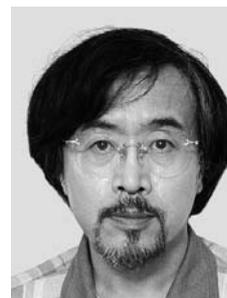


2009年 生物工学功績賞 受賞



生物間相互作用（共生・寄生）の 分子機構解析と バイオテクノロジーへの利用



山田 隆

Biological mutualism and parasitism: from molecular mechanisms to biotechnological applications

Takashi Yamada (*Department of Molecular Biotechnology, Graduate School of Advanced Sciences of Matter, Hiroshima University, 1-3-1 Kagamiyama, Higashi-Hiroshima 739-8530*) *Seibutsu-kogaku* 88: 48-53, 2010.

はじめに

従来のバイオテクノロジーは、主として個々の生物種を対象として、極力純粋単一な系を用いて展開してきた。しかし、本来、生物は自然界において多種多様な生物間の複雑な相互作用のもとに生活している。ゲノム情報が示すように、ある生物種ゲノムの現在の姿は、進化の過程でのさまざまな異種ゲノムとのダイナミックな相互作用の結果である。微生物、動植物が生産する有用物質の多くは、生物間相互作用の中で作られる（たとえば生物間誘因物質、忌避物質、有毒物質、情報交換物質など）。ゲノム中の未知遺伝子の多くは生物間相互作用に働く可能性がある。多くの生物共生系（相互作用の結果）では、機能の総合化、合理化、省エネが達成されている。本研究においては光エネルギーの生物利用を念頭に置いて、生物間相互作用による新たな機能開発、物質生産、エコシステム構築に道を拓くことを意図した。具体的には(1) 微細藻類クロレラウイルス系による新奇酵素・有用物質生産、(2) ファージ・細菌・植物系によるバイオコントロール（病害の生物的防除）、(3) 根粒菌・レンゲソウを用いたバイオ肥料開発の研究を行った。

微細藻類クロレラウイルス系による 新奇酵素・有用物質生産

クロレラウイルス（クロロウイルス）は、1978年に川上らによって広島大学植物園より採取されたミドリゾウリムシの細胞内に共生する藻類 *zoochlorella* 中に初めて発見された。ウイルスは、*zoochlorella* が共生状態にある時には影を潜めており、宿主細胞から分離するや否や一気に増殖を始めることから、細胞内共生を維持する重要な因子として認識された。やがてある種のクロレラ株（たとえば、*Chlorella* sp. NC64A, Pbi, SAG-241-80 など）を用いてのブランクアッセイ法が確立され²⁾、バクテリオファージと同様に扱える優れた実験系となった。

このウイルスは、ウイルス分類学上は *Phycodnaviridae* 科 *Phycodnavirus* 属に属する^{3,4)}。これまでに明らかにされたこのウイルスの特徴は、以下のように要約される^{3,4)}。(i) 直径 140-190 nm の巨大な正二十面体粒子であり（シヨ糖密度勾配沈降係数 2,300S）、主としてタンパク質（64%）、DNA（25%）、および脂質（10%）から成る（図1）。(ii) ウイルス粒子は50種以上の構成タンパク質から成り、そのうち主要タンパク質 Vp54（Vp52）が約40%を占める。(iii) ウイルスゲノムは巨大な（330-380

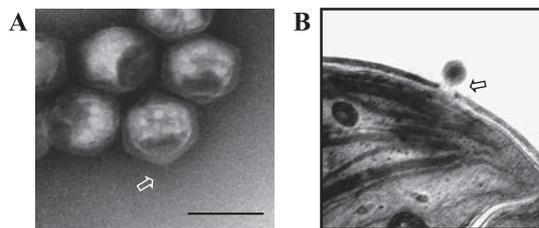


図1. クロレラウイルスの電子顕微鏡写真. 正二十面体粒子の一つの頂角が突起構造を示す (A, 矢印). ウイルスは宿主クロレラ細胞に突起構造で吸着し短時間に孔をあける (B, 矢印). バー: 200 ミクロン.

kbp) 線状 dsDNA であり, 特殊なヘアピン末端構造を有する. (iv) ウイルスゲノムには 360 個以上の遺伝子読み取り枠 (ORF) があり, その多くが感染サイクル中に発現している. (v) ウイルス遺伝子にはウイルス増殖に直接関係するもの以外に, 核酸・ヌクレオチド, 糖質, 脂質, タンパク質・アミノ酸, ポリアミンなどの各種代謝系, イオンチャンネル, 多数の tRNA, グループ I イントロンなどをコードするものが含まれている. (vi) 脂質 2 重膜をビリオン外殻内側に有し, 主として宿主細胞質で増殖するウイルス群 (NCLDV) の代表格として進化的にきわめて古い起原のものと考えられている⁵⁾. (vii) 自然界の淡水中に広く分布しているが, その宿主と増殖サイクルには謎が多い.

