

6. イネいもち病菌に感染するマイコウイルスの分子遺伝学及び生化学的解析

森山 裕充¹⁾・浦山 俊一^{1,2)}・小松 健²⁾

東京農工大学大学院農学研究院 生物制御科学部門

1) 細胞分子生物学研究室, 2) 植物病理学研究室

イネいもち病菌に感染するマイコウイルスのうち、著者らは MoCV1 というウイルスを見出した。MoCV1 は 5 本の 2 本鎖 RNA をゲノムとするウイルスで、クリソウイルス属に分類される。スピソカラム精製、RT-PCR、LAMP 法などマイコウイルス由来の 2 本鎖 RNA を迅速に検出する方法を駆使する事により、MoCV1 関連ウイルスは日本国内にも多数存在することが判明した。本稿では MoCV1 の生化学的な特性やウイルスタンパク質成分が宿主細胞に及ぼす影響、MoCV1 を利用した微生物防除資材としての展望や、出芽酵母異種発現系を利用した宿主細胞に対する生育阻害の作用について解説する。MoCV1 に感染したイネいもち病菌は、生育不良となり、病原力の低下をもたらすが、それだけではなく病原性の変化を生じさせる要因になることも明らかになりつつあり、この事についても考察する。

1. はじめに

動物や植物にウイルスが感染するように、菌類もウイルスによる感染がしばしば見受けられる。一般に、組織や器官形成など発生分化が高度に発達した高等真核生物に対するウイルス感染は、病状の悪化などの様態変化を顕わすのに対して、Simple Eukaryote (下等真核生物) である菌類を宿主とする場合、ウイルス感染による影響を認識することは、日常生活においては殆んどない。しかし、酵母菌や糸状菌からはエピジェネティックな現象をもたらす遺伝因子として、数多くのウイルスの存在が報告されており⁹⁾、また感染性タンパク質のプリオンの存在も知られている^{41,42,43)}。

菌類に感染するマイコウイルスは、罹病したマッシュルーム¹¹⁾、ペニシリン生産菌である *Penicillium chrysogenum*、キラー現象の要因となる醸造用酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の L-A ウイルスなど、キノコの栽培、または発酵生産の過程で発見されてきたが、1970 年にイネいもち病菌 *Magnaporthe oryzae* からの発見後^{36,37)}、多くの植物病原菌からもマイコウイルスが見つかり、その中でもクリ桐枯れ病菌 *Cryphonectria parasitica* に感染するハイポウイルスは、宿主菌を弱毒化すべく生物防除資材として活用された例として有名である²¹⁾。また 1990 年以降はヒト病原性真菌 *Aspergillus fumigatus* からも見つかった^{20,35)}。何れも 2 本鎖 RNA (以下、dsRNA) をゲノムとするか、dsRNA 分子として分離精製されるものが多く、現在に至る報告件数においてもその傾向は変わらない。動物や植物と同様に、多くの菌類にも dsRNA 分子をターゲットする RNA 干渉機構による抗ウイルス作用が備わっていることを考えると、マイコウイルスの繁殖と宿主菌の防御機構との関係を調査することは誠に興味深く、現在ホットな話題でもあるので、他の総説などを参照されたい^{3),5),8),12)}。

真菌類や卵菌類は、地球上に 150 万種類以上存在すると云われているが、それらの中には植物病原菌として農作物の生産に甚大な被害をもたらすものもあり、これまでに日本国内で植物病原として同定された植物病原菌の報告件数

連絡先

〒183-8509

東京都府中市幸町 3-5-8

東京農工大学農学研究院 生物制御科学部門

細胞分子生物学研究室

TEL: 042-367-5622

FAX: 042-367-5622

E-mail: hmori714@cc.tuat.ac.jp

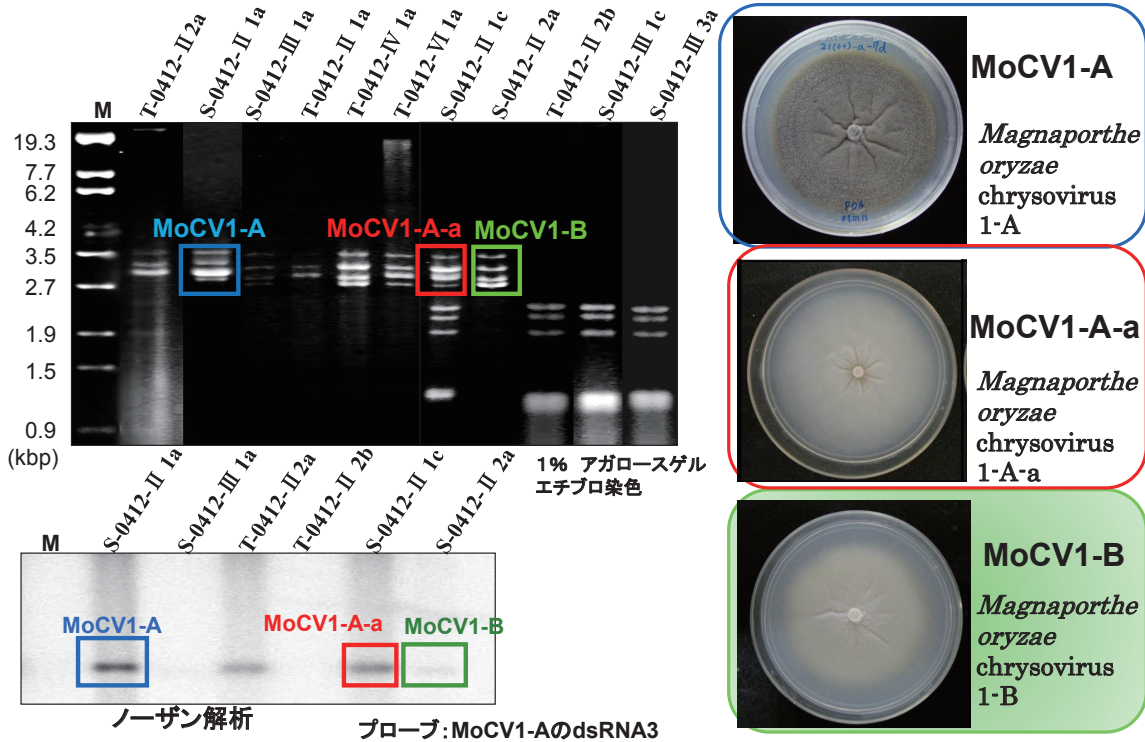


図1 ウイルス感染による宿主菌の表現型の比較

は約8千件にのぼり、病原別では最も多く、植物ウイルスや植物細菌で同定された件数の10倍以上と大きなウェートを占めており²⁵⁾、ヒトに対する病原種の報告件数とは逆の関係にあるといえる。このように多様な農作物に感染する植物病原菌には多くの種が存在し、各々の植物病原菌に複数のマイコウイルスが感染することを考慮すると、今後も新たに同定されるマイコウイルスは年々増加すると考えられる^{8), 24)}。

