

二国間交流事業 共同研究報告書

令和6年4月26日

独立行政法人日本学術振興会理事長 殿

[日本側代表者所属機関・部局]
岡山大学 資源植物科学研究所
[職・氏名]
教授・鈴木 信弘
[課題番号]
JPJSBP 120229933

1. 事業名 相手国: スイス (振興会対応機関: OP) との共同研究

2. 研究課題名

(和文) クリ樹体内での多様なウイルス(感染クリ胴枯病菌)の挙動と生物防除能

(英文) In-tree behavior and biocontrol potential of diverse viruses harbored in the chestnut blight fungus

3. 共同研究実施期間 2022年 4月 1日 ~ 2024年 3月 31日 (2年 ヶ月)【延長前】 年 月 日 ~ 年 月 日 (年 ヶ月)

4. 相手国側代表者(所属機関名・職名・氏名【全て英文】)

Swiss Federal Research Institute WSL・group leader・Daniel Rigling

5. 委託費総額(返還額を除く)

本事業により執行した委託費総額		3,900,000 円
内訳	1年度目執行経費	1,900,000 円
	2年度目執行経費	2,000,000 円
	3年度目執行経費	- 円

6. 共同研究実施期間を通じた参加者数(代表者を含む)

日本側参加者等	8 名
相手国側参加者等	6 名

* 参加者リスト(様式 B1(1))に表示される合計数を転記してください(途中で不参加となった方も含め、全ての期間で参加した通算の参加者数となります)。

7. 派遣・受入実績

	派遣		受入
	相手国	第三国	
1年度目	1		1 (1)
2年度目	2		2 (2)
3年度目			()

* 派遣・受入実績(様式 B1(3))に表示される合計数を転記してください。

派遣: 委託費を使用した日本側参加者等の相手国及び相手国以外への渡航実績(延べ人数)。

受入: 相手国側参加者等の来日実績(延べ人数)。カッコ内は委託費で滞在費等を負担した内数。

8. 研究交流の概要・成果等

(1)研究交流概要(全期間を通じた研究交流の目的・実施状況)

クリ胴枯病は、*Cryphonectria parasitica* という子のう菌で惹起され、ニレ立ち枯病、五葉松類発疹さび病とともに世界3大樹病に数えられている。日本のクリ(*Castanea crenata*)は抵抗性を示すが、米国および欧州のクリ(*Ca. dentata*, *Ca. sativa*)は多くが罹病性を示す。本病は、病原菌に感染するウイルスを用いて防除するヴァイロコントロールの研究が盛んで、一部の地域では実際に成功している。先行研究により、ハイポウイルスのタイプ種(ハイポウイルス1、CHV1)が感染したクリ胴枯病菌を、本菌がすでに蔓延したクリ林に導入し、ウイルスおよびその宿主である菌がどのようにクリ樹間を広がるか野外で調べられた。これらの研究の結果、ハイポウイルスは供与菌と受容菌(強病原力菌)が和合性の場合、樹体レベルでも、集団レベルでも比較的容易に水平伝搬することが示されている。CHV1の生物防除因子としての弱点は、宿主菌の環境適応能をも衰退させてしまう点である。

クリ胴枯病菌は、菌類ウイルスのモデル宿主として広く利用され、申請代表者鈴木の研究室でも本菌をもちいたウイルス/宿主間、ウイルス/ウイルス間の相互作用やせめぎ合いの研究を展開してきている(Chiba & Suzuki, *PNAS*, 2015; Andika,---, Suzuki, *PNAS*, 2017; 2019 他)。さらに、我々はクリ胴枯病菌が、様々なウイルスの複製を許容することを示してきた。クリ胴枯病菌から分離された粒子化されるウイルス、粒子を作らないキャプシドレスウイルス(ミトコンドリアで複製するウイルスも含まれる)だけでなく、他の植物病原糸状菌(例えば、白紋羽病菌)から分離されたウイルスも複製可能である。本研究では、鈴木研究室が保有する各種ウイルス(生物防除因子候補)のクリ樹体内挙動を明らかにし、既存のハイポウイルス(CHV1)より強力なヴァイロコントロール因子の探索に繋げた。本実験の実施は、来日予定の Shamsi 博士、Ulrich 氏(WSL, Swiss Federal Institute for Forest, Snow and Landscape Research)、さらには久野女史、Paul TELENGECH 博士(岡山大学資源植物科学研究所, IPSR)などの若手研究者が中心となり、研究交流を促進しつつ進めた。

