

令和 4 年 6 月 20 日現在

機関番号：12605

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K05946

研究課題名(和文)パン酵母異種発現系を利用したマイコウイルス遺伝子の潜在的機能の顕在化と応用展開

研究課題名(英文) Development and application of potential functions of mycovirus genes using budding yeast heterologous expression system

研究代表者

森山 裕充 (Moriyama, Hiromitsu)

東京農工大学・(連合)農学研究科(研究院)・教授

研究者番号：20392673

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)：本研究では植物病原糸状菌に感染するマイコウイルスが有する蛋白質がパン酵母細胞に及ぼす影響を調査した。ウイルス遺伝子発現酵母細胞の増殖速度、生菌細胞数測定、RNA-Seqによる発現解析を実施した。-クリソウイルス属に属するナシ黒斑病菌マイコウイルスAaCV1の全長ORF2タンパク質と、ヒト病原性真菌AfuCV41362の全長ORF3タンパク質についても酵母異種発現系を追加した。これら同属ウイルスで保存された外被タンパク質の共通した性質として、各宿主菌細胞内で特異的なプロセッシングを受ける性質や、GFP融合蛋白質発現実験より細胞内で凝集能を持つことや、生育速抑制や細胞の肥大化が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究ではマイコウイルスの外皮蛋白質を材料としたパン酵母異種発現系を利用した評価系を確立した。イネいもち病菌、ナシ黒斑病菌、ヒト病原性真菌のそれぞれに感染する3種のベータクリソウイルスの外皮蛋白質の同一性は30%と低い。酵母細胞中では、凝集性、細胞成長の遅延、細胞の肥大化を共通して生じさせた。RNA-Seqの結果、snRNA、40Sリボソームサブユニット(イントロン含有遺伝子)、ロイシンtRNAなど翻訳系に關与する遺伝子の発現量低下が示された。本研究により凝集性蛋白質が齎す細胞毒性機構について、翻訳系遺伝子群の負の制御が示された事により、プリオン病などの疾患モデルへの適用も期待される。

研究成果の概要(英文)：In this study, we investigated the effects of proteins possessed by mycoviruses infecting phytopathogenic filamentous fungi on budding yeast cells. Viral gene expression yeast cell growth rates, viable cell counts were measured, and expression analysis by RNA-Seq were performed. Full-length ORF2 protein of the pear black spot mycovirus AaCV1 belonging to the genus -chrysovirus and the human pathogenic fungus AfuCV41362, full-length ORF3 proteins were also investigated to the yeast heterologous expression systems. The common properties of the conserved coat proteins of these viruses are that they undergo specific processing in each host fungus cell, have intracellular aggregation abilities, suppress growth speeds, and cause cell enlargement, as shown by GFP fusion protein expression experiments.

研究分野：応用菌類ウイルス学

キーワード：マイコウイルス 2本鎖RNAウイルス 凝集性蛋白質 酵母異種発現系 外被タンパク質 プロセッシング  
微生物培養 糸状菌ウイルス

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、研究者個人に帰属します。

## 様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

研究代表者らは、菌類ウイルスのうち、研究代表者らが新たなウイルス属として国際ウイルス分類委員会に定義したベータークリソウイルス属に分類されるマイコウイルス遺伝子産物のうち、宿主菌細胞内でプロセッシングを受ける外被タンパク質をパン酵母に発現させた際に、生育抑制能や、その逆の生育促進能、高温感受性や高温耐性、浸透圧耐性、薬剤耐性が付与されることを見出していた。この外被タンパク質は全長が 800 アミノ酸前後であり、ベータークリソウイルス間において約 30%の同一性を示しており、RNA 依存 RNA ポリメラーゼ(RdRp)に次いで保存性が高く、宿主細胞内の生体高分子との相互作用を持つ事で、上述した細胞に対する作用を有することが予想されていた。

