

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

病原力低下因子の分子学的解析

果樹研究所生産環境部 **おお** **さき** **ひで** **き**
大 **崎** **秀** **樹**

はじめに

白紋羽病および紫紋羽病は、多くの植物の根部を犯す糸状菌による病害であり、特に果樹類での被害が大きい。これら両病害を、病原糸状菌に寄生し宿主の(病原菌の)植物に対する病原力を低下させ得る菌類ウイルスおよび二本鎖(ds)RNA(病原力低下因子)を用いて防除することが提案された(MATSUMOTO, 1998)。

菌類ウイルスおよびdsRNAは、多くの菌類から見出されている(BUCK, 1985; NUSS and KOLTIN, 1990)。しかし、白紋羽病菌および紫紋羽病菌からの検出は未報告であった。今回、病原力低下因子を用いた画期的防除法を確立するため、両病原菌からdsRNAを探索したところ、数種の菌類ウイルスを見出した。本稿では両紋羽病菌から見出され、病原力低下作用が認められた2, 3の菌類ウイルスについて紹介したい。

I 白紋羽病菌 W370 から見出されたウイルス

1 白紋羽病菌分離株 W370 から見出された dsRNA

病原力が低い白紋羽病菌分離株 W370 から 12 種の dsRNA (2.95, 2.60, 2.40, 1.55, 1.54, 1.50, 0.91, 0.74, 0.65, 0.61, 0.45, 0.41×10^6) が見出された(図-1)(OSAKI et al., 2002a)。ポリアクリルアミドゲル電気泳動(PAGE)の移動度をもとに分子量の大きい方から第1分節(segment 1; S1)から第12分節(segment 12; S12)と呼称した。これら12種の分子量域は、同じくdsRNAウイルスであり、10~12分節をゲノムにもつ *Reoviridae* 科のそれと近似であった。

2 白紋羽病菌分離株 W370 からのウイルス粒子の精製

菌体からウイルス粒子の純化を試み、電子顕微鏡観察したところ、直径80 nmの完全粒子を見出した。また inner capsid は径60 nmでB spikeを有することが明らかとなった。このウイルスを *Rosellinia anti-rot virus* (RARV) と名付けた(WEI et al., 2003)。

3 塩基配列解析

白紋羽病菌分離株 W370 から見出された12分節すべての dsRNA の全塩基配列を決定したところ、各分節は中央に一つの翻訳領域をもっていた。各推定アミノ酸配列を相同性検索で解析したところ、S1がコードすると考えられる推定タンパク質 VP1 は、*Reoviridae* 科 *Coltivirus* 属の Colorado tick fever virus (CTFV) (ARTOUI et al., 2000), European Eyach virus (EYAV) (ARTOUI et al., 2002) の RNA 依存 RNA 複製酵素 (RDRP) のアミノ酸配列と相同性が認められた。S2の推定タンパク質 VP2 は、CTFV および EYAV の VP2 (メチルトランスフェラーゼに保存されたアミノ酸モチーフをもつ) のアミノ酸配列と相同性が認められた。S4の推定タンパク質 VP4 は、CTFV の VP4 (細胞結合性タンパク質と考えられる) のアミノ酸配列と相同性が認められた。また、S6の推定タンパク質 VP6 は、CTFV の VP10 (核酸結合機能をもつ)、*Reoviridae* 科 *Fijivirus* 属の *Nilaparvata lugens reovirus* の第7分節がコードするタ

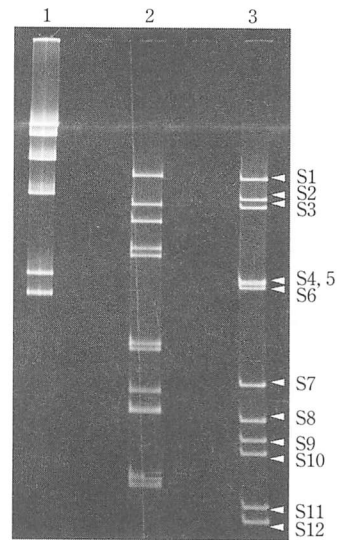


図-1 白紋羽病菌分離株 W370 から見出された二本鎖(ds)RNA

レーン1, λ /Hind III; レーン2, イネ萎縮ウイルス dsRNA ゲノム; レーン3, 白紋羽病菌分離株 W370 から抽出した dsRNA.

