

マイコウイルスの多様性および  
宿主糸状菌への影響に関する研究

名古屋大学大学院生命農学研究科  
植物生産科学専攻

植物病理学研究室  
水谷行善

2021 年 3 月

## Abbreviation

BL	: Black light
BLAST	: Basic local alignment search tool
bp	: Base pair
BSA	: Bovin serum albumin
CAZymes	: CarbohydrateActive enZymes: CAZymes
cDNA	: Complementary DNA
CDS	: Coding sequence
CHI	: Chloroform/isoamylalcohol
CHV1	: Cripthonectria hypovirus 1
CP	: Coat/capsid protein
CTAB	: Hexadecyltrimethylammonium bromide
CW	: Calcofluor white
DMSO	: Dimethylsulfoxide
DNA	: Deoxyribonucleic acid
dNTPs	: Deoxyribonucleotide triphosphates
D-RNA	: Defective RNA
DRS	: Direct RNA sequencing
dsRNA	: Double-stranded RNA
EDTA	: Ethylenediaminetetraacetic acid
EtOH	: Ethanol
FbLFV1	: Fusarium boothii large flexivirus 1
FGSC	: <i>Fusarium graminearum</i> species complex
FgV1	: Fusarium graminearum virus 1
FLDS	: Fragmentation and Loop primer ligated dsRNA sequencing

Gly	: Glycosyltransferase
Hel	: Helicase
ICTV	: International Committee on Taxonomy of Viruses
IDR	: Intrinsically disordered region
indel	: Insertion and deletion
IPTG	: Isopropyl $\beta$ -D-1-thiogalactopyranoside
ITS	: Internal transcribed spacer
LB	: Luria-Bertani
LLPS	: Liquid-liquid phase separation
MCG	: Mycelial compatibility group
MP	: Movement protein
Mtr	: Methyltransferase
NGS	: Next generation sequencing
NJ	: Neighbor-Joining method
nt	: Nucleotides
ORF	: Open reading frame
PASrp	: Proline-alanine-serine-rich protein
PCI	: Phenol/chloroform/isoamylalcohol
PCR	: Polymerase chain reaction
PDA	: Potato dextrose broth agar
PDB	: Potato dextrose broth
PEG	: Polyethylene glycol
Pep	: Peptidase
RdRp	: RNA dependent RNA polymerase
RLM-RACE	: RNA ligase mediated rapid amplification of cDNA ends

RNA	: Ribonucleic acid
RNA-seq	: RNA sequencing
RT-PCR	: Reverse transcription-polymerase chain reaction
satRNA	: Satellite RNA
SNA	: Synthetic low-nutrient agar
SSC	: Saline-sodium citrate
SsHADV-1	: Sclerotinia sclerotiorum hypovirulence-associated DNA virus 1
SSI	: Single spore isolate
ssRNA	: Single-stranded RNA
STC	: Sorbitol/Tris/Calcium chloride
TE	: Tris-EDTA
TEF1 $\alpha$	: Transcription elongation factor 1 $\alpha$
THSM	: Trichoderma harzianum selection medium
Tris	: 2-N-tris (hydroxymethyl) aminomethane
TvVV1	: Trichoderma viride victorivirus 1
UTR	: Untranslated region
VC	: Virus-cured
VCG	: Vegetative incompatibility group
VLS	: Virus-like sequence
YPSA	: Yeast extract/Peptone/Sucrose/Agar medium
Znf	: Zinc-finger



## 目次

諸言 .....	1
1. 菌類と植物 .....	1
2. マイコウイルス .....	1
3. マイコウイルスの利用（ヴァイロコントロール） .....	2
4. これまでの研究 .....	3
5. 本研究の目的 .....	4
研究項目 1: マイコウイルスのゲノム配列解析 .....	5
1. 研究背景 .....	5
1-1. マイコウイルス探索 .....	5
1-2. 網羅的配列解析の試み .....	6
1-3. Fragmentation and Loop primer ligated dsRNA sequencing (FLDS) .....	7
1-4. Nanopore Direct RNA Sequencing (DRS) .....	7
1-5. これまでの研究 .....	9
2. 材料及び方法 .....	11
2-1. 供試菌株 .....	11
2-2. 菌株の生育観察 .....	11
2-3. 全 DNA 抽出 .....	15
2-4. ゲノミック PCR .....	15
2-5. 全 RNA の抽出 .....	15
2-6. dsRNA の抽出 .....	16
2-7. ギャップ配列、末端配列の取得 .....	17
2-8. サンガーシーケンシングによる配列取得 .....	19
2-9. RNA-seq による配列取得 .....	19

2-10. FLDS による配列解析 .....	20
2-11. DRS による配列解析 .....	23
2-12. 分子系統解析 .....	24
3. 結果 .....	34
3-1. 分子系統学的解析による供試菌株の種の推定 .....	34
3-2. ウイルス感染菌株の選抜 .....	34
3-3. RNA-seq による配列取得 .....	34
3-4. FLDS による配列取得 .....	46
3-5. <i>Hypoviridae</i> 科ウイルス .....	66
3-6. <i>Gammartitivirus</i> 属ウイルス .....	76
3-7. <i>Mitovirus</i> 属、 <i>Magoulivirus</i> 属ウイルス .....	79
3-8. <i>Tymovirales</i> 目ウイルス .....	89
3-9. <i>Chrysoviridae</i> 科ウイルス .....	91
3-10. <i>Victorivirus</i> 属ウイルス .....	91
3-11. <i>Alternaviridae</i> 科（未承認）ウイルス .....	96
3-12. <i>Polymycoviridae</i> 科（未承認）ウイルス .....	103
3-13. Umbra-like ウイルス .....	108
3-14. Phenui-like ウイルス .....	110
3-15. Ambivirus .....	114
3-16. ウイルス様配列（VLSs） .....	117
3-17. DRS による配列取得 .....	119
4. 考察 .....	130
研究項目 2: 病原性低下 <i>Fusarium</i> 属菌 BL13 株に感染するウイルスの性状解析 .....	140
1. 研究背景 .....	140

1-1. コムギ赤かび病 .....	140
1-2. 病原性 <i>Fusarium</i> 属菌に感染するウイルス .....	142
1-3. これまでの研究 .....	143
2. 材料と方法 .....	143
2-1. 胞子形成誘導 .....	143
2-2. 生育速度調査 .....	144
2-3. 病原性試験 .....	144
2-4. 単胞子分離 .....	146
2-5. ウイルス水平伝播試験 .....	146
3. 結果 .....	146
3-1. <i>F. boothii</i> の表現型調査 .....	146
3-2. ウイルス非感染株の作出 .....	147
3-3. ウイルスの垂直伝播効率の測定 .....	149
3-4. ウイルスの水平伝播試験 .....	151
4. 考察 .....	156
研究項目 3: 環境分離菌 ( <i>Trichoderma</i> 属菌) に感染するウイルスの性状解析 .....	165
1. 研究背景 .....	165
1-1. <i>Trichoderma</i> 属菌 .....	165
1-2. <i>Trichoderma</i> 属菌のウイルス .....	166
2. 材料と方法 .....	167
2-1. 生育速度測定 .....	167
2-2. 胞子形成能力測定 .....	167
2-3. 統計解析 .....	167
2-4. 顕微鏡観察 .....	168

3. 結果 .....	168
3-1. 生育速度調査 .....	168
3-2. 胞子形成能力調査 .....	170
3-3. 顕微鏡観察 .....	173
4. 考察 .....	173
考察 .....	179
引用文献 .....	181
摘要 .....	196
謝辞 .....	199

## 諸言

### 1. 菌類と植物

菌類は高い多様性をもって世界中に分布しており、地球上に約 220 万～380 万種存在すると概算されている (Hawksworth and Lücking, 2017)。あらゆる環境に普遍的に存在し、生態系が機能するうえで重要な役割を担っている。農業において特に重要なのは土壌中に存在する菌類であり、その多くは土壌環境の変化を通して植物の生育に間接的に関わるが、菌根菌や内生菌として植物の生育を促進させるもの、あるいは植物に感染し病害を引き起こすものなど、直接的に生育に関与するものも多数存在する。

### 2. マイコウイルス

菌類に感染するウイルスはマイコウイルスと総称される。世界で初めて菌類ウイルスが報告されたのは 1962 年のことで、食用キノコ (*Agaricus bisporus*) の Die-back 病の病原体として単離された (Hollings, 1962)。それ以来様々な宿主から菌類ウイルスが報告されており、動植物ウイルスには見られない独特な性質を持つウイルスが数多く発見されている (Chiba *et al.*, 2020a; Hillman and Cai, 2013; Hisano *et al.*, 2018; Nuss *et al.*, 2005; Sato *et al.*, 2020a)。次世代シーケンサー (Next generation sequencing: NGS) によるゲノム解析技術の発展を受けて新奇の科や属を形成するマイコウイルスの発見が相次いでおり、菌類には極めて高い多様性をもったウイルス界が広がっていると予想されている (千葉壮太郎 and 鈴木信弘, 2014)。マイコウイルスは菌類以外の生物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、宿主菌類、分子系統解析などによって分類されるが、動植物ウイルスと比較して

その一般的性状に大きく異なる点が存在する。例えば、マイコウイルスの多くは2本鎖RNA(dsRNA)をゲノムに持つ球形ウイルスであるが、粒子を形成しない一本鎖RNA(ssRNA)ウイルスが見つかっており(Hillman and Suzuki, 2004)、これは他の真核生物を宿主とするウイルスには見られない特徴である。また、クライオ電子顕微鏡と3次元構造再構築モデルによって、マイコウイルスの球状粒子構造の在り方が特殊であることも明らかになっている(Luque *et al.*, 2018)。このようにマイコウイルスは新奇ウイルス探索の対象として注目されている。しかし、マイコウイルスは通常、細胞外からの侵入経路を持たず伝搬が細胞内経路に限られる(菌糸同士の融合により水平伝播する)ため、菌糸体への機械的接種が困難であり、ウイルスの生物検定を行うことができないという共通する特徴がある(鈴木信弘, 2014)。そのため動植物ウイルスと比較してその性状解析技術が未成熟であり、一部の宿主菌/マイコウイルスの系を除いて実験系の確立が大きな課題となっている。

### 3. マイコウイルスの利用 (ヴァイロコントロール)

マイコウイルス(菌類ウイルス)は菌類に広く感染しているが、その多くは宿主菌類に病徴を引き起こさない。しかし、一部のマイコウイルスは宿主菌類に菌糸の成長速度の低下、色素沈着の減少、病原性の減衰などの影響を及ぼす。この性質を利用し、植物病原菌(広義には植物に限らない)にマイコウイルスを感染させて防除する方法は、ヴァイロコントロール(ウイルスを用いた生物防除, virological control, virocontrol)と定義され(千葉ら, 2010)、この造語は学術的には2009年に初記載されている(Chiba *et al.*, 2009)。ヴァイロコントロールの実施には、①病原糸状菌の植物に対する病原力を衰退させるウイルスの発見、②ウイ

ルスの糸状菌への導入法開発、③病原力を衰退させたウイルス感染菌の処理法（圃場で任意の標的菌株へウイルス感染させる接種法）の開発が必要となる。本法の実用化例としては、世界 3 大樹病のひとつであるクリ胴枯病（Chestnut blight）が挙げられる。ヨーロッパのクリ樹林の保護に、*Cryphonectria hypovirus 1*（CHV1）を利用したヴァイロコントロールが成功したことから、本法は有用な生物的防除法の 1 つとして注目を浴びている（Nuss, 2005）。しかし一方で、同様の試みを行ったアメリカ合衆国では標的菌の多様性が障壁となり成功に至らず、大きな課題を残している。つまり、③の要項を如何なる条件下においても満たすような技術開発が必要となる。また、CHV1 が宿主病原性の制御能力とウイルス伝搬能力を長期維持する性質を保持していたことがクリ胴枯病に対するヴァイロコントロールの成功に寄与していた報告もされており（Bryner and Rigling, 2012）、ヴァイロコントロールの成立には有用な性質を持つウイルス資材の探索もまた重要となる。

#### 4. これまでの研究

これまで筆者らは、主にコムギの最重要病害の一つであるコムギ赤かび病に関連する *Fusarium* 属菌に対するヴァイロコントロールの確立を目的として、有用ウイルス資材探索を行ってきた。前任者の Abraham Adane 博士はエチオピアで採取したコムギ赤かび病を発症したコムギ組織を分離源として約 400 株の *Fusarium* 属菌を単離し、マイコウイルス感染の指標である dsRNA 蓄積（dsRNA ウイルスのゲノム分子、或いは ssRNA ウイルスの複製中間体分子）の有無に基づいて 16 株のウイルス感染菌株を選抜した。低温での長期培養によりそのうちのいくつかはウイルスを失っていたが、11 株からは dsRNA の蓄積が認められた

(水谷 (2016))。また、配列解析により断片的なウイルスゲノム配列を取得し、これに基づいた分子系統解析の結果、新奇ウイルスを含む多様なウイルスが感染することが明らかとなった。中でもウイルス重複感染 *F. boothii* Ep-BL13 株は培地上での生育異常を示すことから、本菌株に感染するウイルスをヴァイロコントロール資材候補として選抜し、性状解析を行ってきた (水谷 (2018))。

## 5. 本研究の目的

以上の背景から、マイコウイルスの多様性理解、ヴァイロコントロール資材候補ウイルスである Ep-BL13 株感染ウイルスの性状解析、ウイルス感染による環境分離菌株の表現型への影響の解明の三点を目的として研究を行った。



## 研究項目 1: マイコウイルスのゲノム配列解析

### 1. 研究背景

#### 1-1. マイコウイルス探索

世界初のマイコウイルスが発見されてから現在までの約 60 年間で、様々な菌類宿主を対象としたマイコウイルス探索が行われてきた (Hollings, 1962; Sutela *et al.*, 2019)。特にヴァイロコントロール資材としての利用を目的として、主に植物病原菌に感染するマイコウイルスの探索が精力的に行われており (Jiang *et al.*, 2013; Kotta-Loizou and Coutts, 2017; Li *et al.*, 2019b; Pearson and Bailey, 2013)、いくつかのウイルスについてはその感染による宿主表現型の影響に関する詳細な解析がなされている (Lee *et al.*, 2011; Milgroom and Cortesi, 2004; Moriyama *et al.*, 2018; Sasaki *et al.*, 2016; Yu *et al.*, 2010)。従来のマイコウイルス探索はサンプルからの菌株の単離培養、及び RNA ウイルス感染の指標である dsRNA 蓄積の有無によるウイルス感染株の選抜を必要とするが、この方法では絶対寄生菌などの難培養性菌類を宿主とするウイルス、dsRNA 蓄積量が低い潜在感染ウイルスの検出および解析は不可能である。さらに、多くの研究は主に宿主菌に表現型異常を引き起こすウイルスを対象としており、マイコウイルスの大半を占めるとされる無病徴 (不顕性) 感染ウイルスの存在は軽視される傾向にあった。ウイルスゲノムの配列解析はランダム cDNA ライブラリの構築とサンガーシーケンシングによるもので、比較的単純なゲノム構造を持つ RNA ウイルスであってもその全ゲノム解読に多くの時間を必要とした。2000 年代に急速に発展した NGS はこれまで見過ごされてきたマイコウイルスの解析を可能にし、マイコウイルスの多様性理解に推進力をもたらした。本

技術を用いて植物病原菌のみならず環境サンプルや難培養性の菌類を対象としたウイルス探索が精力的に行われるようになり、菌類には既存の分類群には属さない系統的に多様なウイルスが数多く感染することが明らかとなった（Bartholomäus *et al.*, 2016; Ikeda *et al.*, 2012; Kondo *et al.*, 2016; Osaki *et al.*, 2016; Al Rwahnih *et al.*, 2011）。

## 1-2. 網羅的配列解析の試み

NGS による RNA 配列の網羅的解析手法である RNA sequencing (RNA-seq) を用いたウイルスのゲノム配列解析には、そのゲノムの性質に起因する 2 つの課題がある。1 つは、サンプル中のウイルス集団がもつ配列多様性がデノボアセンブリの計算を複雑化することである。RNA ウイルスの複製酵素（RNA 依存 RNA ポリメラーゼ: RdRp）はエラー率が高く、複製された娘ウイルスのゲノムはしばしば変異を含む（Vignuzzi *et al.*, 2005）。そのため、単一のウイルス株であっても宿主細胞内においてはゲノム中に多様な変異を含むウイルス準種（quasispecies）の集団として存在する（Domingo and Perales, 2019）。一般的なアセンブリツールは真核生物のゲノムなど、多様性の低い DNA 配列の再構築を目的としており、ウイルスのように変異体を多く含む集団に由来するデータでは成果が得られない傾向がある（Hunt *et al.*, 2015; Yang *et al.*, 2012）。2 つ目は、ウイルスゲノム全域にわたる均一なリードカバレッジの取得が困難なことである。ウイルスのゲノム RNA は細胞内において複雑な立体構造を形成しており、タンパク質の翻訳や複製において重要な機能をもつ（Ferré-D'Amaré *et al.*, 1998; Zhou *et al.*, 2013）。このような高次構造は RNA-seq のライブラリ作成で必須の過程である逆転写（RT）反応を阻害し、最終的に得られる配列データ量に偏りを発生させる

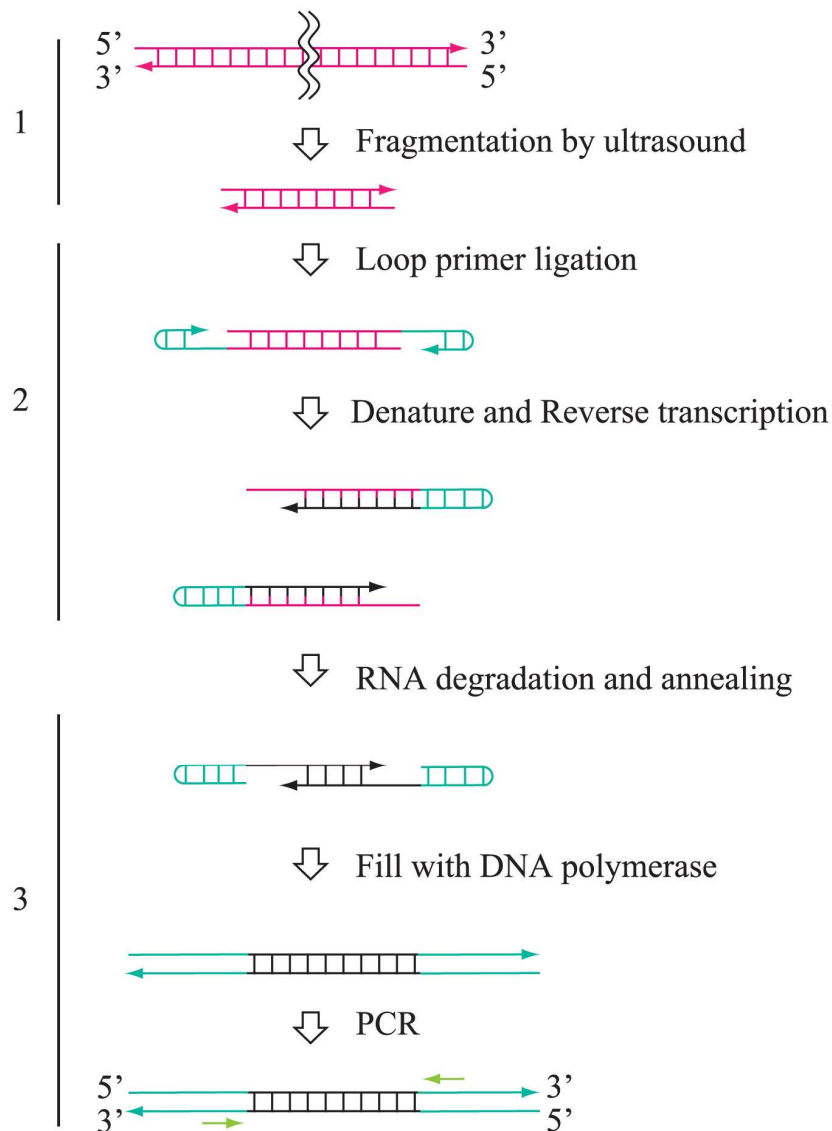
(Boivin *et al.*, 2020; Nasheri *et al.*, 2017; Yang *et al.*, 2012)。極端な場合にはゲノム上にリードが全く得られない領域が生じ、アセンブリの際にコンティグ配列の断片化を生じる。

### **1-3. Fragmentation and Loop primer ligated dsRNA sequencing (FLDS)**

dsRNA を鋳型とした RNA-seq 解析は宿主由来 DNA、RNA 分子の酵素的な除去により試料中のウイルス由来 RNA の割合が増加するため、蓄積量が少ないウイルス（潜在感染）の検出に有効な手段である。しかし異なる長さ、G+C%のゲノムを持つウイルスが複数含まれる試料においては、dsRNA から ssRNA への熱変性効率が各ウイルスゲノムで異なるため、逆転写、Polymerase chain reaction (PCR) 反応の効率に偏りが生じる。FLDS は、RNA ウイルスの完全長ゲノム配列を決定するために開発されたライブラリ構築手法である (Urayama *et al.*, 2016)。本手法は、(1) 超音波により規定サイズに断片化したウイルス dsRNA を鋳型として用いること、及び (2) ループアダプターを各 dsRNA 断片に結合し、PCR 反応を行うことを特徴としており、一般的な RNA-seq のライブラリ構築方法では困難な均一なリードカバレッジと末端配列の取得を可能とする (Fig. 1-1)。この方法により、糸状菌を含む様々な宿主から多様な RNA ウイルスの完全長ゲノム配列が解読されている (Chiba *et al.*, 2020a, 2020b; Fukasawa *et al.*, 2020; Urayama *et al.*, 2016, 2018)。

### **1-4. Nanopore Direct RNA Sequencing (DRS)**

RNA-seq のライブラリ構築において逆転写反応は必須であるが、同時にカバレッジの偏りの原因ともなる。Oxford Nanopore Technologies 社の開発した Nanopore Direct RNA Sequencing (DRS) は、RNA 分子の塩



(Urayama et al., 2016)

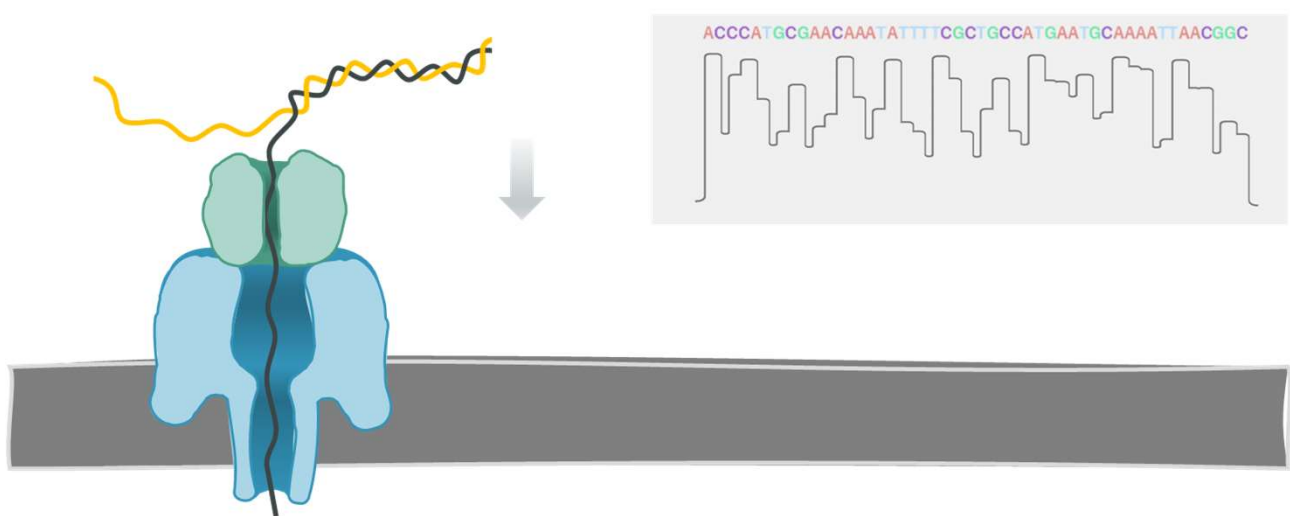
**Figure 1-1. Schematic work-flow of FLDS.**

1. Fragmentation of dsRNA by ultrasound. 2. Ligation of a loop primer on 3'-terminal ends and reverse transcription. 3. Selective duplex formation of cDNA from dsRNA, and PCR amplification. This figure is adapted from Urayama *et al.*, 2016.

基配列を直接読み取る技術である。DRS では、フローセル上に埋め込まれた微小なタンパク質の孔を RNA 分子が通過する際、各塩基の化学的構造の違いを電流の阻害率として検出し、配列データに変換する (Fig. 1-2)。ライブラリ構築に逆転写と PCR を必要としないため、RNA-seq よりも均一なカバレッジが期待できる。また、DRS は取得できる配列長の限界が理論上存在せず、一本のゲノム RNA の端から端までの塩基配列を 1 つの配列データとして取得することが可能である。

### 1-5. これまでの研究

これまで、コムギ赤かび病を発症した植物病変組織から単離されたウイルス感染 *Fusarium* 属菌株コレクション（以下、*Fusarium* head blight (FHB) 関連菌株コレクション）のウイルスゲノム配列解析をランダム cDNA ライブラリのサンガーシーケンシング及び RNA-seq により行ってきた。その結果、FHB 関連菌コレクションに FbMV1 を含む 7 種の異なるウイルスが感染することが明らかとなった（水谷, 2018）。しかしながら、RNA-seq により得られたウイルス配列の多くは断片化しており、完全長ゲノム配列を復元するには RT-PCR 産物のサンガーシーケンシングを主とする追加実験が必要であった。また、当研究室では東京家政大学との研究によって、有用生理活性物質産生菌株コレクション（以下、Beneficial secondary metabolites (BSM) 関連菌株コレクション）から、ウイルス感染菌 13 株を選抜しており、一部のウイルスについてゲノム配列解析を行ってきた（太田, 2018; 2020）。本研究では、追加実験によって得られたウイルスゲノムの配列解析に加え、FLDS、DRS を用いて有用菌株コレクションを含む多様な菌株に感染するウイルスのゲノム配列取得を試み、それぞれの方法の評価を行った。



**Figure 1-2. Illustration of how Nanopore sequencing works.**

A biological nanopore mounted on a synthetic membrane sequences individual nucleic acid molecules by converting the sequence of nucleotide bases as disruptions of current across a membrane.

## 2. 材料及び方法

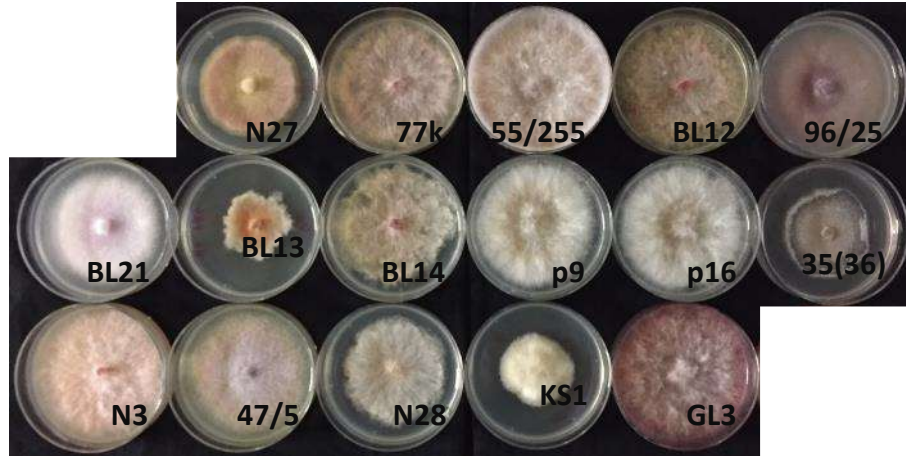
### 2-1. 供試菌株

エチオピア各地で得られたコムギの羅病組織から岡山大学の研究によって分離された FHB 関連菌コレクション 16 株、東京家政大学との共同研究によって分離された BSM 関連菌株コレクションのウイルス感染菌株 13 株（太田, 2018）、及び四日市高校の橋爪氏が野外サンプルから分離した常在菌株の内、ウイルス感染株として選抜した 2 株の合計 31 株を供試菌株として用いた（Fig. 1-3~1-5）。これらの菌株は 20℃で PDA [2.4% potato dextrose broth, 1.5% agar, w/v] 及び Synthetic low-nutrient agar (SNA) [0.1% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.1% KNO<sub>3</sub>, 0.05% MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O, 0.05% KCl, 0.02% Glucose, 0.02% Sucrose, 2% Agar, w/v] 固形培地上にて育成し、4℃で保存した。また、PDA 培地上の菌糸片を菌体保存液 [10% Glycerol, 5% Trehalose] とともに 2 ml チューブに入れ、-80℃で冷凍保存した。冷凍菌体を再生する際には 30℃で急速解凍し、菌糸片を PDA 培地上に接種した。

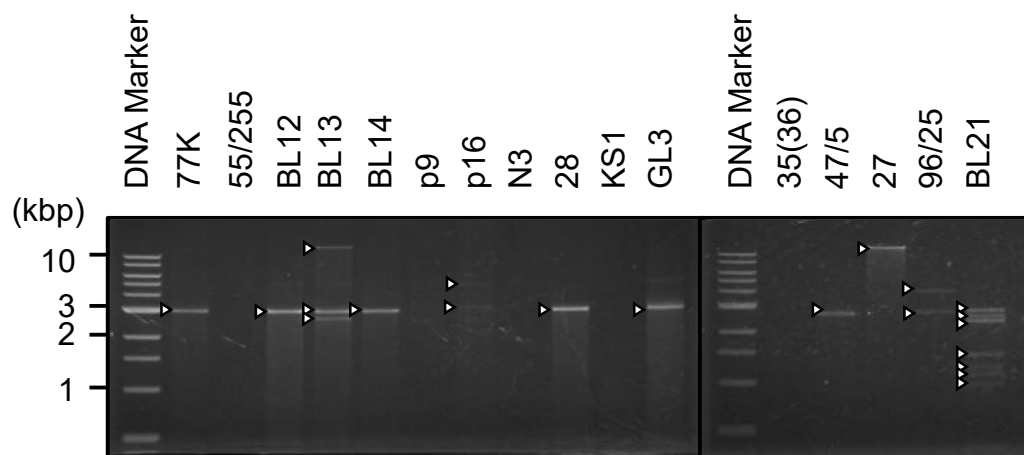
### 2-2. 菌株の生育観察

前培養として、20 ml の PDA を加えた直径 6 cm のシャーレの中心に PDA から切り出した 3 mm 四方の菌糸塊を配置し、20℃下で 5 日間培養した。コロニーの先端付近から 3 mm 四方の菌糸塊を切り出し、20 ml の PDA を加えた直径 6 cm のシャーレの中心に配置した。これを 20℃下で培養し、コロニーの形態を観察した。

A



B



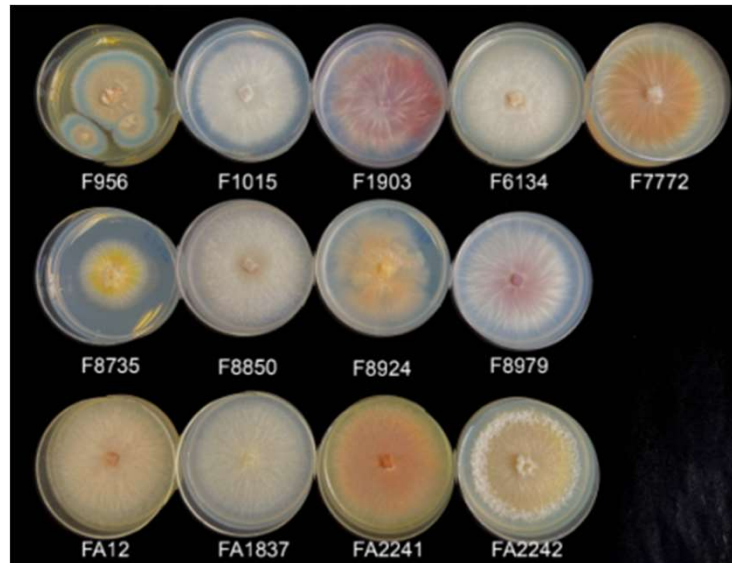
(水谷, 2016, modified)

**Figure 1-3. Colony morphology and dsRNA accumulation pattern of Ethiopian *Fusarium* spp. strains isolated from FHB-developing wheat tissue.**

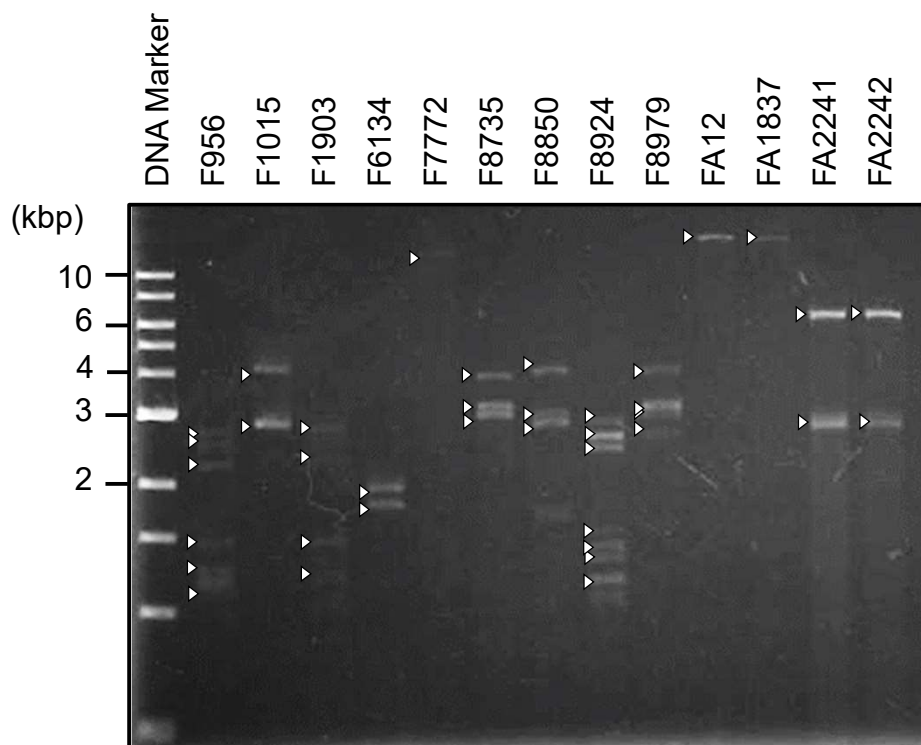
Colony morphologies of fungal strains on PDA (A) and dsRNA banding patterns visualized by agarose gel electrophoresis and EtBr (B). A white arrowhead indicates visible dsRNA band.



A



B

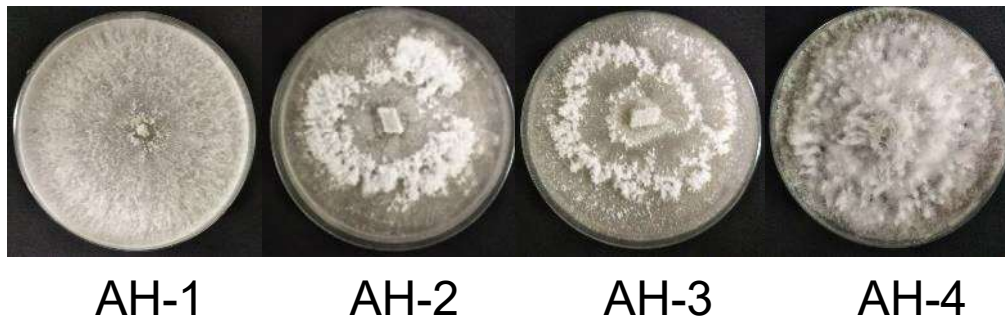


(太田, 2018, modified)

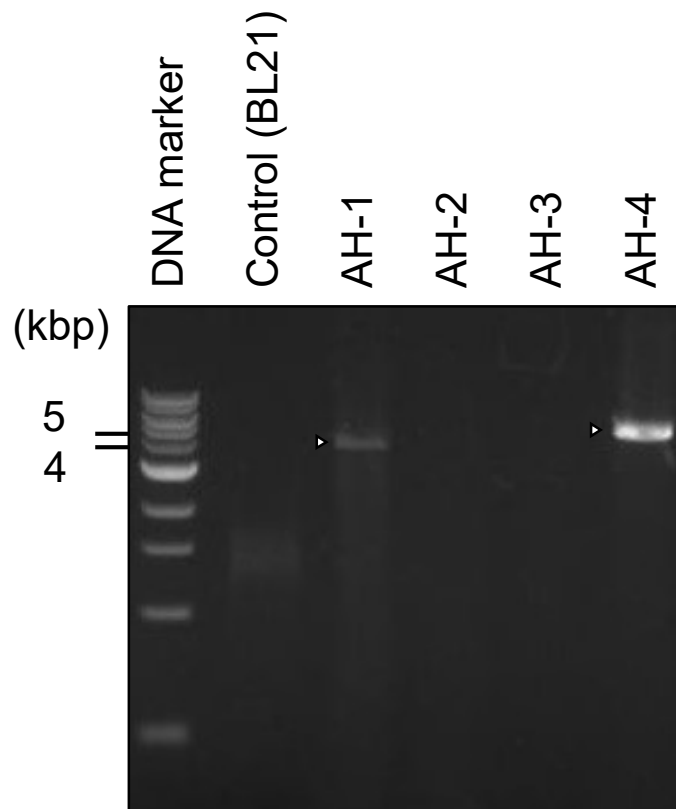
**Figure 1-4. Colony morphology and dsRNA accumulation pattern of beneficial secondary metabolites-producing strains.**

Colony morphologies of fungal strains on PDA (A) and dsRNA banding patterns visualized by agarose gel electrophoresis and EtBr (B). A white arrowhead indicates visible dsRNA band.

A



B



**Figure 1-5. Colony morphology and dsRNA accumulation pattern of fungal strains isolated from environmental samples.**

Colony morphologies of fungal strains on PDA (A) and dsRNA banding patterns visualized by agarose gel electrophoresis and EtBr (B). A white arrowhead indicates visible dsRNA band.

### 2-3. 全 DNA 抽出

20℃下、PDA 上で培養した菌糸を、PDB 20 ml を含む 200 ml 三角フラスコに接種し、20℃下で 7 日間静置培養した。ガーゼを用いて培養液を濾過し、水分を除去して菌体を回収した。得られた菌体を乳鉢中で液体窒素を加えながら摩砕し、菌体粉末と CTAB extraction buffer [100 mM Tris-HCl, 1.4 M NaCl, 25 mM EDTA, 2% CTAB, w/v] 700 µl を 1.5 ml チューブに加えて攪拌した後、65℃で 1 時間反応させた。等量のクロロホルムを加えて攪拌し、遠心分離（14,000 x g、温度、10 分）した。上清を 600 µl のイソプロパノールに加えて遠心分離（14,000 x g、温度、5 分）し、EtOH 沈殿によって回収した沈殿を 100 µl の TE に溶解した。

### 2-4. ゲノミック PCR

菌体から抽出した DNA を鋳型として、Go Taq Green Master Mix を用いて PCR を行った。得られた DNA 溶液をアガロース電気泳動によって分離し、約 1.7 kbp の長さのバンドを切り出し、NucleoSpin Gel and PCR Clean-up (TaKaRa) を用いて推奨プロトコルに従って精製した。

### 2-5. 全 RNA の抽出

供試菌株からの全 RNA 抽出は、以下の方法で行った。20℃下 PDA 固形培地上で培養した新鮮な菌糸を、PDB [0.25% potato dextrose broth, w/v] 20 ml を含む 200 ml 三角フラスコに接種し、20℃下 7 日間培養した。培養液はガーゼ（ソフライナー、pigeon）を用いて濾過し、ペーパータオルで水分を除去して菌体を回収した。得られた菌体を乳鉢中で液体窒素を加えながら摩砕し、3 ml の Extraction Buffer [200 mM NaCl, 100 mM Tris-HCl (pH 8), 4 mM EDTA-Na, 2 % SDS, w/v]、3 ml の PCI [50% Acid Phenol / 48% Chloroform / 2% Isopropanol, v/v/v] に懸濁後、15 ml チ

チューブに移して遠心分離（2,000 x g、常温、15 分）した。PCI 3 ml を含む 15 ml チューブに得られた上清を移し、再攪拌した後遠心分離（1,710 x g、常温、15 分）した。3 ml の CHI [96% Chloroform / 4% Isopropanol, v/v] を含む 15 ml チューブに上層を加えて攪拌し、遠心分離（2,000 x g、常温、15 分）した。2 ml チューブに上層を 400  $\mu$ l ずつ分注し、それぞれ 40  $\mu$ l の 3 M NaOAc、1 ml の 100% EtOH を加えて、-80°C で 15 分間静置した。その後遠心分離（17,000 x g、25 分）によって沈殿を回収し、70% EtOH で洗浄、減圧乾燥した後、ペレットを滅菌水 300  $\mu$ l に溶解させた。得られた全 RNA サンプル 3  $\mu$ l を用いてアガロース電気泳動を行い、抽出サンプルを確認した。

## 2-6. dsRNA の抽出

全 RNA 溶液 270  $\mu$ l を新しいチューブに移し、10 x STE [100 mM Tris-HCl (pH 8.0) , 10 mM EDTA (pH 8.0) , 1.5 M NaCl] を 30  $\mu$ l 加えて 1 x STE とした。100% EtOH を 57  $\mu$ l 加え [16% EtOH, 84% STE, v/v]、少量の cellulose column powder (ADVANTEC) を加えて、ローテーターを用いて室温で 1 時間以上振盪した。遠心分離（17,000 x g、3 分）して上清を除き、Wash buffer [16% EtOH, 84% STE, v/v] を 500  $\mu$ l 加えて激しく攪拌した後、再び遠心分離（17,000 x g、3 分）した。この洗浄工程を 2、3 回繰り返した後、沈殿を回収し、減圧下で乾燥した。1 x STE を 60  $\mu$ l 加えて攪拌して dsRNA を溶出させ、遠心分離（17,000 x g、3 分）し、cellulose column powder を混入させないように上清を 1.5 ml チューブに移した。得られた dsRNA 画分に滅菌水を加えて 354.5  $\mu$ l とし、RQ1 DNase (Promega) 5  $\mu$ l、10 U/ $\mu$ l S1 nuclease (Promega) 0.5  $\mu$ l、10 x Double Digestion Buffer [0.9 M NaOAc, 0.3 M NaCl, 0.15 M MgCl<sub>2</sub>, 0.03 M

ZnSO<sub>4</sub>] 40 µl を混合し、室温で 3 時間反応させた。等量の PCI を加えて攪拌し、遠心分離 (14,000 x g、4°C、15 分) した後、上清を 1.5 ml チューブに移した。等量の CHI を加えて攪拌して再び遠心分離 (14,000 x g、4°C、15 分) し、上清を 1.5 ml チューブに移した。EtOH 沈殿を行った後、沈殿を 20 µl の滅菌水に溶解し、精製サンプルとした。精製物 3 - 9 µl を用いてアガロースゲル電気泳動でウイルス由来 dsRNA の検出を行った。

## 2-7. ギャップ配列、末端配列の取得

### 2-7-1. Gap-filling RT-PCR

菌体から抽出した Total RNA 溶液を鋳型として、ReverTra Ace (TOYOBO) により一本鎖 cDNA 合成を行った。プライマーには 20 µM Random Primer (9 mer) (TOYOBO) 1 µl を使用し、反応条件は製品の推奨プロトコルに従った。得られた cDNA 溶液 1 µl を鋳型として、Go Taq Green Master Mix (Promega)、KOD FX NEO (TOYOBO)、PrimeSTAR (TaKaRa) のいずれかを用いて PCR 反応を行い、2 本鎖 cDNA を合成した。プライマーにはウイルスコンティグ配列を基に作成した特異的プライマーを使用し、反応条件は製品の推奨プロトコルに従った。

### 2-7-2. 3'RNA ligase-mediated rapid amplification of cDNA ends (3'RLM-RACE)

dsRNA 溶液 10 µl に Dimethylsulfoxide (DMSO) 90 µl を加えて熱変性 (65°C、20 分) させ、EtOH 沈殿によって ssRNA を回収した。10 mM 3RACE-adapter 2 µl、10 x T4 RNA ligase buffer 5 µl、0.1% BSA 3 µl、40% PEG 31.25 µl を混合した液を加えて EtOH 沈殿で回収した ssRNA を溶解し、33 U/µl T4 RNA ligase 2 µl を加えて 5~16°C で 16~18 時間反応さ

せた。再び DMSO 処理と EtOH 沈殿を行って回収した ssRNA を 5 x RTbuffer 5  $\mu$ l、2.5 mM dNTP 5  $\mu$ l、20  $\mu$ M 3RACE-1<sup>st</sup> primer 2  $\mu$ l、RNase inhibitor 1  $\mu$ l、RiverTra Ace 1  $\mu$ l、滅菌水 8.5  $\mu$ l を混合した液を加えて溶解し、42°Cで 1 時間、51°Cで 30 分、68°Cで 15 分反応させた。その後、プライマーとして 10  $\mu$ M のウイルス特異的プライマー及び 10  $\mu$ M 3RACE-2<sup>nd</sup> primer 2  $\mu$ l を用いて 2 本鎖 cDNA を合成した。

Gap-filling RT-PCR 及び 3'RLM-RACE により得られた 2 本鎖 cDNA は、PGEM-T easy vector kit (Promega)、Zero Blunt<sup>TM</sup> TOPO<sup>TM</sup> PCR Cloning Kit (Thermo Fisher) のいずれかを用いてベクターにクローニングした。得られた形質転換体から GenElute Plasmid Miniprep kit (SIGMA) を用いてプラスミド DNA を抽出した。ベクターへのクローニング、大腸菌の形質転換及びプラスミドの抽出は製品の推奨プロトコルに従って行った。

### 2-7-3. コロニー RT-PCR

既報の実験手順 (Urayama *et al.*, 2015) に基づき、菌体中のウイルス RNA を鋳型とした RT-PCR を行った。滅菌した爪楊枝で寒天培地上のコロニーを突き刺し、先端に付着した微量の菌体を PCR チューブの底面に擦り付けて接種した。RT-PCR は PrimeScript<sup>TM</sup> One Step RT-PCR Kit (TaKaRa) を用いた。PrimeScript 1 step Enzyme Mix 0.2  $\mu$ l, 10  $\mu$ l Primer 0.4  $\mu$ l/each, 2 x 1 step buffer 2.5  $\mu$ l, RNase-free water 1.5  $\mu$ l を混合して反応液を作成し、菌体を接種した PCR チューブに加えた。製品の推奨プロトコルに従い、逆転写 (50°C、1 時間)、変性 (94°C、2 分) の後、変性 (94°C、30 秒)、アニーリング (60°C、30 秒)、伸長反応 (72°C、90 秒) の条件で 30 サイクルの反応を行った。

## 2-8. サンガーシーケンシングによる配列取得

Big Dye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems) を使い、推奨プロトコルに従って反応液を調整した。精製 DNA 溶液 6.5  $\mu$ l、Big Dye 1  $\mu$ l、5 x sequencing buffer 1.5  $\mu$ l、2  $\mu$ M Primer 1  $\mu$ l を混合したものを反応液とし、変性 (96°C、10 秒)、アニーリング (50°C、5 秒)、伸長反応 (60°C、4 分) の条件で 25 サイクルの反応を行った。反応液中の DNA サンプルを EtOH 沈殿によって回収し、Hi-Di ホルムアミド 15  $\mu$ l に溶解した後、96 well plate に移してシーケンス解析に使用した。解析はシーケンサー ABI3100 (Applied Biosystems) を用いて行った。シーケンスデータの解析及びアッセンブルは GENETYX ver. 14 及び ATGC ver. 14 (GENETYX) にて行った。

## 2-9. RNA-seq による配列取得

Protocol for use with NEBNext Poly (A) mRNA Magnetic Isolation Module (NEB) を一部改変した手順でライブラリを作成した。菌体 (F8924 株、FA1837 株及び FA2242 株) から抽出、精製した dsRNA 200 ng を含む 13  $\mu$ l の滅菌水に 10x first-strand cDNA synthesis buffer 4  $\mu$ l、random primer 1  $\mu$ l を加え、変性 (94°C で 15 分) した。氷冷した反応液に NEBNext First Strand Synthesis Enzyme Mix 2  $\mu$ l を加え、25°C で 10 分、42°C で 15 分、70°C で 15 分反応させることで、一本鎖 cDNA を合成した。2 本鎖 cDNA 合成から平滑末端化の手順については、プロトコルに従って行った (Chapter 1.4-1.6)。配列取得は Illumina Hiseq (77 bp、ペアエンド) により行った。得られた配列データから、クオリティトリミングとして Sickle version 1.33 (Joshi and Fass, 2011) を用いてリード精度 Q30 以下、リード長 20 bp 以下の配列を除去した。デノボアセンブリ

はトリミング後の配列データをインプットとして、SPAdes version 3.13.0 (Bankevich *et al.*, 2012) のデフォルト設定から -k auto 及び --meta のオプションを指定して行った。得られたコンティグ配列を National Center for Biotechnology Information (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) の提供する Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) 解析に供試し、既知のマイコウイルス配列と最大の類似性を示した配列、あるいは平均カバレッジが 10 以上であった配列の内、真菌由来配列と類似性を示さなかった配列を推定ウイルス配列として選抜した (Fig. 1-6)。

## 2-10. FLDS による配列解析

既報の実験手順 (Urayama *et al.*, 2018) に従って行った。菌体 (F956 株、F6134 株、F8850 株、F8979 株、FA2241 株、AH-1 株及び AH-4 株) から抽出、精製した dsRNA を、Covaris S220 ultrasonicator (Woburn) を用いて超音波で断片化 (run time 35 s, peak power 140.0 W, duty factor 2.0% and 200 cycles/burst) した。断片化した dsRNA を Zymo Clean Gel RNA Recovery Kit (Zymo Research) により製品の推奨プロトコルに従って精製した。精製 dsRNA と U2 プライマー (5'-p-GAC GTA AGA ACG TCG CAC CA-p-3') を含む 30 µl のライゲーション反応液 [50 mM HEPES/NaOH、pH 8.0、18 mM MgCl<sub>2</sub>、0.01% BSA、1 mM ATP、3 mM DTT、10% DMSO、20% PEG 6,000、30 U T4 RNA Ligase (TaKaRa) ] を作成し、37°C で 16 時間反応させた。反応物を MinElute Gel Extraction Kit (Qiagen) を用いて製品の推奨プロトコルに従って精製した。U2 プライマーの相補配列である U2-comp プライマー (5'-OH-TGG TGC GAC GTT CTT ACG TC-OH-3') を精製 dsRNA 溶液に添加し、95°C、3 分間の熱変性の後氷水上に移して急速に冷却した。SMARTer RACE 5'/3' Kit



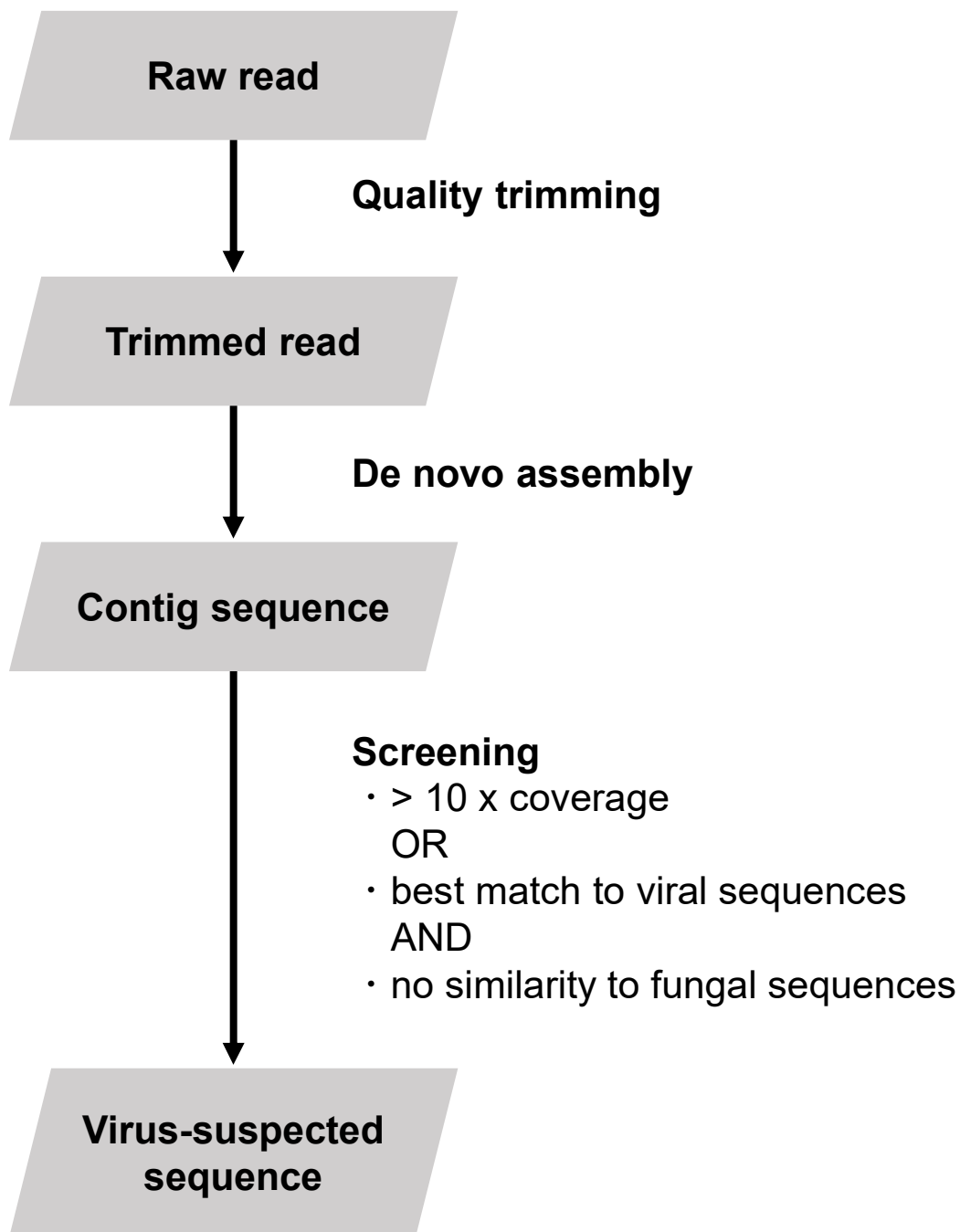


Figure 1-6. Flow chart of viral genomic *de novo* sequencing.

(TaKaRa) を用いて製品の推奨プロトコルに従って cDNA を合成した。反応液中の RNA を RNase H (TaKaRa) で消化した後、U2-comp 及び UPM (SMARTer RACE 5'/3' Kit に付属) プライマーを用いて 96°C で 2 分間の熱変性の後、98°C で 10 秒、60°C で 15 秒、68°C で 2 分を 30~35 サイクル行い 2 本鎖 cDNA を増幅した。1.25 x SPRIselect Reagent Kit (Beckman Coulter) を用いて製品の推奨プロトコル、サイズ選択手順に従って小さい cDNA 及びプライマーダイマーを除去した。(Covaris で 300 pb に断片化) 合成した 2 本鎖 cDNA は RNA-seq 解析で用いたキットの Chapter 1.6 に従い末端処理を行った後、配列解析に供試した。配列取得は Illumina HiSeq (85 bp、シングルエンド) により行った。得られた配列データのトリミングには国立研究開発法人海洋研究開発機構 (JAMSTEC) が開発したパイプラインを使用した。パイプラインの詳細は以下のとおりである。アダプター及び低品質の配列は、Trimmomatic version 0.32 (Bolger *et al.*, 2014) でトリミングした。cDNA 合成及び増幅に使用したプライマー配列は、Cutadapt version 1.10 (Martin, 2011) でトリミングした。50 塩基より短いリードは Trimmomatic version 0.32 を用いて除去した。得られた配列データを基に、SPAdes のデフォルト設定から -k auto 及び --careful のオプションを指定して行った。得られたコンティグ配列を BLAST 解析に供試し、既知のマイコウイルス配列と最大の類似性を示した配列、あるいは平均カバレッジが 10 以上であった配列の内、真菌由来配列と類似性を示さなかった配列を推定ウイルス配列として選抜した (Fig. 1-6)。推定ウイルス配列に対してリードマッピングを行い、IGV version 2.8.0 (Robinson *et al.*, 2017) により可視化した。(Urayama *et al.*, 2016) に従い、コンティグの末端付近において同じ位置が末端となる配列が 10 リード以上見受けられた場合、その位置を

ゲノム末端とした。

## 2-11. DRS による配列解析

既報の実験手順 (Wongsurawat *et al.*, 2019) を参考にライブラリ構築を行った。菌体 (Ep-BL13 株、FA1837 株、FA2242 株) から抽出、精製した dsRNA 200-1,000 ng を含む滅菌水 40  $\mu$ l に DMSO 360  $\mu$ l を加え、熱変性 (65°C、20 分) した。製品の推奨プロトコルに従って *E. coli* Poly (A) Polymerase (NEB) を用いて変性後のウイルス ssRNA に Poly (A) を付加したのち、SQK-RNA002 (Oxford Nanopore Technologies) の推奨プロトコルに従ってライブラリ構築を行った。得られたライブラリ溶液を R9.4/FLO-MIN106 フローセルに加え、2 - 18 時間稼働させることで配列データを取得した。MinKNOW Core version 3.6.0 と Guppy version 3.2.8 のデフォルト設定で電流データの取得及びベースコールを行った。得られた配列データから Nanofilt version 2.6.0 (De Coster *et al.*, 2018) を用いてクオリティスコア 7 以下、リード長 300 bp 以下の配列を除去した。デノボアセンブリは Minimap 2 version 2.17-r941 (Li, 2018) のデフォルト設定及び Miniasm version 0.3-r179 (Li, 2016) のデフォルト設定から -s 0.1、-c 10 及び -e 1 のオプションを指定して行った。得られたコンティグ配列のエラー校正は Pilon version 1.23 (Walker *et al.*, 2014) のデフォルト設定により行った。この手順は配列データの修正が行われなくなるまで繰り返した。得られたコンティグ配列を BLAST 解析に供試し、既知のマイコウイルス配列と最大の類似性を示したものを推定ウイルス配列として選抜した。

RNA-seq、FLDS、DRS のそれぞれの手法で得られた推定ウイルス配列に対するリードマッピングには Minimap2 version 2.17-r941 及び

SAMtools version 1.7 (Li *et al.*, 2009) を、カバレッジの可視化には SparK version 2.6.2 (Kurtenbach, 2019) を使用した。FASTG パスの可視化には Bandage Version 0.8.1 を用いた。末端の結合が予測されたコンティグのアセンブリは GENETYX-ATGC Version 14 のデフォルト設定で行った。ORF 検索は GENETYX Version 14 により行った。

## 2-12. 分子系統解析

マルチプルアライメント解析及び近隣結合法 (Neighbor-Joining method) 系統解析は、MAFFT ver. 7

(<http://mafft.cbrc.jp/alignment/software/>) を用いて、FASTA フォーマットの配列情報を入力して自動計算した。分子系統解析に用いたアミノ酸配列の GenBank アクセッション番号は Table 1-1 から Table 1-7 に示した。

Table 1-1. Genbank accession list of replicase of viruses in the phylum *Pisuviricota* used for multiple alignment and phylogenetic analysis .

