

特集：病原力低下因子利用による果樹類紋羽病の遺伝子治療

病原力低下因子導入技術の開発および導入菌株の作出

果樹研究所生産環境部 佐々木 厚 子

はじめに

菌類ウイルスの多くは二本鎖 RNA (dsRNA) をゲノムにもち、そのほとんどは感染によって宿主の菌類に影響を及ぼさないが (VARGA et al., 2003), これらの中にはまれに宿主に悪影響を及ぼすものもある。特に植物病原糸状菌では宿主の病原力を低下させるウイルスがいくつか見出されており、生物防除資材としての利用の可能性が期待される。中でもクリ胴枯病菌で見出された病原力低下因子である hypovirus (CHV) は、人工接種法が確立していることから、解析が大きく先行している (DAWE and NUSS, 2001)。

前章で述べられたとおり、生物防除資材として利用し得る病原力低下因子を見出すため、果樹類紋羽病菌において dsRNA を含む株の探索がなされ、多様な dsRNA が見出され (松本ら, 2001 ; ARAKAWA et al., 2002 ; 池田ら, 2002), 病原力低下効果のあるものも確認された (KANEMATSU et al., in submission)。菌類ウイルスは菌糸融合による伝搬経路のみが知られているが、これによる伝播は同一菌糸融合群内に限定されることが多いため、見出された dsRNA が異なる菌糸融合群の菌株にも効果があるのか判定するのが困難にしている。また紋羽病菌は圃場内で異なる MCG ごとにパッチを形成しているが (中村ら, 2001 ; 2002 ; 2003), これらを超えて広く圃場内でまん延させるためにも、菌糸融合に限定されない効果的な導入方法を開発する必要がある。

本稿ではこれまでの研究によって得られたウイルス導入法に関する知見の中から、菌糸融合を介した移行にとられない感染拡大法として、白紋羽病菌ではプロトプラストを介した純化ウイルスの接種法を、紫紋羽病菌ではベクターモノカリオン法を紹介する。また本研究にて糸状菌ウイルスを本来見出された宿主とは別の種に感染させることが可能となったので、それも併せて紹介する。

Development of Strategy to Introduce Hypovirulent Factors into Fungi and Production of Hypovirulent Strains. By Atsuko SASAKI

(キーワード: 菌類ウイルス, プロトプラスト, ベクターモノカリオン, パーティクルガン)

I 紋羽病菌へのウイルス導入法

1 白紋羽病菌へのプロトプラストを介した純化ウイルス接種

(1) 糸状菌におけるウイルスの純化と接種

糸状菌ウイルスは近年続々とシークエンズ解析がなされ、いくつかのウイルスでは粒子が純化されている (VARGA et al., 2003)。多くの粒子は球形であるが、棒状のものも報告がある。また糸状菌では少ないながらもプロトプラストを介した純化ウイルスの接種を行った実験が報告されている (LHOAS, 1971)。しかし、一般的に糸状菌ウイルスは濃度が低く純化は困難であるとされる。CHV で解析が先行しているのは、ウイルスの感染性クローンが構築されたことのみならず、宿主のクリ胴枯病菌は形質転換により遺伝的解析が可能である点も大きい。本研究において白紋羽病菌から見出されたウイルス粒子の純化を行い、同時にプロトプラスト調製—再生系およびプロトプラストを介した形質転換法を確立し、それを応用することによってウイルス粒子の接種が可能になったので、これらについて報告する。

(2) プロトプラストの調製

プロトプラスト調製のための浸透圧調節剤、消化酵素の種類や濃度および処理温度、また再生条件について、最適な条件を検討した結果は以下のとおりである (KANEMATSU et al., in submission)。菌体を 0.4% Zymorise 100T と 1% Lysing Enzyme を含む 0.6 M マンニトール、10 mM MOPS (pH 7.0) で 20℃, 2 時間処理した後、プロトプラストを回収した。本法で菌体 1 g 当たり $0.5 \times 10^6 \sim 1 \times 10^7$ 個のプロトプラストが得られた。またプロトプラストは再生液体培地を加えて 1 週間培養した後、再生固体培地で培養して再生させた。プロトプラストから菌体への再生率は 0.01 ~ 0.03% であった。プロトプラストの収量、再生率ともに他の糸状菌と比較して低かった。