本稿ではこれらマイコウイルスのうち、著者らが研究を進めてきたイネいもち病菌に生育不良をもたらすマイコウイルスについて、その生化学的な特性やウイルスタンパク質成分が宿主細胞に及ぼす影響、イネいもち病菌マイコウイルスを利用した微生物防除資材としての展望や、出芽酵母異種発現系を利用した宿主細胞に対する生育阻害の作用についても考察する。またマイコウイルスに感染したイネいもち病菌の植物に対する病原性の変化についても現時点で得られた知見について解説する。

2. イネいもち病菌マイコウイルス MoCV1 がもたらす宿主菌への影響

イネいもち病菌は重要作物であるイネに多大な被害をもたらす植物病原菌で、稲作を行う国々において毎年のようにその病害事例が報告されている。国内外のイネいもち病菌80株を出発材料としてマイコウイルスの感染状況につ

いて、細胞抽出液から dsRNA を簡易精製法²²⁾により調査した結果、dsRNA 保有菌が11株ほど見つかり(図1左側)、このうち2.6~3.6kbp付近に存在するdsRNAをゲノムとするウイルスを *Magnaporthe oryzae chrysovirus* I (以下、MoCV1)として定義した²⁹⁾。8菌株から検出されたMoCV1のうち、最も安定的に菌体から一定含量でdsRNAが回収される、即ち安定した持続感染性を示すウイルス株をMoCV1-Aと称した³¹⁾。MoCV1-A-aやMoCV1-Bは、液体培養後の菌体から得られるdsRNA含量がMoCV1-Aよりも少ない傾向にあったが、興味深いことに、MoCV1-A-aやMoCV1-Bが感染したイネいもち病菌の菌叢は著しいアルビノ化を示し(図1右側)、少なくとも寒天培地上においてはメラニンの生合成が抑制されていた。メラニン生合成能を欠損したイネいもち病菌突然変異体は、イネ葉中への感染に必要とされる付着器形成に異常が生じるために葉中への侵入ができなくなり、従って感染力が大幅に低下する。菌類のメラニン生合成経路は、ヒトとは異なるので、その阻害剤はイネいもち病菌防除のための農薬ターゲットとなる¹⁰⁾。さらに、分生子形成能もMoCV1-A-a, MoCV1-Bに感染した菌株は、寒天培地上においては全くと言ってよいほど失われていた³¹⁾。イネいもち病菌は、分生子が空气中に飛散することで感染が拡大していくので、マイコウイルスによる分生子形成抑制の特質は、イネいもち病菌を防除することに重要な知見と素材をもたらす

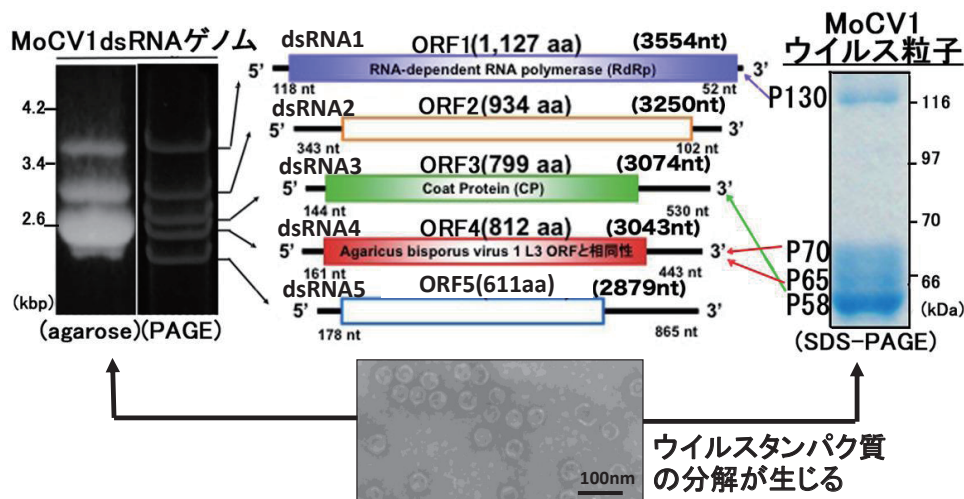


図2 MoCV1-A のゲノム構造及びウイルス粒子

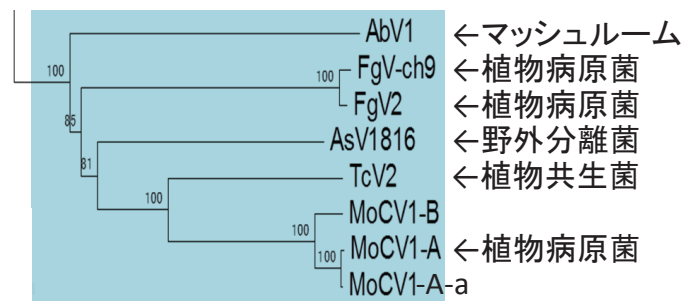


図3 MoCV1 関連ウイルスの系統樹

ことが期待される。Calcofluor white (CW) はダメージを受けた細胞壁の染色検定に用いられるが、MoCV1-B 感染株の細胞壁は顕微鏡観察で肥大化が確認され、更に CW で染色されたことから、細胞壁に損傷が生じていることも判明した。

