

学 位 論 文

イネいもち病菌クリソウイルスの網羅的な性状解析及び
宿主菌に与える影響に関する研究

**Fundamental biochemical analysis of Magnaporthe oryzae chrysovirus 1
(MoCV1) and biological impact of the MoCV1 to host fungus.**

2020. 3

東京農工大学大学院
連合農学研究科
生物生産科学専攻

東 浦 智 也

目次

摘要.....	4
序論.....	6
材料と方法.....	13
結果.....	44
I 章 イネいもち病菌ベトナム分離株に感染するマイコウイルス.....	44
1. マイコウイルスの感染が S-0412-II 1c 株に及ぼす影響	44
2. MoCV1 ウイルスゲノムセグメントの濃度比計測.....	45
3. MoCV1-A-a のシーケンス解析	45
4. ウイルス様粒子の抽出と精製	47
5. 菌糸融合による MoCV1-A フリー化株へのウイルス導入の試み	48
II 章 イネいもち病菌国内分離株に感染するマイコウイルス	50
1. イネいもち病菌国内分離株からの MoCV1 近縁ウイルスの検出.....	50
2. 秋田県分離株 APU10-199A から検出されたマイコウイルス.....	50
3. APU10-199A 株から検出されたマイコウイルスのシーケンス解析.....	51
4. マイコウイルスの感染が APU10-199A 株に及ぼす影響	54
5. MoCV1-D ORF3、ORF4 及び ORF4SUa タンパク質の <i>E. coli</i> 内リコンビナント発現.....	55
6. 秋田県分離株 APU10-199A からのウイルス粒子精製と特徴付け.....	56
7. 糖タンパク質の検出	58
8. 他の国内分離株からの MoCV1-D ウイルス粒子精製と特徴付け	59
9. 菌糸融合による MoCV1-D の導入.....	60

10.	イネいもち病菌プロトプラストへの MoCV1-D ウイルス粒子導入	61
11.	<i>S. cerevisiae</i> 内における MoCV1-D ORF4p の過剰発現の影響.....	62
12.	菌体から液体培養上清への MoCV1-D 及び MoV2 流出.....	63
III 章 MoCV1-D がイネいもち病菌に与える影響.....		65
1.	MoCV1-D 感染が宿主菌のメラニン生合成系に与える影響.....	65
2.	メラニン合成系中間体の溶離条件の最適化.....	65
3.	APU10-199A 株及び MoCV1-D-free APU10-199A 株の抽出物の HPLC クロマトグラム.....	65
4.	APU10-199A 株及び MoCV1-D-free APU10-199A 株の抽出物の抽出イオンクロマトグラム.....	66
5.	メラニン合成系中間体の抽出方法の検討.....	67
6.	UHPLC-ToF-MS 分析によるメラニン生合成系中間体の帰属.....	68
7.	メラニン合成阻害剤を用いた MoCV1-D の作用点予測	71
考察.....		73
1.	ベトナム分離株 MoCV1-A-a と MoCV1-A の比較.....	73
2.	菌糸融合による MoCV1-A フリー化株へのウイルス感染の試み	76
3.	秋田県分離株 APU10-199A から検出されたマイコウイルス.....	77
4.	MoCV1-D がイネいもち病菌に与える影響	79
5.	APU10-199A 株から精製した MoCV1-D ウイルス粒子	80
6.	MoCV1-D ウイルス粒子の部分分解	81
7.	MoCV1-D 構造タンパク質の翻訳後修飾	82
8.	MoCV1-D ORF4p の生理活性	83
9.	MoCV1-D と MoV2 の水平伝播性の違い.....	83
10.	菌糸細胞から培養上清へのマイコウイルスの流出.....	85
11.	イネいもち病菌体からのメラニン生合成系中間体の抽出.....	86
12.	MoCV1-D のイネいもち病菌に対する作用点	88

図説.....	90
引用文献.....	200
謝辞.....	209
付録.....	210

摘要

菌類ウイルス(マイコウイルス)は糸状菌・酵母・栽培キノコなどに感染するウイルスであり、現在では菌界の広範囲の宿主から検出されている。それらのウイルスゲノムは 2 本鎖 RNA (double-stranded RNA; dsRNA)、1 本鎖 RNA、1 本鎖 DNA をゲノムとして存在しており、その報告数は年々増加している。かつては宿主菌に影響を与えない潜伏性ウイルスと考えられることも多かったが、近年報告数の増加や解析技術が発展するにつれ宿主菌の形質にエピジェネティックな変化をもたらす細胞質因子として注目されている。これまで多くの植物病原糸状菌や一部のヒト病原糸状菌において、宿主菌の病原力と連動するマイコウイルスが見出されている。これらは、宿主菌/ウイルス間の相互作用研究の材料であると同時に、宿主病原菌の生物的制御に応用できる可能性がある。とりわけ植物病原菌においてはマイコウイルスを利用した新たな防除技術の開発が期待されている。水稻生産上の重要病害であるイネいもち病の病原菌 *Magnaporthe oryzae* においてもマイコウイルスが検出されている。本研究では、ベトナム及び日本国内にて分離されたイネいもち病菌株に感染するクリソウイルス *Magnaporthe oryzae chrysovirus* (MoCV1)のウイルス学的・生化学的な性状解析を行なった。さらに、MoCV1 感染がイネいもち病菌の病原性と密接に相関するメラニン生合成系に対して与えている影響について報告する。

まずベトナム分離株から検出された MoCV1-A と同一植物体上から分離されながらも、宿主菌に与える表現型の変化がより顕著な MoCV1-A-a に関して性状解析を行うとともに、MoCV1-A との宿主菌への作用性の違いについて論じた。

日本国内分離株では、*Magnaporthe oryzae virus 2* (MoV2)や *Magnaporthe oryzae partitivirus 1* (MoPV1)とともに秋田県分離株 APU10-199A 株に共感染していた *Magnaporthe oryzae chrysovirus 1-D* (MoCV1-D)を中心に、他県分離株から検出された MoCV1-D 近縁ウイルスも解析した。秋田県分離株 APU10-199A から単孢子分離法で各ウイルスがフリー化した菌株が得られた。それらの表現型を比較すると、3 種のウイルスの中で MoCV1-D が宿主菌の気中菌糸の抑制・菌叢のアルビノ化などの生育阻害に最も相関していると考えられた。MoCV1-D の dsRNA ゲノムは、5 本に分節化された構造で、各セグメントはベトナム

ム分離クリソウイルスと高い相同性を示した。RdRp 配列に基づく分子系統解析では MoCV1-A や MoCV1-B と極めて近縁なクレードを形成し、*Chrysoviridae*-cluster II に分類された。MoCV1-D がコードする ORF4p を出芽酵母内で高発現させると、宿主の細胞傷害を誘導した。MoCV1-D ORF4p や ORF3p を *E. coli* 内で発現させると不溶性画分から大量に回収され、それらを抗原タンパク質として抗血清を作製した。異なる培養期間の APU10-199A 株からそれぞれ精製した MoCV1-D 粒子画分に対して、作製した抗血清でウェスタンブロット解析を行った。長期培養によって MoCV1-D 由来タンパク質は全長発現型から分解型へとプロセッシングされ、MoCV1 粒子タンパク質の宿主菌内における部分分解現象の普遍性を確認した。また、短期培養菌体中では MoCV1-D 粒子タンパク質は糖鎖修飾されていた。菌糸融合によって MoCV1-D は遺伝的に異系統な P2 株へ水平伝播しウイルス粒子を構築した。さらに、精製した MoCV1-D 分解型ウイルス粒子はプロトプラスト-PEG 法によって P2 株及び MoV2/MoCV1-D フリー化株へ直接導入が可能であった。APU10-199A 株をフラスコ振盪や微生物培養装置で長期間培養すると、培養上清から MoCV1-D だけでなく混合感染する MoV2 や MoPV1 の dsRNA も同時に検出された。

MoCV1-D が宿主菌に与える影響を解析するため、本菌の病原性や感染生理と密接に関わるメラニンに注目した。逆相クロマトグラフィーと UHPLC-TOF-MS による質量分析によって MoCV1-D 感染株では MoCV1-D フリー化株と比較してメラニン生合成系の中間体 *scytalone* の含量が顕著に低下していることが定性的に明らかとなり、これが菌叢のアルビノ化に関与している可能性が示唆された。しかし、既存のメラニン合成阻害剤共存下で培養した MoCV1-D 感染株では *scytalone* がある程度蓄積していたことから、MoCV1-D は *scytalone* 合成を完全に阻害しないと考えられた。

本研究成果は、ベトナム分離株だけでなく日本分離株から見出されたクリソウイルスに関して詳細な生化学的特徴を明らかにし、クリソウイルスが宿主菌の二次代謝系に与える影響に関して新たな知見を提示した。MoCV1-D のイネいもち病菌に対する作用性の解明は宿主菌/ウイルス間相互作用の理解を深め、もって作物保護及び農業生産性の向上に資すると期待される。

序論

菌類ウイルス（マイコウイルス）は糸状菌・酵母・栽培キノコなどに感染するウイルスであり、現在では菌界の広範囲の宿主から検出されている。マイコウイルスはそのゲノムに基づいて 2 本鎖 RNA (double-stranded RNA; dsRNA)ウイルス、1 本鎖 RNA (single-stranded RNA; ssRNA)ウイルス、1 本鎖 DNA (single-stranded DNA; ssDNA)ウイルスの 3 グループに大別される。dsRNA をゲノムとするマイコウイルスは RNA dependent RNA polymerase (RdRp)のアミノ酸配列やウイルス粒子・外被タンパク質 (CP)の有無に基づいて 6 科に分類される。すなわち、*Totiviridae* (非分節ゲノム)、*Partitiviridae* (2 分節)、*Megabirnaviridae* (2 分節)、*Chrysoviridae* (3-5 分節)、*Quadriviridae* (4 分節)、*Reoviridae* (10-12 分節)、一部の *Endornaviridae* である。ssRNA をゲノムとするマイコウイルスにはプラス鎖 1 本鎖 RNA ((+)ssRNA) とマイナス鎖 1 本鎖 RNA ((-)ssRNA)を持つものに細分化される。(+)ssRNA ウイルスは、*Alphaflexiviridae*、*Barnaviridae*、*Gammaflexiviridae*、*Hypoviridae*、*Narnaviridae*、*Endornaviridae*、*Botourimiaviridae* の 7 科に分類される。(-)ssRNA ウイルスとしては *Mycomononegaviridae* が提唱されている(Ghabrial et al., 2015)。ssDNA ウイルスは唯一、geminivirus-related DNA mycovirus の報告がある(Yu et al., 2010)。dsDNA ウイルスはマイコウイルスとしてリストアップされていないが、菌類ではなく原生生物である水カビに感染する dsDNA ウイルスは報告されている(Dawe and Kuhn, 1983)。

マイコウイルスに関する最初の報告は、栽培マッシュルームである *Agaricus bisporus* において La France disease に罹病した菌株の孢子から単離された 3 タイプのウイルス様粒子である(Hollings, 1962)。これらが無病徴の菌株へ病徴を誘発することが明らかとなり、マイコウイルスと病徴との関連が証明された。

また、エンバクにビクトリアブライト症を引き起こす *Helminthosporium (Cochliobolus) victoriae* においても、マイコウイルス感染による宿主菌の生育抑制が報告された(Lindberg 1959)。罹病エンバクから分離した *H. victoriae* のコロニーの生育阻害と気中菌糸の崩壊に付随してセクタリングが生じる表現型は“菌の病気”と称された。さらに、この宿主菌の病気は菌糸融合を経て、病徴を示すコロニーから無病

徴コロニーへと伝播した。その後の研究で、この株では *Totiviridae* 科の *Victorivirus* 属に分類される *Helminthosporium victoriae* virus 190S (HvV190S)と *Chrysoviridae*-cluster II に分類される *Helminthosporium victoriae* chrysovirus 145S (HvV145S)が混合感染していたことが明らかとなった(Sanderlin and Ghabrial, 1978; Ghabrial et al., 2013)。HvV190S は *Victorivirus* のタイプ種であり、5.2 kb の非分節 dsRNA ゲノム上で 2 つの ORF (Open Reading Frame)が 4 塩基でオーバーラップ構造をとっている(Huang and Ghabrial, 1996)。また、HvV190S のコートプロテイン (CP; coat protein)は翻訳後修飾による異質性を有しており、リン酸化や proteolytic なプロセッシングによって 2 タイプのウイルス粒子の存在が見出された(Ghabrial and Havens, 1992)。HvV145S はウイルスゲノムとして 3.6-2.7 kb の範囲に 4 dsRNA セグメントを有し、モノシストロニックに ORF をコードしている。最近、宿主菌である *H. victoriae* の弱毒化に混合感染が必ずしも必要なわけではなく、HvV190S が単独で宿主菌の弱毒化を誘導し、HvV145S はコロニーの表現型に影響を与えないことが報告された(Xie et al., 2016)。

今日の *Chrysoviridae* のプロトタイプとしては、*Penicillium* 属菌に感染する *Penicillium chrysogenum* virus (PcV) が最もよく研究されており、そのゲノム配列だけでなく 3 次元 Cryo-EM (Cryo-electron microscopy) によるウイルス粒子の物理化学的な解析もなされている(Castón et al., 2013; Ghabrial and Castón, 2011)。元々は *Penicillium* 属菌由来の dsRNA とインターフェロン誘導との関連に注目されており(Ellis and Kleinschmit, 1967)、その後 PcV の精製ウイルス粒子とゲノム dsRNA がマウスにおいてインターフェロン誘導因子として作用している可能性が指摘された(Buck et al., 1971)。PcV は 4 つのモノシストロニックな分節化 dsRNA ゲノムを有し、それぞれ 1 セグメントずつ 1 粒子に内包されている。ゲノム上の 5'-UTR (Untranslated region)が比較的長いことから IRES (Internal ribosomal entry site)の存在が予測されている。また、4 セグメント間の 5'-UTR と 3'-UTR の保存性が非常に高いことに加え、Tobamovirus の 5'-UTR に存在する Translational enhancer elements である (CAA)_nrepeat と非常に相同性の高い領域も存在していた(Jiang and Ghabrial, 2004)。

出芽酵母 *Saccharomyces cerevisiae* に感染するマイコウイルスとしては *S. cerevisiae* virus L-A (L-A ウィルス)が知られている(Wickner et al., 2013)。L-A ウィルスは *Totiviridae* 科の *Totivirus* 属に分類され、単一の CP によって構成される二十面体の粒子構造に 4.6 kbp の 1 分節の dsRNA ゲノムを内包する。このゲ

ノム上には5'側にCPをコードするGagのORFが、3'側にRdRpをコードするPolのORFが存在しており、これら2つのORFはOverlapすることで低確率で-1 ribosomal frameshiftが生じる。いくつかの菌株ではL-A dsRNAの他、M dsRNAと呼ばれるサテライト dsRNAが見出されている。M dsRNAはバリエーションに富むが、共通点として分泌性の毒素タンパク質をコードする preprotoxin のORFを持っている。Prepro-toxinは後期ゴルジ体において宿主由来のKex2pやKex1pによってプロセッシングされた後に成熟キラー毒素(K1、K28など)として分泌小胞によって細胞外へ放出しキラー現象を引き起こす(Schmitt and Breinig, 2006)。キラー毒素を産生・分泌できる菌株(K⁺ phenotype)は周囲の感受性の菌株を致死させるが、分泌細胞自身や対応するM dsRNAを所持する菌株(R⁺ phenotype)は致死効果に抗することが出来る。また、キラー毒素の種類によってもその効果は様々あり、K1はカチオン選択的なイオンチャンネルを形成することで細胞膜の機能を破壊し、K28はDNA合成を阻害して細胞周期をS期で停止させることで致死作用を発揮する。

植物病原糸状菌におけるマイコウイルスの発見は、イネいもち病菌 *Magnaporthe oryzae* で検出された多面体ウイルスが初の報告である(Yamashita et al., 1971)。当時の研究ではウイルスの塩基配列の決定や宿主菌のイネに対する病原性との連動は解析されていないが、後に植物病原糸状菌の病原性とマイコウイルス感染との相関についての研究が進む契機となった。

植物病原糸状菌に感染するマイコウイルスには宿主菌の病原力を低下させるものが報告されており、これらはその病原糸状菌に対する生物防除資材(Biological control agent)として適用できる可能性がある(Huang and Ghabrial, 1996; Yu et al., 2013)。実例として、ヨーロッパではクリ桐枯病(Chest nut disease)の病原糸状菌である *Cryphonectria parasitica* に感染しその病原性を抑制する *Cryphonectria hypovirus 1* (CHV1-EP713)が報告されている(Nuss, 2005)。

イネいもち病は水稲生産における重要病害である。稲作の全期間を通して発病し、特に冷夏・高湿度条件などで穂まで病勢進展した場合は収量減少に直結する。そのため、ほとんどの生産地では本病防除を目的として長期残効型の育苗箱施用剤や本田散布剤などの農薬の使用が推奨されている。これまで、MBI剤(Melanin-biosynthesis inhibitor;メラニン合成阻害)やQoI剤(Qo inhibitor;呼吸系阻害)などイネいもち病に対して高い薬効と選択性を両立する優れた防除薬剤は多く開発されてきた(浅賀ら, 2003)。一方

で、近年の農業生産においては、化学薬剤の過度な連用による薬剤耐性菌の出現・蔓延が課題となっている。これは水稲生産においても例外ではなく、これまで一部のメラニン生合成阻害剤や他の作用点を有する薬剤に対して感受性が低下したイネいもち病菌の出現が報告されている (Takagaki, 2015; Sierotzki, 2015)。このような病原糸状菌の薬剤耐性・抵抗性の発達は防除選択肢の制限につながり、農薬開発メーカーのみならず生産者にとっても喫緊の課題となっている。このことから、耐性菌の蔓延を予防し安定した防除効果を発揮するためには、IPM (Integrated pest management; 総合的病害虫・雑草管理) (宮川ら, 2019) の概念に則って、既存の化学農薬に加えて作用点を複数有する薬剤や、微生物農薬などの生物防除資材との併用が望ましいと考えられる。

イネいもち病菌がイネ体内に侵入する感染プロセスにおいて、侵入器官である付着器内でのメラニン蓄積は重要なステップである (Talbot, 2003; Wilson and Talbot, 2009)。イネ体上に付着した分生子から発芽管が伸長しその先端にドーム上の付着器が形成される。次いで付着器では細胞壁と細胞膜の間にメラニン層が形成されるが、このステップは浸透圧調節物質である高濃度グリセロールの細胞外への漏出を防ぐ役割があり、付着器内の膨圧の発生に必須である。およそ 8 MPa の膨圧によって侵入糸はイネ体内へ物理的に貫通することが可能となる。そのため、メラニン合成能を欠如した *M. oryzae* の変異株はイネに対する病原性を著しく欠く (Chumley et al., 1990)。この他にも、ヒト病原糸状菌である *Cryptococcus neoformans* や *Aspergillus fumigatus* においても菌自身のメラニン化と病原性は密接に相関することが分かっている (Liu and Nizet, 2009)。多くの真菌においてメラニンは生体高分子として多機能的に働いており、好ましくない pH、温度、UV、酸化ストレスや宿主内の分解酵素、酸化還元反応などの外環境ストレスからの防御的役割を果たしており、菌自身の生存や病原性の発揮を支援している (Jacobson, 2000)。メラニンは真菌だけでなく動植物なども含む真核生物が普遍的に利用していて、その合成経路は前駆体の違いによっていくつかのバリエーションがある。多くの植物病原糸状菌は 1,8-dihydroxynaphthalene (1,8-DHN) を介した Pentaketide pathway でメラニン合成を行っている (Belozerskaya et al., 2017)。このメラニン生合成では、まず Malonyl-CoA を前駆体として MoPKS1 によって Pentaketide、次いで 1,3,6,8-tetrahydroxynaphthalene (1,3,6,8-THN) が生成される。それから還元酵素によって Scytalone が生成され、脱水酵素によって 1,3,8-trihydroxynaphthalene (1,3,8-THN) に変換される。更に、同様の還元反応によって

Vermelone が生成し、脱水反応によって 1,8-DHN が産生される。この 1,8-DHN が Laccase などによって酸化重合するとメラニン(Allomelanin)が産生される(Geis et al., 1984)。この合成系における酵素反応は選択性の高い作用点として注目され、イネいもち病防除のためにメラニン生合成阻害剤が開発されてきた。

イネいもち病菌に感染するマイコウイルスの報告数は近年増加しており、*Totiviridae* の *Magnaporthe oryzae virus 1*、2、3 (MoV1; MoV2; MoV3) (Yokoi et al., 2007; Maejima et al., 2008; Tang et al., 2015)や、*Partitiviridae* の *Magnaporthe oryzae partitivirus 1* (Du et al., 2016)、*Chrysoviridae*-cluster II に分類される *Magnaporthe oryzae chrysovirus 1-A*、1-B (MoCV1-A; MoCV1-B) (Urayama et al., 2010; 2012; 2014a)が報告されている。さらに最近では、植物ウイルスの *Tombusviridae* に近縁な *Magnaporthe oryzae virus A* (Ai et al., 2016)や ourmia-like viruses に近縁な(+ssRNA ウイルスとして *Magnaporthe oryzae ourmia-like virus 1* (Illana et al., 2017)、*Pyricularia oryzae ourmia-like virus 1*、2、3 (PoOLV1 - 3) (Ohkita et al., 2019)が報告されている。この中で、イネいもち病菌の病原性の低下に寄与するマイコウイルスとしては MoCV1-A が最初に報告された。

MoCV1-A 発見の経緯として、通年イネが栽培されているベトナムのメコンデルタ地域において、イネいもち病菌の病原性レースに関する推移を調査した結果、病原性が常に変動していることが明らかとなった。特定の地域、近接した圃場、同じ発病株上でさえも同一のレースが見出されなかった。しかし、病原菌のゲノムに大きな変化は認められず、病原性の変動がゲノムの変異によらないことが示唆された (Le et al., 2010)。この時採集されたイネいもち病菌分離株から dsRNA 分子の検出を試みたところ、高頻度に新規マイコウイルスの感染が認められた。その中で、MoCV1-A 及び MoCV1-B は詳細に解析されており、ウイルス感染株では宿主菌の異常な菌糸・コロニー生育や気中菌糸形成の抑制、不均一な色素沈着、病原性の低下などの弱毒化形質が生じていた(Urayama et al., 2010, 2014a)。また、MoCV1-A は5つの分節化 dsRNA をウイルスゲノムとしているが、dsRNA4 上にコードされる ORF4p を *S. cerevisiae* (Urayama et al., 2012, 2016a)及び *C. neoformans* (Urayama et al., 2014b)内で高発現させると、宿主細胞の生育を阻害して Cytological damage を誘導した(浦山ら, 2014; Moriyama et al., 2018)。

最近の知見として、MoCV1-A が病原性の低下だけでなくイネいもち病菌の病原性レースの多様化に寄与している可能性が指摘されている(Aihara et al., 2018)。MoCV1-A 感染株または感染フリー株を、保

持する抵抗性遺伝子 (*R gene*)が様々に異なるイネ品種へそれぞれスプレー接種したところ、MoCV1-A 感染株は宿主菌の非病原性遺伝子 (*AVR*)に変化を伴うことなく罹病型から抵抗型、またはその逆の病斑を形成した。つまり、MoCV1-A 感染は従来の遺伝子対遺伝子説 (*Gene for gene hypothesis*)に則さずにイネいもち病菌の病原性に変化を与えた。本報告はベトナムのメコンデルタ地域で生じていたイネいもち病菌の病原性の変動に関する要因の一端を明らかにした。

マイコウイルスが宿主に及ぼす影響の多様性を示す報告は他にもあり、ナシ黒斑病菌 *Alternaria alternata* の N18 株から発見された *Alternaria alternata chrysovirus 1 (AaCV1)*は宿主菌と植物に対してそれぞれ対照的な効果を与えている。まず、AaCV1 の *viral dsRNA* が高含量な菌株では異常なコロニー形成や色素沈着、気中菌糸の崩壊など生育抑制された表現型を呈した。また、MoCV1-A ORF4 の *counterpart* である AaCV1 ORF2p を *S. cerevisiae* 内で高発現させると、MoCV1-A ORF4 の場合と同様に細胞に傷害を与えていた。これらの効果とは対照的に、AaCV1 感染株は宿主特異的毒素 (HST; *Host selective toxin*) である AK-toxin 産生量の顕著な上昇を伴ってナシ葉上でより大きな病斑を形成しており、すなわち植物に対しては AaCV1 が宿主菌の病原性を亢進していることが報告された(Fuke et al., 2011; Okada et al., 2018)。本報告はマイコウイルス感染による宿主菌の生育抑制が植物体上では必ずしも病徴の抑制に直結しないということを意味しており、このことは *A. alternata* に限らずマイコウイルスを植物病原菌に対する制御因子として応用する上で無視することのできない重要な知見である。

また近年、中国の Hubei 州から分離されたイネいもち病菌株 QSP5 に *Victorivirus* 属に分類される MoV3 と *Chrysoviridae-cluster II* に分類される MoCV1-C が混合感染していることが報告された(Tang et al., 2015)。同論文では MoV3 のシーケンス解析はなされているが、MoCV1-C の塩基配列は決定されていない。

本稿では、ベトナム及び日本国内にて分離されたイネいもち病菌に感染する多様なクリソウイルス (MoCV1s)のウイルス学的な性状解析及び機能解析について報告する。MoCV1-A が検出された S-0412-II 1a 株と同一植物体上から分離されながらも表現型の変化がより顕著な S-0412-II 1c 株から検出された MoCV1-A-a に関して性状解析するとともに、宿主菌への作用性の違いについて論じた。日本国内分離株では、*Magnaporthe oryzae virus 2 (MoV2)*や *Magnaporthe oryzae partitivirus 1 (MoPV1)*とともに秋田県分離株 APU10199A 株に共感染していた *Magnaporthe oryzae chrysovirus 1-D (MoCV1-D)*を中心に、他県分離株

から検出された MoCV1-D 近縁ウイルスについてもウイルス学的・生化学的特徴を明らかにした。また、従来の菌糸融合法だけでなく、イネいもち病菌プロトプラストへの精製ウイルス粒子の導入にも成功し、遺伝的に異系統な菌株への MoCV1-D の人為的な感染系を確立した。MoCV1-D が宿主菌に与える影響を解析するため、本菌の病原性や感染生理と密接に関わるメラニンに注目した。MoCV1-D 感染株はフリー化株よりも DHN-メラニン合成系に関連する中間体の含量が顕著に低下していることが定性的に明らかとなった。本研究成果は、ベトナム分離株だけでなく日本分離株から見出されたクリソウイルスに関して詳細な生化学的特徴を明らかにし、クリソウイルスが宿主菌の二次代謝系に与える影響に関して新たな知見を提示した。MoCV1-D のイネいもち病菌に対する作用性の解明は宿主/ウイルス間相互作用の理解を深め、もって作物保護及び農業生産性の向上に資すると期待される。

材料と方法

使用菌株

Table 1. 本研究で使用した菌株

生物種	菌株名	備考	分譲元
<i>Magnaporthe oryzae</i>	S-0412-II 1a	MoCV1-A感染	ベトナム分離株 東京農工大学 植物病理学研究室
	S-0412-II 1c	MoCV1-A-a/MoPLV混合感染	
	APU10-199A	MoV2/MoCV1-D/MoEV1混合感染	秋田県分離株 (秋田県立大 藤晋一教授)
	0115074	3.6-2.7 kbに5 dsRNA, 1.9-1.5 kbに2 dsRNA	
	0115079-1	3.6-2.7 kbに5 dsRNA, 1.9-1.5 kbに2 dsRNA	新潟県分離株
	P2	Virus free, pAK2-Hyg-expによって <i>hph</i> 導入(Kato et al., 2012)	MAFF235001, Kamakura et al., 2002
生物種	菌株名	遺伝子型	分譲元
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	W303-1A	<i>MATa, ura3 his3 leu2 trp1 ade2 can1</i> [L-A-o]	東江昭夫教授
<i>Escherichia coli</i>	DH5a	F ⁻ , ϕ 80 <i>lacZ</i> Δ <i>M15</i> , Δ(<i>lacZYA-argF</i>)U169, <i>deoR</i> , <i>recA1</i> , <i>endA1</i> , <i>hsdR17</i> (rK ⁻ , mK ⁺), <i>phoA</i> , <i>supE44</i> , λ ⁻ , <i>thi-1</i> , <i>gyrA96</i> , <i>relA1</i>	
	BL21 star (DE3)	F ⁺ <i>ompT hsdSB</i> (rB ^{mB}) <i>gal dcm rne131</i> (DE3)	

培養条件

菌株を−80°Cフリーズストックする時は PDA 平板培地での前培養の後、直径 4 mm のコルクボーラーで菌叢を培地ごと 20-30 片打ち抜いた。2 ml 容スクリューキャップ付チューブに 20~25%グリセロールを用意し、打ち抜いた寒天片を浸漬・攪拌し、−80°Cフリーザーにてストックした。必要に応じてストックチューブから一部断片を取り出し PDA 平板培地にて前培養を行い各種実験に使用した。イネいもち病菌の平板培養は PDA 培地または OMA 培地で 26°C、明期 12 時間、暗期 12 時間の条件下で 2~4 週間培養した。所定期間培養後、コルクボーラーで培地ごと菌叢を打ち抜き、新しい平板培地に菌叢面が下になるように植菌して継代培養した。液体培養には YG 培地を用いた。コルクボーラーで培地ごと菌叢を打ち抜き、1 片から数片を YG 液体培地に植菌後、26°C、明期 12 時間、暗期 12 時間の条件下で

実験目的に応じた速度・期間で振盪培養した。液体培養したイネいもち病菌はメッシュあるいはガラスローとろ紙で集菌し新聞紙等で十分に脱水した後、実験に使用した。

ウイルス粒子の精製等菌体が多く必要となる時は微生物培養装置 (Jar-fermenter、2.5 L 容、Able Biott) を用いて液体培養した。まず、前培養のために前述のように平板培地の菌叢から 10 片をコルクボーラで打ち抜き、YG 液体培地 50 ml (200 ml 三角フラスコ) に植菌し、26°C・120 spm で 2、3 日往復振盪培養した。前培養後、YG 1.5 L を入れた微生物培養装置に液体培地ごと植菌する。26°C・攪拌速度 100 rpm・エアーフロー 1.5 L/min で 3~14 日間培養した。

菌糸や細胞の顕微鏡観察には倒立型リサーチ顕微鏡 IX71 (OLYMPUS, Tokyo) と付属のアプリケーションソフトウェア DP2-BSW (OLYMPUS, Tokyo) の微分干渉モード (Differential interference contrast; DIC)、もしくは高級システム生物顕微鏡 BX50 (OLYMPUS, Tokyo) を用いた。

イネいもち病菌からの全核酸抽出

湿重量 0.05 ~ 1.0 g の菌体を液体窒素を用いて乳鉢・乳棒で凍結破碎した。菌体からの核酸抽出には SDS/フェノール法を用いた。菌体破碎物に PCI と等量の RNA 抽出 buffer を加え、ボルテックスミキサーで 5 分間攪拌した。その後、抽出液を 15,000 rpm で 5 分間遠心分離して上清を回収した。再度等量の PCI を加えボルテックスミキサーで 5 分間攪拌した。再び 15,000 rpm で 5 分間遠心分離して核酸抽出溶液として上清を回収し、dsRNA 精製や cDNA 合成、RT-PCR の鋳型として使用した。

2 本鎖 RNA 精製

核酸抽出溶液からの 2 本鎖 RNA の精製は、繊維状セルロースパウダーである Cellulose D (Advantec) を用いて行った (Okada et al., 2015)。Cellulose D 粉末は 16.6% エタノールを含む 1×STE buffer で平衡化した。バルクスケール精製はバッチ法で行った。まず抽出のために菌体 1.0 g 由来の磨砕物を用いてこれに PCI 5 ml と RNA 抽出 buffer 5 ml を加え、室温で 10 分以上激しく転倒混和した。その抽出液を、8,000 rpm で 10 分間遠心分離して上清を回収した。再度等量の PCI を加え 10 分以上激しく転倒混和した。再び 8,000 rpm で 10 分間遠心分離して核酸抽出溶液として上清を回収した。その上清に 1/10 量の

3M酢酸ナトリウム溶液と2倍量のエタノールを加えて攪拌し、30分間以上静置して核酸を凝集させた。遠心分離 (8,000 rpm、4°C、10分間)によって核酸を沈殿させ上清を除いた。得られた沈殿を1×STEに溶解させ、その後終濃度16.6%となるようにエタノールを加えた。RNAの高次構造を変性させるため、65°Cで10分間熱処理後氷上で急冷した。これを遠心分離 (8,000 rpm、4°C、10分間)し、その上清をCellulose D懸濁液10~20 mlとともに乾熱滅菌済み広口コルベンに加えて、4°C・30~60分間スターラー攪拌した。これを直径1.5 cm、高さ12 cmのカラムに充填し、水面が担体の上面にくるまでフローした。この後、カラム容量の4~5倍量のWash buffer (1×STE/16.6% エタノール)で非吸着画分を洗浄した。洗浄後、カラム容量と等量のElute buffer (1×STE)でdsRNAを含む画分を溶出した。溶出液は1/10量の3M酢酸ナトリウム溶液と2倍量のエタノールで濃縮・精製した。沈殿を適量の1×STEで溶解しNanoDrop Lite (Thermo Fisher Scientific)でUV 260 nmの吸光とA260/A280を確認した。dsRNA含量が3 µgとなるよう1.5 mlチューブに分注し再びエタノール沈殿して-30°C保存した。cDNA合成やRT-PCR用鋳型など適宜必要に応じて使用した。

小スケール精製ではスピンカラム法 (Okada et al., 2015)に従った。抽出に菌体0.05~0.1 g由来の磨砕物を用いてこれにPCI 500 µlと等量のRNA抽出bufferを加え、ボルテックスミキサーで5分間攪拌した。その後、抽出液を15,000 rpmで5分間遠心分離して上清を回収した。再度等量のPCIを加えボルテックスミキサーで5分間攪拌した。再び15,000 rpmで5分間遠心分離して核酸抽出溶液として上清を回収した。この上清に終濃度16.6%となるようにエタノールを加えた。サンプルをアプライする前に2 mlチューブと底面を画鋸で軽く穴を開けた0.6 mlチューブを組み上げ、予め16.6%エタノールを含む1×STEで平衡化したCellulose D懸濁液500 µlを0.6 mlチューブに注ぎ入れ、13,000 rpmで10秒間遠心分離して下受2 mlチューブの素通り画分を捨てた。カラムにサンプル(~500 µl)をアプライして遠心分離 (13,000 rpm、4°C、10秒間)して素通り画分を捨てた。Wash buffer 350 µlで3回以上洗浄後、13,000 rpm・1分間・4°Cで遠心分離した。下受チューブを新しい2 mlチューブに交換しElute buffer 350 µlをアプライして室温・3分間静置した。13,000 rpm・4°C・1分間で遠心分離後、溶出液をエタノール沈殿した。遠心分離して得られた沈殿を2×STEに溶解し10×Loading Dyeを加え、アガロースゲル電気泳動 (1×TAE buffer、

1.0%アガロース)により展開した。ゲルはエチジウムブロマイドで染色し、UV 照射によって dsRNA を可視化した。

Native-PAGE による電気泳動

より良好な分離能を得るため、精製 dsRNA を未変性ポリアクリルアミドゲルで展開した。10 mA・16 時間泳動しエチジウムブロマイドで染色し、UV 照射によって dsRNA を可視化した。

爪楊枝を用いた MoCV1 dsRNA の簡易検出

各ウイルスの簡易かつ迅速な検出には Urayama et al. (2015)に従った。平板培地上に培養した菌体あるいはイネ葉上の病斑を爪楊枝で突き刺し、その先端を SuperScript®III One-Step RT-PCR System with Platinum® Taq DNA Polymerase (Invitrogen) 添付のプロトコルに従って調製した 10 µl の反応溶液に浸けて静かにかき混ぜることでサンプル溶液を調製した。検出プライマーとして、MoCV1 の dsRNA1 上にコードされる RdRp 領域を特異的に認識する Forward: MoCV detect F1440、Reverse: MoCV detect R2106 (増幅断片: 646 nt) を用いた。反応サイクルは 55°C・20 分間、60°C・10 分間、94°C・2 分間、(94°C・15 秒間、55°C・30 秒間、68°C・1 分間) ×40 サイクル、68°C・5 分間で PCR 反応を行い、PCR 産物を得た。この PCR 産物をアガロースゲル電気泳動で展開し、目的断片のサイズを確認した。

cDNA クローニング

First-strand cDNA 合成

First-strand cDNA 合成は、菌体から精製した dsRNA を鋳型として Super Script™ III 逆転写酵素 (Invitrogen)とその添付バッファーを用いて 40 µl の反応系で行った。まず鋳型 dsRNA (100 ng)に配列特異的プライマーを加え、99°C・10 分間インキュベートを行った後、氷上で 5 分間急冷した。その後、1 mM CH₃HgOH を添加してピペッティングし、1×First-strand Synthesis buffer (Invitrogen)、10 mM DDT、1 mM dNTPmix (0.25 mM each)、40 U Recombinant RNase Inhibitor (TaKaRa)、200 U Super Script™ III 逆転写酵素で 55°C・45 分間、次いで 70°C・15 分間インキュベートした。次に、2 U RNase H (TaKaRa)で 37°C・20

分間インキュベートした。合成された cDNA 断片は QIAquick PCR purification Kit (QIAGEN)と添付のプロトコルに従って精製した。

ウイルス dsRNA 末端配列 cDNA の獲得

センス鎖及びアンチセンス鎖の 5'末端配列の決定は、cDNA の 5'末端側に poly C 配列を付加する Terminal deoxynucleotidyl Transferase (TdT) tailing 反応を介した 5'-RACE (Rapid Amplification of cDNA Ends)法を用いた。菌体から精製した dsRNA を鋳型として、5'末端に設計した配列特異的プライマーを用いて前項の通り First-strand cDNA 合成を行った。合成 cDNA は QIAquick PCR purification Kit を用いて精製し、0.2 mM dCTP、15 U Terminal deoxynucleotidyl Transferase (TaKaRa)とその添付バッファーを加え、37°Cで 5 分間インキュベートし、65°Cで 10 分間の熱処理をして TdT tailing 反応を行った。dCTP を付加した cDNA を鋳型に、50 µl の反応系で 10 pmol Oligo dG プライマー及び配列特異的プライマー、0.25 mM dNTPmix、1.5 U Ex-Taq polymerase (TaKaRa)とその添付バッファーを用いて、94°C・3 分間、(94°C・45 秒間、55°C・30 秒間、72°C・30 秒間)×30 サイクル、72°C・5 分間の PCR 反応を行い、5'末端配列を含む PCR 産物を得た。

センス鎖及びアンチセンス鎖の 3'末端配列の決定は、cDNA の 3'末端側に polyA 配列を付加する 3'-RACE 法を用いた。菌体から精製した dsRNA (100 ng)に DMSO を加え、95°C・5 分間の熱処理後直ちに氷上で急冷し、dsRNA を変性させた。これをエタノール沈殿して得られた変性 dsRNA に、1 mM MnCl₂、6 U polyA polymerase (TaKaRa)とその添付バッファーを加え、37°Cで 30 分間インキュベートして polyA 配列を付加した。この PolyA 付加 RNA を鋳型として、5 pmol Oligo dT プライマーを加えて前項の通り First-strand cDNA 合成を行った。精製した poly A 付加 cDNA を鋳型に、50 µl の反応系で 10 pmol Oligo dT プライマー及び配列特異的プライマー、0.25 mM dNTPmix、1.5 U Ex-Taq polymerase とその添付バッファーを用いて、94°C・3 分間、(94°C・45 秒間、55°C・30 秒間、72°C・30 秒間)×30 サイクル、72°C・5 分間の PCR 反応を行い、3'末端配列を含む PCR 産物を得た。これらの PCR 産物はアガロースゲル電気泳動で展開し、目的断片の増幅を確認した。その後、ゲルごと切り出して GENE CLEAN II Kit (MP

Biomedical, LLC)と添付のプロトコルに従って PCR 産物を精製した。精製した目的 DNA 断片は pGEM-T Easy Vector (Promega)と添付の試薬を用いてクローニングした。

また、完全長 dsRNA 配列の獲得や末端配列の確定のため、必要に応じて The fragmented and loop-primer ligated dsRNA sequencing (FLDS) method (Urayama et al., 2016b)を用いた。コンティグのアセンブルは CLC Genomics Workbench (CLC Bio, Aarhus, Denmark)で行い、IonPGM (Life Technologies)で解析した。

大腸菌のコンピテントセル調製

形質転換に用いる大腸菌のコンピテントセルは、遺伝子工学ハンドブック(羊土社)の高効率コンピテントセル調製法(野島ら, 2000)を参考に調製した。まず、LB 平板培地にコンピテント化したい大腸菌を画線培養しシングルコロニーを形成させた。5~10 個のシングルコロニーを SOB 培地 50 ml (500 ml 容坂口フラスコ)へ植菌し、20°C・120 rpm で OD₆₀₀=0.4~0.8 になるまで振盪培養した (12 時間以上)。OD 値測定後フラスコを氷中で急冷し、培養液を遠心チューブに回収し 4°C・10 分間低速遠心した。上清を取り除いた後沈殿した大腸菌を培養液 1/3 量の氷冷 Transformation buffer (TB; 10 mM PIPES, 15 mM CaCl₂, 250 mM KCl)に懸濁し、氷上で 10 分間静置した。これを再び 4°C・10 分間低速遠心し、上清を取り除いた後沈殿した大腸菌を培養液 1/12.5 量の氷冷 TB に懸濁した。終濃度 7%となるよう DMSO を添加し氷上で 10 分間静置した。これを 1.5 ml エッペンチューブに分注した後、液体窒素で急冷し-80°Cフリーザーで保管した。適宜必要に応じて使用した。

大腸菌へのプラスミド DNA の形質転換

プラスミド DNA (10~50 ng)を 50~100 µl の大腸菌コンピテントセルと氷上で静かに混和し、20~30 分間インキュベートした。42°C・1 分間の熱処理後、氷上に静置した。その後、SOC 培地を 500 µl 加え軽く混和させ、37°C・1 時間インキュベートした。その後、原液及び希釈液をスプレッダーで LB 寒天培地 (Ampicillin 50 µg/ml)に塗抹し、37°Cで一晩培養した。形質転換体は Ampicillin 耐性と Blue white selection によって選抜した。

大腸菌からのプラスミド抽出

大腸菌からのプラスミド DNA 抽出は、Molecular Cloning Second Edition (Sambrook et al. 1989)のアルカリ SDS 法に従った。得られたプラスミド抽出液に終濃度 2.5 M になるように 12.5 M LiCl を添加し、氷上で 5 分間静置した後、15,000 rpm・4°C・10 分間 (MX-150 TOMY) で遠心分離し RNA を沈殿させて除去した。上清を D.W.に希釈した後エタノール沈殿し、プラスミドを回収した。得られたプラスミドは TE-RNase (RNase 2 µg/ml)に溶解し、37°Cで 30 分間反応させ完全に RNA を分解させた。上記の方法とは別に、必要に応じて Fast Gene™ Plasmid mini kit (Nippon Genetics Co., Ltd.)と添付のプロトコルに従ってプラスミド抽出を迅速に行った。プラスミド上の挿入断片の有無とサイズを確認するため、プラスミド溶液の一部を制限酵素処理し、アガロースゲル電気泳動で展開した。制限酵素処理は、制限酵素とその添付バッファーを用いて行った。

シーケンス解析

抽出したプラスミド DNA は ABI PRISM BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit (Applied Biosystems)と添付のプロトコルに従って反応を行い、Applied Biosystems 3130xl Genetic Analyzer (Applied Biosystems)を用いて塩基配列を決定した。シーケンサーの操作は添付のプロトコルに従った。得られた Contig の解析は、Sequence Scanner Software 2 (Applied Biosystems)で Quality value を確認し、GENETYX ver. 9.1 ソフトウェア (GENETYX CORPORATION)で配列編集・加工し、ATSQ ver. 6.0 ソフトウェア (GENETYX CORPORATION)で Contig をアセンブルした。ウイルスゲノム上の ORF 領域の推定や他のマイコウイルスとの配列相同性解析には GENETYX ver. 9.1 ソフトウェアを用いた。

系統解析

MoCV1-D 及び *Chrysoviridae* cluster-I、-II に属する既報のマイコウイルスの RdRp 領域アミノ酸配列に基づいて系統解析を行った (Table. 8)。まず、Clustal X ver. 2 ソフトウェア (Thompson et al., 1997)を用いて各ウイルスの RdRp 領域の推定アミノ酸配列のアライメントを組んだ。得られたマルチプルアライメントを GeneDoc ver. 2.7 ソフトウェア (Nicholas et al., 1997)で dsRNA ウイルスに共通する 8 つの保存モチーフ

フを含むコア領域にトリミングした(Jiang and Ghabrial, 2004)。このトリミングしたマルチプルアライメントを用いて MEGA 7 ソフトウェア(Kumar et al., 2016)で系統解析を行った。本ソフトウェアにおいて LG+G+I amino acid substitution model が Best-fit method によって選択され、分子系統樹は Maximum Likelihood method(Le and Gascuel, 2008)に基づいて構築された。

***E. coli* 内リコンビナント発現**

E. coli 内における MoCV1-D の ORF3 (rORF3p)、ORF4 タンパク質 (rORF4p)及び ORF4 SUa 領域 (rORF4SUap)のリコンビナント発現には pCold vector 発現システム (TaKaRa)を用いた。

前培養のため、LB+Amp 平板培地上でコロニーを形成した pCold-empty vector、あるいは発現コンストラクトの形質転換体から 3~5 コロニーをピックアップし、3 ml LB+Amp 液体培地へ植菌して 37°C・160 spm で振盪培養した。適宜 OD₆₆₀ を計測し、OD₆₆₀ が 0.3 ~ 0.5 (およそ 3 ~ 4 時間)となった時、100 ml LB+Amp 液体培地 (500 ml 容枝付坂口フラスコ)へ開始 OD₆₆₀ が 0.025~0.05 となるように植菌し、37°C・160 spm で OD₆₆₀ が 0.4 ~ 0.5 (およそ 2 時間)となるまで振盪培養した。氷水でおよそ 15°C 付近まで急冷し、15°C で 30 分間静置した。その後、培養液に 1 mM IPTG を添加し 15°C・120 spm で 24 時間振盪培養した。この培養液を全量回収後、直ちに後述のようにリコンビナントタンパク質を抽出するか、あるいは -80°C フリーズストックして後日抽出を行った。

リコンビナントタンパク質の抽出

BugBuster™ Protein Extraction Reagent (Novagen)と添付のプロトコルに従って、*E. coli* 内でリコンビナント発現させたタンパク質の抽出を行った。まず、発現誘導後の培養液を 8,000 rpm・室温・10 分間で遠心分離して細胞を沈殿させた。上清を除去した後、ペレットの重量に応じて BugBuster™ Protein Extraction Reagent (5 ml/ペレット 1 g)と添付の Benzonase (1 µl/1 ml BugBuster reagent)を添加し、静かにペレットを懸濁した。懸濁後、チューブをシーソーシェーカー上に寝かせて、室温・10 分間でゆっくり振盪する。次に、懸濁液を 1.5 ml チューブに分注して、15,000 rpm・4°C・20 分間で遠心分離した。ここで得られた上清は可溶性画分 (Soluble fraction)として回収し、沈殿は不溶性画分 (Insoluble fraction)として

回収し BugBuster 付属のプロトコルに従って Inclusion body 精製を行った。まず、不溶性画分に遠心分離前と同量の BugBuster™ Protein Extraction Reagent とリゾチーム溶液 (10 mg/ml)を加えて再懸濁し、室温・5 分間でインキュベートした。15,000 rpm・4℃・15 分間で遠心分離後、得られた沈殿に 1/10 濃度の BugBuster™ Protein Extraction Reagent 1 ml を加えて再懸濁し、15,000 rpm・4℃・10 分間で遠心分離した。再び沈殿に 1/10 濃度の BugBuster™ Protein Extraction Reagent 1 ml を加えて再懸濁して遠心分離する操作を 2 回繰り返した。最後に得られた沈殿は、菌体ペレット重量に応じて 6 M Urea で可溶化した。前述した可溶性画分と Inclusion body 精製で可溶化した不溶性画分に 4×SDS-PAGE sample buffer を加えて SDS-PAGE で展開しタンパク質含量を求めた。目的とするリコンビナントタンパク質が不溶性画分に高純度に得られたため、これらの不溶性画分は 6 M Urea でタンパク質濃度 1.5 mg/ml に希釈した。これを抗原タンパク質として株式会社蛋白精製工業 (群馬、日本)に送付し、ポリクローナル抗体作製を委託した。ウサギに対する免疫は、アジュバンドとして FCA を使用し初回のみ 0.15 mg で以降は 14 日間隔で 0.3 mg ずつ計 5 回の皮内注射によって行った。試験採血及び最終全採血は免疫 3、4、5 回目のそれぞれ 7 日後に行い、ELISA 測定によって抗原タンパク質に対する抗体力価を試験した。

ウイルス粒子の抽出・精製

超遠心分離法によるウイルス粒子の抽出

供試菌株は前述の通り微生物培養装置を用いて液体培養し、菌体を回収・脱水した後適宜-80℃フリーズストックした。回収直後の生菌体または凍結ストック菌体 1 g 当たり 10 ml の Buffer A とともに 4℃の低温下にてブレンダーミキサーで破碎した。さらにこの粗破碎液を手動式フレンチプレス (5501-M, 大竹工業)にて 120~140 MPa で 1~2 回、または高圧式細胞破碎装置 (Constant cell disruption system, 英弘精機)で破碎した。この破碎液を 31,200 g・4℃・30 分間で遠心分離して細胞残渣を沈殿させ、その上清はメッシュを通して回収した。この上清をさらに 104,000 g・4℃・1 時間 (使用ローター:P45AT, CP80WX, Hitachi)で超遠心分離して沈殿を得た。得られた沈殿を少量の Buffer A に懸濁し、ホモジェネーターで破碎した。この懸濁液は 15,000 g・4℃・3 分間で遠心後、上清を回収しこれを粗精製 VP 溶液とした。

シヨ糖濃度勾配遠心法によるウイルス粒子の精製

超遠心分離により得られた粗精製 VLP 溶液は、溶媒を Buffer A とするシヨ糖濃度 10~40%の濃度勾配溶液に重層し 112,700 g・4℃・2.5 時間 (使用ローター: P28S, CP80WX, Hitachi)で超遠心分離した。遠心後、DGF-U フラクショネーター (Hitachi)を用いて上層から 1.5 ml ずつ分画した。各画分の一部を D.W. で希釈し SDS/Phenol 法により核酸抽出してアガロースゲル電気泳動で展開し、ウイルス dsRNA が存在する画分を調べた。また、屈折計アタゴアッベ 3 型 (ATAGO)によって各画分のシヨ糖濃度を計測した。ウイルス dsRNA が検出された画分を集めて Buffer A で 5 倍以上に希釈し、104,000 g・4℃・1 時間 (使用ローター: P70AT, CP80WX, Hitachi)で超遠心分離によって VP を濃縮精製した。上清をパスツールピペットで静かに除去した後、沈殿を少量の Buffer A に静かに懸濁し精製 VP 溶液とした。

塩化セシウム密度勾配遠心法によるウイルス粒子の精製

Buffer A に溶解させた飽和塩化セシウム溶液と Buffer A を混和し、屈折計を用いて浮遊密度 1.375 g/cm³ が密度勾配の中心になるように超遠心チューブへ調製した。これにシヨ糖濃度勾配遠心法にて得られた精製 VLP 溶液を混和し、133,800 g・20℃・24 時間 (使用ローター: P80AT, CP80WX, Hitachi)で超遠心分離した。遠心後、DGF-U フラクショネーター (Hitachi)を用いて上層から 500 µl ずつ分画した。各画分の一部を D.W.で希釈し SDS/Phenol 法により核酸抽出してアガロースゲル電気泳動で展開し、ウイルス dsRNA が存在する画分を調べた。また、屈折計アタゴアッベ 3 型によって各画分の偏光度を計測し、次式に従って浮遊密度を算出した。

$$\text{浮遊密度 } \rho^{25} = \text{屈折率} \times 10.8601 - 13.4974$$

VP 溶液の濃縮のため、ウイルス dsRNA が検出された画分を集めて Buffer A で 5 倍以上に希釈し、104,000 g・4℃・1 時間 (使用ローター: P70AT, CP80WX, Hitachi)で超遠心分離によって VP を濃縮精製した。上清をパスツールピペットで静かに除去した後、沈殿を少量の Buffer A に静かに懸濁し精製 VP 溶液とした。

透過型電子顕微鏡(TEM)による精製ウイルス粒子の観察

シヨ糖濃度勾配遠心法あるいは塩化セシウム密度勾配遠心法にて精製したウイルス粒子溶液をパラフィルム上に5 µl 滴下し、コロジオン膜貼付メッシュ (日新 EM)の表面を下にしてウイルス粒子溶液の液滴に浸した。このメッシュを滅菌蒸留水の液滴に2回浸した後、2% 酢酸ウランでネガティブ染色した。染色済みメッシュは透過型電子顕微鏡 (JEM1400 Plus, JEOL)で観察し、画像データ化した。

SDS-PAGE によるタンパク質の検出

ATTO 製ミニスラブゲル作製キットを使用して Separating gel (8% Acrylamide)、Stacking gel (3% Acrylamide)、1×Electrode buffer を用いた SDS-PAGE により、タンパク質を展開した。泳動後、EzStain AQua (ATTO)を用いた CBB 染色によりタンパク質を可視化した。分子量マーカーとして、LMW (GE Healthcare)、HMW SDS (GE Healthcare)、DynaMarker® Protein MultiColor Stable (BioDynamics Laboratory Inc.)を用いた。

ゲル組成

Separating gel (8% Acrylamide)

4×Separating buffer	3.75 ml
30%アクリルアミド溶液(Acrylamide : Bis = 29.2 : 0.8)	4.0 ml
D.W.	7.25 ml
10% APS	100 µl
TEMED	12 µl

(必要に応じて 0.1 ~ 0.5% TritonX-100 を添加)

Stacking gel (3% Acrylamide)

4×Stacking buffer	1.25 ml
30%アクリルアミド溶液(Acrylamide : Bis = 29.2 : 0.8)	0.5 ml
D.W.	3.25 ml

10% APS 50 μ l

TEMED 12 μ l

(必要に応じて 0.1 ~ 0.5% TritonX-100 を添加)

分子量マーカー

HMW (High Molecular Weight)

タンパク質	分子量(Da)	由来
Myosin	220,000	Rabbit muscle
α -2-Macroglobulin	170,000	Bovine plasma
β -Galactosidase	116,000	<i>E.coli</i>
Transferrin	76,000	Human
Glutamic dehydrogenase	53,000	Bovine liver

LMW (Low Molecular Weight)

タンパク質	分子量(Da)	由来
Phosphorylase b	97,000	Rabbit muscle
Albumin	66,000	Bovine serum
Ovalbumin	45,000	Chicken egg white
Carbonic anhydrase	30,000	Bovine erythrocyte
Trypsin inhibitor	20,100	Soybean
α -Lactalbumin	14,400	Bovine milk

DynaMarker® Protein MultiColor Stable

タンパク質	分子量(kDa)
Myosin	230.0

β -Galactosidase	140.0
Phosphorylase b	96.0
BSA	73.0
Ovalbumin	46.0
Carbonic anhydrase	31.0
Trypsin inhibitor	26.0
Lysozyme	18.0

糖タンパク質の検出には、SDS-PAGE で展開したゲルを用いて Periodic Acid-Schiff 法 (PAS; 過ヨウ素酸シッフ) (Wislocki et al., 1949)を染色原理とする Pierce™ Glycoprotein Staining Kit (Thermo Fisher Scientific)と添付のプロトコルに従って In-Gel Detection を行った。

ウェスタンブロット解析

タンパク質のブロッティング

SDS-PAGE で展開したタンパク質の転写は AE-6677 ホライズブロット (ATTO)を用いてセミドライ式ブロッティングにより行った。まず、装置の陽極板に Westernblotting buffer A に浸漬したろ紙 6 枚とその上に Westernblotting buffer B に浸漬したろ紙 2 枚を重ねて置いた。その上に、予め親水化した後 Westernblotting buffer B に浸漬した PVDF メンブレン (クリアブロット P 膜; ATTO)を重ねた。メンブレンが乾燥しない内に Westernblotting buffer B に浸漬したゲルを積層し、最後に Westernblotting buffer C に浸漬したろ紙 10 枚を重ね、手で上から均一に軽く押しつぶした。陰極板を載せてゲル 1 cm² 当たり 2 mA で 1 時間通電することで、ゲル中のタンパク質を PVDF メンブレンに転写した。

抗原抗体反応

ブロッティング後の PVDF メンブレンは、ブロッキング溶液 (5% スキムミルク, TBST)中で室温・1 時間または 4℃・一晩シーソーシェーカーで振盪してブロッキングした。ブロッキング後、TBST 中で室

温・5分間・100spm で往復振盪する操作を3回繰り返しメンブレンを洗浄した。次に、メンブレンを一次抗体溶液 (1% BSA, TBST, 所定濃度に希釈したウサギ抗血清)中で室温・1時間または4℃・一晚シーソーシェーカーで振盪して一次抗体結合反応を行った。その後 TBST 中で 100spm・室温・5分間で往復振盪する操作を3回繰り返しメンブレンを洗浄した。次に、メンブレンを二次抗体溶液 (1% BSA, TBST, 0.1 µg/ml Goat anti-Rabbit IgG (H+L) Superclonal™ Secondary Antibody HRP (Thermo Fisher Scientific))中で室温・1時間シーソーシェーカーで振盪して二次抗体結合反応を行った。再び、TBST 中で 100spm・室温・5分間で往復振盪する操作を3回繰り返しメンブレンを洗浄後、HRP 標識抗体を検出した。

化学発光検出

HRP 標識抗体の検出は、EzWestLumi plus (ATTO)と添付のプロトコルに従った。添付の発光基質の処理後、PVDF メンブレンをクリアポケットに気泡が入り込まないように挟んだ。発光検出は、AE-9300 Ez-Capture MG (ATTO)と ImageSaver5 for Ez-Capture MG ソフトウェア(ATTO)及び付属の取扱説明書に従って適度な露光で撮影した。撮影画像は、CS Analyzer ver 3.0 for Windows ソフトウェア(ATTO)と付属の取扱説明書に従って分子量マーカー画像との合成や分子量計測などの画像演算を行った。

メンブレンからの抗体除去とリプロービング

HRP 発光検出後、必要に応じて使用した PVDF メンブレンから抗体を剥離し、別の抗血清を用いたリプロービングと HRP 再検出を行った。まず、発光検出後の PVDF メンブレンは乾燥しない内に TBST 中で室温・5分間・100spm で往復振盪する操作を2回以上繰り返し、メンブレンを洗浄した。その後、抗体剥離用 Stripping buffer にメンブレンを浸し、50℃・30分間・50spm でシーソーシェーカー振盪し抗体剥離反応を行った。反応後のメンブレンを TBST に移し、室温・5分間・100spm で往復振盪する操作を2回以上繰り返し、メンブレンを洗浄した。リプロービングを行う前に、洗浄後のメンブレンを用いて前述の HRP 発光検出を行い、発光がネガティブで抗体剥離が間違いなく行われたことを確認した。この後 TBST で再びメンブレンを洗浄し、前述の抗原抗体反応を行うことでリプロービングした。

菌糸融合

MoCV1-A、MoCV1-A-a の感染

Figure 12 に示した手順に従って、ハイグロマイシン耐性遺伝子 (*hph*) を形質転換した MoCV1-A 感染フリー化株 (レシピエント株) と S-0412-II 1c 株または S-0412-II 1a 株 (ドナー株) の菌糸融合を介した MoCV1-A-a または MoCV1-A の感染を試みた。PDA 平板培地上でレシピエント株とドナー株を 3~4 cm 間隔で 3 週間対峙培養し、両株のコロニー接触面をコルクボーラーで取り出してハイグロマイシン含有 PDA 平板培地へ移植した。そのままハイグロマイシンが含有 PDA 平板培地上で 3 週間培養して菌叢の表現型を観察するとともに One-Step RT-PCR 法を用いたウイルスゲノムの検出と PCR 法を用いたハイグロマイシン耐性遺伝子の検出を試みた。

MoCV1-D の感染

Figure 36 に示した手順に従って、ハイグロマイシン耐性遺伝子を搭載する pAK-Hyg-exp vector で形質転換した P2 株 (レシピエント株) と APU10-199A 株 (ドナー株) の菌糸融合を介した MoCV1-D の感染を試みた。まず、0.75 mM ZnSO₄ を含む OMA 平板培地 (Ikeda et al., 2013) 上でレシピエント株とドナー株を 2 cm 間隔で 30 日間対峙培養し、両株のコロニー接触面をコルクボーラーで取り出してハイグロマイシン含有 OMA 培地 (Hygromycin B 200 µg/ml) へ移植した。ドナー株由来の菌糸細胞を除去するため、このハイグロマイシン含有 OMA 培地上で 26°C、14 日間隔で 4 回継代培養し 2 株の菌糸融合候補株を得た。レシピエント株への MoCV1-D の水平伝播の成否を判定するため、この菌糸融合候補株から dsRNA を精製し MoCV1 RdRp 特異的プライマーセットを用いた One-Step RT-PCR を行うとともに、精製 dsRNA を Native-PAGE で展開し dsRNA 分子のセグメント構造を可視化した。さらに、前述したウイルス粒子精製法によって菌糸融合候補株から精製 MoCV1-D 画分を調製し、構造タンパク質を SDS-PAGE で展開するとともに TEM 観察を行った。また、菌糸融合候補株の宿主細胞の由来を検証するため、PCR による *hph* 遺伝子の確認・rep-PCR による宿主 DNA 多型の確認を行った。

イネいもち病菌プロトプラストへの MoCV1-D ウイルス粒子導入

人為的な細胞外感染系の確立を目的として、Polyethylene glycol (PEG)を介したイネいもち病菌プロトプラスト細胞への精製 MoCV1-D 粒子の導入を試みた。導入方法は、Ejmal et al., (2018)の報告を参考として、一部を改変した。ウイルスを受容するレシピエント株としてウイルスフリーな P2 株及び APU10-199A 株 (MoV2-free, MoCV1-D-free, MoPV1-infected)を用いた。またドナーウイルスとして、微生物培養装置にて培養・回収し-80°C凍結ストックしたオリジナル株 APU10-199A (5.0 g)から精製 MoCV1-D ウイルス粒子画分を調製した。精製手法は前項に準じてショ糖濃度勾配遠心にて精製・濃縮した。得られた精製ウイルス粒子溶液及びネガティブコントロールとしてウイルス粒子を含まない Buffer A をそれぞれ 0.22 µm フィルターでろ過滅菌し感染実験に用いた。次に、Aihara et al. (2018)を参考に後述のように P2 株及び MoV2- and MoCV1-D-free APU10-199A 株のプロトプラスト細胞を調整した。まず、PDA 平板培地で培養したレシピエント株からコルクボーラーを用いて寒天片 10 片を YG 液体培地 50 ml へ植菌した。120 spm ・26°Cで3日間振盪培養した後、寒天片はなるべく除いて 50 ml コニカルチューブに回収した。8,730 g ・10 分間で遠心後、回収菌体洗浄のため沈殿を滅菌蒸留水 30 ml で再懸濁した。8,730 g ・5 分間遠心後、沈殿を 0.6 M KCl 50 ml に再懸濁し、さらに 5,500 g ・5 分間遠心分離した。この洗浄操作を2回繰り返した。得られた沈殿に Enzyme solution 10 ml (Lysing enzyme 0.2 g, Driselase 0.2 g, 0.6 M KCl buffer)を加え、再懸濁した。シーソーシェーカー (40 spm)を用いて 28°C ・3.5 時間インキュベートした。このプロトプラスト処理溶液を滅菌キムワイプでろ過し 50 ml コニカルチューブへ回収した。このプロトプラスト処理溶液をスイングローターで 1,230 g ・15 分間遠心分離し沈殿を得た。この沈殿を 5 ml STC buffer に静かに懸濁した後、再びスイングローターを用いて 1,230 g ・10 分間遠心分離し沈殿を得た。この沈殿を再び 3 ml STC buffer に静かに懸濁した後、Thoma 血球計算盤を用いてプロトプラストを計数し、両株のプロトプラスト溶液濃度を 4.15×10^7 個/ml に調整し以降の感染処理に用いた。

ウイルスの感染処理は全工程を氷上で行った。滅菌した 1.5 ml エッペンチューブに、まず 130 µl 60% PEG 4000、次いで 70 µl KTC buffer を層状になるように静かに加えた。ここに、200 µl 精製 MoCV1-D 粒子溶液またはネガティブコントロールとしてウイルス粒子を含まない滅菌 Buffer A を静かに加えた。さらにこの上に、滅菌した 5 µl 0.05 mM Spermidine、次いで 200 µl の各株のプロトプラスト溶液またはネガティブコントロールとして STC buffer を静かに加え、15 秒間静かに混和した。氷上で 20 分間静置し

た後、200 μ l 60% PEG 4000、次いで 100 μ l KTC buffer を静かに加えて混和した。再び氷上で 10 分間静置した後、これを 15 ml コニカルチューブに回収し 10 ml STC-50 buffer を加えて転倒混和した。5,500 g \cdot 室温 \cdot 15 分間遠心分離した後、上清をパスツールピペットで丁寧に除去してペレットを得た。2.5 ml YG 1/2S broth を加えて静かに沈殿を懸濁した後、室温で 4.5 時間静置しプロトプラストを再生させた。Low melting agar を加え 40~50°C に保温した 50 ml YG 20SC 培地に、2.5 ml (原液区) または 0.25 ml (10 倍希釈区) のウイルス感染プロトプラスト溶液を混和して、1 区あたりプレート 4 枚に注いだ。25°C で 4 日あるいは 5 日間インキュベートした後、独立コロニーを選別して PDA 平板培地に移植した。それぞれのコロニーを PDA 平板培地で 6 日間で 3 度継代培養した後、MoCV1-D のトランスフェクション成否を判定するため、各コロニーから dsRNA を精製し MoCV1 RdRp 特異的プライマーセットを用いた One-Step RT-PCR を行った。

酵母シャトルベクター構築

MoCV1-D ORF4p、MoCV1-D ORF4SUap

MoCV1-D の ORF4p が MoCV1-A ORF4p と同じような生育阻害活性を有するかどうか検証するため、酵母内遺伝子発現レベルが TDH3 プロモーター及びターミネーターによって制御されるように設計された pRST426 シャトルベクター (Urayama et al., 2012) に MoCV1-D ORF4 領域 (DORF4) または ORF4SUa 領域 (DORF4SUa) を挿入した発現コンストラクトを作出した。まず、Table 2 に示した認識サイトを付加したアダプタープライマーを設計し、それらを用いて MoCV1-D ORF4 領域または ORF4SUa 領域の cDNA クローンを得た。予め、対応する制限酵素処理を行った pRST426 シャトルベクターと MoCV1-D ORF4 領域または ORF4SUa 領域の cDNA クローンを DNA Ligation Kit ver. 2.1 (TaKaRa) によってライゲーションした。*E. coli* 内でクローニング後、インサート配列の確認のため対応したシーケンシングプライマーを用いて、前項のように ABI PRISM BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Kit と添付のプロトコルに従って反応を行い Applied Biosystems 3130xl Genetic Analyzer を用いてシーケンス解析を行った。

出芽酵母へのシャトルベクター形質転換

酢酸リチウム法 (Gietz et al., 1995; 大矢ら, 2002)に従って、構築したシャトルベクターを出芽酵母 W303-1A[L-A-o]株へ導入した。まず前培養のため、YPAD 平板培地上で形成させた酵母 W303-1A 株のコロニーを 5 ml YPAD 液体培地に植菌して 30°C で 16 時間振盪培養した。これを、開始 OD₆₀₀=0.38 となるように 50 ml YPAD 液体培地 (200 ml 用バッフルフラスコ)に植菌して 160 spm ・ 30°C ・ 4.5 時間往復振盪培養した。培養液を 50 ml コニカルチューブに回収し、3,000 g (スイングロータ) ・ 室温 ・ 5 分間遠心分離して酵母細胞を沈殿させた。ペレットを 25 ml D.W. で再懸濁した後、再び 3,000 g (スイングロータ) ・ 室温 ・ 5 分間遠心分離して沈殿を得た。沈殿した細胞に 0.1 M Lithium acetate 1 ml を加えて再懸濁し、懸濁液を 1.5 ml エッペンチューブに移し、15,000 g ・ 室温 ・ 10 分間遠心分離して沈殿を得た。沈殿に 0.1 M Lithium acetate 400 µl を加えて再懸濁し、50 µl ずつ 1.5 ml エッペンチューブに分注し、再び 15,000 g ・ 室温 ・ 1 分間遠心分離して沈殿を得た。上清をピペットで除去した後、240 µl 50% ポリエチレングリコール (MW:3350)、1.0 M Lithium acetate 36 µl、予め熱処理した一本鎖キャリア DNA (5 mg/ml) 10 µl、プラスミド溶液 (1µg/µl) 50 µl の順序で重層し、ボルテックス懸濁した。30°C で 30 分間、次いで 42°C で 20 分間インキュベートした。これを遠心分離した後、沈殿物に 500 µl D.W. を加えて静かに懸濁し、SC 平板培地及びシャトルベクターの栄養要求性に応じて任意のアミノ酸を欠損させた SC 平板培地に塗布し、再生コロニーが得られるまで 30°C で培養した。

生育試験

Urayama et al., (2012) や Okada et al., (2018) を参考として、シャトルベクターから高発現するマイコウイルス由来タンパク質 (DORF4p) が酵母細胞に与える影響を評価した。pRST426-DORF4 形質転換体の他、対照として DORF4 配列を搭載しない pRST426 空ベクター (pRST426-empty vector) が導入された形質転換体を準備した。pRST426-empty vector 形質転換体とタイムポイント毎の細胞形態、生菌細胞数及び OD₆₀₀ 値を比較した。

イネいもち病菌のメラニン合成中間体の抽出・分析

培養と抽出

MoCV1-D が宿主菌であるイネいもち病菌に与える生育阻害活性の作用点・メカニズム解析を目的として、ウイルス感染の有無による菌叢の色素沈着の変化に着目した。APU10-199A 株及び MoCV1-D-free APU10-199A 株からメラニン生合成系に関連する中間体を抽出し HPLC (High-Performance-Liquid-Chromatograph)による逆相クロマトグラフィーや UHPLC-ToF-MS (Ultra-High-Performance-Liquid-Chromatograph-Quadrupole-Time-of-Flight-Mass-Spectrometer)による定性分析を試みた。菌体からのメラニン合成中間体の抽出法は、Greenblatt and Wheeler (1986)、Wheeler and Greenblatt (1988)及び Kurahashi et al., (1998)の報告を参考として一部を改変した。まず、OMA 平板培地での培養で得た APU10-199A 株あるいは MoCV1-D-free APU10-199A 株の分生子・菌糸懸濁液を、1枚の滅菌セロハン (6 cm×6 cm)が敷かれた PCDA (Potato Carrot Dextrose Agar)平板培地上に 150 ~ 300 µl 滴下し、液滴をセロハン全体に行き渡らせた。液滴が移動しなくなる程度に風乾し、暗黒下で 26°C・5~14 日間インキュベートした。セロハン上に形成された菌叢をピンセットで丁寧に剥がし取り、ろ紙に挟み込んで水気を吸い取ってから菌叢 0.5 ~1 g を液体窒素で磨砕した。この菌叢粉末をアセトン約 30 ml でビーカーに回収し、攪拌子を用いて 4°C・0.5~1 時間攪拌抽出した。この懸濁液をガラスロートとろ紙でろ過して 50 ml コニカルチューブに回収した。アセトン抽出画分をエバポレータで減圧濃縮した後、アセトニトリル 1 ml で回収し逆相クロマトグラフィー分析した。

セロハン上で培養した菌叢からのアセトン抽出だけでなく、Wheeler and Greenblatt (1988)を参考に、他の抽出方法も検討した。まず、前述のようにアセトンで菌叢粉末を攪拌抽出し、懸濁液をろ紙でフィルトレーションした。この時の菌叢粉末残渣をリン酸バッファで回収し、攪拌子を用いて 4°C・20 分間攪拌抽出した。この懸濁液を 17,100 rpm (P70AT)・4°C・20 分間超遠心分離した後上清を HCl で pH 2~3 となるよう酸性化し酢酸エチルで抽出した。有機層は前述のようにエバポレータで減圧濃縮した後、アセトニトリル 1 ml で回収し逆相クロマトグラフィー分析した。

また、液体培養菌体やその時の培養上清からの抽出も試みた。まず、P2-GFP 株の場合、PD 液体培地または YG 液体培地で振盪培養し、培養 5 日、7 日後の培養上清を回収し HCl で酸性化した後酢酸エチルに転溶させた。これを減圧濃縮し逆相クロマトグラフィー分析した。APU10-199A 株及び MoCV1-D-free APU10-199A 株の場合、同じように PD 液体培地または YG 液体培地で振盪培養した培養上清を酢

酸エチルで転溶するとともに、その時の液体培養菌体からも前述と同様の方法でアセトン抽出を行い逆相クロマトグラフィー分析した。

また、宿主いもち病菌内におけるマイコウイルスの作用機序を予測するため、既存のメラニン合成阻害剤共存下でウイルスフリー化株を培養しその抽出物中のクロマトグラムをウイルス感染株のものと比較した。本実験で使用したメラニン合成阻害剤は、ポリケチド合成酵素を阻害する MBI-P (Melanin-biosynthesis inhibitor-Polyketide synthase)剤として Tolprocarb (TPC) (Hamada et al., 2014)、脱水酵素を阻害する MBI-D (Melanin-biosynthesis inhibitor-Dehydratase)剤として Carpropamid (CPP) (Kurahashi et al., 1998) 及び還元酵素を阻害する MBI-R (Melanin-biosynthesis inhibitor-Reductase)剤として Tricyclazole (TCZ) (Woloshuk et al., 1980)を用いた。1% MeOH で 50 ppm TPC、CPP、TCZ 溶液を調製し、前述のセロハン滴下前の各株の孢子懸濁液にこれら进行处理した。薬剤無処理区として 1% MeOH を用いた。その後の培養・抽出・分析条件は前述の方法に従った。

HPLC 分析 (High-Performance-Liquid-Chromatography)

前述の抽出液から必要に応じた注入量で下記条件 (HPLC condition 1~3)の逆相クロマトグラフィー分析を行った。

HPLC condition 1

Instrument	LC-20A HPLC system (Shimadzu)
Column	CAPCELL PAK MGII C18 (5 μ m, 4.6 mm i.d. \times 250 mm; Shiseido)
Column oven temp.	40
Flow rate	1.0 ml/min
Injection vol.	5 μ l
Detection	UV 254 nm
Mobile phase	[A] Milli-Q/Trifluoro acetic acid = 1000/ 1 (v/v) [B] Acetonitrile B conc. 20%/ 0 min \Rightarrow 80%/ 30 min, Linear gradient

HPLC condition 2

Instrument	LC-20A HPLC system (Shimadzu)
Column	CAPCELL PAK MGII C18 (5 μ m, 4.6 mm i.d. \times 250 mm; Shiseido)
Column oven temp.	40
Flow rate	1.0 ml/min
Injection vol.	5 μ l
Detection	UV 254 nm
Mobile phase	[A] Milli-Q/Trifluoro acetic acid = 1000/ 1 (v/v) [B] Acetonitrile/Trifluoro acetic acid = 1000/1 (v/v) B conc. 20%/ 0 min \Rightarrow 80%/ 30 min, Linear gradient

HPLC condition 3

Instrument	LC-20A HPLC system (Shimadzu)
Column	Kinetex XB-C18 (100A, 5 μ m, 4.6 mm I.D. \times 250 mm; Phenomenex)
Column oven temp.	40
Flow rate	1.0 ml/min
Injection vol.	5 ~ 150 μ l
Detection	UV 334 nm
Mobile phase	[A] Milli-Q/ Formic acid = 1000/ 1 (v/v) [B] Acetonitrile B conc. 20%/ 0 min \Rightarrow 80%/ 30 min, Linear gradient

UHPLC-QToF-MS 分析 (Ultra-High-Performance-Liquid-Chromatography-Quadrupole-Time-of-Flight-Mass-Spectrometry)

前述の HPLC 分析で検出されたピークに含まれる化合物を同定するため、抽出液あるいは HPLC で分取した画分をグラジエント開始時の溶離液に溶媒置換し、下記条件 (MS condition 1~3)で質量分析した。使用した分析装置は、ハイフネーテッド法によって質量分離部としての飛行時間型質量分析装置

SYNAPT™ G2 HDMS™ (Waters)の上流に ACQUITY UPLC® (Waters)を連結し、付属の MassLynx ver. 4.1 (Waters)ソフトウェアでオペレートした。イオン化方式はエレクトロイオンスプレー化法で負イオン測定を行った。得られたマススペクトル中のプロダクトイオンの m/z に基づいて、ソフトウェア上で元素組成解析 (Elemental composition analysis)を行い化合物の組成式を予測した。得られた測定精密質量 (Accurate mass)と組成式をメラニン生合成系中間体の計算精密質量 (Exact mass) (付録 4)と比較することでピークの帰属とした。

