

オオムギうどんこ病菌の新たな菌株の病原性の解析

香口 智宏・和原 未季・菅井 維之・山岡 直人・八丈野 孝*

Tomohiro KOHGUCHI, Miki WAHARA, Koreyuki SUGAI, Naoto YAMAOKA and Takashi YAENO*:
Analysis of Pathogenicity of a New Race of *Blumeria graminis* f. sp. *hordei*.

Abstract

Blumeria graminis f. sp. *hordei* (Bgh) secretes effector proteins as virulence factors and suppresses host defense responses to establish the infection. In this study, we analyzed the morphology and the virulence of the newly isolated race of Bgh OU14. As a result, there is no obvious difference in the morphology between OU14 and the well-characterized Race I. However, we found that OU14 has different set of effector genes from Race I.

キーワード : オオムギうどんこ病菌 (*Blumeria graminis* f. sp. *hordei*), エフェクター, 抵抗性遺伝子, 植物免疫

1. 緒言

Blumeria graminis は子嚢菌類に属する絶対寄生菌で、コムギやオオムギなどの重要作物を含むイネ科植物にうどんこ病を引き起こす。オオムギうどんこ病菌 (*B. graminis* f. sp. *hordei*) は主としてオオムギにのみ感染する。オオムギうどんこ病菌のライフサイクルは、分生子がオオムギ表皮細胞に接触することから始まる。接触後、約 2 時間で第一発芽管 (primary germ tube; PGT) を形成する。この PGT はムギ類に感染するうどんこ病菌にのみ観察される形態で、宿主細胞からの水分の吸収などに関わっていると考えられている (Yamaoka *et al.*, 2006)。宿主への接触から約 6~8 時間後に付着器発芽管 (appressorial germ tube; AGT) が形成される。接触後約 9~10 時間で、伸長した AGT の先端が膨張し、付着器 (appressorium; App) が形成され宿主細胞へ侵入する。侵入に成功すると、宿主の細胞壁と細胞膜の間に栄養摂取器官である吸器が形成される。吸器は外側を膜に取り囲まれた状態で存在している。この膜は宿主由来であるが、その生化学的特性には細胞膜とは異なる点があることが分かっている (Hückelhoven and Panstruga, 2011)。吸器形成後、分

生子は栄養を吸収しながら、二次菌糸を宿主細胞の表面に伸長させる。二次菌糸は伸長した先でさらに吸器を形成し、分岐をしながら伸長を続ける。やがて、分生子柄が形成されると、その分生子柄には多くの新しい分生子が形成される。オオムギうどんこ病菌は分生子柄の他に、有性世代として子嚢殻を形成するが、古くから主要菌株として多くの研究室で維持培養されてきた Race I 株では有性世代はまだ見つかっていない。

Flor (1942) は、病原体が持つ非病原性 (avirulence; AVR) 遺伝子には、対応する宿主側の抵抗性 (resistance; R) 遺伝子が存在し、それぞれの遺伝子産物が相互作用することで過敏感反応 (hypersensitive reaction; HR) を代表とする宿主の防御反応が起こる、という遺伝子対遺伝子説を唱えた。AVR タンパク質は後にエフェクターと呼ばれるようになり、エフェクターと R タンパク質の研究には、この遺伝子対遺伝子説を基礎として発展してきた背景がある。病原菌のエフェクターを認識する R タンパク質は、N 末端側の coiled coil (CC) あるいは TIR (Toll / interleukin-1 receptor) ドメイン、中央のヌクレオチド結合 (nucleotide binding; NB) ドメイン、C 末端側のロイシンリッチリピート (leucine-rich repeat; LRR) ドメインの三つの部位からなり、NB-LRR と呼ばれる。

