

植物病原糸状菌におけるゲノム編集技術の開発と応用

荒添貴之 (東京理科大学)

arazoe@rs.tus.ac.jp

生命の設計図であるゲノム情報を自在に改変することができるゲノム編集技術は、様々な生物種において基礎から応用研究に至るまで広くその有用性が示されてきている。ゲノム編集は、狙った DNA 配列をゲノム編集ツール (人工ヌクレアーゼ) を用いて切断し、生物が持つ DNA 修復機構を利用して目的の変異を誘発することを基本原理とする。筆者らは、植物病原糸状菌の無性的な変異機構解析を通して糸状菌独自のゲノム特性を見出すと共に、これらの知見を応用したゲノム編集技術の開発に成功した。ゲノム編集技術を用いることで、植物病原糸状菌の網羅的な遺伝子機能解析や染色体領域の機能解析が可能となり、これまで未解明であった不稔化メカニズムの一端を明らかにした。

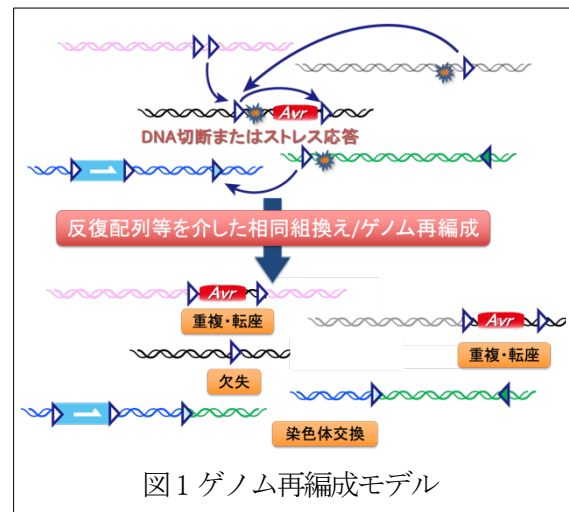
はじめに

タンパク質型ゲノム編集ツールである TALEN (transcription activator-like effector nuclease) は、*Xanthomonas* 属の植物病原細菌が宿主植物の抵抗性反応を攪乱するために分泌する TAL エフェクターを改変したものであり、RNA 誘導型ゲノム編集ツールである CRISPR/Cas9 (clustered regularly interspaced short palindromic repeat/CRISPR-associated protein9) は、細菌や古細菌が持つファージ等の外来核酸に対する獲得免疫機構を応用したものである。このように宿主と病原体のような敵対関係にある生物種間では、共進化の過程で驚くほど精巧な分子機構や巧妙な生存戦略を獲得・発展させているケースがしばしばみられる。植物と植物病原糸状菌との相互作用もその例外ではなく、宿主植物と病原菌の間では、真核生物同士の様々な分子レベルでの攻防が繰り広げられている。多くの植物病原糸状菌にみられる特異な形質 (生存戦略) の一つとして、有性生殖能 (交配能) の喪失 (不稔化) が挙げられる。植物病原糸状菌の感染サイクルは無性的に成り立つものが数多く存在するが、一般にクローン増殖と考えられる無性生殖の中で、不稔化した植物病原糸状菌がどのようにして植物との対抗的な共進化を成し遂げているのかという点に興味を持った。

イネいもち病菌の無性的な多様性創出機構の解析

動物や植物等の真核生物では、染色体の数や構造は種内で保存的かつ安定であると考えられ、遺伝的多様性の創出は有性生殖時の減数分裂に依存した生存戦略を取るものが多い。一方、イネに重要病害を引き起こすイネいもち病菌 (*Pyricularia oryzae*) では、圃場から分離された菌株ごとに染色体の数や大きさが異なるケースが頻繁に見られ、病原性に関わる *Avr* 遺伝子の欠失・重複・多重転座が生じていることが報告されている¹⁾。これは、無性生殖過程での DNA 複製エラーによる変異蓄積のみならず、染色体レベルでのダイナミックな再編成 (ゲノム再編成) がイネいもち病菌ゲノムで繰り返し引き起こされてきたことを示唆している。筆者らは、このようなゲノム多様性を生み出す原動力の一つとして、無性生殖時に生じる相同組換えに着目した。しかし、一細胞レベルでの相同組換えをゲノム配列の変化から捉えることは当時の技術では難しく、相同組換えが生じた細胞を YFP 蛍光により可視化し、薬剤耐性により選抜できるようなマーカー系を構築した²⁾。本マーカー系をゲノム内にエクトピックに導入した株では、栄養成長時の菌糸や無性孢子の一部で YFP 蛍光が観察され、無性生殖時に

