

令和 5 年 6 月 26 日現在

機関番号：32647

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K05791

研究課題名(和文) 菌類ウイルスによる焼酎生産菌の一次・二次代謝産物生産機構に関する研究

研究課題名(英文) Primary and secondary metabolite production mechanism of shochu-producing fungi infected with fungal viruses

研究代表者

藤森 文啓 (Fujimori, Fumihiro)

東京家政大学・家政学部・教授

研究者番号：50318226

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：黒コウジカビ(*Aspergillus luchuensis*)に感染する菌類ウイルスによって、宿主側の生化学反応にどのような変化をもたらされ、醸造酒の味や嗜好性にどのような変化が起こるのかを明らかにするために、代謝物の変化について研究を進めた。その結果、あるウイルスの顕性感染により、一次代謝物のクエン酸、総酸が低下することから、そのウイルスによる宿主菌の転写物への影響が示唆された。そのウイルスはRdRp酵素、CPタンパク質以外に1,2種の酵素を生産しているがその生産物が異なる5パターンが確認されており、パターンの異なる発現が宿主の挙動に変化をもたらすものと考え、追加の研究を進めている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ウイルス感染による宿主側の挙動解析は、宿主側の負の反応や状態の解析がほとんどである。発酵食品類の生産に関与する菌のウイルスに焦点を当てて、その感染によって宿主がどのように生理的な変化を呈しているかの挙動解析を行った本解析では、一次生産物のクエン酸を含む多くの有機酸の生産性がウイルス感染で低下していることが判明した事にとどまらず、そのような顕性感染をする、あるウイルスがそのセグメント構成に変化をきたして5パターンのウイルス粒子として存在していることが判明した。このようなセグメントパターンの変化によって、宿主側の総酸の生産への影響解析は、広くウイルスの感染制御系を理解する上では重要な知見となる。

研究成果の概要(英文)：To clarify what kind of changes in biochemical reactions on the host side are caused by fungal viruses that infect *Aspergillus luchuensis*, and what kind of changes occur in the taste and palatability of brewed sake investigated changes in metabolites. As a result, overt infection with a certain virus decreased citric acid and total acid as primary metabolites, suggesting the influence of the virus on the transcripts of host fungi. The virus produces 1 or 2 enzymes in addition to the RdRp enzyme and CP protein, but 5 patterns of different band have been confirmed, and it is thought that the different expression patterns cause changes in the behavior of the host. We need additional research in future.

研究分野：菌類ウイルス

キーワード：糸状菌 菌類ウイルス 発酵生産 糖化 ウイルスフリー クエン酸 アスペルギルス 醸造

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

Aspergillus 属菌は酒類や発酵食品の醸造、医薬品等の生産で活躍する有用菌類で、時に植物病害やカビ毒、日和見感染症の原因ともなる。近年、属菌よりマイコウイルスの発見が相次いでいるが、宿主菌へ及ぼす影響はほとんど理解されていない。そこで本研究は、食用生産に用いられる黒麹菌 (*Aspergillus luchuensis*) に感染しているウイルスの探索・同定と、それらウイルスが宿主である *A. luchuensis* に及ぼす影響を理解することを目的として行っている。1本鎖(ss)RNA ウイルス6種は、Narnaviridae(1分節および分節型と思われるもの)が4種、Botourumiaviridae1種、Umbr-like virus1種であった。2本鎖(ds)RNA ウイルス6種は2分節の3種に加え3分節と考えられる Partitiviridae が4種、CTTV-like virus が1種、11種の株すべてに存在する Alternavirus の合計12種が感染していることを確認した。また、この中の66-FCG1604株を親株として、菌糸先端分離によるウイルスフリー株(66-18)および、alternavirus と umbr-like virus の重複感染株(66-4)、umbr-like virus と partiti-like virus (3分節)の重複感染株(66-34)を得ることに成功した。生育試験、孢子形成、分生子柄などの形態およびクエン酸を含む1次代謝物の生産性試験を比較したところ partiti-like virus を含む株(66親株、66-34)で、形態異常、生産性の低下が認められた。本ウイルスの宿主への影響、特に宿主遺伝子発現およびメタボロームへの影響評価は推進すべき重要な課題である。

