

特集：植物ウイルス病防除技術開発最前線—イネ萎縮ウイルス—

ウ イ ル ス 合 成 工 場 の 分 子 解 析

中央農業総合研究センター おおむら としひろ ウェイ タイ ユン いち き うへはら たまき しみず たくみ
大村 敏博・Wei Taiyun・一木(植原) 珠樹・清水 巧

は じ め に

植物ウイルス病の防除には、伝染源の除去、媒介昆虫の駆除、抵抗性品種の利用、ウイルスワクチンの使用などが挙げられる。伝染源の除去やウイルスワクチンの使用には多大な労力を必要とする。農業による媒介虫の駆除には環境汚染の問題が伴う。抵抗性品種は遺伝資源が限られており、また長期間使用すると、それを侵すウイルス系統が出現し、利用できなくなるなど、それぞれの問題を抱えている。

ウイルスは宿主の代謝系を利用して複製するため、その制御は極めて困難である。そのため、宿主細胞内におけるウイルスの分子動態に関する情報に基づき、ウイルスの活動を制御することによってウイルス病を防除する技術の開発は、ウイルス研究における大きな目標の一つである。

動物ウイルスでも、最近になって、タミフルなど少数の薬剤が実用化されたばかりである。植物においては、パパイヤリングスポットウイルスの外被タンパク質を過剰発現するパパイヤが本ウイルスに対して抵抗性を示すケースなど、数例の成功例がある。しかし、本法は確実に植物に抵抗性を誘導するものではない。

本稿では、イネ萎縮ウイルス (RDV) を対象とし、ウイルスの複製にとって重要な役割をもつウイルスタンパク質の機能を抑制することによってウイルス抵抗性をイネに誘導する目的で、本ウイルスが有する全 12 種タンパク質の機能とウイルス複製における役割について解析した結果を紹介する。

I イネ萎縮ウイルスに関する原子、分子情報

RDV は媒介昆虫ツマグロヨコバイで増殖した後にイネに感染する植物の病原ウイルスである。我が国では、年間 40 万 ha で発生したことがあるほどの重要病原である。本ウイルスは媒介昆虫で、卵を通じて高率に維持

される性質などがあるため、いったん大発生すると数年間持続する傾向がある。

本ウイルスは内殻粒子とそれを包む外殻タンパク質層から構成され、12 本に分節した 2 本鎖 RNA をゲノムとし、各 RNA が 1 種類のタンパク質をコードしている (口絵①)。ウイルスタンパク質のうち、7 種類はウイルス粒子を構成する構造タンパク質であり (口絵①)、残りの 5 種類はウイルス構築を助けるが、粒子の成分にはならない非構造タンパク質である。これまでに、構造タンパク質、P1, P2, P3, P5, P7, P8, P9 について、図-1 に示す機能がわかっている。本研究では残りの非構造タンパク質 (Non-structural protein) Pns4, Pns6, Pns10, Pns11, Pns12 の機能を解析するとともに、感染細胞内における全 12 種タンパク質の発現の場所、順序およびウイルス複製の過程における役割を明らかにした。

本ウイルスの主要構造タンパク質が、各タンパク質に刻印された原子レベルでの構造特性によって自己集合し、ウイルス粒子を構築するプロセスについては他の報告を参照されたい (NAKAGAWA et al., 2003; 大村ら, 2005)。

