

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 12 日現在

機関番号：32647

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26450234

研究課題名(和文)担子菌ウイルスの宿主に及ぼすシグナル経路の解明と子実体形成への機能解析研究

研究課題名(英文)Elucidation of the signaling pathway to the host of basidiomycete virus and functional analysis on fruiting body formation

研究代表者

藤森 文啓 (FUJIMORI, Fumihiro)

東京家政大学・家政学部・教授

研究者番号：50318226

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：マイタケより2種のParititivirus (GfPV1)とRNA Virus (GfRV1)を同定するに至った。GfPV1は外被タンパク質と逆転写酵素を持つ。超遠心分離法によってウイルス粒子の確認を行い、Grifola flondosaにおいて新規のParititivirusであることを同定することができた。一方で、GfRV1は外被タンパク質を持たないcapcidlessウイルスであると推定した。両ウイルスは宿主であるマイタケに対しては顕著な表現型を与えないが、細胞周期阻害剤や低温培養においてウイルス存在によって生育に影響を与えることが判明し、マイクロアレイによる発現解析へと進めている。

研究成果の概要(英文)：We isolated two mycoviruses from Grifola flondosa (MAITAKE), and finally identified two viruses as Parititivirus (GfPV1) and RNA Virus (GfRV1). GfPV1 has a capcid protein gene and RdRp protein. And we successfully to purified virions with high centrifugation method and with its sequences, finally we identified as new type of Parititivirus in Grifola flondosa. On the other hand, GfRV1 possibly has no coat proteins, thus tentatively we identified as capcidless virus. Both of them behave as no phenotypic effects as host of the G. flondosa, but treated with cell cycle arrest chemical and low temperature harvest influence its growth. And we created virus free hosts and re-infectious each viruses respectively hosts, thus we are now start to analysis of virus positive vs. virus free hosts gene expression analysis as a microarray. This results will be future study.

研究分野：菌類ウイルス

キーワード：ウイルス 担子菌 菌類ウイルス 遺伝子発現 マイクロアレイ 子実体 シグナル キノコ

1. 研究開始当初の背景

食用キノコの多くはゲノム解析がなされておらず、機能性、栽培、品種改良などの科学的な視点での開発研究が遅れていた。そこでマイタケの全ゲノム解読とともに、トランスクリプトームデータを取得し、マッピングによって全遺伝子数の特定作業を行った。その結果、約 16500 の遺伝子を特定することができた一方で、約 800 のゲノムにマッピングされないトランスクリプトーム断片が出現した。これらのアンマップ断片が mRNA 精製時のコンタミネーションによるものなのかを疑ったが、マイタケ以外の外来生物の遺伝子ではないことが確認できたため、内在性の遺伝子断片であることを想定し、短い断片を用いたブラスト解析を実施したところ、2 種のウイルスの RNA 断片であることを特定した。すなわち、ゲノム解析とトランスクリプトーム解析に用いたマイタケ株には 2 種のウイルスが内在していたこととなった。

2. 研究の目的

真核生物には共生という形で多数のウイルスが存在する。ウイルス感染が宿主に対して病徴としての影響を与える場合もあれば、無病徴感染し宿主に対して影響を与えない場合もあるが、どちらの場合も宿主本来の生育にとってはウイルスフリーな状態が良い。

我々は、これまでのゲノム解析、トランスクリプトーム解析から以下のことを明らかとしている。食用マイタケの全ゲノム配列決定とその mRNA の網羅的配列決定を行い、ゲノムへのマッピング作業を行うと、コンタミネーションによる配列断片とは異なる、マッピングされない多数の断片が存在することを見出し、その配列断片より 2 種の新規ウイルスの特定を行っている。外被タンパク質を有するものと、裸の RNA として存在するウイルスである。これらの発見経緯から、「ウイルス粒子を持たないウイルス (ウイロイド様ウイルス) は多数存在するが見過ごされている」と判断した。

