特集：ウイルスの遺伝子解析〔4〕

非病原性トビイロウンカレオウイルスの伝搬様式とゲノム構造：病原レオウイルスとの比較

農林水産省蚕糸・昆虫農業技術研究所　中島（なかしま） 信彦（のぶひこ）・野田（のだ） 博明（ひろあき）

はじめに

ウンカ・ヨコバイ類は，イネ萎縮病ウイルス（RDV）やイネ黒すじ萎縮病ウイルス（RBSDV），Maize rough dwarf virus（MRDV），イネラギッドスタント病ウイルス（RRSV）などの植物病原性ウイルスを媒介する。これらのウイルスは10本から12本に分節した2本鎖RNAをゲノムに持つ直径約70 nmの球状ウイルスであり，分類学上はレオウイルス科に属し，昆虫と植物の両者で増殖する。レオウイルス科は現在は9属に分けられており，そのうちの *Phytoreovirus, Fijivirus, Oryzavirus* の3属はウンカ・ヨコバイ類によって媒介される植物病原性レオウイルスで構成されている（都丸，1996）。

トビイロウンカレオウイルス（NLRV）は，イネの吸汁害虫であるトビイロウンカから分離されたウイルスである（Noda et al., 1991）。昆虫病原レオウイルスとしては細胞質多角体病ウイルス（CPV）が知られているが，このNLRVはトビイロウンカ体内でよく増殖するが，昆虫には病徴をあらわさない。本ウイルスに感染したトビイロウンカに吸汁されたイネにも病徴が認められない。野外でトビイロウンカが定着し増殖できる植物はイネのみと考えられているため，NLRVがイネ以外の植物を宿主に持っているとは考えにくい。したがって，NLRVは一般に知られている植物病原レオウイルスとは異なる性質をもつウイルスであろうと予想された。これまでにウンカ・ヨコバイ類からLAV（Leafhopper A virus）（Ofori and Francki, 1985）やPgMV（Peregrinus maidis virus）（Falk et al., 1988）など数種類の非病原性レオウイルスが報告されている。しかし，これらのウイルスの遺伝子に関して詳しく調査された例はなく，分類学上の位置付けも不明確である。レオウイルスのゲノムは2本鎖RNAであるため，遺伝子組換えによる遺伝子の機能解析を行うことは現状では困難である（上田，1994）。しかし，NLRVのように宿主域に特徴のあるウイルスの遺伝子を調べていけば，ウイルスの宿主特異性や植物に病徴をもたらす機構の解明に役立つと考え，このウイルスの解析に着手した。まずこのウイルスの性状を明確にするため，NLRVの伝搬様式，宿主範囲，ゲノム構造について述べた後，NLRVと既知の植物病原レオウイルスとを比較する。

Comparison between the Nonpathogenic *Nilaparvata lugens* Reovirus and Phytopathogenic Fijiviruses with Reference to Transmission and Genome Organization. By Nobuhiko Nakashima and Hiroaki Noda

I　NLRVの性状

1　NLRVの伝搬様式

一般にウイルスの宿主への伝搬は親から子へ伝えられる垂直伝搬と，個体群内で近隣の個体へ伝えられる水平伝搬の二つに区分できる。昆虫を宿主とする微生物の場合，垂直伝搬はさらに，卵の内部に侵入したウイルスによる場合と，産下された卵の表面に付着したウイルスが一齢幼虫に感染する場合がある。

NLRVがどのようにしてトビイロウンカ個体群の中で維持されているのかを知るために，NLRVの精製粒子に対するマウス抗体を使用した酵素結合抗体法（ELISA）でNLRVの経卵伝搬の有無を調査した。NLRVに感染しているトビイロウンカの雌成虫が産んだ卵30個からはNLRVは検出できなかった。次にふ化した幼虫を成虫になるまで試験管中のイネ幼苗で一頭ずつ個別に飼育し，これらの感染率を調べたところ，約15%の幼虫がNLRVに感染していた。また，卵を次亜塩素酸ナトリウム溶液で処理し，卵殻表面の一部を溶解させた場合には約2%の幼虫が感染していた。このことから，一部の次世代虫は経卵伝搬によってNLRVに感染するが，垂直伝搬はトビイロウンカ個体群の中でNLRVが維持されるための主要な伝搬法ではないと考えられた。ウイルスが垂直伝搬のみによって宿主昆虫の集団内で維持されるためには，ほぼ100%の感染率が必要であると思われる。さもなければ，昆虫がウイルスに感染することによって増殖に有利にならない限り，集団内での感染率は世代を経るたびに減少していくことになる。NLRVの場合，コロニー内での感染率は約60～90%である。この感染率を維持するためには，なんらかの方法により水平伝搬することが必要である。

