

令和 2 年 6 月 15 日現在

機関番号：82111

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K15232

研究課題名(和文) 菌類ウイルス由来スモールRNAによる白紋羽病菌表現型の変化

研究課題名(英文) Phenotypic alterations in *Rosellinia necatrix* by small RNAs derived from a mycovirus.

研究代表者

八重樫 元 (YAEGASHI, HAJIME)

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・果樹茶業研究部門・主任研究員

研究者番号：90582594

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)：白紋羽病菌は、果樹栽培における重要病原糸状菌である。白紋羽病菌に感染するメガビルナウイルス(RnMBV1)は、本菌の菌糸生育や病原力を低下させる。一方、RnMBV1は、白紋羽病菌のウイルス抵抗性機構であるRNAサイレンシングの標的となり、多量のRnMBV1由来スモール(s)RNAが蓄積する。本研究では、RnMBV1-sRNAと本菌の菌糸生育や病原力の関連を解析した。その結果、RnMBV1のdsRNA2の塩基番号901-1900由来のsRNAを発現する形質転換体では菌糸生育と病原力が、dsRNA1の塩基番号7201-8200由来のsRNAを発現する形質転換体では病原力のみが低下した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

土壌生息性の白紋羽病菌において、菌糸生育や病原力といった表現型は植物病理学的に重要である。本研究では、RnMBV1-sRNAがこれらの重要表現型に影響を与えることを明らかにし、菌類ウイルスによる宿主の菌糸生育・病原力低下メカニズムを解明する鍵となる知見を得た。今後の更なる研究により、白紋羽病菌の表現型に関連する遺伝子が明らかになれば、それらを標的とした分子レベルでの新たな防除法の開発に発展すると期待される。以上のように、本研究は、学術的価値が高く、生産現場にも貢献しうる社会的意義を有する発展性の高い研究成果を残すことができたと考えられる。

研究成果の概要(英文)：Rosellinia necatrix is an important phytopathogenic fungus in fruit tree cultivation. A fungal virus, Rosellinia necatrix megabirnavirus 1 (RnMBV1) attenuates mycelial growth and virulence of *R. necatrix*. Our previous studies revealed that RnMBV1 strongly induces antiviral RNA silencing in *R. necatrix*, in which abundant RnMBV1-derived small (s) RNA were accumulated. In this study, we investigated whether RnMBV1-sRNAs affect mycelial growth and virulence of *R. necatrix*. The *R. necatrix* transgenic lines expressing sRNAs from the 901-1900 nucleotide region of dsRNA2 showed attenuation of both mycelial growth and virulence. On the other hand, the *R. necatrix* transgenic lines expressing sRNAs from the 7201-8200 nucleotide region of dsRNA1 showed attenuation of virulence. Present data will be a clue to uncover the mechanism of attenuation of mycelial growth and virulence in *R. necatrix* infected with RnMBV1.

研究分野：植物病理学

キーワード：菌類ウイルス 白紋羽病菌 RNAサイレンシング スモールRNA

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

白紋羽病菌(*Rosellinia necatrix*)は、子の菌類の一種で、土壌生息性の植物病原糸状菌である。本菌は、土壌中を菌糸生育によって広がり、様々な宿主植物の根を侵す。とくに、一本の樹の経済的価値が高いリンゴなどの果樹栽培においては、罹病樹が枯死するばかりでなく土壌も汚染されるため、その経済的被害が大きい。現状では、大量の化学農薬を罹病部(根)に灌注するのが一般的な防除手段であるが、その防除効果への不安に加えて、環境微生物への悪影響や耐性菌出現などの懸念があり、より有効な防御法が切望されている。

糸状菌には普遍的にウイルス(菌類ウイルス)が感染しており、白紋羽病菌からも多数の菌類ウイルスを発見されている。それらのうち、二分節の二本鎖(ds)RNA をゲノム(dsRNA1, 2)とし、直径約 50nm の球形粒子を形成するメガビルナウイルス(*Rosellinia necatrix megabirnavirus* 1; RnMBV1)は、白紋羽病菌の菌糸生育や病原力を低下させる (Chiba et al., 2009, J. Virol.)。RnMBV1 が菌糸生育や病原力を低下させるメカニズムは不明であるが、そのメカニズム解明は、本菌の菌糸生育や宿主植物への病原力の分子レベルでの理解につながり、それらを標的とした新たな防除法開発に発展すると期待される。

