

令和 3 年 6 月 11 日現在

機関番号：82111

研究種目：基盤研究(C)（一般）

研究期間：2018～2020

課題番号：18K05664

研究課題名（和文）いもち病菌の病原因子Rbf1の分子機能解明を目指した標的因子の探索

研究課題名（英文）Identification of the interacting proteins to clarify the molecular function of a virulence factor, Rbf1, in the rice blast fungus

研究代表者

西澤 洋子（Nishizawa, Yoko）

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・生物機能利用研究部門・ユニット長

研究者番号：40355756

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）：イネいもち病菌が感染時特異的に分泌するRbf1タンパク質の作用機構の解明を目指し、その作用部位を解析した。Rbf1をイネの細胞間隙あるいは細胞内に発現しうる形質転換イネを作製し、その葉いもち病抵抗性を評価した。その結果、分泌シグナル付きのRBF1遺伝子を導入したイネでは抵抗性が有意に低下したことから、Rbf1がイネ細胞間隙で機能することが示唆された。

次に、培養細胞を用いて10種類のキチンエリシター誘導性遺伝子の発現を解析した。その結果、分泌シグナルの有無に関係なく発現誘導パターンはコントロールと同様であったことから、Rbf1がイネの病害応答遺伝子の発現に直接作用する可能性は低いと考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

いもち病はイネだけでなく、近年はコムギでの被害が拡大するなど、依然として防除すべき重要病害であるため、半活物寄生菌であるいもち病菌の感染機構を分子レベルで理解することは学術的のみならず経済的にも重要である。いもち病菌の病原力に大きな影響を及ぼす感染時特異的発現タンパク質Rbf1がイネ細胞内ではなく、イネ組織に侵入したいもち病菌系の周辺で機能することを示唆した本研究成果は、今後の防除法の開発研究に資すると考えられる。

研究成果の概要（英文）：To elucidate the mechanism of the action the Rbf1 protein, which is specifically secreted from the rice blast fungus at the penetration stage, we analyzed the site of its action. We prepared the transgenic rice plants that expectedly accumulated Rbf1 in the intercellular spaces or the cytoplasm, and we evaluated their blast disease resistance. As a result, the rice plants introduced with the RBF1 gene with the secretion signal sequence showed significantly reduced resistance. The data suggested that Rbf1 functions at the intercellular spaces between rice and the blast fungus.

Next, we analyzed the expression of 10 chitin-elicitor-responsive genes using the transformed cell lines. The expression patterns induced after chitin-elicitor treatment were similar to that of the control line regardless of the presence or absence of the secretion signal sequence in the introduced RBF1 gene. Thus, it was unlikely that Rbf1 directly acts on the expression of rice disease responsive genes.

研究分野：植物感染生理学

キーワード：いもち病菌 イネ 病原性

### 1. 研究開始当初の背景

(1) イネやコムギに甚大な被害をもたらす病原菌類であるイネいもち病菌は半活物寄生菌であり、接種2日後位までの感染初期は、宿主の抵抗性反応を抑制しつつ宿主由来の膜に包まれた状態で侵入菌糸を伸ばす。この間、侵入菌糸からエフェクターと呼ばれる多種多様なタンパク質が分泌され、それらが宿主の免疫機構を回避する役割を担うと考えられているが、ほとんどのエフェクターの機能は不明であり、病原性の分子レベルでの理解が進んでいなかった。

(2) 感染初期に特異的に発現する遺伝子の中から、いもち病菌の病原性に大きくかかわるエフェクター遺伝子 *RBF1* が同定された。*RBF1* を破壊した変異いもち病菌株を接種したイネでは褐変物質の蓄積を伴う防御反応が起こり、菌はほとんど感染できなくなる等から病原性における *Rbf1* タンパク質の重要性は明らかになってきたが、その作用機構は不明であった。

