

広大科研

15

13660094

0130484585

# バイオマスリサイクル用新規分解酵素系の開発

(研究課題番号 13660094)

平成13年度～平成14年度科学研究費補助金(基盤研究(C)(2))  
研究成果報告書

平成15年 3月

研究代表者

ヤマダ  
山田 隆

(広島大学大学院先端物質科学研究科分子生命機能科学専攻)教授)

広島大学図書

0130484585



バイオマスリサイクル用新規分解酵素系の開発

(研究課題番号 13660094)

平成13年度～平成14年度科学研究費補助金 (基盤研究(C)(2))  
研究成果報告書

平成15年 3月



研究代表者 山田 隆

(広島大学大学院先端物質科学研究科分子生命機能科学専攻)

## はしがき

日本学術振興会科学研究費補助金（基盤研究（C）（2））「バイオマスリサイクル用新規分解酵素系の開発」は平成13年度に始まり、平成14年度に継続された。この度、終了にあたって本研究の二年間にわたる成果をここにまとめて報告する。

バイオマスの有効利用は、21世紀社会の資源・エネルギー不足を解消し、環境負荷の低減、環境保全を行うためには避けて通れない道である。未利用バイオマス資源を有効利用するためには、新規な特徴ある分解酵素を開発する必要がある。本研究は、そのブレークスルーとして極めてユニークなウイルスの新規酵素数種を利用する系を開発することを目的とした。

結果として、微細藻類クロレラに感染するクロロウイルスに見出したキチナーゼ、キトサナーゼ、 $\beta$ -1,3-グルカナーゼ等の多糖分解酵素の遺伝子の構造と発現特性を解析するとともに、それら酵素のユニークな活性特性を明らかにした。これら酵素はさまざまなクロレラ種の細胞壁を分解する活性を有することが明らかとなった。さらに、クロレラ以外にも多種多様な植物・藻類細胞を容易に溶菌する未知の酵素活性2種（AL-1, AL-2）を新たに発見した。溶菌される藻類種の細胞壁組成は、多種の中性糖、グルコサミン、ウロン酸などからなり、極めて不均一かつ複雑である。特にAL-1処理した細胞壁分解産物はGlcA, Gal, Man, GlcNAcから成るオリゴ糖である。従って、これら酵素は、従来にない新しい基質特異性を持った新規酵素である。不均一かつ複雑な構造をした未利用バイオマス資源の分解・低分子化と有効利用の観点から、これら酵素のさらなる特徴付けと幅広い分解活性評価に大きな期待が寄せられる。分解産物は種々の分野における機能性素材・原料としての利用が期待される。

平成15年 3月  
研究代表者 山田 隆

## 研究組織

研究代表者 山田 隆 (広島大学大学院先端物質科学研究科・教授)

研究分担者 藤江 誠 (広島大学大学院先端物質科学研究科・助手)

## 研究経費

(金額単位:千円)

	直接経費	間接経費	合計
平成13年度	2,900	0	2,900
平成14年度	700	0	700
総計	3,600	0	3,600

## 研究発表

### 研究論文 (Original papers)

1. Chuchird, N., Hiramatsu, S., Sugimoto, I., Fujie, M., Usami, S., and Yamada, T. (2001) Digestion of *Chlorella* cells by chlorovirus-encoded polysaccharide degrading enzymes. *Microbes and Environment*, 16, 197-205.
2. Maki, S., Oyama, K., Kurahashi, T., Nakahira, T., Kawabata, T., and Yamada, T. (2001) RFLP analysis for cultivar identification of persimmons. *Scientia Horticulturae* 91, 407-412.
3. Yamada, T. (2002) Peculiar polysaccharide-degrading enzymes encoded by chloroviruses. *Curr. Topics Virology*, in press.
4. Kawasaki, T., Tanaka M., Fujie, M., Usami, S., and Yamada, T. (2002) Chitin synthesis in chlorovirus CVK2-infected *Chlorella* cells. *Virology*, 302, 123-131.
5. Kasai, K., Usami, S., Yamada, T., Endo, Y., Ochi, K., and Tozawa, Y. (2002) A RelA-SpoT homolog (Cr-RSH) identified in *Chlamydomonas reinhardtii* generates stringent factor *in vivo* and localizes to chloroplasts *in vitro*. *Nucl. Acids. Res.* 30:

4985-4992.

6. Nozaki, H., Takahara, M., Nakazawa, A., Kita, Y., Yamada, T., Takano, H., Kawano, S., and Kato, M. (2002) Evolution of *rbcL* group IA introns and intron open reading frames within the colonial Volvocales (Chlorophyceae). *Mol. Phylogenet. Evol.*, 23, 326-338.
7. Chuchird, N., Nishida, K., Kawasaki, T., Fujie, M., Usami, S., and Yamada, T. (2002) A variable region on the chlorovirus CVK2 genome contains five copies of the gene for Vp260, a vira-surface glycoprotein. *Virology*, 295, 289-298.

### 総説等 (Reviews)

1. 山田 隆、杉本一路、平松紳吾(2001) クロレラを溶かすウイルスの酵素. *化学と生物*, 39 (8) 520-526.
2. 山田 隆、(2002) クロロウイルスのバイオテクノロジーへの利用, *生物工学会誌*, 80 (6),239-242.

### 口頭発表 (Oral presentations)

1. Chuchird, N., Nishida, K., Kawasaki, T., Fujie, M., Usami, S., and Yamada, T.: A variable region on the *Chlorella* virus CVK2 genome contains genes possibly involved in the host range determination. 2002 Annual meeting of Japanese Society of Bioscience, Biotechnology, and Agrochemistry. 3Y3p16, March, Kyoto (2001)
2. 川崎 健、田中允博、西田憲正、藤江 誠、宇佐美昭二、山田 隆：クロロウイルス感染初期遺伝子の解析、日本農芸化学会2001年度大会、3Y3p17、京都、2001年3月。
3. 杉本一路、Chuchird, N., 平松紳吾、藤江 誠、宇佐美昭二、山田 隆：クロロウイルスがコードする宿主溶菌酵素群と宿主特異性、日本農芸化学会2001年度大会、3Y3p18、京都、2001年3月。
4. 田中允博、川崎 健、藤江 誠、宇佐美昭二、山田 隆：クロロウイルスにコードされているキチンシターゼの解析、平成13年度日本生物工学会大会、528、甲府、2001年9月。
5. 川崎 健、田中允博、藤江 誠、宇佐美昭二、山田 隆：クロロウイルス感染初期遺伝子の網羅的解析とその発現用式、平成13年度日本生物工学会大会、544、2001年9月。
6. 村上大東、杉本一路、藤江 誠、宇佐美昭二、山田 隆、平成13年度日本生物工学会大会、625、甲府、2001年9月。

7. Chucird, N., Nishida, K., Kawasaki, T., Yamada, T.: A variable region on the chlorovirus CVK2 genome contains genes possibly involved in the host range determination. 平成13年度核酸化学シンポジウム、65-66、岡山、2001年10月。
8. Kawasaki, T., Tanaka, M., Nishida, K., Yamada, T.: Regulatory mechanism of the gene expression during chlorovirus infection cycle, 平成13年度核酸化学シンポジウム、67-68、岡山、2001年10月。
9. 川崎 健、田中允博、藤江 誠、宇佐美昭二、山田 隆：クロロウイルス感染初期遺伝子のバリエーション、2002年度日本農芸化学会大会、2-6Ea01、仙台、2002年3月。
10. 田中允博、川崎 健、藤江 誠、宇佐美昭二、菊地数晃、坂井和男、2002年度日本農芸化学会大会、2-6Ea02 仙台、2002年3月。
11. 杉本一路、村上大東、藤江 誠、宇佐美昭二、山田 隆：クロロウイルスがコードする宿主溶菌酵素 vAL-2 の解析、2002年度日本農芸化学会大会、3-5Ap12、仙台、2002年3月。
12. 藤元勇樹、藤江 誠、宇佐美昭二、山田 隆：植物細胞への巨大DNA導入法の検討、2002年度日本農芸化学会大会、4-4Da15、仙台、2002年3月。
13. Kawasaki, T., Yamada, T.: Characterization of immediate early genes expressed in chlorovirus infection. XIIth International Congress of Virology, V-1156, Paris, July 2002.
14. Sugimoto, I., Yamada, T.: Analysis of lytic enzymes encoded by chlorella viruses, XIIth International Congress of Virology, V-1157, Paris, July 2002.
15. Yamada, T., Kawasaki, T., Tanaka, M.: Chitin synthesis in chlorovirus CVK2-infected *Chlorella* cells. XIIth International Congress of Virology, V-1158, Paris, July 2002.
16. Kawasaki, T., Yamada, T.: Characterization of immediate early genes expressed in chlorovirus infection, The 3<sup>rd</sup> International Algal Virus Workshop, P-2, Hiroshima, May, 2002.
17. Tanaka, M., Kawasaki, T., Fujie, M., Usami, S., Yamada, T.: Chitin accumulation on the cell wall of chlorella cells infected by chlorovirus CVK2, The 3<sup>rd</sup> International Algal Virus Workshop, P-3, Hiroshima, May, 2002.
18. Sugimoto, I., Yamada, T.: Analysis of lytic enzymes encoded by *Chlorella* viruses. The 3<sup>rd</sup> International Algal Virus Workshop, P-4, Hiroshima, May, 2002.
19. 藤元勇樹、櫻井幹太、藤江 誠、宇佐美昭二、山田 隆：植物細胞への人工染色体導入法の検討、平成14年度日本生物工学会大会、439、大阪2002年10月。