2. 研究の目的

菌類は二次代謝物として各種の化合物を生産し植物に対して病原性を持つものがある。さらには日和見感染症の原因となる菌やアレルゲンとなる菌によって、ネガティブな側面も持つものが多数知られている。一方で、キノコ、酒類や発酵食品の醸造、医薬品等の生産の場で活用される有用菌も多く知られている。これらの菌類には多様なマイコウイルスの感染が明らかになりつつあり、ウイルスの宿主となる菌の病原性を低下させる善玉ウイルスが注目されているが、その分子メカニズムは未解明な部分が多い。一方で、食用有用菌におけるマイコウイルスについては、キノコ等の病原性ウイルスの研究などが中心で、キノコ栽培上のウイルスの負の効果についての研究が多い。他の食用有用菌ではその研究は途についたばかりである。そこで、本課題では、食用(醸造)に活用される Aspergillus 属菌のマイコウイルスに焦点を当て、それらのウイルス学的な特徴付けを進めると共に、宿主菌に対してどのような正負の影響を与えているか理解することを目的としている。これまでの本研究から、Aspergillus 属菌(主に黒麹菌・*Aspergillus luchuensis*)には総計11種類のssRNAまたはdsRNAウイルスが存在することが判明している。その多くには論文報告がない新種のウイルスが含まれており、また、食品(飲料など)生産に関わる菌群のウイルスという点でも世界的に報告が少ない。Aspergillus 属菌は工業利用も盛んに行われている菌であり、特にクエン酸生産などにおいてはその生産量がわずかに向上するだけでも、最終生成物の価値が大きく変動する。本研究からはウイルス感染によるそれらの代謝物生産性に負の影響が確認されており、ウイルスフリー株を用いた工業利用の推奨を強く示唆するものである。

3. 研究の方法

(1) 実験試料 PDA培地で孢子形成前までの1,2日間培養した。Aspergillus 株のリストを示す(図1)。

表1 使用菌株の一覧

通し番号	菌番号	種名	由来
38	FCG-999	<i>Aspergillus.Luchuensis</i>	青ヶ島村 製造所B
50	FCG-1186	<i>Aspergillus.Luchuensis</i>	青ヶ島
56	FCG-1252	<i>Aspergillus.Luchuensis</i>	青ヶ島村 酒造所C 麹室
57	FCG-1254	<i>Aspergillus.Luchuensis</i>	青ヶ島村 酒造所A 麹室
58	FCG-1259	<i>Aspergillus.Luchuensis</i>	八丈島町 旧酒造所
66	FCG-1604	<i>Aspergillus.Luchuensis</i>	青ヶ島村 酒造所A 麹
68	FCG-1606	<i>Aspergillus.Luchuensis</i>	青ヶ島村 酒造所A 麹
71	FCG-1609	<i>Aspergillus.Luchuensis</i>	青ヶ島村 酒造所A 麹
155	FCG-1256	<i>Aspergillus.Luchuensis</i>	青ヶ島村 酒造所A 麹室
157	FCG-1258	<i>Aspergillus.Luchuensis</i>	青ヶ島村 製造所B
-	JCM22321	<i>Aspergillus.Luchuensis</i>	沖縄県 喜屋武酒造所

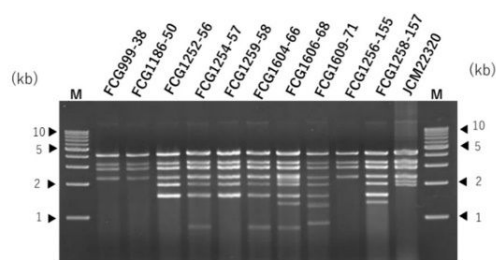


図1 使用菌株のウイルスバンドパターン(dsRNA)

(2) RNA抽出はRNAzol®RT Reagent (Molecular Research Center, Inc) を用い非フェノール法およびRT-PCRに用いた。

(3) 配列末端領域の同定 (RACE法)

SMARTer™ RACE cDNA Amplification Kit (Clontech) を用い、抽出した Total RNA を鋳型に cDNA を合成、RACE法を行い、配列末端を同定して全長配列を決定した。