Class	Order	Family	Genus	Virus name	Accession no.
<i>Duploviricetes</i>	<i>Durnavirales</i>	<i>Hypoviridae</i>	Alphahypovirus	<i>Alternaria alternata</i> hypovirus 1	QFR36339
				<i>Cryphonectria</i> hypovirus 1	AAA67458
				<i>Cryphonectria</i> hypovirus 2	AAA20137
				<i>Fusarium graminearum</i> hypovirus 1	AGC75065
				<i>Macrophomina phaseolina</i> hypovirus 1	ALD89099
				Wuhan insect virus 14	APG76086
			Betahypovirus	<i>Cryphonectria</i> hypovirus 3	AAF13604
				<i>Cryphonectria</i> hypovirus 4	AAQ76546
				<i>Fusarium oxysporum</i> f. sp. dianthi hypovirus 2	QHI00074
				<i>Phomopsis longicolla</i> hypovirus 1	AIG94930
				<i>Sclerotinia sclerotiorum</i> hypovirus 1	AEL99352
			Gammahypovirus	<i>Valsa ceratosperma</i> hypovirus 1	BAM08994
				<i>Sclerotium rolfsii</i> hypovirus 1	AZA15168
				<i>Sclerotinia sclerotiorum</i> hypovirus 2	AHA56680
			Unclassified	<i>Agaricus bisporus</i> virus 2	AQM49946
				Beihai hypo-like virus 1	APG76085
				Beihai sipunculid worm virus 6	APG76084
				<i>Fusarium graminearum</i> hypovirus 2	AKB94065
				<i>Fusarium langsethiae</i> hypovirus 1	APL96674
				<i>Fusarium poae</i> hypovirus 1	BAV56305
				<i>Rosellinia necatrix</i> hypovirus 1	BBC21049
				<i>Rosellinia necatrix</i> hypovirus 2	BBB86794
				<i>Sclerotium rolfsii</i> hypovirus 3	AZF86108
				<i>Sclerotium rolfsii</i> hypovirus 4	AZF86109
				<i>Sclerotium rolfsii</i> hypovirus 5	AZF86110
				<i>Sclerotium rolfsii</i> hypovirus 7	AZF86112
				<i>Sclerotium rolfsii</i> hypovirus 8	AZF86113
		<i>Fusariviridae</i>	<i>Fusarivirus</i>	<i>Alternaria brassicicola</i> fusarivirus 1	ALW95411
				<i>Fusarium graminearum</i> dsRNA mycovirus-1	AAT07067
				<i>Macrophomina phaseolina</i> single-stranded RNA virus 1	ALD89094
				<i>Penicillium aurantiogriseum</i> fusarivirus 1	ALO50125
				<i>Penicillium roqueforti</i> ssRNA mycovirus 1	AII99895
				<i>Pleospora typhicola</i> fusarivirus 1	ALO50136
				<i>Rosellinia necatrix</i> fusarivirus 1	BAP16392
				<i>Sclerotinia sclerotiorum</i> fusarivirus 1	AKJ26309

Table 1-1. (continued)

Class	Order	Family	Genus	Virus name	Accession no.	
<i>Duplopiviricetes</i>	<i>Durnavirales</i>	<i>Partitiviridae</i>	<i>Alphapartitivirus</i>	Amasya cherry disease-associated mycovirus	CAG77604.1	
				Arabidopsis halleri partitivirus 1	BAV56959.1	
				Beet cryptic virus 1	ACA81389.1	
				Bipolaris maydis partitivirus 1	ARJ58793.1	
				Carrot cryptic virus	ACL93278.1	
				Cherry chlorotic rusty spot associated partitivirus	CAH03668.1	
				Chondrostereum purpureum cryptic virus 1	CAQ53729.1	
				Dill cryptic virus 1	AGY36136.1	
				Flammulina velutipes browning virus	BAH56481.1	
				Fusarium poae partitivirus 2	BAV56299.1	
				Helicobasidium mompa partitivirus V1-2	BAD32678.1	
				Heterobasidion partitivirus 1	ADV15441.1	
				Heterobasidion partitivirus 12	AHL25151.1	
				Heterobasidion partitivirus 13	AHL25153.1	
				Heterobasidion partitivirus 14	AHL25161.1	
				Heterobasidion partitivirus 15	AHL25162.1	
				Heterobasidion partitivirus 17	AIF33767.1	
				Heterobasidion partitivirus 3	ACO37245.1	
				Heterobasidion partitivirus 4	ADV15443.1	
				Heterobasidion partitivirus 5	ADV15444.1	
				Heterobasidion partitivirus 9	AEX87909.2	
				Raphanus sativus cryptic virus 1	AAX51289.2	
				Raphanus sativus partitivirus 1	ALT00589.1	
				Red clover cryptic virus 1	AGY36138.1	
				Rhizoctonia fumigata partitivirus	AJE25830.1	
				Rhizoctonia solani dsRNA virus 2	AGY54938.1	
				Rhizoctonia solani dsRNA virus 3	AMW07365.2	
				Rosellinia necatrix partitivirus 2	BAM78602.1	
				Rosellinia necatrix partitivirus 5	BAM36403.1	
				Rosellinia necatrix partitivirus 7	BAT32942.1	
				Sclerotinia sclerotiorum partitivirus S	ACT55329.1	
				Sophora japonica powdery mildew-associated partitivirus	AOF47283.1	
				Soybean leaf-associated partitivirus 1	ALM62245.1	
				Spinach cryptic virus 1	APX42419.1	
				Vicia cryptic virus	AAX39023.1	
				White clover cryptic virus 1	AAU14888.1	
				<i>Betapartitivirus</i>	Atkinsonella hypoxylon partitivirus	NP_604475.1
					Cannabis cryptic virus	AOO34473.1
					Ceratobasidium partitivirus	AOX47567.1
					Crimson clover cryptic virus 2	AGJ83769.1
					Dill cryptic virus 2	AGJ83771.1
					Fusarium poae virus 1	AAC98734.1
					Fusarium solani partitivirus 2	BAQ36631.1
					Helicobasidium mompa partitivirus V1-1	BAD32677.1
					Heterobasidion annosum P-type partitivirus	AAL79540.1
					Heterobasidion partitivirus 2	ADL66905.1
					Heterobasidion partitivirus 7	AEX87907.1
					Heterobasidion partitivirus 8	AFW17810.1
					Hop trefoil cryptic virus 2	AGJ83767.1
					Lentinula edodes partitivirus 1	AQS27950.1
					Pleurotus ostreatus virus 1	AAT07072.1
					Primula malacoides virus China/Mar2007	ABW82141.1
					Rhizoctonia solani virus 717	AAF22160.1
					Rosellinia necatrix partitivirus 1-W8	BAD98237.1
					Rosellinia necatrix partitivirus 3	BAM36401.1
					Rosellinia necatrix partitivirus 4	BAM36402.1
					Rosellinia necatrix partitivirus 6	BAT24481.1
					Sclerotinia sclerotiorum partitivirus 1	AFR78160.1
					White clover cryptic virus 2	AGJ83763.1
			<i>Cryspovirus</i>	Cryptosporidium parvum virus 1	AAC47805.1	

Table 1-1. (continued)

Class	Order	Family	Genus	Virus name	Accession no.
			<i>Deltapartitivirus</i>	Alphacryptovirus JF-2012	AFO65948.1
				Beet cryptic virus 2	ADP24757.1
				Beet cryptic virus 3	AAB27624.1
				Carnation cryptic virus 3	ARJ58791.1
				Diatom colony associated dsRNA virus 14	BAU79511.1
				Fig cryptic virus	CBW77436.1
				Fragaria chiloensis cryptic virus	AAZ06131.2
				Pepper cryptic virus 1	AEJ07890.1
				Pepper cryptic virus 2	AEJ07892.1
				Persimmon cryptic virus	CCH50609.1
				Raphanus sativus cryptic virus 3	ACJ76981.1
				Rosa multiflora cryptic virus	ABV89762.1
				Rose cryptic virus 1	ABZ10945.1
				Sinapis alba cryptic virus 1	ALT00590.1
				Spinach deltapartitivirus 1	ARO72610.1
			<i>Gammapartitivirus</i>	Aspergillus fumigatus partitivirus-1	CAY25801.2
				Aspergillus ochraceous virus	ABV30675.1
				Beauveria bassiana partitivirus 1	CUS18591.1
				Beauveria bassiana partitivirus 2	CUS18593.1
				Botryotinia fuckeliana partitivirus 1	CAM33266.1
				Colletotrichum acutatum RNA virus 1	AGL42312.1
				Colletotrichum truncatum partitivirus 1	ALF46547.1
				Discula destructiva virus 1	AAG59816.1
				Discula destructiva virus 2	AAK59379.1
				Fusarium solani virus 1	BAA09520.1
				Gremmeniella abietina RNA virus MS1	AII16004.1
				Gremmeniella abietina RNA virus MS2	AAT48886.1
				Magnaporthe oryzae partitivirus 1	APP18151.1
				Ophiostoma partitivirus 1	CAJ31886.1
				Penicillium stoloniferum virus S	AAN86834.2
				Pseudogymnoascus destructans partitivirus-pa	AKR15080.1
				Ustilaginoidea virens partitivirus	AGO04402.1
				Ustilaginoidea virens partitivirus 2	AGR45851.1
				Ustilaginoidea virens partitivirus 4	AGJ03719.1
				Verticillium albo-atrum partitivirus-1	AIE47664.1
			Unclassified	Alternaria alternata partitivirus 1	APT70073.1
				Botryosphaeria dothidea partitivirus 1	AGZ84316.1

Table 1-2. Genbank accession list of replicase of viruses in the phylum *Lenarviricota* used for multiple alignment and phylogenetic analysis .

Class	Order	Family	Genus	Virus name	Accession no.
<i>Amabiliviricetes</i>	<i>Wolframvirales</i>	<i>Narnaviridae</i>	<i>Narnavirus</i>	Saccharomyces 20S RNA narnavirus 37-4C	AAC98925
				Saccharomyces 23S RNA narnavirus 37-4C	AAC98708
<i>Howeltoviricetes</i>	<i>Cryppavirales</i>	<i>Mitoviridae</i>	<i>Mitovirus</i>	Botrytis cinerea mitovirus 1	ABQ65153
				Cryphonectria parasitica mitovirus 1-NB631	AAA61703
				Fusarium circinatum mitovirus 1	AHI43533
				Fusarium circinatum mitovirus 2-1	AHI43534
				Fusarium coeruleum mitovirus 1	BAQ36630
				Fusarium globosum mitovirus 1	BAQ36629
				Fusarium poae mitovirus 1	BAV56289
				Fusarium poae mitovirus 2	BAV56290
				Fusarium poae mitovirus 3	BAV56291
				Fusarium poae mitovirus 4	BAV56292
				Gremmeniella abietina mitochondrial RNA virus S1	AAN05635
				Helicobasidium mompa mitovirus 1-18	BAD72871
				Ophiostoma novo ulmi mitovirus 7	AGT55877
				Ophiostoma novo-ulmi mitovirus 1a	CAJ32466
				Ophiostoma novo-ulmi mitovirus 1b	CAJ32467
				Ophiostoma novo-ulmi mitovirus 3a OnuLd	CAA06228
				Ophiostoma novo-ulmi mitovirus 3b	CAJ32468
				Ophiostoma novo-ulmi mitovirus 4 OnuLd	CAB42652
				Ophiostoma novo-ulmi mitovirus 5 OnuLd	CAB42653
				Ophiostoma novo-ulmi mitovirus 6 OnuLd	CAB42654
				Rhizoctonia mitovirus 1	AHL25281
				Rhizoctonia solani mitovirus 2	ALD89121
				Sclerotinia sclerotiorum mitovirus 1/KL-1	AEX91878
				Sclerotinia sclerotiorum mitovirus 2/KL-1	AEX91879
				Sclerotinia sclerotiorum mitovirus 3/NZ1	AGC24232
				Sclerotinia sclerotiorum mitovirus 4/NZ1	AGC24233
				Sclerotinia sclerotiorum mitovirus 5/11691	AHX84130
				Sclerotinia sclerotiorum mitovirus 6/14563	AHX84133
				Sclerotinia sclerotiorum mitovirus 7/Lu471	AHX84135
				Thanatephorus cucumeris mitovirus	AAD17381
				Thielaviopsis basicola mitovirus	AAZ99833
				Tuber aestivum mitovirus	AEG79311
				Tuber excavatum mitovirus	AEP83726
<i>Miaviricetes</i>	<i>Ourlivirales</i>	<i>Botourmiaviridae</i>	<i>Botoulivirus</i>	Botrytis ourmia-like virus	CEZ26310.1
				Sclerotinia sclerotiorum ourmia-like virus 2	ALD89139.1
			<i>Magoulivirus</i>	Acremonium sclerotigenum ourmia-like virus 1	QDB75006.1
				Cladosporium cladosporioides ourmia-like virus 1	QDB74999.1
				Cladosporium uredinicola ourmia-like virus 1	QDB75001.1
				Magnaporthe oryzae ourmia-like virus 1	SBQ28480.1
				Penicillium citrinum ourmia-like virus 1	AYP71797.1
				Phaeoacremonium minimum ourmia-like virus 2	QDB75007.1
				Rhizoctonia solani ourmia-like virus 1	ALD89131.1
			<i>Ourmiavirus</i>	Cassava virus C	ACI03053.1
				Epirus cherry virus	ACF16357.1
				Ourmia melon virus	ACF16360.1
			<i>Scleroulivirus</i>	Sclerotinia sclerotiorum ourmia-like virus 1	ALD89138.1
				soybean leaf-associated ourmiavirus 1	ALM62238.1
				soybean leaf-associated ourmiavirus 2	ALM62250.1
<i>Allasoviricetes</i>	<i>Levivirales</i>	<i>Leviviridae</i>	<i>Allolevivivirus</i>	Enterobacteria phage Q $\beta$	ABK60124.1
				Enterobacteria phage F1	AAM33128.1
			<i>Levivirus</i>	Enterobacteria phage MS2	CAA23991.1
				Enterobacteria phage BZ13	ACT66728.1



Table 1-3. Genbank accession list of replicase of viruses in the phylum *Kitrinoviricota* used for multiple alignment and phylogenetic analysis.

Class	Order	Family	Genus	Virus name	Accession no.
<i>Alsuviricetes</i>	<i>Tymovirales</i>	<i>Alphaflexiviridae</i>	<i>Allexivirus</i>	Shallot virus X-Russia	AAA47787.1
			<i>Botrexvirus</i>	Botrytis virus X-New Zealand:Auckland	AAL17722.1
			<i>Lolavirus</i>	Lolium latent virus-US1	ACA53374.1
			<i>Mandarivirus</i>	Indian citrus ringspot virus-K1	AAK97522.1
			<i>Platypuvirus</i>	Donkey orchid symptomless virus	AHA56694.1
			<i>Potexvirus</i>	Potato virus X-X3	BAA00249.1
			<i>Sclerodarnavirus</i>	Sclerotinia sclerotiorum debilitation-associated RNA virus-China	AAN64332.2
		<i>Betaflexiviridae</i>	<i>Capilovirus</i>	Apple stem grooving virus-P-209	BAA03639.1
			<i>Citrivirus</i>	Citrus leaf blotch virus-SRA-153	CAC39422.1
			<i>Foveavirus</i>	Apple stem pitting virus-PA66	BAA04853.1
			<i>Trichovirus</i>	Apple chlorotic leaf spot virus-P863	AAA42587.1
			<i>Vitivirus</i>	Grapevine virus A-Is 151	CAA53182.1
		<i>Deltaflexiviridae</i>	<i>Deltaflexivirus</i>	Fusarium graminearum deltaflexivirus 1	ANS13830
				Sclerotinia sclerotiorum deltaflexivirus 1	AMD16208
				Soybean leaf-associated mycoflexivirus 1	ALM62223
			Unclassified	Agave tequilana deltaflexivirus 1	QQG34632
				Agrostis stolonifera deltaflexivirus 1	QQG34628
				Lentinula edodes deltaflexivirus 2	QOX06049
				Rhizoctonia solani flexivirus 1	ANR02706.1
				Sclerotinia sclerotiorum deltaflexivirus 2	AWT24701
				Sclerotinia sclerotiorum deltaflexivirus 3	QOE77942
				Triticum polonicum deltaflexivirus 1	QQG34637
		<i>Gammaflexiviridae</i>	<i>Mycoflexivirus</i>	Botrytis virus F-New Zealand:Auckland	AAG23416.1
			Unclassified	Pistacia-associated flexivirus 1	QDO72745.1
				Entoleuca gammaflexivirus 1	AVD68667.2
				Entoleuca gammaflexivirus 2	AVD68668.2
				Leptosphaerulina chartarum flexivirus 1	QDB74984.1
		<i>Tymoviridae</i>	<i>Tymovirus</i>	Turnip yellow mosaic virus - Europe	CAA30322.1
			<i>Marafivirus</i>	Maize rayado fino virus - Costa Rica	AAK52838.2
			<i>Maculavirus</i>	Grapevine fleck virus - Italy	CAC84400.1
<i>Martellivirales</i>	<i>Closteroviridae</i>	<i>Ampelovirus</i>	<i>Closterovirus</i>	grapevine leafroll-associated virus 3	AAC40705.3
				beet yellows virus	CAA51871.1
				citrus tristeza virus	AAC59624.1
		<i>Crinivirus</i>	<i>Velarivirus</i>	lettuce infectious yellows virus	AAA61798.1
				grapevine leafroll-associated virus 7	CCD33051.1

Table 1-4. Genbank accession list of replicase of viruses in the phylum *Duplornaviricota* used for multiple alignment and phylogenetic analysis .

Class	Order	Family	Genus	Virus name	Accession no.
<i>Chrymotiviricetes</i>	<i>Ghabrivirales</i>	<i>Chrysoviridae</i>	<i>Alphachrysovirus</i>	Amasya cherry disease associated chrysovirus	CAG77602.1
				Anthurium mosaic-associated virus	ACU11563.1
				Aspergillus fumigatus chrysovirus	CAX48749.1
				Brassica campestris chrysovirus 1	AKU48197.1
				Colletotrichum gloeosporioides chrysovirus 1	ALW95408.1
				Cryphonectria nitschkei chrysovirus 1	ACT79255.1
				Fusarium oxysporum chrysovirus 1	ABQ53134.1
				Helminthosporium victoriae virus 145S	AAM68953.1
				Isaria javanica chrysovirus 1	APR73428.1
				Macrophomina phaseolina chrysovirus 1	ALD89090.1
				Penicillium chrysogenum virus	AAM95601.1
				Persea americana chrysovirus	AJA37498.1
				Raphanus sativas chrysovirus 1	AFE83590.1
				Shuangao chryso-like virus	ASA47445.1
				Verticillium dahliae chrysovirus 1	ADG21213.1
		<i>Chrysoviridae</i>	<i>Betachrysovirus</i>	Alternaria alternata chrysovirus 1	BBC27878.1
				Botryosphaeria dothidea chrysovirus 1	AGZ84312.1
				Colletotrichum fruticola chrysovirus 1	AXP19674.1
				Fusarium graminearum dsRNA mycovirus 2	ADW08802.1
				Fusarium graminearum mycovirus China 9	ADU54123.1
				Fusarium oxysporum f. sp. dianthi mycovirus 1	AKP45145.1
				Magnaporthe oryzae chrysovirus 1-A	BAJ15133.1
				Magnaporthe oryzae chrysovirus 1-B	BAO20927.1
				Penicillium janczewskii chrysovirus 1	ALO50142.1
				Penicillium janczewskii chrysovirus 2	ALO50149.1
		<i>Totiviridae</i>	<i>Giardiavirus</i>	Giardia lamblia virus	AAB01579
				Leishmania RNA virus 1 - 1	AAB50024
			<i>Leishmaniavirus</i>	Leishmania RNA virus 1 - 4	AAB50028
				Leishmania RNA virus 2 - 1	AAB50031
				Leishmania RNA virus 2 - 1	AAB50031
			<i>Totivirus</i>	Saccharomyces cerevisiae virus L-A	AAA50508
				Saccharomyces cerevisiae virus L-BC	AAB02146
			<i>Trichomonasvirus</i>	Ustilago maydis virus H1	AAA81884
				Trichomonas vaginalis virus 1	AAA62868
				Trichomonas vaginalis virus 2	AAF29445
			<i>Victorivirus</i>	Trichomonas vaginalis virus 3	AAL37370
				Botryotinia fuckeliana totivirus 1	CAM33265
				Coniothyrium minitans RNA virus	AAO14999
				Epichloe festucae virus	CAK02788
				Fusarium asiaticum victorivirus 1	AYD49682
				Fusarium poae victorivirus 1	BAV56302
				Gremmeniella abietina RNA virus L1	AAK11656
				Helicobasidium mompa totivirus 1-17	BAC81754
				Helminthosporium victoriae virus 190S	AAB94791.2
				Magnaporthe oryzae virus 1	BAD60833
				Magnaporthe oryzae virus 2	BAF98178
				Sphaeropsis sapinea RNA virus 1	AAD11601
				Sphaeropsis sapinea RNA virus 2	AAD11603
		<i>Totiviridae</i> suspected	Unclassified	Eimeria brunetti RNA virus 1	AAK26438
				Infectious myonecrosis virus	AAT67231.2
		<i>Alternaviridae</i>	<i>Alternavirus</i>	Alternaria alternata virus 1	BAF94335.1
				Aspergillus foetidus dsRNA mycovirus	CCD33020.1
				Aspergillus heteromorphus alternavirus 1	AZT88575.1
				Aspergillus mycovirus 341	ABX79997.1
				Fusarium graminearum alternavirus 1	AUG68999.1
				Fusarium incarnatum alternavirus 1	AYJ09265.1
				Fusarium poae alternavirus 1	BAV56306.1
				Stemphylium lycopersici mycovirus	AXU25965.1

Table 1-5. Genbank accession list of replicase of viruses in the proposed family Polymycoviridae and the family *Astroviridae* and *Caliciviridae* used for multiple alignment and phylogenetic analysis .

Class	Order	Family	Genus	Virus name	Accession no.
<i>Pisoniviricetes</i>	<i>Picornavirales</i>	<i>Caliciviridae</i>	<i>Bavovirus</i>	Chicken calicivirus	ADN88287.1
			<i>Lagovirus</i>	European brown hare syndrome virus	CAA93445.1
			<i>Lagovirus</i>	Rabbit hemorrhagic disease virus	AAA47285.1
			<i>Minovirus</i>	Fathead minnow calicivirus	AQM56929.1
			<i>Nacovirus</i>	Turkey calicivirus	AFH89833.1
			<i>Nebovirus</i>	Newbury-1 virus	AAV60849.1
			<i>Norovirus</i>	Norwalk virus	AAB50465.1
			<i>Recovirus</i>	Tulane virus	ACB38131.1
			<i>Salovirus</i>	Atlantic salmon calicivirus	AHX24375.1
			<i>Sapovirus</i>	Sapporo virus	ADG03646.1
			<i>Valovirus</i>	St-Valérien calicivirus	ACQ44559.1
			<i>Vesivirus</i>	Feline calicivirus	AAA79326.1
				Vesicular exanthema of swine virus	AAG13641.1
<i>Stelpaviricetes</i>	<i>Stellavirales</i>	<i>Astroviridae</i>	<i>Avastrovirus</i>	Avian nephritis virus 1	BAA92848.1
				Duck astrovirus C-NGB	ACN82428.1
				Turkey astrovirus 1	CAB95006.3
			<i>Mamastrovirus</i>	Human astrovirus 1	CAA81033.1
				Mink astrovirus 1	AAO32082.1
				Ovine astrovirus 1	CAB95003.1
Unclassified	Unclassified	Polymycoviridae	Polymycovirus	Aspergillus fumigatus polymycovirus 1	AXE72937
				Aspergillus fumigatus tetramycovirus 1	CDP74618.1
				Aspergillus spelaeus tetramycovirus 1	AYP71805
				Beauveria bassiana polymycovirus 1	CUS18598
				Beauveria bassiana polymycovirus 2	CUS18599
				Beauveria bassiana polymycovirus 3	CUS18606
				Botryosphaeria dothidea RNA virus 1	AKE49495
				Cladosporium cladosporioides virus 1	AIH80567
				Colletotrichum camelliae filamentous virus 1	ASV63092
				Fusarium redolens polymycovirus 1	QDH44656
				Magnaporthe oryzae polymycovirus 1	QAU09249
				Penicillium brevicompactum tetramycovirus 1	AYP71801
				Penicillium digitatum polymycovirus 1	AVZ65983
Unclassified	Unclassified	Unclassified	Unclassified	Phaeoacremonium minimum tetramycovirus 1	QDB74985
				Sclerotinia sclerotiorum tetramycovirus 1	AWY10945
				Hadaka virus 1	BBU94038.1

Table 1-6. Genbank accession list of replicase of viruses in the family *Tombusviridae* and their unclassified relatives used for multiple alignment and phylogenetic analysis .

Class	Order	Family	Subfamily	Genus	Virus name	Accession no.
<i>Tolucaviricetes</i>	<i>Tolivirales</i>	<i>Tombusviridae</i>	<i>Procedovirinae</i>	<i>Betacarmovirus</i>	Beihai tombus-like virus 1	APG76346
					Turnip crinkle virus	AAA96969
				<i>Gamma-carmovirus</i>	Cowpea mottle virus	AAC54603.1
					Maize chlorotic mottle virus	ACA57840.1
				<i>Machlomovirus</i>	Rosa rugosa leaf distortion virus	AGF70694.1
				<i>Pelarspovirus</i>	Rose yellow leaf virus	AGF70700.1
					Tomato bushy stunt virus	AAB02535
				<i>Tombusvirus</i>	Trailing lespedeza virus 1	ADY69093.2
				<i>Zeavirus</i>		
			<i>Calvusvirinae</i>	<i>Umbravirus</i>	Carrot mottle mimic virus	ACJ03572.1
					Pea enation mosaic virus 2	AAU20330.2
					Tobacco bushy top virus	AAN62863.2
			Unclassified	Unclassified	Beihai tombus-like virus 6	APG76145.1
					Beihai tombus-like virus 8	APG76205
					Changjiang tombus-like virus 8	APG76241
					Diaporthe ambigua RNA virus 1	AAF22958
					Hubei tombus-like virus 11	APG76556
					Hubei tombus-like virus 12	APG76520.1
					Macrophomina phaseolina single-stranded RNA virus 3	ALD89104.2
					Magnaporthe oryzae virus A	AJA41112.1
					soybean leaf-associated ssRNA virus 1	ALM62232.1
					soybean leaf-associated ssRNA virus 2	ALM62236.1
					soybean leaf-associated ssRNA virus 3	ALM62246.1
					Verticillium dahliae RNA virus 1-B4.3	AQM49992.1
					Wenling tombus-like virus 1	APG76584.1
					Wenzhou tombus-like virus 5	APG76630.1
					Sclerotinia sclerotiorum umbra-like virus 1	AHE13862.1

Table 1-7. Genbank accession list of replicase of viruses in the phylum *Negarnaviricota* and their unclassified relatives used for multiple alignment and phylogenetic analysis .

Subphylum	Class	Order	Family	Genus	Virus name	Accession no.
<i>Haploviricotina</i>	<i>Monjiviricetes</i>	<i>Mononegavirales</i>	<i>Nyamiviridae</i>	<i>Nyavirus</i>	Nyamanini virus	ACQ94985.1
				<i>Socyvirus</i>	soybean cyst nematode virus 1	AEF56729
				<i>Berhavirus</i>	Beihai rhabdo-like virus 3	APG78650.1
				<i>Orivirus</i>	Orinoco virus	ANQ45640.1
				<i>Crustavirus</i>	Wenzhou crab virus 1	AJG39154
				<i>Tapwovirus</i>	Wenzhou tapeworm virus 1	APG78764.1
			<i>Bornaviridae</i>	<i>Bornavirus</i>	Borna disease virus 1	AAA20228.1
			<i>Lispiviridae</i>	<i>Arlivirus</i>	Lishi spider virus 2	AJG39111
					Sanxia water strider virus 4	AJG39115
					Tacheng tick virus 6	AJG39142
<i>Polyploviricotina</i>	<i>Ellioviricetes</i>	<i>Bunyavirales</i>	<i>Leishbuviridae</i>	<i>Shilevirus</i>	Leptomonas moramango leishbunyavirus	ANJ59510
				Unclassified	Phytomonas sp. TCC231 leishbunyavirus 1	AUF41956
					Hubei bunya-like virus 5	APG79301
			<i>Phenuiviridae</i>	<i>Beidivirus</i>	Hubei diptera virus 3	APG79285
					Citrus virus A	AYN78568
				<i>Coguvirus</i>	Citrus concave gum-associated virus	AST13127
					Watermelon crinkle leaf-associated virus 1	ASY01340
					Watermelon crinkle leaf-associated virus 2	ASY01343
				<i>Goukovirus</i>	Gouleako virus	AEJ38175
				<i>Horwuvirus</i>	Wuhan horsefly virus	AJG39260
				<i>Hudivirus</i>	Hubei diptera virus 4	APG79298
				<i>Hudovirus</i>	Hubei lepidoptera virus 1	APG79261
				<i>Mobuvirus</i>	Mothra bunyavirus	AOF41426
				<i>Phasivirus</i>	Badu virus	AMA19446
				<i>Phlebovirus</i>	Rift Valley fever virus	ABD51507.1
				<i>Pidchovirus</i>	Pidgey virus	AOX47534.1
				<i>Rubodvirus</i>	Apple rubbery wood virus 1	AWC67511
					Apple rubbery wood virus 2	AWC67530
				<i>Tenuivirus</i>	Rice stripe tenuivirus	BAA06677.1
				<i>Wubeivirus</i>	Wuhan fly Virus 1	AJG39259
			Unclassified	Unclassified	Beihai bunya-like virus 1	APG79237
					Beihai sesarmid crab virus 5	APG79283
					Entoleuca phenui-like virus 1	AVD68666.1
					Fusarium poae negative-stranded virus 2	BAV56313
					Hubei bunya-like virus 3	APG79267
					Hubei bunya-like virus 4	APG79335
					Ixodes scapularis associated virus-5	AUW34407
					Laurel Lake virus	ASU47549
					Lentinula edodes negative-strand RNA virus 2	BBI93118.1
					Rhizoctonia solani negative-stranded virus 4	ALD89133
					Sclerotinia sclerotiorum negative-stranded RNA virus 5	AHF48633
					Severe fever with thrombocytopenia syndrome virus	ATW62994
					Shahe bunya-like virus 1	APG79317
					Shayang ascaridia galli virus 1	APG79325
					Wuhan Spider Virus	AJG39269

### 3. 結果

#### 3-1. 分子系統学的解析による供試菌株の種の推定

FHB 関連菌コレクションに含まれる 16 菌株、BSM 関連菌株コレクションに含まれる 13 菌株について、*Transcription elongation factor 1 $\alpha$*  遺伝子 (*TEF1 $\alpha$* ) あるいは Internal transcribed spacer (ITS) 領域の塩基部分配列類似性に基づいた分子系統解析により分類学的な種の推定を行った (水谷 (2016), 太田 (2018))。本研究で新たに分離された環境分離菌 4 株の分類学的特徴づけを行うため、BLASTn 解析により ITS 領域の塩基配列類似性に基づいた種の推定を行った。その結果、AH-1 株、AH-4 株は土壤中の常在菌として知られる *Trichoderma viride* (完全世代: *Hypocrea rufa*) と ITS 領域の塩基配列類似性が完全一致しており、本種の異なる 2 菌株であると推定された (Table 1-8)。AH-2 株、AH-3 株は *Diaporthe longicolla*、*D. phaseolorum* と最も高い配列類似性 (それぞれ 99.13%、98.80%) を示したことから、これらの種に属すると推定された。

#### 3-2. ウイルス感染菌株の選抜

dsRNA の蓄積の有無を指標として、環境分離菌 4 株からウイルス感染菌株を選抜した。精製 dsRNA をアガロースゲル電気泳動により分離、可視化した結果、AH-1 株、AH-4 株にそれぞれ約 4 kbp、約 5 kbp の dsRNA の蓄積が確認されたため、ウイルス感染菌株として選抜した (Fig. 1-5)。

#### 3-3. RNA-seq による配列取得

事前調査で (水谷 (2018)) で得られていた病害関連菌コレクションに感染するウイルス 7 種のゲノム部分配列を基に特異的プライマーを

Table 1-8. BLASTN hit table of ITS region of environmental fungal strains.

Fungal strain	Experimental fungal species (ITS)	Identity
AH-1	<i>Trichoderma viride</i> ( <i>Hypocrea rufa</i> )	100.00%
AH-2	<i>Diaporthe longicolla</i>	99.13%
AH-3	<i>Diaporthe phaseolorum</i>	98.80%
AH-4	<i>Trichoderma viride</i> ( <i>Hypocrea rufa</i> )	100.00%

設計し、RT-PCR 及び 3'RLM-RACE によるギャップ配列、末端配列の取得を試みた。その結果、4 種のウイルスの完全長ゲノム配列、及び 3 種のウイルスの完全長コード領域配列 (CDS) を得た (Table 1-9)。BLASTX 解析の結果、Ep-N27 株には *Hypoviridae* 科、*Mitoviridae* 科のウイルスが 1 種ずつ計 2 種感染する。これらはそれぞれ非分節+ssRNA ゲノムをもつウイルスである。*Hypoviridae* 科は系統解析から 3 つのグループ (Alphahypovirus 属、Betahypovirus 属、Gammahypovirus 属) への分類が提唱されているが (Khalifa and Pearson, 2014; Suzuki *et al.*, 2018; Xie, 2014; Yaegashi *et al.*, 2012)、本ウイルス配列は Betahypovirus 属ウイルス *Fusarium oxysporum dianthi hypovirus 2* (FodHV2) の RdRp と最大のアミノ酸配列類似性 (E-value: 0 e, Identity: 58.97%) を示した。この結果から、Betahypovirus 属のウイルスとして暫定的にこのウイルスを *Fusarium nelsonii hypovirus 1* (FnHV1) と命名した。Ep-N27 の Mitovirus は *Plasmopara viticola* lesion associated mitovirus 7 (PVaMito7) の RdRp と最大の配列類似性 (E-value: 0 e, Identity: 80.42%) を示した。この結果から本ウイルスを FnMV1 と同種の異ウイルス株として暫定的に *Fusarium nelsonii mitovirus 1* (FnMV1) と命名した。本菌株には FnHV1、FnMV1 以外に、NCBI データベース上から塩基配列レベル、アミノ酸配列レベルで類似性を示す配列が検出されない配列が見出されている (Table 1-9)。本配列には配列の大部分を占める Open reading frame (ORF) を有する配列が見出されるが、その由来が不明であるため暫定的にウイルス様配列 (Virus-like sequence: VLS) 1 と命名した。Ep-BL12 株に感染するウイルスのゲノム配列は *Mitoviridae* 科 *Mitovirus* 属のウイルスである *Ophiostoma mitovirus 7* (OnuMV7) の RdRp と最大の配列類似性 (E-value:  $4 \times 10^{-87}$ , Identity: 36.22%) を示したため、本ウイルスを *Mitovirus*



Table 1-9. Summary of viral sequences detected from FHB-associated *Fusarium* strains.

Host		Virus					Seq completion	
Strain	Fungal species	Genus	Virus name	Abbrev.	Segment no.	Length (nt)	CDS	Genome
Ep-N27	<i>F. nelsonii</i>	Betahypovirus	Fusarium nelsonii hypovirus 1	FnHV1	1	10,571	✓	✓
		<i>Mitovirus</i>	Fusarium nelsonii mitovirus 1	FnMV1	1	2,388	✓	
		Unknown	Virus-like sequence 1	VLS1	-	2,552	✓	
Ep-BL12	<i>F. boothii</i>	<i>Mitovirus</i>	Fusarium boothii mitovirus 2	FbMV2	1	3,033	✓	
Ep-96/25	<i>F. oxysporum</i>	Alternavirus	Fusarium oxysporum alternavirus 1	FoxAV1	1	3,524	✓	✓
					2	2,474	✓	✓
					3	2,460	✓	✓
Ep-BL21	<i>F. oxysporum</i>	Unclassified	Fusarium oxysporum hadaka virus 2	FoxHadV2	1	2,538	✓	✓
					2	2,339	✓	✓
					3	2,187	✓	✓
					4	1,335	✓	
					5	1,135	✓	
					6	1,049	✓	✓
					7	1,022	✓	✓
					8	918	✓	
					9	911	✓	
					10	905	✓	✓
					11	866	✓	
Ep-BL13*	<i>F. boothii</i>	Unclassified	Fusarium boothii large flexivirus 1	FbLFV1	1	12,579	✓	✓
					D-RNA	2,408	✓	✓
		<i>Mitovirus</i>	Fusarium boothii mitovirus 1	FbMV1	1	2,802	✓	✓
Ep-BL14*	<i>F. boothii</i>	<i>Mitovirus</i>	Fusarium boothii mitovirus 1	FbMV1	1	2,801	✓	✓
Ep-N28*	<i>F. boothii</i>	<i>Mitovirus</i>	Fusarium boothii mitovirus 1	FbMV1	1	2,802	✓	✓

\*Mizutani et al., 2018

Table 1-9. (continued)

Host	Virus	BLASTX				
		Description	Query coverage	E-value	Identity	Accession no.
Ep-N27	FnHV1	polyprotein [Fusarium oxysporum dianthi hypovirus 2]	77%	0.E+00	58.97%	QHI00074.1
	FnMV1	RNA-dependent RNA polymerase [Plasmopara viticola lesion associated mitovirus 7]	100%	0.E+00	80.42%	QIR30231.1
	VLS1	No significant similarity found	-	-	-	-
Ep-BL12	FbMV2	RNA-dependent RNA polymerase [Ophiostoma mitovirus 7]	59%	4.E-87	36.22%	AGT55877.1
Ep-96/25	FoxAV1	RNA-dependent RNA polymerase [Fusarium incarnatum alternavirus 1]	95%	0.E+00	86.38%	AYJ09265.1
		ORF2 protein [Fusarium incarnatum alternavirus 1]	87%	0.E+00	81.64%	AYJ09266.1
		ORF3 [Fusarium graminearum alternavirus 1]	90%	0.E+00	82.91%	AUI80777.1
Ep-BL21	FoxHadV2	RNA-dependent RNA polymerase [Hadaka virus 1]	95%	0.E+00	94.40%	BBU94038.1
		hypothetical protein [Hadaka virus 1]	92%	0.E+00	94.31%	BBU94039.1
		methyltransferase [Hadaka virus 1]	89%	0.E+00	94.51%	BBU94040.1
		hypothetical protein [Hadaka virus 1]	57%	2.E-58	54.30%	BBU94041.1
		hypothetical protein [Hadaka virus 1]	61%	3.E-152	93.13%	BBU94042.1
		hypothetical protein [Hadaka virus 1]	30%	6.E-65	93.52%	BBU94043.1
		hypothetical protein [Hadaka virus 1]	36%	2.E-26	46.03%	BBU94045.1
		No significant similarity found	-	-	-	-
		hypothetical protein [Hadaka virus 1]	48%	1.E-48	55.41%	BBU94047.1
		hypothetical protein [Hadaka virus 1]	53%	1.E-42	49.38%	BBU94046.1
		hypothetical protein [Hadaka virus 1]	16%	4.E-05	54.17%	BBU94048.1
Ep-BL13*	FbLFBV1	putative RNA-dependent RNA polymerase [Leptosphaerulina chartarum flexivirus 1]	64%	0.E+00	31.67%	QDB74984.1
	FbMV1	RNA-dependent RNA polymerase [Nigrospora oryzae mitovirus 1]	83%	0.E+00	50.95%	AZP53928.1
Ep-BL14*	FbMV1	RNA-dependent RNA polymerase [Nigrospora oryzae mitovirus 1]	83%	0.E+00	51.07%	AZP53928.1
Ep-N28*	FbMV1	RNA-dependent RNA polymerase [Nigrospora oryzae mitovirus 1]	83%	0.E+00	50.95%	AZP53928.1

\*Mizutani et al., 2018

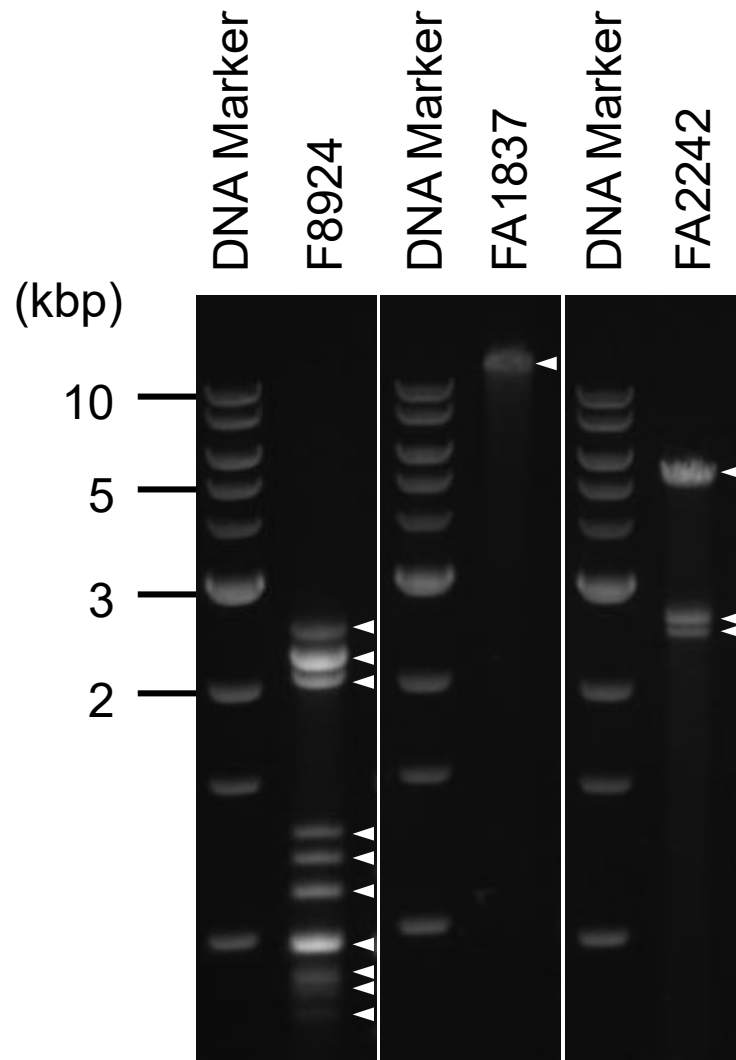
属ウイルスとして *Fusarium boothii* mitovirus 2 (FbMV2) と命名した。

Ep-BL13 株には *Mitovirus* 属及び *Tymovirales* 目のウイルスが 1 種ずつ感染する。*Mitovirus* 属ウイルスは BLASTX 解析から *Nigrospora oryzae* mitovirus 1 (NoMV1) の RdRp アミノ酸配列と最大の配列類似性 (E-value: 0 e, Identity: 50.95%) を示したため、*Mitovirus* 属ウイルスとして暫定的に *Fusarium boothii* Mitovirus 1 (FbMV1) と命名した。Ep-BL14 株及び Ep-N28 株には FbMV1 と塩基レベルで約 98% の配列類似性を示すウイルスが感染しており、これらは FbMV1 の異なるウイルス株であると考えられた。*Tymovirales* 目のウイルス配列は BLASTX 解析の結果 *Leptosphaerulina chartarum* flexivirus 1 (LcfV1) の RdRp アミノ酸配列と最大の配列類似性 (E-value: 0 e, Identity: 31.67%) を示したため、*Tymovirales* 目のウイルスとして暫定的に *Fusarium boothii* large flexivirus 1 (FbLFV1) と命名した。また、本菌株には FbLFV1 の内部配列の大部分 (1,066 nt -11,235 nt) が欠失した長さ 2,408 nt の Defective RNA (D-RNA) が蓄積することも明らかとなった。Ep-96/25 株には未承認ウイルス分類群である *Alternaviridae* 科 *Alternavirus* 属のウイルス、*Fusarium incarnatum* alternavirus 1 (FiAV1) の RNA1 及び 2、*Fusarium graminearum* alternavirus 1 (FgAV1) の RNA3 と最大の配列類似性 (RNA1: E-value: 0 e, Identity: 86.38%; RNA2: E-value: 0 e, Identity: 81.64%; RNA3: E-value: 0 e, Identity: 82.91%) を示す 3 つの異なる dsRNA が蓄積する。この結果から本ウイルスを *Alternaviridae* 科に属するウイルスとして暫定的に *Fusarium oxysporum* alternavirus 1 (FoxAV1) と命名した。Ep-BL21 株には長さ約 800 bp - 約 2.5 kb の dsRNA が蓄積する (Fig. 1-3B)。

BLASTX 解析の結果、分類群不明の新興ウイルスである Hadaka virus 1 (HadV1) の RdRp アミノ酸配列と最大の配列類似性 (E-value: 0 e,

Identity: 94.40%) を示す配列が含まれることが明らかとなった (Table 1-3)。HadV1 は 11 分節 RNA ゲノムを有するが、Ep-BL21 株からはこの内 RNA7 を除く 10 分節と類似性を示す 10 配列、及びこれらのいずれとも類似性を示さない 1 つの配列が見出されており、本ウイルスが少なくとも 10 種類の RNA をゲノムとしてもつことが推測された。RdRp のアミノ酸配列類似性が顕著に高いことから本ウイルスを HadV1 と同種の異なるウイルス株として暫定的に *Fusarium oxysporum* hadakavirus 1 (FoxHadV1) と命名した。RT-PCR 及び 3'RLM-RACE により FnHV1、FbMV1/Ep-BL13、FbMV1/Ep-BL14、FbMV1/Ep-N28、FbLFV1、FbLFV1 D-RNA、FoxAV1 の完全長ゲノム配列及び FnMV1、VLS1、FbMV2、FoxHadV1 の完全長 CDS 配列を取得した。

BSM 関連菌株コレクションの内、F8924 株、FA1837 株及び FA2242 株からウイルス由来 dsRNA を抽出、精製し、Illumina Hiseq による網羅的配列取得を行った。配列解析に供試した各菌株の dsRNA 画分の電気泳動の結果は Fig. 1-7 に示した。各サンプルから得られた配列データの概要は Table 1-10 に示した。デノボアセンブリの結果、F8924 株、FA1837 株、FA2242 株の配列データからそれぞれ 83、35 及び 98 のコンティグ配列が得られた。データベース上の既知のウイルス配列との配列類似性、コンティグ配列の平均カバレッジに基づき、各菌株からそれぞれ 13 (851 nt – 2,544 nt)、1 (13,109 nt)、7 (2,418 nt - 2,725 nt) のコンティグ配列を推定ウイルス配列として選抜した (Table 1-11)。F8924 株の推定ウイルス配列を BLASTX 解析に供試した結果、NODE\_2 及び NODE\_4 が既知のマイコウイルスの RdRp アミノ酸配列と類似性を示した (Table 1-11)。NODE\_2 は未分類ウイルスである Hadaka Virus 1 (HadV1) の RdRp 配列 (RNA1) と最大の配列類似性 (E-value: 0 e, Identity: 86.35%)



**Figure 1-7. Agarose gel electrophoresis of dsRNA samples used for RNA-seq analysis.** White arrowheads indicate visible dsRNA bands.

Table 1-10. Sequence information of RNA-seq analysis.

Sample	num_seqs	sum_len	min_len	avg_len	max_len
F8924	231,024	15,230,509	20	65.93	77
FA1837	80,978	5,391,822	20	66.58	77
FA2242	588,732	39,558,717	20	67.19	77

Table 1-11. Results of *de novo* assembly and BLASTX analysis using RNA-seq data.

Strain name	NODE no.	Length (nt)	Average coverage (x)	Description	E-value	Identity	Accession no.
F8924	2	2,544	146.2	RNA-dependent RNA polymerase [Hadaka virus 1]	0.E+00	86.35%	BBU94038.1
	4	2,393	11.5	RNA-dependent RNA polymerase [Plasmopara viticola lesion associated mitovirus 7]	0.E+00	90.06%	QIR30231.1
	5	2,376	255.7	hypothetical protein [Hadaka virus 1]	0.E+00	83.47%	BBU94039.1
	6	2,182	167.1	methyltransferase [Hadaka virus 1]	0.E+00	83.23%	BBU94040.1
	9	1,354	159.7	hypothetical protein [Hadaka virus 1]	4.E-107	62.60%	BBU94041.1
	10	1,239	160.2	hypothetical protein [Hadaka virus 1]	3.E-39	65.42%	BBU94043.1
	13	1,175	192.0	hypothetical protein [Hadaka virus 1]	1.E-123	76.42%	BBU94042.1
	15	1,037	335.5	hypothetical protein [Hadaka virus 1]	8.E-127	77.45%	BBU94044.1
	16	958	103.6	No significant similarity found	-	-	-
	17	940	187.8	hypothetical protein [Hadaka virus 1]	7.E-04	27.03%	BBU94046.1
	18	917	128.7	No significant similarity found	-	-	-
	19	882	184.4	No significant similarity found	-	-	-
	21	851	89.1	No significant similarity found	-	-	-
FA1837	1	13,110	139.8	hypothetical protein FgHV1gp2 [Fusarium graminearum hypovirus 1]	0.E+00	39.06%	YP_009011065.1
FA2242	2*	2,725	22.0	RNA-dependent RNA polymerase [Ophiostoma minus totivirus]	0.E+00	70.40%	CAJ34336.1
	3	2,650	363.7	RNA-dependent RNA polymerase [Soybean leaf-associated mitovirus 5]	0.E+00	82.12%	ALM62240.1
	4	2,629	4472.1	RNA-dependent RNA polymerase [Botryosphaeria dothidea mitovirus 1]	7.E-130	41.64%	QMU24933.1
	6	2,577	341.1	RNA-dependent RNA polymerase [Soybean leaf-associated mitovirus 4]	0.E+00	78.86%	ALM62249.1
	7	2,473	926.8	RNA-dependent RNA polymerase [Plasmopara viticola lesion associated mitovirus 26]	0.E+00	59.11%	QIR30249.1
	8*	2,421	15.2	coat protein [Botrytis cinerea victorivirus 1]	6.E-165	48.04%	QBA69888.1
	9	2,418	186.6	RNA-dependent RNA polymerase [Plasmopara viticola lesion associated mitovirus 46]	0.E+00	73.52%	QIR30269.1

を示したため、HadV1 と同種の異ウイルス株として暫定的に *Fusarium equiseti hadakavirus 1* (FeHadV1) と命名した。HadV1 は 11 分節の RNA 分子をゲノムとして持つウイルスであり、推定ウイルス配列中には HadV1 の分節ゲノムの内、RNA1 を除く 7 つの分節ゲノム (RNA2-7 及び RNA9) とアミノ酸レベルで最大の類似性 (E-value:  $0\text{ e} - 7.0\text{ e}^{-4}$ , Identity: 27.03% - 83.47%) を示す長さ 940 nt - 2,376 nt の配列が認められた (Table 1-11)。また、本菌株の推定ウイルス配列中には BLASTX 解析の結果 NCBI データベース上のアミノ酸配列のいずれとも配列類似性を示さない 4 配列が含まれる。これらの配列の平均カバレッジ (89.1 x - 184.4 x) は宿主 RNA 由来の配列の平均カバレッジ (最大 6 x) よりも明確に大きいことから、dsRNA として F8924 株に蓄積することが示唆された。これらの配列が FeHadV1 の分節ゲノム由来であるかを判断するには、単一ウイルスで保存される末端配列の比較などの検証が必要である。NODE\_4 は *Mitovirus* 属メンバーと推定されている *Plasmopara viticola* lesion associated mitovirus 7 (PVaMito7) と最大の配列類似性 (E-value: 0 e, Identity: 90.06%) を示したため、PVaMito7 と同種の異なるウイルス株として、暫定的に *Fusarium equiseti mitovirus 1* (FeMV1) と命名した。

FA1837 株から得られた唯一の推定ウイルス配列を BLASTX 解析に供試した結果、Alphahypovirus 属ウイルス、*Fusarium graminearum* hypovirus 1 (FgHV1) のコードする複製酵素のアミノ酸配列と最大の配列類似性 (E-value: 0 e, Identity: 39.06%) を示した (Table 1-11)。この結果から、暫定的に本ウイルスを *Hypoviridae* 科 Alphahypovirus 属ウイルスの一種として *Fusarium sambucinum* hypovirus 1 (FsamHV1) と命名した。3'RLM-RACE による末端配列取得を行い、本ウイルスの完全長ゲノム配列を決



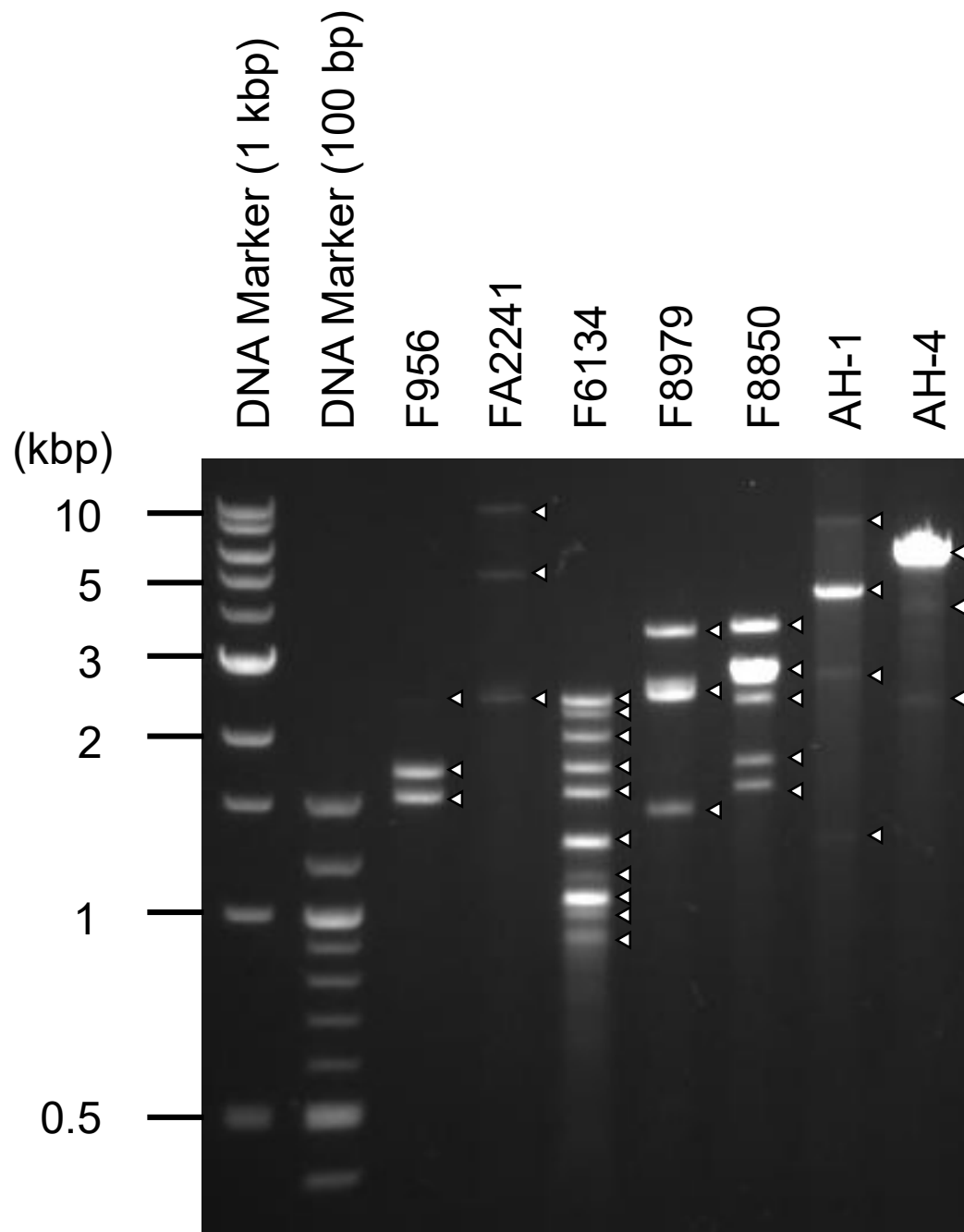
定した。

FA2242 株の推定ウイルス配列を BLASTX 解析に供試した結果、7 配列すべてが既知のマイコウイルスのコードするタンパク質と類似性を示した (Table 1-11)。そのうちの 2 配列 (NODE\_2 及び NODE\_8) は *Totiviride* 科 *Victorivirus* 属ウイルスである *Botrytis cinerea victorivirus 1* (BcVV1) の RdRp、*Ophiostoma minus totivirus* (OmTV1) の外殻タンパク質 (CP) と最大の配列類似性 (それぞれ、E-value: 0 e, Identity: 70.40% 及び E-value:  $6 \times 10^{-165}$ , Identity: 48.04%) を示した。*Totiviridae* 科に属するウイルスは一般的に非分節の dsRNA ゲノムを有しており、そのセンス鎖上には CP 及び RdRp をこの順にコードする 2 つの大きな ORF が座上している。推定ウイルス配列中にはこれら以外に *Totiviridae* 科ウイルスと配列類似性を示すものが見出されず、これらの 2 つの配列が単一の *Totiviridae* 科ウイルスのゲノムに由来すると推定された。分子系統解析に用いられる RdRp 配列が *Victorivirus* 属ウイルスと最大の類似性を示したため、本ウイルスを暫定的に *Fusarium sambucinum victorivirus 1* (FsamVV1) と命名した。これらの配列を基に RT-PCR 及び 3'RLM-RACE を行い、本ウイルスの完全長ゲノム配列を決定した。残りの 5 配列 (NODE\_3-7 及び NODE\_9) はすべて既知の *Mitovirus* 属ウイルスの RdRp 配列と最大の類似性 (E-value: 0 e - 0 e, Identity: 41.64% - 82.12%) を示したため、暫定的にこれらのウイルスを *Fusarium sambucinum mitovirus 1* (FsamMV1)、*Fusarium sambucinum mitovirus 2* (FsamMV2)、*Fusarium sambucinum mitovirus 3* (FsamMV3)、*Fusarium sambucinum mitovirus 4* (FsamMV4)、*Fusarium sambucinum mitovirus 5* (FsamMV5) と命名した。

### 3-4. FLDS による配列取得

BSM 関連菌株コレクションの内、F956 株、F6134 株、F8850 株、F8979 株及び FA2241 株、環境分離 *Trichoderma* 属菌 AH-1 株及び AH-4 株から抽出、精製した dsRNA を用いて FLDS による cDNA ライブラリ作成を行い、Illumina HiSeq による配列解析に供試した。配列解析に供試した菌株の dsRNA 画分電気泳動の結果は Fig. 1-8 に、得られた配列データの概要は Table 1-12 に示した。デノボアセンブリの結果、F956 株、F6134 株、F8850 株、F8979 株、FA2241 株、AH-1 株及び AH-4 株の配列データからそれぞれ 30、55、52、19、44、13 及び 21 のコンティグが得られた。データベース上の既知のウイルス配列との配列類似性、コンティグ配列の平均カバレッジに基づき、各菌株からそれぞれ 3 (1,634 nt - 2,477 nt)、18 (733 nt - 3,368 nt)、19 (354 nt - 5,008 nt)、10 (111 nt - 3613 nt)、17 (213 nt - 10,547 nt)、3 (2,667 nt - 7,755 nt) 及び 10 (220 nt - 2,706 nt) のコンティグ配列を推定ウイルス配列として選抜した (Table 1-13 to 1-19)。

F956 株から得られた推定ウイルス配列を BLASTX 解析に供試した結果、既知のマイコウイルス配列と類似性を示す配列が 3 つ (NODE\_5 - 7) 得られた (Table 1-13)。NODE\_5 は *Mitovirus* 属の推定メンバーである *Bremia lactucae* associated mitovirus 1 の RdRp アミノ酸配列と最大の類似性 (E-value: 0 e, Identity: 58.11%) を示した。この結果から、本ウイルス配列を *Mitovirus* 属の推定メンバーとして暫定的に *Cylindrocladium peruvianum* mitovirus 1 (CperMV1) と命名した。NODE\_6 及び NODE\_7 はそれぞれ *Gammapartitivirus* 属ウイルスである *Fusarium solani* virus 1 (FsV1) の RNA1、RNA2 とそれぞれ最大の配列類似性 (E-value: 0 e, Identity: 99.23% 及び E-value: 0 e, Identity: 82.64%) を示した。



**Figure 1-8. Agarose gel electrophoresis of dsRNA samples used for FLDS-mediated sequencing analysis.**

White arrowheads indicate visible dsRNA bands.

Table 1-12. Sequence information of FLDS-mediated sequencing analysis.

Sample	num_seqs	sum_len	min_len	avg_len	max_len
F956	33,882	2,516,083	30	74.3	80
F6134	174,382	12,916,702	30	74.1	80
F8850	79,366	5,733,951	30	72.2	80
F8979	103,861	7,655,133	30	73.7	80
FA2241	56,732	4,195,529	30	74	80
AH-1	228,275	16,534,805	30	72.4	80
AH-4	74,468	5,110,199	30	68.6	80

Table 1-13. Results of *de novo* assembly using FLDS data of F956.

NODE no.	Length (nt)	Average coverage (x)	BLASTX				
			Description	Query coverage	E-value	Identity	Accession no.
5	2,477	22.4	RNA-dependent RNA polymerase [Bremia lactucae associated mitovirus 1]	85%	0.E+00	58.11%	QIP68024.1
6	1,826	138.3	RNA-dependent RNA polymerase [Fusarium solani virus 1]	85%	0.E+00	99.23%	NP_624350.1
7	1,634	75.9	capsid protein [Fusarium solani virus 1]	78%	0.E+00	82.64%	NP_624351.1

Table 1-14. Results of de novo assembly using FLDS data of F6134.

NODE no.	Length (nt)	Average coverage (x)	BLASTX				
			Description	Query coverage	E-value	Identity	Accession no.
3*	3,368	61.9	hypothetical protein [Fusarium redolens polymycovirus 1]	62%	0.E+00	66.33%	QDH44657.1
5	2,686	6.2	RNA-dependent RNA polymerase [Fusarium oxysporum ourmia-like virus]	78%	0.E+00	90.31%	QPO14979.1
7	2,463	87.5	RNA-dependent RNA-polymerase [Fusarium redolens polymycovirus 1]	93%	0.E+00	76.01%	QDH44656.1
8	2,107	112.0	methyltransferase [Fusarium redolens polymycovirus 1]	88%	0.E+00	59.13%	QDH44658.1
9	1,825	130.4	RNA-dependent RNA polymerase [Fusarium solani virus 1]	85%	0.E+00	99.23%	NP_624350.1
10	1,655	76.2	capsid protein [Fusarium solani virus 1]	77%	0.E+00	82.64%	NP_624351.1
11	1,368	141.1	putative capsid protein [Fusarium redolens polymycovirus 1]	62%	4.E-134	69.72%	QDH44659.1
12	1,187	58.5	hypothetical protein [Fusarium redolens polymycovirus 1]	76%	4.E-02	33.43%	QDH44660.1
13	1,186	27.6	No significant similarity found	-	-	-	-
14	1,171	11.9	No significant similarity found	-	-	-	-
15	1,154	19.3	No significant similarity found	-	-	-	-
17**	1,145	72.6	No significant similarity found	-	-	-	-
18	1,118	464.2	hypothetical protein [Fusarium redolens polymycovirus 1]	41%	5.E-38	46.41%	QDH44661.1
19**	1,035	22.6	No significant similarity found	-	-	-	-
20***	1,008	106.6	No significant similarity found	-	-	-	-
21**	1,005	14.5	No significant similarity found	-	-	-	-
22	961	117.1	hypothetical protein [Fusarium redolens polymycovirus 1]	64%	1.E-18	37.80%	QDH44664.1
25	733	24.1	No significant similarity found	-	-	-	-

\*Merged contig containing two independent genomic sequences

\*\*Contigs possessing large ORF

\*\*\*A contig possessing terminal sequence conserved among FsoPmV1 genomic segments

Table 1-15. Results of de novo assembly using FLDS data of F8850.

NODE no.	Length (nt)	Average coverage (x)	BLASTX				
			Description	Query coverage	E-value	Identity	Accession no.
1*	5,008	57.7	RNA-dependent RNA polymerase [Fusarium incarnatum alternavirus 1]	67%	0.E+00	81.83%	AYJ09265.1
2	4,273	6.1	hypothetical protein [Rhizoctonia solani ambivirus 1]	24%	1.E-37	30.43%	QMP84024.1
4	2,513	33.0	hypothetical protein [Fusarium poae alternavirus 1]	88%	0.E+00	77.79%	YP_009272950.1
5	2,505	36.9	RNA dependent RNA polymerase [Plasmopara viticola lesion associated ourmia-like virus 13]	79%	0.E+00	48.73%	QGY72543.1
6	2,505	19.7	hypothetical protein [Aspergillus foetidus dsRNA mycovirus]	86%	0.E+00	50.00%	YP_007353983.1
7	2,163	54.3	ORF2 protein [Fusarium incarnatum alternavirus 1]	95%	0.E+00	73.77%	AYJ09266.1
8	2,160	7.3	RNA-dependent RNA polymerase [Aspergillus heteromorphus alternavirus 1]	95%	0.E+00	66.91%	AZT88575.1
10**	1,575	11.2	hypothetical protein [Aspergillus foetidus dsRNA mycovirus]	96%	0.E+00	38.67%	YP_007353982.1
11***	1,442	4.4	hypothetical protein WICANDRAFT_63510 [Wickerhamomyces anomalus NRRL Y-366-8]	10%	3.E-03	45.10%	XP_019038216.1
12**	1,369	16.3	RNA dependent RNA polymerase [Aspergillus foetidus dsRNA mycovirus]	95%	0.E+00	52.52%	YP_007353985.1
13	1,279	69.1	No significant similairty found	-	-	-	-
14	1,087	44.1	No significant similairty found	-	-	-	-
16**	1,042	10.3	hypothetical protein AheAV1_s2gp1 [Aspergillus heteromorphus alternavirus 1]	89%	2.E-96	54.78%	AZT88576.1
17****	1,003	60.2	No significant similairty found	-	-	-	-
18	743	38.9	No significant similairty found	-	-	-	-
20	513	19.9	No significant similairty found	-	-	-	-
21	460	49.3	No significant similairty found	-	-	-	-
25	366	32.4	No significant similairty found	-	-	-	-
27**	354	3.1	ORF2 protein [Fusarium incarnatum alternavirus 1]	48%	4.E-17	73.68%	AYJ09266.1

\*Merged contig containing two independent genomic sequences

\*\*Fragmented contigs

\*\*\*A contig possessing terminal sequence conserved among FsoPmV1 genomic segments

\*\*\*\*A contigs possessing large ORF

Table 1-16. Results of *de novo* assembly using FLDS data of F8979.

NODE no.	Length (nt)	Average coverage (x)	BLASTX				
			Description	Query coverage	E-value	Identity	Accession no.
1	3,613	104.5	RNA-dependent RNA polymerase [Fusarium sacchari chrysovirus 1]	94%	0.E+00	97.89%	QIQ28417.1
2	2,880	118.3	P2 protein [Fusarium sacchari chrysovirus 1]	91%	0.E+00	97.04%	QIQ28418.1
3	2,845	105.3	putative coat protein [Fusarium sacchari chrysovirus 1]	87%	0.E+00	98.31%	QIQ28419.1
5	2,428	78.9	PREDICTED: zinc finger protein 2 homolog isoform X1 [Amyeloidis transitella]	25%	3.E-08	30.95%	XP_013194558.1
6	1810	140.2	RNA-dependent RNA polymerase [Fusarium solani virus 1]	88%	0.E+00	99.20%	NP_624350.1
7*	1,787	105.2	P4 protein [Fusarium sacchari chrysovirus 1]	99%	0.E+00	97.31%	QIQ28420.1
8	1,663	68.6	capsid protein [Fusarium solani virus 1]	77%	0.E+00	82.64%	NP_624351.1
10*	677	116.7	P4 protein [Fusarium sacchari chrysovirus 1]	87%	0.E+00	96.95%	QIQ28420.1
13*	331	108.9	P4 protein [Fusarium sacchari chrysovirus 1]	67%	0.E+00	97.33%	QIQ28420.1
19*	111	76.6	P4 protein [Fusarium sacchari chrysovirus 1]	97%	0.E+00	97.22%	QIQ28420.1

\*Fragmented sequences derived from a chrysovirus genomic segment (RNA4)



Table 1-17. Results of *de novo* assembly using FLDS data of FA2241.

