

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

加速フェーズ期間：2023年4月～2024年3月

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。

加速フェーズでは、申請者がそれまでに同定した感染に寄与する二次代謝物生合成酵素 X1 と X2 の生産物同定・局在解析・変異体の表現型解析を目的として、3つの研究を実施した。

2. 研究成果

(1) 概要



本研究においてモデル植物病原系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つの二次代謝物生合成酵素のうち、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侵入時に必要である

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。

加速フェーズでは、A1・A2 の機能解析を実施した。まず共同研究により、in vitro で誘導した付着器の抽出物の HPLC 解析により、野生型でのみ検出され、*a1* 変異体では検出されない化合物ピークの検出に成功した。さらに、自ら炭疽病菌において開発した CRISPR-Cas9 を用いた高効率遺伝子ノックイン法により A1・A2 遺伝子の C 末端側にタンパク質精製の TwinStrep タグを導入し、in vitro 誘導した付着器から A1-TStag および A2-TS-tag タンパク質の大量精製に成功した。これらを用いた in vitro 生化学実験で野生型付着器から検出されたものと同様の分子量の化合物ピークの検出に成功した。この化合物が感染に必要な機能を付与すると考えられる。

また、A1 と A2 の C 末端側に GFP と mCherry 配列を導入し、A1-GFP と A2-mCherry を発現する炭疽病菌株を作出した。A1-GFP と A2-mCherry 発現株はいずれも宿主植物への感染能を保持しており、機能を有していることが示された。これらの株を用いた解析により、付着器での A1・A2 の共局在を明らかにした。

最後に AFM による付着器計測を、金沢大学宮澤博士との共同研究で推進し、付着器の物理学的特性の計測技術を開発した。

(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生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生合成鍵遺伝子 (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(図)。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。

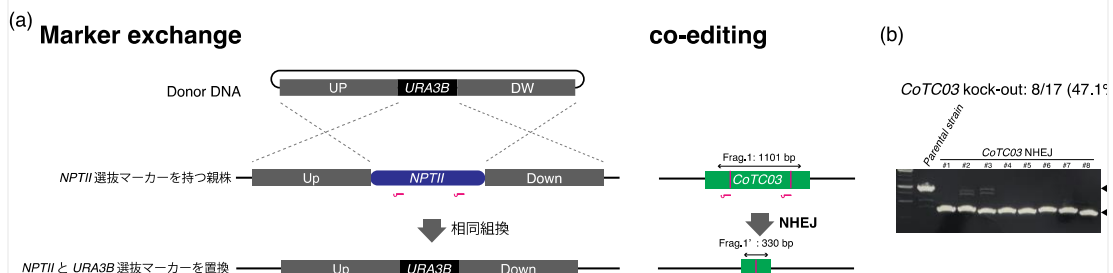


図 Marker exchange 法および co-editing 法を組み合わせた多重遺伝子破壊法の開発 (a) marker exchange 法は、親株が持つ選抜マーカー (NPTII) をドナーの異なる選抜マーカー (URA3B) で置換し、形質転換体を選抜すると同時に co-editing 法を用い、CRISPR-Cas9 で破壊対象の DNA を切断し、Non-homologous end joining (NHEJ) を誘発して目的遺伝子 (CoTC03) を破壊する (co-editing)。ピンクの線はガイド RNA 及びその標的領域。(b) の結果得られた CoTC03 破壊株のジェルのタイピング結果。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 の選抜マーカー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。

加速フェーズ研究 A: A1・A2 の生産物同定

加速フェーズでは付着器から精製したリコンビナントタンパク質を用いた in vitro の実験系で二次代謝物生合成酵素である A1・A2 の生産物同定を試みた。まず A1 と A2 を大量に発現するアブラナ科炭疽病菌付着器から A1・A2 タンパク質の抽出・精製を試みた。アブラナ科炭疽病菌付着器はプラスチックシャーレ上で大量に誘導することが可能であり(Yonehara, Kumakura et al., 2023, *Molecular Plant Pathology*)、必要な細胞数へのスケールアップが容易である。また A1・A2 タンパク質の精製用に近年発表され特異性が非常に高い Twin-Strep-tag (TStag) を付加し発現させた。A1-TStag および A2-TStag ノックイン株の病原性は保持されていたことから、これらのタンパク質が活性を有していることが示された。In vitro で大量誘導した付着器の抽出物を TStag 特異的なカラムで精製し、限外ろ過フィルターでの濃縮を実施した。その結果、A1-TStag および A2-TStag リコンビナントタンパク質を SDS-PAGE し、CBB 染色した際に、目的サイズのバンドが目視で確認された。またタンパク質濃度はそれぞれ 1.2 μ M、6.1 μ M に達した。このことから生化学・CryoEM での解析可能な量・精製度の A1-TStag および A2-TStag タンパク質の生成に成功した。

