

3. マイコウイルスとヴァイロコントロール

千葉 壮太郎¹⁾・近藤 秀樹¹⁾・兼松 聡子²⁾・鈴木 信弘¹⁾

1) 岡山大学資源植物科学研究所 植物・微生物相互作用グループ

2) 農業・食品産業技術総合研究機構 果樹研究所

マイコウイルス（菌類ウイルス）は菌類の主要な分類群から広く報告されている。特に近年のウイルス探索の結果、新しいマイコウイルスが次々と報告され、新規のウイルスゲノム構造、遺伝子発現様式、粒子構造の発見を齎した。また、同時にウイルスの多様性、進化の理解へと繋がった。マイコウイルスの多くは2本鎖RNAをゲノムにもつ球形ウイルスであるが、粒子化されない1本鎖RNAウイルスも多く見つっている。自然界では、マイコウイルスは宿主菌の細胞分裂、細胞融合、胞子形成により水平・垂直伝搬するが、細胞外からの伝搬・侵入経路は知られていない。マイコウイルスの多くは無病徴感染をするが、一部のウイルスは宿主菌に病徴を惹起し、巨視的表現型の変化を齎す。マイコウイルスが植物病原菌の病原力を低下させる場合は、ウイルスを利用した生物防除（ヴァイロコントロールと提唱）が試みられている。ヨーロッパではクリ胴枯病菌のヴァイロコントロールの成功例があり、一方、日本でも果樹の白紋羽病菌を標的としたヴァイロコントロールが試みられている。本稿では、マイコウイルスの一般的性状を概説し、ヴァイロコントロール、さらにはそれに関するウイルスについて紹介する。

はじめに

マイコウイルス(菌類ウイルス)の発見は植物ウイルス、動物ウイルス、あるいは細菌ウイルスに比べ大きく遅れた^{5, 33, 34)}。植物ウイルスがウイルスそのものの概念の確立に貢献したのは、19世紀後半であり、動物ウイルスが発見されたのもそれから数年後のことであった。菌類ウイルスが初めてマッシュルームから発見されたのは、約半世紀後の20世紀半ばである⁴²⁾。この発見の遅れを含む様々な理由で^{5, 34)}、マイコウイルスの研究は立後れてきたが、最近の進展には目を見張るものがある。菌類ウイルスの研究はいくつかの大きな流れがある。1つは50～60年代のマイコウイルス学の幕開けとされる培養キノコからのウイルスの発見とそれに続く研究である。培養可能な食用キノコに感染し、商品

価値の低下を齎すウイルスの研究は現在も行われている。2つ目は、50～60年代の主に *Penicillium* 属菌に感染するウイルスの研究である⁵⁾。これら一連の研究はウイルスというよりもインタフェロンを誘導（自然免疫応答を促進）する物質2本鎖(ds)RNA（マイコウイルスのゲノム）の研究であった。3つ目は、70年代初頭にイネいもち病菌から球状ウイルス（病原糸状菌ウイルスとして初めて）が発見されたが⁹⁸⁾、それに端を発した植物病原菌に感染するウイルスの研究である。実は植物病原糸状菌に感染するウイルスは、それ以前に伝染性因子として数種の糸状菌で知られていた^{32, 91)}。その一つでもあるハイポウイルス（菌類ウイルスの一種）の研究がこの研究の流れに勢いを付けた。ハイポウイルスはクリ胴枯病菌のクリに対する病原力を低下させ（ハイポウイルス）、それが実際に野外でクリ胴枯病菌のヴァイロコントロールに貢献している³⁸⁾。後で詳しく述べるが、我々の提唱するヴァイロコントロール(virological + control)は、ウイルスを用いた生物防除を意味する(広義)。このクリ胴枯病菌/ハイポウイルスの系が引金となって、様々な植物病原菌での生物防除因子と成りうるウイルスの探索が行なわれてきた。これらの宿主菌類のウイルス感染率は数%から高い場合で80%にまでなる。一連のマイコウイルスの研究は、ウイルス多様性と進

連絡先

〒710-0046 岡山県倉敷市中央2丁目20-1
岡山大学 資源植物科学研究所
TEL: 086-434-1230
FAX: 086-434-1232
E-mail: nsuzuki@rib.okayama-u.ac.jp

化の理解, ウイルス構造学, ウイルス/宿主相互作用解析に大きく貢献している. また, 忘れてならない研究は, 1963年のキラー現象の発見に始まり, それ以降の *Saccharomyces cerevisiae* に感染するウイルスの分子生物学的研究である^{26, 93}. 特にトティウイルス (サテライト RNA がキラー因子), ナルナウイルス (後述) の複製機構, ウイルス遺伝子発現機構, 粒子構築機構, 複製に関与する宿主因子の先駆的研究がなされている. 最近では, *S. cerevisiae* を植物ウイルス^{47, 61}あるいは動物ウイルス⁶²の人工的宿主として用いて, 複製, 宿主因子の解析に利用する研究が盛んである.

本稿では, マイコウイルスの紹介を兼ねて一般的なウイルス性状と分類を概説し, さらにヴァイロコントロールの取り組みと関連するウイルスの複製・病徴発現について紹介する. 尚, 紙面の都合上, すべての内容を細かく紹介できないため, 興味をもたれた方は他の総説^{33, 34, 41, 64, 67, 82, 97}を参照されたい.

I. マイコウイルスの一般的性状

ウイルスは各々特徴 (クセ) があるが, マイコウイルスに共通の大きな特徴は細胞外から宿主細胞への侵入経路がないと言われている点であろう. マイコウイルスの伝搬様式は数種類に限られる. 一つは菌糸融合に伴う水平伝搬である. この伝搬は, 一部例外もあるが宿主個体が同種でしかも菌糸融合群が同一 (細胞質和合性) の菌糸間でのみ可能である. 細胞質和合性, 不和合性は遺伝学的に規定されており, 異なる菌糸融合群の菌体間では自己・非自己の認識による細胞質不和合性細胞死が起り, ウイルスの伝搬は起り難い. 無性胞子を通じた垂直伝搬は頻繁におこるが, その伝搬効率はウイルスと宿主の組み合わせで大きく異なる^{80, 84}. 一方, 有性胞子を通じた伝搬がおこるかどうかは宿主菌により決る. ウイルスの担子胞子伝搬はキノコでは起るが, 植物病原糸状菌 (*Helicobasidium mompa*) では起らない. 酵母 (子のう菌) 感染性ウイルスは高率に子のう胞子に伝搬されるが, 高等な糸状菌 (子のう菌) では子のう胞子形成過程でウイルスが除去される. また, 酵母のウイルスは出芽・分裂でも伝搬する. このように, マイコウイルスの伝搬は細胞内の経路に限られる. 菌糸には細胞壁があり, 細胞外からウイルスを処理しても感染せず, 媒介生物の存在も知られていない. 人為的には, ウイルス精製粒子, 感染性ウイルス核酸を単細胞化したプロトプラストの中に導入することで, 感染させる手法が開発されている. 感染性相補鎖 DNA (cDNA) の合成は *Diaporthe RNA virus*⁶⁰, ハイポウイルス科^{7, 8, 10}, ナルナウイルス科^{19, 21}のメンバーで成功している. 再現性の良い粒子導入は, 初め, 2004年にマイコレオウイルス^{40, 73}で成功し, その後パーティティウイルス科⁷⁵, メガビルナウイルス科⁹のメンバーで成功した. 一般的には, 植物ウイルスあるいは動物ウイルスのようにマイコウイルスを機械的に接種すること

は困難である. 検定宿主個体あるいは培養細胞でウイルスの生物検定を行なうこともできない.

マイコウイルスの自然宿主範囲は分離された宿主菌と同種あるいは近縁の種に限られると考えられる. しかし, 実験宿主はそれよりも広いことが様々なマイコウイルスで明らかになっている^{49, 74}. また, 同一のウイルス (90%以上のゲノム塩基配列相同性を示す) が分類学的 (綱のレベル) に大きく異なる子のう菌 *Sclerotinia homoeocarpa*, *Ophiostoma novo-ulmi* から分離されている. このことから, マイコウイルスの自然宿主は考えられているより広いこと, また, 媒介生物あるいは未知の水平伝搬機構の存在が示唆されている.

多くのウイルスが多くの宿主菌から報告されているが, 大部分は不顕性感染をし, 宿主の巨視的表現型を変えるウイルスの例は少ない. 従って, 後述するヴァイロコントロール因子に成りうるウイルスはむしろ例外的と言える. 宿主の表現型の変化 (病徴) は様々で, 宿主菌の生育の低下, 胞子形成の低下, 色素形成の低下, 病原力の低下 (宿主菌が植物病原性の場合) (植物病原菌/マイコウイルスの系で「病原力」あるいは「ヴィルレンス」は菌の植物に対する病原力を意味し, ウイルスの菌に対する病原性を意味するものではない), マイコトキシン産生による選択優位性の付与, などが上げられる. これらの変化は宿主菌の遺伝子発現の変化を伴っている. 限られた系ではあるが, トランスクリプトームの約13%の発現変化を伴うことが報告されている¹. 一部を除いて, 病徴決定に関わる宿主因子, ウイルス因子は明らかになっていない.

II. マイコウイルスの分類

この地球上には, 種として知られている10万を超える菌類の他に未同定あるいは未報告のものも含めると, 菌類は150万種以上存在すると言われている³⁷. 一方, 菌類に感染するウイルス (データベースにゲノム配列のみが報告されている種を含む) は高々200種程度である. しかし, 近年植物病原糸状菌などから続々と新種のウイルスが発見されている^{3, 6, 9, 55, 95}ことから, 菌類にも多様なウイルスの世界が広がっていることは想像に難くない.

