

《温故知新プロジェクト》

食用キノコの子実体形成にウイルス感染が果たす役割についての研究 (2)

小松あき子^{*1, #} 佐藤真之^{*1, 2, 3, #} 近藤秀樹^{*4} 角真理子^{*1} 土屋有紀^{*2} 倉橋 敦^{*3}
西堀耕三^{*3} 鈴木信弘^{*4} 藤森文啓^{*1, 2, §}

Functional Analysis of Viral Infection in the Fruit-Body
Formation of Edible Mushroom (2)

Akiko KOMATSU^{*1, #}, Masayuki SATO^{*1, 2, 3, #}, Hideki KONDO^{*4}, Mariko SUMI^{*1}, Yuki TSUCHIYA^{*2},
Atsushi KURAHASHI^{*3}, Kozo NISHIBORI^{*3}, Nobuhiro SUZUKI^{*4}, and Fumihito FUJIMORI^{*1, 2, §}

1. はじめに

キノコ（担子菌）は食品や食品加工のほか、工業用酵素などに利用できる生物資源である。現在、食用キノコの多くは栽培方法が確立され、オガ粉を用いた菌床栽培により施設内での大規模生産が行われているが、子実体の形成に関するメカニズムはあまり知られていない。当研究室ではマイタケ（*Grifora frondosa*）を材料にキノコの子実体形成のメカニズム解明を目指し、遺伝子レベルでの解析を行っている^{1)~5)}。これまでに、マイタケゲノム情報を取得するとともにトランスクリプトーム情報を得てマッピングしたところ、ゲノムデータにマッチングしない約800の配列の断片を見いだしてきた。そのデータ中に、新規ウイルス *Grifora frondosa partitivirus 1* (GfPV1) と ourmiavirus 様配列 (*Grifola frondosa ourmia-like virus*: GfOLV と仮称) の2種のウイルスを見いだしたので、その機能解析を行っている。

両ウイルスの発現様式の特徴として、マイタケ正常 (Gf-N2) には GfPV1 の遺伝子発現量 (ウイルス蓄積量もリンクすると推定) が高く、マイタケ変異株 (Gf-A1) には GfOLV の遺伝子発現量が高い傾向を示すことが判明している。2種のウイルスについて遺伝子発現プロファイルが異なる傾向を示していることから、これらのウイルスがマイタケ内の遺伝子群やタンパク質群に対してどのような制御を行い、最終的に形態形成に影響を与えるのかを解明するため GfPV1 と GfOLV のフリー株を得て解析したので報告する。

2. マイタケから見いだされた ourmiavirus 様配列 (GfOLV) の性状解析

1) GfOLV の全長配列決定および相同性解析

GfOLV の特徴づけを行うため、GfOLV の全長配列決定と相同性解析を行った。

(1) 方法

(i) 実験試料

PDA 培地で約15日間培養した、マイタケ M51 株由来の変異株 (Gf-A1) 菌糸体 (図1C および D) を実験試料とした。

(ii) RNA 抽出

正常株および変異株菌糸体 (図1A および B) からの RNA 抽出は RNAzol[®] RT Reagent (Molecular Research Center, Inc.) を用いて行った。すなわち、液体窒素で磨砕した菌糸体と RNAzol[®] RT Reagent 500 μ L を混合し均一になるように攪拌後、約10分間室温で静置し遠心分離 (12,000 $\times g$, 15 min, 25 $^{\circ}$ C) を行った。遠心分離後の上澄 500 μ L に 75% エタノール 200 μ L を添加し攪拌し、10分

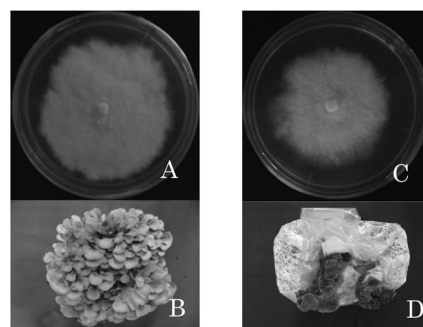


図1 マイタケ菌糸体および子実体の形態

A: マイタケ正常株子実体から得た菌糸系統 (正常株菌糸体) のコロニー (Gf-N2)

