

学 位 論 文 要 旨

イネいもち病菌クリソウイルスの網羅的な性状解析及び
宿主菌に与える影響に関する研究

Fundamental biochemical analysis of *Magnaporthe oryzae* chrysovirus 1 (MoCV1)
and biological impact of the MoCV1 to host fungus.

生物生産科学専攻 生物制御科学大講座
東浦 智也

菌類ウイルス(マイコウイルス)は糸状菌・酵母・栽培キノコなどに感染するウイルスであり、現在では菌界の広範囲の宿主から検出されている。それらのウイルスゲノムは2本鎖RNA (double-stranded RNA; dsRNA)、1本鎖RNA、1本鎖DNAをゲノムとして存在しており、その報告数は年々増加している。かつては宿主菌に影響を与えない潜伏性ウイルスと考えられることも多かったが、近年報告数の増加や解析技術が発展するにつれ宿主菌の形質にエピジェネティックな変化をもたらす細胞質因子として注目されている。これまで多くの植物病原糸状菌や一部のヒト病原糸状菌において、宿主菌の病原力と連動するマイコウイルスが見出されている。これらは、宿主菌/ウイルス間の相互作用研究の材料であると同時に、宿主病原菌の生物的制御に応用できる可能性がある。とりわけ植物病原菌においてはマイコウイルスを利用した新たな防除技術の開発が期待されている。水稻生産上の重要病害であるイネいもち病の病原菌 *Magnaporthe oryzae* においてもマイコウイルスが検出されている。本研究では、ベトナム及び日本国内にて分離されたイネいもち病菌株に感染するクリソウイルス *Magnaporthe oryzae* chrysovirus (MoCV1)のウイルス学的・生化学的な性状解析を行なった。さらに、MoCV1感染がイネいもち病菌の病原性と密接に相関するメラニン生合成系に対して与えている影響について報告する。

まずベトナム分離株から検出された MoCV1-A と同一植物体上から分離されながらも、宿主菌に与える表現型の変化がより顕著な MoCV1-A-a に関して性状解析を行うとともに、MoCV1-A との宿主菌への作用性の違いについて論じた。

日本国内分離株では、*Magnaporthe oryzae* virus 2 (MoV2)や *Magnaporthe oryzae*

partitivirus 1 (MoPV1)とともに秋田県分離株 APU10-199A 株に共感染していた *Magnaporthe oryzae chrysovirus 1-D* (MoCV1-D)を中心に、他県分離株から検出された MoCV1-D 近縁ウイルスも解析した。秋田県分離株 APU10-199A から単胞子分離法で各ウイルスがフリー化した菌株が得られた。それらの表現型を比較すると、3種のウイルスの中で MoCV1-D が宿主菌の気中菌糸の抑制・菌叢のアルビノ化などの生育阻害に最も関連していると考えられた。MoCV1-D の dsRNA ゲノムは、5本に分節化された構造で、各セグメントはベトナム分離クリソウイルスと高い相同性を示した。RdRp 配列に基づく分子系統解析では MoCV1-A や MoCV1-B と極めて近縁なクレードを形成し、*Chrysoviridae*-cluster II に分類された。MoCV1-D がコードする ORF4p を出芽酵母内で高発現させると、宿主の細胞傷害を誘導した。MoCV1-D ORF4p や ORF3p を *E. coli* 内で発現させると不溶性画分から大量に回収され、それらを抗原タンパク質として抗血清を作製した。異なる培養期間の APU10-199A 株からそれぞれ精製した MoCV1-D 粒子画分に対して、作製した抗血清でウェスタンブロット解析を行った。長期培養によって MoCV1-D 由来タンパク質は全長発現型から分解型へとプロセッシングされ、MoCV1 粒子タンパク質の宿主菌内における部分分解現象の普遍性を確認した。また、短期培養菌体中では MoCV1-D 粒子タンパク質は糖鎖修飾されていた。菌糸融合によって MoCV1-D は遺伝的に異系統な P2 株へ水平伝播しウイルス粒子を構築した。さらに、精製した MoCV1-D 分解型ウイルス粒子はプロトプラスト-PEG 法によって P2 株及び MoV2/MoCV1-D フリー化株へ直接導入が可能であった。APU10-199A 株をフラスコ振盪や微生物培養装置で長期間培養すると、培養上清から MoCV1-D だけでなく混合感染する MoV2 や MoPV1 の dsRNA も同時に検出された。

MoCV1-D が宿主菌に与える影響を解析するため、本菌の病原性や感染生理と密接に関わるメラニンに注目した。逆相クロマトグラフィーと UHPLC-TOF-MS による質量分析によって MoCV1-D 感染株では MoCV1-D フリー化株と比較してメラニン生合成系の中間体 *scytalone* の含量が顕著に低下していることが定性的に明らかとなり、これが菌叢のアルビノ化に関与している可能性が示唆された。しかし、既存のメラニン合成阻害剤共存下で培養した MoCV1-D 感染株では *scytalone* がある程度蓄積していたことから、MoCV1-D は *scytalone* 合成を完全に阻害しないと考えられた。

本研究成果は、ベトナム分離株だけでなく日本分離株から見出されたクリソウイルスに関して詳細な生化学的特徴を明らかにし、クリソウイルスが宿主菌の二次代謝系に与える影響に関して新たな知見を提示した。MoCV1-D のイネいもち病菌に対する作用性の解明は宿主菌/ウイルス間相互作用の理解を深め、もって作物保護及び農業生産性の向上に資すると期待される。