

令和 5 年 6 月 7 日現在

機関番号：13801

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2019～2022

課題番号：19K22330

研究課題名(和文)フェアリーリング病における子実体形成メカニズム解明

研究課題名(英文)Elucidation of fruiting body formation mechanism in fairy ring disease

研究代表者

崔 宰燾 (CHOI, JAE-HOON)

静岡大学・グローバル共創科学部・准教授

研究者番号：40731633

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：「妖精が輪を作ってその中で踊る」と伝えられてきたフェアリーリングについてフェアリーリングという未解明な生命現象を説明する分子群をキノコから発見したことで、その謎解きに終止符が打たれた。本研究では、コムラサキシメジとシバとの共存培養により、両者の成長が促進されることが明らかになっている。そこで、まずはシバの成長促進の要因となっている遺伝子を同定することを目的として、コムラサキシメジとの共存によって、シバで発現が変動する遺伝子をRNA-seqによって解析した。また、フェアリー化合物の産生量が多い条件では一酸化窒素合成酵素(NOS)遺伝子の発現が上がるということが明らかになっている。

研究成果の学術的意義や社会的意義

キノコに関わるホルモンあるいは作用機構を明らかにできれば、天然物化学・基礎生物学等における学術的成果は極めて大きい(Nature, Scienceに掲載可能)。また、キノコの発生を人為的に制御(一日当たりのキノコ発生量を制御)することは現時点では不可能である。キノコの発生を自由に促進あるいは抑制することができれば商業的キノコ栽培に対する貢献は大きい。加えて、これまで不可能であったトリュフやマツタケの人工栽培への道を開き、産業、社会に与えるインパクトも極めて大きい。

研究成果の概要(英文)：A group of molecules has been discovered in mushrooms that put an end to the mystery of fairy rings, an unexplained life phenomenon that has been reported as "fairies dancing in a circle. In this study, it has been shown that co-cultivation of *Lepista sordida* and bentgrass promotes the growth of both. Therefore, we first used RNA-seq to analyze the genes whose expression was altered in shiva upon co-cultivation with *L. sordida* with the aim of identifying the genes involved in the promotion of shiva growth. It has also been shown that the expression of nitric oxide synthase (NOS) genes increases under conditions of high production of fairy chemicals.

研究分野：天然物化学

キーワード：フェアリーリング キノコ 相互作用 シバ

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

「妖精が輪を作ってその中で踊る」と伝えられてきたフェアリーリングについて、研究代表者らがフェアリーリングという未解明な生命現象を説明する分子群をキノコから発見したことで、その謎解きに終止符が打たれた。一方、フェアリーリング上でキノコが発生する際には、芝からの化学シグナル(子実体形成物質)が分泌される可能性があるが、その分子は全く不明である。

2. 研究の目的

公園やゴルフ場などで芝生が輪状に周囲より色濃く繁茂し、時には逆に輪状に成長が抑制され、後にその輪の上にキノコが発生する現象があり、「フェアリーリング病」と呼ばれている。研究代表者らは、フェアリーリング形成菌であるコムラサキシメジから、植物の成長を制御する AHX と ICA を発見した。AHX の植物体内での代謝産物として AOH を見出した。この研究を紹介した Nature の記事のタイトルから、これら 3 種の化合物をフェアリー化合物と命名した。一方、フェアリーリング上でキノコが発生する際には、芝からの化学シグナルが分泌される可能性があるが、その分子は全く不明である。本研究では、フェアリーリング形成菌を芝に人工的に感染させ、未解明領域の感染過程の 2 次代謝産物・遺伝子を解析し、感染から子実体発生に至る分子機構の解明を試みた。以上の研究を行うことによって、フェアリーリング病の「本質」を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

研究代表者が発見したフェアリー化合物の生産株コムラサキシメジ及び NBRC に登録されているフェアリーリング形成菌(オオムラサキシメジの共通・特異的なフェアリーリング病のメカニズムを天然物化学とバイオインフォマティクス手法を用い、全容解明を試みた。

(1) 共存に関わるシグナル分子の探索: 既に確立した方法を用い、液体培地で 2 週間培養したフェアリーリング形成菌系体を培養土にて 2 週間生育した芝に植菌し、共存培養した。単独培養と共存培養で培養した芝と菌糸を抽出し、HPLC で化学シグナル分子の比較解析を行った。

