

植物病原性糸状菌 *Fusarium solani* の有する2本鎖RNA

ウイルス及びキトサン分解酵素に関する研究

1996年3月

野川 優 洋

①

植物病原性糸状菌 *Fusarium solani* の有する 2 本鎖 RNA

ウイルス及びキトサン分解酵素に関する研究

1996 年 3 月

野川優洋

目次

略語一覧	1～2
緒論	3～7
第1章 <i>Fusarium</i> 菌からの染色体外レプリコンの精製とその性質	
緒言	8～9
第1節 <i>Fusarium</i> 菌からの染色体外レプリコンのスクリーニング、 及びそのレプリコンの性質	
1： 実験の目的	9
2： 実験方法	9～12
3： 結果及び考察	12～18
第2節 <i>Fusarium solani</i> から得られたマイコウイルスFusoVの精製と分析	
1： 実験の目的	18
2： 実験方法	18～21
3： 結果及び考察	21～27
第3節 FusoVの伝達様式	
1： 実験の目的	27
2： 実験の方法	27～30
3： 結果及び考察	30～38
第2章 FusoV dsRNAゲノムが有する遺伝子について	
緒言	39～40
1： 実験の目的	40
2： 実験の方法	40～44
3： 結果及び考察	44～63

第3章 Fusovの複製機構について

緒言	64
1: 実験の目的	64~65
2: 実験方法	65~68
3: 結果及び考察	68~78

第4章 *Fusarium*菌及び*Acinetobacter*属細菌の生産するキトサナーゼについて

緒言	79~80
第1節 <i>Fusarium</i> 菌の生産するキトサナーゼ	
1: 実験の目的	80
2: 実験方法	80~83
3: 結果及び考察	83~94
第2節 <i>Acinetobacter</i> 属細菌の生産するキトサナーゼについて	
1: 実験の目的	94
2: 実験方法	94~96
3: 結果及び考察	96~109
総括	110~113
謝辞	114
関連文献	115
参考文献	116~129

略語一覽

A., *Atkinsonella*

A. *bisporus*, *Agaricus bisporus*

AM, ammonium medium; minimal agar medium with ammonium as a sole nitrogen source

AS, anastomosis group

bp, base pair(s)

Bq, becquerel

C., *Cryphonectria*

ccDNA, closed circular plasmid DNA

CMC, Carboxymethyl cellulose

C. S., conidia suspension

CYPC, Czapek-dox medium containing yeast extract, peptone, and casamino acid

D. D., deacetylation degree

dsRNA, double-stranded RNA

DTT, dithiothreitol

EDTA, ethylenediamine-N,N,N',N'-tetraacetic acid

F., *Fusarium*

f. sp., forma specialis

Fusov, *Fusarium solani* virus

HM, hypoxanthine medium; minimal agar medium with hypoxanthine as sole nitrogen source

IPTG, isopropyl-1-thio- β -D-galactoside

K., *Kluyveromyces*

kb, kilo base pairs

kDa, kilo dalton

lpDNA, linear plasmid DNA

MM, nitrate medium; minimal agar medium with nitrate as a sole nitrogen source

MMC, chlorate medium: minimal agar medium with chlorate

MOPS, 3-(N-morpholino)propanesulfonic acid

NaPB, sodium phosphate buffer

NM, nitrite medium; minimal agar medium with nitrite as a sole
nitrogen source
OD, optical density
ORF, open reading frame
PDA, Potato Dextrose Agar
PEG, polyethylene glycol
pfu, plaque formation unit
PVDF, polyvinylidene difluoride
PTH, 3-phenyl-2-thiohydantoin
rpm, revolutions per minute
S., *Saccharomyces*
SDS, sodium dodecyl sulfate
SDS-PAGE, SDS-polyacrylamide gel electrophoresis
spm, strokes per minute
ssDNA, single-stranded DNA
ssRNA, single-stranded RNA
TCA, Trichloro acetic acid
TAE buffer, Tris-Acetate-EDTA buffer
TE buffer, Tris-EDTA buffer
UM, uric acid medium; minimal agar medium with uric acid as a sole
nitrogen source
VLP, virus-like particle
X-gal, 5-bromo-4-chloro-3-indolyl β -D-galactopyranoside

*Fusarium*菌は、不完全菌門 (*Deuteromycotina*)、ヒポミケス菌綱 (*Hypomycetes*)、分生子座不完全菌目 (*Tuberculariales*)、ツバクラリア菌科 (*Tuberculariaceae*) に属する糸状菌であり、広範な植物に対する土壌伝染性疾患の主要な病原菌である。*Fusarium*菌の感染は、一般に、土壌に厚膜胞子として存在する菌が植物の根の接近によって出芽し、植物の根や胚軸上に増殖後、直接又は傷、気孔から植物に侵入し成立する。代表的な*Fusarium*菌である *F. solani*、*F. oxysporum* では宿主植物に対する特異性が高く、この宿主植物の特異性を指標とした分化型 (*forma specialis*: f. sp.) が種以下の分類に用いられている (松尾 et al. 1980)。宿主植物の特異性を含め、植物に対する病原性発現機構を遺伝子レベルで研究するためには、*Fusarium*菌を宿主とした効率的な形質転換系の構築が必要である。糸状菌での形質転換に用いられるベクターは染色体組み込み型がほとんどであり、染色体への外来遺伝子の組み込みの過程が非効率的であるために形質転換頻度が低くなっている (五味 and 原 1990)。一方、*Fusarium*菌内で自律複製する形質転換ベクターが開発されれば、大幅な形質転換頻度の向上が期待でき、*Fusarium*菌の有する遺伝子の機能解析が容易になると考えられる。この自律複製に機能する配列 (*Autonomously Replicating Sequence*) の起源としては、染色体DNA、ミトコンドリアDNA、線状プラスミドDNA (*linear plasmid DNA*: lpDNA) などの染色体外レプリコンが考えられる。特に染色体外レプリコンはそのサイズが染色体等に比較して小さいことから、自律複製型形質転換ベクターの構築に適している。

糸状菌における染色体外レプリコンの多くは、lpDNAと2本鎖RNA (*double-stranded RNA*: dsRNA) である。dsRNAは菌類のウイルスであるマイコウイルスのゲノムとして知られている。lpDNAを用いた*Fusarium*菌での形質転換実験の過程で自律複製する形質転換ベクターが得られた報告もあり (Kistler and Powell 1990)、形質転換への応用にはlpDNAを用いるのが一般的である。しかし、近年RNAウイルスの発現ベクターへの応用が以下に示す点で注目されている (永田 and 山中)。1) 遺伝子発現が非常に早く、しかも効率がよい。2) ほとんどのRNAウイルスが宿主細胞質中で増殖するので、宿主の核機能に非依存である。3) DNA依存性RNAポリメラーゼの阻害剤存在下でも、ウイルスゲノムの転写・翻訳は可能であるから、ベクター由来の発現を行わせている間、宿主の遺伝子発現を

抑えておくことができる。4) ゲノムRNAは効率的に複製されるので、細胞に導入する材料は少量でよい。

染色体外レプリコンはそれを保持する宿主菌に様々な影響を与える場合が知られている。代表的な例ではキラー形質を支配する酵母 *Saccharomyces cerevisiae* のdsRNA (Bevan et al. 1973) や *Kluyveromyces lactis* のlpDNA (Gunge et al. 1981)、栽培マッシュルーム (*Agaricus bisporus*) に生長阻害と子実体の変形を引き起こすdsRNAが知られている (Marino et al. 1976)。また植物病原性糸状菌において、dsRNA染色体外レプリコンがそれを保持する菌の宿主植物に対する病原性に影響を及ぼすと考えられる例が報告されており (Nuss and Koltin 1990)、特にアメリカクリ胴枯病菌 *Cryphonectria parasitica* において詳細に研究されている (Anagnostakis 1982; Nuss 1992)。 *C. parasitica* のdsRNAが、宿主植物に対する病原性を低下する弱病原性形質 (hypovirulence) を支配していることが感染性cDNAを用いて証明された (Choi and Nuss 1992)。感染性cDNAとは、dsRNAレプリコンの完全長cDNAをmRNAとして機能するstrand (positive strand) が転写されるように構築した形質転換ベクターのことで、感染性cDNAを用いて形質転換する事で細胞質中にdsRNAが再生される。また、この弱病原性を支配するdsRNAが菌糸融合によって病原性株へ伝達され、病原性株が弱病原性に形質が変化する現象が知られている。この現象を利用した、アメリカクリ胴枯病菌の生物学的な制御 (biological control) がヨーロッパ及びアメリカで行われている。

染色体外レプリコンとそれを保持する菌との関係において、染色体外レプリコンは種以下の分類である分化型や菌糸融合群に特異的に存在しているとする報告がある (Kistler et al. 1987; Kistler and Leong 1986; Miyasaka et al. 1990)。特に *Fusarium* 菌においてはlpDNAが *F. oxysporum* の分化型特異的に検出された例が報告されている (Kistler et al. 1987)。また *F. poae* においてはスクリーニングした全ての株にdsRNAが存在した例が報告された (Feket et al. 1995)。*Fusarium* 菌は、植物病原菌の中で分類が最も困難なものの一つとされており、また分化型を決定するためには、各種の植物、作物に接種試験を行い宿主植物を同定する必要がある (松尾 et al. 1980)。*F. oxysporum*、*F. poae* で見られた分化型、種特異的に存在する染色体外レプリコンが検出できることは、種の同定、分化型の簡便な同定法への応用が考えられる。

糸状菌の染色体外レプリコンの複製機構やそれ自身がどのような遺伝子を有しているかに

ついでの研究が近年行われる様になり、lpDNAではDNAの5'末端にタンパク質が結合したプラスミドDNAと、DNAの末端が連結したヘアピン構造のプラスミドDNAの2種類が存在する(羽柴 and 宮下 1991)。5'末端にタンパク質が結合した構造はアデノウイルスにおいても見られDNAゲノムの末端タンパク質をプライマーに用いて複製されるプロテインプライミング (protein priming) モデルが提唱されており、末端にヘアピン構造を持つlpDNAはヘアピン近傍にニックが作られ、ヘアピン側をプライマーに用いて複製するセルフプライミングモデルが提唱されている (Miyasaka et al. 1990-b)。また、*Claviceps purpurea* のlpDNAの塩基配列が決定されており、2種類のORF (Open Reading Frame) が見つかったが、各々DNAポリメラーゼ、RNAポリメラーゼに相同性があった。またこれらのORFはトウモロコシのlpDNAから検出されているURF (Unidentified open Reading Frame) と相同性を示した事から、これらのlpDNAはウイルス様の祖先から派生したと考えられている (Oeser and Tudzynski 1989)。一方、dsRNA染色体外レプリコンは主にマイコウイルスのゲノムであるが、RNAプラスミドと呼ばれる一群のレプリコンも存在する。マイコウイルスもRNAプラスミドも共に、レプリコン自身がコードするRNA依存性RNAポリメラーゼによって複製維持されている (Koonin 1992)。またこのRNA依存性RNAポリメラーゼの類似性がRNAウイルス分類の上での重要な因子となっている (Bruenn 1991; Koonin 1992)。dsRNA染色体外レプリコンにおいても、塩基配列の分析が行われており遺伝子の機能について研究が進んでいる (Icho and Wickner 1989; Shapira et al. 1991; Esteban et al. 1992; Polashock and Hillman 1994)。lpDNAの祖先としてウイルスが考えられた様に、RNAプラスミドもRNAウイルスを祖先として派生したと考えられている (Koonin 1992)。しかし、遺伝子レベル、塩基配列レベルで解析されている染色体外レプリコンの例は少なく、形質転換ベクターとして応用するためにも、染色体外レプリコンの複製機構や遺伝子に関する詳細な研究が必要と考えられる。

以上述べてきたように、糸状菌の染色体外レプリコンは、以下に示す様な応用面においても興味を持たれる。1) 糸状菌での自律複製型形質転換ベクターへの応用が期待できること。2) 宿主菌の形質に影響を及ぼす例があり、特に植物病原菌では宿主植物に対する病原性を低下させる例があり、植物病原菌の生物学的な制御 (biological control) への応用が期待できること。3) 種、又は分化型特異的に存在している例があり、簡便な同定法への応用が期待できること。また、基礎研究の面では染色体外レプリコンの有する遺伝子や

複製機構に対して興味を持たれる。そこで、本研究では代表的な植物病原性糸状菌である *Fusarium* 菌から染色体外レプリコンのスクリーニングを行った。その結果、ニセアカシア枝枯病菌 *F. solani* f. sp. *robiniae* SUF704株に、2種類のdsRNA染色体外レプリコンが存在していることを見いだした。これらのdsRNAはマイコウイルスのゲノムであった。2つに分節したdsRNAをゲノムに有するマイコウイルスのゲノムdsRNAの塩基配列や遺伝子に関する報告は無く、*F. solani* SUF704株のdsRNAの塩基配列の決定は、複製機構の解明、形質転換ベクターへの応用のみならずRNAウイルスの分類学上重要である。本論文の第1章から第3章において、*Fusarium*菌からの染色体外レプリコンのスクリーニング、*F. solani* SUF704株からのdsRNAとマイコウイルスの精製、マイコウイルスの伝達性の検討、dsRNAゲノムの塩基配列の決定、*in vitro* replication系を用いたマイコウイルスの複製機構の検討について報告する。

植物病原菌が植物に侵入すると、植物は防御反応の一つとしてファイトアレキシンと呼ばれる一群の抗菌物質を生産する。この際、ファイトアレキシンを誘導する物質をエリシターと呼ぶ。*Fusarium*菌の細胞壁構成成分としてキトサンが含まれていることが報告されているが (Hadwiger and Beckman 1980)、インゲン根腐病菌 *F. solani* f. sp. *phaseoli* とエンドウのさや組織の相互作用において、菌の細胞壁からキトサンオリゴマーが放出され、これがファイトアレキシン (pisatin) 生産のエリシターになると考えられている (Kendra et al. 1989)。病原菌の植物への感染過程においてキトサンは、宿主植物、病原菌両者から様々な影響を受けると考えられる。特にキトサン分解酵素は菌の細胞壁からのキトサンオリゴマーの遊離に働いていると考えられる。Kendraらは、エンドウの組織から得られた酵素が菌の細胞壁を分解し、キトサンオリゴマーを放出させる可能性を報告している。しかし、*Fusarium*菌がキトサン分解酵素を持っているかどうかについて検討した報告はない。*Fusarium*菌のキトサナーゼは、自己の細胞壁の代謝においても、また宿主植物への感染においても重要な役割を果たすと考えられる。

キトサンオリゴマーはファイトアレキシンを誘導するばかりでなく、菌類の生長を抑制する効果があることが報告されていることから (Allan and Hadwiger 1979; Hirano and Nagao 1989)、圃場における土壌改良剤としての応用が検討されてきた。さらに、細胞壁にキトサンを有する *Fusarium*菌の防除の観点では、*Fusarium*菌の細胞壁を分解するキト

サン分解菌を、*Fusarium*病原菌に対するバイオリジカルコントロールに用いることができる可能性がある。キトサナーゼは、細菌 (Pelletier and Sygusch 1990; Hedges and Wolfe 1974; Tominaga and Tsujisaka 1975)、放線菌 (Sakai et al. 1991; Price and Storck 1975)、菌類 (Fenton and Eveleigh 1981) から見いだされて、精製されている。一般的に、キトサナーゼは基質キトサンの脱アセチル化度によって活性が異なり、培地中へのキトサン添加によって誘導的に生産される。

*Fusarium*菌の植物病原性発現に関連する因子の一つとして、菌自身が有するキトサナーゼの植物への感染に対する役割は大変興味深い問題である。また、実用面での*Fusarium*病の防除に関して、バイオリジカルコントロールにキトサナーゼ生産菌を応用する可能性が考えられた。以上から、様々な*Fusarium*菌、及びキトサンを単一炭素源として成長する土壌細菌からキトサン分解活性をもつ菌をスクリーニングした。この結果、高いキトサン分解活性を有する *F. solani* f. sp. *phaseoli* SUF386株を選択し、またキトサンが培地中に存在しなくてもキトサナーゼを生産する細菌として *Acinetobacter* sp. CHB101 を単離した。本論文の第4章において、キトサナーゼ生産菌のスクリーニング、それぞれの培養上清からのキトサナーゼの精製、反応生成物の分析について報告する。

第1章

*Fusarium*菌からの染色体外レプリコンFusoVの精製とその性質

緒言

糸状菌における染色体外レプリコンの多くは、線状プラスミドDNA (linear plasmid DNA: lpDNA) または菌類のウイルス (mycovirus) のゲノムの2本鎖RNA (double-stranded RNA: dsRNA) であることが知られている。これらの染色体外レプリコンは種以下の分類である分化型 (forma specialis: f. sp.: 植物病原菌における便宜的な分類で感染する植物の種類によって分類される) やrace (分化型以下の分類で感染する植物が同一植物種内の特定の株に限られる場合に用いられる)、また菌糸融合群 (anastomosis group: AS) に特異的に存在している場合が報告されている (Kistler et al. 1987; Kistler and Leong 1986; Miyasaka et al. 1990)。さらに、これらの染色体外レプリコンがそれを保持する宿主菌に様々な影響を与える場合が知られている。代表的な例では酵母 *Saccharomyces cerevisiae* のキラー形質を支配するdsRNA (Bevan et al. 1973)、同じくキラー形質を支配する酵母 *Kluyveromyces lactis* のlpDNA (Gunge et al. 1981)、マッシュルーム (*Agaricus bisporus*) において La France disease を引き起こすdsRNAなどが知られている (Marino et al. 1976)。特に植物病原性糸状菌では、アメリカクリ桐枯病 (American chestnut blight) を引き起こす *Cryphonectria parasitica* においてdsRNAが存在することによって宿主植物に対する病原性が低下する弱病原性 (hypovirulence) に形質が変化することが知られている (Anagnostakis 1982; Nuss 1992)。 *Fusarium* 菌においてはlpDNAが *F. oxysporum* の分化型に特異的に検出された例が報告されている (Kistler et al. 1987)。 *F. solani* においては以前にlpDNAの存在が報告されていたが (Samac and Leong 1988)、dsRNAの染色体外レプリコンは知られていなかった。 *Fusarium* 菌におけるdsRNAに関連すると思われるウイルス粒子の報告は *F. moniliforme* のみであり詳細な研究は行われていなかった (Bozarth 1972)。そこで、 *F. oxysporum* と共に分化型での分類が進んでいる *F. solani* を中心に染色体外レプリコンのスクリーニングを行った。この結果、ニセアカシア枝枯れ病菌 *F. solani* f. sp. *robiniae* SUF704株からdsRNAの染色体外レプリコンを検出した。

本章では *F. solani* f. sp. *robiniae* SUF704株のdsRNAとこれをゲノムに有するウイルスの精製を行い、 *Fusarium* 菌のウイルスの分析を行うと共に、その伝達様式について明らか

にした。

第1節

*Fusarium*菌からの染色体外レプリコンのスクリーニング、及びそのレプリコンの性質

1： 実験の目的

*Fusarium*菌における染色体外レプリコンの研究から分化型特異的なlpDNAの存在が報告され (Kistler et al. 1987)、またこれらのlpDNAを用いた*Fusarium*菌での形質転換実験から自律複製する形質転換ベクターが得られる (Kistler and Powell 1990) など興味深い現象が報告されてきている。そこで本学に保存されている*Fusarium*菌のカルチャーコレクション (Okazaki and Saito 1987) から新たな染色体外レプリコンの検出を目的として実験を行った。

2： 実験方法

本実験に使用した試薬類及び実験器具は、使用前に121℃で15 分間のオートクレーブ処理をして用いた。特にRNAを取り扱う実験では、オートクレーブの条件を125℃で20 分間に変更した。

2-1：実験に用いた*Fusarium*菌株、及びその培養条件

本研究に用いた*Fusarium*菌をTable 1-1 に示した。凍結保存菌をポテトデキストロース寒天培地 (Potato Dextrose Agar: PDA, Difco) に植菌し、25℃で1 週間培養した。また、*Fusarium*菌の継代維持にもPDAを用いた。核酸抽出に用いる細胞は50 mlのCYPC液体培地 (Czapek-Dox medium containing 0.1% yeast extract, 0.1% peptone, 0.1% casamino acid: Czapek-Dox medium, K₂HPO₄ 0.1%, KCl 0.05%, NaNO₃ 0.2%, MgSO₄·7H₂O 0.05%, FeSO₄ 0.002%, Glucose 2%, PH6.0) にPDA培地上に形成されたコロニーから5 mm x 5 mmの大きさに切り出した菌糸片10 枚を移植し、25℃、180 rpmで1 週間培養することによって得た。

2-2: *Fusarium*菌からの核酸の抽出

染色体外レプリコンのスクリーニングに Specht らのDNA抽出法を変更して用いた (Specht et al. 1982)。CYPC液体培地での培養によって得られた菌糸を吸引濾過によって集め、蒸留水による洗浄後、余分な水分をペーパータオルで取り除き、湿重量を測定した。液体窒素存在下で乳鉢乳棒によって菌糸体を十分に破碎し、菌糸体0.5 g当たり10 mlの2%のSDSを含む緩衝液 A (50 mM Tris-Cl pH 8.0, 150 mM NaCl, 100 mM EDTA) に懸濁し、0.5 mlのトルエンを添加し、室温で24時間、100 rpm振盪した。菌糸粉末懸濁液に、0.1 容の5 M NaClO₄を添加後、懸濁液と等量のフェノール・クロロフォルム・イソアミルアルコール (25:24:1) を加え良く混和し、遠心分離 (10,000 x g, 15 分間, 室温) した。遠心分離によって水層 (上層) と有機層 (下層) に分離した試料から水層を分取した (フェノール・クロロフォルム抽出)。水層に等量のクロロフォルム・イソアミルアルコール (24:1) を加え良く混和し、遠心分離によって水層を分取した (クロロフォルム抽出)。次いで試料に RNase A (最終濃度 50 μ g/ml) を添加し37 °C で2 時間反応させ、次いで Proteinase K (最終濃度 200 μ g/ml) を添加し 37°C、2 時間処理した。酵素処理後の試料を2 回クロロフォルム抽出後、2 倍量のエタノールを添加し、-80°C で 30 分間冷却することで、生じた沈殿を遠心分離 (10,000 x g, 15分間, 0°C) によって回収した (エタノール沈殿)。沈殿を200 μ lのTE 緩衝液 (10 mM Tris-Cl pH 7.6, 1 mM EDTA) に溶解し、アガロースゲル電気泳動分析に用いる試料とした。

特にdsRNA染色体外レプリコンを検出する目的で、Seroussiらの迅速dsRNA抽出法を用いた (Seroussi et al. 1989)。0.1 gの菌糸体を1.5 mlマイクロチューブ中で1.2 mlの2xSSC (0.3 M sodium chloride, 30 mM sodiumcitrate, pH 7.0)に懸濁し、沸騰水中で8 分間処理後、菌糸体を遠心分離 (12,000 x g, 15 分間, 室温) で回収した。菌糸体と同量のガラスビーズ (直径 0.45 mm, HNO₃で洗浄済み) を加え、更に100 μ lのフェノール・クロロフォルム・イソアミルアルコール (25:24:1) を添加し、楊子で良くかき混ぜた。試料に50 μ lのRNaseフリー蒸留水を加え、1 分間ボルテックスミキサーで混和し、遠心分離 (12,000 x g, 15 分間, 室温) によって分離した水層を新しいチューブに移した。この水層に数倍量の水飽和エーテルを添加し、混和後、遠心分離 (12,000 x g, 1 分間, 室温) し有機層を取り除くエーテル抽出を2 回繰り返した。エーテル抽出後の水層画分から核酸をエタノール沈殿で回収し、20 μ lのTE 緩衝液に溶解してアガロースゲル電気泳動分析のための試料とした。

2-3：染色体外レプリコンの精製

5 gの菌糸体から方法2-2で調製した核酸を2 mlのTE 緩衝液に溶解した。0.5 M NaCl及び12.5 % ショ糖を含むTE bufferに、核酸溶液2 mlを重層し超遠心分離 (80,000 x g, 20 時間, 4℃) を行い核酸を沈殿として回収した。この操作で得られた沈殿を3 mlのTE 緩衝液に溶解し、最終濃度0.5 μ g/mlで臭化エチジウムを最終比重を1.55 g/mlとなるように塩化セシウムを添加し、超遠心分離 (84,000 x g, 4 時間, 20℃) を行った。紫外線照射によって蛍光を発するバンドを取り出し、水飽和イソアミルアルコール抽出で臭化エチジウムを取り除き、TE 緩衝液に対して透析を行い精製核酸試料とした。

dsRNAの精製には上記の方法以外に、セルロースカラムクロマトグラフィーによる精製を行った (Franklin 1966)。通常、セルロースカラムクロマトグラフィーでのdsRNAの精製にはCF11カラム (Whatman) を用いるところをAvicelカラム (Avicel for chromatography, 旭化成) で代用した。5 gの菌糸体を液体窒素下で破碎し、得られた菌糸粉末をNaPB (100 mM sodium phosphate buffer, pH 7.5) に懸濁し、氷中で1 時間、振盪 (100 spm) した。菌糸懸濁液を2 回のフェノール・クロロフォルム抽出し、次いでクロロフォルム抽出、エタノール沈殿で核酸成分を回収した。核酸沈殿を5 mlの15% エタノールを含むSTE 緩衝液 (50 mM Tris-Cl pH 7.0, 0.1 M NaCl, 1 mM EDTA) に溶解し、同緩衝液で平衡化したセルロースカラム (カラム体積2 ml) を通してdsRNAのみを吸着させた。カラムの8 倍量の15 %エタノールを含むSTE bufferで洗浄後、カラムの2 倍量のSTE 緩衝液でdsRNAを溶出させた。

2-4：アガロースゲル電気泳動による分析

核酸分子は、一般的な手法に従い1.0% アガロースゲル電気泳動 (TAE buffer: 40 mM Tris-acetate, pH 8.0, 1 mM EDTA) によって分離後、ゲルを臭化エチジウム溶液 (0.5 μ g /ml)で染色し、紫外線照射下により臭化エチジウムがインターカレーションした核酸分子の発する蛍光として検出した (Maniatis et al. 1982)。

2-5：RNase Aによる染色体外レプリコンの分析

2-3の方法で精製した核酸試料 (1 μ g) を最終濃度2xSSC、0.01xSSC (1.5 mM NaCl, 0.15

mM sodium citrate, pH 7.0) となるように調製し、最終濃度が20 μ g/mlとなるようにRNase Aを添加し、37℃で30分間反応させた。反応終了後、フェノール・クロロホルム抽出、エーテル抽出、エタノール沈殿によって核酸を精製し、50 μ lのTE 緩衝液に溶解し、アガロースゲル電気泳動分析に用いる試料とした。

2-6：各種核酸分解酵素による染色体外レプリコンの分析

各種制限酵素、S1 nucleaseによる染色体外レプリコン核酸分子の分解は一般的な手法で行った (Maniatis et al. 1982)。また、染色体外レプリコンの構造の分析のために、Bal31 nucleaseを5、10、15、20、25、30分間反応させた試料を用いてアガロースゲル電気泳動分析で得られるバンドの継時的な変化を追跡した。

3： 結果及び考察

3 種、13 分化型にわたる60 株の*Fusarium*菌 (Table 1-1) から核酸を抽出し、アガロースゲル電気泳動による染色体外レプリコンのスクリーニングを行った結果、ニセアカシア枝枯病菌 *Fusarium solani* f. sp. *robiniae* SUF704株 (= *Hypomyces solani* f. sp. *robiniae* SUF704) にのみ2 kb程度の大きさの染色体外レプリコンと思われるバンドが検出された (Fig. 1-1)。精製試料を用いたアガロースゲル電気泳動分析から、*F. solani* SUF704 から発見された染色体外レプリコンは λ -HindIIIサイズマーカーとの比較から1.9 kbと1.7 kbの2 種類存在することが明らかとなった (Fig. 1-2)。電気泳動での移動度 (線状DNAに換算して) の小さいバンド (1.9 kb) をM1、移動度の大きなバンド (1.7 kb) をM2と命名した。今までに、*Fusarium*菌においても幾つかの染色体外レプリコンの存在が報告されているが、それらは、主に *F. oxysporum* から見いだされた (Kistlar and Leong 1986; Kistler et al. 1987)。Kistler等による一連の研究から、*F. oxysporum* では、宿主植物に対応する分類の分化型、race の違いに対応して、各々制限酵素地図が異なる1.9 kb のlpDNAが存在している可能性が示唆された。

Table 1-1 List of *Fusarium* strains used for screening
of extra-chromosomal replicon

Species	Forma specialis	Host plant	SUF No.
<i>solani</i>	<i>batatas</i>	<i>Ipomoea batatas</i>	1327, 1328, 1329
<i>solani</i>	<i>cucurbitae</i>	<i>Cucurbita moschata</i>	440, 499, 529, 575, 784, 969, 1013, 1196, 1246, 1305, 1309, 1356, 1357, 1358, 1359, 1360
<i>solani</i>	<i>mori</i>	<i>Morus bombycis</i>	217-11, 217-5, 217-9
<i>solani</i>	<i>phaseoli</i>	<i>Phaseolus vulgaris</i>	386
<i>solani</i>	<i>pisi</i>	<i>Pisum sativum</i>	224, 305, 449, 517, 654, 833, 1197, 1205, I-9, II-7
<i>solani</i>	<i>radicicola</i>	<i>Solanum tuberosum</i>	122, 208, 209, 210, 270, 277, 290, 352, 471, 1245
<i>solani</i>	<i>robiniae</i>	<i>Robinia pseudoacacia</i>	577, 578, 704, 755-2, IV-1, IV-7
<i>solani</i>	<i>xanthoxyli</i>	<i>Xanthoxylum piperitum</i>	407, XV-1, XV-23, XV-25
<i>latelitium</i>	<i>cerosiae</i>	<i>Cerosia cristata</i>	820-1
<i>latelitium</i>	<i>crotalariae</i>	<i>Crotalaria juncea</i>	935
<i>latelitium</i>	<i>mori</i>	<i>Morus bombycis</i>	1156
<i>latelitium</i>	<i>xylarioides</i>	<i>Coffea arabica</i>	937
<i>roseum</i>	<i>cerealis</i>	<i>Oryza sativa</i>	554
		<i>Triticum aestivum</i>	570
		<i>Dianthus caryophyllus</i>	1281

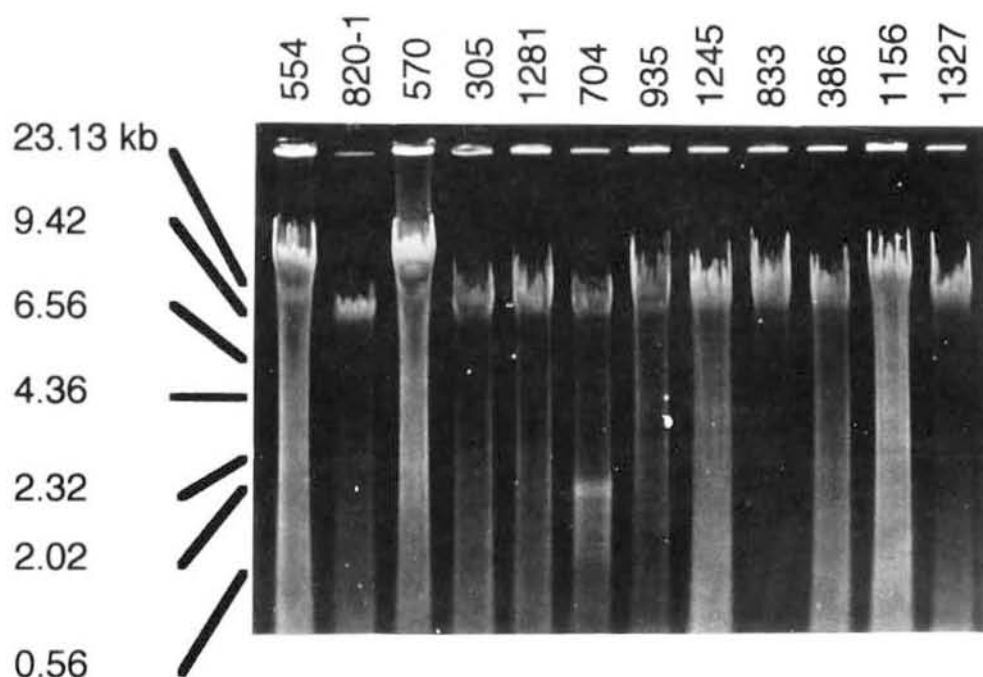


Fig. 1-1. Detection of extra-chromosomal replicon from *Fusarium* strains. Total nucleic acids were extracted from fungi, separated through 1.0% agarose gel electrophoresis, and then detected by ethidium bromide staining. Lane No. indicates the SUF registration numbers of *Fusarium* culture collection.

同じ様な例として、植物病原性担子菌の *Rhizoctonia solani* では菌糸融合群特異的な lpDNA の存在が報告されている (Miyasaka et al 1990)。そこで、他のニセアカシア枝枯病菌 *F. solani* f. sp. *robiniae* 5 株 (SUF577, SUF578, SUF755-2, IV-1, IV-7) からの染色体外レプリコンの検出を試みたが、新たに見出すことはできなかった (データ示さず)。Samac と Leong は、20 株の *F. solani* (f. sp. *cucurbitae* race 1 (13株)、f. sp. *cucurbitae* race 2 (2株)、f. sp. *phaseoli* (2株)、f. sp. *pisi* (1 株)、非病原性株 (2株)) から lpDNA のスクリーニングを行い、*F. solani* f. sp. *cucurbitae* race1 から pFSC1 (9.2 kb) と pFSC2 (8.3 kb) を見いだしているが、同一分化型、同一 race の他の株からはプラスミド DNA が検出されなかった (Samac and Leong 1988)。以上の点から *F. solani* では *F. oxysporum* で見られたような lpDNA についても、また、本研究で取り上げた dsRNA についても分化型と染色体外レプリコンとの相関関係を見出すには至らなかった。

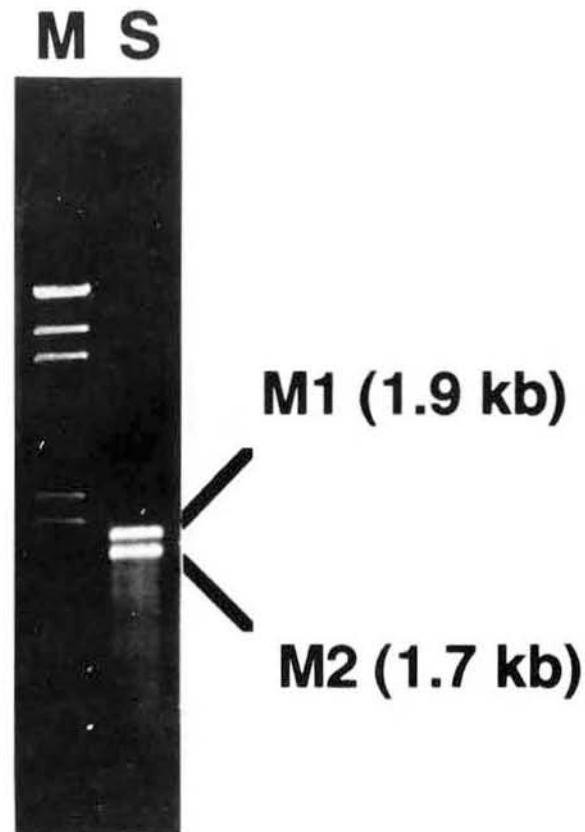


Fig. 1-2. Agarose gel electrophoresis of extra-chromosomal replicons purified from SUF704 by CsCl buoyant density gradient centrifugation. Lane M, λ -HindIII size marker; lane S, purified extra-chromosomal replicons.

F. solani SUF704株の染色体外レプリコン分子は、超遠心精製の際、比重1.55 g/ml の塩化セシウム溶液中ではバンドを形成せず遠心チューブの底 (高比重側) に蓄積したこと、制限酵素では消化されなかったことなどから、lpDNAではなくdsRNAである可能性が示唆された。RNase Aは、高塩濃度 (2xSSC) では1本鎖RNA (single-stranded RNA: ssRNA)を分解するが、dsRNAは分解しない。一方、低塩濃度 (0.01xSSC) ではssRNA、dsRNA共にを分解する事が知られており、dsRNAの分析に良く用いられている (Barrosso and Labarère 1990; Mor et al. 1984; Pryor and Boelen 1987)。そこで、*F. solani* SUF704 の染色体外レプリコンがdsRNAであるかどうかの分析にRNase Aを用いた。この結果、2xSSCの高塩濃度条件ではRNase Aに耐性を示したが、0.01xSSCの低塩濃度条件では感受性を示したことから、本染色体外レプリコンはdsRNAであることが示された (Fig. 1-3)。

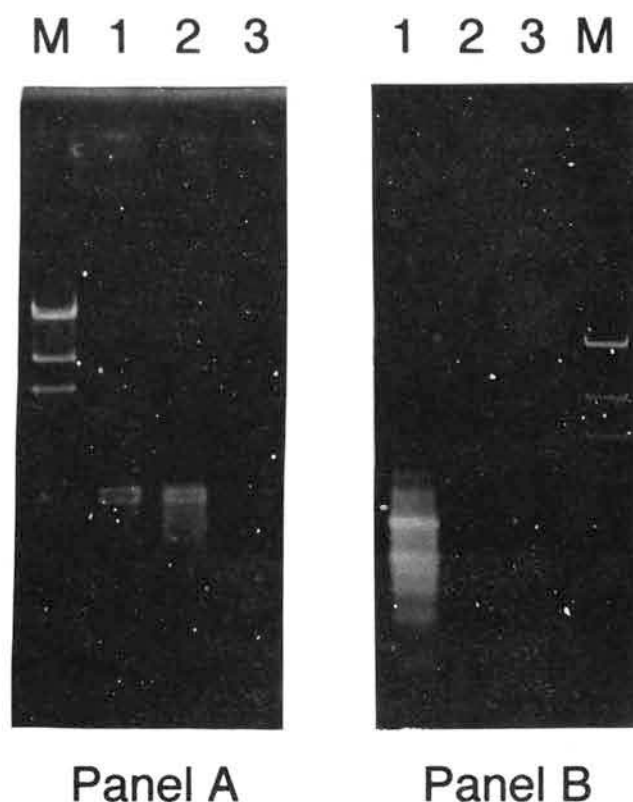


Fig. 1-3. Analysis of purified M1 and M2 digested with RNase A. M1 and M2 replicons were digested with RNase A in high-salt or low-salt conditions. Panel A, RNase A digestion of dsRNAs; Panel B, RNase A digestion of total RNA from *Pharibitis nil*; lane 1, intact M1 and M2; lane 2, M1 and M2 digested with RNase A in 2xSSC; lane 3, M1 and M2 digested with RNase A in 0.01xSSC; lane M, λ HindIII size marker.

この結果は、Seroussiらの迅速dsRNA抽出法 (Seroussi et al. 1989) を用いたスクリーニングでも検出されたこと、またdsRNAに対してアフィニティーを示すセルロースカラムクロマトグラフィーで精製可能なことも *F. solani* SUF704 の染色体外レプリコンがdsRNAであることを支持している (データ示さず)。S1 nuclease と Bal31 nuclease によるdsRNA染色体外レプリコンM1、M2の分析を行った。S1 nuclease は1本鎖核酸特異的に分解する酵素でM1、M2にニックなどがあれば、アガロースゲル電気泳動での移動度に変化が生じるはずである。一方 Bal31 nuclease は、1本鎖核酸特異的なendonuclease 活性と共に2本鎖

核酸を基質とした場合、5'、3' 両方向から分解する exonuclease 活性を有する (Sambrook et al. 1989)。S1 nuclease 処理を行った場合、M1、M2のアガロースゲル電気泳動での移動度に変化がなかったことから、M1、M2はニックを持っていないか持っているとしても末端近傍であると思われる (データ示さず)。一方Bal31 nuclease による消化で継時的にM1、M2のバンドが低分子領域に変化していったことから、M1、M2は線状の構造をしたdsRNAであると考えられた (Fig. 1-4)。

M 0 5 10 15 20 25 30

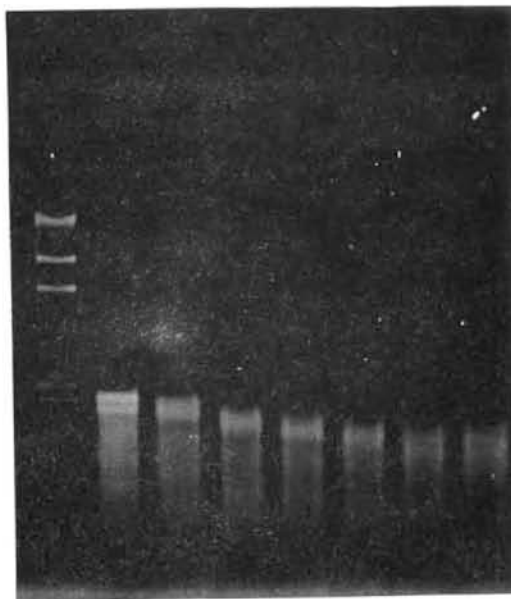


Fig. 1-4. Bal31 nuclease treatment of purified M1 and M2. M1 and M2 dsRNA was digested with Bal31 nuclease for various time. Lane number indicates the reaction time (min). Lane M, λ HindIII size marker.

