

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 6月 1日現在

機関番号：82111

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21780009

研究課題名（和文） 機能休止型いもち病抵抗性遺伝子の進化プロセス

研究課題名（英文） Comparative analysis of homologs of a rice blast resistance gene *Pit* in gramineous species

研究代表者

林 敬子 (HAYASHI KEIKO)

独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構・中央農業総合研究センター病害虫研究領域・主任研究員

研究者番号：40391437

研究成果の概要（和文）：イネいもち病の病害抵抗性遺伝子 *Pit* についてイネ科植物を用いた比較ゲノム解析を行うことにより、*Pit* の相同配列はイネ科植物に広く存在し、一部においては完全な ORF 構造を持つことから、いもち病菌の他のレースもしくは、他の病原菌に対する抵抗性遺伝子として機能している可能性が示された。また、抵抗性機能を示す *Pit* ではなく、機能休止状態の *Pit* 相同遺伝子が、*Oryza* 属に広く存在するアリルであることが明らかとなった。これらの知見は、遺伝子の同定が可能な精度の高いファンクショナルマーカーの構築を可能にし、抵抗性育種に利用できることを示した。

研究成果の概要（英文）：Comparative analysis of homologs of a rice blast resistance gene *Pit* in *gramineous* species revealed that *Pit* coding sequences exist in not only *Oryza* but also *Secale*, *Triticum*, *Hordeum* and *Lolium*. Interestingly, specific sequences of susceptible-type *Pit* homologs in AA genome group of *Oryza* exhibited high homology to those of *Pit* homologs in BB and EE genome group of *Oryza*, showing that the resistant-type *Pit* (in some varieties of *O. sativa*) gene is recently evolved from the susceptible-type *Pit* gene. These results enabled to produce functional markers of *Pit* that allow for identification of the resistant-type *Pit* gene in rice germplasm. Such markers have a great advantage in resistance breeding because they can assess the existence of the resistance-type *Pit* gene without laborious inoculation tests.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|-----------|-----------|
| 2009年度 | 1,100,000 | 330,000 | 1,430,000 |
| 2010年度 | 1,100,000 | 330,000 | 1,430,000 |
| 2011年度 | 1,200,000 | 360,000 | 1,560,000 |
| 年度 | | | |
| 年度 | | | |
| 総計 | 3,400,000 | 1,020,000 | 4,420,000 |

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農学、育種学

キーワード：抵抗性、耐性

1. 研究開始当初の背景

植物が病原菌の侵入を防御する主要な戦略のひとつに、植物側の真性抵抗性タンパク質（*R*タンパク質）が病原菌側の侵入を示す

因子（非病原性タンパク質：AVRタンパク質）を特異的に認識する過敏感反応がある。*R*遺伝子は、病原菌の *Avr* 遺伝子と作用し合う共進化の結果、ゲノム中に多数存在し、多様性

も極めて高い。

イネの *R* 遺伝子のひとつ *Pita* と野生イネ (*O. rufipogon*) の相同遺伝子¹⁾が共通の AVR を認識することから、植物にとって有益な *R* 遺伝子 (機能型 *R* 遺伝子) は進化の過程で長期間維持されることが示されている。その一方、機能休止状態にある *R* 遺伝子 (機能休止型 *R* 遺伝子) は、多様な遺伝的多型を集団内に長期間維持する平衡選択型進化に関与することが示され²⁾、また多くの場合は発現量が低い³⁾。こうした知見より、多数の *R* 遺伝子は自然突然変異の蓄積により抵抗性機能を失い、新しい *R* 遺伝子を構築する材料となると考えられているが、AVR 認識能の変化等の進化様式は未だ明らかでない。