活性試験を指標として菌糸体生育制御物質(キノコ形成物質)の単離・構造決定を試みた。

(2) 共存に関わる遺伝子の網羅的解析: 単独培養と共存培養、感染過程において発現する遺伝子を網羅的に探索と比較を行うため、次世代シーケンサー(MiSeq)を用いた解析を行った。

(3) フェアリーリング形成菌のゲノム解析: コムラサキシメジのほか、ヒダハタケのゲノムが解読されているが、その他オオムラサキシメジのゲノムを解読した。これまでに、化学シグナル分子の合成に関与する遺伝子はフェアリーリング形成菌に特徴的な構造を有していることから、その構造的特徴が広くフェアリーリング形成菌に保存されているかを検討した。

4. 研究成果

本研究では、フェアリーリング形成菌を芝に人工的に感染させ、その感染過程を 2 次代謝産物・遺伝子を解析し、感染から子実体発生に至る分子機構の解明を試みた。研究代表者らは、フェアリーリングを形成するコムラサキシメジ(*Lepista sordida*)のドラフトゲノム配列を決定し、データベースで公開している(Takano et al., <http://bioinf.mind.meiji.ac.jp/f-rings/>)。本研究では、まず RNA-seq のデータを用いて、このゲノム配列の遺伝子予測の修正を行った。BUSCO (<https://busco.ezlab.org/>)により予測精度を検証したところ、網羅性を 88.3% から 96.8% にまで高めることに成功した。コムラサキシメジはフェアリー化合物の骨格を構成する窒素原子の供給源の候補である。一酸化窒素(NO)を産生する一酸化窒素合成酵素(NOS)に相同性のあるタンパク質をコードする遺伝子を 8 個もっていることを明らかにした。詳細な分子系統解析を行ったところ、これらの NOS 様タンパク質はこれまでに知られている NOS とは系統的に分かれた子嚢菌型のファミリーであり、担子菌ではコムラサキシメジ属 3 種のみが存在していることが明らかになった。そこで、NO 代謝に関わる他の遺伝子を探索したところ、シトクロム P450 スーパーファミリーに属する一酸化窒素還元酵素をコードする遺伝子が 2 個存在していることが明らかになった。一方、同属のムラサキシメジとオオムラサキシメジには 1 個しか存在していなかった。シトクロム P450 は一般的にはモノオキシゲナーゼとして機能するが、P450nor は一酸化窒素を還元して一酸化二窒素(亜酸化窒素; N_2O)を産生する反応を触媒するという特有の機能をもつ酵素である。P450nor は子嚢菌では植物病原性糸状菌である *Fusarium oxysporum* から初めて単離され、子嚢菌には広く存在することが明らかになっている。フェアリーリング形成やコムラサキシメジとシバの相互作用においてこれらの酵素が関与しているかどうかを調べる必要があると考えられる。また、菌類とシバとの共存培養法の確立に成功した。コムラサキシメジとシバとの共存培養はそれぞれの単独培養よりも、芝と菌糸体の生育促進が観察された。コムラサキシメジとシバ(ベントグラス)との共存培養により、両者の成長が促進されることが明らかになっている。そこで、まずはシバの成長促進の要因となっている遺伝子を同定することを目的と

