

マイコウイルスに感染したマイタケはシクロヘキシミドに対する感受性が低下する

小松 あき子・藤森 文啓[§]
(平成29年12月9日査読受理日)

Grifola frondosa, infected with mycovirus, is less sensitive to cycloheximide

KOMATSU, Akiko FUJIMORI, Fumihiko[§]
(Accepted for publication 9 December 2017)

要約

マイタケから見出された2種のマイコウイルス(GfPV1, GfRV1)が宿主に与える影響について調べた。ウイルス感染株とウイルス非感染株の表現型を解析するために、まず、2種のウイルスが存在しないウイルスフリー株を菌糸先端分離法により作出した。その後、ウイルスフリー株とウイルス感染株の菌糸接合により、それぞれのウイルスを再感染させた単独感染株を得た。また、正常株、ウイルスフリー株、各ウイルス再感染株の培養至適温度での表現型差異は認められなかったため、本ウイルスは無病徴感染するウイルスであることが示された。一方、菌糸の生育阻害を引き起こすシクロヘキシミド添加した培地上で、GfPV1再感染株の生育はウイルスフリー株、正常株、GfRV1再感染株と比べて早かった。GfPV1に感染したことでシクロヘキシミド感受性が低下した。

Abstract

We investigated the effect of two mycoviruses (GfPV1 and GfRV1) isolated from *Grifola frondosa* on the phenotype of a host (*Grifola frondosa*). To compare the phenotype between virus-infected and non-infected strains, firstly, virus-free strains without GfPV1 and GfRV1 were obtained from normal strains by hyphal tipping. Thereafter, each virus reinfection strain was produced by horizontal transmission during hyphal anastomosis from the virus-infected strain to the virus-free strain. As a result of cultivation at optimum temperature using the normal strain, virus-free strain and GfPV1 or GfRV1 reinfection strains, there were no phenotypic differences between them, showing that two mycoviruses were asymptomatic infections in *Grifola frondosa*. On the other hand, mycelial growth of GfPV1 reinfection strain was significantly faster in terms of hyphal extension than other strains cultivated on cycloheximide containing medium. This result showed a reduced sensitivity to cycloheximide of the host.

キーワード：担子菌，マイタケ，マイコウイルス，表現型，シクロヘキシミド

Key words: Basidiomycetes, *Grifola frondosa*, mycovirus, phenotype, cycloheximide

1. 緒言

キノコは菌界の真菌類、担子菌門または子囊菌門に分類される子実体を形成する菌類であり、食用としての利用に加え、リグニン分解酵素やタンパク質分解酵素等の原料となる有用な生物資源でもある¹⁾。食用キノコの多くは人工栽培方法が確立されており、その多くはおが粉（オガコ）

を用いた菌床栽培で行われ、工場内での大規模栽培が主流となり、年間を通して安定した生産が可能となっている。しかし、子実体形成の分子メカニズムは未だ解明されていない部分が多い。

研究対象であるマイタケ (*Grifola frondosa*) は担子菌門真正担子菌綱タマシヨレイタケ目に属する白色腐朽菌であ

東京家政大学大学院 人間生活学総合研究科 人間生活学専攻 生物工学研究室

§ Corresponding author. Laboratory of Biological Science and Technology, Tokyo Kasei University, 1-18-1 Kaga, Itabashi, Tokyo 173-8602, Japan. Tel: + 81-3-3961-0024. E-mail address: fujimori@tokyo-kasei.ac.jp

り、食用として国内で広く生産されている。当研究室では、食用キノコの子実体形成メカニズム解明を目的に、トランスクリプトーム解析²⁾³⁾、ゲノム解析⁴⁾等を実施し、子実体形成に必要な遺伝子群の探索及び機能解析を行っている^{5)~9)}。これらの研究を実施していく過程で、マイタケのトランスクリプトーム配列をマイタケゲノム配列にマッピングしたところ、ゲノム配列にマッピングされない、約550の配列断片が存在することを見出した（アンマップ配列）。このアンマップ配列の中から2種の新規マイコウイルス様配列を発見するに至っている。（投稿準備中）。動物や植物に感染するウイルスの大部分は不顕性感染（無病徴感染）し、宿主の表現型に明らかな変化をもたらすものは少数である。菌類ウイルス（マイコウイルス）についても同様¹⁰⁾であるが、一部のマイコウイルスのでは菌糸生育の低下、色素形成の異常、子実体形成不良、宿主菌が病原性を持つ場合は病原力の低下等をもたらすウイルスも存在し^{11)~14)}、病原性を持つ宿主の病原力を低下させ、病原性菌糸の蔓延を防ぐ研究も進められている¹⁵⁾。

取得した2種マイコウイルス（*Grifola frondosa partitivirus* 1: GfPV1 と仮称、*Grifola frondosa RNA virus* 1: GfRV 1 と仮称）はマイタケ正常株から発見したが、変異株にも存在し、正常株と変異株でウイルス存在量が異なることが示されている（投稿準備中）。そのため、2種ウイルスが宿主であるマイタケの表現型に影響を与えているものと考え、表現型と連動したマイタケ内部遺伝子の発現変動解析等を行っている。（投稿準備中）

本論文では2種のマイコウイルスがマイタケの表現型に与える影響を明らかにするため、ウイルスフリー株の作出とウイルス再感染株を作出し、シクロヘキシミド作用時の菌糸伸長およびコロニー形態の変化について、測定・観察を行ったので報告する。

