

平成 30 年 5 月 23 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07312

研究課題名(和文)メタゲノム解析に基づく菌類ウイルス叢の解明と有効利用に関する研究

研究課題名(英文)Virome of the phytopathogenic fungi: metagenomic analysis and the possible utilization

研究代表者

近藤 秀樹 (Kodno, Hideki)

岡山大学・資源植物科学研究所・准教授

研究者番号：40263628

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：菌類ウイルスの同定はウイルスの多様性や進化の理解に大きく寄与するが、うどんこ病菌(子囊菌類)やさび病菌(担子菌類)のような活物寄生菌ではウイルスの存在は長らく不明であった。本課題では、赤クローバーうどんこ病菌から二本鎖RNAを取得し、次世代シーケンサーによりウイルス叢解析を行った。その結果、赤クローバーうどんこ病菌に9種以上の新規トティウイルスの存在が明らかになった。さらに、類似するトティウイルス様配列をマメ科のさび病菌の転写物ライブラリーに見いだした。これらの成果は、トティウイルスがうどんこ病菌とさび病菌の間を嘗て水平伝搬し、それぞれの宿主と共進化したとことを示唆している。

研究成果の概要(英文)：The identification of mycoviruses contributes greatly to understanding of the diversity and evolutionary aspects of viruses. However, virus discovery in obligate biotrophs such as powdery mildews (ascomycetes) and rust fungi (basidiomycetes) is still very limited. In this study, we used a deep sequencing approach to analyze the double-stranded RNA (dsRNA) segments isolated from field-collected samples of powdery mildew fungus-infected red clover plants in Japan. Database searches identified the presence of at least nine novel totivirus (genus Totivirus) in this fungus. Similar totivirus-like sequences are found in public transcriptome shotgun assembly (TSA) libraries of the bean rust fungi. Our data suggests that the horizontal transmission of ancestral totiviruses might have occurred across quite different fungal phyla, between powdery mildews and rust fungi and later evolved within the new host fungus separately.

研究分野：植物病理

キーワード：ウイルス 菌類 メタゲノム解析 次世代シーケンサー 絶対寄生菌 うどんこ病菌 クローバー トティウイルス

1. 研究開始当初の背景

近年、菌類ウイルスの探索が植物病原系状菌で精力的に進められたことにより、「多様でしかもユニークなウイルスの世界が菌類にも存在する」ことが徐々に解明されつつある(Kondo et al., Adv Virus Res 2013a). 特にここ数年の間に、わが国や中国の研究グループなどによる新奇なマイコウイルスの発見が相次いでおり、「植物病原系状菌はまさにウイルスハンティングの最前線」となっている. 例えば、これまで菌類に存在しないと考えられていた DNA ウイルスが菌核病菌から(Yu et al., PNAS 2010)、マイナス鎖(-)ssRNA ウイルスがダラスポット病菌から(Kondo et al., Virology 2013b)発見されている. 特に、菌類ウイルスのなかには宿主菌の病原力を低下させることから、「菌類ウイルスを利用した果樹病害の生物防除(ヴァイロコントロール)のモデルウイルス資材」として注目されている(千葉ら, ウイルス 2010).

さらに、我々は非レトロ RNA ウイルス由来 DNA 配列が宿主植物や菌類の核ゲノムへ内在化することを発見した(ウイルスの古の感染記録, いわゆる化石配列)(Chiba & Kondo et al., PLoS Pathogens 2011; Kondo et al., 2013b; Virus Res 2013c). これを契機に、「古ウイルス学(Paleovirology)の観点から菌類におけるウイルスと宿主菌との息の長い闘いが系統進化的に議論可能になった」. 実際、植物や菌類に広く発生するパルティティウイルス(dsRNA ゲノム, 植物では潜在型種子伝染性ウイルスとして知られる)の類似配列 PCLS1 は、シロイヌナズナや近縁種が分化した 1~1.4 千万年前に挿入されたと推測される(Chiba & Kondo et al., 2011). この PCLS1 はオーキシン代謝系の AtILR2 遺伝子と相同であり、植物や菌類で機能同定されている唯一のウイルス化石配列と考えられている. 現在、多くの植物病原系状菌ゲノムが精力的に解析されており、「新規の菌類ウイルスの感染記録探索やその存在意義を紐解くための基盤」が整いつつある.