して、コムラサキシメジとの共存によって、シバで発現が変動する遺伝子を RNA-seq によって解析した。ベントグラスはゲノム配列が決定されていないため、RNA-seq データの De novo アセンブリによりリファレンス配列の作成を試みた結果、網羅性が 98.1% に達する転写産物セットを作成することができた。これをリファレンスとして、トランスクリプトーム解析により、単独培養したシバとコムラサキシメジと共存培養したシバで発現している遺伝子を網羅的に比較した。その結果、ジベレリン、サリチル酸、エチレンなどの植物ホルモンの生合成に関わる遺伝子やオーキシンのトランスポーター、オーキシシンやアブシジン酸、ジャスモン酸によって発現が誘導されるタンパク質等、植物ホルモンに関わる遺伝子の発現が変動していることが明らかになった。また、コムラサキシメジと共存することによって発現が顕著に上昇する遺伝子として、複数のフルクトシルトランスフェラーゼ、ユビキチン、グルタチオン S-トランスフェラーゼ (GST) が検出された。ユビキチンや GST は様々な生命現象に関与する多機能タンパク質であるため、現時点ではシバの成長促進における生理機能は不明であるが、植物ホルモンとのクロストークや関連する遺伝子の発現の変化等により、シバの成長促進にこれらのタンパク質が関与しているかどうかを明らかにする必要がある。コムラサキシメジから芝に対する成長調節活性を有する化合物を探索したところ、新たな 2 次代謝産物を単離することに成功した。現在、詳細な構造決定のために、分析している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Ito Akinobu, Choi Jae-Hoon, Yokoyama-Maruyama Waki, Kotajima Mihaya, Wu Jing, Suzuki Tomohiro, Terashima Yurika, Suzuki Hyogo, Hirai Hirofumi, Nelson David C., Tsunematsu Yuta, Watanabe Kenji, Asakawa Tomohiro, Ouchi Hitoshi, Inai Makoto, Dohra Hideo, Kawagishi Hirokazu	4. 巻 20
2. 論文標題 1,2,3-Triazine formation mechanism of the fairy chemical 2-azahypoxanthine in the fairy ring-forming fungus <i>Lepista sordida</i>	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Organic & Biomolecular Chemistry	6. 最初と最後の頁 2636 ~ 2642
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1039/D20B00328G	査読の有無 有
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 該当する

1. 著者名 Choi Jae-Hoon, Suzuki Tomohiro, Ono Akiko, Kotajima Mihaya, Tanaka Yuki, Suzuki Toshiyuki, Kawagishi Hirokazu, Dohra Hideo	4. 巻 7
2. 論文標題 The complete mitochondrial genome sequence of the fairy ring-forming fungus <i>Lepista sordida</i>	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Mitochondrial DNA Part B	6. 最初と最後の頁 712 ~ 714
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1080/23802359.2022.2067496	査読の有無 有
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19件（うち招待講演 1件/うち国際学会 3件）

1. 発表者名 竹村太秀, 崔宰熏, 近藤満, 稲井誠, 大内仁志, 浅川倫宏, 菅敏幸, 平井浩文, 河岸洋和
2. 発表標題 フェアリー化合物の生合成に関わる新規プリン代謝
3. 学会等名 第190回日本農芸化学会中部支部例会
4. 発表年 2021年 ~ 2022年

1. 発表者名 竹村 太秀, 崔 宰熏, 成川 礼, 大西 利幸, 平井 浩文, 菅 敏幸, 河岸 洋和
2. 発表標題 植物成長調節物質であるフェアリー化合物の生合成に関連した新規プリン代謝
3. 学会等名 植物化学調節学会 第56回大会
4. 発表年 2021年 ~ 2022年

1. 発表者名 崔宰薫
2. 発表標題 菌類と植物とのクロストークに関する化学的研究
3. 学会等名 第3回静岡県三大学連携シンポジウム
4. 発表年 2021年～2022年

1. 発表者名 Hirohide Takemura; Jaehoon Choi; Makoto Inai; Tomohiro Asakawa; Hitoshi Ouchi; Keiji Fushimi; Rei Narikawa; Toshiyuki Ohnishi; Mitsuru Kondo; Hirofumi Hirai; Toshiyuki Kan; Hirokazu Kawagishi
2. 発表標題 Fairy chemicals, new plant growth regulators biosynthesized in novel purine metabolism
3. 学会等名 Pacifichem 2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年～2022年

1. 発表者名 Mihaya Kotajima; Akinobu Ito; Jaehoon Choi; Hideo Dohra; Tomohiro Suzuki; Shinji Tokuyama; Hirofumi Hirai; Tomohiro Asakawa; Hitoshi Ouchi; Makoto Inai; Toshiyuki Kan; Hirokazu Kawagishi
2. 発表標題 Biosynthetic studies on fairy chemicals in the fungus <i>Lepista sordida</i>
3. 学会等名 Pacifichem 2021 (国際学会)
4. 発表年 2021年～2022年

1. 発表者名 Jaehoon Choi
2. 発表標題 Chemical studies on substances involved in the crosstalk between <i>Lepista sordida</i> and turfgrass
3. 学会等名 The 1st SU-CNU Joint Symposium (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年～2022年

1. 発表者名 古田島美颯, 崔宰燾, 呉静, 道羅英夫, 平井浩文, 稲井誠, 大内仁志, 河岸洋和
2. 発表標題 コムラサキシメジが有する新規プリン代謝経路の解明
3. 学会等名 日本キノコ学会
4. 発表年 2021年～2022年