NODE no.	Length (nt)	Average coverage (x)	BLASTX				
			Description	Query coverage	E-value	Identity	Accession no.
1	10,547	23.6	polyprotein [Fusarium oxysporum dianthi hypovirus 2]	78%	0.E+00	56.87%	QHI00074.1
2	3,535	152.1	RNA-dependent RNA polymerase [Plasmopara viticola lesion associated mitovirus 26]	59%	0.E+00	59.11%	QIR30249.1
3	2,690	11.6	RNA-dependent RNA polymerase [Soybean leaf-associated mitovirus 5]	87%	0.E+00	82.12%	ALM62240.1
4	2,613	42.4	RNA-dependent RNA polymerase [Botryosphaeria dothidea mitovirus 1]	67%	0.E+00	41.64%	QMU24933.1
5	2,602	14.7	RNA-dependent RNA polymerase [Soybean leaf-associated mitovirus 4]	54%	0.E+00	78.86%	ALM62249.1
6	2,442	13.0	RNA-dependent RNA polymerase [Plasmopara viticola lesion associated mitovirus 46]	84%	0.E+00	73.52%	QIR30269.1
7*	1,189	0.8	RNA dependent RNA polymerase [Sphaeropsis sapinea RNA virus 1]	99%	0.E+00	67.68%	NP_047558.1
8*	787	2.1	RNA-dependent RNA polymerase [Ophiostoma minus totivirus]	71%	0.E+00	79.26%	CAJ34336.1
9*	677	0.6	RNA dependent RNA polymerase [Sphaeropsis sapinea RNA virus 1]	93%	0.E+00	54.72%	NP_047558.1
13*	480	0.5	CP [Botryosphaeria dothidea victorivirus 2]	97%	0.E+00	75.64%	QBA82442.1
14*	469	0.8	CP [Botryosphaeria dothidea victorivirus 2]	99%	0.E+00	67.31%	QBA82442.1
15*	444	4.1	coat protein [Sclerotinia sclerotiorum victorivirus 1]	33%	1.E-06	50.00%	AWY10936.1
17*	416	1.0	putative RNA dependent RNA polymerase [Magnaporthe oryzae virus 1]	60%	2.E-05	39.29%	YP_122352.1
21*	388	0.6	RdRp [Botryosphaeria dothidea victorivirus 2]	98%	0.E+00	58.27%	QBA82443.1
32*	295	1.0	coat protein [Aspergillus foetidus slow virus 1]	95%	0.E+00	59.57%	YP_009508248.1
35*	264	0.7	coat protein [Botryotinia fuckeliana totivirus 1]	96%	0.E+00	48.24%	ADO60938.1
44*	213	0.5	RNA dependent RNA polymerase [Sphaeropsis sapinea RNA virus 1]	98%	7.E-25	67.14%	NP_047558.1

\*Fragmented sequences derived from single victorivirus genome

Table 1-18. Results of de novo assembly using FLDS data of AH-1.

NODE no.	Length (nt)	Average coverage (x)	BLASTX				
			Description	Query coverage	E-value	Identity	Accession no.
1	7,830	43.0	replicase [Entoleuca phenui-like virus 1]	88%	0.E+00	45.39%	AVD68666.1
2	4,526	57.6	RNA-dependent RNA polymerase [Soybean leaf-associated ssRNA virus 1]	34%	1.E-164	52.62%	ALM62232.1
3	2,741	39.8	movement protein [Entoleuca phenui-like virus 1]	34%	7.E-112	51.76%	QCF40769.1

Table 1-19. Results of *de novo* assembly using FLDS data of AH-4.

NODE no.	Length (nt)	Average coverage (x)	BLASTX				
			Description	Query coverage	E-value	Identity	Accession no.
1*	2,706	96.6	RNA dependent RNA polymerase [Sphaeropsis sapinea RNA virus 1]	93%	0.E+00	62.02%	NP_047558.1
2*	2,370	46.4	CP [Botryosphaeria dothidea victorivirus 2]	86%	0.E+00	73.86%	QBA82442.1
6**	453	0.3	replicase [Entoleuca phenui-like virus 1]	42%	3.E-17	54.69%	AVD68666.1
12**	344	0.3	hypothetical protein H2Bulk345013_000002 [Arenavirus sp.]	94%	5.E-30	46.30%	QDH88832.1
13**	323	0.4	hypothetical protein [Soybean leaf-associated ssRNA virus 1]	91%	4.E-11	35.51%	ALM62233.1
14**	321	0.2	RNA-dependent RNA polymerase [Arenavirus sp.]	100%	2.E-33	50.47%	QDH88831.1
16**	253	0.3	RNA-dependent RNA polymerase [Soybean leaf-associated ssRNA virus 1]	96%	2.E-23	65.43%	ALM62232.1
17**	250	0.5	replicase [Entoleuca phenui-like virus 1]	97%	6.E-23	56.79%	AVD68666.1
19**	243	0.4	RNA-dependent RNA polymerase [Riboviria sp.]	92%	1.E-26	68.00%	QDH89546.1
21**	220	0.3	replicase [Entoleuca phenui-like virus 1]	94%	3.E-02	34.25%	AVD68666.1

\*Fragmented sequences derived from single victorivirus genome

\*\*Fragmented sequences derived from a phenui-like virus and an umbra-like virus

この結果から、本ウイルス配列を FsV1 と同種の異なるウイルス株として暫定的に *Cylindrocladium peruvianum partitivirus 1* (CperPV1) と命名した。リードカバレッジを元に CperMV1、CperPV1 の末端配列を決定し、完全長配列を取得した。

F6134 株から得られた推定ウイルス配列を BLASTX 解析に供試した結果、3 つの配列が既知のマイコウイルの RdRp アミノ酸配列と類似性を示した (Table 1-14)。うち NODE\_5 は *Botourmiaviridae* 科 *Magoulivirus* 属の推定メンバーである *Fusarium oxysporum ourmia-like virus 1* (FoOuLV1) の RdRp アミノ酸配列と最大の配列類似性 (E-value: 0 e, Identity: 90.31%) を示した。この結果から本ウイルスを *Magoulivirus* 属ウイルスとして暫定的に *Fusarium solani magoulivirus 1* (FsoMUV1) と命名した。NODE\_7 は未承認ウイルス分類群である *Polymycoviridae* 科ウイルス、*Fusarium redolens polymycovirus 1* (FrPmV1) の RdRp アミノ酸配列と最大の配列類似性 (E-value: 0 e, Identity: 76.01%) を示した。本ウイルス科のメンバーとして提唱されているウイルスは 4 - 8 分節 RNA ゲノムを持つことが報告されており (Sato *et al.*, 2020a)、BLASTX 解析の結果、推定ウイルス配列中に RdRp をコードする RNA1 の他に分節ゲノム 7 本全て (RNA2 - RNA8) と最大の配列類似性 (E-value: 0 - 4 e<sup>-2</sup>, Identity: 33.43 – 69.72%) を示す配列が含まれることが明らかとなった。この結果から、この 8 配列をゲノムとして含む本ウイルスを FrPmV1 に近縁のウイルスとして暫定的に *Fusarium solani polymycovirus 1* (FsoPmV1) と命名した。ゲノム末端配列はウイルスの複製に重要な役割を担っており、分節ゲノムを持つウイルスではそれぞれの末端配列が保存されている (Kotta-Loizou *et al.*, 2020; Patton and Spencert, 2000; Vainio *et al.*, 2018)。マルチプルアライメントにより FsoPmV1 の分節ゲ

ノムの 5'-末端配列には高度に保存された配列が見出された (Fig. 1-9)。上記の RNA1-8 に加え、BLASTX 解析でデータベース上の既知の配列と類似性を示さない配列 (NODE\_20) の末端にも保存された配列が見いだされ、本配列が FsoPmV1 ゲノムの一分節であることが強く示唆された (Fig. 1-9)。NODE\_9 は CperPV1 の RNA1 と塩基配列レベルで 100% の配列類似性を示した。推定ウイルス配列中には CperPV1 の RNA2 と塩基配列レベルで 100% の配列類似性を示す配列も同様に見出だされ、本菌株には CperPV1 と全く同じ塩基配列のウイルスが感染することが示唆された。この結果から本ウイルスを FsV1 及び CperPV1 と同種の異なるウイルス株として暫定的に *Fusarium solani partitivirus 1* (FsPV1) と命名した。本菌株にはこれら以外に、高い平均カバレッジ値を示す配列が 7 つ見出されている (Table 1-14)。しかしながら NCBI データベース上にはこれらの配列と塩基配列レベル、アミノ酸配列レベルで類似性を示す配列が検出されず、FsoPV1 や FsoPmV1 に保存される末端配列をもたないため、暫定的に VLS2 - 8 と命名した。これらの内 VLS5、6 及び 7 には配列の大部分を占める ORF が予測された (Table 1-14)。リードカバレッジに基づいて末端配列を決定し、RNA6 を除く FsoPmV1 ゲノム、FsoPV1 ゲノム、及び VLS5 - 7 の完全長配列を取得した。

F8850 株から得られた推定ウイルス配列を BLASTX 解析に供試した結果、既知のマイコウイルスの RdRp アミノ酸配列と類似性を示す 4 つの配列が得られた (Table 1-15)。その内、NODE\_1 は BLASTX 解析及びリードマッピングの結果から 2 つの配列のミスアセンブリにより生じた複合配列であると考えられ、2 つの配列 (NODE\_1-1, NODE\_1-2) に分割した。NODE\_1-1 は未承認ウイルス分類群の *Alternaviridae* 科 *Alternavirus* 属ウイルスである *Fusarium incarnatum alternavirus 1* (FiAV1)

5' -END

RNA1	GGAUAAUACACCUUAACCCACUCUAGCGUCCUAAUGACGUCUUU
RNA2	GGAUAAUACACCUUAACCCCGACUUGUCUCCUAAAAACGUAUUU
RNA3	GGAUAAUACACCUUAACCCACUCUUGUGAGCCGAAAUACGUCAGA
RNA4	GGAUAAUACACCUUAACCCGUCUCUUGACUCCAAUCUACGUAAGU
RNA5	GGAUAAUACACCUUAACCCGCCGCUUGCAGUUCGUUCUACGUUGCU
RNA6	GGAUAAUAAGAAUAACCGUCUCUAGCUCGCCAAAAAACGUAGCU
RNA7	GGAUAAUACACCUUAACCCGCCGCUAGCCGUUCUGUGUACGUUGCG
RNA8★	GGAUAAUACACCUUAACCGUCCCUAGCGUUGC GUUUUACGUUGCU
RNA9	GGAUAAUACACCUUAACCGUCCCUAGCAGUCCGCAAUACUUGACU

\*\*\*\*\* .       \*\*\*\*\*       \*\* \*       \*       \*\* \*

**Figure 1-9. A multiple alignment of 5'-termini of FoxPmV1 genomic segments.**

Identical nucleotide positions were highlighted by asterisks and yellow boxes. Highly conserved nucleotide positions were highlighted by periods and light yellow boxes. A star indicates the contig which showed no similarity to any sequences in NCBI database (NODE\_20).

の RdRp アミノ酸配列と最大の類似性 (E-value: 0 e, Identity: 81.83%) を示した。NODE\_1-2 はデータベース上に類似性を示す配列が検出されなかった。NODE\_8 及び NODE\_12 は *Alternavirus* 属の極めて近縁なメンバーである *Aspergillus heteromorphus alternavirus 1* (AheAV1) 及び *Aspergillus foetidus dsRNA mycovirus* (AfV-F) RdRp の C 末端側及び N 末端側と、最大の配列類似性 (E-value: 0 e, Identity: 66.91%; E-value: 0 e, Identity: 52.52%) を示した。これらの配列の末端部には互いに重複する配列が認められ、アセンブルにより単一のコンティグ配列として出力されたため、同一の RNA 分子由来であると考えられた。これらの結果から、NODE\_1 及び NODE\_8 と NODE\_12 の複合配列を *Alternavirus* 属のメンバーとして暫定的に *Fusarium solani alternavirus 1* (FsoAV1) 及び *Fusarium solani alternavirus 2* (FsoAV2) と命名した。これまで報告されている全 6 種の *Alternaviridae* 科ウイルスは RdRp を含む合計 3 - 4 の分節 dsRNA ゲノムをもつ (Zhang *et al.*, 2019)。本菌株の推定ウイルス配列には 2 つの RdRp 配列に加え、*Alternavirus* のゲノム配列と類似性を示す 6 つの配列が含まれる。これらの配列の内 NODE\_7 及び NODE\_27 は NODE\_8 と NODE\_12 同様アセンブルによって単一の配列として出力され、BLASTX 解析から AiAV1 の RNA2 にコードされる推定タンパク質のアミノ酸配列と最大の配列類似性を示した。NODE\_10 及び NODE\_16 はそれぞれ近縁な 2 株の *Alternavirus* の RNA2 にコードされるタンパク質の N 末端側及び C 末端側と最大の類似性を示したため、1 つの dsRNA セグメントに由来すると推察された (Table 1-15)。また、NODE\_4 及び NODE\_6 は系統学的に離れた *Alternavirus* の RNA3 にコードされる推定タンパク質のアミノ酸配列と最大の配列類似性を示した (Table 1-15)。これらの配列の 5'-末端配列の比較により各配列の

帰属を推定した結果、これら 2 種の Alternavirus 属ウイルスはいずれも全ての Alternavirus 間で保存された 2 つの分節 dsRNA ゲノムを持つと推察され (Zhang *et al.*, 2019) (Fig. 1-15)、それぞれ Alternavirus 属のメンバーとしてとして暫定的に *Fusarium solani alternavirus 1* (FsoAV1) 及び *Fusarium solani alternavirus 2* (FsoAV2) と命名した。FsoAV2 と最も近縁である AfV-F は 4 分節ゲノム (RNA1-4) を有するが、RNA1-3 に対応する配列が推定ウイルス配列に含まれていた一方で、RNA4 と類似性を示す配列は認められなかった。また、推定ウイルス配列中にはデータベース上の既知のアミノ酸配列、塩基配列と類似性を示さないが、平均カバレッジの値が FsoAV2 ゲノムと近い配列が複数含まれている。その内上記の NODE\_1-2 及び NODE\_11 はその 5'-末端約 20 nt の配列が FsoAV2 ゲノムの 5'-末端と高い類似性を示した (Fig. 1-10)。この結果から、これらの配列が FsoAV2 の分節ゲノムとして F8850 株内に蓄積する dsRNA 由来であると推察された。NODE\_5 は 2019 年に新設されたウイルス分類群である *Botourmiaviridae* 科 *Magoulivirus* 属のメンバーと推定されている *Plasmopara viticola lesion associated ourmia-like virus 13* (PVaOLV13) の RdRp アミノ酸配列と最大の配列類似性 (E-value: 0 e, Identity: 48.73%) を示した。この結果から、本ウイルスを *Magoulivirus* 属の推定メンバーとして暫定的に *Fusarium solani magoulivirus 1* (FsMUV1) と命名した。また、NODE\_2 は BLASTX 解析により *Rhizoctonia solani ambivirus 1* (RsaV1) の機能未知タンパク質のアミノ酸配列と最大の類似性 (E-value:  $1.0 \times 10^{-37}$ , Identity: 30.43%) を示したことから、暫定的に本ウイルスの近縁種として *Fusarium solani ambivirus 1* (FsoAmV1) と命名した。アガロースゲル電気泳動の結果から本菌株には本配列に相当する長さの dsRNA の蓄積は確認できていないが、本



## FsoAV1/F8850

5' -END

RNA1	GGCUGUGUGUUUGUUCUGGU
RNA2	GGCUGUGUGUUUGUUCUGCU
RNA3	GGCUGUGUGUUUGUUCGAGU
	***** . *

## FsoAV2/F8850

5' -END

RNA1	GGCUGACAGCCUGAGUGAUG
RNA2	GGCUAACAGUCCUGUAGGG
RNA3	GGCUGACAGCCUGAGUGGAC
RNA4★	GGCUGACAGCCUGAGUGGUU
RNA5★	GGCUGACAGCCUGAGUGGGU
	****. **** * * **.

**Figure 1-10. Multiple alignments of 5'-termini of FsoAV1 and FsoAV2 genomic segments.**

Identical nucleotide positions were highlighted by asterisks and yellow boxes. Highly conserved nucleotide positions were highlighted by periods and light yellow boxes. Stars indicate the contigs which showed no similarity to any sequences in NCBI database (RNA4: NODE\_1-2, RNA5: NODE\_11).

配列の平均カバレッジが顕著に低いことから本ウイルスは F8850 株において潜在感染すると推察された (Fig. 1-8、Table 1-15)。本配列はデノボアセンブリの結果から環状構造をとると推定された。また、本菌株にはこれら以外に、高い平均カバレッジ値を示す配列が 7 つ見出されている (Table 1-15)。しかしながら NCBI データベース上にはこれらの配列と塩基配列レベル、アミノ酸配列レベルで類似性を示す配列が検出されず、FsoAV1 や FsoAV2 ゲノムに保存される末端配列をもたないため、暫定的に VLS9 - 15 と命名した。これらの内 VLS11 には配列の大部分を占める ORF が予測された。リードカバレッジに基づいて末端配列の決定を行い、FsoAV1、FsoMUV1、RNA2 を除く FsoAV2 ゲノム、VLS11 の完全長配列を取得した。

F8979 株から得られた推定ウイルス配列を BLASTX 解析に供試した結果、NODE\_1 は *Chrysoviridae* 科 *Betachrysovirus* 属ウイルスである *Fusarium sacchari chrysovirus 1* (FsCV1) の RdRp アミノ酸配列と最大の配列類似性 (E-value: 0 e, Identity: 97.89%) を示した (Table 1-16)。*Chrysoviridae* 科のウイルスは一般的に 4 - 5 本の分節 dsRNA ゲノムを有しており、FsCV1 も 4 本の dsRNA 分節ゲノムを保持すると報告されている (Kotta-Loizou *et al.*, 2020; Yao *et al.*, 2020)。推定ウイルス配列には RdRp の座落する RNA1 を除く FsCV1 の 3 本の分節 dsRNA ゲノム (RNA2 - RNA4) と最大の類似性を示す配列が含まれる。うち NODE\_2 及び NODE\_3 は FsCV1 の RNA2、RNA3 に対応する。RNA4 と類似性を示す 4 配列はアセンブリにより単一の配列として出力された。リードカバレッジに基づいて各セグメントの末端配列の決定を行い 5'非翻訳領域 (Untranslated region: UTR) 配列を比較した結果、それぞれ高度に保存された末端配列が見出されたため (Fig. 1-11)、これら 4 配列をゲ

5' -END

RNA1	CGCAAAAAAGAGAAUAAAAGCCUUA- CGCACAUAGG
RNA2	CGCAAAAAAGAGAAUAAAAGCUAAA- CACGCACGUG
RNA3	UGCAAAAAAGAGAAUAAAAGCCUUA- CGCACGUGGG
RNA4	UGCAAAAAAGAGAAAAAGGCUUUCU- CGUUGCUGGC
RNA5★	CGCAAAAAAGAGAAUAAAAGCACAAAACGCACAUGG-

. \*\*\*\*\* \*\*.\*. \*.. ..

3' -END

RNA1	--UACAAAACAAAAUAAGUAAGCCCUUAUUUUGGC
RNA2	--CCUAAUUGGUUAAUAAUGUCCAACAUUAUUUUGGC
RNA3	UGAUAGAGAAAAUAACACGA--CCCGUGUUAUUUUGGC
RNA4	AUAUAAAUUAAAUACAUA--CCUAUGUUAUUUUGGC
RNA5★	-GCACCAACAACAAGAUGGU-UACGCCUAUUUUGGC

\* . \*\* \* . . \* \*\*\*\*\*

**Figure 1-11. Multiple alignments of 5'-and 3'-termini of FoxCV2 genomic segments.**

Identical nucleotide positions were highlighted by asterisks and yellow boxes. Highly conserved nucleotide positions were highlighted by periods and light yellow boxes. A star indicates the contig which showed no similarity to any sequences in NCBI database (NODE\_5).

ノムとして有するウイルスを *Betacrysovirus* 属のメンバーとして暫定的に *Fusarium oxysporum chrysovirus 2* (FoxCV2) と命名した。NODE\_5 は NCBI データベース上の既知のウイルス由来アミノ酸配列、塩基配列と類似性を示さないが、FoxCV2 ゲノム配列と近い平均カバレッジ値を有する。5'-末端配列の比較により上記の配列が NODE\_5 の末端にも見出されたことから、本配列が FoxCV2 の 5 本目の分節 dsRNA ゲノム由来であると推定した (Fig. 1-11)。NODE\_6 及び NODE\_8 は CperPV1 の RNA1、RNA2 と塩基配列レベルで 100%の配列類似性を示したため、F6134 株と同様に本菌株にも CperPV1 (FsoPV3) と全く同じ塩基配列のウイルスが感染することが示唆された。この結果から本ウイルスを FsV1 及び CperPV1 と同種の異なるウイルス株として暫定的に *Fusarium oxysporum partitivirus 1* (FoxPV1) と命名した。

FA2241 株から得られた推定ウイルス配列を BLASTX 解析に供試した結果、既知のマイコウイルスの RdRp アミノ酸配列全長と類似性を示す 12 の配列が得られた (Table 1-17)。その内 NODE\_1 は Betahypovirus 属ウイルスである *Fusarium oxysporum dianthi hypovirus 2* (FodHV2) と最大の配列類似性 (E-value: 0 e, Identity: 56.87%) を示した。NODE\_2 - 6 はすべて既知の *Mitovirus* 属ウイルスの RdRp 配列と最大の類似性 (E-value: 0 e, Identity: 41.64% - 82.12%) を示した。これらのウイルス配列は FA2242 株の 5 種の *Mitovirus*、FsamMV1 - 5 と塩基配列レベルで極めて高い配列類似性を示したことから、それぞれ同種の異なるウイルス株であると考えられた。推定ウイルス配列には *Victorivirus* 属ウイルスと最大の配列類似性を示すが、カバレッジが低く (0.51 x - 4.10 x)、比較的短い (213 nt - 1,189 nt) 配列が 11 含まれており、これらはそれぞれ FA2242 株の FsamVV1 と塩基配列レベルで高い配列類似性を示した

ため、FsamVV1 と同種の異なるウイルス株由来の配列であると考えられたが、アセンブリによりこれらの配列を連結することはできなかった。リードカバレッジに基づいて末端配列の決定を行い、FsamHV2、FsamMV1、FsamMV2、FsamMV4、FsamMV5 ゲノムの完全長配列を取得した。また、FsamMV3 については 5'-末端配列を実験的に決定した。

AH-1 株から得られた推定ウイルス配列を BLASTX 解析に供試した結果、既知のマイコウイルスのアミノ酸配列と類似性を示す配列が 3 つ得られた (Table 1-18)。NODE\_1 及び NODE\_3 は *Phenuiviridae* 科と比較的近縁の未分類ウイルスである *Entoleuca phenui-like virus 1* (EnPLV1) の RdRp 及び移行タンパク質 (MP) と最大の配列類似性 (E-value: 0 e, Identity: 45.39%; E-value:  $7 \times 10^{-112}$ , Identity: 51.76%) を示した。EnPLV1 は 2 分節-ssRNA ゲノムを持つウイルスであると推定されており (Velasco *et al.*, 2019)、これら 2 つのウイルス配列が EnPLV1 の近縁ウイルスの 2 分節ゲノムであると判断された。この結果から本ウイルスを暫定的に *Trichoderma viride phenui-like virus 1* (TvPLV1) と命名した (Table 1-18)。NODE\_2 は *Tombusviridae* 科に関連のある未分類ウイルス *Soybean leaf-associated ssRNA virus 1* (SlaSSRV1) の RdRp アミノ酸配列と最大の配列類似性 (E-value:  $1 \times 10^{-164}$ , Identity: 52.62%) を示した。この結果から、このウイルス配列を SlaSSRV1 の近縁ウイルスとして暫定的に *Trichoderma viride umbra-like virus 1* (TvULV1) と命名した。リードカバレッジに基づいて末端配列の決定を行い、TvPLV1 及び TvULV1 ゲノムの完全長配列を取得した。

AH-4 株から得られた推定ウイルス配列を BLASTX 解析に供試した結果、長さ 2,706 nt 及び 2,370 nt の配列は既知の *Victorivirus* 属ウイルスの RdRp 及び CP のアミノ酸配列と最大の配列類似性 (E-value: 0 e,

Identity: 62.02%; E-value: 0 e, Identity: 73.86%) を示した (Table 1-19)。推定ウイルス配列中にはこれら以外に *Victorivirus* 属ウイルスと配列類似性を示すものが見出されず、これらの 2 つの配列が単一の *Victorivirus* 属ウイルスのゲノムに由来すると推定された。この結果から本ウイルスを暫定的に *Trichoderma viride victorivirus 1* (TvVV1) と命名した。推定ウイルス配列中には TvVV1 ゲノム配列以外にも TvPLV1 及び TvULV1 と塩基配列レベルで高い配列類似性を示す配列が複数含まれており、これらのウイルスに極めて近縁なウイルスが AH-4 株に潜在感染する可能性が示された (Table 1-19)。リードカバレッジに基づく末端配列の決定、及び RT-PCR によるギャップ領域の配列解析を行い、TvVV1 ゲノムの完全長配列を取得した。

以上、RNA-seq、FLDS によるウイルス配列の取得と解析により、29 種のウイルスが 18 の供試菌株中に感染することが明らかとなった (Table 1-9, 1-20, 1-21)。ここからはそれぞれのウイルスのゲノム構造、分子系統学的特徴について分類群ごとに記述する。

### 3-5. *Hypoviridae* 科ウイルス

配列解析の結果、*Hypoviridae* 科に属するウイルス 3 種類 (FnHV1: Ep-N27 株、FsamHV1: FA1837 株、FsamHV2: FA2241 株) の完全長ゲノム配列が得られた。BLASTX 解析から FsamHV1 は Alphahypovirus 属のメンバーであると推定された (Table 1-20)。FsamHV1 は長さ 10,571 nt (3'端の poly (A) を除く) のゲノム上に単一の ORF を有する。コードされるタンパク質には Alphahypovirus 属メンバーの多機能タンパク質に保存される 4 つの機能ドメイン、ペプチダーゼ (Pep)、DUF3525 (機能未知)、RdRp 及びヘリカーゼ (Hel) をもつ推定タンパク質がコードされる

Table 1-20. Summary of viral sequences detected from BSM-associated fungal strains.

Host		Virus					Seq completion	
Strain	Fungal species	Genus	Virus name	Abbrev.	Segment no.	Length (nt) & NODE no.	CDS	Genome
F956	<i>Cylindrocladium peruvianum</i>	<i>Mitovirus</i>	Cylindrocladium peruvianum mitovirus 1	CperMV1	1	2,444 (NODE_5)		
		<i>Gamma-partitivirus</i>	Cylindrocladium peruvianum partitivirus 1	CperPV1	1	1755 (NODE_6)	✓	✓
					2	1,588 (NODE_7)	✓	✓
F6134	<i>F. solani</i>	<i>Polymycovirus</i>	Fusarium solani polymycovirs 1	FsoPmV1	1	2,453 (NODE_7)	✓	✓
					2	2,276 (NODE_3-1)	✓	✓
					3	2,042 (NODE_8)	✓	✓
					4	1302 (NODE_11)	✓	✓
					5	1,144 (NODE_12)	✓	✓
					6	1,062 (NODE_18)	✓	✓
					7	1,002 (NODE_3-2)	✓	✓
					8	939 (NODE_20)	✓	✓
					9	913 (NODE_22)	✓	✓
		<i>Magoulivirus</i>	Fusarium solani magoulivirus 1	FsoMUV1	1	2,686 (NODE_5)	✓	
		<i>Gamma-partitivirus</i>	Fusarium solani partitivirus 3	FsoPV3	1	1755 (NODE_9)	✓	✓
					2	1,588 (NODE_10)	✓	✓
F7772*	<i>F. concentricum</i>	<i>Betahypovirus</i>	Fusarium concentricum hypovirus 1	FcHV1	1	10,526	✓	✓
F8850	<i>F. solani</i> f. sp. <i>eumartii</i>	<i>Alternavirus</i>	Fusarium solani alternavirus 1	FsoAV1	1	3,528 (NODE_1-1)	✓	✓
					2	2,468 (NODE_7&27)	✓	✓
					3	2,458 (NODE_4)	✓	✓
			Fusarium solani alternavirus 2	FsoAV2	1	3,475 (NODE_8&12)	✓	✓
					2-1	1,567 (NODE_10)		
					2-2	1,013 (NODE_16)		
					3	2,461 (NODE_6)	✓	✓
					4	1,443 (NODE_1-2)	✓	✓
					5	1,416 (NODE_11)	✓	✓
		<i>Magoulivirus</i>	Fusarium solani magoulivirus 2	FsoMUV2	1	2,495 (NODE_5)	✓	✓
			Fusarium solani ambivirus 1	FsoAmV1	1	4,272 (NODE_2)	✓	✓
F8924	<i>F. equiseti</i>	<i>Mitovirus</i>	Fusarium solani mitovirus 1	FeMV1	1	2,393 (NODE_4)	✓	
		Unclassified	Fusarium equiseti hadaka virus 1	FeHadV1	1	2,544 (NODE_2)	✓	
					2	2,376 (NODE_5)	✓	
					3	2,182 (NODE_6)	✓	
					4	1,354 (NODE_9)	✓	
					5	1,239 (NODE_10)	✓	
					6	1,175 (NODE_13)	✓	
					7	1,037 (NODE_15)	✓	
					8	940 (NODE_17)	✓	
					S1	958 (NODE_16)	✓	
					S2	917 (NODE_18)	✓	
					S3	882 (NODE_19)	✓	
					S4	851 (NODE_21)	✓	

\*太田, 2020

\*\*The largest fragmented sequence

Table 1-20. (continued)

Host		Virus					Seq completion	
Strain	Fungal species	Genus	Virus name	Abbrev.	Segment no.	Length (nt) & NODE no.	CDS	Genome
F8979	<i>F. oxysporum</i> f. sp. <i>niveum</i>	<i>Chrysovirus</i>	<i>Fusarium oxysporum</i> chrysovirus 2	FoxCV2	1	3,555 (NODE_1)	✓	✓
					2	2,807 (NODE_2)	✓	✓
					3	2,785 (NODE_3)	✓	✓
					4	2,649 (NODE_7&10&13&19)	✓	✓
					5	2,350 (NODE_5)	✓	✓
		<i>Gamma-partitivirus</i>	<i>Fusarium oxysporum</i> partitivirus 1	FoxPV1	1	1,755 (NODE_6)	✓	✓
					2	1,,588 (NODE_8)	✓	✓
FA1837	<i>F. sambucinum</i>	Alphahypovirus	<i>Fusarium sambucinum</i> hypovirus 1	FsamHV1	1	13,095 (NODE_1)	✓	✓
FA2241	<i>F. sambucinum</i>	Betahypovirus	<i>Fusarium sambucinum</i> hypovirus 2	FsamHV2	1	10,523 (NODE_1)	✓	✓
		<i>Victorivirus</i>	<i>Fusarium sambucinum</i> victorivirus 1	FsamVV1	1	1,189 (NODE_7)**		
		<i>Mitovirus</i>	<i>Fusarium sambucinum</i> mitovirus 1	FsamMV1	1	2,666 (NODE_3)	✓	✓
		<i>Mitovirus</i>	<i>Fusarium sambucinum</i> mitovirus 2	FsamMV2	1	2,594 (NODE_4)	✓	✓
		<i>Mitovirus</i>	<i>Fusarium sambucinum</i> mitovirus 3	FsamMV3	1	2,596 (NODE_5)	✓	
		<i>Mitovirus</i>	<i>Fusarium sambucinum</i> mitovirus 4	FsamMV4	1	2,481 (NODE_2)	✓	✓
		<i>Mitovirus</i>	<i>Fusarium sambucinum</i> mitovirus 5	FsamMV5	1	2,435 (NODE_6)	✓	✓
FA2242	<i>F. sambucinum</i>	<i>Victorivirus</i>	<i>Fusarium sambucinum</i> victorivirus 1	FsamVV1	1	5,069 (NODE2&8)	✓	✓
		<i>Mitovirus</i>	<i>Fusarium sambucinum</i> mitovirus 1	FsamMV1	1	2,650 (NODE_3)	✓	
		<i>Mitovirus</i>	<i>Fusarium sambucinum</i> mitovirus 2	FsamMV2	1	2,629 (NODE4)	✓	
		<i>Mitovirus</i>	<i>Fusarium sambucinum</i> mitovirus 3	FsamMV3	1	2,577 (NODE6)	✓	
		<i>Mitovirus</i>	<i>Fusarium sambucinum</i> mitovirus 4	FsamMV4	1	2,473(NODE_7	✓	
		<i>Mitovirus</i>	<i>Fusarium sambucinum</i> mitovirus 5	FsamMV5	1	2,418 (NODE_9)	✓	



Table 1-20. (continued)

Fungal Strain	Abbrev.	Segment no.	BLASTX				
			Description	Query coverage	E-value	Identity	Accession no.
F956	CperMV1	1	RNA-dependent RNA polymerase [Bremia lactucae associated mitovirus 1]	86%	0.E+00	58.11%	QIP68024.1
	CperPV1	1	RNA-dependent RNA polymerase [Fusarium solani virus 1]	88%	0.E+00	99.23%	BAA09520.1
		2	capsid protein [Fusarium solani virus 1]	80%	0.E+00	82.64%	BAA09521.1
F6134	FsoPmV1	1	RNA-dependent RNA-polymerase [Fusarium redolens polymycovirus 1]	94%	0.E+00	76.01%	QDH44656.1
		2	hypothetical protein [Fusarium redolens polymycovirus 1]	92%	0.E+00	66.33%	QDH44657.1
		3	methyltransferase [Fusarium redolens polymycovirus 1]	91%	0.E+00	59.13%	QDH44658.1
		4	putative capsid protein [Fusarium redolens polymycovirus 1]	65%	2.E-134	69.72%	QDH44659.1
		5	hypothetical protein [Fusarium redolens polymycovirus 1]	79%	4.E-02	33.43%	QDH44660.1
		6	hypothetical protein [Fusarium redolens polymycovirus 1]	43%	3.E-38	46.41%	QDH44661.1
		7	hypothetical protein [Fusarium redolens polymycovirus 1]	37%	2.E-32	50.79%	QDH44662.1
		8	No significant similarity found	-	-	-	-
		9	hypothetical protein [Fusarium redolens polymycovirus 1]	68%	1.E-18	37.80%	QDH44664.1
	FsoMUV1	1	RNA-dependent RNA polymerase [Fusarium oxysporum ourmia-like virus]	78%	0.E+00	90.31%	QPO14979.1
	FsoPV3	1	RNA-dependent RNA polymerase [Fusarium solani virus 1]	88%	0.E+00	99.23%	BAA09520.1
		2	capsid protein [Fusarium solani virus 1]	80%	0.E+00	82.64%	BAA09521.1
F7772*	FcHV1	1	polyprotein [Fusarium oxysporum dianthi hypovirus 2]	78%	0.E+00	56.83%	QHI00074.1
F8850	FsoAV1	1	RNA-dependent RNA polymerase [Fusarium incarnatum alternavirus 1]	94%	0.E+00	81.83%	AYJ09265.1
		2	ORF2 protein [Fusarium incarnatum alternavirus 1]	89%	0.E+00	73.69%	AYJ09266.1
		3	hypothetical protein BHR91_s3gp1 [Fusarium poae alternavirus 1]	89%	0.E+00	77.79%	BAV56308.1
	FsoAV2	1	RNA dependent RNA polymerase [Aspergillus foetidus dsRNA mycovirus]	96%	0.E+00	61.29%	CCD33020.1
		2-1	hypothetical protein [Aspergillus foetidus dsRNA mycovirus]	96%	2.E-91	38.67%	CCD33021.1
		2-2	hypothetical protein AheAV1_s2gp1 [Aspergillus heteromorphus alternavirus 1]	89%	2.E-96	54.78%	AZT88576.1
		3	hypothetical protein [Aspergillus foetidus dsRNA mycovirus]	86%	0.E+00	50.00%	CCD33022.1
		4	No significant similarity found	-	-	-	-
		5	hypothetical protein WICANDRAFT_63510 [Wickerhamomyces anomalus NRRL Y-366-8]	10%	3.E-03	45.10%	ODQ59009.1
	FsoMUV2	1	RNA dependent RNA polymerase [Plasmopara viticola lesion associated ourmia-like virus 13]	79%	0.E+00	48.73%	QGY72543.1
	FsoAmV1	1	hypothetical protein [Rhizoctonia solani ambivirus 1]	24%	1.E-37	30.43%	QMP84024.1

Table 1-20. (continued)

Fungal Strain	Abbrev.	Segment no.	BLASTX				
			Description	Query coverage	E-value	Identity	Accession no.
F8924	FeMV1	1	RNA-dependent RNA polymerase [Plasmopara viticola lesion associated mitovirus 7]	89%	0.E+00	90.06%	QIR30231.1
	FeHadV1	1	RNA-dependent RNA polymerase [Hadaka virus 1]	93%	0.E+00	86.35%	BBU94038.1
		2	hypothetical protein [Hadaka virus 1]	90%	0.E+00	83.47%	BBU94039.1
		3	methyltransferase [Hadaka virus 1]	90%	0.E+00	83.23%	BBU94040.1
		4	hypothetical protein [Hadaka virus 1]	56%	4.E-107	62.60%	BBU94041.1
		5	hypothetical protein [Hadaka virus 1]	25%	3.E-39	65.42%	BBU94043.1
		6	hypothetical protein [Hadaka virus 1]	58%	1.E-123	76.42%	BBU94042.1
		7	hypothetical protein [Hadaka virus 1]	67%	8.E-127	77.45%	BBU94044.1
		8	hypothetical protein [Hadaka virus 1]	46%	7.E-04	27.03%	BBU94046.1
		S1	No significant similarity found	-	-	-	-
		S2	No significant similarity found	-	-	-	-
		S3	No significant similarity found	-	-	-	-
		S4	No significant similarity found	-	-	-	-
F8979	FoxCV2	1	RNA-dependent RNA polymerase [Fusarium sacchari chrysovirus 1]	96%	0.E+00	97.89%	QIQ28417.1
		2	P2 protein [Fusarium sacchari chrysovirus 1]	93%	0.E+00	97.04%	QIQ28418.1
		3	putative coat protein [Fusarium sacchari chrysovirus 1]	89%	0.E+00	98.31%	QIQ28419.1
		4	P4 protein [Fusarium sacchari chrysovirus 1]	94%	0.E+00	97.24%	QIQ28420.1
		5	PREDICTED: zinc finger protein 2 homolog isoform X1 [Amyeloidis transitella]	26%	3.E-08	30.95%	XP_013194558.1
	FoxPV1	1	RNA-dependent RNA polymerase [Fusarium solani virus 1]	88%	0.E+00	99.23%	BAA09520.1
		2	capsid protein [Fusarium solani virus 1]	80%	0.E+00	82.64%	BAA09521.1
	FA1837	FsamHV1	hypothetical protein FgHV1gp2 [Fusarium graminearum hypovirus 1]	82%	0.E+00	39.06%	AGC75065.1
FA2241	FsamHV2	1	polyprotein [Fusarium oxysporum dianthi hypovirus 2]	78%	0.E+00	56.87%	QHI00074.1
	FsamVV1	1	RNA dependent RNA polymerase [Sphaeropsis sapinea RNA virus 1]	99%	0.E+00	67.68%	AAD11601.1
	FsamMV1	1	RNA-dependent RNA polymerase [Soybean leaf-associated mitovirus 5]	88%	0.E+00	82.12%	ALM62240.1
	FsamMV2	1	RNA-dependent RNA polymerase [Botryosphaeria dothidea mitovirus 1]	68%	5.E-130	41.64%	QMU24933.1
	FsamMV3	1	RNA-dependent RNA polymerase [Soybean leaf-associated mitovirus 4]	54%	0.E+00	78.86%	ALM62249.1
	FsamMV4	1	RNA-dependent RNA polymerase [Plasmopara viticola lesion associated mitovirus 26]	84%	0.E+00	59.11%	QIR30249.1
	FsamMV5	1	RNA-dependent RNA polymerase [Plasmopara viticola lesion associated mitovirus 46]	85%	0.E+00	73.52%	QIR30269.1
FA2242	FsamVV1	1	RNA-dependent RNA polymerase [Ophiostoma minus totivirus]	25%	0.E+00	70.40%	CAJ34336.1
	FsamMV1	1	RNA-dependent RNA polymerase [Soybean leaf-associated mitovirus 5]	88%	0.E+00	82.12%	ALM62240.1
	FsamMV2	1	RNA-dependent RNA polymerase [Botryosphaeria dothidea mitovirus 1]	67%	7.E-130	41.64%	QMU24933.1
	FsamMV3	1	RNA-dependent RNA polymerase [Soybean leaf-associated mitovirus 4]	54%	0.E+00	78.86%	ALM62249.1
	FsamMV4	1	RNA-dependent RNA polymerase [Plasmopara viticola lesion associated mitovirus 26]	84%	0.E+00	59.11%	QIR30249.1
	FsamMV5	1	RNA-dependent RNA polymerase [Plasmopara viticola lesion associated mitovirus 46]	85%	0.E+00	73.52%	QIR30269.1

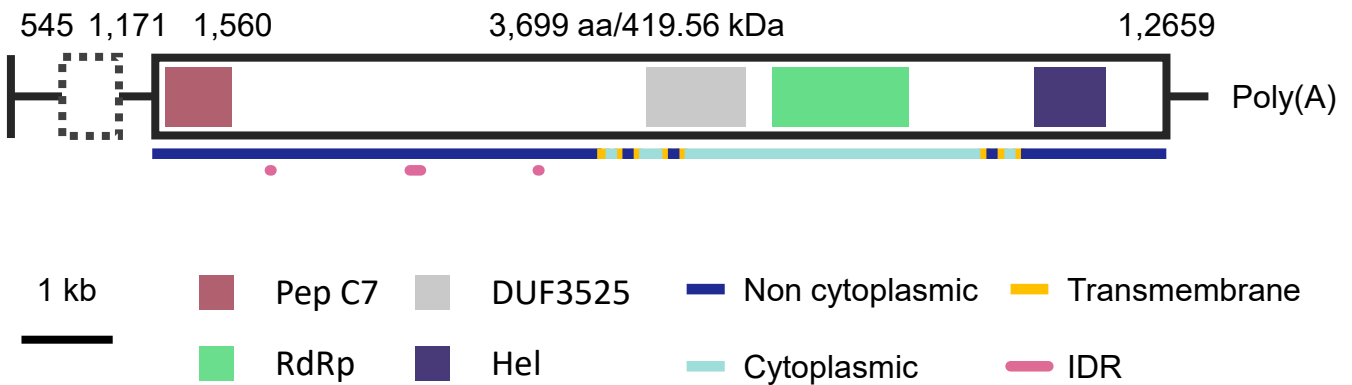
Table 1-21. Summary of viral sequences detected from *Trichoderma* strains.

Host		Virus					Seq completion	
Strain	Fungal species	Genus	Virus name	Abbrev.	Segment no.	Length (nt) & NODE no.	CDS	Genome
AH-1	<i>T. viride</i>	Unclassified	Trichoderma viride Phenui-like virus 1	TvPLV1	1	7,759 (NODE_1)	✓	✓
					2	2,671 (NODE_3)	✓	✓
		Unclassified	Trichoderma viride Umbra-like virus 1	TvULV1	1	4,429 (NODE_2)	✓	✓
AH-4	<i>T. viride</i>	<i>Victorivirus</i>	Trichoderma viride victorivirus 1	TvVV1	1	5,221 (NODE_1&2)	✓	✓
BLASTX								
Fungal Strain	Abbrev.	Segment no.	Description		Query coverage	E-value	Identity	Accession no.
AH-1	TvPLV1	1	replicase [Entoleuca phenui-like virus 1]		89%	0.E+00	45.39%	AVD68666.1
		2	movement protein [Entoleuca phenui-like virus 1]		35%	4.E-112	51.76%	QCF40769.1
	TvULV1	1	RNA-dependent RNA polymerase [Soybean leaf-associated ssRNA virus 1]		35%	8.E-165	52.62%	ALM62232.1
AH-4	TvVV1	1	RNA dependent RNA polymerase [Sphaeropsis sapinea RNA virus 1]		48%	0.E+00	62.02%	NP_047558.1

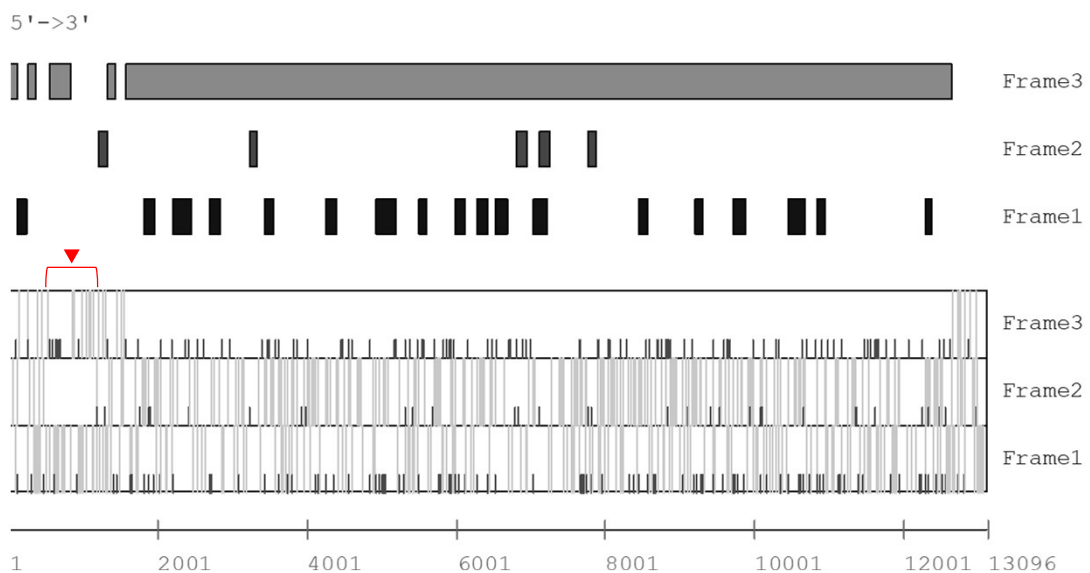
(Li *et al.*, 2019a, 2020; Wang *et al.*, 2013) (Fig. 1-12A)。また、ORF 上流の長い (1,559 nt) 5'-UTR には、708 nt に渡って終止コドンが存在しない領域が確認された (Figs. 1-12A and B)。本領域は AUG を唯一の開始コドンとした際には 297 nt (98 aa) 以上の ORF は推定されないが、*Neurospora crassa* において非 AUG 開始コドンとして比較的頻繁に使用される GUG を開始コドンとした際には 208 aa、分子量 23.72 kDa の推定タンパク質をコードする ORF が予測された (Wei *et al.*, 2013) (Figs. 1-12A and B)。この推定タンパク質は FgHV1 の ORF1 にコードされるタンパク質 (gp1) と最大の配列類似性 (Query cover; 91% E-value:  $4 \times 10^{-24}$ , identity: 31.94%) を示すことから、gp1-like とする。FgHV1 gp1 にはペプチダーゼドメインが推定されており、その活性に必要な 2 つのアミノ酸残基 (Cys<sup>104</sup> 及び His<sup>154</sup>) と切断部位 (Gly<sup>176</sup>) が保存されている (Wang *et al.*, 2013)。gp1-like と *Hypoviridae* 科ウイルスの持つペプチダーゼドメインのアミノ酸配列を基にマルチプルアライメントを行った結果、全体的な配列類似性は認められる一方で上記の 3 つのアミノ酸残基が保存されておらず、gp1-like はタンパク質として発現していたとしてもペプチダーゼ活性は失われていると推測された (Fig. 1-12C)。BLASTX 解析から FnHV1 及び FsamHV2 は Betahypovirus 属のメンバーであると推定された (Tables 1-9 and 1-20)。FnHV1 及び FsamHV2 はそれぞれゲノムサイズ 10,524 nt、10,571 nt (3'端の poly (A) を除く) であり、ゲノムの全域にわたる単一の ORF が推定された (Fig. 1-13)。FnHV1 及び FsamHV2 のコードする ORF にはいずれも 4 つの機能ドメイン、グリコシルトランスフェラーゼ (Gly)、Pep、RdRp、Hel の存在が予測された。ゲノム全長に渡る大きな単一 ORF にこれら 4 つのドメインを有するという特徴は Betahypovirus 属に典型的なものであり、ゲ

A

FsamHV1/FA1837  
13,095 nt



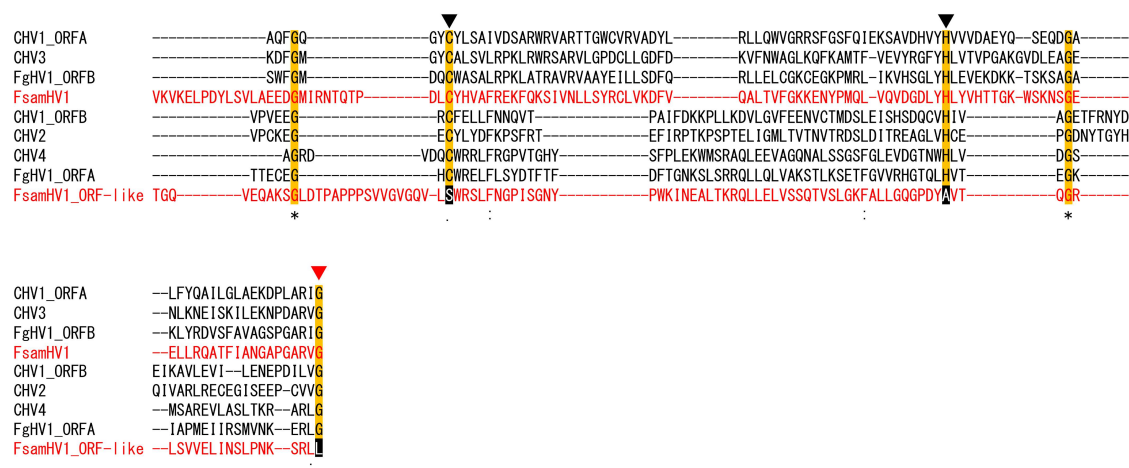
B



**Figure 1-12. Genomic information of FsamHV1.**

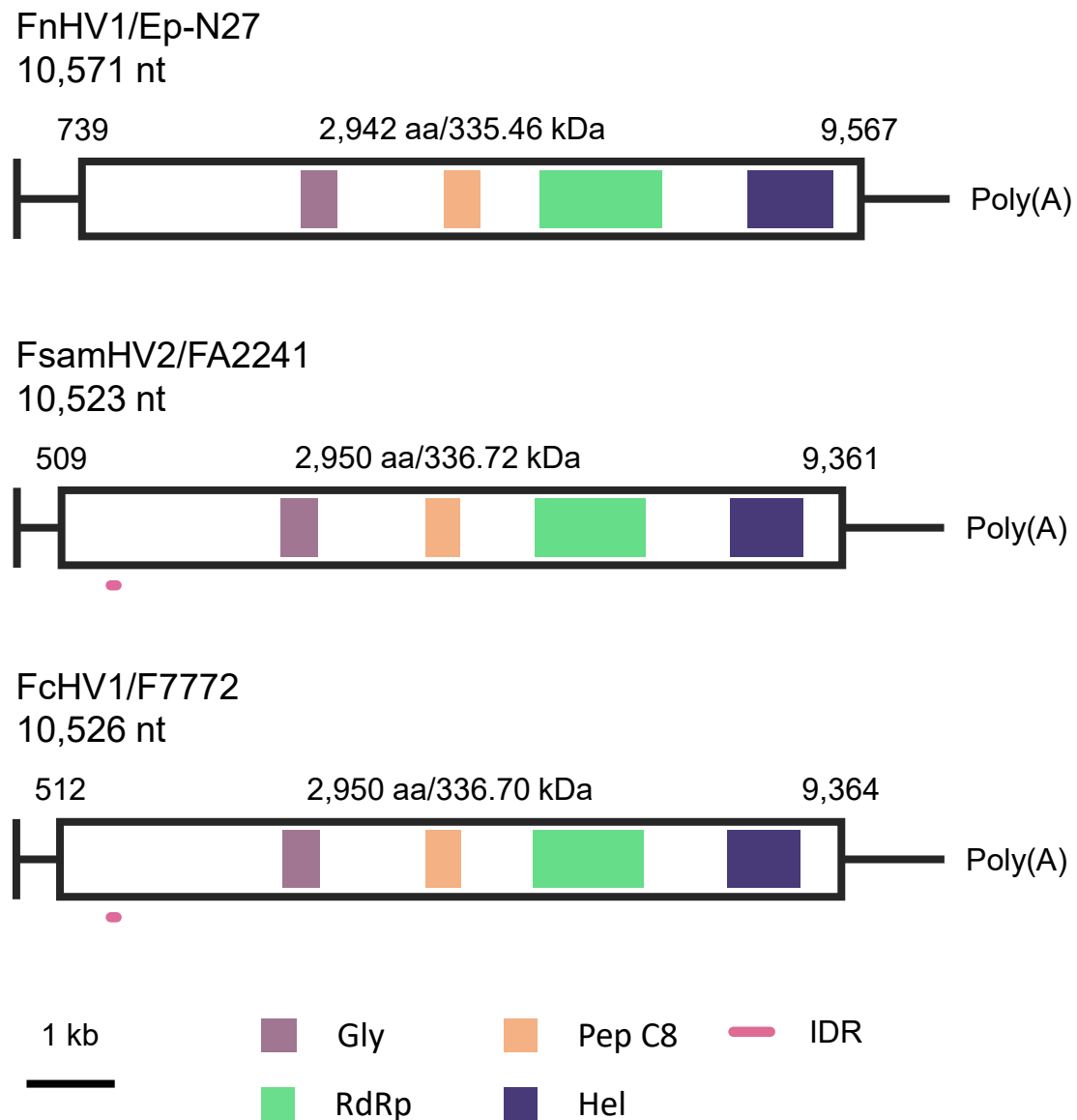
(A) Schematic diagram of FsamHV1 genome. A white box indicates an ORF. A white box with dashed line indicates a putative ORF. A vertical line indicates a terminus determined by RLM-RACE. Numbers above the boxes indicate start and stop nt position of the ORFs. Colored boxes indicate the positions of functional domains; red: peptidase (C7 family), gray: DUF3525, green: RNA dependent RNA polymerase, and dark blue: helicase. Colored lines below the white boxes indicate the areas of specific features; blue: non-cytoplasmic region, yellow: transmembrane region, light blue: cytoplasmic region and pink: intrinsically disordered region. (B) Prediction of the coding regions larger than 100 bp on the sense strand of FsamHV1 (upper panels). Prediction of the initiation codon (AUG) and the termination codons (UAA, UAG and UGA) positions on each reading frame (lower panels). Black bars indicate positions of initiation codons, and gray bars indicate those of termination codons in the lower panels. A red triangle indicates a putative ORF initiated by non-AUG codon.

C



**Figure 1-12. (continued)**

(C) Amino acid sequence alignment of the region corresponding to the peptidase domain. Amino acid residues, which are required for the autoproteolytic activity are indicated by black triangles, and an amino acid residue of the putative cleavage site is indicated by a red triangle.



**Figure 1-13. Schematic diagram of Betahypoviruses' genome.**

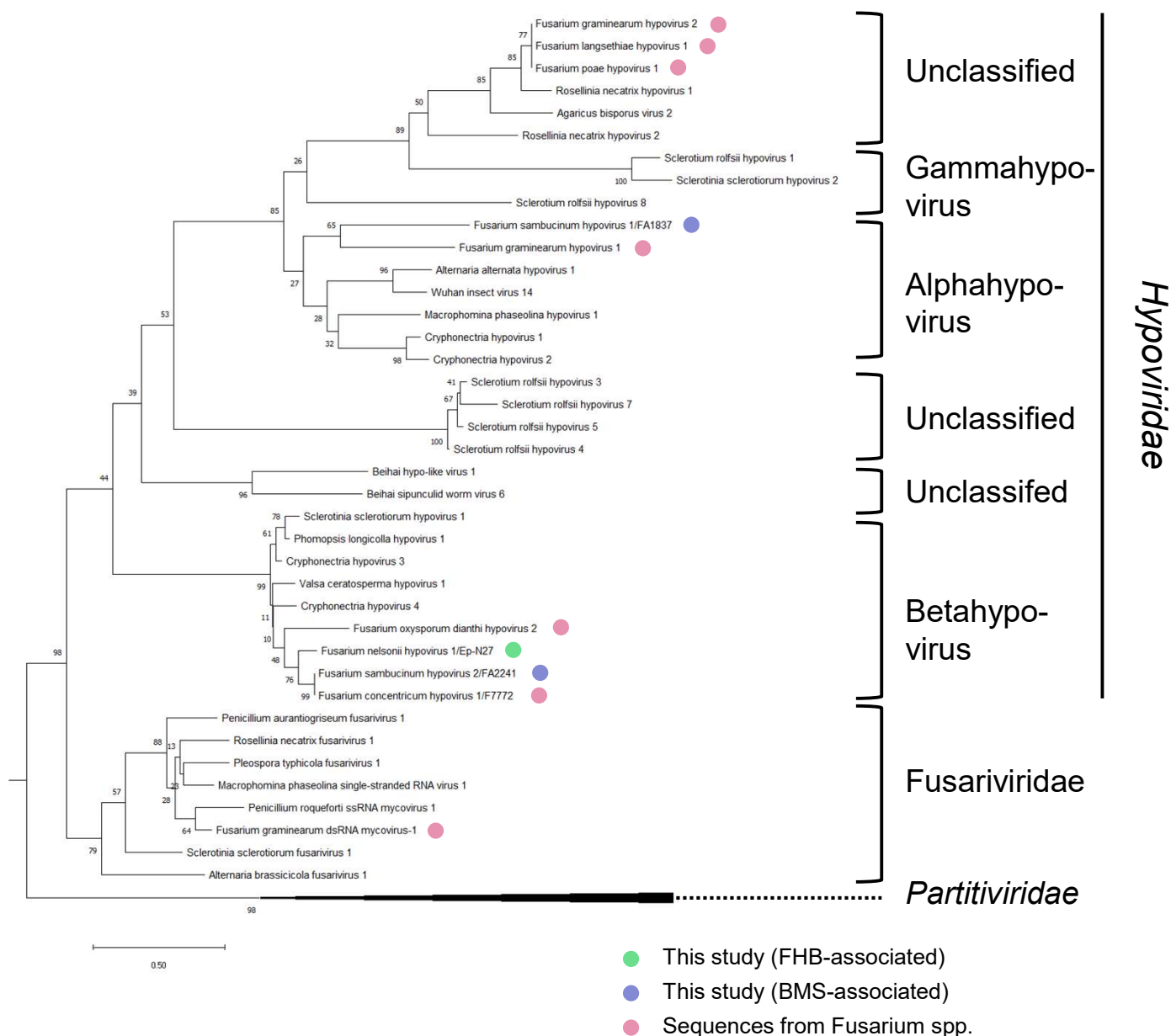
A white box indicates an ORF. Numbers above the boxes indicate start and stop nt position of the ORFs. A vertical line indicates a terminus determined by RLM-RACE or FLDS. Colored boxes indicate the positions of functional domains; purple: Glycosyltransferase, beige: peptidase (C8 family), green: RNA dependent RNA polymerase, and dark blue: helicase. A pink line below the white boxes indicate intrinsically disordered region.

ノム構造からもこれらのウイルスの *Betahypovirus* 属への帰属が示唆された。また、FsamHV2 は F7772 株に感染する *Fusarium concentricum hypovirus 1* (FcHV1) と塩基配列レベルで 99.99%の配列類似性であり、同種の異なるウイルス株であると考えられた (太田 (2020)) (Table 1-20)。本解析で得られた 3 種のハイポウイルス、及び F7772 株の FcHV1 に加え、他の *Hypoviridae* 科ウイルス、近縁グループである *Fusariviridae* 科ウイルス、外群として *Partitiviridae* 科ウイルスの RdRp ドメインのアミノ酸配列を用いた分子系統解析を行った。その結果、BLASTX 解析の結果と一致して、FsamHV1 は FgHV1 を含む *Alphahypovirus* 属のメンバーと共に独立した枝を形成した (Fig. 1-14)。また、FnHV1 及び FsamHV2 は FodV2 を含む *Betahypovirus* 属のメンバーと共に独立した枝を形成した (Fig. 1-14)。これらの結果から、FsamHV1 は *Alphahypovirus* 属の、FnHV1 及び FsamHV2 は *Betahypovirus* 属のメンバーであると推定された。国際ウイルス分類委員会 (International Committee on Taxonomy of Viruses: ICTV) は *Hypoviridae* 科内の種の分類基準を設けていないが、本ウイルス科で現在承認されている 4 種のウイルスの複製酵素のアミノ酸配列類似性が 60%未満であることを考慮すると FnHV1、FsamHV1 及び FsamHV2 はいずれも新種として承認される可能性が高い (Suzuki *et al.*, 2018)。

### 3-6. *Gammapartitivirus* 属ウイルス

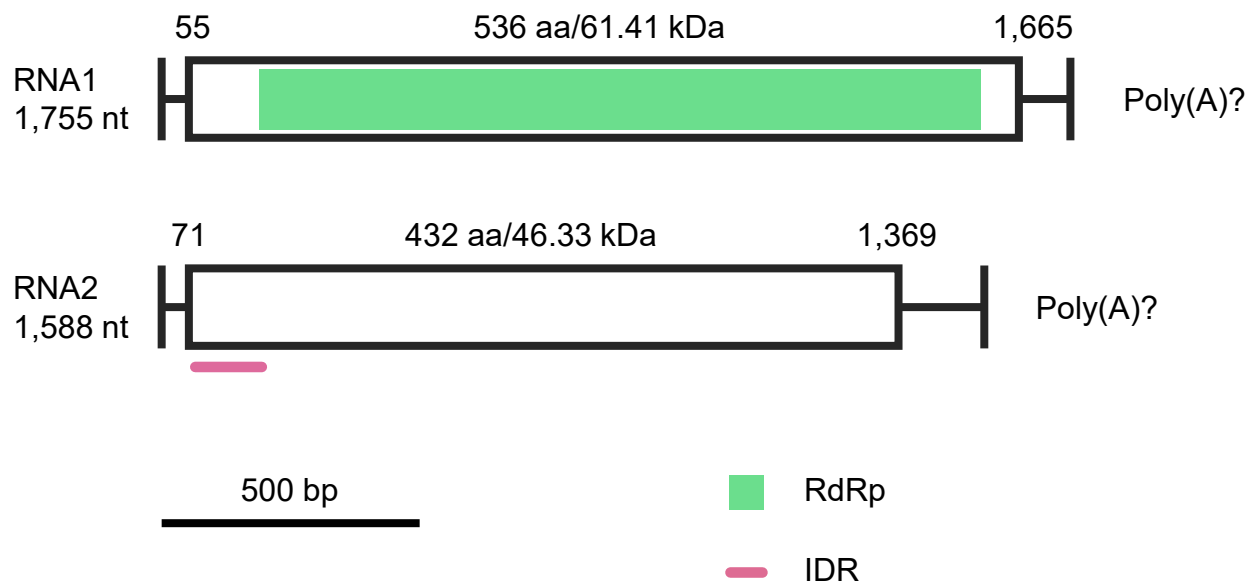
CperPV1、FsoPV3 及び FoxPV1 がそれぞれ塩基レベルで 100%の配列類似性を示したため、同種の異なるウイルス株であると考えられた。これらはいずれも長さ 1,755 nt (RNA1) 及び 1,588 nt (RNA2) の 2 分節 RNA ゲノムを有しており、それぞれ RdRp 及び CP をコードする (Fig. 1-15)。





**Figure 1-14. Phylogenetic placements of FnHV1, FsamHV1, and FsamHV2 based on the replicase sequences.**

Neighbour-joining phylogenetic tree based on the multiple alignment of amino acid sequences of conserved RdRp domain predicted on the putative replicases of FnHV1, FsamHV1, FsamHV2 and on other definitive and tentative members of the families *Hypoiviridae* and *Fusariviridae*. Six members of *Partitiviridae* family were used as the outgroup. Bootstrap values obtained with 1,000 replicates are indicated on branches. Branch length corresponds to the genetic distance; the scale bar at the lower left corresponds to a genetic distance of 0.50.



