

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 27 日現在

機関番号：14501

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22380031

研究課題名（和文） イネ科植物いもち病菌の病原性に果たすクロマチンリモデリング遺伝子の役割

研究課題名（英文） Roles of chromatin remodeling genes in the pathogenicity of *Magnaporthe oryzae*

研究代表者

中屋敷 均 (NAKYASHIKI HITOSHI)

神戸大学・大学院農学研究科・教授

研究者番号：50252804

研究成果の概要（和文）：イネ科植物いもち病菌ゲノムに7個存在する典型的なヒストンメチル基転移酵素遺伝子の各破壊株を作成し、形質調査した所、ヒストン H3 リジン 4 (H3K4) のメチル化を担う MoHMT4 遺伝子が本菌破壊株で最も大きな影響が見られ、胞子発芽、付着器形成、宿主シグナルの感受性および侵入後の進展と、およそ病原性の発現に必要と考えられるすべてのステップで欠損が見られた。そこで ChIP-seq 解析によりいもち病菌感染時の H3K4 修飾の変化を網羅的に明らかとした。

研究成果の概要（英文）：We constructed knock-out mutants of seven histone lysine methyltransferase (HMT) genes in the fungus *Magnaporthe oryzae*. Phenotypic analysis revealed that one of the HMT genes, MoHMT4, which catalyzes methylation of histone H3 lysine 4, had the greatest impact on pathogenicity-related morphogenesis, signal perception and virulence. ChIP-seq analysis was performed to reveal the genome-wide changes of H3K4 methylation during infection of *M. oryzae*.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	7,400,000	2,220,000	9,620,000
2011年度	2,600,000	780,000	3,380,000
2012年度	2,600,000	780,000	3,380,000
総計	12,600,000	3,780,000	16,380,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農学・植物病理学

キーワード：いもち病菌 クロマチンリモデリング 病原性

1. 研究開始当初の背景

イネいもち病菌は、その感染の過程で、胞子から発芽管を伸ばし、その先端に付着器と呼ばれる特殊な器官を形成する。そして付着器内で得られた膨圧により、侵入菌糸を細胞内に侵入させる。この過程は、極めてダイナミックな菌の形態変化が見られる場であり、そこにはクロマチンの修飾や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制御の変化があると想定されるが、その機構についてはほとんど知見が得られていない

のが現状である。そこで本研究では、いもち病菌の感染器官形成、またその病原性に対するクロマチンリモデリングの影響をゲノムワイドで調査する。

2. 研究の目的

本研究では、いもち病菌の感染器官形成でキーとなるようなクロマチン修飾やリモデリング因子を同定することである。これらを明らかにすることで、同菌の感染戦略を明らかとすると共に、新たな薬剤ターゲットの発

見を通じて本菌の効率の良い防除法の将来的な開発につなげる。

3. 研究の方法

いもち病菌は全ゲノム配列が解読されており、出芽酵母等で得られた知見を利用してクロマチン修飾・リモデリングなどの染色体レベルの遺伝子発現制御に関わる遺伝子候補を選定することが可能である。このようなバイオインフォマティクス的アプローチにより選抜された約 50 個の候補遺伝子を当研究室で確立しているハイスループット RNAi 系を用いてノックダウンし、得られた変異株について、菌糸成長、孢子形成、孢子形態、メラニン化、発芽率、付着器形成率、宿主植物への感染率の 7 項目について、表現形解析を行う。

ノックダウン株が興味深い表現系を示す遺伝子は、さらにノックアウト株の作製やマイクロアレイ解析などを行い、詳細な下流の遺伝子発現経路、シグナル経路を明らかにし、いもち病菌の感染器官形成過程におけるクロマチンリモデリングによる遺伝子発現変化の全体像の把握を試みる。

4. 研究成果

本課題研究では、イネ科植物いもち病菌ゲノムに存在するクロマチン修飾・リモデリングを担う可能性のある約 50 個の RNAi スクリーニングから開始した。対象遺伝子は、ヒストンアセチル基転移酵素、ヒストン脱アセチル化酵素、ヒストンメチル基転移酵素 (HMT)、ATP 依存性のクロマチンリモデリング因子等である。RNAi 変異体を作成し、その遺伝子発現を調査した所、非ターゲット遺伝子における発現抑制が顕著に見られる例が散見された。そこで、RNAi スクリーニングの結果、有望と考えられた HMT 遺伝子群に焦点を合わせ、ターゲッティングによる遺伝子破壊法による研究を中心に進めることとした。

