

メロンえそ斑点ウイルスによるえそ病徴の発現機構

—基礎研究から見たウイルス弱毒化の障壁—

大阪府立大学大学院生命環境科学研究科 ^{もち}望 ^{つき}月 ^{とも}知 ^{ふみ}史

はじめに

植物ウイルスが宿主植物に感染して引き起こす病気はウイルスの種によって様々であり、モザイク、黄化や退緑、葉脈透過症状、えそ斑等がその代表的な病徴として挙げられる。ウイルスはゲノム核酸と粒子を構成する外被タンパク質からなるごく微少な病原体であり、ウイルスのゲノム核酸には感染に必要なほぼ最小限のタンパク質のみがコードされている。コードされるタンパク質の数はウイルス種によって様々(4～10数個)であるが、その中で病徴発現に関与しているタンパク質を病原因子(virulence factor)と呼ぶ。病原因子であるウイルスタンパク質(病原タンパク質)の性質はウイルスの毒性、すなわち、ウイルスが植物個体に引き起こす病気の激しさを決定している。病原タンパク質中のアミノ酸が変異するとウイルスの毒性が激しくなったり、逆に全く病徴を示さなくなると弱毒化したりする。病原タンパク質の性質を決定しているアミノ酸残基を病原性決定アミノ酸と呼ぶ。ウイルス核酸がコードする病原タンパク質や病原性決定アミノ酸を決定する基礎的知見は、弱毒ウイルスの作出やその性状解析等、応用研究にとっても重要となる。本稿では、メロンやスイカ等のウリ科植物に感染し、えそ斑点病を引き起こす病原ウイルスであるメロンえそ斑点ウイルス(*Melon necrotic spot virus*: MNSV)の病原因子とえそ病徴の発病機作について、研究を始めるといった経緯、研究により得られた知見(Mochizuki et al., 2009)、さらに今後の展開の可能性についての考察をご紹介したい。

I 病原タンパク質の変異と弱毒化

現在、植物体内に感染しているウイルスを不活性化する有効な化学薬剤はなく、植物ウイルス病害に対する防除法の一つは、交叉防御を利用した植物ウイルスワクチン接種による予防である。植物ウイルスワクチンには宿主植物に感染してもほとんど病気を引き起こさない弱毒

株が用いられ、トマトモザイクウイルス(*Tomato mosaic virus*: ToMV)、*Cucumber green mottle mosaic virus*(CGMMV)、ズッキーニ黄斑モザイクウイルス(*Zucchini yellow mosaic virus*: ZYMV)、キュウリモザイクウイルス(*Cucumber mosaic virus*: CMV)等の弱毒株が植物ウイルスワクチンとして実用化されている。これらウイルスの病原因子であるタンパク質をコードする遺伝子として、ToMVでは130K複製酵素遺伝子、ZYMVではHC-pro遺伝子、CMVでは2b遺伝子が既に報告されている。これら病原タンパク質のアミノ酸が変異することにより、ウイルスの毒性が低下している。

従来の弱毒ウイルスの作出方法は、感染植物を高温や低温で処理したり、亜硝酸ソーダ処理、紫外線処理をすることよりウイルスの毒性低下を誘導する方法であった。つまり、これらの処理をすることによりウイルスの病原タンパク質のアミノ酸配列に変異が起こり(厳密にはウイルスのゲノム核酸の塩基配列に変異が起こるので、コードするアミノ酸配列が変化する)、その結果弱毒化したウイルス株を選抜する。上記のToMVやCGMMV、ZYMV等の弱毒株もこれらの方法により作出されている。一方で、従来の方法では弱毒化が困難なウイルスが存在する。MNSVはその一つであった。

MNSVは、メロンに感染すると葉に褐色のえそ斑を形成し(図-1a)、また、果実内部には空洞・空隙が発生し経済品質を著しく減少させる。MNSVは土壌に生息する絶対寄生菌であるオルピディウム菌によって媒介されるため(Furuki, 1981)、その防除は困難である。そこで、MNSVによるメロンえそ斑点病防除技術を開発するために、弱毒性MNSVの開発が取り組まれた。しかしながら、高温処理や紫外線処理では感染性を保持したままえそ病徴を示さない弱毒性MNSVは作出できなかった。したがって、弱毒性MNSVを作出するためには、まずは、えそ病徴を引き起こすMNSVの病原因子を決定し、えそ病徴の発病機構を解明する必要があると考え、研究を始めた。