### 2. 研究の目的

本研究では、植物病原菌に感染するマイコウイルスが持つ機能未知な新規遺伝子の潜在的機能を、高度な細胞生物学的な知見や培養技術を有するパン酵母に異種発現させて、その時に顕れる生物活性を検証することにより、ジーンバンク情報では予測不可能なマイコウイルス遺伝子産物の潜在的な生物学的機能の解明を試みた。得られた研究成果は、マイコウイルスが感染する植物病原菌の生育、病原性、代謝変換による薬剤感受性への影響の解析に帰還することにより、生物制御科学分野や発酵生産分野の新たな課題克服技術の切り口として活用することを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### 1) 直接的要因としてマイコウイルス遺伝子産物が酵母細胞に与える影響の調査

生育阻害現象の特徴である生菌細胞数の低下、細胞の肥大化、異常な液胞化の観察を行い、同時に RNA-seq やタンパク質発現など生化学的解析を行う。これまでの研究で、MoCV1-A の ORF4 タンパク質 (812aa) のうち、中央付近の SUa 領域(aa325-575)に生育阻害活性を有することが分かっており、AaCV1 の ORF2 (771aa) も生育阻害活性を示すことが分かっている(文献 1, 2, 3, 4)。

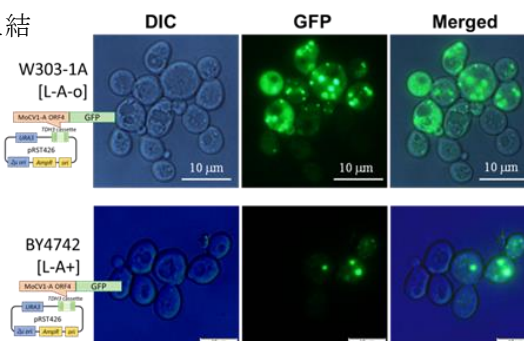
#### 2) マイコウイルス遺伝子産物が酵母細胞の染色体に生育促進変異を与える影響の調査、及び各種ストレス耐性、薬剤耐性試験

MoCV1-A の ORF4 のうち生育阻害能が低下したペプチド配列 258aa(aa436-693)を酵母細胞内で発現させると、生育阻害耐性を獲得して生育促進を現す酵母細胞が再現性を持って単離される。この生育促進能の要因となる染色体上遺伝子の同定を試みる。生育阻害能が低下したペプチドを発現させて、染色体上変異として出現する生育促進株について、①温度、②塩濃度、③エタノールについて各耐性能の調査を行い、その相違について考察する。

### 4. 研究成果

1) 過去の検討において、ベーターマイコウイルス MoCV1-A の ORF4 タンパク質と GFP 融合を W303-1A [L-A-o] 菌株に形質転換した際には多くの顆粒状に集まった凝集体が観察されたが、BY4742 [L-A] 株に MoCV1-A ORF4 GFP 融合タンパク質を発現させた際には、W303-1A [L-A-o] 株で観察された凝集体の数は少なく、細胞形態の異常も軽減されていることが判明した。そこで、W303-1A [L-A-o] 株について、分裂寿命を測定した結果(長浜バイオ大学向由紀夫教授のご厚意による実験データご提供)、W303-1A の分裂寿命は通常の 3 分の 1 程度であり、生育遅延の変異が生じた菌株であることが判明した。L-A ウイルスが治癒されて [L-A-o] となる行程において、RNA 代謝、またはタンパク質代謝に何らかの変異が入っていたことが想定され、その変異の為に、凝集性タンパク質に対する感受性が強くなり、生育抑制現象が顕著に表れたことが予想された。

Comparisons of cell morphologies between W303-1A [L-A-o] and BY4742 [L-A] which are expressing MoCV1-A ORF4 protein.

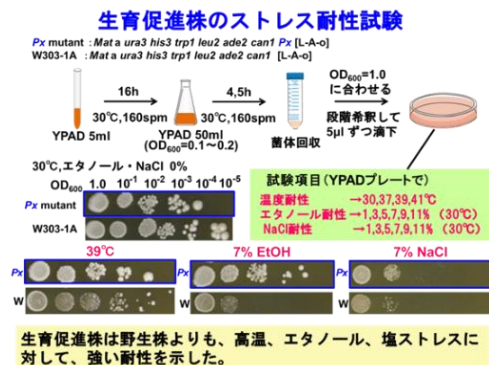
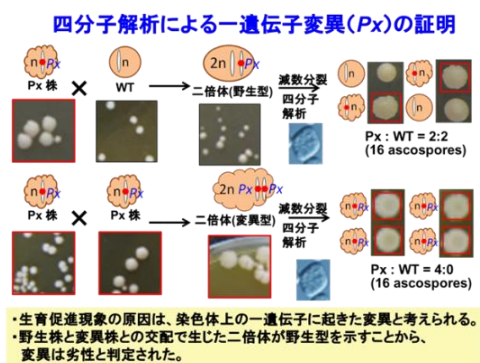


