農研機構
NARO 国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構

マイコウイルスの人工感染法とその利用

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 農業・食品産業技術総合研究機構 果樹研究所 公開日: 2019-03-22 キーワード: mycovirus, biological control, artificial infection, hypovirulent factor 作成者: 佐々木, 厚子 メールアドレス: 所属:
URL	https://doi.org/10.24514/00001908

果樹研報　Bull. Natl. Inst. Fruit Tree Sci. 8：1 ～ 14, 2009

総　　説

マイコウイルスの人工感染法とその利用

佐々木　厚子

独立行政法人　農業・食品産業技術総合研究機構
果樹研究所　果樹病害研究チーム
〒 305-8605　つくば市藤本 2-1

Artificial Infection of Mycoviruses and their Application

Atsuko Sasaki

Plant Pathology Research Team, National Institute of Fruit Tree Science,
National Agriculture and Food Research Organization
Tsukuba, Ibaraki 305-8605, Japan

Summary

According to the 8th ICTV report, mycovirus species belong to seven families. Their artificial infection has generally been regarded as difficult. This paper describes several examples in which artificial infection with mycoviruses was achieved. It has been reported that most of the mycoviruses indicated no appreciable symptoms on their host fungi, but several species, especially those from plant pathogenic fungi, cause reduction in virulence; such species could be used for disease control. I and co-researchers conducted preliminary experiments to characterize mycoviruses in the white root rot fungus, Rosellinia necatrix and the violet root rot fungus, *Helicobasidium mompa* in order to find ways to control the diseases, using the hypovirulent factors presenting in fungal pathogens.

Key words: mycovirus, biological control, artificial infection, hypovirulent factor

1. はじめに

マイコウイルスは 1950 ～ 60 年代にラ・フランス病を引き起こした栽培マッシュルーム（*Agaricus bisporus*）からみいだされたものが最初の報告であり（Hollings, 1960），動植物，細菌に感染するウイルスに比較して発見が遅かった．マイコウイルスはその後，動物細胞のインターフェロンインデューサーとして一時注目され（Banks et al., 1970），日本でも同時期マイコウイルスの解析が行われた．しかしながら，これらの研究は実用化が困難であったために解析は次第に下火となった．マイコウイルスが再び解析されるようになったのは，植物病原糸状菌に感染して病原力を低下させるものが幾つかみいだされてからである．本稿ではマイコウイルスの種類およびその人工感染方法について概説する．さらにマイコウイルスの感染が宿主である糸状菌に与える影響の解析や果樹類紋羽病菌への応用の可能性について言及することで，人工感染利用の学術上，産業的意義について考察する．なお，本研究は生研センターイノベーション創出事業より支援を受けた．

2. マイコウイルスの種類

マイコウイルスは二本鎖 RNA（dsRNA）をゲノムとし，球状の粒子構造を持つものが多いが，ゲノムが一本鎖 +RNA（+ssRNA）のもの，稈状の粒子を持つもの，外被タンパク質を持たないものも存在する．鈴木 (2005) によれば、約 200 種の菌類からマイコウイルスの報告があるが，これ以降も更に新種のマイコウイルスが報告されており，その数は増していると考えられる．国際ウイルス分類委員会（International Committee on Taxonomy of Viruses：ICTV）による第 8 次報告では, 7 科のマイコウイルスが記載されている（Fauquet et al., 2005）．マイコウイルスの命名法は統一されていないが，近年発見されたものは，最初に宿主の菌類の学名を，その後にウイルス属名を表記するように統一する傾向がある．発見が古いマイコウイルスの中には，ウイルスがみいだされた菌株名やウイルス粒子の沈降係数が付記されていたり，あるいは単に virus と表記されている場合がある．なお，ウイルス名がイタリック体で表記されている場合はその種名を，ローマン体で表記されている場合はウイルスの系統名を表している．例えばクリ胴枯病菌からみいだされたハイポウイルス科ハイポウイルス属の *Cryphonectria hypovirus 1* という種には Cryphonectria hypovirus 1-Ep713 と Cryphonectria hypovirus 1-Euro7 の 2 系統が存在する．一方，種名と系統名が全く同じ場合もあり，トティウイルス科トティウイルス属の *Helminthosporium victoriae virus 190S* という種には Helminthosporium victoriae virus 190S という系統しか存在していない．系統名は略記され，Cryphonectria hypovirus 1-Ep713 は CHV-1/EP713 に，Helminthosporium victoriae virus 190S は HvV190S となる．

マイコウイルスのゲノム中には，多くの場合自身の複製に必要な RNA 依存型 RNA 複製酵素（RNA dependent RNA polymerase：RdRp）と外被タンパク質（Coat protein：CP）をコードした領域（Open reading frame: ORF）が存在するが，外被をもたないマイコウイルス種は CP をコードしていない．RdRp と CP の他に酵素や，塩結合のモチーフ等に相同性のある領域が存在するものもある．なお，植物ウイルスの移行タンパク質と相同性を示すタンパク質はマイコウイルスからはみいだされていない．

1）トティウイルス科トティウイルス属 (family *Totiviridae*, genus *Totivirus*)

トティ (Toti) はラテン語の“全体の，分けられていない (*totus*)”に由来する．4.6 ～ 6.7kbp の一本の dsRNA のゲノムを持ち，大きさ 40nm の球状粒子を持つ．ウイルスの複製に必須ではないが，これに同調して複製するサテライト dsRNA を持つ種もある．ゲノム上に２つの ORF が存在し，5’ 側に CP を，3’ 側には RdRp をコードしている．トティウイルス属では CP は単独で発現されるが，RdRp はリボゾームの -1 フレームシフト（mRNA の立体構造によってタンパク質翻訳中にリボゾームがある地点で 1 塩基後ろに戻り，別の読み枠で続けてタンパク質を翻訳する現象）によって，CP との融合タンパク質として発現するウイルスと，単独でそれぞれを発現するウイルスがある．後者に関しては，新しい属としてトティウイルス属から分けるべきだという提案がなされている（Cheng et al., 2003；Maejima et al., 2008）．粒子中に RNA の合成活性を持つ．タイプ種はコウボからみいだされた *Saccharomyces cerevisiae virus L-A* だが，他に解析が進んでいるものとしては，エンバクビクトリア葉枯病菌からみいだされた *Helminthosporium victoriae virus 190S*，トウモロコシ黒穂病からみいだされた *Ustilago maydis virus* H1 等がある．トティウイルス属のウイルスはこれら以外にも様々な菌類からみいだされている．

2）パーティティウイルス科パーティティウイルス属 (family *Partitiviridae*, genus *Partitivirus*)

パーティティ（Partiti）はラテン語の“分割された (*partitus*)”に由来する．大きさ 1.4 ～ 3.0kbp の 2 分節の dsRNA をゲノムに持つが，加えてサテライト dsRNA を持つ場合もある．多くの場合は 2 分節の長さが異なり，長い方に RdRp，短い方に CP をコードしているが，2 分節ともほぼ同じ大きさの場合もある．粒子の形態は 30 ～ 40nm の球状で，各分節を 1 つずつ別の粒子に含む．粒子中に RNA の合成活性を持つ．タイプ種はイネ科植物（*Danthonia* 属）のがまの穂病からみいだされた *Atkinsonella hypoxylon virus* であり，その他ジャガイモ苗立枯病菌からみいだされた *Rhizoctonia solani virus 717*，針葉樹根株心腐病菌からみいだされた *Heterobasidium annosum virus*，多犯性の穀物病原菌である *Fusarium poae* からみいだされた *Fusarium poae virus 1* などで報告がある．パーティティウイルス属の感染は様々な種の糸状菌から報告されている．パーティティウイルス科は植物に感染するアルファクリプトウイルス属とベータクリプトウイルス属および菌類に感染するパーティティウイルス属からなる．これらは血清学的に異なるものであるが，近年、イチゴの *Fu-*

ragaria chiloensislatent virus（Tzanetakis et al., 2008），サクランボの Cherry chlorotic rusty spot and Amasha cherry disease associated partitivirus（Coutts et al., 2004; Covelli et al. 2004），ラディッシュからの 4 種の dsRNA（Chen et al., 2006a, 2006b）等，パーティティウイルス属ウイルスの植物における感染が報告されている．

