

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 20 日現在

機関番号：82111

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25292031

研究課題名(和文) マイコウイルスによる弱病原化機構を利用した白紋羽病菌の病原性関連遺伝子の解析

研究課題名(英文) Analyses of differentially expressed genes in *Rosellinia necatrix* infected with the mycovirus that decreases host fungus virulence

研究代表者

兼松 聡子 (Kanematsu, Satoko)

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・本部人事部・室長

研究者番号：40355433

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,500,000円

研究成果の概要(和文)：白紋羽病菌は果樹類の根を腐敗させる病原糸状菌である。本菌の病原性機構を明らかにするため、病原力を低下させるメガビルナウイルスの感染により発現が変動する遺伝子群の特徴付けと機能解析を行った。発現が変動する10遺伝子の発現抑制株、あるいは過剰発現株を作出したが病原力との明確な相関は認められなかった。メラニン合成酵素遺伝子については、土壌中での白紋羽病菌の長期生存に寄与していることが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Rosellinia necatrix is the causal fungus of white root rot disease of fruit trees. To elucidate the molecular mechanisms underlying the pathogenicity of this fungus, the debilitated W97 strain infected with Rosellinia necatrix megabirnavirus 1 (RnMBV1) underwent a comprehensive transcriptional analysis. Among the differentially expressed genes, 10 were functionally analyzed based on RNAi-mediated gene silencing or overexpression. None of the genes affected the virulence of *R. necatrix*, but the melanin biosynthetic gene contributed to the long-time survival of this fungus in soil via morphogenesis.

研究分野：植物保護科学

キーワード：白紋羽病 糸状菌病 マイコウイルス 病原力低下

## 1. 研究開始当初の背景

(1) 白紋羽病は根を腐敗させる土壌病害で、400種を超える広い宿主範囲が報告されている。胞子で感染する菌とは異なり、菌糸塊が強い腐性能力により感染するとともに、土壌中に長期に残存する。本菌とその近縁種は日本の果樹のみならず、スペインのアボカド、南米のコーヒーやカカオなどで甚大な被害をもたらしているが、その発病メカニズムについてはほとんど何も分かっていない。

近年の急速な次世代シーケンサー技術の発展により、非モデル生物においてもゲノム情報を利用した研究展開が可能となった。白紋羽病菌においては、我々のグループにより、白紋羽病菌 W97 株のゲノム DNA をロシユ 454 で解析したドラフトゲノムを得ていた。

(2) 白紋羽病菌からは多くのウイルスが検出されており、そのうち 5 科 10 種のウイルスが全長配列の解読などにより同定されていた。多くの場合、ウイルス感染による白紋羽病菌への影響は認められないが、レオウイルス (RnMyRV3)、メガビルナウイルス (RnMBV1) は白紋羽病菌の病原力を低下させることが明らかとなっていた。またマイコウイルスは人工接種が困難である例が多く研究の隘路となっていたが、RnMyRV3 や RnMBV1 などいくつかのウイルスについて、白紋羽病菌における人工接種系の開発に成功していた。そのため、白紋羽病菌はウイルスと宿主菌の相互作用を解析できる可能性が示されていた (Kondo et al. (2013) Adv Virus Res 86:177-214)。

## 2. 研究の目的

マイコウイルスを菌の病原力低下ツールとして利用し、ウイルス感染により変動する白紋羽病菌の遺伝子を解析することで、白紋羽病菌の病原性機構を遺伝子レベルで解明する。

(1) 白紋羽病菌において網羅的に遺伝子の発現変動解析を行うため、これまでに得られた白紋羽病菌のゲノム情報の更なる整備をする。

(2) RnMBV1 を感染させた白紋羽病菌の RNA-seq によるトランスクリプトーム解析を行い、ゲノムワイドな遺伝子の発現変動を明らかにする。

また、ウイルス感染応答的な遺伝子群から病原力低下に相関して発現変動する遺伝子を抽出する。

(3) RNAi 法または遺伝子破壊などの逆遺伝学的手法による遺伝子機能解析系の効率化を行う。

(4) ウイルス感染により発現が変動する遺伝子群を逆遺伝学的手法により機能解析する。

## 3. 研究の方法

### (1) ゲノム情報の整備

ロシユ 454 で得られたリードに加えて、HiSeq, PacBio による配列解析の結果を加えてアセンブリし、Scaffoldを得た。イルミナ HiSeq で得られた mRNA 情報と統合し、AUGUSTUS と CodingQuarry ver.1.3 を用いて遺伝子の予測を行うとともに Blast による相同性検索結果による推定される機能アノテーションを行い、ゲノム情報を整備した。