MS condition 1

Instrument	SYNAPT™ G2 HDMS™ (Waters)	
Software	MassLynx 4.1 (Waters)	
UHPLC	Chromatograph	ACQUITY UPLC® (Waters)
	Column	Kinetex C18 (2.1 mm I.D.×100 mm; Phenomenex)
	Column oven temp.	40
	Flow rate	0.4 ml/min
	Detection	Photodiode array, 200 - 400 nm
	Mobile phase	[A] Milli-Q/ Formic acid = 1000/ 1 (v/v)
		[B] Acetonitrile
B conc. 10%/ 0 min ⇒90%/ 10 min, Linear gradient		
MS	Ionization	ESI
	Ion mode	Negative ion
	Resolution mode	Resolution 20000
	mass range (m/z)	100 - 1000
	Source temp. (°C)	150
	Desolvation temp. (°C)	500
	Data threshold (%)	10

MS condition 2

MS	Ionization	ESI
	Ion mode	Negative ion
	Resolution mode	Resolution 20000
	mass range (<i>m/z</i>)	100 - 1000
	Source temp. (°C)	100
	Desolvation temp. (°C)	200
	Data threshold (%)	10

MS condition 3

MS	Ionization	ESI
	Ion mode	Negative ion
	Resolution mode	Resolution 20000
	mass range (<i>m/z</i>)	100 - 1000
	Source temp. (°C)	100
	Desolvation temp. (°C)	250
	Data threshold (%)	10

使用培地

PDA 培地 (Potato dextrose agar medium)

Potato	200 g/L
Glucose	2.0%
Agar	1.5%

ジャガイモの皮をむいて芽を取り、約 5mm 角のサイコロ状に切断した。D.W.とともに約 1 時間煮込んで成分を抽出した。煮汁をガーゼでこして、グルコースと寒天粉末を加え十分攪拌した後、オートクレーブ滅菌した。

PDA 培地 (Hygromycin 100 µg/ml)

上記の組成でオートクレーブ滅菌した後、スターラーで静かに攪拌して培地を冷ます。60~70℃程度まで冷まし、無菌条件下で 25 mg/ml Hygromycin B を、PDA 培地 500 ml 当り 2 ml 添加した。

PCDA 培地 (Potato carrot dextrose agar medium)

上記の組成で、ジャガイモを煮込む際に培地全量 1 L 当たり 150 g のサイコロ状にカットしたニンジンに加え D.W.とともに約 1 時間煮込んで成分を抽出した。この煮汁をガーゼでこして培地調製に用いた。

OMA 培地 (Oatmeal agar medium)

Oatmeal	50 g/L
Agar	1.5%

Oatmeal (日食オーツ) を培地全量の 8~9 割の D.W.とともに約 30 分間煮込む。煮汁をガーゼでこして Agar を加えた後、D.W.でメスアップする。その後オートクレーブ滅菌した。

YG 培地 (Yeast extract glucose broth)

Yeast extract	0.5%
Glucose	2.0%

培地全量に対して、0.5% Yeast extract と 2.0% グルコースを加え、水道水でメスアップし、オートクレーブ滅菌した。

YG1/2S 培地

Yeast extract	0.5%
Glucose	2.0%
0.6 M Sorbitol	

25 mM CaCl₂

YG20SC 培地

Yeast extract	0.5%
Glucose	2.0%
Sucrose	20%
Low melting agar	1.0%

YPAD 培地

Yeast extract	1.0%
Peptone	2.0%
Dextrose	2.0%
Adenine sulfate	0.04%
(Agar	2.0%)

上記の組成で D.W.に完全に溶解させた後、オートクレーブ滅菌した。

SD 培地 (Synthetic minimal medium with dextrose)

Dextrose	2.0%
Yeast nitrogen base without amino acids	0.67%
(Agar	2.0%)

SC 培地 (Synthetic complete medium)

Dextrose	2.0%
Yeast nitrogen base without amino acids	0.67%

Adenine sulfate	0.04%
Agar	2.0%
Appropriate mix composition (H)	50 ml/L
1M K ₂ HPO ₄	10 ml/L

培地全量に対して上記の組成で D.W.に溶解させた後、オートクレーブ滅菌した。任意のアミノ酸欠損培地を調製する際は、そのアミノ酸を含まない Appropriate mix composition (H)を調製し上記組成に混合した。オートクレーブ滅菌後、フィルター滅菌した下記の溶液を混合した。

5% L-threonine	5 ml/L
2% Sodium aspartate	5 ml/L
1% L-leucine	5 ml/L

Appropriate mix composition (H)

Uracil	0.05%
L-Tryptophan	0.05%
L-Histidine	0.05%
L-Arginine	0.05%
L-Methionine	0.05%
L-Tyrosine	0.07%
L-Isoleucine	0.07%
L-Lysine	0.07%
L-Phenylalanine	0.12%
L-Valine	0.3%

上記の組成で D.W.に溶解させた後、オートクレーブ滅菌した。任意のアミノ酸欠損培地を調製する際は、上記組成からそのアミノ酸を除いて調製した。

SOB 培地

Peptone	2.0%
Yeast extract	0.5%
NaCl	10 mM
KCl	2.5 mM
MgCl ₂	10 mM
MgSO ₄	10 mM

培地全量に対して、2.0%のポリペプトン、0.5%の Yeast extract、終濃度 10 mM NaCl、終濃度 2.5 mM KCl を加え、オートクレーブ滅菌した。その後、それぞれの終濃度が 10 mM になるように MgCl₂、MgSO₄ を加えた。

SOC 培地

SOB 培地全量に対して、1/100 量の 2M グルコース溶液（オートクレーブ滅菌済み）を加えた。

LB 培地 (Ampicillin 50 µg/ml)

Peptone	1.0%
Yeast extract	0.5%
NaCl	1.0%
(Agar	1.5%)

培地全量に対して、1.0%のポリペプトン、0.5%の Yeast extract、1.0%の NaCl、1.2%の寒天粉末、1/200 量の 1N NaOH を加え、オートクレーブ滅菌した。その後、十分に冷ましてから終濃度 50 µg/ml になるように Ampicillin を加えた。

使用試薬

PCI (Phenol/chloroform/Isoamyl alcohol)

50% 水飽和フェノール 49% クロロホルム 1% イソアミルアルコール
微量 8-キノリノール

RNA 抽出 buffer

2 × STE 1% SDS 0.2% 2-Mercaptoethanol

10×STE buffer

1 M NaCl 100 mM Tris-HCl (pH 8.0) 10 mM EDTA (pH 8.0)

TE buffer

10 mM Tris-HCl (pH 8.0) 1 mM EDTA

50×TAE buffer

2 M Tris 1 M CH₃COOH 50 mM EDTA (pH 8.0)

10×TBE buffer

0.89 M Tris 0.89 M Boric acid 0.02 M EDTA

10×Loading dye

50% Glycerol 250 mM Tris-HCl (pH 8.0) 125 mM EDTA (pH 8.0) 0.1% Bromophenol blue
0.1% Xylene cyanol

Buffer A (pH 7.4)

0.1 M Sodium phosphate 0.2 M KCl

Buffer B (pH 7.8)

50 mM Tris-HCl (pH7.8) 150 mM NaCl

10×Electrode buffer

0.25 M Tris 1.92 M Glycine 1.0% SDS

4×Separating buffer (分離ゲル用)

1.5 M Tris-HCl (pH 8.8) 0.4% SDS (w/v)

4×Stacking buffer (濃縮ゲル用)

0.5 M Tris-HCl (pH 6.8) 0.4% SDS (w/v)

4×SDS-PAGE sample buffer

0.24 M Tris-HCl (pH6.8) 8.0% SDS (w/v) 40% Glycerol 0.1% Bromophenol blue
20% 2-Mercaptoethanol

10×TBS buffer (pH 7.4)

500 mM Tris 138 mM NaCl 2.7 mM KCl

TBST

1 × TBS 0.05% Tween 20

Stripping buffer (抗体剥離用)

62.5 mM Tris-HCl (pH6.7) 2.0% SDS (w/v) 100 mM 2-Mercaptoethanol

Westernblotting buffer A

300 mM Tris 2.5% Methanol

Westernblotting buffer B

25 mM Tris 2.5% Methanol

Westernblotting buffer C

25 mM Tris 2.5% Methanol 0.02% SDS 2 mM 6-Aminohexanoic acid

Transformation buffer (pH 6.7)

10 mM PIPES 15 mM CaCl₂ 250 mM KCl 55 mM MnCl₂

Solution I (プラスミド抽出用)

25 mM Tris-HCl (pH 8.0) 50 mM Glucose 10 mM EDTA (pH 8.0)

Solution II (プラスミド抽出用)

0.2 N NaOH 1% SDS (w/v)

Solution III (プラスミド抽出用)

3 M CH₃COOK 2 M CH₃COOH

STC buffer

1.2 M Sorbitol 10 mM Tris-HCl (pH 7.5) 20 mM CaCl₂

STC-50 buffer

1.2 M Sorbitol 10 mM Tris-HCl (pH 7.5) 50 mM CaCl₂

KTC buffer

1.8 M KCl 150 mM Tris-HCl (pH 8) 150 mM CaCl₂

結果

I 章 イネいもち病菌ベトナム分離株に感染するマイコウイルス

1. マイコウイルスの感染が S-0412-II 1c 株に及ぼす影響

先行研究においてベトナムで分離されたイネいもち病菌株の中で、S-0412-II 1c 株には *Magnaporthe oryzae chrysovirus 1-A-a* (MoCV1-A-a) (ゲノムサイズ: 3.6 kb、3.1 kb、2.9 kb、2.8 kb)、*Magnaporthe oryzae partiti-like virus* (MoPLV) (ゲノムサイズ: 2.4 kb、2.2 kb、1.9 kb、1.2 kb) が混合感染していることが明らかにされている (Figure 1)。また、シクロヘキシミド処理によるウイルス感染のフリー化処理や、菌糸先端培養、継代培養により、ウイルスフリー化株 (MoCV1-A-a/MoPLV-free S-0412-II 1c 株)、MoCV1-A-a 単独感染株、MoPLV 単独感染株が作出された (鈴木修士論文, 2010)。これらのウイルスが宿主菌に及ぼす影響を解析するため、得られた株の PDA 平板培地上での表現型の比較が行われた。その結果、MoCV1-A-a が感染している S-0412-II 1c 株と MoCV1-A-a 単独感染株では、培地上に生育しているイネいもち病菌の気中菌糸が形成されない、もしくは気中菌糸の形成後溶菌化するウェットな表現型と異常な色素沈着が観察された。一方、MoCV1-A-a が感染していない MoPLV 単独感染株とウイルスフリー化株では、このような表現型は観察されず、旺盛な気中菌糸が観察された。また、分生子形成効率を調査すると、S-0412-II 1c 株と MoCV1-A-a 単独感染株ではウイルスフリー化株と比較して大幅に分生子の形成数が減少していた。しかし、MoPLV 単独感染株とウイルスフリー化株では形成分生子数に差が認められなかった。これらの結果より、MoCV1-A-a がイネいもち病菌に生育阻害を引き起こし、MoPLV は潜在的なウイルスであると考えられた (鈴木修士論文, 2010)。

この結果の再現性を確認するため、各株から 2 本鎖 RNA 抽出を行いウイルスゲノムの有無を確認するとともに PDA 平板培地上での表現型比較を行った。その結果、MoCV1-A-a のウイルスゲノムが確認された S-0412-II 1c 株と MoCV1-A-a 単独感染株において、宿主菌の気中菌糸が形成されない、もしくは気中菌糸の形成後溶菌化するウェットな表現型と異常な色素沈着が観察された。また、ウイルスフリー

化株と MoPLV 単独感染株では旺盛な気中菌糸が観察された。このことから、MoCV1-A-a が感染している株ではイネいもち病菌の生育阻害が引き起こされていることが再確認でき、過去の報告を支持する結果が得られた(Figure 2, 3)。

2. MoCV1 ウイルスゲノムセグメントの濃度比計測

菌体や精製したウイルス粒子から抽出した dsRNA をアガロースゲル電気泳動で展開すると、MoCV1-A-a と MoCV1-A で高分子側から 2 番目のバンド (約 3.1 kb)の濃度比が異なっていた。高分子側から 3 番目のバンド (約 2.9 kb)は両ウイルス間で濃度の差がほとんど確認されなかったが、高分子側から 2 番目のバンドにおいて、MoCV1-A-a のバンド強度は MoCV1-A のそれよりも非常に高く見える。各ウイルスの dsRNA セグメントのバンド強度を数値化するため、CS Analyzer ver 3.0 (ATTO Densitograph Software Library)を用いてデンシトメトリー計測を行った。すると、3.1 kb のバンド輝度のデンシトグラムから計算された積算値は MoCV1-A では約 50,000 であったのに対して、MoCV1-A-a では約 130,000 で 2 倍以上の高い数値を示した。既知濃度の分子量マーカーを基準として各バンドの定量値を求めると、3.1 kb のバンドは菌体 45 mg 当り MoCV1-A では 82 ng だったが、それに対して MoCV1-A-a では 217 ng で 2 倍以上の高い数値を示した。このことから、MoCV1-A-a と MoCV1-A において同一重量の菌体に含まれる dsRNA1~5 のセグメント存在比が異なっていることが明らかとなった (Figure 4, Table 3)。

3. MoCV1-A-a のシーケンス解析

S-0412-II 1c 株に感染している MoCV1-A-a の詳細な解析のため、MoCV1-A-a ウイルスゲノムの全塩基配列の決定を行った。鋳型として S-0412-II 1c 株を凍結破砕し全核酸を抽出し CF-11 セルローズパウダーにより精製した dsRNA を用いた。先行研究で、ランダムプライマーを用いた cDNA クローニングや RT-PCR を用いて MoCV1-A-a のおおよそ全長を網羅する塩基配列が得られているが(鈴木修士論文, 2010)、完全長の塩基配列決定は未完結であった。そこで、5' RACE 法や 3' RACE 法、RT-PCR 法を用いてウイルスゲノムの全塩基配列を決定した。

MoCV1-A-a の全塩基配列とゲノムセグメント構造

過去の研究で明らかとなった部分的な塩基配列情報に基づいて Gene specific primer を設計し、5' RACE 法や 3' RACE 法によって各ウイルスゲノムセグメントの末端配列のフラグメントを得た。ATSQ ソフトウェア上で過去の研究で明らかとなった部分的な塩基配列情報と新規に得られたフラグメントをアセンブルし、各セグメントの完全長の塩基配列を有するコンティグを作成した。これらのシーケンス解析により、MoCV1-A-a の全塩基配列を決定しウイルスのゲノムセグメント構造を特定することができた。結果として、MoCV1-A-a は dsRNA1:3,555 nt、dsRNA2:3,250 nt、dsRNA3:3,077 nt、dsRNA4:3,044 nt、dsRNA5:2,880 nt の 5 つの dsRNA セグメントをウイルスゲノムとして有していることが分かった(Figure 5)。また、各セグメントは ORF1:1,127 aa、ORF2:934 aa、ORF3:799 aa、ORF4:812 aa、ORF5:611 aa の ORF (Open reading frame)1~5 をコードしていることが分かった(Fig. 5)。さらに、GENETYX を用いて MoCV1-A-a と、同一植物体上の他病斑から分離された MoCV1-A との各セグメント間における塩基配列の相同性及びアミノ酸配列の相同性・類似性を計測した。塩基配列では dsRNA1:99.4%、dsRNA2:99.4%、dsRNA3:99.2%、dsRNA4:99.2%、dsRNA5:99.2%の相同性が確認された。アミノ酸配列では、類似性が ORF1:99.8%、ORF2:100%、ORF3:100%、ORF4:100%、ORF5:99.8%、同一性が ORF1:99.4%、ORF2:99.7%、ORF3:99.7%、ORF4:100%、ORF5:99.0%と両ウイルス間で極めて高い相同性が確認された(Table 4)。

MoCV1-A-a と MoCV1-A のウイルスゲノム上の塩基・アミノ酸置換

GENETYX を用いた解析の結果、MoCV1-A-a と MoCV1-A の両ウイルス間では塩基・アミノ酸配列共に 99%以上の非常に高い相同性が確認された。このことは、両ウイルス間で数えるほどの置換しかないということを意味している。各セグメントの ORF と末端の非翻訳領域 (UTR: Untranslated region)上の全ての塩基置換を以下に示す。dsRNA1 においては、計 21 カ所の塩基置換と 7 カ所のアミノ酸置換が確認された。dsRNA2 においては、計 19 カ所の塩基置換と 3 カ所のアミノ酸置換が確認された。dsRNA3 においては、計 22 カ所の塩基置換と 2 カ所のアミノ酸置換が確認された。また 3'末端の AT rich 配列において配列のずれが生じていた。dsRNA4 においては、計 23 カ所の塩基置換が確認されたが、その全てがアミノ酸置換を伴わないサイレント変異であった。dsRNA5 においては、計 22 カ所の塩基置換と 6 カ所

のアミノ酸置換が確認された(Figure 6, Table 5)。

4. ウイルス様粒子の抽出と精製

MoCV1-A-a のウイルス様粒子 (VLP: Virus like particle)の生化学的性質を解析するため、MoCV1-A-a が感染している S-0412-II 1c 株及び MoCV1-A-a 単独感染株から Figure 7 の手順に従って VLP の精製を試みた。まず、YG 液体培地で 3~4 週間フラスコで振盪培養した菌体をブレンダーミキサーで破碎して VLP を抽出した。このクルードサンプルを 3 回の超遠心分離によって粗精製し、沈殿した VLP を含むペレットを Buffer A に再懸濁した。この懸濁液を粗精製 VLP 溶液として以下の実験に使用した。

シヨ糖濃度勾配遠心法によるウイルス様粒子の部分純化

まず、粗精製 VLP 溶液中の混合物を沈降係数に従って分離し部分純化した VLP 溶液を得るため、10~40%シヨ糖濃度勾配遠心法を試みた。まず、粗精製 VLP 溶液を濃度 10~40%のシヨ糖濃度勾配溶液に重層し、70,000 g・10°C・2.5 時間 (スイングローターRPS40T, 55P-72, Hitachi) で超遠心分離を行った。この後、シヨ糖濃度画分ごとに約 500 µl ずつ分画した。ウイルスがどのシヨ糖濃度画分に存在するかを調べるため、各画分を SDS-Phenol 法で核酸抽出しアガロースゲル電気泳動により展開して dsRNA を検出した。その結果、MoCV1-A-a dsRNA はシヨ糖濃度約 20~23%の画分、MoPLV dsRNA はシヨ糖濃度約 10~14%の画分で検出された(Figure 8)。

塩化セシウム密度勾配遠心法によるウイルス様粒子の純化と浮遊密度の測定

VLP 溶液のさらなる純化と浮遊密度の測定のため、シヨ糖濃度勾配遠心法により部分純化した MoCV1-A-a と MoPLV の精製 VLP 溶液を用いて塩化セシウム密度勾配法を試みた。まず、浮遊密度 1.375 g/cm³ が密度勾配の中心になるように調製された飽和塩化セシウム溶液と Buffer B の混合溶液に、シヨ糖密度勾配遠心法により得られた精製 VLP 溶液を重層し、100,200 g・20°C・24 時間 (P80AT ローター, CP80WX, Hitachi) で超遠心分離を行った。この後、塩化セシウム密度画分ごとに約 500 µl ずつ分画した。ウイルスがどの塩化セシウム密度画分に存在するかを調べるため、各画分を SDS-Phenol 法で核酸

抽出しアガロースゲル電気泳動により展開して dsRNA を検出した。その結果、MoCV1-A-a dsRNA は塩化セシウム密度勾配の最上層の浮遊密度 1.311g/cm^3 の画分で検出された(Figure 9)。

SDS-PAGE による MoCV1-A-a と MoPLV の構造タンパク質の検出

ウイルス由来の構造タンパク質を検出するため、ショ糖濃度勾配遠心法により部分純化した MoCV1-A-a と MoPLV の精製 VLP 溶液を SDS-PAGE で展開した。また、MoCV1-A-a と MoPLV が感染していないウイルスフリー化株についても同法で部分純化し、MoCV1-A-a と MoPLV が存在した画分と同じショ糖濃度画分を SDS-PAGE で展開し CBB 染色した。MoCV1-A-a では、130 kDa、70 kDa、65 kDa、58 kDa の分子量をもつ 4 種類のタンパク質（それぞれ P130、P70、P65、P58）が検出された。この時、ウイルスフリー化株由来の精製 VLP 溶液からはこれらのタンパク質は検出されなかった。MoPLV では、約 58 kDa、約 50 kDa の分子量をもつ 2 種類のタンパク質が検出された(Figure 10)。この時、ウイルスフリー化株由来の精製 VLP 溶液からも同じ分子量のタンパク質が検出されたが、各バンドの濃度比が異なっていた。

透過型電子顕微鏡による MoCV1-A-a ウイルス様粒子の観察

ショ糖濃度勾配遠心法により部分純化した MoCV1-A-a の VLP 溶液をネガティブ染色法により染色して透過型電子顕微鏡で観察した。その結果、MoCV1-A-a の VLP と思われる直径約 35 nm の等尺性の球形粒子構造が観察された。観察されたほとんどの粒子は直径約 35 nm で球形の様な形状であるが、一部で形状が歪んだ粒子や直径約 50 nm の大きな粒子が観察された。また、電子線が透過して内部が黒色の粒子が数多く確認されたのに対して、電子線が透過せず内部が白色の粒子が少数観察された(Figure 11)。

5. 菌糸融合による MoCV1-A フリー化株へのウイルス導入の試み

S-0412-II 1c 株 (MoCV1-A-a/MoPLV 感染株)及び S-0412-II 1a 株 (MoCV1-A 感染株)で宿主菌の遺伝的背景の違いに起因してウイルスに対する感受性が異なる可能性を検証するため、Figure 12 の手順に従っ

て核ゲノムにハイグロマイシン耐性遺伝子 (*hph*)を形質転換した MoCV1-A フリー化株(レシピエント株)と S-0412-II 1c 株または S-0412-II 1a 株(ドナー株)間の菌糸融合を介した MoCV1-A-a 及び MoCV1-A の感染を試みた。ハイグロマイシンを用いて、核にレシピエント由来のハイグロマイシン耐性遺伝子、細胞質にドナー由来の Viral dsRNA を保持する菌糸融合候補株を選抜しその表現型を観察することで、各ウイルスが同一の宿主菌株へ与える影響を比較した。まず始めに、本実験では菌糸融合候補株の選抜にハイグロマイシン添加 PDA 培地を用いたため、ハイグロマイシンがレシピエント株とドナー株へ与える影響を表現型で確認した。その結果、ハイグロマイシン耐性遺伝子が形質転換されているレシピエント株は、ハイグロマイシン添加 PDA 培地上においても通常の PDA 培地上で培養した時とほぼ同等の表現型を示し旺盛な気中菌糸が観察された。一方、ドナー株はハイグロマイシン添加 PDA 培地上において生育不良を生じ生育速度の遅延が確認された。このことから、ハイグロマイシンは耐性遺伝子が導入されたレシピエント株の生育には影響を与えずドナー株に生育不良を引き起こし、ハイグロマイシンを用いた菌糸融合候補株の選抜が有効であることが確認できた(Figure 13)。次に、実際に菌糸融合を介した MoCV1-A フリー化株へのウイルス感染を試みた。PDA 培地上でレシピエント株とドナー株を3週間対峙培養し、両株の接触面をコルクボーラーで取り出してハイグロマイシン添加 PDA 培地へ移植した。そのままハイグロマイシン添加 PDA 培地上で3週間培養し、表現型を観察すると共に PCR によって Viral dsRNA とハイグロマイシン耐性遺伝子の検出を試みた。その結果、図に示した菌糸融合候補株においてウイルスゲノムとハイグロマイシン耐性遺伝子が検出された(Figure 13)。このことから、これらの菌糸融合候補株は菌糸融合によってレシピエント株由来の核ゲノムとドナー株のウイルスを1細胞内に保持しており、MoCV1-A フリー化株へウイルスが感染した可能性が示唆された。さらに、菌糸融合候補株の表現型を比較したところ、ドナー株として MoCV1-A 感染株を用いた場合はレシピエント株と同じような旺盛な気中菌糸が観察されたが、MoCV1-A-a 感染株を用いた場合は気中菌糸が溶菌化したウェットな表現型が観察された(Figure 13)。

II 章 イネいもち病菌国内分離株に感染するマイコウイルス

1. イネいもち病菌国内分離株からの MoCV1 近縁ウイルスの検出

日本国内で分離されたイネいもち病菌株から MoCV1 に近縁なマイコウイルスを検出するため、Urayama et al. (2015)で報告された爪楊枝による病斑・コロニーからの迅速検出を試みた。菌株の分離地は、東北地方（秋田県、山形県）、北陸地方（新潟県、石川県、富山県、福井県）、九州地方（福岡県、佐賀県、長崎県、大分県、熊本県、宮崎県、鹿児島県）の各地で、秋田県立大・山形大・農研機構・中央農研・九州沖縄農研から分譲いただいた。分譲株の病変部（罹病穂、罹病葉）や PDA 平板培地で培養した菌叢から MoCV1-A RdRp 特異的プライマーセット(Table 2)を用いた RT-PCR で MoCV1 近縁ウイルスのスクリーニングを行った。その結果、281 サンプルのうち 13 サンプルから MoCV1-A RdRp 特異的増幅産物が検出され、MoCV1 近縁ウイルスの感染が示唆された(加藤修士論文, 2014; 相原修士論文, 2017)。また、分譲株に感染する dsRNA 分子のセグメント構造を可視化するため、前項「材料と方法」に示した通り YG 液体培地で二次培養した菌糸体からセルロースパウダーを用いて dsRNA を抽出・精製しアガロースゲル電気泳動で展開した。

2. 秋田県分離株 APU10-199A から検出されたマイコウイルス

セルロースパウダーを担体として菌糸体から dsRNA を抽出・精製しアガロースゲル電気泳動で展開したところ、秋田県分離株 APU10-199A から多成分の dsRNA 分子が検出された。検出された dsRNA 分子のサイズは、高分子側からおよそ 5.2 kb に 1 セグメント、2.6 kb-3.6 kb の範囲に 5 本の dsRNA セグメント、1.9 kb と 1.5 kb に 2 セグメントであった(Figure 14)。前述の RT-PCR の結果で MoCV1 近縁ウイルスの存在が示唆されたことから、検出された dsRNA 分子の中で 2.6 kb-3.6 kb の範囲に存在する 5 本の dsRNA セグメントが Chrysovirus-related virus のウイルスゲノムであることが予測された。また、この APU10-199A 株とベトナム分離株 S-0412-II 1a (MoCV1-A 感染株)及び S-0412-II 2a (MoCV1-B 感染株)から精製した dsRNA を 5%ポリアクリルアミドゲルで電気泳動した(Figure 15)。すると、APU10-199A 株から検出された MoCV1 近縁ウイルスの dsRNA は、ベトナム分離株 MoCV1-A や MoCV1-B の dsRNA と

は異なる泳動パターンを示した。

APU10-199A 株で検出された多成分の dsRNA 分子の感染フリー化のため、ジョイスティックマイクロマニピュレーター (MN-151、NARISHIGE)を用いて単分生子分離を試みた。分離株のコロニーから YG 液体培地で二次培養した菌糸体から dsRNA を精製しアガロースゲル電気泳動で展開した。1.9 kb と 1.5 kb dsRNA 分子は全ての分離株で維持されており、5.2 kb dsRNA は欠落した分離株が得られたものの非常に高率に維持されていた。それとは対照的に、MoCV1 近縁ウイルスの dsRNA は分離株中の存在量に広範な変動性が認められた(Figure 14)。これらの分離株の中で、5.2 kb と MoCV1 近縁ウイルスの dsRNA が同時に欠落し 1.9 kb と 1.5 kb dsRNA 分子のみを保持する菌株が得られた。本株の菌叢及び菌糸の表現型をオリジナル株 APU10-199A と比較してみると、オリジナル株の菌叢はアルビノ化し気中菌糸も形成されていなかったが、これらの dsRNA を欠落した分離株ではこれらの表現型は回復傾向にあった(Figure 14)。菌糸の表現型についても同様で、オリジナル株の菌糸のみで菌糸内への顆粒状構造体の異常な集積が認められた。つまり、秋田県分離株 APU10-199A において、5.2 kb dsRNA もしくは MoCV1 近縁ウイルスの存在によって宿主菌に弱毒化が生じていることが明らかとなった。

3. APU10-199A 株から検出されたマイコウイルスのシーケンス解析

APU10-199A 株からセルロースパウダーを担体としてカラム精製した dsRNA を鋳型として cDNA 合成を行った。まず 2.6 kb-3.6 kb の範囲に検出された MoCV1 近縁ウイルスの 5 本の dsRNA セグメントをサイズの大きいセグメントから dsRNA1-dsRNA5 とした。シーケンス解析の結果、それぞれの dsRNA セグメントの塩基長は dsRNA1:3,557 nt、dsRNA2:3,251 nt、dsRNA3:2,926 nt、dsRNA4:2,921 nt、dsRNA5:2,603 nt であることが分かった(Figure 16)。dsRNA1-5 の配列情報は DDBJ/EMBL/GenBank データベースに dsRNA1:LC432338、dsRNA2:LC432339、dsRNA3:LC432340、dsRNA4:LC432341、dsRNA5:LC432342 として登録した。GENETYX を用いて MoCV1 近縁ウイルスの dsRNA1-5 と MoCV1-A 及び MoCV1-B dsRNA1-5 との塩基配列の相同性を比較した(Table 6)。MoCV1-A と比較した場合、dsRNA1:81.1%、dsRNA2:78.9%、dsRNA3:75.8%、dsRNA4:76.0%、dsRNA5:63.6%の相同性を示した。MoCV1-B と比較した場合、dsRNA1:81.0%、dsRNA2:77.5%、dsRNA3:72.2%、dsRNA4:73.9%、dsRNA5:63.5%

の相同性を示した。この相同性の高さから、APU10-199A 株から見出された MoCV1 近縁ウイルスを *Magnaporthe oryzae chrysovirus 1-D* (MoCV1-D) と呼称した。MoCV1-D dsRNA1-4 は MoCV1-A 及び MoCV1-B dsRNA1-4 と比較的高い相同性を示したものの、dsRNA5 は特に相同性が低かった。MoCV1-D dsRNA1-5 と MoCV1-A 及び MoCV1-B の 5'末端配列と 3'末端配列のマルチプルアライメントを示した(Figure 18)。特に 5'末端配列においてセグメント間で保存性が非常に高く、5'-GCAAAAAAGAAUAAAGC-3' motif は MoCV1-A 及び MoCV1-B ともコンセンサスな配列であった。3'末端配列は AT rich 配列であるものの、5'末端配列と比較するとウイルス間での保存性は高くなかった。

次に、MoCV1-D dsRNA1-5 の塩基配列情報に基づいて GENETYX によって開始コドン予測し推定アミノ酸配列情報を得た。すると、MoCV1-D dsRNA1-5 はそれぞれ Single open reading frame (ORF) をコードしていた。ORFs は dsRNA セグメントと連動させて、ORF1:1,127 aa、ORF2:934 aa、ORF3:800 aa、ORF4:811 aa、ORF5:661 aa であった(Figure 16)。BLASTp を用いて MoCV1-D ORF1-5 の相同性検索を行ったところ、MoCV1-A 及び MoCV1-B ORF1-5 との相同性が極めて高かった(Table 7)。MoCV1-A と比較した場合、同一性が ORF1:93.9%、ORF2:83.7%、ORF3:90.6%、ORF4:90.9%、ORF5:70.3%、類似性が ORF1:99.7%、ORF2:88.3%、ORF3:99.0%、ORF4:94.5%、ORF5:79.0%の値を示した。MoCV1-B と比較した場合、同一性が ORF1:93.4%、ORF2:82.5%、ORF3:88.8%、ORF4:89.2%、ORF5:70.3%、類似性が ORF1:99.6%、ORF2:88.4%、ORF3:97.7%、ORF4:92.6%、ORF5:74.4%の値を示した。BLASTp 解析によって MoCV1-D ORF1 が RdRp をコードする MoCV1-A の ORF1 と極めて相同性が高いことから、MoCV1-D ORF1 も RdRp をコードすると考えられた。そこで、MoCV1-D ORF1 上において dsRNA ウイルスに共通する 8 つの保存モチーフを含むコア領域 (Jiang and Ghabrial, 2004)に基づいて ML 法による分子系統解析を行った(Figure 20)。その結果、当初期待された通り MoCV1-D は MoCV1-A や MoCV1-B と極めて近縁なクレードを形成し、*Chrysoviridae* cluster-II に分類された。さらに、MoCV1-A よりも MoCV1-B により近縁であることが分かった。系統解析に用いた MoCV1-D と MoCV1-A、MoCV1-B、さらに *Chrysoviridae* cluster-II に属する TcV2、WiV29、FgV-Ch9 の RdRp 上の保存モチーフ I ~ VIII を含むマルチプルアライメントを Figure 19 に示した。これらのウイルス間でモチーフ I ~ VIII の保存性は非常に高かった。系統解析の通り、BLASTp 検索では MoCV1-D ORF1 は TcV2 ORF1 や WiV29 ORF1 と比較的

相同性が高く、それぞれの相同性は TcV2 ORF1:50.5%、WiV29 ORF1:52.8%であった。しかし、MoCV1-D ORF2-5 においては MoCV1-A 及び MoCV1-B における counterpart 以外に相同性の高い他種のウイルスの ORFs はあまり見出されなかった。MoCV1-D ORF3,4 は AaCV1、FodV1、BdCV1、PjCV1 の ORF3,4 とおおよそ 30%前後の相同性を示した。しかし、MoCV1-D ORF2 は BdCV1 ORF2 と 27.3%の相同性を示すのみであり、MoCV1-D ORF5 に至っては MoCV1-A 及び MoCV1-B における counterpart 以外に相同性の高い ORFs は全く見出されなかった(Table 7)。

APU10-199A 株から約 5.2 kb の dsRNA 分子として検出されたマイコウイルスの全塩基配列は FLDS 法 (Urayama et al., 2016b)を用いて決定した。この dsRNA 分子は完全長が 5,194 nt であり、配列情報は DDBJ/EMBL/GenBank データベースに LC432343 として登録した。BLASTx 検索によってこの 5.2 kb dsRNA はイネいもち病菌株 Ken 60-19 (AB300379)から見出された *Magnaporthe oryzae* virus 2 (MoV2)とほぼ同一であった(Maejima et al., 2008)。MoV2 は *Totiviridae* 科 *Victorivirus* 属に分類され、その遺伝子構造は 277-2,646 nt に位置し CP をコードする ORF1 と、2,639-5,131 nt に位置し RdRp をコードする ORF2 から成る(Figure 17)。APU10-199A MoV2 と Ken 60-19 MoV2 の塩基配列の相同性は 98.0%で、ORF1 の同一性は 99.5%、ORF2 の同一性は 99.8%であった。APU10-199A MoV2 配列上の特徴として、ORF1 の終止コドンと ORF2 の開始コドンが 8 塩基上 (AUGAUUGA)でオーバーラップ構造をとっていた。この APU10-199A 株から見出された MoV2 の配列の特徴は、Maejima et al., (2008)で報告された Ken 60-19 由来の MoV2 配列上に見出された *Victorivirus* 属内で保存性のある典型的な start and restart motif (Ghabrial et al., 2013)である 4 塩基 (AUGA)のオーバーラップ構造とは異なっていた。

これらのウイルスのほか、FLDS 法では 1,201 bp と 705 bp の 2 つの contig も得られており、それぞれ *Magnaporthe oryzae* partitivirus 1 (MoPV1)の RdRp (KX119172)及び CP (KX119173)と非常に高い相同性を示した。そのため、Figure 14 で示した低分子側に検出された 2 dsRNA セグメントは MoPV1 と考えられた。

以上のことから、秋田県で分離されたイネいもち病菌 APU10-199A 株には *Chrysoviridae* cluster-II に分類される MoCV1-D、*Totiviridae* に分類される MoV2、*Partitiviridae* に分類される MoPV1 の 3 種のマイコウイルスが混合感染していることが明らかとなった。

4. マイコウイルスの感染が APU10-199A 株に及ぼす影響

宿主菌の表現型にそれぞれのマイコウイルス感染がどのような影響を与えるかを調べるため、APU10-199A 株を用いて単分生子分離を行い、単孢子由来のコロニーに対して MoCV1-D、MoV2 及び MoPV1 の dsRNA の有無をモニタリングした(Figure 14)。74 コロニーの中で、MoV2 及び MoPV1 dsRNA はほとんどの株で検出され、単分生子分離を経ても高率に維持されていた。一方で、MoCV1-D dsRNA 由来のバンド強度は 74 コロニーの中で顕著に変動しており、dsRNA 含量が高い株もあればほとんど検出されない株も得られた。精製 dsRNA の電気泳動において、MoCV1-D と MoV2 がともに検出されなかった株と、MoCV1-D のみ検出されなかった株が確認された。これらの株に対して、MoCV1-D 及び MoV2 特異的プライマーを用いた RT-PCR によってウイルスの完全な脱落を再確認した(Figure 23)。しかし、いずれにおいても MoPV1 の感染は維持されていた。

また、通常の継代培養において、APU10-199A 株で検出された dsRNA1-5 のうち、dsRNA5 のみ欠落した株が得られた(Figure 21)。MoCV1 dsRNA5 特異的なプライマーセットで RT-PCR を行っても、dsRNA5 欠落株から断片増幅が認められなかった。APU10-199A 株と dsRNA5 欠落株の菌叢の表現型を比較しても、目立った違いは認められなかった(Data not shown)。

宿主菌に与える影響を調べるため、オリジナル APU10-199A 株と今回得られた MoCV1-D- and MoV2-free APU10-199A 株及び MoCV1-D-free APU10-199A 株の菌叢の表現型及び菌糸の顕微鏡観察像を比較した。その結果、3 種のマイコウイルスが混合感染する APU10-199A では、PDA 平板培地上で菌叢の色素沈着が抑制されてアルビノ化しており気中菌糸の形成がほとんど確認されなかった。さらに、YG 液体培養した本株の菌糸を DIC で観察すると、菌糸内に肥大化した小胞が高頻度に認められた(Figure 23,24)。これらの宿主菌の生育が阻害されたような表現型は、ベトナム分離株 S-0412-II 2a に感染する MoCV1-B が宿主に与える表現型と類似していた(Urayama et al., 2014a)。しかし、液体培養した S-0412-II 2a 株の菌糸で確認された分岐の増加や生長方向に関する極性の欠如は観察されなかった。前述したオリジナル APU10-199A 株の表現型とは対照的に、MoCV1-D- and MoV2-free APU10-199A 株及び MoCV1-D-free APU10-199A 株では菌叢に黒色の色素沈着が認められ APU10-199A 株よりも気中菌糸が形成されていた。

また、顕微鏡下での菌糸の観察においても肥大化した小胞の蓄積の観察頻度は低下した(Figure 23,24)。つまり、MoCV1-D 感染がフリー化された株で、正常な生育の方向へ表現型が回復した傾向にあった。このことから、オリジナル APU10-199A 株における生育抑制の表現型は、本株で検出された 3 種のマイコウイルスの中で主に MoCV1-D に感染によって引き起こされた可能性が示唆された。しかし、これらの MoCV1-D-free APU10-199A 株では MoPV1 感染はフリー化できていないため、ウイルス間の相互作用によって表現型の変化が生じている可能性は排除できなかった。

5. MoCV1-D ORF3、ORF4 及び ORF4SUa タンパク質の *E. coli* 内リコンビナント発現

発現誘導方式が低温応答性である pCold vector 発現システムを用いて、*E. coli* BL21star (DE3)株内での MoCV1-D の ORF3 (rORF3p)、ORF4 タンパク質 (rORF4p)及び ORF4 SUa 領域 (rORF4SUap)のリコンビナント発現を試みた。各タンパク質の発現コンストラクトの作製方法は前項「材料と方法」に記した。各 ORF タンパク質発現ベクター形質転換体のほか、コントロール区として pCold empty vector 形質転換体も作出した。これらの形質転換体のタンパク質発現誘導培養後、BugBuster™ Protein Extraction Reagent で抽出し可溶性 (Soluble)画分を得たほか、Inclusion body 精製によって不溶性 (Insoluble)画分を調製した。これらのサンプルを SDS-PAGE で展開し CBB 染色するとともに、発現ベクター由来のタンパク質かどうかを確認するため Anti-6 His antibody を一次抗体としてウェスタンブロット解析を行った。

MoCV1-D rORF3p は CBB 染色によって Soluble 画分に発現が認められず、Insoluble 画分に ORF3 領域から全長で翻訳された場合の推定分子量 84 kDa に相当するバンドが検出された(Figure 25)。ウェスタンブロット解析では、Anti-6 His antibody が約 84 kDa のバンドを認識し、さらに低分子側に現れた不完全な翻訳産物も認識した。また、MoCV1-D rORF4p も同様に CBB 染色によって Soluble 画分に発現が認められず、Insoluble 画分に ORF4 領域から全長で翻訳された場合の推定分子量 85 kDa に相当するバンドが検出された(Figure 26)。ウェスタンブロット解析では、Anti-6 His antibody が約 85 kDa のバンドを認識し、さらに低分子側に現れた不完全な翻訳産物も認識した。MoCV1-D rORF4SUap も同様に CBB 染色によって Soluble 画分に発現が認められず、Insoluble 画分に ORF4SUa 領域から翻訳された場合の推定分子量 30 kDa に相当するバンドが検出された(Figure 26)。ウェスタンブロット解析では、Anti-6 His antibody

が約 30 kDa のバンドを認識した。

目的とするリコンビナントタンパク質が不溶性画分に高純度に得られたため、これらの不溶性画分は 6 M Urea で可溶化しタンパク質濃度 1.5 mg/ml に調製した。これをポリクローナル抗体作製のために抗原タンパク質として株式会社蛋白精製工業に委託した。ウサギに対する免疫は、アジュバンドとして FCA を使用し初回のみ 0.15 mg で以降は 14 日間隔で 0.3 mg ずつ計 5 回の皮内注射によって行った。試験採血及び最終全採血は免疫 3、4、5 回目のそれぞれ 7 日後に行い、ELISA 測定によって抗原タンパク質に対する抗体力価を試験した。付録 1~3 に示したとおり、十分な抗体力価を有するポリクローナル抗体が作製された。

6. 秋田県分離株 APU10-199A からのウイルス粒子精製と特徴付け

APU10-199A 株で検出された dsRNA 分子がウイルス粒子と連動するかどうかを決定するため、ジャーファーマンターで 10 日間培養した本菌株からウイルス粒子の抽出・精製を試みた。ショ糖濃度勾配遠心法及び塩化セシウム密度勾配遠心法を併用することで得られた画分をそれぞれアガロースゲル電気泳動で展開し dsRNA を検出した。すると、MoCV1-D dsRNA がリッチに含まれる画分 (lanes 3–6, Pool I) と MoV2 dsRNA がリッチに含まれる画分 (lanes 7–10, Pool II) が得られた (Fig. 27)。偏光度に基づいて浮遊密度を算出すると、Pool I は浮遊密度 $1.35 - 1.39 \text{ g cm}^{-3}$ 、Pool II は浮遊密度 $1.41 - 1.49 \text{ g cm}^{-3}$ であることが分かった。Pool I 及び Pool II を超遠心分離で濃縮精製し TEM で観察すると、両画分で等尺性の球形粒子様構造が観察され、Pool I 画分は直径約 35 nm、Pool II 画分は直径約 38 nm であった (Figure 27)。電気泳動図で示したように、Pool I には少量の MoV2 が、反対に Pool II には少量の MoCV1-D が混入しているが、塩化セシウム密度勾配遠心法によって同株に共感染する 2 種のマイコウイルスをおおよそ分離することができた。

MoCV1-D 及び MoV2 ウイルス粒子の構造タンパク質の解析のため、精製ウイルスがそれぞれ含まれる Pool I 及び Pool II を SDS-PAGE で展開し CBB 染色を行った (Figure 28)。まず Pool I では 120、66、60、58、53 kDa のバンドが検出され、Pool II ではこれらのバンドに加えて 90、79、72 kDa のバンドも検出された。そこで、MoCV1-A においてウイルス粒子の構造タンパク質であることが分かっている

ORF3 及び ORF4 のアミノ酸配列が MoCV1-D ORF3 及び ORF4 とそれぞれ非常に高い相同性を示していることから(Table 7)、抗 MoCV1-A ウイルス粒子抗血清を一次抗体としてウェスタンブロット解析を行った。すると、期待された通り、抗 MoCV1-A ウイルス粒子抗血清は MoCV1-D の構造タンパク質を認識することができ、Pool I、Pool II とともに 120、66、60、58 kDa の分子量のシグナルが検出された。一方で、Pool II の CBB 染色でのみ検出された 90、79、72 kDa のバンドは、ウェスタンブロット解析では検出されなかった(Fig. 28)。このことから、120、66、60、58 kDa のバンドは MoCV1-D ウイルス粒子の構造タンパク質であり、90、79、72 kDa のバンドは MoV2 ウイルス粒子の構造タンパク質であると考えられた。

また、ジャーファーマンターにて 3 日間培養した菌体を用いて前述のように MoCV1-D が含まれる精製ウイルス粒子画分を調製し、SDS-PAGE による展開及び抗 MoCV1-A ウイルス粒子抗血清を一次抗体としたウェスタンブロット解析を行った。すると、CBB 染色によって前述の結果とは異なり 120、95、85、71、66、60 kDa のバンドが検出された。さらにウェスタンブロット解析によって、約 85、71、66、60 kDa の分子量のシグナルが検出された(Figure 28)。ここで、MoCV1-D の ORF1、ORF3 及び ORF4 から全長が翻訳された場合の推定分子量はそれぞれ 125、84、85 kDa であることから(Figure 16)、約 85、71、66、60 kDa の分子量で検出されたシグナルは、これらのタンパク質が部分的に分解された産物に相当すると考えられた。

MoCV1-A の場合と同様に、MoCV1-D においてもその含量の多さから ORF3 及び ORF4 タンパク質がウイルス粒子の主要な構成成分と考えられる。これらの構造タンパク質をさらに詳細に解析するため、*E. coli* 内でリコンビナント発現させた ORF3 (rORF3p)及び ORF4 タンパク質 (rORF4p)を抗原として認識する抗血清を用いてウェスタンブロット解析を試みた。サンプルとして用いた精製ウイルス溶液は、ジャーファーマンターにて 3 日間 (3d)あるいは 14 日間 (14d)培養した APU10-199A 株及び 3 日間培養した MoV2・MoCV1-D フリーな APU10-199A 株からショ糖濃度勾配遠心法によって濃縮・精製することで調製した。これらの精製ウイルス画分を SDS-PAGE で展開し CBB 染色すると、APU10-199A(3d)では約 95 kDa のバンドがメジャーに検出されたが、APU10-199A(14d)では約 60 kDa のバンドがメジャーに検出され(Figure 29)、バンドのパターンは異なるものの前述した菌体の長期培養によるウイルス粒子構

造タンパク質の部分分解は本実験においても再現された。まず、一次抗体として抗 MoCV1-D rORF3p 抗血清を用いてウェスタンブロット解析を行うと、レーン APU10-199A(3d)と APU10-199A(14d)ではそれぞれ約 85 kDa と 60 kDa のバンドを主に認識し、どちらにおいてもこれらのメジャーなバンドより低分子側にラダー状のシグナルを検出した(Figure 29)。次に、一次抗体として MoCV1-A ORF3 の C 末端側の 15 ペプチド (CSSDGASGGSRGEEL)を認識する抗 MoCV1-A ORF3 C-proximal peptide 抗血清を用いてウェスタンブロット解析を行うと、APU10-199A(3d)では 95、92、88 kDa のバンドがメジャーに認識されるとともに低分子側にスメア状のシグナルを検出した。一方で、APU10-199A(14d)では単一に 85 kDa のバンドを認識した(Figure 29)。また、一次抗体として抗 MoCV1-D rORF4p 抗血清を用いてウェスタンブロット解析を行うと、レーン APU10-199A(3d)では 85、75、70 kDa のタンパク質を認識したが、APU10-199A(14d)では 66、60、58 kDa のバンドをメジャーに認識しさらに 85 kDa の位置に微弱なシグナルを検出した(Figure 29)。最後に、MoCV1-A ORF4 上で *S. cerevisiae* に対して生理活性を示す truncated 領域 (SUa) (Urayama et al., 2016a)のホモログである MoCV1-D ORF4SUa を認識する抗 MoCV1-D rORF4SUap 抗血清 (1,000 倍、5,000 倍)を一次抗体としてウェスタンブロット解析を試みた。すると、APU10-199A(3d) と APU10-199A(14d)ともに抗 MoCV1-D rORF4p 抗血清を用いた場合とほぼ同じ分子量のバンドを検出したが、その検出強度は著しく低下していた(Figure 30)。いずれの抗血清を用いた場合も、レーン MoCV1-D- and MoV2-free APU10-199A(3d)ではシグナルが全く検出されなかったため、APU10-199A(3d)と APU10-199A(14d)で検出された全てのシグナルは宿主のタンパク質由来ではないことが分かった。

7. 糖タンパク質の検出

前述の CBB 染色及びウェスタンブロット解析において、APU10-199A(3d)では MoCV1-D ORF3 及び ORF4 から翻訳される推定分子量 85 kDa よりも高分子量な約 95 kDa のタンパク質が検出された。この構造タンパク質の高分子側へのシフトが糖鎖修飾などの翻訳後修飾によるものかどうかを検討するため、SDS-PAGE で展開した精製ウイルス画分に対して Periodic Acid-Schiff 法 (PAS; 過ヨウ素酸シッフ) を染色原理とする Pierce™ Glycoprotein Staining Kit (Thermo Fisher Scientific)を用いて In-Gel Detection を行った。すると、レーン APU10-199A(3d)においても 95 kDa 相当の分子量でマゼンタ色の微弱なバンド

が検出された(Figure 31)。しかし、単一に 95 kDa を検出したわけではなく、95 kDa よりも低分子側にもスメア状のバンドが検出された。特に、60 kDa 付近でバンド強度が高いように見えた。これらのバンドは APU10-199A(7d) サンプルレーンでは全く検出されなかった。一方で、MoCV1-D- and MoV2-free APU10-199A(3d) においてもスメア状に微弱なシグナルが検出されており、本精製画分中に宿主由来の糖鎖修飾されたタンパク質も微量に含まれていることが分かった。これらのことから、APU10-199A(3d) で検出された推定分子量 85 kDa よりも高分子量な約 95 kDa のタンパク質は、翻訳後修飾として少なくとも糖鎖修飾がなされた ORF3 タンパク質に相当すると考えられた。

8. 他の国内分離株からの MoCV1-D ウイルス粒子精製と特徴付け

これまでの研究で、秋田県分離株 APU10-199A 以外の国内分離株においても MoCV1 と極めて近縁なウイルスの dsRNA が検出されている(相原修士論文, 2017)。これらの菌株における MoCV1 様ウイルス粒子の存在や構造タンパク質の部分分解現象を確認するため、北陸分離株 5074 及び 5079-1 株の長期培養菌体からウイルス粒子の抽出・精製を試みた。両菌株から見出されたクリソウイルスの塩基配列は MoCV1-D と極めて高い相同性を示したことから、それぞれのクリソウイルスを MoCV1-D-5074 及び MoCV1-D-5079-1 と仮称した。ウイルス粒子の抽出は APU10-199A 株で行った方法に準じ、ショ糖濃度勾配遠心法のみで簡易に精製した。各画分をアガロースゲル電気泳動で展開し dsRNA を検出すると、MoCV1-D-5074 及び MoCV1-D-5079-1 の dsRNA は MoCV1-D と同様のショ糖濃度 19~24%の画分で主に検出された(Figure 32)。ウイルスゲノムが検出された画分を集約して超遠心分離によって濃縮し MoCV1-D-5074 及び MoCV1-D-5079-1 の精製ウイルス画分を得た。両画分をアガロースゲル電気泳動で展開し dsRNA を検出するとともに SDS-PAGE で展開し CBB 染色を行った。すると、MoCV1-D-5074 は MoCV1-D と同様に 120、66、60、58 kDa のバンドが主要な構造タンパク質として検出された。一方で、MoCV1-D-5079-1 は菌体を 14 日間長期培養したにも関わらず、120 kDa と 90 kDa 前後の分子量に相当するバンドのみが検出された(Figure 33)。また、これらの精製ウイルス画分を 4°C で 4 週間インキュベートした後、dsRNA の検出と SDS-PAGE 解析を行った。すると、MoCV1-D-5074 dsRNA において dsRNA5 に相当するバンドの検出強度はインキュベート前後で変化が無かったが、上から 2 番目のセグメントが消失

した。また、SDS-PAGE では MoCV1-D-5079-1 においてインキュベート前に検出されていた約 90 kDa のバンドがインキュベート後は消失しており、さらに約 66、58 kDa のバンドが新たに検出された(Figure 34)。このことから、ウイルス抽出直後の MoCV1-D-5079-1 は APU10-199A(3d)と同様に未プロセッシングな全長型ウイルス粒子として存在していたが、4°Cインキュベートによって徐々に分解され APU10-199A(14d)と同じような部分分解型ウイルス粒子となったと考えられた。また、精製ウイルス粒子画分を TEM で観察したところ、MoCV1-D と同様の等尺性の球形粒子様構造が確認された(Figure 35)。これらの結果から、少なくとも TEM 観察像で APU10-199A 株由来の MoCV1-D と MoCV1-D-5074 及び MoCV1-D-5079-1 間で構造上の差異は認められなかったものの、ウイルス粒子タンパク質のプロセッシング様式には宿主菌株に応じて多様性がある可能性が示唆された。

9. 菌糸融合による MoCV1-D の導入

秋田県分離株 APU10-199A で見出された MoCV1-D 及び MoV2 の水平伝播性を確認するため、菌糸融合 (Hyphal fusion)によって元々ウイルスフリーな菌株 P2 へのマイコウイルス導入を試みた。ウイルス感染候補株の選抜のため、予めハイグロマイシン耐性遺伝子(*hph*)を形質転換した P2 株をレシピエント株、APU10-199A 株をウイルスドナー株として 0.75 mM ZnSO₄ 含有 OMA 上で対峙培養した(Figure 36)。菌叢接着部をハイグロマイシン含有 OMA 上で 4 回選抜培養後、PCR による *hph* 遺伝子の確認・宿主 DNA 多型の確認・RT-PCR によるウイルス感染の確認を行った。菌糸融合候補株の内、2 株において 2.8 – 3.6 kbp に 4 つの dsRNA セグメントを検出し、RT-PCR においても MoCV1 RdRp 特異的な産物が検出された(Figure 38)。ハイグロマイシン含有 OMA での 4 回の選抜培養によってドナー株由来の細胞はすでに完全に取り除かれていると考えられるが、菌糸融合候補株に対して PCR による *hph* 遺伝子の検出及び Repetitive element-based PCR による宿主 DNA 多型の確認を行った。その結果、候補株で *hph* 遺伝子の保持が確認された上、P2 株と同じ DNA 多型を示した(Figure 37)ことから、候補株はレシピエント株由来の細胞であることが保証された。また、興味深いことに候補株では、ドナー株で検出されている約 2.6 kb の dsRNA5 に相当するセグメントが検出されず(Figure 38)、dsRNA5 特異的なプライマーを用いた RT-PCR でも非検出であった。さらに、ドナー株で検出されている約 5.2 kb の MoV2 dsRNA ゲノムは

候補株からは検出されず、MoV2 特異的なプライマーを用いた RT-PCR でも非検出であった(Figure 38)。レシピエント株である P2 株と MoCV1-D 感染 P2 株 (MoCV1-D-infected P2)の OMA 培地上の表現型を比較すると、気中菌糸の減少・菌叢のアルビノ化などの弱毒化形質は確認できず、両株間で顕著な差異は認められなかった(Figure 38)。

得られた MoCV1-D 感染 P2 株中における MoCV1-D ウイルス粒子の有無を確認するため、前述の方法に従ってショ糖濃度勾配遠心を行い精製ウイルス粒子画分を調製した。SDS-PAGE で含有タンパク質を展開後 CBB 染色を行うと、前述の結果と同様に 120、66、60 kDa のバンドとして主要な構造タンパク質が検出された(Figure 38)。さらに同画分を TEM で観察すると、前述の結果と同様に等尺性の直径約 35 nm の球形粒子様構造を確認することができた(Figure 38)。これらのことから、MoCV1-D は菌糸融合によって伝播したウイルスフリーな P2 株の細胞内で dsRNA5 非存在下でウイルス粒子を構築できることが確認できた。

10. イネいもち病菌プロトプラストへの MoCV1-D ウイルス粒子導入

イネいもち病菌における chrysovirus の人為的感染系確立のため、Virus-free P2 株や MoCV1-D- and MoV2-free APU10-199A 株のプロトプラストへの精製 MoCV1-D ウイルス粒子の導入を試みた。前述の通り両株のプロトプラスト細胞に対して PEG 存在下でショ糖濃度勾配遠心法で得られた精製ウイルス画分を感染処理した。調製した精製ウイルス画分に含まれる MoCV1-D dsRNA やウイルス粒子タンパク質量は図に示した(Figure 39)。感染処理後に再生したプロトプラスト由来のコロニーを 3 回継代培養し、菌体から精製した dsRNA を鋳型として MoCV1-D あるいは MoV2 特異的なプライマーセットを用いた RT-PCR によって感染成否を判定した。本実験では精製ウイルス画分を用いる感染処理区のほか、感染非処理区として精製 MoCV1-D を含まない滅菌 Buffer A を用いた。また、精製ウイルス画分中への宿主細胞のコンタミネーションの可能性を排除するため、プロトプラスト非存在下で同様の実験操作を行なった。

まず、レシピエントを P2 株プロトプラストとした場合、感染処理区では MoCV1-D 特異的増幅産物が 50 株中 38 株で検出された。一方で MoCV1-D ウイルス粒子を含まない Buffer A を処理した感染非処

理区では、8 株中から全く検出されず実験操作中のコンタミネーションの可能性はないと考えられた (Figure 40)。また、MoV2 特異的増幅産物については感染処理区の 35 株及び感染非処理区の 4 株から全く検出されなかった(Figure 41)。感染処理区及び感染非処理区の PDA 培地上の表現型を Figure 42 に示した。感染処理区のコロニー径・気中菌糸の形成程度・菌叢の色素沈着という点で、感染非処理区と明確な差異は認められなかった。

次に、レシピエントを MoCV1-D- and MoV2-free APU10-199A 株プロトプラストとした場合、感染処理区では MoCV1-D 特異的増幅産物が 50 株中 36 株で検出された。一方で MoCV1-D ウイルス粒子を含まない Buffer A を処理した感染非処理区では、4 株中から全く検出されず実験操作中のコンタミネーションの可能性はないと考えられた(Figure 43)。また、MoV2 特異的増幅産物については感染処理区の 35 株及び感染非処理区の 4 株から全く検出されなかった(Figure 44)。感染処理区及び感染非処理区の PDA 培地上の表現型を Figure 45 に示した。感染処理区のコロニー径・気中菌糸の形成程度・菌叢の色素沈着という点で、一部を除き感染非処理区と明確な差異は認められなかった。

以上の結果から、精製 MoCV1-D は Protoplast-PEG 法に基づいた本法により P2 株及び MoCV1-D- and MoV2-free APU10-199A 株へ導入可能であり、MoCV1-D のイネいもち病菌プロトプラストへの人為的感染系が確立できた。一方で、P2 株及び MoCV1-D- and MoV2-free APU10-199A 株の全感染処理区から MoV2 特異的増幅産物が検出されなかったことから、MoV2 は本法では人為的に感染させることができないと考えられた。

11. *S. cerevisiae* 内における MoCV1-D ORF4p の過剰発現の影響

先行研究において、ベトナム由来の MoCV1-A ORF4 タンパク質の *S. cerevisiae* や *C. neoformans* 内における強発現が、宿主細胞に対して Cytological damage を誘導することが分かっている(Urayama et al., 2012; Urayama et al., 2014a)。前述の通り、MoCV1-D は MoCV1-A と極めて近縁な Chrysovirus であるが MoCV1-D ORF4 と MoCV1-A ORF4 のアミノ酸配列は Identity: 90.9%・Similarity: 94.5%で若干の違いがある(Table 7)。そこで、MoCV1-D の ORF4p が MoCV1-A ORF4p と同じような生理活性を有するかどうか検証するため、pRST426 シャトルベクターに MoCV1-D ORF4 領域(DORF4)を挿入した DORF4 発現コ

ンストラクトを作出した。さらにこれを *S. cerevisiae* W303-1A[L-A-o]株に形質転換した後、pRST426-empty vector 形質転換体とタイムポイント毎の細胞形態、生菌細胞数及び OD₆₀₀ 値を比較した。培養温度 30°C 条件下において、DORF4 形質転換体は pRST426-empty vector 形質転換体と比較して OD₆₀₀ 値及び生菌細胞数で低い値を示した(Figure 46)。とりわけ培養 15 時間以降から顕著な差が認められたため、培養 18 時間目の DORF4 形質転換体及び pRST426-empty vector 形質転換体の細胞形態を DIC で確認した。すると、細胞形態においても顕著な差が認められ、DORF4 形質転換体は pRST426-empty vector 形質転換体と比較して肥大化した液胞の細胞内への異常な蓄積や細胞サイズのばらつきが目立っており(Figure 46)、これは MoCV1-A ORF4 形質転換体の表現型と類似していた。培養温度 35°C 条件下で生菌細胞数及び OD₆₀₀ 値を比較した結果、前述した 30°C 条件下での結果よりも DORF4 形質転換体と pRST426-empty vector 形質転換体の差が顕著になった(Figure 47)。これらの結果から、MoCV1-D ORF4p は MoCV1-A ORF4p と同様に、*S. cerevisiae* 内で強発現することで宿主に Cytological damage を誘導することが分かった。

12. 菌体から液体培養上清への MoCV1-D 及び MoV2 流出

先行研究で、YG 液体培地中でベトナム分離株 S-0412-II 1a 株を長期間培養した時、培養上清へ MoCV1-A が流出する現象について報告した(Urayama et al., 2010)。MoCV1-D についてもこのような培養上清への流出現象が生じるかどうか調べるため、APU10-199A 株を YG 液体培養中で 2~8 週間長期培養し 1 週間ごとに培養上清をサンプリングして dsRNA の有無を確認した。すると、4 週間目の培養上清から MoCV1-D だけでなく MoV2 の dsRNA も検出された(Figure 48)。また、この時の培養上清では MoCV1-D の検出強度が低かったが MoV2 の検出強度は高く、MoV2 の方が早く流出すると考えられた。MoCV1-D と MoV2 の dsRNA は 8 週間目の培養上清からも検出された。検出強度は 7 週間目の培養上清がピークであり、培養上清 250 µl あたりおよそ 300 ng の dsRNA が検出された。さらに、フラスコ培養だけでなくジャーフェンターを用いた異なる培養方法で培養上清への流出現象を検証した。すると、培養 15 日目の培養上清で MoCV1-D、MoV2 及び MoPV1 の dsRNA が検出され(Figure 49)、2 つの異なる培養条件においてイネいもち病原体から培養上清へのマイコウイルスの流出現象を確認することができた。

この 15 日目の培養上清をサンプルとして、一次抗体として抗 MoCV1-D rORF3p 抗血清、抗 MoCV1-D rORF4p 抗血清及び抗 MoCV1-A ウイルス粒子抗血清を用いてウェスタンブロット解析を行った。いずれの抗血清を用いた場合も、分子量がおよそ 66、58 kDa の位置に微弱なシグナルが検出された(Figure 49)。一方で、MoCV1-D- and MoV2-free APU10-199A 株の培養 15 日目の培養上清サンプルではこれらのシグナルは検出されなかった。前述した Figure 29 の結果にて APU10-199A 株の精製ウイルス画分から同じ抗血清を用いて同様の分子量のバンドが検出されていることから、ジャーファーメンター培養 15 日目の培養上清サンプルにおいても全体的にシグナルが微弱かつスメア状であるものの MoCV1-D ウィルス粒子の構造タンパク質として検出されたと考えられた。

III 章 MoCV1-D がイネいもち病菌に与える影響

1. MoCV1-D 感染が宿主菌のメラニン生合成系に与える影響

前述した Figure 23 の結果の通り、MoCV1-D が感染している APU10-199A 株では菌叢の色素沈着が抑制されコロニーがアルビノ化していた。MoCV1-D の感染によって宿主菌であるイネいもち病菌のメラニン生合成系が何らかの阻害や干渉を受けたことでこのような異常な表現型が生じた可能性を検証するため、Figure 50 の通り APU10-199A 株及び MoCV1-D-free APU10-199A 株からメラニン生合成系に関連する中間体を抽出し HPLC (High-Performance-Liquid-Chromatography) で逆相クロマトグラフィーや UHPLC-ToF-MS (Ultra-High-Performance-Liquid-Chromatography-Quadrupole-Time-of-Flight-Mass-Spectrometer) で定性分析を試みた。

2. メラニン合成系中間体の溶離条件の最適化

既報で明らかにされているイネいもち病菌のメラニン合成系(付録 4)の中間体の中で、標準品として 1,8-DHN のみ入手が可能であった。そのため、まず 1,000 ppm 1,8-DHN を用いて溶離条件の最適化を試みた。Condition 1~3 に従って、HPLC で逆相クロマトグラフィーを行った。Condition 1, 2 では良好な分離やピークが得られなかったが、Condition 3 に示したようにカラムを変更し溶離液をトリフルオロ酢酸から、イオン化する時にも扱いやすいギ酸へ変更したところ、保持時間 (*Rt.*) 16.0 min にピークが検出され良好なクロマトグラムが得られた(Figure 51)。以降の HPLC 分析条件は注入量を適宜変更し Condition 3 で分析を行った。

3. APU10-199A 株及び MoCV1-D-free APU10-199A 株の抽出物の HPLC クロマトグラム

APU10-199A 株と MoCV1-D-free APU10-199A 株のメラニン生合成系に関連する中間体のプロファイルを得るため、両菌株から Greenblatt and Wheeler(1986)、Wheeler and Greenblatt(1988)及び Kurahashi et al.(1998)の報告を参考として Figure 50 に示した通りアセトン抽出した。抽出過程において、セロハン上に生育した菌叢は PDA 培地上での表現型と同様に、APU10-199A 株では菌叢がアルビノ化し MoCV1-D-

free APU10-199A 株では菌叢の色素沈着が認められた。また、これらをそれぞれ凍結磨砕した時も、APU10-199A 株の菌叢粉末は白色であったが MoCV1-D-free APU10-199A 株の菌叢粉末は灰色だった (Data not shown)。それぞれの菌叢粉末にアセトンを加え低温下で攪拌抽出し、粗抽出液をろ紙でフィルトレーションした後に減圧濃縮した。ペレットを 1 ml のアセトニトリルで溶解した後に、そのうちの 10 μ l を C18 カラムを装填した HPLC に注入し逆相クロマトグラフィーを行った。選択性の高い UV 波長 334 nm で検出を行ったところ、APU10-199A 株と MoCV1-D-free APU10-199A 株のクロマトグラムは顕著に異なっていた (Figure 52)。MoCV1-D-free APU10-199A 株のクロマトグラムでは *Rt.* 4.9 min、8.5 min、16.1 min に代表的なピークが検出された。元々ウイルスフリーで培地上の菌叢も色素沈着している P2-GFP 株からの抽出物についても同等量を HPLC に注入し分析したところ、強度は異なるものの MoCV1-D-free APU10-199A 株と同じ保持時間にピークが検出された。一方で、APU10-199A 株のクロマトグラムではこれらのピークは検出されなかった。この結果は、培養時期が異なるサンプルを用いても再現されていた。

4. APU10-199A 株及び MoCV1-D-free APU10-199A 株の抽出物の抽出イオンクロマトグラム

さらに各ピークに含まれる化合物を予想するため、前述で用いた APU10-199A 株、MoCV1-D-free APU10-199A 株及び P2 株の濃縮アセトン抽出画分を UHPLC-TOF-MS を用いて質量分析を試みた。分析条件は MS condition 1 に従った。各サンプルは UHPLC のグラジエント開始時の溶離液に溶媒置換し、イオン化方式はエレクトロイオンスプレー化法で負イオン測定を行った。全イオン電流クロマトグラム (Total ion current chromatogram; TIC) と PDA (Photo Diode Array) UV 334 nm の検出、及びメラニン生合成系の主要な中間体と考えられる 1,3,6,8-THN (計算精密質量; Exact mass: 192.0423)、scytalone (Exact mass: 194.0579)、1,3,8-THN (Exact mass: 176.0473)、vermelone (Exact mass: 178.0630)、1,8-DHN (Exact mass: 160.0524) (付録 4 を参照) の各プロトン脱離分子 $[M-H]^-$ の抽出イオンクロマトグラムを図示した (Figure 53-55)。MoCV1-D-free APU10-199A 株及び P2 株の UV 検出で、*Rt.* 2.0 min、3.3 min、3.7 min にピークが検出された。しかし、*Rt.* 3.3 min と 3.7 min の UV ピークと一致する生成イオンの存在は TIC スペクトルや各抽出イオンクロマトグラムから検出されなかった。一方で、*Rt.* 2.0 min の UV ピークについ

では、TIC スペクトルで判別できるイオン強度ではなかったが、scytalone と 1,3,8-THN のプロトン脱離分子の抽出イオンクロマトグラムでは比較的高いイオン強度で検出され(Figure 53, 54)、これらの分子が含まれる可能性が示唆された。APU10-199A 株の結果においては、*Rt.* 2.0 min、3.3 min、3.7 min の UV ピークはほとんど現れず、TIC スペクトルや各抽出イオンクロマトグラムでも生成イオンが検出されなかった(Figure 55)。しかし、MoCV1-D-free APU10-199A 株や P2 株のこれらのピークよりも低い強度で *Rt.* 4.6 min と 4.8 min に UV ピークが検出され、TIC スペクトルや抽出イオンクロマトグラムから、1,3,8-THN、vermelone、1,8-DHN 由来のプロトン脱離分子の生成が疑われた(Figure 53, 54)。

5.メラニン合成系中間体の抽出方法の検討

セロハン上で培養した菌叢からのアセトン抽出だけでなく、他の抽出方法も検討した。まず、アセトンで攪拌抽出後にろ紙でフィルトレーションした後の菌叢粉末残渣をリン酸バッファで再懸濁した。このリン酸懸濁液の遠心分離後上清を酸性化した後、酢酸エチルで抽出した。アセトン抽出画分と同様に、APU10-199A 株及び MoCV1-D-free APU10-199A 株を HPLC condition 3 で逆相クロマトグラフィー分析した(Figure 56)。しかし、両菌株間で明瞭な差異のあるクロマトグラムが得られなかった。

また、培養条件を変更し液体培養上清やその時の培養菌体からの抽出を試みた。まず、P2-GFP 株を PD 液体培地または YG 液体培地で振盪培養し、培養 5 日、7 日後の培養上清を回収し HCl で酸性化した後酢酸エチルに転溶させた。これを減圧濃縮し逆相クロマトグラフィー分析した(Figure 57)が、雑ピークが多く良好なクロマトグラムが得られなかった。さらに、APU10-199A 株及び MoCV1-D-free APU10-199A 株を同じように PD 液体培地または YG 液体培地で振盪培養した培養上清を酢酸エチルで転溶するとともに、培養菌体からもアセトン抽出を行い逆相クロマトグラフィー分析した(Figure 58, 59)。しかし、どちらの場合においても Figure 52 で示したよりも明瞭な差異のあるクロマトグラムが得られず、メラニン合成系中間体の抽出にはセロハン上で培養した菌叢からのアセトン抽出画分が最も適していると考えられた。

6. UHPLC-ToF-MS 分析によるメラニン生合成系中間体の帰属

前述の結果のように、濃縮したアセトン抽出画分そのままを UHPLC-ToF-MS 分析しても、HPLC におけるそれぞれの UV ピークにどのメラニン生合成系中間体が含まれているか同定が出来なかった。そこで、質量分析に与える試料マトリックスの影響を軽減するため、HPLC 分離によって代表的なピークを分取して濃縮した後 UHPLC-ToF-MS で定性分析を試みた。

定性分析を行うにあたって、Figure 51 に示した通り、同じ溶離条件で分離した 1,000 ppm 1,8-DHN の保持時間は 16.0 min であった。付録 4 に示した通り、現在までに明らかにされているイネいもち病菌のメラニン生合成系中間体の中で最も極性が低い化合物は 1,8-DHN であり、本溶離条件の逆相クロマトグラフィーにおいては 1,8-DHN の保持時間が理論上最も長いと考えられた。さらに、MoCV1-D-free APU10-199A 株の抽出物と 10 ppm 1,8-DHN を共注入して HPLC 分析したところ、それぞれのピークは重ならずに分離した(Figure 60)。このことから、Figure 52 で検出されたピークのうち、*Rt.* 16.1 min のピークはメラニン合成中間体に該当しないと判断した。

P2-GFP 株

従って、残りの *Rt.* 4.9 min、8.5 min、10 min のピークに含まれる化合物がメラニン生合成系中間体に帰属されるかどうかを調べるために、UHPLC-ToF-MS によって定性分析を試みた。サンプルとして、まず APU10-199A 株や MoCV1-D-free APU10-199A 株と比べて HPLC で良好に分離されていた P2-GFP 株を用いた。P2-GFP 株のアセトン抽出溶液をグラジエント開始時の溶離液に溶媒置換し、ピーク分取のために 150 μ l を注入して HPLC で分離した。そして、*Rt.* 4.9 min、8.5 min、10 min をそれぞれ P2-F1、P2-F2、P2-F3 画分として回収した(Figure 61)。これらの画分を減圧濃縮して UHPLC のグラジエント開始時の溶離液に溶媒置換した後、UHPLC-ToF-MS を用いて MS condition 1, 2 で質量分析した。P2-F1 画分では、UV 334 nm の吸収ピークと TIC スペクトルのピークを *Rt.* 1.8 min に検出した。また、各抽出イオンクロマトグラムにおいても、Figure 54 と同様、生成イオンとして scytalone と 1,3,8-THN のプロトン脱離分子が比較的高いイオン強度で検出された(Figure 62)。さらに、この保持時間におけるマススペクトルでは 2 つの主イオンが検出されており、プロトン脱離分子として *m/z* 193.0494 (測定誤差 2.0 mDa)

と m/z 175.0396 (測定誤差 0.7 mDa)が検出された(Figure 62)。そして、それぞれのプロダクトイオンの m/z に基づいて MassLynx™ ソフトウェア上で元素組成解析 (Elemental composition analysis)を行った結果、 m/z 193.0494 は組成式 $C_{10}H_9O_4$ 、 m/z 175.0396 は $C_{10}H_7O_3$ で表された。得られた測定精密質量 (Accurate mass)と組成式をメラニン生合成系中間体の Exact mass と比較すると、 m/z 193.0494 ($C_{10}H_9O_4$)は scytalone の脱プロトン体、 m/z 175.0396 ($C_{10}H_7O_3$)は 1,3,8-THN の脱プロトン体であると考えられた。一方 P2-F2 画分では、UV 334 nm の吸収ピークと TIC スペクトルのピークを Rt . 3.3 min に検出した。しかし、各抽出イオンクロマトグラムにおいては、Figure 54 と同様に目立った生成イオンが検出されなかった。この保持時間におけるマススペクトルではメラニン生合成系中間体に該当するプロトン脱離イオンが検出されなかった(Figure 63)。P2-F3 画分も同様に、UV 334 nm の吸収ピークと TIC スペクトルのピークを Rt . 3.7 min に検出した。しかし、各抽出イオンクロマトグラムにおいては、Figure 54 と同様に目立った生成イオンが検出されなかった。この保持時間におけるマススペクトルではメラニン生合成系中間体に該当するプロトン脱離イオンが検出されなかった(Figure 64)。MS condition 2 においても同様の結果が得られた(Figure 65-67)。以上の結果から、P2-F2 画分と P2-F3 画分にはメラニン生合成系の中間体は含まれておらず、P2-F1 画分に中間体である scytalone あるいは 1,3,8-THN が含まれていることが明らかとなった。

MoCV1-D-free APU10-199A 株と APU10-199A 株

次に、MoCV1-D-free APU10-199A 株と APU10-199A 株についても同様に HPLC 分離後にピーク分取して、 Rt . 4.9 min、8.5 min をそれぞれ DF (MoCV1-D-free)-F1、DI (MoCV1-D-infected)-F1、DF-F2、DI-F2 画分として回収した(Figure 68)。これらの画分を減圧濃縮して UHPLC のグラジエント開始時の溶離液に溶媒置換した後、UHPLC-ToF-MS を用いて MS condition 1, 3 で質量分析した。すると DF-F1 画分では、P2-F1 画分の分析結果と同様に、UV 334 nm の吸収が Rt . 1.8 min に認められ、TIC スペクトルでも同じ保持時間でピークを検出した(Figure 69)。さらに、この保持時間におけるマススペクトルでは 2 つの主イオンが検出されており、プロトン脱離分子として m/z 193.0500 (測定誤差 1.6 mDa)と m/z 175.0403 (測定誤差 0.6 mDa)が検出された(Figure 71)。そして、それぞれのプロダクトイオンの m/z に基づいて元