3）クライソウイルス科クライソウイルス属 (family *Chrysoviridae*, genus *Chrysovirus*)

大きさ 2.4 ～ 3.6kbp の 4 分節からなる dsRNA をゲノムに持つ．粒子の直径は 35 ～ 40nm で，各分節 1 つずつを含む．1 番長い dsRNA に RdRp を，2 番目に長いものに CP をコードしている．ICTV による第 7 次報告ではクライソウイルス属はパーティティウイルス科に含まれていたが，第 8 次報告では RdRp を用いた系統解析の結果から，新たな科として独立した．粒子中に RNA の合成活性を持つ．タイプ種は本科の名前の由来となったペニシリン産生菌からみいだされた *Penicillium chrysogenum virus* であり，他に前述のエンバクビクトリア葉枯病菌からみいだされた *Helminthosporium victoriae 145S virus* がある．近年，植物に感染する本科のウイルスが報告された（Covelli et al. 2004）．

4）レオウイルス科マイコレオウイルス属 (family *Reoviridae*, genus *Mycoreovirus*)

科名のレオ（Reo）は，最初に発見されたレオウイルスが，“人間や動物の呼吸器（*r*espiratory）や腸管（*e*nteric）に存在するものの疾患との関連が不明確な孤児（*o*rphan）”のようなウイルスであったことから，その頭文字を取って名付けられた．宿主範囲は動物界，植物界，菌界にまたがり，ウイルス最大の科である．属名のマイコ（myco）はギリシア語で“糸状菌”の意味で，ICTV の第 8 次報告で新たな属としてレオウイルス科の中にもうけられた．本科に属するウイルスは 10 ～ 12 分節の dsRNA をゲノムとし，これらが全て一つの粒子の中に含まれる．粒子は直径約 80nm の多重構造で，中心部のコア粒子中に RNA の合成に必要な酵素群をすべて持つ．タイプ種はクリ胴枯病菌からみいだされた *Mycoreovirus 1* であり，他にクリ胴枯病からみいだされた *Mycoreovirus 2* と白紋羽病菌からみいだされた *Mycoreovirus 3* がある．

5）ハイポウイルス科ハイポウイルス属 (family *Hypoviridae*, genus *hypovirus*)

ハイポ（Hypo）は英語の“病原力が弱い（*hypo*virulence）”に由来する．大きさ 9 ～ 13kbp の dsRNA をゲノムに持ち，RdRp をコードしているが，5’ 側にパパイン様プロテアーゼをコードしているものもある．CP はコードしておらず，ウイルスは RNA の転写活性を持つ直径 50 ～ 80nm の楕円形をした宿主由来の脂質膜に包まれているが，近年これはゴルジ体膜であることが示された（Jacob-Wilk et al. 2006）．本ウイルスはパパイン様プロテアーゼと RdRp の相同性から，植物の +ssRNA ウイルスであるポティウイルスに近縁であると考えられている．ハイポウイルスが感染したクリ胴枯病菌ではしばしばウイルスゲノムの一部が欠失し，キメラ状の配列を持つ defective dsRNA が見られる（Shapira et al., 1991；Yuan ・Hillman, 2001）．ハイポウイルスはクリ胴枯病菌からしかみいだされておらず，*Cryphonectria hypovirus 1* がタイプ種で，その他に *Cryphonectria hypovirus 2*，*Cryphonectria hypovirus 3*，*Cryphonectria hypovirus 4* がある．

6）バーナウイルス科バーナウイルス属 (family *Barnaviridae*, genus *Barnavirus*)

科名のバーナ（Barna）は英語の“稈状型の RNA（*bac*illiform-shaped *RNA*）”に由来する．*Mashroom bacilliform virus* のみからなる．ゲノムは大きさ約 4kb の単一の +ssRNA からなり，主に 19 × 50nm の短稈状の粒子を持つ．ゲノムには 7 つの ORF があり，このうち ORF2 はキモトリプシンに類似の推定セリンプロテアーゼモチーフを持ち，ORF3 が RdRp を，ORF4 が CP をコードしていると推定されている．

7）ナーナウイルス科ナーナウイルス属およびマイトウイルス属 (family *Narnaviridae*, genus *Narnavirus* and *Mitovirus*)

本科は 2 属からなる．科名および属名のナーナ（Narna）は英語で“裸の RNA ウイルス（*na*ked *RNA*）”に，マイト（Mito）は英語の“ミトコンドリアの（*mito*chondrial）”に由来する．大きさ 2.3 ～ 2.9kb の +ssRNA のゲノムを持ち，RdRp をコードしているが，それ以外の ORF は存在せず，粒子構造をもたない．ナーナウイルス属のウイルスは細胞質中に存在する．マイトウイルス属のウイルスはミトコンドリア内在性で，ミトコンドリアコドンに従った ORF を持つ．ナーナウイルス属ではコウボの *Saccharomyces 20S RNA narnavirus* が，マイトウイルス属ではクリ胴枯病菌からみいだされた *Cryphonectria mitovirus 1* がタイプ種である．他

にマイトウイルスではニレ立枯病菌からみいだされた *Ophiostoma mitovirus 3a*，*Ophiostoma mitovirus 4*，*Ophiostoma mitovirus 5*，および *Ophiostoma mitovirus 6* がある．

8）dsRNA をゲノムに持つその他のマイコウイルス

紫紋羽病菌から報告されたエンドルナウイルス属の Helicobacidium mompa endornavirus 1（HmEV1-670）（Osaki et al., 2006），菌核病菌から報告された Sclerotinia sclerotiorum debilitation-associated RNA virus（SsDRV）（Xie et al., 2006），むぎ類赤かび病菌から報告された Fusarium graminearum Virus-DK21（FgV-DK21）（Kwon et al. 2007），ナシやモモの胴枯病菌からみいだされた Diaporthe ambigua RNA virus（DaRV）（Preisig et al., 2000）はいずれも CP を持たないと推定されている．エンドルナウイルス属のウイルスは，植物，糸状菌，卵菌等広範な生物種から感染が報告されている（Fukuhara et al., 2005）．植物から報告されたものは CP を持たず，細胞内のコピー数が厳密に定まっていることが明らかにされている．HmEV1-670 は大きさ約 16.6kbp の単一ゲノムからなり，ここに巨大な ORF が 1 つ存在する（Osaki et al., 2006）．ORF 内部にはヘリカーゼと RdRp のモチーフがあり，この間に UDP グリコシルトランスフェラーゼと相同性を示す領域がある（Osaki et al., 2006）．SsDRV は大きさ約 5.4kbp の単一ゲノムからなり，内部に RdRp をコードした ORF が一つ，既知のものとは相同性を示さないタンパク質をコードした ORF が一つある（Xie et al., 2006）．SsDRV の RdRp は植物の“ポテックス様”ウイルスや後述の灰色かび病菌からみいだされた +ssRNA ウイルスの RdRp と相同性を示す（Xie et al., 2006）．FgV-DK21 はゲノムの大きさ約 6.6kbp で，純化を試みると不定形の小胞の凝集が電子顕微鏡で観察され，ここにウイルス dsRNA が存在する（Kwon et al. 2007）．FgV-DK21 のゲノム内部には 5 つの ORF が存在し，このうち ORF1 にコードされた RdRp の保存領域はハイポウイルス科の保存領域と相同性が高い．しかしながら FgV-DK21 は感染菌株中でゲノムから転写されたサブゲノムが存在していたことから，ポテックスウイルスと類似のゲノム構造と発現様式を持っていると考えられた（Kwon et al. 2007）．DaRV は大きさ約 4.1kbp の単一ゲノムからなり，内部に 2 つの ORF をもち，このうち 3’ 側の一つが植物のトンブスウイルス科の RdRp と相同性を示す（Preisig et al., 2000）．他方は既知のタンパク質と相同性を示さないが，N 末端側に膜貫通配列が存在し，ウイルス dsRNA と RdRp の複合体として膜に結合する可能性が示唆されている（Preisig et al., 2000）．

