

令和 6 年 5 月 10 日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2023

課題番号：20K05820

研究課題名(和文)「共生糸状菌」からの二次代謝産物発掘および生物間相互作用における役割の解明

研究課題名(英文) Mining of secondary metabolite from "symbiotic fungi" and elucidation of their roles in biological interactions

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) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、イネいもち病菌*Pyricularia oryzae*を中心とした共生糸状菌を対象に、新しいタイプの二次代謝酵素を活用した化合物発掘及び二次代謝活性化による化合物発掘を行い、新規の生理活性を示す二次代謝産物の取得に成功した。また、共生糸状菌の宿主を用いた二次代謝産物の役割の解析では、イネいもち病菌の感染時に発現誘導される二次代謝遺伝子クラスターの解析を行い、テヌアゾン酸が感染後期に何らかの機能を持つことを見出した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

イネいもち病菌などの共生糸状菌を用いた研究により、生物間相互作用に関与する二次代謝産物の発掘と、作用メカニズムの解明を通じて、糸状菌の共生メカニズムの理解を深めることができた。更に、取得した生理活性を示す新規の二次代謝産物や、得られた二次代謝産物の作用メカニズムに関する知見を利用することにより、糸状菌と宿主の相互作用を特異的に制御する環境に優しい農薬や副作用の少ない医薬の開発への応用が期待される。

研究成果の概要(英文)：In this research, we aimed to discover compounds using new types of secondary metabolism enzymes or by activating secondary metabolism, using symbiotic filamentous fungi, mainly the rice blast fungus *Pyricularia oryzae*. We succeeded in obtaining new bioactive secondary metabolites. Furthermore, in the analysis of roles of secondary metabolites using the host of symbiotic fungi, we analyzed the roles of secondary metabolite gene clusters whose expression is induced during rice-infection of rice blast fungus, and found that tenuazonic acid has some function in the late stages of infection.

研究分野：応用微生物

キーワード：応用微生物 菌類 ゲノム 抗生物質 共生

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

糸状菌はゲノム中に膨大な数の二次代謝遺伝子を持つが、大部分は休眠遺伝子であり利用できない。一方、二次代謝産物は生物間相互作用に重要と考えられているが、大部分の役割は不明である。このような状況から、ゲノム中に存在する膨大な数の二次代謝遺伝子を利用可能にする手法の開発や、二次代謝産物の生物間相互作用における役割を明らかにすることが求められてきた。

2. 研究の目的

本申請では、宿主が明らかな「共生糸状菌」を用いて二次代謝産物を発掘し、生物間相互作用における二次代謝産物の役割を明らかにすることを目指す。

研究項目は以下の三つである。(1)新しいタイプの二次代謝酵素を活用した共生糸状菌からの化合物発掘、(2)二次代謝活性化による共生糸状菌からの化合物発掘と活性化メカニズムの解析、(3)共生糸状菌の宿主を用いた二次代謝産物の役割の解析。

本研究で、共生糸状菌から生物間相互作用に関与する二次代謝産物を見出すことにより、糸状菌の共生メカニズムの理解を深めることが期待できる。更に、得られた知見をもとに、糸状菌と宿主の相互作用を特異的に制御する環境に優しい農薬の開発への応用が期待できる。

3. 研究の方法

(1) 新しいタイプの二次代謝酵素を活用した共生糸状菌からの化合物発掘では、TAS1 ホモログを用いて、共生糸状菌から化合物発掘を行う。テヌアゾン酸生合成酵素 TAS1 は我々がイネいもち病菌から発見した新しいタイプの二次代謝酵素であり、ユニークなドメイン構造を示す NRPS-PKS 融合酵素である。興味深いことに、TAS1 ホモログを持つのはほとんどが共生菌で、共生への関与が期待される。TAS1 ホモログは A から D の 4 グループに分類できる。まず、TAS1 ホモログを活用した化合物発掘を行う。プロモーター交換等で大量生産させ、精製し、構造決定する。また、TAS1 ホモログがテヌアゾン酸以外の化合物をつくる場合、生合成メカニズムを明らかにする。

