

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 20 日現在

機関番号：81202

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2013

課題番号：23580065

研究課題名(和文)いもち病菌に対するイネの階層的抵抗性の機構解明

研究課題名(英文)Elucidation of the mechanism of specific recognition between rice and rice blast

研究代表者

神崎 洋之(KANZAKI, Hiroyuki)

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・研究専門員

研究者番号：10390882

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,100,000円、(間接経費) 1,230,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題において以下のことを明らかにした。(1)いもち病菌由来AVR-PikアレルがイネPikアレルに特異的かつ階層的に認識される。(2)AVR-Pikは遺伝子変異が高いPik1のCoiled-Coilドメイン(CC)に特異的かつ直接的にタンパク質相互作用する(3)AVR-PikとPikのアレル間でのタンパク質相互作用は抵抗性反応の特異的認識のパターンと一致する。

以上より、イネ由来Pikは、いもち病菌由来AvrPikとの共進化の中で、AVR-Pikとのタンパク質直接的結合を介して抵抗性を獲得し、Pik1の変異がAVR-Pikアレルに対する抵抗性認識に重要な役割を担っていることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：Between pathogen and host, attack and counter-attack impose strong reciprocal selection on the involved organisms, leading to the development of arms race evolutionary dynamics. Here we show that Magnaporthe oryzae avirulence gene AVR-Pik and cognate rice resistance (R-) gene Pik are highly variable with multiple alleles differing by DNA replacements causing amino acid changes. There is a tight recognition specificity of AVR-Pik alleles by different Pik alleles. We found that AVR-Pik physically binds the N-terminal coiled-coil (CC) domain of Pik in yeast 2-hybrid assay as well as in in-planta co-immunoprecipitation assay. This binding specificity correlates the recognition specificity between AVR and R-genes. We propose that AVR-Pik and Pik are locked up in arms race co-evolution that is driven by their direct physical interactions.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：植物病理学

キーワード：イネ いもち病菌 非病原力遺伝子AVR-Pik 認識特異性 タンパク質相互作用 Dual抵抗性遺伝子

## 1. 研究開始当初の背景

いもち病菌のもたらすいもち病はイネの最も被害の大きい病害であり、農業にとって克服すべき大きな課題でもある。いもち病菌の感染に対する1つの防御手段として、イネには、いもち病菌由来の非病原性遺伝子 (AVR) に対応する抵抗性遺伝子を介した免疫機構が存在する。先に申請者は、いもち病菌から3種類の非病原性遺伝子 AVR-Pia・AVR-Pii・AVR-Pik を単離した (Yoshida et al. 2009)。また、AVR-Pia に対応するイネ抵抗性遺伝子 Pia の候補として、染色体上に隣接して座する2種類の NBS-LRR タンパク質遺伝子 RGA4 及び RGA5 の同定にも成功し、イネ形質転換体を用いた接種試験によって、これらが Pia の本体であることを証明した (Okuyama & Kanzaki et al. 2011)。また一方、A~E の5種類のアリルが存在する AVR-Pik に対して、イネ抵抗性遺伝子は、Pik・Pik-m・Pik-p・Pik-s・Pik-h が Pik アリルとして存在することが示唆されている。申請者は、イネ抵抗性遺伝子 Pik アリルと、いもち病菌非病原性遺伝子 AVR-Pik アリルの相互作用は階層的であることを明らかにした。しかし、何故、AVR-Pik アリルと Pik アリルとで階層的抵抗性が現れるのかは明らかとなっていない。

