

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 29 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2012～2014

課題番号：24580064

研究課題名(和文)植物ゲノムに存在する非レトロウイルス様配列の挿入メカニズムと病理学的意義

研究課題名(英文) Endogenization process of non-retroviral RNA virus elements into plant genomes and their pathological significance

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,300,000円

研究成果の概要(和文)：近年、哺乳動物などの核ゲノムに非レトロRNAウイルス様配列(NRVS)が発見され、それらは古のウイルス感染記録と考えられている。本研究では、植物、菌類、昆虫の核ゲノムで新規NRVSを探索し、配列解析を行った。その結果、プラス鎖RNAウイルスであるベニウイルスの感染記録を植物(ヒヨコマメ)と昆虫(サシガメ)の核ゲノムに見出した。加えて、菌類ではじめてとなるマイナス鎖RNAウイルスの感染記録をうどんこ病菌核ゲノムに見出した。これらの成果はRNAウイルスの起源や進化を考える上で興味深い情報を提供する。さらに、本研究ではこれらのNRVSの挿入メカニズムと生物学的な存在意義について議論を加えた。

研究成果の概要(英文)：Endogenous non-retroviral RNA virus-like sequences (NRVSs) have been discovered in the genome of the vertebrates and other eukaryotes. These are considered as fossil RNA viral elements integrated into host genomes by as-yet-known mechanisms. In this study, several novel NRVSs from the genome of the plants, insects and fungi were discovered. The presence of benyvirus-like sequences in the chickpea chromosomes is a second example of plant NRVSs related to positive-sense (+)ssRNA viruses. Benyvirus-related sequences were also found in the chromosomes of blood-sucking insect. In addition, the first (-)RNA virus infection in fungus was evidenced based on a discovery of mononegavirus L-like sequences in the genome of the powdery mildew fungus. Our findings may provide novel insights into the origin and evolution of ssRNA viruses. The possible endogenization process of these NRVSs into the genome and its biological significance on the host were discussed.

研究分野：植物病理

 キーワード：非レトロRNAウイルス ゲノム 感染記録 うどんこ病菌 化石配列 ダラースポット病菌 系統進化  
モノネガウイルス

## 1 . 研究開始当初の背景

高等生物のゲノム上にはレトロ RNA ウィルスやパラレトロウィルス ( DNA ウィルス ) 由来の配列が多数存在することが知られている ( ヒトゲノムでは 8 % にもおよぶ ) ( PLoS Biol 8:e1000301 ) . 一方 , RNA ウィルスの大部分を占める「非レトロ RNA ウィルス」は逆転写酵素やインテグラーゼを持たないため , ウィルス配列の宿主染色体への挿入はないと考えられていた . しかし 2010 年になり , 人畜共通の病原性マイナス ( - ) 鎖 RNA ウィルスである「ポルナウィルスやエボラウィルスの類似配列」がヒトや動物のゲノム上に相次いで発見された ( 多くがヌクレオ蛋白質 ( N ) 遺伝子様配列 ) ( Nature 463,84; PLoS Pathog 6:e1001030; PLoS Genet 6:e1001191 など ) . 申請者らも , 菌類・植物 RNA ウィルスのゲノム解析の過程で , 植物ゲノム上に「非レトロ RNA ウィルス様配列 ( NRVS ) 」が多数存在することを見いだした ( Chiba and Kondo et al. , 2011 PLoS Pathog ) . さらに , 同時期に行われた Liu ら ( JV 2010 ) の研究では , パルティウィルスやトティウィルスなどの dsRNA ウィルスの類似配列が , 植物のみならず , 節足動物 , 線虫 , 菌類や原虫類に至る多様な生物種のゲノム上に存在することを報告した .

NRVS はその保存パターンや分子系統解析により , ウィルスからそれぞれの生物種の核ゲノムへ水平伝搬したと考えられている . このことは NRVS が宿主のウィルス感染履歴を示す化石情報として RNA ウィルス研究に全く新しい物差し ( 時間軸 ) を提示できることを示唆している . 実際 , 我々の発見したパルティウィルス様の PCLS1 は , シロイヌナズナや近縁種が分化した 1 ~ 1.4 千万年前の挿入イベントであったと推測されている .

我々による植物 NRVS の発見により , パルティウィルスのみならず , バリコサウィルスの祖先種も古くから植物に感染していたことが示唆される . 興味深いことに , 先のシロイヌナズナ PCLS1 は *ILR2* というオーキシン代謝系の遺伝子 ( Plant J. 2003, 35:523 ) と相同であることから , NRVS の一部は新規遺伝子としての機能を獲得し , 宿主の生存に有利に働いたと推測される . しかし , 現在まで NRVS がどのように生殖細胞の核に到達し , ゲノムへ挿入されるかは不明であり , それらの配列がゲノム上に保持されている理由も全くのブラックボックスである .

