

平成30年6月6日現在

機関番号：82401

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2016～2017

課題番号：16H07452

研究課題名(和文) ミナトカモジグサを用いた紋枯病抵抗性機構の解明とその原因遺伝子の同定

研究課題名(英文) Characterization of sheath blight-resistant mechanisms using *Brachypodium distachyon*

研究代表者

香西 雄介 (Kouzai, Yusuke)

国立研究開発法人理化学研究所・環境資源科学研究センター・基礎科学特別研究員

研究者番号：50783502

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：糸状菌 *Rhizoctonia solani* が原因となる紋枯病はイネの主要な病害である。我々は、小型草本植物であるミナトカモジグサを用いた解析により、標準系統 Bd21 と比べて病徴が顕著に抑制される抵抗性系統を複数同定した。本研究では、その抵抗性発現機構の解明と抵抗性を司る原因遺伝子候補の探索を行った。抵抗性系統の1つ Bd3-1 では、菌の増殖と感染器官の形成が接種後初期から抑制されており、サリチル酸依存的な免疫応答が活性化することがわかった。また、Bd21 と Bd3-1 の組換え自殖系統を用いた QTL 解析により、3番染色体上の QTL から紋枯病抵抗性の原因遺伝子候補を8個同定した。

研究成果の概要(英文)：Sheath blight, caused by the soil-born fungus *Rhizoctonia solani*, is a major disease of rice. We previously identified sheath blight-resistant natural accessions of the small grass plant *Brachypodium distachyon*. In this study, we characterized these accessions and searched for the candidate genes that confer sheath blight resistance. A sheath blight-resistant accession, Bd3-1, suppressed the infection process of *R. solani* and activated salicylic acid-dependent immunity at an early stage of infection. Moreover, we identified eight candidate genes that might confer sheath blight resistance based on the QTL analysis using recombinant inbred lines between Bd3-1 and a sheath-blight susceptible accession, Bd21.

研究分野：植物病理学

キーワード：紋枯病 病害抵抗性 ミナトカモジグサ *Rhizoctonia solani* トランスクリプトーム解析 QTL解析

1. 研究開始当初の背景

糸状菌 *Rhizoctonia solani* が原因となるリゾクトニア病は、野菜類・花き・牧草等を含む 200 種以上の植物で発生する。本菌の一種 *R. solani* AG-1, 1A(紋枯病菌)は、イネ 2 大病害の 1 つ「紋枯病」の原因菌であり、最大で 50% もの減収をもたらす(Groth and Bond, 2007. Plant Dis)。紋枯病菌は、高温・多湿環境を生育に至適とするため、地球環境変動に伴う紋枯病の多発生と被害の深刻化が予測されている。また、大気中の CO₂ 濃度の上昇によっても被害が助長されることが報告されている(Kobayashi et al. 2005. Phytopathology)。

一般に作物の病害防除は、殺菌剤・抵抗性品種・抵抗性誘導剤が主な手段であるが、紋枯病に対する実用的なイネ抵抗性品種は存在しない(Srinivasachary et al. 2011. Euphytica)。これは、本菌に対して完全な抵抗性を付与できる遺伝子資源が栽培イネには存在しないためである。また、いもち病の防除に用いられる市販の抵抗性誘導剤も効果が無いため、防除は殺菌剤に限られている。しかし近年、国内外の圃場において殺菌剤耐性菌が観測され始めたことから(石井, 2012. 植物防疫)、新たな防除策の開発が必要である。

申請者は、小型草本植物であるミナトカモジグサ(*Brachypodium distachyon*)を用いて紋枯病菌の解析を進めている。ミナトカモジグサの世代時間はイネと比べて短いため、形質転換やゲノム解析に係る時間が短縮できる。また、全ゲノム・cDNA・変異体・ゲノム比較解析情報が整備されており、モデル植物としての性質を備えている。申請者は、これまでにミナトカモジグサの小スケール育成系と紋枯病菌の感染系および抵抗性の定量評価系を確立した。また、免疫に関わる植物ホルモンであるサリチル酸(SA)、ジャスモン酸(JA)、エチレン(ET)に応答するマーカー遺伝子群もそれぞれ整備した(Kouzai et al. 2016 BMC Plant Biol)。