次に、A1 と A2 の精製タンパク質を予想された基質とともに in vitro で反応させ、生合成される化合物を高速液体クロマトグラフィーで解析し、A1・A2 反応サンプルでのみ特異的に見られる化合物ピークの検出に成功した。さらに、実際の付着器抽出物からも同じ分子量の化合物ピークの検出に成功した。現在、理研内での共同研究により、これらの化合物ピークの化学構造を解析中である。

加速フェーズ研究 B: A1・A2 の局在解析

A1 および A2 の局在解析を実施した。次に A1 の C 末端側に GFP、A2 の C 末端側に mCherry を融合したタンパク質を発現させるよう遺伝子ノックインを実施した。その結果、A1-GFP と A2-mCherry のノックインに成功し、かつこれらの株が病原性を保持することを確認した。これらの株の共焦点顕微鏡による解析から、A1 と A2 が細胞内で共局在することを明らかにした。

加速フェーズ研究 C: 付着器の物理学的特性の AFM 計測

超解像 AFM 解析を専門とする宮澤博士と共同研究で付着器の物理学的特性の AFM 計測を実施することを目的とする共同研究を実施した。私は in vitro で誘導した付着器を用いた計測対象のサンプリング手法を開発し、これに成功した。本手法を用いた共同研究により、付着器の物理学特性の一部の計測を完了し、更に詳細な解析手法を開発中である。

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。

(加速フェーズ実施後追記)

加速フェーズにより、A1・A2 の生産物が明らかとなり、生産物を in vitro で生合成することにも成功した。これらから、A1・A2 の生合成を阻害する農薬のシード化合物スクリーニングのための基礎的な実験系や、生合成プロセスの詳細な機能解析のための実験系を獲得することができた。今後の展開としては、A1・A2 の機能をより詳細に解明する。さらに、加速フェーズ中に改良に成功した革新的な高速・多重ゲノム編集技術開発により、感染に寄与する未知遺伝子の同定がより高速・簡単に実施できるようになったので、これらを推進したい。

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。

(加速フェーズ実施後追記)

加速フェーズでの研究費支援・メンターの先生方の支援および ACT-X 生間での共同研究を経て炭疽病菌研究に必要・有用な技術開発が可能となった。それらを通じてここで報告した研究成果のみならず、感染・付着器機能に重要な因子が未報告のままであることを認識することができた。実際に加速フェーズ期間中にはこうして得られた結果を 2 本の原著論文として新たに報告した。今後はこれまでの実験系と発見を用い、一つずつ高品質な解析を付して世に出せる独立した研究体制を構築したい。

5. 主な研究成果リスト

(1) 代表的な論文(原著論文)発表

研究期間累積件数: 8件

1. **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, *New Phytologist*, 2024, 242(1), 170–191

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。

2. 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

アグラリ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、アグラリ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リ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。

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の開発した。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。

4. Katsuma Yonehara, **Naoyoshi Kumakura**, Takayuki Motoyama, Nobuaki Ishihama, Jean-Felix Dallery, Richard O'Connell, Ken Shirasu. *Molecular Plant Pathology*, 2023, 24(11), 1451–1464

本論文は実験計画・結果の取得・執筆・投稿に至るまで申請者が実質的に指導した博士課程学生の筆頭著者論文である。モデル植物シロイヌナズを宿主とするアブラナ科炭疽病菌において、マーカーリサイクリング法と CRISPR-Cas9 を用いた高効率遺伝子破壊法を確立した。

(2) 特許出願

研究期間全出願件数: 0 件 (特許公開前のものも含む)

(3) 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リ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
6. 理研プレスリリース: 翻訳阻害剤を介した、植物と糸状菌間の生存競争、2023 年 2 月 28 日, https://www.riken.jp/press/2023/20230228_2/



7. 第 22 回応用物理学会 Poster Award、ウリ類炭疽病菌の付着器の細胞壁のナノスケール構造計測、2023 年第 84 回応用物理学会秋季学術講演会、宮澤佳甫、熊倉直祐、松森海晴、白須賢、福間剛士, 2023 年 9 月