(2) 二次代謝活性化による共生糸状菌からの化合物発掘と活性化メカニズムの解析では、共生糸状菌を化合物処理することにより二次代謝を活性化させ、生産誘導される二次代謝産物を精製し、構造決定し、生合成遺伝子クラスターが未知の場合はそれを同定する。二次代謝を活性化させるための化合物としては、理研天然化合物バンク NPDepo の化合物ライブラリー由来の化合物などを用いる。

(3) 共生糸状菌の宿主を用いた二次代謝産物の役割の解析では、発掘した化合物あるいは化合物の生合成遺伝子の操作株を用いて、宿主生物に対する活性を解析する。イネいもち病菌の場合は、ゲノム中に存在する推定生合成遺伝子クラスターのイネとの相互作用における役割を解析する。

4. 研究成果

(1) 新しいタイプの二次代謝酵素を活用した共生糸状菌からの化合物発掘

グループ A TAS1 ホモログに関しては、イネいもち病菌の TAS1 がテヌアゾン酸の生産に関与することを明らかにしていたが、他に昆虫病原菌であるサナギタケ *Cordyceps militaris* の TAS1 ホモログ *CmTAS1* を大量発現した際もテヌアゾン酸が大量生産されたことから、テヌアゾン酸の生産に関与することが示唆された。グループ C TAS1 ホモログに関しては *Gloeophyllum trabeum* (キノコ、植物病原菌) の TAS1 ホモログ *GtTAS1* のイネいもち病菌での異種発現を行ったところ、テヌアゾン酸の大量生産が認められたことから、グループ A と同様にテヌアゾン酸の生産に関与していることが示唆された。グループ B TAS1 ホモログに関しては、グループ A とグループ C の中間的な配列とドメイン構造であることから、同様にテヌアゾン酸の生産に関与することが推定された。

グループ D TAS1 ホモログに関しては、テルペンドール生産菌 (*Tolypocladium album*) と植物病原菌 (*Fusarium oxysporum*) の TAS1 ホモログ (*TaTAS1* と *FoTAS1*) の大量発現株の作製と、生産される化合物の精製と構造決定などにより、テヌアゾン酸とは異なる新規化合物 taslactam A-D を生合成することを見出した (図 1)。興味深いことに、taslactam A-D は放線菌が生産するプロテアソーム阻害剤と高い類似性を示した。そこで、これらの化合物のプロテアソーム阻害活性を評価したところ、taslactam C が強力な阻害活性 ($IC_{50}=160$ nM) を示した。この新規化合物の生合成の鍵となるドメインを見出すために、テヌアゾン酸の生合成酵素 TAS1 (グループ A) とのドメイン交換実験を行い、KS ドメインが鍵となることを示唆するデータを得た。この結果などをもとに、生合成メカニズムを推定した (図 2)。