2. 研究の目的

イネのいもち病抵抗性 *R* タンパク質である *Pit* は、いもち病菌の非病原性タンパク質 AVR-*Pit* を認識すると考えられる。抵抗性イネ品種「K59」が保有する *Pit* (*Pit*^{K59}) と感受性イネ品種「日本晴」が保有する *Pit* (*Pit*^{Npb}) の相同遺伝子との比較解析により、*Pit*^{Npb} は *Pit*^{K59} と同じく AVR-*Pit* を認識し得るが、転写量が少ないために抵抗性を示さず、一方、*Pit*^{K59} では上流域に挿入されたレトロトランスポゾンが新たなプロモーターとなることで *Pit* の転写が活性化され、抵抗性機能が回復していることを明らかにした。このことは、罹病性イネ品種には、機能を完全に喪失した遺伝子ばかりでなく、機能休止型の遺伝子が存在していることを示す。

そこで、同じ祖先型 *Pit* 遺伝子から進化した相同遺伝子を保有するイネ科植物を用いた比較ゲノム解析を行い、同遺伝子がどのような進化過程を経て、抵抗性機能が休止したかを明らかにすることを目的として研究を進めた。

3. 研究の方法

イネ科植物における *Pit* 相同遺伝子を探索するため、(1)世界のイネコアコレクション 68 品種 (生物資源研究所) を含むインド型、日本型の栽培イネ品種、(2)野生イネのコアコレクション (国立遺伝学研究所)、(3)イネ科植物 (ドクムギ属、オオムギ属、コムギ属、ライムギ属、エノコログサ属等) を用いた。抵抗性イネ品種「K59」と罹病性イネ品種「日本晴」のゲノム配列をもとに設計したプライマーを用いてイネ科植物における相同遺伝子を探索し、塩基配列を確定した。また、オオムギの cDNA 配列の一部、ミナトカモジグサ、アワは、公開されているゲノム配列情報を利用した。

一部の相同遺伝子においては、AVR-*Pit* との関係解析するため、過剰発現させた「日本晴」の組み換え体を作成し、いもち病抵抗

性検定を行った。

4. 研究成果

(1) 主な結果

① 世界のイネコアコレクションを含むインド型、日本型栽培イネ品種を用いた解析

Pit 相同遺伝子は、日本型、インド型を問わず全ての品種に存在した。レトロトランスポゾンが挿入された *Pit* 遺伝子は、インド型 5 品種に見出された (図 1)。



図1 世界のイネコアコレクションにおける *Pit* 相同遺伝子の検出
Pit^{K59} 特異的 DNA マーカーと *Pit*^{Npb} 特異的 DNA マーカーを用いた検出。
01から68までの数字は、イネ品種を示す。

域の配列は、*Pit*^{K59} の配列と完全に一致し、転写量も *Pit*^{K59} と同程度であった。いもち病菌に対する各品種の反応パターンも「K59」と同一であることから、5 品種は「K59」型の *Pit* を保有すると考えられた。感受性品種間においては、ナンセンス変異を持つ相同性遺伝子も一部見出されたものの、多くても数アミノ酸程度の変異と非常に相同性は高かった。完全に *Pit*^{K59} のアミノ酸配列と一致するものは見出されなかった。また、少なくとも一部の上流配列は *Pit*^{Npb} の上流配列に類似しており、転写量も *Pit*^{Npb} と同程度であることから、イネ栽培品種においては、インド型、日本型を問わず *Pit*^{Npb} 型の構造が広く存在し、偶然 *Pit* の上流域にレトロトランスポゾンが挿入した *Pit*^{Npb} 型の一つが *Pit*^{K59} となったと推測された。