### (2) 遺伝子発現解析

ウイルス非感染株、ウイルス感染株から抽出した mRNA の配列を HiSeq で解析した。CLC Genomic Workbench を用いてウイルス感染により発現が 4 倍以上変動する遺伝子群を抽出し、Blast2GO により Gene Ontology 解析を行った。

また、着目する遺伝子については、リアルタイム PCR によりウイルス感染株、非感染株における遺伝子の発現量を比較した。

### (3) RNAi による白紋羽病菌の遺伝子解析

遺伝子発現解析において、ウイルス感染株で発現量が変動するレクチン遺伝子、機能未知遺伝子および転写調節因子などを対象に、RNAi 法により対象遺伝子の発現抑制株を作出し、菌糸生育や病原性などの表現型を解析した。

### (4) ウイルス感染により産生するスモール RNA (vsRNA) の解析

マイコウイルスが RNAi の標的となるか調べるため、RnMBV1 などのマイコウイルス感染株におけるウイルス由来スモール RNA (vsRNA) の次世代シーケンス解析を行った。

## 4. 研究成果

### (1) 白紋羽病菌におけるゲノム情報の整備

得られた配列をアセンブリした結果、1209 個のコンティグを含む 239 個のスキフォールドとなった。ゲノム全長は 44.3 Mb、タンパク質をコードしている推定遺伝子数は 12,444 であった。得られたゲノム情報は、DDBJ/EMBL/Genbank にて公開した。

### (2) RnMBV1 感染白紋羽病菌のトランスクリプトーム解析

白紋羽病菌 W97 株および RnMBV1 感染 W97 菌株の mRNA を HiSeq により解析した。白紋羽病菌遺伝子 12,444 のうちウイルス感染により 4 倍以上発現が変動した遺伝子は、1,160 個であった。

発現変動遺伝子の Gene Ontology 解析を行ったところ、とくに代謝経路に関与する遺伝子の発現変動が示され、細胞壁分解酵素やサイトカラシン合成酵素遺伝子などの細胞外分泌タンパク質などの遺伝子も含まれており、これら遺伝子の病原性への関与が示唆さ

れた。

### (3) 白紋羽病菌における RNAi シグナルの伝達

これまでに構築したヘアピン型 RNAi ベクターによる遺伝子の機能解析系に加えて、transitive RNA、あるいは遺伝子破壊を利用した遺伝子解析系の構築を試みたが、効率的な系の確立には至らなかった。しかしながらその過程で、自立増殖型ベクターを用いた RNAi 実験により、モデル生物である *Caenorhabditis elegans* や *Arabidopsis thaliana* とは異なり、局所的に誘導された白紋羽病菌の RNAi シグナルはコロニー全体には広がらないという興味深い現象が明らかとなった (Shimizu et al. 2015)。

### (4) ウイルス感染により発現が変動する遺伝子の機能解析

#### メラニン合成酵素遺伝子

白紋羽病菌は RnMBV1 の感染により病原力が低下するのみならず、コロニーのメラニン化が抑制された。また RnMBV1 ゲノムのリアレンジメントウイルス株は、野生型 RnMBV1 と比較して白紋羽病菌感染による病原力、およびメラニン化ともに低下効果が下がっていた (Kanematsu et al. 2014)。

そこで、白紋羽病菌のメラニンの機能を解析するため、メラニン生合成遺伝子ホモログである白紋羽病菌の RnPKS1 について、ヘアピン型ベクターを用いた RNAi 株を作成した。