### 2. 研究の目的

いもち病菌の病原性発現の鍵となる *Rbf1* タンパク質の作用機構の解明を目指し、*Rbf1* が機能するイネ内の部位を明らかにし、*Rbf1* と相互作用する因子を探索することを目的とした。

### 3. 研究の方法

(1) いもち病菌から分泌された *Rbf1* がどこで機能するのかを明らかにするために、イネの細胞質あるいは細胞膜外に *Rbf1* を発現する形質転換イネを作製し、いもち病抵抗性を評価した。すなわち、自殖次世代個体の葉身に対しいもち病菌胞子懸濁液をスポット接種し、5日後の菌体量を定量PCR法で数値化し、非形質転換イネのものと比較した。接種源として親和性の稲86-137株(野生株)、およびその *RBF1* 遺伝子欠損株 ( $\Delta rbf1$  株) を用いた。

(2) *RBF1* 発現によるイネの病害応答性の変化を評価するために、(1) で作出した形質転換イネから培養細胞を2系統ずつ作製し、キチンエリシター (*N*-アセチルキトオリゴ糖7量体 0.1  $\mu$ g/mL) で1時間あるいは6時間振とう処理した後、定量RT-PCR法によって10種類のキチンエリシター応答性遺伝子の発現量の変化を解析した。

### 4. 研究成果

(1) *Rbf1* をイネの細胞間隙、あるいは細胞質に蓄積させるためのベクターを3種類構築した(図1)。*RBF1* 遺伝子はコドン使用頻度をイネ用に改変し、その翻訳物を市販の抗体でも検出できるようにするため末端にHAタグを付加した (*OsRBF1-HA*)。それらのベクターでイネを形質転換し、以下の3種類の遺伝子組換えイネを作出した。Pubi-A イネ: トウモロコシのユビキチンプロモーター (Pubi) + *OsRBF1-HA*、Pubi-B イネ: Pubi + 分泌シグナル配列を削除した *OsRBF1-HA*、Pubi-C イネ: Pubi + 分泌シグナル配列をイネのキチナーゼ遺伝子のものと置換した *OsRBF1-HA*。いずれの系統においても転写レベルでは *OsRBF1* 遺伝子の恒常的発現が確認された。一方、翻訳レベルでは検出限界以下であったため、目的どおり細胞間隙あるいは細胞質に *Rbf1* タンパク質が存在しているかどうかは確認できなかった。



図1 形質転換イネ (Pubi-A, -B, -C 系統) に導入した外来遺伝子の構造。

Ubi prom: トウモロコシユビキチンプロモーター、EN: イネアルコールデヒドロゲナーゼ翻訳エンハンサー、SS: 分泌シグナル配列、3': シロイヌナズナヒートショックタンパク質遺伝子のターミネーターおよび Ti プラスミド NOS 遺伝子のターミネーター。

(2) (1) で作製した3種類のイネ系統 (Pubi-A, -B, -C) について葉いもち病抵抗性を評価した結果、Pubi-C イネでは  $\Delta rbf1$  株の病原性が完全に回復するレベルではなかったものの抵抗性が有意に低下したことから、*Rbf1* はイネの細胞外で機能することが示唆された (図2)。