3. MoCV1 の遺伝子構造

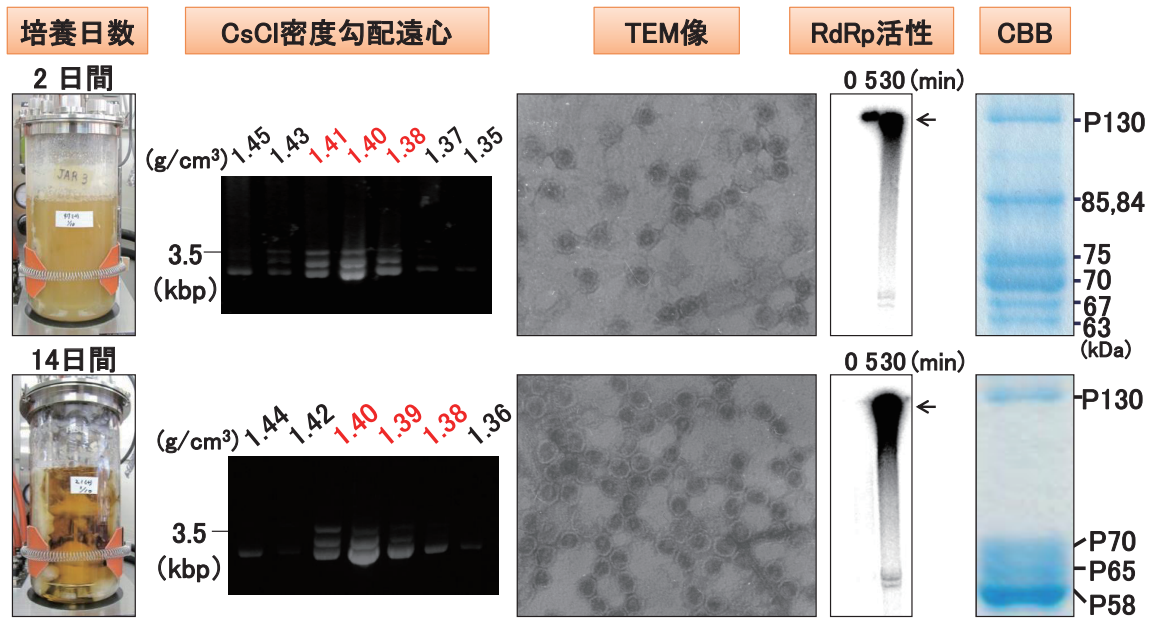
MoCV1-A は、5 成分の dsRNA をゲノムとし、このうち dsRNA1 はウイルスゲノムの複製酵素である RNA 依存 RNA ポリメラーゼ (RdRp) をコードする。MoCV1-A の RdRp は *Helminthosporium victoriae* 145S virus や *Penicillium chrysogenum* virus を典型種とするクリソウイルス科 (*Chrysovirus*)⁷⁾ の RdRp と約 30% の類似性をもつことが示されたので、MoCV1 (*Magnaporthe oryzae* chrysovirus 1) と称した²⁹⁾。MoCV1-A の dsRNA ゲノム数はアガロースゲル電気泳動では 4 成分に見えたが、PAGE で分離すると 5 成分であることが示された (図 2)³⁰⁾。図 1 で、宿主菌に対して著しいアルビノ化をもたらす MoCV1-B の各 dsRNA ゲノム配列は、MoCV1-A と約 75%

の同一性を示すが、dsRNA5 だけは 96% の同一性を示し、サテライト RNA として MoCV1 ウイルス間を転移することが示唆された。実際に MoCV1-B においては dsRNA5 ゲノムのみが脱落したウイルス株も分離された³¹⁾。MoCV1-A-a に感染した菌株は、更に 2.5, 2.2, 1.8kbp をゲノムとするパルティティウイルスと混合感染していた。MoCV1-A-a は、MoCV1-A と全ての dsRNA ゲノムにおいて、MoCV1-A 由来の各 dsRNA と 99% 以上の同一性を示すが宿主菌に及ぼす影響は異なっている。

MoCV1-A, MoCV1-A-a, MoCV1-B は、最初はいずれもベトナムで採取されたイネいもち病菌から検出されたが、その後、RT-PCR 法やマイコウイルスとしては初めての試みとなる LAMP 法を駆使することで、日本で採集されたイネいもち病菌からも、MoCV1-A や MoCV1-B と各 dsRNA ゲノムの核酸配列の同一性が 75% 程度の MoCV1 株を多数得ることができた^{18), 33)}。日本株の dsRNA5 が脱落する可能性については、現在調査中である。また、フザリウムなどイネいもち病菌以外の植物病原菌、また植物共生菌などからも MoCV1 と同じクレードを形成するマイコ



図4 MoCV1 関連ウイルス検出国



MoCV1タンパク質構成は、部分分解された時と、全長タンパク質を構成成分するときと、2パターン存在し、菌体培養日数が少ない時は、精製ウイルス粒子から全長タンパク質が検出された。

図5 培養条件で変化する MoCV1 ウイルス粒子構成成分

ウイルスが報告され始めた (図3)。現在までに MoCV1 関連マイコウイルスが分布する地域としてはアジア、北アメリカ、ヨーロッパで報告がなされている (図4)。

イネいもち病菌に感染するマイコウイルスとしては、著者らが見出したクリソウイルス科以外にも、パルティティウイルス科、トチウイルス科の3つのファミリーに属するウイルスが報告されている。尚、典型的なクリソウイルスが4つの dsRNA ゲノムを有するのに対して、MoCV1 は5本の dsRNA ゲノムを有する点が異なっており、RdRp を基準とした系統解析においても、典型種クリソウイルスとは異なるクレードを形成することから異なるウイルス属と

して分類される予定である。日本で採集されたイネいもち病菌においては、これら3種のマイコウイルスが全て同時に混合感染している例も見つかった (未発表)。

4. MoCV1 のウイルス粒子の構造と細胞外での存在

菌体から MoCV1-A のウイルス粒子を調整し SDS-PAGE で分離後に、N 末端解析により各タンパク質を同定する過程において、著者らが最初に困惑したのは、菌体からのウイルス粒子の回収量を上げることを目的として、ミニジャーで14日間の培養した後に抽出した場合、精製ウイルス粒子のタンパク質のサイズは、ORF3 と ORF4 核酸配