20. 宮嶋純也、桐沢恒一、藤江 誠、山田 隆、宇佐美昭二：藻類用高効率遺伝子導入システムの開発、平成14年度日本生物工学会大会、469、大阪2002年10月。
21. 川崎 健、田中允博、藤江 誠、宇佐美昭二、山田 隆：藻類バイオにおけるクロロウイルス遺伝子の発現戦略、平成14年度日本生物工学会大会、470、大阪2002年10月。
22. 山田 隆、西内隆允、杉本一路、菊地数晃、坂井和男：CVK2 グルコサミン合成酵素の大腸菌への導入と発現、平成14年度日本生物工学会大会、480、大阪2002年10月。
23. 鬼松秀樹、杉本一路、藤江 誠、宇佐美昭二、山田 隆：クロロウイルスの宿主細胞壁吸着タンパク質の解析、平成14年度日本生物工学会大会、540、大阪2002年10月。
24. 西谷哲哉、河本 伸、桐沢恒一、藤江 誠、山田 隆、宇佐美昭二：微細緑藻の MAP キナーゼ情報伝達系の解析、平成14年度日本生物工学会大会、631、大阪2002年10月。
25. 杉本一路、鬼松秀樹、藤江 誠、宇佐美昭二、山田 隆：クロロウイルスがコードする溶菌酵素 vAL-1 の解析、平成14年度日本生物工学会大会、657、大阪2002年10月。
26. 田中允博、川崎 健、藤江 誠、宇佐美昭二、山田 隆：クロロウイルスにコードされたセルロースシンターゼの解析。平成14年度日本生物工学会大会、658、大阪2002年10月。
27. 桐沢恒一、藤江 誠、山田 隆、宇佐美昭二：微細藻類における CDPK 相同遺伝子の解析 平成14年度日本生物工学会大会、958、大阪2002年10月。

# 「バイオマスリサイクル用新規分解酵素系の開発」

## 研究成果

バイオマスの有効利用は、21世紀社会の資源・エネルギー不足を解消し、環境負荷の低減、環境保全を行うためには避けて通れない道である。未利用バイオマス資源を有効利用するためには、新規な特徴ある分解酵素を開発する必要がある。本研究は、そのブレークスルーとして極めてユニークなウイルスの新規酵素数種を利用する系を開発しようとするものである。

### 1. まえがき

現在の地球上には、総重量で約2兆tものバイオマスが存在する。それらは再生（リサイクル）可能なエネルギー資源であるが、実際に利用されているのは約1割にすぎない。未利用バイオマス資源の大部分はセルロースやリグニン等のセルロース系とキチン、キトサン、アルギン酸などの非セルロース系に代表される高分子多糖物質である。これら資源を機能性素材、加工原料、燃料物質などに変換し有効利用するための第一ステップは、低分子化（分解）である。これまでに、種々の微生物由来セルラーゼ、キチナーゼ、キトサナーゼなどバイオマス分解酵素が国内外で分離され、多方面で実用化されてきた。しかしながら、多くの場合バイオマスは不均一かつ複雑な構造をしており、従来の酵素系での分解は効率が悪く不完全なものであった。ここに、未利用バイオマス資源を有効利用するためには、新規な特徴ある分解酵素を開発する必要がある。当研究室では、微細藻類クロレラに感染する珍しいウイルスを自然界より分離し、その遺伝子構成を解析してきた。驚くことに、このウイルスは、キチナーゼ、キトサナーゼ、 $\beta$ -1,3-グルカナーゼ等の多糖分解酵素の遺伝子を有し、感染サイクル中にこれら酵素を利用して、固く分解されにくいことで有名なク



クロレラ細胞壁をいとも簡単に分解することを見出した。さらに、クロレラ以外にも多種多様な植物・藻類細胞を容易に溶菌する未知の酵素活性2種 (AL-1, AL-2)を新たに発見した。溶菌される藻類種の細胞壁組成は、多種の中性糖、グルコサミン、ウロン酸などからなり、極めて不均一かつ複雑である。従って、AL-1,AL-2 の2種の酵素は、それぞれ従来にない新しい基質特異性を持った新規酵素 (AL-1 はアルギン酸分解酵素) である可能性が高い。未利用バイオマス資源の分解有効利用の観点から、これら酵素の特徴付けと実際の分解活性評価に大きな期待が寄せられる。分解産物は多方面での実用化が期待される。

ウイルス酵素をバイオマスリサイクルに利用することを目的とする本研究の骨子は、1997-1998年に行った(財)地球環境産業技術研究機構(RITE)優秀研究企画「産業排ガスCO<sub>2</sub>利用によって生産した微細藻類細胞の有効利用に関する研究」にあり、今回さらに実用に向けて発展させようとするものである。

## 2. 研究開発内容：

1990年より開始した当研究室のウイルス研究は、京都より分離したクロレラウイルスCVK2を対象として進展した。ウイルスゲノム解析により約600もの遺伝子を推定している。その中にキチナーゼ、キトサナーゼ、 $\beta$ -1,3-グルカナーゼの遺伝子を同定し、酵素タンパク質の発現・機能・構造解析を行ってきた。特にキチナーゼvChiti-1は異なる二つの活性中心を有する、従来にない幅広い活性を有することを明らかにした。これらの天然バイオマス基質についての分解特性は未解明である。さらに、新規酵素活性vAL-1, vAL-2をごく最近見出した。vAL-1は次世代医療・医科用素材として注目されているアルギン酸を分解する新しい酵素の可能性がある。vAL-2についても従来にない興味深い活性が観察されている。これら酵素の感染サイクルにおける発現時と細胞、ウイルス粒子における局在についての知見を表1にまとめる。

以下、微細藻類クロレラに感染するウイルスCVK2の有する酵素活性；キチナーゼ、キトサナーゼ、AL-1,AL-2等についてその実用に即した酵素学的特徴付けとともに、実際的バイオマス分解活性についての評価を行った。

表1 クロロ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	アルギン酸リアーゼ?	++	中期	宿主細胞質
vAL-2	ND	+++	ND	ND
vChta-1	キトサナーゼ	+	後期	ウイルス粒子
vChti-1	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	$\beta$ -1,3-グルカナーゼ	ND	初期	宿主細胞質

ND, 不明

### 3. 研究成果

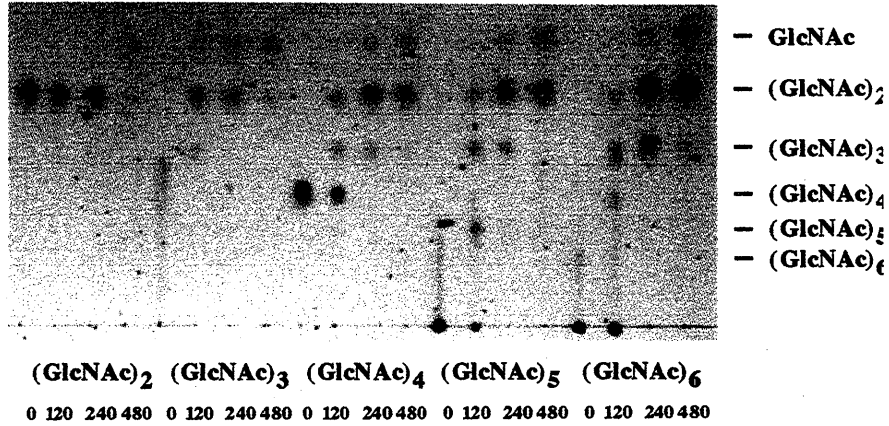
#### (1) キチナーゼ、キトサナーゼ、AL-1,AL-2 等酵素の酵素学的特徴付け

クロレラウイルスのゲノムにコードされている多糖類分解酵素計6種(表1)の遺伝子を大腸菌にクローニングし酵素タンパク質を精製した。各酵素についてその作用形式、比活性、ならびに酵素活性に及ぼす、pH、温度、等の影響を調べ、実際的応用に即しての酵素化学的性質を検討した。以下、各酵素について得られた結果を整理する。

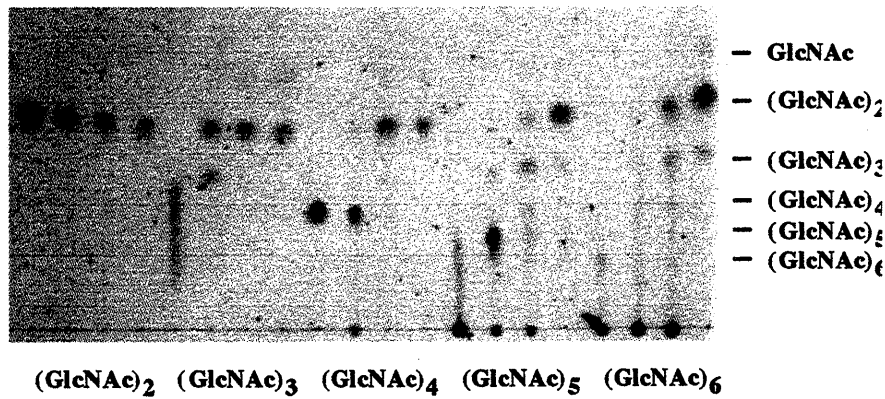
#### a. キチナーゼ

ウイルス CVK2 は2種のキチナーゼ、vChti-1 と A260R をコードする。vChti-1 は family18 型の糖質分解酵素活性中心を2個有する珍しい構造の複合型酵素であり、二つの活性中心はそれぞれ異なる特性を示した。第1活性中心は(図1、construct II)キトオリゴ糖 3-mer 以上に作用し、キト 2-mer を主に生成するエキソ型であり、第2活性中心は(図1、construct V)典型的なエンド型活性を示し、キトピアナーゼ活性、N-アセチルグルコサミニダーゼ活性も同時に有しており、最終的に GlcNAc ユニットまで分解する。複合型となることによって高分子基質(キチン)に作用して効率よく分解できるようになっている(図1、construct I)。酵素活性の最適 pH は 4-6 で、最適温度は 50℃である。1,600 mU/mg タンパク質の比活性が得られた。一方、A260R キチナーゼは、エンド・エキソの両活性を示し、最適 pH 5-9,最適温度 50℃で比活性値 5,000mU/mg タンパク質を与えた。

