

2. マイコウイルス宿主としてのクリ胴枯病菌 ～知られざるマイコウイルスの世界を紐解く新たな解析ツール～

鈴木 信弘

岡山大学資源植物科学研究所 植物・微生物相互作用グループ

菌類は未同定、未報告の種も含めると百万種を超えと言われる。そこにはそれらを宿主とする多種多様なマイコウイルス（菌類ウイルス）の世界も広がっている。ここ20年に渡る一握りのマイコウイルスの研究から、精製したウイルスの粒子に感染性があることが証明されて人工接種法の開発に至り、ウイルス研究に必要な他の技術革新ももたらされた。植物病原糸状菌の一種であるクリ胴枯病菌は、マイコウイルス研究のモデル宿主菌としての地位を確立しつつある。本菌では、いまだ完全ではないがアノテーション付きのドラフトゲノム配列情報も公開され、関連する研究ツール・遺伝子改変技術もよく整備されている。また、最近になり、分類学上の目が異なる宿主菌（白紋羽病菌）に自然感染していた多くのウイルスが本菌で複製できることが判明し、マイコウイルス研究を進めるための実験宿主菌としての一面も併せ持つことも明らかになった。本稿では、マイコウイルスの一般的な性状、クリ胴枯病菌の実験ウイルス宿主としての優位性を概説し、さらにクリ胴枯病菌を舞台に得られた最近の興味深い解析例、「目立たないウイルスの複製を制御するDI-RNAとRNAサイレンシング」ならびに「RNAサイレンシングとウイルスRNAゲノムの組換え」、を紹介する。

はじめに

地球には、多種多様な菌類 (fungi) が存在する。未同定あるいは未報告の種を含めると150万種以上存在するとされている⁴¹⁾。菌類は菌界に属する生物全般を意味する用語で、キノコ、カビ、酵母が含まれる。単細胞性の生物から多細胞性で管状の菌糸からなる生物まで様々である。さらに、細胞分裂あるいは出芽で増殖し、その形態も千差万別であるため、それらを生物学的に定義することは難しい。ウイルスは生きとし生ける細胞性生物のすべてに存在（感染）すると考えられている。最近の研究により、菌類にも多様な生活環を持つ「目立たない」ウイルスの世界が

広がっていることが解明されつつある^{1, 5, 51, 59, 76, 98, 107)}。目立たない理由としては、宿主（菌類）に人間の目が届かない、人間との接点が少ない、また、「マイコウイルス（菌類ウイルス）」の大多数が無病徴感染することが挙げられる^{35, 38, 77)}。多様な菌類の中で研究対象になっているのは農業上、工業上、医学上あるいは純粋に科学（基礎生物学に関する研究）上重要な菌類に限られる。さらにそれらの中で、ウイルスの宿主として盛んに研究されているのは重要な植物病原糸状菌を含む一握りの菌類である。本稿では、ウイルス研究のモデル糸状菌宿主として確立されつつあるクリ胴枯病菌を取り上げる。マイコウイルスの一般的な性状、クリ胴枯病菌 (*Cryphonectria parasitica*) を概説し、クリ胴枯病菌を舞台に新たに展開された研究例を2つ紹介する。尚、マイコウイルスの発見、詳しい分類体系、命名法、研究の歴史的背景、研究意義については他の総説^{35, 37, 38)}あるいは筆者らの拙報¹¹⁹⁾を参照されたい。

I マイコウイルス（菌類ウイルス）

本章では、マイコウイルスの基本的な性状、分類を簡単に述べる（教書的な記述も多くなるかもしれないがご容赦願いたい）。マイコウイルスも、菌類以外の界を宿主とするウイルスと同様にゲノム型、ゲノム配列、粒子形態（粒

連絡先

〒710-0046

岡山大学資源植物科学研究所 植物・微生物相互作用グループ

岡山県倉敷市中央2-20-1

TEL: 086-434-1230

FAX: 086-434-1232

E-mail: nsuzuki@rib.okayama-u.ac.jp

子を作らないウイルスも複数存在する), 分子系統解析, 宿主菌類などにより分類される。2011年に出版された国際ウイルス分類委員会 (ICTV) 9次報告書に掲載されている菌類に感染するウイルスは百に満たない⁵⁷⁾。しかし, この数字は実態より遥かに少ない値である。近年, 様々な植物病原菌でウイルスの探索が行なわれ, 野外菌株のウイルス感染率は数%から高い場合で約70%に上がることが示された^{2, 50, 78)}。2014年時点で承認された分も含めると, DNAウイルス1属, 逆転写RNAウイルス2科, プラス(+)1本鎖(ss)RNAウイルス6科, 2本鎖(ds)RNAウイルス(大半のマイコウイルスが該当する)6科である。上述の範疇に収まらない未分類ウイルスならびにウイルス様配列も多数報告されている。今後, さらに新しいマイコウイルスの科や属の創設が増えてくるのは間違いない。特に, ここ数年の間に新奇なマイコウイルスの発見が相次ぎ, まさに「ウイルスハンティングのフロンティア」と言える。例えば, モノネガウイルス目に新設された科Nyaviridaeに遠縁なマイナス鎖(-)ssRNAウイルスが植物病原菌類から見つかった(菌類で初めての(-)ssRNAウイルス)⁵⁸⁾。また, 植物ウイルスのジェミニウイルスに類似した1本鎖の環状DNA(約2.2 kb)ゲノムをもつ直径約20 nm球形ウイルス(Sclerotinia sclerotiorum hypovirulence-associated DNA virus 1, SsHADV1)がナタネ菌核病菌から分離された¹¹²⁾。

本稿と関連するマイコウイルスの一般的性状のうち, 他の動植物のウイルスと大きく異なる点を中心に簡潔に記す。一般に, ウイルスは細胞性生物の場合と異なりそれ自体多様性が極めて高く, あるグループのウイルスでの常識が他のグループでは非常識となることが多い。また, マイコウイルスには総じて変わり者が多い(我々が良く知っているウイルスの特徴が当てはまらない)。例えば, 粒子を形成せず, 宿主由来の脂質2重膜の中にあいゆる複製中間型dsRNAに類似した形で存在する(+)ssRNAウイルス(hypovirus)が知られている⁴⁸⁾。これは, 菌糸融合でネットワークを作る糸状菌では, わざわざウイルスが粒子を形成しなくても全身感染が成立することと無縁ではないだろう。同様に, 詳細は不明ながら, 粒子を観察できない未分類のマイコウイルスが多数報告されていることも不思議ではない。その他, 宿主菌のミトコンドリアで増殖する極めて単純なゲノム構造を有するウイルス(mitovirus, 2.5~3.0kb程度の単一(+)ssRNAゲノムにRNA依存RNA合成酵素をコードする)も菌類には広く存在する⁴⁵⁾。これらのタイプのウイルスは他の真核生物では報告例がない。一方で, 系統進化的に細菌ウイルス, 植物ウイルスあるいは動物ウイルスと類縁のウイルスも多く存在する^{60, 66, 79, 110, 111)}。それらのゲノム複製・遺伝子発現様式は, 類似のゲノム型を持つ他の真核生物のウイルスとの共通点が多いと考えられている。しかし, 実際に複製機構などを詳しく調べられたマイコウイルスは, 酵母を宿主とするSaccharomyces 23S RNA narnavirus(mitovirusに類似し

たゲノム構造を持つ), Saccharomyces cerevisiae virus L-A(単一dsRNAゲノムを持つ球状ウイルスでTotiviridaeに所属), クリ胴枯病菌のCryphonectria hypovirus 1(Hyoiviridaeに所属)など一部に限られる^{22, 31, 105)}。

次に, マイコウイルスに共通な特徴を何点か挙げる。マイコウイルスは, 通常細胞外からの宿主細胞への侵入経路を持たず, その伝搬は細胞内経路に限られるとされている。ウイルス粒子と宿主菌体が出会っても菌糸には細胞壁があり, 菌体内への侵入・感染が成立することはない。さらに, 菌糸体に機械接種(物理的に細胞壁へ傷を付け, そこからウイルス感染を成立させる)も困難である。すなわち, ウイルス粒子を宿主菌糸体あるいは酵母培養液に混ぜたり, 擦り付けてもマイコウイルスは感染しない。植物・動物ウイルスのように, 検定宿主個体あるいは培養細胞でウイルスの生物検定を行なうこともできない。また, マイコウイルスの伝搬を仲介する媒介生物も報告されていない。しかし, これらは, 細胞外からのウイルスの侵入や媒介生物の存在を完全に否定するものではない。現に, 前出のDNAウイルスSsHADV1の粒子が細胞外から菌体内へ取り込まれ, ウイルスの感染が成立したとの中国のグループの報告や, 媒介生物の関与を示唆するデータが日本の果樹研究所のグループから報告されている^{108, 113)}。

これまで判明しているマイコウイルスの伝搬様式は数種類に限られる。その一つが菌糸融合に伴う「水平伝搬」である。これは, 一部例外もあるが宿主菌が同種でしかも菌糸融合群が同一(細胞質和合性と呼ばれる)の菌糸間で起る。細胞質の「和合性」と「不和合性」は遺伝学的に規定されている。異なる菌糸融合群の菌糸間では自己・非自己の認識による不和合性細胞死(一種のプロプログラム細胞死と考えられる)が誘導され, ウイルスの伝搬は起こり難い。つまり, 菌糸融合群という宿主の集団レベルでウイルス伝搬の成否が決定され, 仮に同一種であっても不和合性の組み合わせではウイルスが伝搬されない。不和合性自体はマイコウイルス感染で誘導されるわけではないが, 結果として, この宿主側の反応はウイルスに対する一種の抵抗性機構としての側面も持つことになる。この現象に関与する遺伝子は複数の菌類で同定されてきているが^{14, 39, 52)}, 菌糸間で繰り返られる不和合反応の実態は不明である。もう一つの伝搬様式である「垂直伝搬」は, 「有性胞子」(二つの細胞が融合し, その核の融合と減数分裂を経て形成される胞子)あるいは「無性胞子」(細胞核の融合および減数分裂を経ずに形成される胞子で, 分生子とも称される)を通じて次世代へウイルス感染が起る。伝搬効率はウイルスと宿主の組み合わせで大きく異なるが, 一般に有性胞子より無性胞子を通じた伝搬の方が頻繁に起る。キノコ(担子菌, 担子器と呼ばれる細胞の外に胞子が形成される)では担子胞子を通じてウイルスは伝搬されるが, 同じ担子菌である紫紋羽病菌(*Helicobasidium*属の植物病原糸状菌)では,

