

特集：ゲノム情報を利用した環境に優しい昆虫制御技術に関するアセス調査

# 昆虫のゲノム情報を利用した媒介昆虫と植物ウイルスの相互作用研究に関する展望

中央農業総合研究センター 津 田 新 哉  
農業生物資源研究所 中 島 信 彦

## はじめに

植物病原ウイルスの多くが生物媒介性、取り分けダニを含む節足動物（昆虫）媒介性（HULL, 2002）であるにもかかわらず、それらの寄主昆虫のゲノム解析は遅々として進展していない。一方、マラリアの媒介昆虫であるガンビアハマダラカのゲノム解析が進み、昆虫と病原体の相互作用に関する分子機構の理解が進展し、既存の技術とは異なる新しい概念による忌避剤、殺虫剤、病原体の媒介効率を低下させた組換え昆虫の作出などが行われようとしている。現在の農業現場において猛威を振っている虫媒伝染性ウイルス病は、アザミウマ類によるトスポウイルス病、タバココナジラミによるトマト黄化葉巻病などである。虫媒伝染性植物ウイルス病のまん延を食い止めるには、媒介昆虫の制御が重要である。対処すべき手法は、主として化学的あるいは物理的防除法である。しかし、圃場における化学農薬の利用は、栽培期間中に多種類の農薬が多数回散布されるため、環境への負荷あるいは食品の安全性が危惧される。また、薬剤耐性媒介虫の出現も懸念される。一方、誘引トラップや防虫ネットなどの遮蔽物を利用した物理的防除法は、施設栽培には一定の効果を示すが露地栽培では顕著な効果は現れない。媒介虫の天敵などを利用した環境保全型害虫防除法を実施するためには、化学的・物理的・生物的防除法等を組み合わせた IPM（病害虫総合管理）マニュアルなどのプロトコールが必須である。

農作物栽培圃場で発生する虫媒伝染性植物ウイルス病を制御するには、虫体内に取り込まれたウイルスがどのように植物へ運ばれて感染が拡大するのかという、虫体内循環システムの詳細を解明する必要がある。これまでの研究により、既に多数の植物ウイルスの遺伝子解析が進み、虫媒に必須な主要ウイルス遺伝子のほとんどは明らかとなった。しかし一方、昆虫のウイルス媒介に関与する遺伝子情報はほとんどなく、結果として虫媒伝染の

分子機構解明に大きな足枷となっている。植物ウイルス媒介に関与する昆虫のゲノム情報並びにその機能を分子生物学的に解析し、ウイルス獲得から接種までの間の昆虫体内で起こる分子間相互作用の全容を明らかにすることで、その循環ルートを遮断する新しい媒介制御技術の開発が期待される。

本稿では、媒介昆虫のゲノム情報や EST 解析の進展状況を調査した結果をまとめるとともに、それらが今までにない新しいコンセプトで創出される植物ウイルスの虫媒伝染制御技術の開発につながる可能性を展望した。

## I 媒介昆虫のゲノム解析進展状況

2006年6月には、ゲノムプロジェクトを実行・計画中の昆虫種として37種がNCBIに掲載されている。動物病原の媒介昆虫では、各種のカ、サシガメ、ツエツエバエ等があり、一応ゲノム解析が終了したとされるのはガンビアハマダラカ (*Anopheles gambiae*) のみである。植物病原関係ではエンドウヒゲナガアブラムシ (*Acyrtosiphon pisum*) のみが計画中であった。動物病原ウイルスの媒介昆虫においてもゲノム情報を自在に活用できる状態とは言えず、媒介昆虫のゲノム情報を基に病原ウイルス媒介を有効に阻止するような手法を実用化に耐える水準で開発できるような状況には至っていない。

媒介虫本体のゲノム解析ではないが、海外でブドウやアーモンドの病原菌を媒介するヨコバイの一種 (*Homalodisca coagulata*) の2種共生細菌のゲノムが解析され、アミノ酸類とビタミン類の生合成に関する酵素類をお互いに補完するように保持するなどの特徴が示された (Wu et al., 2006)。共生細菌が合成するタンパク質が媒介虫体内でのウイルス循環を助けるという報告もアブラムシでなされており、媒介昆虫の共生微生物産物と媒介微生物との高次関係を解明する糸口となるかもしれない。

## II 媒介昆虫の EST 解析進展状況

ゲノム解析には膨大な経費を要するため、植物ウイルス

Perspectives for Insect Genomic Analyses and Virus-vector Interactions. By Shinya TSUDA and Nobuhiko NAKASHIMA

