7. 菌類で媒介される beet necrotic yellow vein virus

玉田 哲男

(北海道立中央農業試験場・生物工学部)

要 旨

Beet necrotic yellow vein virus (BNYVV) は、テンサイそう根病の病原ウイルスであり、土壤菌 *Polymyxa betae* によってうつされる。ウイルス粒子は桿状で、21K外被タンパク質と1本鎖RNAから成る。RNA 1～5の5種類のRNAがみつかり、RNA-1と2は感染に必要なが、RNA-3, 4, 5はサテライト様である。RNAゲノムはいずれも5'末端がキャップ構造、3'末端がポリ(A)配列である。RNA-1には、237Kのタンパク質をコードするORFが存在し、RNA複製酵素と共通の配列が認められる。RNA-2には、6個のORFが存在し、5'末端側には21K外被タンパク質、つづいて54Kタンパク質をコードするORFが存在する。このタンパク質は、外被タンパク質の読み過ぎとしてそのN'末端を含み、75Kタンパク質として翻訳される。このタンパク質は、ウイルス粒子の組立てと菌伝搬性に重要な役割を果たしている。さらに3'側の3個のORFには、それぞれ42K, 13K, 15Kタンパク質がコードされ、これらはトリプロブロックジンと呼ばれ、ウイルスの細胞間移行に関与している。RNA-2の3'末端側には、システイン豊富な14Kタンパク質がコードされている。RNA-3には、25Kタンパク質のORFが存在し、これは検定植物(ツルナ)の黄色斑形成とテンサイのそう根症状の発現に関わっている。31Kタンパク質をコードするRNA-4は、*P. betae* 菌のウイルス伝搬効率を高める働きがある。以上、BNYVVに存在する4種のRNA

は、それぞれ機能分担しており、ウイルスが自然で病気を起こし、存続するために必須であると考えられる。

はじめに

Beet necrotic yellow vein virus (BNYVV, テンサイえそ性葉脈黄化ウイルス) は、テンサイそう根病の病原ウイルスであり、土壤菌の1種 *Polymyxa betae* によって伝搬される¹⁾。BNYVVは、実験室では汁液接種によって感染させることができ、その寄生範囲は狭く、主としてアカザ科の植物に限られる。自然では、ウイルスは土壤中で *P. betae* の遊走子によって運ばれ、テンサイの根に感染し、そう根病をひき起こす。ウイルス粒子は、桿状でプラス鎖のRNAと21Kの外被タンパク質から成る。ウイルスRNAは、4～5種の分節ゲノムに分かれており、ウイルス粒子の長さは、RNA種のサイズによって決められる¹⁷⁾。

BNYVVはウイルス粒子の形態、RNAの特性、媒介者、伝染方法などから、1987年のICVでは、Furovirus群に含められているが、ゲノムの構造がタイプメンバーのsoil-borne wheat mosaic virusと異なる点もあるため、possible memberとされている⁸⁾。最近、このグループに属するpotato mop-top virusやpeanut clump virusについて、そのゲノムの一部の塩基配列が決定されているが、グループ間の遺伝子構造にかなりの違いが認められている¹⁰⁾。BNYVVは、他のウイルスとは異なった特徴をもつウイルスとして注目されており、ここでは、BNYVVゲノムの構造と機能について、最近得られた知見を紹介する。

テンサイそう根病

テンサイそう根病は、rhizomaniaと呼ばれ、根に異常を起こす病気である。1950年代イタリアで発生したのが最初であり、長い間原因不明の土壤病とされていたが、1973年我々の研究によって、この病気が

Beet necrotic yellow vein virus transmitted by the fungus *Polymyxa betae*

Tetsuo Tamada

Hokkaido Central Agricultural Experiment Station,
Naganuma, Hokkaido 069-13

〒069-13 北海道夕張郡長沼町東6線北15号

BNYVV の感染によって起こることが明らかにされた^{11,14)}。

BNYVV に感染すると、テンサイの根の細根が異常に増加し、そう生するのが特徴である。激しい場合には、根は肥大せず、奇形となり、先端から主根にかけてえ死を起こす。地上部の葉は退緑黄化する。ほ場では、BNYVV はほとんど根に局在するが、まれに地上部にウイルスが移行すると葉の脈が鮮明に黄化し、えそを伴うため、テンサイの「necrotic yellow vein」という名がつけられた¹⁴⁾。

