SURE 静岡大学学術リポジトリ
Shizuoka University REpository

冬虫夏草の基礎と応用：菌感染メカニズム解明と機能性物質探索

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 静岡大学 公開日: 2019-05-13 キーワード (Ja): Cordyceps, ゲノム解析, 機能性物質, 交配型遺伝子 キーワード (En): 作成者: 崔, 宰熏 メールアドレス: 所属:
URL	http://hdl.handle.net/10297/00026531

様　式　Ｃ－１９、Ｆ－１９－１、Ｚ－１９　（共通）

科学研究費助成事業　　研究成果報告書

平成 ３０ 年　 ６ 月 １９ 日現在

機関番号：１３８０１
研究種目：挑戦的萌芽研究
研究期間：2016～2017
課題番号：１６Ｋ１４９１２

研究課題名（和文）冬虫夏草の基礎と応用ー菌感染メカニズム解明と機能性物質探索ー

研究課題名（英文）Foundation and application of Cordyceps - Elucidation of fungal infection mechanism and exploration of functional substances

研究代表者
崔　宰熏（Choi, Jae-Hoon）

静岡大学・農学部・助教

研究者番号：４０７３１６３３

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費）　　2,900,000円

研究成果の概要（和文）：サナギタケC. militarisは鱗翅目昆虫に寄生する子嚢菌であり、その子実体は漢方薬として有用であるが、その感染や子実体形成の分子機構には不明な点が多い。MAT染色体の一部が他の染色体と組換えを起こしていることが明らかになり、サナギタケの染色体構造は不安定であることが示唆された。また、コルジセピン産生に関わる遺伝子クラスターの発現量は交配型間で異なることが明らかになった。癌細胞に対して細胞増殖抑制活性を示す化合物の単離に成功した。
このように、本研究はサナギタケの感染や子実体形成などの生命現象の解明に有用なゲノム情報を整備するとともに、機能性物質を単離に成功した。

研究成果の概要（英文）：Cordyceps is an ascomycete that is parasitic on lepidopteran insects and its fruit body is useful as a traditional Chinese medicine, but its molecular mechanism of infection and fruit body formation has many unclear points. It was revealed that a part of the MAT chromosome underwent recombination with other chromosomes in C. militaris, suggesting that the chromosome is unstable. In addition, it was revealed that the expression levels of gene clusters involved in cordycepin production differ between mating types. In addition, we succeeded in isolation of compounds showing toxicity against cancer cells.
Thus, in this study, we improved genome information useful for elucidation of biological phenomena such as infestation of C. militaris and the formation of fruiting bodies, and succeeded in isolation of functional substances.

研究分野：天然物化学

キーワード：Cordyceps　ゲノム解析　機能性物質　交配型遺伝子

１．研究開始当初の背景

冬虫夏草は文献上、約数百種が確認されている。しかしながら、どのように菌が感染し、昆虫を生かしながら体内で生きながらえ、最終的に昆虫を死に至らしめ子実体を発生するのか、全く不明である。また、寄生して世代を繰り返す生活環についても科学的にほとんど不明なままであり、寄生状態での栽培が難しい。冬虫夏草の 1 種サナギタケ（*Cordyceps militaris*）は、漢方では抗癌剤などとして古くから用いられてきた（図1）。

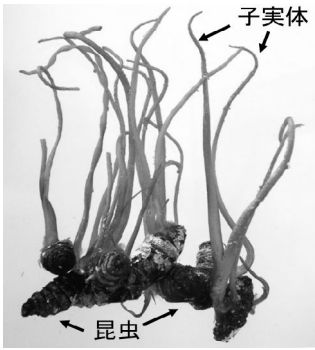


図 1 サナギタケ子実体

現在までにサナギタケに関する物質レベルでの研究では、コルジセピンをはじめとする低分子化合物、多糖類、酵素などが報告されているが、分子レベルでその機能性を詳細に検討した研究例は少ない。さらに、これらの研究は培養した菌糸体（子実体になる前の状態）を用いて行われており、子実体を用いた研究はほとんど無く、特に低分子化合物に関しては全く無い。その理由のひとつは、天然の子実体は極めて高価であり、子実体の人工栽培は極めて困難だったからである。しかし最近、我が国において、カイコ蛹を宿主とした極めて天然に近い状態での人工栽培に成功した。研究代表者らは、人工栽培に成功した企業（株式会社にちはら総合研究所）の協力を得て研究を開始した。