B: マイタケ正常株子実体 (Gf-N2)

C: マイタケ変異株子実体から得た菌糸系統 (変異株菌糸体) のコロニー (Gf-A1)

D: マイタケ変異株子実体 (Gf-A1)

These authors contributed equally to this work.

*1 東京家政大学 (Tokyo Kasei University)

*2 株式会社ハイファジェネシス (HyphaGenesis Inc.)

*3 株式会社雪国まいたけ (Yukiguni Maitake Co., Ltd.)

*4 岡山大学資源植物科学研究所 (Institute of Plant Science and Resources, Okayama University)

§ Corresponding (fujimori@tokyo-kasei.ac.jp)

間静置後、遠心分離 ($1,200\times g$, 8 min, 25°C) を行った。その後、上澄を除き RNA 沈殿物に 75% エタノール $800\ \mu\text{L}$ を添加し遠心分離 ($8,000\times g$, 5 min, 25°C) を行った。この操作を再度繰り返し、RNA 沈殿物を洗浄した。RNA 沈殿物を乾燥させ、Distilled Water (D.W.: DNase, RNase Free water) で RNA 沈殿物を溶解し RNA 溶液とした。

(iii) 配列末端領域の同定 (RACE 法)

SMARTerTM RACE cDNA Amplification Kit (Clontech) を用い、抽出した Total RNA を鋳型に cDNA を合成、RACE 法を行い、配列末端を同定して GfOLV の全長配列を決定した。相同性解析には BLAST 解析および最尤法による分子系統解析を行った。

(2) 結果

(i) 全長配列の決定および配列の相同性解析

ウイルス RNA の末端領域の配列を同定するため、ourmiavirus 様配列の断片 (305 bp) をもとに RACE 法を行い、全長を決定した。図2より、GfOLV の推定 RNA dependent RNA polymerase (RdRp) の全長配列は 2,487 塩基 (nt) であり、GfOLV 全長配列の ORF (338~2,248 nt) は 636 aa のタンパク質をコードすることが判明した。BLASTp 解析から、Cassava virus C (ourmiavirus) の RdRp と 23% (Expect=8e-04) の相同性が認められた。最尤法による分子系統解析 (図3) から GfOLV は植物

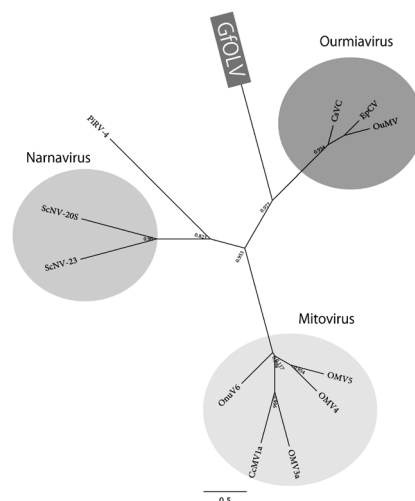


図3 GfOLV および既知ウイルスの分子系統解析

RNA ウイルスである ourmiavirus (粒子を持つ) に最も近縁で、Capsid Protein (CP) を持たない酵母の narnavirus や菌類のミトコンドリアに存在する mitovirus に比較的近縁であった。

