

令和 5 年 5 月 18 日現在

機関番号：12102

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2021～2022

課題番号：21K20567

研究課題名（和文）マイコウイルスカタログの作成：ウイルスと宿主糸状菌の関係性の可視化

研究課題名（英文）Visualize the interaction between mycovirus and host filamentous fungi

研究代表者

黒木 美沙（Kuroki, Misa）

筑波大学・生命環境系・研究員

研究者番号：20910904

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,400,000円

研究成果の概要（和文）：カビ類に感染するウイルスであるマイコウイルスが宿主に与える影響を、多数の宿主菌株を用いて解析し並列に評価することで、その多様性を理解することを目的とした。マイコウイルスの有無による表現型の違いは糸状菌株ごとのゲノム配列に由来する表現型の違いよりも小規模なものであったため、マイコウイルスは宿主の表現型のバリエーションを与える存在と捉えることができた。また、ウイルス交換株ではウイルスと宿主菌の組み合わせによりそれぞれ特異的な発現パターンを示していたことから、ウイルスが宿主に与える影響は非常に高い宿主特異性のもとに成り立っていることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

マイコウイルスは長年宿主菌に対してほとんど影響を与えない存在として捉えられてきたが、近年、宿主の表現型を変化させる例が多数報告されており、糸状菌の表現型をコントロールできる可能性を秘めた因子として注目されている。本研究ではマイコウイルスと宿主糸状菌の関係性には高い宿主特異性が存在することを明らかにした。つまり、その組み合わせ次第で多数の宿主表現型のバリエーションを生み出すことができ、マイコウイルスを活用した糸状菌の機能強化や弱点克服への発展が期待できる。

研究成果の概要（英文）：Mycoviruses are virus detected from fungal tissue. I focused on mycovirus's effect on host organism, such as morphology, secondary metabolism and gene expression. I aim to figure out diversity of mycovirus by comparing the mycovirus's effect among some *Aspergillus flavus* isolates. The effects of mycovirus were various but it seemed to depend on host's genomic background than kind of virus genus. The results presented viruses provide variation of transcriptome pattern for its host. Furthermore, virus swapping isolates showed individual transcriptome pattern depending on pair of virus and its host. This research suggested there is high specific relationships between mycovirus and its host fungi.

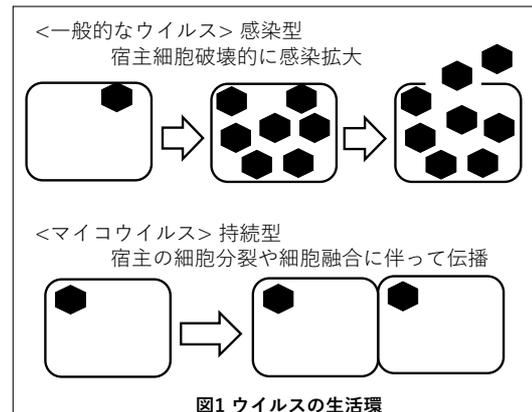
研究分野：分子生物学

キーワード：アスペルギルス 糸状菌 マイコウイルス 二次代謝 遺伝子発現 宿主特異性

### 1. 研究開始当初の背景

糸状菌は地球上のあらゆるところに生息し、古くから人間社会にも多大な影響を及ぼしてきた。しかし糸状菌にウイルスが感染していることが報告されたのはつい最近のことで、マイコウイルスが環境スケールでどれほど存在するのか、全体像は明らかになっていない。一部のマイコウイルスでは病原性や二次代謝化合物の産生など、宿主の機能に影響を及ぼすことが近年報告されている (Nerva et al., 2019, Ninomiya et al., 2020, Takahashi-Nakaguchi et al., 2020, Zhou et al., 2021) が、ほとんどの糸状菌の生理生態の理解はマイコウイルスの存在が全く考慮されていない現状である。本研究の学術的「問い」は、糸状菌の生態におけるマイコウイルスの影響を真に理解することにある。

