

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 18 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2013

課題番号：23658038

研究課題名(和文) 突然変異抑制型イネいもち病防除技術の開発～組換え修復をターゲットとして～

研究課題名(英文) Development of novel rice blast control system, which suppresses mutations in the pathogen

研究代表者

曾根 輝雄 (Sone, Teruo)

北海道大学・(連合)農学研究科(研究院)・准教授

研究者番号：00333633

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円、(間接経費) 870,000円

研究成果の概要(和文)：いもち病はイネの最重要病害である。いもち病防除の重要な問題はイネ品種の抵抗性を打破するいもち病菌の突然変異である。いもち病の突然変異は主にDNAの組換えを介する。本研究の目的はいもち病菌のDNA組換えを担う遺伝子の働きを解明し、突然変異を抑えながら防除する方法を開発することである。本研究の結果、イネいもち病菌が病原性を発揮するためにはDNA修復タンパク複合体が重要な役割を果たしていることが明らかとなった。その複合体形成を阻害する薬剤をスクリーニングする系を構築することが出来た。本研究は突然変異も抑えられるいもち病の新たな防除法につながるものとなるだろう。

研究成果の概要(英文)：Rice blast is the most important disease of rice. One of the big problem in rice blast control is the mutation of pathogen that enables pathogens to overcome rice blast resistance. Mutations in rice blast fungus is mostly occur through DNA recombinations. This study aimed to develop a novel rice blast control strategy, which suppresses mutations in the pathogens, by studying the DNA recombination proteins in the pathogen. Results of this study indicated that DNA recombination is very important for the pathogen to cause the disease. DNA recombination proteins works as a complex will be a target for controlling the disease and suppressing the mutations. In this study, we also developed a screening system for inhibitors for protein-protein interaction.

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：イネ いもち病 DNA修復 複合体 突然変異 スクリーニング

### 1. 研究開始当初の背景

いもち病は稲作の全被害の13%、病害の半分を占めるイネの最重要病害である。いもち病の防除には、抵抗性品種の有効活用と適切な薬剤による管理が有効とされ、現在の防除体系の根幹を成している。しかし、これらの利用には抵抗性イネ品種に感染可能な菌や、薬剤耐性菌などの突然変異菌発生のリスクを常に抱えている。突然変異菌の発生を抑制しつつ病害を防除する薬剤があれば、有効ないもち病対策となる。

イネいもち病菌の宿主特異性を決定する遺伝子である AVR 遺伝子の研究は、申請者や米の研究者らによって進められてきており、AVR 遺伝子の変異、即ち病原性の変異には、DNA 組換えが関与するケースが多いことがわかってきた。特に申請者は、AVR-Pia 遺伝子の自然突然変異は、同一染色体上に座乗する2コピーの反復配列間の相同組換えによる欠失であることを明らかにした。

細胞内の DNA 組換えは、DNA の2重鎖切断を修復する過程で行われる。その修復過程は、DNA の相同性に基き行う相同組換え (HR) と、DNA の相同性を必要としない非同末端結合 (NHEJ) の2つがある。これらに関与するタンパク質遺伝子をいもち病菌からクローニングし、遺伝子破壊株を作成したところ、NHEJ の変異株は目立った表現型は見せなかったが、HR の変異株、あるいは両方の経路に関わるタンパク質の遺伝子の変異株は、病斑数、病斑のサイズともに減少し、病原力の低下が見られた。特に両方の経路に関与する因子である *Rhm50* (酵母 RAD50 のホモログ) の変異株は、全くの無病斑であった。

### 2. 研究の目的

本研究では、このイネいもち病菌の *Rhm50* 遺伝子を題材として、DNA 組換え修復を阻害することにより、組換えによる突然変異の抑制といもち病の防除の両方を達成できる薬剤の探索を目的とする。

### 3. 研究の方法

遺伝子の破壊は、DESTR (Abe et al., Curr. Microbiol., 52, 210-215 (2006)) の系を用いて行った。生育の測定にはプルーアガー培地を用い、適宜薬剤を添加して使用した。胞子形成はオートミールアガー培地を用いた。病原性は噴霧接種および葉鞘裏面接種法により調べた。タマネギ表皮細胞は電子レンジで加熱し、その後胞子懸濁液を滴下し侵入させた。

