

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 19 日現在

機関番号：14501

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24658040

研究課題名(和文) Building blocks法による高効率多重遺伝子サイレンシング系の確立

研究課題名(英文) Building blocks method, efficient gene silencing of multiple genes

研究代表者

中屋敷 均 (NAKAYASHIKI, Hitoshi)

神戸大学・(連合)農学研究科(研究院)・教授

研究者番号：50252804

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円、(間接経費) 960,000円

研究成果の概要(和文)：ポストゲノム時代の逆遺伝学的なアプローチにおける技術的問題の一つは、機能的に重複を持つファミリー遺伝子の機能解析である。本研究では、この問題を解決するために、40-60bp程度のターゲット配列を複数個タンデムにつなげた合成DNAをトリガー配列としたRNAiであるBuilding Blocks法を開発し、その適用を試みた。その結果、植物細胞壁構成成分であるキシロースやセルロースの分解酵素であるキシラナーゼやセルラーゼファミリーに属する約10個の遺伝子を効率的にノックダウンすることが出来た。この方法によりこれまで明らかでなかった植物細胞壁分解酵素のいもち病菌における病原性への関与が明らかとした。

研究成果の概要(英文)：In the post-genomics era, a major obstacle to functional genomics is functional redundancy among gene family members. To overcome this difficulty, we have developed an RNAi strategy design ated building blocks method, in which a 40-60 bp sequence is chosen from a target gene, and such sequences from multiple gene family members were combined to make an artificial RNAi trigger by synthetic DNA. In t his study, the building blocks method was applied to knock-down (KD) two gene families, xylanases and cell ulases, to elucidate their roles in the pathogenicity of the blast fungus, *Magnaporthe oryzae*. In the resu lting KD mutants, the transcript levels of all the target genes were significantly decreased. The number o f lesions, rate of penetration, and extent of infected cells were all reduced in KD mutant-infected leaves . Thus, we concluded that xylanases and cellulases play significant roles in vertical penetration and hori zontal expansion of *M. oryzae* in infected plants.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：植物病理学

キーワード：いもち病菌 細胞壁分解酵素 RNAi

1. 研究開始当初の背景

ポストゲノム時代の逆遺伝学的な遺伝子解析における重要な技術的課題の一つは、機能的に重複を持つファミリー遺伝子の解析である。例えば、糸状菌の遺伝子機能解析では、遺伝子破壊法による変異体作製が主流であるが、この方法では、機能的に重複する遺伝子が複数あった場合に表現形による解析ができない。それは破壊されていない遺伝子の機能によって、遺伝子破壊の効果がマスクされてしまうからである。この問題は、重複する遺伝子をすべて破壊すれば解決するが、二重、三重変異体の作製には、選抜マーカー遺伝子が複数必要になり、現実的には三重変異体以上の解析例はほとんどない。従って、ファミリーを形成する多重遺伝子の機能解析は、糸状菌に限らず、ポストゲノミクスにおける重要な課題の一つと言える。

2. 研究の目的

本研究ではこのファミリー遺伝子の機能解析に RNAi を用いた新たな手法を提案する。RNAi の利点は、塩基配列の相同性によってサイレンシングが起こるため、複数のファミリー遺伝子間に配列の類似性があれば、それらすべてが対象となる。本研究で提唱する building blocks 法は、単一のコンストラクトで多数の遺伝子を同時にノックダウンするための新しい手法である。この方法では、各遺伝子に相同性を持つ 50bp ほどの配列を複数つなげた合成遺伝子を人工的に作製し、それによりサイレンシングを誘導する。これにより、多重遺伝子を簡便に、かつ平均的にサイレンシングさせることが可能となると考えられる。そこで、この方法により植物病原糸状菌において機能重複が著しい加水分解酵素ファミリー等をすべて同時にサイレンシングさせること等を試みる。

3. 研究の方法

当研究室では、二つのプロモーターを用いることでワンステップのクローニングで RNAi ベクターを構築できる pSilent-Dual1 (pSD1) を構築している (Nguyen et al. 2008 Mol. Microbiol.)。このシステムでは、導入配列が GFP 断片と融合された形で転写される仕組みになっており、GFP を発現させた受容菌を用意することで、GFP 蛍光の消長をマーカーとしてサイレンシング株を効率的に選抜できる仕組みとなっている。この系を用いて合成 DNA をインサートとして RNAi を誘導する。

いもち病菌は 2002 年にゲノム配列が公開されており、今回対象とする GH10, GH11 セルラーゼおよび GH6, GH7 キシラナーゼは、それぞれゲノム上に 9 個、11 個存在し、遺伝子ファミリーを形成している。これらの各遺伝子から固有の配列をそれぞれ約 40-60bp ずつ選抜してつなげた仮想配列を作製し、これを人工的に合成しトリガー配列とした。

