

## 論文の内容の要旨

生産・環境生物学専攻

平成 11 年度博士課程進学

氏 名 横井寿郎

指導教官 日比忠明

### 論文題目 イネ病原菌類ウイルスのゲノム構造に関する研究

菌類ウイルスの研究が始まったのは 1950~1960 年代であり、動物や高等植物のウイルスまたはバクテリオファージと比較すると、非常にその進展が立ち遅れた分野である。しかし、近年いくつかの菌で生育異常あるいは病原性にウイルスが関与している可能性が指摘されたことでこの分野に改めて注目が集まり、それらのウイルスを利用した生物防除や弱毒菌株の作出などが検討されはじめた。ウイルス学的な研究が依然立ち遅れているこの分野において、菌類ウイルスの分子生物学的性状を解析し、それらの有効利用を考慮して重要遺伝子資源としての位置付けを明確にすることは意義あることであると考えられる。本研究では、イネ科植物の病原菌類のうち、*Sclerophthora macrospora* virus A, B (SmV A および SmV B) と *Magnaporthe grisea* virus (MgV) に関して、ゲノム RNA から cDNA クローンを作製してその全塩基配列を決定し、予想されるアミノ酸配列とゲノム構造を、既知のウイルスと比較した。

## 1. *Sclerophthora macrospora* virus A

*S. macrospora* は、広くイネ科植物に黄化萎縮病を引き起こす病原菌類で、鞭毛菌亜門卵菌綱に属する。SmV A は、*S. macrospora* を宿主とする小球形ウイルス（径約 30nm で表面に約 4nm の突起を有する）で、菌類ウイルスとしては稀少な、3 分節の 1 本鎖 RNA をゲノムとする。純化 SmV A から抽出したゲノム RNA から、まず、ランダムプライマーを用いて cDNA クローンを作製した。両末端に関しては、Oligo-capping 法と anchor cloning 法により両 terminal clones を作製し、全長の配列を決定した。また、2 成分のコートプロテイン(CP)の N 末端の部分アミノ酸配列に関して、アミノ酸シーケンシングを行い 10 個ずつの配列を決定した。得られた塩基配列から SmV A のゲノム構造は以下のように考えられた。すなわち、ゲノム RNA の全長はそれぞれ RNA 1: 2927nt, RNA 2: 1982nt, RNA 3: 977nt であることが明らかになった。ORF を解析した結果、RNA 1 には、2697nt の大きな ORF (ORF 1a)と、別のフレームの 3'端付近から始まる 870nt の小さな ORF (ORF 1b)が存在することが明らかになった。両末端の非翻訳領域はそれぞれ 66nt, 164nt であった。RNA 2 には 1269nt の ORF 2 があり両末端の非翻訳領域はそれぞれ 11nt, 702nt であった。RNA 3 にはタンパク質をコードしていると考えられる ORF は存在しなかった。RNA の各 5'末端にはキャップ構造が存在すると推測され、各 3'末端には、poly (A) tail が存在しないことが明らかになった。各 ORF の予想されるアミノ酸配列に関してホモロジーサーチを行った結果、ORF 1a は *Nodaviridae* に属する各ウイルスの RNA-directed RNA polymerase (RdRp)と最も類似性が高く、全体で 17-22%程度の相同性を示した。ORF 1b の配列と有意な相同性を示すウイルスタンパク質は存在しなかった。ORF 2 の配列は *Tombusviridae* に属するウイルスの CP の配列と最も高い類似性を示し、その相同性は全体で 25%程度であった。RNA 3 は有意な ORF が見出せなかったので塩基配列全体をホモロジーサーチした結果、一部の配列が *Sclerophthora macrospora* virus B (SmV B)の配列と高い相同性を示した。SDS-PAGE の結果、2 成分の構造タンパク質は、それぞれ CP 1: 約 39kDa, CP 2: 約 43kDa と推測された。N 末端のアミノ酸シーケンスを行った結果、両タンパクの配列はともに ORF 2 から予想されたアミノ酸配列と一致した。しかし、マイナー成分と思われる 43kDa のタンパクが ORF 2 の最も 5'端のアミノ酸配列と一致したのに対し、メジャー成分と考えられる 39kDa のタンパクは内部の 71 番目からのアミノ酸以降の配列と一致した。この結果から 39kDa のタンパク