2. 研究の目的

絶対寄生菌には農業上重要な植物病原性のうどんこ病菌, サビ病菌を含んでいるが、人工培養が難しいため、これまで菌類ウイルスハンティングの対象になってこなかった. しかし、うどんこ病菌の核ゲノムに菌類マイナス鎖 RNA ウイルス(モノネガウイルスに属し、狂犬病やエボラなどのエマージェンクウイルスが遠縁)に由来するウイルス化石配列を見いだした(Kondo et al., 2013b), この事実を受け、絶対寄生菌に現在でも存在するウイルス群を解析するため、「絶対寄生菌における菌類ウイルス叢の実態解明と、その有効利用に向けた基盤整備」を目指す課題を立案した.

本研究では、次世代シーケンサー(NGS)

による網羅解析により、植物病原系状菌に感染する菌類ウイルス叢の一端を解明することを目的としている. 特に研究が遅れている活物寄生菌(絶対寄生菌)の菌類ウイルスに注目し、分離菌系統や特定のフィールド単位で菌類ウイルスの探索を行い、新奇ウイルスのリファレンス配列の取得とウイルス多様性の理解を目指した.

3. 研究の方法

(1)次世代シーケンサーにより絶対寄生菌の菌類ウイルス叢の解析: 岡山大植物研圃場で発生する活物寄生菌(うどんこ病菌)(**図 1**)やその実験室内分離系統を供試する. 各菌体サンプルについて、菌体(分生子)からウイルス感染特異的な dsRNA あるいは全 RNA 画分を回収する. 得られた RNA 試料は外部委託により次世代シーケンスによる塩基配列解析を行った.

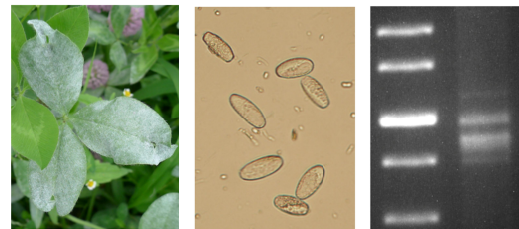


図 1. 岡山大植物研圃場内に発生したアカクロローパーうどんこ病(左), 同菌分生子(右)およびその分生子から得られたウイルス様 2 本鎖 RNA の電気泳動像(右図, Kondo et al., 2016 を改変).

(2)うどんこ病菌ウイルスの性状解析: 次世代シーケンスで取得した生データは、本研究費で挿入した解析ソフト CLC Genomics Workbench を活用し、取得配列のトリミング、アセンブリ、BLAST 検索等の一連の操作を行った. 菌類 RNA ウイルス由来のコンティグ配列は RLM-RACE や RT-PCR を行い、ウイルス全長配列を決定した. あわせて、宿主防御機構(RNAi)のこれらウイルスに対する影響を調べるために、小分子 RNA フラクシオンの次世代シーケンス解析も進めた.

(3)菌類核ゲノムを用いたウイルス化石配列の探索と新規モノネガウイルスのゲノム解読: うどんこ病菌のウイルスを query とし、公開配列データベースにてウイルス様配列を網羅的に検索した(Kondo et al., Methods Mol Biol 2015). 検出されたウイルス様配列は推定されるアミノ酸配列に置換後、PhyML による最尤法による分子系統学的手法で解析した. さらに、ウイルス化石の探索を契機に発見された菌類マイナス鎖 RNA ウイルスのうち、ゲノムの解析が未解明なものについてはゲノム全長配列を進めた.

