

令和元年6月4日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H04883

研究課題名(和文) 糸状菌におけるクロマチン修飾を介した病原遺伝子制御カスケードの包括的理解

研究課題名(英文) Comprehensive analysis of gene regulation cascades via chromatin modifications in fungi

研究代表者

中屋敷 均 (NAKAYASHIKI, HITOSHI)

神戸大学・農学研究科・教授

研究者番号：50252804

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,000,000円

研究成果の概要(和文)：いもち病菌のヒストンメチル基転移酵素の中で、最も感染に影響が大きなMoSET1遺伝子に注目し、そのシグナル伝達の上流および下流の因子の同定を試みた。その結果、細胞外のシグナル受容からの情報系で大きな役割を果たすMAPキナーゼの一種であるPmk1とMoSET1が直接相互作用することを見出した。また、MoSET1の下流の転写因子として約10個の遺伝子に着目して遺伝子破壊を行ったが、胞子および付着器形成に関与する遺伝子を同定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

イネ科植物いもち病菌は、我が国の稲作にとって最も重要な植物病原菌である。この菌は、感染の過程で細胞分化を行い付着器という特殊な細胞を形成し、植物へと侵入していく。この細胞分化にはクロマチン構造の変化が伴っていると想定されるが、本研究ではその変化に重要な役割を果たすMoSET1を中心として、そこに至るまでのシグナル伝達系、またそれに制御される下流遺伝子など、そのシグナルカスケードの一端を明らかにした。

研究成果の概要(英文)：The rice blast fungus *Pyricularia oryzae* shows dramatic morphological changes during infection with global transcriptional alterations possibly resulted from genome-wide chromatin remodeling. We previously showed that MoSET1, histone methyltransferase responsible for H3K4me played the most important roles in infection-related gene expression. In this study, we examined signal pathways up- and down-stream of MoSET1. Using yeast-two-hybrid assay, physical interaction between MoSET1 and protein kinases involved in signal perception was investigated. Some of them bound to MoSET1 in a kinase activity-dependent manner, suggesting MoSET1 could be phosphorylated by them. We also constructed 15 gene knock-out (KO) mutants of MoSET1-dependent transcription factors and kinases. Some of the gene KO mutants showed defects in growth, appressorium formation, conidiation and pathogenicity, suggesting that these genes could be executors of infection-related morphogenesis under the control of MoSET1.

研究分野：植物病理学

キーワード：いもち病菌 エピジェネティクス ヒストン修飾

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

イネいもち病菌(*Pyricularia oryzae*)は、稲作における最大の病害の一つであり、稲作を中心とする日本農業にとって最重要植物病害と言える。イネいもち病菌は、その経済的な重要性から植物病原糸状菌で最初にゲノム配列が解読された菌であり、宿主のイネゲノムも解読されていることから、ポストゲノム時代の植物-糸状菌相互作用のモデル系と目されている。

いもち病菌は感染過程で菌糸、孢子、発芽管、付着器、侵入菌糸といった様々な形態の器官を形成し、また宿主からの抵抗反応を抑制するエフェクターや細胞壁分解酵素などを分泌する。これらの過程には非常に多くの遺伝子が関与していることが想定され、当研究室におけるRNA-seq解析の結果、約4,000個の遺伝子がいもち病菌の感染過程において有意に発現変動していることが明らかとなっている。このような大規模な遺伝子発現変動には、クロマチンの構造変化を介した大規模な遺伝子発現制御があると想定されるが、糸状菌の感染行動とクロマチン構造変化の関係については、得られている知見が乏しいのが現状である。

2. 研究の目的

本研究室では、ヒストンへのメチル基転移酵素であるKMT遺伝子群に着目している。その中でも特にH3K4のメチル化を担うMoSET1と命名した遺伝子が、いもち病菌の感染器官形成やそれに伴う遺伝子の発現に大きな役割を果たしていることを報告した(Pham et al. 2015)。遺伝子発現を活性化させるH3K4のメチル化は感染過程でダイナミックに変動しており、それに伴った遺伝子発現の変動やMoSET1自身の局在性変化も起こることも明らかとなっている。

そこで当研究では、このH3K4メチル化を担うMoSET1を中心として、その活性化につながる上流のシグナル経路とH3K4メチル化により発現が変動する下流遺伝子(特に転写因子)に着目し、いもち病菌の感染過程におけるクロマチン修飾、特にH3K4メチル化を介した遺伝子制御経路の全貌を解明することを目的とする。

