

科学研究費助成事業（基盤研究（S））公表用資料
〔令和5（2023）年度 中間評価用〕

令和5年3月31日現在

研究期間：2021～2025
課題番号：21H05035
研究課題名：マイコイムニティ研究の最前線とその植物病理学への新展開

研究代表者氏名（ローマ字）：鈴木 信弘（SUZUKI Nobuhiro）
所属研究機関・部局・職：岡山大学・資源植物科学研究所・教授
研究者番号：70206514

研究の概要：

植物病原性糸状菌類の多層性抗ウイルス免疫（菌類免疫）とウイルス側の反撃機構の総合理解、植物病理学上での免疫研究の新展開を目指す。菌類の二段階免疫、RNA 干渉（ウイルス複製阻害）と病徴軽減（第二の免疫機構）の仕組みの理解、多層性が知られる菌類免疫へのウイルスの反撃機構、菌類と植物の免疫機構の共通性・独自性の解明を通じ、抗ウイルス免疫研究領域の植物・動物界に次ぐ第三極（菌界）を形成する。

研究分野：植物病理学・ウイルス学

キーワード：菌類ウイルス 菌類免疫 RNA 干渉 抗ウイルス防御 ウイルス反撃

1. 研究開始当初の背景

近年、植物病原性糸状菌を中心に菌類ウイルス（マイコウイルス）探索が積極的に進められ、「**多様でしかもユニークな菌類ウイルス界の存在**」が示唆されている。一方、菌類ウイルスや宿主菌ゲノム情報の蓄積にも拘らず、ウイルス・菌類間の相互作用、特に菌類が持つ「抗ウイルス機構（マイコイムニティ、菌類自然免疫と定義）」の詳細は未だブラックボックスである。これに対し、植物では自然免疫の研究の歴史は古く、特にウイルス防御機構としての「RNA 干渉（RNAi、ウイルス複製阻害）」は、他の宿主界の研究を先導してきた。また、最近になってウイルスの「パターン認識に基づく免疫機構」も報告されている。菌類免疫は抗ウイルス研究が中心で、その主要な機構として、1)細胞レベルで機能する「RNAi」、2) 個体集団レベルで機能する「菌糸融合不和合性（ウイルス移行阻害）」から構成され、多層性を成すことが知られている。これらに加え、私たちは菌類免疫研究でパラダイムシフトをもたらす「**細胞レベルで働く第二の防御機構（宿主遺伝子の転写調節による病徴軽減機構）**」の存在を示している。この転写調節を伴う免疫にはダイサーと転写アクティベーターである SAGA（Spt-Ada-Gcn5 acetyltransferase）複合体が関与する。細胞レベルで機能する二段階の抗ウイルス機構「RNAi と病徴軽減」は、近年注目されている菌類ウイルスを利用した植物病原性糸状菌の生物防除「**ヴァイロコントロール**」を推進する上で、成否に深く関わる重要な宿主要因と考えられる。しかし、菌類抗ウイルス免疫やその多層性の研究は緒に就いたばかりである。

2. 研究の目的

上記研究背景から生じた学術的問いに対応する課題 A-C を推進し（下図参照）、**植物・動物界に次ぐウイルス防御機構研究の第三極（菌界）の形成、植物免疫研究への新展開・植物病理学への応用**を目指す。

問い1. 菌類抗ウイルス RNAi および第二の抗ウイルス防御（病徴軽減）の調節機構は？

問い2. 細胞レベルで機能する二段階性菌類免疫に対するウイルス側の反撃機構の実態は？

問い3. 抗ウイルス機構としての菌類免疫と植物免疫の接点、その認識・作用機構の共通性と独自性は？

3. 研究の方法

中課題 A. RNAi/第2の菌類免疫を巡る細胞レベルの抗ウイルス機構の解明

- 子の菌類によるウイルス認識・RNAi 誘導機構（鈴木・近藤）：ウイルス感知から RNAi 誘導に関わる宿主因子を同定するため、クリ胴枯病菌系を用いたジェネティックスクリーンを進める。特に、RNAi 鍵酵素や SAGA 構成成分（ヒストンアセチル化酵素複合体 HAT モジュール；GCN5, ADA2 など）に注目し、それらに相互作用する因子を同定する。
- 病徴軽減に関わる宿主菌遺伝子の同定とそれらの機能（近藤）：ウイルス感染により SAGA および RNAi 鍵因子（ダイサー, DCL2）が関与して転写亢進する代表的な宿主遺伝子を選抜し、単一・重複遺伝子破壊株を作成し、病徴発現/ウイルス複製への影響を調べる。

