果樹類紋羽病菌で見いだされたマイコウイルスと病原力への影響

果樹研究所　兼松（かねまつ）　聡子（さとこ）・佐々木（ささき）厚子（あつこ）・大崎（おおさき）　秀樹（ひでき）*・須崎（すざき）　浩一（こういち）

はじめに

果樹類紋羽病とは，異なる二病害である白紋羽病と紫紋羽病を含む総称であり，白紋羽病は子のう菌 *Rosellinia necatrix* が，紫紋羽病は担子菌 *Helicobasidium mompa* が引き起こす土壌病害である。両病菌とも宿主範囲は広く，白紋羽病菌は81科306種，紫紋羽病菌は，45科104種の植物に感染するとされ，特に果樹類でその根を腐敗させて枯死に至らしめるため経済的被害が大きい。本病が発生した場合，防除のために1樹当たり50～200 *l* の農薬を隔年で土壌中に注入する必要があり，労力やコスト，および環境への影響も懸念される。

胞子が飛散する地上部糸状菌病害とは異なり，紋羽病は土壌中に進展する菌糸が圃場内でパッチ状に病勢を拡大させる。この土壌中の菌糸に病原力を低下させるウイルス「hypovirulence factor」を人工的に感染させることにより，環境にやさしい永続的な紋羽病の防除法を開発するという試み（松本，2004）が続けられている。hypovirulence factor は弱毒ウイルスのようにウイルス間の干渉作用，あるいは全身獲得抵抗性を誘起して宿主を抵抗性にするものではなく，マイコウイルスの感染によって植物病原糸状菌を病気にし，その病原力を低下させることを意図している。

マイコウイルスの感染は広範な糸状菌で認められるものの，ほとんどの場合は，表現型や環境への適応度に変化のない無病徴感染である。しかしながら，特定のマイコウイルスに感染している菌株は，衰弱や形態異常が引き起こされることがある。特に，植物病原糸状菌では病原力の低下や上昇が見られることがある（McCabe et al., 1999）。

紋羽病菌は土壌病害であるため，クリ胴枯病菌でのhypovirusの発見のように病斑の異常などを観察して菌株を選び出すことはできない。そこで多大な労力の下に数多くの紋羽病菌を分離して，マイコウイルスのゲノムと推定されるdsRNAの検出を行った結果，紫紋羽病菌の約65%，白紋羽病菌の約20%は，多様なサイズのdsRNAを保持してることが明らかにされた（中村・池田，2004）。これらの中でシークエンス解析がなされたものを，表-1に示す。

これら紋羽病菌から見いだされたウイルス様dsRNAからhypovirulence factorを選び出すためには，dsRNA感染菌株をフリーにして比較，さらにはdsRNAフリーの菌株にdsRNAを感染させて比較する必要がある。自然界においてマイコウイルスは細胞外から宿主細胞への感染経路が知られておらず，ウイルスの伝搬はウイルス保持株と非保持株の菌糸融合によってのみ行われると考えられている（Ghabrial, 1998）。しかしながら，糸状菌には自己・非自己の認識機構である細胞質不和合性があり，細胞質和合性の異なる系統間では，菌糸の融合後にプログラムされた細胞死が起こり，ウイルスの移行が阻害される（Milgroom and Cortesi, 2004）。

紋羽病菌においても同様で，対峙培養でコロニー間に褐色の境界線を生じる株は異なるMCG（mycelial compatibiliy group）に属し（松本，2004），ウイルスの移行は阻害された。そこで，白紋羽病菌ではプロトプラストを利用した純化ウイルスの感染系を，紫紋羽病菌では，ベクターモノカリオン法，すなわち1核菌糸株と2核菌糸株間では異なるMCGでも菌糸融合が起こる現象を利用して，ウイルスの特性解明を進めた（佐々木，2004）。

本稿では，植物防疫58巻2号での特集以降に，構造解析あるいは病原力への影響について調査された紋羽病菌のマイコウイルスについて紹介し，これらの利用における今後の課題について考えてみたい。

