

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 31 日現在

機関番号：81202

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2013

課題番号：22780040

研究課題名(和文)いもち病菌感染イネにおけるエフェクターとそのターゲットの相互作用の解明

研究課題名(英文)Unraveling of interaction between Magnaporthe oryzae effectors and host targets during rice blast infection.

研究代表者

齋藤 宏昌(Saitoh, Hiromasa)

公益財団法人岩手生物工学研究センター・生命科学研究部・主任研究員

研究者番号：20414336

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円、(間接経費) 930,000円

研究成果の概要(和文)：研究代表者らは、イネいもち病菌の3つの非病原力エフェクター - AVR-Pia、AVR-Pii、AVR-Pik と1つの病原性分泌タンパクMC69の同定に成功するとともに、イネにおいては、いもち病抵抗性(R)遺伝子Piaの単離同定に成功している。その後、MC69がイネいもち病菌およびウリ類炭疽病菌の感染に共通して必要な病原性分泌タンパク質であることを見出した。また、イネのRタンパク質Pik1が直接的タンパク質相互作用によってAVR-Pikを認識することを明らかにした。さらに、R遺伝子Piiの単離同定に成功した。

研究成果の概要(英文)：We have successfully identified three avirulence effectors AVR-Pia, AVR-Pii, AVR-Pik and a pathogenicity protein MC69 from the rice blast fungus Magnaporthe oryzae. In addition, a rice blast resistance (R) gene Pia has been isolated. We have then found out that MC69 is a secreted protein and required for infection by monocot and dicot fungal pathogens, *M. oryzae* and cucumber anthracnose fungus *Colletotrichum orbiculare*, respectively. We also revealed that an R protein Pik1 recognizes AVR-Pik through direct protein-protein interaction. Furthermore, another R gene Pii has been successfully isolated.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：生産環境農学・植物保護科学

キーワード：非病原力エフェクター - 病原性分泌タンパク質 いもち病抵抗性遺伝子 ウリ類炭疽病菌 直接的タンパク質相互作用

1. 研究開始当初の背景

植物病原体とそれらの宿主は攻撃、防御そして反撃という戦いの中で常に進化してきた。植物の抵抗性は、抵抗性 (R) 遺伝子産物が病原体の非病原力 (AVR) タンパク質を認識することによって生じる場合がある (遺伝子対遺伝子モデル)。AVR タンパク質はエフェクターとして知られる病原体由来分泌型病原力タンパク質の一群で、対応する R 遺伝子産物を発現する植物において過敏細胞死を伴う強度の抵抗性を引き起こす。

イネいもち病は子囊菌 *Magnaporthe oryzae* (Couch and Kohn, 2002 *Mycologia* 94:683) によって引き起こされるイネの最重要病害である (Talbot, 2003 *Annu. Rev. Microbiol.* 57:177)。イネいもち病菌エフェクターの機能と宿主ターゲット因子、さらに AVR-R 遺伝子相互作用を解明することは、いもち病防除の効果的な手段を考案するためにも重要である。さらに、イネいもち病菌由来 AVR 遺伝子の同定と解析は、いもち病菌の病原性機構およびいもち病菌のエフェクターとその宿主ターゲットの共進化機構の理解に役立つであろう。

