

平成 28 年 4 月 30 日現在

機関番号：14501

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2015

課題番号：26660034

研究課題名(和文)古起源病害抵抗性遺伝子の他標的の探索と植物種分化における役割の検討

研究課題名(英文)Targets of old resistance genes and their implications in plant speciation

研究代表者

土佐 幸雄(TOSA, YUKIO)

神戸大学・(連合)農学研究科(研究院)・教授

研究者番号：20172158

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,900,000円

研究成果の概要(和文)：コムギのエンバクいもち病抵抗性遺伝子Rwt4は、コムギのカモジグサうどんこ病抵抗性遺伝子Pm10とメンデル遺伝学的に同じ遺伝子座に座乗する。そこで、Rwt4に対応する非病原力遺伝子PWT4とPm10に対応する非病原力遺伝子Ppm10が同じ遺伝子座ではないかと考え、サザン解析を行なったが、カモジグサうどんこ病菌ゲノム内にPWT4と相同の配列は認められなかった。

一方、オオムギのさまざまないもち病菌に対する抵抗性を支配する遺伝子座Rmo2のクローニングを試みた。fine mappingの結果、座乗領域を50kbまで狭めることができた。

研究成果の概要(英文)：Rwt4, a wheat resistance gene against the oat blast fungus, is located at the same locus as Pm10, a wheat resistance gene against the wheatgrass powdery mildew fungus. Southern blot analyses suggested that PWT4 corresponding to Rwt4 is different from Ppm10 corresponding to Pm10.

Rmo2, a barley resistance gene, is effective against various subgroups of the blast fungus. The candidate genomic region with Rmo2 was delimited to 50kb through fine mapping.

研究分野：植物病理学

キーワード：Pyricularia oryzae 抵抗性遺伝子 非病原力遺伝子

1. 研究開始当初の背景

コムギは、エンバクいもち病菌 *Pyricularia oryzae* Avena subgroup、メヒシバいもち病菌 *P. grisea* 等イネ科他属植物を宿主とするさまざまな病原菌に強度の抵抗性を示すが、その抵抗性を解析すると抵抗性主働遺伝子が必ず検出される (Takabayashi et al. 2002; Nga et al. 2009)。しかし、このようなコムギ以外のイネ科植物を宿主とする病原菌は限りなく存在する。それらすべてに対して個々に抵抗性遺伝子を具備することは、ゲノムの容量の限界を考えた時に非現実的なように思われる。これは、非宿主抵抗性の基本的パラドックスである。

一方、近年植物種内交雑によって起こる Hybrid necrosis または growth defect に、NB-LRR 遺伝子(座) が関与しているという例が相次いで報告された (Bombliès et al. 2007; Alcazar et al. 2009, 2010)。雑種の growth defect は生殖的隔離を起こし、生殖的隔離は種分化を引き起こすが、NB-LRR 遺伝子は病害抵抗性遺伝子として広く知られているものである。

以上のことを総合した結果、筆者は (a) 起源の古い抵抗性遺伝子においては、複数種の病原体を認識することは稀ではなく、それによって「抵抗性遺伝子の節約」を可能にしている (b) 起源の古い抵抗性遺伝子には、植物他個体を認識するものもあり、それを通して種分化に関与する と考えるに至った。

2. 研究の目的

上記仮説を検証するため、次の二つの系を用いることにした。

(1) コムギのエンバクいもち病菌に対する抵抗性は、コムギの持つ抵抗性遺伝子 *Rwt3*、*Rwt4* と、それぞれに対するエンバクいもち病菌の非病原力遺伝子 *PWT3*、*PWT4* に支配されている。普通系コムギ 30 品種を用いてそれらの分布を調べると、*Rwt3* は 90% 以上の、*Rwt4* は 70% 以上の品種に存在している。しかし、それらのほとんどは、エンバクいもち病菌の存在する南米以外の地域で栽培されてきた品種であり、さらにその多くは、いもち病菌の

活動に不適な乾燥地帯のものである。それにも拘わらずこれら遺伝子が広く保持されていることから、それらはいもち病菌以外の標的を持っており、その標的の有効候補の一つはうどんこ病菌 *Blumeria graminis* 等乾燥地帯に適応した病原菌であると考えた。興味深いことに、*Rwt4* は、カモジグサうどんこ病抵抗性遺伝子 *Pm10* と同じ座に座乗する。上記品種群における *Rwt4* と *Pm10* の有無が完全に一致することから、両遺伝子は同じものであると推測される。この事実は、カモジグサうどんこ病菌の持つ非病原力遺伝子 *Ppml0* (*Pm10* に対応) が *PWT4* のオースログであると考えれば、Gene-for-gene で説明できる。これが正しいかどうかを検討した。

(2) アワいもち病菌のコムギに対する非病原性は、非病原力遺伝子 *PWT1* に支配されている。本遺伝子がどの範囲の植物に認識されるかを調べたところ、興味深いことにイチゴツナギ亜科 (Pooideae) の植物は調べた限りにおいてすべてこれを認識するが、それ以外の亜科の植物は全く認識しないことが判明した。このことから、*PWT1* に対応する抵抗性遺伝子 (*Rwt1* と仮称) は、イチゴツナギ亜科の分化時点から存在しており、イチゴツナギ亜科の分化そのものに関与したのではないかと考えた。