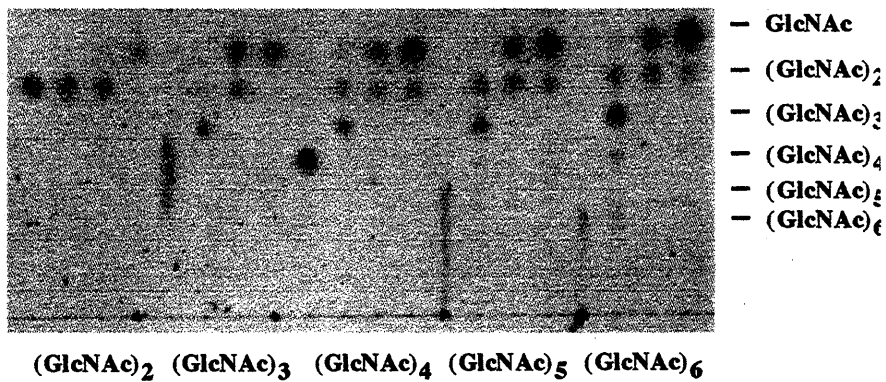
**Construct I**



**Construct II**



**Construct V**



**Fig. 1. Thin-layer chromatography (TLC) to monitor the time-course of hydrolysis products by chitinase reaction. Use of chitooligosaccharides as the substrate for each reaction is indicated under the panel. Numbers indicate the reaction duration (min). The positions of control oligosaccharides are shown on the right side with arrows.**

**b. キトサナーゼ**

CVK2 キトサナーゼ vChta-1 は、糖質分解酵素 family46 に属する分子量

37kDa の酵素であり、ウイルス感染後期に発現して一部ウイルス粒子に組み込まれ、一部は溶菌液に回収される (表 1)。この酵素はキトサンオリゴ糖 4-mer 以上に作用し、4-mer からは 2-mer, 5-mer からは 3-mer と 2-mer, 6-mer 以上からは最終的に 3-mer と 2-mer を生成する (図 2)。従ってこの酵素はエンド型に作用する。酵素活性の最適 pH は 5-8 で、最適温度は 50℃ である。3,000 mU/mg タンパク質の比活性が得られた。

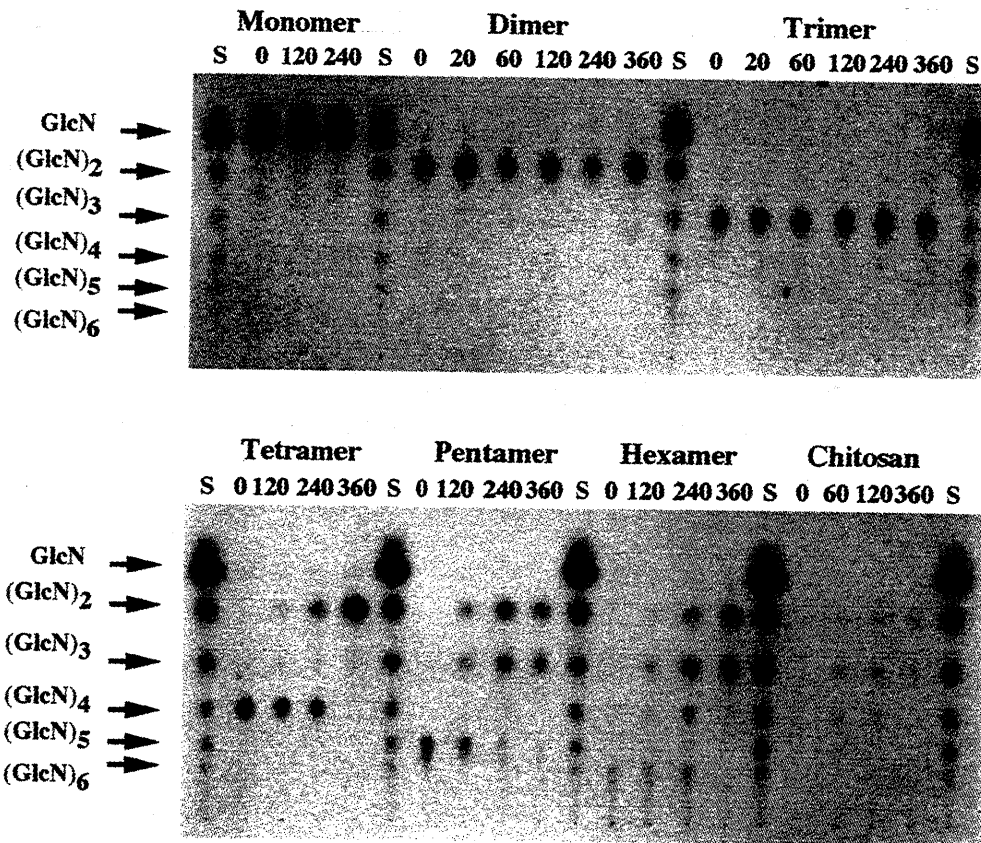
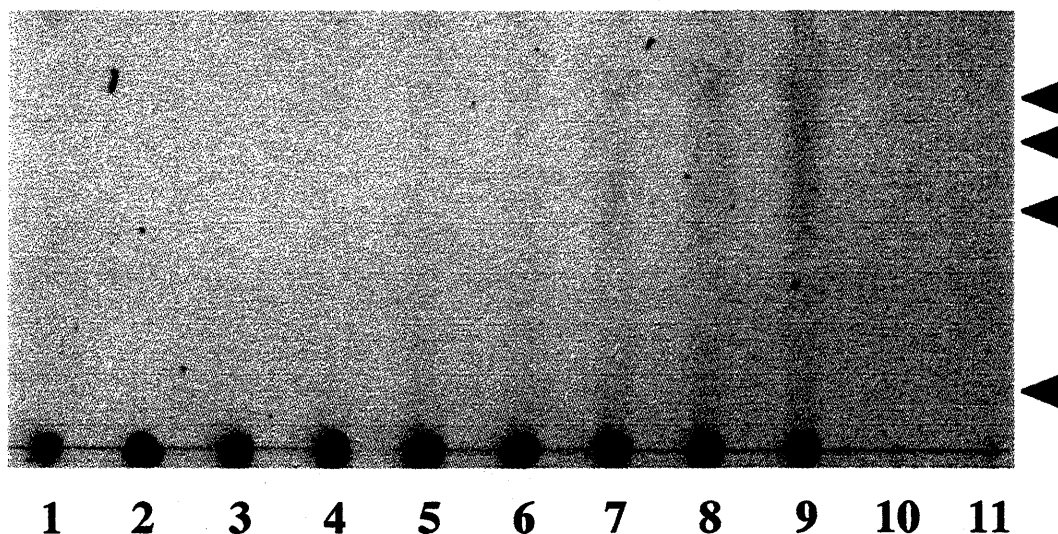


Fig. 2. Thin-layer chromatography (TLC) to monitor the time-course of hydrolysis products by chitosanase reaction. Use of chitosan oligosaccharides as the substrate for each reaction is indicated under the panel. Numbers indicate the reaction duration (min). The positions of control oligosaccharides are shown on the left side with arrows.

### c. vAL-1, vAL-2

この酵素活性は、プレート培養したクロレラ細胞を溶菌する画分として得られた (Algal Lytic)。vAL-1 は、感染中期 (感染後 90 min) に発現する約 38kDa のタンパク質であり、2つの特徴的な構造ドメインから成っている。アミノ酸配列モチーフからのデータベース検索では、有為な相同タンパク質は見出されないことから新規な酵素であると予想される。この酵素はウイルス粒子に組み

込まれず (表 1)、明らかに感染最終段階での宿主細胞壁分解に作用する。クロレラ (NC64 株) から調製した細胞壁標品をこの酵素で処理し、その分解物を薄層クロマトグラフィー (TLC) に展開し検出すると、酸性糖展開条件で複数のスポットが出現した (図 3)。この分解活性は pH6.0~7.5 で最適であり、生理的条件と一致した。この分解物構造については現在解析中であり、この情報によって vAL-1 活性の特徴付けと同時に未知の部分の多いクロレラ細胞壁構造についての理解が深まると期待される。vAL-2 は、vAL-1 と同様に溶菌活性画分として検出された未知の酵素である。その遺伝子は CVK2 ゲノム上で数 kbp の領域にまで特定しているが確定できていない。2 種以上の酵素活性の複合作用である可能性が高い。



**Fig. 3.** Thin-layer chromatography to monitor the time course of degradation products from *Chlorella* cell wall material treated with vAL-1. Degradation products are indicated by arrowheads. Lane 1, incubated with GST-fragment; lanes 2-9, incubated with vAL-1 for 0, 20, 60, 120, 240, 480, 720, and 1440 min, respectively; lane 10, vAL-1 protein; lane 11, GST-fragment.