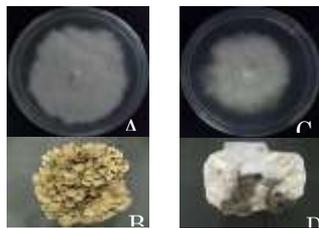


図 1. マイタケ菌糸体および子実体の形態

3. 研究の方法

(1) 実験試料 PDA 培地で約 15 日間培養した、マイタケ M51 株由来の変異株 (Gf-A1) 菌糸体 (図 1.) を実験試料とした。

(2) RNA 抽出は RNazol®RT Reagent (Molecular Research Center, Inc) を用いて行った。

(3) 配列末端領域の同定 (RACE 法)

SMARTer™ RACE cDNA Amplification Kit (Clontech) を用い、抽出した Total RNA を鋳型に cDNA を合成、RACE 法を行い、配列末端を同定して GfPV1 及び GfRV の全長配列を決定した。

(iv) 2 種ウイルスの対峙培養による GfPV1・GfOLV 再感染株の作出

GfPV1 単独感染株または GfRV 単独感染株と正常株 (Gf-N2) 由来ウイルスフリー株を対峙培養して、両株の菌糸を接触させ、ウイルスフリー株側にウイルスが感染するのかを調べた。

4. 研究成果

(1) 全長配列の決定および配列の相同性解析

マイタケ正常株菌糸体 (Gf-N2) を部分精製し、核酸を抽出したところ、約 2.3 kbp の dsRNA のバンドを確認した (図 2)。partitivus RdRp の配列を用いた分子系統解析により、GfPV1 は菌類 partitivirus I (betapartitivirus) と同一のクレードを形成することが判明した (図 3)。

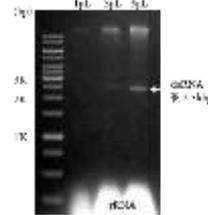


図 2. 1.2%アガロースゲル電気泳動

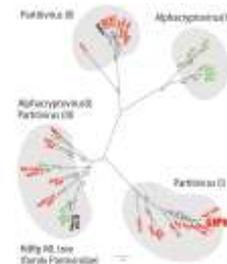
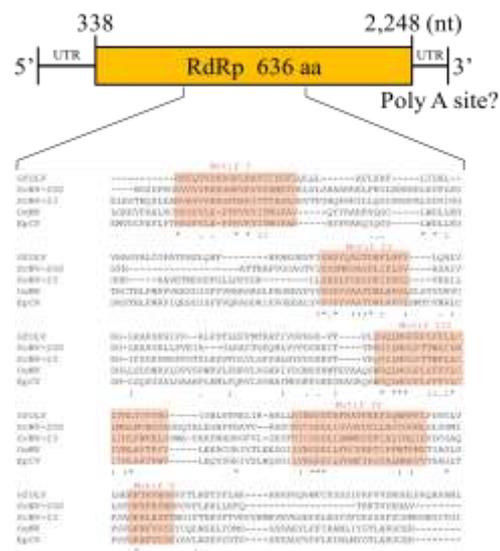


図 3. GfPV1 および既知の partitivirus の分子系統樹

各ウイルスの RdRp アミノ酸配列のマル



チプルアライメントを基にして、最尤法により作成した。

(2) GfPV1 ウイルス粒子の観察

GfPV1 の形態学的な特徴や粒子サイズは partitiviruses 科 (partitiviridae) のウイルスと類似していることが判明した (図 4)。

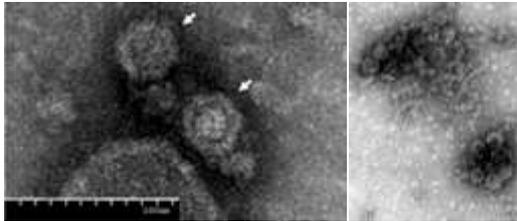


図 4 GfPV1 ウイルス粒子

(3) GfRV ウイルス RNA の末端領域の配列を同定するため、ourmiavirus 様配列の断片 (305 bp) をもとに RACE 法を行い、全長を決定した (図 5)。最尤法による分子系統解析 (図 6) から GfRV は植物 RNA ウイルスである ourmiavirus (粒子を持つ) に最も近縁で、Capsid Protein (CP) を持たない 酵母の narnavirus や菌類のミトコンドリアに存在する mitovirus に比較的近縁であった。

