

令和元年6月14日現在

機関番号：14501

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K19269

研究課題名(和文)生物間相互作用に介在する小分子RNAの進化機構

研究課題名(英文)Evolutionary implications of small RNAs on plant-microbe interactions

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)：イネ科植物いもち病菌が産生する小分子RNA(sRNA)の網羅的な解析を行った。その結果、rRNAやtRNAのプロセシングにRNAi機構が重要な役割を果たしていること、rRNAやtRNA由来のsRNAはアルゴノートに優先的に結合していること等が明らかとなった。さらに同菌にはRNAi経路に依存しないsRNAが存在することが示唆された。また、同菌は液体培地の中にsRNAを分泌しており、植物との応答にsRNAを用いている可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

いもち病菌はイネに甚大な被害を及ぼす植物病原菌であるが、この菌は植物の病害抵抗性を抑止するために、蛋白質や低分子の毒素など、様々な分子を分泌している。近年、これらに加えて小分子RNAを分泌することにより、植物の遺伝子発現をコントロールして病害を発生させる病原菌の例が発見され、本菌においても同様の機構がないのか、また現在ないとしても、今後の進化の過程で獲得する可能性がないのか調査した。

研究成果の概要(英文)：We performed sRNA sequencing analysis using the *Pyricularia oryzae* strain Br48 and its gene knock-out (KO) mutants including double dicer- and triple RNA-dependent RNA polymerase (RdRP)-KO mutants. In wild type, approximately 65% of the sRNAs were derived from rRNA and tRNA, and 10% from gene coding and intergenic regions. Several small rRNA sequences, called small rDNA-derived RNAs (srRNAs), exhibited more than 100-fold enrichment in the AGO-libraries relative to the WT library, suggesting a tight association of RNAi with rRNA processing and/or degradation. Consistently, the srRNAs were significantly depleted in the dicer and RdRP KO mutants. The majority of sRNAs mapped to the gene coding and intergenic regions were not considerably affected by deletion of either dicer or RdRP, suggesting that their biogenesis were dicer- and RdRP-independent. This suggests that significant portions of coding gene-derived sRNAs in the Br48 strain are independent of the canonical RNAi pathways.

研究分野：植物病理学

キーワード：いもち病菌 小分子RNA RNAi

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

本研究課題は、小分子 RNA を介した生物間のインタラクション、特にそれを担うような分子がどのように生じたのか、その進化の過程を解き明かそうとするものである。miRNA や siRNA に代表される小分子 RNA は、細胞内の遺伝子制御に用いられるノンコーディング RNA であるが、近年、これが多細胞生物において細胞間に分泌され、細胞間のシグナル物質として利用されている例が報告されている。また、例えばこれらが病原菌の感染の際に、宿主細胞へと遺伝子水平移行のように持ち込まれ、エフェクターとして宿主遺伝子の制御を行うことも報告されている。こういった新たな小分子 RNA の機能が明らかにされるにつれ、細胞内でどのような小分子 RNA が生産されているのか、またそれらが生物間の相互作用にどの程度、普遍的に関わっているのか、興味もたれている。

### 2. 研究の目的

我が国の重要病害であるイネいもち病菌では、多くの小分子 RNA が細胞内で産生されていることが知られているが、その産生を担っている Dicer や Argonaute といった遺伝子の変異体においても、目立った病原性の低下は見られない。これは本菌においては小分子 RNA が宿主の遺伝子発現を制御するエフェクターとしては現在、使用されていないことを示唆している。しかし、本研究では、本菌にも生物間の相互作用に機能するような RNA エフェクター分子を生み出す仕組みはあり、現在は、それを有効なエフェクターとして利用できるようになるまでの、進化の途上にあるのではないかと仮定している。

つまり本研究では、いもち病菌においても機能のない形で様々な RNA 分子が生産され細胞外に分泌されており、その中から変異により機能分子が生まれ、選択圧により「遺伝子」として確立されていくというシナリオを考えている。そこで本研究では、どのような小分子 RNA がいもち病菌に存在しており、それらがどのような機構で産生されているのか、またその中から機能の有無に関わらず、どのような小分子 RNA が実際に分泌されているのか、という点を調査する。これにより小分子 RNA を介した生物間の相互作用の進化について、その一端を解き明かす。

