

氏名	張 瑞
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5240号
学位授与の日付	平成27年 9月30日
学位授与の要件	環境生命科学研究科 農生命科学専攻 (学位規則第5条第1項該当)
学位論文の題目	Novel mycoviruses isolated from <i>Rosellinia necatrix</i> (白紋羽病菌から分離された新規マイコウイルス)
論文審査委員	教授 鈴木 信弘 教授 ガリス イバン 准教授 園田 昌司

学位論文内容の要旨

Rosellinia necatrix is a soil-borne phytopathogen that causes white root rot in perennial plants worldwide. This fungus has emerged as a useful host for studying virus-host and virus-virus interactions. The biological and molecular characterizations of three novel viruses infecting *R. necatrix*, which are designated as *Rosellinia necatrix* fusarivirus1 (RnFV1), yado-nushi virus 1 (YnV1) and yado-kari virus 1 (YkV1) are reported here. RnFV1 was isolated from a field strain NW10, while the other two viruses were from a single hypovirulent fungal strain, W1032 where a unique virus/virus interplay occurred. Established virion transfection of YnV1 revealed the YnV1 molecular variability in W1032. The development of an infectious cDNA clone of YkV1 contributed to unravel a unique mutualistic interaction between YnV1 and YkV1.

To investigate possible biological effects of RnFV1, two isogenic fungal strains, a virus-free and a virus-carrying strain, must be prepared. To this end, a recently developed technology using zinc ions allowed us to transfer RnFV1 to two mycelially incompatible *R. necatrix* strains. A biological comparison of the virus-free and -recipient isogenic fungal strains suggested that RnFV1 infects latently and thus has no potential as a virocontrol agent. The virus has an undivided positive-sense (+) RNA genome of 6286 nucleotides excluding a poly (A) tail. The genome possesses two non-overlapping open reading frames (ORFs): a large ORF1 that encodes RNA-dependent RNA polymerase (RdRp) and smaller ORF2 that encodes polypeptides of unknown function. A lack of coat protein genes was suggested by the failure of virus particle purification from infected mycelia. Sequence similarities were found in amino-acid sequence between RnFV1 putative proteins and counterparts of a previously reported mycovirus, *Fusarium graminearum* virus 1 (FgV1), and other virus-like sequences. It is proposed that a new taxonomic family termed *Fusariviridae* be created to include RnFV1 and FgV1.

YnV1 and YkV1 were isolated from field strain W1032, which shows a debilitation phenotype compared with virus-free isogenic strains. YnV1, which is present as a mixture of similar variants, has an undivided dsRNA genome of approximately 9.0 kilobase (kb). The genome contains two ORFs: ORF1 encoding polypeptides of capsid protein (CP) and ORF2 encoding polypeptides RdRp. YnV1 is distantly related to members of the family *Totiviridae*. Peptide mass fingerprinting (PMF) and N-terminal sequencing showed that CP initiates at the one third region of ORF1. YkV1 has a genome of approximately 6.3 kb containing one single large ORF. Phylogenetic analysis showed that YkV1 is placed into a cluster comprising (+)ssRNA virus members of the family *Caliciviridae*. The *Caliciviridae* family accommodates human-infecting viruses such as noro- and sapoviruses. However, unlike for these viruses, a lack of CP gene was suggested by the sequence and PMF analyses for YkV1. Immunological and molecular analyses revealed trans-encapsidation of not only YkV1 RNA but also RdRp by the major CP of the other virus, YnV1. Virion transfection assay and previous epidemiological data strongly suggest that YkV1 depends on YnV1 for viability, although it probably encodes functional RdRp. A full-length cDNA of YkV1 was infectious only in the presence of YnV1, confirming that YkV1 rely for its viability on YnV1. The comparison of accumulation of YnV1 genomic dsRNA between mycelia infected singly and doubly with YkV1 showed that YnV1 dsRNA was increased in fungal isolates infected by both viruses, suggesting that YkV1 benefits YnV1 replication and enhances production of YnV1 CP. I propose the term “RNA virophage” for the capsidless (+) single-stranded (ss) RNA virus, YkV1, which highjacks CP of the dsRNA virus, YnV1, for the trans-encapsidation of its genome and RNA polymerase at the replication site. Instead, YkV1 enhances dsRNA and CP production of YnV1.

This study represents the first discovery of (+)ssRNA viruses in *R. necatrix*, RnFV1 and YnKV1, and has revealed a new virus life style challenging the virus rules and concepts: a unique mutualistic interaction between YnV1 and YkV1.

論文審査結果の要旨

白紋羽病菌、*Rosellinia necatrix* は 400 以上の植物感染可能な病原菌のうちの菌である。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。本菌は病原として農業上重要であるが、同時に、ウイルス宿主として、ウイルス/宿主、ウイルス/ウイルス相互作用の解析にも用いられている。松本らによって、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、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。Mycoreovirus 3, *Rosellinia necatrix megabirnavirus 1*, *Rosellinia necatrix partitivirus 1* など、これまでに性状解析が進められたウイルスは全て 2 本鎖(ds)RNA をゲノムにももち、一部が宿主菌の病原性衰退を引き起こす。

張女史は、ウイルス感染野外分離株 N10、W1032 に感染していた RNA ウイルスの詳細な性状解析を進めた。N10 からはハイポウイルスに近縁の新規の科に属すると考えられるポジティブ鎖(+)一本鎖(ss)RNA ウイルス(*Rosellinia necatrix fusarivirus 1*)が、W1032 にも新しい科に属する新規の dsRNA ウイルス(*Yado-nushi virus 1*, YnV1)と(+)ssRNA ウイルス(*Yado-kari virus1*, YkV1)が分離された。YnV1 は菌類 dsRNA であるトテウイルスと遠縁の関係にあり、YkV1 はノロウイルスあるいはサポウイルスが包含されるカリシウイルス科に類縁関係が認められた。RnFV1 は宿主菌に無病徴感染することが示されたが、YnV1, YkV1 の生物学的性状は今後検討を要する。YnV1 と YkV1 の関係はユニークで、YkV1 が YnV1 のコート蛋白質ハイジャックし、RNA と RNA 合成酵素を粒子化し、複製の場として使っていることが強く示唆された。すなわち、YkV1 はキャプシドレスの RNA ヴァイロフェージと言える。一方、YnV1 は YkV1 により複製が促進された。従って、両者の間には未報告の共生関係が成り立ち、YkV1 はウイルスの概念を覆すライフスタイルを持つことが示された。

張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。