

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 10 月 5 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25292028

研究課題名(和文)いもち病菌の感染器官形成におけるクロマチン修飾のダイナミズム

研究課題名(英文) Epigenetic gene regulation of the rice blast fungus *Pyricularia oryzae* during infection

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) 12,700,000円

研究成果の概要(和文)：イネ科植物いもち病菌におけるヒストン修飾の役割を明らかにするために、同菌ゲノムに存在する8個のヒストンメチル基転移酵素様遺伝子を破壊した変異体を作成した。これら変異体の解析から、MoSET1と命名された遺伝子の破壊株で、最も顕著な付着器形成の異常と感染性の低下が認められた。MoSET1は、H3K4のメチル化を担う酵素であったが、H3K4メチル化は感染器官の形成に伴って動的に変動しており、原則的には遺伝子の正の制御と関連していた。MoSET1は感染器官形成時に発現変動する4,077個の遺伝子のうち、過半数にあたる2,082個の遺伝子の発現制御に関与していることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：We performed genetic analyses of eight putative histone lysine methyltransferase (KMT) genes in the phytopathogenic fungus *Pyricularia oryzae*. Phenotypic assays revealed that MoSET1 disruptants (*moset1*) showed the most severe defects in infection-related morphogenesis, including conidiation and appressorium formation, indicating that H3K4me is an important epigenetic mark for infection-related gene expression in *P. oryzae*. ChIP-seq analysis of H3K4 di- and tri-methylation (H3K4me2/me3) and MoSET1 protein during infection-related morphogenesis, together with RNA-seq analysis of the *moset1* mutant, led to the following conclusions: 1) In general, H3K4-me2 and -me3 abundance was positively associated with active transcription. 2) Among the 4,077 differentially expressed genes (DEGs) between mycelia and germination tubes, 1,201 and 882 genes were up- and down-regulated, respectively, in a MoSET1-dependent manner.

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 病原性

1. 研究開始当初の背景

イネいもち病菌(*Magnaporthe 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。

この菌の宿主植物への感染は、無性的な分生孢子によって起こることが一般的である。宿主植物上に付着した孢子は、そこから発芽管と呼ばれる菌糸を伸ばし、その先端に付着器という特殊な感染器官を形成する。付着器はメラニン化した強固な器官であり、そこで得られた膨圧により宿主の細胞壁を貫通して菌体を送り込み、侵入菌糸を形成して、栄養授受関係を確立する。

このようにいもち病菌は感染過程で菌糸、孢子、発芽管、付着器、侵入菌糸という様々な形態の器官を形成し、その形態分化が菌の感染性に必須であるが、この過程にどのような遺伝子制御が関与しているのか、その多くが未解明のままである。特にこのような大きな形態変化には、クロマチンのリモデリングを介した大規模な染色体レベルでの遺伝子発現制御の変化があると想定されるが、ほとんど知見が得られていないのが現状であった。

2. 研究の目的

本研究の目的は、いもち病菌の付着器形成までの過程におけるヒストン修飾のダイナミックな変化を世界で初めて明らかにすることである。当研究室ではRNAiスクリーニングにより、ヒストンメチル化を担うヒストンメチルトランスフェラーゼ(HMT)ファミリーに着目するに至った。特に MoSET1 と命名した遺伝子の破壊株では、顕著な付着器形成の阻害が認められており、いもち病菌の付着器形成に至るまでの感染過程で、MoSET1 に依存したヒストン修飾にどのようなダイナミックな変化が起こるのかを包括的に明らかにする。

3. 研究の方法

本研究では、ゲノムワイドなクロマチン修飾の解析を行なうために、次世代シーケンサーを用いたクロマチン免疫沈降シーケンス(ChIP-seq)法を主として用いた。付着器形成に至るまでの各段階のいもち病菌細胞からサンプルを採取し、そのヒストンメチル化について解析した。

また、同時にそれらサンプルにおける遺伝子発現もRNA-seq法によりゲノムワイドに解析を行い、ChIP-seq解析との比較を行なった。これによりヒストン修飾の変化によって発現が影響を受けている遺伝子を特定した。

4. 研究成果

(1) いもち病菌の KMT 遺伝子

公開されているいもち病菌のゲノム配列を対象に、既知の KMT 遺伝子配列をクエリとして用いた BLAST 解析を行った結果、8 個の KMT 候補遺伝子を同定した。それらは、既知 KMT 遺伝子との類似性から MoKMT1 (MGG_06852), MoSET1 (MGG_15053), MoKMT3 (MGG_01661), MoKMT4 (MGG_05254), MoKMT5 (MGG_07393), MoKMT6 (MGG_00152), MoKMT2h (MGG_02937), MoSET6 (MGG_15522) とそれぞれ命名された。

