

令和 5 年 5 月 28 日現在

機関番号：82111
研究種目：基盤研究(C) (一般)
研究期間：2018～2022
課題番号：18K05581
研究課題名(和文) イネの開花期病害抵抗性遺伝子の同定 - 受粉後の柱頭への菌の攻撃を阻んでいるのか？

研究課題名(英文) Identification of a disease resistant gene in anthesis of rice. Does it block the attack of the pathogen on the surface of stigma after the pollination?

研究代表者
溝淵 律子 (Mizobuchi, Ritsuko)

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・作物研究部門・グループ長補佐

研究者番号：40425591
交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：イネにおける代表的な開花期病害の一つであるもみ枯細菌病菌に対する穂枯れ抵抗性遺伝子RBG2の機能解明を目指し、コアコレクション品種の染色体を遺伝背景「コシヒカリ」(罹病性品種)に導入した染色体置換系統(CSSLs)を評価した。その結果、品種AのRBG2領域をコシヒカリに導入した系統が穂枯れ抵抗性を示すことが明らかになった。抵抗性品種Kと罹病性品種Hの柱頭ではRBG2が発現していることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、もみ枯細菌病菌に対する穂枯れ抵抗性遺伝子の単離と機能解明を目指し、コアコレクション品種の染色体を「コシヒカリ」(罹病性)に導入した染色体置換系統(CSSLs)から、品種AのRBG2領域をコシヒカリに導入した系統が穂枯れ抵抗性を示すことを明らかにした。このことは、世界の複数の品種のRBG2アレルが今後育種母本として有用であることを示唆している。もみ枯細菌病の穂枯れ抵抗性遺伝子を単離して機能を明らかにした報告はないため、本研究成果は、学術的および育種的に重要な知見であり、今後は本研究で見出した予測遺伝子が真の原因遺伝子であるかどうかを明らかにしていく予定である。

研究成果の概要(英文)：The objective of this study is cloning and characterization the QTL (RBG2) for resistance to bacterial grain rot, caused by the bacterial pathogen *Burkholderia glumae*, which is a destructive disease in heading stage of rice. We analyzed the CSSLs derived from a cross between Koshihikari (susceptible) and cultivars of World Rice Collection. We found that a line derived from cultivar A was resistant. The expression of RBG2 on the surface of stigma was detected in both of K (resistant) and H (susceptible).

研究分野：植物育種学

キーワード：イネ 病害抵抗性 もみ枯細菌病 *Burkholderia glumae*

1. 研究開始当初の背景

「イネもみ枯細菌病」は、日本および世界で発生が増大している重要病害である。微生物は、植物に病害を引き起こす「病原菌」と植物体の表面上に存在しているにも関わらず全く害を与えない「植物生息菌」に分類される。植物表生細菌の一つである「もみ枯細菌病菌」は特殊な感染機構を有している。すなわち、イネが田んぼに移植されてから出穂までは葉面上で無害の植物生息菌として存在するが、開花期には穎花(もみ)の内側の表面で増殖し、病原細菌として毒素を分泌することにより、籾の褐変や胚の生長抑制を引き起こし、籾(玄米)に多大な被害をもたらす。このことは、もみ枯細菌病菌は、通常の病原菌が植物組織内に侵入して組織内部の抵抗性反応に打ち勝って増殖するのは全く異なる発病メカニズムを持っていることを示唆する。従って、このような発病メカニズムを持っている病害に対しては、従来解析が進められている植物の抵抗性遺伝子等では作用しない可能性が考えられ、「**植物体の表面で菌の増殖を阻止する戦略**」が植物体にとっては必要である。研究代表者は、穎花を開花日ごとに分けて抵抗性を比較したところ、開花1日後以降に菌に感染させると抵抗性品種は抵抗性を示すことから(溝淵ら(2012)日本植物病理学会大会)イネ側の開花後の状態の変化が抵抗性に影響を与えていると推測される。さらに、研究代表者は新たな検定法を確立することにより、複数のもみ枯細菌病抵抗性遺伝子を見出すことに成功し(Mizobuchi et al. (2013) *Rice*, Mizobuchi et al. (2013) *TAG*)、現在解析を進めている。すでに、もみ枯細菌病菌に対する穂枯れ抵抗性遺伝子 *RBG2* が第1染色体上に存在し、染色体上における抵抗性遺伝子の候補領域を約500kb以内まで絞りこみを進めている。そこで、遺伝学的解析により抵抗性遺伝子(*RBG2*)の染色体上の座乗位置を詳細に明らかにし(Mizobuchi et al. (2015) *Molecular Breeding*)、絞りこみを進めた結果、*RBG2*の候補領域は12.7kbまで狭めた。そこで、本研究では、新規の機能を有する可能性があるイネにおけるもみ枯細菌病抵抗性遺伝子 *RBG2*の単離および機能解明を行い、植物の生存戦略を明らかにする。

