

平成 29 年 6 月 14 日現在

機関番号：12605

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2016

課題番号：26660033

研究課題名(和文) 菌類ウイルスMoCVsはイネいもち病菌の病原性レース変異に関与しているか

研究課題名(英文) Can MoCV1A-infection trigger to change the pathogenic races of the rice blast fungus?

研究代表者

寺岡 徹 (TERAOKA, Tohru)

東京農工大学・(連合)農学研究科(研究院)・名誉教授

研究者番号：60163903

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：イネいもち病菌はMoCV1A感染により、特定のイネ判別品種に対する病原性をR、S、S Rの両方向に変化させること、生育等は抑制させることが示唆された。イネいもち病菌の非病原性遺伝子 Avr-PikはMoCV1A感染により発現量が変化することがreal-time RT-PCR解析で実証され、MoCV1Aが遺伝子発現を後天的に制御できることが示唆された。日本各地区のイネいもち病菌保存株、分離株にはMoCV1が昔から広く分布していたこと、それらがお互いに近縁であること、他のMoV2とMoCV1が重複感染しているものも確認され、今まで影響が未報のMoV2も宿主菌の病原性を昂進させることも確認された。

研究成果の概要(英文)：The inoculation tests of the MoCV1A-infected or -free rice blast fungus to the isogenic rice lines to differentiate the pathogenic races suggest that the MoCV1A-infection can trigger to suppress the growth of the rice blast fungus and also to change epigenetically the pathogenic races of the fungus to specific rice lines. The expression of the Avr-Pik, one of the avirulence genes, was affected by the MoCV1A-infection in real-time PCR analysis. The application of the conventional detection method and newly-developed simple methods of MoCV1A to stock cultures and newly-isolated cultures reveals that the MoCV1A has distributed in almost all area of Japan since some ten years ago, and the viruses are closely related with the original one in the genomic levels.

研究分野：植物病理学

キーワード：イネいもち病 マイコウイルス 病原性レース エピジェネティック変異 MoCV1A MoV2 one-step RT-PCR RT-LAMP

1. 研究開始当初の背景

いもち病菌の病原性レース変異は *Avr* 遺伝子の突然変異により起こると考えられ、準有性的組換や転座、レトロトランスポゾンゲノム挿入などのゲノム変異が主な機構と考えられてきた。したがって、病原性レース変異は急激かつ高頻度には発生せず、その変動幅も極端に大きくはないと考えられてきた。実際、日本各地での栽培イネ品種といもち病菌レースのモニタリングでは大きな変動がないことがしばしば報告されてきた。他方、年間を通してイネ栽培が可能なフィリピンやベトナムではいもち病菌レースの変動は激しく、その変動幅も大きいことは我々も含めて古くから報告され、日本でも前山形大の生井らは庄内平野ではいもち病菌レースの変動が激しいと報告していた。では、何故そのような矛盾した報告が起こりえたのか。我々は多様なレースが分布し常に変動していたベトナム・メコンデルタ地域から新規な菌類ウイルス *MoCV1* 類を発見し、その性状解析の過程で、ウイルスフリー株も得ることができた。両いもち病菌株を比較すると、本ウイルスはいもち病菌の生育を抑える「負」の作用と同時に、いもち病菌の品種特異性すなわち病原性レースを変動させていることを見出した。すなわち、宿主いもち病菌の病原性に多様性を創出・促進する「正」の因子としても機能していることが示唆され、一見矛盾した上述の報告の主因である可能性も示唆された。

2. 研究の目的

我々は新規にベトナム・メコンデルタ地域でイネいもち病菌マイコウイルス *MoCV1A* を発見し、ウイルスフリー化したいもち病菌は生育が正常化すると同時に、罹病斑数は増加したが、特定のイネ品種に対する病原性も S 型から R 型、ないしは R 型から S 型に変化することを見出した (Fig.1)。