9）+ssRNA をゲノムに持つその他のマイコウイルス

広範な植物種に病気を引き起こす灰色かび病菌からは，ひも状の粒子を持つ Botrytis virus F（BVF）と Botrytis virus X（BVX）がみいだされている（Howitt et al., 2001, 2006）．ゲノムの大きさは BVF が 6.8kb（Howitt et al., 2001），BVX が 6.9kb で（Howitt et al., 2006），RdRp および salt-binding domain の相同性から両者ともに植物ウイルスの“ポテックス様”ウイルスとして提案されている．イネ科植物のうどんこ病菌からは，Sclerophthora macrospora virus A（SmV A）と Sclerophthora macrospora virus B（SmV B）の 2 種が報告されている（Yokoi et al., 1999, 2003）．SmV A は直径 30nm の球状粒子で，約 3kb，2kb，1kb の 3 分節からなり，推定 RdRp は植物ウイルスのノダウイルス科のものと，推定 CP は植物ウイルスのトンブスウイルス科のものと相同性を示す（Yokoi et al., 2003）．SmV B は 32nm の球状粒子で 5.5kb の単一のゲノムからなり，内部に 2 つの ORF が存在し，それぞれが CP と RdRp と推定されている（Yokoi et al., 1999）．RdRp はソベモウイルス属，ルテオウイルス属，バーナウイルス属ウイルスのものと相同性を示す（Yokoi et al., 1999）．ヒラタケからみいだされた Oyster mushroom spherical virus（OMSV）は直径 27nm の球状粒子で，大きさ約 5.8kb の単一ゲノムからなる（Yu et al., 2003）．内部には 7 つの ORF が存在し，ORF1 が RdRp を，ORF2 が CP をコードしているが，残りのものは既知のタンパク質の配列とは相同性を示さない（Yu et al., 2003）．

3. マイコウイルスの人工感染法

マイコウイルスの菌体外での複製系路はみいだされておらず，その伝搬は体細胞的に和合な菌糸間での菌糸融合の際に起こる細胞質の移行に伴ってのみ起こることから（Buck, 1998），基本的に自己と同一の菌糸でなければウイルスの伝搬は起こらない．前項で触れたようにマイコウイルスは多様な種から構成されることに加え，純化が困難であったこと，汎用性のある菌体への導入方法が確立されなかったことから，人工感染は解析が始められたごく初期に試みられた後，しばらく行われることがなく，感染による宿主への影響等の解析が立ち後れる一因となった．しかしながら，近

年幾つかのマイコウイルスと宿主間で人工感染法が確立し，その解析に大きな進展が見られている．現在行われている菌糸融合を利用しない人工感染法は糸状菌の細胞壁を酵素的に除去したプロトプラスト（またはスフェロプラスト）を利用する場合が多い．プロトプラストを利用したマイコウイルスの人工感染法の一つは，ウイルスフリーの株から調製したプロトプラストに，ウイルス発現ベクターを形質転換するか，ウイルスの +ssRNA の試験管内転写産物あるいは純化粒子を導入して菌糸を再生させる手法がある．プロトプラストを利用したもう一つの手法は，ウイルス感染株とウイルスフリー株からプロトプラストを調整し，両者を融合させてウイルスを感染させるプロトプラスト融合法がある．一方，菌糸融合を利用した人工感染は同種の体細胞的に和合な菌株間で行われるのが一般的だが（Buck, 1998），同種で体細胞的に不和合な菌株間（Charlton and Cubeta, 2007；Liu and Milgroom, 1996；Ihrmark et al., 2002），同種であっても生殖的な隔離が起こっている菌株間（Ihrmark et al., 2002），同属間で達成された報告がある（Buck et al., 2003; Liu et al., 2003）．

1）ウイルス発現ベクターの形質転換

本法はクリ胴枯病菌のハイポウイルスである CHV-1/EP713 と（Choi・Nuss, 1992），コウボのナーナウイルスである Saccharomyces 23S RNA narnavirus（SNV-23S）（Esteban・Fujimura, 2003）および Saccharomyces 20S RNA narnavirus（SNV-20S）で行われている（Esteban・Fujimura, 2005）．CHV1-EP/713 はウイルス cDNA に宿主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のプロモーターとターミネーターを連結したウイルス発現ベクターを，宿主のスフェロプラストにエレクトロポレーション法で形質転換して発現させる．宿主の核に挿入された cDNA から発現したウイルスは，エクソン除去のメカニズムにより 5’ 末端の非翻訳領域に 73bp の欠損が起こるが（Chen et al., 1994b），宿主に与える影響は全く変化しない．また，CHV1-EP/713 の発現ベクターは，パーティクルガン法により直接菌糸に導入して，クリ胴枯病菌だけでなく，同じディアポルテ目に属するホモプシス属菌やリンゴ腐らん病菌でもウイルスを発現させることができる（Sasaki et al., 2002）．SNV-20S および SNV-23S の発現ベクターは，ウイルス cDNA の 5’ 側にコウボの高発現ハウスキーピング遺伝子である 3- ホスホグリセリン酸キナーゼのプロモーターを連結してある．3’ 側にはウイルス以外の配列をトリミングするため，D 型肝炎ウイルス（hepatitis delta virus）のリボザイムコード領域を連結し，リボザイムの切断認識配列をウイルス cDNA の直後に配置してある．このベクターをコウボに形質転換してウイルスを発現させる．発現させた CHV1-EP/713, SNV-23S ともに 5’ 末端のベクター配列は何らかのメカニズムにより除去され，もともとのウイルスと同じ配列となる（Chen et al., 1994b；Esteban・Fujimura, 2003）．

2）試験管内転写産物の導入

試験管内転写産物の導入はクリ胴枯病菌の CHV-1/EP713 と Cryphonectria hypovirus 1-Euro7（CHV-1/Euro7）（Chen et al., 1994a；Chen・Nuss, 2000），ナシやモモの胴枯病菌の DaRV で成功が報告されている（Moleleki et al., 2003）．どちらの場合もウイルス cDNA の 5’ 側に T7 プロモーターを連結し，試験管内でウイルスの +ssRNA を転写させて，これをプロトプラスト化した菌に導入する．CHV-1/EP713 は本法でクリ胴枯病菌だけでなく，同じクリフォネクトリア属の菌およびそれと近縁のエンドチア属の菌に感染することが示されている（Chen et al., 1996）．

3）純化粒子の導入

純化粒子の導入はマイコウイルスの解析が行われたごく初期に試みられ（Lhoas, 1971；Stanway・Buck, 1984），その後ほとんど報告がない状態が続いていたが，近年になって灰色かび病菌の 33nm の粒子を持つ 6.8kbp の dsRNA（Castro et al., 2003），クリ胴枯病菌でみいだされたレオウイルスの Cryphonectria parasitica Mycoreovirus 1（9B21）（CpMYRV-1/9B21）で成功している（Hillman et al., 2004）． 灰色かび病菌，クリ胴枯病菌ともにスフェロプラストを調整し，純化したウイルス粒子を塩化カルシウムとポリエチレングリコール（PEG）でスフェロプラストに取り込ませ，菌糸を再生させて感染株を得ている．植物とは異なり，糸状菌は組織に分化させる必要がないことから，本法は粒子が純化できるマイコウイルスの人工感染に広く有効であると考えられる．

