

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 29 日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2011～2014

課題番号：23580125

研究課題名(和文)糸状菌の環境応答攪乱による休眠二次代謝遺伝子クラスター覚醒

研究課題名(英文)Fungal silent secondary metabolite gene cluster activation by disturbance of environmental responses

研究代表者

本山 高幸(Motoyama, Takayuki)

独立行政法人理化学研究所・長田抗生物質研究室・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) 4,100,000円

研究成果の概要(和文)：イネいもち病菌を用いて環境応答情報伝達系を攪乱することにより、ネクトリアピロン類とテヌアゾン酸の生産誘導を可能にした。一方、エピジェネティック制御化合物はこれらの二次代謝産物の生産誘導を引き起こさなかった。テヌアゾン酸の生産誘導は糸状菌二次代謝のグローバル制御因子を介していることが明らかとなった。ネクトリアピロン類とテヌアゾン酸の生合成遺伝子を同定し、これら化合物がイネいもち病菌感染に必須ではないこと及びテヌアゾン酸がイネいもち病防除効果を示すことを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：By disturbance of the signal transduction systems for environmental signals, we have enabled induced production of nectriapyrones and tenuazonic acid in the rice blast fungus. In contrast, epigenetic control compounds could not cause induced production of these secondary metabolites. We found that the induced production of tenuazonic acid is caused via a LaeA ortholog, a global regulator of fungal secondary metabolism. We have succeeded in identifying the biosynthetic gene for nectriapyrones and tenuazonic acid and revealed that these compounds are not essential for infection of the rice blast fungus. Tenuazonic acid showed rice blast disease suppression activity.

研究分野：応用微生物学

キーワード：イネいもち病菌 天然化合物 シグナル伝達 生合成 農薬

1. 研究開始当初の背景

糸状菌はペニシリンやスタチン等、二次代謝産物の宝庫である。糸状菌ゲノムの相次ぐ解読により、糸状菌は当初の予想より遙かに多くの二次代謝遺伝子を持つことが明らかになったが、大部分は実験室条件では発現しない休眠遺伝子であり、利用できない。休眠遺伝子覚醒が可能になれば、天然化合物のレパートリーを劇的に増やし、医薬や農薬の開発を促進できる。また、糸状菌が潜在的に生産可能な二次代謝産物を見出すことは、棲息する環境中でのサバイバルメカニズムの解明と糸状菌コントロールへの応用に役立つ。本研究では、休眠二次代謝遺伝子を強制的に覚醒させ、利用・解析可能にするアプローチを提案した。

2. 研究の目的

(1) 糸状菌の環境応答を攪乱し、休眠二次代謝遺伝子クラスターを強制的に覚醒させる

二成分情報伝達系因子攪乱で休眠遺伝子覚醒し、代謝物変化を明らかにする。

主要な環境応答情報伝達系因子である MAP キナーゼの情報伝達系攪乱で休眠遺伝子覚醒し、代謝物変化を明らかにする。

光応答情報伝達系因子 (LaeA) 攪乱で休眠遺伝子覚醒し、代謝物変化を明らかにする。

化合物処理により環境応答攪乱し、休眠遺伝子覚醒する。

(2) 覚醒させた二次代謝遺伝子クラスターが生産する化合物の構造を明らかにする

上記の様々な方法で休眠遺伝子覚醒し、蓄積させた代謝物の構造を明らかにする。

蓄積した代謝物がどの二次代謝遺伝子クラスターで生産されるかを明らかにする。

(3) 休眠二次代謝遺伝子クラスター発現制御メカニズムを明らかにする

二次代謝遺伝子クラスター覚醒化合物が取得できた場合は、作用機構に関する知見を得る。

環境応答攪乱による休眠遺伝子覚醒が、染色体レベルのエピジェネティック制御によりなされているかどうかを明らかにする。

環境応答攪乱による休眠遺伝子覚醒が、進化的に離れた糸状菌でも可能かどうか明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 糸状菌の環境応答を攪乱し、休眠二次代謝遺伝子クラスターを覚醒させる (担当: 本山)

休眠二次代謝遺伝子クラスターを覚醒させるために、環境応答情報伝達系因子の遺伝子操作と天然化合物処理を行う。既にいくつかの遺伝子操作株で、新たな代謝物を作ることを見出しているが、それらの解析を進めるとともに新たな条件での休眠遺伝子覚醒をおこなう。

(2) 覚醒させた二次代謝遺伝子クラスターが作る化合物を明らかにする (担当: 本山、廣田)

