学会賞受賞者講演

弱毒ウイルスの分子作用機構に関する研究[†]

夏秋 知英*

NATSUAKI, T.*: Studies on molecular mechanisms of viral attenuation and cross protection

トマトで発生するタバコモザイクウイルス (TMV) の被害は抵抗性品種の利用で防ぐことが出来るが、キュウリモザイクウイルス (CMV) では有効な抵抗性遺伝子がトマトにないために防除が難しい。このため、CMV による「すじ腐れ病」がトマトで大発生した 1980 年代には、栃木県や長野県

の加工トマト産地が壊滅的被害を受けて次々と生産をやめていった。このときの経験からウイルス病防除の大切さを認識し、これまで主に野菜類に発生する多種多様な病原ウイルスの分類・同定や遺伝子解析、検出法の確立、といった研究に従事すると同時に、京都府農業資源研究センターや日本デルモンテ (株) をはじめとするウイルス病の発生現場を抱える研究機関と共同で弱毒ウイルス (ワクチン) の開発と、その分子作用機構の解析に取り組んできた。

一方、植物ではあるウイルスに感染するとその後は同種の近縁なウイルスに感染しなくなるという現象が知られていて、干渉効果 (cross protection) と呼ばれている。干渉効果は TMV で 1929 年に最初に報告されて以来、1933 年にはジャガイモ X ウイルス (PVX) とジャガイモの組み合わせで、1952 年には汁液接種できないジャガイモ葉巻ウイルス (PLRV) やカンキツトリステザウイルス (CTV) でも報告され、その後は RNA ウイルスだけでなく、DNA ウイルスやタンパク質をコードしないウイロイドでも報告されてきた (Gal-On and Shibolet, 2006; Pennazio *et al.*, 2001)。

この干渉効果の原理にもとづいて、弱毒ウイルスを利用した生物的防除法は以前から利用されている。しかし、弱毒株の選抜は経験と勘に頼っており、実際に実用化できた弱毒株は少ない。そこで本研究では、弱毒ウイルスが示す弱毒性および干渉効果について分子レベルで解析を進め、最近の RNA

サイレンシングに関する研究の急激な発展と合わせて、弱毒ウイルスの分子作用機構を RNA サイレncing の観点から検討した。さらに、遺伝子解析が弱毒株の選抜や識別に必須の技法であることを示した。

ところで、干渉効果は protection という用語から弱毒ウイルス特有の現象と思われがちであるが、実際は強毒株間でも起きている。このため、弱毒ウイルスによる防除機構を考える場合に、弱毒性と干渉効果を分けて考えねばならない。また弱毒ウイルスを生物防除に用いる立場から、最初に感染させるウイルスを防御ウイルス、その後に感染させる強毒ウイルスをチャレンジウイルスと呼ぶ場合もあるが、強毒系統間でも干渉効果が起きることから、本稿では単純に一次ウイルス、二次ウイルスとした。

1. キュウリモザイクウイルス

キュウリモザイクウイルス (CMV) では、二種類の弱毒株が知られている。ひとつは CMV に寄生するサテライト RNA が関与する弱毒株で、もうひとつは RNA2 がコードする 2b タンパク質が変異した弱毒株である。

CMV に関しては、1980 年代から日本デルモンテ (株) との共同研究で実用的な弱毒 CMV の開発に成功した (Sayama *et al.*, 1993)。この弱毒 CMV では、ウイルスに寄生するサテライト RNA が宿主 CMV の病原性低下をもたらしていた。また、CMV のサテライト RNA が多量体を形成することを世界に先駆けて報告した (Kuroda *et al.*, 1997)。

CMV とその近縁ウイルスでは様々なサテライト RNA が見いだされており (夏秋ら, 1994; Wang *et al.*, 1990)、感染植物でえそを示すものから CMV の増殖に影響を与えないもの、CMV を弱毒化するものまで多種多様である。また CMV は三分節の (+) 一本鎖 RNA をゲノムとするため、しばしばゲノム RNA の交換が起きて新系統が出現していることを示し

