

新たな展開を見せる TYLCV 媒介阻止機構

—媒介・非媒介虫の比較から見えてきた媒介を阻止する障壁の存在—

野菜茶業研究所 ^{おお}大 ^{にし}西 ^{じゅん}純

はじめに

トマト黄化葉巻病は、*Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV) による虫媒性難防除ウイルス病である。1996年に九州・東海地域で初めて発生が確認され (Kato et al., 1998), 同ウイルスを唯一媒介することができるタバココナジラミ *Bemisia tabaci* (GENNADIUS) の分布拡大に伴い、現在までに東北地域南部まで本病の発生が広がっている。タバココナジラミは広範囲の植物種を寄主とし、発生地域では同じコナジラミ亜科に属するオンシツコナジラミ *Trialeurodes vaporariorum* (WESTWOOD) も同じ感染トマト上で繁殖することができるが、オンシツコナジラミは TYLCV を媒介しないことが知られている。この2種コナジラミは多くの地域で寄主植物を同じくするが、「なぜ、オンシツコナジラミは TYLCV の媒介虫とならないのか」という基本的な問題は不明なままであった。筆者らは、媒介・非媒介性を決める要因を明らかにしようと考え、この2種コナジラミ間で TYLCV 媒介能力が異なる原因について研究を行った。その結果、TYLCV が媒介されるためには、昆虫体内組織への侵入が重要であること、オンシツコナジラミでは中腸上皮細胞膜により TYLCV の組織への侵入が阻止されることが現在までに明らかとなった (OHNISHI et al., 2009)。すなわち、非媒介虫オンシツコナジラミには TYLCV の媒介を阻止する「障壁」が存在し、それが媒介・非媒介性を決定していることが示唆された。本稿では、これまでの既往の報告も含めて TYLCV の媒介機構について紹介するとともに、他の動物・植物ウイルスの研究により解き明かされつつある媒介を阻止する「障壁」について、概説する。

I 非媒介虫オンシツコナジラミ体内における TYLCV の挙動

1 中腸上皮細胞膜がウイルスの細胞への侵入を阻止する

媒介虫タバココナジラミによる TYLCV の媒介は、本病に罹病した植物を吸汁してウイルスを保毒 (この過程を「獲得吸汁」という) することより開始される。その後、保毒虫が健全植物へ移動し、加害吸汁中に唾液とともにウイルスを植物組織中へ放出することにより、TYLCV が媒介される (ウイルス保毒虫による健全植物への吸汁を「接種吸汁」という)。コナジラミ類の口器は口針型であり、植物の篩部組織へ口針を挿入して篩管液を吸汁する。ウイルスはこの篩部組織へと直接的に侵入することになり、実際に TYLCV は植物組織内でも篩部組織周辺にある伴細胞などで増殖している。植物ウイルスの昆虫媒介には様々な様式があることが知られており、次のように区分されている。媒介虫の体内 (血体腔) をウイルスが循環するか否かにより、「循環型」と「非循環型」に大別される。さらに虫体内におけるウイルスの増殖性の有無により、「増殖型」と「非増殖型」とに区別される。TYLCV のタバココナジラミによる媒介は、循環型-非増殖型とされている。これまで、媒介虫タバココナジラミ体内における TYLCV の局在部位についての研究が行われ、ウイルスが虫体内を移行することが明らかとなってきた (GHANIM and MEDLINA, 2007)。獲得吸汁により虫体内に侵入した TYLCV は、消化管内を移動し、中腸内腔へと到達する。その後、養分 (主に植物の篩管液成分) を吸収する中腸上皮細胞を入り口として、昆虫組織内部へと侵入する。中腸上皮細胞内へと侵入した TYLCV は、血リンパ (昆虫の体液成分) へと侵出して、さらに虫体内深部へと移行する。全身を循環する血リンパの流れに乗り、TYLCV は脚の先から、頭部や腹部組織へと広がり、やがて唾液腺組織に到達し、唾液腺細胞内部へと侵入する。こうして唾液腺組織内へと侵入した TYLCV は唾液へと放出される。TYLCV が媒介昆虫により媒介されるためには、細胞外から細胞内 (中腸細胞) への侵入、全身への循環、唾液などによる体外への放出という一連のウイルス移行過程がすべてス

