

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 6 月 11 日現在

機関番号：82111

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25660039

研究課題名(和文) マイコウイルスの“開かれた生態”仮説の検証：異なる糸状菌間を伝播するのか？

研究課題名(英文) A hypothesis of mycovirus ecology: Can mycoviruses be transmitted between different fungal species?

研究代表者

兼松 聡子 (KANEMATSU, Satoko)

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・主任研究員

研究者番号：40355433

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：RNA ゲノムを有するマイコウイルスの伝播は、細胞内を移行していく経路のみが知られている。そのためマイコウイルスの伝播は菌系融合可能な菌体間(多くの場合同種で和合性)のみに限られると考えられているが、我々は野外観察によりウイルスが自然感染する現象を見いだしてきた。本研究では、採取した土壤中に埋設したウイルスフリーの白紋羽病菌にRNAウイルスが自然感染する現象を再現することに成功し、感染したウイルスは新種のパーティティウイルスとエンドルナウイルスであることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：In general, RNA mycoviruses (fungal viruses) are transmitted through hyphal anastomosis between mycelially compatible fungal strains, and their intracellular life cycle within the host limits transmission to different species and even to incompatible strains of the same species. However, in our field observations, we found a novel virus appeared in the ascomycetous fungus, *Rosellinia necatrix*, in an apple orchard. This finding suggests diverse infection routes for mycoviruses. In this study, we show that mycoviruses can infect *R. necatrix* through the soil under green-house conditions. After incubating virus-free *R. necatrix* strains in soil-filled buckets, *R. necatrix* sub-isolates were obtained, and the presence of viral dsRNAs was confirmed in the sub-isolates using dot-blot hybridization with an anti-dsRNA antibody. Sequencing analyses revealed that the viruses in the *R. necatrix* sub-isolates were novel partitivirus and endornavirus.

研究分野：植物病理学

キーワード：マイコウイルス 植物病原糸状菌

## 1. 研究開始当初の背景

RNA ゲノムを有するマイコウイルスの伝搬は、菌糸融合により細胞内を移行していく経路のみが知られる。そのため RNA ウイルスの伝搬経路は菌糸融合可能な菌体間(多くの場合同種で和合性の組み合わせ)のみに限られると考えられている。しかしながら我々は野外調査において果樹類白紋羽病菌にウイルスが自然感染する現象を見いだした(Yaegashi et al. (2013) FEMS Microbiol. Ecol. 83:49-62)。このため、マイコウイルスはこれまでの概念よりも広範に種を超えて伝播する可能性が示唆された。

## 2. 研究の目的

本研究課題においては、マイコウイルスが異なる糸状菌間で伝播する可能性について以下の2試験により検討した。

(1) 野外圃場で観察されたマイコウイルスの自然感染現象が、温室など限られた条件下で再現されるのかを明らかとする。

(2) 白紋羽病菌に新規7種ウイルスが自然感染したリンゴ圃場の土から、感染源となった7種ウイルスを保持する糸状菌を探索する。

## 3. 研究の方法

### (1) 自然感染の再現

3箇所から採取した土壌をそれぞれバケツに入れ、ウイルスフリーの白紋羽病菌株 W97あるいは W370T1 をリンゴ枝とともに埋設し、温室条件下で乾燥しないように管理した。一定期間後にリンゴ枝上で増殖した白紋羽病菌を再分離した。再分離した菌株から総核酸を抽出してメンブレンにスポットし、市販の抗 dsRNA 抗体を利用したドットプロットを行うことで各菌株にウイルスゲノム由来の dsRNA が存在するかを調査した。ドットプロットによる検出は、アガロースゲル電気泳動による可視化よりも、検出感度が高いことを確認済みである。再分離した菌株のジェノタイプはオートミール培地上での対峙培養による MCG 判別により確認した。

ドットプロット法により RNA ウイルスの感染有りと推定された菌株については、培養菌体から dsRNA を抽出し、電気泳動で確認した。また、各 dsRNA についてランダムプライマーを用いた cDNA ライブラリを作製、シークエンスすることにより、ウイルスゲノムの塩基配列を決定した。ウイルス感染株からの粒子の純化も行った。