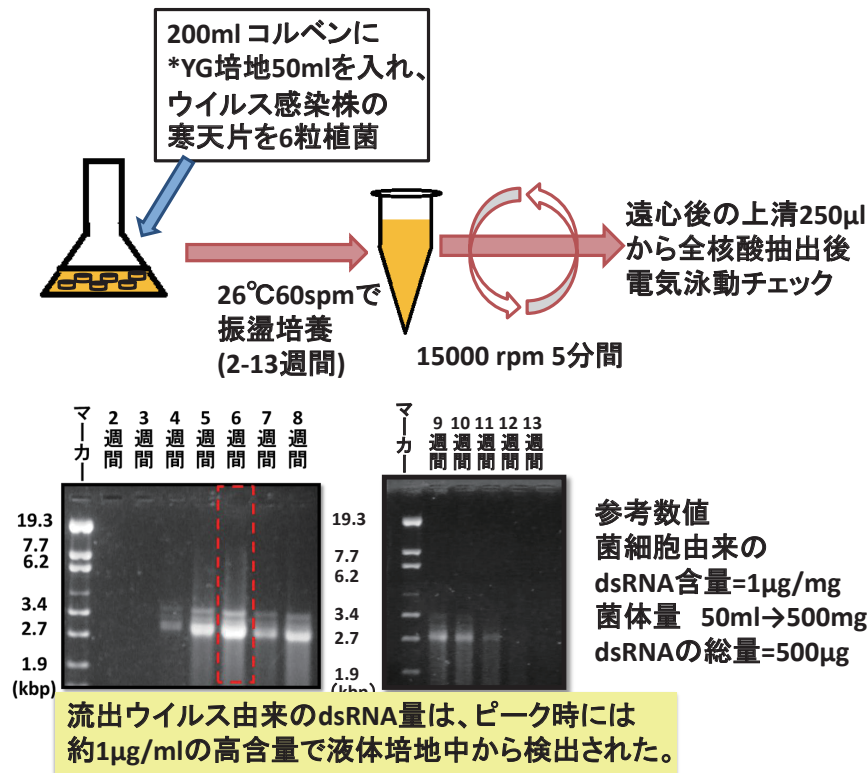


図6 MoCV1の細胞外流出の検出実験

列情報で予測されるものよりも小さかったことである (図2, 図5). 後になってペプチドフィンガープリンティング解析により, ORF3のC末端側の約200アミノ酸残基が除去されている事が分かった³⁰⁾. またORF4についても, N末端の16残基と, C末端側の約200残基がやはり除去されていることが判明した. そこで, 菌体が約2日間でグルコースを消費することを想定して (バイオセンサーでグルコース濃度を測定), 栄養炭素源が枯渇する直前のタイミングで菌体を集菌して, ウイルス粒子を精製したところ, 配列情報から予想されたサイズのインタクトなタンパク質が検出された. このようにミニジャーで培養条件を制御する事により, ウイルス粒子を構成するタンパク質は少なくとも2つのパターンを有する事が判明した. 尚, 電子顕微鏡によるネガティブ染色では, 構造上の差異は観察されず, 粒子構造に及ぼす影響を調べるためには, クライオ電顕などの解析を行う必要がある. RdRp活性を測定したが, どちらのケースでも複製活性が確認された (図5). また, 大腸菌やパン酵母による異種発現系においては, ORF3, ORF4の何れも完全長の状態で産生されており, 部分分解は生じなかったため自己分解することは考えにくく, 宿主菌のタンパク質分解機構が関与することが予想される.

MoCV1-Aのウイルスタンパク質のもう一つの特徴は, 複数のタンパク質成分でウイルス粒子が構成されること

で, RdRpをコードするORF1も粒子成分の中にメジャーバンドとして存在することである (図5). 上述したように, 菌体を長期間培養すると, ORF3とORF4のウイルスタンパク質成分は恐らくオートファジーなどの影響で部分分解されるが, ORF1はどちらの培養条件でもインタクトな状態で検出された. 即ち, 粒子構成にインタクトなRdRpが必要なのであろう. 因みにクリソウイルスの典型種であるPcVは, ウイルス粒子タンパク質としては, ORF2にコードされる約100 kDaのペプチドがメジャーバンドとして検出される¹³⁾. 一方, MoCV1に近縁なウイルスは, やはり複数の構成タンパク質が存在する⁴⁾.

5. 菌体細胞外で検出される MoCV1

一般に, 菌類ウイルスは細胞外の感染ステージがないと云われており, 実際, 著者らもMoCV1以外のマイコウイルスについては, 細胞外である培養上清中からマイコウイルスを検出することは殆どない. マイコウイルスが感染拡大する際に, 細胞外フェーズが必要とされないのは, その感染過程において, 菌類に特有の現象で個体同士が接合する菌糸融合を利用して伝播されるためと理解されている^{21), 26)}. 但し, 同じ菌種同士がお互いに菌糸融合する場合でも, 融合型が和合性であるケースに限られる. 糸状菌の *Podospora anserina* においては, 菌糸融合因子となるペブ

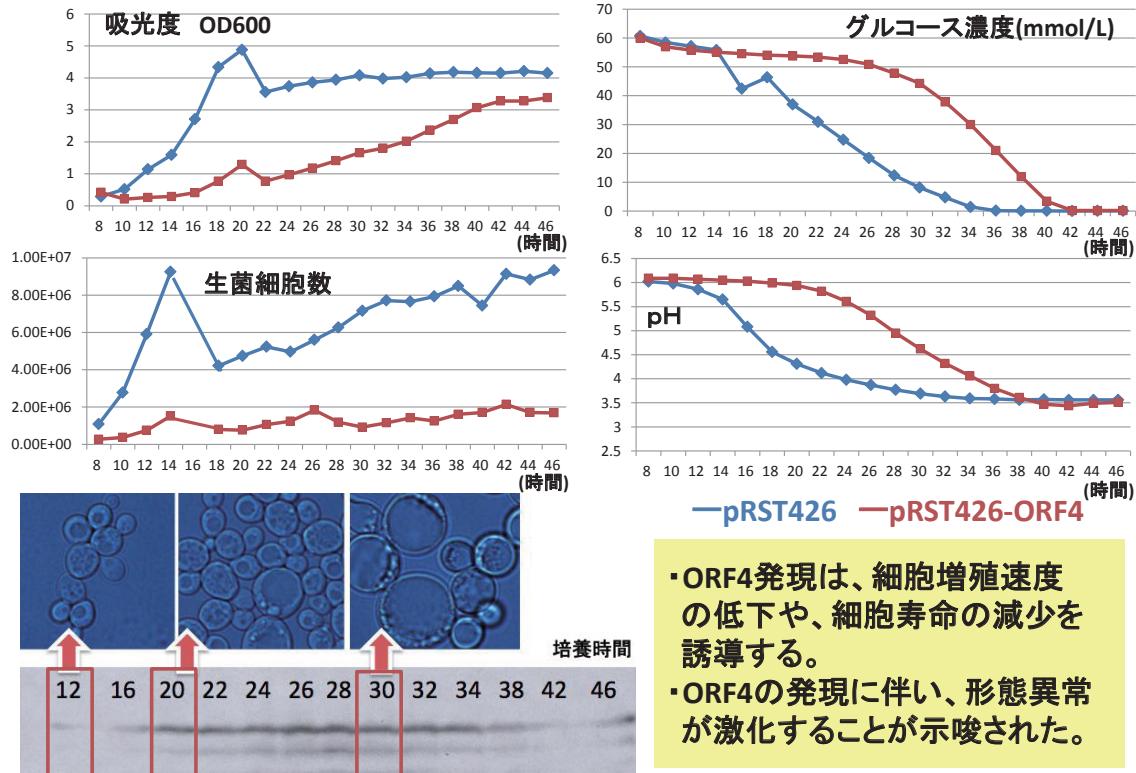


図7 MoCV1-A ORF4 発現による細胞生育阻害

チドがプリオン化する事により、これまで和合性だった菌株同士が、突然不和合性となり、菌糸が接触した部分の細胞がアポトーシスを起こして死ぬことが見つかったが、それは菌糸融合によるウイルス感染を防ぐための巧妙な自己防衛機構という説もある⁴⁴⁾。

