

平成 30 年 6 月 11 日現在

機関番号：15301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2017

課題番号：15K14663

研究課題名(和文) ミトコンドリア感染性ウイルスの感染機構の解明と有効利用

研究課題名(英文) Exploration of infection mechanism and utilization of a mitochondrially replicating virus

研究代表者

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：ミトウイルスは菌類を宿主とし1本鎖(ss)RNAゲノムを持つ唯一無二のミトコンドリア感染性ウイルスである。このうち、*Cryphonectria parasitica* mitovirus 1(CpMV1)は世界3大樹病の病原であるクリ桐枯菌(子のう菌)に感染し、複雑な3者間相互作用(クリ樹-子のう菌、子のう菌-ウイルス：2つの宿主・パラサイトの関係が存在)を織りなす。本研究は、このユニークなウイルスの感染機構(宿主範囲、水平伝染搬能、宿主防御機構への対抗手段、病徴発現機構などのウイルス学的命題)の解明した世界最初の例となる。

研究成果の概要(英文)：Mitoviruses are a unique group of mitochondrially replicating viruses with positive-sense, single stranded RNA genomes. Among them is *Cryphonectria mitovirus 1* (CpMV1) which infects one of the three most destructive tree pathogens, chestnut blight fungus. This pathosystem involves two host/parasite interactions (chestnut vs. chestnut blight fungus) and chestnut blight fungus vs. CpMV1). This study represents the first example in which the host range, lateral transmissibility, symptom expression and counter-defense mechanism of a mitovirus was thoroughly analyzed.

研究分野：ウイルス学

キーワード：ミトコンドリア ミトウイルス 菌類ウイルス

1. 研究開始当初の背景

菌類ウイルスには、ミトコンドリアに感染する唯一のウイルス群、ミトウイルスが存在する。ミトウイルス (*Mitovirus*, 属名) は Hillman 博士らにより 1994 年に世界 3 大樹病の一つに数えられるクリ桐枯病の病原糸状菌 (*Cryphonetria parasitica*, 子のう菌) から始めて見つかった (Hillman & Suzuki, *Adv. Virus Res.*, 2004)。類似のウイルスは酵母を除く子のう菌や担子菌に広く存在するが、原核生物では見つかっていない (Ghabrial & Suzuki, *Ann Rev Phytopathol*, 2009)。

ミトウイルスは、ウイルスの中で最も小さいゲノム(2-3kb の一本鎖(ss)(+)RNA)を持ち、単一の ORF に RNA 依存 RNA 合成酵素 (RdRp) をコードする (図 1 A)。しかし、外被蛋白質遺伝子を持たないため粒子を作らず、RdRp がゲノム RNA に結合した状態 (RNP) で存在すると考えられる (図 1 B)。さらに、ウイルスの ORF がミトコンドリア型のコドンを使用することから、その複製部位や翻訳はミトコンドリア内と推定されているが、その詳細やウイルスの移行については不明である (図 1 C)。

2. 研究の目的

ミトウイルスは菌類を宿主とし 1 本鎖 (ss)RNA ゲノムを持つ唯一無二のミトコンドリア感染性ウイルスである。このうち、*Cryphonetria parasitica mitovirus 1* (CpMV1) は世界 3 大樹病の病原であるクリ桐枯菌 (子のう菌) に感染し、複雑な 3 者間相互作用 (クリ樹-子のう菌、子のう菌-ウイルス: 2つの宿主・パラサイトの関係が存在) を織りなす。本研究では、まずこのユニークなウイルスの感染機構 (ミトウイルスのミトコンドリア内複製部位、宿主範囲、水平伝染搬能、宿主防御機構への対抗手段、病徴発現機構などのウイルス学的命題) の解明を目指す。さらに、CpMV1 の感染性クローンの構築ならびにその発現ベクター化を進めることで、糸状菌類オルガネラ研究に新しい研究ツールの開発 (菌類オルガネラ研究の新展開) が期待される。

3. 研究の方法

ミトウイルス (CpMV1) の感染様式 (移行、伝染、宿主範囲、病原性) については細胞融合法を (図 2) 用いて、解析を進める (感染性核酸を必要としない検討課題)。CpMV1 複製能は、クリ桐枯菌別系統、別種菌、さらには植物細胞を用いて調べる。感染性核酸の合成は、3' に HDV リボザイムとミトコンドリア機能性核コード tRNA 配列を付加した完全長ミトウイルス RNA、あるいはそれと同時にミトコンドリア標的配列を付加したミトウイルス RNA 依存 RNA 合成酵素を核より発現する形質転換クリ桐枯病菌を