4. 研究成果

1本鎖(ss)RNA ウイルス6種は、Narnaviridae(1分節および分節型と思われるもの)が4種、Botourumiaviridae1種、Umbr-like virus1種であった。2本鎖(ds)RNA ウイルス6種は2分節の3種に加え3分節と考えられる Partitiviridae が4種、CTTV-like virus が1種、11種の株すべてに存在する

Alternavirus の合計 12 種が感染していることを確認した。
各系統樹解析を掲載する。

また、宿主に対しての表現的な影響を持つ partiti-like virus を保有する 7 種の菌では、2 分節型が 2 種、3 分節型が 3 種、4 分節型が 2 種存在することが判明した。総合的には 5 パターンが確認された (表 1、図 1)。

Local Blast analysis (viral sequence contigs)

virus	segments	Contig name	Size	Reads	Average
AIAV1	dsRNA1	71-FCG1609.c43	>3616	504249	14032.8
	dsRNA2	71-FCG1609.c255	>2900	139079	4807.3
	dsRNA3	71-FCG1609.c27	>2399	121454	5087.4
	dsRNA4	71-FCG1609.c38	>1842	86491	4711.0
AIULV1	(-)	71-FCG1609.c32	3751	1375813	36925.3
AINLV1	(-)	71-FCG1609.c49	3137	46182	1495.6
AIOLV1	(-)	71-FCG1609.c166	>2822	148980	5283.6
AIPV1	dsRNA1	71-FCG1609.c15	1759	628135	34324.8
	dsRNA2	71-FCG1609.c13	1376	423118	30799.8
	dsRNA3	71-FCG1609.c164	1183	102292	9425.5

AIAV1: Aspergillus luchuensis artemavirus 1
AIULV1: Aspergillus luchuensis umbra-like virus 1
AINLV1: Aspergillus luchuensis narna-like virus 1
AIOLV1: Aspergillus luchuensis ourmia-lie virus 1
AIPV1: Aspergillus luchuensis partitivirus 1

