

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25年 6月 4日現在

機関番号：82111

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22580055

研究課題名（和文）真性抵抗性との比較解析によるイネいもち病圃場抵抗性機作の解明

研究課題名（英文）Characterization of the rice blast partial resistance using comparative analysis with the complete resistance

研究代表者

鬼頭 英樹 (KITO HIDEKI)

独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構・東北農業研究センター水田作研究領域・主任研究員

研究者番号：40455308

研究成果の概要（和文）：イネいもち病圃場抵抗性の機作解明のため、圃場抵抗性遺伝子 *Pi34* の単離、および遺伝子・細胞レベルで真性抵抗性遺伝子との抵抗性反応の比較解析を行った。遺伝子発現抑制により相補性が確認された *Pi34* 候補遺伝子 OMG02 は、2 個のエクソンからなる機能未知遺伝子であった。いもち病菌感染時の *Pi34* 保有系統における抵抗性反応を真性抵抗性と比較した結果、葉鞘表皮細胞では真性抵抗性遺伝子を保有する系統と同様の反応を示した。一方、葉身における活性酸素蓄積パターンは接種 24 時間後では真性抵抗性と類似性を示したが、48 時間後では異なった。

研究成果の概要（英文）：

In this study, we have cloned the rice blast partial resistance gene *Pi34* and compared the cytological reaction carrying *Pi34* and complete resistance genes. RNAi and inoculation assay confirmed that OMG02 was *Pi34*. OMG02 was predicted as the gene of unknown function with two exons. Responses of rice sheath epidermal cells carrying *Pi34* to rice blast infection were similar to those carrying a complete resistance gene. The other hand, the reactive oxygen species (ROS) accumulation in infected leaf blades epidermal cells of NILs carrying either *Pi34* or a complete resistance gene indicated that manners of ROS accumulation were similar to each other in 24 hours post inoculation (hpi) but differed in 48hpi.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,300,000	390,000	1,690,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2012年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農学・植物病理学

キーワード：病害抵抗性・いもち病・圃場抵抗性遺伝子

1. 研究開始当初の背景

(1) イネいもち病に対する圃場抵抗性は真性抵抗性に比べて抵抗性崩壊の危険性が低いことが知られているが、その理由は明らかになっていない。

(2) 単離されたいもち病圃場抵抗性遺伝子の数が少なく、抵抗性機作についても不明な点が多い。

(3) いもち病圃場抵抗性遺伝子 *Pi34* は圃場抵抗性強品「中部 32 号」で同定され、QTL 解析

および精密連鎖解析により、11 番染色体上に位置づけられた。また、*Pi34* 保有品種を特異的に強く侵すもち病菌の遺伝解析から、もち病菌は *Pi34* に対応する非病原力遺伝子 *AVR-Pi34* を保有していることが明らかとなっている。

2. 研究の目的

いもち病圃場抵抗性遺伝子 *Pi34* を、単離するとともに、いもち病圃場抵抗性と真性抵抗性を、遺伝子の構造、いもち病菌感染時の抵抗性関係遺伝子群の発現変化およびいもち病菌の侵入過程におけるイネ細胞反応について比較することで、圃場抵抗性の機作の一部を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) いもち病圃場抵抗性遺伝子 *Pi34* の単離

①ショットガンシーケンス法によって解読された BAC クローン Ch21I21 および精密シーケンスが行われた Ch46F14 のインサート配列に対して SuperSAGE 法によって *Pi34* 保有品種で特異的に発現しているタグから *Pi34* 候補となる遺伝子を選抜した。

②塩基配列のホモロジーから OMG02 を第一候補遺伝子として塩基配列解析を行った。ゲノム配列を元にプライマーを作成し、RT-PCR 法によってイントロンを決定した。cDNA の 5' および 3' 末端の決定は RACE 法を用いて行った。

③OMG02 の cDNA 部分配列を RNAi 用バイナリーベクター pANDA にサブクローニングし、*Pi34* 保有系統「中国 IL1 号」へアグロバクテリウム法により形質転換した。得られた OMG02 の T₀ および T₁ 発現抑制個体に導入された RNAi 誘導配列のコピー数をサザンハイブリダイゼーションにより確認した。形質転換個体に親和性いもち病菌株 Kyu89-246 を接種し、T₀ 発現抑制個体については葉鞘接種 72 時間後の細胞反応、T₁ 発現抑制個体については葉身噴霧接種 5 日後の病斑面積率により抵抗性程度を評価した。噴霧接種後の T₁ 発現抑制個体における OMG02 の転写量をリアルタイム PCR 法により解析した。