においても一定の頻度でゲノム内での相同組換え反応が生じていることが明らかとなった²⁾。また、相同組換え頻度は様々なストレスにตอบสนองする形で飛躍的に上昇すること³⁾、ゲノム内に複数コピー存在する *Avr* 遺伝子間での相同組換え反応により、抵抗性品種に対する新たな病原性を獲得する可能性があることを示した⁴⁾。加えて、18塩基認識の希少切断制限酵素である I-SceI を用いることにより、無性生殖時に生じる相同組換えが DNA 修復機構の一部として機能していること、動植物や酵母とも異なる独自の DNA 修復特性を持ち合わせていることが明らかになった⁵⁾。様々な知見を総合すると、イネいもち病菌のゲノム再編成は、ゲノムに散在するトランスポゾン等の反復配列近傍への切断が引き金となり、その後の相同組換え反応によって誘発されるものと想定された (図 1)。



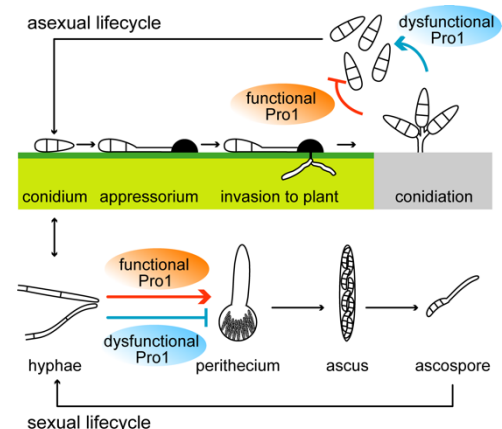
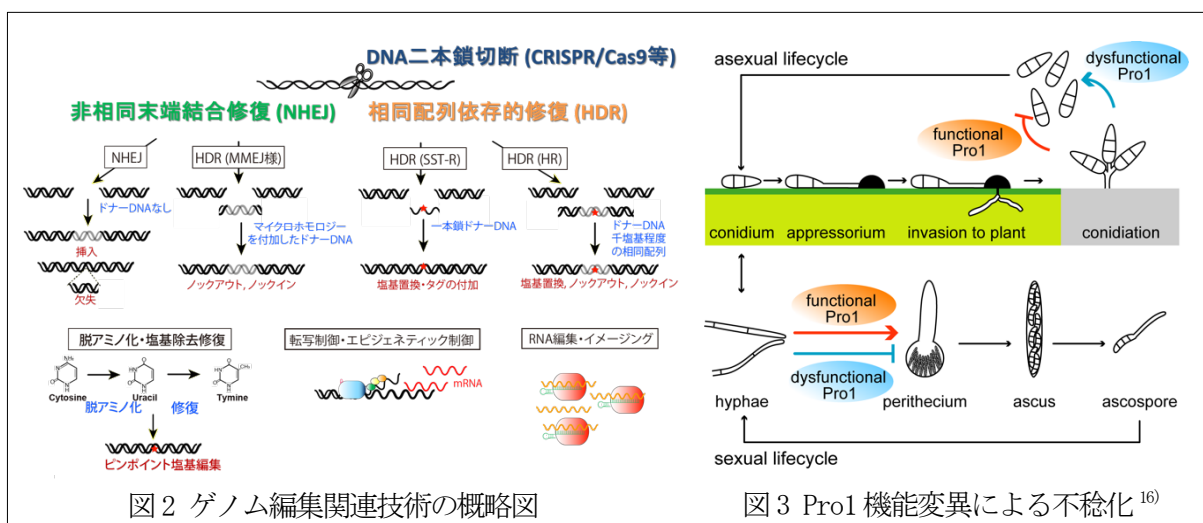
ゲノム編集ツールの構築と植物病原糸状菌ゲノム編集