遺伝子操作と天然化合物処理により覚醒させた遺伝子クラスターが何を生産するか明らかにする。蓄積量が多くない場合は、イネいもち病菌の主要な二次代謝産物であるメラニンの生合成遺伝子を破壊したクリーンホスト (作成済) を用いて、代謝物の精製を容易にする。化合物の構造決定は NMR 構造解析のエキスパートである廣田 (研究分担者) が担当する。

(3) 休眠二次代謝遺伝子クラスター発現制御メカニズムの解析 (担当: 本山)

天然化合物による休眠遺伝子覚醒では、覚醒メカニズムが不明であるため、まず天然化合物の作用機構の解析を行う。更に環境応答攪乱による覚醒が染色体レベルのエピジェネティック制御によるものであるかどうか明らかにして、最後に覚醒メカニズムの一般性について解析する。

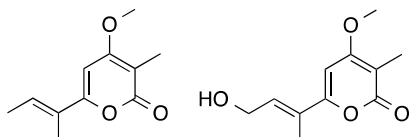
4. 研究成果

(1) 二成分情報伝達系攪乱による二次代謝産物生産誘導

ネクトリアピロン生産誘導と生合成遺伝子同定

モデル植物病原糸状菌であるイネいもち病菌を用いて、環境応答に關与する二成分情報伝達系因子の遺伝子破壊株を作製し、環境応答攪乱による二次代謝産物生産誘導が可能かどうかを検討した。真核生物の二成分情報伝達系はヒスチジンキナーゼ、リン酸リレーを仲介する HPt、レスポンスレギュレーター の 3 成分からなる。HPt 遺伝子 *MoYPD1* を破壊することにより二成分情報伝達系を攪乱して、二次代謝産物生産への影響を解析することにした。ただし、HPt 遺伝子破壊により下流の p38 MAP キナーゼ (p38 MAPK) OSM1 が常時活性化されて致死的になることが予想されたため、OSM1 の遺伝子破壊株 *osm1* を作製した後に、HPt 遺伝子破壊を行い、二重遺伝子破壊株 *osm1 Moypd1* を作製した。この HPt 遺伝子破壊株を用いて、二次代謝産物の解析を行った。HPt 遺伝子破壊株の培養液中で二つの代謝産物の生産が誘導されていることを見出した。これらの代謝産物を精製して、質量分析及び NMR による構造決定を行った。一つは、イネいもち病菌と近縁の植物内共生菌 (エンドファイト) 等での生産が報告されているポリケタイド化合物ネクトリアピロンであり、もう一つはその水酸化類縁体で新規物質である水酸化ネクトリアピロンであることが明らかとなった (図 1)。ネクトリアピロンの生産をイネいもち病菌で確認したのは初めてである。以上の結果から、環境応答攪乱による二次代謝産物生産誘導が可能であることが明らかとなった。DNA マ

マイクロアレイ等を用いた解析により、これら化合物の生合成遺伝子クラスターを同定することに成功した。ネクトリアピロン類の生合成遺伝子クラスターを同定したのは初めてである。今後、イネいもち病菌やエンドファイトにおけるネクトリアピロンの役割についての解析が可能になる。



ネクトリアピロン 水酸化ネクトリアピロン

図1 ネクトリアピロン類の化学構造

テヌアゾン酸生産誘導と生合成遺伝子同定

二成分情報伝達系で働く p38 MAPK の遺伝子破壊あるいは DMSO 処理によりポリケチド-非リボソームペプチド融合化合物テヌアゾン酸が生産誘導されることを見出した(図2)。テヌアゾン酸は *Alternaria* 属糸状菌等が生産するかび毒として知られており、タンパク質合成を阻害する。DNA マイクロアレイ等を用いた解析によりテヌアゾン酸の生合成遺伝子クラスターを同定することに成功した。テヌアゾン酸生合成遺伝子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。テヌアゾン酸は 1957 年の発見以来かび毒として注目されてきた化合物であるが、生合成遺伝子クラスターを同定したのは初めてである。テヌアゾン酸生合成遺伝子のホモログは様々な糸状菌ゲノム中から見出される。テヌアゾン酸生合成酵素は新規のドメイン構造を持つユニークな酵素であることから、今後、様々な糸状菌由来のホモログ遺伝子を用いることで、新規のテヌアゾン酸類縁化合物を取得できる可能性がある。