オオムギにおいては、*MLA* 遺伝子座に座乗する R 遺伝子として *MLA* 対立遺伝子が複数の品種で見つ

2015 年 4 月 1 日受領

2015 年 7 月 30 日受理

*愛媛大学農学部植物病学教育分野

かっている。MLA は N 末端に CC ドメインを持つ R タンパク質であり、対応するエフェクターを持つオオムギうどんこ病菌に対して分離株特異的抵抗性を発揮する。MLA の LRR ドメインには品種間で多様性が見られ、対応するエフェクターの認識特異性に関わると予測されている (Seeholzer *et al.*, 2010)。オオムギでは MLA の他に *Mlg*, *Mlp* および *Mlk* 遺伝子座などが見つかっているが、遺伝子の同定にはまだ至っていない。

オオムギうどんこ病菌の新規分離株である OU14 株はオオムギ品種‘Haruna Nijo’へ感染できるという、Race I 株には見られない特徴を持つ。そこで OU14 株の形態形成や病原性について、Race I 株との比較解析を行った。光学顕微鏡による細胞学的な解析の結果、OU14 株は形態形成などにおいて Race I 株とほぼ同様の傾向を示すことが分かった。また、複数のオオムギ品種への接種実験から、OU14 株はいくつかのエフェクター遺伝子を持つことが示唆され、Race I 株とは異なる特徴を持つことが明らかとなった。

2. 材料と方法

2.1. オオムギとオオムギうどんこ病菌

本実験では‘Algerian’ (CI 1179), ‘Mars’ (CI 7015), ‘Opal’, ‘Gopal’ (CI 1091), ‘Golden Promise’, ‘Bonus’, ‘Turkey 290’, ‘Morex’, ‘Goldfoil’ (CI 928), ‘Psaknon’ (CI 6305), ‘Kwan’ (CI 1016), ‘Kobinkatagi’ および ‘Haruna Nijo’ (はるな二条) の 13 品種のオオムギを使用した。また、オオムギうどんこ病菌 *Blumeria graminis* f. sp. *hordei* Race I 株および OU14 株はそれぞれ感受性品種‘Kobinkatagi’および‘Haruna Nijo’で維持した。いずれの実験においても、使用するオオムギは 20°C, 24 時間連続光に設定した人工気象器 (LH-220, 日本医化器械または M-230FN, タイテック) で生育させた。

2.2. OU14 株の形態形成

7 日齢の‘Kobinkatagi’から Yamaoka *et al.* (2000) の方法に従って子葉鞘切片を作成し、筆を用いてオオムギうどんこ病菌 OU14 株を接種した。それを 1mM CaCl₂ 水溶液に浮かべ、20°C に設定した人工気象器内で培養した。その後、光学顕微鏡 (BX53, オリンパス) を使って経時的に形態を観察した。

2.3. オオムギ子葉鞘切片における吸器形成率

7 日齢の‘Kobinkatagi’から子葉鞘切片を作成し、オオムギうどんこ病菌の分生子を接種した。それを 1mM CaCl₂ 水溶液に浮かべ、20°C に設定した人工気

象器内で培養した。上述のようにオオムギうどんこ病菌を接種した‘Kobinkatagi’の子葉鞘を、接種 24 時間後に光学顕微鏡下で観察し、吸器を形成している分生子数を計数した。分離株ごとに 3 反復行い、1 つの子葉鞘につき 25~50 個の分生子を調べた。

2.4. OU14 株に対する各オオムギ品種の抵抗性

7 日齢の各オオムギ品種に Race I 株または OU14 株を接種し、1 週間後に抵抗性の評価を行った。うどんこ病の標徴が観察された場合には感受性 (S)、標徴が観察されると共に、HR 細胞死も観察された場合には中度抵抗性 (M)、標徴が観察されず、HR 細胞死が観察される場合には抵抗性 (R) とした。

3. 結果

3.1. OU14 株の形態形成

新たに分離されたオオムギうどんこ病菌 OU14 株の形態形成を子葉鞘切片上で経時的に観察した。Race I 株と同様に、OU14 株の分生子はまず最初に第一発芽管を形成し、その後、付着器、吸器、二次菌糸の順に形態形成を行い、最終的に新しい分生子柄形成に至った (図 1)。