ところが、MoCV1 に関しては例外的なケースとして、細胞フリーな状態で培養液中にしばしば存在することが観察された^{29), 31)}。図6に検出実験工程を示したが、MoCV1-A, MoCV1-B, 日本で検出された MoCV1-AK の全てにおいて、細胞フリーな培養上清からウイルス由来の dsRNA 成分や、ウイルス粒子タンパク質が検出された。細胞外で検出されるウイルス由来の dsRNA 量は、フラスコ培養 4-5 週間目にピークを迎え、約 1 μg/ml の高い含量で培養上清から検出された。著者らは、他のイネいもち病菌マイコウイルスである MoV2 (トチウイルス科 Victorivirus) や^{39), 40)}、パルティティウイルス、またアルタナリア・アルタナリア菌に感染する AaV1¹⁾, N18V⁶⁾ (仮称)、新種の victorivirus (Komatsu et al. 投稿中, 仮称 AaVV1), またパン酵母に感染する L-A ウイルス (トチウイルス科 Totivirus) などについても、細胞外流出の検討を行ったが、何れのケースにおいても殆ど検出は確認されなかった。尚、著者が培養上清中におけるマイコウイルスの存在に着目した理由は、以前に動物ウイルスを取り扱った

体験に由来する。もっともその際は、ウイルス接種3日後に培養上清をウイルス溶液として回収しており、4週間など長期間培養することはなかった。細胞外に存在する時の MoCV1-A ウイルスタンパク質の組成は、ミニジャーによる14日間の培養後に抽出した時と同じく、ORF3 タンパク質はC末端側の約200アミノ酸が除去されていた。これは、ORF3のC末端から16残基の合成ペプチドに対する抗体を用いたウェスタン解析で明らかにされた³⁰⁾。

次に MoCV1-A を含む培養上清をウイルスフリーの治癒菌株に接種する実験を行ったところ、治癒菌株の菌糸は萎縮し生育が抑制されることが確認された²⁹⁾。さらに菌体から抽出してショ糖密度勾配で精製したウイルス粒子成分でも、同様な効果が確認された。そこで、イネいもち病菌の分生子の発芽を抑制する効果について調べたところ、約 5ng/μl の精製ウイルス濃度で抑制効果を示すことが分かった (投稿準備中)。イネいもち病菌の菌体湿重量 100 グラムからは、およそ 5mg の MoCV1-A が回収されるので、約 1 リットル分のウイルス溶液を調整できる。菌体 100 グラムを産生するためには、約 100 グラムのグルコースを必要とするが、液体培地には通常 2% 濃度のグルコースが含まれるので、5 リットルの培養液から上記のウイルス溶液 1 リットルを調整できる試算となる。

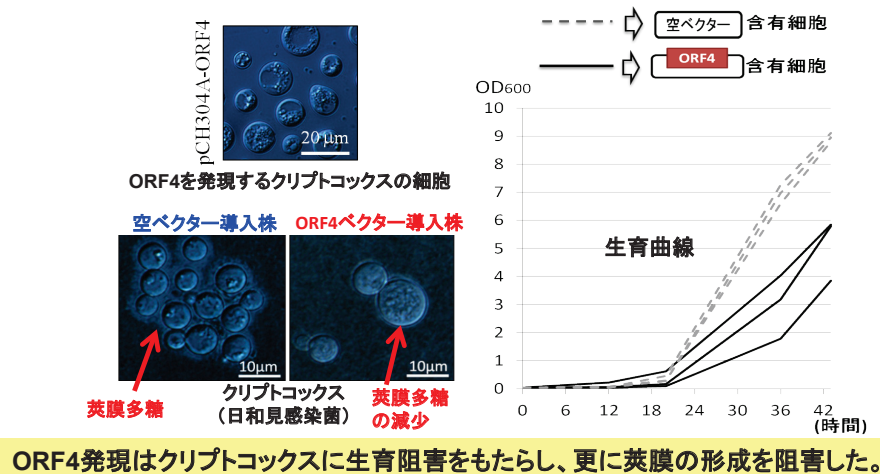


図8 ORF4を発現させたヒト病原性真菌の生育異常

6. 酵母を利用した MoCV1-A タンパク質の解析と産生系の検討

パン酵母は真核生物のモデル系としてよく利用されるが、著者らもマイコウイルスが有する遺伝子の機能解析に用いてみた。MoCV1-Aの5つのORFタンパク質のうち、RdRpをコードするORF1以外は、BLAST検索では機能を推定する事が出来なかった。そこで、各ORFを低発現系と高発現系のシャトルベクターに結合して、酵母細胞中で発現させると、ORF4を高発現させた時に、肥大化した液胞や小胞の増加など細胞形態の変化を伴う生育阻害が生じることを見出した(図7)。ミニジャーで培養温度を28度、送気流量を1.5L/min、液体培地(酵母用半合成培地)1L、攪拌速度は100rpmを一定に保ちながら、培養開始8時間から46時間目までの間、2時間毎にサンプリングをして、吸光度、生菌細胞数、グルコース濃度、pHに加えて、細胞形態観察やウェスタン解析を行った。得られたデータより、ORF4発現は、細胞増殖速度の低下や、細胞寿命の減少を誘導し、さらにORF4の発現に伴い形態異常が激化することも示唆された(図7)。

次に、著者らは出芽酵母であるヒト病原性真菌であるクリプトコックス *Cryptococcus neoformans* の細胞内で、MoCV1-AのORF4を発現させて、その生育阻害効果を検討したところ、図8の写真に示したように、パン酵母で発現させた時と同様な生育異常を示し、生育速度の減少や、細胞形態的にも液胞の肥大化や小胞の増加が確認された³²⁾。更に、クリプトコックスの病原性に関与する莢膜の形成も、ORF4発現細胞では減少していることから、病原力の低下も示唆された。尚、パン酵母細胞で異種発現させたORF4-GFP融合タンパク質は、細胞内で凝集体として存在していることが示されており、また高温条件下(35℃)では、