これら KMT 候補遺伝子のいもち病菌における機能解析を行うために、Split marker 法により (Fu et al., 2005) これらの遺伝子破壊株を作成した。まず、これらの KMT がいもち病菌においてどのようなヒストン修飾を担っているのかを明らかにするために、市販の抗体を用いてこれら破壊株におけるヒストンタンパク質のウエスタンブロッティング解析を行った。その結果、MoKMT1 は H3K9me3 を、MoSET1 は H3K4me1, H3K4me2, H3K4me3 を、MoKMT5 は H4K20me3 を、また MoKMT6 は H3K27me3 を修飾する酵素であることが示唆された (図 1)。

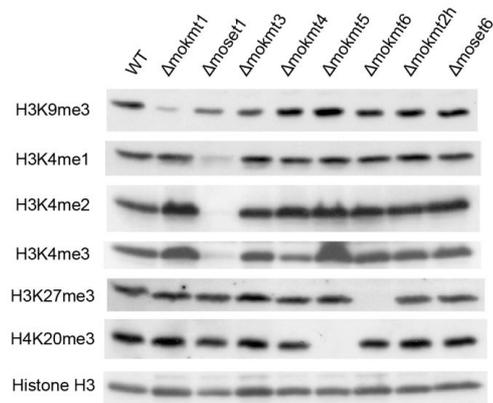


図 1. 各 KMT 変異体のウエスタンブロッティングによるヒストンメチル化の解析

(2) 各 KMT 遺伝子破壊株の表現型解析

各 KMT 遺伝子破壊株の栄養菌系成長、発芽率、孢子形成率、付着器形成率、および宿主植物への感染性について調査した。結果を図 2 に示したが、各 kmt 変異体は様々なレベルで感染器官形成等の低下があることが示された。菌系成長では、mokmt1、moset1、mokmt3、mokmt2h で有意な遅延が見られ、孢子形成では moset1、mokmt3、mokmt6、mokmt2h において有意な形成率の低下が認められた。発芽率が低下したのは mokmt3 と mokmt2h の 2 遺伝子の変異体のみであったが、付着器形成率は moset1、mokmt3、mokmt6、mokmt2h の 4 遺伝子の変異体で低下しており、特に moset1 における低下が著しかった。また、感染性は mokmt1 および mokmt6 では抵抗性反応である HR 率がやや上昇し、mokmt3 および mokmt2h では HR 率

のさらなる上昇がみられた。また *moset1* では病原性の完全な喪失が認められた。

以上の結果は、いもち病菌の感染過程において最も大きな影響を持つ KMT 遺伝子は *MoSET1* であり、次いで *MoKMT3* および *MoKMT2h* の両遺伝子と考えられた。これを受けて、以後の研究では、*MoSET1* に焦点を合わせた実験を行った

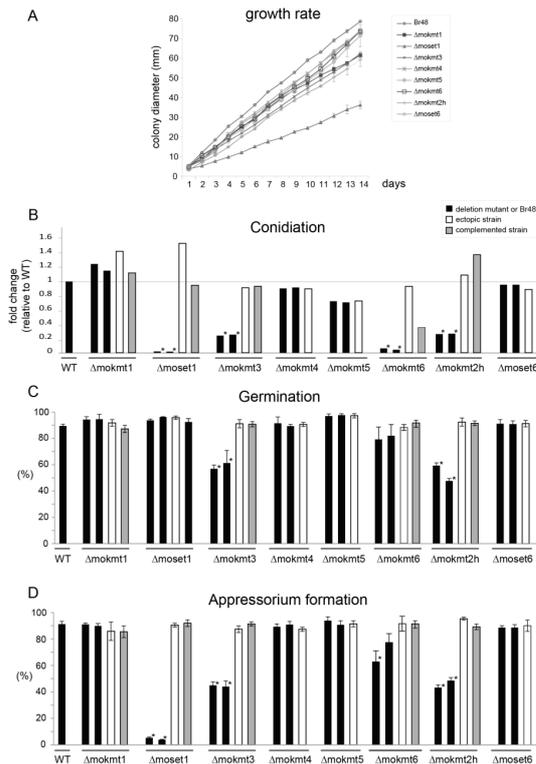


図 2 . KMT 変異体の表現型解析

A, 完全培地上での菌糸成長率; B, 胞子形成率は野生株 (Br48) における胞子形成数と変異体におけるそれとの比として表した; C, 胞子発芽率; D, 付着器形成率は疎水面上で胞子を発芽させ、付着器を形成した胞子の比率として表した。

