ゲノム解析による相互作用の基礎研究にも適している。私たちの研究グループでは、2008 年に日本産いもち病菌 Ina168 菌株の全ゲノムシーケンスを実施し、2005 年に公開さ

れた 70-15 菌株のゲノム情報と合わせて約 1300 種類の分泌タンパク質遺伝子を同定した。計 23 のいもち病菌株を対象に、連関 (association) 解析を実施した結果、3 種類の非病原力遺伝子 *AVR-Pia*, *AVR-Pii*, *AVR-Pik* を同定した (Yoshida et al. 2009, Plant Cell)。非病原力遺伝子とは、病原菌エフェクターの内、宿主の抵抗性遺伝子 (*R-gene*) によって認識される因子をコードしている遺伝子である。イネ側には、*AVR-Pia*, *AVR-Pii*, *AVR-Pik* をそれぞれ認識する抵抗性遺伝子 *Pia*, *Pii*, *Pik* が存在する。*Pia* は私たちのグループによって (Okuyama et al. 2010, Plant J)、*Pik* は、Ashikawa らによって (Ashikawa et al. 2009, Genetics) 単離同定済みである。

本研究では、既に同定済みの 3 種類の非病原力因子と対応するイネ側抵抗性タンパク質の相互作用、さらに抵抗性遺伝子を保有しないイネ系統において、*AVR-Pia*, *AVR-Pii*, *AVR-Pik* が相互作用して病原性に関与するような因子の同定を進める。これらの研究を通じて、病原菌-宿主の相互作用を分子レベルで明らかにするとともに、相互作用がゲノムの共進化におよぼす影響を明らかにする。

(2) 全ゲノム解析による selective sweep 検出技術の開発と利用

報告者らの研究グループでは、現在までに、品種「ひとめぼれ」を材料として、EMS 処理により 12,000 系統の変異系統群を作成した。さらに、「ひとめぼれ」を共通親として、23 系統のイネ系統と交配し、Recombinant Inbred Lines (RILs) を計約 3000 系統育成した。これらの遺伝子資源は、様々な表現型を示す。これらの材料を用いて全ゲノム解析により表現型の原因遺伝子を同定する技術開発を進めている。その目的で、突然変異系統と親系統（ひとめぼれ）を交配し、得られた F2 個体群から変異形質を示す個体を集め、20 個体の DNA をバルク化してシーケンスし、親系統のゲノム基準配列と比較して原因遺伝子を同定する新手法 MutMap 法を開発を進める。さらに、イネ遠縁交雑後の F2 個体からいもち病耐病性の個体を複数選抜し、その DNA をバルクシーケンシングして解析することにより、一度に多数の耐病性 QTL を同定する手法の開発も進める。

4. 研究成果

イネ-いもち病菌相互作用の分子機構を明らかにする目的で、既に単離済みのいもち病菌 *AVR-Pia*, *AVR-Pii*, *AVR-Pik* と、対応するイネ抵抗性遺伝子 *Pia*, *Pii*, *Pik* の相互作用を中心に研究を展開した。以下、

①*AVR-Pik/Pik* 相互作用、②*AVR-Pia/Pia* 相互作用、③*AVR-Pii/Pii* 相互作用、④その他のエフェクター候補タンパク質の順に、研究成果を報告する。