表1はマイコウイルスの代表種を纏めたものである. ウイルスの探索が細胞内にはほとんど存在しない dsRNA を指標に行われてきたため, 大半は2本鎖あるいは1本鎖 RNA をゲノムに持つウイルスである. マイコウイルスはこれまでに ICTV (国際ウイルス分類委員会) により DNA ウイルス1属, 逆転写 RNA ウイルス2科, プラス (+) 1本鎖 RNA ウイルス6科, 2本鎖 RNA ウイルス4科が承認されている (2008年時点で役員会が承認した分も含む). 表1は一部未認定ウイルスを含んでいるが, 現在のマイコウイルスの分類体系が概ねお分かり頂けるだろう. 他の宿主界のウイルスと同様, マイコウイルスでもゲノム核酸型, セ

表1 マイコウイルスの分類

Family/Genus/Virus	Abbreviation	No. of segments (size in kb)	Accession number
Double stranded DNA genome			
Unassigned <i>Rhizidiovirus</i> <i>Rhizidiomyces virus</i> ^a	RhiV	1 (unknown)	
Single stranded DNA genome			
Unassigned Sclerotinia sclerotiorum hypovirulence-associated DNA virus 1	SsHADV-1	1 (2.2 kb)	GQ365709
RNA Reverse Transcribing genome			
<i>Pseudoviridae</i> <i>Pseudovirus</i> <i>Saccharomyces cerevisiae Ty1 virus</i>	ScTy1V	1 (5.9 kb)	M18706
<i>Hemivirus</i> <i>Saccharomyces paradoxus Ty5 virus</i>	ScTy5V	1 (6.7 kb)	U19263
<i>Metaviridae</i> <i>Metavirus</i> <i>Saccharomyces cerevisiae Ty3 virus</i>	ScTy3V	1 (5.5 kb)	M34549
Double stranded RNA genome			
<i>Reoviridae</i> <i>Mycoreovirus</i> <i>Cryphonectria parasitica mycoreovirus 1 (9B21)</i>	MyRV1- Cp9B21	11 (4.1 kb~0.7 kb)	AY277888 - AY277890; AB179636 - AB179643
<i>Totiviridae</i> <i>Totivirus</i> <i>Saccharomyces cerevisiae virus L-A (L1)</i>	Sc V-L-A	1 (4.6 kb)	J04692
<i>Victorivirus</i> ^b <i>Helminthosporium victoriae 190SV</i>	Hv190SV	1 (5.2 kb)	U41345
<i>Partitiviridae</i> <i>Partitivirus</i> <i>Atkinsonella hypoxylon virus</i>	AhV	2+1 (2.2 kb~1.8 kb)	L39125 - L39126 L39127 (satellite RNA)
<i>Chrysoviridae</i> <i>Chrysovirus</i> <i>Penicillium chrysogenum virus</i>	PcV	4 (3.6 kb~2.9 kb)	AF296439 - AF296442
<i>Megabirnaviridae</i> ^c <i>Megabirnavirus</i> ^c <i>Rosellinia necatrix megabirnavirus 1/W779</i>	RnMBV1- W779	2 (8.9 kb; 7.2 kb)	AB512282 - AB512283
Single stranded (+) RNA genome			
<i>Narnaviridae</i> <i>Narnavirus</i> <i>Saccharomyces 20S narnavirus</i>	ScNV-20S	1 (2.5 kb)	AF039063
<i>Mitovirus</i> <i>Cryphonectria mitovirus 1</i>	CMV1	1 (2.7 kb)	L31849
<i>Barnaviridae</i> <i>Barnavirus</i> <i>Mushroom bacilliform virus</i>	MBV	1 (4.0 kb)	U07551
<i>Hypoviridae</i> ^d <i>Hypovirus</i> ^d <i>Cryphonectria hypovirus 1-EP713</i>	CHV1/EP713	1 (12.7 kb)	M57938
<i>Endornaviridae</i> ^d <i>Endornavirus</i> ^d <i>Phytophthora endornavirus 1</i>	PEV	1 (13.9 kb)	AJ877914
<i>Alphaflexiviridae</i> ^e <i>Botrexvirus</i> ^e <i>Botrytis virus X</i>	BVX	1 (7.0 kb)	AY055762
<i>Sclerodarnavirus</i> ^e <i>Sclerotinia sclerotiorum debilitation-associated RNA virus</i>	SsDRV	1 (5.5 kb)	AY147260
<i>Gammapflexiviridae</i> ^e <i>Mycoflexivirus</i> ^e <i>Botrytis virus F</i>	BVF	1 (6.8 kb)	AF238884
Unassigned <i>Diaporthe RNA virus</i> <i>Sclerophthora macrospora virus A</i> <i>Sclerophthora macrospora virus B</i>	DRV SmV A SmV B	1 (4.1 kb) 2 (2.9kb ~ 2.0 kb) 1 (5.5 kb)	AF142094 AB083060, AB083061 AB012756

^a The type species of the specified genus is underlined

^b Proposed new genus in the family Totiviridae

^c New family/genus under consideration by ICTV

^d Grouped with dsRNA viruses in the 8th Report of ICTV

^e Recently approved new family/genus by ICTV

ゲメント数, コード遺伝子, 粒子形態とサイズ, 血清学的関連性等の基本性状に加え, 複製酵素の分子系統解析のデータを考慮して分類が行われている。マイコウイルスの命名法は, 宿主菌の学名(馴染み難い原因にもなっている)に続き, そのウイルスの特徴あるいはウイルス属名を明記するといったものが多い。

1.2 本鎖 RNA ウイルス

レオウイルス科³⁹⁾, トティウイルス科³⁰⁾, クライソウイルス科²⁹⁾, パルティティウイルス科³¹⁾の4科に分かれる。これらのうち, レオウイルス科のメンバーは哺乳動物, 鳥類, 魚類, 昆虫, 植物にも広く発生することが知られている。レオウイルス科マイコレオウイルス属のウイルスは10~12本のゲノム dsRNA を2重殻構造の単一球状粒子に全てパッケージングするが, その他の科の2本鎖 RNA ウイルスでは単層の球状粒子にゲノムセグメントが1本ずつ含まれる。マイコレオウイルスのコア粒子, その他のウイルスの粒子中には複製酵素(群)も含まれ, 粒子内に RNA 合成活性が認められる。粒子の直径は概ねゲノムサイズに比例して大きくなり, マイコレオウイルスで約80 nm, トティウイルスで約40 nm, クライソウイルスで35~40 nm, パルティティウイルスで約30~40 nm程である。トティウイルス科は単一ゲノムで2つのオープンリーディングフレーム(ORF)をコードするが, それ以外は分節ゲノムを有し, 各セグメントが単一のORFをコードしている。これまでにマイコレオウイルス属, ヴィクトリウイルス属(トティウイルス科)のウイルスが宿主病原糸状菌にハイポウイルスを付与する(または可能性のある)という報告があるのに対し, パルティティウイルス属のウイルスは宿主菌の病原性・表現型に影響を与えないと言われている。新しい科の創設が提案されているメガビルナウイルスは, 直径約50 nmの球状粒子と2種の dsRNA にそれぞれが2つのORFをコードするユニークな分節ゲノムを持つ。このウイルスも宿主である植物病原糸状菌の病原性を低下させる。

2.1 本鎖 RNA ウイルス

現在までに, マイナス(-)鎖のRNAゲノムをもつマイコウイルスは発見されていない。従って既知の1本鎖 RNA マイコウイルスのゲノムはすべて+鎖 RNA である。粒子を構成するタイプのウイルスとしては, バルナウイルス科⁷¹⁾(桿状粒子)と, ティモウイルス目に新設されたアルファフレキシウイルス科(ひも状の粒子, ポテックスウイルス属などの植物ウイルスが含まれる), ガンマフレキシウイルス科(ひも状の粒子)がある。これらのウイルスは植物ウイルスとゲノム構造の類似性が認められ, 分子系統学的にバルナウイルスはソベモウイルス属(科未設定, 球状ウイルス)等と近縁で, 後者はポテックスウイルス属, ティモウイル

ス属等と近い。

一方, 粒子を形成しないウイルスとして, ナルナウイルス科²⁰⁾, エンドルナウイルス科²⁷⁾, ハイポウイルス科⁶⁴⁾などが知られている。ナルナウイルス科のナルナウイルス属, マイトウイルス属の仲間は複製酵素遺伝子のみをコードする最小のマイコウイルスで, RNA-蛋白質複合体で安定的に存在する。核コドン(前者), ミトコンドリアコドン(後者)のどちらを使用するかで(複製部位により), 属が分類されている。エンドルナウイルス科のウイルスは外被蛋白質(CP)を喪失したアルファ様ウイルスで, ゲノム上に単一の長大な OFR をもつ。ハイポウイルス科ハイポウイルス属は, 1本の RNA ゲノムに1つあるいは2つのORFをもつ, ピコルナ様ウイルスである。径50~80 nmの脂質膜で形成された楕円形小胞内にウイルス dsRNA(複製中間体と推定される)と複製酵素が複合体化して存在する。初めてハイポウイルスを世に知らしめ, その名の由来となっている。尚, このウイルスはクリ朧枯病菌以外からは分離されていない。

3. DNA ウイルスおよび逆転写 RNA ウイルス

ICTVに認められているDNAウイルスは2本鎖DNAをゲノムに持つライジディオウイルス属が唯一知られていたが, 最近植物病原菌である菌核病菌から植物ウイルスのジェミニウイルスに類似した1本鎖環状DNAウイルス(*Sclerotinia sclerotiorum hypovirulence-associated DNA virus 1*, SsHADV)が分離され, 注目を集めた¹⁰¹⁾。環状DNAゲノムには, 双方向機能性のプロモーターを挟んで複製酵素とCP遺伝子がコードされている。さらにSsHADVは宿主菌を衰弱させ, 病原性を低下させることも報告された。

