

氏名	LAKHA SALAIPETH
授与した学位	博士
専攻分野の名称	農学
学位授与番号	博甲第4983号
学位授与の日付	平成26年 3月25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	A novel mycovirus <i>Rosellinia necatrix</i> megabirnavirus 1: Biological and molecular characterization, gene expression strategy, and genome rearrangements (新規マイコウイルス <i>Rosellinia necatrix</i> megabirnavirus 1: 生物学のおよび分子生物学的性状, 遺伝子発現戦略, ゲノム再編成)
論文審査委員	教授 鈴木 信弘 教授 ガリス イバン 准教授 且原 真木

学位論文内容の要旨

Rosellinia necatrix causes white root rot disease in many plant species including perennial fruit trees. The pathogen is mainly disseminated in the form of mycelia and can survive in the soil for many years. This soil-borne fungus is difficult to control by conventional methods. Therefore, mycoviruses that can attenuate the virulence of their plant-pathogenic fungus attract interests as biocontrol agents. This study represents a thorough molecular and biological characterization of a novel mycovirus, termed *Rosellinia necatrix* megabirnavirus 1 (RnMBV1) using the natural host and an experimental host fungus. The virus isolated from the natural host, *R. necatrix* was shown to have 2 dsRNA genome segments, dsRNA1 and dsRNA2, of about 9 and 7.2 kb. dsRNA1 and 2 each possess 2 ORFs. The BLAST search detected low levels of sequence similarities only between dsRNA1 ORF2 and RdRps of members of the families *Totiviridae* and *Chrysoviridae*. Phylogenetic tree based on an RdRp sequence alignment revealed that RnMBV1 is placed in a distinct clade from reported dsRNA mycoviruses. Purified virus particles of about 50 nm in diameter were observed under the electron microscope. SDS-PAGE of particles showed a single major band corresponding to 135 kDa that possibly represents the major capsid protein. This protein was shown immunologically and biochemically to be encoded by dsRNA1 ORF1. A transfection protocol with purified virions was developed to demonstrate the ability of RnMBV1 to reduce the host virulence to apple seedlings.

Purified RnMBV1 particles were then transfected into *Cryphonectria parasitica*, a filamentous fungus that has been used as a model for mycovirus research for further studies. This provided an additional example of *C. parasitica* serving as a versatile, heterologous fungus for exploring virus-host interactions and virus gene expression strategies. Transfection of RnMBV1 particles into an RNA silencing-defective strain ($\Delta dcl-2$) of *C. parasitica* and subsequent anastomosis with the wild type strain (EP155) resulted in stable persistent infection in both host strains. Intriguingly, whilst RnMBV1 reduced both virulence and growth rate in $\Delta dcl-2$, it attenuated virulence without affecting significantly other traits in EP155. Western blot analysis demonstrated the presence of a 250 kDa protein in purified virion preparations, which could be expressed as a CP-RdRp fusion product via a -1 frameshift.

Some RnMBV1 mutants with genome rearrangements occurred after transfection of *R. necatrix* and *C. parasitica* as well. One of the mutants RnMBV1-RS1 retained dsRNA1, encoding capsid protein (ORF1) and RNA-dependent RNA polymerase (ORF2), and had a newly emerged segment named dsRNAS1, but with loss of dsRNA2 were detected. Analyses of two variants of dsRNAS1 revealed that they both originated from dsRNA1 by deletion of ORF1 and partial tandem duplication of ORF2, retaining a much shorter 50 untranslated region (UTR). *R. necatrix* transfected with RnMBV1-RS1 virions showed maintenance of virulence on host plants compared with infection with RnMBV1. This suggests that dsRNA2, while dispensable for virus replication, is required to reduce the virulence.

These combined results indicate that RnMBV1 is a novel bipartite dsRNA virus, with potential for biological control (virocontrol), that belongs to a new virus family. The mutant viral strains will provide additional tools for further functional analyses of RnMBV1.

論文審査結果の要旨

白紋羽病菌, *Rosellinia necatrix* は土壌生息性の植物病原菌の一種である。本菌は宿主範囲が極めて広く、日本の果樹をはじめとする多年生作物の根に感染し、甚大な被害をもたらす。他の土壌病害と同様にその防除は困難である。農薬を用いた防除は可能であるが、費用と労力を要し、また、環境への影響も懸念される。一方で、生物防除の一種である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 1990 年代後半から進められた。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、さらに、その中に白紋羽病菌の病原力を低下させるウイルスが存在することが明らかとなった。

SALAIPTH女史は、白紋羽病菌から分離された新規潜在的生物防除因子、*Rosellinia necatrix megabirnavirus 1* (RnMBV1)に着目し、その生物学的解析、ゲノムの構造解析、遺伝子発現戦略の解析、ゲノム再編成株を利用した機能解析を進めた。RnMBV1のゲノムが2本の分節dsRNAセグメントとなり、それぞれが2つORFと有すること、それらが別々に粒子に取り込まれること、キャプシド蛋白質はdsRNA1のORF1にコードされ、下流のORF2は-1フレームシフティングにより翻訳されること、既報のウイルスとは類縁関係が遠いことが明らかとなった。これらの特徴から、本ウイルスが新規の科を構成するメンバーであることが国際ウイルス分類委員会に承認された。また、粒子トランスフェクション法を用いて任意の白紋羽病菌に導入する系を確立し、RnMBV1が宿主菌の病原力を著しく低下させることを証明した。フィールドテストの結果を待たねばならないが、これらの結果はRnMBV1がヴァイロコントロール因子として有望であることを示唆する。また、この病原力を低下させるウイルス側の因子として、dsRNA2が関与することを再編成株の解析により明らかにした。

上記のように、SALAIPTH 女史は博士号に値する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。