A Potential Mechanism of a Transmission Barrier Presented in the Nonvector Whitefly *Trialeurodes vaporariorum* to *Tomato yellow leaf curl virus*. By Jun OHNISHI

(キーワード: 昆虫媒介, オンシツコナジラミ, タバココナジラミ, TYLCV, トマト黄化葉巻病, 媒介阻止)

ムーズに行われる必要がある。すなわち、どこか一つの過程でも阻止されるとウイルスが媒介されなくなると考えられる。このような考察に基づき、筆者らは非媒介虫であるオンシツコナジラミ体内におけるウイルスの挙動を観察し、媒介虫タバココナジラミと比較することで、ウイルス移行過程を阻止して虫媒性を決めている要因を解析した。

TYLCV が虫体内を移行する様子を観察するために、ウイルスの局在部位を可視化した。具体的には、2種コナジラミ成虫を TYLCV に罹病したトマト上にて8日間吸汁させた後に、供試虫の組織切片を作成し、TYLCV の外皮タンパク質 (CP) に対する特異的な抗体を利用した蛍光抗体法により、ウイルス局在部位を組織レベルで観察した。その結果、タバココナジラミでは最初に中腸上皮組織内部に TYLCV が集積しており、吸汁により

消化管内に取り込まれた TYLCV が中腸上皮細胞膜を通過して、同細胞に侵入することが明らかとなった (図-1 上)。一方で、非媒介虫オンシツコナジラミでは、TYLCV は消化管内腔や中腸上皮細胞膜表面 (中腸管内腔側) にとどまるのみで、組織内部への侵入が観察されなかった (図-1 下)。さらに、タバココナジラミでは、その後に唾液腺組織に TYLCV が局在 (図-1 上図枠内) をしていたことより、中腸組織の基底膜から血リンパに侵出し、唾液腺の特定の細胞へと侵入する様子が観察された。

昆虫の組織切片を用いたウイルスの局在部位の観察に加え、血体腔を循環するウイルスを高感度検出する目的で、獲得吸汁後の2種コナジラミより頭部・腹部・脚部をその接合部より切り離し、それぞれの部位より DNA を抽出して PCR 検定を行った。腹部には消化器系組織・脂肪体組織などが含まれ、脚部は血リンパが循環していることより血体腔中のウイルスを間接的に検出することができる。また、頭部には唾液腺組織が含まれる。保毒したタバココナジラミのこれらの部位より、TYLCV が高率で検出された (表-1)。しかし、オンシツコナジラミでは腹部以外の部位からは TYLCV が検出されず、脚部からも検出されなかったことより、TYLCV は血体腔中を循環していないことがあきらかとなった。これら二つの異なる実験手法により2種コナジラミ間における TYLCV の挙動が明らかとなり、オンシツコナジラミの中腸上皮細胞膜は「障壁」となり TYLCV の昆虫細胞内への侵入と、その後の血体腔内への侵出を阻止していることが示唆された (図-2) (OHNISHI et al., 2009)。