２．研究の目的

冬虫夏草とは、菌が昆虫などに感染し、最終的に昆虫体内から子実体（所謂キノコ）が発生するものの総称である。漢方では抗癌剤などとして古くから用いられてきたが、感染メカニズムは未だ明らかになっていない。本研究では、冬虫夏草の１種サナギタケをカイコ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・タンパク質レベルで解析し、感染から子実体発生、子実体成熟に至る分子機構の解明を試みる。また、成熟子実体から様々なバイオアッセイを用い、その結果を指標に機能性物質の探索を行うことで冬虫夏草の基礎から応用までの全容解明を目的とし、研究を行う。

３．研究の方法

（１）遺伝子・タンパク質発現解析・メタボローム解析

感染初期過程において発現する遺伝子を網羅的に探索するため、次世代シーケンサー（MiSeq）を用いた解析した。また、サナギタケ単相株と異核共存体株をカイコ蛹に接種すると、子実体形成能に差がみられる。そこで、単相株と異核共存体株における遺伝子発現差解析を行うことにより、子実体形成に関与する遺伝子を探索する。また、生きたカイコ蛹に感染する際に特異的に発現する遺伝子を選抜するために、カイコ蛹に接種したときとカイコ蛹をホモジナイズして作成した培地で培養したときの遺伝子発現の比較も行う。さらに、メタボローム・プロテオーム解析でも同様に網羅的な比較を行うが、トランスクリプトーム解析とは異なり、カイコ蛹の中に存在するサナギタケ菌体のメタボローム・プロテオーム解析を行うためには、カイコ蛹からサナギタケ菌体を単離する必要がある。予備実験によりカイコ蛹とサナギタケ菌体は浮遊密度が異なることが明らかになっており、ホモジナイズして密度勾配遠心によって単離する。液体培養した菌糸体とカイコ蛹から単離した菌体を LC-MS/MS と 2 次元 SDS-PAGE に供し、2 次代謝産物とタンパク質の相違を比較する。

（２）サナギタケのゲノム解析

NBRC で分譲しているサナギタケ菌株 18 種を全て入手し、交配型遺伝子の PCR により交配型を決定するとともに、子実体形成能やコルジセピン産生能などの表現型の確認を行った。子実体は有性生殖過程において胞子を形成する構造であることから、相補的な交配型の菌株を混合してカイコ蛹に接種すると、交配を起こして二倍体となり、子実体形成が起こると予想される。そこで、異核共存体の株から相補的な交配型の単相株を単離し、それぞれのゲノム配列を決定し、リファレンスとすることによって、子実体形成過程における各交配型の遺伝子発現を解析することが可能となる。また、一度カイコ蛹に接種して子実体を形成させたサナギタケから単離・培養したサナギタケ菌を再度カイコ蛹に再感染させると、子実体形成能や子実体の形態が変化することが知られている（にちはら総合研究所私信）。同じゲノムを有するはずの 2 世代目のサナギタケの表現型が変化することから、DNA のメチル化などエピジェネティックな変化が生じている可能性が高いと考えている。そこで、カイコ蛹に接種して子実体を形成させた後に再度カイコ蛹に接種して子実体形成能や子実体の形態の表現型を調べるとともに、網羅的なエピゲノム解析を行うことによって、メチル化が引き起こされる遺伝子を特定し、その遺伝子機能と子実体形成能の変化に関わる因果関係を解明する。

（３）サナギタケレクチンとその結合物質の探索：感染・寄生・子実体形成における菌と昆虫との相互作用に関与している可能性が考えられるサナギタケレクチン(CML)と結合