クロレラウイルスの感染サイクルにおいて興味深いのは, ウイルスによる宿主クロレラ細胞壁の分解である. ウイルスは正二十面体の頂角で細胞壁に吸着すると, 短時間 (5~10 分) の内に細胞壁に孔を開け, ウイルスコア部分を細胞質へ注入する. ウイルス感染後 6~8 時間で溶菌が起こり, ウイルス粒子は細胞外へ放出され新たな感染サイクルに入る. つまり, 感染の最初と最後のステップでクロレラの細胞壁の分解がおこる. クロレラの細胞壁は難分解性で知られており, ここに新奇な多糖分解酵素の関与が予想された⁶⁾. ウイルス粒子タンパク質の Zymogram, ゲノム情報からの遺伝子クローニングなど

によって, 結果的に 5 種の分解酵素を同定した (表 1). vChta-1 キトサナーゼ (A292L)⁷⁾ と A260L キチナーゼ⁸⁾ が後期に発現し, ウイルス粒子に組み込まれる. おそらく, 細胞壁結合タンパク質 Vp130 と複合体を形成しユニークな頂角に位置して (図 1)⁹⁾, 吸着後細胞壁の局所的分解に働くと予想される. vChti-1 キチナーゼ (A181/182R)¹⁰⁾, A94L β -グルカナーゼ, vAL-1 アルギン酸リアーゼ (A215L)^{11,12)} が後期細胞溶菌活性の実体であると思われる. これら酵素はウイルスと宿主クロレラの相互作用の結果進化選択されてきたものであり, いずれも従来にないコンパクトな構造と機能を有し, 酵素化学の基礎面でも重要である. 特にファミリー 18 糖質分解酵素活性中心を二つ保有する vChti-1¹⁰⁾ と pH により作用様式が変換する vAL-1 多糖リアーゼ¹³⁾ (京都大学農学研究科村田幸作先生との共同研究) は注目に値する. ちなみにクロレラの細胞壁は多種の中性糖, ウロン酸, グルコサミンなどからなっておりきわめて複雑な構造をしている. クロレラウイルスの酵素は各種難分解性バイオマスの低分子化に有効に働く可能性があり, 溶菌液から容易に回収できるメリットから今後の利用が期待される¹⁴⁾. 一方, クロレラ細胞とウイルスの共同作業による多糖質 (ヒアルロン酸, キチン様多糖) 生産も特筆に値する. 単独では, クロレラもウイルスもこれら物質をまったく生成せず, 感染 (共生) によってはじめてクロレラ細胞表面への生産蓄積が始まる. 通常, ウイルス感染後 30 分から 1 時間で宿主クロレラ細胞は凝集しやすくなり, 多くの場合培養液中で細胞塊を形成する. この状態の細胞を電子顕微鏡で観察すると, 細胞表面に 1-数ミクロン長の繊維状物質の蓄積が観察される (図 2A). この繊維状物質がヒアルロン酸またはキチンであることが判明した^{15,16)}. ウイルスは, ヒアルロン酸生産型とキチン生産型のどちらかに分類され, まれではあるが両方を生産するものもある. 多糖生産は感染後約 1 時間から検出でき, 数時間後溶菌時まで継続する. ウイルスゲノムにコードされたヒアルロン酸合成酵素 (HAS), キチン合成酵素 (CHS)

表1. クロレラウイルスが有する多糖分解酵素

遺伝子	酵素活性	クロレラ溶菌活性	発現時期	酵素の所在
vAL-1 (A215L)	アルギン酸リアーゼ	++	中期	宿主細胞質
vChta-1 (A292L)	キトサナーゼ	+	後期	ウイルス粒子
vChti-1 (A181/182R)	キチナーゼ	+	中期	宿主細胞質
A260L	キチナーゼ	ND	後期	ウイルス粒子
A94L	β -1,3-グルカナーゼ	ND	初期・中期	宿主細胞質