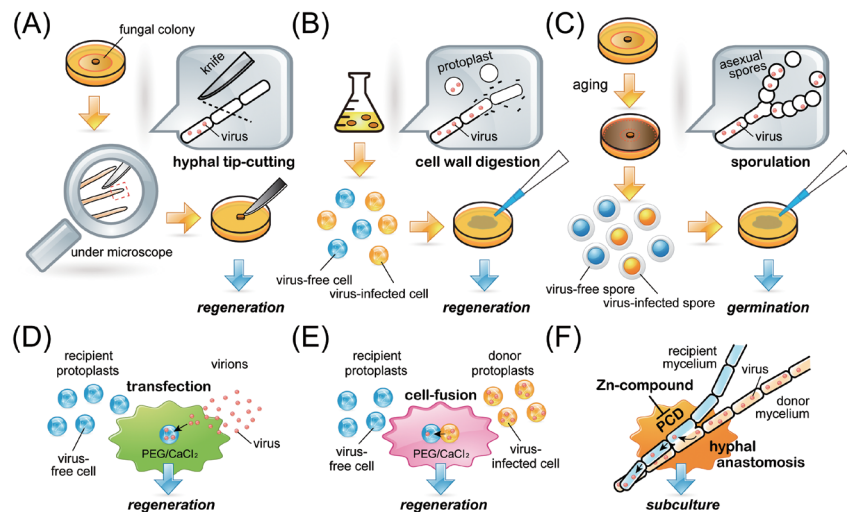


図1 マイコウイルスの除去法と導入法

マイコウイルスの除去法として単菌糸分離法 (A), プロトプラスト法 (B), 単分生胞子分離法 (C) を図示した. いずれの手法でも, ウイルスが全く存在しないか, あるいは極めて低濃度で存在する菌糸, プロトプラスト, 分生胞子を単離し, ウイルスフリーの再生菌糸体を取得する. ウイルス導入法として, 粒子トランスフェクション法 (D), 細胞融合法 (E), 亜鉛イオンによる菌糸融合促進法 (F) を示した. D, E では菌糸からプロトプラストを作成する必要があるが, F ではその必要がない.

担子胞子を通じた垂直伝染は起きないとされている⁵⁰⁾. 子のう菌 (子のうと呼ばれる単一の細胞の内部に胞子を形成される菌類) に属する酵母に感染するウイルスは高率に子のう胞子に伝搬されるが, 糸状菌 (子のう菌) では子のう胞子形成過程でウイルスが除去されることが多い. また, 酵母のウイルスは細胞分裂・出芽でも伝搬する.

大部分のマイコウイルスは不顕性感染し, 宿主菌表現型の明瞭な変化をもたらすケースは僅かである (これは菌類を宿主とするウイルスに限ったことではない). 宿主菌で観察されるウイルスによる病徴 (表現型の変化) は様々で, 菌糸の生育の低下, 胞子形成の低下, 色素形成の低下, マイコトキシン産生による他者排除, 病原力の低下 (宿主菌が植物あるいは動物病原性を示す場合) などが上げられる. 上記のマイコトキシン産生については, 酵母やトウモロコシ黒穂病菌 (*Ustilago maydis*) の生存力の増強戦略の一つとして知られている. これは dsRNA ウイルス (totivirus) に付随するサテライト dsRNA (キラー因子) に毒素蛋白質がコードされており, このキラー因子を持っていない宿主菌を殺してしまう (他者排除) というものである¹⁰⁴⁾. 尚, 植物病原菌/ウイルスの系で, 「病原力」, 「ヴィルレンス」は菌の植物に対する病原力を意味し, ウイルスの菌に対する病原性を意味するものではない. 同様にウイルス感染による病原力の低下「ハイボヴィルレンス」も宿主菌の形質を指す.

II マイコウイルス学研究におけるウイルス導入技術の開発と進歩

往々にして, 他の宿主界のウイルスで取られている手法をそのままマイコウイルスに応用することは困難である. 例えば, 動物ウイルス/宿主培養細胞やファージ/細菌宿主系で生物活性のあるウイルスを定量するため, あるいはウイルス系統の分離 (純化) をするためにプラークアッセイを用いる. 植物ウイルスでは同様の目的に単一病斑形成法 (ウイルスを機械的に検定植物に接種し, 局部病斑を形成させる) を使う. しかし, マイコウイルスを機械的に菌糸体に接種することは極めて困難であり, これらの手法は一般的には適さない. マイコウイルスの宿主への影響を調べるには, 宿主菌からの「ウイルスの除去 (キュアリング)」, 「再導入 (接種)」が必要である (図 1). ウイルスの除去には, 菌糸先端部を切り取り, それを培養する「単菌糸分離法」^{11, 12, 64)}, 菌糸から酵素を用いて単細胞を分離し, 再生する「プロトプラスト法」¹³⁾, あるいは「単胞子分離法」がある⁴⁷⁾. これらの手法がウイルス除去に有効である点は, 裏を返せば, 感染菌糸体のすべての細胞にはウイルスは存在していないこと, あるいは細胞分裂して増殖する場合に感染を成立させるだけのウイルス量に達していない細胞が存在することを意味する. 特に, 菌糸の成長先端部などは, 植物の茎頂のようにウイルスの侵入・増殖が難しい領域であるのかもしれない. また, 同時にリバビリン (Ribavirin)

等のウイルス複製阻害剤あるいは環境負荷を与える（高温処理）ことでウイルス除去を高効率化できる場合があるが^{19, 44, 118}、一方で、これらを試みてもウイルスを除去できないとする報告もなされている^{11, 56, 106}。

上述のように、マイコウイルスの機械的接種は困難である。そのため、最近まで、マイコウイルスは「非感染性」、「内在性」あるいは「遺伝性」の因子と見なされていた³⁶。しかし、過去20年の間に画期的な発見やそれに基づく技術革新がもたらされた。1990年代初頭にNuss博士のグループにより、(+) ssRNA ウイルスの *Cryphonectria hypovirus 1* (CHV1, ピコルナ様ウイルスに近縁なウイルス) の完全長クローンから感染性核酸が合成され、これが菌糸プロプラストに導入された^{7, 15}。従って、この系を用いてはじめてマイコウイルスの宿主範囲が調べられたのは1994年以降である。さらにこれまでに、2種の(+)ssRNA ウイルス、narnavirus^{27, 28}、*Diaporthe RNA virus* (未分類のウイルス)⁶⁹ に対して感染性 cDNA クローンをを用いた逆遺伝学実験系が開発されている。しかし、マイコウイルスの大多数を占める dsRNA ウイルスにおいては、未だウイルスの逆遺伝学は確立されていない。そこで、この実験系の代わりとして、dsRNA ウイルスの精製粒子を自然宿主菌に感染させた例^{6, 26, 88} を基に、再現性の高い「粒子トランスフェクション法」が開発されたのは2004年のことである⁴⁷。この手法は、調整した宿主菌糸のプロプラストに PEG, CaCl₂ 存在下で精製した mycoreovirus 1 (MyRV1, 分節型 dsRNA をゲノムとするレオウイルスの1種) 粒子を導入するものである。この粒子トランスフェクション法は、後に MyRV3^{53, 82}, *Rosellinia necatrix partitivirus 1* (RnPV1)^{53, 83}, RnPV2¹², *Rosellinia necatrix victorivirus 1* (RnVV1)¹¹, *Rosellinia necatrix megabirnavirus 1* (RnMBV1)¹³ など他の dsRNA ウイルスに応用され、さらに未同定の dsRNA ウイルスでも可能であることが確認された(鈴木, 未発表)。これらは、細胞壁を持つ宿主生物へ dsRNA ウイルスを人為的に導入した最初の例であり、本手法がマイコウイルスの病原学にもたらした意義は非常に大きい。一般に、dsRNA ウイルスの粒子には複製・転写に必要な酵素が包含されると考えられていることから、一度、粒子が細胞へ導入されると、それら酵素が活性化し、感染が成立すると推測される。この点を考慮すれば、本手法は他の菌類 dsRNA ウイルスのみならず植物へ感染する dsRNA ウイルスへの応用も大いに期待される。注目すべきことに、ssDNA ウイルス SsHADV1 の精製粒子でも本手法が応用可能であることが示されている¹¹²。このことから、粒子を形成する(+) ssRNA タイプのマイコウイルス、例えば、barnavirus, alphaflexivirus (botrexvirus), gammaflexivirus あるいは(-) ssRNA ウイルス(粒子形態は不明である)についても精製粒子のトランスフェクションを試みる価値がある。

上記と異なるウイルス導入法として「プロトプラスト融合法」がある。1998年に、アスペルギルス属の別種の菌株間で最初の成功例が報告された¹⁰¹。その後、本手法は異なる属の間でも(属の壁を乗り越えて)成功している^{62, 102}。このプロトプラスト融合法は、粒子トランスフェクション法が適用されないウイルス(粒子精製が困難あるいは粒子を作らないようなタイプ)に効果的だと考えられる。しかし、本手法では、実際にはウイルスだけでなく、すべての宿主側の遺伝因子(ミトコンドリアや細胞核)の混合を伴うので、ウイルス感染の宿主への影響を調べる際は注意を要する(細胞融合により宿主菌の遺伝的バックグラウンドも混合状態となる)。興味深い疑問は、この手法が科、綱、門、界の異なる宿主間で応用できるかである。