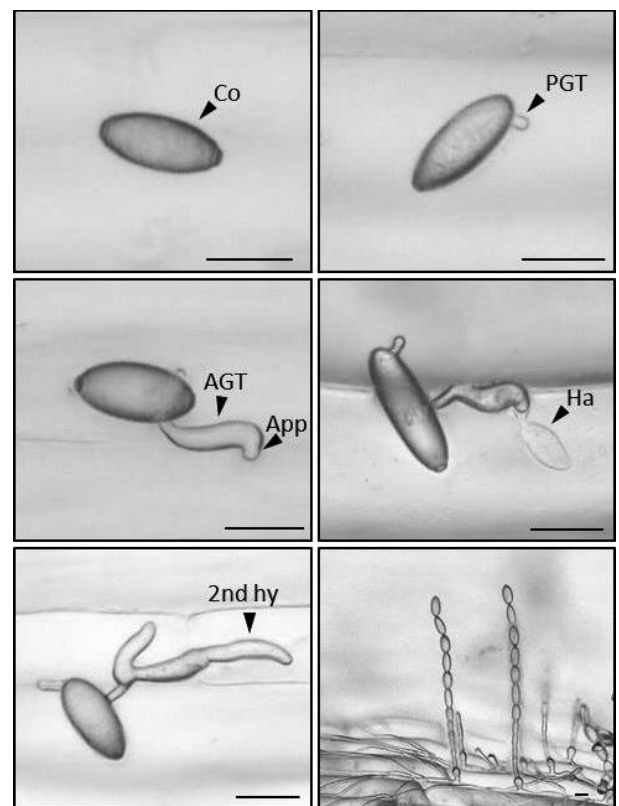


図 1 OU14 株の形態形成

Co, 分生子; PGT, 第一発芽管; AGT, 付着器発芽管; App, 付着器; Ha, 吸器; 2nd hy, 二次菌糸
スケールバーは 20 μm.

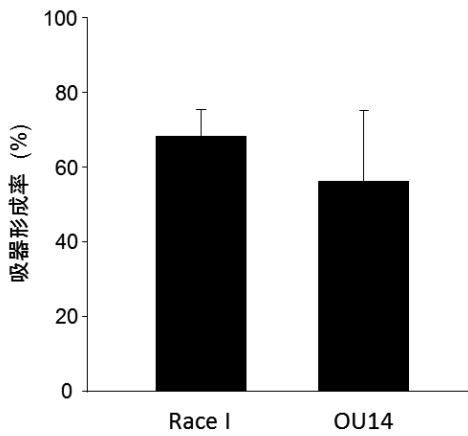


図2 各菌株の吸器形成率

3.2. オオムギ子葉鞘切片における吸器形成率

オオムギ品種 ‘Kobinkatagi’は Race I 株および OU14 株に対して感受性を示す。そこで、両菌株の病原性を定量的に比較するために ‘Kobinkatagi’の子葉鞘切片上における Race I 株と OU14 株の吸器形成率を測定した。両分離株の吸器形成率に有意差はなく、Race I 株においては付着器を形成した分生子の 69%，OU14 株においては 56%が吸器形成に至った (図2)。

3.3. OU14 株に対する各オオムギ品種の抵抗性

各オオムギ品種のオオムギうどんこ病菌に対する抵抗性は、オオムギが持つ R 遺伝子とオオムギうどんこ病菌が持つ AVR 遺伝子の組み合わせによって決定される。オオムギは *MLA* 対立遺伝子の他に *Mlg*, *Mlp*, *Mlk* 遺伝子座を持ち、これらの遺伝子座に座乗している遺伝子是对応するエフェクターを認識すると思われる。そこで、OU14 株がどの AVR 遺伝子を持つのかを調べるために、*MLA* 対立遺伝子および *Mlg*, *Mlp*, *Mlk* 遺伝子座をひとつずつ持つオオムギ品種の OU14 株に対する抵抗性を調べた。その結果、供試した 12 品種のうち、‘Algerian’ (*MLA1*)，‘Gopal’ (*MLA7*)，‘Goldfoil’ (*Mlg*)，‘Kwan’ (*Mlk*) の 4 品種で HR 細胞死が観察され、OU14 株に対し