逆転写RNAウイルスは2科4属に亘り, シュードウイルス科⁹²⁾にはシュードウイルス属とヘミウイルス属, シレウイルス属, メタウイルス科⁵⁴⁾にはメタウイルス属が含まれる。これらはレトロトランスポゾンであるが, レトロウイルスとの高い類似性に基づき, 最近になりICTVによりウイルスとして分類された。シュードウイルス科はTy1-copiaレトロトランスポゾンと呼ばれ, pol遺伝子コーディングドメイン(プロテアーゼPR, インテグラーゼIN, 逆転写酵素RT)の並び順, またRTの分子系統学的な関係性からメタウイルス科, レトロウイルス科と異なるウイルスである。

上述の範疇に収まらない未分類ウイルスならびにウイルス様配列も多数報告されている。その中で, 性格付けが行なわれている例として, *Magnaporthe oryzae chrysovirus 1*⁸⁹⁾, *Phytophthora infestans RNA virus 1*(新しい科を形成すると考えられるssRNAウイルス)⁶⁾, *Diaporthe RNA virus*(感染性cDNAクローンが合成されている)^{60, 70)}, *Alternaria alternata virus 1*(新規の4分節性dsRNAウイルス)³⁾, *Sclerotinia sclerotiorum RNA virus L*(ヒト感染性

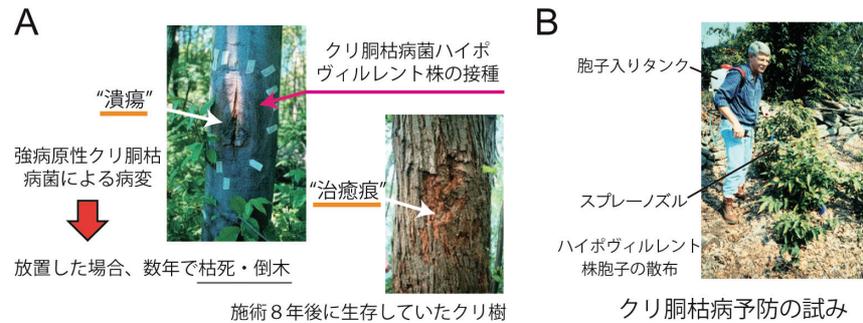


図1 クリ胴枯病菌のヴァイロコントロール

A 強毒型菌に罹病したクリ樹の低病原力菌処理による治療 病班部周辺にハイポウイルスに感染した弱毒型菌を接種することで(写真左), 樹体内で強毒型菌が弱毒型に転換される(写真右)。

B ハイポウイルス感染分生子のクリ林への散布 ハイポウイルスゲノム cDNA が染色体に組み込まれた胞子の懸濁液を, 米国コネティカット州の実験クリ林の処理区にスプレイヤーで散布し, 弱毒型菌が優占することを期待する。

Hepatitis E virus との類似性が指摘されている)⁵⁵⁾, *Sclerophthora macrospora virus A*¹⁰⁰⁾, *Sclerophthora macrospora virus B*⁹⁹⁾, *Fusarium virus strain DK21*⁵³⁾ 等が上げられる。膨大な数の未知のウイルスが存在すると考えられる菌類では, 今後さらなる知見の蓄積と共に上記のウイルスを含め新しいマイコウイルスの科や属の創設が増えてくるであろう。菌類はまさにウイルスハンティングのフロンティアと言えよう。尚, 筆者らが整理したマイコウイルスの分類表が <http://www.rib.okayama-u.ac.jp/pmi/2003/html/UIRUSsuppl.html> で得られるので参考にして頂きたい。

III. ヴァイロコントロールへの取り組みと関連するマイコウイルス

1. ヴァイロコントロールとは

既に述べたように, ヴァイロコントロール (virological + control) は, 生物防除の一種で, マイコウイルスを用いて植物病原糸状菌を防除することを意味する^{9, 33)} (狭義)。すなわち, 悪玉カビを善玉ウイルスで駆逐するということである。ここでは, ヴァイロコントロールの取り組みと関連するウイルスの複製・病徴発現因子について紹介する。ヴァイロコントロールの実現のためにはいくつかの技術的困難を乗り越える必要がある。それは, 先ず 1) 潜在的なヴァイロコントロール因子 (善玉ウイルス) の分離, 2) それの任意の菌株への導入, 3) 処理区での伝染である。各々が, 色々な要素を含んでいる。これまでのウイルス探索の結果から, 検体数を増やせばヴァイロコントロール因子の候補は見つかると考えられる。2) については前述のようにウイルス感染性核酸あるいは粒子を用いた導入法が確立された系が未だ少ないが, 増えつつある。3) にはヴァイロコントロール因子の水平伝搬を左右する病原菌の個体群構造, ウイルス垂直伝搬率等複雑な要素がからみ合っており, 試

してみないとわからないことも多い。以下にヴァイロコントロールの実践例, 取り組み例とそれらに關与するウイルスを併せて紹介する。

2. クリ胴枯病のヴァイロコントロール

i) クリ胴枯病

クリ胴枯病菌 (*Cryphonectria parasitica*) はクリ樹の傷口から侵入し, 栄養補給路である篩部組織, 分裂組織である形成層を破壊し, 宿主を枯死させる病原である。クリ胴枯病菌はとも 19 世紀から 20 世紀にかけて東アジア (恐らく日本) から欧米に広がったらしい。北米では今でも猛威を奮っており, クリ林は全滅状態である。アメリカ合衆国だけでも数十億本のクリ樹が枯死したとされる。クリ胴枯病が世界 3 大樹病の一つに数えられる所以である。アメリカ合衆国では 19 世紀にアイルランドを中心としたヨーロッパで数百万人の飢餓と海外移住を余儀なくしたとされるジャガイモ疫病について大きな衝撃を与えた植物流行病と受け止められている。一方, 1951 年, 胴枯病に侵されてはいるが, クリ樹が回復するという現象がイタリアで見つかった⁴⁾。このような病斑からは, 病原力の著しく低下した菌が分離され³⁵⁾, そうした菌株からはハイポウイルスが高頻度で分離されている。ヨーロッパではハイポウイルスに感染し病原力の衰退した菌が自然に広がり, あるいは人工的に処理することで本病の防除 (ヴァイロコントロール) に繋がっている。かつては, ウイルスに感染した菌が生物農薬として市販されていた。クリ胴枯病の人為的ヴァイロコントロールには 2 つのアプローチがある。1 つは強毒型 (ウイルス非感染の菌による) の病班部にピンポイント的に病原力が低下した菌を処理し, 病原力の強い菌をマイコウイルスにより弱毒型に樹体内で転換するアプローチである (図 1A)。このアプローチはほぼ 100% の成功率である。もう一つはアメリカで行なわれた取り組みであるが, ウイル

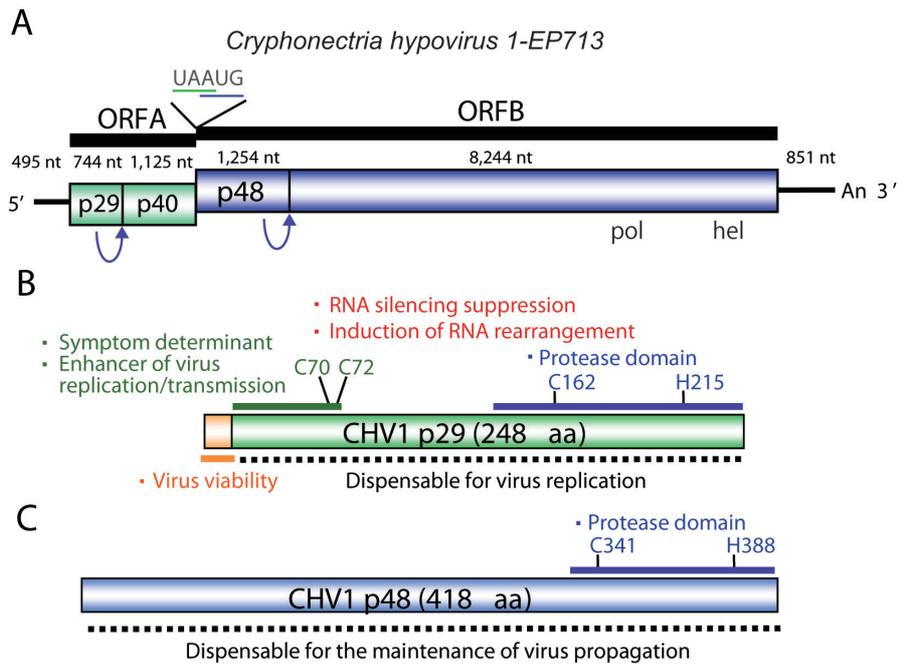


図2 ハイポウイルス科代表種のゲノムとコードされる2つの多機能性蛋白質

A CHV1のゲノム構成 CHV1は約13 kbの1本鎖(+)RNAをゲノムとし、2つのORF AとBを有する。両ORFはUAAUGペンタマーにより連結され、UAAはORF Aの終止コドン、AUGはORF Bの開始コドンとして機能する。ORF A, Bにコードされたポリプロテインは、N末端のp29, p48により切断される(矢印)。

