

研究終了報告書

「遺伝子多重破壊法を用いた感染メカニズムの網羅的解明」

研究期間：2020年12月～2023年3月

研究者：熊倉直祐

1. 研究のねらい

植物病害による農業被害の約8割を占める糸状菌の植物への感染を理解するためには、その関係を成り立たせる遺伝子、すなわち病原性因子に着目することが重要である。しかしながらその冗長性を持つ遺伝子や破壊が困難な遺伝子のため、植物病原糸状菌の病原性因子の同定は困難であった。私はこれらの問題を解決する糸状菌の高効率多重遺伝子破壊法の開発に成功した。そこで、本研究では自ら開発した技術を用い、植物感染に寄与する糸状菌の病原性因子を同定し、機能解明することを目的とした。

世界の人口は増えつつあるものの作付面積の増加が見込めない現在において、植物病害を減らすことは食料の安全保障上重要な課題の一つである。植物病害による世界の作物被害額は年間21兆円程度と推定され、その約8割を植物病原糸状菌が占める（『植物医科学』, 2008, 養賢堂より試算）。植物病原糸状菌ゲノムは感染時特異的に発現が上昇する多数の二次代謝物生合成酵素遺伝子をコードすることから、病原性に寄与する生理活性を持った二次代謝物の存在が予測される（Presti et al., *Ann. Rev. Plant Pathol.*, 2015）。病原性に寄与する二次代謝物生合成酵素遺伝子の同定には、感染時に発現が上昇する候補遺伝子の破壊株の病原性を評価する逆遺伝学的手法が有効である。しかしながら、植物病原糸状菌の病原性への寄与が明らかになった二次代謝物生合成酵素やその生産物は、予想される数と比較するとごくわずかである。その理由として、破壊が困難な遺伝子の存在や病原性因子の冗長性が挙げられる（Collemare et al., *New Phytol.*, 2019）。そこでこれらの問題を解決するために、私はゲノム・トランスクリプトーム情報を完備した植物病原糸状菌の炭疽病菌においてCRISPR-Cas9とマーカーリサイクリング法を組み合わせた高効率多重遺伝子破壊法を開発し、これに成功した。

本手法を用いれば、病原性に寄与する二次代謝物生合成酵素遺伝子の同定が可能となり、まだほとんど明らかになっていない植物病原糸状菌感染の分子メカニズムについて、新たな知見を得ることが期待できた。さらに、同定した病原性に寄与する二次代謝物生合成酵素を標的とした阻害剤を化合物スクリーニングにより同定すれば、低環境負荷の農薬開発にも貢献できる。

2. 研究成果

(1) 概要

本研究においてモデル植物病原糸状菌である炭疽病菌の病原性に寄与する二次代謝物生合成鍵遺伝子を計4個（遺伝子A、B、C、D）同定した。このうち、遺伝子Aと遺伝子Bは単独の変異体で病原性が低下する。また冗長的に機能する2つの二次代謝物生合成鍵遺

伝子をコードする遺伝子 C と D を同定した。これらの成果は私が開発した高効率多重遺伝子破壊法を使用することで得られたものである。

病原性に寄与することを明らかにした4つの二次代謝物合成酵素のうち、遺伝子 A について詳細な解析を実施し主に以下の2点を明らかにした。

- 遺伝子 A は破壊株が同じ表現型を示す遺伝子 A2 とゲノム上で遺伝子クラスターを形成する
- 遺伝子 A・A2 は炭疽病菌の宿主細胞への進入時に必要である

遺伝子 A・A2 の機能を阻害すれば、炭疽病菌の病原性を大きく抑制することが可能である。したがってこれらの遺伝子産物を標的とした阻害剤は、低環境負荷の農薬のシード化合物となりうる。

また、従来のマーカーリサイクリング法と比較して、より迅速・簡便な多重遺伝子破壊が可能な遺伝子破壊法の開発に取り組み、これに成功した。この手法では、形質転換する炭疽病菌ゲノムが選抜マーカーを持つ領域に、異なる選抜マーカーを持つドナーDNA を相同組み換えで導入すると同時に、CRISPR-Cas9 で意図した領域に遺伝子変異を入れる手法である。本手法では二種類の選抜マーカーを交互に用いながら、同時に CRISPR-Cas9 で遺伝子破壊を実施するため、マーカーリサイクリング法におけるマーカー除去のステップを実施する必要がない。更に原理的には gRNA の種類を増やすことで同時に破壊する遺伝子数を2個以上に増やすことも可能であるという拡張性を持つ。本手法を用いれば、より迅速な多重遺伝子破壊が可能となり、世界に先駆けて未知の病原性因子を網羅的に同定することが期待できる。