#### d. $\beta$ -1,3-グルカナーゼ

このウイルス酵素は、糖質分解酵素 family16 の活性中心構造を有する約 40kDa のタンパク質である。この酵素は、 $\beta$ -1,3-グルカンのラミナリンによく作用し、 $\beta$ -1,3-1,4-グルカンである大麦グルカンにも弱いながら作用する。最適 pH8、最適温度 65°C の条件で、酵素比活性 2,000mU/mg タンパク質の値が得られた。以上の各酵素の特徴を表 2 にまとめて示す。

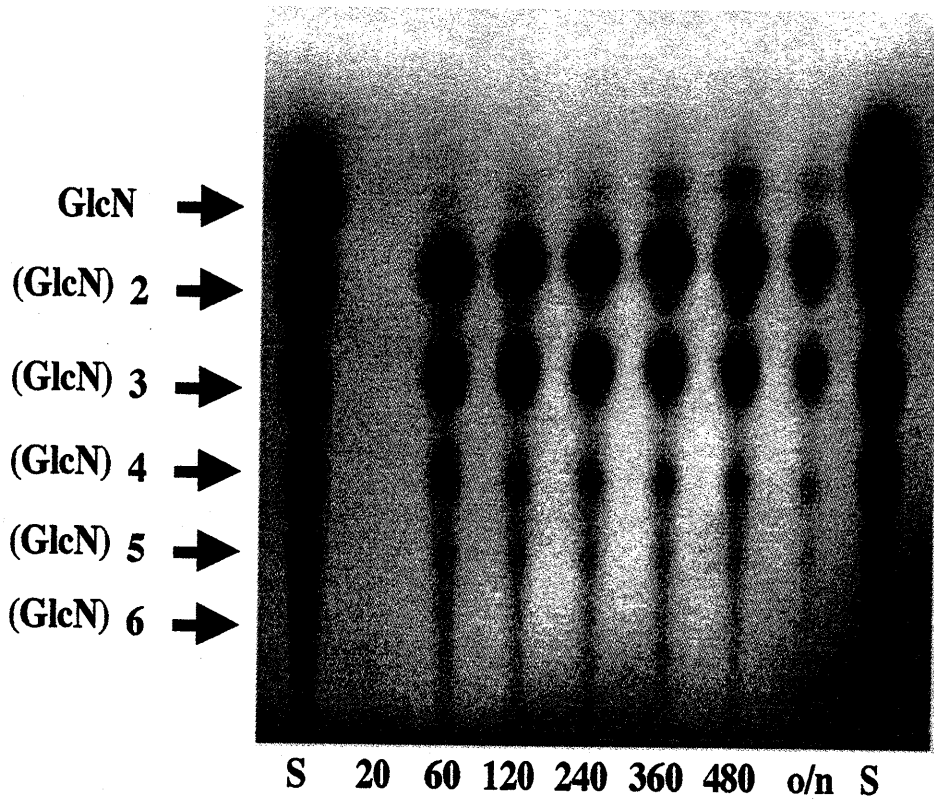


Fig. 4. Chitosan degradation by vChta-1 chitosanase. Chitosan was treated with the enzyme for various periods as indicated (min) and subjected to TLC analysis for detection of degradation products. Arrows indicate the positions of glucosamine oligomers. Lane S contains a mixture of glucosamine oligomers as standard markers.

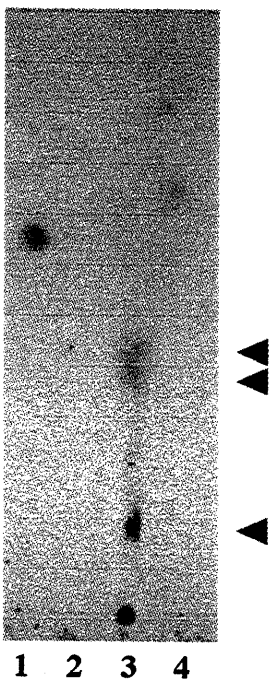


Fig. 5. Degradation of *Chlorella* cell wall by vAL-1 enzyme. vAL-1- treated cell wall materials were analyzed by TLC. Lanes: 1, galacturonic acid as a standard; 2, vAL-1 protein as control; 3, vAL-2- treated cell wall; 4, gluconolactone as a standard. Arrowheads indicate the degradation products.

表2 クロロウイルスが有する多糖分解酵素の特性

酵素	活性型	最適 pH	最適温度	比活性(mU/mg 蛋白)
vAL-1	エンド型 (?)	6-7	50 °C	ND
vAL-2	ND	ND	ND	ND
vChta-1	エンド型	5-8	50°	3,000
vChti-1	エンド/エキソ型	4-6	50°C	1,600
A260L	エンド/エキソ型	5-9	50°C	5,000
A94L	ND	8	65 °C	2,000

ND, 不明

## (2) キチナーゼ、キトサナーゼ、AL-1,AL-2 等酵素の実際的バイオマス分解評価

自然界のバイオマス物質、結晶性セルロース、ヘミセルロース、リグニン、ペクチン、キチン、キトサン、アルギン酸等の均一物質及びこれらの複合系による天然型物質（藻類・植物細胞を含む）を基質として、精製キチナーゼ、キトサナーゼ、AL-1,AL-2 による分解性をプレート法により定性的に検出した。また、分解生成物の内容を明らかにし、各々の実際的応用の方途を模索する基礎情報とした。例えば低分子化アルギン酸は医療資材として極めて有用である。キチン・キトサンオリゴ糖は生分解性プラスチック、食品加工材料として有用である。

市販のキチン、キトサン（生化学工業（株））を基質として用いた場合、ゲルアッセイ法でウイルスキチナーゼ、キトサナーゼともに強い分解活性を示した。vChti-1 では、基質のキチンは GlcNAc にまで最終的には分解される。反応時間制御によって 2-mer, 3-mer を優先的に生産できる。また、A260R では最終産物は 2-mer, 3-mer となる。両者の混合処理によってキチンは極めて効率よく GlcNAc に分解される。vChta-1 キトサナーゼは、キトサン基質(100% 脱アセチル化) に対して極めて効率よく作用し、短時間に 2-mer, 3-mer を生産する（図 4）。vAL-1 は、クロレラ細胞壁標品に直接作用し分解物を生成する（図 3、図 5）。高アルカリ条件下でアルギン酸を分解することも観察されている。しかしながら常温、中性条件下でポリマンヌロン酸、ポリガラクトロン酸、xanthan gum, guar gum 等には作用しなかった。β-1,3-グルカナーゼ

は、天然の各種 $\beta$ -1,3-グルカン、 $\beta$ -1,3-1,4-グルカンに作用したが、 $\beta$ -1,4-グルカン (CMセルロース)、 $\alpha$ -グルカンには作用しなかった。

これらウイルス酵素は感染サイクルの中で宿主細胞の溶解に働く。クロレラ細胞壁主要構造部分の分解に働くと予想される vAL-1 では、その分解産物が容易に検出された。これに比して、他の酵素では識別できる分解産物が極微量であり検出が困難である。従って、細胞壁の不均一構造の極めて特異的な部分の分解に働いているものと思われる。天然バイオマスの多くは生細胞であるからこれら酵素の生細胞に対する生育への影響も調べた。平板培養した各種藻類細胞に対して酵素標品を重層し、生育阻害を溶菌班 (ハロー) 形成性によって判定した。その結果を表3に示す。これらウイルス酵素は、感受性株のみでなく特に *Chlorella vulgaris* グループの各株に有効に作用した (表3)。バイオテクノロジー分野では、細胞が生きてままで細胞壁を溶解させるいわゆるプロトプラスト化の技術が重要である。これらウイルス酵素をプロトプラスト化のツールとして利用することが期待される。

表3. クロロウイルス酵素のクロレラ細胞溶解活性

Strains	Chitosanase	Chitinase	vAL-1	vAL-2	CVK2 <sup>a</sup>	SAGV <sup>b</sup>
<i>Chlorella</i> sp. NC64A	+	+	+	+	+	-
<i>C. prototrichoides</i> 211-6	+	+	+	+	+	-
<i>C. vulgaris</i> 211-11b	+	+	+	+	-	-
211-1e	+	+	+	+	-	-
C-27	+	+	+	+	-	-
C-135	+	+	+	+	-	-
C-150	+	+	+	+	-	-
C-207	+	+	+	+	-	-
<i>Chlorella</i> sp. SAG-241-80	+	+	+	+	-	+
Zoochlorella						
PB-3	(+)	(+)	+	+	-	-
PB-4	(+)	(+)	+	+	-	-
PB-5	(+)	(+)	+	+	-	-
<i>C. prototrichoides</i> 211-7a	-	-	-	-	-	-
211-10d	-	-	-	-	-	-
C-206	-	-	-	-	-	-

a CVK2 感染性.

b SAGV (chlorovirus infecting SAG-241-80)感染性.