通常条件下(30℃)よりも顕著な生育阻害を引き起こすことなども考慮して、今後は細胞に対する毒性のメカニズムについて追求する予定である。これまでの解析において、ORF4を発現させたパン酵母の細胞では、ストレス応答遺伝子群の発現量の下降や、逆に翻訳関連遺伝子群の発現の上昇が見られ、活性酸素種の発生も確認されている。ORF4のディリーション実験を行い、その部分領域を発現させた場合、細胞に対する生育阻害の程度が維持されるケースと、やや緩和されるケースなどの現象が見られた(投稿準備中)。生育阻害の程度が弱くなった領域を発現させた酵母細胞を、ミニジャーで 10^8 個以上の細胞数を増殖すると、逆に生育が促進される突然変異酵母菌も現れてきた。通常酵母株との遺伝解析の結果、この生育促進を支配するのは、染色体上の1つの劣性遺伝子であり、再現性をもって同じ遺伝子座に生じることなどが分かってきた。これは、毒性が弱まったORF4の発現により、逆に耐性菌が出現したと考えられる。現在は、生育促進現象となる遺伝子をゲノミックライブラリーによる相補性試験などで同定を試みている。因みに、酵母ゲノムの総塩基数は、 4×10^9 bpであり、 10^8 個以上の細胞数を増殖させると、突然変異が生じる染色体領域も十分に広範囲に亘ることが期待される。

MoCV1-AのORF4タンパク質を大腸菌で産生させると不溶性画分として回収され、OD₆₀₀ = 1.0では50mlのLB培地で約1mg産生される。但し、大部分が不溶性の画分に回収される。ピキア酵母を利用した分泌生産系では、100mlあたりの培養液中に約1mg産生させることが可能である。現在、ORF4がイネいもち病菌や酵母細胞にもたらす生育阻害活性について、タンパク質の可溶性産生技術などを取り入れながら活性型の異種発現タンパク質を作製しており、今後MIC(最小濃度)などの測定や、凝集性

を示しウイルス粒子構成タンパク質でもある ORF4 の立体構造などを明らかにしていきたい。

7. 宿主菌の病原性に与える影響について

クリ胴枯れ病菌や⁵⁾、白紋羽病菌^{15), 19)}、菌核菌¹⁴⁾、フザリウム菌²⁾において、種々のマイコウイルスに感染した宿主菌は植物に対する病原力を低減させることが報告されており、またヒト病原性真菌においてもマイコウイルス感染により、ハチミツガに対してや²³⁾、マウスに対する病原性が低下する²⁷⁾ことが報告されている。イネいもち病菌においても各 MoCV1 が宿主菌の菌糸成長速度を低下させるのに加えて、MoCV1-B などはアルビノ化や分生子形成抑制などの生育不良をもたらす。そこで、イネに対する病原力の影響について噴霧接種法と葉鞘裏面接種法を用いて調査を行った。この2つの感染手法は、オートミール培地上から回収した分生子を接種原とするため、分生子形成能を通常数に保持するなど、宿主菌に対する生育阻害の程度が比較的マイルドな MoCV1-A 感染菌株と、そのフリー化菌株を試供菌とした。国際イネ判別品種を供試植物として噴霧接種によるイネいもち病菌の感染実験を行い、イネ葉上の病斑形成数や病斑の大きさを指標としてマイコウイルス感染が病原性に及ぼす影響を調べたところ、ウイルス感染株の病原力は全般的に減少していた。次に、病原性について調査したが、その検定方法としてはイネいもち病菌において確立されたレース判別方法を用いた¹⁷⁾。多くの植物病原菌には、宿主植物の品種に対する病原性を異にする系統が存在して、この現象は病原性の分化といわれており、その菌系統をレース (physiologic race, あるいは pathogenic race) と呼んでいるが、イネいもち病菌は病原性の変異頻度が高いことで有名である¹⁶⁾。そこで MoCV1-A 感染株とウイルスフリー化株を用いた病原性レースとの関連の調査したところ、ウイルスフリー化株では罹病性 (S) 型を示すが、MoCV1-A が感染した株では病斑型が抵抗性 (R) 型を示すケースもあれば、逆にウイルスフリー化株は抵抗性 (R) 型であるが、ウイルス感染株は罹病性 (S) 型を示すケースも近同質系統 (near-isogenic lines) の国際イネ判別品種で観察された^{28, 34)}。葉鞘接種で感染イネ細胞内の侵入菌糸の動態を観察しても、同様に S 型から R 型に変化した品種では侵入菌糸の伸展が抑えられ、R 型から S 型に変化した品種では伸展が助長していた。このことは MoCV1-A が宿主イネいもち病菌の生育や病原力を低下させるだけでなく、病原性も変化させ得ることを示唆する。

9. おわりに

菌類に感染するマイコウイルスの存在は、自然界から分離した菌の培地上での生育状況について、プレート上における菌叢のエピジェネティックな変化により顕在化される

ことが多い。しかし、クリ胴枯れ病菌をはじめとする植物病原菌に感染するマイコウイルスなどは、宿主菌の病原力を低下させることで、即ち、植物体に対する宿主菌の感染様式を変化させることでも、その存在を見出すことができる。イネいもち病菌マイコウイルスにおいても、宿主菌の病原力や病原性を変動させることが分かってきた。MoCV1-A の ORF4 をパン酵母細胞中で発現させると生育不良が生じたが、イネいもち病菌でも同様に生育不良が観察される。このことは、ORF4 の異種発現が、宿主菌の病原性関連遺伝子の発現転写機構の低下に影響することも考えられるが、DNA 修復機構の不全やエピジェネティックな変異の原因となる、いわゆる“ミューテーター”的な機能を持つことも推察される。著者らの研究グループは、愛知県で分離されたナシ黒斑病菌株からも MoCV1 近縁のウイルス (N18V 仮称) を分離しており、本ウイルス感染株は黒斑病菌 (*Alternaria alternata*) の宿主特異的毒素の AK 毒素産生量を増加させ、病原力・病原性を増進させることを見出している (投稿準備中)。このことから、MoCV1 に関連する新規なクリソウイルスのグループは、トチウイルスやパルティティウイルスなどと同様に生態的に広く分布しており、様々な植物病原糸状菌の病原力や病原性の変動要因となるケースもあることが推察され、今後、詳細について検討していきたい。