2 媒介されなくても虫体内に滞るウイルス

吸汁により消化管内腔に取り込まれたウイルスは、そ

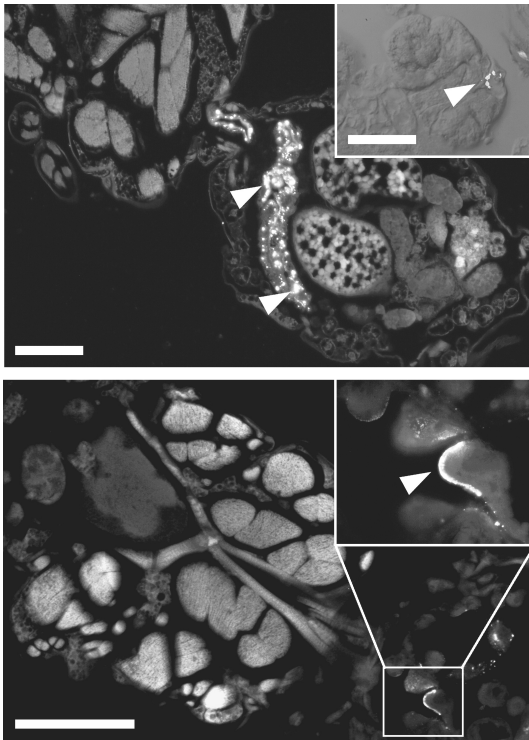


図-1 蛍光抗体法による2種コナジラミ成虫体内での TYLCV 外皮タンパク質の局在部位の観察 (上図) タバココナジラミの中腸組織に侵入したウイルス, (下図) オンシツコナジラミの中腸上皮細胞膜により侵入を阻止されているウイルス。上図中の白枠は唾液腺組織内に局在するウイルス。下図中の白枠は拡大図を示す。矢印は TYLCV 外皮タンパク質の局在を示す。スケールバー: 100 μm (上下図中), 25 μm (上図中の白枠)。

表-1 獲得吸汁後の2種コナジラミ体内における TYLCV の検出

コナジラミ類	TYLCV 陽性率 (%)		
	頭部	腹部	脚部
タバココナジラミ	100	100	72
オンシツコナジラミ	0	100	0

タバココナジラミとオンシツコナジラミに、トマト黄化葉巻病に罹病したトマト葉を7日間吸汁させた。その後 TYLCV が感染しない健全キャベツ葉上で6日間飼育した。保毒虫より頭部・腹部・脚部を切り離し、DNA を抽出して PCR 法により TYLCV を検出した。

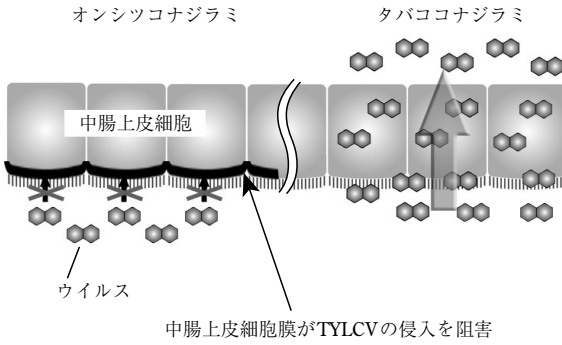


図-2 オシツコナジラミ中腸組織内へのTYLCVの侵入阻害とタバコナジラミに見られるウイルス通過

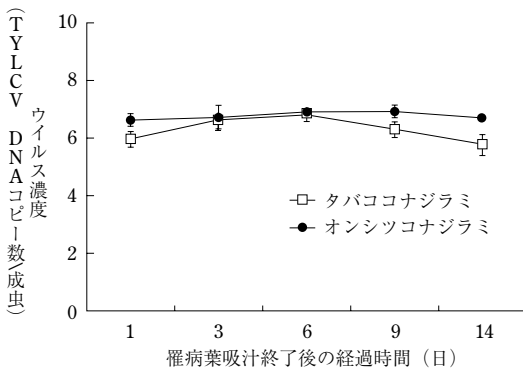


図-3 2種コナジラミ類成虫体内におけるTYLCV濃度の経時変化

2種コナジラミ成虫をトマト黄化葉巻病に感染したトマト葉を24時間吸汁させ、その後にキャベツ葉上で飼育し、各経過日数時に保毒虫を回収した。保毒虫よりDNAを抽出し、定量PCR法によりTYLCV DNA (*v1* 遺伝子) の1個体当たりのコピー数を測定しウイルス濃度とした。グラフ中の縦線は標準偏差を示す。グラフ縦軸は対数表示。

