

令和 4 年 5 月 31 日現在

機関番号：14501

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2020～2021

課題番号：20K21314

研究課題名(和文)イネ科植物いもち病菌が産生する小分子RNAの包括的理解

研究課題名(英文)Comprehensive analysis of small RNAs produced by the blast fungus, *Pyricularia oryzae*

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) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、イネ科植物いもち病菌における小分子RNA(sRNA)の網羅的な解析を行った。その結果、16-18ntでその生成機構がDicer、またRdRPのいずれとも無関係で、AGOタンパク質とも結合しないという新奇sRNAを発見した。ノーザン解析の結果、新奇sRNAの前駆体と思われる複数の分子を見出し、多段階の反応により本分子が生成されてくることが示唆された。また、GFPを用いたレポーターアッセイを行ったが、この新奇sRNAは遺伝子サイレンシングには機能しないことが示され、RNAiと独立した機能を持つことが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

小分子RNA(sRNA)は、siRNAやmiRNAなどの細胞内で遺伝子発現制御を行うだけでなく、近年宿主と病原菌のような生物種間における相互作用においても、重要な役割を果たすことが知られている。本研究では、我が国の重要植物病原菌であるいもち病菌におけるsRNAの網羅的な解析を行い、新奇sRNAを見出すとともに、それらの生合成過程や細胞内の機能などについての新規知見を得た。これらの成果は、基礎科学としての興味だけでなく、農業上も制御がもためられているいもち病菌の低環境負荷型の新たな防除法の開発にもつながる可能性を持っている。

研究成果の概要(英文)：In this study, a novel class of small RNAs (sRNAs) was identified in the blast fungus, *Pyricularia oryzae*. The novel sRNAs were characterized by its smaller size (16-18nt), Dicer- and/or RdRP-independent biogenesis, and nonbinding to AGO protein. Northern blotting analysis revealed several sizes of precursors of the novel sRNA, indicating multiple steps of processing for its biogenesis. Consistently, RNA-seq analysis suggested that some of the precursors were generated via complex splicing. GFP reporter assay indicated that the novel sRNA was not functional in the gene silencing pathways, supporting the idea that these sRNAs possess so-far unknown biological roles.

研究分野：植物病理学

キーワード：いもち病菌 小分子RNA エピジェネティクス

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

2005年にサイエンス誌に報告された「RNA 新大陸の発見」は(Carninci *et al.* 2005)、ゲノムに対する我々の視点を大きく揺さぶるものであった。真核生物の細胞に膨大な数のノンコーディング RNA(ncRNA)が存在していることが明らかになったのである。その後、実際、種々の新しい ncRNA が発見され、様々な生理的役割を果たすことが明らかとなっていったが、その中には植物病原菌が植物細胞内に小分子 RNA (sRNA) を分泌することで宿主遺伝子の発現を攪乱し、感染を成立させるツールとして用いているという驚くべき発見も含まれていた (Weiberg *et al.* 2013; Wang *et al.*, 2017)。

本研究室では、我が国における重要植物病原菌であるイネ科植物いもち病菌を材料に、sRNA が関与する RNAi 機構を長年研究してきた。その過程で、RNAi 経路の重要な構成要素である Dicer や RdRP の多重変異体でも生成量が低下しない sRNA 群が存在することを次世代シーケンサー(NGS)による網羅的解析で見出した。これらの新奇 sRNA は RNAi 経路のエフェクターである AGO タンパク質とも結合せず、RNAi 経路から独立していると考えられた。これらの新奇 sRNA は、コード領域、イントロン、遺伝子間領域と、いずれのゲノム領域にも存在が確認されるという興味深い特徴を示した。

2. 研究の目的

新奇クラスと考えられる sRNA は以下の3つの主な特徴を持つ； サイズが 16-18bp と通常の siRNA や miRNA よりも短く、特定のゲノム領域 (20-30bp) にマッピングされる、その生成が Dicer, アルゴノート (AGO), RNA 依存 RNA ポリメラーゼ (RdRP) といった RNAi のコンポーネントのいずれにも依存しない、AGO 複合体にロードされない。このような sRNA を 30 種ほど同定したが、これらはよく知られている miRNA や siRNA とは明らかに異なり、アカパンカビで報告された Dicer 非依存性の sRNA とも異なっている (これらは AGO にロードされる)。この新しいクラスの sRNA の生物学的な機能を調査することが本研究の目的である。

3. 研究の方法

1) 新奇 sRNA の生成機構の解析

NGS で検出された新奇 sRNA の分子が実際に存在すること、またその生成経路に対する示唆を得るためにノーザン解析による sRNA の検出を行った。プローブには、FITC ラベルした新奇 sRNA の相補鎖を合成して用いた。また、種々の培養条件で sRNA の蓄積量に変動があるのかといった点も併せて調査した。また、RNA-seq 解析を行い、新奇 sRNA と配列相同性のある RNA 分子の検索を行った。

