



Studies on molecular factors regulating H3K27me3 in *Pyricularia oryzae*

DANG, THACH AN

(Degree)

博士 (学術)

(Date of Degree)

2024-09-25

(Date of Publication)

2026-09-25

(Resource Type)

doctoral thesis

(Report Number)

甲第9033号

(URL)

<https://hdl.handle.net/20.500.14094/0100492542>

※ 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（博士論文審査等内規第2条関係）

博士論文内容の要旨

氏 名 DANG AN THACH

専攻・講座 生命機能科学専攻 応用機能生物学講座

論文題目（外国語の場合は，その和訳を併記すること。）

Studies on molecular factors regulating H3K27me3 in *Pyricularia oryzae*
(イネ科植物いもち病菌におけるヒストン修飾 H3K27me3 を制御する分子の研究)

指導教員 中屋敷均

Chapter 1: Background information

1. Rice blast fungus *Pyricularia oryzae*

The filamentous ascomycete fungus *Pyricularia oryzae* causes blast disease in various species of gramineous plants, such as rice, wheat, barley or finger millet. *P. oryzae* penetrates the host plant by producing an infection specific cell called appressorium and interferes with disease resistance mechanisms by secreting fungal effectors. *P. oryzae* is frequently used as an ideal model for studies on host-pathogen interactions.

2. Chromatin status

There are two main chromatin regions in the eukaryotic chromosome, euchromatin and heterochromatin. Euchromatin has an open structure allowing active gene transcription. In contrast, heterochromatin exhibits a highly condensed structure with transcriptionally silent genes and is classified into two types, constitutive heterochromatin and facultative heterochromatin. The structure and function of each chromatin state can be regulated by nucleosome modifications, such as histone modifications.

3. Histone methylation

Histone methylation occurs when methyl groups are added to amino acids of histone protein by the activity of histone methyltransferases. Histone methylation can impact chromatin structure based on the target amino acid residue position and the degree of methylation.

4. Histone H3 Lysine 27 trimethylation (H3K27me3)

H3K27me3 is described as an epigenetic mark for facultative heterochromatin and is associated with transcriptional silencing. H3K27me3 is catalyzed by the SET-domain Enhancer-of-zester enzymes, a catalytic subunit of Polycomb Repressive Complex 2 (PRC2). The deposition of H3K27me3 significantly affects various cellular processes and plays crucial roles in maintaining the integrity of the genome and promoting fungal genome evolution. The deletion mutant of MoKMT6, which removes the H3K27me3 deposition in the genome, resulting in serious defects in infection-related morphogenesis and virulence of *P. oryzae*.

5. DNA damage

DNA damage can be caused by endogenous, exogenous or environmental agents, such as reactive oxygen species (ROS), UV, and irradiation. Double-strand breaks (DSBs) are known as the most dangerous form of DNA damage against genome stability.

Additionally, horizontal gene transfer (HGT) is considered as a natural event that causes DNA damage during eukaryotic genome evolution. Genetic materials are transferred between distantly related organisms, which contrasts vertical transmission from parent to progeny.

6. RNA interference

RNA interference (RNAi) is an RNA-dependent gene silencing process that regulates gene expression in most eukaryotic organisms. There are three major components in RNAi machinery, consisting of Dicer, Argonaute, and RNA-dependent RNA-polymerase (RdRP). Recently, RNAi has been proved to play an important role in the interaction between transcription, epigenetic modifications, and DNA methylation by utilizing sRNAs as a molecular guide to specific target sequences.

Chapter 2: Transferred DNA is associated with the silent epigenetic mark H3K27me3 in *P. oryzae*

Genetic variation in many pathogenic fungi may be caused by asexual exchange of genetic materials. Various HGT-derived genes have been reported to play important roles in fungal genome evolution. Genome integrity in eukaryotes is maintained by epigenetic regulation mechanisms, such as histone modifications and DNA methylation. H3K4me2, H3K9me3, and H3K27me3 affect various aspects of genome regulation. Moreover, an association between DBSs and H3K27me3 in mammals has been observed.

When comparing the genomes of two blast isolates, Br48 and 70-15, megabase-scale variable domains were detected in Br48 genome. Interestingly, chromatin immunoprecipitation (ChIP) analysis revealed that repressive epigenetic marks, H3K9me3 and H3K27me3, were associated with the variable domains in Br48 genome. Detailed sequence analysis of several segments in Br48 genome suggested that some of them may have been obtained by HGT from other *Pyricularia* species. To globally detect possible HTG genes in Br48 genome, I examined the phylogenetic concordance of genes by defining an index, namely the IPC. IPC of a gene is calculated as a correlation coefficient between the ranking of species similarity and gene similarity. Low IPC levels were associated with high enrichment of H3K27me3. This result indicated that H3K27me3 is closely correlated with HGT-derived genes in the variable domains in Br48 genome. The role of H3K27me3 in the regulation of the possible HGT genes was examined by RNA-seq analysis using a deletion mutant of MoKMT6 which encodes lysine methyltransferase responsible for H3K27me3 in *P.*

oryzae. Gene groups with lower IPC levels were up-regulated in Δmokmt6 , indicating that H3K27me3 preferentially repressed transcription of HGT-derived genes.

