

メロンえそ斑点ウイルスの 媒介菌 *Olpidium bornovanus* 遊走子における 局在性とウイルス外被タンパク質の役割

中央農業総合研究センター ^{もちづき}望月 ^{ともふみ}知史・^{つだ}津田 ^{しんや}新哉

はじめに

植物ウイルスの多くは、何らかの媒介者によって感染を拡大する。植物ウイルスの媒介者の多くは昆虫（アブラムシ、アザミウマ、コナジラミ、甲虫等）であるが、その他に土壤中に生息し植物根に寄生する微生物の一部も媒介者であることが知られている。それらは、原生動物のネコブカビ門ネコブカビ科に分類される *Polymixa graminis*, *P. bete* および *Spongospora subterranea*, また菌類のツボカビ門フクロカビ科に属する *Olpidium virulentus* と *O. bornovanus* の5種類である。これら微生物は、植物体内では変形体・遊走子のう・休眠胞子を形成し、休眠胞子あるいは遊走子のうから放出される遊走子により土壤中を移動するという点で共通している。これら土壤微生物に媒介されるウイルスを表-1 (CAMPBELL, 1996 と ROCHON et al., 2004 を元に改編) にまとめたので参照していただきたい。日本で発生している土壤微生物媒介性の植物ウイルスは、*P. graminis* により媒介されるオオムギ縮萎縮ウイルス (BaYMV), コムギ縮萎縮ウイルス (WYMV), ムギ類萎縮ウイルス (SBWMV), *P. bete* によるビートえそ性葉脈黄化ウイルス (BNYVV), *S. subterranea* によるジャガイモモップトップウイルス (PMTV), *O. virulentus* によるミラフィオリレタスウイルス (MiLV), チューリップ条斑ウイルス (TuSV), チューリップ微斑モザイクウイルス (TMMMV), タバコネクロシスウイルス (TNV), *O. bornovanus* によるメロンえそ斑点ウイルス (MNSV) 等が挙げられる。

これら土壤伝染性ウイルス病がいったん栽培圃場で発生すると、その防除は困難を極める。メロンえそ斑点病では、これまで臭化メチル剤を用いた土壤くん蒸による防除法が実施されてきたが、本剤はモンリオール議定書締約国会合においてオゾン層破壊物質に指定されたことから2005年に撤廃を余儀なくされた。現在では、不

可欠用途 (特例措置) として全国でわずかな量の製造・使用が認められている (2008年度分総量で約137トン) が、その特例措置も間もなく撤廃される兆しである。土壤伝染性ウイルス病に対して、臭化メチル剤以外の効果的な防除法は皆無といっても過言ではない。近い将来に想定される本剤の完全撤廃以降には、これまで以上のウイルス性土壤病害の発生が危惧される。

一般に、植物ウイルスに直接作用する化学農薬は臭化メチル剤以外には知られていない。また、近年の地球環境保全の観点から、化学農薬に頼らず環境に優しい土壤伝染性ウイルス病の防除技術の開発が求められている。その目的を達成するためには、自然界で起こる様々な現象を巧みに利用した生物防除技術が適しており、中でも媒介菌の何らかの機能を阻害する方法が効果的であろうと思われる。現在、我々は当独立行政法人の特別研究プロジェクト「難防除植物ウイルスの土壤生息菌オルピディウムによる媒介機構の解明」においてMNSVの*O. bornovanus* 媒介機構解明に向けた基礎研究に取り組んでいる。本稿では、これまでに明らかとなったオルピディウム菌 (*Olpidium*) による植物ウイルスの媒介様式の最新情報を交えながら、我々の研究室で解析しているMNSV (*Tombosviridae* 科 *Carmovirus* 属) の菌媒介様式について、特に*O. bornovanus* 遊走子のウイルス獲得過程を中心に紹介したい。本稿が、今後の菌類媒介ウイルス病の防除技術開発に寄与できれば幸いである。