て抵抗性であると判定された (図3 および表1)。また、‘Psaknon’ (*Mlp*) においては、うどんこ病の標徴と HR 細胞死が観察され、中度抵抗性を示した。以上の結果から、OU14 株はエフェクター遺伝子として *AVRa1*, *AVRa7*, *AVRg*, *AVRp*, *AVRk1* を持つことが示唆された。

3.4. ‘Haruna Ni jo’ は OU14 株に対して感受性である

‘Haruna Nijo’は、日本国内で優良品種として長年栽培され続けており、オオムギゲノムプロジェクトのモデルオオムギとして利用されている。‘Haruna Nijo’は、古くから国内で発生していた Race I 株に対して強い抵抗性を持っているが (図4)，どの R 遺伝子が寄与しているのか不明であった。そこで、‘Haruna Nijo’が持つ *MLA* 対立遺伝子を調べるために、*MLA1* 遺伝子の cDNA 配列を用いて ‘Haruna Nijo’のゲノムデータベースに対して BLAST 検索したところ (IPK Barley BLAST Server, <http://webblast.ipkgatersleben.de/barley/>)，相同性の高い配列として AK249764, AK356684, AK369908 の 3 つの配列が得られた (図5)。‘Morex’品種の *MLA* 遺伝子座にあるが R 遺伝子としての機能を持たない *RGH1bcd* 遺伝子と同様に、AK249764 および AK356684 は、C 末端領域が大幅に欠失した NB-LRR をコードする遺伝子であることがわかった。一方で AK369908 のアミノ酸配列は、*MLA8* と完全に一致することが明らかとなった。実際に *MLA8* 遺伝子を持つ ‘Golden Promise’が Race I 株に対して抵抗性を示すことから、*MLA8* 遺伝子が ‘Haruna Nijo’の Race I 株に対する抵抗性に寄与していると考えられる。また、OU14 株が ‘Haruna Nijo’に感染する菌株として分離され、‘Golden Promise’にも感染することからも (図3, 4)，‘Haruna Nijo’の Race I 株に対する抵抗性が *MLA8* 遺伝子によって決定されていることが支持された。