素組成解析を行った結果、 m/z 193.0500 は組成式 $C_{10}H_9O_4$ 、 m/z 175.0403 は $C_{10}H_7O_3$ で表されることが分かった。しかし、DF-F1 画分の分析結果とは対照的に、DI-F1 画分では Rt . 1.8 min において UV 334 nm の吸収が全くなかった。さらに、各抽出イオンクロマトグラムやこの保持時間におけるマススペクトルにおいては目立った生成イオンが全く検出されず、メラニン生合成系中間体に該当するプロトン脱離イオンが検出されなかった(Figure 70, 71)。

ここで、DF-F1 画分の Rt . 1.8 min に scytalone と 1,3,8-THN のどちらがメジャーに含まれるかを調べるため、分析条件において MS condition 1 よりもイオン源温度 (Ion source temperature) と脱溶媒温度 (Desolvation temperature) を下げた MS condition 3 で質量分析した。DF-F1 画分では、MS condition 1 での分析結果と同様に、UV 334 nm の吸収が Rt . 1.8 min に認められ、TIC スペクトルでも同じ保持時間でピークを検出した(Figure 72)。さらに、この保持時間におけるマススペクトルでは 2 つの主イオンが検出されており、プロトン脱離分子として m/z 193.0498 (測定誤差 1.1 mDa) と m/z 175.0394 (測定誤差 1.0 mDa) が検出された。それぞれのプロダクトイオンの m/z に基づいて元素組成解析を行った結果、 m/z 193.0498 は組成式 $C_{10}H_9O_4$ 、 m/z 175.0394 は $C_{10}H_7O_3$ で表されることが分かった(Figure 74)。しかし、2 つの生成イオンのイオン強度比が MS condition 1 での分析結果と顕著に異なっており、MS condition 1 においては組成式 $C_{10}H_7O_3$ で表されるプロトン脱離分子がメジャーに検出された(Figure 71)。対照的に、MS condition 3 においては組成式 $C_{10}H_9O_4$ で表されるプロトン脱離分子のイオン強度比が顕著に向上していた(Figure 74)。このことから、DF-F1 画分のマススペクトルで検出された 2 つの生成イオンにおいて、 m/z 193.0498 ($C_{10}H_9O_4$) が真正のプロトン脱離分子 $[M-H]^-$ であり、 m/z 175.0394 ($C_{10}H_7O_3$) はイオン化・脱溶媒過程で生じた脱水分子 $[M-H-H_2O]^-$ であると結論付けた。一方で、DI-F1 画分では MS condition 1 の分析結果と同様に、 Rt . 1.8 min において UV 334 nm の吸収が全くなかった。さらに、各抽出イオンクロマトグラムやの保持時間におけるマススペクトルにおいては目立った生成イオンが全く検出されず、メラニン生合成系中間体に該当するプロトン脱離イオンが検出されなかった(Figure 74)。ちなみに、DF-F2 画分と DI-F2 画分は、P2-F2 画分の分析結果と同様に、UV 334 nm の吸収ピークと TIC スペクトルのピークを Rt . 3.3 min に検出した(Figure 75, 76)。しかし、各抽出イオンクロマトグラムにおいては目立った生成イオンが検出されず、この保持時間におけるマススペクトルでもメラニン生合成系

中間体に該当するプロトン脱離イオンが検出されなかった(Figure 77)。このことから、DF-F2 画分と DI-F2 画分にはメラニン生合成系の中間体は含まれていないことが分かった。

以上の結果から、DF-F1 画分及び P2-F1 画分 (HPLC *Rt.* 4.9 min; UHPLC *Rt.* 1.8 min)は、メラニン生合成系の中間体である scytalone として帰属され、この中間体は DI-F1 画分にはほとんど蓄積されていないことが分かった。すなわち、MoCV1-D が感染する APU10-199A 株では、MoCV1-D-free APU10-199A 株と比較して scytalone の含量が極めて減少しており、このことが APU10-199A 株の菌叢のアルビノ化の要因である可能性が示唆された。

7. メラニン合成阻害剤を用いた MoCV1-D の作用点予測

イネいもち病菌の防除において、選択性の高い作用点としてメラニン生合成系を阻害する薬剤が多く開発され一般的に使用されている。本実験では、メラニン生合成系のポリケチド合成酵素を阻害する MBI-P 剤として Tolprocarb (TPC)、脱水酵素を阻害する MBI-D 剤として Carpropamid (CPP)及び還元酵素を阻害する MBI-R 剤として Tricyclazole (TCZ)を用いた。宿主いもち病菌内における MoCV1-D の作用機序を予測するため、これらのメラニン合成阻害剤を添加して MoCV1-D-free APU10-199A 株を培養しその抽出物中のクロマトグラムを APU10-199A 株のものと比較した。MoCV1-D-free APU10-199A 株を 50 ppm TPC、CPP、TCZ 及び薬剤無処理区として 1% MeOH の存在下で培養し抽出物を HPLC condition 3 で逆相クロマトグラフィー分析した。まず、1% MeOH を添加した MoCV1-D-free APU10-199A 株の薬剤無処理区では Scytalone に帰属された *Rt.* 4.9 min のピークの外、Figure 52 と同様の保持時間にピークが検出された(Figure 78)。一方で、MoCV1-D-free APU10-199A 株の TPC 及び TCZ 処理区では Scytalone に帰属された *Rt.* 4.9 min のピークが検出されなかった。また、Scytalone \Rightarrow 1,3,8-THN への変換を阻害する CPP 処理区では無処理区と比較して Scytalone のピーク強度が増した。一方で、APU10-199A 株の 1% MeOH 薬剤無処理区では、Scytalone に帰属された *Rt.* 4.9 min のピークはほとんど検出されず、さらに Figure 52 と同様に他の目立ったピークは検出されなかった(Figure 79)。また、APU10-199A 株の TPC 及び TCZ 処理区でも、Scytalone に帰属された *Rt.* 4.9 min のピークが検出されなかった。しかし、APU10-199A 株の CPP 処理区では薬剤無処理区と比較して Scytalone のピーク強度が増した。このことから、APU10-199A

株においてメラニン合成が完全に阻害されているわけではなく、MoCV1-D 感染株でも MoCV1-D フリー化株と比べて少ないながらもメラニン合成が行われていることが分かった。また、培養条件を変更して、有効成分の溶解促進のために薬剤に 0.1% Tween 20 を添加して培養期間を 5 日間で MoCV1-D-free APU10-199A 株を培養しアセトン抽出画分を HPLC 分析しても、前述の Figure 78, 79 と同様の結果が得られた(Figure 80)。

考察

1. ベトナム分離株 MoCV1-A-a と MoCV1-A の比較

菌叢の表現型

先行研究で、MoCV1-A-a と MoPLV が混合感染している S-0412-II 1c 株においては、MoCV1-A-a が宿主菌であるイネいもち病菌に生育阻害を引き起こしていることが分かっている(鈴木修士論文, 2010)。また、MoCV1-A が感染する S-0412-II 1a 株においては、MoCV1-A が宿主菌に生育阻害を引き起こす(Urayama et al., 2010)。しかし、この両株を PDA 培地上で生育させた時、表現型には明らかな違いがある。MoCV1-A-a が感染する S-0412-II 1c 株では、培地上に生育しているイネいもち病菌の気中菌糸が形成されない、もしくは気中菌糸の形成後溶菌化するウェットな表現型が観察される。一方、MoCV1-A が感染する S-0412-II 1a 株では、S-0412-II 1c 株ほど激しいウェットな表現型は見られず、ウイルスフリー株のように旺盛な気中菌糸が観察されることが多い。両株の表現型の違いの要因として、MoCV1-A-a は MoCV1-A よりも宿主菌に対する生育阻害作用が強い、もしくは S-0412-II 1c 株と S-0412-II 1a 株で宿主菌の遺伝的背景が異なっていて S-0412-II 1c 株の方がよりウイルス感染にセンシティブである可能性が考えられる。

DsRNA セグメントの成分比

デンシトメトリー計測によって MoCV1-A-a 及び MoCV1-A の dsRNA1~5 のバンド強度を数値化したところ、3.1 kb のバンド輝度のデンシトグラムから計算された積算値は MoCV1-A では約 50,000 であったのに対して MoCV1-A-a では約 130,000 で 2 倍以上の高い数値を示した。このことから、同重量の菌体に含まれる各セグメント含有量は異なっていて、MoCV1-A-a は 3.1 kb のバンドとして検出されるセグメントを多く保持していることがあらためて確認された。3.1 kb のバンドはウイルスゲノムの dsRNA2 に相当すると考えられるが、dsRNA2 がコードする ORF2 から翻訳されるタンパク質 (ORF2p)の機能は未知である。これまでに分かっていることとして、MoCV1-A に関する研究では精製 MoCV1-A ウイル

ス粒子画分に対して、大腸菌内でリコンビナント発現させた ORF2p を抗原として作製した抗 MoCV1-A ORF2p 抗体を一次抗体としてウェスタンブロット解析を行ったが、ORF2p に相当するシグナルはほとんど検出されなかった(浦山博士論文, 2012)。このことから、ORF2p は MoCV1-A のウイルス粒子を構成する主要なタンパク質として発現していない可能性が考えられる。さらに、ORF2 領域を発現強度の異なるシャトルベクターに搭載しそれらを形質転換した *S. cerevisiae* の生育状況を empty vector 形質転換体と比較しても顕著な差は認められなかった(浦山博士論文, 2012)。もし ORF2p が宿主の弱毒化に関与していた場合、MoCV1-A-a の dsRNA2 のセグメント含量の高さが宿主に対する強い生育阻害作用の要因と考えられるため、ORF2p の機能解析が必要である。

遺伝子構造と塩基配列

5'-RACE 法や 3'-RACE 法、RT-PCR 法を用いたシーケンス解析により、MoCV1-A-a ウイルスゲノムの全塩基配列を決定し遺伝子構造を特定した。その結果、MoCV1-A-a は dsRNA1:3,555 nt、dsRNA2:3,250 nt、dsRNA3:3,077 nt、dsRNA4:3,044 nt、dsRNA5:2,880 nt の 5 セグメントをウイルスゲノムとして有し、さらに各セグメントは ORF1:1,127 aa、ORF2:934 aa、ORF3:799 aa、ORF4:812 aa、ORF5:611 aa をコードしていることが分かった。さらに、GENETYX を用いて MoCV1-A-a と MoCV1-A の各セグメント間の塩基配列相同性及びアミノ酸配列相同性・類似性を比較したところ、どのセグメントも 99%以上の非常に高い相同性を示し遺伝子構造はほぼ同じであったが、数カ所の塩基・アミノ酸置換が確認された。まず、各セグメントにおける塩基置換は、約 85%がプリン塩基（アデニン、グアニン）間またはピリミジン塩基（シトシン、チミン）間の置換であり、プリン塩基からピリミジン塩基またはピリミジン塩基からプリン塩基への塩基置換の頻度は低かった。また、塩基置換は各セグメントで約 20 カ所確認されたが、5'-UTR における置換は 1、2 カ所と少なく、ほとんどの塩基置換は翻訳領域と 3'-UTR 内で確認された。また、翻訳領域内での塩基置換は多く確認されたが、そのほとんどがアミノ酸の置換を伴わないサイレント変異であった。アミノ酸の置換は dsRNA4 を除いて各セグメントで数カ所生じていたが、ほとんどが GENETYX で定義される類似性のアミノ酸間の置換であった。アミノ酸の類似性は、親水性や疎水性、電荷の有無、酸性、塩基性などを指標とした側鎖の性質によって分類されるため、類似性のア

ミノ酸間の置換は翻訳されるタンパク質の高次構造やフォールディングには影響を与えないためにその機能にもほとんど影響しないと考えられる。一方で、類似性でないアミノ酸間の置換は、ORF1 で 2 ヲ所、ORF5 で 1 ヲ所確認された。本研究では多様な塩基・アミノ酸置換が確認され、これらが MoCV1-A-a の強い生育阻害作用の要因である可能性が示唆された。

ウイルス様粒子の構造

シヨ糖濃度 10~40%のシヨ糖濃度勾配遠心法を用いて MoCV1-A-a のウイルス様粒子を部分純化し、ウイルス様粒子の性状解析を行った。その結果、MoCV1-A-a ウイルス様粒子はシヨ糖濃度約 20~23%の画分に存在し、130 kDa、70 kDa、65 kDa、58 kDa の分子量の構造タンパク質から成ることが分かった。また TEM 観察では MoCV1-A-a の VLP と思われる直径約 35 nm の球形の粒子が観察された。これらの性質を MoCV1-A と比較すると MoCV1-A-a と MoCV1-A は同じシヨ糖濃度 20~23%に存在し、粒子タンパク質のバンドパターンもほぼ同じであった。さらに電子顕微鏡で観察されたウイルス様粒子像においてもほぼ同じ形態だった。つまり、MoCV1-A-a と MoCV1-A のウイルス様粒子は沈降係数、構造タンパク質、粒子形態の点でほぼ同等であった。その一方で、塩化セシウム密度勾配超遠心においては、密度勾配溶液を MoCV1-A が検出された浮遊密度 1.375 g/cm³ が中心になるように調製したにも関わらず、MoCV1-A-a のウイルスゲノムは MoCV1-A と異なり密度勾配の最上層の浮遊密度 1.311g/cm³ の画分で検出された。原因として、精製の過程で MoCV1-A-a のウイルス粒子が破壊されて遊離した dsRNA が最上層に浮遊していたためと考えられる。しかし、通常遊離した dsRNA は浮遊密度 1.375g/cm³ 以上の画分から検出されるはずであるため MoCV1-A-a dsRNA は何らかの膜性物質と挙動を共にしていることで浮遊密度の低い画分で検出された可能性がある。相同性の極めて高い MoCV1-A-a と MoCV1-A で粒子の浮遊密度に大差はないと推測されるため、今後の再検証が必要である。

MoCV1-A-a と MoCV1-A の類似点と相違点

MoCV1-A-a と MoCV1-A のウイルス粒子はほぼ同等の性質であったため、ウイルス様粒子の性質の違いが MoCV1-A-a の強い生育阻害作用の要因である可能性は低いと予想された。一方、相違点としてウ

ウイルスゲノムセグメント濃度比とウイルスゲノムの塩基・アミノ酸置換が挙げられる。濃度比の違いが確認されたのは dsRNA2 に相当すると考えられ高分子側から 2 番目のセグメントである。dsRNA2 上の ORF2 から翻訳されるタンパク質 ORF2p は機能未知であるが、もし ORF2p が宿主の弱毒化に寄与する場合、dsRNA2 のセグメント含量の高さが MoCV1-A-a の強い生育阻害作用の要因となり得る。さらに、ウイルスゲノムの多様な塩基・アミノ酸置換も確認され、これらの差異が MoCV1-A-a の強い生育阻害作用の要因である可能性が示唆された。特に、MoCV1-A では宿主菌の弱毒化に寄与する因子として ORF4 から翻訳される ORF4p が候補に挙げられているため、dsRNA4 上の変異が MoCV1-A-a の強い生育阻害作用の要因となり得る。ORF4 にはサイレント変異のみが存在したことから、末端の非翻訳領域内の塩基置換が ORF4 の翻訳を促進し ORF4p の産生量を上昇させることで宿主菌に強い生育阻害作用を与えている可能性が示唆された。MoCV1-A においては、pRSA316 シャトルベクターに ORF4 配列のみ、あるいは dsRNA4 の両末端の非翻訳領域をインサートして *S. cerevisiae* 内で発現させた場合、dsRNA4 の 5'-UTR と 3'-UTR が含まれるベクターの形質転換体で表現型が顕著に変化した。ORF4p の出芽酵母に対する生育阻害作用の詳細なメカニズムは明らかではないが、非翻訳領域上に表現型の激化に関連する因子が存在する可能性が示唆されている(浦山博士論文, 2012)。

2. 菌糸融合による MoCV1-A フリー化株へのウイルス感染の試み

菌糸融合の確実性

ハイグロマイシン耐性遺伝子 (*hph*)を導入した MoCV1-A フリー化株(レシピエント株)と S-0412-II 1c 株または S-0412-II 1a 株(ドナー株)の菌糸融合を介した MoCV1-A-a または MoCV1-A の感染を試みた。その結果、PCR でウイルス dsRNA と *hph* の存在が確認された数株の菌糸融合候補株が得られた。そのため、これらの菌糸融合候補株は菌糸融合によってレシピエント株の核ゲノムとドナー株のウイルスを同一細胞内に保持し、ウイルス感染フリー化株へウイルスが伝播した可能性が示唆された。しかし、選抜に用いたハイグロマイシンはドナー株の生育を完全に抑制しない。今回得られた菌糸融合候補株ではドナー株が完全に除去されていない可能性があるため、次の 2 通りの方法によって菌糸融合の確実性を検証する必要がある。1 つは、菌糸融合候補株から単分生子分離を行い、1 分生子からウイルス dsRNA

と *hph* を同時に検出する方法である。しかし、特に MoCV1-A-a がイネいもち病菌に感染すると分生子形成が強く抑制され単分生子分離ができない可能性がある。この場合は2つ目の方法として、菌糸融合候補株をハイグロマイシン添加 PDA 培地上で5回以上継代培養し、ドナー株のコンタミネーションを希釈していく方法がある(Kim et al., 2013)。今後、これらの方法で菌糸融合の確実性を向上させる。

菌糸融合候補株の表現型

観察された菌糸融合候補株の表現型については、ドナー株として MoCV1-A 感染株を用いた場合はレシピエント株と同じような旺盛な気中菌糸が観察されたが、ドナー株として MoCV1-A-a 感染株を用いた場合は気中菌糸が溶菌化したウェットな表現型が観察された。一部の菌糸融合候補株でドナー株として MoCV1-A-a 感染株を用いた場合でもウェットな表現型が見られず気中菌糸が観察されたものの、MoCV1-A 感染株を用いた場合は全ての菌糸融合候補株において気中菌糸が溶菌化したウェットな表現型が観察されなかった。これらの結果から、マイコウイルスが S-0412-II 1c 株と S-0412-II 1a 株に与える生育阻害作用の激しさの違いは、宿主菌株間の遺伝的背景の違いが要因ではなく MoCV1-A-a が MoCV1-A よりも強い生育阻害作用を持つことが要因である可能性が示唆された。

3. 秋田県分離株 APU10-199A から検出されたマイコウイルス

イネいもち病菌国内分離株から MoCV1-A RdRp 特異的プライマーセットを用いた RT-PCR で MoCV1 近縁ウイルスのスクリーニングを行った結果、13 サンプルから MoCV1-A RdRp 特異的増幅産物が検出され、MoCV1 近縁ウイルスの感染が示唆された。さらに、菌株に内在する dsRNA 分子のセグメント構造を可視化するため菌糸体からセルロースパウダーを用いて dsRNA を抽出・精製しアガロースゲル電気泳動で展開した結果、秋田県分離株 APU10-199A において MoCV1 近縁ウイルスを含む3種の dsRNA ウイルスが混合感染することを見出した。近年、中国の Hubei 州から分離されたイネいもち病菌株 QSP5 にて、*Victorivirus* 属に分類される MoV3 及び *Chrysovirus* 属に分類される MoCV1-C が報告された(Tang et al., 2015)。同論文にて MoCV1-C の塩基配列は決定されていなかったものの、我々が秋田県分離株 APU10-199A から検出した MoCV1 近縁ウイルスは MoCV1-D (*Magnaporthe oryzae chrysovirus 1-D*)と呼

称した(Komatsu et al., 2016, Higashiura et al., 2019)。

MoCV1-D dsRNA ゲノムのシーケンス解析の結果、ベトナム分離株から見出された MoCV1-A 及び MoCV1-B と同様に dsRNA1-dsRNA5 のセグメント化された遺伝子構造であり、それぞれの dsRNA セグメントはおよそ 60 – 80%の非常に高い相同性を示した。特に 5'-UTR においてセグメント間で保存性が非常に高い上に、MoCV1-A 及び MoCV1-B とコンセンサスな配列 5'-GCAAAAAAGAAUAAAGC-3' motif (Urayama et al., 2010; Urayama et al., 2014a)が存在していた。一方で、MoCV1-D の 3'末端配列は AT rich 配列であるものの、5'末端配列と比較するとウイルス間での保存性は高くなかった。MoCV1-A の dsRNA3 及び dsRNA4 は 3'末端近傍にそれぞれ 130 bp、100 bp の AT rich 配列が存在するが、MoCV1-D の dsRNA3 及び dsRNA4 は MoCV1-B と同様に 3'末端近傍に類似した配列は存在しなかった。MoCV1-D dsRNA1-4 はベトナム分離株である MoCV1-A 及び MoCV1-B の counterpart とおよそ 70%以上の高い相同性を示したが、対照的に dsRNA5 についてはおよそ 60%前後と比較的低い相同性を示した点は興味深い。dsRNA5 セグメントのみを欠落した MoCV1-D は継代培養の過程で自然に得られた。その上、菌糸融合を介して Virus-free P2 株へ MoCV1-D を感染させた時、ウイルス導入株から MoCV1-D dsRNA5 セグメントが RT-PCR 法で検出されなかったにも関わらず、MoCV1-D ウイルス粒子が観察された。このことから、まだ MoCV1 の構造タンパク質の発現機構やウイルス粒子構築の分子機構、複製メカニズム等は明らかでないが、dsRNA5 セグメントは MoCV1-D ウイルス粒子の構成に必須な分子ではなく dsRNA5 非存在下でもウイルス複製及びウイルス粒子の構築が可能である可能性が示唆された。近年、当研究グループでは秋田県分離株 APU10-199A 以外からも複数の MoCV1 近縁ウイルスを見出しそのシーケンス解析を行ったところ、それらのウイルスゲノムは MoCV1-D dsRNA1-5 と極めて近縁で相同性はおよそ 90%以上であることを見出した(相原修士論文, 2017)。しかし、これらの MoCV1-D 近縁ウイルスの dsRNA5 をベトナム分離株 MoCV1-A 及び MoCV1-B dsRNA5 と比較した時、APU10-199A MoCV1-D の結果と同様に、dsRNA5 のみ 60%前後の比較的低い相同性を示した。また、dsRNA5 のみに注目し、ベトナム分離株 MoCV1-A と MoCV1-B dsRNA5 同士、あるいは APU10-199A MoCV1-D と国内分離株 MoCV1-D 近縁ウイルス同士で相同性を比較すると、その値は 95%前後で非常に高い相同性を示した。つまり、MoCV1 chrysovirus の dsRNA1~5 において、特に dsRNA5 の相同性は菌株の分離地の違

いを強く反映していることが分かった。当研究グループで報告した AaCV1 はウイルスゲノムとして dsRNA1~dsRNA5 を保有しており、AaCV1 dsRNA1~4 は MoCV1-D dsRNA1~4 と比較的高い相同性を示した。また、連続した継代培養によって AaCV1 のいくつかの dsRNA セグメントは突然欠落してしまうことがある(Okada et al., 2018)。AaCV1 dsRNA5 は MoCV1-D dsRNA5 と比較して、塩基長がおよそ 2 kb 短く相同性がほとんどないという点も特徴的である。これらのことから、*Chrysoviridae*-cluster II に分類される chrysovirus において、dsRNA5 分子は dsRNA1-4 の 5'末端配列及び 3'末端配列とコンセンサスであるが、ウイルスの複製に必須な分子ではなく、例えば本病の防除実態の違いなどの外環境に依存してサテライト RNA のような振る舞いをする dsRNA 分子であると類推される。

4. MoCV1-D がイネいもち病菌に与える影響

本研究では、単分生子分離によってオリジナル分離株 APU10-199A から MoCV1-D のみ、あるいは MoCV1-D と MoV2 が欠落した株が得られた。これらの株の表現型を比較することによって、APU10-199A 株における菌叢のアルビノ化・気中菌糸が形成されない・菌糸内への肥大化した小胞の蓄積等の弱毒化形質は 3 種のマイコウイルスの中で MoCV1-D の関与が最も強く疑われた。しかし、このことは chrysovirus や victorivirus が宿主に与える影響についての既報とは異なっている。*H. victoriae* から分離された *Chrysoviridae*-cluster I に属する Hv145S について、これまで Hv145S が単独で感染している株は報告されていないが、DNA の形質転換やウイルスのトランスフェクションを用いた近年の報告において *H. victoriae* の弱毒化には Hv145S ではなく *victorivirus* である Hv190S の方が強く影響を及ぼしていることが分かってきた(Xie et al., 2016)。また、本研究では単分生子分離によって MoPV1 の感染がフリー化できていないため、ウイルス間の相互作用の結果として表現型の変化が生じている可能性は排除できなかった。実際、*Partitiviridae* に属するマイコウイルスが宿主菌に対して弱毒化形質をもたらす報告がある。多くの場合、*partitiviruses* は宿主菌に対して無病徴であるが、*Sclerotinia sclerotiorum* に感染する *Sclerotinia sclerotiorum partitivirus 1* (SsPV1)は *S. sclerotiorum* の生育や病原性に対して著しく影響を与えることが報告されている(Xiao et al., 2014)。一方で、*Aspergillus thermomutatus* から分離され、*Chrysoviridae*-cluster II に属する *Aspergillus thermomutatus chrysovirus 1* (AthCV1)においては、精製 AthCV1 粒子を *A.*

nidurans と *A. niger* に導入すると両株の孢子形成を顕著に低下させた(Ejmal et al., 2018)。しかし、オリジナルの宿主菌である *Aspergillus thermomutatus* と *A. nidurans* においてはウイルスフリー株で有性器官である子嚢胞子が形成されず、ウイルス感染株で子嚢胞子形成が誘導された結果も示されていた。つまり、*Chrysoviridae* cluster-II のウイルスは宿主菌に生育抑制を引き起こす場合もあれば、例え同属の宿主菌であっても異なる影響を及ぼす場合もあることから、ウイルスが宿主菌に与える弱毒化形質を評価する時には宿主菌の病原性とより強く相関する因子への作用について評価する必要があると考える。

5. APU10-199A 株から精製した MoCV1-D ウイルス粒子

ジャーファーマンターで 10 日間培養した APU10-199A 株からショ糖濃度勾配遠心法及び塩化セシウム密度勾配遠心法を併用してウイルス粒子の抽出・精製を試みた。MoCV1-D dsRNA がリッチに含まれる画分 Pool I と MoV2 dsRNA がリッチに含まれる Pool II に分画できた。Pool I には少量の MoV2 が、反対に Pool II には少量の MoCV1-D が混入しているが、塩化セシウム密度勾配遠心法によって同株に共感染する 2 種のマイコウイルスをおおよそ分離することができた。MoCV1-D dsRNA を含む Pool I は浮遊密度 1.35~1.39 g/cm であり、TEM 観察によって直径約 35 nm の等尺性の球形粒子様構造を確認した。Pool I を SDS-PAGE で展開すると 120、66、60、58、53 kDa の分子量のタンパク質が検出された。MoCV1-D のこれらのウイルス学的性質は、ベトナム分離株 MoCV1-A や MoCV1-B のそれと類似していた。また、ジャーファーマンターにて 3 日間培養した菌体から精製した MoCV1-D ウイルス粒子画分を調製し、SDS-PAGE 解析やウェスタンブロット解析を行うと 85、71、66、60 kDa の分子量のシグナルが検出され、10 日間培養した APU10-199A 株由来の精製ウイルス画分で検出されたバンドよりも高分子量であった。すなわち、菌体の培養期間が短いと ORF3 や ORF4 から翻訳される推定分子量 84、85 kDa で全長サイズの MoCV1-D ウイルス粒子を検出できるが、培養期間が長期化するにつれてイネいもち病菌体内で MoCV1-D ウイルス粒子構造タンパク質が部分分解する現象が本研究においても再現された。つまり、MoCV1 においてウイルス粒子構成タンパク質の部分分解現象は普遍的な現象であることが明らかとなった。

6. MoCV1-D ウイルス粒子の部分分解

一次抗体として抗 MoCV1-D rORF3p 抗血清を用いてウェスタンブロット解析を行うと、レーン APU10-199A(3d)と APU10-199A(14d)ではそれぞれ約 85 kDa と 60 kDa のバンドを主に認識し、どちらにおいてもこれらのメジャーなバンドより低分子側にラダー状のシグナルを検出した。それとは対照的に、一次抗体として抗 MoCV1-D rORF4p 抗血清を用いてウェスタンブロット解析を行うと、レーン APU10-199A(3d)では 85、75、70 kDa のタンパク質を認識したが、APU10-199A(14d)では 66、60、58 kDa のバンドをメジャーに認識しさらに 85 kDa の位置に微弱なシグナルを検出した。本実験では、MoCV1-D ORF3p と ORF4p はともにウイルス粒子を構成するメジャーな CP であるにも関わらず、各抗血清を用いたウェスタンブロット解析のバンドパターンは全く異なっていた。その理由として、MoCV1-D ORF3p と ORF4p でタンパク質の分解の様式が異なっており、ORF4p は一定に制御されたプロセッシングを受けて 66、60、58 kDa の分子量のタンパク質に分解されるが、ORF3p は厳密に制御されたプロセッシングではなく比較的ランダムに分解される可能性が考えられた。また、ORF3p は ORF4p とは異なってサンプル APU10-199A(3d)ですでに低分子側にラダー状のシグナルが検出されていることから、ORF3p は ORF4p と比較して分解されやすく、ORF4p が”コア”タンパク質として、ORF3p は”サブユニット”のようなタンパク質として MoCV1-D のウイルス粒子を構成する可能性が示唆された。

このようなウイルスタンパク質の制御されたプロセッシングは、宿主への生育阻害作用に代表される生物活性と関係があるのかもしれない。実際、MoCV1-A ORF4p においては、全長から翻訳される ORF4p だけでなく他の *Chrysoviridae*-cluster II virus とも保存性の高い内部領域から翻訳される SUap を *S. cerevisiae* で高発現させた時に宿主の細胞へ障害を生じさせた(Urayama et al., 2016a)。また、Figure 30 に示したように、抗 MoCV1-D rORF4SUap 抗血清(1,000 倍、5,000 倍)を一次抗体としてウェスタンブロット解析を試みたところ、APU10-199A(3d)と APU10-199A(14d)ともに抗 MoCV1-D rORF4p 抗血清を用いた場合とほぼ同じ分子量のバンドを検出したがシグナル強度は著しく低下していた。この理由として以下の2つが考えられる。まず、抗原調製時の問題として、*E. coli* 内リコンビナント発現 ORF4SUap がイネいもち病菌内と異なるフォールディングがなされたために自然なエピトープを認識できないポリクローナル抗体となってしまった可能性が考えられる。もう一つの理由として、イネいもち病菌内の

MoCV1-D の構造タンパク質として存在する時に SUa 領域は内部にフォールディングされており抗原提示性が低い可能性が考えられる。ここであらためて Figure 30 に注目し APU10-199A(3d)と APU10-199A(14d)のシグナル強度を比較してみると、同じ一次抗体濃度での結果において APU10-199A(14d)でより強いシグナルが得られたことが分かる。このことから、SUa 領域は表面ではなく内部にフォールディングされていて、培養期間の長期化にともなうウイルス粒子タンパク質の分解が進むと表面付近に露出して生理活性を発揮する作用機構が想起される。

7. MoCV1-D 構造タンパク質の翻訳後修飾

APU10-199A(3d)の精製ウイルス粒子画分に対して CBB 染色及び一次抗体を抗 MoCV1-D rORF3p 抗血清または抗 MoCV1-A ORF3 C-proximal peptide 抗血清としてウェスタンブロット解析を行うと、MoCV1-D ORF3 及び ORF4 から翻訳される推定分子量 85 kDa よりも高分子量な約 95 kDa 相当のタンパク質が検出された。このような結果は先行研究においても得られており、MoCV1-A ORF4p をメタノール資化性酵母である *Pichia pastoris* で分泌生産させた時、その培養上清に対して抗 MoCV1-A ORF4p 抗体を用いてウェスタンブロット解析すると 85 kDa の他、約 100 kDa 相当のタンパク質がメジャーに検出された(Urayama et al., 2016a)。MoCV1-A ORF3p で同様の実験は行っていないが、このような高分子側への分子量のシフトは目的タンパク質への糖鎖修飾あるいはリン酸化などの翻訳後修飾の可能性が考えられた。本研究では実際、多糖類を非選択的に検出可能な PAS 反応を染色原理とする Pierce™ Glycoprotein Staining Kit を用いて糖タンパク質の In-Gel Detection を行った。すると、APU10-199A (3d)において 95 kDa 相当の分子量でマゼンタ色の微弱なバンドが検出された。このことから、やはり APU10-199A (3d)から精製した MoCV1-D ORF3p は宿主内で糖鎖修飾されており、*P. pastoris* だけでなく本来の宿主であるイネいもち病菌内で MoCV1-D の構造タンパク質が翻訳後修飾された痕跡を見出すことができた。今後、抗リン酸化抗体を用いたウェスタンブロット解析でウイルス粒子タンパク質へのリン酸化の有無を調査する必要がある。*Victorivirus* ではあるが Hv190S において粒子構造タンパク質とリン酸化の関係が言及されている(Ghabrial et al., 2014)。

8. MoCV1-D ORF4p の生理活性

先行研究において、ベトナム由来の MoCV1-A ORF4 タンパク質の *S. cerevisiae* や *C. neoformans* 内における強発現が、宿主細胞に対して Cytological damage を誘導することが分かっている(Urayama et al., 2012; Urayama et al., 2014a)。MoCV1-D ORF4 と MoCV1-A ORF4 のアミノ酸配列は Identity: 90.9%・Similarity: 94.5%で若干の違いがあるが、pRST426 シャトルベクターで DORF4p を *S. cerevisiae* 内に高発現させると、DORF4 形質転換体は pRST426-empty vector 形質転換体と比較して OD₆₀₀ 値及び生菌細胞数で低い値を示した。以上の結果から、MoCV1-D ORF4p は *S. cerevisiae* の細胞に傷害を生じさせ、MoCV1-A ORF4p と同じような生理活性を有することが分かった。また、MoCV1-A ORF4 において、全長 ORF4 領域から他種の *Chrysoviridae*-cluster II に属するウイルスがコードするタンパク質と特に相同性の高い truncated 領域 (SUa)も *S. cerevisiae* に対して細胞傷害活性を示した(Urayama et al., 2016a)。

F. graminearum に感染し *Chrysoviridae*-cluster II に分類される FgV-ch9 は、宿主菌の弱毒化を引き起こすことが分かっている。そして、この FgV-ch9 の CP である P3 をウイルスフリーな *F. graminearum* 内で発現させると、コロニー生育の抑制、胞子形成抑制や病原性低下などオリジナルのウイルス感染株のような表現型を示す(Bormann et al., 2018)。FgV-ch9 や P3 の存在によって引き起こされる宿主の弱毒化と関連する宿主因子としては virus response 1 (*vr1*)と呼ばれる mRNA-binding protein も同定された。FgV-ch9 感染株や P3 発現株では *vr1* の発現レベルが低下し、さらに *vr1* 欠損株ではウイルス感染株のような弱毒化が誘導されることが明らかとなった。FgV-ch9 の P3 と宿主因子 *vr1* の直接的な相互作用は未知であるが、マイコウイルス由来の構造タンパク質が宿主菌を弱毒化する分子機構が紐解かれつつある。MoCV1 の ORF4p と FgV-ch9 の P3 はアミノ酸配列レベルで近縁ではないものの、MoCV1-A SUa 領域には FgV-ch9 と保存性のあるモチーフを含んでいることから、これらは機能的にオルソログの関係にあるのかもしれない。

9. MoCV1-D と MoV2 の水平伝播性の違い

本稿では、菌糸融合法の他、プロトプラスト-PEG 法によるウイルス粒子の直接導入によって MoCV1-

D や MoV2 の水平伝播性を検証した。まず菌糸融合法では、APU10-199A 株をウイルスドナー株、遺伝的バックグラウンドの全く異なる P2 株をレシピエント株として対峙培養し菌叢接着部をハイグロマイシン含有 OMA 上で 4 回選抜培養し、2 株の菌糸融合候補株を得た。これらの株では、MoCV1-D の dsRNA5 を除く dsRNA1-4 が検出され、ショ糖濃度勾配遠心で精製したウイルス粒子画分から主要な構造タンパク質と MoCV1-D ウイルス粒子が検出された。また、宿主 DNA 多型を確認することで候補株は間違い無くレシピエント株由来の細胞であることが保証され、菌糸融合によって MoCV1-D が P2 へ水平伝播できることが明らかとなった。一方で、MoV2 は菌糸融合株から RT-PCR で非検出であり、菌糸融合を介して P2 へ水平伝播できない可能性が示唆された。さらに、プロトプラスト-PEG 法を用いて Virus-free P2 株や MoCV1-D- and MoV2-free APU10-199A 株プロトプラスト内へ精製ウイルス粒子画分の導入を試みた。感染処理後に再生したプロトプラスト由来のコロニーを 3 回継代培養し、菌体から精製した dsRNA を鋳型として RT-PCR によって MoCV1-D あるいは MoV2 感染成否を判定した。すると、Virus-free P2 株と MoCV1-D- and MoV2-free APU10-199A 株の両株において MoCV1-D の感染を確認できたが、MoV2 特異的増幅産物は全く検出されなかった。本実験に用いた APU10-199A 株由来精製ウイルス粒子画分において、MoCV1-D の構造タンパク質は確認できたものの、MoV2 は 5.2 kb dsRNA の存在を確認したのみで粒子として同画分に存在していなかった可能性も少なからず考えられるが、MoV2 は本法では人為的に感染させることができないと考えられた。MoCV1-D と MoV2 で水平伝播性が異なることが 2 つの感染手法で明らかとなったが、なぜ MoV2 のみが P2 株や MoCV1-D- and MoV2-free APU10-199A 株に伝播できないのか、その理由は不明である。考えられる要因の一つとして、広範な真核生物において外来 dsRNA を siRNA (small interfering RNA) へ分解するために利用される RNA サイレンシング機構によって MoV2 の水平伝播が妨げられているのかもしれない。M. oryzae Ken 60-19 株から見出された MoV2 の場合では、宿主細胞内で MoV2 由来の siRNAs が検出されたものの、その蓄積レベルは CHV1 のケースと比較して顕著に低いことが報告された。しかし、Nicotiana benthamiana を用いた Agrobacterium infiltration assay と M. oryzae 内での MAGGY 由来 siRNA を指標とした解析において、MoV2 がコードする CP と RdRp はともにサイレンシングサプレッサーとしての活性は見出されなかった(Himeno et al., 2010)。このような既報を踏まえると、菌糸融合株や VP 感染処理をした P2 株や MoCV1-D- and MoV2-

free APU10-199A 株で MoV2 由来 siRNA の蓄積レベルを調査する必要があるかもしれない。反対に、MoCV1-D が容易に水平伝播した要因として、未だに機能が未知である ORF2 から翻訳されるタンパク質がサイレンシングサプレッサー様の活性を有するのかもしれない。ORF2はBLASTp検索でも MoCV1s のと BdcV1 の ORF2 が候補に挙がるのみで、他の *Chrysoviridae*-cluster II ウイルスとの相同性はほとんどない。*Chrysoviridae*-cluster II に属する *Aspergillus mycovirus* 1816 (AmV1816)では、*Aspergillus nidulans* 内で Inverted-repeat-transgene (IRT)由来の siRNA レベルを抑制することが報告されている(Hammond et al., 2008)。

10. 菌糸細胞から培養上清へのマイコウイルスの流出

本研究では、APU10-199A 株を 4 週間以上フラスコ振盪培養した時の培養上清やジャーファーマンターで 2 週間以上培養した時の培養上清から、MoCV1-D・MoV2・MoPV1 の dsRNA が検出された。これまで報告されてきた MoCV1-A(Urayama et al., 2010)や MoCV1-B(Urayama et al., 2014a)だけでなく、MoCV1-D でも培養上清へのウイルス RNA 及び構造タンパク質の流出現象が確認されたことから、この現象は MoCVs にとって普遍的である可能性が示唆された。フラスコ振盪培養の上清中から検出された MoCV1-D dsRNA の濃度はおよそ 1 µg/ml と高濃度であるが、抗 MoCV1-D rORF3p 及び抗 MoCV1-D rORF4p 抗血清を用いたウェスタンブロット解析ではシグナルが微弱かつスメア状に検出された。このことから、MoCV1-D の構造タンパク質は培養上清に存在するものの崩壊しやすい状態であると考えられた。本研究では培養上清の濃縮画分を TEM 観察していないが、培養上清に放出された MoCV1-D や MoV2 の dsRNA はもはやウイルス粒子のような強固なタンパク質によってパッケージングされておらず、これらの dsRNA は崩壊しかかったウイルス構造タンパク質あるいは何らかの膜成分に包埋されている可能性が考えられた。たとえウイルス粒子構造が崩壊した場合でも構造タンパク質は RNA との結合能は持ち続けており、一定の期間を経ても dsRNA 分子を保護していると考えられる。MoCV1-D dsRNA が長期の培養期間に渡って培養上清から検出されたことを考慮すると、本現象はイネいもち病菌の培養長期化にともなって λ ファージのように溶菌した結果として生じたわけではなく、MoCV1-D は細胞崩壊のプロセス中に放出されたと考えられる。マイコウイルスが液体培養中に細胞外へ流出する現象につ

いての報告例は極めて稀であるが、近年では真核生物において、細胞が小型の膜小胞を細胞外へと分泌する現象に関する報告が増加しており、これらは細胞外小胞 (Extracellular vacuoles; EVs)あるいはエキソソームと総称される。しかも、この EVs 内に宿主細胞由来の RNA やタンパク質等の分子が内蔵され、他細胞へと取り込まれる細胞間情報伝達媒体として注目されている(Colombo et al., 2014)。Leishmania 原虫においては Totiviridae 属に分類される Leishmania RNA virus 1 (LRV1)は宿主の産生するエキソソームと同調し、これをエンベロープとして利用して他宿主へ伝播することが分かった(Atayde et al., 2019)。このように宿主由来の EVs とウイルスの関係が明らかにされつつある。

今後細胞外に放出された MoCV1-D や MoV2 の解析を進めるにあたり、細胞外面分から MoCV1-D や MoV2 を大量かつ高い純度で回収する必要がある。本稿で前述したような、培養上清をろ過した後に1度の超遠心分離で濃縮した画分では精製度が十分でない可能性がある。実際、この濃縮ウイルス画分に対して行ったウェスタンブロット解析では、細胞内から精製したウイルス粒子画分に対してのウェスタンブロット解析よりもシグナルが微弱でありレーン全体にスメア状に検出された。最近では、エキソソームの精製手法に関しても報告が充実してきており、それらを参考にすると、例えば超遠心分離で一度濃縮した培養上清画分を再懸濁した後にショ糖濃度勾配超遠心や塩化セシウム密度勾配超遠心よりも細胞成分へ与える損傷が少ないパーコール密度勾配超遠心を用いてより精製度を高める方法が考えられる(Atayde et al., 2019)。細胞外面分から検出される MoCV1-D や MoV2 の RNA や粒子タンパク質が何らかの膜性構造体に内蔵されているかどうかを検証するためには、細胞外面分の他に、ウイルス感染株の菌糸体から抽出・精製したウイルス粒子画分やセルロースパウダーで精製した dsRNA を対照としてショ糖濃度勾配超遠心やパーコール密度勾配超遠心で分離する方法が有効である。また、細胞外面分に対して TritonX-100 等の界面活性剤を処理した区を対照とする方法も考えられる。密度勾配超遠心で分画した細胞外面分とこれらの対照区において、ウイルス由来の RNA やタンパク質が検出される画分の違いを比較することで、これらが膜性構造体に内蔵されているかどうか検証できる。

11. イネいもち病菌体からのメラニン生合成系中間体の抽出

今回、1,8-DHN 以外の他のメラニン生合成系中間体の標準品が入手できなかったため、mDa オーダー

で分子量を識別できる高精度かつ高分解能な UHPLC-ToF-MS を用いて前述の HPLC 分析で検出されたそれぞれの化合物の同定を試みた。HPLC で検出された代表的なピークを分画した後に UHPLC-ToF-MS による定性分析を行った結果、MoCV1-D-free APU10-199A 株と P2 株で *Rt.* 4.9 min のピークが scytalone であると同定した。しかし、HPLC で *Rt.* 8.5 min と 10 min のピークはメラニン生合成系の間体に該当しなかった。HPLC での検出条件は UV 334 nm で通常よりある程度選択性は高いものの、これらのピークには 2 重結合を多く含む別の化合物が含まれていると考えられる。

MoCV1-D-free APU10-199A 株のアセトン抽出画分からピーク分取せずに UHPLC-ToF-MS 分析を行った時、UPLC の *Rt.* 4.6 min と 4.75 min において UV 334 nm のピークが僅かに検出され、1,3,8-THN、vermelone 及び 1,8-DHN のプロトン脱離分子に該当する抽出イオンクロマトグラムでプロダクトイオンも僅かに検出された。HPLC クロマトグラムにおいても、おそらくこれらに該当するであろう *Rt.* 13 min、13.5 min のピークが MoCV1-D-free APU10-199A 株だけでなく APU10-199A 株からも検出されている。今後、これらのピークが 1,3,8-THN、vermelone、1,8-DHN のどれかに帰属されるかどうか、ピーク分取して UHPLC-ToF-MS で同定する必要がある。しかし、抽出後のサンプル溶液中で反応が進んでしまった可能性も考えられる。

本抽出条件では、HPLC で検出された代表的なピークの中でメラニン生合成系の間体へ帰属できたピークは 1 つのみであり、他の中間体は検出できなかった。この要因として、イネいもち病菌内でのメラニン生合成において安定な中間体として scytalone でプールされており他の中間体は不安定であるか速やかに反応が進行している可能性が考えられる。また、使用する抽出溶媒についても再検討が必要であり、例えば抽出溶媒をアセトン:水=8:2 混合溶媒やメタノールもしくはアセトニトリルの単一溶媒に変更する場合は考えられる。アセトンと水の混合溶媒とメタノール単一溶媒を用いた場合は抱合体も抽出されやすくなるため、ギ酸で酸性化した後固相抽出でクリーンアップしてから逆相クロマトグラフィーで分析すると、Figure 52 とは異なるクロマトグラムが得られる可能性がある。また、Kurahashi et al, (1998)や Hamada et al, (2014)の報告では、液体培養上清から酢酸エチルに転溶させて中間体を抽出している。本実験では培養上清からうまく抽出できていないので、今後再検討する必要がある。

12. MoCV1-D のイネいもち病菌に対する作用点

本実験では、Malonyl-CoA \Rightarrow Pentaketide \Rightarrow 1,3,6,8-THN の反応を触媒する PKS を阻害する MBI-P 剤として Tolprocarb、1,3,6,8-THN \Rightarrow scytalone/1,3,8-THN \Rightarrow vermelone の反応を触媒する還元酵素を阻害する MBI-R 剤として Tricyclazole、scytalone \Rightarrow 1,3,8-THN/vermelone \Rightarrow 1,8-DHN の反応を触媒する脱水酵素を阻害する MBI-D 剤として Carpropamid を用いた。これらのメラニン合成阻害剤を添加して培養した MoCV1-D-free APU10-199A 株の抽出物のクロマトグラムは APU10-199A 株のものと全く異なっていた。このことから、MoCV1-D は既知のメラニン合成阻害剤のようにメラニン生合成系の中に特定の作用点を阻害するわけではなく、生合成系のさらに上流に作用点を持つあるいは何らかの細胞内イベントに影響を与えることによって副次的にメラニン蓄積を抑制しコロニーのアルビノ化が生じる可能性が考えられた。

この可能性を検証する手段として、もし各中間体の標準品を使用できれば、阻害試験だけでなく中間体化合物のフィーディング試験によっても作用点に関する明瞭な知見を得ることができるだろう。APU10-199A 株に対してそれぞれの中間体化合物共存下で培養を行い、菌叢の色素沈着が正常に復帰するかどうか試験することは興味深い。菌叢のアルビノ化を解消できない中間体化合物があればウイルスの作用点は単一であると予想される。反対に、どの中間体化合物を添加しても APU10-199A 株の菌叢のアルビノ化が正常な色素沈着へ復帰するのであれば、おそらくウイルスの作用点がメラニン生合成系の中に単一に存在するわけではないと予想される。この場合、メラニン生合成系のさらに上流で何らかの攪乱が生じている可能性が挙げられるが、本合成系の上流には前駆体として Malonyl-CoA、さらに上流には Acetyl-CoA がある。Acetyl-CoA は真核生物のペルオキシソーム内で脂肪酸の β 酸化によって産生され、グリオキシル酸回路などの代謝系に関与する重要な分子である(Kubo et al., 2013)。また、ペルオキシソームはほとんどの真核生物で存在する 1 重膜の細胞小器官で、多様な代謝系に関与する酵素を区分化している。その代謝系とは、脂肪酸の β 酸化やグリオキシル酸回路だけでなく、TCA 回路やコレステロール、アミノ酸抗生物質、活性酸素種、メタノール同化など多様である(Brown and Baker, 2008)。また、ペルオキシソームの機能は糸状菌においては *Penicillium chrysogenum* における Penicillin の二次代謝や分生子形成(Kiel et al., 2005; Kiel et al., 2004)、*A. alternata* における宿主特異的毒素 (HST; Host selective toxin) (Imazaki et al., 2010)、Woronin body 形成にも関与している。つまり、ペルオキシソームの機能は病

原糸状菌が宿主植物へ病原性を発揮するために重要であり、*M. oryzae* だけでなく *Colletotrichum orbiculare* においても peroxin やペキシファジー関連遺伝子の欠損株は病原性が欠如する。このように、ペルオキシソーム内で起こる脂肪酸の β 酸化によって生成される Acetyl-CoA や peroxin は付着器のメラニン化を介した病原性の発揮に強く相関するため、MoCV1-D 感染によってこれらの産生・発現が抑制されていないかどうか調べる必要がある。また、Wheeler, (1988)や Hamada et al., (2014)によると、メラニン合成阻害剤の作用点を調べるために、菌叢粉末からリン酸バッファを用いて生合成系に関与する酵素を抽出し、この Cell free extract に前駆体として Malonyl-CoA を添加して *in vitro* で反応進行させる系がすでに確立されている。この反応系に MoCV1-D VP や ORF タンパク質を添加して阻害されるかどうか試験することは興味深い。

本研究では、MoCV1-D 感染が scytalone 含量の低下を伴ってイネいもち病菌のメラニン生合成系やさらに上流の反応系を攪乱している可能性が示唆された。上記の実験によって、MoCV1 のイネいもち病菌に対する作用機序を明らかにしたい。

図説

Table 2. 本研究で使用したプライマー

Primer name	Primer sequence	Note
AK199-dsRNA1-5'RACE	5'-CCACCATGTCATCTATGTCGTAC -3'	
AK199-dsRNA1-3'RACE	5'-AAGACGATGATAGATTACC GC -3'	
AK199-dsRNA2-5'RACE	5'-TGCCGATGCGCGTTGACCAAATG -3'	
AK199-dsRNA2-3'RACE	5'-GCTGACTTACTCGACGTGCTAAAG -3'	
AK199-dsRNA3-5'RACE	5'-CCAAACACATGTCGTCAATCGGCA -3'	Cloning of 5' or 3' terminal sequences of MoCV1-D, dsRNAs1-5
AK199-dsRNA3-3'RACE	5'-GACCGAAGGGTCGGATAACAGAG-3'	
AK199-dsRNA4-5'RACE	5'-TTCTCTGTCCTGACGTAGAAAACG-3'	
AK199-dsRNA4-3'RACE	5'-CGCGTACTGCACTTCCTACTAAG -3'	
AK199-dsRNA5-5'RACE	5'-CTGCTTGCTGAGCACTCATGGTC -3'	
AK199-dsRNA5-3'RACE	5'-GTGAGATAGTCGACGGATAACGTG-3'	
AK199-dsRNA5-1	5'-CAAGGAACCGGTGATGTAGCGACAC -3'	PCR to detect MoCV1-D dsRNA5 (nt830-1773)
AK199-dsRNA5-2	5'-GTGGTCCCTATAGCCGCACTCAC-3'	
AK199-dsRNA1-1 (1292-1314)	5'-TCCGCGTAATGCTCCAGCTTCAG-3'	PCR to detect MoCV1-D dsRNA1 (nt1292-1783)
AK199-dsRNA1-2 (1761-1783)	5'-TAGCTAATGTTCCGGCTGAATAAG-3'	
MoV2-detecte F 3877-3899	5'-AAGACCAGAGCAATCTTTGCCTG-3'	PCR to detect MoV2 dsRNA (nt3877-4073)
MoV2-detecte R 4052-4073	5'-CGGTGGCCACTCATCAGAGTAC-3'	
5HygroXho/TRUE RYOTA ASAOKA	5'-GCACTCGAGATGAAAAAGCCTGAACTCACCGCG -3'	PCR to detect Hygromycin B resistance gene
3HygroClaI Hiromitsu Moriyama	5'-GTATCGATTTCCTTTGCCCTCGGACGAGTGCTG -3'	
Pot2-TIR	5'-ACAGGGGGTACGCAACGTTA-3'	rep-PCR to detect TIR sequence of Pot2 element (Suzuki, et al., 2006)
AK199-cDNA-dsRNA4ORF-Bln1-5end-1	5'-AGCCTAGGATGGCGATGGGCACAACAGG -3'	Cloning for MoCV1-D ORF4 into pRST426 shuttle vector
AK199-cDNA-dsRNA4ORF-Hpa1-3end-1	5'-GTGTTAACTCAGCTGCTGCGGATAGAC -3'	
MoCV1-D-AKORF3-BamHI-5end	5'-ATTGGATCCATGGGCTTGACACTCGACCCG -3'	Cloning for MoCV1-D ORF3 into pCold vector
MoCV1-D-AKORF3-EcoRI-3end	5'-CTAGAATTCACACGACCGCTGCGCAATG -3'	
MoCV1-D-AKORF4-SacII-5end	5'-ATTGAGCTCATGGCGATGGGCACAACAGGCGG-3'	Cloning for MoCV1-D ORF4 into pCold vector
MoCV1-D-AKORF4-XbaI-3end	5'-CTATCTAGATCAGCTGCTGCGCGATAGACGTC-3'	
U-19	5'-GTTTTCCAGTCACGACGT -3'	
RV-N	5'-TGTGGAATTGTGAGCGG -3'	
AK199-dsRNA4-1	5'-GACGGTCTTGGAAATTGGTCTGTAG -3'	Confirm sequences of MoCV1-D ORF4 ligated into pRST426 shuttle vector
AK199-dsRNA4-2	5'-CAATAGCGAATTCCTTACAAGCG -3'	
AK199-dsRNA4-3	5'-GCTATCGTATCCTTGGCGGAAAAG -3'	
AK199-dsRNA4-4	5'-CGTCTAGTAAAACCAGGCGGTAG -3'	
Sc-TDH3promoter-F	5'-GACGGTAGGTATTGATTGTAATTC-3'	
PC3-T7 loop primer	5'-GGATCCCGGAATTCGGTAATACGACTCACTATA TTTTATAGTGAGTCGTATTA-3'	FLDS: fragmented and loop primer ligated dsRNA sequencing for dsRNA full-length cloning method
PC2	5'-CCGAATTCCTGGGATCC-3'	
EcoRI-EGFP-5'end	5'-CAGTACGCCAGTCCACCAACTTG -3'	Cloning of pAK2-Hyg-eGFP
EcoRI-EGFP-3'end	5'-CGAATTCCTACTTGTACAGCTCGTCCATG -3'	

Table 3. MoCV1 ウイルスゲノムセグメントの濃度比計測

試料名	ピークNo.	積算値	濃度比 (%)	定量値 (ng)	相対位置
MoCV1-A	1	55160	23.752	91.274	28.57
	2	49616	21.365	82.100	55.10
	3	127456	54.883	210.903	72.45
	総和	232232	100.00		
MoCV1-A-a	1	38696	15.911	64.031	28.57
	2	131712	54.156	217.946	59.18
	3	72800	29.933	120.463	73.47
	総和	243208	100.00		

Table 4. MoCV1-A-aとMoCV1-Aの塩基・アミノ酸配列相同性

	塩基配列		アミノ酸配列	
	Identity (%)	Similarity (%)	Identity (%)	
dsRNA1	99.4	99.8	99.4	
dsRNA2	99.4	100	99.7	
dsRNA3	99.2	100	99.7	
dsRNA4	99.2	100	100	
dsRNA5	99.2	99.8	99.0	

Table 5. MoCV1-AとMoCV1-A-aの塩基配列及びアミノ酸配列置換

dsRNA1			dsRNA2		
	MoCV1-A	MoCV1-A-a		MoCV1-A	MoCV1-A-a
5' UTR	A54	G54	5' UTR	T21	A21
	G55	A55		G59	A59
ORF	G136/Gly6	A136/Asp6	ORF	A524	G524
	A359	C359		A641	G641
	T685/Ile189	C685/Thr189		A660/Thr106	G660/Ala106
	G765/Ala216	A765/Thr216		C670/Pro109	A670/Gln109
	T854	C854		A816/Thr158	G816/Ala158
	T1099/Val327	C1099/Ala327		T1515	C1515
	C1139	T1139		G1583	A1583
	A1319	G1319		A1691	G1691
	A1334	G1334		A1835	G1835
	T1540/Phe474	C1540/Ser474		T2192	C2192
	G1757	A1757		A2228	G2228
	G1913	A1913		G2282	A2282
	G1964	A1964		A2345	G2345
	G1979	T1979		G2576	A2576
	G2429	A2429		A2666	G2666
	G2486	A2486		A2777	G2777
	A2651	C2651		G3056	A3056
	A3057/Ile980	G3057/Val980			
G3357	C3357				

dsRNA3		
	MoCV1-A	MoCV1-A-a
ORF	C341	T341
	A436	G436
	G583	A583
	A637	G637
	T775	C775
	C1102	T1102
	G1237	A1237
	C1456	T1456
	A1960	G1960
	A2071	G2071
	A2103/His653	G2103/Arg653
	G2310/Arg722	A2310/Lys722
	A2431	G2431
	G2512	A2512
3' UTR	T2566	C2566
	G2619	A2619
	T2824	C2824
	G2854	A2854
	T2910	C2910
	C2963	T2963
	G2975	A2975
	C2977	A2977

dsRNA4		
	MoCV1-A	MoCV1-A-a
5' UTR	T104	C104
	C139	A139
ORF	A291	G291
	A324	G324
	C417	T417
	T525	C525
	A627	G627
	T717	C717
	A936	G936
	A954	G954
	C1105	T1105
	T1129	C1129
	C1266	T1266
	A1908	G1908
	C2148	T2148
	C2376	T2376
	C2606	T2606
	G2673	T2673
	G2683	A2683
	A2689	G2689
	A2916	C2916
	A2922	G2922
	C2946	A2946

dsRNA5		
	MoCV1-A	MoCV1-A-a
5' UTR	T63	C63
ORF	C314	T314
	A528/Thr117	G528/Ala117
	G541/Arg121	A541/Gln121
	A598/Asn140	G598/Ser140
	A689	G689
	A716	G716
	G746	A746
	T764	C764
	A831/Thr218	G831/Ala218
	C841/Pro221	T841/Leu221
	A863	G863
	A1111/Asp311	G1111/Gly311
	A1439	G1439
	A2180	C2180
	C2220	A2220
	C2409	T2409
	A2452	G2452
	G2619	A2619
	C2626	T2626
	G2651	A2651
	T2723	G2723

Table 6. MoCV1-DとMoCV1-A, MoCV1-B間の核酸配列の相同性解析

MoCV1-D dsRNA segments	Viral dsRNA segments	Length (nt)	Identity (%)
dsRNA1 (3,557 nt)	MoCV1-A dsRNA1	3,554	81.1
	MoCV1-B dsRNA1	3,558	81.0
dsRNA2 (3,251 nt)	MoCV1-A dsRNA2	3,250	78.9
	MoCV1-B dsRNA2	3,254	77.5
dsRNA3 (2,926 nt)	MoCV1-A dsRNA3	3,074	75.8
	MoCV1-B dsRNA3	2,874	72.2
dsRNA4 (2,921 nt)	MoCV1-A dsRNA4	3,043	76.0
	MoCV1-B dsRNA4	2,997	73.9
dsRNA5 (2,603 nt)	MoCV1-A dsRNA5	2,879	63.6
	MoCV1-B dsRNA5	2,880	63.5

Table 7. MoCV1-Dと他のchrysovirusesとのアミノ酸配列の相同性解析

MoCV1-D ORFs	Viral ORFs	Length (aa)	Identity (%)	Similarity (%)
ORF1 (1,127 aa)	MoCV1-A ORF1	1,127	93.9	99.7
	MoCV1-B ORF1	1,127	93.4	99.6
	TcV2 ORF1	1,132	50.5	65.0
	WiV29 ORF1	916	52.8	67.1
	PjCV2 ORF1	1119	40.2	56.7
	AmV1816 ORF1	1084	38.8	55.4
	AaCV1 ORF1	1117	38.9	55.7
	BdCV1 ORF1	1116	38.7	54.9
	FodV1 ORF1	1,139	34.2	51.1
ORF2 (934 aa)	MoCV1-A ORF2	934	83.7	88.3
	MoCV1-B ORF2	934	82.5	88.4
	BdCV1 ORF2	746	27.3	43.2
ORF3 (800 aa)	MoCV1-A ORF3	799	90.6	99.0
	MoCV1-B ORF3	784	88.8	97.7
	BdCV1 ORF3	717	32.9	46.8
	PjCV1 ORF3	687	33.6	48.6
	AaCV1 ORF3	774	31.4	47.0
	FodV1 ORF3	878	30.5	47.9
ORF4 (811 aa)	MoCV1-A ORF4	812	90.9	94.5
	MoCV1-B ORF4	811	89.2	92.6
	BdCV1 ORF4	768	27.4	44.8
	PjCV2 ORF4	783	28.9	46.1
	PjCV1 ORF4	770	26.3	42.1
	AaCV1 ORF4	771	26.5	41.4
	FodV1 ORF4	852	22.5	39.4
ORF5 (661 aa)	MoCV1-A ORF5	611	70.3	79.0
	MoCV1-B ORF5	666	65.9	74.4

Table 8. Abbreviations of viruses and accession numbers for their RdRp genes used in the phylogenetic analysis.

Virus name	Abbreviation	Accession number
Agaricus bisporus virus 1	AbV1	CAA64144.1
Amasya cherry disease associated chrysovirus	ACDACV	YP_001531163.1
Aspergillus fumigatus chrysovirus	AfuCV	CAX48749.1
Aspergillus mycovirus 1816	AmV1816	ABX79996.1
Botryosphaeria dothidea chrysovirus 1	BdCV1	YP_009353026.1
Brassica campestris chrysovirus 1	BcCV1	AKU48197.1
Cryphonectria nitschkei chrysovirus 1	CnCV1	ACT79256.1
Fusarium graminearum dsRNA mycovirus-2	FgV2	ADW08802.1
Fusarium graminearum mycovirus-China 9	FgV-Ch-9	ADU54123.1
Fusarium oxysporum chrysovirus 1	FoCV1-Shiraz	ABQ53134.1
Fusarium oxysporum f. sp. dianthi mycovirus 1	FodV1	YP_009158913.1
Grapevine associated chrysovirus 1	GaCV1	ADO60926.1
Helminthosporium victoriae virus 145S	HvV145S	YP_052858.1
Magnaporthe oryzae chrysovirus 1-A	MoCV1-A	YP_003858286.1
Magnaporthe oryzae chrysovirus 1-B	MoCV1-B	YP_008914864.1
Magnaporthe oryzae chrysovirus 1-D	MoCV1-D	
Magnaporthe oryzae virus 2	MoV2	YP_001649206.1
Penicillium chrysogenum virus	PcV	YP_392482.1
Penicillium janczewskii chrysovirus 1	PjCV1	YP_009182332.1
Penicillium janczewskii chrysovirus 2	PjCV2	ALO50149.1
Persea americana chrysovirus	PaCV	AJA37498.1
Raphanus sativas chrysovirus 1	RsCV1	AFE83590.1
Saccharomyces cerevisiae virus L-A	ScVL-A	NP_620495.1
Tolypocladium cylindrosporum virus 2	TcV2	CBY84993.1
Verticillium dahliae chrysovirus 1	VdCV1	ADG21213.1
Wuhan insect virus 29	WiV29	APG76052.1

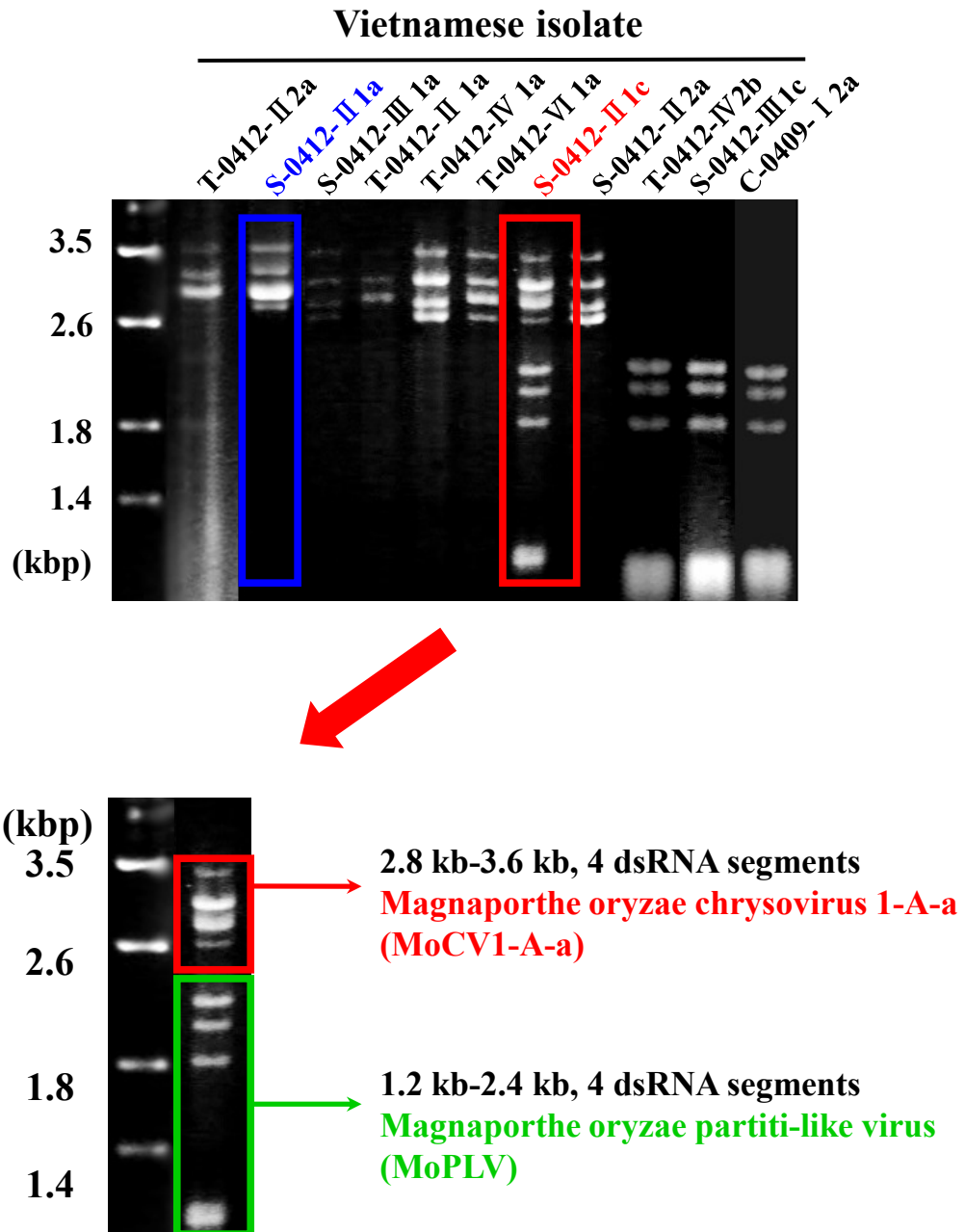


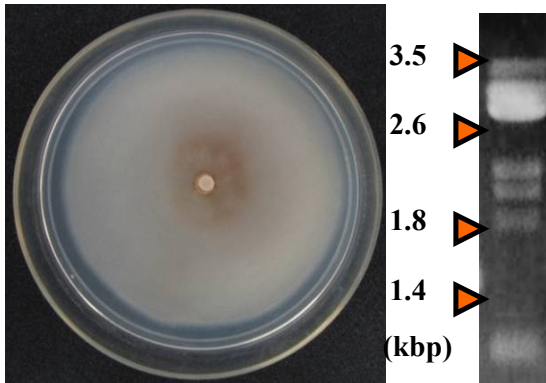
Figure 1

イネいもち病菌ベトナム分離株から検出されたマイコウイルス。

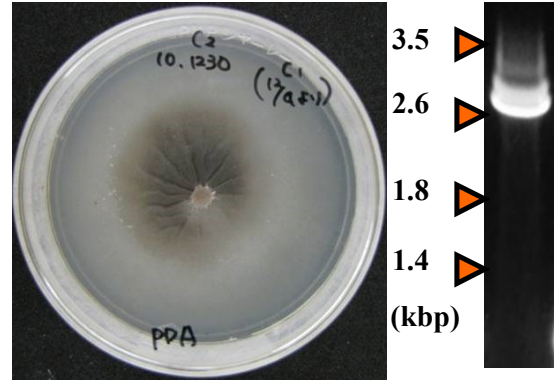
S-0412-II 1c株から8成分のdsRNAが検出された。2.8 kb-3.6 kbの4 dsRNAセグメントを *Magnaporthe oryzae chrysovirus 1-A-a*(MoCV1-A-a)、1.2 kb-2.4 kbの4 dsRNAセグメントを *Magnaporthe oryzae partiti-like virus*(MoPLV)と呼称した。

S-0412-II 1c株

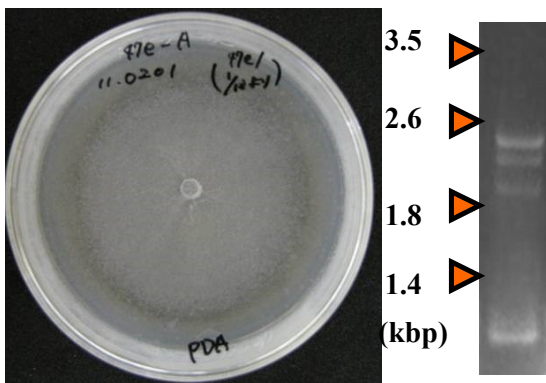
MoCV1-A-a, MoPLV混合感染株



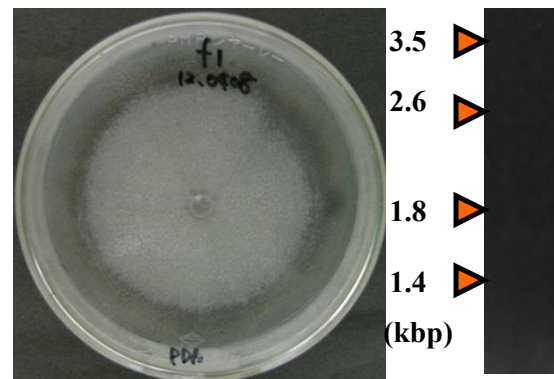
MoCV1-A-a単独感染株



MoPLV単独感染株



ウイルスフリー化株



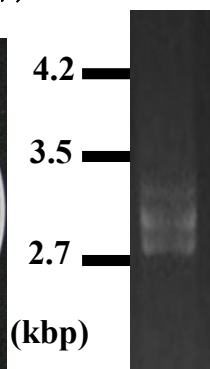
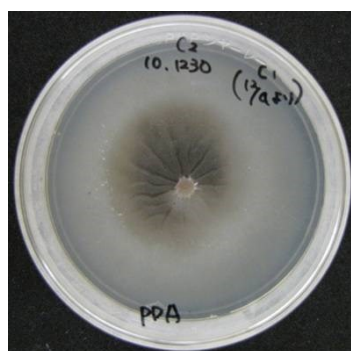
1%アガロースゲル、1×TAE
DNase I、S I nuclease処理

Figure 2

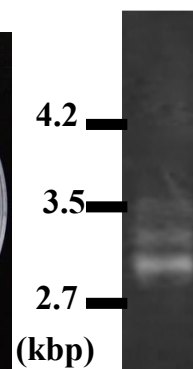
MoCV1-A-aとMoPLVがS-0412-II 1c株に及ぼす影響。

MoCV1-A-aとMoPLVの感染により引き起こされるPDA平板培地上におけるイネいもち病菌の表現型と、各菌株の培養サンプルからdsRNA抽出を行った結果を示した。

S-0412-II 1c株
(MoCV1-A-a単独感染株)

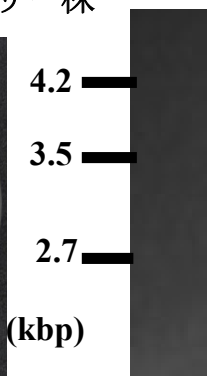
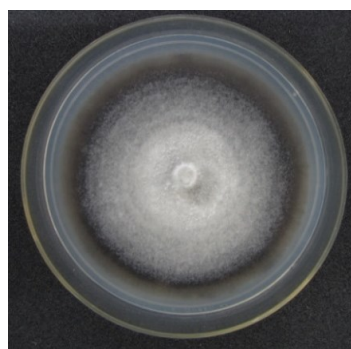


S-0412-II 1a株
(MoCV1-A感染株)



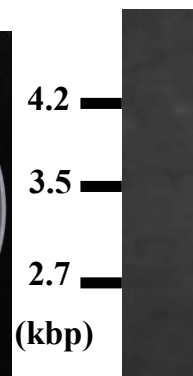
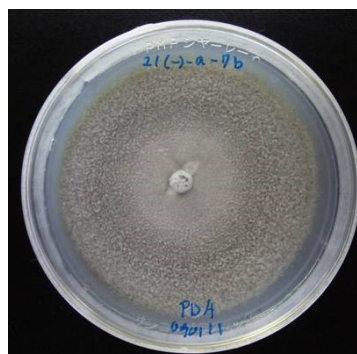
ウイルス感染フリー化