I　白紋羽病菌のウイルス

1　*Mycoreovirus 3*（RnMYRV-3/W370）

病原力の弱い白紋羽病菌W370株から見いだされた12分節のdsRNAは，粒子の形状およびシークエンス解析の結果から *Reoviridae* の1種であることが明らかになり，当初Rosellinia anti rot virusと命名された（大崎，2004 a）。その後，クリ胴枯病菌から見いだされたreovirusとともにICTV8で新設された *Mycoreovirus* に属する *Mycoreovirus 3*（RnMYRV-3/W370）と種名変

Host-virulence Attenuation of Some Mycoviruses in *Rosellinia necatrix* and *Helicobasidium mompa*.　By Satoko Kanematsu, Atsuko Sasaki, Hideki Osaki and Koichi Suzaki

（キーワード：白紋羽病，紫紋羽病，dsRNAウイルス）

* 現所属：近畿中国四国農業研究センター

表-1　白紋羽病菌・紫紋羽病菌から見いだされたウイルス

科	属	種名（略称）	ゲノム	粒子	引用
Reoviridae	*Mycoreovirus*	*Mycoreovirus 3* (RnMYRV-3/W370)	dsRNA，12 分節	直径 80 nm，球形	大崎，2004 a
Partitiviridae	*Partitivirus*	*Rosellinia necatrix partitivirus 1-W8*	dsRNA，2 分節	直径 25 nm，球形	Sasaki et al., 2005
Partitiviridae	*Partitivirus*	*Hellicobasidium mompa V70 virus*	dsRNA，dsRNA1 のみシークエンス	直径 25 nm，球形	大崎，2004 a
Partitiviridae	*Partitivirus*	*Hellicobasidium mompa V1 dsRNA1*	dsRNA，RDRP 鎖のみシークエンス	未調査	Osaki et al., 2004 b
Partitiviridae	*Partitivirus*	*Hellicobasidium mompa V1 dsRNA3*	dsRNA，RDRP 鎖のみシークエンス	未調査	Osaki et al., 2004 b
Totiviridae	*Totivirus*	*Hellicobasidium mompa totivirus 1-17*	dsRNA，satellite dsRNA	直径 40 nm，球形	大崎，2004 a
未定	*Endornavirus*	*Hellicobasidium mompa endornavirus 1-670*	dsRNA	裸の dsRNA	Osaki et al., 2006
Narnaviridae	*Mitovirus*	*Hellicobasidium mompa mitovirus 1-18*	ssRNA，＋鎖	裸の dsRNA	Osaki et al., 2005

更された（Fauquet et al., 2005）。

本ウイルスは，W370 菌株を単菌糸分離して得られたウイルスフリー菌株と元株との病原力比較により，白紋羽病菌の病原力低下をもたらす可能性が示唆された（中村・池田，2004）。そこで，RnMYRV-3/W370 が病原力低下因子であることを証明するために，得られたウイルスフリーの菌株へ，RnMYRV-3/W370 の戻し接種を試みた。本試験では W370 菌株とウイルスフリー菌株とを対峙培養し，菌糸融合による移行試験を行った。その際に，ウイルスを保有している W370 菌株の菌糸がウイルスフリー菌株側へ混入することを防ぐため，ウイルスフリー菌株にハイグロマイシン B 耐性遺伝子を形質転換して，薬剤による選抜を可能にした。こうして作出したウイルス感染菌株とウイルスフリー菌株をリンゴ実生苗に接種して病原力を比較した（図-1）。その結果，ウイルス感染菌株による発病はウイルスフリー菌株に比較して低かったため，RnMYRV-3/W370 の感染により W370 菌株の病原力は低下することが明らかとなった（Kanematsu et al., 2004）。

さらに RnMYRV-3/W370 が W370 菌株以外の白紋羽病菌株で病原力の低下を引き起こすのかを調べるため，W370 菌株と異なる MCG に属するウイルスフリーの菌株に，プロトプラスト感染系で純化ウイルスを感染させたところ，前述の移行試験と同様に感染菌株での病原力低下が確認された（Sasaki et al., 2007）。以上の結果から，RnMYRV-3/W370 は白紋羽病菌の普遍的な hypovirulence factor である可能性が示された。

RnMYRV3/W370 は，白紋羽病菌の菌体内で不均一に分布する（Sasaki et al., 2007）ためか，菌体から脱落しやすいなど，生物防除剤として利用するには大きな欠点

図-1　RnMYRV-3/W370 感染菌株をリンゴ実生へ接種
W370：野生株，W370T1：単菌糸分離により W370 から RnMYRV-3 をフリーにした株，RT37-1：W370T1 をハイグロマイシン耐性にした株，RT37-1（W370dsRNA＋）1～4：対峙培養により，W370 から RT37-1 へ RnMYRV-3/W370 を移行させた株.