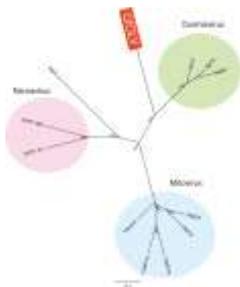


図 6. GfRV および既知ウイルスの分子系統樹

以上のことから、GfPV1 はウイルス粒子の精製により約 40 nm の球状粒子が観察され、形態学的特徴が判明し、また、粒子に包含される dsRNA 解析でウイルスゲノム全塩基配列を決定した。

マイタケから発見された GfRV は ourmiavirus に最近縁のウイルスであることが推測された。

(4) 2 種ウイルスの対峙培養による GfPV1・GfOLV 再感染株の作出

(1) 方法

① 実験試料

ウイルスドナー側は GfPV1 感染株組換え体 (+hph)、GfOLV 感染株組換え体 (+hph) を、レシピエント側はウイルスフリー株を用いた。

(i) 対峙培養 (図 7)

ウイルス感染株 (GfPV1 単独感染株、GfOLV 単独感染株) とウイルスフリー株を 2cm の距離をおいて PDA 培地に植菌し、25 度、暗所で対峙培養した (図 7)。

(ii) ウイルスチェック

培養した分離株を用いて GfPV1 および GfOLV の遺伝子発現をリアルタイム RT-PCR 法にて検出した。

② 結果

図 8 A, B より、GfPV1 単独感染株と GfOLV 単独感染株をウイルスフリー株と対峙培養した結果、ウイルスフリー株側から GfPV1 または GfOLV の遺伝子発現が認められる株が存在した。

③ 考察

マイタケから発見された GfPV1 および GfOLV はレシピエント側への移行が確認され、GfPV1 および GfOLV の再感染株作出 (ウイルス感染性の証明) に成功した。

また、表 1 から、GfOLV 再感染株において分離株のうち半数の 8 株 (50%) で GfOLV ドナー側と同等のウイルス遺伝子発現を示したが、GfPV1 再感染株では 1 株 (6%) のみの結果となった。

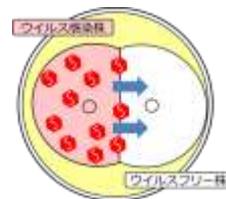


図 7. 対峙培養

表 1. GfPV1 および GfOLV の再感染株取得

ウイルスドナー (+hph)	× レシピエント	ウイルスドナーと同等のウイルス発現を検出した	ウイルス発現は検出されたが、ウイルスドナーより発現は低い	ウイルス不検出
GfPV1 感染株組換え体 (GfPV1+, GfOLV-)	× ウイルスフリー株	1 (6%)	8 (50%)	7 (44%)
GfOLV 感染株組換え体 (GfPV1-, GfOLV+)	× ウイルスフリー株	8 (50%)	2 (12%)	6 (38%)