糸状菌でのdsRNAは、菌類のウイルス (mycovirus) の染色体として知られている。一般的なマイコウイルスは 2~4 本に分節したdsRNAをゲノムに持つ直径 30~50 nmの球状ウイルス粒子であり、40~125 kDa の1種類のキャプシドタンパク質によって構成されている (Buck et al. 1984)。マイコウイルスは、ランダムにスクリーニングした場合菌類の

10～15 % の株に見いだされるという報告もあり(Bozarth 1972)、比較的広く存在していると考えられている。しかし、*Fusarium*菌におけるdsRNAマイコウイルスは、*F. moniliferum* で直径40 nm のウイルス様粒子 (virus-like particle: VLP) が存在したとする報告があるのみで詳細な研究例はない。本研究で見出したM1、M2は、*F. solani* で初めて見いだされたdsRNA染色体外レプリコンであると考えられた。

第2節

Fusarium solani から得られたマイコウイルスFusoVの精製と分析

1： 実験の目的

F. solani f. sp. *robiniae* SUF704 からdsRNA染色体外レプリコンが検出された。dsRNAはマイコウイルスのゲノムとして知られており、*F. solani* SUF704株のdsRNAがM1、M2と2つに分節している点でもマイコウイルスの一般的な性質に一致した。そこで、dsRNA染色体外レプリコンM1、M2に関連するマイコウイルスの精製を試みた。

2： 実験方法

本実験に使用した試薬類及び実験器具は、使用前に121℃で15 分間のオートクレープ処理をして用いた。特にRNAを取り扱う実験では、オートクレープの条件を125℃で20 分間に変更した。

2-1： *F. solani* SUF704株の培養条件

PDA培地で継代維持していた*F. solani* SUF704株からPDA平板培地に菌糸片を植菌し、25℃で1 週間、ほぼ全面に菌糸体が広がるまで培養した。コロニーの表面を無菌的に滅菌蒸留水で洗浄することにより分生胞子を集めた。PDA培地 1 枚分の分生胞子を100 ml のCYPC液体培地に植菌し、25℃、180 rpmで1 週間培養した菌糸をマイコウイルスの調製に用いた。

2-2: *F. solani* SUF704株からのマイコウイルスの調製

CYPC液体培養で得られた菌糸を吸引濾過により集め、滅菌蒸留水による洗浄後、余分な水分をペーパータオルで取り除き、液体窒素存在下で乳鉢乳棒によって菌糸体を破碎した。5 g の菌糸粉末を20 mlのNaPB (100 mM sodium phosphate buffer pH 7.2) に懸濁し、氷中で1時間振盪 (120 spm) する事で細胞抽出液を得た。低速遠心分離 (12,000 x g、10分間、4℃) で細胞残渣を取り除いた後、超遠心分離 (270,000 x g、2時間、4℃) を行った。遠心分離で得られたペレットを2 mlのNaPBに懸濁後、試料を10 ml の25% のショ糖を含んだNaPBに重層し、超遠心分離 (110,000 x g、4時間、4℃) を行った。得られたペレットを2 ml のNaPBに懸濁し、10 ml のショ糖密度勾配 (10~50 % NaPB) 上に重層し、超遠心分離 (140,000 x g、3時間、4℃) を行った。超遠心後、試料を遠心チューブの底から500 μ l ずつ分画した。マイコウイルスを含むと考えられる分画は、各分画に対して50 μ l の試料からフェノール・クロロフォルム抽出、エーテル抽出、エタノール沈殿によって核酸を調製し、TE 緩衝液に溶解後、アガロースゲル電気泳動によってM1、M2の検出される分画とした。マイコウイルスを含む分画を集め、超遠心分離 (390,000 x g、2時間、4℃) によってマイコウイルスを沈殿として回収し、次いで塩化セシウム密度勾配遠心 ($d=1.375$ g/ml、180,000 x g、20時間、4℃) による精製を行った。500 μ l ずつ分画した試料から、アガロースゲル電気泳動分析によりマイコウイルスを含む分画を選び、滅菌蒸留水に対して透析し、精製マイコウイルス試料とした。

2-3: dsRNAに関連する核酸タンパク質複合体の検出

2-2のマイコウイルス調製ステップのショ糖密度勾配遠心で得られたマイコウイルス分画を1% アガロースゲル電気泳動 (TAE buffer) し、臭化エチジウム染色し核酸を検出後、同ゲルをクマシーブルー溶液 (0.05 % Coomassie Brilliant Blue R250, 50 % methanol, 10 % acetic acid, 40 % distilled water) で一晩染色後、脱色液 (5 % methanol, 7 % acetic acid, 88 % distilled water) で一晩脱色することでタンパク質のバンドを検出した。また同分画をDNase I (RNase free) とRNase Aによる消化を行った試料を用いた分析も行った。

2-4: 透過型電子顕微鏡によるマイコウイルスの観察

2-2の方法で精製したマイコウイルスを遠心濃縮後、ネガティブ染色するために等量の

2% phospho-tangstic acid (pH 6.0)と混合した。この混合液をコロジオン膜付きメッシュグリッド上に滴下し風乾させた後、透過型電子顕微鏡 (HU-12A型, HITACHI) で観察した。

2-5：マイコウイルスを構成するタンパク質のSDS-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) による分析。

2-2により精製したマイコウイルス分画 20 μ l を用いて、8 % ポリアクリルアミドゲルを用いたSDS-PAGEによる分析を行った (平野 1989)。精製FusoV粒子を等量のSDS-サンプル緩衝液 (125 mM Tris-Cl pH 6.8, 20% glycerol, 280 mM 2-mercaptoethanol, 0.01mg/ml bromophenol blue) と混合し沸騰水中で5 分間変性の変性処理後、電気泳動した。電気泳動後のゲルをクマシーブルー溶液 で6 時間穏やかに振盪しながら染色し、次いで脱色液で一晩脱色後、染色されたバンドとしてマイコウイルスを構成するタンパク質を検出した。

2-6：臭化シアンによるマイコウイルスタンパク質の分解

臭化シアンは、ポリペプチド鎖のメチオニン残基のC末端側を化学的に切断する。2-2により得られたマイコウイルス分画を濃縮遠心機にかけて、溶媒を完全に取り除き乾固させた。マイコウイルスタンパク質を1 %臭化シアンを含む70% ギ酸溶液に溶解させ、室温で24時間遮光放置した。試料を再び遠心濃縮機で乾固させてSDS-PAGE用サンプルバッファーに溶解し、SDS-PAGEで分離した。

2-7：マイコウイルスタンパク質のPVDF膜へのトランスファー及びアミノ酸シーケンサーによるアミノ酸配列の決定

電気泳動後のゲルを200 mlのプロッティング溶液C (25 mM Tris, 40 mM 6-amino-n-capronic acid, 20 % methanol, 0.05 % SDS) に浸して5 分間軽く振盪した。セミドライプロッティング装置 (Sartorius) に下から陽極電極板、プロッティング溶液A (0.3 M Tris, 20 % methanol, 0.05 % SDS) に浸した濾紙2 枚、プロッティング溶液B (25 mM Tris, 20 % methanol, 0.05 % SDS) に浸した濾紙2 枚、PVDF膜 (PVDFメンブレン, BIO-RAD)、PAGEゲル、プロッティング溶液Cに浸した濾紙2 枚、陰極電極板を各々気泡が入らないように重ね、1 mA/cm²の定電流で90分間トランスファーした。トランスファー後、PVDF膜を200 mlの蒸留水に浸して5 分間振盪し、クマシーブルー染色液 (0.2 % Commassie

Brilliant Blue R250, 40 % methanol, 10 % acetic acid) で5分間染色し、脱色液 (60 % methanol) でバックグラウンドの色が低くなるまで脱色、次いで蒸留水による洗浄を5分間行った。風乾後、タンパク質のバンドを切り出し、アミノ酸シーケンサーでの分析の試料とした (平野 1993)。マイコウイルスのインタクトな試料のバンド、及び臭化シアン分解で得られたバンドからアミノ酸配列をアミノ酸シーケンサーPSQ1 (島津)、及び気相シーケンサー476A (Perkin-Elmer) を用いて決定した。

3： 結果及び考察

*Fusarium*菌からの染色体外レプリコンのスクリーニングの結果、*F. solani* f. sp. *robiniae* SUF704 から2種類のdsRNAが検出された。dsRNAは、マイコウイルスのゲノムとして良く検出されることより、*F. solani* SUF704 からマイコウイルスの精製を試みた。*F. solani* SUF704 からのマイコウイルスの精製は、細胞抽出試料から各種遠心分離を繰り返すことで行った。最終精製段階の塩化セシウム密度勾配遠心分離で得られた分画から核酸を抽出し、アガロースゲル電気泳動による分析の結果をFig. 1-5 に示した。dsRNA M1、M2が検出されるピーク分画は浮遊密度 1.36 g/ml であった。dsRNAのみの浮遊密度は、第1章、第1節の実験2-3の塩化セシウム密度勾配遠心分離 ($d=1.55$ g/ml) の結果、遠心チューブの底に分画されることから1.55 g/ml 以上であった。マイコウイルス調製の結果、浮遊密度 1.36 g/ml に分画されたことは、これらのdsRNAがタンパク質などと複合体を形成している可能性を示唆する結果であった。また塩化セシウム溶液中での浮遊密度 1.36 g/ml は、他のdsRNAマイコウイルスで得られている値 (1.30~1.40 g/ml) と良く一致した (Lemke and Nash 1974)。植物の球状のRNAウイルスについてカチオン濃度や、pH によるコンフォメーション変化をアガロースゲル電気泳動によって検出する報告があったので (Heaton 1992)、シヨ糖密度勾配遠心によって得られたマイコウイルス分画をそのままアガロースゲル電気泳動による分析を試みた。電気泳動したゲルを核酸のインターカレーション剤である臭化エチジウムで染色し、紫外線照射下で得られた核酸バンドと、タンパク質の染色剤であるクマシーブルー染色で得られたバンドが同一の位置に現れた。また、この核酸バンドは DNase I、RNase A 処理に耐性であった (Fig. 1-6)。

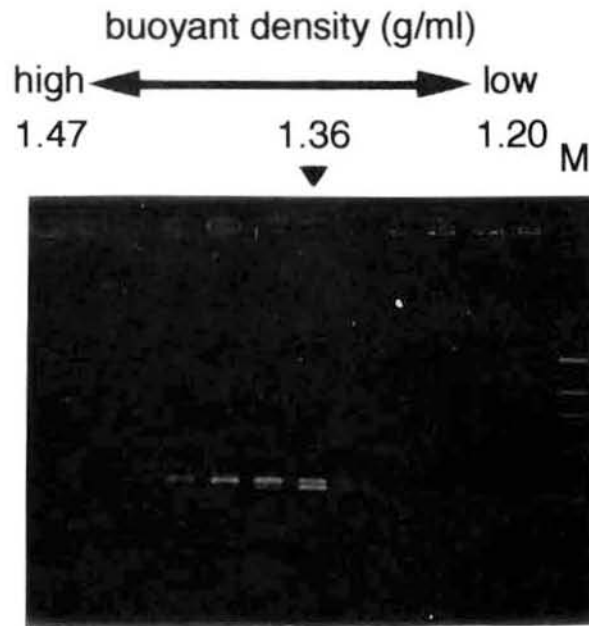


Fig. 1-5. Agarose gel electrophoresis of dsRNA extracted from fractions obtained by CsCl density gradient centrifugation. The top, bottom and dsRNA peak fractions had a buoyant density (g/ml) of 1.47, 1.20 and 1.36, respectively. Lane M, λ HindIII size marker.

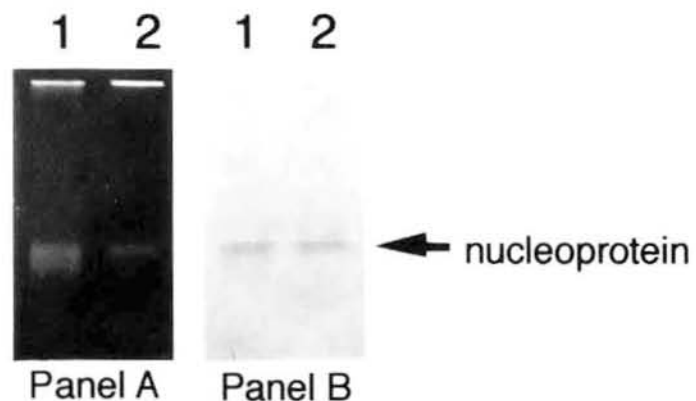


Fig. 1-6. Nuclease-resistant nucleoprotein structure of mycovirus FusoV. Sucrose gradient fraction, showing the peak of dsRNA content, was treated with both DNase I and RNase A, and separated by 1.0% agarose gel electrophoresis. The resulting gel was stained with ethidium bromide for nucleic acid, and successively stained with Coomassie Brilliant Blue for protein. Panel A, ethidium bromide staining; panel B, Coomassie Brilliant Blue staining; lane 1, intact fraction; lane 2, nuclease-treated fraction.

以上の結果は、臭化エチヂウム、クマシーブルー両染色法で確認されたバンドが、dsRNAとタンパク質の複合体であり、タンパク質によってdsRNAが nuclease のアタックから保護されている構造にあると考えられる。これらの結果から、dsRNA M1、M2がマイコウイルスのゲノムであることが強く示唆された。最終精製マイコウイルス分画をネガティブ染色し透過型電子顕微鏡で観察した結果、エンベロープを持たない直径 30 nm の球状の

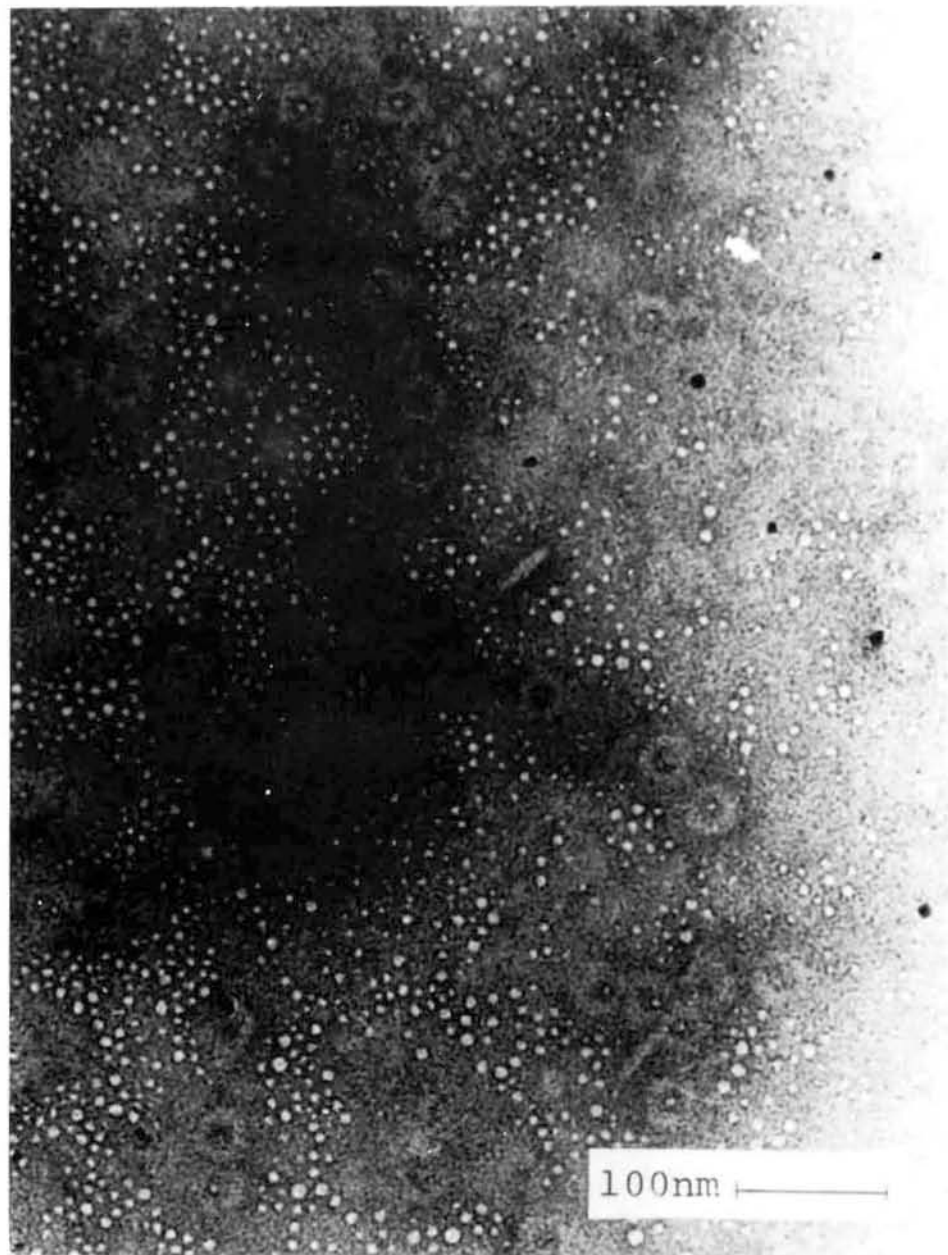


Fig. 1-7 Electron microgram of negatively stained (2% phosphotungstic acid) Fusov particles. Internal Bar represents 100 nm.

粒子が確認された (Fig. 1-7)。以上の結果からdsRNA M1、M2は *F. solani* SUF704株中に存在する直径 30 nm の球状のマイコウイルスのゲノムである事が明らかになった。このマイコウイルスを Pryor と Boelen による命名法に従って、FusoV (*Fusarium solani* virus) と名付けた (Pryor and Boelen 1987)。FusoVを構成するタンパク質のSDS-PAGE分析から、44 kDaのタンパク質が検出された (Fig. 1-8)。マイコウイルスは一般的に1種類のキャプシドタンパク質でウイルス粒子を形成している事から、FusoVで検出された44 kDaのタンパク質がFusoVのキャプシドタンパク質であると考えられた。

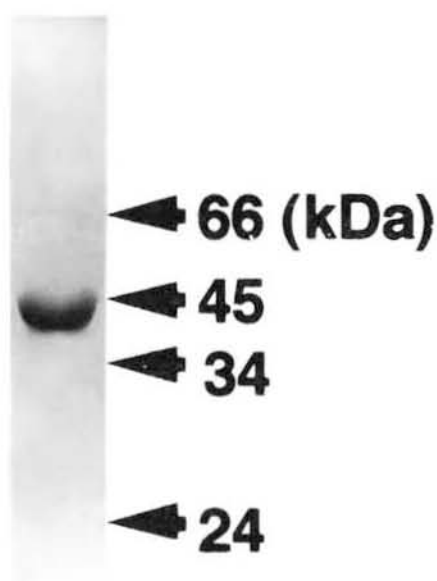


Fig. 1-8 Polypeptide present in the FusoV. The final FusoV preparation was boiled in SDS buffer, and electrophoresed in a SDS-polyacrylamide gel (8 %). The gel was stained with Coomassie brilliant blue. Molecular mass markers were bovine albumin (66,000 Da), egg albumin (45,000 Da), pepsin (34,700 Da), and trypsinogen (24,000 Da).

FusoVは1.9 kb、1.7 kb の2つに分節したdsRNAをゲノムに有するエンベロープを持たない直径 30 nm の球状のウイルス粒子であり、この粒子は主に44 kDaのキャプシドタンパク質によって構成されていた。この構造は、マイコウイルスの一般的な構造、すなわち、

1) エンベロープを持たない直径 25~50 nm の球状の粒子であること、2) 1 種類のキャプシドタンパク質 (42~125 kDa) でウイルス粒子が構成されること、3) 分節していないか、又は数本に分節したdsRNAをゲノムに有すること、4) 分節ゲノムは各々別々のウイルス粒子にパッケージングされていることと良く一致していた (Buck et al. 1984)。FusoVのキャプシドタンパク質のアミノ酸配列を決定するためアミノ酸シーケンサーによる分析を行った。インタクトなキャプシドタンパク質を用いた場合、アミノ酸配列を決定することができなかった。以上の結果からキャプシドタンパク質のN末端は何らかの修飾を受けていると考えられた。そこで、臭化シアン分解で得られた 15 kDa と 29 kDa の断片を用いて実験を行ったところ、15 kDa 断片からはインタクトな試料同様N末端が修飾されているらしく、アミノ酸配列を決定することができなかった。

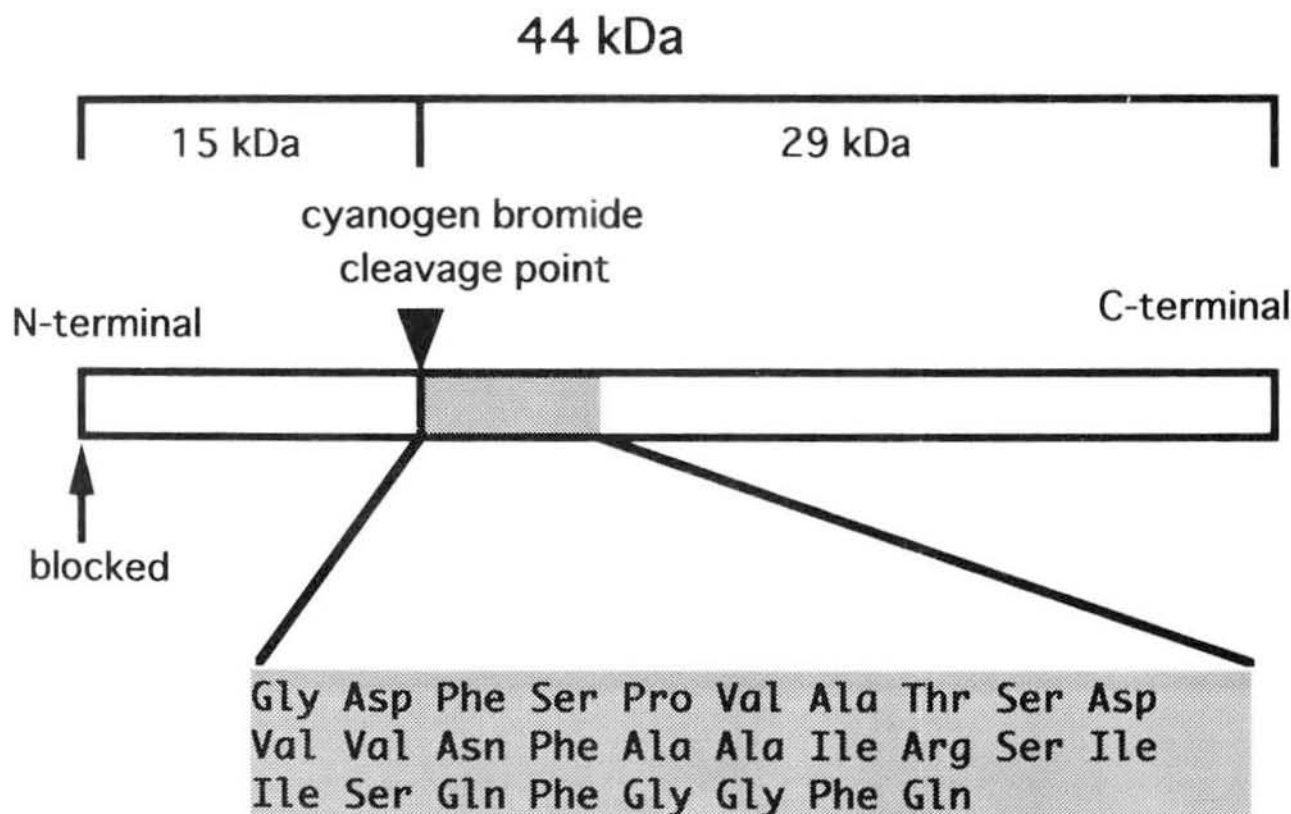


Fig. 1-9 Presumed structure of capsid protein. Cyanogen bromide cleavage of the capsid protein generated two peptide fragments of 15 and 29 kDa. N terminal of intact protein and 15-kDa fragment was blocked against Edman degradation. Twenty-eight amino acid residues was determined from 29 kDa fragment using 476A protein sequencer (Perkin-Elmer).

一方、29 kDa 断片を用いた結果、28アミノ酸残基の配列を決定できた。15 kDa 断片の N末端が修飾されていること、15 kDa 断片と29 kDa 断片を合わせると44 kDa とインタクトなキャプシドタンパク質と同じ分子量となることから、臭化シアン分解によりインタクトなキャプシドタンパク質のN末端側から15 kDa の、C末端側から29 kDa のポリペプチド断片が得られたと考えられた (Fig. 1-9)。キャプシドタンパク質のN末端が修飾されている例として、酵母 *Saccharomyces cerevisiae* の L-A virus では、N末端がアセチル化されていることが明らかになっている。このアセチル化に働く宿主酵母の遺伝子 MAK3 (maintenance of killer) がクローニングされている (Tercero et al. 1992)。この遺伝子産物 N-acetyltransferase が機能しないとキャプシドタンパク質の集合が阻害され、ウイルス粒子を形成できなくなる (Tercero and Wickner 1992; Tercero et al. 1993)。FusoVにおいても第2章で詳しく示すが、dsRNA M1、M2は、各々一つの遺伝子 (ポリメラーゼとキャプシドタンパク質) をコードしている事から、キャプシドタンパク質のN末端の修飾に関与する酵素は宿主菌由来であると考えられた。

動植物に感染するdsRNAウイルスは、分節 dsRNA ゲノムが 10~12 本あるゲノム構造を取っている *Reoviridae* 科と2つに分節したゲノムを持つ *Birnaviridae* 科に分類されている。一方、マイコウイルスは *Saccharomyces cerevisiae* の L-A virus のように、5 kb 弱の分節していない dsRNA ゲノムを持つ球状ウイルスである *Totiviridae* 科と、FusoVが含まれる2~4 本に分節した dsRNA ゲノムを有する球状ウイルスの *Partitiviridae* 科 (Ward 1993)、更に *Cryphonectria parasitica* の弱病原性形質を引き起こす CHV1などが含まれる 11~13 kb の非分節ゲノムを持つ *Hypoviridae* 科に分類される (Murphy et al. 1995)。*Partitiviridae* 科は2つに分節しているゲノムを持つ点で *Birnaviridae* 科に類似であるが、ゲノムサイズと遺伝子の構造が異なっている (Koonin 1992)。*Hypoviridae* 科は、分節していない大きな (11~13 kb) の dsRNA をゲノムに持っていること、またキャプシドタンパク質を持たず、ヴェシクルにくるまれているというエンベロープ構造を持っている点で (Hansren et al. 1985)、一般的なマイコウイルスの *Totiviridae* 科、*Partitiviridae* 科とはかなり性質が異なっている。菌類に感染するマイコウイルス特に *Totiviridae* 科、*Partitiviridae* 科では、動植物に感染する dsRNA ウイルスに比べ構造的に単純化しており、レオウイルスなどで見られる転写と複製が行われるウイルス内部のコアと呼ばれる核酸タンパク質複合体との類似性が指摘されている (Cheng et al. 1994)。一方、マイコウイルスとして主要な属になる *Totiviridae* 科に

は原生動物で発見されたdsRNAウイルスが含まれ、またPartitiviridae科には植物ウイルスのcryptovirusが含まれると考えられている (Ward 1993)。また、最近では、ヒト、ウサギなどの動物からPartitiviridae科ウイルスに類似の2～3本に分節したdsRNAをもつpicobirnavirusの発見が報告されるなど (Ludert and Liprandi 1993; Gallimore et al. 1993; Gallimore et al. 1995)、菌類に特異的と考えられていた1～数本に分節したdsRNAを有する単純な構造のウイルス (Totiviridae, Partitiviridae科) が動物・植物からも見いだされたことからFusoVを含めたマイコウイルスが、これらdsRNAウイルスの進化を含めより興味深い研究対象になると思われる。

第3節

FusoVの伝達様式

1： 実験目的

一般的に、マイコウイルスは宿主菌を溶菌させることはなく、細胞外の経路による水平感染はできない。マイコウイルスの水平感染はマイコウイルスを持つ菌と同一菌糸融合群に属する菌の間で菌糸融合によって行われる (Lemke and Nash 1974)。一方、胞子を介しての次世代への伝達は無性孢子である分生胞子を介する場合の伝達率は高いが、有性孢子である子嚢孢子での伝達が起こりにくい例も報告されている。FusoVが菌糸融合で伝達するのか、胞子を介してどの程度伝達するのかについて検討を行った。

2： 実験方法

2-1：実験に用いたFusarium菌株、及びその培養条件

本実験に用いたFusarium菌は、ニセアカシア枝枯病菌 *F. solani* f. sp. *robiniae* SUF704、単孢子分離によって得られた FusoV 欠落株 SUF704-free、同分化型の SUF577、SUF578 株であり、PDA培地上で継代維持した。迅速dsRNA抽出に用いる菌は、5 mlのCYPC培地で30℃、100 spm、5日間培養した。菌糸融合実験の為のマーカー形質として硝酸同化系欠損変異を持つ変異菌株の作成を以下の方法で行った。継代維持しているPDA培地上のコロニーから5 mm x 5 mmに菌糸体を切り出し、MMC培地 (Table 1-2) に植菌し、25℃で培養中に出現する成長速度の高いセクターを分離し、硝酸を単一窒素源に含むMM培地

(Table 1-2) に植菌し培養した菌糸体から単孢子分離を行った。得られた単孢子分離株のMM培地で気中菌糸を作らず薄いコロニーを形成する株を硝酸同化系欠損変異株として選抜した。

Table 1-2. Medium compositions used for nitrate assimilation pathway mutant

basal medium		trace element solution	
sucrose	30 g	citric acid	5 g
KH ₂ PO ₄	1 g	ZnSO ₄ ·7H ₂ O	5 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.5 g	Fe(NH ₄) ₂ (SO ₄) ₂ ·5H ₂ O	1 g
KCl	0.5 g	CuSO ₄ ·5H ₂ O	0.25 g
FeSO ₄ ·7H ₂ O	10 mg	MnSO ₄ ·H ₂ O	50 mg
agar	20 g	H ₃ BO ₄	50 mg
trace element solution	0.2 ml	NaMoO ₄ ·2H ₂ O	50 mg
per 1000 ml of H ₂ O (pH 5.6)		per 95 ml of H ₂ O (pH 5.6)	

MMC medium (minimal agar medium with chlorate)

1000 ml of basal medium	
L-asparagine	1.6 g
NaNO ₃	2 g
NaClO ₃	13 g (pH 5.6)

MM medium (minimal medium = nitrate medium)

1000 ml of basal medium	
NaNO ₃	2 g (pH 5.6)

NM medium (nitrite medium)

1000 ml of basal medium	
NaNO ₂	0.5 g (pH 5.6)

HM medium (hypoxanthine medium)

1000 ml of basal medium	
hypoxanthine	0.2 g (pH 5.6)

AM medium (ammonium medium)

1000 ml of basal medium	
ammonium tartrate	1 g (pH 5.6)

UM medium (uric acid medium)

1000 ml of basal medium	
uric acid	0.2 g (pH 5.6)

2-2：分生孢子(無性孢子)を介するFusoVの伝達(無性サイクルでの垂直伝播)

PDAで継代維持してきた *F. solani* SUF704株を新たにPDA培地に植菌し、25℃ で1週間培養し、培地表面に広がったコロニーを滅菌蒸留水3 mlで洗浄する事で分生孢子懸濁液を得た。この懸濁液を、1.0 ml 用のピペットチップにガラスウールを詰めた分生孢子回収用のフィルターを通し、混入した菌糸を取り除いた。分生孢子懸濁液中の孢子数を血球計算板で算定し、寒天培地一枚当たり10 から50 分生孢子となるように、分生孢子懸濁液をPDA培地に塗り広げ、25℃ で培養した。単孢子由来のコロニーを肉眼で確認し、同コロニーを新しいPDA培地に移植した。この様にして得られた、単孢子分離株を5 ml のCYPC培地に植菌し培養後、得られた菌糸を遠心分離によって回収し、第1章・第1節2-2の迅速dsRNA抽出法 (Seroussi et al. 1989) を用いてdsRNAの検出を行った。

2-3：菌糸融合によるFusoVの伝達

塩素酸耐性変異株から得られた硝酸同化系欠損変異株は、単一窒素源として亜硝酸を含むNM培地 (Table 1-2)、アンモニウムを含むAM培地 (Table 1-2)、尿酸を含むUM培地 (Table 1-2)、hypoxanthineを含むHM培地 (Table 1-2) にそれぞれ植菌し、各培地での成長を親株の SUF704、SUF704-free、SUF577、SUF578株と比較する事で、硝酸同化系の硝酸還元酵素の構造遺伝子に変異を持つ *nit1* 変異株なのか、硝酸還元酵素、亜硝酸還元酵素の制御遺伝子に変異を持つ *nit3* 変異株であるのか、硝酸還元酵素の活性発現に要求されるモリブデンコファクターの遺伝子に変異を持つ *NitM* 株であるのかを決定した。変異遺伝子が異なる変異株同士の組み合わせを用いて、MM培地上でSUF704株の変異株(ドナー)と、SUF704-free、SUF577、SUF578 (レシピエント) を対峙培養した。用いた両株の薄いコロニーの境界面に、菌糸融合によって両株の変異が相補された結果生じた気中菌糸を伴って成長するヘテロカリオンの菌糸を分離し、MM培地で25℃、1週間培養した。ヘテロカリオンのコロニーを滅菌蒸留水で洗浄し分生孢子を得た。この分生孢子からレシピエントの表現型の株を分離し、この株がdsRNAを保持しているかどうかについて迅速dsRNA抽出法 (Seroussi et al. 1989) により検討した。

2-4：子嚢胞子を介したdsRNAの伝達 (有性サイクルでの垂直伝播)

F. solani は一般的に有性世代が見つからない不完全菌類に分類されるが、*F. solani* f. *sp. robiniae* は有性世代である子嚢世代が見つかっており、交配が可能である (松尾 et al. 1980)。*F. solani* SUF704、SUF577 [mating type, MF (+)]、SUF578 [mating type, MF (-)]を用いて交配実験 (mating) を行った。交配には一方の株をPDA培地上にコロニーを形成させ、他方の株をPDA培地上の相手方のコロニーから滅菌蒸留水で洗い出した分生胞子懸濁液として用意し、PDA上のコロニーに分生胞子懸濁液を加え、余分な懸濁液をピペットで取り除き、25℃で4週間培養する事で行った。交配実験は、SUF704 (PDA: growth on PDA) x SUF577 (C. S.: conidia suspension)、SUF704 (PDA) x SUF578 (C.S.)、SUF577 (PDA) x SUF704 (C. S.)、SUF577 (PDA) x SUF578 (C. S.)、SUF578 (PDA) x SUF704 (C. S.)、SUF578 (PDA) x SUF577 (C. S.) の組み合わせで行った。交配の結果 PDA 培地上に形成される子嚢殻を分離し、スライドグラス上に乗せ、蒸留水を添加しカバーグラスを被せて押し潰したところ、光学顕微鏡による観察で子嚢胞子が観察された。子嚢殻を菌糸から分離する際に紛れ込む分生胞子からマイクロマニピュレーターを用いて子嚢胞子を分離した。子嚢胞子をアルコール滅菌してあるホールスライド中で、滅菌水に浸しながら白金耳を用いて潰した。得られた胞子液を大きめのカバーグラスに2% 寒天を含むPDA培地の薄いシートの方の端に塗り、その後、四分子分析用の台に取り付け顕微鏡下で子嚢胞子をマイクロマニピュレーターで分離した。幾つかの胞子を分離後、PDA培地上に乗せて、25℃で一晩培養し、伸びてきた菌糸を新しいPDA培地に移した。得られた分離株から迅速dsRNA抽出法 (Seroussi et al. 1989) によってdsRNAを抽出し、子嚢胞子を介してFusoVが伝達するかどうか検討した。

3： 結果及び考察

F. solani SUF704株から得られた単胞子分離株からdsRNAを抽出し、アガロースゲル電気泳動で分析を行った (Fig. 1-10)。42株の分離株を分析した結果、その約85%にあたる36株からdsRNA M1、M2が検出された。FusoVのdsRNAゲノムM1とM2は必ず二つ一組で伝達されており、M1またはM2のみが伝達された株は存在しなかった。栽培マッシュルーム (*Agaricus bisporus*) ではdsRNAの脱落は、菌の致死温度より2℃低い温度で培養し、コロニーの先端を切り取り、新しい培地に移植し、高温条件で培養する操作を繰り返

す方法 (Lemke and Nash 1974) で、また、*C. parasitica* では -10°C で 24 時間凍結する (Friese et al. 1992) などの過酷な条件で処理することによってはじめて得られることが報告されている。しかし、*F. solani* SUF704株では単に単孢子分離によってdsRNA脱落株が得られた。

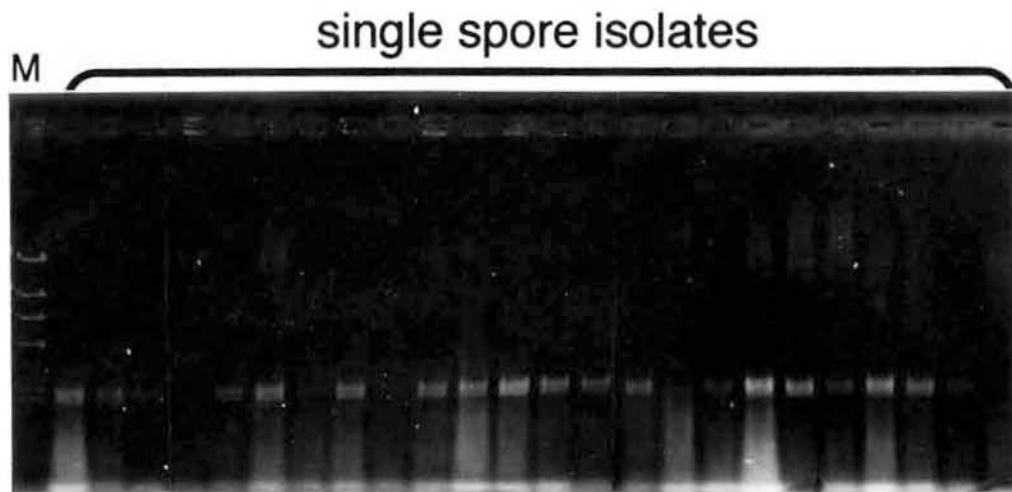


Fig. 1-10. FusoV transfer through conidia. DsRNA viral genome was extracted from single spore isolates of *F. solani* SUF704, separated by agarose gel electrophoresis, and detected by ethidium bromide staining. Lane M, λ HindIII size marker.

このFusoV脱落株をSUF704-free株として以降の実験に用いた。*C. parasitica* のdsRNA保持株では弱病原性形質の他に幾つかの形質、成長速度の低下、コロニー形態の変化、色素生産性の低下、分生胞子の生産性の低下が報告されている (hypovirulence associated traits; Hillman et al. 1990)。FusoVでは、SUF704株とSUF704-free株間に、成長速度、コロニー形態、色素生産性、分生胞子の生産性などの形質に一切変化は観察されなかった。単孢子分離株でdsRNAを保持している株は、全てM1、M2 両方を保持していた。このことから、FusoVの複製に際して、M1、M2 が相互依存的な関係にあることが示唆された。

菌糸融合によるFusoVの伝達を確認するために、FusoVのドナーとなる *F. solani* SUF704 とレシピエントに用いる、SUF704-free、SUF577、SUF578 の各株にマーカー形質を付与する必要があった。そこで、菌類での菌糸融合群の決定実験に良く用いられて

いる硝酸同化系欠損変異マーカーを用いることにした (Correll et al. 1987; Klittich and Leslie 1988; Malardier et al. 1989)。簡単な硝酸同化系の経路を Fig. 1-11 に示した。

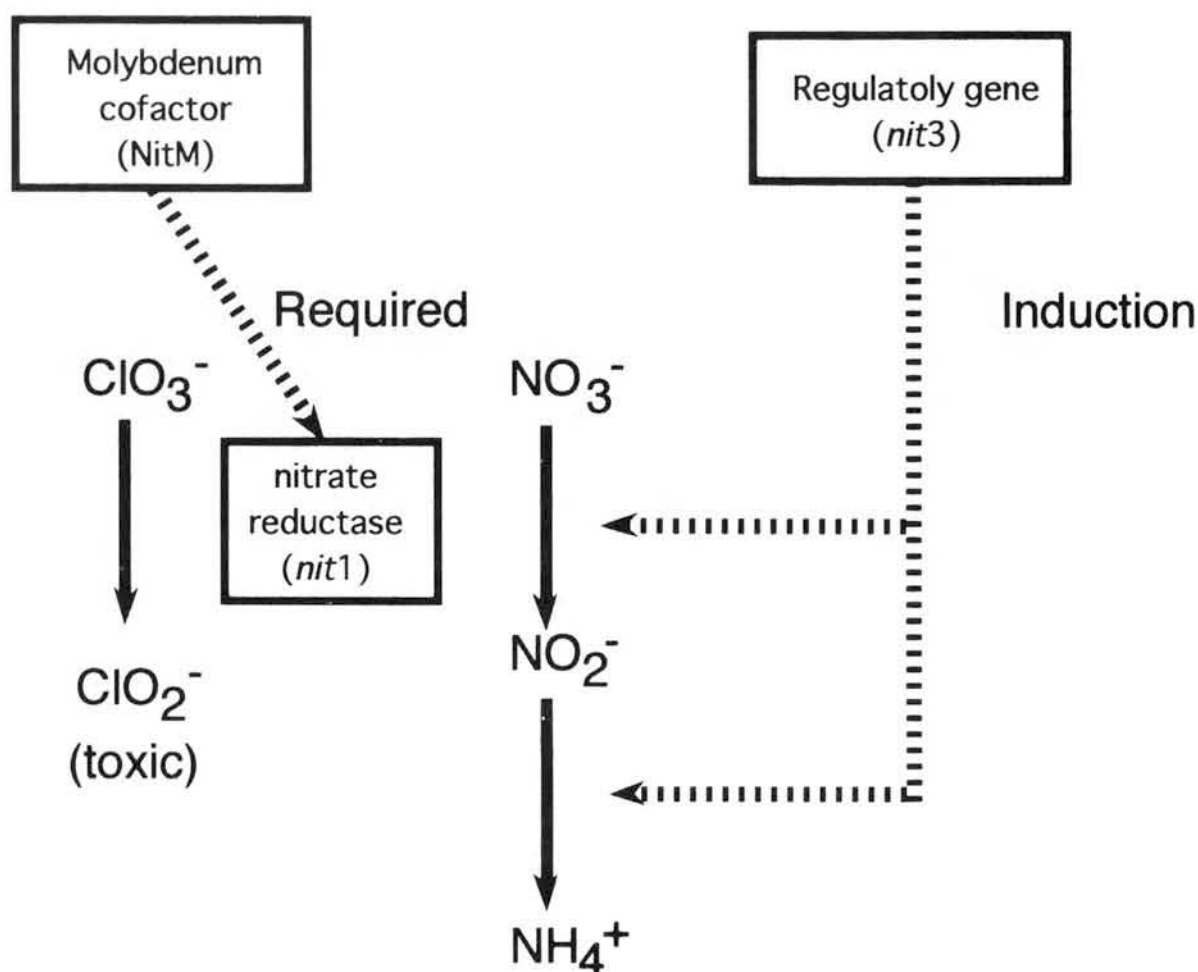


Fig. 1-11 Nitrate utilization pathway in fungi. Nitrate was reduced to nitrite by nitrate reductase. Resulting nitrite was subsequently reduced to ammonium by nitrite reductase. Nitrate reductase was regulated by pathway-specific regulatory protein and required molybdenum cofactor for enzyme activity. Nitrate reductase reduced chlorate, an analogue of nitrate, to chlorite. Resulting chlorite was toxic substance. The chlorate resistant strains can be classified into three types of mutations, nitrate reductase structural locus (*nit1*), pathway-specific regulatory locus (*nit3*) and loci associated with molybdenum cofactor (*NitM*).

培地中の硝酸は nitrate permease によって菌体内に取り込まれ、硝酸還元酵素 (nitrate reductase)、亜硝酸還元酵素 (nitrite reductase) によって還元され、最終的にはアンモニウム

ムとして利用される。硝酸のアナログである塩素酸 (chlorate) は、硝酸還元酵素によって還元され、毒性物質である亜塩素酸 (chlorite) を生じるので、硝酸還元酵素活性をもつ菌は塩素酸を含むMMC培地中では著しくその成長を阻害される。MMC培地中で硝酸還元活性が欠損した株は培地中のアスパラギンを窒素源として利用しセクターとして増殖することを利用して硝酸還元活性が欠損した変異株を分離した。変異株には硝酸還元酵素の構造遺伝子に変異を受け、硝酸を単一窒素源として含むMM培地で十分な成長ができない *nit1*、硝酸還元酵素、亜硝酸還元酵素の制御遺伝子に変異を持ち、亜硝酸を単一窒素源とするNM培地とMM培地で十分な成長ができない *nit3*、硝酸還元酵素の活性発現に要求されるモリブデンコファクターに関連する遺伝子に変異を持つNitMに分けることができる。モリブデンコファクターはヒポキサンチンから尿酸への代謝を行うプリン脱水素酵素 (purine dehydrogenase) においても必須であり、NitM変異株はMM培地、ヒポキサンチンを単一窒素源に含むHM培地で増殖できない。この様に各種窒素源を異にする培地の増殖を野生株と比較することで、硝酸同化系欠損変異株のタイプ分けをした。この様にして得られた *nit* 変異株の内、高い頻度で野生型に復帰変異する株からトランスポゾンの分離を行った興味深い報告がある (Daboussi et al. 1992; Julien et al. 1992; Langin et al. 1995)。 *F. solani* を塩素酸を含む培地 (MMC培地) で培養したところ、成長の早いセクターが 1 コロニーあたり 1 セクターの頻度で出現した。SUF704株では得られた塩素酸耐性変異株の内、約 80% がMM培地中では薄い菌糸のコロニーを形成する硝酸同化系欠損変異株であった (Table 1-3)。硝酸同化系欠損変異株の変異部位の別では、46% が硝酸還元酵素の構造遺伝子に変異をもつ *nit1*、31% が硝酸還元酵素、亜硝酸還元酵素を制御している制御遺伝子に変異をもつ *nit3*、23% が硝酸還元酵素の活性発現に要求されるモリブデンコファクターに関連する遺伝子変異を有するNitMであった (Table 1-3)。SUF704 の NitM と SUF704-free の *nit1* 株を用いて行った菌糸融合実験の結果、両コロニーの境界面に、ヘテロカリオン化によって各々の変異が相補されて得られた気中菌糸を伴う菌の成長が観察された (Fig. 1-12)。SUF704 NitM株とSUF577 *nit1* 株、SUF704 NitM株とSUF578 *nit1* 株を用いた対峙培養では、菌糸融合に由来する気中菌糸を伴う成長は観察されなかった。SUF704とSUF577、SUF578は別の菌糸融合群に属するため相補されなかったと考えられる。

Table. 1-3 Genotypes of nitrate non-utilizing (*nit*) mutants from *F. solani* SUF704

number of chlorate resistant mutants	number of <i>nit</i> mutants	<i>nit</i> mutants class		
		<i>nit1</i> ^a	<i>nit3</i> ^b	NitM ^c
100	78	36	24	18

a mutation at nitrate reductase structural gene locus

b mutation at pathway specific regulatory gene locus

c mutation at molybdenum cofactor loci

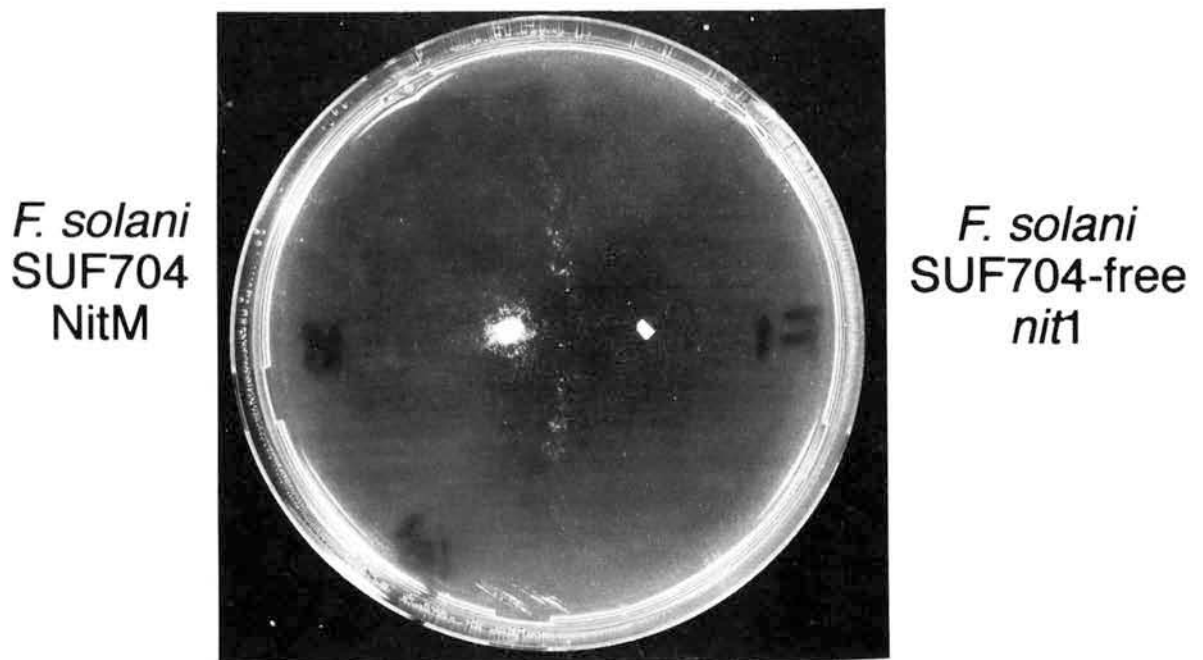


Fig. 1-12. Hyphal fusion between *F. solani* SUF704 and its Fusov free derivative (SUF704-free). NitM mutant of SUF704 possessed a mutation at molybdenum cofactor associated loci required for nitrate reductase activity. SUF704-free *nit1* had a mutation at nitrate reductase structural gene locus. Hyphal fusion between SUF704 NitM and SUF704-free *nit1* resulted in an appearance of aerial hypha (wild type growth) on the Czapek-Dox agar plate because their mutations were complemented each other by making heterokaryon.