前記したように、同一菌類では菌糸融合を介して容易にウイルスは水平伝搬するが、同じ菌でも細胞質和合性が異なるグループ間(不和合性の組み合わせ)ではウイルス伝搬できない。しかし、昨年、神戸大学の池田博士らにより、この問題を解決可能な新たなマイコウイルスの「水平伝搬促進法」が開発された⁴⁹。彼らは約100種類の化合物をスクリーニングにかけ、塩化亜鉛が白紋羽病菌(*Rosellinia necatrix*, 果樹の重要病害として知られている)の細胞質不和合性の組み合わせでもウイルス伝搬を促進することを発見した。この手法は上記3つのウイルス導入法とは異なり、プロトプラストの作製を必要としない。至適濃度の塩化亜鉛(0.5-1.5 mM)を培地に含ませ、目的のウイルス受容菌とウイルス供与菌を共培養するだけである。この報告では、2種の dsRNA ウイルス(RnMBV1 と未同定の partitivirus) の水平伝搬に成功している。筆者らも同様に、新規の(+)ssRNA ウイルスの伝搬に成功した¹¹⁵。池田らにより、類似の効果は硫酸亜鉛でも確かめられており、亜鉛イオンにウイルス伝搬の促進効果があると考えられる。上記の通り、細胞質不和合は遺伝学的に支配されている。遺伝学のモデル糸状菌であるアカパンカビ^{39, 52}、クリ胴枯病菌^{14, 87}では、それらの遺伝子も同定されている。しかし、その認識機構、不和合性細胞死(プログラム細胞死とされる)発現機構の詳細は不明である。白紋羽病菌では、和合性の異なる菌糸が接触した後に起る一連の細胞死反応を塩化亜鉛、硫酸亜鉛が遅延させ、その間にウイルスが受容菌側へ伝搬すると推察されている。この作用が、他の種の不和合性菌株間でも同じように起きるか、あるいは別種の菌間でも作用しウイルス伝搬を促進するかは興味深い課題である。

III マイコウイルス研究のモデル糸状菌宿主としての クリ胴枯病菌

1. クリ胴枯病菌

クリ胴枯病菌(*Cryphonectria parasitica*)は、19世紀から20世紀にかけて東アジア(恐らく日本)から欧米に広がり、クリ樹林に大きな被害をもたらした(ている)子のう

表1 クリ胴枯病菌に感染するウイルス

	ウイルス科	ウイルス名	略称	ゲノム型	粒子形成	文献
自然感染	<i>Hypoviridae</i>	<i>Cryphonectria hypovirus 1</i>	CHV1	非分節 (+)ssRNA	無し	Hillman & Suzuki (2004)
	<i>Hypoviridae</i>	<i>Cryphonectria hypovirus 2</i>	CHV2	非分節 (+)ssRNA	無し	Hillman & Suzuki (2004)
	<i>Hypoviridae</i>	<i>Cryphonectria hypovirus 3</i>	CHV3	非分節 (+)ssRNA	無し	Hillman & Suzuki (2004)
	<i>Hypoviridae</i>	<i>Cryphonectria hypovirus 4</i>	CHV4	非分節 (+)ssRNA	無し	Hillman & Suzuki (2004)
	<i>Reoviridae</i>	<i>Mycoreovirus 1</i>	MyRV1	11 分節 dsRNA	球形	Hillman & Suzuki (2004)
	<i>Reoviridae</i>	<i>Mycoreovirus 2</i>	MyRV2	11 分節 dsRNA	球形	Hillman & Suzuki (2004)
	<i>Narnaviridae</i>	<i>Cryphonectria mitovirus 1</i>	CpMV1	非分節 (+)ssRNA	無し	Hillman & Suzuki (2004)
人工感染	<i>Reoviridae</i>	<i>Mycoreovirus 3</i>	MyRV3	12 分節 dsRNA	球形	Kanematsu et al. (2010)
	<i>Partitiviridae</i>	<i>Rosellinia necatrix partitivirus 1</i>	RnPV1	2 分節 dsRNA	球形	Kanematsu et al. (2010)
	<i>Partitiviridae</i>	<i>Rosellinia necatrix partitivirus 2</i>	RnPV2	2 分節 dsRNA	球形	Chiba et al. (2013b)
	<i>Totiviridae</i>	<i>Rosellinia necatrix victorivirus 1</i>	RnVV1	非分節 dsRNA	球形	Chiba et al. (2013a)
	<i>Megabirnaviridae</i>	<i>Rosellinia necatrix megabirnavirus 1</i>	RnMBV1	2 分節 dsRNA	球形	Salaipeth et al. (2014)

菌である。植物流行病としては、19世紀にアイルランドを中心としたヨーロッパで数百万人が飢餓と海外移住を余儀なくしたとされるジャガイモ疫病が有名である。アメリカ合衆国では、クリ胴枯病はそれに次いで大きな衝撃を与えた植物流行病として受け止められている。これが世界三大樹病の一つに数えられる所以でもある。本菌はクリ樹の傷口から侵入し、栄養補給路である篩部組織、分裂組織である形成層を破壊し、最終的に宿主を枯死させる恐ろしい菌である。クリ胴枯病菌の染色体は細胞学的、電気泳動的に9本が同定され³⁰⁾、そのゲノムサイズは45 Mbと推定されている。現在では、この菌のドラフトゲノム配列も公開されている。本病に関しては、マイコウイルス (CHV1) を用いた生物防除 (ヴェイロコントロール) の成功例が広く知られており、クリ胴枯病菌/マイコウイルス系を対象とした研究が世界各国で進められている。詳しくは優れた総説^{23, 43, 68, 73)}を参照されたい。

2. マイコウイルス宿主としてのクリ胴枯病菌

一般的な「モデル生物」は、マウス、ショウジョウバエ、植物ではシロイヌナズナに代表されよう⁴²⁾。それらに共通な特徴は、個体サイズが小さく、世代を回すための時間が短く、研究室での実験を速やかに行うことができ、そこで得られる成果がモデル生物より重要な生物種へも普遍化できることである。一方で、現在では、広い意味で多くの生物が「モデル生物」と称されている。その条件は何であろうか？ 研究材料として優れていて (世代のスピードや維持管理のし易さなど)、ゲノム配列が公開され、それには信頼できるアノテーションが付されていること。さらに、研究解析用ツール・遺伝子改変技術が整備されていることであろう。クリ胴枯病菌は、それらの多くの条件を兼ね備えており、「ウイルス/宿主間」、「ウイルス/ウイルス間」相互作用研究に適している。実際に、実験室で扱

い易い糸状菌であり、培養性状、病原力を含む表現型が比較的安定していて、それらのアッセイ系が確立している⁴⁶⁾。また、完全世代と不完全世代を実験室で比較的短い期間で回すことが可能である⁴⁸⁾。すなわち、分生子 (無性胞子) あるいは子のう胞子 (有性胞子) をそれぞれ1-2週間、2-3ヶ月で形成させることが可能である。従って、ウイルス感染動態や宿主への影響を多様な生育ステージで観察可能である。クリ胴枯病菌ゲノムのアノテーションは十分とは言えないが、標準菌株「EP155」のドラフトゲノム配列はJGIのサイトで公開されており (<http://genome.jgi-psf.org/Crypa2/Crypa2.home.html>)、EST (expressed sequence tag) も登録されている^{21, 86)}。さらに、本菌では「多重形質転換」^{32, 33, 55, 85)}、「単一遺伝子破壊」^{34, 54)}あるいは「多重遺伝子破壊」¹¹⁴⁾が可能である。

ウイルス研究のモデル糸状菌宿主として最も重要な条件であるが、クリ胴枯病菌に自然感染するウイルスだけではなく^{7, 8, 15, 47, 63, 92, 93)}、異種菌のウイルスの導入法が確立している。例えば、兼松博士ら⁵³⁾は白紋羽病菌由来ウイルスのクリ胴枯病菌に対する感染性を調べた。その結果、RnPV1 (partitivirus) と MyRV3 (mycoreovirus) がクリ胴枯病菌に感染性を示し、病原力の低下、培養条件下でのコロニー形態の変化を引き起こすことを示した。さらに、我々も白紋羽病菌由来の RnVV1 (victorivirus)、RnPV2 (partitivirus)、RnMBV1 (megabirnavirus) が本菌へ感染することを明らかにしている。また、Linらによって、*Helminthosporium victoriae* 由来の victorivirus (HvV190S) が感染することも示された (Y.-H. Lin, S.A. Ghabrial and N. Suzuki, unpublished data)。現在では、表1に示すウイルスがクリ胴枯病菌の標準株である EP155 で複製可能であることが示されている。

VI クリ胴枯病菌を利用したマイコウイルスの解析例

1. 目立たないウイルスの複製を制御する DI-RNA と RNA

サイレンシング

菌類を舞台に繰り広げられたウイルス・宿主の闘ぎ合いについて、モデル宿主のクリ胴枯病を用いて行った詳細な解析例を、以下と次の項目で紹介する。まず最初の事例を紹介する前に、役者である「partitivirus」という一群の dsRNA ウイルスについて述べたい。ウイルスのスクリーニングが行なわれたいくつかの菌で、partitivirus は最も高頻度で検出されている（例えば、白紋羽病菌と *Heterobasidion* sp.）^{2, 50, 99}。ゲノムは2分節の dsRNA から成り、それぞれ、複製酵素 (RdRp) と外被タンパク質 (CP) をコードし、極めて単純な構造である。粒子は球形で、キャプシド蛋白質 120 分子から構成され、 $T=1$ の対称性により構築されている。これらのウイルスは、菌類だけではなく、植物にも広く存在する「目立たないウイルス」の代表格である。いくつかの例外^{4, 12, 67, 71, 100}を除いてすべてが、不顕性持続感染する（宿主に病徴を示さない）。今年に入り（3月）、国際ウイルス分類委員会 (ICTV) により、再整理された分類体系（5つの属）が承認され、菌類と植物の partitivirus はそのうち4属 (*Alpha-*, *Beta-*, *Gamma-*, *Deltapartitivirus*) を構成し、原虫の partitivirus (*Cryspovirus*) が1属を構成する⁷²。一つのウイルス科に植物ウイルスと菌類ウイルスが含まれることはあるが、通常それらは分子系統学的に異なる独立クラスターを形成することが多い。一方、*Partitiviridae* (alphapartitivirus や betapartitivirus) では、他のウイルス科と大きく異なり、一つのクラスターに植物ウイルスと菌類ウイルスの両者が混在する。これは、両方の宿主界すなわち植物と植物に共生あるいは寄生する菌類との間で partitivirus の水平伝搬が起きている可能性を示唆する^{10, 80}。もう一つ partitivirus に関する大きな話題として宿主ゲノムへの内在化が挙げられる。最近、非レトロ RNA ウイルスが動物、菌類、植物の染色体に水平伝搬することが明らかになったが、partitivirus の遺伝子やその部分配列が多く種の核ゲノムに挿入されていることが示されている^{10, 65}。