RnMBV1 は他の菌類ウイルスと比較して安定して増殖するため、宿主の防御機構を回避する戦略を持つと考えられる。宿主の防御機構の一つとして、真核生物に共通して保存されている RNA サイレncing が挙げられる。申請者は、RnMBV1 が何らかの RNA サイレncing 対抗戦略を有していると推測し、白紋羽病菌における RnMBV1 と RNA サイレncing の相互作用を研究してきた。多くのウイルスは、RNA サイレncing を抑制するためのサイレncing サプレッサー(RSS)を有しているが、RnMBV1 は RSS を有さなかった(Yaegashi et al., 2013, Virology)。一方、RnMBV1 に対して RNA サイレncing が誘導されるかを調べたところ、RNA サイレncing 誘導の指標となる RnMBV1 由来スモール(s)RNA が豊富に蓄積しており、それらは RNA 誘導サイレncing 複合体(RISC)を活性化させることが明らかになっている(Yaegashi et al. 2016, J. Virol.)。以上のように、RnMBV1 は、白紋羽病菌の菌糸生育や病原力を低下させ、安定に増殖するが、RNA サイレncing に対しては抑制能を有さず、むしろ標的となると考えられている。

2. 研究の目的

植物では、ウイルス由来 sRNA と宿主遺伝子が相同性を有する場合、ウイルス sRNA が標的となる宿主遺伝子の発現量を低下させ、宿主植物に病徴が引き起こされることが報告されている (Shimura et al., 2011, PLOS Pathog.)。これまでの研究で、RnMBV1 感染株においても RnMBV1-sRNA は豊富に蓄積しており、RISC を活性化させることから、RnMBV1-sRNA が白紋羽病菌の表現型(菌糸生育や病原力)に関わる遺伝子を標的にする可能性が考えられた。そこで本研究では、上記仮説の検証に挑戦した。土壌生息性の白紋羽病菌において、菌糸生育や病原力といった表現型は植物病理学的に重要である。本仮説が実証されれば、RnMBV1 による白紋羽病菌の菌糸生育・病原力低下メカニズムの解明に加え、それらの表現型に関わる白紋羽病菌遺伝子を明らかにできると期待される。

3. 研究の方法

1. RnMBV1-dsRNA 発現形質転換体の解析

RnMBV1-sRNA が白紋羽病菌の菌糸生育や病原力を変化(低下)させるか検証するために、RnMBV1 の二分節 dsRNA ゲノムである dsRNA1 と dsRNA2 について 100bp オーバーラップするように 1000bp 毎に分割し、各領域の dsRNA を発現するプラスミドで白紋羽病菌 W97 株を形質転換した。各領域の sRNA が安定に蓄積する系統をノーザン解析により選抜し、PDA 寒天培地上での菌糸生育および宿主植物(黄花ルピナス)への接種試験により病原力を解析した。

2. RnMBV1-sRNA が標的とする白紋羽病菌遺伝子の探索

RnMBV1-sRNA の標的遺伝子を探索するため、ウイルスフリー株、RnMBV1 感染株および RnMBV1-dsRNA 発現形質転換体について、RnMBV1-sRNA により切断された mRNA の 3' 末端側配列(非 CAP、ポリ A 含む)を抽出・精製し、cDNA を Illumina HiSeq2500 で高速シーケンシングする degradome-seq 解析を実施した。これまでに明らかにしている RnMBV1 感染株の sRNA-seq データと白紋羽病菌のドラフトゲノムデータを利用し(Shimizu et al., 2018, Phytopathology)、PARESNIP2 ver 4.4(Stocks et al., 2018, Bioinformatics)を用いて degradome シグナルが検出される mRNA を選抜した。また、ウイルスフリー株と RnMBV1 感染株の RNA-seq データを整備し、degradome-seq でシグナルが検出された mRNA について、発現量を CLC ゲノミックワークベンチで解析し、RnMBV1-sRNA の標的遺伝子候補の探索を行った。

3. RnMBV1-sRNA が標的とする白紋羽病菌遺伝子の同定

上述のインフォマティクス解析で絞り込まれた標的遺伝子候補について、真に標的となるかを検証するため、GFP 遺伝子に標的候補遺伝子の RnMBV1-sRNA による切断推定領域を付加した GFP センサー遺伝子を発現する形質転換体を作成し、RnMBV1 感染(=RnMBV1-sRNA 発現)により GFP センサー遺伝子がサイレncing されるかを調べた。本法の有効性はこれまでの研究で示している(Yaegashi et al. 2016, J. Virol.)。