また、マイコウイルスは宿主を殺さず持続的に感染する(図1)が、感染様式には不明な点が多く、ウイルスの宿主範囲やウイルス種ごとの多様性など、動物や植物を宿主にするウイルスに比べて理解が大きく遅れている。また、これまで報告されたマイコウイルスはいずれも宿主の病原性など表現型に大きく関与する点から着目されたものである。そのため、表現型に影響を与えないマイコウイルスについては、環境中にどの程度存在するのか、宿主との相互作用はないのかなどの情報がほとんどない。しかし、自然淘汰の中で特定のウイルスが長きにわたり感染した状態を維持していることには何らかの意味があると考えられる。これまで見過ごされてきたマイコウイルスの役割は学術的に重要な「問い」であり、網羅的にウイルスの生態を観察し規則性を見出すことで、ウイルス学的理解に全く新しい視点を提供できる。



### 2. 研究の目的

本研究では、これまでその存在が見過ごされてきたマイコウイルスにも目を向け、その感染による宿主糸状菌の表現型の変化の有無を評価することで宿主-ウイルスの組み合わせやその関係性を可視化することを主な目的とした。

### 3. 研究の方法

#### (1) ウイルスの検出

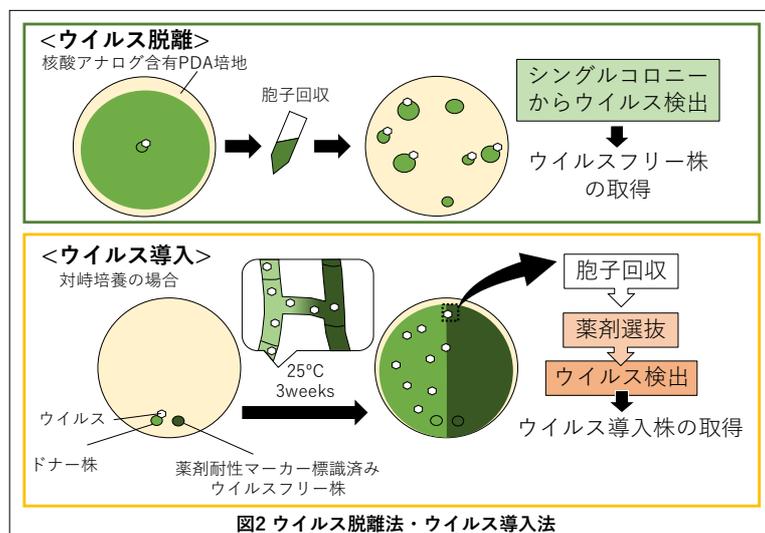
千葉大学真菌医学研究センターに保管されている 73 株の *Aspergillus flavus* 野生株からマイコウイルスを探索した。各野生株の液体培養菌体から、マイコウイルスの指標となる二本鎖 RNA を単離し、電気泳動によってマイコウイルスの有無を判定した。ウイルス陽性となった菌株から抽出した二本鎖 RNA を用いて FLDS 法 (Hirai et al., 2021) による NGS 解析を行うことで、ウイルス配列を推定した。Blastx で  $1.0e-5$  以上となる相同配列を検索することでウイルス属の推定を行った。ウイルス配列推定後は、各ウイルスの RdRp 配列特異的なプライマーを設計し、ワンステップ RT-PCR 試薬によりコロニーダイレクト PCR あるいは total RNA を鋳型とした PCR により検出した。

#### (2) ウイルスの脱離 (図2上)

ヒトウイルスの治療薬として利用されている核酸アナログを含む寒天培地上で1週間培養し、形成された胞子を回収した。単孢子分離ののちコロニーPCRによりウイルスの有無を確認し、計3回の単孢子分離を経てウイルスフリー株を取得した。

#### (3) ウイルスの導入 (図2下)

プロトプラスト PEG 法を用いて、ウイルスフリー株にピリチアミン耐性マーカーを導入した。ウイルス保持株とマ



ーカー入りのウイルスフリー株の胞子液を同一プレート上の2ヶ所に点植菌する対峙培養、あるいはそれぞれの胞子液を混合し1ヶ所に点植菌する混合培養を行った。培養の過程で、ウイルスは菌糸融合を介して水平伝播すると考えられている。対峙培養あるいは混合培養後のプレー

トから胞子液を回収しピリチアミンマーカによる選抜およびコロニーPCR によるウイルス検出を行った。計 3 回の単胞子分離を経て、ウイルスフリー株に新規にウイルスが感染した株を取得した。

#### (4)表現型解析

胞子液を PDA 培地にそれぞれ植菌し、生育および胞子形成率を測定した。寒天プレートあるいはスライドカルチャーで培養した菌体を光学顕微鏡および実体顕微鏡で観察し、性状の比較を行った。各種薬剤の最小発育阻止濃度は CLSI 法で測定した。UV 耐性は、胞子液を YPGA 培地上でシングルコロニーに分離できるように播種したプレートに UV を照射し、UV 非照射プレートで形成されるコロニーの数と比較した。

