

平成 30 年 5 月 21 日現在

機関番号：14101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2017

課題番号：26640141

研究課題名(和文) 真菌類感染性ウイルス“マイコウイルス”を利用した「菌類ウイルス育種学」の創設

研究課題名(英文) Breeding of fungi using fungal infectious virus "Mycovirus"

研究代表者

白水 貴 (Shirouzu, Takashi)

三重大学・生物資源学研究科・助教

研究者番号：10571789

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)：真菌類に感染するウイルス，マイコウイルスの未知の多様性と機能を明らかにすることを目的とし，主に木材腐朽菌から検出されたマイコウイルス由来と考えられる二本鎖RNAの塩基配列の解読を行った．結果，2菌株に由来する二本鎖RNAからマイコウイルス由来と考えられるRdRp領域および未知のタンパク質をコードする領域の部分配列が得られた．これらの全配列を決定するため，RACE法による末端配列の解読を行ったが良好な結果が得られなかった．そこで，従来法よりもより高性能な網羅的RNAウイルス検出技術であるFLDS法による配列解読を試みている．

研究成果の概要(英文)：To clarify the unknown diversity and function of mycovirus, we tried to read sequence of double-stranded RNA thought to be derived from mycoviruses which were mainly detected from wood-decaying fungi. As the result, partial sequences of the RdRp region and the region encoding unknown proteins were obtained from the double-stranded RNA. In order to determine full sequences of these gene regions, their terminal sequences were read by RACE (Rapid amplification of cDNA ends), but adequate results were not obtained. Therefore, we are planning to read the full sequence by the FLDS (Fragmented and loop primer ligated dsRNA sequencing) method which is a more comprehensive RNA virus detection technique than conventional methods.

研究分野：菌類多様性生物学

キーワード：マイコウイルス 木材腐朽菌 多様性 機能 ゲノム解読

1. 研究開始当初の背景

真菌類に感染するマイコウイルス (myco-virus) の研究は、栽培きのこの病害ウイルス研究に始まり、近年では作物病原菌の病原力を弱める機能を利用した病害防除が注目を集めている。マイコウイルスは 100 種ほどしか記載されておらず、その多様性と機能の大部分が未知である。この解明に向けては様々な菌群からのサンプリングが重要となるが、これまでは栽培きのこや作物病原菌などが重点的に研究されており、マイコウイルスの多様性と機能に関する知見は限定的であった。また、マイコウイルスが宿主菌に及ぼす影響については、作物病原菌の病原力低下を引き起こすような、宿主菌に対しての“負の影響”に重点が置かれていた。そのため、マイコウイルスと宿主菌との機能的関係を解明していく上で欠くことのできない、宿主菌の利益となる“正の影響”についてはあまり評価されてこなかった。

2. 研究の目的

マイコウイルスの未知の多様性と機能を明らかにするとともに、ウイルス感染が宿主菌におよぼす正の影響を探索するため、マイコウイルス研究のフロンティアである木材腐朽菌を対象としたウイルスの多様性と機能探索を行う。特に、「ウイルス感染が宿主菌に与える正の影響」というこれまでの主流とは逆の発想から研究を進め、ウイルス感染によって宿主菌に付与される有用形質を探索し、これを利用して育種を行う「菌類ウイルス育種学」の基盤を形成する。

3. 研究の方法

菌株の収集、マイコウイルスの検出、ゲノム解読と機能遺伝子マップの作成、ウイルス感染による形質変化の評価、の順で進める。

・菌株収集

木材腐朽菌に感染するマイコウイルスの多様性を明らかにするため、日本および海外のあらゆる生態系での採集、および菌株保存施設からの分譲により培養株を収集する。マイコウイルスの多様性を網羅的に探索するため、木材腐朽菌の菌株は子囊菌類と担子菌類の様々な系統から幅広く収集する。菌株保存施設からは、材分解試験の指標菌株とされてきたような、これまでの研究の基準となってきた重要株を中心に収集する。

