

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 19 日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26450109

研究課題名(和文)糸状菌ゲノムの「膨大な数の二次代謝遺伝子群」の役割と環境シグナル伝達系による制御

研究課題名(英文) Huge number of secondary metabolism genes in fungal genomes: roles and regulation by environmental signal transduction pathways

研究代表者

本山 高幸 (Motoyama, Takayuki)

国立研究開発法人理化学研究所・環境資源科学研究センター・専任研究員

研究者番号：70291094

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：イネいもち病菌のテヌアゾン酸合成遺伝子TAS1が、新しいタイプの二次代謝産物生合成酵素をコードしており、感染に関与することを見出した。また、環境シグナルによるテヌアゾン酸の生産誘導がエピジェネティック制御因子と転写因子を介して起こっていることを見出した。更に、化合物ライブラリーからテヌアゾン酸の生産誘導を引き起こす化合物を取得した。この化合物はイネいもち病菌以外でも二次代謝産物の生産誘導を引き起こすことから、二次代謝産物の生産制御メカニズムの共通性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：We found that TAS1, the tenuazonic acid biosynthetic gene of the rice blast fungus, codes for a new-type secondary metabolite biosynthetic enzyme, and involved in infection. We also found that environmental signals induce tenuazonic acid production via an epigenetic regulator and a transcription factor. Furthermore, we isolated a tenuazonic acid production-inducing compound from a chemical library. This compound induced production of secondary metabolites in other fungus, suggesting that there is a common mechanism in secondary metabolite production control.

研究分野：応用微生物学

キーワード：イネいもち病菌 糸状菌ゲノム 二次代謝 抗生物質 シグナル伝達

1. 研究開始当初の背景

糸状菌は二次代謝産物の宝庫であり、ペニシリン等の有用化合物や、アフラトキシン等の有害化合物(かび毒)を生産する。驚くべきことに、糸状菌ゲノムは当初の予想より遙かに多くの二次代謝遺伝子を持っていた。大部分は実験室条件で発現しない「休眠遺伝子」と考えられたが、詳細な培養条件検討で、大部分の二次代謝遺伝子は発現させることが可能なことが示された。それぞれの二次代謝産物が何らかの役割を持つと予想されたが、大部分の二次代謝産物の機能は不明であった。また、膨大な数の二次代謝遺伝子群の発現制御メカニズムも大部分が不明であった。本研究では、このような重要課題の解決のため、環境中での挙動が明らかなイネいもち病菌を用いて二次代謝遺伝子群の環境中でのサバイバルにおける役割を明らかにすること、及び環境シグナル伝達系に注目して外部刺激に応答した二次代謝制御メカニズムを明らかにすることを目指した。

2. 研究の目的

(1) 二次代謝遺伝子群の役割の解析

①イネいもち病菌のゲノム中に存在する約30の二次代謝遺伝子クラスターがイネ等との相互作用においてどのような役割を持っているのかについて明らかにする。

(2) 既知の環境シグナル伝達系の二次代謝制御への関与を明らかにする

①既知の環境シグナル伝達系の二次代謝制御への関与を網羅的に明らかにする。二成分情報伝達系、MAPキナーゼ、Gタンパク質、光応答情報伝達系(Velvet-LaeA)等を標的にする。

②生産制御されている二次代謝産物とその生合成遺伝子クラスターを同定する。

(3) 未知の二次代謝制御系の探索

①ケミカルバイオロジー的手法で未知の二次代謝制御系を探索する。具体的には、天然化合物ライブラリー(理研天然化合物バンク NPDepo、<http://npd.riken.go.jp/npd/ja/>)を用いて二次代謝を制御する化合物を探索し、その標的を見出し、新たな二次代謝制御タンパク質を同定する。

②生産制御されている二次代謝産物とその生合成遺伝子クラスターを同定する。

(4) 環境シグナル伝達系による二次代謝遺伝子の発現制御メカニズムの解析

①環境シグナル伝達系による二次代謝制御が、染色体レベルのエピジェネティック制御や生合成経路特異的転写因子等の既知の制御因子を介してなされているかどうかを明らかにする。

②それぞれの環境シグナル伝達系による二次代謝制御の間の関連を明らかにする。

③環境シグナル伝達系による二次代謝制御

が、進化的に離れた糸状菌でも共通かどうか明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 二次代謝遺伝子群の役割の解析

(担当: 本山)