トビイロウンカは，イネに口針を差し込み師管液を吸

表-1　NLRV に感染したトビイロウンカとの混合飼育による他のウンカ・ヨコバイ類への NLRV の感染(感染個体数/供試虫数)

ヒメトビウンカ	23/130
セジロウンカ	0/64
ツマグロヨコバイ	0/44
マラヤツマグロヨコバイ	0/56

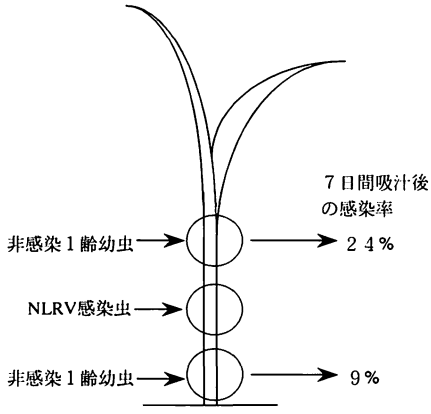


図-1　イネに取り付けた小ケージ中に放飼したトビイロウンカ間における NLRV のイネを介した水平伝搬

汁することによって養分を摂取している。そこで，出穂期のイネを使用して，NLRV に感染した5齢幼虫に吸汁させ，その部位の上下の位置で非感染個体群のトビイロウンカ1齢幼虫を放飼したところ，7日間の吸汁により平均で約16%の個体が NLRV を獲得した(図-1)。ウイルスがイネの維管束を通って，他の部位に広がったものと考えられる。NLRV 感染虫にさらに近接した位置で吸汁すればもっと効率よく獲得すると予想され，NLRV はイネを介した水平伝搬によってトビイロウンカ個体群内で維持されていると思われる(Nakashima and Noda, 1995)。

2　宿主範囲

NLRV に感染したトビイロウンカと他のウンカ・ヨコバイ類とを混合飼育することにより，他の種への NLRV の感染を調査したところ，ヒメトビウンカにのみ NLRV が感染した(表-1)。混合飼育していたヒメトビウンカを回収して，その後のヒメトビウンカ個体群での NLRV 感染率の推移を見た。少なくとも回収後第3世代までは NLRV に感染した個体がいたため，NLRV はヒメトビウンカ体内でも増殖していると思われる。

現在，一般に知られているウンカ類のレオウイルスは植物に病原性をもっている。NLRV に感染したウンカに吸汁されたイネに病徴は認められないが，ウイルス自身は植物体中で増殖している可能性も残されている。これを検討するために逆転写反応を利用した PCR（RT-PCR）法でイネからの NLRV の検出を試みた。対照として RRSV のゲノムセグメント S9 を用いた。NLRV 感染虫に3日間吸汁させた直後のイネからは NLRV のゲノムセグメント S8 が検出されたが，吸汁後3週間および6週間のイネからは検出されなかった。予備試験の結果では，RT-PCR 法による NLRV の検出感度は ELISA 法の625倍以上である。これに対し，RRSV は保毒虫による吸汁後3および6週間後でも明瞭に検出できた。この結果は，植物病原ウイルスである RRSV はイネで増殖しているのに対し，NLRV はトビイロウンカによってイネの中に接種されてもそこでは増殖せず，時間の経過に伴い消失してしまうことを示している。同様の結果が，長粒種のイネ(IR 系統)を用いた実験でも得られている(Nakashima and Noda, 1995)。

3　NLRV のゲノム構造

レオウイルスの遺伝子は10～12本の2本鎖 RNA から構成されている。NLRV の場合は10本の分節ゲノムを持っており，各分節はポリアクリルアミドゲル電気泳動の易動度が小さいほうから S1～S10 と呼ばれている。植物レオウイルスのうち遺伝子解析が最も進んでいるのは *Phytoreovirus* 属の RDV で，全塩基配列が決定されている(上田，1993)。レオウイルスでは，各分節ゲノムの末端に属特異的な配列が見られることを北海道大学のグループが報告している(Kudo et al., 1991)。NLRV の場合は 5′AGU…GUUGUC 3′であり，RBSDV や MRDV といった *Fijivirus* 属のメンバーのものとの類似性が高かった(Azuhata et al., 1992; Noda et al., 1994)。

NLRV の S1 から S10 の全遺伝子の配列を読みとり，これに基づいた解析結果を表-2 に示した。総塩基数は28,699塩基対からなり，これは RDV よりもさらに約3Kb大きく，今のところレオウイルス内では最大の塩基数を有する。最長のものは S1 で4,391塩基対，最小は S10 で1,430塩基対であった。各セグメントの5′端と3′端には非翻訳領域があり，5′端は S5 の201塩基，3′端は S6 の328塩基が最長であった。S2 と S3 は実際の塩基数とポリアクリルアミドゲル電気泳動の易動度に逆転現象が見られた。また，各セグメントには タンパク質の読み枠（オープンリーディングフレーム，ORF）が基本的に1本ずつ存在するが，S9 にだけ独立した2本の ORF が認められた。これらの ORF が翻訳されてできるタンパク質については，一部はその機能がわかっている。S1 は精製したウイルス粒子中に含まれる分子量約160 kDa

