

わが国に発生するトマト黄化えそウイルスとその特性

茨城県農業総合センター生物工学研究所 津 田 新 哉

はじめに

トマト黄化えそウイルス (tomato spotted wilt virus; TSWV) は、1915年にオーストラリアで始めて発見された。TSWVは熱帯、亜熱帯を中心に全世界に分布しているウイルスであり、数種のアザミウマによって永続伝搬される。TSWVは汁液接種が可能であり、宿主域は双子葉植物32科169種、単子葉植物6科7種と広く、ナス科、マメ科、キク科、ウリ科等の主要農作物に甚大な被害を与えている。TSWVは、その特性からウイルスの純化が困難であったため、分子生物学的解析が他のウイルスに比べて遅れていたが、最近の研究技術の進展に伴い塩基配列また遺伝子構造などが明らかとなり、1990年のベルリンにおける国際ウイルス分類委員会で動物ウイルスを中心とする *Bunyaviridae* 科に *Tospovirus* 属として分類された (CALISHER, 1991)。しかしながら、本ウイルス遺伝子の機能には不明の部分が多く、今後の研究展開が注目される植物ウイルスの一つである。

I 我が国における TSWV の発生と被害

我が国における TSWV の発見は、1965年、アメリカから輸入された隔離検疫中のグリアから検出されたのが最初であり、その後の発生報告を表-1に示した。1970年、岡山県及び北海道で葉に激しいえそ輪紋を示すグリアから TSWV が検出され、その後、罹病グリアの塊根を通して日本各地に広がったものと考えられる。

1972年に奈良県下、1974年には神奈川県下の露地及びハウス栽培トマトに発生したえそを伴う黄化症状は、TSWVによることが判明した。発病したトマトは葉に褐色えそ斑を生じて黄化し、茎や葉柄にも褐色えそ条斑を生じ、時に枯死する。果実は表面に褐色えそ斑を生じ、こぶ状に盛り上がった奇形果となり、上段果房ほど脱落しやすくなる。それによって病名をトマト黄化えそ病、TSWVの和名はトマト黄化えそウイルスと命名された。小島ら(1976)によると、本病常発地区の露地トマト及びその圃場周辺植物に着生するアザミウマの優占種はダイズウスイロアザミウマ (*Thrips setosus*) であり、TSWVの新しい媒介虫であることが判明した。発

病株の分布はダイズウイロアザミウマのトマト寄生密度分布と一致していた。トマト圃場及び周辺で畦畔雑草のノゲシやオニタビラコが TSWV に高率に感染しており、特にノゲシは越冬株からも本ウイルスが検出され、翌年の伝染源になっている可能性が示唆された。また、ある例では罹病トマト圃場周辺に TSWV に感染したグリア圃場があり、グリア栽培を中止した1978年以降には、本病の発生は認められなくなった。

ピーマン黄化えそ病の発生は、1972年兵庫県下で最初に確認され、1975年ごろから茨城県鹿島地帯で、その後岩手県下でも発生が認められた。茨城県鹿島地帯では1978年の春から夏にかけて半促成栽培で生長点組織が枯死する病害が大発生した。現地では「脳天病」と呼ばれ、被害のひどいハウスでは、ピーマン栽培を放棄するほどであった。本病によるピーマンの症状は発生時期によって異なる。主な病徴は、生長点組織付近の葉が奇形化し退緑モザイク症状となり、後に不鮮明な黄色輪紋が現れる。生長点組織付近の茎は褐色えそを生じ、葉柄と生長点組織が枯死する。果実は軽いモザイク、不規則な褐色えそを生じ、奇形化して商品価値を失う。ヒラズハナアザミウマ (*Frankliniella intonsa*) の花への寄生率が高いピーマンほど発病率が高く、着花数、結果数ともに減少する。鹿島地帯のピーマンの施設栽培作付面積は

表-1 日本において分離された TSWV

発生植物	都道府県	報告者(年次)
グリア	岡山	井上・井上(1972)
グリア	北海道	四方・佐藤(1975)
ピーマン	兵庫	坂本・松尾(1975)
トマト	神奈川	宇田川(1976)
トマト	奈良	小島ら(1976)
ヒオオギ	徳島	山本・大畑(1977)
ピーマン	茨城	米山・栃原(1979)
ネギ	神奈川	荒城ら(1980)
タバコ	沖縄	都丸ら(1982)
タバコ	岩手	TOMARU et al.(1984)
グリア	兵庫	坂本・松尾(1984)
スイカ	沖縄	IWAKI et al.(1984)
キュウリ	沖縄	外間・渡嘉敷(1987)
ピーマン	岩手	藤澤・仲谷(1991)
トウガン	鹿児島	鳥越ら(1992)

