

氏名	林 諭昕
授与した学位	博士
専攻分野の名称	学 術
学位授与番号	博甲第4649号
学位授与の日付	平成24年 9月27日
学位授与の要件	自然科学研究科 バイオサイエンス専攻 (学位規則第5条第1項該当)
学位論文の題目	Characterization of novel viruses from the white root rot fungus using the natural and an experimental host (chestnut blight fungus) (白紋羽病菌から分離された新規ウイルスの自然宿主および実験宿主(クリ胴枯病菌)を用いた性状解析)
論文審査委員	教授 鈴木 信弘 教授 Ivan Galis 准教授 且原 真木

学位論文内容の要旨

Rosellinia necatrix is a filamentous ascomycete that is pathogenic to a wide range of perennial plants worldwide, particularly in Europe and Japan. An extensive search for double-stranded RNA of a large collection of field isolates led to the detection of a variety of viruses and revealed a high virus infection rate approximately 20%. Since the first identification of a reovirus in this fungus in 2002, several novel viruses have been molecularly characterized that include members of at least five, two new and three established virus families (*Reoviridae*, *Partitiviridae*, *Megabirnaviridae*), and unassigned viruses. While a megabirnavirus (RnMBV1) and a mycoreovirus (MyRV3) cause phenotypic alterations, a partitivirus (RnPV1) shows latent infections. Viruses attenuating the virulence of a host fungus to their plant hosts attract much attention as agents for virocontrol (biological control using viruses) of fungi. However, many of the viruses in *R. necatrix* remain unexplored molecularly and biologically partially because of the unavailability of methods for virus introduction and elimination.

In this study, a total of 5 novel viruses were identified in *R. necatrix* and characterized using the natural host fungus and an experimental host fungus, *Cryphonectria parasitica* (chestnut blight fungus). *C. parasitica* has been established as a model fungus for studying virus/host and virus/virus interactions. The five novel viruses included *Rosellinia necatrix* quadrivirus 1 (RnQV1), *Rosellinia necatrix* victorivirus 1 (RnVV1), RnPV2, RnPV3, and RnPV6. Of particular note is that RnQV1 has recently been approved as the type species of the newly proposed virus family Quadriviridae by the Executive Members of the International Committee of Virus Taxonomy. Unfortunately, all the newly identified viruses infecting *R. necatrix* are unable to confer hypovirulence to the natural host *R. necatrix*. This study further showed that most *R. necatrix* viruses tested can infect a *dcl2* deletion mutant (RNA silencing defective strain) of *C. parasitica* and reduce its virulence to plant, but they do not replicate well in the wild type, silencing competent EP155. Only the exception to this is RnPV6 that confers hypovirulence to EP155. The fact that RnPV6 can reduce the virulence of an experimental host, *C. parasitica* may encourage researchers to utilize heterologous viruses for virocontrol agents. During the course of the study, several techniques were developed which enhance the investigation of virus etiology, replication and symptom induction in this mycovirus/fungal host system. For example, protocols for hyphal tipping for virus elimination, transfection with purified particles of homologous and heterologous viruses, and protoplast fusion between mycelially incompatible strains (intra species fusion), as well as between this fungus and different fungal species (inter species fusion), now become available.

This study showed that the *R. necatrix*/viruses is an amenable system, like the *C. parasitica*/viruses, for studying virus/host interactions, despite some drawbacks, such as the inability of the fungus to obtain isolates through asexual sporulation and the lack of a reverse genetics system for any *R. necatrix* viruses.

論文審査結果の要旨

白紋羽病菌、*Rosellinia necatrix*、は宿主範囲の広い植物病原菌の一種である。本菌は日本の果樹をはじめとする多年生作物の根に感染する土壌生息菌で、大きな被害をもたらす。1990年代後半から、ヴァイロコントロール（ウイルスを用いた糸状菌病の生物防除）を目指したウイルス探索が精力的に進められた。その結果、約20%の野外分離菌株にウイルスが感染していることが明らかとなった。しかし、性状解析されたウイルスは *Rosellinia necatrix megabirnavirus 1*, *Rosellinia necatrix partitivirus 1* など数種である。原因として、ウイルスの精製、除去、接種が困難であることが上げられる。

林女史は、ウイルス感染陽性の白紋羽病菌4株から5種の新規ウイルスの性状解析に成功した。ここでは、自然感染宿主の白紋羽病菌に加え、ウイルス・宿主相互作用解析のためのモデル糸状菌となりつつあるクリ胴枯病菌を用いた。5種の新規ウイルスは全て球形2本鎖RNAウイルスで、RnPV2, RnPV3, RnPV6, RnVV1, RnQV1である。RnQV1の新規性は際立っており、数週間前の国際ウイルス分類委員会役員会にて新しい科として承認された。生物学的性状を調べるためにこれら5種のウイルスのトランスフェクション法、単菌系分離、プロトプラスティングによるウイルス除去法を開発した。それらを用いて、生物学的性状を調べた。その結果、自然宿主では無病徴感染すること、すなわちヴァイロコントロール因子としては役立たないこと、しかし、クリ胴枯病菌ダイサー変異株では複製量が増大し、コロニー形態の変化をもたらすことが示された。一方、クリ胴枯病菌野生型ではウイルス複製量が極めて低く、継代中にウイルスが自然除去されることが示された。従って、RNAサイレンシングがウイルス宿主を規定している一つの要因となっていることが示された。例外として RnPV6 は野生型クリ胴枯病菌にもコロニー形態の変化と病原性の衰退をもたらした。これは異種ウイルスのヴァイロコントロール因子として有用性を示唆する。以上のように、白紋羽病菌／ウイルス系のウイルス宿主相互作用、ウイルス／ウイルス相互作用の研究のための土台作りに成功した。また、非自然宿主系を用いることで、RNAサイレンシングがウイルス宿主範囲を規定する一因であることが示された。

林女史は博士号に値する上記のような十分な研究成果を挙げ、またその過程で十分な研鑽を積んだことを学位論文審査員として認める。