(3) ウイルス純化法

白紋羽病菌で見出された dsRNA ウイルスのうち、シークエンズ解析の結果から W8 株由来の M-dsRNA は Partitivirus と、W370 株由来の 12 セグメントからなる

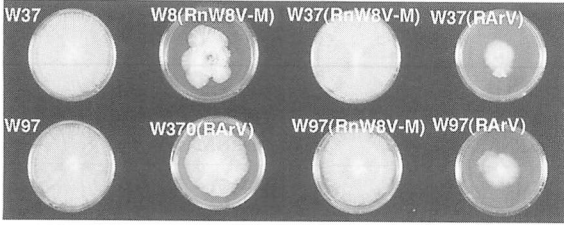


図-1 ウイルスを接種した白紋羽病菌の培養性状

W37 株と W97 株はウイルスフリー株、W8 株は RnW8V-M が、W370 株は RArV がもともと感染していた株、ウイルスを接種した株は菌株名の横にウイルス名をカッコで示した。

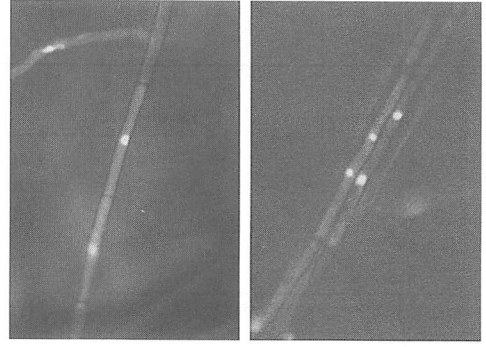


図-2 紫紋羽病菌の核数

左がモノカリオン株 (1核)、右がダイカリオン株 (2核)。

dsRNA は Reovirus と相同性があることが示されている (佐々木ら, 2002 ; OSAKI et al., 2002a ; WEI et al., 2003)。便宜上 W8 株由来の M-dsRNA に RnW8V-M, W370 株由来の dsRNA に RArV と名前を付け、ウイルス粒子の純化を試みた。ウイルスはそれぞれの凍結保存菌株を液体窒素で磨砕し、リン酸バッファーで抽出し、四塩化炭素で清澄化し、PEG-NaCl で沈殿させ、ショ糖密度勾配遠心によって部分純化を行った。RnW8V-M は密度 30% 付近に明瞭なバンドを形成し、電顕観察によってウイルス様粒子が観察された。RArV は明確な粒子は観察されなかったものの、30%の密度勾配中にウイルスゲノム核酸のピークが形成されたことから、このフラクションをウイルス画分とした。

(4) 形質転換またはウイルスの接種

形質転換はプロトプラストに PEG-Ca²⁺ の存在下でハイグロマイシン耐性を付与したプラスミドを取り込ませ、菌体を再生させた後、ハイグロマイシンを含む培地で生育させてスクリーニングした。その結果、形質転換効率はプラスミド 10 μg 当たり 2 ~ 5 個体の形質転換体が得られた。

ウイルス接種は dsRNA フリー株をプロトプラスト化し、プラスミドを純化ウイルス画分に変更して同様の操作を行い、菌体を再生固体培地全面に再生させた。

(5) ウイルス感染の確認と培養性状の変化

ウイルス接種後、菌糸を全面に再生させた培地から 6 ~ 8 個ランダムに含菌寒天を打ち抜き、セロファンを敷いた PDA 上で培養後、dsRNA の抽出に供試した (佐々木ら, 2003)。RnW8V-M の場合、感染率はほぼ 100% であったが、RArV は 16 ~ 33% と感染率に差があった。ウイルス接種後の培養性状は RnW8V-M 接種株ではウイルスフリー株と変わらず健全なままであったが、RArV 接種株はもともと RArV が感染していた野生株と同様の生育異常を示した (図-1)。これは供試した異な

る菌糸融合群に属する 2 菌株 (W37 株と W97 株) とも同様であった。

(6) 対峙培養による移行の確認

純化ウイルス接種株から他の菌株にウイルスが移行するか確認するため、マーカーとしてハイグロマイシン耐性遺伝子を導入したウイルスフリー株を受容株、ウイルス接種株を供与株として対峙培養した後、受容株側をハイグロマイシンを含む培地で生育させ、ウイルス dsRNA の有無を確認した (佐々木ら, 2003)。RnW8V-M の場合ウイルスは速やかに移行して受容株内で広がり、移行した菌株はウイルスフリー株と変わらない培養性状を示した。RArV の場合、移行は菌糸接触部近傍に限られた。ウイルスが移行した株はウイルス接種株と同様の培養性状を示した。ウイルスの移行様式は W37 株、W97 株ともに変わらなかった。以上の結果から、白紋羽病菌では本法を用いることより菌糸融合群を超えてウイルスを感染させ得ることが明らかになった。

