

氏名	スピヤニ
授与した学位	博士
専攻分野の名称	学術
学位授与番号	博甲第3422号
学位授与の日付	平成19年 3月23日
学位授与の要件	自然科学研究科資源管理科学専攻 (学位規則第4条第1項該当)
学位論文の題目	Characterization of a novel reovirus isolated in a hypovirulent stain (9B21) of the chestnut blight fungus that is infectious as particles (クリ胴枯病菌病原性衰退系統 9B21 から分離され、粒子として感染性を有する新規レオウイルスの性格付け)
論文審査委員	助教授 鈴木 信弘 教授 玉田 哲男 教授 積木 久明

#### 学位論文内容の要旨

A filamentous fungus, *Cryphonectria parasitica* is the causal pathogen of the chestnut blight disease. *C. parasitica* is known to be a host of members of at least 5 virus families, which often confer hypovirulence to the fungal host, thus being potential biological control agents. These viruses are classified into two groups: "true" and "pseudo" dsRNA viruses. The cause/effect relationship is established only for a few "pseudo" dsRNA viruses, but not for "true" ones because of the unavailability of an inoculation method.

Here, a transfection protocol was developed for a novel "true" dsRNA mycovirus, *Mycoreovirus 1* (MyRV-1) from a hypovirulent strain 9B21 of the chestnut blight fungus, which manifested reduced growth of aerial mycelia and enhanced production of brown pigments. The virus was subsequently characterized biologically and molecularly. Virus particles purified by differential and sucrose density gradient centrifugation had a double-shelled structure of approximately 80 nm in diameter. Cryo-electron microscopy showed clearly turrets on MyRV-1 core particles. Spheroplasts of a virus-free isogenic strain were transfected with purified particles, resulted in colony morphology identical to the original strain 9B21. Regenerated colonies harbored virus particles with the same morphology and possessed identical phenotypic attributes as 9B21, representing the fulfillment of Koch's postulates.

Molecular analysis revealed that MyRV-1 had 11 dsRNA genome segments ranging in size from 4127 bp to 732 bp. Each segment had a single open reading frame (ORF) on its capped, plus-sense strand. All the 11 genome segments had common terminal sequences on both 5'- and 3'- termini. Together with particle morphology, these molecular characteristics indicated that the virus is a member of the family *Reoviridae*, that constitutes a new genus. The International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV) approved in 2004 a proposal that a new genus *Mycoreovirus* within the family *Reoviridae* contains MyRV-1 as a type member, and two other members MyRV-2 and MyRV-3, as suggested in this study.

As an initial step toward molecular dissection of complex particles, all the 11 dsRNA genome segments of MyRV-1 were expressed in insect cells via a baculovirus vector system. This heterologous expression system was utilized to identify S3-coded VP3 as a guanylyltransferase. Deletion and site-directed mutational analyses revealed its enzymatic activity domain residing at the N-terminal region that contained critical amino acid residues H233, H242, Y243, F244, and F246, and lead to the identification of as-yet-unrevealed motif Hx<sub>3</sub>H of guanylyltransferases of the turreted group of the family *Reoviridae*.

These findings will contribute to progress on the study of the mycoreovirus as a potential biocontrol agent, and exploration into MyRV-1/*C. parasitica* interactions and reovirus intracellular replication.

## 論文審査結果の要旨

菌類に感染するウイルスはこれまで数百種類報告されているが、それらのほとんどが2本鎖 RNA ウイルスである。それらは転写活性を有する粒子を形成する「真」の2本鎖 RNA ウイルスと粒子を形成しない「偽」の2本鎖 RNA ウイルスがある。これまで、「偽」の2本鎖 RNA ウイルス数種類に対し感染系が確立されているが、「真」の2本鎖 RNA ウイルスに対してはゲノム cDNA あるいは粒子を用いたとしても宿主菌に感染させることができなかった。

Supyani 氏はクリ胴枯病菌 (*Cryphonectria parasitica*) 病原性衰退系統 (hypovirulent strain)(9B21)から新しく分離されたマイコウイルス、MyRV1 (*Mycoreovirus 1*)の精製粒子を用いたトランスフェクション系を確立し、生物学的性状と分子生物学性状を解析し、以下の成果を得た。

- 1 マイコウイルスとして初めて粒子を感染させることに成功し、9B21 系統の病原学を確立した。
- 2 MyRV1 ゲノムである 11 本の dsRNA セグメント(S1-S11)について末端を含む配列を決定し、両末端に数塩基から成る保存領域、単一の ORF を有することを明らかにした。
- 3 重殻構造を持つ粒子の特徴、さらにゲノム構造から MyRV1 が新規の属を構成する新種のレオウイルスであることを ICTV に提案し、承認された。
- 4 S1,S5, S6 が RNA 依存 RNA 合成酵素、ミリストイル化蛋白質、NTP 結合蛋白質をコードすることをモチーフサーチにより明らかにした。
- 5 S3 がキャッピング酵素をコードすることを生化学的に証明した。また、これまで長い間不明であったレオウイルス科のキャッピング酵素モチーフを同定に成功した。

以上の成果の一部は3編の論文(Hillman et al. J. Virol. 2004; Suzuki et al., 2004; Supyani et al., 2007)として纏められている。

Supyani 氏は学位に値する十分な研究成果を挙げ、またその過程で十分な研鑽を積んだことを学位論文審査員として認める。