### 3. 研究の方法

#### 1) RNAi 変異株を用いた sRNA の網羅的解析

小分子 RNA の産生には Dicer、Argonaute、RdRP の三種のタンパク質が関与していることが明らかになっている。いもち病菌ゲノムには 2 種の Dicer、三種の Argonaute、三種の RdRP 遺伝子が存在している。そこで、野生株に加え、これらの遺伝子破壊株を用いて産生される小分子 RNA を網羅的に調査する。

#### 2) いもち病菌の細胞外小分子 RNA の解析

いもち病菌の培養過程において液体培地中に分泌される小分子 RNA をライブラリー化して、次世代シーケンサーを用いて解析し、どのような分子が分泌されているのかを網羅的に調査する。

### 4. 研究成果

コムギいもち病菌 Br48 系統を用いて、ゲノム上の二つの Dicer の二重変異体 ( $\Delta dcl1/2$ )、三つの RdRP の三重変異体 ( $\Delta rdrp1/2/3$ )、三つの Argonaute の各単独変異体を作製し、次世代シーケンサーによる sRNA の解析を行った。その結果、野生株では sRNA の約 65% が rRNA および tRNA に由来しており、約 15% が rRNA と tRNA 以外の核ゲノムから、また約 10% がミトコンドリアゲノムから産生されていることが明らかとなった。通常生物では RNAi の主要なターゲットである転移因子やウイルスに由来する sRNA は、本菌では極めて少なく、全体の数パーセントに過ぎなかった (図 1)。

興味深いことに Dicer や RdRP の欠失により大きな影響を受けた sRNA は rRNA、tRNA、転移因子および内在性ウイルス由来のものであり、核ゲノムのコード領域やインタージェニック領域に由

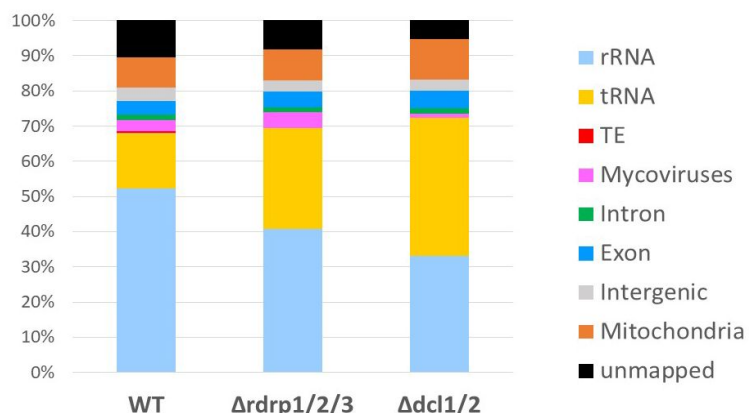


図 1. 各菌系統において小分子 RNA がマップされたゲノム領域

来する sRNA は、その比率に大きな影響がなかった。Dicer や RdRP の欠失変異体では rRNA に由来する小分子 RNA (srRNA) は大きく減少し、srRNA の産生には RNAi 機構が大きく関与していることが明らかとなった。また、tRNA に由来する tsRNA は特に Dicer の変異株において、25-35nt の分子が多くなり、これは野生株における tsRNA のピーク (17nt) から、ピークがシフトしていた。この 25-35nt の分子は成熟した tsRNA 分子への中間体ではないかと思われた (図 2)。いもち病菌では、これらの反応中間体が Dicer によりプロセッシングされ、成熟した tsRNA になるという生化学反応が起きていると想定された。

また、これらの解析から、いもち病菌において、これまでに報告のないと考えられる新規クラスの small RNA を発見した。これらの新規 small RNA は、その生成が Dicer と RdRP のいずれにも依存しない。Argonaute にもロードされない、という RNAi に非依存性という特徴を持っていた (図 3)。また、このクラスの small RNA は非常に狭いゲノム領域に特異的にマップされており、エクソン、イントロン、遺伝子間領域のいずれにもマップされていることが分かった。その生物学的意義については、今回の研究では明らかにできなかったが、今後の研究対象としては興味深いものと考えられる。