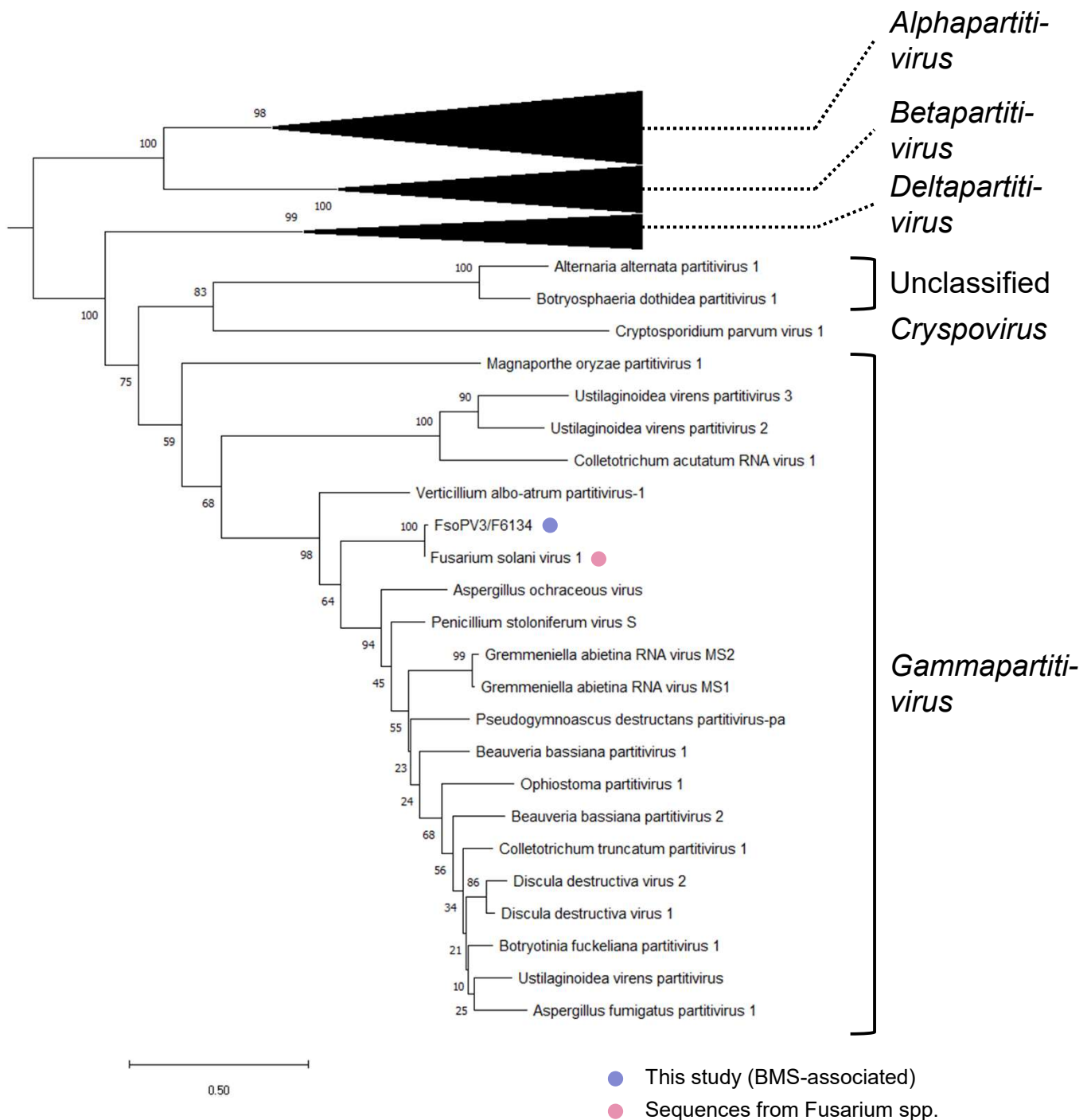
**Figure 1-15. Schematic diagram of partitivirus's genome commonly detected from F956, F6134, and F8850.**

A white box indicates an ORF. Numbers above the boxes indicate start and stop nt position of the ORFs. A vertical line indicates a terminus determined FLDS. A green box indicate the positions RNA dependent RNA polymerase. A pink line under the white box indicate the areas of intrinsically disordered region.

*Partitiviridae* 科ウイルスは両セグメントの 3'-末端に Poly (A) 鎖を有するが、FLDS により決定した末端配列には Poly (A) 鎖は含まれない。本ウイルスと最も近縁である FsV1 は Poly (A) 鎖を有することから、3'-末端配列の決定に関しては追加で実験的な検証を行う必要がある。*Partitiviridae* 科ウイルスの RdRp アミノ酸配列を用いた分子系統解析の結果、CperPV1 は *Gammapartitivirus* 属ウイルスと共に独立した枝を形成した (Fig. 1-16)。*Gammapartitivirus* 属における新種の基準は ICTV により「既知のメンバーの RdRp、CP とのアミノ酸配列類似性がそれぞれ 90%以下、80%以下」と定められており、本ウイルスが FsV1 と同種の 3 つの異なるウイルス株であると結論付けた。

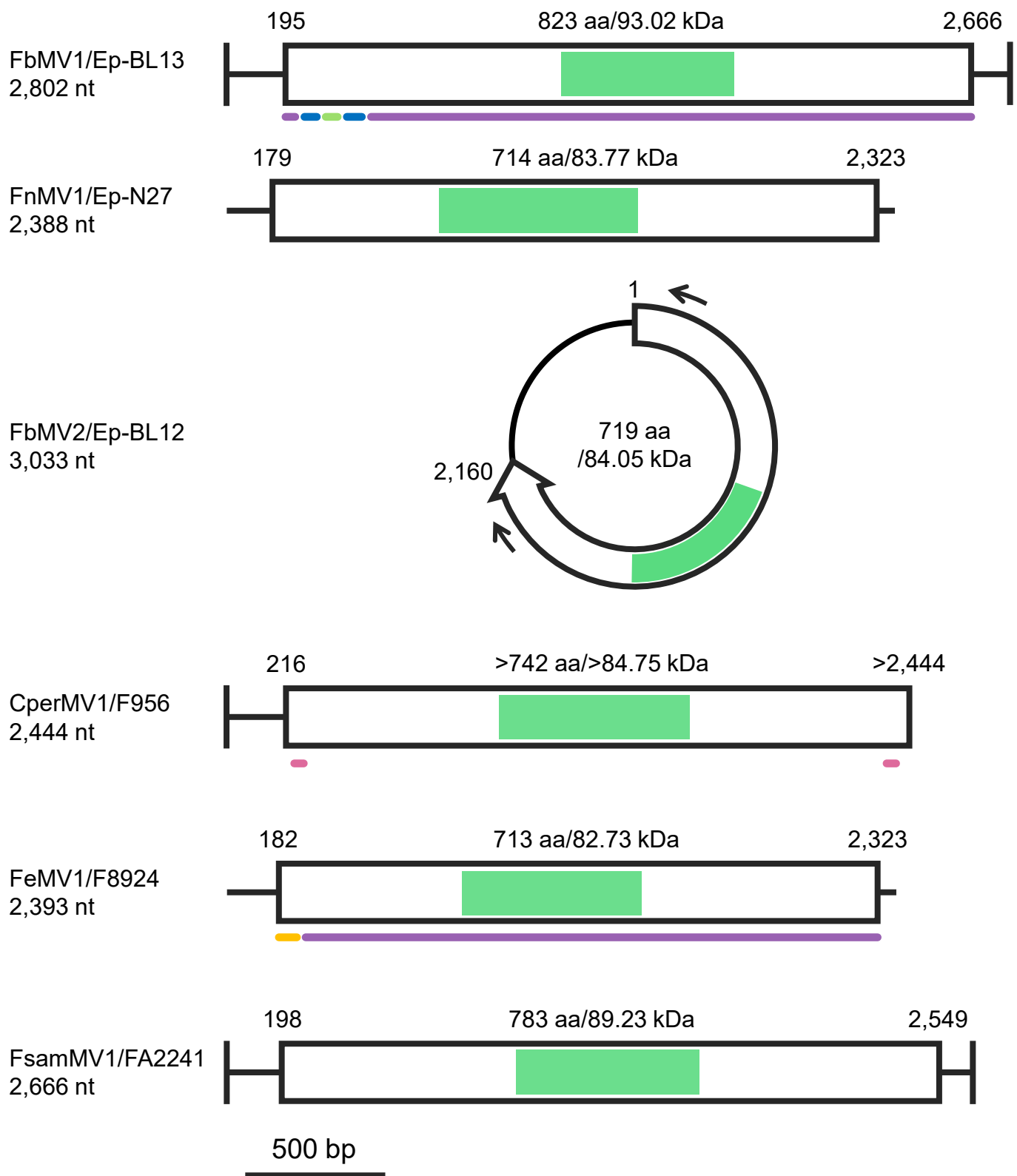
### 3-7. *Mitovirus* 属、*Magoulivirus* 属ウイルス

FHB 関連菌コレクションの内 Ep-BL12 株、Ep-BL13 株、Ep-BL14 株、Ep-N27 株及び Ep-N28 株の 5 菌株から 3 種の、BSM 関連菌株コレクションの内 F956 株、F8924 株、FA2241 株及び FA2242 株の 4 菌株から 7 種の異なる Mitovirus が検出された (Table 1-9, 1-20)。Ep-BL13 株、Ep-BL14 株及び Ep-N28 株に共通して感染する FbMV1 は互いに塩基配列レベルで 98.50% - 99.00% の類似性を示す同種の異なるウイルス株である。Mitovirus は一般的に、単一の ORF が座する長さ 2.3 kb - 2.7 kb の非分節、直鎖状+ssRNA ゲノムをもつ (King *et al.*, 2011a)。ミトコンドリアコドンテーブルにおいて、UGA は終止コドンではなくトリプトファンとして翻訳されるが、Mitovirus の ORF はこのミトコンドリアコドン暗号を用いた際にのみ RdRp ドメイン全長を含む機能的なタンパク質をコードする (Hillman and Cai, 2013)。本研究で決定された Mitovirus ゲノム配列は、すべてこの特徴を有する (Fig. 1-17)。FbMV2 と最大の



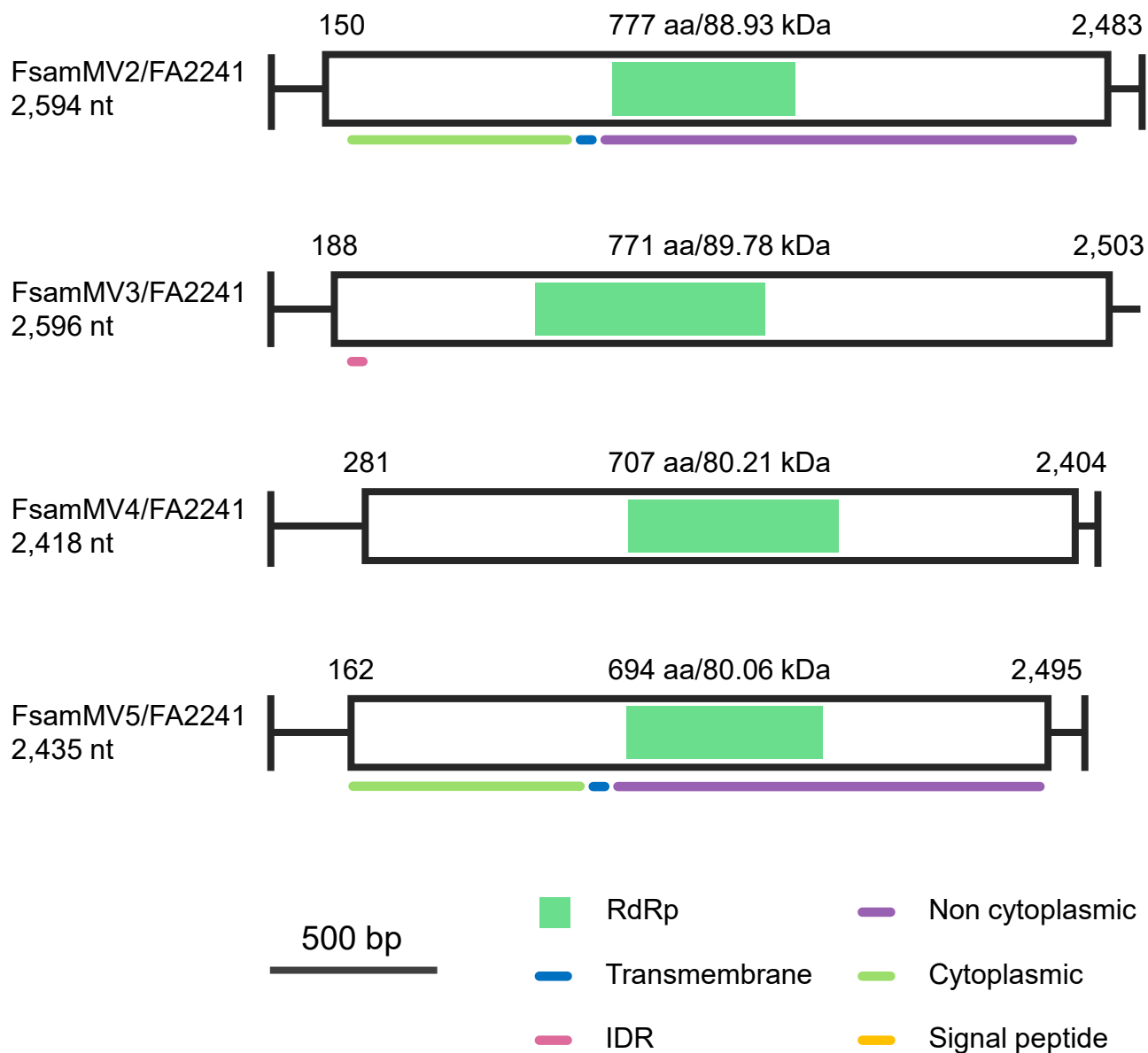
**Figure 1-16. Phylogenetic placements of FsoPV1/F6134 based on the replicase sequences.**

Neighbour-joining phylogenetic tree based on the multiple alignment of amino acid sequences of conserved RdRp domain predicted on the putative replicases of FsoPV1 and on other definitive and tentative members of the *Partitiviridae*. Bootstrap values obtained with 1,000 replicates are indicated on branches. Branch length corresponds to the genetic distance; the scale bar at the lower left corresponds to a genetic distance of 0.50.



**Figure 1-17. Schematic diagram of genomic structure of mitoviruses.**

A white box indicates an ORF. Numbers above the boxes indicate start and stop nt position of the ORFs. A vertical line indicates a terminus determined by RLM-RACE or FLDS. A green box indicate the positions RNA dependent RNA polymerase. Colored lines below the white boxes indicate the areas of specific features; purple: non cytoplasmic region, blue, transmembrane region, light green: cytoplasmic region, pink: intrinsically disordered region, and yellow: signal peptide. Arrows along the circular ORF of FbMV2 indicate the primers used for RT-PCR.



**Figure 1-17. (continued)**

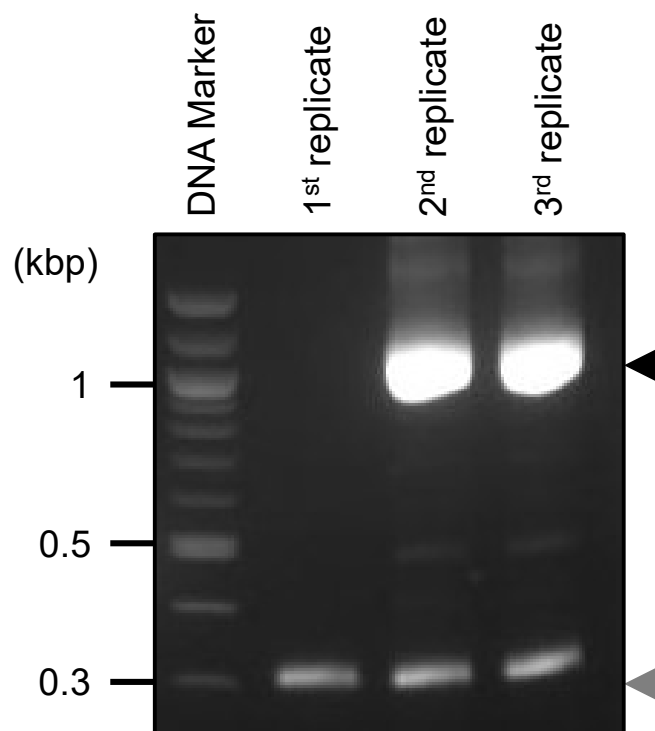
配列類似性を示した OnuMV7 のゲノムは他の Mitovirus と異なり、環状、あるいは単位配列が連結したコンカテマー構造である可能性が示されている (Hintz *et al.*, 2013)。興味深いことに、デノボアセンブリにより得られた FbMV2 のゲノム配列 5'、3'-末端には 55 nt の共通配列が見出されており、OnuMV7 同様環状あるいはコンカテマー構造のゲノムを有することが示唆された (Fig. 1-17)。ORF の末端から UTR を挟み込む形で設計したプライマーを用いたコロニー RT-PCR を行った結果、3 反復中 2 反復で UTR 全長に相当する増幅産物が得られた (Fig. 1-18)。配列解析によりこの PCR 産物が FbMV2 の UTR 配列であることが確認された。dsRNA の電気泳動の結果から Ep-BL12 株には長さ約 3 kbp の単一のバンドのみが検出されており (Fig. 1-3)、環状ゲノムを有する可能性が高い。Mitovirus 属内で環状ゲノムを有するウイルスの報告例はなく、今後 RT-PCR などによりゲノム構造を解明する必要がある。また、CperMV1 の ORF は終止コドンがゲノム配列中に含まれず、3'-末端配列が正しく決定できていない可能性がある。これに関しても RLM-RACE により実験的に検証する必要がある。

また、F6134 株、F8850 株から検出された FsoMUV1 及び FsoMUV2 は Mitoviridae 科と共に Lenarviricota 門に属する分類群である Botourmiaviridae 科 Magoulivirus 属のウイルスであると推定された。本ウイルス属は 2019 年に ICTV に承認された分類群であり、Magnaporthe oryzae ourmia-like virus 1 (MOLV1) 及び Rhizoctonia solani ourmia-like virus 1 (RsOLV1) の 2 種を含む (Ayllón *et al.*, 2020)。MOLV1 の完全長ゲノム配列は解読されており、2,364 nt の単分節+ssRNA ゲノム (3'-poly (A) を除く) に複製酵素をコードする単一の ORF をもつ (Illana *et al.*, 2017)。RsOLV1 は部分配列のみが解読されているが、MOLV1 と

**A**



**B**



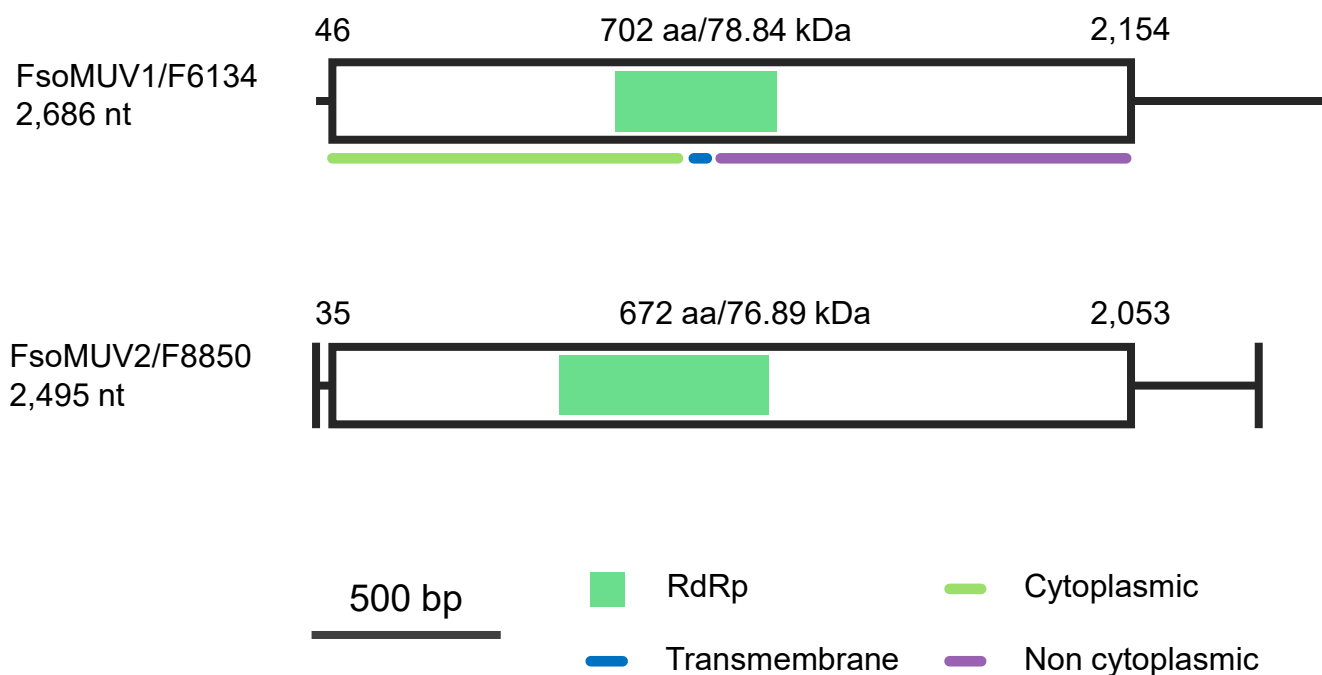
**Figure 1-18. Confirmation of continuity of FbMV2 UTR region by colony RT-PCR.**

(A) Display of read mapping to the sequence consists of a tandem repeat of FbMV2 genomes. A white arrow indicates the ORF of FbMV2. A set of black arrows indicates the primer sets used for RT-PCR. The read alignments are shown in the lower panel. (B) UTR region was amplified using a specific primer set indicated in Fig. 1-17 and visualized by agarose gel electrophoresis. A black triangle indicates PCR products in expected length, and a gray one indicates PCR products generated by mis-annealing of one of the primers. The PCR products were gel-extracted and sequenced.



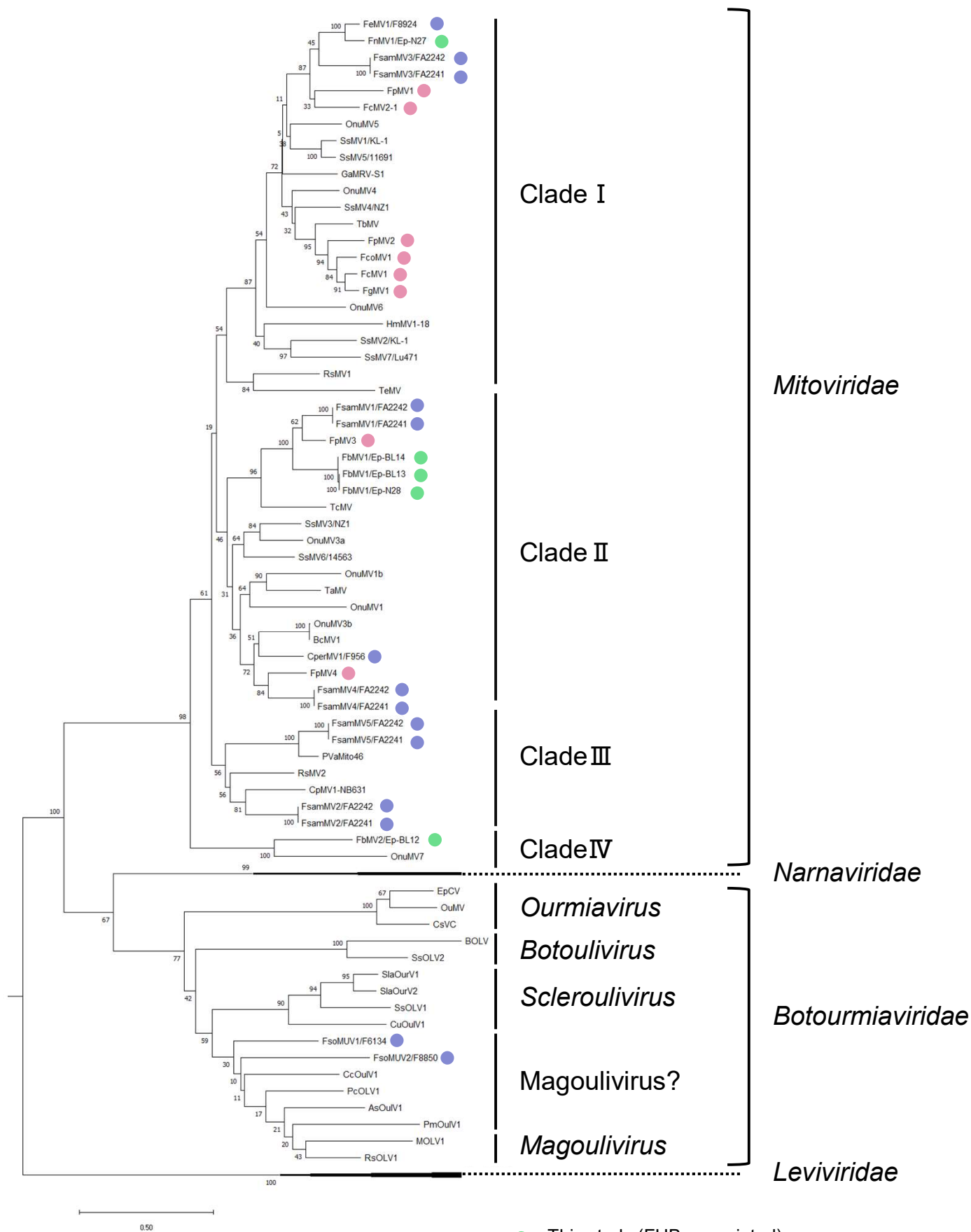
同様単一の ORF が予測されている。FsoMUV1 及び FsoMUV2 ゲノム上にもそれぞれ単一の ORF が予測され、コードするタンパク質上には RdRp の機能ドメインが予測された (Fig. 1-19)。MOLV1 はゲノムの 3'-末端に poly (A) 鎖を有するが、FLDS により決定した FsoMUV2 の末端配列には poly (A) 鎖は含まれないため、実験的な検証によりその有無を判別する必要がある。

本研究で得られた 9 種 16 株の Mitovirus 及び 2 種の Magoulivirus に加え、*Lenarviricota* 門を構成する 4 つの科 (*Narnaviridae* 科、*Mitoviridae* 科、*Leviviridae* 科、*Botourmiaviridae* 科) に属するウイルスの RdRp ドメインのアミノ酸配列を用いて分子系統解析を行った。その結果、本研究で発見された Mitovirus は全て BLASTX 解析の結果と一致して *Mitovirus* 属ウイルスと共に 1 つのクラスターを形成した。*Mitovirus* 属内には 4 つのクレード (CladeI-IV) の存在が示唆された (Fig. 1-20)。クレードIには FeMV1、FnMV1 及び FsamMV3 が、クレードIIには FsamMV1、FsamMV4、CperMV1 及び FbMV1 が、クレードIIIには FsamMV2 及び FnMV1、FeMV1 及び FsamMV3 は CperMV1、FsamMV1、FsamMV2、FsamMV4 及び FsamMV5 が、そしてクレードIVには FbMV2 が含まれる (Fig. 1-20)。中でもクレードIVはクレードI-IIIの外側に独立した枝を形成することが明らかとなった (Fig. 1-20)。FsoMUV1 及び FsoMUV2 は、OLV1 及び RsOLV1 に加え *Magoulivirus* 属と関連性があるが未分類である 5 種のウイルスと共に他の *Botourmiaviridae* 科のウイルス属 (*Botoulivirus* 属、*Ourmiavirus* 属及び *Scleroulivirus* 属) から独立した枝を形成しており、*Magoulivirus* 属への帰属が示唆された (Fig. 1-20)。ICTV は *Mitovirus* 属、*Magoulivirus* 属における明確な種の分類基準を設けていないが、承認されたウイルス種同士の RdRp アミノ酸配列



**Figure 1-19. Schematic diagram of genomic structures of FsoMUV1 and FsoMUV2.**

A white box indicates an ORF. Numbers above the boxes indicate start and stop nt position of the ORFs. A vertical line indicates a terminus determined by FLDS. A green box indicate the positions RNA dependent RNA polymerase. Colored lines below the white boxes indicate the areas of specific features; light green: cytoplasmic region, purple: non cytoplasmic region, and blue, transmembrane region.



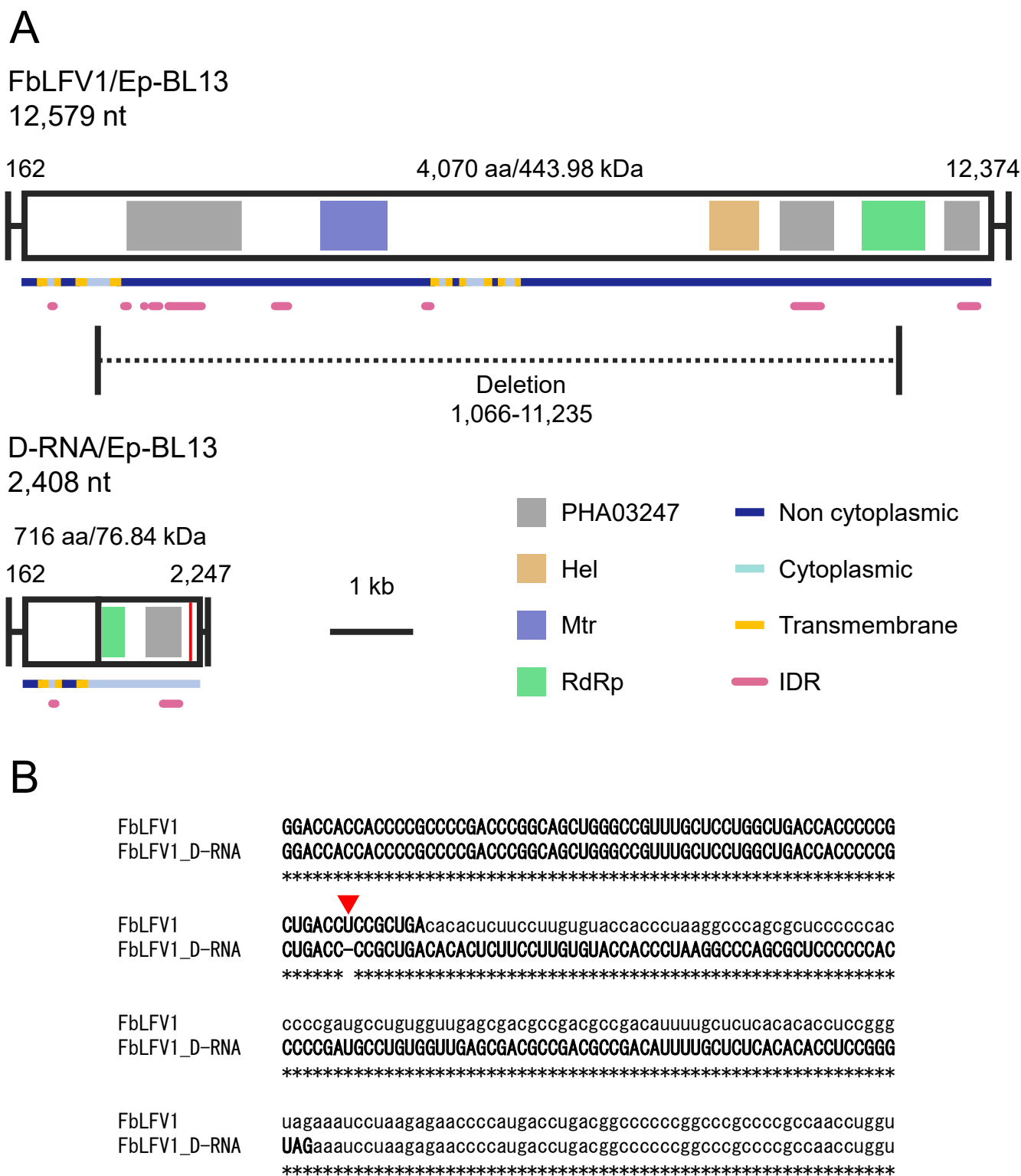
**Figure 1-20. Phylogenetic placements of putative mitoviruses and magouliviruses based on the replicase sequences.**

Neighbour-joining phylogenetic tree based on the multiple alignment of amino acid sequences of conserved RdRp domain predicted on the putative replicases of putative mitoviruses and magouliviruses sequenced in this study, and on other definitive and tentative members of the Phylum *Lenerviricota*. Bootstrap values obtained with 1,000 replicates are indicated on branches. Branch length corresponds to the genetic distance; the scale bar at the lower left corresponds to a genetic distance of 0.50.

類似度がそれぞれ 40%、90%以下であることから、本研究で発見された FbMV2 は *Mitovirus* 属の、FsoMUV2 は *Magoulivirus* 属の新種ウイルスであると推定された (Ayllón *et al.*, 2020; King *et al.*, 2011a)。

### 3-8. *Tymovirales* 目ウイルス

配列解析の結果、FbLFV1 は長さ 12,579 nt の +ssRNA ゲノムを有しており、ゲノムのほぼ全長 (97.1%) にわたる単一の ORF が座落すると推定された。*Tymovirales* 目ウイルスは 3'-末端に poly (A) 鎖をもつ長さ 5.9 kb - 10.6 kb のゲノムを有するが、FbLFV1 のゲノムサイズは既知の本ウイルス目メンバーの最大ゲノムサイズを大幅に上回っており、ゲノムの 3'-末端には poly (A) 鎖が存在しない (Fig. 1-21A)。コードされるポリペプチドは長さ 4,070 aa、分子量 443.6 kDa であり、3 つの複製酵素ドメイン、Mtr、Hel、RdRp が N 末端から C 末端にかけてこの順に配置されている (Fig. 1-21A)。この複製酵素ドメインの配置は植物ウイルスを含むアルファウイルス様スーパーファミリーに典型的な性質であり、*Tymovirales* 目のウイルスにも保存されている (King *et al.*, 2011b)。これに加え、3 か所に機能未知ドメイン PHA03247 が推測された。D-RNA は長さ 2,408 nt であり、716 aa の推定タンパク質をコードする単一の ORF を有するため、FbLFV1 の内部配列がフレームシフトを起こさない形で欠損した結果生じた RNA エlement であると考えられた (Fig. 1-21A)。D-RNA と FbLFV1 は塩基配列レベルで極めて高い配列類似性を示すが、D-RNA の ORF の終止コドン直前の 1 塩基欠損によるフレームシフトが生じており、FbLFV1 の ORF よりも 3'側に 108 nt 延長する (Fig. 1-21B)。FbLFV1、*Tymovirales* 目のウイルス及び外群として *Closteroviridae* 科ウイルスの RdRp アミノ酸配列を用いた分子系統



**Figure 1-21. Schematic diagram of FbLFV1's and its D-RNA's genomes.**

(A) A white box indicates an ORF. Numbers above the boxes indicate start and stop nt position of the ORFs. A vertical line indicates a terminus determined by RLM-RACE. Colored boxes indicate the positions of functional domains; gray: PHA03247, blue: methyltransferase, beige: helicase, and green: RNA dependent RNA polymerase. Colored lines below the white boxes indicate the areas of specific features; blue: non-cytoplasmic region, yellow: transmembrane region, light blue: cytoplasmic region and pink: intrinsically disordered region. (B) An alignment of 5'-terminal sequences of FbLFV1 and D-RNA. Nucleotides included in the ORF are capitalized. Identical nucleotides are indicated by asterisks. A red arrowhead indicates the deletion position.

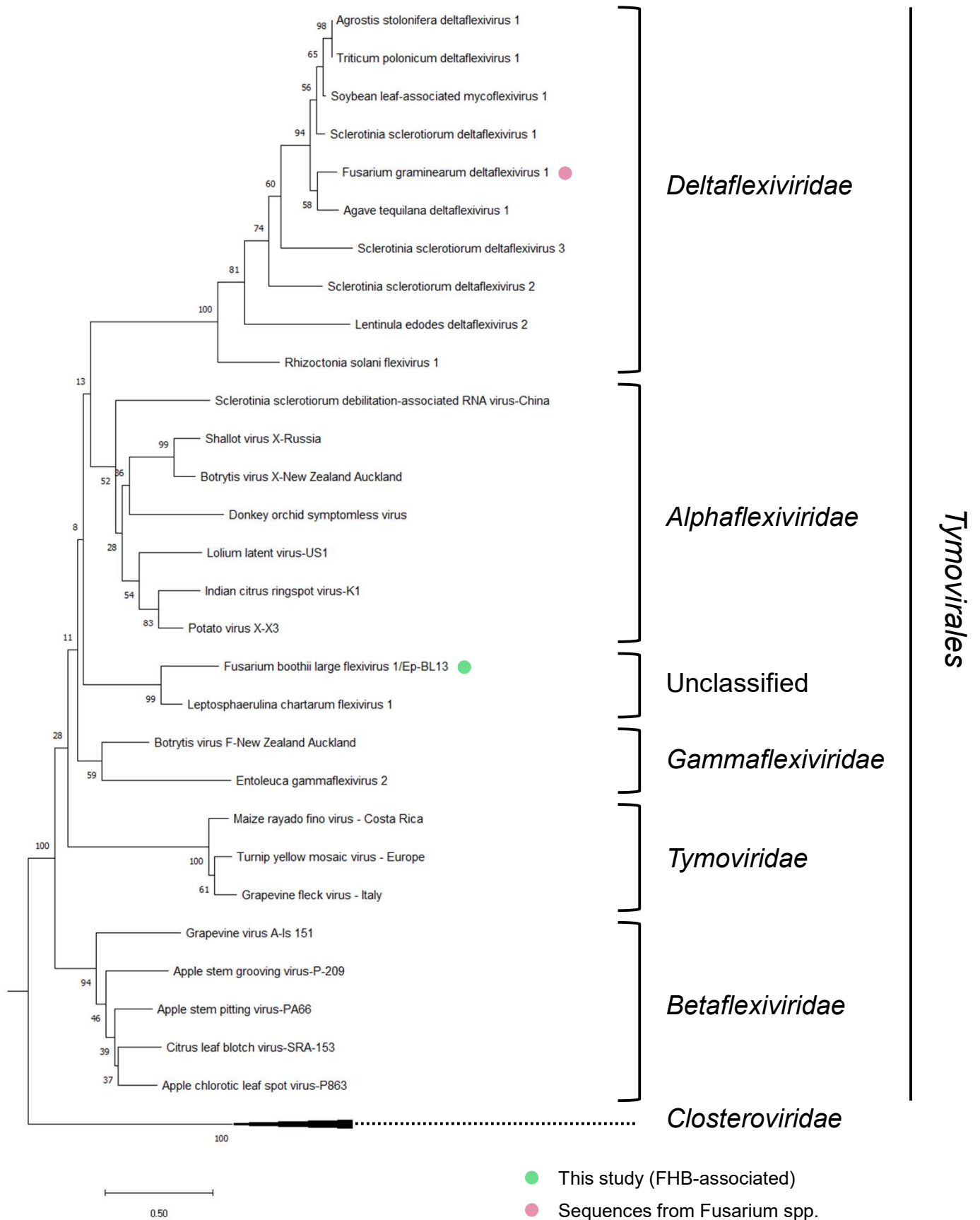
解析の結果、FbLFV1 は *Gammaflexiviridae* 科唯一の種である BotFV と最も近い系統関係にあるが、独立した枝を形成した (Fig. 1-22)。ICTV は *Tymovirales* 目内の科、属、種の明確な分類基準を設けていないが、既知のウイルスとの低い配列類似性及び特徴的なゲノム構造から本ウイルス目の新種であると強く示唆された。

### 3-9. *Chrysoviridae* 科ウイルス

配列解析から FoxCV2 は 5 分節 RNA ゲノム (RNA1 - 5) を有する *Betacrysovirus* 属のメンバーであると推定された。FoxCV2 のすべての分節ゲノムには単一の大きな ORF が座上し、RNA1 にコードされるタンパク質 (P1) には RdRp の機能ドメインが推測された。RNA2 - 4 のコードするタンパク質 (P2 - 4) には機能ドメインは見出されなかった (Fig. 1-23)。データベース上にウイルス由来の類似配列が検出されなかった RNA5 のコードするタンパク質 (P5) の C-末端側には C2H2 型 Zinc-finger (Znf) モチーフが推測され、核酸との結合能力が示唆された (Fig. 1-23)。FoxCV2、*Crysoviridae* 科のウイルス及び近縁ウイルス分類群である *Totiviridae* 科、*Altenaviridae* 科のウイルスの RdRp アミノ酸配列を用いて分子系統解析を行った。その結果、BLASTX 解析の結果と一致して *Betacrysovirus* 属の形成する枝の内部に位置することが明らかとなった (Fig. 1-24)。以上から、FoxCV2 は *Betacrysovirus* 属の FsCV1 と同種の異なるウイルス株であると推定された。

### 3-10. *Victorivirus* 属ウイルス

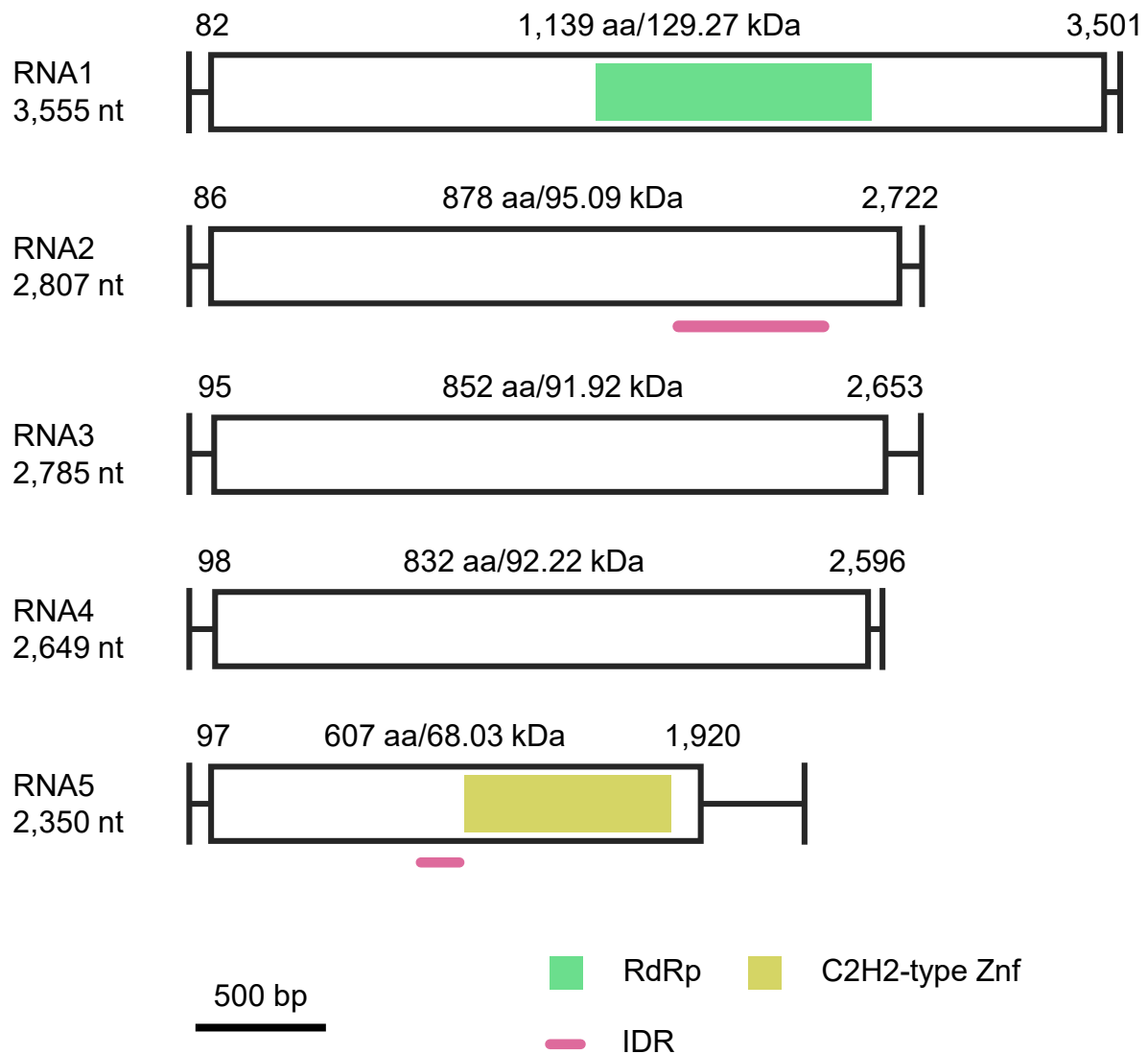
配列解析から FsamVV1 及び TvVV1 はそれぞれ単文節 dsRNA ゲノムを有する *Victorivirus* 属のメンバーであると推定された。FsamVV1 は FA2241 株及び FA2242 株の両方から検出され、FA2242 に感染するウイ





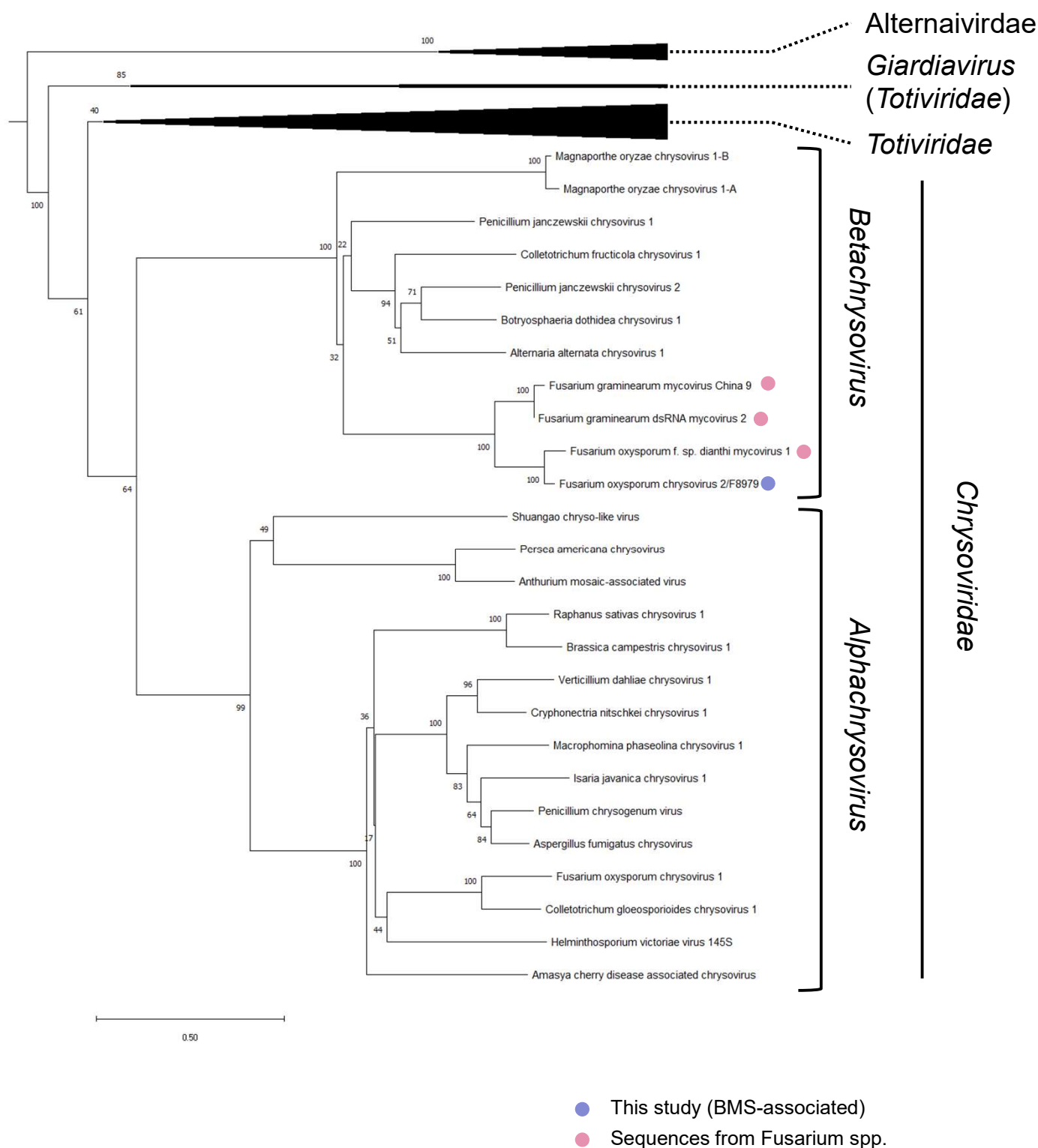
**Figure 1-22. Phylogenetic placements of FbLFV1 based on the replicase sequences.**

Neighbour-joining phylogenetic tree based on the multiple alignment of amino acid sequences of conserved RdRp domain predicted on the putative replicases of FbLFV1 and on other definitive and tentative members of the order *Tymovirales*. Five members of *Closteroviridae* family were used as the outgroup. Bootstrap values obtained with 1,000 replicates are indicated on branches. Branch length corresponds to the genetic distance; the scale bar at the lower left corresponds to a genetic distance of 0.50.



**Figure 1-23. Schematic diagram of FoxCV2 genome.**

A white box indicates an ORF. Numbers above the boxes indicate start and stop nt position of the ORFs. A vertical line indicates a terminus determined by FLDS. Colored boxes indicate the positions of functional domains; green: RNA dependent RNA polymerase and beige: C2H2-type zinc-finger domain. Pink lines below the white boxes indicate intrinsically disordered regions.



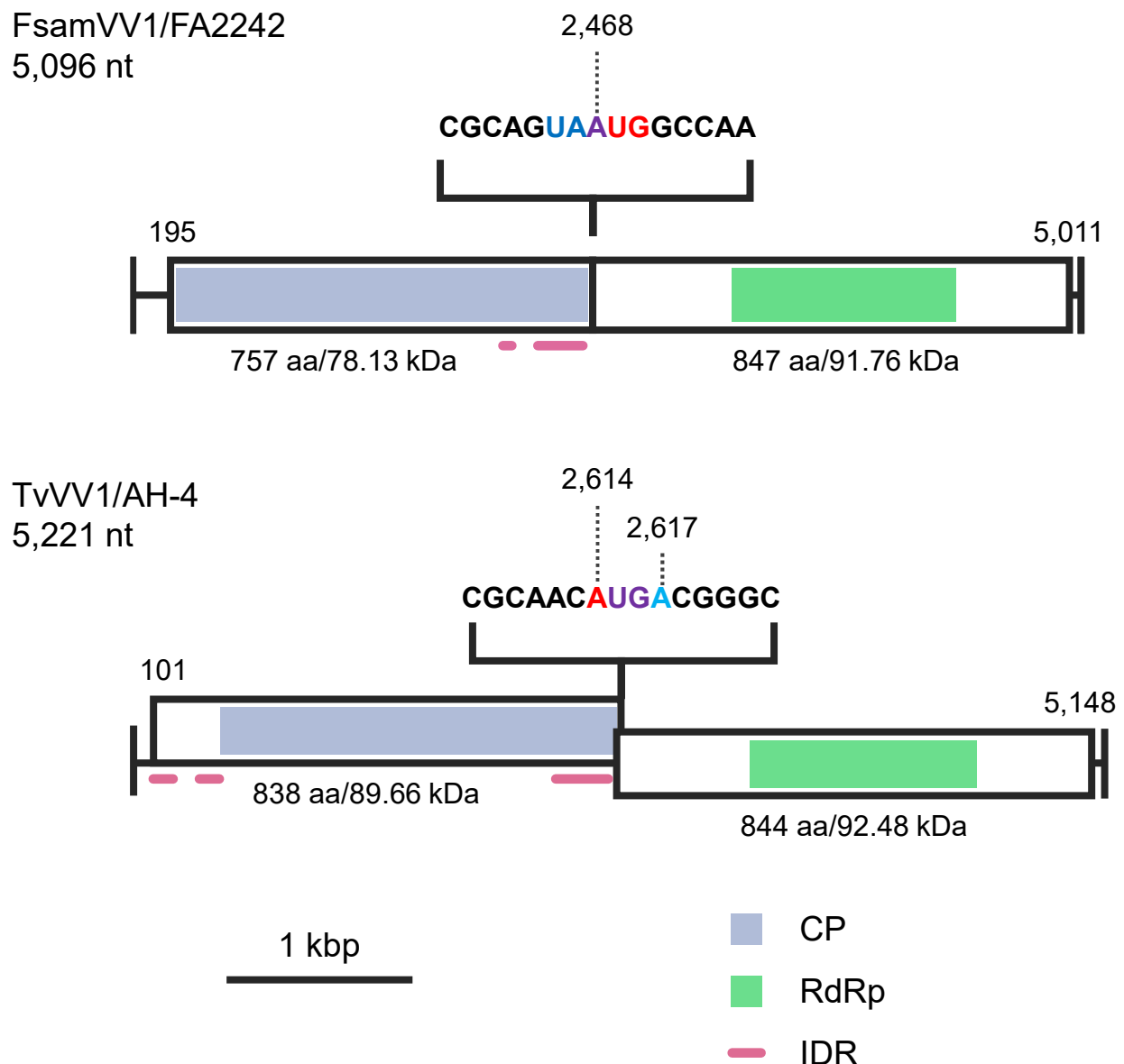
**Figure 1-24. Phylogenetic placements of FoxCV2 based on the replicase sequences.**

Neighbour-joining phylogenetic tree based on the multiple alignment of amino acid sequences of conserved RdRp domain predicted on the putative replicases of FoxCV2 and on other definitive and tentative members of the family Crysoviridae. Members of *Totiviridae* and *Alternaviridae* family were used as the outgroup. Bootstrap values obtained with 1,000 replicates are indicated on branches. Branch length corresponds to the genetic distance; the scale bar at the lower left corresponds to a genetic distance of 0.50.

ルス株の配列を基に完全長ゲノムが解読された。FsamVV1 及び TvVV1 ゲノムはいずれも *Victorivirus* 属ウイルスに共通する特徴であるオーバーラップする 2 つの大きい ORF を有しており、5'-末端側 (ORFA) は CP を、3'-末端側 (ORFB) は RdRp をコードする (Ghabrial and Nibert, 2009) (Fig. 1-25)。 *Victorivirus* 属ウイルスはゲノム上流の ORF の翻訳終了直後のリボソームが再度 RNA に結合して下流の ORF の翻訳を開始する Ribosome termination-reinitiation 機構により CP 及び RdRp を合成する (Ghabrial and Nibert, 2009)。 FsamVV1 と TvVV1 の ORF の間にはそれぞれ UAAUG、AUGA という *Victorivirus* 間に高頻度で見いだされるオーバーラップ配列を有しており、上記の機構を利用してタンパク質合成を行うことが示唆された (Jamal *et al.*, 2019) (Fig. 1-25)。 FsamVV1、TvVV1、*Totiviridae* 科のウイルス及び近縁ウイルス分類群である *Chrysoviridae* 科、*Altenaviridae* 科のウイルスの RdRp アミノ酸配列を用いて分子系統解析を行った。その結果、FsamVV1、TvVV1 はいずれも他の *Victorivirus* 属のメンバーと共に *Totiviridae* 科の内部に独立した枝を形成した (Fig. 1-26)。以上の結果から、FsamVV1 及び TvVV1 は *Victorivirus* 属のメンバーであると推定した。ICTV は *Victorivirus* 属内における種の明確な分類基準を設けていないが、TvVV1 は既知の *Victorivirus* との配列類似性が比較的低く、将来的に新種として承認される可能性がある。

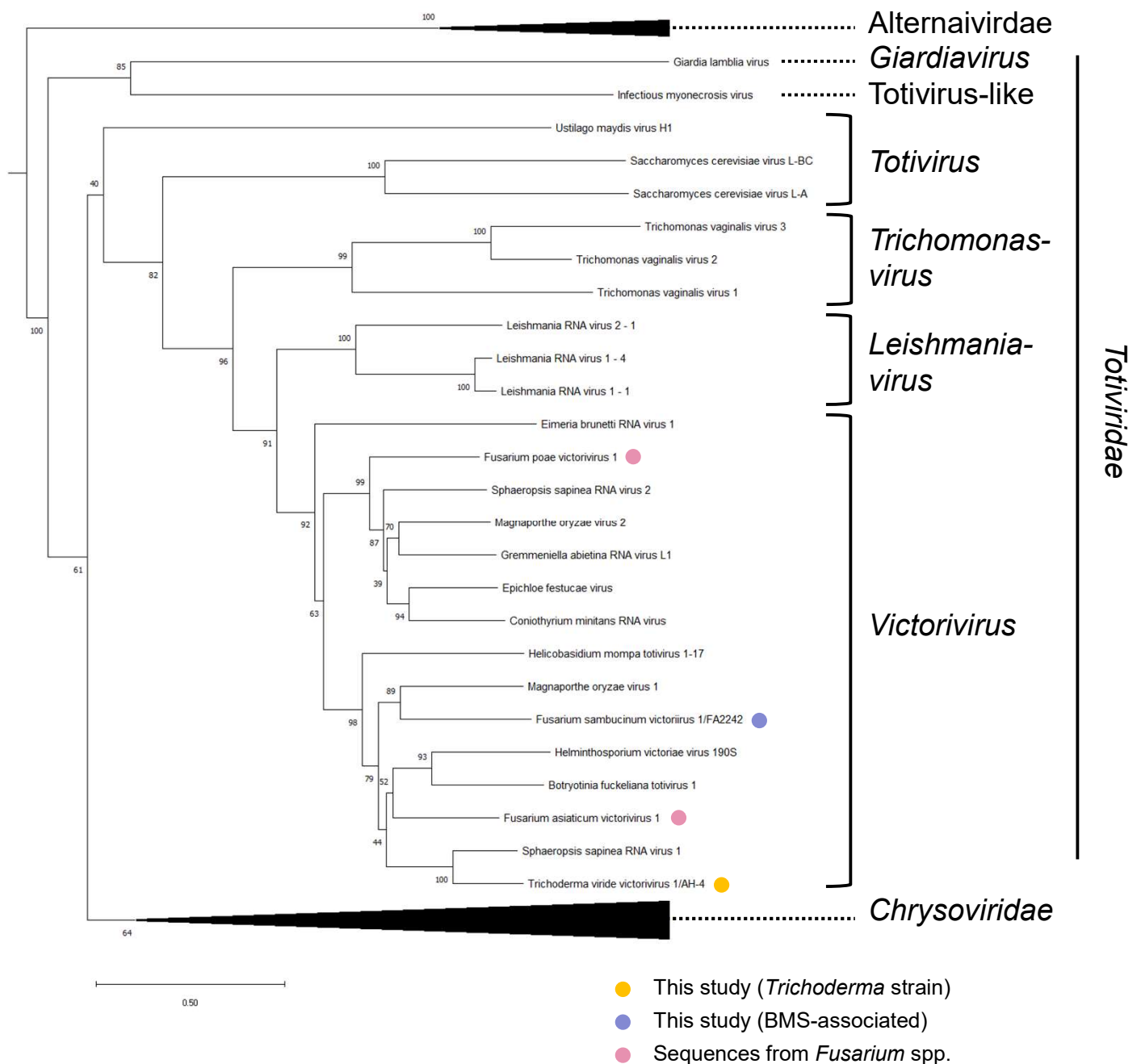
### 3-11. *Altenaviridae* 科 (未承認) ウイルス

配列解析の結果 Ep-96/25 株から FoxAV1 が、F8850 株から FsoAV1 及び FsoAV2 が検出された。BLASTX 解析及び保存された 5'-末端配列のマルチプルアライメントから FoxAV1 及び FsoAV1 は 3 分節の、FsoAV2



**Figure 1-25. Schematic diagrams of FsamVV1 and TvVV1 genomes.**

A white box indicates an ORF. Numbers above the boxes indicate start and stop nt position of the ORFs. A vertical line indicates a terminus determined by RLM-RACE or FLDS. Nucleotide sequences of overlap region of two ORFs are indicated above the genome. Colored boxes indicate the positions of functional domains; light blue: capsid protein and green: RNA dependent RNA polymerase. Pink lines below the white boxes indicate intrinsically disordered regions.

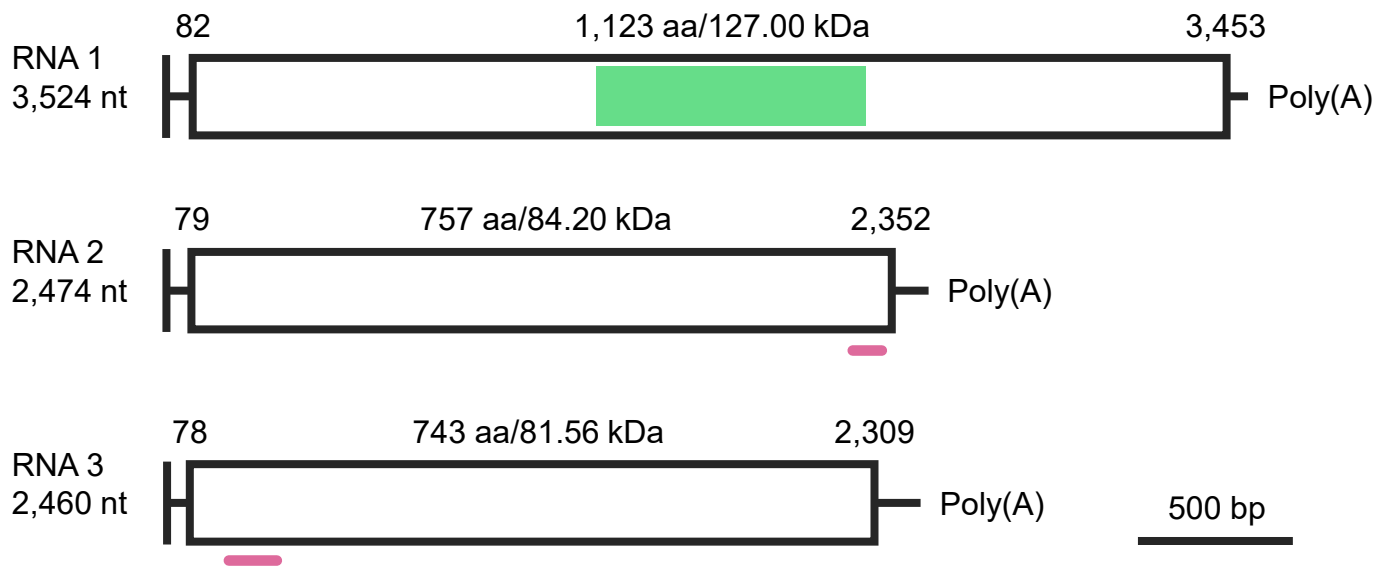


**Figure 1-26. Phylogenetic placements of FsamVV1 and TvVV1 based on the replicase sequences.**

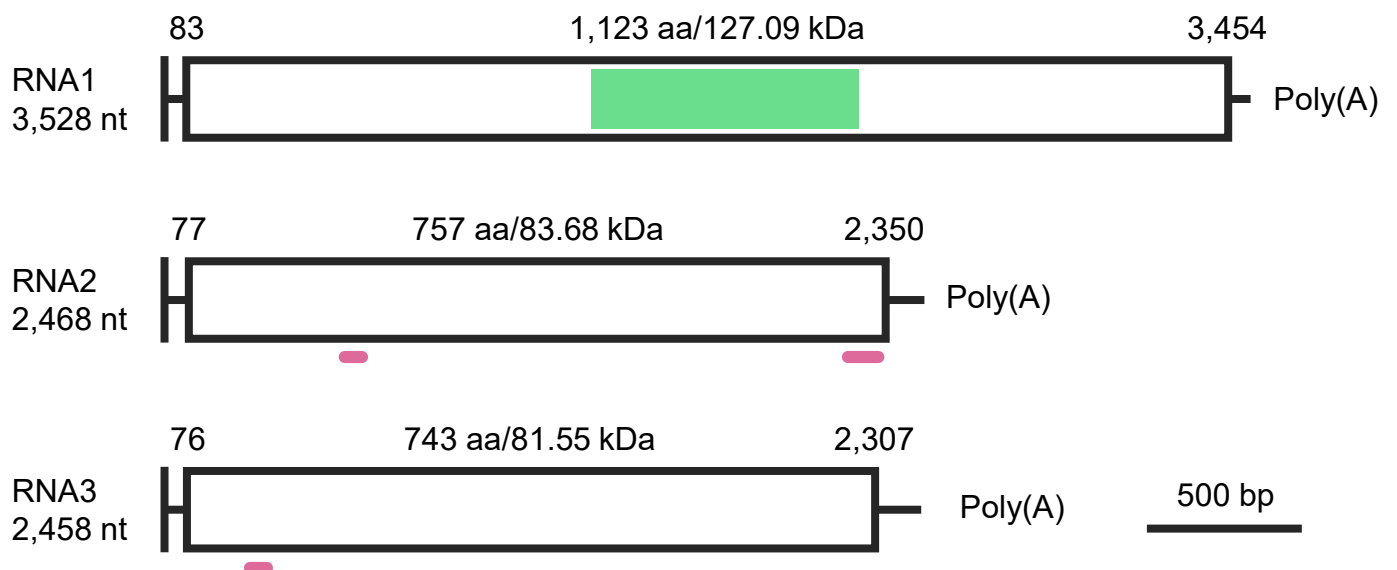
Neighbour-joining phylogenetic tree based on the multiple alignment of amino acid sequences of conserved RdRp domain predicted on the putative replicases of FsamVV1, TvVV1 and on other definitive and tentative members of the family *Totiviridae*. Members of *Chrysoviriidae* and *Alternaviridae* family were used as the outgroup. Bootstrap values obtained with 1,000 replicates are indicated on branches. Branch length corresponds to the genetic distance; the scale bar at the lower left corresponds to a genetic distance of 0.50.