さらに、クロレラ以外の藻類、植物等への影響に関する若干のデータも得ている。稲作用水田に繁茂する有害藻類（草類）アオミドロ、ヒビミドロ、ホシミドロに対して、ウイルス溶菌液を添加すると有為な生育阻害が見られた。これは天然微生物農薬（除草剤）としての利用の可能性を示唆するものである。

### (3) ウイルス酵素大量生産・製剤化システムの開発

宿主となるクロレラは排ガス CO<sub>2</sub> 処理などと組み合わせて、大量培養可能であり、ウイルス増殖は極めて効率がよい。実験室レベルでは、1リットルのクロレラ培養液 (10<sup>7</sup> cells/ml) から6～8時間で 2 x 10<sup>12</sup> pfu のウイルス粒子が回収でき、これは 250mg のタンパク質に相当する。その中の酵素活性は例えばキトサナーゼでは 2,500 ユニットが含まれる。溶菌液からのウイルスの回収は通常の遠心分離法 (15,000rpm, 15 min) で十分である。低温でウイルスの保存性は極めて高い。また活性を保持したままでの凍結乾燥も可能である。一方、宿主溶菌液中に残る混合酵素タンパク質は、凍結乾燥法によって粉末製剤化できる。

## 4. むすび

これまで未利用資源であった難分解性不均一系バイオマスを分解する上で、本研究で明らかにした酵素活性は効力を発揮する。酵素処理により、特に非セルロース系バイオマス(キチン、キトサン、アルギン酸等)を低分子化し分離・抽出することによって成分の分別が効率化され、その後のプロセスを有効に稼働させることが出来る。特に、発酵産業をはじめ以下の種々の分野における新機能性素材としての利用が期待される。

- (1) 一般発酵原料 (アルコール、酸、水素、メタン、その他)
- (2) 生体活性剤、免疫賦活剤、変形性関節炎治療薬、化粧品、その他
- (3) 医療用繊維、人工臓器素材、その他医科用資材
- (4) 生分解性プラスチック原料、(5) 食品可塑剤、食物繊維
- (6) 産業廃液処理、廃液からの特殊成分回収
- (7) バイオリアクター用固定化材

また、バイオテクノロジー分野において上記酵素の粗混合製剤（ウイルス溶菌液の凍結乾燥製剤）は、クロレラは勿論のこと種々の有用藻類、植物のプロトプラスト化用細胞壁溶解酵素としての利用が可能である。農業分野では水田

除草（除藻）作用が期待され微生物農薬として有望である。

## 5. 参考文献

- (1) Kawasaki, T., Tanaka, M., Fujie, M., Usami, S., Sakai, K., and Yamada, T. (2002) Chitin synthesis in chlorovirus CVK2-infected *Chlorella* cells. *Virology*, in press.
- (2) Yamada, T. (2002) Peculiar polysaccharide-degrading enzymes encoded by Chloroviruses. *Curr. Topics Virology*, in press.
- (3) 山田 隆 (2002) クロロウイルスのバイオテクノロジーへの利用。生物工学会誌、80 (6), 印刷中.
- (4) Chuchird N., Hiramatsu, S., Sugimoto, I., Fujie, M., Usami, S., and Yamada, T. (2001) Digestion of *Chlorella* cells by chlorovirus-encoded polysaccharide degrading enzymes. *Microbe Environ.*, 16, 206-212.
- (5) 山田 隆、杉本一路、平松紳吾(2001)クロレラを溶かすウイルスの酵素、*化学と生物*, 39, 520-526.
- (6) 山田 隆、藤江 誠 (1998) 産業排ガスCO<sub>2</sub>利用によって生産した微細藻類細胞の有効利用に関する研究. RITE 優秀研究企画平成 10 年度研究成果報告会要旨集 p. 7-11.
- (6) Sugimoto, I., Hiramatsu, S., Murakami, D., Fujie, M., Usami, S., and Yamada, T. (2000) Algal-lytic activities encoded by *Chlorella* virus CVK2. *Virology*, 277, 119-126.
- (7) Hiramatsu, S., Fujie, M., Usami, S., Sakai, K., and Yamada, T. (2000) Two catalytic domains of *Chlorella* virus CVK2 chitinase. *J. Biosci. Bioeng.*, 89, 252-257.
- (8) Yamada, T., Chuchird N., Kawasaki, T., Nishida, K., and Hiramatsu, S. (1999) *Chlorella* virus as a source of novel enzymes. *J. Biosci. Bioeng.*, 88, 353-361.
- (9) Hiramatsu, S., Ishihara, M., Fujie, M., Usami, S., and Yamada, T. (1999) Expression of a chitinase gene and lysis of the host cell wall during *Chlorella* virus CVK2 infection. *Virology*, 260, 308-315.
- (10) Yamada, T., Hiramatsu, S., Songsri, P., and Fujie, M. (1997) Alternative expression of a chitosanase gene produces two different proteins in cells infected with *Chlorella* virus CVK2. *Virology*, 230, 361-368.

Current Topics in Virology, RESEARCH TRENDS

To be published in 2003.

Peculiar polysaccharide-degrading enzymes encoded by chloroviruses

Takashi Yamada

Department of Molecular Biotechnology, Graduate School of Advanced Sciences of  
Matter, Hiroshima University, 1-3-1 Kagamiyama, Higashi-hiroshima 739-8530, Japan

## ABSTRACTS

Polysaccharide-degrading enzymes including chitinases, chitosanases,  $\beta$ -1,3-glucanase, vAL-1, and vAL-2 are encoded by chloroviruses (Phycodnaviridae). These enzymes are expressed during infection and function at the initial stage as well as the final stage of the viral replication cycle. The vChti-1 chitinase of CVK2, a virus isolated in Kyoto, Japan, has a tandem array of two catalytic domains, each of which shows a different fashion of enzyme activity. Two size-different vChta-1 chitosanases are produced from a single gene by a read-through mechanism: the larger protein with a virion-targeting signal is incorporated into the virus particle, functioning at the beginning of the infection while the smaller protein is expressed late in infection and aids in the digestion of the host cell wall prior to the release of the viruses. The vAL-1 algal lytic enzyme digests the *Chlorella* cell wall, releasing acidic sugars, probably uronic acids. All of these enzymes are supposed to function cooperatively to digest complex structures and compositions of the host *Chlorella* cell wall.

## INTRODUCTION

Large icosahedral, dsDNA-containing viruses (*Chlorella* virus or chlorovirus, Phycodnaviridae [1]) that infect certain strains of the unicellular green alga *Chlorella* are ubiquitous in natural environments [2-4]. These viruses were first found in *Chlorella*-like algae (zoochlorella) that are endosymbiotic with *Paramecium bursaria* [5] and isolated from zoochlorella of *Hydra viridis* [6, 7] and *P. bursaria* [8]. These viruses can be assayed by plaque formation and produced in large quantities with some exsymbiotic *Chlorella* strains such as NC64A [9], SAG-241-80 [10], and Pbi [11]. One of the remarkable features of chloroviruses is their large, 330-380 kbp dsDNA genomes that potentially encode more than several hundred genes. Recently, the nucleotide sequence of the 330,740-bp genome of PBCV-1 (*Paramecium bursaria chlorella virus-1*), the prototype virus of Phycodnaviridae, was completed, and 702 open reading frames (ORFs) were identified along the genome, of which 377 are predicted to encode functional proteins; 121 of them resemble proteins in the databases [12-16]. These proteins include a variety of enzymes involved in modification of DNA, RNA, protein and polysaccharides as well as those involved in the metabolism of sugars, nucleotides and nucleosides, amino acids and lipids (GenBank accession no. U42580).

Some of these genes were demonstrated to be actually expressed during viral infection, and functional enzymes were detected in the host cytoplasm or were incorporated into the virion. However, exact biological roles of these enzymes are largely unknown.

In the normal lytic cycle of chloroviruses, viral particles attach to the surface of the host *Chlorella* cells, digest the cell wall at the point of attachment, and inject the viral core into the host cytoplasm leaving an empty capsid on the cell surface (Fig. 1). This mode of penetration resembles that of bacteriophage T4 which infect *Escherichia coli* cells. Viral DNA synthesis begins about 1 h postinfection (p.i.) and by 2-3 h p.i. parts of the viral capsid accumulate in the host cytoplasm. Mature, DNA-filled virions appear by 4 h p.i. and about 2-4 h later the host cells burst, releasing viral progeny into the culture medium [17]. Both the initial and final stages of the viral replication cycle obviously require cell wall-digesting activities, but little is known about the nature and origin of the enzymes that digest the cell wall. A characteristic feature common to virus-sensitive *Chlorella* strains is a rigid cell wall containing glucosamine in addition to other sugars; glucosamine comprises 7-17% of total sugars in the cell wall [18-21]. This suggests that enzymes degrading polymers of glucosamine, like chitin ( $\beta$ -1,4-linked polymer of N-acetyl-D-glucosamine) and chitosan ( $\beta$ -1,4-linked polymer of D-glucosamine with various degrees of N-acetylation), may be involved in the viral infection process.

#### CHLOROVIRUS PARTICLES

Chloroviruses are large icosahedral particles 150-200 nm in diameter. The molecular weight of typical virion is approximately  $1 \times 10^9$  [22,23] and the particles sediment in sucrose density gradients at about 2,300S [8]. The virion contains about 64% protein, 21 to 25% dsDNA, and 5 to 10% lipid [22,24]. Electron micrographs of negatively stained viral particles indicated that the viral particles consist of electron dense cores and their surrounding multilaminar shells. There is a lipid layer inside the outer glycoprotein capsid [24]. Viral structural proteins can be separated by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) into more than 50 species ranging in apparent size from 10 to more than 200 kDa. Although the protein separation patterns vary from virus to virus [3], the typical pattern described for PBCV-1 is as follows [2]: The major capsid protein of 54 kDa (Vp54), that is glycosylated, makes up about 40% of the total viral protein. It behaves as a dimer under some electrophoretic conditions.

In addition to Vp54, the proteins Vp14.5, Vp71 and Vp135 (also a glycoprotein) are exposed to the virus surface [24]. Four PBCV-1 proteins (Vp27.5, Vp54, Vp55 and Vp135) are thought to be myristylated, and six proteins (Vp14, Vp20, Vp29, Vp36, Vp45 and Vp60) are likely phosphoproteins. Except for these data, very little is known about the location, properties, structure and function of the individual protein constituents of *Chlorella* viral particles. Recently, Yamada *et al.* [25] have established a method to fractionate several capsid proteins from the viral core of CVK2 (a chlorovirus isolated in Kyoto, Japan [3]) by treatment with 4M urea. Through this treatment, at least seven different proteins with molecular masses of 16.2, 20, 20.5, 25, 41, 45 and 52 kDa were released reproducibly from the viral particles into the soluble fraction. Computer-aided comparison of the N-terminal amino acid sequences of these proteins with those of ORFs identified in the PBCV-1 genome resulted in a one-to-one correspondence, except for Vp16.2, as follows: Vp20, Vp20.5, Vp25, Vp41, Vp45, and Vp52 corresponded to A168R, A523R, A203R, A625L, A430L, and A430L of PBCV-1, respectively [26]. Vp16.2 may be a species-specific protein. There is no information about the biological functions of these proteins except for Vp52, Vp45, and Vp41, all of which are related to the major capsid protein Vp54 of PBCV-1 or its homologs. Interestingly, some of the CVK2 capsid proteins were processed at their N-terminal regions by two different proteolytic activities [26].