I オルピディウム菌によるウイルス媒介様式

オルピディウム菌によるウイルス媒介機構は、その媒介様式の違いにより大きく2タイプに分けられる。一つは *in vitro acquisition* と呼ばれるタイプ (MNSV, TNV 等) であり、もう一つは *in vivo acquisition* (MiLV, TMMMV 等) である。前者はウイルスフリーの遊走子にウイルスを人為的に混合することで媒介が成立するが、後者はウイルスとオルピディウム菌が共感染している植物から放出された遊走子のみがウイルス媒介できる。すなわち、前者は植物根から土壤中に放たれた遊走子とその後にウイルスを獲得し、後者は植物根内に感染

Localization of Melon necrotic spot virus on a Zoospore of *Olpidium bornovanus* and a Role of the Coat Protein for the Fungal-vector Transmission. By Tomofumi MOCHIZUKI and Shinya TSUDA
(キーワード: 媒介, オルピディウム菌, 遊走子, メロンえそ斑点ウイルス, 外被タンパク質)

表-1 現在報告されているウイルス媒介微生物と媒介されるウイルス

媒介菌	ウイルス属	ウイルス	略称	獲得タイプ
<i>Polymixa graminis</i>	<i>Furoviruses</i>	<i>Soilborne wheat mosaic virus</i>	SBWMV	<i>in vivo</i>
		<i>Soilborne cereal mosaic virus</i>	SBCMV	<i>in vivo</i>
		<i>Oat golden stripe virus</i>	OGSV	<i>in vivo</i>
		<i>Chinese wheat mosaic virus</i>	CWMV	<i>in vivo</i>
		<i>Rice stripe necrosis virus</i>	RSNV	<i>in vivo</i>
		<i>Sorghum chlorotic spot virus</i>	SrCSV	<i>in vivo</i>
	<i>Pecluvirus</i>	<i>Indian peanut clump virus</i>	PCV	<i>in vivo</i>
		<i>Peanut clump virus</i>	PCV	<i>in vivo</i>
	<i>Bymoviruses</i>	<i>Barley mild mosaic virus</i>	BaMMV	<i>in vivo</i>
		<i>Barley yellow mosaic virus</i>	BaYMV	<i>in vivo</i>
		<i>Oat mosaic virus</i>	OMV	<i>in vivo</i>
		<i>Rice necrosis mosaic virus</i>	RNMV	<i>in vivo</i>
		<i>Wheat spindle streak virus</i>	WSSMV	<i>in vivo</i>
		<i>Wheat yellow mosaic virus</i>	WYMV	<i>in vivo</i>
	<i>Polymixa bete</i>	Unclassified	<i>Aubian wheat mosaic virus</i>	AWMV
<i>Benyvirus</i>		<i>Beet necrotic yellow vein virus</i>	BNYVV	<i>in vivo</i>
		<i>Beet soil-borne mosaic virus</i>	BSBMV	<i>in vivo</i>
<i>Pomovirus</i>	<i>Beet soil-borne virus</i>	BSBV	<i>in vivo</i>	
	<i>Beet virus Q</i>	BVQ	<i>in vivo</i>	
	<i>Potato mop-top virus</i>	PMTV	<i>in vivo</i>	
<i>Spongopora subterranea</i>	Unclassified	<i>Watercress yellow spot virus</i>	WYSV	unknown
<i>Olpidium virulentus</i>	<i>Necroviruses</i>	<i>Tobacco necrosis virus</i>	TNV	<i>in vitro</i>
		<i>Chenopodium necrosis virus</i>	ChNV	<i>in vitro</i>
		<i>Lisianthus necrosis virus</i>	LNV	<i>in vitro</i>
	<i>Ophiovirus</i>	<i>Mirafiori lettuce virus</i>	MilV	<i>in vivo</i>
		<i>Tulip mild mottle mosaic virus</i>	TMMMV	<i>in vivo</i>
	<i>Varicosavirus</i>	<i>Lettuce big vein virus</i>	LBVV	<i>in vivo</i>
		<i>Tobacco stunt virus</i>	TSV	<i>in vivo</i>
		<i>Freesia leaf necrosis virus</i>	FLNV	<i>in vivo</i>
		<i>Lettuce ring necrosis virus</i>	LRNV	<i>in vivo</i>
	Unclassified	<i>Tulip streak virus</i>	TuSV	<i>in vivo</i>
<i>Olpidium bornovanus</i>	<i>Tombsvirus</i>	<i>Cucumber necrosis virus</i>	CNV	<i>in vitro</i>
	<i>Carmoviruses</i>	<i>Melon necrotic spot virus</i>	MNSV	<i>in vitro</i>
		<i>Cucumber soil-borne virus</i>	CSBV	<i>in vitro</i>
		<i>Squash necrosis virus</i>	SqNV	<i>in vitro</i>
	<i>Aureusvirus</i>	<i>Cucumber leaf spot virus</i>	CLSV	<i>in vitro</i>
	<i>Dianthovirus</i>	<i>Red clover necrotic mosaic virus</i>	RCNMV	<i>in vitro</i>