具体的研究成果としては、ハイポウイルス(CHV3)がクリ樹体でクリ胴枯病菌の病原力を衰退させ、生物防除因子として潜在力を有することを明らかにした。さらに、日本産 *C. carpnicola* を10以上分離することに成功した。それらから新規ウイルスを検出し、現在分子生物学的、生物学的解析を進めているところである。これらの成果は、日本側、スイス側研究者の受け入れ、派遣によって可能となった(下記「相手国との交流」参照)。また、若手育成を主な目的として2つのワークショップ(主にスイス、日本側機関を中心)、一つの国際フォーラムを開催した。

(2)学術的価値(本研究交流により得られた新たな知見や概念の展開等、学術的成果)

上記「研究交流概要」で述べた成果は学術的価値が極めて高い。CHV3はアメリカ合衆国で生物防除因子として、実際に試験されていたハイポウイルスである(Milgroom and Cortesi, *Annu Rev Phytopathol* 2004)。CHV3には欠損型RNA(RNA2)とサテライトRNAが2種(RNA3とRNA4)随伴することが報告されていた(Hillman et al., *Virology* 2000)。本研究により、RNA2がCHV3ゲノムRNA(RNA1)の複製を負に、しかしウイルスの宿主菌病原力衰退を正に制御することが明らかとなった。すなわち、RNA2を保有しないCHV3は宿主菌の病原力を衰退できず、生物防除因子として機能するにはRNA2が必須であることを示した。これは、ウイルス学的にも、植物病理学的にもインパクトの大きい発見である。

また、日本産の *C. carpnicola* を10株以上分離でき、ウイルス感染を確認できた。これまで本種菌は、ヨーロッパでしか見つかっておらず、菌学の常識に大きな一石を投じることになった。今後のウイルス学的解析と合わせて、菌学的解析により *C. carpnicola* のウイルス集団構造、宿主として特徴が見えてくるだろう。

(3)相手国との交流(両国の研究者が協力して学術交流することによって得られた成果)

2022年度は、Shahi 博士、Telengech 博士とともに各種ウイルス感染クリ胴枯病菌株を岡山大学植物研で準備し、鈴木がWSLを訪問し、Rigling 博士と共にバイオセーフティレベル3(BSL3)温室内でクリ樹を用いた接種試験を行った。クリの若木(2~3年生)を用いてクリ胴枯病菌の病原力試験、生物防除試験、ウイルス移行試験を実施し、ウイルス間で樹体内挙動に大きな違いがあることを確認した。ハイポウイルス1、2(CHV1、CHV2)は宿主菌の病原力を衰退させ、高い樹体内移行能、生物防除効果も有していた。マイコレオウイルス1(MyRV1)は、宿主菌の病原力を衰退させたが、樹体内移行能が低いと思われるが、生物防除効果は低かった。CHV3は樹体内移行能を有していたが、病原力低下能も生物防除効果も低かった。白紋羽病菌パルティティウイルス6は、病原力低下能、樹体内移行能、生物防除効果全てが低かった。ミトコンドリア感染性のCpMV1は、病原力低下能、樹体内移行能は有していたが、生物防除効果CHV1、CHV2に比べ低かった。CHV3で得られた結果は予想と大きく異なった。CHV3は米国で潜在的な生物防除因子として野外試験に用いられている。また、クリ樹を用いた試験でも宿主菌の病原力を衰退させることが証明されている。そこで、ラトガーズ大学のHillman 博士から元株を取り寄せ、ウイルス核酸を調べた。その結果、本研究で使用したCHV3は欠損RNA(RNA2)が消失していることが判明した。そこで、RNA2を含むCHV3と含まないCHV3を用いて、上記の試験を行っ