日本産イネいもち病菌 Ina168 菌株は、未同定の 9 つの非病原力遺伝子 (AVR-*Pia*、AVR-*Pii*、AVR-*Pik*、AVR-*Pikm*、AVR-*Piz*、AVR-*Pita2*、AVR-*Pizt*、AVR-*Pib*、AVR-*Pit*) を保有している。そこで応募者らは、Ina168 の全ゲノム配列を決定し、既報のアメリカ産 70-15 菌株のゲノム配列と比較したところ、70-15 には存在しない 316 個の分泌タンパク質遺伝子 (pex1-pex316) の存在が確認された。数個の非病原力遺伝子を様々な組合せで有する 23 のいもち病菌菌株を材料にして pex1-pex316 の DNA 多型を PCR 増幅によって調べたところ、pex22 と非病原力遺伝子 AVR-*Pia*、pex33 と AVR-*Pii*、pex31 と AVR-*Pik/Pikm/Pikp* がそれぞれ連関していることが示された。pex22 が AVR-*Pia* 本体であることを証明するために、AVR-*Pia* を保有していない菌株に pex22 を含む DNA 断片を導入し、R 遺伝子 *Pia* を有するイネ品種「ササニシキ」に接種したところ、抵抗性が誘導された。同様に AVR-*Pii* を保有していない菌株に pex33 を含む DNA 断片を導入した形質転換体は、R 遺伝子 *Pii* を有するイネ品種「かけはし」に抵抗性を誘導した。また、AVR-*Pik*、AVR-*Pikm*、AVR-*Pikp* を保有していない菌株に pex31 を含む DNA 断片を導入した形質転換体は、R 遺伝子 *Pik*、*Pikm*、*Pikp* をそれぞれ有するイネ品種「関東 51 号」「ツユアケ」「K60」全てに抵抗性を誘導した。以上の結果より、pex22、pex33、pex31 がそれぞれ対応する AVR-*Pia*、AVR-*Pii*、AVR-*Pik/Pikm/Pikp* 本体であることが証明された (Yoshida et al., 2009 *Plant Cell* 21:1573)。一方、応募者らは病原力エフェクター遺伝子を同定するために、イネいもち病菌予想分泌タンパク質遺伝子のうち、112 個の遺伝子破壊株を各々作

出し、供試した菌株の野生株と比較した。その結果、MC69 と名付けた遺伝子破壊株の表現型は、培養状態の菌糸、孢子形成率、付着器形成率ともに、野生株と変化がなかったものの、イネとオオムギへの病原性、イネ葉鞘組織における侵入率および侵入菌糸進展の低下を示した。また、MC69 プロモーターで MC69 と緑色蛍光タンパク質 (GFP) の融合タンパク質を発現させる形質転換いもち病菌を液体培養し、抗 GFP 抗体により融合タンパク質の存在を調べたところ、培養液中に検出された。以上の結果から、MC69 は植物侵入時に菌体外に分泌される病原力エフェクターであると考えられた。

本研究では AVR-*Pia*、AVR-*Pii* および AVR-*Pik/Pikm/Pikp* (以降 AVR-*Pik* と表記)、MC69 のターゲットとなる植物タンパク質の同定を試み、イネいもち病菌由来エフェクターと植物との相互作用の解明を目指す。

2. 研究の目的

いもち病はイネの最重要病害であるため、イネのいもち病抵抗性機構およびいもち病菌のイネへの感染機構の解明は非常に重要な課題である。病原体から分泌される様々なエフェクター因子が、植物への病原性および植物の抵抗性誘導に重要な役割を果たすという機構が近年明らかになってきている。しかしながら、いもち病を含む糸状菌病においてはエフェクター関連研究は、未だ未発表の状況である。応募者らは現在までに 3 つの非病原力遺伝子 (抵抗性誘導) と 1 つの病原力遺伝子の単離同定に成功している。本研究では同定されたエフェクターのターゲットとなる植物タンパク質の同定を試み、エフェクターと植物との相互作用の解明を目指す。

3. 研究の方法

エフェクターターゲットを同定する手段として (1) 当研究センターで作出したイネ突然変異系統へのイネいもち病菌接種試験、(2) 酵母 2 ハイブリッド法、(3) *in planta* 共免疫沈降法の手法を用いた。

4. 研究成果

AVR-*Pia*、AVR-*Pik*、AVR-*Pii* に対応する抵抗性遺伝子の中で、AVR-*Pik* に対応する *Pik* は既に報告されており、R タンパク質 *Pik* は 2 種の CC-NBS-LRR 型タンパク質 *Pik1* と *Pik2* から構成されている (Ashikawa et al., 2008 *Genetics* 180:2267)。そこで、AVR-*Pik* と *Pik* の相互作用を酵母 2 ハイブリッド法と *in planta* 共免疫沈降法で調べた結果、*Pik1* が直接的タンパク質相互作用によって AVR-*Pik* を認識することが明らかとなった (Kanzaki et al., 2012 *Plant J.* 72:894)。