MoCV1-A-a/ MoPLVフリー株



PDA, 26°C

MoCV1-Aフリー株



1% Agarose
1×TAE

Figure 3

S-0412-II 1c株とS-0412-II 1a株の表現型の比較。

PDA培地上のS-0412-II 1c株とS-0412-II 1a株及びこれらのウイルスフリー化株の菌叢とdsRNA抽出結果を示した。

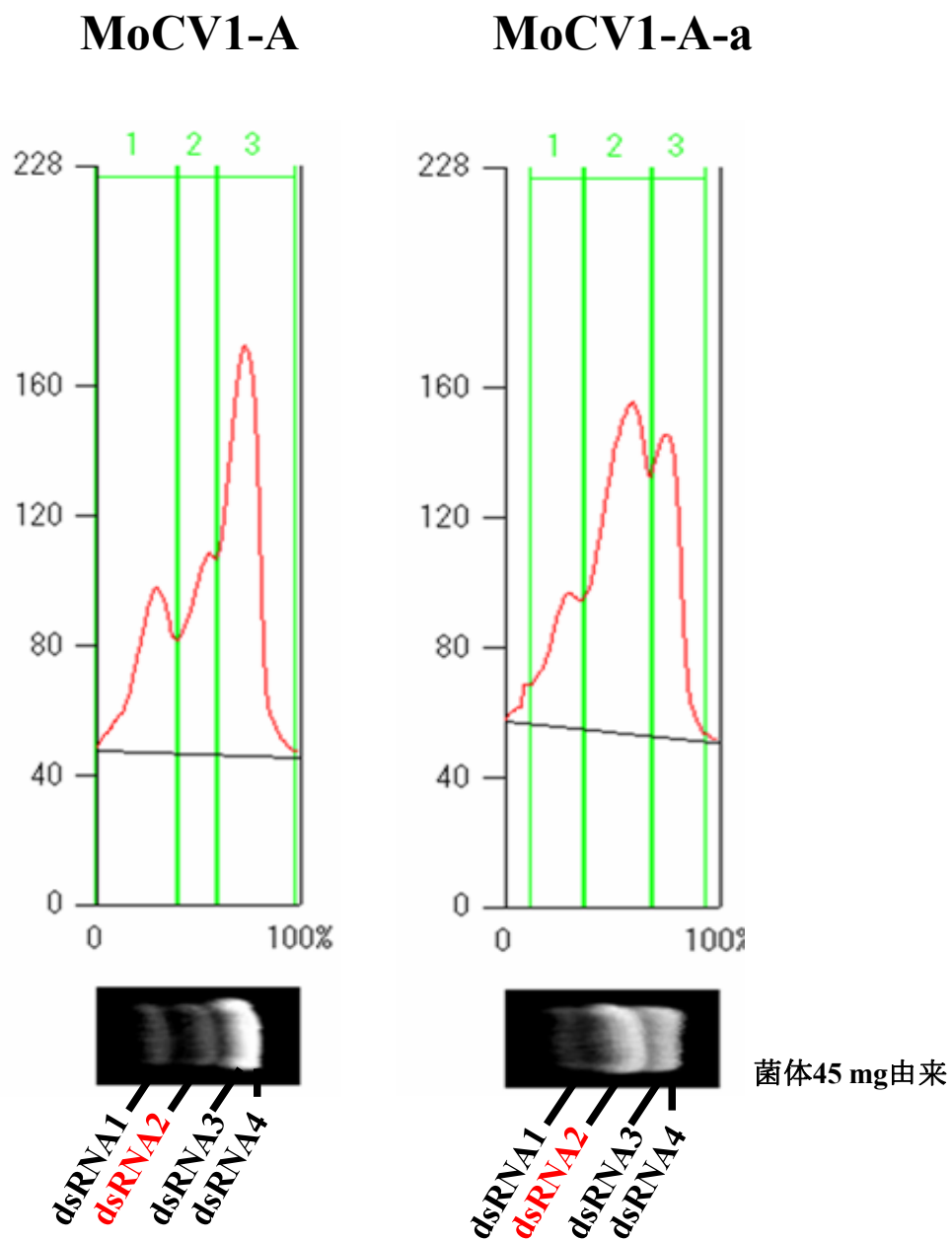


Figure 4

dsRNAセグメントのデンストメトリー計測。

アガロースゲル電気泳動で展開したMoCV1-AとMoCV1-A-aのdsRNAの各バンド強度をデンストメトリー計測によって数値化した。

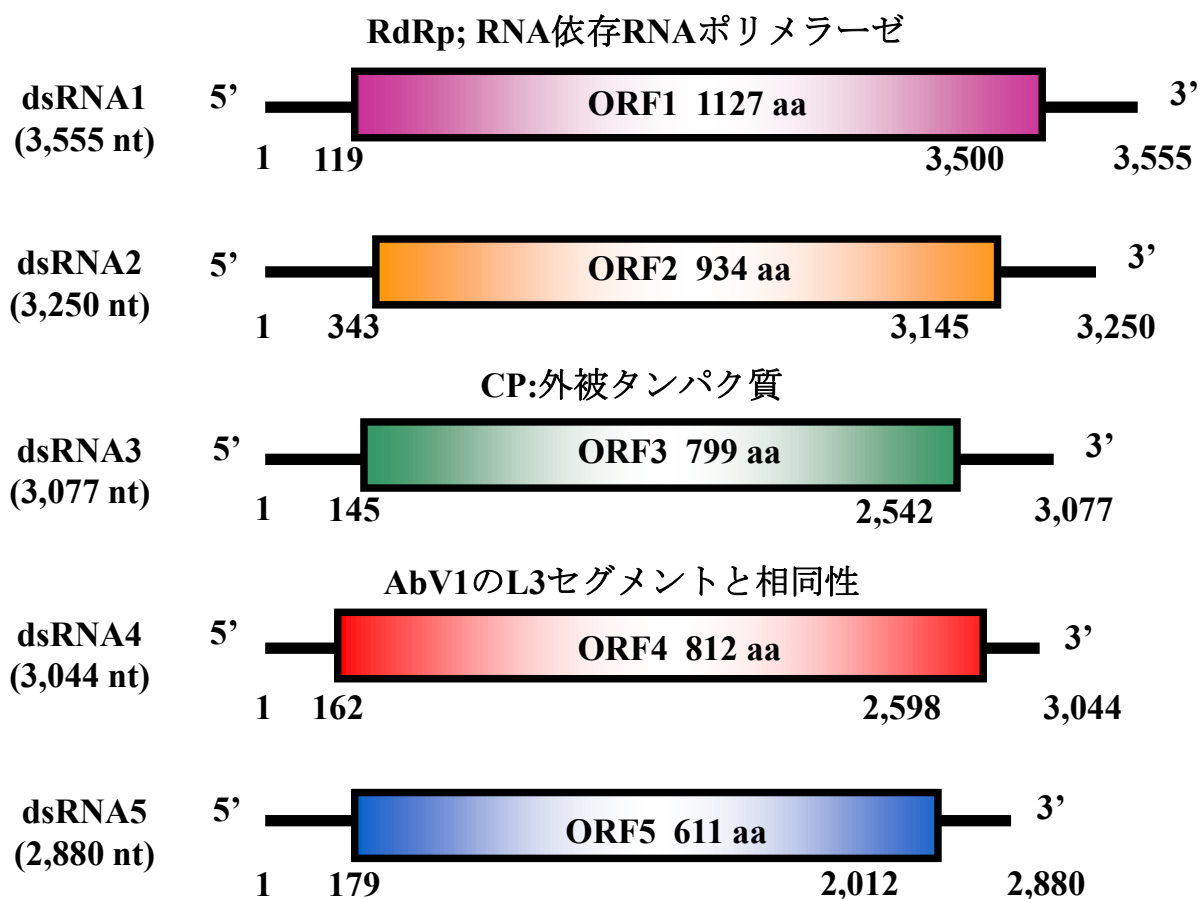


Figure 5

MoCV1-A-aのゲノムセグメント構造。

シーケンス解析により MoCV1-A-a ウイルスゲノムの全塩基配列を決定した。dsRNA1-5上のORF(Open Reading Frame)領域を図示した。

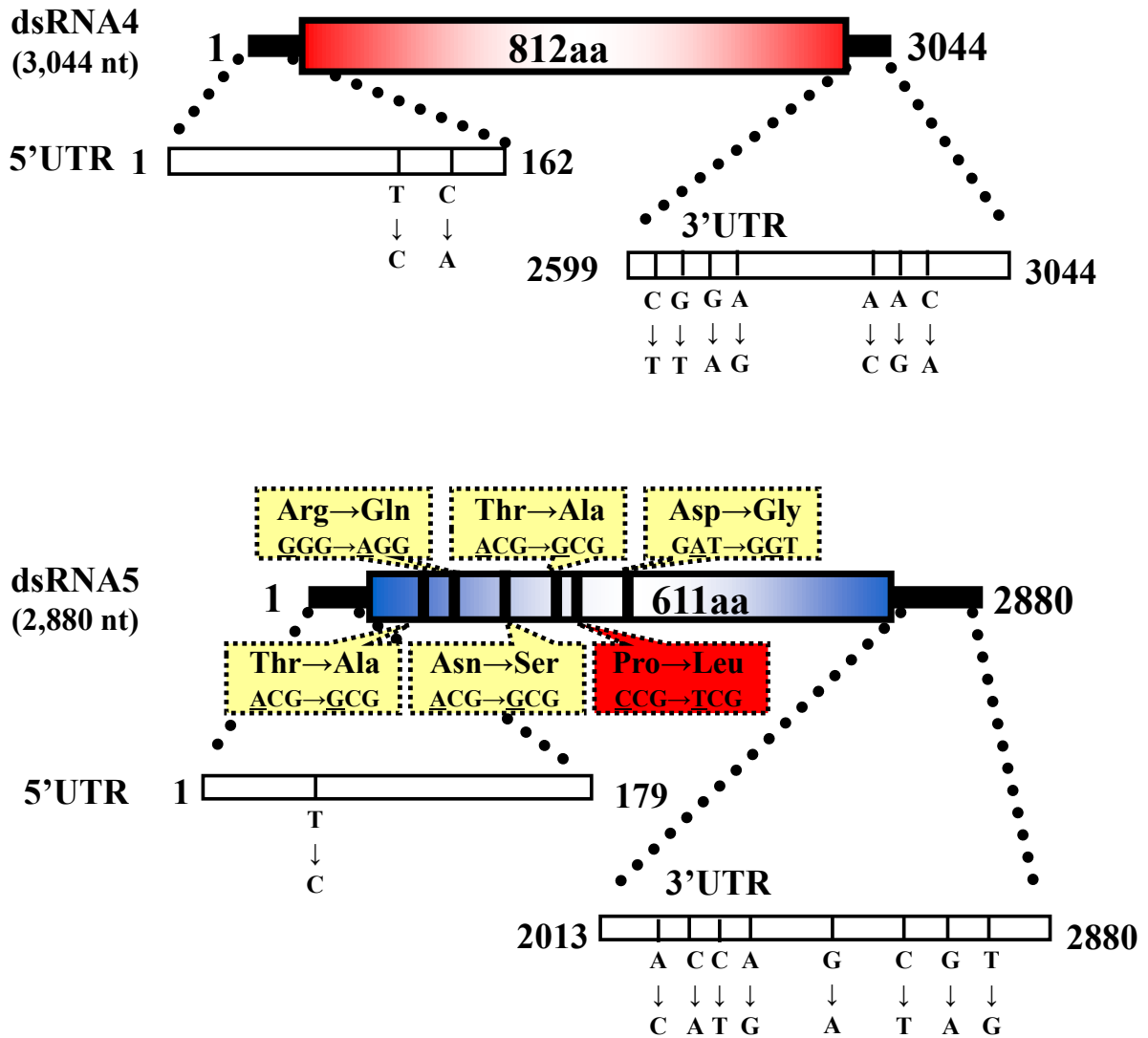


Figure 6

MoCV1-A-aとMoCV1-Aのウイルスゲノム上の塩基・アミノ酸置換。

MoCV1-A-aとMoCV1-AのdsRNA1~5上の5'-UTR、3'-UTR中の塩基置換、ORF中のアミノ酸置換を図示した。黄色枠はGENETYX上で類似性があるアミノ酸間の置換と判別、赤色枠は類似性がないアミノ酸間の置換と判別された。

S-0412-II 1c株を振盪培養
(YG:4 L, 50 rpm, 25日間)

生菌体を回収・乾燥
(乾重量:24.2g)

10倍量buffer A
(pH 7.4)

ミキサーで菌体破碎
大ミキサー:15 sec
→小ミキサー:30 sec

遠心分離
7,450 rpm (P45AT),
10 min, 4°C

上清回収
(メッシュでこす)

遠心分離
17,300 rpm (P45AT),
1h, 4°C

上清回収

遠心分離
35,800 rpm (P45AT),
1h, 4°C

沈殿
(上清は静かに捨てる)

遠心チューブ 1本当たり
100 µlの buffer B (pH 7.8)
を添加

4°C, 一晩

よく懸濁して沈殿回収

遠心分離
8,000 rpm (TOMY
MX-150), 1min, 4°C

上清回収

ショ糖密度勾配遠心
(ショ糖濃度10~40%)
24,000 rpm (RPS40T), 2.5h, 10°C

500 µlずつ分画

2本鎖RNA抽出

ウイルス存在画分を
超遠心チューブへ回収
buffer Bを肩口まで添加

4°C, 一晩

遠心チューブを転倒混和
サンプルをよく希釈する

遠心分離
37,000 rpm (P70AT),
1h, 4°C

上清を静かに捨て
沈殿を回収

少量のbuffer Bで
静かに懸濁

- ・ 2本鎖RNA抽出 (菌体1.0 g分)
- ・ 塩化セシウム密度勾配遠心
- ・ SDS-PAGE (菌体1.0 g分)
- ・ 透過型電子顕微鏡観察

※実験器具は予め冷やしておき、
実験操作は低温下 (4°C) で行う。

Figure 7

MoCV1-A-aウイルス様粒子の精製プロトコル。

上記のプロトコルに従ってウイルス様粒子を純化しTEMで粒子像を確認した。

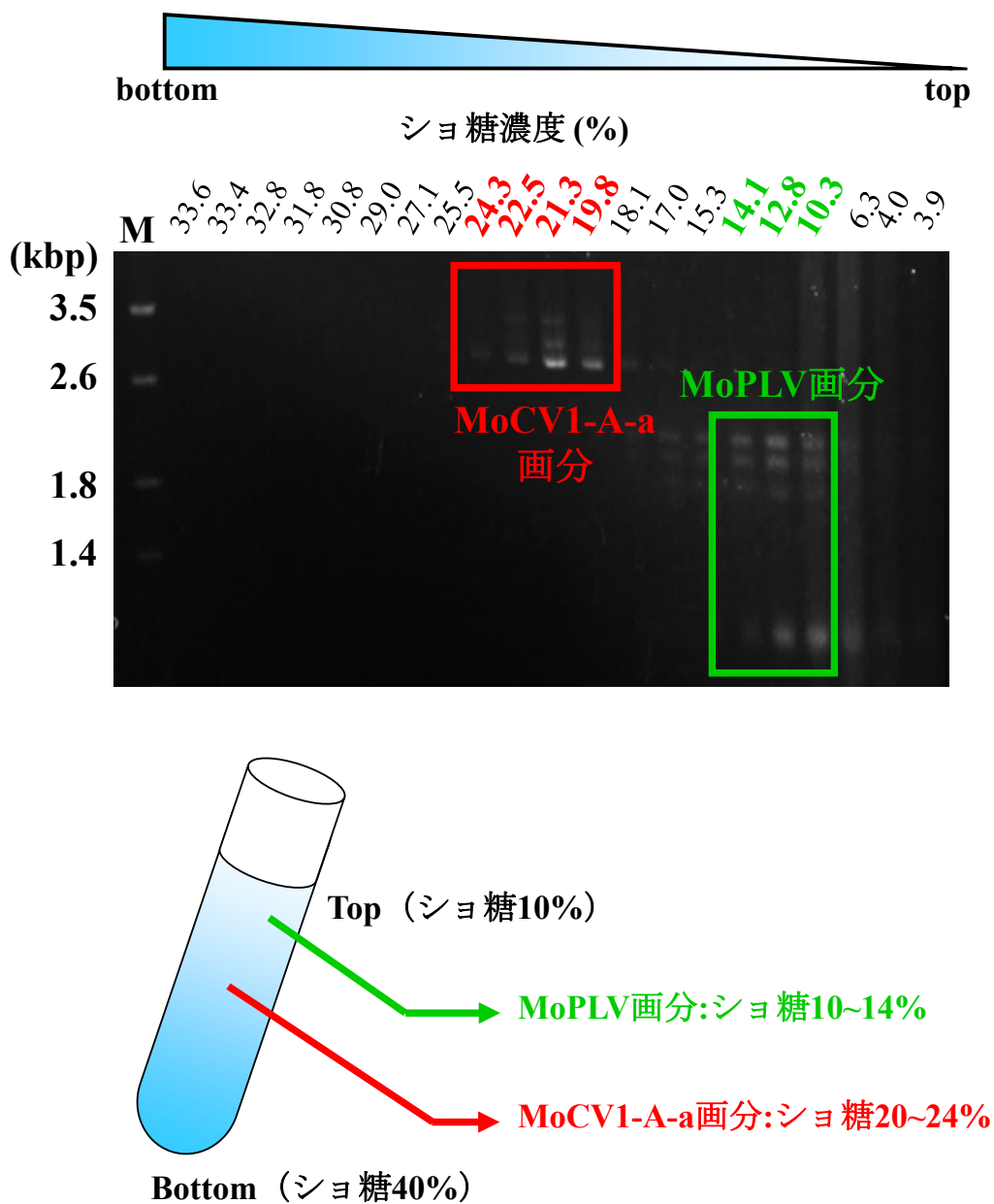


Figure 8

シヨ糖濃度勾配遠心法によるMoCV1-A-aウイルス粒子の純化。

Fig. 7の手順に従って得られた粗精製VLP溶液をシヨ糖濃度10~40%の濃度勾配溶液に添加し、超遠心分離を行った後分画した。得られた各画分からSDS-Phenol法を用いてdsRNA抽出を行い、アガロースゲル電気泳動で展開した。

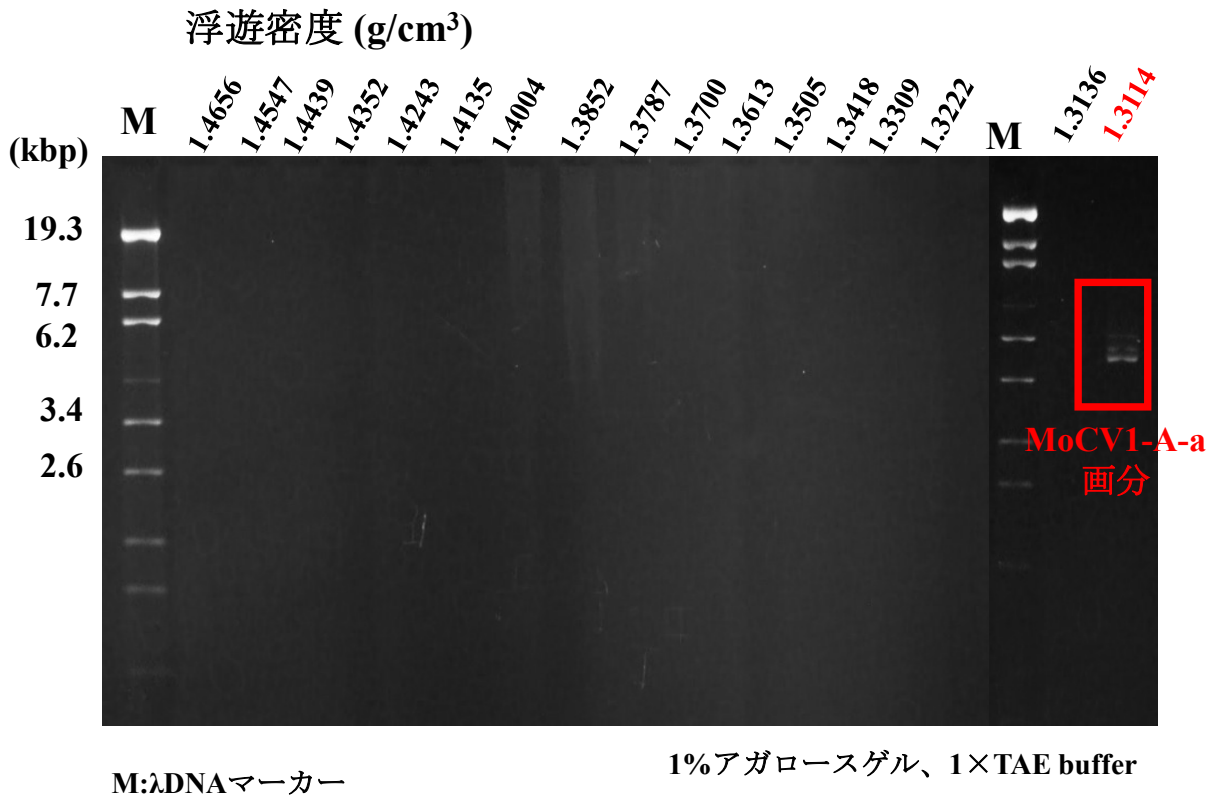


Figure 9

塩化セシウム密度勾配遠心法によるMoCV1-A-aウイルス様粒子の純化。

VLP溶液のさらなる純化と浮遊密度の測定のため、ショ糖密度勾配遠心法により純化したMoCV1-A-aとMoPLVの精製VLP溶液を用いて塩化セシウム密度勾配法を試みた。得られた各画分からSDS-Phenol法を用いて核酸抽出を行い、アガロースゲル電気泳動で展開した。

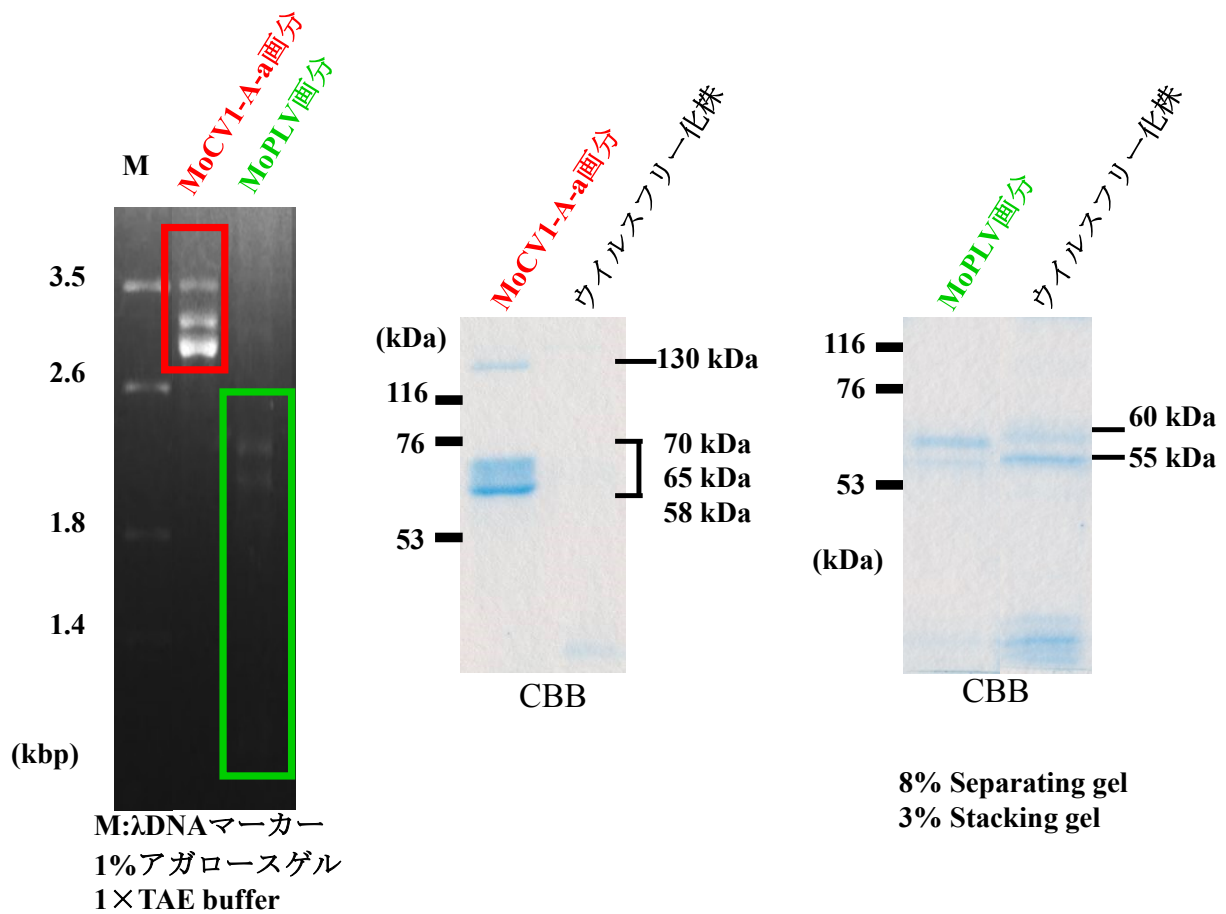


Figure 10

SDS-PAGEによるMoCV1-A-aとMoPLVの構造タンパク質の検出。

ショ糖密度勾配遠心法により純化したMoCV1-A-aとMoPLVの精製VLP溶液をSDS-PAGEで展開した。また、ウイルスフリー化株もショ糖密度勾配遠心法を用いて部分純化しMoCV1-A-aとMoPLVが存在した画分と同じショ糖濃度の画分をSDS-PAGEで展開した。

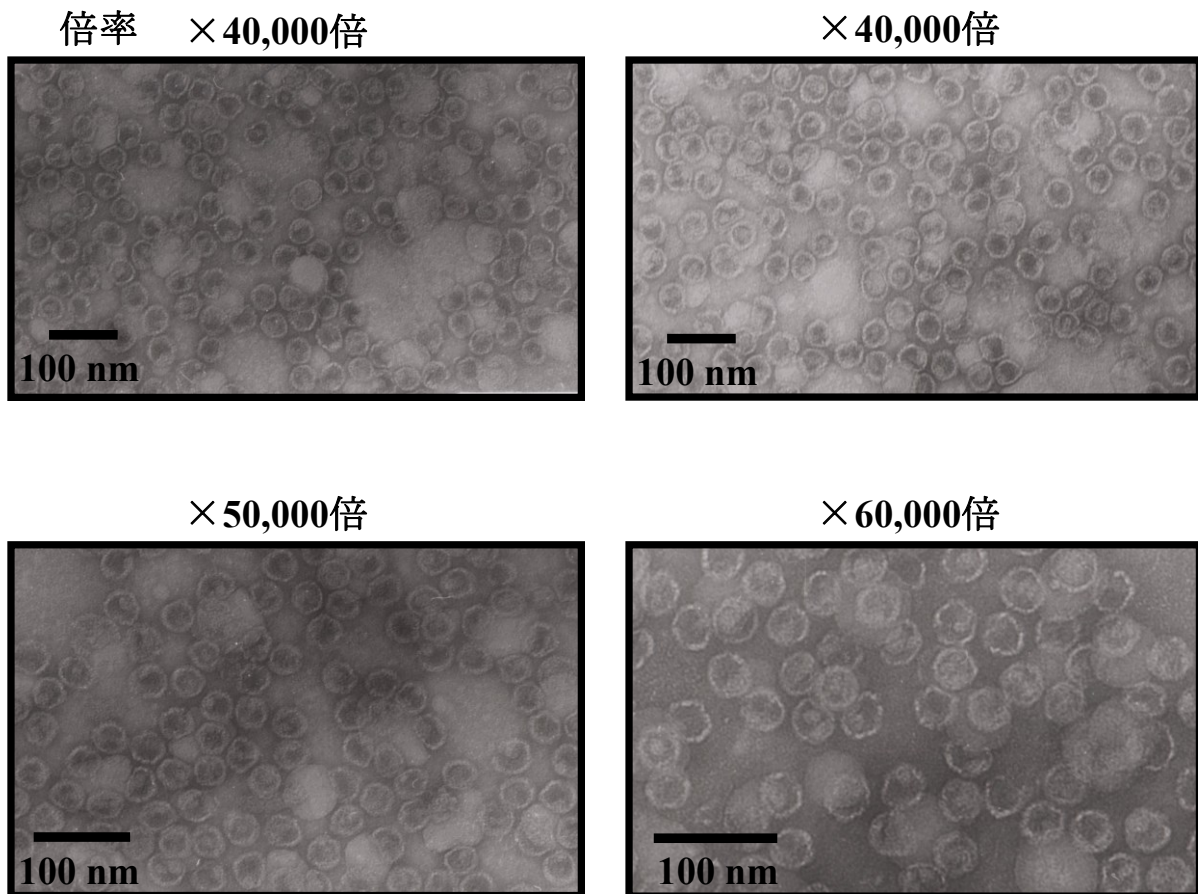


Figure 11

電子顕微鏡によるMoCV1-A-aウイルス様粒子の観察。

ショ糖濃度勾配遠心法により得られた精製VLP溶液をネガティブ染色法により染色し、透過型電子顕微鏡で観察した。

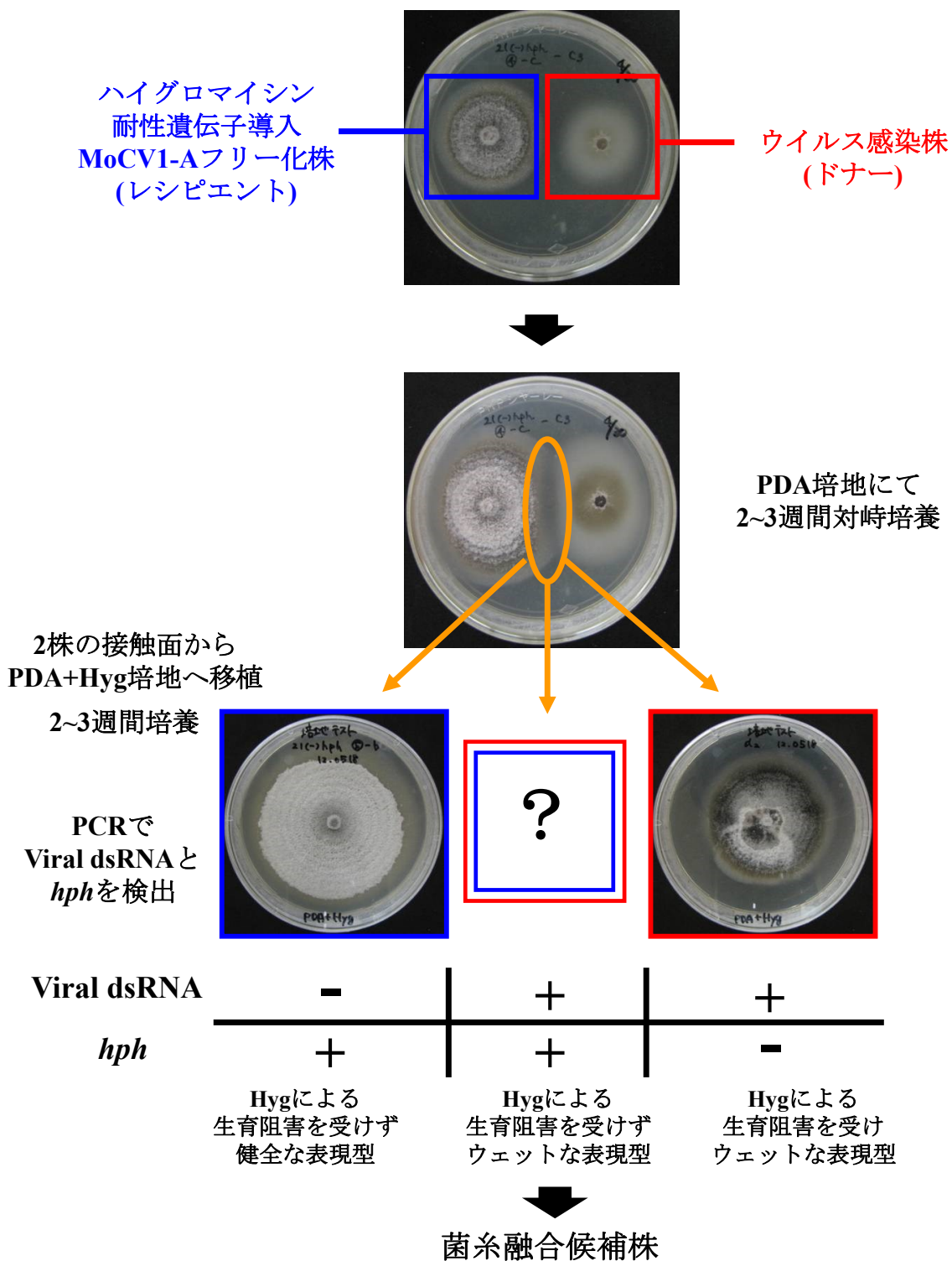


Figure 12
 菌糸融合によるウイルス感染手法。
 上図の通り、菌糸融合を介して、ウイルス感染株(ドナー)からMoCV1-Aフリー化株(レシピエント)へウイルスを感染させた。

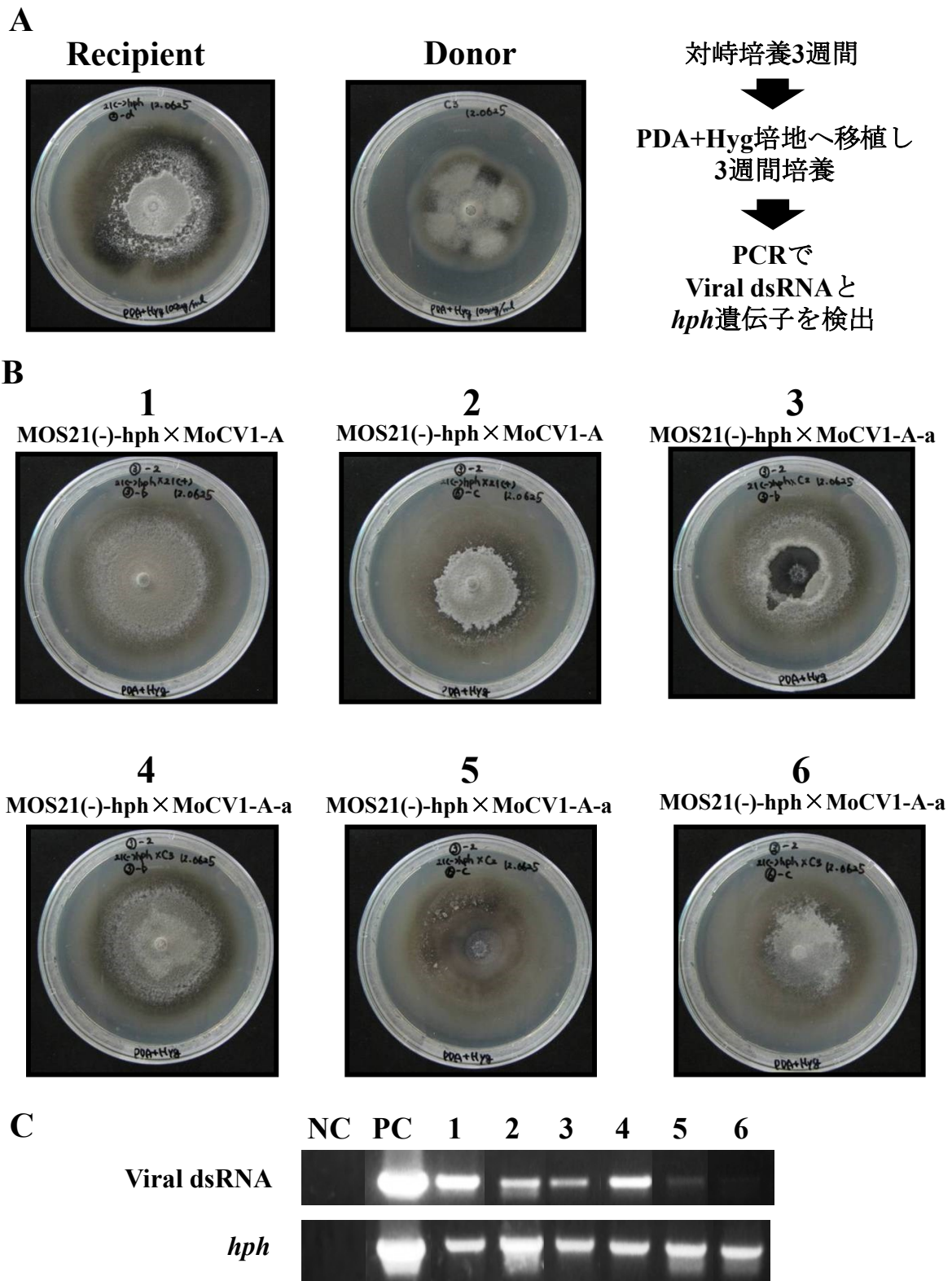
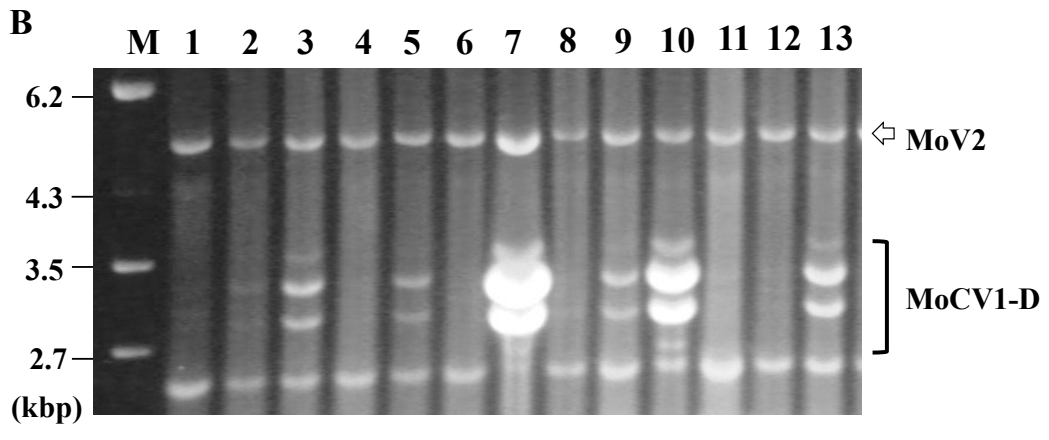
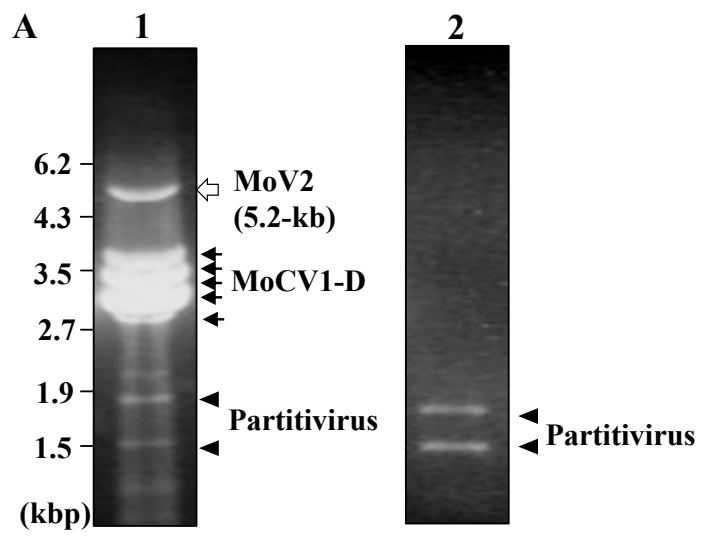


Figure 13

菌糸融合によるMoCV1-Aフリー化株へのMoCV1-A-aまたはMoCV1-Aの導入。

(A)ハイグロマイシン添加PDA培地上における*hph*遺伝子導入MoCV1-Aフリー化株とウイルス感染株の表現型。(B)ハイグロマイシン添加PDA培地上における菌糸融合候補株の表現型。(C)PCR法を用いたウイルスゲノムと*hph*遺伝子の検出。



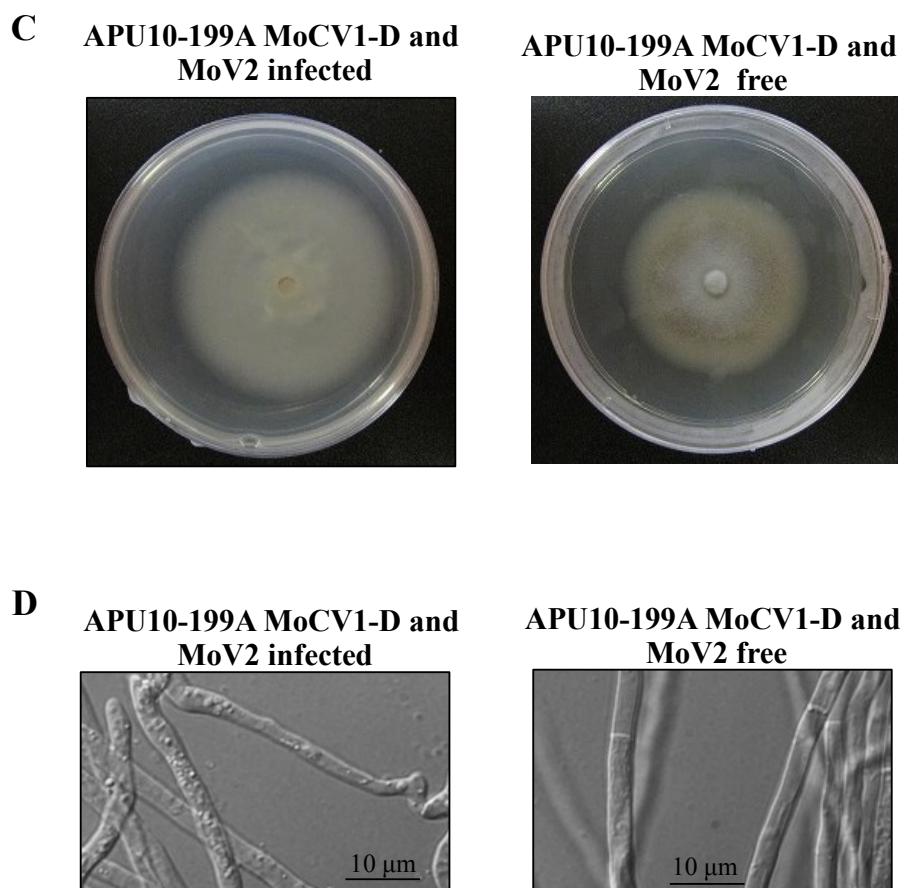


Figure 14

秋田県分離株APU10-199AとMoV2- and MoCV1-D-free APU10-199A株のdsRNAと表現型の比較。

(A) APU10-199A株 (lane 1) とMoV2 and MoCV1-D-free株(lane 2)のdsRNAパターン。1% (w/v) agarose gel、50V、4 hで泳動し、エチジウムブロマイドで染色後UVで検出した。White arrow, MoV2 5.2 kb dsRNA; Black arrows, MoCV1-D dsRNA1-5; Arrowheads, Partitivirus dsRNA. (B)APU10-199A由来の単孢子分離株から精製したdsRNAをアガロースゲル電気泳動した(lanes 1-13)。M: DNA marker (0.3 μg of λ DNA digested with EcoT14I) (C)PDA平板培地で26 °C・10日培養した菌叢の表現型。(D)YG brothで 26 °C・3日培養した菌糸の表現型。

Japanese isolate

Vietnamese isolate

APU10-199A

S-0412-II 1a

S-0412-II 2a

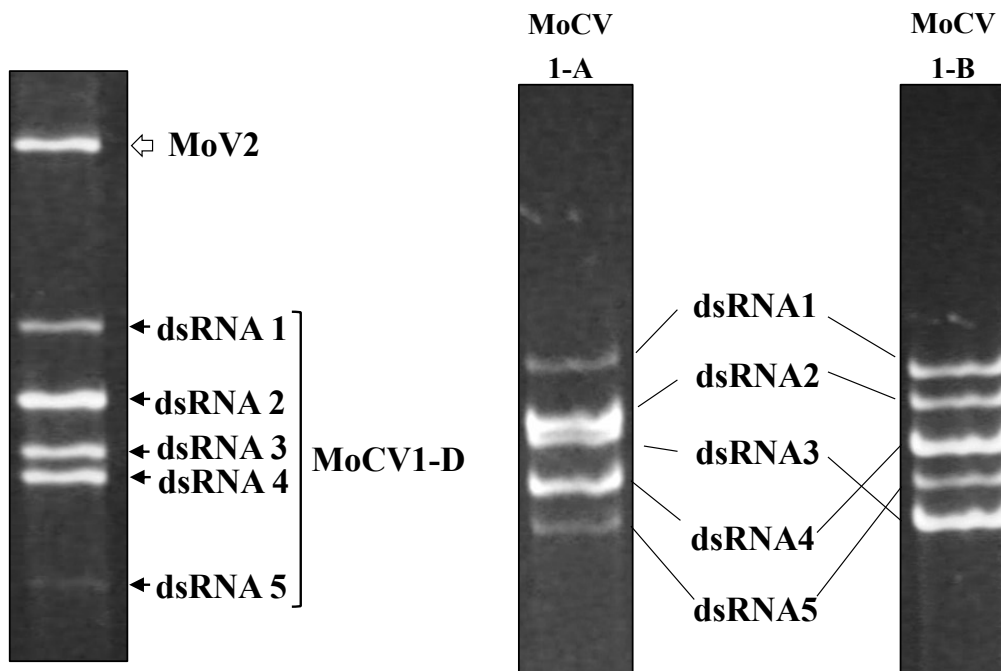


Figure 15

APU10-199A株とベトナム分離株由来精製dsRNAの泳動パターン比較。

APU10-199A株とベトナム分離株からdsRNAを精製し、5%未変性ポリアクリルアミドゲル電気泳動で展開した。

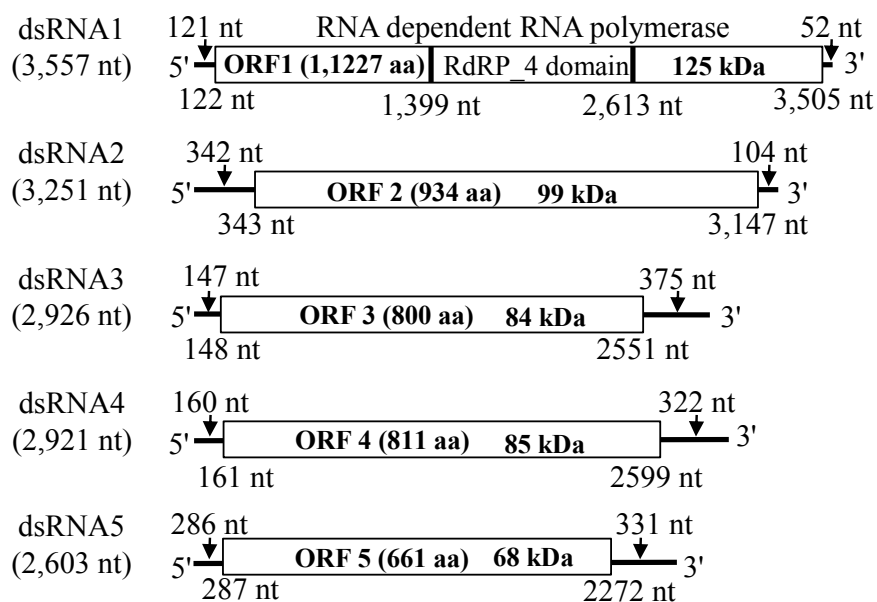


Figure 16

MoCV1-Dのゲノムセグメント構造。

APU10-199A株から検出されたMoCV1-DのdsRNA1-5とゲノム上のORF1-5と5'-UTR及び3'-UTRを図示した。

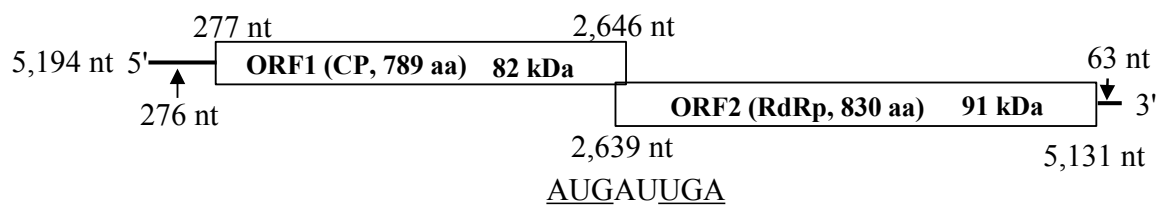


Figure 17

MoV2のゲノム構造。

APU10-199A株から検出されたMoV2のdsRNAとゲノム上のORF1,2と5'-UTR及び3'-UTRを図示した。ORF1-2間は8塩基でオーバーラップしていた。

5' end terminus

dsRNA1	1:	GCAAAAAAGAGAAUAAAGCUUUCUCCUUUUU-GCUCCUUGCUUGUCGUC	CCGCAUUUGACU	58
dsRNA2	1:	GCAAAAAAGAGAAUAAAGCAUUCUUCUUUUUUGCUCACGCACGCCCGACUCAGAU	GGCAG	60
dsRNA3	1:	GCAAAAAAGAGAAUAAAGCUUUCUCCUUUUU-GCAAGAAUACAG-GAUCGGCAU	CAUCG	58
dsRNA4	1:	GCAAAAAAGAGAAUAAAGCUUUCUCCUUUUU-GACAACAGAAUC-GAUUCGACACCUCC		58
dsRNA5	1:	GCAAAAAAGAGAAUAAAGCUUUCUCCUUUUU-GCAGAAGUGACA--GACCCUGCGGCUAC		57
MoCV1-A, MoCV1-B		consensus sequence GCAAAAAAGAGAAUAAAGC-UUC-C-UUUUU-GC		

3' end terminus

dsRNA1	3,508:	-AGUAGGUGC--GAACCGUCCAUAACUUCUUACACUGUAGGGUGU---	AAGUACC	3,557
dsRNA2	3,202:	-GGUGGCCGCUGGCACCGACUCAAAUUCUUACGUGUUA--CGU---	AAGUACC	3,251
dsRNA3	2,873:	-AACCGCGCCGCGCGGGUGCGCUUCUUGUUAGGCAUAGGGACCUAAC	AAGUACC	2,926
dsRNA4	2,868:	-AGCCAACGCCACUACGAUAAACUUCUUGUUUGGCUUAGGGCUUUAAC	AAGUACC	2,921
dsRNA5	2,551:	AGGCUCGUACUGCGACGAAAGACUUCUUGUUAGCGUGAGGCUUUAAC	AAGUACC	2,603
MoCV1-A, MoCV1-B		consensus sequence CUU-UU-----AAGUACC		

Figure 18

MoCV1-D dsRNA1-5の5'末端配列と3'末端配列のマルチプルアライメント。

MoCV1-AとMoCV1-Bで保存されている塩基を示し、MoCV1間で保存されている塩基はドットで示した。Black, 100% nucleotide identity; grey, 60–80% nucleotide identity.

MoCV1-D 404: HRLVRRSSVTLIGRRLDAGQLSVCTYWDCLAGRYLGS GDMKEKLADRTSEQKPR-VWVSRDGTQSADRFAH : 472
 MoCV1-A 404: HRLVRRSSVTLIGRRLDAGQLSVCTYWDCLAGRYLGS GDMKEKLADRTSEQKPR-VWVSRDGTQSADRFAH : 472
 MoCV1-B 404: HRLVRRSSVTLIGRRLDAGQLSVCTYWDCLAGRYLGS GDMKEKLADRTSEQKPR-VWVSRDGTQSADRFAH : 472
 WiV29 172: HTAVRGSNTLLGRKLLTRDLAVCSYWDCLAGRYFGAGDMEKEIADRTSDLKPK-VFIME DGSRSHEGF MV : 240
 TcV2 408: HTLVDRDTKSMIGAAALNTHGLALCTYFDCLAGRYFCEGDIEKEIHDRTVSLPR-HFIMPDGSKSEAEFDM : 476
 FgV-Ch-9 415: HNLIRISGTVFGEVMPESQIGLLTYWSSLAGRSQEEVDIEKEAAERAVMSAPKRYYSRALGRWSGEEFDA : 484

I

MoCV1-D 473: EFACEVRALLHQTIADGGERMRTVTD MVASFDTFLEYRKKWVRPGSVTGS PKTDIYLEAVS EREGMIAEI : 542
 MoCV1-A 473: EFACEVRALLHQTIADGGERMRTVTD MVASFDTFLEYRKKWVRPGSVTGS PKTDIYLEAVS EREGMIAEI : 542
 MoCV1-B 473: EFACEVRALLHQTIADGGERMRTVTD MVASFDTFLEYRKKWVRPGSVTGS PKADIYLEAVS EREGMIAEI : 542
 WiV29 241: ERRRAVKEVLSSTVADGGEMRRGLDIAKDFDFLEFRKSWVRPGSVTGS PKTDIALKAVGERETMIAEI : 310
 TcV2 477: RKNVAVADVLSHTLV DGGARILLRASKITKSFDFLEHRKAWVRPGSVTGS PKTDVYIKVVG DREMGI RE V : 546
 FgV-Ch-9 485: RLHRAIVHGFNETTTEISDKIYDIAEWATDFDFELKHKRQWVKS GSATGAPKTDLYLAVPAEYRNMVSEV : 554

II

MoCV1-D 543: ADDLIAA---MCTYVLANVRLNKAATFEFAEFPAIVKRVLADYVPNSFTRVFIKNEIGKPA GRPLYPSHLA : 609
 MoCV1-A 543: ADDLIAA---MCTYVLANVRLNKAATFEFAEFPAIVKRVLADYVPNSFTRVFIKNEIGKPA GRPLYPSHLA : 609
 MoCV1-B 543: ADDLIAA---MCTYVLANVRLNKAATFEFAEFPAIVKRVLADYVPNSFTRVFIKNEIGKPA GRALYPSHLA : 609
 WiV29 311: ADEIHT---MCLFVLHVKVRLNKAATFEFPEFVGI VKKAI GDYVPNSFTRVFIKNEIAKPKGRALYPSHVL : 377
 TcV2 547: ADDLHM---MCTYVLSRVRLNKAATFEFEKPELV RDCIGDYVPNSFTRVFIKNEIAKVKGRALFPSHVL : 613
 FgV-Ch-9 555: AESVAEGVSLTLHRVRRRLRNKLSATFEFPEFVQIVKDALRDYKPN SFTRVFIKKEVGRAKFRSPSPSTLM : 624

III

MoCV1-D 610: HYVVGQFALYALMKAQPIPKVRLTAERDVAMDEHWMW MQAREFTVGVM LDYDNFNEKEHEFADMQLIMREL : 679
 MoCV1-A 610: HYVVGQFALYALMKAQPIPKVRLTAERDVAMDEHWMW MQAREFTVGVM LDYDNFNEKEHEFADMQLIMREL : 679
 MoCV1-B 610: HYVAGQFALYALMKAQPIPKVRLASERDVAMDEHWMW MQAREFTVGVM LDYDNFNEKEHEFADMQLIMREL : 679
 WiV29 378: HYITASYCLHLMLKGLPIEHARLVPEES IARDEHWMWRQARDFTVGVMADYDNFNESHETEDMQAVMHS L : 447
 TcV2 614: HYIVGTIVVQLLMKAAPTEHARLIPDEATPRDEHWMWMEARDFTVGLMLDYDDFNESHETIRDMQMI INSL : 683
 FgV-Ch-9 625: HYIVCCFVLTIVVEKGS PAKGTRQQARS DQQRKDHWLWVE TYDRVTALMMDYVS FNEQQEDKHLKDLINSL : 694

IV

MoCV1-D 680: KGLYRTAGVLSFDLKV MIDWVAEAYDRTVLE YD GELHSFKHGMLSGQAPTSAINNIINGANKRLLIROVE : 749
 MoCV1-A 680: KGLYRTAGVLSFDLKV MIDWVAEAYDRTVLE YD GELHNFKHGMLSGQAPTSAINNIINGANKRLLIROVE : 749
 MoCV1-B 680: KGLYRTAGVLSFDLKT MIDWVAEAYDRTVLE YD GELHSFKHGMLSGQAPTSAINNIINGANKRLLIROVE : 749
 WiV29 448: KTVYRQAGAMSDDL RHMLDWVTEAYEKTILEYEGGLYKFKHGMLSGQAPTSAIN TVMNASNKRVIRROMH : 517
 TcV2 684: KGVYRRAGALSFDLSAMIDWVVEAYEKVFEEDCKQYHFTLHGMLSGQAPTSMTINTVIN TANKRVIREQIF : 753
 FgV-Ch-9 695: KGVYSQFGLLITDMKWAIDWVQESFDNIVLEVGD KHYQFMNGLLSGWRMTSFGNSWLNKAYMAVIKEQV L : 764

V

MoCV1-D 750: EITGRVIFQKRTSGGDDVAGETYSLYDAYLAVKCGQLMGLAFKDIKQLLSADYEFFRFLFVSQGVHGS L : 819
 MoCV1-A 750: EITGRVIFQKRTSGGDDVAGETYSLYDAYLAVKCGQLMGLAFKDVKQLLSADYEFFRFLFVSVEGVNGS L : 819
 MoCV1-B 750: EITGRVIFQKRTSGGDDVAGETYSLYDAYLAVKCGQMLAFKDIKQLLSADYEFFRFLFVSVKGVHGS L : 819
 WiV29 518: VLYGESVMNKRTSGGDDVAEVYDAYQAALLIKVGMGFAFSSHKQLISTTNYEFFRFLFISSEGTYGSL : 587
 TcV2 754: AIFGESVMTKRTSGGDDVAETVDVFOAMIVKVGEMMFAESTHKQLISTSDYEFFRFLFSAEGVYGS L : 823
 FgV-Ch-9 765: ELSGRVVLHHAQSGGDDVMALETSLNSAHTLNI GOAMGFS LKAIKQLISNKYREFFRLEATGSGVYGS V : 834

VI

VII

MoCV1-D 820: PRALGSLCSGQWSNSVKAKFVDPAAKLS SVTDAAFKISRRA : 860
 MoCV1-A 820: PRALGSLCSGQWSNSVKAKFVDPAAKLS SVTEAAFKISRRA : 860
 MoCV1-B 820: PRALGSLCSGQWSNSVKAKFVDPAAKLS SVTDAAFKIAARRA : 860
 WiV29 588: PRALGSLCSGQWSNSVKAKFVDPASKLS SVVEIARKAGRRA : 628
 TcV2 824: PRVLGSLCSGQWSNSVKAKFIDPASKLNSV VEMARKAARRA : 864
 FgV-Ch-9 835: CRTIGSAASGQWSNSVVGTLVPEPSVKFAS IDVMAKIMRRS : 875

VIII

Figure 19

Chrysoviridae cluster-IIに属するウイルスのRdRp領域のマルチプルアライメント。

MoCV1-D, MoCV1-A, MoCV1-B, Wuhan insect virus 29 (WiV29), TcV2, and FgV-Ch-9の8つの保存モチーフを含むRdRp領域でアライメントを構築した。Black, 100% amino acid identity; grey, 60–80% amino acid identity.

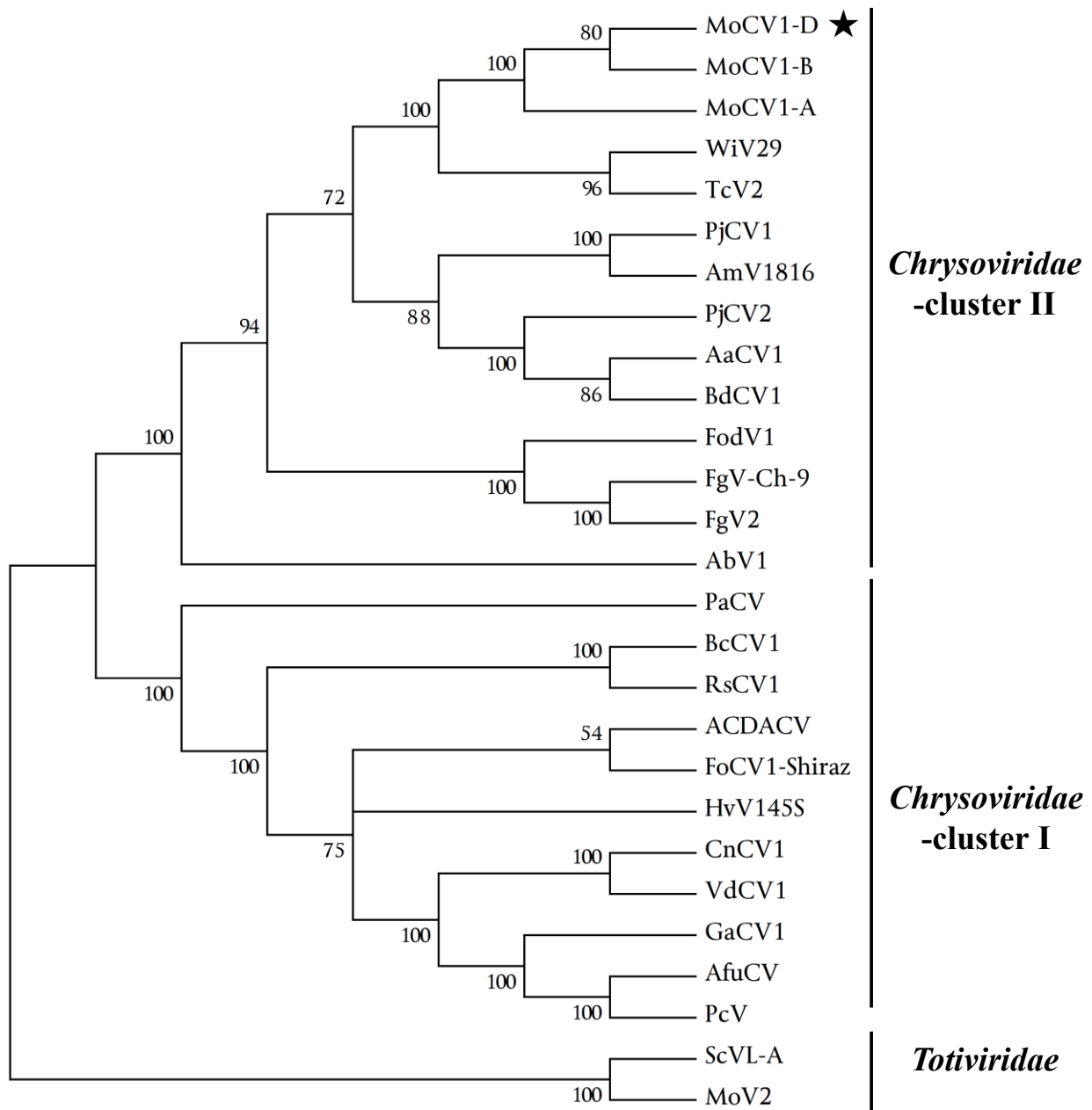


Figure 20

RdRpコア領域に基づく *Chrysoviridae* 科の分子系統解析。

MEGA7 softwareを用いて最尤法で分子系統樹を構築した。

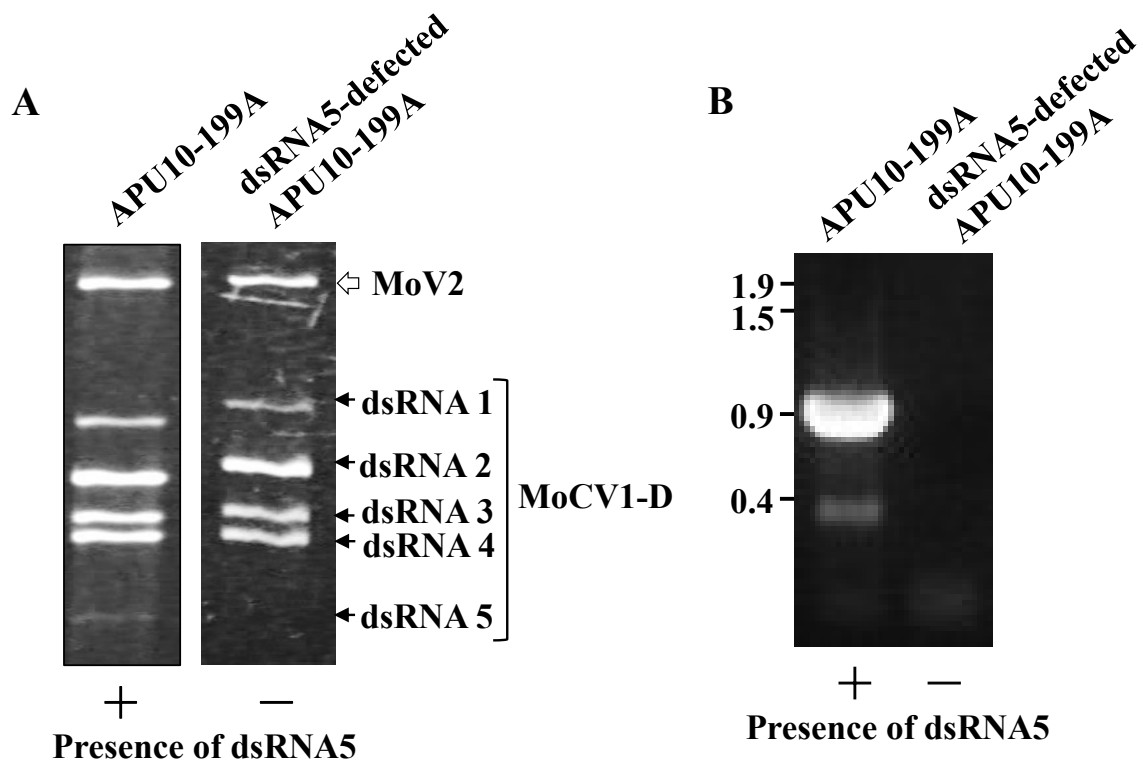


Figure 21

DsRNA5セグメントの確認。

(A) APU10-199A株とdsRNA5-defected APU10-199A株の精製dsRNAをポリアクリルアミドゲル電気泳動で分離した。(B) MoCV1 dsRNA5特異的プライマーセットを用いたRT-PCRで両株中のdsRNA5の存在を検証した。

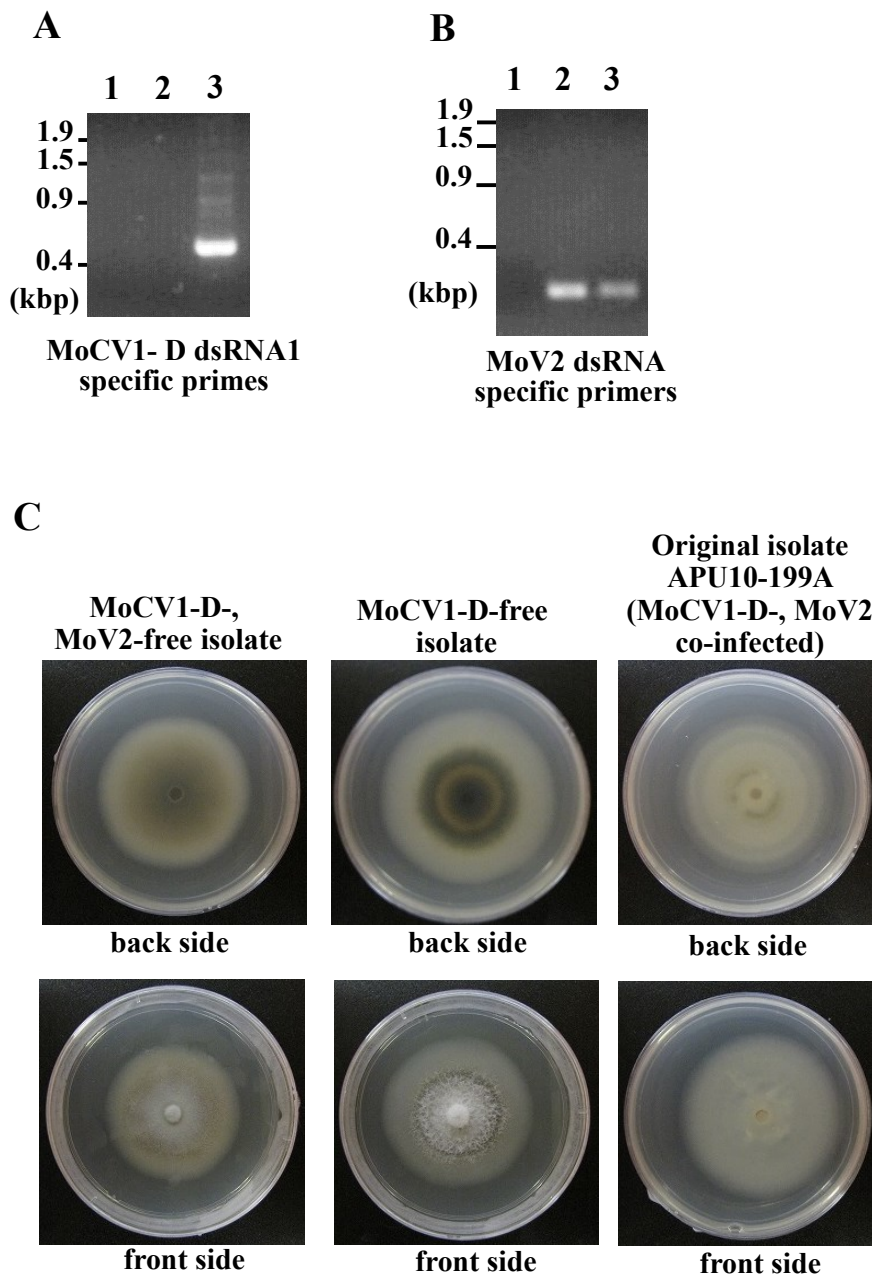


Figure 23

APU10-199A株とMoCV1-D-、MoCV1-D and MoV2フリー化株のコロニーの表現型の比較。

(A, B) MoCV1-D dsRNA1-specific primers(A)またはMoV2 dsRNA-specific primers(B)を用いて MoCV1-D- and MoV2フリー株 (lane 1)、MoCV1-Dフリー株(lane 2)、APU10-199A株(lane 3)由来のdsRNAを鋳型としてRT-PCR解析した。(C)3株の PDA平板培地・26℃・10日培養した菌叢比較。

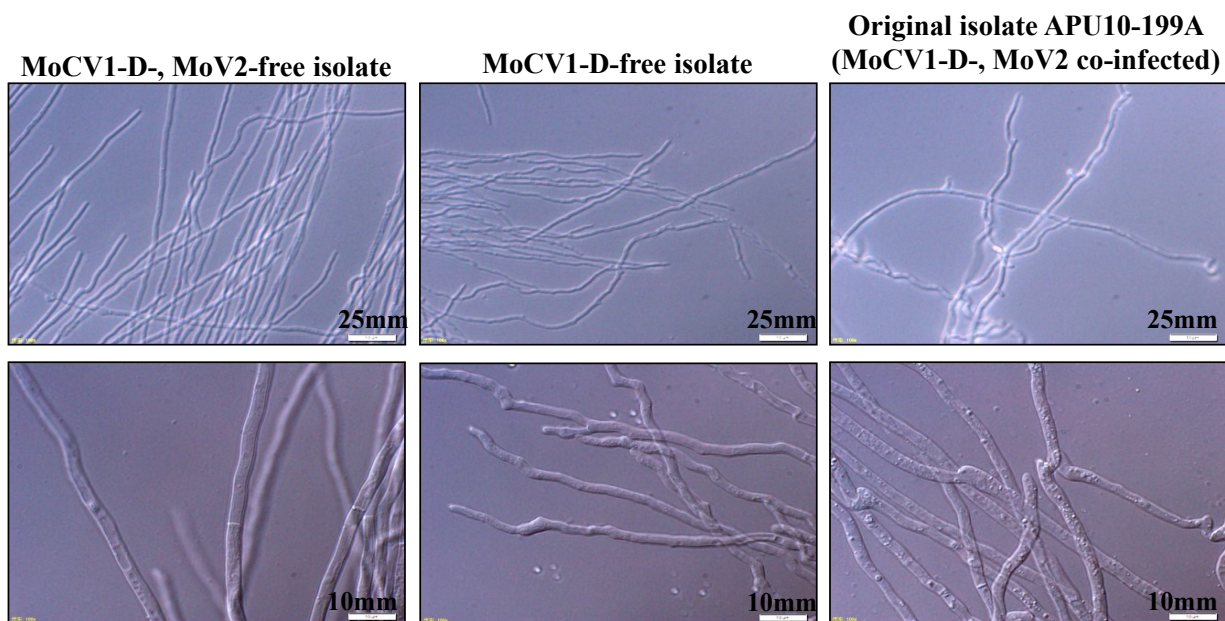


Figure 24
 APU10-199A株とMoCV1-Dフリー株、MoCV1-D and MoV2フリー株の菌糸の表現型の比較。
 3株をYG brothで26℃・2日培養し菌糸を比較した。

Host: *E. coli* BL21star (DE3)
 Culture volume: 100 ml
 Induction: 1mM IPTG
 Extraction: Bug Buster

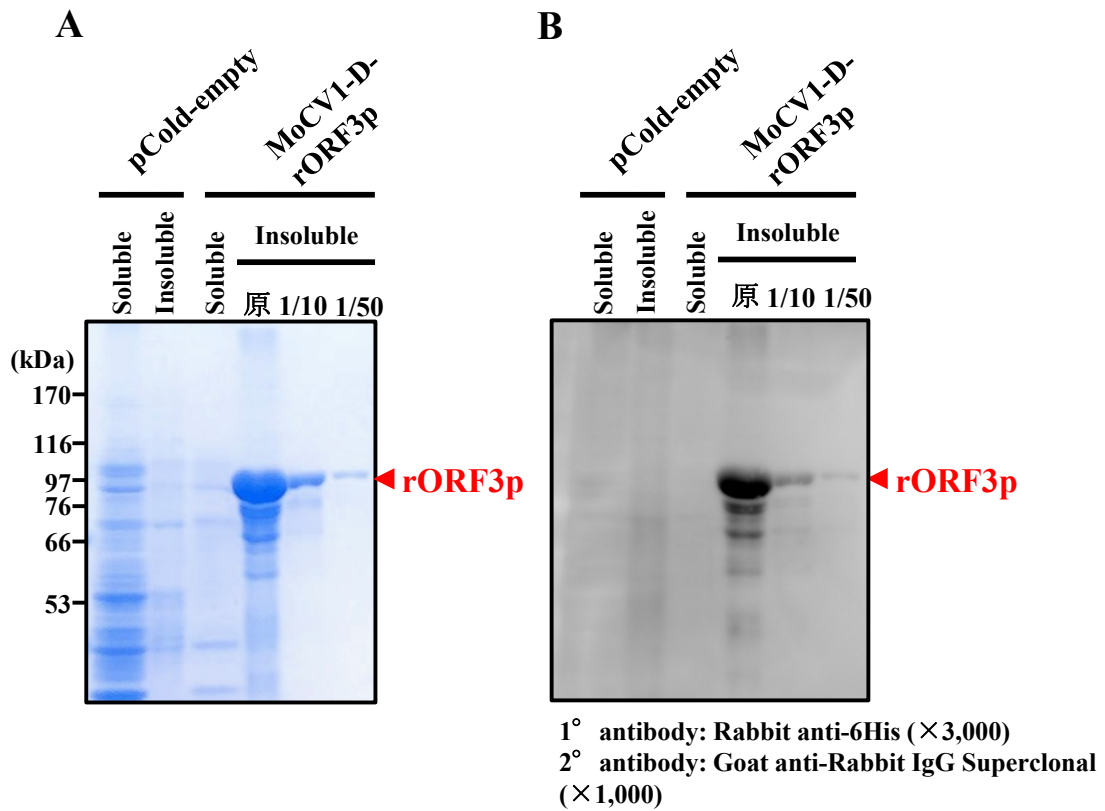


Figure 25

大腸菌における MoCV1-D ORF3 のリコンビナント発現。

(A) 大腸菌内で発現・抽出した MoCV1-D ORF タンパク質の可溶性画分と不溶性画分をそれぞれ SDS-PAGE で展開した。(B) さらに、一次抗体として anti-6-His antibody を用いてウェスタンブロット解析を行った。

Host: *E. coli* BL21star(DE3)
 Culture volume: 50 ml
 Induction: 1mM IPTG
 Extraction: Bug Buster

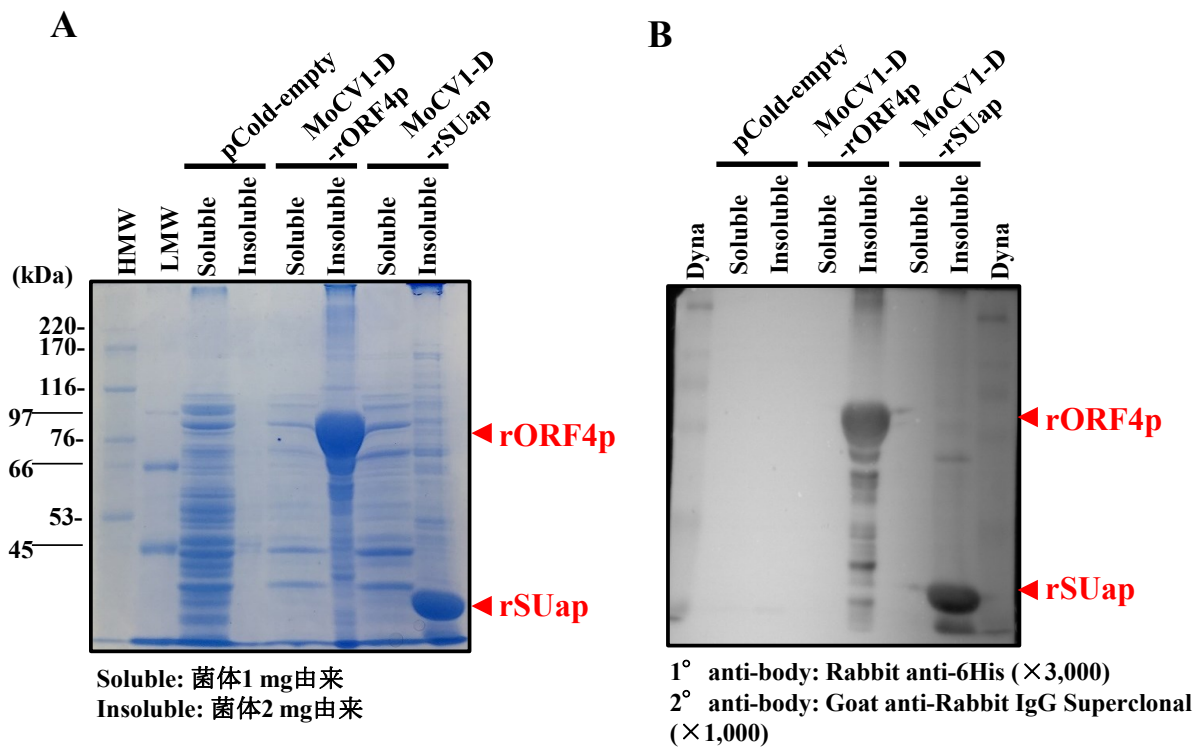


Figure 26

大腸菌における MoCV1-D ORF4及びORF4SUa領域のリコンビナント発現。

(A)大腸菌内で発現・抽出したMoCV1-D ORF4及びORF4SUaタンパク質の可溶性画分と不溶性画分をそれぞれSDS-PAGEで展開した。(B)さらに、一次抗体としてanti-6-His antibodyを用いてウェスタンブロット解析を行った。