本研究を進めるにあたり、イネいもち病菌をご提供いただいた東京農工大学農学部植物病理学研究室の寺岡 徹教授、有江 力教授、*Alternaria alternata* 菌をご提供いただいた鳥取大学農学部植物病理学研究室の児玉基一朗教授に厚く御礼を申し上げます。ヒト病原真菌に関わる研究においては、千葉大学真菌医学研究センターの川本 進客員教授、五ノ井 透教授、東江昭夫研究員、高橋 梓博士のご指導に感謝を申し上げます。また、2本鎖 RNA の単離方法をご助言戴いた東京農工大学農学部細胞分子生物学研究室の福原敏行教授、青木菜々子博士、岡田 亮博士、清田 依里博士にも厚く御礼を申し上げます。最後に、本研究を推進するために、卒業論文、修士論文、博士論文で日夜努力して戴いた細胞分子生物学研究室の学生諸君にも多大な感謝の意を述べたい。本研究は、NEDO 若手グラント (H21 年~H24 年)、JST つなぐしくみ (H20 年~21 年)、A-STEP (H24 年~H25 年)、科研費基盤 (C) (H20 年~22 年、H27 年~29 年) などにより研究支援をして戴いた。

参考文献

- 1) Aoki, N., Moriyama, H., Kodama, M., Arie, T., Teraoka, T., and Fukuhara, T. A novel mycovirus associated with four doublestranded RNAs affects host fungal growth in *Alternaria alternata*. *Virus Res.* 140:179-187. 2009.
- 2) Cho W.K, Lee KM, Yu J, Son M, Kim KH. Insight into mycoviruses infecting *Fusarium* species. *Advances in*

- Virus Research. 86: pp273-288. 2013
- 3) 千葉壮太郎・近藤秀樹・兼松聡子・鈴木信弘 マイコウイルスとヴァイロコントロール ウイルス 60(2) p163-176. 2010
 - 4) Darissa, O., Willingmann, P., Schafer, W., Adam, G. A novel double stranded RNA mycovirus from *Fusarium graminearum*: nucleic acid sequence and genomic structure. *Arch. Virol.* 156:647-658. 2011
 - 5) Dawe A.L., Nuss D.L. Hypovirus *Molecular Biology. Advances in Virus Research.* 86: pp109-147. 2013
 - 6) Fuke K, Takeshita K, Aoki N, Fukuhara T, Egusa M, Kodama M, Moriyama H. The presence of double-stranded RNAs in *Alternaria alternata* Japanese pear pathotype is associated with its morphological changes. *Journal of General Plant Pathology.* 77(4) 248-252. 2011
 - 7) Ghabrial, S.A., Chrysovirus. *Encyclopedia of Virology (Third Edition).* 503-513. 2008. Edited by B.W.J. Mahy and M.H.V. Van Regenmortel. Oxford; Elsevier.
 - 8) Ghabrial SA, Castón JR, Jiang D, Nibert ML, Suzuki N 50-plus years of fungal viruses. *Virology* 479-480:356-368. 2015
 - 9) Ghabrial SA, Suzuki N Viruses of plant pathogenic fungi. *Annu Rev Phytopathol* 47: 353-384. 2009
 - 10) Hamada T., Asanagi M., Satozawa T., Araki N., Banba S, Higashimura N., Akase T., Hirase K. Action mechanism of the novel rice blast fungicide tolprocarb distinct from that of conventional melanin biosynthesis inhibitors. *Journal of Pesticide Science.* Vol. 39 No. 3 p. 152-158. 2014
 - 11) Hollings M. Viruses associated with a die-back disease of cultivated mushroom. *Nature* 196: 962-965. 1962
 - 12) Ines A. Drinnenberg, David E. Weinberg, Kathleen T. Xie, Jeffrey P. Mower, Kenneth H. Wolfe, Gerald R. Fink, and David P. Bartel. RNAi in budding yeast. *Science.* October 23; 326(5952): 544-550. 2009
 - 13) Jiang, D., Ghabrial, S.A., Molecular characterization of *Penicillium chrysogenum* virus: reconsideration of the taxonomy of the genus Chrysovirus. *J. Gen. Virol.* 85, 2111-2121. 2004
 - 14) Jiang D, Fu Y, Guoqing L, Ghabrial SA. Viruses of the plant pathogenic fungus *Sclerotinia sclerotiorum*. *Adv Virus Res.* 86:215-48. 2013
 - 15) Kanematsu S, Shimizu T, Salaipeh L, Yaegashi H, Sasaki A, Ito T, Suzuki N. Genome rearrangement of a mycovirus *Rosellinia necatrix* megabirnavirus 1 affecting its ability to attenuate virulence of the host fungus. *Virology.* Feb;450-451:308-15. 2014
 - 16) Kiyosawa, S. (1976). Pathogenic variations of *Pyricularia oryzae* and their use in genetic and breeding studies. *SABRAO J.* 8, 53-67.
 - 17) 高坂卓爾 農作物有害動物発生予察特別報告 24 : 215-306
 - 18) Komatsu K, Urayama S, Katoh Y, Fuji S, Hase S, Fukuhara T, Arie T, Teraoka T, Moriyama H. Detection of *Magnaporthe oryzae* chrysovirus 1 in Japan and establishment of a rapid, sensitive and direct diagnostic method based on reverse transcription loop-mediated isothermal amplification. *Archives of Virology* DOI: 10.1007/s00705-015-2666-x. 2015
 - 19) Kondo H, Kanematsu S, Suzuki N. Viruses of the white root rot fungus, *Rosellinia necatrix*. *Adv Virus Res.* 86:177-214. 2013
 - 20) Lakkhana Kanhayuwa, Ioly Kotta-Loizou, Selin Özkan, A. Patrick Gunning, and Robert H. A. Coutts. A novel mycovirus from *Aspergillus fumigatus* contains four unique dsRNAs as its genome and is infectious as dsRNA. *PNAS* 2015 112 (29) 9100-9105; published ahead of print July 2, 2015,
 - 21) Nuss DL. Hypovirulence: mycoviruses at the fungal-plant interface. *Nat Rev Microbiol* 3:632-642. 2005
 - 22) Okada R, Kiyota E, Moriyama H, Fukuhara T, Natsuaiki T. A simple and rapid method for viral dsRNA isolation from plant and fungal tissue. *Journal of General Plant Pathology* 81(2) 103-107. 2015
 - 23) Özkan S, Coutts RH. *Aspergillus fumigatus* mycovirus causes mild hypervirulent effect on pathogenicity when tested on *Galleria mellonella*. *Fungal Genet Biol.* Mar;76:20-6. doi: 10.1016/j.fgb.2015.01.003. 2015
 - 24) 佐々木厚子 マイコウイルスの人工感染法とその利用 果樹研報 Bull. Natl. Inst. Fruit Tree Sci. 8 : 1 ~ 1 , 2009
 - 25) 佐藤豊三 我が国の植物病害と病原微生物 日本微生物資源学会誌 . 29(2): 79-90. 2013
 - 26) 鈴木信弘 マイコウイルス宿主としてのクリ胴枯病菌 ウイルス 第64巻第1号, pp.11-24, 2014
 - 27) Takahashi N.A., Yahara M., Shishido E., Moriyama H., Gonoï T. A novel dsRNA mycovirus associated with reduced virulence of *Aspergillus fumigatus* in a mouse infection model. *International Union of Microbiology Society, July 25th Montreal, Canada.* 2014
 - 28) Teraoka T, Urayama S, Le Minh-Tuong, Katoh Y, Aihara M, Fukuhara T, Fuji S, Kobayashi T, Hase S, Komatsu K, Arie T, and Moriyama H Potential traits of the mycovirus MoCV1-A on interaction between rice plant and rice blast fungus. 18th International Plant Protection Congress August 24-27 Berlin Germany. 2015
 - 29) Urayama S., Kato S., Suzuki Y., Aoki N., Le Minh T., Arie T., Teraoka T., Fukuhara T., Moriyama H. Mycoviruses related to chrysovirus affect vegetative growth in the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*. *Journal of General Virology* 91: 3085-3094. 2010
 - 30) Urayama S, Ohta T., Onozuka N., Sakoda H, Fukuhara T., Arie T., Teraoka T., Moriyama H. Characterization of *Magnaporthe oryzae* chrysovirus 1 structural proteins and their expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of Virology* 86 (15): 8287-8295. 2012
 - 31) Urayama S, Sakoda H, Takai R, Katoh Y, Le TM, Fukuhara T, Arie T, Teraoka T, Moriyama H. A dsRNA mycovirus, *Magnaporthe oryzae* chrysovirus 1-B, suppresses vegetative growth and development of the rice blast fungus. *Virology* 448: 265-273. 2014
 - 32) Urayama S, Fukuhara T, Moriyama H, Toh-e A, Kawamoto S. Heterologous expression of a gene of *Magnaporthe oryzae* chrysovirus 1 strain A disrupts growth