4. 研究成果

1. RnMBV1-dsRNA 発現形質転換体の解析

RnMBV1 の 2 分節ゲノムの dsRNA1 と dsRNA2 について、dsRNA1 は 100bp オーバーラップするように 1000bp 毎に 10 分割、dsRNA2 では 8 分割し、各領域の dsRNA を発現する形質転換体を作成した(図 1)。すべての dsRNA 領域で、導入した dsRNA 由来の sRNA が検出されるラインが得られ、PDA 寒天培地での菌糸生育や黄花ルピナスに対する病原力を調査した。その結果、dsRNA2 の 2-2 領域(塩基番号 901-1900)由来の sRNA を発現する形質転換体(2-2)で菌糸生育と病原力の両者の低下が認められた(図 2)。一方、dsRNA1 の 1-9 領域(塩基番号 7201-8200)由来の sRNA を発現する形質転換体(1-9)では、生育は非形質転換体と同等であったが、病原力が低下していた。これらの結果から、RnMBV1-sRNA は白紋羽病菌の菌糸生育や病原力といった重要表現型に関わる遺伝子を標的にしていることが示唆された。2-2 領域および 1-9 領域について、更なる原因領域の絞り込みを行うため、領域の一部を欠失させた dsRNA を発現する形質転換体を作成したが、sRNA が蓄積する形質転換体を安定に得ることができず、明確な絞り込みは出来なかった。