[†] 平成 23 年 3 月 27 日 平成 23 年度大会で行われる予定であった学会賞受賞者講演の要旨

* 宇都宮大学農学部 Faculty of Agriculture, Utsunomiya University, Mine-machi 350, Utsunomiya 321-8505, Japan

た (Kuroda *et al.*, 2005; Wang *et al.*, 1988). サテライト RNA が CMV を弱毒化する機構は CMV の複製機構を乗っ取って優先的に複製するためと単純に考えられていたが、RNA サイレンシングの立場からさらなる検討が必要であろう。

一方、京都府と共同研究した CMV の弱毒株 CM95 では、RNA サイレンシングのサプレッサーである 2b タンパク質に強毒株と比較して極めて特異的な 1 アミノ酸の変異が生じて弱毒性になったことを見出した (Nakazono-Nagaoka *et al.*, 2005). 次に、感染性クローンを用いてこの変異を強毒株に導入すると弱毒化することを証明し、特許 (4085166 号; 夏秋ら, 2008) を取得した。さらに弱毒株 CM95 の 2b タンパク質では small interfering RNA 結合能が低下しているために、サイレンシングシグナルの移行を阻止できないことが弱毒性をもたらしていると考えられた (Goto *et al.*, 2007)。

2. ポティウイルス

野菜類では、CMV とともにポティウイルスの被害が極めて多い。京都府と共同研究したズッキーニ黄斑モザイクウイルス (ZYMV) の弱毒株 ZYMV-2002 では、選抜元の強毒株と比較して、サイレンシングサプレッサーである HC-Pro タンパク質に 4 アミノ酸の変異が生じて弱毒性に変化したことを解明し (Wang *et al.*, 2006), CMV の場合と同様に感染性クローン実験でこれらの変異が弱毒性を決定していることを直接証明して特許を取得した (小坂ら, 2007)。興味深いことに、ZYMV-2002 と海外の弱毒性 ZYMV (Gal-On and Shibolet, 2006) では、HC-Pro における弱毒性をもたらす変異アミノ酸の位置が異なる。このため、今のところポティウイルスを弱毒化するような HC-Pro のアミノ酸変異に定説はない。なお、HC-Pro は多機能タンパク質で、病原性以外にアブラムシ伝搬、プロテアーゼ活性、病徴などを決定していて、ZYMV-2002 はアブラムシ伝搬されず、*Chenopodium quinoa* に局部病斑を形成しない (Wang *et al.*, 2006)。

同様にインゲンマメ黄斑モザイクウイルス (BYMV) でも、サイレンシングサプレッサーである HC-Pro タンパク質に変異が生じて弱毒性になることを明らかにし、干渉効果を詳細に解析した (Nakazono-Nagaoka *et al.*, 2004, 2009)。

このような研究の中で、ポティウイルスの病原性や宿主範囲を決定するウイルス遺伝子に関してカブモザイクウイルス (TuMV) をモデルに解析を進め、P3 タンパク質が宿主範囲の決定やえそ症状の発生を決めていること (Suehiro *et al.*, 2004)、ウイルス RNA の 5' 末端に結合する VPg タンパク質が植物の翻訳開始因子と mRNA の cap 構造より強く結合してウイルスタンパク質の翻訳を優先させること (Khan *et al.*, 2006; Miyoshi *et al.*, 2006, 2008; Okade *et al.*, 2009)、なども報

告してきた。なお、VPg 領域に変異を導入すると増殖しなくなるので、VPg 領域を弱毒株の選抜に用いることは出来なかった。

3. カンキツトリステザウイルス

同様に、果樹のウイルス病でも CTV で弱毒株と強毒株の全塩基配列を決定し (Suastika *et al.*, 2001)、遺伝子レベルでの識別法を開発した (Kano *et al.*, 1998, 2006)。ただし、残念ながら CTV のゲノム RNA は全長が 2 万塩基ほどあって、いまだに感染性クローンの構築には成功していない。このように、感染性クローンの構築が弱毒ウイルスの解析に必須である。