末次(1969)による輸入検疫中のグリア分離株の報告は除いた。

Tomato spotted wilt virus Occurred in Japan and its Properties. By Shinya TSUDA

約300haで、春期の東京市場占有率は80%に達したこともある。1979年の本病の発生は、全作付面積の20%に当たる60haに達し、出荷減収量は約1,200t、3.2億円であった。積極的なアザミウマ防除の結果、1979年以降本病の発生は減少している。

TSWVによるタバコの病害は、1975年以来、沖縄県下及び岩手県下でそれぞれ発生が確認されており、タバコの葉に黄斑、えそ、奇形を生じ、株はわい化する。1976年、沖縄県下の調査では、発生面積14ha、平均発病率30%で、被害面積は4haであった。

1982年11月以降、沖縄県下でハウス栽培スイカに灰白色の斑紋を示す病害が発生し、病名はスイカ灰白色斑紋病と命名され、病原はTSWVで、ミナミキイロアザミウマ (*Thrips palmi*) によって伝搬されることが判明した。罹病スイカは節間が短縮し、若い葉は退色縮葉症状を示し、後にほとんどの葉は灰白色を示す。激しくなると葉は下に巻き、柳葉状となり、毛茸が増生して銀色に見える。果実表面に退緑斑を生じ、激しくなると凹凸になり奇形果となる。皮下にコルク状のえそ斑を生じ、果肉部は空洞になることが多い。沖縄県下ではスイカと同等にトウガンの被害も甚大である。キュウリ、メロン、ニガウリ、ヘチマにも同病が発生しているが、いずれも症状は軽く、果実への影響は少ない。ハウス内スイカでのミナミキイロアザミウマの発生は沖縄本島で1981年3月、宮古島、石垣島で同年6月に確認され、スイカ灰白色斑紋病もそれに伴って発生したと考えられる。近年、ミナミキイロアザミウマの北上に伴ってTSWVも北上し、鹿児島県奄美大島のトウガンにも甚大な被害を及ぼしている。本病は特に露地栽培のスイカ、トウガンの果実の被害が大きく、商品価値は著しく低下する。トウガンの出荷量はミナミキイロアザミウマの発生以来毎年減少し、1980、1981、1982年で、それぞれ700、500、300tとなった。

単子葉植物では、ヒオウギ及びネギの2種類の作物からTSWVが検出されている。

II TSWVの特性

1 TSWVの一般的性状及び精製法

TSWV粒子は、直径80~100nmの球状粒子であり、植物ウイルスとしては珍しい外被膜を有し、内部の電子密度が高い部分(核)は直径が約60nmである(図-1)。このウイルスの宿主細胞内での増殖の場は細胞質であり、そこから小胞体内に向けて発芽する(MILNE, 1970)。その際、小胞体を形成している膜の一部を取り込み完全粒子となる。このような現象は、インフルエンザ

ウイルス等の *Orthomyxovirus* 科のウイルスと酷似しているが、それらは細胞から分泌される際に細胞膜を取り込み発芽しているので、質的には異なる。

TSWV粒子は、リン脂質及びタンパク質から構成される外被膜を持つため、多くの植物ウイルスの一般的な精製法では純化が困難である。各種磨砕用緩衝液、酸化防止剤またはキレート剤等の添加剤の検討もされ、また超音波ホモジナイザーによる磨砕、リン酸カルシウムを担体としたカラムクロマトグラフィーも行われた。しかしそのいずれもが十分にウイルスを回収することはできなかった。その後、TAS et al. (1977) は特徴的な処理法として、健全植物タンパク質に対する抗体を精製過程に添加することにより、磨砕粗汁液の清浄化を行った。一方、HANADA et al. (1993) は、TSWVのRNAを回収することを目的として、感染タバコ粗汁液を界面活性剤(Triton X-100)で処理し外被膜を除去したヌクレオキャプシドを精製する方法を報告した。TSUDA et al. (1991) は、40%と60%のショ糖溶液を重層しウイルスを含む粗分画を超速心分離した。このstep-wise sucrose density gradient法を用いたことで植物成分の除去に成功し、完全粒子としてのウイルスを分離精製することができた。ウイルスの分子生物学的特性を明らかにするためには、精製程度のよいウイルスを準備することは重要である。