### (2) 自然感染源の探索

リンゴ圃場にて自然感染した7種ウイルスの配列それぞれに基づくマルチプレックスプライマーを作製し、One-step RT-PCR により各ウイルスを同時に検出する系を構築した。自然感染した現地土壌を6月下旬に採取して白紋羽病菌を培養した枝片とリンゴ枝を埋設し、一定期間後に白紋羽病菌が増殖したリンゴ枝を取り出した。リンゴ枝表面に付着した土壌を回収し、希釈平板法により糸状菌を分離した。分離用の培地としてクロラムフェニコールを添加した PDA、コーンミール培地、モルト培地を用いた。分離した糸状菌の培養菌体から抽出した総核酸を鋳型としてマルチプレックス RT-PCR を行った。

さらに、(1)にて自然感染が認められた区からもトラップに使用した枝周辺の土から土壌糸状菌を更に分離し、自然感染した各ウイルス特異的プライマーによるウイルスの検出を試みた。

## 4. 研究成果

### (1) 自然感染の再現

これまでの野外観察事例から、菌糸融合による菌体内を通じた伝播以外の経路によりマイコウイルスは白紋羽病菌に土壌中で自然感染することが想定された。そこで、温室条件下での限られた条件においても白紋羽病菌へマイコウイルスが自然感染するかを検討した。

土壌へ埋設後、1ヶ月半で再分離した白紋羽病菌 240 菌株においては、RNA マイコウイルスの感染の指標となる dsRNA は、ドットプロット法により検出されなかった。一方、埋設4~4ヶ月半後に分離した菌体からは、125 菌株中4菌株と、低率ながらも抗 dsRNA 抗体と反応した菌株が認められた(図1)。

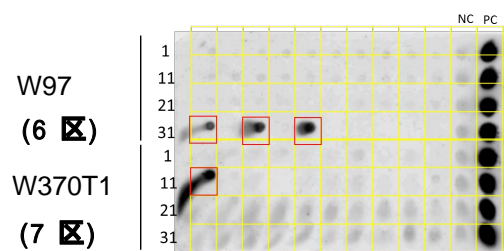


図1. 抗 dsRNA 抗体を利用したドットプロットによる菌体内 dsRNA の検出

ドットプロットにより陽性反応を示した菌株はそれぞれの区に埋設した元菌株と同一 MCG であった。また、分離菌株から無作為に抽出した 97 菌株について MCG の確認を行ったところ、すべてにおいて各区に埋設した菌株と同一であることが確認された。

ドットプロットにより陽性反応を示した4菌株に含まれる dsRNA 像を電気泳動により確認した(図2)。W97 由来の3菌株(6-31, 33, 35 株)は約 10 kb の dsRNA を有していた。W370T1 由来の7-11 株は約 2 kb の dsRNA を含んでいた。

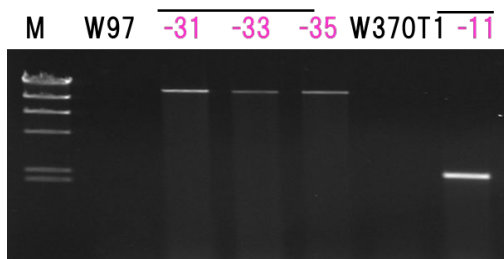


図2 . ドットプロットによる dsRNA 陽性株から抽出された dsRNA の電気泳動像 (M; /Hind )

6-31 株から抽出した dsRNA から作製した cDNA の部分塩基配列を決定した。Blast 解析の結果、既報エンドルナウイルスの polyprotein と 30%前後の相同性が認められたため、6-31 ウイルスは新種のエンドルナウイルスと推定された。6-33, 6-35 dsRNA は RT-PCR により 6-31 と同一ウイルスと推定された。

一方、7-11 ウイルスは2分節の dsRNA( 2052 bp と 1928 bp ) をゲノムとして有していた。Blast 解析の結果、既知パルティティウイルスの RdRP と最大で 57%の相同性を示し、アルファパルティティウイルス属の新規ウイルスであることが明らかとなった。