② 野生イネのコアコレクションを用いた解析

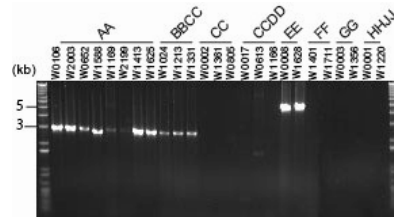


図2 野生イネにおける *Pit* 相同遺伝子の PCR パターン
W以下の番号はコアコレクションにおけるアクセッション番号を示す。
上欄はゲノムの種類を示す。

野生イネのコアコレクション (国立遺伝学研究所) のうち、AA、CC、BBCC、CCDD、EE、FF、GG および HHJJ の各ゲノムを含む野生イネ 25 系統の DNA を鋳型に PCR を行った。その結果、AA、BB、EE、FF ゲノムを鋳型とした場合に PCR 産物の増幅が認められた (図 2 ; FF は別条件で増幅)。このことから、少なくとも、上記の 4 種類のゲノムを有する野生イネには、*Pit* 相同遺伝子が

存在することが示唆された。これらの塩基配列を解析した結果、*Pit* の相同配列が確認され、EE ゲノムを有する 2 系統には挿入配列が認められた。他の *Oryza* 属ゲノムにおいても挿入、欠失はあるものの、*Pit*^{K59} とのアミノ酸配列の類似性は 96% 以上であった。AA、BB、FF の各ゲノムにおいては、*Pit* の N 末から C 末までに相当する完全な ORF 構造を保持する系統が存在した。また、FF ゲノムの上流配列は、*Pit*^{Npb} と全く相同性がない一方、AA、BB、EE の上流配列は相同性が高かった。AA ゲノム以外の染色体をもつ野生稲にも *Pit*^{Npb} の上流配列と相同性の高い配列が見出されたことから、*Pit*^{Npb} 遺伝子周辺の基本構造は、*Oryza* 属野生イネに広く存在すると考えられる。野生イネの多様な草型によるサンプリング時期の植物状態の違いを考慮する必要があるものの、一部の野生イネの転写量は、*Pit*^{K59} より高い結果が得られた。AA、FF ゲノムにおける相同遺伝子を過剰発現させた組み換え体を作成し、いもち検定を行ったが、「K59」と同程度の強い抵抗性は見出されなかった。

③ イネ科植物（ドクムギ属、オオムギ属、コムギ属、ライムギ属、エノコログサ属等）を用いた解析

Oryza 属以外のイネ科植物のゲノム DNA を鋳型として PCR を行った結果、オオムギ、コムギ、ライムギ、アワ、オーチャードグラス、イタリアンライグラスで PCR 産物の増幅が認められた。



図3 イネ科植物における*Pit*相同遺伝子の系統樹
赤色は完全なORF構造を保持する系統が見つかった植物を示す。

トカモジグサには、*Pit* の N 末から C 末までに相当する完全な ORF 構造を保持する品種、系統の存在が明らかとなった(図 3)。また、オオムギ、コムギ、アワ、ミナトカモジグサの上流配列は、*Pit*^{Npb} の上流配列と相同性がなかった。オオムギ、コムギの転写活性は *Oryza* 属よりも低いと考えられたが、*Pit*^{Npb} 型と同様に長い 5' -UTR を有していた。このことは、進化の過程で *Oryza* 属とオオムギ属が分化した後も、長い 5' -UTR の配列を保持する必要性があったことを示唆する。オオムギについては、相同遺伝子を過剰発現させた組み換え体を作成し、いもち検定を行ったが、「K59」と同程度の強い抵抗性は見出されなかったことから、イネいもち病菌由来

