

令和元年6月10日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07549

研究課題名(和文) イネいもち病圃場抵抗性遺伝子qBRM6.2の単離と機能解析

研究課題名(英文) Cloning and characterization of blast resistance QTL qBRM6.2 in rice

研究代表者

犬飼 剛 (Inukai, Tsuyoshi)

北海道大学・農学研究院・講師

研究者番号：90223239

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、イネ実験系統MC276の持ついもち病圃場抵抗性QTL qBRM6.2に着目し、その単離と機能解明を行った。これまでのfine mappingの結果からqBRM6.2は真性抵抗性遺伝子と報告されていたPid3-11ではないかと考えられたため、この遺伝子をアグロバクテリウム法により日本晴に導入し、得られた形質転換系統の特性を解析した。その結果、形質転換系統はレース特異的な量的抵抗性を示したことから、qBRM6.2はPid3-11で、圃場抵抗性遺伝子であることが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

真性抵抗性遺伝子として報告されていたPid3-11遺伝子が実際は圃場抵抗性遺伝子であること及びその特性が明らかになったことで、抵抗性育種におけるこの遺伝子の利用において有用な知見が得られた。また、配列のわずかな違いによって真性抵抗性(Pid3-13遺伝子)から圃場抵抗性(Pid3-11遺伝子)へと形質が変わることが明らかとなり、今後圃場抵抗性の機構を解明する上で重要な手がかりが得られた。

研究成果の概要(英文)：In the present study, we focused on qBRM6.2, a known blast-resistance QTL in experimental resistant rice line MC276. Because it was possible that Pid3-11, one of the alleles at the Pid3 locus might be qBRM6.2 according to the previous results, we investigated the resistance phenotype of Pid3-11 to Japanese isolates using Nipponbare transgenic lines that express Pid3-11. The results showed that Pid3-11 was a race-specific but partial-resistance allele at the Pid3 locus, suggesting strongly that Pid3-11 is qBRM6.2.

研究分野：植物育種学

キーワード：イネ いもち病 圃場抵抗性 植物免疫

1. 研究開始当初の背景

イネのいもち病抵抗性育種では真性抵抗性の他に圃場抵抗性の付与が重要であるが、圃場抵抗性の作用機作については不明な点が多い。これまでに単離された圃場抵抗性遺伝子には *pi21*, *Pb1*, *Pi35* などがあるが、このうち *Pb1* や *Pi35* は真性抵抗性の誘導に働く R タンパクと同様 CC-NB-LRR 型のタンパクをコードしている。レースに対する非特異性を考えるとこれらの R タンパクが病原菌由来の非病原性遺伝子産物 (エフェクター) の認識に関わっている可能性は低い。一方、*Pb1* タンパクは代わりにイネ自身の転写因子 WRKY45 と相互作用することによってイネを抵抗性が誘導されやすい状態にする (priming) ことが示されている。一方、*Pi35* は真性抵抗性遺伝子 *Pish* 座の遺伝子であることが報告されており、一部の圃場抵抗性遺伝子はその機能や進化において真性抵抗性遺伝子と密接な関係にあることが明らかになってきている。

2. 研究の目的

MC276 の持ついもち病圃場抵抗性 QTL *qBRM6.2* に着目し、その単離と機能解明を目的に研究を行った。これまでの fine mapping の結果から *qBRM6.2* は真性抵抗性遺伝子 *Pid3* 座の遺伝子であると推定されたが、もしそうだとすると、抵抗性の程度やいもち病菌のレースに対する特異性の有無において真性抵抗性とは異なる圃場抵抗性が、同一の遺伝子座によって制御されていることになる。本研究では *Pid3* 座の遺伝子が *qBRM6.2* であることを証明するとともに、*qBRM6.2* の機能が真性抵抗性遺伝子とどのように異なるのか、抵抗性誘導経路の制御の面から解析した。

3. 研究の方法

(1) *qBRM6.2* (*Pid3-I1*) の形質転換体の作成

実験系統 MC276 由来の *Pid3-I1* を水稻品種日本晴にアグロバクテリウム法を用いて導入し、*qBRM6.2* の相補性検定を行った。発現ベクターとして pBract204 を用い、これに上流約 1.3kb と下流約 0.2kb を含む *Pid3-I1* のゲノム配列を組み込んで導入した。得られた T₀ 個体 20 個体の中から T₂ 系統 3 系統を養成し、以下の実験に用いた。