2. 実験方法

2.1 ウイルスフリー株の作出およびウイルス再感染株の作出

ウイルスの感染の有無によるコロニー形態を比較するために、ウイルスフリー株（ウイルス非感染株: Gf-N2-VF）およびウイルス再感染株（Gf-N2-VFi5 (Pv), Gf-N2-VFi5 (Rv)) の作出を行った。

(1) ウイルスフリー株の作出

ウイルス感染株からの、ウイルス除去は菌糸先端分離法^{16), 17)}を用いて行った。

1) 供試菌株

マイタケ正常株（Gf-N2）、マイタケ変異株（Gf-A1）をPDA培地（OXOID）に1点培養し、15日間培養した株を供試した。

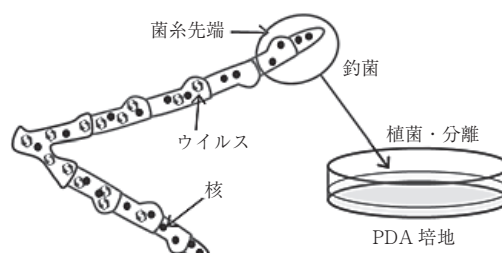


図1 菌糸先端分離法

低栄養下で培養した菌糸先端の1~2細胞を釣菌し、PDA培地に577株を植菌・分離した。約5日後に新しいPDA培地に植え継ぎし、分離株を得た。

2) 方法

(i) 菌糸先端分離法

1/10濃度PDA培地に、マイタケ正常株およびマイタケ変異株の培養寒天片を植菌した。約7日間培養後、実体顕微鏡下で菌糸先端を細い針で釣菌し、PDA培地に植菌・分離した。その後、生育した菌糸をPDA培地に植え継ぎ、分離株とした（図1）。

(ii) 定量RT-PCRによるウイルス遺伝子の検出

生存したGf-N2由来分離株の菌糸体をRNAzol®RT Isolation Reagent (Molecular Research Center, Inc.)と共にビーズ式細胞破碎装置 (Micro Smash MS-100 (株) TOMY 精工) を用いて破碎し、Total RNAを抽出した。その後、ReverTra Ace qPCR Master Mix (TOYOBO) を用いてcDNA合成し、定量RT-PCRの鋳型として使用した。定量RT-PCRはTHUNDERBIRD® SYBR® qPCR Mix (TOYOBO) を用いてGfPV1およびGfRV1の遺伝子発現の蛍光強度をChromo 4™ (BioRad) 解析システムで検出した。解析は内部標準遺伝子として、マイタケ細胞のハウスキーピング遺伝子であるグリセルアルデヒド-3-リン酸デヒドロゲナーゼ (Gf. GAPDH: Accession Number AB78111) を用いて行った。ウイルス特異的に結合するプライマーを用いて、ウイルス遺伝子の検出を行った。使用したプライマーを表1に示す。

表1 GfPV1, GfRV1 および GAPDH のプライマー配列

Primer name	Sequence (5' to 3')
GfPV1_CP_QPCR_F4	AGATGGCCCTGTGTCTTACG
GfPV1_CP_QPCR_R4	GGCCATACTGAGCGTTGTTG
GfPV1_RdRp_QPCR_F2	AGTACGATCAGCGTCTACCAAG
GfPV1_RdRp_QPCR_R2	TCATCTTCGGTGAGGTCAGG
GfRV1_RdRp_QPCR_F5	CCACATTCCCTCCAACACTTTC
GfRV1_RdRp_QPCR_R5	GTAAACCGCGAACTAGAGCCTG
Gf-GAPDH_QPCR_F1	ATCGTCGAGGGTCTCATGACTA
Gf-GAPDH_QPCR_R1	GTGGAAGACGGGATGATGTTG

(2) ウイルス再感染株の作出

ウイルスをGf-N2-VFi5に再感染させることで宿主への影響を観察した。

1) 供試菌株

ウイルスドナー側は GfPV1 または GfRV1 感染ハイグロマイシン耐性遺伝子 (+*hph*) 導入株を, レシピエント側には Gf-N2-VFi5 を用いた¹⁸⁾. 各株は PDA 培地で 15 日間培養後, 実験に供試した.

2) 方法

(i) 対峙培養

ウイルスドナーとレシピエントを PDA 培地に 2 cm の距離をおいて植菌し, 25℃, 暗所で対峙培養した¹⁸⁾(図 2). 両菌株の菌糸体が接触したところで, 4℃冷暗所で 10 日間保存した後, レシピエント側を分離, 培養した. 分離, 培養した株はハイグロマイシン添加 PDA 培地に植菌し, 生育しないことを確認した.



図 2 対峙培養

ウイルスドナー (ウイルス感染株 (+*hph*)) とレシピエント (ウイルスフリー株) を対峙培養させ, レシピエント側にウイルスが再感染した株を作出した. ドナー側にハイグロマイシン耐性遺伝子持たせることで, レシピエント側のウイルスフリー株がハイグロマイシン非耐性であることをマーカーとした.

(ii) 定量 RT-PCR によるウイルス遺伝子発現の検出

(1)-2)-(ii) と同様の方法で Total RNA を抽出, cDNA 合成後, 定量 RT-PCR を行い, ウイルス遺伝子発現を検出した.

2.2 シクロヘキシミド添加培地における菌糸伸長測定およびコロニー形態の観察

感染していても無病徴である場合, 生物の生育環境を変化させてストレスを与えると, 感染株・非感染株との間に表現型の差が見出される場合がある¹⁹⁾. そこで, 薬剤添加によるストレスに対する影響を検証するため以下の実験を行った.