Chapter 3: Impact of interplay among histone modifications on the H3K27me3 distribution in the *P. oryzae* genome

Histone methylation occurs on lysine and arginine residues and impacts gene expression, depending on the position of the methylated residues in histone proteins and the degree of methylation. Histone lysine methyltransferases (KMTs) are an enzyme group which catalyzes the transfer of methyl groups from S-adenosyl to lysine on histone proteins. The loss of KMT genes causes the redistribution of specific histone modifications. In *P. oryzae*, deletion mutants of eight possible KMTs revealed that KMT mutations showed the defect in the infection-related morphogenesis and pathogenicity. Therefore, I analyzed the impact of gene deletion of three KMTs, MoSET1 catalyzing H3K4me2/3, MoKmt1 catalyzing H3K9me3, and MoKmt6 catalyzing H3K27me3, on H3K27me3 distribution in *P. oryzae* genome.

Based on ChIP-seq data of the Br48 strain, three major genomic compartments were identified, including euchromatin (EC), facultative heterochromatin (FH), and constitutive heterochromatin (CH). In Δmoset1 , the most significant change was observed in the CH region, characterized by a decline of H3K9me3 and an increase of H3K27me3. Additionally, two distinct H3K27me3-rich regions were defined by the adjacent genomic region, H3K4me2 or H3K9me3. These findings demonstrated that H3K27me3 levels were affected by other histone modifications such as H3K4me3 and H3K9me3. However, the mode of their effect differs significantly depending on genomic compartments. Especially, H3K27me3 appeared to compensate for the loss of H3K9me3 to repress target genes in the CH region.

Chapter 4: Role of RNA interference key components in H3K27me3 maintenance in *p. oryzae*

In this chapter, I inspected the effects of RNAi core components on H3K27me3 in the *P. oryzae* genome using double knock-out mutant of MoDCL (Δd2dcl) and triple knock-out mutant of MoRdRP (Δrdprt). ChIP-seq analysis with antibodies against H3K9me3 and H3K27me3 was performed to elucidate the role of MoDCL and MoRdRP in the *P. oryzae* genome. On a global scale, H3K9me3 and H3k27me3 distribution did not differ considerably in Δd2dcl and Δrdprt compared to WT. However, close-up mapping data depicted differences in the histone modifications

between WT and RNAi mutants at specific genomic locations. H3K27me3 deposition showed a reverse relationship with H3K9me3, meaning that H3K27me3 levels tend to increase at genomic locations where H3K9me3 levels decline. The foldchange (FC) of RPM values in deletion mutants compared to WT was calculated to analyze the effects of Dicer and RdRP mutants on H3K9me3 levels and H3K27me3 levels. The data indicated that H3K27me3 levels changed up and down at certain locations in the CH region. The relationship between repetitive elements and the histone modification alteration was also examined in the RNAi mutants. The results suggested that RNAi components were required to target TEs for silencing by H3K9me3 deposition. H3K27me3 appears to compensate for H3K9me3 reduction.

氏名	DANG AN THACH		
論文 題目	Studies on molecular factors regulating H3K27me3 in <i>Pyricularia oryzae</i> (イネ科植物いもち病菌におけるヒストン修飾 H3K27me3 を制御する分子の研究)		
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	藤本 龍
	副 査		
	副 査		
要 旨			
ヒストン修飾を中心とした遺伝子のエピジェネティック制御は、植物病原菌の病原性発現にも大きな役割を果たしていることが近年明らかとなりつつある。特に条件的ヘテロクロマチンのマーカーである H3K27me3 は、病原菌が植物宿主に向けて分泌するエフェクターと呼ばれる病原性因子等の、生態的なニッチェを決定する種々の遺伝子制御に重要な役割を果たすことが示唆されており、注目を集めている。本学位論文は、イネ科植物いもち病菌を材料にヒストン修飾、特に H3K27me3 に着目し、その制御に関連する要因の調査を行ったものである。 第1章では、エピジェネティクス、特に真菌におけるヒストン修飾に関するこれまでの知見を整理した導入が述べられている。第2章では、近年真核生物においても広範囲で起きていることが明らかとなった遺伝子の水平移行と H3K27me3 修飾の関係を調査している。第3章では、H3K4me2/3 および H3K9me3 といった他のヒストン修飾が H3K27me3 修飾に与える影響を詳細に調査している。また、第4章ではいもち病菌ゲノムにおける H3K27me3 修飾の維持に RNAi 経路の関与があるか検討している。最後に以上の要因をまとめていもち病菌における H3K27me3 の制御機構についての総合的な考察を行っている。 第2章では、まず当研究室で完全長のゲノム配列が決定されたコムギいもち病菌 Br48 株とすでにゲノム配列が決定されているイネ菌、シコクビエ菌、ライグラス菌などとの配列比較を行った。その結果、コムギ病菌集団や Br48 株が固有に保有するゲノム領域が見出されたが、そのうちのいくつかはイネ菌やコムギ菌が属する <i>Pyricularia oryzae</i> ではなく、直接有性生殖ができない他種の <i>Pyricularia</i> 属菌ゲノムとの配列相同性が高いことが明らかとなった。これらのゲノム領域は、数十万塩基対から二百万塩基対の大きさがあったが、DNA 断片の水平移行が起こった結果、Br48 ゲノムへの挿入が起こったと考えられた。興味深いことに、これらの水平移行したと思われるゲノム領域には、H3K27me3 や H3K9me3 といった抑制的なヒストン修飾が集積する傾向があった。そこで、この遺伝子の水平移行とヒストン修飾の関係を明らかにする目的で、種の系統関係と遺伝子の系統関係の相関係数として与えられる IPC(Index of Phylogenetic Concordance)という指標を考案し、ゲノム上のすべての遺伝子の IPC 値と各種ヒストン修飾の相関を検討した。その結果、H3K27me3 の上昇と IPC 値の低下に有意な相関が認められ、水平移行			

