

報告番号	※	第	号
------	---	---	---

主論文の要旨

論文題目 マイコウイルスの多様性および宿主糸状菌への影響に関する研究

氏名 水谷 行善

論文内容の要旨

菌類は高い多様性をもって様々な環境に普遍的に生息する真核微生物であり、環境中では周囲の生物との相互作用、物質の分解などを通して生態系機能維持に重要な役割を担う他、医療、工業、農業など幅広い分野において人間の生活と深く関わっている。菌類に感染するウイルス（マイコウイルス）は多様な菌類から発見されており、既存の分類群には属さない独自の性質をもったウイルスが数多く含まれる。マイコウイルスのほとんどは宿主表現型に巨視的な変化をもたらさず無病徴感染するが、宿主の生育を抑制するもの、促進するものも少数存在する。これらの内、植物病原菌の病原性を低下させる能力を有するウイルスは病害防除に利用できる可能性がある。マイコウイルスを用いた病害防除法はヴァイロコントロールと呼ばれ、世界三大樹病の一つであるクリ胴枯病の防除に成功して以来、様々な病害への応用展開を目的とした研究が盛んに行われている。植物病原菌の病原性を低下させるウイルスはこれまで複数発見されているが、ヴァイロコントロールの成功例は上記のクリ胴枯病を含め2例しか報告されておらず、さらなる応用展開には有用ウイルス資材の探索及び新たな施術方法の開発が必要である。

Fusarium graminearum 種複合体によって引き起こされるムギ類赤かび病（*Fusarium Head Blight*: FHB）は、コムギの最重要病害であり、当研究室ではこれまで FHB に対するヴァイロコントロールの確立を目的として研究を行ってきた。過去、エチオピアのコムギ圃場において FHB に罹患したコムギ組織を採取し、単離した *Fusarium* 属菌からウイルス感染株の選抜が行われた。本研究では、これらの菌株の表現型解析及び感染するウイルスのゲノム配列解析を行った。その結果、生育異常を示す *F. boothii* Ep-BL13 株に感染するウイルスを有用ウイルス資材候補として選抜した。さらに、上記の菌株コレクションを含む 18 菌株に感染するウイルスのゲノム配列解析、病原性低下 Ep-BL13 株に感染するウイルスの宿主表現型への影響の調

査を行った。また、生態系におけるマイコウイルスの役割の理解を目的として、環境中から分離された菌寄生性 *Trichoderma* 属菌に感染するウイルスの性状解析を行った。

次世代シーケンシング技術は無病徴感染ウイルスが大多数を占めるマイコウイルスの配列解析に極めて有効な手段であるが、RNA ウイルスの高い変異率やゲノムの複雑な立体構造などに起因する様々な課題を抱えている。これらを解決する手段として、**fragmented and loop primer ligated dsRNA sequencing (FLDS)** 及び **Nanopore Direct RNA Sequencing (DRS)** といった異なる 2 つのアプローチを用いて、未知ウイルスのゲノム配列解析を試みた。その結果、*Fusarium* 属菌を主とする 18 の菌株から新奇ウイルスを含む 30 種に及ぶウイルスのゲノム配列取得に成功した。RNA ウイルスは分類学的に 6 つの門から構成されるが、本研究で発見されたウイルスはこれらの門の内 5 つを網羅しており、供試菌株中に極めて多様なウイルスが感染することを明らかにした。

ウイルスゲノム配列解析の結果、Ep-BL13 株には病原性 *F. boothii* 株 Ep-BL14 株、Ep-N28 株にも共通して感染する *Fusarium boothii* mitovirus 1 (FbMV1) に加え、新奇ウイルス *Fusarium boothii* large flexivirus 1 (FbLFV1) 及びその内部配列欠損 RNA (Defective RNA: D-RNA) が重複感染することが明らかとなった。単孢子分離を用いたウイルス除去により D-RNA 単独、あるいは FbLFV1 と D-RNA の両方を失った株を樹立したが、FbMV1 の除去はできなかった。表現型解析により D-RNA を失ったこれらの株で共通して宿主菌株の生育速度の増加(回復)が認められたことから、D-RNA と宿主の生育異常の関与が示唆された。また、対峙培養法を用いたウイルス水平伝播試験により Ep-BL13 株からウイルス除去株に D-RNA が水平移行させると、これらの D-RNA 再感染菌株で生育異常の表現型が再現された。この結果から、宿主の生育異常が D-RNA によって規定されることが示唆された。

環境中から分離された 4 つの菌株の内、*T. viride* 2 菌株 (AH-1 株及び AH-4 株) をウイルス感染株として選抜した。ウイルスゲノム配列の結果これらの菌株には共通して 2 種類のウイルス (phenui-like virus, umbra-like virus) が重複感染することが明らかとなったが、AH-4 株にはこれらに加え、*Trichoderma viride* victorivirus 1 (TvVV1) が感染する。培地上で AH-1 株は気中菌糸の少ない白色のコロニー上に黄色の胞子塊を形成するが、一方で AH-4 株は胞子形成能力をもたず、気中菌糸を盛んに形成し、黒色の色素を沈着する。AH-4 株の継代培養により偶然得られた TvVV1 非感染株 (AH-4W 株) は親株と比較して色素沈着、気中菌糸が顕著に減少しており、胞子形成能力が認められた。AH-1 株、AH-4 株、及び AH-4W 株は異なる栄養条件下で異なる生育応答を示し、AH-4 株の生育はブラックライト照射により抑制された。菌糸の顕微鏡観察により AH-4 株にのみ一般的な菌糸細胞壁構成成分であるキチンや β -グルカンを標的とする Calcofluor white 染色で染まらない黒色の菌糸が認められ、特殊な細胞壁成分構成を有することが示唆された。これらの結果から、AH-4 株特異的に感染する TvVV1 が栄養、光条件への応答様式と細胞壁成分の変異に影響を与え

る可能性が考えられた。

以上、これら三項目の調査から得られた結果は、マイコウイルスの多様性、ヴァイロコントロール応用展開への課題、環境中におけるマイコウイルスの役割の一端を理解するうえで重要な知見となる。