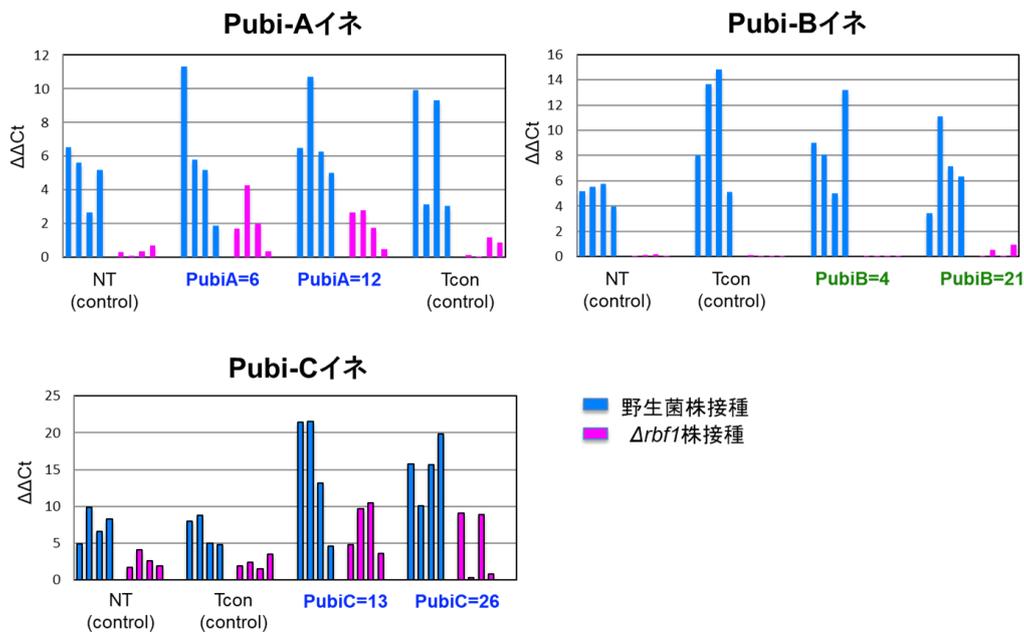


図2 接種5日後のイネ葉身におけるいもち病菌体量。

(3) Pubi-B イネおよび Pubi-C イネの種子から誘導したカルスにおける防御応答を解析した結果、分泌シグナルの有無に関係なくキチンゼリクター応答性遺伝子の発現誘導パターンはコントロールと同様であったことから、Rbf1 がイネの病害応答遺伝子の発現に直接作用する可能性は低いと考えられた (図3)。

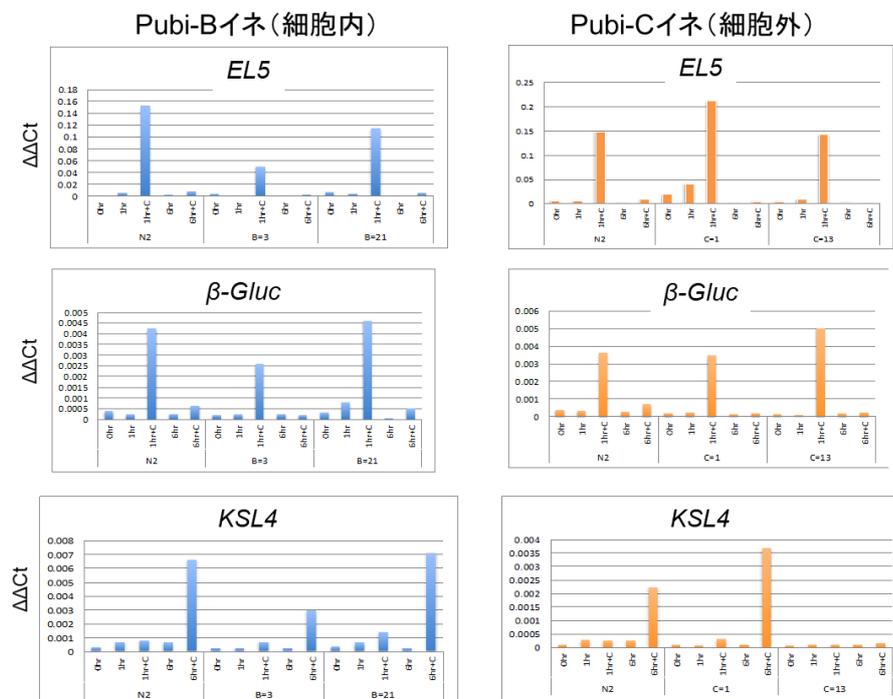


図3 防御関連遺伝子の定量 RT-PCR 結果例。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
--	---------------------------	-----------------------	----

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