2 紫紋羽病菌におけるベクターモノカリオン法を用いたウイルス導入

(1) ベクターモノカリオン法

紫紋羽病菌ではプロトプラストの調製・再生とも困難であったため、白紋羽病菌のようなウイルスの感染実験は行えなかった。そこで菌糸融合群を超えてウイルスを感染させるために、ベクターモノカリオン法が考案された。紫紋羽病菌は通常は 1 細胞中に核を 2 個含むダイカリオンであるが、継代培養中に核が 1 核化したモノカリオンが見られた (AIMI et al., 2001) (図-2)。モノカリオンの株は体細胞不和合性が厳密に識別されなくなり、ダイカリオンの菌糸と出会った場合、MCG が異なっても融合して相手の核を受け取る。この現象を利用して、ある株で見出された有望ウイルスをモノカリオン株に移

表-1 ベクターモノカリオン株へのウイルス供与株からの移行

供与株 (保持する dsRNA)	受容株 (保持する dsRNA)	移行頻度
V17 (V17ds)	V1M (V1ds)	1/10
V70 (V70ds)		1/10
V1M (V1Mds + V17ds) ^{a)}	V3M	1/10
V17 (V17ds)		— ^{b)}
V70 (V70ds)		3/10

^{a)} 対峙培養後 V17 の dsRNA が移行した V1M 株. ^{b)} 移行が起こらなかった組み合わせ.

行させ、これを橋渡しとして菌糸融合群の異なる株に移行させるというのがベクターモノカリオン法の概念である。本研究では紫紋羽病菌で見出された病原力低下に関わるウイルスを、ベクターモノカリオンを介して MCG の異なる菌株に移行させることが可能となったので、これについて報告する。

(2) 対峙培養によるユニバーサルイノキュラム株への移行

本研究ではベクターモノカリオン株として V1M 株と V3M 株の 2 菌株 (以下、モノカリオンを示すものには菌株名の最後に M をつけて表記する)、ウイルス供与株として dsRNA 保持株で病原力の弱い V17 株と V70 株の 2 菌株 (ともにダイカリオン) を供試し、ウイルスの移行が起こるか確認した (SUZAKI et al., 2003 ; 須崎ら, 2003)。なお、シークエンス解析から V70 株は Partitivirus が (OSAKI et al., 2002b)、V17 株は Totivirus が感染していることが明らかになっている (NOMURA et al., 2003)。V1M 株も dsRNA を含んでいるがこれについては未解析である。供与株と受容株の組み合わせを菌叢接触後 30 日間対峙培養し、ウイルスの移行が起こるか観察した。ウイルスの移行頻度は対峙培養を 10 反復行って確認した。その結果、V17 株と V3M 株以外の組み合わせではウイルス供与株からベクターモノカリオン株へのウイルスの移行が観察された (表-1)。V3M 株へは V17 株のウイルスが移行した V1 株と対峙培養することによって V17 株のウイルスを移行させた。この際、V17 株のウイルスとともに V1M 株が保持していた dsRNA が V3 株へ移行した。ウイルスが移行したベクターモノカリオン株は 1 核のままで、核の移行は起こっていないと考えられた。

(3) 対峙培養によるベクターモノカリオン株からの移行

ウイルスの移行したベクターモノカリオン株を供与株、供与株と MCG の異なる 12 菌株 (すべてダイカリ

表-2 ベクターモノカリオン株から MCG の異なる株への移行

供与株 (保持する dsRNA)	受容株	移行頻度 ^{a)}	供与株 (保持する dsRNA)	受容株	移行頻度 ^{a)}
V1M	V2	— ^{b)}	V3M	V2	—
(V1Mds + V17ds)	V11	—	(V1Mds + V17ds)	V11	1/10
	V12	—		V12	3/10
	V18	4/1		V18	1/10
	V21	0		V21	2/10
	V26	—		V26	—
	V30	—		V30	—
	V48	—		V48	1/10
	V231	2/1		V231	—
	V666	0		V666	—
	V773	—		V773	—
	V777	6/1		V777	1/10
V1M (V1Mds + V70ds)	V2	1/8	V3M (V70ds)	V2	1/10
	V11	—		V11	—
	V12	2/10		V12	—
	V18	7/10		V18	2/10
	V21	—		V21	—
	V26	—		V26	—
	V30	—		V30	—
	V48	—		V48	—
	V231	—		V231	—
	V666	—		V666	4/10
	V773	—		V773	—
	V777	—		V777	—