2. 研究の目的

本研究では、植物表生細菌である「もみ枯細菌病菌」の抵抗性遺伝子の機能解析を行う。もみ枯細菌病菌は、葉面上では無害の表生細菌として存在するが、開花後に穎花(もみ)の内部に侵入すると増殖し、病原細菌へと相転換をする特殊な感染機構を有しているが、どのように病原性を獲得しているのかは不明である。本研究では、新規の機能を有する可能性があるイネにおけるもみ枯細菌病菌の穂枯れ抵抗性遺伝子 *RBG2*の単離および機能解明を行い、植物の生存戦略を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) もみ枯細菌病抵抗性遺伝子 *RBG2* の発現解析および相補性検定

研究開始時点で、もみ枯細菌病抵抗性遺伝子 *RBG2* が第1染色体上に存在し、染色体上における抵抗性遺伝子の候補領域を12.7kbまで絞りこみを進め、予測遺伝子を1個と推定している。そこでまず、*RBG2*-NIL (QTL領域(約30kb)を罹病性品種に導入した系統)を用いて、予測遺伝子の発現様式を明らかにする。次に、CRISPR技術を用い遺伝子内に機能欠失型の突然変異を導入し、loss of function変異体を作成し、抵抗性を評価する。

(2) 染色体置換系統(CSSLs)を用いた抵抗性評価

研究代表者が所属する研究機関では、ジーンバンクからイネのコアコレクションを選定しそれらを用いた遺伝解析集団をすでに作出済みである。そこで、コアコレクション品種の塩基配列情報から、*RBG2*のアリルタイプによる系統樹を作成する。その結果を踏まえて、代表的なコアコレクション品種の染色体を遺伝背景「コシヒカリ」(罹病性品種)に導入した染色体置換系統(CSSLs: Chromosome Segment Substitution Lines)で*RBG2*領域がコシヒカリに導入された系統を横断的に評価する。*RBG2*領域の近くに出穂期関連遺伝子が座乗している場合、コシヒカリが遺伝背景ではあるが出穂期がずれてしまう。従って、出穂期が近い系統をグループ分けし、各々の検定には罹病性品種と抵抗性品種の移植を複数回行い出穂期を広げることにより比較として入れた。検定方法は論文(Mizobuchi et al. *Rice*, 2013, 6:13)に記述したやり方に従った。

(3) 作出した準同質遺伝子系統 *RBG2*-NIL の苗腐敗抵抗性の評価

もみ枯細菌病菌による病徴は苗腐敗と穂枯れであり、研究開始時点で単一の遺伝子で苗腐敗と穂枯れのいずれに対しても抵抗性を示す遺伝子は見出されていない。そこで、*RBG2*-NIL (QTL領域(約30kb)を罹病性品種に導入した系統)について、日本の主な栽培品種43品種とあわせて苗腐敗の対する抵抗性の比較を行う。検定方法は論文(Mizobuchi et al. *TAG*, 126(9) 2417-2425, 2013)に記述したやり方に従った。