4. 弱毒株の選抜・識別法の開発

このように弱毒性を決定しているウイルス遺伝子を塩基配列レベルで明らかにすることによって、血清反応では識別できない強毒株と弱毒株を塩基配列レベルで確実に識別できるようになり、ひいては干渉効果を迅速・確実に検定できるようになった (Nakazono-Nagaoka *et al.*, 2004, 2005)。

さらに研究経過の中で、モザイク症状を示す CMV 感染葉において強毒株は黄色部分に偏在しているのに対し、弱毒株は緑色部分にも広く低濃度で存在していることを明らかにし (Kobori *et al.*, 2005)、迅速に弱毒株を選抜する方法を確立した。

5. 干渉効果 (cross protection) の機構

干渉効果、すなわち二次ウイルスの感染が阻止される機構については、以前より様々な仮説が提案されてきた: ①「抗体」のようなものが形成されて二次ウイルスの感染を阻害する; ②侵入直後の二次ウイルスの脱外被タンパク質を阻害する、あるいは脱外被した直後に粒子を形成して翻訳に進めない; ③ウイルス複製のために必要な成分の競合が起きる; ④ウイルス複製のために必要な細胞内の「場所 (site)」の競合が起きる; などである (Gal-On and Shibolet, 2006; Pennazio *et al.*, 2001)。これらはいずれも、「一次ウイルスと二次ウイルスの競合」が基本となっている。しかしこれまでに、明確に証明された干渉効果の機構は、外被タンパク質介在性干渉効果と RNA 介在性干渉効果の二つだけである。

「②脱外被」の阻害による干渉効果は、TMV で詳細に研究され、証明されている (Beachy *et al.*, 1999)。一方、外被タンパク質を欠損したウイルスでも干渉効果がみられること、外被タンパク質を持たない裸の RNA 病原分子であるウイロイドでも干渉効果が認められることから、早くから外被タンパク質の介在しない機構も考えられてきた。これらは RNA サイレンシングによる「RNA 介在性干渉効果」で二次ウイルスに

対して感染阻害を示すと考えられた (Gal-On and Shibolet, 2006).

本研究では、弱毒ウイルスと強毒ウイルスの干渉効果を可視化するために、感染性クローンをを用いて強毒株と弱毒株を異なる蛍光タンパク質で標識した。このような2種の同種ウイルスを混合感染させると、2種のウイルスがきれいにすみ分けて増殖し、両ウイルスが同時に増殖する領域がないことを見出した (夏秋, 2009; Takahashi *et al.*, 2007).

以前から、複製開始点 *ori* が同一の2種のプラスミドは同時に一つの宿主細胞で共存・増殖することはないという、プラスミドの不和合成が知られている (Nordström, 1993). これは、複製機構が類似していて競合することが原因と考えられている。このような現象は、植物ウイルスで見られる干渉効果と同じようなものであろうか。

また、ウイルス遺伝子の一部を導入した形質転換植物の示すウイルス抵抗性は、異種ウイルスの感染で失われる。しかし、弱毒ウイルスの示す干渉効果は異種ウイルスの感染によって失われることはない。これらのことから、遺伝子組換え植物で機能する RNA サイレンシングとは別の抵抗性メカニズムも弱毒ウイルスの干渉効果で働いていると思われる。

弱毒ウイルスは現在、「ワクチン」と呼ばれて商品化されている。弱毒ウイルスの将来性を考えると、まずはより多くの植物ウイルスで実用的な弱毒株を確立する必要がある。そのためには、干渉効果が強く強毒性へと逆変異しないような弱毒株を短時間で選抜できる方法を確立する必要がある。

以上のように弱毒ウイルスの病原性や干渉効果という現象を分子レベルで解明することは、弱毒ウイルス開発という農業上の応用に大きく貢献すると同時に、植物ウイルスの病原性とジーンサイレンシングの相互作用を究明する大きな足掛かりとなっている (夏秋, 2009).

