

平成 31 年 4 月 29 日現在

機関番号：14501

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2018

課題番号：17K19266

研究課題名(和文)糸状菌における分生子を介した新たな菌類ウイルス伝搬様式

研究課題名(英文) Novel mycovirus transmission pathway via conidia in filamentous fungi

研究代表者

池田 健一 (Ikeda, Kenichi)

神戸大学・農学研究科・准教授

研究者番号：40437504

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 5,000,000円

研究成果の概要(和文)：研究過程で見出された変異菌は分生子を形成する特徴を有しており、その特徴が任意菌株へウイルスを伝搬する能力に関わっていることが考えられた。そこで、本研究では、変異菌が分生子を介してウイルス伝搬していることを顕微鏡観察により明らかとし、さらに、その能力を発揮するために重要な遺伝子について、各系統の菌株を用いて次世代シーケンサーを用いた全ゲノム解析およびRNA-seq解析を行う事により特徴付けを行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

菌類ウイルスは糸状菌病害の病原性を低下させる作用を有しており、ウイルスを利用した生物防除剤としての利用が期待される。この防除法をヴァイロコントロールと呼んでいる。しかしながら、任意菌株へ効率よく伝搬する方法が求められていた。研究過程で見出された変異菌は任意菌株へウイルスを伝搬することができた。この変異菌は分生子を形成する特徴を有しており、分生子がウイルス伝搬に関わっていることが考えられた。この仕組みを明らかとすることで、任意菌株へのウイルス移行が容易となり、ヴァイロコントロールの実用化につながる。

研究成果の概要(英文)：Virocontrol is a novel disease protection method by using mycoviruses. The major obstacle is heterogenic incompatibility system that blocks to transmit mycovirus to arbitrary fungal strains. I found a mutant that was able to transmit mycovirus in *Rosellinia necatrix*. In this study, we tried to elucidate the characters of the mutant. I found that the mutant produce conidia during plate culture suggesting that mycovirus is transmitted via conidia. I observed that the conidia of the mutant anastomosed to vegetative hypha that was different genetic back ground. I also analyzed genome sequences and expression profiles by next generation sequence. I found numerous genomic mutation points and differential expression genes.

研究分野：植物保護

キーワード：ヴァイロコントロール 菌類ウイルス 細胞質不和合性 菌糸融合 分生子形成

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

研究実施者は植物糸状菌病害に対する新たな生物防除法として、病原力低下作用を有する菌類ウイルスを任意菌株へ感染させ「病原菌を病気にさせる」アプローチである「ヴァイロコントロール (virological control)」法の開発に取り組んでいる。この防除法では、菌類ウイルスが菌糸融合により圃場全体へ蔓延することで予防効果ばかりでなく治療効果も期待できる。しかし、糸状菌には、ヒトにおける臓器移植時の拒絶反応と同様に、遺伝型の異なる菌株同士が融合した場合、細胞質不和合性反応による細胞死が誘導され、菌類ウイルスを任意菌株へ伝搬させることは困難となっている。ヴァイロコントロールの成功には、細胞質不和合性反応を回避し、菌類ウイルスを任意菌株へ伝搬できる技術の確立が鍵となる。果樹類を中心に深刻な被害を及ぼす白紋羽病菌は、培地上で分生子を形成せず、圃場でも菌糸の伸展により被害が拡大する。このような特徴は、病原菌に菌類ウイルスが感染すると、クローン状態の菌糸ネットワーク全体に広がるため、生物防除効果が高くなるものと期待される。

白紋羽病菌において細胞質不和合性を克服するための技術開発を試みていたところ、その培養過程において、任意菌株に菌類ウイルスを伝搬できるようになった変異菌が出現した。この変異菌は異なる遺伝型の菌株と菌糸融合することが期待されたが、細胞観察の結果、菌糸同士での融合は確認できなかった。しかし、変異菌は培地上で多量の分生子を形成する能力を有しており、この分生子と菌糸が融合することを発見した。すなわち、分生子を介することで任意菌株へ菌類ウイルスを伝搬することが可能であることを明らかとした。

2. 研究の目的

これまでの研究において、分生子を介した新たな菌類ウイルスの伝搬様式の存在を見出した。本課題では、この新たな伝搬様式について、(1)分生子と菌糸の融合様式について細胞学的レベルでの特徴付けを進める、(2)変異菌は元の保存菌株と比較してゲノムレベルでどのような変異が生じたのか、(3)変異菌においてどのような遺伝子発現パターンの変化が起きているのかを明らかとする。上記項目を明らかとすることで、ヴァイロコントロール法における新たな基盤技術を構築することができ、さらに、分生子の形成制御機構を理解することにより、糸状菌病害の防除技術に関する新たなターゲットとなることが期待される。