④BAC クローン Ch21I21 を *Sau3AI* で部分消化し、バイナリーベクター pYLTAC7 を用いてサブゲノミックライブラリーを作成した。OMG02 の全長を含むクローンは PCR 法によってスクリーニングした。

(2) 圃場抵抗性と真性抵抗性の比較解析

①圃場抵抗性遺伝子 *Pi34* と真性抵抗性遺伝子 *Pib* をそれぞれ保有するコシヒカリ同質遺伝子系統 (*Pi34*-NIL および *Pib*-NIL) および「コシヒカリ」を用いて、葉鞘感染細胞における接種後の菌糸侵入率、菌糸の分枝・伸長割合、細胞死亡率について顕微鏡観察により解

析した。

②*Pi34*-NIL および真性抵抗性遺伝子 *Pizt* のコシヒカリ同質遺伝子系統 *Pizt*-NIL、「コシヒカリ」の 3 系統・品種を用いて、5 葉期の葉身に噴霧接種を行い、接種後の葉身表皮細胞に蓄積された活性酸素を

3,3'-Diaminobenzidine (DAB) 染色により染色し観察した。

③*Pi34*-NIL、*Pib*-NIL、「コシヒカリ」の 3 系統・品種に対する親和性菌および非親和性菌を接種し、活性酸素蓄積に差が見られた 24 時間および 48 時間後における mRNA を抽出した。SuperSAGE 法を用いてそれぞれの mRNA について網羅的遺伝子発現解析を行った。接種 24 時間後については得られたデータから、2 種の NIL 間で発現量に差異があったタグを抽出した。

4. 研究成果

(1) いもち病圃場抵抗性遺伝子 *Pi34* の単離

①BAC クローン Ch21I21 および Ch46F14 に含まれるゲノミック DNA (推定サイズ 200kb) の塩基配列から、いもち病感染時に発現している配列を選抜し、候補となる推定遺伝子を 3 つ選抜した。ホモロジー検索から候補遺伝子の機能を推定し、OMG02 を *Pi34* の第一候補遺伝子として以降の解析を進めることにした。RT-PCR の結果、OMG02 は 2 個のエクソンからなる遺伝子であることが明らかとなった。さらに、RACE 法および RT-PCR 法により OMG02 の完全長 cDNA 配列を解読した結果、OMG02 は既知の真性抵抗性遺伝子 *Pib* に見られるような NBS-LRR 構造をコードしていなかった。いもち病感受性品種「日本晴」の対立遺伝子と比較した結果、中国 IL1 号型アレルの第 1 エクソンには欠失が存在した。また、第 2 エクソンに比べ、第 1 エクソンの相同性は低かった。以上の結果から、*Pi34* は新規の構造を持つ抵抗性遺伝子であり、第 1 エクソン領域が主として圃場抵抗性に関与する可能性が高いと推測した。

②OMG02 発現抑制コンストラクトを導入した「中国 IL1 号」の T₀ 発現抑制個体を、9 系統 36 個体得た。形質転換個体に導入された RNAi 誘導配列は 1~5 個であった。これら T₀ 発現抑制個体にいもち病菌を葉鞘接種し、接種 72 時間後のイネ細胞の反応についてベクターコントロール (vc) 個体と比較した。その結果、OMG02 の T₀ 発現抑制個体では、全ての個体において菌糸侵入と隣接細胞への菌糸伸展が認められたが、「中国 IL1 号」および vc では菌糸の隣接細胞への侵入・伸展は観察されなかった。さらに、T₁ 発現抑制個体の葉身噴霧接種後の遺伝子転写量と抵抗性表現型を調査した結果、接種 24 時間後の本遺伝子の転写量は減少し、接種 5 日後の病斑面積率は vc の T₁ 発現抑制個体よりも増加していた

(図 1)。このことから、OMG02 がいもち病抵抗性に関与することが確認された。

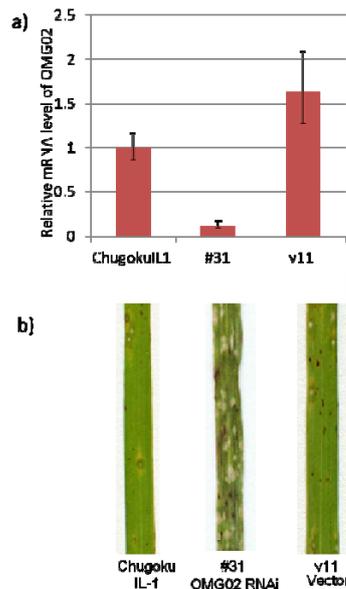


図 1 OMG02 発現抑制個体における表現型

「中国 IL1 号」、発現抑制個体、ベクターコントロール個体にいもち病菌株 Kyu89-246 を噴霧接種した a) 24 時間後の OMG02 の転写量 (N=3) b) 5 日後の発病。