している菌がその生活環のどこかでウイルスを獲得する(遊走子が土壤中に放出されたときには既にウイルスを保有している), と考えられている。

in vitro acquisition タイプの媒介様式は, 試験管内である程度の実験系が構築できることから比較的研究が進んでいる。本タイプによりウイルスを媒介するオルピディウム属菌は, MNSV や *Tombsvirus* 属の *Cucumber necrosis virus* (CNV) を媒介する *O. bornovanus*, TNV を媒介する *O. virulentus* の2種類が知られている。しかしながら, *O. bornovanus* は TNV を媒介できず, *O. virulentus* は MNSV, CNV を媒介できないように, その菌

媒介にはウイルス種と菌種間で厳密な特異性がある。その特異性を決定するウイルス側の因子は, CNV と TNV においては外被タンパク質 (CP) であることが報告されている (McLEAN et al., 1994)。CNV の *in vitro* acquisition 機構については, カナダのグループにより詳細な研究成果が発表されている (ROCHON et al., 2004)。それらによると, CNV 粒子は *O. bornovanus* 遊走子表面に付着し, ①その付着は CP の特定部位のアミノ酸により支配されていること, ②そのアミノ酸変異によりウイルス粒子の遊走子表面への付着率その後の菌媒介率が低下すること, ③ CNV 粒子は遊走子の表面膜を構成している糖

タンパク質に修飾されているマンノース型糖鎖に付着すること、などが報告されている。

一方, *in vivo* acquisition タイプの媒介機構は, 遊走子が植物体内でしかウイルスを獲得できないなどの実験条件の制約があることから, いまだ不明な点が多い。ポリミキサ (*Polymyxa*) による *Wheat spindle streak mosaic virus* (WSSMV) と SBWMV の媒介機構研究では, ポリミキサの休眠胞子および胞子塊の内部から WSSMV の CP が検出されるが, SBWMV ではその CP は認められず, その代わりにウイルスのゲノム RNA と移行タンパク質が検出される。したがって, WSSMV はウイルス粒子として, 一方 SBWMV は核タンパク複合体として菌体内に局在しているのであろうと推察されている (DRISKEL et al., 2004)。BNYVV では, CP 並びにウイルスのコードする非構造タンパク質がポリミキサの休眠胞子・遊走子のう内に検出されることが報告されている (VERCHOT-LUBICZ et al., 2007)。以上の研究結果からもわかるように, *in vivo* acquisition タイプの媒介様式はウイルス種により様々であることが想定される。

では, *in vitro* acquisition タイプに属する MNSV の *O. bornovanus* 遊走子による媒介様式はどのようになっているのであろうか? 筆者らの研究成果の一部を紹介していきたい (MOCHIZUKI et al., 2008)。