4）プロトプラスト融合法

本法ではウイルス感染株とウイルスフリー株の両方からプロトプラストを調製し，ポリエチレングリコールと塩化カルシウムの存在下で両者を融合させ，再生

した菌体からウイルスが感染したフリー株由来の菌体を選抜する．そのため，ウイルスフリー株は薬剤耐性あるいは栄養要求性等何らかの遺伝子マーカーを持つか，形態的に異なる株などウイルス感染株と区別が出来るものを使用する．本法は初期にイネいもち病菌で試みられた後(Lecoq et al., 1979)，黒コウジ菌で用いられている(Coenen et al., 1997；Varga et al., 1994；van Diepeningen et al., 1998)．プロトプラスト融合法によるマイコウイルス感染は同種間, 同属間(*Aspergillus nigar* のウイルスを *A. nidulans* に感染)だけでなく，穀物の普遍的な表生糸状菌である *F. poae* から黒コウジ菌へと属を越えての感染を達成した(van Diepeningen et al., 2000)．

4. マイコウイルスが糸状菌に与える影響

これまで報告されたマイコウイルスの多くは感染しても宿主に何の病徴も示さない(Buck, 1998)．これは菌株の収集を目的として野外から採集してくる場合，異常な生育を示すものは選抜されないということが一因であろう．一方，通常と異なる性状を示すウイルス感染株が得られた場合は，何らかの方法でウイルス感染株からウイルスを除去する(ウイルスフリー化)か，または健全株に新たに感染させることによって，初めてマイコウイルスが宿主に与える影響の有無を明らかにできる．しかしながら，マイコウイルスの人工感染は一般に困難であったことから，もっぱら体細胞的に和合なウイルスフリー株に対峙培養で移行させるか，ウイルス感染株をウイルスフリー化する方法で，宿主への影響が解析されてきた．マイコウイルスが宿主に与える影響は，感染が宿主に悪影響を引き起こす場合と，逆に感染が宿主に有利に働く場合が存在することが示されている．

1）感染して宿主に悪影響を及ぼすマイコウイルス

植物病原糸状菌ではクリ胴枯病菌から病原力を低下させるハイポウイルスが発見されて以来(Anagnostakis, 1982)，特に病原力を低下させるマイコウイルスが注目されてきた．これまでに病原力低下効果のあるマイコウイルスとしては，灰色かび病菌からみいだされた大きさ 6.8kbp で 33nm の球状粒子を持つ dsRNA (Castro et al., 2003)や大きさ 3.0kbp のマイトウイルスと推定される Botrytis cinerea debilitation-related virus（BcDRV)(Wu et al., 2007)，むぎ類赤かび病の新種ウイルス FgV-DK21（Chu et al., 2002)，芝等のダラースポット病菌からみいだされたマイトウイルスの Sclerotinia homoeocarpa mitovirus（Deng et al., 2003；Zhou・Boland, 1997)，菌核病菌からみいだされた新種ウイルス SsDRV (Xie et al., 2006)およびシークエンス未解析 dsRNA（Boland, 1992)，ジャガイモ黒あざ病菌からみいだされたマイトウイルスの RdRp と相同性を示す M2dsRNA（M2dsRNA は大部分が細胞質に存在し，DNA の状態も存在するため，マイトウイルスそのものではないと推定される)(Jian et al., 1997；Lakshman・Tavantzis, 1994)，ナシやモモの胴枯病菌の新種ウイルス DaRV（Smit et al., 1996)等，様々な植物病原糸状菌からみいだされている．クリ胴枯病菌ではハイポウイルス以外にも病原力低下効果のあるマイトウイルスとレオウイルスがみいだされている(Hillman et al., 2004；Polashock・Hillman, 1994)． また，病原力の低下に関与すると示唆されるマイコウイルスとしては，ニレ胴枯病菌のマイトウイルスである Ophiostoma mitovirus 4（OMV4)(Hong et al. 1998, 1999)とエンバクビクトリア病菌のクライソウイルスの Helminthosporium victoriae 145S virus (Hv145SV)がある．OMV4，Hv145SV ともにこれらが単独で感染した株が得られていないことから，他のウイルスとの重複感染によって病原力が低下するのか，単独感染でも病原力が低下させられるのかは今後の解析結果を待ちたい．

植物病原糸状菌以外では, 栽培キノコのマッシュルームやヒラタケで，マイコウイルスの感染が悪影響を示すことが知られている．これらのキノコではマイコウイルスの感染によって Die-Back あるいはラ・フランス病と呼ばれるような形態異常や変色，溶菌が観察される(Hollings, 1960；Romaine・Goodin, 2002；Yu et al., 2003)．このような症状を示すマッシュルームでは，複数の dsRNA がみいだされており，このうちのクライソウイルスと相同性のある La-France Isomeric virus（LIV)が原因である可能性が高いと推定されている(Romaine・Goodin, 2002)．

2）感染が宿主に有利に働くマイコウイルス

植物病原菌に感染して病原力を上昇させるマイコウイルスとしては，チョウセンニンジン根腐病菌の L1dsRNA（Ahn・Lee, 2001)とジャガイモ黒あざ病菌の M1dsRNA (Jian et al., 1997, 1998)が報告されている．チョウセンニンジン根腐病菌の L1dsRNA は大きさ約 6.0kbp で, パーティティウイルスと相同性を示す．ジャガイモ黒あざ病菌の M1dsRNA は大きさ約 6.4kbp で 100 アミノ酸以上のタンパク質をコードした ORF を 3

つ持ち，そのうち 1 つは 7 つのヘリカーゼモチーフ全てを持つものの，RdRp と相同な配列は存在しない．

エンドファイト菌である *Curvularia protuberata* からみいだされた新種の dsRNA ウイルスの Curvularia thermal tolerance virus（CThTV）も感染によって宿主に有利に機能する（Marquez et al., 2007）．本菌は火山地帯など地熱の高い地域に生育する単子葉植物 *Dichanthelium lanuginosum* に共生しているが，CThTV が感染した状態で共生することによって，*D. lanuginosum* に耐熱性を付与することが明らかとなった．

コウボでみいだされたトティウイルスの Saccharomyces cerevisiae virus LA（L1）（ScV-L-A，L-A）や，トウモロコシ黒穂病菌でみいだされたトティウイルスの Ustilasgo maydis virus（UmV）は，それ自身が感染しても無病徴であるが，サテライト dsRNA とともに感染することによって，ウイルス感染株がウイルスフリー株に溶菌性を示すようになり，ウイルス感染株の生存に有利となる（Bruenn, 2002；Wickner et al., 2002）．