SUF704 NitM株とSUF704-free *nit1*株の菌糸融合で得られた野生型菌糸から単離された単胞子分離株からレシピエント株と同じHM培地で成長できるがMM培地では成長できない *nit1*形質の株を選択した。*nit1*株からdsRNAを抽出し、アガロースゲル電気泳動で分析した結果、12 単胞子分離株の約90% にあたる11 株からdsRNA M1、M2が検出されたことから菌糸融合によってFusoVが伝達されることが確認された (Fig. 1-13)。

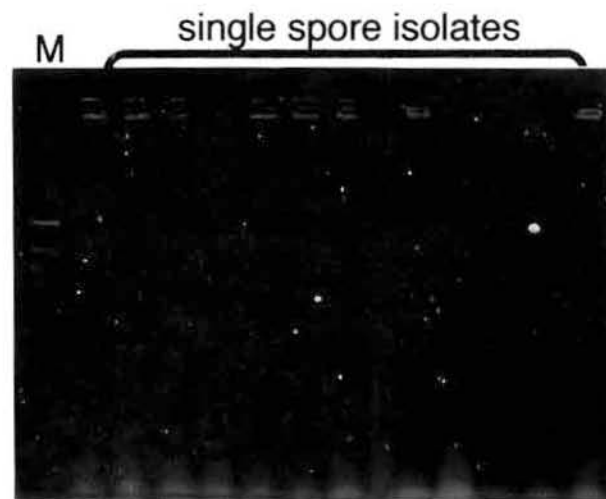


Fig. 1-13. Transfer of FusoV through hyphal fusion. Single spore isolates from heterokaryon hypha were tested for nit mutation class by comparing the growth on various nitrogen source medium. DsRNA viral genome was extracted from single spore isolates possessing *nit1* mutation, and analysed by agarose gel electrophoresis. Lane M, λ HindIII size marker.

一般的に同一菌糸融合群間ではdsRNAが良く伝達されるが、異なる菌糸融合群間では伝達されにくい。dsRNA hypovirus が菌糸融合によって病原性株に伝達され、病原性株を弱病原性株に形質転換する性質を用いた *C. parasitica* の biological control においても、菌糸融合群の障壁によるdsRNA伝達の制限が問題になっている (dsRNA hypovirus は異なる菌糸融合群間では伝達されず、また交配によって得られる子嚢胞子へもほとんど伝達されない)。 *C. parasitica* では様々な菌糸融合群の株に dsRNA hypovirus を導入するために、人工弱病原性株 (engineered hypovirulent strain) の作製が考えられている。人工弱病原性株は、

dsRNAゲノムの完全長cDNAをmRNAとして機能するstrand (positive strand) が転写されるように構築した形質転換ベクター (感染性cDNA) を用いた形質転換によって得られる形質転換体で、細胞質中にcDNA由来のdsRNAが存在している (Anagnostakis and Day 1979; Choi and Nuss 1992; Chen et al. 1993, Chen et al. 1994, Nuss 1992)。

Fusarium 菌は不完全菌類に分類されているが、*F. solani* f. sp. *robiniae* は有性世代 (子囊世代) が知られており、子囊世代の学名は *Hypomyces solani* または、*Nectria haematococca* である (松尾 et al. 1980)。*F. solani* の交配は、一方の株をPDA培地上に形成させたコロニーとして、他方の株を分生孢子懸濁液として用意し、PDA上のコロニーに分生孢子懸濁液を加えることで行う。*F. solani* の病原性株での交配はヘテロタリックであり、これは和合型+、-の菌株を共存させなければ成熟子嚢胞子が形成されない。一方、非病原菌はホモタリックであり他の株との交配なしにPDA培地上で容易に子嚢胞子を形成する。また、*F. solani* は雌雄同体の株と雌雄異体の株がある。ここでの雌性とはPDA培地上でコロニーを形成させる側の株として用いた場合にのみ交配可能な株のことで、雄性とは分生孢子懸濁液側の株として用いた場合にのみ交配可能な株のことである。雌雄同体の株はPDA培地にコロニーを形成させても、分生孢子懸濁液として用いた場合でも交配可能な株のことである。つまり、*F. solani* には、雌雄同体の和合型 (+) の株 [MF (+)]、雌雄同体の和合型 (-) の株 [MF (-)]、雄性の和合型 (+) の株 [M (+)]、雄性の和合型 (-) の株 [M (-)]、雌性の和合型 (+) の株 [F (+)]、雌性の和合型 (-) の株 [F (-)] が存在する (松尾 et al. 1980)。SUF577は [MF (+)] でありSUF578は [MF (-)] なので、どちらをPDA培地上にコロニーを形成させても、他方の株を分生孢子懸濁液として添加すれば子嚢胞子を形成する株同士である。*F. solani* SUF704とSUF577、SUF578株間での交配実験から、子嚢殻が形成された組み合わせは、SUF577 (PDA: growth on PDA) x SUF704 (C. S.: conidia suspension) のみであった。コントロールのSUF577 (PDA) x SUF578 (C. S.)、SUF578 (PDA) x SUF577 (C. S.) では子嚢殻の形成が観察された。*F. solani* SUF704 の分生孢子とPDA培地上に形成したSUF577株コロニーの組み合わせでのみ子嚢殻の形成が見られ、かつ子嚢胞子が観察されことから *F. solani* SUF704 は [M (-)] であると考えられた。SUF577 (PDA) x SUF704 (C. S.)で得られた8つの子嚢胞子単離株からdsRNAの抽出を行ったがdsRNAは検出されなかった (Fig. 1-14)。

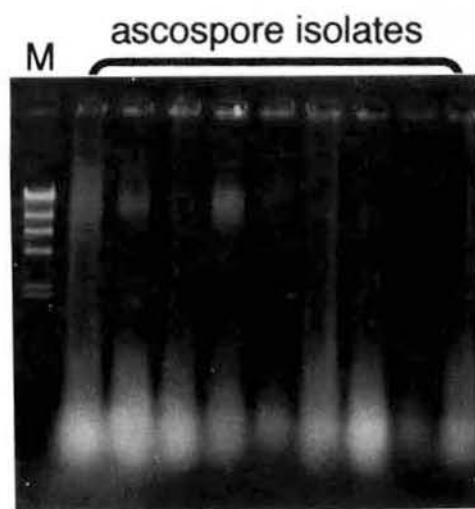


Fig. 1-14. Transfer of FusoV through ascospore. Ascospores from mating between *F. solani* f. sp. *robiniae* SUF704 and SUF577 were obtained using micromanipulator under microscope. DsRNA viral genome was extracted from ascospore isolates and analyzed by agarose gel electrophoresis. Lane M, λ HindIII size marker.

この結果から、FusoVは子嚢胞子を介して伝達されない可能性が示された。*F. solani* から得られているlpDNA染色体外レプリコンのpFSC1、pFSC2は、母性遺伝する事が知られている。つまり、PDA培地上でコロニーを形成させる雌性株にlpDNA保持株を用いた場合にのみ、子嚢胞子にlpDNAが伝達される(Samac and Leong 1988)。この点で、*F. solani* SUF704 が雌性の株でないことが原因でFusoVが伝達されない可能性が考えられた。

無性胞子 (asexual spore) と有性胞子 (sexual spore) でdsRNAの伝達パターンが変化する例は、サビ菌の *Melampsora lini* で観察されている (Lawrence et al. 1987)。このようなdsRNAの菌糸融合や交配による伝達性の違いは、dsRNAの宿主細胞内での局在部位によって異なっていると考えられる。一般にマイコウイルスは細胞質に存在している (Lemke 1976) 事から、菌糸融合のような細胞質成分の交換が含まれる過程では伝達されるが、有性生殖では母性遺伝すると考えられる。FusoVの伝達実験の結果は、一般的なマイコウイルスの伝達によく一致しており、FusoVは *F. solani* SUF704株の細胞質中で複製維持され

ていると考えられる。植物の cryptovirus は、2 つに分節した dsRNA をゲノムに有し、1 つのキャプシドタンパク質で構成されるエンベロープを持たない球状ウイルスであり、マイコウイルスに類似の構造を持っている。しかし、宿主細胞中での存在部位がマイコウイルスが細胞質であるのに対し、植物 cryptovirus は核に存在していると考えられている点で異なっている。植物 cryptovirus は核に存在することから、花粉を介した場合でも効率的に種子感染する (夏秋 1993)。最近、プロトプラスト化した宿主菌とマイコウイルスを PEG 沈殿することでマイコウイルスの人為的な導入を行った報告がある (Van der Lende et al. 1995)。FusoV においても、同様な手法による人為的な他の菌株への導入は、宿主域の観点から重要な研究課題であるが、FusoV が導入された菌株を検出するための選択マーカーが現時点では見つかっておらず、今後の研究課題である。

第2章 FusoV dsRNAゲノムが有する遺伝子について

緒言

ニセアカシア枝枯病菌 *Fusarium solani* f. sp. *robiniae* SUF704 から発見されたマイコウイルスFusoVは2つに分節したdsRNAゲノムを有し、そのサイズはM1が1.9 kb、M2が1.7kbと小さく、44 kDaの一つのキャプシドタンパク質からなる直径30 nmの球状のウイルス粒子であった。これらの特徴からFusoVは、*Partitiviridae*科に属するマイコウイルスであると考えられる (Buck and Ghabrial 1991)。dsRNAウイルスは、一般的に次のような科に分類されている。1) *Reoviridae*科、10~12本に分節したゲノムを持つ複雑な構造を有するウイルスで、動物、植物を宿主にする reovirus、rotavirus が知られている。2) *Totiviridae*科、5 kb程度の分節していないdsRNAを有するエンヴェロープを持たない球状のウイルスで、原生動物や酵母 *Saccharomyces cerevisiae* を宿主にするウイルスが知られている。3) *Cystoviridae*科、エンヴェロープを有する球状ウイルスで3つに分節したゲノムを持つウイルスで、bacteriophage ϕ 6が含まれる。4) *Hypoviridae*科、キャプシドタンパク質を持たず、宿主由来のヴェシクルに包まれている13 kb程度の大きさの分節していないゲノムを有するウイルスで、*C. parasitica* を宿主とするマイコウイルス hypovirus CHV1 が含まれる。5) *Partitiviridae*科、2~4本に分節したdsRNAを有し、エンヴェロープを持たない球状のウイルスで、FusoVをはじめマイコウイルスの多くが含まれる。6) *Birnaviridae*科、2つに分節したdsRNAをゲノムに有するウイルス、*Partitiviridae*科に比較しゲノムサイズが大きい。この科には、動物を宿主とする infectious bursal disease virus が含まれる。ここに示した幾つかの科では代表的なウイルスについて、dsRNAゲノムの塩基配列の解析が行われており、ウイルスの有する遺伝子の機能について研究が進んでいる [Wiener and Joklik 1989 (*Reoviridae*); Ichio and Wickner 1989 (*Totiviridae*); Shapira et al. 1991 (*Hypoviridae*); Mindich et al. 1988 (*Cystoviridae*)]。一方、菌類のウイルスとして、主要な科であると考えられる *Partitiviridae*科では、最近までdsRNAゲノムの塩基配列の解析が行われていなかった。

最近のウイルスの分類では、感染する宿主に基づいた旧来の動物ウイルス、植物ウイルスといった分類から、ウイルスゲノムがどのような核酸で構成されているか、ゲノム上の遺伝子の構造といった分子生物学的な指標を元に、分類し直す事が検討されている。実際

に、植物ウイルス独自の科として分類されていたウイルスの科の内、3つの科 (*Reoviridae*, *Rhabdoviridae*, *Bunyaviridae*) が脊椎動物や非脊椎動物のウイルスと同じ科に分類された (Ward 1991)。この様な観点から、植物ウイルスの cryptovirus が *Partitiviridae* 科に入るのではないかと示唆されていた。その理由は、ウイルスの構造上の類似性である (2つに分節したdsRNAをゲノムに有し、エンヴェロープを持たない1つのキャプシドタンパク質で構成された球状のウイルス)。しかし、*Partitiviridae* 科のウイルスについては塩基配列の情報が乏しいことから分類の妥当性が確定していない。RNAウイルスではRNAポリメラーゼのアミノ酸配列が分類の大きな指標となっていることから、植物 cryptovirus 及び *Partitiviridae* 科マイコウイルスの塩基配列、特にRNA依存性RNAポリメラーゼの配列を明らかにすることが待たれていた (Ward 1991)。最近、草本植物カニツリグサなどに choke disease を引き起こす植物病原性糸状菌 *Atkinsonella hypoxylon* から発見された *Partitiviridae* 科マイコウイルスの3つに分節したゲノムdsRNAの塩基配列が報告された (Oh and Hillman 1995)。FusoV と *A. hypoxylon* のマイコウイルスとでは、dsRNAゲノムが2つに分節するか、3つに分節するかの点で大きな違いがある。FusoV dsRNAゲノムの塩基配列を明らかにし、*A. hypoxylon* マイコウイルスや植物 cryptovirus の遺伝子と比較することで、*Partitiviridae* 科ウイルスのゲノム構造の特徴を明らかにする事ができると考えられる。またFusoV は、非常に単純な構造のウイルスであり、有するゲノムサイズも小さく、ウイルス遺伝子発現機構やウイルスゲノムの複製機構の解明のモデルとして適していると考えられる。以上の点を明らかにする目的でFusoV dsRNA ゲノムに対するcDNAを合成し、塩基配列の解析を行った。

1： 実験目的

Fusarium solani f. sp. *robiniae* SUF704 から発見されたマイコウイルスFusoV dsRNAゲノムの有する遺伝子を明らかにする目的で、ゲノムdsRNAからcDNAの合成を行い、塩基配列の決定、ORF (Open Reading Frame) の決定、推定されるアミノ酸配列の相同性解析を行った。

2： 実験方法

本実験に使用した試薬類及び実験器具は、使用前に121℃ で15 分間のオートクレーブ

処理をして用いた。特にRNAを取り扱う実験では、オートクレーブの条件を125℃で20分間に変更した。

2-1：ゲノムdsRNAに対するcDNAの合成

F. solani SUF704株からのdsRNAの調製は、前章・第1節・2-3のセルロースカラムクロマトグラフィー法で精製した (Franklin 1966)。精製dsRNA 20 μ l (7.5 μ g) に5 μ l の50 mM 水酸化メチル水銀を変性剤として、また、プライマーとして1.1 μ g のランダムヘキサマーを添加し、室温で10 分間の変性処理を行った。変性試料に5 μ l の700 mM 2-メルカプトエタノールを加え、室温で5 分間放置後、2 μ l (740 kBq) の[α - 32 P] dCTP (110 TBq/mmol) を添加した試料を用いて、TimeSaver cDNA Synthesis Kit (Pharmacia) によりcDNA合成を行った。合成cDNA断片に *Eco*RI/*Not*I adaptor をライゲーションし、S-400 Spun column に通し、余分な adaptor を除去後、ファージミドベクター pUC118の *Eco*RI サイトにライゲーションした。cDNAライブラリーは、ライゲーション反応液を塩化カルシウム法で調製した *E. coli* JM105 コンピテント細胞に形質転換することで作成した (Sambrook et al. 1989)。組み換え体プラスミドを保持する形質転換体は、500 μ g/ml の isopropyl-1-thio- β -D-galactoside (IPTG)、100 μ g/ml の 5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-galactopyranoside (X-gal)、50 μ g/mlのampicillin を含むLB寒天培地に塗布し37℃で一晩培養後、白色コロニーを選択することで得た。

2-2：ドットプロットハイブリダイゼーションによるM1、M2 cDNAクロンの検出

2-1の方法で合成したcDNAクロンがM1、M2どちらのdsRNAゲノムに由来するのか検討するために、dsRNAゲノムM1、M2を変性後ドットプロットしたメンブレンを用い、各クロンをプローブに用いたハイブリダイゼーションを行った。

精製dsRNAゲノムM1、M2をアガロースゲル電気泳動により分離し、臭化エチジウム染色後、ゲルからM1、M2のバンドを切り出した。各々切り出したゲルからdsRNAを SUPRECTTM-01 (Takara) を用いて抽出回収し、エタノール沈殿後 100 ng/ μ l の濃度になるようにTE 緩衝液に溶解した。分離回収したM1、M2それぞれ10 μ l (1 μ g) に、10 μ l の10xSSC、6 μ lの50 mM 水酸化メチル水銀、4 μ l の滅菌蒸留水を加え室温で5 分間放置しdsRNAを変性させた。ドットプロット装置 (BIO-DOT: BIO-RAD) に滅菌蒸留水で5 分間、

次いで2xSSCで10分間前処理したナイロンメンブレン (GeneScreen Plus: Dupont) をセットし、変性させたdsRNAをマニフォールドに注入し、緩やかに吸引しdsRNAをメンブレンに吸着させ、80℃で2時間乾燥させdsRNAを固定した。コントロールとして用いたcDNAのプロッティングは、迅速アルカリ法で抽出したプラスミドDNA 25 μ l (1 μ g) に75 μ l の0.25 M NaOH、0.5 M NaCl 溶液を加え、室温で10分間放置し、アルカリ変性させた。100 μ l の変性プラスミドDNAに等量の0.2xSSCを添加し、ドットプロット装置によってナイロンメンブレンにプロットした。

cDNAプローブは、迅速アルカリ法で抽出したプラスミドDNAをEcoRIで消化後、cDNAインサート断片をアガロースゲル電気泳動で分離しアガロースゲルから切り出した (Sambrook et al. 1989)。アガロースゲルからの挿入DNA断片の回収には Gene Clean II Kit (Bio101) を用いた。50 ng のcDNAインサートを Multiprime DNA Labelling System (Amersham) を用いて 32 P 標識した。

核酸をプロットしたメンブレンにプレハイブリダイゼーション緩衝液 (0.5 M NaPB pH 7.2, 7% SDS, 1% BSA, 1 mM EDTA, 50% deionized formamide) を加え42℃で1時間プレハイブリダイゼーションを行った後、cDNA プローブと キャリアーDNA (100 μ g/ml の salmon sperm DNA) を添加し、42℃で16時間ハイブリダイゼーションを行った。

ハイブリダイゼーション後、メンブレンの洗浄は、5% SDS 洗浄液 (5% BSA, 1 mM EDTA, 40 mM NaPB pH 7.2, 5% SDS) にて42℃で5分間穏やかに振盪し、更に1% SDS 洗浄液 (5% BSA, 1 mM EDTA, 40 mM NaPB pH 7.2, 1% SDS) にて42℃で5分間穏やかに振盪して行った。洗浄後メンブレンをサランラップで覆い、X線フィルム (X-OMAT: Kodak) に感光させ、ハイブリダイゼーションシグナルを検出した。

2-3: サザンハイブリダイゼーションによるcDNAクローンの分析

ランダムにcDNAライブラリーから白色コロニーを選択し、迅速アルカリ法でプラスミドDNAを抽出した。cDNAインサート断片は、EcoRI または NotI 消化によってベクターより切り出しアガロースゲル電気泳動によってその大きさを確認した。これらcDNAインサート断片の内 500 bp 以上の断片を有するcDNAクローンを選び、再度、200 ng 相当のプラスミドDNAを制限酵素消化後、アガロースゲル電気泳動した。電気泳動後のゲルをアルカリトランスファー溶液 (0.4 N NaOH, 0.6 M NaCl) に30分間浸した。滅菌蒸留水で5

分間、アルカリトランスファー溶液で10 分間プレウエットしたナイロンメンブレン (GeneScreen Plus: Dupont) とゲルをバキュームプロットティング装置 (LKB 2016 VacuGene Vacuum Blotting System: Pharmacia) にセットし、アルカリトランスファー溶液を用いてプロットした。プロット後のメンブレンを1 M Tris-HCl pH 5.0、2 M NaClでリンスした後、80℃で2 時間放置しDNAをメンブレンに固定した。プローブの合成、プレハイブリダイゼーション、ハイブリダイゼーション、ハイブリダイゼーション後のメンブレンの洗浄、ハイブリダイゼーションシグナルの検出は、2-2のドットプロットハイブリダイゼーションと同じ手法で行った。

2-4：ハイブリダイゼーションに用いたメンブレンの再利用

ハイブリダイゼーションに用いたメンブレンは1% SDS を含むTE 緩衝液で30 分間煮沸することでプローブを取り除いた。煮沸処理後に残存する放射活性が無いことをオートラジオグラフィーで確認後、再利用した。

2-5：M1、M2 に由来するcDNAの塩基配列の決定

M1、M2 由来のcDNAクローンから、比較的大きなcDNAインサート断片を持つクローンを選択し、抽出したプラスミドDNAを *EcoRI* と *VspI* で完全消化した。この操作で *EcoRI* 消化によりcDNAインサート断片を切り出すと共にベクター pUC118を3 つの *VspI* 断片に分解しベクターの自己ライゲーションによる形質転換後のバックグラウンドを減少させた。*EcoRI* 消化し、アルカリフォスファターゼによって5' 末端を脱リン酸化したファージミドベクターpUC118 に先に述べた *EcoRI*、*VspI* 消化DNA断片をライゲーションし、塩化カルシウム法で調製した *E. coli* JM109 コンピテント細胞に形質転換にすることで、両方向にcDNAインサート断片が組み込まれた構造の組換えプラスミドを保持するクローンを得た。この様にして得られたcDNAクローンから塩化セシウム-臭化エチジウム密度勾配遠心法で精製した ccDNA (closed circular plasmid DNA) について適当な制限酵素で2 重消化し、Kilo-Sequence 用 Deletion Kit (Takara) を用いて塩基配列決定用のデレーションクローンを作成した。これらの塩基配列決定用クローンから塩化セシウム密度勾配遠心法で精製したプラスミドDNAを鋳型に用い、Taq Dydeoxy Terminator Cycle Sequencing Kitと373A DNA Sequencing System (Perkin-Elmer) を用いて塩基配列を決定し

た。決定した塩基配列をGenetyx Mac ver 7.3 (Software Development) を用いて結合編集し、M1、M2の塩基配列とした。また、上記ソフトウェアをM1、M2の塩基配列、アミノ酸配列の分析に用いた。

2-6：actinomycin D耐性RNAポリメラーゼ活性の検出

F. solani SUF704株、及びSUF704-free株から、前章・第2節・2-2のFusoV精製ステップに従い25% ショ糖クッション遠心分離で沈殿として回収された分画を実験に用いた。沈殿を2 mlの15 SSB (15% sucrose, 10 mM Tris-HCl pH 6.8, 5 mM 2-mercaptoethanol) に懸濁した試料100 μ lを200 μ lの反応混合液 (reaction mixture: 100 mM Tris-HCl pH7.5, 10 mM magnesium acetate, 1 mM each of ATP, CTP, GTP, 0.5 mM UTP ([α - 32 P] 12.6 MBq/ μ mol), 200 units/ml Ribonuclease inhibitor (Takara), 50 μ g/ml actinomycin D, 5 mM 2-mercaptoethanol)と混合し、30℃で36 時間で反応させた。反応後、フェノール・クロロフォルム抽出、クロロフォルム抽出、エタノール沈殿によってRNAを精製した。合成されたRNAの検出は、1.0% アガロースゲル電気泳動 (TAE buffer) によって分離後、ゲルを7% TCAで30 分間固定し吸引乾燥後、オートラジオグラフィーによって行った。

3： 結果及び考察

SUF704株からセルロースカラムクロマトグラフィーで精製したdsRNAを用いて、cDNAの合成を行った。結果を要約すると、cDNAはランダムヘキサマーをプライマーに用い、水酸化メチル水銀を変性剤として用いた場合に、2 kb 弱の大きさのcDNAまで合成が確認できた (Fig. 2-1)。一方、プライマーにオリゴdTを用いた反応ではcDNAの合成が確認できなかったことから、FusoVゲノムdsRNA は poly A tail を3' 末端に持たないことが示唆された。マイコウイルスでは、dsRNAゲノムに poly A tail を有する例と、FusoVと同じく保持しない例が報告されている。*Hypoviridae*科のCHV1では、positive strand (遺伝子をコードしている鎖、mRNAとして機能する) の3' 末端に poly A tail があり相補鎖の5' 末端は poly U となっていた (Shapira et al. 1991)。一方、poly A tail をそのゲノムに持たないことが*Totiviridae*科の *S. cerevisiae* のL-A virus や *Partitiviridae*科の *A. hypoxylon* virusで報告されている (Icho and Wickner 1989, Oh and Hillman 1995)。

M 1 2



Fig. 2-1. Detection of synthesized cDNA by agarose gel electrophoresis. Purified dsRNA was denatured by 50 mM methylmercury hydroxide, and then used for template of cDNA synthesis. Newly synthesized cDNA were ^{32}P -labelled by incorporating $[\alpha\text{-}^{32}\text{P}]\text{dCTP}$ as a substrate. After second strand synthesis, cDNA was separated through agarose gel electrophoresis and detected by autoradiography. Lane 1, synthesized cDNA using randomhexamer as a primer; lane 2, synthesized cDNA using oligo-dT as a primer; Lane M, $\lambda\text{HindIII}$ marker.

酵母 *S. cerevisiae* の L-A virus やアメリカクリ桐枯病菌 *C. parasitica* の CHV1 などでは、複数の dsRNA 分子が観察されている。これらの dsRNA 分子の内、低分子の dsRNA はマイコウイルスの遺伝子を有する dsRNA ゲノムの内部領域が欠損した内部欠損 dsRNA (internal deletion dsRNA) であることが明らかにされている (Esteban and Wickner 1988; Shapira et al. 1991-b)。これらの内部欠損 dsRNA 分子は、遺伝子をコードしている訳ではないが、RNA 依存性 RNA ポリメラーゼによって認識されるシス領域を持っているため、マイコウイルスに依存したレプリコンとして維持される。そこで FusoV dsRNA ゲノムにおいて、M1 と M2 の間に共通配列が存在するかどうか、また M2 が M1 の内部欠損 dsRNA であるかどうかを見るために、ドットプロットハイブリダイゼーション及びサザンハイブリダイゼーション実験を行った。*E. coli* JM105 への形質転換によって得られたクローンから調製した cDNA インサート断片をプローブに用いたドットプロットハイブリダイゼーションの結果、M1、M2 dsRNA に対する cDNA がそれぞれ合成されたことが確認された。

(Fig. 2-2)。ドットプロットの結果から、6 個のM1 由来 cDNA (pFSV1-74, pFSV5-40, pFSV20-73, pFSV10-37, pFSV17-1, pFSV20-16) と2個のM2 由来 cDNA (pFSV5-100, pFSV8-4) が確認された。M2 由来のクローンの出現頻度が低かったが、これはM2に対するプローブとして用いた pFSV5-100 のcDNAインサート断片 (450 bp) がM1に対するプローブとして用いた pFSV10-37 のそれ (1.1 kb) に比較して短かった事に原因があると考えられた。

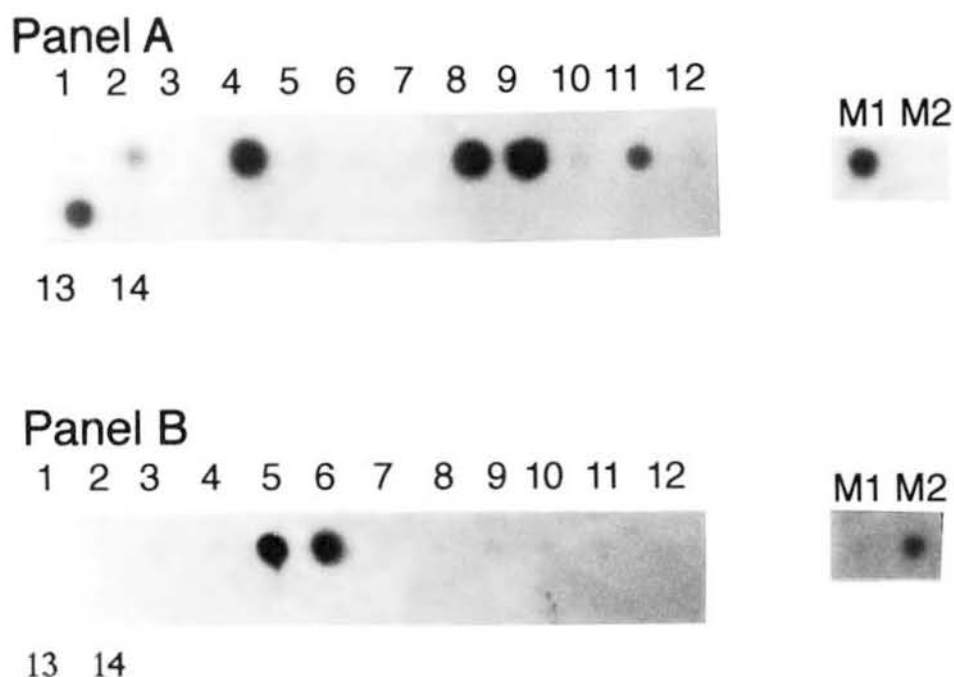


Fig. 2-2. Dot blot hybridization analysis of cDNA clones. Hybridization analysis was done against dot blotted M1, M2 dsRNA and by using cDNA insert from each clone as a probe. Panel A shows the result of hybridization using pFSV10-37 as a probe, panel B shows the results of pFSV5-100. No. 1, pFSV1-58; No. 2, pFSV1-74; No. 3, pFSV5-8; No. 4, pFSV5-40; No. 5, pFSV5-100; No. 6, pFSV8-4; No. 7, pFSV8-37; No. 8, pFSV20-73; No. 9, pFSV10-37; No. 10, pFSV10-91; No. 11, pFSV17-1; No. 12, pFSV17-49; No. 13, pFSV20-16; No. 14, pUC118; M1, M1 dsRNA; M2, M2 dsRNA.

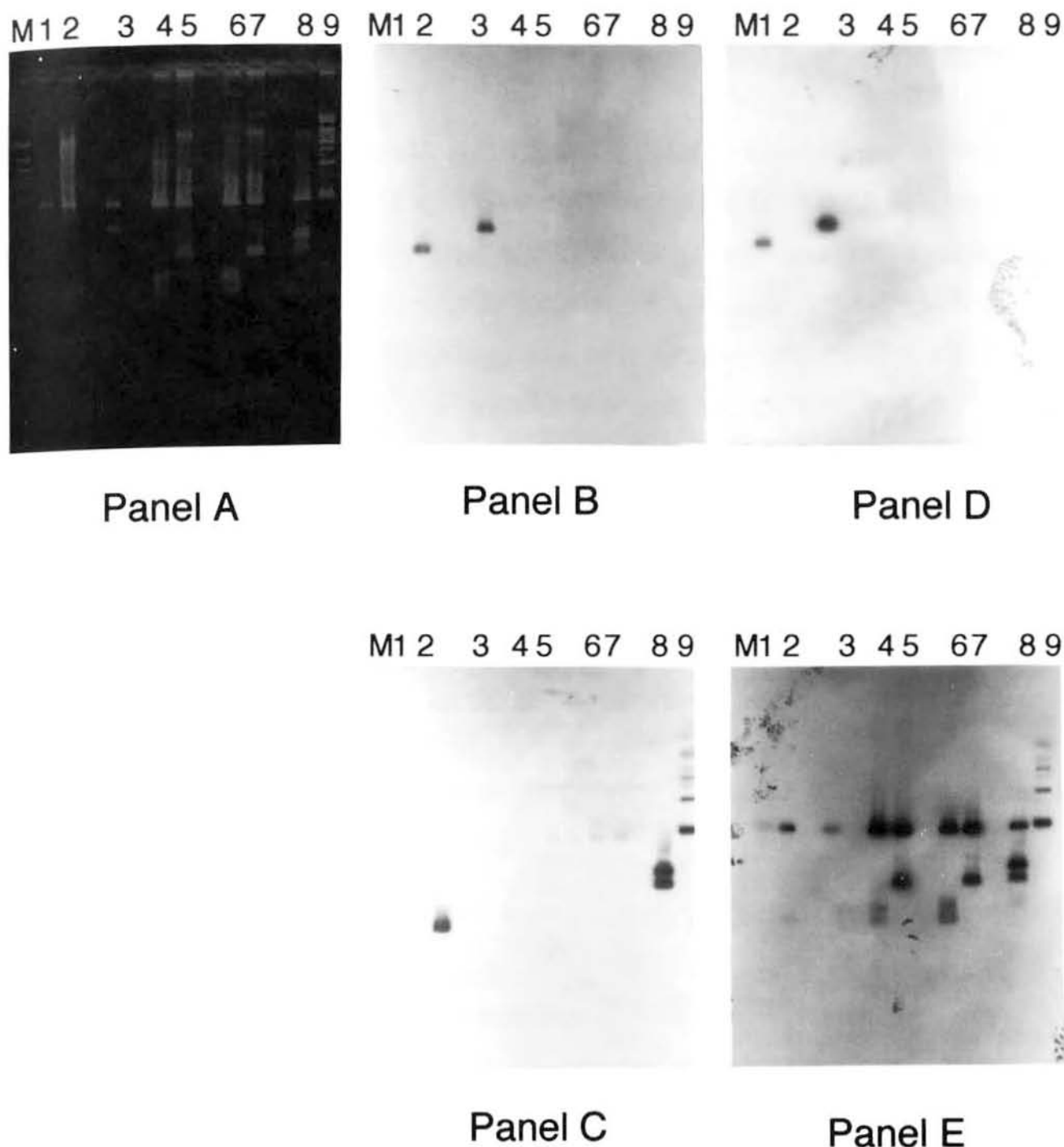


Fig. 2-3. Southern hybridization analysis of cDNA clones. Recombinant plasmid DNAs from each clone were digested with *Eco*RI or *Not*I, fractionated through agarose gel electrophoresis, and blotted on nylon membrane (GeneScreenPlus). Panel A shows ethidium bromide staining gel; panel B to E were autoradiogram of hybridization using cDNA insert from pFSV10-37 (B), pFSV5-100 (C), pFSV1-10 (D) and whole plasmid DNA from pFSV10-6 (E) as a probe. Lane M, λ HindIII size marker; lane 1, pFSV10-37 digested with *Eco*RI; lane 2, pFSV5-100 with *Eco*RI; lane 3, pFSV1-10 with *Eco*RI; lane 4, pFSV21-58 with *Eco*RI; lane 5, pFSV21-58 with *Not*I; lane 6, pFSV10-91 with *Eco*RI; lane 7, pFSV10-91 with *Not*I; lane 8, pFSV10-6 with *Eco*RI, lane 9, pFSV10-6 with *Not*I.

そこで、サザンハイブリダイゼーションでは、ドットプロットでプローブに用いた pFSV10-37、pFSV5-100 以外に比較的挿入DNA断片の長い pFSV1-10 (1.6 kb)、pFSV21-58 (0.9 kb)、pFSV10-91 (0.9 kb)、pFSV10-6 (2.6 kb) をプロットした。pFSV5-100とのハイブリダイゼーションが確認された、pFSV10-6 をプローブに用いた結果、ドットプロットではシグナルの得られなかった pFSV21-58、pFSV10-91 がM2に由来するcDNAインサート断片を有することが示された (Fig. 2-3)。両ハイブリダイゼーション実験において、M1特異的、M2特異的プローブの双方にハイブリダイゼーションを示すcDNAクローンを見いだすことはできなかった事から (Fig. 2-2, 2-3)、分子量の小さいM2 dsRNAはM1 dsRNAの内部欠損により生じたものではなく、M1、M2 両dsRNAは各々別の遺伝子をコードしていると考えられた。

Table 2-1. cDNA clones constructed from FusoV genomic dsRNA

Derived from M1 dsRNA	Derived from M2 dsRNA
pFSV1-10 (1.6 kb) ^a	pFSV10-6 (2.6 kb)
pFSV10-37 (1.1 kb)	pFSV21-58 (0.9 kb)
pFSV12-25 (0.9 kb)	pFSV10-91 (0.9 kb)
pFSV12-96 (1.3 kb)	pFSV21-86 (0.9 kb)
pFSV21-57 (0.7 kb)	pFSV5-100 (0.4 kb)
for ssDNA synthesis ^b	
pFV101 (M1 positive ^c)	pFV301 (M2 positive)
pFV201 (M1 negative ^d)	pFV401 (M2 negative)

^a cDNA insert size.

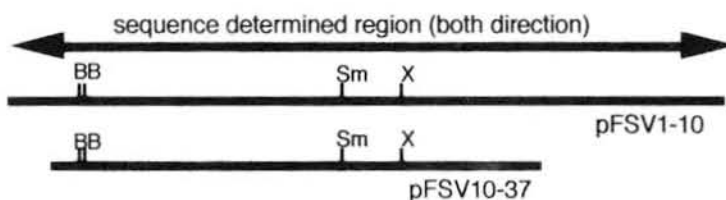
^b In order to obtain single-stranded cDNA of each strand, pFV101 and 201 were constructed which contained cDNA insert derived from pFSV1-10 at an opposite orientation (vector pUC118). Similarly, pFV301 and 401 possessed cDNA inserts derived from pFSV5-100. (See Section 3)

^c Positive strand is gene coding strand.

^d Negative strand is the complementary strand of a positive strand.

500 個のcDNAクローンを分析した結果、比較的長めのcDNAインサート断片を有するクローンとして、Table 2-1に示したクローンが得られた。これらのcDNA クローンからM1ではpFSV10-37 とpFSV1-10を、M2 に関してはpFSV21-58, pFSV5-100, pFSV10-6を用いて塩基配列を決定編集した (Fig. 2-4)。M1のクローン pFSV10-37 の挿入DNA断片は、pFSV1-10 の挿入DNA断片内に完全に含まれていたことから、pFSV1-10 の配列をM1 dsRNA配列とした。一方、M2 由来のcDNAクローンpFSV10-6 は、挿入DNA断片が2.6 kbp であり、アガロースゲル電気泳動によって推定したM2の大きさ1.7 kbp より大きかった。pFSV10-6 の挿入DNA断片は、作成した制限酵素地図からM2 由来のcDNAがタンデムに繋がった構造を取っていると考えられた (Fig. 2-5)。

M1 cDNA



M2 cDNA

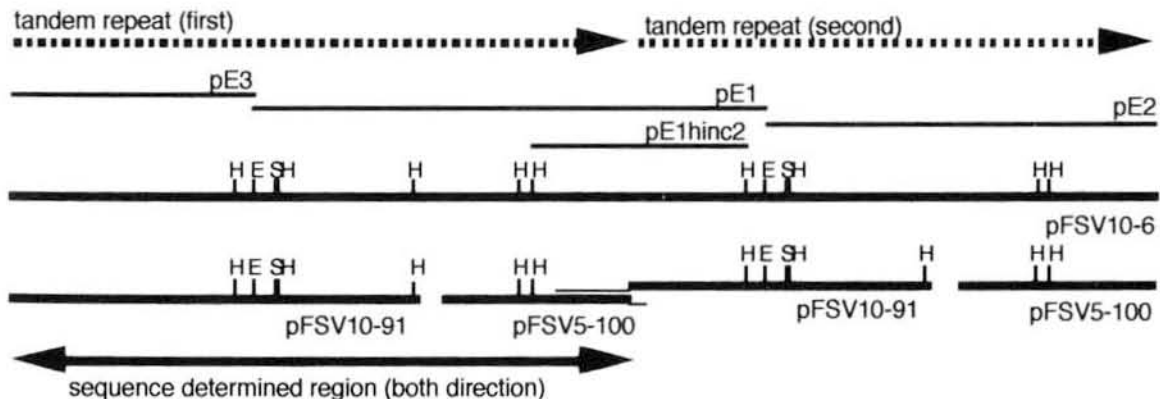
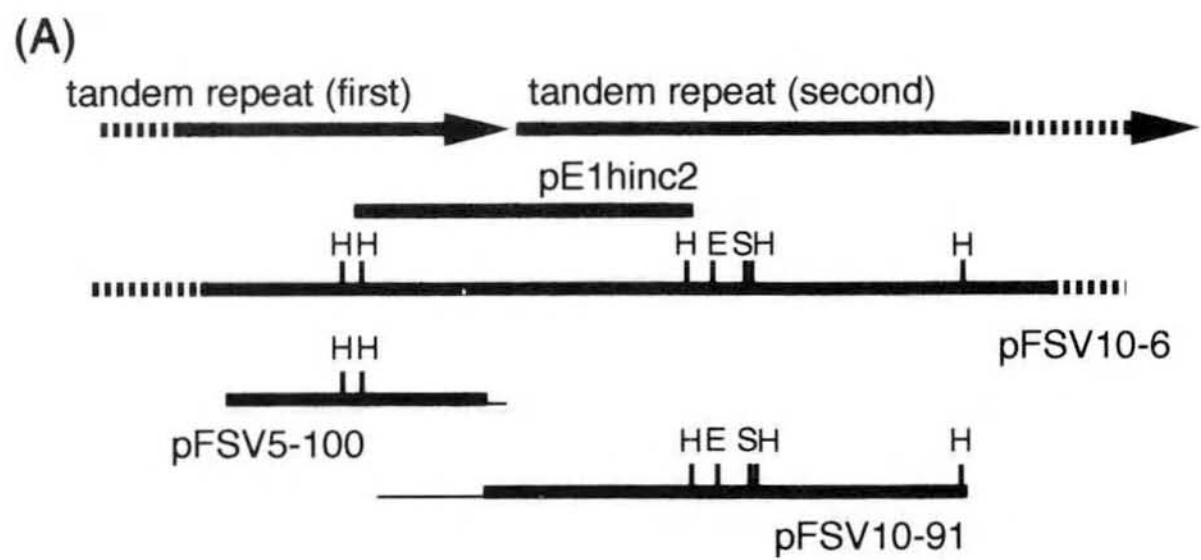


Fig. 2-4. Overlapping cDNA clones used for sequence analysis. cDNA clones derived from M1 dsRNA were pFSV1-10 and pFSV10-37. pFSV10-6, pFSV10-91 were M2 derivative cDNA clones. pFSV10-6 insert DNA possessed tandem repeated sequence. pE1, pE2, pE3 and pElhinc2 were subcloning derivatives of pFSV10-6. Thin line region of pFSV5-100 and pFSV10-91 were deleted in pElhinc2. B, *Bam*HI; E, *Eco*RI; H, *Hinc*II; S, *Sal*I; Sm, *Sma*I; X, *Xba*I.