氏名	DANG AN THACH
により獲得された DNA 領域には H3K27me3 修飾が誘導されていることが明らかとなった。このことから、水平移行で獲得された遺伝子は一般的に抑制的な制御を受け、その後、条件に応じて発現することになることで自己遺伝子化が起こることが推測された 第 3 章では、H3K27me3 が他のヒストン修飾との相互作用で制御されている可能性について調査した。当研究室の過去の研究から、いもち病菌では MoSET1、MoKMT1 および MoKMT6 と命名された各遺伝子がそれぞれ H3K4me2/3、H3K9me3 および K3K37me3 を触媒する酵素であることが明らかとなっている。そこでこれら遺伝子の欠失変異体 (Δmoset1、Δmokmt1 および Δmokmt6) におけるヒストン修飾の動向を ChIP-seq 解析により調査した。いずれの変異体においても、自己が触媒するヒストン修飾は期待された通りほぼ消失していたが、いずれの組み合わせでも自己が触媒しないヒストン修飾にも増減があり、そのパターンはユークロマチン、構成的ヘテロクロマチンなどのゲノムのコンパートメント毎に特徴的なものであった。つまり H3K4me2/3、H3K9me3 および K3K37me3 の各ヒストン修飾は互いに相互作用するが、相互作用の様式はゲノムコンパートメントで異なることが明らかとなった。また、この解析を行う過程で、いもち病菌の条件的ヘテロクロマチンには、他のヒストン修飾からの影響のパターンが明らかに異なる二つの領域があることが判明した。この二つの異なる条件的ヘテロクロマチンは隣接するゲノムのコンパートメントと強い相関があり、ユークロマチンと隣接する領域を K4-associated facultative heterochromatin および構成的ヘテロクロマチンと隣接する領域を K9-associated facultative heterochromatin と命名した。これは真菌における新しいクロマチン領域の発見と言える。 第 4 章では、いもち病菌ゲノムにおける H3K27me3 の維持に RNAi 機構の関与があるか検討した。RNAi 機構の主要な因子である Dicer および RNA-dependent RNA polymerase の遺伝子は、いもち病菌ゲノムにそれぞれ 2 個および 3 個存在している。そこでこれらの二重変異体 (Δdcl) および三重変異体 (Δrdp) を作製し、その変異体における H3K27me3 の修飾パターンの変化を調査した。その結果、これらの変異体では共通してゲノムの特定の領域で H3K27me3 の増減が認められたが、ゲノムのコンパートメントとの関連性は明確ではなかった。ただし H3K27me3 が増加した領域では、H3K9me3 は逆に減少している傾向が顕著であった。他の生物種におけるヒストン修飾制御と同等の機構が <i>P. oryzae</i> でもあると仮定すると RNAi が H3K9me3 を介して特定の構成的ヘテロクロマチン領域形成に関与しており、RNAi が欠失した変異体ではその領域に H3K27me3 が代替の抑制的シグナルとして付与されていることが考えられた。 以上の結果から、本研究でイネ科植物いもち病菌の条件的ヘテロクロマチンの制御機構に多くの要因が関与していることが明らかとなった。これらの知見は、真核生物におけるクロマチン制御機構の一端を明らかにしただけでなく、本病原菌の病原性発現に重要な遺伝子の制御機構の理解を大きく進めたものである。また、将来的に本菌の効率的な防除法への応用へつながることも期待される。よって、学位申請者 DANG AN THACH は、博士（学術）の学位を得る資格があると認める。	