イネ抵抗性遺伝子 Pikm の原因遺伝子として、染色体上に隣接して座する2種類の NBS-LRR タンパク質遺伝子 Pikm1 及び Pikm2 が既に同定されている2)。品種間の DNA 変異の調査では、Pikm2 は DNA 配列がよく保存されている一方、Pikm1 で特に変異が集中することが報告されている。この結果は、抵抗性遺伝子 Pikm の Pikm1 の変異が AVR-Pik に対する抵抗性を決定していることを示唆している。これは、Pia の本体である RGA4 は RGA5 よりも遺伝子変異が高いという事実と類似している。以上を総合すると、イネ抵抗性遺伝子 Pik は、いもち病菌 AVR-Pik との共進化の中で抵抗性を獲得し、Pikm1 の変異が AVR-Pik アリルに対する抵抗性認識に重要な役割を担っていることが考えられる。またさらに、AVR-Pik/Pik の相互作用が誘導する抵抗性では、AVR-Pia/Pia 相互作用 (AVR-Pii/Pii も同様) によるものとは明らかに異なる極めて強い過敏細胞死が観察された。この現象は、AVR-Pik/Pik の抵抗性誘導システムと、AVR-Pia/Pia の抵抗性誘導システムとは異なる機構が働いていることを示している。抵抗性遺伝子 Pik アリルである Pikm 及び Pia の本体は、共に2種類の NBS-LRR タンパク質である。これらの抵抗性遺伝子は何故2種類のタンパク質を必要とするのか、どのような機構で2種類のタンパク質が非病原性因子 AVR を認識して抵抗性をもたらすかは明らかとなっていない。

## 2. 研究の目的

対応するイネ品種を用いて抵抗性遺伝子 Pik アリルの塩基配列を決定し、アリル間でのアミノ酸変異を明らかにする。さらに、Pik アリルを判別する DNA マーカーを開発する。また、いもち病菌 AVR-Pik の全てのアリルを同定し、階層的抵抗性の解明を完成させる。また、Pikm1 と AVR-Pik、Pikm2 と AVR-Pik、Pikm1 と Pikm2 の間の直接的タンパク質相互作用の有無を明らかにする。さらに結合がタンパク質のどの領域で行われているかなどの詳細についても明らかにする。また、場合によってはタンパク質相互作用に関係する仲介タンパク質を同定する。Pik アリル及び AVR-Pik アリル間での直接的タンパク質相互作用の解析を網羅的におこない、タンパク質相互作用マップを作成する。そしてこのマップが階層的抵抗性と結びついたものであるかを明らかにする。さらに、抵抗性遺伝子と非病原性遺伝子のアリルの相互作用によるいもち病抵抗性および過敏細胞死誘導能を、一過的遺伝子発現あるいは形質転換体を用いた解析によって明らかにする。また、mutation や deletion を加えたコンストラクトを用いて、過敏細胞死や抵抗性反応に必要な遺伝子領域を明らかにする。以上の事象を明らかにすることで、イネといもち病菌の間の階層的抵抗性の免

疫学的機構、或いは2種の抵抗性遺伝子の抵抗性誘導機構を明らかにすることを目的とする。

## 3. 研究の方法

### (1) Pik アリル・AVR-Pik アリルの全セットの収集

イネ抵抗性遺伝子 Pik・Pik-m・Pik-p・Pik-s・Pik-h の Pikm1・Pikm2 遺伝子のアリルの全長を、対応するイネ品種より単離し変異を比較する。AVR-Pik アリル A~E を単離し、Pik アリルとの階層的抵抗性を見いだした。しかし、Pik と Pikm での抵抗性の差異を示す AVR-Pik アリルは見いだされていない。そこで、Pik と Pikm での抵抗性の差異を示す AVR-Pik アリルを単離する。

### (2) Pik・AVR-Pik 間での直接的タンパク質相互作用解析

酵母 two-hybrid 法、精製タンパク質あるいはタバコ植物への一過的発現による pull-down 法により Pikm1・Pikm2・AVR-Pik 間で、直接的タンパク質相互作用が見られるかどうかを確認する。

### (3) Pik アリル・AVR-Pik アリル間でのタンパク質相互作用

酵母 two-hybrid 法、精製タンパク質あるいはタバコ植物への一過的発現による pull-down 法により、Pik アリル・AVR-Pik アリル間での直接的タンパク質相互作用を解析する。さらに、Pik アリルの各ドメインと、AVR-Pik アリルとのタンパク質相互作用を確認する。