^{a)} 供与株に複数種の dsRNA が入っている場合、V17ds または V70ds が移行した場合をカウントした. ^{b)} 移行が起こらなかった組み合わせ.

オン) を受容株として、前述の条件で対峙培養を行い、ウイルスの移行を観察した (SUZAKI et al., 2003 ; 須崎ら, 2003)。表-2 に示したとおり、ベクターモノカリオン株からいくつかの菌株へのウイルスの移行が観察された。V18 株ではすべてのベクターモノカリオンとの組み合わせで移行が観察されたが、それ以外の株への移行頻度はまちまちだった。V1 (V1ds + V17ds) 株と V3 (V1ds + V17ds) 株ではすべての dsRNA が移行する場合と、V17 株由来 dsRNA しか移行しない場合があった。対峙培養後のベクターモノカリオン株の核型を確認したところ、1 核のままであった。またウイルス受容株を RAPID 解析したところ、ウイルス移行前と移行後で、パターンに変化は見られず、核の移動は起こっていないと考えられた。

(4) ウイルス移行株の病原力の評価

V17 株のウイルスを受容した菌株の病原力をマルバカイドウ挿木を用いて調べた。菌株による差異が見られた

ものの V17 ウイルスを受容した菌株はウイルスフリーの株と比較して発病の遅延が見られた。発病の遅延は V17 株のウイルスの影響と考えられた (須崎ら, 2003)。

II 異菌種へのウイルス導入法

1 クリ胴枯病菌 hypovirus の *Phomopsis* 属菌とリンゴ腐らん病菌への接種

(1) 糸状菌ウイルスの異菌種への導入

一般に糸状菌ウイルスは接種が困難なことから、宿主範囲が明らかではない場合が多い。例外は CHV で、試験管内で転写した+鎖一本鎖 RNA をプロトプラストに導入することによって、本来の宿主であるクリ胴枯病菌と同属の菌および近縁の属の異なる菌にも感染することが示されている。本研究では糸状菌ではあまり例のないパーティクルガン法を用いて CHV1-713 を発現するベクターをこれまで感染の報告のあった菌よりさらに遠縁の *Phomopsis* 属菌とリンゴ腐らん病菌に導入した (SASAKI et al., 2002)。

(2) パーティクルガン法によるウイルス発現ベクターの導入

クリ胴枯病菌の 155/2 菌株, NB58 株, *Phomopsis* 属菌 G 型株の 930811-14 株, リンゴ腐らん病菌の AVC-51 株と AVC-53 株はセロファンの上で培養し, これをはがして, BioRad 製パーティクルガン PDS-1000/He によりハイグロマイシン耐性遺伝子を撃ち込み, 撃ち込み圧と撃ち込み距離の至適な組み合わせを検討した。得られた至適条件でクリ胴枯病菌 hypovirus の一種, CHV1-EP713 を発現するベクターの pXH9 を導入した。

(3) CHV1-EP713 発現の確認と培養性状の変化

クリ胴枯病菌の CHV1-EP713 感染株は菌叢の白色化と生育遅延という典型的な培養性状の変化を示す。パーティクルガン法で pXH9 が導入され, CHV1-EP713 が発現したクリ胴枯病菌は, 同様な培養性状の変化を示した。CHV1-EP713 が発現した *Phomopsis* 属菌 G 型株では菌叢の著しい散生化, 生育遅延, 分生子形成の増加が観察された。リンゴ腐らん病菌 AVC-51 株では菌叢の著しい散生化, 生育遅延, 色素形成の低下が, AVC-53 株では生育遅延と色素形成の増大が観察された。

