

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 6 月 14 日現在

機関番号：32682

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24580070

研究課題名(和文) イネいもち病菌の相同組換えと病原性変異機構の解明

研究課題名(英文) Mitotic homologous recombination and pathogenic changes in the fungus *Pyricularia oryzae*

研究代表者

大里 修一 (Shuichi, Ohsato)

明治大学・農学部・講師

研究者番号：30533228

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,200,000円

研究成果の概要(和文)：イネいもち病菌の体細胞相同組換えを検証するために相同組換え検出系を構築した。本系を導入したイネいもち病菌に対し、ケミカルストレス等処理すると高頻度で相同組換えが生じること、またその条件について明らかにした。非病原性遺伝子Avr-Pitaの遺伝的変異に相同組換えが関与していることを示した。メガヌクレアーゼI-SceIを用いて、DNA二本鎖切断を導入すると相同組換え頻度が上昇することを実証した。任意のゲノム部位に相同組換えを導入するために、糸状菌型人工ヌクレアーゼの構築を行った。以上から、体細胞相同組換えによるゲノム変異は本菌の病原性変異に寄与することを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：To study somatic homologous recombination (HR) in *Pyricularia oryzae*, we created an HR detection system, using which we showed that somatic HR occurs at high levels in *P. oryzae* after treatment with several chemical agents. Somatic HR was also seen to be involved in the instability and diversification of the avirulence gene Avr-Pita in *P. oryzae*. We found that DNA double-strand breaks (DSBs) generated by the endonuclease I-SceI increased the frequency of ectopic HR in the genome of *P. oryzae*. To generate DSBs at a specific site in the desired locus within the *P. oryzae* genome, we designed and engineered nucleases called Platinum-Fungal TALENs. To summarize, genetic mutations caused by somatic HR in *P. oryzae* are responsible for the diversification of its virulence.

研究分野：植物病理学

キーワード：イネいもち病菌 相同組換え DNA二本鎖切断 病原性変異

1. 研究開始当初の背景

イネいもち病菌は圃場において遺伝的変異を繰り返し、抵抗性品種を打破する菌系が出現することが知られている。本菌ゲノムにおいて遺伝子破壊、転座、欠損、転写制御の変化、エキソン置換等がその変異機構として考えられている。我々はイネいもち病菌の遺伝子ターゲティング法に関する研究を進める中で、本菌が感染過程を含む様々なストレス条件下において相同組換えにより、積極的にゲノム再編を行っている可能性を見出した。また、「菌系融合が複数のレースの病原性を併せ持つレースを出現させる」(野口ら, 2006) という知見を元に、菌系間融合と準有性的組換えが生じた菌系において相同組換えの寄与を検証することで、本菌の遺伝的多様性に関する新知見の取得が期待された。

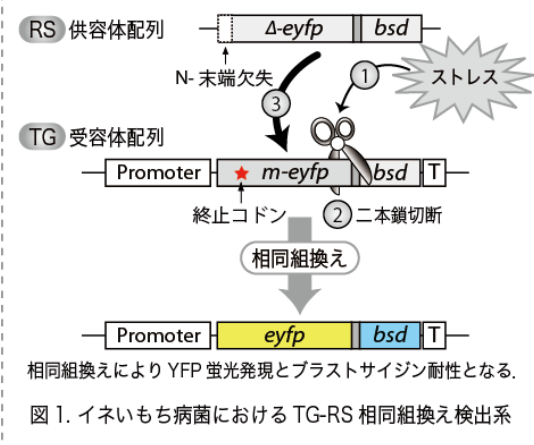
2. 研究の目的

イネいもち病菌の変異機構として「相同組換え」に注目し、非病原性遺伝子の変異や準有性的組換えによる遺伝子交換および伝達における相同組換えの関わりについて検証する。その方法として、相同組換えを簡便に検出できる相同組換え検出系を用い、本菌における相同組換えの諸条件を明らかにする。DNA二本鎖切断導入法の開発と相同組換え検出系の改変によって、本菌の準有性的組換え様式や非病原性遺伝子である *Avr-pita* 遺伝子配列の変異について検証する。以上から、イネいもち病菌の迅速な変異の原動力として相同組換えが大きな役割を担っていることを立証することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) イネいもち病菌における相同組換え検出系の最適化

YFP::BSD融合マーカーを用いたTG-RS相同組換え検出系(図1)を導入したイネいもち病菌を作出し、サザン解析に各マーカーのコピー数を調べた。本菌株より得られた分生子や菌系に対し、一次代謝阻害薬剤やゲノム損傷試薬を用いた様々なストレス処理により、YFP 蛍光とプラストサイジン(BS)耐性によって、ゲノム内で生じる相同組換えをリアルタ