- of the human pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*. *Microbiology and Immunology* 58: 294-302. 2014
- 33) Urayama S, Katoh Y, Fukuhara T, Arie T, Moriyama H, Teraoka T Rapid detection of Magnaporthe oryzae chrysovirus 1-A from fungal colonies on agar plates and lesions of rice blast. *Journal of General Plant Pathology* 81(2) 97-102. 2015
- 34) 浦山俊一, Le Minh Tuong, 岡田 亮, 加藤 優, 福原敏行, 有江 力, 森山裕充, 寺岡 徹 イネいもち病菌の病原力(性)と菌類ウイルスの作用とその応用土と微生物 68(1) p3-5. 2014
- 35) Varga J, Rinyu E, Kevei E, Tóth B, Kozakiewicz Z. Double-stranded RNA mycoviruses in species of Aspergillus sections Circumdati and Fumigati. *Can J Microbiol.* Jun;44(6):569-74. 1998
- 36) Yamashita S, Doi Y, Yora K A polyhedral virus found in rice blast fungus, *Pyricularia oryzae* Cavara. *Ann Phytopathol Soc Japan* 36: 372-373 (Abstr) 1970
- 37) Yamashita S, Doi Y, Yora KA polyhedral virus found in rice blast fungus, *Pyricularia oryzae* Cavara. *Ann Phytopathol Soc Japan* 37: 356-359. 1971
- 38) Yamashita S, Doi Y, Yora K. Electron microscopic. 1975
- 39) Maejima K, Himeno M, Komatsu K, Kakizawa S, Yamaji Y, Hamamoto H, Namba S Complete nucleotide sequence of a new double-stranded RNA virus from the rice blast fungus, *Magnaporthe oryzae*. *Arch Virol* 153:389-391. 2008
- 40) Yokoi, T., Yamashita, T., Hibi, T. The nucleotide sequence and genome organization of *Magnaporthe oryzae* virus 1. *Arch Virol* 152, 2265-2269. 2007.
- 41) 宇育奈理努 (Reed B. Wickner), 森山裕充 遺伝子として機能する蛋白質: "発芽酵母"におけるプリオンとその複製機構, *化学と生物* 37(10): 634-636, 1999
- 42) Wickner, R. B.. Evidence for a prion analog in *S. cerevisiae*: the [URE3] non-Mendelian genetic element as an altered URE2 protein. *Science* 264: 566-569. 1994
- 43) Wickner R.B., Fujimura T., Esteban R. Viruses and Prions of *Saccharomyces cerevisiae*. *Advances in Virus Research.* 86: pp1-28. 2013
- 44) Wickner RB, Edskes HK, Maddelein ML, Taylor K, Moriyama H. Prion of Yeast and Fungi: Proteins as Genetic Material. *Journal of Biological Chemistry* 274(2): 555-558, 1999.

Molecular genetics and Biochemical analyses of mycoviruses in rice blast fungus, *Magnaporthe oryzae*

Hiromistu MORIYAMA¹⁾, Syun-ichi URAYAMA^{1),2)}, Ken KOMATSU²⁾

Laboratories of 1)Molecular and Cellular Biology and

2)Plant Pathology, Graduate School of Agriculture, Tokyo University of Agriculture and Technology

We have found a novel mycovirus, MoCV1 in the rice blast fungus, *Magnaporthe oryzae*. MoCV1 has five dRNA segments as genome, and belong to *Chrysoviridae* tentatively. Using micro-spin column method or one-step reverse-transcription PCR (RT-PCR) assay, we detected a MoCV1-related virus from *M. oryzae* in Japan, whose sequence shares considerable identity with that of the MoCV1 Vietnamese isolate. To establish a system for comprehensive survey of MoCV1 infection in the field, we developed a reverse-transcription loop-mediated isothermal amplification (RT-LAMP) assay for direct detection of the virus. In this review, we introduce our current knowledges of MoCV1 properties for biochemical and molecular genetic aspects and also describe its negative effects to host fungus, which imply potentiality to utilize MoCV1 as bio-controller. Heterologous gene-expression system in yeast is employed to investigate biological activities or functions of mycoviral proteins in fungal host cells. MoCV1-A infection caused hypovirulence to the host fungus, unexpectedly, also resulted in the change of pathogenic races in several differential rice lines, namely S (compatible) to R (incompatible) reaction or R to S. The cause of epigenetic alteration is also discussed.