

研究終了報告書

「ウイルスゲノムを利用した糸状菌の二次代謝機能開発」

研究期間：2020年12月～2023年3月

研究者：二宮 章洋

1. 研究のねらい

糸状菌が産生する二次代謝産物は、世界初の抗生物質ペニシリンのアオカビからの発見以降、有用物質の探索源として長年にわたって利用され、人類福祉の向上に大きく貢献してきた。また微生物は、化学合成と比較して環境負荷が少なくかつ経済的な有用物質の供給源として再注目されている。近年、配列解析技術の発達と、二次代謝に関する知見の蓄積によって、「糸状菌ゲノム中には膨大な数の二次代謝産物の生合成遺伝子が含まれるが、その大半は研究室条件では発現しない」ことが明らかになりつつある。そのような休眠状態にある遺伝子は「休眠遺伝子」と呼ばれ、新規化合物の探索源として期待されている。

バクテリアにファージが感染するのと同様に、糸状菌にも RNA ウイルスが感染することが知られており、それらは「菌類ウイルス」と呼ばれる。一般的なファージとは異なり、菌類ウイルスの大半は宿主を溶菌することなく細胞間を伝わることから、宿主と共生的な関係にあると考えられている。研究代表者は先行研究で、菌類ウイルスがイネいもち病菌という糸状菌の毒素産生を代謝レベルで促進することを明らかにし(Ninomiya A et al. (2020) Front Microbiol 11:1641)、菌類ウイルスが「二次代謝を活性化する内在性因子」である可能性を示した。

このような背景のもと、研究代表者は、ウイルスが二次代謝に与える影響を利用して糸状菌の二次代謝機能を向上させる本研究を着想した。具体的にはまず、糸状菌にウイルス粒子そのもの、あるいはウイルスの遺伝情報を導入する手法を確立する。そして、当該技術を用いて糸状菌に多様なウイルス/ウイルス遺伝情報を導入し、糸状菌の二次代謝を活性化するウイルス/ウイルス遺伝情報を探索する。

本研究において確立する技術によって、物質生産に利用されている糸状菌の物質生産能を高めることが可能である。すなわち、「クリーンな物質生産工場」としての糸状菌の利用価値を高める。一方で、糸状菌の未利用の物質産生能を活性化して新たな有用物質を得ることに利用可能である。すなわち、糸状菌を用いて「ケミカルスペースの拡充」に貢献することができる。以上の2つの点から、本研究は、糸状菌の二次代謝機能を開発してより深く利用することで、人類が抱える環境問題や公衆衛生上の問題の解決に貢献すると考えられる。

2. 研究成果

(1) 概要

簡便かつ幅広い糸状菌に適用可能なウイルス導入法としてまず、マイクロインジェクション法を検討した。しかしながら、比較的菌糸が太い糸状菌に対してはインジェクションが可能であったが、本研究でウイルスの受容体として使う予定であった *Aspergillus* 属糸状菌は比較的菌糸が細く、インジェクションが困難であった。そこで、次にパーティクルガンを用いたウイルス導入を試みた。宿主の二次代謝を活性化するトティウイルスが感染したイネいもち病菌



*Magnaporthe oryzae*をウイルス供与体として、*Aspergillus*属糸状菌をウイルス受容体として用いた。ウイルス供与体から得たウイルス粒子で金粒子をコーティングし、ウイルス受容体の胞子に射出した。なお、ウイルス粒子に少量の薬剤耐性遺伝子を加え、薬剤耐性を指標としてウイルスが導入された株の候補を選抜した。得られた候補株についてウイルス感染の有無を逆転写 PCR によって調べた結果、少なくとも 1 株にウイルスが感染したことを示す結果を得た。しかしながら、当該候補株を寒天培地上で植え継いでからもう一度逆転写PCRをおこなうと、ウイルスは検出されなかった。この結果は、ウイルスが細胞内に導入されたが、維持されず脱落してしまった可能性を示す。以上のように、細胞内でのウイルスの維持という課題は残されているが、ウイルス導入に成功した可能性を示す結果が得られた。