作出された RnPKS1 発現抑制株は、コロニーのメラニン化は減少し、白色コロニーとなった。リンゴマルバ苗への接種試験の結果、発現抑制株は野生株と同等の病原力を維持しており、RnPKS1 遺伝子は病原力に影響しなかった。

一方、RnPKS1 発現抑制株は、疑似菌核の形成が抑制され (図 1)、土壤中における長期生存能力が低下した (図 2)。すなわち、白紋羽病菌のメラニンには病原力には影響しないが、土壤中における生存能力に関わることが明らかとなった (Shimizu et al. 2014)。

無接種

VC

KD1



図 1 . 発現抑制株 (KD1) による疑似菌核の形成阻害

\*リンゴ枝片で培養した VC (ベクターコントロール) 株と、KD1 株 (RnPKS1 発現抑制株) を 2 か月間土壤中に埋設し、疑似菌核の形成状況を比較した。

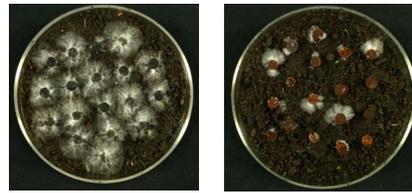


図 2 . 土壤中に 8 か月埋設後の白紋羽病菌の生存比較

転写調節因子、レクチン遺伝子、機能未知の遺伝子

上述のトランスクリプトーム解析により抽出された RnMBV1 感染により発現変動する遺伝子について生育・病原性への関与を調べた。

RnMBV1 感染により発現変動する転写因子ホモログ 2 種 (cTF2 (発現低下)、cTF8 (発現上昇)) について、それぞれ発現抑制株あるいは過剰発現株を作成したが、生育・病原力との明確な関連は認められなかった。

白紋羽病菌の病原性に関与すると推測されるレクチン遺伝子 (Iec2) や、RnMBV1 感染により発現量が大きく低下する機能未知遺伝子 (C35、C67) について、発現抑制株を作成したが、生育・病原力との関連は認められなかった。

#### RNAi 関連遺伝子

RNAi はウイルス感染に対する防御機構として働くことが知られている。白紋羽病菌において 5 種のマイコウイルス (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)、レオウイルス (RnMyRV3)、RnMBV1) について RNAi 関連遺伝子 (RnDCL-2、RnAGL-1、-2、RnRdRP-1、-2、-3、-4) の発現変動をリアルタイム PCR により相対的に比較解析したところ、白紋羽病菌の生育・病原力を低下させる RnMBV1 や RnMyRV3 の感染株では、ウイルスフリー株 (VF) や他 3 種のウイルス感染株と比べて RnDCL-2、RnAGL-2、RnRdRP-1、-2 の発現量が増大することが明らかとなった (図 3) (Yaegashi et al. 2016)。これらの遺伝子の過剰発現株を作成したが生育に変化は認められなかった。

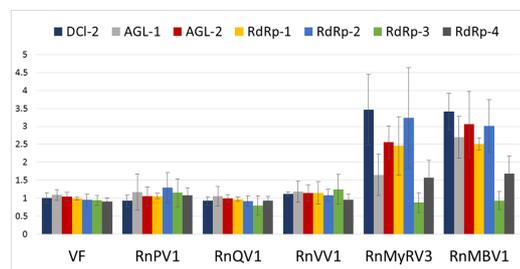


図 3 . ウイルス感染による RNAi 関連遺伝子の発現変動比較

\*各遺伝子の発現量はアクチン遺伝子の発現量で標準化した。

#### (5)vsRNA の解析

上述の RNAi 関連遺伝子の発現解析結果から、白紋羽病菌に感染するマイコウイルスは RNAi を誘導することが示されたため、上述の 5 種マイコウイルス感染株において、RNAi 誘導の指標となるウイルス由来スモール RNA(vsRNA)を次世代シーケンス解析した。その結果、RNAi 関連遺伝子の発現量を上昇させる RnMyRV3 や RnMBV1 では vsRNA 蓄積量が高いことが示された。また、RnMBV1 由来 vsRNA は RNA 誘導サイレンシング複合体(RISC)を活性化させ、標的 RNA の分解を導くことを明らかにした (Yaegashi et al. 2016)。さらに、RnMBV1 由来 vsRNA 発現株を作出したところ、RnMBV1 のゲノムセグメント 2 の vsRNA の蓄積株で生育および病原力の低下が認められた。この結果から、RnMBV1-vsRNA は白紋羽病菌の生育・病原性に関連する遺伝子を発現抑制している可能性が示唆された。

