

カブモザイクウイルスの分子進化と生態

—ゲノム情報からの追跡—

佐賀大学農学部 ^{おお}大 ^{しま}島 ^{かず}一 ^{さと}里

はじめに

1980年代からヒト、植物、線虫、病原体そしてウイルスゲノムの構造解析が始まり、2000年ころまでに代表的なウイルス種についてゲノム構造が明らかとなった。その後シーケンス技術の急速な進歩により、動物ウイルスでは様々な種の分離株が地球規模で採集され、各国で発生が見られるウイルス分離株のゲノム型について大量に解析される時代となった。同時に、それらの塩基配列に隠された情報をコンピュータにより解析するバイオインフォマティクス（生物情報学）と呼ばれる新しい学問が生まれ現在も急速な勢いで発展を遂げている。

考古学では遺跡から見つかる人骨などを分析することで人類の進化について論議されるが、化石が見つからないウイルスの進化や生態は、どのようにして調べたらよいのであろうか。DNA人類進化学ではミトコンドリアゲノムの変異（分子化石）から人類の進化や生態を推測し、これまでの数多くの常識を覆してきたが、ウイルスゲノムにもこのような足跡が刻まれているのでこれをたどることが可能である。すなわち、ゲノム中の突然変異や組換えを最新のバイオインフォマティクスを用いて分子進化学的に、生態学的に、集団遺伝学的に調査することにより、ウイルスの進化や生態は探れるのである。

I ウイルスの分子進化学的・生態学的研究

動物ウイルスの拡散を未然に防ぐにはワクチンの製造が欠かせない。また最近「トリインフルエンザウイルスが新型インフルエンザウイルスになるのではないかと世間を騒がせているが、おそらく進化の三大推進力（突然変異、組換え、再集合）の組合せと思われるが実はそのメカニズムがわかっていない。このような理由でインフルエンザウイルスやヒト免疫不全ウイルスの分子進化学的・生態学的研究が早くから開始され、現在では各国で発生している分離株のゲノム型がおおよそわかっている。その研究を追いかけるようにいくつかの植物ウイルス

分離株も世界規模で採集されるようになり、ゲノムの一部や全領域について大量に解析され出した。例えばDNAウイルスでありエマージングウイルス（新興ウイルス）のジェミニウイルス科ベゴモウイルス属のトマト黄化葉巻ウイルス（TYLCV）、1本鎖RNAウイルスでアフリカのイネに被害を与えているソベモウイルス属の *Rice yellow mottle virus* (RYMV)、そして1本鎖RNAウイルスで、世界中の農作物に甚大な被害を与えているポティウイルス属のカブモザイクウイルス (*Turnip mosaic virus*; TuMV) などがその代表である。網羅的に解析されたゲノムの塩基配列を追跡することにより、どのような新しい情報を我々に提供してくれるのだろうか。TuMVは宿主域がとて広く世界中に分布しており、このような古い進化的歴史をもつと思われるウイルスを研究材料として調査することは、TuMVの過去・現在そして未来だけでなく、他のウイルスの進化についても何かを伝えてくれそうである。我々がここ数年で得たTuMVの分子進化と生態にかかわる成果について紹介する。

II カブモザイクウイルス

1 歴史と生物学的な性状

TuMVは、アフリカ、アジア、ヨーロッパ、オセアニア、南北アメリカなどの温帯、亜熱帯など世界中に広く分布しており、最近ではアラスカでも分離された (OHSHIMA et al., 2002)。本ウイルスは植物ウイルスとしては最も大きい科であるピコルナ様スーパーグループのポティウイルス科、ポティウイルス属に含まれる。1921年にアメリカで初記載され、その後日本などのアジア諸国でも発見された。当初、野菜や園芸植物の病徴に基づいて様々なウイルス名がつけられた。例えば、Anemone mosaic virus, Cabbage A virus, Cabbage black ring virus, Daikon mosaic virus, Horseradish mosaic virus など*である。アブラムシで非永続的に伝播され、野菜の重要病害ウイルスとしてキュウリモザイクウイルスに次いで2番目にランクされ (WALSH and JENNER, 2002)、アブラナ科植物であるカリフラワー、ブ

Molecular Evolution and Ecology of *Turnip mosaic virus*. By Kazusato OHSHIMA

(キーワード：分子進化、生態、カブモザイクウイルス、ゲノム情報)