①*AVR-Pik/Pik* 相互作用: いもち病菌非病原力因子 *AVR-Pik* には、5 種類のアリルが存在し、互いに 1~4 アミノ酸で異なっている。これらのアリル間の DNA 変異は、全て非同義置換で、同義置換が存在しないことから、*AVR-Pik* に強い正の自然選択が働いている事が推察された (Yoshida et al. 2009)。一方、*AVR-Pik* を認識するイネ抵抗性遺伝子 *Pik* は、Ashikawa ら(2010)により単離され、*Pik-1* と *Pik-2* の2つの NBS-LRR 型タンパク質をコードする密接に連鎖した 2 遺伝子からなることが示された。その後の研究により、*Pik-1* の N-端の Coiled-coil(CC)ドメインに対応する遺伝子領域に非同義置換が集積していることが示された (Costanzo and Jia, 2011)。報告者らは、*AVR-Pik* と *Pik-1* 双方の遺伝子に見られる強い自然選択の痕跡は、これらの因子間の相互の選択によると推察して、酵母 2 ハイブリッド法により *AVR-Pik* と *Pik-1* の CC ドメインの物理的相互作用を調べたところ、これらが直接結合することが明らかになった。さらに、*Pik* の異なるアリルによる *AVR-Pik* の異なるアリルの認識の有無とこれらのアリル間の結合の有無が完全に一致する事も示された。このことから、いもち病菌 *AVR-Pik* とイネ *Pik* は arms race 型の共進化をしている可能性が強く示唆された。この成果は、Kanzaki et al. (2012)として、Plant J. に報告した。さらに英国 Norwich の Kamoun 博士及び Banfield 博士の研究グループと共同研究を実施し、*AVR-Pik* と *Pik-1* の HMA ドメインの結合結晶構造を解明して eLife 誌に報告した (Maqbool et al. 2015)。本成果は、NLR 型の植物抵抗性タンパク質と病原菌のエフェクターの結合構造としては世界初の知見である。

② *AVR-Pia/Pia* 相互作用: *AVR-Pia* (Yoshida et al. 2009)および *Pia* (Okuyama et al. 2010)は、過去に報告者のグループが単離した。これらの相互作用の研究は、共同研究者であるフランス INRA の Thomas Kroj 博士のグループで進展した。*AVR-Pia* は、*Pia* を構成する 2 つのタンパク質 RGA4 と RGA5 の内、RGA5 の C 端の HMA ドメインと物理的に結合することを示して報告した (Cesari et al. 2013, Plant Cell)。

③ *AVR-Pii/Pii* 相互作用: イネ側の *Pii* 抵抗性遺伝子は、最近まで未単離であったが、2013 年に、下記 MutMap 法を活用して、報告者が単離に成功した (Takagi et al. 2013, New Phytologist)。さらに *AVR-Pii* と相互作用するイネ因子として、細胞外

分泌に関わるタンパク質 *exo70-1* を同定した。イネ *Pii* 抵抗性遺伝子の *AVR-Pii* 認識にとって *exo70-1* が必須であることを示した (Fujisaki et al. 2015, Plant J.)。

④ その他のエフェクター候補タンパク質: またいもち病菌のエフェクター候補タンパク質をコードする遺伝子 78 種類の遺伝子破壊を実施した。殆どの遺伝子では表現型に影響はなかったことから、多くのエフェクターの機能が重複していることが示唆された。唯一強い表現型が現れた遺伝子 MC69 は、いもち病菌のイネ侵入に必須であることを明らかにして報告した (Saitoh et al. 2012, PLoS Pathogens)。

(2) 全ゲノム解析による selective sweep 検出技術の開発と利用

全ゲノム解析によりイネ突然変異系統の表現型の原因遺伝子を迅速に同定する技術 MutMap 法を開発して報告した (Abe et al. 2012, Nature Biotechnol.)。MutMap 法では、突然変異体を、変異処理に用いた親系統と交配し、F₂ で分離する突然変異型の子孫 20 個体の DNA をバルク化して全ゲノムシーケンスし、親系統の基準配列に対してアライメントする。ゲノム上の特定の箇所にアライメントされたショートリード全体の内、SNP を含むリードの割合を SNP-index と定義し、横軸に染色体位置、縦軸に SNP-index のグラフを作成し、SNP-index が 1 となるゲノム領域を探索することにより、突然変異表現型の原因 SNP を一度の全ゲノム解析で迅速に同定することが可能となった。本技術の発展型として、MutMap-Gap 法を開発し、上記の通りイネ抵抗性遺伝子 *Pii* の単離同定に成功した (Takagi et al. 2013, New Phytologist)。さらに、MutMap+法 (Fekih et al. 2013, PLoS One) も開発して利用を開始した。MutMap 法を活用して、耐塩性突然変異体の原因遺伝子を同定し、耐塩性水稻系統を育成した (Takagi et al. 2015, Nature Biotechnol.)。