2 TSWVのゲノム及びタンパク質

TSWVのゲノムは3分節の1本鎖RNAであり、基本的にマイナス鎖である(図-2)。最短からS、M及びL RNAと呼ばれ、分子量はS RNAから順に約1.02、1.56及び 3.08×10^6 である。オランダのDE HAAN et al. (1990) は、ブラジルのトマト分離株のS RNAをクローニングし、完全長の塩基配列を決定した。それによる

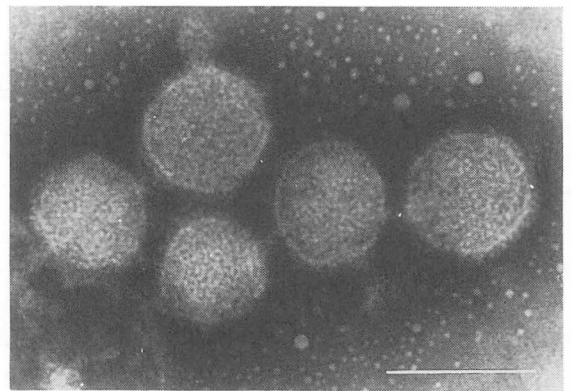


図-1 トマト黄化えそウイルスの電子顕微鏡像
白線は100nmを示す。

と、S RNA の前長は 2916 塩基であり、5′ と 3′ の両末端の 15 塩基は相補的配列を有し、かつ 5′ からの 3 分の 2 付近にヘアピン構造を推定させる約 250 塩基の A-U リッチな配列が認められた。また、S RNA 上には二つのオープンリーディングフレーム (ORF) が存在し、5′ 末端側の ORF は正方向 (ウイルス鎖) に、3′ 末端側の ORF は逆方向 (ウイルス相補鎖) にコードされている (図-3)。このような遺伝子構造は、*Arenaviridae* 科の *Arenavirus* 属、TSWV が属する *Bunyaviridae* 科 *Phlebovirus* 属、*Uukuvirus* 属の各ウイルス、さらにイネ縞葉枯ウイルス (rice stripe virus; RSV, *Tenuivirus* 属) 等に見られ、ambisense gene coding strategy と呼ばれている。近年、M RNA にもその塩基配列から S RNA と同様な遺伝子構造であることが明らかとなった (KORMELINK et al., 1992)。さらに、TsUDA et al. (1992) は、S、M 及び L RNA ゲノムに対する完全長相補性 RNA 鎖 (cRNA) が TSWV 粒子内に含まれていることを証明した。同様の遺伝子構造を有する *Phlebovirus*、*Uukuvirus* 及び RSV にも各ゲノムに対応した cRNA が粒子内に存在していることから、この cRNA が遺伝子情報発現に重要な機能を有しているものと考えられる。TSWV の L RNA では、ウイルス相補鎖のみに一つの ORF が存在し、一般的なマイナス鎖の転写翻訳過程を経るとされている (DE HAAN et al., 1991)。

TSWV の粒子内タンパク質は 3 種類の構造タンパク質 (N, G₁ 及び G₂) 及び 1 種類の機能タンパク質 (L) の 4 種類である (図-2)。N タンパクは S RNA にコード

され、分子量約 28k ダルトン (Da) で、ウイルス RNA と結合することにより閉環状のヌクレオキャプシドを構成している。G₁ (分子量約 75kDa) 及び G₂ (分子量約 46kDa) と呼ばれる 2 種類の構造タンパク質は、ヌクレオキャプシドを包む外被膜を貫通するように突出している。両者とも糖タンパク質であることから、構造タンパク質としてだけではなく、機能にも関与していることが示唆されている。これらは、M RNA にポリプロテインとしてコードされ、分解酵素により一定の位置で切断されて機能する。L タンパクは、分子量が約 335kDa であり、L RNA にコードされる。これは、ウイルス RNA を複製する RNA 依存 RNA ポリメラーゼであることが、そのアミノ酸配列から推定されている。TSWV は、粒子を構成するタンパク質以外に 2 種類の非構造タンパク質 (M RNA 上に NSm タンパク、S RNA 上に NSs タンパク) をコードしているが、それらの働きは不明である。