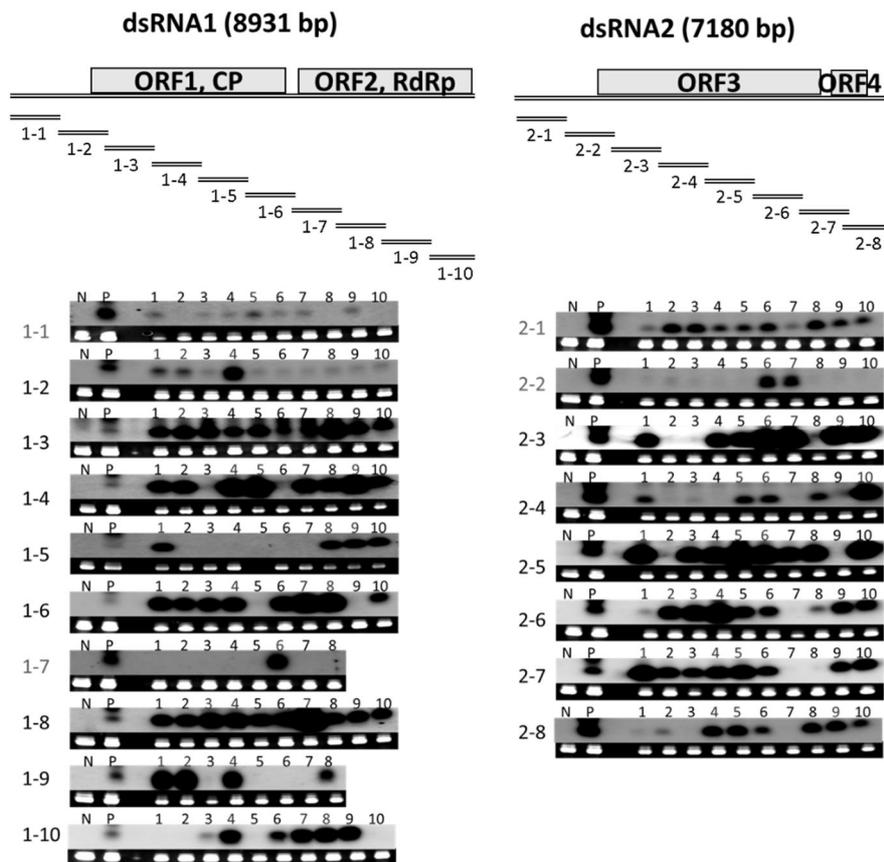


図 1. RnMBV1-dsRNA 発現形質転換体における sRNA の蓄積

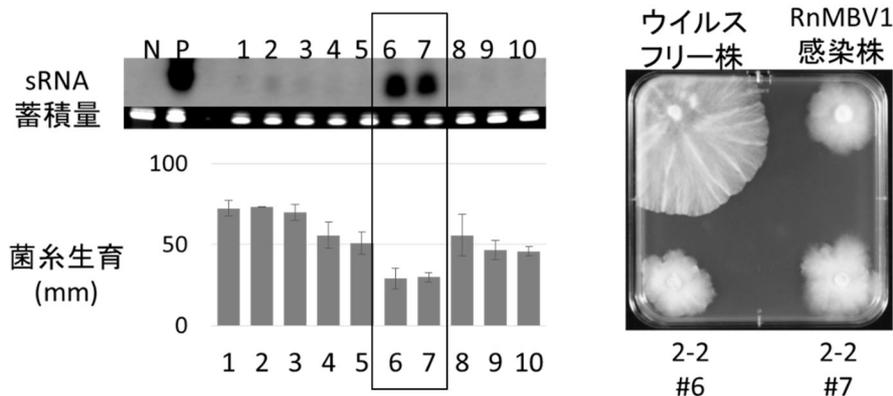


図 2. RnMBV1-dsRNA 発現形質転換体 2-2 株における sRNA の蓄積と菌糸生育の低下

2. RnMBV1-sRNA が標的とする白紋羽病菌遺伝子の探索

RnMBV1-sRNA の標的遺伝子を探索するため、ウイルスフリー株、RnMBV1 感染株および RnMBV1-dsRNA 発現形質転換体(2-2, 1-9)について、degradome-seq 解析を実施した。2-2 では 2 ライン、1-9 では 3 ラインを解析に用いた。Degradome シグナルが検出される切断推定領域にマッピングされる sRNA の配列相溶性やリード数を基に 2-2 あるいは 1-9 に特異的な標的候補遺伝子の選抜を行い、2-2 と 1-9 で合計 25 種の候補遺伝子を選抜した。選抜された遺伝子に機能的な類似性は認められず、RnMBV1-sRNA と標的候補配列で 100%相溶性を示す場合も認められなかった。また、25 種の遺伝子全てで発現量が低下しているわけではなく、これらのデータで標的候補遺伝子をこれ以上絞り込むことは出来なかった。

3. RnMBV1-sRNA が標的とする白紋羽病菌遺伝子の同定

選抜された 25 種の標的候補遺伝子について、真に標的となるかを検証するため、GFP 遺伝子に標的候補遺伝子の RnMBV1-sRNA による切断推定領域を付加した GFP センサー遺伝子を発現する形質転換体を作成した。各形質転換体の 5 から 10 ラインに RnMBV1 を感染させ、GFP センサー遺伝子がサイレンシングされるかを調べた。その結果、残念ながら、全ての遺伝子において GFP 蛍光のサイレンシングは認められず、本研究で選抜した 25 種の候補遺伝子は標的ではないと考えられた。sRNA は、相同配列を有する mRNA のエクソンばかりでなく、5' または 3' 非翻訳領域を標的にする場合がある。また、mRNA ではなく、ゲノムのプロモーター領域のメチル化を引き起こし転写抑制する場合も知られている。今後、これらの可能性についても検証する必要がある。

本研究では、2-2 では菌糸生育と病原力、1-9 では病原力のみが低下することを明らかにした。すなわち、白紋羽病菌の菌糸生育と病原力は、異なる機構に支配されていることが示唆された。本研究では、RnMBV1-sRNA が標的とする遺伝子の同定には至らなかったが、得られた形質転換体は今後の研究の鍵となる。更なる解析により、RnMBV1 が白紋羽病菌の表現型を変化させるメカニズムの解明が進むと期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Shimizu Takeo, Kanematsu Satoko, Yaegashi Hajime	4. 巻 108
2. 論文標題 Draft Genome Sequence and Transcriptional Analysis of <i>Rosellinia necatrix</i> Infected with a Virulent Mycovirus	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Phytopathology	6. 最初と最後の頁 1206 ~ 1211
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1094/PHYTO-11-17-0365-R	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Hajime Yaegashi, Satoko Kanematsu
2. 発表標題 Inhibition of megabirnavirus infection by RNA silencing in the white root rot fungus, <i>Rosellinia necatrix</i>
3. 学会等名 4th International Mycovirus Symposium（国際学会）
4. 発表年 2017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