(2) 詳細

研究テーマ1「炭疽病菌の病原性因子の同定」

炭疽病菌の感染に寄与する因子として分泌性タンパク質や二次代謝物が予想される。本研究では病原性への寄与が疑われるものの機能がほとんど明らかになっていない二次代謝物合成酵素に着目した。まず炭疽病菌のゲノム配列を解析し、73個の二次代謝物の骨格部分の合成を担う二次代謝物合成鍵遺伝子 (Secondary metabolite synthesis key gene: SMKG) を持つことを明らかにした。さらにトランスクリプトーム解析からこれらの SMKG のうち 23 個が感染時特異的に発現が上昇することから病原性候補因子とした。とくに発現の高い病原性候補因子の単独・多重破壊株を自ら開発した高効率多重遺伝子破壊法により作出した。

作出した変異体の表現型解析により単独の破壊で病原性が低下する遺伝子 A と B、冗長的に病原性に寄与する遺伝子 C と遺伝子 D を同定した。遺伝子 A・B・C・D の感染における機能・生産物は未報告であり、これらの解析により炭疽病菌感染の分子基盤について新たな知見を得ることが期待できる。

研究テーマ2「より迅速・簡便な炭疽病菌多重遺伝子破壊法の開発」

本研究で私が用いていたマーカーリサイクリング法を用いた多重遺伝子破壊法では一ヶ月に1遺伝子の破壊が可能である。この遺伝子破壊速度を高めれば、より迅速に病原性因子

を同定することが可能である。そこで、より迅速・簡便な多重遺伝子破壊が可能な技術の開発に取り組み、これに成功した。新たな手法では遺伝子破壊速度が二倍に向上し、一ヶ月に2つの多重遺伝子破壊が可能になった。新たな手法では形質転換する炭疽病菌ゲノムが選抜マーカ―を持つ領域に、異なる選抜マーカ―を持つドナーDNAを相同組み換えで導入すると同時に、CRISPR-Cas9で意図した領域に遺伝子変異を入れる手法である(図)。本手法では二種類の選抜マーカ―を交互に用いながら、同時にCRISPR-Cas9で遺伝子破壊を実施するため、マーカ―リサイクリング法におけるマーカ―除去のステップを実施する必要がない。更に原理的にはgRNAの種類を増やすことで同時に破壊する遺伝子数を2個以上に増やすことも可能であるという拡張性を持つ。

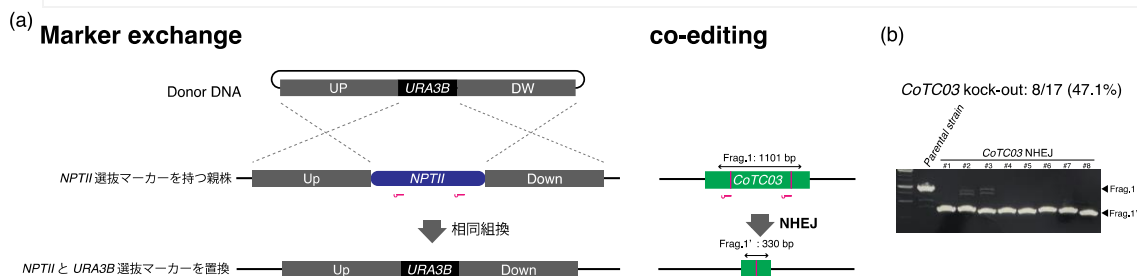


図 Marker exchange 法および co-editing 法を組み合わせた多重遺伝子破壊法の開発 (a) marker exchange 法では、親株が持つ選抜マーカ― (*NPTII*) をドナーの異なる選抜マーカ― (*URA3B*) で置換し、形質転換体を選抜する。同時に co-editing 法を用い、CRISPR-Cas9 で破壊対象の DNA を切断し、Non-homologous end joining (NHEJ) を誘発して目的遺伝子 (*CoTC03*) を破壊する (co-editing)。ピンクの線はガイド RNA 及びその標的領域。(b) (a) の結果得られた *CoTC03* 破壊株のジェのタイピング結果。遺伝子が破壊されると Fragment1' (330 bp) のバンドを生じる。得られた株のうち、47.1% が破壊株であった。*NPTII* と *URA3B* の選抜マーカ―を交互に用いることで同一株内で繰り返し遺伝子破壊が可能である。

3. 今後の展開

今後数年間の短期的な展開としては、前述の炭疽病菌の宿主細胞侵入に寄与する遺伝子 A の研究を推進する。遺伝子 A の生産物を同定すれば、低環境負荷の農薬開発に貢献できる。遺伝子 A・A2 の生産物の生合成を阻害する化合物を既存のケミカルライブラリーから同定し、構造展開すれば感染のみを阻害する農薬について有効な特許を取得することが視野に入る。