申請者は、DOE Joint Genome Institute より入手した 35 種のミナトカモジグサ野生系統の紋枯病抵抗性を調べ、標準系統である Bd21 と比べて顕著に病徴が軽減される系統、すなわち「紋枯病抵抗性系統」を複数同定した。菌感染過程における植物ホルモンマーカー遺伝子群の発現パターンから、紋枯病抵抗性系統は、SA マーカー遺伝子の発現が顕著に誘導される真性抵抗性型と、ホルモン非依存性の非宿主抵抗性型に区別された。これらの事実から、ミナトカモジグサには紋枯病抵抗性を付与できる遺伝子資源が存在し、それにより紋枯病菌の感染が効果的に抑制されたと仮定した。この原因遺伝子および抵抗性メカニズムの理解は、イネ等に応用されることで抵抗性品種開発への利用が期待できる。

2. 研究の目的

本研究では、ミナトカモジグサを研究材料として(1)紋枯病抵抗性メカニズムの解明と、(2)紋枯病抵抗性の原因遺伝子候補の同定を目的とした。抵抗性系統の 1 つ Bd3-1 をモデルとして(図 1)、菌感染過程の観察と時系列トランスクリプトーム解析により紋枯病菌に対する特徴的な応答を明らかにすると共に、ゲノム科学的手法により抵抗性を司る遺伝子の候補を探索した。

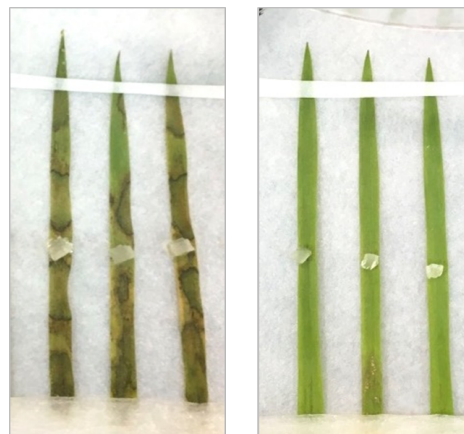


図1. ミナトカモジグサにおける紋枯病菌接種3日後の病徴

左: Bd21 (罹病性) 右: Bd3-1(抵抗性)

3. 研究の方法

(1)紋枯病抵抗性メカニズムの解明

紋枯病菌のミナトカモジグサ葉身上的感染行動と、葉身内の菌体バイオマスの経時的な変化を、Bd3-1 と罹病性の標準系統 Bd21 とで比較解析した。さらに、両系統に特徴的な紋枯病菌に対する応答を明らかにするため、菌接種後 0、8、16、24 時間における時系列トランスクリプトーム解析を行った。

(2)紋枯病抵抗性の原因遺伝子候補の同定

Bd3-1 および Bd21 を交配することで作出された Recombinant Inbred Lines (RILs)を展開し、QTL 解析によって紋枯病抵抗性の原因遺伝子候補を探索した。紋枯病抵抗性の表現型の評価は菌接種後の発病率および病斑面積率を指標として行い、遺伝子型の決定はリシーケンスデータを基にゲノムワイドに設定した SNP を用いて MTA-seq (Onda et al. 2018. Front Plant Sci)により行った。QTL 領域のファインマッピングは、別の既報 SNP マーカー (Cui et al. 2012. PLOS One)を用いて実施した。

4. 研究成果

(1)紋枯病抵抗性メカニズムの解明

まず、Bd3-1 で抑止される紋枯病菌の感染行動とそのタイミングを調べた。Bd21 および Bd3-1 に紋枯病菌を接種し、20、30、40、60 時間後における葉身表面の菌の感染行動と葉内に侵入した菌のバイオマスを、顕微鏡観察と定量 PCR によりそれぞれ解析した。その結果、Bd21 では経時変化に伴って顕著に菌体バイオマスが増加し、接種 30 時間後では紋

