

令和 4 年 4 月 10 日現在

機関番号：81202

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K05981

研究課題名(和文) イネもみ枯細菌病菌に対する組織特異的な抵抗性遺伝子の単離

研究課題名(英文) Identification of a causal rice gene for resistance to Burkholderia glumae

研究代表者

石川 和也 (Ishikawa, Kazuya)

公益財団法人岩手生物工学研究センター・ゲノム育種研究部・研究員

研究者番号：40804703

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：東北の主力品種である「ひとめぼれ」とイネもみ枯細菌病菌が引き起こす苗腐敗症に対して抵抗性を示す「KALUHEENATI」の交配集団を用いた解析から、2箇所のQTLを得た。加えて、エチレンシグナリングがその耐病性に重要であることも明らかにした。さらに、これらの解析からエチレンシグナリングやエチレン合成に關与する有力な候補遺伝子を得ている。

KALUHEENATI遺伝子型で抵抗性を付与するQTL領域のみKALUHEENATI遺伝子型の、ひとめぼれ準同質遺伝子系統を作出した。この系統は、「ひとめぼれ」と比較しイネもみ枯細菌病菌が引き起こす苗腐敗症に対して抵抗性を示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

東北の主力品種である「ひとめぼれ」にエチレン前駆体である1-アミノシクロプロパン-1-カルボン酸(ACC)で処理すると、イネもみ枯細菌病菌が引き起こす苗腐敗症に対して抵抗性を示すことが明らかになった。これは、エチレンシグナリングがその耐病性に重要であることを示しており、新規農薬の創薬の基盤となる成果である。

さらに、「ひとめぼれ」よりイネもみ枯細菌病菌が引き起こす苗腐敗症に対して抵抗性を示す『ひとめぼれ準同質遺伝子系統』も作出した。今後、味や収量などを解析する必要はあるが、この系統は育種の母本として使用できる可能性があると思われる。

研究成果の概要(英文)：Bacteria seedling rot (BSR) is caused by *Burkholderia glumae* in rice under the high humidity and temperature conditions such as in nursery boxes. We detected 2 quantitative trait locus (QTLs) for BSR resistance on rice by using backcross inbred lines derived from a cross between Japanese cultivar Hitomebore and aus cultivar KALUHEENATI, which is showed resistance compared with Hitomebore to BSR. Additionally, we found that KALUHEENATI may showed resistance to BSR through the ethylene signaling. We identified the candidate genes that are involved in ethylene signaling or ethylene synthetic enzyme within both QTL regions.

We generated a near isogenic line (NIL) containing the KALUHEENATI allele of QTL. Moreover, NIL exhibited reduced susceptibility to BSR compared with Hitomebore.

研究分野：植物感染生理

キーワード：イネ イネもみ枯細菌病菌 苗腐敗症

### 1. 研究開始当初の背景

イネもみ枯細菌病菌は、高温多湿条件下でもみの褐変、枯死を引き起こす病気である。加えて、地球の温暖化に伴いもみだけではなく、葉鞘の褐変や枯死も引き起こし、世界中で深刻な問題を引き起こしている (Ham *et al.*, 2011)。それに伴い、箱育苗時に汚染している種子が存在すると、苗腐敗症を引き起こすことも報告されている (Azegami *et al.*, 2009)。特に、東北などの寒い地域ではもみや葉鞘であまり病徴を示さず、苗腐敗症が深刻な問題を引き起こしている。しかしながら、これまで苗腐敗症に対するイネの抵抗性については解析がほとんどされておらず、溝渕らが抵抗性に関与する quantitative trait locus (QTL) を同定したのみであった (Mizobuchi *et al.*, 2013)。

### 2. 研究の目的

東北の主力品種である「ひとめぼれ」と比較し、苗腐敗症に対して抵抗性を有するひとめぼれ準同質遺伝子系統を作出し、その耐病性のメカニズムを明らかにすることを目的とする。

### 3. 研究の方法

東北の主力品種である「ひとめぼれ」とスリランカ品種である「KALUHEENATI」、その交配集団 191 系統を用いて QTL 解析を行なった。イネもみ枯細菌病菌は MAFF302928 を使用した。接種実験は、温室で行なった。

### 4. 研究成果

(1) 「ひとめぼれ」と比較し「KALUHEENATI」は、イネもみ枯細菌病菌が引き起こす苗腐敗症に抵抗性を示したため、その交配集団 191 系統を用いて QTL 解析を行なった。その結果、染色体 3 番に KALUHEENATI 遺伝子型で抵抗性を付与する QTL (*KAL-qtl*)、染色体 4 番にひとめぼれ遺伝子型で抵抗性を付与する QTL (*Hit-qtl*) を検出した (Fig. 1)。