4. 研究成果

(課題 1) 次世代シーケンサーによる絶対

寄生菌のウイルス叢の解読

岡山大学植物研圃場で栽培するアカクローバーに発生したうどんこ病菌 (*Erysiphe trifoliorum*) の分生子を回収し (図 1), その dsRNA 画分を取得した。電気泳動による解析により, 5~6kbp の 2 本鎖 RNA バンドが複数確認された (図 1)。そこで, この 2 本鎖 RNA 試料をもとに次世代シーケンサーで配列解析を行った。得られたコンティグ配列をもとに BLAST 解析を行ったところ, 少なくとも 9 種のトティウイルス (酵母で 2 本鎖 RNA ウィルスであるトティウイルスに類似) 類似配列 (4kb 以上) の存在が確認された。PCR 解析により, これらの配列がウイルスに由来し, 宿主ゲノムに内在化されたものではないことが確認された (Kondo et al., 2016)。

同一圃場よりアカクローバーうどんこ病菌を分離したところ, その実験室内系統においてもウイルス様 dsRNA の存在を確認した。そこで, その分生子の全 RNA 画分を取得し NGS 解析を行った結果, 圃場で見いだされた上記のトティウイルス様配列に加え (1 種のみが検出されず), さらに 13 種の異なるトティウイルス様配列が検出された。さらに, エンドウのうどんこ病菌系統 (岡山大学・豊田和弘博士より分譲いただいた) のウイルス叢を解析する目的で分生子の全 RNA 画分の NGS 解析を進めた。その結果, アカクローバーうどんこ病菌と同様, 複数のトティウイルス様配列の存在が確認された。興味深いことに, これらのうどんこ病菌にはトティウイルス以外にも新規 RNA ウィルス由来と考えられる複数のウイルス様配列がみだされている。実験室内のうどんこ病菌系統に見いだされたウイルス叢データは, 今後各ウイルス様配列の末端部の解析を進めた後, 成果の取り纏めを行う予定である。

(課題 2) うどんこ病菌ウイルスの性状解析

課題 1 で取得した野外のクローバーうどんこ病菌のウイルス様配列データのうち, 優占種と考えられるトティウイルス (CP と RdRp 遺伝子をコードする単一の dsRNA ゲノムをもつ) に関して詳細な解析を行った。その結果, クローバーうどんこ病菌の圃場サンプルには少なくとも 9 種の新規トティウイルス種に由来する少なくとも 10 配列 (コンティグ長, 4.2-6.0 kbp) の存在が確認された (図 2a)。そのうち 5 種については, RLM-RACE 法によりゲノムの完全長配列を解読した。これらのトティウイルス様配列を, 以下 red clover powdery mildew-associated totiviruses (RPaTVs) と呼ぶ。

RPaTV1~8 (PaTV9 を除く) のゲノム構造はトティウイルス属のタイプ種 *Saccharomyces cerevisiae virus-LA* (ScV-LA) に類似していた。すなわち, ゲノム上に外被蛋白質 CP と複製酵素 RdRp の二種のオープンリーディングフレーム (ORF) が重複して座乗していた (Kondo et al., 2016) (図 2b, 上

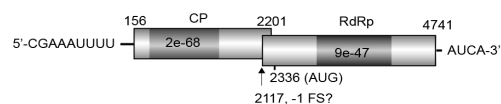
図)。これらの ORF の重複領域においては, シュドノット構造とその下流に -1 のリボソームフレームシフト保存モチーフ様の配列を含んでいた。このことから, RPaTV1~8 では, 酵母の ScV-LA で知られているように RdRp が CP-RdRp 融合体として翻訳されていると推定された。RPaTV のコードする蛋白質の推定アミノ酸配列の相同性は, BLAST 解析でお互い 44%, 既知のトティウイルスとの間でも最大 59% であった。一方, RPaTV9 については 5' 末端の配列決定には至らなかったが, 上記とは異なり *Ustilago maydis virus H1* (UmV-H1, トティウイルス属の別メンバー) と同様に単一の ORF を持つと推定された (Kondo et al., 2016) (図 1b, 下図)。UmV-H1 では, まずポリ蛋白として発現後, 自身のプロテアーゼ活性により CP と RdRp が切り出されると考えられている。RPaTV9 の蛋白質発現においても同様な戦略を用いていると推定された (Kondo et al., 2016)。