(B)

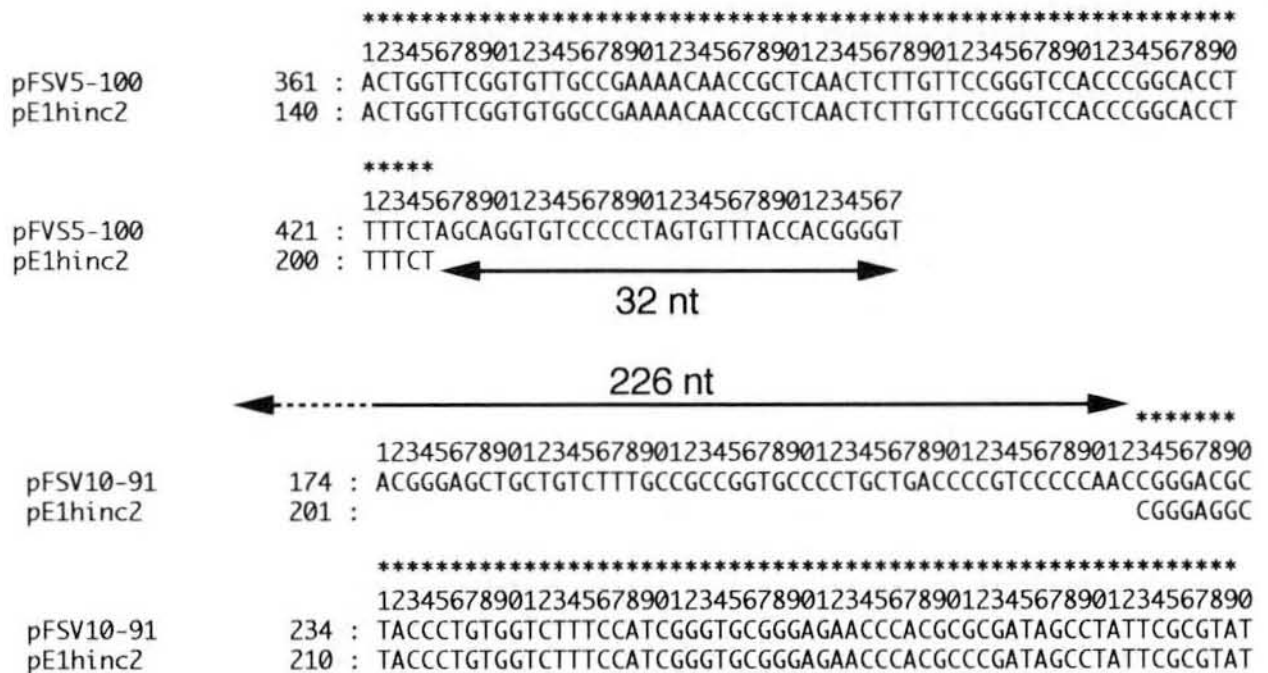


Fig. 2-5. Combined region of pFSV10-6 tandem repeat. The sequence of combined region was determined using pE1hinc2. The determined sequence was compared with pFSV10-91 containing 5' terminal region of M2 positive-strand and pFSV5-100 containing 3' terminal region. The first repeat sequence of tandem repeat lacked 32 nt at 3' end and the second repeat sequence was deleted 226 nt at 5' end. (A) cDNA clone map of the combined region. Thin line region of pFSV5-100 and pFSV10-91 were deleted in pE1hinc2 (the original clone pFSV10-6). (b) Sequence comparison among pFSV5-100, pFSV10-91 and pE1hinc2. The numbers above the bar with arrows indicate number of deleted nucleotides. The identical sequence indicated asterisk. The number beside the nucleotide sequence indicate position of the sequence from 5' terminal of cDNA insert.

クローン pE1hinc2 の解析から得られたタンデムリピートした2つの配列の結合部分の配列を、M2 dsRNAの末端領域を含むcDNAクローンと考えられるpFSV10-91 (positive strandの5' 末端領域)、pFSV5-100 (positive strandの3' 領域) のcDNAインサート断片の塩基配列との比較を行った。pFSV10-6 の挿入DNA断片のタンデムリピートは、pFSV5-100 の配列との比較から3' 末端が32 nt 削れた5' 末端側リピート配列と、pFSV10-91の配列との比較から5' 末端がから226 nt 削れた3' 末端側リピート配列がタンデムに結合していることが示された。pFSV10-6 は、cDNA合成後ファージミドベクターpUC118 にクローニングする際に、2つのcDNA断片(5' 末端側リピートと3' 末端側リピート) が一つのベクターにたまたまクローニングされたために生じたアーティファクトであり、各cDNAクローンの塩基配列に問題はないと考えられた。以上から pFSV10-91、pFSV10-6、pFSV5-100 の配列を組み合わせM2の配列とした。今回決定した配列は、M1で1645 bp であり (Fig. 2-6)、M2では1445 bpであった (Fig. 2-7)。このM1、M2の配列は完全長ではないが、各々1645 nt、1445 ntとアガロースゲル電気泳動で推定した大きさの85~90%を占めていた。注意しなければならないことは、アガロースゲル電気泳動によるdsRNAの大きさの推定値はdsRNAの λ HindIII マーカーとの比較で求めたので、ある程度の誤差を含んでいることである。*Melampsola lini* の例では、dsRNAとの比較で求めたdsRNAゲノムのサイズ (4800 bp) はdsRNAとの比較で求めたゲノムサイズ (4200 bp) より14% 大きく推定された (Dickinson and Pryor 1989)。primer extension による末端領域の検討から、決定したM1、M2の配列は完全長に近いことが推定された (データ示さず)。以上からM1、M2にコードされている遺伝子のORFの検出は可能と考えた。決定した塩基配列を元にORFの分析を行ったところ、M1、M2共に一つのほぼ全長にわたるORFが一方の strand のみに検出された (Fig. 2-8)。100 アミノ酸以上をコード可能なORFは6通りの読み枠について検討したが、上記のほぼ全長にわたるORF以外存在しなかった (Fig. 2-8)。M1のORFはポジション16 の開始コドンAUGで始まり、ポジション1573 の終止コドンUAGで終わり、519 アミノ酸からなる推定分子量 59,707 Da のタンパク質がコード可能であった (Fig. 2-6)。一方 M2のORFはポジション40 の開始コドンAUG から、ポジション1279 の終止コドンUGA であり、413 アミノ酸からなる推定分子量 44,185 Da のタンパク質をコード可能であった (Fig. 2-7)。真核生物の開始コドン周囲の保存配列として Kozak 配列が提唱されている。

GGCGATGCTCTAGCCATGGTAGAGCTGTTGTGATGGTTGATCCTACAACCAAAAGACGCCGCATTCAAGTCAACCCCTCGGTCTTTCTTGTCTGTGCCGGGCCTTCAAGAGATCGCGCGA 120
M V E L F V M V D P T T K R R R I Q S T L G P F L S V P G L Q E I A R 35
TATGGTGGCTACGCCACCTATCGTGCTGCCGAACACGGATCCATGGATCCGTCAATCTCTGAAACTTTTGTGCTGACCTATACGGTAACATTTATGGTTTTACCCGTCGACCTGCT 240
Y G G Y A T Y R A V R N T D P W I R Q S L K L F D P D L Y G N I Y G F T R R P A 75
GGACCTGAAGGGATGTACAAATCTCTGATGAAGTTTGGTGAAGTGCCTCGGTTTACAGATATGTCTACCGTACAGCGTTGAGCGATGAAGACCGCCATCACCGCCGCCGGAAGAGG 360
G P E G M Y K S L M K F G E S M P R F T D M S T V Q R S A M K T A I T A A R K R 115
TTTAAGACTCCCGTCAAGTTTGAACCCCTGGAGTGGTGGAAAGTGGTCAAGATATGAGACGTGATACATCTGCCGGTGTTCCTTTCTGGAAAGAAGAAGGGAGATGTGATGGAACGA 480
F K T P V K F E P L E W S E V G Q H M R R D T S A G V S F P G K K K G D V M E R 155
ATTTATGCTGAAGGACGTTGGCTGGGTGATCGTATGAAACAAGGTGGTAAAGGACGTTTTGATCCAAGGAAAGTGGTATGCCTCCTTGTCTGCTACGACGCGCGGTCACTCTCACCA 600
I Y A E G R W L G H R M K Q G G K G R F D P R K V R M P P C L A T Q R G H L S P 195
AGAGATGATCCCAAGACACGTTTAGCGTGGATCTATCCCTCCGAGATGCTCATGGTTGAAGGGCTTTACGCCCTACTATGTACAAGGCTTTGAGGCAATGCCCGATAGCCCGCTTCTG 720
R D D P K T R L A W I Y P S E M L M V E G L Y A P T M Y K A F E A M P D S P L L 235
TTGGAAAGGGCTCACATCGGTTGTTTTCCGAGTGGGTGCTGCTGCAACCCCGGTATGAGACTGTATGGCTCGACTTTTCCAGTTTGTATACGAAGGTGCCGGCGTGGTTGATCCAC 840
L G K G S H R L F S E W V S A A T P G M R L Y G L D F S S F D T K V P A W L I H 275
Region 1
ACCGCTTTGATATCCTCCATGACAATATAGACTGGTTACATTGGAGAGGTAAACCTACCACCAACGTTCTAGACAAAAGTGAAGAATGTGTGGGATGGTATGGTGTACTACTTTATC 960
T A F D I L H D N I D W L H W R G K P T T K R S R Q K W K N V W D G M V Y Y F I 315
AATACCCCATCTTGATGCCTGATGGAAGGATGTTCCGCAAGAGACGCGGTGTGCTTCTGGCTCTTGGTGGACCAACTTGTGACAGCGTGGTCAACTGGATACCTTGAAGTATCTC 1080
N T P I L M P D G R M F R K R R G V P S G S W W T Q L V D S V V N W I L V K Y L 355
Region 2
TCCCTGTGTCAGGGAGTTAACGCAAGAATCTTAGAGTTCTTGGTGACGACAGCGCTTCATGGCAGCTGAAACCATGGATCTGAGTGTGGCAGCGGAAGACGCCGCTGCCGTAGGTATG 1200
S L C Q G V N A K N L R V L G D D S A F M A A E T M D L S V A A E D A A A V G M 395
Region 3
GACCTAAGCGATGAGAAGTCGATCAGCGTGAAGACGCGACCGAACTGAAATTGCTGGGTGTACGATATCGTGATGGACATGCATTGAGGGAACCTGAAGAATGGTTCAAACCTGGCTCTC 1320
D L S D E K S I S V E D A T E L K L L G V R Y R D G H A F R E T E E W F K L A L 435
TACCCGAGGGAGATGTACCCGATATCGCCACATCTTAAACACGTCTAGTCGGTCTTTGGATCGCGCGGCCATGTGGGATACAAAATCTCACGCTTCATGGAATACTTTCAAGGGTGT 1440
Y P E G D V P D I A T S L T R L V G L W I G G A M W D T K F S R F M E Y F Q G C 475
TACCTTGTCCGTCGGAAGGTTGGTTTTCTAAAGACCAAAGACGATGGATGGAGATCGTACATGGAGGCGAGCACCTCGAGGATGGACGAAGAACAAGAATTTATTCTGGAGGTCAATC 1560
Y P C P S E G W F S K D Q R R W M E I V H G G R A P R G W T K N K N L F W R S I 515
TTTTATACCTGTAGGGTAGCTGTTTATCAGCGCAACTATTCCGGTGCATCCGGTGGGTTGTCAACGCTTGCCTGTGGAACGCG 1645
F Y T L 519

Fig. 2-6. Nucleotide sequence of M1 cDNA. M1 ORF is shown with the amino acid single-letter code. Initiation and stop codons are underlined. Kozak consensus sequence for translation initiation is indicated by an asterisk. Boxed sequences represent consensus RNA-dependent RNA polymerase motifs, region 1, 2 and 3 as described. Sequence was deposited in DDBJ under the accession No. D55668.

GCTCTCTTCATTACAATTGCCTGCCTGACAAGCACAACTGTCATCTTCTGTGCCCCCTGGCGACTTGTCTCTTCTGCGGGAAGCGGGAAGAAAAACCGTCCCAGCAAGAGGACGA 120
 M S S S V A P G D F V S S A G S G K K N R P G K K E R 27
 CAGGCCCGTCGAGGTCTGTCTGAGGCTACGGCGTCTAACGCCCCCTCATCCCTTACGGGAGCTGCTGTCTTTCGCCCGCGGTGCCCTGCTGACCCCGTCCCCAACCGGGACGCTACCT 240
 Q A R R G L S E A T A S N A P S S L T G A A V F A A G A P A D P V P Q P G R Y P 67
 GTGGTCTTTCATCGGGTGCAGGAGAACCACGCGCGATAGCCTATTGCGGTATGATGGTGAAGCATTGAGGACACGGTTAGTGAACCTACTGATCGTTATGTCCAGAAGCTCTAAGTAT 360
 V V F P S G A G E P T R D S L F A Y D G E S I Q D T V S E L T D R Y V Q N S K Y 107
 GCCGAGTTCGCCGCTCACTCCGACTGAACCTCGGCGACCTGGAGACGCTGATCCTCCGTGGAATCTTCTCGGTCTGGCGCAGCAAACCGTCCATTCCCATTGTCAATATGGGTCTACCT 480
 A E F A A H S G L N F G D L E T L I L R G I F L G L A Q Q T V H S H V N M G L P 147
 ATGGGTGATTTTTCTCCCGTGGCAACTTCGGACGCTGCTCAACTTTGCTGCGATCCGGTCCATCATTTCTCAGTTTGGTGAATTCCAATCTGTCTCTGAGGGTACTGCATACCTTCTTGCT 600
 M G D F S P V A T S D V V N F A A I R S I I S Q F G E F Q S V S E G T R Y L L A 187
 GGCTACGAGTCGACGGTAGCCGCCTGTGTTCTGTGCTGCGAAGCGCGCGGACTCAGATAAACCCTAAACGCCTCGCTCAAACCTTCTGGCTTCCAACACGTGTGGACGACCAACGTAAG 720
 G Y E S T V A A C V R A A K R A D S D N P K R L A Q T F W L P T R V D D Q R T K 227
 TATGTGGTCGACATAAGTTGGCTTCTACTGCATTCTTTTGGTGTACCTGGATGTAGAGGAGCTGGCTCATCATGTGTTCTCGTCTTCTCGGATGCGTGGGATGCTGTGAAGGTG 840
 Y V V A H K L A S Y C I P F G V Y L D V E E L A H H V F S S S S D A W D A V K V 267
 CTCTTGGTGCTGACGCTCGCGCTCAAAACCGCTTTGATTTTCTATTGGTACTTACAACACCGAAGCTGCCTTCTGTCTCTCGTGACGGGTAGTGCAGATCGTGTGACTGGCTTGCC 960
 L L G A D A A A Q N R F D F L F G T Y N T E A A F L S L V T G S A D R V D W L A 307
 CGTGTGCGTAACACGCTCGCCAAAGTTCTTTTCTCTCGGTTCTGGTCTCCAGAATCGGGCTGCCGCCTCCGGTCCCTTGGCCAGATGTCTCGTGTCTAGACATGTCTGGTGTTCCTTG 1080
 R V R N T L A K F F S L G S G L Q N R A A A S G S L G Q M S R V V D M S G V S L 347
 GTTCTTCCCGTCTGGCGGTTTCCGCCCGGAATACTCACTGCTTGTGTGTTCCCGTCTCTGGTCTGTTTTCAGACCTGACCCCGTATCGTGTGGTGTTAACCACCTCGTTAAATAC 1200
 V S S R L A V S R P G I L T A C V F P V L W S V F R P D P V S C G V N H F V K Y 387
 GGGTCAACGAGCTACGGAGTTTACACAAGTAGAAGTGGTGTGATTTCCGATACGCTTAACCGCGTGTGGGCTGGTCTATGACCGCTTCCATCTTTCTAGGAGCAGCTAGGTTTATCCAGC 1320
 G S T S Y G V Y T T R L A V I S D T L N R V W A G L 413
 TTGGCCAGAAGATGATTATCCAGCAGCGACTGGTTCGGTGTGCCGAAACAACCGCTCAACTCTTGTTCGGGTCCACCCGGCACCTTTCTAGCAGGTGTCCCCCTAGTGTTACCAC 1440
 GGGGT 1445

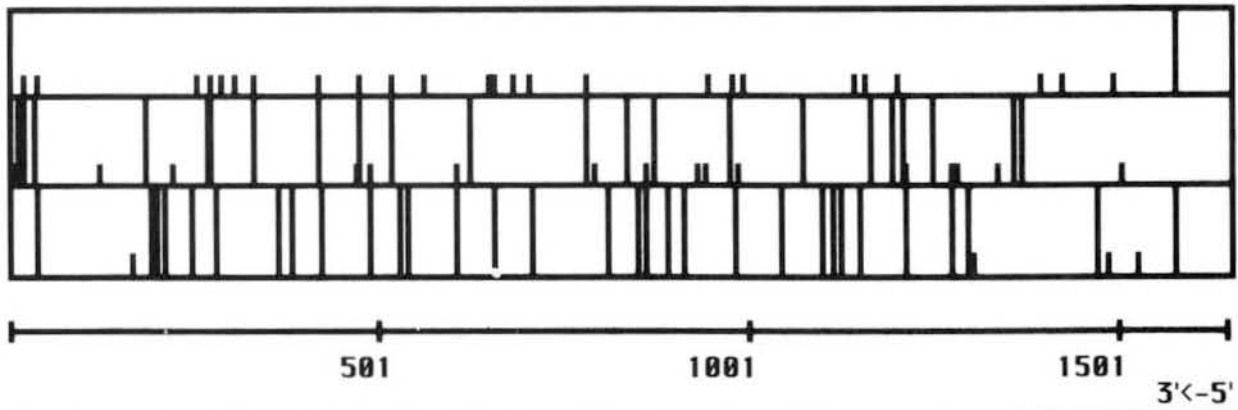
Fig. 2-7. Nucleotide sequence of M2 cDNA. Amino acid sequence of M2 ORF is shown with single-letter code. Initiation and stop codons are underlined. Kozak consensus sequence is indicated by an asterisk. The amino acid sequence determined from the purified capsid protein is boxed. Sequence was deposited in DDBJ under the accession No. D55669.

M1dsRNA

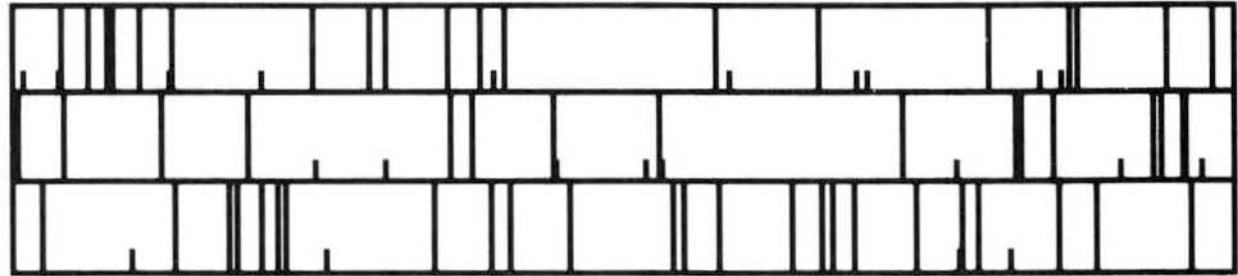
5'→3'

| : Initiation Codon

| : Termination Codon



3'←5'

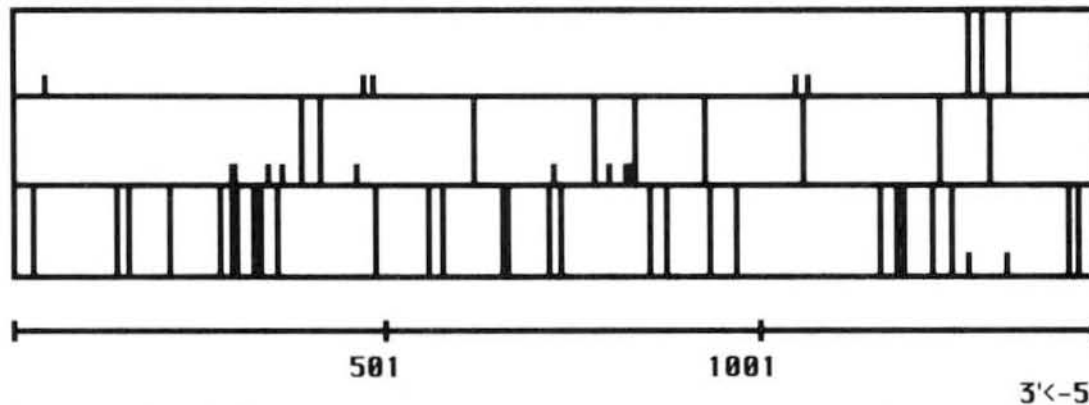


M2 dsRNA

5'→3'

| : Initiation Codon

| : Termination Codon



3'←5'

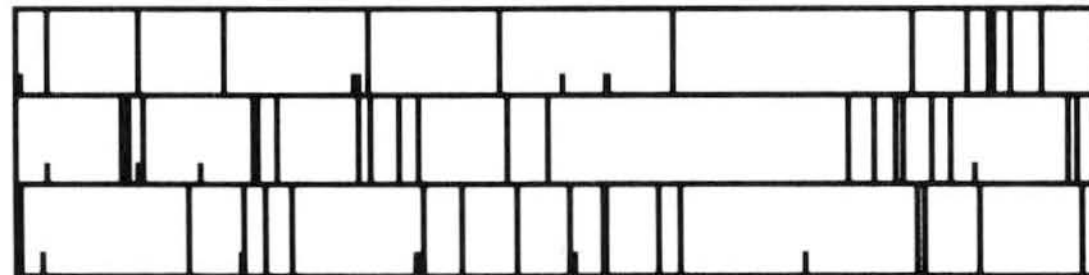


Fig. 2-8. Reading frame analysis of the translated sequences of both strands of M1 and M2 dsRNA. Long vertical bar indicate the position of stop codons in each frames and short vertical bar indicate the position of initiation codons (ATG).

コンセンサス配列 (A/G XXAUG G) は開始コドンAUGのAを1とした場合に、下線部の-3の位置のAまたはGのプリン、+4の位置のGの保存性が高く、-3、+4の両塩基ともこのコンセンサス配列に従うか、少なくともどちらか一方が従っている場合がほとんどである (Kozak 1981)。 *F. solani* から単離された塩基配列が報告されている遺伝子について、Kozak 配列が当てはまるかどうかについて検討した結果、cutinase ではACCAUGA、P450 ではACAUGC、ストレス応答性遺伝 *sti35* ではCAAUGU、D-amino acid oxidase ではAUCAUGUであり、-3の位置は全ての例で Kozak 配列に一致した (Soliday et al. 1989; Maloney and VanEtten 1994; Choi et al. 1990; Isogai et al. 1990)。FusoVゲノムM1、M2のORFの開始コドンの周囲の配列は、各々AGCAUGG、ACAUGUであり、Kozak 配列が確認できた (Fig. 2-6, Fig. 2-7)。このことから、M1、M2の推定ORFの開始コドンが実際に機能する可能性が裏付けられた。

M1のORFの推定アミノ酸配列中には、3カ所にRNA依存性RNAポリメラーゼの保存領域が観察されたことから、dsRNAゲノムの複製転写に機能するRNA依存性RNAポリメラーゼをコードしていると考えられた (Fig. 2-6)。dsRNAウイルスでは、ウイルス粒子内に複製転写に機能するRNA依存性RNAポリメラーゼを持っていることが一つの特徴になっている (Koonin 1992)。これらのRNA依存性RNAポリメラーゼはDNA依存性RNAポリメラーゼの阻害剤であるactinomycin Dに耐性である (Barroso and Labarère 1993; Lemke 1976; Fahima et al. 1994)。そこで、SUF704株とSUF704-free株から25% ショ糖クッション遠心分離のステップまで精製した試料を用いて *in vitro* replication 実験を行った。反応溶液中の ³²P-UTP を基質として新たに合成されたRNAをアガロースゲル電気泳動後、オートラジオグラムで検出した。この結果、FusoVを有するSUF704株中に 50 µg/ml の actinomycin D に耐性のRNA依存性RNAポリメラーゼ活性が検出されたが、SUF704-free株ではRNA依存性RNAポリメラーゼ活性を検出できなかった (Fig. 2-9)。また、第3章において詳しく示すが、精製FusoV 粒子には、ssRNAを合成する転写活性とdsRNA合成に働く複製活性が検出されており、FusoV粒子自身がRNA依存性RNAポリメラーゼを持っていることを明らかにした。



Fig. 2-9. Analysis of actinomycin D resistant RNA polymerase activity in *F. solani* SUF704. Crude extract fraction obtained from *F. solani* SUF704 and *F. solani* SUF704-free was used for *in vitro* replication. After reaction, newly synthesized RNA was separated through agarose gel electrophoresis and detected by autoradiography. Lane 1, lambda HindIII size marker; lane 2, reaction product of SUF704; lane 3, reaction products of SUF704 free.

M2の推定ORFのアミノ酸配列中には、前章で示した精製キャプシドタンパク質から決定した28 残基のアミノ酸配列と同一な配列が認められた (Fig. 2-7)。精製キャプシドタンパク質から決定したアミノ酸配列は、臭化シアン分解の結果得られたC末端側の29 kDaのペプチド断片から決定された (Fig. 1-9)。M2 ORFのアミノ酸配列から推定される臭化シアンによる分解点の配列は148 番目のMetと149 番目のGlyの間であり、MetのC末端側で分解する臭化シアンによるタンパク質分解の様式と一致した。翻訳開始点と推定される1 番目のMetから分解点の148 番目のMetまでの推定アミノ酸配列から予測されるペプチド断片の分子量は15,469 Da となり、精製キャプシドタンパク質の臭化シアン分解で得られたN末端側のペプチド断片の分子量 (15 kDa) と良く一致していた。これらの結果はM2

dsRNAの推定ORFがFusoVのキャプシドタンパク質をコードしていることと矛盾しない。また推定されたORFの開始コドン周囲には Kozak 配列が見られることに加え、ORFから推定される臭化シアン分解点から開始コドンまでのペプチド断片の分子量と精製キャプシドタンパク質の臭化シアン分解で得られるN末端側のペプチド断片の分子量が一致した事は、推定した開始コドンの位置の妥当性を示している。

M1、M2とも塩基配列から推定されたORFのアミノ酸配列から、各々RNA依存性RNAポリメラーゼ、キャプシドタンパク質をコードしていることが示された。これらの2つの遺伝子で構成されるウイルスの例は、*Totiviridae*科の*S. cerevisiae* L-A virus (Icho and Wickner 1989)や*Leishmania* virus (Stuart et al. 1992)、*Partitiviridae*科の*A. hypoxylon* virus (Oh and Hillman 1995)、さらに植物 cryptovirus のRYEV、CTeV (Dr. T. Natsuaki 私信)で見られる。L-A virus などの*Totiviridae*科では、分節していない5 kbp 程度のdsRNAをゲノムに有しており、このdsRNAゲノムにはキャプシドタンパク質 (gag) とポリメラーゼ (pol) をコードする2つのORFが見られる。*Totiviridae*科ウイルスでは、キャプシドタンパク質は普通に転写翻訳されるが、ポリメラーゼは、-1 ribosomal frameshift によって gag-pol 融合タンパク質として翻訳される。*Partitiviridae*科のAhVは3つに分節したdsRNAゲノムを持っており、サイズの大きな方からdsRNA1、dsRNA2、dsRNA3と命名されている。dsRNA1、dsRNA2にはほぼ全長にわたるORFが存在し、それぞれRNA依存性RNAポリメラーゼ、キャプシドタンパク質をコードしている点ではFusoVと同様であるが、dsRNA 3には機能すると考えられるORFが検出されなかった。FusoVを含め、RNA依存性RNAポリメラーゼとキャプシドタンパク質はRNAウイルスが複製するのに必要な最小限の遺伝子の組み合わせであると考えられる。

第1章で示したように、FusoVのインタクトなキャプシドタンパク質では、アミノ酸シーケンサーでの分析が不可能であったことから、N末端は何らかの修飾を受けていると考えられた。このキャプシドタンパク質のN末端の修飾は宿主菌である *F. solani* SUF704 由来の修飾酵素で行われていると考えられる。この点で、FusoV は宿主菌に依存しており、FusoV を他の菌に導入する際の制限要因になり得ると思われる。この様にマイコウイルスの複製が宿主菌に依存する例は、*S. cerevisiae* の L-A virus でも観察されており、ウイルスの維持に関連する宿主側遺伝子群を mak (maintenance of killer) と呼んでいる。この mak 遺伝子の内 mak3 は L-A virus のキャプシドタンパク質のN末端のアセ

チル化に働く N-acetyltransferase をコードしている (Tercero et al. 1992; Tercero et al. 1993)。mak3 遺伝子に変異を有する酵母ではキャプシドタンパク質がアセチル化されないために、ウイルス粒子への集合が上手くゆかずに、ウイルスが脱落してゆく現象が観察されている (Tercero and Wickner 1992)。

M1 dsRNAから推定されるORF中に見いだされたRNA依存性RNAポリメラーゼ保存配列は positive strand をゲノムに有するRNAウイルス (positive strand RNA virus) とdsRNAウイルスにおいて保存されており、negative strand (positive strandの相補鎖) をゲノムに有するもの (negative strand RNA virus) では観察されない配列である (Poch et al. 1989; Koonin 1992; Bruenn 1991)。種々の positive strand RNAウイルスとdsRNAウイルス間においてRNA依存性RNAポリメラーゼ保存領域をFusoVの保存領域と比較した結果、18~51%の相同性が見られた (Fig. 2-10)。FusoVと比較的高い相同性が確認されたのが、相同性 47% のbeet cryptic virus 3 (BCV3)、51% の radish yellow edge virus (RYEV)、41% の carrot temperate virus (CTeV) の植物 cryptovirus であった。また、*Partitiviridae*科のウイルスである *A. hypoxylon* virus (AhV) において38% の相同性が確認された (BCV3, Xie et al. 1993; RYEV and CTeV, Dr T. Natsuaki 私信; AhV, Oh and Hillman 1995)。植物 cryptovirus は、エンヴェロープを持たない直径 30~38 nm の球状のウイルス粒子であり、2~3 本に分節した1.5~2.5 kbp のdsRNAゲノムとし、55 kDa 程度の1種類のキャプシドタンパク質で構成されている (夏秋 1993)。これらの特徴はFusoVが属すると考えられる*Partitiviridae*科ウイルスの形態と類似であることから、植物 cryptovirus が *Partitiviridae*科に属する可能性が示唆されていた (Ward 1993)。現在、ウイルスの分類で重要な指標となっているのがウイルスの有する遺伝子の情報であり、特にRNAウイルスにおいてはRNA依存性RNAポリメラーゼのアミノ酸配列が分類の大きな指標となっている。RNA依存性RNAポリメラーゼの配列はRNAウイルスにおいて唯一保存されている領域であり、全ての positive strand RNAウイルス、dsRNAウイルスに適応できる唯一の塩基配列、アミノ酸配列レベルでの分類指標として用いることができるからである (Koonin 1992)。この点で植物 cryptovirus 及び *Partitiviridae*科マイコウイルスの塩基配列、特にRNA依存性RNAポリメラーゼの配列を明らかにすることが待たれていた (Ward 1993)。FusoV、AhV と植物 cryptovirus とのRNA依存性RNAポリメラーゼの相同性の高さは、植物 cryptovirus が *Partitiviridae*科に分類できることを支持していると考えられる。

ssRNA virus	Region 1	Region 2	Region 3	Homology (%)
Qbeta:	TVDL SAASDSIS-	36- ISSMNGYTFELES LIFAS LARSVCEILD-	5-VTVYGD DII L	20
Tmev:	DVD-YSNFDASH-	46-GLPS GCA ATSM LNT IMNW IIRAALYLY-	9-VLSYGD DLL I	26
Pvx:	AND-YTAFDQSQ-	41-MRLT GEG PT FDANTECNIAYTHTKFDIPA-	3-QVYAGD DSA L	22
Cyrv:	GLD-ASRFDOHC-	49-CRMS GDI NTS LGNYLLMCAMVHGVMRHLG-	5-LANCGD DCV L	28
Mcmv:	GFD-ASRFDOHV-	49-KRMS GDMNISLGNCILATAITHDFVTKLG-	4-LINNCGD DNV L	26
Bydv:	GVD-ASRFDOHV-	48-HRMS GDI NTS MGNKLMCGMMHAYLKKLG-	4-LCNGCGD DCV I	26
Hcv:	SFD-TKAWDTQV-	48-QRGS GQP DTSAGNSMLNVL TMVYAFCEAT-	12-IHVCGD DGF L	28
Wnv:	ADD-TAGWDTRI-	56-QRGS GQV VTYALNTFTNLAVQLVRMEGE-	33-MAVSGD DCV V	22
Bbv:	DAE-VIETDFSN-	55-GVKS GSS TITPHNTQYNGCVEFTALTFEH-	12-GPKCGD DGL S	22
Tbrv:	NCD-YSGFDGLL-	52-GLPS GFA LTVVNSVFNELIRYAYKKLA-	13-LLVYGD DNL I	42
Tev:	DAD-GSQFDSSL-	50-GNNS GQP STVVDNTLMV IIMLYTCEKCG-	7-YYVNGD DLL I	20
Bnyvv:	VID-AAACDSGQ-	45-VKTS GEP GT! LGNTILMGAMLNAMLRGTG-	3-MAMKGD DGF K	20
Bsmv:	EIDF-SKFDKSK-	47-QQKS GNC DTYGSNTWSAALALLDCLPLED-	3-CVFGGD DSL I	24
Trv:	EIDM-SKFDKSA-	47-QQKS GDA DTYNANS DRTL CALL SELPLEK-	3-VTYGGD DSL I	24
Tmv:	ELDI-SKYDKSQ-	47-QRKS GQV TTFIGNTVIIAACLASMLPMEK-	3-GAFCGD DSL L	22
Onv:	ETDIAS-FDKSQ-	47-MMKS GMF LTLFVNTLLNITIASRVLEERL-	5-AAFICGD DNI I	24
Sfv:	ETDIAS-FDKSQ-	47-MMKS GMF LTLFINTVLNITIASRVLEQRL-	5-AAFICGD DNI V	24
dsRNA virus				
Reo:	NIDI-SACDASI-	85-TFPS GST ATSTEHTANNSTMMETFLTVMG-	21-YVCQGD DGL M	26
Rota:	YTDV-SQWDSSQ-	59-AVAS GEK QTKAANS IANLAL IKTVLSRIS-	9-IRVDGD DNY A	32
phi6:	ATDV-SHDFTFW-	57-GLSS GQG ATDLMTLLMSITYLVMQLDHT-	29-QISKSD DAIL	26
CHV1-713:	IAD-ATAYDSNC-	179-GGGT GQS ATSWDNTATFKLGVISAWARAT-	12-LYNTSD DTV W	18
CHV2-58:	IAD-AKAYDSKC-	179-GGGT GQS ATSWDNTATFKLGVISAWARAT-	12-FYNTSD DTV W	18
Mit-dsRNA:	GFDLTAATDRTP-	28-KSPQ GFT TYAVGQPMGAYSSFAMTAL THH-	18-YCMLGD DIV I	18
Rice-dsRNA:	ENDL-TKQDRQT-	45-MRLT GQA TTA LGNCITNMQVHSKFVIKNK-	5-ALFLGD DMC M	20
W-dsRNA:	SSDMKSASDLIP-	46-GILMGLPTT WAILNLMHLWCWDSADRQYR-	5-CRVCGD DLI G	22
T-dsRNA:	SADLTSASDRIP-	49-GILMGLPTT WPLLCLIHLFWVELSDWAPA-	13-FRICGD DLI A	22
Leishmania V:	L-DPGSMGNCGI-	75-TLMS GHRATS FINSVLNRAYIICAGGHVP-	1-SMHVGD DIL M	24
L-A:	L-DGASSFCFDY-	60-TLLS GWR LTT FMNTVLNWAYMKLAGVFDL-	5-SVHNGD DVM I	30
Fusov:	L-DF-SSFDTKV-	62-GVPS GSW WTLQVDSVWNWILVKYLSLCOG-	5-LRVLGD DSA F	100
BCV3:	L-DW-SSFDSSV-	51-GIPS GSY YTS IVGSVVRNRLRIEYIWRVLF-	6-CYTQGD DSL I	47
RYEV:	L-DW-SEFDMRV-	67-GMPS GIF CTQFWDSFYNCIMVTTLEALG-	8-LKVLGD DVI F	51
CTeV:	L-DW-SRFDKRA-	71-GIPS GLF ITQL HSWYNYTMLATILSALG-	7-IKVQGD DSI I	41
AhV:	LIDW-SRFDHLA-	94-GVPS GIL MTQFIDSFVNLITLLDGLIEFG-	10-VFIMGD DNI V	38
Consensus:	D S D	S G T N T N	GDD	

Fig. 2-10. Alignment of the conserved motifs of the RNA-dependent RNA polymerases from positive-strand and dsRNA viruses. The consensus sequences are shown on consensus column. Identical residues with Fusov sequence are shade-boxed. The numerals denote aa number between each regions. The sequences are obtained from the following sources: Qbeta, bacteriophage Q- β (Leviviridae: Mills et al., 1988); Tmev, Theiler murine encephalomyelitis virus (Picornaviridae: Pevear et al., 1987); Pvx, Potato virus X (Potexviridae: Huisman et al., 1988); Cyrv, Cymbidium ringspot virus (Tombusvirus: Grieco et al., 1989); Mcmv, Maize chlorotic mottle virus (Bromoviridae: Nutter et al., 1989); Bydv, Barley yellow dwarf virus (Luteovirus: Miller et al., 1988); Hcv, Hog Cholera virus (Togaviridae: Meyers ete al.,

1989); Wnv, West Nile virus (Togaviridae: Castle et al., 1986); Bbv, Black Beetle virus (Nodaviridae: Dasmahapatra et al., 1985); Tbrv, Tomato black ring virus (Nepovirus: Greif et al., 1988); Tev, Tobacco Etch virus (Potyvirus: Allison et al., 1986); Bnyvv, Beet necrotic yellow vein virus (Furovirus: Bouzoubaa et al., 1987); Bsmv, Barley stripe mosaic virus (Hordeiviridae: Gustafson et al., 1987); Trv, Tobacco Rattle virus (Tbravirus: Hamilton et al., 1987); Tmv, Tobacco mosaic virus (Tobamovirus: Goelet et al., 1982); Onv, O'Nyong-nyong virus (Togaviridae: Levinson et al., 1990); Sfv, Semliki forest virus (Togaviridae: Takkinen, 1986); Reo, Reovirus (Reoviridae: Wiener and Joklik, 1989); Rota, Rotavirus (Reoviridae: Cohen et al., 1989); Phi 6, bacteriophage $\phi 6$ (Cystoviridae: Mindich et al., 1988); CHV-1, *Cryphonectria parasitica* hypovirus 1 (Hypoviridae: Shapira et al., 1991); CHV-2, *C. parasitica* hypovirus 2 (Hypoviridae: Hillman et al., 1994); Mit-dsRNA, *C. parasitica* mitochondrial dsRNA (dsRNA genetic element: Polashock and Hillman, 1994); rice-dsRNA, dsRNA of *Oryza sativa* (dsRNA genetic element: Fukuhara et al. 1993); W-dsRNA, W-dsRNA of *Saccharomyces cerevisiae* (dsRNA genetic element: Rodriguez-Cousiño et al., 1991; Matsumoto and Wickner, 1991); T-dsRNA, T-dsRNA of *S. cerevisiae* (dsRNA genetic element: Esteban et al., 1992); Leishmania V, *Leishmania* RNA virus 1 (Totiviridae: Stuart et al., 1992); L-A, L-A virus of *S. cerevisiae* (Totiviridae: Icho and Wickner, 1989); FusoV, this work (Partitiviridae); BCV3, Beet cryptic virus 3 (Plant cryptic virus: Xie et al., 1993); RYEV, Radish Yellow Edge Virus (Plant cryptic virus: Dr. T. Natsuaki, personal communication) and CTeV, Carrot Temperate Virus (Plant cryptic virus: Dr. T. Natsuaki, personal communication); Ahv, *Atkinsonella hypoxylon* virus (Partitiviridae: Oh and Hillman, 1995).

しかし、positive RNAウイルスの Tomato black ring virus (Tbrv)との間でも42%と高い相同性が観察されることから分かるように、ただ単に保存領域1~3のアミノ酸配列の相同性の比較のみでは根拠として薄弱であるので、この保存領域1から3にわたる配列全体を用いて系統樹の作成を PHYLIP (Phylogeny Interence Package) Version 3.57C (Felsenstein 1989) により行った (Fig. 2-11)。ウイルスでは、その起源が通常の生物のように最終的に一つの細胞にたどり着ける monophyletic origin な関係ではなく、多元的に発生してきた polyphyletic origin であると考えられていることから、このような系統樹が直接的な進化の道筋を示すとは考えられないが、各ウイルス間の類縁関係を示す指標としては有効である。この系統樹においても、FusoV、AhVのPartitiviridae科ウイルスとBCV3、RYEV、CTeVの植物 cryptovirus が近い関係にあることが示された。

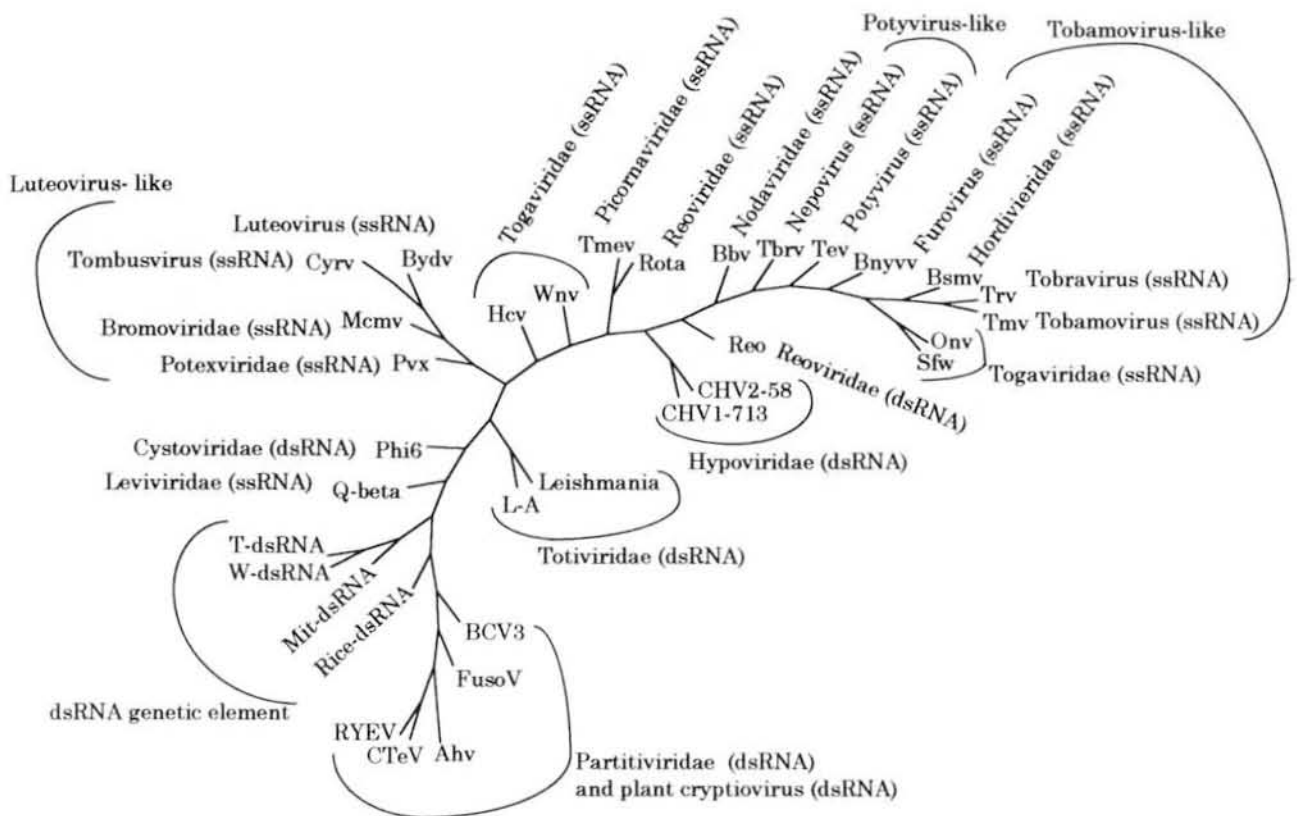


Fig. 2-11. Evolutionary tree constructed from amino acid sequence of the RNA-dependent RNA polymerases conserved regions. The tree was generated using PHYLIP program package (Felsenstein, 1989). Potyvirus-like, Tobamovirus-like and Luteovirus-like group classification was described by Bruenn (1991). The sequence source is described in the legend to Fig. 2-9.