Rwt1 の機能解析のためにはその同定とクローニングが必要であるが、これまで調べたすべての普通系コムギ品種が *PWT1* に反応する (*Rwt1* を持っている) ため、それは不可能であった。一方、我々は、オオムギ品種のなかに、あらゆるいもち病菌に高度の感受性を示す品種 Nigrate (Ngt) を見出し (Hyon et al. 2012)、これを感受性親として用いて、*PWT1* を認識する抵抗性遺伝子 *Rmo2* を同定した (Nga et al. 2012)。これは *Rwt1* のホモログであると考え、そのクローニングを試みた。

3. 研究の方法

(1) では、カモジグサうどんこ病菌 *B. graminis* f.sp. *agropyri* 菌系 Ah-1、コムギうどんこ病菌 *B. graminis* f.sp. *tritici* 菌系 Th-1、ならびにその F₁ 菌系のひとつ、AT-100 を用い

た。

(2) では、*Rmo2* を保有するオオムギ品種 Russian No.81 (R81), H.E.S.4 (H4), *Rmo2* を保有しないオオムギ品種 Nigrate (Ngt), ならびにその F_2 , F_3 , F_4 を用いた。*Rmo2* 遺伝子型の決定には、アワイもち病菌 *P. oryzae* 菌系 GFSI1-7-2 を供試した。

4. 研究成果

(1) カモジグサうどんこ病菌における *PWT4* ホモログの探索

カモジグサうどんこ病菌は増殖が難しいので、これとコムギうどんこ病菌を交配し、 F_1 菌系群を得た。これらを、*Pm10* を持つコムギ品種に接種し、各菌系の *Ppm10* 遺伝子型を決定した。そうして、*Ppm10* を保有し、かつ継代培養に用いている一粒系コムギ *Triticum urartu* (Urr)の上で旺盛に増殖する菌系 AT-100 を選抜した。この菌系を Urr 上で培養して胞子を回収し、DNA を抽出した。

まず、*PWT4* を増幅させるプライマーを作成し、上記のうどんこ病菌ゲノム DNA から PCR 増幅を試みた。しかし、増幅産物は得られなかった。

次に、うどんこ病菌ゲノム DNA を制限酵素で切断・電気泳動し、メンブレンに転写後、*PWT4* をプローブとしてサザンハイブリダイゼーションを行なった。しかしながら、ポジティブシグナルを得ることはできなかった。

以上のことから、同じ抵抗性遺伝子(座)に対応するものの、*Ppm10* と *PWT4* は異なる遺伝子であることが示唆された。

(2) *Rmo2* クローニングの試み

抵抗性品種 R81 x 感受性品種 Ngt 由来 *Rmo2* 分離集団 10,000 個体を用いたマッピングの結果、本遺伝子座乗領域を 7H 染色体末端の約 100kb に絞り込んだ。オオムギ全ゲノムシーケンスと照合したところ、この領域には 3 つの遺伝子が存在し、その一つは NB-LRR 型タンパク質、一つは Cystein-rich receptor-like protein kinase をコードしていた。しかし、さらに分離集団を増やして精密マッピングを行なった結果、これらは *Rmo2* では

ないことが判明した。

つぎに、連鎖マーカーを用いて当該領域の BAC クローンを選抜した。これらのクローンを整列化し、塩基配列を解読したところ、候補領域を 50kb にまで絞り込むことができた。現在、形質転換による相補性試験の準備を行っている。

ところで、これまでの研究において、オオムギの *P. oryzae* の菌群に対する抵抗性においては、どの菌群に対しても *Rmo2* 座が関与することが明らかとなっている。そこで、*Rmo2* 座が *P. oryzae* 外のどの範囲まで作用するのかを検討した。*P. oryzae/grisea* species complex の潜在種ならびに形態種をさまざまなオオムギ品種に接種したところ、潜在種 *P. pennisetigena* 菌株 tO-7 が、H4 に非病原性を示す一方で Ngt に強度の病原性を示した。そこで、H4 (抵抗性) x Ngt (感受性) の F_2 に tO-7 を接種したところ、抵抗性個体と感受性個体が 3:1 に分離した。さらに、 F_3 においては、homozygous resistant:segregating:homozygous susceptible の系統が 1:2:1 の比で分離した。この F_3 系統に *P. oryzae* GFSI1-7-2 を接種したところ、その反応パターンは、tO-7 に対するものとはほぼ一致した。このことから、*Rmo2* は、他種 *P. pennisetigena* に対しても作用することが示唆された。

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 0 件)

[学会発表](計 1 件)

Tagle A., Hyon, G-S., Yamaji, N., Hisano, H., Sato, K., Chuma, I., and Tosa, Y. (2015) Fine-mapping of *Rmo2*, a resistance locus against the blast fungus in barley. 平成 27 年度日本植物病理学会大会. 平成 27 年 3 月 30 日. 明治大学リバティータワー(東京).

[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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

土佐 幸雄 (TOSA, Yukio)
神戸大学・大学院農学研究科・教授
研究者番号：20172158

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：