a)

	size (nt)	read count	best-matched virus	identity	e-value
ETV1	4162	7273	<i>Saccharomyces cerevisiae virus L-BC</i>	29%	3e-120
ETV2a	4683	2802	<i>Black raspberry virus F</i>	42%	0.0
ETV2b	4695	3326	<i>Black raspberry virus F</i>	42%	0.0
ETV3	4769	2300	<i>Xanthophyllomyces dendrorhous virus L2</i>	44%	0.0
ETV4	4498	3904	<i>Xanthophyllomyces dendrorhous virus L1b</i>	59%	0.0
ETV5	5010	6811	<i>Xanthophyllomyces dendrorhous virus L1A</i>	37%	1e-115
ETV6	4986	5933	<i>Xanthophyllomyces dendrorhous virus L1A</i>	33%	9e-107
ETV7	4916	3756	<i>Xanthophyllomyces dendrorhous virus L2</i>	36%	9e-98
ETV8	4809	29408	<i>Xanthophyllomyces dendrorhous virus L1A</i>	33%	2e113
ETV9	5741	21875	<i>Ustilago maydis virus H1</i>	29%	1e-20

b)

RPaTV1a/65-114_SG I-A



RPaTV9/85-21_SG II



図 2. 圃場より採取したアカクローバーうどんこ病菌に見いだされた主な新規トティウイルス様配列 (a) と典型的なウイルスゲノム構造 (b)。ETV=RPaTV; -1 FS は推定リボソームフレームシフト部を示す。Kondo et al., 2016 を改変。

本課題では, トティウイルスの粒子精製方法を検討し, 異種モデル宿主系への導入実験にチャレンジした。しかし, トランスフェクション実験は残念ながら成功に至らなかった。これは, ウィルス粒子精製に必要な菌体量を充分得られなかったことや, 既知の粒子精製法がうどんこ病菌には適合しなかった可能性が考えられた。さらに, 本課題では

どんこ病菌系統の分生子由来全 RNA より低分子 RNA 配列を取得し、そのデータの解析も行った。その結果、RPaTV 由来の低分子 RNA 配列は得られたが、比較に用いた他の糸状菌ウイルスの低分子 RNA プロファイルとは異なる傾向が認められた。その原因は不明であるが、サンプル調整を含め再解析が必要であると判断されたため、本報告書ではデータを割愛した。

(課題 3) 菌類核ゲノムを用いたウイルス化石配列の探索と新規モノネガウイルスの解読

課題 2 のアカクローバーうどんこ病菌由来のトティウイルスをクエリとし、NCBI サイトで BLAST 検索を行った。その結果、酵母ゲノムに存在する既知のウイルス様配列以外に、海草(紅藻、ヤハズツノマタ *Chondrus crispus*)核ゲノム配列にトティウイルス様配列が存在する可能性を確認した(Kondo et al., 2016)。これらの結果は、トティウイルスが酵母・糸状菌類のみならず、海草類にも存在するあるいは古に存在したことを示唆するデータである。

さらに、未知のトティウイルスの存在を理解するために、菌類、植物や昆虫類のトランスクリプトームショットガンアセンブリ(TSA)ライブラリーの探索を進めた。その結果、複数のトティウイルス(酵母の ScV-LA)様配列が複数のマメ科植物のさび病菌(*Uromyces appendiculatus*, *Phakopsora pachyrhizi*)、植物および昆虫の TSA ライブラリーに見いだされた。そこで、比較的全長に近いさび病菌の TSA 配列と RPaTV1~8 を用いた最尤法による分子系統解析を行った。その結果、RPaTV1~8 は既知のトティウイルス