* 以上は現在シノニムとされる。

ロッコリー、キャベツ、ハクサイそしてダイコンなどにモザイク症状、えそ症状、時には黄色斑点などを呈する。またアブラナ科植物以外の植物、例えばユリ科やキンポウゲ科植物などにも感染し、ポティウイルスの中でも特に広い宿主域をもつことで知られ、最近ではバイオ燃料を生産する植物に被害を起すために注目されている。

2 ゲノム構造

TuMV は約 720 nm の粒子で、そのゲノムは 1 本鎖プラス RNA で約 9,830 塩基から構成されている。このゲノムから大きなポリタンパク質が翻訳され、第 1 タンパク質 (P1)、ヘルパー成分プロテアーゼタンパク質 (HC-Pro) さらに核内封入体 a-タンパク質 (NIa-Pro) によりプロセッシング (分解) され、最低 10 種類の成熟したタンパク質、P1、HC-Pro、第 3 タンパク質 (P3)、6 キロダルトン 1 タンパク質 (6K1)、筒状封入体タンパク質 (CI)、6 キロダルトン 2 タンパク質 (6K2)、ゲノム結合タンパク質 (VPg)、NIa-Pro、核内封入体 b タンパク質 (NIb) さらに外被タンパク質 (CP) が産生されると考えられている。それぞれの遺伝子は様々な役割をしているが、例えば HC-Pro 遺伝子は、アブラムシの伝搬性やサイレンシングの抑制に関与し、NIb 遺伝子は子孫を残すための複製に、CP 遺伝子はアブラムシの伝搬性やウイルス粒子の会合に関与している。以上は TuMV だけではなくポティウイルス一般のゲノム構造とその機能であるが、ポティウイルスのタイプ種としては、ジャガイモやタバコに感染しナス科植物に大きな被害を与えているジャガイモ Y ウイルスがあげられる (OGAWA et al., 2008)。

3 分子系統樹に見られるゲノム型グループ

動物ウイルスは各国の大学や保健機関に過去のそして現在流行している分離株が大量に保存されて整備されている。一方、植物ウイルス分離株を保存している大学や農業関係の機関は少なく国内外から収集するのが困難であったが、世界の多数の研究者の協力を得て、主に我が国を含めたユーラシア大陸からの分離株であるが、現在まで数百分離株を採集した。筆者もこれまでトルコやイランなど国内外含めて 4 万キロ以上を調査した (KORKMAZ et al., 2008 ; FARZADFAR et al., 2009)。

まず地域と病原性を考慮して 76 分離株を選抜し、TuMV ゲノムの両端に位置し最も変異が多い遺伝子と考えられている P1 遺伝子とポティウイルスで最も研究が進展している CP 遺伝子 (合計約 2,000 塩基、ゲノムの 20%) について塩基配列を決定後、世界に発生している TuMV の生物学的な性状を調査し、分子系統関係を描いた (OHSHIMA et al., 2002)。その結果、本ウイルスには最低大きな 4 ゲノム型グループが存在することが明らかとなった (図-1)。すなわちアブラナ科植物以外の植物から採集され、まれにアブラナ (*Brassica*) 属植物 (ハクサイ、カブ、キャベツ、ナタネなど) に病原性をもち地中海地方から中東を含めた南西ユーラシア大陸地方で採集された分離株から構成される祖先型と思われるグループ (basal-B ; basal-*Brassica*)、アブラナ属に病原性をもちアブラナ植物に宿主適応したと考えられヨーロッパやアジアなどの世界中の分離株から構成されるグループ (world-B ; world-*Brassica*)、アブラナ属植物だけでなくダイコン (*Raphanus*) 属植物に病原性をも