た結果、RNA2 がウイルスの表現型に大きく影響することが示唆された。次年度さらに検討する予定である。

WSL 研究者 1 名 (Carolina Cornejo) が岡山大学植物研を訪問し、下記の研究を進める。上記 WSL 研究者がクリ樹から分離したクリ胴枯病菌・数百株を IPSR に持参し、IPSR 保有する菌株とともにマイクロサテライトプライム PCR 法による核ゲノムタイピング、遺伝子上に発見した SNP を元にしたミトコンドリアのマイトハプロタイピングを行う (一部解析は WSL でも並行して進める)。本目的のため、マイクロサテライトを利用した菌株識別法、マイトハプロタイピングに使える SNP を同定してある。さらに、IPSR 研究者が WSL で進めたクリ樹接種試験で分離したクリ胴枯病菌 (受容菌株) の核ゲノム、ミトコンドリアゲノムのタイピングを進めた後、ウイルスが実際に水平伝播したのかあるいはその感染菌株がクリ樹体を広がったのかを調べ、上記の結論に至っている。

2023 年度は、2022 年度と同様に両機関の研究者が相互訪問を実施し、前年度成果の再現性を検証する実験を行った。2022 年度と同数の研究者による交流を進め、IPSR では主にウイルス学の実験を行い、WSL では、クリ樹を用いた植物病理学的な試験を実施した。前年度、RNA ゲノムを持つハイポウイルスの一種 *Cryphonectria hypovirus 3* (CHV3) の生物学的性状 (生物防除能、水平伝搬能) が欠損型 RNA (RNA2) の有無で大きく異なることを示唆するデータを得た。2023 年度は、各種実証試験を行い、データの再現性を検証した。その結果、RNA2 の興味深い CHV3 の複製への負の影響と宿主菌のクリ樹病原性への正の影響が明らかとなった。

「Birmensdorf Day」の開催をスイスで対面で開催し、岡山大学植物研 (IPSR) の近藤博士、WSL (Swiss Federal Institute for Forest, Snow and Landscape Research) の Cornejo 博士、Shamsi 博士が菌類ウイルス学、植物病理学に関する講演を行った。

(4) 社会的貢献 (社会の基盤となる文化の継承と発展、社会生活の質の改善、現代的諸問題の克服と解決に資する等の社会的貢献はどのようにあったか)

クリ胴枯病菌のヴァイロコントロールは教科書に掲載される生物防除の成功例の一つである。しかし、米国で有効と認められているのは限られた地域であり、比較的広い範囲で有効性が示されているヨーロッパでも未だ限定的である (Milgroom & Cortesi, *Annu Rev Phytopathol* 2006)。米国、ヨーロッパでの限定的あるいは不成功の要因として、菌糸融合不和合性が宿主菌の集団レベルで防御機構として機能し、ウイルスの水平伝搬を阻害することが大きいとされている。前述の Nuss 博士らの菌糸融合不和合性を示さない遺伝子破壊株は、今後スーパー供与菌として実用化が期待できる。鈴木研では菌類ウイルスの導入法をすでに開発し、多種多様のウイルスをスーパー供与菌に導入することが可能となっている。本課題で検証する新たなウイルスは、これまでの予備知見から、生物防除因子の能力を有することが期待できる。フランスではすでに CHV1 が感染した菌糸ペーストが微生物製剤として市販されている。本課題では CHV1 とは異なる CHV3 が宿主菌病原性衰退因子 (ヴァイロコントロール因子) として有望であり、その機構に関わる因子 (RNA2) を同定した。従って、欧州での CHV1 に次ぐ別のハイポウイルスしかも複数のヴァイロコントロール因子を用いた菌糸ペーストの製剤化にも大いに期待される。また、病原性衰退機構解明にも大きく貢献する。日本から輸出された菌による樹木流行病の防除に貢献できるのは意義深い。