(キーワード：媒介昆虫, ゲノム解析, EST 解析, ウイルス病)

の媒介昆虫に対しては相対的に簡便な EST 解析が試みられている。

ミカンクロアブラムシ (*Toxoptera citricida*) は、カンキツトリステザウイルスの主要媒介虫である。2003 年に USDA で 5,180 個の cDNA の配列が解析されて 2,124 個の独立した配列が得られ、そのうちの約 3 割は新規遺伝子と推定された (HUNTER et al., 2003)。オオムギ黄萎病ウイルスの媒介昆虫であるムギクビレアブラムシ (*Rhopalosiphum padi*) が単為生殖相から有性生殖相に変化する機構を解明する目的で短日処理した虫から作製した EST ライブラリーでは、ショウジョウバエの卵細胞の初期分裂に関与する遺伝子に相関する遺伝子などが含まれていた (TAGU et al., 2004)。

エンドウヒゲナガアブラムシの EST ライブラリーから作製したマイクロアレイを用いて、共生細菌のゲノムアレイと同時解析し、共生細菌の熱ショックタンパク質遺伝子群の挙動解析が可能であると報告された (WILSON et al., 2006)。また、数千個体のエンドウヒゲナガアブラムシを解剖して菌細胞を摘出して作製した EST ライブラリーを解析し、この器官ではアブラムシの共生細菌が合成したアミノ酸の輸送などに必要な遺伝子の mRNA の発現が亢進していると判明した (NAKABACHI et al., 2005)。EST ライブラリーが高密度化すれば、微生物の感染・増殖における媒介昆虫の各種解析に利用できる可能性を示している。

### III アザミウマ類によるトスポウイルス媒介研究の現状

トスポウイルスのアザミウマ類 (*Thysanoptera*) による媒介様式は、ウイルス増殖・永続循環型である。トスポウイルスが感染した植物でふ化した 1 齢幼虫のアザミウマは、摂食活動により体内にウイルスを獲得し、蛹から羽化までの 10 日前後の潜伏期間を経た後、2 齢幼虫の後期もしくは成虫になって初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 (ULLMAN et al., 2002)。また、トスポウイルスは感染したアザミウマ体内の中腸、唾液腺等の感染細胞内で増殖する (TSUDA et al., 1996; OHNISHI et al., 2001)。トスポウイルスがアザミウマの中腸細胞へ侵入するためにはトスポウイルス外被膜の Gn タンパク質が必要であり、それらがリガンドとなって中腸細胞表面に接合する (WHITFIELD et al., 2004)。一方、アザミウマ体内にあると思われるウイルスレセプターは、中腸細胞から単離された 50 kDa タンパク質の可能性が (MEDEIROS et al., 2000)。トスポウイルス

を獲得したアザミウマの体内では、免疫系が活性化されているらしい (MEDEIROS et al., 2004)。アザミウマの cDNA マイクロアレイを使った実験で、抗微生物関連ペプチドであるディフェンシンとセクロピン、体内侵入病原体認識に関連するレクチン類、自然免疫を活性化するレセプターである Toll-3, Toll-like レセプターによって活性化される伝達物質である JNK キナーゼなどがアップレギュレートされている。トスポウイルスとアザミウマ類に関する上記以外の事例は、現在の処得られていない。トスポウイルスによる病害を回避する新たな防除技術を創出するには、ウイルス媒介機能を含めたアザミウマ類のゲノム解析情報の蓄積が必須である。

### IV タバココナジラミによるトマト黄化葉巻ウイルス媒介研究の現状

トマト黄化葉巻ウイルスのタバココナジラミ (*Bemisia tabaci*) による媒介様式は永続循環型であるが、虫体内でウイルス増殖は未確認である。イスラエルの研究チームは、本ウイルスが経卵伝搬すると報告している (GHANIM et al., 1998) が、我が国ではタバココナジラミの経卵伝搬を自国のウイルス系統と在来媒介虫間で確認できていない (私的通信)。コナジラミ伝搬に関与するウイルス側因子は、外被タンパク質であることが判明している (NORIS et al., 1998)。一方、タバココナジラミ側因子は、体内共生細菌が生産する GroEL というタンパク質とウイルス粒子が結合することからそのタンパク質がウイルスレセプターとしての機能を担っている可能性が示唆されている (MORIN et al., 1999; AKAD et al., 2004)。しかしながら、その GroEL タンパク質がウイルスの体内循環ルートにおいてどのような役割を果たすのか、現在も不明である。

