

令和 6 年 6 月 3 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2021～2023

課題番号：21H02195

研究課題名（和文）植物病原糸状菌の寄生性を規定するクロマチン状態の解明

研究課題名（英文）Elucidation of chromatin states regulating parasitism in plant pathogenic filamentous 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） 13,100,000円

研究成果の概要（和文）：いもち病菌は腐生的な生活環と植物病原菌としての寄生的な生活環を持つ。本研究では、このいもち病菌の「寄生」と「腐生」という二つのモードをスイッチングする機構として、エピジェネティックなクロマチン状態の変化に注目した。その結果、いもち病菌ゲノムには寄生を可能とさせる遺伝子（水平移りで獲得した多くの遺伝子を含む）をゲノムの特定の領域に局在させており、それを主にヒストン修飾の一種であるH3K27me3を用いて制御していることが明らかとなった。また、保存性の高い遺伝子で構成されるユークロマチン領域にも感染に必要な遺伝子は存在しているが、これらは主にH3K4me2/3の制御下にあると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

いもち病菌は、コメを主食とする我が国の稲作にとって、最大の脅威となる植物病害であり、その安定的な防除法の確立は、喫緊の課題である。本研究は、腐生的に生きていくことができる本菌が、どのようにして寄生的な生活環を獲得したのか、またそれに伴う遺伝子制御とはどのようなものかを明らかにしたものであり、いもち病菌を防除するための新たな戦略や殺菌剤の開発等に有用な知見であると考えられる。

研究成果の概要（英文）：The blast fungus, *Pyricularia oryzae*, has both saprophytic and parasitic lifestyles as a plant pathogen. In this study, we investigated epigenetic chromatin changes in as a mechanism for switching between these "parasitic" and "saprophytic" lifestyles. Our findings reveal that the *P. oryzae* genome contains genes that facilitate parasitism, including potentially horizontally transferred genes that are localized to specific genomic regions that are primarily regulated by H3K27me3. In addition, genes necessary for parasitism are also found in euchromatic regions, which consist of highly conserved genes and are mainly regulated by H3K4me2/3.

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 ゲノム進化

様式 C - 19、F - 19 - 1 (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、米を主食とする日本人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系状菌で最初にゲノム配列が解読された菌であり、近年、近縁種のゲノム配列も多く明らかとなっており、比較ゲノム研究に適した環境が整っている。

一方、本研究で着目しているヒストン修飾は、染色体の最小単位であるヌクレオソームを構成するヒストンタンパク質に付加される、メチル化、アセチル化、リン酸化などの化学修飾であり、染色体の状態を規定するエピジェネティックな標識として機能する。ヒストン修飾が起こるアミノ酸には多くの部位が知られており、また修飾の種類が多さと合わせて、複雑な組み合わせを作り出すことが可能である。こういったヒストン修飾の組み合わせが、クロマチンの状態を規定する“コード(暗号)”として機能しているとする「ヒストンコード仮説」も提唱されている。実際、遺伝子発現の活性化、抑制、またDNA修復などに関与する一部のヒストン修飾については、多くの真核生物種で共通した“コード”として機能を持つことが示唆されている。

当研究室ではイネ科植物いもち病菌を材料に、特にヒストンメチル化について研究を進めており、それらを担う lysine methyltransferase (KMT) 酵素群の機能解析を行ってきた。その中でこれらのヒストン修飾がいもち病菌の病原性に関与することを明らかとってきた。

2. 研究の目的

植物病原系状菌の多くは、宿主の「寄生者」であるが、枯葉のような植物遺体を利用して「腐生的」に生育することもできる。「寄生者」としてのいもち病菌は、その感染過程で菌糸、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。当研究室における RNA-seq 解析の結果、こういった「寄生者」としてのいもち病菌では、「腐生者」状態と比較して、約 4,000 個の遺伝子が有意に発現変動していることが明らかとなった。

本研究では、この病原菌の「寄生」と「腐生」の二つのモードがどのように制御されているか、特にその制御へのエピジェネティクスの関与を明らかとすることを目的とする。

3. 研究の方法

1) コムギいもち病菌ゲノムにおける各種ヒストン修飾の分布様式

約 20 種類のヒストン修飾や DNA 修飾 (5mC, メチル化シトシン; 5hmC, ヒドロキシメチル化シトシン) などに対する市販抗体を用いて、まず「腐生者」状態である培養菌体における ChIP-seq 解析を行った。市販抗体がうまく反応しなかったヒストン修飾のうち、H2A.Z などには、ペプチド鎖を合成し抗体を作製して同様の解析を行った。これらの ChIP-seq の結果と、感染葉で発現上昇する遺伝子の分布を比較して、寄生モードと相関する修飾を探索した。また、この解析の中で、コムギいもち病菌ゲノムで特徴的に分布するヒストン修飾を発見し、それに着目した *in silico* 解析を行った。