(1) 分生子と菌糸の融合様式

変異菌の分生子が相手方菌糸と融合した場面を、各種顕微鏡を用いて詳細に観察する。また、この菌糸融合は、分生子が相手方菌糸と直接接触しなければ起こらないのか、分生子が発芽した菌糸であれば相手方菌糸と融合できるのか、顕微鏡観察を行う。

(2) 変異菌のゲノム構成

本研究で用いる変異菌の履歴は以下のとおりである。圃場分離菌株で菌類ウイルスが感染していない W563 株を出発点とした。W563 株を圃場に埋設して一定期間放置し、再分離を行うことで W1032 株を得た。W1032 株は 2 種の菌類ウイルス感染により菌糸生育速度が著しく遅延しており、この菌株を継代培養したところ、セクター状に灰色状菌糸が出現し、この領域を単菌糸分離することにより W1032BF 株が得られた。変異菌とは W1032BF 株のことである。このように時系列に沿った菌株を保有していることより、それぞれの菌株のゲノム配列を次世代シーケンサーにより解読し、W1032BF 株特異的に生じた変異箇所を特定する。

(3) 変異菌の遺伝子発現様式

変異菌 W1032BF 株は菌糸生育様式、菌叢色、分生子形成などの点で元の菌株 W563 株および W1032 株と特徴が大きく異なることより、多くの遺伝子の発現パターンが変化していることが考えられた。それぞれの菌株の培養菌糸の RNA を抽出し、RNA-seq 解析を行う。分生子形成あるいは菌糸融合などに関わる遺伝子群の発現パターンが変化しているのか、明らかとする。

3. 研究の方法

(1) 分生子と菌糸の融合様式

菌糸融合に伴う細胞質移行を観察するために、変異菌 W1032BF 株に GFP 標識したレポーター変異株を用いて、遺伝的に不和合な組み合わせの菌株と共存培養を行い、蛍光顕微鏡観察を行う。菌糸融合した相手方菌糸における菌類ウイルス検出については、受容菌株に抗生物質耐性マーカーを付与しておき、受容菌のみが生育できるように培養を行う。

(2) 変異菌のゲノム構成

時系列に沿った白紋羽病菌 W563, W1032, W1032BF 株のゲノム DNA を抽出し、次世代シーケンサーを用いて全塩基配列を解読し、変異箇所を明らかとする。なお、白紋羽病菌の W97 株は既にゲノム解析が終了し、アノテーションに関して充実した環境にあることより、検出された変異が分生子形成あるいは菌糸融合に関わる遺伝子であるかどうかの判別を行うことができる。

(3) 変異菌の遺伝子発現様式

時系列に沿った白紋羽病菌 W563, W1032, W1032BF 株の RNA を抽出し、RNA-seq 解析を行う。この発現変動パターンを解析することにより、分生子形成あるいは菌糸融合に関わる遺伝子の中でどの遺伝子が変動しているのか明らかとする。

4. 研究成果

(1) 分生子と菌糸の融合様式

変異菌と和合性および不和合性関係にある野生株菌糸との間の接触様式について顕微鏡観察を行った。その結果、新たな知見を得ることができた。変異菌と特定の菌株の組み合わせにおいて、菌糸接触時に片側の菌糸にもう片側の菌糸が巻き付く現象が確認された。変異菌は菌糸接触時に単独培養時より菌糸が太くなり、その一方で接触相手となっている W779 株は菌糸が細くなった。その結果、W779 の菌糸が変異菌の菌糸に巻き付く結果となった。しかし、その他の菌株との接触においては、そのような現象は観察されなかった。この結果は、菌糸の成長過程において、それぞれ固有の因子を分泌し、それらを認識することで菌糸の形態を多様に変化させることができることが明らかとされた(図1)。