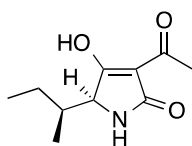


図2 テヌアゾン酸の化学構造

(2) MAPK 情報伝達系攪乱による二次代謝産物生産誘導

二つの MAPK 遺伝子 (*PMK1*, *MPS1*) の遺伝子破壊株及び大量発現株を作製し、代謝物を解析した結果、両遺伝子とも大量発現株でテヌアゾン酸の生産誘導が認められ、これらの MAPK の二次代謝制御への関与が明らかとなった。今後、RNA-seq 等による解析を行うことにより、様々なテヌアゾン酸生産誘導条件の間の詳細な比較が可能になる。

(3) 化合物による二次代謝産物生産誘導

レポーター系を用いた二次代謝活性化化合物探索

休眠遺伝子覚醒を行う活性を持つ化合物

を探索するために、二次代謝産物生合成の鍵遺伝子のプロモーターを用いた GUS レポーター株を 6 種類作製した。PKS-NRPS 遺伝子プロモーターを用いた GUS レポーター株を用いた約 400 化合物からの活性化化合物探索ではヒット化合物が得られなかった。更に、高レベルで発現する PKS 遺伝子 *MGG_10912* のプロモーターを用いた GUS レポーター株の解析で、イネいもち病菌での GUS レポーター系の感度が低いことが明らかになった。以上の結果から、イネいもち病菌は GUS レポーター系を用いた探索には向かないことが示唆された。

化合物アレイを用いた二次代謝活性化化合物探索

理研天然化合物バンク NPDepo の約 3 万化合物の中から化合物アレイによる探索により p38 MAPK と Hpt に対する結合化合物を取得した。p38 MAPK 結合化合物がテヌアゾン酸生産誘導活性を示すことを見出した。これらの化合物は、他の糸状菌で二次代謝産物生産誘導を引き起こすことができる可能性がある。

(4) 二次代謝産物の生産制御メカニズムの解析

エピジェネティック制御との関連の解析

二成分情報伝達系攪乱によるネクトリアピロンやテヌアゾン酸の生産誘導とエピジェネティックな制御との関連を解析するために、野生型株をヒストン脱アセチル化酵素阻害剤 (SAHA) や DNA メチル化阻害剤 (5-azacytidine) で処理したが、生産誘導は認められなかった。この結果から、二成分情報伝達系攪乱株では、これらの化合物による生産誘導とは異なるメカニズムで二次代謝産物が生産誘導されていることが示唆された。

糸状菌二次代謝のグローバルレギュレーターとの関連の解析

糸状菌二次代謝のグローバルレギュレーター *LaeA* のテヌアゾン酸生産誘導への関与を解析するため、イネいもち病菌のオルソログ遺伝子 *LAE1* を破壊したところ DMSO 処理によるテヌアゾン酸生産誘導が起こらなくなり、大量発現させたところ DMSO 非存在下でも生産誘導が起こるようになり、テヌアゾン酸生産への *LAE1* の関与が明らかになった。p38 MAPK 遺伝子 (*OSM1*) 破壊株でのテヌアゾン酸生産誘導への *LAE1* の関与を解析するために、*OSM1* と *LAE1* の二重遺伝子破壊株を作製したところ、この株ではテヌアゾン酸の生産誘導が起こらなくなり、p38 MAPK 遺伝子破壊によるテヌアゾン酸生産誘導は *LAE1* を介して起きていることが明らかになった。p38 MAPK が *LaeA* オルソログの制御に関与していることは現在まで報告がない。今後、更に詳細な解析を行うことにより、糸状菌の二次代謝制御メカニズム解明に貢献できると考えられる。

(5) 生産誘導された二次代謝産物の機能の解析

ネクトリアピロン及びテヌアゾン酸の生合成遺伝子破壊株ではいずれもイネに対する病原性の低下が認められなかった。この結果から、ネクトリアピロンとテヌアゾン酸はイネいもち病菌の病原性には必須ではないことが示された。テヌアゾン酸の生理活性を更に解析するため、バクテリア及び菌類に対する抗菌活性を評価したが、特に強い活性を示すことはなかった。一方、イネいもち病菌とテヌアゾン酸を同時にイネに散布すると、イネいもち病菌のイネに対する感染能の低下が観察された。これらの結果から、テヌアゾン酸はイネいもち病菌の生育を阻害せずに、感染を阻害する効果を持つことが示唆された。今後、テヌアゾン酸の生産を制御することにより、イネいもち病菌の感染を制御することができるようになる可能性がある。