は 5 分節のゲノムを有することが示唆された (Tables 1-9, 1-20, Figs. 1-10, 1-27)。各ウイルスに共通する性質として、RNA1 にコードされるタンパク質 (P1) にはいずれも RdRp の機能ドメインが予測されたが、RNA2 及び RNA3 のコードするタンパク質 (P2 及び P3) には機能ドメインは予測されなかった。FsoAV2 の RNA2 の中央部分の配列は得られておらず、何らかの機能ドメインがこの領域に予測される可能性がある。FsoAV2 は RNA1 - 3 に加え、2 つの分節ゲノム (RNA4 及び RNA5) を有すると推測された。これらはいずれも単一の ORF を有するが、RNA5 にコードされるタンパク質 (P5) 中央部付近に Znf モチーフが検出され、P5 が核酸あるいは他のタンパク質と相互作用することが示唆された (Fig. 1-27)。Alternaviridae 科ウイルス、及び近縁である Chrysoviridae 科、Totiviridae 科ウイルスの RdRp アミノ酸配列を用いた分子系統解析の結果、BLASTX 解析の結果と一致して FoxAV1 及び FsoAV1 は他の *Fusarium* 属菌を宿主とする Alternavirus 属のメンバーと共に独立した枝を形成した (Fig. 1-28)。一方で FsoAV2 は他の *Fusarium* 属菌を自然宿主とする Alternavirus とは異なり、*Aspergillus* 属菌から発見された Alternavirus と比較的近縁であることが示唆された (Fig. 1-28)。FiAV1、FgAV1 及び *Fusarium poae* alternavirus 1 (FpAV1) はそれぞれ RdRp のアミノ酸配列類似性が高く (Identity: 87.36% - 98.13%) これらのウイルス株を含むウイルス種として *Fusarium alternavirus* 1 (FAV1) が提唱されている (Zhang *et al.*, 2019)。BLASTX 解析及び分子系統解析の結果から FoxAV1 と FsoAV1 は共に FAV1 に属する異なるウイルス株であると推定された。また、FsoAV2 は FAV1 とは異なる系統に属する独立した種であることが示唆された。

## FoxAV1/Ep-96/25



## FsoAV1/F8850



**Figure 1-27. Schematic diagram of alternaviruses' genomes.**

A white box indicates an ORF. Numbers above the boxes indicate start and stop nt position of the ORFs. A vertical line indicates a terminus determined by RLM-RACE or FLDS. Colored boxes indicate the positions of functional domains; green: RNA dependent RNA polymerase, and light purple: zinc-finger domain. Colored lines below the white boxes indicate the areas of specific features; light blue: non-cytoplasmic region, light green: transmembrane region, dark purple: cytoplasmic region and pink: intrinsically disordered region.



FsoAV2/F8850

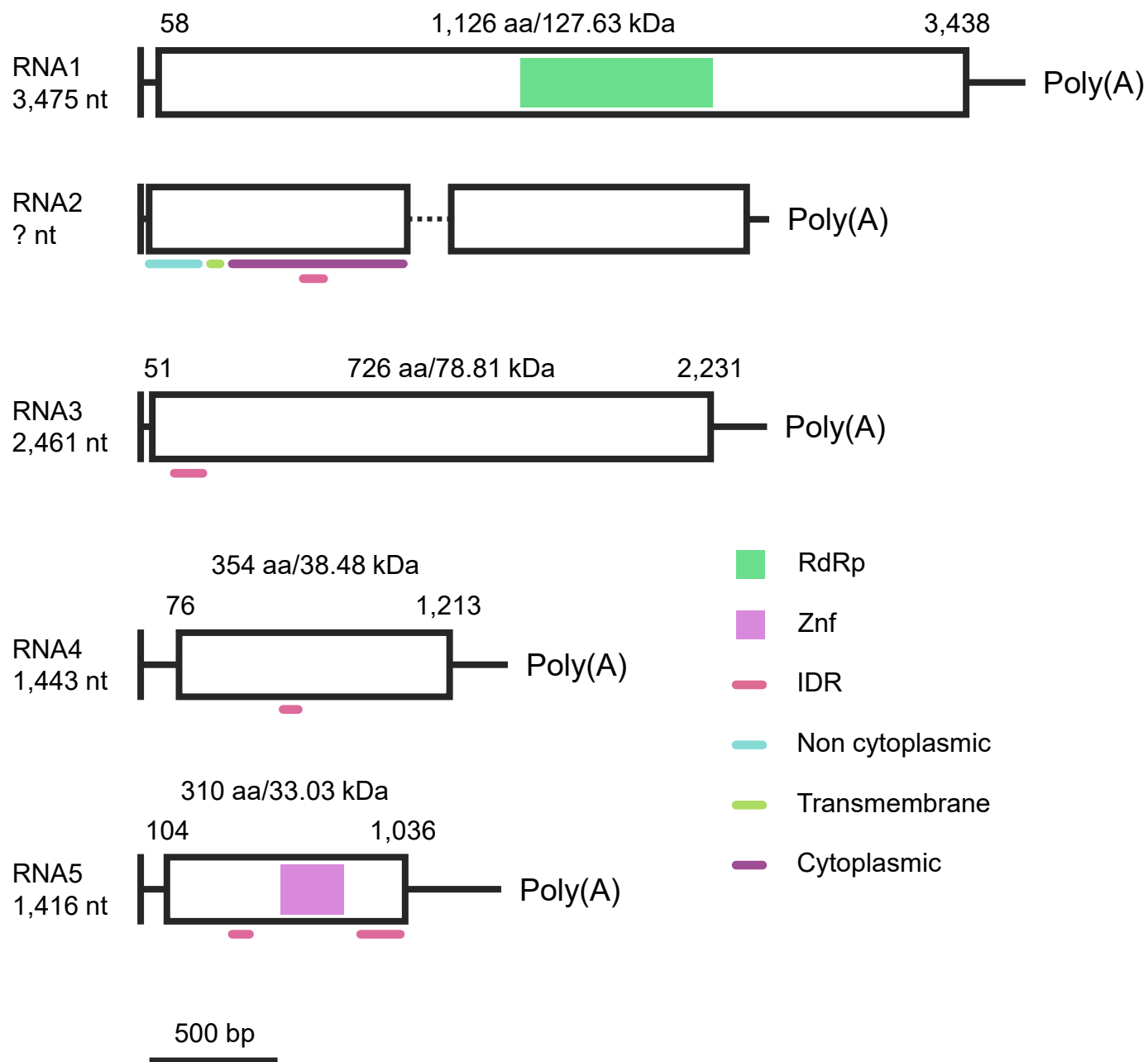
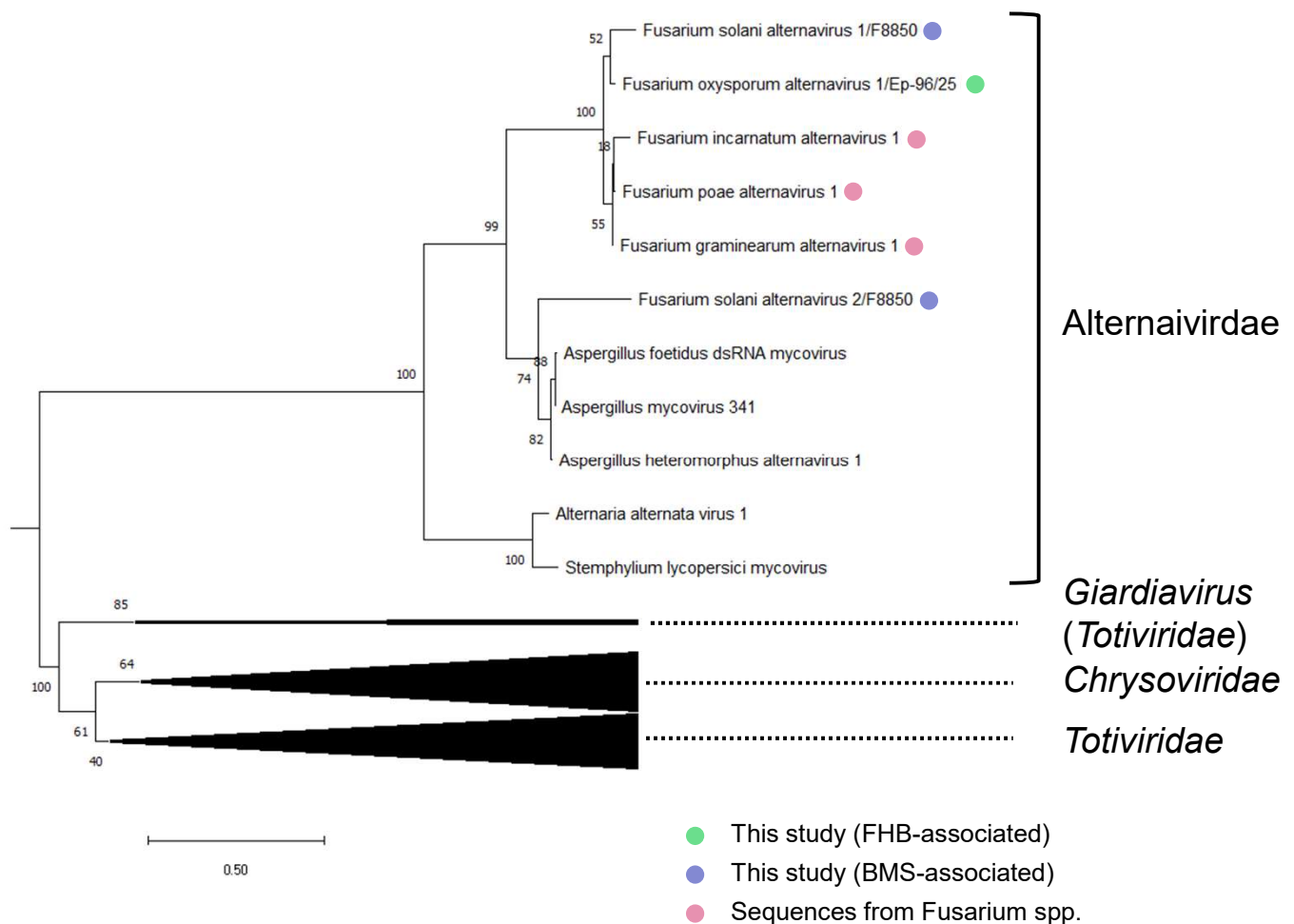


Figure 1-27. (continued)



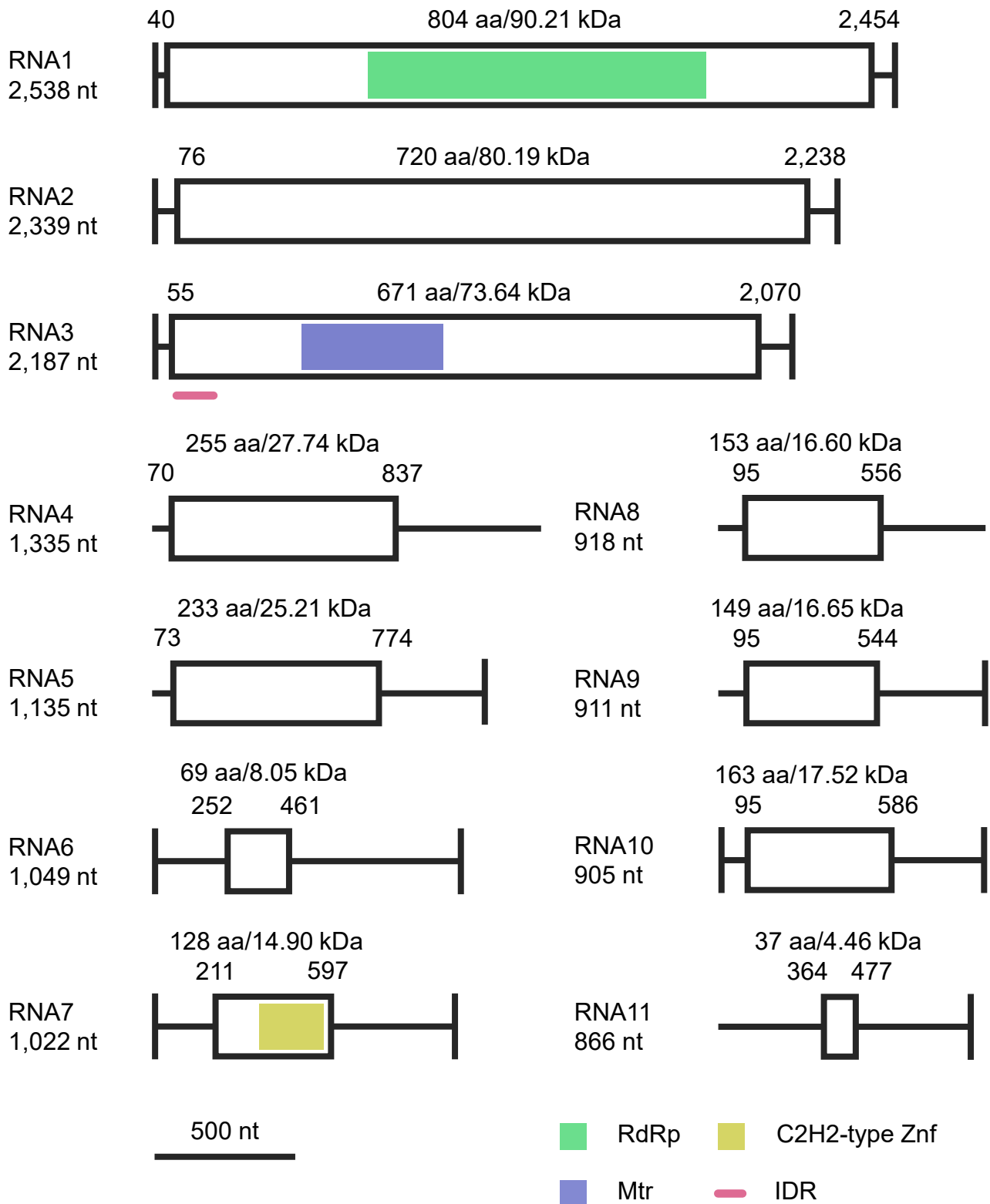
**Figure 1-28. Phylogenetic placements of Alternaviruses sequenced in this study based on the replicase sequences.**

Neighbour-joining phylogenetic tree based on the multiple alignment of amino acid sequences of conserved RdRp domain predicted on the putative replicases of FoxAV1, FsoAV1, FsoAV2, and on other putative members of the proposed family Alternaviridae. Members of *Chrysoviridae* and *Totiviridae* family were used as the outgroup. Bootstrap values obtained with 1,000 replicates are indicated on branches. Branch length corresponds to the genetic distance; the scale bar at the lower left corresponds to a genetic distance of 0.50.

### 3-12. Polymycoviridae 科（未承認）ウイルス

Ep-BL21 株、F6134 株及び F8924 株には多分節 RNA ゲノムを有する未分類ウイルス FoxHadV1、FsoPmV1 及び FeHadV1 が感染することが明らかとなった。RNA1-RNA3 は Polymycoviridae 科ウイルスの間で共通のセグメントであり、RNA1 には RdRp が、RNA2 には機能未知タンパク質が、RNA3 には Met がコードされる (Sato *et al.*, 2020a) (Fig. 1-29)。これらに加え、FsoPmV1 の RNA4 には Colletotrichum camelliae filamentous virus 1 (CcFV-1) の形成するひも状粒子から検出された推定 CP と類似性を示すタンパク質がコードされる (Jia *et al.*, 2017)。FsoPmV1 の RNA1-7 及び 9 は FrPmV1 の RNA1 - 8 と類似性を示したが、RNA8 は FsoPmV1 に特有の分節ゲノムであり、分子量 16.31 kDa の機能未知タンパク質をコードする (Fig. 1-29)。FoxHadV1 及び FeHadV1 及びは互いに近縁なウイルスであるが、有する分節ゲノムの数が異なっており、いずれもデータベース上に類似配列が存在しない分節 RNA を有する (Tables 1-9, 1-20)。また、FeHadV1 が感染する F8924 株には帰属不明の 4 本の推定ウイルス配列 (RNAS1 - S4) が検出されている。これらのウイルスに加え、データベース上で最も近縁なウイルスである HadV1 のすべての分節ゲノムの塩基配列を用いて系統解析を行った。その結果、FeHadV1 の推定分節ゲノム RNAS3 は FoxHadV1 の RNA8 と、RNAS4 は FoxHadV1 及び HadV1 の RNA11 と比較的類似した配列を有することが示された (Fig. 1-30)。また、BLASTX 解析により FeHadV1 の RNA8 は HadV1 の RNA9 と最大の類似性を示しており、RNAS1、RNAS2 は FoxHadV1 及び HadV1 の RNA9、RNA10、FeHadV1 の RNA8 と共に 1 つのクレードを形成した。以上から、RNAS1 及び RNAS2 は RNA8 に変異が蓄積することで生じた派生的セグメントである可能性

## FoxHadV1/Ep-BL21



**Figure 1-29. Schematic diagram of FoxHadV1, FsoPmV1, and FeHadV1's genomes.**

A white box indicates an ORF. Numbers above the boxes indicate start and stop nt position of the ORFs. A vertical line indicates a terminus determined by RLM-RACE or FLDS. Colored boxes indicate the positions of functional domains; green: RNA dependent RNA polymerase, blue: methyltransferase, and beige: zinc-finger domain. Colored lines below the white boxes indicate the areas of specific features; yellow: signal peptide, light blue: non-cytoplasmic region, and pink: intrinsically disordered region.

# FsoPmV1/F6134

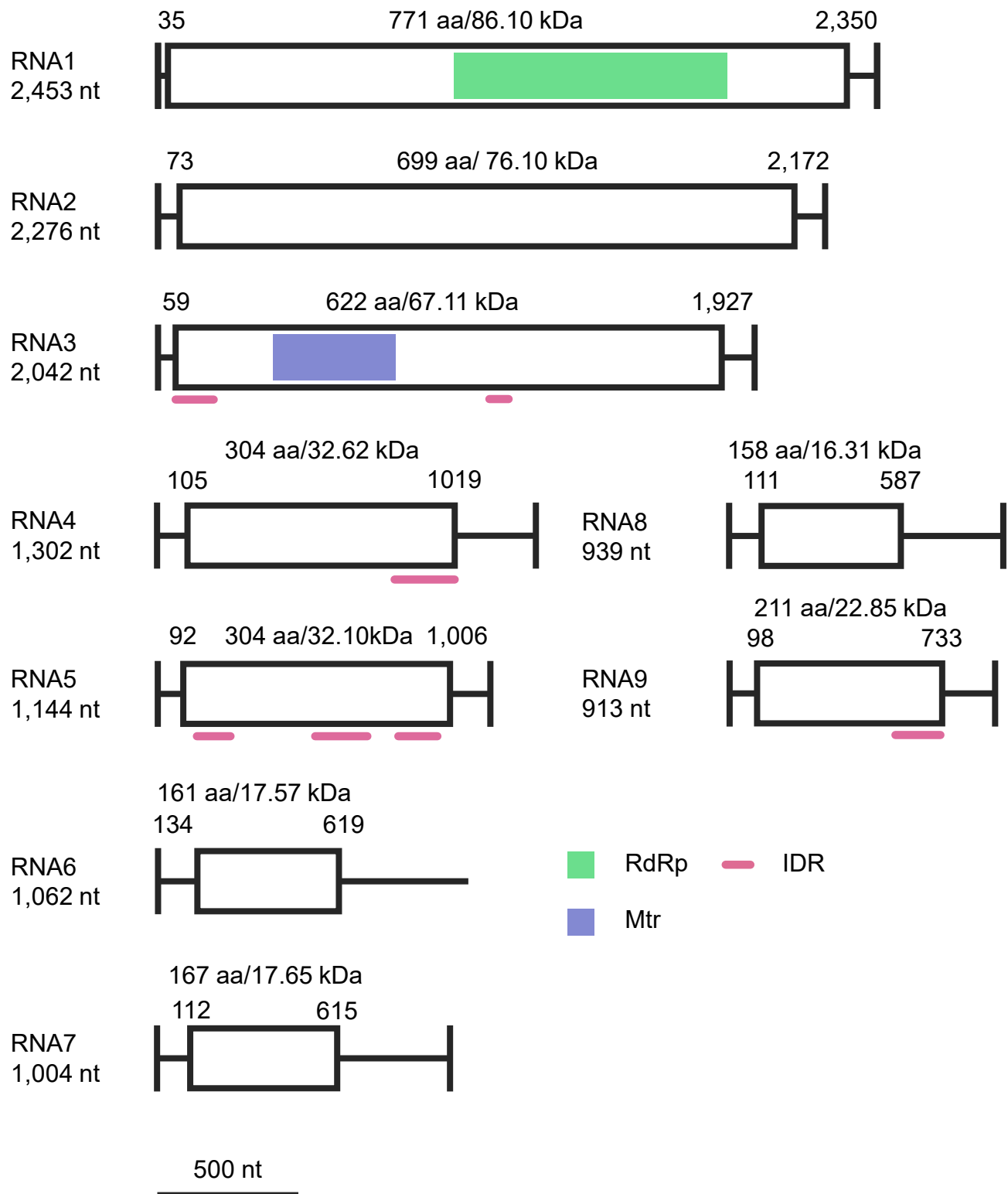


Figure 1-29. (continued)

## FeHadV1/F8924

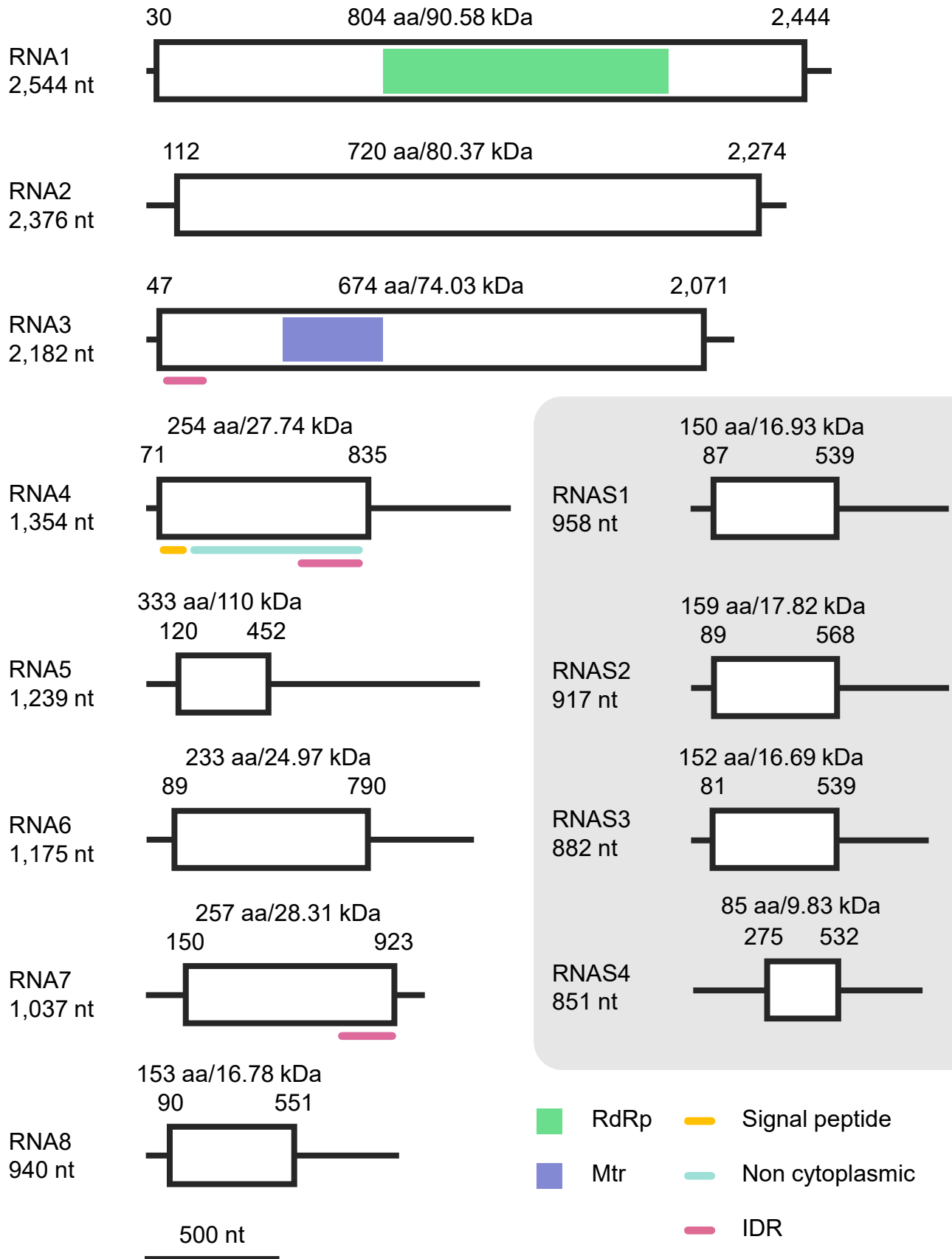
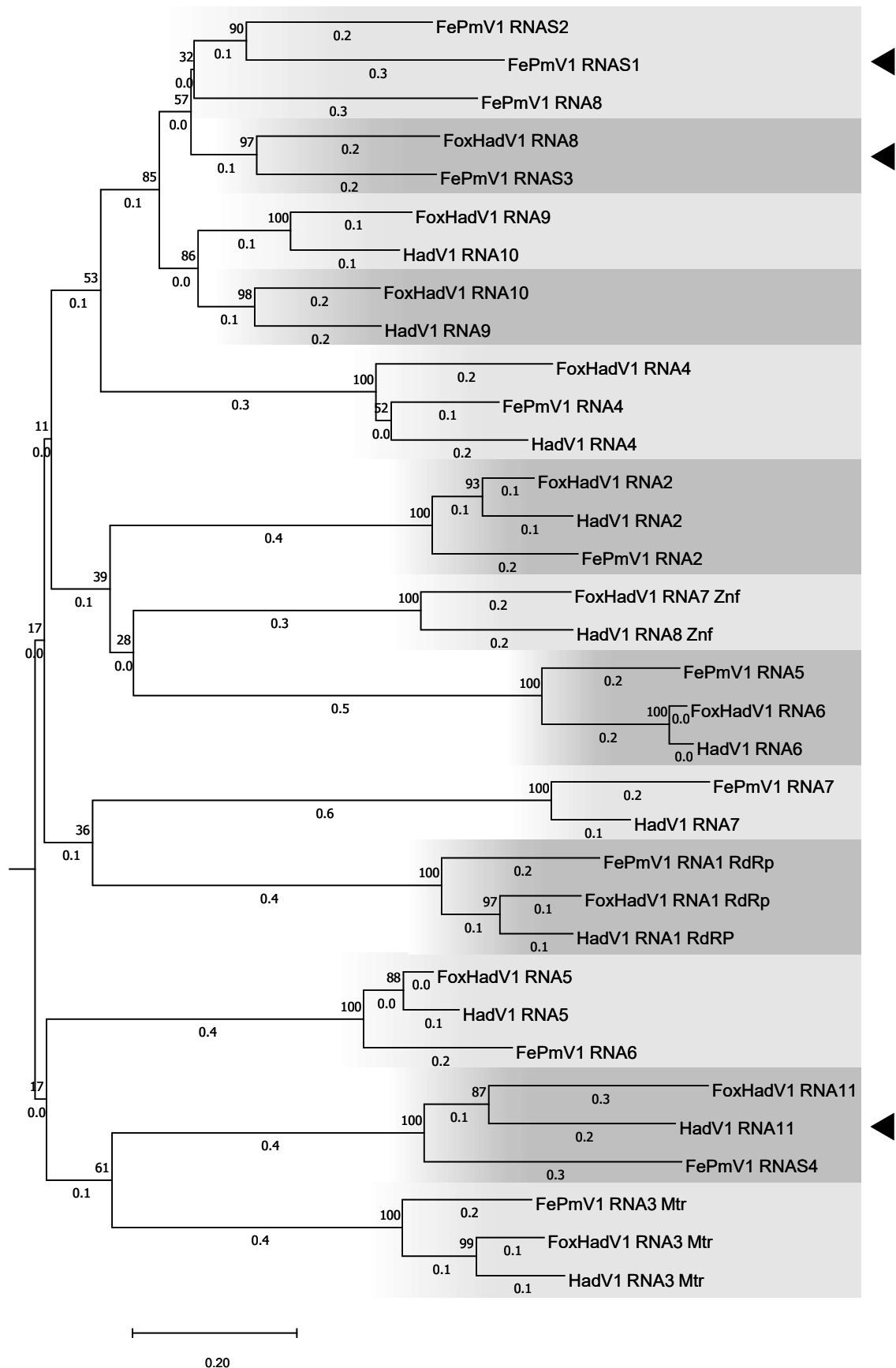


Figure 1-29. (continued)



**Figure 1-30. Phylogenetic analysis of nucleotide sequences of hadakaviruses' genomic segments.**

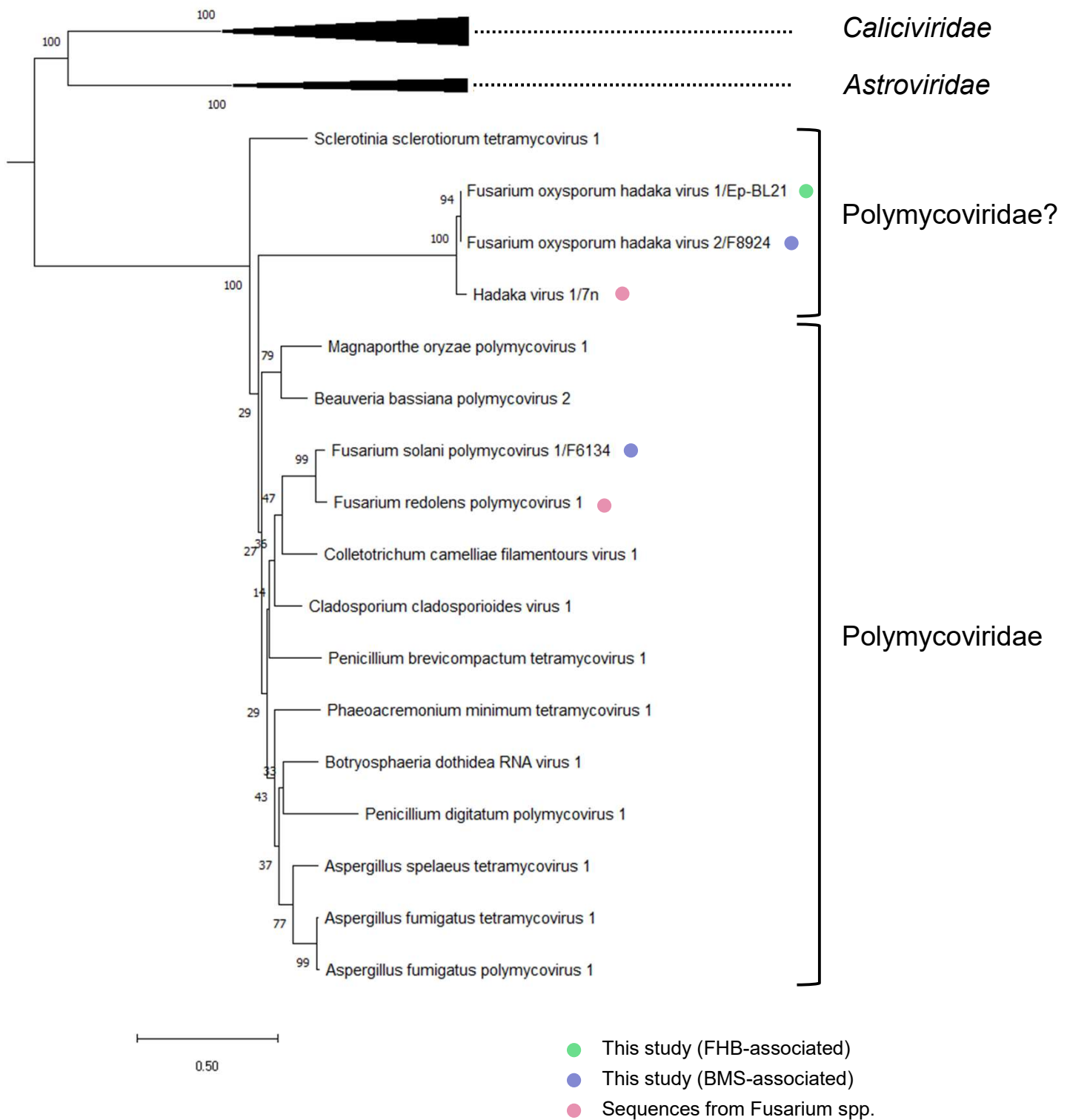
A triangle indicates a clade which consists of FeHadV1 accessory RNA segment(s).

が示された (Table 1-20 and Fig. 1-30)。しかし、RNAS1 - S4 が FeHadV1 のゲノムであるかを決定するには実験的な検証が必要である。Polymycoviridae 科ウイルス、比較的近縁な *Astroviridae* 科、*Caliciviridae* 科の RdRp アミノ酸配列を用いた分子系統解析により、FsoPmV1 は Polymycoviridae 科の内部に、FoxHadV1 及び FeHadV1 は Polymycoviridae 科の外部に推定新規分類群として位置することが明らかとなった (Fig. 1-31)。この結果は BLASTX 解析の結果と一致しており、FsoPmV1 が Polymycoviridae 科のメンバーであると推定された。また、FoxHadV1 及び FeHadV1 は HadV1 を含む Polymycoviridae 科に近縁だが独立した単系統に属すると推定された。

### 3-13. Umbra-like ウイルス

*Tombusviridae* 科には現在 16 のウイルス属が含まれるが、近年、本ウイルス科の *Umbravirus* 属に近縁な未承認ウイルスが複数報告されており、Umbra-like ウイルスと総称されている (Cañizares *et al.*, 2018; Tahir *et al.*, 2021)。*Tombusviridae* 科ウイルスは植物を自然宿主としており、長さ 3.7 - 4.8 kb の単分節+ssRNA ゲノム上に 4 つの ORF を有する (Rochon *et al.*, 2009)。これらの ORF には RdRp、CP、MP、RNA サイレンシングサプレッサーがコードされているが、*Umbravirus* は CP 及び RNA サイレンシングサプレッサーを欠いており、他のウイルスのタンパク質と類似性のないタンパク質をコードする ORF(ORF4)を有する。Umbra-like ウイルスは無脊椎動物や菌類から発見されており、CP、MP、RNA サイレンシングサプレッサー、及び *Umbravirus* の ORF4 にコードされるタンパク質のいずれももたず、機能未知タンパク質と RdRp をコードする 2 つの ORF のみを有する (Cañizares *et al.*, 2018)。配列解析の





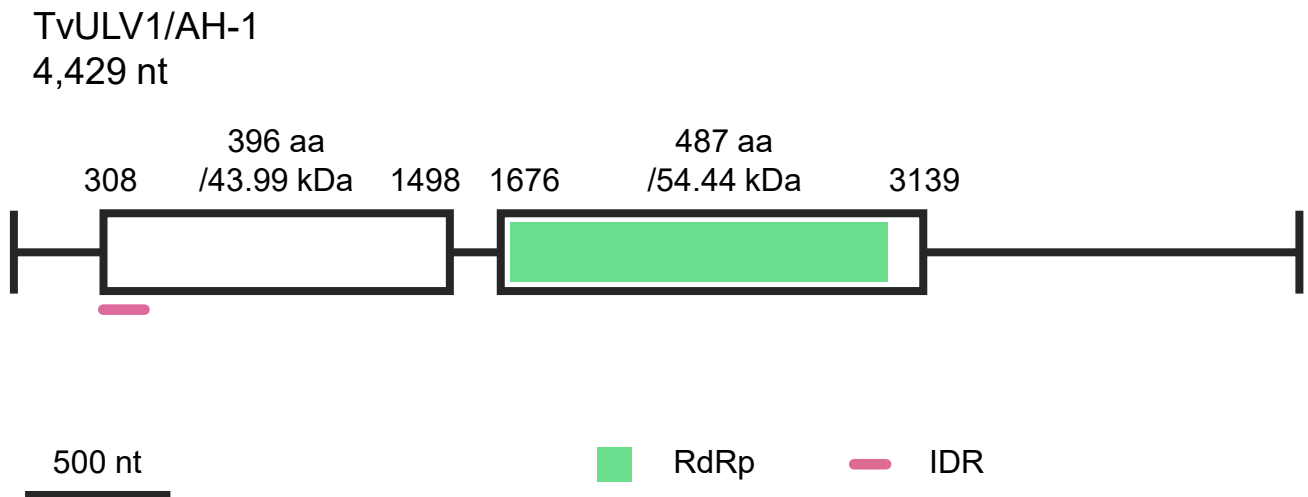
**Figure 1-31. Phylogenetic placements of FoxHadV1, FsoPmV1, and FeHadV1 based on the replicase sequences.**

Neighbour-joining phylogenetic tree based on the multiple alignment of amino acid sequences of conserved RdRp domain predicted on the putative replicases of FoxHadV1, FsoPmV1, FeHadV1, and on other putative members of the proposed family Polymyoviridae. Members of *Astroviridae* and *Caliciviridae* family were used as the outgroup. Bootstrap values obtained with 1,000 replicates are indicated on branches. Branch length corresponds to the genetic distance; the scale bar at the lower left corresponds to a genetic distance of 0.50.

結果から、AH-1 株から *Umbravirus* 属に近縁な未分類ウイルスである TvULV1 が検出された。本ウイルスは全長 4,429 nt のゲノム上に 2 つの ORF をタンデムにもつ。ORF 予測及びタンパク質機能予測から、他の Umbra-like ウイルス同様、5'-末端側の ORF は機能未知タンパク質を、3'-末端側の ORF は RdRp をコードすると推測された (Fig. 1-32)。TvULV1 とその近縁ウイルス、及び *Umbravirus* 属と *Tombusviridae* 科メンバーの RdRp アミノ酸配列を基に分子系統解析を行った結果、TvULV1 は菌類を宿主とするウイルスと共に *Umbravirus* 属、*Tombusviridae* 科から独立した枝を形成する新奇分類群に属することが示唆された (Fig. 1-33)。

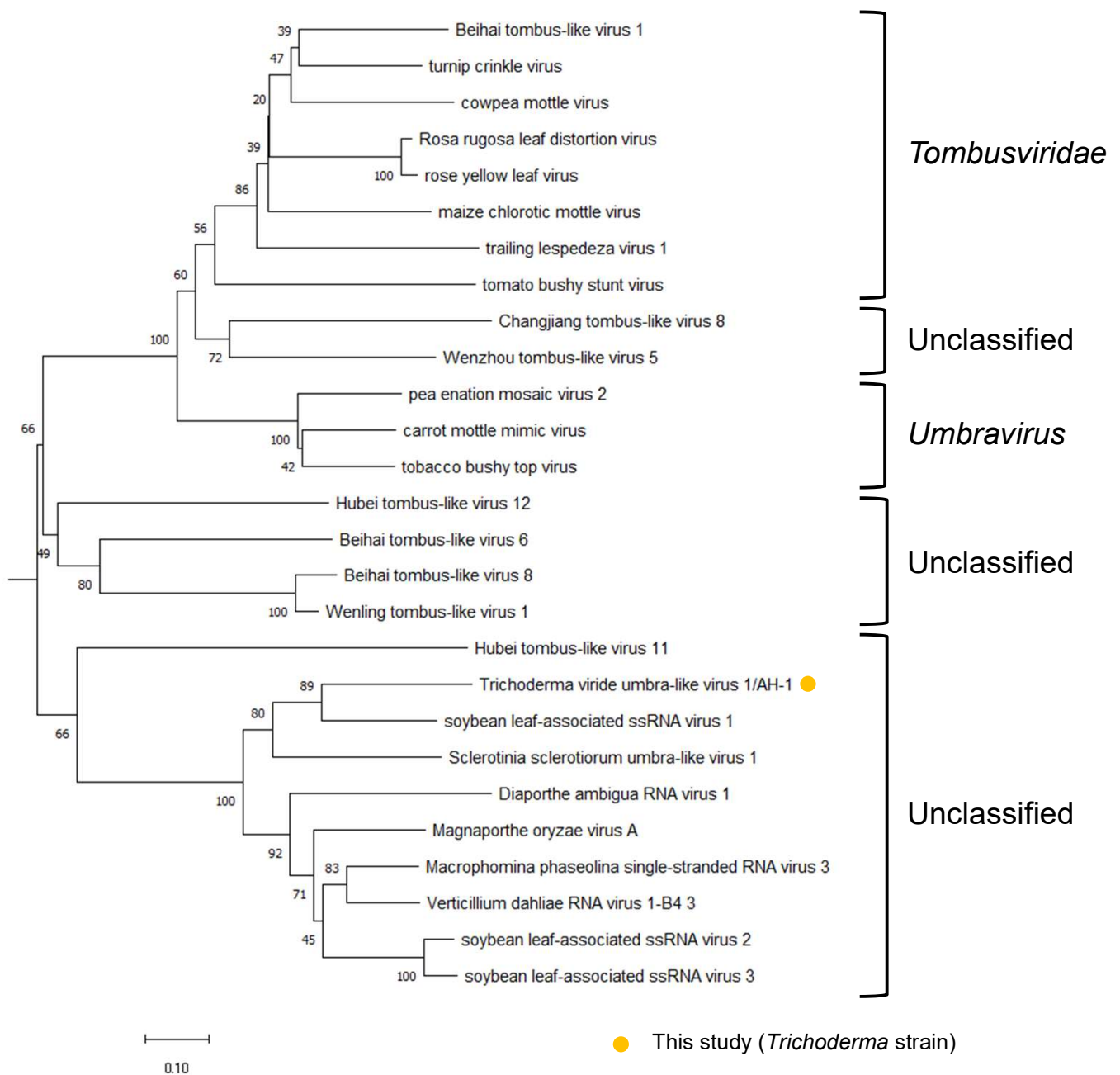
### 3-14. Phenui-like ウイルス

*Phenuiviridae* 科は多分節-ssRNA ウイルスを含む分類群であるが、これと近縁な未承認ウイルス分類群の存在が知られており、Phenui-like ウイルスと総称されている (Diaz-Lara *et al.*, 2019; Navarro *et al.*, 2018)。これらの内の 3 つのグループに関しては正式なウイルス分類群 (*Coguvirus* 属、*Laulavirus* 属、*Rubodvirus* 属) として ICTV に承認されている (Walker *et al.*, 2020)。AH-1 株から検出された TvPLV1 はサイズの大きく異なる 2 つの分節ゲノム (RNA1: 7,759 nt 及び RNA2: 2,671 nt) を有する (Fig. 1-34A)。Phenuiviridae 科ウイルスは一例を除き 3 分節ゲノムを有するが、このうち糖タンパク質をコードするセグメント (M segment) に相当する配列は AH-1 株からは検出されなかった (Lin *et al.*, 2019) (Table 1-18)。末端配列のアライメント解析により、RNA1 及び RNA2 の 5'-、3'-両末端には、Phenuiviridine 科ウイルス間でよく保存された配列 (5'- ACACA – UGUGU -3') が検出された (Diaz-Lara *et al.*, 2019) (Fig. 1-34B)。両末端は一般的な-ssRNA ウイルス同様互いに相補的な



**Figure 1-32. Schematic diagram of TvULV1 genome.**

A white box indicates an ORF. Numbers above the boxes indicate start and stop nt position of the ORFs. A vertical line indicates a terminus determined by FLDS. A green box indicate the positions RNA dependent RNA polymerase. A pink line under the white box indicate the areas of intrinsically disordered region.

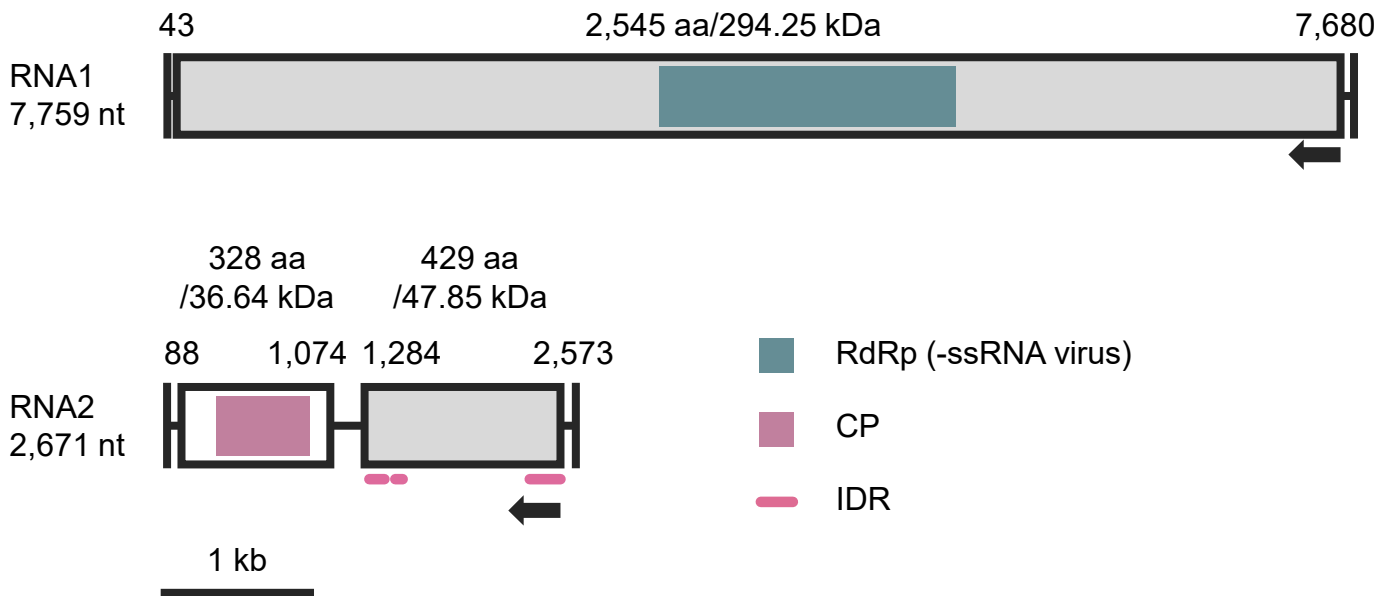


**Figure 1-33. Phylogenetic placements of TvULV1 based on the replicase sequences.**

Neighbour-joining phylogenetic tree based on the multiple alignment of amino acid sequences of conserved RdRp domain predicted on the putative replicases of TvULV1, related sequences, and on the definitive and tentative family *Tombusviridae* and genus *Umbravirus*. Bootstrap values obtained with 1,000 replicates are indicated on branches. Branch length corresponds to the genetic distance; the scale bar at the lower left corresponds to a genetic distance of 0.10.

A

TvPLV1/AH-1



B

RNA1 5' - ACACAAAGACGUCUAGGCUUAAAGCAC.....CUUUUGUUUAGCCUAGACUCUUUGUGU -3'

RNA2 5' - ACACAAAGAUUCCAAAGGAGAAACGAA.....ACGUUGUAUCCUUUGGACUCUUUGUGU -3'

\*\*\*\*\*. . \* \* \* \* \* . \*\*\*\*\*

C

RNA1

5' - ACACAAAGACGUCUAGGCUUAA - AGCAC )

3' - UGUGUUUCU - CAGAUCCGAUUUGUUUC )

\*\*\*\*\* \*\*\*\*\* \*\* \* . \*

RNA2

5' - ACACAAAGAUUCCAAAGGAGAAACGAA )

3' - UGUGUUUCU CAGGUUCCUAUGUUGCA )

\*\*\*\*\* \*\*\*\*\* \* \* .

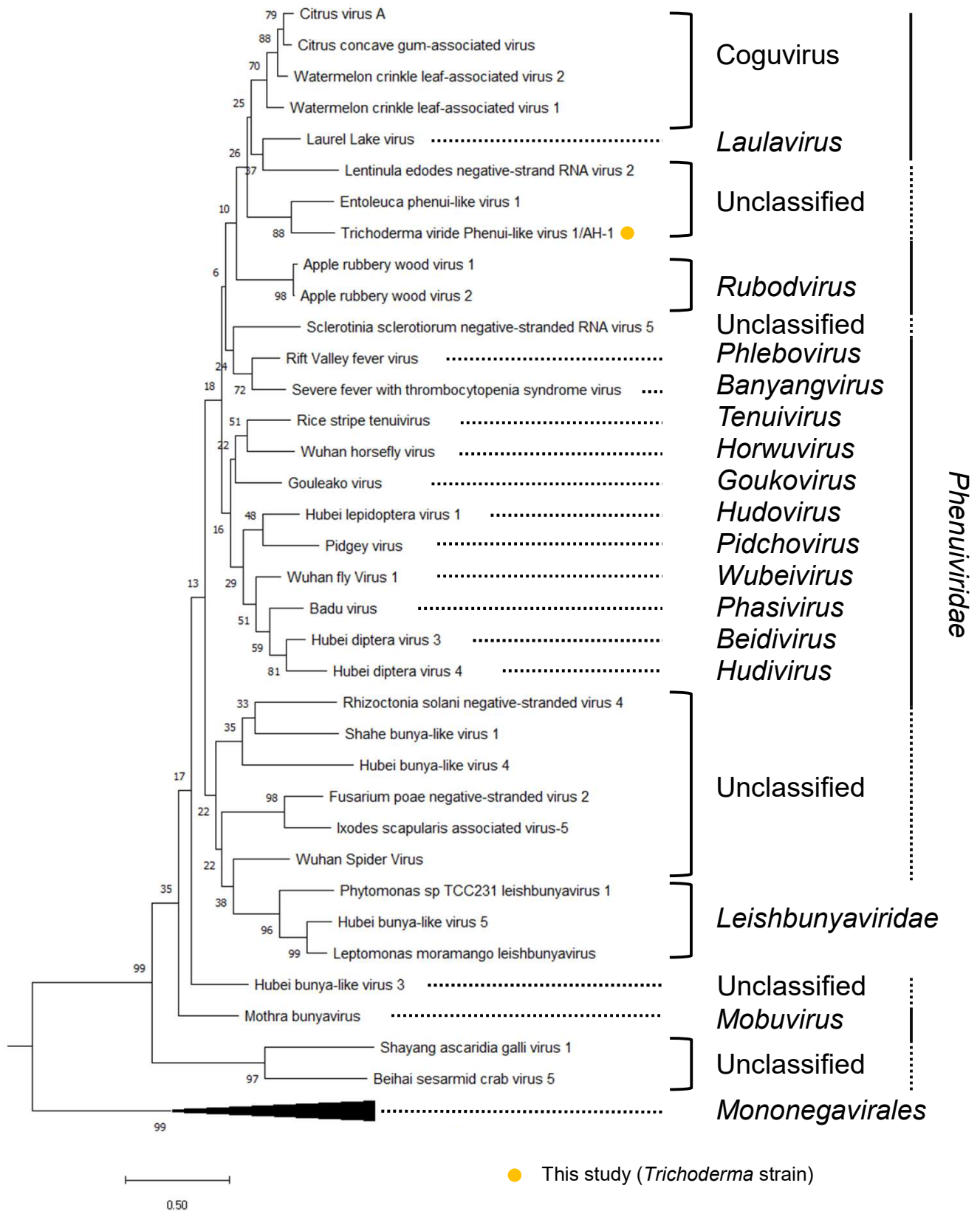
**Figure 1-34. Schematic diagram of TvPLV1 genome and an alignment of their terminal sequences.**

(A) A white box indicates an ORF encoded by the negative strand, and gray boxes indicate ORFs encoded by the sense strand. A vertical line indicates a terminus determined by FLDS. Numbers above the boxes indicate start and stop nt position of the ORFs. An arrow indicates the direction of the ORF. Colored boxes indicate the positions of functional domains; dark blue: RNA dependent RNA polymerase and purple: capsid protein. A pink line under the white box indicate the areas of intrinsically disordered region. (B) Identical nucleotide positions are highlighted by asterisks. Highly conserved nucleotide positions are highlighted by periods. (C) Prediction of panhandle structures formed by the 5' and 3' termini of TvPLV1.

配列であり、ゲノムの両末端の対合が示唆された (Fig. 1-34C)。TvPLV1 の RNA1 にはゲノムのほぼ全長にわたる大きな単一の ORF が座上し、RdRp ドメインを有するタンパク質をコードする。RNA2 には内向きの 2 つの ORF が座上し、それぞれ CP と移行タンパク質 (Movement protein: MP) をコードすると推定された。TvPLV1 とその近縁ウイルス、及び *Phenuiviridae* 科、*Leishbunyaviridae* 科、*Bunyavirales* 目ウイルスの RdRp アミノ酸配列を基に分子系統解析を行った結果、TvPLV1 が形成する枝は *Coguvirus* 属、*Rubodvirus* 属及び *Laulavirus* 属に近縁であることが明らかとなった (Fig. 1-35)。

### 3-15. Ambivirus

F8850 株から検出された環状配列 (FsoAmV1) は既存のいかなるウイルス配列とも類似性を示さない、Ambivirus と呼ばれるウイルス様配列と低い類似性を示すことが明らかとなった (Table 1-20)。Ambivirus はいずれも環状構造の RNA 上に逆向きの 2 つの ORF を有することが報告されている (Forgia *et al.*, 2021; Sutela *et al.*, 2020)。コードされるタンパク質からはウイルスの複製に必須である RdRp の機能ドメインが検出されないが、2 つの ORF の内の一方にコードされるタンパク質からは共通して RdRp コアモチーフの 3 アミノ酸配列 (GDD) が見出されている。また、宿主の DNA を鋳型とした PCR で検出されず、Northern blot 解析により+鎖及び-鎖の両方が検出されることから、ウイルスであると考えられている (Forgia *et al.*, 2021; Sutela *et al.*, 2020)。FsoAmV1 もこの報告と一致して機能未知タンパク質をコードする逆向きの 2 つの ORF が推測され、そのうちの一方は GDD モチーフを有するタンパク質をコードすることが明らかとなった (Fig. 1-36)。この結果から、

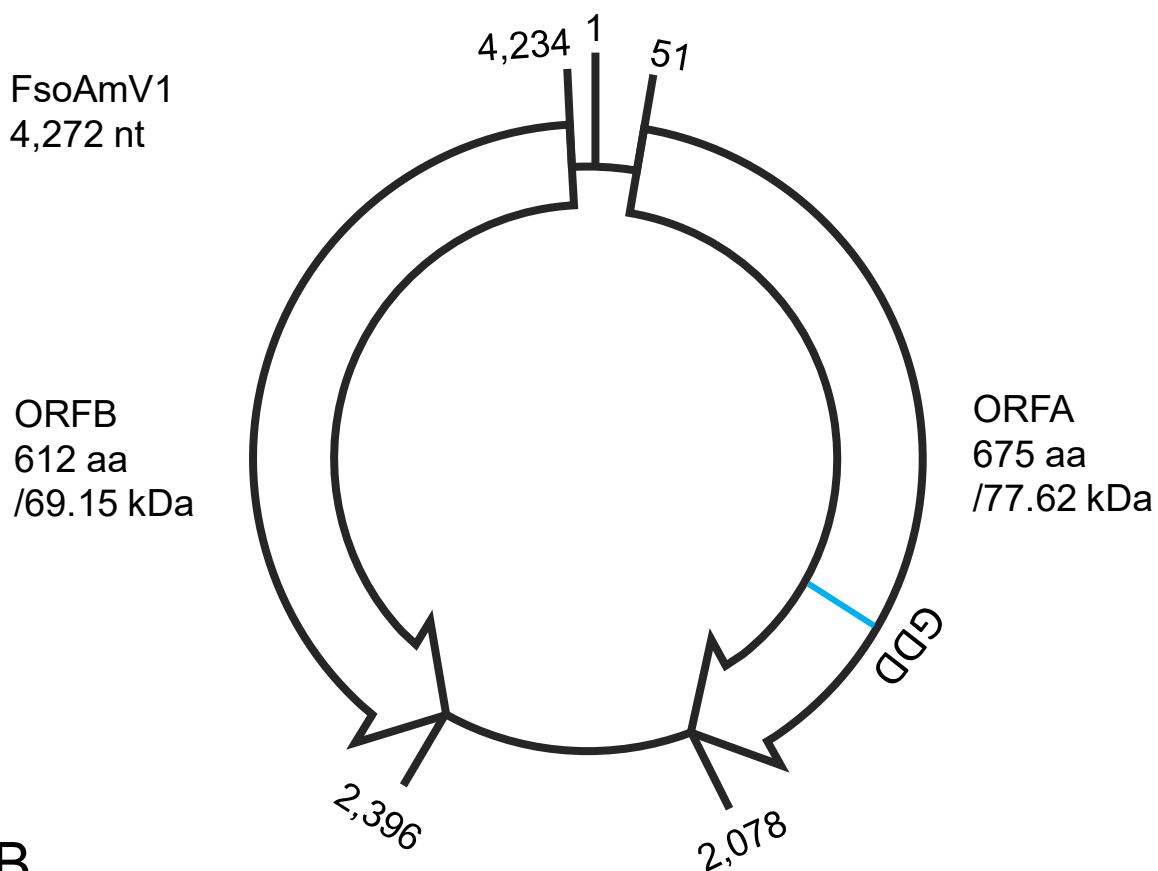


**Figure 1-35. Phylogenetic placements of TvPLV1 based on the replicase sequences.**

Neighbour-joining phylogenetic tree based on the multiple alignment of amino acid sequences of conserved RdRp domain predicted on the putative replicases of TvPLV1, related sequences, and on the definitive and tentative family *Phenuiviridae* and *Leishbunyaviridae*. Members of *Mononegavirales* order were used as the outgroup. Viruses of *Phenuiviridae* are highlighted by vertical lines and unclassified “phenui-like” viruses were highlighted by vertical dashed lines. Bootstrap values obtained with 1,000 replicates are indicated on branches. Branch length corresponds to the genetic distance; the scale bar at the lower left corresponds to a genetic distance of 0.50.