の後どのような変遷をたどるのか。罹病葉吸汁後の2種コナジラミ成虫体内におけるTYLCVの蓄積量の変化を、TYLCVの*v1*遺伝子断片を指標とした定量PCR法により解析した。その結果、TYLCVの蓄積量は獲得吸汁終了直後から大きく変化することはなく、同程度のレベルで保持されていた(図-3)。非媒介虫オシツコナジラミでは、TYLCVが昆虫組織内部に侵入しないにもかかわらず、長期間ウイルスが保持されるという興味深い結果を得た。上述のTYLCVの局在部位の観察結果を踏まえると、2種コナジラミ成虫においてTYLCVは中腸上皮細胞の表面(細胞膜表面)へ結合親和性を有しており、その結合は安定であると考えられる。同細胞膜

上にはウイルス粒子を受容するレセプター分子などの存在が示唆されている。筆者らの研究結果は、オシツコナジラミのTYLCV非媒介性を決める要因は、同細胞表面へのウイルス結合親和性ではなく、細胞内部への取り込み(transcytosis)過程である可能性を示唆している。

II ウイルス媒介を阻止する障壁: Transmission barriers

植物ウイルスを媒介する昆虫類の種類は多岐にわたるが、昆虫類全体から見れば限られた種類の昆虫だけがウイルス媒介虫となっているに過ぎない。媒介虫が寄生する植物には、媒介虫以外の昆虫類も多く寄生しており、罹病植物体上で繁殖することも多い。媒介虫と非媒介虫が同一の生物に寄生する例は、動物ウイルスとヒトや家畜の吸血性昆虫・無脊椎動物の組み合わせでも多く見られる。動物ウイルスの媒介蚊は、直接ヒトを吸血する衛生害虫として、さらに伝染病の予防衛生の観点から虫媒メカニズムの研究が古くから行われてきた。HARDY et al. は、西部ウマ脳炎ウイルスとその媒介蚊の一種である *Culex tarsalis* (イエカの一種) の疫学的な調査や、実験室レベルでコントロールされた研究から、吸血によりウイルスを保毒(吸血した蚊よりウイルスが検出される)するが、媒介能力が異なる個体群が存在することを明らかとした(HARDY et al., 1976; 1978)。蚊体内におけるウイルスの挙動が研究され、後述のようなウイルスの虫体内移行の阻止がウイルス媒介能力に影響を及ぼすことが示唆された。ウイルスの虫体内移行を阻止し、虫媒性に影響を及ぼす要因は、transmission barriers(本稿中では媒介障壁と訳す)と呼ばれる。媒介障壁には様々なステップが含まれ、腸管細胞への侵入阻止(gut infection barrier)、腸管組織から血リンパへの離脱阻止(gut escape barrier)、唾液腺組織への侵入阻止(salivary gland infection barrier)等、昆虫の組織別に存在することが知られ、いずれも細胞膜や基底膜などの生体膜を介した障壁である(BEERNTSEN et al., 2000)。一方で、免疫システムによる自己・非自己の寛容が、同一の病原体であっても非媒介・媒介生物間で異なることが知られ、媒介障壁の一つと考えられている。興味深いことに、このような媒介障壁はウイルス-昆虫間だけではなく、原虫(真核生物)や細菌(原核生物)性病原体に対しても存在する(BEERNTSEN et al., 2000)。

非媒介虫オシツコナジラミにおけるTYLCVの媒介障壁は、ウイルス粒子が中腸上皮細胞膜表面に結合した後、細胞内への侵入過程であるtranscytosisの阻止が示唆されることより、上記のgut infection barrierと考