6-31 株、7-11 株の培養菌体から粒子の純化を試みた。6-31 の培養菌体からはウイルス粒子は純化されず、既報のエンドルナウイルスと同様に粒子を形成しないことが確認された。7-11 ウイルスからは直径 ~ 40 nm の球状粒子が純化された。プロトプラストを介したトランスフェクションにより、7-11 ウイルスの純化粒子は W97 菌株に感染可能であった。

## (2) 自然感染源の探索

野外にて白紋羽病菌へのマイコウイルスの自然感染が見られた圃場の土に白紋羽病菌を埋設し、白紋羽病菌の周囲に付着した土壌から糸状菌類の分離を行った。圃場内2地点、各4か所から分離した計451菌株についてマルチプレックス RT-PCR を行ったが、ウイルスが検出された株は認められなかった。

また、6-31 ウイルスが検出された区、および7-11 ウイルスが検出された区において、白紋羽病菌を再分離後に冷蔵保存していた土からさらに145菌株と259菌株の糸状菌をそれぞれ分離した。各ウイルス特異的プライマーを用いて RT-PCR を行ったが、いずれの

分離菌からも各ウイルスは検出されなかった。

野外における自然感染が認められた場所の土壌(6-11 ウイルスが検出された圃場と同じ)、および7-11 ウイルスの感染が認められた場所の土壌を再度採取し、採取後直ぐ(白紋羽病菌の埋設を行わない)にそれぞれ糸状菌を1000株と200株分離し、マルチプレックス RT-PCR、あるいは RT-PCR によるウイルスの検出を試みたが、結果はすべて陰性であった。

マイコウイルスの自然感染現象は、これまで知られてきた同種和合性の菌体間での菌系融合による伝搬、とされるマイコウイルスの伝搬経路に加えた未知の生態の可能性を示すものである。

本研究課題において、これまでの野外観察で認められた白紋羽病菌へのマイコウイルスの自然感染現象が、温室条件下においても再現されることが明らかとなった。このことは、土壌中での白紋羽病菌へのマイコウイルスの自然感染が一定の割合で普遍的に起こっていることを示すものである。見いだされたウイルスは新規のエンドルナウイルスとパルティティウイルスであった。また、これまで白紋羽病菌へ自然感染が確認されたウイルスはすべて新種ウイルスである。土壌中に存在する糸状菌の多様性は高いことが知られており、そこに感染するマイコウイルスの多様性も高いと推定される。そのため、土壌中でのウイルスの自然感染は、増殖した白紋羽病菌の周囲に存在していた多様な糸状菌由来かもしれない。これまでにも白紋羽病菌からは6属10種以上のウイルスが同定されており、現在解析中のものも含めると属および種数はさらに増加することは明らかとなっている。このような多様なウイルスが存在する理由のひとつとして、白紋羽病菌の同種内でのウイルス伝播のみならず、今回明らかとした自然感染現象が寄与しているのではないかと推察される。

今回の研究においては、自然感染源の候補となる糸状菌を特定することはできなかった。分離できる糸状菌にバイアスがかかってしまうことが影響しているのかもしれない。あるいは、土壌中に存在する無数の糸状菌から感染源を特定するには、調査数を更に増やす必要があるのかもしれない。今回の結果から、自然感染現象は局所的に接触した糸状菌種から偶発的に感染がおり、それが検出できる量まで増殖可能となった場合のみに検出されると想定される。

マイコウイルスには、その多様性、生態において未知の部分が多く残されている。今後は今回の試験による1対1の対応関係の解析に加えて次世代シーケンサによる大量解析を行うことで、土壌中でのウイルスおよび宿主菌の集団解析を行うことが望まれる。

## 5. 主な発表論文等

〔学会発表〕(計 1件)

兼松聡子、八重樫元、伊藤伝  
白紋羽病菌へのマイコウイルスの自然感染現象の再現、平成 27 年度日本植物病理学会大会、平成 27 年 3 月 31 日、明治大学(東京都)

## 6. 研究組織

### (1)研究代表者

兼松 聡子 (KANEMATSU, Satoko)  
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・主任研究員  
研究者番号：4 0 3 5 5 4 3 3

### (2)研究分担者

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・主任研究員  
研究者番号：9 0 5 8 2 5 9 4