II *O. bornovanus* 遊走子における MNSV の局在

MNSV の菌媒介機構を解明する第一段階として, 媒介菌である *O. bornovanus* 遊走子および MNSV を媒介しない *O. virulentus* 遊走子におけるウイルスの局在性と菌種特異性について解析した。まず初めに, 試験管内で MNSV 粒子と混合した各種オルピディウム菌遊走子の表面上でのウイルス局在を免疫組織化学的に観察した。オルピディウム菌遊走子表面上の MNSV を検出する方法は, ウイルス粒子に特異的に反応する抗体と蛍光標識二次抗体を用いた間接蛍光抗体法で, 共焦点レーザー顕微鏡により観察した。その結果, MNSV を処理した *O. bornovanus* では遊走子の頭部と鞭毛, すなわち菌体表面全体からウイルスが検出された (図-1 上パネル)。一方, *O. virulentus* 遊走子ではウイルスは全く検出されなかった (図-1 下パネル)。このことから, *O. bornovanus* 遊走子からには MNSV 粒子が付着できるレセプター (受容器) が存在していると推察された。MNSV 粒子が付着しない *O. virulentus* はウイルスを媒介できず, 一方で MNSV 粒子が表面全体に付着する *O. bornovanus* 遊走子はウイルス媒介できることから,

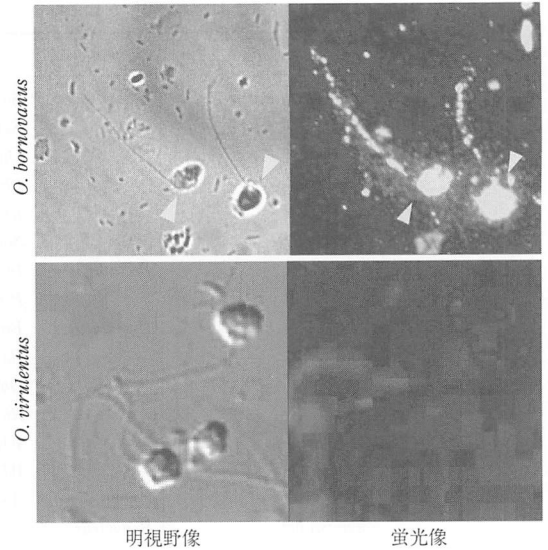


図-1 間接蛍光抗体法による *Olpidium bornovanus* (上) と *O. virulentus* (下) 遊走子上の MNSV の局在性観察

MNSV は *O. bornovanus* 遊走子の全表面から検出されるが (上の蛍光像白色部, 白矢印), *O. virulentus* 遊走子からは検出されない。

MNSV 媒介の菌種特異性は, オルピディウム菌遊走子表面へのウイルス粒子の付着に大きく依存していることが明らかになった。

III *O. bornovanus* 遊走子への特異的付着を決定する MNSV 外被タンパク質の因子

MNSV と同じく *in vitro* acquisition 様式で媒介される CNV では, CP の特定のアミノ酸と媒介との関係について詳細に解析されている。特に, CNV 粒子の外側の突起状部分に位置する 294 番目のアミノ酸残基は *O. bornovanus* 遊走子を構成する糖タンパク質のマンノース型糖鎖と相互作用すると推察され, このアミノ酸残基をロイシンからフェニルアラニンへ置換するとウイルス粒子の遊走子への付着とその後の菌媒介効率が大きく低下する (KAKANI et al., 2001)。MNSV と CNV の CP のアミノ酸配列は, 共に *O. bornovanus* によって媒介されるためか, 異なるウイルス属に分類されるにも関わらずその相同性が高い。そこで両者の配列を比較すると, CNV CP の 294 番目のアミノ酸残基に相当する MNSV CP のアミノ酸残基は 300 番目のイソロイシンであった。逆遺伝学的手法により, MNSV CP の 300 番目のアミノ酸残基イソロイシンをフェニルアラニンに置換した CP 変異 MNSV を作製し, *O. bornovanus* 遊走子への付着と菌媒