もある。そこで，日本各地の白紋羽病菌から見いだされた RnMYRV3 株（Ikeda et al., 2005 b）について，RnMYRV-3/W370 との性状比較をした。白紋羽病菌の菌株間の遺伝的差異に影響されずにウイルス感染による菌への影響を比較するため，プロトプラスト化したテスター菌株に純化したウイルス株をそれぞれ感染させた。その結果，病原力低下能や菌体からの脱落しにくさについてはウイルス株に多様性のあることが伺え（兼松ら，2006），純化ウイルスを用いたプロトプラスト接種系により生物防除資材としてより有望なウイルスの選抜に繋がることが期待される。

2 *Rosellinia necatrix partitivirus 1-W8* (RnPV1-W8)

partitivirusには子のう菌と担子菌の多様な菌種からの報告例があり（Fauquet et al., 2005），多くの菌類に普遍的に存在すると考えられる。紫紋羽病菌からのみならず（表-1；大崎，2004 a），白紋羽病菌W8株からもpartitivirusが検出された（表-1；Sasaki et al., 2005）。本ウイルスはRNA依存RNA複製酵素（RdRp）をコードするRNA1（2299 bp）と外皮タンパク質（CP）をコードするRNA2（2279 bp）の2分節をゲノムとする球状ウイルスである。RdRpは子のう菌である*Fusarium poae*の，CPは担子菌の*Rhizoctonia solani*から見いだされたpartitivirusと相同性が高く，ウイルスの糸状菌内での進化過程について考えるうえでも興味深い。

W8菌株は比較的病原力が弱く，L1，L2，Mの3種のdsRNAが検出される。そのうちの，M-dsRNAのみがRnPV1-W8のゲノムである。プロトプラストを介してRnPV1-W8純化ウイルスをウイルスフリー菌株に接種した結果，本ウイルスは白紋羽病菌の病原力，培養性状等への影響は認められず，他のpartitivirusと同様に潜在的に感染していると考えられた（Sasaki et al., 2006）。

II 紫紋羽病菌のウイルス

1 *Hellicobasidium mompa endornavirus 1-670* (HmEV1-670)

弱病原力の紫紋羽病菌V670菌株に含まれる3種の異なるサイズのdsRNA，L1，L2，Sのうち，L1dsRNAはhypovirulence factorであることが示唆されている（中村・池田，2004）。V670L1dsRNAは全長のシークエンス解析結果から，巨大dsRNAレプリコンと呼称されイネやソラマメ，インゲンマメなどで花粉や種子への垂直伝搬はするが水平伝搬はしないとされるendornavirusに類似していることが明らかとなった（Osaki et al., 2006）。本ウイルスのゲノムサイズ（16,614 bp）はこれまでに報告されたマイコウイルスにおいて最大である。プラス鎖に5373アミノ酸からなる一つの大きな翻訳領域（ORF）があり，その中にそれぞれRdRP，UDP糖転移酵素，ヘリカーゼで保存されているモチーフが認められた。最近，ベイマツの疫病菌である*Phytophthora*種からもendornavirusが報告された（Hacker et al., 2005）。HmEV1-670のRdRp領域は*Phytophthora*の，ヘリカーゼ領域は植物のendornavirusに相同性が高く，本ウイルスが植物と植物病原菌を行き来しながら進化したことを伺わせ，興味深い。

2 *Hellicobasidium mompa totivirus 1-17* (HmTV1-17)