1) 供試菌株

ウイルスフリー株 (Gf-N2-VFi5), GfPV1 再感染株 (Gf-N2-VFi5 (Pv)), GfRV1 再感染株 (Gf-N2-VFi5 (Rv)) およびマイタケ正常株 (Gf-N2) を用いた. 各株は PDA 培地で 15 日間培養後, 供試した.

2) 方法

シクロヘキシミドを添加した PDA 培地に各株を植菌し, 菌糸伸長測定およびコロニー形態の観察を行った. 測定及び観察は 3 回実施し, PDA 培地のシクロヘキシミド濃度は, 1 回目は 0.0, 5.0, 10.0, 50.0 (μg/mL) とし, 2 回

目は 1 回目の測定を受けて 0.0, 4.0, 7.5, 10.0, 20.0 (μg/mL), 3 回目は 1, 2 回目の測定から 0.0, 1.0, 2.5, 5.0, 7.5, 10.0 (μg/mL) とした.

(i) 菌糸伸長測定

シクロヘキシミド添加 PDA 培地を入れた φ 90mm プレートの裏面に, 中心を通る直線を 4 本引き, 培養用プレートとした. 培養した供試菌株の PDA 培地をコルクボーラーで約 φ 4mm に打ち抜いたものをディスクとし, 培養用プレートの中心に植菌した. 25℃・暗所で, 1 回目は 20 日間, 2 回目は 25 日間, 3 回目は 20 日間培養した. 伸長した菌糸先端と直線が交わる部分に線を引き, 中心部からの距離 (コロニー半径: mm) を菌糸伸長として, 1, 2 回目は 5 日毎, 3 回目は 1 日毎に測定した (図 3).

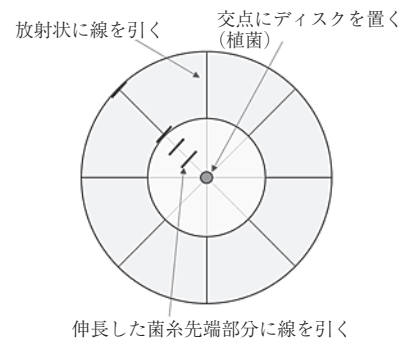


図 3 菌糸伸長 (コロニー半径) 測定

直線の交点に植菌したディスクから外側に向かって伸長する菌糸の先端と培地プレートに記入した直線が交差する位置に線を引き, 菌糸伸長位置とした. 菌糸伸長 (コロニー半径) は直線交点から菌糸伸長位置の距離 (mm) を測定した.

(i)-1 統計処理

菌糸伸長測定により得られた値の平均値と標準偏差を求めた. 平均値の差の検定は統計ソフト R (Ver. 3.4.2) を用い, 1 回目及び 2 回目の測定では一元配置分散分析および多重比較 Tukey 法を用いて検定し有意水準を 5% 未満とした. 3 回目の測定では T 検定を実施し有意水準を 5% 未満とした.

(ii) シクロヘキシミド添加培地における各株コロニー形態の観察

コロニー形態の観察は, 1 回目は 20 日目, 2 回目は 25 日目, 3 回目は 15 日目のコロニー形態を撮影し, 比較・観察を行った.

3. 結果

3.1 ウイルスフリー株およびウイルス再感染株の作出

(1) 菌糸先端分離法によるウイルスフリー株の作出

菌糸先端分離法によりマイタケ正常株 (Gf-N2) からウイルスを除いたウイルスフリー株の作出を行ったところ, 分離した 577 株中 7 株 (生存確率 1.2%) が生育した. こ

の分離株7株中2株 (i5, i6) でウイルスは非検出であった (図4). すなわち, Gf-N2由来ウイルスフリー株 (Gf-N2-VF) は0.3%の確率で作出できた.

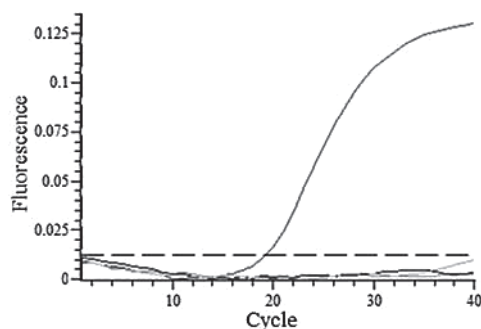


図4 ウイルスフリー株の定量 RT-PCR 蛍光強度

Gf-N2-VF のウイルス遺伝子蛍光強度を示す. 縦軸は蛍光強度, 横軸はPCR サイクル数を示す. 供試したcDNA 鋳型に目的遺伝子がある場合, 図中の赤線: 内部標準遺伝子 (GAPDH) に類似した波形を示す. GAPDH 遺伝子の蛍光強度がPCR サイクル毎に検出されたことから, 供試株がマイタケであったことを示す. GfPV1 および GfRV1 遺伝子発現蛍光強度は測定検出限界以下であったため, ウイルス遺伝子は存在しないことが示された.

(3) 対峙培養によるウイルス再感染株の作出

対峙培養により, GfPV1 再感染株および GfRV1 再感染株の作出を行った. レシピエント側であるウイルスフリー株は, GF-N2-VFi5 を使用した. その結果, レシピエント側に GfPV1 または GfRV1 の遺伝子発現が認められる再感染株が存在した.