Fractionation and separation of the viral proteins by gel electrophoresis made it possible to detect and assign various enzyme activities to individual protein bands using zymography methods [27, 28]. So far, several active enzymes have been detected in the CVK2 viral particles, including chitosanase, chitinase, protein kinase, RNase and superoxide dismutase.

## CHITINASES

When CVK2 proteins were separated into the capsid and core particle fractions as above [25, 26], and separated and assayed by SDS-PAGE with chitosan or chitin as substrate in the gel matrix [27], several enzymatically active bands with molecular masses ranging from 35 to 70 kDa were detected in the core fraction. Of these, a 65-kDa band had the strongest chitosanase activity and a few bands in the 50- to 60-kDa range showed chitinase activities.

Chitinase catalyze the hydrolysis of chitin, a linear homopolymer of  $\beta$ -1,4-linked N-

acetylglucosamine (GlcNAc) residues. The enzyme is produced by a wide range of organisms, including bacteria [28-30], fungi [31], higher plants[32, 33], insects[34], crustaceans[35], and some vertebrates. Bacteria produce chitinases to meet nutritional needs. In most cases, they produce several chitinases to hydrolyze the diversity of chitins occurred in nature. A major role of the chitinases produced by fungi, crustaceans, and insects is to modify the structural constituent, chitin, of these organisms during developmental processes or morphogenesis[36]. The proposed role of plant chitinases is a defence mechanism against chitin-containing pathogens [33].

Based on amino acid sequence similarities, the chitinases from various organisms are classified from class I to class V [37]. These classes can be grouped into two families of glycosyl hydrolases, family 18 and 19 [38, 39]. When a chitinase hydrolyzes a  $\beta$ -1,4 linkage, the GlcNAc at the reducing end contains an asymmetric carbon 1, which exists as two different stereoisomers,  $\alpha$  or  $\beta$ . Chitinases of family 19 invert the anomeric configuration of the hydrolyzed GlcNAc residue, while chitinases of family 18 retain the anomeric configuration [40]. Chitinases from Class I, II, and IV are of plant origin and comprise the family 19 glycosyl hydrolases [36, 41]. Class III chitinases are mainly plant and fungal origin [41] and belong to the family 18 glycosyl hydrolases. Class V is mainly comprised of bacterial chitinases, which also belong to the family 18 glycosyl hydrolases. Such wide variations in the structure and function of chitinases raise interesting questions about the evolution of those enzymes.

A few ORFs identified in the chlorovirus PBCV-1 genome, A181R, A182R, and A260R show significant amino acid sequence homology with chitinases of various organisms [14]. A single gene corresponding to A181R/A182R was cloned and characterized from chlorovirus CVK2 [42]. The CVK2 gene (*vChiti-1*) codes for an open reading frame of 2,508 bp, corresponding to 836 amino acids (aa). The predicted amino acid sequence contained two sets of a family 18 catalytic domain that is responsible for chitinase activity. Each of the domains showed amino acid sequence homology to different chitinases of the bacterial subfamily C [43]: The first catalytic domain exhibited a high level of similarity to the catalytic sequence of *Saccharopolyspora (Streptomyces) erythraeus* (30% identity), whereas the second domain resembled that of the *Ewingella americana* chitinase (34.7% identity). The two catalytic domains are connected by short linker sequences rich in proline residues (Fig. 2). This structure suggested different origins for the two domains of *vChiti-1*

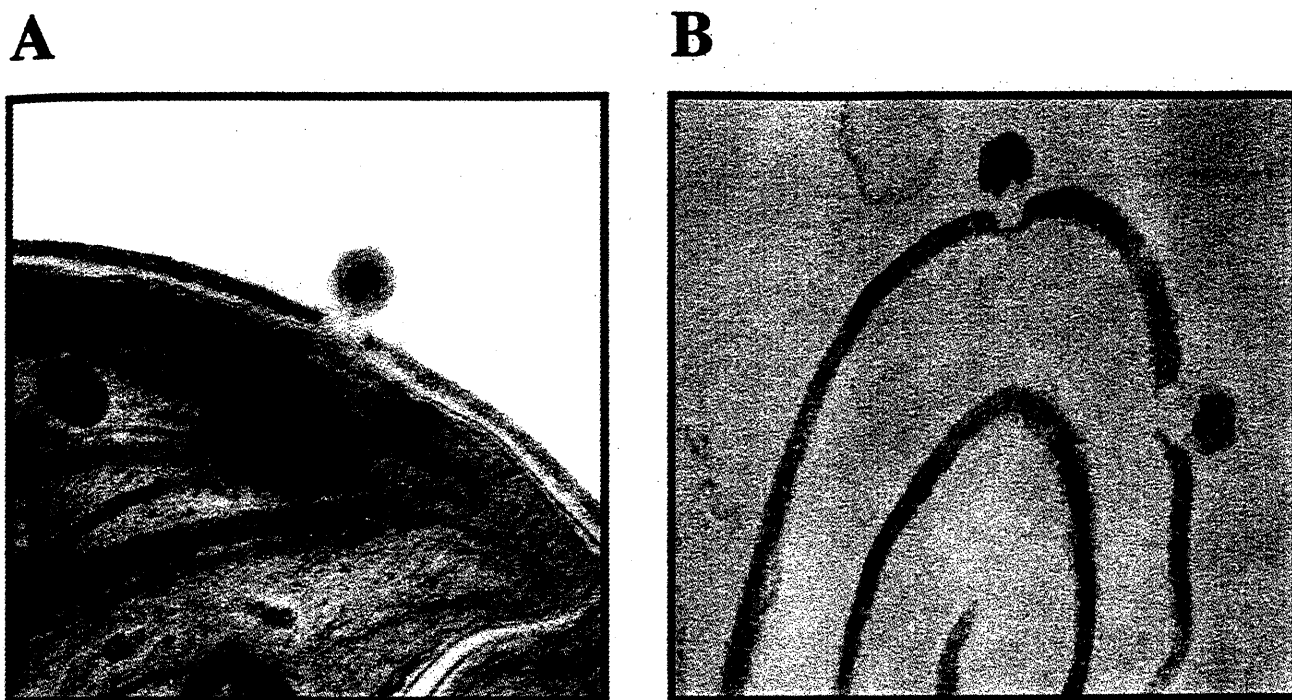


Fig. 1. Electron micrographs showing digestion of the *Chlorella* cell wall by chloroviruses. (A) The cell wall is digested at the attachment point (arrow). (B) Chloroviruses also digest isolated *Chlorella* cell wall fragments. Bar marker represents 0.2  $\mu\text{m}$ .

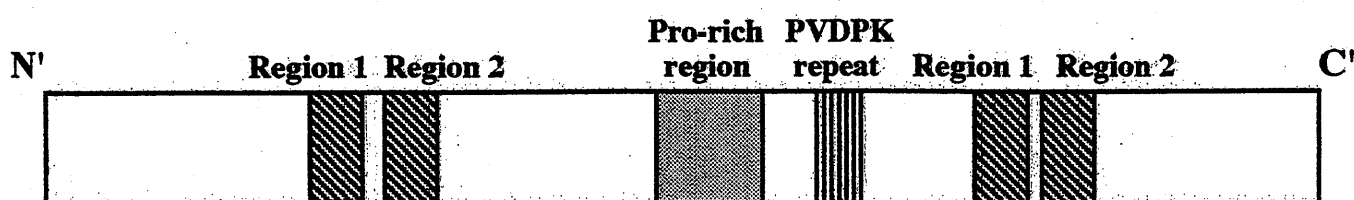


Fig. 2. Composite structure of the chlorovirus CVK2 vChti-1 chitinase. Regions 1 and 2 conserved in the catalytic domain of family 18 glycosyl hydrolases are indicated by hatched boxes. A Pro-rich region and PVDPK repeats are also shown [42].



chitinase [42]. Recently, a similar composite structure of a chitinase A181/182R encoded by chlorovirus PBCV-1 has also been reported for [44]. The first catalytic domain on a C-terminal-truncated derivative of vChti-1 generated exclusively chitobiose from chitotetraose, chitohexaose, and colloidal high-molecular mass chitin in the enzyme reaction, a typical characteristic of an exochitinase. In contrast, N-acetylglucosamine was produced from chitobiose as well as chitooligosaccharides by the second catalytic domain on an N-terminal-truncated derivative of vChti-1. Therefore, the second domain possessed N-acetylglucosaminidase activity as well as endochitinase activity. The presence of two catalytic domains with different enzymatic properties in the viral enzyme seems to be necessary for hydrolyzing natural substrates in nature in a cooperative fashion.

The *vChti-1* gene is expressed in virus-infected cells from 120 min p.i., and its 94-kDa protein product is not incorporated into the virion but remain in the medium after cell lysis [42].

*A260R*, another chitinase gene identified on the PBCV-1 genome, was also characterized with respect to its structure and expression [44]. The predicted amino acid sequence of A260R chitinase showed high similarity (36%) to that of fungal chitinases from *Aphanocladium* or *Trichoderma*. This gene is expressed late in infection, and the 55-kDa protein is enzymatically active and integrated into PBCV-1 virion. Both endochitinase and exochitinase activities were found with A260R chitinase. The optimal temperature of the enzyme reaction is 50 °C for both vChti-1 and A260R chitinases, while the optimal pHs are 4-6 for the former and 5-9 for the latter, respectively.