3. 研究の方法

1) MoSET1 上流因子の探索

いもち病菌は外界からのシグナルを受容して、感染行動を開始し、MoSET1による遺伝子発現制御を受け、感染器官の形成や侵入行動を可能とする。糸状菌の外界のシグナル認識では各種特異的レセプター、Gタンパク質共役受容体(GPCR)や二成分情報伝達系(ヒスチジンキナーゼ、HIK)等を最上流の分子装置としたキナーゼのカスケードが主要なものと考えられている。これらキナーゼは細胞表面のレセプターから下流へのシグナル伝達に関わっている因子と想定されるため、逆遺伝学的にそれらの遺伝子破壊株を作製し、MoSET1との相互作用や物理的な結合などを調査してシグナル経路を同定していく。

2) MoSET1 の下流遺伝子制御カスケードの解明

これまで当研究室におけるRNA-seqおよびChIP-seq解析の結果、感染器官形成時にH3K4メチル化レベルが有意に変動する遺伝子が約400個同定されたが、興味深いことに、MoSET1で直接制御されると考えられるそれらの遺伝子の中には、Hap, XlnR, Pro1, VosAといった複数の遺伝子を同時に制御するグローバルな転写因子が多く含まれていた。このようなキーとなる転写因子をMoSET1が直接制御することで、より多くの下流の遺伝子発現を活性化、あるいは抑制するような遺伝子制御カスケードが存在することを想定している。このモデルを検証するため、転写因子やキナーゼに着目し、それらの遺伝子破壊株を作製することで。

4. 研究成果

1) MoSET1 上流因子の探索

いもち病菌は外界からのシグナルを受容して、感染行動を開始し、MoSET1による遺伝子発現制御を受け、感染器官の形成や侵入行動を可能とする。MoSET1の上流因子の候補としていもち病菌の付着器形成に重要な働きをすることが分かっているPmk1との関連を調査する目的で、酵母ツーハイブリットアッセイを行った。その結果、Pmk1とMoSET1の相互作用が検出された。さらにPmk1のキナーゼ活性化ドメインの変異体を作製し、それとMoSET1の結合をアッセイした所、ドミナントネガティブ型のPmk1ではより強い結合が、また恒常的活性型のPmk1では結合が弱くなることが示された。これは基質とキナーゼの結合様式として、よく見られるものであり、基質のリン酸化によりキナーゼと基質の結合が乖離されることを再現していると考えられる。

また、未知のMoSET1上流因子を同定するために、MoSET1にFLAGタグをつけ、免疫沈降によりin vivoにおける結合蛋白質を調査した。得られた特異的なバンドをLC-MS/MSにより同定した結果、いくつかのpre-mRNA-splicing factor RSE11やcalpain-9などの候補遺伝子を得ることができた。RSE11は選択的スプライシングに関与する因子であり、先行研究より、選択的スプライシングの特異性にヒストン修飾の組織特異性が寄与する可能性が示唆されていることから、いもち病菌でもそのような機構が保存されているのかも知れない。今回の解析では、MoSET1を介したシグナル伝達の上流下流に関わらず、結合因子を同定しているため、MoSET1に結合する下流の因子である可能性も高いが、今後、これら因子との相互作用の生物学的な意義について検討する予定である。

2) MoSET1 の下流遺伝子制御カスケードの解明

これまで当研究室における RNA-seq および ChIP-seq 解析の結果、感染器官形成時に H3K4 のメチル化レベルが変動する遺伝子が約 400 個同定された。これらの中の転写因子およびタンパク質リン酸化酵素に着目し、順次遺伝子破壊株を作製し、その機能解析を行った。特に転写因子に着目して解析を行ったが、MGG_04699 および MGG_00494 の破壊株で、胞子産生能の低下が認められ、病原性も大きく低下していた。また、MGG_00494 では、胞子産生能の低下があったが、病原性は野生株と変わらず、菌糸成長にやや遅延が見られた。胞子産生能の低下、病原性の低下、菌糸成長の低下などは、MoSET1 の破壊株で見られるものであり、これらの転写因子は、MoSET1 の下流因子として有力な候補であると考えている。