Partitivirus に関する前置きが長くなったが、筆者らは兼松博士（果樹研）との共同研究を通して、白紋羽病菌の partitivirus をいくつか分離している^{12, 108}。その中の *Rosellinia necatrix partitivirus 2* (RnPV2) の複製を負に制御するウイルス因子、宿主因子について紹介する。RnPV2 は白紋羽病菌の野外分離菌株 W57 から分離されたが、ウイルス dsRNA セグメントを3本 (dsRNA1, dsRNA2, DI-dsRNA1) 保持していた¹⁰。他の partitivirus と同じように、dsRNA1 と dsRNA2 はそれぞれ複製酵素 (RdRp) と外被タンパク質 (CP) をコードする。ところが、DI-dsRNA1 は dsRNA1 由来の「干渉性 RNA」(defective interfering RNA, DI-RNA) であると推測された。そこで、DI-dsRNA1 の存在が、正規ゲノム RNA の複製や機能へ及ぼす影響を自然宿主菌と実験宿主菌を用いて詳細に解析した。まず、当研究室で開発し

た粒子トランスフェクション法⁴⁷により、クリ胴枯病菌が本ウイルスの宿主（実験宿主菌）であることが確認され、同時に DI-dsRNA1 保有ウイルス株 RnPV2-DI(+) および DI-dsRNA1 フリー株 RnPV2-DI(-) を取得することに成功した。これは、partitivirus の DI-RNA を除去した初めての成功例であり、多くのマイコウイルスの逆遺伝学が確立していない状況で、粒子トランスフェクション法のもたらした大きな成果と言える。自然感染宿主である白紋羽病菌にトランスフェクション（戻し接種）し調べると、RnPV2-DI(+) の蓄積量は RnPV2-DI(-) に対して約 400 倍低く、ウイルス複製は DI-RNA により顕著に抑制されることが確認された。さらに、実験宿主のクリ胴枯病菌を用いた結果も類似であった。これらから RnPV2 の DI-dsRNA1 が干渉性 RNA 分子であることが証明されている。

菌類にはウイルスに対する2つの防御機構がある。一つは「集団レベル」で働く菌糸融合不和合性（前述）、もう一つは「細胞レベル」で働く「RNA サイレncing」である。RNA サイレncing は真核生物に広く保存されたウイルスに対する宿主防御機構の側面もあり、他の高等真核生物と同様に菌類でも普遍的に存在する²⁰。しかし、菌類で RNA サイレncing のウイルス防御機構は、ごく一部の子う菌（クリ胴枯病菌を含む2種）で証明されているにすぎない⁷⁵。一般的な RNA サイレncing では、ウイルス由来の dsRNA が Dicer (dsRNA 切断酵素) により 21-26 塩基の small interfering (si) RNA に分解され、その片方の鎖が RISC 複合体 (RNA 誘導サイレンシング複合体) の Argonaute (ssRNA 分解酵素) に取り込まれ、ガイド役として標的ウイルス RNA の分解を担う。一方、多くの植物や動物ウイルスでは RNA サイレncing に対抗するために「RNA サイレncing 抑制蛋白質」を用いて反撃すること（いわゆるカウンター防御機構）が知られているが、これらと同様に一部の菌類 RNA ウイルスでも RNA サイレncing 抑制蛋白質の存在が証明されている^{40, 84, 93, 109}。クリ胴枯病菌は、他の生物で報告されている RNA サイレncing 関連遺伝子、*dcl* (dicer-like) 遺伝子、*agl* (ago-like) 遺伝子、*rdr* (RNA-dependent RNA polymerase) 遺伝子をそれぞれ2つ、4つ、4つ持ち、その中で *dcl2* と *agl2* のみが抗ウイルス機構としての RNA サイレncing に関与するとされている^{85, 91}。植物で siRNA の増幅に関与する *rdr* の関与は今のところ認められていない (Donald L. Nuss 博士、私信)。著者の研究室でも、菌類宿主（クリ胴枯病菌）の抗ウイルス機構を、RNA サイレncing 関連遺伝子の欠損変異菌株ならびに前出の partitivirus (RnPV2) を用いて解析した。その結果、RNA サイレncing 鍵酵素 *dcl2* 欠損変異株 ($\Delta dcl2$) では、野生株に比べ RnPV2 の蓄積量は DI-RNA の有無に拘らず顕著に上昇することが示された¹²。両者は、クリ胴枯病菌 $\Delta dcl2$ で激しい病徴を引き起こしたが、クリ胴枯病菌野生株および白紋羽病

菌では無病徴感染するか極めて穏やかな病徴を引き起こした。このように、菌類 partitivirus の複製・病徴発現が DI-RNA と宿主 RNA サイレンシングで顕著に抑制されることが初めて示された。「目立たないウイルス」と考えられている partitivirus でも宿主に感知され、RNA サイレンシングという抗ウイルス防御反応の標的になるということが明らかになった。

筆者の研究室では、前出の RnPV2 だけではなく、白紋羽病菌由来の異なるウイルス科のウイルス、RnVV1 (victorivirus) や RnMBV1 (megabirnavirus) も宿主 RNA サイレンシングの標的になることを明らかにしている^{11, 81)}。先行研究では、ウイルス感染 (CHV1 など) により RNA サイレンシング関連遺伝子 *dcl2*, *agl2* の発現誘導 (宿主側の防御応答と想定される) が報告されている。同時に、CHV1 の RNA サイレンシング抑制蛋白質 p29 により、その発現誘導が抑制 (キャンセル) されることも判明している⁹¹⁾。このような事象に加えて、「新たに RNA サイレンシングの標的となることが判明したウイルスがどのような対抗手段 (カウンター防御戦略) を持つのか、持つ場合どのような機構か」は興味深い課題である。

2. RNA サイレンシングとウイルス RNA ゲノムの組換え

RNA ウイルスのゲノムで生じる「RNA 組換え」の現象は、ウイルスの多様化、進化の原動力の一つと考えられている。その機構は大きく2つに分かれる。1つ目は、「RNA ウイルスの複製を伴わない切断・再結合機構」であり、もう一方は「ウイルスの RNA 複製酵素の鋳型スイッチ」で、後者は大きくは相同組換えと非同相組換えに分かれる^{9, 61, 70, 94)}。鋳型 RNA と新生 RNA の分子内および分子間の配列の反復性、類似性により数種のタイプが提案されている。

クリ胴枯病菌では他の宿主界では報告されていない面白いウイルス RNA ゲノムの組換え現象が見ついている。例えば、RNA サイレンシングが CHV1 ((+)ssRNA タイプ) の DI-RNA の出現、あるいは CHV1 に組込んだ外来遺伝子の不安定化 (脱落) に関与する。すなわち、野生型菌では CHV1 DI-RNA が出現し、外来遺伝子 (GFP 遺伝子) が CHV1 ベクターからトランスフェクション後に速やかに脱落するのに対して、RNA サイレンシング欠損 $\Delta dcl2$, $\Delta agl2$ 系統では DI-RNA が出現せず、GFP 遺伝子もウイルスゲノム上に長期間保持される^{91, 116)}。この RNA 組換え (脱落) 機構については、ウイルス (外来遺伝子を含む) 由来の siRNA がゲノム RNA を標的とし、切断された RNA が RNA 複製過程で組換えに関与すると説明されている¹¹⁷⁾。一方で、RNA サイレンシングに関与する宿主因子が、DI-RNA の伝達、複製に必要であるとの説も出されている。最近、植物でも、(+)ssRNA ウイルスが感染した RNA サイレンシング欠損変異体と野生型の植物宿主において、異なるタイプの RNA 組換え体の出現が報告されたが、クリ

胴枯病菌変異体 / CHV1 で認められたような劇的な影響は認められないとされている²⁵⁾。

dsRNA をゲノムに持つウイルスに関しては、partitivirus (RnPV2) の DI-RNA と RNA サイレンシングの関係が調べられた¹²⁾。前記のように、RnPV2 は白紋羽病菌野外分離株 W57 から分離され、その時点で既に DI-dsRNA1 を保持していた。DI-dsRNA1 と dsRNA1 の配列比較から、7 個の塩基置換と 1 塩基挿入が認められた。これらの変異の蓄積は、野外 (RNA サイレンシング能を有する W57 株) で DI-RNA 出現後長い時間が経過していることを示唆する。異種菌であるクリ胴枯病菌では、RnPV2 DI-dsRNA1 は野生型菌株のみならず RNA サイレンシング欠損株でも安定して維持され、先に紹介した CHV1 の DI-RNA (RNA サイレンシング欠損株では出現しない) とは異なる挙動を示した。また、野生型菌で DI-RNA フリーの RnPV2-DI(-) を研究室で継代しても、新たな DI-RNA の出現は認められず、感染後に直ちに DI-RNA を産生する CHV1 とはその成立と維持において大きく異なる。