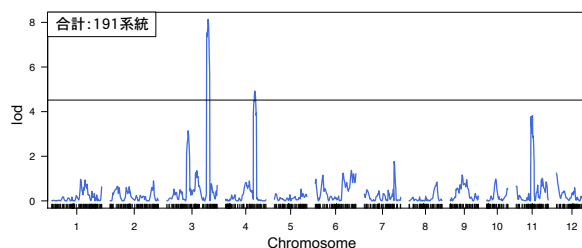


Fig. 1 QTL解析

(2) 各 QTL に存在する抵抗性因子を同定するため、接種後のサンプルを用いて RNA-seq 解析を行なった結果、「KALUHEENATI」では、コントロール条件下においても耐病性に関わる遺伝子の発現量は、「ひとめぼれ」と比較して高い値を示した。一方、「ひとめぼれ」では接種後にアブシジン酸 (ABA) 応答性マーカー遺伝子 (*OsRab16b*) の発現誘導が認められたが、「KALUHEENATI」では認められなかった (Fig. 2)。そのため、ABA シグナリングが苗腐敗症に対する抵抗性に及ぼす影響を解析した。抵抗性品種である「KALUHEENATI」に ABA 処理を行い、接種実験を行なった結果、Mock 処理区と比較して感受性を示した (Fig. 3)。さらに、

感受性品種である「ひとめぼれ」に ABA 合成阻害剤 (Abamine) を処理し解析を行なった結果、Mock 処理区より抵抗性を示した (Fig. 3)。これらのことから、ABA シグナリングは苗腐敗症に対する抵抗性を負に制御する事が明らかになった。

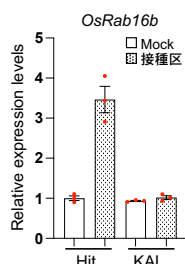


Fig. 2 *OsRab16b* の発現変化

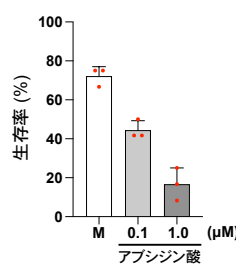


Fig. 3 アブシジン酸シグナリングは抵抗性を負に制御する

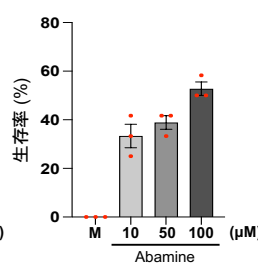


Fig. 3 アブシジン酸シグナリングは抵抗性を負に制御する

(3) 「KALUHEENATI」では、ABA シグナリングを負に制御する機構があると考え、これまでに ABA シグナリングと拮抗する事が報告されているサリチル酸 (SA) シグナリングやジャスモン酸 (JA) シグナリングそして、イネではエチレン (ET) シグナリングが ABA シグナリングと拮抗することが報告されていたことから、イネの子葉鞘に SA、メチル JA、ET 前駆体である ACC (1-アミノシクロプロパン-1-カルボン酸) 処理を行い、*OsRab16b* の発現量を解析した。その結果、ACC 処理時のみ *OsRab16b* の発現量の減少が認められたため (Fig. 4)、ET シグナリングが耐病性におよぼす影響を解析した。感受性品種である「ひとめぼれ」に ACC 処理、抵抗性品種である「KALUHEENATI」に ET

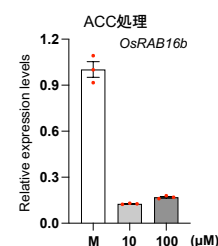


Fig. 4 ACC処理は *OsRab16b* の発現を抑制する

合成阻害剤 (Pyrazinamide: PZA) を処理し、接種実験を行なった。その結果、ACC 処理により生存率は上昇し、PZA 処理により生存率の減少が認められた (Fig. 5)。これらのことから、「KALUHEENATI」が示す抵抗性には、ET シグナリングが関与する事が示唆された。

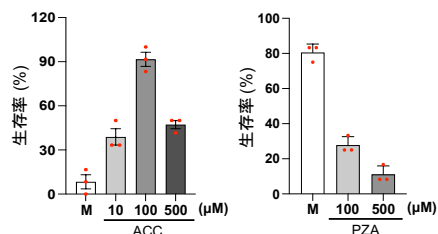


Fig. 5 エチレンシグナリングは抵抗性を正に制御する

(4) 以上の結果を基に、各 QTL における抵抗性因子の同定を試みた結果、*KAL.-qtl* には、ET シグナリング情報伝達因子である *OsEIN2* のホモログ (*OsEIN2h*) が存在していた。*OsEIN2h* の CRISPR 変異体を作成し、耐病性について解析を行なった結果、*OsEIN2h* CRISPR 変異体は野生株と比較して感受性を示した (Fig. 6)。さらに、野生株と比較して *OsEIN2h* CRISPR 変異体では、*OsRab16b* の発現量がコントロール区においても高かった。これらのことから、「KALUHEENATI」では *OsEIN2h* を介して、イネの耐病性を負に制御している ABA シグナリングを負に制御していることが一因で、抵抗性を示している事が示唆された。