GfPV1 感染株 (+hph) との対峙培養によりレシピエント側から分離した16株中9株で GfPV1 が検出された (図5A). また, GfRV1 感染株 (+hph) との対峙培養では, 分離した16株中10株において GfRV1 が検出された (図5B). GfPV1 または GfRV1 再感染株のうち, ドナー側と同レベルのウイルス遺伝子発現を示す株は, GfPV1 再感染株で1株, GfRV1 再感染株では8株であった (図5).

3.2 シクロヘキシミド添加培地における菌糸伸長およびコロニー形態の比較

シクロヘキシミド (CHX) 添加 PDA 培地での培養を3回実施した. 2回目は1回目の実験結果を受けて, 3回目は1, 2回目の実験結果を受けて, PDA 培地へのシクロヘキシミド濃度 ($\mu\text{g/mL}$) を変更して実施した. 実施した全ての回でシクロヘキシミド濃度が高くなるに従い, 供試菌株の菌糸伸長は抑制された.

1回目の菌糸伸長測定では0.0, 5.0, 10.0, 50.0 ($\mu\text{g/mL}$) のシクロヘキシミド添加培地を使用し, 供試菌株を培養した. 菌糸伸長の記録は5日間毎に行い, コロニー形態の観察は培養20日目に実施した. その結果 (図6, 図7), 全ての株でシクロヘキシミド濃度依存的に菌糸伸長が抑えら

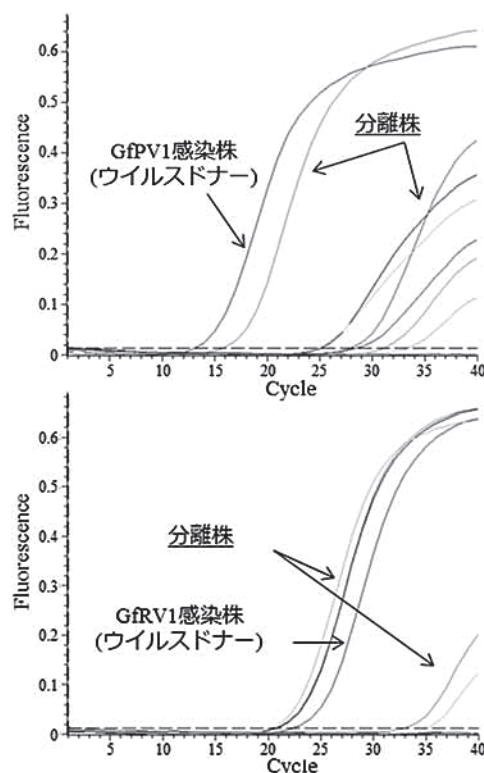


図5 定量 RT-PCR によるウイルス遺伝子発現検出

縦軸は蛍光強度, 横軸はPCR サイクル数を示す. A は GfPV1 再感染株 (分離株), B は GfRV1 再感染株 (分離株) の蛍光強度を示し, 両グラフ中の赤線は各ウイルスドナー株の GfPV1 または GfRV1 の蛍光強度を示す. 赤線以外の波形はウイルス再感染株の GfPV1 または GfRV1 遺伝子蛍光強度の波形を示し, GfPV1 および GfRV1 再感染株が分離株中に存在した.

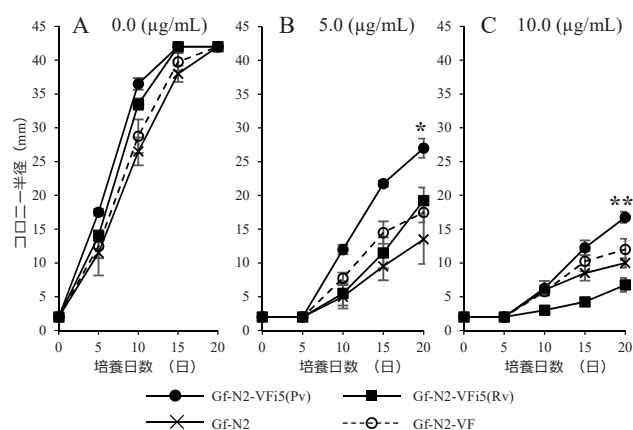


図6 菌糸伸長 (コロニー半径): CHX 培養 (1回目)

A はシクロヘキシミド濃度 0.0 ($\mu\text{g/mL}$), B は 5.0 ($\mu\text{g/mL}$), C は 10.0 ($\mu\text{g/mL}$) での菌糸伸長 (コロニー半径) を示した. 50.0 ($\mu\text{g/mL}$) は測定不可能のため示していない. 5.0 ($\mu\text{g/mL}$) 添加培地では培養20日目で GfPV1 再感染株と他3株との菌糸伸長に有意な伸長差 (* $p < 0.01$) を示し, 10.0 ($\mu\text{g/mL}$) 添加培地でも20日目で有意な伸長差 (** $p < 0.001$) を示した.

れ, 0.0 ($\mu\text{g/mL}$) の培地と比較してコロニー形態は歪んだ形を示した. また, 50.0 ($\mu\text{g/mL}$) では全株とも菌糸伸長は見られず, 測定は不可能だった. しかし, GfPV1 再

感染株 (Gf-N2-VFi5 (Pv)) は他の 3 株と比較して, 5.0 ($\mu\text{g/mL}$) および 10.0 ($\mu\text{g/mL}$) の菌糸伸長は 20 日目において有意に伸長した (図 6). また, コロニー形態は比較的安定した円形で, 寒天培地上に密に気中菌糸が生育したマット状であった (図 7).