RNA-Seq の結果においても、W303-1A [L-A-o] 菌株では翻訳系、ストレス耐性(小分子シャペロン)、抗活性酸素酵素などの発現量の低下が著しかった。BY4742 [L-A] 株においても同様な傾向が見られた。ミトコンドリアを欠損させた  $\rho$  ゼロ細胞においては、W303-1A [L-A-o] 株、BY4742 株 [L-A] 共に、 $\rho$  + 細胞に比べると生育抑制程度が激しかったことより、凝集性タンパク質の毒性を緩和するためには、ミトコンドリアの存在が必要であることが予想された。

2) MoCV1-A の ORF4 のうち生育阻害能が低下したペプチド配列 258aa(aa436-693)を発現させたパン酵母をジャーファーメンターで培養すると、生育促進を示す変異株が見つかった

た。さらに生育促進を示す変異株は、39°C高温耐性やエタノール耐性、塩ストレス耐性を獲得していた。39°C高温耐性に着目した四分子解析及びそれにより得られた四分子と親株の39°Cにおけるストレス試験では、39°Cの高温において W303-1A[L-A-o]がほとんど生育することができなかった一方で、BY4742 は生育することが可能であった。また、W303-1A[L-A-o]と BY4742 を交配させ得られた四分子は 39°Cにおいて生育するものとしないうものが高い割合で 2 : 2 に分離した。得られた分離比は、検定数は  $\chi^2$  乗検定に資する値であるが、BY4742 の 39°C温度耐性が一遺伝子支配であるか否かは、まだ確かとは言えない。しかし、今回の一連の実験で BY4742 は 39°Cにおいて温度耐性を示し、その要因遺伝子は染色体上に座することが予測された。

バツフルラスコにおける MoCV1-A ORF4-24 を導入したパン酵母の生育試験において、濁度 (OD<sub>600</sub>) には顕著な差は見られなかった。一方、生菌細胞数に関しては、L-A ウイルスを保持している菌株 (BY4742, W303-1A[L-A]) では ORF4-24 導入により empty 導入株と比較して生育が阻害された。また、L-A ウイルスがフリー化され、保持していない菌株 (W303-1A[L-A-o]) では ORF4-24 導入により empty 導入株と比較して生育が促進され、先行研究を支持する結果が得られた。ORF4-24 導入がパン酵母に与える影響が L-A ウイルスの有無に左右されるかを確認するために L-A ウイルス高含量株を用いて、今後関連を調べる予定である。



#### <引用文献>

- 1) Urayama S, (他 6 名) Moriyama H. (8 番目責任著者) Journal of Virology 86 (15): 8287-8295, (2012).
- 2) Urayama S, (他 8 名) Moriyama H (10 番目責任著者) Virus Research 223: 10-19, (2016).
- 3) Urayama S, (他 2 名) Moriyama H (3 番目責任著者) Microbiology and Immunology 58:294-4
- 4) Okada R, (他 9 名) Moriyama H (9 番目責任著者) Virology 519: 23-32, (2018).

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 7件/うち国際共著 2件/うちオープンアクセス 9件）

