



Studies on epigenetic mechanisms involved in the pathogenicity of *Pyricularia oryzae*

DANG NGOC MINH

(Degree)

博士 (学術)

(Date of Degree)

2023-03-06

(Date of Publication)

2024-03-01

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

乙第3428号

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/0100482225>

※ 当コンテンツは神戸大学の学術成果です。無断複製・不正使用等を禁じます。著作権法で認められている範囲内で、適切にご利用ください。



(別紙様式3)

論文内容の要旨

氏 名 DANG NGOC MINH

論文題目 (外国語の場合は、その和訳を併記すること。)

Studies on epigenetic mechanisms involved in the pathogenicity of *Pyricularia oryzae*

(イネ科植物いもち病菌の病原性に関与するエピジェネティクス機構の研究)

The fungus *Pyricularia oryzae* causing rice blast disease has seriously affected the yield of crops. It has become a worldwide crop epidemic and poses a threat to food security. Therefore, in-depth study of the mechanism as well as the pathogenicity of *P. oryzae* has an important role in providing solutions to control and manage this fungus in rice paddy field.

In this thesis, the first, we introduce about the involved factors that including two focused factors in *P. oryzae* are RNA silencing components and Mose1-dependent transcription factors. RNA silencing components are often used to control the expression of endogenous genes in various ways, and consequently affect a number of cellular processes such as growth, differentiation, and cell death, especially in higher eukaryotes. TFs are key players in the signal transduction pathways and regulatory mechanisms, in *P. oryzae*, among the 22 Cys2-His2 TFs required for pathogenicity, 2 were MoSET1-dependent TFs.

Next, in Chapter II, we analysis the roles of RNA silencing components in pathogenesis in *P. oryzae* and our results indicated that *P. oryzae* RNA silencing components deletion mutants showed defects in vegetative development, sporulation, appressorium formation and pathogenicity to host plants in which $\Delta dcl1/2$ mutants showed

a significant reduction in pathogenicity. Then, in Chapter III, we perform deep sequencing analysis of small RNA associated with RNAi components to understanding how RNAi component effect to tRNA or srRNA biogenesis. Intriguingly, the RdRP and DCL proteins, with a greater influence of the latter, play roles directly or indirectly in the maturation of tRNA, or at least in the rapid elimination of immature tRNA products from the cell while DCL and RdRP were not essential for srRNAs biogenesis, but may improve it.

In addition to, we also investigate Mose1 – dependent transcription factors regulate different stages of infection-related morphogenesis in *P. oryzae* to understanding the role of those TFs in *P. oryzae* virulence. Interestingly, the results suggested that MoSET1 orchestrate various transcription factors to achieve successful infection of host plants by *P. oryzae* in which MGG_00472 and MGG_04699 genes contributed to the full virulence of *P. oryzae* by regulating their downstream genes.

Overalls, our study suggesting that lack of RNA silencing components and transcription factor causes a reduction in the pathogenicity of *P. oryzae*.

