

令和 2 年 7 月 7 日現在

機関番号：12102

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2018～2019

課題番号：18H05999・19K21142

研究課題名(和文) ウイルス 糸状菌間相互作用に基づく新規生物活性物質の探索

研究課題名(英文) Search for new biologically active compounds based on viral-fungal interaction

研究代表者

二宮 章洋(Ninomiya, Akihiro)

筑波大学・生命環境系・研究員

研究者番号：50823522

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円

研究成果の概要(和文)：糸状菌のゲノム中には、通常の培養条件では発現しない二次代謝産物の生合成遺伝子が存在する。このような遺伝子を活性化する因子として、本研究では糸状菌に感染するウイルスに着目し、ウイルス感染によって産生が誘導される二次代謝産物を探索した。その結果、トディウイルスがイネいもち病菌の毒素産生を誘導することが明らかになった。さらに、トランスクリプトーム解析を基に、ウイルス感染に伴う当該毒素の生合成遺伝子の転写調節機構を推定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は世界で初めて、ウイルス感染に伴って、糸状菌の二次代謝産物の生合成遺伝子の発現が転写レベルで正に調節されることを確認した。一部のウイルスは菌糸融合等の手法によって容易に糸状菌に導入可能であることが確認されている。従って本研究は、物質産生を活性化する内在性の因子としてウイルスを物質生産や物質探索に応用できる可能性を示す。

研究成果の概要(英文)：Fungal genome contains a large number of biosynthetic genes for secondary metabolites, most of which are hardly expressed under normal laboratory conditions. We focused on mycoviruses as an inducer of such silent genes, and searched for secondary metabolites, the production of which is promoted by viral infection. As a result, we discovered totivirus-induced mycotoxin production in a rice blast fungus. Furthermore, transcriptome analysis indicated the transcriptional regulatory mechanism of the biosynthetic gene for the toxin associated with viral infection.

研究分野：天然物化学

キーワード：イネいもち病菌 マイコウイルス 二次代謝 テヌアゾン酸

様式 C-19、F-19-1、Z-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

(1) 糸状菌の休眠遺伝子は次世代の有用物質の探索源である

糸状菌は多様な二次代謝産物を産生することから、世界初の抗生物質ペニシリンの発見以降、医薬品等の探索源として長年に亘り利用されてきた。近年、糸状菌のゲノム解析が進むにつれて、糸状菌のゲノム中には多数の未知化合物の生合成遺伝子が存在することが明らかになった。^[1]これらの遺伝子の大半は通常の条件では発現しないため、「休眠遺伝子」と呼ばれる。休眠遺伝子はポストゲノム時代の新規化合物の探索源として注目されており、休眠遺伝子を強制的に発現させる手法は複数考案されてきた。^[2]例えば、薬剤や他種微生物等の誘導因子を用いる方法、プロモーターの置換、および、生合成遺伝子の異種発現等が挙げられる。しかしながら、あらゆる遺伝子に適用できる万能な手法は存在しないため、休眠遺伝子を活性化する手法を拡充することが望まれる。

(2) 糸状菌に感染するウイルス

糸状菌にも細菌と同様にウイルスが感染することが知られており、そのようなウイルスはマイコウイルスと呼ばれる。細菌に感染するファージとは異なり、既知のマイコウイルスの大半は宿主を溶菌することなく細胞間を移行するため、共生的であると考えられている。マイコウイルスは菌糸伸長、コロニーの形態、および有性生殖等、宿主の様々な表現型に影響を与え得る。^[3]しかしながら、マイコウイルスが宿主の二次代謝に与える影響は、これまでの糸状菌の二次代謝研究においては考慮されてこなかった。研究代表者は、マイコウイルスが宿主の生理に広く影響を与え得ることに着目し、ウイルスが糸状菌の二次代謝にも影響を与えると予想した。

2. 研究の目的

先述の背景の下、申請者は糸状菌の潜在的な二次代謝を活性化する因子として、マイコウイルスを利用するという着想に至った。本研究の目的は、ウイルスが誘導する二次代謝の変化を利用して、通常の条件下では生産されない二次代謝産物を発見することである。