(2) いもち病菌及び白葉枯病菌の接種

いもち病菌の接種試験では、レースの異なる日本産菌系 5 菌系を用いた。接種は噴霧接種法により、5~6 葉期のイネ個体に 5 万/ml の孢子懸濁液を接種した。抵抗性の程度は形成病斑のタイプとその割合から 6 段階で判定した。白葉枯病菌の接種試験は、レース VII (MAFF 211111) 系統のみ用いて行った。接種は剪葉接種法により、止葉期のイネの止葉に接種した。抵抗性の程度は、接種後 14 日目における病斑長により判定した。

(3) 防御関連遺伝子の発現解析

防御関連遺伝子 8 遺伝子の発現量を GenomeLab GeXP システムによる multiplex 定量 RT-PCR 法を用いて解析した。内部標準遺伝子として既報の 3 遺伝子を用い、これらの計測値の幾何平均を用いて解析遺伝子の発現量を標準化した。

4. 研究成果

(1) 圃場抵抗性 QTL *qBRM6.2* の単離

Fine mapping の結果から *qBRM6.2* の候補遺伝子は真性抵抗性遺伝子 *Pid3* 座の遺伝子と推定されたためその配列をシーケンスしたところ、*qBRM6.2* は *Pid3* 座の対立遺伝子の一つである *Pid3-I1* と同じであることが明らかとなった。*Pid3-I1* は真性抵抗性遺伝子として報告されていたが、これは allele miming の手法によって同定された遺伝子で、35S プロモーター下で発現させた結果に基づいてその抵抗性は完全、すなわち真性抵抗性と報告されていた。一方、筆者らは *qBRM6.2* に関する CO39 の near-isogenic line (NIL) を用いた遺伝解析により、この抵抗性が量的な形質であり、分離集団における抵抗性も連続的に変異することから圃場抵抗性であると判断した。この違いはプロモーターの違いによると考えられたため、*qBRM6.2* (*Pid3-I1*) を native promoter 下で発現させるコンストラクトを作成、日本晴に導入してその表現型を解析した。作成した形質転換系統 3 系統いずれも供試したいもち病菌系に対して抵抗性を示したこと、またその表現型が量的であったことから、*qBRM6.2* (*Pid3-I1*) は真性抵抗性遺伝子ではなく、圃場抵抗性遺伝子であると結論された。

(2) 圃場抵抗性遺伝子 *qBRM6.2* の機能

qBRM6.2 による圃場抵抗性の特徴を精査するため、形質転換系統 3 系統を用いて以下の実験を行った。

① レース特異性: レースの異なるいもち病菌 8 菌系に対する反応を調べた結果、7 菌系に対して圃場抵抗性を示したが、1 菌系に対しては日本晴と同程度の罹病性を示した。この結果から *qBRM6.2* はレース特異的な遺伝子であると判断された。ただし、この菌系はマイコウイルスの感染により病原力が增大しているとの報告があるため、ここで見られた抵抗性の打破が単純に非病原性遺伝子の変異によって説明されるものなのか、マイコウイルスの感染によるものなのか今後検討を要すると考えられた。

② 防御遺伝子の発現パターン: 日本晴に対して病原性を示す菌系を接種し防御遺伝子 8 遺伝子の発現パターンを調べたところ、*qBRM6.2* の NIL と同様、4 個の PR genes、2 個のモミラクトン合成遺伝子及び WRKY45 遺伝子において接種後の発現増加程度が日本晴よりも有意に増大していた。*qBRM6.2* の導入によってこれら遺伝子の応答性が高くなっていることから、抵抗性の priming が生じている可能性が示唆された。

③ 白葉枯病抵抗性: *qBRM6.2* の NIL が白葉枯病菌に対して量的な抵抗性を示したことから、形質転換系統においても白葉枯病菌に対して量的な抵抗性を示すか調べた。白葉枯病菌のレース VII を剪葉接種法により接種し、接種後 2 週間目の病斑長を調べた結果、日本晴と形質転換系統 3 系統の間で有意な差は認められなかった。この結果が、*qBRM6.2* と連鎖している別の遺伝子によるのか、遺伝的背景の違いによって *qBRM6.2* の白葉枯病菌に対する効果に変動するのか、今後明らかにする必要がある。