Pia と *Pii* は未同定であったので、これら 2 遺伝子の単離を試みた。その材料として、当研究センターで作出したイネ突然変異系統群を供試した。

品種「ササニシキ」は、*Pia* 抵抗性遺伝子を保有するので、*AVR-Pia* を保有するいもち病菌に対して抵抗性を示す。そこで、「ササニシキ」突然変異系統 3,000 系統に *AVR-Pia* をもつイネいもち病菌を接種し、罹病する系統を選抜した。その結果、独立の 2 系統が得られ、*Pia* の単離同定に成功した。*Pia* 遺伝子座は、隣接する逆向きの 2 つの NBS-LRR 型タンパク質遺伝子、*RG44*、*RG45* によって構成されることが明らかになった (Okuyama et al., 2011 Plant J. 66:467)。

同様に、*Pii* 抵抗性遺伝子を保有する品種「ひとめぼれ」突然変異系統 3,000 系統に *AVR-Pii* を保有するいもち病菌を接種し、罹病する系統を選抜した結果、独立の 2 系統が得られ、*Pii* の単離同定に成功した。*Pik*、*Pia* と同様に *Pii* も密接に連鎖した逆向きの 2 つの ORF *Pii1* と *Pii2* によって構成されていることが示された (Takagi et al., 2013 New Phytol. 200:276)。

MC69については、他の植物病原系状菌の病原性にも必要とされるか否かを調べるため、ウリ類炭疽病菌の *MC69* 相同遺伝子を欠失させたところ、それによってキュウリと *Nicotiana benthamiana* への病原性が低下した。この結果から、MC69 は単子葉および双子葉植物にそれぞれ病原性を示すイネいもち病菌およびウリ類炭疽病菌の感染に共通して必要な病原性分泌タンパク質であることが明らかとなった (Saitoh et al., 2012 PLoS Pathog. 8:e1002711)。

酵母2ハイブリッド (Y2H) 法を用いて、同定済みの3種類の *AVR*、*AVR-Pia*、*AVR-Pii*、*AVR-Pik* および MC69 と相互作用するイネ由来因子の候補を選抜した。

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 12 件)

1. Okuyama Y, Kanzaki H, Abe A, Yoshida K, Tamiru M, Saitoh H, et al.: A multifaceted genomics approach allows the isolation of the rice *Pia*-blast resistance gene consisting of two adjacent NBS-LRR protein genes. (2011) The Plant Journal 66: 467-479
2. Terauchi R, Yoshida K, Saitoh H, et al.: Studying of genome-wide DNA polymorphisms to understand *Magnaporthe*-rice interactions. (2011) Australasian Plant Pathology 40: 328-334
3. Saitoh H, Fujisawa S, Mitsuoka C, Ito A, Hirabuchi A, Ikeda K, et al.: Large-scale gene disruption in *Magnaporthe oryzae* identifies MC69, a

secreted protein required for infection by monocot and dicot fungal pathogens. (2012) PLoS Pathogens 8: e102711

4. Mentlak TA, Kombrink A, Shibuya T, Ryder LS, Otomo I, Saitoh H, et al.: Effector-mediated suppression of chitin-triggered immunity by *Magnaporthe oryzae* is necessary for rice blast disease. (2012) The Plant Cell 24: 322-335.
5. Kanzaki H, Yoshida K, Saitoh H, et al.: Arms race co-evolution of *Magnaporthe oryzae* *AVR-Pik* and rice *Pik* genes driven by their physical interactions. (2012) The Plant Journal 72: 894-907
6. Undan JR, Tamiru M, Abe A, Yoshida K, Kosugi S, Takagi H, Yoshida K, Kanzaki H, Saitoh H, et al.: Mutation in *OsLMS*, a gene encoding a protein with two double-stranded RNA binding motifs, causes lesion mimic phenotype and early senescence in rice (*Oryza sativa* L.). (2012) Genes & Genetic Systems 87: 169-179
7. Sharma S, Sharma S, Hirabuchi A, Yoshida K, Fujisaki K, Ito A, Uemura A, Terauchi R, Kamoun S, Sohn KH, Jones JDG, Saitoh H: Deployment of the *Burkholderia glumae* type III secretion system as an efficient tool for translocating pathogen effectors to monocot cells. (2013) The Plant Journal 74: 701-712
8. Takagi H, Uemura A, Yaegashi H, Tamiru M, Abe A, Mitsuoka C, Utsushi H, Natsume S, Kanzaki H, Matsumura H, Saitoh H, et al.: MutMap-Gap: whole-genome resequencing of mutant F2 progeny bulk combined with *de novo* assembly of gap regions identifies the rice blast resistance gene *Pii*. (2013) New Phytologist 200: 276-283
9. Giraldo MC, Dagdas YF, Gupta YK, Mentlak TA, Yi M, Martinez-Rocha AL, Saitoh H, et al.: Two distinct secretion systems facilitate tissue invasion by the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*. (2013) Nature Communications 4: 1996
10. Fekih R, Takagi H, Tamiru M, Abe A, Natsume S, Yaegashi H, Sharma S, Sharma S, Kanzaki H, Matsumura H, Saitoh H, et