いもち病菌ゲノムには、バイオインフォマティクスによる調査により、少なくとも 7 個の遺伝子 (MGG_05254, MGG_01661, MGG_15053, MGG_07393, MGG_02937, MGG_06852, MGG_10842) があることが示されており、それらすべての破壊株を作製した。これらの遺伝子破壊株の、菌糸成長、孢子形成、孢子形態、メラニン化、発芽率、付着器形成率、宿主植物への感染率の 7 項目について、表現形解析を行った。

その結果、MGG_15053 破壊株では病原性が大きく低下していることが明らかとなり、また MGG_06852 および MGG_01661 破壊株でも有意な病原性の低下が見られた。MGG_15053 破壊株では、菌糸成長、孢子形成能および付着器形成率も大きく低下していた。この付着器形成欠損は、そのシグナル因子である cAMP

を加えることにより回復したことから、MGG_15053 は付着器形成のためのシグナル伝達に何らかの欠損があることが示された。

また、興味深いことに MGG_15053 は、宿主であるコムギの上では完全に病原性を失っていたがオオムギ品種 *nigrata* では、野生株と比較すると病斑数が低下していたものの、感染性を示し、同遺伝子が植物種特異的な抵抗性の抑制に働いている可能性も示唆された。上記の実験結果から、MGG_15053 遺伝子産物は、極めて多方面の形質に影響を与えていることが明らかとなった。

これらいもち病菌の DMT 遺伝子産物がどのようなヒストン修飾を担っているか、各ヒストン修飾に対する抗体を用いたウエスタンブロッティングを行った。その結果から、MGG_15053 は H3K4me2 の修飾を、MGG_06852 は、H3K9me3 の修飾を、また MGG_07393 は H4K20 をそれぞれ担っていることが明らかとなった (図 1)。

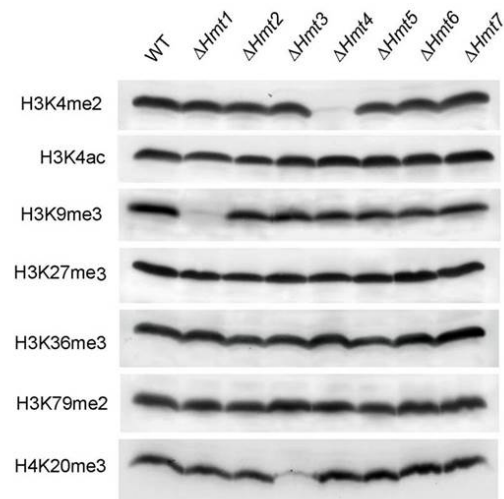


図 1. 各 HMT 遺伝子破壊株におけるヒストン修飾のウエスタン解析
ΔHmt4, MGG_15053 破壊株

そこで、MGG_15053 が担う H3K4me2 修飾がいもち病菌の感染過程でどのように変化するかを明らかにする目的で、Chip-Seq 解析を行った (図 2)。その結果、H3K4me2 の修飾は、遺伝子のコード領域に多く存在することが明らかとなったが、そのパターンは発芽管形成時や付着器形成時に多くの遺伝子で有意に変化しており、この修飾の変化が特異的な遺伝子発現に影響を与えていることが示唆された。CLC 社の Genomics workbench ソフトウェアで解析を行った所、付着器形成時に ChIP-seq ピークが変化したと判定された遺伝子が、約 800 個検出された。

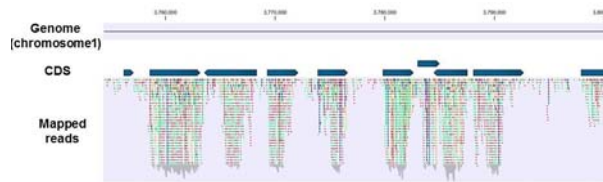


図 2. H3K4me2 抗体を用いた ChIP-seq 解析の一例

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 12 件)

