

特集：ウイルスの遺伝子解析〔1〕

イネ縞葉枯ウイルスのゲノム構造と塩基配列からみたウイルスの起源

農林水産省農業環境技術研究所 たかはし ま み とりやま しげみつ
高橋 真実・鳥山 重光

はじめに

イネ縞葉枯病は、1900年代初頭から、関東地方を中心に被害が目立ってきたが、1931年になって、ヒメトビウソカによって媒介されるウイルス病であることが明らかにされた(栗林, 1931)。しかし、その後長い間病原ウイルスの粒子を特定することはできなかった。1975年、小金沢らによって、イネ縞葉枯ウイルス(RSV)に感染したイネから枝分れ状の粒子が純化され、RSVは既知のウイルスにない特殊な形態のウイルスとして注目された。その後、鳥山はRSVの新しい純化法を開発し、新たに分離した重い分画(nB)にウイルスの病原性があることを明らかにした。この分画には4種類の一本鎖RNAが含まれることから、RSVは4分節のRNAウイルスであるとした(TORIYAMA, 1982)。

RSVの遺伝子の解析は、1980年代後半から始められ、1993年までに、RSVの4分節のRNAのうち、分子量の小さい3分節のRNAの塩基配列が決定された。その結果、3分節のRNAはすべて、アンピセンスRNAであることがわかった。また、RNAの末端塩基配列が、同じアンピセンスRNAをゲノムとして持つブニヤウイルス科のフレボウイルス属のウイルスと同一であり、RSVは、動物ウイルスであるフレボウイルスと進化の上で関連があることが示唆された。

1994年には、分子量が最大のRNA1の塩基配列を決定し、RNA1には、ウイルスの相補的配列上にRNAポリメラーゼがコードされることがわかった。このRNAポリメラーゼのアミノ酸配列もフレボウイルスと相同性を示したが、約1,500アミノ酸残基の領域で30%と非常に高く、これまでに植物ウイルスと動物ウイルスの配列の相同性が指摘されたものの中で最も高い値であった。これらのRSVの遺伝子解析の結果から、植物ウイルスであるRSV等のテヌイウイルスと動物ウイルスであるフレボウイルスが同一祖先から進化したウイルスであり、かつ、非常に近縁なウイルスであることがわかった。

以下に、RSVのゲノム構造と、テヌイウイルスとフレ

ボウイルスとの関係についてまとめた。なお、アミノ酸配列の相同性検索は、GENE BRIGHT(日立ソフト)によって行った。

I RSVのゲノム

我々が解析を行ったRSVの分離株Tは、ウイルス抵抗性品種ムサシコガネから分離された株であるが、このT株は、4分節のRNAをゲノムとしている。石川らの分離株には、T株と同様な4種のRNAのほか、さらに低分子量のRNA5が検出されると報告された。しかし、最近この低分子RNAは、RNA4と同じ配列を持つサブゲノムであることが明らかとなった(石川・大村, 1996)。

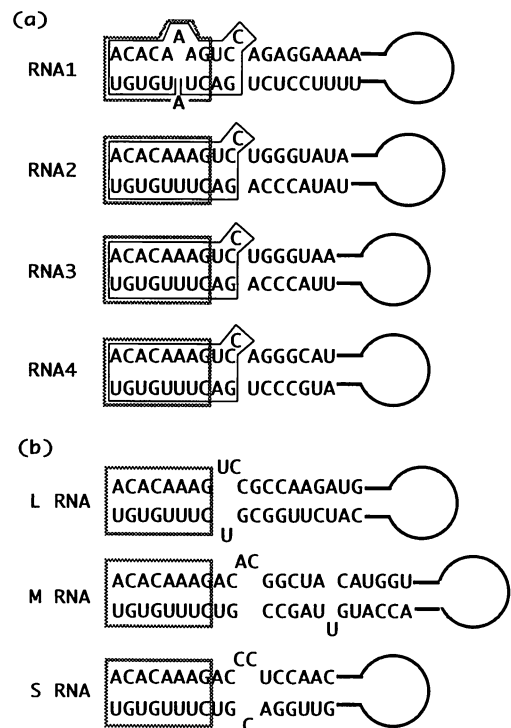


図-1 RSVとフレボウイルス(UUKV)の各RNAの末端塩基配列とパンハンドル構造

(a) RSV, (b) UUKV. □内の配列はRNA1で1塩基が異なるが、RSVの4分節で共通な配列。□内の配列は、テヌイウイルス(RSV)とフレボウイルスで共通な配列。