またRNAポリメラーゼ保存配列のみを比べた場合、FusoVと比較的高い相同性を示した Tbrvは、Partitiviridae科ウイルスや植物 cryptovirus とはかなり離れた位置となった。この結果は、植物 cryptovirus がPartitiviridae科に含まれることを強く示唆するものである。この系統樹で注目すべきは、dsRNAウイルスが全体として一群を形成しているのではなく、Partitiviridae科、Totiviridae科、Hypoviridae科、dsRNA genetic element が各々、別々の系統樹上の位置を占めたことである。Reoviridae科では rotavirus と reovirus が間に Hypoviridae科を挟む形になってはいるがやはり比較的近い位置関係となった。この様

な結果は、Koonin (1992) の研究でも報告されており、dsRNAウイルスが祖先となる1つのdsRNAウイルスから進化してきたのではなくpositive strand RNAウイルスからdsRNAウイルスが多元的に発生した可能性を考察している。この仮説では positive strand RNA ウイルスからdsRNAウイルスに進化する過程を2つの段階、すなわち第1段階としてssRNAゲノムのdsRNAへの変化、第2段階としてウイルス粒子内へのRNA依存性RNAポリメラーゼの取り込みを考えている。positive strand RNAウイルスの複製は、一般的に以下の過程で進行する。1) 宿主細胞に感染したウイルスからゲノムの positive strand RNA が放出されmRNAとして機能し、RNA依存性RNAポリメラーゼ等のウイルスタンパク質を合成する。2) 合成されたRNA依存性RNAポリメラーゼによって、positive strand RNA を鋳型に negative strand を合成することで複製中間体としてのdsRNAとなる。3) 次いでこのdsRNAから新たにゲノムのpositive strand が合成される。先に述べた、positive strand RNAウイルスからdsRNAウイルスが発生したとする仮説の第1段階は本来複製中間体であったdsRNAがウイルスのゲノムとして利用されることであり、第2段階はdsRNAはそのままではmRNAとして機能できないので、ウイルス粒子からmRNAとなる positive strand を転写する活性を持つために、ウイルス粒子内へRNA依存性RNAポリメラーゼを取り込むことである。この positive strand RNAウイルスからdsRNAウイルスへの変化の過程で、キャプシドタンパク質の遺伝子を脱落させた存在が RNA plasmid であると考えられている。RNA plasmid は dsRNA genetic element と呼ばれ、Fig. 2-11の系統樹では *Partitiviridae*科ウイルスに比較的近い関係に位置した。これらの dsRNA genetic element には酵母 *S. cerevisiae* の T-dsRNA、W-dsRNA、アメリカクリ桐枯病菌 *C. parasitica* のミトコンドリア内在性 dsRNA (Mit-dsRNA) があり、それぞれdsRNAゲノムサイズは、2.9 kbp、2.5 kbp、2.7 kbp となっており、各々一つのRNA依存性RNAポリメラーゼをコードしていると考えられるORFを有していた (Matsumoto and Wickner R 1991; Rodriguez-Cousiño et al. 1991; Esteban 1992; Polashock and Hillman 1994)。またイネから発見された Rice-dsRNA はで16 kbp と大きく、少なくとも2つのORFを別々の読み枠に有していた (Fukuhara et al. 1993)。T-dsRNA、W-dsRNA、Mit-dsRNA はそのゲノム構造上、*Partitiviridae*科ウイルスの分節ゲノムの内キャプシドタンパク質をコードしてる分節が欠落した結果生じたと考えられる。しかし、Rice-dsRNA は*Partitiviridae*科ウイルスとはゲノム構造がかなり異なり、そのdsRNAゲノムの大きさ、2つのORFを別々の読み枠に有し

ている点などの特徴は *Hypoviridae* 科の CHV1 や CHV2 に類似であり、*Partitiviridae* 科ウイルスの 2~3 kbp 程度の分節 dsRNA から進化したと考えるのは困難である。Rice-dsRNA とゲノム構造上類似性が指摘されている *Hypoviridae* 科ウイルスでは、その塩基配列から推定される RNA ポリメラーゼ、ヘリカーゼ、プロテアーゼのアミノ酸配列をも含めたゲノム構造との関連性から positive strand RNA ウイルスである植物 potyvirus との進化的な関連性が示唆されている (Koonin et al. 1991; Nuss 1992)。*Hypoviridae* 科ウイルスはこの系統樹上でも potyvirus-like グループと比較的近い関係にある。*Hypoviridae* 科ウイルスの宿主菌が植物病原菌 *C. parasitica* であることから、植物への感染過程で元々は植物 positive strand RNA ウイルスであった potyvirus を細胞内に取り込み、菌内でこのウイルスゲノムが ssRNA よりは安定性の高い dsRNA として複製維持されるようになったと考えられている。Rice-dsRNA の進化的起源に関しては *Hypoviridae* 科ウイルスの進化的起源に関する仮説の様に、イネが有していた positive strand RNA ウイルスから進化したと考えるのが妥当であると思われるが、この点を検証するためには RNA 依存性 RNA ポリメラーゼの保存配列領域のみではなくより広い範囲を類似の遺伝子の配置を持つ dsRNA、ssRNA ウイルス間で比較することが必要であると思われる。

以上アミノ酸配列のレベルで、*Partitiviridae* 科ウイルス FusoV、AhV と植物 cryptovirus、BCV3、RYEV、CTeV 間に類縁関係が認められたことから、植物 cryptovirus は *Partitiviridae* 科に分類するのが適当であると考えられた。*Partitiviridae* 科ウイルスは主に菌類が宿主となっている。菌類、特に植物病原菌は植物との間で様々なレベルで関連していると考えられ、植物に存在した *Partitiviridae* 科の祖先ウイルスが菌類に取り込まれる、または菌類が持っていた祖先ウイルスが植物に取り込まれる過程を繰り返し、様々な植物、菌類に *Partitiviridae* 科ウイルスが伝搬していった過程が推定される。この様な植物と菌類間でのウイルスの伝搬は、*Hypoviridae* 科ウイルスにおいても推定されている (Koonin 1991; Nuss 1992)。最近ではヒト、ウサギ等から *Partitiviridae* 科ウイルスと類似の特徴を有する picobirnavirus が報告されており (Gallimore et al. 1993; Gallimore et al. 1995; Ludert and Liprandi 1993)、*Partitiviridae* 科ウイルスが、菌類、植物に限らずより広い宿主に存在しているが、宿主の形質に変化を与えない場合が多いため発見例がこれまで少なかった可能性が考えられる。

第3章

FusoVの複製機構について

緒言

FusoVはゲノムdsRNAに対して合成したcDNAの塩基配列の解析から、RNA依存性RNAポリメラーゼとキャプシドタンパク質の2種類の遺伝子を有していることが示された。RNAウイルスはウイルス粒子中に存在するゲノムの存在形態によって、ゲノムがそのままmRNAとして機能するssRNAである positive strand RNAウイルスとゲノムがmRNAの相補鎖のssRNAである negative strand RNAウイルス、さらにFusoVのようなdsRNAがゲノムとなっているdsRNAウイルスに分類される。これらの内、positive strand RNAウイルスは宿主細胞内に導入されたゲノム positive strand RNA がmRNAとして機能し、複製に必要なRNA依存性RNAポリメラーゼやキャプシドタンパク質などが合成される。この新たに合成されるRNA依存性RNAポリメラーゼを用いて positive strand を鋳型として複製が行われる。一方、negative strand RNAウイルスとdsRNAウイルスでは、ゲノムRNAはそのままではmRNAとして機能しないため、ウイルス粒子内で negative strand または、dsRNAから positive strand の転写を行う必要がある。このために、これらのRNAウイルスではウイルス粒子内にRNA依存性RNAポリメラーゼを持っている点が特徴となっている (Koonin 1992; 永田 and 山中 1991)。dsRNAウイルスはウイルス粒子内で positive strand を転写する際、新たに合成された positive strand RNA がそのまま、ウイルス粒子外に放出される保存的複製 (conservative replication) と新たに合成された positive strand RNA がゲノムのdsRNA中の元々存在した positive strand と置換される半保存的複製 (semiconservative replication) の2通りの複製機構が報告されている (Wickner 1993)。

FusoVがどのような複製機構を有しているのか、精製FusoV粒子を用いた *in vitro* replication 実験によって検討すると共に宿主細胞内に存在するFusoV転写産物についてノーザンハイブリダイゼーションによる分析を行った。

1： 実験目的

FusoVの複製機構を明らかにする目的で、精製FusoV粒子を用いた *in vitro* replication 実験でのRNA合成パターンの分析、及び宿主細胞内でのFusoV転写産物の存在形態につい

てノーザンハイブリダイゼーション分析を行った。

2： 実験方法

本実験に使用した試薬類及び実験器具は、使用前に121℃で15 分間のオートクレーブ処理をして用いた。特にRNAを取り扱う実験では、オートクレーブの条件を125℃で20 分間に変更した。

2-1： *in vitro* replication 実験

第1章・第2節・2-2のFusoV精製ステップにより塩化セシウム密度勾配遠心精製したFusoV粒子を15 SSB (15% sucrose, 10 mM Tris-HCl pH 6.8, 5 mM 2-mercaptoethanol) に対して透析し、*in vitro* replication 実験に用いるFusoV分画とした。

BarrosoとLabarère (1993) の方法に従い、100 μ lのFusoV分画を200 μ lの反応混合液 (reaction mixture: 100 mM Tris-HCl pH7.5, 10 mM magnesium acetate, 1 mM each of ATP, CTP, GTP, 0.5 mM [α - 32 P] UTP (12.6 MBq/ μ mol), 200 units/ml Ribonuclease inhibitor (Takara), 50 μ g/ml actinomycin D, 5 mM 2-mercaptoethanol)と混合し、30℃で様々な時間反応させた。replication反応は、フェノール・クロロフォルム抽出によって停止し、次いでクロロフォルム抽出をした。RNAは0.5 倍量の7.5 M 酢酸アンモニウムと3 倍量の-20℃に冷やしたエタノール (99%) を添加することで沈殿させ、遠心分離 (12,000 x g, 15 分間, 室温) によって回収し、10 μ lの蒸留水に溶解した。

合成されたRNAの検出は、1.0% アガロースゲル電気泳動 (TAE buffer) によって分離後、ゲルを7% TCAで30 分間固定し吸引乾燥後、オートラジオグラフィーによって行った。

2-2： 塩化リチウム沈殿処理によるssRNAとdsRNAの分離

in vitro replication 実験によって合成されたRNA産物からssRNAとdsRNAを分離する目的で、塩化リチウム沈殿を行った (Chen et al. 1994-b)。 *in vitro* replication 反応後、フェノール・クロロフォルム抽出、クロロフォルム抽出、エタノール沈殿で精製し、蒸留水に懸濁したRNA溶液に最終濃度2 Mとなるように10 M 塩化リチウムを添加し、氷中で1 時間保持することで、沈殿したssRNAを遠心分離 (12,000 x g, 15 分間, 室温) で分離した。

遠心分離で得られた上清に2倍量のエタノールを添加し沈殿したdsRNAを遠心分離によって回収し、ssRNA分画、dsRNA分画ともに蒸留水に懸濁し、アガロースゲル電気泳動による分析の試料とした。

2-3: ssRNA *in vitro* replication 産物のドットプロットハイブリダイゼーションによる分析

第2章において作製した、ファージミドベクター pUC118 にM1由来のcDNAクローン pFSV1-10 とM2由来のcDNAクローン pFSV5-100 のcDNAインサート断片が両方向に組み込まれたcDNAクローンから1本鎖DNA (single-stranded DNA: ssDNA) を調製した。M1由来の pFSV1-10 から作製した組み換えプラスミドの内、ssDNAを調製した際 positive strand が合成される組み換え体プラスミドを pFV101 と、negative strand が合成されるプラスミドを pFV201 と命名した。同様にM2由来の pFSV5-100 から作製した組み換え体プラスミドの内、ssDNAとして positive strand が合成されるものを pFV301、negative strand が合成されるものを pFV401 と命名した。これらの pFV101から401を塩化カルシウム法で調製した *E. coli* MV1184株のコンピテント細胞に形質転換して得られた形質転換体をssDNA調製に用いた。

ssDNAは各ベクターを有する *E. coli* クローンにヘルパーファージを感染させることで調製した。pFV101から401を有する *E. coli* MV1184 を150 μ g/mlの ampicillin を含んだ 2xYT (1.6% peptone, 1.0% yeast extract, 0.5% NaCl, pH 7.6) 液体培地で前培養し、OD₆₀₀=0.02~0.05になるように前培養液を150 μ g/mlの ampicillin、0.01% thiamine を含む3 mlの2xYT液体培地に接種し本培養した。OD₆₀₀=0.1~0.2の時、30 μ lのヘルパーファージ M13K07 (10⁶pfu/ml) を加え、37℃で30 分間穏やかに振盪培養後、70 μ g/mlとなるように kanamycin を添加し、37℃で14~18 時間激しく振盪培養した。培養終了後、遠心分離 (8000 x g, 5 分間, 室温) で菌体を取り除き、1 mlの培養上清に対して200 μ lのPEG-NaCl溶液 (20% polyethylene glycol, 2.5 M NaCl) 加え良く混合し、15 分間室温に置いた。次いで遠心分離 (8000 x g, 5 分間, 室温) によって上清を完全に取り除き、沈殿を100 μ lのTE緩衝液に完全に溶かした後、50 μ lの TE飽和フェノールを加え、10 秒間良く混和した。10 分間放置後、遠心分離 (8000 x g, 5 分間, 室温) によって水層を抽出し、クロロホルム抽出、エタノール沈殿処理によってssDNAを精製した。

各々10xSSCに溶解した200 ngのssDNAをドットプロット装置 (BIO-DOT: BIO-RAD) を用いて、滅菌蒸留水で5 分間、次いで10xSSCで10 分間前処理したナイロンメンブレン (GeenScreen Plus: Dupont) に対して、緩やかに吸引することでssDNAをメンブレンに吸着させ、80℃で2 時間乾燥させssDNAを固定した。プローブには *in vitro* replication 産物から塩化リチウム沈殿により精製した³²P-ラベルされたssRNAを用いた。ハイブリダイゼーションの条件は、第2章・2-2に従った。

2-4：ノーザンハイブリダイゼーションによる宿主細胞中のFusoV転写産物の分析

CYPC液体培地で培養した *F. solani* SUF704株の菌糸を液体窒素存在下で乳鉢乳棒により破碎した。10 gの菌糸粉末に20 mlの guanidin thiocyanate solution (5 M guanidin thiocyanate, 30 mM sodium citrate, 100 mM 2-mercaptoethanol, 5mg/ml N-lauroylsarcosine sodium salt) と20 mlの滅菌蒸留水を添加し、更に40 mlのフェノール・クロロフォルム溶液を加え、ボルテックスミキサーにより良く混和した。遠心分離 (10,000 x g, 30 分間, 室温) によって水層を回収した。この水溶液 2.5 ml 当たり1 g の塩化セシウムを溶解し、10 mlのRNA試料溶液を2 ml の 5.7 M 塩化セシウム溶液 (5.7 M CsCl, 0.1 M EDTA pH7.5) 上に重層し、超遠心分離 (110,000 x g, 22 時間, 20℃) によってRNAを沈殿として回収した。このRNA沈殿を2 ml の Tris-EDTA-SDS solution (50 mM Tris-HCl pH 9.0, 1% SDS) に完全に溶解し、クロロフォルム抽出、エタノール沈殿により total RNA を精製した。

ノーザンハイブリダイゼーションは、変性条件と非変性条件で行った。変性ゲルを用いたノーザンハイブリダイゼーションには、2.2 M formaldehyde 変性アガロースゲル (1.2%) を用いて電気泳動 (20 mM MOPS buffer: 20 mM MOPS pH 7.0, 8 mM sodium acetate, 1 mM EDTA)した (Sambrook et al. 1989)。非変性ゲルとして1.0% アガロースゲルを用い電気泳動 (TAE buffer) した。電気泳動後、臭化エチジウム染色でRNAを検出し、次いで 20xSSC (3 M NaCl, 0.3M sodium citrate) でプレウエットしたナイロンメンブレンとゲルをバキュームプロットティング装置にセットし、20xSSC をトランスファー溶液を用いてプロットティングした。プロットティング終了後、ナイロンメンブレンを 2xSSC でリンスし、80℃、2 時間放置しRNAをメンブレンに固定した。

ノーザンハイブリダイゼーションの実験に用いるプローブは、M1、M2の各 positive strand、negative strand を特異的に検出する為に、pFV101から401のssDNAを鋳型として

用い、Multiprimer DNA labelling system (Amersham) によって合成した。プライマーには、universal primer (M13 primer P7: Toyobo) または Multiprimer DNA labelling system 付属の random hexamer を用いた。pFV101を鋳型に用いて合成したプローブは M1 positive strand 特異的に検出するプローブとして機能する。同様に、pFV201、pFV301、pFV401を鋳型として合成したプローブは、それぞれ M1 negative strand、M2 positive strand、M2 negative strand を特異的に検出するプローブとなる (Fig. 3-4)。

ノーザンハイブリダイゼーション実験でのプレハイブリダイゼーション、ハイブリダイゼーション、メンブレンの洗浄の条件は、第2章・2-2に従った。

2-5: ssRNAを含んでいるFusoV粒子のハイブリダイゼーションによる検出

第1章・第2節・2-2によりFusoVの精製を進め、塩化セシウム密度勾配遠心により得られた各分画 (500 μ l) から50 μ lの試料について、フェノール・クロロフォルム抽出、エタノール沈殿によりRNAを精製し、非変性条件の1.0% アガロースゲル電気泳動 (TAE 緩衝液) により分離後、実験方法2-4により、ナイロンメンブレンにトランスファーし、positive strand 又は negative strand 特異的プローブを用いたノーザンハイブリダイゼーションを行った。

3: 結果及び考察

dsRNAウイルスは negative strand RNAウイルスと共に、ウイルス粒子内にRNA依存性RNAポリメラーゼ活性を持っている点が特徴の一つである。dsRNAウイルスのゲノムの複製はウイルス自身が有するRNA依存性RNAポリメラーゼによって行われている。FusoVのdsRNAゲノムに対するcDNAを合成し、その塩基配列の分析から、M1 dsRNAにRNA依存性RNAポリメラーゼがコードされている事を示した。実際に、dsRNAウイルスである reovirus、rotavirus、bacteriophage ϕ 6 においても、菌類を宿主とするdsRNAウイルスである *C. parasitica* のCHV1、*Aspergillus foetidus* の AfV-S や *Penicillium stoloniferum* の PsV-S、*Rizoctonia solani*、*Ustilago maydis*、ヒトに対する病原菌の *Blastomyces dermatitidis* において、*in vitro* transcription、*in vitro* replication によりウイルス粒子に付随したRNAポリメラーゼ活性が観察されている (Joklik 1981; Chen et al. 1994-b; Bamford and Wickner 1994; Fahima et al. 1994; Lemke 1976; Tavantzis and Bandy 1988;

Ben-Tzvi et al. 1984; Kohno et al. 1994)。酵母 *S. cerevisiae* の L-A virus では、*in vitro* 系でのゲノム dsRNA の複製以外に、サテライトウイルスのゲノムの複製も報告されている (Bruenn et al. 1980; Fujimura et al. 1986; Fujimura and Wickner 1988; Esteban and Wickner 1988; Esteban and Wickner 1989)。FusoV のウイルス粒子が M1 dsRNA の塩基配列分析から推定された RNA 依存性 RNA ポリメラーゼ活性を有するかどうかについて、*in vitro* replication 実験で検討した。FusoV を用いた *in vitro* replication 実験は、*Agrocybe aegerita* で用いられた実験系を参考とした (Barroso and Labarère 1993)。我々の実験系においても、混入する恐れのある宿主 *F. solani* の RNA ポリメラーゼの影響を除外するために、RNA ウイルスの RNA 依存性 RNA ポリメラーゼを阻害しないが、宿主菌由来の DNA 依存性 RNA ポリメラーゼによる RNA 合成を特異的に阻害する actinomycin D を添加した (Barroso and Labarère 1993; Lemke 1976; Fahima et al. 1994)。精製 FusoV 粒子を用いて 30℃ で 1 時間、*in vitro* replication 反応させることによって、基質として反応系に入っている α -³²P UTP が取り込まれた 新たに合成された RNA バンドがオートラジオグラフィーによって確認された (Fig. 3-1)。この結果から FusoV 粒子が RNA 依存性 RNA ポリメラーゼ活性を有することが確認された。*in vitro* replication 実験によって合成された RNA は移動度の異なる 2 つのバンドとして検出された。M1、M2 に相当する大きさのつまり移動度の大きなバンドと移動度の小さなバンドの 2 のシグナルとして確認された。この条件では移動度の大きなバンドとして検出される M1、M2 を別々のシグナルとして確認するのは困難であった。移動度の小さなバンドは M1、M2 dsRNA とは異なると考えられた。そこで各バンドの性状を明らかにするために、塩化リチウム沈殿処理による ssRNA と dsRNA の分離を試みた。この結果、*in vitro* replication 産物の内、M1、M2 と同じ移動度を示したバンドは dsRNA 分画である塩化リチウム沈殿処理の上清に分画された。一方、移動度の小さい *in vitro* replication 産物は、ssRNA 分画である沈殿として回収された (Fig. 3-1)。また、移動度の小さなバンドが ssRNA であることは、高塩条件下での RNase A 分解 (第 1 章・第 1 節・2-5) によっても確認された (データ示さず)。この結果から、FusoV は *in vitro* の反応系で ssRNA と dsRNA を合成することが明らかにされた。

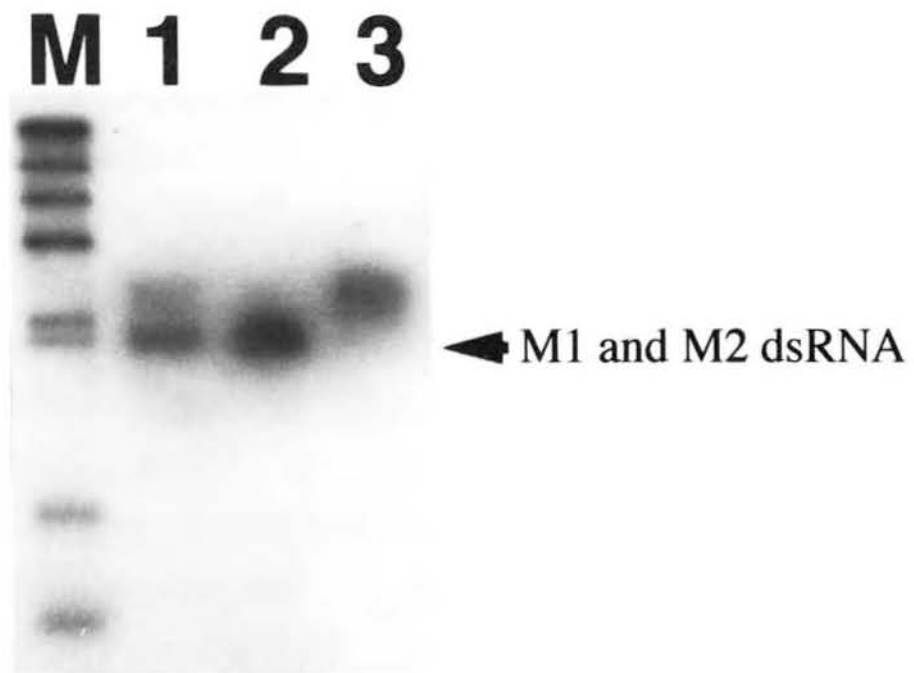


Fig. 3-1. Detection of *in vitro* replication products from FusoV particle. Newly synthesized RNA species that incorporated [α - 32 P] UTP as a substrate were detected by autoradiography. The position of the purified M1 and M2 dsRNAs was indicated by an arrow. lane 1, *in vitro* replication products; lane 2, supernatant fraction after LiCl precipitation; lane 3, pellet fraction after LiCl precipitation, lane M; 32 P-labelled λ HindIII size marker.

この ssRNA が positive strand 由来であるのか、negative strand 由来であるのかについて分析する目的で、ssRNA *in vitro* replication 産物をプローブに用いたドットプロットハイブリダイゼーション分析を行った。この結果、M1、M2 dsRNA の negative strand にあたる pFV201 と pFV401 の ssDNA とのハイブリダイゼーションが確認された (Fig. 3-2)。この結果は *in vitro* replication 実験で合成される ssRNA が positive strand であることを示している。つまり、dsRNA を鋳型とする positive strand RNA の合成である転写 (transcription) と新たに positive strand RNA を鋳型とする dsRNA の合成である複製 (replication) が行われた事を示している。*in vitro* replication 反応で合成される産物を 5 分間ごとに経時的に観察した結果、反応初期に ssRNA が合成され、次いで dsRNA が蓄積してゆくパターンが観察された (Fig. 3-3)。

pFV101 pFV201 pFV301 pFV401



Fig. 3-2. Dot blot hybridization analysis using LiCl-precipitated fraction of ssRNA species from *in vitro* replication products as a probe. Hybridization membrane was blotted with ssDNAs corresponding to either strand of M1 and M2 cDNAs. The probe used in this hybridization was ssRNA species of *in vitro* replication products. pFV101, (+) strand of M1 cDNA; pFV201, (-) strand of M1 cDNA; pFV301, (+) strand of M2 cDNA; pFV401, (-) strand of M2 cDNA.

FusoVでは最初に positive strand RNA が転写され、次いでdsRNAへの複製が行われるパターンが見られた。dsRNAウイルスでは、2通りの複製機構が報告されており、その違いは positive strand RNA の合成過程にある (Bamford and Wickner 1994)。半保存的複製 (semiconservative replication) は、新たに合成された positive strand RNA が鋳型に用いた dsRNA中の positive strand RNA と置換され、鋳型dsRNA由来の positive strand RNA がウイルス粒子外に放出される。一方、保存的複製 (conservative replication) では新たに合成された positive strand RNA が鋳型dsRNAの positive strand RNA と置換されることはなく、そのままウイルス粒子外に放出される。*Penicillium* や *Aspergillus* のマイコウイルス、bacteriophage $\phi 6$ などでは半保存的複製を行い、*S. cerevisiae* の L-A virus や哺乳類の reovirus、rotavirus は保存的複製を行う (Gottlieb et al. 1990; Wickner 1993)。*in vitro* replication でのFusoV粒子によるRNAの合成パターンでは、最初にssRNAである positive strand RNA が検出される。つまり、FusoVのdsRNA複製では、最初に合成される positive strand RNA がssRNAとして存在している事を示している。これは、FusoVが保存的複製によってdsRNAを維持していることを示していると考えられる。もし、FusoVが半保存的複製をするならば、最初に合成される positive strand RNA が鋳型のdsRNA中の negative strand RNA と相補対を形成するので、反応初期の放射活性を持つ *in vitro* replication 産物はdsRNAとなるはずである。

M 5 10 15 20 25

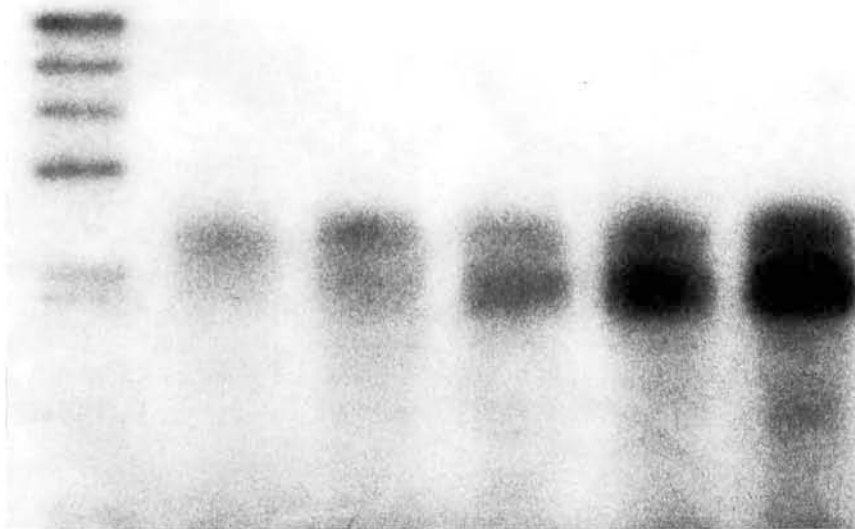


Fig. 3-3. Time-course analysis of *in vitro* replication products. RNA species, synthesized in *in vitro* replication reaction for various times, were extracted and then detected by autoradiography. The faster migrating band was dsRNA species (M1 and M2) and the slower migrating band was ssRNA species (M1 and M2 positive strand). The lane number means reaction time (min). lane M was a ^{32}P -labelled λ HindIII size marker.

in vitro の系ではあるがFusoVの転写産物として positive strand RNA が保存的複製機構で合成されることが示された。そこで *in vivo* でのFusoV転写産物について、ノーザンハイブリダイゼーションによる分析を試みた。通常の手法である変性ゲルを用いた実験では、positive strand 特異的、negative strand 特異的 probe を用いても得られるシグナルの強度に大きな差はなかった(データ示さず)。この結果は、*F. solani* SUF704 から抽出した全RNAに混入しているdsRNAが変性しナイロンメンブレンにトランスファーされたために、dsRNAに由来するハイブリダイゼーションシグナルも検出されたと考えられた。そこで、非変性条件でRNAを電気泳動しプロットしたメンブレンを用いて、strand 特異的プローブとハイブリダイゼーションさせることでFusoVのdsRNAゲノムに関連するssRNAのみを検出した。精製M1、M2 dsRNAをプロットしたレーンではどのプローブを用いた場

合でもハイブリダイゼーションシグナルを検出できなかったが、SUF704株から抽出した全RNAに対してはpFV201とpFV401のssDNAから調製した negative strand 特異的に検出するプローブを用いた場合のみハイブリダイゼーションシグナルが得られた (Fig. 3-5)。 *in vitro* では、FusoV粒子は positive strand RNA を合成するが、ハイブリダイゼーションシグナルが確認されたのは、M1、M2共に negative strand を特異的に検出するプローブを用いた場合のみであった。

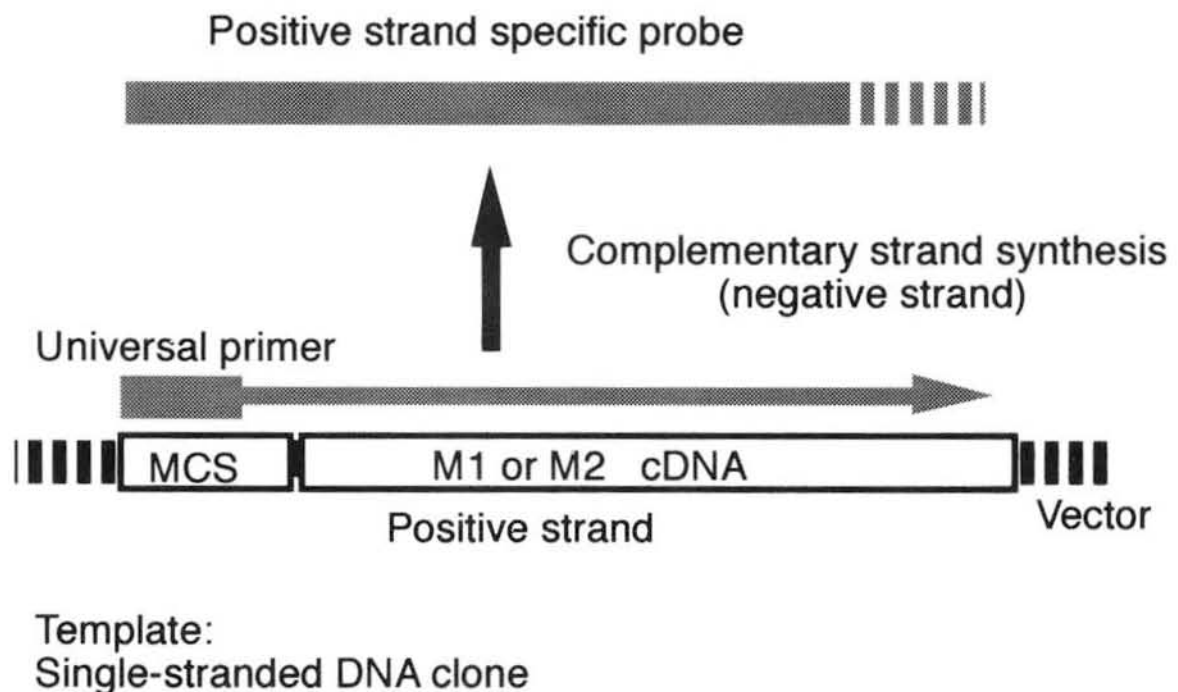


Fig. 3-4. Synthesis of strand specific probe. The probe was synthesized using ssDNA template (positive or negative strand cDNA). The primer used was universal primer (M13 primer P7: Toyobo) or randomhexamer. The resulting probe will detect either of M1 or M2 specifically.

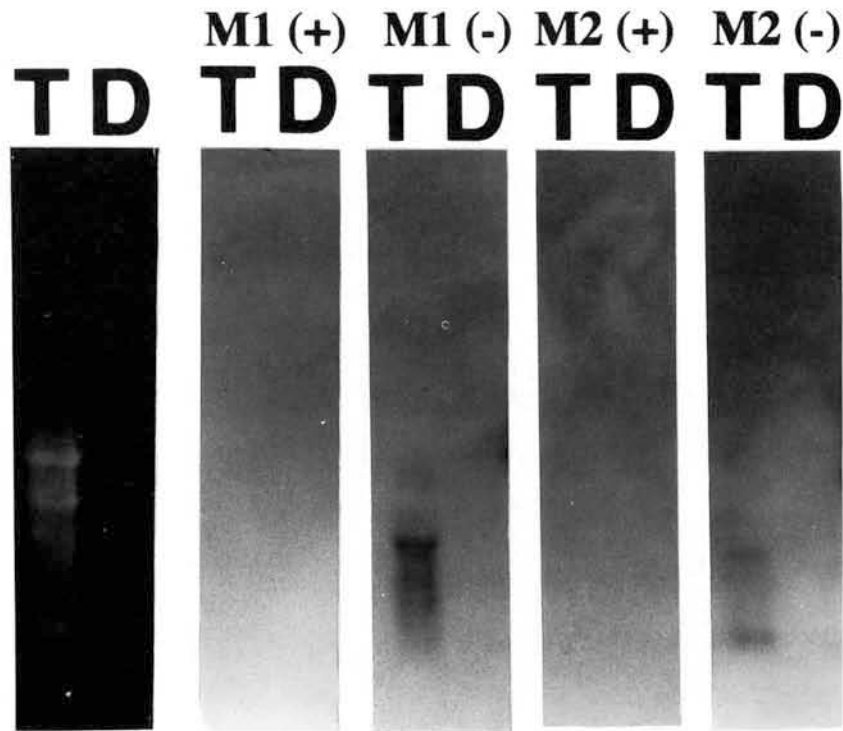


Fig. 3-5. Northern hybridization analysis of FusoV related ssRNA species in host cell. Strand specific probes were used as a probe. Total RNAs and purified M1 and M2 dsRNAs were fractionated through native agarose gel (1.0%) and blotted on the nylon membrane (GeneScreenPlus). The probes used for hybridization were indicated on the top of each autoradiograph. (+) and (-) means positive and negative strand specific probe, respectively. lane T, total RNAs extracted from *F. solani* SUF704; lane D, purified dsRNA (M1 and M2).

この結果は、*in vivo* では M1、M2 の negative strand RNA が蓄積している事を示している。通常dsRNAウイルスの複製では、細胞質中に、negative strand や dsRNA は存在しないとされているので (Koonin 1992)、この *in vivo* でのnegative strand の蓄積は、FusoVに特異的な現象であると考えられる。さらに、このssRNAを特異的に検出できるハイブリダイゼーション法を利用して、*F. solani* SUF704株中に、ssRNAを持つウイルス粒子が存在するかどうかについて検討した。この結果、塩化セシウム密度勾配遠心分離で得られた各分画の内、positive strand 特異的プローブでハイブリダイゼーションシグナルが得られたのは、臭化エチジウム染色で観察されるdsRNAのピーク分画よりも、浮遊密度が低い分画においてであり、negative strand 特異的プローブを用いた場合も、浮遊密度の低い分画で

観察された (Fig. 3-6)。

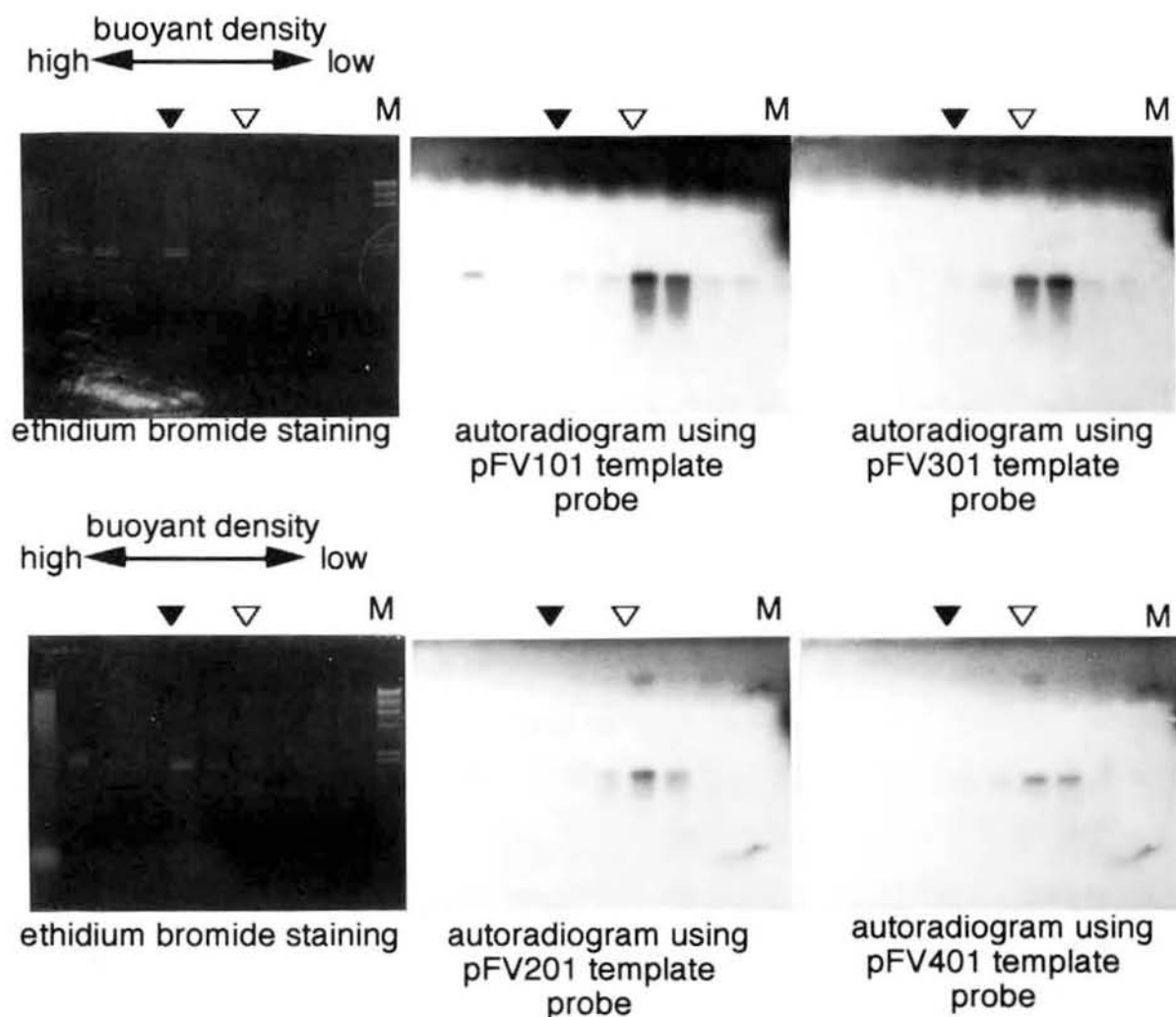


Fig. 3-6. Northern hybridization analysis of FusoV related ssRNA species in CsCl buoyant density gradient fractions. Template plasmids used for strand specific probe synthesis were indicated under the autoradiogram. Total RNAs were extracted from CsCl gradients, fractionated through native agarose gel (1.0%) and blotted on the nylon membrane (GeneScreenPlus), which was a condition that eliminated hybridization signals derived from dsRNAs. Lane M, λ HindIII size marker; ▼, dsRNA peak fraction; ▽, ssRNA peak fraction.