(3) 考察

マイタケから発見された GfOLV は ourmiavirus に最近縁のウイルスであることが推測された。植物に感染している既存の ourmiavirus は 3 粒子性の + 鎖 RNA を持つ桿菌状のウイルス粒子⁶⁾ として存在するが、GfOLV では RdRp 以外の他の分節やウイルス粒子の存在は不明である。また、GfOLV ゲノム末端におけるポリ A 配列の有無は解析中である。近縁種である narnavirus と mitovirus は粒子を持たず RNP 複合体で存在⁷⁾ し、ゲノム末端にポリ配列を持たないが、mitovirus においてはポリ A を有するものも存在するため⁸⁾、GfOLV がポリ A を有する場合は mitovirus に近縁とも考えられる。

GfOLV の解析にはさらなる検討を要する。

3. GfPV1、GfOLV の温度による増殖特性および GfPV1・GfOLV 再感染株の取得

1) 培養温度によるウイルス遺伝子発現量の違い

2 種ウイルスの単独感染株を用いて培養温度を変化させた場合の両ウイルスの遺伝子発現量 (ウイルス蓄積量) の違いを測定・検討した。

(1) 方法

(i) 実験試料

GfPV1 単独感染株 (Gf-N2)、GfOLV 単独感染株 (Gf-A1) を用いた。

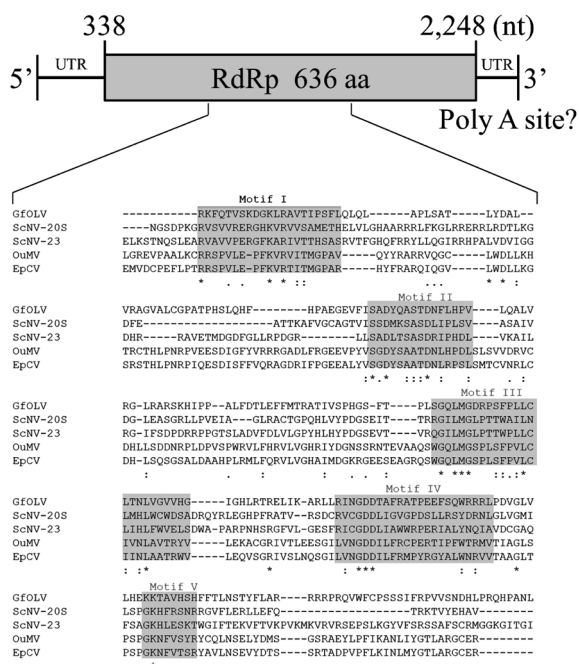


図2 GfOLV のゲノム構造と RdRp 配列のアミノ酸配列のアライメント: ourmiavirus と narnavirus の RdRp モチーフに対応する領域が確認された。

(ii) 培養

PDA 培地に各株を植菌し、25℃・暗所で10日間培養した。その後、4℃および25℃（共に暗所）に移動し、5日間、10日間、20日間の培養期間で培養した。

(iii) ウイルスチェック

培養した株の菌糸体を用いて GfPV1 および GfOLV の遺伝子発現をリアルタイム RT-PCR 法にて検出した。

各株の菌糸体を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、RNAzol® RT Reagent で Total RNA を抽出した。抽出した RNA から、ReverTra Ace® qPCR RT Master Mix (TOYOBO) を用いて cDNA を合成し、THUNDERBIRD® SYBR® qPCR Mix (TOYOBO) を用いて GfPV1 の RdRp および CP、GfOLV の RdRp の遺伝子発現を Chrome 4™ (BIORAD) 解析システムで測定した。