## 2 . 研究の目的

本研究では , 新規 NRVS の探索と系統進化

学的解析およびその発現解析を進め , それらの生物学的 ( 病理学的 ) 意義や挿入機構に迫る .

植物 NRVS ( 既知のパルティウィルス・バリコサウィルス様配列 ) に加え , 新規の NRVS の探索を植物・昆虫・菌類のゲノム上で進める .

得られたウィルス由来の化石配列情報から「祖先ウィルス」ならびに「現代ウィルス」の系統進化的な関係を明らかにする .

RNA ウィルスと宿主である「植物」「昆虫」「菌類」との古くて新しい相互作用 , 「植物・昆虫・菌類」の三者間の相互作用の新規指標として NRVS の有効利用を目指す .

農業生産上問題になる植物ウィルスの NRVS に注目し , ゲノム上に存在する NRVS の発現や機能について , NRVS の持つ病理学的な意義や NRVS 挿入メカニズムの理解を目指した基盤整備を行う .

## 3 . 研究の方法

非レトロ RNA ウィルス類似配列・NRVS の解析は以下のように行った ( 図 1 ) .

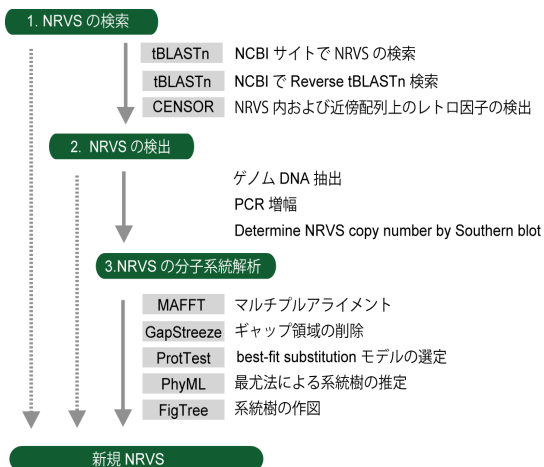


図 1 . 植物・菌類・昆虫ゲノム上の NRVS の検索 , 検出ならびに分子系統解析のアウトライン ( Kondo et al. , 2015 を改変 )

(1) NRVS の探索 : 既知の植物ウィルス遺伝子配列をクエリ配列とし , NCBI サイトで NRVS 配列の探索を行った . 得られた NRVS 候補を用いて逆 BLSAT 検索を行い , 近縁な配列の存在を確認した . さらに , CENSOR サイトにより , NRVS 候補の内部あるいは近接領域にレトロ因子やトランスポゾンなどに由来する配列が存在するかを確認した .

(2) NRVS の検出 : NRVS 候補が見出された生物種のゲノム DNA は必要に応じて DNeasy® Blood and Tissue Kit ( Qiagen ) で取得した .

それを鋳型としてゲノム PCR を行い、目的配列の増幅とシーケンス解析を行った。

(3) **NRVS の分子系統解析**：取得された NRVS およびウイルス配列の分子系統解析は、まず MAFFT サイトによりマルチプルアライメントを行い、ギャップ領域を削除後、ProtTest server で best-fit model を選定した。最尤法による系統樹は PhyML 3.0 サイトで推定し FigTree で作図した。

(4) **NRVS の発現解析**：NRVS の発現解析は、目的の植物種全 RNA をフェノーラルクロロフォルム法で精製後、cDNA を合成し、RT-PCR により行った。

#### 4. 研究成果

##### (1) 既知NRVS類縁配列の探索と発現解析

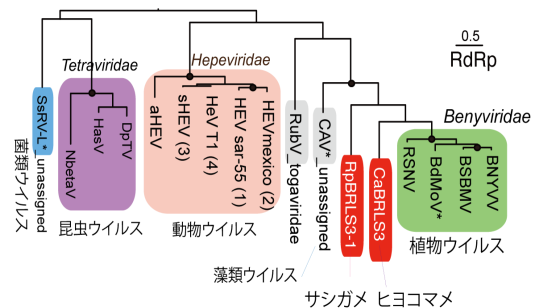
これまで見出されている植物の非レトロ RNAウイルス様配列(NRVS)は、dsRNAウイルス(パルティテウイルス)とマイナス(-)鎖RNAウイルス(バリコサウイルス)のCPやNの類似配列が中心である。そこで、新規に登録された植物ゲノムデータベースを検索したところ、既知のパルティテウイルスタイプ(PCLS)やバリコサウイルスタイプ(RNLS)の新たなNRVSを複数検出した。このうちバラ科(リンゴ, チュウゴクナシ, イチゴ)のPCLS7配列はゲノムの同一領域に座上していたことから、その挿入イベントは非常に古く、これら植物の分岐前に起こったことが示唆された。さらに、既知のハクサイBrRNLS, タバコNtRNLS, ミヤコグサのLjRNLSについては、RT-PCRにより mRNAレベルが発現していることを確認した。

