

令和 3 年 6 月 10 日現在

機関番号：82111

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2020

課題番号：16K07562

研究課題名(和文) イネ縞葉枯病抵抗性遺伝子Stvbを強化する因子の解明

研究課題名(英文) Analysis of rice gene Stva that enhances stripe resistance by Stvb

研究代表者

早野 由里子 (Hayano-Saito, Yuriko)

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・中央農業研究センター・上級研究員

研究者番号：90414739

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：イネのウイルス病であるイネ縞葉枯病に対する抵抗性遺伝子Stvb-iは、イネの第11染色体のStvb座に座乗し、複数の対立遺伝子が報告されている。Stvb-iは、細胞分裂が盛んな組織でウイルスと高温の影響を軽減してイネの成長を保護する働きを示した。その働きによって、持続性のある抵抗性を発揮していると考えられた。Stvb-iの抵抗性アリルである、StvbおよびStvb-oも、Stvb-iと同様の働きをしていることが推察された。さらに、Stvbの抵抗性を強化するStva遺伝子について、連鎖マーカーを開発した。これらはStva導入によるStvb-iやStvb-oの抵抗性強化に利用できる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

植物の抵抗性の利用は、環境負荷が小さく、安全な作物病害の防除対策であるが、その安定性には不安があるとされている。本課題では、50年以上安定した抵抗性を発揮してきたイネ縞葉枯病抵抗性の安定性と強化に関与する遺伝子の解析を行った。抵抗性を担う遺伝子Stvb-iの機能を明らかにし、その抵抗性メカニズムを推測することによって、その縞葉枯病抵抗性の持続的利用の可能性を示した。また、縞葉枯病抵抗性の強化因子であるStva遺伝子の解析や育種利用に有効なDNAマーカーを開発した。本研究成果は、イネの縞葉枯病対策における抵抗性の利用や品種開発に基盤的情報となる。

研究成果の概要(英文)：A rice gene, Stvb-i, confers durable resistance against the destructive rice stripe tenuivirus, which causes rice stripe. Stvb-i is located at the Stvb locus on chromosome 11 of rice (*Oryza sativa*) and has multiple allelic genes. Here, we showed that Stvb-i was expressed in the seedling base containing meristems and contributed to the attenuation of viral and heat damage in plant development. Probably, the mechanism of meristem growth protection conferred by Stvb-i makes the resistance durable. The Stvb-i allelic genes, Stvb and Stvb-o, had gene structure, transcript sequence, and expression pattern similar to those of Stvb-i. These similarities suggest that Stvb and Stvb-o have similar function to that of Stvb-i. The Stva gene, which is located at the Stva locus on chromosome 2, further enhances stripe resistance mediated by the Stvb gene. Furthermore, we developed several Stva-linked markers. These markers will be useful in improving stripe resistance mediated by Stvb-i and Stvb-o.

研究分野：植物病理、植物育種

キーワード：イネ 抵抗性 ウイルス 遺伝子

1. 研究開始当初の背景

イネ縞葉枯病は、イネ縞葉枯ウイルス Rice stripe virus (RSV) がヒメトビウンカにより媒介されて引き起こされるイネの最重要ウイルス病害である。日本国内では数十年おきに多発生し、稲作に甚大な影響を与えるが、虫媒伝染性であること、媒介虫体内でのウイルス増殖が可能であること、また、イネ・麦に加え、イネ科雑草などを広く宿主とすることから完全な撲滅が不可能であり、発生の予測自体も非常に困難な病害である。本病の対策としては、縞葉枯病抵抗性遺伝子保有品種の導入・作付が最も効果的な防除方法であることから、食用水稻だけでなく、飼料用稲も含め多数の抵抗性イネ品種が日本各地で育成されている。一方で、抵抗性遺伝子の重要性にも関わらず、虫媒性ウイルス病である本病の抵抗性遺伝資源の探索や既存の遺伝子のメカニズムの解明は、生物検定の困難さもあり進んでいない。