イムかつ非破壊的に検出して評価した。本検出系が相同組換えを検出できる条件を明確にするために、ストレスの種類やアッセイに適した生育ステージ、相同組換えに必要な供与体配列および受容体配列の長さ、両配列のコピー数などの諸条件を検討した。

(2) 相同組換え検出系を利用した準有性的組換えの検出

相同組換え検出系として構築したTG受容体配列(ハイグロマイシン耐性遺伝子導入株)とRS供与体配列(ピアラフォス耐性遺伝子導入株)のそれぞれを単独導入した菌株を樹立し、(1)TG株とRS株を様々な条件で液体混合培養後にBS選抜プレート上に塗布する、(2)TG株とRS株間の対峙培養を行い、菌系が交わった領域を切り出し、BS選抜プレートに置床するなど準有性的組換えが生じる条件の検討を行い、薬剤選抜と相同組換えによるYFP蛍光の出現について調査した。

(3) *Avr* 組換え検出系を用いた非病原性遺伝子の変異

非病原性遺伝子である *Avr-pita* 配列を受容体配列として、対応する供与体配列を人工DNA配列(*Avr* 供与体配列)として構築後、いもち病菌北-1株に形質転換した。この供与体配列は不活性化した *Avr-pita* 配列内に、解析用の制限酵素認識配列を付加してある。供与体配列の導入コピー数はサザン解析により調べた。供与体配列を導入した各菌株は非親和性品種ヤシロモチに噴霧接種を行った。接種葉上の病斑の有無による病原性の確認と病斑部より単菌系または単孢子分離して得た菌株よりゲノム抽出を行い、PCR-RFLP解析を行った。

(4) DNA二本鎖切断導入系の構築

超低頻度切断の制限酵素I-SceIの認識配列(18bp)を受容体配列内に導入し、糸状菌用I-SceIによるDNA二本鎖切断導入系の構築を行った。I-SceI遺伝子はイネいもち病菌のコドン出現頻度に最適化した後、プラスミドによる一過性発現またはゲノムへの挿入によってDNA二本鎖切断の導入を行った。

糸状菌型人工ヌクレアーゼ Platinum Fungal TALENs(PtFg TALEN)の構築は、広島大学の山本卓教授、佐久間哲史講師らとの共同研究により実施し、各モジュールはイネいもち病菌のコドン出現頻度に最適化した。

4. 研究成果

(1) 相同組換え検出系を用いた組換え最適条件の検討

相同組換え検出系を導入した菌株を用いて相同組換えが生じる諸条件について、本菌の相同組換えが誘導されるストレスの種類や生育ステージ、ゲノム中の両配列のコピー数などの検討を行い、諸条件の洗い出しを行った。また、相同組換えに必要な供与体配列および受容体配列の長さについて、約15bp間隔でサイレント変異を印として挿入した相同配列を用いることで、本菌の相同組換え

が切断部位近傍において生じ易いことを見出した。

(2)相同組換え検出系を利用した準有性的組換えの検出

TG 受容体配列と RS 供与体配列を各々を導入した菌株を複数系統準備して、それぞれ対峙培養または液体混合培養を行い、薬剤選抜と相同組換えによる YFP 蛍光の出現を調査した。その結果、3 系統の組合せにおいて YFP 蛍光が確認されたが、同じ系統の組合せによって再現性を得るに至らなかった。また、YFP 蛍光が得られた菌株において、組換え部位を解析したところ明瞭な痕跡を確認できなかったことから、本系で準有性的組換えを検出するためには、菌糸融合(Anastomosis)による 2 核共存(Heterokaryosis)状態を確実にモニターできる実験デザインと条件検討が必要であることが分かった。現在、赤色系蛍光タンパク質を用いて 2 核共存を検出できる検出系への再構築を行っている。

(3)Avr 組換え検出系を用いた非病原性遺伝子の変異

内生の *Avr-pita* と新たにゲノムへ挿入した *Avr* 供与体配列間で相同組換えが生じたかどうかについて、非親和性品種ヤシロモチへの接種試験により検定した。接種葉上の病斑の有無による病原性の確認と分離菌の遺伝子解析によって、元々ゲノム上に存在していた非病原性遺伝子に変異が生じたことを実証し、相同組換えによる変異を確認した。

(4)DNA 二本鎖切断導入系の構築

高頻度の相同組換えを誘導するために、I-Sce I 認識配列を受容体配列内に導入し、糸状菌用 I-Sce I による DNA 二本鎖切断導入系の構築を行った。I-Sce I 実験系において、相同配列を持たない系統は DNA 二本鎖切断の導入により広範囲(約 4,000 bp ~)の欠失が高い割合で生じるのに対して、相同配列を有する系統では欠失の割合が減少し、大幅に相同組換え修復の割合が上昇することを明らかにした。