AVR-Pit の認識能は極めて低いことが示された。

(2) 得られた成果の国内外における位置づけとインパクト

イネいもち病抵抗性育種では、いもち病抵抗性に関わる性質を把握するために親品種や育成系統が保有する抵抗性遺伝子の種類を同定する場合がある。抵抗性遺伝子の種類の同定には、複数種類のいもち病菌を用いた接種試験が必要だが、DNA マーカーで遺伝子の種類を検出できれば、検定作業の煩雑さを解消できる。しかしながら、特定の交配親を用いた連鎖解析で作出した DNA マーカーをそのまま他の品種に利用することはできず、広汎な品種で抵抗性遺伝子の種類を特定できるような DNA マーカーを作成するには、様々な品種の遺伝背景を考慮する必要がある。本研究では、インド型、日本型栽培イネ品種と野生稲における *Pit* 遺伝子の進化を解明する過程で、*Pit* 遺伝子の基本構造は *Pit*^{Npb} 型であり、*Pit*^{K59} 型におけるレトロトランスポゾンの挿入は限定的な系統で引き起こされたことを明らかにした。この知見を応用し、*Pit* 遺伝子のファンクショナルマーカーの構築が可能となった。本研究により、イネのいもち病抵抗性遺伝子の進化の解析は、抵抗性のメカニズムを解明するうえで重要である一方、進化を解明する過程で得られた知見を応用することで育種に直接貢献できることが示された。

(3) 今後の展望

本研究では、残念ながら *AVR-Pit* を *Pit*^{K59} と同レベルに認識するオオムギ、野生イネ系統由来の遺伝子を見出すことはできなかったが、イネ科ゲノムにイネいもち病抵抗性遺伝子の相同遺伝子が広く保有されていることが明らかになった。一つの抵抗性遺伝子が複数の病害の抵抗性に関与している例が報告されていることから、イネいもち病以外の病害抵抗性に関与している可能性も含め解析を展開したい。その一方、*Pit*^{Npb} 特有の上流配列は、*Oryza* 属にのみ存在する配列であること、また野生イネ系統間で転写量の違いがあることが示されたことから、イネいもち病抵抗性遺伝子 *Pit* としての特性は、*Oryza* 属で形成されたと考えられる。

イネいもち病抵抗性遺伝子 *Pit* の相同遺伝子がイネ科植物に広く存在することから、他のイネいもち病抵抗性遺伝子の相同遺伝子も同様にイネ科植物に広く存在する可能性が高い。今後、他の病害抵抗性を考慮しつつ、更に詳細な転写解析を含めた比較解析を進めることにより、種の分化と抵抗性遺伝子の分化の関係を解き明かしたい。

引用文献

- 1) Huang, C.L. et al. Genetics, 179, 1527-1538, 2008
- 2) Holub, E.B. Nat Rev Genet, 2, 516-527, 2001
- 3) Tan, X. et al. BMC Plant Biol, 7, 56., 2007

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)

- ① Keiko Hayashi, Nobuko Yasuda, Yoshikatsu Fujita, Shinzo Koizumi, Hitoshi Yoshida. Identification of the blast resistance gene *Pit* in rice cultivars using functional markers. Theoretical and Applied Genetics 121, 1357-1367, 2010. 査読有り

〔学会発表〕(計4件)

- ① 林敬子、安田伸子、吉田均、イネ科植物におけるいもち病真性抵抗性遺伝子 *Pit* の進化、日本育種学会 第120回大会、2011年9月23日、福井県立大学
- ② 林敬子、安田伸子、藤田佳克、小泉信三、吉田均、ファンクショナルマーカーをもちいたイネいもち病真性抵抗性遺伝子 *Pit* 保有品種の同定、日本育種学会 第118回大会、2010年9月25日、秋田県立大学
- ③ Keiko Hayashi, Nobuko Yasuda, Yoshikatsu Fujita, Shinzo Koizumi, Hitoshi Yoshida, Identification of the blast resistance gene *Pit* in rice cultivars using functional markers, The fifth international rice blast conference, 2010年8月12日, Arkansas, USA
- ④ 林敬子、プロモーター化した転移因子ーレトロトランスポゾンによる機能休止型病害抵抗性遺伝子の活性化、日本遺伝学会 第81回大会、2009年9月17日、信州大学

6. 研究組織

(1) 研究代表者

林 敬子 (HAYASHI KEIKO)

(独) 農研機構・中央農業総合研究センター・病害虫研究領域・主任研究員

研究者番号：40391437