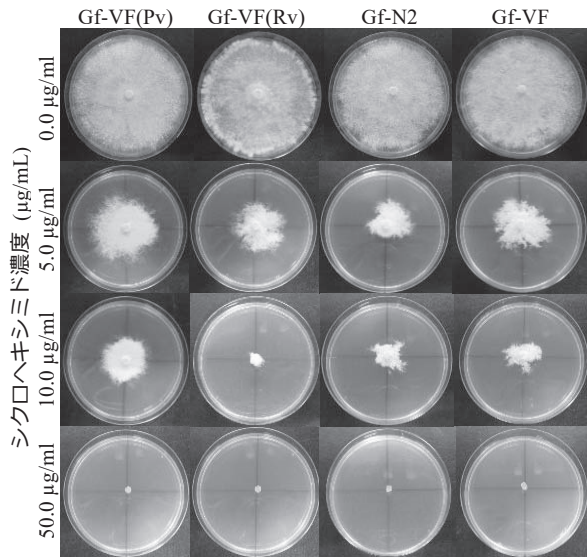


図 7 コロニー形態 : CHX 培養 20 日目 (1 回目)

縦列はシクロヘキシミド濃度を, 横列は各株のコロニー形態を示す. 各株ともシクロヘキシミド濃度依存的にコロニー形態は縮小し, 50.0 ($\mu\text{g/mL}$) ではすべての株でコロニーは形成されなかった. 5.0, 10.0 ($\mu\text{g/mL}$) において, GfPV1 再感染株のコロニー形態は他 3 株よりも歪みの少ない円形を示した.

2 回目の測定では 1 回目の測定を受けて, シクロヘキシミド濃度を変更し, 0.0, 4.0, 7.5, 10.0, 20.0 ($\mu\text{g/mL}$) で実施した. 菌糸伸長の記録は 5 日毎に行い, コロニー形態の撮影は培養 25 日目に実施した. その結果を図 8, 図 9 に示す. 10.0, 20.0 ($\mu\text{g/mL}$) シクロヘキシミド濃度で, 他の 3 株と比較して Gf-N2-VFi5 (Pv) の菌糸伸長は有意に早く (図 8), コロニー形態は他の株よりもマット状であり, 比較的安定した円形を形成していた (図 9). 他の菌株は菌糸伸長, コロニー形態ともにバラつきが大きかった.

3 回目の測定は, 1, 2 回目の測定の結果から Gf-N2-VFi5 (Pv) は高濃度のシクロヘキシミド添加培地でも比較的安定した生育が認められたため, 3 回目の測定はシクロヘキシミド濃度を低濃度から 10.0 ($\mu\text{g/mL}$) まで, 供試菌株を Gf-N2-VFi5 (Pv) とし, 対照に Gf-N2-VF を用いた. 薬剤濃度が低いため, 菌糸伸長の記録を 1 日毎に行い, コロニー形態の撮影は 15 日目に実施した. その結果, 1, 2 回目と同様にシクロヘキシミド濃度依存的に菌糸伸長は緩やかになり, 2.5 ($\mu\text{g/mL}$) の培地で, Gf-N2-VFi5 (Pv) は Gf-N2-VF よりも有意に菌糸が伸長した (図 10).

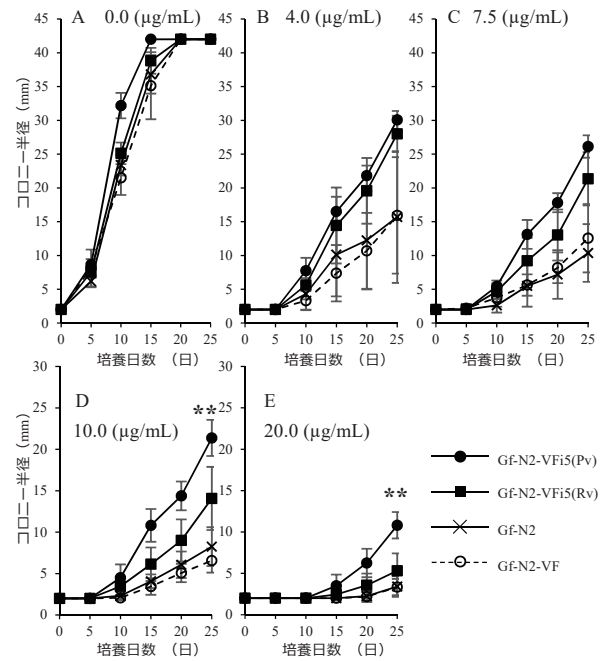


図 8 菌糸伸長 (コロニー半径) : CHX 培養 (2 回目)

A ~ E は各シクロヘキシミド濃度 PDA 培地での菌糸伸長を示す. A: 0.0 ($\mu\text{g/mL}$), B: 4.0 ($\mu\text{g/mL}$), C: 7.5 ($\mu\text{g/mL}$), D: 10.0 ($\mu\text{g/mL}$), E: 20.0 ($\mu\text{g/mL}$). Gf-N2-VFi5 (Pv) はどの培地でも他の株よりも早く伸長し, 10.0, 20.0 ($\mu\text{g/mL}$) 培地での培養 20 日目では, 有意な伸長差 (** p < 0.001) を示した.