2) レポーターアッセイ

新奇 sRNA の生物学的な機能を調査する目的で、これらの分子が遺伝子サイレンシングを誘導することができるかどうか、レポーター遺伝子を用いて調査した。構成的な TrpC プロモーターの下流に eGFP 遺伝子を挿入し、その 3' UTR に新奇 sRNA に相補的な配列を導入したコンストラクトを作成した。コントロールとして、導入配列に点変異を与えた新奇 sRNA の配列を用いたコンストラクトも併せて構築した。これらのコンストラクトを新奇 sRNA を産生しているコムギいもち病菌に導入して、形質転換体の GFP 蛍光強度の平均値を比較した。

3) 遺伝子破壊株の作成

当研究室で同定されている新奇 sRNA は、当初同定された約 50 種から精査した結果、約 30 種

ほどに絞られたが、このうち発現量の多い二つの sRNA について遺伝子破壊株の作成を試みた。破壊ベクターはハイグロマイシン耐性遺伝子の両側に、対象染色体座位の近接領域を挿入したダブルクロッシングオーバー型のものを用いた。この破壊ベクターを PEG 法によりコムギいもち病菌に導入し、目的ゲノム配列の相同組み換えによる破壊を試みた。

4. 研究成果

1) 新奇 sRNA には前駆体様の分子が存在する

新奇 sRNA のノーザン解析の結果、配列相同性を持つ異なる分子量の RNA 分子が少なくとも 4 種類存在することが明らかとなった(図 1)。これら RNA の分子量は、それぞれ約 150nt, 90nt, 25nt および 16nt と推定された。これらの分子は、pri-miRNA のような機能性の sRNA を生成するための前駆体である可能性が考えられるが、これら長い RNA 自身に何らかの機能があることも否定できず、今後の検討が必要である。RNA-seq の結果からは、これらの前駆体と考えられる分子の中には複雑なスプライシングを経て生成されているものがあることが示唆されているが、in silico でのアーティファクトの可能性もあり、現在、末端にリンカーをアニーリングしてこれらの配列を実際にクローニングして塩基配列を決定することを試みている。

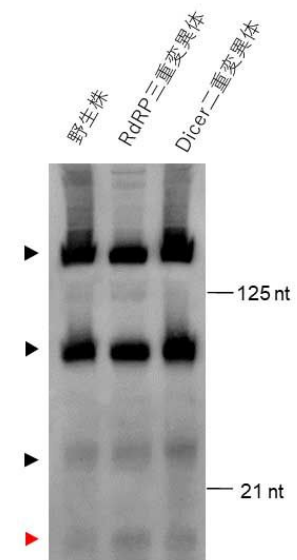


図1. 新奇sRNA(#7)のノーザン解析

2) 新奇 sRNA は RNAi 経路では機能しない

レポーターアッセイの結果、GFP 遺伝子の RNAi コンストラクトを導入した形質転換体では、有意に GFP 蛍光の平均値がコントロールと比較して低下していたが、新奇 sRNA の相補配列を 3' UTR に導入したコンストラクトでは、コントロールと有意差がなく(図 2)。新奇 sRNA が予想通り RNAi 経路では機能していないことが確認された。これら新奇 sRNA の生物学的な機能を調査する目的で、遺伝子破壊株の作成に取り組み、多くの形質転換体を作成したが、遺伝子破壊株が取得できず、これらの遺伝子座位の破壊が致死性を持っている可能性が考えられた。

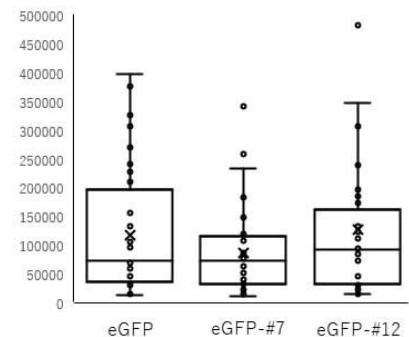


図2. 新奇sRNAのレポーター解析
eGFP発現プラスミドの3'UTRに新奇sRNA(#7および#12の相補配列を挿入し、GFP発現に対する影響を調査した

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

| | |
|---|-------------------|
| 1. 著者名 Van Vu Ba, Nguyen Quyet, Kondo-Takeoka Yuki, Murata Toshiki, Kadotani Naoki, Thi Nguyen Giang, Arazoe Takayuki, Ohsato Shuichi, Nakayashiki Hitoshi | 4. 巻 4 |
| 2. 論文標題 Copy number-dependent DNA methylation of the Pyricularia oryzae MAGGY retrotransposon is triggered by DNA damage | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Communications Biology | 6. 最初と最後の頁 351 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s42003-021-01836-5 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である） | 国際共著 - |

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計1件

| | |
|------------------|-----------------|
| 1. 著者名 中屋敷均 | 4. 発行年 2022年 |
| 2. 出版社 講談社 | 5. 総ページ数 270 |
| 3. 書名 遺伝子とは何か | |

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

| 氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号) | 所属研究機関・部局・職 (機関番号) | 備考 |
|---------------------------|-----------------------|----|
|---------------------------|-----------------------|----|

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| | |
|---------|---------|
| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|