えられる。

植物ウイルスにおいても非媒介虫を用いた研究例があり、「循環型」の媒介様式によりアブラムシ類によって媒介されるルテオウイルス科のウイルスにおいて、媒介障壁の存在を示唆する報告がされている。オオムギにおいて黄化萎縮症を引き起こす *Cereal yellow dwarf virus* (CYDV-RPV 株) は穀類に寄生するムギクビレアブラムシ (*Rhopalosiphum padi*) により媒介されるが、ムギヒゲナガアブラムシ (*Sitobion avenae*) および、ムギウスイロアブラムシ (*Metopolophium dirhodum*) では媒介されない。虫体内におけるウイルスの挙動が相互に比較解析された結果、*S. avenae* では血体腔内を循環し、副唾液腺組織までウイルスが到達するが、副唾液腺細胞膜表面にウイルスがとどまるのみで細胞内部への侵入が阻止されていた (GILDOW and ROCHOW, 1980)。一方で、*M. dirhodum* では後腸細胞膜上 (腸管腔側) へのウイルスの吸着が観察されず、細胞内への侵入が阻止されていることが明らかとなった (GILDOW, 1993)。さらに、同じルテオウイルス科に属する *Barley yellow dwarf virus* (BYDV) では、上記を含むアブラムシ種による虫媒性の有無が各ウイルス分離株間において異なることが確認されている。BYDV では非媒介虫の血体腔内を循環できる分離株が多く、上記のような副唾液腺細胞膜による細胞内部へのウイルス侵入の阻止のほかに、同組織細胞の基底膜もウイルスの通過を阻止しており、複数のステップによる副唾液腺組織への侵入過程が障壁となることを示唆している (GILDOW, 1993; GRAY and GILDOW, 2003; BRAULT et al., 2007)。

ウイルス媒介能力が媒介虫の発育段階に依存するタイプの植物ウイルスも存在する。トマト黄化えそウイルス (TSWV) は、数種のアザミウマ類により媒介される。ダイズウスイロアザミウマでは、幼虫期にウイルスを獲得し羽化後に成虫となって初めて TSWV を媒介する能力を発揮する。成虫期にウイルスを吸汁したとしても、ウイルスを媒介する能力はない。幼虫期に獲得されたウイルスは、中腸組織への侵入・増殖後、蛹期間中に中腸組織から唾液腺組織へと移行を開始し、羽化成虫ではウイルスは唾液腺組織のみで増殖し、媒介される。一方で、成虫期にウイルスを吸汁した個体では、ウイルスは中腸組織へ侵入・増殖はできるものの、その後に唾液腺組織への虫体内移行が行われず、中腸組織中のウイルスも次第に減少して消失してしまい、媒介されない。本種の成虫体内では、上記の gut escape barrier が存在し、中腸細胞基底膜を TSWV が通過できないことが示されている (OHNISHI et al., 2001)。媒介障壁が昆虫の生育期

中の変態という発生過程において創出されることで、発育段階に依存したウイルス媒介様式を示すようになる例として興味深い。

おわりに

本稿では循環型の媒介様式を行うウイルスについて、媒介虫と非媒介虫を用いた研究により明らかにされつつある媒介障壁の存在について、研究事例を概説した。動植物ウイルスの虫媒研究では、媒介虫体内におけるウイルス動態に関する研究が行われてきた。動物ウイルスと媒介蚊の研究より、同じ媒介虫種でも生息地域が異なる個体群においてウイルスの媒介能が異なり (HARDY et al., 1976; 1978)、虫体内でのウイルスの挙動の違いから、前章までに述べた「媒介障壁」の存在と重要性が認識された (HARDY et al., 1983)。すなわち、虫体内を循環するウイルスでは、虫体内に存在する障壁を乗り越えて媒介を成功させているという考え方が用いられ、非媒介虫体内ではウイルスの組織間の移行過程が妨げられるために、ウイルス媒介が行われないと考えられる。媒介能の異なる種間における交雑実験により、媒介障壁は遺伝的に複数の因子によって決定されていることが示唆された (HARDY et al., 1978)。自然界における虫媒性病原体 (原虫・細菌を含む) の生物的拡散 (吸血性昆虫・ダニなどの吸血性無脊椎動物を含む) には遺伝的なバイアスが存在すると言われ (GOODING, 1996)、複数の因子よりなる媒介障壁がそのバイアスの実体と考えられる。媒介障壁は特定の昆虫種が特定のウイルスを媒介するという媒介親和性を規定していることより、媒介障壁にかかわる因子とその機序に関する知識の蓄積は、虫媒ウイルスの媒介抑制技術開発における有力な干渉作用点としての情報を提供するであろう。