(6) 二次代謝制御メカニズムの一般性の解析

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とシラクタエン生産菌で *LaeA* オルソログの遺伝子破壊を行うと、それぞれテルペンドールとルシラクタエンの生産が消失した。この結果から、テルペンドールとルシラクタエンはテヌアゾン酸と同様に *LaeA* オルソログにより生産制御されていることが明らかとなった。次に、テルペンドール生産菌で p38 MAPK 遺伝子を破壊したところ、テルペンドール生産が低下し、イネいもち病菌で p38 MAPK 遺伝子破壊を行うとテヌアゾン酸の生産誘導が引き起こされるのとは対照的な結果になった。また、ルシラクタエン生産菌において、ハイグロマイシン B がルシラクタエンとメラニンの生産を誘導することを見出した。ハイグロマイシン B はイネいもち病菌においても、メラニン等の生産を誘導した。以上の結果より、二次代謝産物生産制御メカニズムには共通の部分と共通ではない部分があることが明らかになった。

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7件)

- (1) 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.
- (2) Hongo, Y., Nakamura, T., Takahashi, S.,

Motoyama, T., Hayashi, T., Hirota, H., Osada, H., and 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.

- (3) Tarui, Y., Chinen, T., Nagumo, Y., Motoyama, T., Hayashi, T., Hirota, H., Muroi, M., Ishii, Y., Kondo, H., Osada, H., Usui, T.: "Terpendole E and its derivative inhibit STLC- and GSK-1-resistant Eg5", *Chembiochem* (査読有), **15**: 934-938 (2014).

DOI: 10.1002/cbic.201300808.

- (4) 本山高幸, 植木雅志, 長田裕之: 「インドールジテルペンかび毒生合成経路の解明とテルペンドール E の鍵中間体としての位置づけ」, *JSM Mycotoxins* (査読有), **64**: 75-86 (2014).

DOI: 10.2520/myco.64.75.

- (5) Nakajima, Y., Kawamura, T., Maeda, K., Ichikawa, H., Motoyama, T., Kondo, Y., Saito, T., Kobayashi, T., Yoshida, M., Osada, H., and Kimura, M.: "Identification and characterization of an inhibitor of trichothecene 3-O-acetyltransferase, TRI101, by the chemical array approach", *Biosci. Biotechnol. Biochem.* (査読有), **77**: 1958-1960 (2013).

DOI: 10.1271/bbb.130153.

- (6) Motoyama, T., Hayashi, T., Hirota, H., Ueki, M., and Osada, H.: "Terpendole E, a kinesin Eg5 inhibitor, is a key biosynthetic intermediate of indole-diterpenes in the producing fungus *Chaunopycnis alba*", *Chemistry & Biology* (査読有), **19**: 1611-1619 (2012).

DOI: 10.1016/j.chembiol.2012.10.010.

- (7) Tajul, M.I., Motoyama, T., Hatanaka, A., Sariah, M., Osada, H.: "Green-odour compounds have antifungal activity against the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*", *Eur. J. Plant Pathol.* (査読有), **132**: 91-100 (2012).

DOI: 10.1007/s10658-011-9851-x.

[学会発表](計22件)