表-1 RSV の各分節 RNA の塩基数とコードされるタンパク質

分 節 RNA	全塩基数	5'非翻 訳領域 塩基数	3'非翻 訳領域 塩基数	ORF ^{a)} 間の 非 翻 訳 領 域 塩 基 数	RNA にコードされるタンパク質 の分子量(アミノ酸残基)	
					ウイルス鎖	ウイルス相補鎖
1	8,970	57	153	—	—	336,860 (2,919)
2	3,514	80	30	299	22,762 (199)	94,047 (834)
3	2,504	65	92	742	23,874 (211)	35,134 (322)
4	2,157	54	51	654	20,541 (178)	32,474 (286)
合計	17,145	256	226	1,695	67,177 (588)	498,515 (4,361)

a) : オープンリーディングフレーム

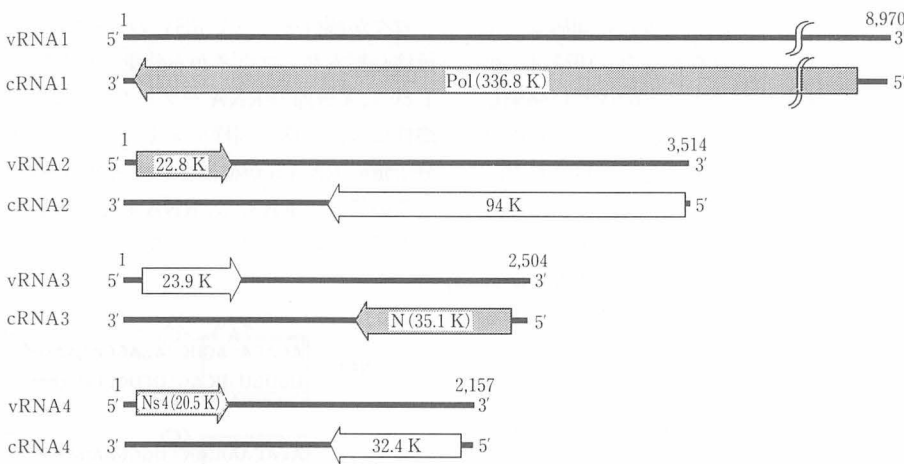


図-2 RSV の全ゲノム構造

RNA の鎖長を塩基数で示し、ゲノム上の ORF を矢印で示した。網掛け矢印は、ORF にコードされるタンパク質の発現が確認されているもので、Pol は RNA ポリメラーゼ、N は外被タンパク質、Ns 4 は感染植物中に封入体をつくる非構造タンパク質。ORF にコードされるタンパク質の分子量を矢印内に記載した。

4 分節の RNA の末端配列は、3' 末端の 10 塩基 (UGUGU^U/_AUCAG-)、5' 末端の 11 塩基 (ACACAAAGUCC-) が共通であった。さらにいずれのゲノムも、約 20 塩基が相補的配列となっており、マイナス鎖ウイルスやアンピセンスウイルスでよく知られているパンハンドル構造をとるものと推察される (図-1) (TAKAHASHI et al., 1990)。

RSV T 株の 4 分節 RNA の累計の塩基数は、17,145 個で、少なくとも 7 個のタンパク質がコードされている。RSV の全ゲノムの分析結果を図-2 と表-1 に示し、詳細については、各 RNA ごとに以下にまとめた。

1 RNA 1

最も分子量の大きい RNA 1 は、8,970 塩基からなり、ウイルス RNA の相補的配列上に、337 kDa のタンパク質をコードする巨大なオープンリーディングフレーム