2) 感染葉を模した培養条件におけるヒストン修飾の変化と RNA 発現の関係

「寄生者」としてのいもち病菌を規定する「ヒストンコード」を探索する目的で、感染時特異的な遺伝子の発現を誘導するような培地条件を探索した。この中で、最小培地に植物抽出液を加えた培地が良好な結果を示したため、その条件における ChIP-seq および RNA-seq 解析を行い、遺伝子発現変動とクロマチン修飾変動の関係を調査した。

4. 研究成果

1) コムギいもち病菌ゲノムにおける各種ヒストン修飾の分布様式

ヒストン修飾や DNA 修飾に対する約 20 種類の抗体を用いた ChIP-seq 解析、修飾を担う酵素の欠失変異体の表現型解析および感染葉における RNA-seq 解析を合わせた考察の結果、いもち病菌の感染モードへのフェイズ移行に特に重要と考えられるヒストン修飾は H3K4me2/3 と H3K27me3 の 2 つであると考えられた。

また、これらのヒストン修飾のコムギ病菌 Br48 株ゲノムにおける分布を調査する中で、これらのヒストン修飾がゲノム進化と密接に関連しているという興味深い知見が得られた。いもち病菌系統間におけるゲノム構造や配列の比較から、H3K4me2/3 は保存性が高く、組み換えが少ない領域に多く分布し、逆に H3K9me3 や H3K27me3 などの抑制的なヒストン修飾は、構造的に変異が多く、配列保存性も低い領域に多く分布していた(図1)。

そこで Br48 系統の各遺伝子について、種の類似度と遺伝子の類似度の相関係数として得られる IPC (Index of Phylogenetic Concordance) という指標を考案し算出した。その結果、IPC の

低下と H3K27me3 の修飾量の増加に明確な相関がみられ、H3K27me3 が水平移行で得られた遺伝子を修飾している可能性が示された。低 IPC 遺伝子はゲノムの特定の部位に局在する傾向があり、感染時に発現が上昇する遺伝子を多く含んでいた (図 1)。

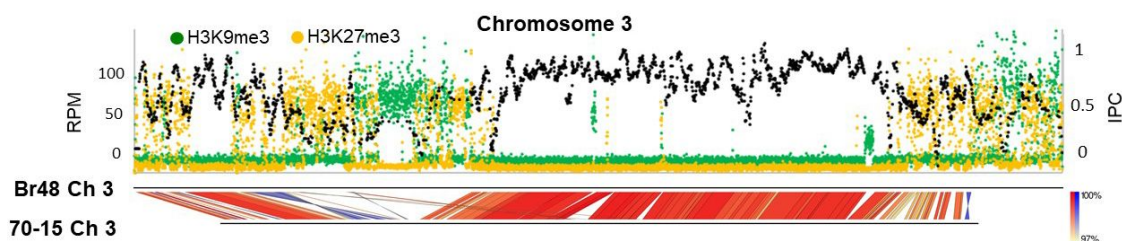


図 1 いもち病菌ゲノムの抑制的なヒストン修飾は染色体構造変異や IPC 値の低下と関連している

Br48 系統の 3 番染色体における H3K9me3 および H3K27me3 の分布と連続する 15 遺伝子の Index of Phylogenetical Concordance (IPC) の移動平均値 (黒点) を示している。下部にはイネ菌 (70-15 系統) 染色体との構造比較を図示しており、いもち病菌系統間で大規模な構造変異のある部位で、抑制的なヒストン修飾の集積や IPC 値の低下が起こる傾向が認められた。

2) 感染葉を模した培養条件におけるヒストン修飾の変化と RNA 発現の関係

「寄生者」としてのいもち病菌のクロマチン構造を解き明かすために感染葉における ChIP-seq 解析に取り組んだが、菌糸由来のクロマチンを感染葉から効率よく抽出することが技術的に非常に難しく、これに変わる方法として、感染葉を模した培地の探索を行った。その結果、最小培地に植物抽出液を加えた MinPS 培地において、接種 48 時間後の感染葉で発現誘導される遺伝子が多数誘導できることが明らかとなった。特に植物との相互作用に重要な役割を果たすと考えられるエフェクター様遺伝子に限れば、感染葉で誘導されるものの約 50% が誘導できていた。