II MNSVの病原因子p29複製酵素の性質

MNSVは、トンプスウイルス科カルモウイルス属に分類される小球形ウイルスであり、ゲノムRNAには五

Induction Mechanism for Necrotic Symptom Caused by *Melon necrotic spot virus*. By Tomofumi MOCHIZUKI

(キーワード: メロンえそ斑点ウイルス, えそ病徴, 毒性, 病原因子, ウイルス複製酵素, ミトコンドリア, 弱毒化)

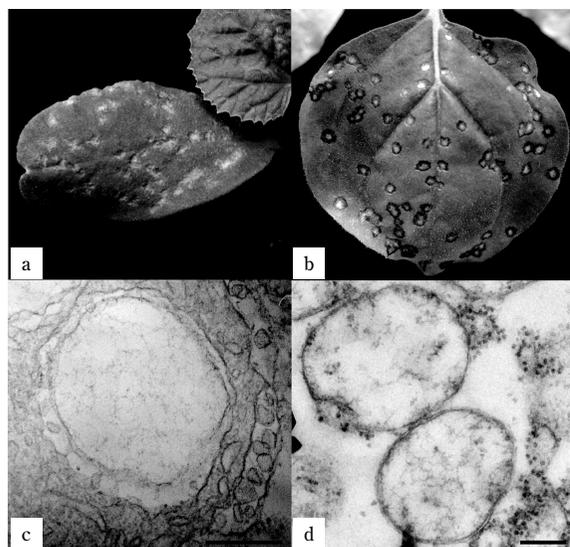


図-1 a: MNSVを接種したメロン子葉に形成されたえそ斑。b: MNSVのp29を発現するCMVベクターを接種した*Nicotiana benthamiana*接種葉に形成されたえそ斑。c: MNSVが感染したメロン細胞内のミトコンドリア膜に形成された、ウイルス複製複合体様小胞体。d: p29が発現して形成されたえそ斑周辺の細胞内で観察された、クリステ構造が崩壊したミトコンドリア。線は200 nmを示す。

つのタンパク質—p29およびp89（複製酵素）、p7Aおよびp7B（細胞間移行タンパク質）、並びにCP（外被タンパク質）—がコードされている（GENOVÉS et al., 2006; RIVIERE and ROCHON, 1990）。これら五つのMNSVタンパク質を、CMVを基にしたウイルスベクターを用いて*Nicotiana benthamiana*葉で個々に発現させたところ、複製酵素タンパク質であるp29を発現させた*N. benthamiana*葉にのみえそ斑病徴が現れた（図-1 b）。この結果から、MNSVのえそ病徴の病原因子はp29であり、p29は単独で植物体にえそ病徴を引き起こせることが明らかになった。

続いて、p29がえそ病徴を引き起こす発病機作を探るために、p29が発現しえそ斑が形成された*N. benthamiana*葉の病斑周辺の細胞内微細構造を電子顕微鏡により観察した。p29が発現した細胞では、特徴的な異常としてクリステ構造が崩壊し変形したミトコンドリアの凝集が認められた（図-1 d）。そのほかにも葉緑体の変形や液胞膜の崩壊が観察された。

以前の研究により、MNSVが感染したメロン細胞内では、ミトコンドリア外膜にウイルス複製複合体と見られる小胞構造が観察されている（図-1 c）（Di FRANCO

and MARTELLI, 1987; YOSHIDA et al., 1980）。また、細胞質で翻訳されたタンパク質がミトコンドリアへ移行するためのシグナル配列がp29のアミノ（N）末端に存在することがCIUFFREDA et al. (1998)により予測されている。これらのことから、p29は植物細胞内でミトコンドリアに局在しており、それとミトコンドリアの形態異常とえそ病徴とに何らかの関係があることが予想された。そこで、p29が発現した*N. benthamiana*葉の細胞内小器官を遠心分離により分画してp29を検出する方法と、p29に蛍光タンパク質を融合させて生細胞における局在性を蛍光観察する方法を用いて解析した。その結果、MNSVのp29はミトコンドリアに局在し（図-2 b）、ミトコンドリア膜を貫通する膜内在性のタンパク質であることがわかった。