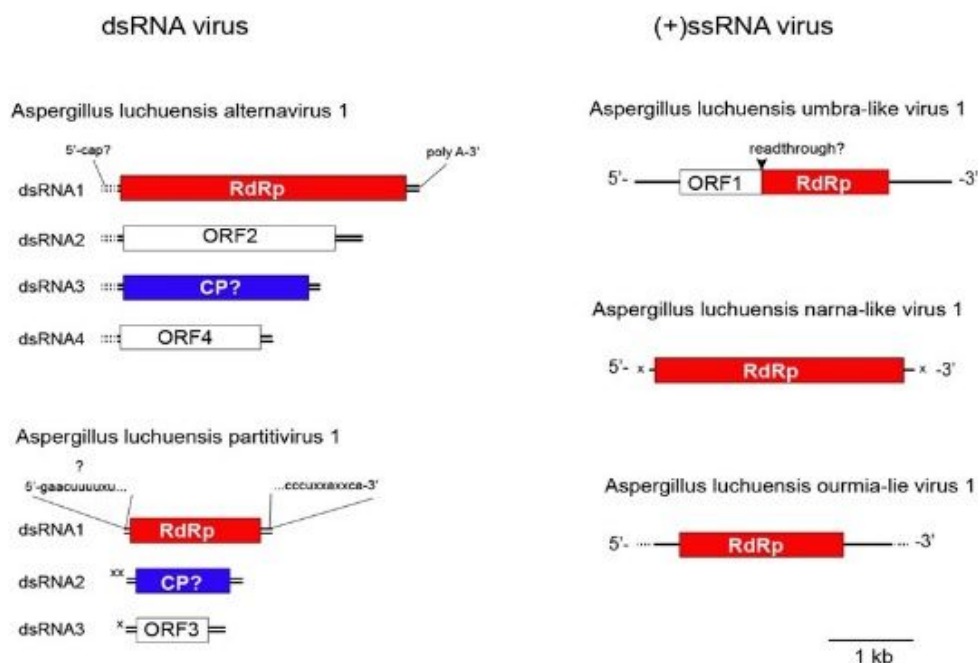
図2 FCG1609株にはNGS解析で5種のマイコウィルスの感染が示唆された

virus	segments	BLAST-P top virus name	Protein	E-value	Identity	Accession
AIAV1	dsRNA1	Aspergillus foetidus dsRNA mycovirus	RdRP	0	97.8%	YP_007353985
	dsRNA2	Aspergillus foetidus dsRNA mycovirus	HP	0	98.2%	YP_007353982
	dsRNA3	Aspergillus foetidus dsRNA mycovirus	CP?	0	97.4%	YP_007353983
	dsRNA4	Aspergillus foetidus dsRNA mycovirus	HP	5.0E-137	45.2%	YP_007353984
AIULV1	(-)	Erysiphe necator umbra-like virus 2	RdRP	0	74.2%	QHD64838
AINLV1	(-)	Neofusicoccum parvum narnavirus 1	RdRP	0	56.5%	QDB74994
AIOLV1	(-)	Aspergillus flavus magoulivirus 1	RdRP	0	79.9%	UAW09569
AIPV1	dsRNA1	Botryosphaeria dothidea virus 1	RdRP	0	77.3%	AIE47694
	dsRNA2	Botryosphaeria dothidea virus 1	CP?	5.0E-134	54.1%	AIE47695
	dsRNA3	Aspergillus flavus partitivirus 1	HP	5.0E-173	93.2%	QDE53636

※少なくとも5種のマイコウィルスを見出し、4種は新規ウィルス種と推定
※ウィルス分節 (AIAV1, AIPV1) によって相同性のトレンドが異なる

図3 FCG1609株にみいだされた5種のマイコウィルスのblast解析結果

71-FCG1609 に感染しているマイコウィルスの確認を RNASeq で行ったところ、5 種のマイコウィルスの共感染が確認された。dsRNA ウィルスとして Aspergillus luchuensis artemavirus, A.l. partitivirus の 2 種が確認され、ssRNA ウィルスの A.l. umbra-like virus, A.l. narna-like virus, A.l. ourmia-like virus の 3 種、合計 5 種のウィルスが確認された (図 2, 3)。

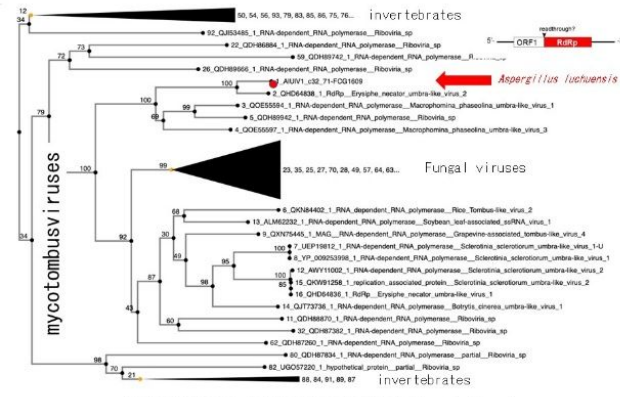


※ゲノム末端部分の配列は3' RLM-RACEにより解析した (一部進行中)

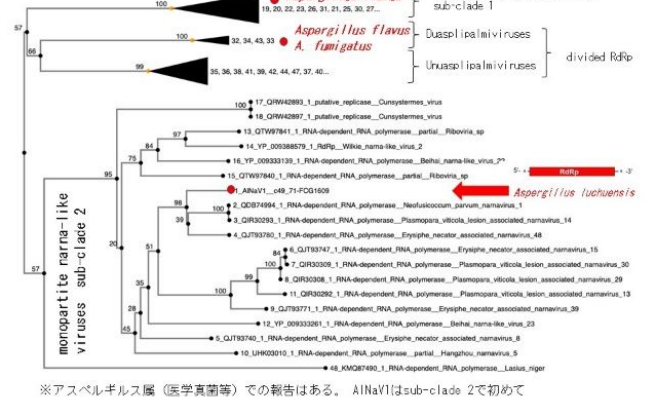
図4 FCG1609株にみいだされた5種のマイコウィルスの構造

見出された 5 種ウィルスのゲノムの模式図は図 4 に示すとおりである。RdRp および CP 以外に dsRNA ウィルスではその機能が未知のセグメントもある。それぞれのウィルス近縁関係はそれぞれのゲノムのアミノ酸配列を基に系統解析し系統樹として示した (図 5, 6, 7, 8)