表-2 トビイロウンカレオウイルスのゲノム構造

ゲノムセグメント	塩基数	翻訳開始コドンの位置	コードされるアミノ酸の数	3′側非翻訳領域の塩基数	タンパク質の予想分子量	予想されるタンパク質の機能
S1	4,391	21	1,442	42	165.9 kDa	RNAポリメラーゼ
S2	3,732	22	1,199	111	136.6 kDa	Bスパイク
S3	3,753	15	1,223	67	138.5 kDa	コアキャプシッド
S4	3,560	76	1,132	86	130.0 kDa	?
S5	3,427	202	972	307	106.4 kDa	?
S6	2,970	150	830	328	95.1 kDa	?
S7	1,994	41	629	64	73.5 kDa	NTP結合
S8	1,802	7	562	107	62.4 kDa	外殻キャプシッド
S9	1,640	53	290	56	33.0 kDa	?
			206	38	23.6 kDa	?
S10	1,430	46	431	89	49.4 kDa	?

のRNA依存RNAポリメラーゼを，S7は核酸に結合する働きをもつ75 kDaのタンパク質をコードすると予想されている。これらはいずれもコア粒子に存在する。S2はコア粒子表面のBスパイク，S3はコア粒子のキャプシッドタンパク質をコードしている。S8は外殻のキャプシッドタンパク質をコードする。S9とS10は翻訳可能なタンパク質の分子量から推測すると非構造タンパク質をコードしていると思われる。S4,5,6の遺伝子産物については現在も解析中である(Nakashima et al., 1996)。ウイルスの遺伝子がコードしているタンパク質の機能解析により，宿主特異性や病原性に関する知見が得られることが期待される。

II NLRVと*Fijivirus*属の植物病原ウイルスとの比較

1 粒子構造

Fijivirus類は正20面体の球状ウイルスであり，外殻とコア粒子からなる二重のキャプシッド構造を持っている。さらに，外殻キャプシッドの表面には12個のAスパイク，コア粒子の表面には12個のBスパイクを持つ。Aスパイクは不安定でウイルスの純化過程でウイルス粒子の表面から脱離してしまい，純化したウイルス粒子には認められないことがある。NLRVに感染したトビイロウンカの唾液腺を解剖して摘出し，それを磨砕して電子顕微鏡で観察すると，Aスパイクを保持したNLRV粒子が認められる。また，ウイルス粒子精製の過程で，外殻キャプシッドが一部崩壊した粒子も観察され，それらにはBスパイクが認められる。NLRVと植物病原性のRBSDVとの間に，粒子構造上の相違は現在のところ認められない。

2 伝搬法

*Fijivirus*属のウイルスの伝搬様式については，Lovisolo and Milne (1977)，新海(1962)によって詳細に検討されている。それによると，MRDV, RBSDVともに経卵伝搬率は非常に低く，*Phytoreovirus*属のウイルスの高さとは明らかに異なる。NLRVの経卵伝搬率も決して高いとはいえず，*Fijivirus*属に近い傾向を示す。

3 宿主範囲

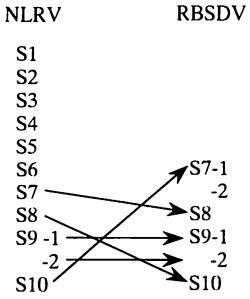
NLRVはトビイロウンカとヒメトビウンカで増殖するが，イネでは増殖できない。MRDVとRBSDVはそれぞれ植物ではトウモロコシとイネ，媒介昆虫ではヒメトビウンカを中心にして数種のウンカ類で増殖する。これらのウイルスはトビイロウンカでは媒介されない。

4 虫体内での増殖部位

NLRVに感染したトビイロウンカの組織切片を作成し，NLRVに対する抗体を用いて免疫組織化学を行ったところ，NLRVは中腸・脂肪体・唾液腺で増殖していることが示唆された。RBSDVの場合と同じく，ウンカ体内の多くの器官で増殖可能と思われる。