#### (5)二次代謝産物解析

胞子液を YESA 培地に全面播種し 7 日間培養した。培地ごと凍結乾燥したのち、アセトンで抽出を行い、濃縮後 DMSO に再溶解した。1260 Infinity LC system で Poroshell 120 EC-C18 column  $\phi$  3.0 mm  $\times$  100 mm, particle size 2.7  $\mu$  m)を用いて HPLC 解析を行った。流速 0.8 mL/min で、0.5%酢酸含有アセトニトリルが 18 分間で 5-100%になるようグラジエント容離を行った。

#### (6)遺伝子発現解析

胞子液を YESA 培地に全面植菌し 7 日間培養した。菌体を凍結破碎し TRIzol により RNA を抽出し、市販の RNA 抽出キットで濃縮精製した。取得した total RNA から NEBnext キットを用いて cDNA ライブラリーを作製し Novogene への外部委託により NGS 解析を行った。リードデータは CLC genomics workbench によりトリミング、マッピングを経て、各遺伝子の TPM (Transcripts per million) を算出した。基準となる株での TPM と比較して 2.5 倍以上発現が上昇あるいは減少している遺伝子 (Differentially expressed genes)DEGs とした。FungiFun (elbe.hki-jena.de) を用いて Enrichment 解析を行った。

### 4. 研究成果

#### (1)ウイルスの探索

自然環境中や臨床現場から単離された 73 株のアスペルギルスフラバス菌株に対してウイルスの探索を行うと、9 株から 6 属のマイコウイルス配列を検出することができた (表 1)。ほとんどの株からは 1 種類のマイコウイルスしか検出されなかったが、IFM 63847 株は *Aspergillus flavus*

表 1 ウイルス保有株

Host accession	Host's isolation source	Virus name	Virus abbreviation
IFM 65242	心臓中隔@日本	<i>Aspergillus flavus</i> partitivirus1	P
IFM 65241	心臓中隔@日本	<i>Aspergillus flavus</i> partitivirus1	P
IFM 64473	気管支肺胞@日本	<i>Aspergillus flavus</i> deltaflexivirus1	dF
IFM 63847	結膜のう@日本	<i>Aspergillus flavus</i> partitivirus1	P
		<i>Aspergillus flavus</i> polymycovirus1	Pm
IFM 63449g	爪@日本	<i>Aspergillus flavus</i> narnavirus1	N
IFM 63449w	爪@日本	<i>Aspergillus flavus</i> narnavirus1	N
IFM 61879	頭部(死体)@日本	<i>Aspergillus flavus</i> vivivirus1	V
IFM 61226	心臓中隔@日本	<i>Aspergillus flavus</i> partitivirus1	P
IFM 49866	米@ベトナム	<i>Aspergillus flavus</i> virga like virus	VL

*partitivirus 1* と *Aspergillus flavus* polymycovirus 1 が共感染していた。IFM 49866 株に感染していたウイルス配列は既存のウイルスゲノムとの相同性が低く、新規の配列であることが推測できた。最も近縁のウイルスから *Aspergillus flavus* virga like virus と命名し、NCBI にも新規のウイルスとして登録した (txid3030773)。また、多くのウイルスでは既知の配列に加えて数遺伝子分の新規配列が検出できた。ウイルスの網羅探索ではメタトランスクリプトームデータから既知の配列との相同性をもとにウイルス配列を検出することが一般的だが、本研究で用いた FLDS 法では株ごとに抽出した dsRNA の配列を解析するため新規の配列を検出しやすいという特徴がある。今回の結果もその特性を反映したものだとして推測している。

#### (2)ウイルスフリー株の表現型解析/遺伝子発現解析

それぞれの菌株に抗ウイルス薬処理を行うことでウイルスフリー株を取得し (図 2 上)、同様のゲノム背景を持つウイルス保有株とウイルスフリー株について生育速度、胞子形成、抗菌活性などの表現型を解析した。これまでの報告と同様に、ほとんどの菌株でウイルスの有無による大規模な表現型の変化は観察できなかった。一方で、複数の菌株で二次代謝産物の生産量が変動していること、多数の遺伝子が発現変動していることが明らかとなった。Enrich 解析の結果、特に二次代謝に関わる遺伝子が多く発現変動していることがわかった。これらの結果は、マイコウイルスは表面的な変化を与えない場合でも、その細胞活動には大きな影響を与えていることを示唆している。