動植物の病原体を媒介する昆虫のゲノム研究が多国間の連携プロジェクトにより進展中であり、それらゲノム情報を基に分子レベルでの虫媒メカニズムの理解も進んできている。その中でもウイルス媒介に関与する媒介昆虫側因子 (ウイルス受容体を含む) の同定作業は、虫媒研究において重要な課題であり、今後とも精力的に研究が展開されるものと思われる。媒介虫だけではなく、非媒介虫を含めた研究展開により虫媒メカニズムの総合的な理解が可能となる。

本稿執筆に当たっては、農研機構野菜茶業研究所本多健一郎氏にご助言をたまわった。また、本研究は同研究所北村登史雄氏・寺見文宏氏のご協力のもとに共同で行った。同研究所太田泉氏には本研究で用いたオンシツコナジラミをご提供いただいた。ここに記して謝意を表する。

引用文献

- 1) BEERTSEN, B. T. et al. (2000): Microbiol. Mol. Biol. Rev. 64: 115 ~ 137.
- 2) BRAULT, V. et al. (2007): Micron 36: 302 ~ 312.
- 3) GHANIM, M. and V. MEDLINA (2007): Tomato Yellow Leaf Curl Virus Disease: management, molecular biology, breeding for resistance, Springer, Berlin, p. 171 ~ 183.
- 4) GILDOW, F. E. (1993): Phytoathol. 83: 270 ~ 277.
- 5) ——— and W. F. ROCHOW (1980): Virology 104: 97 ~ 108.
- 6) GOODING, R. H. (1996): Clin. Microbiol. Rev. 9: 301 ~ 320.
- 7) GRAY, A. and F. E. GILDOW (2003): Ann. Rev. Phytopathol. 41: 539 ~ 566.
- 8) HARDY, J. et al. (1976): Am. J. Epidemiol. 103: 498 ~ 505.
- 9) ——— et al. (1978): Am. J. Trop. Med. Hyg. 27: 313 ~ 321.
- 10) ——— et al. (1983): Ann. Rev. Entomol. 28: 229 ~ 262.
- 11) KATO, K. et al. (1998): Ann. Phytopathol. Soc. Jpn. 64: 552 ~ 559.
- 12) OHNISHI, J. et al. (2001): Phytopathol. 91: 1149 ~ 1155.
- 13) ——— et al. (2009): J. Gen. Plant. Pathol. 75: 131 ~ 139.

(新しく登録された農薬25ページからの続き)

22428: 日農ビームアブロードスタークル微粒剤 F (日本農薬) 09/08/05

ジノテフラン: 0.35%, ププロフェジン: 1.0%, トリシクラゾール: 0.50%

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

「殺菌剤」

●チアジニル粒剤

22425: アブライ箱粒剤 (日本農薬) 09/08/05

チアジニル: 12.0%

稲 (箱育苗): いもち病, 白葉枯病: は種時覆土前

●マンゼブ水和剤

22432: MIC ペンコゼブ水和剤 (三井化学アグロ) 09/08/05
マンゼブ: 80.0%

みかん: 黒点病, 小黒点病, そうか病, チャノキイロアザミウマ, そばかす病, 褐色腐敗病, ミカンサビダニ, 炭疽病: 収穫30日前まで

かんきつ (みかんを除く): チャノキイロアザミウマ, 炭疽病, 褐色腐敗病, そばかす病, 汚れ果症, 黒点病, 小黒点病, ミカンサビダニ: 収穫90日前まで