枯病菌の感染器官である *infection cushion* が葉身表面に多数形成されることがわかった。一方、Bd3-1 では菌体バイオマスが検出されはじめる接種 20 時間後から菌体量が低レベルに抑えられており、葉身表面では *infection cushion* の形成がほとんど観察されなかった。以上の結果から、Bd3-1 では紋枯病菌感染初期に何らかの抵抗性反応が起こり、それによって後続の感染行動が抑止されることが示唆された。

そこで次に、Bd3-1 の抵抗性反応の詳細を明らかにする目的で、時系列トランスクリプトーム比較解析を行った。Bd21 および Bd3-1 のそれぞれについて菌接種後 0、8、16、24 時間の葉身から RNA を抽出し、Illumina HiSeq 4000 を用いて解読した。菌の接種により統計的有意に発現が変動した遺伝子群 (DEGs) を抽出し、各系統に特異的な DEGs および共通の DEGs を各時点で同定した。次に、各 DEGs セットの Gene Ontology 解析を行った。その結果、Bd21 では接種後 8 時間から PAMP-triggered immunity (PTI) 関連遺伝子群の発現が誘導され、接種 16 時間後から光合成や細胞壁合成などの 1 次代謝関連遺伝子群の発現が抑制されることがわかった。病害応答における植物のリソーストレードオフの観点から (Takatsuji, 2017. *Front Plant Sci*)、この発現抑制は、免疫反応へリソースが配分された結果であることが示唆された。また、菌の感染拡大に起因すると考えられる傷害応答関連遺伝子群の発現も接種 16 時間後から認められた。一方、Bd3-1 では接種後 8 時間から PTI に加えて SA 依存的免疫に関連する遺伝子群の発現が顕著に誘導されていた。また、傷害応答関連遺伝子群の発現誘導は認められなかった。1 次代謝関連遺伝子群の発現抑制のタイミングは Bd21 と比べて早く、接種 8 時間後から認められた。以上の結果から、SA 依存的免疫の活性化と免疫応答への速やかなリソースの配分が Bd3-1 の紋枯病抵抗性に寄与していることが示唆された。

(2) 紋枯病抵抗性の原因遺伝子候補の同定

まず、Bd21 と Bd3-1 を交配することで作出された計 164 系統の RILs を展開し、それらの紋枯病抵抗性の評価と遺伝子型の決定を行った。紋枯病抵抗性の表現型として、菌接種 3 日後における葉身の病斑面積率および発病率を、画像解析ソフト Image J を用いて評価した。各 RILs について生物学的な反復実験を 3 回行い、得られたデータの回帰分析の結果から、両表現型には強い相関関係があることが示された。次に、RILs の遺伝子型の決定を行った。ゲノムワイドに均等になるように設定した 443 個の SNP について、multiplex PCR targeted amplicon sequencing (MTA-seq, Onda et al. 2018. *Front Plant Sci*) により各 RILs の多型情報を得た。

次に、紋枯病抵抗性の QTL 解析を行った。RILs の紋枯病抵抗性および遺伝子型のデータを用いて、統計解析ソフト R の R/qtl パッケージによるインターバルマッピングを行い、紋枯病抵抗性 QTL をマッピングした。その結果、病斑面積率および発病率のどちらの表現型を用いた解析においても、3 番染色体上に効果の強い QTL を 1 つ検出できた。当該 QTL 領域を、別の既報 SNP マーカーを用いてファインマッピングを行ったところ (Cui et al. 2012. *PLOS One*)、QTL は 14.6Mb の 1,298 遺伝子に絞り込まれた。①で実施したトランスクリプトーム解析の遺伝子発現量データから、QTL 領域内において Bd3-1 である程度発現している遺伝子 (RPM 値>1) は 645 個存在し、これらに紋枯病抵抗性の原因遺伝子候補が含まれることが示唆された。

