

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 11 日現在

機関番号：82111

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23780045

研究課題名(和文) 菌類ウイルスによるRNAサイレンシング誘導・抑制機構の解析

研究課題名(英文) Analysis of induction and suppression of RNA silencing by mycovirus infection

研究代表者

八重樫 元 (YAEGASHI, Hajime)

独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構・果樹研究所リンゴ研究領域・研究員

研究者番号：90582594

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円、(間接経費) 1,020,000円

研究成果の概要(和文)：RNAサイレンシングは真核生物に保存された塩基配列特異的RNA分解機構であり、糸状菌においては菌類ウイルス(マイコウイルス)に対する防御機構として働く。本研究では、果樹類の重要病原菌である白紋羽病菌において、マイコウイルス感染によるRNAサイレンシング誘導・抑制機構を解析した。その結果、白紋羽病菌由来のマイコレオウイルス3(RnMyRV3)がRNAサイレンシングを抑制することが明らかとなった。また、サイレンシング誘導の指標となるスモールRNAの蓄積をディープシーケンシングで解析した結果、RnMyRV3を含む5種マイコウイルス由来のスモールRNAが蓄積することを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：RNA silencing is a sequence-specific RNA degradation mechanism conserved among eukaryotes, and act as a defence mechanism against fungal virus (mycovirus) in filamentous fungi. In this study, we analyzed induction and suppression of RNA silencing in white root rot fungus, *Rosellinia necatrix* by mycovirus infection. We revealed that a mycoreovirus (*Rosellinia necatrix* mycoreovirus 3; RnMyRV3) suppresses RNA silencing in *R. necatrix*. On the other hand, by deep-sequencing analysis of small RNA which is a hallmark of induction of RNA silencing, we showed that mycovirus-derived small RNA accumulates in *R. necatrix* strains infected with each of five mycoviruses including RnMyRV3 and other four unrelated mycoviruses, indicating that mycoviruses induce RNA silencing in *R. necatrix*.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農学・植物病理学

キーワード：マイコウイルス サイレンシング サイレンシングサプレッサー 白紋羽病菌 レオウイルス スモールRNA 次世代シーケンス

1. 研究開始当初の背景

糸状菌に感染する菌類ウイルス(マイコウイルス)の大半は宿主糸状菌に影響を及ぼさないが、一部は糸状菌の生育や病原力を低下させるため、植物病原糸状菌の生物防除因子として期待されている。しかしながら、マイコウイルス感染と糸状菌の相互作用については不明な点が多い。

糸状菌を含む真核生物のウイルス感染に対する基礎的な防御機構として RNA サイレncing が挙げられる。RNA サイレncing は塩基配列特異的 RNA 分解機構であり、二本鎖(ds)RNA が引き金となって、標的 RNA の分解を導く。すなわち、細胞内の dsRNA は Dicer と呼ばれる dsRNA 分解酵素によって 21-25 塩基対の小さな RNA (small RNA; sRNA) に切断され、sRNA は RISC (RNA-induced silencing complex) と呼ばれるタンパク質複合体に取り込まれる。RISC は取り込んだ sRNA と相補的な一本鎖(ss)RNA を特異的に分解する。一方、ウイルスは RNA サイレncing を抑制、回避する戦略を備えている。多くのウイルスは RNA サイレncing を抑制する機能を持つ遺伝子(RNA サイレncing サプレッサー; RSS) をコードしており (Voinnet, 2005, Nat. Rev. Genet. 6:206-220)、この RSS 遺伝子を利用して RNA サイレncing に対抗している。

糸状菌では、クリ胴枯病菌、コウジカビ属およびイネいもち病菌で RNA サイレncing がマイコウイルスを標的とすることが報告されている。クリ胴枯病菌のハイポウイルスやコウジカビ属の *Aspergillus virus 1816* は RNA サイレncing の標的となるが、それを抑制する能力を持つ (Segers et al., 2007, Proc. Natl. Acad. Sci. 104:12902-12906; Hammond et al., 2008, Eukaryotic Cell 7:350-357)。一方、イネいもち病菌のトティウイルスは RNA サイレncing 抑制能を持たず、何らかの回避戦略を有すると推測されている (Himeno et al., 2009, Virology 396:69-75)。このように、マイコウイルス感染による RNA サイレncing 誘導・抑制機構については限られた例しか報告されていない。

2. 研究の目的

我々の研究グループでは、果樹類の重要病原菌である白紋羽病菌に感染するマイコウイルスの研究を行っている。これまでに、緑色蛍光タンパク質遺伝子 (GFP) に対する RNA サイレncing が誘導される白紋羽病菌株 (RiGFP) の作出に成功しており、RiGFP 株に複数の白紋羽病菌由来マイコウイルス種を感染させたところ、マイコレオウイルス 3 (*Rosellinia necatrix mycoreovirus 3*; RnMyRV3) が RNA サイレncing を抑制することが示唆されている。そこで本研究では、白紋羽病菌と RnMyRV3 を研究モデルとして、マイコウイルス感染による RNA サイレncing 誘導・抑制機構を明らかにすること