(ORF) が存在する。この 337 kDa タンパク質のアミノ酸配列は、フレボウイルス属のウイルスの RNA ポリメラーゼである L タンパク質と 1,500 アミノ酸残基の領域で約 30% の高い相同性を示した。その領域の中には、RNA ポリメラーゼのモチーフやロイシンジッパーモチーフが見られる。このような特徴から、RNA 1 に存在する ORF は、RNA ポリメラーゼをコードすることが明らかになった (TORIYAMA et al., 1994)。

一方、RSV の精製粒子は RNA 合成活性を示し、精製粒子より検出される微量成分の 230 kDa タンパク質が RNA ポリメラーゼと考えられた (TORIYAMA, 1986)。しかし、RNA 1 の ORF のアミノ酸配列より計算される値は、337 kDa であり、230 kDa と比較すると分子量において 107 kDa の差がある。その理由は不明であるが、植物を宿主とするブニヤウイルス科のトマト黄化えそウイルス

スにおいても、粒子より検出される RNA ポリメラーゼと、ORF の配列から算出される値との間に 131 kDa の差がみとめられている (DE HAAN *et al.*, 1991)。

2 RNA 2

RNA 1 以外の RNA 2, 3, 4 はいずれも、同一ゲノム上に方向の異なる二つの ORF を持つアンビセンス RNA である。RNA 2 は 3,514 塩基からなり、ウイルス RNA の配列上の 5' 側の ORF と相補的配列上の 3' 側の ORF に、それぞれ 22.8 kDa と 94 kDa のタンパク質がコードされている。94 K タンパク質は、プンタトロウイルスやウルクニミウイルス (UUKV) などのプニヤウイルス科のフレボウイルスのエンベロープを構成する糖タンパク質の約 500 アミノ酸残基の領域と 20% 程度の相溶性がみられた (TAKAHASHI *et al.*, 1993)。RSV 粒子はエンベロープ構造を持たないが、RSV の 94 K タンパク質は、膜タンパク質として重要なアミノ酸配列の疎水性分布が、フレボウイルスのエンベロープの糖タンパク質との間でほぼ似たパターンを示す。

5' 端側の ORF の 22.8 K タンパク質については、最近、遺伝子を大腸菌で発現させ、発現タンパク質に対する抗体を作成し、その抗体を使ったウエスタンブロット法で、ウイルス感染植物での発現が確認されている。しかし、既知のタンパク質のアミノ酸配列と十分な相溶性が見られず、機能は不明である (高橋・鳥山, 1996)。

3 RNA 3

RNA 3 は、2,504 塩基からなる。3' 端の 35.1 kDa タンパク質は外被タンパク質であることが確かめられており、このアミノ酸配列は、フレボウイルスのヌクレオキャプシドタンパク質と約 180 残基の領域で約 20% の相溶性を示した。5' 端の ORF は、23.9 kDa のタンパク質をコードするが、このタンパク質はウイルス感染宿主やウイルス粒子からまだ検出されていない (ZHU *et al.*, 1991; KAKUTANI *et al.*, 1991)。RNA 3 の二つの ORF の間の非翻訳領域は、アデニン(A)やウリジン(U)塩基に富み、707 塩基から 1,011 塩基までの領域でヘアピン構造をとることが可能で、転写のターミネーターとして機能しているのではないかと考えられている。

4 RNA 4

RSV の RNA で最も分子量の小さな RNA 4 は、2,157 塩基からなっており、5' 端側の ORF には、20.5 kDa のタンパク質がコードされ、3' 端側の ORF には、32.4 kDa のタンパク質がコードされている (KAKUTANI *et al.*, 1990; ZHU *et al.*, 1992)。20.5 K タンパク質は、感染葉中に多量に生成される非構造タンパク質で、細胞質中で封入体として観察される (鳥山, 1985)。RAMIREZ ら

(1993)は、RSV の 20.5 K タンパク質に当たる、テヌイウイルス属のオーハーブランカウイルス (RHBV) の 20.1 K タンパク質に、ポティウイルス属のタバコベインモットリングウイルスのヘルパーコンポーネントと相溶性が見られるとして、これらのタンパク質が虫媒感染に関与している可能性を指摘した。

