会 長 講 演

科学史から見たウィロイド研究の軌跡*

高 橋 壯**

Tsuyoshi TAKAHASHI**: On the Development of Viroid Researches
—A Brief Science-historic Sketch—

ウィロイドという言葉が一般的に使われるようになってきたのは、この20数年のことに過ぎない。事実、ウィロイドを発見・命名した T. O. Diener が著書『Viroids and Viroid Diseases』を刊行したのは1979年であり、初期の業績に関与した研究者がまだ存命中でもある。したがって、科学史の対象として見ることができるのか疑問を抱く向きがあるかもしれない。とは言え、ウィロイド研究の誕生と発展の跡を辿ることは、植物病理学や一般生物科学において新しい分野が確立されていく背景や概念形成の動きが明らかになることであり、科学史的に見て意義があると考えられる。

ウィロイドの研究分野がどのような経緯でウイルス学から分かれて発展したか、何故ウイルス学の延長線上に見ることができなかったか、ウィロイド研究の成果がどのような波紋を呼び起こしたか、それらの考え方の方向や流れを追跡しようとしたのが、本稿を草する主な動機である。

ウィロイド研究の出発点—ウィロイドの発見と命名

植物ウイルス病の研究の過程で、発病経過と伝染方法が通常のウイルスの場合とよく似ていることから、ウイルス病とみなされていた病気があった。それらの中に、ウイルスよりはるかに小さい低分子量 RNA (後にウィロイドと呼ぶ) およびマイコプラズマ様微生物 (後にファイトプラズマと呼ぶ) による病害が含まれていた。両者は奇しくも1967年にそれぞれアメリカと日本で報告され、植物の新しい病原体として登場し、教科書が書きかえられた。

ウィロイドの発見の歴史を見ると、今から100年前の濾過性ウイルスと言われたウイルスの発見を想起させるものがある。当時 R. Koch とその門下たちは人間の病気が細菌によって起こることを次々と証明し、すべての病気が細菌の感染で生ずるに違いないという考え方が定着していた。とこ

ろが、タバコモザイク病の病原因子が細菌濾過器の濾孔を通り抜けるという D. Ivanowski(1892) や M.W. Beijerinck (1898) の研究に刺激されて、動物には細菌のほかに、ウイルスに起因する病気があるということが認識されるようになり、「ウイルス」という概念が確立されたのである。やがて、通常の細菌学的手法で正体が明らかでない伝染性の病気に対して、ウイルスが原因で起こるものだと想定されるようになった。ウィロイドが発見された経緯もまさにそうであった。病原となる菌類も細菌も見つからないが、汁液や接木によって伝染する故にウイルスによるとみなされていた病害からウィロイドが発見されたのである。

低分子量 RNA そのものが新しいタイプの病原体であることを最初に報告したのは、アメリカ農務省のベルツビル農業研究センターの T.O. Diener のグループである。長い間ウイルス病と言われていた potato spindle tuber 病の病原因子を特定し、Science 誌の158巻10月20日号(1967)に「Potato spindle tuber 'virus': 遊離核酸の性質を備えた植物ウイルス」と題して公表された論文がそれである。

「ウィロイド」(viroid) とは、ウイルスに似て非なることから、「ウイルスもどき」、あるいは「ウイルス類似体」を意味する造語であり、T.O. Diener が1971年、potato spindle tuber viroid (PSTVd) と名づけたのが最初である。ちなみに、ウィロイドの略号はその語尾に Vd をつけ、ウイルスの略号である V と区別する。

ウィロイドが発見された当初、「ウィロイド」という用語に対して異説が唱えられたことがある。カナダ農務省の R. P. Singh のグループ (1972) は、ウイルスに似るが RNA 分子に多重形 (multiple forms) が見られることから「メタウイルス」(metavirus) と命名した。また、カリフォルニア大学の J.S. Semancik のグループ (1972) は、宿主植物の遺伝子発現が誘導されて病徴が現れることを仮定して

* 平成11年4月2日 平成11年度大会で行われた会長講演の要旨

** 岩手大学農学部 Faculty of Agriculture, Iwate University, Morioka 020-8550, Japan

「パソジーン」(pathogene) という用語を導入した。しかし、ウィロイドはそれぞれの病気の類似性を表現したものであり、病原因子の性状を表したものでないことは明らかである。翌 1973 年にミネアポリスで開催された第 2 回国際植物病理学会議では「Viroid」が正式に公認され、コロキウムが開かれた。その後、上述の R. P. Singh, J. S. Semancik の両グループともウィロイドという用語を採用し、今日に至っている。

また、遊離核酸という表現についても、タバコモザイクウイルス (TMV) に感染した植物組織に遊離の感染性 RNA が存在することや、単にごく小さいウイルス RNA に過ぎないなどの理由から、ウィロイドと称する新しい用語は不要であるとする異論が出された。T.O. Diener (1979) は「ウィロイドとは特定の病気にかかったある種の生物に存在する低分子量の核酸である」と定義づけ、ウィロイドとして具備すべき証拠をあげて論破した。この定義は通常のウイルスをはじめ、他のあらゆる既知の病原体から区別して、ウィロイドを最も適切に表現している。この間の事情を巡って T.O. Diener は、L. Pasteur (1876) の次の言葉を引用しながら、自説を主張した。すなわち、「垣間見た真理を自ら確信しようと努力することが進歩への第一歩であり、他人を説得するのはその次のことである」と。

