

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 6 月 15 日現在

機関番号：14501

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25850028

研究課題名(和文)非病原力遺伝子変異を指標としたいもち病抵抗性遺伝子持続性予測システムの確立

研究課題名(英文) Prediction of durable resistance genes against rice blast fungus based on fungal mutation mechanism

研究代表者

中馬 いづみ (Chuma, Izumi)

神戸大学・学内共同利用施設等・助教

研究者番号：90628926

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：AVR遺伝子のうち、欠失型変異を起こすAVR-Pita、AVR-Pia、AVR-Pii、AVR-Pikと非欠失型変異を起こすAVR-Piztの変異様式および、国内外より分離した新規いもち病菌菌株における分布を比較した。これにより、AVR-Piztは周辺のゲノム構造の安定性(寄生性の異なるいもち病菌を比較した場合少なくとも数百kbが保存されている)、変異様式(変異菌の分離頻度は低いが、すべてトランスポゾン挿入変異かアミノ酸置換による)から比較的変異の起こりにくい遺伝子であることを支持するデータが得られた。

研究成果の概要(英文)：We examined mutation mechanisms of AVR-Pizt, an avirulence gene of rice blast fungus, and found that the main mechanism of AVR-Pizt mutation was nucleotides substitution or transposon insertion. Hybridization analysis revealed that AVR-Pizt was conserved among rice isolates from Philippine, Vietnam, and Italy, whereas the other avirulence genes were deleted in some isolates. These results suggested that AVR-Pizt is relatively stable when compared with the other avirulence genes.

研究分野：植物病理学

キーワード：イネ科植物いもち病菌

## 1. 研究開始当初の背景

*Pyricularia oryzae* (完全世代 *Magnaporthe oryzae*) によって引き起こされるイネいもち病は世界の稲作地域における最重要病害のひとつである。本病害の有効な防除方法のひとつに抵抗性育種があるが、単一の抵抗性遺伝子を持つ品種を継続使用するとその品種が罹病化しやすいという問題がある。これは宿主植物が持つ抵抗性遺伝子(以下R遺伝子)に対応する菌の非病原性遺伝子(以下AVR遺伝子)の変異が原因である。本邦ではマルチラインの作出等、高度な育種技術により優れた抵抗性品種の作出および利用方法の開発が展開されている。しかし、どのR遺伝子を使用するかについてはこれまでに蓄積してきた膨大なデータによるところが大きく、新規R遺伝子のように過去のデータが少ないものについては、それが有効であるかを知るにはかなりの時間や試行錯誤を必要とする。

本研究室ではこれまでに、イネ菌においてクローニングされたAVR遺伝子(*AVR-Pita*、*AVR-Pik/km/kp*、*AVR-Pia*、*AVR-Pii*、*AVR-Pizt*)の変異機構を解析してきた。これらの多くは染色体上の転移因子 rich 領域あるいはテロメア近傍領域に存在していた。採集国の異なるイネ菌 30 菌株における座乗染色体を調べると、各菌株において過剰染色体も含めた異なる染色体領域に存在することが明らかとなり、我々はこの現象を multiple translocation (MT) と呼んだ。MT を起こしたAVR遺伝子について病原性獲得の原因となる変異機構を調査したところ、病原性獲得にはこれら遺伝子の欠失が主な機構であることと、MTは欠失した遺伝子の再獲得が繰り返された痕跡である可能性を見出した。このような欠失と獲得には、ゲノム上の散在反復配列が寄与していると考えられた。一方、*AVR-Pizt* はこれらとは対照的に、*P. oryzae* 全菌株において第7染色体の遺伝子 rich 領域(転移因子 poor 領域)に存在し、これを欠失させた菌株は検出されなかった。病原性変異に関わる変異機構を調べると、アミノ酸変異またはトランスポゾン挿入による遺伝子の機能喪失が原因であった。これまでに知られているR遺伝子罹病化の記録と照合すると、*Pita*、*Pik*、*Pia*、*Pii* は抵抗性品種作付後数年以内に罹病化した記録があり、*Pizt* については罹病化の記録が認められなかった。これらのことを総合し、菌のすばやい病原性変異を引き起こすカギとなるのはAVR遺伝子の欠失変異で、欠失が起こるか否かはその遺伝子の染色体領域が変異を起こしやすい領域であるか(テロメア近傍か、あるいは転移因子 rich 領域であるか)の影響を受けているのではないかと考えられた。