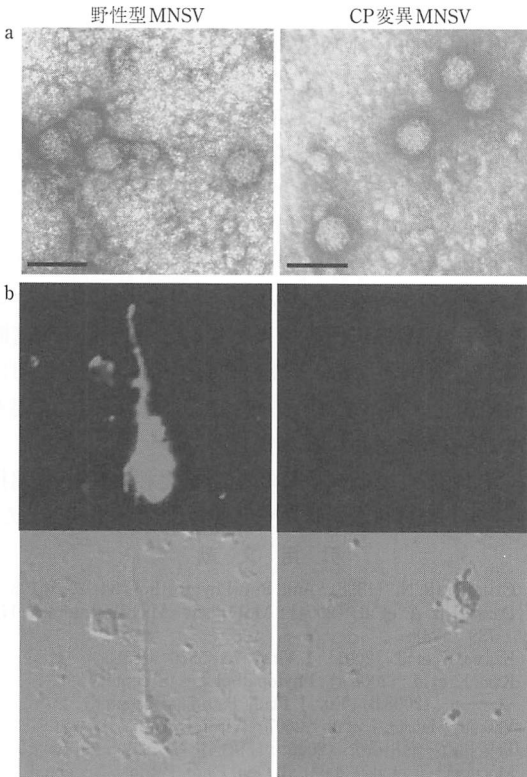


図-2 野性型 MNSV (右) と外被タンパク質に変異を加えた MNSV (左) の比較

a: 粒子の電子顕微鏡像。線は 50 nm。粒子形態は野性型と CP 変異 MNSV で変わらない。b: 間接蛍光抗体法による *Olpidium bornovanus* 遊走子上の MNSV 局在性観察。CP 変異 MNSV は *O. bornovanus* 遊走子から検出されない。

介性について検討した。CP 変異 MNSV の汁液接種によるメロンへの感染性は野生型と変わらず、さらに本ウイルスの感染メロン組織からは野生型と同様のウイルス粒子が観察された (図-2 a)。ところが、*O. bornovanus* 遊走子によるメロン幼苗根への菌媒介接種では、野性型 MNSV が 100% 媒介されたのに対し、CP 変異 MNSV は全く媒介されなかった。さらに、先の間接蛍光抗体法でも CP 変異 MNSV の *O. bornovanus* 遊走子への付着は全く認められなかった (図-2 b)。以上のことから、MNSV 粒子の *O. bornovanus* 遊走子表面への付着は本菌媒介を成立させるための重要な過程であり、CP の 300 番目のアミノ酸残基 (イソロイシン) は MNSV 粒子の *O. bornovanus* 遊走子への付着に欠くことのできない機能を有していることが判明した。

IV 菌媒介機構を逆手にとった次世代型メロンえそ斑点病防除技術開発への展望

メロンえそ斑点病は春先の低温時や長梅雨などでの冷夏に発病が多く見られる。本病の症状である全身えそは、20℃以下の低温条件下で発症が助長される (Kido et al., 2008 a)。一方、生産現場では、メロンえそ斑点病対策の即戦力として期待できる免疫性の抵抗性メロン (劣勢遺伝子「*nsv*」支配) 品種が栽培され始めた。しかしながら、この抵抗性も先と同様に 20℃以下の低温条件下では脆弱性を示すことが明らかとなった (Kido et al., 2008 b)。これらのことから、メロンの冬季から春先にかけての栽培環境では耕種的防除法だけに依存した対策では不十分であることが予想される。本メロンえそ斑点病の対策には、耕種的防除法に加えさらに何らかの手法により媒介菌であるオルピディウム菌の制御が重要と思われる。しかしながら、オルピディウム菌は土壤深層まで生息しているため、臭化メチル剤が使用できなくなると菌そのものを駆除することが非常に困難になる。これまでに述べた研究結果から、MNSV の菌媒介では土壤中におけるオルピディウム菌によるウイルスの獲得、すなわち MNSV 粒子の遊走子への付着が媒介初期過程での重要なステップとなっている。したがって、*in vitro* acquisition タイプの菌媒介ウイルス病を防除するためにはウイルスの遊走子への付着を遮断することが一つのポイントであると考えられる。筆者らの研究では、MNSV のオルピディウム菌遊走子への付着および菌媒介はウイルス CP の 1 アミノ酸の変異により著しく阻害された。CNV の研究では、CP のアミノ酸変異によりウイルス粒子の遊走子への付着率が 70% になると植物へのウイルス媒介率は 20% にまで減少することが示されている。したがって、ウイルス粒子の遊走子への付着率を下げることであれば、媒介率の大きな低下に繋がるかもしれない。これらのことから考えると、土壤中に残存する感染性のあるウイルス粒子上の標的アミノ酸を熱、界面活性剤、またはイオン強度変化等の処理により変性させることができれば、オルピディウム菌による MNSV 媒介の効率を減少させることができると予想される。