一方、遠縁系統間の交配により得られた F₂ や RILs の分離集団において形質値で子孫を分類し、形質値の極端な子孫の DNA をバルク化してシーケンスし、迅速に QTL を同定するための技術 QTL-seq 法を開発した (Takagi et al. 2013, Plant J.)。さらに、本技術を用いる事によりイネ品種「Nortai」由来のいもち病菌圃場抵抗性遺伝子 QTL の同定に成功した。QTL-seq 法は、分離集団に人為選択を加えた後、選択されたゲノム領域を同定する一般的な技術である。従って、本技術を自然集団に対して適用することにより、迅速に自然選択を受けたゲノム領域を同定することが可能となる。今後、QTL-seq 法を交

配集団および野外集団に適用することにより、選択を受けたゲノム領域を体系的に検出する研究が可能となったと考えられる。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 21 件)

- ①Undan J, Tamiru M, Abe A, Yoshida K, Kosugi S, Takagi H, Yoshida K, Kanzaki K, Saitoh H, Fekih R, Sharma S, Undan J, Yano M, Terauchi R. Mutation in *OsLMS*, a gene encoding a protein with two double-stranded RNA motifs, causes lesion mimic phenotype and early senescence in rice (*Oryza sativa* L.). (2012) *Gene and Genetic Systems* 87:169-179. DOI:10.1266/ggs.87.169.
- ②Terauchi R, Abe A, Takagi H, Yoshida K, Kosugi S, Natsume S, Yaegashi H, Kanzaki H, Matsumura H, Mitsuoka C, Utsushi H, Tamiru M. Whole genome sequencing and future breeding of rice. (2012) *Journal of Plant Biochemistry and Biotechnology*. 21:10-14. DOI:10.1007/s13562-012-0133-2.
- ③Kanzaki H, Yoshida K, Saitoh H, Fujisaki K, Hirabuchi A, Alaux L, Fournier E, Tharreau D, Terauchi R. Arms race co-evolution of *Magnaporthe oryzae* AVR-Pik and rice *Pik* genes driven by their physical interactions. (2012) *Plant J*. 72:894-907. DOI: 10.1111/j.1365-3113X.2012.05110.x.
- ④Takagi H, Abe A, Yoshida K, Kosugi S, Natsume S, Mitsuoka C, Uemura A, Utsushi H, Tamiru M, Takuno S, Innan H, Cano LM, Kamoun S, Terauchi R. QTL-seq: rapid mapping of quantitative trait loci in rice by whole genome resequencing of DNA from two bulked populations. (2012) *Plant J*. 74:174-183. DOI:10.1111/tpj.12105.
- ⑤Sharma S, Sharma S, Hirabuchi A, Yoshida K, Fujisaki K, Ito A, Uemura A, Terauchi R, Kamoun S, Sohn KH, Jones JDG, Saitoh H. Deployment of the *Burkholderia glumae* type III secretion system as an efficient tool for translocating pathogen effectors to monocot cells. *Plant J*. 74:701-712. DOI:10.1111/tpj.12148.
- ⑥Giraldo MC, Dagdas YF, Gupta YK, Mentlak TA, Marinez-Rocha AL, Saitoh H, Terauchi R, Talbot NJ, Valent B. Two distinct systems facilitate tissue invasion by the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*. (2013) *Nature Communications* 4:1996. DOI:10.1038/ncomms2996.
- ⑦Takagi H, Uemura A, Yaegashi H, Tamiru M, Abe A, Mitsuoka C, Utsushi H, Natsume S, Kanzaki H, Matsumura H, Saitoh H, Yoshida K, Cano LM, Kamoun S, Terauchi R. MutMap-Gap: whole-genome resequencing of mutant F2 progeny bulk combined de novo assembly of gap regions identifies the rice blast resistance gene *Pii*. (2013) *New Phytologist* 200:276-283. DOI:10.1111/npg.12369.
- ⑧Fekih R, Takagi H, Tamiru M, Abe A, Natsume S, Yaegashi H, Sharma S, Sharma S, Kanzaki H, Matsumura H, Saitoh H, Mitsuoka C, Utsushi H, Uemura A, Kanzaki E, Kosugi S, Yoshida K, Cano I, Kamoun S, Terauchi R. MutMap+: Genetic mapping and mutant identification without crossing in rice. *PLoS One* 8:368529. DOI:10.1371/journal.pone.0068529.
- ⑨Kosugi S, Natsume S, Yoshida K, MacLean D, Cano I, Kamoun S, Terauchi R. Coval: Improving alignment quality and variant calling accuracy for next-generation sequencing data. (2013) *PLoS One* 8:e75401. DOI:10.1371/journal.pone.0075402.
- ⑩Tamiru M, Abe A, Utsushi H, Yoshida K, Takagi H, Fujisaki K, Undan JR, Rakshit S, Takaichi S, Jikumaru Y, Yokota T, Terry MJ, Terauchi R. The tillering phenotype of the rice plastid terminal oxidase (PTOX) loss-of-function mutant is associated with strigolactone deficiency. (2013) *New Phytologist* 2-2:116-131. DOI:10.1111/nph.12630.
- ⑪Saitoh H, Hirabuchi A, Fujisawa S, Mitsuoka C, Terauchi R, Takano Y. *MoST1* encoding a hexose transporter-like protein is involved in both conidiation and mycelial melanization of *Magnaporthe oryzae*. (2013) *FEMS Microbiology Letters* 352:104-113. DOI:10.1111/1574-6968.12369.
- ⑫Varshney RK, Terauchi R, McCouch SR. Harvesting the promising fruits of genomics: applying genome sequencing technologies to crop breeding. (2014) *PLoS Biology* 12:1-7. DOI:10.1371/journal.pbio.1001883.
- ⑬Cesari S, Kanzaki H, Fujiwara T, Bernoux M, Chalvon V, Kawano Y, Shimamoto K, Dodds P, Terauchi R, Kroj T. The NB-LRR proteins RGA4 and RGA5 interact functionally and physically to confer disease resistance. (2014) *EMBO J*. 33:1941-1959. DOI:10.15252/embj.201487923.
- ⑭Fekih R, Tamiru M, Kanzaki H, Abe A, Yoshida K, Kanzaki E, Saitoh H, Takagi H, Natsume S, Undan JR, Undan J, Terauchi R. The rice (*Oryza sativa*) *LESTON MIMIC RESEMBLING*, which encodes an AAA-type ATPase, is implicated in disease response. (2014) *Molecular Genetics and Genomics*