ウィロイド研究の胎動—ウィロイドの同定と分子形態・構造

ジャガイモが potato spindle tuber 病の唯一の宿主であり、なんの有力な検定手段ももたなかった状況の中で、同じナス科のトマトを用いた定量法が T.O. Diener により確立された意義は大きい。この検定に供されるトマトは、動物ウイルス学におけるマウスやモルモットのような実験動物に相当するもので、PSTVd の感染実験では必要不可欠な存在となった。初期の研究段階では、感染組織から電気泳動分析によって回収される低分子 RNA 分画をトマトに接種し、2~3 週間後に生ずる病徴を指標として病原因子の探索と同定が進められた。この手続きでは、特定の病理現象には、それに特異的な病原体が関与するという病原微生物の存在を証明するコッホの原則が生かされたことは言うまでもない。

ウィロイドは、病原微生物学的に同定された病原体の中では最も小さい。ウイルスのような外被たん白質をもたず、低分子 RNA として細胞中に存在し、ヘルパーウイルスの介助なしに自律的に複製することなどから、通常のウイルスと基本的に異なることが明白となった。ウィロイド研究をウイルス学の延長線上に見ることができなかったのである。A. Lwoff (1981) は第 5 回国際ウイルス学会議 (ストラスブール) における記念講演でウィロイドの位置づけについて言及し、ウイルス界は真正ウイルス (Euvirus)

とウィロイドから構成されることになるだろうという見解を表明した。

低分子量 RNA だけのウィロイドがどんな分子形態をとるのかは、発見された当初から関心が寄せられていた。T. O. Diener のグループ (1973) は、電子顕微鏡で PSTVd の姿を写し出すと、短棒状の形に見え、その長さは 50 nm しかなく、塩基対構造をとった天然状態のものであった。変性処理を施すと、完全に変性した 1 本鎖の環状構造や、ヌクレオチドのある部位が切断された 1 本鎖の線状構造のものなどの種々の形態が観察された。環状構造をとる核酸分子としては当時、1 本鎖 DNA と 2 本鎖 DNA、それに 2 本鎖の RNA 複製中間体がわかっていたが、ウィロイドに見られるような 1 本鎖の環状 RNA の存在は未詳であった。ウィロイドがその証明の先駆となったのである。

1978 年にドイツの H. L. Sänger のグループは PSTVd の全塩基配列を決定し、「裸の RNA」の正体を突き止めた。それによると、ヌクレオチド数が 359 個、共有結合で閉じた 1 本鎖の環状 RNA 分子で、らせん状に分子内相補構造をとる 2 本鎖領域と、ループ状の 1 本鎖領域が交互に連なり、分子全体として短い棒状となっている。その当時、天然にあって完全に自己増殖できる 1 つの遺伝子の全構造が決定済みのものとして、MS 2 ファージ RNA や ϕ X 174 ファージ DNA などがあったが、動植物を含む真核生物の病原体の中で、PSTVd が再びその最初の例証となった。

ウィロイドの性状が調べられた初期の段階で、ウィロイドの構造が 1 本鎖か、あるいは 2 本鎖なのか、また、電気泳動分析による分子量の決定において必ずしも一致した結果が得られなかった。このような混乱した結果を招いた理由の 1 つとして、ウィロイド RNA の特徴的な分子形態と構造に起因することが後になって指摘された。

自然圃場で発生するウィロイド病の同定にあたっては、長い間ウイルス病であると言われていたものや、ウィロイドの定義が確立された後に意識的にウィロイドを探索しようとして同定されたものなど、ウィロイドの種類によって同定の経緯はさまざまである。たとえば、ココヤシの cadang-cadang 病は 1920 年代にフィリピン群島の一部で、また、わが国のホップ矮化病は 1950 年代に福島、長野地方で発生することが知られていたが、PSTVd の研究に触発されて、ウィロイド病であることが判明した。

ウィロイド研究の波紋—ウィロイドの機能発現と起源

これまでに 30 種近いウィロイドと、それらの変異株の全構造が決定され、ウィロイドは一定の構造的特徴をもった RNA 分子種であることが明白となった。その分子量は 8~13 万 (246~399 ヌクレオチド) であり、ウイルスゲノムの 1/10~1/100 に過ぎない。さらに、ウィロイド RNA にはたん白質をコードする遺伝子が刻み込まれていない。この