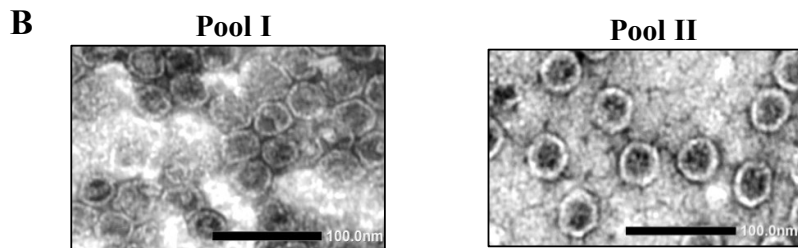
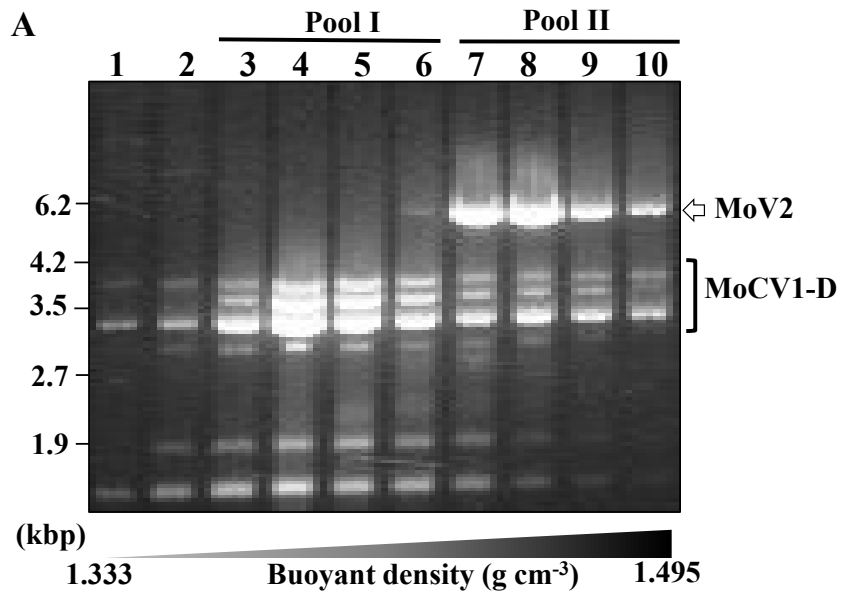


Figure 27

APU10-199A株からのウイルス粒子精製。

(A) 微生物培養装置で10日間培養したAPU10-199A株からウイルス粒子精製を試みた。塩化セシウム密度勾配超遠心で得られた画分から全核酸抽出し、アガロースゲル電気泳動で展開した。MoCV1-Dがメジャーに含まれるPool I (lanes 3-6) とMoV2がメジャーに含まれるPool II (lanes 7-10) が得られた。

(B) Pool IとPool IIを濃縮しネガティブ染色した後、TEMでウイルス粒子を観察した。(Scale bars: 100 nm)。

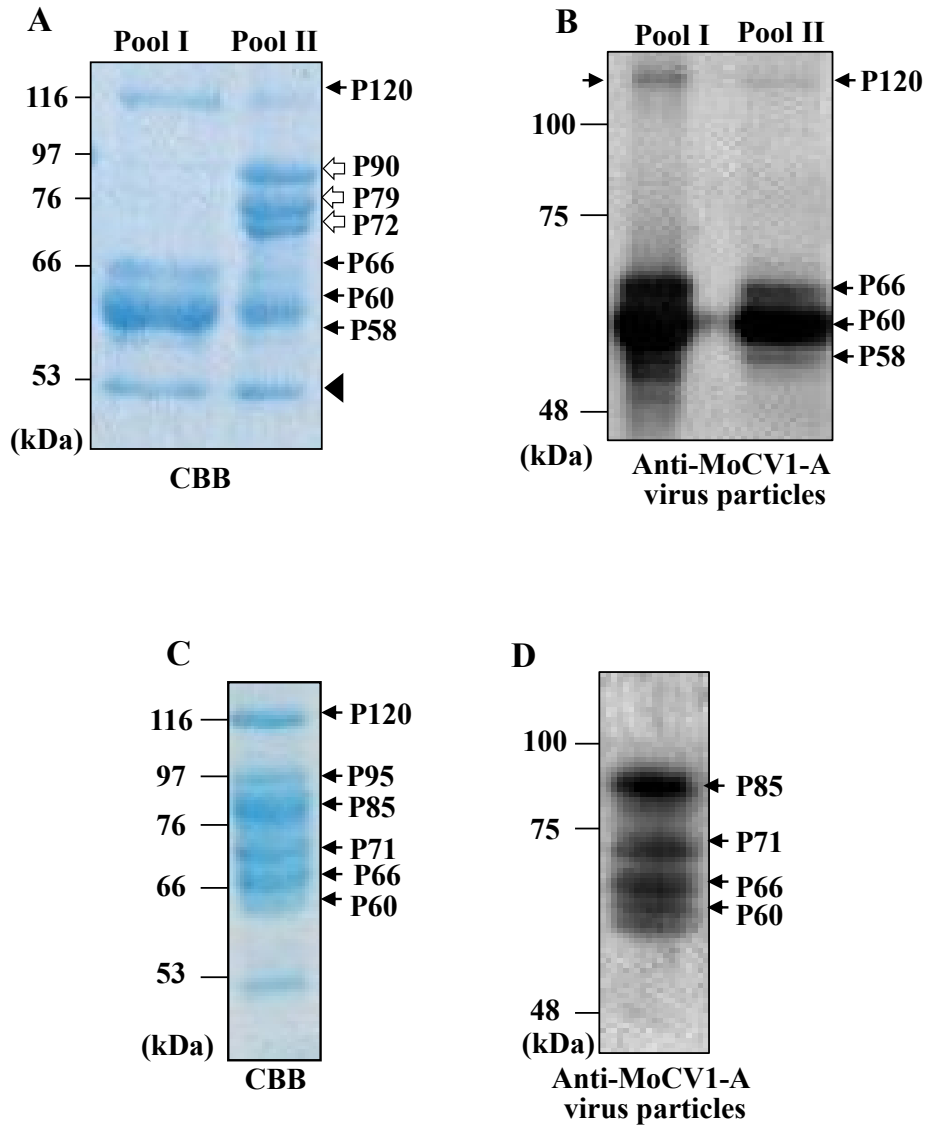


Figure 28

APU10-199A株から精製したウイルス粒子タンパク質の検出。

(A, B) Figure 27で得られた Pool Iと Pool II画分をSDS-PAGE で展開しCBB染色した(A)。また、Anti-MoCV1-A virus particles 抗血清でウェスタンブロット解析を行った(B)。(C, D)微生物培養装置で3日間培養したAPU10-199A株からウイルス粒子精製画分を調製し、SDS-PAGE で展開しCBB染色した(C)。また、Anti-MoCV1-A virus particles 抗血清でウェスタンブロット解析を行った(D)。

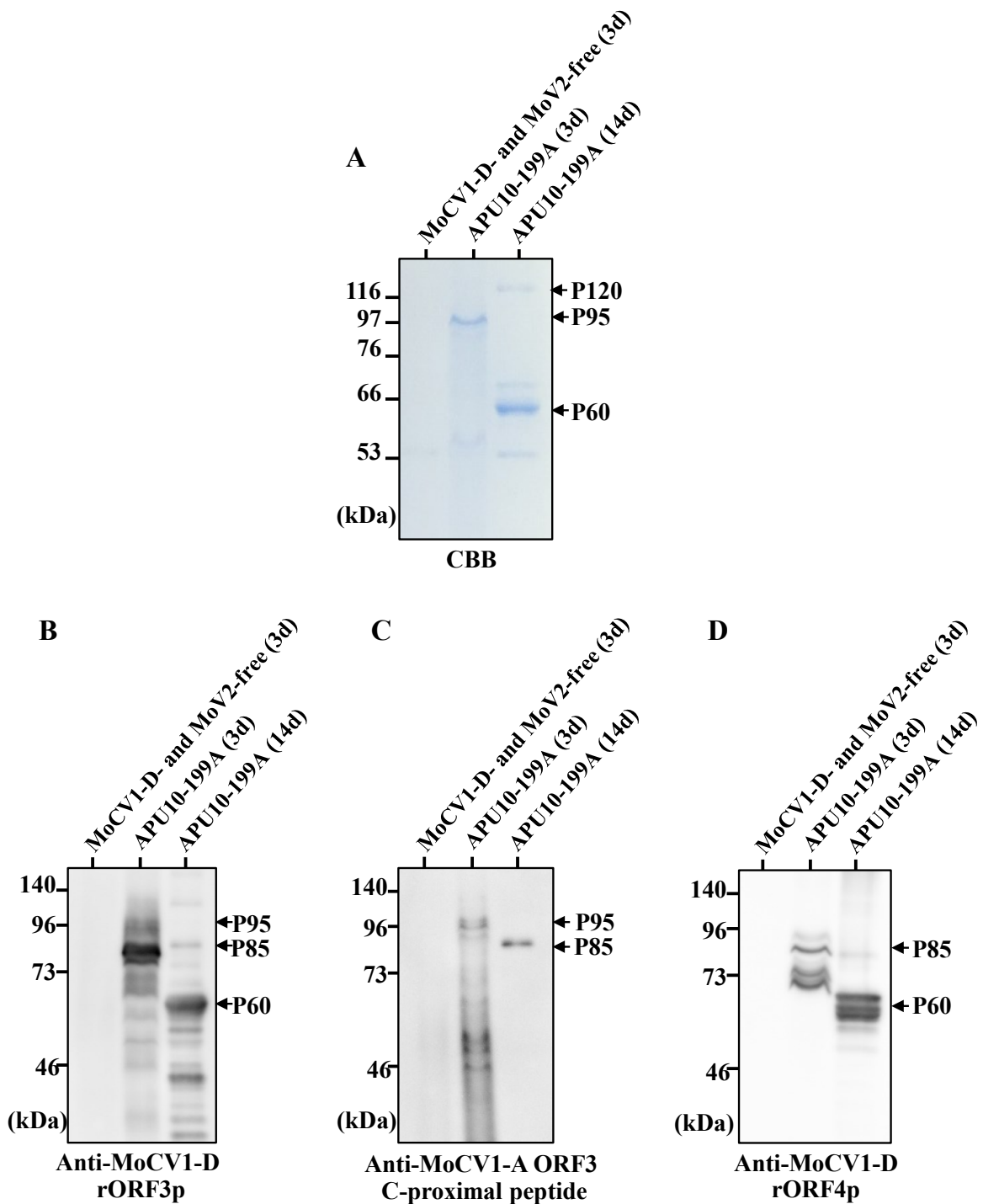


Figure 29

APU10-199A株及びMoCV1-D・MoV2フリー化株の精製ウイルス粒子画分のSDS-PAGE及びウェスタンブロット解析。

(A) APU10-199A株(3日、14日培養)及びMoCV1-D・MoV2フリー化株(3日培養)からショ糖濃度勾配遠心法でそれぞれ精製した画分をSDS-PAGEで展開した。(B-D)さらに、一次抗体として抗MoCV1-D rORF3p(B)、MoCV1-D rORF4p(C)及び MoCV1-A ORF3 C-proximal peptide抗血清(D)を用いてウェスタンブロット解析を行った。

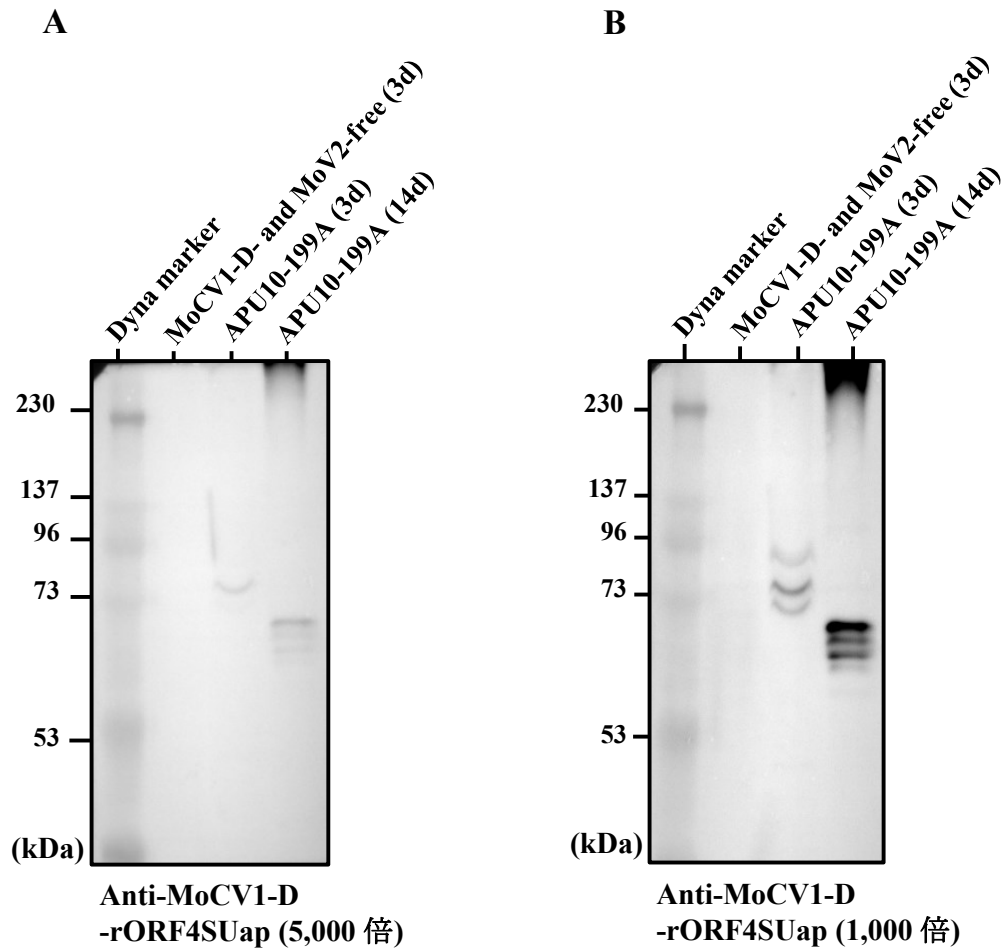


Figure 30

APU10-199A株及びMoCV1-D・MoV2フリー化株の精製ウイルス粒子画分のウェスタンブロット解析。

(A) APU10-199A株(3日、14日培養)及びMoCV1-D・MoV2フリー化株(3日培養)からショ糖濃度勾配遠心法でそれぞれ精製した画分をSDS-PAGEで展開した。(B) さらに、一次抗体として抗MoCV1-D rORF4SUap(1,000倍、5,000倍)抗血清を用いてウェスタンブロット解析を行った。

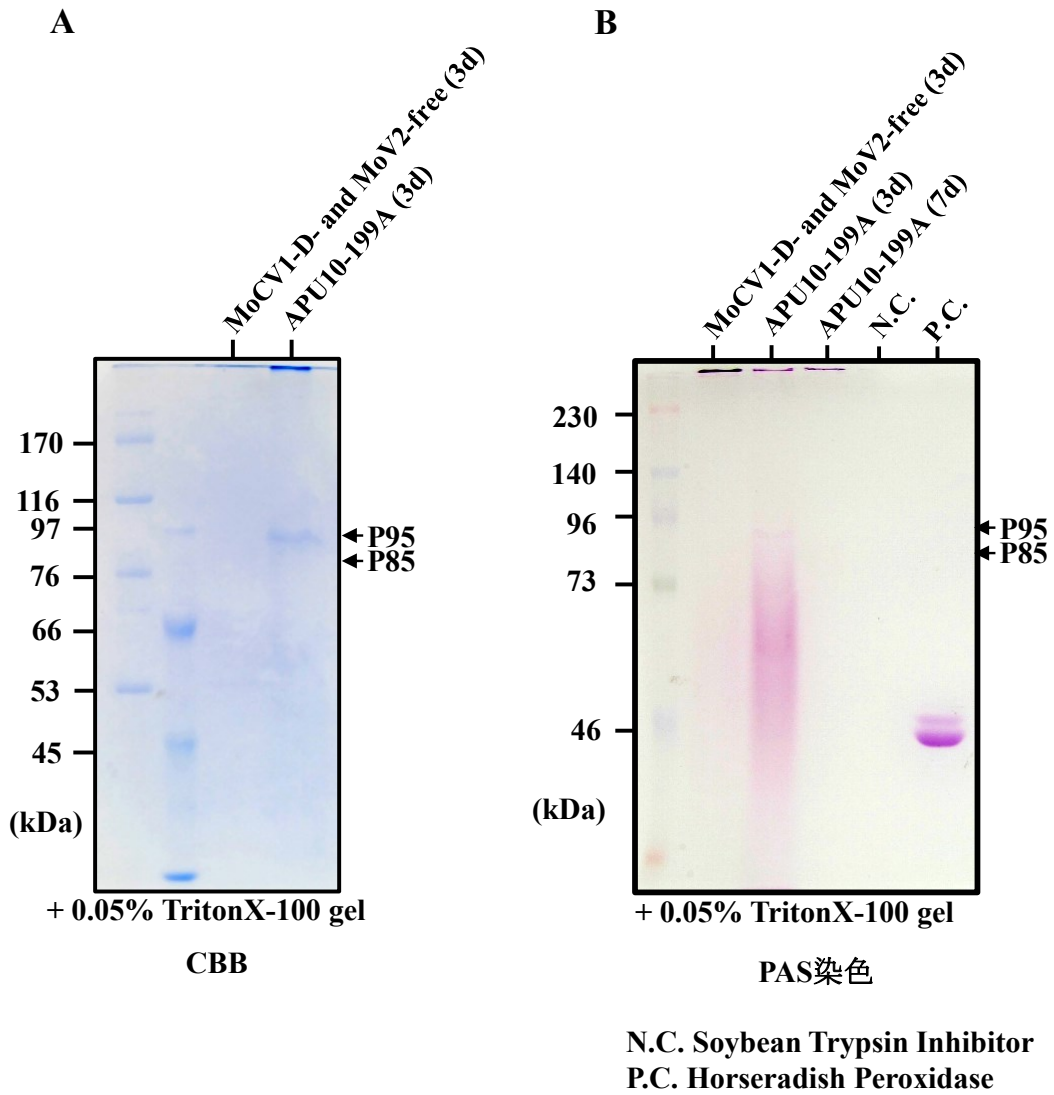
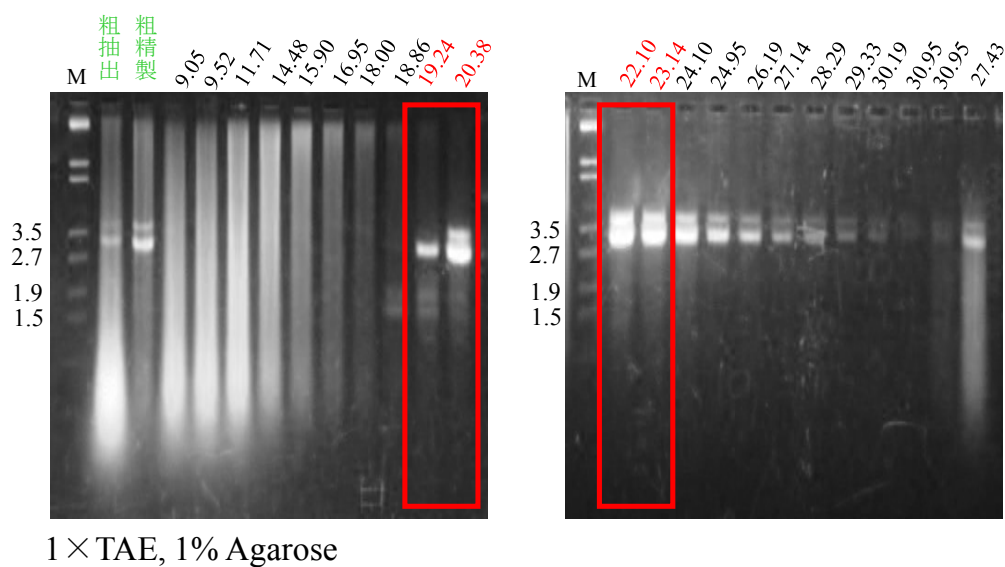


Figure 31

APU10-199A 株及び MoCV1-D・MoV2 フリー化株の精製ウイルス粒子画分の Glycoprotein 染色。

(A) APU10-199A 株(3日培養)及び MoCV1-D・MoV2 フリー化株(3日培養)からショ糖濃度勾配遠心法でそれぞれ精製した画分を SDS-PAGE で展開した。(B) PAS 法によって糖タンパク質を検出した。

新潟県分離株0115074 (MoCV1-D-5074)



新潟県分離株0115079-1 (MoCV1-D-5079-1)

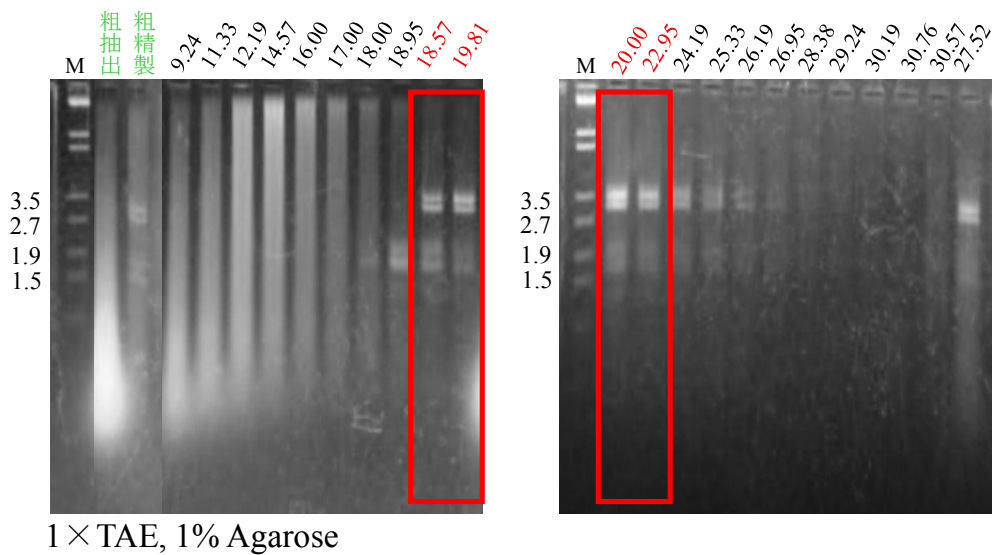


Figure 32

他の国内分離株(北陸株)からのウイルス粒子精製。

APU10-199A株と同様に新潟県分離株0115074及び0115079-1株からショ糖濃度勾配超遠心でMoCV1-D近縁ウイルスを精製した。それぞれの画分から全核酸抽出し、アガロースゲル電気泳動で展開した。

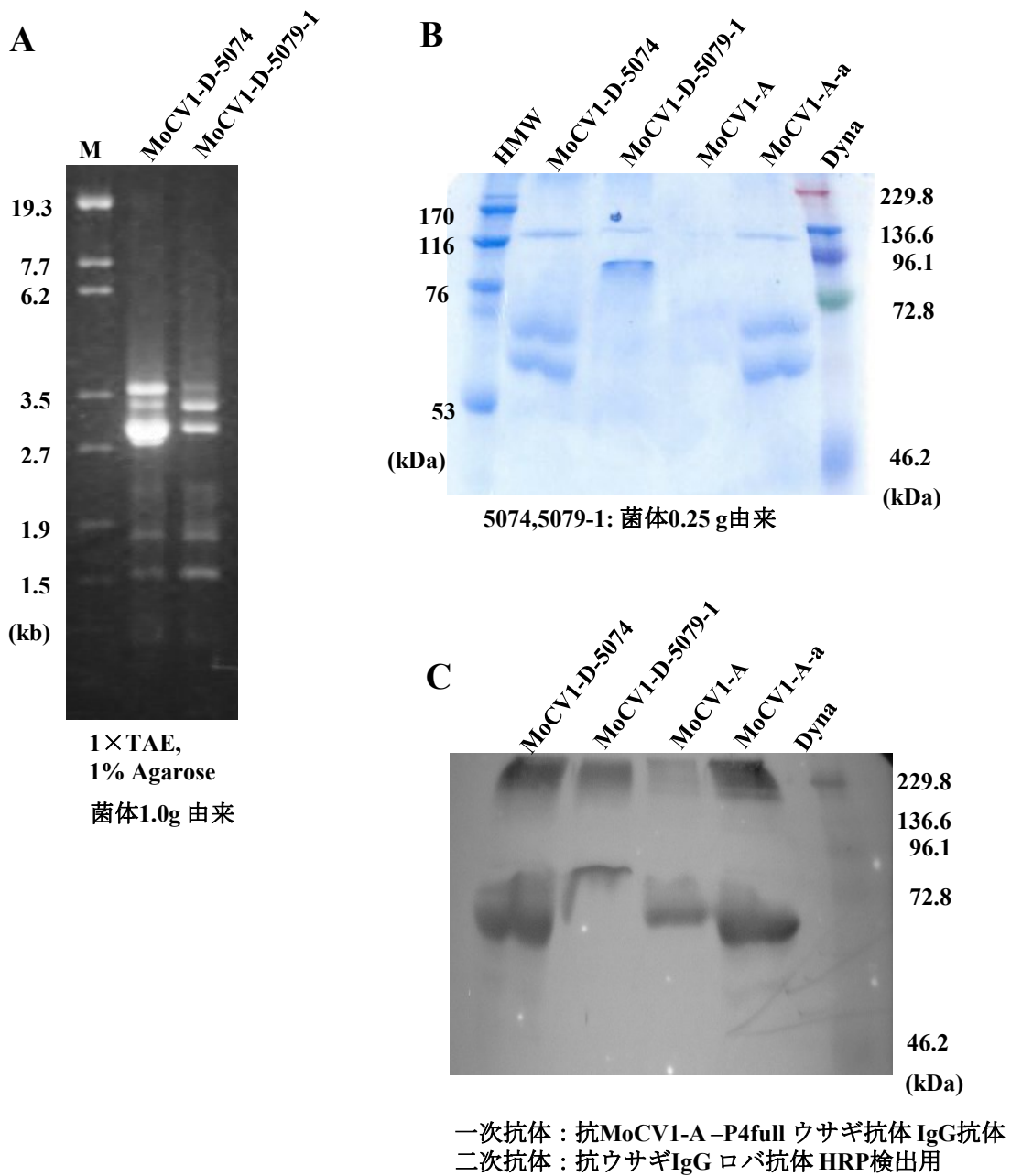


Figure 33

他の国内分離株から精製したウイルス粒子構造タンパク質の解析。

(A) ショ糖濃度勾配超遠心でMoCV1-D近縁ウイルスが存在した画分を濃縮し、全核酸抽出してアガロースゲル電気泳動で展開した。(B)各菌株由来の精製ウイルス粒子画分をSDS-PAGEで展開しCBB染色した。(C) Anti-MoCV1-A P4full 抗血清でウェスタンブロット解析した。

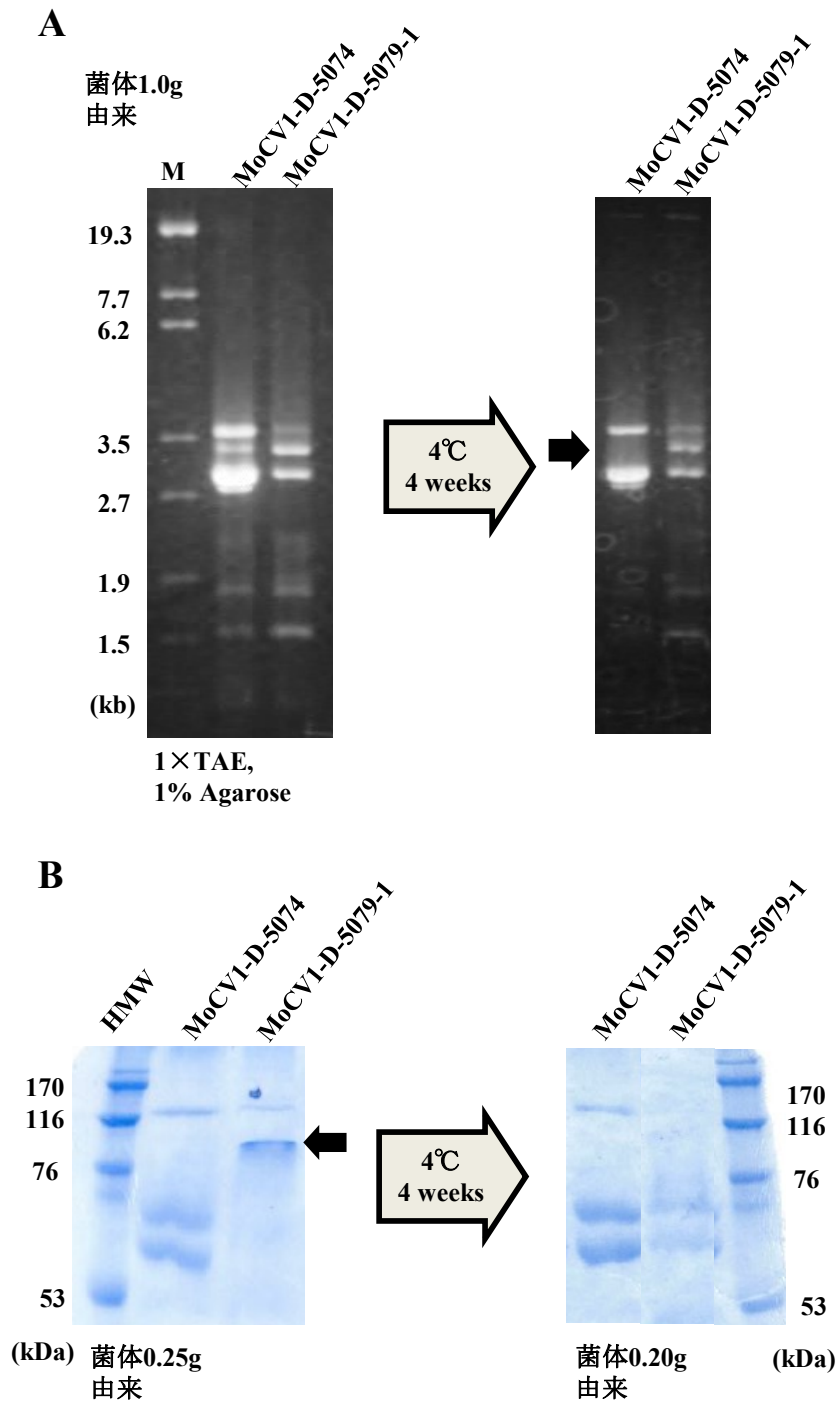
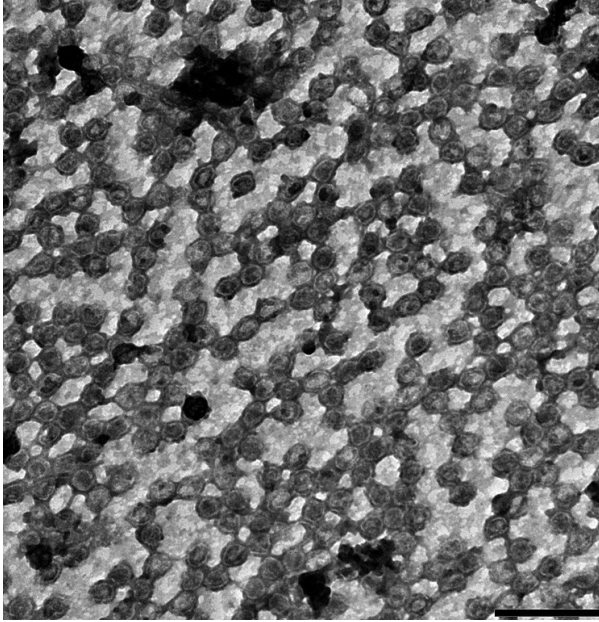


Figure 34

他の国内分離株から精製したウイルス構造タンパク質の経時的な分解推移。

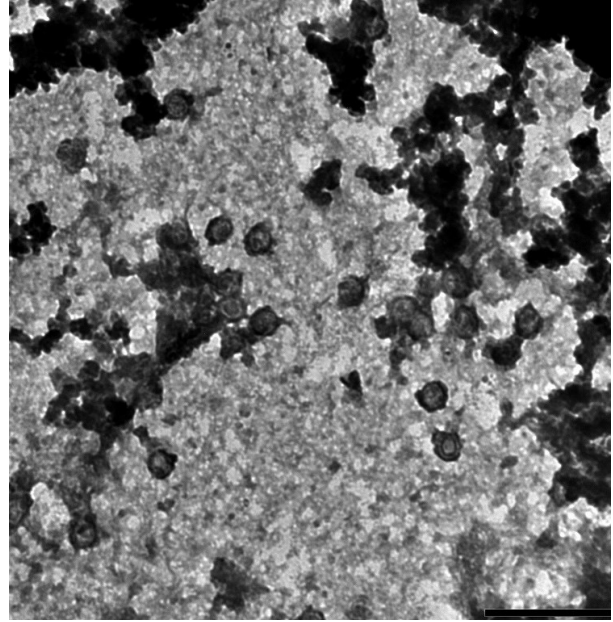
(A, B) 新潟県分離株0115074及び0115079-1株から精製したウイルス粒子画分を4°C・4週間インキュベートし、全核酸抽出した後アガロースゲル電気泳動で展開(A)するとともに、SDS-PAGEで展開しCBB染色した(B)。

MoCV1-D-5074

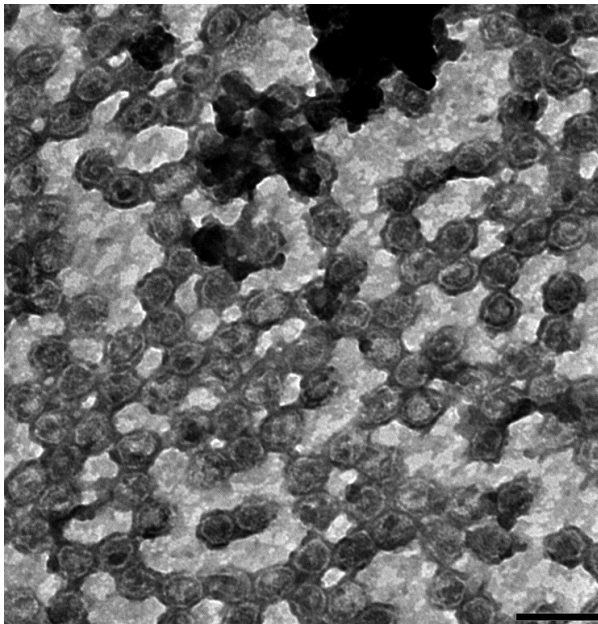


200 nm

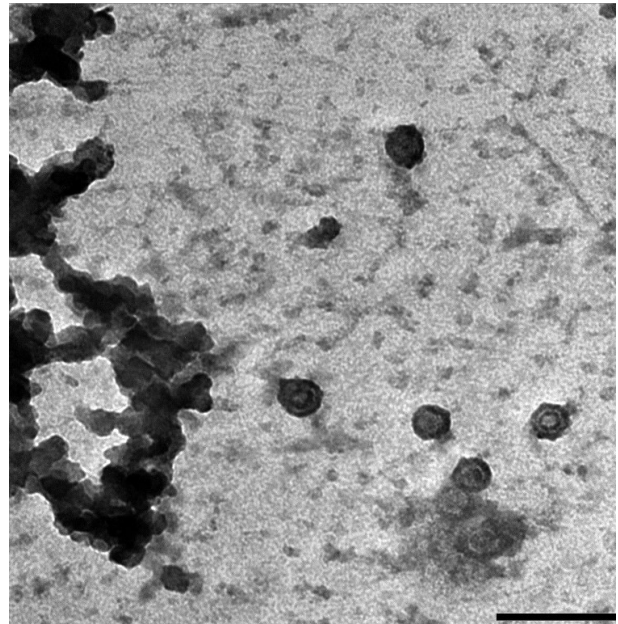
MoCV1-D-5079-1



200 nm



100 nm



100 nm

Figure 35

他の国内分離株から精製したウイルス粒子のTEM観察。

MoCV1-D-5074及びMoCV1-D-5079-1の精製ウイルス画分をネガティブ染色した後、TEMでウイルス粒子を観察した。

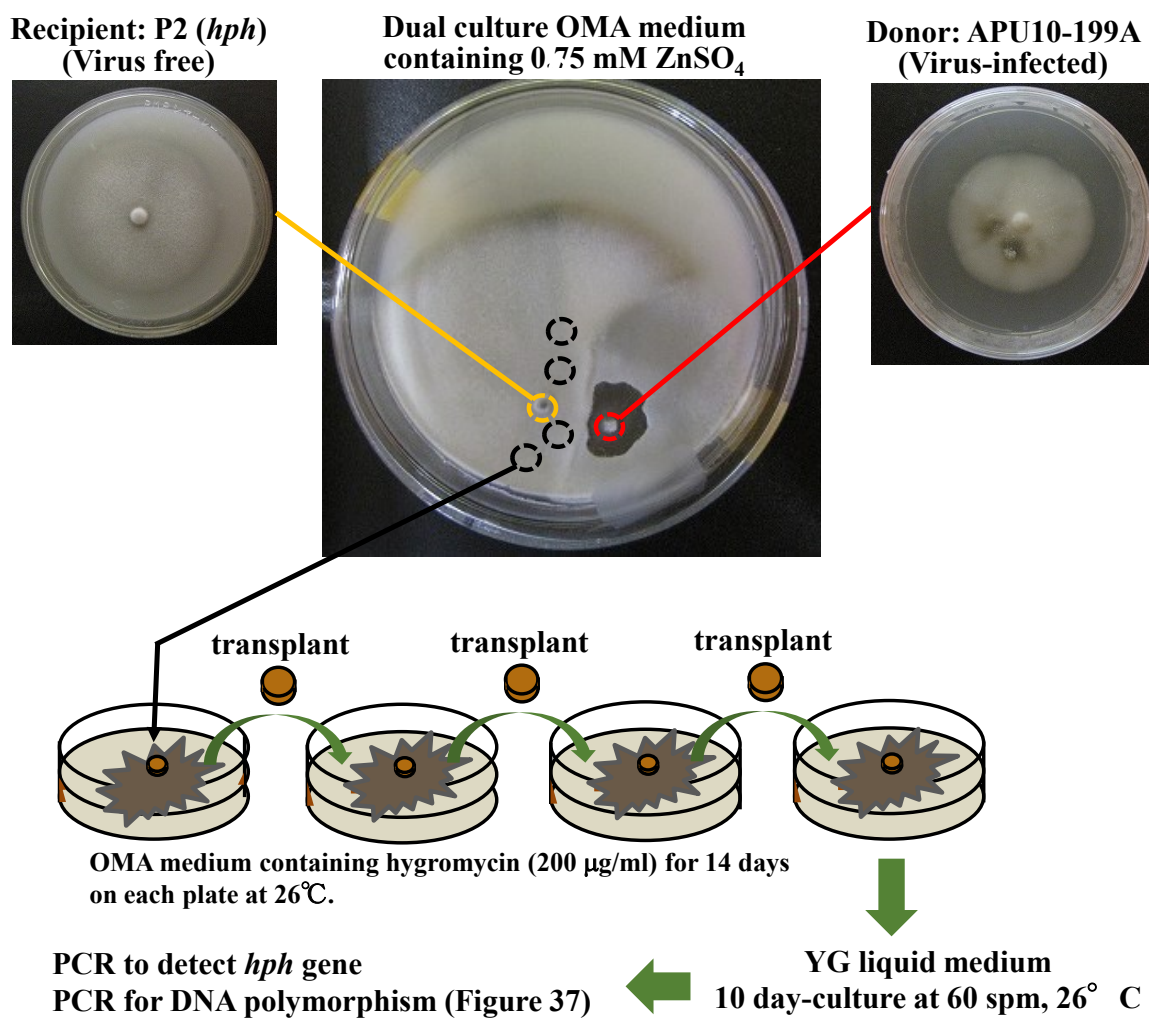


Figure 36

菌糸融合を介したP2株へのマイコウイルス感染。

*hph*導入P2株をレシピエント、APU10-199A株をドナーとしてOMA (0.75 mM ZnSO₄含有)上で対峙培養することにより菌糸融合を促した。上図の手順で菌糸融合候補株を選抜した。

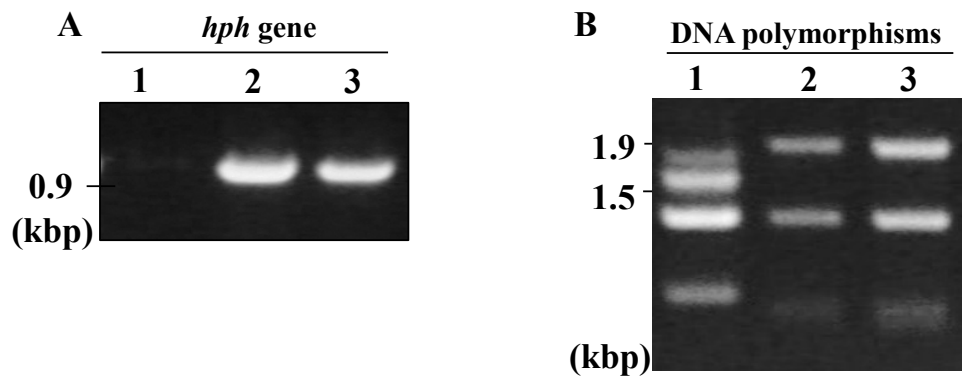
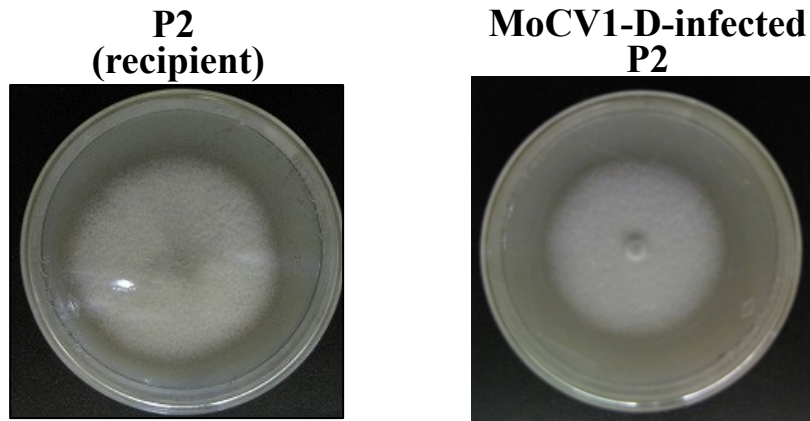


Figure 37

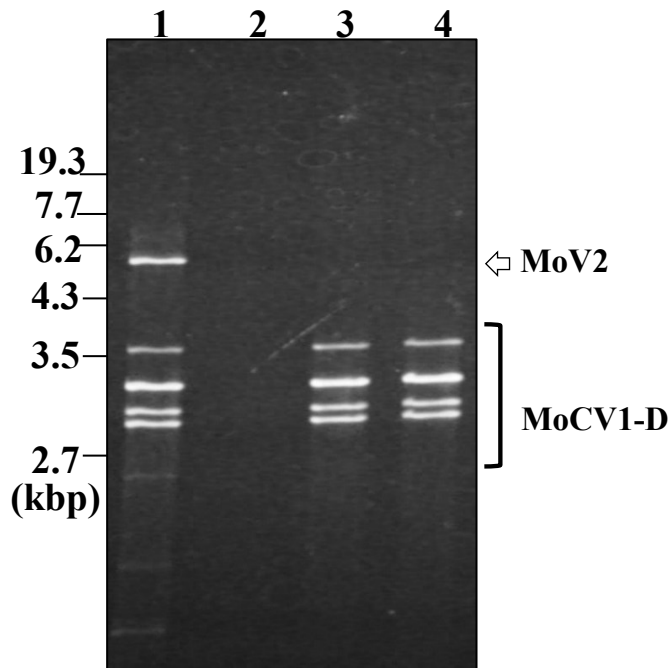
MoCV1-D-infected P2株の*hph*遺伝子およびDNA多型の検証。

(A, B) Donor APU10-199A (lane 1)、Recipient P2 (lane 2)、MoCV1-D-infected P2 (lane 3) に対して、*hph*-specific primersでPCRしてハイグロマイシン耐性遺伝子の有無を検証した (A)。Repetitive element-based PCRによって宿主菌のDNA多型を確認した(B)。

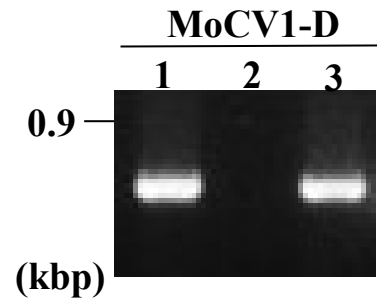
A



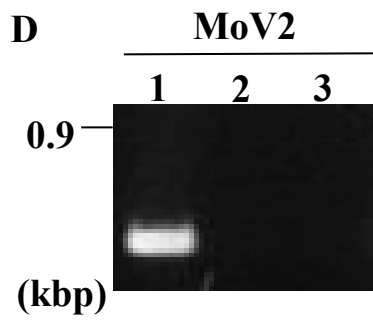
B



C



D



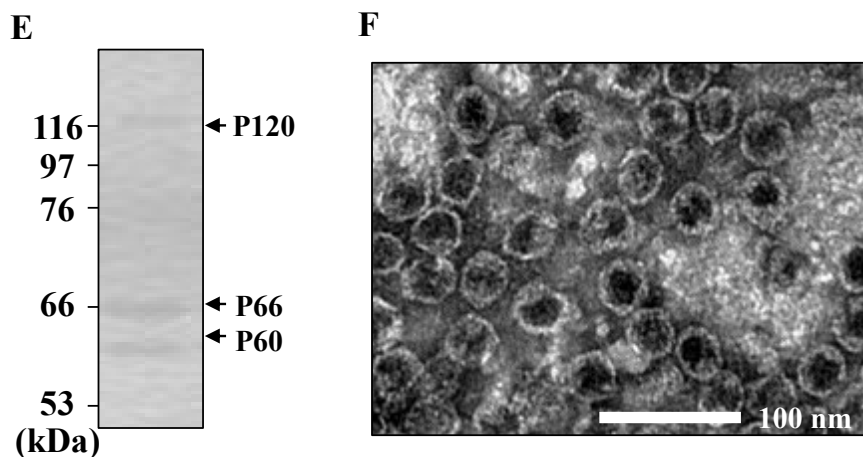
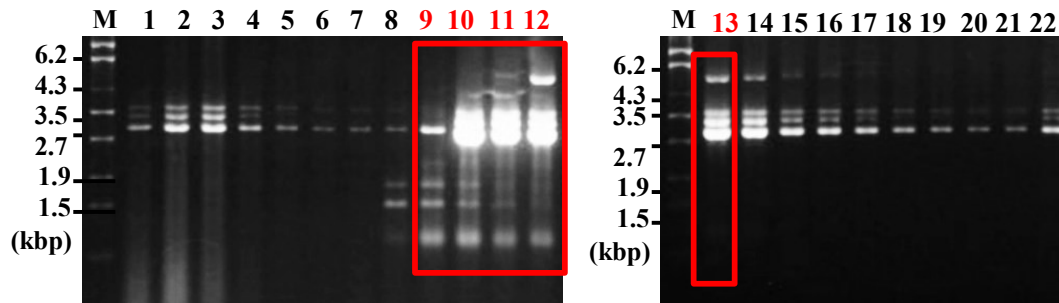


Figure 38

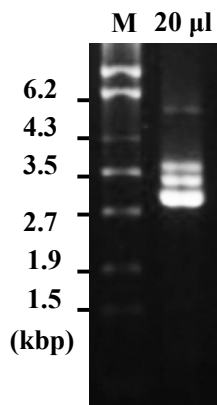
MoCV1-D-infected P2株からのMoCV1-D検出。

(A) P2株 (*hph*導入)とMoCV1-D-infected P2株の菌叢の表現型。OMA plate, 10 days at 25°C. (B) APU10-199A株 (lane 1)、P2株 (lane 2)、MoCV1-D-infected P2株(lanes 3, 4)由来の精製dsRNAsを5%ポリアクリルアミドゲルによる電気泳動で展開した。(C, D) MoCV1-D dsRNA1 specific primer (C)とMoV2 dsRNA specific primer (D)でRT-PCRを行った。APU10-199A株 (lane 1)、P2株 (lane 2)、MoCV1-D-infected P2株 (lanes 3)由来の精製dsRNAsを鋳型とした。(E) ショ糖濃度勾配超遠心でMoCV1-D-infected P2株から精製ウイルス粒子画分を調製しSDS-PAGEで展開した後、CBB染色した。(F)ネガティブ染色した後、TEMでウイルス粒子を観察した。(Scale bars: 100 nm)。

A



B



C

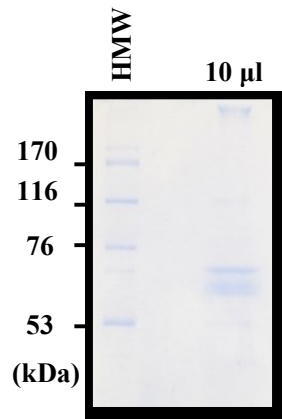


Figure 39

トランスフェクションに用いた精製MoCV1-Dウイルス粒子画分の検証。

(A-C)ショ糖濃度勾配遠心法で得られた画分(Lanes 9-13)を濃縮精製(A)し、プロトプラスト-PEG法によるウイルス粒子感染実験に用いた。精製MoCV1-D画分のうち、20 µlからViral dsRNAを検出し(B)、10 µlからMoCV1-D構造タンパク質を検出した(C)。

Recipient: P2-GFP (Virus-free)

P: Purified MoCV1-D dsRNA template

← MoCV1-D-Specific amplicon(666 bp)

MoCV1-D VP処理 : 1-1~35, 1'-1~15

VP-lacking buffer A処理 : 3-1~8

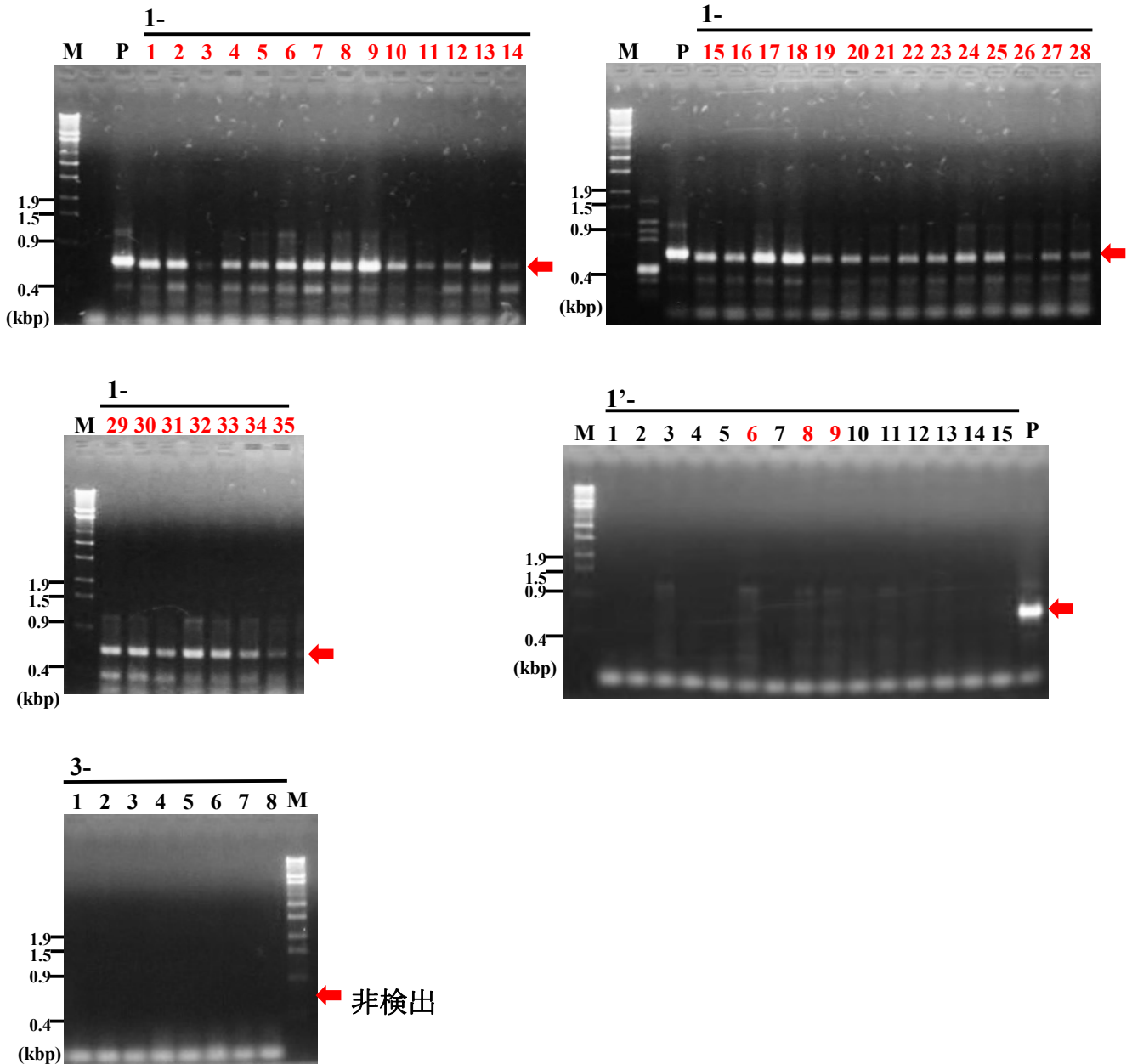


Figure 40

Protoplast-PEG法によるP2株への MoCV1-Dウイルス粒子のトランスフェクション。

トランスフェクション処理後再生したコロニーをPDA 培地上で3回継代培養した菌体からRT-PCRでMoCV1-Dの存在を確認した。P2をレシピエントとして、ショ糖濃度勾配遠心で得た精製MoCV1-D VP溶液またはBuffer Aを処理した。666 bpのMoCV1-D ORF1アンプリコンを矢印で示した。

Recipient: P2-GFP (Virus-free)

← MoV2-specific amplicon(370 bp)

MoCV1-D VP処理 : 1-1~35, 1'-1~15

VP-lacking buffer A処理 : 3-1~8

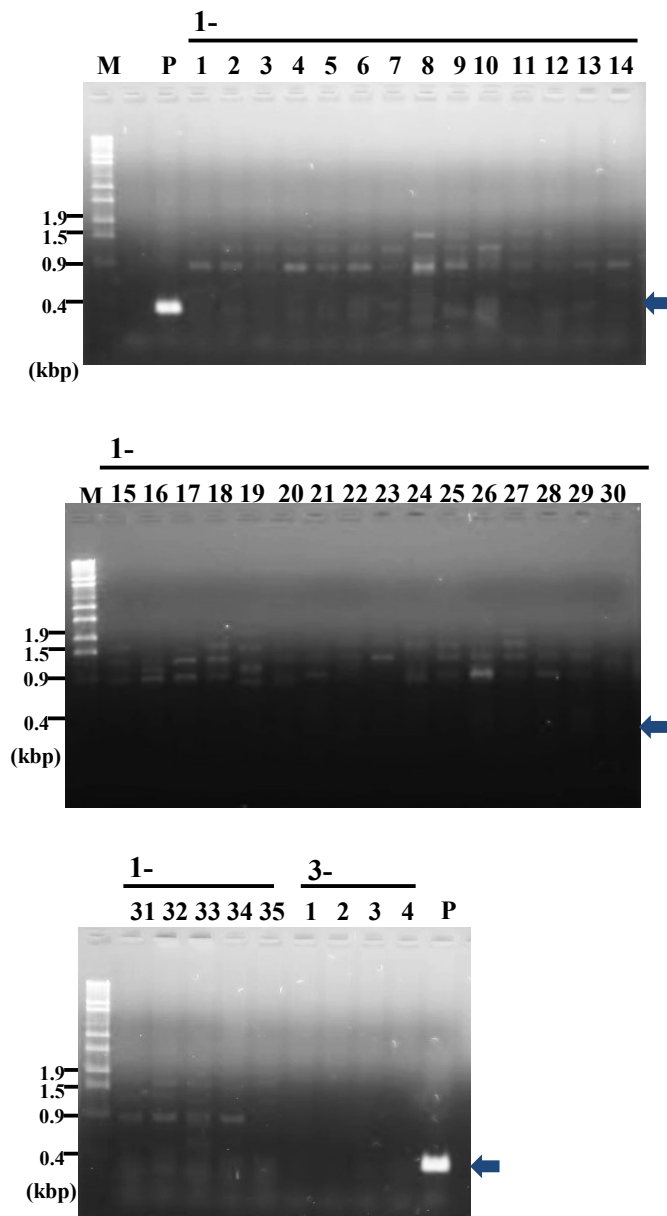


Figure 41

Protoplast-PEG法によるP2株への MoCV1-Dウイルス粒子のトランスフェクション。

トランスフェクション処理後再生したコロニーをPDA 培地上で3回継代培養した菌体からRT-PCRでMoV2の存在を確認した。P2をレシピエントとして、ショ糖濃度勾配遠心で得られたMoV2ゲノムを含む精製MoCV1-D VP溶液またはBuffer Aを処理した。370 bpのMoV2特異的アンプリコンを矢印で示した。

Recipient: P2-GFP (Virus-free)

MoCV1-D VP処理 : 1-1~40, 1'-1~20
VP-lacking buffer A処理 : 3-1~8

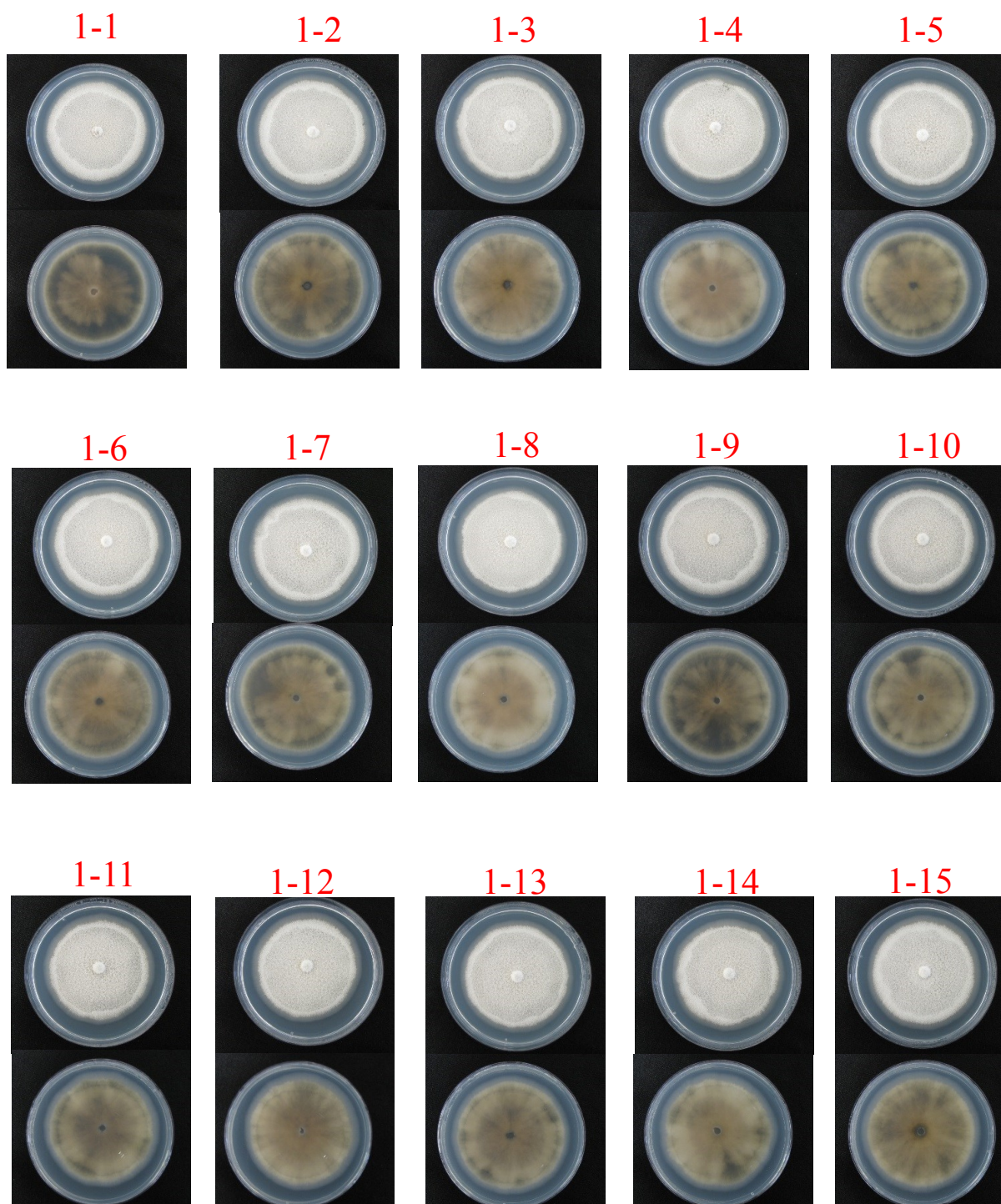
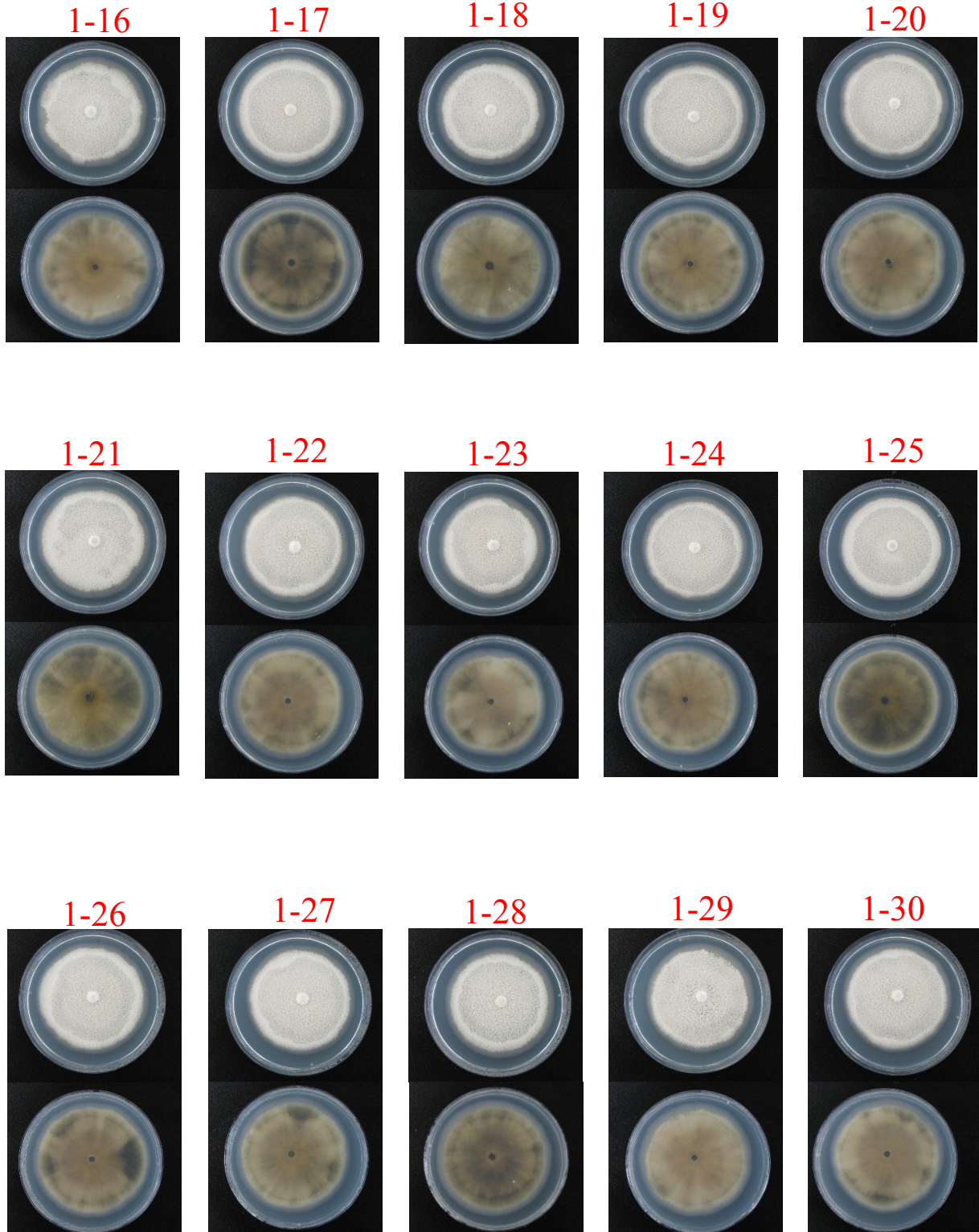


Figure 42
MoCV1-D VPまたはVP-lacking buffer A導入P2株の表現型

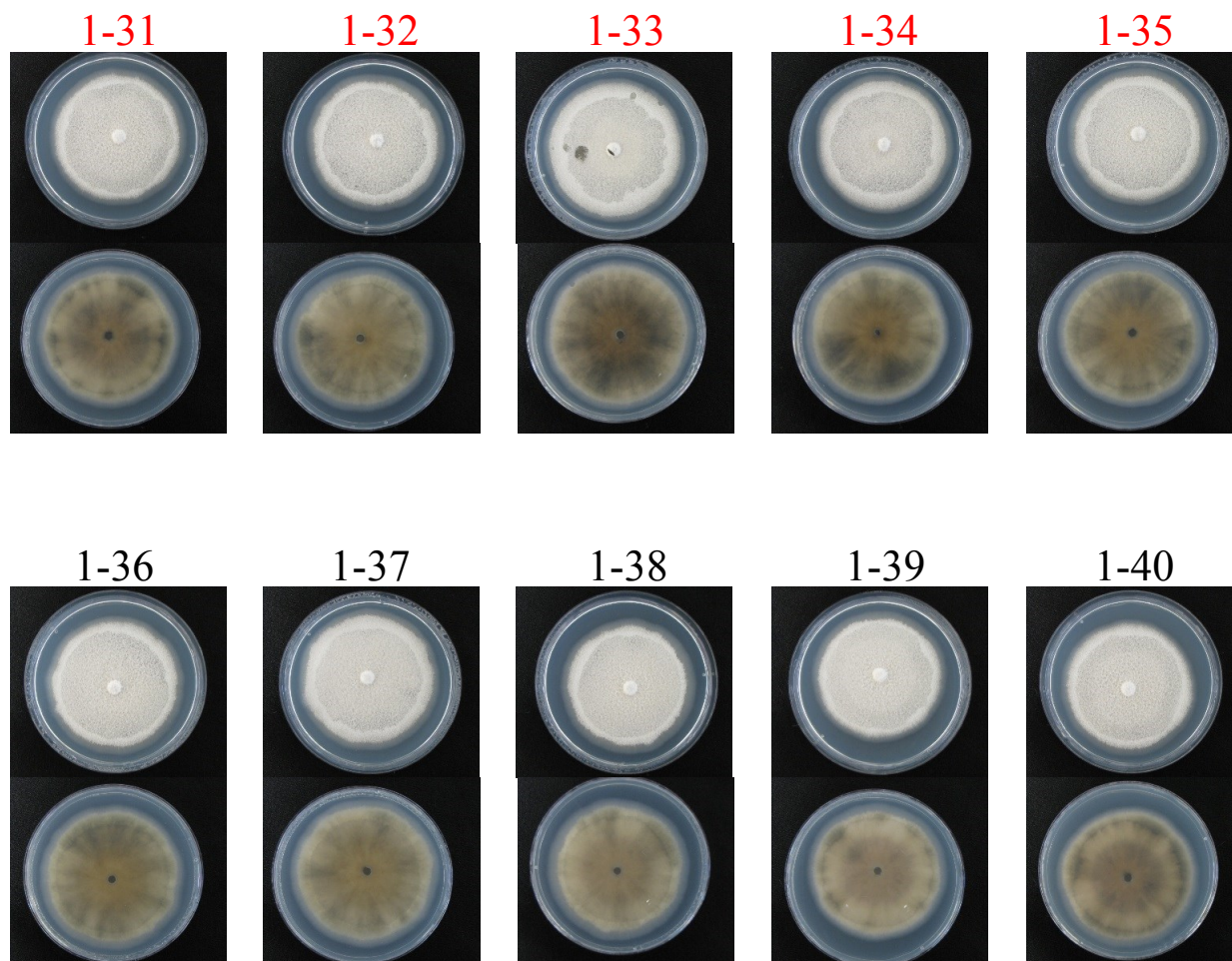
Recipient: P2-GFP (Virus-free)

MoCV1-D VP处理 : 1-1~40, 1'-1~20
VP-lacking buffer A处理 : 3-1~8



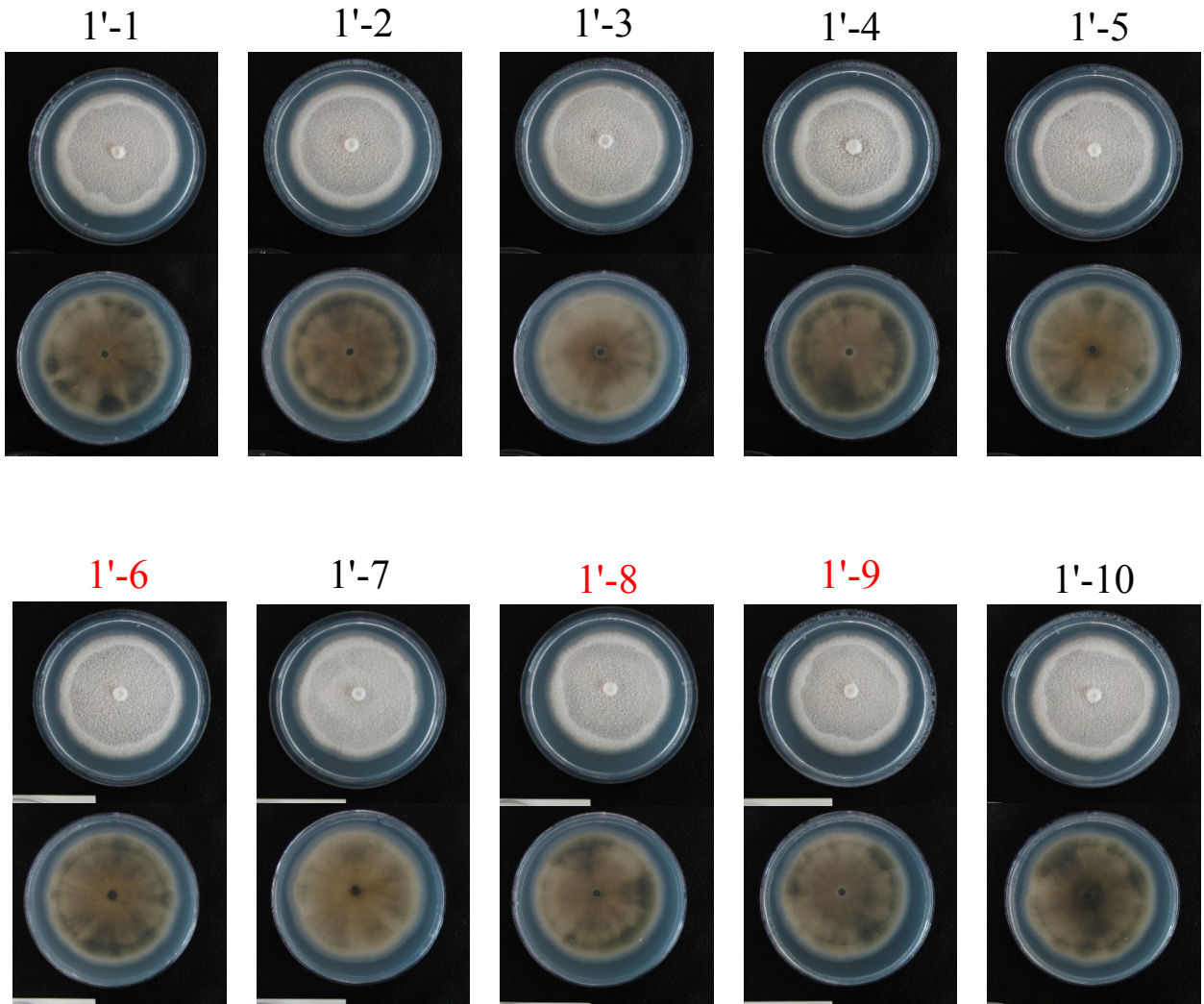
Recipient: P2-GFP (Virus-free)

MoCV1-D VP处理 : 1-1~40, 1'-1~20
VP-lacking buffer A处理 : 3-1~8



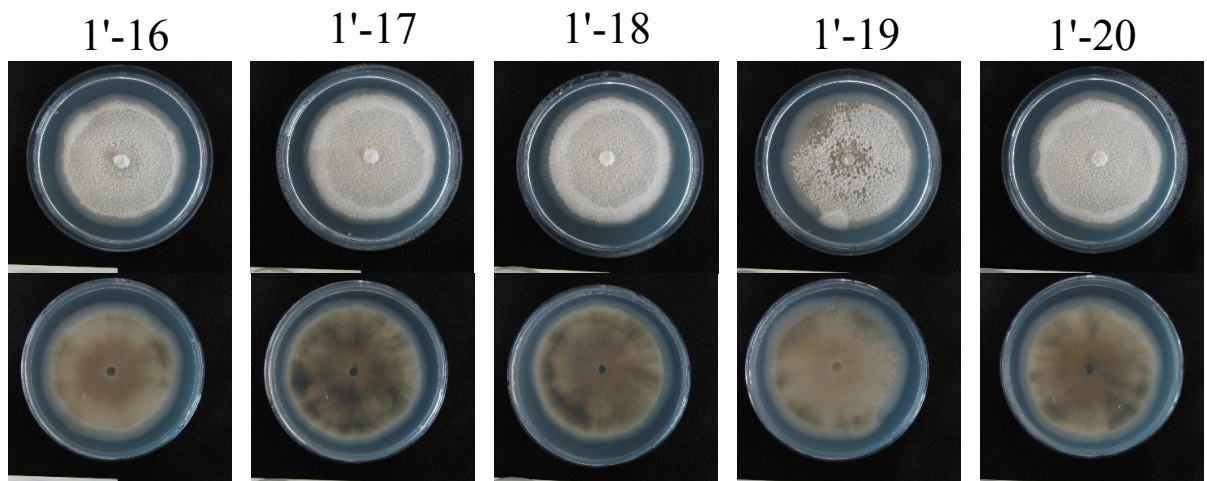
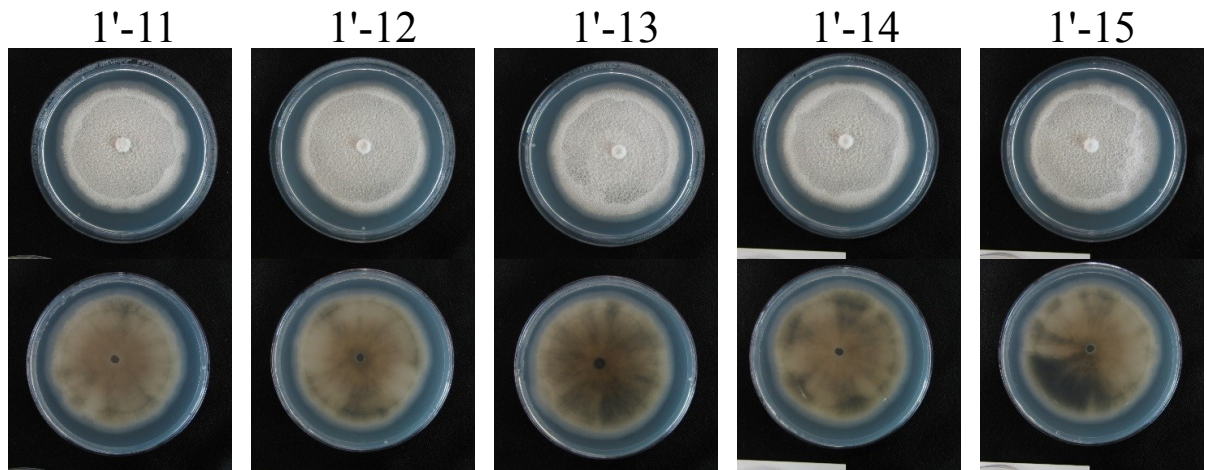
Recipient: P2-GFP (Virus-free)