イネいもち病菌のゲノム中に存在する約30の二次代謝遺伝子クラスターのイネ等の生物との相互作用における役割を解析する。機能既知のメラニンの遺伝子クラスター以外を標的にする。

(2) 既知の環境シグナル伝達系の二次代謝制御への関与を明らかにする

(担当: 本山、廣田)

イネいもち病菌を用いて、既知の環境シグナル伝達系がどのように二次代謝制御に関与しているかについて明らかにする。既に、イネいもち病菌の二成分情報伝達系が二次代謝制御に関与していることを見出しているが、網羅的な解析を行い、既知因子による制御の全貌を明らかにする。

(3) 未知の二次代謝制御系の探索

(担当: 本山、廣田)

未知の二次代謝制御系を見出すために、ケミカルバイオロジー的手法を用いる。化合物ライブラリー(理研天然化合物バンク NPDepo)を用いて二次代謝を制御する化合物を探索し、その標的を化合物ビーズで探索し、新たな二次代謝制御タンパク質を同定する。

(4) 環境シグナル伝達系による二次代謝遺伝子の発現制御メカニズムの解析

(担当: 本山)

環境シグナル伝達系による生合成遺伝子クラスターの発現制御がどのような経路で行われているのかを明らかにする。特にエピジェネティック制御や経路特異的転写因子との関係に注目する。更に、二次代謝制御系の間に関連や、一般性について解析する。

4. 研究成果

(1) 二次代謝遺伝子群の役割の解析

①テヌアズン酸生合成遺伝子同定と生合成メカニズムの解析

テヌアズン酸はイネいもち病菌が生産する二次代謝産物であり、ポリケチドとアミノ酸(イソロイシン)の融合化合物である。テヌアズン酸がDMSO処理及びp38 MAPK遺伝子(OSMI)破壊により生産誘導されることを明らかにしていたため、生産条件と非生産条件の全RNAを用いてDNAマイクロアレイ解析を行うことにより生合成遺伝子の候補を絞り込み、遺伝子破壊により生合成酵素遺伝子を確定させた。テヌアズン酸生合成遺伝子TASIは新たなタイプの二次代謝産物生合成酵素をコードしていた。具体的には、非リボソームペプチド合成酵素(NRPS)の後にポリケチド合成酵素(PKS)のKSドメインが続くユニ

一様な構造の酵素であった (図 1)。テヌアゾン酸の生合成酵素 TAS1 が新しいタイプの二次代謝産物生合成酵素であったため、ホモログ遺伝子を探索したところ、約 30 個のホモログが見出された (図 2)。ホモログ遺伝子を持つのは全て糸状菌であり、多くは昆虫や植物の病原糸状菌やキノコであり、生物間相互作用への関与が示唆された。

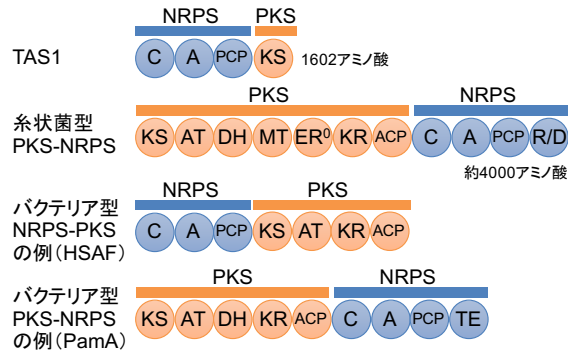


図 1 テヌアゾン酸生合成酵素 TAS1 のドメイン構造と他の PKS と NRPS の融合型酵素との比較。TAS1 のドメイン構造は糸状菌型 PKS-NRPS とは異なる。さらに、バクテリア型の NRPS-PKS などとも異なり、新しいタイプのドメイン構造を示す。ドメイン名の詳細は以下の通り (C: condensation (縮合); A: adenylation (アデニル化); PCP: peptidyl carrier protein (ペプチジルキャリアタンパク質); KS: ketosynthase (ケト合成酵素); AT: acyltransferase (アシル基転移酵素); DH: dehydratase (脱水酵素); MT: methyltransferase (メチル基転移酵素); ER0: nonfunctional enoylreductase (機能しないエノイル還元酵素); KR: ketoreductase (ケト還元酵素); ACP: acyl carrier protein (アシルキャリアタンパク質); R/D: reducing/Dieckmann cyclization (還元/ディークマン環化); TE: thioesterase (チオエステラーゼ))。