図 1 に示したような変異モデルの立証には、狙ったゲノム領域 (反復配列近傍) の切断によりゲノムの再編成が生じることを実験的に示す必要があった。幸運にもタンパク質型ゲノム編集ツールである ZFN (Zinc Finger Nuclease) や TALEN が脚光を浴び始めた時期であり、筆者らも糸状菌に最適化したゲノム編集ツールの開発に着手した。これまでの変異機構解析の知見や経験を活用することで ZFN および TALEN の最適化に成功し、反復配列近傍で生じる DNA 切断が *Avr* 遺伝子の欠失や転座を含むゲノムの再編成の一因となり得ること、ゲノム配列への切断導入により効率的な相同組換えの誘導とゲノム編集が可能であることを示した^{4,5,6)}。一方、DNA 切断時にゲノム内に相同配列が存在しない、または外部から相同配列を供給しない場合には、数千塩基にも及ぶゲノム領域の広域欠損が頻繁に生じることから、植物病原糸状菌独自のゲノム維持機構または生存戦略の存在が示唆された^{4,5)}。TALEN が開発された翌年には、RNA 誘導型ゲノム編集ツールである CRISPR/Cas9 を用いたゲノム編集手法が報告され^{7,8)}、より簡便にヌクレアーゼを作成できることから、瞬く間に様々な生物種での利用やより発展的な研究開発が進められていった。筆者らもガイド RNA の発現系を最適化することにより、TALEN に引き続き CRISPR/Cas9 を用いたゲノム編集手法を構築した⁹⁾。これらの開発したゲノム編集ツールは、イネいもち病菌以外の糸状菌においても広く利用可能であったが、ヌクレアーゼの一過的な発現による相同組換えの誘導が効果的であることや、広域欠失が比較的高頻度で生じることなど、他の生物種にはみられない特異なゲノム特性は糸状菌 (子囊菌) 内である程度共通しているようにみえる^{10,11)}。現在進行中の研究内容を含めると、Cas9 とは異なる特性を有する Cas12a を用いた網羅的な遺伝子破壊、RNA を標的とすることができる Cas13b を用いた mRNA 編集技術、切断活性を消失させた dCas9 と脱アミノ化酵素を融合した切らないゲノム編集、交叉反応を伴う相同組換えを利用したノックイン・塩基編集、ゲノム内 2 箇所同時切断と相同組換えの誘導による染色体編集等の開発に成功しており、文字通り自由にゲノムを編集できる技術レベルに到達しつつある (図 2)¹²⁻¹⁵⁾。

ゲノム編集技術を用いた植物病原糸状菌の不稔化機構の解析

イネいもち病菌を含む植物病原糸状菌では、ゲノム編集技術を利用せずとも遺伝子の導入や破壊が可

能な菌種も多い。一方、ゲノム編集技術は、従来の研究スピードを大幅に加速させ、より高度なゲノム操作を期待することができ、次世代シーケンス解析等の様々な技術との組み合わせによって、これまで多大な労力を要するような新たな研究アプローチをデザインすることが可能となる。上述したように、植物病原糸状菌の不稔化現象は多くの菌種で確認されているものの、その分子メカニズムについてはこれまで全く明らかになっていなかった。筆者らは、イネいもち病菌の発生起源地とされる中国の雲南省などから単離された一部の菌株においては交配能が保持されていることに着目し、本菌の雌性不稔化機構の解明を試みた。まず、稔性株と雌性不稔性株の連続戻し交雑により、稔性株ゲノムに近似させた雌性不稔性交配後代株を複数取得し、次世代シーケンス解析により不稔性に起因するとされるゲノム領域を絞り込んだ。不稔化に起因すると考えられた遺伝子変異は推定されたゲノム領域に多数存在したが、ゲノム編集技術を用いた網羅的な遺伝子機能解析により、転写因子である *Pro1* の機能変異が不稔化の一因であることを突き止めた¹⁶⁾。*Pro1* の機能変異は数塩基の欠失によるフレームシフトによるものであったが、塩基編集技術を用いることで稔性株の *PRO1* 配列を不稔性型に、不稔性株の *PRO1* 配列を稔性型に改変することでの横断的な表現型解析を実施し、データベース上に登録されている世界中の *PRO1* 変異配列を手持ちの稔性株で再現することでの機能検証を行なった。興味深いことに、これらの遺伝子機能解析から、現在パンデミック化の様相を呈しているコムギいもち病菌においてもイネいもち病菌と同様に不稔化が進行していることが明らかになった。*PRO1* 変異株では分生子の離脱率が高まることやマイコウイルスに対する治癒現象などがみられることから、やはり不稔化は病原菌としての進化(パンデミック化)の過程で重要なイベントの一つなのかもしれない¹⁶⁾。