作成する。ミトコンドリアへミトウイルスの本来の RNA (RdRp 結合型あるいは非結合型) がたどり着き、

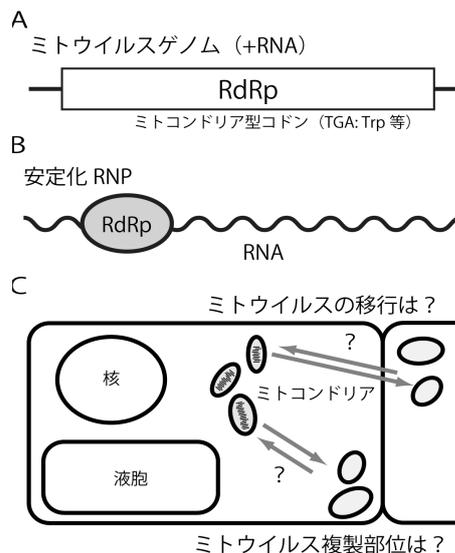


図 1 唯一無二のミトコンドリア感染性ウイルス

複製が開始されることを期待する。感染性核酸の合成に成功した場合は、逆遺伝学を用いて、上記検討課題の確認、複製に関わるウイルス因子の同定、CpMV1 のベクター化 (ミトコンドリア形質転換) を進める。

4. 研究成果

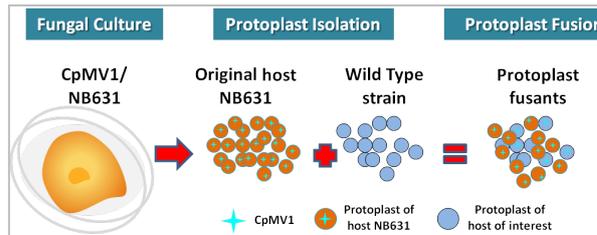


図 2 プロトプラストフュージョン

=ミトウイルスの感染様式 (移行、伝染、宿主範囲、病原性) を主に細胞融合法を用いて明らかにする=

1. 菌糸融合によるミトウイルスの水平伝搬の検定

感染菌から非感染の菌糸融合和合性菌へ菌糸融合により水平移行が起こるか調べた。この実験を行うには菌糸融合和合性の菌株準備する必要がある。申請者は、プロトフュージョン (細胞融合) により、自然クリ桐枯病菌感染株 NB631 の CpMV1 を標準菌系統 (EP155, ゲノム配列公開中) に感染させることに成功した。

2. ミトウイルスによるミトコンドリア感染率

クリ桐枯病菌株 NB631 (CpMV1 に感染) から細胞分画法によりミトコンドリアを精製し (Polashock & Hillman, *PNAS*, 1994)、CpMV1 RNA 合成酵素に対する抗体を用いてミトコンドリア感染率の検定を試みた。しかし、作

成した組換え CpMV1 RdRp に対して作成した抗体の力価が低いのか、RdRp 発現量が検出限界を下回っているのか、本実施項目の成功には至らなかった。今後の検討課題である。

3. ミトウイルスのクリ胴枯病菌異種系統への感染性検定

ミトウイルス感染細胞 (NB631) からクリ胴枯病菌別系統の非感染細胞への移行が起こるか調べた。2 同様に CpMV1 感染 EP155 あるいは NB631 と日本産非感染 J3 系統 (MAFF410557)、J4 系統 (MAFF410726)、米国产産非感染系統 NB58-19 (ATCC 76211)、C18 系統、EP67 系統、GH2-6 系統と細胞融合に供し、CpMV1 の複製能・感染性を調べた (種内宿主範囲検定)。その結果、全ての供試菌での CpMV1 の複製が観察された (図 3)。本実験では、クリ胴枯病菌系統間で非感染系統由来のミトコンドリアで複製していることを確認するため、ミトコンドリア DNA のハプロタイプ判別法を行った。その結果、J3 と他の系統との識別が可能となった。これらは、クリ同枯病菌同種内別系統が CpMV1 の宿主となることを示すことができた。