浮遊密度の一番高い、遠心チューブの底に相当する分画についても、ハイブリダイゼーションシグナルが見られるが、これはウイルス粒子にコートされていないssRNAが検出されたと考えられる。bacteriophage $\phi 6$ と *S. cerevisiae* の L-A virus の研究から、BamfordとWicknerはdsRNAウイルスの複製過程を、ウイルス粒子からの positive strand RNA の放出、この positive strand RNA からのウイルスタンパク質の翻訳、新たに作られたウイルスタンパク質と positive strand による新たなウイルス粒子のパッケージング、ウイルス粒子内での positive strand RNA を鋳型とする negative strand RNA の合成によるdsRNAゲノムの完成と考えている (Bamford and Wickner 1994)。この様にdsRNAウイルスの複製の過程ではssRNA (通常 positive strand) を有するウイルス粒子が生じる。このウイルス粒子はdsRNAを有する成熟ウイルス粒子に比較して浮遊密度が低くなる (Lemke 1976; Fujimura et al. 1986)。以上から、FusoVは宿主菌内でdsRNAの複製過程から推定される positive strand RNA を含むウイルス粒子と共に、今までに報告のない negative strand RNA を持つウイルス粒子が存在していると考えられた。

in vitro replication 実験の結果は、FusoV粒子から positive strand RNA が合成されていることを示していたが (Fig. 3-1, 2, 4)、宿主菌の細胞に存在するssRNAとしては negative strand RNA が検出された (Fig. 3-5)。この negative strand RNA は、M1 positive strand から翻訳されたRNA依存性RNAポリメラーゼによって、宿主菌の細胞質において positive strand RNA からdsRNAを経由して合成されたと推定される。同様に、宿主菌細胞質中でdsRNAを鋳型として positive strand RNA の合成も起こっていると考えられるが、Fig. 3-5の実験に用いたSUF704株の total RNA 抽出過程で、もともとssRNAとして存在していた positive strand RNA と negative strand RNA が、dsRNAにアニーリングした結果、positive strand RNA に比較して多量に存在していた negative strand RNA が strand 特異的プローブを用いたハイブリダイゼーションによって検出されたと考えられた。また、positive strand RNA を持つウイルス粒子と共に negative strand RNA を持つウイルス粒子が検出された (Fig. 3-6)。これは、宿主菌の細胞内で positive strand RNA 以外に negative strand RNA が存在し、これらのssRNAが新たに作られるウイルス粒子にパッケージングされることを示していると考えられる。

れ、ウイルス粒子内で negative strand を合成しdsRNAを有する成熟ウイルス粒子になる。一方、宿主細胞で合成されたRNA依存性RNAポリメラーゼが細胞質中で機能し、positive strand RNAからdsRNAを合成し、このdsRNAを鋳型に positive strand RNA、negative strand RNA が各々合成される。合成された両ssRNAは、新たなウイルス粒子としてパッケージングされるが、positive strand RNA を持つウイルス粒子は通常のFusoV複製サイクルに組み込まれる。一方、negative strand RNA を有するウイルス粒子において粒子内でのnegative strand RNA を鋳型とする positive strand RNA の合成が機能しないならば、宿主菌の細胞中に negative strand RNA を持つウイルス粒子が蓄積していくことになる。このモデルを検証してゆくためには、感染性cDNA系の構築や *in vitro* での精製FusoV RNA依存性RNAポリメラーゼを用いたpositive strand RNA、negative strand RNA、dsRNA の各基質を鋳型に用いた場合のRNA合成パターンなどを詳細に研究してゆく必要があると思われる。また、FusoVでは保存的複製によりdsRNAが複製されていると考えられたが、*Partitiviridae*科で半保存的複製を行うとされるウイルスもあり、これらのウイルスが有するRNA依存性RNAポリメラーゼがFusoVのそれとどの程度異なるのかは興味深い問題であり、他の*Partitiviridae*科ウイルスの塩基配列が明らかにされることが待たれる。

第4章

*Fusarium*菌及び*Acinetobacter*属細菌の生産するキトサナーゼについて

緒言

キトサンはキチンの脱アセチル化によって得られる多糖で、自然界では菌類の細胞壁に見られるなど分布が限られている (Bartnicki-Garcia 1968)。工業的にキトサンは、カニやエビの甲羅から得られるキチンの化学的な脱アセチル化によって得られている。キトサンの分解によって生じるキトサンオリゴマーは菌類や細菌の増殖阻害作用や (Allan and Hadwiger 1979; Hirano and Nagao 1989)、高等植物でのファイトアレキシン生産に対するエリシター活性 (Hadwiger et al. 1980; Kendra et al. 1989) を持つことで注目されている。キトサンオリゴマーの生産に利用が可能と思われるキトサン分解酵素は細菌 (Boucher et al. 1992; Hedges and Wolfe 1974; Pelletier and Sygusch 1990; Price and Storck 1975; Sakai et al. 1991; Seino et al. 1991; Tominaga and Tsujisaka 1975; Yamasaki et al. 1992; Yoshihara et al. 1992) や菌類 (Alfonso et al. 1992; Fenton and Eveleigh 1981; Somashekar and Joseph 1992) を含む多くの微生物で見いだされている。微生物のキトサナーゼの多くは、基質キトサンをエンド型に加水分解する事が明らかにされている。また、これらの酵素は基質キトサンの脱アセチル化度によって活性が異なり、また培地中にキトサンを添加する事によって誘導的に生産されることが報告されている。

*Fusarium*菌には、多くの植物病原菌が含まれており、細胞壁構成成分としてキトサンが含まれている (Hadwiger and Beckman 1980)。 *F. solani* f. sp. *phaseoli* とエンドウのさや組織の相互作用において、菌の細胞壁からキトサンオリゴマーが放出され、これがファイトアレキシン (pisatin) 生産のエリシターとしてはたらくことが報告されている (Kendra et al. 1989)。このファイトアレキシンは菌の生長阻害剤であり、菌の感染から植物組織を保護するはたらきがある。Kendraらは、エンドウの組織から得られたキトサン分解酵素が菌の細胞壁を分解し、キトサンオリゴマーを放出させる可能性を報告している。しかし、*Fusarium*菌自身がキトサン分解酵素を持っているかどうかについて検討した報告はない。*Fusarium*菌のキトサナーゼは自己の細胞壁の代謝においても、また宿主植物への感染においても重要な役割を果たす可能性がある。

糸状菌の細胞壁には一般的にキチンが含まれている。植物は糸状菌による感染に際し抗

菌物質の一つとしてキチナーゼを生産し病原菌の生長を阻害する。また、同じようにキチナーゼ生産菌も糸状菌の生長を阻害する。同様な観点から、*Fusarium*菌の細胞壁にはキトサンが含まれるので、キトサナーゼによる細胞壁の分解によって*Fusarium*菌の生長を抑制できると考えられる。以上の点からキトサナーゼ生産菌は*Fusarium*菌が引き起こす植物病に対するバイオリジカルコントロールに応用できる可能性がある。

以上から、*Fusarium*菌保存株、及びキトサンを単一炭素源として成長する様々なタイプの微生物からキトサン分解活性をもつ菌をスクリーニングした。この結果、高いキトサン分解活性を有する *F. solani* f. sp. *phaseoli* SUF386株と、*Acinetobacter* sp. CHB101株を選択し、それぞれの培養上清からキトサナーゼを精製し、その性質を分析した。

第1節 *Fusarium*菌の生産するキトサナーゼ

1： 実験の目的

*Fusarium*菌自身のキトサナーゼが、自己の細胞壁の代謝や、宿主植物にエリシターとして作用するキトサンの遊離に関わると考えられる。*Fusarium*保存菌からキトサン分解活性をもつ菌をスクリーニングし、そのキトサナーゼを精製することを目的とした。

2： 実験方法

2-1：実験に使用した菌及び培養条件

本研究に用いた*Fusarium*菌は、本学に保存されている*Fusarium*菌カルチャーコレクション (Okazaki and Saito 1987) から得た。キトサン分解活性のスクリーニングには0.25%のキトサン [脱アセチル化度 70% (deacetylation degree: D. D.)]を単一炭素源に含む Czapek-Dox寒天培地の中央部に菌糸片を植え30℃で培養した。

2-2：キトサナーゼ活性測定

キトサナーゼ活性は、キトサンの加水分解によって遊離する還元糖量を、 $\text{Fe}(\text{CN})_6^{3-}$ から $\text{Fe}(\text{CN})_6^{4-}$ への還元に伴い、赤色カリ $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ の黄色い呈色が無色になるのを利用したSchale法 (Imoto and Yagishita 1971) によって測定した。0.5%のキトサン (D. D. 70%)を含む50 mM 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH5.6) 2 mlに1 mlの酵素溶液を添加し、37℃で15

～30分間反応させた。酵素反応を100℃、3分間の煮沸で停止し、2.7 mlのSchale試薬 (0.5g $K_3[Fe(CN)_6]$ par 1 liter of 0.5 M Na_2CO_3) を添加し、100℃で15分間反応させた。室温まで試料を冷却し、OD₄₂₀を測定した。対照として、酵素溶液の代わりに25 mM 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 5.6) を用いて、0.5% キトサン溶液に元々存在する還元糖量を測定した。酵素反応に由来する ΔOD_{420} 値をグルコサミンを用いて作成した検量線と比較する事で還元糖量を定量した。キトサナーゼ活性は1分間に1 μ molの還元糖を遊離する酵素量を1 U (unit) と定義した。粘度低下によるキトサナーゼ活性測定は以下の方法で行った (Ohtakara 1988)。0.1% キトサン (D. D. 70%) を含む50 mM 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 5.6) 3.5 mlと酵素溶液3.5 ml (必要な場合は50 mM 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 5.6) で希釈した酵素溶液) を混合後、粘度計 (Shibata製 1号) に注入し、30℃で反応させ継続的に溶液が所定の距離を流下するのに要する時間を測定した。比粘度 (specific viscosity) は (サンプルの流下速度 / 蒸留水の流下速度 - 1) と定義した。

2-3：キトサナーゼ生産条件の検討

F. solani SUF386株のキトサナーゼ生産条件を検討するため、2% のグルコースを炭素源に含むCzapek-Dox液体培地で対数増殖後期まで培養したマット状の菌糸体をホモゲナイザー (日本精機) を用いて、最大速度で15秒間の条件で菌糸片に分解した。分解した菌糸片を遠心分離 (10,000 x g, 10分間, 室温) によって沈殿として回収し、滅菌蒸留水を用いて3回洗浄した。50 mlの滅菌蒸留水に懸濁した菌糸片から5 mlを各種炭素源を含むCzapek-Dox液体培地45 mlに植菌した。各培地に植菌後、26℃で7日間振盪培養 (116 rpm) した。培養後、菌糸を濾過によって回収し、80℃で3時間乾燥させて重量を測定した。また、培養上清は20 mMの酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 5.6) で透析後、還元糖定量法によってキトサナーゼ活性を測定した。

2-4：キトサナーゼの精製

全ての精製段階は4℃で行った。*F. solani* f. sp. *phaseoli* SUF386 からキトサナーゼを精製するために、PDA培地 (直径 9 cm) に展開したコロニーから滅菌水で洗い出した孢子懸濁液を1000 mlのCYPC液体培地に植菌し、27℃で5日間振盪培養 (90 rpm) した。4 literの培養上清に対して80% 飽和の硫酸分画を行い、4℃で一晩放置しタンパク質を沈殿

させた。タンパク質沈殿を遠心分離 (4000 x g, 10 分間、4℃) によって回収し、40 ml の 25 mM 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 5.6) に溶解し、同緩衝液で平衡化した Sephadex G-25 カラムを通すことで脱塩した。次いで試料を 20 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 7.0) で平衡化したヒドロキシアパタイトカラム ($\phi 2.1 \times 23$ cm) にチャージし、同緩衝液で十分に洗浄後 (カラム体積の2倍)、20~500 mM の濃度勾配のリン酸カリウム緩衝液 (pH 7.0) で溶出させた。この際の流速は 22 ml/h で 1 分画を 3 ml とした。キトサナーゼ活性分画をプールし、Sephadex G-25 カラムを通すことで脱塩した。次いで 20 mM 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 4.5) で平衡化した CM-Sephadex CL-6B カラム ($\phi 2.1 \times 17$ cm) に試料をチャージし、同緩衝液で洗浄後、0~1 M の KCl の濃度勾配を付けた 20 mM 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 4.5) で溶出した。この際の流速は 22 ml/h で 1 分画を 3 ml とした。キトサナーゼ活性分画を 25 mM 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 5.6) で平衡化した Sephadex G-100 カラム ($\phi 2.0 \times 55$ cm) にチャージし、同緩衝液でタンパク質を溶出したこの際の流速は 29 ml/h で、1 分画あたり 1.7 ml とした。Sephadex G-100 ゲル濾過によって得られたキトサナーゼ活性分画を、精製酵素とした。

2-5：アクリルアミドゲル電気泳動による分析

精製タンパク質は、10% ゲルを用いた SDS-PAGE (Leammler 1970)、及び 10% ゲルを用いた native-PAGE (Reisfeld et al. 1962) による分析を行った。電気泳動後ゲルをクマシーブルー染色することによってタンパク質のバンドを検出した。

2-6：タンパク質定量法

各分画のタンパク質量は、ローリー法 (Lowry et al. 1951) によって定量した。この際、ウシ血清アルブミンを標準タンパク質に用いた。

2-7：薄層クロマトグラフィーによるキトサナーゼ分解産物の同定

キトサナーゼによる加水分解産物を薄層クロマトグラフィーによって分析した (Sakai et al. 1991)。反応液 (100 μ l) は、50 mM 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 5.6) に基質として 1.0 μ mol の 2 量体から 5 量体のキトサンオリゴマーまたは 250 μ g のキトサン (D. D. 100%)

を含み、精製キトサナーゼ (5 mU) を添加し、37℃で一晩反応させた。100℃、3 分間の熱処理で酵素反応を停止し、薄層プレート (HPTLC Aluminium Seets Silica Gel 60 F₂₅₄ : Merck) にスポットし、展開溶媒にn-プロパノール/水/酢酸エチル/30% アンモニウム (6:3:1:1) (V:V:V:V) を用いた薄層クロマトグラフィーを行った。プレートを風乾後、生成したアミノ糖をニンヒドリン発色によって検出した。

3 : 結果及び考察

キトサン分解活性を有する *Fusarium* 菌のスクリーニング

本学に保存されている162 株の *Fusarium* 菌を用いてキトサン分解菌のスクリーニングを行った結果、22 株の *Fusarium* 菌においてコロニーの周囲に培地中のキトサンの濁りが分解されることによって生じる透明域 (ハロー) が観察された (Table 4-1)。22 株のハローを形成した *Fusarium* 菌は、試験した9 種なかの4 種に含まれた。特に *F. splendens* と *F. solani* においてキトサン分解活性を有する株が高い頻度で観察された (Table 4-1)。 *F. solani* における種以下の分類として、病原性を示す宿主植物の違いを基とした分化型 (forma specialis) が提唱されている。 *F. solani* でハローを形成した株は試験した9 分化型全てにわたり、分化型とキトサン分解活性の分布に相関関係は見出せなかった。試験した22 株中ハローの直径と菌のコロニーの直径の比が1.3 と最大であった、インゲン根腐病菌 *F. solani* f. sp. *phaseoli* SUF386 株 (= *Hypomyces solani* f. sp. *phaseoli* IFO9974) を以降の研究に用いた。このSUF386 株と同一分化型の他の株では、エンドウのサヤ組織においてファイトアレキシシン (pisatin) 合成を誘導する。この pisatin の誘導因子として菌の細胞壁から遊離するキトサンが考えられている (Kendra et al. 1989)。このスクリーニングの過程を通して、試験した全ての株は2% グルコースと0.25% キトサン (D. D. 70%) の両者を含む Czapek-Dox 寒天培地上でのコロニーが、2% グルコースを含む Czapek-Dox 寒天培地上でのコロニーに比較して小さく、気中菌糸が少ないコロニー形態となった。この事は、キトサンにより生長阻害が起こることを示しており、広い種類の *Fusarium* 菌に対してキトサンが生長抑制剤として効果があることを示している。

Table 4-1. Halo formation test of *Fusarium* strains on chitosan containing agar medium

Species	Number of strains	
	Tested	Halo formation
<i>episphaeria</i>	5	0
<i>lateritum</i>	7	0
<i>moniliiforme</i>	7	0
<i>nivale</i>	4	1
<i>oxysporum</i>	88	2
<i>roseum</i>	6	0
<i>solani</i>	44	16
<i>splendens</i>	3	3
<i>tricinetum</i>	4	0

キトサナーゼ生産条件の検討

キトサナーゼの生産が炭素源に依存するのかを検討するために、*F. solani* SUF386株を Czapek-Dox液体培地に様々な炭素源を添加した培地を用いて培養して得られた培養上清中のキトサナーゼ活性を還元糖定量法で測定した (Table 4-2)。*F. solani* SUF386株は2% N-アセチルグルコサミンを単一炭素源に用いた培地で、培養液単位体積当たりのキトサナーゼ活性が最大となり (2.8 mU/ml)、2% グルコースを炭素源に用いた場合 (0.58 mU/ml) の約4倍となった。グルコサミンを炭素源に用いた場合、菌糸の伸長は観察されるが、キトサナーゼ活性は検出されなかった。キトサナーゼの生産性を評価するために、菌糸量 (乾燥重量) 当たりのキトサナーゼ活性を比較した。この結果、N-アセチルグルコサミンを単一炭素源に用いた培養での生産性が、2% グルコースを炭素源に用いた場合の8倍となった。この結果は、N-アセチルグルコサミンにキトサナーゼ生産を増大させる効果があることを示唆した (Table 4-2)。興味深いことに、*F. solani* SUF386株は、キトサナーゼの基質となるキトサン (D. D. 70%) が単一炭素源として0.25% 含まれている液体培地では全く増殖できなかった。2% グルコースと0.25% キトサンの両者を炭素源に含む液体培地においても増殖しないことから、この増殖の抑制は *F. solani* SUF386株が単にキトサンを炭素源として利用できないことによるのではなく、キトサンによって引き起こされる増殖阻害が原因であることが示された。一般的なキトサナーゼ生産微生物では、キト

サンを培地に添加することで誘導的にキトサナーゼが生産される (Pelletier and Sygusch 1990; Fenton and Eveleigh 1981)。

Table 4-2. Effects of carbon source on chitosanase production by *Fusarium solani* SUF386

Medium	Carbon source	Mycelium dry weight (g)	activity (mU/ml)	Activity per cell mass (U/g-cell)
CD ^a	Glc (2%)	0.146	0.58	0.20
CD	GlcNAc (2%)	0.081	2.8	1.7
CD	GlcN (2%)	0.052	ND ^f	-----
CD	Chitosan 70H (0.25%)	nil ^e	ND	-----
CD	Glc (2%) + chitosan 70H (0.25%)	nil	ND	-----
CD+Y ^b	Glc (2%)	0.350	2.2	0.31
CD+C ^c	Glc (2%)	0.178	2.4	0.67
CD+P ^d	Glc (2%)	0.256	1.6	0.31
CD+YCP	Glc (2%)	0.471	9.9	1.1

Cell were grown in 50 ml of medium at 26°C for 7 d on a rotary shaker (116 rpm). Initial inoculum corresponded to 0.005-0.01g (dry weight) cell per flask. Values represent the average from three samples measured in three independent experiments.

^a Czapek-Dox medium without carbon source

^b Yeast extract (0.1%)

^c Casamino acids (0.1%)

^d Peptone (0.1%)

^e Little growth (<0.02 g)

^f Not detected (<0.2 mU/ml)

F. solani SUF386株でのキトサナーゼの生産は、キトサンを含む培地では著しく菌の生長が阻害されたため評価できないが、キトサンを構成する単糖であるグルコサミンでは増殖はするものの活性は見られなかった。また、0.25% キトサン (D. D. 70%) と2% グルコースの両者を含む Czapek-Dox 寒天培地においてハローを伴ったコロニーを形成すること (Fig. 4-1)、2% グルコースを炭素源に含む液体培養においてキトサナーゼを生産すること

から、*F. solani* SUF386株のキトサナーゼ生産はキトサンによる誘導を必要とせず、また、グルコースによるカタボライトリプレッションを受けないと考えられた。酵母エキス、カザミノ酸、及びペプトンの培地への添加は、培地当たりのキトサナーゼ活性を3～4倍に、菌糸重量当たりでは1.5～3倍に増加させる効果があった (Table 4-2)。炭素源を2% グルコースとし、酵母エキス、カザミノ酸、ペプトンを同時に培地に添加した場合、培地当たりのキトサナーゼ活性が9.9 mU/mlとなり、試験した条件内で最大となった。そこでこの培養条件で得られた培養上清からキトサナーゼの精製を行った。

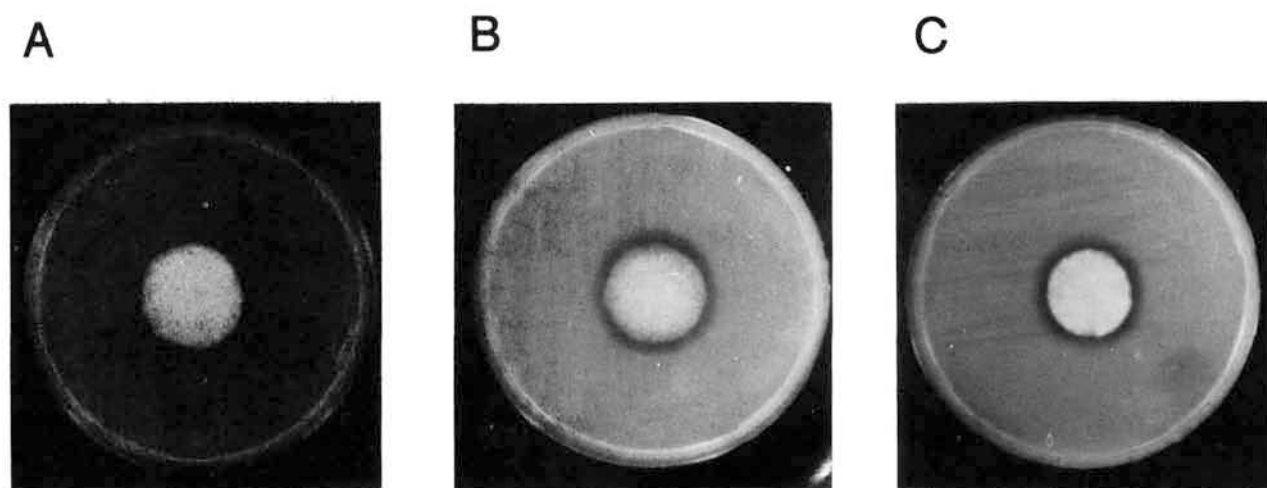


Fig. 4-1. Growth of *Fusarium solani* SUF386 on chitosan-containing agar medium. The plates were incubated at 26°C for 5 days after inoculated with mycelium plug from the colony grown on PD agar medium. The media used were Cazeq-Dox containing (A) 2% glucose, (B) 0.25% chitosan (D. D. 70%), (C) 2.0% glucose and 0.25% chitosan.

キトサナーゼの精製

F. solani SUF386株の生産するキトサナーゼを、SDS-PAGEで単一バンドとなるまで精製した (Fig. 4-2)。この精製は、ヒドロキシアパタイト、CM-Sepharose CL-6B、Sephadex-G100の3段階のカラムクロマトグラフィーで行い、10%の回収率で、36倍に精製された (Table 4-3)。全てのカラムクロマトグラフィーにおいて、キトサナーゼ活性は単一ピークとして溶出されたことは、*F. solai* SUF386株が1種類のキトサン分解活性を有するタン

パク質を分泌している事を示していた。精製酵素の分子量は SDS-PAGE により 36 kDa と推定された (Fig. 4-3)。Sephadex G-100 カラムクロマトグラフィーでの溶出位置から推定される intact なキトサナーゼタンパク質の分子量は、SDS-PAGE で求めた結果より小さくなった。これはキトサナーゼと Sephadex G-100 のゲルマトリックスの間に何らかの相互作用が起こったためであると考えられ、ゲル濾過による intact な酵素の分子量の推定は不可能であった。

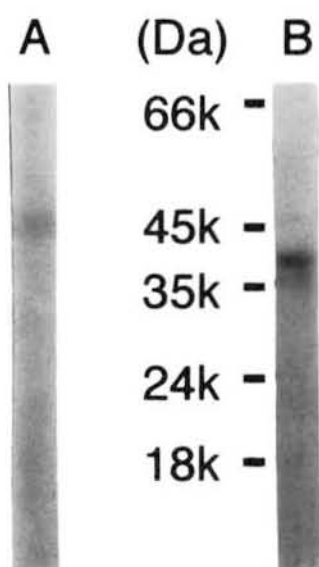
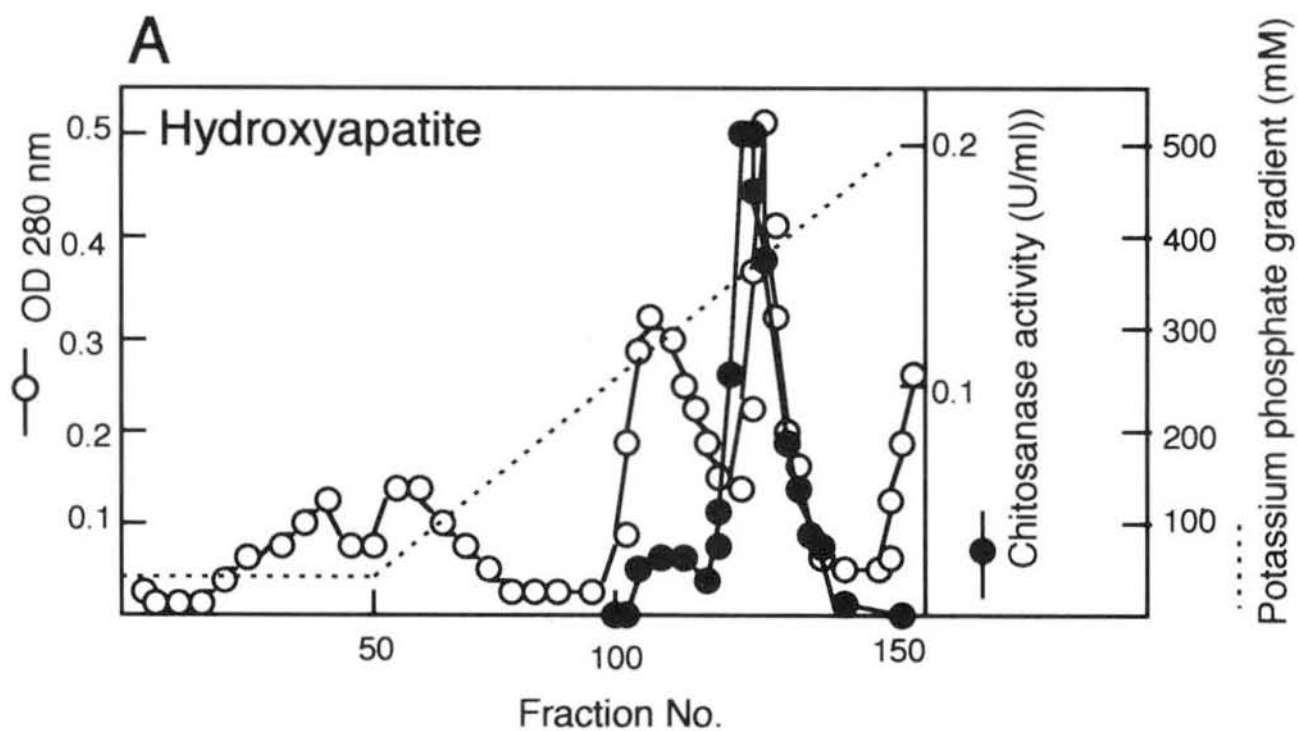


Fig. 4-2. Analysis of the purified *F. solani* chitosanase by native (A) and SDS (B) polyacrylamide gel electrophoresis. The purified enzyme was electrophoresed. Proteins were stained with Commassie brilliant blue. Molecular mass markers were bovine albumin (66,000 Da), egg albumin (45,000 Da), pepsin (34,700 Da), trypsinogen (24,000 Da), and β -lactoglobulin (18,400 Da).

Table 4-3. Purification of chitosanase from *F. solani* culture filtrate

Step	Volume (ml)	Total activity (U)	Total protein (mg)	Specific activity (U/mg)	Recovery (%)
0-80% (NH ₄) ₂ SO ₄	51	6.08	38.8	0.16	100
Hydroxyapatite	58	4.18	8.39	0.50	69
CM-Sephadrose CL-6B	21	2.77	0.44	6.4	46
Sephadex G-100	17	0.60	0.11	5.7	10



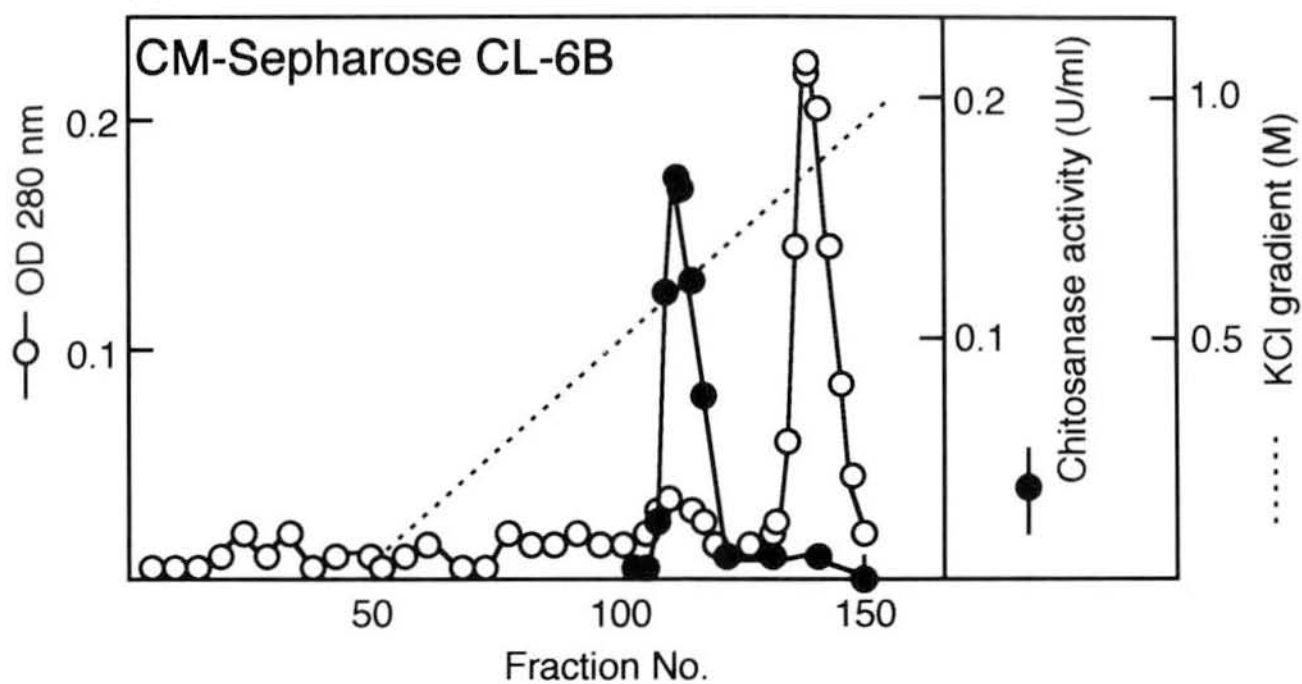
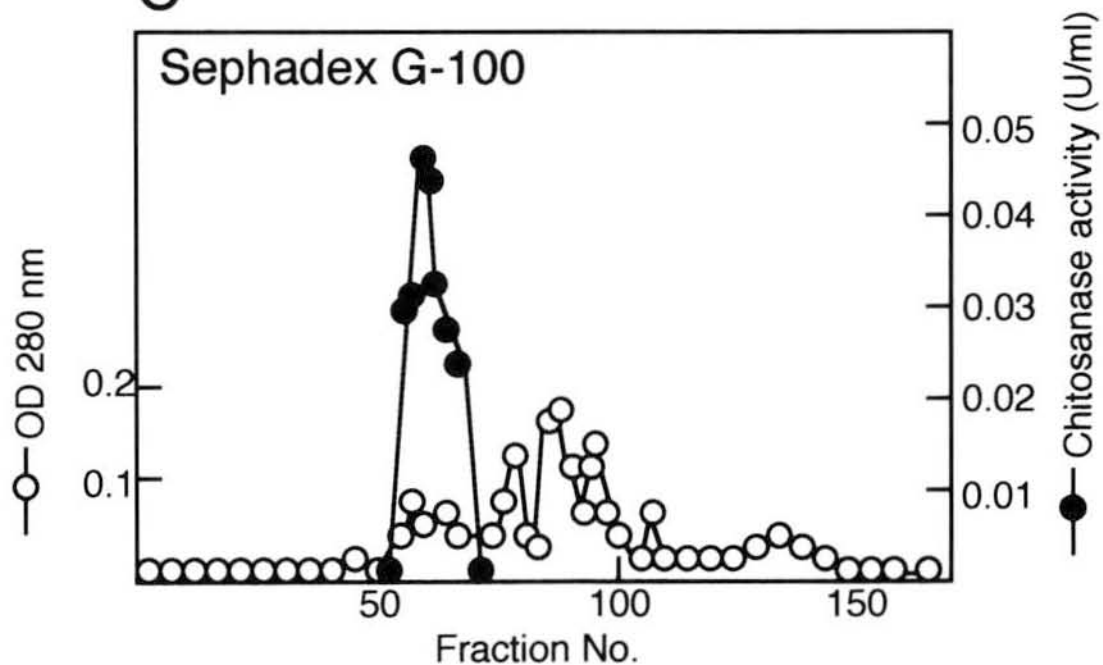
B**C**

Fig. 4-3. Purification of chitosanase from *F. solani* SUF386 (A) Hydroxyapatite chromatography. The crude enzyme after ammonium sulfate precipitation was desalted through the Sephadex G-25 step and was applied to the hydroxyapatite column. (B) CM-Sepharose CL-6B chromatography. The enzyme obtained at the Hydroxyapatite chromatography step was applied to the CM-Sepharose CL-6B column. (C) Sephadex G-100 chromatography. The enzyme obtained at the CM Sepharose CL-6B step was applied to the Sephadex G-100 column. Symbols: ○, protein (OD₂₈₀); ●, chitosanase activity.

キトサナーゼ精製酵素の諸性質

(i) キトサナーゼ活性に及ぼすpHと温度の影響

グリコールキトサンを基質として用いた場合、キトサナーゼ反応の最適 pH 及び最適温度はそれぞれ pH 5.6 と 40℃ であった (Fig. 4-4)。

(ii) キトサナーゼの基質特異性

精製キトサナーゼの種々の基質に対する活性をTable 4-4 に示した。本キトサナーゼはグリコールキトサン、キトサン (D.D. 70%) に対する活性が高く、キトサン (D. D. 100%) に対する活性はキトサン (D. D. 70%) での活性に比較して、約60% と低くなった。グリコールキチンやカルボキシメチルセルロース (CMC, carboxymethylcellulose) に対する活性は低く、グリコールキトサンでの活性と比較して10% 以下であった。

(iii) キトサナーゼによるキトサン溶液の粘度変化

本キトサナーゼは、キトサン溶液 (D. D. 70%) の粘度を反応開始直後から速やかに低下させた (Fig. 4-5)。

(iv) 反応生成物の分析

本キトサナーゼは、2 量体、3 量体、4 量体のキトサンオリゴマーを分解できず、5 量体キトサンオリゴマーを2 量体と3 量体の混合物に分解した (Fig. 4-6)。キトサン (D. D. 100%) を基質とした場合、本酵素は多量の3 量体と少量の2 量体、4 量体、5 量体の混合物を生成した。

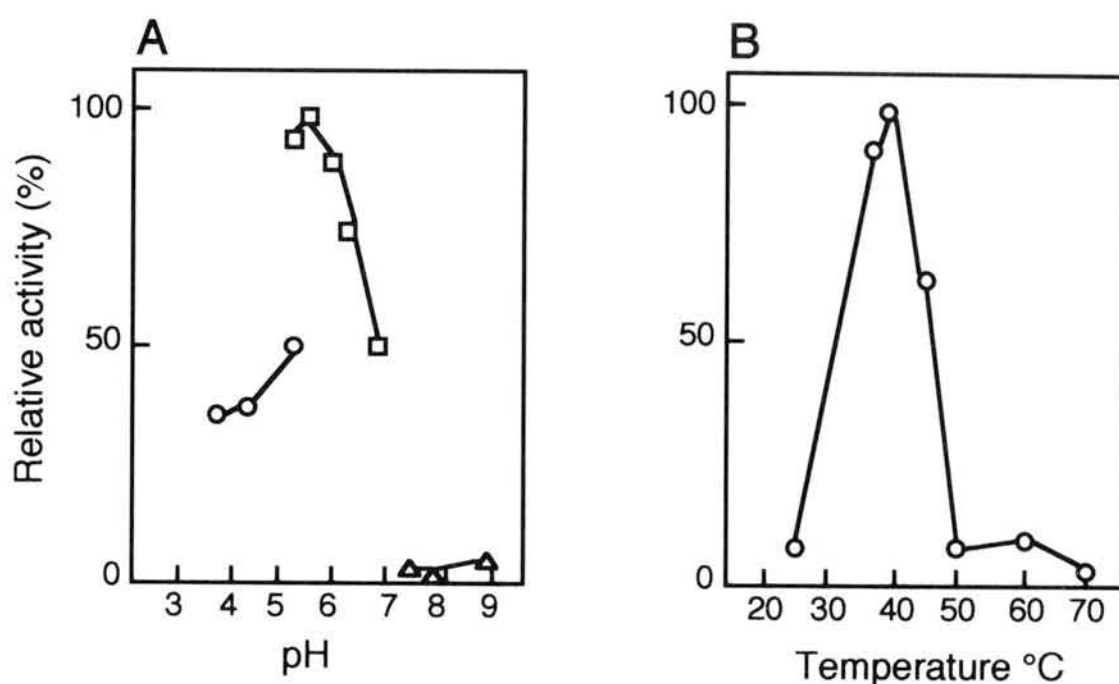


Fig. 4-4. Effects of pH (A) and temperature(B) on *F. solani* chitosanase. (A) Buffers: ○, 50 mM Sodium acetate buffer; □, sodium-potassium phosphate buffer; △, Tris-Cl buffer. (B) The reaction was done using 50 mM sodium potassium phosphate buffer (pH 5.6).

Table 4-4. Substrate specificity of *F. solani* chitosanase

Substrate ^a	Reducing sugar ^b (nmol)	Relative activity (%)
Glycol chitosan	56	100
Chitosan (70% deacetylated)	52	93
Chitosan (100% deacetylated)	32	57
Glycol chitin	5.3	9.4
Carboxymethyl cellulose	1.4	2.5

^a The reaction mixture contained 0.25% substrate except for glycol chitin and glycol chitosan (0.5% each).

^b The amount of reducing sugar liberated after a 30-min reaction with 3.7 mU of the purified chitosanase.

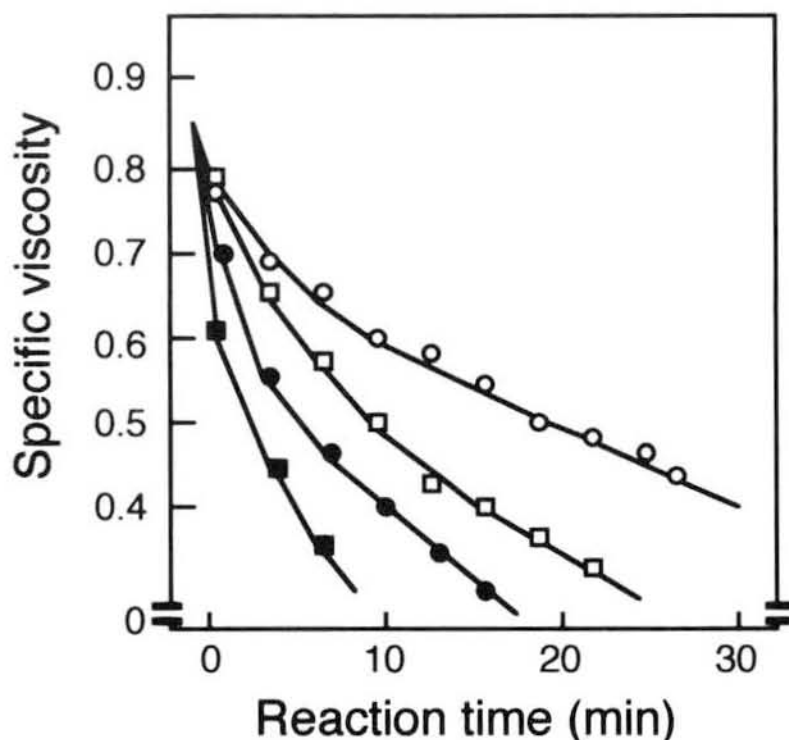


Fig. 4-5. Reduction in viscosity of chitosan solution by *F. solani* chitosanase. Reductions in viscosity were determined with an Ostwald viscometer. Specific viscosity was defined as follows: $[(\text{flow time of reaction mixture})/(\text{flow time of distilled water})-1]$. Different amounts of enzyme was used. The amount of the enzyme: ○, 0.8 mU; □, 1.2 mU; ●, 1.6 mU; ■, 2.4 mU.

キトサナーゼは、細菌 (Pelletier and Sygusch 1990; Hedges and Wolfe 1974; Tominaga and Tsujisaka 1975)、放線菌 (Sakai et al. 1991; Price and Storck 1975)、菌類 (Fenton and Eveleigh 1981) から精製されている。Myxobacter sp. のキトサナーゼは、キトサンのみならずCMCに対して分解活性を有していた (Hedges and Wolfe 1974)。*F. solani* SUF386株から精製されたキトサナーゼは他のキトサナーゼと同じくCMCに対してほとんど活性を示さなかった。キトサナーゼ活性は、基質として用いたキトサンの脱アセチル化度によって影響を受けることが知られている (Ohtakara et al. 1988)。*F. solani* SUF386株のキトサナーゼは、脱アセチル化度70%のキトサンに対する活性が、脱アセチル化度100%のキトサンに対する活性より高かったことから、キトサン分子中のグルコサミン-グルコサミン間の結合に比較して、N-アセチルグルコサミン-グルコサミン間の結合に対する分解能が

高いと考えられた。一方、キトサン溶液の粘度を速やかに低下させることから、本キトサナーゼはエンド型にキトサンを分解している事が示唆された。反応生成物の分析から、本キトサナーゼは5量体以上のキトサンオリゴマーをエンド型の様式でランダムに加水分解し、3量体以上のオリゴマーを主要な生成物とすると考えられた。

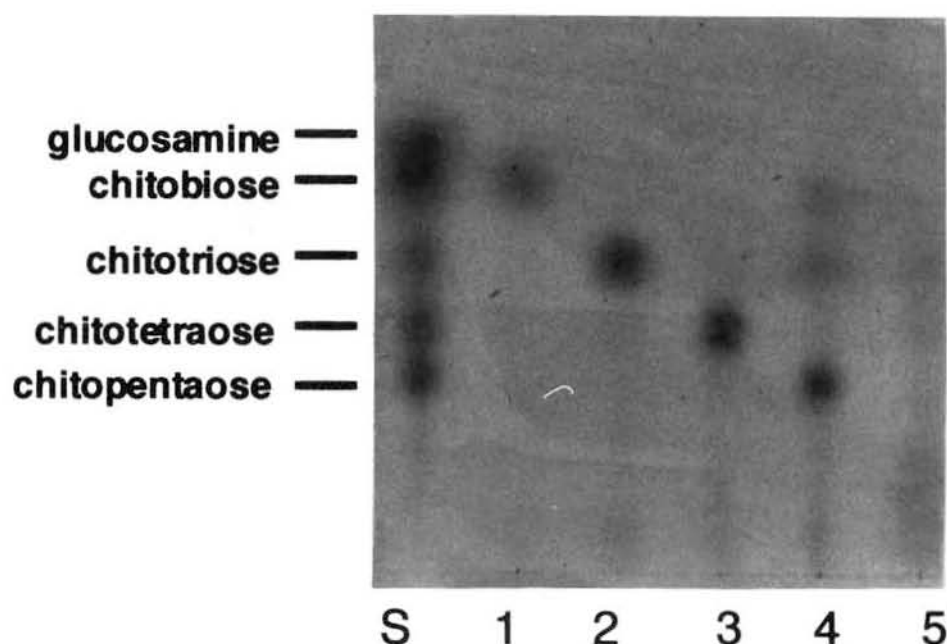


Fig. 4-6. Analysis of enzymatic hydrolysates by thin-layer chromatography. The substrates used were chitobiose (lane 1), chitotriose (lane 2), chitotetraose (lane 3), chitopentaose (lane 4) and chitosan (D. D. 100 %: lane 5). Lane S contained a mixture of chitoooligomers ranging from glucosamine to chitopentaose.