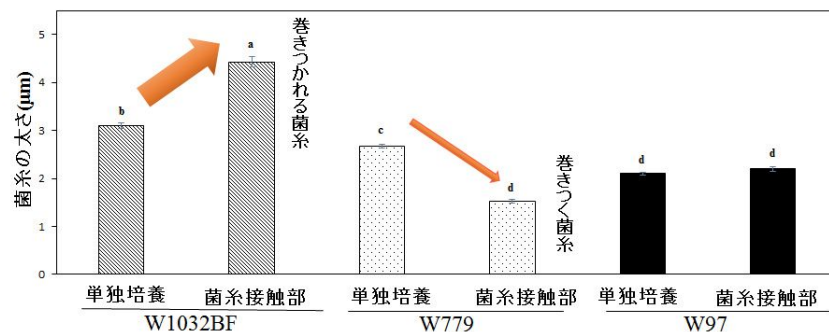


図1. 菌株系統の違いによる菌糸接触時における菌糸直径の変化

変異菌は培地上での栄養成長において分生子形成を行うことが既に明らかとされていた。異なる菌株間の菌糸接触時においても、分生子形成が起きていることを観察することができた。しかし、変異菌同士の菌糸接触においては、菌糸接触領域において分生子形成が起らないことを発見した(図2)。このことは、先行研究において、不和合性組み合わせにおいて菌類ウイルスが伝搬された現象と共に、和合性組み合わせにおいて、ウイルス伝搬効率が100%に達しなかったことを説明できるものである。また、このウイルス伝搬効率の結果とも併せて考察すると、分生子形成がウイルス伝搬に大きな役割を果たしていることを示唆している。



図2 . 変異菌の分生子形成 . (A) 変異菌単独培養、(B) 異なる菌株との対峙培養、(C) 変異菌同士の対峙培養 . 写真下側の変異菌において (C) では分生子が形成されていない .

(2) 変異菌のゲノム構成

白紋羽病菌の変異菌およびその親系統に該当する W1032 株、W563 株のゲノム解読を行った。得られたデータについて、モデル菌株として既に全ゲノム解読が完了している W97 株と比較解析を行った。その結果、W97 株とは 1%程度の変異が含まれていることが明らかとされた。さらに、培養変異前の親系統に該当する W1032 と変異株との間においては、3552 ヶ所の変異が確認され、その変異率は 0.008%であった(図3)。この変異のうち、6割程度は 1塩基置換であり、終始コドンおよびフレームシフト変異を引き起こすものは含まれていなかった。この他に、多塩基変異、挿入、欠失変異がそれぞれ 1割程度を占めていた。

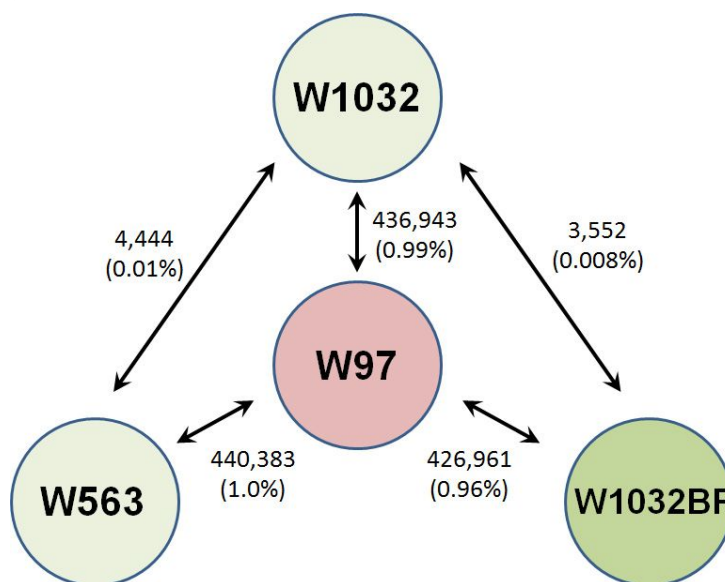


図3 . 各菌系間のゲノム配列変異率

(3) 変異菌の遺伝子発現様式

白紋羽病菌のモデル菌株である W97 株 (WT) および、変異菌とその親系統にあたる W1032 株それぞれの生育菌糸を用いて RNA-seq 解析を行った。その結果、変異菌においてのみ 2 倍以上

発現変動した遺伝子が 417 個存在し、発現が増加したものは 150 個であり、発現が減少したものは 267 個であった (図 4)。

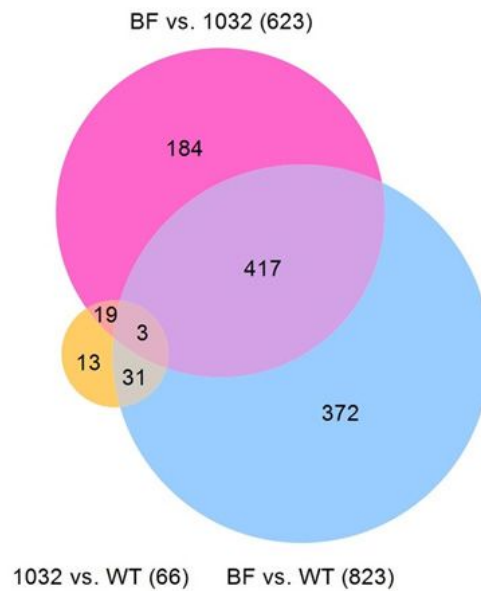


図 4 . 各菌系間における RNA-seq 解析による発現量に変化の認められた遺伝子数

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 4 件)