(3) 感染器官形成に応じたゲノムワイドな H3K4me2/me3 修飾のダイナミズム解析

表現型解析の結果、*moset1* で最も劇的な付着器形成率と病原性が低下したことから、いもち病菌の感染器官形成において最も重要なヒストンメチル化修飾は H3K4 に対するものであると想定し、ChIP-seq 解析により H3K4me2/me3 修飾が、感染器官形成において、どのように変化して行くのか調査した。

その結果、発芽管形成に伴って H3K4me2 および H3K4me3 のパターンが有意に変動する遺伝子が、それぞれ 426 個と 621 個検出された。このことから、胞子発芽から付着器形成に至る感染器官形成の過程で、実際に H3K4me2/me3 の分布様式が大きく変動していることが示された。また、H3K4me2/me3 の変動パターンと連動する遺伝子発現を調査するために、RNA-seq 解析も同時に行った。その結果、発芽管形成に伴って発現が増加する遺伝子が 2,141 個、発現が減少する遺伝子が

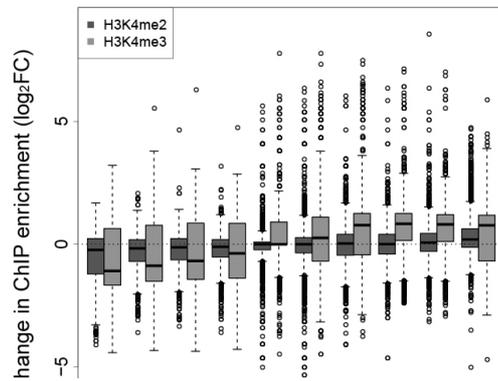


図 3 . H3K4me2/me3 修飾と遺伝子発現の相関解析
RNA-seq 解析により、発芽 6 時間後の発芽管と栄養菌糸における遺伝子発現を比較し、発芽管で発現上昇 (u1-u5) あるいは低下 (d1-d5) していた遺伝子をその程度によりそれぞれ 5 グループに分類した。各グループにおける H3K4me2/H3K4me3 の発芽管と栄養菌糸における蓄積量の比を図に示した。d1-d5 では H3K4me2/H3K4me3 も発芽管で低下しており、u1-u5 では上昇している傾向が認められる。

1,936 個検出された。興味深いことに、これら発現変動が見られた遺伝子の内、増加、減少のそれぞれ 883 個 (41.2%) および 1,201 個 (62.0%) の遺伝子は、*moset1* では、その発現変動が見られなくなっていた。従って、発芽管形成に際して発現変動する遺伝子のおおよそ半分は *MoSET1* に直接、もしくは間接的に依存して制御されていると考えられた。この *MoSET1* に依存して発現変動する遺伝子を *MoSET1* 依存遺伝子とこれ以降、呼称する。

次に H3K4 メチル化がいもち病菌の遺伝子発現に対してどのような影響を与えているかを明らかにするために、ChIP-seq によって得られた H3K4 メチル化レベルと RNA-seq によって得られた遺伝子発現レベルの相関を調査した。その結果、図 3 で示したが、全体としては発現量レベルが上昇した遺伝子では、H3K4 メチル化のレベルも上昇するという傾向が見られた。特に H3K4me3 ではその傾向がより顕著であった。従って、これまで他の真核生物で報告されているように (Pokholok et al., 2005; Barski et al., 2007; Van et al., 2010) いもち病菌においても H3K4 メチル化は遺伝子発現を正に制御している可能性が示された。しかし、上述したように実際には *MoSET1* に依存して、発芽管で発現が低下している遺伝子も 1,201 個検出されており、*MoSET1* の作用は間接的なものも含めると単純に遺伝子の発現を上昇させているだけではないと考えられた。

この問題を考えるために、より詳細に H3K4 メチル化レベルと遺伝子発現の相関を見てみると (図 4) MGG_11149 のように菌糸における高い H3K4me2/me3 レベルと遺伝子発現レベルが同時に見られ、その発現変動が *moset1* では見られなくなるというきれいな相関を見せる例があるものの、これに隣接する MGG_01755、MGG_01756、