- (1) 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)。
- (2) 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).
- (3) 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系状菌 *Fusarium* sp. RK97-94 における二次代謝産物生産誘導」, 第 14 回系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).
- (4) 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 回系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).
- (5) 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) 前田 一行, 中嶋 佑一, 近藤 恭光, 斉藤 臣雄, 本山 高幸, 長田 裕之, 金丸 京子, 小林 哲夫, 木村 真: 「化合物アレイを用いたトリコジエンシンターゼ阻害剤の探索」, 日本農芸化学会 2014 年度大会, 2014.3.28, 東京.
- (7) 加藤 翔, 本山 高幸, 林 敏明, 廣田 洋, 鎌倉 高志, 長田 裕之: 「系状菌 *Fusarium* sp. RK97-94 のルシラクタエン生合成遺伝子クラスターの解析」, 日本農芸化学会 2014 年度大会, 2014.3.28, 東京.
- (8) 本山 高幸, 尹 忠銖, 二村 友史, 廣田 洋, 長田 裕之: 「系状菌の情報伝達系攪乱による二次代謝活性化及び生産誘導される化合物の解析」, 日本農芸化学会 2014 年度大会, 2014.3.29, 東京.
- (9) Choong-Soo Yun, Takayuki Motoyama, Hiroyuki Osada: “Induced production of a PK-NRP hybrid compound and its production control mechanism in *Magnaporthe oryzae*”, The 7th Japan-Korea Chemical Biology Symposium, 2014.2.10, Jeju, Korea
- (10) 加藤 翔, 本山 高幸, 廣田 洋, 鎌倉 高志, 長田 裕之: 「系状菌 *Fusarium* sp. RK97-94 のルシラクタエン生合成遺伝子クラスター中のメチル基転移酵素遺伝子 *luc1* とトランスポーター遺伝子 *luc4* の機能解析」, 第 13 回系状菌分子生物学コンファレンス, 2013.11.21, つくば.
- (11) 尹 忠銖, 本山 高幸, 二村 友史, 長田 裕之: 「イネいもち病菌におけるテヌアゾン酸の生産制御メカニズム及び生理活性」, 第 13 回系状菌分子生物学コンファレンス, 2013.11.21, つくば.
- (12) 本山 高幸, 長田 裕之: 「かび毒テルペンドールの生産制御メカニズム」, 第 13 回系状菌分子生物学コンファレンス, 2013.11.20, つくば.
- (13) 本山 高幸, 植木 雅志, 長田 裕之: 「系状菌のテルペンドール生合成経路の解明と生理活性物質生産への応用」日本生物工学会 2013 年度大会, 2013.9.19, 広島.
- (14) Kato, S., Motoyama, T., Hirota, H., Kamakura, T., Osada, H.: “Functional analysis of the *luc1* and *luc4* genes in the lucilactaene biosynthesis gene cluster of the producing fungus *Fusarium* sp. RK97-94”, KRIBB-RIKEN Chemical Biology Joint Symposium, Ochang, Korea, 29 May, 2013.
- (15) 本郷 やよい, 中村 健道, 高橋 俊哉, 本山 高幸, 林 敏明, 廣田 洋, 長田 裕之, 越野 広雪: 「ESI-MS 分析で観測される Terpendole イオンの酸化とその抑制」, 日本農芸化学会 2013 年度大会, 2013.3.24-27, 仙台.
- (16) 加藤 翔, 本山 高幸, 林 敏明, 廣田 洋, 田中 彰, 安藤 直子, 鎌倉 高志, 長田 裕之: 「系状菌 *Fusarium* sp. RK97-94 のルシラクタエン生合成遺伝子クラスター中のトランスポーターおよびメチル基転移酵素遺伝子の機能解析」, 日本農芸化学会 2013 年度大会, 2013.3.24-27, 仙台.
- (17) 尹 忠銖, 本山 高幸, 林 敏明, 廣田 洋, 長田 裕之: 「系状菌 *Magnaporthe oryzae* の二成分情報伝達系攪乱によるテヌアゾン酸の生産誘導」, 日本農芸化学会 2013 年度大会, 2013.3.24-27, 仙台.
- (18) 本山 高幸, 林 敏明, 廣田 洋, 長田 裕之: 「系状菌の二成分情報伝達系攪乱により生産誘導されるポリケタイド化合物の生合成遺伝子クラスターの同定」, 日本農芸化学会 2013 年度大会, 2013.3.24-27, 仙台.
- (19) 尹 忠銖, 本山 高幸, 林 敏明, 廣田 洋, 長田 裕之: 「イネいもち病菌の二成分情報伝達系攪乱による PK-NRP 融合化合物生産誘導」, 第 12 回系状菌分子生物学コンファレンス, 2012.11.13-14, 名古屋.
- (20) 本山 高幸, 林 敏明, 廣田 洋, 長田 裕之: 「イネいもち病菌の二成分情報伝達系攪乱によるポリケタイド化合物生産誘導」, 第 12 回系状菌分子生物学コンファレンス, 2012.11.13-14, 名古屋.
- (21) 本山 高幸, 林 敏明, 廣田 洋, 長田 裕之: 「イネいもち病菌の二成分情報伝達系攪乱による二次代謝産物生産誘導」, 日本農芸化学会 2012 年度大会, 2012.3.23, 京都女子大学(京都府).
- (22) 田中 彰, 本山 高幸, 林 敏明, 廣田 洋, 安藤 直子, 長田 裕之: 「ルシラクタエン生合成遺伝子クラスターの解析」, 第 11 回系状菌分子生物学コンファレンス, 2011.11.16, 東京大学弥生講堂(東京都).

6. 研究組織

(1) 研究代表者

本山 高幸 (MOTOYAMA, Takayuki)

理化学研究所・長田抗生物質研究室・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