4. 研究成果

(1) もみ枯細菌病抵抗性遺伝子 *RBG2* の発現解析および相補性検定

発現解析用のサンプリング(開花前後のしずい等)には非常の多数の個体が必要であるため当初、圃場で栽培した個体からのサンプリングを予定していたが、新型コロナウイルス感染拡大を防ぐための在宅勤務および交代勤務を行ったため、圃場での栽培に支障が生じ、実験を予定通り進めることが難しかった。そこで予定を変更して、すでにサンプリングをしていた抵抗性品種 K と罹病性品種 H のサンプル(開花 0 日および開花 1 日後のしずい)で *RBG2* の発現をリアルタイム PCR で調査したところ、抵抗性品種 K と罹病性品種 H のいずれのステージでも発現していることが分かった。しかしながら、サンプル数が少ないため詳細な発現量の比較はできなかった。現在圃場および温室栽培した *RBG2*-NIL および比較品種個体からサンプリングをして *RBG2* の発現を詳細に調べているところである。一方、抵抗性品種 K と罹病性品種 H の塩基配列情報は、農研機構が構築したデータベース(RAP-DB)から入手し、CRISPR/Cas9 による変異を入れる箇所候補の選定はできた。現在、シークエンスの確認をしているところである。

(2) 染色体置換系統(CSSLs)を用いた抵抗性評価

コアコレクション品種の *RBG2* のアリルタイプによる系統樹を作成したところ、いくつかのグループに分かれることがわかった。その結果を踏まえて、代表的なコアコレクション品種の染色体を遺伝背景「コシヒカリ」(罹病性品種)に導入した染色体置換系統(CSSLs)で *RBG2* 領域がコシヒカリに導入された系統を横断的に評価した。その結果、*RBG2* の由来となる抵抗性品種 K と系統樹で近い品種 A の *RBG2* 領域をコシヒカリに導入した系統が穂枯れ抵抗性を示すことが明らかになった。このことは、抵抗性品種 K 以外にも世界の複数の品種の *RBG2* アリルが今後育種母本として有用であることを示唆している。

(3) 作出した準同質遺伝子系統 *RBG2*-NIL の苗腐敗抵抗性の評価

RBG2-NIL は、遺伝子を導入した「ひとめぼれ」(罹病性品種)より苗腐敗に対する抵抗性程度がやや高かったものの、明確な抵抗性は示さなかった。このことからもみ枯細菌病(*Burkholderia glumae*)に由来する 2 つの病徴(苗腐敗症状および穂枯れ症状)に対する抵抗性をあわせて付与するには、複数の QTL を導入する必要があることが推測された(Mizobuchi et al. *Breeding Science*, 70(2) 221-230, 2020)。