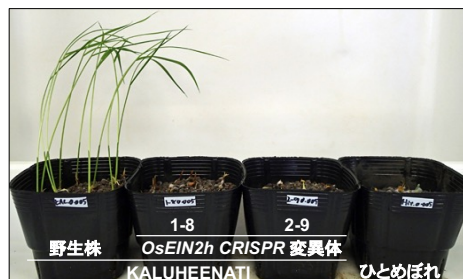


Fig. 6 *OsEIN2h* CRISPR 変異体は感受性を示す

一方、*Hit.-qtl* にはエチレン合成酵素である *OsACS2* が存在していた。「ひとめぼれ」では接種後 *OsACS2* の発現量の上昇が認められたのに対し、「KALUHEENATI」ではその誘導は認められず、コントロール条件下における発現量も「ひとめぼれ」と比較し非常に低かった (Fig.7)。さらに、「ひとめぼれ」の培養細胞に、エリシターであるキチン、ペプチドグリカン、*flg22* 処理を行なった結果、*OsACS2* の発現誘導が認められたことから、*OsACS2* は PTI で発現制御されている事が明らかになった。これらのことから、現在 *OsEIN2h* と *OsACS2* を有力な候補因子として、品種間差や下流因子などについて詳細な解析を行なっている。

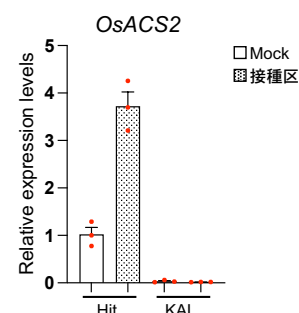


Fig. 7 *OsACS2* の発現量

(5) *KAL.-qtl* のみ KALUHEENATI 遺伝子型のひとめぼれ準同質遺伝子系統 (NIL: BC<sub>4</sub>F<sub>2</sub>) を作成し、イネもみ枯細菌病菌が引き起こす苗腐敗症に対する耐病性について解析を行なった結果、「ひとめぼれ」と比較し抵抗性を示す事が明らかになった (Fig. 8)。今後、収量や味などの農業形質について解析を行い、系統として使用できるか検討する予定である。また、NIL を用いて耐病性機構についても解析を行なっていく。



Fig. 8 NIL は抵抗性を示す

#### <引用文献>

Ham H. J., Melason A. R. and Rush C. M. *Burkholderia glumae*: next major pathogen of rice? *Mol. Plant Path.* (2011) 12 (4), 329-339

Azegami K. *Burkholderia glumae* and *Burkholderia plantarii*, the pathogens of bacterial grain rot of rice and bacterial seedling blight of rice, respectively. *MAFF Microorg Genet Resour Man* (2009) 26: 1-23

Mizobuchi R., Sato H., Fukuoka S., Tsushima S., Imbe T., Yano M. Identification of qRBS1, a QTL involved in resistance to bacterial seedling rot in rice. *Theor. Appl. Genet.* (2013) 126: 2417-2425

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 石川和也、伊藤和江、宇津志博恵、小笠原由美子、神崎英子、菊池秀子、阿部陽、寺内良平
2. 発表標題 イネもみ枯細菌病菌が引き起こす苗腐敗症に対するイネ抵抗性因子の同定
3. 学会等名 令和2年度 日本植物病理学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 石川 和也、伊藤 和江、宇津志 博恵、小笠原 由美子、神崎 英子、菊池 秀子、竹田 匠、寺内 良平、阿部 陽
2. 発表標題 イネもみ枯細菌病菌が引き起こす苗腐敗症に対する抵抗性因子の同定とひとめぼれ準同質遺伝子系統の作出
3. 学会等名 日本育種学会第140回講演会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 石川 和也、伊藤 和江、宇津志 博恵、小笠原 由美子、神崎 英子、竹田 匠、寺内 良平、阿部 陽
2. 発表標題 エチレンジグナリングはイネもみ枯細菌病菌が引き起こす苗腐敗症に対する抵抗性を正に制御する
3. 学会等名 令和4年度 日本植物病理学会大会
4. 発表年 2022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
---------------------------	-----------------------	----

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