・RT-PCR によるマイコウイルスの検出

マイコウイルスの多くは 2 本鎖 RNA をゲノムとする RNA ウイルスである。これを検出するため、RT-PCR による RdRp 遺伝子の増幅と DNA シーケンシングによる塩基配列の解読を行う。RT-PCR には、収集した菌株から抽出した核酸 (マイコウイルス由来の RNA を含む) を用いる。配列は BLAST 検索と系統解析にてその系統的位置を推定する。

・マイコウイルスのゲノム解読と機能遺伝子マップの作成

マイコウイルスの詳細な系統解析と構造決定のため、ゲノム解読と機能遺伝子マップの作成を行う。RT-PCR、DNA クローニングおよびシーケンシングによりウイルスゲノムを解読する。

・ウイルスフリー株の作出とウイルス感染による形質変化の評価

ウイルス感染による宿主菌の形質変化を評価するため、ウイルスフリー株とウイルス感染株の培養性状や材分解能を比較する。ウイルスフリー株の作出は 2 つの方法で行う。すなわち、抗生物質である cAMP とリファマイシンを添加した培地で菌株を培養する方法と菌株を高温処理する方法にてウイルスを除去する。培養性状の違いを評価するため、ウイルスフリー株と感染株の菌糸の成長速

度や酵素生産能を比較する。また、材分解能の違いを評価するため、滅菌した様々な樹木材に菌株を接種し、その分解効率や材の化学的变化を比較する。

・「菌類ウイルス育種学」の創設に向けた基盤形成

マイコウイルスと宿主菌の有用生物資源化をめざし、宿主菌に有用な形質変化が引き起こされるような菌とマイコウイルスの組み合わせを明らかにする。さらに、マイコウイルス保有菌株の保存法を確立するとともに、菌株コレクションとデータベースを整備し、「菌類ウイルス育種学」の創設に向けた基盤形成を行う。

4. 研究成果

木材腐朽性の担子菌類など 10 菌株からマイコウイルス由来と考えられる二本鎖 RNA が検出された。精製した二本鎖 RNA を鋳型として合成した cDNA を用い、次世代シーケンサーにて塩基配列を解読したところ、2 菌株に由来する二本鎖 RNA からマイコウイルス由来と考えられる RdRp 領域および未知のタンパク質をコードする領域の配列が得られた。これらの領域を対象としたプライマーを設計し、PCR 後、サンガー法にて RdRp 領域および未知のタンパク質をコードする領域の内部配列を決定した。サンガー法にて決定されたこれらの内部配列は次世代シーケンサーにて得られた配列と両末端を除きほぼ一致していた。

これらの領域の全配列を決定するため、RACE 法による末端配列の解読を行った。それぞれの領域の両末端 150bp ~ 200bp を対象としたプライマーを設計し、RACE 法および DNA クローニングにより末端配列の解読を試みたが、目的の配列を得ることができなかった。この原因特定のため得られた配列の BLAST 検索の結果を参照したところ、様々な生物や遺

伝子由来と考えられる配列が得られていたことが分かった。このことから、おそらく、RACE 用に設計したプライマー配列が適切ではなかったことが原因と考えられた。よって、新たなプライマーを設計し、反応条件を検討しなおした上で、再度 RACE (Rapid amplification of cDNA ends) 法による末端配列の解読を試みたものの、良好な結果は得られなかった。

そこで、二本鎖 RNA の配列解読法について再度検討し、従来法よりもより高性能な網羅的 RNA ウイルス検出技術である FLDS (Fragmented and loop primer ligated dsRNA sequencing) 法による配列解読を試みている。

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 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔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：

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

白水 貴 (SHIROUZU, Takashi)

三重大学・大学院生物資源学研究科・助教

研究者番号：10571789

(2)研究分担者

森山 裕充 (MORIYAMA, Hiromitsu)

東京農工大学・(連合)農学研究科(研

究院)・准教授

研究者番号：20392673

(3)連携研究者

保坂 健太郎 (HOSAKA, Kentaro)

独立行政法人国立科学博物館・植物研究部・

研究主幹

研究者番号：10509417

(4)研究協力者

()