米国・イスラエルの共同研究チームによりタバココナジラミの卵・幼虫・成虫からも EST ライブラリーが作製されている (LESHKOWITZ et al., 2006)。卵・幼虫・成虫の異なる素材間で重複しない遺伝子数のおよそ半数が塩基配列データベースにない新規遺伝子であった。タバココナジラミが蛹期を経ない不完全変態の昆虫であり、これまでに解析されたキイロショウジョウバエ、ガンビアハマダラカ、ミツバチ等の完全変態昆虫とは異なる仕組みを反映するとも考えられる。また、トマト黄化葉巻病ウイルスとトマトモットル病ウイルスを獲得したタバココナジラミ成虫からも EST ライブラリーが作製されたが、残念ながらマイクロアレイ解析などには至らず、ウイルス獲得の際の媒介昆虫の遺伝子発現変動調査などは残された課題である。タバココナジラミのウイルス感染

や媒介効率に差異のある昆虫の発現遺伝子の変動追跡データが集積すれば、ウイルス感染・媒介に重要な昆虫側の遺伝子も明らかになろう。

## V 先行事例から推察される今後のゲノム情報を利用した植物病原媒介昆虫研究

動物病原体の媒介昆虫やモデル昆虫で行われてきた発見は、植物病原ウイルスをコントロールする新たな方策の開発にも役立つと思われる。それら先行研究事例を参考に今後の展望をまとめた。

昆虫側の病原媒介に必要な因子を効率よく解析・特定するには、トランスジェニック昆虫の利用が望まれる。また、トランスジェニック昆虫を用いることで、ウイルス媒介を遮断する防除モデルをデザインすることもできる。例えば、吸汁に伴い合成・分泌されるようなタンパク質のプロモーター制御下にウイルス粒子に親和性のあるタンパク質遺伝子、あるいは抗ウイルス作用をもつ核酸やタンパク質・ペプチドを配置することで媒介能力低下に繋がる可能性もある。また、昆虫体内増殖型のウイルスに対しては、消化管から唾液腺への移行に関わるような因子を突き止め、それを不活性化することにより媒介能を低下させることができるかもしれない。しかし、何れの方法を実施するにせよ、これらのモデルを参考としてトランスジェニック昆虫に依存しない方法を考案しなければならないことはいままでのない。

RNA干渉に必要なタンパク質遺伝子のサイレンシングを行ったところ、EGFPでラベルしたアルファウイルスの増殖がカの体内で約15倍上昇した。昆虫体内でRNA干渉作用がRNAウイルス増殖と拮抗することを直接示す結果であり、媒介昆虫の先天性免疫反応の強弱がウイルス獲得に大きく影響する(Keene et al., 2004)。同様のことが植物ウイルス媒介昆虫でも起きる可能性は十分にあり、媒介能制御のための研究対象の一つとなろう。

増殖型・持続伝播型の植物ウイルスは、媒介昆虫の唾液腺から植物体内へ送り込まれると考えられる。哺乳動物を吸血するダニが媒介する病原体では、病原体の表層タンパク質が唾液タンパク質の一種と特異的に作用する。その唾液腺タンパク質を抑制してダニによる病原体の媒介効率が大幅に低下した例がある(Ramamoorthi et al., 2005)。病原体媒介過程において、病原体と直接接触する唾液腺のタンパク質との相互関係も重要と思われる。

また、媒介昆虫の植物病原体侵入部位や病原体保持部位となる各器官に病原体の受容器(レセプター)があるとすれば、そこへの結合を阻止することで媒介昆虫による病原体獲得の阻止も可能となろう。植物病原体では、

媒介昆虫体内のレセプターを明快地同定した例はまだ知られていない。レセプターの同定は、媒介昆虫が長期間にわたり病原体を保持する理由の解明につながり、レセプターの機能を人為的にコントロールすることにより媒介生物体内における病原体の制御に結びつくと思推される。本年、ファイトプラズマの媒介昆虫特異性に関し、ファイトプラズマの表面膜タンパク質が媒介ヨコバイのマイクロフィラメントやミオシンと結合するのに対して媒介できないヨコバイのものとは結合しないことが報告され、この結合が媒介昆虫の媒介特性並びに種特異性を規定すると示唆された(Suzuki et al., 2006)。