5. 果樹類紋羽病菌のマイコウイルスとその人工感染

果樹類紋羽病は子嚢菌である白紋羽病菌 *Rosellinia necatrix* と担子菌の紫紋羽病菌 *Helicobasidium mompa* によって引き起こされる病害の総称である。両者とも難防除土壌病害であり，根部からの感染とその後の進展によって根が腐敗し，水や養分の通導が完全に絶たれてしまうと，樹は枯死してしまう．本病の防除には，罹病樹一樹につき毎年 50 ～ 200 リットルの農薬が潅注されるが（Kanadani et al., 1998），これは農家にとって手間のかかる作業であり，経済的に痛手であるうえ，環境汚染も懸念される．本病の特徴としては圃場での個体群構造が比較的単純で，体細胞的に不和合な個体数が少ないことが挙げられる（Katsumata et al., 1996；中村ら , 2000）．これは，圃場で有性世代を経て感染する糸状菌病害では複数の遺伝子座によって支配される体細胞和合性が，交配によって多様化して個体群構造が複雑化するのに対し，白紋羽病菌，紫紋羽病菌とも圃場ではクローンである栄養菌糸の蔓延により分布を拡大することによると考えられている（Katsumata et al., 1996；Nakamura et al. 2000）．これらのことから果樹類紋羽病菌では病原力を低下させるようなマイコウイルスを感染させて防除する新規の防除法が提案された（Matusmoto, 1998）．これを受けて，日本各地の圃場や山野から紋羽病菌の採収を行った結果，白紋羽病菌は 1968 菌株，紫紋羽病菌は 1496 菌株が収集され，それぞれ約 20%，60% の菌株でマイコウイルスと見られる dsRNA が含まれていた（Arakawa et al., 2002；Ikeda et al.,2004；松本，私信）．これらのうち，白紋羽病菌ではパーティティウイルス属の Rosellinia necatrix Partitivirus 1-W8 （RnPV1-W8）（Sasaki et al., 2005）とレオウイルス属の Rosellinia necatrix mycoreovirus 3 W370（RnMYRV3-W370）（Osaki et al., 2002；Wei et al., 2003, 2004）が，紫紋羽病菌ではパーティティウイルス属の Helicobasidium mompa virus（HmV）（Osaki et al., 2002）と Helicobasidium mompa partitivirus 1-1（HmPV1-1）（Osaki et al., 2004），トティウイルス属の Helicobasidium mompa totivirus1 V17（HmTV1-17）（Nomura et al., 2003），マイトウイルス属の Helicobasidium mompa mitovirus 1-18（HmMV1-18）（Osaki et al., 2005），そして前述のエンドルナウイルス属の HmEV1-670 で全塩基配列が決定された．これらのうち，病原力低下に関与するのは白紋羽病菌の RnMYRV3-W370（Kanematsu et al., 2004）と，紫紋羽病菌の HmTV1-17 と Hm EV1-670 である（Ikeda et al., 2003；Suzaki et al., 2005）．白紋羽病菌では近年 RnPV1-W8 と RnMYRV3-W370 の純化粒子を PEG と塩化カルシウムの存在下でプロトプラストに取り込ませて接種する人工感染法が確立された（Sasaki et al., 2006, 2007）．また白紋羽病菌ではプロトプラスト融合法による人工感染法も検討されている（佐々木ら , 2006）．紫紋羽病菌は継代培養中に通常 2 核（ダイカリオン）の菌糸が 1 核（モノカリオン）の菌糸になることがある．モノカリオンの菌糸は白色化する傾向にあり，体細胞和合性が異なっていても菌糸融合時に不和合反応を起こしにくい．紫紋羽病菌では本現象を利用したベクターモノカリオン法と名付けた手法で異なる体細胞和合性を示す株間でウイルスの移行を可能とした（Suzaki et al., 2003, 2005）．具体的には，ウイルスが感染したダイカリオン株とモノカリオン株を対峙培養してモノカリオン株にウイルスを移行させた後，ウイルスが感染したモノカリオン株とウイルスを移行させたいダイカリオン株を対峙培養して目的の株にウイルスを移行させる．本法で，紫紋羽病菌の HmV と HmTV1-17 が，もともとウイルスが感染していた株から，それらとは体細胞和合性の異なる菌株に移行した．

6. 終わりに

植物や動物ではウイルスの感染実験が容易なこと，特に全ゲノム計画が終了したモデル生物では宿主側の

遺伝的背景が明らかにされていることなどから，ウイルスの感染を阻止するメカニズムのひとつであるRNAサイレンシング(RNAを介して特定のRNAの分解をする機構)が良く研究されている．また植物ウイルスはRNAサイレンシングを回避するためのタンパク質をコードしていることが明らかとなっている(Levy et al., 2008)．糸状菌でもRNAサイレンシングは様々な種で解析されているが，RNAサイレンシングとマイコウイルスの関係は，全ゲノム計画が終了したモデル糸状菌のアカパンカビ(Choudhary et al., 2007)と黒コウジ菌(*A. nidulans*)(Hammond et al., 2008)，そして最も古くから解析が進んでいたクリ胴枯病菌から報告があるのみである(Segers et al., 2006, 2007)．黒コウジ菌，クリ胴枯病菌はともにウイルスを人工感染させることによってRNAサイレンシングの関与が検討されていることから(Hammond et al., 2008；Segers et al., 2006, 2007)，糸状菌のウイルス抵抗性解析における人工感染系確立の重要さが伺える．アカパンカビでは保存株の中にウイルス感染株が存在しないため，dsRNAを菌体内で発現させて検討していることから(Choudhary et al., 2007)，実際にウイルスを人工感染させた株ではどうなるのか非常に興味深い．クリ胴枯病菌の全ゲノム計画も進行中であることから，今後本分野はますます発展が見られるであろう．また，マイコウイルスは宿主に感染し，なおかつ宿主に致死的な影響を与えない関係でなければウイルス感染株の採集は困難である．しかしながら，例えば人工感染法によって，マイコウイルスを元々の宿主の菌とはかけ離れた異種の菌に感染させた場合などは，致死性ウイルスがみいだされる可能性がある．果樹類紋羽病菌では人工的なマイコウイルス感染が可能となったことから，本菌の遺伝子的解析，あるいは他の種からみいだされたマイコウイルスの感染実験により，新たな展開が期待される．

植物病原糸状菌では病原力を低下させるマイコウイルスが相当数みいだされているにもかかわらず，実際にこれらを用いて圃場レベルの病害防除に成功したのは，ヨーロッパにおけるクリ胴枯病菌と(Heininger・Rigligs, 1994)，芝生のダラースポット(Zhou・Boland, 1998)の2例のみである．前者は圃場内の病原菌の個体群構造が単純であったこと，後者は菌の体細胞不和合性が顕著でないことが成功した要因として挙げられている．前述したように果樹類紋羽病菌は圃場内の個体群構造が比較的単純であることや，幾つかのマイコウイルスでは人工感染系が確立していることから，マイコウイルスによる治療的防除が可能であると期待される．

マイコウイルスの重複感染は多数報告されているが(Buck, 1998)，植物ウイルスのように，先に感染したウイルスがその後のウイルスの感染を阻害するウイルスの干渉効果，あるいは複数のウイルスが感染して病徴等が劇症化するシナジー効果の有無に関する報告は少ない．ジャガイモ黒あざ病菌でM2dsRNAの病原力低下効果がM1dsRNAとの重複感染によって打ち消されること(Jian et al., 1997)，クリ胴枯病菌でのハイポウイルスのCHV-1/EP713とマイコレオウイルスのCpMYRV-1/9B21を重複感染させた場合，培養性状および病徴はCHV-1/EP713単独感染と類似したが，分生子形成は著しく低下し，CpMYRV-1/9B21のdsRNA量が増加すること等の報告がある(Sun et al., 2006)．紫紋羽病菌分離株の6割以上でdsRNAの保持が確認されたが，マイコウイルスが干渉作用を示す場合は，病原力低下を引き起こすマイコウイルスの導入がもともと感染していたウイルスによって阻害され，実用上問題となる可能性が予想される．また，白紋羽病菌，紫紋羽病菌ともに多数のウイルス感染株が収集され，そのうち幾つかのウイルスでは人工感染が可能になっていることから，複数のウイルスを組み合わせて感染させた重複感染株でウイルスのシナジー効果を生じるような組み合わせがみいだされる可能性がある．

マイコウイルスでは植物ウイルスにおける媒介生物に相当するものはこれまで報告がない．もしマイコウイルスでも媒介性物がみいだされたならば，体細胞不和合性にまったく制限されることなく，まさに任意のウイルスを任意の株に感染できるようになる(これも一種の人工感染法と言えるだろう)．これらの可能性を視野に入れて，今後更に解析を進めていけば，マイコウイルスによる糸状菌病の防除が達成されると思われる．

摘　要

マイコウイルスは現在7科が報告され，糸状菌を宿主とするマイコウイルスでは病原力低下を引き起こすものについて主に解析が行われている．マイコウイルスは一般に人工感染が困難であるが，一部のウイルスで人工感染法が確立されている．これまでにマイコウイルスによる果樹類紋羽病防除のための基礎的解析が行われ，病原菌の病原力低下を引き起こすマイコウイルスがみいだされた．それらの幾つかは人工感染が可能となっている．