F. solani SUF386株におけるキトサナーゼ分泌生産の生理的意義は不明である。キトサナーゼの基質であるキトサンによって *F. solani* SUF386株の増殖が著しく阻害されることが、キトサンが自然界では菌の細胞壁などの極限られた分布で存在していることから、本キトサナーゼが *F. solani* SUF386株のキトサン資化に機能しているとは考えにくい。本キトサナーゼの役割として推測されるのが、加齢した菌糸の細胞壁を分解する自己溶解にはたらく可能性である。菌の生産するキトサナーゼが自己溶解にはたらく例は、*Mucor rouxi* において報告されている (Reyes et al. 1985)。 *F. solani* SUF386が宿主植物への感

染過程において、キトサナーゼを分泌するのかどうか、また、本キトサナーゼが自己の細胞壁を分解し、遊離するキトサンないしはキトサンオリゴマーがエリシターとして機能するのかどうかは今後の解明すべき課題である。

第2節 *Acinetobacter*属細菌の生産するキトサナーゼについて

1： 実験の目的

キトサナーゼ生産菌は、*Fusarium*菌の細胞壁を分解し成長を抑制することにより、*Fusarium*菌が引き起こす植物病の防除を目的としたバイオリジカルコントロールに用いることができる可能性がある。そこでキトサンを単一炭素源として成長する様々なタイプの微生物を土壌からスクリーニングし、そのキトサナーゼを精製することと*Fusarium*菌の増殖阻害効果の検定を目的とした。

2： 実験方法

2-1：実験に使用した菌及び培養条件

キトサナーゼ生産菌のスクリーニングには単一炭素源として0.25% キトサン (D. D. 70%) を含むM9培地 (Na_2HPO_4 0.6%, K_2HPO_4 0.3%, NH_4Cl 0.05%, NaCl 0.05%, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.025%; Sambrook et al. 1989) を用いた。長野県上田市内の各種土壌を脱イオン水に懸濁しその適当量を、50 ml のM9-キトサン液体培地に植菌し、25℃ で7日間振盪培養 (150 rpm) した。次いで、この培養液2 mlを再度 50 ml のM9-キトサン液体培地に植菌、同条件で7日間集積培養し、得られた培養液を適当に希釈しM9-キトサン寒天培地に塗り広げ30℃ で数日間培養し、培地中のキトサンによる濁りが分解されることによって生じるハローをコロニーの回りに形成する細菌を単離した。

2-2：キトサナーゼ生産細菌の分離同定試験

単離されたキトサン資化性細菌の分類学的位置付けを、属のレベルをめざして行った。分類に用いた各種試験は *Bergey's Manual of Systematic Bacteriology* (Krieg and Holt ed. 1984) に従った。

2-3：キトサナーゼ活性測定

前節・2-2の方法に従い、キトサンの加水分解によって遊離する還元糖量をSchale法 (Imoto and Yagishita 1971) で測定した、粘度低下によるキトサナーゼ活性測定はOhtakaraの方法に従い37℃の反応温度で行った (Ohtakara 1988)。

2-4：キトサナーゼの精製

全ての精製段階は4℃で行った。キトサン分解菌 *Acinetobacter* sp. CHB101株を、500 ml の0.2% グルコサミンを単一炭素源とするM9 液体培地に植菌し、25℃ で7日間培養した。500 ml の培養上清に対して80% 飽和の硫酸分画を行い、4℃ で一晩放置しタンパク質を沈殿させた。タンパク質沈殿を遠心分離 (4000 x g, 10 分間, 4℃) によって回収し、20 ml の20 mM 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 4.6) に溶解し、同緩衝液に対して透析する事で脱塩した。透析後、試料を20 mM 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 4.6) で平衡化したCM-Sephacrose CL-6B (φ2.1 x 25 cm) にチャージし、同緩衝液で十分に洗浄した。タンパク質は0~1 MのKClの濃度勾配を付けた20 mM 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 4.5) で溶出した。この際の流速は30 ml/hで1 分画あたり 3 mlとした。CM-Sephacrose CL-6Bイオン交換クロマトグラフィーによりキトサナーゼ活性は2つの独立したピークとして溶出した。2つのキトサナーゼ活性分画を各々集め、25 mM 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 5.6) で平衡化したSephadex G-100カラム (φ2.0 x 51 cm) にチャージし、同緩衝液でタンパク質を溶出した。その際の流速は14 ml/hで1 分画を 3 ml とした。Sephadex G-100ゲル濾過によって得られた各キトサナーゼ活性分画を、精製酵素とした。

2-5：アクリルアミドゲル電気泳動による分析

精製タンパク質は、10% ゲルを用いた SDS-PAGE (Leammli 1970) による分析を行った。電気泳動後ゲルをクマシーブルー染色することによってタンパク質のバンドを検出した。

2-6：タンパク質定量法

各分画のタンパク質量は、ブラッドフォード法 (Bradford et al. 1976) を用いた protein

assay kit (Bio-Rad) によって定量した。この際、ウシ血清アルブミンを標準タンパク質に用いた。

2-7：薄層クロマトグラフィーによるキトサナーゼ分解産物の同定

キトサナーゼによる加水分解産物を薄層クロマトグラフィーによって分析した (Sakai et al. 1991)。反応液 (50 μ l) は、50 mM 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 5.6) に基質として 0.5 μ mol の5量体のキトサンオリゴマーまたは125 μ g のキトサン (D. D. 100%) を含み、酵素としてキトサナーゼ I、II を各々 3 mU、または2 μ g の粗タンパク質に相当する培養上清を添加し37℃で一晩反応させた。100℃、3 分間の熱処理で酵素反応を停止し、前節・2-7の方法で薄層クロマトグラフィーを行った。

2-8： *Acinetobacter* sp. CHB101株の *Fusarium* 菌に対する増殖阻害作用とプロトプラスト化活性

CHB101株の *Fusarium* 菌に対する増殖阻害効果を見るために、PD寒天培地上で対峙培養を行った。PD寒天培地の中央に *Fusarium solani* f. sp. *robiniae* SUF704株を植菌し、SUF704株の両側に、*Acinetobacter* sp. CHB101株と *Acinetobacter calcoaceticus* ATCC23055 (type strain) を植菌し、30℃で3日間培養した。

CHB101株の培養上清中の *Fusarium* 菌に対するプロトプラスト化活性を検討するために、以下の実験を行った。PD寒天培地 (直径9 cm) で培養した *F. solani* f. sp. *robiniae* SUF704株から、培地一枚分のコロニーを滅菌蒸留水3 mlで洗浄する事で分生孢子懸濁液を得た。この分生孢子懸濁液を40 ml のCYPC液体培地に植菌し、25℃で一晩培養して得られた菌糸体を滅菌蒸留水で2回、更に1.2 M MgSO_4 , 10 mM NaPB (pH 5.6) で2回洗浄し2 mlの1.2 M MgSO_4 , 10 mM NaPB (pH 5.6) に懸濁した。2 mlの菌糸懸濁液に対して、CHB101株を0.2% グルコサミンを単一炭素源とするM9液体培地で培養し得られた培養上清の硫酸沈殿分画 (1.5 U/ml) を1 ml 加え、37℃で静置し1時間ごとに *Fusarium* 菌の菌糸形態を光学顕微鏡で観察した。

3： 結果及び考察

キトサン分解活性を有する土壌細菌のスクリーニング

キトサン分解性土壌細菌のスクリーニングにおいてもM9-キトサン寒天培地上に大きく透明なハローを有するコロニーを形成する細菌が数株分離できた。この数株についてM9-グルコース液体培地、M9-キトサン液体培地で培養した際の細胞外に分泌されるキトサナーゼ活性を測定した。M9-キトサン液体培地では全ての細菌分離株がキトサナーゼを生産した。一方、M9-グルコース液体培地でキトサナーゼを生産した株は1株(単離株No. 5)のみであった(データ示さず)。この結果から、No. 5株は構成的にキトサン分解酵素を生産している、或いはグルコースによるカタボライト抑制を受けないと考えられた。そこでこの単離株 No. 5を選択し以降の研究に用いた。

このNo. 5株の分類学的な位置づけを Bergey's Manual of Systematic Bacteriology に従って行った。結果、*Acinetobacter*属に分類できた(Table 4-5)。この分類を特定するにあたって、グラム陰性桿菌、好気性、オキシダーゼ活性無し、カタラーゼ活性有り、運動性無しの性質を基準とした。現在、*Acinetobacter*属に関しては1種類の種 *A. calcoaceticus* が提唱されているだけである。No.5株は、試験した項目についてはほとんど *A. calcoaceticus* type strain ATCC23055 と同じであったが、キトサンの資化能を有すること、酢酸を単一炭素源として利用できない点で異なっていた。以上から、No. 5株について種の決定は行わず *Acinetobacter* sp. CHB101 と命名した。

Table 4-5. Characteristics of the chitosan assimilating bacterial isolate

Gram negative, Aerobic, Non-motile
Rod (0.9-1.1 x 1.6-1.8 μ m), commonly in pairs
Agar colonies: circular, flat, glossy, nonpigmented, mucoid
Growth temperature: 20-37°C (optimum 30-35°C)
Oxidase test: Negative
Catalase test: Positive
Indole formation: Negative
O-F test: Oxidative
Acid formation from glucose: positive
Starch hydrolyzation: Negative
Carbon source usage: glucose(+), glycerol(+), glucosamine(+), N-acetyl-glucosamine(+), arabinose(+), ethanol(+), lactate(+), DL-malate(+), L-alanine(+), L-leucine(+), L-tyrosine(+), chitosan(+), acetate(-), chitin(-), carboxymethyl-cellulose(-)
Nitrogen source usage: nitrate(+), ammonium(+), chitosan(-)

キトサナーゼ生産条件の検討

Acinetobacter sp. CHB101株のキトサナーゼ生産に及ぼす炭素源の影響を検討した。まず、M9-グルコース液体培地、M9-キトサン液体培地で培養した場合の、細胞外へ分泌されるキトサナーゼ活性を測定した。CHB101株はM9キトサン液体培地においても増殖を示すが(世代時間 280 分)、M9-グルコース培地での増殖(世代時間110 分)に比較すると増殖速度が低下した(Fig. 4-7)。2 日間培養後の培養上清あたりのキトサナーゼ活性は、M9グルコース培地で0.2 U/ml、M9-キトサン培地で0.1 U/ml に達した。興味深いことに両培地とも対数増殖期では、キトサナーゼ活性が低いレベル(0.01 U/ml 以下)にとどまり、定常期に達してから活性が増大した(Fig. 4-7)。この結果は、回分培養におけるキトサナーゼの生産、または分泌が、細胞の増殖段階に依存している可能性を示している。定常期に見られる活性が、元々細胞内に存在しているキトサナーゼが細胞の溶解によって細胞外に出ている可能性が考えられた。しかし定常期の間、生菌数(約 1×10^9 細胞/ml)が4 日間培養を継続しても減少することがないこと、更に対数増殖期の細胞抽出物中にキトサナーゼ活性が検出されなかった結果から、この可能性は否定できた(データ示さず)。

他の多糖に関する分解活性を、M9-グルコース液体培地、M9-キトサン液体培地で2 日間培養した定常期の培養上清を用いて測定した。両培養上清はキトサン(D. D. 70%)、キトサン(D. D. 100%)、グリコールキチンに関しては分解活性を示したが、グリコールキトサン、CMCに対しては分解活性を示さなかった(データ示さず)。M9-グルコース液体培地での培養上清中の粗タンパク質をCM-Sepharose CL-6Bカラムクロマトグラフィーで分画したところ、キトサン(D. D. 70%)を基質として用いた場合、キトサン分解活性は2種類のピークとして溶出した。高いイオン強度で溶出する活性ピーク(ピークII)は脱アセチル化度70%のキトサン以外にグリコールキチンに対しても分解活性を示した。同様な溶出パターンはM9-キトサン液体培地での培養上清中の粗タンパク質においても観察された(データ示さず)。この2種類のキトサナーゼが生産されるパターンは、グルコサミン、N-アセチルグルコサミン、グリセロールを各々炭素源として添加した培地においても同様に観察された(データ示さず)。しかし、CHB101株はグリコールキチン分解活性を生産することにもかかわらず、グリコールキチン、コロイドキチンを単一炭素源として増殖すること

はできなかった。

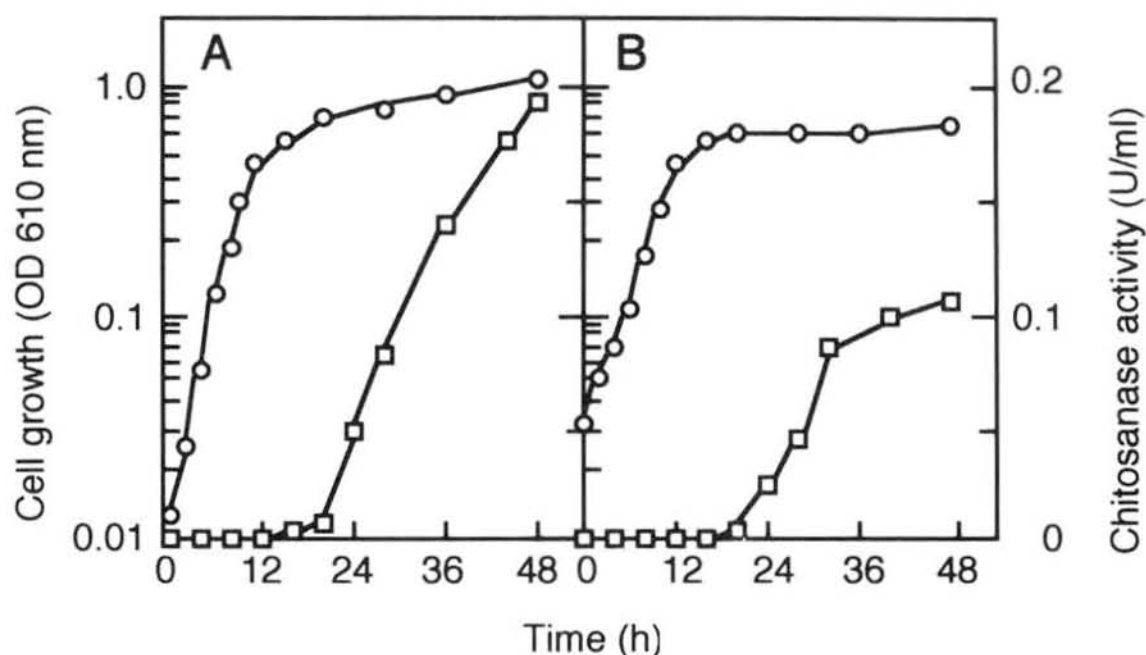
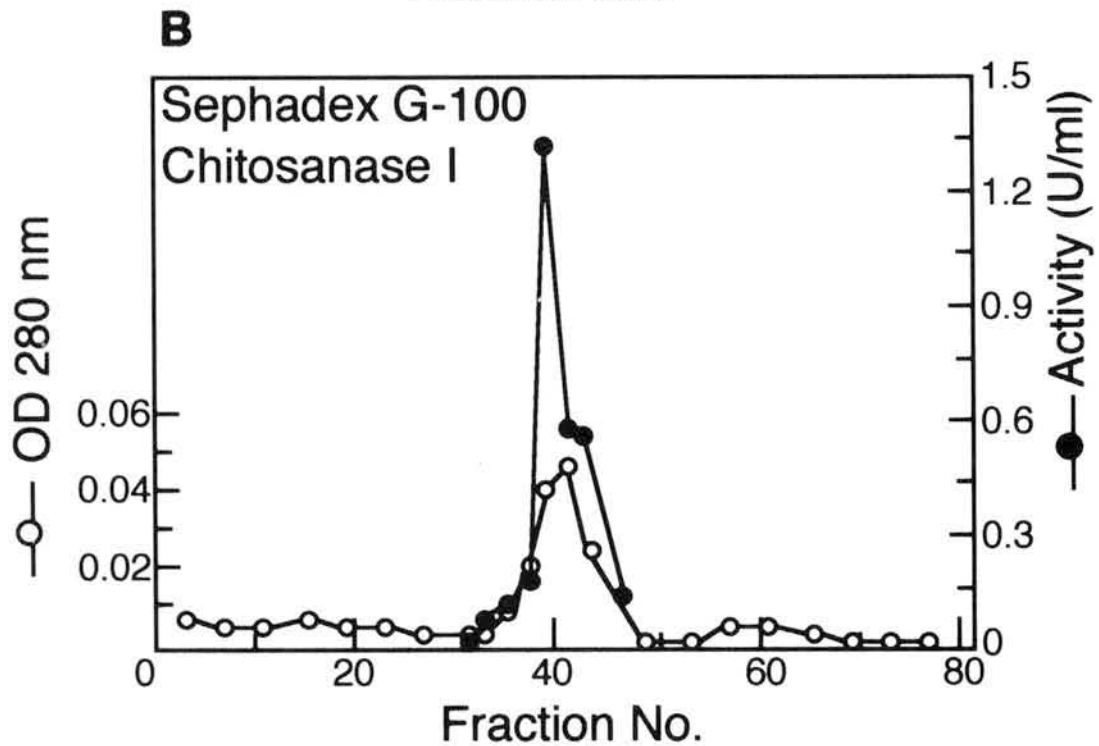
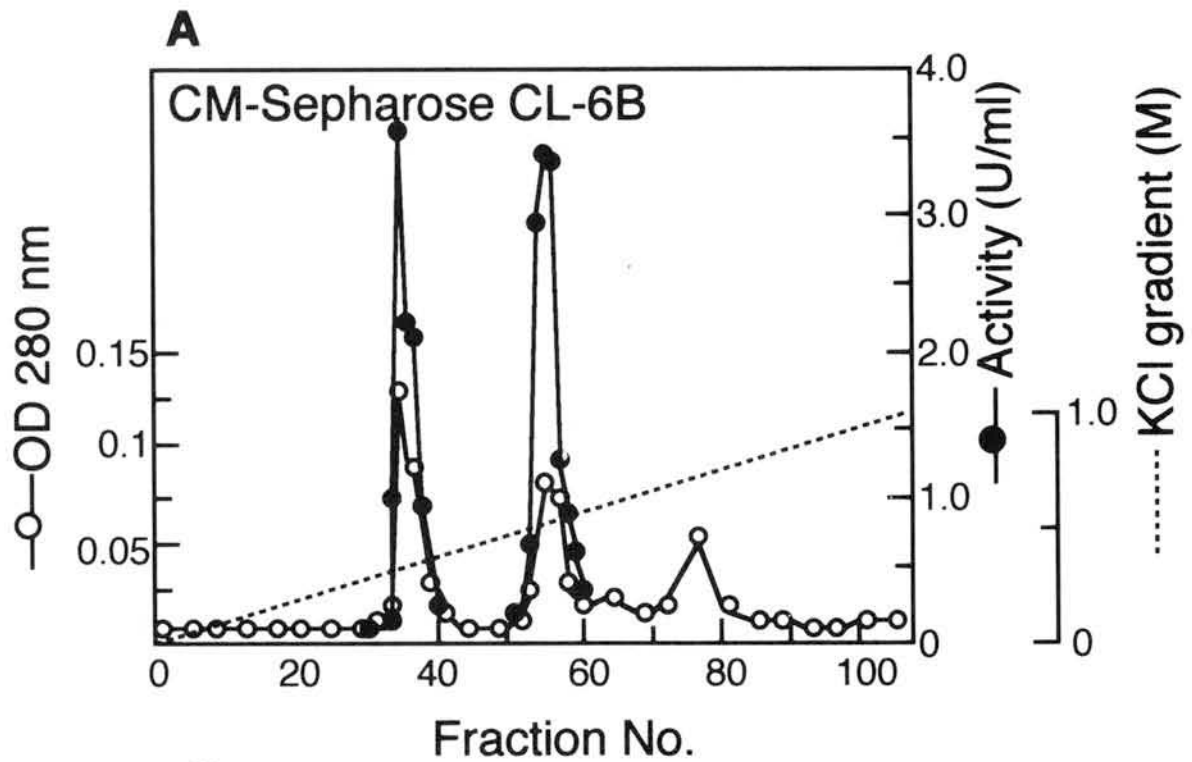


Fig. 4-7. Cell growth and extracellular chitosanolytic activity of *Acinetobacter* sp. CHB101. Cells were grown in M9-glucose medium (A) and in M9-chitosan medium (B) at 30°C with shaking. At appropriate intervals, cell density was measured by determining the OD₆₁₀, and the chitosanolytic activity in a culture fluid was determined by using chitosan (D. D. 70%) as the substrate. Symbols: ○, cell growth (OD₆₁₀ nm); □, chitosanolytic activity.

2種類のキトサナーゼの精製

Acinetobacter sp. CHB101株の生産する2種類のキトサナーゼをM9-グルコサミン液体培地で定常期まで培養した培養上清から精製した (Table 4-6, Fig. 4-8)。グルコサミンを炭素源に用いたのは、試験した炭素源の中で培養上清あたりのキトサナーゼ活性が最も高かったからである (データ示さず)。CM-Sepharose CL-6Bカラムクロマトグラフィーによってキトサナーゼ活性は2つのピークとして溶出し、低イオン強度で溶出するピークI、高イオン強度で溶出するピークIIをそれぞれ、キトサナーゼI、IIと命名した。両キトサナーゼはCM-Sepharose CL-6Bカラムクロマトグラフィーに次いで、Sephadex G-100カラムクロマトグラフィーによって、SDS-PAGEで単一バンドとなるまで精製された (Fig. 4-9)。SDS-PAGEでの移動度から求めたキトサナーゼI、IIの分子量はそれぞれ、37 kDa、30

kDa であった。Sephadex G-100カラムクロマトグラフィーでの溶出位置から推定される intact なキトサナーゼタンパク質の分子量は、SDS-PAGEで求めた結果とほぼ一致することからであることから両キトサナーゼが単量体であることが示された。



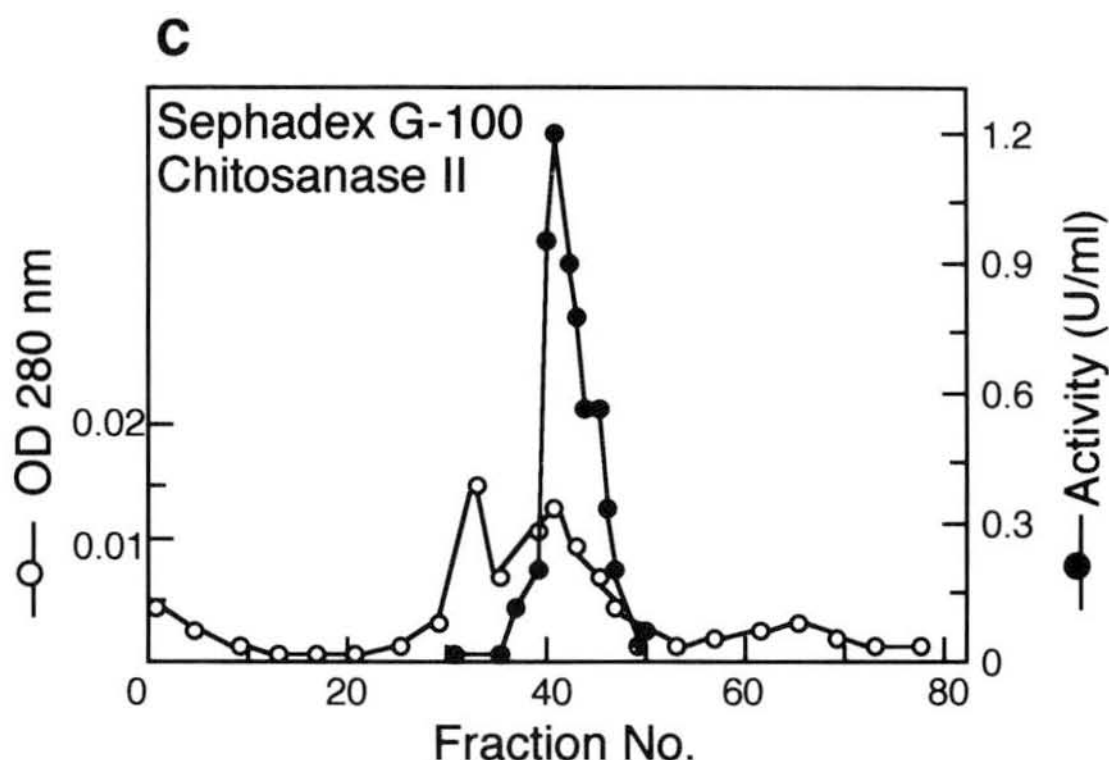


Fig. 4-8. Purification of chitosanases from *Acinetobacter* sp. CHB101. (A) CM Sepharose CL-6B chromatography. The crude proteins from culture fluid were applied to the CM Sepharose CL-6B column. The chitosanolytic activities were eluted in two peaks. The first and the second eluted peak designated chitosanase I and II, respectively. (B) Sephadex G-100 chromatography of chitosanase I. The peak fractions of chitosanase I collected from the CM Sepharose CL-6B step were applied to Sephadex G-100 column. (C) Sephadex G-100 chromatography of chitosanase II. The peak fractions of chitosanase II collected from the CM Sepharose CL-6B step were applied to Sephadex G-100 column. Symbols: ○, protein (OD₂₈₀); ●, chitosanase activity.

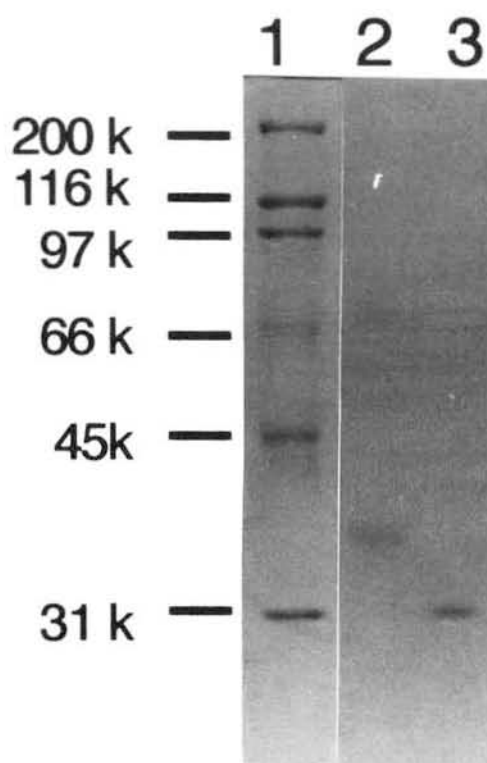


Fig. 4-9. Analysis of the purified chitosanases I and II by SDS polyacrylamide gel electrophoresis. The purified enzyme was electrophoresed. Proteins were stained with Commassie brilliant blue. Lane 1, molecular marker; lane 2, chitosanase I; lane 3, chitosanase II.

Table 4-6. Purification of chitosanases I and II from *Acinetobacter* sp. CHB101 culture fluid

Step	Volume (ml)	Total activity (U)	Total protein (mg)	Specific activity (U/mg)	Recovery (%)
Culture supernatant	453	101	— ^a	—	100
0-80% (NH ₄) ₂ SO ₄	27	107	2.06	52	106
Chitosanase I					
CM-Sepharose CL-6B	11	24	0.22	109	24
Sephadex G-100	21	17	0.05	334	17
Chitosanase II					
CM-Sepharose CL-6B	11	28	0.07	406	28
Sephadex G-100	21	16	0.02	800	16

^a Protein contents could not be determined because of a disturbance caused by unknown constituents in the sample.

キトサナーゼ精製酵素の諸性質

(i) キトサナーゼ活性に及ぼすpHと温度の影響

キトサナーゼ I、II の双方ともグリコールキチンを基質として用いた場合、pH 5～9 の広い範囲ではほぼ一定の活性を示した。脱アセチル化度70% をキトサンを基質に用いた場合、キトサナーゼIとIIはそれぞれ、65℃、50℃ で最大の活性を示した (Fig. 4-10)。

(ii) キトサナーゼの基質特異性

キトサナーゼ I、II の様々な基質に対する相対活性をTable 4-7 に示した。キトサナーゼ I は脱アセチル化度 70～90% のキトサンに対して高い活性を示すが、脱アセチル化度 100% キトサン、コロイドキチン、グリコールキチンに対する活性は低かった。一方、キトサナーゼ II はグリコールキチンに対して最も強い活性を示し、キトサンの脱アセチル化度が高くなるに従って活性が低下し特に脱アセチル化度 90～100% のキトサンに対してはほとんど活性を示さなかった。両キトサナーゼともグリコールキトサン、CMCに対する分解活性は示さなかった。

(iii) キトサナーゼによるキトサン溶液の粘度低下

キトサナーゼ I、II 共に、反応初期から基質キトサン溶液 (D. D. 70%) の粘度を低下させた (Fig. 4-11)。還元糖定量法で求めた等しい活性量の酵素を用いた場合、粘度低下の度合いは、キトサナーゼ I、II ではほぼ同じであった。

(iv) 反応生成物の分析

キトサナーゼ I、II に対してグルコサミン 5 量体または、キトサン (D. D. 100%) を基質とした長時間反応の生成物を薄層クロマトグラフィーで検出した。今回用いた薄層クロマトグラフィーの条件では、単量体から 5 量体までのキトサンオリゴマーが分離可能であった。キトサナーゼ I、II 共に 5 量体のキトサンオリゴマーを基質に用いた場合、分解によって生じる 4 量体以下のオリゴマーを検出できなかった (Fig. 4-12 lane 3 and 4)。同様に、2 量体から 4 量体を基質に用いた場合も分解産物は検出できなかった (データ示さず)。一方、キトサンを基質に用いた場合も少なくとも分離可能な 5 量体以下のキトサンオリゴマーの生成は認められなかった (Fig. 4-12 lane 1 and 2)。一方、硫酸沈殿分画の粗酵素を用いた場合は、基質として用いたキトサン (D. D. 100%)、キトサンオリゴマー (5 量体) の双方ともに、2 量体、3 量体のキトサンオリゴマーにまで分解された (Fig. 4-12 lane 5 and 6)。

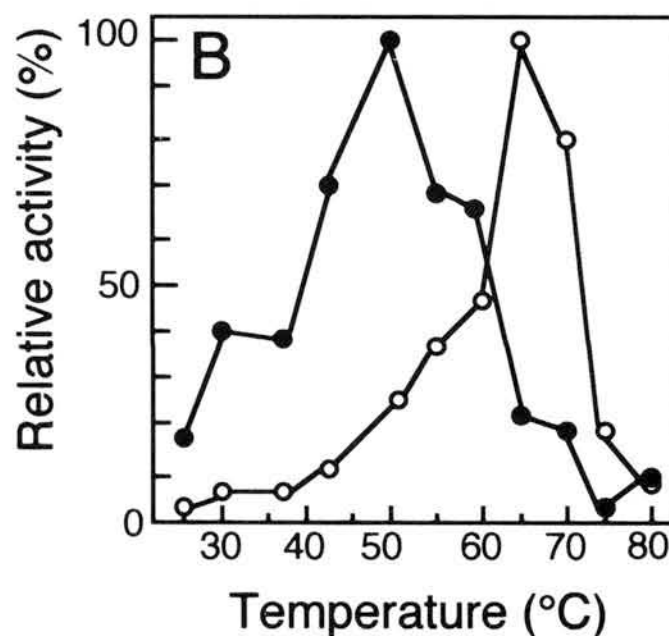
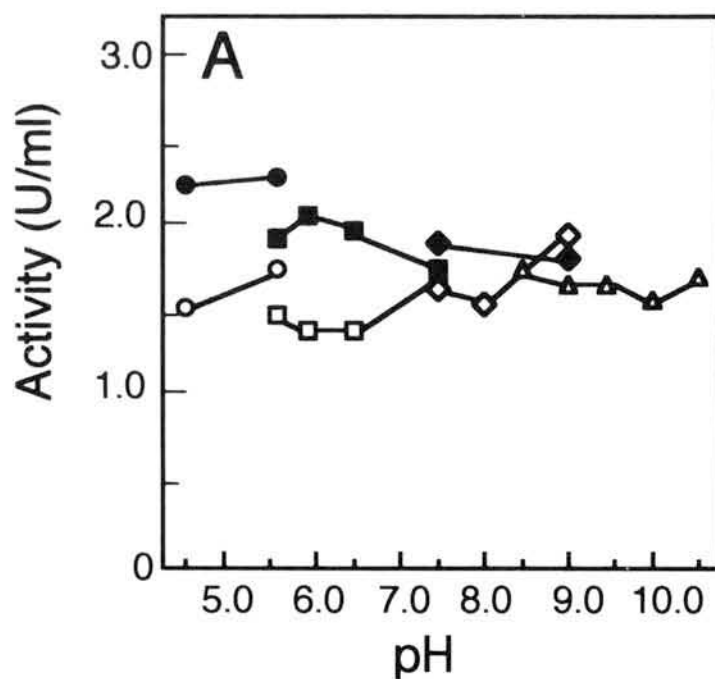


Fig. 4-10. Effects of pH (A) and temperature(B) on activity of chitosanases I, II. (A) Buffers:○, 50 mM sodium acetate buffer (chitosanase I);●, 50 mM sodium acetate buffer (chitosanase II);□, 50 mM potassium phosphate buffer (chitosanase I);■, 50 mM potassium phosphate buffer (chitosanase II);◇, 50 mM Tris-Cl buffer (chitosanase I);◆, 50 mM Tris-Cl buffer (chitosanase II);△, 50 mM glycine-NaOH buffer. (B) The reaction was done using 50 mM sodium potassium phosphate buffer (pH 5.6). Symbols:○, chitosanase I; ●, chitosanase II.

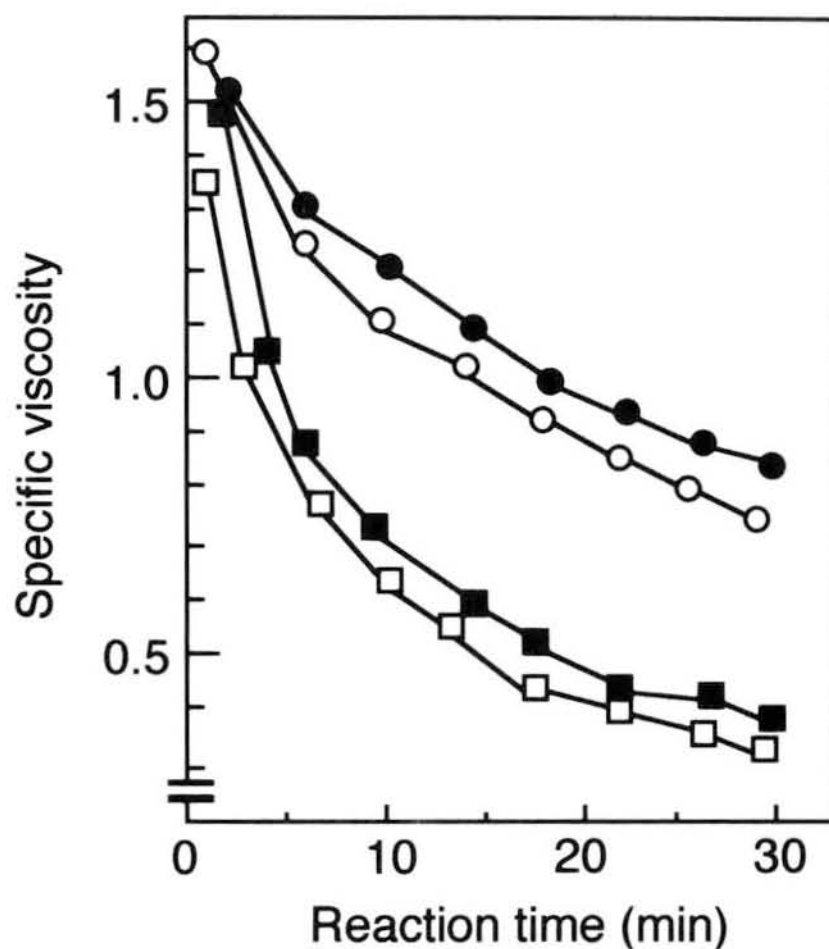


Fig. 4-11. Reduction in viscosity of chitosan solution by chitosanase I and II. Reductions in viscosity were determined with an Ostwald viscometer. Specific viscosity was defined as follows: $[(\text{flow time of reaction mixture})/(\text{flow time of distilled water})-1]$. Different amounts of enzymes were used. Symbols: ○, 4 mU of chitosanase I; □, 16 mU of chitosanase I; ●, 4 mU of chitosanase II; ■, 16 mU of chitosanase II.

Table 4-7. Substrate specificities of chitosanases I and II

Substrate ^a	Relative activity (%) ^b	
	Chitosanase I	Chitosanase II
Chitosan (70% deacetylated)	86	45
Chitosan (80% deacetylated)	100	35
Chitosan (90% deacetylated)	85	17
Chitosan (100% deacetylated)	20	10
Glycol chitin	22	100
Colloidal chitin	15	30
Glycol chitosan	7	2
Carboxymethyl cellulose	2	2

^a Each reaction mixture contained substrate at a concentration of 0.25%.

^b The amount of reducing sugar liberated after a 15-min reaction relative to the largest amount for each chitosanase (280 and 290 nmol for chitosanases I and II, respectively).

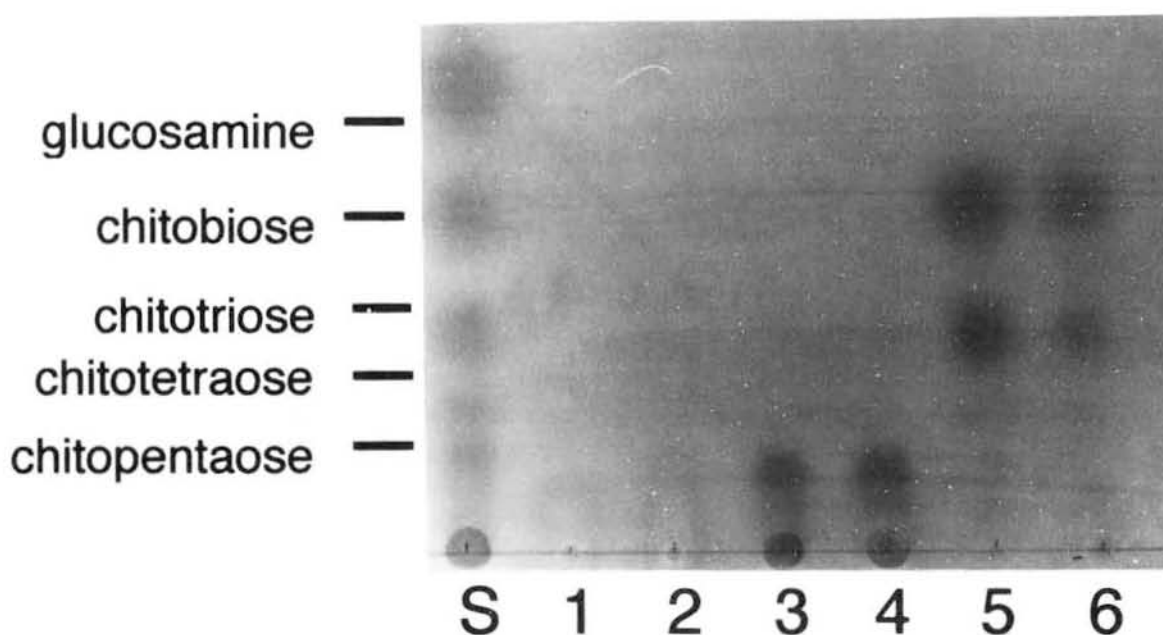


Fig.4-12. Analysis of enzymatic hydrolysates by thin-layer chromatography. The substrates used were chitosan (lanes 1, 2 and 6) and chitopentaose (lanes 3 through 5). The enzymes used were purified chitosanase I (lanes 1 and 3), purified chitosanase II (lanes 2 and 4), and crude proteins (lane 5 and 6). Lane S contained a mixture of chitooligomers ranging from glucosamine to chitopentaose.

キトサン資化性細菌の土壌からのスクリーニングから、M9-グルコース培地でキトサナーゼを生産する細菌が単離され、*Acinetobacter*属細菌と同定された。キトサナーゼを生産する *Acinetobacter*属細菌は他に報告された例がない。*Acinetobacter* sp. CHB101と命名したこの細菌は、グルコース、キトサン (D. D. 70%)、グリセロール、グルコサミン、N-アセチルグルコサミンを炭素源とするM9 培地においてキトサナーゼを分泌生産した。CHB101株はキトサン (D. D. 70%) を単一炭素源として含むM9 培地で良く増殖した。このことから、培地中のキトサンは速やかに低分子の糖に分解され細菌の増殖に利用されると考えられた。しかし対数増殖期には細胞外のキトサナーゼ活性は低く、培養が定常期に至ってから増大する結果が得られた。この結果は、CHB101株が培地中のキトサンを炭素源として盛んに分解吸収する対数増殖期に培養上清中にキトサナーゼをほとんど分泌しないことを示しており、対数増殖期におけるキトサンの分解吸収がどの様に行われているのかに興味を持たれる。この点に関して、対数増殖期において生産される極少量のキトサナーゼが、細胞の増殖を支えるに充分量である可能性、更に通常の還元糖定量法のキトサナーゼ活性測定では測定できない他のキトサン分解酵素が対数増殖期において存在しキトサンの分解にはたらいっている可能性も考えられる。

*Fusarium*菌の細胞壁にはキトサンが含まれていることから、細胞壁を分解できるキトサン分解菌が、*Fusarium*菌の増殖阻害作用を持つことが期待される。そこで、*Acinetobacter* sp. CHB101株が*Fusarium*菌に対する増殖阻害作用を持つかどうかを、PD寒天培地上で対峙培養する事で検討した (Fig. 4-13)。*Acinetobacter* sp. CHB101株の周囲では *F. solani* SUF704株の菌糸は伸長できなかった。一方、コントロールとして植菌した *Acinetobacter calcoaceticus* ATCC23055株の周囲ではSUF704株の菌糸の伸長は阻害されなかった。コントロールに用いたATCC23055株はキトサナーゼを生産しないことから、CHB101株のキトサナーゼが*Fusarium*菌の細胞壁に作用することで菌の増殖阻害を引き起こす可能性が考えられた。そこで、CHB101株の培養上清が*Fusarium*菌の細胞壁に形態変化を引き起こすかどうかについて、*Fusarium*菌のプロトプラスト形成を指標として観察した。この結果、反応開始から2 時間後に*F. solani* SUF704株の菌糸の細胞壁が分解されプロトプラスト化していることが観察された (Fig. 4-14)。この結果から、CHB101株を土壌中に投入し*Fusarium*菌の増殖を抑制することで、*Fusarium*病に対するバイオリジカルコントロールに応用できる可能性が示唆された。

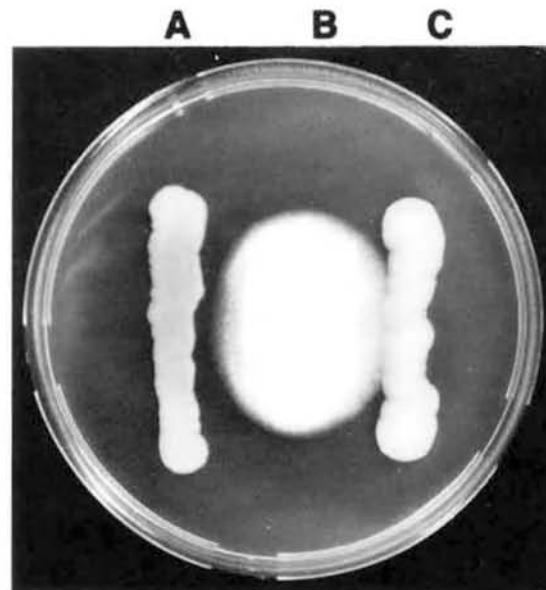


Fig. 4-13. Growth inhibition of *Fusarium solani* by *Acinetobacter* sp. CHB101. *F. solani* f. sp. *robiniae* SUF704, *Acinetobacter* sp. CHB101, and *A. calcoaceticus* ATCC23055 (type strain) were inoculated on PDA plate and incubated for 3 days at 30°C. A, *Acinetobacter* sp. CHB101; B, *F. solani* SUF704; C, *A. calcoaceticus* ATCC23055.

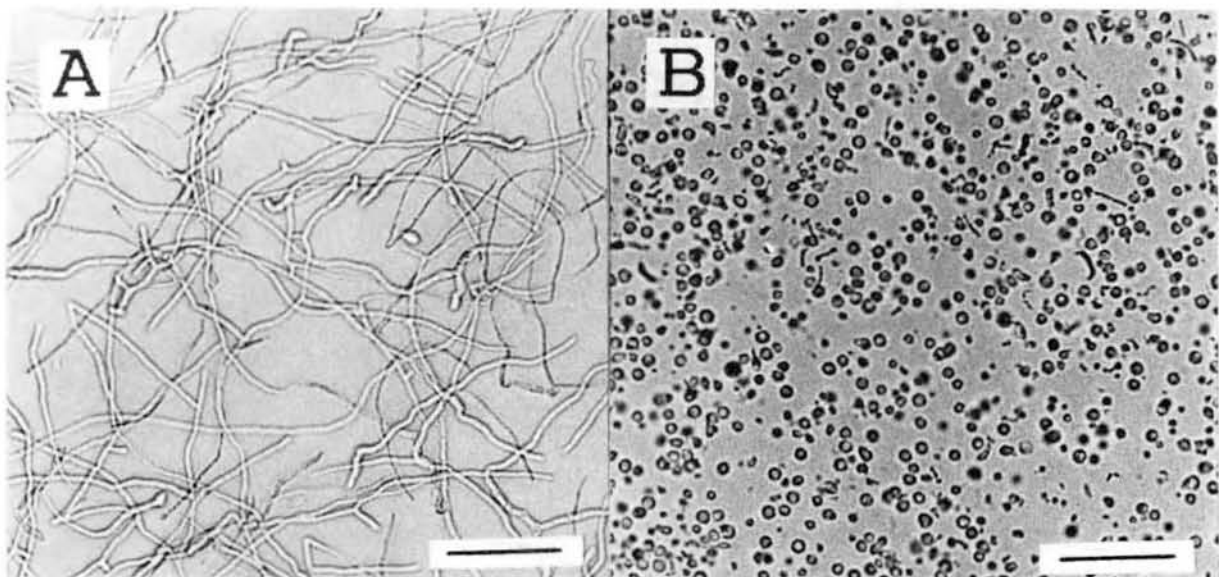


Fig. 4-14. Protoplast-forming activity against mycelia of *Fusarium solani*. (A) Germlings of *F. solani* (young mycelial cells originated from conidia). (B) Protoplasts formed from mycelia after incubation for 2 h at 37°C in a 1.2 M $MgSO_4$, 10 mM NaPB (pH 5.6) containing chitosanases of $(NH_4)_2SO_4$ precipitation fraction (1.5U/ml). Internal bars, 50 μm .