北海道では、1965年ごろから発生が認められ、現在では約20%以上のほ場がそう根病に汚染されている¹²⁾。外国では1950年代にイタリアで発生して以来、1970年代ヨーロッパ全域に発生地域が拡大、1980年以降、東欧、旧ソ連、中国、アメリカにおいても急速に発生が拡大している。

そう根病は、典型的な土壌伝染性病害であり、一度汚染されたほ場から病原菌を除くことは極めて困難である。また被害が大きいため、農業上最も恐ろしい病気の一つとして、注目されている¹²⁾。

媒介菌 *Polymyxa betae*

BNYVV は *Polymyxa betae* によって伝搬される。*P. betae* は変形菌門 (Plasmodiophorales) のネコブカビ科に属する完全な活物寄生菌である⁵⁾。この科には *Spongospora* 属菌と *Polymyxa* 属菌があり、いずれもウイルスの媒介者として知られている。*Polymyxa* 属菌はさらに *P. graminis* と、*P. betae* の2種類に分けられている。両者は形態的に同じであるが、寄生範囲が異なり、前者はイネ科植物、後者はアカザ科の植物

に寄生する⁵⁾。

P. betae の生活史は十分明らかにされていない。一般に休眠胞子から放出された遊走子が宿主の細根の表皮または表層細胞に侵入し、変形体を経て、遊走子のうまたは休眠胞子になる。遊走子のうからは多数の遊走子が放出される。これらの遊走子はいずれも直径約 5 μm 、長短2本のべん毛を有し、洋なし形をしている。休眠胞子は数10個から数100個が接合してクラスターを作り、この状態で土壌中で長期間生存できる。

BNYVV が *P. betae* でうつされる場合、ウイルスは遊走子の内部に存在するが、菌体内では増殖しないとされている¹⁾。菌の生活史のどの過程で、どのようにしてウイルスを特異的に獲得し、伝搬されるかについては明らかでない。

BNYVV の遺伝子構成

BNYVV には、ゲノムのサイズの異なる5種のRNAが報告されており、サイズの大きい順にRNA-1~RNA-5と名付けられている^{8,17)}。RNA-1~4の4種は、ほ場分離株に常に存在し、発病とウイルスの伝搬に必要である¹⁷⁾。RNA-5は今のところ日本の分離株からのみ見つかった。図に示すように、5種のRNAのすべての全塩基配列が決定されている⁸⁾。これらのRNAゲノムは、いずれも5'末端がキャップ構造、3'末端がポリ(A)配列である。5'末端の8~9塩基と3'末端の少なくとも70塩基に相同性が認められており、多分ウイルスRNAの複製開始域として重要な役目を果たしていると推定される⁸⁾。

BNYVV ゲノムの特徴は、RNA-1とRNA-2がウイルスの感染と増殖に必要であり、RNA-3, 4, 5は

図 BNYVVの遺伝子地図

サテライト様であり、ウイルスの感染には必要でないことである¹⁷⁾。しかし、RNA-3とRNA-4はほぼ分離株に常に存在することから、RNA-1とRNA-2はすべての寄生に共通の“house keeping”機能をもつものに対して、RNA-3とRNA-4は自然感染の過程でより特異的な重要な役割を分担していると考えられる⁸⁾。その詳細は後述する。

BNYVV ゲノムの機能と遺伝子産物

1. 複製と237Kタンパク質

RNA-1 (6,747塩基)には、1個の長いORFが存在し、237Kのタンパク質がコードされている(図)⁸⁾。プロトプラストでは、RNA-1のみによってウイルスRNAが複製されることが証明されており、RNA-1には複製のためのすべての情報が含まれていると考えられる⁸⁾。

237Kタンパク質には、Sindbis-like supergroupのウイルス感染に必要な非構造タンパク質にみられる領域と相同性のある領域が2ヶ所存在する²⁾。一つは、C末端に近い位置の200残基で、RNA依存RNAポリメラーゼに共通のアミノ酸配列、すなわちGDD配列が検出されており、多分coreポリメラーゼ機能をもつと考えられている。他は、ORFのほぼ中央の260残基にGXXGXGKS/T配列が存在する。これはATPまたはGTP依存性RNAまたはRNAヘリカーゼ活性をもつタンパク質と共通の配列である(図)。