I-Sce I 導入系を受け、トランスポゾン近傍など任意配列に DNA 二本鎖切断を導入するために、PtFg TALEN の構築を行った。本系による標的遺伝子の破壊を確認するため、シタロン脱水素酵素遺伝子(SDH)を標的として、SDH 上流および下流の領域間に薬剤耐性遺伝子を挿入した SDH 破壊ベクターと PtFg TALEN を本菌へ共導入した。得られた薬剤耐性菌ゲノムを解析したところ、すべての薬剤耐性菌において標的遺伝子が薬剤選抜マーカーと置換されていた。この結果は相同組換えを介した標的遺伝子置換効率が極めて高いことを示し、本菌の通常の遺伝子置換効率と比べ、大幅にその効率の向上に成功した。

## 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 7 件)

1. Arazoe T, Ogawa T, Miyoshi K, Yamato T, Ohsato S, Sakuma T, Yamamoto T, Arie T, Kuwata S. Tailor-made TALEN system for highly efficient targeted gene replacement in the rice blast fungus. *Biotechnology and Bioengineering*, DOI: 10.1002/bit.25559 (2015) 査読有
2. Arazoe T, Ohsato S, Maeda K, Arie T, Kuwata S. The effect of chemicals on somatic homologous recombination in the rice blast fungus: its possible application for detection of mycotoxins. *JSM Mycotoxins*, 64:141-146 (2014) 査読有
3. Ichida H, Sun X, Imanaga S, Ito Y, Yoneyama K, Kuwata S, Ohsato S. Construction and characterization of a copy number-inducible fosmid library of *Xanthomonas oryzae* pathovar *oryzae* MAFF311018. *Gene* 546:68-72 (2014) 査読有
4. 荒添貴之, 大里修一, 木村 真, 有江 力, 桑田 茂. 薬剤ストレス処理により誘導される糸状菌の体細胞相同組換えを利用したマイコトキシンバイオアッセイ系への展開 *JSM Mycotoxins* 64:87-94 (2014) 査読有
5. Arazoe T, Younomaru T, Ohsato S, Kimura M, Arie T, Kuwata S. Site-specific DNA double-strand break generated by I-SceI endonuclease enhances ectopic homologous recombination in *Pyricularia oryzae*. *FEMS Microbiol. Lett.* 352:221-229 (2014) 査読有
6. Arazoe T, Kuwata S, Arie T, Ohsato S. Experimental evidence of a pathogenic change by homologous recombination between the endogenous and introduced-dysfunctional *Avr-Pita* genes in *Pyricularia oryzae*. *J. Gen. Plant Pathol.* 80:153-157 (2014) 査読有
7. Arazoe T, Ohsato S, Arie T, Yoneyama K, Kuwata S. Construction of a system for exploring mitotic homologous recombination in the genome of *Pyricularia oryzae*. *J. Gen. Plant Pathol.* 79:422-430 (2013) 査読有

〔学会発表〕(計 18 件)

1. 小川哲央, 荒添貴之, 佐久間哲史, 山本卓, 桑田茂, 草野好司, 大里修一 イネいもち病菌 Srs2DNA ヘリカーゼの機能解析 日本植物病理学会創立 100 周年記念大会 2015 年 3 月 29 日~ 2015 年 3 月 31 日 明治大学駿河台キャンパス
2. 三好健之介, 荒添貴之, 大和澄, 小川哲央, 佐久間哲史, 山本卓, 大里修一, 有江力, 桑田茂 糸状菌型人工ヌクレアーゼ