A : GfPV1 感染株

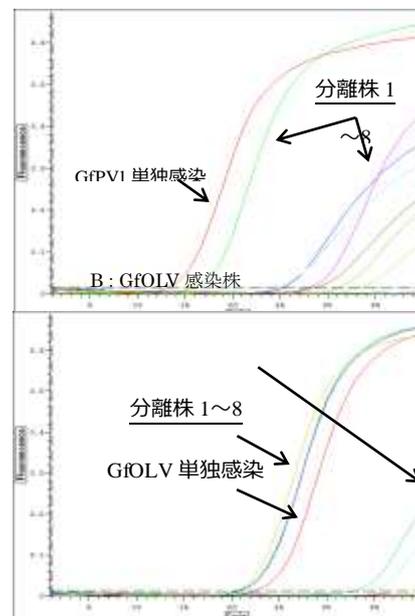


図 8. リアルタイム RT-PCR によるウイルス遺伝子発現の測定

A : GfPV1 感染分離株および GfPV1 単独感染株測定結果

B : GfOLV 感染分離株および GfOLV 単独感染株測定結果

以上から、マイタケから発見された

ourmiavirus 様ウイルス (GfRV) はゲノム末端の配列解析により全長が決定され、さらに、分子系統解析から植物に感染する ourmiavirus に最も近縁であることが判明した。しかし、既に述べたように、植物に感染する ourmiavirus は桿状粒子を持つ分節ウイルス型のウイルスで、GfRV (現段階では粒子を形成しないと推定) とは明らかに異なる。さらに、GfRV は RdRp のゲノム RNA の他に分節は見つかっていない。また、転写物解析で発見された経緯から、ゲノム末端のポリ A 配列が存在するか否かは興味を持たれ、現在解析中である。もし GfRV がポリ A 配列を有する場合は mitovirus 同様、菌類ウイルスのゲノム構造 (3' 末端配列) の多様性を示す興味深い事例となる。

GfPV1 は対峙培養試験により感染性を示したことから、ウイルス粒子を持つマイタケに存在する新規 partitivirus 種 (植物・菌類 2 本鎖 RNA ウイルス) であると断定した。

(5) GfPV1 単独感染株とウイルスフリー株のシクロヘキシミド添加培地での菌糸伸長の比較 1) シクロヘキシミド添加培地における GfPV1 単独感染株およびウイルスフリー株の菌糸伸長比較

GfPV1 単独感染株がシクロヘキシミドに対して耐性を示すと推測されたため、再度実験を行い、菌糸伸長速度およびコロニー形態の観察を行った。

#### ①方法

(i) 供試菌株および方法

マイタケウイルスフリー株 (Gf-VF), GfPV1 再感染株 (Gf-VF(Pv)) を実験に供試した。

(ii) シクロヘキシミド添加培地における菌糸伸長測定

PDA 培地にシクロヘキシミドを添加した培地 (0.0, 0.1, 0.25, 0.5, 0.75, 1.0, 2.5, 5.0, 7.5, 10.0  $\mu\text{g}/\text{mg}$ ) を調製し、GfPV1 単独感染株およびウイルスフリー株のディスク ( $\phi$  約 5 mm) を植菌し、25°C・暗黒下で培養し、培養 1 日目のコロニー直径測定後は 2 日毎に測定した。(n=3)

(iii) シクロヘキシミド添加培地における各株コロニー形態の観察

(ii) で実施した菌糸伸長測定に合わせてコロニー形態の観察を行った。

#### ②結果

GfPV1 単独感染株およびウイルスフリー株を各濃度のシクロヘキシミド添加培地へ植菌し、25°Cにて培養、菌糸伸長の測定およびコロニー形態の観察を行った。

図 9. にシクロヘキシミド添加培地における各株のコロニー形態、図 2. にシクロヘキシミド添加培地における菌糸伸長速度を示す。シクロヘキシミド濃度が高いほどコロニー形態は小さくなる傾向であり、菌糸伸長速度も遅くなる傾向であった。菌糸伸長測定ではどの濃度でもウイルスフリー株より GfPV1 単独感染株の伸長速度が速い傾向を示したが、ほとんどの添加濃度において、有意な差は見られなかった。しかし、シクロヘキシミド濃度 2.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ~5.0  $\mu\text{g}/\text{mL}$  の培地で GfPV1 単独感染株の菌糸伸長速度がウイルスフリー株よりも有意に早かった。

