

令和 5 年 5 月 12 日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K05968

研究課題名(和文) イネいもち病圃場抵抗性遺伝子Pid3-I1の作用機作の解明

研究課題名(英文) Study on function of quantitative resistance gene Pid3-I1 to blast fungus in rice

研究代表者

犬飼 剛 (Inukai, Tsuyoshi)

北海道大学・農学研究院・講師

研究者番号：90223239

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)：Pid3-I1はレース特異的な量的抵抗性遺伝子として同定されたが、レース特異性について精査したところ遺伝子の発現量が増加する生育後期では病原性と思われたレースに対しても抵抗性を示した。Pid3-I1は真性抵抗性遺伝子Pid3-I3の対立遺伝子でアミノ酸配列は6カ所しか違わない。このうちLRRに生じている4カ所の変異をPid3-I3に導入しこれを罹病性のゆきひかりで発現させたところ、T0世代の個体において擬似病斑が形成されPRタンパク質遺伝子の発現増加も認められた。これらの結果からPid3-I1は防御反応のautoactivationによりレース非特異的な抵抗性を誘導するものと考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

イネのいもち病抵抗性育種において特に求められる点は抵抗性のレベルの高さとともにその持続性、安定性にある。圃場抵抗性はいもち病菌側の病原性の変異によっても抵抗性が変動しにくい安定した抵抗性であるが、しかしこの抵抗性は十分に育種には生かされているとは言えない。いもち病圃場抵抗性遺伝子を有効に利用するにはその作用機作を明らかにすることも重要であることから、本研究では圃場抵抗性遺伝子Pid3-I1を対象にその作用機作について解析を進め、Pid3-I1は抵抗性反応のautoactivationに関わる遺伝子であり、いもち病菌のレースに対して非特異的に働くことを示した。

研究成果の概要(英文)：Pid3-I1 was reported as a quantitative blast resistance gene with race specificity. However, because the level of Pid3-I1 resistance was increased in an age-dependent manner and showed resistance to the blast isolate which was previously reported as a compatible race at the late growth stage, it was shown that the Pid3-I1 resistance was essentially non-race specific. Pid3-I1 is an allele at the Pid3 locus where a qualitative resistance gene Pid3-I3 was differentiated. The differences in amino acid sequences between Pid3-I1 and -I3 were only six sites and four of the six sites are occurred in the LRR domain. To determine which differences are important in the Pid3-I1 function, we made the chimeric gene Pid3- (I3-CC-NBS + I1-LRR). The T0 transgenic plants developed HR-like lesions spontaneously, and several PR genes were also upregulated in those plants. Taken together, we concluded that the Pid3-I1 resistance was due to the autoactivated defense reaction related with the LRR function.

研究分野：植物育種学

キーワード：イネ いもち病菌 圃場抵抗性 Rタンパク

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

圃場抵抗性とは病原体のレースに対する特異性が低い量的な抵抗性のことで、レース特異的かつ完全な抵抗性である真性抵抗性とは対照的な形質である。これまでイネいもち病菌圃場抵抗性の作用機作についてはほとんど不明であったが、圃場抵抗性 QTL の単離が進むにつれ、圃場抵抗性は従来考えられたよりも動的かつ多様な機作による抵抗性であることが明らかになってきた。申請者が単離したいもち病菌圃場抵抗性遺伝子 *Pid3-11* は真性抵抗性遺伝子座 *Pid3* に分化している対立遺伝子の一つで、R タンパク質をコードしているにもかかわらず量的な抵抗性を誘導するが、一方、その抵抗性は少なくとも幼苗期においてレース特異性を示した。*Pid3-11* は真性抵抗性を示す *Pid3-13* と比較すると配列に 6 アミノ酸の違いしかなく、そのうち 4 アミノ酸は LRR における変異であったことから、*Pid3-11* の機能に関しては、主に LRR の変異によっていもち病菌のエフェクターとの結合性が低下し真性抵抗性の発現が不完全になった可能性と、エフェクターとの相互作用なしに抵抗性が誘導される autoactivation が起きている可能性の両者が考えられた。