(4) 対峙培養による移行

CHV1-EP713 発現形質転換体の培養性状の変化が遺伝子破壊による変異でないことと, 発現ウイルスが導入遺伝子からだけでなく自律増殖できることを確認するため, 健全な非形質転換体をウイルス受容株, ウイルス発現形質転換体をウイルス供与株として対地培養を行った。CHV1-EP713 が移行した株はウイルス発現ベク

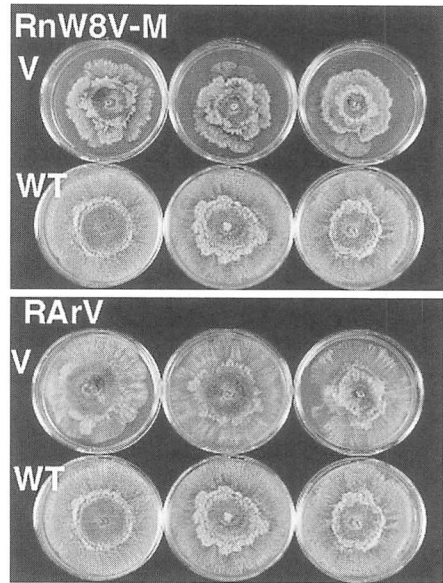


図-3 ウイルスを接種した *Phomopsis* 属菌の培養性状。上が RnW8V-M 接種株, 下が RArV 接種株。写真中の下側のシャーレ (WT) がウイルスフリー株, 上側 (V) がウイルス感染株。

ーが存在しなくとも形質転換体と同様の培養性状を示したことから, 培養性状の変化はウイルス感染によるものと考えられた。クリ胴枯病菌では CHV1-EP713 が速やかに株全体に広がったが, *Phomopsis* 属菌とリンゴ腐らん病菌はクリ胴枯病菌と比較して移行のスピードが遅かった。培養性状が変化した部分から含菌寒天を打ち抜き, 培養した菌体にも CHV1-EP713 が含まれていたことから, CHV1-EP713 は移行した株の中で自律増殖できると考えられた。

(5) CHV1-EP713 発現株の病原力の評価

クリ胴枯病菌の CHV1-EP713 発現株は病原力が低下することから, CHV1-EP713 が発現した *Phomopsis* 属菌はニホンナシとモモの休眠枝, リンゴ腐らん病菌はリンゴ休眠枝に接種して病原力を評価した。*Phomopsis* 属菌, リンゴ腐らん病菌ともに CHV1-EP713 発現株は健全株と比較して 30 ~ 70% に病原力が低下していた。

2 白紋羽病菌由来ウイルスの *Phomopsis* 属菌への接種

糸状菌ウイルスでは, ある糸状菌で得られた純化ウイルスを他の糸状菌に導入する試みはほとんど行われていない。白紋羽病菌で純化ウイルスをプロトプラストに接種することが可能であると示されたことから, この系を応用し, 白紋羽病菌で見出されたウイルスが他の糸状菌にも感染性を有し, 病原力低下効果があるのかを検討する

ために、*Phomopsis* 属菌に対して白紋羽病菌で見出された RnW8V-M と RArV の接種を試みた (兼松ら, 2003)。

I-2-(1)項で述べた RnW8V-M と RArV の部分純化画分をそれぞれ PEG-Ca²⁺存在下で *Phomopsis* 属菌 G 型株のプロトプラスト内に取り込ませ、再生培地に接種し、菌糸が生育するまで培養した。再生させた菌体からウイルス dsRNA を抽出したところ、RnW8V-M, RArV とともに感染が確認された。白紋羽病菌では RnW8V-M 感染による菌叢生育の変化は認められなかったが、*Phomopsis* 属菌では菌叢生育の遅延が観察された (図-3)。一方、RArV 感染株は菌叢が薄くなる傾向にあった。これらウイルス感染株は対峙培養により移行し、ウイルスが移行した株はウイルス感染株と同様の培養性状を示すことも確認された。以上の結果から、白紋羽病菌で見出された2種のウイルスは遠縁の *Phomopsis* 属菌内でも増殖できることが示された。ウイルスに感染した *Phomopsis* 属菌をニホンナシの休眠枝に接種し、病原力を評価した結果、RnW8V-M 感染株、RArV 感染株ともウイルスフリー株と比較して30%程度小さい病斑を形成した。

