

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 18 日現在

機関番号：15301

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2014

課題番号：24658041

研究課題名(和文)アカパンカビモデル糸状菌を用いたウイルス/宿主相互作用解析系の確立

研究課題名(英文)Development of *Neurospora crassa* as a model filamentous fungus for studying virus/host interactions.

研究代表者

鈴木 信弘 (SUZUKI, Nobuhiro)

岡山大学・その他部局等・教授

研究者番号：70206514

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文): ウイルス感染の報告例がないアカパンカビ(*Neurospora crassa*, 子う菌、糸状菌)で複製可能なウイルスを探索し、ウイルス/宿主相互作用解析のモデル系を確立するのが目的である。クリ朧枯病菌感染性マイコレオウイルス(MyRV1)、白紋羽病菌感染性パルティティウイルス(RnPV2)をアカパンカビの野生型、RNAサイレンシング成分(*agl*, *dcl*, *rdr*)各種変異株菌に導入し、ウイルス複製を確認した。それら宿主成分のウイルス感染への影響を解析中である。今後、アカパンカビの強力な遺伝学、さらには整備された各種研究ツールを利用し、宿主因子の探索を進め、さらに詳細な解析を行う予定である。

研究成果の概要(英文): As a model system for genetics, biochemistry or developmental biology, *Neurospora crassa* has greater advantages over any other filamentous fungi due to its even short life cycle time, ease of crossing, and well-established tools and resources represented by a number of gene knockout strains available from the Fungal Genetics Stock Center. This study aimed at screening of previously reported fungal viruses for *N. crassa*-infectious viruses. We confirmed that *N. crassa* supports the replication of two heterologous viruses, mycoreovirus 1 (MyRV1) and *Rosellinia necatrix* partitivirus 2 (RnPV2) from other ascomycetes, *Cryphonectria parasitica* and *R. necatrix*. The two viruses could be maintained not only in the wild-type strain but also RNA silencing defective mutants of *N. crassa*. It is now being investigated what effects of deletions of RNA silencing-related genes on virus replication are, and how these genes respond to virus infection.

研究分野: ウイルス学

キーワード: マイコウイルス トランスフェクション 宿主範囲 逆遺伝学 dsRNA RNAウイルス RNAサイレンシング

アカパンカビモデル糸状菌を用いたウイルス/宿主相互作用解析系の確立

Development of *Neurospora crassa* as a model filamentous fungus for studying virus/host interactions.

1. 研究開始当初の背景

菌類は未同定分を加え約 150 万もの種があると言われる。最近、それら特に植物に病気を起こすカビでウイルス狩りが行なわれ、野外分離菌株が高頻度(数%~80%)でウイルスに感染していること、しかも多くの新規の RNA ウイルスが分離されることが示された(Ghabrial & Suzuki, Annu Rev. Phytopath, 2009)。報告されているマイコウイルス(菌類ウイルス)は約 200 種であるが、この数字はマイコウイルス全体の氷山の一角であろう。マイコウイルス研究は、ウイルスを利用した生物防除(ヴァイロコントロール)の発展、ウイルス多様性の再認識、他の界を宿主とするウイルスとの進化の解明、粒子を作らないウイルスの発見、新規遺伝子発現様式の発見、新規粒子構造の発見に繋がり、生物学に大きく貢献している。しかし、ウイルス/宿主相互作用という近代ウイルス学の命題研究では、解析系の制限から遅れをとっている。

制限には、1) ウイルスを研究者が接種できない、あるいは 2) 宿主菌遺伝子操作系の欠如、宿主菌遺伝学の遅れ、等がある。これら両者あるいは片方を欠くために優れた解析系が極めて少なく、ウイルス学的性状を調べるのが極めて困難となっている(Nuss, Nat Rev Microbiol., 2005; Ghabrial & Suzuki, Annu Rev Phytopathol, 2009)。野外収集菌株からウイルスが確認されたとしても、同種、異種の他の菌に感染し病徴を惹起するかどうかを調べるのが難しい。この点が他の動物ウイルス、植物ウイルスとの大きな違いである。また、ウイルスが分離されている宿主糸状菌の殆どで、遺伝学が確立していない、宿主菌遺伝子操作系が欠如しているため、ウイルス・宿主相互作用を伴うウイルス複製機構、病徴発現機構の解析には不向きである。しかし、1) については未だ 10 種のウイルスにもみたくないが、ウイルスを粒子、感染性 cDNA あるいは感染性 RNA として宿主プロトプラストへ導入する系が申請者らのグループ他により確立された(Choi & Nuss, 1992; Suzuki et al., 1999; Hillman

& Suzuki, 2004)。

アカパンカビは NIH によりモデル生物として認定された(<http://www.nih.gov/science/models/>) 子のう菌である。これまでウイルス宿主菌として着目されて来なかったが、糸状菌感染性マイコウイルスの複製/病徴発現に關与する宿主因子を解析するには最適なモデル実験糸状菌となりうる。大きな問題点はこれまでに、アカパンカビに感染するウイルスがこれまで見つかっていないことである。本研究では期間内に、アカパンカビと類似の子のう菌由来のウイルスがアカパンカビで感染することを確認し、アカパンカビの遺伝学を利用したウイルス/宿主相互作用解析系を確立する。本系は 3 次元病徴決定機構(単細胞では観察不能)、コロニー内複製/移行、宿主防御の機構の解析に優れており、ウイルス研究の発展さらには自然宿主系へのフィードバック等により生物学全般に大きく貢献する。