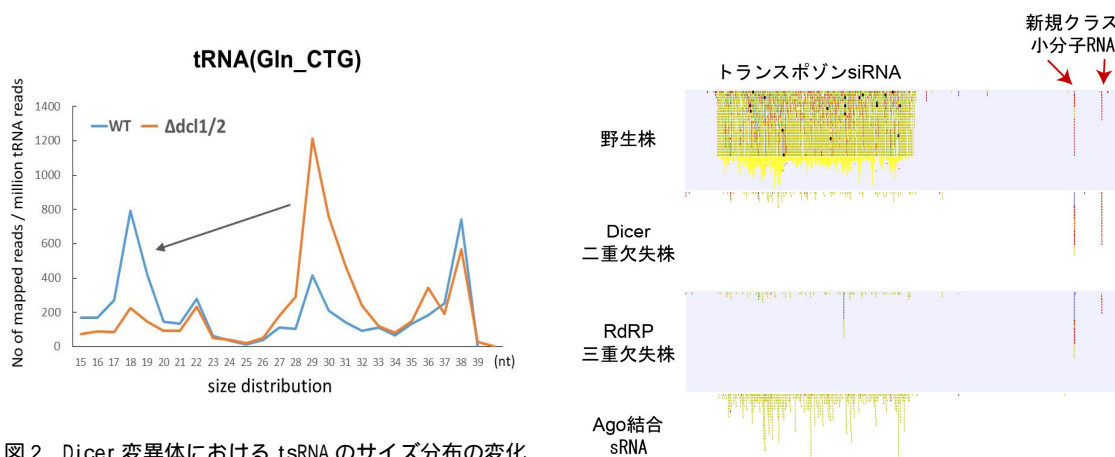


図 2. Dicer 変異体における tsRNA のサイズ分布の変化

図 3. 本研究で同定されたいもち病菌の新規クラス small RNA の特徴

また、培養中に培地に分泌されてくる sRNA については、これらも大部分はゲノムのごく狭い特定の領域にマップされるという特徴があった。これらのうち、明確なピークとなった分子種を 100 種程度ピックアップして詳細を解析した所、相対的にエクソンやイントロンなどの領域に由来するものが多く、5' および 3' における塩基のプレファレンスが通常のいもち病菌 siRNA などとは異なることが明らかとなった。また、これらは細胞内の mRNA の量などとは関連しておらず、単なる死細胞からの流出ではないと考えられた

今回、いもち病菌から、多くの分泌性の small RNA が生成されることが明らかになったのは大きな成果であると言えるが、これらの生物学的な意義についても、今後のさらなる分子レベルの研究が必要である。

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 2 件)

Ohkita S, Lee Y, Nguyen Q, Ikeda KI, Suzuki N, Nakayashiki H. Three ourmia-like viruses and their associated RNAs in *Pyricularia oryzae*. *Virology* (in press). doi.org/10.1016/j.virol.2019.05.015. 査読有

Nguyen Q, Iritani A, Ohkita S, Vu BV, Yokoya K, Matsubara A, Ikeda KI, Suzuki N, Nakayashiki H. (2018) A fungal Argonaute interferes with RNA interference. *Nucleic Acids Res.* 46:2495-2508. doi: 10.1093/nar/gkx1301. 査読有

〔学会発表〕(計 3 件)

Nakayashiki, H. Comprehensive analysis of RNAi-dependent and -independent small RNAs (sRNAs) in a wheat-infecting strain of *Pyricularia oryzae*. 8<sup>th</sup> international rice blast conference. (2019) Chengdu, China.

李 唯衣, 大北 修平, 池田 健一, 鈴木 信弘, 中屋敷 均 . コムギいもち病菌 Ourmia-like viruses の 2 種のサテライト RNA 様因子 . 平成 31 年度日本植物病理学会 . 2019 年 3 月 (つくば市)

梅崎 佑樹, Quyet Nguyen, 池田 健一, 中屋敷 均 . コムギいもち病菌の生産する小分子 RNA の体系的な特徴付け . 平成 31 年度日本植物病理学会 . 2019 年 3 月 (つくば市)

〔図書〕(計 0 件)

〔その他〕  
ホームページ等

## 6 . 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名 :

ローマ字氏名 :

所属研究機関名 :

部局名 :

職名 :

研究者番号 (8 桁):

### (2)研究協力者

研究協力者氏名 : Quyet Nguyen

ローマ字氏名 : Quyet Nguyen

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。