##### (2) プラス鎖 RNA ウイルスタイプの新規 NRVS の探索と配列解析

我々の先行研究(Chiba and Kondo et al., 2011)では、植物で最も多く発生が知られているプラス鎖 RNA ウイルスの配列はキュウリのフレキシウイルス複製酵素様配列 1 件のみであった。そこで、代表的な植物(+鎖 RNA ウイルスの配列によるデータベース検索では、ベニウイルス科(土壌生息菌類により伝搬され、テンサイ叢根病ウイルス BNYVV をタイプ種とする(+鎖 RNA ウイルス)の複製酵素に類似した配列断片(Benyvirus replicase-like sequence, BRLS)を、植物(ヒヨコマメ, *Cicer arietinum*)の核ゲノム配列データベース上に見出した。それらの配列は、ヒヨコマメ抽出 DNA のゲノミック PCR で存在が再確認された。さらに、昆虫(吸血性の衛生害虫ベネズエラサシガメ, *Rhodnius prolixus*)の核ゲノムにも、同様な配列を発

見し、一部についてはゲノミック PCR でその配列の存在を確認した。

ベニウイルスの複製酵素は、動物 RNA ウイルスのヘペウイルス(E型肝炎ウイルスなど)や一部の昆虫や菌類ウイルスに近く、最近の我々の研究により淡水藻類の一種、オーストラリアシャジクモ(*Chara australis*)から検出された chara australis virus(CAV)がさらに近縁であることが判明している(Gibbs et al., 2012)。そこで、これらのウイルス配列と BRLS を用いた分子系統関係を作成した。その結果、ヒヨコマメ CaBRLS, サシガメの RpBRLS はベニウイルスメンバーの複製酵素配列と共にクラスターを形成し、CAV の配列よりもベニウイルスにより近縁な関係であることが判明した(図2)。これらの成果は、植物、昆虫さらに藻類等を含む広範囲の宿主にベニウイルスや類縁ウイルスが感染している可能性を示唆している。ベニウイルスは土壌菌類により媒介される植物病原ウイルスであるが、その起源や進化を理解する上で興味深い情報である。



(ベニウイルス複製酵素と化石配列を用いた分子系統樹)

図2. 植物・昆虫ゲノム上に発見されたベニウイルスの感染記録。ベニウイルス複製酵素と化石配列を用いた ML 分子系統樹 (Kondo et al., 2013c を改変)

なお、ここでは詳しく述べないが、プラス鎖 RNA ウイルス類似配列は昆虫類ゲノムに複数発見されている。これらの新規 NRVS については、現在詳細に解析を進めているところである。昆虫類には植物 RNA ウイルスの媒介者も多く含まれることから、「昆虫と植物ウイルスの相互作用や知られざる共進化」を理解する新しい物差しになると期待される。

##### (3) マイナス鎖 RNA ウイルスタイプの新規 NRVS の探索と配列解析

植物病原糸状菌であるうどんこ病菌 (*Erysiphe pisi*) で非分節型のマイナス鎖 RNA ウイルス (モノネガウイルス, 狂犬病やエボ

ラウイルスを含む)の複製酵素(L)に類似した配列(モノネガウイルス様配列, MLLS)が複数発見された。それら配列はゲノム PCR でうどんこ病菌ゲノムに存在する事が確認された。さらに, ダラスポット病菌(*Sclerotinia homoeocarpa*)では, 転写物データベース中にほぼ全長のウイルスゲノムコンティグ配列(8-10kb)が見出された。これらの成果は, 菌類でこれまで未発見であったマイナス鎖 RNA ウイルスの存在を強く示唆した。

この MLLS とモノネガウイルス代表種の複製酵素を用いた分子系統学的な解析を進めたところ, 既知のモノネガウイルスとは異なるクレードを形成した(図3)。さらに, マイナス鎖 RNA ウイルスの存在を証明するため, 日本産ダラスポット病菌 5 株を入手し RT-PCR でモノネガウイルス感染の有無を検討した。その結果, 2 株よりモノネガウイルス様断片の増幅が確認され, 菌類ではじめてモノネガウイルスの存在を実証した。