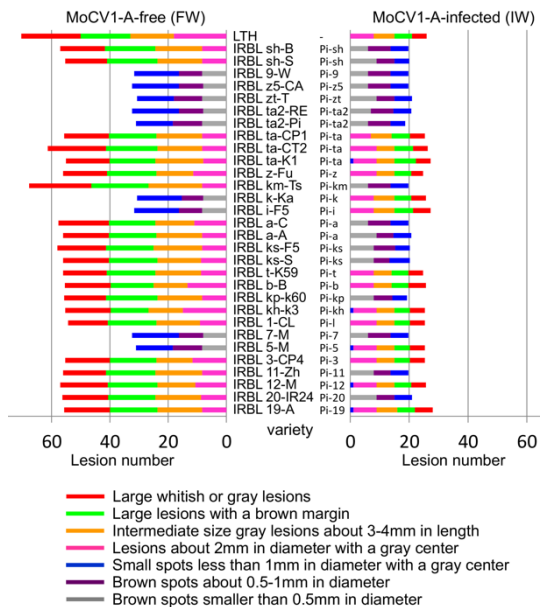


Fig. 1 国際イネ判別品種に対する *MoCV1A*

感染株ならびにフリー化株の病斑型と病斑数

本研究では(1) *MoCV1A* 感染が宿主いもち病菌の病原性をどのように変化させているのか、その変化は方向性があるのか、可逆的なのか、再現性があるのかを実証すること、(2) その病原性レース変異機構を分子生物学的に検証すること、予備的調査から、我が国にも *MoCV1* 類が保存菌株、乾燥保存病斑等から検出されたことから、(3) 国内各地のいもち病菌のレース分布と *MoCV1A* の生態学的分布ならびに近縁性を検証する。それらの検証から、*MoCV1* 類がトランスポゾンのような宿主のゲノム配列を変化させるのではなく、ゲノム外因子として、いもち病菌病原性の多様性創出に関わっていることを解明する。

3. 研究の方法

(1) マイコウイルス *MoCV1A* に感染したイネいもち病菌の病原性がゲノム変異を伴わずに変化すること、すなわち病原性レースが変異することを確認するために、*MoCV1A* 自然感染親株(WI)、それから様々な curing 処理により獲得したウイルスフリー化株(WF)、その WF 株にハイグロマイシン耐性変異マーカーを導入したフリー化株(HF)を作出すると共に、HF 株と親株 WI 株とを菌糸融合してハイグロマイシン耐性の人工再感染株(HI)を作出した。それら 4 種の菌株を国際イネ判別品種に様々な手法で接種して病原性、病原力を繰返し検定した。

(2) 病原性レースの変異機構として、イネいもち病菌相互作用を決定するイネいもち病菌の非病原性(*Avr*)遺伝子の発現量について、その遺伝子構造が明確になっている *Avr-Pik* を材料に real-time RT-PCR で発現量解析した。

(3) *MoCV1A* の検出法として、従来からの菌体からの dsRNA 抽出と電気泳動解析によるバンド確認の方法に加えて、罹病葉や培養菌体・胞子等から直接の迅速に検出できる one-step RT-PCR 法、加えて現場圃場でも簡易検出できる RT-LAMP 法を開発した。それらを手法を併用して、過去のいもち病菌保存株および新たに発生したいもち病斑、ないしはその分離株から、*MoCV1A* の検出を試み、*MoCV1A* の生態学的分布とレース変異の相関を検証した。

4. 研究成果

(1) *MoCV1A* 自然感染親株(WI)、それから様々な curing 処理により獲得したウイルスフリー化株(WF)、その WF 株にハイグロマイシン耐性変異マーカーを導入したフリー化株(HF)を作出すると共に、HF 株と親株 WI 株とを菌糸融合してハイグロマイシン耐性の人工再感染株(HI)を作出し、それら 4 種の菌株を国際イネ判別品種に様々な手法で接種して病原性を繰返し確認したところ、親株 WI 株がフリー化(WF 及び HF)することにより、総じていもち病菌の生育は回復し、形成される病斑数は増加した。同時に、

病原性は特定の判別品種に対して、R→S、S→Rの両方向に変化し、再感染させた HI 株では元の親株 WI 株の病原性にほぼ可逆的に復帰した。すなわち、MoCV1A 感染はイネいもち病菌の特定の病原性レースを両方向に変異しえること、生育などは概して抑制されることが示唆された(Fig.2)。