する物質がカイコに存在するのではないかと考え、その精製と機能解析を行う。子実体から PBS 中で破砕し、赤血球凝集活性を指標に、各種クロマトグラフィーを駆使して、既に CML の精製に成功している。このレクチンによる赤血球凝集反応の阻害活性を指標に、カイコ抽出物のクロマトグラフィーを繰り返し、CML 結合物質を精製する。この CML の一次構造、レクチンとして緒性質を明らかにする。

（４）サナギタケ子実体由来の機能性物質の探索：サナギタケ子実体の新規機能性物質を探索するため、サナギタケ子実体をエタノールで抽出する。酵母に対するアンチエイジング活性と *in vitro* でのコレステロール吸収阻害活性を指標に、各種クロマトグラフィーを駆使し、抽出物から活性物質の精製を行う。得られた活性物質は NMR 等の機器分析によって構造を決定する。

４．研究成果

サナギタケ *C. militaris* は鱗翅目昆虫に寄生する子嚢菌であり、その子実体は漢方薬として有用であるが、その感染や子実体形成の分子機構には不明な点が多い。その理由の１つとして、子実体は有性生殖過程において胞子を形成する構造体であり、その形成は相補的な交配型（α型と HMG 型）の相互作用によるものであることが予想されるにもかかわらず、ゲノムシーケンスが行われているのはα型のみであったことが考えられた。そこで、本研究ではまずα型と HMG 型のドラフトゲノム配列を決定し、比較ゲノム解析を行った。NBRC のサナギタケ全 18 株の中から NBRC100741 株と NBRC103759 株を選抜し、分生子を限界希釈法によってクローニングし、それぞれの相補的な交配型（α型と HMG 型）の株を単離した。これら 4 株のゲノムを次世代シーケンサーMiSeq によってシーケンスし、ドラフトゲノム配列を決定した。これらのドラフトゲノムの比較ゲノム解析として、MAT 染色体（交配型遺伝子座が存在する染色体）の構造比較、SNP 解析、交配型特異的な遺伝子の探索を行った。その結果、これまでにサナギタケでは見つかっていなかった新規の HMG 型特異的な交配型遺伝子 MAT1-2-3a と MAT1-2-3b を発見した。さらに、これら 4 株で遺伝子予測を行い、詳細なオーソログ解析を行った結果、各交配型に特異的な遺伝子は交配型遺伝子のみであり、MAT 染色体上に存在するフェロモン遺伝子やそのレセプター遺伝子は交配型特異的ではないことが明らかとなった。

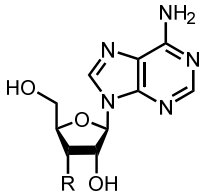
より詳細な比較ゲノム解析を行うため、PacBio の超ロングリードシーケンスにより、HMG 株ゲノムを染色体レベルでアセンブリする予定にしていたところ、2017 年 11 月に ATCC34164 株の染色体レベルにアセンブリされたゲノム配列が報告された。そこで、ATCC34164 株のゲノム配列に我々が決定した 4 株のドラフトゲノム配列をアラインメントし、染色体構造を比較した。その結果、NBRC100741 株と NBRC103759 株の両方において、MAT 染色体の一部が他の染色体と組換えを起こしていることが明らかになり、サナギタケの染色体構造は不安定であることが示唆された。交配型間のゲノム構造の比較や SNP 解析により、両方の株において相同組換えによって完全に同じ配列になっている領域が存在していることも明らかになった。今後、MAT 染色体構造が異なる株間での交配や子実体、胞子形成が正常に進行するかどうか、また、その際に相同組換えが起こるのかどうかを明らかにすることにより、サナギタケのゲノム構造と交配のメカニズムに関する知見が得られると考えられる。