A



B

FsoAmV1	SLERLGI-----NLVLRHSIAGFLGVYGNLITCTIPHGICLMTLYGNLITCTIPHGICLMTLDTLMK-QWCAGDDAGTL-----AKNDVHFDNDVNLNMLSIQSVQWEKLFKRGE
RsaV1	SYERFPGFDK-----DVISEHARASMLGIFGNLMSCTLAHGIAVAQT-----VETPDE-LNVAGDDAAVA-----ENVEDPFLTDYAIR-----SVGEYERSKTFYGDE
RsaV2	TYDRVSKKLKWLSTDTHPRQYTASMLGIFGNLMSCTFEHAAIMGQC-----IEDETQ-GGVAGDDGHILA-----EDEHNEHYIRCSAC-----AIGVYEESKCFNTLE
TuAmV1	SYERFYKSQK-----GFRHAHHYAGMLGVYGNLITCTIPHGICLMTLYGNLITCTIPHGICLMTLDTLMK-QWCAGDDAGTL-----AKNDVHFDNDVNLNMLSIQSVQWEKLFKRGE
TuAmV2	SWRRFDSEFK-----HIPRYHHAGCLGVFGNMLSTVVHNLILA-----TGDMKI-FNVAGDDGAIAT-----TDPDMEHDLSPAIV-----HMGRDQDPRFRSDE
TuAmV3	SVERIDKHL-----DRVFMGGGGCLGKGNIVLSTSLHGLALADL-----TNTVHN-DCVIGDDALTQ-----VLLQLIAVFIACVN-----NLGDINSTK-FSMIK
CeAmV1	DVSRLLLETFS-W---VPYKQLRSGMLGVQGNIGLSTLLHGIHISRF-----SGGLHKFTCCVGGDCLTR-----VAEKHYDAFVSHVN-----ILGSIQEER-FTQWE
TuAmV4	DVSRLLKEDLF-W---VPSYHQLRSGMLGIGQNTIGLSTLLHGIHISRF-----ADGHMH-ICCVGGDCLDR-----VHRDQYTEYIQHVN-----ILGEISPD-FTTWV
CpaV1	DASRVLQSSA-----GTTLLQHTCGMLGVEGNIFATLLHGIHLRFI-----AGLNR-SRCVGGDARMHHRVPFGIMDNTETDYLAWL-----AGCGDLSKEK-MGKFE
	*. . . . . ** : ** : . * * : . . . . . *** . . . . . *
FsoAmV1	L-----DAVVALKQLVKLP-----NLLALQPNILFPFSSLFK-DD
RsaV1	V-----GAIALKRPIHIEGDR-----PVMS-VNIVPPSLTMTLH-QL
RsaV2	P-----PCISLKRPIITQVPS-----TILIAQGMPIPPSFHLKRLLQP
TuAmV1	P-----GCICLKRSLSVPEGS-----IHPQHGVRIIPPSLYTIVH-HGF
TuAmV2	P-----GAICLKRPIWQDEDFRIYPILKQGVSIIPPSLSNLS-HGF
TuAmV3	P-----RSVDPLGETNFKFTKRPLSLDIY-----SVPVLGGDLFFDFASVLY-----
TuAmV4	YAPYLNDWETELKPDGYQTFPFCKRPTLDIDYFG-----NVFTE-QLPPFPNLAAPV-----
CeAmV1	CPPGYEEEEQFTGED-----ETFPFCKRPTLINAFG-----EVETE-YLPPFPNVAALL-----
TuAmV4	CPPGYEEEEQFTGED-----ETFPFCKRPTLINAFG-----EVETE-YLPPFPNVAALL-----
CpaV1	S-----GVDSEL-QAYRYIKRPIHRDG-----SIMIEGILLTLPSIIPLL-----
	. . . . . ** . . . . . *

**Figure 1-36. Schematic diagram of FsoAmV1 genome and a multiple alignment of putative replicases encoded by FsoAmV1 and related sequences.**

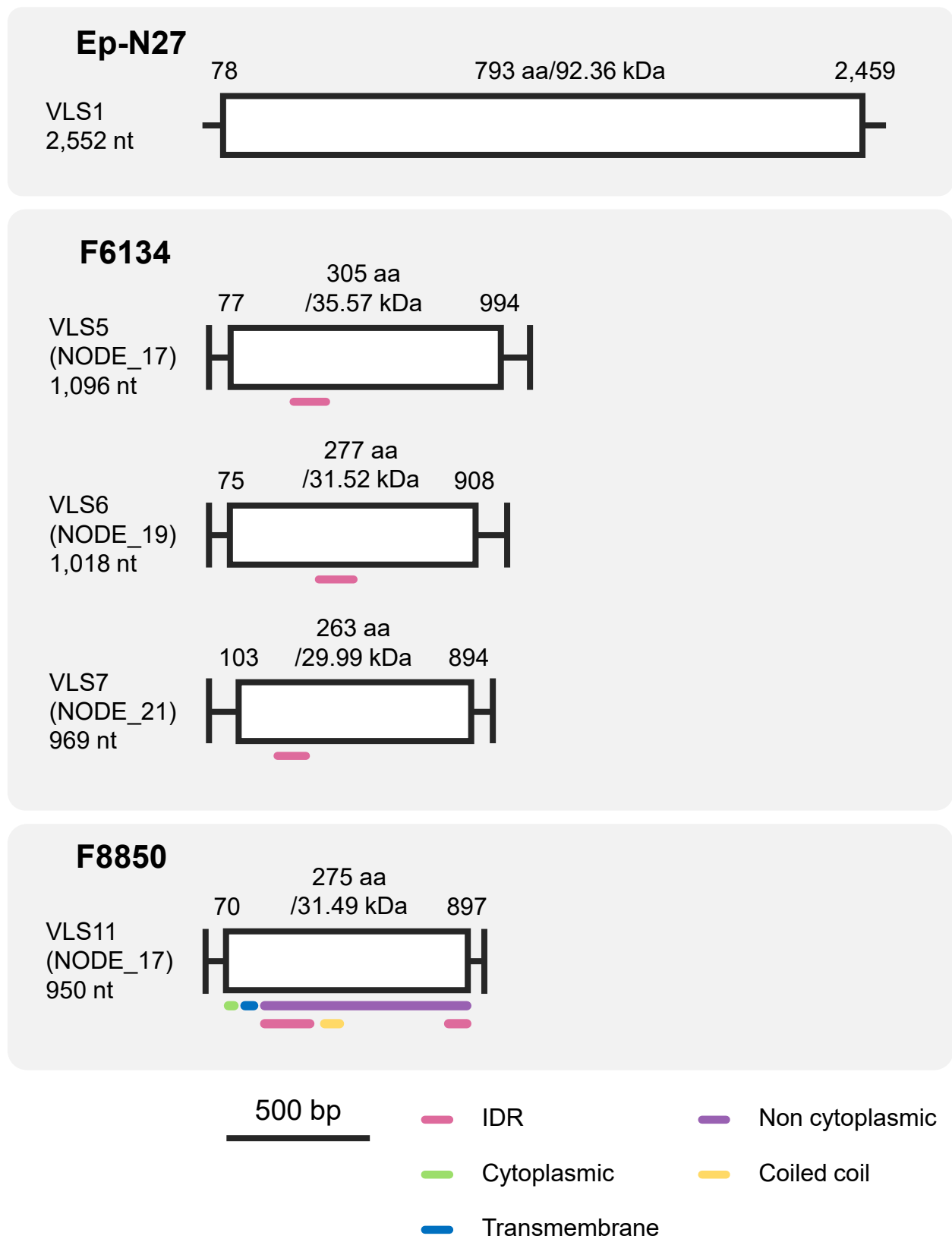
(A) A white box indicates an ORF. Numbers above the boxes indicate start and stop nt position of the ORFs. (B) Identical nucleotide positions are highlighted by asterisks. Highly conserved and relatively conserved nucleotide positions are highlighted by colons and periods, respectively. Conserved “GDD” triplets are highlighted by a blue box.



FsoAmV1 と既報の Ambivirus との類縁性が示された。

### 3-16. ウイルス様配列 (VLSs)

Ep-N27 株、F6134 株及び F8850 株からは帰属不明のウイルス様配列 (VLS1 - 15) が検出された。これらは共通してウイルス配列と同等の平均カバレッジ値を示すが、NCBI データベース上に類似性を示す配列が検出されないことから、サテライト RNA (satRNA) であると推測された。satRNA は同一細胞内に感染するウイルス (ヘルパーウイルス) にその複製を依存する RNA 分子であり、220 nt から約 1.5 kb のものが知られている。多くの場合 satRNA はヘルパーウイルスとの配列類似性を示さず、ORF も持たない (Wang and Smith, 2016)。これらのうち VLS1、5-7、11 にはゲノムの大部分を占める ORF が座上する (Fig. 1-37)。コードされる推定タンパク質はいずれも機能未知であるが、VLS5 - 7 及び 11 にコードされるタンパク質には共通して天然変性領域 (IDR) が存在する。また VLS11 にコードされるタンパク質は膜貫通領域を有しており、非細胞質領域側にはコイルドコイル構造が予測された。上記の Ambivirus とは異なり、ウイルスの RdRp コアモチーフとして知られる GDD、SDD、GDNQ などの配列はこれらのタンパク質からは見出されず、複製能力の有無は不明である。



**Figure 1-37. Schematic diagram of sequence structures of virus-like sequences.**

A white box indicates an ORF. Numbers above the boxes indicate start and stop nt position of the ORFs. A vertical line indicates a terminus determined by FLDS. Colored lines below the white boxes indicate the areas of specific features; pink: intrinsically disordered region, light green: cytoplasmic region, blue, transmembrane region, purple: non cytoplasmic region, and beige: coiled coil.

### 3-17. DRS による配列取得

#### 3-17-1. 条件検討 (BL13 株)

ウイルス研究において DRS はリファレンス配列が存在するウイルスの解析に用いられており、未知ウイルスの配列解析での使用例は報告されてない。本研究では DRS が未知ウイルスのゲノム配列解析に利用できるかを検証するため、ライブラリ構築法の検討、RNA-seq によって得られたウイルス配列との比較を行った。DRS は真核生物の遺伝子発現解析を目的として設計されており、3'末端に poly (A) をもつ RNA 分子がライブラリ作成の対象となる。マイコウイルスには poly (A) をもつものともたないものの両方が存在しており、未知ウイルスの配列解析にはウイルス RNA の 3'末端への poly (A) 付加が必須となる。先行研究 (Wongsurawat *et al.*, 2019) では DRS を用いた poly (A) をもたないウイルスの配列解析を行っており、この論文のプロトコルを参考にライブラリ構築を行った。

DRS のライブラリ作成方法について、①ライブラリ作成時の逆転写反応、及び②dsRNA のゲル切り出し精製の 2 点が配列取得に与える影響を調査し、最適な条件を検討した。まず初めに、逆転写反応の影響について調査した。DRS において逆転写反応は必須ではないが、RNA と cDNA をハイブリダイズさせることで RNA の立体構造を直鎖状に安定させる効果があり、製品プロトコルで推奨されている手順である。一方で逆転写酵素には RNaseH 活性があり、cDNA 合成の際に鋳型となる RNA 分子を切断することから、取得できる配列長を低下させる可能性がある。条件検討にはすでに感染するウイルスの完全長ゲノム配列が解読されている Ep-BL13 株を用いた。精製した dsRNA 1 µg を鋳型として逆転写反応を行わずにライブラリを作成し、18 時間の配列解析に供

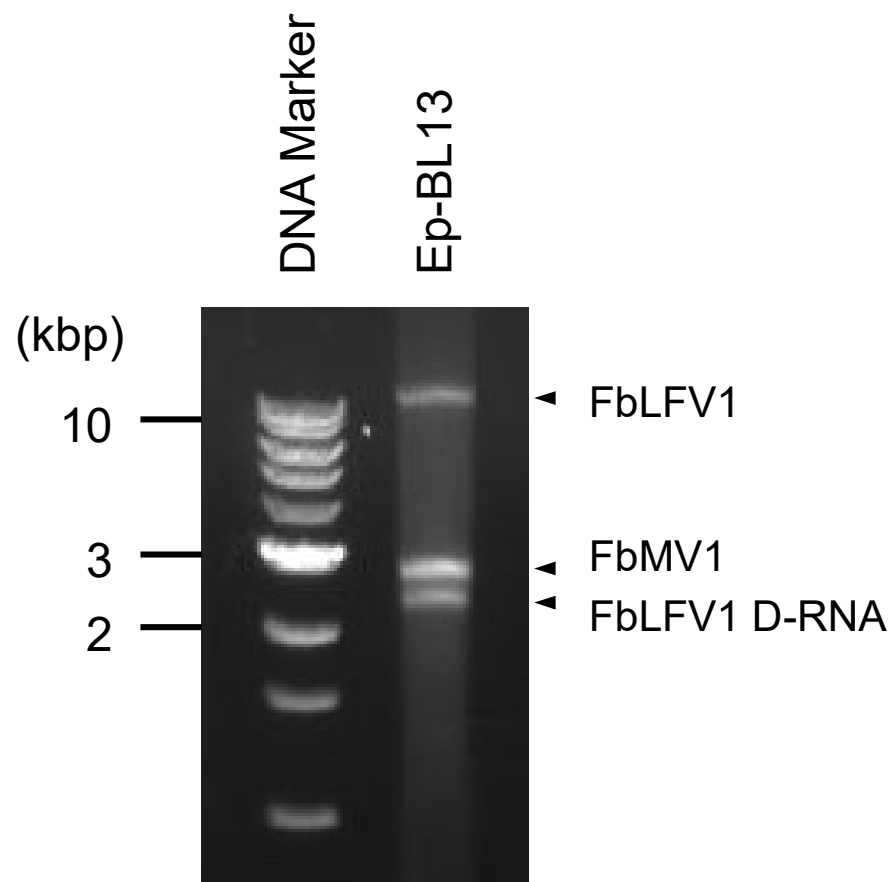
試した。その結果、最大配列長を 4,880 nt とする 113,403 配列を取得した (Table 1-22)。トリミングにより約 63%のリードが取り除かれ、残ったリードの約 76%がウイルス配列であった。dsRNA の電気泳動から、FbMV1 と FbLFV1 D-RNA の蓄積量に大きな差異は認められなかったが (Fig. 1-38)、ウイルス配列の約 61%が FbMV1 由来であることが分かった。

次の解析では、製品の推奨プロトコルに従い、逆転写反応を行いライブラリを作成した。1 µg の dsRNA を用いてライブラリを作成し、18 時間の配列解析を行った結果最大配列長 10,712 nt のリードを含む 136,580 配列が得られた (Table 1-22)。トリミングにより約 67%のリードが取り除かれ、残ったリードの約 82%がウイルス配列であった。1 回目の解析同様、dsRNA の蓄積量からの推測に反して FbMV1 由来のリードが約 67%という高い割合を示した。2 回目の解析の結果から、同じ dsRNA 量、解析時間にも関わらず 1 回目の解析と比較して最大リード長が大きく、得られたリード数が多かったため、逆転写反応が解析結果を向上させると結論付けた。

1 回目、2 回目の配列解析では配列長の平均値がそれぞれ 611.3 nt、533.5 nt とウイルスのゲノムサイズと比較して顕著に短いことが明らかとなった。原因として供試サンプル中に含まれる断片化された dsRNA が優先的に読み込まれている可能性が考えられたため、アガロースゲル電気泳動により分離した各 dsRNA のゲル切り出し精製を行い、断片化 dsRNA の除去を試みた。ゲル切り出し精製した dsRNA 400 ng を用い、2 回目の配列解析と同様の手順でライブラリ作成を行った。1.5 時間の配列解析の結果、最大配列長 4,386 のリードを含む 51,650 配列を取得した (Table 1-22)。トリミングにより約 12%のリードが取り除かれ、

Table 1-22. Result of the sequencing from DRS with different library preparation procedure.

1st run		Raw reads	Trimmed reads	Mapped reads	FbLFV1	FbLFV1 D-RNA	FbMV1
-RT, -Gel purification	num reads	113,403	42,258	37,314	10,227	5,533	21,554
Input RNA: 1 µg	sum len	37,953,361	25,832,185	21,226,716	4,482,115	2,533,647	14,210,954
Run time: 18 h	max len	4,880	4,880	4,880	4,880	3,407	3,641
	min len	19	300	300	300	300	300
	avg len	334.7	611.3	657.8	630	688.9	661.5
<b>2nd run</b>							
+RT, -Gel purification	num reads	136,580	49,362	40,675	7,642	5,494	27,539
Input RNA: 1 µg	sum len	42,322,796	26,333,344	22,580,932	4,497,187	3,738,895	14,344,850
Run time: 18 h	max len	10,712	10,712	10,712	10,712	2,424	2,785
	min len	1	300	300	300	300	300
	avg len	309.9	533.5	555.2	588.5	680.5	520.9
<b>3rd run</b>							
+RT, +Gel purification	num reads	51,650	45,695	42,778	2,152	1,655	38,981
Input RNA: 400 ng	sum len	48,716,115	47,356,462	45,219,246	1,226,404	1,156,927	42,835,915
Run time: 1.5 h	max len	4,386	4,386	4,386	4,386	2,404	3,013
	min len	4	300	300	300	300	300
	avg len	943.2	1,036.40	1,056.80	569.9	699	1,099



**Figure 1-38. Agarose gel electrophoresis of dsRNA samples used for DRS.**  
An arrowhead indicates dsRNA band of each viral elements.

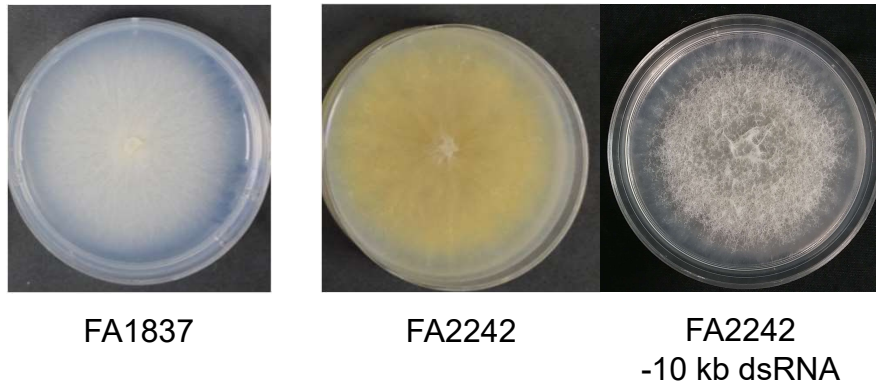
残ったリードの約 93%がウイルス配列であった。3 回目の解析は 1、2 回目の解析と比較して使用した dsRNA 量、解析時間がともに少ない(それぞれ 40%、約 8%) にも関わらず、取得した総塩基長が各解析を上回っており、平均配列長、平均配列精度の顕著な向上も認められた (Table 1-22)。一方で、全ウイルス配列に対する FbMV1 の割合が大幅に上昇しており、異なるウイルス間で出力される配列数の偏りを強化することが示唆された。この結果から、ゲル切り出し精製は配列解析のパフォーマンスを向上させるが、複数の異なるウイルスを含むサンプルの配列解析においては低蓄積量のウイルスゲノム配列取得を困難にする可能性があると推定された。以上の解析結果から、DRS によるウイルス配列解析には 2 回目の条件 (逆転写有、ゲル切り出し精製無) を適用した。

### 3-17-2. デノボシーケンシング

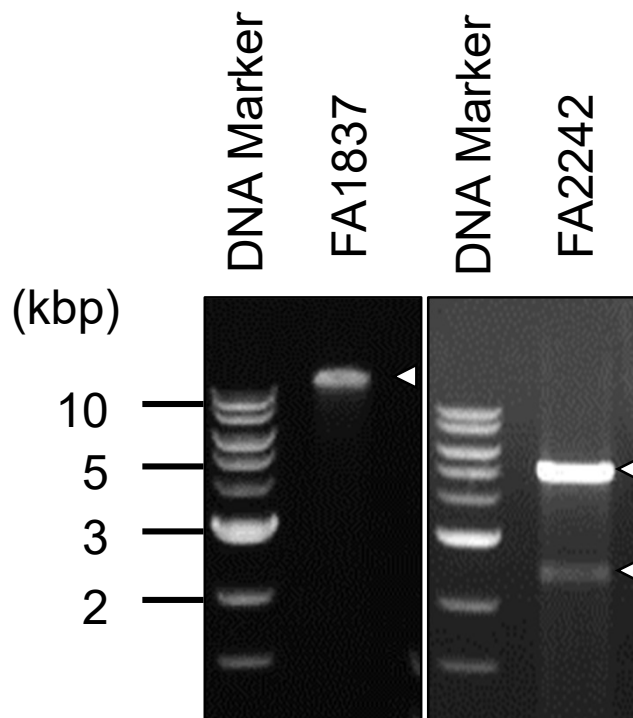
配列解析に供試した菌株のコロニー形態及び dsRNA 画分の電気泳動の結果、各サンプルから得られた配列データの概要はそれぞれ Fig. 1-39、Table 1-23 示した。FA2242 株から抽出した dsRNA の蓄積パターンが RNA-seq 及び DRS のサンプル間で異なっており、DRS のサンプルには RNA-seq のサンプルには見られない約 10 kbp の dsRNA が見受けられること、また約 5 kbp の dsRNA の蓄積量が顕著に少ないことが明らかとなった。培地上でのコロニー形態もこれらのサンプル間で異なり、この表現型変化に 10 kbp の dsRNA が関与する可能性が示唆された。

FA1837 株のライブラリから得られた配列の最大リード長、平均リード長はそれぞれ 10,571 nt、787.3 nt であった。デノボアセンブリにより長さ 12,721 nt のコンティグ配列が 1 つだけ再構築され、これを BLASTX 解析に供試した結果、FgHV1 の RdRp 配列と最大の類似性 (E-value:  $6.0e^{-}$

A



B



**Figure 1-39. Colony morphology and agarose gel electrophoresis of dsRNA samples used for DRS of the fungal strains.**

**(A)** Colony morphologies of FA1837, FA2242 and FA2242 lacking the 10 kb dsRNA. **(B)** Agarose gel electrophoresis of dsRNA fraction used for extracted from the *F. sambucinum* strains FA1837 and FA2242. The 1 kb DNA ladder (NEB) and dsRNA samples were loaded on the left and right lanes, respectively. A triangle indicates the position of a viral dsRNA band



Table 1-23. Sequencing information of DRS.

Sample	Run time (h)	Number of reads	Total bases	Read length			Viral reads (%)
				Minimum	Average	Maximum	
FA1837	2 raw_data	75,139	40,831,406	1.0	543.0	10,571	
	trimmed(>q7, >300 bp)	44,947	35,385,181	300.0	787.3	10,571	79.25
FA2242	12 raw_data	530,510	263,876,004	1.0	497.4	7,664	
	trimmed(>q7, >300 bp)	346,720	227,987,879	300.0	657.6	7,664	73.34

<sup>11</sup>, Identity: 25.83%) を示した (Table 1-24)。本配列は RNA-seq 解析で得られた FsamHV1 と近い配列長であり、塩基配列レベルで高い類似性 (E-value: 0 Identity: 96.74%) を示したことから、DRS データのみでウイルスゲノムの再構築が可能であることが示された。FA2242 株のライブラリから得られた配列の最大リード長、平均リード長はそれぞれ 7,664 nt、657.6 nt であった。デノボアセンブリにより長さ 2,292 nt - 10,380 nt のコンティグ配列が 7 つ再構築された。これを BLASTX 解析に供試した結果、最大の配列は *Hypoviridae* 科 *Betahypovirus* 属のウイルス、FodHV2 の RdRp と最大の配列類似性 (E-value:  $9 \times 10^{-69}$ , Identity: 29.36%) を示した。本配列は FA2241 株から検出されたウイルスである FsamHV2 と塩基配列レベルで高い類似性 (E-value: 0 e, Identity: 94.65%) を示したことから、本ウイルスと同種の異ウイルス株であると推定された。FsamHV2 を除く 6 種のウイルス配列はそれぞれ FA2242 株の RNA-seq データから再構築された FsamVV1、FsamMV1-5 のゲノム配列と高い類似性 (E-value: 0 e, Identity: 92.88% - 95.10%) を示したことから、同一ウイルス由来の配列であると推定された。この結果から、複数のウイルスを含むサンプルにおいても DRS データのみでウイルスゲノムの再構築が可能であることが示された。

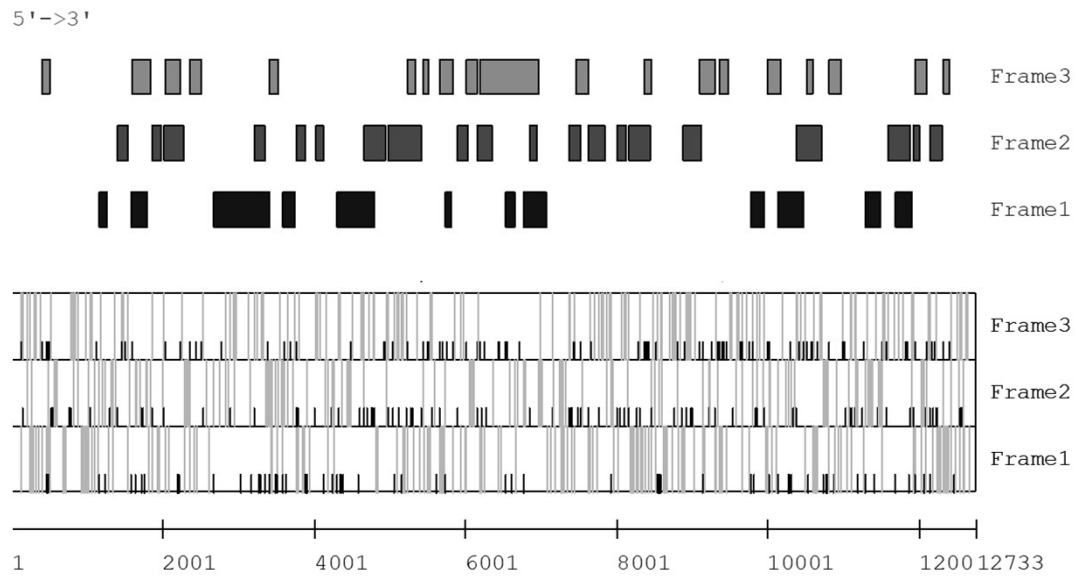
DRS が出力する配列は精度が低く、Illumina などのショートリード RNA-seq と比較して数百倍の数のエラーを含む (Leigh *et al.*, 2020)。ウイルスの分子生物学的性状の解析は正確なゲノム配列を必要とするため、DRS 及び RNA-seq で得られた配列を比較することで、配列の精度を調査した。比較には、Illumina と DRS 間で最も高い配列類似性を示した FsamHV1 の配列を用いた。その結果、DRS 配列に含まれる多くの indel エラーがフレームシフトを引き起こし、正確な ORF 予測が多数の

Table 1-24. The results of BLASTX using contigs generated from DRS reads

Sample	Name	Contig no.	Length	Coverage	BLASTX				
					Description	Query cover	E-value	Identity	Accession no.
FA1837	FsamHV1	1	12,721	3,012.0	polyprotein [Fusarium graminearum hypovirus 1]	27%	6.0E-11	25.83%	AZT88611.1
FA2242	FsamHV2	2	10,380	3,901.0	polyprotein [Fusarium oxysporum dianthi hypovirus 2]	68%	9.0E-69	29.36%	QHI00074.1
	FsamVV1	3	5,119	10,061.3	RNA-dependent RNA polymerase [Botrytis cinerea victorivirus 1]	24%	3.0E-37	47.42%	QBA69889.1
					coat protein [Botrytis cinerea victorivirus 1]	18%	1.0E-12	46.15%	QBA69888.1
	FsamMV1	4	2,791	1,940.4	RNA-dependent RNA polymerase [Plasmopara viticola lesion associated mitovirus 24]	53%	2.0E-52	37.08%	QIR30247.1
	FsamMV2	5*	2,500	26,562.2	RNA-dependent RNA polymerase [Botryosphaeria dothidea mitovirus 1]	43%	3.E-13	28.86%	QMU24933.1
	FsamMV3	6	2,560	1,424.7	RNA-dependent RNA polymerase [Soybean leaf-associated mitovirus 4]	55%	0.0E+00	78.86%	ALM62249.1
	FsamMV4	7	2,468	21,908.7	RNA-dependent RNA polymerase [Plasmopara viticola lesion associated mitovirus 26]	81%	5.0E-40	30.04%	QIR30249.1
	FsamMV5	8	2,292	884.3	RNA-dependent RNA polymerase [Plasmopara viticola lesion associated mitovirus 46]	78%	1.0E-55	35.19%	QIR30269.1

\*Generated by second de novo assembly procedure

終止コドンによって阻害されることが明らかとなった (Figs. 1-12 and 1-40)。この結果から、正確な配列情報が必要となるウイルスゲノム配列決定には DRS が適さないことが示された。



**Figure 1-40. ORF prediction of FsamHV1 contigs derived from DRS reads.**

Prediction of the coding regions larger than 100 bp on the sense strand of FsamHV1 (upper panels). Prediction of the initiation codon (AUG) and the termination codons (UAA, UAG and UGA) positions on each reading frame (lower panels). Black bars indicate positions of initiation codons, and gray bars indicate those of termination codons in the lower panels.

#### 4. 考察

本研究により、新奇ウイルスを含む 29 種のウイルスの部分、あるいは完全長配列が解読された。ICTV は 2019 年にウイルスの分類体系の大幅な整理を行い、RNA ウイルスを 2 つの界、6 つの門に分類した (Gorbalenya *et al.*, 2020)。その内 1 界 1 門は逆転写 RNA ウイルスの分類群であり、残りの 1 界 5 門に dsRNA ウイルス、+ssRNA ウイルス、-ssRNA ウイルスが含まれる。本研究で解析されたウイルスはこれら 5 つの門に属するウイルスを網羅しており、供試菌株中のマイコウイルスの多様性の高さが示された (Tables 1-9, 1-20, 1-21, 1-25)。本研究の供試菌株の多く (15 株/18 株) は *Fusarium* 属菌であった。*Fusarium* 属菌のうち、植物病原菌を対象としたマイコウイルス探索は盛んに行われているが、非病原菌に感染するマイコウイルスの報告例は極端に少なく、ゲノムが決定されたウイルスは全て植物病原菌を自然宿主としている (Li *et al.*, 2019b)。本研究で病原菌だけでなく非病原菌からも多数の新奇ウイルスが発見されたことを考慮すると、菌類に広がるウイルスの多様性をより詳細に理解するには非病原菌を探索対象に加える必要があると考えられる。また、マイコウイルス探索を目的とした *Fusarium* 属菌の分離地としては大韓民国、アメリカ合衆国、イラン及び日本が大半を占めており、アフリカ大陸 (エチオピア) から分離した *Fusarium* 属菌を対象としたマイコウイルスのスクリーニングを行ったのは筆者の知る限り本研究が初である。複製サイクルが宿主細胞内で完結するマイコウイルスは生息域の拡大を宿主に依存すると考えられ、その分布は地理的な隔離の影響を強く受けると予想される。本研究においてエチオピア産 *Fusarium* 属菌から 7 種のウイルス感染が確認されたが、うち 4 種は新種と推定された。中でも FbLFV1 や FbMV2 はゲノム構造、

Table 1-25. List of viruses sequenced in this study.

Genome	Phylum	Class	Order	Family	Genus	Virus name	Collection	
+ssRNA	Lenarviricota	Howeltoviricetes	Cryppavirales	Mitoviridae	Mitovirus	FbMV1	FHB-associated	
						FbMV2	FHB-associated	
						FnMV1	FHB-associated	
						CperMV1	BSM-associated	
						FeMV1	BSM-associated	
						FsamMV1	BSM-associated	
						FsamMV2	BSM-associated	
						FsamMV3	BSM-associated	
						FsamMV4	BSM-associated	
						FsamMV5	BSM-associated	
	Miaviricetes	Ourlivirales	Botourmiaviridae	Magoulivirus	FsoMUV1	BSM-associated		
					FsoMUV2	BSM-associated		
	Kitrinoviricota	Alsuviricetes	Tymovirales	Gammaflexi-viridae?	Unclassified	FbLFV1	FHB-associated	
						Tolivirales?	Unclassified	Unclassified
	Pisuviricota	Duplopiviricetes	Durnavirales	Hypoviridae	Alpha-hypovirus	FsamHV1	BSM-associated	
Betahypovirus						FnHV1	FHB-associated	
FsamHV2						BSM-associated		
Partitiviridae					Gamma-partitivirus	CperPV1*	BSM-associated	
+ssRNA?	Unclassified	Unclassified	Unclassified	Polymycoviridae	Polymycovirus	FsoPmV1	BSM-associated	
						Polymycoviridae?	Unclassified	FoxHadV1
								FeHadV1
-ssRNA	Negarnaviricota	Ellioviricetes	Bunyavirales	Unclassified	Unclassified	TvPLV1	Environmental	
dsRNA	Duplornaviricota	Chrymotiviricetes	Ghabrivirales	Chrysoviridae	Beta-chrysovirus	FoxCV2	BSM-associated	
						Totiviridae	Victorivirus	FsamVV1
								TvVV1
				Ghabriviridae?	Alternaviridae	Alternavirus	FoxAV1	FHB-associated
							FsoAV1	BSM-associated
							FsoAV2	BSM-associated
Virus-like sequence					Ambivirus	FoxAmV1	BSM-associated	

\*The partitivirus detected in multiple fungal isolates (F956, F6134, and F8979)

系統学的な位置づけにおいて極めて特徴的であり、アフリカ大陸を分離源とするサンプルからのウイルス探索に大きな期待が寄せられる。FbLFV1 はデータベース上の配列と低い類似性を示し、分子系統学的に独立であると推定された (Table 1-9、Fig. 1-22)。

LcfV1 及び BotVF は FbLFV1 の RdRp と配列類似性を示す近縁種である。BotVF は *Gammaflexiviridae* 科の唯一のメンバーであり、*Mycoflexivirus* 属の基準種であるが、長さ約 6.8 kb (6827 nt) の単分節 +ssRNA ゲノム上に CP と RdRp をコードする 2 つの ORF が座落しており、その 3'-末端は他の *Tymovirales* 目ウイルス同様 Poly (A) 鎖を有する。一方で LcfV1 は FbLFV1 と同等の長さ (>12 kb) のゲノム上に RdRp をコードする単一の ORF が座落する。末端配列が決定されていないため Poly (A) 鎖の有無は不明であるが、BotVF とは明瞭に異なるゲノム構造を有する。配列類似性及び分子系統解析の結果から FbLFV1 は LcfV1 により近縁であり、BotVF との共通祖先が CP を欠失した結果生じた派生的な新奇ウイルス分類群に属すると推測される。マイコウイルスには CP を持たないものが数多く含まれるが (King *et al.*, 2011a; Suzuki *et al.*, 2018)、*Tymovirales* 目においても CP をもたないウイルスが異なる属から報告されており (Bartholomäus *et al.*, 2017; Li *et al.*, 2016; Xie *et al.*, 2006)、CP の欠失は *Tymovirales* 目において独立して複数回生じたと考えられる。

*Mitovirus* 属ウイルスは菌類宿主から最も頻繁に見つかるウイルスである。近縁分類群である *Narnaviridae* 科に属する 2 種類のウイルス、*Saccharomyces* 20S RNA narnavirus 及び *Saccharomyces* 23S RNA narnavirus に関しては感染性クローンが作出され、その複製機構、宿主への影響について詳細な研究がなされているが、*Mitovirus* はミトコン



ドリアに局在するという性質から遺伝学的実験が困難であり、その普遍性にも関わらずこれらに関する知見は極めて限られている (Esteban and Fujimura, 2003; Esteban *et al.*, 2005; Hillman and Cai, 2013)。3 種類の異なる Mitovirus が共通感染する *S. sclerotiorum* の病原性低下株においてミトコンドリアのクリステ膜構造の異常が観察されており、ウイルスとの関与が強く示唆されているが、確定的な証拠は得られていない (Khalifa and Pearson, 2013)。FA2241 株及び FA2242 株にはそれぞれ 5 株の異なる Mitovirus が感染する。これらのウイルスは全てミトコンドリアに局在感染すると考えられるが、それぞれが同一ミトコンドリア内に感染するのか、ミトコンドリア内における局在は異なるのかはいずれも不明である。これらの Mitovirus の内、クレード III に属する FsamMV2 と FsamMV5 のコードする RdRp 上にはそれぞれ一か所の膜貫通領域が推測されており、膜タンパク質であると推察された (Fig. 1-17)。また FeMV1 の有する RdRp はシグナルペプチド配列を有しており、特定の場所への局在が示唆された (Fig. 1-17)。この結果から、Mitovirus 属ウイルスは共通して極めて単純なゲノム構造 (2-3 kb の単分節+ssRNA ゲノム上に単一の ORF をもつ) を有するが、その複製メカニズムにはいくらかの多様性があると思われる。dsRNA 画分の電気泳動、デノボアセンブリ、RT-PCR、の結果から、FbMV2 は環状 RNA ゲノムを有することが示唆された (Figs. 1-3, 1-18)。近年節足動物に感染するウイルスの網羅的解析により発見された Chuviridae 科ウイルスの一部は RNA ウイルスで唯一環状ゲノムを有する (Li *et al.*, 2015a)。本科のウイルスゲノムは -ssRNA であるが、その複製過程は不明である。FbMV2 が環状ゲノムを有することが証明されれば、+ssRNA ウイルスで初の報告となるため、詳細かつ慎重な検証によりゲノム構造の決定

を行う必要がある。

Polymycoviridae 科は多分節 RNA ウイルスを含む ICTV 未承認の分類群である。本分類群に属するウイルスはウイルス間で保存された 4 分節に加え、最多で 5 分節の RNA を有する。これらの RNA は極めて多様性が高く、ウイルス間で配列類似性がない、あるいは極めて乏しい (Sato *et al.*, 2020a, 2020b)。また本科のウイルスは細胞内におけるゲノム RNA の状態がユニークかつ多様である。本ウイルス科で最初に発見された *Aspergillus fumigatus* tetramycovirus 1 (AfuTmV1) は CP を持たず、ゲノム RNA を自身がコードする proline-alanine-serine-rich protein (PASrp) が覆う形でヌクレオプロテインを形成すると考えられている (Kanhayuwa *et al.*, 2015)。一方で *Colletotrichum camelliae* filamentous virus 1 (CcFV-1) を含む一部のウイルスは CP をコードしており、ひも状粒子を形成する (Jia *et al.*, 2017)。分子系統解析から CP を有するウイルスは Polymycoviridae 科の枝の内部に独立した単一の枝を形成することから、PASrp の欠失及び CP の獲得により生じた単系統であると推察される (Fig. 1-31)。近年、これらに加え、PASrp 及び CP のいずれも有さない 11 分節ゲノムを有する Hadakavirus (HadV1) が報告された (Sato *et al.*, 2020a)。AfuTmV1 (PASrp をもつ) 及び CcFV-1 (CP をもつ) は超遠心によりウイルス粒子あるいはヌクレオプロテインとして精製が可能であるが、HadV1 の精製はこの方法では成功しておらず、ウイルスゲノムが宿主細胞内で裸の RNA として存在すると推測されている (Sato *et al.*, 2020a)。HadV1 は分子系統的に Polymycoviridae 科と最も類縁性を示すものの、外部に独立した枝を形成する (Sato *et al.*, 2020a) (Fig. 1-31)。FsoPmV1 は CP を有するウイルス (FrPmV1) と、FoxHadV1 及び FeHadV1 は HadV1 と極めて近縁であることが明らかとなった

(Tables 1-9, 1-20, Fig. 1-31)。これらはいずれも *Fusarium* 属菌を自然宿主としており、遺伝的に大きく異なる宿主間を移行する機会は限られていると推察される。このうち Hadakavirus は地理的に大きく離れた地域から分離されたにも関わらず (FeHadV1: 本邦、FoxHadV1: エチオピア連邦民主共和国、HadV1: パキスタン・イスラム共和国)、互いに高い RdRp アミノ酸配列類似性 (identity: >86.35%) を示しており、これらのウイルスの長距離伝播の手段に興味を持たれる。RdRp が高い配列類似性を示す一方で Hadakavirus はいずれも独自の分節 RNA を有する。これらの配列の機能は不明であるが、各セグメントの塩基配列を用いた系統解析は Hadakavirus の分節 RNA が一部の分節 RNA の多様化により生じた可能性を示しており、異なる宿主への適応や宿主表現型の制御に関与すると推測される。

NGS を用いたウイルスゲノムの網羅的配列解析は夥しい数の新規ウイルスを検出してきたが、ほとんどの研究ではデータベース上の配列との類似性を基にウイルス配列の選抜を行っており、既知のウイルス配列と類似性を示さない配列は見落とされる (Forgia *et al.*, 2021)。類似性ベースではなく閾値以上の長さの ORF の有無を指標とした配列の選別により既知のウイルスと全く配列類似性を示さないウイルス様環状 RNA 配列の検出に成功したという報告があり (Forgia *et al.*, 2021)、ウイルス配列選抜のパイプラインの再検討によりこれまでの報告よりも多くのウイルス配列が発見される可能性がある。RNA ウイルスはそのゲノムとして、あるいは複製中間体として必ず dsRNA を蓄積する。ウイルス非感染菌株の細胞内において dsRNA は Small interfering RNA などの小分子 RNA 以外に存在しないため、dsRNA の蓄積の有無は RNA ウイルス感染の指標として利用される。本研究では DNA、ssRNA を酵

素的に除去した dsRNA 画分を配列解析に供試することで、平均カバレッジ値によるウイルス由来配列の選抜を試みた。その結果、データベース上のウイルス由来配列とアミノ酸レベル、塩基レベルのいずれにおいても類似性を示さない配列が複数検出された (Tables 1-9, 1-11, 1-14 to 1-16)。同一サンプルから検出されたウイルスゲノムの末端に保存された配列を有することから、これらの内のいくつかは FoxCV2、FsoAV2 及び FsoPmV1 の分節ゲノムであると推定された。F8924 株からは帰属不明の配列が 4 配列 (RNAS1 - S4) 検出されているが、FeHadV1 の分節ゲノムとこれらの配列の塩基配列を用いた系統解析により、FeHadV1 のゲノムの一部である可能性が示唆されている (Fig. 1-30)。また、Ep-N27 株、F6134 株、F8850 株から検出された VLS は末端配列の比較からいずれも同一菌株内に感染するウイルスの分節ゲノムではないと推定されており、宿主細胞内における自律的複製能力の有無を実験的な検証により明らかにする必要がある。先行研究及び本研究の結果から、①カバレッジ、②末端配列の比較、③一定長以上の ORF の有無の三点を指標にすることで、従来 of 配列解析で見落とされてきたウイルス (様) 配列の選抜が可能になると考えられる。

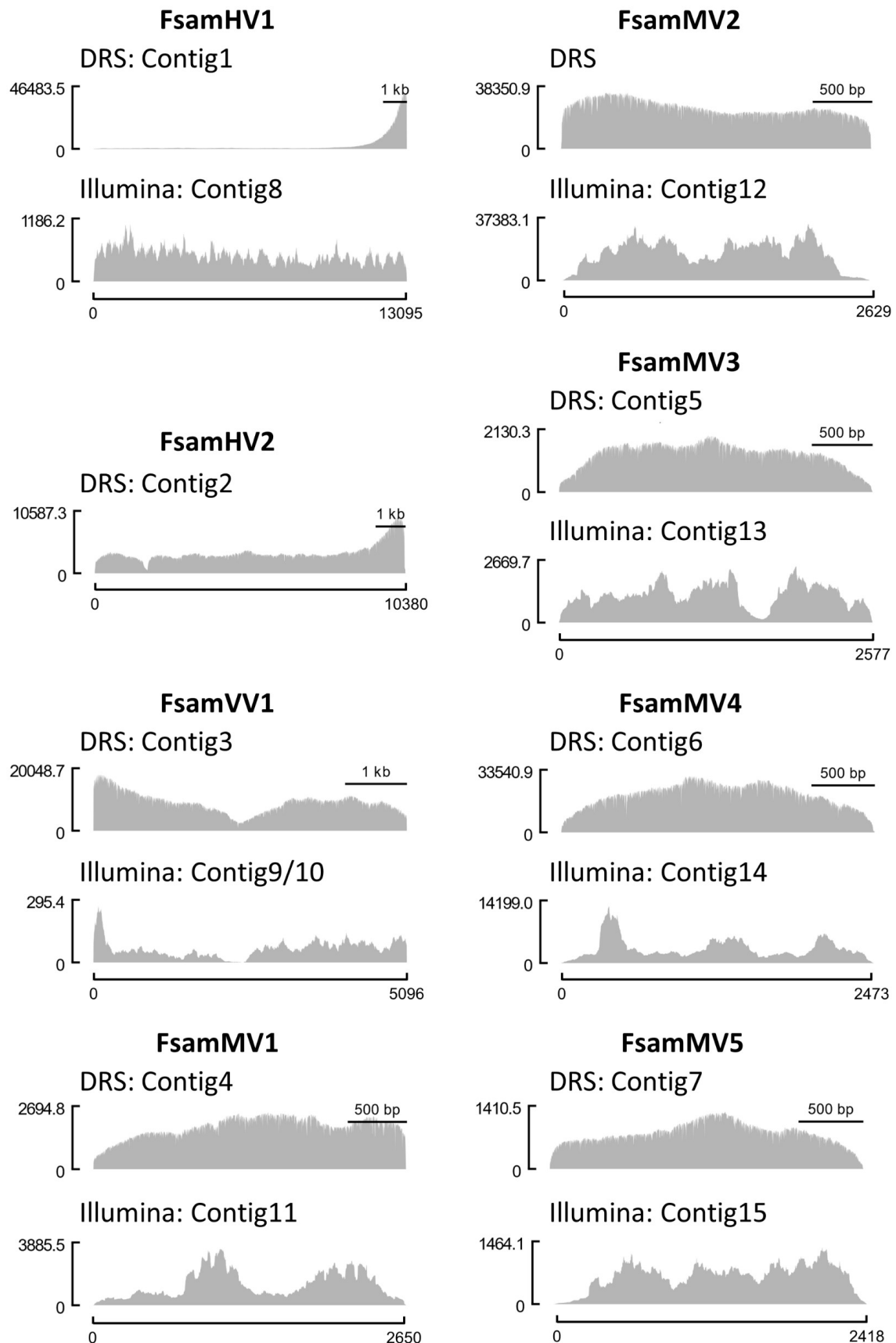
DRS を用いた配列解析により FA1837 株、FA2242 株に感染するウイルスのゲノム全長に相当する配列を取得に成功したが、最もリファレンス配列に対する塩基配列類似性が高い FsamHV1 配列は indel エラーを含んでおり ORF の復元は不可能であった (Table 1-24, Fig. 1-40)。DRS リードの配列精度は、DNA を鋳型とした Nanopore シーケンシング (エラー率<5%) と比較して顕著に低く、ウイルス研究における DRS の利用は臨床サンプル中のウイルスの検出、ウイルスゲノムの RNA 修飾の解析、および複雑なウイルスゲノム構造の解析に限定される (Depledge

and Wilson, 2020; Keller *et al.*, 2018; Kim *et al.*, 2019; Lewandowski *et al.*, 2019; Quick *et al.*, 2016; Wongsurawat *et al.*, 2019)。これらの解析はいずれもリファレンス配列のあるウイルスのリシーケンスであり、未知ウイルスの配列決定に用いられた例はない。先行研究において、ウイルス末端配列特異的アダプターとリファレンスベースのアセンブラーの使用により、高い精度 (identity: 98.97%) を有する配列の取得に成功している (Keller *et al.*, 2018)。しかし、それらのコンセンサス配列には依然としてエラーが含まれており、現在の性能では DRS がデノボアセンブリに基づく配列決定に適用できないことを示唆している。本研究では、宿主由来 RNA を酵素的に除去した dsRNA を鋳型とすることで全リード中のウイルス由来リード率を向上させ、バイオインフォマティクス的手法によるエラー除去を試みた。その結果、Illumina により得られた配列に対する配列の類似性は最大 96.74% まで向上した。Nanopore DNA シーケンシングの精度は、過去 5 年間で劇的に向上しており (<60% から約 95%)、現在では 99.99% の精度のコンセンサス配列の取得が可能となっている (Goodwin *et al.*, 2016; Kono and Arakawa, 2019)。DRS についても配列精度の向上が期待され、将来的には単独での配列決定に用いられる可能性がある。

本研究で得られた DRS リードの平均長 (672.5 nt) は、他の研究で報告されたものよりも有意に短かった。その理由として dsRNA を鋳型としたことが考えられる。DRS は mRNA の配列解析を目的として設計されており、先行研究はいずれも ssRNA をライブラリ構築に用いている (Depledge and Wilson, 2020; Keller *et al.*, 2018; Kim *et al.*, 2019; Lewandowski *et al.*, 2019; Quick *et al.*, 2016; Wongsurawat *et al.*, 2019)。本研究ではライブラリ構築の前処理として dsRNA の熱処理による

ssRNA への乖離、酵素的な Poly (A) 鎖の付加（ポリアデニル化）を行った。DRS リードの大部分は、末端配列をカバーしていない dsRNA の内部配列であり、ポリアデニル化が主に内部 dsRNA 領域で生じていることを示唆している (Fig. 1-41)。このことから、セルロースカラムを用いたクロマトグラフィー精製時の激しいボルテックス混合により、dsRNA が損傷を受け、断片化した RNA がポリアデニル化酵素の基質となった可能性、あるいは熱変性による dsRNA の ssRNA への乖離が不十分であった可能性が考えられた。

RNA ウイルスはしばしば 3'-末端に Poly (A) 鎖を有する。リードマッピングの結果から、FsamHV1、FsamHV2 の 3'-末端に強いカバレッジの偏りが見出された (Fig. 1-41)。3'-末端の Poly (A) がライブラリ構築の標的となるが、ポリアデニル化反応の効率が低く、ウイルスゲノムの 3'-末端にもともと存在する Poly (A) 鎖がサンプル中の大部分を占めていたため生じたと考えられる。しかしながら FsamHV1 及び FsamHV2 以外のウイルスについては全体的に均一なリードカバレッジが得られており、Illumina を用いた RNA-seq 解析では断片化された 2 つの配列として出力された FsamVV1 の全長配列の復元にも成功している (Table1-24, Fig. 1-41)。FsamVV1 を含む *Victorivirus* 属ウイルスはゲノム上に G+C%が高く堅牢な高次構造を有する領域を有しており、RNA-seq 解析ではしばしば断片化された配列として出力される (Marzano and Domier, 2016; Urayama *et al.*, 2016) (Table 1-11, Table1-19)。海洋サンプル中の DNA ウイルスの配列解析において NGS 単独では断片化してしまう配列をつなぎ合わせる目的で Nanopore DNA シーケンシングが利用されており、DRS も NGS との併用により RNA ウイルスの網羅的解析に利用できる可能性がある (Warwick-Dugdale *et al.*, 2018)。



**Figure 1-41. Comparison of coverage uniformity between DRS and Illumina HiSeq.**

Genomic coverages of each viral contigs from DRS (upper graph) and Illumina HiSeq (lower graph) visualised as histograms. The Illumina contigs of FsamHV1 and FsamMVs and the DRS contig polished with Illumina reads of FsamVV1 were used as reference sequences for read mapping. The x-axis indicates the nucleotide position of a viral genome, and the y-axis indicates the coverage depth at each nucleotide position.

## 研究項目 2: 病原性低下 *Fusarium* 属菌 BL13 株に感染するウイルスの性状解析

### 1. 研究背景

#### 1-1. コムギ赤かび病

コムギはイネ、トウモロコシと並び世界三大穀物として数えられ、日本においてもコムギの作付け面積は 2013 年の時点で 21 万 2 千 ha と、畑地面積全体に対して 1.7%を占める重要な作物であり、食生活の西洋化からその需要は増え続けている。しかしながら世界的に見ても、その収量や品質は病害虫による被害に大きく左右され、場合によっては 60% 近く収量が減少することが明らかとなっている (Oerke, 2006)。ムギ類赤かび病 (FHB) はコムギを含む穀物の収量、品質に特に甚大な被害をもたらし、ムギ類の最重要病害の 1 つとして認識されている。1990 年代にアメリカで大流行した際には、小麦と大麦の市場に 3 億ドル近い被害を与えたと報告されている (Windels, 2000)。発病した穂は一部、あるいは全体が褐色になり、穎の接合部に桃色の分生孢子が生ずる。激発すると穂軸が侵され、それより上部が穂枯を起こす (Fig. 2-1)。原因菌は、*Fusarium graminearum* species complex (FGSC) に属する子囊菌である。本菌は半寄生性の不完全菌であり、産生するマイコトキシン (ニバレノール、デオキシニバレノールなど) を人や家畜が摂取すると嘔吐、腹痛、下痢などの中毒症状を引き起こすことから、収穫後にも深刻な問題となっている。日本では、厚生労働省によって 2002 年にコムギにおけるデオキシニバレノールの基準値が 1.1 ppm と定められおり、現場ではより一層厳格な対応が必要となっている。以上が、コムギ赤かび病が世界中で大きな問題になっている理由として挙げられる。近年、自然環



A



B



**Figure 2-1. Fusarium head blight disease in wheat caused by a phytopathogenic fungus, *Fusarium graminearum* species complex (FGSC).**

**(A)** Spikes of wheat infected by FGSC. **(B)** Wheat grains affected by the pathogen. Infection of the pathogen results in shriveled and mycotoxin-contaminated grains (The left side). These figures were obtained from “小麦のDON低減対策マニュアル” made by Food Safety and Consumer Affairs Bureau, Japanese Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries. URL: [https://www.maff.go.jp/j/syouan/seisaku/risk\\_analysis/priority/kabidoku/bousi/pdf/komugi\\_DON\\_manual.pdf](https://www.maff.go.jp/j/syouan/seisaku/risk_analysis/priority/kabidoku/bousi/pdf/komugi_DON_manual.pdf)

境の破壊が世界的に問題になる中で、環境への負荷が少なく持続可能な農業への関心が高まっており、環境負荷の大きい化学農薬に代わる防除法の開発に期待が寄せられている。このような社会的背景を受けてムギ類の生産現場においても、生物農薬などの開発が進められているが、コストや持続性、防除効率などの面で課題が多く、実用的な防除法の確立には至っていない。

### 1-2. 病原性 *Fusarium* 属菌に感染するウイルス

FHB に対するヴァイロコントロールの確立により、コムギ生産において世界的に問題となっている病害の防除に貢献できる可能性がある。有用ウイルス資材選抜を目的として *Fusarium* 属菌に感染するウイルスの探索が精力的に行われており、多様な菌類ウイルスが数多く発見されている。最新の総説 (Li *et al.*, 2019b) によると、*Fusarium* 属菌から単離されたウイルスの内これまで完全長配列が決定されているのは 29 種であり、*Fusarium graminearum* virus 1 (FgV1)、*Fusarium graminearum* virus 2 (FgV2)、*Fusarium graminearum* virus ch9 (FgV-ch9)、*Fusarium graminearum* mycotymovirus 1 (FgMTV1)、*Fusarium graminearum* hypovirus 2 (FgHV2)、*fusarium oxysporum* f.sp. *dianthi* mycovirus 1 (FodV1) はその感染により宿主の病原性が低下することが証明されている (Chu *et al.*, 2002; Darissa *et al.*, 2012; Lemus-Minor *et al.*, 2015; Li *et al.*, 2015, 2016, 2019b; Yu *et al.*, 2009, 2011)。中でも *F. graminearum* DK21 株から新奇ウイルスとして発見された FgV1 はその生物学的性状が詳細に調べられている。本ウイルスは *Fusariviridae* 科 *Fusarivirus* 属のメンバーであり、4 つの ORF が座する単分節+ssRNA ゲノムとしてもつ (Chu *et al.*, 2002)。FgV1 が感染した *F. graminearum* は培地上での生育異常、コムギ

への病原性、孢子形成能の低下などの種々の表現型変化を呈する (Kwon *et al.*, 2007)。トランスクリプトーム解析から FgV1 感染時に宿主遺伝子発現パターンの大幅な変動が観察されており、宿主細胞内の生化学的な環境を転写レベルで調節することで効率的な複製環境を構築すると考えられている (Cho *et al.*, 2012; Lee *et al.*, 2014)。最新の研究では ORF2 にコードされたタンパク質 (pORF2) が宿主の抗ウイルス機構である RNA サイレンシングの鍵酵素、FgDICER2 および FgAGO1 遺伝子のプロモーター領域への配列特異的結合により転写を抑制する機能があること報告された (Yu *et al.*, 2020)。

### 1-3. これまでの研究

*Fusarium* 属菌の病原性を低下させるウイルスは上述のように数例報告されているが、コムギ赤かび病防除への応用展開の成功例はない。Adane 博士が選抜した FHB 関連菌株コレクションに含まれる *F. boothii* Ep-BL13 株はウイルスに重複感染しており、培地上での生育異常を示すことが明らかとなっている (水谷 (2016) , Fig. 1-3)。Ep-BL13 株の生育異常がウイルス感染によると推定し、これまで感染ウイルスのゲノム配列解析及び生育速度調査を行ってきた。本研究項目ではウイルス感染と宿主の生育異常の関連性をより詳細に調査するため、ウイルス除去株の作出とウイルスの再導入実験を行った。

## 2. 材料と方法

### 2-1. 孢子形成誘導

既報の実験手順 (中島, 2004) に基づき、緑豆培地に接種した菌糸片の振盪培養により孢子形成を誘導し、その分離を試みた。緑豆 20 g を

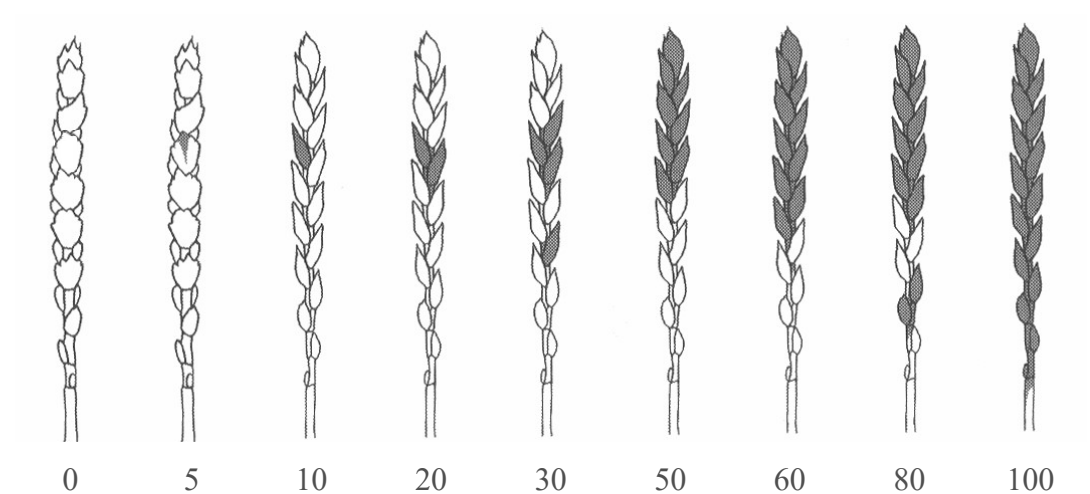
1 L の蒸留水に加え、40 分間煮沸した。ソフライナーで濾過して緑豆を除き、蒸留水を加えて液量が 1 L となるよう調整した。耐熱瓶に移し、オートクレーブ滅菌を行った。300 ml の三角フラスコに緑豆培地 100 ml を加え、PDA 培地で培養したコロニーから切り出した菌糸片を接種し、室温、120 rpm で一週間振盪培養した。ウイルス除去実験の際には緑豆培地に Ribavirin を終濃度 200  $\mu$ M となるよう加え、同条件で培養した。滅菌したソフライナーで培養液をろ過し、ろ液を 15 ml チューブに回収した。遠心分離（室温、3,000 x g、15 分）により胞子を沈殿させ、上清を除いた後に滅菌水で胞子を再懸濁した。

## 2-2. 生育速度調査

SNA 培地上で 5 日間培養したコロニーから切り出した菌糸片を PDA 培地に接種し、20°C、暗黒下で一週間培養した。培養開始 2 日目から 1 日おきにコロニー直径を 1 コロニー当たり 2 方向計測した。コロニーの形状を円に近似し、コロニー直径の平均値からコロニー面積を算出した。

## 2-3. 病原性試験

1% Triton (v/v) 溶液で調整した  $1 \times 10^5$  個胞子/ml を接種実験に用いた。FHB 感受性コムギ品種 Apogee をチャンバー (KG-50HLA; 小糸電機工業、横浜市) で 27 °C で生育させた。接種は注入法及び噴霧法の 2 通りの方法で行った。注入法では、胞子懸濁液 10  $\mu$ l をコムギ小穂に注入接種し、接種後 15 日目に発病した小穂数を計測した。噴霧法では、胞子懸濁液をコムギ小穂に 3 回 (500  $\mu$ l/push) 散布し、接種 15 日後に (Ban and Suenaga, 2000) の基準 (5, 10, 20, 30, 50, 60, 80, 100) に無病徴 (0) を加えた 9 段階で発病度を評価した (Fig. 2-2)。胞子の発



(Ban and Suenaga, 2000, Modified)

**Figure 2-2. A schematic diagram of disease index and corresponding disease severity based on .**

Spicklets colored with gray indicates ones showing typical FHB symptom.

芽を促進するために接種した植物を透明な加湿箱で 1 日（注入法）または 2 日（噴霧法）維持した後、チャンバーに移して培養した。尚、本試験は植物防疫所から植物体接種試験を認められた岐阜大学内の実験施設（須賀晴久准教授）で行った。

#### 2-4. 単孢子分離

100 個孢子/ml に調整した孢子懸濁液 100  $\mu$ l を PDA 培地が入った 9 cm シャーレに塗布し、20°C、暗黒下で 2 日間培養した。独立したコロニーから菌糸片を切り出し、PDA 培地に接種した。

#### 2-5. ウイルス水平伝播試験

SNA 培地上で 5 日間培養した Ep-BL13-Ori (Donor 株) 及び Ep-BL13-VC1、VC3、VC17 のいずれか (Recipient 株) のコロニーから切り出した菌糸片を単一の PDA 培地上に接種し、20°C、暗黒下で 7 日間培養した。Recipient 株のコロニーの外縁部の内、Donor 株からの距離が異なる 3 か所から菌糸片を切り出し、再分離株として新しい PDA 培地に接種した。再分離株を 20°C、暗黒下で培養し、5 日後にコロニー形態の撮影、100 ml PDB 培地への接種を行った。PDB に接種した菌体を 20°C、暗黒下で一週間静置培養し、dsRNA の抽出および精製を行った。精製した dsRNA を 1%アガロースゲル電気泳動によって分離、可視化し、dsRNA 蓄積の有無を指標にウイルス感染パターンを判別した。

### 3. 結果

#### 3-1. *F. boothii* の表現型調査

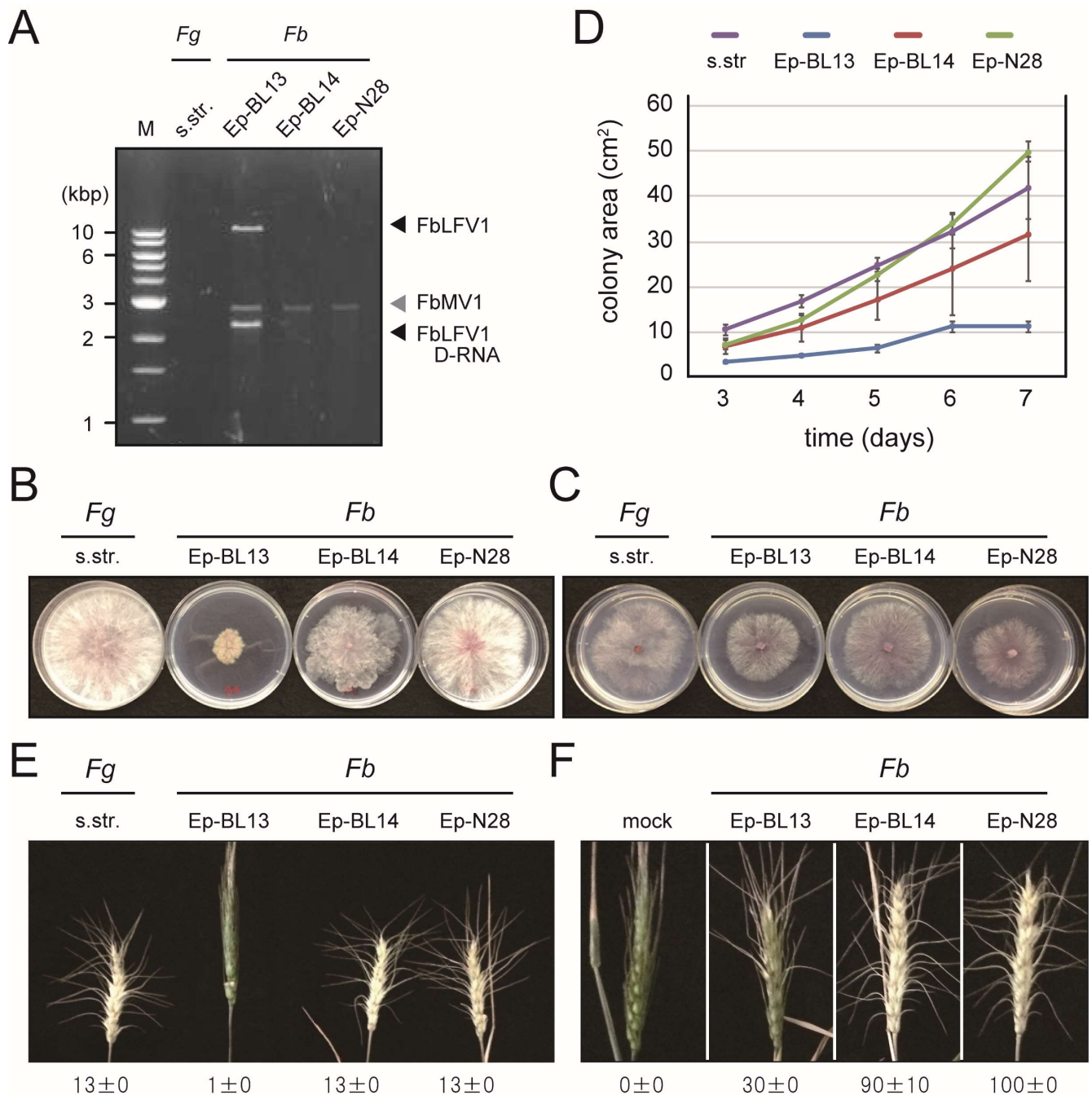
*TEFI- $\alpha$*  の塩基配列を用いた分子系統解析から、Ep-BL13 に加えて Ep-BL14 及び Ep-N28 が *F. boothii* に属する菌であると推定されており、ウ

イルスゲノム配列解析によりこれらの菌株には共通して FbMV1 感染が認められている。Ep-BL14 株、Ep-N28 株には FbMV1 以外のウイルス感染は認められていないが、Ep-BL13 株には FbMV1 に加えて FbLFV1 及びその D-RNA が蓄積する (Table 1-3 and Fig. 2-3A)。これらの菌株の PDA 培地上でのコロニー形態を観察したところ、Ep-BL13 株が Ep-BL14 株、Ep-N28 株と比較して異常なコロニー形態を示す傾向が観察された (Fig. 2-3B and C)。生育速度調査およびコムギ小穂への接種実験から、Ep-BL13 株は Ep-BL14 株、Ep-N28 株よりも生育が遅く、病原性が低い傾向が観察された (Fig. 2-3D, E, and F)。この結果から、Ep-BL13 株に特異的に蓄積する FbLFV1 及び D-RNA、或いはどちらか一方が本菌株の生育異常及び病原性の低下に関与することが示唆された。

### 3-2. ウイルス非感染株の作出

マイコウイルス感染による宿主表現型への影響を調査するには、宿主の遺伝的背景を同じくするウイルス感染菌株および非感染菌株の比較が必要となる。しかしながら、マイコウイルスの実験系においては、感染細胞の摩砕物を用いた接種試験が可能な動植物ウイルスの実験系と異なり、接種試験系の確立が容易でない。マイコウイルスはごく一部を除きその複製サイクルが細胞内で完結しており、自然環境において異なる菌株間の移動手段は菌糸融合を介したものに限られる (Andika *et al.*, 2017; Liu *et al.*, 2016; Nuss, 2005)。しかしながら糸状菌は複数の遺伝子座の対立遺伝子により規定される細胞質和合型 (vegetative compatibility group: VCG) を区別する自己非自己認識能を有しており、VCG の異なる菌株間では菌糸融合が生じないか、あるいは細胞死誘導





**Figure 2-3. Biological properties of *F. boothii* strains and dsRNA-banding profiles.**

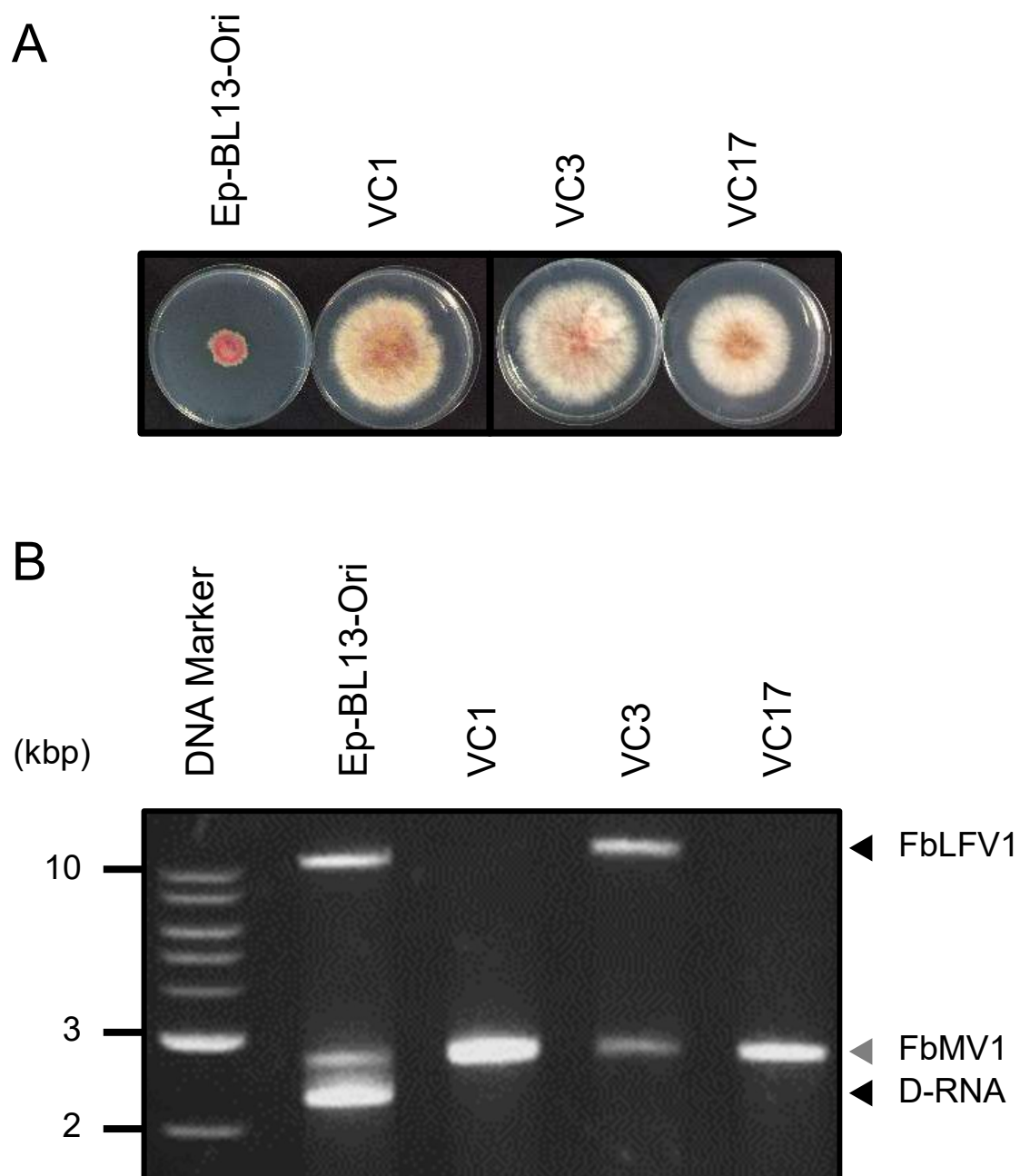
(A) The dsRNA-banding profiles of each *F. boothii* strain (Ep-BL13, Ep-BL14 or Ep-28) and a reference pathogenic strain. *F. graminearum* s.str. Three *F. boothii* strains all carried dsRNA fragments of approximately 3 kbp. Aside from the 3-kbp dsRNA band, Ep-BL13 harboured two additional dsRNA bands of over 10 kbp and about 2.5 kbp. (B,C) The colony morphologies of *F. boothii* strains and *F. graminearum* s.str. on PDA nutrition-rich media (B) and SNA nutrition-poor media (C) that were photographed at four days after transplanting. The three *F. boothii* strains exhibited various colony morphologies in terms of colony size, the amount of aerial mycelium and pigmentation. (D) Growth rate of *Fusarium* strains on PDA media. Colony sizes were measured at 3–7 days post-transplantation. (E) Pathogenicity test I. A wheat spikelet was inoculated with *Fusarium* strains by injection and photographed at 15 days post-inoculation. The number of spikelets exhibiting symptoms is presented. (F) Pathogenicity test II. Wheat photographs taken as in (E), but after spray inoculation. Disease index (0–100) were measured based as per Ban and Suenaga (2000) are shown.



