

イネいもち病菌での Cas9 スクリーニング系の確立とその応用 ー農薬フェリムゾンの作用機作に関する機能・構造解析ー

1. 研究の目的

(1) 本研究の1つめの目的は、「イネいもち病菌に対する農薬の一種であるフェリムゾンの作用機作を明らかにすること」である。フェリムゾンを含む農薬は以前から使われているが、圃場でフェリムゾン耐性糸状菌が発生したという報告は無い。非常に優れた農薬である一方、作用点が不明であることから、その解明が期待されている。我々の先行研究の結果から、培地上においてフェリムゾン耐性となるイネいもち病菌の変異体が単離された。原因遺伝子を決定したところ、銅の輸送に関与する MoICT1 と MoCcc2 という遺伝子がフェリムゾン感受性に重要であることが明らかとなった (iScience 2020, 23, 101660)。これらの結果から、フェリムゾンが MoICT1 と MoCcc2 を標的分子とする可能性が示唆されたが、直接的な証拠は得られていない。本研究では、生化学的な解析および構造解析を通して、フェリムゾンがイネいもち病菌内の銅イオンの受け渡しを直接阻害するかどうかを検証する。

(2) 本研究の2つめの目的は、「イネいもち病菌における Cas9 スクリーニング系を確立すること」である。Cas9 を用いたゲノム編集は、現代の生命科学の必須ツールの一つである。Cas9 を用いたゲノム編集は、単に一つの遺伝子を破壊するだけでなく、特定の生命現象に関与する遺伝子の順遺伝学的なスクリーニングにも応用可能である。培養細胞を用いたヒトの研究では、レンチウイルスを用いた発現系を利用することで、Cas9 を用いた遺伝子スクリーニング系が確立されている。実際に、SARS-CoV2 が増殖する際に必要な宿主因子の同定などで、威力を発揮している。他方、糸状菌研究における Cas9 の応用は進んでいない。先行研究において、イネいもち病菌で Cas9 を発現させると、毒性を示すことが明らかとなった (Sci Rep, 2018, 8, 14355)。この報告以降、植物病原糸状菌での Cas9 を用いた応用研究は停滞したままである。そこで、本研究では、将来的にフェリムゾンの標的遺伝子のゲノムワイドスクリーニングを行うことを視野に入れつつ、イネいもち病菌における Cas9 スクリーニング系を確立することを試みる。

2. 研究の計画

(1) イネいもち病菌に対する農薬の一種であるフェリムゾンの作用機作を明らかにするために、以下の研究を行うことを計画した。

①MoICT1およびMoCcc2の異種発現と精製法の確立

1年目にフェリムゾンの標的分子候補として同定されたイネいもち病菌の MoICT1 と MoCcc2 を大腸菌内で発現させ、精製することを試みる。

②MoICT1およびMoCcc2とフェリムゾンとの相互作用に関する解析

2年目には、精製した MoICT1 と MoCcc2 がフェリムゾンと結合するかどうかについて、等温滴定カロリーメーターを用いて検証する。

③MoICT1およびMoCcc2の結晶構造解析

3年目には、銅イオン存在下および非存在下での MoICT1 と MoCcc2 の結晶構造解析を試みつつ、銅イオン存在下および非存在下でのフェリムゾンと MoICT1/MoCcc2 の共結晶構造の解析も試みる。

上記の生化学的な解析と構造解析を通して、3年以内にフェリムゾンが MoICT1 と MoCcc2 を標的分子とするかどうかを明らかにし、フェリムゾンの作用機作の一端を明らかにする計画である。MoICT1 と MoCcc2 のオルソログは、ヒトや酵母にも存在する。フェリムゾンの作用点が MoICT1 と MoCcc2 だった場合、構造的な視点から、ヒトや酵母の銅輸送にフェリムゾンが及ぼしうる影響を評価・検証する計画である。

(2) イネいもち病菌における Cas9 スクリーニング系を確立するために、以下の研究を行うことを計画した。

①イネいもち病菌におけるマーカーリサイクリングシステムの構築

1年目には、複数の遺伝子を何度でもイネいもち病菌に導入可能なマーカーリサイクリングシステムを構築する。

②イネいもち病菌におけるCas9の毒性発現機構の解明

2年目には、様々なCas9変異体やgRNA発現カセットを複数回に分けてイネいもち病菌に導入することで、Cas9システムのどの部分がイネいもち病菌に毒性をもたらすのかを明らかにする。

③イネいもち病菌で利用可能なCas9系の構築

②の結果を踏まえてCas9システムを改良することで、イネいもち病菌で毒性を示さないように発現させることが可能なCas9変異体を開発する。そして、3年目には、実際に少数の遺伝子群を対象とした順遺伝学スクリーニングを行う計画である。最終的には、イネいもち病菌における全遺伝子スケールのCas9スクリーニング系を確立し、フェリムゾンの標的遺伝子の順遺伝学的なスクリーニングへの利用を目指す。