を目的とした。

3. 研究の方法

(1) RNA サイレncing 抑制機構の解析
RnMyRV3 は 12 分節の二本鎖(ds)RNA をゲノムとしており、各分節ゲノムにはそれぞれ 1 種類の遺伝子がコードされる。これらの 12 遺伝子に RNA サイレncing サプレッサー (RSS) 活性があるか調べるため、まずは植物を用いた実験系、GFP 発現 *Nicotiana benthamiana* line 16c (GFP-Nb; Brigenti et al., 1998, EMBO J. 17:6739-6746) を用いたアグロインフィルトレーションアッセイを行った。さらに、上述の方法で RSS 候補遺伝子が同定されたら、GFP 遺伝子の RNA サイレncing が誘導される株 (RiGFP) に RSS 候補遺伝子を導入し、白紋羽病菌における RSS 活性を検証する。

(2) RNA サイレncing 誘導機構の解析
RNA サイレncing が誘導されると、対象となる遺伝子由来の sRNA が蓄積する。そこで、sRNA の蓄積を指標として、マイコウイルスに対する RNA サイレncing が誘導されているかを解析した。すなわち、RnMyRV3 が感染した白紋羽病菌株から抽出した sRNA 画分をイルミナ社 HiSeq2000 を用いたディープシーケンシング法により大規模解析し、RnMyRV3 の二本鎖ゲノム RNA 由来の sRNA の蓄積量を調べた。また、RnMyRV3 以外の 4 種マイコウイルス (パルティティウイルス; RnPV1, クアドリウイルス; RnQV1, ビクトリウイルス; RnVV1, メガビルナウイルス; RnMBV1) についても同様の方法で解析した。

4. 研究成果

(1) RNA サイレncing 抑制機構の解析
予備的な試験において、RnMyRV3 が白紋羽病菌で RNA サイレncing 抑制能を有すると示唆されている。すなわち、GFP 遺伝子の RNA サイレncing が誘導されている白紋羽病菌株 (RiGFP 株) に RnMyRV3 を感染させると GFP 蛍光が回復した (図 1A)。本研究では、まず RnMyRV3 感染 RiGFP 株において GFP-mRNA および GFP-sRNA の蓄積レベルをノーザンプロットで解析した。その結果、RnMyRV3 感染 RiGFP 株では、ウイルス非感染 RiGFP 株と比べて GFP-mRNA 蓄積量が上昇し、逆に GFP-sRNA 蓄積量は減少した (図 1B)。これらの結果から、RnMyRV3 が RNA サイレncing を抑制することが世界で初めて明らかになった。上述したように RnMyRV3 は GFP-sRNA の蓄積量を減少させたことから、RnMyRV3 は二本鎖 RNA の Dicer による分解を阻害する可能性が考えられた。そこで、GFP 遺伝子の二本鎖 RNA を発現する白紋羽病菌株 (irGFP) を作出した。irGFP 株に RnMyRV3 を感染させたところ、GFP-sRNA の蓄積量は減少し、逆

に二本鎖 RNA の蓄積が認められた。すなわち、RnMyRV3 は二本鎖 RNA の Dicer による分解を阻害することが示された。

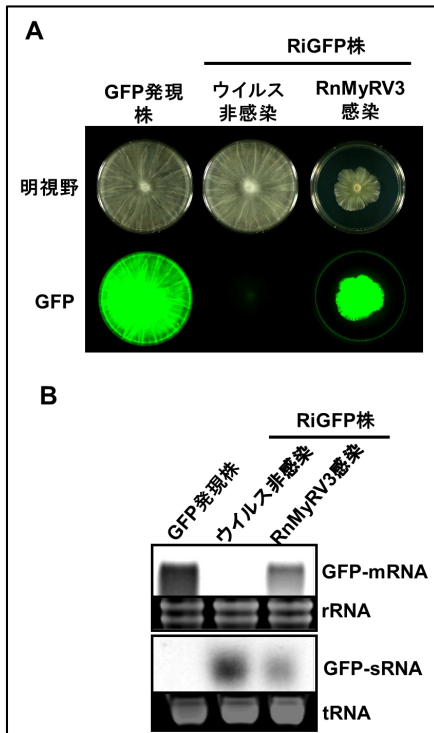


図 1. RnMyRV3 感染による白紋羽病菌での RNA サイレncing抑制。(A)RnMyRV3 感染 RiGFP 株の GFP 蛍光。(B)RnMyRV3 感染 RiGFP 株のノーザンブロット解析