続いて、p29の268個のアミノ酸残基の中で毒性を発揮するために必要な領域の決定を行った。変異誘導法では毒性を決定するアミノ酸残基は見つけられなかったため、p29を細切れにしたタンパク質断片を多数作成し、CMVベクターを用いて*N. benthamiana*葉で発現させた（図-2 a）。その結果、p29のえそ斑の形成には36番目～76番目のアミノ酸残基が重要であることがわかった。では、この36番目～76番目のアミノ酸残基はどのようにp29のえそ斑形成に関与しているのか？ コンピュータプログラムにより、55番目～75番目の21アミノ酸残基が疎水性 α ヘリックスを構成することが予測された。そこで、この21アミノ酸残基をp29から取り除くとえそ斑を形成しなくなり、この疎水性 α ヘリックスがp29のえそ斑形成に必須であることが明らかになった。

膜内在性タンパク質の疎水性 α ヘリックスは脂質2重膜を貫通する領域（膜貫通領域：Transmembrane domain TMD）であり、タンパク質の膜局在性に関与する。したがって、55番目～75番目の疎水性 α ヘリックス（TMD2と呼ぶ）を取り除くことにより、p29のミトコンドリアへの局在が変化しているのではないかと予想された。そこで、TMD2を取り除いたp29を蛍光タンパク質で標識して細胞内局在性を観察したところ、ミトコンドリアに局在しなくなることが明らかになった（図-2 c）。このことは、TMD2がp29のミトコンドリア局在に機能していること、さらに、p29のミトコンドリア局在はえそ斑を形成するために必須であることを示している。実際に様々なp29断片を用いて観察を行ったが、ミトコンドリアへ局在しなくなったp29断片はすべてTMD2が不完全であり、えそ斑の形成能を失っていた。例えば、p29のカルボキシ（C）末端から202アミノ酸残基を欠損させた断片（ここではp29- Δ C202と呼ぶ）はTMD2が半分欠けており、ミトコンドリア

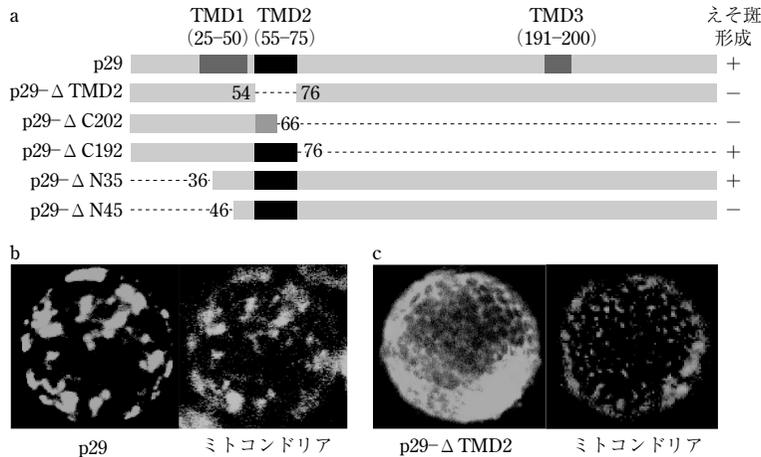


図-2 a : 各 p29 の欠損断片の構造図とえそ斑形成能. p29 のボックス内の黒色ボックスは、それぞれ推測される膜貫通領域 (TMD) 1 ~ 3 を示す. えそ斑形成の下のおよび-は、それぞれえそ斑を形成する、形成しないを示す. b : 蛍光タンパク質を融合した p29 の細胞内局在性. 左写真の白色シグナルは p29 の局在を示し、右写真の白色シグナルはミトコンドリアの局在を示す. p29 の局在とミトコンドリアの局在は一致する. c : 55 ~ 75 番目のアミノ酸残基の TMD2 を欠いた p29-Δ TMD2 の細胞内局在性. p29-Δ TMD2 の局在を示す白色シグナルは細胞質全体へと拡散している (左). 右写真の白色シグナルはミトコンドリアの局在を示す.