図 2 TAS1 ホモログの系統解析。TAS1 ホモログを持つ生物名を示している。TAS1 ホモログは約 30 個ヒットし、全て糸状菌由来であり、4 グループに分類された。テヌアゾン酸の生産が確認できているものを枠で囲った。イネいもち病菌の TAS1 はクラス A に分類できる。TAS1 ホモログを持つ生物は、植物病原糸状菌 (緑)、昆虫あるいは線虫の病原糸状菌 (青)、担子菌 (赤) が多く、生理活性物質の生産に関与していることが期待される。

② テヌアゾン酸生合成遺伝子の感染への関与の解析

テヌアゾン酸生合成酵素遺伝子破壊株はイネに対する病原性が低下せず、テヌアゾン酸は感染には必須ではないことが明らかになった。我々は既に、テヌアゾン酸がイネいもち病防除効果を示すことを見出しており、テヌアゾン酸はむしろ感染を抑制する化合物であることが明らかとなった。更に、テヌアゾン酸の生合成遺伝子 TAS1 の大量発現株のイネへの病原性を評価したところ、病原性が低下していることが明らかになり、テヌアゾン酸が感染を抑制する効果を持つことが支持された。この大量発現株を用いて、イネへの応答を解析したところ、サリチル酸及びジャスモン酸への応答に関与する遺伝子の発現が変動していることが明らかになった。

③ ピリクロール類の生合成遺伝子同定と感染への関与の解析

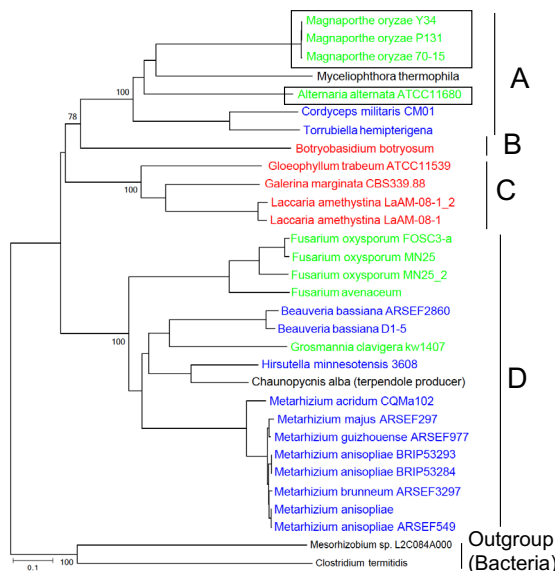
イネいもち病菌のピリクロール類の生産誘導条件を見出し、DNA マイクロアレイデータを解析し、生産誘導条件で発現誘導される二次代謝遺伝子の中から生合成遺伝子を見出し、生合成遺伝子クラスターを同定した。ピリクロール類はイネに病斑様の褐変を引き起こすポリケチド化合物であるが、ピリクロール生合成遺伝子破壊株はイネに対する病原性を保持していた。

(2) 既知の環境シグナル伝達系の二次代謝制御への関与を明らかにする

環境シグナル伝達系因子の遺伝子破壊株と大量発現株を用いた解析により、二つの MAPK (PMK1、MPS1) 及び光応答情報伝達系因子 LaeA のオルソログ (LAE1) の大量発現株でテヌアゾン酸の生産誘導が引き起こされることを見出していた。生産誘導メカニズムを明らかにするためにそれぞれの株から全 RNA を精製して RNA-seq による解析を行い、テヌアゾン酸の生合成遺伝子以外にも発現誘導される遺伝子があることを見出した。

(3) 未知の二次代謝制御系の探索

理研天然化合物バンク NPDepo の化合物ライブラリーを用いて二次代謝を制御する化合物を探索し、その標的を明らかにすることにより新たな二次代謝制御タンパク質を同定することを目指した。NPDepo の標準化合物ライブラリーの 80 化合物及びパイロットラ



イブラリーの 376 化合物の中から、二次代謝産物生産を変化させるものを探索し、2 種類のイネいもち病菌株に対してテヌアゾン酸生産を上昇させる化合物を 1 個取得した。NPDepo からヒット化合物の類縁構造化合物を入手し、評価し、より活性が高い化合物を 1 個取得した。取得した化合物は現在までに二次代謝制御活性が報告されていないものだった。更に、この化合物がイネいもち病菌以外の糸状菌であるテルペンドール生産菌 *Tolypocladium album* において、テルペンドール及び未知化合物の生産誘導を引き起こすことを見出した。この結果から、二次代謝産物の生産制御メカニズムの共通性が示唆された。

