

平成 21 年 5 月 18 日現在

研究種目：基盤研究（C）  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19580050  
 研究課題名（和文）イネいもち病菌の余剰染色体からの非病原性遺伝子 *AvrPik* のクローニング  
 研究課題名（英文）Molecular cloning of avirulence gene *AvrPik* from *Magnaporthe oryzae*  
 研究代表者  
 草場 基章（KUSABA MOTOAKI）  
 佐賀大学・農学部・准教授  
 研究者番号：90304881

研究成果の概要：イネいもち病菌 84R-62B 菌株の余剰染色体（1.6Mb 染色体）から非病原性遺伝子 *AvrPik* のクローニングを計画した。1.6Mb 染色体の特徴付けを実施し、他の非病原性遺伝子 *AvrPikp* も座乗すること、さらに、本染色体は体細胞分裂時に消失変異が生じることを明らかにした。また、他の研究者によりクローニングされた *AvrPik* 候補遺伝子を用いた検討の結果、本クローンが *AvrPik* であることを確認した。さらに、*AvrPik* のホモログとして *AvrPikm* の同定に成功した。

## 交付額

（金額単位：円）

|         | 直接経費      | 間接経費      | 合計        |
|---------|-----------|-----------|-----------|
| 2007 年度 | 2,300,000 | 690,000   | 2,990,000 |
| 2008 年度 | 1,400,000 | 420,000   | 1,820,000 |
| 年度      |           |           |           |
| 年度      |           |           |           |
| 年度      |           |           |           |
| 総計      | 3,700,000 | 1,110,000 | 4,810,000 |

研究分野：植物病理学

科研費の分科・細目：農学・植物病理学

キーワード：(1) *Magnaporthe oryzae* (2) rice blast (3) avirulence gene (4) *AvrPik*  
 (5) *AvrPikm* (6) supernumerary chromosome

## 1. 研究開始当初の背景

(1)背景：イネいもち病菌の防除には抵抗性イネ品種の栽培が重視されるが、育成した抵抗性品種が普及後、数年で罹病化する「抵抗性の崩壊」がしばしば生じる。これは、当該品種の有する抵抗性遺伝子に特異的に対応

する菌側の非病原性遺伝子に変異することにより生じると考えられる。そこで、本研究では「抵抗性の崩壊」を実際にもたらした非病原性遺伝子 *AvrPik* について、クローニングを試みた。1960年代の日本ではいもち病防除の切り札として抵抗性遺伝子 *Pik* を導入した

イネ品種クサブエが育成されたが、農家へ普及後、数年の内に高度罹病性品種に転落してしまった。*AvrPik* は *Pik* に対応する非病原性遺伝子であり、本遺伝子のクローニングは非病原性遺伝子の変異に関するメカニズムの解明に有効な情報をもたらすことが期待された。また、*AvrPik* は極めて興味深い性質を有する非病原性遺伝子として知られる。すなわち、*AvrPik* はイネいもち病菌 84R-62B 菌株では余剰染色体（以下、1.6Mb 染色体）に座乗している。また、後述の本研究の成果により、本遺伝子は抵抗性遺伝子 *Pikp* に対応する非病原性遺伝子 *AvrPikp* と連鎖すること、さらに、これまでの当研究グループの成果から、本遺伝子は抵抗性遺伝子 *Pikm* に対応する非病原性遺伝子 *AvrPikm* とも連鎖することが報告されている。これら抵抗性遺伝子は同一遺伝子座の複対立遺伝子であり、3つの非病原性遺伝子についても互いにホモログである等の関連が予想されていた。従って、本研究で試みた *AvrPik* のクローニングは近年植物病原菌の新規レースを生み出す機構として注目されている「Arms race」についても新規知見を提供するとが期待された。

(2) 動機：これまでに同様の非病原性遺伝子のクローニングは多くの研究者が取組んできた。すなわち、連鎖地図の作成ならびにそれを利用した染色体歩行法によるクローニング手法である。一方、その試みの多くは失敗に終わっている。これは、多くの研究例で原因不明なものの目的遺伝子の近傍配列がゲノミックライブラリー中に捕捉できず、染色体歩行が困難となる現象に直面したためである。一方、上記の通り 84R-62B では *AvrPik* は 1.6Mb 染色体に座乗している。また先に、申請者らは 84R-62B と *AvrPik* を保有しないイネいもち病菌との交配系を用いた遺伝解析により、1.6Mb 染色体は有するものの、*AvrPik* を保有していない変異菌株 (F1-327) を得た。従って、F1-327 の *AvrPik* 失活の原因となった 1.6Mb 染色体の構造変異部位を同定することにより染色体歩行法の技術的難点を回避し、*AvrPik* のクローニングが確実にできるものと期待された。