B パパイン様プロテアーゼ p29の機能ドメイン 詳しくは本文参照。

C パパイン様プロテアーゼ p48の機能ドメイン 詳しくは本文参照。

スに感染した宿主菌胞子(予めウイルスcDNAを染色体に組込んだ胞子も試みられた)を散布し、処理区での予防効果(たとえ病原力の強い菌が処理区に侵入してもマイコウイルス存在下では優占種になり得ないと期待される)を狙うアプローチである²⁾(図1B)。しかし、このアメリカでの取り組みは成功していない。クリ胴枯病菌の場合、細胞質不和合性の遺伝学的多様性が高く、導入した菌との菌糸融合を介したウイルスの伝搬(低病原力菌への転換)が起らないなどの原因が考えられている。詳しくは優れた総説^{38, 58)}を参照されたい。

ii) ヴァイロコントロール因子CHV1の複製/病徴発現

ヨーロッパでのヴァイロコントロールの立て役者はハイポウイルスというピコルナ様スーパーファミリーに属するウイルスである。ハイポウイルスはハイポウイルス科のメンバーのことで、現在は1属に4種のウイルスが知られている。ハイポウイルスは外被蛋白質をコードせず、感染菌細胞中にウイルス粒子を形成しない。ハイポウイルス科の中で、タバコモザイクウイルスのようにこの分野の発展に顕著に寄与したのが代表種 *Cryphonectria hypovirus 1* strain EP713 (CHV1-EP713)である⁴¹⁾。CHV1がマイコウイルス学を牽引して来たのにはそれなりの理由がある。総説⁴¹⁾に記されているように、1) 無病徴感染するマイコウ

イルスが多い中、ハイポウイルスをはじめ色素形成の低下、胞子形成の低下といった巨視的な表現型の変化を宿主に齎す、2) ゲノムcDNAを用いた逆遺伝学が確立されている、3) 宿主菌の多重形質転換、標的遺伝子破壊系が確立されている、4) 宿主菌の核型が決定されており(染色体数が9でサイズが約45 Mbp)²²⁾、EST (expressed sequence tag)およびゲノム配列も公開されている、5) 分生子、子の胞子が比較的短期間に得られる、等がその理由としてあげられる。クリ胴枯病菌の宿主菌としての優位性は他にもある。通常マイコウイルスは人為的な宿主菌への導入が極めて困難であるが、本菌から分離された5科に跨がるウイルスでは、CHV1のみならずマイコレオウイルスの導入も可能である。すなわち、同一の遺伝学的バックグラウンドをもつ宿主菌を用いて科の異なるマイコウイルスの研究が可能である。尚、粒子を用いたトランスフェクション法により、現在では3科のウイルスが再現性高く導入可能である。

ハイポウイルスは前述のようにピコルナ様スーパーファミリーに属するが⁵²⁾、感染細胞中に粒子は形成せず、ゴルジ由来の小胞で複製する^{23, 45)}。また、ゲノム構造、遺伝子発現様式もピコルナウイルスとは異なる。ハイポウイルスは約12.7 kbの1本鎖RNAゲノムを持ち、約500塩基の5'非翻訳領域、2つの連続する大きなORF AとORF B、

さらにポリ A を含む 3'非翻訳領域からなる (図 2A). ORF A は 5'非翻訳領域がキャップ構造非依存性リボソーム内部結合配列 (IRES, internal ribosome entry site) として機能することでゲノムサイズのウイルスメッセンジャー RNA (mRNA) から翻訳されると考えられるが、証明が待たれる⁴¹⁾. 一方、下流の ORF B はインフルエンザ B ウイルスのセグメント 7⁶⁸⁾ やカリシウイルスのサブゲノム RNA 上の下流の ORF^{57, 69)} と同じように翻訳停止・再開始機構によりポリシストロニックなウイルス mRNA から翻訳されることが証明された. すなわち、ORF A の翻訳を終えたりボソームの約 3.5% が解離せずに ORF B の翻訳を再開する³⁶⁾. ORF A, ORF B の 5'側にはシステインプロテアーゼ (p29, p48)^{12, 78)} が各々コードされ、ポリプロテインの切断に関与する.

ここ数年で、CHV1 と宿主菌とのせめぎ合い (RNA サイレンシング) の研究で大きな進展があったので簡単に紹介する. RNA サイレンシングは植物ウイルスに対する植物の防御機構として活発に研究されている. 菌類でも同様な機構でウイルスに対抗していることが明らかになりつつある^{76, 77, 104, 105)}. モデル植物シロイヌナズナの例では、RNA サイレンシングに関与する鍵役者 DCL (dicer-like), RDR (RNA-dependent RNA polymerase), AGO (Argonaute) の遺伝子がそれぞれ 4, 6, 10 個存在する. それらの中では、機能分担、重複が認められる. ウイルス抵抗反応には *DCL4*, *RDR6*, *AGO1* が中心的な役割を担う^{16, 72)}. 一方、クリ桐枯病菌の場合 DCL, AGL (Argonaute-like protein) で各々 2 つ、RDR で 3 つの遺伝子が存在する. マイコウイルス抵抗反応に関わるのは *dcl2*, *agl2* (菌類遺伝子は小文字表記) で RDR 群の関与については現在のところ不明である. ウイルスの反撃手段としては植物ウイルス同様に RNA サイレンシング抑制蛋白質 (RSS, RNA silencing suppressor) の存在があげられる^{59, 94)}. 植物ウイルスの RSS は、1) siRNA (small interfering RNA) あるいは長鎖 dsRNA, あるいは両方に結合し、それらの RNA 干渉作用を抑制する、2) RNA サイレンシングの宿主因子に直接作用し、その機能を阻害する、3) サイレンシングシグナルの長距離移行を阻害する、等の作用を有する. 一方、ハイポウイルス RSS はこれまで報告されていない作用を持つようである. RSS の p29 は、ウイルス感染依存的に発現誘導がかかる *dcl2*, *agl2* の誘導 (これ自体新たな発見である) を抑制することが明らかにされた⁷⁷⁾. その作用機構の詳細は今後の解析を待たなければならない.

CHV1 p29 は実は多機能性を示し、RNA サイレンシング抑制以外にもウイルス複製・病徴発現、マイコレオウイルスのゲノム再編成にも深く関与する. CHV1 の感染が宿主であるクリ桐枯病菌に及ぼす影響は、前述のクリ桐に対する病原力の低下の他に、コロニーの形態異常、色素形成の抑制、無性孢子形成の抑制、雌性交配不能等が含まれる.

尚、これらは宿主遺伝子発現パターン (トランスクリプトームの 13.4%) の変化、そしてセルラーゼ、クチナーゼ等の各種酵素の活性低下を伴っている. ハイポウイルスの 2 つの多機能性蛋白質 p29, p48 (どちらもウイルスポリプロテインの自己切断を担うシステインプロテアーゼである) について最近面白い報告がなされている (図 2B, 2C). p29 コード領域の 88% (コドン 25-248) はウイルス複製には不要である¹³⁾. しかし、N 末端領域 (コドン 1-24) の塩基配列はゲノムの 5'非翻訳領域と共にウイルス複製に必須で、IRES の一部と思われる⁸⁵⁾. p29 はプロテアーゼの活性中心を H¹⁶², C²¹⁵ に持ち、ORF A 前駆体蛋白質、p69 の自己切断を担う^{11, 12)}. p29 は、分生孢子形成の抑制、色素形成の抑制^{10, 13)}、同種及び異種ウイルスの効率の複製・垂直伝搬 (これらは RNA サイレンシング抑制と関連すると考えられる^{80, 83, 84)}) に貢献する. 最近、p29 が異種ウイルスであるマイコレオウイルスのゲノム再編成を高頻度で誘導することが示された⁷⁹⁾. その詳細な機構については不明な点が多い. これまでに 3 つの機能領域、1) ウイルス生存に必須な N 末端領域 (コドン 1-24⁸⁵⁾), 2) それに続く病徴決定・ウイルス複製促進領域 (F²⁵-Q⁷³)⁸³⁾, 3) さらに C 末端側半分の自己切断に関与するプロテアーゼ活性領域、が p29 上にマップされている (図 2B)¹¹⁾.

ORF B にコードされた p48 (p29 のパラログ) も巨大な前駆体蛋白質のプロセッシングに関与する⁷⁸⁾ (図 2C). また、p29 程ではないが、宿主菌の色素形成の低下と孢子形成の低下に関与する¹⁷⁾. この活性は p48 を宿主菌染色体から単独で発現された場合もあるいはウイルスゲノムから発現された場合も認められる. また、シスにウイルスゲノムから供給された場合にのみ、ウイルス複製の促進作用も有する. ピコルナ様ウイルスのシステインプロテアーゼと大きく異なる機能はウイルス複製の開始に関与する点である. CHV1 の複製に p48 は必須であるが、必ずしもウイルスゲノムから供給される必要はない. 宿主染色体から供給されても p48 欠失 CHV1 の複製開始に支障ない. 驚くべきことに、一度 p48 欠失 CHV1 の複製が開始されると p48 は必要無くなり、p48 を発現しない菌株でも持続的に複製可能である. すなわち、p48 はウイルス複製の維持には不要である. p48 が関与する複製開始の分子機構は全く不明であるが、ウイルス + 鎖 RNA の翻訳鋳型からマイナス鎖合成鋳型への転換、あるいは宿主・ウイルス由来の因子からなる複製複合体の構築に関与するのではないかと推定されている. 筆者らはこのような「ヒットアンドラン」機構をもつ他の RNA ウイルス蛋白質を知らない.