引用文献

1) Ahn, I. P. and Y. H. Lee. 2001. A viral double-stranded RNA up regulates the fungal virulence of *Nectria radicicola*. Mol. Plant-Microbe. Interact. 14: 496-507.
2) Anagnostakis, S. L. 1982. Biological control of chestnut blight. Science. 215: 466-471.
3) Arakawa, M., H. Nakamura, Y. Uetake, and N. Matsumoto. 2002. Presence and distribution of double-stranded RNA elements in the white root rot fungus *Rosellinia necatrix*. Mycoscience 43: 21-26.
4) Banks, G.T., K. W. Buck, E. B. Chain, J.E. Darbyshire, F. Himmelweit, G. Ratti, T. J. Sharpe and D. N. Planterose. 1970. Antiviral activity of double stranded RNA from a virus isolated from *Aspergillus foetidus*. Nature. 227:505-507.
5) Boland, G. 1992. Hypovirulence and double–stranded RNA in *Sclerotinia Sclerotiorum*. Can. J. Plant pathol. 14: 10-17.
6) Bruenn, J. 2002. The double-stranded RNA viruses of Ustilago maydis and their killer toxins In :Tavantzis S. M. (ed). dsRNA genetic elements. p.109-124. CRC press, Boca Raton, Frolida.
7) Buck, K. W. 1998. Molecular variability of viruses of fungi In: Molecular variability of fungal pathogens. Bridge P, Couteaudier Y, Clarkson J. (eds.) p.53-72. CAB International, Wallingford, Oxfordshire.
8) Buck, K. W., C. M. Brasier, M. Paoletti and L. J. Crawford. 2003. Virus transmission and gene flow between two species of the Dutch elm disease fungi, *Ophiostoma ulmi* and *O. novo-ulmi*: deleterious viruses as selective agent for gene introgression In: Genes in the environment. Halis, R. S., Beringer, J. E., Godfray, H. J. C. (eds.) p. 26-45. Blackwell, Oxford. UK.
9) Castro, M., K. Kramer, L. Valdivia, S. Ortiz and A. Castillo. 2003. A double-stranded RNA mycovirus confers hypovirulence-associated traits to *Botrytis cinerea*. FEMS Microbiol. lett. 228: 87-91.
10) Charlton, N. D. and M. A. Cubeta. 2007. Transmission of the M2 dsRNA in Rhizoctonia solani anastomosis group 3 (AG-3). Mycologia. 99: 859-867.
11) Chen, B., G. H. Choi and D.L. Nuss. 1994a. Attenuation of fungal virulence by synthetic infectious hypovirus transcripts. Science. 264: 1762-1764.
12) Chen, B., M. G. Craven, G. H. Choi and D. L. Nuss. 1994b. cDNA-derived hypovirus RNA in transformed chestnut blight fungus is spliced and trimmed of vector nucleotides. Virology. 202: 441-448.
13) Chen, B., C-H. Chen, B. H. Bowman and D. L. Nuss. 1996. Phenotypic changes associated with wild-type and mutant hypovirus RNA transfection of Plant pathogenic fungi phylogenetically related to *Cryphonectria parasitica*. Phytopathology. 86: 301-310.
14) Chen, B. and D. L. Nuss. 2000. 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.
15) Chen, L., J. S. Chen, L. Liu, X. Yu, S. Yu, T. Z. Fu and W. H. Liu. 2006a. Complete nucleotide sequences and genome characterization of double-stranded RNA 1 and RNA 2 in the *Raphanus sativus*-root cv. Yipinghong. Arch. Virol. 151: 849-859.
16) Chen, L., J. S. Chen, H. Zhang and S. N. Chen. 2006b. Complete nucleotide sequences of three dsRNA segments from *Raphanus sativus*-root cv. Yipinghong with leaf yellow edge symptoms. Arch. Virol. 151: 2077-2083.
17) Cheng, J., D. Jiang, Y. Fu, G. Li, Y. Peng amd S. A. Ghabrial. 2003. Molecular characterization of a dsRNA totivirus infecting the sclerotial parasite *Coniothyrium minitans*. Virus Res. 93: 41-50.
18) Choudhary, S., H. C. Lee, M. Maiti, Q. He, P. Cheng, Q. Liu and Y. Liu. 2007. A double-stranded-RNA response program important for RNA interference efficiency. Mol. Cell Biol. 27:3995-4005.
19) Choi, G. H. and D. L. Nuss. 1992. Hypovirulence of chestnut blight fungus conferred by an infectious viral cDNA. Science. 257. 800-803.
20) Chu, Y. M., J. J. Jeon, S. J. Yea, Y. H. Kim, S.

H. Yun, Y. W. Lee and K. H. Kim. 2002. Double-Stranded RNA Mycovirus from *Fusarium graminearum*. Appl. Environ. Microbiol. 68: 2529-2534.

21) Coenen, A., F. Kevei and R. F. Hoekstra. 1997. Factors affecting the spread of double-stranded RNA viruses in *Aspergillus nidulans*. Genet Res. 69: 1-10

22) Coutts, R. H., L. Covelli, F. Di Serio, A. Citir, S. Acikgo, C. Hernadez, A. Ragozzino aand R. Flores. 2004. Cherry chlorotic rusty spot and Amasya cherry diseases are associated with a complex pattern of mycoviral-like double-stranded RNAs. II. Characterization of a new species in the genus Partitivirus. J. Gen. Virol. 85: 3399-3403.

23) Covelli, L., R. H. Coutts, F. Di Serio, A. Citir, S. Acikgo, C. Hernadez, A. Ragozzino and R. Flores. 2004. Cherry chlorotic rusty spot and Amasya cherry diseases are associated with a complex pattern of mycoviral-like double-stranded RNAs. I. Characterization of a new species in the genus Chrysovirus. J. Gen. Virol. 85: 3389-3397.

24) Deng, F., R. Xu, G. J. Boland. 2003. Hypovirulence-associated double-stranded RNA from *Sclerotinia homoeocarpa* is conspecific with Ophiostoma novo-ulumi mitovirus 3a-Ld. Phytopathology. 93: 1407-1414.

25) Esteban, R., L. Vega and T. Fujimura. 2005. Launching of the yeast 20 s RNA narnavirus by expressing the genomic or antigenomic viral RNA in vivo. J. Biol. Chem. 2005 280: 33725-3334.

26) Esteban, R. and T. Fujimura. 2003. Launching the yeast 23S RNA Narnavirus shows 5' and 3' cis-acting signals for replication. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 100: 2568-2573.

27) Fauquet, C. M., M. A. Mayo, J. Maniloff, U. Desselberger, L. A. Ball (eds). 2005. 1259pp. Virus Taxsonomy. 8th Report of the international committee on Taxonomy of Viruses. Elsevier Academic Press, San Diego, CA.

28) Fukuhara, T., R. Koga, N. Aoki, C. Yuki, N. Yamamoto, N. Oyama, T. Udagawa, H. Horiuchi, S. Miyazaki, Y. Higashi, M. Takeshita, K. Ikeda, M. Arakawa, N. Matsumoto and H. Moriyama. 2005. The wide distribution of endornaviruses, large double-stranded RNA replicons with plasmid-like properties. Arch. Virol. 151: 995-1002.

29) Hammond, T. M., M. D. Andrewski, M. J. Roossinck and N. P. Keller. 2008. *Aspergillus* mycoviruses are targets and suppressors of RNA silencing. Eukaryot. Cell. 7: 350-357.

30) Heiniger, U. and D. Rigking. 1994. Biological control of chestnut blight in Europe. Ann. Rev. Phytopathol. 32: 581-599.

31) Hillman, B. I., S. Supyani, H. Kondo and N. Suzuki. 2004. 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.

32) Hollings, M. 1962. Viruses associated with a dieback disease of cultivated mushroom. Nature. 196: 962-965.

33) Hong, Y., T. E. Cole, C. M. Brasier and K. W. Buck. 1998. Novel structures of two virus-like RNA elements from a diseased isolate of the Dutch elm disease fungus, *Ophiostoma novo-ulmi*. Virology. 242: 80-89.

34) Hong, Y., S. L. Dover, T. E. Cole, C. M. Brasier and K. W. Buck. 1999. Multiple mitochondrial viruses in an isolate of the Dutch Elm disease fungus *Ophiostoma novo-ulmi*. Virology. 258: 118-127.