- al. MutMap+: Genetic mapping and mutant identification without crossing in rice. (2013) PLoS One 8: e68529
11. Saitoh H, Hirabuchi A, Fujisawa S, Mitsuoka C, Terauchi R, Takano Y.: *MoST1* encoding a hexose transporter-like protein is involved in both conidiation and mycelial melanization of *Magnaporthe oryzae*. (2014) FEMS Microbiology Letters 352: 104-113
12. Kanzaki H, Yoshida K, Saitoh H, Tamiru M, Terauchi R.: Protoplast cell death assay to study *Magnaporthe oryzae* AVR gene function in rice. (2014) Methods in Molecular Biology 1127: 269-275

〔学会発表〕(計 7件)

1. 齋藤宏昌、藤澤志津子、伊東明子、寺内良平：イネいもち病菌病原力エフェクター-MC69の機能解析(2010.4.19)平成22年度日本植物病理学会大会(国立京都国際会館)
2. 齋藤宏昌、吉田健太郎、池田恭子ら：イネいもち病菌の大規模遺伝子破壊解析によって同定された分泌タンパク質 MC69は単子葉および双子葉病原菌による感染に必要とされる(2012.3.29)平成24年度日本植物病理学会大会(福岡国際会議場)
3. 齋藤宏昌、三岡周子、平淵亜紀子ら：Large-scale gene disruption in *Magnaporthe oryzae* identifies MC69, a secreted protein required for infection by monocot and dicot fungal pathogens. (2012.7.29-8.2) XV International Congress of Molecular Plant-Microbe Interactions(国立京都国際会館)
4. 齋藤宏昌、三岡周子、平淵亜紀子ら：Large-scale gene disruption in *Magnaporthe oryzae* identifies MC69, a secreted protein required for infection by monocot and dicot fungal pathogens. (2012.9.16-9.19) 30th New Phytologist Symposium(Stanford Sierra Conference Center, California, USA)
5. 齋藤宏昌、Shailendra Sharma ら：イネもみ枯細菌病菌型分泌機構を利用したイネいもち病菌エフェクターの単子葉植物細胞内への移行(2013.3.28)平成25

年度日本植物病理学会大会(岐阜大学)

6. 齋藤宏昌、Shailendra Sharma ら：Deployment of the *Burkholderia glumae* type III secretion system as an efficient tool for studying *Magnaporthe oryzae* effector functions in plant cells.(2013.8.20-8.24)The 6th International Rice Blast Conference (Ramada Plaza Jeju Hotel, Jeju, South Korea)
7. 齋藤宏昌、高野義孝、寺内良平：イネいもち病菌の孢子生産と菌系のメラニン化に關与するヘキソーストランスポーター様タンパク質遺伝子 *MoST1* (2013.10.28)平成25年度日本植物病理学会東北部会(秋田市にぎわい交流館)

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

名称：
 発明者：
 権利者：
 種類：
 番号：
 出願年月日：
 国内外の別：

取得状況(計 0件)

名称：
 発明者：
 権利者：
 種類：
 番号：
 取得年月日：
 国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等
 岩手生物工学研究センター
<https://sites.google.com/a/ibrc.or.jp/ibrc/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

齋藤宏昌(公益財団法人岩手生物工学研究センター)

研究者番号：20414336

(2)研究分担者

()

研究者番号：

(3)連携研究者 ()

研究者番号：