クリ胴枯病菌由来の dsRNA をゲノムに持つ MyRV1 (mycoreovirus) に関して、CHV1 DI-RNA とは大きく異なる DI-RNA の挙動を示す事例が我々の研究室から報告されている。レオウイルス科は最も大きな (いろいろな宿主生物に感染する多様なメンバーが包含される) 科の一つで、15 の属を持ち、病原としてまた基礎研究の対象として重要なウイルスを含む³⁾。本科の特徴は、9 - 12 本の分節 dsRNA セグメントをゲノムに持ち、粒子は多重殻構造をとり、RNA 合成工場と見なされる内殻にゲノムセグメントを包含する。MyRV1 は、同じくクリ胴枯病菌に感染する MyRV2 と白紋羽病菌に感染する MyRV3 とともにマイコレオウイルス属に含まれる^{48, 103)}。この属では、RNA 組換えにより、他のレオウイルス科では認められない 3 つのタイプの「ゲノムセグメントの再編成」が見つかり (以下で紹介する)、動・植物ウイルス研究者にも注目されている⁹⁵⁾。

MyRV1 の RNA 組換えによるゲノム変異は、2008 年に筆者のグループで発見されたが、これは異なる RNA ウイルスのゲノム間で繰り広げられる新規の相互作用 (相手ゲノムの再編成の誘導) 現象としてもたらされた^{90, 96)}。すなわち、(+)ssRNA ウイルスである CHV1 と MyRV1 が、共通の宿主クリ胴枯病菌に共感染すると、MyRV1 のゲノム再編成 (伸長、欠失あるいはその両方を含むゲノムセグメントの大幅な変異) が誘発される。CHV1 はゲノムとして 1 本の ssRNA をゲノムとし、一方、MyRV1 は 11 本 (S1-S11) の分節型 dsRNA (各分節はそれぞれ単一のタンパク質をコードする) をゲノムとする。MyRV1 再編成は CHV1 の RNA サイレンシング抑制蛋白質の p29 (RNA サイレンシング抑制活性に関わる機能領域は未同定である⁸⁴⁾。なお、p29 は蛋白質分解^{16, 17)}、病徴決定他の活性^{18, 89)}を

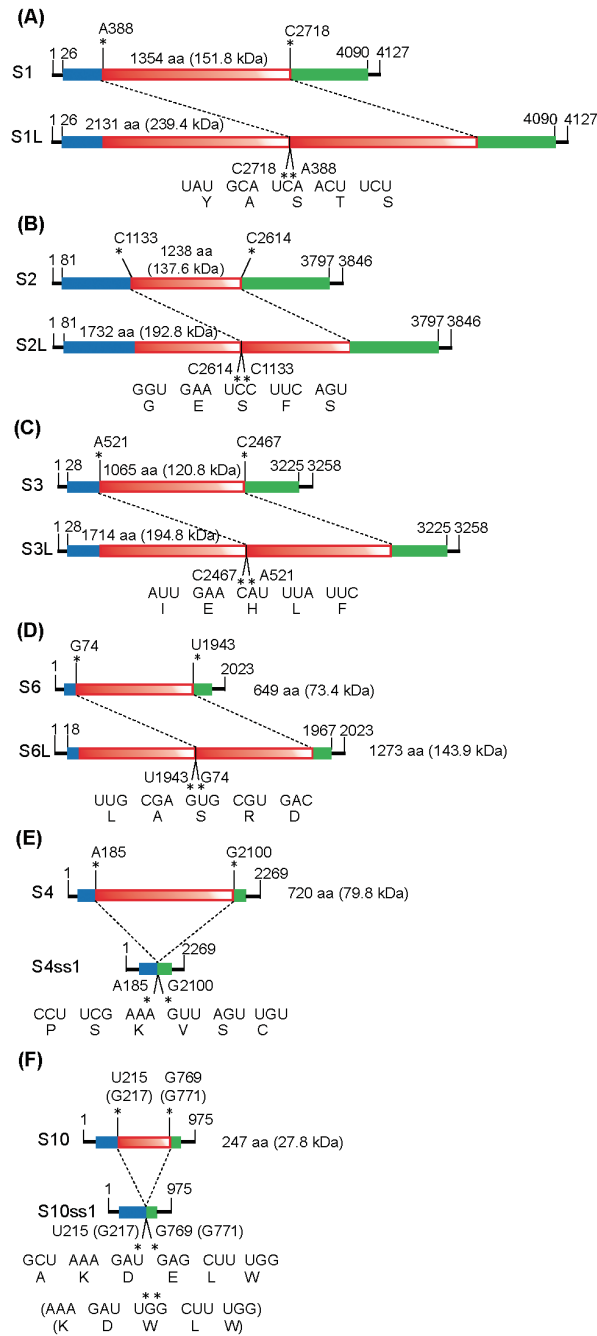


図2 mycorevirus 1 (MyRV1) 再編成セグメントの模式図

これまで報告されている MyRV1 再編成セグメントを図示した。それらは大きく2つ大別される。セグメントの伸長を含む (S1L, S2L, S3L, S6L) と欠失を含む S4ss and S10ss である。S1L, S2L は S3L は in-frame の ORF の融合を伴い、サイズが大きくなった翻訳産物も感染菌糸から検出されている。一方、S4ss, S10ss は必ずしも ORF の融合を伴わない。正常型セグメントの下に再編成セグメントの遺伝子構造が示されている。S1L (A), S2L (B), S3L (C), および S6L (D) は、3つ配列断片が3色 (青, 赤, 緑) に色分けされている。赤色は重複配列を表し、そのグラデーションは head-to-tail のオリエンテーションを示す。青, 緑は再編成で影響を受けなかった5' 及び3' 末端領域を示す。内部欠失を伴う S4ss (E), S10ss (F) の ORF は、正常型 ORF の 11%-22% (S4ss) あるいは 10%-43% (for S10ss) に相当する。S4ss, S10ss にはそれぞれ少なくとも4つ (S4ss1 to S4ss4) あるいは2つ (S10ss1 and 2) のバリエーションが見つかっている。黒の実線は非翻訳領域を、青, 赤, 緑のボックスは ORF 領域を示す。ORF の開始および停止部位、組換え部位近傍の塩基、マップポジション、コードアミノ酸も示してある。尚、本図は田中らの論文⁹⁵⁾ から転載した。

有する多機能性蛋白質としての側面をあわせ持つ)により誘導される。MyRV1 S10のORF領域75%を欠失したセグメントS10ssは特に高率で出現する。S10ssをもつMyRV1/S10ssは野生型ウイルスと比較してその複製量に差は認められないが、培養条件下でMyRV1が引き起こす気中菌糸の生育低下をさらに促進させる。また、低率ではあるが、MyRV1の構造蛋白質をコードするS1(RdRp), S2(外殻キャプシド), S3(cap付加酵素)のORF領域が約1.5倍程度大きくなる再編成セグメントS1L, S2L, S3L(一部がin-frameに反復)も生じる。それらは感染細胞で翻訳型活性を持つ。S1~S3の再編成セグメントを持つMyRV1株は野生型ウイルスに比べ、その病徴が穏やかになるが、MyRV1/S10ss同様、ウイルス株間のゲノム蓄積量には大きな変化は認められない。これらの結果から、RNA複製に重要な役割を担うと考えられるMyRV1 S1~S3の再編成が複製に大きく影響しない点は意外であったが、少なくともMyRV1本来の病徴発現に正常型セグメントが必要であることを示す。現象自体も興味深いのだが、逆遺伝学系の確立していない本属ウイルスにおいては、セグメントの機能解析に利用できる点で有用性も高い⁹⁵⁾。

レオウイルスのゲノム再編成は、これまで動物レオウイルス、特に、ヒトに下痢を引き起こすロタウイルスあるいは植物病原性のレオウイルスで多数報告例が存在する^{24, 74, 97)}。しかし、それらの場合、異種ウイルスの存在の如何に関わらず(上記のマイコレオウイルスのケースと異なる)、レオウイルスが宿主細胞あるいは個体中で増殖する過程で自然発生的にゲノムセグメントの再編成が生じる。確かに、MyRV1の再編成でも、一部のセグメント(S4, S10)で自然発生(培養条件下)することが確認されているが、非常に低率である²⁹⁾。ロタウイルスのゲノム再編成の研究では、免疫不全宿主の個体中あるいは高感染多重度(MOI, multiplicity of infection)で継代した宿主培養細胞中で高率に再編成セグメントの出現が認められる。一方、MyRV1の場合でも、ゲノムセグメント再編成が高頻度に誘導される系が報告されている。しかし、その場合、先行のロタウイルスの事例と大きく異なり、上記の通り異種の(+ssRNAウイルス(CHV1)との混合感染下、あるいはCHV1のRNAサイレンシング抑制蛋白質p29の発現条件下で、高頻度でMyRV1再編成が誘導される。これまでに、MyRV1セグメントの半数以上でゲノム再編成が確認されている(図2)⁹⁵⁾。

著者らは、p29介在型のゲノム再編成機構として2つの可能性を提案した⁹⁰⁾。一つ目は、p29が直接MyRV1の複製装置に作用し、再編成を誘導するというものである。これはp29が細胞内でMyRV1 VP9(機能未知)と相互作用することに基づいている。2つ目は、p29が宿主菌の細胞環境を変化させ、再編成が出現・維持され易くするという可能性である。後者の可能性について、RNAサイレンシ

ングとMyRV1のゲノム再編成との関連を調べる実験を立案し、推進している。具体的には、サイレンシング経路の鍵役者と考えられる宿主因子(RDR, DCL, AGO)の欠失変異株にMyRV1の野生型、あるいは再編成セグメントを保有する系統を感染させ、新たなゲノム再編成の誘導を調べている。それらの結果の詳細は次回の執筆の機会に回すが、RNAサイレンシング欠損株でMyRV1系統(MyRV1/S4ss, S4 ORFの79%の欠失)特異的ゲノム再編成が高頻度で起ることを見いだしている。すなわち、MyRV1のS1, S2あるいはS3のサイズが自身の重複化でほぼ2倍に伸長したセグメントが、p29非存在下で高率に誘導された(A. Eusebio-Cope & N. Suzuki, 未発表データ)。RNAサイレンシングが機能しないp29発現体、 $\Delta dcl2$, $\Delta agl2$ で、どのような分子機構で再編成株が出現するかは今後の興味深い検討課題である。