35) Howitt, R. L., R. E. Beever, M. N. Pearson and R. L. Forster. 2001. Genome characterization of Botrytis virus F, a flexuous rod-shaped mycovirus resembling plant 'potex-like' viruses. J. Gen. Virol. 82: 67-78.

36) Howitt, R. L., R. E. Beever, M. N. Pearson and R. L. Forster. 2006. Genome characterization of a flexuous rod-shaped mycovirus, Botrytis virus X, reveals high amino acid identity to genes from plant 'potex-like' viruses. Arch. Virol. 151: 563-579.

37) Huang. S., and S. A. Ghabrial. 1996. Organization and expression of the double-stranded RNA genome of Helminthosporium victoriae 190S virus, a Totivirus infecting a plant pathogenic filamentous fungus. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 93: 12541-12546.

38) Ihrmark, K., H. Johannesson, E. Stenstrom

and J. Stenlid. 2002. Transmission of double-stranded RNA in *Heterobasidion annosum*. Fungal. Genet. Biol.36; 147-54.

39) Ikeda, K., H. Nakamura and N. Matsumoto. 2003. Hypovirulent strain of the violet root rot fungus, *Helicobasidium mompa*. J. Gen. Plant Pathol. 69: 385-390.

40) Ikeda, K., H. Nakamura, M. Arakawa and N. Matsumoto. 2004. 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.

41) Jacob-Wilk, D., M. Turina and N. K. Van Alfen. 2006. Mycovirus cryphonectria hypovirus 1 elements cofractionate with trans-Golgi network membranes of the fungal host *Cryphonectria parasitica*. J. Virol. 80: 6588-6596.

42) Jian, J., D. K. Lakshman and S. M. Tavantzis. 1997. Association of distinct double-stranded RNAs with enhanced or diminished virulence in *Rhizoctonia solani* infected potato. Mol. Plant-Microbe Interact. 10: 1002-1009.

43) Jian, J., D. K. Lakshman and S. M. Tavantzis. 1998. A virulence-associated, 6.4-kb, double-stranded RNA from *Rhizoctonia solani* is phylogenetically related to plant bromoviruses and electron transport enzymes. Mol. Plant-Microbe Interact. 11: 601-609.

44) Kanadani, G., H. Date and H. Nasu. 1998. Effect of Fluazinam soil-drench on white root rot of grapevine. Ann. Phytopath. Soc. Jpn. 64: 139-141.

45) Kanematsu, S., M. Arakawa, Y. Oikawa, M. Onoue, H. Osaki, H. Nakamura, K. Ikeda, Y. Kuga-Uetake, H. Nitta, A. Sasaki, K. Suzaki, K. Yoshida, and N. Matsumoto. 2004. A reovirus causes hypovirulence of *Rosellinia necatrix*. Phytopathology 94: 561-568.

46) Katsumata, H., T. Ogata and N. Matsumoto. 1996. Population structure of *Helicobasidium mompa* in an apple orchard in Fukushima. Annual Phytopathol. Soc. Jpn. 62: 490-491.

47) Kwon, S. J., W. S. Lim, S. H. Park, M. R. Park and K. H. Kim. 2007. 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: 304-315.

48) Lakshman,D. K. and S. M. Tavantzis. 1994. Spontaneous appearance of genetically distinct double-stranded RNA elements in *Rhizoctonia solani*. Phytopathology 84: 633-639.

49) Lecoq, H., M. Boissonnet -Menes and P. Delhotal. 1979. Infectivity and transmission of fungal viruses In: Fungal viruses. Molitoris, H. P., M. Holling and H. A. Wood (eds.). p34-47. Springer-Verlag Berlin Germany

50) Levy, A., M, Dafny-Yelin and T. Tzfira. 2008. Attacking the defenders: plant viruses fight back. Trends Microbiol. 16:194-197.

51) Lhoas, P. 1971. Infection of protoplasts from *Penicillium stoloniferum* with double-stranded RNA viruses. J. Gen. Virol. 13: 365-367.

52) Liu, Y.-M. and Milgroom M. G. 1996. Correlation between hypovirus transmission and the number of vegetative incompatibility (vic) genes different among isolates from a natural population of *Cryphonectria parasitica*. Phytopathology. 86: 79-86.

53) Liu, Y.-C., D. Linder-Basso, B. I. Hillman, S. Kaneko and M. G. Milgroom. 2003. Evidence for interspecific transmission of viruses in natural population of filamentous fungi in the genus Cryphonectria. Mol. Ecol.12; 1619-1628.

54) Maejima, K., M. Himeno, K. Komatsu, S. Kakizawa, Y. Yamaji, H. Hamamoto and S. Namba. 2008. Complete nucleotide sequence of a new double-stranded RNA virus from the rice blast fungus, *Magnaporthe oryzae*. Arch. Virol. 153: 389-391.

55) Marquez, L., R. Redman, R. Rodriguez and R. Roossinck. 2007. A Virus in a Fungus in a Plant: Three-Way Symbiosis Required for *Thermal Tolerance*. Science 315: 513-515.

56) Matsumoto, N. 1998. Biological control of root disease with dsRNA based on population structure of pathogens. Jpn. Agric. Res. Quart. 32: 31-35.

57) Moleleki, N., S. W. van Heerden, M. J. Wingfield, B. D. Wingfield and O. Preisig. 2003. Transfec-

tion of *Diaporthe perjuncta* with Diaporthe RNA virus. Appl. Environ. Microbiol. 69: 3952-3956.

58) Nakamura, H., Y. Uetake, M. Arakawa, I Okabe and M. Matsumoto. 2000. Observations the teleomorph of the white root rot fungus, *Rosellinia necatrix*, and related fungus, *Rosellinia aquia*. Mycoscience 41: 503-507.

59) 中村　仁・植竹ゆかり・荒川征夫・岡部郁子・松本直幸．2000．果樹類白紋羽病菌 MCG の圃場内分布．日本植物病理学会報 66: 100（講演要旨）

60) Nomura, K., H. Osaki, T. Iwanami, N. Matsumoto and Y. Ohtsu. 2003. Cloning and characterization of a totivirus double-stranded RNA from the plant pathogenic fungus, *Helicobasidium mompa* Tanaka. Virus Genes. 26: 219-226.

61) Osaki, H., H. Nakamura, K. Nomura, N. Matsumoto and K. Yoshida. 2005. Nucleotide sequence of a mitochondrial RNA virus from the plant pathogenic fungus, *Helicobasidium mompa* Tanaka. Virus Res. 107: 39-46.

62) Osaki, H., H. Nakamura, A. Sasaki, N. Matsumoto and K. Yoshida. 2006. An endornavirus from a hypovirulent strain of the violet root rot fungus, *Helicobasidium mompa*. Virus Res. 118: 143-149.

63) Osaki, H., K. Nomura, T. Iwanami, S. Kanematsu, I. Okabe, N. Matsumoto, A. Sasaki and Y. Ohtsu. 2002. Detection of a double-stranded RNA virus from a strain of the violet root rot fungus *Helicobasidium mompa* Tanaka. Virus Genes. 25: 139-145.

64) Osaki, H., K. Nomura, N. Matsumoto and Y. Ohtsu. 2004. Characterization of double-stranded RNA elements in the violet root rot fungus *Helicobasidium mompa*. Mycol. Res. 108: 635-640.

65) Osaki, H., C. Z. Wei, M. Arakawa, T. Iwanami, K. Nomura, N. Matsumoto and Y. Ohtsu. 2002. Nucleotide sequences of double-stranded RNA segments from a hypovirulent strain of the white root rot fungus *Rosellinia necatrix*: possibility of the first member of the *Reoviridae* from fungus. Virus Genes. 25: 101-107.

66) Polashock, J. J. and B. I. Hillman. 1994. A small mitochondrial double-stranded (ds) RNA element associated with a hypovirulent strain of the chestnut blight fungus and ancestrally related to yeast cytoplasmic T and W dsRNAs. Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 91: 8680-8684.