CNV の菌媒介研究では、ウイルス粒子をマンノース型の糖で処理すると *O. bornovanus* 遊走子への付着が阻害されることが報告されている (Rochon et al., 2004)。この阻害は、オルピディウム遊走子に結合するための CNV 粒子のリガンド (結合部位) にマンノースが結合してその機能をブロックしてしまったためと推察される。すなわち、媒介菌遊走子を構成する糖タンパク質の

マンノース型糖鎖が CNV 粒子吸着のためのレセプターになっていることが示唆された (ROCHON et al., 2004)。MNSV が CNV 同様に遊走子の構成糖鎖を認識しているかどうかは不明であるが、同様の理論 (菌体表面のレセプターと構造が類似している物質を土壤中の MNSV 粒子に処理することでウイルス粒子のリガンドを覆ってしまう) により MNSV 粒子の遊走子への付着を防ぐ方法も考えられる。また反対に、MNSV CP のリガンドと同様の遊走子付着機能を示す類似物質で遊走子上のレセプターを覆ってしまい、感染性のある MNSV 粒子の結合を防ぐという方法も考えられる。以上述べてきた新規防除技術開発の基礎となるアイデアは、あくまでも可能性であり実行可能な技術に仕上げるためには相当な時間を要する。しかしながら、臭化メチル剤が使用できなくなった今、様々な角度から新たな防除技術の開発に着手することが必要であろうと思われる。

おわりに

MNSV は、試験管内での安定性は比較的高くないにもかかわらず (耐熱性は 60℃, 耐保存性は粗汁液中で 9 ~ 30 日間), 汚染土壤中での病原性保持期間は条件によっては長期間にわたる。松尾らは、汚染土壤中における *O. bornovanus* と MNSV 病原性保持期間を調査し、*O. bornovanus* の感染性は環境条件にほとんど影響を受けずに維持されているが、MNSV の病原性保持期間は土

壤の含水量に大きく影響を受けると報告している (松尾・内川, 2006)。MNSV の病原性は、風乾土壌では保存 2 か月後には失活するが、含水率約 16% の土壌では 20℃ 保存で 6 か月、4℃ 保存では 1 年以上も保たれる。しかしながら、実際に圃場土壌中のどこでどのように MNSV が残存しているのか (おそらく、MNSV 感染メロンの根や葉の残査中と想定される)、また土壌中のどこでオルピディウム菌遊走子が MNSV を獲得するのか、いまだ多くの謎が残されている。今後、オルピディウム菌遊走子の MNSV 獲得過程を標的とした菌媒介遮断 (防除) 法を開発していくためにも、汚染土壌における MNSV とオルピディウム菌の生態学的研究は必要不可欠であろうと思われる。