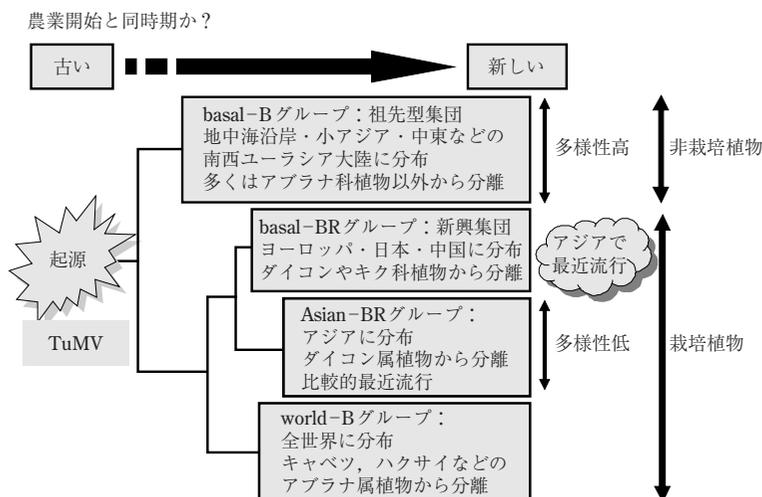


図-1 カブモザイクウイルスの分子系統樹の略図
現在 4 ゲノム型グループが存在する。

ちダイコン属植物にも適応したと考えられるアジア分離株から構成されるグループ (Asian-BR ; Asian-*Brassica/Raphanus*), さらにアブラナ属植物のみならずダイコン属植物に病原性をもちヨーロッパや日本のダイコン属植物あるいはキク科植物 (レタス, キンセンカなど) に宿主適応したと考えられ, 我が国においては最近突発的に拡散したと思われる分離株から構成されるグループ (basal-BR ; basal-*Brassica/Raphanus*) が存在する。また TuMV の分子進化には組換えが深く関与していることが明らかとなった。したがってアブラナ属栽培植物に感染できるようになった TuMV が, 起源地と考えられる地中海沿岸地方, 小アジアから中東の南西ユーラシア大陸から突然変異, 組換え, 宿主適応 (宿主との共進化) し, さらに分離株の地理的隔離, 病原性の地理的隔離を行いながら, 現代の農作物に大きな影響を受け, 世界中のアブラナ属植物栽培地域に拡散し, 一方アジア地方へはアブラナ属植物だけでなくダイコン属植物に対する病原性を獲得し拡散してきたと思われる (図-2)。

4 組換え

約 40 分離株の全ゲノム構造を決定した (TOMIMURA et al., 2003)。組換え部位はゲノムの様々な部位に存在し必ずしも遺伝子の境界には存在しなかった。明瞭な組換え部位をもっていた組換え体は, アブラナ属植物だけでなくダイコン属植物に病原性をもつ BR (*Brassica/Raphanus*) 宿主型であり, このような明瞭な組換え部位をもつ分離株は東アジアに多く見られた。一方突然変異が時間の経過とともに蓄積することから昔起きた組換え部位は不明瞭となると思われるが, このような不明瞭

な組換え部位をもつ組換え体はヨーロッパに多く見られた。以上の結果と分子系統樹の結果を総合的に考察すると, 東アジアへの侵入は比較的最近のことと思われた。

さらに東アジアを中心に約 90 分離株についてゲノム一部領域 (ゲノム長の 30%) の塩基配列を決定し, 組換え部位について調査した結果, 3分の2は組換え体であった (TAN et al., 2004)。多くの組換え部位は, 異なる東アジア地方で採集した分離株間で同一の組換え部位を共有していたことから, 様々な地域で同一部位の組換えが別々に起きたと結論するよりもむしろ一度できた組換え体が東アジア地方に広まったと考えられた。以上から, 組換えは TuMV ゲノムで頻繁に見られることを証明し, 分子系統樹と同様に組換え部位もウイルス拡散の追跡調査に有効と結論した。その後約 100 分離株について全ゲノム構造を調査した結果, 組換えホットスポット (組換えが頻繁に見られる領域) が P1 遺伝子と CI の C 末端から VPg 遺伝子領域の 2 箇所に存在することを明らかにし (OHSHIMA et al., 2007), 本報告は自然界から採集したウイルスに見られるホットスポットの最初の報告であるが, 組換えが新しい宿主に感染するために重要な役割をしていることを示唆した。

5 ヨーロッパと東アジアの集団遺伝構造

約 140 分離株を用いてユーラシア大陸のヨーロッパと東アジアの集団について, 植物体での反応, さらに両地方の集団遺伝構造について分子進化的に比較した (TOMIMURA et al., 2004)。ヨーロッパ分離株の多くは, アブラナ属植物のみに感染したが, 東アジア分離株はアブラナ属植物だけでなくダイコン属植物にも感染した。また組換え部位は P1 遺伝子内に多く見られたが, 組換え