2. 研究の目的

イネの最重要ウイルス病であるイネ縞葉枯病は、虫媒性のため撲滅が難しく、抵抗性品種の利用が最も有効な防除策である。抵抗性品種への利用は、抵抗性遺伝子 *Stva*、*Stvb*、*Stvb-i* に限られている。これまでの報告によると、生物検定により *Stva* が *Stvb* と *Stvb-i* の抵抗性を大幅に向上させることから、*Stvb* 座の抵抗性遺伝子と *Stva* 遺伝子の相互作用による抵抗性強化メカニズムの解明は抵抗性品種の強化の道を拓く。本課題では、*Stvb-i* の遺伝子構造予測が終了していることを踏まえ、*Stvb-i* の機能解析、縞葉枯病抵抗性の主座である *Stvb* 座の対立遺伝子の構造比較解析を行い、その異同を検討する。また、解析が十分でなく、マーカーも不足している *Stva* については、*Stva* 領域の解析を行い、マーカー開発および *Stva* 候補遺伝子の特定を行う。

3. 研究の方法

(1) *Stvb-i* 遺伝子のゲノム領域を導入した系統 (以下相補系統) および RNAi による *Stvb-i* 遺伝子の発現抑制系統 (以下 RNAi 系統) を作製し、生物検定による抵抗性評価、発現解析に供試し、研究が蓄積している *Stvb-i* 遺伝子の機能を解析した。

(2) *Stvb* 座の抵抗性アリルである *Stvb* (日本陸稲由来) および *Stvb-o* (*Oryza officinalis* 由来) を保有するイネ品種の次世代シークエンスを行い、*Stvb-i* の遺伝情報を参照しつつ、それらを特定した。感受性対立遺伝子については、*stvb-jn* (「日本晴」)、*stvb-jy* (「ユーカーラ」) はデータベースおよび転写産物の情報よりを特定した。*Stvb-i* を含めた *Stvb* 座対立遺伝子の構造比較を行った。

(3) *Stva* と *Stvb* の両遺伝子を保有するイネ品種「コシヒカリ近中四 SBL1 号」、*Stva* のみを保有するコシヒカリ同質系統「中系 1L9 号」、「コシヒカリ」の次世代シークエンスを解析し、DNA マーカーの開発、*Stva* のゲノム領域の限定を行った。

4. 研究成果

(1) 転写産物の配列から、*Stvb-i* 遺伝子は、よく研究されている植物の抵抗性遺伝子とは異なる、ATP 結合ドメインを保有する約 150kDa のタンパク質をコードしていることが明らかとなった。*Stvb-i* 遺伝子の相補系統および RNAi 系統は、縞葉枯病に対し、それぞれ既存抵抗性品種と同等の抵抗性および感受性を示し、*Stvb-i* が縞葉枯病抵抗性を担う遺伝子であることが示された。*Stvb-i* 遺伝子の発現を 5 つのイネ植物体組織 (幼苗の基部、分けつ基部、1 cm 程度の極若い幼穂、第 3 葉および止め葉) 調べたところ、病原ウイルスである RSV が主に増殖するメリステムを含む組織で発現が認められた。

RSV 感染により、感受性イネは生育が著しく抑制されるが、抵抗性イネでは非常に軽微である。RNAi 抑制系統の生育は、RSV の感染によらず抑制され、RSV 感染によってさらに著しく抑制された (図 1)。予備試験によって、RNAi 系統の生育は、温度変化の影響を受けやすい傾向があることが示された。そこで、RNAi 系統を用いて、*Stvb-i* 遺伝子の有無と温度変化とイネの生育の関係を調べた。*Stvb-i* 遺伝子を保有するイネに比べ、RNAi 系統では、高温処理 (35-38 度、2-4 日間) によるイネ幼苗の生育障害が甚大であった。*Stvb-i* 遺伝子は、ウイルス抵抗性だけでなく、イネ植物体の生育 (特に、高温) にも何らかの効果を持っていることが示唆された。