グループD TAS1ホモログが作る化合物

放線菌由来のプロテアソーム阻害剤

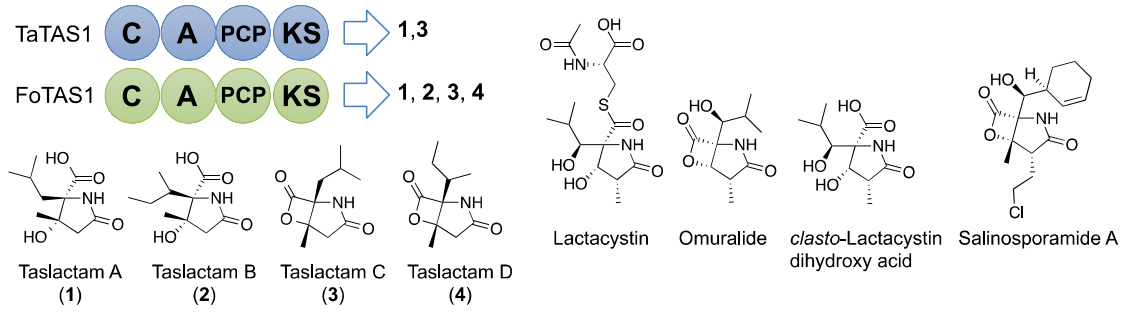
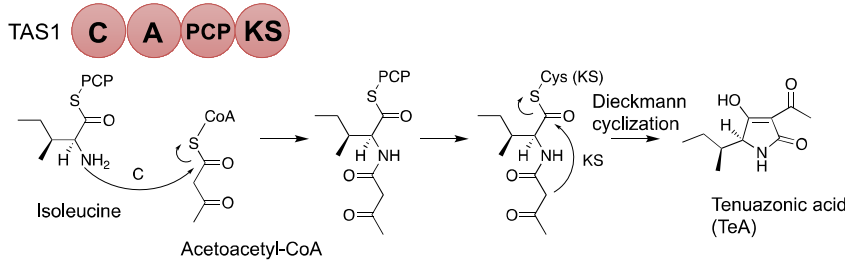


図1 グループD TAS1 ホモログが作る化合物と放線菌が作るプロテアソーム阻害剤

テヌアゾン酸の生合成



Taslactam AとCの生合成モデル

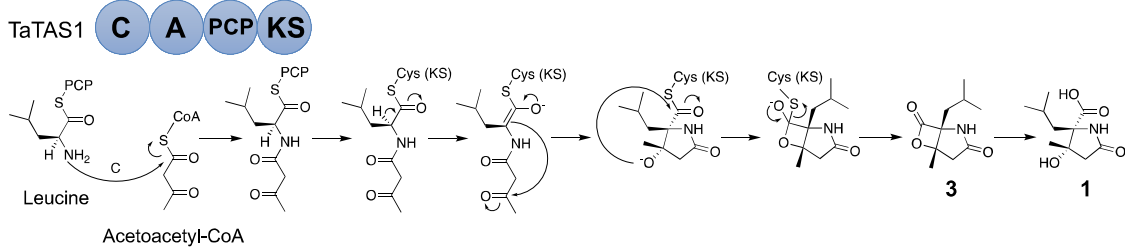


図2 グループA とグループD の TAS1 ホモログの生合成メカニズムの比較

(2) 二次代謝活性化による共生糸状菌からの化合物発掘と活性化メカニズムの解析

天然化合物バンク NPDepo 由来の化合物 NPD938 はイネいもち病菌を含む糸状菌において二次代謝を制御する活性を持つことを見出していた。そこで、様々な糸状菌を NPD938 で処理した場合に生産誘導される化合物の解析を行なった。我々は、植物の葉面から単離した糸状菌 *Fusarium* sp. RK97-94 が細胞周期阻害剤であるルシラクタエンを生産することを見出していたが、本菌を NPD938 で処理することにより、ルシラクタエンの類縁化合物の生産誘導が引き起こされることを見出した。これらの中から、非常に強力な抗マラリア活性 ($IC_{50}=1.5$ nM) を示す新規化合物 dihydrolucilactaene (DHLC) を単離し、同定した。更に、ルシラクタエンの生合成に関与する酵素の解析を進め、ルシラクタエンの新規の類縁化合物を取得し、抗マラリア活性に関する構造活性相関を明らかにした(図3)。

イネいもち病菌を放線菌 *Streptomyces griseus* が生産するタンパク質合成阻害剤であるシクロヘキシミドやハイグロマイシン B で処理することにより、二次代謝産物の dihydropyriculol (DHP) の生産が誘導されることを見出した。更に、発現誘導される遺伝子群の中から生合成遺伝子クラスターを同定した。