また一方で、ウイルスの遺伝情報を糸状菌に導入する系を確立した。糸状菌内で自己複製可能なベクター-pPTRII に、構成的プロモーターとターミネーター配列を導入し、発現用ベクター-pPTRII_VGENを得た。当該ベクターにウイルス由来の配列を挿入し、糸状菌に導入すると、挿入配列由来のORFが転写される。発現用ベクター-pPTRII_VGENに海水由来の二本鎖 RNA から逆転写によって得た cDNA の配列を挿入し、糸状菌 *A. nidulans* に導入した。ウイルス由来配列を挿入したベクターを導入した株と、配列未挿入のベクターを導入した株とを比較して、ウイルス由来配列が宿主の二次代謝に与える影響を調べた。

(2) 詳細

(A) 糸状菌へのウイルス粒子の導入

① キャピラリーを用いた導入の検討

キャピラリーを用いて糸状菌に直接ウイルスを注入することが可能かどうか検討した。ネッパジーン社からインジェクターシステム LTM-1000M を借り受け、3 種の糸状菌、アカパンカビ *Neurospora crassa*、クモノスカビ *Rhizopus oryzae*、および *Aspergillus nidulans* への液体注入を試みた。その結果、クモノスカビに対してはキャピラリーを用いて液体を注入することができた。一方で、*A. nidulans* はクモノスカビと比較して菌糸が細いため、キャピラリーを細胞に挿入することが極めて困難であった。本研究では *Aspergillus* 属糸状菌をウイルス受容体として用いる予定であり、従ってキャピラリーを用いてウイルスを注入することは難しいと結論づけた。

② ウイルス粒子の抽出と精製

イネいもち病菌 *Magnaporthe oryzae* APU10-199A を菌類ウイルスの供与体として用いた。なぜならば、当該株にはトティウイルス、クライソウイルス、パルティティウイルス、および 2 種のナルナウイルスという合計 5 種のウイルスが感染しており、このうちトティウイルスがテヌアゾン酸という毒素の産生を促進することを既に明らかにしていたためである。APU10-199A 株を液体培地で培養し、菌体を破碎後、多段階の遠心分離によってウイルス粒子画分を得た。電気泳動によって、当該画分にはトティウイルスとクライソウイルスの二本鎖 RNA が含まれることを確認した。

③ パーティクルガンを用いたウイルス導入

一般的に糸状菌にウイルスを感染させるために用いられる手法として、接合法、プロトプラスト-PEG 法、プロトプラスト融合法、およびエレクトロポレーション法が挙げられる。接合法は、ドナーとレシピエントを同一プレート上で培養することで簡便に感染を達成可能であるが、

用いることができるのはドナーとレシピエントが遺伝的に近縁(多くの場合同種,あるいは同株)である場合のみに限られる。プロトプラスト-PEG 法, プロトプラスト融合法, およびエレクトロポレーション法は, 遠縁の宿主由来のウイルスをレシピエントに導入可能であるが, 感染に先立ってレシピエント株のプロトプラストを作製する必要があるため, 煩雑さを伴う上, プロトプラストの作製が困難な種には用いることができない。そこで本研究では, パーティクルガンを用いて, 幅広い糸状菌に適用可能で, 簡便なウイルス導入法の確立を目指す。パーティクルガンによってウイルス粒子を直接菌糸や孢子に導入する手法を確立すれば, プロトプラストを作製することなく, 理論上はあらゆる糸状菌にウイルスが導入可能となると考えられる。