MGG_01757 などでは発芽管における遺伝子発現量は増加し、その増加は *moset1* で見られなくなっているが、H3K4me2/me3 レベルは菌糸と発芽管で変わらないように見える例もあった(図4)。また、MGG_11148 などでは、H3K4me2/me3 レベルと遺伝子発現には相関があるように見えるが、*moset1* でも同じような遺伝子発現の変化が認められており、本当にこれが H3K4 メチル化に依存しているのか疑問である(図4)。

このように詳細に解析を行うと単純に H3K4 メチル化が遺伝子の発現上昇と相関しているとは言い難い状態であり、他のヒストン修飾の影響や H3K4 によって発現が変化した遺伝子の機能が影響する間接的な遺伝子制御といったものも考慮しなければならぬ複雑性があることが明らかとなった。

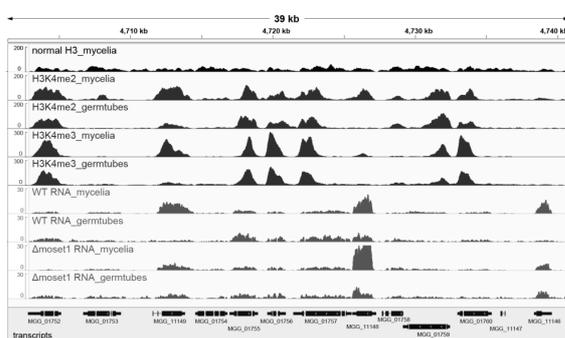


図4. いもち病菌ゲノムにおける ChIP-seq および RNA-seq 解析の一例
発芽管 (germtubes) と栄養菌糸 (mycelia) を用いた ChIP-seq および RNA-seq 解析においてマップされたリードのピークを示した。コントロールとしてヒストン H3 の C 末端に対する抗体を用いた ChIP-seq の結果を最上段に示している。

< 引用文献 >

Barski, A., Cuddapah, S., Cui, K., Roh, T.Y., Schones, D.E., Wang, Z., Wei, G., Chepelev, I., and Zhao, K. (2007) High-resolution profiling of histone methylations in the human genome. *Cell* 129: 823-837.

Fu, J., Hettler, E., and Wickes, B.L. (2005) Split marker transformation increases homologous integration frequency in *Cryptococcus neoformans*. *Fungal Genet. Biol.* 43: 200-212.

Pokholok, D.K., Harbison, C.T., Levine, S., Cole, M., Hannett, N.M., Lee, T.I., Bell, G.W., Walker, K., Rolfe, P.A., Herbolsheimer, E., Zeitlinger, J., Lewitter, F., Gifford, D.K., and Young, R.A. (2005) Genome-wide map of nucleosome acetylation and methylation in yeast. *Cell* 122: 517-527.

Van, D.K., Ding, Y., Malkaram, S., Riethoven, J.J., Liu, R., Yang, J., Laczko, P., Chen, H., Xia, Y., Ladunga, I., Avramova, Z., and Fromm, M.

(2010) Dynamic changes in genome-wide histone H3 lysine 4 methylation patterns in response to dehydration stress in *Arabidopsis thaliana*. *BMC Plant Biol.* 10: 238.

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 3 件)

1. Pham KT, Inoue Y, Vu BV, Nguyen HH, Nakayashiki T, Ikeda K, Nakayashiki H (2015) MoSET1 (Histone H3K4 methyltransferase in *Magnaporthe oryzae*) regulates global gene expression during infection-related morphogenesis. *PLoS Genet.* 11: e1005385.
2. Pham, TMK., Nguyen, H.H., Murai, T., Chuma, I., Tosa, Y., Nakayashiki, H. (2015) Histone H3K4 methyltransferase globally regulates substrate-dependent activation of cell wall degradation enzymes in *Magnaporthe oryzae*. *J Gen Plant Pathol.* 81:127-130.
3. 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.

{ 学会発表 } (計 7 件)

1. Nakayashiki, H. (2013) Histone methyltransferase genes play roles in the pathogenicity of the rice blast fungus, *Magnaporthe oryzae*. Sino-Japan Joint Symposium of Plant Pathology (Beijing, China, August) (招待講演)
2. Pham, K. T. M., Vu, B. V., Nguyen, Q. B., Ikeda, K., 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, August) P332. (招待講演)
3. 他 5 件

{ 図書 } (計 1 件)

1. Nguyen, Q.B., Nakayashiki, H. (2015) RNA silencing in filamentous fungi: from basic to applications. In *Genetic Transformation Systems in Fungi* (eds. Marco van den Berg and Karunakaran Maruthachalam), pp.107-124. Springer-Verlag (Heidelberg)

{ 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

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

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：