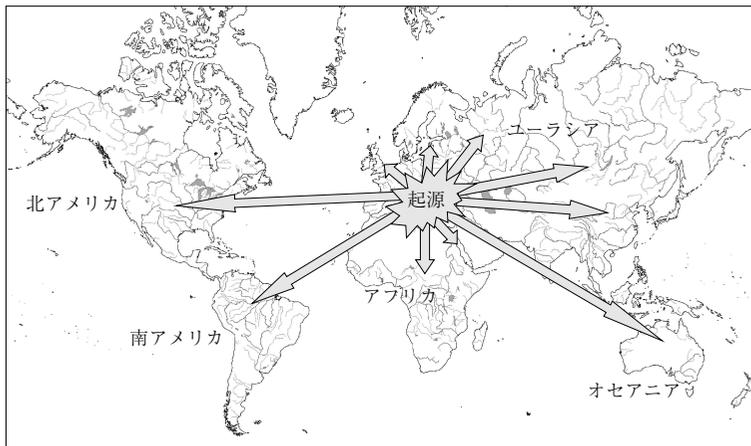


図-2 カブモザイクウイルスの世界への拡散
突然変異, 組換えが関与し, 起源地から5大陸へ拡散した。

部位の位置はヨーロッパと東アジアの分離株では異なっていた。さらに遺伝的多様性について解析すると、ヨーロッパのほうが東アジアの集団より多様であったが、宿主からの選択圧を探る解析では、東アジアのみに見られる Asian-BR グループのいくつかの遺伝子で非同義置換/同義置換比が大きかったことから、おそらく東アジアでよく栽培されているダイコン属植物に強い影響を受け、起源地から拡散してきたと思われた。したがってヨーロッパと東アジア集団の TuMV はほとんど異なる集団であったことから、それぞれの地方に異なる進化をして拡散したことが推測され、それらの集団遺伝構造には創始者効果 (隔離された個体群が新しく作られるときに、新個体群の個体数が少ない場合、元になった個体群とは異なった遺伝子頻度の個体群ができること) が影響したように思われた。

6 中華人民共和国と日本の集団遺伝構造

中華人民共和国と主に日本の九州より収集した約 120 分離株を生物学的に解析した。温室内で分離株ごとの病原性について検討した結果、アブラナ属植物から採集した中国産分離株の多くの TuMV はダイコン属植物への感染は見られず、一方日本産分離株ではアブラナ属とダイコン属植物の両方に感染性を示した。2 国間において TuMV 集団の宿主適応の違いを示している現象のように思われた。両国間の遺伝学的な調査から、中国と日本の TuMV は一部が同じ集団であったことから、おそらくこれらの集団は中国と日本で過去になんらかの関係があったと思われた。一方中国では確認されていなかったゲノム型 (basal-BR グループ) が、九州地方で 2000 年以降突然優勢となった。TuMV はアブラムシにより伝染するため、拡散は比較的緩やかに進むと思われるが、今回の調査では短期間に突発的に拡散している事実が確認されたことから、本ウイルスが種子伝染する可能性も否定できず、今後の課題と思われた。興味深いことに、その集団は最近中国で日本に遅れて確認された。この集団がどのようなルートで双方の国に侵入したのか、メタ個体群 (似たようなあるいは同一の集団が地理的に離れた土地で点在して存続していること) との関連性についても今後検討していきたい。以上の研究は、中国と日本の 2 国間の植物ウイルスの関連性について、最初に報告した例と思われる。

九州と本州中央部の集団遺伝構造について解析した (Tomitaka et al., 2007)。basal-BR 集団が九州と同様本州中央部でも優勢であり、その集団の中にいくつかのサブ集団が認められ、それぞれの地方では別々の basal-BR サブ集団が拡散していたことから、我が国のような

小さな国においても罹病植物の移動には細心の注意が必要であることを示唆した。

III 今後の課題

以上の研究は、一ウイルス種についての研究ではあるが、おそらく他のウイルスも遠からず似たような進化をしており、植物ウイルスの分子進化学的・生態学的研究の見本となり得る研究と期待する。しかしながら世界で発生して農作物に大きな被害を及ぼしているウイルス分離株のゲノム型を網羅的に把握することは、各国で分子指紋を作成することであり、絶えず国境を越えようとねらっているウイルスに将来対抗できる糸口となるかもしれない。また抵抗性植物の育種への応用、インフルエンザウイルスで試みられているように将来のゲノムレベルでの発生予測などへの応用などが考えられ、分子進化学的・生態学的研究は、将来、植物防疫に貢献できるかもしれない。