Acinetobacter sp. CHB101株の培養上清から精製された2種類のキトサナーゼ I、II は、速やかにキトサン溶液の粘度を低下させる事から、基質をエンド型に分解していると考えられた。精製酵素を用いた場合のキトサンの分解生成物は少なくとも5 量体以上のキトサンオリゴマーでとどまっており、これらがそのまま細胞に取り込まれるとは考えにくい。粗酵素を用いた場合には、キトサン、グルコサミン5 量体を基質とした分解生成物は2 量体、3 量体のキトサンオリゴマーであったことから、キトサナーゼ I、II 以外にキトサンを分解する第3の酵素が存在していることが明らかにされた。この第3の酵素は、キトサンを用いた通常の活性測定で検出できなかったことから、高分子のキトサンに対して作用せず、低分子のオリゴマーに対して分解活性を示すと考えられる。キトサナーゼ I、II によって生成されるキトサンオリゴマーを、この第3の酵素が2 量体、3 量体にまで分解し、その後CHB101株に取り込まれ代謝されると考えられる。CHB101株のキトサン分解、代謝機構を明らかにする上で、この酵素の精製が課題である。

キトサナーゼ I、II の基質特異性は、キトサンの脱アセチル化の度合いの点で異なっていた。以前に報告されているキトサン分解性細菌の多くは、狭い範囲の脱アセチル化度のキトサンを分解する1種類のキトサナーゼを生産した。CHB101株は2種類の異なるタイプのキトサナーゼを生産することにより、0~100% までの脱アセチル化度のキトサン、キチンを分解できることが推定される。培地上清中のキトサナーゼ I、II の活性が定常期に達して増加することから、これらの酵素の生合成が回分培養での増殖段階に依存している可能性が示唆された。元々不活性型で存在していたキトサナーゼが静止期の間に活性型にプロセッシングされ、分泌される可能性を除外することはできないが、キトサナーゼの生産が増殖ステージに呼応して転写レベルで制御されている可能性がある。キトサナーゼ生産、分泌の制御を詳細に解明するために、キトサナーゼ I、II の遺伝子をクローニングする事が今後の課題である。

総括

*Fusarium*菌は広範囲な植物における土壌伝染性疾患の主要な病原菌であり、その病原性発現機構の解明には様々なアプローチが必要であると思われる。糸状菌の染色体外レプリコンとして、線状プラスミドDNAとdsRNAが良く知られている。特に、植物病原性糸状菌の *Cryphonectria parasitica* では、dsRNA染色体外レプリコンが宿主菌の宿主植物に対する病原性を低下させる事が知られている。その他に糸状菌の染色体外レプリコンは、糸状菌での自律複製型形質転換ベクターへの応用が期待できること、種、又は分化型特異的に存在している例があり、簡便な菌株同定法への応用が期待できることにおいても興味を持たれる。基礎研究の面では染色体外レプリコンの有する遺伝子や複製機構に対して興味を持たれる。そこで、本学保存*Fusarium*菌からの染色体外レプリコンのスクリーニングを行った。

*Fusarium*菌の細胞壁成分としてキトサンが含まれている。エンドウへの *F. solani* f. sp. *phaseoli* の侵入において、菌の細胞壁からキトサンオリゴマーが放出され、これがファイトアレキシン (pisatin) 生産のエリシターになると報告されていることから、*Fusarium*菌自身の有するキトサナーゼは植物感染の際に何らかの役割を果たすと考えられた。また、一般にキトサナーゼ生産能を有する微生物は、*Fusarium*菌の細胞壁を分解することにより生長を抑制できる可能性があることから、*Fusarium*病の防除に関してバイオロジカルコントロールに応用できる可能性が考えられた。以上の観点から、本学保存の*Fusarium*菌、及び長野県上田市周辺の土壌からキトサン分解菌をスクリーニングし、キトサナーゼの精製を行い、その生理学的意義に関して考察した。

第1章において、60株の*Fusarium*菌から、染色体外レプリコンのスクリーニングを行った結果、ニセアカシア枝枯病菌*F. solani* f. sp. *robiniae* SUF704株が2種類のdsRNA M1 (1.9 kb)とM2 (1.7kb)を保持していることを検出した。同一分化型の他の株では染色体外レプリコンは検出されなかった。*F. solani* SUF704株からdsRNA M1、M2をゲノムに有するマイコウイルスの精製を試みた。この結果、直径30 nmのエンヴェロープを持たない球状のウイルス、FusoVが得られた。FusoVは44 kDaの1種類のキャプシドタンパク質で構成されており、キャプシドタンパク質のN末端は修飾を受けていた。FusoVが2種類の

分節したdsRNAをゲノムに有すること、1種類のキャプシドタンパク質で構成されるエンヴェロープを持たない球状のウイルス粒子であることは、菌類で報告されている一般的なウイルスの特徴に一致した。FusoVは約85%の分生孢子に伝達されるが、交配によって得られる子嚢孢子への伝達は観察されなかった。*F. solani* SUF704株と、単孢子分離の結果得られたFusoVの欠落したSUF704-free株の硝酸同化系欠損変異株を用いて行った菌糸融合実験の結果、FusoVは菌糸融合によって他の菌株へ伝達が可能であることが示された。単孢子分離の結果得られたSUF704-free株とSUF704株において、成長速度、コロニー形態、色素生産性などに変化なく、FusoVは多くのマイコウイルスと同様に宿主菌の形質に大きな影響を及ぼさないと考えられた。

第2章において、FusoVのdsRNAゲノムM1、M2からcDNAを合成し、各々1645、1445 ntの塩基配列を決定した。M1、M2ともほぼ全長にわたる1つのORFが検出された。M1のORFは519アミノ酸からなる推定分子量 59,707 Daのタンパク質をコードしており、推定アミノ酸配列中には positive strand RNAウイルスとdsRNAウイルスで観察されるRNA依存性RNAポリメラーゼの保存配列が見いだされた。また、*in vitro* relication 実験から、FusoV粒子にRNA依存性RNAポリメラーゼ活性があることが示された。一方、M2のORFは413アミノ酸からなる推定分子量 44,185 Da のタンパク質をコードしており、推定アミノ酸配列中に精製キャプシドタンパク質から決定したアミノ酸配列が存在した。以上からFusoVはRNA依存性RNAポリメラーゼとキャプシドタンパク質の2つの遺伝子のみを持っていることが示された。2つに分節したdsRNAマイコウイルスの塩基配列としては初めて明らかにされたものである。RNA依存性RNAポリメラーゼの保存配列は positive strand RNAウイルスとdsRNAウイルスで唯一保存されている配列であり、この保存配列の類似性はウイルス分類の重要な指標となっている。既知のRNA依存性RNAポリメラーゼの配列とFusoVの配列を比較した結果、ウイルスの構造上類似性が指摘されていたFusoVを含む *Partitiviridae* 科のマイコウイルスと植物 cryptovirus との間にアミノ酸配列レベルで高い類似性が見られた。また、菌類、特に植物病原菌は植物との間で様々なレベルで相互作用していると考えられることから、*Partitiviridae* 科マイコウイルスと植物 cryptovirus が菌類又は植物に存在した共通の祖先ウイルスから進化した可能性が考えられた。以上からFusoVは植物 cryptovirus と共に *Partitiviridae* 科に分類するのが適当であると考えられ

た。

第3章において、*in vitro* replication 実験から、精製FusoV粒子にRNA依存性RNAポリメラーゼ活性が検出された。FusoV粒子は *in vitro* 系において、dsRNAを鋳型として positive strand のssRNAを合成する転写酵素活性 (transcriptase) と positive strand RNA を鋳型とし、negative strand を合成する複製酵素活性 (replicase) が検出された。経時的にどのような *in vitro* replication 産物が得られるかについて検討した結果、FusoVでは最初に positive strand RNA が転写され、次いでdsRNAへの複製が行われるパターンが見られたことから、保存的複製 (conservative replication) によってdsRNAゲノムが複製されていることが示された。*in vitro* の系ではFusoVの転写産物として positive strand RNA が合成されたが、*in vivo* でのFusoV転写産物について、strand 特異的のプロブを用いて、ssRNAを特異的に検出する非変性条件のノーザンハイブリダイゼーションによる分析を試みた。この結果、*in vivo* で negative strand RNA が蓄積している事が示された。またこのハイブリダイゼーション法によってssRNAを持つFusoV粒子が存在するか検討した結果、positive strand RNA、negative strand RNA をそれぞれ有するFusoV粒子が検出された。宿主細胞中での negative strand の蓄積や、negative strand RNA を有するウイルス粒子の存在は、dsRNA ウイルス一般に見られる現象ではなく、FusoVに特徴的であると考えられた。

第4章において、162株の*Fusarium*菌からキトサン分解能を持つ株をスクリーニングした結果、22株でキトサン分解によるハローが見られた。最も大きなハローを形成したインゲン根腐病菌 *F. solani* f. sp. *phaseoli* SUF386株からキトサナーゼの精製を試みた。SUF386株はN-アセチルグルコサミンを炭素源に用いた場合に最も高いキトサナーゼ活性の液体培地中に分泌生産した。一方、キトサナーゼの基質であるキトサンを炭素源に用いた液体培養において、SUF386株は完全に生長が阻害されキトサナーゼの生産は見られなかった。*F. solani* SUF386株の培養上清から1種類のキトサナーゼをヒドロキシアパタイトカラムクロマトグラフィー、CM-Sepharose CL-6Bカラムクロマトグラフィー、Sephadex G-100カラムクロマトグラフィーによって精製した。本キトサナーゼの分子量はSDS-PAGE から36 kDa であることが示された。このキトサナーゼは脱アセチル化度70%と100%のキトサン、グリコールキトサン、及びキトペントース (グルコサミンの5量体) を加水分解したが、キトビオース (グルコサミンの2量体)、キトトリオース (3量体)、キト

テトラオース (4 量体)、グリコールキチン、CMCは分解しなかった。また、本キトサナーゼは、キトサン溶液の粘度を速やかに低下させることから、エンド型に作用していると考えられた。

一方、土壌からキトサン資化性細菌をスクリーニングした結果、培地中にキトサンが存在しなくてもキトサナーゼを生産する株を単離し、このキトサン資化性菌を

Acinetobacter sp. CHB101株と命名した。CHB101株の培養上清中のキトサナーゼ活性は、対数増殖期では低く定常期に入ってから増大した。CHB101株の培養上清中のキトサナーゼをCM-Sepharose CL-6Bカラムクロマトグラフィー、Sephadex G-100カラムクロマトグラフィーによって精製した結果、2種類のキトサナーゼ (I、II) が存在していることが示された。キトサナーゼ I は分子量37 kDaであり、脱アセチル化度70~90% のキトサンを良く分解した。キトサナーゼ II は分子量30 kDaであり、脱アセチル化度70% のキトサン、コロイドキチン、特にグリコールキチンに対する活性が強かった。キトサナーゼ I、II は、キトサン溶液の粘度を速やかに低下させることから、エンド型に作用していると考えられた。キトサナーゼ I、II の反応生産物は5量体以上のキトサンオリゴマーであったが、粗酵素での分解産物は2量体、3量体のキトサンオリゴマーであった。このことからCHB101株はキトサナーゼ I、II 以外に第3のキトサン分解酵素を分泌していることが示された。CHB101株には*Fusarium*菌に対する増殖阻害作用があり、培養上清には *F. solani* SUF704株の細胞壁を分解しプロトプラスト化する活性のあることから、本株を土壌に投入することで*Fusarium*病の防除を目的としたバイオリジカルコントロールに応用できる可能性が考えられた。

謝辞

本研究にご指導、御鞭撻を賜り、かつ本論文の御校閲を頂きました信州大学大学院工学系研究科後期博士課程生物機能工学専攻生物機能科学講座の岡崎光雄教授、下坂誠助教授に深甚なる謝意を表します。また、御校閲頂きました信州大学大学院工学系研究科後期博士課程生物機能工学専攻生物機能科学講座の神田鷹久教授、小島峯雄教授、関口順一教授に深謝いたします。

本研究を行うにあたり、電子顕微鏡によるFusoVの解析にご助力いただいた、信州大学繊維学部応用生物科学科蚕遺伝疫学講座、中垣雅雄助教授にたいして、*Fusarium*菌の交配に関して有益なご助言を頂きました信州大学繊維学部附属農場の齊藤英毅博士に、また植物cryptovirus RYEV 及びCTeVのdsRNAゲノムの情報を提供していただいた、宇都宮大学農学部、夏秋知英博士にたいして篤く御礼を申し上げます。研究を進めるにあたり、御協力いただいた、影山努氏、中谷愛子氏、権田恵一氏、糸原正典氏、王秀英氏、大野泰世氏、田口悟朗氏を始め信州大学繊維学部応用生物科学科遺伝子工学講座の諸氏に深く感謝いたします。

1995年 12月 野川優洋

関連文献

Nogawa, M., Shimosaka, M., Kageyama, T. and Okazaki, M.: A double-stranded RNA mycovirus from the plant pathogenic fungus, *Fusarium solani* f. sp. *robiniae*. *FEMS Microbiol. Lett.* **110** (1993) 153-158.

Shimosaka, M., Nogawa, M., Ohno, Y. and Okazaki, M.: Chitosanase from the plant pathogenic fungus, *Fusarium solani* f. sp. *phaseoli*-purification and some properties. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **57** (1993) 231-235.

Shimosaka, M., Nogawa, M., Wang, X.-Y., Kumehara, M. Okazaki, M.: Production of two chitosanases from a chitosan-assimilating bacterium, *Acinetobacter* sp. strain CHB101. *Appl. Environ. Microbiol.* **61** (1995) 438-442.

Nogawa, M., Kageyama, T., Nakatani, A., Shimosaka, M. and Okazaki, M.: Cloning and characterization of mycovirus dsRNA from the plant pathogenic fungus, *Fusarium solani*. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* in press.

Nogawa, M., Nakatani, A., Gonda, K., Shimosaka, M. and Okazaki, M.: Replication of double-stranded RNA in mycovirus from the plant pathogenic fungus, *Fusarium solani*. *FEMS Microbiol. Lett.* in press.

参考文献

- Alfonso, C., Martinez, M. J. and Reyes, F.: Purification and properties of two endochitosanases from *Mucor rouxii* implicated in its cell wall degradation. *FEMS Microbiol. Lett.* **95** (1992) 187-194.
- Allan, C. R. and Hadwiger, L. A.: The fungicidal effect of chitosan on fungi of varying cell wall composition. *Exp. Mycol.* **3** (1979) 285-287.
- Allison, R., Johnston, R. E. and Dougherty, W. G.: The nucleotide sequence of the coding region of tobacco etch virus genomic RNA: evidence for the synthesis of a single polyprotein. *Virology* **154** (1986) 9-20.
- Anagnostakis, S. L. and Day, P. R.: Hypovirulence conversion in *endothia parasitica*. *Phytopathology* **69** (1979) 1226-1229.
- Anagnostakis, S. A.: Biological control of chestnut blight. *Science* **215** (1982) 466-471.
- Bamford, D. H. and Wickner, R. B.: Assembly of double-stranded RNA viruses: bacteriophage $\phi 6$ and yeast virus L-A. *Semin. Virol.* **5** (1994) 61-69.
- Bartnicki-Garcia, S.: Cell wall chemistry, morphogenesis, and taxonomy of fungi. *Ann. Rev. Microbiol.* **22** (1968) 87-108.
- Boucher, I., Dupuy, A., Vidal, P., Neugebauer, W. A. and Brzezinski, R.: Purification and characterization of a chitosanase from *Streptomyces* N174. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **38** (1992) 188-193.
- Buck, K. W. and Ghabrial, S. A.: Partitiviridae. in classification and nomenclature of viruses. Fifth report of the international committee for the taxonomy of viruses. *Archives of Virology Supplementum* **2** (1991) 208-211. Edited by Francki, R. I. B., Fraquet, C. M., Knudsen, D. L. and Brown, F. New York: Springer Verlag.
- Barrosso, G. and Labarère, J.: Evidence for viral and naked double-stranded RNAs in the basidiomycete *Agrocybe aegerata*. *Curr. Genet.* **18** (1990) 231-237.

Barroso, G. and Labarère, J.: Transcription of naked double-stranded RNA molecules in a fraction containing large vesicles plus mitochondria from the basidiomycete *Agrocybe aegerita*. *J. Gen. Microbiol.* **139** (1993) 287-293.

Ben-Tzvi, B.-S., Koltin, Y., Mevarech, M. and Tamarkin, A.: RNA polymerase activity in virions from *Ustilago maydis*. *Mol. Cel. Biol.* **4** (1984) 188-194.

Bevan, E. A., Herring, A. J. and Mitchell, D. J.: Preliminary characterization of two species of dsRNA in yeast and their relationship to the "killer" character. *Nature* **245** (1973) 81-86.

Bouzoubaa, S., Quillet, L., Guilley, H., Jonard, G. and Richards, K.: Nucleotide sequence of beet necrotic yellow vein virus RNA-1. *J. Gen. Virol.* **68** (1987) 615-626.

Bozarth, R. F.: Mycoviruses: a new dimension in microbiology. in *Environmental Health Perspectives Experimental Issue No.2* (1972) 23-39.

Bradford, M. M. : A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72** (1976) 248-254.

Bruenn, J. A.: Relationships among the positive stranded and double-stranded RNA viruses as viewed through their RNA-dependent RNA polymerases. *Nucleic Acids Res.* **19** (1991) 217-226.

Bruenn, J., Bobek, L., Brennan, V. and Held, W.: Yeast viral RNA polymerase is a transcriptase. *Nucleic Acids Res.* **8** (1980) 2985-2997.

Buck, K. W., Ackermann, H.-W., Bozarth, R. F., Bruenn, J. A., Koltin, Y., Rawlinson, C. J., Ushiyama, R. and Wood, H. A.: Six groups of double-stranded RNA mycovirus. *Intervirology* **22** (1984) 17-23.

Castle, E., Leidner, U., Nowak, T., Wengler, G. and Wengler, G.: Primary structure of the west nile flavivirus genome region coding for all nonstructural proteins. *Virology* **149** (1986) 10-26.

Chen, B., Choi, G. H. and Nuss, D. L.: Mitotic stability and nuclear inheritance of integrated viral cDNA in engineered hypovirulent strains of the chestnut blight fungus. *EMBO J.* **12** (1993) 2991-2998.

- Chen, B., Choi, G. H. and Nuss, D. L.: Attenuation of fungal virulence by synthetic infectious hypovirus transcripts. *Science* **264** (1994) 1762-1764.
- Chen, D., Zeng, C. Q. Y., Wentz, M. J., Gorziglia, M., Estes, M. K. and Rming, R. F.: Template-dependent, in vitro replication of rotavirus RNA. *J. Virol.* **68** (1994-b) 7030-7039.
- Cheng, R. H., Caston, J. R., Wang, G., Gu, F., Smith, T. J., Baker, T. S., Bozarth, R. F., Trus, B. L., Cheng, N., Wickner, R. B. and Steven A. C.: Fungal virus capsids, cytoplasmic compartments for the replication of double-stranded RNA, formed as icosahedral shells of asymmetric gag dimers. *J. Mol. Biol.* **244** (1994) 255-258.
- Choi, G. H., Marek, E. T., Schardl, C. L., Richey, M. G., Chang, S. and Smith, D. A.: sti35, a stress-responsive gene in *Fusarium* spp.. *J. bacteriol.* **172** (1990) 4522-4528.
- Choi, G. H. and Nuss, D. L.: Hypovirulence of chestnut blight fungus conferred by an infectious viral cDNA. *Science* **257** (1992) 800-803.
- Correll, J. C., Klittich, C. J. R. and Leslie, J. F.: Nitrate nonutilizing mutants of *Fusarium oxysporum* and their use in vegetative compativility tests. *Phytopathology* **77** (1987) 1640-1646.
- Daboussi, M. J., Langin, T. and Brygoo, Y.: Fot1, a new family of fungal transposable elements. *Mol. Gen. Genet.* **232** (1992) 12-16.
- Dasmahapatra, B., Dasgupta, R., Ghosh, A. and Kaesberg, P.: Structure of the black beetle virus genome and its functional implications. *J. Mol. Biol.*, **182** (1985) 183-189.
- Dickinson, M. J. and Pryor, A. J.: Encapsidated and unencapsidated double-stranded RNAs in flax rust, *Melampsola lini*. *Can. J. Bot.* **67** (1989) 1137-1142.
- Esteban, L. M., Fujimura, T., Garcia-Cuellar, M. P., Esteban, R.: Association of yeast 23S RNA with its putative RNA-dependent RNA polymerase. *J. Biol. Chem.* **269** (1994) 29771-29777.
- Esteban, L. M., Rodriguez-Cousiño, N. and Esteban, R.: T double-stranded RNA (dsRNA) sequence reveals that T and W dsRNAs from a new family in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **267** (1992) 10874-10881.

- Esteban, R. and Wickner, R. B.: A deletion mutant of L-A double-stranded RNA replicates like M1 double-stranded RNA. *J. Virol.* **62** (1988) 1278-1285.
- Esteban, R. and Wickner, R. B.: Three different M1 RNA containing virus-like particle types in *Saccharomyces cerevisiae*: in vitro M1 double-stranded RNA synthesis. *Mol. Cel. Biol.* **6** (1989) 1552-1561.
- Fahima, T., Wu, Y., Zhang, L. and Van Alfen, N. K.: identification of the putative RNA polymerase of *Cryphonectria hypovirus* a solubilized replication complex. *J. Virol.* **68** (1994) 6116-6119.
- Fekete, C., Giczey, G., Papp, I., Szabò, L. and Hornok, L.: High-frequency occurrence of virus-like particles with double-stranded RNA genome in *Fusarium poae*. *FEMS Microbiol. Lett.* **131** (1995) 295-299.
- Felsenstein, J.: PHYLIP-phylogeny inference package. *Cladistics* **5** (1989) 164-166.
- Fenton, D. M. and Eveleigh, D. E.: Purification and mode of action of a chitosanase from *Penicillium isolandicum*. *J. Gen. Microbiol.* **126** (1981) 151-165.
- Franklin, R. M.: Purification and properties of the replicative intermediate of the RNA bacteriophage R17. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **55** (1966) 1504-1511.
- Friese, C. F., Allen, M. F., Martin, R. and Van Alfen, N. K.: Temperature and structural effects on transfer of double-stranded RNA among isolates of chestnut blight fungus (*Cryphonectria parasitica*). *Appl. Environ. Microbiol.* **58** (1992) 2066-2070.
- Fukuhara, T., Moriyama, H., JunYong, P., Hyakutake, H. and Nitta, T.: Enigmatic double-stranded RNA in japonica rice. *Plant Mol. Biol.* **21** (1993) 1121-1130.
- Fujimura, T., Esteban, R. and Wickner, R. B.: In vitro L-A double-stranded RNA synthesis in virus-like particles from *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **63** (1986) 4433-4437.
- Fujimura, T. and Wickner, R. B.: Replicase of L-A virus-like particles of *Saccharomyces cerevisiae*, in vitro conversion of exogenous L-A and M1 single-stranded RNAs to double-stranded form. *J. Biol. Chem.* **263** (1988) 454-460.

Gallimore, C., Lewis, D. and Brown, D.: Detection and characterization of a novel bisegmented double-stranded RNA virus (picobirnavirus) from rabbit faeces. *Archives of Virology* **133** (1993) 63-73.

Gallimore, C. I., Appleton, H., Lewis, D., Green, J. and Brown, D. W. G.: Detection and characterisation of bisegmented double-stranded RNA viruses (picobirnaviruses) in human faecal specimens. *J. Med. Virol.* **45** (1995) 135-140.

Goelet, P., Lomonossoff, G. P., Butler, P. J. G., Akam, M. E., Gait, M. J. and Karn, J.: Nucleotide sequence of tobacco mosaic virus RNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **79** (1982) 5818-5822.

五味勝也 and 原昌道: カビの宿主・ベクター系. 蛋白質・核酸・酵素 **35** (1990) 2552-2566.

Greif, C., Hemmer, O. and Fritsch, C.: Nucleotide sequence of tomato black ring virus RNA-1. *J. Gen. Virol.* **69** (1988) 1517-1529.

Grieco, F., Burgyan, J. and Russo, M.: The Nucleotide sequence of Cymbidium ringspot virus RNA. *Nucleic Acids Res.* **17** (1989) 6383.

Gunge, N., Tamaru, A., Ozawa, F. and Sakaguchi, K.: Isolation and characterization of linear deoxyribonucleic acid plasmids from *Kluyveromyces lactis* and the plasmid associated killer character. *J. bacteriol.* **145** (1981) 382-390.

Gustafson, G., Hunter, B., Hanau, R., Armour, S. L. and Jackson, A. O.: Nucleotide sequence and genetic organization of barley stripe mosaic virus RNA gamma. *Virology* **158** (1987) 394-406.

Gottlieb, P., Strassman, J., Qiao, X., Frucht, A. and Mindich, L.: In vitro replication, packaging, and transcription of the segmented double-strand RNA genome of bacteriophage $\phi 6$: studies with procapsids assembled from plasmid-encoding proteins. *J. Bacteriol.* **172** (1990) 5774-5782.

Hadwiger, L. A. and Beckman, J. M.: Chitosan as a component of pea-*Fusarium solani* interactions. *Plant Physiol.* **66** (1980) 205-211.

Hamilton, W. D. O., Boccara, M., Robinson, D. J. and Baulcombe, D. C.: The nucleotide sequence of tobacco rattle virus RNA-1. *J. Gen. Virol.* **68** (1987) 2563-2575.

Hansren, D. R., Van Alfen, N. K., Gillies, K. and Powell, W. A.: Naked dsRNA associated with hypovirulence of *Endothia parasitica* is packaged in fungal vesicle. *J. Gen. Virol.* **66** (1985) 2605-2614.

羽柴輝良 and 宮坂俊一郎: 糸状菌線状プラスミドの構造と機能. *化学と生物* **29** (1991) 200-205.

Heaton, L. A.: Use of agarose gel electrophoresis to monitor conformational changes of some small, spherical plant viruses. *Phytopathology* **82** (1992) 803-807.

Hedges, A. and Wolfe, R. S.: Extracellular enzyme from *Myxobacter* AL-1 that exhibits both β -1,4-glucanase and chitosanase activities. *J. Bacteriol.* **120** (1974) 844-853.

Hillman, B. I., Shapira, R. and Nuss, D. L.: Hypovirulence-associated suppression of host functions in *Cryphonectria parasitica* can be partially relieved by high light intensity. *Phytopathology* **80** (1990) 950-956.

Hillman, B. I., Halpern, B. T. and Brown, M. P.: A viral dsRNA element of the chestnut blight fungus with a distinct genetic organization. *Virology* **201** (1994) 241-250.

平野 久: 遺伝子クローニングのためのタンパク質構造解析. プロテインとシーケンシング. 東京化学同人. (1993)

Hirano, S and Nagao, N.: Effects of chitosan, pectic acid, lysozyme, and chitinase on growth of several phytopathogens. *Agric. Biol. Chem.* **53** (1989) 3065-3066.

Huisman, M. J., Linthorst, H. J. M., Bol, J. F. and Cornelissen, B. J.: The complete nucleotide sequence of potato virus X and its homologies at the amino acid level with various plus-stranded RNA viruses. *J. Gen. Virol.* **69** (1988) 1789-1798.

Icho, T and Wickner, R. B.: The double-stranded RNA genome of yeast virus L-A encodes its own putative RNA polymerase by fusing two open reading frames. *J. Biol. Chem.* **264** (1989) 6716-6723.

Imoto, T. and Yagishita, K.: A simple activity measurement of lysozyme. *Agric. Biol. Chem.* **35** (1971) 1154-1156.

Isogai, T., Ono, H., Ishitani, Y., Kojo, H., Ueda, Y. and Kohsaka, M.: Structure and expression of cDNA for D-amino acid oxidase active against cephalosporin C from *Fusarium solani*. *J. Biochem.* **108** (1990) 1063-1069.

Joklik, W. K.: Structure and function of the reovirus genome. *Microbiol. Rev.* **45** (1981) 483-501.

Julien, J., Poirier-Hamon, S. and Brygoo, Y.: Foret1, a reverse transcriptase-like sequence in the filamentous fungus *Fusarium oxysporum*. *Nucleic Acids Res.* **20** (1992) 3933-3937.

Kendra, D. F., Christain, D. and Hadwiger, L. A.: Chitosan oligomers from *Fusarium solani*/pea interactions, chitinase/ β -glucanase digestion of sporangia and from fungal wall chitin actively inhibit fungal growth and enhance disease resistance. *Physiological and Molecular Plant Pathol.* **35** (1989) 215-230.

Kistler, H.C., Bosland, P. W., Benny, U., Leong, S. and Williams, P. H.: Relatedness of strains of *Fusarium oxysporum* from crucifers measured by examination of mitochondrial and ribosomal DNA. *Phytopathology* **77** (1987) 1289-1293.

Kistler, H. C. and Leong S. A.: Linear plasmidlike DNA in the plant pathogenic fungus *Fusarium oxysporum* f. sp. *conglutinans*. *J. bacteriol.* **167** (1986) 587-593.

Kistler H. C. and Powell, W. A.: In vitro rearrangement of foreign DNA by *Fusarium oxysporum* produces linear self-replicating plasmid. *J. Bacteriol.* **172** (1990) 3163-3171.

Klittich, C. J. R. and Leslie, J. F.: Nitrate reduction mutants of *Fusarium moniliforme* (*Gibberella fujikuroi*). *Genetics* **118** (1988) 417-423.

Kohno, S., Fujimura, T., Rulong, S. and Kwon-Chung, K. J.: Double-stranded RNA virus in the human pathogenic fungus *Blastomyces dermatitidis*. *J. Virol.* **68** (1994) 7554-7558.

Koonin, E. V., Choi, G. H., Nuss, D. L., Shapira, R. and Carrington, J. C.: Evidence for common ancestry of a chestnut blight hypovirulence-associated double-stranded RNA and a group of positive-strand RNA plant viruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **88** (1991) 10647-10651.

Koonin, E. V.: Evolution of double-stranded RNA viruses: a case for polyphyletic origin from different groups of positive stranded RNA viruses. *Semin. Virol.* **3** (1992) 327-339.

Kozak, M.: Possible role of flanking nucleotides in recognition of the AUG initiator codon by eukaryotic ribosomes. *Nucleic Acids Res.* **9** (1981) 5233-5252.

Krieg, N. R. and Holt, I. G.: In Bargey's Manual of Systematic Bacteriology, vol. 1. Baltimore: The Williams and Wilkins Corporation. (1984).

Langin, T., Capy, P. and Daboussi, M. J.: The transposable element *impala*, a fungal member fo the Tc1-mariner superfamily. *Mol. Gen. Genet.* **246** (1995) 19-28.

Lawrence, G. J., Bollen, M. G. and Pryor, A.: Transmission of double-stranded RNAs in flax rust, *Melampsora lini*. *Can. J. Bot.* **66** (1987) 61-66.

Laemmli, U. K.: Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227** (1970) 680-685.

Lemke, P. A. and Nash, C. E.: Fungal viruses. *Bacteriol. Rev.* **38** (1974) 29-56.

Lemke, P.A.: Viruses of eucaryotic microorganisms. *Ann. Rev. Microbiol.* **30** (1976) 105-145.

Levinson, R. S., Strauss, J. H. and Strauss, E. G.: Complete sequence of the genomic RNA of o'nyong-nyong virus and its use in the construction of alpha virus phylogenetic trees. *Virology* **175** (1990) 110-123.

Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. J.: Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193** (1951) 265-275.

Ludert, J. E. and Liprandi, F.: Identification of viruses with bi- and trisegmented double-stranded RNA genome in faeces of children with gastroenteritis. *Res. Virol.* **144** (1993) 219-224.

Malardier, L., Daboussi, M. J., Julien, J., Roussel, F., Scazzocchio, C. and Brygoo, Y: Cloning of the nitrate reductase gene (*niaD*) of *Aspergillus nidulans* and its use for transformation of *Fusarium oxysporum*. *Gene* **78** (1989) 147-156.

Maloney A. P. and VanEtten, H. D.: A gene from the fungal plant pathogen *Nectria haematococca* that encodes the phytoalexin-detoxifying enzyme pisatin demethylase defines a new cytochrome P450 family. *Mol. Gen. Genet.* **243** (1994) 506-514.

Maniatis, T., Fritsch, E. F. and Sambrook, J.: In *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. New York: Cold Spring Harbor Laboratory. (1982)

Marino, R., Saksena, K. N., Schuler, M., Mayfield, J. E. and Lemke P. A.: Double-stranded ribonucleic acid in *Agaricus bisporus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **31** (1976) 433-438.

Matsumoto, Y and Wickner R. B.: Yeast 20S RNA replicon. *J. Biol. Chem.* **366** (1991) 12779-12783.

松尾 卓見, 駒田 旦, 松田 明: 作物のフザリウム病. 全国農村教育会 (1980).

Meyers, G., Rüenpf, T. and Thiel, H.-J.: Molecular cloning and nucleotide sequence of the hog cholera virus. *Virology* **171** (1989) 555-567.

Miller, W. A., Waterhouse, P. M. and Gerlach, W. L.: Sequence and organization of barley yellow dwarf virus genomic RNA. *Nucleic Acids Res.* **13** (1988) 6097-6111.

Mills, D. R., Priano, C., DiMauro, P. and Binderow, B. D.: Q-beta replicase: mapping the functional domains of an RNA-dependent RNA polymerase. *J. Mol. Biol.* **205** (1988) 751-764.

Mindichi, L, Nemhauser, I., Gottlieb, P., Romantschuk, M., Carton, J., Frucht, S., Strassman, J., Bamford, D. H. and Kalkkinen, N.: Nucleotide sequence of the large double-stranded RNA segment of bacteriophage $\phi 6$: genes specifying the viral replicase and transcriptase. *J. Virol.* **62** (1988) 153-158.

Miyasaka, A., Chen, C. L. and Hashiba, T.: Detection and properties of plasmid-like DNA in isolates from nine anastomosis and interspecific groups of *Rhizoctonia solani*. *J. Gen. Microbiol.* **136** (1990-a) 1791-1798.

Miyasaka, S., Hirochika, H., Ikeda, J. and Hashiba, T.: Linear plasmid DNAs of the plant pathogenic fungus *Rhizoctonia solani* with unique terminal structures. *Mol. Gen. Genet.* **220** (1990-b) 165-171.

Mor, H., Steinlauf, R. and Baeash, I.: Virus like particles and double-stranded RNA in *Geotrichum candidum*, the causal agent of citrus sour rot. *Phytopathology* **74** (1984) 921-924.

Murphy, F. A., Fauquet, C. M., Bishop, D. H. L., Ghabrial, S. A., Jarvis, A. W., Martelli, G. P., Mayo, M. A. and Summers M. D.: Virus taxonomy - Sixth report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. *Archives of Virology* **10** (1995).

永田恭介 and 山中邦俊: RNAレプリコンの構造と機能. 蛋白質・核酸・酵素 **36** (1991) 2480-2493.

夏秋 知英: Cryptovirusの遺伝解析. 植物ウイルス病研究会レポート **2** (1993) 52-59.

Nuss, D. L.: Biological control of chestnut blight: an example of virus-mediated attenuation of fungal pathogenesis. *Microbiol. Rev.* **56** (1992) 561-576.

Nutter, R. C., Scheets, K., Panganiban, L. C. and Lommel, S. A.: The complete nucleotide sequence of the maize chlorotic mottle virus genome. *Nucleic Acids Res.* **17** (1989) 3163-3177.

Oh, C-S. and Hillman B. I.: Genome organization of a partitivirus from the filamentous ascomycete *Atkinsonella hypoxylon*. *J. Gen. Virol.* **75** (1995) 1461-1470.

Oeser, B. and Tudzynski, P.: The linear mitochondrial plasmid pCIK1 of the phytopathogenic fungus *Claviceps purpurea* may code for a DNA polymerase and RNA polymerase. *Mol. Gen. Genet.* **217** (1989) 132-140.

Ohtakara, A.: Viscosimetric assay for chitinase. *Methods Enzymol.* **161** (1988) 426-430.

Ohtakara, A., Izumi, M. and Mitsutomi, M.: Action of microbial chitinases on chitosan with different degrees of deacetylation. *Agric. Biol. Chem.* **52** (1988) 3181-3182.

Okazaki, M and Saito, H.: List of Culture collection of *Fusarium* in shinshu university. *Bull. Jpn. Fed. Cult. Coll.* **3** (1987) 54-62.

Pelletier, A. and Sygusch, J.: Purification and characterization of three chitosanase activities from *Bacillus megaterium* Pl. *Appl. Environ. Microbiol.* **56** (1990) 844-848.

Pevear, D. C., Calenoff, M., Rozhon, E. and Lipton, H. L.: Analysis of the complete nucleotide sequence of the picornavirus theiler's murine encephalomyelitis virus indicates that it is closely related to cardioviruses. *J. Virol.* **61** (1987) 1507-1516.

Poch, O., Sauvaget, I., Delarue M. and Tordo N.: identification of four conserved motifs among the RNA-dependent polymerase encoding elements. *EMBO J.* **8** (1989) 3867-3874.

Polashock, J. J. and, Hillman B. L.: A small mitochondrial double-stranded (ds) RNA element associated with a hypovirulent strain of the chestnut blight fungus and ancestrally related to yeast cytoplasmic T and W dsRNAs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **91** (1994) 8680-8684.

Price, J. S. and Storck, R.: Production, purification and characterization of an extracellular chitosanase from *Streptomyces*. *J. Bacteriol.* **124** (1975) 1574-1585.

Pryor, A. and Boelen, M. G.: A double-stranded RNA mycovirus from the maze rust *Puccinia sorghi*. *Can. J. Bot.* **65** (1987) 2380-2383.

Reisfeld, R. A., Lewis, U. J. and Williams, D. E.: Disk electrophoresis of basic proteins and peptides on polyacrylamide gel. *Nature* **195** (1962) 281-283.

Reyes, F., Lahoz, R., Martinez, M. J. and Alfonso, C.: Chitosanases in the autolysis of *Mucor rouxii*. *Mycopathologia* **89** (1985) 181-187.

Rodriguez-Cousiño, N., Esteban, L. M. and Esteban R.: Molecular cloning and characterization of W double-stranded RNA, a linear molecule present in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **266** (1991) 1272-1278.

Sakai, K., Katsumi, R., Isobe, A. and Nanjo, F.: Purification and hydrolytic action of a chitosanase from *Nocardia orientalis*. *Biochem. Biophys. Acta* **1079** (1991) 65-72.

Samac, D. A. and Leong, S. A.: Two linear plasmids in mitochondria of *Fusarium solani* f. sp. *cucurbitae*. *Plasmid* **19** (1988) 57-67.

Sambrook, J., Fritsch, E. F. and Maniatis, T.: In Molecular Cloning: A Laboratory Manual second edition. New York: Cold Spring Harbor Laboratory. (1989).

- Seino, H., Tsukuda, K. and Shimasue, Y.: Properties and action pattern of chitosanase from *Bacillus* sp. PI-7S. *Agric. Biol. Chem.* **55** (1991) 2421-2423.
- Seroussi, E., Reery, T., Ginzberg, I. and Koltin, Y.: Detection of killer-independent dsRNA plasmid in *Ustilago maydis* by a simple and rapid method of extraction of dsRNA. *Plasmid* **21** (1989) 216-225.
- Shapira, R., Choi, G. H., and Nuss D. L.: Virus-like genetic organization and expression strategy for a double-stranded RNA genetic element associated with biological control of chestnut blight. *EMBO J.* **10** (1991-a) 731-739.
- Shapira, R., Choi, G. H., Hillman, B. I. and Nuss, D. L.: The contribution of defective RNAs to the complexity of viral-encoded double-stranded RNA populations present in hypovirulent strains of the chestnut blight fungus *Cryphonectria parasitica*. *EMBO J.* **10** (1991-b) 741-746.
- Soliday, C. L., Dickman, M. B. and Kolattukudy, P. E.: Structure of the cutinase gene and detection of promoter activity in the 5'-flanking region by fungal transformation. *J. Bacteriol.* **171** (1989) 1942-1951.
- Somashekar, D. and Joseph, R.: Partial purification and properties of a novel chitosanase secreted by *Rhodotorula gracilis*. *Lett. Appl. Microbiol.* **14** (1992) 1-4.
- Specht, C. A., DiRusso, C. C., Novotny, C. P. and Ullrich, R. C.: A method for extracting high-molecular-weight deoxyribonucleic acid from fungi. *Anal. Biochem.* **119** (1982) 158-163.
- Stuart, K. D., Weeks, R., Guilbride, L. and Myler, P. J.: Molecular organization of Leishmania virus 1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **89** (1992) 8596-8600.
- Takkinen, K.: Complete nucleotide sequence of the nonstructural protein genes of Semliki forest virus. *Nucleic Acids Res.* **14** (1986) 5667-5682.
- Tavantzis, S. M. and Bandy, B. P.: Properties of a mycovirus from *Rhizoctonia solani* and its virion-associated RNA polymerase. *J. Gen. Virol.* **69** (1988) 1465-1477.

- Tercero, J. C., Dinman, J. D. and Wickner, R. B.: Yeast MAK3 N-acetyltransferase recognizes the N-terminal for amino acids of the major coat protein (gag) of the L-A double-stranded RNA virus. *J. Bacteriol.* **175** (1993) 3192-3194.
- Tercero, J. C. and Wickner, R. B.: MAK3 encodes an N-acetyltransferase whose modification of L-A gag NH2 terminus is necessary for virus particle assembly. *J. Biol. Chem.* **267** (1992) 20277-20281.
- Tercero, J. C., Riles, L. E. and Wickner, R. B.: Localized mutagenesis and evidence for post-transcriptional regulation of MAK3. *J. Biol. Chem.* **267** (1992) 20270-20276.
- Tominaga, Y. and Tsujisaka, Y.: Purification and some enzymatic properties of the chitosanase from *Bacillus* R-4 which lyses *Rhizopus* cell wall. *Biochem. Biophys. Acta* **410** (1975) 145-155.
- Van der Lende, T. R., Harmsen, M. C., Go, S. J. and Wessel, J. G. H.: Double-stranded RNA mycovirus in mycelium of *Pleurotus ostreatus*. *FEMS Microbiol. Lett.* **125** (1995) 51-56.
- Ward, C. W.: Progress toward a higher taxonomy of viruses. *Res. Virol.* **144** (1993) 419-453.
- Wickner, R. B.: Double-stranded RNA virus replication and packaging. *J. Biol. Chem.* **268** (1993) 3797-3800.
- Wiener, J. R. and Joklik, W. K.: The sequence of the reovirus serotype 1, 2 and 3 L1 genome segments and analysis of the mode of divergence of the reovirus serotypes. *Virology* **169** (1989) 194-203.
- Xie, W. S., Antoniow, J. F. and White, R. F.: Nucleotide sequence of beet cryptic virus 3 dsRNA 2 which encodes a putative RNA-dependent RNA polymerase. *J. Gen. Virol.* **74** (1993) 1467-1470.
- Yamasaki, Y., Ohta, Y., Morita, Y., Nakagawa, T., Kawamukai, M. and Matsuda, H.: Isolation, identification, and effect of oxygen supply on cultivation of chitin and chitosan degrading bacterium. *Biosci, Biotechnol. Biochem.* **56** (1992) 1325-1326.
- Yoshihara, K., Hosokawa, J., Kubo, T., Nishiyama, M. and Koba, Y.: Purification and properties of a chitosanase from *Pseudomonas* sp. H-14. *Biosci. Biotechnol. Biochem.* **56** (1992) 972-973.