(2) 結 果

温度を変化させて培養した場合のウイルス遺伝子発現量の差異を正常株 (Gf-N2) 変異株 (Gf-A1) の2株について行った。

各株ともに培養期間ごとに培養温度25℃のウイルス遺伝子発現量を1とした場合の培養温度4℃のウイルス遺伝子発現量をウイルス遺伝子相対発現量として算出した。

ウイルス遺伝子発現量は

$\Delta Ct = (\text{各株の GfPV1 または GfOLV の Ct 値})$

$-(\text{各株の Gf.GAPDH の Ct 値})$

$\Delta \Delta Ct = (\text{各株の } \Delta Ct)$

$-(\text{各々の培養期間ごとの 25℃ 培養株の } \Delta Ct)$

の式で得られた $\Delta \Delta Ct$ 値を $2^{-\Delta \Delta Ct}$ に代入し、算出した。

GfPV1 が感染している正常株 (Gf-N2) は培養温度が低下すると GfPV1 の RdRp 遺伝子発現量も低くなる傾向を示した。CP (Capsid Protein) も同様の傾向であった。4℃培養での GfPV1 遺伝子 (RdRp) 発現量は25℃培養と比べて、5日間培養で0.54倍、10日間培養で0.75倍、20日間培養で0.89倍となった。4℃での培養期間が長くなると25℃培養のウイルス遺伝子発現量に近づく傾向であった。

GfOLV が感染している変異株 (Gf-A1) および GfOLV 再感染株は培養期間にかかわらず、25℃で培養した株よりも4℃で培養した株の GfOLV 遺伝子発現量は高くなる傾向を示した。変異株 (Gf-A1) の遺伝子発現量では5日間4℃培養で25℃培養の3.78倍、10日間培養では56.89倍、20日間培養では30.48倍と顕著に高い相対値となった。

GfPV1 は低温下細胞内での増殖は変化が見られないまたは抑制傾向を示すが、GfOLV は低温下においてウイル

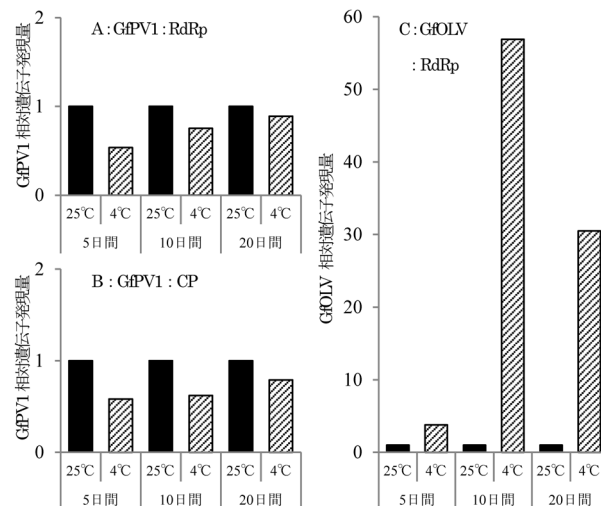


図4 異なる培養温度によるウイルスの相対遺伝子発現量の違い
A: GfPV1: RdRp 相対遺伝子発現量
B: GfPV1: CP 相対遺伝子発現量
C: GfOLV: RdRp 相対遺伝子発現量

ス増殖が増大する傾向を示した (図4)。

(3) 考 察

25℃培養および4℃培養の菌糸体より得たウイルス遺伝子の相対的発現量は、25℃培養と比較して4℃培養で GfPV1 では若干の低下を示し、GfOLV では顕著な増加を示した。

感染宿主が低温下にさらされることにより宿主の細胞機能が低下しウイルスが感染・増殖に変化をもたらす場合と、ウイルスの温度感受性に直接作用してウイルスの増殖速度が増大する場合があります。植物ウイルスにおいてもウイルスが増殖しやすいまたは、増殖しにくい温度範囲が存在する⁹⁾。これらのことから、宿主であるマイタケの細胞機能が低下し GfOLV が増殖した、または GfOLV はマイタケ細胞内で低温環境が遺伝子スイッチとして作用し、GfOLV 増殖速度が速くなり、遺伝子発現量が増加したのではないかと考えられる。

2) 2 種ウイルスの対峙培養による GfPV1・GfOLV 再感染株の作出

GfPV1 単独感染株または GfOLV 単独感染株と正常株 (Gf-N2) 由来ウイルスフリー株を対峙培養して、両株の菌糸を接触させ、ウイルスフリー株側にウイルスが感染するのかを調べた。ウイルス感染株にはハイグロマイシン耐性遺伝子 (+hph) を導入した組換え体を用いることでウイルスフリー株と区別ができるようにした。