### (4) 一過的発現系によるイネ-いもち病菌アリル間相互作用

抵抗性遺伝子 Pikm1 及び Pikm2 の各アリル、そして AVR-Pik アリルとの組み合わせで、イネ protoplast を用いた一過的発現解析試験をおこない、イネ-いもち病菌の対応遺伝子アリル間での相互作用による細胞死誘導性について検討する

### (5) 接種試験によるイネ-いもち病菌アリル間相互作用

親和性のいもち病菌レースに各 AVR-Pik アリルを導入した形質転換いもち病菌を、各 Pik アリルをもつイネ品種に接種試験し、イネ-いもち病菌の対応遺伝子のアリル間で特異的認識が見られるかどうかを比較検討する。

### (6) Pikm1・Pikm2・AVR-Pik の細胞死誘導性の解析

イネ protoplast を用いた一過的発現解析試験により、Pikm1・Pikm2・AVR-Pik の様々な組み合わせにおける細胞死誘導能を解析し、タンパク質相互作用の結果と併せて比較検討する。また、同様の試験を、いもち病菌 AVR-Pia 及び対応するイネ抵抗性遺伝子 Pia の因子 RGA4・RGA5 についても比較検討する。

## 4. 研究成果

Pik アリルと avrPik アリルの特異的認識機構について、以下の知見が得られた。

(1) いもち病菌接種による抵抗性検定、及びイネ一過的過敏細胞死検定をおこない、いもち病菌由来 AVR-Pik アリルがイネ Pik アリルに特異的かつ階層的に認識されることを明らかにした。

(2) AVR-Pik-Pik 間のタンパク質間相互作用についてそれぞれのアリルを用いて検討した結果、AVR-Pik は、Pik1 の遺伝子変異が高い Coiled-Coil ドメイン (CC) に特異的かつ直接的にタンパク質相互作用することを明らかにした。

(3) AVR-Pik と Pik のアリル産物間でのタンパク質相互作用は、抵抗性反応の特異的認識のパターンと一致することを明らかにした。

(4) 進化解析の結果、Pik1 と Pik2 はそれぞれ2種のグループに分かれること、AVR-Pik アリルは抵抗性認識の程度が高い D アリルが最初に出現したこと等が明らかとなった。

以上の結果を総合すると、イネ Pik は、いもち病菌 AVR-Pik との共進化の中で、AVR-Pik とのタンパク質直接的結合を介して抵抗性を獲得し、Pik1 の変異が AVR-Pik アリルに対する抵抗性認識に重要な役割を担っていることが示唆された。病原菌エフェクターと宿主植物抵抗性遺伝子産物とが、直接的にタンパク質相互作用するという知見は、数例しかない。さらに、病原菌エフェクターと宿主植物抵抗性遺伝子産物の各アリル間で階層的特異的認識が認められ、且つその認識に両者の直接的タンパク質相互作用が重要な役割を担っているという知見は、植物では 2 例目、イネ-いもち病菌では新規な知見である。また、病原菌-宿主植物間において、arms race の共進化が起こった証拠でもあり、生物学的にも意義のある研究成果であると考えられる。以上の結果は、Plant Journal (2012.72:894-907) において発表した。

また、Pia の 2 種の NBS-LRR (RGA4・RGA5) の認識機構について、以下の知見が得られた。

(1)イネ protoplast または、*Nicotiana benthamiana* タバコを用いた一過的発現解析により、RGA4 単独で細胞死を引き起こし、RGA5 がそれを抑制すること、さらにその抑制を AVR-Pia が解除することを明らかにした。

(2) RGA4 或いは RGA5 は homo-dimer を形成し、RGA4 と RGA5 は CC ドメインで hetero-dimer を形成すること、さらに AVR-Pia は RGA5 の C 末の HMA ドメインと直接的相互作用することを明らかにした。