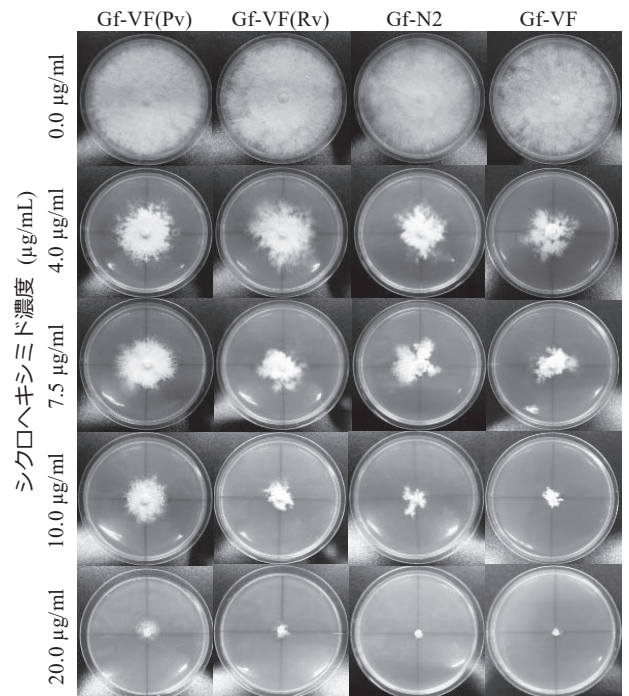


図 9 コロニー形態 : CHX 培養 25 日目 (2 回目)

縦列はシクロヘキシミド濃度を, 横列は各株のコロニー形態を示す. 各株ともシクロヘキシミド濃度依存的にコロニー形態は縮小した. 10.0 ($\mu\text{g/mL}$) においても, GfPV1 再感染株のコロニー形態は他株よりも歪みが少なく円形を示し安定した形態を示した.

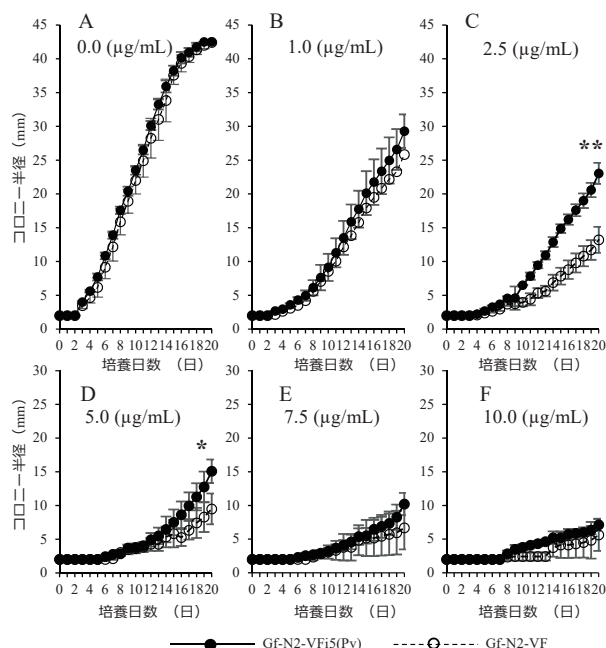


図 10 菌糸伸長（コロニー半径）：CHX 培養（3回目）

図 10A～F は各シクロヘキシミド濃度 PDA 培地での菌糸伸長を示す。A：0.0 (µg/mL)，B：1.0 (µg/mL)，C：2.5 (µg/mL)，D：5.0 (µg/mL)，E：7.5 (µg/mL)，F：10.0 (µg/mL)。培養 20 日目で 2.5 (µg/mL) ** $p < 0.001$ ，5.0 (µg/mL) で * $p < 0.01$ の有意な伸長さであった。

コロニー形態は，2.5 (µg/mL) で Gf-N2-VF よりも Gf-N2-VFi5 (Pv) で大きく，マット状の安定した円形を示した（図 11）。5.0 (µg/mL) で菌糸伸長は 20 日目で Gf-N2-VFi5 (Pv) は Gf-N2-VF よりも有意に菌糸が伸長していたが，1，2 回の実施よりも菌糸伸長は強く抑えられ，コロニー形態もマット状を形成していなかった。3 回目の測定では 5.0，10.0 (µg/mL) は総じて，1，2 回目よりも菌糸伸長は抑制されていた。

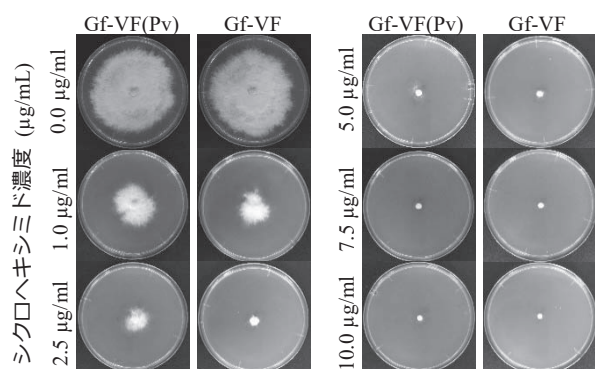


図 11 コロニー形態：CHX 培養 15 日目（3回目）

左側は 0.0～2.5 (µg/mL) のコロニー形態を，右側は 5.0～10.0 (µg/mL) のコロニー形態を示す。シクロヘキシミド濃度依存的にコロニーが縮小していることが示され，2.5 (µg/mL) では Gf-N2-VFi5 (Pv) で明確なコロニー形態の違いが示された。