## 2. 研究の目的

イネいもち病菌 84R-62B の 1.6Mb 染色体から非病原性遺伝子 *AvrPik* のクローニングを行う。

## 3. 研究の方法

(1) AFLP 分析：供試菌株として、84R-62B および F1-327 を用いた。これら菌株の AFLP パターンを比較し、多型の認められた AFLP バンドについては、ポリアクリルアミドゲルから単離してクローニングを行った。これらク

ローニングされた AFLP バンドをプローブとして用い、パルスフィールド電気泳動法により分画した 84R-62B の染色体に対してハイブリダイゼーションを行った。これにより、クローニングされた AFLP バンドの 1.6Mb 染色体への座乗を検討した。

(2) F1-327 における病原性変異の検討：F1-327 を *Pik* 保有イネ品種関東 51 号に接種して得られた病斑から単孢子分離により後代菌株を得た。これら後代菌株の染色体をパルスフィールド電気泳動法により分画し、1.6Mb 染色体の保有について検討を行った。

(3) 1.6Mb 染色体座乗配列のクローニング：供試菌株として F1-327 および上述の F1-327 の後代菌株を用いた。これら菌株からの AFLP バンドのクローニングならびにクローニングされた AFLP バンドの 1.6Mb 染色体への座乗の検討は (1) に述べた方法に準じて行った。また、84R-62B と Y93-245c-2 の F<sub>1</sub> 子孫 115 菌株を供試し、イネ品種 K60 (抵抗性遺伝子 *Pikp* 保有) への接種実験を行った。そして、供試した子孫菌株集団中における本品種への非病原性 / 病原性の分離パターンと 1.6Mb 染色体の分離パターンとの関連を調べた。

(4) *AvrPik* 候補遺伝子配列をプローブとしたハイブリダイゼーション実験：供試プローブとして岩手生物工学研究所寺内良平博士より分譲を受けたプラスミドクローンをを用いた。本クローンにはインサートとして同博士らにより同定された *AvrPik* 候補遺伝子配列が含まれている。84R-62B と Y93-245c-2 の F<sub>1</sub> 子孫 60 菌株を供試し、それら菌株の全ゲノム DNA を制限酵素 *XhoI* で切断した。切断後、ゲル分画した DNA 断片に上記プローブをハイブリダイズさせ、検出されたハイブリダイゼーションバンドについて、供試菌株のイネ品種に対する病原性との分離パターンを解析した。また、84R-62B の染色体をパルスフィールド電気泳動により分画し、同様のハイブリダイゼーション実験を行った。

## 4. 研究成果

### (1) 主な成果：

AFLP 分析：AFLP 分析により 84R-62B および F1-327 間で認められた多型 (AFLP バンド) は F1-327 の *AvrPik* 失活の原因となった 1.6Mb 染色体の構造変異部位と関連が期待された。そこで、当該 AFLP バンドのクローニングを試みた。しかしながら、1.6Mb に座乗する配列は本実験ではクローニングされなかった。

F1-327 における病原性変異の検討：上記から、F1-327 の *Pik* 保有イネ品種に対する病原性は当初予想した 1.6Mb 染色体の構造変異には起因しないことも考えられた。そこで、F1-327 における *AvrPik* 失活変異のメカニズムを検討した。F1-327 を *Pik* 保有イネ品種関東 51 号に接種して得られた病斑から単孢子分離により後代菌株を得た。パルスフィールド電気泳動法により、F1-327 と後代菌株の染色体を比較したところ、後代菌株は 1.6Mb 染色体を保有しないことが明かとなった。すなわち、F1-327 の関東 51 号に対する病原性変異は単なる *AvrPik* の失活によるものではなく、体細胞分裂時（孢子形成時）に 1.6Mb 染色体自体に消失変異が生じたことに起因することが明かとなった。

1.6Mb 染色体座乗配列のクローニング：上記結果より、F1-327 とその後代菌株を用いて AFLP 分析を行った。これにより、F1-327 で検出され、その後代菌株で検出されない AFLP バンドを検索することにより 1.6Mb 染色体座乗配列を容易にクローニングできる実験系が確立した。また、*AvrPik* に連鎖する遺伝子についてさらに情報を得るため、当研究室で既に作出していた 84R-62B と Y93-245c-2 の F<sub>1</sub> 子孫菌株を供試し、これまで検討されていなかった抵抗性遺伝子に対応する非病原性遺伝子について遺伝分離を調査すると同時に 1.6Mb 染色体との連鎖解析を行った。その結果、*AvrPikp* は *AvrPik* さらには 1.6Mb 染色体自体とも密に連鎖することが明かとなった。