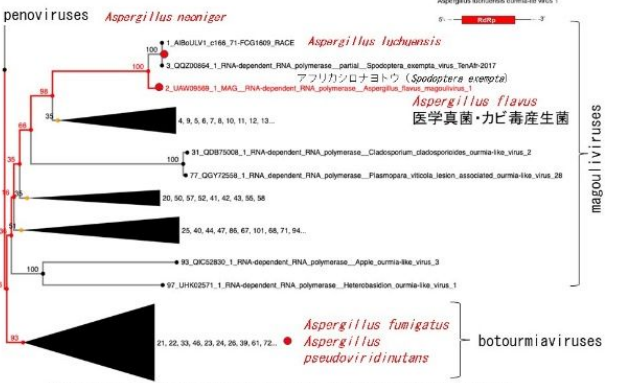
partitivirus は新規の zetapartitivirus であり、3 分節目にはバリエーションが存在することが示唆された。4 分節もつものについては解析中。



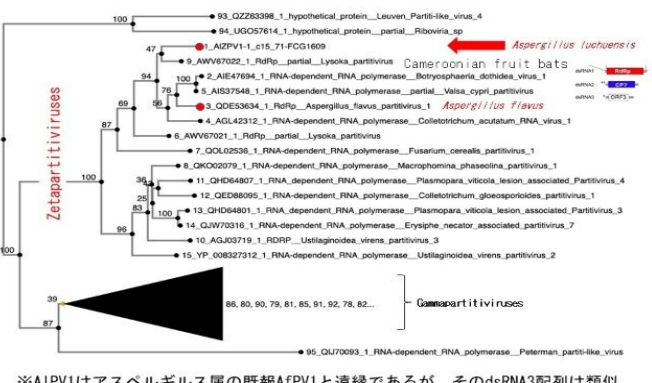
※AILUV1はアスペルギルス属で初めてのMycotombusvirus
 図5 Umbr-like virusの分子系統解析 (RdRP_NJ法)



※アスペルギルス属 (医学真菌等) での報告はある。AINAV1はsub-clade 2で初めて
 図6 Narna-like virusの分子系統解析 (RdRP_NJ法)



※アスペルギルス属のマイクロウイルスの報告あり、AILUV1はヨウ虫由来の配列に近似
 図7 Durmia-like virusの分子系統解析 (RdRP_NJ法)



※AIPV1はアスペルギルス属の既報AFPVIと遠縁であるが、そのdsRNA3配列は類似
 図8 Partitivirusの分子系統解析 (RdRP_NJ法)

また、親株が *Aspergillus luchuensis* artenavirus, A.I.partitivirus, ssRNA ウイルスの A.I. umbr-like virus の3種のウイルスに共感染している66-FCG-1604では、ウイルスフリー化を試みたところ、分離株 ①では *Aspergillus luchuensis* artenavirus, A.I. umbr-like virus の2種の共感染、分離株 ②では *Aspergillus luchuensis* artenavirus, A.I.partitivirus の2種の共感染が確認された。さらにフリー株では3種のウイルスが存在しない株を取得することに成功した(図9)。

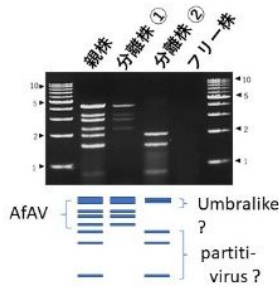


図9 FCG1604-66の親株にはAfAV, Umbralike virus2とパーティティウイルス3種が重複感染している。分離株①と②およびウイルスフリー株を作出し、形態的解析、代謝産物解析を図10、表2で行った。

そこで、これらの株を用いて米麹を作成し、その米麹中の酸度を測定したところ、クエン酸の生産性において親株と分離株 ①では分離株 ②やフリー株に比較して低下していることが判明した。つまり A.I.partitivirus の存在によってクエン酸の生産性が低下していることが見て取れた。その逆に、A.I.partitivirus が存在によって、コハク酸、リン酸、ピログルタル酸は生産性が上昇することも判明した。この A.I.partitivirus の存在がどうしてこれらの物質の生産性に影響するのかのメカニズムに関してはさらなる解析が必要である(表2、図10)。