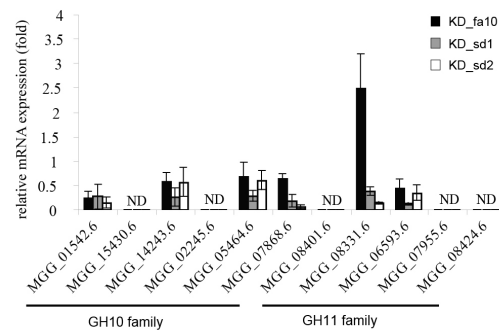
GFP 蛍光のサイレンシングにより形質転換体を選抜し、さらに酵素活性および qPCR によりそれぞれの遺伝子の発現動向を調査し、どのような配列を使用した遺伝子がどれくらいサイレンシングを受けたのかを調査した。

また、キシラナーゼやセルラーゼは、植物病原糸状菌の病原性に関わっていることが古くから示唆されてきたが、多重遺伝子であるため一つ二つの遺伝子破壊では、これまで病原性に影響を与えず (Wu et al. 1997 MPMI) その遺伝的にこれらの遺伝子が病原性に影響を与えている直接的な証拠が得られていなかった。そこで得られたサイレンシング株の病原性について、詳しく調査し、これらの遺伝子ファミリーが感染に必須なのか、侵入時に必要なのか、病斑の拡大に必要なのかと言った点について調査した。

4. 研究成果

いもち病菌ゲノム上に存在する計 11 個の GH6, GH7 キシラナーゼからは、各 40bp ずつの配列を抽出し、それらを繋げた合成 DNA をトリガー配列とした。また、計 9 個の GH10, GH11 セルラーゼからは、各 50bp の配列を抽出し、およびは、それぞれゲノム上に 9 個、11 個存在し、それらを繋げた合成 DNA をトリガー配列とした。これらを糸状菌のサイレンシングベクターである pSilent-Dual に挿入し、こむぎいもち病菌 Br48 に導入した。これらのいもち病菌形質転換体における遺伝子発現や表現型を調査した所、以下のような主要な結果が得られた。

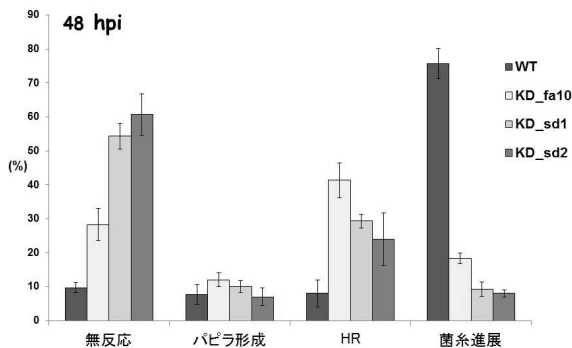
(1) キシラナーゼ遺伝子のサイレンシング



上図には、接種後 72 時間の 3 つのキシラナーゼサイレンシング株 (KD_fa10, KD_sd1, KD_sd2) における各キシラナーゼ遺伝子の発現量を野生株における発現量との比で示している。各キシラナーゼ遺伝子は、KD_fa10 における一部の遺伝子を除き、その発現が野生株と比べると概ね 1/2 以下に低下しており、良好な遺伝子サイレンシングが building blocks 法により誘導されることが明らかになった。各遺伝子間におけるサイレンシング効率は、特に KD_SD1 株では安定していたが、GH10 に属するキシラナーゼの配列をトリガーとして用いた KD_fa10 株では不安定な結果

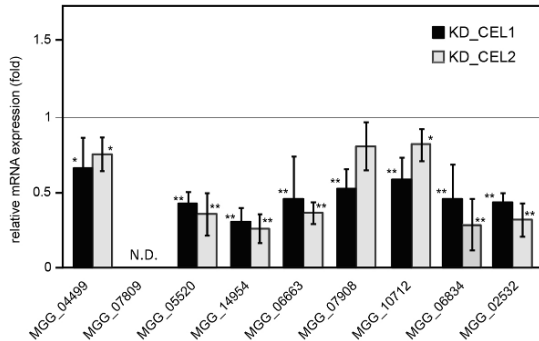
であり、building blocks 法の優位性が示された。

(2) キシラナーゼサイレンシング株の病原性



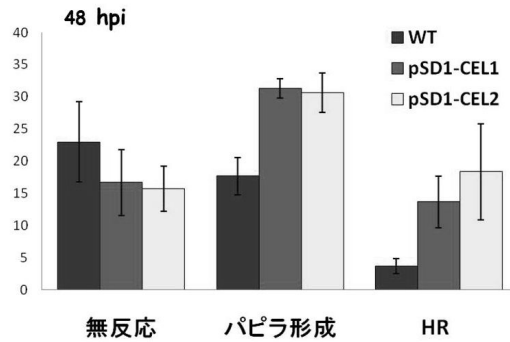
得られたキシラナーゼサイレンシング株の植物への接種試験を行い、その表現型の変化を観察した。上図にその結果を示したが、野生株では約 80% の発芽胞子が、宿主細胞内に侵入し感染を成立させるが、キシラナーゼのサイレンシング株では、どれも菌糸進展を示す割合が劇的に低下していた。その多くが過敏反応 (HR) やそれ以前の侵入過程において、侵入を阻止されており、明白な病原性の低下を示すことが明らかとなった。