ND, 不明

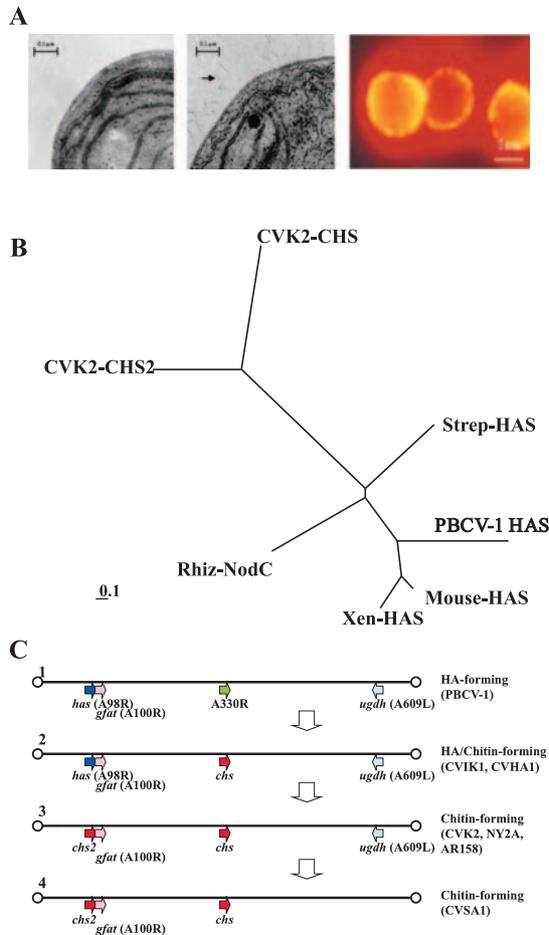


図2. ウイルス・クロレラ系によるヒアルロン酸/キチン物質の生成。(A) ウイルス感染細胞の表面にはファイバー状の多糖が生成・蓄積される(中央)。未感染細胞には蓄積はない(左)。蛍光標識したヒアルロン酸結合タンパク質による多糖質の確認(右)。(B) クロレラウイルスがコードするヒアルロン酸合成酵素(HAS)とキチン合成酵素(CHS)の系統的關係。*Rhizobium*のNodファクター合成酵素(Rhiz-NodC)と*Streptococcus*のHAS(Strep-HAS)を介して、クロレラウイルスCVK2の有する二つのCHS(CHS1, CHS2)はクロレラウイルスPBCV-1の有するHASと結びつく。(C) クロレラウイルスはヒアルロン酸とキチン質生成によって基本的に3つのタイプに分かれる。各タイプの代表ウイルスを括弧内に示す。多糖合成に関与する遺伝子; ヒアルロン酸合成酵素(*has*), キチン合成酵素(*chs*), グルコサミン合成酵素(*gfat*), UDP-Glc脱水素酵素(*ugdh*)の構成が各タイプで異なる。ヒアルロン酸合成型からキチン質合成型への移行モデルを縦型矢印で示す¹⁸⁾。

共にこれまで知られているどの起原の酵素よりも小さくコンパクトな構造をしている。さらに興味深いのは、これら多糖質の前駆体となる単糖GlcNAcとGlcA合成に必要なGlcNAc合成酵素(GFAT), UDP-Glc脱水素酵素(UGDH)までもウイルスがコードしており、感染初期に同調して発現しきわめて短時間に多糖合成を行うことである^{15,16)}。合成された多糖質は細胞外に分泌される。細胞外のヒアルロン酸・キチン繊維は電子顕微鏡で明瞭に識別できることから重合度がかかなり高いものと予想される(数 μ = 重合度約1万)。ここに宿主細胞膜・細胞表

	RSL1	RSM1	RSS1	RSA1	RSB1
ゲノム構造	直鎖状dsDNA	環状ssDNA	環状ssDNA	直鎖状dsDNA	直鎖状dsDNA
ゲノムサイズ	231kbp	9004b	6662b	38760bp	43079bp
GC含量	58.0%	59.9%	62.5%	65.3%	61.7%
宿主とする <i>R. solanacearum</i> 株	C319 MAFF106603 M4S MAFF106611 P29 MAFF211270 P46S MAFF211271 P272 MAFF211272 P274 MAFF301556 MAFF301558 MAFF730138 MAFF730139				
ブランク形成能	強い	弱い	弱い	強い	非常に強い