Molecular Analysis of Hypovirulence Factor. By Hideki OSAKI
(キーワード: 病原力低下因子, dsRNA, 菌類ウイルス, Reovirus, Rartitivirus, Totivirus)

表-1 *Reoviridae* 科ウイルスと *Rosellinia anti-rot virus* のゲノム末端共通保存配列

ウイルス	ゲノム末端共通保存配列
<i>Phytoreovirus</i> 属 イネ萎縮ウイルス wound tumor virus	5'GGUAAA ... UGAU3' C C 5'GGUAAA ... UGAU3'
<i>Fijivirus</i> 属 イネ黒条萎縮ウイルス	5'AAGUUUUU ... GUC3'
<i>Oryzavirus</i> 属 イネレギッドスタント ウイルス	5'GAUAAA ... GUGC3'
<i>Coltivirus</i> 属 Colorado tick fever virus	5'GACAUUUUGU ... UGCAGUG3' C C
<i>Rosellinia anti-rot virus</i>	5'ACAAUUU ... UGCAGAC3' AA A

ンパク質 (コアタンパク質), そして同じく *Fijivirus* 属のイネ黒条萎縮ウイルスの第8分節がコードするタンパク質 (コアタンパク質) のアミノ酸配列と相同性が見られた。さらに, S12の推定タンパク質 VP12は, ssRNAウイルスである *Astroviridae* 科 turkey astrovirus の外被タンパク質 (CP) 前駆体と相同性が見られた。しかし, その他7種の dsRNA (S3, S5, S7-11) がコードすると考えられる推定タンパク質のアミノ酸配列については, 相同性が認められるものはなかった。

RDRP アミノ酸配列を基に, ほかの *Reoviridae* 科ウイルスとの系統樹を作成したところ, 本ウイルスは *Coltivirus* 属と最も近縁であり, 共通の先祖ウイルスから派生したと示唆された (WEI et al., in press)。

4 各分節末端の共通保存配列

各分節の5', および3'末端にはそれぞれ保存された共通配列が見出された (表-1)。これらの特徴は, *Reoviridae* 科に見られ, また, 同属のウイルス間ではその配列の類似性が高いことが知られている。本 W370 dsRNA の末端保存配列は, 5'末端が (5'-ACAAU^U/A^U/A-3') で, 3'末端が (5'-^U/AGCAGAC-3') であり, 推定タンパク質のアミノ酸配列に相同性が見られた CTFV の共通保存配列 (5'-^G/cACAUUUUGU ... UGCAGU^G/c-3') と類似性が見られた。

分節したゲノムをもつウイルスでは, それぞれのセグメントが同じ機構で, 複製および転写するために, 分節間で共通の塩基配列または高次構造をもつと考えられており, 本ウイルスでも, この末端共通保存配列がこれらの役割を担っていると示唆された。

5 逆向き繰り返し配列による各分節特有パンハンドル構造

さらに, 各分節の両末端領域には, 共通保存配列に続いて各分節に特異的な数塩基の逆向き反復配列があり, これにより各々の分節両末端が相補結合し, 分節特有のパンハンドル構造をとることが明らかとなった。これらは *Reoviridae* 科ウイルスで知られている特徴と一致していた。*Reoviridae* 科ウイルスは, 一つのウイルス粒子に分節したゲノムが1コピーずつセットになってパッケージングされている。したがって, 分節ゲノム間で複製や転写に必要な共通保存配列のほかに, パッケージングされる際に各々の分節を識別するシグナルが必要であると示唆されており, この分節特異的パンハンドル構造がそのシグナルではないかと考えられている (ANZOLA et al., 1987)。

6 菌類を宿主とする初めての *Reoviridae* 科ウイルス

従来, 菌類 dsRNA ウイルスは, *Totiviridae* 科, *Chrysoviridae* 科, *Partitiviridae* 科, そして *Hypoviridae* 科 (van REGENMORTEL et al., 2000) に分類されていた。今回, 白紋羽病菌分離株 W370 より見出された12種 dsRNA の全塩基配列解析およびウイルス粒子観察より, 本ウイルスは *Reoviridae* 科のウイルスであると考えられた。*Reoviridae* 科ウイルスは, 無脊椎動物, 脊椎動物, そして植物から見出されているが, 菌類からは未報告であった。本ウイルスが最初の *Reoviridae* 科に属する菌類ウイルスであること, また RDRP のアミノ酸配列を基にした系統樹解析の結果から, *Reoviridae* 科に菌類レオウイルスのための新属の創設が期待された。さらに, クリ胴枯病菌の低病原力分離株から, 本ウイルスに似た多分節 (11分節) の dsRNA が見出されている (ENEBAK et al., 1994)。これら dsRNA も菌類レオウイルス由来である可能性が示唆された。