ことも、ウイルス学の延長線上では解決できない新しい課題となった。

通常のウイルスは、それぞれ固有の遺伝子を有し、「遺伝子→たん白質→機能」という図式で、たん白質を介して遺伝子発現をしている。これに対して、ウィロイドはたん白質を翻訳しない病原核酸であることから、「遺伝子→機能」による発現様式をとる。たとえば、PSTVd の RNA 分子の一部が、宿主のシグナル認識粒子の中の 7sRNA と結合して安定なハイブリッド分子を形成し、その結果、膜たん白質の膜透過に障害が起こり、細胞膜の構造と機能が異常になるという仮説がその一例である。このように、ウィロイド RNA 自身(あるいは、感染後に生じたウィロイド特異的 RNA)が機能体として働き、宿主標的因子や宿主遺伝子と作用して、宿主の機能発現を干渉する機構が考えられ、病原性発現の研究に一石を投ずることとなった。

一方では、ウィロイドと分子サイズや形態、複製様式が類似した、いわゆるウィロイド様の病原 RNA が相次いで発見された。それらの研究により、ウィロイドと共通した性状をもつことが明らかとなり、新しい低分子量病原 RNA の存在が注目された。

T.O. Diener は 1989 年、ウィロイドは RNA ワールド時代の「生きた分子化石」ではないかと提言した。言い換えれば、ウィロイドは生命誕生の初期段階における細胞進化の遺物であるという見解である。自然界では、RNA 分子自身の特定部位を自己切断する機能(リボザイム活性)を有する RNA として、①グループ I とグループ II イントロン、②リボヌクレアーゼ P、③低分子量植物病原 RNA が知られている。とくに、③の病原 RNA には、アボカド sunblotch ウィロイドやウィルソイド(ウィロイド様環状サテライト RNA)などがあり、その RNA 分子の環状構造は複製開始や複製終止のシグナルを必要とせずに生存可能な生命形態であると考えられる。ウィロイドの複製がローリングサークル型の様式をとることは、それを物語っている。ウィロイド RNA の塩基配列とウィロイド様サテライト RNA のそれを比較した S.F. Elena らは 1991 年、これらの低分子量病原 RNA は系統発生上は共通の祖先 RNA を起原とする分子種であり、先に T. O. Diener が提言した「RNA ワールドの分子化石説」と矛盾するものでないと結論づけている。ウィロイドはさまざまな被子植物から発見されているが、被子植物の化石の多くは中生代の白亜紀(1~1.4 億年前)のものである。RNA ワールドが始生代(25 億年前)であると仮定すると、生命の始まりを解く一つの鍵は、現存する「始生代の残存生物」からリボザイムを探すことであろう。J. Chela-Flores (1994) は、その候補として始生代に推積したラン藻の化石(ストロマトライト岩

石)を指摘している。生きた化石 RNA の正体に迫るアプローチとして注目される。

これまでに発見されたウィロイドはすべて植物のみからのものである。近年、動物の肝炎デルタウイルス(HDV)のゲノム RNA の解析から、植物の低分子量病原 RNA との共通性が示唆された(A.D. Branch ら, 1990, J. Taylor, 1990)。HDV は B 型肝炎ウイルス(HBV, 2 本鎖 DNA ウィルス)のサテライトウィルスで、ヘルパーウィルスである HBV に依存して複製する。HDV のゲノムは環状 1 本鎖 RNA で、約 70 % の塩基が分子内塩基対を形成し、ウィロイドと同様の短棒状構造をとっている。その左側 1/4 (約 370 ヌクレオチド)の部分にウィロイド様ドメインと称する、ウィロイドと類似の塩基配列が刻み込まれている領域があり、かつ、このドメインには自己切断する部位がある。HDV ゲノムでは、このような構造上の共通性のほかに、ローリングサークル型の様式で複製することも明らかである。系統進化学的に見て、HDV ゲノムが環状サテライト RNA に属していることは、同種の RNA 分子種が植物のみでなく、動物にも存在することを示唆しており、今後の研究に期待したい。

ウィロイドを発見した T. O. Diener は、ウィロイド感染による栽培植物の病気はすべて 20 世紀になってから報告されたもので、人間の農業活動によって引き起こされたのではないかと言及している。おそらく、野生植物に潜伏していたウィロイドが、接木や剪定などの農作業を介して栽培植物へ偶然導入され、しかも同じ作物を単一栽培するようになったことから、近年になって発病が目立つようになったのではなかろうか。もしこの考えが正しければ、栽培植物のウィロイド病は、今後も農業活動の活発な展開に伴いますます増え続けることが予想される。これまでに報告されているウィロイド病の宿主域の研究によると、潜在的に感染する事例の多いことが明らかにされた。このように潜在感染しているいくつかのウィロイドが、ある栽培植物で病原性を示すことになるのであろう。このような背景を踏まえた予防対策の確立が望まれる。

かつて TMV がそうであったように、ウィロイドの数々の問題を解明する上で、中心的な位置を占めたのは、ほかでもない植物に感染するウィロイドであった。とりわけ、PSTVd はウィロイド概念の生みの親となり、その過程で従来のウイルス研究で得られた所見では解決できないことから、しばしば新しい発想の転換が求められたことは既に述べたとおりである。ウィロイド研究の流れは未完というに止まらず、今もまさに書き加えられつつある歴史であることに思い至るのである。