により細胞内容物の移行が妨げられる (Zhang and Nuss, 2016)。予備試験 (水谷 (2018)) において Ep-BL13 株と同種 (*F. boothii*) のウイルス非感染株、Ep-55/255 株との対峙培養によるウイルス水平移行を試みたが、ウイルス感染 Ep-55/255 株は得られていない。精製粒子をプロトプラストに導入する粒子トランスフェクション法も開発されているが (Hillman *et al.*, 2004)、この方法は粒子を形成するウイルスにしか適用できない。FbLFV1 には CP がコードされておらず、粒子を形成しないことが示唆されているため、本法の利用も困難であると予想された。そのため、ウイルス非感染株への FbLFV1 導入は困難であると判断し、Ep-BL13 株からのウイルス除去を試みた。マイコウイルスの多くは胞子を介して垂直伝播することが知られるが、低確率でウイルスを含まない胞子が生じる (Hillman *et al.*, 2004)。これを利用し、ウイルス非感染胞子の単離によるウイルス非感染株の樹立を試みた。本実験ではウイルスを含まない胞子の割合を増加させるため、胞子形成誘導時に RNA ウイルス治療薬である Ribavirin の処理を行った。単胞子分離により 18 の娘株 (VC1-VC18) を作出し、dsRNA 抽出によりウイルス感染の有無を調査した。その結果、VC3 株からは D-RNA のみが、VC1 株、VC17 株からは FbLFV1 及び D-RNA の両方が失われており、これらをウイルス除去株として選抜した (Fig. 2-4)。これら 3 菌株はいずれも親株と比較して顕著に生育速度が大きいことが明らかとなり (Fig. 2-4)、すべての株から共通して失われている D-RNA が宿主表現型に関与すると推察された。

### 3-3. ウイルスの垂直伝播効率の測定

糸状菌は効率的な生息域拡大のために、長距離移動に適した単一あ



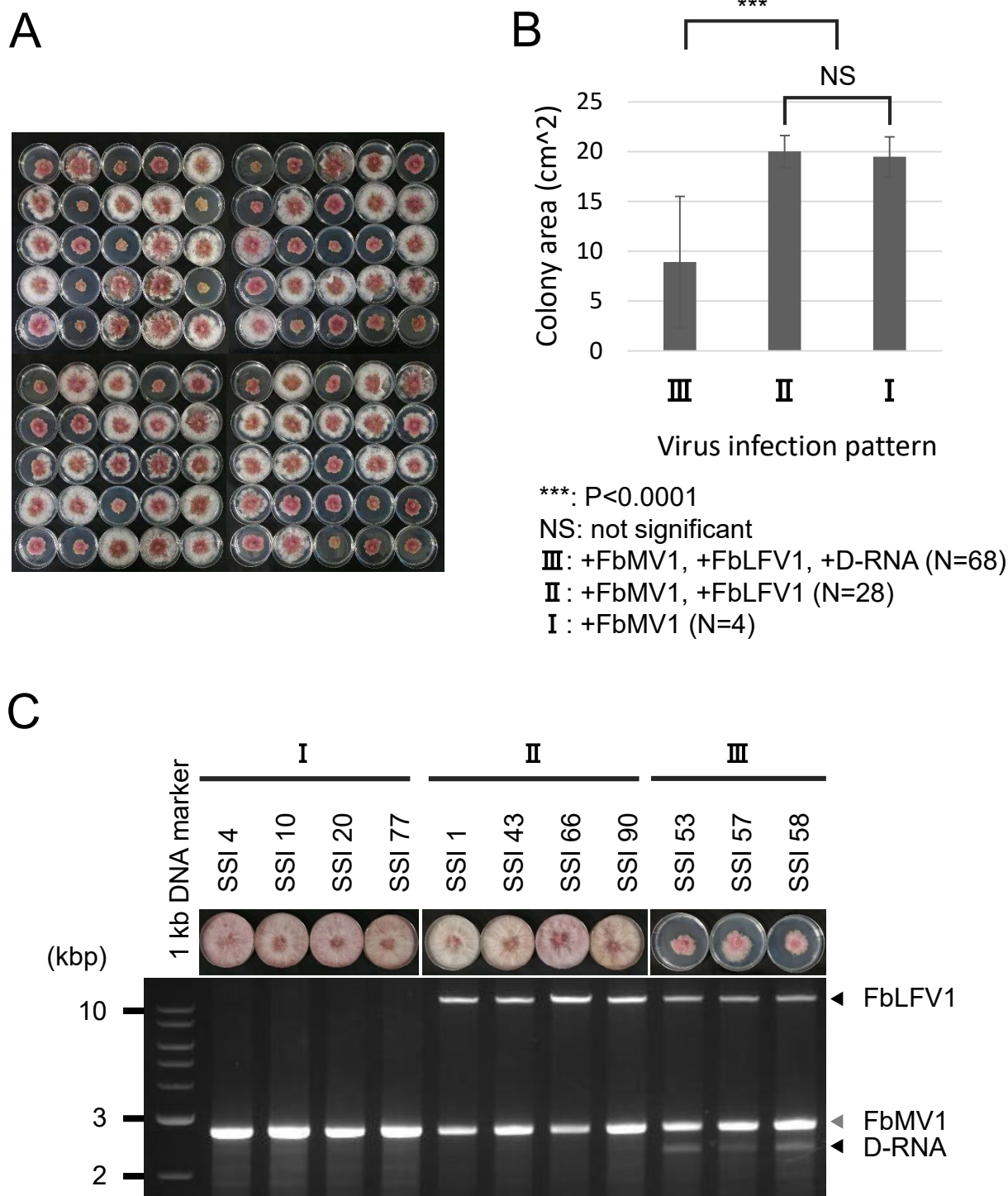
**Figure 2-4. Colony morphologies and dsRNA accumulation patterns of the three virus-cured (VC) strains.**

Colony morphologies of the Ep-BL13-Ori and its derivative strains (VC1, VC3, and VC17) are shown in (A) and their dsRNA banding patterns were shown in (B).

るいは少数の細胞で構成された胞子を形成する。複製サイクルが細胞内で完結するマイコウイルスにとって胞子への垂直伝播効率は適応度に密接に関与するため、その生態を類推するうえで重要な基礎情報となる。Ep-BL13 株に感染するウイルスの垂直伝播効率を調査するため、薬剤処理なしで単胞子分離を行い、Single spore isolate (SSI) を 100 株作出した (Fig. 2-5A)。これらの菌株すべてについて各ウイルスの感染の有無を調査した結果、FbMV1 および FbLFV1 の垂直伝播効率は比較的高い値 (それぞれ 100%、96%) であったのに対し、約 3 割の SSI 株から D-RNA が失われていることが分かった (Table 2-1)。ウイルス感染パターンごとの生育速度を調査した結果、D-RNA を蓄積する株はしない株と比較して顕著に生育が遅いことが明らかとなった (Fig. 2-5B and C)。この結果からも、D-RNA と宿主の生育異常との関連が強く示唆された。

### 3-4. ウイルスの水平伝播試験

薬剤処理により得られた 3 つのウイルス除去株と親株は遺伝的背景が等しく型も同じであるため、菌糸融合によるウイルスの水平伝播が可能である。ウイルス供与株 (Ep-BL13 親株) とウイルス授受株 (VC1 株、VC3 株及び VC17 株) を同じ PDA 培地上に隣接させる形で接種、培養し、ウイルス授与株のコロニー外端部のうち供与株と異なる距離にある 3 か所 (Near、Middle、Far) を切り出して単離培養した (Fig. 2-6)。2 つのコロニーの接点付近ではウイルス授受株の生育速度が低下する傾向が認められ、ウイルスの水平伝播が示唆された (Fig. 2-7A)。単離した菌株のうち VC1-Near 株、VC1-Middle 株及び VC17-Near 株は親株と類似した生育異常を示し、これらに共通して FbLFV1 及び D-RNA

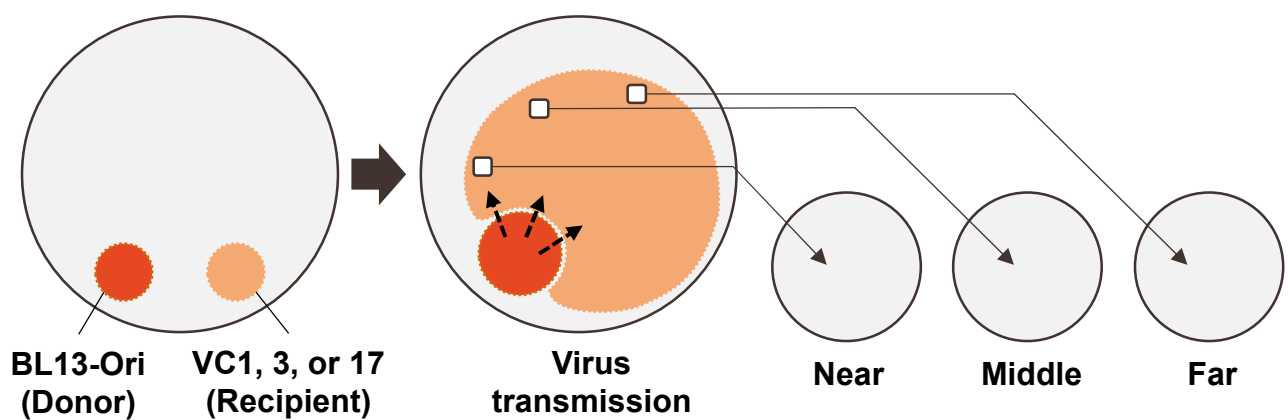


**Figure 2-5. Colony morphologies, growth speeds dsRNA accumulation patterns of single spore isolates (SSIs).**

(A) SSIs just after isolation were incubated on PDA for 5 days and colony of each SSI were photographed. (B) Colony area of each SSI with different dsRNA accumulation pattern was measured and visualized as a bar graph. Colony morphologies and dsRNA accumulation patterns of the randomly selected SSIs (C). Colony morphology and dsRNA banding pattern on agarose gel of each isolates were shown on the same column.

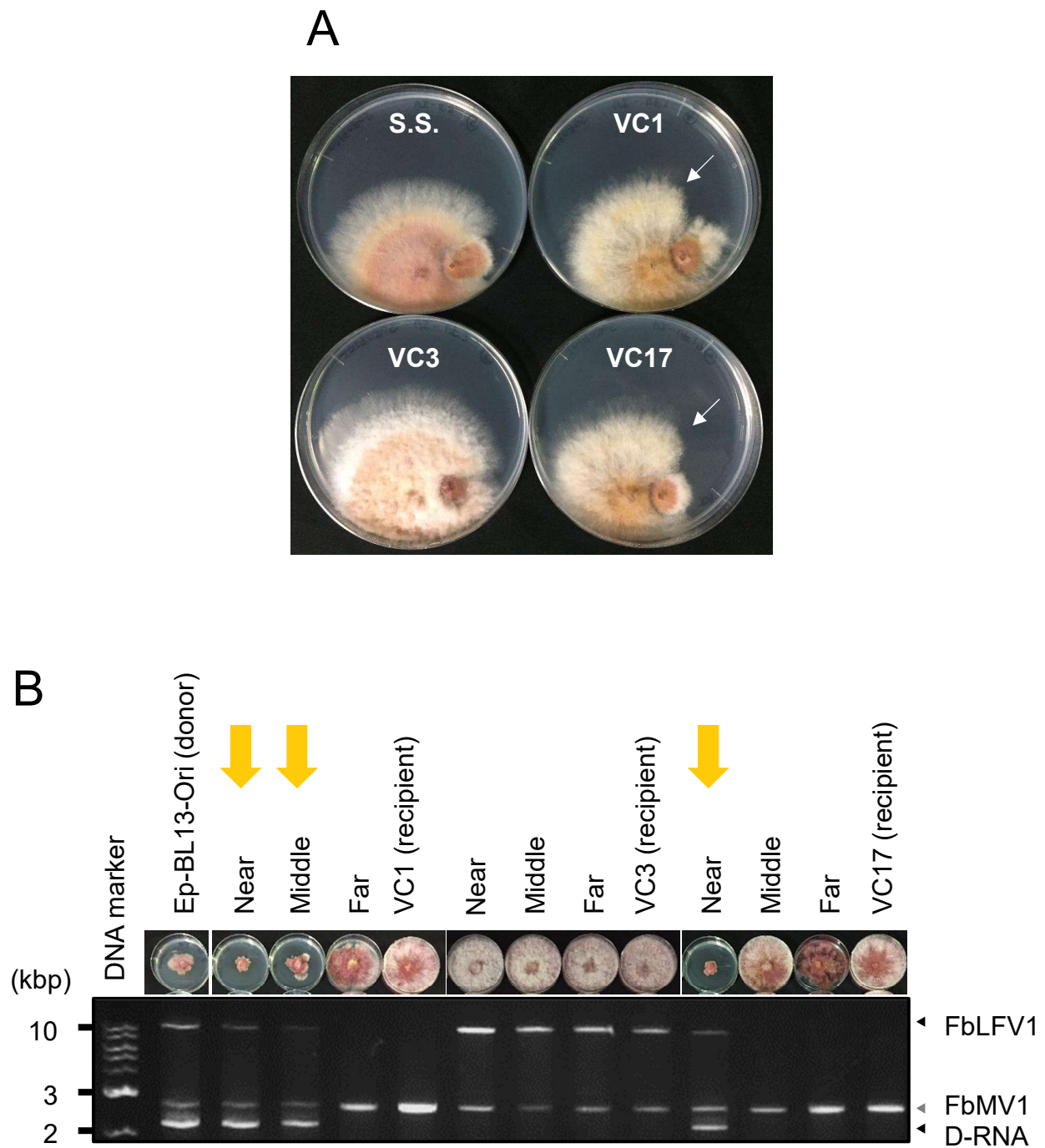
Table 2-1. Vertical transmission rate of the dsRNA elements (N=100).

Vertical transmission rate (%)	
FbMV1	100%
FbLFV1	96%
D-RNA	68%



**Figure 2-6. Schematic diagram of virus transmission experiment.**

Fungal mycelial plugs of the donor strain and a recipient strain were placed on a single PDA plate and grown for 1 week. Fungal mycelia of different distances (Near, Middle, and Far) at the margin of the recipient colony was inoculated on fresh PDA plates and their colony morphologies were observed.



**Figure 2-7. Colony morphologies and dsRNA accumulation patterns of the recipient strains recovered from co-cultured plate.**

**(A)** Co-cultured plates were photographed at 5 dpi. Arrows indicate colony areas of recipient strains showing slow growth. **(B)** Colony morphology and dsRNA banding pattern on agarose gel of each isolates were shown on the same column. Three reisolated strains (near, middle, and far) were shown on the left of the recipient strains, and the donor strain was shown on the left. An arrow indicates isolates showing debilitated morphology and accumulating D-RNA.

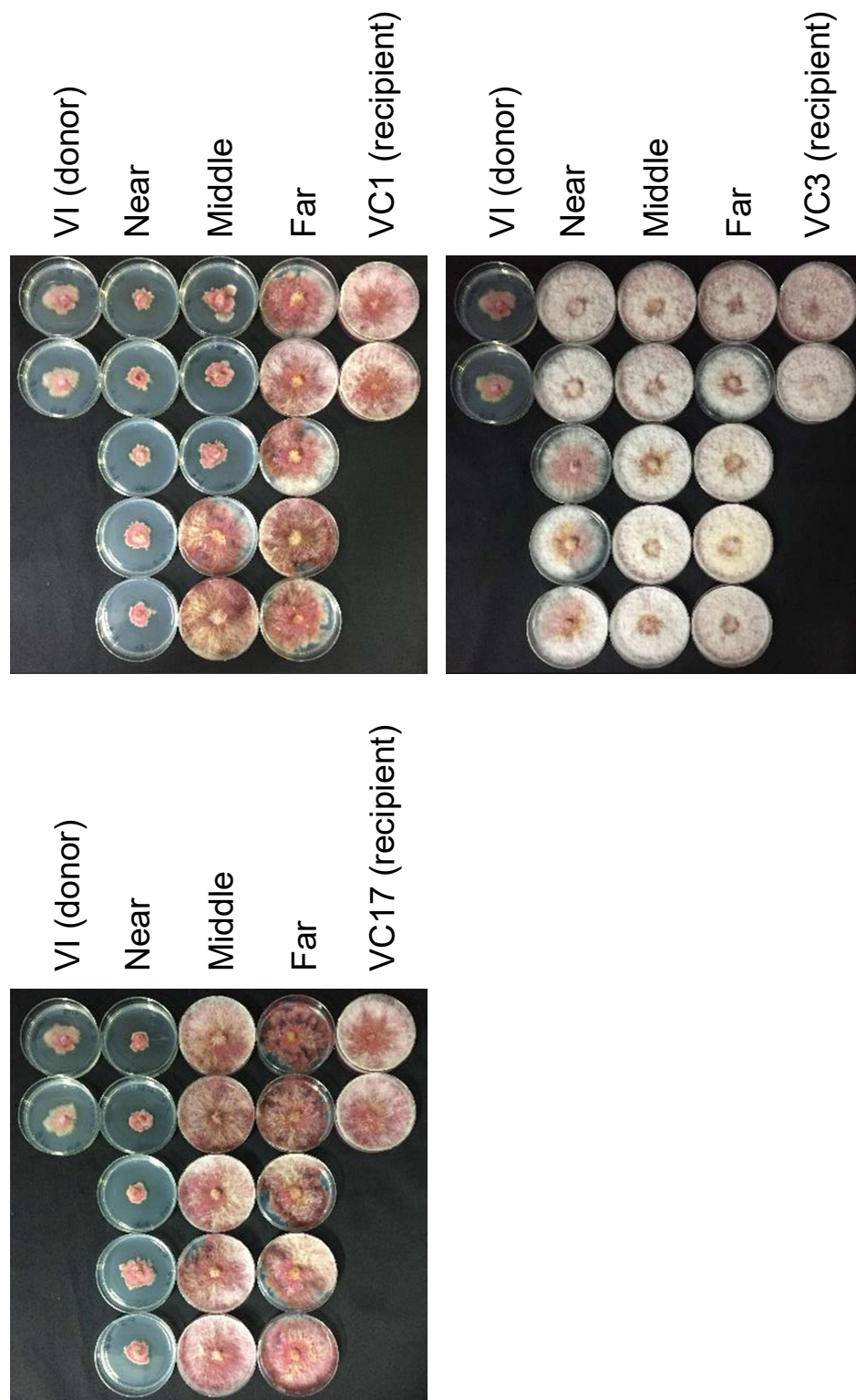


の蓄積が認められた (Fig. 2-7B)。これら 3 つ以外の単離株はすべて正常なコロニー形態を示し、対峙培養前と同じウイルス感染パターンを示した。実験は 5 反復行ったが、すべて同様の結果が得られた (Fig. 2-8)。いずれの反復においても VC3 株由来の単離株からは生育異常を示すものが認められず、何らかの理由により VC3 株への D-RNA の移行が妨げられることが示唆された (Fig. 2-8)。

#### 4. 考察

ウイルス除去株の作出と表現型の比較により、D-RNA が宿主の生育異常に関与する可能性が強く示唆された。リバビリン処理、非処理のいずれの単孢子分離株においても D-RNA を欠失したすべての株で菌糸生育の回復が認められ、逆に D-RNA を蓄積するすべての株が生育異常を呈することが明らかとなった。単孢子分離によりウイルス蓄積量が低下し、それに伴って宿主の生育が回復する現象は報告されており (Hillman and Cai, 2013; Wu *et al.*, 2007)、これらの菌株の分離直後の一時的な生育回復も D-RNA の蓄積量の低下によると推測された。また、菌糸融合を介したウイルスの再導入実験から、D-RNA と表現型が同時に移行する現象が再現性よく観察されており、D-RNA と宿主生育異常への関与が強く示唆された。しかし、これらの結果はあくまで D-RNA と表現型の関連性を支持するに留まる。また、本実験で使用した菌株は全て FbMV1 に感染しており、D-RNA、FbLFV1 と FbMV1 の相互作用の結果として表現型の変化が引き起こされる可能性も排除できない。白紋羽病菌 (*Rosellinia necatrix*) から単離された *Rosellinia necatrix* partitivirus 1 (RnPV1) 及び *Rosellinia necatrix* megabirnavirus 2 (RnMBV2) の単独感染株はウイルス非感染株と同程度の生育速度、病原性を示す





**Figure 2-8. Colony morphologies of the five biological replicates obtained by the virus transmission test.**

The 1<sup>st</sup> replicate (isolates on the first row) were subjected to virus infection confirmation by dsRNA extraction.

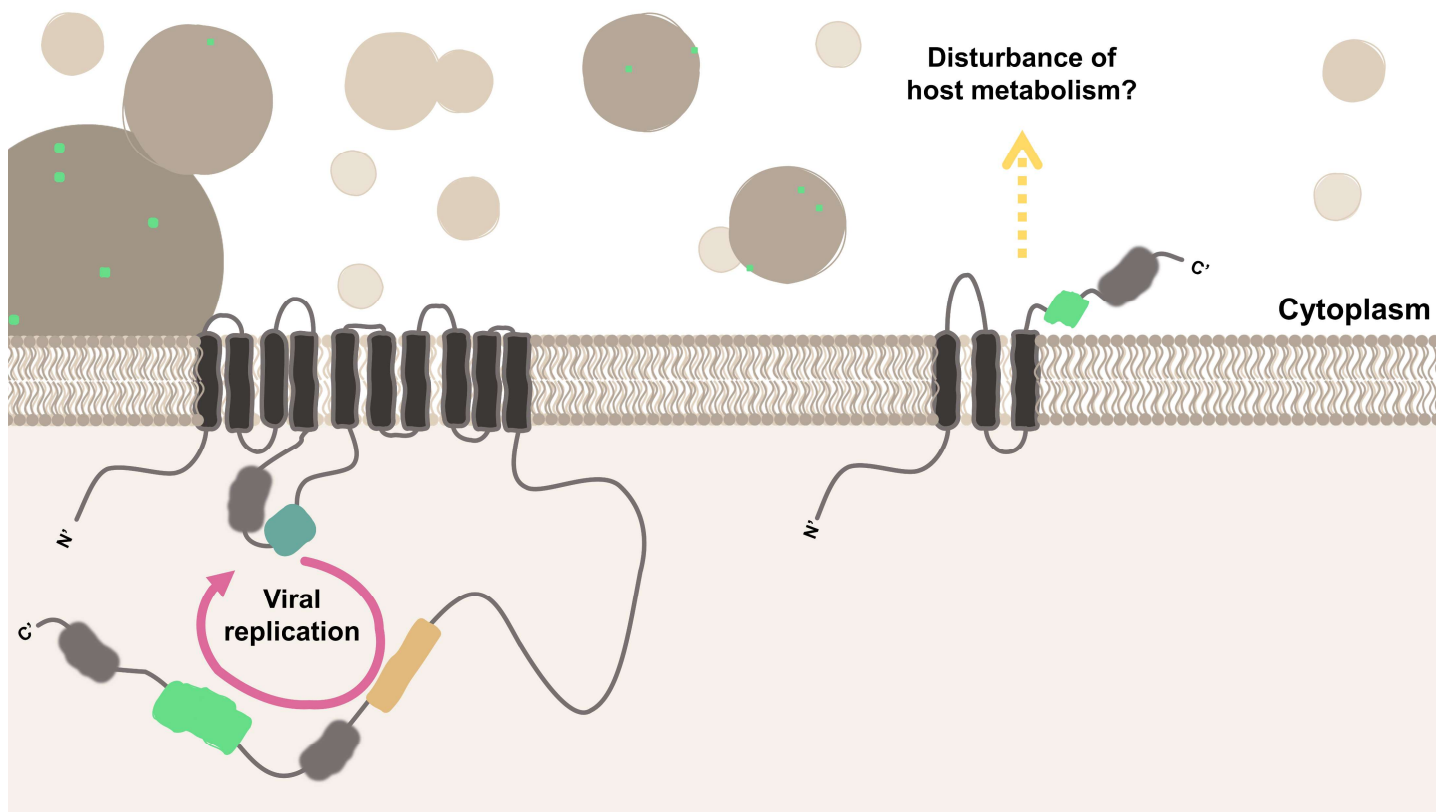
が、これらが重複感染したときのみ、宿主の生育、病原性の顕著な低下を引き起こす (Sasaki *et al.*, 2016)。この現象のメカニズムは不明であるが、ウイルス間の相互作用により宿主表現型の顕著な変化が生じ得ることを示す一例である。D-RNA 及び各ウイルスの宿主への影響を直接的に評価するには単独感染株の作出が必須であると考えられたため、薬剤処理、単孢子分離により FbMV1 除去を試みているが、現在のところ除去株は得られていない。岡山大学の研究 (Shahi *et al.*, 2019) において *Mitovirus* 属の代表種である *Cryphonectria parasitica mitovirus 1* (CpMV1) の複製が宿主の RNA サイレンシングの影響を受けない可能性が指摘されており、ミトコンドリアに局在する(隔離される)という本ウイルスの性質が安定的な感染に寄与することが示唆されている。Mitovirus 除去の試みは数例報告されているが、遺伝的背景の変化を伴わない形で除去できた例はない (Hillman and Cai, 2013)。ウイルスゲノム全長の cDNA を組み込んだプラスミドベクターである感染性 cDNA クローンは+ssRNA ウイルスの逆遺伝学的解析を行う上で強力なツールであり、マイコウイルスにおいては CHV1、yado-kari virus 1 (YkV1) の複製機構や宿主糸状菌との相互作用の解明に利用されている (Chen and Nuss, 1999; Hisano *et al.*, 2018)。ティモウイルス目 (*Tymovirales*) に属する FbLFV1 も CHV1、YkV1 同様+ssRNA ウイルスであると推定されており、感染性 cDNA クローンの構築により単独感染株の樹立が可能であると考えられる。

D-RNA は多様な RNA ウイルスから比較的頻繁に報告される RNA エlementであり、FbLFV1 (ヘルパーウイルス) のゲノムの一部が template-switching mechanism と呼ばれる原理により欠損することで生じると考えられている (Pathak and Nagy, 2009)。菌類ウイルスにおいて

は CHV1、Cryphonectria hypovirus 3 (CHV3)、Rosellinia necatrix partitivirus 2 (RnPV2)、Rosellinia necatrix partitivirus 6 (RnPV6)、BotVF、Trichoderma harzianum hypovirus 1 (ThHV1) などで D-RNA の存在が報告されている (Chiba *et al.*, 2013, 2016; Eusebio-Cope *et al.*, 2010; Hillman *et al.*, 2000; Howitt *et al.*, 2006; You *et al.*, 2019; Zhang and Nuss, 2008)。RnPV2、RnPV6、ThHV1 の D-RNA はヘルパーウイルスの蓄積量を減少させることから Defective Interfering RNA (DI-RNA) と呼ばれており、その存在の有無によって宿主菌株の表現型も大きく変動する (Chiba *et al.*, 2013, 2016; You *et al.*, 2019)。RnPV2 及び RnPV6 は単独感染では宿主の表現型異常を引き起こすが、DI-RNA が蓄積する場合にはこの表現型変化が消失する (Chiba *et al.*, 2013, 2016)。一方で ThHV1 の単独感染株はウイルス非感染株同様の表現型を示すが、DI-RNA の蓄積により宿主の生育阻害、菌寄生能力、孢子形成能力の低下が生じる (You *et al.*, 2019)。FbLFBV1 が属する *Tymovirales* 目においても D-RNA は数例報告されているが、興味深いことにこれらはいずれも共通してヘルパーウイルスの遺伝子領域がフレームシフトを起こさない形で欠失しており、N 末端、C 末端の融合タンパク質をコードする (Beever *et al.*, 2001; Calvert *et al.*, 1996; White *et al.*, 1992)。特に *Tymoviridae* 科 *Potexvirus* 属のメンバーである clover yellow mosaic virus (CYMV) の D-RNA の複製には融合タンパク質自体ではなく融合タンパク質をコードする機能が必須であることが逆遺伝学的実験により示唆されている (White *et al.*, 1992)。FbLFBV1 の D-RNA が同様の性質を有するかに関しては実験的な検証が必要である。

FbLFBV1 がコードする複製酵素の構造予測及び疎水性予測から、本酵素が 10 か所の膜貫通ドメインを有することが推測された (Fig. 1-21)。複製酵素上の 3 つの機能ドメイン Mtr、Hel 及び RdRp に加え、3 か所

の機能未知ドメイン PHA03247 は全て非細胞質領域に存在し、多くの +ssRNA ウイルス同様に複製が脂質膜により細胞質から隔離された区画で行われることが示唆された (Den Boon and Ahlquist, 2010) (Fig. 2-9)。PHA03247 は単純ヘルペスウイルスのテグメントタンパク質 (UL36) にも見いだされる。UL36 はエンベロープ (脂質膜) とカプシド (タンパク質) をつなぎ合わせる機能があり (Scrima *et al.*, 2015)、FbLFV1 の脂質膜上での複製に関与すると推察されるが、詳細な機構は不明である。また、PHA03247 ドメインには共通して天然変性領域 (IDR) が予測された。IDR は特定の構造に折りたたまれることがなく、形状が安定しない領域である。IDR を持つタンパク質 (IDP) は細胞内における液-液相分離 (LLPS) による液滴形成に関与するとされている (Ward *et al.*, 2004)。LLPS は特定のタンパク質、RNA や ATP などの基質が細胞内で濃縮されて液滴を形成し、周囲から緩く隔離される現象であり、多数の異なる反応系を抱える細胞質内において複数の酵素が関与する複雑な反応の場を提供する (Boeynaems *et al.*, 2018)。クロマチン凝集やオートファジーなどの重要な生命現象へ LLPS の関与が明らかとなっており (Noda *et al.*, 2020; Strom *et al.*, 2017)、近年の研究から系統的に広範なウイルスの複製においても重要な役割を担うことが示された (Guseva *et al.*, 2020; Nikolic *et al.*, 2017; Savastano *et al.*, 2020; Zhou *et al.*, 2019)。FbLFV1 複製酵素中の IDR はゲノム複製に関与する機能ドメインと隣接して非細胞質領域に特異的に存在することから、LLPS の FbLFV1 のゲノム複製への寄与が示唆された。D-RNA がコードするタンパク質には 3 か所の膜貫通領域が予測され、FbLFV1 の複製酵素同様膜局在化するタンパク質であると推定された。本タンパク質からは Mtr 及び Hel の全長と RdRp の前半が欠失しており、RdRp の断片 (79 aa)



**Figure 2-9. A schematic diagram of a hypothetical model of FbLFV1 and D-RNA replication.**

Intact FbLFV1 replicase is mounted on a membrane, and viral replication occur on the surface of it. PHA03247 may function for the recruitment of viral RNA, three functional domains and host factors at replication site, possibly in LLPS mediated manner. The putative protein encoded by D-RNA is also a membrane protein, but its C'-terminus including partial RdRp and PHA03247 protrudes into the cytoplasmic side. The C'-terminus may affect fungal metabolism and it may lead to morphological change of the host fungus.

と IDR 及び PH03247-C を含む C'末端側が細胞質領域に露出する。D-RNA 蓄積が宿主の生育異常を引き起こす分子生物学的な原理は不明であるが、この露出した領域が宿主の代謝攪乱に関与する可能性がある (Fig. 2-9)。また、D-RNA は複製をヘルパー (FbLFV1) の複製酵素に依存すると推察されており、細胞内ではヘルパーと類似した細胞内局在を示すはずであるが、D-RNA の垂直伝播効率は比較的低く、D-RNA は細胞内のより限られた区画に局在すると考えられる (Table 2-1)。

諸言で述べたように、ヴァイロコントロールの成功例はこれまで 2 例報告されている。1 例目は CHV1 によるヨーロッパでのクリ胴枯病の防除、2 例目は SsHADV-1 による菌殻病の防除である (Heiniger and Rigling, 1994; Zhang *et al.*, 2020)。宿主の病原性を低下させるウイルスの報告数と比較して成功例が顕著に少ない理由として、ヴァイロコントロールの成否がウイルスの伝播効率によって大きく左右されることが挙げられる (Milgroom and Cortesi, 2004)。ヴァイロコントロールは、ウイルス感染菌株の導入により圃場中の菌株集団へウイルスを蔓延させ、圃場全体で持続的に病害発生を抑制する方法である。しかしほとんどのマイコウイルスの菌株間の移行手段は遺伝的にごく近縁な (VCG が同一の) 菌株間でのみ生じる菌糸融合に限られており、圃場へのウイルスの蔓延が防除におけるボトルネックとなっている。CHV1 によるクリ胴枯病防除が成功した理由は、施術した樹林におけるクリ胴枯病菌の遺伝的多様性が低く、菌糸融合が比較的頻繁に生じたためであると考えられており、現により高い遺伝的多様性が確認されたアメリカの樹林では同病害の防除に失敗している (Milgroom and Cortesi, 2004)。一方で、SsHADV-1 は樹木病害に比べてより迅速なウイルス伝播が必要となる単年性草本植物病害の防除に圃場レベルの試験で例外的に成果を上げ



ている (Zhang *et al.*, 2020)。菌核病菌 *Sclerotinia sclerotiorum* から単離された SsHADV-1 はマイコウイルスとしては珍しい DNA ウィルスであるが、ヴァイロコントロールに適した様々な性質を持つことが報告されている。本ウィルスは VCG が異なる菌株間においても菌糸融合を介した移行が可能である (Yu *et al.*, 2010)。これに加え、精製粒子あるいは菌糸断片の噴霧接種や昆虫ベクターの利用によって容易にウィルスの伝播が生じることが報告された (Liu *et al.*, 2016; Yu *et al.*, 2013)。このような宿主糸状菌の自己非自己認識能に依存しない効率的な伝播能力が、SsHADV-1 が病害防除に成果を挙げる上で重要な要因となったと考えられる。さらに、SsHADV-1 に感染した *S. sclerotiorum* は病原性を失う代わりに植物組織内で内生菌として持続感染する能力を獲得し、植物に病害抵抗性を付与することも示された (Zhang *et al.*, 2020)。以上を鑑みると、ヴァイロコントロールの成否は伝播能力を主とするウィルス固有の性質に大きく依存すると推察される。そのため、ヴァイロコントロールによる持続的かつ安定的な効果を達成するには、これまで以上に大規模なスクリーニングによる有用ウィルス資材の探索、もしくは伝播能力が低いウィルスでも効果を発揮できる新しい施術方法の開発が必要である。

D-RNA が宿主の生育異常の原因であることを示す明確な証拠は得られていないが、本研究の結果から D-RNA のヴァイロコントロールへの適用は困難であると推察された。植物表面に付着した胞子の発芽と植物体への侵入はコムギ赤かび病の発病機序の第一段階であるが、D-RNA の比較的低い垂直伝播効率は、D-RNA を導入した生育異常の菌株からも病原性を持った胞子が再生産されることを示唆している (Table 2-1)。また、水平伝播試験では D-RNA のみを失った菌株へは D-RNA が

伝播されず、水平伝播能力が通常のマイコウイルスよりもより限定的である可能性がある (Fig. 2-6)。ウイルス受領株に感染する FbLFV1 がウイルス供与株からの D-RNA の移行を妨げる要因であるかは不明であるが、胞子形成時に生産される D-RNA のみを失った株への D-RNA の再導入が困難となる場合、持続的な防除法としては期待できない。しかし、宿主病原菌－ウイルス間の相互作用の研究は病原菌の性状理解につながる可能性がある。*C. parasitica* と CHV1 を利用した研究から、宿主の生育や病原性に関与する遺伝子が複数同定されている (Baek *et al.*, 2014; Gao *et al.*, 2013)。*Sclerotinia sclerotiorum integrin-like gene* (SSITL) は *S. sclerotiorum* の病原性を低下させるウイルス (Sclerotinia sclerotiorum debilitation-associated RNA virus: SsDRV) の感染により発現が抑制される宿主遺伝子として見いだされたが、シロイヌナズナに対する病原性に重要な分泌タンパク質であることが明らかとなった (Zhu *et al.*, 2013)。これらの例を踏まえると、Ep-BL13 株と感染ウイルスの相互作用を解明することで FGSC の発病機序理解、新奇防除方法の開発に貢献しうると考えられる。



## 研究項目 3: 環境分離菌 (*Trichoderma* 属菌) に感染するウイルスの性状解析

### 1. 研究背景

#### 1-1. *Trichoderma* 属菌

*Trichoderma* 属菌は世界中の様々な環境に普遍的に存在する代表的な土壌常在菌であり、おもに植物根圏に生息することが知られている (Vinale *et al.*, 2008)。*Trichoderma* 属には現在 89 種が認められるが (Samuels, 2006)、中でも *T. harzianum*、*T. atroviride*、*T. viride* などは広範な宿主に対して強力な菌寄生能力を有しており、*Fusarium* 属菌、*Rhizoctonia* 属菌、*Botrytis* 属菌などの植物病原菌に対する高い発病抑制効果を示すため、農業の現場では生物防除資材として広く用いられている (Harman *et al.*, 2004)。菌寄生能力に加え、これらの菌は植物と共生関係を築き、生育や病害抵抗性を向上させるため、作物収量増加に相乗的な効果を発揮する (Harman *et al.*, 2004; Vinale *et al.*, 2008)。一方で、その高い生育速度と広い宿主域から様々な食用キノコの収量を著しく損なうため、防除の対象ともなっている (Samuels, 1996)。菌寄生能力には多様な糖質関連酵素 (CarbohydrateActive enZymes: CAZymes)、抗菌活性物質の合成、分泌が関与する。CAZymes には植物細胞壁の構成要素である難分解性高分子を分解するものが含まれ、菌寄生能力だけでなく、生態系内の物質循環にも重要な役割を担う (Baldrian *et al.*, 2011; Lynd *et al.*, 2002)。中でも *T. reesei* は工業的なセルラーゼ、ヘミセルラーゼの大量生産に適しており、様々な変異株が昨今のエネルギー問題の解決策として注目されるバイオ燃料の合成に利用されている (Bischof *et al.*, 2016)。

## 1-2. *Trichoderma* 属菌のウイルス

*Trichoderma* 属菌を宿主とするウイルスは+ssRNA ウイルスおよび dsRNA ウイルスを含む 7 種が報告されている。dsRNA ウイルスには未承認ウイルス科である Fusaguraviridae 科に属する *Trichoderma atroviride* mycovirus 1 (TaMV1)、*Trichoderma asperellum* dsRNA Virus 1 (TaRV1)、*Partitiviridae* 科に属する *Trichoderma atroviride* Partitivirus 1 (TaPV1)、*Trichoderma harzianum* Partitivirus 1 (ThPV1) が含まれる (Chun *et al.*, 2018b, 2018a; Lee *et al.*, 2017; Zhang *et al.*, 2018)。+ssRNA ウイルスは *Hypoviridae* 科 Betahypovirus 属から ThHV1 が報告されている (You *et al.*, 2019)。また、*Parititviridae* 科と系統学的関連性がある未分類ウイルスとして *Trichodemra harzianum* mycovirus 1 (ThMV1)、*Trichoderma harzianum* bipartite mycovirus 1 (ThBMV1) が報告されている (Liu *et al.*, 2019b, 2019a)。これらの内 TaMV1、ThPV1、ThHV1 及び ThMV1 に関してはその感染により宿主表現型に変化が生じるが、興味深いことに ThPV1 感染株では宿主の菌寄生能力が向上する (Chun *et al.*, 2018a)。また、*T. harzianum* strain 525 を処理したキュウリは根の発育が増加するが、ThMV1 感染により生育促進能力が向上する傾向が観察された (Liu *et al.*, 2019b)。この結果はウイルス感染により生じる宿主 *Trichoderma* 属菌の代謝変動が土壌中の微生物環境や植物の生育に影響を与えること、さらには植物根圏の生態系におけるマイコウイルスの重要性を示唆している。

本研究では、生態系におけるマイコウイルスの機能理解を目的として環境中から単離された *Trichoderma* 属菌に感染するウイルスの配列解析及び分子系統解析を行った。またこれらのウイルス感染と宿主表現型の関連についても調査した。

## 2. 材料と方法

### 2-1. 生育速度測定

PDA 培地上のコロニーから採取した菌糸片を PDA、SNA、あるいは *Trichoderma* 選択培地 (THSM) [0.02%  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ , 0.09%  $\text{K}_2\text{HPO}_4$ , 0.1%  $\text{NH}_4\text{NO}_3$ , 0.015%  $\text{KCl}$ , 0.3% Glucose, 2% Agar, w/v] の入った直径 6 cm のシャーレに植継ぎ、温度 20°C、暗黒あるいはブラックライト (BL) 照射下で 48 時間培養した。培養開始から 24 時間後、48 時間後に菌糸片の外端部からコロニーの外端部までの距離をシャーレー一枚につき四方向測定した。それぞれの実験区分について 5 回の生物学的反復測定を行い、平均値と標準偏差を算出した。

### 2-2. 孢子形成能力測定

PDA 培地上のコロニーから採取した菌糸片を THSM の入った直径 9 cm のシャーレに植継ぎ、20°C、BL 照射下で 5 日間培養した。培地上に 15 ml の孢子回収溶液 [0.8%  $\text{NaCl}$ , 0.05% Tween20] を加え、スプレッダーにより菌糸を十分に懸濁したのち、2 重にしたソフライナーで懸濁液を濾過した。濾過液を 15 ml チューブに移し、遠心分離 (20°C、3,000 x g、15 分) により孢子を沈殿させた。上清を除いた後に 5 ml の滅菌水で沈殿を再懸濁し、血球計算版を用いて孢子数を算出した。それぞれの菌株について 3 回の技術的反復測定を行い、平均値と標準偏差を算出した。

### 2-3. 統計解析

統計解析には Microsoft Excel を使用した。2 つの測定区分間の分散性の検証には F 検定を使用した。両側検定で P 値が 0.005 以下であった場

合に等分散とした。2つの測定区分の有意差検定には T-検定を使用し、P 値が 0.005 以下であった場合に統計的に優位であると判定した。

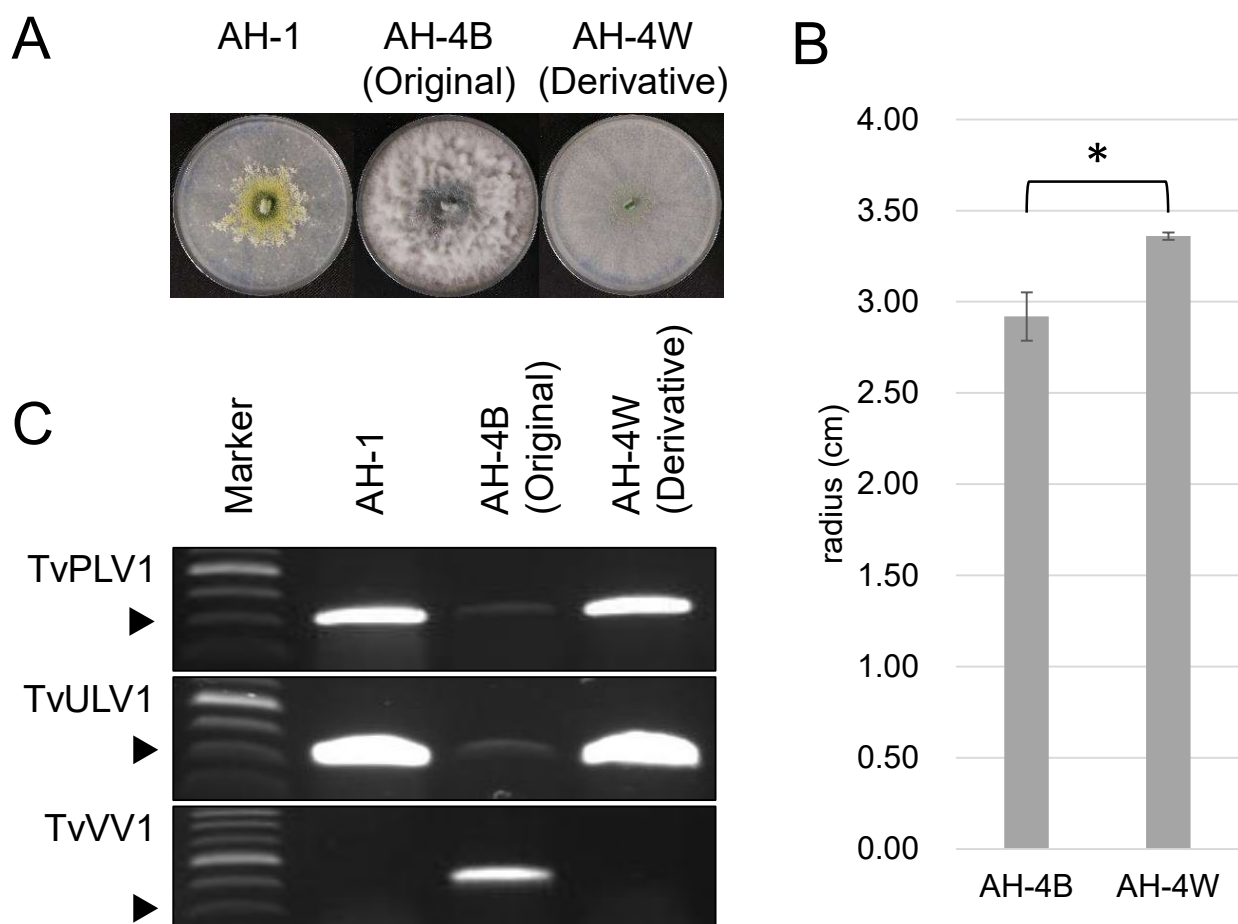
#### 2-4. 顕微鏡観察

PDA 培地上のコロニーから採取した菌糸片を 3% Agar の入った直径 6 cm のシャーレに植え継ぎ、20°C、暗黒下で 5 日間培養した。培地上の菌糸に Calcofluor-white (CW) (Sigma-Aldrich) を滴下し、常温で 3 分間静置したのち、コロニーの外端部を共焦点レーザー顕微鏡 (VF1000, オリンパス) で観察した。

### 3. 結果

#### 3-1. 生育速度調査

研究項目 1 の結果から、AH-1 株、AH-4 株にはそれぞれ TvPLV1 及び TvULV が重複感染することが明らかとなった (Table 1-21)。さらに AH-4 株にはこれら 2 種のウイルスに加え、TvVV1 も感染する。PDA 培地上でのコロニー形態の観察から、AH-4 株は褐色から黒色の色素沈着を呈し、AH-1 株と比較して気中菌糸量の増加がみられた (Fig. 3-1A)。また、AH-4 株の継代培養により異なるコロニー形態を示す派生株、AH-4W 株が単離された。以降、親株である AH-4 株を便宜上 AH-4B 株と呼称する。AH-4W 株は上で白色のコロニー、黄色の胞子塊を形成し (Fig. 3-1A)、PDA 培地上での生育速度が AH-4B 株よりも顕著に早いことが明らかとなった (Fig. 3-1B)。精製 dsRNA のアガロースゲル電気泳動、及びウイルス特異的プライマーを用いた RT-PCR により、AH-4W からは AH-4B 株に感染する TvVV1 が失われていることが明らかとなり (Fig. 3-1C)、TvVV1 感染と宿主の表現型の関連が示唆された。



**Figure 3-1. Colony morphologies, virus infection patterns, and growth speed of *T. viride* strains.**

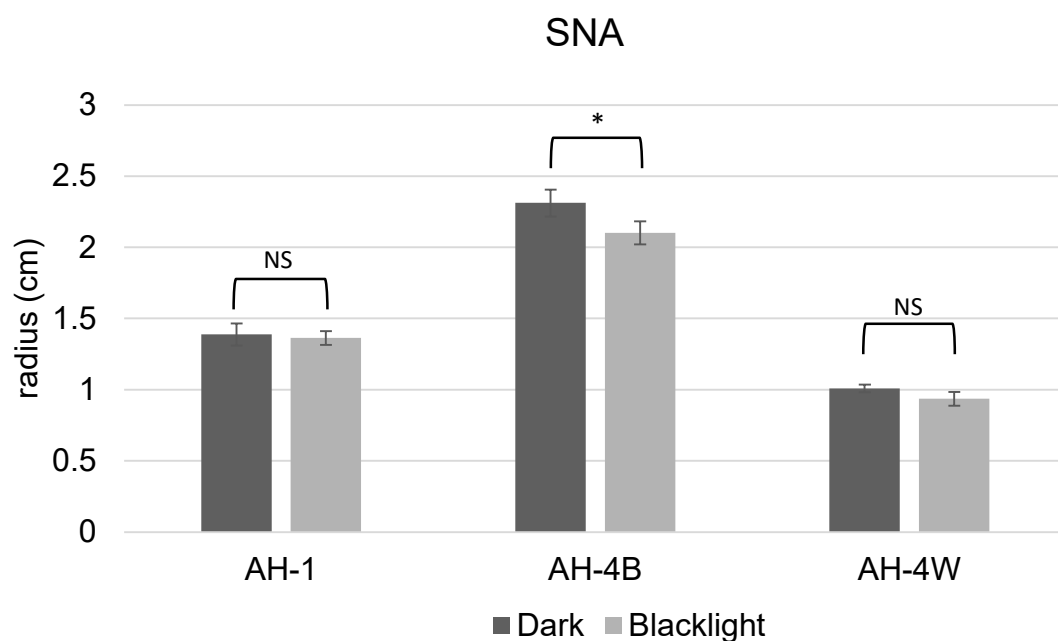
(A) Fungal mycelia of AH-1, AH-4B and AH-4W were grown on THSM and photographed at 5 days post inoculation. (B) The radius of fungal colonies of AH-4B and AH-4W grown on PDA at 24 hours post inoculation as a histogram. The figures were made with five biological replicates for each bars. An asterisk indicates statistical significance with p-value lower than 0.005 by student t-test. NS indicates there are no statistical significance. (C) Viral RNA accumulation was confirmed by RT-PCR using virus-specific primer sets. A triangle indicates DNA marker in length 300 bp.

自然環境下における菌類の生育条件は一定ではなく、利用できる栄養の制限や種々の環境ストレスに晒される。生態系における TvVV1 の宿主への影響をより正確に推測するため、異なる栄養源を含む培地上での生育速度を調査した。また、AH-4B 株の産生する黒色色素はフェノール抽出において水層、フェノール層のいずれにも不溶であったため（データ未掲載）、メラニン的一种である可能性が考えられた。菌類はメラニンなどの色素を合成し、紫外線を主とする光ストレスからの保護に利用する（Schumacher and Gorbushina, 2020）。これまでの結果から TvVV1 感染が宿主の色素合成を促進することが示唆されていたため、BL 照射による菌の生育に対する影響の調査も同時に行った。その結果、貧栄養培地である SNA、富栄養培地である THSM の両方で AH-4B 株が AH-1 株、AH-4W 株よりも早い生育速度を示した（Fig. 3-2）。また、AH-4B 株でのみ、BL 照射における生育抑制がみられた。AH-4B 株は PDA 培地上では AH-4W 株よりも低い生育速度を示したことから、TvVV1 感染が宿主菌の環境ストレスへの応答に影響を与えることが示唆された（Fig. 3-2）。

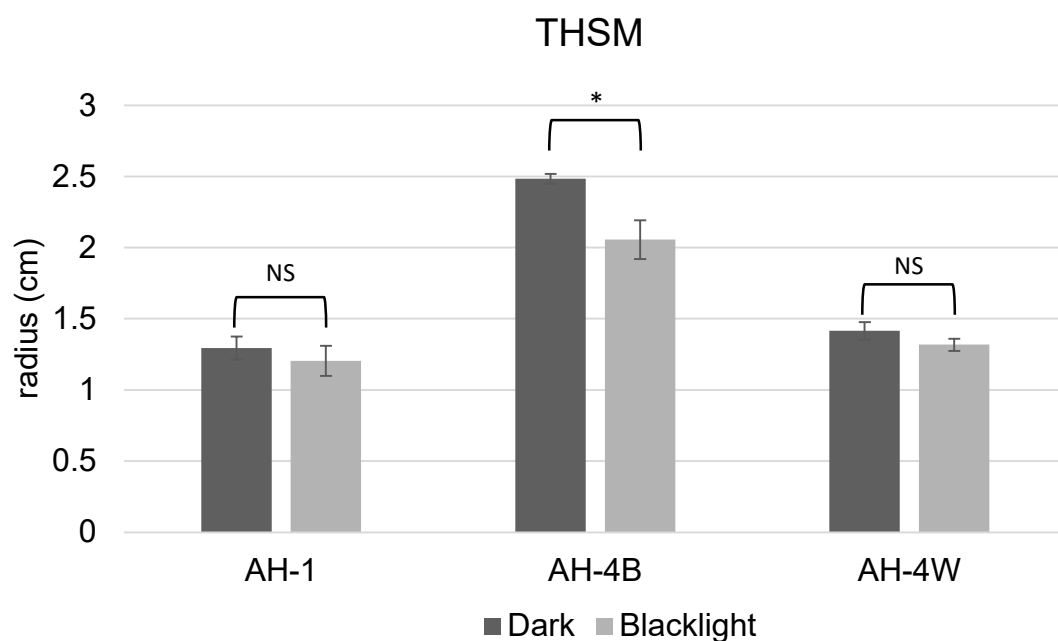
### 3-2. 孢子形成能力調査

各菌株の孢子形成能力を調査するため、シャーレー一枚当たりの孢子数を計測した。その結果、AH-1 株、AH-4W 株に孢子形成能力が認められた一方で、AH-4B 株からは孢子が全く検出されなかった（Fig. 3-3）。また、AH-1 株と AH-4W 株のウイルス感染パターンは同じであるが、孢子形成能力に顕著な差が認められた。これら 2 つの株は異なる分離源から単離されたことから遺伝的背景が異なると考えられ、孢子形成能力の違いは宿主の遺伝的な差異に起因すると推察された。

A



B



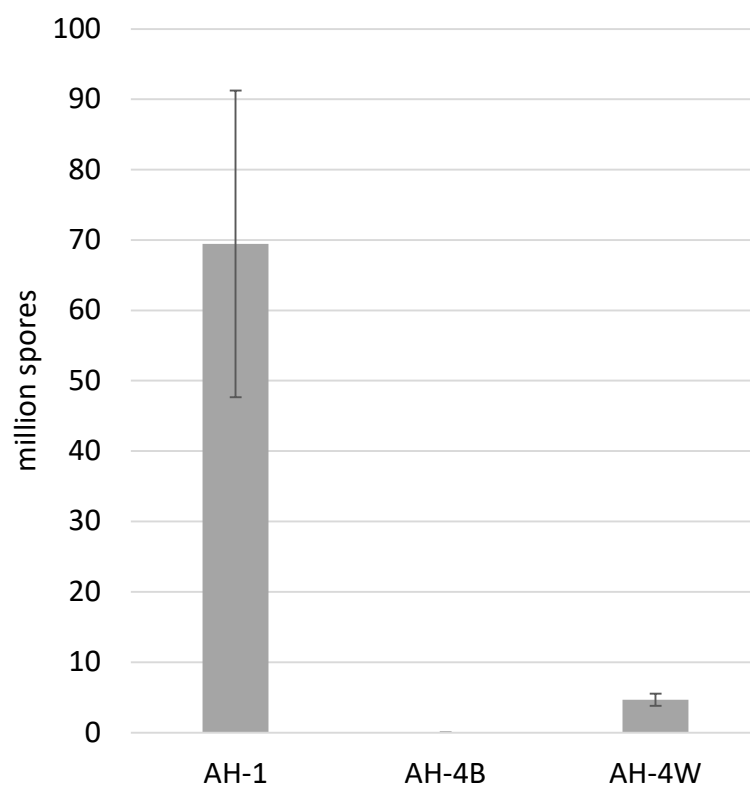
2 dpi

N=5

\*:  $P < 0.005$  (T-test)

**Figure 3-2. Histograms showing the radius of fungal colonies grown on SNA (A) and THSM (B) with or without blacklight exposure.**

The figures were made with five biological replicates for each bars. An asterisk indicates statistical significance with p-value lower than 0.005 by student t-test. NS indicates there are no statistical significance.



**Figure 3-3. A histogram showing the sporulation ability of *T. viride* strains.**

The number of spores collected from single colony grown on a THSM were measured. No fungal spore was collected from AH-4B. Bars indicate standard deviation.