3. 研究の成果

(1) イネいもち病菌に対する農薬の一種であるフェリムゾンの作用機作を明らかにするための研究を行い、以下の研究成果を得た。

①MoICT1およびMoCcc2の異種発現と精製法の確立に関して

大腸菌を用いてMoICT1およびMoCcc2を発現させるために、低温発現用のpColDベクターに、全長のMoICT1およびMoCcc2の銅結合ドメインのクローニングを完了した。BL21 (DE3)株を用いてこれらの発現を誘導した結果、目的のサイズのタンパク質の発現が確認された。また、MoICT1に関しては、12 Lの培地を用いて大量発現を行い、アフィニティークロマトグラフィー、イオン交換クロマトグラフィー、およびゲルろ過クロマトグラフィーを組み合わせることで、高濃度のタンパク質を精製する系を確立した。SDS-PAGEで精製状況を確認したところ、単一バンドが確認できた。想定以上の進捗でMoICT1の精製に成功したため、当初3年目に行うことを計画していた結晶化条件の検討を行った。

②MoICT1の結晶構造解析に関して

①で精製に成功したMoICT1タンパク質溶液を用いて結晶化条件を検討した。モスキートを用いた微量結晶化スクリーニングを行った結果、亜鉛イオンを含む溶液条件において、結晶化が確認された。ハンギングドロップ法を用いて、PEG濃度、pH、亜鉛イオン濃度などの条件をより詳細に検討した結果、Spring-8で解析可能と思われる結晶化が起こる条件の同定に成功した。

(2) イネいもち病菌におけるCas9スクリーニング系を構築するための研究を行い、以下の研究成果を得た。

①イネいもち病菌におけるマーカーリサイクリングシステムの構築に関して

イネいもち病菌P2株のゲノムDNAよりウラシル合成遺伝子(MoURA3)の配列を増幅し、シーケンス解析を行うことでMoURA3遺伝子のコード領域の配列を決定した。また、MoURA3遺伝子のプロモーターとターミネーターの断片をクローニングし、塩基配列を確認した。MoURA3遺伝子のプロモーターとターミネーターの間にハイグロマイシン耐性遺伝子カセットをクローニングし、MoURA3遺伝子破壊用のコンストラクトを作製した。他方、MoURA3遺伝子を標的とするgRNAを設計した。このgRNAを*in vitro*転写で合成し、Cas9タンパク質とgRNAの複合体を形成させた後でMoURA3遺伝子中の標的部位を切断する活性があることを確認した。

4. 研究の反省・考察

(1) コロナウイルス感染に伴う研究遅延に関して

全般的には、当初想定していたペースで研究が進展した。しかし、2022年度の期中に研究代表者がコロナウイルスに感染し、その後椎骨動脈解離を発症して入院するアクシデントに見舞われてしまったため、研究の進展にブレーキがかかってしまったのは残念であった。

(2) イネいもち病菌に対する農薬の一種であるフェリムゾンの作用機作を明らかにするための

の研究に関して

イネいもち病菌に対する農薬の一種であるフェリムゾンの作用機作を明らかにするための研究に関しては、当初の予定以上に研究が進展した。

①MoICT1に関しては結晶構造解析の目処がたった。2023年度の7月に Spring-8にサンプルを送付する予定である。結晶構造解析が完了したら、学会発表と論文投稿を行う計画である。また、MoICT1とフェリムゾンの共結晶化条件のスクリーニングを開始し、銅と結合した状態のMoICT1の発現・精製条件の検討にも着手し始めた。

②MoCcc2に関しては、精製条件の確立には至らなかった。引き続き、生化学的解析と結晶構造解析に必要な質のタンパク質を十分量精製するための精製条件を検討していく。

(3) イネいもち病菌における Cas9 スクリーニング系を構築するための研究に関して

イネいもち病菌における Cas9 スクリーニング系を構築するための研究に関しては、1年目の当初予定よりは少々遅れ気味であるが、一定程度研究が進展した。イネいもち病菌におけるマーカリサイクリングシステムの構築に関して、イネいもち病菌のプロトプラストに、MoURA3 を標的とする Cas9-gRNA 複合体と MoURA3 遺伝子破壊用のコンストラクトを同時にトランスフェクションしたが、現時点では MoURA3 破壊株の単離には至っていない。引き続き実験を反復するとともに、gRNA を新たに設計し直すなどの対策を講じていく計画である。

上記の通り、初年度の申請内容時の計画通り、おおよそ順調に研究が推移している。2年目の継続申請が不採択になってしまったのは非常に残念であるが、1年間のご支援のおかげで実施できた研究の成果を今後さらに発展させ、学会発表と論文発表に繋げていきたいと考えている。

5. 研究発表

- (1) 学会誌等
なし
- (2) 口頭発表
なし
- (3) 出版物
なし