Mertens 博士は, 白紋羽病菌分離株 W370 から見出された本ウイルスを, type species とする *Mycodornavirus* 属の新設を国際ウイルス分類委員会 (ICTV) に提案した。“Myco”は菌類を, “dorna”は dodeca (12分節) RNA をそれぞれ意味する。

II 紫紋羽病菌 V70 から見出されたウイルス

1 紫紋羽病菌分離株 V70 から見出された dsRNA

病原力が低い紫紋羽病菌分離株 V70 菌体から核酸を抽出し CF-11 セルロースカラムで精製した試料を PAGE 解析すると3種の dsRNA が見出された。それらの分子量は 1.30, 1.27, 1.23 × 10⁶ (dsRNA1, 2, 3) であった (OSAKI et al., 2002b)。

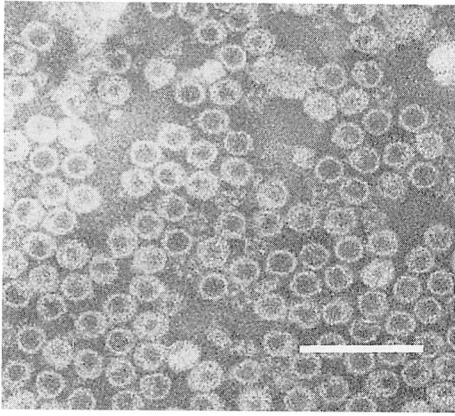


図-2 紫紋羽病菌分離株 V70 から精製したウイルス粒子
バーは 100 nm.

2 紫紋羽病菌分離株 V70 からのウイルス粒子の精製
菌体からウイルス粒子画分を精製したところ、約 25 nm の球形粒子が見出され (図-2)、また、同試料から同様に 3 種の dsRNA が検出された。さらに、ウイルス純化試料を SDS-PAGE 解析すると、CP の分子量は 67 K と算出された。本ウイルスを *Helicobasidium mompa* 70 virus と呼称した。

3 塩基配列解析

3 種の dsRNA 中、最大の dsRNA1 の塩基配列を解析したところ、それは 1,928 塩基よりなっていた。その中には 598 アミノ酸残基をコードする 1,794 塩基の翻訳領域が見出された。この翻訳産物には広く RNA ウイルスの RDRP 中に存在する 8 種のアミノ酸保存配列が含まれていたことより、RDRP である可能性が示唆された。さらに相同性検索の結果、当翻訳産物は同じく糸状菌 *Atkinsonella hypoxylon* から見出された *Partitiviridae* 科 *Partitivirus* 属 *Atkinsonella hypoxylon* 2H virus (OH and HILLMAN, 1995) のそれと相同性が高かった。*Partitiviridae* 科は一般的に RDRP と CP をそれぞれコードする 2 分節を保有するが、本ウイルス RDRP と相同性が高かった *A. hypoxylon* 2H virus は、本ウイルスと同様、サテライトと推定される 3 種目の dsRNA を保有していた。

4 系統解析

RDRP のアミノ酸配列をもとにほかの菌類ウイルス等と系統解析を行ったところ、*H. mompa* 70 virus は、*A. hypoxylon* 2H virus、*Fusarium solani* virus などの *Partitiviridae* 科ウイルスとクラスターを形成し、*Helminthosporium victoriae* virus 190S (HvV190S)、*Saccharomyces cerevisiae* virus La、*Ustilago maydis* virus

H1 などの *Totiviridae* 科ウイルスは別のクラスターを作った。これらの結果より、*H. mompa* 70 virus は *Partitivirus* 属の新規な菌類ウイルスであるとともに、紫紋羽病菌から見出された初めての菌類ウイルスであることが明らかとなった。*Partitivirus* 属ウイルスは、*Rhizoctonia solani* の弱病原性分離株 (STRAUSS et al., 2000) 等、多数の菌類から見出されている。