本稿に記載した研究結果の一部は、農林水産省「先端技術を活用した農林水産研高度化事業」により実施された。

引用文献

- 1) CAMPBELL, R. N. (1996): Ann. Rev. Phytopathol. 34: 87 ~ 108.
- 2) DRISKEL, B. A. et al. (2004): Mol. Plant-Microb. Interact. 17: 739 ~ 748.
- 3) KAKANI, K. et al. (2001): J. Virol. 75: 5576 ~ 5583.
- 4) KIDO, K. et al. (2008 a): Phytopathology (accepted).
- 5) ——— (2008 b): Eur. J. Plant. Pathol. (accepted).
- 6) VERCHOT-LUBICZ, J. et al. (2007): Virol. J. 4: 37.
- 7) 松尾和敏・内川敬介 (2006): 日植病報 72: 28 ~ 29 (講要).
- 8) MOCHIZUKI, T. et al. (2008): J. Gen. Plant. Pathol. (accepted).
- 9) McLEAN, M. A. et al. (1994): Virology 204: 840 ~ 842.
- 10) ROCHON, D. et al. (2004): Ann. Rev. Phytopathol. 42: 211 ~ 241.

(新しく登録された農薬 10 ページからの続き)

稲 (箱育苗): いもち病, イネミズゾウムシ, ウンカ類, ツマグロヨコバイ: 移植 2 日前 ~ 移植当日

●ジノテフラン・トリシクラゾール水和剤

22036: ビームエイトスタークルゾール (クミアイ化学工業) 07/10/26

ジノテフラン: 10.0%, トリシクラゾール: 8.0%

稲: いもち病, ウンカ類, ツマグロヨコバイ, カメムシ類: 収穫 7 日前まで

稲: いもち病, カメムシ類: 収穫 7 日前まで (無人ヘリコプター散布)

●フィプロニル・チアジニル粒剤

22039: アプライプリンス粒剤 10 (日本農薬) 07/10/31

フィプロニル: 1.0%, チアジニル: 12.0%

稲 (箱育苗): いもち病, イネミズゾウムシ, イネドロオウムシ, ウンカ類, ニカメイチュウ, イナゴ類, コブノメイガ, イネツトムシ: は種時覆土前

22040: アプライプリンス粒剤 6 (日本農薬) 07/10/31

フィプロニル: 0.60%, チアジニル: 12.0%

稲 (箱育苗): いもち病, イネミズゾウムシ, イネドロオウムシ, ウンカ類, ニカメイチュウ, イナゴ類: は種時覆土前

「殺菌剤」

●チオファネートメチル・メトコナゾール水和剤

22041: トップバスター顆粒水和剤 (日本曹達) 07/10/31

22042: クレハトップバスター顆粒水和剤 (クレハ)

チオファネートメチル: 35.0%, メトコナゾール: 5.0%

芝 (ベントグラス): ダラスポット病, 葉腐病 (ブラウンパッチ), 炭疽病: 発病初期

芝 (ベントグラス): 紅色雪腐病, 雪腐小粒菌核病: 根雪前

芝 (ベントグラス): カーブラリア葉枯病: 発病初期

芝 (日本芝): カーブラリア葉枯病, 葉腐病 (ラージパッチ): 発病初期

芝 (日本芝): 疑似葉腐病 (春はげ症): 休眠期前

「除草剤」

●カフェンストロール・ベンゾビシクロン剤

22020: テロスジャンボ (クミアイ化学工業) 07/10/04

22021: SDS テロスジャンボ (エス・ディー・エス バイオテック) 07/10/04

カフェンストロール: 8.4%, ベンゾビシクロン: 8.0%

移植水稲: 水田一年生雑草, マツバイ, ホタルイ, ミズガヤツリ (北海道を除く), ヒルムシロ, ヘラオモダカ (北海道, 東北)

●トリフロキシスルフロキサリウム塩水和剤

22045: モニュメントフロアブル (シンジェンタジャパン) 07/10/31

トリフロキシスルフロキサリウム塩: 10.0%

樹木等 (公園, 庭園, 堤とう, 駐車場, 道路, 運動場, 宅地, のり面, 鉄道等): 一年生及び多年生広葉雑草, 多年生イネ科雑草