### 2. 研究の目的

*Pid3-11* は量的な抵抗性を誘導する一方、その抵抗性はレース特異性を示す。本研究では、まずこのレース特異性がいもち病菌側の病原力の強弱を反映した量的抵抗性の現れ方の違いである可能性を考え、*Pid3-11* の抵抗性が age dependent に変化し、レース特異的に見える反応が生育進度によって変化するかどうか調べた。次に *Pid3-11* の量的な抵抗性が真性抵抗性と同様いもち病菌の認識を介して誘導されるのか、あるいは autoactivation のような現象が起きているのか明らかにする目的で、*Pid3-11* と真性抵抗性遺伝子として働く *Pid3-13* との間のキメラ遺伝子を作成し、これらを劣性遺伝子 *pid3* をもつ水稻品種「ゆきひかり」などに導入してその表現型を調査した。*Pid3-11* と *Pid3-13* では、CC 及び NBS ドメインに各 1 箇所、LRR ドメインに 4 箇所変異が存在するため、CC 及び NBS ドメインの変異及び LRR の変異をそれぞれ入れ替えたキメラ遺伝子をもつ形質転換体を作成して表現型を解析した。また、抵抗性の誘導に重要な NBS ドメインと OsRAC1 ドメイン間の相互作用が *Pid3-11* における変異によって影響を受けているかどうか Yeast two hybrid (Y2H) 法を用いて調べた。

### 3. 研究の方法

#### 1) いもち病菌接種試験

いもち病菌抵抗性検定には菌系研 54-20 及び研 60-19 を用い、いもち病菌の接種は噴霧接種法により行った。噴霧用の孢子懸濁液は 5 万/ml に調整し、噴霧後は 20 時間 25℃、湿度 100% に設定した育苗箱でインキュベートした。接種処理終了後は隔離温室で生育させ、接種処理終了 1 週間後に抵抗性の判定を行った。

#### 2) 遺伝子発現解析

遺伝子発現量の定量的解析は、GenomeLab GeXP 遺伝子解析システムを用いた multiplex 定量 RT-PCR により行った。内部標準として *actin1*、*eEF-1a*、*eIF-4a* 及び *-tubulin* の 4 遺伝子を用い、これらの幾何平均を用いて各遺伝子の発現量を標準化した。

#### 3) キメラ遺伝子の作成と形質転換体の作成

既存の *Pid3-11* クローンに対して site-directed mutagenesis 行う、あるいは *Pid3-11* の部分配列に変異を導入した人工合成 DNA を forced cloning することで、キメラ遺伝子 *Pid3-* 及び *Pid3-* を作成した。作成したキメラ遺伝子は pBRACT ベクターに組み込み、アグロバクテリアウム法により水稻品種「ゆきひかり」、「日本晴」及び「台中 65 号」に導入した。

#### 4) Yeast two hybrid (Y2H)

Y2H は Matchmaker Gold 酵母ツーハイブリッドシステムを利用して行った。酵母のコンピテントセル化には Frozen-EZ Yeast Transformation II Kit を用い、Bait 用ベクター pGBKT7 及び Prey 用ベクター pGADT7 への目的遺伝子の導入には In-Fusion HD Cloning Kit を用いた。

### 4. 研究成果

#### 1) *Pid3-11* のレース特異性

*Pid3-11* による抵抗性は一部のいもち病菌レースに対しては効果が十分ではなく、少なくとも幼苗期においてレース特異性を示す。これまでのところ、*Pid3-11* はマイコウイルス MoV2 に感染している研 60-19 に対してのみ高度の罹病性を示していたため、MoV2 の感染により研 60-19 の病原性が変化した結果、*Pid3-11* による抵抗性が打破された可能性も考えられた。そこでシクロヘキシミドを含む培地で研 60-19 を生育させ、MoV2 フリーの菌系を得ることを試みた。その結果、元の研 60-19 とは菌そうが明らかに異なり、増殖が旺盛な菌系(研 60-19m) が得られた。しかし、RT-PCR を行った結果、研 60-19m から MoV2 が検出されたことから、研 60-19m では未同定のマイコウイルスが抜けたのではないかと考えられた。この研 60-19m を *Pid3-11* を有するイネ系統に接種したところ、研 60-19 に対するのとほぼ同程度の罹病性を示したため、今のところ