1. 著者名 Uchida K, Sakuta K, Ito A, Takahashi Y, Katayama Y, Omatsu T, Mizutani T, Arie T, Komatsu K, Fukuhara T, Uematsu S, Okada R, Moriyama H	4. 巻 3
2. 論文標題 Two novel endornaviruses co-infecting a Phytophthora pathogen of Asparagus officinalis modulate the developmental stages and fungicide sensitivities of the host oomycete	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Microbiology	6. 最初と最後の頁 1-18
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fmicb.2021.633502	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 Moriyama H, Aoki N, Fuke K, Urayama-Takeshita K, Takeshita N, Chien-Fu Wu	4. 巻 4
2. 論文標題 Alternaviruses (Unassigned)	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Encyclopedia of Virology (Fourth Edition)	6. 最初と最後の頁 544-548
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/B978-0-12-814515-9.00031-X	査読の有無 無
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 Kotta-Loizou, I, Coutts, R.H.A, Caston, J.R, Moriyama, H, Ghabrial, S.A	4. 巻 4
2. 論文標題 Chrysovirus (Chrysovirus) - General Features and Chrysovirus-Related Viruses	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Encyclopedia of Virology (Fourth Edition)	6. 最初と最後の頁 557-567
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/B987-0-12-809633-8.21319-8	査読の有無 無
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 該当する
1. 著者名 Takahashi-Nakaguchi A, Shishido E, Yahara M, Urayama M, Ninomiya A, Chiba Y, Sakai K, Hagiwara D, Chibana H, Moriyama H, Gono T	4. 巻 11
2. 論文標題 Phenotypic and Molecular Biological Analysis of Polymycovirus AfuPmV-1M From Aspergillus fumigatus: Reduced Fungal Virulence in a Mouse Infection Model	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Microbiology	6. 最初と最後の頁 1-17
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fmicb.2020.607795	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 Owashi Y, Aihara M, Moriyama H, Arie T, Teraoka T, Komatsu K	4. 巻 11
2. 論文標題 Population Structure of Double-Stranded RNA Mycoviruses That Infect the Rice Blast Fungus <i>Magnaporthe oryzae</i> in Japan	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Microbiology	6. 最初と最後の頁 1-10
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fmicb.2020.593784	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 Akihiro Ninomiya, Syun-ichi Urayama, Rei Suo, Shiro Itoi, Shin-ichi Fuji, Hiromitsu Moriyama, Daisuke Hagiwara	4. 巻 11
2. 論文標題 Mycovirus-Induced Tenuazonic Acid Production in a Rice Blast Fungus <i>Magnaporthe oryzae</i>	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Microbiology	6. 最初と最後の頁 1-9
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 -

1. 著者名 Takahashi-Nakaguchi A., Shishido E., Yahara M., Urayama S.I., Sakai K., Chibana H., Kamei K., Moriyama H., Gonoï T.	4. 巻 10
2. 論文標題 Analysis of an intrinsic mycovirus associated with reduced virulence of the human pathogenic fungus <i>Aspergillus fumigatus</i> .	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Microbiology	6. 最初と最後の頁 1-22
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fmicb.2019.03045	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 Higashiura T., Kato Y., Urayama S.I., Hayashi O., Aihara M., Fukuhara T., Fuji S., Kobayashi S., Hase S., Arie T., Teraoka T., Komatsu K., Moriyama H.	4. 巻 535
2. 論文標題 <i>Magnaporthe oryzae</i> chrysovirus 1 strain D confers growth inhibition to the host fungus and exhibits multifunctional viral structural proteins.	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Virology	6. 最初と最後の頁 241-254
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.virol.2019.07.014.	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 Kotta-Loizou I., Cast&ocute;n J.R., Coutts R.H.A., Hillman B.I., Jiang D., Kim D.H., Moriyama H., Suzuki N.	4. 巻 101
2. 論文標題 ICTV Consortium. ICTV Virus Taxonomy Profile: Chrysoviridae.	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Journal of General Virology	6. 最初と最後の頁 143-144
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1099/jgv.0.001383	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 該当する