おわりに

以上、マイコウイルスの一般的性状を概説し、最近確立されつつあるモデル宿主糸状菌としてのクリ胴枯病菌の特徴、それを舞台に明らかにされた最近の知見を紹介した。とりわけ、クリ胴枯病菌実験系によりスポットライトがあたりはじめた、RNAサイレンシングが関与するマイコウイルスに対する防御反応、ウイルスRNAゲノムの組換えに関連する研究例に紙面を割いて紹介した。これらの研究で得られたマイコウイルスに関わるユニークな現象を通して、クリ胴枯病菌をモデル宿主として使う意義を感じて頂けると幸いである。クリ胴枯病菌は今回紹介した便利なマイコウイルスの実験宿主としての側面以外にも、世界三大樹病の一つクリ胴枯病を引き起こす病原としても重要で、古くから注目されている。上記のCHV1はヴァイロコントロール因子として、クリ胴枯病の防除に一役かっている。本稿では、紙面の関係で、こちらの研究は割愛した。マイコウイルスの研究グループは日本や新興国を中心に増えつつあり、関連する研究の更なる発展が期待されるうえ、他の界のウイルス研究への波及効果も大きいと考えられる。今後、クリ胴枯病菌実験系を中心に展開されるマイコウイルス研究は益々目を離せない研究分野へと成長するであろう。

謝辞

本研究は、兼松聡子博士、千葉壮太郎博士、Ana Eusebio-Cope博士、近藤秀樹博士を始めとする多くの方々の共同研究による成果であり、ここに共同研究者の方々に感謝する。谷口孝喜博士からはロタウイルス再編成についての貴重な情報を頂戴した。また、本稿執筆の機会を与えて下さった松浦善治博士に深謝する。

引用文献

- 1) **Aoki, N., H. Moriyama, M. Kodama, T. Aric, T. Teraoka, and T. Fukuhara.** 2009. A novel mycovirus associated with four double-stranded RNAs affects host fungal growth in *Alternaria alternata*. *Virus Res* **140**:179-187.
- 2) **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.
- 3) **Attoui, H., and 32 other authors.** 2012. Family Reoviridae, p. 541-637 *In* A. M. Q. King, M. J. Adams, E. B. Carstens, and E. J. Lefkowitz (ed.), *Virus Taxonomy: Ninth Report of the International Committee for the Taxonomy of Viruses*. Elsevier, Academic Press, New York.
- 4) **Bhatti, M. F., A. Jamal, M. A. Petrou, T. C. Cairns, E. M. Bignell, and R. H. Coutts.** 2011. The effects of dsRNA mycoviruses on growth and murine virulence of *Aspergillus fumigatus*. *Fungal Genet Biol* **48**:1071-1075.
- 5) **Cai, G., and B. I. Hillman.** 2013. Phytophthora viruses. *Adv Virus Res* **86**:327-350.
- 6) **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.
- 7) **Chen, B., G. H. Choi, and D. L. Nuss.** 1994. Attenuation of fungal virulence by synthetic infectious hypovirus transcripts. *Science* **264**:1762-1764.
- 8) **Chen, B., and D. L. Nuss.** 1999. 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**:985-92.
- 9) **Chetverin, A. B.** 1999. The puzzle of RNA recombination. *FEBS Lett* **460**:1-5.
- 10) **Chiba, S., H. Kondo, A. Tani, D. Saisho, W. Sakamoto, S. Kanematsu, and N. Suzuki.** 2011. Widespread endogenization of genome sequences of non-retroviral RNA viruses into plant genomes. *PLoS Pathog* **7**:e1002146.
- 11) **Chiba, S., Y. H. Lin, H. Kondo, S. Kanematsu, and N. Suzuki.** 2013. A novel victorivirus from a phytopathogenic fungus, *Rosellinia necatrix* is infectious as particles and targeted by RNA silencing. *J Virol* **87**:6727-6738.
- 12) **Chiba, S., Y. H. Lin, H. Kondo, S. Kanematsu, and N. Suzuki.** 2013. Effects of defective-interfering RNA on symptom induction by, and replication of a novel partitivirus from a phytopathogenic fungus *Rosellinia necatrix*. *J Virol* **87**:2330-2341.
- 13) **Chiba, S., L. Salaipeth, Y. H. Lin, A. Sasaki, S. Kanematsu, and N. Suzuki.** 2009. A novel bipartite double-stranded RNA mycovirus from the white root rot fungus *Rosellinia necatrix*: molecular and biological characterization, taxonomic considerations, and potential for biological control. *J Virol* **83**:12801-12812.
- 14) **Choi, G. H., A. L. Dawe, A. Churbanov, M. L. Smith, M. G. Milgroom, and D. L. Nuss.** 2012. Molecular characterization of vegetative incompatibility genes that restrict hypovirus transmission in the chestnut blight fungus *Cryphonectria parasitica*. *Genetics* **190**:113-127.
- 15) **Choi, G. H., and D. L. Nuss.** 1992. Hypovirulence of chestnut blight fungus conferred by an infectious viral cDNA. *Science* **257**:800-803.
- 16) **Choi, G. H., D. M. Pawlyk, and D. L. Nuss.** 1991. The autocatalytic protease p29 encoded by a hypovirulence-associated virus of the chestnut blight fungus resembles the potyvirus-encoded protease HC-Pro. *Virology* **183**:747-752.
- 17) **Choi, G. H., R. Shapira, and D. L. Nuss.** 1991. Cotranslational autoproteolysis involved in gene expression from a double-stranded RNA genetic element associated with hypovirulence of the chestnut blight fungus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**:1167-1171.
- 18) **Craven, M. G., D. M. Pawlyk, G. H. Choi, and D. L. Nuss.** 1993. Papain-like protease p29 as a symptom determinant encoded by a hypovirulence-associated virus of the chestnut blight fungus. *J Virol* **67**:6513-6521.
- 19) **Dalzoto, P. R., C. Glienke-Blanco, V. Kava-Cordeiro, J. Z. Ribeiro, E. W. Kitajima, and J. L. Azevedo.** 2006. Horizontal transfer and hypovirulence associated with double-stranded RNA in *Beauveria bassiana*. *Mycol Res* **110**:1475-1481.
- 20) **Dang, Y., Q. Yang, Z. Xue, and Y. Liu.** 2011. RNA interference in fungi: pathways, functions, and applications. *Eukaryot Cell* **10**:1148-1155.
- 21) **Dawe, A. L., V. C. McMains, M. Panglao, S. Kasahara, B. S. Chen, and D. L. Nuss.** 2003. An ordered collection of expressed sequences from *Cryphonectria parasitica* and evidence of genomic microsynteny with *Neurospora crassa* and *Magnaporthe grisea*. *Microbiology-Sgm* **149**:2373-2384.
- 22) **Dawe, A. L., and D. L. Nuss.** 2013. Hypovirus molecular biology: from Koch's postulates to host self-recognition genes that restrict virus transmission. *Adv Virus Res* **86**:109-47.
- 23) **Dawe, A. L., and D. L. Nuss.** 2001. Hypoviruses and chestnut blight: exploiting viruses to understand and modulate fungal pathogenesis. *Annu Rev Genet* **35**:1-29.
- 24) **Desselberger, U.** 1996. Genome rearrangements of rotaviruses. *Adv Virus Res* **46**:69-95.
- 25) **Dzianott, A., J. Sztuba-Solinska, and J. J. Bujarski.** 2012. Mutations in the antiviral RNAi defense pathway modify Brome mosaic virus RNA recombinant profiles. *Mol Plant Microbe Interact* **25**:97-106.
- 26) **el-Sherbeini, M., and K. A. Bostian.** 1987. Viruses in fungi: infection of yeast with the K1 and K2 killer viruses. *Proc Natl Acad Sci U S A* **84**:4293-7.
- 27) **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**:2568-73.