3 TSWV のアザミウマ媒介特性

TSWV のアザミウマによる媒介様式は、特異的である。アザミウマは、幼虫時にのみ TSWV を獲得し、蛹から羽化までの 10 日前後の潜伏期間を経た後、成虫になって 5 分間以上の加害吸汁で始めてウイルスを伝搬する。また、一度保毒したアザミウマは終生ウイルス伝搬能力を保持するが、経卵伝染はしない。このような伝搬様式を示す媒介虫は他に類をみない。TSWV の媒介虫は、ダイズウスイロアザミウマ、ネギアザミウマ (*Thrips tabaci*)、ヒラズハナアザミウマ、ミナミキイロアザミウ

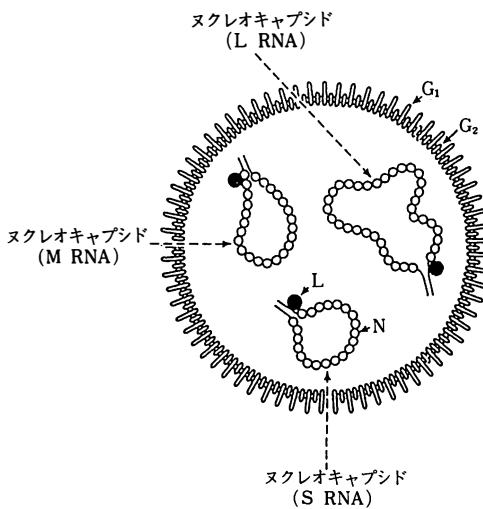


図-2 トマト黄化えそウイルスの構造模式図 (RESENDE, 1993)

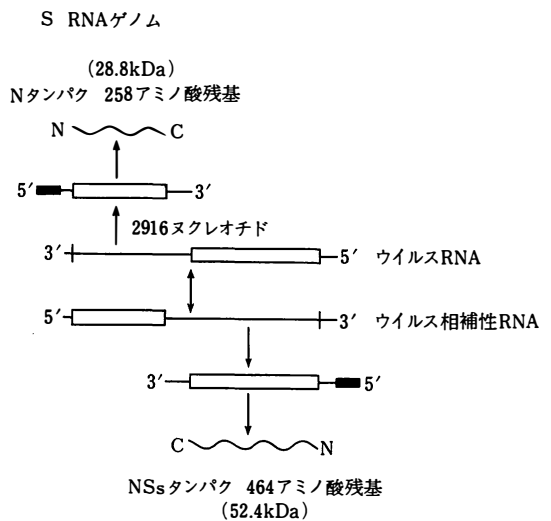


図-3 トマト黄化えそウイルス S RNA の遺伝子発現機構 (RESENDE, 1993)

マ, チャノキイロアザミウマ (*Scirtothrips dorsalis*), ミカンキイロアザミウマ (*Frankliniella occidentalis*), *F. schultzei*, *F. fusca* の8種類が知られている。TSWVのアザミウマ類による媒介機構に属する研究は少ない。最近, 保毒したアザミウマ超薄切片の電子顕微鏡観察により, 中腸及び口針にウイルスが確認されたとする報告がある (WIJKAMP et al., 1993)。これは, 昆虫体内に侵入したウイルスがどのような経路で植物への感染に結びつかかという観点から, 興味深い。

アザミウマは体長1mm以下であるため, TSWVを獲得し体内で維持したとしてもウイルス量は微量であるという推測から, TSUDA et al. (1994) は, アザミウマ1頭からの TSWV 検出を目的として Polymerase Chain Reaction (PCR) 法を応用し, S RNA の検出を行った。S RNA の3'末端側からの PCR 反応により約800塩基の cDNA 断片が作成されるようにデザインした2種類のプライマーを合成し, アザミウマ1頭から抽出した全 RNA を試料として供試した。その結果, 作業仮説に相当するような1本の cDNA 断片が検出され, その塩基配列から, 本ウイルスの S RNA を鋳型としていることが証明された。本法は, 媒介虫の伝搬機構解明に有用な技術となるであろう。

III TSWV の系統判別

TSWV の属する *Bunyaviridae* 科は, *Tospovirus* 属を含む5属に分類されており, その中の4属は脊椎または無脊椎動物を宿主とするウイルスである。近年, TSWV の分子生物学的性状が明らかになるにつれて, *Tospovirus* 属内の系統判別が示唆されるようになった。