- 290:611-622. DOI:10.1007/s00438-014-0944-z.
- ⑮ Tamiru M, Undan JR, Takagi H, Abe A, Yoshida K, Undan JQ, Natsume S, Uemura A, Saitoh H, Matsumura H, Urasaki N, Yokota T, Terauchi R. A cytochrome P450, OsDSS1, is involved in growth and drought stress responses in rice (*Oryza sativa* L.). (2015) *Plant Molecular Biology* 88:85-99. DOI:10.1007/s11103-015-0310-5.
- ⑯ Takagi H, Tamiru M, Abe A, Yoshida K, Uemura A, Yaegashi H, Obara T, Oikawa K, Utsushi H, Kanzaki E, Mitsuoka C, Natsume S, Kosugi S, Kanzaki H, Matsumura H, Urasaki N, Kamoun S, Terauchi R. MutMap accelerates breeding of a salt-tolerant rice cultivar. (2015) *Nature Biotechnology* 33:445-449. DOI:10.1038/nbt.3188.
- ⑰ Utsushi H, Abe A, Tamiru M, Ogasawara Y, Obara T, Sato E, Ochiai Y, Terauchi R, Takagi H. WIPPER: an accurate and efficient field phenotyping platform for large-scale supplantation. (2015) *Breeding Science* 65:285-289. DOI:10.1270/jsbbs.65.285.
- ⑱ Fujisaki K, Abe Y, Ito A, Saitoh H, Yoshida K, Kanzaki H, Kanzaki E, Utsushi H, Yamashita T, Kamoun S, Terauchi R. Rice Exo70 interacts with a fungal effector, AVR-Pii and is required for AVR-Pii-triggered immunity. (2015) *Plant J.* 83:875-887. DOI:10.1111/tbj.12934.
- ⑲ Maqbool A, Saitoh H, Franceschetti M, Stevenson CEM, Uemura A, Kanzaki H, Kamoun S, Terauchi R, Banfield MJ. Structural basis of pathogen recognition by an integrated HMA domain in a plant NLR immune receptor. *eLife* 4:1-24. DOI:10.7554/elife.08709.002.
- ⑳ Tamiru M, Takagi H, Abe A, Yokota T, Kanzaki H, Okamoto H, Saitoh H, Takahashi H, Fujisaki K, Oikawa K, Uemura A, Natsume S, Jikumaru Y, Matsumura H, Umemura K, Terry MJ, Terauchi R. A chloroplast-localized protein LESION AND LAMINA BENDING affects defense and growth responses in rice. (2016) *New Phytologist* 210:1282-1297. DOI:10.1111/nph.13864.
- ㉑ Terauchi R, Kanzaki H, Fujisaki K, Takagi H, Abe A, Yoshida K, Okuyama Y, Tamiru M, Saitoh H. Whole genome sequencing approaches to understand *Magnaporthe*-rice interactions. (2016) *Physiological and Molecular Plant Pathology* 94:1-5. DOI:10.1016/j.pmp.2016.03.007.