#### 5 . 主な発表論文等

##### 〔雑誌論文〕(計 4 件)

Hajime Yaegashi, Takeo Shimizu, Tsutae Ito and Satoko Kanematsu (2016) Differential inductions of RNA silencing among encapsidated double-stranded RNA mycoviruses in the white root rot fungus *Rosellinia necatrix*. J. Virol. 90(12) 5677-5692. 査読有  
DOI:10.1128/JVI.02951-15.

Takeo Shimizu, Hajime Yaegashi, Tsutae Ito, Satoko Kanematsu (2015) Systemic RNA interference is not triggered by locally-induced RNA interference in a plant pathogenic fungus, *Rosellinia necatrix*. Fungal Genet. Biol. 76; 27-35. 査読有  
doi: 10.1016/j.fgb.2015.02.001.

Takeo Shimizu, Tsutae Ito, Satoko Kanematsu (2014) Functional analysis of a melanin biosynthetic gene using RNAi-mediated gene silencing in *Rosellinia necatrix*. Fungal Biol. 118:413-421. 査読有  
doi: 10.1016/j.funbio.2014.02.006.

Satoko Kanematsu, Shimizu Takeo, Salaipeth L, Yaegashi Hajime, Sasaki Atsuko, Ito Tsutae, Suzuki Nobuhiro. (2014) Genome rearrangement of a mycovirus *Rosellinia necatrix* megabirnavirus 1 affecting its ability to attenuate virulence of the host fungus. Virology 450-451:308-15. 査読有  
doi: 10.1016/j.virol.2013.12.002.

##### 〔学会発表〕(計 11 件)

八重樫元 (2016) 果樹白紋羽病菌に対するマイコウイルスの感染・移行戦略. 第 17 回植物病原菌類談話会 2017.4.28.「アイーナセンター (岩手県盛岡市)」

Satoko Kanematsu, Hajime Yaegashi (2015) Mycoviruses in *Rosellinia necatrix*: Features of potential virocontrol agents. 23rd International Conference on Virus and other Graft Transmissible Diseases of Fruit Crops. 2015.6.8-6.12 「アイーナセンター (岩手県盛岡市)」.

Satoko Kanematsu, Takeo Shimizu, Tsutae Ito, Functional analysis of a melanin biosynthetic gene using RNAi-mediated gene silencing in *Rosellinia necatrix*. The 3rd International Mycovirus Symposium 2014.8.2~8.5 「Burlington, USA」

Hajime Yaegashi, Takeo Shimizu, Tsutae Ito, Satoko Kanematsu (2014) Virulent mycoviruses up-regulate RNA silencing related genes in a phytopathogenic fungus, *Rosellinia necatrix*. The 16th International Congress of Virology, 2014.7.26 ~8.1 「Montreal, Canada」

清水健雄、八重樫元、伊藤伝、中屋敷均、兼松聡子 (2014) 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大会、「札幌コンベンションセンター (北海道、札幌市)」. 2014.6.2-6.4

##### 〔図書〕(計 1 件)

Takeo Shimizu, Satoko Kanematsu(2015) Transformation of ascomycetous fungi using autonomously replicating vectors, In Genetic transformation systems in fungi, Vol.2 161-167. Springer

#### 6 . 研究組織

##### (1)研究代表者

兼松 聡子 (KANEMATSU, Satoko)  
国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・本部人事部・室長  
研究者番号：40355433

##### (2)研究分担者

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・果樹茶業研究部門リンゴ研究領域・主任研究員  
研究者番号：90582594