LAW and MOYER (1990) は, 鑑賞植物ニューギニアインパチエンス (*Impatiens* sp.) 分離株 (TSWV-I) が TSWV-L (アメリカ普通系統) の M 及び S RNA と分子生物学的に明らかに異なっていることを報告した。さらに, TSWV-L 及び TSWV-I の N タンパク抗体は相互に交差反応は示さなかった。また, 1968年以降, インドでラッカセイに全身えそを示す TSWV が REDDY et al. (1968) により報告された。しかしその後の生化学的, 血清学的実験により, N タンパクの電気泳動的移動度の違い, また前記の TSWV-L とこの分離株の N タンパク抗体によるウェスタンブロットティングの反応性に相違があることから, この株も従来の TSWV とは区分されるべきものであるとされている。現在これらのウイルスは, *Tospovirus* 属内で, TSWV-I は *Impatiens necrotic spot virus* (INSV), インドのピーナッツ分離株は

bud necrosis virus (BNV) として提唱されている。

現在までに日本で分離された株は, ウィルス粒子内のヌクレオキャプシドの生化学的特性及びウリ科植物での感染性の違いから, 少なくとも2グループに大別することができる (TSUDA et al., 1993)。その比較特性を表-2に示した。九州以北で発生した分離株のうちトマト, ピーマン及びタバコ分離株は, ヌクレオキャプシドの抗原性, S RNA の相同性が高く, N タンパクと S RNA の電気泳動的移動度が同様であることから, 同一群とし, 普通 (O) 系統とした。O 系統の N タンパク領域の S RNA 塩基配列は, 国際的に最も研究が進んでいる TSWV-L (アメリカ普通系統) 及びブラジル普通系統のそれらと98%以上のきわめて高い相同性を示した。以上の結果から, これらの分離株は国際的に普通系統と判断してよいであろう。

一方, 沖縄県のスイカ分離株及び鹿児島県のトウガン分離株は, TSWV の局部病斑宿主であるペチュニアで接種葉に局部えそ斑点形成後全身感染を, ウリ科植物で全身感染を呈する。また, モノクローナル抗体により系統特異的抗原決定基の存在及びノーザンハイブリダイゼーションにより, S RNA 間にわが国 O 系統との相同性がないことが証明された。また, N タンパク及び S RNA の電気泳動的移動度も異なることから, 明らかに別系統であることが証明され, これをスイカ (W) 系統とした。

表-2 2系統に類別されたわが国産の TSWV の系統特性

系統	分離株 ^{a)}	N タンパク分子量	N タンパク抗原性 ^{b)}	S RNA 分子量	S RNA の相補性 ^{c)}		ウリ科感染
					N	W	
O	N	30K	a, o	1.02×10^6	+	-	局部感染
	M	30K	a, o	1.02×10^6	+	-	局部感染
	P	30K	a, o	1.02×10^6	+	-	局部感染
W	W	32K	a, w	1.21×10^6	-	+	全身感染
	K	32K	a, w	1.21×10^6	-	+	全身感染

a) N: 奈良県トマト分離株, M: 岩手県タバコ分離株, P: 茨城県ピーマン分離株, W: 沖縄県スイカ分離株, K: 鹿児島県トウガン分離株

b) ポリクローナル抗体を用いたウェスタンブロットティングによる系統特異抗原決定基の検出, a: 共通抗原決定基, o: O 系統特異的抗原決定基, w: W 系統特異的抗原決定基

c) N または W 分離株の S RNA をプローブとしたノーザンハイブリダイゼーションにおける反応性

これらのことから、わが国に発生した TSWV は、O 系統と W 系統に大別される。しかし、先に示したように INSV や BNV がウイルス種として扱われるならば、この W 系統も種として独立させることが可能である。これは、ウリ科植物に全身感染することからも国際的に極めてユニークである。以上のことから、今後のゲノム RNA の解析結果の集積を待って、近い将来 watermelon silver mottle virus と命名する用意がなされている。

おわりに

本稿では、TSWV の防除法には触れなかったが、感染源植物の除去、媒介虫アザミウマの防除、特に紫外線カットフィルム等の利用による防除が施設栽培で行われ、効果を上げている (外間, 1987)。

近年、TSWV の N タンパク質遺伝子を導入した形質転換植物が作出され、本ウイルスに対して抵抗性を示すことが報告されている。その抵抗性は、導入遺伝子からの翻訳タンパク質の関与ではなく、導入遺伝子の転写核酸の干渉によるらしい (GIELEN et al., 1991)。このように、本ウイルスに抵抗性を示す形質転換作物の実用化も時間の問題である。また、本ウイルスはアザミウマ伝搬様式や遺伝子発現機構に代表されるように、きわめてユニークな生物学的特性があり、動物ウイルスとの類似性も高いことから、アザミウマによる媒介機構を含む諸性