MoCV1-D VP处理 : 1-1~40, 1'-1~20
VP-lacking buffer A处理 : 3-1~8



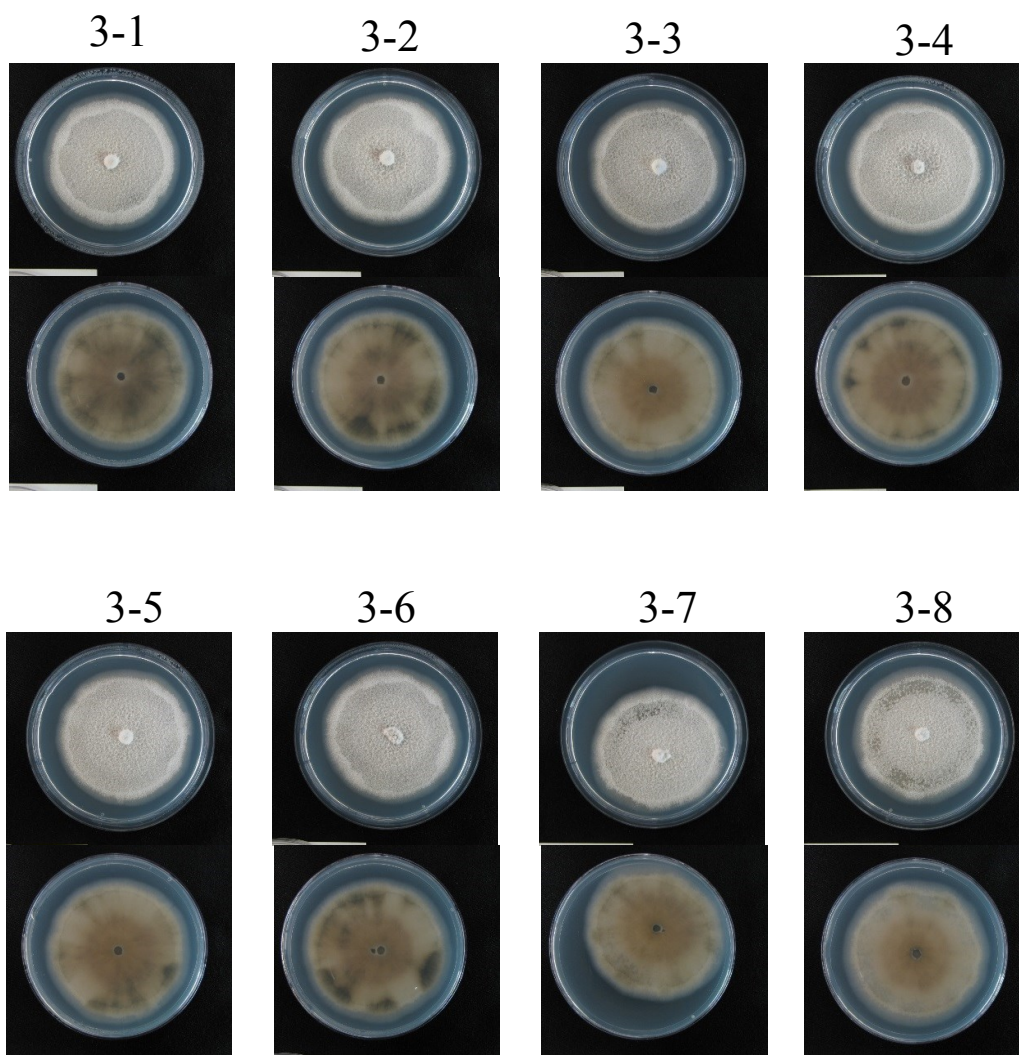
Recipient: P2-GFP (Virus-free)

MoCV1-D VP处理 : 1-1~40, 1'-1~20
VP-lacking buffer A处理 : 3-1~8



Recipient: P2-GFP (Virus-free)

MoCV1-D VP处理 : 1-1~40, 1'-1~20
VP-lacking buffer A处理 : 3-1~8



Recipient: 日本採取株APU10-199A (MoV2-, MoCV1-D-, MoPV1+)

MoCV1-D VP処理 : 2-1~35, 2'-1~15
 VP-lacking buffer A処理 : 4-1~4

P: Purified MoCV1-D dsRNA template

← MoCV1-D-Specific amplicon(666 bp)

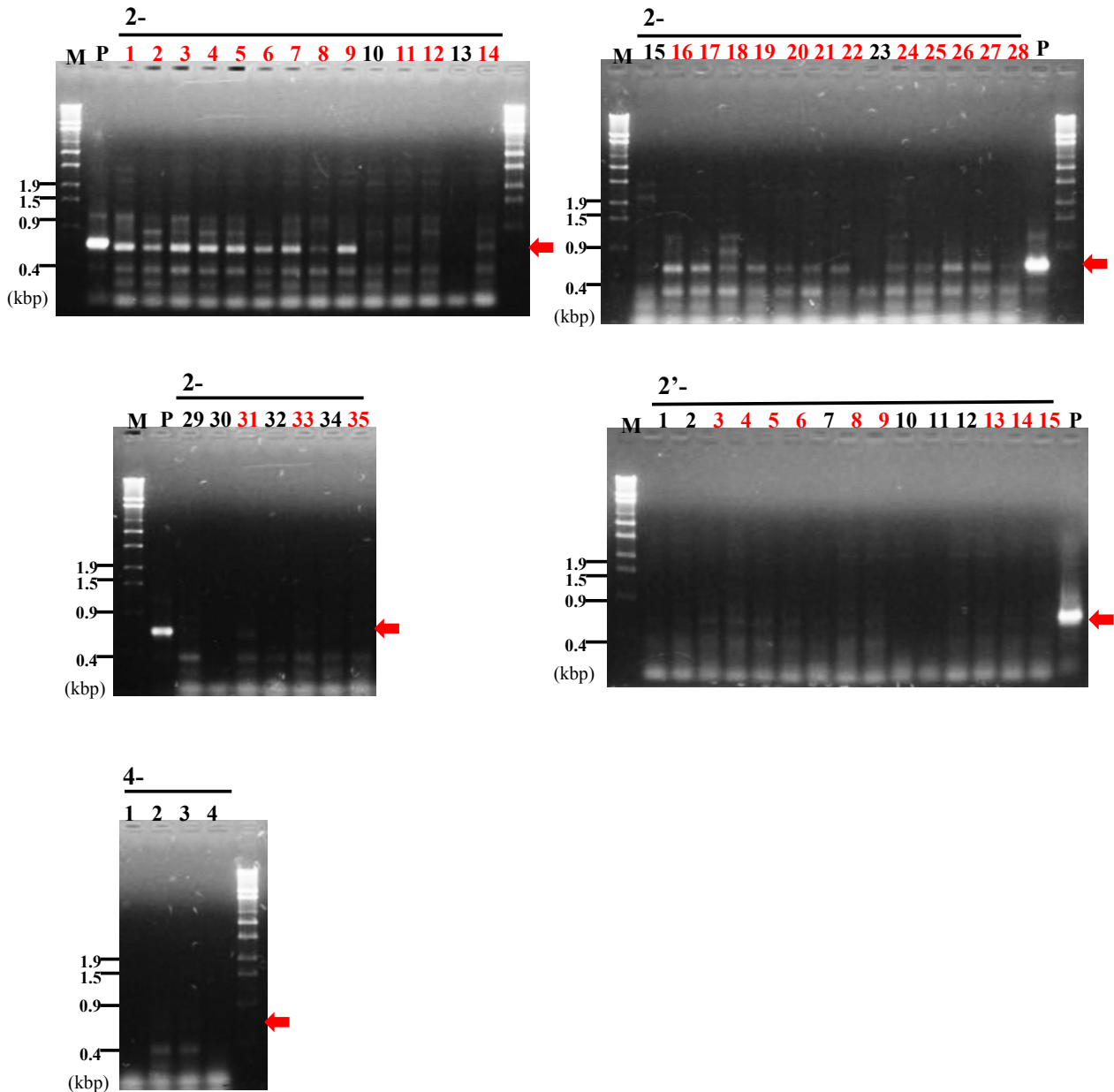


Figure 43

Protoplast-PEG法によるMoV2・MoCV1-Dフリー株への MoCV1-Dウイルス粒子のトランスフェクション。

トランスフェクション処理後再生したコロニーをPDA 培地上で3回継代培養した菌体からRT-PCRでMoCV1-Dの存在を確認した。MoV2・MoCV1-Dフリー株をレシピエントとして、ショ糖濃度勾配遠心で得た精製MoCV1-D VP溶液またはBuffer Aを処理した。666 bpのMoCV1-D ORF1アンプリコンを矢印で示した。

Recipient: 日本採取株APU10-199A (MoV2-, MoCV1-D-, MoPV1+)

MoCV1-D VP処理 : 2-1~35

← MoV2-specific amplicon(370 bp)

VP-lacking buffer A処理 : 4-1~4

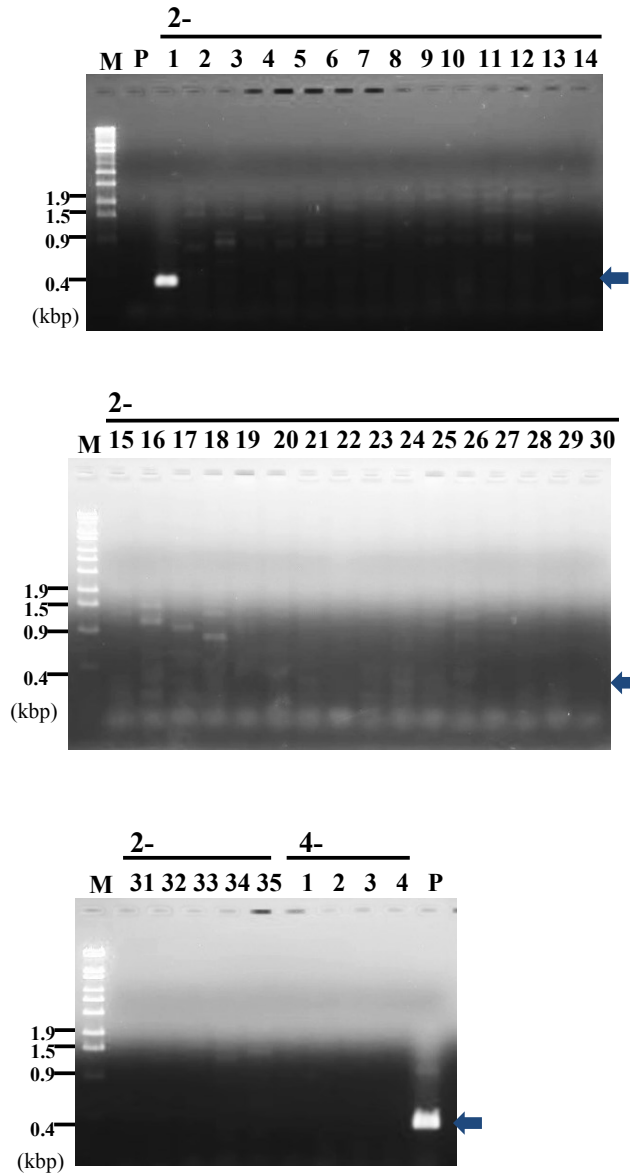


Figure 44

Protoplast-PEG法によるMoV2・MoCV1-Dフリー株への MoCV1-Dウイルス粒子のトランスフェクション。

トランスフェクション処理後再生したコロニーをPDA 培地上で3回継代培養した菌体からRT-PCRでMoV2の存在を確認した。MoV2・MoCV1-Dフリー株をレシピエントとして、ショ糖濃度勾配遠心で得られたMoV2ゲノムを含む精製MoCV1-D VP溶液またはBuffer Aを処理した。370 bpのMoV2特異的アンプリコンを矢印で示した。

Recipient: 日本採取株APU10-199A (MoV2-, MoCV1-D-, MoPV1+)

MoCV1-D VP処理 : 2-1~40, 2'-1~20

VP-lacking buffer A処理 : 4-1~8

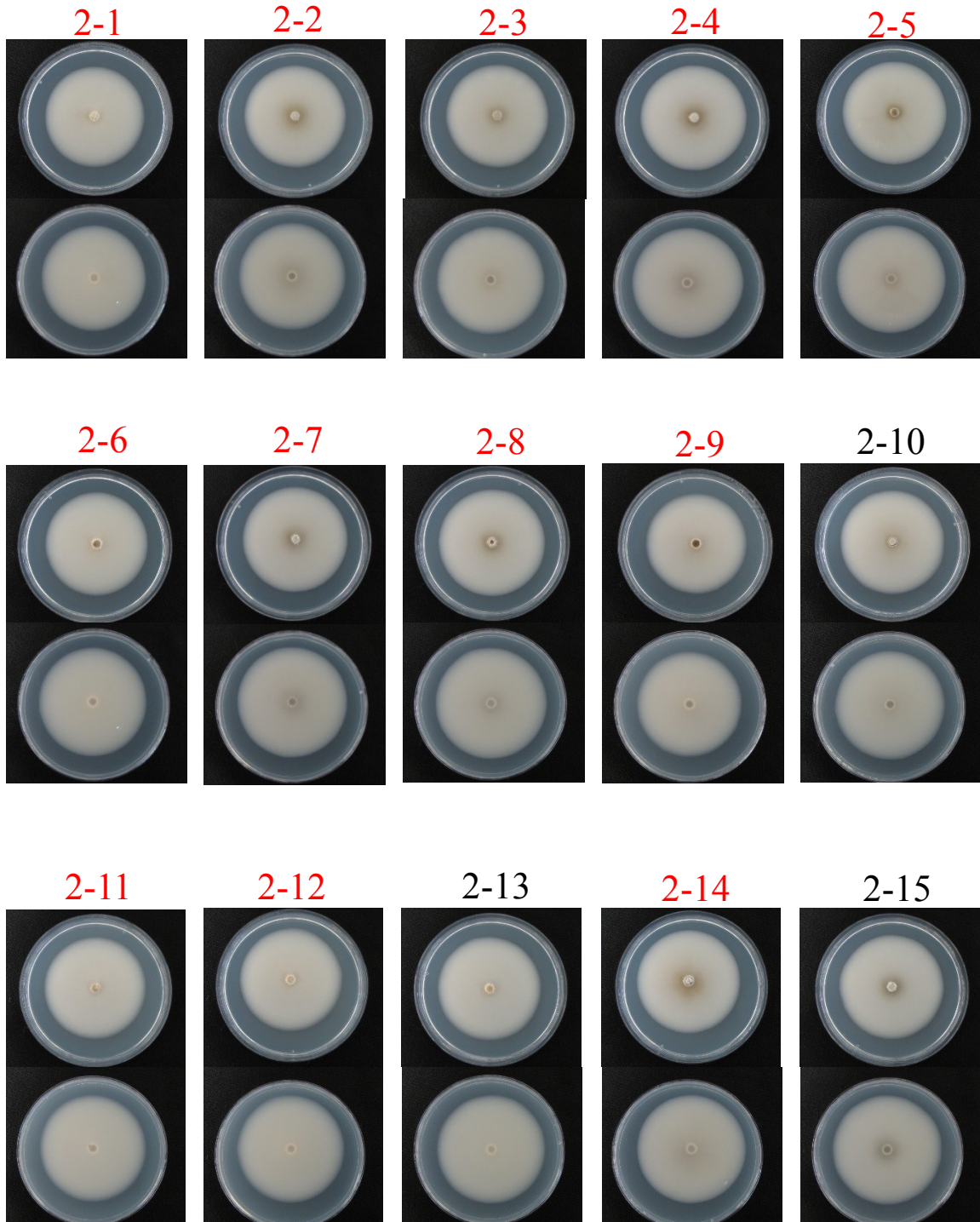
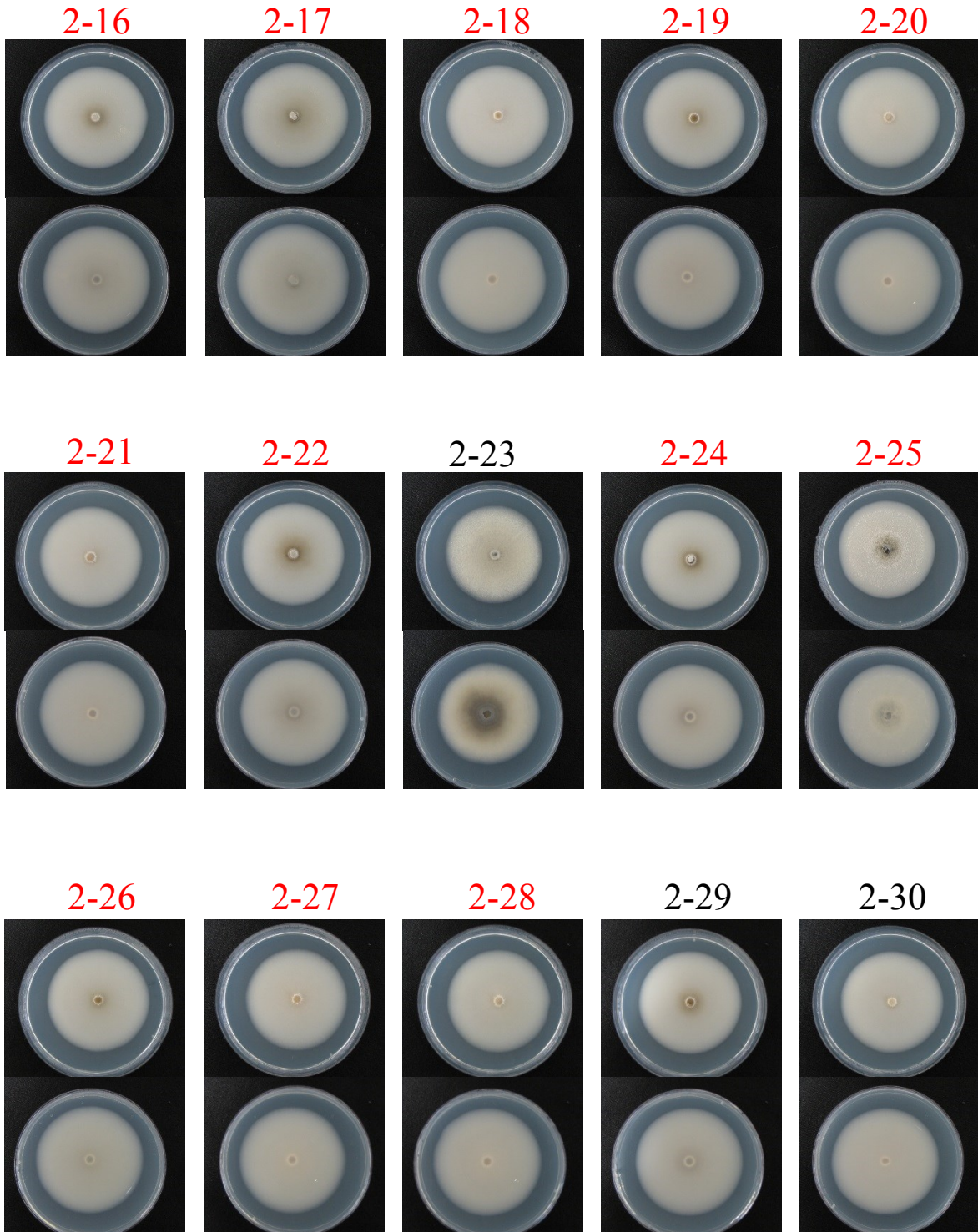


Figure 45
MoCV1-D VPまたはVP-lacking buffer A導入APU10-199A株(MoV2-, MoCV1-D-, MoPV1+)の表現型

Recipient: 日本採取株APU10-199A (MoV2-, MoCV1-D-, MoPV1+)

MoCV1-D VP処理 : 2-1~40, 2'-1~20

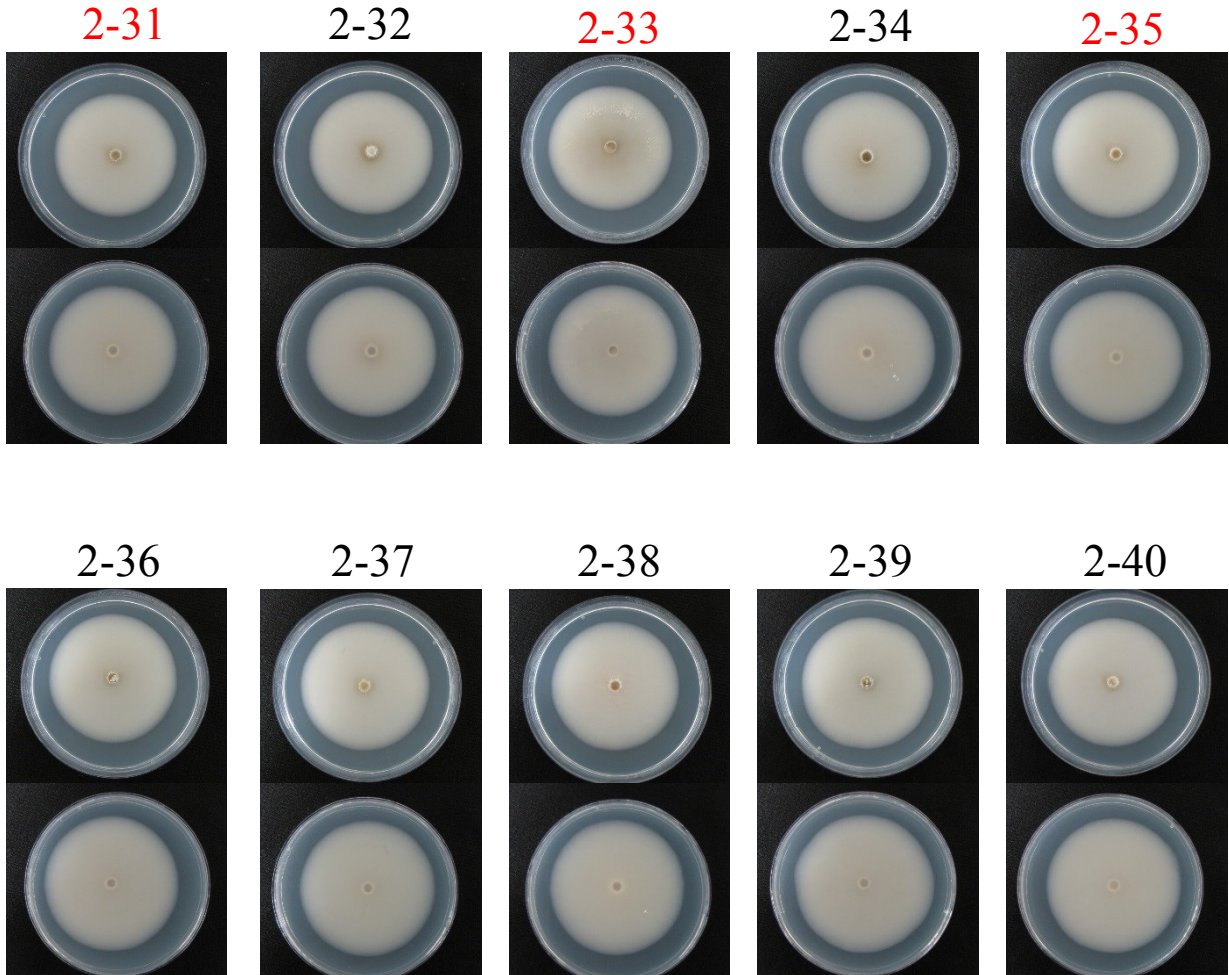
VP-lacking buffer A処理 : 4-1~8



Recipient: 日本採取株APU10-199A (MoV2-, MoCV1-D-, MoPV1+)

MoCV1-D VP処理 : 2-1~40, 2'-1~20

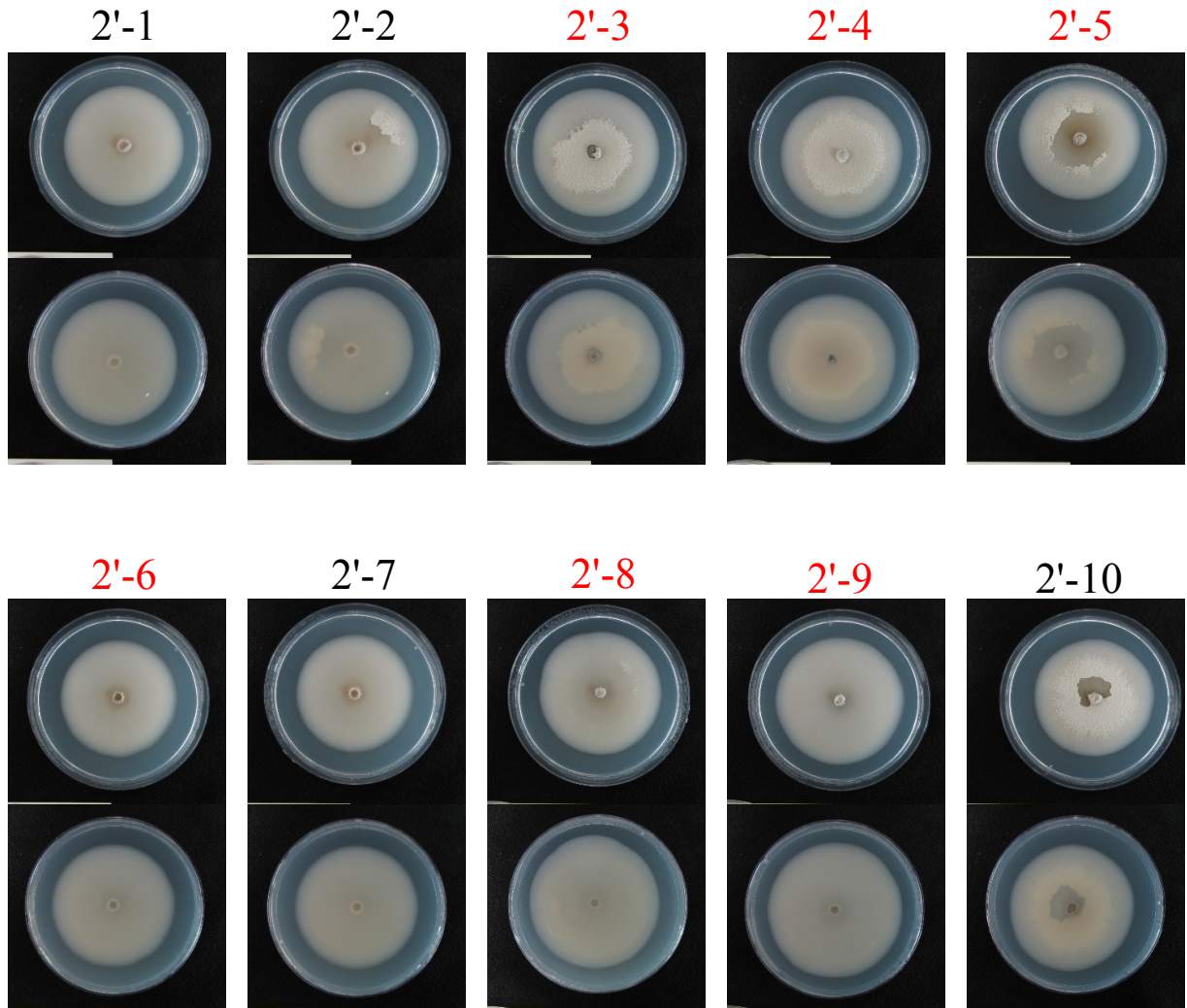
VP-lacking buffer A処理 : 4-1~8



Recipient: 日本採取株APU10-199A (MoV2-, MoCV1-D-, MoPV1+)

MoCV1-D VP処理 : 2-1~40, 2'-1~20

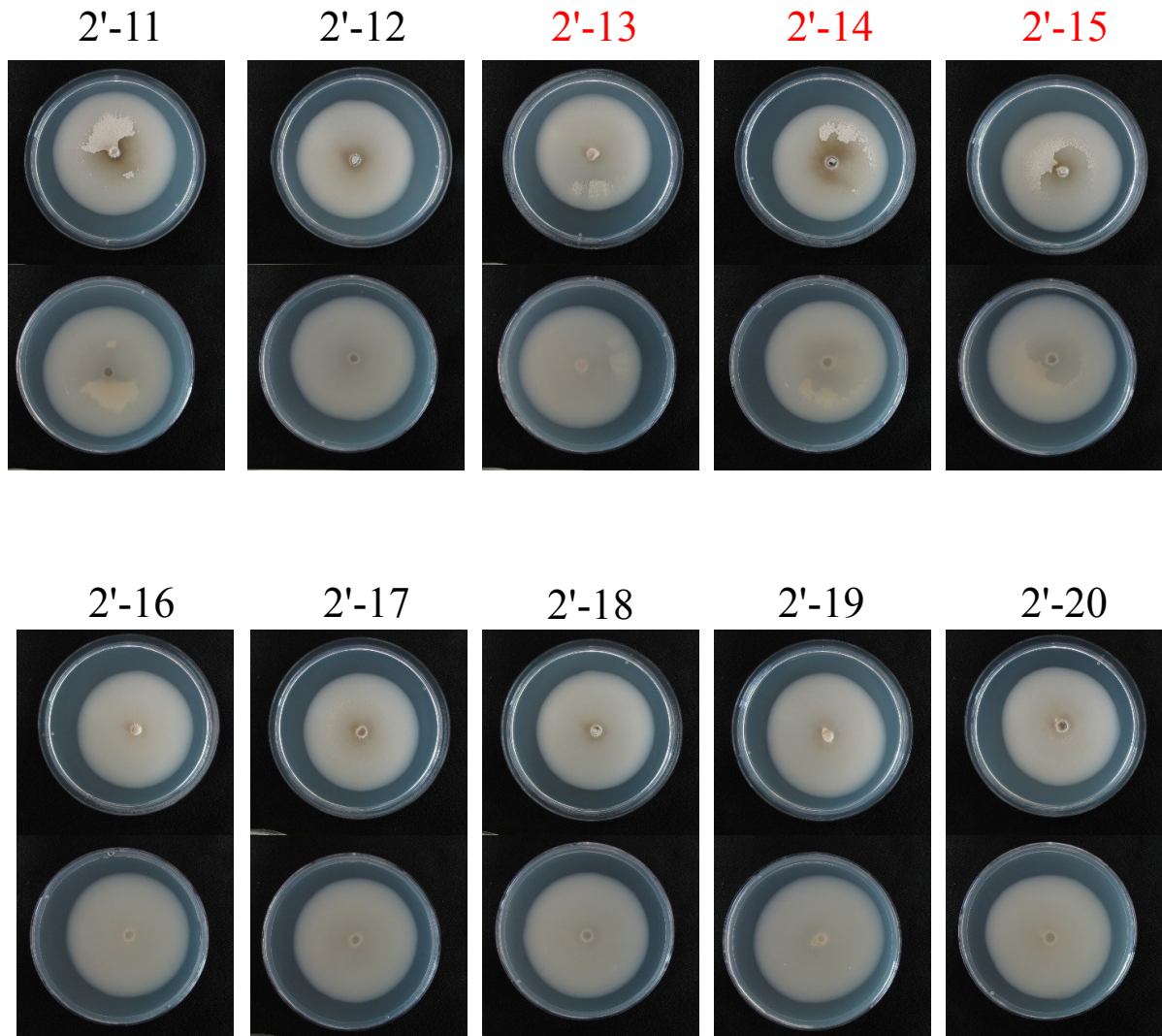
VP-lacking buffer A処理 : 4-1~8



Recipient: 日本採取株APU10-199A (MoV2-, MoCV1-D-, MoPV1+)

MoCV1-D VP処理 : 2-1~40, 2'-1~20

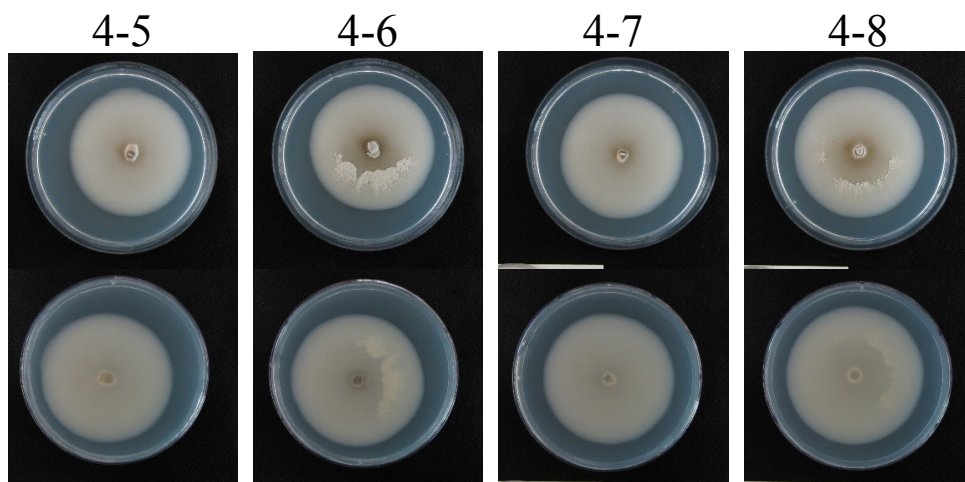
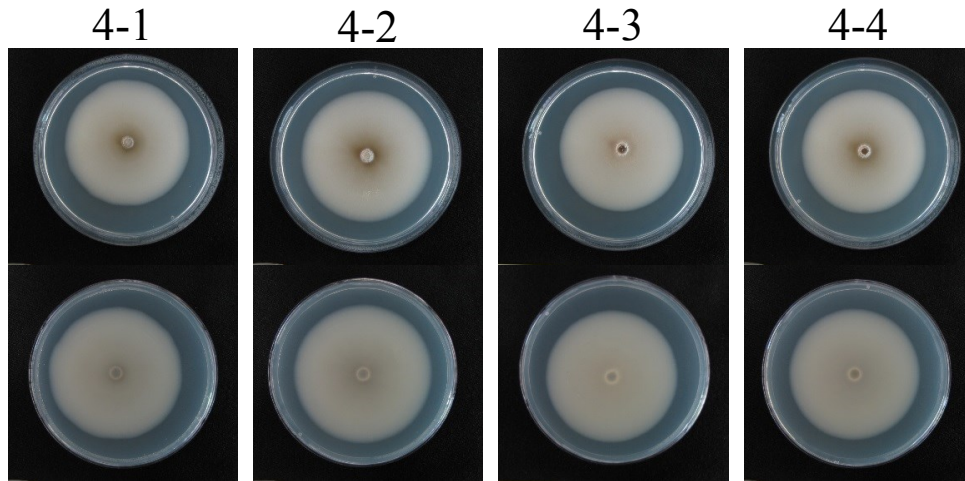
VP-lacking buffer A処理 : 4-1~8



Recipient: 日本採取株APU10-199A (MoV2-, MoCV1-D-, MoPV1+)

MoCV1-D VP処理 : 2-1~40, 2'-1~20

VP-lacking buffer A処理 : 4-1~8



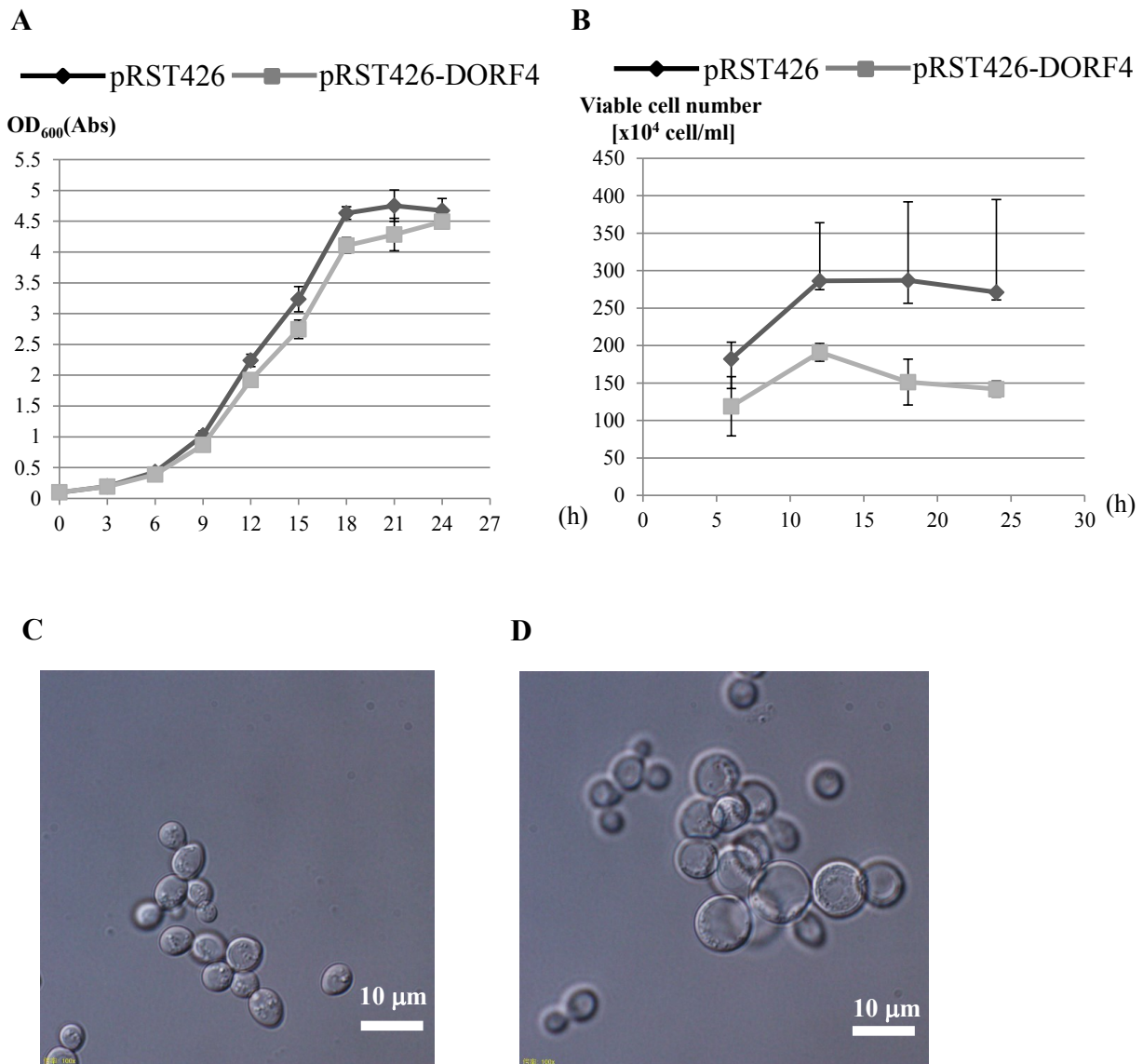


Figure 46

***S. cerevisiae* 内でのMoCV1-D DORF4p発現の影響 (30°C)。**

(A, B) pRST426-DORF4及びpRST426-empty形質転換体の生育曲線を示した。3時間ごとのOD₆₀₀値(A)と6時間ごとの生菌細胞数(B)を示した。(C, D) 30°C・18時間培養したpRST426-empty形質転換体(C)とpRST426-DORF4形質転換体(D)の細胞形態をDICで観察した。

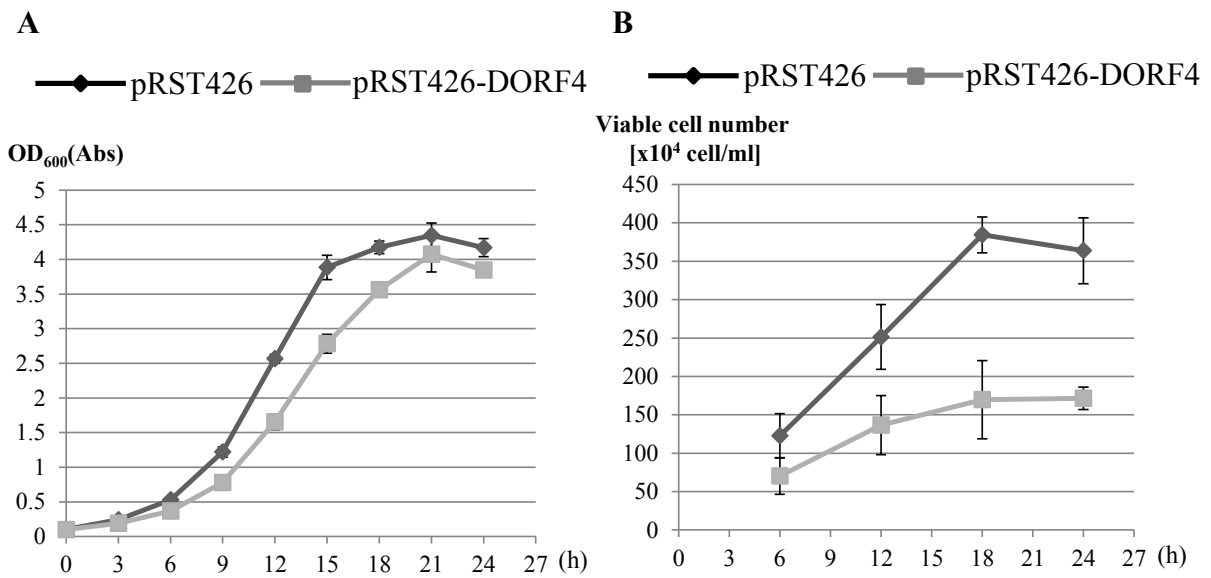


Figure 47

***S. cerevisiae* 内でのMoCV1-D DORF4p発現の影響 (35 °C)。**

(A, B) pRST426-DORF4及びpRST426-empty形質転換体の生育曲線を示した。3時間ごとのOD₆₀₀値(A)と6時間ごとの生菌細胞数(B)を示した。

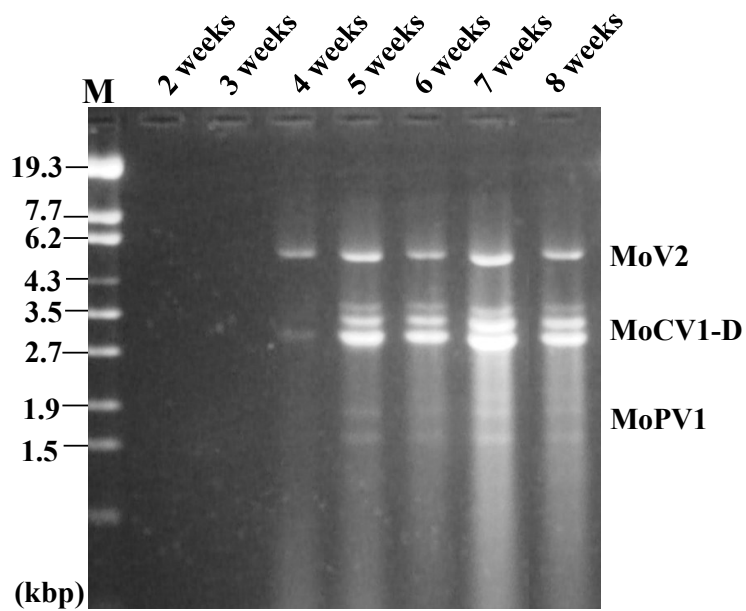


Figure 48

APU10-199A株のフラスコ培養上清からのマイコウイルス検出。

APU10-199A株を2-8週間フラスコ振盪培養した時の培養上清(250 μ l) から全核酸を抽出しアガロースゲル電気泳動で展開した。

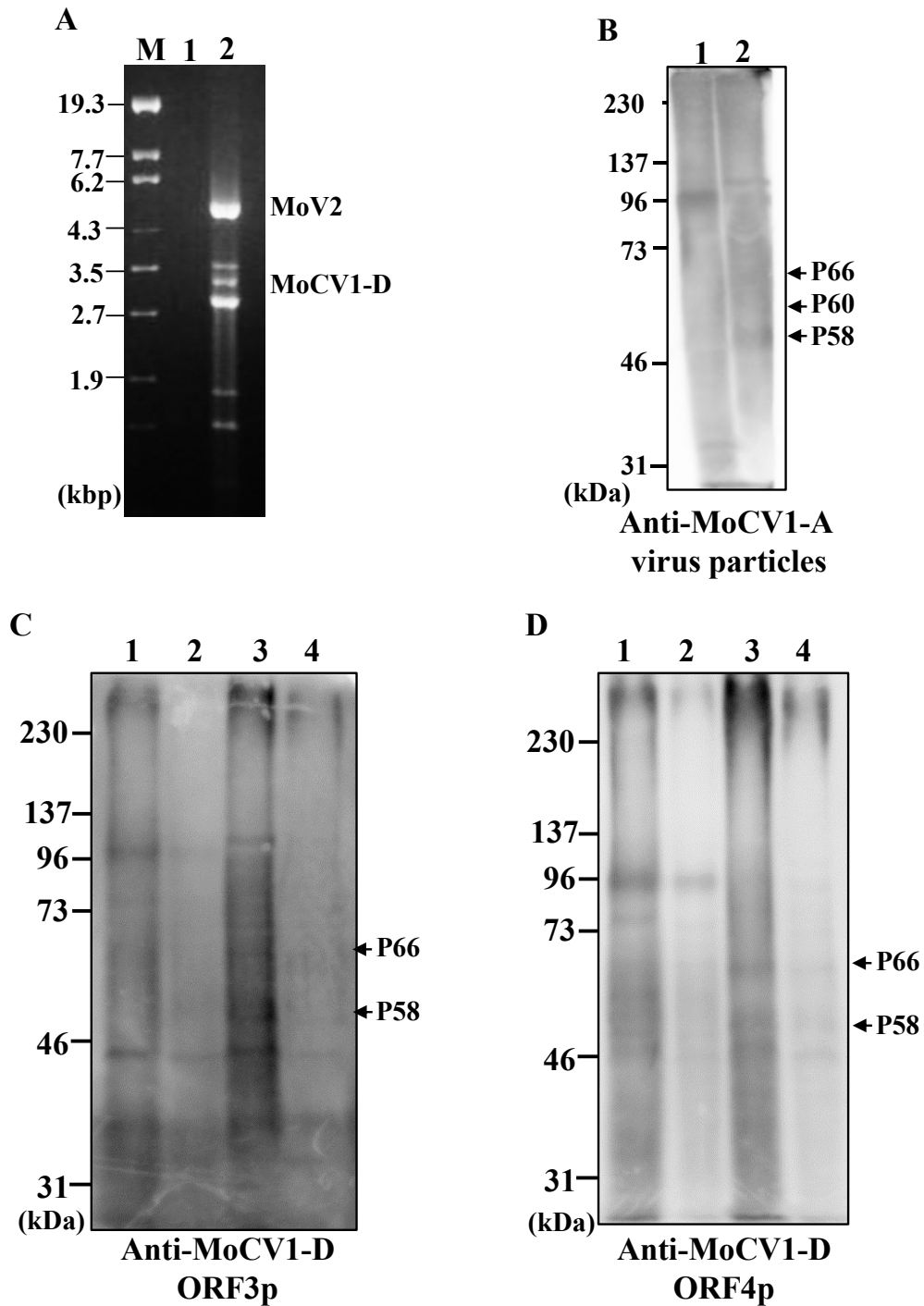
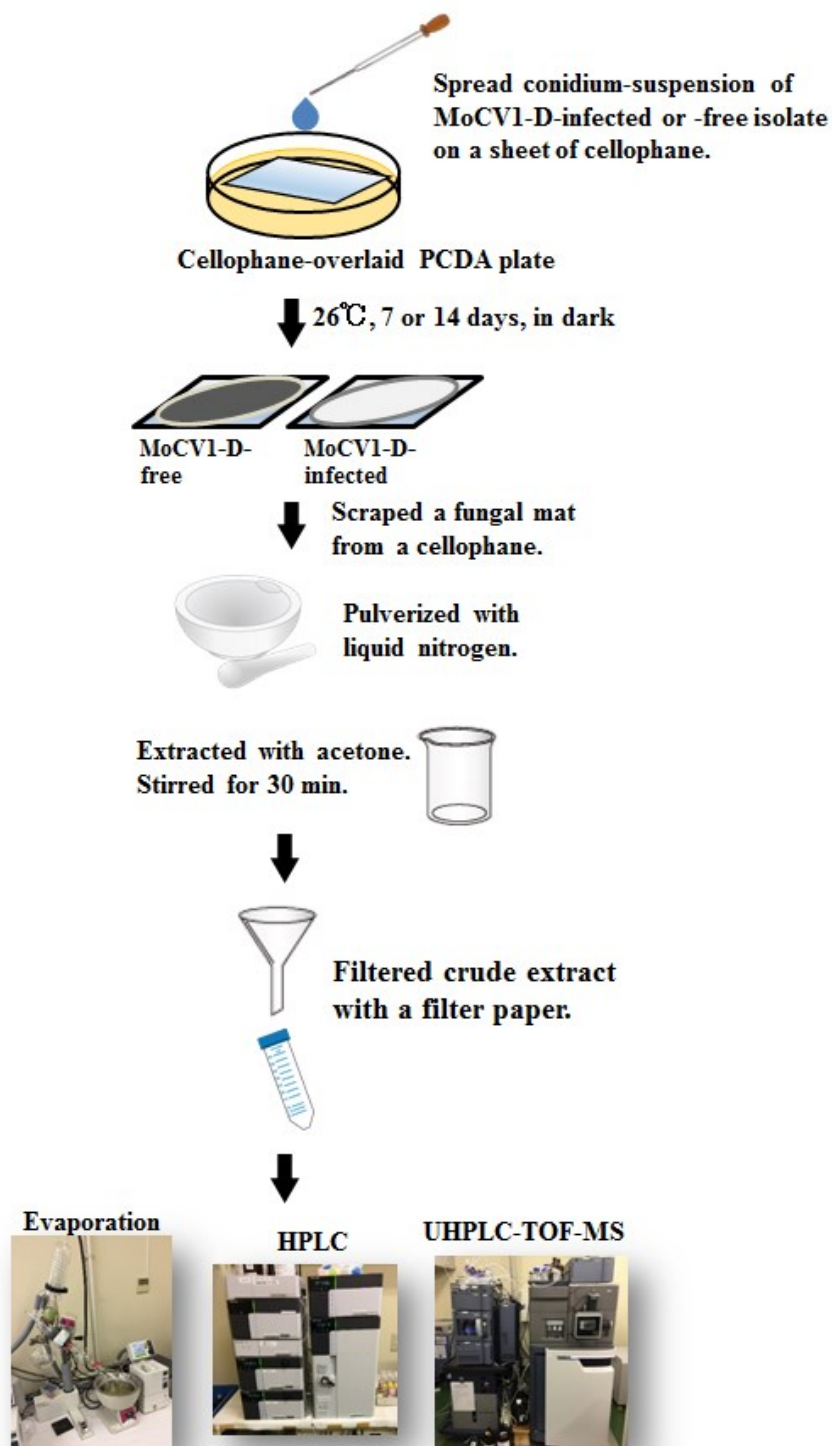


Figure 49

微生物培養装置で培養したAPU10-199Aの培養上清からのマイコウイルス検出。

(A) APU10-199A株を微生物培養装置で15日間培養し培養上清を一部回収して超遠心分離で濃縮した。再懸濁液50 μ lから全核酸を抽出しアガロースゲル電気泳動で展開した。Lane 1: the MoCV1-D- and MoV2-free APU10-199A株; lane 2, APU10-199A株。(B) SDS-PAGE で展開しAnti-MoCV1-A virus particles 抗血清でウェスタンブロット解析を行った。Lane 1: the MoCV1-D- and MoV2-free APU10-199A株; lane 2, APU10-199A株。

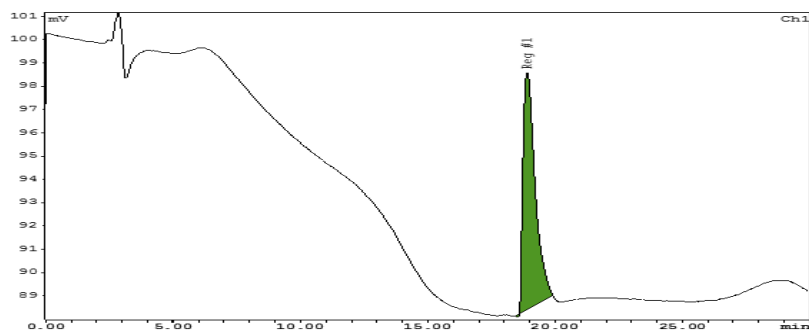
(C, D) Anti-MoCV1-D rORF3p抗血清(C)またはAnti-MoCV1-D rORF4p抗血清(D)でウェスタンブロット解析を行った。Lanes: 1, 2, the MoCV1-D- and MoV2-free APU10-199A; 3, 4, APU10-199A; 2, 4; 原液を5倍希釈した。



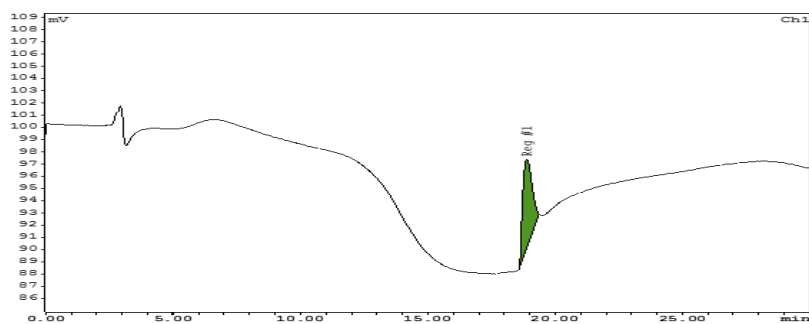
場所：残留農薬研究所 代謝研究室

Figure 50
イネいもち病菌からのメラニン生合成関連中間体の抽出・分析工程。

HPLC condition 1



HPLC condition 2



HPLC condition 3

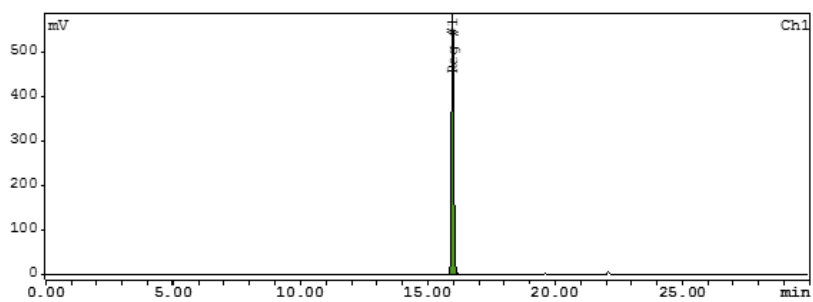
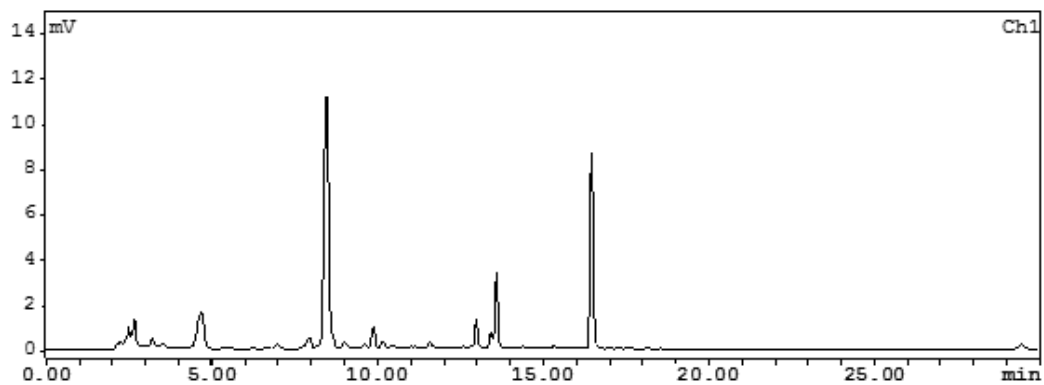


Figure 51

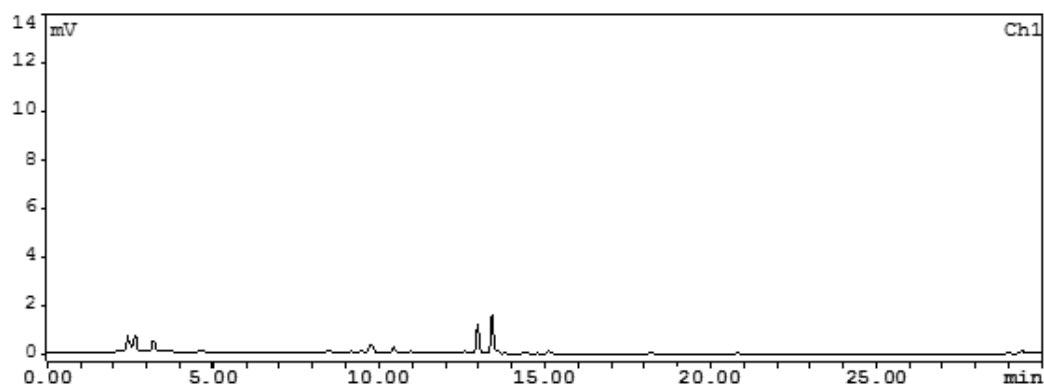
1,8-Dihydroxynaphthalene (1,8-DHN)の分析条件検討。

アセトニトリルに溶解させた1,8-DHN標準品 1,000 ppmを異なる分析条件(HPLC condition 1~3)でHPLCにて分析した。

MoCV1-D-free isolate (DF)



MoCV1-D-infected isolate (DI)



P2-GFP (virus-free)

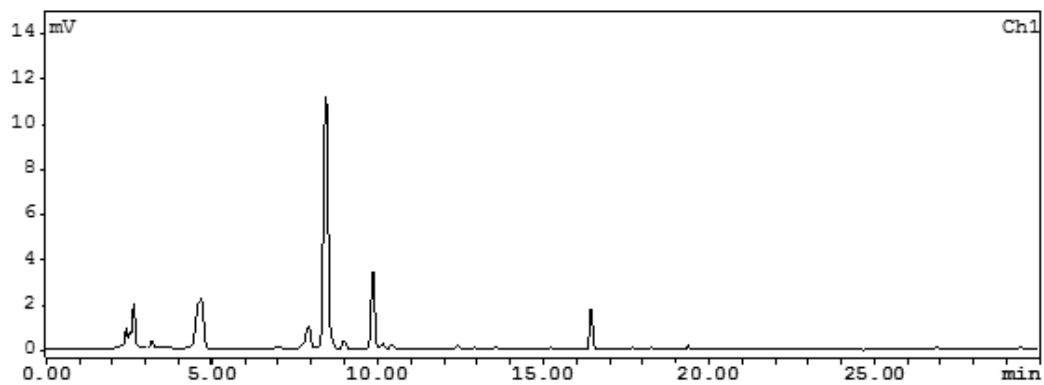


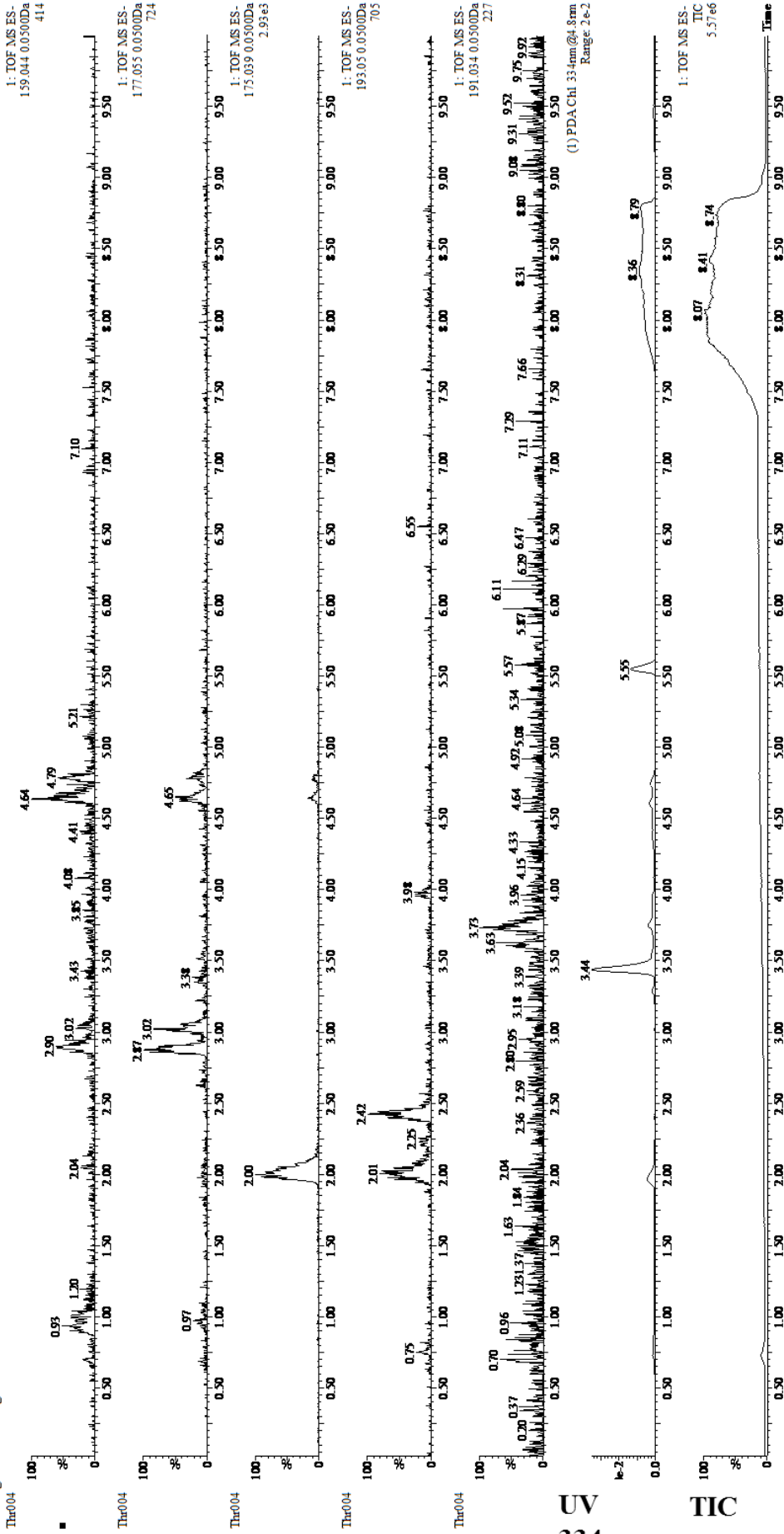
Figure 52

ウイルス感染株とウイルスフリー化株のアセトン抽出画分のHPLCクロマトグラム。

APU10-199A株、MoCV1-D-free APU10-199A株及びP2株のアセトン抽出画分をHPLCで分析した。

A MoCV1-D-free Isolate (DF)

Through.004 VF nega.



B

Through.004 VF nega.
Thr004 520 (1.996)

1: TOF MS ES-
8.76e3

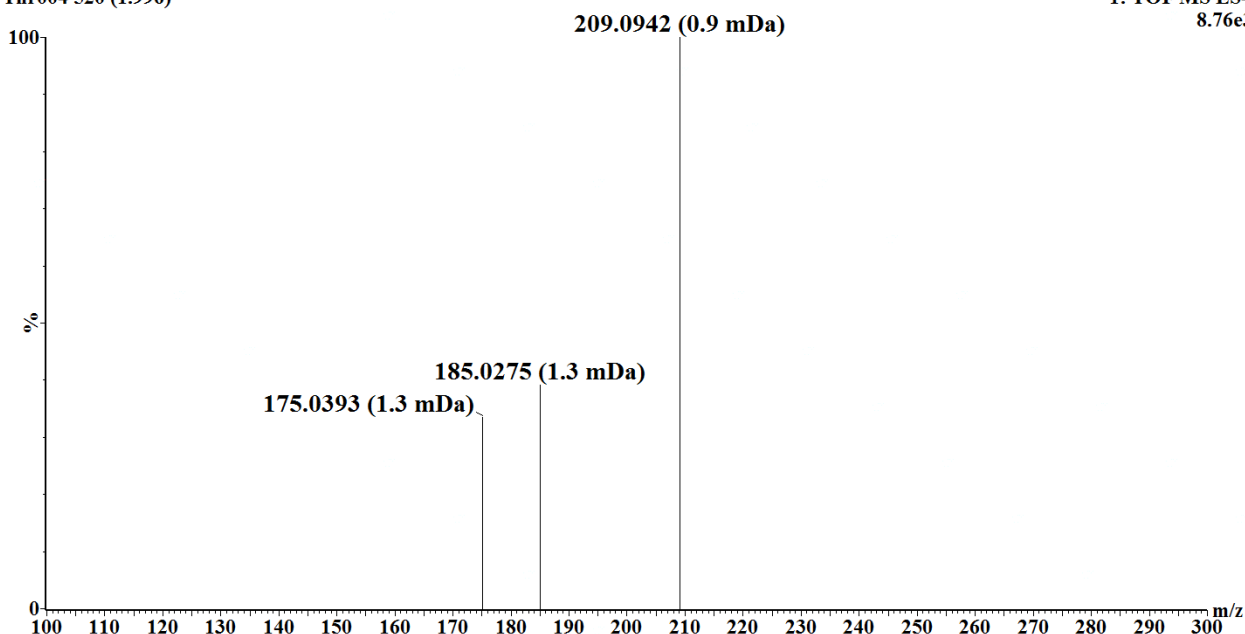


Figure 53

MoCV1-D-free APU10-199A株のUHPLC-TOF-MS解析。

アセトン抽出画分を溶媒置換しMS condition 1で質量分析した。

(A) 下段にTIC、PDA UV 334 nmの吸収を示した。また上段から、1,8-DHN(Exact mass: 160.0524)、vermelone(Exact mass: 178.0630)、1,3,8-THN(Exact mass: 176.0473)、scytalone(Exact mass: 194.0579)、1,3,6,8-THN(Exact mass: 192.0423)(付録 4を参照)の各プロトン脱離分子[M-H]⁻の抽出イオンクロマトグラムを示した。(B) *Rt.* 2.0 minのマスペクトルを示した。

B

Through.006 P2GFP nega.
Thr006 520 (1.996)

1: TOF MS ES-
6.09e3

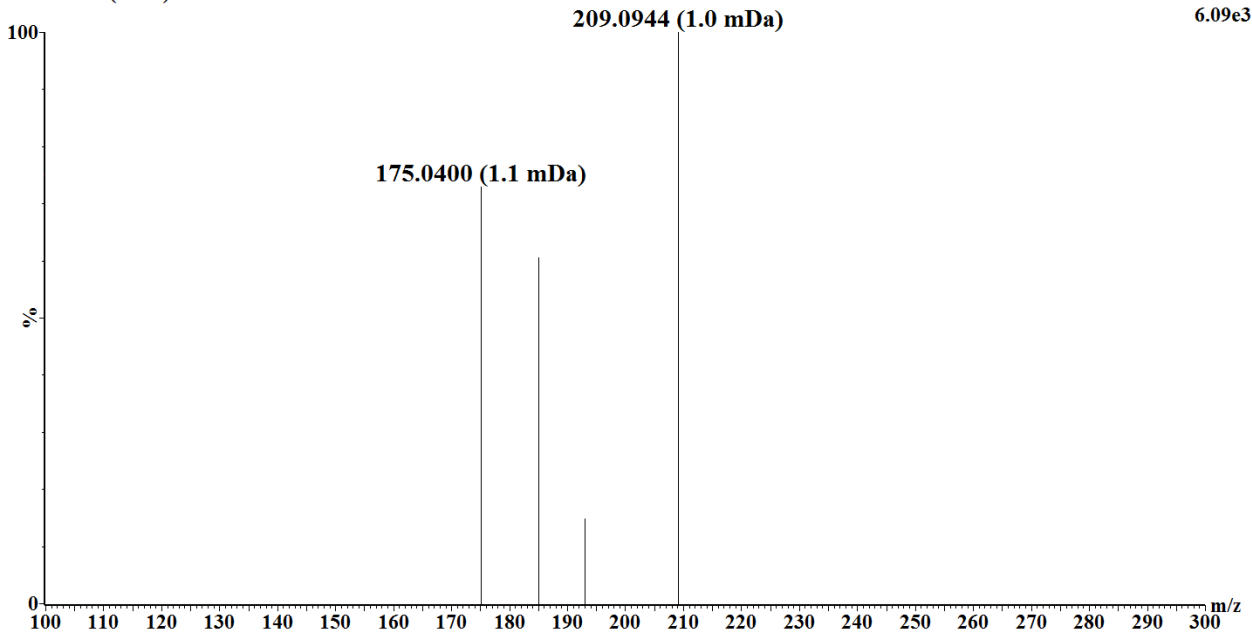
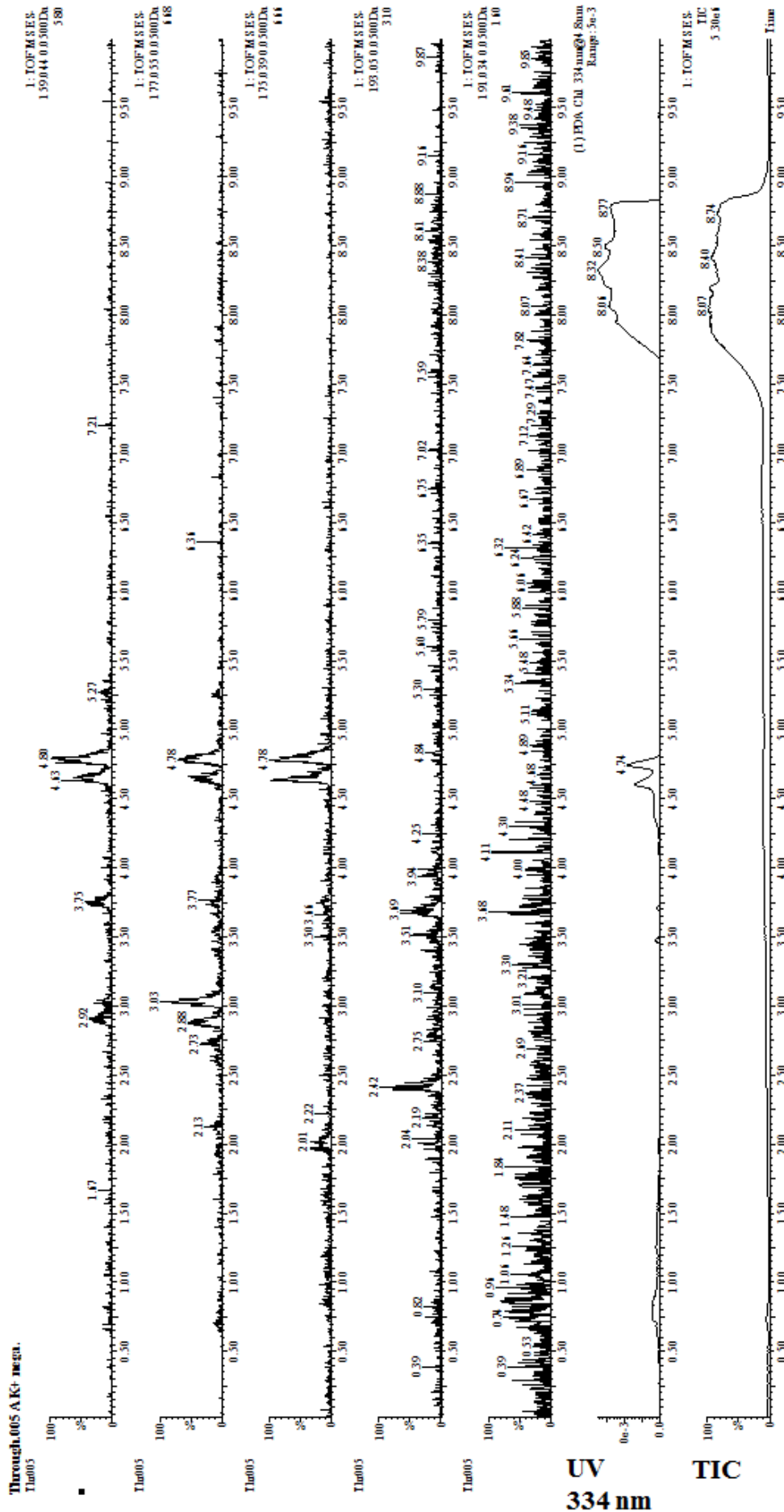


Figure 54

P2株のUHPLC-TOF-MS解析。

アセトン抽出画分を溶媒置換しMS condition 1で質量分析した。
(A) 下段にTIC、PDA UV 334 nmの吸収を示した。また上段から、1,8-DHN(Exact mass: 160.0524)、vermelone(Exact mass: 178.0630)、1,3,8-THN(Exact mass: 176.0473)、scytalone(Exact mass: 194.0579)、1,3,6,8-THN(Exact mass: 192.0423)(付録 4を参照)の各プロトン脱離分子[M-H]⁻の抽出イオンクロマトグラムを示した。(B) Rt. 2.0 minのマススペクトルを示した。

A MoCV1-D-infected isolate (DI)



B

Through.005 AK+ nega.
Thr005 520 (1.996)

1: TOF MS ES-
6.72e3

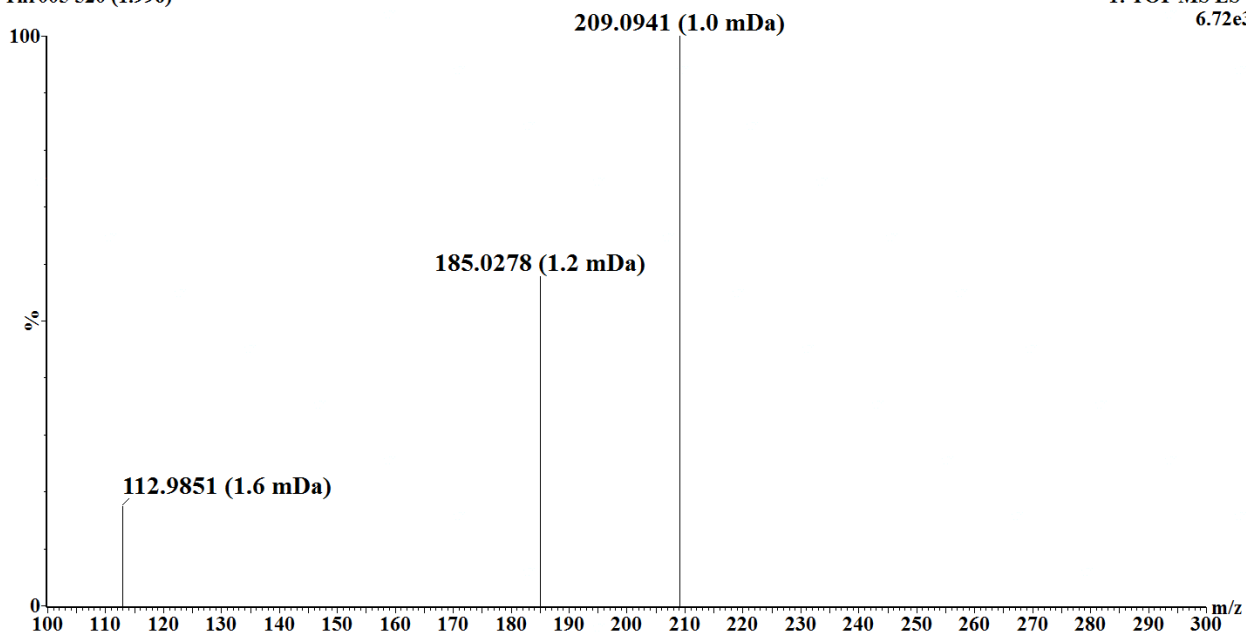
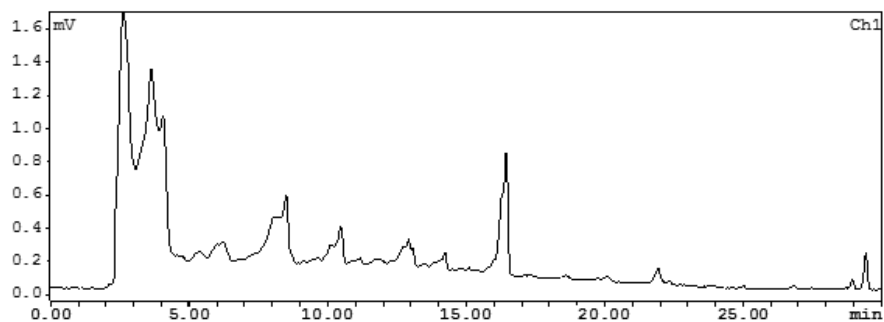


Figure 55

APU10-199A株のUHPLC-TOF-MS解析。

アセトン抽出画分を溶媒置換しMS condition 1で質量分析した。
(A) 下段にTIC、PDA UV 334 nmの吸収を示した。また上段から、1,8-DHN(Exact mass: 160.0524)、vermelone(Exact mass: 178.0630)、1,3,8-THN(Exact mass: 176.0473)、scytalone(Exact mass: 194.0579)、1,3,6,8-THN(Exact mass: 192.0423)(付録4を参照)の各プロトン脱離分子[M-H]⁻の抽出イオンクロマトグラムを示した。(B) *Rt.* 2.0 minのマススペクトルを示した。

MoCV1-D-free APU10-199A(DF)



MoCV1-D-infected APU10-199A(DI)

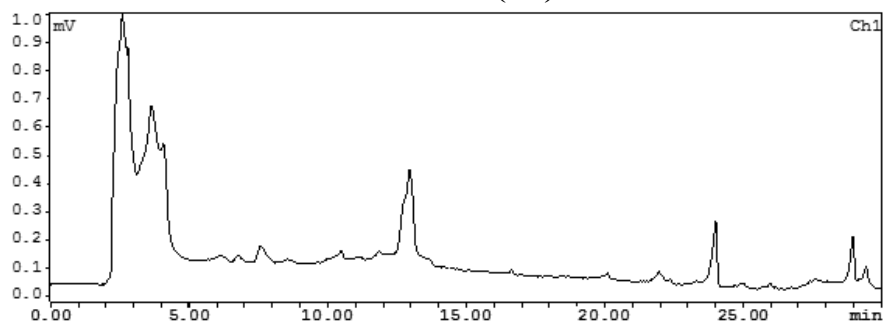


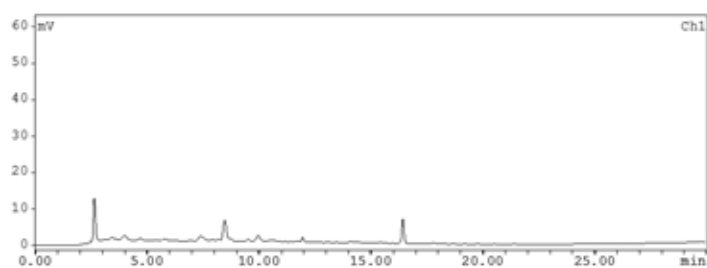
Figure 56

抽出方法の検討(リン酸バッファ懸濁)。

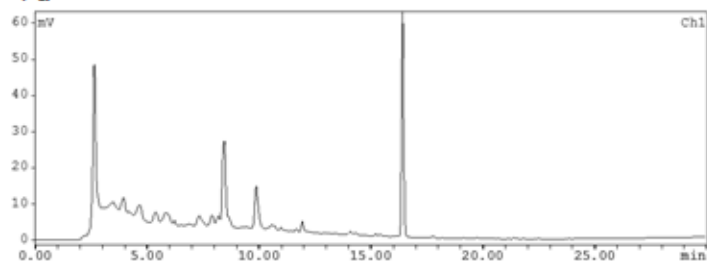
アセトンで攪拌抽出後にろ紙でフィルトレーションした後の菌叢粉末残渣をリン酸バッファで再懸濁した。このリン酸懸濁液の遠心分離後上清を酸性化した後、酢酸エチルで抽出した。アセトン抽出画分と同様に、APU10-199A株及びMoCV1-D-free APU10-199A株をHPLC condition 3で逆相クロマトグラフィー分析した。