ハイポウイルスの複製・病徴発現に関与する宿主因子の研究には、トランスクリプトーム解析^{1, 18, 81)}、メタボローム解析¹⁵⁾、ジェネティックスクリーン^{24, 25)} のアプローチが採用されている. また、ハイポウイルス感染によって宿主菌の発生・生育が大きな影響を受けること、分泌蛋白質

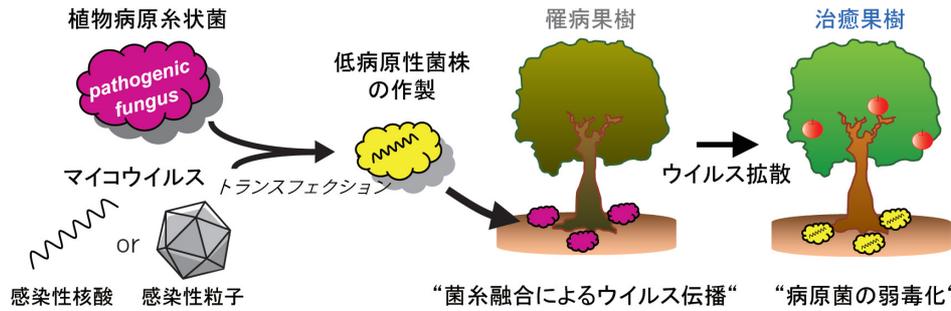


図3 土壌伝染性病原菌のヴァイロコントロール実現へ向けた戦略

果樹の根腐れを引き起こす土壌伝染性病原菌（白紋羽病菌）にヴァイロコントロール因子（マイコウイルス）を導入する。低病原性（ハイポウイルス）の菌を罹病果樹の根部に戻し、ヴァイロコントロール因子の水平伝播により強毒型菌から弱毒型菌への転換を図り、治療を目指す。

の発現が著しく低下することから、宿主菌の基本的な鍵信号伝達経路^{14, 28, 50, 51, 66, 88)}あるいは蛋白質分泌経路^{44, 102, 103)}を切り口とした研究も行なわれている。最近の総説、文献を参照されたい^{64, 87)}。

IV. 白紋羽病菌のウイルスとヴァイロコントロール

リンゴやナシ、ブドウなどの果樹は永年性作物であり、一つの樹が何十年もの間果実を稔らせ続ける。当然これらの樹が花をつけ実をならせるのは「根あればこそ」であるが、土壌生息性の糸状菌である白紋羽病菌 (*Rosellinia necatrix*) が感染すると、根が腐敗するため、大きな樹であっても次々に枯死する。白紋羽病による被害は甚大であり、例えば、果樹主産県の一つである長野県での2007年度調査によると、リンゴでは栽培面積全体の3.2%の園地、ナシでは6%の園地で白紋羽病が発生しており、年間の被害額は10億円近くとも試算される。本病を治療するために、根に殺菌剤あるいは温水を処理して菌を駆除する方法が開発され効果を上げているが、効果は処理樹にのみ限定され、またその持続性も限定される。同時に環境負荷やコストの課題を抱えている。

筆者らを含むグループは、この土壌中の白紋羽病菌をマイコウイルスによって“病気”にして沈静化（土壌中に存在するが、根に感染できなくなる）状態にする新たな治療法（図3）の開発を目指し⁵⁶⁾、紋羽病菌に感染するウイルスの探索、特性の解析を行ってきた。上述の通り、多くのマイコウイルスはdsRNAをゲノムに持つことが知られていたため、これまでに日本国内から収集した1000超の菌株についてdsRNAの有無を検定した。その結果、国内に生息する白紋羽病菌の約20%がウイルスゲノムと目されるdsRNAを保持していることが明らかになった⁴³⁾。

これらのほとんどの菌株ではウイルスは潜在感染していると推察されたが、いくつかのウイルス感染菌株は菌の病原力が低下する傾向がみられた。そこで白紋羽病菌では純

化したウイルス粒子をプロトプラストに導入し、菌体を再生させることによって（糸状菌は菌糸への再生は容易である）感染個体を得る方法をとった（図4A）。その結果、メガビルナウイルス（RnMBV1）、マイコレオウイルス（RnMyRV3）、パルティティウイルス（RnPV1）を任意の菌株に接種することが可能になった^{9, 75)}。菌糸融合による伝播のみしか知られていないマイコウイルスは宿主範囲に関する知見も乏しいが、プロトプラストを介して純化粒子を接種すると、白紋羽病菌由来のウイルスが他の植物病原菌に感染し、病原力を低下させる例も確認された⁴⁹⁾。

上記手法による解析からRnPV1が感染した白紋羽病菌は無病徴であった。一方、RnMBV1⁹⁾、RnMyRV3⁴⁸⁾が感染すると白紋羽病菌のコロニーは衰弱し、感染菌のリンゴ苗に対する病原力は明らかに低下したため（図4BはRnMBV1による宿主菌への影響を示す）、両ウイルスは白紋羽病のヴァイロコントロール因子候補と考えられた。マイコウイルスをヴァイロコントロール因子として利用するためには、菌体内でのウイルスの安定性や、菌糸融合による菌体間のウイルス伝播の様相を知ることが、野外でのウイルスの動態を推察する上で有用である。そこで、RnMBV1、RnMyRV3、RnPV1などのコロニー内の分布や菌糸融合による和合性菌体間の移行を比較した。コロニーをメンブレンにプロットングし、市販のdsRNA抗体でウイルスの分布を検出する新手法と比較したところ、RnMyRV3はコロニー内でセクター様に不均一に分布するが、RnMBV1やRnPV1はコロニー内に均一に分布し、菌糸融合によるウイルスの移行も速やかであることが分かった⁹⁶⁾。このことから、RnMyRV3よりもRnMBV1に対するヴァイロコントロール因子としての期待が大きい。

現在、野外の発病樹から分離した白紋羽病菌にプロトプラストを介してRnMBV1を感染させ、このRnMBV1感染菌株を野外で生息している元の白紋羽病菌に近接させてウイルスを伝搬させることを試みている（図3）。本法は温室

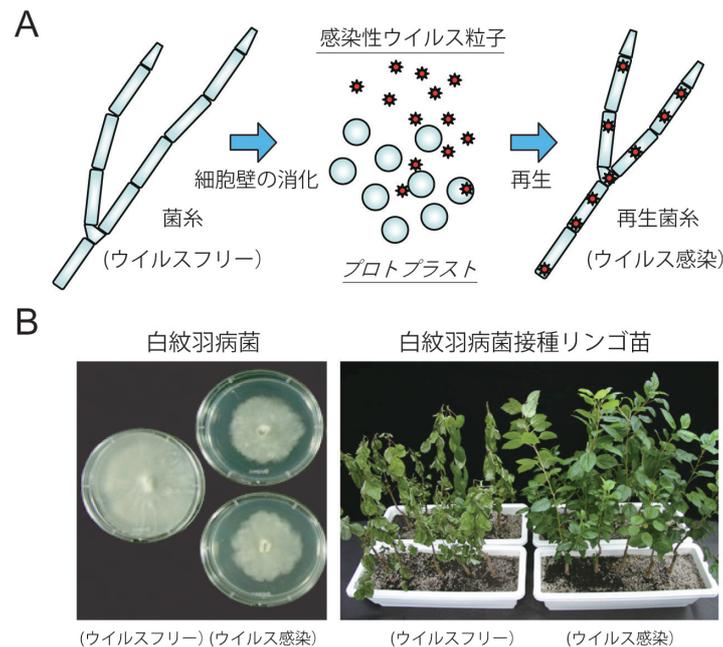


図4 白紋羽病菌への人為的ウイルス導入とその影響

A 白紋羽病菌へのウイルス粒子 (RnMBV1) の人為的導入 ウイルス非感染菌糸の細胞壁を酵素的に分解し、単細胞化を行う。ポリエチレングリコールと CaCl_2 存在下でプロトプラストに精製ウイルス粒子を処理する。プロトプラストを再生培地中で培養することで、菌糸が形成 (再生) される。コロニー形成過程でウイルスが菌糸融合により水平伝搬し、コロニー全体で感染が成立する。

B RnMBV1 感染、非感染白紋羽病菌の生物学的性状 左のパネルは RnMBV1 感染、非感染白紋羽病菌のコロニー形態を示し、右のパネルはそれらの病原力を示す。

病原力は、白紋羽病菌を埋設した土壤にリンゴ苗を植え、根の腐敗に伴う生育障害の程度で判断する。ウイルス非感染菌処理区(左側)では明瞭な枯死前兆の病徴が確認されるが、ウイルス感染菌処理区(右側)ではほとんど生育障害は確認されない。

内で生育させたリンゴ苗上では可能であることを確認しているが、野外でのウイルスの伝搬促進には、さらなる施用法の改善や伝搬手法の開発が必要となるかもしれない。今後、野外でのマイコウイルスの動態や生態を調べることで糸状菌とマイコウイルスのせめぎ合いが明らかになり、ヴァイロコントロール実現に近づくことが期待される。

おわりに

以上のように、菌類ウイルス学の歴史から最近の展開までを概観し、併せてヴァイロコントロールの (取り組み) 例、そこで用いられるウイルスの性状を紹介した。マイコウイルスの研究自体ウイルス学、菌学あるいは生物学に貢献してきた。菌類からのウイルスの探索は、新規ウイルスの発見へと繋がり、ウイルスの多様性が改めて認識された。植物ウイルスあるいは動物ウイルスとの進化的関係を示す例も多く見つかっている。菌類ウイルスをプローブにして菌の生理学へ迫る研究も行なわれている⁶³⁾。本稿では触れなかったが、ウイルス構造学への貢献も大きい^{65, 86)}。また、マイコウイルスの研究は大変興味深くそしてこれから

挑戦すべき研究課題を包含している。例えば、ハイポウイルスの例で分かるように、病徴決定機構に関わるウイルス因子、宿主因子が同定されてきている。方法論も確立されている。しかし、マイコウイルスが如何に病原力の低下を引き起こすかは不明な点が多い。ハイポウイルスとクリ胴枯病菌の系では宿主菌の生育に関わる鍵信号伝達経路 (例えば、ヘテロ3量体G蛋白質経路、MAPK 経路など) を阻害し、ウイルスの低下を招くのではないかと考えられている。確かに、ウイルス感染により発現変化が認められる遺伝子の多くがその経路の関連遺伝子の破壊で同様の影響を示す。また、破壊株の表現型はウイルス感染株と類似の表現型を示す。仮にウイルス感染がそれら信号伝達系を攪乱するとしたら、どのような機構でおこるのか? 今後検討を要する。