④ 遺伝的背景の影響: MC276 由来の *qBRM6.2* の配列はインディカ型品種 Kasalath と相同であったことから、コシヒカリと Kasalath の交雑組合せに由来する Chromosome segment substitution lines (CSSLs) を農業生物資源ジーンバンクより分譲を受け、その中から *qBRM6.2* を有し、遺伝的背景が

コシヒカリにもっとも近い SL217 を選択して、いもち病菌各レースに対する反応や防御関連遺伝子の発現パターンを *qBRM6.2* に関する CO39 の NIL と比較した。その結果、SL217 は供試レースに対してコシヒカリよりも量的に抵抗性であったものの、その程度は RIL66 よりも低かった。CO39 とコシヒカリは同程度に罹病性であるにも関わらず、それぞれ *qBRM6.2* を導入した系統における抵抗性に差が認められたことから、コシヒカリでは *qBRM6.2* を介した抵抗性の誘導に必要な因子の一部が欠落しているのではないかと考えられた。そこで、次に PR gene などの防御関連遺伝子の発現パターンをコシヒカリと CO39 で比較した。その結果、コシヒカリでは抵抗性の誘導に重要な転写因子 WRKY45 を始め、多くの防御関連遺伝子の発現量がいもち病菌の接種前、接種 24 時間後において CO39 よりも低かった。これらの結果から、コシヒカリでは *qBRM6.2* 抵抗性誘導経路の上流においてシグナル伝達に関わる遺伝子の機能が喪失しているのではないかと考えられた。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (6 件)

- ① [Inukai T](#), Nagashima S, Kato M (2019) *Pid3-11* is a race-specific partial-resistance allele at the *Pid3* blast resistance locus in rice. *Theoretical and Applied Genetics* 132:395-404 (査読有り)
- ② Matsunaga W, Shimura H, Shirakawa S, Isoda R, [Inukai T](#), Matsumura T, Masuta C (2019) Transcriptional silencing of 35S driven transgene is differentially determined depending on promoter methylation heterogeneity at specific cytosines in both plus- and minus-sense strands. *BMC Plant Biology* 19:24 (査読有り)
- ③ [Inukai T](#) (2017) Differential regulation of starch-synthetic gene expression in endosperm between indica and japonica rice cultivars. *Rice* 10:7 (査読有り)
- ④ Furuta K, Nagashima S, [Inukai T](#), Masuta C (2017) Construction of a system for the strawberry nursery production towards elimination of latent infection of anthracnose fungi by a combination of PCR and microtube hybridization. *Plant Pathology Journal* 33:80-86 (査読有り)
- ⑤ Fujiwara A, Togawa S, Hikawa T, Matsuura H, Masuta C, [Inukai T](#) (2016) Ascorbic acid accumulates through the jasmonic acid-dependent signaling pathway as a defense response to turnip mosaic virus in a resistant *Brassica rapa* cultivar. *Journal of Experimental Botany* 67:4391-4402 (査読有り)
- ⑥ Yamashita Y, Ota M, Inoue Y, Hasebe Y, Okamoto M, [Inukai T](#), Masuta C, Sakihama Y, Hashidoko Y, Kojima M, Sakakibara H, Inage Y, Takahashi K, Yoshihara T, Matsuura H (2016) Chemical promotion of endogenous amounts of ABA in *Arabidopsis thaliana* by a natural product, theobroxide. *Plant and Cell Physiology* 57:986-999 (査読有り)

[学会発表] (2 件)

- ① 長嶋 沙希, 加藤 美弥子, [犬飼 剛](#) (2018) イネいもち病真性抵抗性に関わる *Pid3* 座に分化した複対立遺伝子の一つは量的抵抗性に関与する. 第 133 回 日本育種学会 (口頭発表)
- ② 加藤美弥子, 氷川貴大, 保田浩, 提箸祥幸, 佐藤裕, [犬飼剛](#), 増田税アスコルビン酸及び植物の ROS 消去能がイネいもち病菌の病原性に与える影響 (2016) 第 130 回 日本育種学会講演会 (ポスター発表)

6. 研究組織

(1) 研究分担者

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：加藤 美弥子

ローマ字氏名：(KATO, miyako)

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。