る MoV2 を含むマイコウイルスの感染が研 60-19 の病原性に与える影響については結論が得られていない。

一方、*Pid3-11* の抵抗性の評価はこれまで 5~6 葉期のイネを用いて行っていたが、さらに葉令の進んだイネを用いて研 60-19 に対する抵抗性の評価を行ったところ、より葉令が進んだイネでは *Pid3-11* による抵抗性が確認された。すなわち、5~6 葉期では研 60-19 に対して *Pid3-11* による抵抗性の効果はほとんど認められないが、葉令が進むにつれ抵抗性が増大し効果が現れてくるものと考えられた。さらに、*Pid3-11* 遺伝子の発現パターンを調べたところ第 8 葉期以降発現量が増加することがわかった。以上の結果から、*Pid3-11* による抵抗性はその遺伝子発現量と強く関連し age dependent に増加するが、逆に幼苗期における抵抗性レベルは低く、病原力の強い菌系に対して十分働かない結果、レース特異性を示しているように見えると考えられた。従って、*Pid3-11* は本質的にはレースに対して非特異的に働く抵抗性遺伝子であると考えられた。

## 2) *Pid3-11* と *Pid3-13* のキメラ遺伝子の作成及びそれらの表現型解析

上述の結果から *Pid3-11* はレース非特異的に働く量的な抵抗性遺伝子であると考えられたが、同じ遺伝子座で真性抵抗性遺伝子として働く *Pid3-13* とはアミノ酸配列レベルで 6 カ所しか違わない (図 1)。

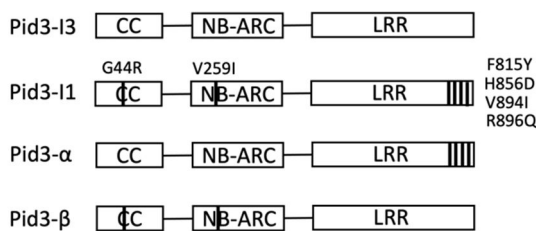


図1 *Pid3-13* 及び *Pid3-11* 間に見られるアミノ酸配列変異

これらの変異は CC 及び NBS ドメインにそれぞれ 1 カ所、並びに LRR ドメインに 4 カ所生じており、これらの変異によって抵抗性遺伝子の機能が大きく変化しと考えられる。どの変異が圃場抵抗性遺伝子として機能するのに重要であるか明らかにするため、これらの変異に関してキメラにもつコンストラクト *Pid3-* 及び *Pid3-* を作成し (図 1) 劣性遺伝子 *pid3* をもつ水稻品種「ゆきひかり」、「日本晴れ」、「台中 65 号」にそれぞれ導入してその表現型を解析した。その結果、*Pid3-* を導入した  $T_0$  個体ではいずれの遺伝的背景下においても擬似病斑を生じた。一方、同様な擬似病斑は *Pid3-* を導入した  $T_0$  個体では認められなかった。また、*Pid3-* を導入した「ゆきひかり」の健全葉において感染特異的タンパク質遺伝子の発現が有意に増加していることが明らかとなった。これらの結果から *Pid3-* を導入した系統では防御反応の autoactivation が起きているのではないかと考えられた。

*Pid3-* では、CC 及び NBS ドメインの配列は真性抵抗性を示す *Pid3-13* 型である一方、LRR ドメインは *Pid3-11* 型である。*Pid3-13* 及び *Pid3-11* ともにこれらの導入系統において擬似病斑は生じないことから、*Pid3-11* による抵抗性の作用機作として次のような仮説が考えられた。すなわち、1) *Pid3-11*, *13* ともに CC-NBS 及び LRR ドメイン間の相互作用によって活性が抑制されており、この制御には上述の 6 カ所の変異の組み合わせが重要である、2) *Pid3-13* では LRR といもち病菌のエフェクターとの間の相互作用によってドメイン間相互作用が解除され、これによって *Pid3-13* が活性化されて抵抗性が誘導される、3) *Pid3-* では CC-NBS と LRR の配列の組合せが *13* とも *11* とも異なるためドメイン間の相互作用が働かず R タンパク質が不活性化されない。これによって autoactivation が起こり、擬似病斑が生ずる、4) *Pid3-11* では CC-NBS 及び LRR 間の相互作用が *Pid3-13* の場合よりも弱く、緩やかに autoactivation が起きる結果、非特異的な抵抗性が誘導されやすくなっている。この仮説を検証するにはさらに *Pid3-13* 及び *Pid3-11* におけるドメイン間の相互作用をそれぞれ示す必要があるが、*Pid3-13* ですでに報告されている NBS ドメインとその下流で働く OsRAC1 間の相互作用が *Pid3-11* においても維持されていることがその前提となるため、次の実験でそれを確かめた。