(3) 共生糸状菌の宿主を用いた二次代謝産物の役割の解析

イネいもち病菌が生産する二次代謝産物テヌアゾン酸の役割を解析した。テヌアゾン酸の生合成遺伝子 *TAS1* の発現は感染後期に誘導され、テヌアゾン酸は感染後期に何らかの機能を持つことが示唆された。また、*TAS1* を常時発現させると、イネのジャスモン酸応答遺伝子等の発現誘導を引き起こし、いもち病菌の感染を阻害することが示唆された。また、イネいもち病菌の感染時に発現誘導される二次代謝遺伝子クラスター3個の鍵遺伝子の破壊株を作製し、そのうちのひとつが感染に関与することを見出した。

イネいもち病菌でシクロヘキシミド処理により生産誘導される DHP の生理作用は今まで知られていなかったが、シクロヘキシミドの生産菌である放線菌 *S. griseus* に対して生育阻害活性を示すことを見出した。この結果から、DHP は微生物間相互作用に関与することが示唆された。

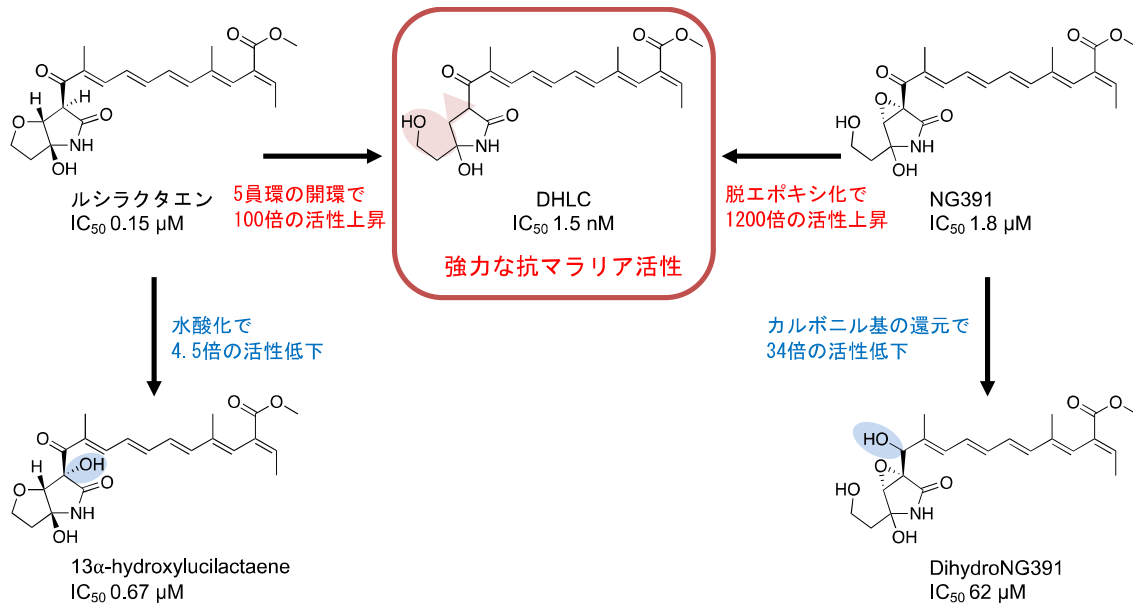


図 3 DHLC の構造活性相関

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計13件（うち査読付論文 9件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Yonehara Katsuma, Kumakura Naoyoshi, Motoyama Takayuki, Ishihama Nobuaki, Dallery Jean Felix, O'Connell Richard, Shirasu Ken	4. 巻 24
2. 論文標題 Efficient multiple gene knockout in <i>Colletotrichum higginsianum</i> via <i>CRISPR/Cas9</i> ribonucleoprotein and <i>URA3</i> based marker recycling	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Molecular Plant Pathology	6. 最初と最後の頁 1451 ~ 1464
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/mpp.13378	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 -
1. 著者名 Motoyama Takayuki, Nogawa Toshihiko, Shimizu Takeshi, Kawatani Makoto, Kashiwa Takeshi, Yun Choong-Soo, Hashizume Daisuke, Osada Hiroyuki	4. 巻 18
2. 論文標題 Fungal NRPS-PKS Hybrid Enzymes Biosynthesize New β -Lactam Compounds, Taslactams A-D, Analogous to Actinomycete Proteasome Inhibitors	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 ACS Chemical Biology	6. 最初と最後の頁 396 ~ 403
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acscchembio.2c00830	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 -
1. 著者名 Ono Akiko, Suzuki Tomohiro, Takeshima Yoshino, Kashiwa Takeshi, Motoyama Takayuki, Choi Jae-Hoon, Sato Chihiro, Konno Naotake, Miyakawa Hitoshi, Ogata Makoto, Hirai Hirofumi, Dohra Hideo, Osada Hiroyuki, Kawagishi Hirokazu	4. 巻 215
2. 論文標題 CmLec4, a lectin from the fungus <i>Cordyceps militaris</i> , controls host infection and fruiting body formation	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 International Journal of Biological Macromolecules	6. 最初と最後の頁 303 ~ 311
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.ijbiomac.2022.06.106	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 -
1. 著者名 Abdelhakim Islam A., Motoyama Takayuki, Nogawa Toshihiko, Mahmud Fauze Bin, Futamura Yushi, Takahashi Shunji, Osada Hiroyuki	4. 巻 75