*AvrPik* 候補遺伝子配列をプローブとしたハイブリダイゼーション実験：研究実施期間内に他の研究グループが *AvrPik* 候補遺伝子のクローニングに成功した。そこで、同クローンの分譲を受けて更なる検討を行った。同クローンは 84R-62B の 1.6Mb 染色体にハイブリダイズすることが確認された。また、84R-62B とイネいもち病菌 Y93-245c-2 の交配子孫について同クロ

ーンをプローブとした RFLP 分析を行った。その結果、表現形から予想される *AvrPik* の分離パターンと完全に共分離するハイブリダイゼーションバンドが観察された。また、これに加えていくつかのバンドが子孫菌株から検出されたが、この中には興味深いことに *AvrPikm* の分離パターンと完全に共分離するものが見出された。すなわち、本研究の成果により、*AvrPik* のホモログとして *AvrPikm* の同定に成功したものと考えた。(2)得られた成果の国内外における位置づけ：*AvrPik* の単離については、研究実施期間内に他の研究者により候補遺伝子のクローニングがなされた。そのため、本研究成果の位置づけはこの先行研究結果の確認・補強としてのデータ提供となった。一方、いもち病菌のレース・品種間特異性を支配する非病原性遺伝子ではこれまで同族遺伝子のホモログの関係にあるものの報告は無く、*AvrPikm* の同定、すなわち、*AvrPik* と *AvrPikm* が互いにホモログであるとする本研究の結果は極めて新規性の高いものとなった。また、本研究では余剰染色体が体細胞分裂時に消失変異を起こすことを明らかにした。このような消失変異は、他菌を含めて報告例が皆無となっている。また、*AvrPikp* は、余剰染色体に座乗する非病原性遺伝子の例として他菌を含めて、当研究グループが先に報告した *AvrPik* に続く 2 番目の報告例である。(3)今後の展望：*AvrPik* と本研究で同定された *AvrPikm* の比較解析は、非病原性遺伝子の抵抗性遺伝子に対する特異性の決定機構を DNA レベルにおいて解明する端緒となる。また、*AvrPik*、*AvrPikm*、さらには、本研究で *AvrPik* との連鎖が予想された *AvrPikp* は宿主・寄生者の「Arms race」で予想される多様化選択により非病原性遺伝子座に生じた対立遺伝子の多型と考えられる。これら遺伝子のさらなる特徴付けは、「Arms race」の分子進化学的解明といった新規研究分野の開拓につながると考えられる。今後は、*AvrPikm* に加え、*AvrPikp* についてもクローニングを検討して行く。また、本研究で見い出された、余剰染色体の消失変異は、いもち病菌のレース変異に関与する可能性も考えられる。1.6Mb 染色体に非病原性遺伝子が座乗することも併せて、本余剰染色体のレース変異への関与については、興味深い研究課題として今後の展開が期待される。

## 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 1 件)

Motoaki Kusaba, Chao-Xi Luo, Hiromi Hanamura, Masakazu Misaka, Taiga Mochida, Yoshikatsu Fujita, Yukio Tosa, An avirulence gene to rice cultivar K60 is located on the 1.6-Mb chromosome in *Magnaporthe oryzae* isolate 84R-62B, Journal of General Plant Pathology, 74, 250-253, 2008, 査読有り

〔学会発表〕(計 3 件)

草場基章、三坂将和、藤田佳克、土佐幸雄  
イネいもち病菌 84R-62B および Y93-245c-2 の F<sub>1</sub> 菌株に認められた *AvrPik* が座乗する 1.6Mb 染色体の消失変異について、平成 20 年度日本植物病理学会大会、2008 年 4 月 26 日、松江市

三坂将和、羅朝喜、花村博美、持田泰雅、藤田佳克、土佐幸雄、草場基章、イネいもち病菌 84R-62B 菌株におけるレーズ判別イネ品種 K60 に対する非病原力遺伝子の座乗染色体について、第 75 回九州病害虫研究会、2008 年 1 月 31 日、熊本市

三坂将和、大鷹和也、平田健治、荒井治喜、善林薫、平八重一之、藤田佳克、土佐幸雄、草場基章、2001 年に採集された日本産イネいもち病菌における第一染色体部分配列を有する余剰染色体の分布について、平成 19 年度植物病理学会九州部会、2007 年 10 月 31 日、鹿児島市

## 6. 研究組織

(1)研究代表者

草場 基章 (KUSABA MOTOAKI)

佐賀大学・農学部・准教授

研究者番号：90304881

(2)研究分担者

土佐 幸雄 (TOSA YUKIO)

神戸大学・農学研究科・教授

研究者番号：20172158

(3)連携研究者