ショウジョウバエをはじめとするモデル昆虫のゲノム解析が終了し、ウイルスに対する昆虫側の先天性免疫に関わると思われる分子群の解析も行われている。選択性の高い昆虫制御剤開発の面からは、ショウジョウバエやカイコなどの昆虫種と害虫との比較ゲノムを基礎とした標的遺伝子の抽出を行う傾向にあり、引き続きゲノム解析情報の蓄積をはかる必要がある。

ウイルス研究においてはウイルス増殖可能な培養細胞の開発が研究の進展に大きく寄与する。しかし、昆虫から樹立された培養細胞株は極めて限られており、特に植物ウイルス媒介昆虫の培養細胞株はほとんど樹立されていないのが現状である。胚由来の細胞系統を数種確立した例は半翅目昆虫でもあるが、増殖に要する時間が汎用実績のある培養細胞(24時間程度)に比較すると長く(Kamita et al., 2005)、試験管内におけるウイルス感染実験に適した昆虫培養細胞株の樹立も望まれる。

## おわりに

虫媒伝染性ウイルス病が発生した園芸栽培圃場では、必ずといってよいほど被害作物上に媒介昆虫の生息が確認される。媒介昆虫の忌避を目的として、紫外線カットフィルムやシルバーテープなどを利用した耕種的防除法や殺虫剤散布による化学的防除法が実施されている。また、環境保全型防除の一環として天敵などを利用した総合防除システムが実施されている。しかし、種苗の国際的流通化や薬剤耐性媒介虫の出現、さらに害虫駆除に利用している天敵と同属の害虫が出現したときの対処法の未整備など、農業を取り巻く環境は一刻一刻と変化している。

媒介昆虫体内において、ウイルス媒介制御に効果を発揮する薬剤を開発するには、まず標的となるウイルス感染・増殖に関与するレセプターや輸送因子などの昆虫側の因子を同定する必要がある。ショウジョウバエやカにおける解析例を実際の植物病原媒介昆虫に適用する方向で研究が進展すると考えられるが、対象昆虫におけるゲ

ノム情報や形質転換技術などの研究ツールを充実させる必要がある。次に、媒介昆虫体内での植物ウイルスの循環ルートを解明し、虫体内器官間のウイルス移行に関与する媒介虫側とウイルス側の双方の因子を特定して、その循環ルートを遮断する媒介制御技術の開発につなげる。

海外侵入害虫の発生や殺虫剤耐性媒介昆虫の出現により、昆虫媒介性ウイルス病の防除は困難を極めている。昆虫が伝播に必須の媒介者である場合には、ウイルスを伝播できないようにして病害のまん延を抑止できると考えられる。媒介昆虫のウイルス伝播能力を制御するための手段を、できるだけ多く揃えておく必要があろう。

### 引用文献

- 1) AKAD, F. et al. (2004) : Arch. Virol. 149 : 1481 ~ 1497.
- 2) GHANIM, M. et al. (1998) : Virology 240 : 295 ~ 303.
- 3) HULL, R. (2002) : Matthews' Plant Virology, Academic Press, London, 1001 pp.

- 4) HUNTER, W. B. et al. (2003) : J. Insect Sci. 3 : 23.
- 5) KAMITA, S. G. et al. (2005) : In Vitro Cell Dev. Biol. Anim. 41 : 149 ~ 153.
- 6) KEENE, K. M. et al. (2004) : Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 101 : 17240 ~ 17245.
- 7) LESHKOWITZ, D. et al. (2006) : BMC Genomics 7 : 79.
- 8) MEDEIROS, R. B. et al. (2000) : Virus Res. 67 : 109 ~ 118.
- 9) ——— et al. (2004) : J. Virol. 78 : 4976 ~ 4982.
- 10) MORIN, S. et al. (1999) : Virology 256 : 75 ~ 84.
- 11) NAKABACHI, A. et al. (2005) : Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 102 : 5477 ~ 5482.
- 12) NORIS, E. et al. (1998) : J. Virol. 72 : 10050 ~ 10057.
- 13) OHNISHI, J. et al. (2001) : Phytopathology 91 : 1149 ~ 1155.
- 14) RAMAMOORTHY, N. et al. (2005) : Nature 436 : 573 ~ 577.
- 15) SUZUKI, S. et al. (2006) : Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 103 : 4252 ~ 4257.
- 16) TAGU, D. et al. (2004) : Insect Biochem. Mol. Biol. 34 : 809 ~ 822.
- 17) TSUDA, S. et al. (1996) : Phytopathology 86 : 1199 ~ 1203.
- 18) ULLMAN, D. E. et al. (2002) : Adv. Bot. Res. 36 : 113 ~ 140.
- 19) WHITFIELD, A. E. et al. (2004) : J. Virol. 78 : 13197 ~ 13206.
- 20) WILSON, A. C. C. et al. (2006) : BMC Genomics 7 : 50.
- 21) WU, D. et al. (2006) : Plos Biol. 4 : 1079 ~ 1092.