とともに 4 種類の独立クレード(I~IV)に包含された(Kondo et al., 2016)(図 3)。クレード IV には、RPaTV6~8 と複数のさび病菌由来配列が見いだされた(酵母のトティウイルスは認められない)。一方、RPaTV9 は UmV-H1 と全く異なる独立クレードを形成することが判明した。子囊菌類であるうどんこ病菌と担子菌のさび病菌に類似のウイルスが存在することは(最近になり、さび病菌のトティウイルスが報告された: Zheng, et al., Front Microbiol 8, 1960, 2017)、嘗てマメ科のうどんこ病菌とさび病菌の間をトティウイルスが水平伝搬し、さらにそれぞれの宿主とともに共進化したとことを強く示唆している。

本課題では、先行の NGS によるウイルス叢解析を補完するため、チューリップ褐色斑点病菌やダイズの葉圏より見いだされた新規マイナス鎖 RNA ウイルス(Kondo et al., 未発表; Marzano & Domier, Virus Research, 213, 332-342, 2016)に関してゲノム塩基配列解析を行った。後者に関しては、Guo 博士(Chinese Academy of Agricultural Sciences)との国際共同研究として推進し、フザリウムに見いだされた新規のマイナス鎖 RNA ウイルスに一致することを明らかにした(Wang et al., Virology 2018)。

(まとめ)

本研究では次世代シーケンサーによる網羅解析で、植物病原糸状菌に感染する「菌類ウイルス叢」の一端を明らかにすることができた。特に研究が遅れている「絶対寄生菌のウイルス」で新奇ウイルスのリファレンス配列の取得と多様性を理解が進んだことは、菌類ウイルスを利用した植物病原糸状菌の生物防除「ヴァイロコントロール」(Kondo et al., 2013a)へ資する基盤情報となり得ると期待される。

トティウイルスはこれまで主に酵母やごく一部の植物病原菌類などでのみその発生が知られていた。しかし、本研究で一圃場由来のうどんこ病菌試料(宿主クローバー)から、既知の配列多様性を凌駕するトティウイルス群が見いだされたことは驚きである。あわせて、マメ科植物のさび病菌に類似のトティウイルス属メンバーが存在する可能性を示唆したことは、今後の本属ウイルスと宿主生物の進化の歴史を理解する上で意義深い成果であると考えられる。

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 8 件)

Wang L, He H, Chen X, Qiu D, Kondo H*, Guo L*. Evidence for a novel negative-stranded RNA mycovirus in the plant pathogenic fungus *Fusarium graminearum*. Virology 528: 232-240,