(1) 方 法

(i) 実験試料

ウイルスドナー側は GfPV1 感染株組換え体 (+*hph*)、GfOLV 感染株組換え体 (+*hph*) を、レシピエント側はウイルスフリー株を用いた。

(ii) 対峙培養 (図5)

ウイルス感染株 (GfPV1 単独感染株、GfOLV 単独感染株) とウイルスフリー株を 2 cm の距離をおいて PDA 培地に植菌し、25℃、暗所で対峙培養した (図5)。両菌株の菌糸が接触したら (植菌から約7日目)、4℃の冷暗所に移した。4℃冷暗所で約20日間保存したのち、ウイルスフリー株側のコロニーを分離、培養した (図5)。各々の株で対峙培養は2回行い、GfPV1 単独感染株組換え体 (+*hph*) × ウイルスフリー株：合計16サンプル、GfOLV 単独感染株組換え体 (+*hph*) × ウイルスフリー株：合計16サンプル分離培養した。

分離、培養した株は再度ハイグロマイシン入り PDA 培地に植菌し、生育しないことを確認した。

(iii) ウイルスチェック

培養した分離株を用いて GfPV1 および GfOLV の遺伝子発現をリアルタイム RT-PCR 法にて検出した。

各株の菌糸体を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、RNAzol® RT Reagent で Total RNA を抽出した。抽出した RNA から、ReverTra Ace® qPCR RT Master Mix (TOYOBO) を用いて cDNA を合成し、THUNDERBIRD® SYBR® qPCR Mix (TOYOBO) を用いて GfPV1 の RdRp および CP、GfOLV の RdRp の遺伝子発現を Chrome 4™ (BIORAD) 解析システムで測定した。

(2) 結 果

図6 A, B より、GfPV1 単独感染株と GfOLV 単独感染株をウイルスフリー株と対峙培養した結果、ウイルスフリー株側から GfPV1 または GfOLV の遺伝子発現が認められる株が存在した。

GfPV1 感染株との対峙培養により、レシピエント側分離株16株中9サンプルで GfPV1 が検出された。このうち、1株はウイルスドナー側と同等の GfPV1 遺伝子発現を示したが、8株はウイルスドナー側の GfPV1 発現よりも低くなった。残りの7株においてウイルスは検出されなかった (表1)。また、GfOLV 感染株との対峙培養ではレシピエント側の分離した16株中、10株において GfOLV が検出された。このうち、8株にウイルスドナー側と同等の GfOLV 発現が認められた、2株でウイルスドナー側の遺伝子発現よりも低くなった。残り6株では GfOLV は不検出であった。