かき: 落葉病, 炭疽病: 収穫45日前まで

なし: 黒星病, 赤星病, 黒斑病, 輪紋病: 収穫45日前まで

りんご: 黒星病, 赤星病, 黒点病, 斑点落葉病, 褐斑病, 炭疽病: 収穫60日前まで

小粒種ぶどう (露地栽培): 黒とう病, べと病, 晩腐病, 黒とう病, べと病, 晩腐病: 収穫60日前まで

ぶどう (施設栽培): 黒とう病, べと病, 晩腐病: 開花前まで

すいか: 炭疽病, つる枯病: 収穫7日前まで

メロン: つる枯病, べと病: 収穫7日前まで

きゅうり: べと病, 炭疽病, 褐斑病, 黒星病: 収穫前日まで

キャベツ: べと病: 収穫30日前まで

はくさい: べと病, 黒斑病, 白斑病: 収穫30日前まで

ねぎ: べと病, 黒斑病, さび病: 収穫30日前まで

たまねぎ: べと病, 黒斑病, 灰色かび病: 収穫3日前まで

ばれいしょ: 夏疫病, 疫病, 疫病: 収穫7日前まで

てんさい: 褐斑病, 褐斑病: 収穫30日前まで

だいず: べと病: 収穫45日前まで

にんにく: 葉枯病: 収穫7日前まで

さんしょう (果実): さび病: 最終収穫後から落葉期まで

オリーブ: 炭疽病: 収穫90日前まで

アスパラガス (露地栽培): 斑点病, 茎枯病: 収穫終了後但し, 秋期まで

かぼちゃ: べと病: 収穫30日前まで

やまのいも: 炭疽病: 収穫21日前まで

樹木類: 炭疽病, 斑点症 (シールドサーコスポラ菌): 発病初期

樹木類: 枝枯細菌病: 新梢伸長期~発病初期

●シモキサニル・マンゼブ水和剤

22434: MIC カーゼート PZ 水和剤 (三井化学アグロ) 09/08/05

シモキサニル: 12.0%, マンゼブ: 65.0%

ばれいしょ: 疫病: 収穫7日前まで

トマト: 疫病: 収穫前日まで

きゅうり: べと病: 収穫前日まで

すいか: 褐色腐敗病, つる枯病: 収穫7日前まで

メロン: べと病: 収穫7日前まで

はくさい: べと病: 収穫30日前まで

たまねぎ: べと病, 白色疫病: 収穫3日前まで

らっきょう: 白色疫病: 収穫30日前まで

だいず: べと病: 収穫45日前まで

小粒種ぶどう (露地栽培): べと病: 収穫60日前まで

大粒種ぶどう (露地栽培): べと病: 収穫60日前まで

ぶどう (施設栽培): べと病: 開花前まで

●マンゼブ水和剤

22435: MIC ペンコゼブフロアブル (三井化学アグロ) 09/08/19

マンゼブ: 28.0%

小粒種ぶどう (露地栽培): べと病, 黒とう病, 晩腐病: 収穫60日前まで

大粒種ぶどう (露地栽培): べと病, 黒とう病, 晩腐病: 収穫60日前まで

ぶどう (施設栽培): べと病, 黒とう病, 晩腐病: 開花前まで

きゅうり: べと病, 炭疽病: 収穫前日まで

トマト: 疫病, 葉かび病, 輪紋病: 収穫前日まで

ミニトマト: 疫病, 葉かび病, 輪紋病: 収穫前日まで

メロン: べと病, つる枯病: 収穫7日前まで

すいか: つる枯病, 炭疽病: 収穫7日前まで

キャベツ: べと病: 収穫30日前まで

ねぎ: 黒斑病, さび病, べと病: 収穫30日前まで

実えんどう: 褐斑病: 収穫14日前まで

●ピロキロン・フラメトピル粒剤

22438: MIC コラトトップリンバー粒剤 (三井化学アグロ) 09/08/19

ピロキロン: 5.0%, フラメトピル: 1.5%

(36ページに続く)