YG broth

5d

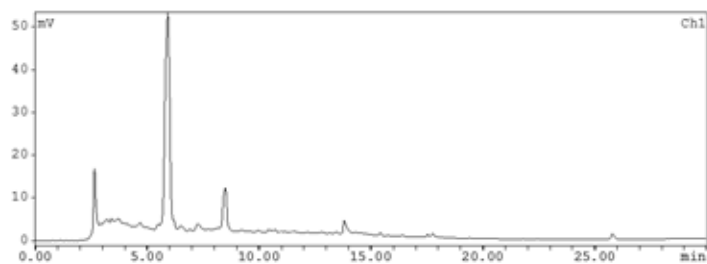


7d



PD broth

5d



7d

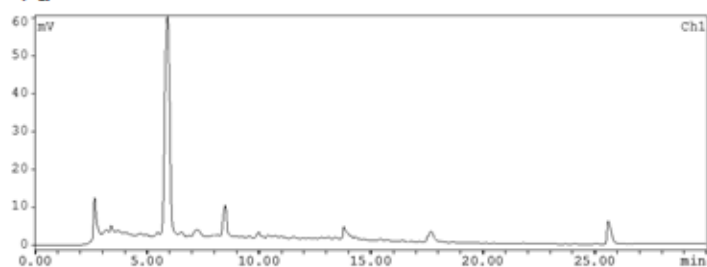


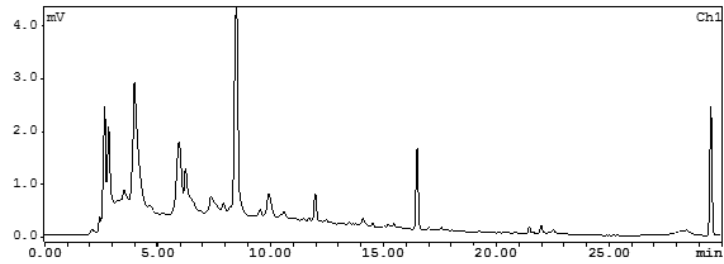
Figure 57

抽出方法の検討(液体培養上清からの酢酸エチル抽出)。

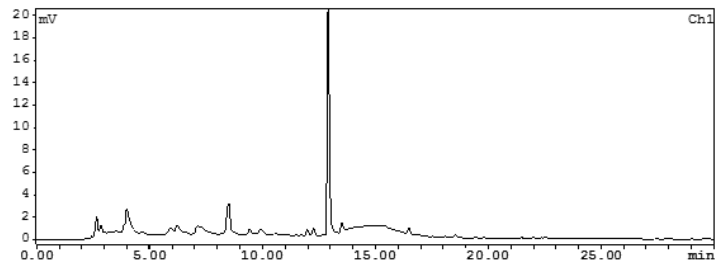
P2-GFP株をPD液体培地またはYG液体培地で振盪培養し、培養5日、7日後の培養上清を回収しHClで酸性化した後酢酸エチルに転溶させた。これを減圧濃縮し逆相クロマトグラフィー分析した。

YG broth

MoCV1-D-free APU10-199A(DF)

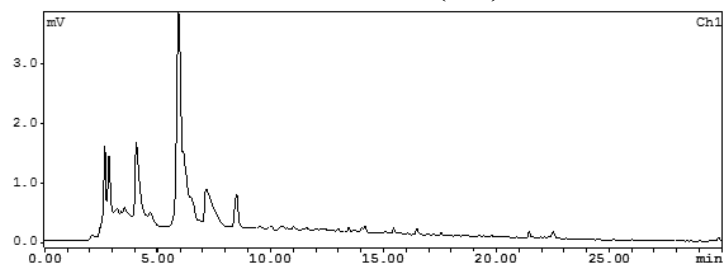


MoCV1-D-infected APU10-199A(DI)



PD broth

MoCV1-D-free APU10-199A(DF)



MoCV1-D-infected APU10-199A(DI)

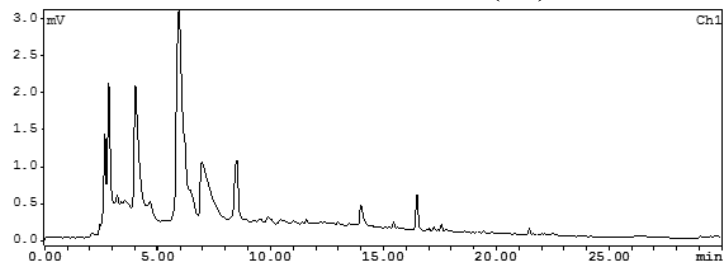


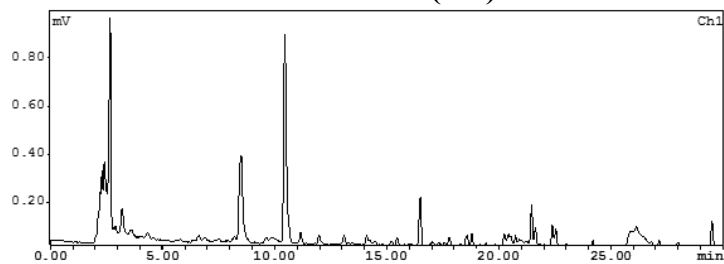
Figure 58

抽出方法の検討(液体培養上清からの酢酸エチル抽出)。

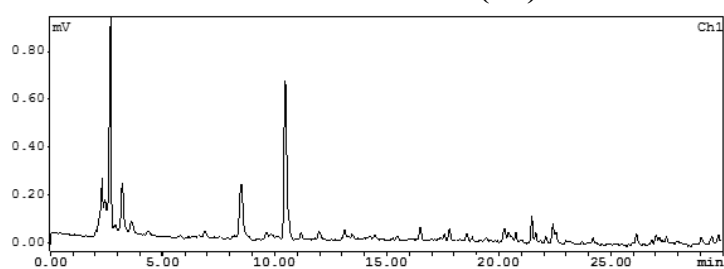
APU10-199A株及びMoCV1-D-free APU10-199A株をPD液体培地またはYG液体培地で振盪培養し、培養7日後の培養上清を回収しHClで酸性化した後酢酸エチルに転溶させた。これを減圧濃縮し逆相クロマトグラフィー分析した。

YG broth

MoCV1-D-free APU10-199A(DF)

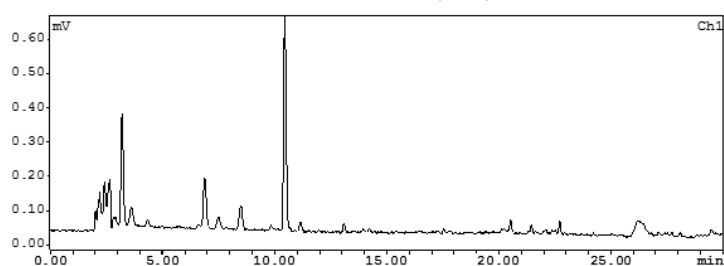


MoCV1-D-infected APU10-199A(DI)



PD broth

MoCV1-D-free APU10-199A(DF)



MoCV1-D-infected APU10-199A(DI)

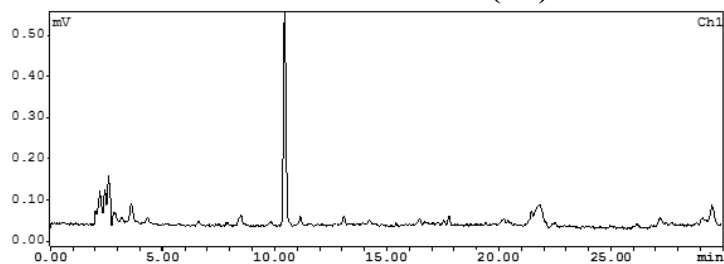


Figure 59
抽出方法の検討(液体培養菌体からのアセトン抽出)。

Figure 58の培養時の菌体を回収しアセトン抽出した。これを減圧濃縮し逆相クロマトグラフィー分析した。

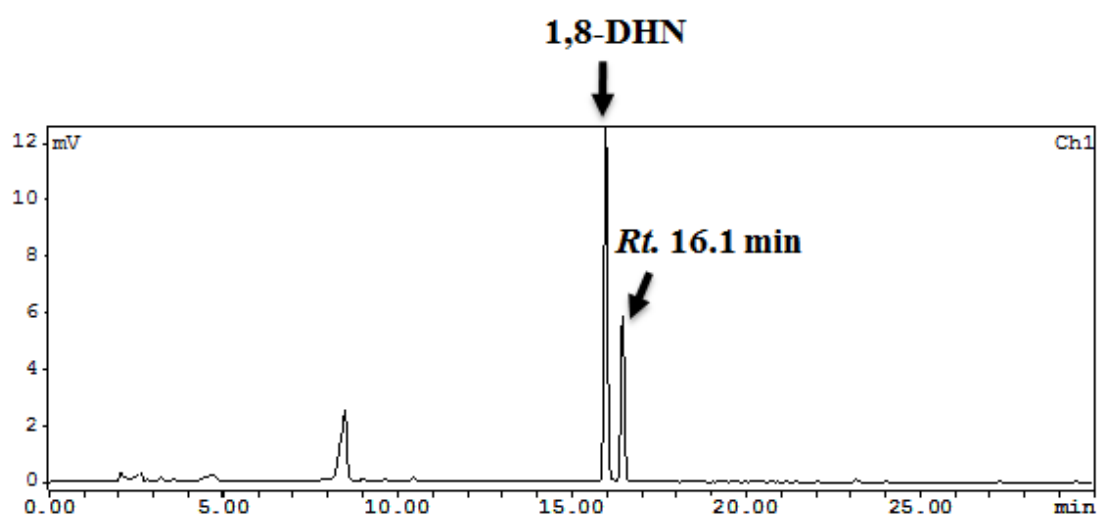


Figure 60

MoV2- and MoCV1-D-free APU10-199A株のアセトン抽出画分と10 ppm 1,8-DHNの共注入分析。

1,8-DHNと菌株由来Rt. 16.0 minのピークは分離しており、MoV2- and MoCV1-D-free APU10-199A株のRt. 16.1 minのピークは1,8-DHN ではないことが分かった。

P2-GFP (virus-free)

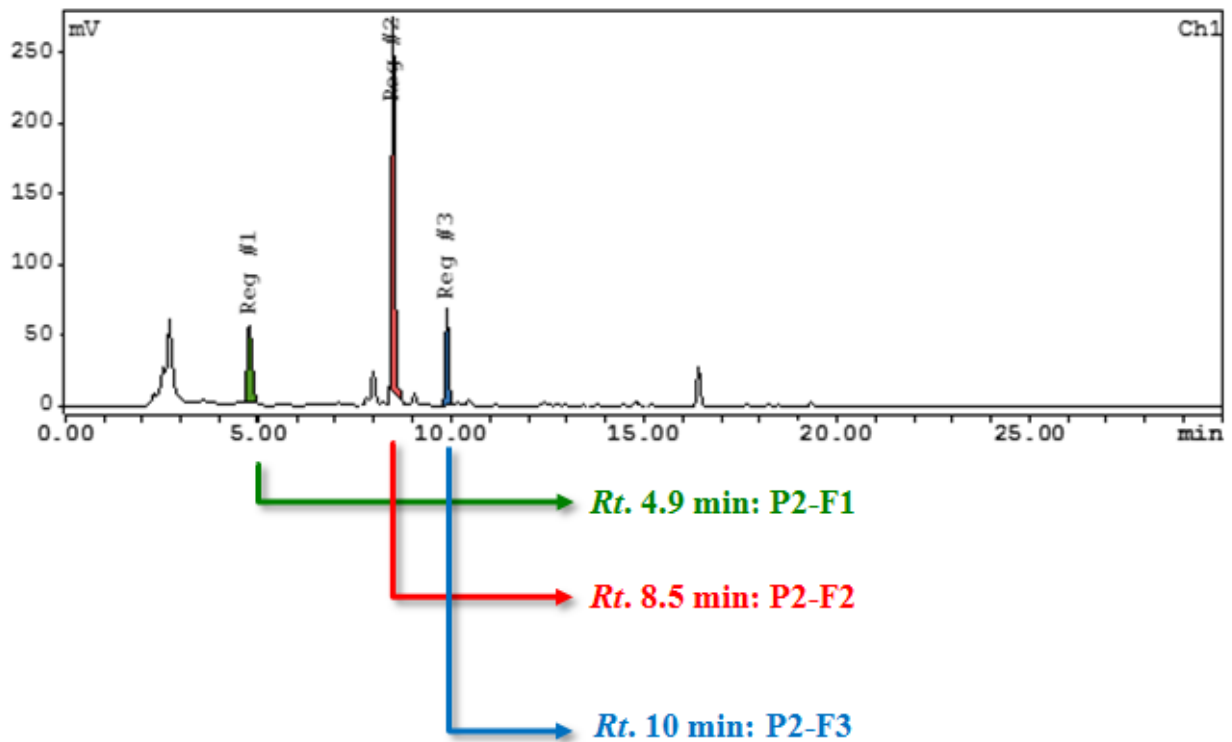


Figure 61

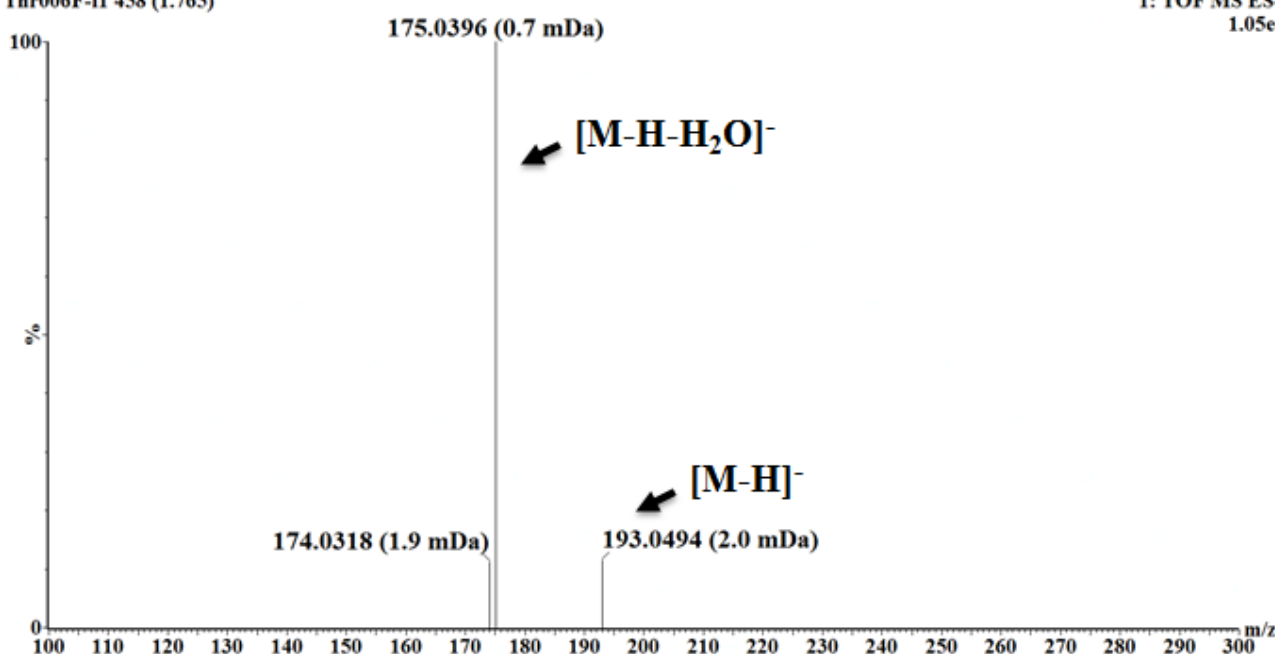
P2-GFP株アセトン抽出画分のピーク分取。

P2-GFP株のアセトン抽出溶液をグラジエント開始時の溶離液に溶媒置換し、ピーク分取のために150 μ lを注入してHPLCで分離した。そして、Rt. 4.9 min、8.5 min、10 minをそれぞれP2-F1、P2-F2、P2-F3画分として回収した。

B

Through006F-fraction1 P2GFP
Thr006F-fl 458 (1.765)

1: TOF MS ES-
1.05e4



C

Mass	Calc. Mass	mDa	PPM	DBE	Formula	i-FIT	i-FIT Norm	Fit Conf %	C	H	N	O
175.0396	175.0395	0.1	0.6	7.5	C10 H7 O3	28.3	0.812	44.38	10	7		3
	175.0440	-4.4	-25.1	4.5	H3 N10 O2	29.0	1.557	21.08		3	10	2
	175.0368	2.8	16.0	8.5	C6 H3 N6 O	29.0	1.573	20.73	6	3	6	1
	175.0355	4.1	23.4	3.5	C5 H7 N2 O5	29.4	1.980	13.81	5	7	2	5

Mass	Calc. Mass	mDa	PPM	DBE	Formula	i-FIT	i-FIT Norm	Fit Conf %	C	H	N	O
193.0494	193.0501	-0.7	-3.6	6.5	C10 H9 O4	22.9	1.158	31.42	10	9		4
	193.0474	2.0	10.4	7.5	C6 H5 N6 O2	23.1	1.379	25.18	6	5	6	2
	193.0461	3.3	17.1	2.5	C5 H9 N2 O6	23.5	1.690	18.44	5	9	2	6
	193.0514	-2.0	-10.4	11.5	C11 H5 N4	23.6	1.870	15.42	11	5		4
	193.0447	4.7	24.3	8.5	C2 H N12	24.1	2.350	9.54	2	1		12

Figure 62

P2-GFP株のP2-F1画分のUHPLC-TOF-MS解析。

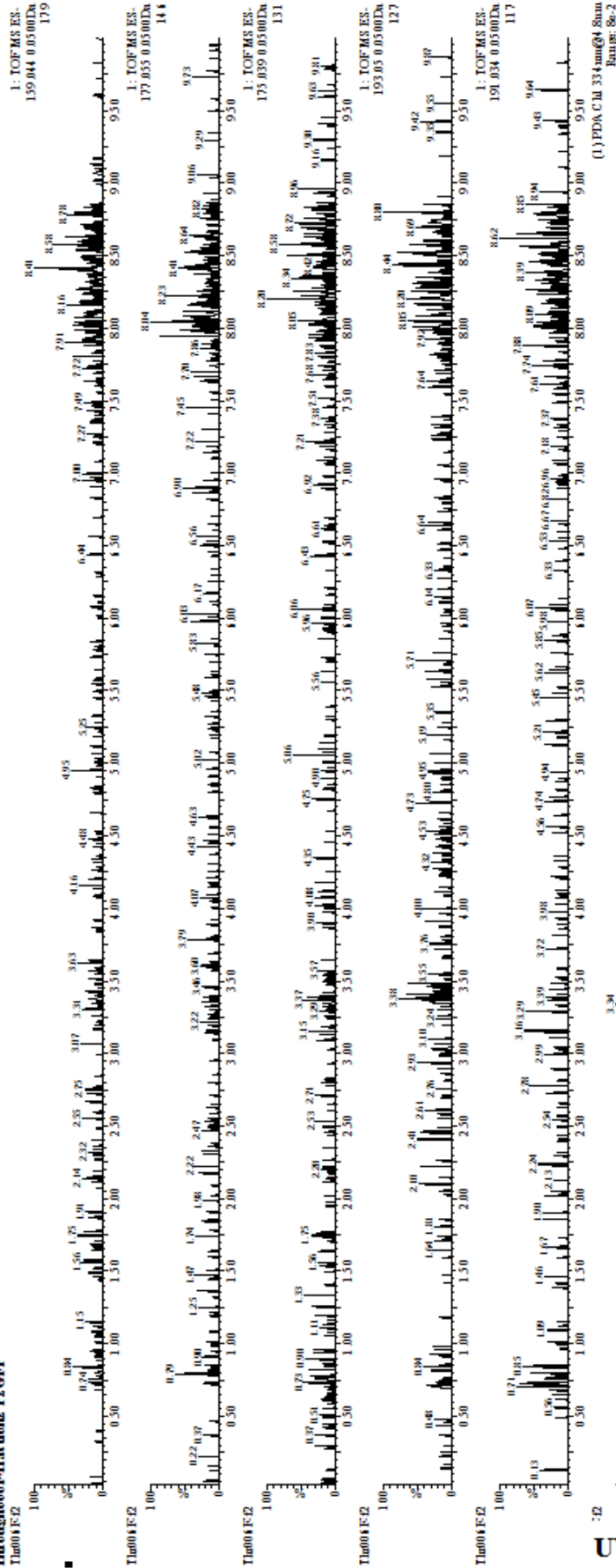
P2-F1画分を溶媒置換しMS condition 1で質量分析した。

(A) 下段にTIC、PDA UV 334 nmの吸収を示した。また上段から、1,8-DHN(Exact mass: 160.0524)、vermelone(Exact mass: 178.0630)、1,3,8-THN(Exact mass: 176.0473)、scytalone(Exact mass: 194.0579)、1,3,6,8-THN(Exact mass: 192.0423)(付録4を参照)の各プロトン脱離分子 $[M-H]^-$ の抽出イオンクロマトグラムを示した。(B) R_t 1.8 minのマススペクトルを示した。プロトン脱離分子として、2つの主イオン m/z 193.0494(測定誤差 2.0 mDa)と m/z 175.0396(測定誤差 0.7 mDa)が検出された。(C) 2つのプロダクトイオンの m/z に基づいてMassLynx™で元素組成解析を行った。

P2-F2, MS condition 1

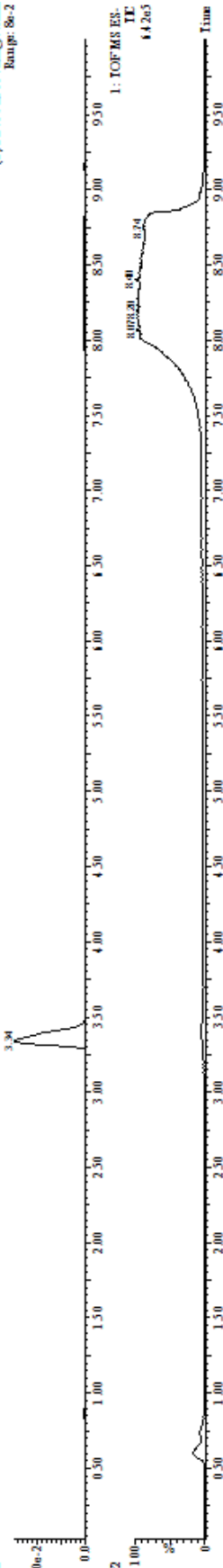
A

Through06Fraction2 P2 GFP



UV
334 nm

TIC



↑
Rt. 3.3 min

B

Through006F-fraction2 P2GFP
Thr006F-f2 889 (3.407)

1: TOF MS ES-
4.26e3

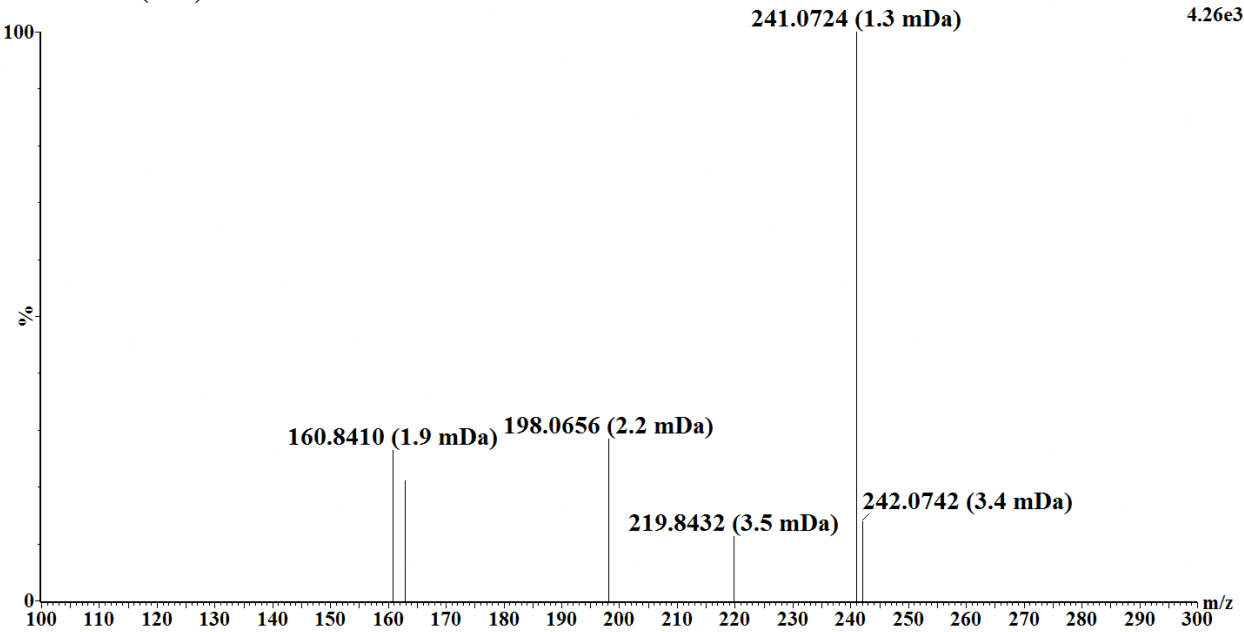


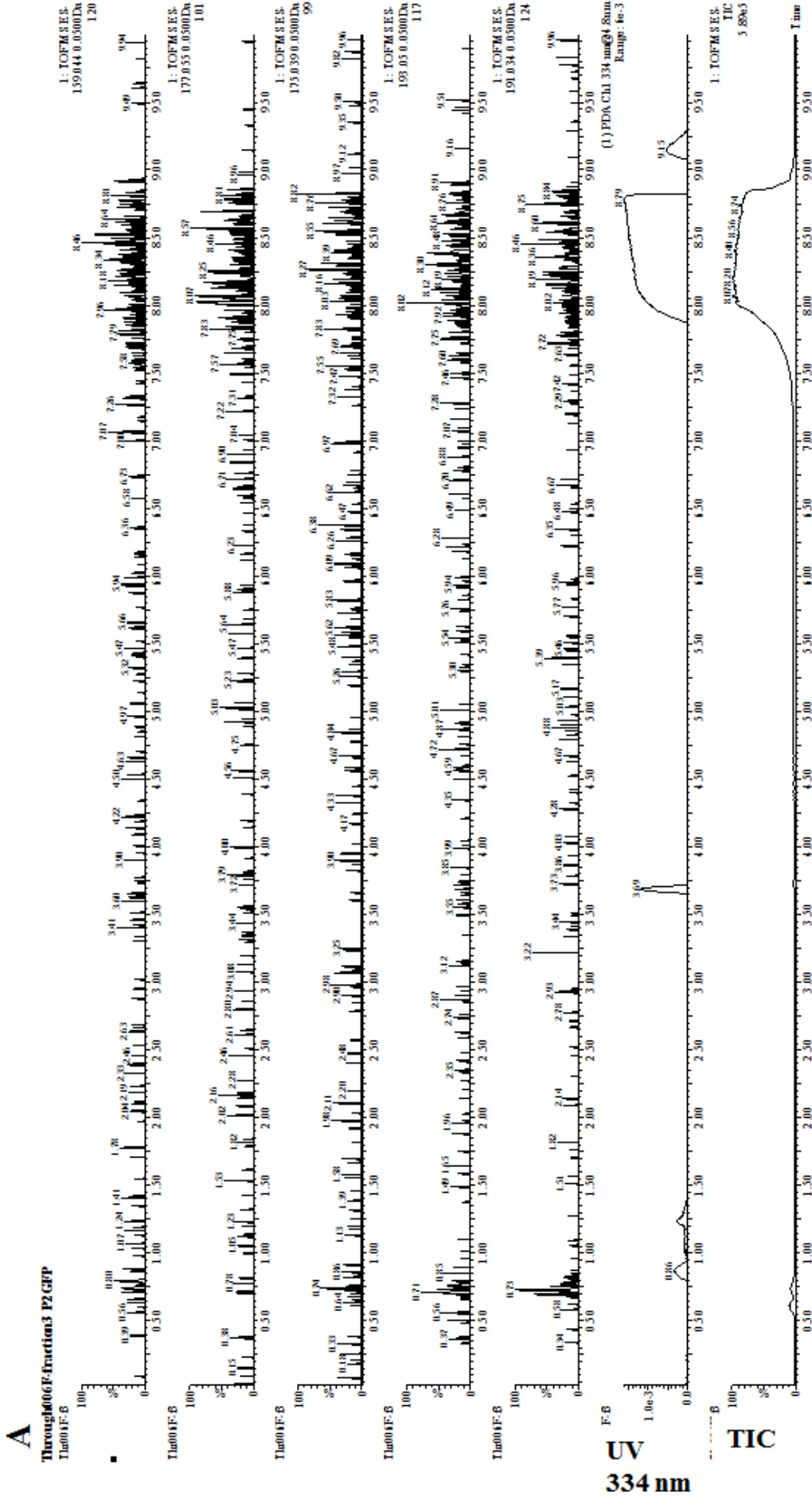
Figure 63

P2-GFP株のP2-F2画分のUHPLC-TOF-MS解析。

P2-F2画分を溶媒置換しMS condition 1で質量分析した。

(A) 下段にTIC、PDA UV 334 nmの吸収を示した。また上段から、1,8-DHN(Exact mass: 160.0524)、vermelone(Exact mass: 178.0630)、1,3,8-THN(Exact mass: 176.0473)、scytalone(Exact mass: 194.0579)、1,3,6,8-THN(Exact mass: 192.0423)(付録 4を参照)の各プロトン脱離分子[M-H]⁻の抽出イオンクロマトグラムを示した。(B) *Rt.* 3.3 minのマススペクトルを示した。

P2-E3, MS condition 1



B

Through006F-fraction3 P2GFP
Thr006F-f3 974 (3.730)

1: TOF MS ES-
913

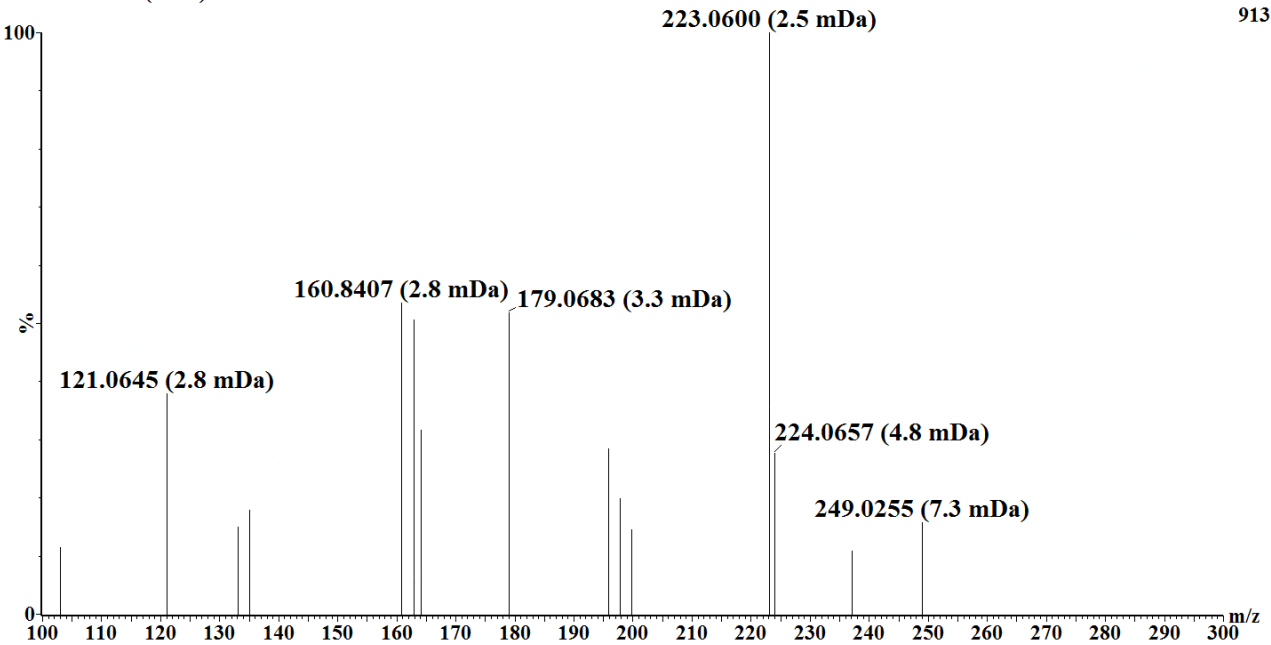


Figure 64

P2-GFP株のP2-F3画分のUHPLC-TOF-MS解析。

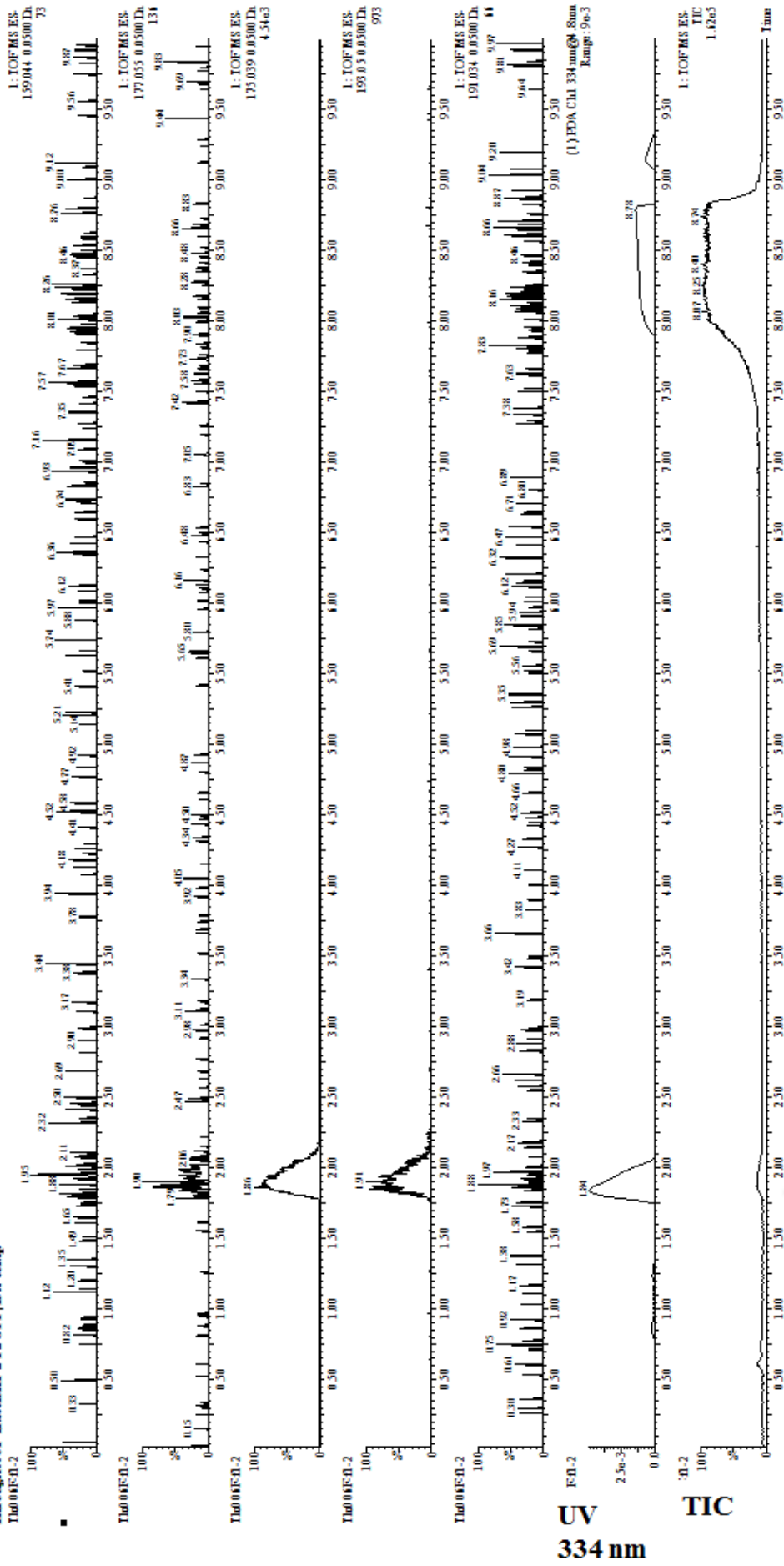
P2-F3画分を溶媒置換しMS condition 1で質量分析した。

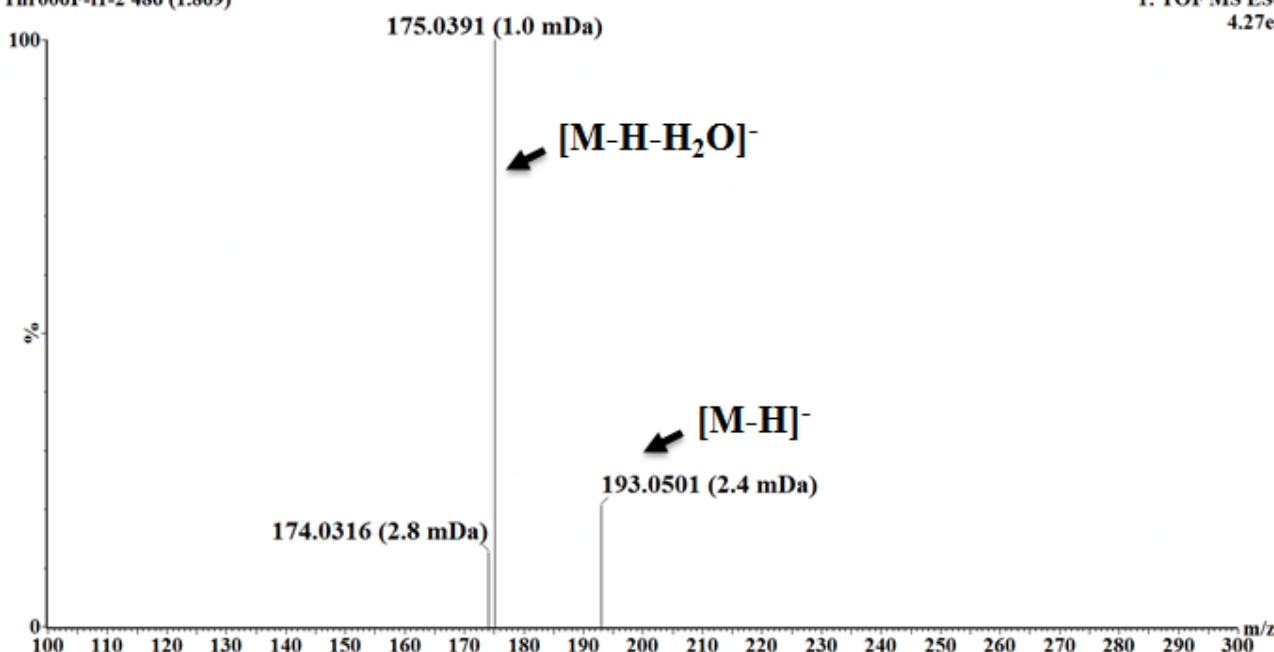
(A) 下段にTIC、PDA UV 334 nmの吸収を示した。また上段から、1,8-DHN(Exact mass: 160.0524)、vermelone(Exact mass: 178.0630)、1,3,8-THN(Exact mass: 176.0473)、scytalone(Exact mass: 194.0579)、1,3,6,8-THN(Exact mass: 192.0423)(付録4を参照)の各プロトン脱離分子[M-H]⁻の抽出イオンクロマトグラムを示した。(B) *Rt.* 3.7 minのマススペクトルを示した。

P2-F1, MS condition 2

A

Through061F-fraction1-2 P2 GPP, low temp



BThrough006F-fraction1-2 P2GFP, low temp
Thr006F-f1-2 486 (1.869)1: TOF MS ES-
4.27e3**C**

Mass	Calc. Mass	mDa	PPM	DBE	Formula	i-FIT	i-FIT Norm	Fit Conf %	C	H	N	O
175.0391	175.0395	-0.4	-2.3	7.5	C10 H7 O3	26.0	0.921	39.79	10	7		3
	175.0368	2.3	13.1	8.5	C6 H3 N6 O	26.5	1.368	25.45	6	3	6	1
	175.0440	-4.9	-28.0	4.5	H3 N10 O2	26.8	1.726	17.80		3	10	2
	175.0355	3.6	20.6	3.5	C5 H7 N2 O5	26.9	1.775	16.95	5	7	2	5

Mass	Calc. Mass	mDa	PPM	DBE	Formula	i-FIT	i-FIT Norm	Fit Conf %	C	H	N	O
193.0501	193.0501	0.0	0.0	6.5	C10 H9 O4	22.0	1.246	28.78	10	9		4
	193.0546	-4.5	-23.3	3.5	H5 N10 O3	22.1	1.321	26.68		5	10	3
	193.0514	-1.3	-6.7	11.5	C11 H5 N4	22.5	1.728	17.76	11	5		4
	193.0474	2.7	14.0	7.5	C6 H5 N6 O2	22.7	1.891	15.09	6	5	6	2
	193.0461	4.0	20.7	2.5	C5 H9 N2 O6	22.9	2.147	11.69	5	9	2	6

Figure 65**P2-GFP株のP2-F1画分のUHPLC-TOF-MS解析。**

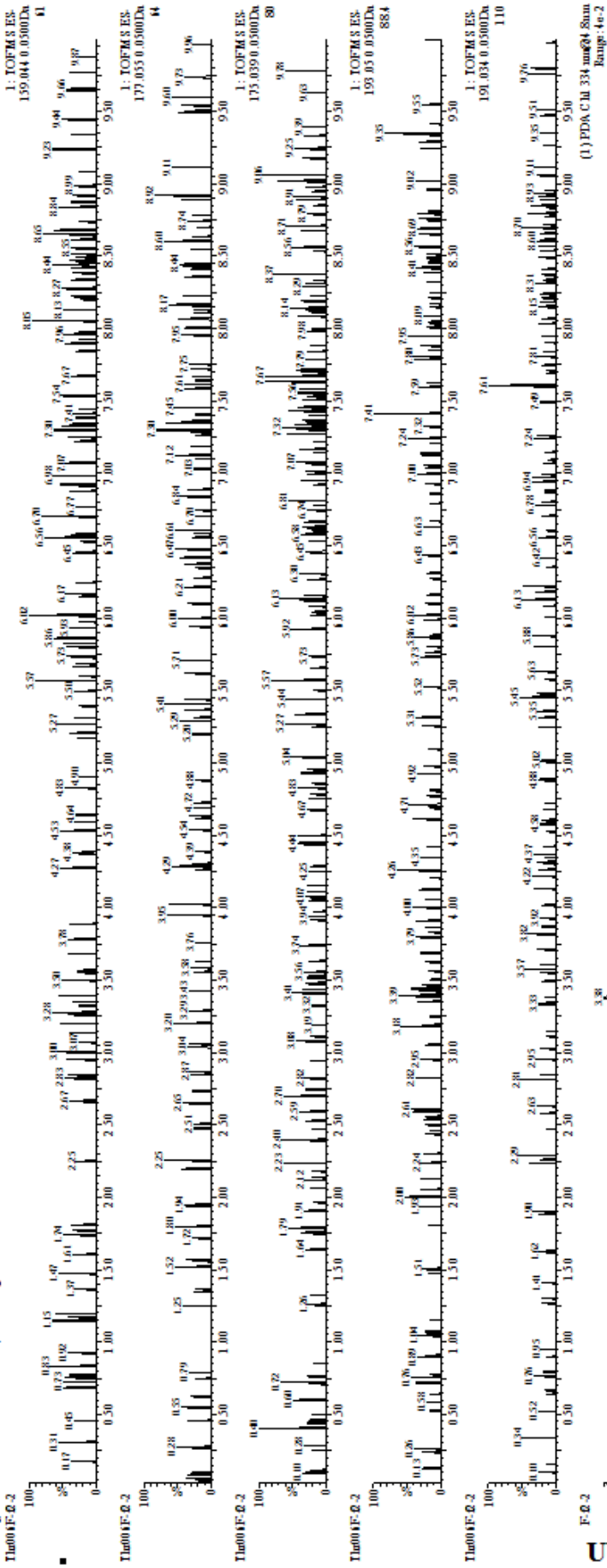
P2-F1画分を溶媒置換しMS condition 2で質量分析した。

(A) 下段にTIC、PDA UV 334 nmの吸収を示した。また上段から、1,8-DHN(Exact mass: 160.0524)、vermelone(Exact mass: 178.0630)、1,3,8-THN(Exact mass: 176.0473)、scytalone(Exact mass: 194.0579)、1,3,6,8-THN(Exact mass: 192.0423)(付録4を参照)の各プロトン脱離分子[M-H]⁻の抽出イオンクロマトグラムを示した。(B) Rt. 1.8 minのマススペクトルを示した。プロトン脱離分子として、2つの主イオンm/z 193.0501(測定誤差 2.4 mDa)とm/z 175.0391(測定誤差 1.0 mDa)が検出された。(C) 2つのプロダクトイオンのm/zに基づいてMassLynx™で元素組成解析を行った。

P2-F2, MS condition 2

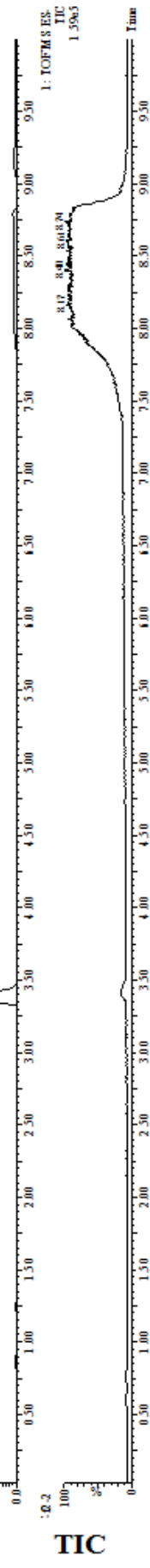
A

Through06E-Fraction2-2 P2.GFP_lowtemp



UV
334 nm

TIC



B

Through006F-fraction2-2 P2GFP, low temp
Thr006F-f2-2 890 (3.410)

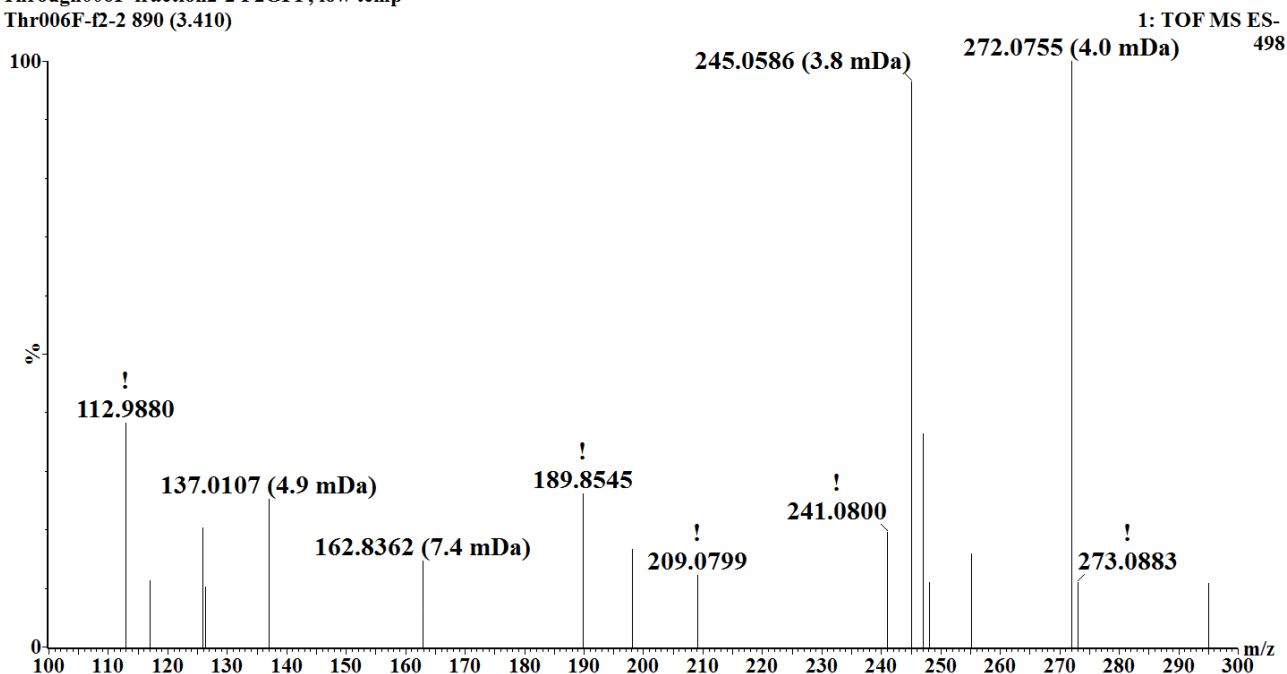


Figure 66

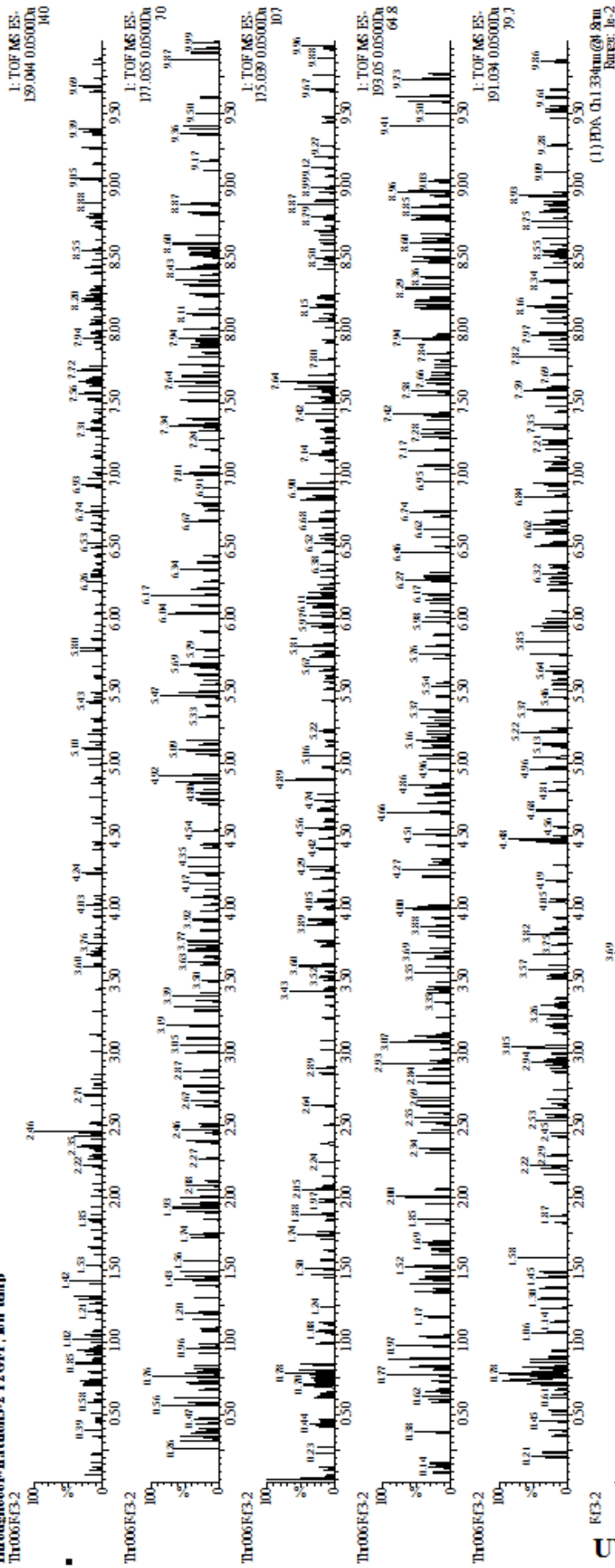
P2-GFP株のP2-F2画分のUHPLC-TOF-MS解析。

P2-F2画分を溶媒置換しMS condition 2で質量分析した。
(A) 下段にTIC、PDA UV 334 nmの吸収を示した。また上段から、1,8-DHN(Exact mass: 160.0524)、vermelone(Exact mass: 178.0630)、1,3,8-THN(Exact mass: 176.0473)、scytalone(Exact mass: 194.0579)、1,3,6,8-THN(Exact mass: 192.0423)(付録4を参照)の各プロトン脱離分子[M-H]⁻の抽出イオンクロマトグラムを示した。(B) *Rt.* 3.3 minのマススペクトルを示した。

P2-F3, MS condition 2

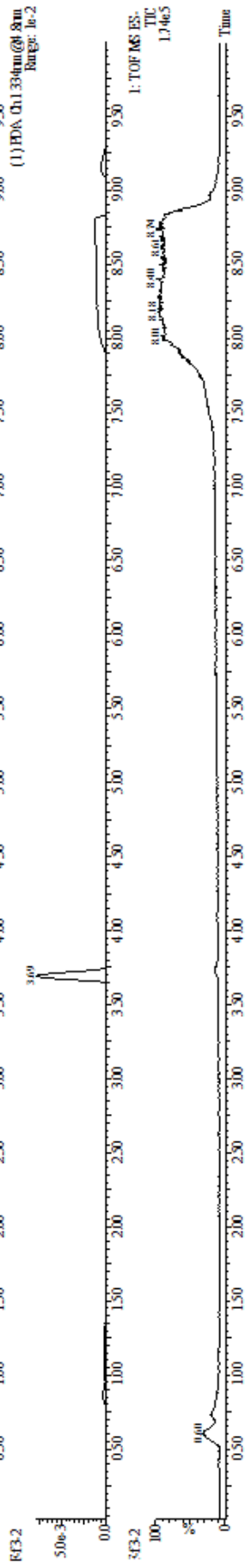
A

Through006F-fractions3-2 P2 GFP, low temp
Thr006F3-2



UV
334 nm

TIC



B

Through006F-fraction3-2 P2GFP, low temp
Thr006F-f3-2 974 (3.731)

1: TOF MS ES-
2.74e3

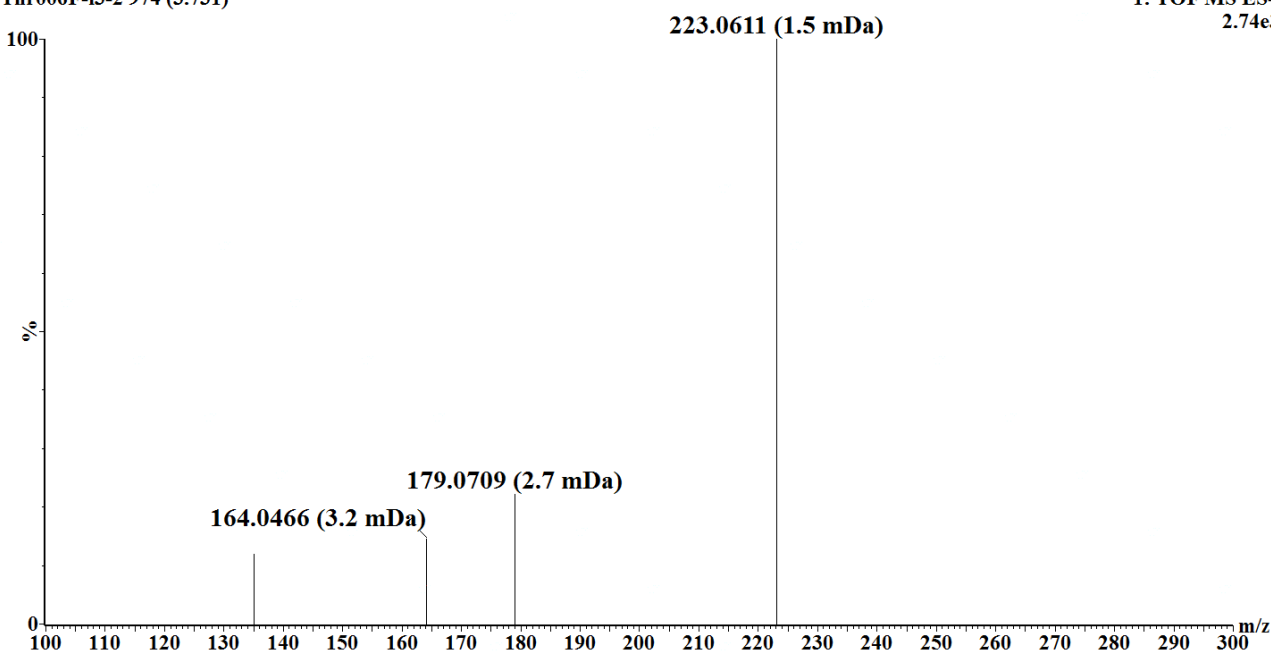


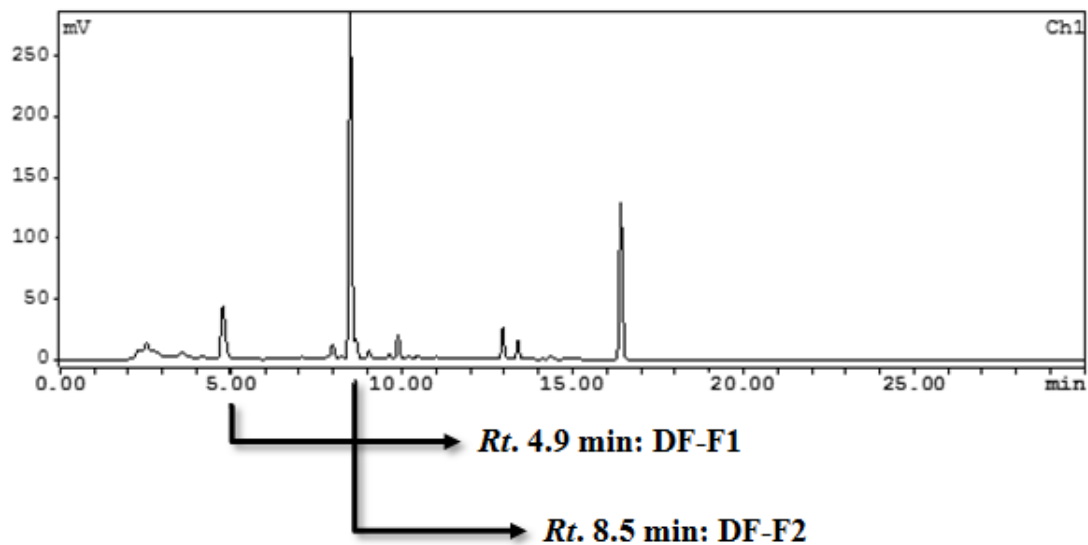
Figure 67

P2-GFP株のP2-F3画分のUHPLC-TOF-MS解析。

P2-F3画分を溶媒置換しMS condition 2で質量分析した。

(A) 下段にTIC、PDA UV 334 nmの吸収を示した。また上段から、1,8-DHN(Exact mass: 160.0524)、vermelone(Exact mass: 178.0630)、1,3,8-THN(Exact mass: 176.0473)、scytalone(Exact mass: 194.0579)、1,3,6,8-THN(Exact mass: 192.0423)(付録 4を参照)の各プロトン脱離分子[M-H]⁻の抽出イオンクロマトグラムを示した。(B) *Rt.* 3.7 minのマススペクトルを示した。

MoCV1-D-free isolate (DF)



MoCV1-D-infected isolate (DI)

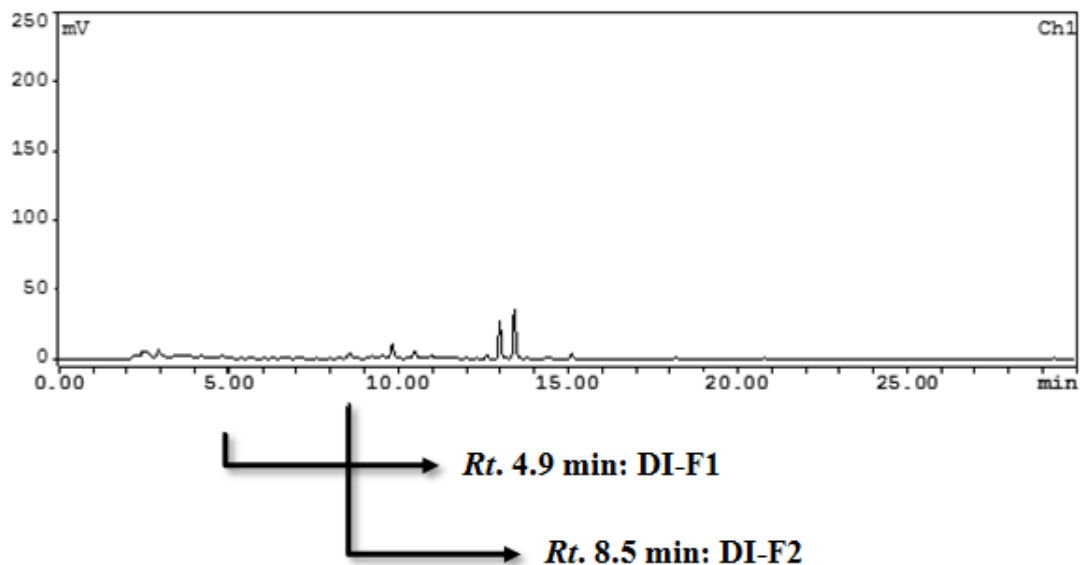


Figure 68

APU10-199A株及びMoCV1-D-free APU10-199A株アセトン抽出画分のピーク分取。

APU10-199A株及びMoCV1-D-free APU10-199A株のアセトン抽出溶液をグラジエント開始時の溶離液に溶媒置換し、ピーク分取のために150 μ lを注入してHPLCで分離した。そして、Rt. 4.9 min、8.5 minをそれぞれDF-F1、DI-F1、DF-F2、DI-F2画分として回収した。

DF-F1, MS condition 1

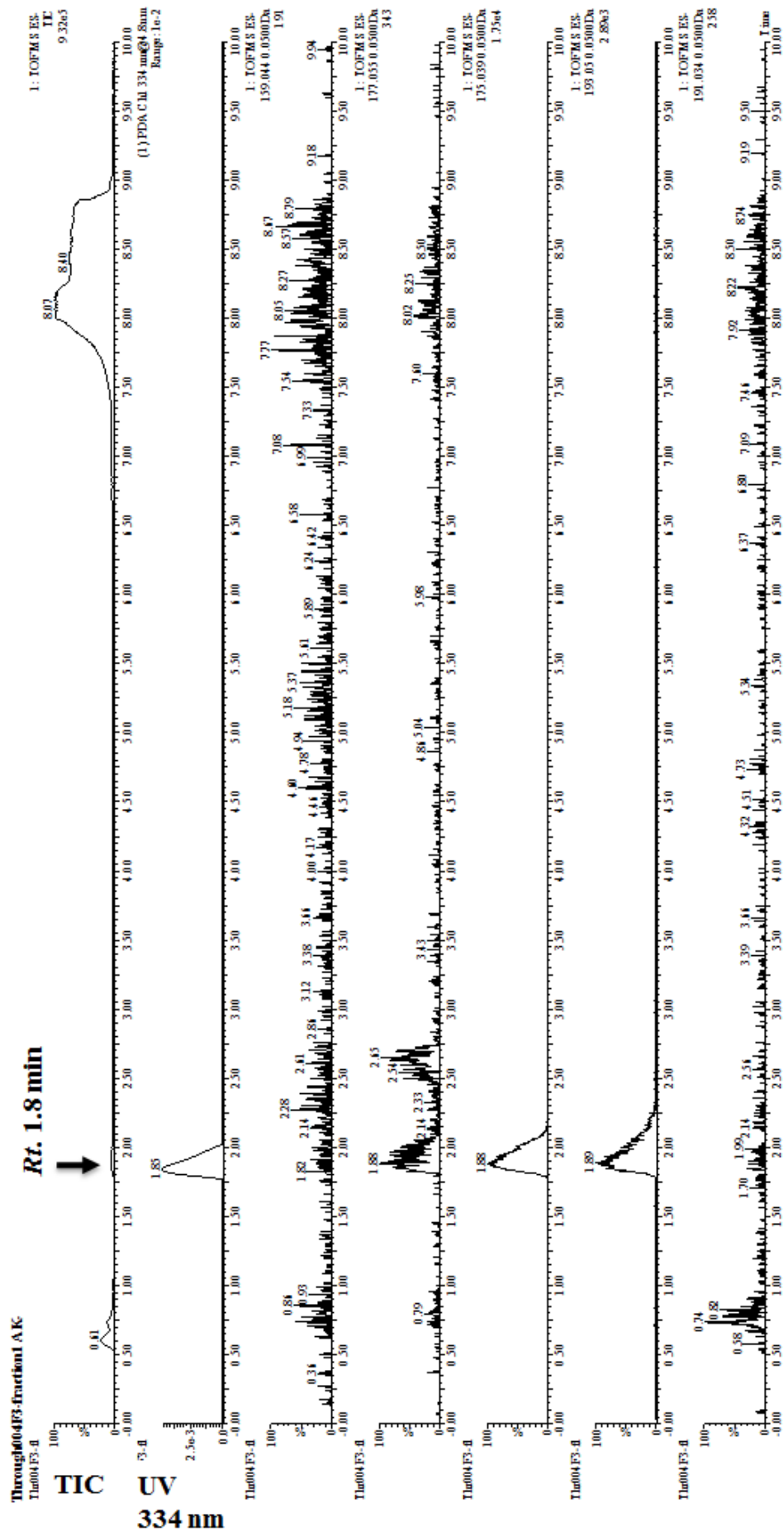


Figure 69

MoCV1-D-free APU10-199A株のDF-F1画分のUHPLC-TOF-MS解析。

DF-F1画分を溶媒置換しMS condition 1で質量分析した。(A) 上段にTIC、PDA UV 334 nmの吸収を示した。また順に、1,8-DHN(Exact mass: 160.0524)、vermelone(Exact mass: 178.0630)、1,3,8-THIN(Exact mass: 176.0473)、scytalone(Exact mass: 194.0579)、1,3,6,8-THIN(Exact mass: 192.0423)(付録 4を参照)の各プロトン脱離分子[M-H]⁺の抽出イオンクロマトグラムを示した。

DI-F1, MS condition 1

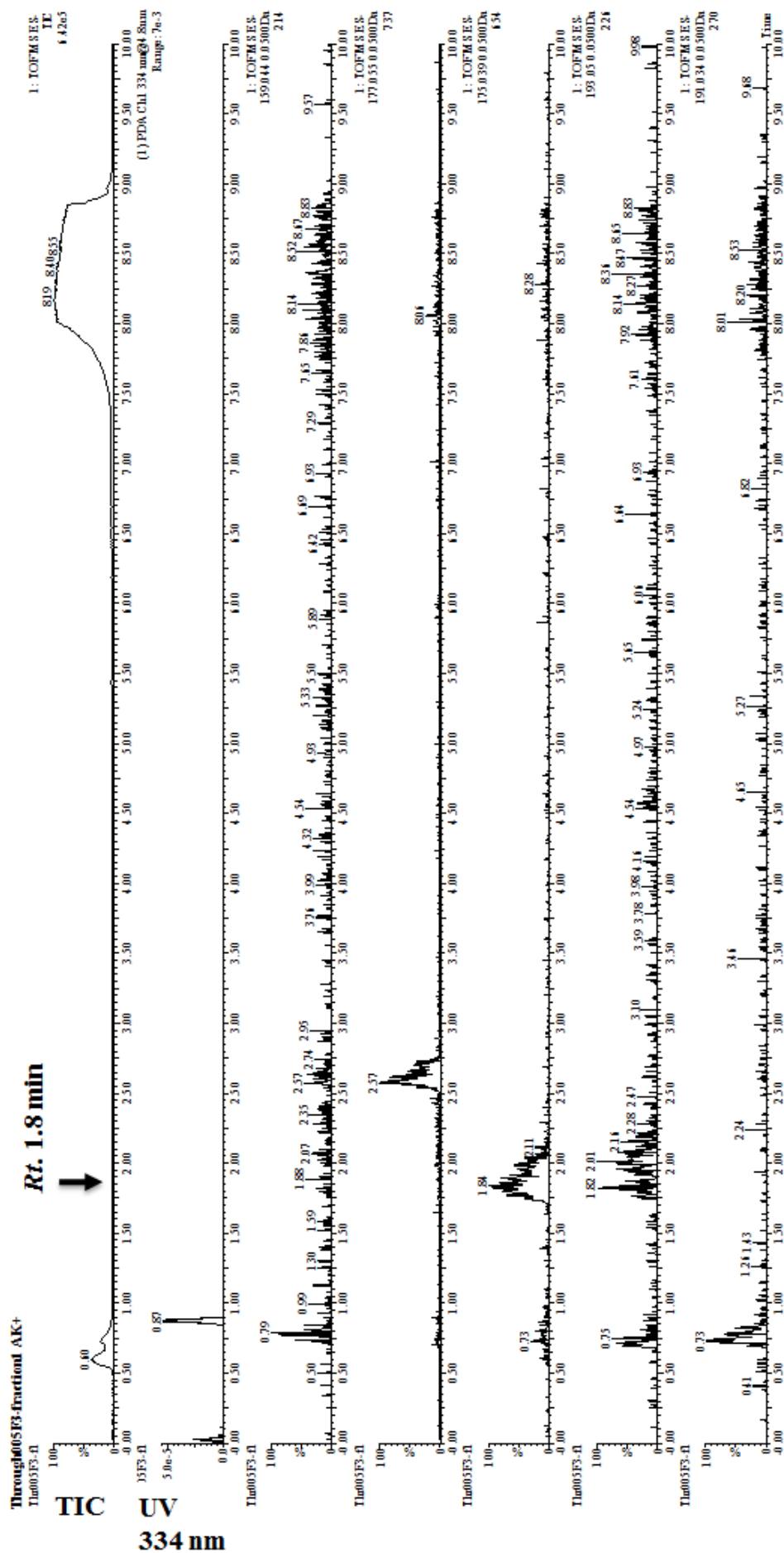


Figure 70

APUI0-199A株のDI-F1画分のUHPLC-TOF-MS解析。

DI-F1画分を溶媒置換しMS condition 1で質量分析した。(A) 上段にTIC、PDA UV 334 nmの吸収を示した。また順に、1,8-DHN(Exact mass: 160.0524)、vermelone(Exact mass: 178.0630)、1,3,8-THN(Exact mass: 176.0473)、soytalone(Exact mass: 194.0579)、1,3,6,8-THN(Exact mass: 192.0423)(付録 4を参照)の各プロトン脱離分子[M-H]⁺の抽出イオンクロマトグラムを示した。

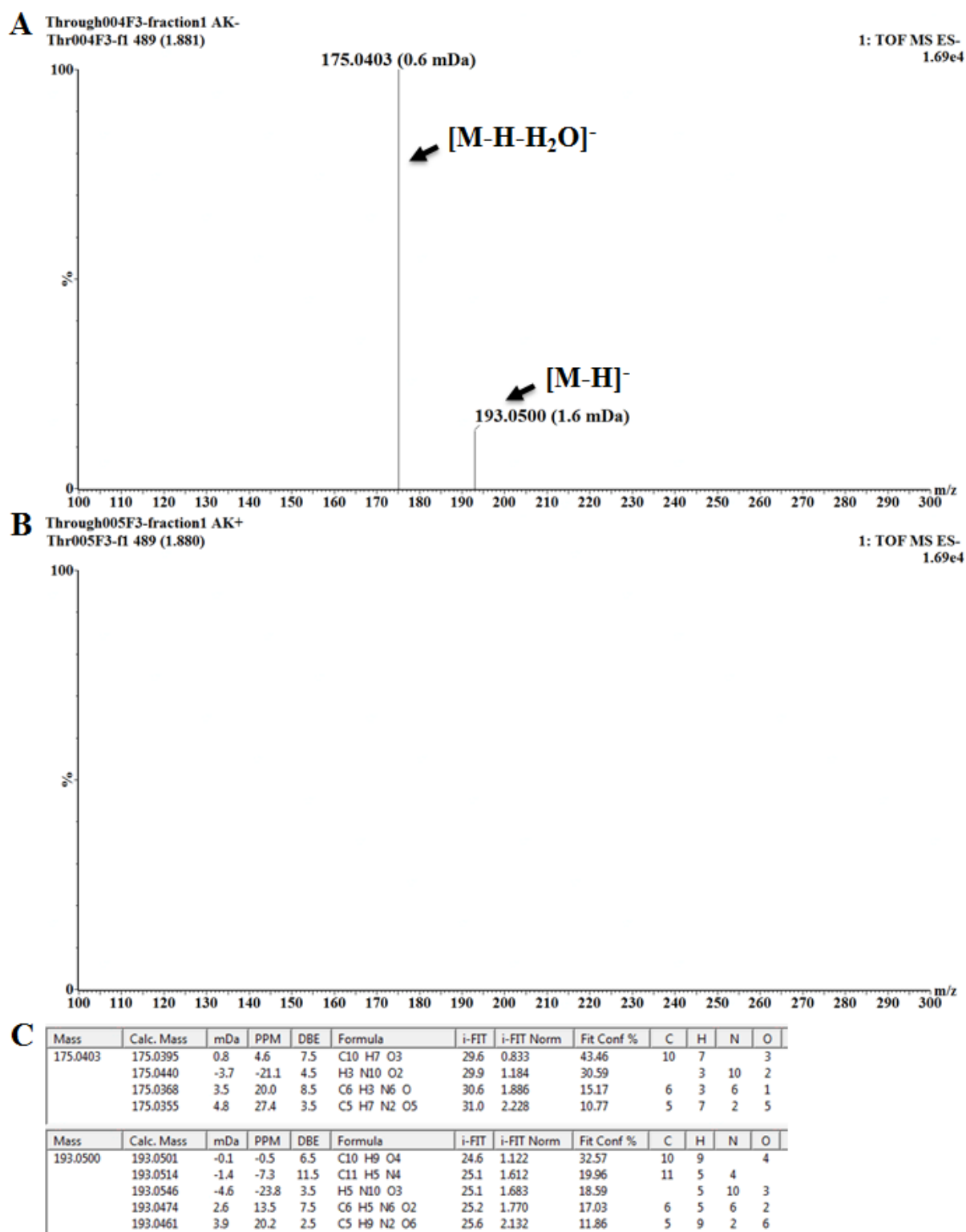


Figure 71

DF-F1及びDI-F1画分のマスペクトル(MS condition 1)。

(A, B) MS condition 1で分析したDF-F1(A)及びDI-F1画分(B)の R_t 1.8 minのマスペクトルを示した。DF-F1画分ではプロトン脱離分子として、2つの主イオン m/z 193.0500(測定誤差 1.6 mDa)と m/z 175.0403(測定誤差 0.6 mDa)が検出された。(C) 2つのプロダクトイオンの m/z に基づいてMassLynx™で元素組成解析を行った。