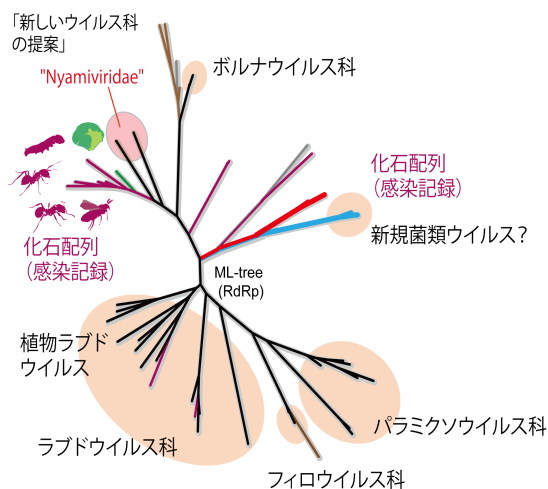


図3. モノネガウイルス L 蛋白質および菌類ゲノム並びに転写物で発見されたウイルス様配列を用いた ML 分子系統樹 (Kondo et al., 2013a を改変)

本研究では, 菌類ゲノム上の感染記録から, これまで未発見であった現代のモノネガウイルスが感染している本邦産「ダラスポット病菌(芝類の重要病害)」の菌株を取得する事に成功した。この成果は, ゲノム上のウイルス化石によりマイナス鎖 RNA タイプの未知のウイルス探索に有効であることを示し, RNA ウイルス化石配列の持つ研究上の重要性が別の角度から実証された。今後は, 菌類モノネガウイルスの全長配列解析, 粒子構造や宿主菌への病原性などウイルス学・生物学的性状について解析を進める予定である。なお,

近年, 我々の研究室で提唱する植物系状菌の制御技術であるヴァイロコントロール(生物防除の一種: ウイルスによる生物防除)に, 菌類モノネガウイルスが利用できないか検討する予定ある。

以上, 本研究では, 植物(+鎖) RNA ウイルスやモノネガウイルス類似配列の解析から, 宿主/ウイルス間相互作用とその共進化の一端を紐解くことができた。すなわち, NRVS は「ウイルス進化を推測するための重要なツール」といえる。さらに, 菌類モノネガウイルスの例から「未知のウイルス探索」にも利用でき, その病理学的インパクトは非常に大きい。

本研究では, 新規 NRVS 配列の近傍に関しても調べているが, NRVS に近接した形でレトロ因子様配列が存在することが判明している。このことは, NRVS の挿入イベント(ウイルス配列の逆転写と核ゲノム上へのインテグレーション)にそれらの因子が直接的に関与していた可能性を示唆しており, その挿入メカニズムを考える上で興味深い。一部 NRVS (RNLS) は mRNA として転写されていたことから, 蛋白質レベルで何らかの機能(抗ウイルス戦略?)を有すると推定された。しかし, 翻訳の確認やその機能を示唆する実験データは取得できなかった。今後, 得られた知見を基盤としさらに検証を進めることで, これまで見出されてきた宿主ゲノムの NRVS を用いた有効な実験系の確立が急務となる。その上で, 宿主ゲノムへの NRVS 挿入機構や宿主側の知られざる抗ウイルス戦略の一端を紐解くことを目指していきたい。

## 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)

Kondo H, Maruyama K, Chiba S, Andika IB, Tamada T, Suzuki N. Transcriptional mapping of the messenger and leader RNAs of orchid fleck virus, a bisegmented negative-strand RNA virus. *Virology* 452-453:166-174, 2014 (査読有)

Kondo H, Chib, S, Suzuk, N. Discovery of negative-strand RNA virus infection in fungi. *Proc. Symp. 9th Int. Working Group on Plant Viruses with Fungal Vectors*.55-57, 2014 (査読無)

玉田哲男・近藤秀樹. テンサイそう根病の

病原ウイルス (BNYVV) の進化と品種抵抗性. 植物防疫 68, 168-179, 2014 (査読無)

Kondo H, Chiba S, Toyoda K, Suzuki N. Evidence for negative-strand RNA virus infection in fungi. *Virology* 435:201-209,2013a (Essential Collection: Editors' Selection 2013)(査読有)

Kondo H, Chiba S, Andika IB, Maruyama K, Tamada T, Suzuki N. Orchid fleck virus structural proteins N and P, form intranuclear viroplasm-like structures in the absence of viral infection. *J Virol* 87:7423-7434, 2013b (査読有)