- ① Tanaka, M., Wali, U.M., Nakayashiki, H., Fukuda, T., Mizumoto, H., Ohnishi, K., Kiba, A., Hikichi, Y. (2012) Implication of an aldehyde dehydrogenase gene and a phosphinothricin N-Acetyltransferase gene in the diversity of *Pseudomonas cichorii* virulence. *Genes*. 3:62-80. (査読有)
 - ② 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*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 25:1135-1141. (査読有)
 - ③ Hoat, T.X., Nakayashiki, H., Tosa, Y. and Mayama, S. (2012) Molecular cloning of the apoptosis-related calcium-binding protein AsALG-2 in *Avena sativa*. *Mol. Plant Pathol.* 14:222-9. (査読有)
 - ④ Morita, Y., Hyon, G.-S., Hosogi, N., Miyata, N., Nakayashiki, H., Muranaka, Y., Inada, N., Park, P., and Ikeda, K. (2012) 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.* 14:365-78. (査読有)
 - ⑤ Vu, V.B., Takino, M., Murata, T., Nakayashiki, H. (2011) Novel vectors for retrotransposon-induced gene silencing in *Magnaporthe oryzae*. *J. Gen. Plant Pathol.* 77: 147-151. (査読有)
 - ⑥ Uchihashi, K., Nakayashiki, H., Okamura, K., Ishihara, A., Tosa, Y., Park, P., and Mayama, S. (2011) In situ localization of avenanthramide A and its biosynthetic enzyme in oat leaves infected with crown rust fungus, *Puccinia coronata* f. sp. *avenae*. *Physiol. Mol. Plant Pathol.* 76: 173-181. (査読有)
 - ⑦ Chuma, I., Isobe, C., Hotta, Y., Ibaragi, K., Futamata, N., Kusaba M, Yoshida K, Terauchi R, Fujita Y, Nakayashiki, H., Valent, B., Tosa, Y. (2011) Multiple translocation of the AVR-Pita effector gene among chromosomes of the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae* and related species. *PLoS Pathog.* 7:e1002147. (査読有)
 - ⑧ Nakayashiki, H. (2011) The Trickster in the genome: contribution and control of transposable elements. *Genes Cells.* 16:827-841. (査読有)
 - ⑨ Nguyen, Q.B., Itoh, K., Van Vu, B., Tosa, Y., Nakayashiki, H. (2011) Simultaneous silencing of endo- β -1,4 xylanase genes reveals their roles in the virulence of *Magnaporthe oryzae*. *Mol. Microbiol.* 81:1008-1019. (査読有)
 - ⑩ Tanaka, M., Hyon, G., Murata, T., Nakayashiki, H., and Tosa, Y. (2010) Evolution of the *Eleusine* subgroup of *Pyricularia oryzae* inferred from rearrangement at the *Pw11* locus. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 23: 771-783. (査読有)
 - ⑪ Nguyen, H.P., Chakravarthy, S., Velásquez, A.C., McLane, H.L., Zeng, L., Nakayashiki, H., Park, D.H., Collmer, A., and Martin, G.B. (2010) Methods to study PAMP-triggered immunity using tomato and *Nicotiana benthamiana*. *Mol Plant Microbe Interact.* 23:991-999. (査読有)
 - ⑫ Tsurushima, T., Minami, Y., Miyagawa, H., Nakayashiki, H., Tosa, Y., and Mayama, S. (2010) Induction of chlorosis, ROs generation and cell death by a toxin isolated from *Pyricularia oryzae*. *Biosci Biotechnol Biochem.* 74:2220-2225. (査読有)
- [学会発表] (計 5 件)
- ① Pham, T.H.K. ・ Vu, V.B. ・ Nguyen, B.Q. ・ 池田健一 ・ 中屋敷均 ヒストンメチル基転移酵素群はイネ科植物いもち病菌の感染において重要な役割を果

たす。平成 25 年度日本植物病理学会講演要旨集 p65、平成 25 年 3 月 29 日 岐阜大学

- ② Pham, T.H.K., Nguyen, B.Q., Vu, V.B., and Nakayashiki, H. (2012) Roles of histone lysine methyltransferases in the pathogenicity of *Magnaporthe oryzae*. XV International Congress on Molecular Plant-Microbe Interactions (Kyoto International Congress Center, Kyoto, July-August). 平成 24 年度 7 月 30 日 京都国際会議場
- ③ Pham, T.H.K., Nguyen, B.Q., Vu, V.B., and Nakayashiki, H. (2012) Histone methyltransferase genes play roles in infection-related morphogenesis of *Magnaporthe oryzae*. 平成 24 年度日本植物病理学会大会. 平成 24 年 3 月 28 日、福岡国際会議場
- ④ Pham, TMK, Nguyen, QB., Vu VB, Nakayashiki, H. (2011) Roles of Histone Methyltransferase genes in infection processes of *Magnaporthe oryzae*. 平成 23 年度日本植物病理学会関西支部要旨集 p36、平成 23 年 10 月 1 日、香川
- ⑤ 伊藤賢司・Quoc Bao Nguyen・河南裕美・村部知里・土佐幸雄・中屋敷均 (2011) Building Blocks 法によるイネ科植物いもち病菌細胞壁加水分解酵素群の機能解析. 平成 23 年度日本植物病理学会関西支部要旨集 p36、平成 23 年 10 月 1 日、香川
- ⑥ 伊藤賢司・Quoc Bao Nguyen・土佐幸雄・中屋敷均 (2011) 細胞壁加水分解酵素群はイネ科植物いもち病菌による角皮侵入に寄与している. 平成 23 年度日本植物病理学会講演要旨集 p56、平成 23 年 3 月 28 日、東京農工大学

[図書] (計 0 件)

[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 (NAKYASHIKI 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

なし

(3) 連携研究者
なし