しかしながら、コルジセピン産生に関わる遺伝子クラスターの発現量は交配型間で異なることが明らかになり、交配型間で異なる遺伝子発現制御を受けていることが示唆された。

さらに、103759 株については、ドラフトゲノムをリファレンスとして、α型、HMG 型をそれぞれ単独でカイコ蛹に接種した場合とα型と HMG 型を混合して異核共存体とした状態での遺伝子発現差解析を行った。その結果、もっとも子実体が形成される異核共存体において、複数のプロテアーゼやキチンを脱アセチル化してキトサンを合成する酵素であるキチン脱アセチル化酵素の遺伝子発現が上昇していることが明らかになった。菌糸体の構造を分解し、キチンからキトサンを合成して子実体を形成する過程において、これらの酵素が関与していると考えられる。これらの酵素遺伝子は異核共存体において、α型と HMG 型それぞれの核で異なる発現調節を受けている可能性があることも示唆する結果が得られており、交配型特異的な遺伝子発現調節機構について、今後調べていく予定である。

サナギタケ子実体より total RNA を抽出・精製し、逆転写反応により cDNA を得た。精製 CML の LC-MS/MS の結果から相同性の高かった Ricin B-related lectin [*C. militaris* CM01]の遺伝子情報をもとにプライマーを設計し、cml 遺伝子のクローニングを行った。酵母による異種発現には、*K. lactis* Protein expression Kit を使用した。酵母発現用 cml 遺伝子の 5’末端に Kex プロテアーゼ切断部位と制限酵素サイト Xho I を、3’末端に enterokinase 切断部位、His Tag および制限酵素サイト Not I を付加し、pKLAC2 ベクターに挿入して発現プラスミドの構築を行った。Sac II により直鎖状にしたベクターを相同組み換えにより、*K. lactis* GG799 株のゲノムに導入し、形質転換体を取得した。得られた酵母形質転換体を YPGal 培地で培養後、培養上清を His Trap HP アフィニティークロマトグラフィーに供することで精製 rCML を得た。取得した精製 rCML を SDS-PAGE に供したところ、目的の 15 kDa 付近にシングルバンドが

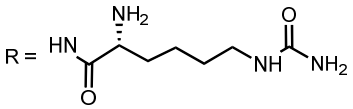
確認された。更に赤血球凝集活性試験および赤血球凝集反応阻害試験の結果から rCML はおよび糖認識能を有していること、その糖認識特異性は native CML と同等であることが明らかになった。



cordycepin (**1**): R = H

3'-amino-3'-deoxyadenosine (**2**): R = NH_2

homocitrullylaminoadenosine (**3**)



C. militaris からは抗生物質である cordycepin (**1**)の他、いくつかの類縁体 (2, 3)が単離されている 3,4)。我々はこれらの化合物に注目し、*C. militaris*のゲノム配列情報から生合成遺伝子を探索した。その結果、3 と類似の化学構造を持つ puromycin の生合成遺伝子と相同性の高い遺伝子がクラスターとして存在していることを見出した。これらの酵素遺伝子の機能について行い、遺伝子 cgp1622の5'-nucleotidase活性を確認した。この遺伝子クラスターの働きによって C. militaris を利用した新しい化学構造の抗生物質の創出ができる可能性に期待し、更に機能解析を試みた。

C. militaris のゲノム配列情報から見いだされた遺伝子のうち、cgp1620 は BLAST データベース上で1つの ORF に oxidoreductase と aminotransferase の 2 つの異なる機能性ドメインを有するとアノテーションされており、ATP のリボース 3 位の水酸基を酸化・アミノ基転移反応を触媒する酵素遺伝子と高い相同性を示した。*C. militaris* の cDNA を取得し配列を明らかにするとともに、現在、大腸菌宿主系から得られる組換え体酵素を用いた変換反応を解析した。また、サナギタケを接種した *Bombyx mori* から 3'-デオキシイノシンおよびコルジセピンを単離・構造決定した。これらの化合物は A549、PANC-1、および MCF-7 癌細胞に対して細胞増殖抑制活性を示した。