謝辞: これまでご指導を賜った與良清先生、故土居養二先生、山下修一先生、寺中理明先生、奥田誠一先生、故 R. G. Milne 博士、故 M. A. Mayo 博士、B. D. Harrison 博士に厚く御礼申し上げます。また、小坂能尚博士、故小堀 崇博士、長岡栄子博士、梁 宝成博士ほか京都府農業資源研究センターの関係者の皆様、安原壽雄博士ほか微生物化学研究所の関係者の皆様、佐山春樹博士ほか日本デルモンテ (株) の関係者の皆様、加納 健博士、三好 洋博士、増田 税博士、吉川信幸博士には共同研究で大変お世話になりました。さらに、公的研究機関、試験場、企業、大学等の多数の研究者の方々には意見交換や材料提供で大変お世話になりました。最後に、宇都宮大学農学部植物病理学研究室の学生の皆様、さ

らに王 蔚芹博士、黒田智久博士、高橋 翼博士、厚井 融博士、石川典子博士のご支援の賜物です。ここに記して深謝の意を表します。

引用文献

- Beachy, R. N. (1999). Coat-protein-mediated resistance to tobacco mosaic virus: discovery mechanisms and exploitation. *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 354: 659–664.
- Gal-On, A. and Shibolet, Y. M. (2006). Cross-protection. *In* Natural resistance mechanism of plants to viruses. (Loebenstein, G. and Carr, J. P., eds.). pp. 261–288. Springer, Dordrecht.
- Goto, K., Kobori, T., Kosaka, Y., Natsuaki, T. and Masuta, C. (2007). Characterization of silencing suppressor 2b of *Cucumber Mosaic Virus* based on examination of its small RNA-binding abilities. *Plant Cell Physiol.* 48: 1050–1060.
- Kano, T., Hiyama, T., Natsuaki, T., Imanishi, N., Okuda, S. and Ieki, H. (1998). Comparative sequence analysis of biologically distinct isolates of citrus tristeza virus in Japan. *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.* 64: 270–275.
- Kano, T., Natsuaki, T., Isaka, M., Suastika, G., Okuda, S. and Ieki, H. (2006). Restriction fragment length polymorphism analysis of Citrus tristeza virus isolates in Japan and its application to cross-protection experiments. *Bull. Natl. Inst. Fruit Tree Sci.* 5: 63–70.
- Khan, M. A., Miyoshi, H., Ray, S., Natsuaki, T., Suehiro, N. and Goss, D. J. (2006). Interaction of genome-linked protein (VPg) of turnip mosaic virus (TuMV) with wheat germ translation initiation factors eIFiso4E and eIFiso4F. *J. Biol. Chem.* 281: 28002–28010.
- Kobori, T., Ryang, B.-S., Natsuaki, T. and Kosaka, Y. (2005). A new technique to select mild strains of *Cucumber mosaic virus*. *Plant Dis.* 89: 879–882.
- 小坂能尚・夏秋知英・塩見 寛・安原壽雄 (2007). 弱毒ブッキーニ黄斑モザイクウイルスを用いたウリ科作物ウイルス病の防除方法. 特許第 4045358.
- Kuroda, T., Natsuaki, T., Wang, W. Q. and Okuda, S. (1997). Formation of multimers of cucumber mosaic virus satellite RNA. *J. Gen. Virol.* 78: 941–946.
- Kuroda, T., Natsuaki, T., Okuda, S. and Teranaka, M. (2005). Analysis of natural populations and possible natural reassortment of *Cucumber mosaic virus*. *J. Gen. Plant Pathol.* 71: 221–229.
- Miyoshi, H., Suehiro, N., Tomoo, K., Muto, S., Takahashi, T., Tsukamoto, T., Ohmori, T. and Natsuaki, T. (2006). Binding analyses for the interaction between plant virus genome-linked protein (VPg) and plant translational initiation factors. *Biochimie* 88: 329–340.
- Miyoshi, H., Okada, H., Muto, S., Suehiro, N., Nakashima, H., Tomoo, K. and Natsuaki, T. (2008). *Turnip mosaic virus* VPg interacts with *Arabidopsis thaliana* eIF(iso)4E and inhibits *in vitro* translation. *Biochimie* 90: 1427–1434.
- Nakazono-Nagaoka, E., Sato, C., Kosaka, Y. and Natsuaki, T. (2004). Evaluation of cross-protection with an attenuated isolate of *Bean yellow mosaic virus* by differential detection of virus isolates using RT-PCR. *J. Gen. Plant Pathol.* 70: 359–362.
- Nakazono-Nagaoka, E., Suzuki, M., Kosaka, Y. and Natsuaki, T. (2005). RT-PCR-RFLP analysis for evaluating cross protection