2. 粒子の組立と75Kリードスルータンパク質

RNA-2 (4,612塩基)には、6個のORFが存在する(図)⁸⁾。5'末端から最初のORF 1には、21K外被タンパク質、つづいてORF 2には、その外被タンパク質シストロンからアンバー終止コドンとして読み過ぎ産物として54Kのタンパク質がコードされている。これは外被タンパク質のN'末端を含み、75Kタンパク質として翻訳される(75Kリードスルータンパク質と呼ぶ)。このタンパク質は、21K外被タンパク質とともに、感染細胞のどの分画からも多量に検出される⁷⁾。

Schmittら(1992)は、外被タンパク質とウイルス粒子の再構成を知るため、外被タンパク質遺伝子の領域にいくつかの欠失を起こさせ、RNA-1とともにプロトプラストまたは植物に接種を行なった。その結果、外被タンパク質遺伝子のどの変異株もウイルス粒子は形成されなかったという⁹⁾。例えば、外被タンパク質の1ヶ所に点変異、119番目のアルギニンをセリンに変えただけでもウイルス粒子は形成されなかった。さらに彼らは54Kタンパク質もまた粒子の再構成に影響して

いる結果を示した。例えば外被タンパク質の終止コドンより下流の350塩基内に109塩基の短い欠失を起こさせた変異株は、ウイルスの再構成を強く阻害したという⁹⁾。

3. 細胞間移行とトリプルブロックタンパク質

RNA-2には、ORF 2につづいて42K、13Kおよび15Kのタンパク質をコードする3個のORFが存在する(図)⁸⁾。これら3個の遺伝子はトリプルブロックジーンと呼ばれ、他の桿状ウイルス、potexviruses、carlavirusesおよびbarley stripe mosaic virusにも存在し、部分的に相同性が認められている⁶⁾。

BNYVVの42Kと13Kタンパク質はサブゲノミックRNAから翻訳される³⁾。この42Kタンパク質には、237Kタンパク質のヘリカーゼに共通に保存されているアミノ酸配列が見出されている。13Kと15Kタンパク質は疎水性が高く、42Kタンパク質とともに感染植物の膜成分を含む画分から検出されている⁷⁾。このトリプルブロックジーンの位置にいくつかの欠失を起こさせ、RNA-1転写産物とともにプロトプラストと植物へ接種を行った結果、すべての欠失変異株はプロトプラストで増殖したが、接種葉には目に見える病斑は形成されなかったという³⁾。すなわち、これら3個の遺伝子は、barley stripe mosaic virusやpotexvirusにみられる遺伝子と同様、ウイルスの細胞間移行に関与していると考えられる。

4. 病原性と25Kタンパク質

BNYVVの野生株をツルナ(検定植物)に接種すると、黄色斑、退緑斑、え死斑など様々な病斑型が混在して現われる^{11,17)}。我々は、これらの病斑を単一病斑分離によって増殖すると、それぞれ均一な安定した病徴となり、その表現型とRNA種との間に密接な関係があることを示した¹⁷⁾。つまりRNA-3を含む分離株は、ツルナに黄色斑、テンサイに葉脈黄化症状、*Beta macrocarpa*に強い萎縮症状を示したことから、このRNA-3 (1,773塩基)には病原性を左右する遺伝情報が含まれていると考えた。

さらに我々は、BNYVVについて汁液による機械的接種を繰り返すと、RNA-3に欠失変異の生じることをみつけ、種々のRNA-3欠失変異株を用いて病原性の解析を行った。その結果、25Kタンパク質のORF内に欠失が生じると、ツルナ上の黄色斑がすべて退緑斑に変わり、病原性が低下することを認めた。さらにJupinら(1992)はRNA-3について人為的に変異株を作成し、病斑形成を詳細に調べ、同様の結果を得ている⁴⁾。また彼女らは、この実験でえ死斑を形成する領域

も RNA-3 に存在することを示した⁴⁾。この領域は 25 K ORF 内にあり、ORF-N と名づけたが、興味あることに全長の RNA-3、つまり 25 K タンパク質が発現している時には、この遺伝子が発現せずサイレントであるが、もしある特定の箇所に欠失が生じると ORF-N が活性化されると報告している⁴⁾。しかし、ツルナ接種葉でのえ死斑形成について、我々は RNA-3 を含まない分離株でもえ死斑が形成されることをしばしば観察している。え死斑形成は細胞の過敏感死を意味しており、他の多くのウイルスと宿主との間で認められている。