おわりに

人間に感染するいくつかのウイルスでは、人類の移動との関連性について論じられている。一方植物ウイルスでは、人類が栽培する農作物を決めていることから、栽培作物や農業の拡散ルートそして人類の移動などにも強い影響を受けて今日まで進化・拡散してきたと想像される。最近、ウイルスの突発的拡散と農業との関連に関する報告がされた (Gibbs et al., 2008)。おそらく分子進化学的・生態学的研究のこれからの大きな課題の一つは、ウイルス拡散と時間的な関係の解明である。

ウイルスの解明は、ウイルス学はもちろん従来の植物ウイルス病学や植物病理学そして植物生態学、作物学、育種学、昆虫学など農業に関係する学問だけでは解明できないことが多く、例えばここに示した分子進化学、分子生態学、集団遺伝学そして生物情報学などの学問融合が必要なかもしれない。今後様々な学問を積極的に取り入れて、いまだほとんどわかっていないであろうウイルスについて、特に分子進化と生態について、これからも明らかにしていきたいと考えている。

最後に、TuMV との「出会い」を提供していただいた元佐賀大学学長佐古宣道先生、共に研究した富村健太博士 (果樹研究所)、譚 鐘揚博士 (中国湖南大学)、富高保弘博士 (中央農業総合研究センター) をはじめ多くの卒業生に厚くお礼申し上げる。なお、これらの一連の研究には世界中の多くの研究者に分離株分譲などの協力をしていただき、特にオーストラリア国立大学名誉教授の Adrian J. Gibbs 博士にはバイオインフォマティクス

のご指導と激励を、イギリスヴォーリック大学国際園芸研究所の John A. WALSH 博士にはヨーロッパ分離株の分譲とご助言をいただいた。心から厚くお礼申し上げます。

引用文献

1) OHSHIMA, K. et al. (2002): J. Gen. Virol. 83: 1511 ~ 1521.
 2) WALSH, J. A. and C. E. JENNER (2002): Mol. Pl. Path. 3: 289 ~ 300.
 3) OGAWA, T. et al. (2008): Virus Res. 131: 199 ~ 212.
 4) KORKMAZ, S. et al. (2008): Pl. Path., DOI 10: 1111/j.1365-3059.

2008.01902.x.

5) FARZADFAR, S. et al. (2009): Eur. J. Pl. Path., 印刷中.
 6) TOMIMURA, K. et al. (2003): Mol. Ecol. 12: 2099 ~ 2111.
 7) TAN, Z. et al. (2004): J. Gen. Virol. 85: 2683 ~ 2696.
 8) OHSHIMA, K. et al. (2007): ibid. 88: 298 ~ 315.
 9) TOMIMURA, K. et al. (2004): Virology 330: 408 ~ 423.
 10) TOMITAKA, Y. and K. OHSHIMA (2006): Mol. Ecol. 15: 4437 ~ 4457.
 11) ——— et al. (2007): J. Gen. Pl. Path. 73: 197 ~ 208.
 12) GIBBS, A. J. et al. (2008): PLoS ONE 3(6): 1 ~ 11, e2523.

(新しく登録された農薬 20 ページからの続き)

いちご：ハダニ類：収穫前日まで
 すいか：ハダニ類：収穫前日まで
 なす：ハダニ類：収穫前日まで
 茶：カンザワハダニ：摘採 7 日前まで
 ●シエノピラフェン・ピリダベン水和剤
 22306：バリユースターフロアブル（日産化学工業）
 08/11/27
 シエノピラフェン：20.0%，ピリダベン：15.0%
 かんきつ：ミカンハダニ，サビダニ類：収穫 7 日前まで

〔殺虫殺菌剤〕

●シフルトリン・ピテルタノールエアゾル
 22297：アースガーデン WQ（アース製薬）08/11/19
 シフルトリン：0.020%，ピテルタノール：0.075%
 ばら：うどんこ病，アブラムシ類，チュウレンジハバチ，黒星病：—
 きく：白さび病，黒さび病，褐斑病，アブラムシ類：—
 つつじ類：ツツジグンバイ：—
 つばき類：チャドクガ：—
 はばたん：アオムシ：—