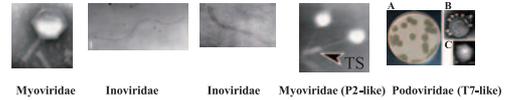


図3. 青枯病ウイルスの特徴。各ウイルスのゲノム構造、ゲノムサイズ、宿主域(赤色が感受性株)、溶菌性を比較している。ウイルスの電子顕微鏡写真と分類学的位置付けを下段に示す。ウイルスRSB1は特に大きなブランクを形成する(>1cm)。TS, 尾鞘。RSB1: (A) 寒天培地上に形成されたブランク, (B) 細胞片に吸着したウイルス粒子, (C) 短い尾部を有する典型的なT7型ウイルス粒子。

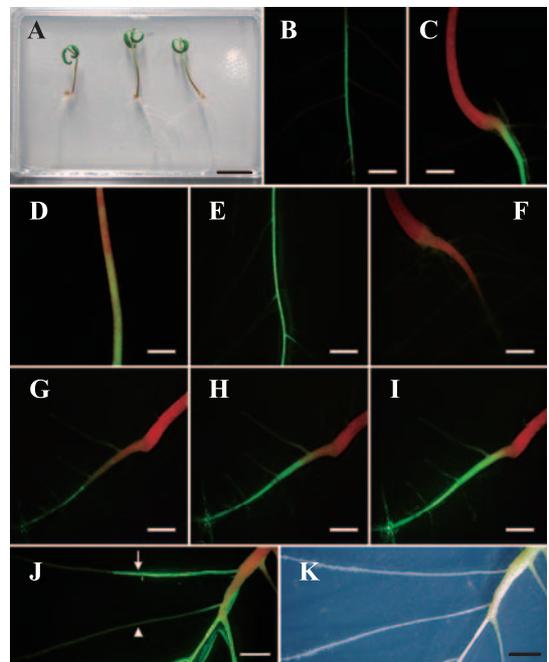
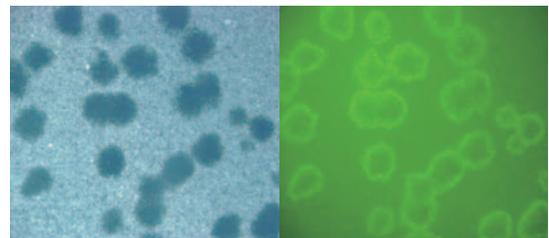


図4. フェージを利用した青枯病の検出と感染モニタリング²⁹⁾。上段: GFP標識フェージのブランク(左)とGFP蛍光(右)。下段: トマト実生(発芽後2週間, A)の主根先端に標識青枯病ウイルスを接種後、導管を伝っての増殖移動(12時間後B)、根・茎境界バリア(C)、胚軸(D)、側根(E)における細菌の挙動を示す。GFP蛍光は未接種植物には見られない(F)。細菌細胞は主根導管を1-4 mm/hの速さで移動する(12時間後G, 18時間後H, 24時間後I)。トマト耐性品種(B-barrier)では細菌の側根への移動が抑えられている(J, K)。バー, 2 mm。

面で起こる合成反応・分泌機構、ヒアルロン酸とキチン質ならびにその合成酵素間の相関関係とともにそのヒアルロン酸・キチン質のウイルス・宿主相互作用における生物学的意義に大きな興味を持たれる。通常の培養系で行ったヒアルロン酸・キチン生産回収実験においては、1 l のクロレラ培養液 ($10^7 \sim 10^8$ cells/ml) から感染後3時間で、100 mg の多糖が回収できた¹⁷⁾。ウイルス感染細胞からの多糖の遊離は簡単なボルテックス処理と遠心分離、抽出によってきわめて容易にできる。副生成物、夾雑物からの精製過程は不要である。全工程は多糖回収を含めて4時間以内に終了できる。1日に6ラウンドできる計算となる。