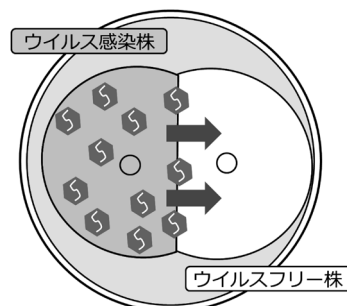


図5 対峙培養

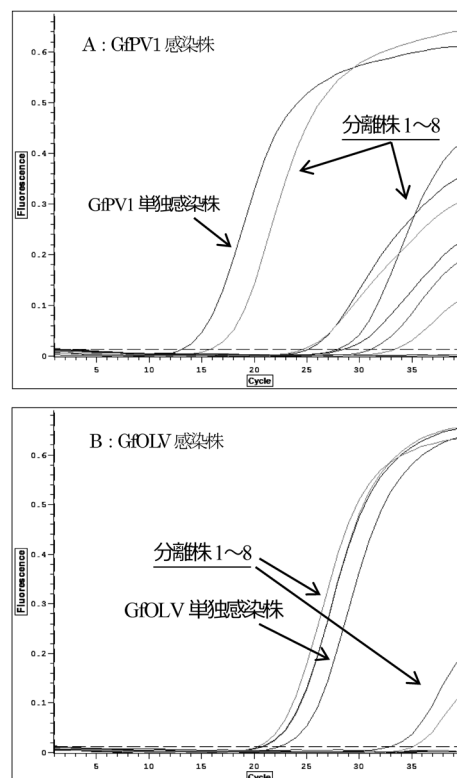


図6 リアルタイム RT-PCR によるウイルス遺伝子発現の測定
A : GfPV1 感染分離株および GfPV1 単独感染株測定結果
B : GfOLV 感染分離株および GfOLV 単独感染株測定結果

(3) 考 察

ウイルスフリー株を用いた対峙培養実験の結果 (リアルタイム RT-PCR) から、マイタケから発見された GfPV1 および GfOLV はレシピエント側への移行が確認され、GfPV1 および GfOLV の再感染株作出 (ウイルス感染性の証明) に成功した。

また、表1から、GfOLV 再感染株において分離株のうち半数の8株 (50%) で GfOLV ドナー側と同等のウイルス遺伝子発現を示したが、GfPV1 再感染株では1株 (6%) のみの結果となった。3. 1) の結果から4℃で保管している間に GfOLV の遺伝子発現量 (GfOLV の蓄積量) が増大したと考えられる。植物や菌類には RNA サイレンシング

表1 GfPV1および GfOLV の再感染株取得

ウイルスドナー (+hph)	×	レシピエント	ウイルスドナーと同等 のウイルス発現を検出	ウイルス発現は検出された が、ウイルスドナーより発現 は低い	ウイルス不検出
GfPV1 感染組換え体 (GfPV1+, GfOLV-)	×	ウイルスフリー株	1 (6%)	8 (50%)	7 (44%)
GfOLV 感染組換え体 (GfPV1-, GfOLV+)	×	ウイルスフリー株	8 (50%)	2 (12%)	6 (38%)

グによる宿主ウイルス感染防御機構（ウイルス増殖を抑える）が存在している^{10), 11)}。また、植物や一部の菌類ウイルスでは RNA サイレンシングを回避する働きを示す RNA サイレンシングサプレッサーをコードし、植物ではその RNA 分解を阻止する機構も多くの研究が行われている¹²⁾。マイタケの菌体細胞内においても、両ウイルスに対し RNA サイレンシングが発動し標的になっているか、さらにその場合、ウイルス側はどのように RNA サイレンシングによる抑制機構をかいくぐっているのか、今後、詳細な実験を行う必要がある。

4. ま と め

以上から、マイタケから発見された ourmiavirus 様ウイルス (GfOLV) はゲノム末端の配列解析により全長が決定され、さらに、分子系統解析から植物に感染する ourmiavirus に最も近縁であることが判明した。しかし、既に述べたように、植物に感染する ourmiavirus は桿状粒子を持つ分節ウイルス型のウイルスで、GfOLV (現段階では粒子を形成しないと推定) とは明らかに異なる。さらに、GfOLV は RdRp のゲノム RNA のほかに分節は見つかっていない。また、転写物解析で発見された経緯から、ゲノム末端のポリ A 配列が存在するか否かは興味を持たれ、現在解析中である。もし GfOLV がポリ A 配列を有する場合は mitovirus 同様、菌類ウイルスのゲノム構造 (3' 末端配列) の多様性を示す興味深い事例となる。

培養温度試験から GfOLV は 4℃ の低温域においてウイルス遺伝子発現量 (蓄積量) が増加する傾向を示したが、GfPV1 には同様の傾向は確認できなかった。また、ウイルス再感染試験では、菌糸融合により GfPV1 と GfOLV はレシピエント株へ移行し、両者の感染性が確認された。GfOLV 再感染株は 50% でドナー側と同等のウイルス蓄積を示したのに対し、GfPV1 再感染株の場合では 6% であった。低温域における GfOLV の蓄積量増大の宿主要因 (RNA サイレンシング等のウイルス防御機構を想定) については、今後 GfPV1 と対比しながら解明を進められると考える。