5 ORFの対応関係

RBSDVではS10,S9,S8,S7の全塩基配列が報告されている(Uyeda et al., 1990; Azuhata et al., 1993; 磯貝ら, 1995)。データベースに登録されているタンパク質のアミノ酸配列の中から，NLRVの塩基配列から予想されるものと相同性の高いものを検索すると，NLRV S10, S8,S7のORFは，RBSDVのS7-1, S10, S8のものにそれぞれ対応する。また，NLRVのS9にコードされる2本のORFは同じくRBSDVのS9の2本のORFに対応すると思われる(磯貝ら，1996)(図-2)。比較できるゲノムセグメントに限りはあるが，*Fijivirus*属で最も豊富なデータがあるRBSDVのORFとNLRVのそれとは互いによく対応する。報告されているRBSDVのORFのうち，S7の2番目のORFに対応するORFのみがNLRVには存在しない。したがって，RBSDV S7の



図－2　NLRV と RBSDV の ORF の対応関係

2番目の ORF にコードされるタンパク質が NLRV と RBSDV の最も際立った性質の違い，すなわちイネでウイルスが増殖できるかどうかを規定している可能性も考えられる。

お わ り に

NLRV の総合的な性状を考慮すると，NLRV は *Fijivirus* 属に属する可能性が最も高い。しかし，今までに *Fijivirus* 属に分類されているウイルスはすべて植物病原ウイルスであるため，現在の国際ウイルス分類命名委員会の基準に適合するかどうか微妙な面もある。NLRV と *Fijivirus* 属の既知の植物病原性レオウイルスとの際立った違いは，NLRV が植物で増殖できないということである。多くの植物ウイルス学者から，植物病原性のレオウイルスの起源は昆虫にあるという仮説が出されているが，その根拠になっているのは，これらのレオウイルスが一般に宿主植物よりも媒介昆虫の中でよく増殖し，しかも昆虫には目立った悪影響を与えないということである。LAV や PgMV などの植物で増殖しない昆虫のレオウイルスが発見されたこともこの説を支持することとなった(Matthews, 1991)。NLRV は LAV や PgMV と同じような性質を持ったウイルスであるが，その遺伝子まで細かく調査された初の非病原性レオウイルスである。いままでは植物あるいは昆虫に病気をもたらすウイルスの解析には努力が払われてきたが，NLRV のようなウイルスは昆虫・植物いずれの研究分野からもあまり注目されていない。このようなウイルスとそれに近縁な病原性ウイルスの遺伝子どうしを比較することにより，都合の悪い形質をウイルスのどの遺伝子がもたらすかということを予測でき，さらには，その情報をもとに新しい概念に基づくウイルス防除法の開発が可能になるかもしれない。

引 用 文 献

1) Azuhata, F. et al. (1992) : J. Gen. Virol. 73 : 1593～1595.
2) ――― et al. (1993) : ibid. 74 : 1227～1232.
3) Falk, B. W. et al. (1988) : Intervirology 29 : 195～206.
4) 磯貝雅道ら (1995) : 日植病報 61 : 281～282.
5) ―――ら (1996) : 平成8年度日本植物病理学会講演要旨予稿集, p159.
6) Kudo, H. et al. (1991) : J. Gen. Virol. 72 : 2857～2866.
7) Matthews, R. E. F. (1991) : Plant Virology Third Edition, Academic Press, San Diego, pp. 665～672.
8) Milne, R. G. and O. Lovisolo (1977) : Adv. Virus Res. 21 : 267～341.
9) Nakashima, N. and H. Noda (1995) : Virology 207 : 303～307.
10) ――― et al. (1996) : J. Gen. Virol. 77 : 139～146.
11) Noda, H. et al. (1991) : ibid. 72 : 2425～2430.
12) ――― et al. (1994) : ibid. 75 : 221～225.
13) Ofori, F. A. and R. I. B. Francki (1985) : Virology 144 : 152～157.
14) 新海　昭(1962) : 農業技術研究所報告 C 14 : 1～107.
15) 都丸敬一(1996) : 植物防疫 50 : 26～29.
16) Uyeda, I. et al. (1990) : Proc. Japan Acad. 66 Ser. B : 37～40.
17) 上田一郎(1993) : 植物防疫 47 : 449～452.
18) ―――(1994) : 化学と生物 32 : 443～446.

本 会 発 行 図 書

『応用植物病理学用語集』

濱屋悦次（前 農林水産省農業環境技術研究所微生物管理科長） 編著

定価　4,800 円（本体 4,660 円）　**送料　340 円　B 6 版　本文 506 ページ**

植物病理学研究に必要な用語について，植物病理学はもちろん，農薬，防除，生化学，分子生物学などについても取り上げ（約 6,800 語），紛らわしい用語には簡単な説明を付けそれぞれを英和，和英に分けてアルファベット順に掲載し，また，付録には植物のウイルス，細菌，線虫の分類表を付した用語集です。植物病理学の専門家はもちろん広く植物防疫の関係者にとってご活用いただきたい用語集です。

お申し込みは前金（現金書留・郵便振替）で直接本会までお申し込み下さい。