〔殺菌剤〕

●イプロジオン水和剤
 22288：ロブラールフロアブル（バイエルクロップサイエンス）08/11/19
 22289：日産ロブラールフロアブル（日産化学工業）08/11/19
 イプロジオン：24.8%
 日本芝：疑似葉腐病（春はげ症）：休眠期前及び萌芽前
 日本芝：疑似葉腐病（象の足跡），葉腐病（ラージパッチ），ヘルミントスポリウム葉枯病：発病初期
 西洋芝（パーミュダグラス）：ヘルミントスポリウム葉枯病：発病初期
 西洋芝（ベントグラス）：葉腐病（ブラウンパッチ）：発病初期
 西洋芝（ベントグラス）：疑似葉腐病（イエローパッチ）：秋～春期
 西洋芝（ベントグラス）：雪腐小粒菌核病，紅色雪腐病：根雪前
 西洋芝（ブルーグラス）：雪腐小粒菌核病，紅色雪腐病：根雪前
 西洋芝（ライグラス）：雪腐褐色小粒菌核病，紅色雪腐病：根雪前
 ●ピラクストロピン・ボスカリド水和剤
 22290：シグナム WDG（BASF アグロ）08/11/19
 ピラクストロピン：6.7%，ボスカリド：26.7%
 なす：すすかび病：収穫前日まで
 すいか：炭疽病，うどんこ病，つる枯病：収穫前日まで

かぼちゃ：うどんこ病：収穫前日まで
 ●ポリカーバメート水和剤
 22293：ビスダイセン水和剤（ダウケミカル）08/11/19
 ポリカーバメート：85.0%
 小粒種ぶどう（露地栽培）：晩腐病，さび病，褐斑病，黒とう病，つる割病：収穫 60 日前まで
 大粒種ぶどう：晩腐病，さび病，褐斑病，黒とう病，つる割病：収穫 95 日前まで
 おうとう：灰星病，褐色せん孔病：収穫 30 日前まで
 うめ：黒星病：収穫 30 日前まで
 りんご：斑点落葉病，すす点病，すす斑病：収穫 60 日前まで
 なし：黒星病，黒斑病，輪紋病，赤星病，ニセナシサビダニ：収穫 45 日前まで
 かき：落葉病，炭疽病：収穫 45 日前まで
 かき：炭疽病：休眠期
 もも：黒星病，灰星病，せん孔細菌病：収穫 45 日前まで
 もも：せん孔細菌病：休眠期
 もも：縮葉病：発芽前
 かんきつ：黒点病，そばかす病，黄斑病，かいよう病：収穫 60 日前まで
 くり：実炭疽病：裂果前
 すいか：褐斑細菌病，炭疽病，べと病：収穫 7 日前まで
 まくわうり：炭疽病，べと病：収穫 30 日前まで
 かぼちゃ：炭疽病，べと病：収穫 30 日前まで
 メロン：炭疽病，べと病，斑点細菌病，つる枯病：収穫 3 日前まで
 トマト：葉かび病，疫病，輪紋病：収穫前日まで
 きゅうり：黒星病，べと病，炭疽病，褐斑病，斑点細菌病：収穫前日まで
 たまねぎ：べと病，軟腐病，白色疫病，灰色腐敗病，灰色かび病：収穫 21 日前まで
 はくさい：べと病，黒斑病，白斑病，軟腐病：収穫 30 日前まで
 未成熟そらまめ：赤色斑点病：収穫 30 日前まで
 茶：炭疽病，網もち病，白星病，もち病，赤焼病：摘採 21 日前まで
 レタス：腐敗病，斑点細菌病，べと病：収穫 14 日前まで
 ばれいしょ：疫病，夏疫病，軟腐病：収穫 14 日前まで
 セルリー：斑点病，軟腐病：収穫 30 日前まで
 らっきょう（エシャロット栽培を除く）：白色疫病：開花後 60 日まで
 ほうれんそう：べと病：本葉 2 葉期まで 但し，収穫 45 日前まで
 たばこ：赤星病：—
 ばら：黒星病：—
 ●シプロコナゾールくん煙剤
 22301：日曹アルトくん煙剤（日本曹達）08/11/19
 (30 ページに続く)