③OMG02 を含む BAC クローンのサブゲノミックライブラリーを作成し、OMG02 を含むサブクローンを 10 個選抜した。

(2) 圃場抵抗性と真性抵抗性の比較解析

①葉鞘接種 36 時間後において、「コシヒカリ」と *Pi34-NIL* と *Pib-NIL* の付着器直下の葉鞘表皮細胞への菌糸侵入を調べた結果、「コシヒカリ」と *Pi34-NIL* 間では有意差が認められなかったが、*Pib-NIL* では他の 2 系統に比べ有意に低い侵入率を示した。また、被侵入イネ細胞における菌糸の分岐および隣接細胞への伸展は、「コシヒカリ」でのみ観察され、*Pi34-NIL* および *Pib-NIL* では観察されなかった (図 2a)。接種 30 時間後における *Pib-NIL* および *Pi34-NIL* の付着器下イネ細胞の細胞死頻度は同程度を示し、「コシヒカリ」よりも有意に高かった (図 2b)。接種 24 時間後における付着器下イネ細胞における活性酸素の蓄積は細胞死の反応と同様に *Pi34-NIL* と *Pib-NIL* 間で類似した傾向を示した (図 3)。このことから圃場抵抗性遺伝子 *Pi34* は葉鞘表皮細胞においては、いもち病菌の侵入を抑制しないが、侵入を許した後は真性抵抗性遺伝子 *Pib* と同様の反応を示すことが明らかになった。

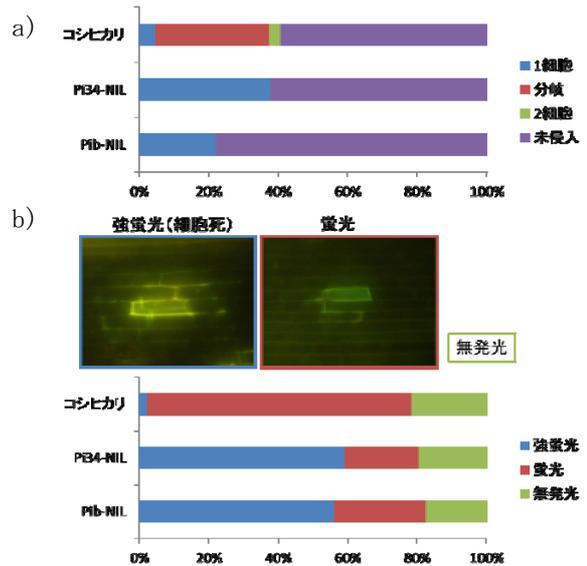


図 2 葉鞘表皮細胞の感染応答

いもち病菌付着器直下のイネ表皮細胞における a) 接種 36 時間後の被侵入率および菌糸伸展割合、b) 接種 24 時間後の自家蛍光観察による細胞死の観察。

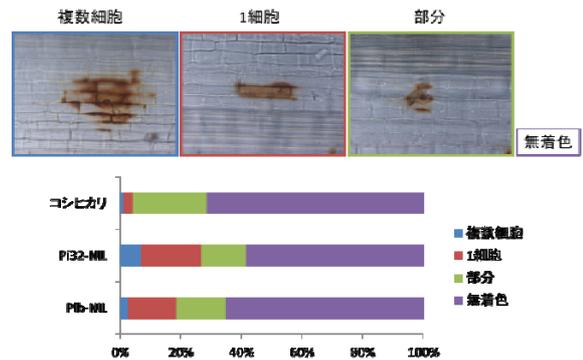
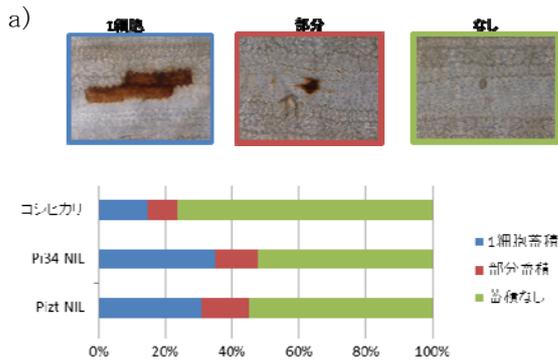