質の解明が必要である。

引用文献

- 1) CALISHER, C. H. (1991) : Arch. Virol. Suppl. 2: 273~283.
- 2) DE HAAN, P. et al. (1990) : J. Gen. Virol. 71: 1001~1007.
- 3) ——— et al. (1991) : ibid. 71: 2207~2216.
- 4) GIELEN, J. J. L. et al. (1991) : Bio/Technology 9: 1363~1367.
- 5) HANADA, K. et al. (1993) : Ann. Phytopath. Soc. Japan 59: 500~506.
- 6) 外間数男 (1987) : 植物防疫 41: 574~577.
- 7) 小島博文ら (1976) : 日植病院 42: 287~294.
- 8) KORMELINK, R. et al. (1992) : J. Gen. Virol. 73: 2795~2804.
- 9) LAW, M. D. and J. W. MOYER (1990) : ibid. 71: 933~938.
- 10) MILNE, R. G. (1970) : ibid. 6: 267~276.
- 11) REDDY, M. et al. (1968) : Plant Dis. Rep. 52: 494~495.
- 12) RESENDE, R. DE O. (1993) : Generation and characterization of mutants of tomato spotted wilt virus. Wageningen Agricultural University, The Netherlands, p. 2.
- 13) TAS, P. W. L. et al. (1977) : Neth. J. Pl. Path. 83: 61~71.
- 14) TSUDA, S. et al. (1991) : Ann. Phytopath. Soc. Japan 57: 239~246.
- 15) ——— et al. (1992) : ibid. 58: 393~404.
- 16) ——— et al. (1993) : ibid. 59: 626~634.
- 17) ——— et al. (1994) : ibid. 60: 99~103.
- 18) WIJKAMP, I. et al. (1993) : J. Gen. Virol. 74: 341~349.

なお、「表-1 日本において分離された TSWV」の引用文献は、紙面の都合上割愛させていただいた。

新刊紹介

原色図鑑「野外の毒虫と不快な虫」

梅谷献二 編

B6版, 331頁, 定価1,300円

全国農村教育協会 発行

植物防疫の専門家の中で、虫屋と病理屋という呼び方があるが、病理屋がいちばん虫屋を羨しく思うのは写真を写したときだろう。虫の写真は常に立体的で素人目にも興味深い。対するに病理屋がとる写真は、どんなに美しい花でも正常なものには役に立たず、美しい花卉に斑点があったりかびが生えたりして初めて写真になる。本書の表紙は恐ろしいはずのアシナガバチの写真だが、これが何とも美しい。本を開いてみても見飽きないほど美しく興味深い写真が並んでいる。

書名こそ「野外の毒虫と不快な虫」というように、そのものずばりすぎてあまり感心した書名ではないと思ったが、開いてみると2頁おきに出てくる虫の写真が、実にシャープで色鮮やか、毒虫や危険な虫たちであることもつい忘れて見とれてしまう。そして見とれたついでにその解説まで読んでしまうので、その意味でもなかなかよくできた本である。今年の夏

は猛暑で、スズメバチの類が大量繁殖し、大都会の住宅地や公園などでもハチに刺される被害が続出したが、本書を読むと、スズメバチにも何種類もあり、種類によって営巣場所や毒の強弱に大差があることや、退治するにはどんな方法がよいかなど有益な情報が満載されている。来年も猛暑になるかどうかかわからないが、本書が一般の人にも広く読まれて、来年にはキャンプに行った小中学生が入院するほどの被害に遭ったりしないようになって欲しいものである。

さてこの小文が載るのは「植物防疫」誌だと聞いているので、仲間うちの気安さからもう一つ悪口をいわせてもらえば、カやアブの項に写真としては色美しくできているのだが、毛むくじらの腕や脚などの被害写真がこれでもかこれでもかと出て来るのはいただけない。もっともこれも、こんな興味深い被写体を持たない病理屋のひがみなのかもしれない。自分の子供の頃の記憶をたどってみても、夕方遊び疲れた野原で、腕の上でアブが見る見る腹を真赤にふくらませていくのを見つめたことが一再ならずあったのが思い出される。してみると本書の中の毛ずねの写真も科学者らしい真摯な態度とみなせないこともないかと思えてくる。いずれにせよ不快な本どころか愉快で見どころの多い良書である。

(東京都立立川短期大学 岸 國平)