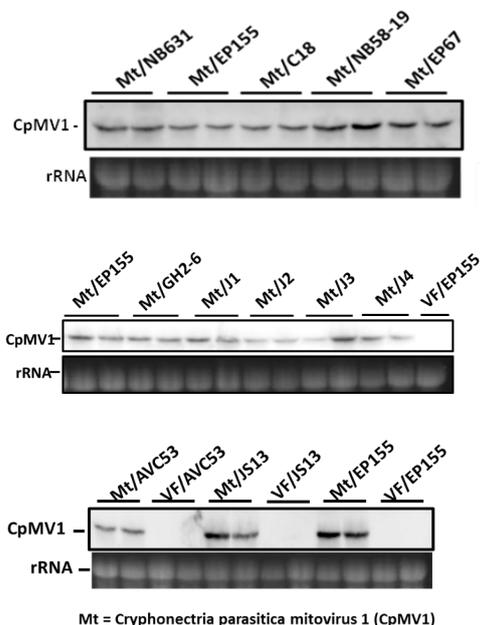


図 3 CpMV1 のノーザン解析による検出

4. ミトウイルスの菌類宿主範囲

宿主の科を越えた菌群から種々の近縁のミトウイルスが分離されることがある。しかし、宿主域が解析されたミトウイルスは報告例がない。そこで、異種菌類間でプロトフージョンを行い、その疑問に答える。具体的には *C. radicularis*, *Rosellinia necatrix*, *Helminthosporium victoriae*, *Valsa ceratosperma*, *Coprinopsis cinerea* (前 4 者は子のう菌、後 2 者は担子菌)

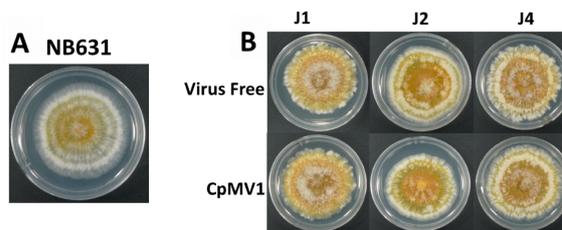


図 4 CpMV1 の宿主菌生育への影響

等の近縁～遠縁の菌群を用いて、CpMV1 の宿主域を決定した。その結果、自然宿主と比較的近縁な *C. radicularis*, *V. ceratosperma* では安定的な複製が、*Helminthosporium victoriae* では不安定ではあるが複製が認められた。一方、*C. cinerea* での複製は認められなかった。

5. ミトウイルスの植物細胞での複製能

ミトウイルスが界を超えて宿主範囲を広げることができるかを調べるため、植物細胞へのミトウイルス (導入) を試みる。ハイグロマイシン耐性遺伝子をもつシロイヌナズナ T87 培養細胞 (既に整備済み) あるいはタバコ BY2 培養細胞をクリ胴枯病菌 NB631 とプロトフージョンさせる。3. ハイグロマイシン耐性遺伝子をもつシロイヌナズナ T87 培養細胞 (既に整備済み) あるいはタバコ BY2 培養細胞 をクリ胴枯病菌 NB631 とプロトフージョンさせた。しかし、これまでのところ、結果は陰性であった。

6. ミトウイルスの病原学的解析

これまでウイルスフリーの同質遺伝子系統が得られていなかったため、ミトウイルスの宿主菌への影響が不明であった。そこで 3 で得られたウイルス感染、非感染の同質遺伝子系統を比較し、ミトウイルスの病原性 (宿主菌の生育、植物へ病原性) を常法により調べた。その結果、ミトウイルスの病原性 (宿主菌の呼吸機能、生育、植物へ病原性) を常法により調べた結果、病原性の衰退あるいはコロニー形態の異常を引き起こさないことが示唆された (図 4)。

7. 宿主防御機構とミトウイルス複製

ミトコンドリアで複製するミトウイルスが RNA サイレncing (核支配の宿主防御機構) の影響を受けるかを RNA サイレncing 欠損株 (クリ胴枯病菌標準株 EP155 の遺伝子破壊) ミトコンドリアで複製するミトウイルスが RNA サイレncing (核支配の宿主防御機構) の影響を受けるかを RNA サイレncing 欠損株 (クリ胴枯病菌標準株 EP155 の遺伝子破壊株、Nuss 博士から分譲を受けた) を用いて調べた。しかし、野生型菌と RNA サイレncing

グ欠損株での CpMV1 蓄積量に顕著な差が認められなかった。これは、ミトコンドリア感染性 CpMV1 は抗ウイルス RNA サイレンシングを回避していると考えられる (図 5)。