(4) 環境シグナル伝達系による二次代謝遺伝子の発現制御メカニズムの解析

二成分情報伝達系の下流で働く MAP キナーゼ OSM1 の遺伝子破壊及び DMSO 処理によりテヌアゾン酸が生産誘導されること及びこの生産誘導がエピジェネティック制御に関与すると予想される LAE1 を介していることを見出していた。LAE1 は糸状菌二次代謝のグローバルレギュレーターLaeA のオルソログである。*TASI* の近傍に存在する転写因子をコードすると予想される遺伝子 (*MGG_07800*) の解析を行った。LAE1 と *MGG_07800* の作用の位置関係を調べるため *LAE1* 過剰発現株に対して *MGG_07800* を破壊した二重変異株を作製したところ、テヌアゾン酸の生産誘導が起らなくなったことから、LAE1 の下流で *MGG_07800* が働いていることが示唆された (図 3)。

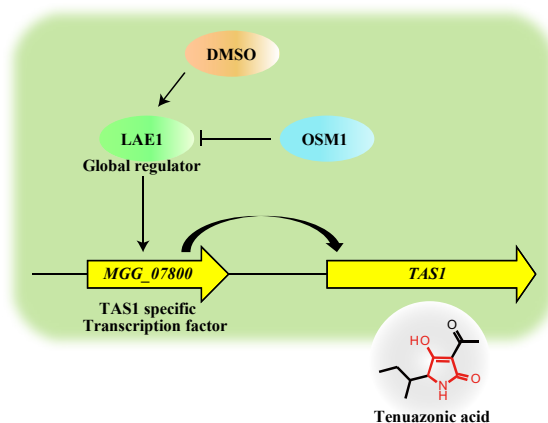


図 3 テヌアゾン酸の生産制御メカニズム

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 5 件)

- (1) Nagumo, Y., Motoyama, T., Hayashi, T., Hirota, H., Aono, H., Kawatani, M., Osada, H., Usui, T.: “Structure-activity relationships of terpendole E and its natural

derivatives”, *ChemistrySelect* (査読有), **2**: 1533–1536 (2017)

DOI: 10.1002/slct.201602015

- (2) Motoyama, T., Osada, H.: “Biosynthetic approaches to creating bioactive fungal metabolites: Pathway engineering and activation of secondary metabolism”, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* (査読有), **26**: 5843–5850 (2016)

DOI: 10.1016/j.bmcl.2016.11.013

- (3) Yun, C.S., Motoyama, T., Osada, H.: “Biosynthesis of the mycotoxin tenuazonic acid by a fungal NRPS-PKS hybrid enzyme”, *Nature Commun.* (査読有), **6**: 8758 (2015)

DOI: 10.1038/ncomms9758

- (4) Hongo, Y., Nakamura, T., Takahashi, S., Motoyama, T., Hayashi, T., Hirota, H., Osada, H., Koshino, H.: “Detection of oxygen addition peaks for terpendole E and related indole-diterpene alkaloids in a positive-mode ESI-MS”, *J. Mass Spectrom.* (査読有), **49**: 537–542 (2014)

DOI: 10.1002/jms.3360

- (5) Maeda, K., Nakajima, Y., Motoyama, T., Kitou, Y., Kosaki, T., Saito, T., Nishiuchi, T., Kanamaru, K., Osada, H., Kobayashi, T., Kimura, M.: “Effects of acivicin on growth, mycotoxin production and virulence of phytopathogenic fungi”, *Lett. Appl. Microbiol.* (査読有), **59**: 377–383 (2014)

DOI: 10.1111/lam.12289

[学会発表] (計 15 件)

- (1) 古山 祐貴、本山 高幸、鎌倉 高志、野川 俊彦、長田 裕之: 「イネいもち病菌におけるピリクロール類生合成に関わる FAD 依存性モノオキシゲナーゼ遺伝子の解析」日本農芸化学会 2017 年度大会、2017. 3. 20、京都女子大学 (京都府京都市)
- (2) 尹 忠銖、本山 高幸、長田 裕之: 「イネいもち病菌におけるかび毒テヌアゾン酸の生産制御機構」日本農芸化学会 2017 年度大会、2017. 3. 20、京都女子大学 (京都府京都市)
- (3) 本山 高幸、田中 陽子、長田 裕之: 「イネいもち病菌のネクトリアピロン類の生産誘導条件の探索と大量生産株の作製」日本農芸化学会 2017 年度大会、2017. 3. 20、京都女子大学 (京都府京都市)
- (4) Takayuki Motoyama, Yoko Tanaka, Hiroyuki Osada: “Activation of fungal secondary metabolism by disturbance of the two-component signal transduction system and identification of the nectriapyrone biosynthetic gene cluster”, *9th Joint Natural Products Conference 2016*, 2016. 7. 26, Tivoli Congress Centre, Copenhagen, Denmark