表2 FCG1604-66分離株の有機酸生産量

	リンゴ酸	クエン酸	コハク酸	ピルビン酸	酢酸	乳酸	リン酸	ビロリジン酸
親株	37.6	166.7	22.4	4	0.6	ND	28.8	4.9
分離株①	29.8	403.1	0.7	2.9	0.6	4	5.5	0.9
分離株②	37	107.3	27.1	3.3	0.7	ND	41.9	5.5
ウイルスフリー株	30.9	452.8	4.6	3.8	0.6	2.5	6.8	1.4

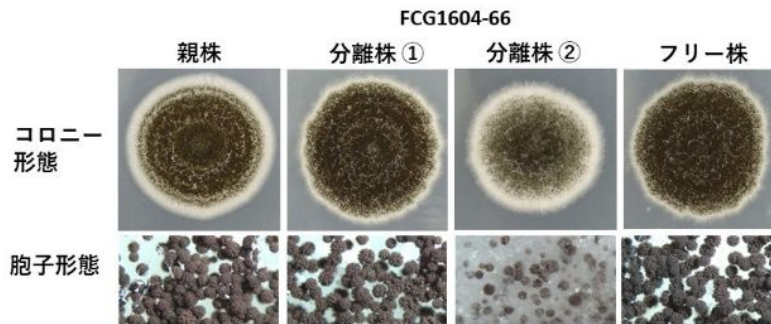


図10 FCG1604-66の親株、と分離株②にはパルティティウイルスが存在し、孢子形成能に影響があるが、分離株①とフリー株では孢子形成能は旺盛である。

以上の結果から、*A. luchuensis*に感染する菌類ウイルスの普遍性と多様性の一端を紐解くことに成功した。得られた宿主系統の解析により、未同定の3分節・4分節RNAウイルス(partiti-like virus)は宿主菌の表現型および米麹の性質に影響を及ぼしていることが示唆された。見出された多くのウイルスは不顕性感染であったが、未同定の3分節RNAウイルスは宿主菌の孢子形成、分生子柄形成、総酸度、クエン酸生産性などに影響しており、今後はそのメカニズム解明が、分節の有無によりどのように挙動するのかなどの解析が必要である。この3分節、4分節RNAウイルスの性状解析を進めるとともに、醸造生産物である焼酎の成分解析、官能評価を行うことでのウイルスの機能解析が必要である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Akiko Yamaji-Hasegawa, Motohide Murate, Takehiko Inaba, Naoshi Dohmae, Masayuki Sato, Fumihiro Fujimori, Yasushi Sako, Peter Greimel and Toshihide Kobayashi	4. 巻
2. 論文標題 A novel sterol binding protein reveals heterogeneous cholesterol distribution in neurite outgrowth and in late endosomes/lysosomes	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Cellular and Molecular Life Sciences	6. 最初と最後の頁
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00018-022-04339-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Yukiyoshi Mizutani, Kazuma Uesaka, Ayane Ota, Matteo Calassanzio, Claudio Ratti, Takamasa Suzuki, Fumihiro Fujimori and Sotaro Chiba.	4. 巻
2. 論文標題 De novo sequencing of novel mycoviruses from Fusarium sambucinum: an attempt on direct RNA sequencing of viral dsRNAs	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Microbiology.	6. 最初と最後の頁
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fmicb.2021.641484	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 藤森文啓	4. 巻
2. 論文標題 菌類ウイルスは悪者なのか。～重複感染であることの意義～	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 きのこ研だより	6. 最初と最後の頁
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

豊かなLife（生）実現のための、環境微生物由来の二次代謝産物（化合物）の活用に関する研究
<https://www.tokyo-kasei.ac.jp/research/assets/2019houkokusyo-7.pdf>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	近藤 秀樹 (Hideki Kondo) (40263628)	岡山大学・資源植物科学研究所・准教授 (15301)	
研究分担者	千葉 壮太郎 (Sotarou Chiba) (70754521)	名古屋大学・生命農学研究科・准教授 (13901)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------