### (新しく登録された農薬 19 ページからの続き)

なす：黒枯病，灰色かび病，すすかび病：収穫前日まで  
 キャベツ：べと病：収穫 14 日前まで  
 はくさい：白斑病，べと病，黒斑病，白さび病：収穫 14 日前まで  
 ひろしまな：白斑病：収穫 28 日前まで  
 だいこん：白さび病，ワッカ症，白斑病，炭疽病：収穫 45 日前まで  
 なばな類：白さび病，べと病，白斑病，黒斑病：収穫 60 日前まで  
 たまねぎ：べと病，灰色かび病：収穫 7 日前まで  
 ねぎ：黒斑病，べと病：収穫 14 日前まで  
 わけぎ：黒斑病，べと病：収穫 21 日前まで  
 らっきょう：灰色かび病：収穫 14 日前まで  
 にんじん：黒葉枯病：収穫 7 日前まで  
 セルリー：斑点病：収穫 21 日前まで  
 レタス：すそ枯病，べと病：収穫 14 日前まで  
 リーフレタス：すそ枯病，べと病：収穫 21 日前まで  
 みつば：べと病：根株養成期 但し，収穫 75 日前まで  
 アスパラガス：茎枯病，斑点病，褐斑病：収穫前日まで  
 しょうが：紋枯病，白星病：収穫 14 日前まで  
 みょうが：葉枯病，紋枯病：収穫 14 日前まで  
 にんにく：葉枯病，黄斑病：収穫 7 日前まで  
 ゆうがお：炭疽病，うどんこ病，べと病：収穫前日まで  
 うり類（漬物用，ただし，ゆうがおを除く）：炭疽病，うどんこ病，べと病，つる枯病：収穫前日まで  
 てんさい：褐斑病：収穫 45 日前まで  
 うど：黒斑病：根株養成期 但し，収穫 200 日前まで  
 ふき：灰色かび病：収穫 45 日前まで  
 食用ぎく：褐斑病：収穫 30 日前まで  
 食用ゆり：葉枯病：収穫 14 日前まで  
 ピーマン：斑点病，うどんこ病：収穫前日まで  
 しそ：斑点病（株枯症）：収穫前日まで

茶：炭疽病，もち病，輪斑病，網もち病，褐色円星病，新梢枯死症（輪斑病菌による），黒葉腐病：摘採 10 日前まで  
 みしまさいこ：炭疽病：収穫 30 日前まで  
 たばこ：うどんこ病：—  
 ばら：黒星病，うどんこ病：—  
 きく：黒斑病，褐斑病：—  
 カーネーション：斑点病，褐色斑点病：—  
 ゆり：葉枯病：—  
 りんどう：葉枯病，褐斑病：—  
 宿根アスター：斑点病：—  
 芝（ペントグラス）：ヘルミントスポリウム葉枯病，ヘルミントスポリウム葉枯病，葉腐病（ブラウンパッチ），葉腐病（ブラウンパッチ）：発病初期  
 稲（箱育苗）：苗立枯病（リゾプス菌）：は種時  
 きゅうり：苗立枯病（リゾクトニア菌）：は種時又は活着後（但し，定植 14 日後まで）  
 トマト：苗立枯病（リゾクトニア菌）：は種時又は活着後（但し，定植 14 日後まで）  
 みずな：立枯病：は種時  
 ねぎ：苗立枯病（リゾクトニア菌）：出芽揃い後（出芽 3 日後から 10 日まで）  
 レタス：ビッグベイン病：収穫 42 日前まで  
 にんじん：黒葉枯病：は種前

### 「除草剤」

●イマズスルフロン・カフェンストロール・ダイムロン・ベンゾピシクロン水和剤  
 21756：テッテイフロアブル（エスディーエス バイオテック）2006/8/16  
 イマズスルフロン：1.7%，カフェンストロール：4.0%，ダイムロン：7.6%，ベンゾピシクロン：3.8%  
 (28 ページへ続く)