共生工学の見地から見たクロレラウイルスによるヒアルロン酸・キチン生成系はきわめて興味深い。多糖合成遺伝子群をウイルスが宿主に持ち込み、宿主の細胞表面に多糖を蓄積させるというユニークなものである。ヒアルロン酸は主として脊椎動物の細胞外マトリックス物質であり、動物感染細菌は免疫系からのカモフラージュのためにこの物質を作る。キチンはカビや甲殻類の細胞壁・外骨格物質である。ウイルスは多糖合成酵素のみでなく、その原料となる2種の単糖を合成する酵素遺伝子まで装備している。その生物学的意義については想像の域を出ないが、ウイルスの宿主となるクロレラが多くの場合、原生動物ゾウリムシと細胞内共生を営むことがポイントで、ウイルスを加えての三者間の相互作用が興味深い。さらに、HASについてみると、この酵素は「1つの酵素は1つの糖を転移する」という糖転移反応の常識に反して2種の糖を異なる様式で主鎖に重合してゆく。この酵素は明らかに複数の機能ユニットの複合(共生)によって生じている。一般的に支持されている仮説は、UDP-GlcNAc β -1,4-転移活性(CHS様活性)が原型であり、これにUDP-GlcA β -1,3-転移活性が付加されたというものである。すなわちCHSをもとにHASが進化したということになる。現にマウスのHASは*in vitro*でキチン合成活性を示す。さらにクロロウイルスのコンパクトなCHS, HAS間のアミノ酸配列を比較すると両者の明らかな系統的つながりが見て取れた(図2B)。この点で、クロロウイルスがキチン生成型とヒアルロン酸生成型に二分されることが注目される。HAS-型ウイルス、CHS-型ウイルスのゲノムを比較すると、HASとCHSが度々置換した形となっている(図2C)¹⁸⁾。少なくともヒアルロン酸とキチンはこの場合、相補的な生物機能を担っているはずである。ウイルス感染により本来宿主が有さない新たな機能が発現するという点で、ウイルスがどのような遺伝子を有し、どのような潜在性を持つかという点が注目される。クロロウイルスゲノム上には、ウイルス複

製に必要な遺伝子以外に、糖鎖修飾酵素群をはじめ種々の代謝系遺伝子が存在する。各遺伝子の真の機能と感染中の宿主細胞内での発現を検討する必要がある。これらの遺伝子はウイルス進化の過程で獲得されてきたものであり、ウイルスゲノム上に「共生」している。それらをよく理解することによって幅広い利用の道が開かれる。

ファージ・細菌・植物系によるバイオコントロール

近年の抗生物質・薬剤耐性菌の蔓延が引き金となり、病原菌を自然界の天敵ファージを用いて駆除する技術(ファージセラピー、ファージバイオコントロール)の研究・技術開発が欧米を中心に急激に再燃している。すでに欧米ではファージセラピーとして多剤耐性菌感染治療の実例が増えつつある^{19,20)}。日本ではこの方向の研究は大きく遅れている。農業分野においても、農薬の過剰使用による環境汚染・生態系破壊、残存農薬による健康への悪影響に加え、消費者の食に対する信頼を回復するべく、2002年の農薬取締法改正後、農薬使用・開発のあり方が真に問われている。最も重要な植物病害の一つに青枯病がある。青枯病菌(*Ralstonia solanacearum*)は、ナス科やマメ科など経済的にも重要な農作物を含む33科200種以上の植物に感染し、世界的に甚大な被害をもたらしている(年間950億ドルの損失)。その防除に使用されてきた主農薬は劇物であるクロロピクリンや臭化メチルであったが、後者はオゾン層破壊物質であり、2005年に生産/使用中止となっている。地球温暖化傾向も拍車をかけ青枯病菌の蔓延と農作物生産低下による地球規模の食糧不足が危惧されている。ここに病原菌に高い特異性を示す、安全かつ持続的な代替農薬・防除技術の開発が強く望まれている。その有力候補として、青枯病菌特異的バクテリオファージの利用に着目した。まず、(1)自然界からの多種のファージの分離、(2)ゲノム解読によるファージの高度な特徴付け、(3)ゲノム情報をもとにした感染特性・宿主との相互作用の分子基盤の理解のもとに、ファージの特性を生かした青枯病菌バイオコントロール技術「診断・予防・防除」の開発を行った^{21,22)}。

これまでに分離した多数のファージは基本的に6タイプに分かれた(図3)。それらは、大腸菌P2型ファージRSA(RSA 1, 38, 760 bp)²³⁾、T7型ファージRSB(RSB 1, 43, 079 bp)²⁴⁾、 λ 型ファージRSC(RSC 1, 約40 kbp, 未発表)、大型myovirus RSL(RSL 1, 231, 255 bp)²⁵⁾、大型M13様ファージRSM(RSM 1, 9, 004 b)²⁶⁾、小型M13様ファージRSS(RSS 1, 6, 662 b)²⁶⁾などである。これらのうち、M13型ファージはすでにM13で確立しているファージ呈示技術を適用し、標識ファージによる青枯病菌の土壌や植物体からの検出、診断に利用できる。