4. 考察

4.1 ウイルスフリー株およびウイルス再感染株の作出

ウイルスフリー株作出は菌糸先端分離法にて行い，Gf-N2 由来ウイルスフリー株（Gf-N2-VF）を 2 株作出することが出来た。しかし，作出した Gf-N2-VF は菌糸伸長およびコロニー形態について，親株のウイルス感染株（Gf-N2）との差異は示さなかった（図 6 A，図 8 A）。また，対峙培養により，それぞれのマイコウイルスを再感染させた GfPV1 再感染株と GfRV1 再感染株を作出した。

マイコウイルスは菌糸先端分離法や他のウイルス除去方法でも除くことができないウイルスもあり，その場合はミトコンドリアや特定の細胞小器官に局在するウイルスである可能性高いことが報告されている²⁰⁾²¹⁾。本実験では，菌糸先端分離法でウイルスフリー株を作出できたことから，GfPV1 および GfRV1 は特定の細胞小器官に局在していないタイプのウイルスと推測される。

GfPV1，GfRV1 ウイルス再感染株は対峙培養により作出出来たことから，GfPV1 と GfRV1 は感染性のあるウイルスであることが示された。対峙培養の際に用いたマイタケ菌株は細胞質和合性があり，菌糸接合（菌糸融合）による水平伝搬でレシピエント側の株にウイルスが伝搬したものと考えられる²²⁾。ウイルス伝搬を防ぐ宿主側の手立てとして，同じ菌種であっても菌糸接合が起こらない細胞質不和合性である場合は，ウイルスの水平伝搬は起こらないこと，その他に，動物や植物，菌類等の真核生物は，RNA サイレncing と総称される遺伝子発現抑制機構を保持しており，この機構はウイルス防御機構（ウイルス増殖を抑える）であることが知られている²³⁾²⁴⁾。今回の実験では，2 種ウイルスは細胞質和合性のある細胞同士であれば水平伝搬による細胞間での移行が可能であることが示された。一方で，マイタケ正常株および変異株，作出したウイルスフリー株，ウイルス再感染株の各株間で培養至適温度（25℃）培養における菌糸伸長およびコロニー形態の有意な差は認められず，子実体形態においても差はなかったため（data not shown），GfPV1 および GfRV1 はマイタケに無病徴感染（不顕性感染）しているものと結論した。

4.2 シクロヘキシミドによるマイタケウイルス感染株への表現型への影響

薬剤ストレスにより宿主（マイタケ）の生育を制御した培養条件下に置くと，宿主細胞内の機能が変化する。また，通常，ウイルスは宿主の生合成遺伝子群を利用して増殖するので，各種遺伝子群の転写レベルの不均衡によって様々な影響が生じる場合がある。

マイタケの菌糸伸長やコロニー形態は，シクロヘキシミド濃度依存的に形態の縮小，菌糸伸長の遅延が起こったため，シクロヘキシミドによるタンパク質合成阻害²⁵⁾²⁶⁾に

よって、菌糸生育阻害が起こっていることが示された。

1, 2 回目は 4.0 ~ 10.0 (μg/mL) で Gf-VF (Pv) の菌糸伸長は有意に伸長し、コロニー形態の観察でも密に気中菌糸が生育したマット状を示した。また、3 回目の実施でも 2.5 ~ 5.0 (μg/mL) の菌糸伸長測定で、微弱ではあるが有意な差が示された。各実施回で、GfPV1 再感染株において抗生物質であるシクロヘキシミドに対する感受性が低下しているものと考えられた。

抗生物質や抗菌物質に対する耐性機序として、宿主の薬剤排出ポンプの活性が促進されることや膜タンパクの挙動変化により引き起こされることが知られている²⁷⁾。本実験において GfPV1 がシクロヘキシミドによるタンパク質合成阻害機構やマイタケの排出ポンプ、膜タンパク質の挙動に影響を与える可能性があるか、詳細な作用機序の解明が必要である。このウイルス感染によるシクロヘキシミド感受性低下の分子メカニズムについては今後の課題である。

5. まとめ

マイタケの 2 種マイコウイルス感染株から、ウイルスフリー株およびウイルス再感染株を作出した。2 種のマイコウイルスはマイタケ菌糸細胞間で感染性があり、水平伝搬することが示された。また、シクロヘキシミド添加培地で GfPV1 再感染株において有意な生育差が観察され、シクロヘキシミドへの感受性が低下傾向を示した。マイタケにおけるシクロヘキシミド感受性低下の要因が GfPV1 感染により引き起こされたものであるか否かを明確にすることは、ウイルスと宿主の相互関係を知る上で興味深く、今後、更なる検討が必要である。

謝辞

本研究で使用した菌株の提供およびご助言をくださいました雪国まいたけ(株)佐藤真之氏、(株)ハイファジェネシス 内田(土屋)有紀氏、実験にご協力頂きました平成 25 年度卒業生 青池咲季氏、浦澤真奈美氏、平成 26 年度卒業生 深澤絃子氏、東島あおい氏、平成 27 年度卒業生 石橋岬氏、平成 28 年度 修了生 角真理子氏、皆様に深く御礼申し上げます。

参考文献

- 1) Dimitrios Floudas *et al.*, The Paleozoic Origin of Enzymatic Lignin Decomposition Reconstructed from 31 Fungal Genomes., *Science.*, **336**(6089): 1715-1719(2012)
- 2) Kurahashi, A., *et al.*, Analysis of Gene Expression Profiles during Cultivation of *Grifola frondosa*., *Bull. Tokyo Kasei Univ.*, **52**: 17-32(2012)
- 3) Kurahashi, A., *et al.*, Identification of differentially expressed genes in fruiting body mutants of *Grifola*