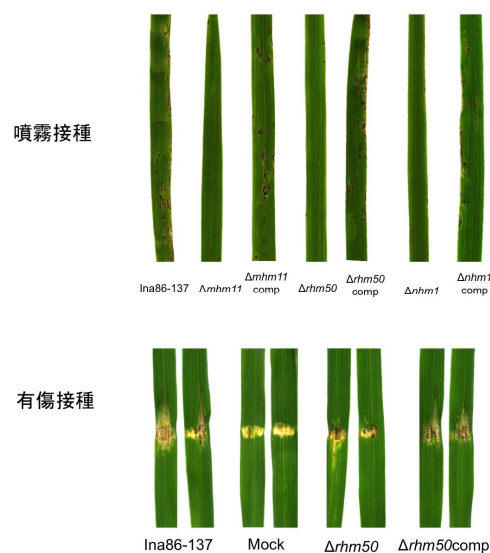
Yeast two hybrid 法は Matchmaker キットを用いて行った。

### 4. 研究成果

いもち病菌 *Magnaporthe oryzae* のゲノム情報から *MRE11* 及び *XRS2* に相同性のある遺伝

子を検索した。その結果、*MRE11* と相同性のある *Mhm11* (MGG\_09555) の存在を確かめた。*XRS2* に相同性のある遺伝子は見つからなかったため、分裂酵母の *NBS1* と相同性のある遺伝子を検索したところ、*Nhm1* (MGG\_11757) が見つかった。これらの遺伝子の欠損株を得るために遺伝子破壊用コンストラクト pBLASTR/*Mhm11* inv (プラストサイジン耐性)、pDESTR/*Nhm1* inv (ハイグロマイシン耐性) を構築した。プロトプラスト-PEG 法により形質転換し、欠損株を得た。それぞれの欠損株の諸性質を既已取得した *rhm50* 欠損株と比較した。その結果、胞子形成数の低下、付着器形成率の低下、生育の遅延、MMS への感受性の増加が見られ、その程度も *rhm50* 欠損株と同程度であった。また、それぞれの相補株も作成し、得られた性質が遺伝子欠損によって引き起こされている事を確かめた。さらに、噴霧接種により病原性を調べたところ、両遺伝子の欠損株はイネへの病原性を失っており、*rhm50* 欠損株と同様であった以上ことから、*Mhm11*、*Nhm1* は *Rhm50* と同じ DNA 修復経路で機能していると考えられた (図)。

*mhm11*、*nhm1*、*rhm50* 変異株の病原性の欠損理由を詳細に解析した。イネ葉にペーパーディスクで傷をつけ、そこに *rhm50* 変異株の胞子懸濁液を滴下し観察したところ、病徴の進展が野生株と比べ著しく抑制されており、*Rhm50* が宿主細胞内での生育に必要な事がわかった (図)。また、*rhm50* 欠損株をイネ葉鞘に接種した場合には付着器形成はみられないものの、イネ細胞内への侵入が全くみられなかったが、加熱処理したタマネギ表皮に接種したところ、付着器からの侵入菌糸の形成がみられた。以上のことから、宿主細胞内での生育抑制の要因として、宿主による DNA へのストレスが考えられた。



それぞれのタンパク質の直接的な相互作用を確かめるために、Yeast two hybrid 法を

用いて Mhm11, Nhm1, Rhm50 の解析を行った。それぞれの全長を AD 及び BK ベクターにクローニングして接合を行い、相互作用を確認したところ、Mhm11 を BK にすると Mhm11AD, Nhm1AD, Rhm50AD と相互作用を確認することが出来た。

また、特異抗体作成、構造解析を目的として上記3種の組換えタンパク質の大腸菌を用いた発現を行った。それぞれの cDNA をクローニングし、発現用ベクター pET28 に挿入した。いずれのタンパクも発現が確認できたが、中でも Mhm11 は可溶性タンパクとして発現出来たので、精製を開始した。現在、His-tag によるアフィニティ精製を終了した。