(5) 若手研究者養成への貢献 (若手研究者養成への取組、成果)

2022 年度に「Kurashiki Day」の開催：下記のように、Carolina Cornejo 博士を含む 3 名の講師による特別セミナーを岡山大学植物研で開催した。

1, Dr. Carolina Cornejo

Affiliation: Swiss Federal Research Institute WSL, Forest Health & Biotic Interactions, CH-8903 Birmensdorf

Title: Species diversity and distribution of the genus *Cryphonectria* in Europe, and the impact of fusagraviruses in *Cryphonectria* species

2. Dr. Milica Raco

Affiliation: Phytophthora Research Centre, Department of Forest Protection and Wildlife Management, Faculty of Forestry and Wood Technology, Mendel University in Brno, Brno, Czechia

Laboratory of Molecular and Cellular Biology, Tokyo University of Agriculture and Technology, Fuchu, Japan

Title: Diversity of viruses in *Phytophthora* species

3. Dr. Chien-fu Wu

Affiliation: Laboratory of Molecular and Cellular Biology, Tokyo University of Agriculture and Technology, Fuchu, Japan

Title: Characterizations of a novel alternavirus and a novel deltaflexi-like virus

2023 年度は、近藤准教授が WSL に 2 週間ほど滞在し、講演を行った。さらに Wajeelha SHAMSI 博士、Daniel RIGLING 博士を別々に 1 ヶ月ほど招聘し、鈴木、近藤博士との共同研究の促進を図った。1 対 1 型ディスカッションを設け、学生、博士研究員に発表の場を与え、ディスカッションスキルの向上につながった。

また、2003 年 12 月 1 日、国際フォーラム International Forum on Plant Stress Sciences by/for Junior Researchers 2023<<https://www.rib.okayama-u.ac.jp/information/20231205-1/>>をオンライン・オンサイト(IPSIR, 岡山大学)ハイブリッドモードで開催した。オーガナイザーあるいはスピーカーとして IPSIR 側の若手研究者 Paul TELENGECH, Sakae HISANO が参加した。一方、WSL 側から Carolina CORNEJO 博士が「How to enjoy your academic life and career path」セッションのパネリストとして参加した。オンサイトでは50名、オンラインでは60名を超える多くの参加者があり、活発な議論が展開された。今回のフォーラムでは若手研究者を中心に発表者を選定し、また、司会・進行についても大学院生を含めた若手研究者が行うことにより、将来植物科学分野で活躍する若手研究者の国際的感覚の醸成に大きく貢献した。

(6)将来発展可能性(本事業を実施したことにより、今後どのような発展の可能性が認められるか)

Wajeelha SHAMSI 博士が本研究成果を発展させるべく、Swiss Science Foundation および WSL への грант “Biocontrol of ash dieback using hypovirulence-inducing mycoviruses from other fungal pathogens?” 申請した。その結果、2023 年度 WSL の研究費が承認された。下記のように両機関の次世代の研究者による共同研究成果も上がってきている。今後さらなる外部資金の獲得に期待する。

(7)その他(上記(2)～(6)以外に得られた成果があれば記載してください)

例:大学間協定の締結、他事業への展開、受賞など

部局間交流は締結済みであるが、今後の発展を見据えた研究の展開を考えている。IPSIR の参画者(近藤秀樹博士と WSL の参画者(Carolina Cornejo 博士)との新たな共同研究が進行中であり、成果も上がっている (Shamsi et al., Environ Microbiol 2024; Shamsi et al., Phytopathology 2024)。