次に、植物を用いた実験系、*Nicotiana benthamiana* を用いたアグロインフィルトレーションアッセイでマイコレオウイルス 3 のコードする 12 遺伝子(S1-S12)に RNA サイレncingサブレッサー(RSS)能があるかを調べた。その結果、S10 遺伝子に RSS 能が認められた(図 2)。S10 遺伝子が白紋羽病菌でも RNA サイレncing抑制効果を示すか調べるため、RiGFP 株に S10 遺伝子を導入した形質転換株の作出を試みたが、残念ながら S10 遺伝子を発現する形質転換体は得られず、S10 遺伝子は白紋羽病菌に何らかの影響を与える可能性が考えられた。

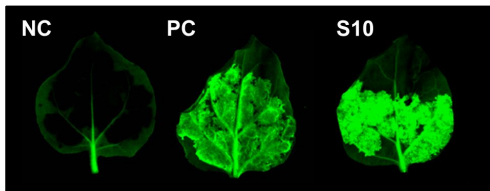


図 2. アグロインフィルトレーションアッセイによる S10 遺伝子の RSS 能の評価。NC; 陰性対照区、PC; 陽性対照区(ポティウイルスの HCPPro 遺伝子を発現)

S10 遺伝子のアミノ酸配列から特異的抗体を作出し、分子量約 32 キロダルトンと推定される S10 翻訳産物(P32)が蓄積するかをウ

ェスタンブロットで解析したところ、RnMyRV3 感染白紋羽病菌では、P32 に加えて、P32 の N 末端側切断産物と推定される P20 および C 末端側切断鎖物と推定される P11 の蓄積が認められた(図 3)。この結果から、S10 遺伝子から翻訳された P32 は、何らかの翻訳後分解を受けることが示唆された。

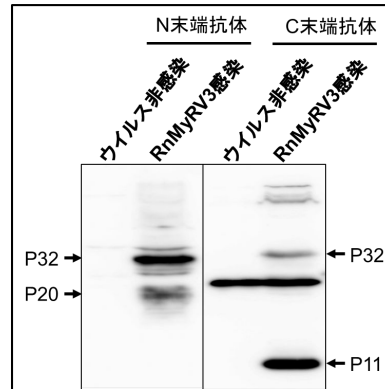


図 3. S10 タンパク質のウェスタンブロット解析。S10 遺伝子の推定翻訳産物(P32)の N 末端または C 末端に特異的な抗体を用いた。

以上の結果より、RnMyRV3 は RNA サイレncing抑制能を有し、二本鎖 RNA の切断を阻害することが明らかにされた。菌類に感染するレオウイルスでサイレncing抑制能が見出されたのは世界で初めてである。また、S10 遺伝子が RSS 活性を有することが明らかとなった。マイコウイルスで RSS が同定されたのは世界で 2 例目であり、RSS としての S10 遺伝子がマイコレオウイルス 3 の感染過程および白紋羽病菌の表現型にどのような影響を及ぼすのか、今後の研究が期待される。

(2)RNA サイレncing誘導機構の解析

RnMyRV3 が RNA サイレncingを誘導するのか、すなわち RnMyRV3 由来の sRNA は蓄積するのかを調べるため、RnMyRV3 感染白紋羽病菌から sRNA 画分を抽出し、ディープシーケンシング解析を行った。その結果、菌体全 sRNA のうち約 10%が RnMyRV3 ゲノム由来であった。RnMyRV3 由来 sRNA (vsRNA)は RnMyRV3 の 12 ゲノムセグメントに広く分布し、ほとんどのゲノムセグメントにおいてセンス鎖とマイナス鎖にほぼ均等に分布した(図 4)。以上より、RnMyRV3 のゲノム二本鎖 RNA が RNA サイレncingの標的になると考えられた。一方、RnMyRV3 とは異なる 4 種マイコウイルス(パルティティウイルス; RnPV1, クアドリウイルス; RnQV1, ピクトリウイルス; RnVV1, メガビルナウイルス; RnMBV1)についても同様の方法でディープシーケンシング解析したところ、各ウイルスの vsRNA 蓄積量は RnPV1 が 4.2%、RnQV1 が 1.2%、RnVV1 が 0.3%、RnMBV が 17.6%であり、ウイルス種によって sRNA 蓄積量が異なることが

示された。特筆すべきは、白紋羽病菌の生育や病原力を阻害する RnMyRV3 と RnMBV1 の sRNA 蓄積量が比較的高いことであり、菌の表現型に影響を及ぼすマイコウイルスは RNA サイレンシングを誘導しやすいことが考えられた。RnMyRV3 は、感染によって誘導される RNA サイレンシングに対抗するために RNA サイレンシング抑制能を獲得したものと考えられる。