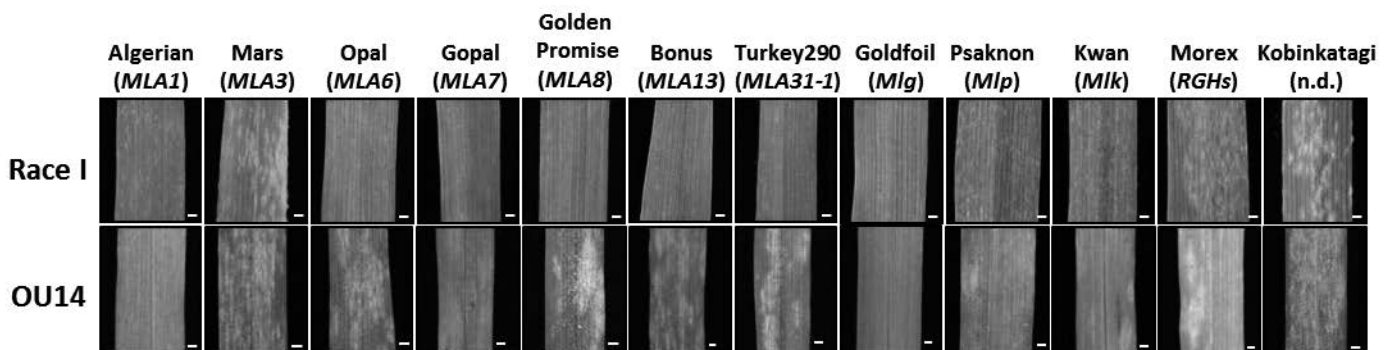


図3 各菌株を接種したオオムギ品種が示す表現型

表1 オオムギうどんこ病菌に対する各オオムギ品種の抵抗性

品種	抵抗性遺伝子(座)	抵抗性	
		OU14	Race I
Algerian	<i>Mla1</i>	R	R
Mars	<i>Mla3</i>	S	S
Opal	<i>Mla6</i>	S	R
Gopal	<i>Mla7</i>	R	R
Golden Promise	<i>Mla8</i>	S	R
Bonus	<i>Mla13</i>	S	R
Turkey 290	<i>Mla31-1</i>	S	R
Goldfoil	<i>Mlg</i>	R	R
Psaknon	<i>Mlp</i>	M	M
Kwan	<i>Mlk</i>	R	M
Morex	<i>RGH</i>	S	S
Kobinkatagi	n.d.	S	S

R=抵抗性, M=中度抵抗性, S=感受性, n.d.=未同定

表2 各菌株が持つエフェクター遺伝子

エフェクター遺伝子	Race I	OU14 ^f	DH14 ^b	A6 ^b	K1 ^b
<i>AVRa1</i>	+	+	+	-	+
<i>AVRa3</i>	-	-	+	+	+
<i>AVRa6</i>	+	-	+	+	+
<i>AVRa7</i>	+	+	?	-	+
<i>AVRa8</i>	+	-	-	-	-
<i>AVRa13</i>	+	-	+	+	+
<i>AVRa31-1</i>	+	-	?	-	-
<i>AVRg</i>	+	+	- ^c	+	- ^d
<i>AVRp</i>	+	+	?	+ ^e	+ ^e
<i>AVRk1</i>	+ ^{a,f}	+	-	+ ^e	+ ^e

^aSacristan *et al.*, 2009; ^bHacquard *et al.*, 2013; ^cBrown and Jessop, 1995;^dMiklis *et al.*, 2007; ^eWiberg, 1974; ^fThis work.

4. 考察

子葉鞘切片における OU14 株と Race I 株の形態形成及び吸器形成率に大きな違いは認められなかった (図 1, 2)。これはオオムギ葉を使った接種実験において 'Kobinkatagi' が両菌株に対して感受性を示すことと一致している (図 3)。各オオムギ品種への OU14 株の接種実験において、供試した 12 品種のうち 'Algerian' (*MLA1*), 'Gopal' (*MLA7*), 'Goldfoil' (*Mlg*), 'Psaknon' (*Mlp*), 'Kwan' (*Mlk*) の 5 品種が抵抗性を示した。このことから、OU14 株はエフ

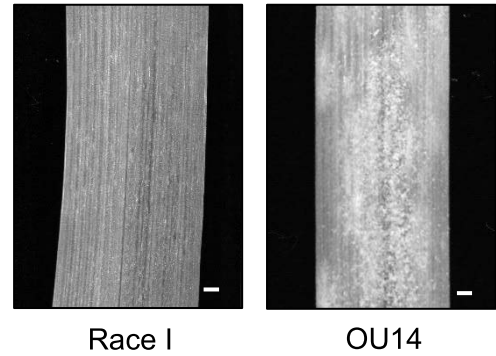


図4 各菌株を接種した Haruna Nijo の表現型

エクター遺伝子として *AVRa1*, *AVRa7*, *AVRg*, *AVRp*, *AVRk1* を持つことが示唆された。'Kwan' (*Mlk*) は OU14 株, Race I 株に対して抵抗性を示すことからどちらの分離株も *AVRk1* を持っていると考えられるが、OU14 株に対しては抵抗性であるのに対し、Race I 株に対しては中度抵抗性と、抵抗性の程度に違いがみられた。このことから、それぞれの分離株ごとに持っている *AVRk1* の配列が異なることが予想される。実際、Race I 株は、*AVRk1* ホモログを多数持ち、それらは完全長の *AVRk1* と比べて一部の配列が欠失していることが報告されている (Sacristan *et al.*, 2009)。このことを踏まえると、OU14 株の *AVRk1* は完全長あるいはそれに近いものであることが予想される。