## CHITOSANASES

Chitosanase catalyzes the hydrolysis of chitosan, partially or fully deacetylated chitin. Searching the PBCV-1 ORFs identified A292L showing significant homology with chitosanases from various microorganisms [14]. A CVK2 gene corresponding to PBCV-1 A292L was cloned by using PCR where oligonucleotide primers synthesized according to the A292L sequence were used. The cloned gene of CVK2 (*vChta-1*) encodes 328 aa with a predicted molecular mass of 37 kDa; the gene was cloned and characterized [45]. The predicted amino acid sequence of an N-portion (174 aa) of this gene product showed 22 to 25% identity with chitosanases of various bacteria including

*Nocardioides* sp. N106 and *Streptomyces* sp. N174. Especially a region around the active center containing E107 and D125 of the family 46 of glycosyl hydrolases is highly conserved among these chitosanases. The *vChta-1* gene was expressed in CVK2-infected cells late in infection. Western blot analysis with specific antisera raised against the vChta-1 protein identified two proteins of 37 and 65 kDa in virus-infected cells: The larger protein, which was most likely produced by read-through into a downstream gene, was packaged in the virion, while the smaller protein remained in the cell lysate. Therefore, the C-extension of the 65-kDa protein may function as a virion-targeting signal. This signal can be used to package a protein of interest into the virion. Therefore, the larger 65-kDa chitosanase assembled into the virion presumably functions at the beginning of the infection, while the smaller 37-kDa chitosanase remained in the host cytoplasm where they most likely aids in the digestion of the host cell wall prior to viral release (Fig. 3).

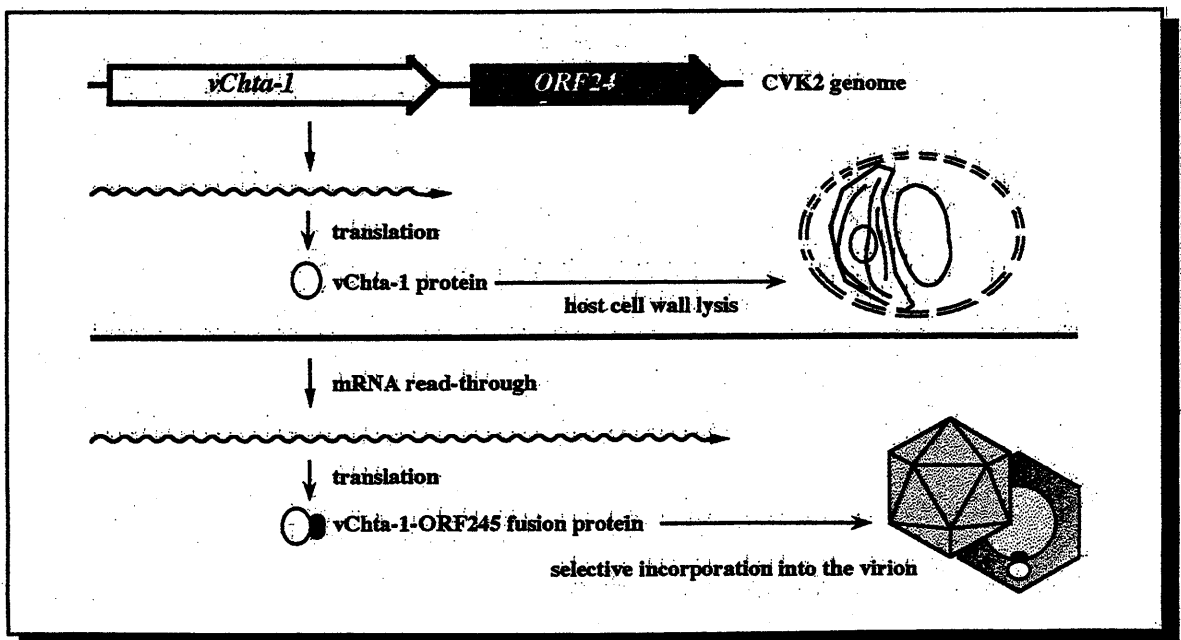
Both large and small proteins showed strong chitosanase activity in zymography assays. The specific chitosanase activity of the 65-kDa enzyme in the CVK2 virion was 10 U/mg protein, and a total of 2,500 units of the enzyme activity was recovered from a 1-liter *Chlorella* culture. The optimal pH and temperature of vChta-1 activity with glycol chitosan as a substrate are 5-8 and 50 °C, respectively. vChta-1 can act on chitosan-oligosaccharides larger than tetramer and the major products are dimmers and trimers. Since no GlcN is produced by the enzyme reaction, vChta-1 is an endoglycosidase.

#### vAL-1 AND vAL-2

All the chitinase and chitosanase genes mentioned above are widely conserved in chloroviruses, suggesting the possible importance of them in viral replication. However, cells of *Chlorella* strain NC64A, a predominant laboratory host strain, treated with the vChti-1 chitinase and/or vChta-1 chitosanase did not show any significant morphological changes [42]. These results suggest that other potential enzymes encoded by chloroviruses might be involved in host cell wall digestion. To detect such cell wall-degrading activities, *E. coli* lysates expressing chlorovirus CVK2 genes on a cosmid contig were subjected to a halo-forming assay with *Chlorella* NC64A cells as a substrate. As a result, two different algal-lytic activities (vAL-1 and vAL-2) were found on the CVK2 genome [46]. The gene for vAL-1, one of the two activities,

**Table 1. Polysaccharide-degrading enzymes encoded by chloroviruses**

Gene	Enzyme activity	Cell lysis	Expression	Localization
<i>vAL-1</i>	ND	++	Intermediate	Cytoplasm
<i>vAL-2</i>	ND	+++	ND	ND
<i>vChta-1</i>	Chitosanase	+	Late	Virus particle/ Cytoplasm
<i>vChti-1</i>	Chitinase	+	Intermediate	Cytoplasm
<i>A260R</i>	Chitinase	ND	Late	Virion
<i>A94L</i>	$\beta$ -1,3-Glucanase	ND	Early	Cytoplasm



**Fig. 3. A predicted mechanism for alternative expression of the CVK2 *vChta-1* gene. The smaller protein (37 kDa) expressed from *vChta-1* only retains in the cell lysate, whereas the larger protein (65 kDa) formed by read-through into an adjacent downstream ORF (*ORF245*) is incorporated into the virion. It presumably function at the beginning of infection.**

encoded an ORF of 349 aa, which was homologous with PBCV-1 A215L and CVN1 CL-2 (reported as alginate lyase [47]). The nucleotide sequence identity was 97% between vAL-1 and A215L and 93% between vAL-1 and CL-2. Due to the major difference in repetition of a PAPK motif after amino acid position 58, the size of vAL-1, CL2, and A215L varies 349 aa, 334 aa, and 322 aa, respectively: although in a few positions P is replaced with T or S, a PAPK motif reiterated 10 times, 6 times, and 3 times in vAL-1, CL2, and A215L, respectively. Except for the PAPK region, the overall amino acid sequence is highly conserved (more than 95% identity) among the three and substituted residues are almost always of the same amino acid families. The vAL-1 gene was expressed at relatively early stages of the virus life cycle; transcripts and translation products appeared at 60 min p.i. and 90 min p.i., respectively. The vAL-1 protein was not incorporated into the viral particles but remained in the cell lysate, suggesting its role in the digestion of the cell wall before viral release at the final stage of infection. Cell wall materials isolated from *Chlorella* strain NC64A were actually digested by vAL-1 under physiological conditions and degradation products were detected on TLC. The degradation products could be only separated under TLC conditions for uronic acids and the detailed nature or structure of them is not known.

In addition to *Chlorella* strain NC64A, vAL-1 lysed cells of four *C. vulgaris* strains as well as *Chlorella* sp. SAG-241-80 [46, 48].

The characterization of vAL-2 is now under investigation.

### $\beta$ \_1,3-GLUCANASE

An ORF (A94L) of PBCV-1 encodes a protein of 364 aa residues, whose sequence shows 26 to 30% amino acid identity with family 16 endo- $\beta$ \_1,3-glucanases from several bacteria including *Bacillus circulans* [49, 50]. The catalytic site of family 16 endo- $\beta$ \_1,3- and endo- $\beta$ \_1,3-1,4-glucanases contains the sequence E(LIV)D(LIV)X<sub>0,1</sub>EX<sub>2</sub>(GQ)(KRNF) X(PSTA). The PBCV-1 A94L ORF contains a EIDIFETPycEr sequence, including the three critical amino acids Glu(234), Asp(236), and Glu(239). A94L is clearly more similar to  $\beta$ \_1,3-glucanases than to  $\beta$ \_1,3-1,4-glucanases. A94L protein produced in *E.coli* cells hydrolyzed the  $\beta$ \_1,3-glucan laminarin and had slightly less hydrolytic activity on  $\beta$ \_1,3-1,4-glucan lichenan and barley  $\beta$ -glucan. The highest enzyme activity was attained at 65 °C and pH 8 [51]. Both the A94L mRNA and protein appeared 15 min after PBCV-1 infection and

disappeared 60- and 120 min p.i., respectively, indicating that this gene is an early gene. Approximately 50% of chloroviruses contained the A94L gene.

Enzymes that degrade  $\beta$ \_1,3-glucans are widely distributed among bacteria, fungi, and plants where they participate in many physiological functions, including  $\beta$ -glucan mobilization in fungi [52] and fungal pathogen-plant interactions [53]. Virus-encoded  $\beta$ \_1,3-glucanases have never been reported so far.