2. 論文標題 Isolation of new lucilactaene derivatives from P450 monooxygenase and aldehyde dehydrogenase knockout <i>Fusarium</i> sp. RK97-94 strains and their biological activities	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 The Journal of Antibiotics	6. 最初と最後の頁 361 ~ 374
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41429-022-00529-3	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 -

1. 著者名 Motoyama Takayuki, Ishii Tomoaki, Kamakura Takashi, Osada Hiroyuki	4. 巻 85
2. 論文標題 Screening of tenuazonic acid production-inducing compounds and identification of NPD938 as a regulator of fungal secondary metabolism	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry	6. 最初と最後の頁 2200 ~ 2208
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/bbb/zbab143	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 -

1. 著者名 Kashiwa Takeshi, Motoyama Takayuki, Yoshida Kazuko, Yun Choong-Soo, Osada Hiroyuki	4. 巻 86
2. 論文標題 Tenuazonic acid production is dispensable for virulence, but its biosynthetic gene expression pattern is associated with the infection of <i>Pyricularia oryzae</i>	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry	6. 最初と最後の頁 135 ~ 139
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/bbb/zbab195	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 -

1. 著者名 A. Abdelhakim Islam, Bin Mahmud Fauze, Motoyama Takayuki, Futamura Yushi, Takahashi Shunji, Osada Hiroyuki	4. 巻 85
2. 論文標題 Dihydrolucilactaene, a Potent Antimalarial Compound from <i>Fusarium</i> sp. RK97-94	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Natural Products	6. 最初と最後の頁 63 ~ 69
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.jnatprod.1c00677	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 -

1. 著者名 Motoyama Takayuki, Kondoh Yasumitsu, Shimizu Takeshi, Hayashi Teruo, Honda Kaori, Uchida Motoko, Osada Hiroyuki	4. 巻 70
2. 論文標題 Identification of Scytalone Dehydratase Inhibitors Effective against Melanin Biosynthesis Dehydratase Inhibitor-Resistant <i>Pyricularia oryzae</i>	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Agricultural and Food Chemistry	6. 最初と最後の頁 3109 ~ 3116
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1021/acs.jafc.1c04984	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 -

1. 著者名 Motoyama Takayuki, Yun Choong-Soo, Osada Hiroyuki	4. 巻 48
2. 論文標題 Biosynthesis and biological function of secondary metabolites of the rice blast fungus <i>Pyricularia oryzae</i>	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology	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) 10.1093/jimb/kuab058	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 -