先に述べたように、BNYVV はテンサイの根で特異的に増殖し、細根を増生させるのが特徴である。我々は、25 K タンパク質を発現する正常株、その内部欠失株および RNA-3 を全く含まない分離株を各々保有する *P. betae* を作成し、テンサイに接種を行った。その結果、25 K タンパク質を発現する正常なウイルス株のみがそう根症状を示したのに対して、他の欠失変異は全く病徴を示さず、対照の無接種区と同じであった。以上の結果は、25 K タンパク質は、ツルナの黄色斑形成と同様、根の細根を増加させる機能をもつと結論される（未発表）。この 25 K タンパク質は、219 個のアミノ酸から成り、システイン含量の多い領域があることから核酸結合タンパク質（transcriptional activator）の機能をもつと考えられるが、どのような機構により葉では黄色斑を形成し、根では細根を増加させるのか、今後の興味ある課題である。

5. 菌伝搬性と 31 K および 75 K リードスルータンパク質

我々は、BNYVV の RNA-3 と RNA-4 とが野外分離株に常に存在することから、この RNA 種の菌伝搬性における役割を調べた。その結果、RNA-4 をもつウイルス分離株は、RNA-4 をもたない分離株より常に効率よく菌によって伝搬されることをみつけた¹³⁾。RNA-4（1,467 塩基）には、31 K タンパクがコードされていること（図）から、このタンパク質が菌伝搬性を向上させる働きがあると推定される。

しかしながら、RNA-4 をもたないウイルス分離株でも *P. betae* によって伝搬されるため、本質的には RNA-1 または RNA-2 に菌伝搬性に関与する遺伝子が存在する可能性がある。そこで RNA-2 の欠失変異株を用いて伝搬試験を行った。RNA-2 の欠失領域は、54 K タンパク質をコードする ORF 2 の C'末端約半分の部分で、1 つは 480 塩基、他の 1 つは 578 塩基の欠失が生じた変異株である。外被タンパク質は正常で

ある。これらの変異株を用いて *P. betae* による接種試験を行ったところ、*P. betae* は、これらの RNA-2 変異株を全くうつすことができなかった。すなわち、RNA-2 にコードされている 75 K リードスルータンパク質は、*P. betae* のウイルス伝搬に必須であることが証明された¹⁵⁾。

6. 14 K タンパク質

RNA-2 の 3'末端にある ORF 6 には、14 K タンパク質がコードされている（図）。このタンパク質の特徴はシステインリッチで Zn-フィンガー配列をもち、*in vitro* では Zn²⁺ にアフィニティーである⁸⁾。これらの性質から核酸との結合タンパク質としての活性をもっと考えられる。このタンパク質は、感染した組織の細胞質分画から容易に検出される⁷⁾。14 K タンパク質の欠失変異株は野生株に比べて、局部病斑内のウイルス濃度が極端に少なくなることを観察している³⁾。

7. 19 K タンパク質

日本の分離株に存在する RNA-5（1,348 塩基）には、19 K タンパク質がコードされている（図）。RNA-5 は、テンサイに対して RNA-3 と異なった病原性を示し、RNA-4 と同時に存在するとウイルスの増殖や菌伝搬性を高める働きがあるが、このような機能と 19 K タンパク質の発現との関係はまだ明らかでない。

おわりに

テンサイそう根病の病原ウイルス（BNYVV）ゲノムの遺伝子産物とその機能について、最近得られた知見について述べた。ウイルスの機能として大切な感染性、病原性および伝搬性に関与する遺伝子の全体像が明らかになったようにみえる。しかしながら、遺伝子の解析が進むにつれて、さらに次のような疑問が生じてきた。

①どのような仕組で 237 K タンパク質が複製酵素として働くのか？ またどの領域が宿主域を決定しているのか？ ②どのような機構によってトリプルブロックタンパク質がウイルスの細胞間移行に関与しているのか？ TMV などで見られる 30 K タンパク質との関係は？ ③ 25 K タンパク質が、なぜテンサイの細根を増殖させ、そう根病をひき起こすのか？ ④ 75 K と 31 K タンパク質が、どのような機構により菌体細胞と宿主細胞に働きかけ、*P. betae* のウイルス伝搬性を制御しているのか？ このようにウイルスゲノムに対応した宿主細胞側の遺伝子あるいは媒介菌側の遺伝子の応答は、ほとんど明らかでない、それらを解決するためには、ここで述べたウイルスの遺伝子産物と宿主細胞の