紋枯病抵抗性メカニズムの解析により、Bd3-1 では感染の阻止と SA 依存的免疫の活性化が、いずれも菌接種後の早いタイミングで起こっていることが明らかとなった。これらの結果は、Bd3-1 の紋枯病抵抗性を司る原因遺伝子が免疫受容体であることを強く示唆する。一般に、植物の病害抵抗性遺伝子である免疫受容体は、NBS-LRR 型 (nucleotide binding site and leucine rich repeats)、受容体キナーゼ型、もしくは受容体タンパク質型である (Sekwhal et al. 2015. *Int J Mol Sci*)。そこで、QTL 領域内で発現している 645 遺伝子のタンパク質構造を調査したところ、12 遺伝子が免疫受容体をコードしていることがわかった。これらのうち、Bd3-1 で大規模な構造変異または非同義置換を持つ遺伝子は 8 個存在した。今後、これら 8 遺伝子を Bd3-1 の紋枯病抵抗性を司る原因遺伝子の有力な候補と考え、ノックアウト変異体や過剰発現体の作出によって紋枯病抵抗性を司る原因遺伝子の特定を進める。

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 2 件)

(1) Kouzai Y., Kimura M, Watanabe M, Kusunoki K, Osaka D, Suzuki T, Matsui H, Yamamoto M, Ichinose Y, Toyoda K, Matsuura T, Mori I. C., Hirayama T, Minami E, Nishizawa Y, Inoue K, Onda Y, Mochida K, Noutoshi Y. Salicylic acid-dependent immunity contributes to resistance against *Rhizoctonia solani*, a necrotrophic fungal agent of sheath blight, in rice and *Brachypodium distachyon*. *New Phytologist* (2018) 217:771-783. 査読有。

(2) 持田恵一, 香西雄介, 恩田義彦. 草本系バイオマス増産のためのゲノム育種基盤. *アグリバイオ* (2017)1:1314-1317. 査読無。

〔学会発表〕（計 5 件）

(1) 香西雄介, 能年義輝, 井上小楨, 恩田義彦, 持田恵一. 抵抗性と罹病性のミナトカモジグサへの紋枯病菌感染時のトランスクリプトーム比較解析. 平成 30 年度日本植物病理学会大会. 2018 年 3 月. 神戸.

(2) Kouzai Y. Expression profiling of marker genes for defense-associated phytohormones in *Brachypodium distachyon* highlights its similar immune systems to rice. The 3rd International Bracypodium Conference. 2017 年 7 月. 中国, 北京. (招待講演)

(3) 香西雄介, 持田恵一, 恩田義彦, 能年義輝. 小型草本モデル植物ミナトカモジグサを用いた紋枯病抵抗性システムの探索とその特徴付け. 平成 29 年度日本植物病理学会大会. 2017 年 4 月. 盛岡.

(4) Kouzai Y, Onda Y, Mochida K, Noutoshi Y. Screening of sheath blight resistant accessions in *Brachypodium distachyon*. 第 58 回日本植物生理学会年会. 2017 年 3 月. 鹿児島.

(5) 香西雄介, 山中由利恵, 渡邊恵, 木村麻美子, 松井英譲, 山本幹博, 一瀬勇規, 豊田和弘, 恩田義彦, 持田恵一, 能年義輝. ミナトカモジグサにおける植物免疫ホルモン応答性マーカー遺伝子の同定と発現プロファイルの解析. 平成 28 年度日本植物病理学会関西西部会. 2016 年 9 月. 静岡.

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

○取得状況（計 0 件）

〔その他〕

ホームページ等

<https://researchmap.jp/ykouzai/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

香西 雄介 (KOUZAI, Yusuke)

国立研究開発法人理化学研究所・環境資源科学研究センター・基礎科学特別研究員

研究者番号：50783502

(2) 研究協力者

持田 恵一 (Mochida, Keiichi)

国立研究開発法人理化学研究所・環境資源科学研究センター・チームリーダー

研究者番号：90387960

恩田 義彦 (ONDA, Yoshihiko)

国立研究開発法人理化学研究所・環境資源科学研究センター・研究員

研究者番号：50547073

清水 みなみ (SHIMIZU, Minami)

国立研究開発法人理化学研究所・環境資源科学研究センター・テクニカルスタッフ

上原 由紀子 (UEHARA, Yukiko)

国立研究開発法人理化学研究所・環境資源科学研究センター・テクニカルスタッフ

井上 小楨 (INOUE, Komaki)

国立研究開発法人理化学研究所・環境資源科学研究センター・テクニカルスタッフ

能年 義輝 (NOUTOSHI, Yoshiteru)

岡山大学大学院・環境生命科学研究科・准教授

研究者番号 70332278