#### 考察

シクロヘキシミド添加培地における GfPV1 単独感染株とウイルスフリー株の菌糸伸長速度およびコロニー形態を観察した。

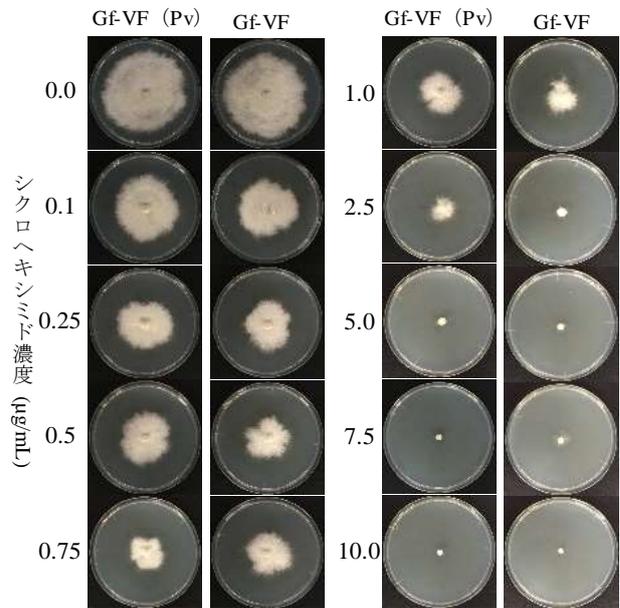


図 9. シクロヘキシミド添加濃度 2.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  培地で、Gf-VF(Pv)が Gf-VF よりもコロニー形態が大きくなる傾向を示した。

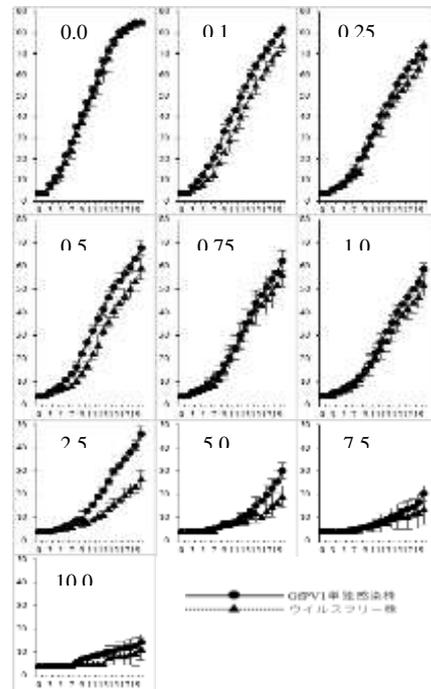


図10. シクロヘキシミド添加培地における菌糸伸長速度

コロニー形態および菌糸伸長速度はシクロヘキシミド濃度依存的に形態の縮小、伸長速度の遅延が起こった。昨年度の報告<sup>8)</sup>ではシクロヘキシミド濃度が高い 5  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ~10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  で GfPV1 単独感染株とウイルスフリー株の菌糸伸長とコロニー形態に明確な差が認められたが、今回、昨年度と同様の

実験を行った場合では 2.5 µg/mL 添加培地において、GfPV1 単独感染株の伸長がウイルスフリー株と比較して有意に伸長し、シクロヘキシミド濃度 2.5 µg/mL の培地では微弱ではあるが、シクロヘキシミドへの耐性が示された。マイタケのタンパク質合成阻害機構に対して GfPV1 が何らかの耐性を示していると考えられるが、実施回によりばらつきがあるため、シクロヘキシミド添加濃度 2.5 µg/mL 前後における実験条件の適正化が必要であり、今後検討を要する。

以上の解析を元に、現在はシクロヘキシミドおよび低温下でのウイルス感染・非感染株を用いた、マイタケの内在遺伝子群の網羅的発現解析をすすめ、形体や機能に及ぼす影響を遺伝子レベルで解明を目指している。