32.4 K タンパク質については、まだ検出されておらず、アミノ酸配列において既知のタンパク質と十分な相溶性がみとめられず、機能は不明である。

5 RSV と他のテヌイウイルスのゲノム

RSV に関する研究の進行とともに、RSV と同様な粒子形態をしたウнка類媒介性ウイルスである、RHBV、トウモロコシストライブウイルス (MStV)、イネグラッシースタントウイルス、欧州コムギストリエートモザイクウイルスに関する論文が相次いで発表され始めた。これらのウイルスグループは、ICTV (国際ウイルス分類委員会) の第六次報告で、テヌイウイルス属として分類されるに至っている。

RHBV のゲノムは、RSV と同じ 4 分節の RNA から構成されており、MStV では、5 分節の RNA から構成されている。RHBV では、RNA 3, 4、MStV では RNA 3, 4, 5 の全塩基配列が決定されている。決定された RNA の末端塩基配列は、RNA 3, 4 では、5' 末端 17, 18 塩基、3' 末端 16 塩基が、RSV のものと共通であり、RSV には存在しない MStV の RNA 5 の末端配列も RSV の RNA 1 と 5' 末端 11 塩基、3' 末端 10 塩基の配列が同じであった。また、RHBV、MStV の RNA 3 および RNA 4 は、いずれも RSV と同じアンビセンス RNA であり、それぞれ対応する ORF のタンパク質は、分子量がほぼ等しく、アミノ酸配列が、RSV のタンパク質と 49~76% の高い相溶性を示す (RAMIREZ *et al.*, 1994)。これらの結果をみるかぎり、テヌイウイルス属のウイルスは、基本的には、同じゲノム構造をしている。

MStV は、RSV には見られない RNA 5 をゲノムとして持っているが、このゲノムは相補的配列上に単一の ORF を持つ RNA であり、塩基性のアミノ酸に富むタンパク質がコードされている。しかし、このタンパク質のアミノ酸配列は、既知のタンパク質と十分な相溶性が認められず、機能は不明である。

II テヌイウイルスの起源

RSV の遺伝子解析の結果、各ゲノム RNA の末端塩基配列にプニヤウイルス科のフレボウイルスと相溶性が認められ、また、RSV のゲノムにコードされる三つのタンパク質においても、フレボウイルスのタンパク質と相同

性が見られた。

ウイルス末端塩基配列は、ウイルス RNA の複製、転写、粒子の形成に深くかかわっていると考えられ、各ウイルスでよく保存された配列となっている。ブニヤウイルス科では、五つのウイルス属それぞれが、特有の共通末端塩基配列を持っている (SCHMALJOHN and PATTERSON, 1991)。テヌイウイルスの末端塩基配列は、両末端から 8 塩基が、フレボウイルス属の末端共通配列と一致した (図-1)。

RSV の外被タンパク質と 94 K タンパク質のフレボウイルスタンパク質とのアミノ酸配列の相同性はいずれも約 20% であった。一方、RSV の RNA ポリメラーゼとフレボウイルスの RNA ポリメラーゼである L タンパク質の相同性は非常に高い。RSV と UUKV では、1,554 アミノ酸の範囲で、30.6%、リフトバーレー熱ウイルス (RFV) では、1,427 アミノ酸で、30.1% であり、RNA ポリメラーゼの RSV とフレボウイルスの相同性は、同じフレボウイルスどうしの値に準じる高い値であった (図-3)。この RNA ポリメラーゼ遺伝子の高い相同性は、RSV とフレボウイルスが、同じ祖先ウイルスから進化したウイルスであることを強く示唆するものである。

ブニヤウイルス科のウイルスの性質を表-2 にまとめて示した。

ブニヤウイルス科は動物を宿主とするブニヤウイルス属、ハンタウイルス属、ナイロウイルス属、フレボウイ

ルス属と、植物を宿主とするトスポウイルス属の五つのウイルス属から構成されている。ハンタウイルスは、ネズミによって媒介されるが、ブニヤウイルス、ナイロウイルス、フレボウイルスは、いずれもカ、サシチョウバエ、ダニ等の節足動物で伝搬され、家畜やヒトに熱病、肝炎、脳炎などの症状を引き起こす病原ウイルスである。また、数種の虫媒伝染性ウイルスで、経卵伝染することが確認されており (GONZALEZ-SCARANO et al., 1991)、テヌイウイルスがウンカで伝搬され、かつ経卵伝染するのとは一致する。