異なる種の菌間で水平伝搬したと思われる例がいくつか報告されている。細胞外ルートがないと考えられているマイコウイルスで、水平伝搬が如何に可能であろうか? 種間での菌糸融合は同種の異なる細胞質不和合菌グループ間の菌糸融合よりハードルは高いと考えられる。それとも、マイ

コウイルスの媒介生物が存在するのか?大きな検討課題である。この点に関連して、植物ウイルスの中には媒介動物(昆虫)で増殖可能なウイルスが比較的多く見つかっているが、菌類と他の界の種の両方で複製可能なウイルスは見つかっていない。パン酵母(子のう菌)が植物ウイルス^{46, 61)}と動物ウイルス⁶²⁾の両者の複製を支援可能であることを考えると、将来菌類以外でも複製可能なマイコウイルスが見つかるかもしれない。

持続的な農業を考えた場合、ヴァイロコントロールは魅力的な植物病の防除法と成り得る。しかし、その達成には標的とする病原菌の個体群構造、時空間的動態の把握が必須条件となる。これらは、マイコウイルスの伝搬様式を考慮した時の生態系での伝搬能、適応能を占う上で重要である。さらには、ヴァイロコントロールを実用化する上でクリアしなければ成らない課題としては、効率的にマイコウイルスを菌へ導入する方法の確立である。マイコウイルスが宿主菌の病原力を衰退させるとしても任意の菌株に導入できなければ、ヴァイロコントロール因子としての価値を失ってしまう。強力なヴァイロコントロール因子の発見とその導入法がヴァイロコントロールの実用化に貢献することは間違いない。クリ胴枯病以外の植物菌類病での成功例が増えることを期待したい。

ヴァイロコントロールは動物病原性菌へも応用できるであろうか?宿主をヒトに限定しても、皮膚真菌症の代表的な病原である *Trichophyton mentagrophytes* (水虫菌)あるいは日和見感染症を起こす *Aspergillus fumigatus*, *Candida albicans*, *Cryptococcus neoformans* 等の病原性菌が知られている。それらに感染するウイルスの存在は数例を除いて、筆者は知らない。今年 Coutts らのグループが *A. fumigatus* の 390 分離株コレクションからウイルスの探索を行ない 6% の頻度でウイルス感染が認められることを報告した⁴⁶⁾。その中のクライソウイルスについては、ゲノム配列が決定された。残念なことにウイルス感染による病原性への影響は不明である。しかし、この研究は動物感染性真菌にも感染するウイルスが存在することを示す。これまで、注意深くウイルスの探索がなされてこなかったか、あるいは探索が行なわれたとしても、対象が研究室保存菌株(継代中にウイルスが除去されることはよく観察される)だったのではなからうか?今後、ウイルスの探索を含め、面白い結果が期待される領域である。今年、同様の期待が込められた総説がでたので⁹⁰⁾、参照されたい。

謝 辞

貴重な写真を提供頂いた Bradley I Hillman 博士、Donald L Nuss 博士には感謝する。

文 献

- 1) Allen T. D., Dawe A.L., Nuss D.L.: Use of cDNA microarrays to monitor transcriptional responses of the chestnut blight fungus *Cryphonectria parasitica* to infection by virulence-attenuating hypoviruses. *Eukaryot Cell* 2: 1253-1265, 2003.
- 2) Anagnostakis S. L., Chen B., Geletka L.M., Nuss D.L.: Hypovirus transmission to ascospore progeny by field-released transgenic hypovirulent strains of *Cryphonectria parasitica*. *Phytopathology* 88: 598-604, 1998.
- 3) Aoki N., Moriyama H., Kodama M., Arie T., Teraoka T., Fukuhara T.: A novel mycovirus associated with four double-stranded RNAs affects host fungal growth in *Alternaria alternata*. *Virus Res.* 140: 179-187, 2009.
- 4) Biraghi A.: Caratteri di resistenza in "Castanea sativa" nei confronti di "Endothia parasitica". *Boll. Staz. Patol. Veget.* 8: 5, 1951.
- 5) Buck K.W.: Fungal virology-an overview pp. 2-84. In K. W. Buck (ed.) *Fungal Virology*. CRC Press, Boca Raton, Fla, 1986.
- 6) Cai G., Myers K., Hillman B.I., Fry W.E.: A novel virus of the late blight pathogen, *Phytophthora infestans*, with two RNA segments and a supergroup 1 RNA-dependent RNA polymerase. *Virology* 392: 52-61, 2009.
- 7) Chen B., Choi G.H., Nuss D.L.: Attenuation of fungal virulence by synthetic infectious hypovirus transcripts. *Science* 264: 1762-1764, 1994.
- 8) Chen B., Nuss D.L.: Infectious cDNA clone of hypovirus CHV1-Euro7: a comparative virology approach to investigate virus-mediated hypovirulence of the chestnut blight fungus *Cryphonectria parasitica*. *J. Virol.* 73: 985-992, 1999.
- 9) Chiba S., Salaipeth L., Lin Y.-H., Sasaki A., Kanematsu S., Suzuki N.: A novel bipartite dsRNA mycovirus from the white root rot fungus *Rosellinia necatrix*: Molecular and biological characterization, taxonomic considerations, and potential for biological control. *J. Virol.* 83: 12801-12812, 2009.
- 10) Choi G.H., Nuss D.L.: Hypovirulence of chestnut blight fungus conferred by an infectious viral cDNA. *Science* 257: 800-803, 1992.
- 11) Choi G.H., Pawlyk D.M., Nuss D.L.: The autocatalytic protease p29 encoded by a hypovirulence-associated virus of the chestnut blight fungus resembles the potyvirus-encoded protease HC-Pro. *Virology* 183: 747-752, 1991.
- 12) Choi G.H., Shapira R., Nuss D.L.: Cotranslational autoproteolysis involved in gene expression from a double-stranded RNA genetic element associated with hypovirulence of the chestnut blight fungus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:1167-1171, 1991.
- 13) Craven M.G., Pawlyk D.M., Choi G.H., Nuss D.L.: Papain-like protease p29 as a symptom determinant encoded by a hypovirulence-associated virus of the chestnut blight fungus. *J. Virol.* 67: 6513-6521, 1993.
- 14) Dawe A.L., Nuss D.L.: Hypoviruses and chestnut blight: exploiting viruses to understand and modulate