[学会発表] (計 14 件)

- ① Terauchi R. Toward understanding *Magnaporthe*-rice interactions. 15th International Congress on Molecular Plant-Microbe Interactions. 2012年7月30日-8月2日 京都国際会議場
- ② Terauchi R. Toward understanding *Magnaporthe*-rice interactions. 30th New Phytologist Symposium: Immunomodulation by plant-associated organisms. 2012年9月17日-19日, Fallen Leaf Lake, California, USA.
- ③ 寺内良平, いもち病菌とイネ相互作用の解析. 平成24年度植物観戦生理談話会. 2012年8月31日. 近江八幡市
- ④ 寺内良平, いもち病菌とイネ相互作用の解析. 第54回日本植物生理学会年会. 2013年3月23日. 岡山大学
- ⑤ 齋藤宏昌, イネもみ枯細菌病 III 型分泌機構を利用したイネいもち病菌エフェクターの単子葉植物葉への移行. 平成25年度日本植物病理学会大会 2013年3月28日. 岐阜大学
- ⑥ 高木宏樹, 八重樫弘樹, 植村亜衣子, 宇津志博恵, 夏目俊, 阿部陽, 寺内良平. MutMap, MutMap+ & MutMap-Gaps: 次世代シーケンサーを用いた遺伝子単離技術. 第124回日本育種学会講演会 2013年10月12日 鹿児島大学
- ⑦ 寺内良平, 神崎洋之, 齋藤宏昌, 藤崎恒喜, 高木宏樹. 分子間相互作用によるイネいもち病菌の共進化. 第124回日本育種学会講演会 2013年10月12日 鹿児島大学
- ⑧ 寺内良平. 植物-病原菌相互作用の集団ゲノム解析. 日本遺伝学会第85回大会 2013年9月20日 慶応大学
- ⑨ Terauchi R, Saitoh H, Kanzaki H, Fujisaki K, Takagi H, Yoshida K, Kamoun S. Toward understanding evolution and function of *Magnaporthe oryzae* effector AVR-Pia, AVR-Pii and AVR-Pik. 6th International Rice Blast Conference. Jeju, Korea.
- ⑩ Terauchi R. Whole genome analysis of rice-*Magnaporthe* interaction. 10th International Congress of Plant Pathology. 2013年8月26日. Beijing, China.
- ⑪ Terauchi R. *Magnaporthe*-rice interactions as revealed by whole genome analysis. IS-MPMI XIV International Congress. 2014年7月7日-10日. Rhodes, Greece.
- ⑫ Terauchi R. Interaction between rice NLR Pik and *Magnaporthe oryzae* effector AVR-Pik. NLR workshop at Schloss Ringberg. 2015年5月3日 Tegernsee, Germany.
- ⑬ Terauchi R. Genome sequencing and modern breeding. 20th Japanese-German Symposium: Agriculture and Food Supply, Challenges and Perspectives. 2015年5月8日 Potsdam, Germany.

⑭ Terauchi R. Towards understanding molecular co-evolution of *Magnaporthe* and rice. 2015年10月25日-29日 The 11th US-Japan Scientific Seminar Kagawa International Hall, Kagawa, Japan.

〔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 なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

寺内良平 (TERAUCHI Ryohei)
(公財)岩手生物工学研究センター・ゲノム
育種研究部・部長
研究者番号：50236981

(2) 研究分担者

齋藤宏昌 (SAITOH Hiromasa)
(公財)岩手生物工学研究センター・ゲノム
育種研究部・主任研究員
研究者番号：20414336