への局在性もえそ斑形成能も喪失している (図-2 a)。

一方で、ミトコンドリアへ局在した p29 断片のすべてがえそ斑病徴を引き起こしたわけではなかった。p29 の N 末端から 35 アミノ酸残基を欠損させた断片 (p29-Δ N35) はミトコンドリアへ局在してえそ斑を形成するが、アミノ末端から 10 アミノ酸残基をさらに削った断片 (p29-Δ N45) は、完全な TMD2 を保持しミトコンドリアへ局在するにもかかわらずえそ斑形成能を喪失した (図-2 a)。このことは、TMD2 はえそ斑形成の必要条件であるが十分条件ではないこと、すなわち、p29 のえそ誘導には TMD2 による p29 のミトコンドリアへの局在とともに、さらに TMD2 前後の数十アミノ酸残基が必要であることを示している。

III p29 の発現によるミトコンドリア生理活性の減退

p29 がミトコンドリアに局在することがなぜえそ病徴を引き起こすか? この疑問に対する部分的な証拠を得るために、p29 の発現によりミトコンドリアの生理活性がどのように変化をするのかを解析した。そのために、ミトコンドリア膜電位依存的に染色する色素、すなわち、生きて活動しているミトコンドリアのみを染色する色素 (Mito-Tracker) を用いて、p29 を発現させた細

胞内のミトコンドリア生理活性の変化を観察した。その結果、p29 を発現させた細胞では Mito-Tracker による染色が観察されなくなり (図-3)、p29 の発現によりミトコンドリアの生理活性が減退していることが示唆された。このミトコンドリア生理活性の減退は、先に述べた TMD2 を取り除いた p29 断片を含むえそ斑を形成しない p29 断片すべてで観察されなかったことから、ミトコンドリア生理活性の減退とえそ病徴の発病には高い相関関係があることが示された。

さらに、ミトコンドリア生理活性の減退は MNSV が感染したメロン細胞においても観察された。MNSV を接種したメロンプロトプラストにおけるミトコンドリアの生理活性を Mito-Tracker を用いて観察したところ、MNSV 感染細胞では Mito-Tracker による染色が検出されなくなった。

以上の結果をまとめると、① MNSV がコードする複製酵素 p29 のミトコンドリアへの局在がえそ病徴を引き起こす、② p29 のミトコンドリアへの局在には 55 番目 ~ 75 番目のアミノ酸残基が形成する TMD2 が必要である、③ えそ誘導には、TMD2 に加え前後数十アミノ酸残基が必要である、④ p29 発現細胞、および MNSV 感染細胞ではミトコンドリア生理活性が減退する、ということがわかった。この結果から MNSV の感染による

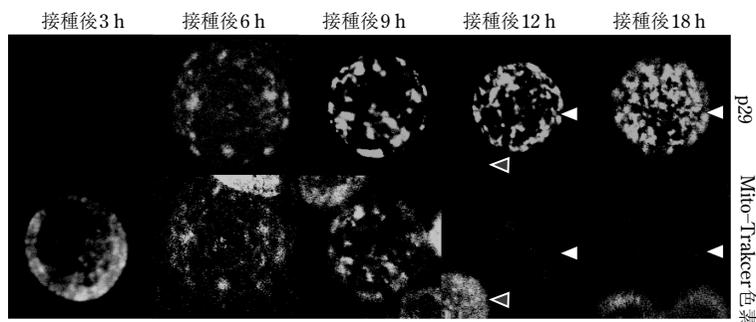


図-3 蛍光標識した p29 が発現した *Nicotiana benthamiana* プロトプラストにおける Mito-Tracker 色素による染色の減退

p29 シグナルは接種後 6 時間目から検出される。接種後 6, 9 時間目の p29 発現細胞では Mito-Tracker 色素による染色が検出される。接種後 12, 18 時間目の p29 発現細胞では Mito-Tracker 色素による染色が観察されなくなる (白矢印)。一方で、p29 が発現していない健全細胞では、Mito-Tracker 色素による染色が検出される (白ヌキ矢印)。