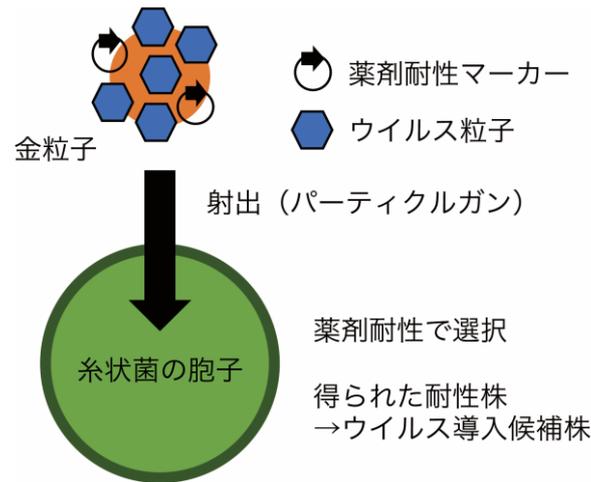


図 1. パーティクルガンを用いたウイルス導入の概要。

パーティクルガンはネッパジーン社から GDS-80 ジーンガンシステムを借り受けた。ウイルス粒子, および, 薬剤耐性遺伝子を含む自己複製型ベクター-pPTRII を金粒子に吸着させ, パーティクルガンを用いてこの金粒子を, 3 種の糸状菌 *Aspergillus fumigatus*, *A. nidulans*, *Aspergillus oryzae* の孢子に射出した。その結果, *A. fumigatus* は 5 株/25 射出, *A. oryzae* は 1 株/8 射出, *A. nidulans* は 22 株/25 射出の薬剤耐性株を得た。これらの薬剤耐性株は, 金粒子, および pPTRII と共にウイルス粒子が導入された可能性があるため, ウイルス導入候補株とした。候補株が得られる効率率は *A. nidulans* が最も高かったため, 以降, *A. nidulans* へのウイルス導入を目指すこととした。さらに *A. nidulans* の孢子に対して 43 回の射出をおこない, 79 株の候補株を得, *A. nidulans* の候補株は合計で 101 株となった。候補株の中には, 色素産生や菌糸形成の異常を示すものが含まれていた。

得られた *A. nidulans*, *A. fumigatus*, および *A. oryzae* の候補株それぞれ 101 株, 5 株, 1 株について, ウイルスの塩基配列に特異的なプライマーを用いて逆転写 PCR をおこない, ウイルス感染の有無を確認した。その結果, *A. fumigatus* と *A. oryzae* の候補株にはウイルス感染が確認できなかった。これに対して, *A. nidulans* については, 少なくとも 1 つの株がクライソウイルスに感染していることを示す結果が得られたが, ウイルス感染が疑われる株を新たに寒天培地で培養してウイルスの有無を確認したところ, ウイルスは検出されなかった。この原因として, ウイルスが継代によって容易に欠失してしまう可能性が考えられた。

(B)糸状菌へのウイルス遺伝情報の導入技術の確立

①ウイルス遺伝情報導入用ベクターpPTRII_VGE の確立

ウイルスの遺伝子を *Aspergillus* 属糸状菌内で発現させるためのベクターを作製した。先述したベクターpPTRIIに構成的プロモーターP_{gpdA}とターミネーターT_{gpdA}を導入し、ウイルス遺伝子発現ベクターpPTRII_VGE を得た。当該ベクターが機能することを確認するため、*A. fumigatus* に感染するナルナウイルス AfuNV2 の RNA 依存型 RNA ポリメラーゼをコードする ORF (ORF2) を pPTRII_VGE に導入し、当該ベクターを用いて *A. fumigatus* を形質転換した。得られた形質転換体について、ORF2 の発現を逆転写定量 PCR によって確認した。

②ウイルス遺伝情報導入用ベクターpPTRII_VGE の改良

pPTR_VGE は、プロモーター-開始コドン-マルチクロニングサイト-終止コドン-ターミネーターという構造を含んでおり、マルチクロニングサイトにウイルス由来の配列を導入することで、タンパク質の発現が可能である。しかしながら、当該ベクターは終止コドンを 1 つしか含んでおらず、3 通り考えられる読み枠のうち、ただ 1 通りの読み枠が使われた場合しかタンパク質が正しく翻訳されないと考えられた。そこで、新たに終止コドンを 2 つ加えることによって、いずれの読み枠が使われた場合でも問題なくタンパク質が翻訳されるように改良した。この改良ベクターを pPTRII_VGEN と呼ぶ。

③二次代謝を活性化させる配列の探索

北大西洋の海水に含まれるウイルス由来配列から得られた cDNA ライブラリを鋳型として、ウイルス由来配列の増幅をおこなった。当該 cDNA ライブラリには 1,000-1,500 塩基程度の多様な cDNA が含まれており、それぞれの cDNA は末端に共通配列を有するため、共通プライマーで配列を増幅することが可能である。そこで、共通プライマーを用いてウイルス由来配列を増幅し、pPTRII_VGEN ベクターに導入した。得られたプラスミドを糸状菌 *A. nidulans* に導入して二次代謝プロファイルを調べたところ、二次代謝産物の産生が抑制された株は見られたが、活性化した株は見られなかった。