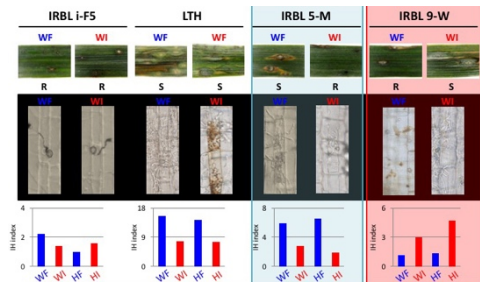


Fig.2 ウイルスフリー化により病斑型が変化したイネ品種 IRBL5-M と IRBL9-W の噴霧接種、葉鞘接種の様相

(2) イネいもち病菌相互作用を決定するイネいもち病菌の非病原性(Avr)遺伝子の発現量について、その遺伝子構造が明確になっている *Avr-Pik* を材料に real-time RT-PCR で発現量解析したところ、病原性が変化したイネ品種において、感染性を変化させるような発現量の変化が実証された(Fig.3)。

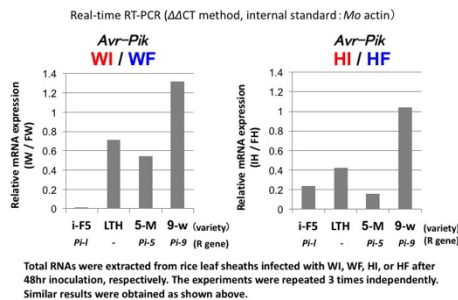


Fig.3 MoCV1A 感染による非病原性遺伝子 *Avr-Pik* の発現量の変化

この結果は MoCV1A 感染が宿主のいもち病菌の様々な遺伝子の発現制御をエピジェネティックに変異させていることを示唆していた。

(3) 従来の菌体からの dsRNA 抽出と電気泳動解析による MoCV1A の検出法に加えて、我々が新たに開発した one-step RT-PCR 法、RT-LAMP 法を適用することで、いもち病菌保存株はもちろんのことイネいもち病菌病斑から直接検出することが可能となった(論文業績 1, 3)。その結果、日本国内全域までの調査には至らなかったものの、東北、北陸、九州地区のイネいもち病菌保存株や乾燥病斑や新たな病斑から、MoCV1 類を含むマイコウイルス類が検出され、特にレース変異が激しいと言われていた山形県を含む秋田県と、新潟県(富山県、石川県、福井県

はそれぞれ 1 例のみ) の北陸地方で、ベトナムでの検出頻度(約 20%)よりは低頻度(約 4%)ながら、昔から偏在していることが示された。九州地域では長崎県のみを検出された (Table 1)。

Table 1. MoCV1 類の検出頻度

菌株採集地	RT-PCRバンド 検出株(個)	MoCV1様 dsRNA検出株(個)
秋田県	1 / 15	-
山形県	4 / 89	1 / 89
新潟県	5 / 38	5 / 38
富山県	1 / 9	1 / 9
石川県	1 / 11	0 / 11
福井県	1 / 13	1 / 13
茨城県	0 / 3	0 / 3
福岡県	0 / 13	0 / 13
佐賀県	0 / 12	0 / 12
長崎県	1 / 12	2 / 12
熊本県	0 / 16	0 / 16
大分県	0 / 12	0 / 12
宮崎県	0 / 26	0 / 26
鹿児島県	0 / 15	0 / 15
総計	14 / 284	10 / 269

それら MoCV1 類はゲノム配列からベトナムで見出されたものとアミノ酸レベルで 69~93%、塩基配列レベルで 62~81%の同一性を示し、近縁であること、日本国内のウイルス株同士では塩基配列およびアミノ酸配列レベルで 90%以上の高い同一性を示していた。

加えて既報の MoV1、MoV2 と重複感染しているものや新規のエンドロウイルスに感染しているものも確認された。今まで宿主菌に明確な影響が報告されていなかった MoV2 も宿主菌の病原性を昂進させること、MoCV1A との重複感染によりさらに病原性が昂進されることも確認された。

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 4 件)