- frondosa*., *Bull. Tokyo Kasei Univ.*, **54**: 23-33(2014)
- 4) Sato. M., *et al.*, High quality draft genome sequence analysis of the edible mushroom *Grifola frondosa*., *Bull Tokyo Kasei Univ.*, **53**: 17-30(2013)
- 5) Kurahashi, A., *et al.*, Heat shock protein 9 mRNA expression increases during fruiting body differentiation in *Grifola frondosa* and other edible mushrooms., *Mycoscience.*, **55**: 98-102(2014)
- 6) Kurahashi, A., *et al.*, Homologous genes, *Pe.pleurotolysin A* and *Pe.ostreolysin*, are both specifically and highly expressed in primordia and young fruiting bodies of *Pleurotus eryngii*. *Mycoscience.*, **55**: 113-117(2014)
- 7) Kurahashi, A., *et al.*, A putative transcription factor Gf. BMR1 in *Grifola frondosa*, the homolog of BMR1 in *Bipolaris oryzae*, was strongly induced by near-ultraviolet light and blue light., *Mycoscience.*, **56**: 177-182(2015)
- 8) Sato. M., *et al.*, Overexpression of a putative transcription factor Gf.CRZ1 affects the expression of oxalate-degrading genes and causes morphological defects during mycelium formation in *Grifola frondosa*., *Mycoscience.*, **56**: 516-522(2015)
- 9) Sato. M., *et al.*, Development of a transformation system for the edible mushroom *Grifola frondosa*: Demonstrating heterologous gene expression and RNAi-mediated gene silencing., *Mycoscience.*, **56**: 364-372(2015)
- 10) Ghabrial, S., and Suzuki, N., Viruses of plant pathogenic fungi., *Annual Review of Phytopathology.*, **47**: 353-384
- 11) Magae, Y., Molecular characterization of a novel mycovirus in the cultivated mushroom, *Lentinula edodes*., *Virology Journal* 2012, **9**: 60(2012)
- 12) Ha-Yeon Song., *et al.*, Viral Effects of a dsRNA Mycovirus(PoV-ASI2792)on the Vegetative Growth of the Edible Mushroom *Pleurotus ostreatus*., *Mycobiology.*, **44**(4): 283-290(2016)
- 13) Magae, Y., and Sunagawa, M., Characterization of a mycovirus associated with the brown discoloration of edible mushroom, *Flammulina velutipes*., *Virology Journal.*, **7**: 342(2010)
- 14) Chiba, S., *et al.*, A Novel Bipartite Double-Stranded RNA Mycovirus from the White Root Rot Fungus *Rosellinia necatrix*: Molecular and Biological Characterization, Taxonomic Considerations, and Potential for Biological Control., *Journal of Virology.*, **83**(24): 12801-12812(2009)
- 15) 千葉 壮太郎ら: 3. マイコウイルスとヴァイロコントロール, ウイルス, **60**(2): 163-176(2010)
- 16) Chiba, S., *et al.*, Effects of Defective Interfering RNA on Symptom Induction by, and Replication of, a Novel

- Partitivirus from a Phytopathogenic Fungus, *Rosellinia necatrix*., *Journal of Virology*., **87**(4): 2330-2341(2013)
- 17) Lin, Yu-Hsin., *et al.*, A novel quadripartite dsRNA virus isolated from a phytopathogenic filamentous fungus, *Rosellinia necatrix*., *Virology*., **426** : 42-50(2012)
 - 18) Chiba, S., *et al.*, Highly activated RNA silencing via strong induction of dicer by one virus can interfere with the replication of an unrelated virus., *Proc Natl Acad Sci U S A.(PNAS)*, **112**(35): E4911-E4918(2015)
 - 19) Luis M. Marquez, *et al.*, A Virus in a Fungus in a Plant: Three-Way Symbiosis Required for Thermal Tolerance., *SCIENCE*., **315**(26): 513-515(2007)
 - 20) Mahmoud E. Khalifa and Michael N. Pearson., Molecular characterization of three mitoviruses co-infecting a hypovirulent isolate of *Sclerotinia sclerotiorum* fungus., *Virology*., **441** : 22-30(2013)
 - 21) Chiba S., *et al.*, A Novel Victorivirus from a Phytopathogenic Fungus, *Rosellinia necatrix*, Is Infectious as Particles and Targeted by RNA Silencing., *Journal of Virology*., **87**(12): 6727-6738
 - 22) 鈴木 信弘 : 2. マイコウイルス宿主としてのクリ胴枯れ病菌～知られざるマイコウイルスの世界を紐解く新たな解析ツール～, ウイルス, **64**(1) : 11-24(2014)
 - 23) 志村 華子 : 3. 植物の RNA サイレncing とウイルスの病徴誘導, ウイルス, **62**(1) : 19-26(2012)
 - 24) Nuss,D. L., Mycoviruses, RNA silencing, nad viral RNA recombination. *Adv Virus Rse* **80** : 25-48(2011)
 - 25) Nicolas Garreau de Loubresse *et al.*, Structural basis for the inhibition of the eukaryotic ribosome., *Nature*., **513** : 517(2014)
 - 26) Sebastian Klinge *et al.*, Crystal Structure of the Eukaryotic 60S Ribosomal Subunit in Complex with Initiation Factor 6., *SCIENCE*., **334**(6058): 941-948(2011)
 - 27) Rajendra Prasad and Snehlata Panwar., Physiological functions of multidrug transporters in yeast., *Current Science*., **86**(1):62-73(2004)