直接菌体を検出する場合には、たとえばRSS型ファージのORF10, ORF11の間にGFPやルシフェラーゼ遺伝子を挿入し、組換えファージを感染させることで青枯病菌細胞を発光検出できる(図4)。現時点で、1g土壌サンプル中 $\sim 10^2$ 程度の感度での検出が可能である。青枯病菌M13型ファージは一般に宿主域が狭いが(5 races, 6 biovars, 4 phylotypesに細別される青枯病菌株のそれぞれに異なる特異性を示す)、RSMの場合、宿主認識タンパク質(pIII)の異なる2種のファージ(RSM1, RSM3)の組み合わせによって異なるrace, biovar, phylotypeの15株のすべてをカバーすることができる²⁷⁾。細菌検出対比技術として各種PCR法、ELISA法などがあるが、いずれも植物細胞や土壌環境を対象とした場合、高いノイズの影響でほとんど無効である。特にPCR法では死菌、細胞残さのノイズによる混乱が非常に大きな問題となる。生菌を特異的に認識し、かつ指数関数的に増殖するファージの特徴は検出・診断に最適である。

また、ファージを利用した細菌細胞の標識により、土壌中の細菌の挙動・動態、植物への感染過程、植物体内における細菌細胞の移動などをモニタリングすることが可能である。RSM1のゲノムDNAから構造遺伝子部分約4 kbpを除去し、標識遺伝子(GFP)とKm耐性カセットと入れ替えたプラスミドpRSS12は、ほとんどの青枯病菌株で安定に保持され、GFPを発現させる。IncQ系プラスミドなどとは異なり、pRSS12はKmの選択圧なしに100世代以上にわたってもまったく消失しない²⁸⁾。この特質は土壌や植物体など抗生物質選択ができない条件での細菌追跡にきわめて有効である。トランスポゾンを用いた標識での、挿入部位の遺伝子への影響、生理的变化によるトランスポゾンの不安定さなどの問題もpRSS12ではまったくない。pRSS12-標識細菌(MAFF 106611株)のモニタリング例を図4に示す。寒天平板培地で発芽させたトマト実生(発芽7日)の主根先端に切れ目を入れ標識細菌細胞を滴下すると、細菌は主根導管に侵入し1-4 mm/hの速度で増殖と進行を繰り返しながら茎頂方向へ移動する²⁹⁾。主根-側根、根部-茎部の境界で特徴的な挙動が見られた。この系を用いることで、感染機構の詳細な解析、感染に関与する細菌側遺伝子・植物側遺伝子の同定、耐性品種検定、耐性機構の理解、病害防除薬の検定などを効率よく行うことができる。

青枯病の予防と防除については、広範な宿主域を有し、溶菌活性の強いファージRSA, RSB, RSLなどが有効である。ただし、従来多くの議論があるように、ファージと宿主菌の間にはarms raceの関係があり、相互に耐性と新たな感染性を生む仕組みを有する。宿主とファージ双方のゲノム情報が利用できる現在、この仕組みが繰り返

されるパターンを理解し、パターンに応じたファージセットを整備することが持続的バイオコントロールには必要である。異なるタイプのファージ3種(RSA1, RSB1, RSL1)の単独、および混合剤(phage cocktail)を用いて各種青枯病菌株の増殖を調べた結果、早期に溶菌した場合、約30時間後に耐性菌の出現が顕著となる。しかしながらRSL1を用いた場合、適当な条件でのファージ投与により、増殖抑制は実験室条件下2週間以上も継続し(耐性菌出現なし)、ファージ処理をしたトマトは青枯病菌の植菌に対し、2ヶ月以上も発病せず生育している(論文準備中)。さらに、数種類の他のファージでは感染菌の病原性を喪失させ、感染菌を植物に事前接種した場合、二次的な強毒性株の接種に対し顕著な抵抗性を付与する(青枯病ワクチン)。このような植物・細菌・ファージ間の相互作用の活用は、新たな持続的農業産業が展開する上での次世代技術として有望と思える。重要なポイントは診断・予防・防除を総合システム体系化することにある。生産現場と直結したコンサルタント機関などを通じて徹底した農地診断、リスクアセスメント、生産モニタリングなどが可能となる。診断キットは農作物生産現場での青枯病発生の危険性や農薬の使用量を算出する根拠を提供でき、予防剤は、診断に基づき病害発生の危険性のある現場で、予防的に使用することで青枯病を発病しにくくし、さらに防除剤は発生した病害現場で土壌に処理することで青枯病菌を効果的に死滅させ、または病害植物に直接投与することで病徴を遅らせ、トマト、なす、ジャガイモなどの収穫を可能にする。モニタリングキットは病理学・土壌生態学など基礎研究・調査現場での必需ツールとなる。これら診断・予防・防除の体系化は、危険な環境負荷の大きい農薬に替わる安心・安全・高効率(低コスト、省力)な農業技術(将来は農産業技術)として大きな貢献ができる。