(C)その他

- 本 ACT-X での研究成果が認められ、2021 年 8 月に筑波大学生命環境系から東京大学大学院農学生命科学研究科へと異動し、助教のポストにつくことができた。その結果、独自のアイデアに基づく研究を加速・発展させる基盤を固めることができた。
- 本 ACT-X での研究成果が認められ、ACT-X「環境とバイオテクノロジー」新学術領域「ポストコッホ生態」合同シンポジウム(2021 年 9 月 1 日)で招待講演をおこなった。
- 研究代表者が筑波大学在籍時に所属していた糸状菌相互応答講座と、JAMSTEC と共同で本プロジェクトを進めた。特に糸状菌相互応答講座の萩原大祐准教授と浦山俊一助教とは頻りに意見交換をおこなってきた。

3. 今後の展開

研究代表者は、パーティクルガンを用いた糸状菌へのウイルス導入法を開発し、当該手法を用いてウイルス導入が可能であることを示す結果を得た。しかしながら、導入したウイルスが細胞内に維持されないという問題点があった。一般的に、ウイルスの供与体を受容体と系統的に近

ければ、ウイルスは維持されやすいと考えられている。実際に、*Aspergillus* 属の糸状菌を供与体と受容体として用いてウイルス感染に成功した例がある(Ejmal MA et al. (2018) *Viruses* 10:539)。そこで今後はウイルス受容体と同じ属の *Aspergillus* 属糸状菌を供与体として用いて、引き続きウイルス感染を進める。パーティクルガンを用いたウイルス導入法について、よりウイルス感染の確率が高くなる条件検討をおこない、半年程度かけて各種条件の最適化をおこなう。以上のようにして、効率的なウイルス感染法を確立する。

糸状菌に、他種糸状菌由来のウイルスを導入すると、孢子形成、酸化還元、ストレス応答等に関わる様々な遺伝子の発現が影響を受けるとの報告がある(Ejmal MA et al. (2018) *Viruses* 10:539)。従って、糸状菌にウイルスを導入した時に糸状菌の生理に与える影響は幅広いと考えられる。そこで、研究代表者は、ウイルスを用いて二次代謝機能だけではなく、糸状菌の他の有用機能も開発する研究を着想した。すなわち、本研究で確立した技術を用いてウイルス/ウイルス遺伝情報を糸状菌に導入し、有用酵素の生産性や、ストレス耐性といった糸状菌の有用な機能を活性化する技術の開発を目指す。まずはウイルス/ウイルス遺伝情報の導入が比較的容易な糸状菌をモデルとして用いて有用なウイルスを探索する。そして、有用なウイルスがヒットすれば、当該ウイルスを、実際に工業的に利用されている糸状菌に導入し、モデル糸状菌と同様の表現を誘導するか調べる。以上のような工程を繰り返すことで、工業的に利用される糸状菌に有利な形質を誘導する技術を開発可能と考えている。

4. 自己評価

研究代表者は、ACT-X 研究期間中に研究機関を異動し、それに伴う移動先での研究環境の整備等に時間を費やしたため、当初の予定通り研究を進めることができなかった。しかしながら、本研究は、これまで糸状菌には用いられてこなかった簡便な手法でウイルス導入をおこなえる可能性を示すもので、科学技術への波及効果は大きいと考えられる。今後、この手法を改良することで、より効率が高く普遍的なウイルス導入技術の確率に繋がるものと期待される。生物に感染する、あるいは環境中に存在するウイルスの大半はその機能が不明であり、本研究で開発した技術はそのようなウイルスの機能を明らかにする上で大きな助けとなる。すなわち、基礎科学(ウイルス学)にも大きな波及効果を持つ。

5. 主な研究成果リスト

(1) 代表的な論文(原著論文)発表

該当なし

(2) 特許出願

該当なし

(3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

[学会発表] 菌類ウイルスがイネいもち病菌の二次代謝に与える影響, 二宮章洋, 浦山俊一, 周防玲, 藤晋一, 森山裕充, 萩原大祐, 日本農芸化学会 2021 年度大会, 2021 年 3 月 20 日



[招待講演] ウイルスゲノムを利用した糸状菌の二次代謝機能開発, 二宮章洋, ACT-X「環境とバイオテクノロジー」新学術領域「ポストコッホ生態」合同シンポジウム, 2021年9月1日

[招待講演] 真菌細胞内で“家畜化”されたウイルス, 浦山俊一, 二宮章洋, 千葉悠斗, 池田彩乃, 趙彦杰, 老木紗予子, 萩原大祐, 第94回日本細菌学会総会, 2021年3月23日

[総説] 古くて新しい, 糸状菌からの「ものとり」の話, 二宮章洋, 2022年, 生物工学, 100:316