また、新たないもち病防除法の開発に向けて、MRN complex のタンパク質間相互作用を阻害する物質をスクリーニングする系の開発を行った。レポーター遺伝子として CAN1 (Arginine permease) 遺伝子を使用した Yeast two hybrid 法を用いることにより、相互作用を阻害した場合に酵母が生育するタンパク質間相互作用阻害物質のポジティブスクリーニング系として機能すると考えた。イネいもち病菌の MRN complex のうち、強固な相互作用が確認された Mhm11 と Rhm50 を発現する CAN1 レポーターを有する酵母はカナバニン含有培地上では生育しなかった。現在、この酵母をカナバニン含有の培地に混釈したプレート上に放線菌培養液を含むペーパーディスクを置き、酵母の生育ゾーンが確認される物質を探索している。これまでに 1000 種の放線菌代謝産物をスクリーニングしたが、目的の活性を示す物質は見つかっていない。

以上、イネいもち病菌が病原性を発揮するためには MRN 複合体が重要な役割を果たしていることが明らかとなった。MRN 複合体は DNA の組換え修復を行う分子であることから、イネいもち病菌において DNA の組換え修復が非常に重要であることが窺える。組み換え修復が阻害されると、その生育、分生子形成、付着器形成、イネ体内での生育が正常に行えなくなる。これは、おそらく修復されない DNA により細胞周期が正しく進まないためであろう。細胞周期は付着器形成に非常に重要であることが明らかとなっているが、本研究はそれを確認することとなった。

また、MRN はいもち病菌においてもおそらく複合体を形成する。その複合体形成を阻害する薬剤をスクリーニングする系を構築することが出来た。本スクリーニング系は Yeast two hybrid 法を応用したものであり、どんなタンパク質複合体にも応用可能であり、今後の発展が見込まれる。

いもち病菌の突然変異で重要なのは DNA の組換えによる非病原性遺伝子の欠失であり、これにより抵抗性の崩壊が引き起こされる。DNA の組換えを担っているタンパク質の代表

が MRN 複合体で有り、この複合体形成を阻害することで上記の様に病原性を抑えるだけでなく、遺伝子の突然変異も抑えられる可能性がある。本スクリーニング系により活性物質が発見できれば、いもち病の新たな防除法につながるものとなるだろう。

#### 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)

Teruo Sone, Saori Takeuchi, Shinsuke Miki, Yuki Satoh, Keisuke Ohtsuka, Ayumi Abe, and Kozo Asano, Homologous recombination causes the spontaneous deletion of *AVR-Pia* in *Magnaporthe oryzae*, FEMS Microbiology Letters, 339, 102-109 (2013).

##### [学会発表](計7件)

船引麻衣, 竹内紗央里, 中馬いづみ, 浅野行蔵, 曾根輝雄, イネいもち病菌の AVR-Pik の変異機構の解析, 日本植物病理学会平成 26 年度大会, 2014 年 6 月 3 日, 札幌コンベンションセンター (札幌市)

中山 航, 阿部 歩, 浅野行蔵, 曾根輝雄, イネいもち病防除法の開発に向けたタンパク質間相互作用阻害物質のスクリーニング系の構築, 日本植物病理学会平成 26 年度大会, 2014 年 6 月 3 日, 札幌コンベンションセンター (札幌市)

阿部 歩, 浅野行蔵, 曾根輝雄, イネいもち病菌の DNA 修復遺伝子 Mhm11, Rhm50, Nhm1 の解析, 日本植物病理学会平成 26 年度大会, 2014 年 6 月 3 日, 札幌コンベンションセンター (札幌市)

曾根輝雄, イネいもち病菌の病原性変異に関する分子遺伝学的研究, 日本農芸化学会北海道支部講演会(招待講演)2013 年 11 月 30 日, 北海道大学 (札幌市)

Funabiki M., Takeuchi S., Satoh Y., and Sone, T., Study on mutation mechanism of *AVR-Pia* and *AVR-Pik* in *Magnaporthe oryzae*, International Rice Blast Conference, 2013 年 8 月 20 日, Ramada Plaza Jeju Hotel, Jeju, South Korea

Teruo Sone, Strategy of the rice blast fungus to deal with blast resistant cultivars of rice, International Conference on Biosciences and Biotechnology, 2012 年 09 月 20 日, Udayana University, Bali (Indonesia)

田鹿 結, 阿部 歩, 曾根輝雄, イネいもち病菌の DNA 損傷シグナルトランスドューサー p53BP1 の解析, 日本農芸化学会北海道支部夏期シンポジウム, 2012

年 07 月 27 日 ,北海道大学水産学部講堂  
(函館市)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

曾根 輝雄 (SONE, Teruo)

北海道大学・大学院農学研究院・准教授

研究者番号: 00333633

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

なし