(3) キシラナーゼ遺伝子のサイレンシング



続いて、キシラナーゼと同様の手法を用いて、GH6 および GH7 セルラーゼファミリーのサイレンシングを試みた。上図には、接種後 72 時間の 2 つのセルラーゼサイレンシング株 (KD_CEL1, KD_CEL2) における各セルラーゼ遺伝子の発現量を野生株における発現量との比で示している。各セルラーゼ遺伝子は、野生株と比べると概ね発現量が 1/2 以下に低下したものが多かったが、いくつかの遺伝子においては、20~30% 程度の減少にとどまっていた。しかし、全体的に言えば、良好な遺伝子サイレンシングがセルラーゼにおいても building blocks 法により誘導されることが明らかになった。

(4) セルラーゼサイレンシング株の病原性 次にセルラーゼサイレンシング株の植物への接種試験を行い、その表現型の変化を観



察した。上図にその結果を示したが、キシラナーゼサイレンシング株と同様に、野生株と比較して過敏反応 (HR) を示すものが多い結果が得られた。しかし、セルラーゼサイレンシング株に特徴的なこととして、キシラナーゼサイレンシング株では見られなかったパピラ形成率の上昇が観察された。これはセルラーゼサイレンシング株において、植物の細胞壁突破速度が低下し、その影響でパピラが形成される前に、細胞内に侵入することが阻止された結果と想定された。キシラナーゼサイレンシング株は、より早いクチクラ層の突破に何らかの障害があり、無反応に見える相互作用が多くなったと考えられた。

以上の結果により、いもち病菌が保有する植物細胞壁分解酵素であるキシラナーゼおよびセルラーゼが、実際に病原因子として同菌の侵入過程の少し異なった段階で有効に機能していることが明らかとなった。また、これらの研究を通して、RNAi の応用である building blocks 法が糸状菌におけるファミリー遺伝子群の新しい機能解析手法として有効に機能すること示されたと考える。

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 4 件)

1) Vu BV, Pham KT, Nakayashiki H. (2013) Substrate-induced transcriptional activation of the MoCel7C cellulase gene is associated with methylation of histone H3 at lysine 4 in the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*. *Appl Environ Microbiol.* 79:6823-6832. 査読有

2) Morita Y, Hyon GS, Hosogi N, Miyata N, Nakayashiki H. Muranaka Y, Inada N, Park P, Ikeda K. (2013) Appressorium-localized NADPH oxidase B is essential for aggressiveness and pathogenicity in the host-specific, toxin-producing fungus *Alternaria alternata* Japanese pear pathotype. *Mol Plant Pathol.* 14:365-378. 査読有

3) Hoat TX, Nakayashiki H., Yang Q, Tosa Y, Mayama S. (2013) Molecular cloning of the apoptosis-related calcium-binding protein AsALG-2 in *Avena sativa*. Mol Plant Pathol. 14:222-229. 査読有

4) Vu, V.B., Itoh, K., Nguyen, Q.B. and Nakayashiki, H. (2012) Cellulases belonging to glycoside hydrolase families 6 and 7 contribute to the virulence of *Magnaporthe oryzae*. Molecular Plant-Microbe Interaction 25:1135-1141. 査読有

〔学会発表〕(計 2 件)

1)村部知里、河南浩美、伊藤賢司、中屋敷均 (2012) いもち病菌における新たな遺伝子解析手法、Building Blocks 法の検討。平成 24 年度日本植物病理学会関西支部会、鳥銀文化会館、鳥取市、9 月 27 日

2)Pham, K. T. M., Vu, B. V., Nguyen, Q. B., Ikeda, K., and Nakayashiki, H. (2013) Histone lysine methyltransferases in *Magnaporthe oryzae* are involved in various aspects of infection and pathogenesis. 10th International Congress of Plant Pathology (Beijing, China, 29th August) P332.

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等
<http://www.ans.kobe-u.ac.jp/jyukensei/e-bio/guide/structure.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

中屋敷 均 (NAKAYASHIKI, Hitoshi)
神戸大学・大学院農学研究科・教授
研究者番号：50252804