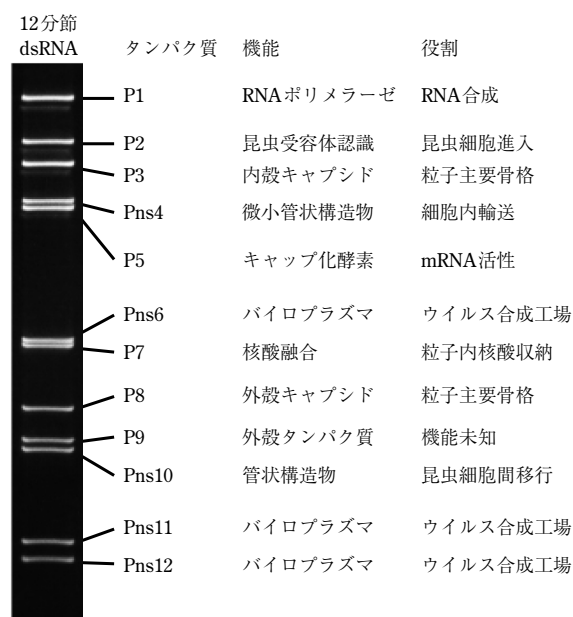


図-1 イネ萎縮ウイルスの各タンパク質の機能と役割

Molecular Analysis of Rice dwarf virus Replication. By
Toshihiro OMURA, Taiyun Wei, Tamaki UEHARA-ICHIKI and Takumi
SHIMIZU

(キーワード：イネ萎縮ウイルス、ウイルス複製、バイロプラズマ、細胞間移行、昆虫因子)

また、本ウイルスの生物学的および生化学的諸性質については他の総説 (OMURA, 1995 ; OMURA and YAN, 1999) を参照されたい。

本研究では、感染細胞内における上記 12 種の各タンパク質の動態を追跡する手段として各タンパク質に対する抗体を作製して利用した。また、操作性の高い本ウイルスの媒介昆虫の培養細胞をウイルスの宿主として主に用いた。さらに、解析手法として、共焦点レーザー顕微鏡手法および組織免疫電子顕微鏡法を用いた。

II イネ萎縮ウイルス複製の分子解剖

RDV の感染サイクルに沿って、ウイルス複製の概要を下に箇条書きする。

(1) イネ萎縮ウイルスはクラスリン由来のエンドサイトーシスを利用して媒介昆虫細胞に侵入、感染した (Wei et al., 2007)。

(2) ウイルス侵入の 6 時間後に Pns12 で構成される球状の封入体が認められた (口絵①, 右 1 段目)。本ウイルスの 12 種タンパク質のうち、本タンパク質が最も早く検出された (Wei et al., 2006 a)。

(3) 本封入体に Pns6 および Pns11 (口絵①, 右 1 段目) (共在していると合体図で黄色になる) が集積した。

(4) ウイルス核酸は封入体内で合成された (口絵①, 右 2 段目)。これは二本鎖目の RNA 合成であると想定される。

(5) 封入体の内部にウイルス粒子の内殻を構成する P1, P3, P5 および P7 が認められた (口絵①, 右 3 段目)。

(6) 封入体の周縁にウイルス粒子の外殻を構成する P2, P8 および P9 (口絵①, 右 4 段目) (封入体の存在を示す赤色領域の周縁にウイルスの存在を示す緑色領域が分布している) が分布していた。接種 18 時間後にはウイルス粒子が認められた。

(7) 以上の結果から、上記封入体はパイロプラズマと呼称されるウイルス合成工場であり、その骨格はウイルスゲノムがコードする Pns6, Pns11 および Pns12 によって形成され、その内部ではウイルス核酸が合成され、それにウイルスの内殻を構成する構造タンパク質である P1, P3, P5 および P7 が集積してウイルスの内殻粒子を形成、その後ウイルス粒子の外殻を構成する P2, P8 および P9 がパイロプラズマの周縁に集積、アセンブリーするという一連のウイルス粒子の構造構築プロセスが明らかになった (図-2, 3, 4)。

(8) Pns4 は径約 10 nm のミニチューブを形成し、その周辺に多数のウイルス粒子が存在していた。さらに、本ミニチューブはパイロプラズマ間を連結していた

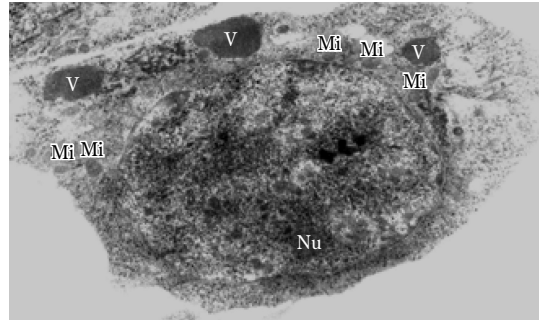


図-2 RDVに感染した媒介昆虫細胞

V:パイロプラズマ, Mi:ミトコンドリア, Nu:核.