また、MGG_00472 は他の真菌における解析から致死遺伝子であることが想定され、実際に欠失破壊株を得ることができなかった。そこで遺伝子サイレンシングによる解析を行った結果、付着器形成に異常は認められなかったが、病原性が低下しており、本菌の病原性に関与することが示唆された。

転写因子に加え、MoSET1 で直接制御されることが想定されるタンパク質リン酸化酵素の変異体も変異体解析を行った。これらにおいても、生育や付着器の形成に異常が見られる変異体が得られた。特に MGG_12647 の破壊株は、一つの発芽管が分岐して二つの付着器を作るという珍しい表現型を示し、また病原性も著しく低下していた。MGG_12647 は、これまで他の真菌でも機能が明らかにされていないキナーゼであり、今後、注目してより詳細な解析に供する予定である。

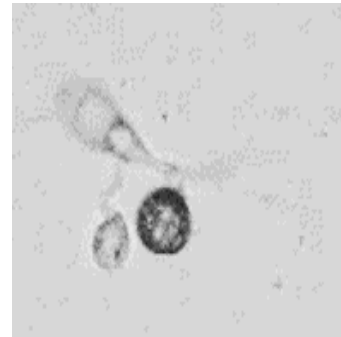


図1 . MGG_12647 の欠失変異体で観察される付着器を二つ作る表現型

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 3 件)

Gómez Luciano LB, Tsai IJ, Chuma I, Tosa Y, Chen YH, Li JY, Li MY, Lu MJ, Nakayashiki H, Li WH. (2019) Blast fungal genomes show frequent chromosomal changes, gene gains and losses, and effector gene turnover. *Mol Biol Evol.* 36:1148-1161. doi: 10.1093/molbev/msz045. 査読有

Ikeda K, Park P, Nakayashiki H. (2019) Cell biology in phytopathogenic fungi during host infection: commonalities and differences. *J. Gen. Plant Pathol.* 85:163–173. doi.org/10.1007/s10327-019-00846-w. 査読有

Nguyen Q, Iritani A, Ohkita S, Vu BV, Yokoya K, Matsubara A, Ikeda KI, Suzuki N, Nakayashiki H. (2018) A fungal Argonaute interferes with RNA interference. *Nucleic Acids Res.* 46:2495-2508. doi: 10.1093/nar/gkx1301. 査読有

〔学会発表〕(計 7 件)

Nakayashiki, H. Comprehensive analysis of RNAi-dependent and -independent small RNAs (sRNAs) in a wheat-infecting strain of *Pyricularia oryzae*. 8th international rice blast conference. (2019) Chengdu, China.

濱根 美穂子, 池田 健一, 中屋敷 均. ヒストンメチル基転移酵素 MoSET1 が制御するいもち病菌リン酸化酵素の機能解析 . 平成 30 年度日本植物病理学会関西西部会 . 2018 年 9 月(山口市)

岡田 大樹, 中屋敷 均, 池田 健一 . いもち病菌のイネ根における宿主特異的寄生性評価 . 平成 30 年度日本植物病理学会関西西部会 . 2018 年 9 月 (山口市)

原田 勲人, 中本 知里, Ngyyen Hanh, 中屋敷 均, 池田 健一 . いもち病菌の脂質・糖代

謝における付着器形成シグナル経路の関与．平成 30 年度日本植物病理学会．2018 年 3 月（神戸市）

Nguyen Quyet, 松原 愛, 池田 健一, 鈴木 信弘, 中屋敷 均．MoAgo3 アルゴノートは MoAgo1 との siRNA の競合により RNA サイレンシングを負に制御する．平成 29 年度日本植物病理学会関西支部会．2017 年 9 月（堺市）

池田 健一, 翠川 陽大, 前田 健太郎, 中屋敷 均．Building blocks 法によるいもち病菌の脂質代謝遺伝子群の機能解析．平成 29 年度日本植物病理学会関西支部会．2017 年 9 月（堺市）

Nakayashiki, H. Three argonaute proteins and their associated sRNAs in *Pyricularia oryzae*. 7th international rice blast conference. (2016) Manila, Philippines.

〔図書〕(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

6．研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：竹田 篤史

ローマ字氏名：Takeda, Atsushi

所属研究機関名：立命館大学

部局名：生命科学部

職名：教授

研究者番号（8 桁）：60560779

(2)研究協力者

研究協力者氏名：Nguyen Quyet

ローマ字氏名：Nguyen Quyet

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。