## 2. 研究の目的

本研究は、新規R遺伝子に対応する遺伝子の変異頻度(変異のしやすさ)の指標となる遺伝子変異あるいは特徴を見出し、R遺伝子

の持続性を予測することを目的として行った。欠失型変異を起こすAVR遺伝子は変異を起こしやすく、非欠失型変異を起こすAVR遺伝子は変異を起こしにくいという仮説が正しければ、*AVR-Pizt* は変異を起こしにくいことになり、これに対応する *Piz-t* は持続性が比較的高いR遺伝子であると言えることになる。本研究では、*AVR-Pizt* 変異菌の菌株数を増やし、変異機構および変異菌における遺伝子発現の有無を調査した。また、欠失型変異を起こす遺伝子については、欠失変異の生物学的意義を見出すために、欠失後の再獲得の起こる可能性について検討した。特に、遺伝子獲得の場となる、異系統間の細胞融合について検討した。

## 3. 研究の方法

### (1) *AVR-Pizt* の変異機構

本研究室保有の *AVR-Pizt* 菌株数が少ない(3菌株)ため、データベースに登録されている菌株等を新規に得、本遺伝子が普遍的に非欠失型変異を起こしているかを調査した。遺伝子の分布は分子マーカーを用いたPCRとゲノミックサザン解析によって調査し、座乗染色体はCHEFサザン解析によって調査した。遺伝子発現は、RT-PCR および qPCR によって解析した。

### (2) AVR 遺伝子と R 遺伝子の地理的相関の検討

以前にフィリピン、ベトナム、タイで採集したいもち病罹病植物体および、各国で既に分離されたいもち病菌菌株を輸入した。イタリア産菌株については、既に輸入したものを使用した。これらを用い、外国におけるイネ菌とイネ品種の相互作用について、AVR 遺伝子分布の調査結果に基づき検討した。

### (3) 異なる菌株間の遺伝子交換の可能性

欠失型変異を起こした遺伝子は、その後異系統の菌から遺伝子を再獲得する(その結果としてMTが検出される)という仮説を検証するため、異なる2菌株を共存培養し、遺伝子交換の現場と考えられる細胞融合の再現を試みた。PDA 培地を用い、孢子懸濁液の混合物または菌糸片を対峙培養し、光学顕微鏡を用いて経時的に細胞融合の有無を観察した。

### (4) LTH monogenic lines を用いた各種 AVR 遺伝子の R 品種上での変異菌検出頻度の比較

AVR 遺伝子の座乗領域を変化させることで、変異頻度が変異するか否かを検討する。ゲノム上で変異を起こしやすい不安定領域(転移因子 rich 領域、テロメア近傍領域)として、イネ菌における *AVR-Pita* 座乗領域を候補として選抜し、変異を起こしにくい安定領域(転移因子 poor 領域、遺伝子 rich 領域)として、*AVR-Pizt* 座乗領域を選抜した。これに対し、欠失型 AVR 遺伝子 (*AVR-Pia*) と非欠

失型 AVR 遺伝子 (*AVR-Pizt*) を人工ヌクレアーゼ TALEN を用いて各領域に導入した。

#### 4. 研究成果

##### (1) *AVR-Pizt* の変異機構

*AVR-Pizt* の変異機構は非欠失型で、塩基置換 (アミノ酸変異) と転移因子挿入変異の報告例がある。このような変異を持つ菌が自然界にどの程度定着しているかを知るために、これまでに *AVR-Pizt* 変異菌が日本国内でどの程度分離されているかを調査した。MAFF ジーンバンクに登録されているイネ菌約 600 菌株のうち、レース番号から *AVR-Pizt* 変異菌は 6 菌株認められた。このことから、変異菌は国内において広範囲に定着しており、優先レースとしては存在していないことが示唆された。

上記変異菌 6 菌株に加え、宮城大学圃場で分離されたササニシキ (*Pia*) 病斑上の菌 (非変異菌) とこれが変異してとりで 1 号 (*Piz-t*) に感染した菌 (変異菌) および、本研究室所有の変異菌 3 菌株の計 10 菌株を用い、変異様式を解析した。変異の種類は、トランスポゾン挿入 (プロモーター領域、コード領域)、塩基置換 (終止コドンへの変異、アミノ酸変異) のいずれかに類別され、何らかのかたちで元の遺伝子配列が保持されていた。転写の有無を調査したところ、ほとんどの変異菌株において本遺伝子が転写されていることが明らかとなった。これらのうち、宮城大学で分離された変異菌は、*AVR-Pizt* プロモーターへのトランスポゾン挿入変異によってとりで 1 号に対する病原性を獲得した。非変異菌・変異菌における *AVR-Pizt* の発現量を比較したところ、接種後ともに *AVR-Pizt* 遺伝子は発現していたが、変異菌においてはプロモーターへのトランスポゾン挿入によって、発現量が有為に低下していたことが明らかとなった。一方、イネ菌以外の菌株が持つ *AVR-Pizt* ホモログについては、*AVR-Pizt* 非保有イネ菌に導入した形質転換体をとりで 1 号に接種することで、すべて抵抗性反応が誘導されることを確認した。また、イネ菌、アワ菌、コムギ菌、シコクピエ菌、エンバク菌の全ゲノムシーケンスより、*AVR-Pizt* を含む scaffold の塩基配列を比較したところ、本遺伝子周辺約 100kb にはハウスキーピングが含まれており、周辺はすくなくとも数百 kb にわたり基本的構造が保存されていることを確認した。