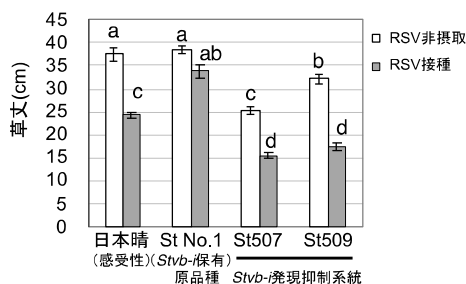


図 1 *Stvb-i* 発現抑制系統の草丈
RSV 接種 1 ヶ月後のイネの草丈。同じアルファベット間に有意差はない。(Tukey-Kramer test, $p < 0.01$, $n = 15$)

Stvb-i 遺伝子の効果をより詳細に検討するため、RNAi 系統とその原品種のイネ幼苗に 38 度 1 日という熱処理を行った。この熱処理を 0 回（無処理）、1 回、3 回と行い、幼苗の草丈を 10 日間経時的に調査し、RNAi 系統と原品種との生育比較を行った。RNAi 系統と原品種との生育差は、熱処理 1 - 2 日後に現れ、処理後日数の経過に伴って徐々に大きくなった。また、熱処理回数の増加は生育差を増大させた。一方、無処理区では RNAi 系統と原品種の生育差は、試験開始から 10 日を経過しても認められなかった（図 2）。*Stvb-i* 遺伝子の発現抑制の影響は、熱処理後速やかに現れ、生育の回復に及ぶことが示された。これまでの結果から、*Stvb-i* 遺伝子は、イネの生育、特に、高温による生育への影響を軽減する効果を有すると考えられた。*Stvb-i* 遺伝子の有無は、RSV の増殖に係るとされる熱ショックタンパク質の発現に影響していた。RSV の増殖は熱と似た影響を細胞内に引き起こす可能性が示唆された。

以上から、*Stvb-i* 遺伝子は、細胞分裂が盛んな組織で機能し、その機能は RSV や熱による影響を軽減し、イネの生育を支える働きをしていると考えられた。そうした働きの結果、縞葉枯病抵抗性という形質を発揮しているのであろうと推測された。この *Stvb-i* 遺伝子の働きから推測される抵抗性メカニズムでは、ウイルス側の変異を生じにくいことが推測される。これまで 50 年以上実用されてきた縞葉枯病抵抗性の安定性は、*Stvb-i* 遺伝子の生育を支える働きによるところが大きいことが推測された。

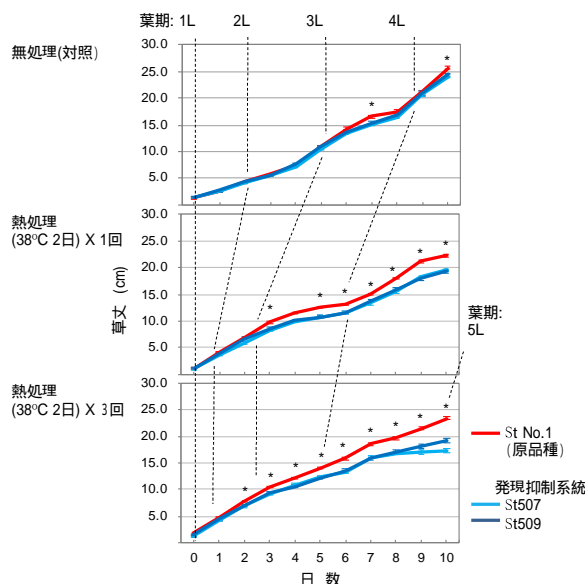


図2 高温処理下における*Stvb-i*発現抑制系統の草丈
1葉期のイネに熱処理（38℃、2日、グラフ中黄色部分）を行い、草丈を調査した。*は原品種-発現抑制系統間での有意差を示す（Tukey-Kramer test, $p < 0.01$, $n = 20$ ）