また、遺伝子発現データを用いて主成分分析を行うと、同じ菌株由来の株はウイルスの有無に関わらず近位に位置することがわかった (次ページ図 3)。これは、ウイルスの有無による表現型の変化の度合いが宿主菌株ごとの発現パターンの違いよりも小規模であることを示唆している。糸状菌株ごとのゲノム配列の違いが表現型に大きく反映されてしまうため、ウイルスごとの宿主への影響を現段階で推測することは困難であると判断した。

### (3) ウイルス再導入

ウイルスごとの特徴をつかむには、同一の菌株に対してウイルスの導入を行い比較する必要があると考えた。そこで、ウイルスフリーの株に対してウイルス保持株からウイルスを転移させ、ウイルス再導入株を作出した(図2下)。作成したウイルス再導入株の表現型や遺伝子発現を解析することで、宿主ゲノムの違いに影響されることなくウイルス種間の特徴を比較することができる。

2つの菌株 Ha (IFM 65241), Hb (IFM 65242) は同一種のウイルス Va, Vb にそれぞれ感染している。Va と Vb は全体で 10k ほどあるゲノムのうち 3 塩基しか相違がない、非常に似たウイルスである。ウイルスフリー化した Ha 株および Hb 株に対して Va あるいは Vb を導入した、ウイルス再導入株を作出した。

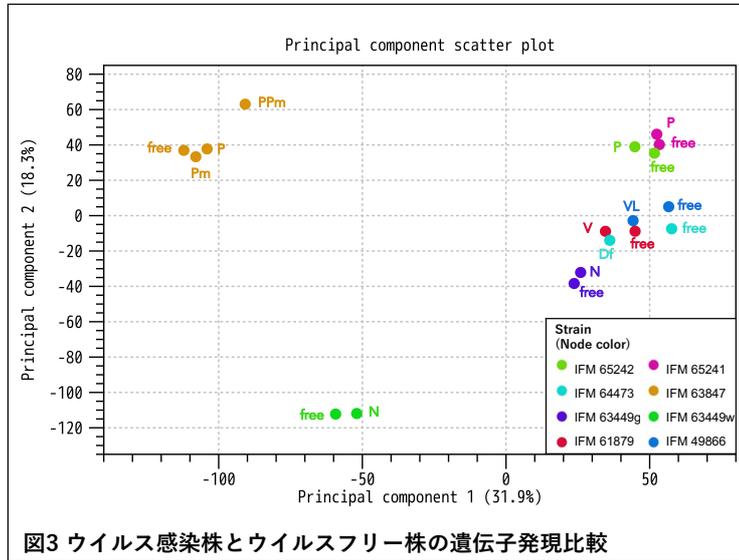


図3 ウイルス感染株とウイルスフリー株の遺伝子発現比較

### (4) ウイルス再導入株の表現型解析/遺伝子発現解析

HaVa 株、HaVb 株、HbVa 株、HbVb 株の4種のウイルス再導入株と、親株であるウイルスフリーの Ha 株および Hb 株について遺伝子発現を解析し、主成分分析を行った(図4A)。それぞれ3株ずつあるウイルス再導入株は比較的近位に位置しており、異なるウイルスを持った株や親株となるウイルスフリー株とは別個のクラスターを形成していることがわかった。各ウイルス再導入株について、親株であるウイルスフリー株での遺伝子発現と比較することで DEGs を抽出した(図4B)。宿主表現型はいずれの株でもウイルス感染による影響が観察されなかったにもかかわらず、数百単位の遺伝子の発現が変動していた。また、それぞれの DEGs で共通している遺伝子を抽出しベン図に示した(図4C)。同一の宿主菌株であってもウイルス株によって引き起こされる遺伝子発現変動は多くが異なっていること、また同一のウイルス株であっても宿主菌株に対して引き起こす遺伝子発現変動はほとんど一致しないことが明らかになった。これはウイルスが宿主に与える影響は非常に高い宿主特異性のもとに成り立っていることを示唆している。