以上のことから、*AVR-Pizt* は変異菌のフィールドからの分離頻度の低さ、染色体上の構造の保存性から、安定な遺伝子であるという仮説が支持されたと言える。

##### (2) AVR 遺伝子と R 遺伝子の地理的相関の検討

フィリピン、ベトナム、イタリアより分離したイネいもち病菌およびメヒシバいもち病菌について、AVR 遺伝子の保有状況を調査

した。これまでに調査した日本および外国産の菌株における AVR 遺伝子の分布の特徴と顕著に異なる分布を示す集団は見出されなかった。同一採集地における異なる菌株間の遺伝子交換の痕跡等も検出されなかった。*AVR-Pizt* については、変異菌は検出されなかった。

##### (3) 異なる菌株間の遺伝子交換の可能性

異なる菌株間での遺伝子交換を再現するために、まず菌系融合が起こる可能性について検討した。異なる 2 菌株の分生孢子を混合し、PDA 液体培地、寒天培地において共存培養を試みた。孢子細胞からの conidial anastomosis tube による細胞融合は観察されなかったが、いくつかの菌株の組み合わせにおいて発芽管細胞の融合が認められた。また、菌糸片の対峙培養により、伸長した菌糸先端で細胞融合が観察された。

##### (4) LTH monogenic lines を用いた各種 AVR 遺伝子の R 品種上での変異菌検出頻度の比較

本実験は当初の予定より進行が遅れている。LTH monogenic lines を栽培したところ、植物体の外見が大きく異なっており、遺伝的にこれらが均一であるかに疑問が持たれた。接種試験を行ったところ、*AVR-Pizt* 保有菌に対する反応が予想と異なったため、この monogenic lines を今後使用しないことにした。現在、宮城県古川農業試験場より分譲されたササニシキ BL を用い、実験を再開している。本実験で用いるいもち病菌については、遺伝子を転移因子 rich 領域に導入することがかなり困難であることが予想されていたが、人工ヌクレアーゼ TALEN を用いることで、正確に導入する領域を指定することが可能となった。現在、染色体上の不安定領域 (転移因子 rich 領域、テロメア近傍領域等)、安定領域 (遺伝子 rich 領域) をターゲットとして各種 AVR 遺伝子を既に導入している。今後、これらの形質転換体の接種試験を行い、ササニシキ BL の各種 R 遺伝子保有個体上での変異頻度の比較を行う。今後は他の領域もターゲットとした AVR 遺伝子導入システムを作出する予定である。

これらの研究成果は現在投稿準備中の内容も含め、下記 5 つの国内外の学会において招待講演を行い研究成果を発表した。本研究により、抵抗性遺伝子持続性予測システムの確立までは至らなかったが、*AVR-Pizt* の変異の、欠失型変異を起こす AVR 遺伝子との違いを明確にすることができた (現在投稿準備中)。これにより、*AVR-Pizt* の変異菌出現および自然界への定着頻度は比較的 low、これに対応する R 遺伝子 *Piz-t* は比較的持続性が高いという仮説を支持することができた。AVR 遺伝子変異頻度の比較については、人工ヌクレアーゼ TALEN を用い、AVR 遺伝子を様々なゲノム領域に転移させ、変異頻度を比較す

る予定である。例えば、AVR 遺伝子周辺に転移因子がどのような構造をとって存在していれば、より欠失が起こりやすくなるかを調査する。非欠失型変異については、周辺に致死遺伝子が存在する場合の変異様式、特に *AVR-Piz1* 変異については TALEN によって遺伝子周辺に欠失変異を誘導した場合の影響についても検討する予定である。これらの研究結果に基づき、AVR 遺伝子変異を引き起こすゲノム的な要因を明らかにすれば、変異を起こしにくい AVR 遺伝子がどのような領域に存在するかを予測することができるはずである。

#### 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)

[雑誌論文](計 9 件)

Cumagun C.J.R., V.L. Anh, T.T.P Vy, G.-S.