- 28) **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* **280**:33725-34.
- 29) **Eusebio-Cope, A., L. Sun, B. I. Hillman, and N. Suzuki.** 2010. Mycoreovirus 1 S4-coded protein is dispensable for viral replication but necessary for efficient vertical transmission and normal symptom induction. *Virology* **397**:399-408.
- 30) **Eusebio-Cope, A., N. Suzuki, H. Sadeghi-Garmaroodi, and M. Taga.** 2009. Cytological and electrophoretic karyotyping of the chestnut blight fungus *Cryphonectria parasitica*. *Fungal Genet Biol* **46**:342-51.
- 31) **Fahima, T., P. Kazmierczak, D. R. Hansen, P. Pfeiffer, and N. K. Van Alfen.** 1993. Membrane-associated replication of an unencapsidated double-strand RNA of the fungus, *Cryphonectria parasitica*. *Virology* **195**:81-89.
- 32) **Faruk, M., M. Izumimoto, and N. Suzuki.** 2008. Characterization of mutants of the chestnut blight fungus (*Cryphonectria parasitica*) with unusual hypovirus symptoms. *J Gen Plant Pathol* **74**:425-433.
- 33) **Faruk, M. I., A. Eusebio-Cope, and N. Suzuki.** 2008. A host factor involved in hypovirus symptom expression in the chestnut blight fungus, *Cryphonectria parasitica*. *J Virol* **82**:740-754.
- 34) **Gao, S., and D. L. Nuss.** 1996. Distinct roles for two G protein alpha subunits in fungal virulence, morphology, and reproduction revealed by targeted gene disruption. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**:14122-14127.
- 35) **Ghabrial, S., and N. Suzuki.** 2009. Viruses of plant pathogenic fungi. *Annu Rev Phytopathol* **47**:353-384.
- 36) **Ghabrial, S. A.** 2001. Fungal viruses, p. 267-269. *In* O. Maloy and T. Murray (ed.), *Encyclopedia of Plant Pathology*, vol. 1. John Wiley & Sons, New York.
- 37) **Ghabrial, S. A.** 2013. Mycoviruses, 2013/03/19 ed, vol. 86. Academic Press.
- 38) **Ghabrial, S. A., and N. Suzuki.** 2008. Fungal Viruses, p. 284-291. *In* B. W. J. Mahy and V. R. M. H. V (ed.), *Encyclopedia of Virology*, 3rd edn, vol. 2. Elsevier, Oxford.
- 39) **Glass, N. L., and K. Dementhon.** 2006. Non-self recognition and programmed cell death in filamentous fungi. *Curr Opin Microbiol* **9**:553-558.
- 40) **Hammond, T. M., J. W. Bok, M. D. Andrews, Y. Reyes-Dominguez, C. Scazzocchio, and N. P. Keller.** 2008. RNA silencing gene truncation in the filamentous fungus *Aspergillus nidulans*. *Eukaryot Cell* **7**:339-49.
- 41) **Hawksworth, D. L.** 1991. The fungal dimension of biodiversity: magnitude, significance, and conservation. *Mycol Res* **95**:641-655.
- 42) **Hedges, S. B.** 2002. The origin and evolution of model organisms. *Nat Rev Genet* **3**:838-49.
- 43) **Heiniger, U., and D. Rigling.** 1994. Biological control of chestnut blight in Europe. *Annu Rev Phytopathol* **32**: 581-599.
- 44) **Herrero, N., and I. Zabalgoitia.** 2011. Mycoviruses infecting the endophytic and entomopathogenic fungus *Tolyocladium cylindrosporum*. *Virus Res* **160**:409-413.
- 45) **Hillman, B. I., and G. Cai.** 2013. The family *Narnaviridae*: simplest of RNA viruses. *Adv Virus Res* **86**:149-76.
- 46) **Hillman, B. I., R. Shapira, and D. L. Nuss.** 1990. Hypovirulence-associated suppression of host function in *Cryphonectria parasitica* can be partially relieved by high-light intensity. *Phytopathology* **80**:950-956.
- 47) **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.
- 48) **Hillman, B. I., and N. Suzuki.** 2004. Viruses of the chestnut blight fungus, *Cryphonectria parasitica*. *Adv Virus Res* **63**:423-472.
- 49) **Ikeda, K., K. Inoue, C. Kida, T. Uwamori, A. Sasaki, S. Kanematsu, and P. Park.** 2013. Potentiation of mycovirus transmission by zinc compounds via attenuation of heterogenic incompatibility in *Rosellinia necatrix*. *Appl Environ Microbiol* **79**:3684-3691.
- 50) **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.
- 51) **Jiang, D., Y. Fu, L. Guoqing, and S. A. Ghabrial.** 2013. Viruses of the plant pathogenic fungus *Sclerotinia sclerotiorum*. *Adv Virus Res* **86**:215-248.
- 52) **Kaneko, I., K. Dementhon, Q. Xiang, and N. L. Glass.** 2006. Nonallelic interactions between het-c and a polymorphic locus, pin-c, are essential for nonself recognition and programmed cell death in *Neurospora crassa*. *Genetics* **172**:1545-1555.
- 53) **Kanematsu, S., A. Sasaki, M. Onoue, Y. Oikawa, and T. Ito.** 2010. Extending the fungal host range of a partiti-virus and a mycoreovirus from *Rosellinia necatrix* by inoculation of protoplasts with virus particles. *Phytopathology* **100**:922-930.
- 54) **Kasahara, S., and D. L. Nuss.** 1997. Targeted disruption of a fungal G-protein beta subunit gene results in increased vegetative growth but reduced virulence. *Mol Plant Microbe Interact* **10**:984-893.
- 55) **Kasahara, S., P. Wang, and D. L. Nuss.** 2000. Identification of bdm-1, a gene involved in G protein beta-subunit function and alpha-subunit accumulation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**:412-417.
- 56) **Khalifa, M. E., and M. N. Pearson.** 2013. Molecular characterization of three mitoviruses co-infecting a hypovirulent isolate of *Sclerotinia sclerotiorum* fungus. *Virology* **441**:22-30.
- 57) **King, A. M. Q., M. J. Adams, E. B. Carstens, and E. J. Lefkowitz.** 2011. *Virus Taxonomy: Ninth Report of the International Committee for the Taxonomy of Viruses*. Elsevier, Academic Press, New York.
- 58) **Kondo, H., S. Chiba, A. Sasaki, S. Kanematsu, and N. Suzuki.** 2013. Evidence for negative-strand RNA Virus infection in fungi *Virology* **435**:201-209.
- 59) **Kondo, H., S. Kanematsu, and N. Suzuki.** 2013. Viruses of the white root rot fungus, *Rosellinia necatrix*. *Adv*

- Virus Res **86**:177-214.
- 60) **Koonin, E. V., G. H. Choi, D. L. Nuss, R. Shapira, and J. C. Carrington.** 1991. Evidence for common ancestry of a chestnut blight hypovirulence-associated double-stranded RNA and a group of positive-strand RNA plant viruses. *Proc Natl Acad Sci U S A* **88**:10647-10651.
 - 61) **Lai, M. M.** 1992. RNA recombination in animal and plant viruses. *Microbiol Rev* **56**:61-79.
 - 62) **Lee, K. M., J. Yu, M. Son, Y. W. Lee, and K. H. Kim.** 2011. Transmission of *Fusarium boothii* mycovirus via protoplast fusion causes hypovirulence in other phytopathogenic fungi. *PLoS One* **6**:e21629.
 - 63) **Lin, H., X. Lan, H. Liao, T. B. Parsley, D. L. Nuss, and B. Chen.** 2007. Genome sequence, full-length infectious cDNA clone, and mapping of viral double-stranded RNA accumulation determinant of hypovirus CHV1-EP721. *J Virol* **81**:1813-1820.
 - 64) **Lin, Y. H., S. Chiba, A. Tani, H. Kondo, A. Sasaki, S. Kanematsu, and N. Suzuki.** 2012. A novel quadripartite dsRNA virus isolated from a phytopathogenic filamentous fungus, *Rosellinia necatrix*. *Virology* **426**:42-50.
 - 65) **Liu, H., Y. Fu, D. Jiang, G. Li, J. Xie, J. Cheng, Y. Peng, S. A. Ghabrial, and X. Yi.** 2010. Widespread horizontal gene transfer from double-stranded RNA viruses to eukaryotic nuclear genomes. *J Virol* **84**:11876-11887.
 - 66) **Liu, H., Y. Fu, D. Jiang, G. Li, J. Xie, Y. Peng, X. Yi, and S. A. Ghabrial.** 2009. A novel mycovirus that is related to the human pathogen hepatitis E virus and rubi-like viruses. *J Virol* **83**:1981-1991.
 - 67) **Magae, Y., and M. Sunagawa.** 2010. Characterization of a mycovirus associated with the brown discoloration of edible mushroom, *Flammulina velutipes*. *Virol J* **7**:342.
 - 68) **Milgroom, M. G., and P. Cortesi.** 2004. Biological control of chestnut blight with hypovirulence: a critical analysis. *Annu Rev Phytopathol* **42**:311-338.
 - 69) **Moleleki, N., S. W. van Heerden, M. J. Wingfield, B. D. Wingfield, and O. Preisig.** 2003. Transfection of *Diaporthe perijuncta* with *Diaporthe* RNA virus. *Appl Environ Microbiol* **69**:3952-3956.
 - 70) **Nagy, P. D., and A. E. Simon.** 1997. New insights into the mechanisms of RNA recombination. *Virology* **235**:1-9.
 - 71) **Natsuaki, T., S. Yamashita, Y. Doi, S. Okuda, and M. Teranaka.** 1983. Radish yellow edge virus, a seed-borne virus with double-stranded RNA of a possible new group. *Ann Phytopathol Soc JPN* **49**:593-599.
 - 72) **Nibert, M. L., S. A. Ghabrial, E. Maiss, T. Lesker, E. J. Vainio, D. Jiang, and N. Suzuki.** 2014. Taxonomic reorganization of family *Partitiviridae* and other recent progress in partitivirus research. *Virus Res* **188**:128-141.
 - 73) **Nuss, D. L.** 2005. Hypovirulence: mycoviruses at the fungal-plant interface. *Nat Rev Microbiol* **3**:632-42.
 - 74) **Nuss, D. L.** 1984. Molecular biology of wound tumor virus. *Adv Virus Res* **29**:57-93.
 - 75) **Nuss, D. L.** 2011. Mycoviruses, RNA silencing, and viral RNA recombination. *Adv Virus Res* **80**:25-48.
 - 76) **Pearson, M. N., and A. M. Bailey.** 2013. Viruses of *Botrytis*. *Adv Virus Res* **86**:249-72.
 - 77) **Pearson, M. N., R. E. Beever, B. Boine, and K. Arthur.** 2009. Mycoviruses of filamentous fungi and their relevance to plant pathology. *Mol Plant Pathol* **10**:115-28.
 - 78) **Peever, T. L., Y. C. Liu, K. R. Wang, B. I. Hillman, R. Foglia, and M. G. Milgroom.** 1998. Incidence and diversity of double-stranded RNAs occurring in the chestnut blight fungus, *Cryphonectria parasitica*, in China and Japan. *Phytopathology* **88**:811-817.
 - 79) **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**:3107-14.
 - 80) **Roossinck, M. J.** 2010. Lifestyles of plant viruses. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **365**:1899-905.
 - 81) **Salaipeth, L., S. Chiba, A. Eusebio-Cope, S. Kanematsu, and N. Suzuki.** 2014. Biological properties and expression strategy of *Rosellinia necatrix* megabirnavirus 1 analyzed in an experimental host, *Cryphonectria parasitica*. *J Gen Virol* **95**:740-750.
 - 82) **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 the genus *Mycovirus* reveals its uneven distribution in single colonies. *Phytopathology* **97**:278-286.
 - 83) **Sasaki, A., S. Kanematsu, M. Onoue, Y. Oyama, and K. Yoshida.** 2006. Infection of *Rosellinia necatrix* with purified viral particles of a member of Partitiviridae (RnPV1-W8). *Arch Virol* **151**:697-707.
 - 84) **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.
 - 85) **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.
 - 86) **Shang, J., X. Wu, X. Lan, Y. Fan, H. Dong, Y. Deng, D. L. Nuss, and B. Chen.** 2008. Large-scale expressed sequence tag analysis for the chestnut blight fungus *Cryphonectria parasitica*. *Fungal Genet Biol* **45**:319-327.
 - 87) **Smith, M. L., C. C. Gibbs, and M. G. Milgroom.** 2006. Heterokaryon incompatibility function of barrage-associated vegetative incompatibility genes (*vic*) in *Cryphonectria parasitica*. *Mycologia* **98**:43-50.
 - 88) **Stanway, C. A., 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**:2061-2065.
 - 89) **Sun, L., D. L. Nuss, and N. Suzuki.** 2006. Synergism between a mycovirus and a hypovirus mediated by the papain-like protease p29 of the prototypic hypovirus CHV1-EP713. *J Gen Virol* **87**:3703-3714.
 - 90) **Sun, L., and N. Suzuki.** 2008. Intragenic rearrangements of a mycovirus induced by the multifunc-