また病原性に寄与する遺伝子を計 4 個同定することができた。さらに、病原性因子同定を加速するより効率的な高効率多重遺伝子破壊法を開発にも成功した。これらを用い、作物病害の 8 割を占めると推定される植物病害糸状菌の病原性の分子メカニズムを可能な限り明らかにしたい。

4. 自己評価

当初の研究目的として、3 つの病原性因子を同定することを掲げていた。計画の実施後に計 4 つの病原性因子を同定したことを鑑みると、目的は達成できた。また、新たな病原性因子を同定するための技術開発にも成功し、今後の新たな発見の可能性を高める技術を手にすることができた。これらの成果は未発表なので、今後、一つずつ発表していくことが課題だ。

5. 主な研究成果リスト

- (1) 代表的な論文(原著論文)発表
- (2) 研究期間累積件数:5件

1. Mingming Chen*, **Naoyoshi Kumakura***, Ryan Muller, Yuichi Shichino, Madoka Nishimoto, Mari Mito, Pamela Gan, Nicholas T Ingolia, Ken Shirasu, Takuhiro Ito, Shintaro Iwasaki. A parasitic fungus employs mutated eIF4A to survive on rocaglate-synthesizing *Aglaia* plants, *eLife*, 2022, doi: <https://doi.org/10.7554/eLife.81302>, *共筆頭著者

アグライア属植物から単離された小分子 rocaglate は真核生物の翻訳開始因子の一つである eIF4A を標的として翻訳を抑制する。Rocaglate は抗真菌活性を持ち、アグライア属植物の真菌への抵抗性に寄与すると考えられる。本発表では rocaglate による抗真菌活性を回避することでアグライア属植物に寄生する真菌を見出した。ACT-X 研究で開発した炭疽病菌の遺伝子編集技術を活用した。

2. **Naoyoshi Kumakura**, Suthitar Singkaravanit-Ogawa, Pamela Gan, Ayako Tsushima, Nobuaki Ishihama, Shunsuke Watanabe, Mitsunori Seo, Shintaro Iwasaki, Mari Narusaka, Yoshihiro Narusaka, Yoshitaka Takano, Ken Shirasu, Guanosine-specific single-stranded ribonuclease effectors of a phytopathogenic fungus potentiate host immune responses, *bioRxiv*, 2021, doi: <https://doi.org/10.1101/2021.10.13.464185>

炭疽病菌が植物への感染時に分泌する RNase が RNase 活性残基依存的に植物の免疫反応を増強することを見出した。またこの RNase は一本鎖 RNA を guanosine 残基特異的に分解することを明らかにした。

3. Jinlian Chen, Yoshihiro Inoue, **Naoyoshi Kumakura**, Kazuyuki Mise, Ken Shirasu, Yoshitaka Takano, Comparative transient expression analyses on two conserved effectors of *Colletotrichum orbiculare* reveal their distinct cell death-inducing activities between *Nicotiana benthamiana* and melon, *Molecular Plant Pathology*, 2021, 22(8), 1006-1013

炭疽病菌由来の分泌性タンパク質が、*Nicotiana benthamiana* とメロンの植物で異なる細胞死誘導能を持つことを示した。本研究の遂行に当たりウリ科植物においてアグロバクテリアを用いた遺伝子の一過的発現系を開発した。ウリ科植物における遺伝子の一過的発現系は ACT-X 研究で同定した病原性因子の機能解析に活用できる。

(3) 特許出願

研究期間全出願件数: 0 件 (特許公開前のもも含む)

(4) その他の成果 (主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

1. Identification of secondary metabolite synthesis genes involved in virulence of *Colletotrichum* fungi using a multiplex gene disruption system, Seminar at BIOGER in INRAE, フランス、2021 年 9 月 21 日 (招待セミナー)
2. 植物二次代謝物を介した植物-糸状菌間の軍拡競争、第 21 回糸状菌分子生物学コンファレンスシンポジウム、2022 年 11 月 25 日 (招待講演)
3. 植物病原糸状菌研究の壁 ~炭疽病菌の事例~、糸状菌分子生物学研究会若手の会、第 10 回ワークショップ、2022 年 11 月 23 日 (招待講演)
4. Rocaglate を生合成するアグライア属植物に寄生する糸状菌は変異型 eIF4A を利用して生存する、令和 4 年度 日本植物病理学会大会、2022 年 3 月 27 日



5. Guanosine-specific single-stranded ribonuclease effectors of a phytopathogenic fungus potentiate host immune responses, 第 63 回日本植物生理学会年会、2022 年 3 月 23 日