- by an attenuated isolate of *Cucumber mosaic virus*. J. Gen. Plant Pathol. 71: 243–246.
- Nakazono-Nagaoka, E., Takahashi, T., Shimizu, T., Kosaka, Y., Natsuaki, T., Omura, T. and Sasaya, T. (2009). Cross-protection against *Bean yellow mosaic virus* (BYMV) and *Clover yellow vein virus* by attenuated BYMV isolate M11. Phytopathology 99: 251–257.
- 夏秋知英・王 蔚芹・奥田誠一 (1994). ピーマンとペチュニアから見出されたキク微斑ウイルスの性状. 宇都宮大学農学部学術報告 15: 11–19.
- 夏秋知英・小坂能尚・小堀 崇 (2008). 核酸, ポリペプチド, 及び当該核酸を含む組み換えベクター. 特許 4085166 号.
- 夏秋知英 (2009). 弱毒ウイルスの防除機構 (「微生物と植物の相互作用—病害と生物防除—」百町満朗・對馬誠也編). pp. 134–141, ソフトサイエンス社, 東京.
- Nordström, K. (1993). Plasmid replication and maintenance. In *Plasmids: A practical approach*. (Hardy, K. G., ed.). pp. 1–38. IRL Press, Oxford.
- Okade, H., Fujita, Y., Miyamoto, S., Tomoo, K., Muto, S., Miyoshi, H., Natsuaki, T., Rhoads, R. E. and Ishida, T. (2009). Turnip mosaic virus genome-linked protein VPg binds C-terminal region of Cap-bound initiation factor 4E orthologue without exhibiting host cellular specificity. J. Biochem. 145: 299–307.
- Pennazio, S., Roggero, P. and Conti, M. (2001). A history of plant virology: cross protection. New Microbiol. 24: 99–114.
- Sayama, H., Sato, T., Kominato, M., Natsuaki, T. and Kaper, J. M. (1993). Field testing of satellite-containing attenuated strain of cucumber mosaic virus for tomato protection in Japan. Phytopathology 83: 405–410.
- Suastika, C., Natsuaki, T., Terui, H., Kano, T., Ieki, H. and Okuda, S. (2001). Nucleotide sequence of *Citrus tristeza virus* seedling yellows isolate. J. Gen. Plant Pathol. 67: 73–77.
- Suehiro, N., Natsuaki, T., Watanabe, T. and Okuda, S. (2004). An important determinant of the ability of *Turnip mosaic virus* to infect *Brassica* spp. and/or *Raphanus sativus* is in its P3 protein. J. Gen. Virol. 85: 2087–2098.
- Takahashi, S., Sugawara, T., Yamatsuta, T., Isogai, M., Natsuaki, T. and Yoshikawa, N. (2007). Analysis of the spatial distribution of identical and two distinct virus populations differently labeled with cyan and yellow fluorescent proteins in coinfecting plants. Phytopathology 97: 1200–1206.
- Wang, W.-Q., Natsuaki, T., Okuda, S. and Teranaka, M. (1988). Comparison of cucumber mosaic virus isolates by double-stranded RNA analysis. Ann. Phytopathol. Soc. Jpn. 54: 536–539.
- Wang, W.-Q., Natsuaki, T., Okuda, S. and Teranaka, M. (1990). Detection of cucumber mosaic virus RNA5 by hybridization with photobiotin-labelled double-stranded RNA5 probe. Ann. Phytopathol. Soc. Jpn. 56: 33–38.
- Wang, W.-Q., Natsuaki, T., Kosaka, Y. and Okuda, S. (2006). Comparison of the nucleotide and amino acid sequences of parental and attenuated isolates of *Zucchini yellow mosaic virus*. J. Gen. Plant Pathol. 72: 52–56.