Kondo H, Hirano S, Chiba S, Andika IB, Hirai M, Maeda T, Tamada T. Characterization of burdock mottle virus, a novel member of the genus *Benyvirus*, and the presence of benyvirus-related sequences in the plant and insect genomes. *Virus Res* 177:75-86,2013c (査読有)

Kuhn JH, Bekal S, Cai Y, Clawson AN, Domier LL, Herrel M, Jahrling PB, Kondo H, Lambert KN, Mihindukulasuriya KA, Nowotny N, Radoshitzky SR, Schneider U, Staeheli P, Suzuki N, Tesh RB, Wang D, Wang LF, Dietzgen RG. *Nyamiviridae*: Proposal for a new family in the order *Mononegavirales*. *Arch Virol* 158:2209-2226, 2013 (査読有)

近藤秀樹. 分節型ゲノムを持つラブドウイルス. ウイルス. 63:143-154,2013 (査読無)

[学会発表](計 10 件)

近藤秀樹・久野 昌・林 諭昕・千葉壮太郎・鈴木信弘. Deep sequencing 解析により明らかになった *Botrytis tulipae* の9種ウイルスによる混合感染. 平成 27 年度日本植物病理学会大会, 東京, 3月 28-31 日,2015

Kondo H, Maruyama K, Chiba S, Andika IB, Tamada T, Suzuki N. Detection and transcriptional mapping of the messenger and leader RNAs of orchid fleck virus, a bisegmented negative sense RNA virus. XVIth International Congress of Virology, Montreal, Canada, July 27- August 1, 2014

Kondo H, Hisano S, Lin YH, Chiba S, Suzuki N. Multiple infection of a single *Botrytis tulipae* isolate by at least nine RNA viruses revealed by a deep sequencing approach. The third International Mycovirus Symposium. Burlington, USA, August 2-5, 2014

近藤秀樹 植物ゲノム上の RNA 感染記録から紐解くウイルス-宿主相互作用. 第 6 回植物ストレス科学研究シンポジウム, 倉敷, 3月 6-7 日,2014

近藤秀樹・千葉壮太郎・鈴木信弘. 菌類に感染するマイナス鎖 RNA ウイルス. 29 回中国四国ウイルス研究会, 山口, 6 月 28-29 日, 2014

近藤秀樹・丸山和之・千葉壮太郎・鈴木信弘. 2 分節マイナス鎖 RNA ウイルスであるランエソ斑紋ウイルス (OFV) の mRNA および leader RNA の特性. 平成 26 年度日本植物病理学会大会, 札幌, 6 月 2-4 日,2014

近藤秀樹・千葉壮太郎・Ida Bagus Andika・鈴木信弘・玉田哲男. 新規ベニウイルス・burdock mottle virus (BdMoV) の配列解析とベニウイルス類似配列の植物・昆虫ゲノム上での発見. 第 61 回日本ウイルス学会学術集会 神戸, 11 月 10-12 日国際会議場,2014

近藤秀樹・千葉壮太郎・鈴木信弘. 植物および昆虫の核ゲノム上に見いだされたベニウイルス様配列. 平成 25 年度日本植物病理学会関西西部会, 岡山, 9 月 26-27 日,2013

近藤秀樹・千葉壮太郎・豊田和弘・鈴木信弘. マイナス鎖 RNA ウイルスの菌類への感染の可能性. 平成 25 年度日本植物病理学会大会, 岐阜, 3月 27-29 日,2013

Chiba S, Kondo H, Kanematsu S, Suzuki N. Evolutionary history of the family Partitiviridae: insight from the viewpoint of paleovirology. The American Society for Virology, 31st Annual Meeting. Wisconsin, USA, 7/21-7/25,2012

[図書](計 2 件)

Kondo H, Chiba S, Suzuki N. Detection and analysis for non-retroviral RNA virus-like elements in plant, fungal and insect genomes. *Methods in Molecular Biology* 1236: 73-88 (in *Plant Virology Protocols: New approaches to detect viruses and host responses*. eds, Uyeda I, Masuta C. Humana Press Inc.), 2015

Kondo H, Kanematsu S, Suzuki N. Viruses of the white root rot fungus, *Rosellinia necatrix* (Chapter Seven). *Advances in Virus Research* 86 177-214. (Mycoviruses, 1st Edition; ed. S. Ghabrial, Academic Press), 2013

〔その他〕  
ホームページ等  
<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・資源生物科学研究所・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・資源生物科学研究所・教授  
研究者番号：70206514
- (4)研究協力者  
丸山 和之 (MARUYAMA, Kazuyuki)  
岡山大学・資源植物科学研究所・技術職員  
研究者番号：20379811