[学会発表] 計16件(うち招待講演 2件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 林 勇歩、原 和弘、岩崎桃子、向由起夫、福原敏行、森山裕充
2. 発表標題 マイコウイルス由来タンパク質を出芽酵母に異種発現させた時に現れる生育促進現象の解析
3. 学会等名 第53回酵母遺伝学フォーラム
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 Wu Chien-Fu, Fukuhara Toshiyuki, Okada Ryo and Moriyama Hiromitsu
2. 発表標題 Specific genome alterations of segmented dsRNA mycovirus, <i>Altenaria alternata</i> virus 1 (AaV1), causing the morphologies changing in saprophyte <i>A. alternata</i> :
3. 学会等名 2020年度日本植物病理学会関東部会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 作田康平、内田景子、高橋優実、福原敏行、植松清次、森山裕充
2. 発表標題 アスパラガス疫病菌に混合感染する <i>Phytophthora endornavirus</i> ゲノムの末端構造及びニック構造の解析
3. 学会等名 2020年度日本植物病理学会関東部会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 内田景子、作田康平、井藤碧吏、岡田亮、福原敏行、植松清次、森山裕充
2. 発表標題 2つの新規エンドルナウイルスが同時感染したアスパラガス疫病菌の遊走子嚢形成と殺菌剤感受性
3. 学会等名 第46回日本農薬学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Lentukei Daniel, Hironitsu Moriyama, Tsutomu Arie, Ken Komatsu
2. 発表標題 Infection by three hypovirulence-associated chrysovirus cause differential phenotypic traits in an isogenic Magnaporthe oryzae host
3. 学会等名 2021年度日本植物病理学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 岡田 亮・北浦健太郎・宮本拓也・秋元拓己・小河原孝司・森山裕充
2. 発表標題 Sequence analysis of novel mycoviruses infecting the strawberry anthracnose fungus, Colletotrichum fructicola
3. 学会等名 2021年度日本植物病理学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Chien-Fu Wu, Toshiyuki Fukuhara, Ryo Okada and Hiromitsu Moriyama
2. 発表標題 Identification of 5' terminal structure and specific genome alterations of segmented dsRNA mycovirus, Alternaria alternata virus 1 (AaV1), causing the morphologies changing in saprophyte A. alternata
3. 学会等名 2021年度日本植物病理学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 作田康平, 岡田 亮 , 内田景子、植松清次、福原 敏行, 森山 裕充
2. 発表標題 アスパラガス疫病菌エンドルナウイルスの 遺伝子構造解析と生物学的機能解析
3. 学会等名 2021年度日本植物病理学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 北浦 健太郎 ・ 岡田 亮 ・ 小河原 孝司 ・ 森山裕充
2. 発表標題 イチゴ炭疽病菌 ( <i>Colletotrichum fructicola</i> ) に感染する ミトウイルスの細胞内局在性と性状解析
3. 学会等名 2021年度日本植物病理学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 橋本莉央、八代田陽子、大澤 晋、平井 剛、森山裕充、吉田 稔
2. 発表標題 分裂酵母のオキシリピンを介した窒素代謝に関わる細胞間コミュニケーションの解明
3. 学会等名 2021年度日本農芸化学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 宇多真悟・大津直子・横山 正・山田哲也・森山裕充・Maria Daniela Artigas Ramirez・福原いずみ
2. 発表標題 ダイズの放射性セシウム吸収に関するQTL-seq解析および候補遺伝子の性能評価
3. 学会等名 2020年度日本土壌肥料学会関東部会
4. 発表年 2020年



1. 発表者名 岡田 亮, 北浦健太郎, 吳 建甫, 宮本拓也, 林 可奈子, 小河原孝司, 森山裕充
2. 発表標題 複数の分化型のFusarium oxysporumから見つかった新規デルタフレキシウイルスの塩基配列の解析
3. 学会等名 2020年度日本植物病理学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 岡田亮, 宮本拓也, 林可奈子, 小河原孝司, 森山裕充
2. 発表標題 イチゴ炭疽病菌に感染するピクトリウイルスの全塩基配列の解析
3. 学会等名 2019年糸状菌分子生物学カンファレンス
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 浦山俊一, 岩橋由佳, 榎尾俊介, 兼松周作, 森山裕充, 高谷直樹, 野村暢彦, 竹下典男, 豊福雅典, 萩原大祐
2. 発表標題 イネいもち病菌における細胞外膜小胞の探索と性状解析
3. 学会等名 2019年糸状菌分子生物学カンファレンス
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 森山 裕充
2. 発表標題 RNAゲノムを有するマイコウイルスが菌類に広く存在する理由は何か?
3. 学会等名 2019年糸状菌分子生物学カンファレンス シンポジウム(招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 森山 裕充
2. 発表標題 下等真核生物を往来するマイコウイルスの機能探索
3. 学会等名 日本ワネルスサイエンス学会（招待講演）
4. 発表年 2019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
---------------------------	-----------------------	----

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