III 紫紋羽病菌 V17 から見出されたウイルス

1 紫紋羽病菌分離株 V17 から見出された dsRNA

病原性が低い紫紋羽病菌分離株 V17 菌体から CF-11 セルロースカラムを用い dsRNA 画分を精製し、5% PAGE で解析したところ、2 種の dsRNA が検出された。それらのサイズは、約 5.5 kbp (17L)、2.2 kbp (17S) と算出された (NOMURA et al., 2003)。

2 紫紋羽病菌分離株 V17 からのウイルス粒子の精製

ウイルス画分を精製し電子顕微鏡観察したところ、約 40 nm の球形ウイルス粒子が見出された。また、ウイルス純化試料を SDS-フェノール処理し PAGE 解析したところ、2 種の dsRNA (17L, 17S) が検出された。

3 塩基配列解析

17L dsRNA と 17S dsRNA の塩基配列を解析したところ、17L は 5,207 bp、17S は 2,096 bp からなっていた。17L には、*Totiviridae* 科の特徴であるオーバーラップする二つの翻訳領域 (ORF1, ORF2) が見出された。

ORF1 (200 ~ 2,566) は、788 アミノ酸残基からなる推定分子量 83.0 K、pI 8.13 のポリペプチドをコードすると考えられた。相同性検索の結果、このポリペプチドは、HvV190S (42%) (HUANG and GHABRIAL, 1996)、*Sphaeropsis sapinea* RNA virus 1 (SsRV1; 38%) (PREISIG et al., 1998)、そして *S. sapinea* RNA virus 2 (SsRV2; 37%) のそれぞれの CP と相同性が示された。純化試料を SDS-PAGE で解析をすると 77 K と 87 K のバンドが見られた。HvV190S 純化試料からも同様に 78 K、88 K の 2 種のタンパク質が見出されている。

ORF2 (2,563 ~ 5,100) は、845 アミノ酸残基からなる推定分子量 93.1 K、pI 8.47 のポリペプチドをコードすると考えられた。このポリペプチドには RDRP で保存されたモチーフが存在することから、RDRP であることが考えられた。相同性検索の結果、このポリペプチドは、SsRV1 (40%)、SsRV2 (35%)、そして HvV190S (36%) のそれぞれの RDRP との相同性が示された。*Totiviridae* 科は、3 属 (*Totivirus*、*Giardiavirus*、そして *Leishmanivirus*) から構成されている。SsRV1、SsRV2 および HvV190S は *Totivirus* 属に分類されている。CP

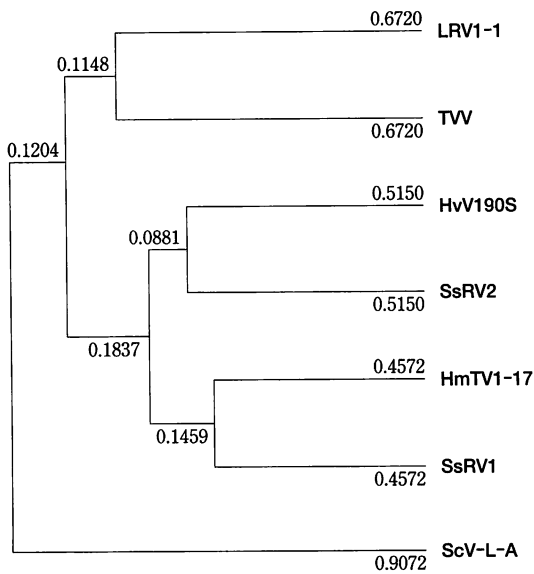


図-3 *Helicobasidium mompa* Totivirus 1-17 および他 Totiviridae 科ウイルスの RNA 依存 RNA 複製酵素 アミノ酸配列を基にした UPGMA 法による系統樹
 HmTV1-17: *Helicobasidium mompa* Totivirus 1-17, HvV190S: *Helminthosporium victoriae* virus 190S, SsRV1: *Sphaeropsis sapinea* RNA virus 1, SsRV2: *S. sapinea* RNA virus 2, ScV-L-A: *Saccharomyces cerevisiae* virus L-A, TVV: *Trichomonas vaginalis* virus, LRV1-1: *Leishmania* RNA virus 1-1.