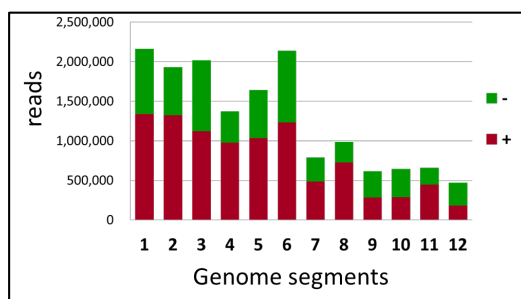


図 4. RnMyRV3 由来 sRNA の 12 ゲノムセグメントへの分布。緑色のバーはマイナス鎖、赤色のバーはプラス鎖に分布する sRNA のリード数を示す。

本研究では、白紋羽病菌と RnMyRV3 をモデルとして RNA サイレンシング誘導・抑制機構を解析した。本研究で得られた成果により、糸状菌とウイルスの攻防の一端が明らかになった。植物ウイルスにおいては、RSS はウイルス増殖に関わるばかりではなく、植物の形態異常を引き起こすことが知られている。また、ウイルス由来 sRNA が宿主遺伝子の発現に影響することが知られている。(Wang et al., 2012, Mol. Plant-microbe Interact., 25:1275-1285)。今後、RnMyRV3 による RNA サイレンシングの誘導と抑制が RnMyRV3 の増殖ならびに白紋羽病菌の表現型とどのような関連があるのかを明らかにする必要がある。

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 2 件)

Hajime Yaegashi, Nobuyuki Yoshikawa, Tsutae Ito, Satoko Kanematsu, A mycoreovirus suppresses RNA silencing in the white root rot fungus, *Rosellinia necatrix*., *Virology*, 査読有, 2013, vol. 444, pp. 409-416.

DOI: 10.1016/j.virol.2013.07.010.

Satoko Kanematsu, Takeo Shimizu, Lakha Salaipeth, Hajime Yaegashi, Atsuko Sasaki, Tsutae Ito, Nobuhiro Suzuki. Genome rearrangement of a mycovirus *Rosellinia necatrix* megabirnavirus 1 affecting its ability to attenuate virulence of the host fungus. *Virology*, 査読有, 2013, vol. 450-451, pp. 308-315. DOI: 10.1016/j.virol.2013.12.002.

[学会発表](計 8 件)

八重樫元、伊藤伝、吉川信幸、兼松聡子、*Rosellinia necatrix* mycoreovirus 3 は白紋羽病菌での RNA サイレンシングを抑制する。平成 24 年度日本植物病理学会、2012 年 3 月 30 日、福岡国際会議場(福岡県)

八重樫元、伊藤伝、兼松聡子、*Rosellinia necatrix* mycoreovirus 3 由来 Small Interfering RNA の大規模解析、平成 25 年度日本植物病理学会、2013 年 3 月 27 日、岐阜大学(岐阜県)

兼松聡子、清水健雄、八重樫元、伊藤伝、白紋羽病菌(*Rosellinia necatrix*)のドラフトゲノム解析、平成 25 年度日本植物病理学会、2013 年 3 月 28 日、岐阜大学(岐阜県)

清水健雄、八重樫元、伊藤伝、兼松聡子、白紋羽病菌 *Rosellinia necatrix* における RNA interference の誘導機構の解析、平成 25 年度日本植物病理学会、2013 年 3 月 28 日、岐阜大学(岐阜県)

八重樫元、伊藤伝、兼松聡子、白紋羽病菌マイコレオウイルス 3 は siRNA 産生を阻害する、平成 25 年度日本植物病理学会東北部会、2013 年 10 月 28 日、秋田市にぎわい交流館(秋田県)

八重樫元、清水健雄、伊藤伝、兼松聡子、マイコウイルス感染による白紋羽病菌 RNA サイレンシング遺伝子の発現上昇、平成 26 年度日本植物病理学会、2014 年 6 月 4 日、札幌コンベンションセンター(北海道)、発表確定

兼松聡子、清水健雄、八重樫元、伊藤伝、*Rosellinia necatrix* megabirnavirus 1 の機能未知 ORF の部分欠損変異株の解析、平成 26 年度日本植物病理学会、2014 年 6 月 4 日、札幌コンベンションセンター(北海道)、発表確定

清水健雄、八重樫元、伊藤伝、兼松聡子、白紋羽病菌 *Rosellinia necatrix* のメガビルナウイルス感染株におけるトランスクリプトーム解析、平成 26 年度日本植物病理学会 2014 年 6 月 4 日、札幌コンベンションセンター(北海道)、発表確定

6. 研究組織

(1)研究代表者

八重樫元 (YAEGASHI, Hajime)

独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構・果樹研究所・リンゴ研究領域・研究員

研究者番号：90582594