## FUTURE PROSPECTS

The polysaccharide-degrading enzymes encoded by chloroviruses are listed in Table 1. At least some of these enzymes may function to digest the host cell wall at the initial stage and/or the final stage of the virus replication cycle. The activities of these enzymes apparently contribute to host-selection by viruses, because a good correlation was seen between the virus-sensitivity and the lytic enzyme-sensitivity of *Chlorella* strains [48]. Since the *Chlorella* cell wall is generally known to be composed of very heterogeneous sugars and usually resistant to enzymatic digestion [54], one can expect unique activities or novel substrate specificity of these viral enzymes. In fact, vAL-1 by itself degrades cell wall materials isolated from the host *Chlorella* cells and produces acidic sugars, probably uronic acids, so that it is most likely a novel enzyme. Moreover, the viral chitinases and chitosanases showed composite structures and have composite enzyme activities. To understand their potential activities, further detailed enzymological characterization of these enzymes is required.

These enzymes may be able to be utilized in the degradation and recycling of huge amounts of natural biomass materials that consist of very heterogeneous polysaccharides and are indigestible by usual enzymes such as cellulase, glucanases, chitinases, and chitosanases.

## ACKNOWLEDGEMENTS

The works in the laboratory of T. Yamada were supported in part by grants from the Chugoku Technology Promotion Center and The Mazda Foundation, and by a Grant-in-Aid for Scientific Research (No. 13660094) from the Ministry of Education, Culture, Sports, Science and Technology, Japan.

## REFERENCES

- [1] Van Etten, J. L. 2000, *Virus Taxonomy, Classification and Nomenclature of Viruses, Seventh Report*, M. H. V. Van Regenmortel, C. M. Fauquet, D. H. L. Bishop, E. B. Carsten, M. K. Esters, S. M. Lemon, J. Maniloff, M. A. Mayo, D. J. McGeoch, C. R. Pringle and R. B. Wickner (Eds.), Academic Press, San Diego, CA, 183.
- [2] Van Etten, J. L., Lane, L. C., and Meints, R. H. 1991, *Microbiol. Rev.*, 55, 586.
- [3] Yamada, T., Higashiyama, T., and Fukuda, T. 1991, *Appl. Environ. Microbiol.*, 57, 3433.
- [4] Yamada, T., Shimomae, A., Furukawa, S., and Takehara, J. 1993, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 57, 733.
- [5] Kawakami, H., and Kawakami, N. 1978, *J. Protozool.*, 25, 217.
- [6] Van Etten, J. L., Meints, R. H., Burbank, D. E., Kuczmarski, D., Cuppels, D. A., and Lane, L. C. 1981, *Virology*, 113, 704.
- [7] Meints, R. H., Van Etten, J. L., Kuczmarski, D., Lee, K., and Ang, B. 1981, *Virology*, 113, 698.
- [8] Van Etten, J. L., Meints, R. H., Kuczmarski, D., Burbank, D. E., and Lee, K. 1982, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 79, 3867.
- [9] Van Etten, J. L., Burbank, D. E., Kuczmarski, D., and Meints, R. H. 1983, *Science*, 219, 994.
- [10] Kvitko, K. V., and Gromov, B. V. 1984, *Dokl. Akad. Nauk. SSSR*, 279, 998.
- [11] Reisser, W., Becker, B., and Klein, T. 1986, *Protoplasma*, 135, 162.
- [12] Lu, Z., Li, Y., Zang, Y., Kutish, G. F., Rock, D. L., and Van Etten, J. L. 1995, *Virology*, 206, 339.
- [13] Li, Y., Lu, Z., Burbank, D. E., Kutish, G. F., Rock, D. L., and Van Etten, J. L. 1995, *Virology*, 212, 135.
- [14] Lu, Z., Li, Y., Que, Q., Kutish, G. F., Rock, D. L., and Van Etten, J. L. 1996, *Virology*, 237, 360.
- [15] Kutish, G. F., Li, Y., Lu, Z., Furuta, M., Rock, D. L., and Van Etten, J. L. 1996, *Virology*, 223, 303.
- [16] Li, Y., Lu, Z., Sun, L., Ropp, S., Kutish, G. F., Rock, D. L., and Van Etten, J. L. 1997, *Virology*, 237, 360.
- [17] Meints, R. H., Lee, K., Burbank, D. B., and Van Etten, J. L. 1984, *Virology*, 138, 341.

- [18] Meints, R. H., Burbank, D. E., Van Etten, J. L., and Lamport, D. T. A. 1988, *Virology*, 164, 15.
- [19] Kapaun, E., Loos, E., and Reisser, W. 1992, *Phytochemistry*, 31, 3103.
- [20] Kapaun, E., and Reisser, W. 1995, *Planta*, 197, 577.
- [21] Takeda, H. 1995, *Phytochemistry*, 40, 457.
- [22] Van Etten, J. L., Burbank, D. E., Xia, Y., and Meints, R. H. 1983, *Virology*, 126, 117.
- [23] Yonker, C. R., Caldwell, K. D., Giddings, J. C., and Van Etten, J. L. 1985, *J. Viol. Methods*, 11, 145.
- [24] Skldra, M. P., Burbank, D. E., Xia, Y., Meints, R. H., and Van Etten, J. L. 1984, *Virology*, 135, 308.
- [25] Yamada, T., Furukawa, S., Hamazaki, T., and Songsri, P. 1996, *Virology*, 219, 395.
- [26] Songsri, P., Hiramatsu, S., Fujie, M., and Yamada, T. 1997, *Virology*, 227, 252.
- [27] Gabriel, O. and Gersten, D. M. 1992, *Anal. Biochem.*, 203, 1.
- [28] Clark, P. H., and Tracey, M. V. 1956, *J. Gen. Microbiol.*, 14, 315.
- [29] Watanabe, T., Suzuki, K., Oyanagi, W., Ohnishi, K., and Tanaka, H. 1990, *J. Biol. Chem.*, 265, 15659.
- [30] Flach, L., Pilet, P. E., and Jolles, P. 1992, *Experientia*, 48, 701.
- [31] Gooday, G. W., Humphreys, A. M., and McIntosh, W. H. 1986, *Chitin in Nature and Technology*, R. Muzzarelli, C. Jeuniaux, and G. W. Gooday (Eds.), Plenum Press, New York, 83.
- [32] Boller, T. 1985, *Cellular and Molecular Biology of Plant Stress*, J. L. Key, and T. Kosuge (Eds.), Alan R. Liss, Inc., New York, 247.
- [33] Collinge, D. B., Kragh, K. M., Mikkelsen, J. D., Nielsen, K. K., Rasmussen, U., and Vad, K. 1983, *Plant J.*, 3, 31.
- [34] Koga, D., Jilka, J., and Kramer, K. J. 1983, *Insect Biochem.*, 13, 295.
- [35] Lunt, M. R., and Kent, P. W. 1960, *Biochim. Biophys. Acta*, 44, 371.
- [36] Sahai, A. S., and Manocha, M. S. 1993, *FEMS Microbiol. Rev.*, 11, 317.
- [37] Cohen-Kupiec, R., and Chet, I. 1998, *Curr. Opinion Biotech.*, 9, 270.
- [38] Henrissat, B., and Bairoch, A. 1993, *Biochem. J.*, 293, 781.
- [39] Henrissat, B., and Bairoch, A. 1996, *Biochem. J.*, 316, 695.

- [40] Iseli, B., Armand, S., Boller, T., Neuhaus, J.-M., and Henrissat, B. 1996, *FEBS Lett.*, 382, 186.
- [41] Hamel, F., Boivin, R., Temblay, C., and Bellemare, G. 1997, *J. Mol. Evol.*, 44, 614.
- [42] Hiramatsu, S., Ishihara, M., Fujie, M., Usami, S., and Yamada, T. 1999, *Virology*, 260, 308.
- [43] Watanabe, T., Kobori, K., Miyashita, K., Fujii, T., Sakai, H., Uchida, M., and Tanaka, H. 1993, *J. Biol. Chem.*, 268, 18567.
- [44] Sun, L., Adams, B., Gurnon, J. R., Ye, Y., and Van Etten, J. L. 1999, *Virology* 263, 376.
- [45] Yamada, T., Hiramatsu, S., and Fukuda, T. 1997, *Virology*, 230, 361.
- [46] Sugimoto, I., Hiramatsu, S., Murakami, D., Fujie, M., Usami, S., and Yamada, T. 2000, *Virology*, 277, 119.
- [47] Suda, K., Tanji, Y., Hori, K., and Unno, H. 1999, *FEMS Microbiol. Lett.*, 180, 45.
- [48] Chuchird, N., Hiramatsu, S., Sugimoto, I., Fujie, M., Usami, S., and Yamada, T. 2001, *Microbes Environ.*, 16, 206.
- [49] Yahata, H., Watanabe, T., Nakamura, Y., Yamamoto, Y., Kamimiya, S., and Tanaka, H. 1990, *Gene*, 86, 113.
- [50] Yamamoto, M., Aono, R., and Horikoshi, K. 1993, *Biosci. Biotechnol. Biochem.*, 57, 1518.
- [51] Sun, L., Gurnon, J. R., Adams, B. J., Graves, M. V., and Van Etten, J. L. 2000, *Virology*, 276, 27.
- [52] Bielecki, S., and Galas, E. 1991, *Crit. Rev. Biotechnol.*, 10, 275.
- [53] dela Cruz, J., Pintor-Toro, J. A., Benitez, T., Llobell, A., and Romero, L. C. 1995, *J. Bacteriol.*, 177, 6937.
- [54] Yamada, T., and Sakaguchi, K. 1982, *Arch. Microbiol.*, 132, 10.