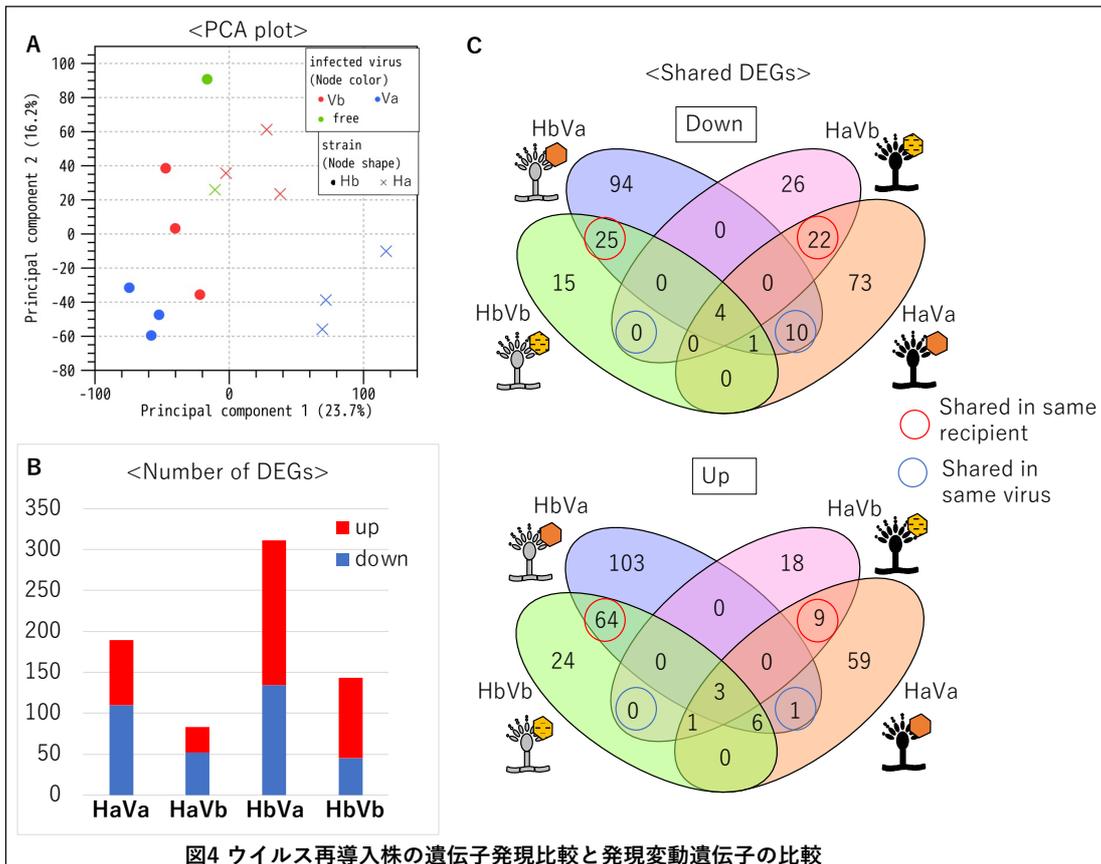


図4 ウイルス再導入株の遺伝子発現比較と発現変動遺伝子の比較

本研究の結果、マイコウイルスは目に見えるような表現型がないものであっても宿主の細胞活動に多大な影響を与えていること、マイコウイルスと宿主糸状菌の関係性は非常に特異性が高いことがわかり、マイコウイルスが宿主に与える影響は一概にまとめられるものではないことが明らかになった。これは、マイコウイルスとの組み合わせによって宿主糸状菌に無限の発現バリエーションを与えられる可能性を秘めていることを示唆している。マイコウイルスの存在を認識することが容易になってきた昨今、培養条件を変えるような感覚で、マイコウイルスによって糸状菌の特性を左右させるような技術への足がかりを提示できたことが本研究の最大の成果である。

<引用文献>

Nerva, L., Turina, M., Zanzotto, A., Gardiman, M., Gaiotti, F., Gambino, G., and Chitarra, W. Isolation, molecular characterization and virome analysis of culturable wood fungal endophytes in esca symptomatic and asymptomatic grapevine plants. **Environ. Microbiol.** 21.8, (2019) 2886-2904. DOI: 10.1111/1462-2920.14651.

Ninomiya, A., Urayama, S. I., Suo, R., Itoi, S., Fuji, S. I., Moriyama, H., and Hagiwara, D. Mycovirus-induced tenuazonic acid production in a rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*. **Front. Microbiol.** 11, 1641. (2020). DOI: 10.3389/fmicb.2020.01641.