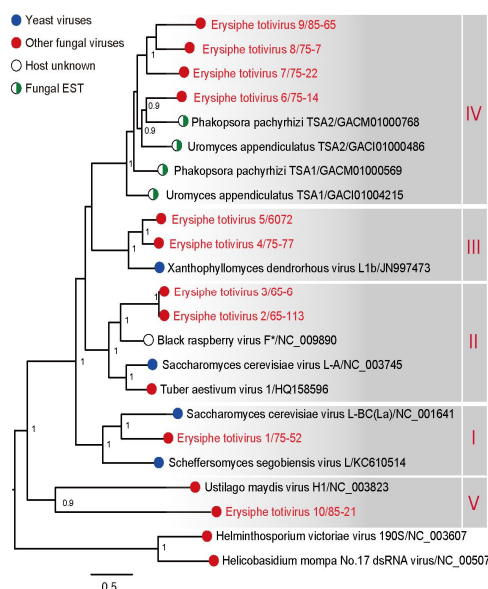


図 3. アカクローバーうどんこ病より見いだされた新規トティウイルスを含む最尤法による分子系統樹。Kondo et al., 2016 を改変。

2018 (査読有)
Kondo H*, Chiba S, Maruyama K, Andika IB, Suzuki N. A novel insect-infecting alphavirus-like group and its pervasive endogenization into insect genomes. *Virus Res* 2018 in press. (査読有)
Andika IB, Wei S, Cao C, Salaipeth L, Kondo H, Sun L*. Phytopathogenic fungus hosts a plant virus: a naturally occurring cross-kingdom viral infection. *PNAS USA* 114, 12267-12272, 2017 (査読有)
Kondo H*, Hirota K, Maruyama K, Andika IB, Suzuki N. A possible occurrence of genome reassortments among bipartite rhabdoviruses. *Virology* 508, 18-25, 2017 (査読有)
Kondo H*, Hisano S, Chiba S, Maruyama K, Andika IB, Toyoda K, Fujimori F, Suzuki N. Sequence and phylogenetic analyses of novel totivirus-like double-stranded RNAs from field-collected powdery mildew fungi. *Virus Res* 213, 353-364, 2016 (査読有)
Zhang R, Hisano S, Tani A, Kondo H, Kanematsu S, Suzuki N*. A capsidless ssRNA virus hosted by an unrelated dsRNA virus. *Nature Microbiol* 1, 1500, 2016 (査読有)
Chiba S, Lin YH, Kondo H, Kanematsu S, Suzuki N*. A novel betapartitivirus RnPV6 tolerates host RNA silencing but is impaired by its defective RNAs. *Virus Res* 219: 62-72, 2016 (査読有)
Andika IB, Kondo H, Sun, L.* Interplays between soil-borne plant viruses and RNA silencing-mediated antiviral defense in roots. *Front Microbiol*, 7, 1458, 2016 (査読有)

【学会発表】(計 5 件)

近藤秀樹・広田恵介・鈴木信弘. 分節型ラブドウイルスに見いだされたゲノムリアソートメント. 平成 30 年度日本植物病理学会大会、神戸、3月 25-27 日, 2018
Kondo H. Cross-kingdom viral infection between plants and insects: An evolutionary insight into rhabdoviruses Africa Day 2017, 岡山, 2月 14 日, 2018
近藤秀樹・鈴木信弘. 植物ラブドウイルスの分節化と進化-シンポジウム: 多様なウイルスと進化の世界. 日本進化学会第 17 回大会、京都、8月 24-26 日, 2017
近藤秀樹. 分節型ラブドウイルスの感染戦略. 第 39 回 岡山植物病理セミナー、倉敷市、5月 21 日, 2017.
近藤秀樹・久野 昌・千葉壮太郎・鈴木信弘. アカクローバーうどんこ病菌より見いだされた新規トティウイルス. 平成 29 年

度日本植物病理学会大会、盛岡、4月 26-28 日, 2017

【図書】(計 2 件)

Tamada T*, Kondo H, Chiba S. Genetic diversity of beet necrotic yellow vein virus (Chapter 5). in *Rhizomania*. eds, Biancardi, E. and Tamada, T. Springer, Switzerland. p109-131, 2016 (査読無)
近藤秀樹*・千葉壮太郎・鈴木信弘. 宿主ゲノム上に存在する RNA ウイルス感染記録を紐解く. 植物感染生理談話会論文集 50, 133-142, 2016 (査読無)

【産業財産権】

出願状況 (計 0 件)
取得状況 (計 0 件)

【その他】

ホームページ等
岡山大学・資源植物科学研究所・植物・微生物相互作用グループ：
<http://www.rib.okayama-u.ac.jp/pmi/index-j.html>

6 . 研究組織

(1) 研究代表者

近藤秀樹 (KONDO, Hideki)
岡山大学・資源植物科学研究所・准教授
研究者番号：40263628

(2) 研究分担者

鈴木信弘 (SUZUKI, Nobuhiro)
岡山大学・資源植物科学研究所・教授
研究者番号：70206514