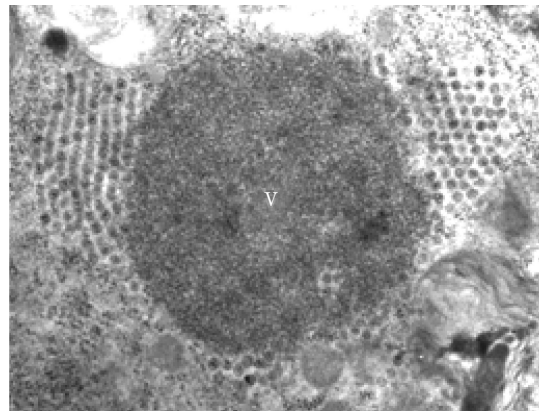


図-3 パイロプラズマ (V) とその周縁に分布するウイルス粒子

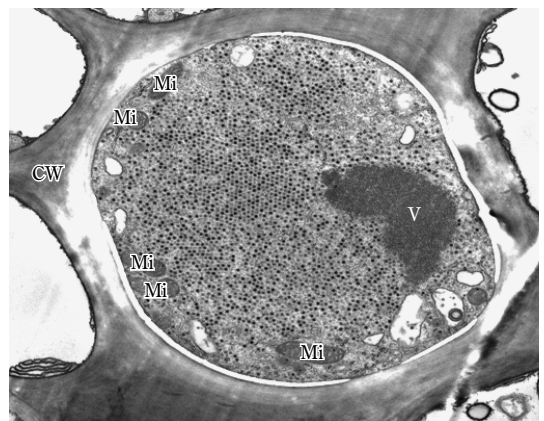


図-4 RDVに感染したイネ細胞の電顕像

V:パイロプラズマ, Mi:ミトコンドリア, CW:細胞壁.

ことから、本ウイルスの細胞内移行にかかわっている可能性が考えられた (Wei et al., 2006 b)。

(9) Pns10 は感染媒介昆虫細胞内において径約 85 nm の管状構造体を構築した (口絵②) (Wei et al., 2006 c)。

(10) ウイルス粒子は本管状構造体内に並んで分布していた (口絵③)。

(11) ウイルス粒子を含む本管状構造体は、近隣健全細胞に結合、貫入した (口絵④)。

(12) ウイルスの中和抗体存在下でフリーなウイルスによる再感染は阻止されたが、本管状構造体が貫入した近隣細胞は感染した。

(13) これらの結果から、本ウイルスの分節ゲノム S10 がコードする Pns10 タンパク質は径約 85 nm の管状構造体を形成し、径約 70 nm のウイルス粒子を本構造内に導き、近隣細胞へウイルスを安全に移行させる役割をもっていることが示唆された。

(14) さらに、Pns10 管状構造体は媒介昆虫細胞のアクチンフィラメントに沿って伸長することが明らかになった (口絵④)。

(15) アクチン重合阻害剤の使用により、Pns10 の伸長と近隣細胞への感染が阻害された。

(16) これらの結果から、アクチンは本管状構造体の構築伸長をサポートし、細胞間ウイルス移行に必要な昆虫因子であると考えられた。

(17) 動物細胞 (昆虫: 無脊椎動物) において、ウイルスのタンパク質が管状構造物を形成し、それを經由して近隣細胞にウイルス粒子が安全に移行するという知見は、イネ萎縮ウイルスと同様に媒介昆虫で増殖する植物ウイルスのみならず、動物ウイルスの研究発展にも寄与