そこでこの MinPS 培地におけるヒストン修飾の変化と RNA 発現の関係を調査した所、H3K4me2 と H3K27me3 によるいもち病菌ゲノム制御は、ゲノムの領域 (コンパートメント) によって、役割の重要性が異なっており、ユークロマチン領域では H3K4me2 が、また条件的ヘテロクロマチンでは、H3K4me2 と H3K27me3 の両方、特に H3K27me3 が、環境変動による遺伝子発現制御に強い影響力を持っていた。また、H3K27me3 は、H3K4me2 に隣接した領域と H3K9me3 に隣接した領域で異なった制御を受けているデータが得られ、周辺のクロマチン状態により少し制御が異なった H3K27me3 領域が存在することも明らかとなった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Dang Ngoc Minh, Yusaku Tsukahara, Dang An Thach, Ken-ich Ikeda, Hitoshi Nakayashiki	4. 巻 89
2. 論文標題 MoSET1-dependent transcription factors regulate different stages of infection-related morphogenesis in <i>Pyricularia oryzae</i>	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of General Plant Pathology	6. 最初と最後の頁 77-83
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s10327-022-01111-3	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Kobayashi Natsuki, Dang Thach An, Pham Kieu Thi Minh, Gomez Luciano Luis B, Van Vu Ba, Izumitsu Kosuke, Shimizu Motoki, Ikeda Ken-ichi, Li Wen-Hsiung, Nakayashiki Hitoshi	4. 巻 40
2. 論文標題 Horizontally Transferred DNA in the Genome of the Fungus <i>Pyricularia oryzae</i> is Associated With Repressive Histone Modifications	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Molecular Biology and Evolution	6. 最初と最後の頁 msad186
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/molbev/msad186	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 該当する

1. 著者名 Ikeda Ken-ichi, Uchihashi Kaichi, Okuda Itsuki, Xiang Zikai, Nakayashiki Hitoshi	4. 巻 90
2. 論文標題 Specific detection of <i>Pyricularia oryzae</i> pathotype <i>Triticum</i> using qPCR and LAMP methods	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Journal of General Plant Pathology	6. 最初と最後の頁 82 ~ 94
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s10327-023-01162-0	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 -

1. 著者名 Xiang Zikai, Okada Daiki, Asuke Soichiro, Nakayashiki Hitoshi, Ikeda Kenichi	4. 巻 23
2. 論文標題 Novel insights into host specificity of <i>Pyricularia oryzae</i> and <i>Pyricularia grisea</i> in the infection of gramineous plant roots	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Molecular Plant Pathology	6. 最初と最後の頁 1658 ~ 1670
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/mpp.13259	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7件（うち招待講演 1件／うち国際学会 0件）

1. 発表者名 小林奈月・Thach An Dang・池田健一・中屋敷均
2. 発表標題 いもち病菌のゲノム進化における遺伝子水平移行のインパクト
3. 学会等名 令和4年度日本植物病理学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 小林奈月・Thach An Dang・Pham Thi Minh Kieu・池田健一・中屋敷均
2. 発表標題 イネ科植物いもち病菌における抑制的ヒストン修飾H3K9me3とH3K27me3による遺伝子発現制御
3. 学会等名 令和4年度日本植物病理学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 小林奈月・Pham Thi Minh Kieu・池田健一・中屋敷均
2. 発表標題 イネ科植物いもち病菌における抑制的ヒストン修飾H3K9me3とH3K27me3の相互作用
3. 学会等名 令和3年度日本植物病理学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小林奈月・池田健一・中屋敷均
2. 発表標題 ヒストン修飾から見たイネ科植物いもち病菌のゲノム進化
3. 学会等名 令和3年度日本植物病理学会関西支部会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小林奈月・Thach An Dang・池田健一・中屋敷均
2. 発表標題 イネ科いもち病菌ゲノムへ人為的に導入したDNA配列のヒストン修飾
3. 学会等名 令和4年度日本植物病理学会関西支部
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 小林奈月・Thach An Dang・Pham Thi Minh Kieu・池田健一・中屋敷均
2. 発表標題 イネ科植物いもち病菌のヒストン修飾機構とゲノム進化
3. 学会等名 令和4年度植物感染整理談話会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 森本熱海・馬場智子・Thach An Dang・小林奈月・池田健一・中屋敷均
2. 発表標題 感染環境を模した培養条件下におけるコムギいもち病菌の遺伝子発現解析
3. 学会等名 令和5年度日本植物病理学会関西支部
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔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			
中国	Academia Sinica			