トスポウイルス属は、アザミウマによって伝搬され、植物を宿主とするウイルス属であるが、最近ブニヤウイルス科に分類された。このトスポウイルスの L タンパク質は、ブニヤウイルスの L タンパク質と 22.1% の相同性を示すが、フレボウイルスや RSV の RNA ポリメラーゼタンパク質との相同性は見られない (図-3)。

ブニヤウイルス科のウイルスは、いずれも 3 分節の RNA をゲノムとし、ヌクレオキャプシドがエンベロープで被われた球状粒子であるが、テヌイウイルスは紐状粒子であり、これまでウイルス感染組織内にエンベロープを被った球状粒子は観察されていない (SUZUKI et al., 1992)。RSV の 94 K タンパク質は、フレボウイルスのエンベロープを構成する糖タンパク質の前駆体と相同性が見られたが、フレボウイルスの糖タンパク質の前駆体は、アミノ酸数が少ない UUKV でも 1,008 アミノ酸である

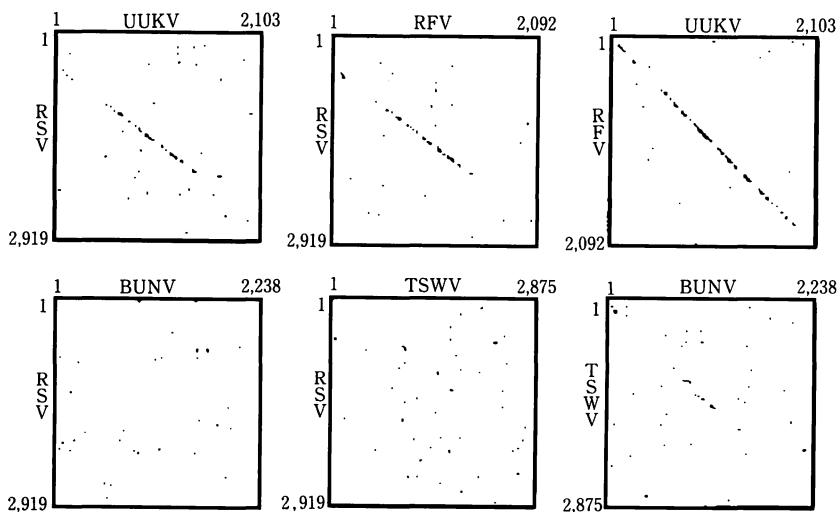
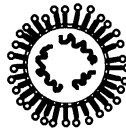
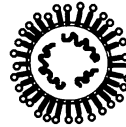


図-3 イネ縞葉枯ウイルスの RNA ポリメラーゼとブニヤウイルス科の L タンパク質のホモロジープロット

RSV: イネ縞葉枯ウイルス, UUKV: ウクニミウイルス, RFV: リフトバーレー熱ウイルス, BUNV: ブニヤウイルス (ブニヤウイルス属), TSWV: トマト黄化えそウイルス。

表-2 テヌイウイルスとブニヤウイルスの性状

ウイルスの所属	ウイルス粒子	分節 RNA ^{a)}	媒介動物	ウイルスが起こす主な病気
(科は未定) テヌイウイルス属		RNA 1 - RNA 2 +/- RNA 3 +/- RNA 4 +/- RNA 5 ^{b)} -	ウンカ	イネ縞葉枯病, オーハブラン カ病, グラッシースタント病, トウモロコシストライブ病
ブニヤウイルス科 ブニヤウイルス属 ナイロウイルス属 ハンタウイルス属 フレボウイルス属		L RNA - M RNA - S RNA ^{c)} -, +/-	蚊, ヌカガ, サシチョウバエ, ダニ, ネズミ	カリフォルニア脳炎, クリミ ア・コンゴ熱, サシチョウバ エ熱, リフトバレー熱, 腎 症候性出血熱
トスポウイルス属		L RNA - M RNA +/- S RNA +/-	アザミウマ	トマト黄化えそ病