するものと期待される。

(18) バイロプラズマや管状構造体の形成は RDV 感染イネ細胞内でも同様に認められた (図-4)。

(19) 本ウイルスは、上記管状構造体經由以外に、小胞体に包まれ、細胞外に放出され、フリーなウイルスとして、二次感染することも明らかになった (Wei et al., 2008)。

(20) 以上の結果、RDV の細胞への侵入、複製、細胞からの放出、二次感染等の概要が分子レベルで一通り明らかになった。また、これまで不明であった RDV の 5 種非構造タンパク質、Pns4, Pns6, Pns10, Pns11, Pns12 を含む本ウイルスの 12 種全タンパク質の発現の順序とウイルス複製における役割が明らかになった。

(21) さらに、イネ萎縮ウイルスの全タンパク質の機能が一通り判明した (図-1)。

(22) 本結果によって、ウイルスゲノムがコードするどのタンパク質の機能を抑制すれば有効にウイルスの複製を制御することができるかという、標的遺伝子の推定が可能になった。

本研究の一部は、(独)生研センター「新技術・新分野創出のための基礎研究推進事業」の一環として行われたものです。

引用文献

- 1) OMURA, T. (1995): Sem. Virology 6: 97 ~ 102.
- 2) ——— and J. YAN (1999): Adv. Virus Res. 54: 15 ~ 43.
- 3) NAKAGAWA, A. et al. (2003): Structure 11: 1227 ~ 1238.
- 4) 大村敏博ら (2005): 蛋白質 核酸 酵素 50: 1349 ~ 1354.
- 5) WEI, T. et al. (2006 a): J. Gen. Virol. 87: 429 ~ 438.
- 6) ——— et al. (2006 b): Arch. Virol. 151: 1701 ~ 1712.
- 7) ——— et al. (2006 c): J. Virol. 80: 8593 ~ 8602.
- 8) ——— et al. (2007): ibid. 81: 7811 ~ 1815.
- 9) ——— et al. (2008): J. Gen. Virol. 89: 2915 ~ 2920.

(新しく登録された農薬 15 ページからの続き)

はくさい: アオムシ, コナガ, ヨトウムシ, ハスモンヨトウ, タマナギンウワバ: 収穫 7 日前まで
 だいこん: アオムシ, コナガ, ヨトウムシ, ハスモンヨトウ, キスジノミハムシ: 収穫 14 日前まで
 ブロッコリー: アオムシ, コナガ, タマナギンウワバ: 収穫 21 日前まで
 カリフラワー: コナガ: 収穫 7 日前まで
 いちご: ハスモンヨトウ, ミカンキイロアザミウマ: 収穫前日まで
 ねぎ: シロイチモジヨトウ, ネギアザミウマ: 収穫 21 日前まで
 わけぎ: シロイチモジヨトウ, ネギアザミウマ: 収穫 21 日前まで
 あさつき: シロイチモジヨトウ, ネギアザミウマ: 収穫 21 日前まで
 レタス: ハスモンヨトウ: 収穫 3 日前まで

オクラ: ハスモンヨトウ, オオタバコガ, ヨトウムシ: 収穫前日まで
 ししとう: ミナミキイロアザミウマ, ハスモンヨトウ, オオタバコガ: 収穫前日まで
 てんさい: ヨトウムシ, ヨトウムシ, カメノコハムシ: 収穫 30 日前まで
 やまのいも: ナガイモコガ: 収穫 7 日前まで
 やまのいも (むかご): ナガイモコガ: 収穫 7 日前まで
 みょうが (花穂): ハスモンヨトウ: 収穫前日まで
 みょうが (茎葉): ハスモンヨトウ: みょうが (花穂) の収穫前日まで 但し、花穂を収穫しない場合にあっては開花期終了まで
 エンサイ: ハスモンヨトウ: 収穫 14 日前まで
 ふぎ: ハスモンヨトウ: 収穫 3 日前まで
 さやいんげん: ミナミキイロアザミウマ: 収穫前日まで

(30 ページに続く)