1. 発表者名 鈴木 兵梧, 伊藤 彰将, 崔 宰燾, 鈴木 智大, 平井 浩文, 道羅 英夫, 河岸 洋和
2. 発表標題 コムラサキシメジ(<i>Lepista sordida</i>)における2-azahypoxanthine の生合成研究
3. 学会等名 日本農芸化学会
4. 発表年 2021年～2022年

1. 発表者名 鈴木 海斗, 住田 真晟, 崔 宰燾, 道羅 英夫, 平井 浩文, 河岸 洋和
2. 発表標題 シバとコムラサキシメジの共存培養によるフェアリーリング形成の分子機構解明の試み
3. 学会等名 日本農芸化学会
4. 発表年 2021年～2022年

1. 発表者名 伊藤 綾乃, 鈴木 智大, 崔宰燾, 青木 大地, 野村 崇人, 岡本 昌憲, 河岸 洋和
2. 発表標題 フェアリー化合物の作用機序解明に向けたシロイヌナズナ有用系統の探索
3. 学会等名 日本農芸化学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Ayano Ito, Tomohiro Suzuki, Jae-hoon Choi, Daichi Aoki, Yudai Tsutsumi, Takahito Nomura, Masanori Okamoto, Hirokazu Kawagishi
2. 発表標題 Screening for highly sensitive ecotypes of <i>Arabidopsis thaliana</i> against fairy chemicals
3. 学会等名 日本分子生物学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 住田 真晟、呉 静、崔 宰燾、伊藤 彰将、平井 浩文、 河岸 洋和
2. 発表標題 コムラサキシメジ菌糸体培養濾液由来の植物成長調節物質の探索
3. 学会等名 日本農芸化学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 古田島 美颯、崔 宰燾、呉 静、謝 肖男、木村 洋子、道羅 英夫、大西 利幸、平井 浩文、浅川 倫宏、大内 仁志、稲井 誠、菅 敏幸、河岸 洋和
2. 発表標題 ICAの代謝産物であるS-ICAr-Hの存在意義についての研究
3. 学会等名 日本農芸化学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 小椋隆平、呉 静、崔 宰燾、平井 浩文、 河岸 洋和
2. 発表標題 オオシロカラカサタケ培養濾液由来の生体機能性物質の探索
3. 学会等名 日本農芸化学会
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 渥美 有矢、竹村 太秀、呉 静、崔 宰熏、平井 浩文、近藤 満、浅川 倫宏、稲井 誠、菅敏幸、河岸 洋和
2. 発表標題 フェアリー化合物の安定性と分解産物に関する化学的研究
3. 学会等名 日本農芸化学会
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 住田 真晟、呉 静、崔 宰熏、平井 浩文、河岸 洋和
2. 発表標題 コムラサキシメジ菌糸体培養濾液由来の植物成長調節物質の探索
3. 学会等名 日本農芸化学会
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 Apirati Sukprasitchai, Ayaka Kikuchi, Jae-Hoon Choi, Hirokazu Kawagishi, Shinji Tokuyam
2. 発表標題 Conversion of 2-Azahypoxanthine (AHX) to 2-Aza-8-oxohypoxanthine (AOH) by resting cells of <i>Buttiauxella</i> sp. A111
3. 学会等名 日本農芸化学会
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 稲木 僚、竹村 太秀、崔 宰熏、堤 祐司、平井 浩文、河岸 洋和
2. 発表標題 植物におけるフェアリー化合物 2-azahypoxanthine の代謝酵素に関する生化学的研究
3. 学会等名 日本農芸化学会
4. 発表年 2019年～2020年

1. 発表者名 崔 宰薫、與五澤 薫、平井 浩文、松浦 英幸、堀越 秀、佐分利 亘、森 春英、河岸 洋和
2. 発表標題 イネにおけるフェアリー化合物の代謝に関する化学的研究
3. 学会等名 日本農芸化学会
4. 発表年 2019年～2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

生物化学研究室のhomepage https://shizudai-biological-chemistry.labby.jp/

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	道羅 英夫 (Dora Hideo) (10311705)	静岡大学・理学部・教授 (13801)	
研究分担者	鈴木 智大 (Suzuki Tomohiro) (10649601)	宇都宮大学・バイオサイエンス教育研究センター・准教授 (12201)	

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
---------	---------