中課題 B. 多層性抗ウイルス菌類免疫に対するウイルス反撃機構

- RNAi 抑制蛋白質作用点の解明（近藤・鈴木）：ウイルス RNAi 抑制蛋白質の作用点の理解のため、宿主相互作用因子を探索するとともに、細胞学的・分子生物学的手法を駆使してアプローチする。
- 第二の免疫（病徴軽減）機構を抑制するウイルス蛋白質の同定（鈴木）：第二の免疫機構（病徴軽減に関与する宿主因子の転写亢進）に対し、ウイルス側の対抗手段を担う抑制蛋白質の同定を行う。

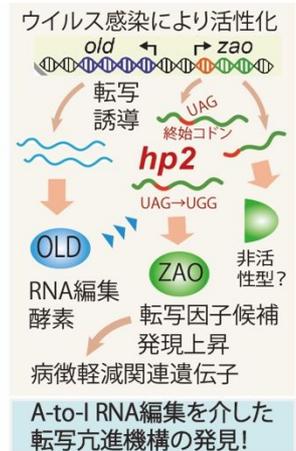
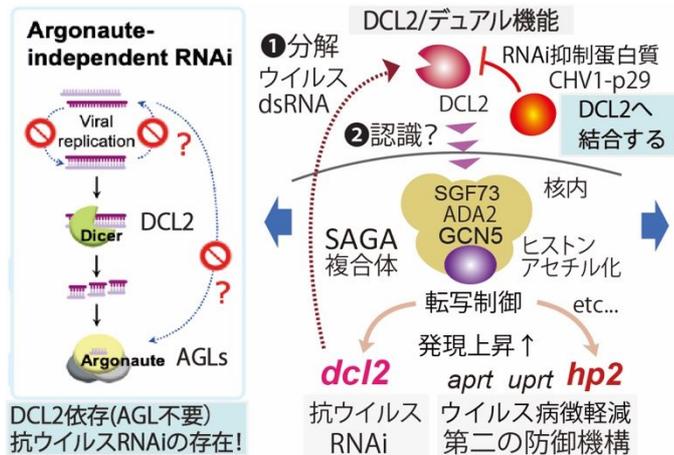
中課題 C. 植物病理学への応用・新展開

- 植物病原性糸状菌免疫不全系統の作出（鈴木・河野）：クリ胴枯病菌スーパードナー株（vic 破壊株：Nuss 博士から分譲）を改良し、多層性、集団レベルでの免疫不全ハイパードナーを作出する。
- SAGA を巡る菌類免疫と植物免疫との接点（河野）：SAGA 複合体の植物 RNAi 鍵因子転写誘導、ウ

ウイルス防御機構への関与を、野生タバコとイネの ADA2, GCN5 発現抑制システムを作成し解析する。

4. これまでの成果

中課題 A. クリ朧枯病菌の Argonaute (*agl1-4*) 重破壊株、ダイサー (*dcl2*) 破壊株、それらの 5 重変異株を作成し、RNAi 鍵因子である Argonaute が不要なダイサー依存的抗ウイルス RNAi を明らかにした。Argonaute 非存在下での短鎖干渉 RNA (siRNA) の挙動や機能解析を可能となった。



A-to-I RNA 編集酵素遺伝子 (*old1/2*) と隣接する転写因子候補遺伝子 (*zao1/2*; RNA 編集の標的遺伝子) 2 組が、抗ウイルス RNAi さらには下記病徴軽減に関わるマスターレギュレーターである可能性が示唆された。以上の結果は、抗ウイルス機構研究の第 3 極の地位確立に向けた着実な一歩となる成果である。