以上の結果を総合すると、Pia の RGA4 はイネ細胞内で起爆装置として機能するが、通常は RGA5 がその暴発を抑えており、いもち病菌から分泌されたエフェクター AVR-Pia を RGA5 が認識すると RGA4-RGA5 の相互作用が解除されて RGA4 が homo-dimer となり細胞死が誘導され抵抗性反応がもたらされる可能性が示唆された。近年、2 種の NBS-LRR が抵抗性遺伝子が機能する例が、様々な病原菌-宿主植物で報告されている。しかし、その機構は謎であった。本成果はその機構を明らかにするものであり、植物病理学のブレークスルーとなる大きな成果であると考えられる。この成果は、共同研究として EMBO Journal に発表した (印刷中)

## 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 9 件)

(1) Césari, S., Kanzaki, H., Fujiwara, T.(co-first authors), Bernoux, M., Chalvon, V., Kawano, Y., Shimamoto, K., Dodds P., Terauchi, R., Kroj, T. The NB-LRR proteins RGA4 and RGA5 interact functionally and physically to confer disease resistance EMBO journal 2014. in press

(2) Fekih, R., Takagi, H., Tamiru, M., Abe, A., Natsume, S., Yaegashi, H., Sharma, S., Sharma, S., Kanzaki, H., Matsumura, H., Saitoh, H., Mitsuoka, C., Utsushi, H., Uemura, A., Kanzaki, E., Kosugi, S., Yoshida, K., Cano, L., Kamoun, S., Terauchi, R. MutMap+: Genetic Mapping and Mutant Identification without Crossing in Rice. PLoS ONE 2013. 8: e68529. (DOI:10.1371/journal.pone.0068529)

(3) Takagi H., Uemura A., Yaegashi H., Tamiru M., Abe A., Mitsuoka C., Utsushi H., Natsume S., Kanzaki H., Matsumura H., Saitoh H., Yoshida K., Cano L.M., Kamoun S., Terauchi R. 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*. New Phytologist 2013. 200: 276-83 (DOI: 10.1111/nph.12369.Epub 2013 Jun 24.)

(4) Cesari, S., Thilliez, G., Ribot, C., Chalvon, V., Michel, C., Jauneau, A., Rivas, S., Alaux, L., Kanzaki, H., Okuyama, Y., Morel, J.B., Fournier, E., Terauchi, R., Kroj, T. The rice resistance protein pair RGA4/RGA5 recognize the *Magnaporthe oryzae* effectors AVR-Pia and AVR-CO39 by direct binding. Plant Cell. 2013. 25: 1463-1481. (DOI: 10.1105/tpc.112.107201)

(5) Undan, JR., Tamiru, M., Abe, A., Yoshida, K., Kosugi, S., Takagi, H., Yoshida, K., Kanzaki, H., Saitoh, H., Fekih, R., Sharma, S., Undan, J., Yano, M., Terauchi, R. 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.). Gene and Genetic Systems. 2012. 87: 169-179. (DOI: 10.1266/ggs.87.169)

(6) Terauchi, R., Abe, A., Takagi, H., Yoshida, K., Kosugi, S., Natsume, S., Yaegashi, H., Kanzaki, H., Matsumura, H., Mitsuoka, C., Utsushi, H., Tamiru, M. Whole genome sequencing and future breeding of rice. Journal of Plant Biochem. Biotechnol. 2012. 21: 10-14 (DOI: 10.1007/s13562-012-0133-2)

(7) Kanzaki, H., Yoshida, K., Saitoh, H., Fujisaki, K., Hirabuchi, A., Alaux, L., Fournier, E., Tharreau, D., Terauchi, R. Arms race co-evolution of *Magnaporthe oryzae* AVR-Pik and rice Pik genes driven by their physical interactions. Plant Journal 2012. 72: 894-907 (DOI: 10.1111/j.1365-313X.2012.05110.x)

(8) Abe, A., Kosugi, S., Yoshida, K., Natsume, S., Takagi, H., Kanzaki, H., Matsumura, H., Yoshida, K., Mitsuoka, C., Tamiru, M., Innan, H., Cano L., Kamoun, S. & Terauchi, R. Genome sequencing reveals agronomically important loci in rice using MutMap. Nature Biotechnology 2012. 30: 174-178 (DOI: 10.1038/nbt.2095)