^{a)} : - はマイナス鎖 RNA, +/- はアンビセンス RNA を示す。

^{b)} : トウモロコシストライブウイルスには, RNA 5 が存在する。

^{c)} : フレボウイルス属の S RNA は, アンビセンス RNA であり, 他のウイルス属では, マイナス鎖 RNA である。

のに対し, 94 K タンパク質は, 834 アミノ酸であり, エンベロープを構成するため必要な部分を欠失した可能性も考えられる。

最近, 植物ウイルスに特異的に見られる細胞間移行タンパク質が注目されている。ウイルス RNA が細胞間の原形質連絡を通過する際に, 介助する役割をするタンパク質で, 植物ウイルスでは, 不可欠なタンパク質と考えられている。動物ブニヤウイルスの M RNA はウイルス RNA の相補的配列上に単一の ORF が存在するが, トスポウイルスの M RNA はアンビセンス RNA で, 相補的配列上の ORF 以外に, 動物ブニヤウイルスの M RNA には見られない ORF が存在する。最近この ORF にコードされるタンパク質が, 移行タンパク質であることが明らかとなった。トスポウイルスが, どのような過程を経て, 移行タンパク質遺伝子を獲得したのか興味深い。

現在, テヌイウイルスがコードするタンパク質の多くは, その機能が不明である。これらのタンパク質の役割が明らかになれば, テヌイウイルスがどのような進化を遂げたのか, また, フレボウイルスとの進化上の関係についてもさらに理解が深められるものと考えている。

おわりに

RSV の遺伝子解析の結果, これまで謎の多かった RSV は, 動物ウイルスのフレボウイルスと同じ祖先ウイルスから分岐してきたことが明らかになった。一方では, ウイルス RNA の複製や転写機構の解明が大幅に加速さ

れ, ウイルスがコードするタンパク質の機能解析へと研究が進められている。ウイルスの病原性や宿主の抵抗性の分子機構が解明され, イネ縞葉枯病防除のための技術開発へつながることを期待している。

引用文献

- 1) DE HAAN, P et al. (1991): J. Gen. Virol. 71: 2207~2216.
- 2) GONZALEZ-SCARANO, F. et al. (1991): Bunyaviridae: 217~249, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg.
- 3) 石川浩一・大村敏博 (1996): 平成 8 年度日本植物病理学会大会講演要旨予稿集: 165.
- 4) KAKUTANI, T. et al. (1990): J. Gen. Virol. 71: 1427~1432.
- 5) ——— et al. (1991): ibid. 72: 465~468.
- 6) 小沢碩城ら (1975): 日植病報 41: 148~154.
- 7) 栗林数衛 (1931): 長野農試報 2: 45~69
- 8) RAMIREZ, B.-C. et al. (1993): J. Gen. Virol. 74: 2463~2468.
- 9) ——— and A. -L. HAENNI (1994): ibid. 75: 467~475.
- 10) SCHMALJOHN, C. S. and J. L. PATTERSON (1991): Fundamental Virology 2nd ed.: 545~564, Raven Press, Ltd., New York.
- 11) SUZUKI, Y. et al. (1992): Ann. Phytopath. Soc. Japan 58: 480~484.
- 12) TAKAHASHI, M. et al. (1990): J. Gen. Virol. 71: 2817~2821.
- 13) ——— et al. (1993): ibid. 74: 769~773.
- 14) 高橋真実・鳥山重光 (1996): 平成 8 年度日本植物病理学会大会講演要旨予稿集: 164
- 15) 鳥山重光 (1985): 植物防疫 39: 508~514
- 16) TORIYAMA, S. (1982): J. Gen. Virol. 61: 187~195.
- 17) ——— (1986): ibid. 67: 1247~1255.
- 18) ——— et al. (1994): ibid. 75: 3569~3579.
- 19) ZHU, Y. et al. (1991): J. Gen. Virol. 72: 763~767.
- 20) ——— et al. (1992): ibid. 73: 1309~1312.