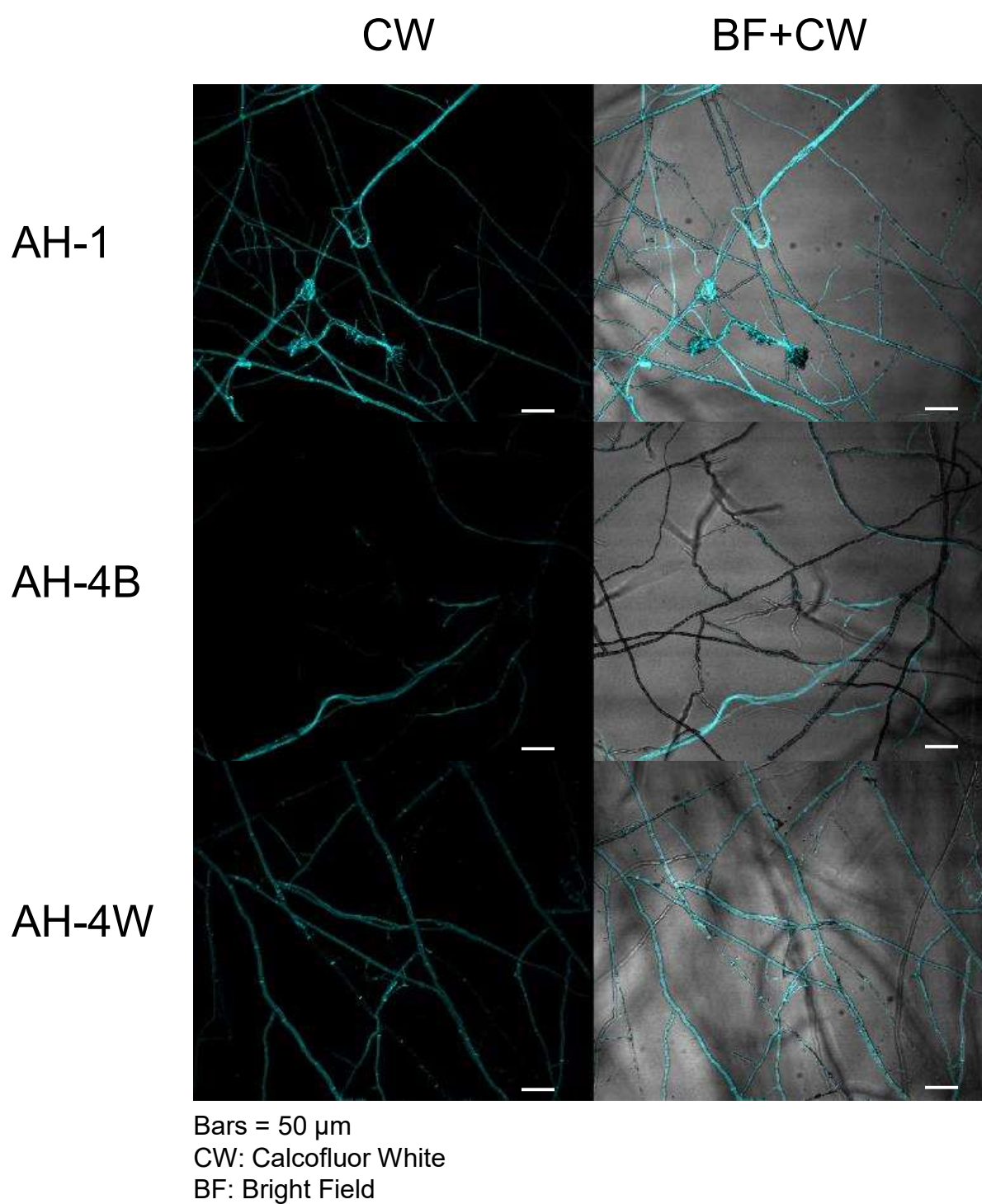


### 3-3. 顕微鏡観察

AH-4B 株、AH-4W 株は外観上大きく異なるコロニーを形成する。菌糸レベルでの形態の違いを明らかにするため、共焦点顕微鏡を用いて各菌株の菌糸の詳細な観察を行った。寒天培地上で生育した菌糸の細胞壁を CW で染色して観察した結果、AH-1 株及び AH-4W 株の菌糸がすべて CW で染色される一方で、AH-4B 株は CW での染色効率が著しく低下した、黒色色素を沈着する菌糸を発達させることが明らかとなった (Fig. 3-4)。また、AH-1 株、AH-4W 株においては *Trichoderma* 属菌に典型的なフィアライドのほぼ垂直の分枝が見られず、無秩序に枝分かれした菌糸の集合体の内部で胞子の形成が行われる様子が観察された (Fig. 3-4)。

## 4. 考察

TvVV1 感染株 (AH-4B 株) と TvVV1 除去株 (AH-4W 株) の表現型比較により、TvVV1 感染が宿主表現型に影響を与えることが示唆された。具体的には、TvVV1 の除去により気中菌糸及び色素沈着の減少、胞子形成能力の増加 (回復)・栄養条件による応答の変化が生じた (Figs. 3-1 to 3-4)。マイコウイルス感染による気中菌糸量、色素沈着、胞子形成能力の変動は複数報告されている (Ghabrial *et al.*, 2015; Hillman *et al.*, 2018; Son *et al.*, 2015)。例えば FgV1 の感染は宿主糸状菌 (*F. graminearum*) の生育速度、気中菌糸量、胞子形成能力、コムギへの病原性の低下、色素沈着の増加を引き起こす激しい症状を呈する (Lee *et al.*, 2014)。一方で、ウイルス感染により栄養、光条件に対する応答が変化する例は筆者の知る限り報告されていない。菌類の生育環境は一定ではなく、生存のために様々な環境に適応する必要がある (Rodriguez-Romero *et al.*, 2010)。



**Figure 3-4. Microscopic observation of fungal mycelia.**

Fungal mycelia were observed under the confocal laser scanning microscopy. Cell wall was stained with calcofluor white (CW) and visualized as light-blue.

本研究により、AH-4B 株の生育速度は PDA 培地上では AH-4W 株よりも小さいが、SNA 及び THSM 培地上では AH-4W 株よりも大きくなることが示された (Figs. 3-1 and 3-2)。また、AH-4B 株は BL 照射により生育速度が低下することも示された。これらの結果はウイルス感染パターンの違いが宿主菌類の環境への応答をゲノムの変異を伴わない形で変化させ、異なるニッチへの適応を促進することを示唆している。しかし、異なる培地に対する応答変化に関与する物質は不明であり、さらなる解析が必要となる。光条件は菌類が周囲の環境（特に土壌中であるか、地上であるか）を認識するうえで重要な刺激である。*N. crassa* において概日リズム、菌糸の生育、色素合成、無性孢子形成に関連する種々の代謝経路が主に紫外線から青色光によって調節されることが明らかとなっている (Corrochano, 2007)。TvVV1 感染株 (AH-4B 株) のみにおいて BL 照射により生育が負に制御されたことから、光刺激に対する上記の代謝経路の調節にウイルスが関与する可能性が示された (Fig. 3-2)。AH-4B 株が産生する黒色色素は水、Phenol、2-propanol のいずれにも不溶なため、メラニン的一种であると推測された (データ未掲載)。細胞壁に蓄積するメラニンの機能については主に動物病原糸状菌において詳しく研究がなされており、抗菌物質や活性酸素種、熱ストレスに対する抵抗性、細胞壁の機械的強度の増加に重要な役割を担うことが知られている (Nosanchuk and Casadevall, 2006)。ヒトのクリプトコッカス症の原因菌である *Cryptococcus neoformans* は特定の条件下で細胞壁にメラニンを蓄積するが、Uvitex (CW と同じく菌類細胞壁成分であるキチンを標的とする) による染色効率がメラニン誘導処理を行った菌糸で著しく低下する (Perez-Dulzaides *et al.*, 2018)。顕微鏡観察により AH-4B 株の形成する黒色の菌糸は CW による染色効率が顕著に低いこ

とが明らかとなり、*C. neoformans* 同様メラニンの細胞壁への蓄積が示唆された (Fig. 3-4)。 *Trichoderma* 属菌の生態におけるメラニンの役割に関する知見は極めて限られているが、*T. viride* の孢子細胞壁がキチンの代わり含有するメラニンが自身の分泌する細胞壁分解酵素からの孢子の保護に関与すると考えられており (Benitez *et al.*, 1976)、AH-4B 株の菌糸に蓄積する黒色色素と細胞壁分解酵素耐性の関係性にも興味を持たれる。

BLASTX 解析及び分子系統解析の結果から TvVV1 は *Victorivirus* 属のメンバーであると推定された (Table 1-21 and Fig. 1-26)。 *Victorivirus* は一例を除き宿主に対して無病徴感染すると考えられている (Ghabrial and Nibert, 2009; Ghabrial *et al.*, 2015; Hillman *et al.*, 2018; Xie *et al.*, 2016)。 *Helminthosporium victoriae* virus 190S (HvV190S) は本属内で宿主の生育異常への関与が報告されている唯一のウイルスであるが、分子系統解析から TvVV1 は HvV190S よりも無病徴感染ウイルスとされる *Sphaeropsis sapinea* RNA virus 1 (SsRV1) と近縁であると推定された (Preisig *et al.*, 1998) (Fig. 1-26)。 定量的データは得られていないが、dsRNA の電気泳動写真から TvVV1 の菌体内蓄積量が極めて高いことが示唆された (Fig. 1-8)。 RnPV2 は DI-RNA の非存在下、あるいは *dcl2* 破壊 (RNA サイレンシング欠損) 株ではゲノム dsRNA 蓄積量が増加し、それに伴って宿主糸状菌の表現型異常が生じるが (Chiba *et al.*, 2013)、AH-4B 株における TvVV1 ゲノム dsRNA の多量蓄積が宿主表現型変化の原因となっている可能性がある。また、TvVV1 は AH-4 株内で TvPLV1 及び TvULV1 と重複感染しており、研究項目 2 における D-RNA 同様複数のウイルスとの相互作用の結果宿主表現型の変化が生じている可能性がある。AH-4B 株の TvVV1 蓄積量は TvPLV1 及び TvULV1 と比較し

て極めて高く (Figs. 1-8 and 3-1C)、TvVV1 が宿主表現型変化に最も大きな影響力を有すると推察されるが、これに関しても定量的なデータは得られていない。TvVV1 感染と宿主表現型変化の関連性を証明するにはウイルス再感染株を作出し、比較する必要がある。

AH-4W 株は継代培養により偶発的に TvVV1 を失った菌株として単離された。マイコウイルスはコロニー全域にわたって均一に蓄積しているわけではなく、コロニー内の分布もウイルス種によって大きく異なることが報告されている (Yaegashi *et al.*, 2011)。本研究において継代培養はコロニーから菌糸片を切り出し、新しい培地に移すことで行われたが、TvVV1 が存在しないコロニー領域からの切り出しにより AH-4W 株が作出されたと推察された。

シイタケ (*Lentinula edodes*) の病原菌として単離された *Trichoderma* 属菌コレクションからのスクリーニングでは 32/315 株 (10.4%) でウイルス感染が認められた (Yun *et al.*, 2016)。dsRNA 蓄積の有無を指標とした選抜では見逃される潜在感染ウイルスを考慮すると (研究項目 1、研究背景参照) 実際の感染率はもう少し高いと考えられるが、一割を超える *Trichoderma* 属菌が程度の違いはあれどウイルス感染による代謝変動の影響を受けるという事実は、生態系におけるマイコウイルスの重要性を示唆する。本属の分類は主にコロニー形態、菌糸や分生子の形状などの形態的特徴を基になされてきたが、近年の分子系統学的分類方法の確立により生育が遅く、菌糸が褐色や茶褐色を呈するなど *Trichoderma* 属菌の特徴に該当しないものも数多く単離されている (Jaklitsch, 2009)。本研究や先行研究からウイルス感染により生育速度の低下、褐色や橙色の色素沈着が誘導されることが示唆される通り (You *et al.*, 2019) (Figs. 3-1A, 3-1B, and 3-4)、従来の分類基準におい

てマイコウイルス感染による表現型変化が一部の *Trichoderma* 属菌の発見及び分類を妨げていた可能性がある。

*Trichoderma* 属菌は生態系において菌寄生菌、植物共生菌、分解者としての3つの役割を持つことが知られている。本研究から、ウイルス感染による宿主 *T. viride* の表現型（気中菌糸量、色素沈着、環境応答）の変化が示唆されたが、上記の役割を果たすうえで生じる影響は不明である。これを推定するにあたって、以下の5つの点、すなわち、1) 生育応答の違いを規定する物質は何なのか、2) AH-4B 株に沈着する色素は何なのか、3) 細胞壁分解酵素の分泌能力と、それに対する耐性に違いはあるのか、4) 菌寄生能力に違いはあるのか、5) 植物との共生能力はあるのか、は特に重要である。今後これらの特性を調査することで、マイコウイルスの環境中の重要性の証明のみならず、マイコウイルスを利用した有用 *Trichoderma* 属菌株の樹立に貢献できる可能性がある。

## 考察

NGS の発達を主とする探索コストの低下により夥しい数のマイコウイルスが様々な宿主、様々な環境から検出されている。(Nerva *et al.*, 2015; Neupane *et al.*, 2018; Osaki *et al.*, 2016; Sutela *et al.*, 2019; Wickner *et al.*, 2013) また、これまで少数のウイルスに限られていた宿主表現型への影響に関する知見も集まってきており、一部のウイルスは複製メカニズムに関する分子生物学的な研究もおこなわれている。これらの研究から、そのゲノムの単純さとは対照的に、マイコウイルスが予想よりもはるかに多様で、複雑な生態を有することが明らかとなりつつある。NGS を用いた網羅的な配列解析は特に無病徴感染ウイルスが大半を占めるマイコウイルスの多様性理解を強力に推し進めており (Bartholomäus *et al.*, 2016; Nerva *et al.*, 2019; Osaki *et al.*, 2016; Zoll *et al.*, 2018)、本研究においても、門レベルで極めて多様なウイルスが供試菌株中に含まれること、さらには現在の分類体系に収まらないユニークなウイルスが複数含まれることも明らかとなった。この結果はマイコウイルスの多様性を理解するうえで重要な知見となると考えられる。

また、本研究において植物ホロビオンにおけるマイコウイルスの役割を理解するうえで重要な知見が得られた。菌類は土壤生態系において多面的な機能を有するが、単純な生育の増減のみならず異なる環境への応答がウイルス感染によって変化することを明らかにした研究はこれまで報告されていない。これまでウイルス感染による表現型の比較は困難であったが、様々な技術や研究材料が開発され、今後進展が見込まれる (Chen and Nuss, 1999; Esteban and Fujimura, 2003; Hisano *et al.*, 2018; Lee *et al.*, 2011, 2014)。最新の研究によりモデル真菌である *N. crassa* がマイコウイルス研究に利用できる可能性が示されており、様々

な変異体を利用することで、これまで困難であったウイルス-菌類宿主間の相互作用に関する分子遺伝学的な解析が比較的容易に可能となる。今後、これらの研究を通じた環境マイコウイルスの重要性理解の進展が期待される。



## 引用文献

- Andika, I.B., Wei, S., Cao, C., Salaipeth, L., Kondo, H., and Sun, L. (2017). Phytopathogenic fungus hosts a plant virus: A naturally occurring cross-kingdom viral infection. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *114*, 12267–12272.
- Ayllón, M.A., Turina, M., Xie, J., Nerva, L., Marzano, S.Y.L., Donaire, L., and Jiang, D. (2020). ICTV Virus Taxonomy Profile: *Botourmiaviridae*. *J. Gen. Virol.* *101*, 454–455.
- Baek, J.H., Park, J.A., Kim, J.M., Oh, J.M., Park, S.M., and Kim, D.H. (2014). Functional analysis of a tannic-acid-inducible and hypoviral-regulated small heat-shock protein hsp24 from the chestnut blight fungus *cryphonectria parasitica*. *Mol. Plant-Microbe Interact.* *27*, 56–65.
- Baldrian, P., Voříšková, J., Dobiášová, P., Merhautová, V., Lisá, L., and Valášková, V. (2011). Production of extracellular enzymes and degradation of biopolymers by saprotrophic microfungi from the upper layers of forest soil. *Plant Soil* *338*, 111–125.
- Ban, T., and Suenaga, K. (2000). Genetic analysis of resistance to *Fusarium* head blight caused by *Fusarium graminearum* in Chinese wheat cultivar Sumai 3 and the Japanese cultivar Saikai 165. *Euphytica* *113*, 87–99.
- Bankevich, A., Nurk, S., Antipov, D., Gurevich, A.A., Dvorkin, M., Kulikov, A.S., Lesin, V.M., Nikolenko, S.I., Pham, S., Pribelski, A.D., *et al.* (2012). SPAdes: A New Genome Assembly Algorithm and Its Applications to Single-Cell Sequencing. *J. Comput. Biol.* *19*, 455–477.
- Bartholomäus, A., Wibberg, D., Winkler, A., Pühler, A., Schlüter, A., and Varrelmann, M. (2016). Deep sequencing analysis reveals the mycoviral diversity of the virome of an avirulent isolate of *Rhizoctonia solani* AG-2-2 IV. *PLoS One* *11*, 1–25.
- Bartholomäus, A., Wibberg, D., Winkler, A., Pühler, A., Schlüter, A., and Varrelmann, M. (2017). Identification of a novel mycovirus isolated from *Rhizoctonia solani* (AG 2-2 IV) provides further information about genome plasticity within the order *Tymovirales*. *Arch. Virol.* *162*, 555–559.
- Beever, R.E., Howitt, R.L.J., Forster, R.L.S., and Pearson, M.N. (2001). Genome characterization of Botrytis virus F, a flexuous rod-shaped mycovirus resembling plant ‘potex-like’ viruses. *J. Gen. Virol.* *82*, 67–78.
- Benitez, T., Villa, T.G., and Garcia Acha, I. (1976). Some chemical and structural features of the conidial wall of *Trichoderma viride*. *Can. J. Microbiol.* *22*, 318–321.
- Bischof, R.H., Ramoni, J., and Seiboth, B. (2016). Cellulases and beyond: The first 70 years of the enzyme producer *Trichoderma reesei*. *Microb. Cell Fact.* *15*, 106.
- Boeynaems, S., Alberti, S., Fawzi, N.L., Mittag, T., Polymenidou, M., Rousseau, F.,

Schymkowitz, J., Shorter, J., Wolozin, B., Van Den Bosch, L., *et al.* (2018). Protein Phase Separation: A New Phase in Cell Biology. *Trends Cell Biol.* 28, 420–435.

Boivin, V., Reulet, G., Boisvert, O., Couture, S., Elela, S.A., and Scott, M.S. (2020). Reducing the structure bias of RNA-Seq reveals a large number of non-annotated non-coding RNA. *Nucleic Acids Res.* 48, 2271–2286.

Bolger, A.M., Lohse, M., and Usadel, B. (2014). Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. *Bioinformatics* 30, 2114–2120.

Den Boon, J.A., and Ahlquist, P. (2010). Organelle-Like Membrane Compartmentalization of Positive-Strand RNA Virus Replication Factories. *Annu. Rev. Microbiol.* 64, 241–256.

Bryner, S.F., and Rigling, D. (2012). Virulence Not Only Costs But Also Benefits The Transmission Of A Fungal Virus. *Evolution (N. Y.)* 66, 2540–2550.

Calvert, L.A., Cuervo, M.I., Ospina, M.D., Fauquet, C.M., and Ramirez, B.C. (1996). Characterization of cassava common mosaic virus and a defective RNA species. *J. Gen. Virol.* 77, 525–530.

Cañizares, M.C., López-Escudero, F.J., Pérez-Artés, E., and García-Pedrajas, M.D. (2018). Characterization of a novel single-stranded RNA mycovirus related to invertebrate viruses from the plant pathogen *Verticillium dahliae*. *Arch. Virol.* 163, 771–776.

Chen, B., and Nuss, D.L. (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, 985–992.

Chiba, S., Salaipeth, L., Lin, Y.-H., Sasaki, A., Kanematsu, S., and Suzuki, N. (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.

Chiba, S., Lin, Y.-H., Kondo, H., Kanematsu, S., and Suzuki, N. (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.

Chiba, S., Lin, Y.H., Kondo, H., Kanematsu, S., and Suzuki, N. (2016). A novel betapartitivirus RnPV6 from *Rosellinia necatrix* tolerates host RNA silencing but is interfered by its defective RNAs. *Virus Res.* 219, 62–72.

Chiba, Y., Yaguchi, T., Urayama, S.-I., and Hagiwara, D. (2020a). Discovery of divided RdRp sequences and a hitherto unknown genomic complexity in fungal viruses. *BioRxiv* 2020.09.08.288829.

Chiba, Y., Tomaru, Y., Shimabukuro, H., Kimura, K., Hirai, M., Takaki, Y., Hagiwara,

D., Nunoura, T., and Urayama, S.I. (2020b). Viral rna genomes identified from marine macroalgae and a diatom. *Microbes Environ.* 35, 1–8.

Cho, W.K., Yu, J., Lee, K.M., Son, M., Min, K., Lee, Y.W., and Kim, K.H. (2012). Genome-wide expression profiling shows transcriptional reprogramming in *Fusarium graminearum* by *Fusarium graminearum* virus 1-DK21 infection. *BMC Genomics* 13, 1–16.

Chu, Y.-M., Jeon, J.-J., Yea, S.-J., Kim, Y.-H., Yun, S.-H., Lee, Y.-W., and Kim, K.-H. (2002). Double-stranded RNA mycovirus from *Fusarium graminearum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 68, 2529–2534.

Chun, J., Yang, H.-E., and Kim, D.-H. (2018a). Identification of a Novel Partitivirus of *Trichoderma harzianum* NFCF319 and Evidence for the Related Antifungal Activity. *Front. Plant Sci.* 9, 1699.

Chun, J., Yang, H.-E., and Kim, D.-H. (2018b). Identification and Molecular Characterization of a Novel Partitivirus from *Trichoderma atroviride* NFCF394. *Viruses* 10, 578.

Corrochano, L.M. (2007). Fungal photoreceptors: Sensory molecules for fungal development and behaviour. *Photochem. Photobiol. Sci.* 6, 725–736.

De Coster, W., D’Hert, S., Schultz, D.T., Cruts, M., and Van Broeckhoven, C. (2018). NanoPack: Visualizing and processing long-read sequencing data. *Bioinformatics* 34, 2666–2669.

Darissa, O., Adam, G., and Schäfer, W. (2012). A dsRNA mycovirus causes hypovirulence of *Fusarium graminearum* to wheat and maize. *Eur. J. Plant Pathol.* 134, 181–189.

Depledge, D.P., and Wilson, A.C. (2020). Using Direct RNA Nanopore Sequencing to Deconvolute Viral Transcriptomes. *Curr. Protoc. Microbiol.* 57, e99.

Diaz-Lara, A., Navarro, B., Di Serio, F., Stevens, K., Hwang, M.S., Kohl, J., Vu, S.T., Falk, B.W., Golino, D., and Al Rwahnih, M. (2019). Two Novel Negative-Sense RNA Viruses Infecting Grapevine Are Members of a Newly Proposed Genus within the Family *Phenuiviridae*. *Viruses* 11, 685.

Domingo, E., and Perales, C. (2019). Viral quasispecies. *PLoS Genet.* 15, e1008271.

Esteban, R., and Fujimura, T. (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.

Esteban, R., Vega, L., and Fujimura, T. (2005). Launching of the yeast 20 S RNA narnavirus by expressing the genomic or antigenomic viral RNA in vivo. *J. Biol. Chem.* 280, 33725–33734.

Eusebio-Cope, A., Sun, L., Hillman, B.I., and Suzuki, N. (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.

Ferré-D'Amaré, A.R., Zhou, K., and Doudna, J.A. (1998). Crystal structure of a hepatitis delta virus ribozyme. *Nature* 395, 567–574.

Forgia, M., Isgandarli, E., Aghayeva, D.N., Huseynova, I., and Turina, M. (2021). Virome characterization of *Cryphonectria parasitica* isolates from Azerbaijan unveiled a new mymonavirus and a putative new RNA virus unrelated to described viral sequences. *Virology* 553, 51–61.

Fukasawa, F., Hirai, M., Takaki, Y., Shimane, Y., Thomas, C.E., Urayama, S. ichi, Nunoura, T., and Koyama, S. (2020). A new polycipivirus identified in *Colobopsis shohki*. *Arch. Virol.* 165, 761–763.

Gao, K., Xiong, Q., Xu, J., Wang, K., and Wang, K. (2013). CpBir1 is required for conidiation, virulence and anti-apoptotic effects and influences hypovirus transmission in *Cryphonectria parasitica*. *Fungal Genet. Biol.* 51, 60–71.

Ghabrial, S.A., and Nibert, M.L. (2009). *Victorivirus*, a new genus of fungal viruses in the family *Totiviridae*. *Arch. Virol.* 154, 373–379.

Ghabrial, S.A., Castón, J.R., Jiang, D., Nibert, M.L., and Suzuki, N. (2015). 50-plus years of fungal viruses. *Virology* 479, 356–368.

Goodwin, S., Mcpherson, J.D., and McCombie, W.R. (2016). Coming of age : ten years of next- generation sequencing technologies. *Nat. Publ. Gr.* 17, 333–351.

Gorbalenya, A.E., Krupovic, M., Mushegian, A., Kropinski, A.M., Siddell, S.G., Varsani, A., Adams, M.J., Davison, A.J., Dutilh, B.E., Harrach, B., *et al.* (2020). The new scope of virus taxonomy: partitioning the virosphere into 15 hierarchical ranks. *Nat. Microbiol.* 5, 668–674.

Guseva, S., Milles, S., Jensen, M.R., Salvi, N., Kleman, J.P., Maurin, D., Ruigrok, R.W.H., and Blackledge, M. (2020). Measles virus nucleo- And phosphoproteins form liquid-like phase-separated compartments that promote nucleocapsid assembly. *Sci. Adv.* 6, eaaz7095.

Harman, G.E., Howell, C.R., Viterbo, A., Chet, I., and Lorito, M. (2004). *Trichoderma* species - Opportunistic, avirulent plant symbionts. *Nat. Rev. Microbiol.* 2, 43–56.

Hawksworth, D.L., and Lücking, R. (2017). Fungal Diversity Revisited: 2.2 to 3.8 Million Species. In *The Fungal Kingdom*, (Washington, DC, USA: ASM Press), pp. 79–95.

Heiniger, U., and Rigling, D. (1994). Biological control of chestnut blight in Europe. *Annu. Rev. Phytopathol.* 32, 581–599.

- Hillman, B.I., and Cai, G. (2013). The Family *Narnaviridae*: Simplest of RNA Viruses. *Adv. Virus Res.* 86, 149–176.
- Hillman, B.I., and Suzuki, N. (2004). Viruses of the chestnut blight fungi, *Cryphonectria parasitica*. *Adv. Virus Res.* 63, 423–472.
- Hillman, B.I., Foglia, R., and Yuan, W. (2000). Satellite and defective RNAs of *Cryphonectria hypovirus 3-Grand Haven 2*, a virus species in the family Hypoviridae with a single open reading frame. *Virology* 276, 181–189.
- Hillman, B.I., Supyani, S., Kondo, H., and Suzuki, N. (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.
- Hillman, B.I., Annisa, A., and Suzuki, N. (2018). Viruses of Plant-Interacting Fungi. In *Advances in Virus Research*, (Academic Press Inc.), pp. 99–116.
- Hintz, W.E., Carneiro, J.S., Kassatenko, I., Varga, A., and James, D. (2013). Two novel mitoviruses from a Canadian isolate of the Dutch elm pathogen *Ophiostoma novo-ulmi* (93-1224). *Virol. J.* 10, 252.
- Hisano, S., Zhang, R., Faruk, M.I., Kondo, H., and Suzuki, N. (2018). A neo-virus lifestyle exhibited by a (+)ssRNA virus hosted in an unrelated dsRNA virus: Taxonomic and evolutionary considerations. *Virus Res.* 244, 75–83.
- Hollings, M. (1962). Viruses associated with a die-back disease of cultivated mushroom. *Nature* 196, 962–965.
- Howitt, R.L.J., Beever, R.E., Pearson, M.N., and Forster, R.L.S. (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.
- Hunt, M., Gall, A., Ong, S.H., Brener, J., Ferns, B., Goulder, P., Nastouli, E., Keane, J.A., Kellam, P., and Otto, T.D. (2015). IVA: accurate *de novo* assembly of RNA virus genomes. *Bioinformatics* 31, 2374–2376.
- Ikeda, Y., Shimura, H., Kitahara, R., Masuta, C., and Ezawa, T. (2012). A Novel Virus-Like Double-Stranded RNA in an Obligate Biotroph Arbuscular Mycorrhizal Fungus: A Hidden Player in Mycorrhizal Symbiosis. *Mol. Plant-Microbe Interact.*
- Illana, A., Marconi, M., Rodríguez-Romero, J., Xu, P., Dalmay, T., Wilkinson, M.D., Ayllón, M.Á., and Sesma, A. (2017). Molecular characterization of a novel ssRNA ourmia-like virus from the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*. *Arch. Virol.* 162, 891–895.
- Jaklitsch, W.M. (2009). European species of *Hypocrea* Part I. The green-spored species. *Stud. Mycol.* 63, 1–91.
- Jamal, A., Sato, Y., Shahi, S., Shamsi, W., Kondo, H., and Suzuki, N. (2019). Novel

victorivirus from a pakistani isolate of *Alternaria alternata* lacking a typical translational stop/restart sequence signature. *Viruses* 11, 577.

Jia, H., Dong, K., Zhou, L., Wang, G., Hong, N., Jiang, D., and Xu, W. (2017). A dsRNA virus with filamentous viral particles. *Nat. Commun.* 8, 168.

Jiang, D., Fu, Y., Guoqing, L., and Ghabrial, S.A. (2013). Viruses of the Plant Pathogenic Fungus *Sclerotinia sclerotiorum*. In *Advances in Virus Research*, (Academic Press Inc.), pp. 215–248.

Joshi, N., and Fass, J. (2011). Sickle: A sliding-window, adaptive, quality-based trimming tool for FastQ files (Version 1.33) [Software].

Kanhayuwa, L., Kotta-Loizou, I., Özkan, S., Gunning, A.P., and Coutts, R.H.A. (2015). A novel mycovirus from *Aspergillus fumigatus* contains four unique dsRNAs as its genome and is infectious as dsRNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 112, 9100–9105.

Keller, M.W., Rambo-Martin, B.L., Wilson, M.M., Ridenour, C.A., Shepard, S.S., Stark, T.J., Neuhaus, E.B., Dugan, V.G., Wentworth, D.E., and Barnes, J.R. (2018). Direct RNA sequencing of the coding complete influenza A virus genome. *Sci. Rep.* 8, 1–8.

Khalifa, M.E., and Pearson, M.N. (2013). Molecular characterization of three mitoviruses co-infecting a hypovirulent isolate of *Sclerotinia sclerotiorum* fungus. *Virology* 441, 22–30.

Khalifa, M.E., and Pearson, M.N. (2014). Characterisation of a novel hypovirus from *Sclerotinia sclerotiorum* potentially representing a new genus within the Hypoviridae. *Virology* 464–465, 441–449.

Kim, J.H., Kim, J., Koo, B.S., Oh, H., Hong, J.J., and Hwang, E.S. (2019). Rapid whole-genome sequencing of Zika viruses using direct RNA sequencing. *J. Bacteriol. Virol.* 49, 115–123.

King, A.M.Q., Adams, M.J., Carstens, E.B., and Lefkowitz, E.J. (2011a). Family *Narnaviridae*. In *Virus Taxonomy: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*, (Elsevier), pp. 1055–1060.

King, A.M.Q., Adams, M.J., Carstens, E.B., and Lefkowitz, E.J. (2011b). *Tymovirales*. In *Virus Taxonomy: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*, pp. 920–941.

Kondo, H., Hisano, S., Chiba, S., Maruyama, K., Andika, I.B., Toyoda, K., Fujimori, F., and Suzuki, N. (2016). Sequence and phylogenetic analyses of novel totivirus-like double-stranded RNAs from field-collected powdery mildew fungi. *Virus Res.* 213, 353–364.

Kono, N., and Arakawa, K. (2019). Nanopore sequencing: Review of potential

applications in functional genomics. *Dev. Growth Differ.* 61, 316–326.

Kotta-Loizou, I., and Coutts, R.H.A. (2017). Mycoviruses in *Aspergilli*: A Comprehensive Review. *Front. Microbiol.* 8, 1699.

Kotta-Loizou, I., Castón, J.R., Coutts, R.H.A., Hillman, B.I., Jiang, D., Kim, D.H., Moriyama, H., and Suzuki, N. (2020). ICTV virus taxonomy profile: *Chrysoviridae*. *J. Gen. Virol.* 101, 143–144.

Kurtenbach, S. (2019). SparK: A Publication-quality NGS Visualization Tool. *BioRxiv* 845529.

Kwon, S.J., Lim, W.S., Park, S.H., Park, M.R., and Kim, K.H. (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.

Lee, K.-M., Yu, J., Son, M., Lee, Y.-W., Kim, K.-H., and Arkowitz, R.A. (2011). Transmission of *Fusarium boothii* Mycovirus via Protoplast Fusion Causes Hypovirulence in Other Phytopathogenic Fungi. *PLoS One* 6, 1–9.

Lee, K.-M., Cho, W.K., Yu, J., Son, M., Choi, H., Min, K., Lee, Y.-W., and Kim, K.-H. (2014). A Comparison of Transcriptional Patterns and Mycological Phenotypes following Infection of *Fusarium graminearum* by Four Mycoviruses. *PLoS One* 9, e100989.

Lee, S.H., Yun, S.-H., Chun, J., and Kim, D.-H. (2017). Characterization of a novel dsRNA mycovirus of *Trichoderma atroviride* NFCF028. *Arch. Virol.* 162, 1073–1077.

Leigh, D.M., Schefer, C., and Cornejo, C. (2020). Determining the Suitability of MinION's Direct RNA and DNA Amplicon Sequencing for Viral Subtype Identification. *Viruses* 12, 801.

Lemus-Minor, C.G., Cañizares, M.C., García-Pedrajas, M.D., and Pérez-Artés, E. (2015). Complete genome sequence of a novel dsRNA mycovirus isolated from the phytopathogenic fungus *Fusarium oxysporum* f. sp. *dianthi*. *Arch. Virol.* 160, 2375–2379.

Lewandowski, K., Xu, Y., Pullan, S.T., Lumley, S.F., Foster, D., Sanderson, N., Vaughan, A., Morgan, M., Bright, N., and Kavanagh, J. (2019). Metagenomic Nanopore sequencing of influenza virus direct from clinical respiratory samples. *J. Clin. Microbiol.* 58.

Li, H. (2016). Minimap and miniasm: Fast mapping and de novo assembly for noisy long sequences. *Bioinformatics* 32, 2103–2110.

Li, H. (2018). Minimap2: pairwise alignment for nucleotide sequences. *Bioinformatics* 34, 3094–3100.

Li, C.X., Shi, M., Tian, J.H., Lin, X.D., Kang, Y.J., Chen, L.J., Qin, X.C., Xu, J.,

Holmes, E.C., and Zhang, Y.Z. (2015a). Unprecedented genomic diversity of RNA viruses in arthropods reveals the ancestry of negative-sense RNA viruses. *Elife* 2015.

Li, H., Handsaker, B., Wysoker, A., Fennell, T., Ruan, J., Homer, N., Marth, G., Abecasis, G., and Durbin, R. (2009). The Sequence Alignment/Map format and SAMtools. *Bioinformatics* 25, 2078–2079.

Li, H., Bian, R., Liu, Q., Yang, L., Pang, T., Salaipeth, L., Andika, I.B., Kondo, H., and Sun, L. (2019a). Identification of a Novel Hypovirulence-Inducing Hypovirus From *Alternaria alternata*. *Front. Microbiol.* 10, 1076.

Li, P., Zhang, H., Chen, X., Qiu, D., and Guo, L. (2015b). Molecular characterization of a novel hypovirus from the plant pathogenic fungus *Fusarium graminearum*. *Virology* 481, 151–160.

Li, P., Lin, Y., Zhang, H., Wang, S., Qiu, D., and Guo, L. (2016). Molecular characterization of a novel mycovirus of the family *Tymoviridae* isolated from the plant pathogenic fungus *Fusarium graminearum*. *Virology* 489, 86–94.

Li, P., Bhattacharjee, P., Wang, S., Zhang, L., Ahmed, I., and Guo, L. (2019b). Mycoviruses in *Fusarium* Species: An Update. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 9, 257.

Li, Q., Huang, W., Hai, D., Wang, Y., Xie, J., and Wang, M. (2020). The complete genome sequence of a novel hypovirus infecting *Bipolaris oryzae*. *Arch. Virol.* 165, 1027–1031.

Lin, Y.H., Fujita, M., Chiba, S., Hyodo, K., Andika, I.B., Suzuki, N., and Kondo, H. (2019). Two novel fungal negative-strand RNA viruses related to mymonaviruses and phenuiviruses in the shiitake mushroom (*Lentinula edodes*). *Virology* 533, 125–136.

Liu, C., Li, M., Redda, E.T., Mei, J., Zhang, J., Elena, S.F., Wu, B., and Jiang, X. (2019a). Complete nucleotide sequence of a novel mycovirus from *Trichoderma harzianum* in China. *Arch. Virol.* 164, 1213–1216.

Liu, C., Li, M., Redda, E.T., Mei, J., Zhang, J., Wu, B., and Jiang, X. (2019b). A novel double-stranded RNA mycovirus isolated from *Trichoderma harzianum*. *Virol. J.* 16, 113.

Liu, S., Xie, J., Cheng, J., Li, B., Chen, T., Fu, Y., Li, G., Wang, M., Jin, H., Wan, H., et al. (2016). Fungal DNA virus infects a mycophagous insect and utilizes it as a transmission vector. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 113, 12803–12808.

Luque, D., Mata, C., Suzuki, N., Ghabrial, S., and Castón, J. (2018). Capsid Structure of dsRNA Fungal Viruses. *Viruses* 10, 481.

Lynd, L.R., Weimer, P.J., van Zyl, W.H., and Pretorius, I.S. (2002). Microbial Cellulose Utilization: Fundamentals and Biotechnology. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 66, 506–577.

Martin, M. (2011). Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput



sequencing reads. *EMBnet.Journal* 17, 10.

Marzano, S.Y.L., and Domier, L.L. (2016). Novel mycoviruses discovered from metatranscriptomics survey of soybean phyllosphere phytobiomes. *Virus Res.* 213, 332–342.

Milgroom, M.G., and Cortesi, P. (2004). Biological Control of Chestnut Blight with Hypovirulence: A Critical Analysis. *Annu. Rev. Phytopathol.* 42, 311–338.

Moriyama, H., Urayama, S., Higashiura, T., Le, T., and Komatsu, K. (2018). Chrysoviruses in *Magnaporthe oryzae*. *Viruses* 10, 697.

Nasheri, N., Petronella, N., Ronholm, J., Bidawid, S., and Corneau, N. (2017). Characterization of the Genomic Diversity of Norovirus in Linked Patients Using a Metagenomic Deep Sequencing Approach. *Front. Microbiol.* 8, 73.

Navarro, B., Zicca, S., Minutolo, M., Saponari, M., Alioto, D., and Di Serio, F. (2018). A Negative-Stranded RNA Virus Infecting Citrus Trees: The Second Member of a New Genus Within the Order *Bunyavirales*. *Front. Microbiol.* 9, 2340.

Nerva, L., Ciuffo, M., Vallino, M., Margaria, P., Varese, G.C., Gnani, G., and Turina, M. (2015). Multiple approaches for the detection and characterization of viral and plasmid symbionts from a collection of marine fungi. *Virus Res.*

Nerva, L., Turina, M., Zanzotto, A., Gardiman, M., Gaiotti, F., Gambino, G., and Chitarra, W. (2019). Isolation, molecular characterization and virome analysis of culturable wood fungal endophytes in esca symptomatic and asymptomatic grapevine plants. *Environ. Microbiol.* 21, 2886–2904.

Neupane, A., Feng, C., Feng, J., Kafle, A., Bücking, H., and Lee Marzano, S.-Y. (2018). Metatranscriptomic analysis and in silico approach identified mycoviruses in the arbuscular mycorrhizal fungus *Rhizophagus* spp. *Viruses* 10, 707.

Nikolic, J., Le Bars, R., Lama, Z., Scrima, N., Lagaudrière-Gesbert, C., Gaudin, Y., and Blondel, D. (2017). Negri bodies are viral factories with properties of liquid organelles. *Nat. Commun.* 8, 1–13.

Noda, N.N., Wang, Z., and Zhang, H. (2020). Liquid–liquid phase separation in autophagy. *J. Cell Biol.* 219.

Nosanchuk, J.D., and Casadevall, A. (2006). Impact of melanin on microbial virulence and clinical resistance to antimicrobial compounds. *Antimicrob. Agents Chemother.* 50, 3519–3528.

Nuss, D.L. (2005). Hypovirulence: Mycoviruses at the fungal-plant interface. *Nat. Rev. Microbiol.* 3, 632–642.

Nuss, D.L., Hillman, B.I., Rigling, D., and Suzuki, N. (2005). Family *Hypoviridae*.

Oerke, E.C. (2006). Crop losses to pests. *J. Agric. Sci.* 144, 31–43.

- Osaki, H., Sasaki, A., Nomiyama, K., and Tomioka, K. (2016). Multiple virus infection in a single strain of *Fusarium poae* shown by deep sequencing. *Virus Genes* 52, 835–847.
- Pathak, K.B., and Nagy, P.D. (2009). Defective interfering RNAs: Foes of viruses and friends of virologists. *Viruses* 1, 895–919.
- Patton, J.T., and Spencert, E. (2000). Genome replication and packaging of segmented double-stranded RNA viruses. *Virology* 277, 217–225.
- Pearson, M.N., and Bailey, A.M. (2013). Viruses of Botrytis. In *Advances in Virus Research*, (Academic Press Inc.), pp. 249–272.
- Perez-Dulzaides, R., Camacho, E., Cordero, R.J.B., and Casadevall, A. (2018). Cell-wall dyes interfere with *Cryptococcus neoformans* melanin deposition. *Microbiol. (United Kingdom)* 164, 1012–1022.
- Preisig, O., Wingfield, B.D., and Wingfield, M.J. (1998). Coinfection of a Fungal Pathogen by Two Distinct Double-Stranded RNA Viruses. *Virology* 252, 399–406.
- Quick, J., Loman, N.J., Duraffour, S., Simpson, J.T., Severi, E., Cowley, L., Bore, J.A., Koundouno, R., Dudas, G., Mikhail, A., *et al.* (2016). Real-time, portable genome sequencing for Ebola surveillance. *Nature* 530, 228–232.
- Robinson, J.T., Thorvaldsdóttir, H., Wenger, A.M., Zehir, A., and Mesirov, J.P. (2017). Variant review with the integrative genomics viewer. *Cancer Res.* 77, e31–e34.
- Rochon, D., Lommel, S., Martelli, G.P., Rubino, L., and Russo, M. (2009). *Tombusviridae* - Positive Sense RNA Viruses - Positive Sense RNA Viruses (2011) - ICTV.
- Rodriguez-Romero, J., Hedtke, M., Kastner, C., Müller, S., and Fischer, R. (2010). Fungi, Hidden in Soil or Up in the Air: Light makes a difference. *Annu. Rev. Microbiol.* 64, 585–610.
- Al Rwahnih, M., Daubert, S., Urbez-Torres, J.R., Cordero, F., and Rowhani, A. (2011). Deep sequencing evidence from single grapevine plants reveals a virome dominated by mycoviruses. *Arch. Virol.* 156, 397–403.
- Samuels, G.J. (1996). *Trichoderma*: A review of biology and systematics of the genus. *Mycol. Res.* 100, 923–935.
- Samuels, G.J. (2006). *Trichoderma*: Systematics, the sexual state, and ecology. In *Phytopathology*, ( The American Phytopathological Society ), pp. 195–206.
- Sasaki, A., Nakamura, H., Suzuki, N., and Kanematsu, S. (2016). Characterization of a new megabirnavirus that confers hypovirulence with the aid of a co-infecting partitivirus to the host fungus, *Rosellinia necatrix*. *Virus Res.* 219, 73–82.
- Sato, Y., Shamsi, W., Jamal, A., Bhatti, M.F., Kondo, H., Suzuki, N., and Wickner, R.B. (2020a). Hadaka virus 1: A capsidless eleven-segmented positive-sense single-

stranded RNA virus from a phytopathogenic fungus, *Fusarium oxysporum*. MBio 11.

Sato, Y., Jamal, A., Kondo, H., and Suzuki, N. (2020b). Molecular Characterization of a Novel Polymycovirus From *Penicillium janthinellum* With a Focus on Its Genome-Associated PASrp. Front. Microbiol. 11, 2523.

Savastano, A., Ibáñez de Opakua, A., Rankovic, M., and Zweckstetter, M. (2020). Nucleocapsid protein of SARS-CoV-2 phase separates into RNA-rich polymerase-containing condensates. Nat. Commun. 11, 1–10.

Schumacher, J., and Gorbushina, A.A. (2020). Light sensing in plant- and rock-associated black fungi. Fungal Biol. 124, 407–417.

Scrima, N., Lepault, J., Boulard, Y., Padeloup, D., Bressanelli, S., and Roche, S. (2015). Insights into herpesvirus tegument organization from structural analyses of the 970 central residues of HSV-1 UL36 protein. J. Biol. Chem. 290, 8820–8833.

Shahi, S., Eusebio-Cope, A., Kondo, H., Hillman, B.I., and Suzuki, N. (2019). Investigation of host range of and host defense against a mitochondrially replicating mitovirus. J. Virol. 93.

Son, M., Yu, J., and Kim, K.H. (2015). Five Questions about Mycoviruses. PLoS Pathog. 11.

Strom, A.R., Emelyanov, A. V., Mir, M., Fyodorov, D. V., Darzacq, X., and Karpen, G.H. (2017). Phase separation drives heterochromatin domain formation. Nature 547, 241–245.

Sutela, S., Poimala, A., and Vainio, E.J. (2019). Viruses of fungi and oomycetes in the soil environment. FEMS Microbiol. Ecol. 95, 119.

Sutela, S., Forgia, M., Vainio, E.J., Chiapello, M., Daghino, S., Vallino, M., Martino, E., Girlanda, M., Perotto, S., and Turina, M. (2020). The virome from a collection of endomycorrhizal fungi reveals new viral taxa with unprecedented genome organization. Virus Evol. 6.

Suzuki, N., Ghabrial, S.A., Kim, K.-H., Pearson, M., Marzano, S.-Y.L., Yaegashi, H., Xie, J., Guo, L., Kondo, H., and Koloniuk, I. (2018). ICTV virus taxonomy profile: *Hypoviridae*. J. Gen. Virol. 99, 615–616.

Tahir, M.N., Bolus, S., Grinstead, S.C., McFarlane, S.A., and Molloy, D. (2021). A new virus of the family *Tombusviridae* infecting sugarcane. Arch. Virol. 1, 3.

Urayama, S., Takaki, Y., and Nunoura, T. (2016). FLDS: A Comprehensive dsRNA Sequencing Method for Intracellular RNA Virus Surveillance. Microbes Environ. 31, 33–40. .

Urayama, S., Takaki, Y., Nishi, S., Yoshida-Takashima, Y., Deguchi, S., Takai, K., and Nunoura, T. (2018). Unveiling the RNA virosphere associated with marine

microorganisms. *Mol. Ecol. Resour.* 18, 1444–1455.

Urayama, S.I., Katoh, Y., Fukuhara, T., Arie, T., Moriyama, H., and Teraoka, T. (2015). Rapid detection of *Magnaporthe oryzae* chrysovirus 1-A from fungal colonies on agar plates and lesions of rice blast. *J. Gen. Plant Pathol.* 81, 97–102.

Vainio, E.J., Chiba, S., Ghabrial, S.A., Maiss, E., Roossinck, M., Sabanadzovic, S., Suzuki, N., Xie, J., and Nibert, M. (2018). ICTV virus taxonomy profile: *Partitiviridae*. *J. Gen. Virol.* 99, 17–18.

Velasco, L., Arjona-Girona, I., Cretazzo, E., and López-Herrera, C. (2019). Viromes in *Xylariaceae* fungi infecting avocado in Spain. *Virology* 532, 11–21.

Vignuzzi, M., Stone, J.K., and Andino, R. (2005). Ribavirin and lethal mutagenesis of poliovirus: Molecular mechanisms, resistance and biological implications. *Virus Res.* 107, 173–181.

Vinale, F., Sivasithamparam, K., Ghisalberti, E.L., Marra, R., Woo, S.L., and Lorito, M. (2008). Trichoderma-plant-pathogen interactions. *Soil Biol. Biochem.* 40, 1–10.

Walker, B.J., Abeel, T., Shea, T., Priest, M., Abouelliel, A., Sakthikumar, S., Cuomo, C.A., Zeng, Q., Wortman, J., Young, S.K., *et al.* (2014). Pilon: An Integrated Tool for Comprehensive Microbial Variant Detection and Genome Assembly Improvement. *PLoS One* 9, e112963.

Walker, P.J., Siddell, S.G., Lefkowitz, E.J., Mushegian, A.R., Adriaenssens, E.M., Dempsey, D.M., Dutilh, B.E., Harrach, B., Harrison, R.L., Hendrickson, R.C., *et al.* (2020). Changes to virus taxonomy and the Statutes ratified by the International Committee on Taxonomy of Viruses (2020). *Arch. Virol.* 165, 2737–2748.

Wang, M.-B., and Smith, N.A. (2016). Satellite RNA pathogens of plants: impacts and origins-an RNA silencing perspective. *Wiley Interdiscip. Rev. RNA* 7, 5–16.

Wang, S., Kondo, H., Liu, L., Guo, L., and Qiu, D. (2013). A novel virus in the family *Hypoviridae* from the plant pathogenic fungus *Fusarium graminearum*. *Virus Res.* 174, 69–77.

Ward, J.J., Sodhi, J.S., McGuffin, L.J., Buxton, B.F., and Jones, D.T. (2004). Prediction and Functional Analysis of Native Disorder in Proteins from the Three Kingdoms of Life. *J. Mol. Biol.* 337, 635–645.

Warwick-Dugdale, J., Solonenko, N., Moore, K., Chittick, L., Gregory, A., Allen, M., Sullivan, M., and Temperton, B. (2018). Long-read viral metagenomics enables capture of abundant and microdiverse viral populations and their niche-defining genomic islands. *BioRxiv* 345041.

Wei, J., Zhang, Y., Ivanov, I.P., and Sachs, M.S. (2013). The stringency of start codon selection in the filamentous fungus *Neurospora crassa*. *J. Biol. Chem.* 288, 9549–9562.

- White, K.A., Bancroft, J.B., and Mackie, G.A. (1992). Coding capacity determines in vivo accumulation of a defective RNA of clover yellow mosaic virus. *J. Virol.* *66*.
- Wickner, R.B., Fujimura, T., and Esteban, R. (2013). Viruses and Prions of *Saccharomyces cerevisiae*. In *Advances in Virus Research*, (Academic Press Inc.), pp. 1–36.
- Windels, C.E. (2000). Economic and social impacts of Fusarium head blight: Changing farms and rural communities in the Northern Great Plains. In *Phytopathology*, (American Phytopathological Society), pp. 17–21.
- Wongsurawat, T., Jenjaroenpun, P., Taylor, M., Lee, J., Tolardo, A.L., Parvathareddy, J., Kandel, S., Wadley, T.D., Kaewnapan, B., and Ahipanyasilp, N. (2019). Rapid sequencing of multiple RNA viruses in their native form. *Front. Microbiol.* *10*, 260.
- Wu, M.D., Zhang, L., Li, G.Q., Jiang, D.H., Hou, M.S., and Huang, H.-C. (2007). Hypovirulence and Double-Stranded RNA in *Botrytis cinerea*. *Phytopathology* *97*, 1590–1599.
- Xie, J. (2014). Molecular characterization of two positive-strand RNA viruses co-infecting a hypovirulent strain of *Sclerotinia sclerotiorum*. *Virology* *464–465*, 450–459.
- Xie, J., Wei, D., Jiang, D., Fu, Y., Li, G., Ghabrial, S., and Peng, Y. (2006). Characterization of debilitation-associated mycovirus infecting the plant-pathogenic fungus *Sclerotinia sclerotiorum*. *J. Gen. Virol.* *87*, 241–249.
- Xie, J., Havens, W.M., Lin, Y.H., Suzuki, N., and Ghabrial, S.A. (2016). The victorivirus *Helminthosporium victoriae* virus 190S is the primary cause of disease/hypovirulence in its natural host and a heterologous host. *Virus Res.* *213*, 238–245.
- Yaegashi, H., Sawahata, T., Ito, T., and Kanematsu, S. (2011). A novel colony-print immunoassay reveals differential patterns of distribution and horizontal transmission of four unrelated mycoviruses in *Rosellinia necatrix*. *Virology* *409*, 280–289.
- Yaegashi, H., Kanematsu, S., and Ito, T. (2012). Molecular characterization of a new hypovirus infecting a phytopathogenic fungus, *Valsa ceratosperma*. *Virus Res.* *165*, 143–150.
- Yang, X., Charlebois, P., Gnerre, S., Coole, M.G., Lennon, N.J., Levin, J.Z., Qu, J., Ryan, E.M., Zody, M.C., and Henn, M.R. (2012). De novo assembly of highly diverse viral populations. *BMC Genomics* *13*, 1–13.
- Yao, Z., Zou, C., Peng, N., Zhu, Y., Bao, Y., Zhou, Q., Wu, Q., Chen, B., and Zhang, M. (2020). Virome Identification and Characterization of *Fusarium sacchari* and *F. andiyazi*: Causative Agents of Pokkah Boeng Disease in Sugarcane. *Front. Microbiol.* *11*, 240.

- You, J., Zhou, K., Liu, X., Wu, M., Yang, L., Zhang, J., Chen, W., and Li, G. (2019). Defective RNA of a Novel Mycovirus with High Transmissibility Detrimental to Biocontrol Properties of *Trichoderma* spp. *Microorganisms* 7, 507.
- Yu, J.-S., Kwon, S.-J., Lee, K.-M., Son, M., and Kim, K.-H. (2009). Complete nucleotide sequence of double-stranded RNA viruses from *Fusarium graminearum* strain DK3. *Arch. Virol.* 154, 1855–1858.
- Yu, J.-S., Lee, K.-M., Son, M.-I., and Kim, K.-H. (2011). Molecular Characterization of Fusarium Graminearum Virus 2 Isolated from *Fusarium graminearum* Strain 98-8-60. *Plant Pathol. J.* 27, 285–290.
- Yu, J., Park, J.Y., Heo, J., and Kim, K. (2020). The ORF2 protein of Fusarium graminearum virus 1 suppresses the transcription of *FgDICER2* and *FgAGO1* to limit host antiviral defences. *Mol. Plant Pathol.* 21, 230–243.
- Yu, X., Li, B., Fu, Y., Jiang, D., Ghabrial, S.A., Li, G., Peng, Y., Xie, J., Cheng, J., Huang, J., *et al.* (2010). A geminivirus-related DNA mycovirus that confers hypovirulence to a plant pathogenic fungus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 8387–8392.
- Yu, X., Li, B., Fu, Y., Xie, J., Cheng, J., Ghabrial, S.A., Li, G., Yi, X., and Jiang, D. (2013). Extracellular transmission of a DNA mycovirus and its use as a natural fungicide. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 110, 1452–1457.
- Yun, S.-H., Lee, S.H., So, K.-K., Kim, J.-M., and Kim, D.-H. (2016). Incidence of diverse dsRNA mycoviruses in *Trichoderma* spp. causing green mold disease of shiitake *Lentinula edodes*. *FEMS Microbiol. Lett.* 363, fnw220.
- Zhang, D.-X., and Nuss, D.L. (2016). Engineering super mycovirus donor strains of chestnut blight fungus by systematic disruption of multilocus vic genes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 113.
- Zhang, X., and Nuss, D.L. (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.
- Zhang, H., Xie, J., Fu, Y., Cheng, J., Qu, Z., Zhao, Z., Cheng, S., Chen, T., Li, B., Wang, Q., *et al.* (2020). A 2-kb Mycovirus Converts a Pathogenic Fungus into a Beneficial Endophyte for Brassica Protection and Yield Enhancement. *Mol. Plant* 13, 1420–1433.
- Zhang, T., Zeng, X., Cai, X., Liu, H., and Zeng, Z. (2018). Molecular characterization of a novel double-stranded RNA mycovirus of *Trichoderma asperellum* strain JLM45-3. *Arch. Virol.* 163, 3433–3437.
- Zhang, X., Xie, Y., Zhang, F., Sun, H., Zhai, Y., Zhang, S., Yuan, H., Zhou, L., Gao,

F., and Li, H. (2019). Complete genome sequence of an altarnavirus from the phytopathogenic fungus *Fusarium incarnatum*. *Arch. Virol.* 164, 923–925.

Zhou, H., Sun, Y., Guo, Y., and Lou, Z. (2013). Structural perspective on the formation of ribonucleoprotein complex in negative-sense single-stranded RNA viruses. *Trends Microbiol.* 21, 475–484.

Zhou, Y., Su, J.M., Samuel, C.E., and Ma, D. (2019). Measles Virus Forms Inclusion Bodies with Properties of Liquid Organelles. *J. Virol.* 93.

Zhu, W., Wei, W., Fu, Y., Cheng, J., Xie, J., Li, G., Yi, X., Kang, Z., Dickman, M.B., and Jiang, D. (2013). A Secretory Protein of Necrotrophic Fungus *Sclerotinia sclerotiorum* That Suppresses Host Resistance. *PLoS One* 8, e53901.

Zoll, J., Verweij, P.E., and Melchers, W.J.G. (2018). Discovery and characterization of novel *Aspergillus fumigatus* mycoviruses. *PLoS One* 13, e0200511.

太田綺弥. (2020). *Fusarium* 属菌に感染するマイコウイルスの探索および生物学的性状解析.名古屋大学大学院生命農学研究科, 修士論文.

水谷行善. (2018). *Fusarium*属菌感染性マイコウイルスの多様性に関する研究.名古屋大学大学院生命農学研究科, 修士論文.

中島 (2004.) ムギ類赤かび病とマイコトキシン汚染の薬剤防除. 植物防疫 58.

千葉壮太郎, 鈴木信弘. (2014). 多様性に満ちた菌類の 2 本鎖 RNA ウイルス. ウイルス 64, 225–238.

千葉壮太郎, 近藤秀樹, 兼松聡子, 鈴木信弘. (2010). マイコウイルスとヴァイロコントロール. ウイルス 60, 163–176.

鈴木信弘. (2014). 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~. ウイルス 64, 11–24.

## 摘要

菌類は高い多様性をもって様々な環境に普遍的に生息する真核微生物であり、環境中では周囲の生物との相互作用、物質の分解などを通して生態系機能維持に重要な役割を担う他、医療、工業、農業など幅広い分野において人間の生活と深く関わっている。菌類に感染するウイルス（マイコウイルス）は多様な菌類から発見されており、既存の分類群には属さない独自の性質をもったウイルスが数多く含まれる。マイコウイルスのほとんどは宿主表現型に巨視的な変化をもたらさず無病徴感染するが、宿主の生育を抑制するもの、促進するものも少数ではあるが存在する。これらの内、植物病原菌の病原性を低下させる能力を有するウイルスは病害防除に利用できる可能性がある。マイコウイルスを用いた病害防除法はヴァイロコントロールと呼ばれ、世界三大樹病の1つであるクリ胴枯病の防除に成功して以来、様々な病害への応用展開を目的とした研究が盛んに行われている。植物病原菌の病原性を低下させるウイルスはこれまで複数発見されているが、ヴァイロコントロールの成功例は上記のクリ胴枯れ病を含め2例しか報告されておらず、さらなる応用展開には有用ウイルス資材の探索及び新たな施術法補開発が必要である。*Fusarium graminearum* 種複合体によって引き起こされるムギ類赤かび病（*Fusarium* Head Blight: FHB）コムギの最重要病害であり、当研究室ではこれまで FHB に対するヴァイロコントロールの確立を目的として研究を行ってきた。前任者の Abraham 博士は FHB を発症したコムギ組織から多数の *Fusarium* 属菌を単離し、ウイルス感染株の選抜を行った。筆者はこれらの株の表現型解析及び感染するウイルスの配列解析を行った。その結果、生育異常を示す *F. boothii* Ep-BL13 株に感染するウイルスを有用ウイルス資材候補として選抜し、修士論



文にて報告した。本研究では上記の菌株コレクションを含む 18 菌株に感染するウイルスの配列解析、病原性低下 Ep-BL13 株に感染するウイルスの宿主表現型への影響の調査を行った。また、生態系におけるマイコウイルスの役割の理解を目的として、環境中から分離された *Trichoderma* 属菌に感染するウイルスの性状解析を行った。

次世代シーケンシング技術は無病徴感染ウイルスが大多数を占めるマイコウイルスの配列解析に極めて有効な手段であるが、RNA ウイルスの高い変異率やゲノムの複雑な立体構造などに起因する様々な課題を抱えている。これらを解決する手段として、fragmented and loop primer ligated dsRNA sequencing (FLDS) 及び Nanopore Direct RNA Sequencing (DRS) という異なる 2 つの手法を用いて未知ウイルスの配列解析を行った。その結果、*Fusarium* 属菌を主とする 18 の菌株から新奇ウイルスを含む 30 種のウイルスのゲノム配列取得に成功した。RNA ウイルスは分類学的に 6 つの門から構成されるが、本研究で発見されたウイルスはこれらの門の内 5 つを網羅しており、供試菌株中に極めて多様なウイルスが感染することを明らかにした。

配列解析の結果、Ep-BL13 株には病原性 *F. boothii* 株 Ep-BL14 株、Ep-N28 株にも共通して感染する *Fusarium boothii* mitovirus 1 (FbMV1) に加え、*Fusarium boothii* large flexivirus 1 (FbLFV1) 及びその内部配列欠損 RNA (Defective RNA: D-RNA) の重複感染が明らかとなった。単孢子分離を用いたウイルス除去により D-RNA 単独、あるいは FbLFV1 と D-RNA の両方を失った株を樹立し、表現型解析により D-RNA を失った株で共通して生育速度の増加が認められたことから、D-RNA と宿主の生育異常の関与が示唆された。また、対峙培養法を用いたウイルス水平伝播試験により Ep-BL13 株からウイルス除去株に D-RNA が水平移行

し、これらの再感染菌株で生育異常の表現型が観察された。この結果から、宿主の生育異常が D-RNA によって規定されることが示唆された。

四日市高校の橋爪氏は環境中から 4 つの菌株を単離し、この内 2 菌株 (AH-1 株及び AH-4 株) をウイルス感染株として選抜した。これらの菌株の Internal transcribed spacers 領域の部分配列を用いた種の推定により両菌株はいずれも *T. viride* であると判明した。ウイルスゲノム配列の結果これらの菌株には共通して 2 種類のウイルスが重複感染することが明らかとなったが、AH-4 株にはこれらに加え、*Trichoderma viride victorivirus 1* (TvVV1) が感染する。培地上で AH-1 株は気中菌糸の少ない白色のコロニー上に黄色の胞子塊を形成するが、一方で AH-4 株は胞子形成能力をもたず、気中菌糸を盛んに形成し、黒色の色素を沈着する。AH-4 株の継代培養により偶然得られた TvVV1 非感染株 (AH-4W 株) は親株と比較して色素沈着、気中菌糸が顕著に減少しており、胞子形成能力が認められた。AH-1 株、AH-4 株、及び AH-4W 株は異なる栄養条件下で異なる生育応答を示し、AH-4 株の生育はブラックライト照射により抑制された。菌糸の顕微鏡観察により AH-4 株にのみ一般的な菌糸細胞壁構成成分であるキチンや  $\beta$ -グルカン を標的とする Calcofluor white 染色で染まらない黒色の菌糸が認められ、特殊な細胞壁成分構成を有することが示唆された。これらの結果から、AH-4 株特異的に感染する TvVV1 が栄養、光条件への応答様式と細胞壁成分の変異に影響を与える可能性が考えられた。

これら三項目の調査から得られた結果は、マイコウイルスの多様性、ヴァイロコントロール応用展開への課題、環境中におけるマイコウイルスの役割の一端を理解するうえで重要な知見となる。

## 謝辞

本研究を進めるにあたりご指導を賜りました名古屋大学大学院アジアサテライトキャンパス学院の千葉壮太郎特任准教授に心より感謝の意を表します。また、ご助言とご支援を頂いた名古屋大学農学部生命農学研究科植物病理学研究分野の川北一人教授、竹本大吾准教授、佐藤育男助教に深く感謝いたします。

ウイルス感染 *Fusarium* 属菌エチオピア産分離株を分譲頂いた岡山大学資源植物科学研究所の鈴木信弘教授、有用 2 次代謝産物産生菌株を分譲頂いた東京家政大学の藤森文啓教授、環境サンプルからの菌株の単離を行って頂いた、三重県立四日市高校の橋爪彩衣里氏、FGSC のゲノム配列解析について助言、コムギへの病原菌接種試験に協力頂いた岐阜大学生命科学総合研究支援センターの須賀晴久准教授、次世代シーケンサーによる配列取得を実施して頂いた中部大学の鈴木孝征准教授 RNA-seq 解析をご助言、ご協力頂いた名古屋大学遺伝子実験センターの上坂一馬博士、FLDS をご教授頂いた、筑波大学大学院糸状菌応答講座の千葉雄大氏、浦山俊一助教、データ解析用のパイプラインをご提供頂いた JAMSTEC の高木善弘博士に感謝の意を表します。研究期間を通じて助言と支援を頂いた植物病理学研究分野の皆様に心より御礼申し上げます。

本研究は、岡山大学資源植物科学研究所の全国共同利用・共同研究事業の一環として支援を頂き、実施されました。ここに感謝の意を表します。

最後に、これまでの研究生活を経済的、精神的に支えて下さった家族、祖父母に心から感謝します。