図 3 DAB 染色によるいもち病菌付着器直下のイネ葉鞘表皮細胞における活性酸素蓄積の検出

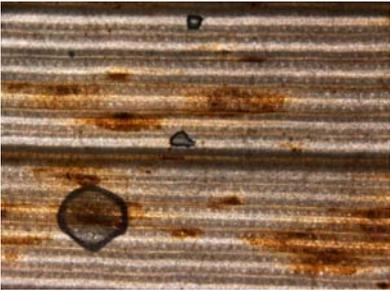
②いもち病菌を接種した葉身表皮細胞における活性酸素蓄積を観察した結果、接種 24 時間後では、*Pi34-NIL*、*Pizt-NIL* ともにいもち病菌付着器直下のイネ葉身細胞において DAB による 1 細胞着色が多く観察される一方、「コシヒカリ」での 1 細胞着色は有意に少なかった。接種 48 時間後では、*Pizt-NIL* では被侵入細胞およびその隣接細胞の細胞単位で強い着色が認められたが、*Pi34-NIL* では着色の境界が判然とせず「コシヒカリ」と類似した表現型を示した (図 4)。このことから、*Pi34-NIL* における活性酸素蓄積は、接種 24 時間後では真性抵抗性と類似したパターンを示すが、48 時間には感受性と類似したパターンになることが明らかとなった。さらに、葉身と葉鞘では圃場抵抗性の機作が異なることが明らかになった。



b) 「コシヒカリ」



Pi34-NIL



Pizt-NIL



図4 イネ葉身における活性酸素蓄積
噴霧接種 a) 24 時間後、b) 48 時間後

③SuperSAGE法による接種24時間後における発現遺伝子の網羅的解析を行った結果、Pi34-NILにおいてPib-NILよりも強く発現誘導あるいは抑制されるタグをそれぞれ584個、130個、両系統に共通して感染による同程度発現誘導・抑制されるタグをそれぞれ21個、8個、Pi34-NILでのみ恒常的に発現するタグを17個得た。接種48時間後のデータについては解析中である。

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)

[学会発表] (計7件)

①鬼頭英樹、善林 薫、いもち病圃場抵抗性遺伝子 *Pi34* の単離および感染初期応答における真性抵抗性との比較、平成25年度日本植物病理学会大会、岐阜市、2013

②Hideki Kito, Kaoru Zenbayashi-Sawata, Cloning of rice blast resistance gene *Pi34* and comparative analysis to explore a cue of durable resistance, XV International Congress on Molecular Plant-Microbe Interactions abstracts, 京都市、2012

③鬼頭英樹、善林 薫、いもち病圃場抵抗性遺伝子 *Pi34* 候補領域の解析、平成24年度日本植物病理学会大会、福岡市、2012年

④鬼頭英樹、善林 薫、中島敏彦、真性抵抗性との比較によるいもち病圃場抵抗性遺伝子 *Pi34* の細胞反応および発現解析、平成23年度日本植物病理学会大会、府中市、2011年

⑤Hideki Kito, Kaoru Zenbayashi-Sawata, Toshihiko Nakajima, Molecular and cellular characterization of a Koshihikari NIL introduced the partial resistance gene *Pi34*, The 5th International Rice Blast Conference, アーカンソー州、アメリカ合衆国、2010.

⑥Hideki Kito, Kaoru Zenbayashi-Sawata, Toshihiko Nakajima, Cytological and genetic responses of near isogenic-lines carrying rice blast resistance genes, 2010 APS annual meeting, ノースカロライナ州、アメリカ合衆国

⑦Kaoru Zenbayashi-Sawata, Hideki Kito, Toshihiko Nakajima, Shinzo Koizumi, Fine Mapping of the Partial Resistance Gene to Blast, *Pi34*, and Anyalysis of its Gene-for-Gene Relationship in Rice, The 5th International Rice Blast Conference, アーカンソー州、アメリカ合衆国、2010

6. 研究組織

(1) 研究代表者

鬼頭 英樹 (KITO HIDEKI)

独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構・東北農業研究センター水田作研究領域・主任研究員

研究者番号：40455308

(2) 研究分担者

善林 薫 (ZENBAYASHI KAORU)

独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構・東北農業研究センター水田作研究領

域・主任研究員
研究者番号：80355320