は 43kDa のタンパクが翻訳後プロセッシングを受けた産物であると考えられた。SmV A のゲノム構造を他のウイルスと比較すると、SmV B などの菌類ウイルスとは大きく異なっており、むしろ、昆虫ウイルスの *Nodaviridae* と類似していることが明らかになった。以上の結果から、本ウイルスのゲノム構造は既知の菌類 RNA ウイルスとは大きく異なることが明らかになった。

## 2. *Sclerophthora macrospora* virus B

SmV B は、*S. macrospora* を宿主とする小球形ウイルス（径約 32nm で表面平滑）で、単一の 1 本鎖 RNA をゲノムとする。純化 SmV B から抽出したゲノム RNA から、SmV A と同様の方法で cDNA クローンを作製し、全長の配列を決定した。また、CP の N 末端の部分アミノ酸配列に関して、アミノ酸シーケンシングを行い 10 数個の配列を決定した。得られた塩基配列から SmV B のゲノム構造は以下のように考えられた。すなわち、ゲノム RNA は全 5533 塩基からなり、5'末端にキャップ構造は存在しない。5'末端から順に、102nt の非翻訳領域、3840nt の ORF 1、A リッチな 135nt の非翻訳領域、1113nt で 41kDa の CP をコードしている ORF 2、343nt の非翻訳領域が存在し、3'末端にはポリ(A)配列はない。ORF 1 には、キモトリプシン様セリンプロテアーゼおよび RNA-directed RNA polymerase (RdRp)と推定される領域がそれぞれ存在し、約 145kDa のポリプロテインとして発現すると推定された。ORF の各領域に関してホモロジー検索を行い、他の 1 本鎖 RNA ウイルスと比較した。セリンプロテアーゼと推測される領域に関しては、同じく菌類 RNA ウイルスの MBV や植物ウイルスのインゲンマメ南部モザイクウイルス(SBMV)およびジャガイモ葉巻ウイルス(PLRV)などと、GxSG など 3 つのモチーフ配列付近の配列が類似性を示した。RdRp と推測される領域は、プラス 1 本鎖 RNA ウイルスの分類で supergroup 1 に属するウイルス(Koonin, 1993)の多くと 17-22%程度の類似性を示し、GDD モチーフなど 8 つのモチーフ配列付近の配列が保存されていることが明らかになった。CP の領域に関しては、有意な類似性を示す既知のウイルスは存在しなかった。以上の結果から、本ウイルスのゲノム構造は、既知の菌類 RNA ウイルスとは大きく異なる特徴的な構造を有していることが明らかになった。

### 3. *Magnaporthe grisea* virus

*M. grisea* は、イネの最重要病害であるいもち病を引き起こす病原菌類であるが、MgV は同菌を宿主とする径約 36nm の小球形ウイルスで、単一 2 本鎖 RNA をゲノムとする。純化 MgV から抽出したゲノム RNA から、同様に、ランダムプライマーを用いて cDNA クローンを作製した。両末端に関しては、anchor cloning 法により両 terminal clones を作製し、全長の配列を決定した。得られた塩基配列から MgV のゲノム構造は以下のように考えられた。すなわち、ゲノム RNA の全長は 2927nt で、ORF を解析した結果、2 塩基の非翻訳領域をはさんで 2 つの ORF (ORF 1 : 2241nt, ORF 2 : 2499 nt) が存在することが明らかになった。両末端の非翻訳領域はそれぞれ 568nt, 40nt であった。3' 末端には、poly (A) tail が存在しないことが明らかになった。各 ORF の予想されるアミノ酸配列に関してホモロジーサーチを行った結果、どちらの ORF も *Totiviridae* に属する各ウイルスと高い類似性を示し、中でも *Helminthosporium victoriae* virus 190S, *Sphaeropsis sapinea* RNA virus 1, 2 などのウイルスと特に高い相同性を示しどちらの ORF でも 30~35% ほどの相同性を示した。ゲノム構造全体でも、*Totiviridae* に属するウイルスと類似していることが明らかになった。

以上を要するに、3 種のイネ病原菌類ウイルス SmV A, SmV B, MgV のゲノム RNA 全長についてその全塩基配列を決定し、遺伝子構造を解析した結果、SmV A, SmV B のゲノムはそれぞれ、既知の菌類 RNA ウイルスとは大きく異なり、新たなウイルスグループに属すると推測された。一方、MgV は *Totiviridae* に属すると推測された。