## 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 16 件)

- 1) Makino A, Abe M, Ishitsuka R, Murate M, Kishimoto T, Sakai S, Hullin-Matsuda F, Shimada Y, Inaba T, Miyatake H, Tanaka H, Kurahashi A, Pack CG, Kasai RS, Kubo S, Schieber NL, Dohmae N, Tochio N, Hagiwara K, Sasaki Y, Aida Y, Fujimori F, Kigawa T, Nishibori K, Parton RG, Kusumi A, Sako Y, Anderlueh G, Yamashita M, Kobayashi T, Greimel P, Kobayashi T. (2017) A novel sphingomyelin/cholesterol domain-specific probe reveals the dynamics of the membrane domains during virus release and in Niemann-Pick type C. *FASEB J.* 2017 Apr;31(4):1301-1322. doi:10.1096/fj.201500075R. Epub 2016 Aug 4. (査読あり)
- 2) 小松あき子, 佐藤真之, 藤森文啓 (2017) マイタケに感染するウイルスの機能解析研究. 『東京家政大学生生活科学研究報告』 39 :Now printing. (査読なし)
- 3) Taiki Shimizu; Yoshimasa Bamba; Yosuke Kawabe; Tomokazu Fukuda; Fumihiko Fujimori; Katsuhiko Takahashi; Chiyoko Uchida. (2016) Prolyl Isomerase Pin1 Regulates Doxorubicin-Inducible P-glycoprotein Level by Reducing Foxo3 Stability. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* 471:328-333. (査読あり)
- 4) Hideki, Kondo, Sakae Hisano, Sotaro Chiba, Kazuyuki Maruyama, Ida Bagus Andika, Kasuhiro Toyoda, Fumihiko Fujimori, Nobuhiro Suzuki. (2016) Sequence and phylogenetic analyses of novel totivirus-like double-stranded RNAs from field-collected powdery mildew fungi. *Virus Research.* 213:353-364. (査読あり)
- 5) 小松あき子, 佐藤真之, 近藤秀樹, 西堀耕三, 鈴木信弘, 藤森文啓, 食用キノコの子実体形成にウイルス感染が果たす役割についての研究 (3), 東京家政大学生生活科学研究所研究報告 第 39 集, 57-61 (2016) (査読なし)
- 6) Bhat HB, Ishitsuka R, Inaba T, Murate M, Abe M, Makino A, Kohyama-Koganeya A, Nagao K, Kurahashi A, Kishimoto T, Tahara M, Yamano A, Nagamune K, Hirabayashi Y, Juni N, Umeda M, Fujimori F, Nishibori K, Yamaji-Hasegawa A, Greimel P, Kobayashi T. (2015) Title: Evaluation of aegerolysins as novel tools to detect and visualize ceramide phosphoethanolamine, a major sphingolipid in invertebrates. *FASEB J.* 29:3920-3934. (査読あり)
- 7) Masayuki Sato, Atsushi Kurahashi, Kozo Nishibori, Fumihiko Fujimori. (2015) Overexpression of a putative transcription factor *Gf. CRZ1* causes morphological defects in mycelium formation and affects the expression of oxalate-degrading genes in *Grifola frondosa*. *Mycoscience* 56:516-522. (査読あり)
- 8) Masayuki Sato, Atsushi Kurahashi, Kozo Nishibori, Fumihiko Fujimori. (2015) Development of a transformation system for the edible mushroom *Grifola frondosa*: Demonstrating heterologous gene expression and RNAi-mediated gene silencing. *Mycoscience* 56:364-372. (査読あり)
- 9) 小松あき子, 佐藤真之, 近藤秀樹, 角真理子, 土屋有紀, 倉橋敦, 西堀耕三, 鈴木信弘, 藤森文啓 (2015 年 7 月) 「食用キノコの子実体形成にウイルス感染が果たす役割についての研究 (2)」『東京家政大学生生活科学研究所研究報告』 第 38 集, 79-84. (査読なし)
- 10) 宮本康司, 二川正浩, 藤森文啓, 池田壽文, 吉原富子, 井上宮雄 (2015 年 7 月) 狭山茶の新規機能性開発を目指した探索研究 (第 2 報) 『東京家政大学生生活科学研究所研究報告』 第 38 集, 85-92. (査読なし)
- 11) 池田壽文, 井上宮雄, 藤森文啓, 宮本康司, 二川正浩, 吉原富子 (2015 年 3 月) 「緑茶中に含有する Catechin 類