67) Preisig, O., N. Moleleki, W. A. Smit, B. D. Wingfield and M. J. Wingfield. 2000. A novel RNA mycovirus in a hypovirulent isolate of the plant pathogen *Diaporthe ambigua*. J. Gen. Virol. 81: 3107-3114.

68) Romaine, C. P. and M. M. Goodin. 2002. Unraveling the viral complex associated with La France disease od the cultivated Mushroom *Agaricus bisporus*. In :Tavantzis S. M. (ed). dsRNA genetic elements. p.237-257. CRC press, Boca Raton, Frolida.

69) Sasaki, A., M. Onoue, S. Kanematsu, K. Suzaki , M. Miyanishi, N. Suzuki, D. L. Nuss and K. Yoshida. 2002. Extending chestnut blight hypovirus host range within *Diaporthales* by biolistic delivery of viral cDNA. Mol. Plant-Microbe Interact. 15: 780-789.

70) Sasaki, A., M. Miyanishi, K. Ozaki, M. Onoue and K. Yoshida. Molecular characterization of a partitivirus from the plant pathogenic *ascomycete Rosellinia necatrix*. Arch. Virol. 150: 1069-1083.

71) Sasaki, A., S. Kanematsu, M. Onoue, Y. Oikawa and K. Yoshida. 2006 Infection of Rosellinia necatrix with purified viral particles of a member of *Partitiviridae* (RnPV1-W8). Arch. Virol. 151: 697-707.

72) Sasaki, A., S. Kanematsu, M. Onoue, Y. Oikawa , H. Nakamura and K. Yoshida. 2007. Artificial infection of *Rosellinia necatrix* with purified viral particles of a member of Mycoreovirus reveals its uneven distribution in single colonies. Phytopathology. 9: 278-286.

73) 佐々木厚子・中村仁・吉田幸二・島根孝典．2006．白紋羽病菌ウイルスフリー株とウイルス保持株のプロトプラスト融合によるウイルスの感染．日植病報 72：243.（講要）

74) Segers, G. C., R. van Wezel, X. Zhang, Y. Hong and D. L. Nuss. 2006. Hypovirus papain-like protease p29 suppresses RNA silencing in the natural fungal host and in a heterologous plant system. Eukaryot. Cell. 5: 896-904.

75) Segers, G. C., X. Zhang, F. Deng, Q. Sun and D. L.

Nuss. 2007. Evidence that RNA silencing functions as an antiviral defense mechanism in fungi. Proc. Natl. Acad. Sci. U S A. 104: 12902-12906.

76) Shapira, R., G. H. Choi, B. I. Hillman and D. L. Nuss. 1991. The contribution of defective RNAs to the complexity of viral-encoded double-stranded RNA populations present in hypovirulent strains of the chestnut blight fungus *Cryphonectria* parasitica. EMBO. J. 10: 741-746.

77) Smit, W. A., B. D. Wingfield and M. J. Wingfield. 1996. Reduction of laccase activity and other hypovirulence-associated traits in dsRNA-containing Strains of *Diaporthe ambigua* . Phytopathology. 86: 1311-1316.

78) Stanway, C. and K. W. Buck. 1984. Infection of protoplasts of the Wheat Take-all fungus, *Gaeumannomyces graminis* var. tritici, with double-stranded RNA viruses. J. Gen. Virol. 65: 2061-2066.

79) Sun, L., D. L. Nuss and N. Suzuki. 2006. 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.

80) Suzaki, K., K. Ikeda, A. Sasaki, S. Kanematsu, N. Matsumoto and K. Yoshida. 2005. Horizontal transmission and host-virulence attenuation of Totivirus in vioret root rot fungus *Helicobasidium mompa*. J. Gen. Plant Pathol. 71: 161-168.

81) Suzaki K., A. Sasaki, S. Kanematsu, N. Matsumoto and K. Yoshida. 2003. Transmissibility of viral double-stranded RNA between strains of the violet root rot fungus *Helicobasidium mompa* at the potential for vital dsRNA infection to this fungus using monokaryotic strains. Mycoscience. 44: 139-147.

82) 鈴木　信弘. 2005. マイコウイルス学の新展開. p.144-157. 羽柴輝良編・新しい作物保護への展開－バイオサイエンスへのかけはし－. ソフトサイエンス社, 東

83) Tzanetakis, I. E., R. Price and R. R. Martin. 2008. Nucleotide sequence of the tripartite Fragaria chiloensis cryptic virus and presence of the virus in the Americas. Virus Genes. 36: 267-272.

84) van Diepeningen, A. D., A. J. M. Debets and R. F. Hoekstra. 1998. Intra-and interspecies virus transfer in *Aspergilli* via protoplast fusion. Fungal Genet. Biol. 25: 171-180.

85) van Diepeningen, A. D., A. J. M. Debets, S. M. Slakhorst, C. Feket, L. Hornok and R. F. Hoekstra. 2000. Interspecific virus transfer via protplast fusion between *Fusarium* poae and black *Aspergillus* strain. Fungal Genet. Newslett. 47: 99-100.

86) Varga, J., F. Kevei, C. Vagvorgyi, A. Vriesema and J .H. Croft. 1994. Double-stranded mycoviruses in section Nigri of the *Aspergillus* genus. Can. J. Microbiol . 40: 325-329.

87) Wei, C. Z., H. Osaki, T. Iwanami, N. Matsumoto and Y. Ohtsu. 2003. Molecular characterization of dsRNA segments 2 and 5 and electron microscopy of a novel reovirus from a hypovirulent isolate, W370, of the plant pathogen *Rosellinia necatrix*. J. Gen. Virol. 84: 2431-2437.

88) Wei, C. Z., H. Osaki, T. Iwanami, N. Matsumoto and Y. Ohtsu. 2004. Complete nucleotide sequences of genome segments 1 and 3 of Rosellinia anti-rot virus in the family *Reoviridae*. Arch. Virol. 149: 773-777.

89) Wickner, R. B., J. C. Ribas and A. Seaefoss. 2002. The double-stranded RNA viruses of Saccharomyces cerevisiae. In :Tavantzis S. M. (ed). dsRNA genetic elements. p.67-108. CRC press, Boca Raton, Frolida.

90) Wu, M. D., L. Zhang, G. Q. Li, D. H. Jiang, M. S. Hou and H.-C. Huang. 2007. Hypovirulence and double-stranded RNA in *Botrytis cinerea*. Phytopathology. 97: 1590-1599.

91) Xie, J., D. Wei, D. Jiang, Y. Fu, G. Li, S. Ghabrial and Y. Peng. 2006. Characterization of debilitation-associated mycovirus infecting the plant-pathogenic fungus *Sclerotinia sclerotiorum*. J. Gen. Virol. 87: 241-249.

92) Yokoi, T., Y. Takemoto, M. Suzuki, S. Yamashita and T. Hibi. 1999. The nucleotide sequence and genome organization of Sclerophthora macrospora virus B. Virology. 264: 344-349.

93) Yokoi, T., S. Yamashita and T. Hibi. 2003. The nucleotide sequence and genome organization

of Sclerophthora macrospora virus A. Virology. 311:394-399.

94) Yu, H. J., D. Lim and H. S. Lee. 2003. Characterization of a novel single-stranded RNA mycovirus in *Pleurotus ostreatus*. Virology. 314: 9-15.

95) Yuan, W. and B. I. Hillman. 2001. In vitro translational analysis of genomic, defective, and satellite RNAs of Cryphonectria hypovirus 3-GH2. Virology. 281: 117-123.

96) Zhou, T. and G. J. Boland. 1997. Hypovirulence and Double-Stranded RNA in *Sclerotinia homoeocarpa*. Phytopathology. 87: 147-153.

97) Zhou, T. and G. J. Boland. 1998. Suppression of Dollar spot by hypovirulent isolates of *Sclerotinia homoeocarpa*. Phytopathology. 88: 788-794.