生化学的, 細胞化学的研究が必要である。

さらに, BNYVV はなぜ4種の分節ゲノムでなければならないのか。日本でみつかったRNA-5の役割は何か。Furovirus 群や他のウイルスとの分子レベルでの比較もウイルスの分子進化と併せて, 今後の研究に期待したい。

文 献

- 1) Abe, H. and Tamada, T. (1986). Association of beet necrotic yellow vein virus with isolates of *Polymyxa betae* Keskin. *Ann. Phytopathol. Soc. Japan*, **52**, 235-247.
- 2) Goldbach, R. and Wellink, J. (1988). Evolution of plus-strand RNA viruses. *Intervirology*, **29**, 260-267.
- 3) Gilmer, D., Bouzoubaa, S., Hehn, A., Guilley, H., Richards, K. and Jonard, G. (1992). Efficient cell-to-cell movement of beet necrotic yellow vein virus requires 3' proximal genes located on RNA 2. *Virology*, **189**, 40-47.
- 4) Jupin, I., Guilley, H., Richards, K. E. and Jonard, G. (1992). Two proteins encoded by beet necrotic yellow vein virus RNA 3 influence symptom phenotype on leaves. *EMBO J.* **11**, 479-488.
- 5) Keskin, B. (1964). *Polymyxa betae* n. sp., ein Parasit in den Wurzeln von *Beta vulgaris* Tournefort, besonders während der Jugendentwicklung der Zuckerrübe. *Archiv. Mikrobiol.*, **49**, 348-374.
- 6) Morozov, S. Y., Dolja, V. V. and Atabekov, J. G. (1989). Probable reassortment of genomic elements among elongated RNA-containing plant viruses. *J. Mol. Evol.* **29**, 52-62.
- 7) Niesbach-Klösgen, U., Guilley, H., Jonard, G. and Richards, K. (1990). Immuno-detection *in vivo* of beet necrotic yellow vein virus encoded proteins. *Virology*, **178**, 52-61.
- 8) Richards, K. E. and Tamada, T. (1992). Mapping functions on the multipartite genome of beet necrotic yellow vein virus. *Ann. Rev. Phytopath.*, **30**, 291-313.
- 9) Schmitt, C., Balmori, E., Jonard, G., Richards, K. E. and Guilley, H. (1992). *In vitro* mutagenesis of biologically active transcripts of beet necrotic yellow vein virus RNA 2: evidence that a domain of the 75-kDa readthrough protein is important for efficient virus assembly. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**, 5715-5719.
- 10) Shirako, Y. and Wilson, T. M. A. (1993). Complete nucleotide sequence and organization of the bipartite RNA genome of soil-borne wheat mosaic virus. *Virology*, **195**, 16-32.
- 11) Tamada, T. (1975). Beet necrotic yellow vein virus. *CMI/AAB Descriptions of Plant Viruses*, No.144.
- 12) 玉田哲男. (1991). テンサイそう根病ウイルス (BNYVV) 遺伝子の生物学的機能, 植物防疫, **45**, 157-160.
- 13) Tamada, T. and Abe, H. (1989). Evidence that beet necrotic yellow vein virus RNA-4 is essential for efficient transmission by the fungus *Polymyxa betae*. *J. Gen. Virol.*, **70**, 3391-3398.
- 14) Tamada, T. and Baba, T. (1973). Beet necrotic yellow vein virus from rhizomania affected sugar beet in Japan. *Ann. Phytopathol. Soc. Japan*, **39**, 325-332.
- 15) Tamada, T. and Kusume, T. (1991). Evidence that the 75K readthrough protein of beet necrotic yellow vein virus RNA-2 is essential for transmission by the fungus *Polymyxa betae*. *J. Gen. Virol.*, **72**, 1497-1504.
- 16) Tamada, T., Saito, M., Kiguchi, T. and Kusume, T. (1990). Effect of isolates of beet necrotic yellow vein virus with different RNA components on the development of rhizomania symptoms. *Proc. Symp. Int. Working Group on Plant Viruses with Fungal Vectors*, 1st., ed. Koenig, R., pp 41-44.
- 17) Tamada, T., Shirako, Y., Abe, H., Saito, M., Kiguchi, T. and Harada T. (1989). Production and pathogenicity of isolates of beet necrotic yellow vein virus with different numbers of RNA components. *J. Gen. Virol.*, **70**, 3399-3409.