3. 研究の方法

(1) イネいもち病菌を用いた解析

ウイルス感染プロファイルが異なる3株のイネいもち病菌 (*Magnaporthe oryzae*) のそれぞれについて、ウイルス感染株とウイルス治癒株を準備した。ウイルス感染株/治癒株を様々な条件で培養し、高速液体クロマトグラフィー (HPLC) によってウイルス感染の有無によって産生量に変化する化合物を探索した。ウイルスが産生を誘導すると考えられる化合物を単離し、質量分析 (MS)、および核磁気共鳴 (NMR) スペクトルを基に化学構造を決定した。さらに、RNA-シーケンシング (RNA-seq) 解析によって、ウイルスが二次代謝関連遺伝子の発現に与える影響を明らかにすると共に、ウイルス感染に伴う二次代謝の制御機構を推定した。

(2) ヒト病原菌 *Aspergillus fumigatus* を用いた解析

3種のウイルス (クライソ、ナルナ、ボトウルミア) に感染した *A. fumigatus* (3重感染株) について単分生子分離をおこなうことで、クライソウイルスを欠失した株 (クライソ欠失株) を得た。3重感染株とクライソ欠失株の二次代謝プロファイルと比較することで、クライソウイルスが宿主の二次代謝に与える影響を調べた。

4. 研究成果

(1) トティウイルスはイネいもち病菌の毒素産生を誘導する

①ウイルスが毒素産生に与える影響

3種のウイルス (トティ、クライソ、パルティティ) に感染したイネいもち病菌 *M. oryzae* APU10-199A、および、当該株からトティとクライソウイルスを除いた株 APU10-199A_P^[4]を、3種類の培地で培養し、2株の間で産生量が異なる化合物を探索した。その結果、醤油白砂糖培地において APU10-199A ではカビ毒テヌアゾン酸の産生が確認できたが、APU10-199A_P では確認できなかった (図1)。テヌアゾン酸は複数の植物病原菌から報告されている毒素であり、過去に遺伝子操作と薬剤の添加によって産生が誘導されることが示されているが、^[5]内在性の因子による当該毒素の産生誘導は本研究によって初めて明らかになった。

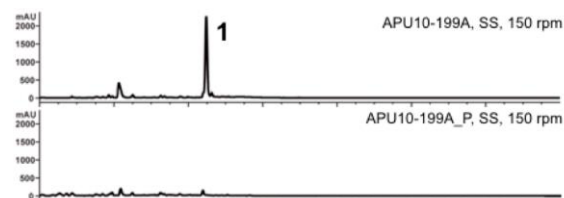


図1. 醤油白砂糖培地 (SS) で APU10-199A と APU10-199A_P を培養した時の二次代謝プロファイル。化合物1はテヌアゾン酸を示す。

②ウイルスが毒素の生合成遺伝子に与える影響

テヌアゾン酸はテヌアゾン酸生合成酵素 TAS1 によって生合成されること、および、TASI の発

現は転写因子 TAS2 によって正に制御されることが報告されている。^[6]そこで、*TAS1* と *TAS2* の発現量を APU10-199A と APU10-199A_P の間で比較したところ、いずれの遺伝子も APU10-199A の方が高いことが明らかになった。この結果から、ウイルスが転写因子の転写を活性化することで、テヌアゾン酸の産生を促進することが示唆された。ウイルス感染に伴って二次代謝が転写レベルで調節されることを世界で初めて明らかにした。