## 3) *Pid3-11* タンパク質と OsRAC1 タンパク質間の相互作用

*Pid3-13* では、NBS ドメインと RAC1 タンパク質間の相互作用が抵抗性誘導のシグナル伝達において重要であることが報告されている。本実験では、タンパク質間相互作用を検出するため Y2H 法を用いた。OsRAC1 を Bait、*Pid3-11* 及び *13* の NBS ドメインを Prey とし、4 種類のレポーターを用いた選択を行って相互作用の検出を行ったところ、*Pid3-13*、*Pid3-11* ともにそれぞれの NBS ドメインと OsRAC1 との間で相互作用は検出されなかった。しかし、*Pid3-13* の NBS ドメインが OsRAC1 と相互作用することは免疫沈降法などによってすでに確かめられていることから 4 種類のレポーターすべてを用いた選択では stringency が高過ぎたのではないかと考え、次に、レポーターとして *MEL1* のみを用いた相互作用の検出を行った。その結果、*Pid3-13* 及び *Pid3-11* の NBS ドメインともに OsRAC1 と相互作用を示すことが明らかとなった。以上の結果から、*Pid3-11* の NBS ドメインに生じた変異は OsRAC1 との相互作用には影響を与えず、抵抗性のシグナル伝

達能力は維持されているものと考えられた。上述の 3) で考えられた仮説を検証するため、今後 *Pid3-11* 及び *Pid3-13* におけるドメイン間相互作用の解析を行う必要がある。

#### 4) 日本品種に見られる感染特異的タンパク質 OsPR1b 遺伝子の欠失変異

*Pid3-11* はいもち病菌に対して量的に働く抵抗性遺伝子である。この *Pid3-11* の効果をそれぞれ C039 とコシヒカリの遺伝的背景下で比較すると、C039 とコシヒカリの罹病程度は同定程度であるにも関わらず、コシヒカリの遺伝的背景下では *Pid3-11* の効果が C039 におけるそれと比べて低い傾向にあった。これは *Pid3-11* と相互作用して抵抗性を増大させる因子があることを示唆している。この因子を同定する目的で、いもち病菌感染時における防御関連遺伝子の発現パターンを C039 とコシヒカリで比較したところ、コシヒカリでは *PR1b* の発現が全く誘導されないことが見いだされた。*PR1* タンパク質は抗菌タンパク質として病原菌類に作用するだけでなく、タンパク質 C 末端の 11 アミノ酸がプロテアーゼによって切断され、CAPE1 ペプチドエリターとして抵抗性の誘導に関わることが他種植物で報告されており、イネにおいて *Pid3-11* を介した抵抗性誘導経路が CAPE1 を介した経路とクロストークしている可能性が示唆された。本研究では、まずコシヒカリにおいて *PR1b* が発現しない原因を調べた。その結果、*PR1b* のアミノ酸コード領域にレトロトランスポゾン様因子が挿入されており、この挿入変異によって遺伝子の機能が喪失していることが明らかになった。また、この *PR1b* 座における多型をマーカー化して日本の栽培品種における拡がり調べたところ、主要品種のほとんどがこの変異をもつことが示された。このため、現在の日本品種に *Pid3-11* を導入しても十分な圃場抵抗性の向上が期待できない可能性がある。今後、*PR1b* をコシヒカリに導入した過剰発現体を作成し、イネにおける *PR1b* の機能を解析するとともに *Pid3-11* との相互作用を解析する必要がある。

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 0件）

1. 著者名 Matsunaga Wataru, Inukai Tsuyoshi, Masuta Chikara	4. 巻 135
2. 論文標題 Progressive DNA demethylation in epigenetic hybrids between parental plants with and without methylation of the transgene promoter	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Theoretical and Applied Genetics	6. 最初と最後の頁 883-893
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00122-021-04004-9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Inukai Tsuyoshi, Kim Hangil, Matsunaga Wataru, Masuta Chikara	4. 巻 74
2. 論文標題 Battle for control of anthocyanin biosynthesis in two <i>Brassicaceae</i> species infected with turnip mosaic virus	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Experimental Botany	6. 最初と最後の頁 1659 ~ 1674
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/jxb/erac502	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 石原健人, 加藤美弥子, 犬飼剛
2. 発表標題 水稻品種コシヒカリのイネいもち病高度罹病性とOsPR1bにおけるトランスポゾン挿入変異との関係
3. 学会等名 日本植物病理学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 石原健人・犬飼剛
2. 発表標題 コシヒカリのPR1b座におけるDasheng挿入変異とその日本水稻品種内における拡がり
3. 学会等名 日本育種学会
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
---------	---------