OU14 株と Race I 株との間で、異なるエフェクター遺伝子を持つことが明らかとなった (表 2)。現在のところ、本研究のように遺伝学的な観点からエフェクター遺伝子の有無について解析することは可能であるが、その実体については不明のままである。オオムギうどんこ病菌は絶対寄生菌であるため人工培養ができず、形質転換できないことがエフェクターの分子遺伝学的解析を妨げる要因となっている。近年では、次世代シーケンス技術が飛躍的に発展し、ゲノム解析及び網羅的な遺伝子発現解析が可能となっている。そのため、すでにゲノム解読が完了している DH14, A6 および K1 株と、OU14 株および Race I 株の比較ゲノム解析を行うことによって、各菌株でのエフェクター遺伝子の有無とゲノム中の一塩基多型との相関が得られ、遺伝子同定に至ると期待される。

5. 摘要

オオムギうどんこ病菌は、病原性因子であるエフェクターを分泌して宿主の防御反応を抑制し、感染する。本研究では、新規分離株である OU14 株の形態および病原性の解析を行った。その結果、形態形

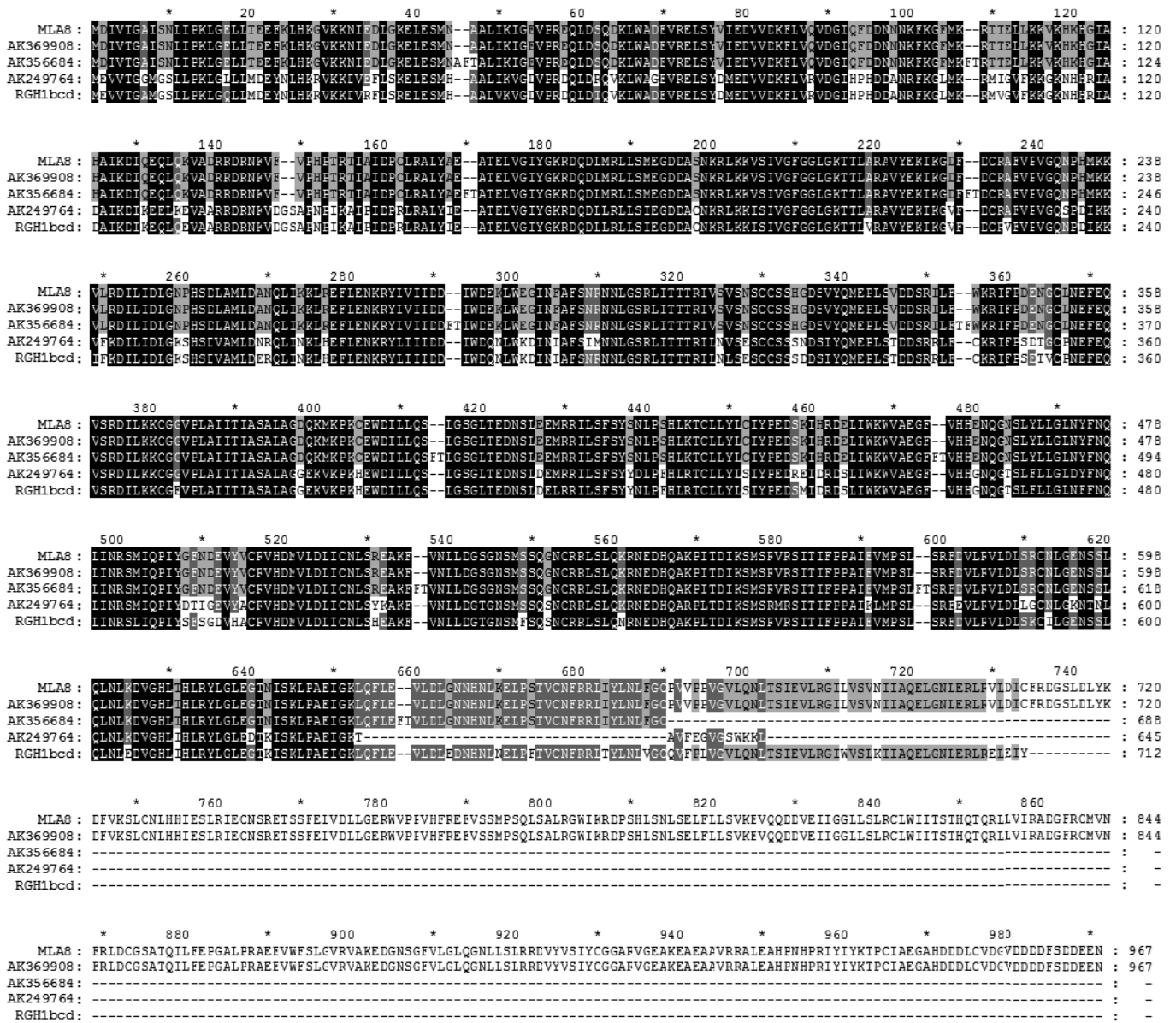


図5 MLA8 と Haruna Nijo および Morex の類似遺伝子産物のアミノ酸配列

成については既存の Race I 株と比べて違いは見られなかった。しかしながら、OU14 株は Race I 株とは異なるエフェクター遺伝子を持つことが明らかとなった。

引用文献

Brown, J. K. M. and Jessop, A. C. (1995): Genetics of avirulences in *Erysiphe graminis* f. sp. *hordei*. Plant Pathol. 44:1039–1049.

Flor, H. H. (1942): Inheritance of pathogenicity in *Melampsora lini*. Phytopathol. 32:653–669.

Hacquard, S., Kracher, B., Maekawa, T., Vernaldi, S., Schulze-Lefert, P. and van Themaat, E. V. L. (2013): Mosaic genome structure of the barley powdery mildew pathogen and conservation of transcriptional programs in divergent hosts. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 110:E2219–2228.

Hückelhoven, R. and Panstruga, R. (2011): Cell biology of the plant–powdery mildew interaction. Curr. Opin. Plant Biol. 14:738–746.

Miklis, M., Consonni, C., Bhat, R. A., Lipka, V.,