- tional protein p29 encoded by the prototypic hypovirus CHV1-EP713. *RNA* **14**:2557-2571.
- 91) **Sun, Q., G. H. Choi, and D. L. Nuss.** 2009. A single Argonaute gene is required for induction of RNA silencing antiviral defense and promotes viral RNA recombination. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**:17927-17932.
 - 92) **Suzuki, N., B. Chen, and D. L. Nuss.** 1999. Mapping of a hypovirus p29 protease symptom determinant domain with sequence similarity to potyvirus HC-Pro protease. *J Virol* **73**:9478-9484.
 - 93) **Suzuki, N., K. Maruyama, M. Moriyama, and D. L. Nuss.** 2003. Hypovirus papain-like protease p29 functions in trans to enhance viral double-stranded RNA accumulation and vertical transmission. *J Virol* **77**:11697-11707.
 - 94) **Sztuba-Solinska, J., A. Urbanowicz, M. Figlerowicz, and J. J. Bujarski.** 2011. RNA-RNA recombination in plant virus replication and evolution. *Annu Rev Phytopathol* **49**:415-443.
 - 95) **Tanaka, T., A. Eusebio-Cope, L. Sun, and N. Suzuki.** 2012. Mycoreovirus genome alterations: similarities to and differences from rearrangements reported for other reoviruses. *Frontiers in Virology*.
 - 96) **Tanaka, T., L. Sun, K. Tsutani, and N. Suzuki.** 2011. Rearrangements of mycoreovirus 1 S1, S2 and S3 induced by the multifunctional protein p29 encoded by the prototypic hypovirus *Cryphonectria hypovirus 1* strain EP713. *J Gen Virol* **92**:1949-1959.
 - 97) **Taniguchi, K., and S. Urasawa.** 1995. Diversity in rotavirus genomes. *Semin Virol* **6**:123-131.
 - 98) **Urayama, S., S. Kato, Y. Suzuki, N. Aoki, M. T. Le, T. Arie, T. Teraoka, T. Fukuhara, and H. Moriyama.** 2010. Mycoviruses related to chrysovirus affect vegetative growth in the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*. *J Gen Virol* **91**:3085-3094.
 - 99) **Vainio, E. J., J. Hakanpaa, Y. C. Dai, E. Hansen, K. Korhonen, and J. Hantula.** 2011. Species of *Heterobasidion* host a diverse pool of partitiviruses with global distribution and interspecies transmission. *Fungal Biol* **115**:1234-1243.
 - 100) **Vainio, E. J., K. Korhonen, T. T. Tuomivirta, and J. Hantula.** 2010. A novel putative partitivirus of the saprotrophic fungus *Heterobasidion ecrustosum* infects pathogenic species of the *Heterobasidion annosum* complex. *Fungal Biol* **114**:955-965.
 - 101) **van Diepeningen, A. D., A. J. Debets, and R. F. Hoekstra.** 1998. Intra- and interspecies virus transfer in *Aspergilli* via protoplast fusion. *Fungal Genet Biol* **25**:171-180.
 - 102) **van Diepeningen, A. D., A. J. Debets, S. M. Slakhorst, C. Fekete, L. Hornok, and R. F. Hoekstra.** 2000. Interspecies virus transfer via protoplast fusions between *Fusarium poae* and black *Aspergillus* strains. *Fungal Genetics Newsletter* **47**:99-100.
 - 103) **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.
 - 104) **Wickner, R. B., T. Fujimura, and R. Esteban.** 2013. Viruses and prions of *Saccharomyces cerevisiae*. *Adv Virus Res* **86**:1-36.
 - 105) **Wickner, R. B., J. C. Ribas, and A. Searfos.** 2002. The double-stranded RNA viruses of *Saccharomyces cerevisiae*, p. 67-108. *In* S. Tavantzis (ed.), *Molecular biology of double-stranded RNA: concepts and applications in agriculture, forestry and medicine*. CRC Press, Boca Raton.
 - 106) **Xie, J., and S. A. Ghabrial.** 2013. Molecular characterization of two mitoviruses co-infecting a hypovirulent isolate of the plant pathogenic fungus *Sclerotinia sclerotiorum* [corrected]. *Virology* **428**:77-85.
 - 107) **Yaegashi, H., S. Kanematsu, and T. Ito.** 2012. Molecular characterization of a new hypovirus infecting a phytopathogenic fungus, *Valsa ceratosperma*. *Virus Res* **165**:143-50.
 - 108) **Yaegashi, H., H. Nakamura, T. Sawahata, A. Sasaki, Y. Iwanami, T. Ito, and S. Kanematsu.** 2013. Appearance of mycovirus-like double-stranded RNAs in the white root rot fungus, *Rosellinia necatrix*, in an apple orchard. *FEMS Microbiol Ecol* **83**:49-62.
 - 109) **Yaegashi, H., N. Yoshikawa, T. Ito, and S. Kanematsu.** 2013. A mycoreovirus suppresses RNA silencing in the white root rot fungus, *Rosellinia necatrix*. *Virology* **444**:409-416.
 - 110) **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.
 - 111) **Yokoi, T., S. Yamashita, and T. Hibi.** 2003. The nucleotide sequence and genome organization of *Sclerophthora macrospora virus A*. *Virology* **311**:394-399.
 - 112) **Yu, X., B. Li, Y. Fu, D. Jiang, S. A. Ghabrial, G. Li, Y. Peng, J. Xie, J. Cheng, J. Huang, and X. Yi.** 2010. A geminivirus-related DNA mycovirus that confers hypovirulence to a plant pathogenic fungus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**:8387-8392.
 - 113) **Yu, X., B. Li, Y. Fu, J. Xie, J. Cheng, S. A. Ghabrial, G. Li, X. Yi, and D. Jiang.** 2013. Extracellular transmission of a DNA mycovirus and its use as a natural fungicide. *Proc Natl Acad Sci U S A* **110**:1452-1457.
 - 114) **Zhang, D. X., H. L. Lu, X. Liao, R. J. St Leger, and D. L. Nuss.** 2013. Simple and efficient recycling of fungal selectable marker genes with the Cre-loxP recombination system via anastomosis. *Fungal Genet Biol*.
 - 115) **Zhang, R., S. Liu, S. Chiba, H. Kondo, S. Kanematsu, and N. Suzuki.** 2014. A novel single-stranded RNA virus isolated from a phytopathogenic filamentous fungus, *Rosellinia necatrix*, with similarity to hypo-like viruses.(submitted).
 - 116) **Zhang, X., and D. L. Nuss.** 2008. A host dicer is required for defective viral RNA production and recombinant virus vector RNA instability for a positive sense RNA virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**:16749-16754.
 - 117) **Zhang, X., G. C. Segers, Q. Sun, F. Deng, and D. L. Nuss.** 2008. Characterization of hypovirus-derived small RNAs generated in the chestnut blight fungus

- by an inducible DCL-2-dependent pathway. *J Virol* **82**:2613-9.
- 118) **Zhou, T., and G. T. Boland.** 1997. Hypovirulence and double-stranded RNA in *Sclerotinia homoeocarpa*. *Phytopathology* **87**:147-153.
- 119) 千葉壮太郎, 近藤秀樹, 兼松聡子, 鈴木信弘. 2010. ヴァイロコントロールとマイコウイルス. *ウイルス* **60**:163-176.

***Cryphonectria parasitica* as a host of fungal viruses: a tool useful to unravel the mycovirus world**

Nobuhiro SUZUKI

Agrivirology Laboratory, Group of Plant/Microbe Interactions, Institute of Plant Science and Resources, Okayama University, Kurashiki, Okayama 710-0046, Japan.
nsuzuki@rib.okayama-u.ac.jp

There appear to be over a million of fungal species including those that have been unidentified and unreported, where a variety of viruses make a world as well. Studies on a very small number of them conducted during the last two decades demonstrated the infectivity of fungal viruses that had previously been assumed to be inheritable, indigenous and non-infectious. Also, great technical advances were achieved. The chest blight fungus (*Cryphonectria parasitica*), a phytopathogenic ascomycetous fungus, has emerged as a model filamentous fungus for fungal virology. The genome sequence with annotations, albeit not thorough, many useful research tools, and gene manipulation technologies are available for this fungus. Importantly, *C. parasitica* can support replication of homologous viruses naturally infecting it, in addition to heterologous viruses infecting another plant pathogenic fungus, *Rosellinia necatrix* taxonomically belonging to a different order. In this article, I overview general properties of fungal viruses and advantages of the chestnut blight fungus as a mycovirus host. Furthermore, I introduce two recent studies carried out using this fungal host: "Defective interfering RNA and RNA silencing that regulate the replication of a partitivirus" and "RNA silencing and RNA recombination."