根粒菌・レンゲソウを用いたバイオ肥料開発の研究

微生物と植物の共生の顕著な例としてマメ科植物の根粒による大気中窒素固定系がある。日本や中国においては、窒素化学肥料に替わる自然緑肥としてレンゲソウが利用されてきた。レンゲソウ-根粒系をモデルとして持続的バイオ肥料の更なる展開を目指した。レンゲソウ-根粒系レンゲソウ-根粒菌の共生系から共生確立に重要なレンゲソウ遺伝子各種(システインプロテアーゼCP, ダイナミン, アスパラギン酸合成酵素など)を検出しその機能を解明した^{30,31)}。特にCP遺伝子(*AsNodf32*)は老化根粒のリサイクル、感染細菌の識別において重要な働きをすることを明らかにした³²⁾。またレンゲソウ根粒から分離した根粒菌 *Mesorhizobium huakuii* subsp. *rengi*

の根粒菌群における系統学的な位置づけを行った³³⁾。根粒系研究は、大阪大学生物工学国際交流センターを窓口としたJSPS大型拠点大学交流事業(代表 室岡義勝大阪大学名誉教授・現広島工業大学教授)において、東南アジア諸国との技術・情報交流に貢献できた³⁴⁾。

おわりに

生物間の相互作用(系全体を「シンビオーム: symbiome」と定義する)³⁵⁾は純粋系では見られない新たな現象、能力、効果をもたらす可能性がある。生物の従来の枠を超えたダイナミックな相互作用の仕組みを分子レベルで解明し、これを基に「共生工学」基礎技術を確立し、さらにこの共生技術を持続的産業社会確立・維持のブレークスルーとして活用することは将来的にきわめて重要であると思われる。

これらの研究は広島大学工学部第三類化学・バイオ・プロセス系ならびに大学院先端物質科学研究科分子生命機能科学専攻において学生をはじめとする多くの協力者と共に行ってきたものである。特に、クロロウイルス研究においては米国ネブラスカ大学リンカーン校Jim L. Van Etten教授と情報・材料を頻りに交換し、多大な協力を得た。また、DOEクロレラゲノムプロジェクトには共同参画させていただいた。青枯病バイオコントロール研究では、NEDO(04A09505, 81030)の支援を得て、また和光純薬工業との共同研究に支えられている。レンゲソウ根粒系の研究では室岡義勝大阪大学名誉教授(現広島工業大学教授)にご指導いただいた。共生工学全般にわたる研究活動は、当学会光合成微生物研究部会、共生工学研究部会(代表)においても展開してきた。この間、多くの企業との共同研究、財団法人助成金による援助を頂いた。ご指導・ご協力いただいた多くの方々に心より感謝申し上げます。

文 献

- 1) Kawakami, H. and Kawakami, N.: *J. Protozool.*, **25**, 217–225 (1978).
- 2) Van Etten, J. L.: *Annu Rev. Genet.*, **37**, 153–195 (2003).
- 3) Yamada, T., Onimatsu, H., and Van Etten, J. L.: *Adv. Virus Res.*, **66**, 293–336 (2006).
- 4) Van Etten, J. L., Burbank, D. E., Kuczmariski, D., and Meints, R. H.: *Science*, **219**, 994–996 (1983).
- 5) 山田 隆: 蛋白質核酸酵素, **52**, 463–468 (2007).
- 6) 山田 隆, 杉本一路, 平松紳吾: 化学と生物, **39**, 520–526 (2001).
- 7) Yamada, T., Hiramatsu, S., Songsri, P., and Fujie, M.: *Virology*, **230**, 361–368 (1997).
- 8) Sun, L., Adams, B., Gurnon, J. R., Ye, Y., and Van Etten, J. L.: *Virology*, **263**, 376–387 (1999).
- 9) Onimatsu, H., Sukanuma, K., Uenoyama, S., and Yamada, T.: *Virology*, **353**, 433–442 (2006).
- 10) Hiramatsu, S., Ishihara, M., Fujie, M., Usami, S., and