(2) 縞葉枯病抵抗性遺伝子の主座である *Stvb* 座は複対立遺伝子群を形成している。国内の縞葉枯病抵抗性品種の育成には、*Stvb-i* (*O. sativa* ssp *indica* 由来) および *Stvb* (*O. sativa* ssp *japonica* upland) に加え、近年 *O. officinalis* に由来する抵抗性遺伝子 *Stvb-o* が利用されつつある。由来の異なる *Stvb* 座の抵抗性アリルの遺伝子比較および発現を検討した。

抵抗性日本陸稲「陸稲農林 24 号」に由来する *Stvb* および *Stva* を保有する「コシヒカリ近中四 SBL1 号」および抵抗性野生イネ *O. officinalis* の抵抗性を保有する「関東 IL17 号」の次世代シーケンスおよび *Stvb-i* (*indica* 「Modan」由来) のデータを利用し、*Stvb* および *Stvb-o* を単離した。*Stvb* および *Stvb-o* のゲノム構造、転写産物および CDS は、いずれも *Stvb-i* のものと高い相同性を示した。これら 2 つの抵抗性アリルは、*Stvb-i* と同様に、RSV が盛んに増殖するメリステムを含むイネ幼苗植物体基部で発現していた。*Stvb* 座の抵抗性アリルは *Stvb-i* と同様の機能を保有することが推測された。感受性アリル、*stvb-jn* (「日本晴」由来)、*stvb-jy* (「ユーカラ」由来) も単離した。感受性のアリルの遺伝子構造および転写産物は、抵抗性アリルのものと相同性は高かった。しかし、CDS 長は抵抗性アリルよりも短く、また、イネ幼苗植物体基部での発現も見られなかった。

以上から、*Stvb* 座の対立遺伝子は、タンパク質及び発現に抵抗性-感受性アリル間差があることが示された。また、抵抗性アリル同士においては、検討したすべての項目で非常に相同性が高かった。*Stvb* 座の抵抗性アリルは、由来を問わず、縞葉枯病抵抗性の強化因子と考えられる *Stva* によって、抵抗性を強化することが可能であることが示唆された。

(3) *Stva* 遺伝子領域の解析： *Stva* を保有する「コシヒカリ近中四 SBL1 号」および「中系 IL9 号」、および感受性品種「コシヒカリ」ゲノムの次世代シーケンスを取得した。*Stva* 座乗領域（前田、2008）をカバーするコシヒカリ近中四 SBL1 号由来の BAC クローンを選抜し、そのシーケンスデータを取得した。上記シーケンスデータを合わせて配列比較を行い、既報の連鎖マーカーの物理的関係を明らかにし、配列情報を利用して、*Stva* の座乗領域を特定するマーカーを開発した。*Stva* 遺伝子座乗領域は、今回の解析で約 800kb と推定された。この *Stva* 領域のテロメア側の約 400kb には、*Stva* 保有 / 非保有系統・品種間で配列がよく似ており、多型の少ない領域があったものの、全体として 5 つのマーカーを新たに開発した。それらのマーカーの中には、網羅的発現解析により抽出された 3 つの *Stva* 遺伝子候補の一つである RNA 依存型 RNA 合成酵素と予測される遺伝子内に確認された 23 塩基の挿入・欠失を利用したものも含まれており、*Stva* 導入や解析に有効利用可能と推測された。

< 引用文献 >

前田英郎、近中四農研報、第 7 号、2008、71 - 107

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Hayano-Saito Yuriko, Hayashi Keiko	4. 巻 11
2. 論文標題 Stvb-i, a Rice Gene Conferring Durable Resistance to Rice stripe virus, Protects Plant Growth From Heat Stress	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Plant Science	6. 最初と最後の頁 519
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fpls.2020.00519	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 早野由里子、川原善浩、前田英郎、林敬子
2. 発表標題 Stvb座に座乗するイネ縞葉枯病抵抗性対立遺伝子の単離
3. 学会等名 日本育種学会第131回講演会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	川原 善浩 (Kawahara Yoshihiro) (30546370)	国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・次世代作物開発研究センター・主任研究員 (82111)	
研究分担者	前田 英郎 (Maeda Hideo) (40442751)	国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・次世代作物開発研究センター・ユニット長 (82111)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------