DF-F1, MS condition 3

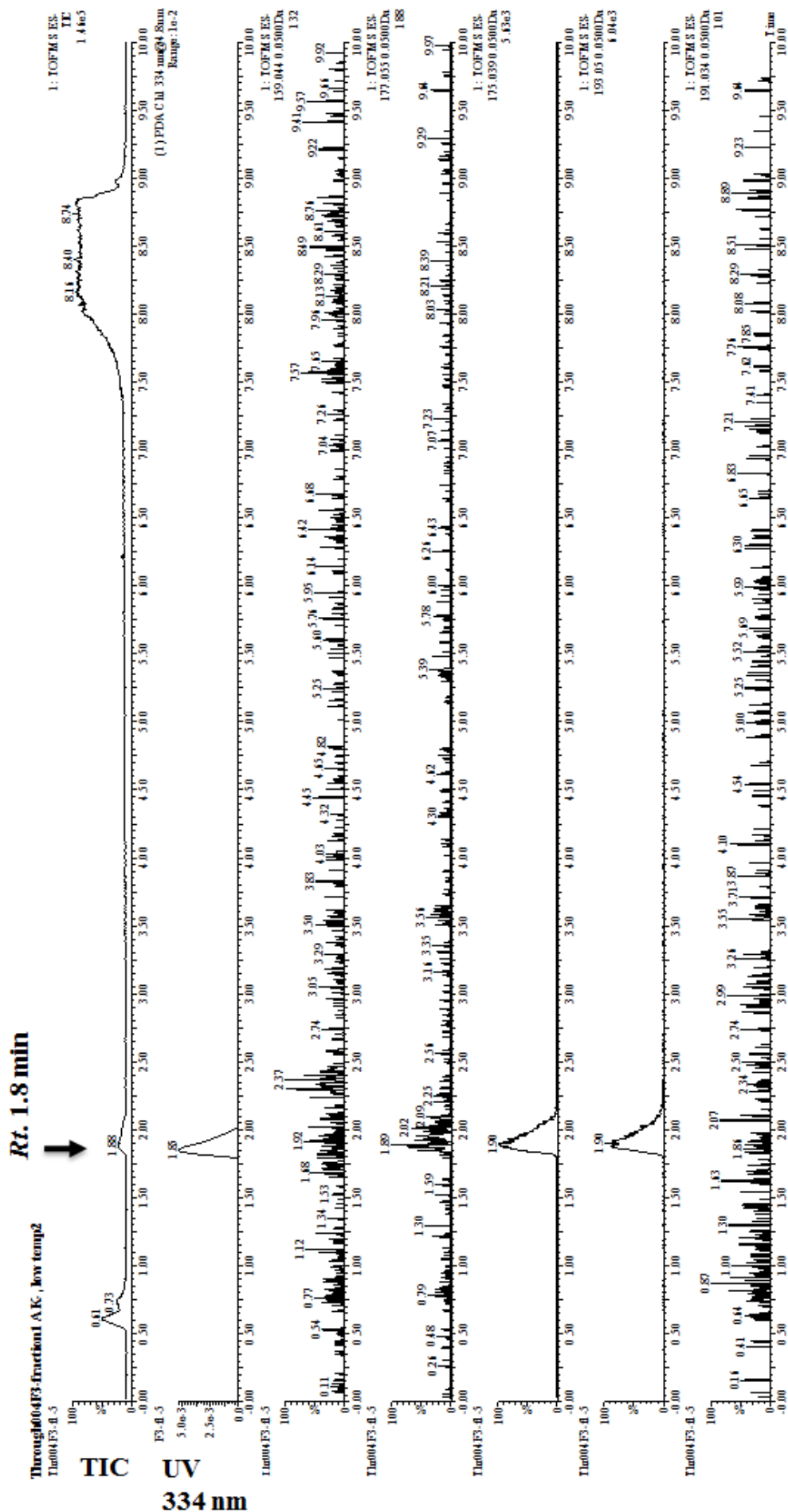


Figure 72

MoCV1-D-free APU10-199A株のDFE-F2画分のUHPLC-TOF-MS解析。

DF-F2画分を溶媒置換しMS condition 3で質量分析した。(A) 上段にTIC, PDA UV 334 nmの吸収を示した。また順に、1,8-DHN(Exact mass: 160.0524), vermelone(Exact mass: 178.0630), 1,3,8-THN(Exact mass: 176.0473), scytalone(Exact mass: 194.0579), 1,3,6,8-THN(Exact mass: 192.0423)(付録 4を参照)の各プロトン脱離分子[M-H]⁺の抽出イオンクロマトグラムを示した。

DI-F1, MS condition 3

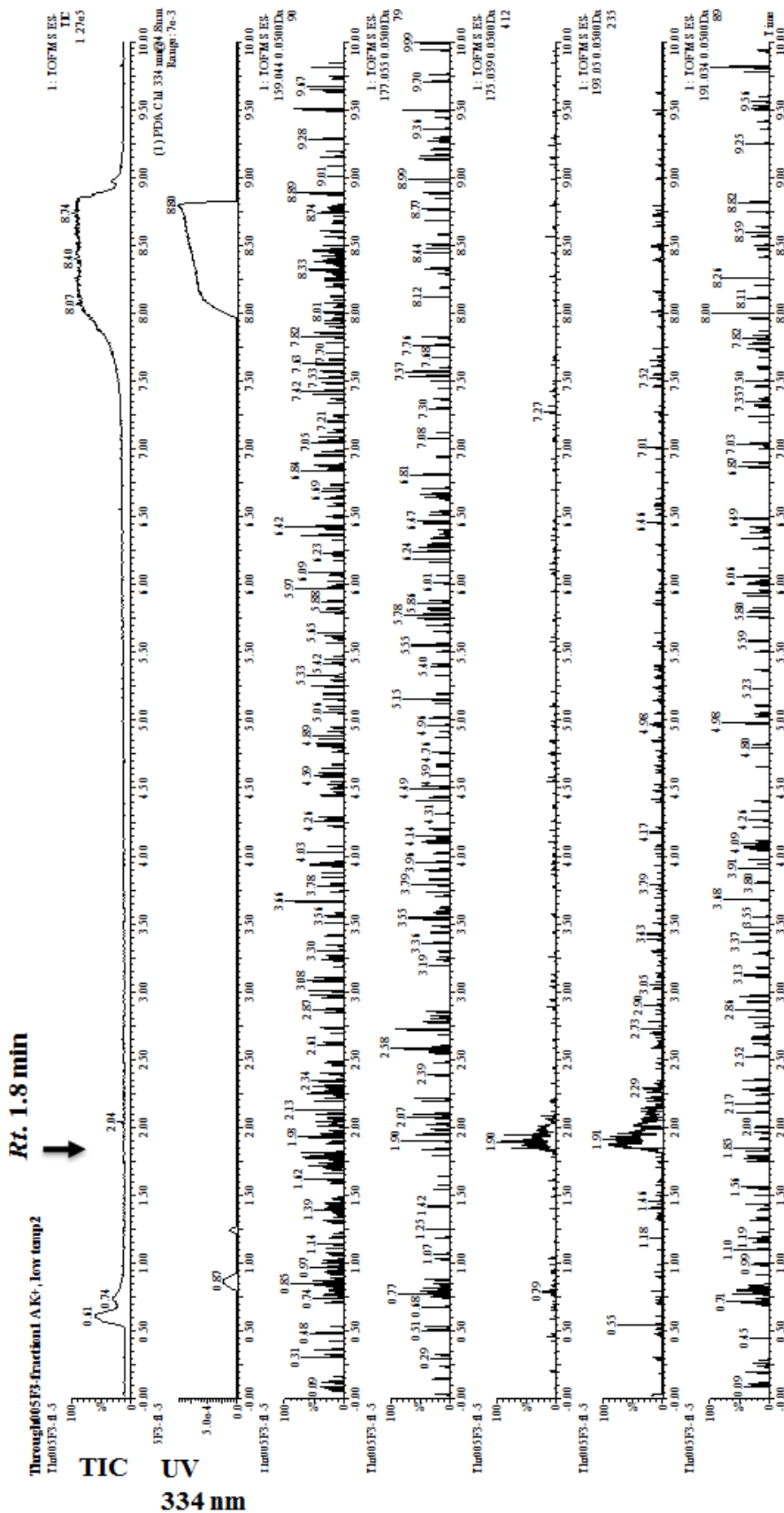
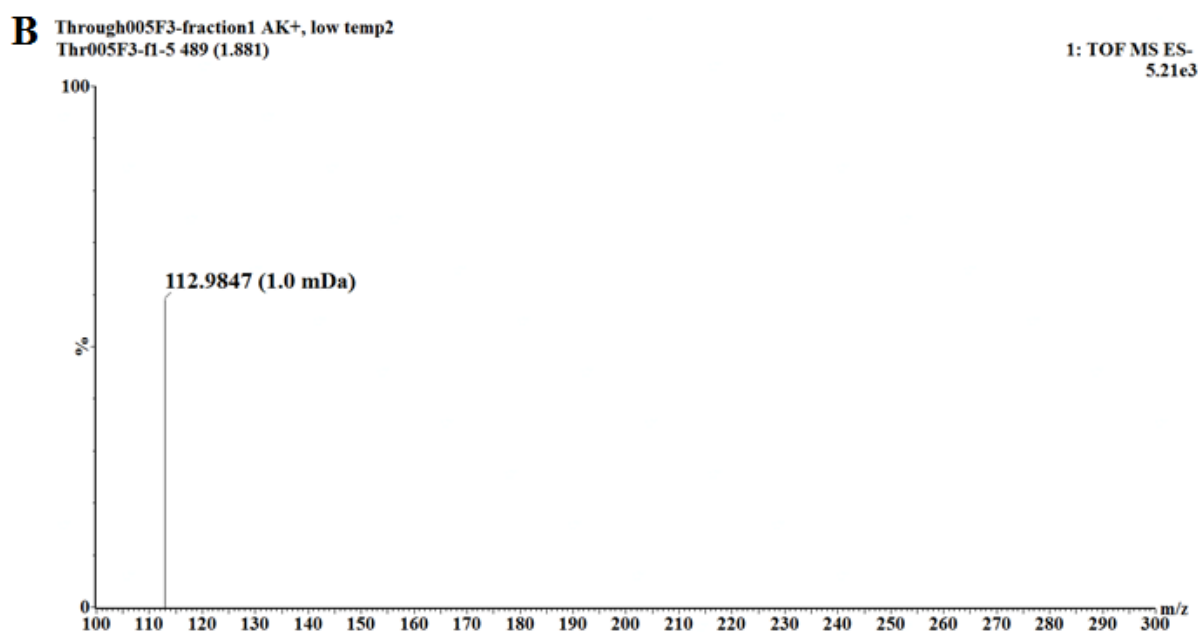
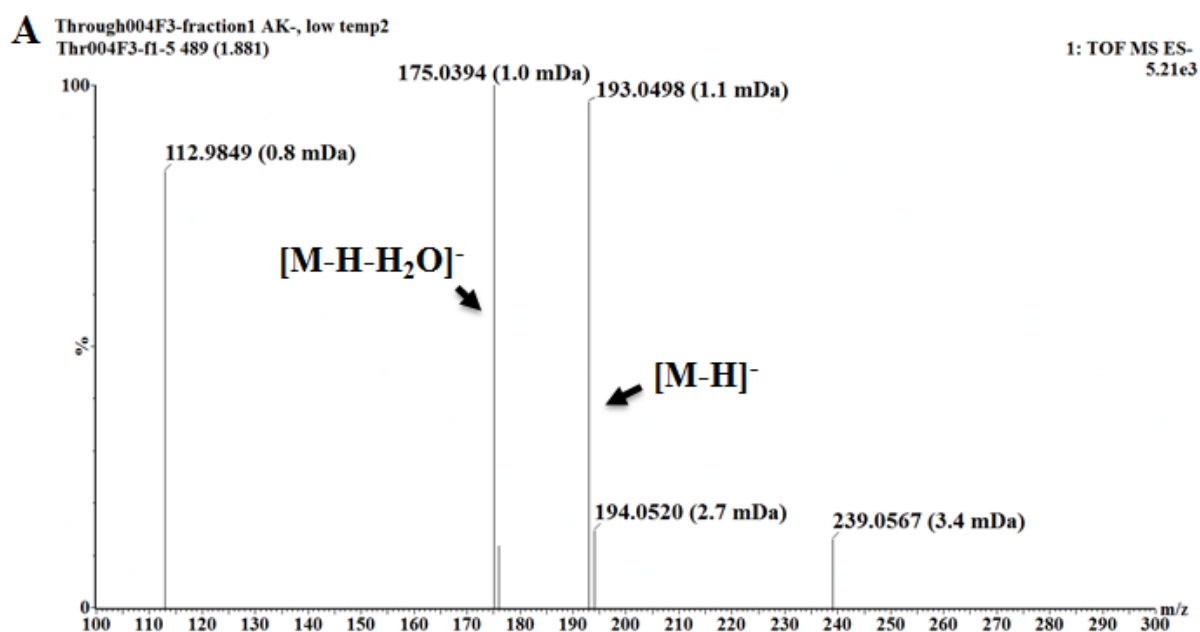


Figure 73

APUI0-199A株のDI-F2画分のUHPLC-TOF-MS解析。

DI-F2画分を溶媒置換しMS condition 3で質量分析した。(A) 上段にTIC, PDA UV 334 nmの吸収を示した。また順に、1,8-DHN(Exact mass: 160.0524)、vermelone(Exact mass: 178.0630)、1,3,8-THIN(Exact mass: 176.0473)、scytalone(Exact mass: 194.0579)、1,3,6,8-THIN(Exact mass: 192.0423)(付録 4を参照)の各プロトン脱離分子[M-H]⁻の抽出イオンクロマトグラムを示した。



C

Mass	Calc. Mass	mDa	PPM	DBE	Formula	i-FIT	i-FIT Norm	Fit Conf %	C	H	N	O
175.0394	175.0395	-0.1	-0.6	7.5	C10 H7 O3	22.3	0.547	57.84	10	7		3
	175.0368	2.6	14.9	8.5	C6 H3 N6 O	22.9	1.093	33.51	6	3	6	1
	175.0355	3.9	22.3	3.5	C5 H7 N2 O5	24.4	2.623	7.26	5	7	2	5
	175.0440	-4.6	-26.3	4.5	H3 N10 O2	26.1	4.279	1.39		3	10	2
193.0498	193.0514	-1.6	-8.3	11.5	C11 H5 N4	19.8	0.717	48.82	11	5		4
	193.0474	2.4	12.4	7.5	C6 H5 N6 O2	19.8	0.755	46.99	6	5	6	2
	193.0461	3.7	19.2	2.5	C5 H9 N2 O6	22.6	3.569	2.82	5	9	2	6
	193.0501	-0.3	-1.6	6.5	C10 H9 O4	23.4	4.352	1.29	10	9		4
	193.0546	-4.8	-24.9	3.5	H5 N10 O3	26.1	7.034	0.09		5	10	3

Figure 74

DF-F1及びDI-F1画分のマスペクトル(MS condition 3)。

(A, B) MS condition 3で分析したDF-F1(A)及びDI-F1画分(B)の*Rt.* 1.8 minのマスペクトルを示した。DF-F1画分ではプロトン脱離分子として、2つの主イオン*m/z* 193.0498(測定誤差 1.1 mDa)と*m/z* 175.0394(測定誤差 1.0 mDa)が検出された。(C) 2つのプロダクトイオンの*m/z*に基づいてMassLynx™ で元素組成解析を行った。

DF-F2, MS condition 1

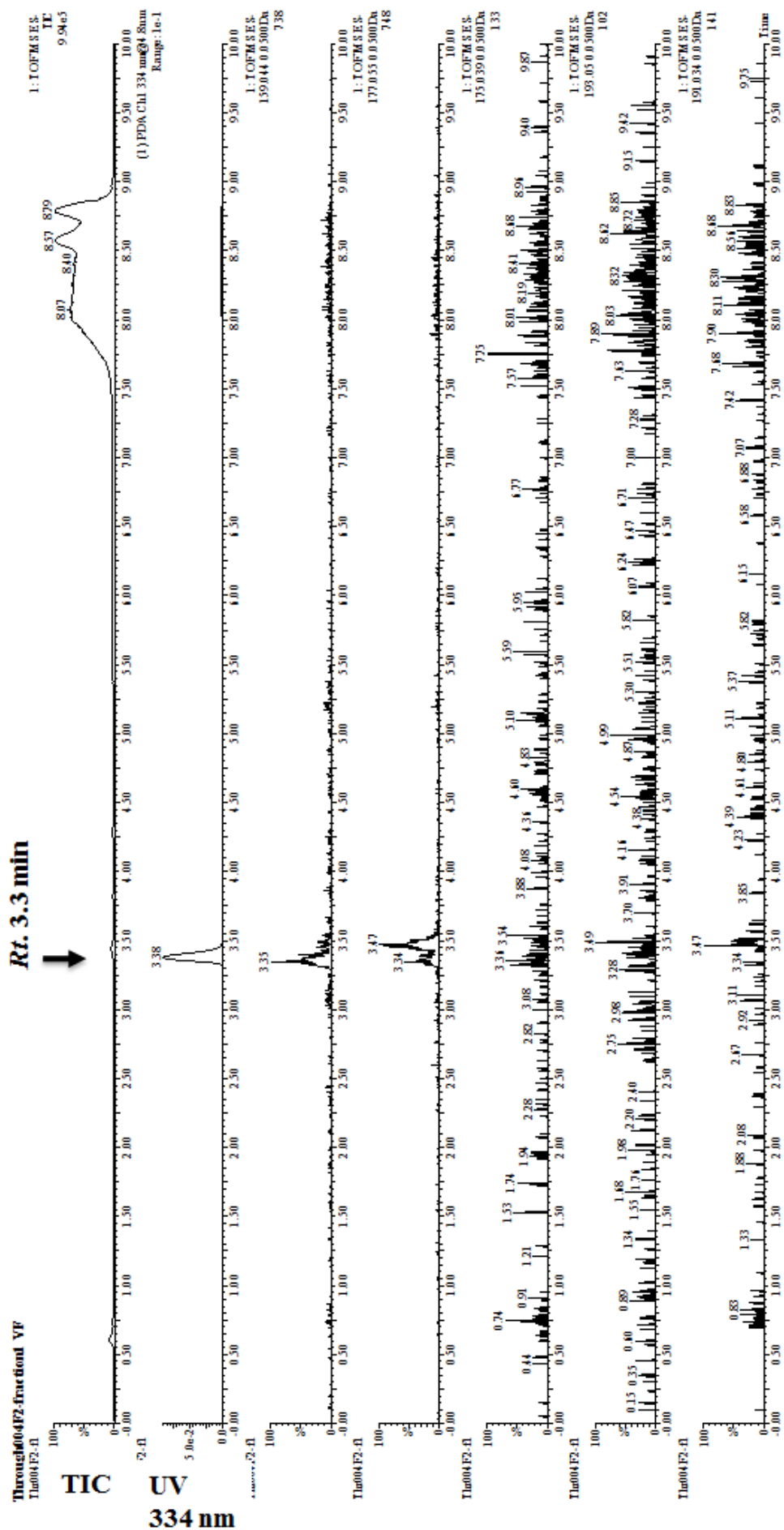


Figure 75

MoCV1-D-free APU10-199A株のUHPLC-TOF-MS解析。

DF-F2画分を溶媒置換しMS condition 1で質量分析した。(A) 上段にTIC、PDA UV 334 nmの吸収を示した。また順に、1,8-DHN(Exact mass: 160.0524)、vermelone(Exact mass: 178.0630)、1,3,8-THN(Exact mass: 176.0473)、seytalone(Exact mass: 194.0579)、1,3,6,8-THN(Exact mass: 192.0423)(付録 4を参照)の各プロトン脱離分子[M-H]⁺の抽出イオンクロマトグラムを示した。

DI-F2, MS condition 1

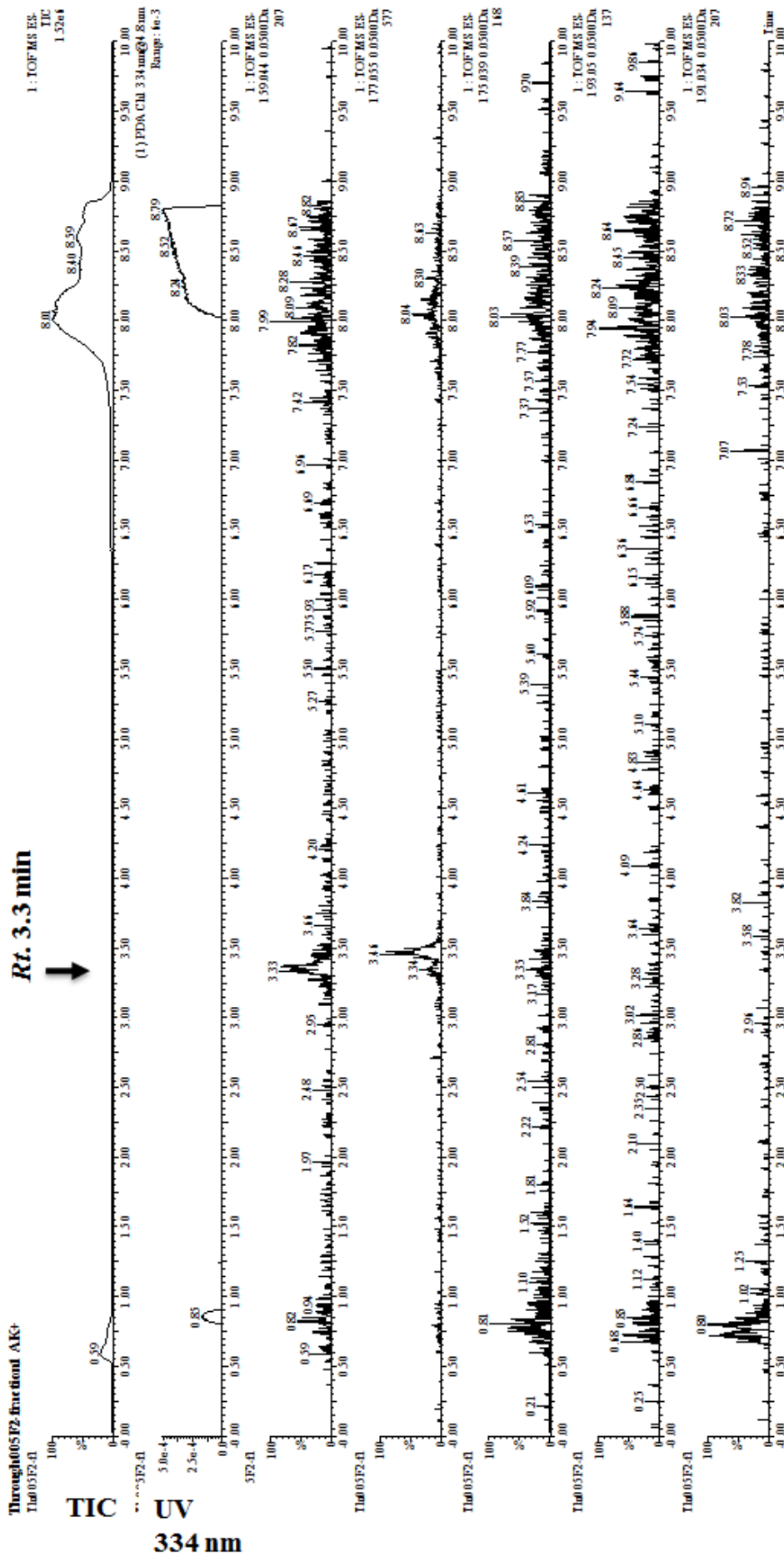
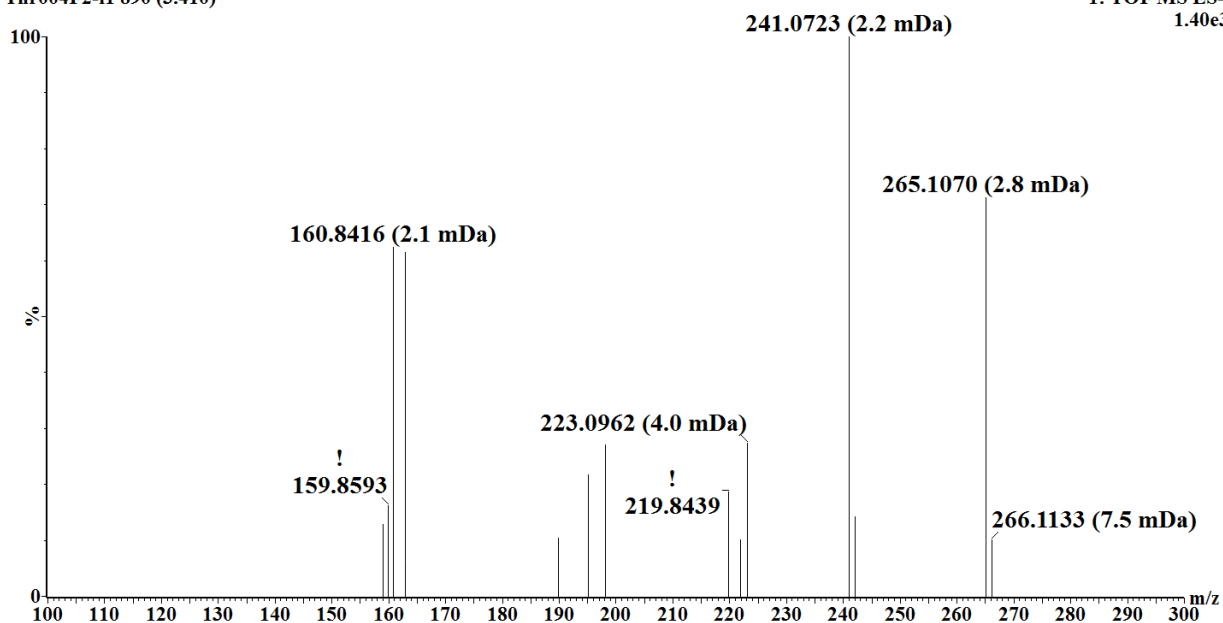
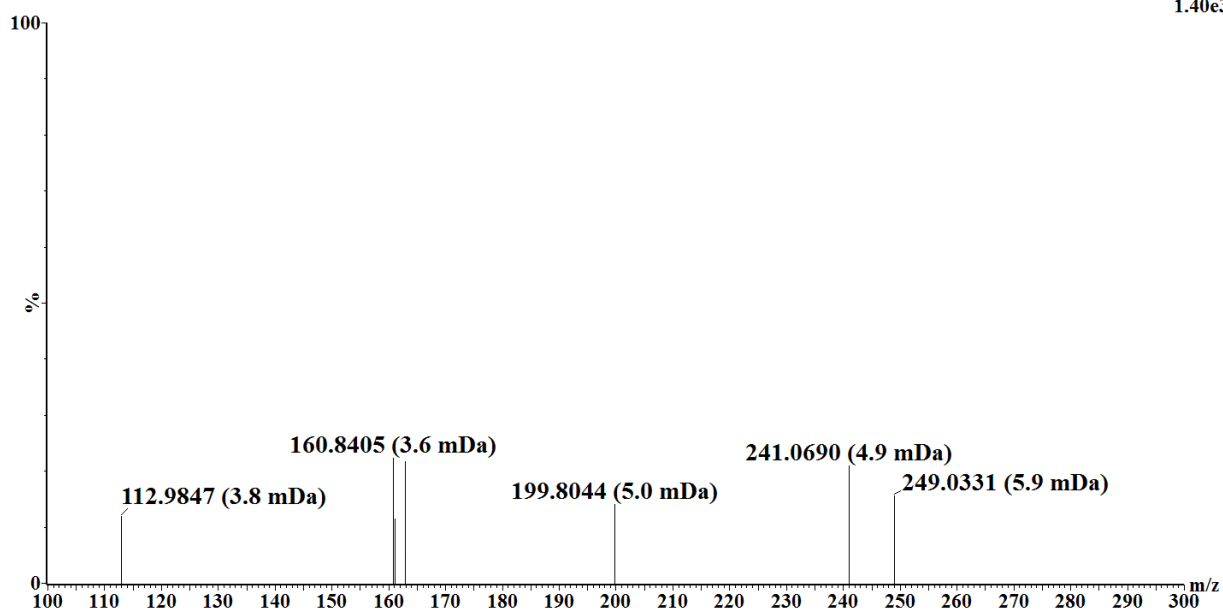


Figure 76

APU10-199A株のDI-F2画分のUHPLC-TOF-MS解析。

DI-F2画分を溶媒置換しMS condition 1で質量分析した。(A) 上段にTIC, PDA UV 334 nmの吸収を示した。また順に、1,8-DHN(Exact mass: 160.0524)、vermelone(Exact mass: 178.0630)、1,3,8-THN(Exact mass: 176.0473)、scytalone(Exact mass: 194.0579)、1,3,6,8-THN(Exact mass: 192.0423)(付録 4を参照)の各プロトン脱離分子[M-H]⁺の抽出イオンクロマトグラムを示した。

AThrough004F2-fraction1 VF
Thr004F2-f1 890 (3.410)1: TOF MS ES-
1.40e3**B**Through005F2-fraction1 AK+
Thr005F2-f1 890 (3.410)1: TOF MS ES-
1.40e3**Figure 77****DF-F2及びDI-F2画分のマススペクトル(MS condition 1)。**

(A, B) MS condition 1で分析したDF-F2(A)及びDI-F2画分(B)のRt. 3.4 minのマススペクトルを示した。

MoCV1-D-free APU10-199A(DF)

●試験条件

接種: 孢子懸濁液(1.0×10^4 spore/ml) 300 μ l

薬剤: 50 ppm

培養: 26°C、暗条件、16日間

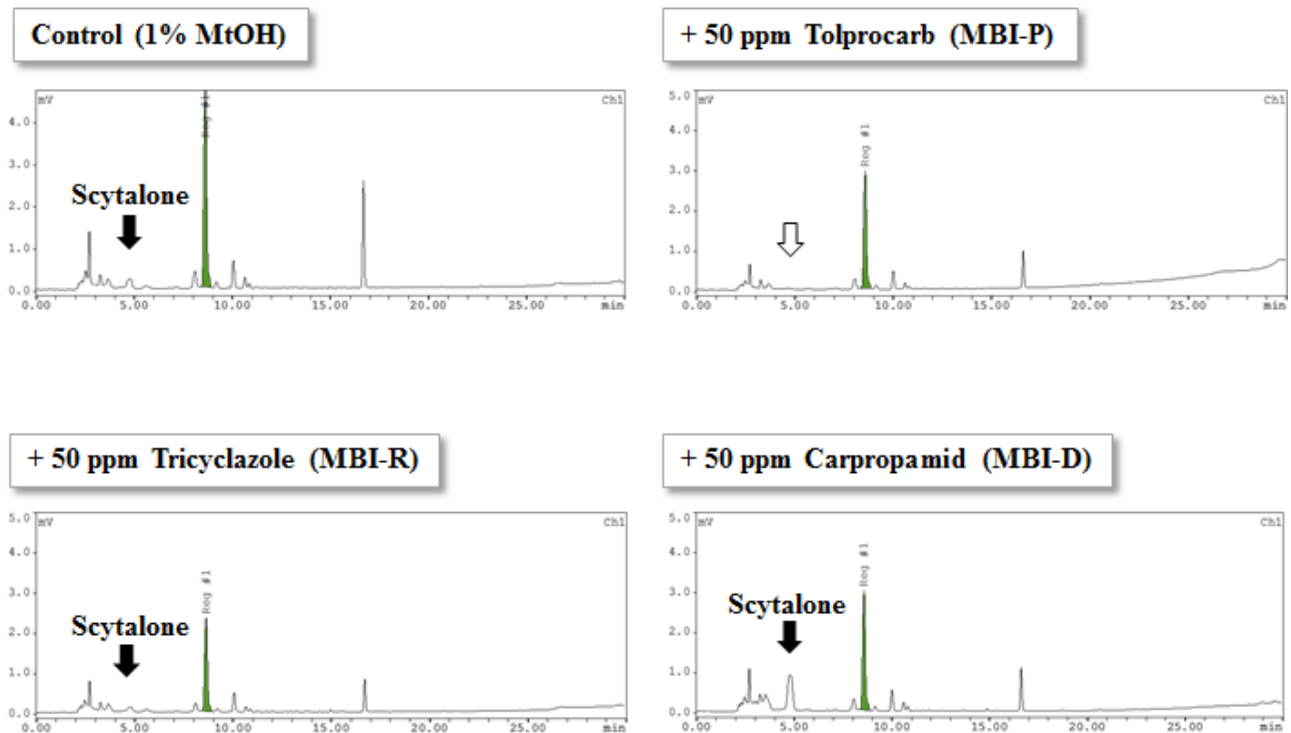


Figure 78

メラニン合成阻害剤共存下で培養したMoV2- and MoCV1-D-free APU10-199A株由来の抽出物のHPLC分析。

MoV2- and MoCV1-D-free APU10-199A株の孢子・菌糸懸濁液にメラニン合成阻害剤として50 ppm Tolprocarb、Tricyclazole、Carpropamidまたは薬剤無処理区として1% MeOHを添加し、セロハン上に塗布して培養した。菌叢のアセトン抽出物をHPLCで分離した。

APU10-199A(DI)

●試験条件

接種: 孢子懸濁液(1.0×10^4 spore/ml) 300 μ l

薬剤: 50 ppm

培養: 26°C、暗条件、16日間

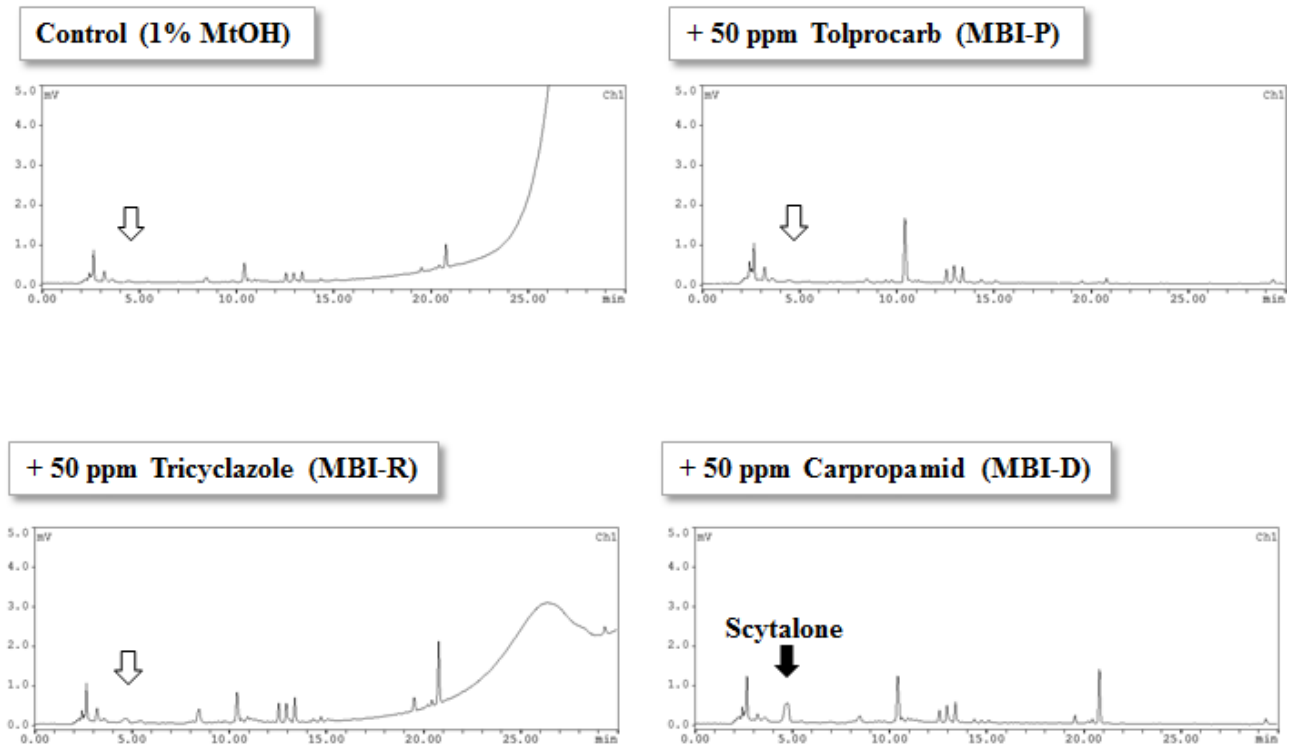


Figure 79

メラニン合成阻害剤共存下で培養したAPU10-199A株由来の抽出物のHPLC分析。

APU10-199A株の孢子・菌糸懸濁液にメラニン合成阻害剤として50 ppm Tolprocarb、Tricyclazole、Carpropamidまたは薬剤無処理区として1% MeOHを添加し、セロハン上に塗布して培養した。菌叢のアセトン抽出物をHPLCで分離した。

MoCV1-D-free APU10-199A (DF)

●試験条件

接種: 孢子懸濁液(1.0×10^4 spore/ml) 150 μ l

薬剤: 50 ppm with 0.1% Tween 20

培養: 26°C、暗条件、5日間

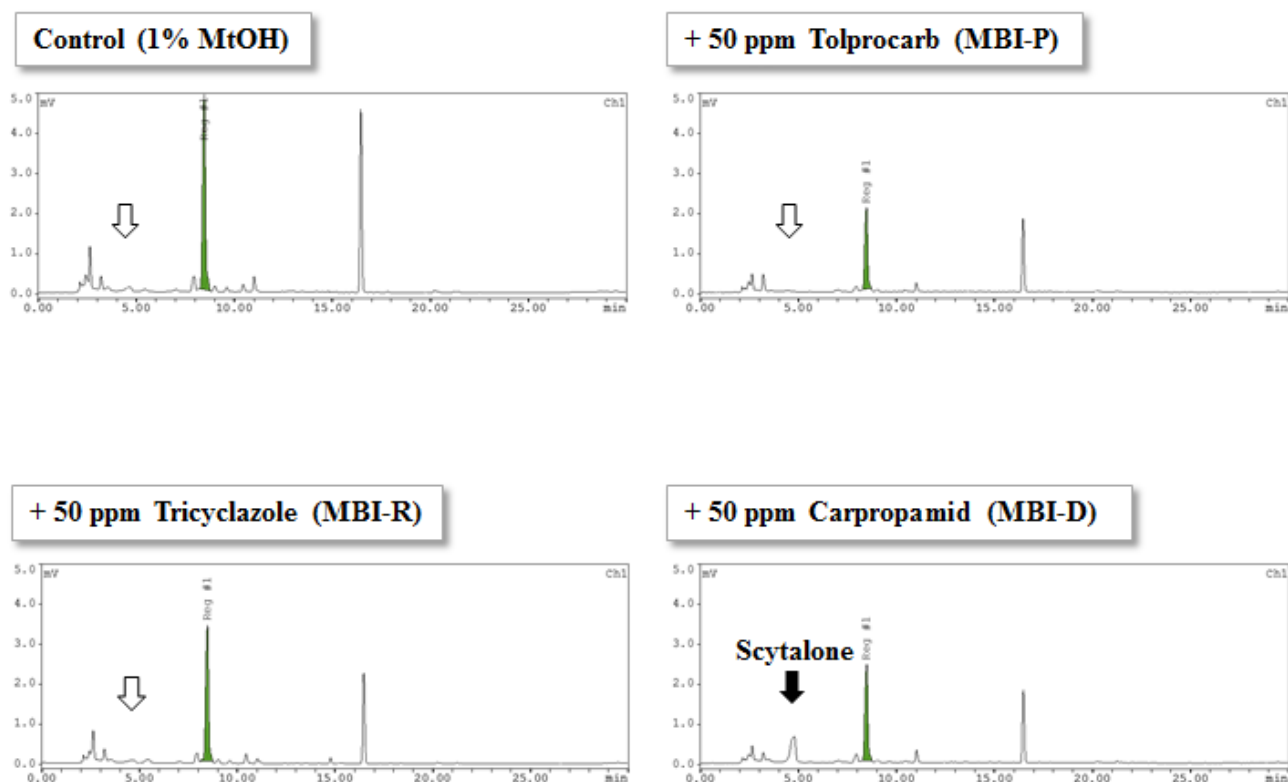


Figure 80

メラニン合成阻害剤共存下で培養したMoV2- and MoCV1-D-free APU10-199A株由来の抽出物のHPLC分析 2。

MoV2- and MoCV1-D-free APU10-199A株の孢子・菌糸懸濁液にメラニン合成阻害剤として50 ppm Torprocarb、Tricyclazole、Carpropamidまたは薬剤無処理区として1% MeOHを添加し、セロハン上に塗布して異なる条件で培養した。菌叢のアセトン抽出物をHPLCで分離した。

引用文献

- Ai, Y.P., Zhong, J., Chen, C.Y., Zhu, H.J., Gao, B.D., 2016.** A novel single-stranded RNA virus isolated from the rice-pathogenic fungus *Magnaporthe oryzae* with similarity to members of the family Tombusviridae. Arch. Virol. 161, 725–729.
- Aihara, M., Urayama, S.I., Le, M.T., Katoh, Y., Higashiura T., Fukuhara, T., Arie, T., Teraoka, T., Komatsu, K., Moriyama, H., 2018.** Infection by *Magnaporthe oryzae* chrysovirus 1 strain A triggers reduced virulence and pathogenic race conversion of its host fungus, *Magnaporthe oryzae*. J. of Gen. Plant Pathol. 84, 92-103.
- Aoki, N., Moriyama, H., Kodama, M., Arie, T., Teraoka, T. & Fukuhara, T., 2009.** A novel mycovirus associated with four double-stranded RNAs affects host fungal growth in *Alternaria alternata*. Virus Res. 140, 179-187.
- Atayde, V.D., da Silva Lira Filho, A., Chaparro, V., 2019.** Exploitation of the Leishmania exosomal pathway by Leishmania RNA virus 1. Nat Microbiol. 4(4):714–723. doi:10.1038/s41564-018-0352-y.
- Belozerskaya, T.A., Gessler, N.N., Aver'yanov, A.A., 2017.** In: Merillon, J.,-M., Ramawat, K.G. (Eds.), Melanin Pigments in Fungi. Fungal Metabolites, pp263–291. https://doi.org/10.1007/978-3-319-25001-4_29.
- Bormann, J., Heinze, C., Blum, C., Mentges, M., Brockmann, A., Alder, A., Landt, S.K., Josephson, B., Indenbirken, D., Spohn, M., Plitzko, B., Loesgen, S., Freitag, M., Schäfer, W., 2018.** Expression of a structural protein of the mycovirus FgV-ch9 negatively affects the transcript level of a novel symptom alleviation factor and causes virus-infection like symptoms in *Fusarium graminearum*. J. Virol. 92:e00326-18. <https://doi.org/10.1128/JVI.00326-18>.
- Brown, L.A., Baker, A. 2008.** Shuttles and Cycles: Transport of Proteins Into the Peroxisome Matrix (Review). Mol. Membr. Biol., 25 (5), 363-75.
- Buck, K.W., Chain, E.B., Himmelweit, F., 1971.** Comparison of interferon induction in mice by purified *Penicillium chrysogenum* virus and derived double stranded RNA. J.Gen.Virol.12,131–139.
- Castón, J.R., Luque, D., Gómez-Blanco, J., Ghabrial, S.A., 2013.** Chrysovirus structure: Repeated helical core

as evidence of gene duplication. *Adv. Virus Res.* 86, 87–108.

- Chumley, F.G. & Valent, B. 1990.** Genetic analysis of melanin deficient, nonpathogenic mutants of *Magnaporthe grisea*. *Mol. Plant Microbe Interact.* 3, 135–143.
- Colombo, M., Raposo, G., Théry, C., 2014.** Biogenesis, secretion, and intercellular interactions of exosomes and other extracellular vesicles. *Annu Rev Cell Dev Biol.* 30:255-89. doi: 10.1146/annurev-cellbio-101512-122326.
- Dawe, V.H., Kuhn, C.W., 1983.** Isolation and characterization of a double-stranded DNA mycovirus infecting the aquatic fungus, *Rhizidiomyces*. *Virology.* Oct 15;130(1):21-8.
- Ejmal, M.A., Holland, D.J., MacDiarmid, R.M., Pearson, M.N., 2018.** The Effect of *Aspergillus thermomutatus* Chrysovirus 1 on the biology of three *Aspergillus* species. *Viruses.* <https://doi.org/10.3390/v10100539>.
- Ellis, L.F., Kleinschmit, W.J., 1967.** Virus-like particles of a fraction of statolon, a mold product. *Nature* 215, 649–650.
- Fuke, K., Takeshita, K., Aoki, N., Fukuhara, T., Egusa, M., Kodama, M., Moriyama, H., 2011.** The presence of double-stranded RNAs in *Alternaria alternata* Japanese pear pathotype is associated with morphological changes. *J. Gen. Plant. Pathol.* DOI 10.1007/s10327-011-0315-0.
- Geis, P.A., Wheeler, M.H., & Szanislo, P.J. 1984.** Pentaketide metabolites of melanin synthesis in the dematiaceous fungus *Wangiella dermatitidis*. *Arch. of microb.*, 137(4), 324–328.
- Ghabrial, S.A., Castón, R.J., 2011.** Family Chrysoviridae Ninth Report of the International Committee for the Taxonomy of Viruses. In: King, A.M.Q., Adams, M.J., Carstens, E.B., Lefkowitz, E.J. (Eds.), *Virus Taxonomy*. Elsevier Academic Press, San Diego, pp.509–513.
- Ghabrial, S.A., Havens, W.M., 1992.** The *Helminthosporium victoriae* 190S Mycovirus Has Two Forms Distinguishable by Capsid Protein Composition and Phosphorylation State. *Virology*, 188 (2), 657-65.
- Ghabrial, S. A., Suzuki, N., 2009.** Viruses of plant pathogenic fungi. *Annu. Rev. Phytopathol.* 47, 353–384.
- Ghabrial, S.A., Dunn, S.E., Li, H., Xie, J., Baker, T.S., 2013.** Viruses of *Helminthosporium (Cochliobolus) victoriae*. *Adv Virus Res (SanDiego, Elsevier)* 86, 289–325.

- Ghabrial, S.A., Castón, J. R., Jiang, D., Nibert, M. L., Suzuki, N., 2015.** 50-plus years of fungal viruses. *Virology* 479–480, 356–368.
- Gietz, R.D., Schiestl, R.H., Willems, A.R., Woods, R.A., 1995.** Studies on the transformation of intact yeast cells by the LiAc/SS-DNA/PEG procedure. *Yeast* 11, 355–360.
- Greenblatt, G.A., Wheeler, M.H., 1986.** HPLC analysis of fungal melanin intermediates and related metabolites. *J. Liq. Chromatogr.* 9 (5), 971–981.
- Hamada T. Asanagi M. Satozawa T. Araki N. Banba S. Higashimura N. Akase T. Hirase K., 2014.** Action mechanism of the novel rice blast fungicide tolprocarb distinct from that of conventional melanin biosynthesis inhibitors *J. Pestic. Sci.* 39, 152–158.
- Hammond, T.M., Andrews, M.D., Roossinck, M.J., Keller, N.P., 2008.** *Aspergillus* Mycoviruses Are Targets and Suppressors of RNA Silencing. *Eukaryot Cell*, 7 (2), 350-7.
- Higashiura, T., Katoh, Y., Urayama, S., Hayashi, O., Aihara, M., Fukuhara, T., Fuji, S., Kobayashi, T., Hase, S., Arie, T., Teraoka, T., Komatsu, K., Moriyama, H. 2019.** *Magnaporthe oryzae* chrysovirus 1 strain D confers growth inhibition to the host fungus and exhibits multiform viral structural proteins. *Virology*. Jul 15;535:241-254.
- Himeno, M., Maejima, K., Komatsu, K., Ozeki, J., Hashimoto, M., Kagiwada, S., Yamaji, Y., Namba, S., 2010.** Significantly Low Level of Small RNA Accumulation Derived From an Encapsidated Mycovirus With dsRNA Genome. *Virology*, 396 (1), 69-75.
- Hollings, M., 1962.** Viruses associated with a die-back disease of cultivated mushroom. *Nature* 196, 962-965.
- Huang, S., Ghabrial, S.A., 1996.** Organization and expression of the double-stranded RNA genome of *Helminthosporium victoriae* 190S virus, a totivirus infecting a plant pathogenic filamentous fungus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 93, 12541–12546.
- Ikeda, K., Inoue, K., Kida, C., Uwamori, T., Sasaki, A., Kanematsu, S., Park, P., 2013.** Potentiation of mycovirus transmission by zinc compounds via attenuation of heterogenic incompatibility in *Rosellinia necatrix*. *Appl. Environ. Microbiol.* 79, 3684–3691.

- Imazaki, A., Tanaka, A., Harimoto, Y., Yamamoto, M., Akimitsu, K., Park, P., Tsuge, T. 2010.** Contribution of Peroxisomes to Secondary Metabolism and Pathogenicity in the Fungal Plant Pathogen *Alternaria Alternata*. Eukaryot Cell, 9 (5), 682-94.
- Illana, A., Marconi, M., Rodríguez-Romero, J., Xu, P., Dalmay, T., Wilkinson, M.D., Ayllón, M., Sesma, A., 2017.** Molecular characterization of a novel ssRNA ourmia-like virus from the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*. Arch. Virol. 162, 891–895.
- Jacobson, E.S. 2000.** Pathogenic roles for fungal melanins. Clinical microbiology reviews, 13(4), 708–717.
- Jiang, D., Ghabrial, S. A., 2004.** Molecular characterization of *Penicillium chrysogenum* virus: reconsideration of the taxonomy of the genus Chrysovirus. J. Gen. Virol. 85, 2111-2121.
- Kamakura, T., Yamaguchi, S., Saitoh, K., Teraoka, T., Yamaguchi, I., 2002.** A novel gene, CBP1, encoding a putative extracellular chitin-binding protein, may play an important role in the hydrophobic surface sensing of *Magnaporthe grisea* during appressorium differentiation. Mol. Plant Microbe Interact. 15, 437–444.
- Kato, A., Miyake, T., Nishimura, K., Tateishi, H., Teraoka, T., Arie, T., 2012.** Use of fluorescent proteins to visualize interactions between the Bakanae disease pathogen *Gibberella fujikuroi* and the biocontrol agent *Talaromyces* sp. KNB-422. J. Gen. Plant Pathol. 78, 54–61.
- Kiel, J.A., van der Klei, I.J., van den Berg, M.A., Bovenberg, R.A., Veenhuis, M. 2005.** Overproduction of a Single Protein, Pc-Pex11p, Results in 2-fold Enhanced Penicillin Production by *Penicillium Chrysogenum*. Fungal Genet. Biol., 42 (2), 154-64.
- Kiel, J.A., van den Berg, M., Bovenberg, R.A., van der Klei, I.J., Veenhuis, M. 2004.** *Penicillium Chrysogenum* Pex5p Mediates Differential Sorting of PTS1 Proteins to Microbodies of the Methylotrophic Yeast *Hansenula Polymorpha*. Fungal Genet. Biol., 41 (7), 708-20.
- Kim J.M., Jung J.E., Park J.A., Park S.M., Cha B.J., Kim D.H., 2013.** Biological function of a novel chrysovirus, CnV1-BS122, in the Korean *Cryphonectria nitschkei* BS122 strain. J. Biosci. Bioeng. Jan;115(1):1-3.
- Komatsu, K., Urayama, S., Katoh, Y., Fuji, S., Hase, S., Fukuhara, T., Arie, T., Teraoka, T., Moriyama, H., 2016.** Detection of *Magnaporthe oryzae* chrysovirus 1 in Japan and establishment of a rapid, sensitive and

- direct diagnostic method based on reverse transcription loop-mediated isothermal amplification. *Arch. Virol.* 161, 317-326.
- Kubo, Y., 2013.** Function of peroxisomes in plant-pathogen interactions. In: L.A. del Rio (Ed.), *Peroxisomes and their key role in cellular signaling and metabolism*, Subcellular Biochemistry 69, chapter 18. Pp329-345.
- Kumar, S., Stecher, G., Tamura, K., 2016.** MEGA7: Molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol. Bio. Evol.* 33, 1870-1874.
- Kurahashi, Y., Araki, Y., Kinbara, T., Pontzen, R., Yamaguchi, I., 1998.** Intermediates accumulation and inhibition sites of carpropamid in the melanin biosynthesis pathway of *Pyricularia oryzae*. *J. Pestic. Sci.* 23, 22–28.
- Le S.Q., Gascuel O., 2008.** An improved general amino acid replacement matrix. *Mol Biol Evol* 25, 1307-1320.
- Le M.T., Arie, T., Teraoka, T., 2010.** Population dynamics and pathogenic races of rice blast fungus, *Magnaporthe oryzae*, in the Mekong Delta in Vietnam. *J. Gen. Plant Pathol.*, 76, 177– 182.
- Lindberg, G.D., 1959.** A transmissible disease of *Helminthosporium victoriae*. *Phytopathology*, 49, 29-32.
- Liu, G.Y., & Nizet, V. 2009.** Color me bad: microbial pigments as virulence factors. *Trends in microbiology*, 17(9), 406–413.
- Maejima, K., Himeno, M., Komatsu, K., Kakizawa, S., Yamaji, Y., Hamamoto, H., Namba, S., 2008.** Complete nucleotide sequence of a new double-stranded RNA virus from the rice blast fungus, *Magnaporthe oryzae*. *Arch. Virol.* 153, 389-391.
- Moriyama, H., Urayama, S., Higashiura, T., Le, T.M., Komatsu, K., 2018.** Chrysovirus in *Magnaporthe oryzae*. *Viruses*, 10, 697; doi:10.3390/v10120697.
- Nicholas, K.B., Nicholas, H.B.Jr., Deerfield, D.W.II., 1997.** GeneDoc: analysis and visualization of genetic variation. *Embnet News*, 4, 1–4.
- Nuss, D.L., 2005.** Hypovirulence: mycoviruses at the fungal–plant interface. *Nat. Rev. Microbiol.* 3, 632–642.
- Ohkita, S., Lee, Y., Nguyen, Q., Ikeda, K., Suzuki, N., Nakayashiki, H., 2019.** Three ourmia-like viruses and their associated RNAs in *Pyricularia oryzae*. *Virology*. 2019 Aug;534:25-35.

- Okada, R., Kiyota, E., Moriyama, H., Fukuhara, T., Natsuaki, T., 2015.** A simple and rapid method to purify viral dsRNA from plant and fungal tissue. *J. Gen. Plant. Pathol.* 81, 103-107.
- Okada, R., Ichinose, S., Takeshita, K., Syun-ichi Urayama, S., Fukuhara, T., Komatsu, K., Arie, T., Ishihara, A., Egusa, M., Kodama, M., Moriyama, H., 2018.** Molecular characterization of a novel mycovirus in *Alternaria alternata* manifesting two-sided effects: down-regulation of host growth and up-regulation of host plant pathogenicity. *Virology* 519, 23-32.
- Sambrook, J., Fritsch, E.F., Maniatis, T., 1989.** *Molecular cloning: A Laboratory Manual* Second edition, CSH Press.
- Sanderlin, R.S., Ghabrial, S.A. 1978.** Physicochemical Properties of Two Distinct Types of Virus-Like Particles From *Helminthosporium Victoriae*. *Virology*, 87 (1), 142-51.
- Schmitt, M.J., Breinig, F., 2006.** Yeast viral killer toxins: lethality and self-protection. *Nat Rev Microbiol.* Mar;4(3):212-21. Review.
- Sierotzki, M., 2015.** Respiration Inhibitors: Complex III. In: Ishii, H., Hollomon, D.H., (Eds.), *Fungicide Resistance in Plant Pathogens*. Springer, Chap. 9. pp.119-144.
- Suzuki, F., Arai, M. and Yamaguchi, J. 2006.** DNA fingerprinting of *Pyricularia grisea* by rep-PCR using a single primer based on the terminal inverted repeat from either of the transposable elements *Pot2* and MGR586. *J. Gen. Plant Pathol.* 72: 314–317.
- Takagaki, M., 2015.** Melanin Biosynthesis Inhibitors. In: Ishii, H., Hollomon, D.H., (Eds.), *Fungicide Resistance in Plant Pathogens*. Springer, Chap. 11. pp.175–180.
- Talbot, N.J., 2003.** On the trail of a cereal killer: Exploring the biology of *Magnaporthe grisea*. *Annu Rev Microbiol.* 2003;57:177–202. doi:10.1146/annurev.micro.57.030502.090957.
- Tang, L., Hu, Y., Liu, L., Wu, S., Xie, J., Cheng, J., Fu, Y., Zhang, G., Ma, J., Wang, Y., Zhang, L., 2015.** Genomic organization of a novel victorivirus from the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*. *Arch. Virol.* 160, 2907–2910.
- Thompson, J. D., Gibson, T. J., Plewniak, F., Jeanmougin, F., Higgins, D. G., 1997.** The CLUSTAL X windows

interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. *Nucleic Acids Res.* 25, 4876–4882.

Urayama, S., Kato, S., Suzuki, Y., Aoki, N., Le, M. T., Arie, T., Teraoka, T., Fukuhara, T., Moriyama, H., 2010. Mycoviruses related to chrysovirus affect vegetative growth in the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*. *J. Gen. Virol.* 91, 3085-3094.

Urayama, S., Ohta, T., Onozuka, N., Sakoda, H., Fukuhara, T., Arie, T., Teraoka, T., Moriyama, H., 2012. Characterization of *Magnaporthe oryzae* chrysovirus 1 structural proteins and their expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Virol.* 86, 8287-8295.

Urayama, S., Sakoda, H., Takai, R., Katoh, Y., Minh Le, T., Fukuhara, T., Arie, T., Teraoka, T., Moriyama, H., 2014a. A dsRNA mycovirus, *Magnaporthe oryzae* chrysovirus 1-B, suppresses vegetative growth and development of the rice blast fungus. *Virology* 448, 265-273.

Urayama, S., Fukuhara, T., Moriyama, H., Toh, E. A., Kawamoto, S., 2014b. Heterologous expression of a gene of *Magnaporthe oryzae* chrysovirus 1 strain A disrupts growth of the human pathogenic fungus *Cryptococcus neoformans*. *Microbiol. Immunol.* 58, 294-302.

Urayama, S., Kimura, Y., Katoh, Y., Ohta, T., Onozuka, N., Fukuhara, T., Arie, T., Teraoka, T., Komatsu, K., Moriyama, H., 2016a. Suppressive effects of mycoviral proteins encoded by *Magnaporthe oryzae* chrysovirus 1 strain A on conidial germination of the rice blast fungus. *Virus Res.* 223, 10-19.

Urayama, S., Katoh, Y., Fukuhara, T., Arie, T., Moriyama, H., Teraoka, T., 2015. Rapid detection of *Magnaporthe oryzae* chrysovirus 1-A from fungal colonies on agar plates and lesions of rice blast. *J. Gen. Plant Pathol.* 81:97–102.

Urayama, S., Takai, Y., H., Nonomura, T., 2016b. FLDS: A comprehensive dsRNA sequencing methods for intracellular RNA virus surveillance. *Microbes Environ.* 31, 33-40.

Wheeler, M.H., Greenblatt, G.A., 1988. The inhibition of melanin biosynthetic reactions in *Pyricularia oryzae* by compounds that prevent rice blast disease. *Exp. Mycol.* 12, 151–160.

Wickner, R.B., Fujimura, T., Esteban, R., 2013. Viruses and prions of *Saccharomyces cerevisiae*. *Advances in*

- Wislocki, G.B., Rheingold, J.J., Dempsey, E.W., 1949.** The occurrence of the periodic acid-Schiff reaction in various normal cells of blood and connective tissue. *Blood*. 1949 May;4(5):562-8.
- Wilson, R.A., Talbot, N.J., 2009.** Under pressure: investigating the biology of plant infection by *Magnaporthe oryzae*. *Nat Rev Microbiol*, 7 (3), 185-95.
- Woloshuk, C.P., Sisler, H.D., Tokousbalides, M.C., Dutky, S.R., 1980.** Melanin biosynthesis in *Pyricularia oryzae*: Site of tricyclazole inhibition and pathogenicity of melanin-deficient mutants. *Pesti. Bio. And Physi.* Vol. 14, Issue 3, 256-264
- Xiao, X., Cheng, J., Tang, J., Fu, Y., Jiang, D., Baker, T.S., Ghabrial, S.A., Xie, J., 2014.** A novel partitivirus that confers hypovirulence on plant pathogenic fungi. *J Virol*. 88(17):10120-33. doi: 10.1128/JVI.01036-14.
- Xie, J., Havens, W.M., Lin, Y.H., Suzuki, N., Ghabrial, S.A., 2016.** The victorivirus *Helminthosporium victoriae* virus 190S is the primary cause of disease/hypovirulence in its natural host and a heterologous host. *Virus Res*. 213, 238–245
- Yamashita, S., Doi, Y., Yora, K. 1971.** A polyhedral virus found in rice blast fungus, *Pyricularia oryzae cavara*. *Ann.Phytopathol. Soc. Jpn.* 37, 356–359.
- Yokoi, T., Yamashita, S., Hibi, T., 2007.** The nucleotide sequence and genome organization of *Magnaporthe oryzae* virus 1. *Arch. Virol.* 152, 2265–2269.
- Yu, X., Li, B., Fu, Y., Jiang, D., Ghabrial, S.A., Li, G., Peng, Y., Xie, J., Cheng, J., Huang, J., Yi, X., 2010.** A geminivirus-related DNA mycovirus that confers hypovirulence to a plant pathogenic fungus. *Proc. Natl. Acad. Sci. U S A*, 107 (18), 8387-92 107(18), 8387–8392.
- Yu, X., Li, B., Fu, Y., Xie, J., Cheng, J., Ghabrial, S.A., Li, G., Yi, X., Jiang, D., 2013.** Extracellular transmission of a DNA mycovirus and its use as a natural fungicide. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 110, 1452–1457.
- 相原光宏, 2017.** マイコウイルス MoCV1 感染によるイネいもち病菌の病原性変動に関する解析および国内における MoCV1 近縁ウイルスの探索と配列比較. 東京農工大学農学府 生物制御科学専攻 修士論文

- 浅賀宏一, 加藤 肇, 山田昌雄, 吉野嶺一(編), 2003. 世界におけるいもち病研究の軌跡 -21 世紀の研究 発展をめざして-. 社団法人日本植物防疫協会.
- 浦山俊一, 2012. イネいもち病菌を弱毒化する新規マイコウイルス *Magnaporthe oryzae chrysovirus 1* (MoCV1)の遺伝子及びタンパク質の構造と機能に関する研究. 東京農工大学連合農学研究科 生物生産科学専攻 博士論文.
- 浦山俊一, Le M.T., 岡田 亮, 加藤 優, 福原敏行, 有江 力, 森山裕充, 寺岡 徹. 2014. イネいもち病菌の病原力(性)と菌類ウイルスの作用とその応用. 土と微生物(Soil Microorganisms). Vol. 68 No. 1, pp. 3-5.
- 大矢 禎一(監), 2002. 酵母遺伝子実験マニュアル 高効率の酵母の形質転換. 丸善株式会社. P107-110.
- 加藤 優, 2015. 日本国内で検出されたイネいもち病菌マイコウイルス *Magnaporthe oryzae chrysovirus 1*(MoCV1)の生化学的及び生育阻害機能の解析. 東京農工大学農学府 生物制御科学専攻 修士論文.
- 鈴木 祐, 2010. 生育阻害を示すイネいもち病菌に混合感染する二種のマイコウイルスの性状解析. 東京農工大学農学府 生物制御科学専攻 修士論文
- 野島 博ら, 2000. 遺伝子工学ハンドブック 第 I 部遺伝子クローニング 高効率コンピタントセル調整法. 羊土社.
- 宮川 恒, 田村廣人, 浅見忠男(編著). 2019. 新版 農薬の科学 7. 農薬とその将来. 朝倉書店. P191-196.

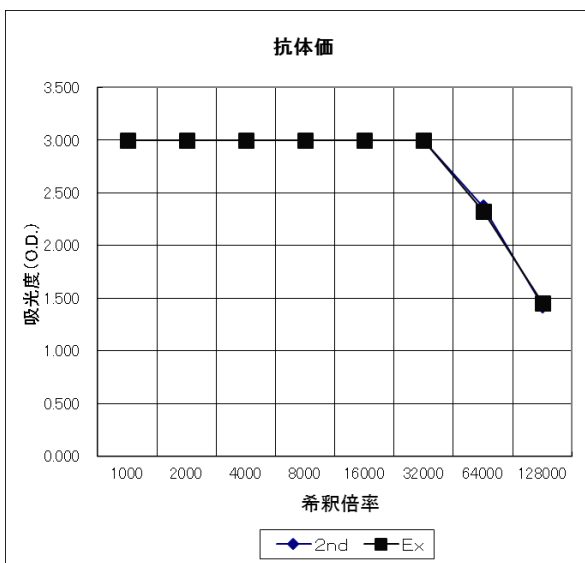
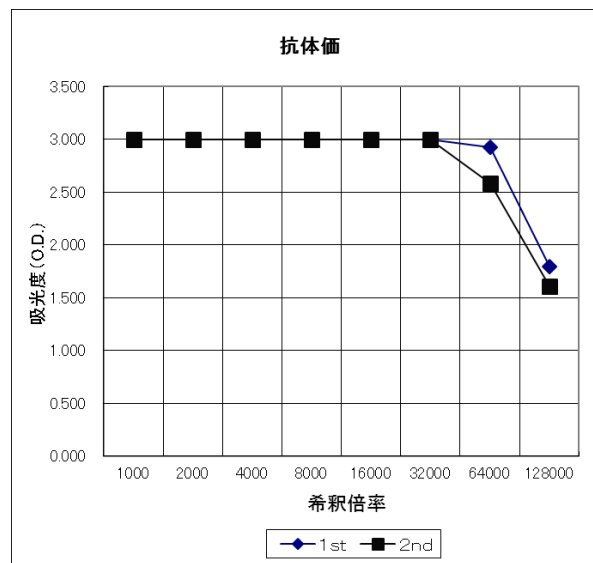
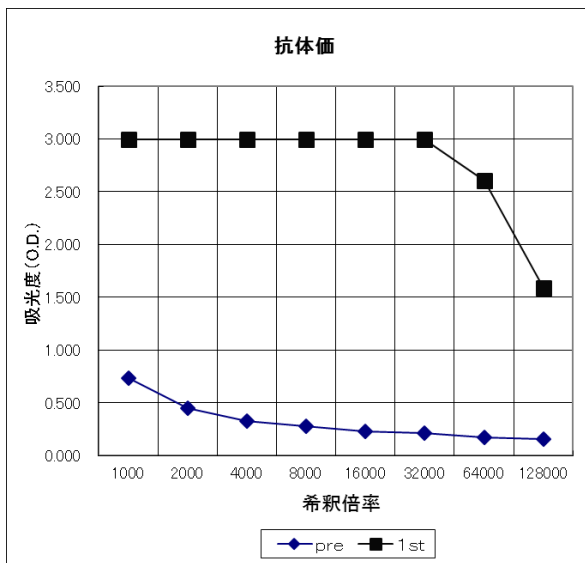
謝辞

本論文は筆者が東京農工大学大学院連合農学研究科生物生産科学専攻博士課程に在籍中の研究成果を纏めたものです。同専攻准教授 森山裕充 先生におかれましては指導教官として本研究の機会を与えていただき、その遂行にあたって丹念なご指導を賜りました。ここに厚く御礼申し上げます。また、同専攻准教授 小松健 先生、同専攻教授 福原敏行 先生、同専攻教授 有江力 先生、並びに、宇都宮大学農学部生物資源科学科教授 夏秋知英 先生、茨城大学農学部地域総合農学科教授 中島雅己 先生におかれましては副査としてご助言をいただくとともに本研究の細部にわたりご指導を賜りました。また、本学元教授 寺岡徹 先生におかれましては研究内容に関して親身にご指導を賜りました。ここに厚く御礼申し上げます。

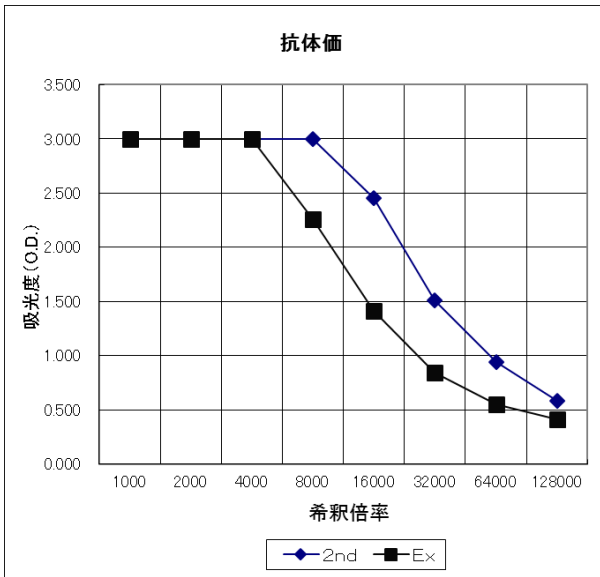
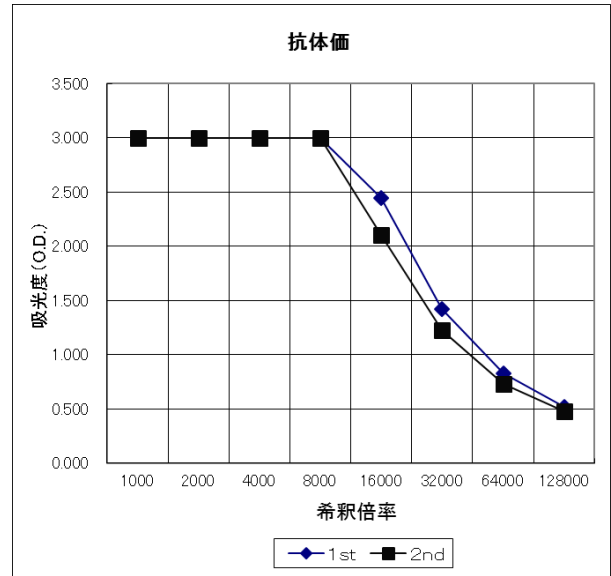
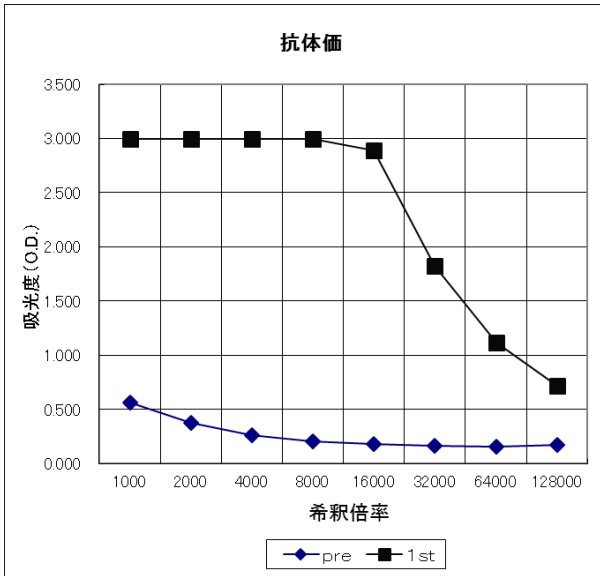
学位論文および投稿論文の分析実験におきまして、一般財団法人残留農薬研究所化学部代謝第2研究室室長 林靖 様におかれましては分析機器や研究内容に関する丹念なご指導とご支援を賜りました。ここに同氏に対して厚く御礼申し上げます。また、本学産学連携研究員 千浦博 先生と植松清次 先生におかれましては日頃よりご討論いただき数々のお知恵を賜りました。ここに厚く御礼申し上げます。

また、筑波大学助教 浦山俊一 先生、並びに、茨城県農業総合センター園芸研究所 岡田亮 博士におかれましては原著論文投稿や研究遂行にあたって大変なご助力とご支援を賜りました。ここに厚く御礼申し上げます。加藤優氏、相原光宏氏をはじめ、本学細胞分子生物学研究室の諸先輩方、同僚、後輩の皆様には日頃より有益なご討論とご助力を賜りました。また、永井様をはじめ、本学植物病理学研究室の方々にもご協力を賜りました。多くの方の並々ならぬお力添えによって学位論文研究を完遂することができました。ここに厚く御礼申し上げます。

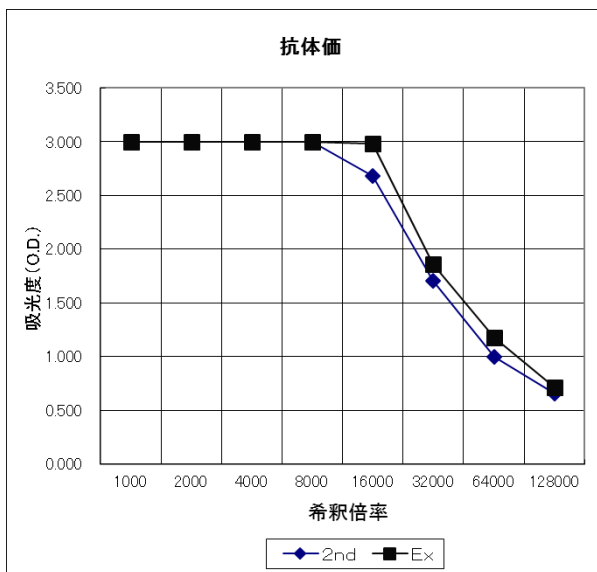
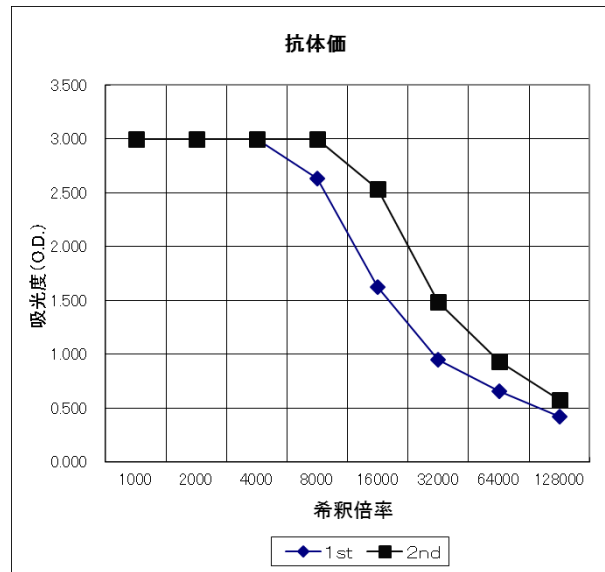
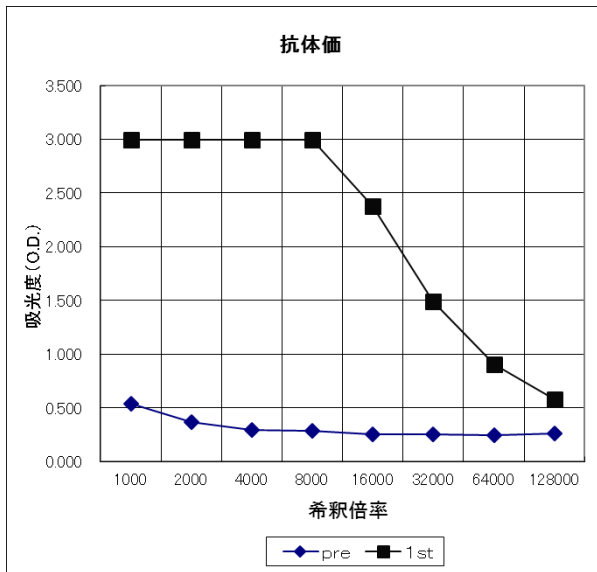
付録



付録1
 抗原に対する抗MoCV1-D rORF3pポリクローナル抗体のELISA測定。



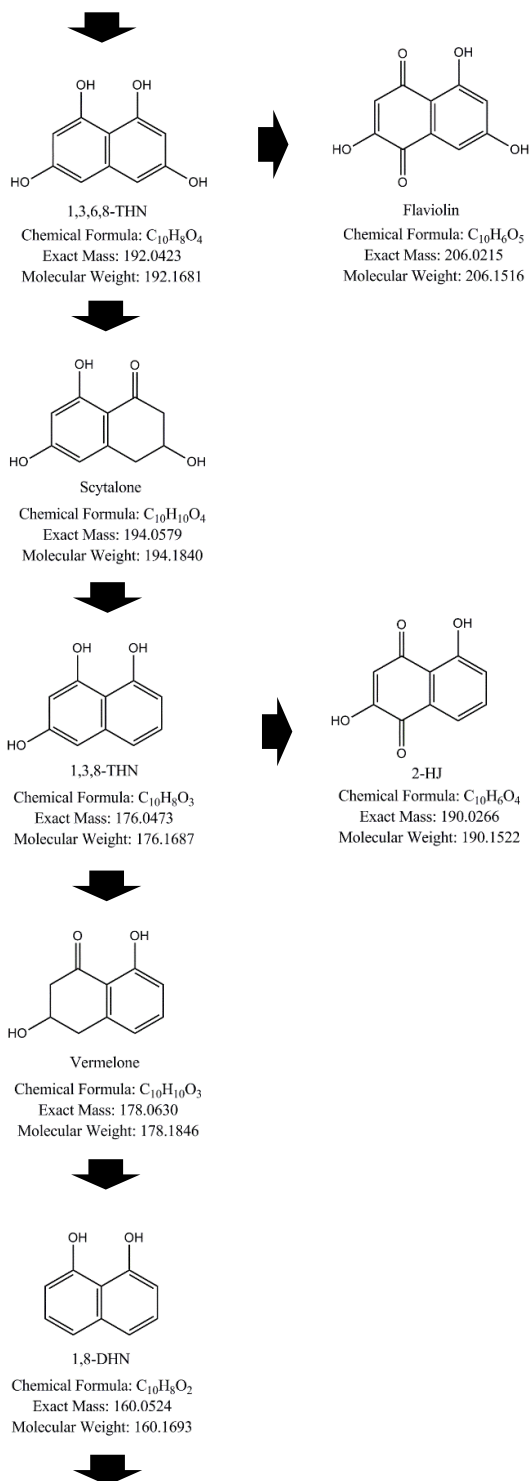
付録2
 抗原に対する抗MoCV1-D rORF4pポリクローナル抗体のELISA測定。



付録3

抗原に対する抗MoCV1-D rORF4SUapポリクローナル抗体のELISA検定。

5 × Malonyl-CoA



Melanin

付録 4

メラニン生合成系中間体の化学構造と精密分子量(Exact mass)。

イネいもち病菌のメラニン生合成経路(Pentaketide pathway)と各中間体の計算精密分子量(Exact mass)と組成式を示した。