(9) Okuyama, Y., Kanzaki, H.(co-first authors), Abe, A., Yoshida K., Tamiru M., Saitoh H., Fujibe T., Matsumura H., Shenton M., Galam, D.C., Undan, J., Ito, A., Sone, T. and Terauchi, R. A multifaceted genomics approach allows the isolation of the rice Pia- blast resistance gene consisting of two adjacent NBS- LRR protein genes. Plant Journal 2011. 66: 467-479 (DOI: 10.1111/j.1365- 313X.2011.04502.x)

### 〔学会発表〕(計 7 件)

(1)神崎洋之、齊藤宏昌、藤崎恒喜、小林光智、伊藤和江、神崎英子、三岡周子、Mark Banfield、Sophien Kamoun、寺内良平 いもち病菌 (*Magnaporthe oryzae*) 非病原力遺伝子 AVR-Pik と相互作用するイネタンパク質の同定 平成 26 年度日本植物生理学会 (2014 年 3 月 18~20 日 富山市)

(2)Kanzaki, H., Saitoh, H., Fujisaki, K., Kobayashi, M., Ito, K., Kanzaki, E., Mitsuoka, C., Banfield, M., Kamoun, S., Terauchi, R. Rice proteins that interact with the *M. oryzae* avirulence effector Avr-Pik. 2013-International Rice Blast Conference. (2013 年 8 月 20 日~23 日 韓国 済州島)

(3)神崎 洋之・齊藤 宏昌・藤崎 恒喜・寺内 良平 いもち病菌非病原力遺伝子 AVR-Pik が認識する新規イネ遺伝子の単離 平成 25 年度日本植物病理学会大会 (2012 年 3 月 27 日~29 日 岐阜市)

研究者番号：10390882

(2)研究分担者  
( )

研究者番号：

(3)連携研究者  
( )

研究者番号：

(4)Kanzaki, H., Yoshida, K., Saitoh, H., Fujisaki, K., Hirabuchi, A., Allaux, L., Fournier, E., Tharreau, D., Terauchi, R. Arms race co-evolution of *Magnaporthe oryzae* AVR gene and rice R genes driven by their physical interactions. 30th New Phytologist Symposium ~ Immunomodulation by plant-associated organisms. (2012年9月16日～19日 California 米国)

(5)Kanzaki, H., Yoshida, K., Saitoh, H., Hirabuchi, A., Allaux, L., Fournier, E., Tharreau, D., Terauchi, R. The direct protein-protein interaction results in the arms race co-evolution between *Magnaporthe oryzae* AVR-Pik and rice Pik. XI International Congress of Molecular Plant-Microbe Interactions. (2012年7月29～8月2日京都市)

(6)神崎 洋之、吉田 健太郎、平瀬亜紀子、寺内 良平 いもち病菌非病原力遺伝子AVR- Pikとイネいもち病抵抗性遺伝子Pikは、直接的タンパク質相互作用によって認識する。平成24年度日本植物病理学会大会 (2012年3月29日福岡市)

(7)神崎 洋之、吉田 健太郎、寺内 良平 いもち病菌非病原力遺伝子 AVR- Pik とイネいもち病抵抗性遺伝子 Pik におけるアリル間認識特異性。日本育種学会第120回講演会秋季大会 (2011年9月23日 福井市)

〔図書〕(計 1件)

Kanzaki, H., Yoshida, K., Saitoh, H., Tamiru, M. Terauchi, R. (Edit. Baul Birch) Protoplast cell death assay to study AVR function in rice (in Methods in Molecular Biology ; Plant Immunity (Springer) 2013. (DOI: 10.1007/978-1-62703-986-4\_20.)

〔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

6. 研究組織

(1)研究代表者

神崎 洋之 (KANZAKI, Hiroyuki)  
(公財)岩手生物工学研究センター