サナギタケに近縁な白きょう病菌 (*Beauveria bassiana*) はノムシタケ科 *Beauveria* 属の昆虫病原性真菌で、害虫を防除するための生物学的殺虫剤として広く使用されている。*B. bassiana* は非常に稀にしか子実体を形成しないことが知られているが、我々はカイコ (*Bombyx mori*)から高頻度で子実体を形成する株の分離に成功した。子実体を形成する *B. bassiana* は稀であるため、*B. bassiana* の子実体から単離された生理活性物質は全く報告されていない。現在、*B. bassiana* の子実体に存在する生物活性物質の探索を進めているところである。

このように、本研究はサナギタケの感染や子実体形成などの生命現象の解明に有用なゲノム情報を整備するとともに、相補的な交配型における遺伝子発現調節機構を明らかにし、感染や子実体形成の分子機構を解明した。また、機能性物質を単離に成功した。

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１件）

①Qiu, W., Wu, J., Choi, J.-H., Hira, H., Nishida, H., and Kawagishi, H., Cytotoxic compounds against cancer cells from *Bombyx mori* inoculated with *Cordyceps militaris*, Biosci. Biotechnol. Biochem., 81, 1224-1226 (2017).査読有

〔学会発表〕（計７件）

①碓井 梓美、森 拓未、呉 静、道羅 英夫 、崔 宰熏、平井 浩文、河岸 洋和、白きょう病菌（*Beauveria bassiana*)由来の生理活性物質の探索、日本農芸化学会 2018 年大会(2018)
②鈴木 智大、鈴木 貴也、崔 宰熏、小野 晶子、河岸 洋和、道羅 英夫、冬虫夏草サナギタケ（*Cordysceps millitaris*）の各交配型における比較ゲノム解析、日本農芸化学会 2018 年大会(2018)
③小野 晶子、柏 毅、本山 高幸、崔 宰熏、平井 浩文、道羅 英夫、長田 裕之、河岸 洋和、鈴木智大、冬虫夏草（*Cordyceps militaris*）由来レクチンが宿主への感染に及ぼす影響の検討、日本農芸化学会 2018 年大会(2018)
④天内 優子、崔 宰熏、恒松 雄太、渡辺 賢二、道羅 英夫、鈴木 智大、平井 浩文、河岸 洋和、冬虫夏草 *Cordyceps militaris* における 3'-amino-3'-deoxyadenosine の生合成経路の解析、日本農芸化学会 2018 年大会(2018)
⑤鈴木 智大、道羅 英夫、崔 宰熏、鈴木 貴也、加藤 竜也、朴 龍洙、河岸 洋和、RNA-Seq を用いた冬虫夏草（*Cordyceps militaris*）の感染過程における遺伝子の網羅的解析、日本農芸化学会 2017 年大会(2017)
⑥天内 優子、鈴木 智大、崔 宰熏、道羅 英夫、恒松 雄大、渡辺 賢二、河岸 洋和、冬虫夏草 *Cordyceps militaris* における cordycepin 生合成経路の研究、日本農芸化学会 2017 年大会(2017)
⑦鈴木 智大、鈴木 貴也、崔 宰熏、河岸 洋和、道羅 英夫、冬虫夏草サナギタケ（*Cordyceps millitaris*）の各交配型-異核

共存体間の遺伝子発現差解析、日本きのこ学会第 21 回大会（2017）

〔その他〕
ホームページ
http://www.agr.shizuoka.ac.jp/c/biochem/index.html

６．研究組織
(1)研究代表者
崔　宰熏（CHOI, Jae-Hoon）
静岡大学・農学部・助教
研究者番号：40731633

(2)研究分担者
道羅　英夫（DOHRA Hideo）
静岡大学・理学部・准教授
研究者番号：10311705

(3)研究分担者
河岸　洋和（KAWAGISHI, Hirokazu）
静岡大学・グリーン科学技術研究所・教授
研究者番号：70183283

(4)研究分担者
朴　龍洙（PARK,Enoch Y.）
静岡大学・グリーン科学技術研究所・教授
研究者番号：90238246