おわりに

糸状菌(子囊菌)のゲノム編集時にみられる重要かつ特異な現象の一つとして、CRISPR システムを細胞内で構成的に発現させた際に、何らかの形でその機能や活性を抑制するようなエスケープ機構の存在が挙げられる。本機構が糸状菌(子囊菌)内でどの程度共通性があり、保存されている機構なのかは定かではないが、筆者らは細菌のCRISPRがそうであったように、外来核酸に対する糸状菌(子囊菌)の免疫機構の一つではないかとの仮説を立てている。現在その足掛かりとなるような知見が得られつつあり、本機構を解明することができれば糸状菌(子囊菌)の新たな生存戦略を明らかにすると共に、より自由度の高いゲノム編集技術へと発展させることができるかもしれない。

謝辞

本賞の受賞にあたっては、日本植物病理学会から推薦を賜りました。一ノ瀬勇規会長をはじめ関係者の皆様に深謝いたします。本研究は、明治大学農学部 米山勝美教授の植物病理学研究室に筆者が学生として在籍していた時に開始したものです。その後、同大学 桑田茂教授の植物細胞工学研究室、神戸大学 近藤昭彦教授のバイオ生産工学研究室、および東京理科大学 鎌倉高志教授の研究室にて現在まで研究を継続することができています。この間、明治大学 大里修一准教授、神戸大学 西田敬二教授、土佐幸雄教授、中屋敷均教授、東京農工大学 寺岡徹教授、有江力教授、帯広畜産大学 中馬いづみ准教授、北海道大学 曾根輝雄教授、広島大学 山本卓教授、京都大学 佐久間哲史特定教授をはじめとして、多くの方々のご指導・ご協力を賜りました。心より御礼申し上げます。また東京理科大学の学生諸氏のほか、多くの関係者の皆様にご助言・ご協力をいただきました。ここに感謝の意を表します。

引用文献

1. Chuma I, Isobe C, Hotta Y, Ibaragi K, Futamata N, Kusaba M, Yoshida K, Terauchi R, Fujita Y, Nakayashiki H, Valent B, Tosa Y. *PLoS Pathog* 7:e1002147, 2011.
2. Arazoe T, Ohsato S, Arie T, Yoneyama K, Kuwata S. *J Gen Plant Pathol* 79:422–430, 2013.
3. Arazoe T, Ohsato S, Maeda K, Arie T, Kuwata S. *JSM Mycotoxins* 64:141–146, 2014.
4. Arazoe T, Kuwata S, Arie T, Ohsato S. *J Gen Plant Pathol* 80:153–157, 2014.
5. Arazoe T, Ogawa T, Miyoshi K, Yamato T, Ohsato S, Sakuma T, Yamamoto T, Arie T, Kuwata S. *Biotech Bioeng* 112:1335–1342, 2015.
6. Arazoe T. *J Gen Plant Pathol* 86:523–525, 2020.
7. Gasiunas G, Barrangou R, Horvath P, Siksnys V. *Proc Natl Acad Sci USA* 109:E2579–86, 2012.
8. Jinek M, Chylinski K, Fonfara I, Hauer M, Doudna JA, Charpentier E. *Science* 337:816–82, 2012.
9. Arazoe T, Miyoshi K, Yamato T, Ogawa T, Ohsato S, Arie T, Kuwata S. *Biotech Bioeng* 112:2543–2549, 2015.
10. Mizutani O, Arazoe T, Toshida K, Hayashi R, Ohsato S, Sakuma T, Yamamoto T, Kuwata S, Yamada O. *J Biosci Bioeng* 123:287–293, 2017.
11. Itoh H, Miura A, Matsui M, Arazoe T, Nishida K, Kumagai T, Arita M, Tamano K, Machida M, Shibata T. *Appl Microbiol Biotech* 102:1393–1405, 2017.
12. Nishida K, Arazoe T, Yachie N, Banno S, Kakimoto M, Tabata M, Mochizuki M, Miyabe A, Araki M, Hara KY, Shimatani Z, Kondo A. *Science* 353:8729, 2016.
13. Yamato T, Handa A, Arazoe T, Kuroki M, Nozaka A, Kamakura T, Ohsato S, Arie T, Kuwata S. *Sci Rep* 9:7427, 2019.
14. Shinkado S, Saito H, Yamazaki M, Kotera S, Arazoe T, Arie T, Kamakura T. *Sci Rep* 12:16243, 2022.
15. Arazoe T. *Method Mol Biol* 2356:149–160, 2021.
16. Uchida M, Konishi T, Fujigasaki A, Kita K, Arie T, Teraoka T, Kanda Y, Mori M, Arazoe T, Kamakura T. *iScience* 26:107020, 2023.