Hyon, Y. Inoue, I. Chuma, and Y. Tosa.

(2014) Identification of a hidden resistance gene in tetraploid wheat using laboratory strains of *Pyricularia oryzae* produced by backcrossing. *Phytopathology*. 104:634-640.

Tosa Y. and I. Chuma. (2014) Classification and parasitic specialization of blast fungi.

*Journal of General Plant Pathology*.

80:202-209. (総説)

Kusaba M., T. Mochida, T. Naridomi, Y. Fujita, I. Chuma and Y. Tosa. (2014) Loss of a 1.6Mb chromosome in *Pyricularia oryzae* harboring two alleles of *AvrPik* leads to acquisition of virulence to rice cultivars containing resistance alleles at the *Pik* locus. *Curr. Genet*. 60:315-325.

Pham T.M.K., H.H. Nguyen, T. Murai, I. Chuma, Y. Tosa and H. Nakayashiki. Histone H3K4 methyltransferase globally regulates substrate-dependent activation of cell wall degradation enzymes in *Magnaporthe oryzae*. *Journal of General Plant Pathology*. 81:127-130.

Tagle A.G., I. Chuma, and Y. Tosa. (2015) *Rmg7*, a new gene for resistance to *Triticum* isolates of *Pyricularia oryzae* identified in tetraploid wheat. *Phytopathology*. 105:495-499.

Murata N, Aoki T, Kusaba M, Tosa Y, and Chuma I. (2014) Various species of *Pyricularia* constitute a robust clade distinct from *Magnaporthe salvinii* and its relatives in Magnaporthaceae. *Journal of General Plant Pathology*, 80:66-72.

Vy, T. T. P., G.-S. Hyon, N.T.T. Nga, Y. Inoue, I. Chuma and Y. Tosa. (2014) Genetic analysis of host-pathogen incompatibility between *Lolium* isolates of *Pyricularia oryzae* and wheat. *Journal of General Plant Pathology*, 80:59-65.

Ikeda K., B. Vu, M. Tanaka, T. Murata, K. Shiina, I. Chuma, Y. Tosa, H. Nakayashiki. (2013) Is the fungus *Magnaporthe* losing DNA methylation? *Genetics*, 195:845-855.

Inoue Y, Mori R, Takahashi Y, Kiguchi S, Enomoto T, Chuma I, and Tosa Y. (2013) Identification and Molecular Mapping of a Wheat Gene for Resistance to an Unadapted Isolate of *Colletotrichum cereale*. *Phytopathology* 103:575-582.

[学会発表](計 20 件)

中馬いづみ (2013) 国際植物命名規約改訂に伴ういもち病菌属名に関する議論の現状. 日本菌学会第 57 回大会. 於東京農業大学(東京都). 平成 25 年 6 月. (招待講演)

中馬いづみ (2013) 国際植物命名規約改訂に伴ういもち病菌属名に関する議論の現状. 第 13 回植物病原菌類談話会「稲熱病(菌)研究に学ぶ」. 於岐阜大学(岐阜県). 平成 25 年 3 月. (招待講演)

中馬いづみ (2014) いもち病菌の宿主への適応とエフェクター遺伝子の維持. 平成 26 年度日本植物病理学会関西支部若手の会. 於富山大学五福キャンパス(富山県). 平成 26 年 9 月. (招待講演)

Chuma I, Aoki T and Tosa Y (2014) Evolution of the genus *Pyricularia*, the rice blast fungus, and its effector genes. The 10th International Mycological Congress. Bangkok, Thailand. (August 2014) (招待講演)

中馬いづみ (2015) Vir/Avr 遺伝子の長い旅路「Avr 因子」. 日本植物病理学会創立 100 周年記念シンポジウム「植物病理学: 新たな 100 年への羅針盤」. 於明治大学御茶ノ水キャンパス(東京都). 平成 27 年 3 月. (招待講演)

#### 6. 研究組織

(1) 研究代表者

中馬 いづみ (CHUMA, Izumi)

神戸大学・自然科学系先端融合研究環重点研究部・助教

研究者番号: 90628926

(4) 研究協力者

Dr. Le Dinh Don (ベトナム・ノンラム大学)

Dr. Nguyen Thi Thin Nga (ベトナム・農業遺伝学研究所)

Dr. Christian Cumagun (フィリピン・フィリピン大学ロスバニョス校)

Dr. Taneer Sreewongchai (タイ・カセサート大学)

Dr. Otmar Spring (ドイツ・ホーヘンハイム大学)