弱病原力の紫紋羽病菌V17菌株にはLとSの2サイズのdsRNAが含まれる。これらは全長のシークエンス解析により*Totivirus*の1種であることが明らかになり，*Hellicobasidium mompa totivirus 1-17*（HmTV1-17）と名付けられた（表-1；大崎，2004 a）。本ウイルスは単菌糸分離によってはV17菌株から脱落せず，菌の病原力低下への影響は不明であったため，前述のモノカリオン菌株を介して細胞質和合性の異なる紫紋羽病菌の系統にHmTV1-17を移行させ，ウイルス感染菌株を得た。これらウイルス感染菌株は，HmTV1-17フリーの親菌株に比較して，リンゴ苗に対する病原力が低下したことから，HmTV1-17は紫紋羽病菌の病原力を低下させることが示唆された（Suzaki et al., 2005）。また，ウイルスフリーの菌株にHmTV1-17を単独感染させたものよりも，いくつかのdsRNAを含んでいた菌株にHmTV1-17を移行させた菌株の方に病原力低下効果が強く出たことから，ウイルスの混合感染による病原力低下効果増強の可能性も考えられる。

3 *Hellicobasidium mompa mitovirus 1-18* (HmMV1-18)

やや弱い病原力をしめす紫紋羽病菌V18菌株から見いだされた全長2,411 bpのdsRNAは，ミトコンドリアの遺伝コードと同様にUGAをトリプトファンとし，プラス鎖に700アミノ酸からなる一つのORFを有していた（Osaki et al., 2005）。このORFに保存されたRdRp領域の相同性から，本ウイルスは一本鎖RNAゲノムで粒子を形成せずミトコンドリアに内在するmitovirusの新種と考えられた。他のmitovirusと同様に，本ウイルスは5′端と3′端にステムループ構造をもち，さらに両末端にある逆向きの相補的な配列によって，パンハンドル構造をとることが推定された。クリ胴枯病菌やニレ胴枯病菌から見いだされているmitovirusは宿主菌の病原力を低下させることから，HmMV1-V18についてもその効果が期待されるが，現在のところ検討できておらず，今後の課題である。

おわりに

前章までに述べたように，紋羽病菌から見いだされた多種のウイルス様dsRNAのうち，いくつかについて構造解析によりウイルス種が同定され，「hypovirulence factor」として病原力を低下させるマイコウイルスも発見された。これらは発病を遅延させるものであり全く発病しない非病原性化をもたらすものではないため，実用

化の際は予防的にウイルスを含む菌を施用するのではなく，発病した樹で病原菌にウイルスを導入し，治療的に処理することが期待される。しかしながら，現在のところは安定した治療効果を確認できるところまでは至っておらず，生物防除剤として利用するためには，圃場に生息する病原菌に対するウイルス導入手法の開発や病原菌パッチ内への速やかなウイルス拡散，ウイルスの菌体内での安定性，ウイルス保有菌体の土壌中での安定性など，克服すべき多くの課題が残されている。

また，圃場の菌株は何らかのウイルスに感染している割合が高いので，さらなる有望ウイルスを追加感染させる例も想定される。圃場分離菌株の電気泳動像からも混合感染が推定されたように（中村・池田，2004），紫紋羽病菌 V1 菌株では異なる partitivirus 種の混合感染（表-1）が，V670 菌株では endornavirus と未同定 dsRNA 種，また白紋羽病菌 W8 菌株では partitivirus と未同定ウイルス，W780 菌株では mycoreovirus と未同定ウイルス（Ikeda et al., 2005 b）の混合感染が可能であることが示された。マイコウイルスにおいて，ウイルス間の干渉効果についての研究は少なく，今後は同定されたウイルス種を用いた混合感染による試験が期待される。

紋羽病菌において見いだされたウイルスには未解析のものも多数残されている。これらの中にさらに有望な hypovirulecne factor が存在するか精査するとともに，現在得られているウイルスの育種，混合感染による相乗効果など，可能な限り病原力を低下させ，なおかつ圃場内でのウイルス増殖，拡散が良い株を選抜する努力が必要と考えている。