- fungal pathogenesis. *Annu. Rev. Genet.* 35: 1-29, 2001.
- 15) Dawe A.L., Van Voorhies, W.A., Lau T.A., Ulanov, A.V. and Li Z: Major impacts on the primary metabolism of the plant pathogen *Cryphonectria parasitica* by the virulence-attenuating virus CHV1-EP713. *Microbiology* 155: 3913-3921, 2009.
 - 16) Deleris A., Gallego-Bartolome J., Bao J., Kasschau K.D., Carrington J.C., Voinnet O.: Hierarchical action and inhibition of plant Dicer-like proteins in antiviral defense. *Science* 313:68-71, 2006.
 - 17) Deng F., Nuss D.L.: Hypovirus papain-like protease p48 is required for initiation but not for maintenance of virus RNA propagation in the chestnut blight fungus *Cryphonectria parasitica*. *J. Virol.* 82: 6369-6378, 2008.
 - 18) Deng F., Allen T.D., Nuss D.L.: Ste12 transcription factor homologue CpST12 is down-regulated by hypovirus infection and required for virulence and female fertility of the chestnut blight fungus *Cryphonectria parasitica*. *Eukaryot Cell* 6: 235-244, 2007.
 - 19) Esteban R., Fujimura T.: Launching the yeast 23S RNA Narnavirus shows 5' and 3' cis-acting signals for replication. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 100: 2568-2573, 2003.
 - 20) Esteban R., Fujimura T.: Narnaviruses. In Mahy BWJ, Van Regenmortel, eds. *Encyclopedia of Virology*. Oxford: Elsevier. 3rd ed., pp. 392-98, 2008.
 - 21) Esteban R., Vega L., Fujimura T.: Launching of the yeast 20 s RNA narnavirus by expressing the genomic or antigenomic viral RNA in vivo. *J. Biol. Chem.* 280: 33725-33734, 2005.
 - 22) Eusebio-Cope A., Suzuki N., Sadeghi-Garmaroodi H., Taga M.: Electrophoretic and cytological karyotyping of the chestnut blight fungus, *Cryphonectria parasitica*. *Fungal Genet. Biol.* 46: 342-351, 2009.
 - 23) Fahima T., Kazmierczak P., Hansen D.R., Pfeiffer P., Van Alfen N.K.: Membrane-associated replication of an unencapsidated double-strand RNA of the fungus, *Cryphonectria parasitica*. *Virology* 195: 81-89, 1993.
 - 24) Faruk M., Izumino M., Suzuki N.: Characterization of mutants of the chestnut blight fungus (*Cryphonectria parasitica*) with unusual hypovirus symptoms. *J. Gen. Plant Pathol.* 74: 425-433, 2008.
 - 25) Faruk M.I., Eusebio-Cope A., Suzuki N.: A host factor involved in hypovirus symptom expression in the chestnut blight fungus, *Cryphonectria parasitica*. *J. Virol.* 82:740-754, 2008.
 - 26) Fujimura T., Esteban R.: Yeast double-stranded RNA virus L-A deliberately synthesizes RNA transcripts with 5'-diphosphate. *J. Biol. Chem.* 285: 22911-22918, 2010.
 - 27) Fukuhara T., Moriyama H.: Endornaviruses. In Mahy BWJ, Van Regenmortel, eds. *Encyclopedia of Virology*. Oxford: Elsevier. 3rd ed., pp. 392-98, 2008.
 - 28) Gao S., Nuss D.L.: Distinct roles for two G-protein alpha subunits in fungal virulence, morphology, and reproduction revealed by targeted gene disruption. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93: 14122-14127, 1996.
 - 29) Ghabrial S.: Chrysovirus. In Mahy BWJ, Van Regenmortel, eds. *Encyclopedia of Virology*. Oxford: Elsevier. 3rd ed. pp. 503-513, 2008.
 - 30) Ghabrial S.: Totiviruses. In Mahy BWJ, Van Regenmortel, eds. *Encyclopedia of Virology*. Oxford: Elsevier. 3rd ed. pp. 163-174, 2008.
 - 31) Ghabrial S., Ochoa W., Baker T., Nibert M.: Partitiviruses: general features. In Mahy BWJ, Van Regenmortel, eds. *Encyclopedia of Virology*. Oxford: Elsevier. 3rd ed. vol. 4, pp. 68-75, 2008.
 - 32) Ghabrial S.A., Soldevila A.I., Havens W.M.: Molecular genetics of the viruses infecting the plant pathogenic fungus *Helminthosporium victoriae*. In *Molecular Biology of Double-Stranded RNA: Concepts and Applications in Agriculture, Forestry and Medicine*, ed. S Tavantzis, pp. 213-236. Boca Raton: CRC Press, 2002.
 - 33) Ghabrial S.A., Suzuki N.: Fungal Viruses. In Mahy BWJ, Van Regenmortel, eds. *Encyclopedia of Virology*. Oxford: Elsevier. 3rd ed. vol. 2, pp. 284-291, 2008.
 - 34) Ghabrial S.A., Suzuki N.: Viruses of plant pathogenic fungi. *Annu. Rev. Phytopathol.* 47: 353-384, 2009.
 - 35) Grente J.: Les formes hypovirulentes d'*Endothia parasitica* et les espoirs de lutte contre le chancre du chataignier. *C. R. Acad. Agric. France* 51: 1033-1037, 1965.
 - 36) Guo L., Sun L.-Y., Chiba S., Araki H., Suzuki N.: Coupled termination/reinitiation for translation of the downstream open reading frame B of the prototypic hypovirus CHV1-EP713. *Nuc. Acids Res.* 37: 3645-3659, 2009.
 - 37) Hawksworth D.L.: Presidential address 1990: The fungal dimension of biodiversity: magnitude, significance, and conservation. *Mycol. Res.* 95: 641-655, 1991.
 - 38) Heiniger U., Rigling D.: Biological control of chestnut blight in Europe. *Annu. Rev. Phytopathol.* 32: 581-599, 1994.
 - 39) Hillman B.I.: Mycoreoviruses. In Mahy BWJ, Van Regenmortel, eds. *Encyclopedia of Virology*. Oxford: Elsevier. 3rd ed., pp. 378-383, 2008.
 - 40) Hillman B.I., Supyani S., Kondo H., Suzuki N.: A reovirus of the fungus *Cryphonectria parasitica* that is infectious as particles and related to the coltivirus genus of animal pathogens. *J. Virol.* 78: 892-898, 2004.
 - 41) Hillman B.I., Suzuki N.: Viruses of the chestnut blight fungus, *Cryphonectria parasitica*. *Adv. Virus Res.* 63:423-472, 2004.
 - 42) Hollings M.: Viruses associated with die-back disease of cultivated mushroom. *Nature* 196: 962-965, 1962.
 - 43) Ikeda K., Nakamura H., Arakawa M., Matsumoto N.: Diversity and vertical transmission of double-stranded RNA elements in root rot pathogens of trees, *Helicobasidium mompa* and *Rosellinia necatrix*. *Mycol. Res.* 108: 626-634, 2004.
 - 44) Jacob-Wilk D., Turina M., Kazmierczak P., Van Alfen N.K.: Silencing of Kex2 significantly diminishes the virulence of *Cryphonectria parasitica*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 22: 211-221, 2009.
 - 45) Jacob-Wilk D., Turina M., Van Alfen N.K.: Mycovirus *Cryphonectria* hypovirus 1 elements cofractionate with *trans*-Golgi network membranes of the fungal

- host *Cryphonectria parasitica*. J. Virol. 80: 6588-6596, 2006.
- 46) Jamal A., Bignell E.M., Coutts R.H.: Complete nucleotide sequences of four dsRNAs associated with a new chrysovirus infecting *Aspergillus fumigatus*. Virus Res. 153: 64-70, 2010.
 - 47) Janda M., Ahlquist P.: RNA-dependent replication, transcription, and persistence of brome mosaic virus RNA replicons in *S. cerevisiae*. Cell 72: 961-970, 1993.
 - 48) Kanematsu S, Arakawa M, Oikawa Y, Onoue M, Osaki H, et al. A reovirus causes hypovirulence of *Rosellinia necatrix*. Phytopathology 94: 561-568, 2004.
 - 49) Kanematsu S., Sasaki A., Onoue M., Oikawa Y., Ito T.: Extending the fungal host range of a Partitivirus and a Mycoreovirus from *Rosellinia necatrix* by inoculation of protoplasts with virus particles. Phytopathology. 100: 922-930, 2010.
 - 50) Kasahara S., Wang P., Nuss D.L.: Identification of *bdm-1*, a gene involved in G protein beta-subunit function and alpha-subunit accumulation. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97: 412-417, 2000.
 - 51) Kim M.J., Choi J.W., Park S.M., Cha B.J., Yang M.S., Kim D.H.: Characterization of a fungal protein kinase from *Cryphonectria parasitica* and its transcriptional upregulation by hypovirus. Mol. Microbiol. 45: 933-941, 2002.
 - 52) Koonin E.V., Choi G.H., Nuss D.L., Shapira, R., Carington J.C.: Evidence for common ancestry of a chestnut blight hypovirulence-associated double-stranded RNA and a group of positive-strand RNA plant viruses. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88: 10647-10651, 1991.
 - 53) Kwon S.J., Lim W.S., Park S.H., Park M.R., Kim K.H.: Molecular characterization of a dsRNA mycovirus, *Fusarium graminearum* virus-DK21, which is phylogenetically related to hypoviruses but has a genome organization and gene expression strategy resembling those of plant potex-like viruses. Mol. Cells 23: 369-378, 2007.
 - 54) Levin H.L.: Metaviruses. In Mahy BWJ, Van Regenmortel, eds. *Encyclopedia of Virology*. Oxford: Elsevier. 3rd ed., pp. 301-311, 2008.
 - 55) Liu H., Fu Y., Jiang D., Li G., Xie J, et al.: A novel mycovirus that is related to the human pathogen *Hepatitis E virus* and rubi-like viruses. J. Virol. 83: 1981-1991, 2009.
 - 56) Matsumoto N. Biological control of root diseases with dsRNA based on population structure of pathogens. JARQ 32:31-35, 1998.
 - 57) Meyers G.: Characterization of the sequence element directing translation reinitiation in RNA of the calicivirus rabbit hemorrhagic disease virus. J. Virol. 81: 9623-9632, 2007.
 - 58) Milgroom M.G., Cortesi P.: Biological control of chestnut blight with hypovirulence: a critical analysis. Annu. Rev. Phytopathol. 42: 311-338, 2004.
 - 59) 峯 彰, 奥野 哲郎: ウイルスと RNA サイレンシング. ウイルス 58: 61-68, 2008.
 - 60) Moleleki N., van Heerden S.W., Wingfield M.J., Wingfield B.D., Preisig O.: Transfection of *Diaporthe perijuncta* with Diaporthe RNA virus. Appl. Environ. Microbiol. 69: 3952-3956, 2003.
 - 61) Nagy P.D.: Yeast as a model host to explore plant virus-host interactions. Annu. Rev. Phytopathol. 46: 217-242, 2008.
 - 62) Naito T., Kiyasu Y., Sugiyama K., Kimura A., Nakano R., Matsukage A., Nagata K.: An influenza virus replicon system in yeast identified Tat-SF1 as a stimulatory host factor for viral RNA synthesis. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 104: 18235-18240, 2007.
 - 63) Nuss D.L.: Using hypoviruses to probe and perturb signal transduction processes underlying fungal pathogenesis. Plant Cell 8: 1846-1853, 1996.
 - 64) Nuss D.L.: Hypovirulence: mycoviruses at the fungal-plant interface. Nat. Rev. Microbiol. 3: 632-642, 2005.
 - 65) Pan J., Dong L., Lin L., Ochoa W., Sinkovits R., et al.: Atomic structure reveals the unique capsid organization of a dsRNA virus. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 106: 4225-4230, 2009.
 - 66) Park S.M., Choi E.S., Kim M.J., Cha B.J., Yang M.S., Kim D.H.: Characterization of HOG1 homologue, CpMK1, from *Cryphonectria parasitica* and evidence for hypovirus-mediated perturbation of its phosphorylation in response to hypertonic stress. Mol. Microbiol. 51: 1267-1277, 2004.
 - 67) Pearson M.N., Beever R.E., Boine B., Arthur K.: Mycoviruses of filamentous fungi and their relevance to plant pathology. Mol. Plant Pathol. 10: 115-128, 2009.
 - 68) Powell M.L., Naphthine S., Jackson R.J., Brierley I., Brown T.D.: Characterization of the termination-reinitiation strategy employed in the expression of influenza B virus BM2 protein. RNA 14: 2394-2406, 2008.
 - 69) Poyry T.A., Kaminski A., Connell E.J., Fraser C.S., Jackson R.J.: The mechanism of an exceptional case of reinitiation after translation of a long ORF reveals why such events do not generally occur in mammalian mRNA translation. Genes Dev. 21: 3149-3162, 2007.
 - 70) Preisig O., Moleleki N., Smit W.A., Wingfield B.D., Wingfield M.J.: A novel RNA mycovirus in a hypovirulent isolate of the plant pathogen *Diaporthe ambigua*. J. Gen. Virol. 81: 3107-3114, 2000.
 - 71) Revill P.A.: Barnaviruses. In Mahy BWJ, Van Regenmortel, eds. *Encyclopedia of Virology*. Oxford: Elsevier. 3rd ed., pp. 286-288, 2008.
 - 72) Ruiz-Ferrer V., Voinnet O.: Roles of plant small RNAs in biotic stress responses. Annu. Rev. Plant Biol. 60: 485-510, 2009.
 - 73) Sasaki A., Kanematsu S., Onoue M., Oikawa Y., Nakamura H., Yoshida K.: Artificial infection of *Rosellinia necatrix* with purified viral particles of a member of the genus *Mycoreovirus* reveals its uneven distribution in single colonies. Phytopathology 97: 278-286, 2007.
 - 74) Sasaki A., Onoue M., Kanematsu S., Suzaki K., Miyaniishi M., Suzuki N., Nuss D.L., Yoshida K.: Extending chestnut blight hypovirus host range within Dia-