- Platinum Fungal TALENs を用いたイネいもち病菌における新規遺伝子ノックインおよび塩基置換導入法 日本植物病理学会創立 100 周年記念大会 2015 年 3 月 29 日～2015 年 3 月 31 日 明治大学駿河台キャンパス
3. 荒添貴之, 田中寿樹, 小川哲央, 三好健之介, 大和澄, 佐久間哲史, 山本卓, 有江力, 中馬いづみ, 大里修一, 土佐幸雄, 桑田茂 DNA 二本鎖切断とその修復過程において生じるイネいもち病菌の病原性変異 日本植物病理学会創立 100 周年記念大会 2015 年 3 月 29 日～2015 年 3 月 31 日 明治大学駿河台キャンパス
  4. 荒添貴之, 大里修一, 佐久間哲史, 山本卓, 有江力, 桑田茂 植物病原系状菌 (イネいもち病菌) のゲノム編集および変異機構解析に向けて 植物ゲノム編集ワークショップ 2014 年 11 月 4 日 岡山大学資源植物科学研究所
  5. 荒添貴之, 小川哲央, 大里修一, 佐久間哲史, 山本卓, 有江力, 桑田茂 人工ヌクレアーゼ TALENs を用いたイネいもち病菌における高効率遺伝子改変法 第 14 回糸状菌分子生物コンファレンス 2014 年 11 月 15 日～2014 年 11 月 16 日 東北大学川内北キャンパス
  6. 荒添貴之, 小川哲央, 大里修一, 佐久間哲史, 山本卓, 有江力, 桑田茂 糸状菌型 Platinum TALEN の作製とイネいもち病菌 (糸状菌) におけるゲノム編集 第 4 回ゲノム編集研究会 2014 年 10 月 6 日～2014 年 10 月 7 日 広島国際会議場ダリア
  7. 水谷治, 荒添貴之, 利田賢次, 林梨咲, 大里修一, 佐久間哲史, 山本卓, 桑田茂, 山田修 TALEN を用いた麹菌 *Aspergillus oryzae* におけるゲノム編集 第 4 回ゲノム編集研究会 2014 年 10 月 6 日～2014 年 10 月 7 日 広島国際会議場ダリア
  8. Arazoe T, Ohsato S, Arie T, Kuwata S. Highly efficient gene targeting in *Pyricularia oryzae* by Zinc Finger Nuclease XVI International Congress on Molecular Plant-Microbe Interactions 2014/7/6～2014/7/10 Rhodes, Greece
  9. 荒添貴之, 用之丸哲也, 大里修一, 佐久間哲史, 山本卓, 有江力, 桑田茂. Platinum Gate TALEN システムを用いたイネいもち病菌における高効率遺伝子ターゲティング 平成 26 年度日本植物病理学会 2014 年 6 月 2 日～2014 年 6 月 4 日 札幌コンベンションセンター
  10. 小川哲央, 荒添貴之, 桑田茂, 草野好司, 大里修一. イネいもち病菌 Srs2DNA ヘリカーゼの単離と機能解析 平成 26 年度日本植物病理学会 2014 年 6 月 2 日～2014 年 6 月 4 日 札幌コンベンションセンター
  11. 用之丸哲也, 荒添貴之, 大里修一, 有江力, 桑田茂. DNA 二本鎖切断によるイネいもち病菌の標的遺伝子改変法 第 13 回糸状菌分子生物コンファレンス 2013 年 11 月 20 日～2013 年 11 月 21 日 つくば国際会議場
  12. Ito Y, Ichida H, Ohsato S, Kuwata S. Development of a novel reporter system for analyzing gene expressions in rhizobia. 18th International Congress on Nitrogen Fixation. 2013/10/14～2013/10/18 Miyazaki Prefecture, Phoneix Seagaia Resort
  13. 用之丸哲也, 荒添貴之, 大里修一, 有江力, 桑田茂. DNA 二本鎖切断を介したイネいもち病菌の遺伝子ターゲティング法 日本植物病理学会関東部会 2013 年 9 月 12 日～2013 年 9 月 13 日 法政大学市ヶ谷キャンパス
  14. 荒添貴之, 用之丸哲也, 大里修一, 有江力, 米山勝美, 桑田茂. Zinc finger nuclease および transcription activator-like effector nuclease を用いたイネいもち病菌ゲノム DNA の配列特異的二本鎖切断導入の試み 平成 25 年度日本植物病理学会大会 2013 年 03 月 27 日～2013 年 03 月 29 日 岐阜大学
  15. T. Arazoe, T. Younomaru, S. Ohsato, T. Arie, S. Kuwata. DNA double-strand breaks generated by yeast endonuclease I-Sce I induce ectopic homologous recombination and targeted gene replacement in *Magnaporthe oryzae*. 27th Fungal Genetics Conference 2013/3/12/～2013/3/17 Asilomar Conference Grounds CA, USA
  16. 荒添貴之, 用之丸哲也, 大里修一, 有江力, 桑田茂 イネいもち病菌における DNA 二本鎖切断誘導系を用いた遺伝的変異機構の解析と遺伝子ターゲティング法への応用 第 12 回糸状菌分子生物コンファレンス 2012 年 11 月 12 日～2012 年 11 月 13 日 ウィンクあいち(愛知県名古屋)
  17. 真籠洋, 藤枝俊介, 花田篤志, 大里修一, 神谷勇治, 山口信次郎 イネいもち病菌感染誘導性を示すジベレリン 2-酸化酵素遺伝子 第 47 回植物化学調節学会大会 2012 年 10 月 27 日～2012 年 10 月 28 日 山形大学農学部(鶴岡)
  18. T. Arazoe, S. Ohsato, T. Arie, K. Yoneyama, S. Kuwata. Various stress conditions induce somatic homologous recombination in *Magnaporthe oryzae*. XV International Congress of Molecular Plant-Microbe Interactions 2012/7/29～2012/8/2 Kyoto International Conference Center, Japan
- 〔図書〕(計 0 件)
- 〔産業財産権〕  
出願状況 (計 0 件)

取得状況(計0件)  
〔その他〕  
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大里 修一 (SHUICHI OHSATO)

明治大学・農学部・講師

研究者番号：30533228

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

該当なし