- Urayama S, Kimura Y, Katoh Y, Ohta T, Onozuka N, Fukuhara T, Arie T, Teraoka T, Komatsu K, Moriyama H (2016) Suppressive effects of mycoviral proteins encoded by Magnaporthe oryzae chrysovirus 1 strain A on conidial germination of the rice blast fungus. *Virus Research* **223**:10-19. Doi:10.1016/j.virusres.2016.06.010 [査読有り]
- Komatsu K, Urayama S, Katoh Y, Fuji S, Hase S, Fukuhara T, Arie T, Teraoka T, Moriyama H (2016) Detection of Magnaporthe oryzae chrysovirus 1 in Japan and establishment of a rapid, sensitive and direct diagnostic method based on reverse transcription looped-mediated isothermal amplification. *Archives of Virology* **161**(2):317-326. Doi:10.1007/s00705-015-

2666-x [査読有り]

- (3) Teraoka T (2015) Molecular aspects of infection in plant-microbe interactions based on the rice-rice blast fungus interaction. *J Gen Plant Pathol* **81**(6): 457-460. [査読有り]
- (4) Urayama S, Katoh Y, Fukuhara T, Arie T, Moriyama H, Teraoka T (2015) Rapid detection of Magnaporthe oryzae chrysovirus 1-A from fungal colonies on agar plates and lesions of rice blast. *J. Gen. Plant Pathol.* **81**(2): 97-102. Doi:10.1007/s10327-014-0567-6. [査読有り]

[学会発表] (計 16 件)

- (1) 内田景子・高橋優実・岡田 亮・福原敏行・有江 力・寺岡 徹・植松清次・森山裕充 (2017) 本邦産アスパラガス疫病菌から検出されたエンドルナウイルスのゲノム構造解析、平成 29 年度日本植物病理学会大会、アイーナ、岩手県・盛岡市、4 月
- (2) 大鷲友多・相原光宏・福原敏行・平八重一之・有江 力・寺岡 徹・森山裕充・小松 健 (2017) 日本産イネいもち病菌に感染する Magnaporthe oryzae virus 2 の遺伝的多様性と宿主に与える影響、平成 29 年度日本植物病理学会大会、アイーナ、岩手県・盛岡市、4 月
- (3) 濱田健太郎、福原敏行、寺岡 徹、有江 力、児玉基一郎、森山裕充 (2016) 菌糸細胞破断法による Alternaria alternata マイコウイルス高含量株および欠損型 dsRNA 含有株の作出、平成 28 年度日本植物病理学会大会、岡山コンベンションセンター、岡山県・岡山市、3 月。
- (4) 一ノ瀬俊、岡田 亮、福原敏行、有江 力、寺岡 徹、児玉基一郎、黒田 裕、森山裕充 (2016) Alternaria alternata N18 株を強毒化するマイコウイルス由来タンパク質の活性領域特定と産生、平成 28 年度日本植物病理学会大会、岡山コンベンションセンター、岡山県・岡山市、3 月。
- (5) 木村優理、月本竣司、太田智子、浦山俊一、福原敏行、小松 健、有江 力、寺岡 徹、森山裕充 (2016) パン酵母で異種発現させたマイコウイルス MoCV1-A ORF4 タンパク質による生育不良および生育促進誘発の解析、平成 28 年度日本植物病理学会大会、岡山コンベンションセンター、岡山県・岡山市、3 月。
- (6) 大鷲友多、相原光宏、福原敏行、藤 晋一、小林 隆、長谷 修、有江 力、寺岡 徹、森山裕充、小松 健 (2016) 日本産イネいもち病菌から検出された Magnaporthe oryzae virus 2 の遺伝的多様性、平成 28 年度日本植物病理学会大会、岡山コンベンションセンター、岡山県・岡山市、3 月。
- (7) 相原光宏、加藤 優、浦山俊一、福原敏行、藤 晋一、小林 隆、長谷 修、小松 健、有江 力、森山裕充、寺岡 徹 (2016) マイコウイルス MoCV1-A 感染がもたらすイネいもち病菌病原性変動の調査、平成 28 年度日本植物病理学会大会、岡山コンベンションセンター、岡山県・岡山市、3 月。
- (8) 内田景子、高橋優実、岡田 亮、福原敏行、有江 力、寺岡 徹、植松清次、森山裕充 (2016) エンドルナウイルスに感染されたアスパラガス疫病菌の殺菌剤感受性について、平成 28 年度日本植物病理学会大会、岡山コンベンションセンター、岡山県・岡山市、3 月。
- (9) 内田景子、高橋優実、岡田 亮、福原敏行、有江 力、寺岡 徹、植松清次、森山裕充 (2015) アスパラガス疫病菌から検出されたエンドルナウイルスの塩基配列解析および宿主菌の薬剤感受性について、平成 27 年度日本植物病理学会関東部会、宇都宮大学、栃木県・宇都宮市、9 月。
- (10) 濱田健太郎、福原敏行、寺岡 徹、有江 力、児玉基一郎、森山裕充 (2015) マイコウイルス感染 Alternaria alternata における菌糸細胞破断法によるウイルスフリー化株の作出、平成 27 年度日本植物病理学会関東部会、宇都宮大学、栃木県・宇都宮市、9 月。
- (11) Teraoka T, Urayama S, Le Minh Tuong, Katoh Y, Aihara M, Fukuhara T, Fuji S, Kobayashi S, Hase S, Komatsu K, Arie T, Moriyama H (2015) Potential traits of the mycovirus MoCV1-A on interaction between rice plant and rice blast fungus, XVIIIth International Plant Protection Congress, 21-27 August, Berlin, Germany.
- (12) 内田景子、北村優実、岡田 亮、福原敏行、有江 力、寺岡 徹、植松清次、森山裕充 (2015) 生育不良を示す Phytophthora 属菌から検出されたエンドルナウイルス、平成 27 年度日本植物病理学会大会、明治大学駿河台キャンパス、東京・千代田区、3 月。
- (13) 一ノ瀬俊、岡田 亮、福原敏行、有江 力、寺岡 徹、石原 亨、児玉基一郎、森山裕充 (2015) Alternaria alternata N18 株に感染するマイコウイルスの 2 本鎖 RNA ゲノムの一部欠損及びタンパク質の機能解析、平成 27 年度日本植物病理学会大会、明治大学駿河台キャンパス、東京・千代田区、3 月。
- (14) 小松 健、藤田尚子、有江 力、寺岡 徹、森山裕充 (2015) イネいもち病菌マイコウイルス MoCV1 の RT-LAMP を用いた検出法の確立、平成 27 年度日本植物病理学会大会、明治大学駿河台キャンパス、東京・千代田区、3 月。
- (15) 加藤 優、浦山俊一、相原光宏、福原敏行、藤 晋一、小林 隆、長谷 修、小松 健、有江 力、寺岡 徹、森山裕充 (2015) 日本国内で採取されたイネいもち病菌マイコウイルス Magnaporthe oryzae chrysovirus 1