えそ病徴の発症機構について、「ゲノム RNA の複製のために、ミトコンドリア膜上で p29 ともう一つの複製酵素である p89 が共同して複製複合体を形成し、それによりミトコンドリア膜が形態異常を起こすことでその生理活性が減退し、えそ病徴の発現につながる」という仮説が立てられた。

おわりに

MNSV では病原因子とウイルス複製酵素が一致しており、MNSV の引き起こすえそ病徴はゲノム RNA の複製というウイルス活動に密接に関係していることが推察された。弱毒化を目指して行った高温処理や紫外線処理による変異誘導法では MNSV の感染性が減少するばかりだったことは、p29 複製酵素の変異がウイルス複製能を低下させていたためと考えられる。したがって、従来の病原タンパク質にアミノ酸変異を誘導する方法では、弱毒 MNSV を作出することは困難ではないかと結論づけられた。えそ病徴の誘導に必須である p29 のミトコンドリアへの局在は、MNSV の複製にとっても必須であり、ウイルス RNA の複製という行為自体がえそ病徴を引き起こす引き金になっているのではないかと考えている。

では、得られた知見からどのような弱毒化 MNSV を作出する戦略が考えられるのか。一つは、TMD2 前後のアミノ酸残基を標的に人為的にアミノ酸変異を導入することであろう。TMD2 に変異を導入すると p29 のミトコンドリアへの局在が変化するために MNSV の感染性が損なわれる可能性が高いが、TMD2 前後の毒性領域のアミノ酸変異は p29 の毒性のみを減少させる可能性を残している。今後、TMD2 とその前後数十アミノ

酸が MNSV のゲノム RNA 複製に果たす役割を明らかにする必要がある。もう一つは、アミノ酸置換を伴わない遺伝子変異を導入する方法である。動物ウイルスであるポリオウイルスでは、アミノ酸配列はそのままにウイルスタンパク質遺伝子のコドン配列を改変し、ウイルスを弱毒化することに成功している (COLEMAN et al., 2008 ; ROBINSON, 2008)。これら方法論の確立や、人為的な組換え技術により作出した弱毒ウイルスの使用法が今後の課題である。

本稿の研究成果は筆者が独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構中央農業総合研究センターにて勤務していたときに携わったものであり、研究の一部は、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。多大なご支援を賜った中央農業総合研究センターの津田新哉博士に厚く感謝の意を申し上げる。また、平井克之博士、神田絢美博士、大木健広博士、大西純博士をはじめとする中央農研・環境保全型オープンラボ (開放型研究施設) 関係者の皆様に深く感謝の意を申し上げる。

引用文献

- 1) CIUFFREDA, P. et al. (1998) : Arch. Virol. 143 : 173 ~ 180.
- 2) COLEMAN, J. R. et al. (2008) : Science 320 : 1784 ~ 1787.
- 3) DI FRANCO, A. and G. P. MARTELLI (1987) : J. Submicrosc. Cytol. 19 : 605 ~ 613.
- 4) FURUKI, I. (1981) : Tech. Bull. Shizuoka Agric. Exp. Station 14 : 1 ~ 94.
- 5) GENOVÉS, A. et al. (2006) : J. Gen. Virol. 87 : 2371 ~ 2380.
- 6) MOCHIZUKI, T. et al. (2009) : Virology 390 : 239 ~ 249.
- 7) RIVIERE, C. and D. M. ROCHON (1990) : J. Gen. Virol. 71 : 1887 ~ 1896.
- 8) ROBINSON, H. L. (2008) : Nat. Biotechnol. 26 : 1000 ~ 1001.
- 9) YOSHIDA, K. et al. (1980) : Ann. Phytopath. Soc. Japan 46 : 339 ~ 348.