GfPV1 は対峙培養試験により感染性を示したことから、

ウイルス粒子を持つマイタケに存在する新規 partitivirus 種 (植物・菌類 2 本鎖 RNA ウイルス) であると断定した。

マイタケ宿主のウイルスに対する防御機構の詳細や、ウイルス感染が宿主遺伝子 (群) の発現パターンへどのように影響するかについての検証、および宿主の形態や遺伝子学的視点から検証する必要がある。このような解析によって、最終的にはマイタケの子実体形成メカニズムの解明につなげたい。

文 献

- 1) Kurahashi Atsushi, Fujimori Fumihiko, and Nishibori Kozo: Analysis of gene expression profiles during cultivation of *Grifola frondosa*. *The Bulletin of Tokyo Kasei University*, **52**(2), 17–32 (2012).
- 2) Sato Masayuki, Kurahashi Atsushi, Ezaki Masahiro, Takeda Aya, Uemura Yasuo, Nishi Tatsunari, Nishibori Kozo, and Fujimori Fumihiko: High quality draft genome sequence analysis of the edible mushroom *Grifola frondosa*. *The Bulletin of Tokyo Kasei University*, **53**(2), 17–30 (2013).
- 3) Kurahashi Atsushi, Sato Masayuki, Kobayashi Toshihide, Nishibori Kozo, and Fujimori Fumihiko: 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**(2), 113–117 (2014).
- 4) Kurahashi Atsushi, Sato Masayuki, Nishibori Kozo, and Fujimori Fumihiko: Heat shock protein 9 mRNA expression increases during fruiting body differentiation in *Grifola frondosa* and other edible mushrooms. *Mycoscience*, **55**(2), 98–102 (2014).
- 5) Kurahashi Atsushi, Sato Masayuki, Nishibori Kozo, and Fujimori Fumihiko: Identification of differentially expressed genes in fruiting body mutants of *Grifola frondosa*. *The Bulletin of Tokyo Kasei University*, **54**(2), 23–33 (2014).
- 6) M. Rastgou, M. K. Habibi, K. Izadpanah, V. Masenga, R. G. Milne, Y. I. Wolf, E. V. Koonin, and M. Turina: Molecular characterization of the plant virus genus Ourmiavirus and evidence of inter-kingdom reassortment of viral genome segments as its possible route of origin. *Journal of General Virology*, **90**, 2525–2535 (2009).

- 7) Viral Zone Narnavirus, http://viralzone.expasy.org/viral-zone/all_by_species/303.html (Accessed 27 Nov. 2013)
- 8) Jiatao Xie and Said A. Ghabrial: Molecular characterization of two mitoviruses co-infecting a hyovirulent isolate of the plantpathogenic fungus *Sclerotinia sclerotiorum*. *Virology*, **428**(2), 77–85 (2012).
- 9) 平井篤造 編集：改訂版 新編 植物ウイルス学. pp. 248–253, 養賢堂 (1988).
- 10) 峯 彰、奥野哲郎：ウイルスと RNA サイレンシング. ウィルス, **58**(1), 61–68 (2008).
- 11) Sotaro Chiba, Yu-Hsin Lina, Hideki Kondoa, Satoko Kanematsub, and Nobuhiro Suzuki: Effects of defective interfering RNA on symptom induction by, and replication of, a novel partitivirus from a phytopathogenic fungus. *Rosellinia Necatrix*, **87**(4), 2330–2341 (2013).
- 12) 志村華子, 増田 税：植物の RNA サイレンシングとウイルスの病徴誘導. ウィルス, **62**(1), 19–26 (2012).