Iwamoto, Y., Inoue, K., Nishiguchi, S., Matsuura, K., Aino, M., Nakayashiki, H., Ikeda, K. (2017) Acidic soil conditions suppress zoospore release from zoosporangia in *Olpidium virulentus*. *Journal of General Plant Pathology* 83: 240-243.

Mori, Y., Hosoi, Y., Ishikawa, S., Hayashi, K., Asai, Y., Ohnishi, H., Shimatani, M., Inoue, K., Ikeda, K., Nakayashiki, H., Nishimura, Y., Ohnishi K., Kiba, A., Kai, K., Hikichi, Y., (2018) Ralfuranones contribute to mushroom-type biofilm formation by *Ralstonia solanacearum* strain OE1-1. *Molecular Plant Pathology* 19: 975-985.

Nguyen, Q., Iritani, A., Ohkita, S., Vu, B.V., Yokoya, K., Matsubara, A., Ikeda, K., Suzuki, N., Nakayashiki, H. (2018) A fungal argonaute interferes with RNA interference. *Nucleic Acids Research* 46: 2495-2508.

Ikeda, K., Park, P., Nakayashiki, H. (2019) Cell biology in phytopathogenic fungi during host infection: commonalities and differences. *Journal of General Plant Pathology* 85: 163-173.

〔学会発表〕(計 10 件)

池田健一、翠川陽大、前田健太郎、中屋敷均 (2017) Building blocks 法によるいもち病菌の脂質代謝遺伝子群の機能解析 . 平成 29 年度日本植物病理学会関西西部会、大阪、2017.9.19-20

原田叡人、中本知里、Nguyen H. Hanh、中屋敷均、池田健一 (2018) いもち病菌の脂質・糖代謝における付着器形成シグナル経路の関与 . 平成 30 年度日本植物病理学会大会、神戸、2018.3.25

濱根美穂子、池田健一、中屋敷均 (2018) ヒストンメチル基転移酵素 MoSET1 が制御するいもち病菌リン酸化酵素の機能解析 . 平成 30 年度日本植物病理学会関西西部会、山口、2018.9.27

岡田大樹、中屋敷均、池田健一 (2018) いもち病菌のイネ根における宿主特異的寄生性評価 . 平成 30 年度日本植物病理学会関西西部会、山口、2018.9.27

下元祥史、池田健一、森田泰彰、竹内繁治 (2018) 高知県のシトウガラシから検出されたフアイトプラズマ . 平成 30 年度日本植物病理学会関西西部会、山口、2018.9.28

諏訪瑞季、岩瀬彩、池田健一、乾秀之 (2018) ウリ科植物における POPs 輸送タンパク質の細

胞内局在と分泌．第36回農薬環境科学研究会、山梨、2018.11.8.
下元祥史、岡田知之、池田健一、久保田健嗣、柳澤広宣、森田泰彰(2019)輪紋病のシキミから見出された新規エマウイルス様ウイルス．平成31年度日本植物病理学会大会、つくば、2019.3.18-20
梅崎佑樹、Quyet Nguyen、池田健一、中屋敷均(2019)コムギいもち病菌の生産する小分子RNAの体系的な特徴付け．平成31年度日本植物病理学会大会、つくば、2019.3.18-20
池田健一、岩本豊、松浦克成、西口真嗣、中屋敷均(2019) *Olpidium virulentus* の休眠胞子におけるミラフィオリレタスビックベインウイルスの局在．平成31年度日本植物病理学会大会、つくば、2019.3.18-20
李唯衣、大北修平、池田健一、鈴木信弘、中屋敷均(2019)コムギいもち病菌 Ourmia-like viruses の2種のサテライトRNA様因子．平成31年度日本植物病理学会大会、つくば、2019.3.18-20

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕
出願状況(計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況(計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究分担者
研究分担者氏名：
ローマ字氏名：
所属研究機関名：
部局名：
職名：
研究者番号(8桁)：

(2)研究協力者
研究協力者氏名：
ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。