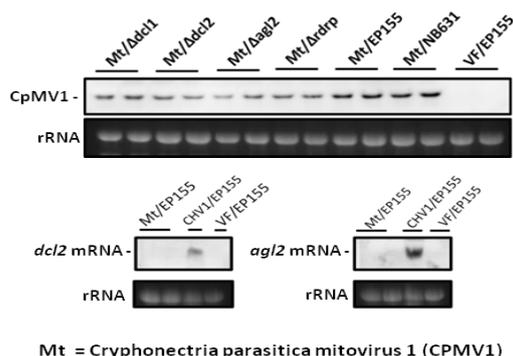


図 5 RNA サイレンシングの CpMV1 への影響

＝ミトウイルス複製部位の確認と感染性クローンの構築を目指す＝

9. ミトウイルス感染性クローンの構築

クリ胴枯病 菌由来のミトウイルス (Cryphonectria mitovirus 1, CpMV1) の完全長 cDNA クローン 2 種類作成した。1 種類は、CpMV1 の cDNA であり、もう一方は 8 箇所ミトコンドリア型のトリプトファンコドン (UGA) (核型では停止コドンとして機能する) は保存されていた。従って、まずこれらの UGA コドンを核型トリプトファンコドン (UGG) に変更した cDNA も同時に合成した。尚、試験管内でウイルスゲノムと同一の配列を有する RNA の合成を可能とするため、5' 末端に T7 プロモーター、3' 末端に Sal I を付加した。これらのクローンを核型コドンに変更した RdRp 発現クリ胴枯病菌、あるいは非形質転換体にトランスフォームあるいはトランスフェクションを行った、しかし、感染性クローンの構築に至らなかった。そこで、さらにミトウイルスとは同科のナルナウイルスの感染性クローンをスペインの R. Esteban 博士より共同研究の一環として分譲を受けた。本クローンは自然宿主であり *Saccharomyces cerevisiae* での感染性が確認されている。しかし、本クローンも自然免疫欠損クリ胴枯病菌系統 (ダイサー遺伝子、アルゴノート遺伝子欠失株) でも感染性は認められなかった。

当初「8. ミトウイルスミトコンドリア内複製の確認と部位の同定」、「10. ミトウイルスの機能解析とベクター化」の実施も予定していた。しかし、H27 年実施報告書に記した通り、分担していた学生の就職により、プロジェクト全体が遅延したため、実施に至らなかった。

まとめ

本研究は、唯一無二のミトコンドリア感染性のミトウイルス (CpMV1) の生物学へ切り込んだ極めて独創性の高い研究内容となった。ミトウイルスの宿主範囲、病原性、宿主防御機構を詳細に解析した世界初の成果である。

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 4 件)

- ① Tomonaga, K., Berkhout, B., and Suzuki, N. (2018). "Integration of viral sequences into eukaryotic host genomes: legacy of ancient infections" *Virus Research* (in press). (査読無)
- ② Hillman, B. I., Aulia, A., and Suzuki, N. (2018). Viruses of plant-interacting fungi. *Advances in Virus Research* 100 (Special Issue): 99-116. <https://doi.org/10.1016/bs.aivir.2017.10.003> (査読有)
- ③ Suzuki, N. (2017). Frontiers in Fungal Virology. *Journal of General Plant Pathology* 83, 419-423. <https://doi.org/10.1007/s10327-017-0740-9> (査読無)
- ④ Suzuki, N. (2016). The world of diverse viruses in the kingdom Fungi. *Virus Research* 219, 1. doi: 10.1016/j.virusres.2016.05.022. (査読無)

【学会発表】 (計 6 件)

- ① Shahi, S., Eusebio-Cope, A., Chiba, S., Hillman, B. I., and Suzuki, N. Host expansion of *Cryphonectria mitovirus 1* revealed its avoidance of antiviral RNA silencing. The Annual Meeting of the Japanese Phytopathological Society. March 25-27, 2018. Kobe International Convention Center, Kobe, Japan.
- ② Shahi, S., Eusebio-Cope, A., Chiba, S., Hillman, B. I., and Suzuki, N. Avoidance of antiviral RNA silencing by *Cryphonectria mitovirus 1* revealed by the expansion of its hosts. 4th International Mycovirus Symposium. Huazhong Agricultural University. Wuhan, P. R. China. October 10-14, 2017.
- ③ Shahi, S., Hyodo, K., Chiba, S., Hillman, B. I., and Suzuki, N. Properties of a mitochondrially replicating positive-sense RNA virus isolated from a filamentous ascomycete, *Cryphonectria parasitica*. 32nd Annual Meeting of the Chugoku/Shikoku Regional Virology Society. June 10-11, 2017. Kawasaki Medical School,

Kurashiki, Japan.

④ Shahi, S., Hyodo, K., Chiba, S., Hillman, B. I., and Suzuki, N. Development of molecular and biologic tools for studying a mitovirus from *Cryphonectria parasitica*. The Annual Meeting of the Kansai Regional Branch of Japanese Phytopathological Society. September 29-30, 2016. Shizuoka Convention Center, Shizuoka, Japan.

⑤ Suzuki, N. Another nude virus: a capsidless ssRNA virus hosted by an unrelated dsRNA virus. International Symposium on Virology and Fungal Genetics, Institute for Bioscience and Biotechnology Research, Rockville, MD, USA. January 15, 2016.

⑥ Suzuki, N. (2015). From virology to plant disease control. JSPS Core-to-Core Program Sponsored Workshop on Crop Science and Innovation for Agriculture. October 15, 2015, Makerere University, Uganda.

〔図書〕 (計 0 件)

〔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

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