Takahashi-Nakaguchi, A., Shishido, E., Yahara, M., Urayama, S. I., Sakai, K., Chibana, H., Kamei, K., and Gono, T. Analysis of an intrinsic mycovirus associated with reduced virulence of the human pathogenic fungus *Aspergillus fumigatus*. **Front. Microbiol.** 10, 3045. (2020). DOI: 10.3389/fmicb.2019.03045.

Zhou, L., Li, X., Kotta-Loizou, I., Dong, K., Li, S., Ni, D., Hong, N., Wang, G., and Xu, W. A mycovirus modulates the endophytic and pathogenic traits of a plant associated fungus. **The ISME Journal**, 15(7), 1893-1906. (2021). DOI: 10.1038/s41396-021-00892-3

Hirai, M., Takaki, Y., Kondo, F., Horie, M., Urayama, S. I., and Nunoura, T. RNA viral metagenome analysis of subnanogram dsRNA using fragmented and primer ligated dsRNA sequencing (FLDS). **Microbes Environ.** 36(2), ME20152. (2021). DOI: 10.1264/jsme2.ME20152.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 2件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Urayama Syun-ichi, Takaki Yoshihiro, Chiba Yuto, Zhao Yanjie, Kuroki Misa, Hagiwara Daisuke, Nunoura Takuro	4. 巻 37
2. 論文標題 Eukaryotic Microbial RNA Viruses? Acute or Persistent? Insights into Their Function in the Aquatic Ecosystem	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Microbes and Environments	6. 最初と最後の頁 n/a ~ n/a
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1264/j sme2.me22034	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 Ikeda A, Chiba Y, Kuroki M, Urayama S and Hagiwara D	4. 巻 13
2. 論文標題 Efficient elimination of RNA mycoviruses in aspergillus species using RdRp-inhibitors ribavirin and 2'-C-methylribonucleoside derivatives.	5. 発行年 2022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.2022.1024933	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 Urayama Syun-ichi, Kuroki Misa, Ninomiya Akihiro, Hagiwara Daisuke	4. 巻 73
2. 論文標題 The potential of mycoviruses affecting fungi	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 JSM Mycotoxins	6. 最初と最後の頁 25 ~ 28
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.2520/myco.73-1-6	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 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件/うち国際学会 3件）

1. 発表者名 黒木美沙, 浦山俊一, 矢口貴志, 萩原大祐
2. 発表標題 マイコウイルスが <i>Aspergillus flavus</i> の表現型に与える影響の普遍性を解明する
3. 学会等名 第20回糸状菌分子生物学コンファレンス
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 黒木美沙 , 浦山俊一 , 矢口貴志 , 萩原大祐
2. 発表標題 Aspergillus flavus のアフラトキシン生産を促進するマイコウイルスの発見
3. 学会等名 日本マイコトキシン学会第 87 回学術講演会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Misa Kuroki, Syun-ichi Urayama, Takashi Yaguchi, Daisuke Hagiwara
2. 発表標題 Mycovirus influences secondary metabolite production in Aspergillus flavus.
3. 学会等名 31st Fungal Genetics Conference (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Misa Kuroki, Syun-ichi Urayama, Takashi Yaguchi, Daisuke Hagiwara
2. 発表標題 Comparing fungal response to mycovirus infection between some strain of Aspergillus flavus.
3. 学会等名 V-International Mycovirus Symposium (国際学会)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 黒木美沙 , 浦山俊一 , 矢口貴志 , 萩原大祐
2. 発表標題 水平伝播頻度からAspergillus flavusにおけるマイコウイルスの宿主特異性を俯瞰する
3. 学会等名 第21回糸状菌分子生物学コンファレンス
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 黒木美沙 , 浦山俊一 , 矢口貴志 , 萩原大祐
2. 発表標題 マイコウイルスが宿主の二次代謝クラスターに与える影響を可視化する
3. 学会等名 日本マイコキシソ学会 第 88 回学術講演会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 Misa Kuroki, Syun-ichi Urayama, Takashi Yaguchi, Daisuke Hagiwara
2. 発表標題 Catching altered relationships between mycovirus and its host fungi during symbiosis
3. 学会等名 16th European Conference on Fungal Genetics (国際学会)
4. 発表年 2023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