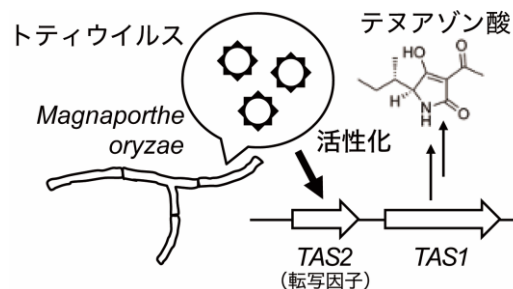


図 2. トティウイルスによるテヌアゾン酸産生促進の機構。

③ トティウイルスが毒素産生を誘導する

トティウイルスとクライソウイルスのどちらがテヌアゾン酸の産生を誘導するかを明らかにするために、ウイルス再感染実験をおこなった。その結果、トティウイルスとパルティティウイルスに感染した再感染株はテヌアゾン酸を産生するが、クライソウイルスとパルティティウイルスに感染した再感染株は産生しないことが明らかになり、トティウイルスがテヌアゾン酸産生を誘導することが示された。

④ ウイルスが二次代謝産物の生合成遺伝子の発現に与える影響

ウイルスが二次代謝産物の骨格の形成を担う遺伝子の発現に与える影響を調べた結果、テヌアゾン酸に加えて、1つの非リボソームペプチド合成酵素と1つのテルペン合成酵素の遺伝子の発現がウイルス感染の影響により低下することが示唆された。トティウイルス、あるいはクライソウイルスがテヌアゾン酸の生合成遺伝子のみならず、他の二次代謝産物の生合成遺伝子の発現にも影響を与えることが明らかになった。

⑤ 結論

イネいもち病菌に感染したトティウイルスが、転写因子の活性化を通して休眠遺伝子であるテヌアゾン酸生合成遺伝子の転写を促すことで、当該化合物の産生を促進することが示された。以上の研究成果は *Frontiers in Microbiology* 誌に投稿し、2020年7月現在印刷中である。

(2) ウイルスがヒト病原菌 *Aspergillus fumigatus* の物質産生に与える影響

3種のウイルス(クライソ、ナルナ、ボトウルミア)に感染した *A. fumigatus* と、当該株からクライソウイルスが欠失した株を2種類の培地で培養し、二次代謝プロファイルと比較したところ、1種の化合物の産生量が、3重感染株よりもクライソ欠失株において高いことを見出した。イネいもち病菌とは系統的に離れた *Aspergillus* 属菌においても、ウイルス感染が二次代謝に影響を与えることが示唆された。

<文献>

- [1] Sanchez JF *et al.* *Nat Prod Rep* 2012;**29**:351-71, [2] Brakhage AA, Schroeckh V. *Fungal Genet Biol* 2011;**48**:15-22, [3] Ghabrial SA *et al.* *Virology* 2015;**479-80**:356-68, [4] Higashiura T *et al.* *Virology* 2019;**535**:241-54, [5] Yun C-S *et al.* *Nat Commun* 2015;**6**:8758, [6] Yun C-S *et al.* *ACS Chem Biol* 2017;**12**:2270-4.

5. 主な発表論文等

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

1. 著者名 Akihiro Ninomiya, Syun-ichi Urayama, Rei Suo, Shiro Itoi, Shin-ichi Fuji, Hiromitsu Moriyama, Daisuke Hagiwara	4. 巻 -
2. 論文標題 Mycovirus-induced tenuazonic acid production in a rice blast fungus Magnaporthe oryzae	5. 発行年 2020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.2020.01641	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 -

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 二宮 章洋・浦山 俊一・藤 晋一・森山 裕充・萩原 大祐
2. 発表標題 ウイルスがイネいもち病菌の物質産生に与える影響の解析
3. 学会等名 日本農芸化学会関東支部2019年度支部大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 二宮 章洋・浦山 俊一・藤 晋一・森山 裕充・萩原 大祐
2. 発表標題 Totivirusによるイネいもち病菌の物質産生の活性化
3. 学会等名 第19回糸状菌分子生物学コンファレンス
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 二宮 章洋・浦山 俊一・周防 玲・藤 晋一・森山 裕充・萩原 大祐
2. 発表標題 トテivirusによるイネいもち病菌のカビ毒テヌアゾン酸産生誘導
3. 学会等名 日本農芸化学会2020年度大会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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