- (5) Choong-Soo Yun, Takayuki Motoyama, Hiroyuki Osada: “Biosynthesis of mycotoxin tenuazonic acid by novel type of fungal PKS/NRPS hybrid enzyme”, *9th Joint Natural Products Conference 2016*, 2016. 7. 25, Tivoli Congress Centre, Copenhagen, Denmark
- (6) 尹 忠銖、本山 高幸、長田 裕之:「カビ由来新規 NRPS-PKS 融合酵素によるカビ毒テヌアゾン酸の生合成」*日本農芸化学会 2016 年度大会*, 2016. 3. 30、札幌コンベンションセンター (北海道札幌市白石区)
- (7) 古山 祐貴、本山 高幸、鎌倉 高志、長田 裕之:「イネいもち病菌のピリクロール類生合成遺伝子クラスターの同定」*日本農芸化学会 2016 年度大会*, 2016. 3. 30、札幌コンベンションセンター (北海道札幌市白石区)
- (8) 尹 忠銖、本山 高幸、長田 裕之:「イネいもち病菌におけるカビ毒テヌアゾン酸の生合成」、*第 59 回日本放線菌学会学術講演会*, 2016. 3. 7、東京電機大学東京千住キャンパス 1 号館 1 階 100 周年ホール (東京都足立区)
- (9) 本山 高幸、尹 忠銖、長田 裕之:「糸状菌二次代謝を標的とした農薬探索」、*BMB2015 ワークショップ*, 2015. 12. 3、神戸商工会議所 (兵庫県神戸市中央区)
- (10) 尹 忠銖、本山 高幸、長田 裕之:「新たな NRPS-PKS 融合酵素によるかび毒テヌアゾン酸の生合成」、*第 14 回糸状菌分子生物学コンファレンス*, 2015. 11. 19、ルミエール府中 (東京都府中市)
- (11) 加藤 翔、本山 高幸、鎌倉 高志、長田 裕之:「ハイグロマイシン B 処理によるルシラクタエン生産糸状菌 *Fusarium* sp. RK97-94 における二次代謝産物生産誘導」、*日本農芸化学会 2015 年度大会*, 2015. 3. 27、岡山大学 (岡山県岡山市)
- (12) 本山 高幸、植木 雅志、加藤 翔、鎌倉 高志、長田 裕之:「糸状菌の生合成制御による有用生理活性物質生産」、*2014 年度生物生産工学研究センターシンポジウム「生合成マシナリーの精密解析と有用物質生産への応用」*, 2014. 12. 8、東京大学 (東京都文京区)
- (13) 加藤 翔、本山 高幸、鎌倉 高志、長田 裕之:「ハイグロマイシン B 処理によるルシラクタエン生産糸状菌 *Fusarium* sp. RK97-94 における二次代謝産物生産誘導」、*第 14 回糸状菌分子生物学コンファレンス*, 2014. 11. 16、東北大学 (宮城県仙台市)
- (14) 本山 高幸、田中 陽子、長田 裕之:「化合物アレイを用いたメラニン生合成阻害剤探索」、*第 14 回糸状菌分子生物学コンファレンス*, 2014. 11. 15、東北大学 (宮城県仙台市)
- (15) Choong-Soo Yun, Takayuki Motoyama, Hiroyuki Osada: “Bioactivity of tenuazonic acid and its production

control mechanism in *Magnaporthe oryzae*”, *3rd RIKEN-SNU symposium*, 2014. 4. 21, RIKEN, Wako, Saitama, Japan

6. 研究組織

(1) 研究代表者

本山 高幸 (MOTOYAMA, Takayuki)
理化学研究所・環境資源科学研究センター・専任研究員
研究者番号: 70291094

(2) 研究分担者

廣田 洋 (HIROTA, Hiroshi)
理化学研究所・理研-KRIBB 連携研究ユニット・客員研究員
研究者番号: 00126153