のゲノム配列の決定とウイルス粒子の構造解析、平成 27 年度日本植物病理学会大会、明治大学駿河台キャンパス、東京・千代田区、3 月。

- (16) 木村優理、浦山俊一、福原敏行、有江力、寺岡 徹、森山裕充 (2015) イネいもち病菌マイコウイルス由来タンパク質の活性領域の特定、平成 27 年度日本農薬学会大会、玉川大学、東京都・町田市、3 月。

〔図書〕(計 件)

- (1) 寺岡 徹 (2016) 抵抗性品種・マルチラインと物理的抵抗性誘導, *JATAFF* ジャーナル **4(9)**: 24-28, 農林水産食品産業技術振興協会
- (2) 浦山俊一、森山裕充、寺岡 徹、川本進 (2015) ウイルスの毒性遺伝子を用いた病原菌の生育抑制～植物病原菌からヒト病原菌への応用～, *バイオサイエンスとバイオインダストリー* **73(4)**: 306-307. バイオインダストリー協会

〔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：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

寺岡 徹 (Tohru TERAOKA)
東京農工大学・大学院農学研究院・名誉教授
研究者番号：60163903

(2) 研究分担者：なし

(3) 連携研究者：なし

(4) 研究協力者

森山 裕充 (Hiromitsu MORIYAMA)
浦山 俊一 (Shyun-ichi URAYAMA)
小松 健 (Ken KOMATSU)