- Yamada, T.: *Virology*, **260**, 308–315 (1999).
- 11) Sugimoto, I., Hiramatsu, S., Murakami, D., Fujie, M., Usami, S., and Yamada, T.: *Virology*, **277**, 119–126 (2000).
- 12) Sugimoto, I., Onimatsu, H., Fujie, M., Usami, S., and Yamada, T.: *FEBS Lett.*, **559**, 51–56 (2004).
- 13) Ogura, K., Yamasaki, M., Yamada, T., Mikami, B., Hashimoto, W., and Murata, K.: *J. Biol. Chem.*, **284**, 35572–35579 (2009).
- 14) 山田 隆: 生物工学, **80**, 239–242 (2002).
- 15) DeAngelis, N., Jing, W., Graves, M., Burbank, D. E., and Van Etten, J. L.: *Science*, **278**, 1800–1803 (1997).
- 16) Kawasaki, T., Tanaka, M., Fujie, M., Usami, S., Sakai, K., and Yamada, T.: *Virology*, **302**, 123–131 (2002).
- 17) Yamada, T., and Kawasaki, T.: *J. Biosci. Bioeng.*, **99**, 521–528 (2005).
- 18) Ali, M. M. A., Kawasaki, T., and Yamada, T.: *Virology*, **342**, 102–110 (2005).
- 19) Merrill, C. R., Scholl, D., and Adhya, S. L.: *Nature Rev. Drug Disc.*, **2**, 489–497 (2003).
- 20) Hausler, T.: *Viruses vs Superbugs: A Solution to the Antibiotic Crisis?*, Palgrave Macmillan (2006).
- 21) Yamada, T., Kawasaki, T., Nagata, S., Fujiwara, A., Usami, S., and Fujie, M.: *Microbiology*, **153**, 2630–2639 (2007).
- 22) Yamada, T.: *Contemporary Trends in Bacteriophage Research* (Adams, T. A.), p. 375–390, Nova Science Publishers, Inc. (2009).
- 23) Fujiwara, A., Kawasaki, T., Usami, S., Fujie, M., Yamada, T.: *J. Bacteriol.*, **190**, 143–156 (2008).
- 24) Kawasaki, T., Shimizu, M., Satsuma, H., Fujiwara, A., Fujie, M., Usami, S., and Yamada, T.: *J. Bacteriol.*, **191**, 422–427 (2009).
- 25) Yamada, T., Kawasaki, T., Ishikawa, H., Fujiwara, A., Fujie, M., and Ogata, H.: *Virology*, doi:10.1016/j.virol.2009.11.043.
- 26) Kawasaki, T., Nagata, S., Fujiwara, A., Satsuma, H., Fujie, M., Usami, S., and Yamada, T.: *J. Bacteriol.*, **189**, 5792–5802 (2007).
- 27) Askora, A., Kawasaki, T., Usami, S., Fujie, M., and Yamada, T.: *Virology*, **384**, 69–76 (2009).
- 28) Kawasaki, T., Satsuma, H., Fujie, M., Usami, S., and Yamada, T.: *J. Biosci. Bioeng.*, **104**, 451–456 (2007).
- 29) Fujie, M., Takamoto, H., Kawasaki, T., Fujiwara, A., and Yamada, T.: *J. Biosci. Bioeng.*, **109**, 153–158 (2010).
- 30) Fujie, M., Nakanishi, Y., Murooka, Y., and Yamada, T.: *Plant Cell Physiol.*, **39**, 846–852 (1998).
- 31) Kasai, K., Fujie, M., Nakanishi, Y., Murooka, Y., Usami, S., and Yamada, T.: *J. Biosci. Bioeng.*, **89**, 559–563 (2000).
- 32) Naito, Y., Fujie, M., Usami, S., and Yamada, T.: *Plant Physiol.*, **124**, 1087–1095 (2000).
- 33) Nuswantara, S., Fujie, M., Yamada, T., Malek, W., Inaba, M., Kaneko, Y., and Murooka, Y.: *J. Biosci. Bioeng.*, **87**, 49–55 (1999).
- 34) Biotechnology for Sustainable Utilization of Biological resources in the Tropics, (JSPS-NRCT/DOST/LIPI/VCC Joint Activities), ICBiotech, Osaka University, 1999–2004.
- 35) 山田 隆: 生物工学, **85**, 211–226 (2007).