2. 研究の目的

ウイルス感染の報告例がないアカパンカビ(*Neurospora crassa*, 子のう菌、糸状菌)で複製可能なウイルスを探索し、ウイルス/宿主相互作用解析のモデル系を確立する。本研究は、ウイルス・宿主相互作用研究で着目されなかったアカパンカビに焦点をあてた独創性が高い課題である。アカパンカビでは、強力な遺伝学、さらには整備された各種研究ツールが利用可能である。最近、単細胞性の子のう菌であるパン酵母を宿主とし、植物ウイルスあるいは動物ウイルスの複製あるいは組換えに關与する宿主因子の網羅的解析例が報告されている。本系は、酵母系では解析不可能な 3 次元病徴決定機構、コロニー内複製/移行、宿主防御の機構の解析に優れており、ウイルス研究の発展さらには自然宿主系へのフィードバック等により生物学全般に大きく貢献する。

3. 研究の方法

本課題は 3 つの中課題 1[アカパンカビ感染性ウイルスの探索]、2[ウイルス病徴発現・複製に關与する宿主因子の同定]、3[ウイルス病徴発現・複製に關与するウイルス因子の同定]から構成させる。中課題 1 では、他の菌類に感染する感染性 cDNA クローン(ハイポウイルス、ナーナウイルス、作成予定のメガバーナウイルス)あるいは申請者が開発した粒子接種法で感染性が認められたウイルス(マイコレオウイルス、メガバーナウイルス)

を供試する(Hillman et al., 2004, Chiba et al., 2009)。中課題2では、感染性ウイルスをアカパンカビ変異株に菌糸融合により感染させ、ウイルス複製、病徴発現を詳細に比較・解析し宿主因子の網羅的解析を進める。中課題3では、ウイルス逆遺伝学、ウイルス遺伝子再編成株の利用あるいはウイルス遺伝子の高発現、ノックダウンにより病徴発現・複製に関するウイルス因子を同定する。

4. 研究成果

中課題1[アカパンカビ感染性ウイルスの探索]

クリ胴枯病菌感染性ハイポウイルス cDNA(Suzuki et al., JVI, 1999), *Saccharomyces cerevisiae* 感染性ナーナウイルス cDNA(Esteban and Fujimura, PNAS, 2003), 白紋羽病菌感染性メガビルナウイルス粒子(Chiba et al., JVI, 2009)をアカパンカビへの導入を試みた。結果は陰性であった。しかし、クリ胴枯病菌感染性マイコレオウイルス(MyRV1)粒子(Suzuki et al., JGV, 2004; Hillman et al., JGV, 2004), 白紋羽病菌感染性パルティティウイルス(RnPV2)粒子(Chiba et al., JVI, 2013)をアカパンカビに導入し、ウイルス複製を確認した。

2[ウイルス病徴発現・複製に関する宿主因子の同定]

1で感染が確認されたMyRV1, RnPV2感染株をRNAサイレンシング成分(ag1, dcl, rdr)各種変異株と融合させることに成功した。それら宿主成分のウイルス感染への影響を解析中である。以上のように、当初の予定よりは若干遅れたものの、ウイルス感染の報告例がなかったアカパンカビに感染するウイルスを見つけることができた。今後、アカパンカビの強力な遺伝学、さらには整備された各種研究ツールを利用し、宿主因子の探索を進め、さらに詳細な解析を行う予定である。

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 2件)

1. Eusebio-Cope, A., and Suzuki, N. (2015). Mycoreovirus genome rearrangements associated with RNA silencing deficiency. *Nucleic Acids Research* 43, 3802-3813. doi: 10.1093/nar/gkv239.

2. Chiba, S., Lin, Y.-H., Kondo, H., Kanematsu, S. and Suzuki N. (2013). Effects of defective-interfering RNA on symptom induction by, and replication of, a novel partitivirus from a phytopathogenic fungus *Rosellinia necatrix*. *Journal of Virology* 87, 2330-2341.

[学会発表](計 2件)

1. Eusebio-Cope, A and Suzuki, N. Mycoreovirus 1 genome rearrangements generated in RNA-silencing defective strains of the chestnut blight fungus, *Cryphonectria parasitica*. (2014). Third International Mycovirus Symposium, August 2-4, Burlington, USA.

2. Chiba, S., Lin, Y.-H., Kondo, H., Kanematsu, S and Suzuki N. (2013). Effects of defective-interfering RNA on symptom induction by, and replication of, a novel partitivirus from a phytopathogenic fungus *Rosellinia necatrix*. The 32nd Annual Meeting of American Society for Virology, State College, Pennsylvania, USA. July 20-24, 2013.

[図書](計 0件)

[産業財産権]

出願状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]

ホームページ等

<http://www.rib.okayama-u.ac.jp/research/pmi-hp.html>

6 . 研究組織

(1)研究代表者

鈴木 信弘 (SUZUKI Nobuhiro)

研究者番号：70206514

資源植物科学研究所・教授

(2)研究分担者

()

(3)連携研究者

()

研究者番号：