Schulze-Lefert, P. and Panstruga, R. (2007): Barley MLO modulates actin-dependent and actin-independent antifungal defense pathways at the cell periphery. Plant Physiol. 144:1132–1143.

Sacristan, S., Vigouroux, M., Pedersen, C., Skamnioti, P., Thordal-Christensen, H., Micali, C., Brown, J. K. M. and Ridout, C. J. (2009): Coevolution between a family of parasite virulence effectors and a class of LINE-1 retrotransposons. PLOS ONE. 4:e7463.

Seeholzer, S., Tsuchimatsu, T., Jordan, T., Bieri, S., Pajonk, S., Yang, W., Jahoor, A., Shimizu, K. K., Keller, B. and Schulze-Lefert, P. (2010): Diversity at the *Mla* powdery mildew resistance locus from cultivated barley reveals sites of positive selection. Mol. Plant. Microbe. Interact. 23:497–509.

Wiberg, A. (1974): Sources of resistance to powdery mildew in barley. Hereditas. 78:1–40.

Yamaoka, N., Yoshida, S., Motoyama, E., Takeuchi, Y., Takada, Y. and Fukunaga, N. (2000): Resistance Induction in Barley Coleoptile Cells by Intracellular pH Decline. Plant Cell Physiol. 41:1321–1326.

Yamaoka, N., Matsumoto, I. and Nishiguchi, M. (2006): The role of primary germ tubes (PGT) in the life cycle

of *Blumeria graminis*: the stopping of PGT elongation is necessary for the triggering of appressorial germ tube (AGT) emergence. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 69:153–159.