- porthales by biolistic delivery. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 15: 780-789, 2002.
- 75) Sasaki A., Kanematsu S., Onoue M., Oyama Y., Yoshida K.: Infection of *Rosellinia necatrix* with purified viral particles of a member of *Partitiviridae* (RnPV1-W8). *Arch. Virol.* 151: 697-707, 2006.
 - 76) Segers G.C., van Wezel R., Zhang X., Hong Y., Nuss D.L.: Hypovirus papain-like protease p29 suppresses RNA silencing in the natural fungal host and in a heterologous plant system. *Eukaryot. Cell* 5: 896-904, 2006.
 - 77) Segers G.C., Zhang X., Deng F., Sun Q., Nuss D.L.: Evidence that RNA silencing functions as an antiviral defense mechanism in fungi. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 104: 12902-12906, 2007.
 - 78) Shapira R., Nuss D.L.: Gene expression by a hypovirulence-associated virus of the chestnut blight fungus involves two papain-like protease activities. *J. Biol. Chem.* 266: 19419-19425, 1991.
 - 79) Sun L., Suzuki N.: Intragenic rearrangements of a mycoreovirus induced by the multifunctional protein p29 encoded by the prototypic hypovirus CHV1-EP713. *RNA* 14: 2557-2571, 2008.
 - 80) Sun L.Y., Nuss D.L., Suzuki N.: Synergism between a mycoreovirus and a hypovirus mediated by the papain-like protease p29 of the prototypic hypovirus CHV1-EP713. *J. Gen. Virol.* 87: 3703-3714, 2006.
 - 81) Sun Q., Choi G.H., Nuss D.L.: Hypovirus-responsive transcription factor gene *pro1* of the chestnut blight fungus *Cryphonectria parasitica* is required for female fertility, asexual spore development, and stable maintenance of hypovirus infection. *Eukaryot. Cell* 8: 262-270, 2009.
 - 82) 鈴木 信弘：マイコウイルス学の新展開 作物保護の新展開—バイオサイエンスのかけはし— (羽柴輝良編) ソフトサイエンス社 144-157, 2005.
 - 83) Suzuki N., Chen B., Nuss D.L.: Mapping of a hypovirus p29 protease symptom determinant domain with sequence similarity to potyvirus HC-Pro protease. *J. Virol.* 73: 9478-9484, 1999.
 - 84) Suzuki N., Maruyama K., Moriyama M., Nuss D.L.: Hypovirus papain-like protease p29 functions in *trans* to enhance viral double-stranded RNA accumulation and vertical transmission. *J. Virol.* 77: 11697-11707, 2003.
 - 85) Suzuki N., Nuss D.L.: Contribution of protein p40 to hypovirus-mediated modulation of fungal host phenotype and viral RNA accumulation. *J. Virol.* 76: 7747-7759, 2002.
 - 86) Tang J., Ochoa W.F., Li H., Havens W.M., Nibert M.L., Ghabrial S.A., Baker T.S.: Structure of *Fusarium poae* virus 1 shows conserved and variable elements of partitivirus capsids and evolutionary relationships to picobirnavirus. *J. Struct. Biol.* 2010. July 3 [Epub ahead of print]
 - 87) Turina M., Rostagno L.: Virus-induced hypovirulence in *Cryphonectria parasitica*: still an unresolved conundrum. *J. Plant Pathol.* 89: 165-178, 2007.
 - 88) Turina M., Zhang L., Van Alfen N.K.: Effect of *Cryphonectria hypovirus 1* (CHV1) infection on Cpkk1, a mitogen-activated protein kinase kinase of the filamentous fungus *Cryphonectria parasitica*. *Fungal Genet. Biol.* 43: 764-774, 2006.
 - 89) Urayama S., Kato S., Suzuki Y., Aoki N., Le M.T., Arie T., Teraoka T., Fukuhara T., Moriyama H.: Mycoviruses related to chrysovirus affect vegetative growth in the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*. *J. Gen. Virol.* 2010 Aug 25. [Epub ahead of print]
 - 90) Van de Sande W.W., Lo-Ten-Foe J.R., Van Belkum A., Netea M.G., Kullberg B.J., Vonk A.G.: Mycoviruses: future therapeutic agents of invasive fungal infections in humans? *Eur. J. Clin. Microbiol. Infect. Dis.* 29: 755-763, 2010.
 - 91) Van Alfen N.K., Jaynes R.A., Anagnostakis S.L., Day P.R.: Chestnut blight: biological control by transmissible hypovirulence in *Endothia parasitica*. *Science* 189: 890-891, 1975.
 - 92) Voytas D.F.: Pseudoviruses. In Mahy BWJ, Van Regenmortel, eds. *Encyclopedia of Virology*. Oxford: Elsevier. 3rd ed., pp. 352-357, 2008.
 - 93) Wickner R.B.: Double-stranded RNA viruses of *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol. Rev.* 60: 250-265, 1996.
 - 94) Wu Q., Wang X., Ding S.W.: Viral suppressors of RNA-based viral immunity: host targets. *Cell Host Microbe.* 8: 12-15, 2010.
 - 95) Wu M.D., Zhang L., Li G., Jiang D., Ghabrial S.A.: Genome characterization of a debilitation-associated mycovirus infecting the phytopathogenic fungus *Botrytis cinerea*. *Virology* 406: 117-126, 2010.
 - 96) Yaegashi H., Sawahata T., Ito T., Kanematsu S.: A novel colony-print immunoassay reveals differential patterns of distribution and horizontal transmission of four unrelated mycoviruses in *Rosellinia necatrix*. *Virology*, in press.
 - 97) 山下 修一：菌類，藻類ウイルスの分類. 植物病理学事典 (日本植物病理学会編) p.101-105, 1995.
 - 98) Yamashita S., Doi Y., Yora K.: A polyhedral virus found in rice blast fungus, *Pyricularia oryzae* Cavara. *Ann. Phytopath. Soc. Jpn.* 37: 356-359, 1971.
 - 99) Yokoi T., Takemoto Y., Suzuki M., Yamashita S., Hibi T.: The nucleotide sequence and genome organization of *Sclerophthora macrospora* virus B. *Virology* 264: 344-349, 1999.
 - 100) Yokoi T., Yamashita S., Hibi T.: The nucleotide sequence and genome organization of *Sclerophthora macrospora* virus A. *Virology* 311: 394-399, 2003.
 - 101) Yu X., Li B., Fu Y., Jiang D., Ghabrial S.A., Li G., Peng Y., Xie J., Cheng J., Huang J., Yi X.: A geminivirus-related DNA mycovirus that confers hypovirulence to a plant pathogenic fungus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 107: 8387-8392, 2010.
 - 102) Zhang L., Baasiri R.A., Van Alfen N.K.: Viral repression of fungal pheromone precursor gene expression. *Mol. Cell. Biol.* 18: 953-959, 1998.
 - 103) Zhang L., Churchill A.C.L., Kazmierczak P., Kim D.-H., Van Alfen N.K.: Hypovirulence-associated traits induced by a mycovirus of *Cryphonectria parasitica*

- are mimicked by targeted inactivation of a host gene. *Mol. Cell. Biol.* 13: 7782-7792, 1993.
- 104) Zhang X., Nuss D.L.: A host dicer is required for defective viral RNA production and recombinant virus vector RNA instability for a positive sense RNA virus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 105: 16749-16754, 2008.
- 105) Zhang X., Segers G.C., Sun Q., Deng F., Nuss D.L.: Characterization of hypovirus-derived small RNAs generated in the chestnut blight fungus by an inducible DCL-2-dependent pathway. *J. Virol.* 82: 2613-2619, 2008.

Mycoviruses and Virocontrol

Sotaro CHIBA, Hideki KONDO, Satoko KANEMATSU, and Nobuhiro SUZUKI

- 1) Institute of Plant Science and Resources, Okayama University, Kurashiki, Okayama 710-0046, Japan.
 2) National Institute of Fruit Tree Science, National Agricultural Research Organization (NARO), Morioka, Japan
 nsuzuki@rib.okayama-u.ac.jp

Viruses are widespread in all major groups of fungi. The transmission of fungal viruses occurs intracellularly during cell division, sporogenesis, and cell fusion. They apparently lack an extracellular route for infection. Recent searches of the collections of field fungal isolates have detected an increasing number of novel viruses and lead to discoveries of novel genome organizations, expression strategies and virion structures. Those findings enhanced our understanding of virus diversity and evolution. The majority of fungal viruses have dsRNA genomes packaged in spherical particles, while ssRNA mycoviruses, possessing or lacking the ability to form particles, have increasingly been reported. This review article discusses the current status of mycovirus studies and virocontrol (biocontrol) of phytopathogenic fungi using viruses that infect them and reduce their virulence. Selected examples of virocontrol-associated systems include the chestnut/chestnut blight/hypovirus and fruit trees/ white root rot fungus/ mycoviruses. Natural dissemination and artificial introduction of hypovirulent fungal strains efficiently contributed to virocontrol of chestnut blight in European forests. Attempts to control white root rot with hypovirulence-conferring mycoviruses are now being made in Japan.