氏名	Dang Ngoc Minh		
論文 題目	Studies on epigenetic mechanisms involved in the pathogenicity of <i>Pyricularia oryzae</i> (イネ科植物いもち病菌の病原性に関するエピジェネティクス機構の研究)		
審査 委員	区 分	職 名	氏 名
	主 査	教授	中屋敷 均
	副 査	教授	坂本 克彦
	副 査	准教授	池田 健一
	副 査		
	副 査		
印			
要 旨			
<p><i>Pyricularia oryzae</i> はイネやコムギなどのイネ科栽培植物にいもち病を引き起こす世界的に重要な植物病原糸状菌である。本菌の感染過程では孢子からの発芽、付着器形成による植物体への侵入、感染菌糸形成による植物細胞からの栄養摂取という細胞分化を伴った形態的、また遺伝子発現上の変化が生じる。こういった大規模な細胞の変化には、エピジェネティクスを介した染色体レベルの制御が関与している可能性が考えられる。そこで本研究では、いもち病菌におけるヒストン修飾、小分子 RNA を介した遺伝子発現制御に注目し、その分子機序の解明を試みた。</p> <p>第1章では、真核生物において種々の遺伝子制御に寄与するエピジェネティクス機構を概説した。特に、ヒストン修飾や DNA メチル化、そして小分子 RNA を介した制御が関与する機構の現在までの知見をレビューした。</p> <p>第2章では、MoSET1 と命名されたヒストンメチル基転移酵素が制御している転写因子群に関する解析を行った。MoSET1 はヒストン H3 の N 末端から 4 番目のリジン残基 (H3K4) にメチル基を転移する酵素であり、MoSET1 の欠失変異体は孢子形成能が低下し、付着器形成に欠損が生じ、病原性を完全に喪失する。過去の RNA-seq および CHIP-seq 解析から、MoSET1 が感染行動に伴って直接制御していると考えられる転写因子が 19 個同定されており、その中でこれまで比較的機能解析が進んでいない 5 個の転写因子 (MGG_00472, MGG_04699, MGG_06898, MGG_07386, and MGG_07450) を本研究の調査対象とした。</p> <p>これらの転写因子は、いずれもいもち病菌の感染行動に伴って発現が上昇しており、本菌の病原性の発現に関連していることが示唆された。そこで相同性組換えによる遺伝子破壊法を用いた欠失変異体、もしくはヘアピン RNA を発現するベクターによる遺伝子サイレンシング変異体を作製し、それらの形質調査を行った。その結果、MGG_06898 は孢子形成能に大きく関与していることが示され、MGG_04699 の欠失変異体は付着器の形成能が低下していた。また、MGG_00472 および MGG_04699 の変異体では宿主植物に対する病原性が有意に減じていた。これらの表現型は、いずれも MoSET1 の破壊株で見られた表現型変異の一部であった。このことから MoSET1 は多くの転写因子を制御しており、それらの転写因子群がさらに病原性に関与する種々の形質を担う遺伝子群の発現調節をするカスケード状の遺伝子制御機構が、いもち病菌に存在していることが示唆された。</p> <p>第3章では、小分子 RNA を介してエピジェネティクスへ関与することが知られている RNAi 機構といもち病菌の病原性について検討した。いもち病菌ゲノムには RNAi のコンポーネントとして 3 種の RNA 依存 RNA ポリメラーゼ (RdRP)、3 種のアルゴノート (AGO) および 2 種のダイサー様タンパク質 (DCL) が存在している。このうち 3 種の RdRP をすべて欠失させた三重変異体および 2 種の DCL をすべて欠失</p>			

氏名

Dang Ngoc Minh

された二重変異体を作製し、それらの病原性について調査した。RdRP の三重変異体では大きな表現型は認められなかったが、DCL の二重変異体では生育に若干の遅延が見られ、宿主植物における病原性が低下していた。これらの結果は、いもち病菌で RNAi 機構を利用したエピジェネティクス制御機構があり、本菌の病原性発現に寄与していることが示唆された。

第4章では、第3章で見出された RNAi コンポーネントによるいもち病菌の病原性制御がどのような小分子 RNA を介して起こるのか、ハイスループットシーケンスにより各変異体における小分子 RNA の網羅的解析を行った。その結果、意外なことに小分子 RNA を生成する主要な酵素とされていた DCL の二重変異体においてもいもち病菌には多くの小分子 RNA が存在しており、DCL によって生成する所謂 siRNA は転移因子やウイルス感染に伴って生じる特殊な小分子 RNA であることが明らかとなった。また、近年、特に哺乳動物において注目されている tRNA や rRNA に由来する小分子 RNA (tsRNAs および srRNAs) に関しては、RdRP や DCL の欠損により中間産物と考えられる 30~40 塩基の RNA 分子が蓄積する傾向が見られ、これらの成熟分子の生成もしくは中間産物の消去といったプロセスに RdRP や DCL が関与していることが考えられた。また、こちら tsRNAs に関しては tRNA の分子種により DCL や RdRP の関与の様式は異なっており、複雑な制御様式があることが考えられた。本解析からは、いもち病菌の病原性発現に関与する小分子 RNA の同定には至らなかったが、srRNAs はタンパク質合成を制御していることが示唆されており、DCL 二重変異体で見られた成長の遅延や病原性の低下は、グローバルなタンパク質合成の低下によって起こっている可能性が考えられた。

以上の研究は、いもち病菌における種々のエピジェネティクス制御機構につき、多くの新しい知見を加えたものである。また、その知見は、本植物病原菌の病原性発現機構および本菌ゲノム制御に対する洞察を深めたものである。よって、学位申請者 Dang Ngoc Minh は、博士(学術)の学位を得る資格があると認める。