おわりに

本研究では白紋羽病菌は純化ウイルスの接種によって、また紫紋羽病菌はベクターモノカリオンによって、これまで困難とされていた糸状菌へ任意のウイルスを導入する可能性が開けた。これらの方法によって、弱病原株から見出された有望ウイルスを一定の株に導入して病原力の比較を行うことにより、糸状菌の遺伝的バックグ

ラウンドの差異にとらわれずにウイルスの評価ができること期待される。また、菌類ウイルスの宿主範囲はほとんど不明であったが、本研究によってかなり広い可能性があると考えられた。ウイルスが感染した糸状菌を野外から分離してくる場合、致命的なウイルスが感染したものは分離が不可能なので、ある糸状菌では無害であっても、他の糸状菌には多大な影響を及ぼすウイルスがこれによって探索でき、より強力な生物農薬として使用できるかもしれない。

謝辞：本研究は生物系特定産業技術研究推進機構の援助により行われた。また本研究で使用したウイルス発現ベクターを分譲いただいた Maryland 大学の Dr. Nuss に感謝の意を表します。

引用文献

- 1) AMI, T. et al. (2001) : *Mycoscience* 42 : 247 ~ 254.
- 2) ARAKAWA, M. et al. (2002) : *ibid.* 43 : 21 ~ 26.
- 3) 池田賢一ら (2002) : *日植病報* 68 : 241.
- 4) DAWE, A. L. and D. L. NUSS (2001) : *Annual Review of genetics* 35 : 1 ~ 29.
- 5) 兼松聡子ら (2003) : *日植病報* 69 : 278.
- 6) LHOAS, P. (1971) : *J. Gen. Virol* 13 : 365 ~ 367.
- 7) 松本直幸ら (2001) : *日植病報* 67 : 192.
- 8) 中村 仁ら (2001) : 同上 67 : 198.
- 9) ——— (2002) : 同上 68 : 68.
- 10) ——— (2003) : 同上 69 : 44 ~ 45.
- 11) NOMURA, K. et al. (2003) : *Virus Genes* 26 : 219 ~ 226.
- 12) OSAKI, H. et al. (2002a) : *ibid.* 25 : 101 ~ 107.
- 13) ——— et al. (2002b) : *ibid.* 25 : 139 ~ 145.
- 14) SASAKI, A. et al. (2002) : *Mol. Plant-Microbe Interact* 15 : 780 ~ 789.
- 15) 佐々木厚子ら (2003) : *日植病報* 69 : 278.
- 16) 須崎浩一ら (2003) : *日植病報* 69 : 241.
- 17) SUZAKI, K. et al. (2003) : *Mycoscience* 44 : 139 ~ 147.
- 18) VARGA, J. et al. (2003) : *Acta Microbiologica et Immunologica Hungarica* 50 : 77 ~ 94.
- 19) WEI, C. Z. et al. (2003) : *J. Gen. Virol* 84 : 2431 ~ 2437.

！当協会発行の年刊図書・資料！

農薬適用一覧表 2003 年版

独立行政法人農薬検査所 監修

我が国で登録されている殺虫剤、殺菌剤、除草剤、植物成長調整剤の適用作物 (適用病害虫)・目的等の一覧表。

—平成 15 年 9 月 30 日現在—

定価 13,650 円 (本体 13,000 円) 送料サービス

農薬要覧 2003 年版 (改訂版)

農林水産省農産安全管理課・植物防疫課 監修

我が国で生産・出荷されている全農薬の数量・金額に関する統計資料。

—平成 15 農薬年度—

定価 7,560 円 (本体 7,200 円) 送料サービス

農薬概説 第四版修正 2003 年版

農林水産省農産安全管理課・植物防疫課 監修

植物防疫全国協議会 編集

農薬取扱者が知っておかなければならない事項を解説したテキスト。法律や基準などの詳しい解説を掲載。

—農薬取扱業者研修テキスト—

定価 1,890 円 (本体 1,800 円) 送料 310 円

お申し込みは直接当協会へ、前金 (現金書留・郵便振替) で申し込むか、お近くの書店でお取り寄せ下さい。

社団法人 日本植物防疫協会 出版情報グループ 〒170-8484 東京都豊島区駒込 1-43-11

郵便振替口座 00110-7-177867 TEL (03) 3944-1561 (代) FAX (03) 3944-2103 メール : order@jppa.or.jp