中課題 B. ハイボウイルス CHV1 の RNAi 抑制蛋白質 p29 が、二段階性抗ウイルス免疫 (RNAi および宿主遺伝子の転写調節を伴う病徴軽減機構) の両方の鍵因子となるダイサー (DCL2) と結合することを示した。本成果は、CHV1 p29 がダイサー結合性を持ち、二段階性免疫に反撃可能なデュアル機能性因子であることを強く示唆した。RNAi 抑制蛋白質研究が盛んな植物ウイルスも含め、極めて稀な例である。

中課題 C. 課題 A 推進のため、クリ朧枯病菌 RNAi 関連遺伝子を用いて多重遺伝子破壊株作出方法を確立した。野生タバコの GCN5 (SAGA, ヒストンアセチルトランスフェラーゼ遺伝子) が 2 本鎖 RNA 合成酵素 *rdr1* 遺伝子 (siRNA 産生促進に関与) の発現調節、植物 RNA ウイルス (CMV, TMV) の病徴発現に影響を及ぼすことが示唆された。イネでも GCN5 が防御関連遺伝子の発現に関与する可能性が示された。

5. 今後の計画

中課題 A. クリ朧枯病菌変異株を用いて、ウイルス由来 siRNA の挙動やターンオーバー、Argonaute 遺伝子および siRNA のウイルス感染認識への関与などを明らかにする。クリ朧枯病菌でウイルス病徴軽減に関わるマスターレギュレーター関連遺伝子の各種破壊株作出や遺伝子相補実験を行う。

中課題 B. CHV1 p29 と二段階性抗免疫 (RNAi および病徴軽減) の鍵因子であるダイサー (DCL2) との結合様式を複数の手法を用いて検証する。また、CHV1 p29 の二段階性抗免疫への作用点を証明する。ダイサーの *in vitro* dsRNA 切断阻害活性は、既に確立した評価法 (Tabara-Suzuki-Fukuhara, FGB2021) で調べる。

中課題 C. 宿主クリ朧枯病菌の細胞質不和合性遺伝子 (*vic*) の多重破壊に加え、さらに RNAi 鍵酵素遺伝子を破壊した多層性抗ウイルス免疫機構が機能しない「真の免疫不全菌ハイバードナー菌」を創出する。野生タバコおよびイネで SAGA/HAT モジュールを構成する ADA2 遺伝子の発現抑制システムを作成する。構築済みの GCN5 遺伝子発現抑制システムと合わせ、ウイルスを含む各種植物病原体に対する植物側の防御関連遺伝子の発現応答、防御反応に対する影響を評価する。

6. これまでの発表論文等 (受賞等も含む)

1. Sato Y, Hisano S, Lopez-Herrera C, **Kondo H**, **Suzuki N***. 2022. Three-layered complex interactions among capsidless (+)ssRNA yadokariviruses, dsRNA viruses, and a fungus. *mBio* 13(5) e0168522. 査読有
2. Wang H, 他 4 名 (**Suzuki N***, 4 番目). 2023. Capsid structure of a fungal dsRNA megabirnavirus reveals its previously unidentified surface architecture. *PLoS Pathog* 19(2), e1011162. 査読有
3. Das S, Hisano S, Eusebio-Cope A, **Kondo H**, **Suzuki N***. 2022. A transfectable fusagravirus from *Cryphonectria carpnicola* with spherical particles. *Viruses* 14, 1836546. 査読有
4. Sato Y, 他 6 名 (**Kondo H**, 6 番目; **Suzuki N***, 7 番目). 2022. A new tetra-segmented splipalmivirus with divided RdRP domains from *Cryphonectria naterciae*, a fungus found on chestnut and cork oak trees in Europe. *Virus Res* 307, 19860. (top 10%, Elsevier Scopus) 査読有
5. **Kondo H**, Botella L, **Suzuki N***. 2022. Mycovirus diversity and evolution revealed/inferred from recent studies. *Annu Rev Phytopathol* 60, 307-336 (top 1%, Web of Science) 査読有

7. ホームページ等

URL: <http://www.rib.okayama-u.ac.jp/pmi/index.html>