1. 著者名 Yun Choong-Soo, Nishimoto Kazuki, Motoyama Takayuki, Shimizu Takeshi, Hino Tomoya, Dohmae Naoshi, Nagano Shingo, Osada Hiroyuki	4. 巻 295
2. 論文標題 Unique features of the ketosynthase domain in a nonribosomal peptide synthetase-polyketide synthase hybrid enzyme, tenuazonic acid synthetase 1	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of Biological Chemistry	6. 最初と最後の頁 11602 ~ 11612
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1074/jbc.RA120.013105	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 -

1. 著者名 Furuyama Yuuki, Motoyama Takayuki, Nogawa Toshihiko, Hayashi Toshiaki, Hirota Hiroshi, Kiyota Hiromasa, Kamakura Takashi, Osada Hiroyuki	4. 巻 85
2. 論文標題 Controlling the production of phytotoxin pyricularin in <i>Pyricularia oryzae</i> by aldehyde reductase	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry	6. 最初と最後の頁 126 ~ 133
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/bbb/zbaa035	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 -

1. 著者名 Furuyama Yuuki, Motoyama Takayuki, Nogawa Toshihiko, Kamakura Takashi, Osada Hiroyuki	4. 巻 85
2. 論文標題 Dihydropyricularin produced by <i>Pyricularia oryzae</i> inhibits the growth of <i>Streptomyces griseus</i>	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry	6. 最初と最後の頁 1290 ~ 1293
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/bbb/zbab021	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 -

1. 著者名 Motoyama Takayuki	4. 巻 21
2. 論文標題 Secondary Metabolites of the Rice Blast Fungus <i>Pyricularia oryzae</i> : Biosynthesis and Biological Function	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences	6. 最初と最後の頁 8698 ~ 8698
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms21228698	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6件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 本山 高幸
2. 発表標題 イネいもち病菌の二次代謝産物の生合成と 生物間相互作用における役割
3. 学会等名 第21回糸状菌分子生物学コンファレンス (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 A. Abdelhakim Islam, Bin Mahmud Fauze, Motoyama Takayuki, Nogawa Toshihiko, Futamura Yushi, Takahashi Shunji, Osada Hiroyuki
2. 発表標題 Discovery of new lucilactaene derivatives with potent antimalarial activity and their structure-activity relationship
3. 学会等名 日本農芸化学会2022年度大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Bin Mahmud Fauze, Futamura Yushi, A. Abdelhakim Islam, Motoyama Takayuki, Takahashi Shunji, Lai Ngit Shin, Osada Hiroyuki
2. 発表標題 Mode of action study of dihydrolucilactaene, a new highly potent antimalarial compound
3. 学会等名 日本農芸化学会2022年度大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 古山 祐貴、本山 高幸、鎌倉 高志、長田裕之
2. 発表標題 イネいもち病菌におけるpyriculol類縁体の未知生理機能の解析
3. 学会等名 糸状菌分子生物学研究会若手の会 第八回ワークショップ
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 加藤 翔、本山 高幸、浦本 雅一、野川 俊彦、鎌倉 高志、長田 裕之
2. 発表標題 タンパク質合成阻害剤hygromycin B処理による二次代謝の誘導と1233A生合成遺伝子クラスターの発見
3. 学会等名 糸状菌分子生物学研究会若手の会 第八回ワークショップ
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Abdelhakim Amin Islam Adel、本山 高幸、二村 友史、長田 裕之
2. 発表標題 Chemical induction of fungal secondary metabolism toward production of novel bioactive secondary metabolites
3. 学会等名 日本農芸化学会2021年度大会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 抗マラリア活性を示す新規生理活性物質及びその用途	発明者 長田裕之、本山高幸、アブデルハキム イスラム アデル、	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2021-034047	出願年 2021年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔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
---------	---------------------------	-----------------------	----

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