マイコウイルスは，自然界においては菌糸融合による移行のみしか証明されていないため，その宿主は菌糸融合可能な限られた範囲であり，宿主とウイルスは共進化したと考える説がある（Buck, 1998）。しかしながら，上述のウイルス構造解析結果からも明らかなように，ウイルスゲノム内でも系統的に大きく異なる宿主由来のゲノムが混在していることがある。また，プロトプラスト感染系や感染性クローンによる人工接種により強制的に接種すると，由来の異なるウイルスが他宿主菌で感染・増殖する例もある（佐々木，2004）。さらに圃場での経時的な菌株のサンプリングによって，同一 MCG の菌糸融合に依存しないウイルスの感染を想起させる観察例がある（Ikeda et al., 2005 a；古屋ら，2007）。例えば，mycoreovirus はダニ媒介性の coltivirus と近縁であり，野外での本ウイルスの伝搬経路においては菌糸融合のみならず昆虫などの媒介者が存在するのかなどの興味がもたれる。

これらマイコウイルスが菌糸融合以外の手段で水平伝搬可能かもしれないという事実は，生物防除剤としてマイコウイルスを利用するうえで心強いものである。異なる圃場間での紋羽病菌の MCG には多様性が見られるために，生物防除資材となるマイコウイルスを治療対象圃場へ導入するためには，現在のところ各圃場で優先している MCG の菌株に人為的にウイルスを導入してから圃場に戻す必要があるが，この壁を越えられる感染手法を自然界から見つけることが期待される。

引用文献

1) Buck, K. W.（1998）: Molecular variability of fungal pathogens, CAB International, Wallingford, U.K., p. 53 ～ 72.
2) Fauquet, C. M. et al.（2005）: Virus Taxonomy, Elsevier Academic Press, Tokyo, 1259 pp.
3) 古屋典子ら（2007）: 日植病報 印刷中（講要）.
4) Ghabrial, S. A.（1998）: Virus genes **16** : 119 ～ 131.
5) Hacker, C. V. et al.（2005）: J. Gen. Virol. **86** : 1561 ～ 1570.
6) Ikeda, K. et al.（2005 a）: FEMS Microbiol. Ecol. **51** : 293 ～ 301.
7) ――― et al.（2005 b）: ibid. **54** : 307 ～ 315.
8) Kanematsu, S. et al.（2004）: Phytopathology **94** : 561 ～ 568.
9) 兼松聡子（2006）: 日植病報 **72** : 323（講要）.
10) 松本直幸（2004）: 植物防疫 **58** : 47 ～ 49.
11) McCabe, P. M. et al.（1999）: Trends Microbiol. **7** : 377 ～ 381.
12) Milgroom, M. G. and P. Cortesi（2004）: Annu. Rev. Phytopathol. **42** : 311 ～ 38.
13) 中村　仁・池田健一（2004）: 植物防疫 **58** : 50 ～ 53.
14) 大崎秀樹（2004 a）: 同上 **58** : 59 ～ 62.
15) Osaki, H. et al.（2004 b）: Mycol. Res. **108** : 635 ～ 640.
16) ――― et al.（2005）: Virus Res. **107** : 39 ～ 46.
17) ――― et al.（2006）: ibid. **118** : 143 ～ 149.
18) 佐々木厚子（2004）: 植物防疫 **58** : 54 ～ 58.
19) Sasaki, A. et al.（2005）: Arch. Virol. **150** : 1069 ～ 1083.
20) ――― et al.（2006）: ibid. **151** : 697 ～ 707.
21) ――― et al.（2007）: Phytopatholgoy **97** : 278 ～ 286.
22) Suzaki, K. et al.（2005）: J. Gen. Plant Pathol. **88** : 161 ～ 168.

発生予察情報・特殊報（19.5.1 ～ 5.31）

各都道府県から発表された病害虫発生予察情報のうち，特殊報のみ紹介。**発生作物：発生病害虫**（発表都道府県）発表月日。都道府県名の後の「初」は当該都道府県で初発生の病害虫。

※詳しくは各県病害虫防除所のホームページまたは JPP-NET（http://www.jppn.ne.jp/）でご確認下さい。

■ニンジン：ニンジンハネオレバエ（青森県：初）5/23

■コナラ：ムラクモカレハ（大阪府：初）5/24