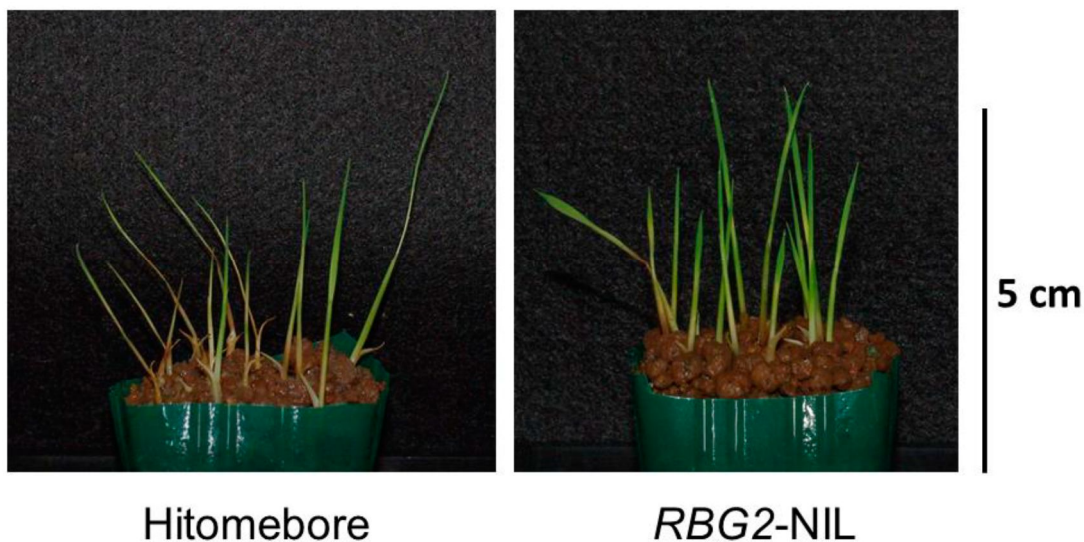


Fig. 1. Comparison of BSR resistance of 'Hitomebore' and *RBG2*-NIL.

RBG2-NIL is a near-isogenic line produced by introducing a BGR-resistance QTL (*RBG2*) from 'Kele' into 'Hitomebore'.

論文より転載 (Mizobuchi et al. *Breeding Science*, 70(2) 221-230, 2020)。

< 引用文献 >

Ritsuko Mizobuchi, Hiroyuki Sato, Shuichi Fukuoka, Seiya Tsushima, Tokio Imbe, Masahiro Yano, Identification of *qRBS1*, a QTL involved in resistance to bacterial seedling rot in rice. *TAG* 126(9) 2417-2425 2013

Ritsuko Mizobuchi, Hiroyuki Sato, Shuichi Fukuoka, Takanari Tanabata, Seiya Tsushima, Tokio Imbe, Masahiro Yano, Mapping a quantitative trait locus for resistance to bacterial grain rot in rice. *RICE* 6(1) 13 2013.

Ritsuko Mizobuchi, Hiroyuki Sato, Shuichi Fukuoka, Seiya Tsushima, Masahiro Yano, Fine mapping of *RBG2*, a quantitative trait locus for resistance to *Burkholderia glumae*, on rice chromosome 1 . *MOLECULAR BREEDING* 35(1) 15 2015.

Ritsuko Mizobuchi, Shuichi Fukuoka, Chikako Tsuiki, Seiya Tsushima, Hiroyuki Sato, Evaluation of major rice cultivars for resistance to bacterial seedling rot caused by *Burkholderia glumae* and identification of Japanese standard cultivars for resistance assessments. *Breeding Science* 70(2) 221-230 2020.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Mizobuchi Ritsuko, Fukuoka Shuichi, Tsuiki Chikako, Tsushima Seiya, Sato Hiroyuki	4. 巻 70
2. 論文標題 Evaluation of major rice cultivars for resistance to bacterial seedling rot caused by <i>Burkholderia glumae</i> and identification of Japanese standard cultivars for resistance assessments	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Breeding Science	6. 最初と最後の頁 221-230
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1270/jsbbs.19117	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 -

1. 著者名 Mizobuchi Ritsuko, Sugimoto Kazuhiko, Tsushima Seiya, Fukuoka Shuichi, Tsuiki Chikako, Endo Masaki, Mikami Masafumi, Saika Hiroaki, Sato Hiroyuki	4. 巻 13
2. 論文標題 A MAPKKK gene from rice, RBG1res, confers resistance to <i>Burkholderia glumae</i> through negative regulation of ABA	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-023-30471-9	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 溝淵律子、福岡修一、對木千加子、對馬誠也、佐藤宏之
2. 発表標題 日本の主要水稻品種のもみ枯細菌病菌による苗腐敗抵抗性の評価
3. 学会等名 日本育種学会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

病害抵抗性育種の最前線～もみ枯細菌病とごま葉枯病を中心として～
富山県農林水産総合技術センターでの講演（2018年11月8日）

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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------