- とCafeinの定量分析」『東京家政大学研究紀要集』第55集, 35-38. (査読あり)
- 12) Masayuki Sato, Atsushi Kurahashi, Kozo Nishibori, Fumihiro Fujimori. (2014) Identification of differentially expressed genes in fruiting body mutants of *Grifola frondosa*. *The Bulletin of Tokyo Kasei University* 54, 23-33. (査読あり)
- 13) Atsushi Kurahashi, Takafumi Shimoda, Masayuki Sato, Fumihiro Fujimori, Junji Hirama, Kozo Nishibori. (2014) A putative transcription factor *Gf. BMRI* in *Grifola frondosa*, the homolog of *BMRI* in *Bipolaris oryzae*, was strongly induced by near-ultraviolet light and blue light. *Mycoscience* 56: 177-182. (査読あり)
- 14) 池田壽文、宮本康司、二川正浩、藤森文啓、吉原富子、井上宮雄 (2014年7月) 狭山茶の新規機能性開発を目指した探索研究 (第1報) 『東京家政大学生生活科学研究所研究報告』第37集, 103-107. (査読なし)
- 15) 小松あき子、近藤秀樹、佐藤真之、土屋有紀、倉橋敦、西堀耕三、鈴木信弘、藤森文啓 (2014年7月) 「食用キノコの子実体形成にウイルス感染が果たす役割についての研究」、『東京家政大学生生活科学研究所研究報告』第37集, 109-114. (査読なし)
- 16) 小松あき子、佐藤真之、藤森文啓 (2014年7月) 「マイタケウイルスフリー化に関する研究 - 施設栽培の検討 - 」 『東京家政大学生生活科学研究所研究報告』第37集, 143-144. (査読なし)

[学会発表] (計 5件)

- 1) 2016. 11. 30. 小松あき子、佐藤真之、近藤秀樹、鈴木信弘、藤森文啓 マイタケに感染するマイコウイルスの機能解析研究. 第39回 日本分子生物学会年会 (横浜パシフィコ・神奈川県・横浜市)
- 2) 2016. 3. 8. 小松あき子、佐藤真之、近藤秀樹、鈴木信弘、西堀耕三、藤森文啓 課題番号 2734 マイタケのウイルスの機能解析研究 平成26年度岡山大学資源植物科学研究所共同研究成果発表会 (倉敷市芸文館・岡山県・倉敷市)
- 3) 2015. 12. 2. 小松あき子、佐藤真之、角真理子、下田隆史、近藤秀樹、鈴木信弘、西堀耕三、藤森文啓. マイタケから見出されたマイコウイルスの性状解析 第38回 日本分子生物学会年会 (神戸ポートアイランド・兵庫県・神戸市)

- 4) 2015. 12. 2. 佐藤真之、西堀耕三、藤森文啓 マイタケの子実体分化にはFASIドメイン含有蛋白質遺伝子 *Gf. FASI* が関与している 第38回 日本分子生物学会年会 (神戸ポートアイランド・兵庫県・神戸市)
- 5) 2015 9. 4. 佐藤真之、小松あき子、下田隆史、近藤秀樹、鈴木信弘、西堀耕三、藤森文啓. マイタケ内在マイコウイルスが宿主の形質に及ぼす影響の解析、日本きのこ学会 第19回大会 (つくば国際会議場・茨城県・つくば市)

[図書] (計 0件)

[産業財産権]

出願状況 (計 0件)

[その他]

ホームページ等

研究者情報データベース

<http://tk-kenkyugyoseki.tokyo-kasei.ac.jp/tkuhp/KgApp?kyoinId=ymdggssooggy>  
研究室紹介

[http://www.tokyo-kasei.ac.jp/Portals/0/data/college/kasei/kankyo/images/Laboratory/Fujimori/fujimori\\_panel.pdf](http://www.tokyo-kasei.ac.jp/Portals/0/data/college/kasei/kankyo/images/Laboratory/Fujimori/fujimori_panel.pdf)

<http://www.tokyo-kasei.ac.jp/kankyo/tabid/1328/index.php>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

藤森 文啓 (FUJIMORI Fumihiro)

東京家政大学・家政学部・環境教育学科・教授 研究者番号: 50318226

### (2) 研究分担者

小松 あき子 (KOMATSU Akiko)

東京家政大学・家政学部・環境教育学科・助教 研究者番号: 20649371

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