および RDRP のアミノ酸配列の相同性から本ウイルスは *Totivirus* 属に分類されると考えられる。そこで、このウイルスを *Helicobasidium mompa* Totivirus 1-17 (HmTV1-17) と呼称した。

17S dsRNA は、両鎖とも短い ORF しかもたず、タンパク質をコードしていないと考えられ、サテライト分子と示唆された。*Totivirus* 属 *Saccharomyces cerevisiae* virus L-A (ScV-L-A) のサテライト dsRNA は、酵母のキラ現象 (WICKNER, 1986) に関与しているため、本 17S dsRNA についても、病原性低下機構に何らかの関与をしている可能性もあり、その複製機構等さらなる精査が必要であろう。

4 系統解析

本ウイルスの RDRP を、*Totivirus* 属の SsRV1, SsRV2, HvV190S, ScV-L-A, *Giardiavirus* 属の *Trichomonas vaginalis* virus (TVV), および *Leishmaniavirus* 属の *Leishmania* RNA virus 1-1 (LRV1-1) のそれぞれの RDRP のアミノ酸配列とのアライメントを行い、さらに系統樹を作成した (図-3)。

RDRP のアミノ酸配列を基にした系統樹は、HmTV1-17 が HvV190S より SsRV1 により近縁であることを示した。一方、CP において、HmTV1-17 は、SsRV1 (38%) よりむしろ HvV190S (42%) に高い相同性を示した。これらの結果は菌類ウイルスゲノムの heterogeneity を示唆するものであった。これら菌類ウイルスの RNA 組換えや進化の過程は、大変興味をもたれる。

おわりに

白紋羽病菌および紫紋羽病菌の低病原性分離株より見出された dsRNA の分子学的解析を行い、今回 3 種のウイルスを見出した。そのうち 1 種、白紋羽病菌分離株 W370 から見出されたウイルスは、今まで菌類から未報告の *Reoviridae* 科のウイルスと示唆された。dsRNA および菌類ウイルスは多くの菌類から多数見出され、近年それらの分子学的解析がなされているが、解析されたものは見出された数に比べて依然少なく、現在でもこれらの研究は序についたとしかいえない状況にある。これらからも菌類から新規ウイルスが見出される可能性は多いにあると思われる。

今後、両紋羽病菌から見出されたこれらウイルスの病原性低下機構の解析をとおして、防除の難しい果樹類両紋羽病害に対する、環境負荷がなく持続的な防除法の確立を目指したい。

謝辞: 本研究は、生物系特定産業技術研究推進機構の援助を受け行われた。

引用文献

- 1) ANZOLA, J. V. et al. (1987): Proc. Natl. Acad. Sci. USA 84: 8301 ~ 8305.
- 2) ATTOUTI, H. et al. (2000): Biochem. Biophys. Res. Commun. 273: 1121 ~ 1125.
- 3) ——— et al. (2002): Arch. Virol. 147: 533 ~ 561.
- 4) BUCK, K. W. (1985): Fungal Virology, CRC Press, Boca Raton, pp.2 ~ 84.
- 5) ENEBAK, S. A. et al. (1994): MPMI 7: 590 ~ 595.
- 6) HUANG, S. and S. A. GHABRIAL. (1996): Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93: 12541 ~ 12546.
- 7) MATSUMOTO, N. (1998): JARQ 32: 31 ~ 35.
- 8) NOMURA, K. et al. (2003): Virus Genes 26: 219 ~ 226.
- 9) NUSS, D. L. and Y. KOLTIN (1990): Annu. Rev. Phytopathol. 28: 37 ~ 58.
- 10) OH, C.-S. and B. I. HILLMAN (1995): J. Gen. Virol. 76: 1461 ~ 1470.
- 11) OSAKI, H. et al. (2002a): Virus Genes 25: 101 ~ 107.
- 12) ——— et al. (2002b): ibid. 25: 139 ~ 145.
- 13) PREISIG, O. et al. (1998): Virology 252: 399 ~ 406.
- 14) STRAUSS, E. E. et al. (2000): J. Gen. Virol. 81: 549 ~ 555.
- 15) van REGENMORTEL, M. H. V. et al. (2000): Virus Taxonomy, Academic Press, San Diego, pp.491 ~ 520.
- 16) WEI, C. Z. et al. (2003): J. Gen. Virol. 84: 2431 ~ 2437.
- 17) ——— et al. (2004): Arch. Virol. (in press).
- 18) WICKNER, R. B. (1986): Ann. Rev. Biochem. 55: 373 ~ 395.