

**弱毒ウイルスによる防除技術利用及び
種苗技術との連携における課題**



宇都宮大学農学部生物資源科学科 夏秋知英

**0. イントロダクション
平成以前の弱毒ウイルス研究の歴史**

1. 弱毒ウイルスの分子作用機構
2. ZYMVにおける優良ワクチン株の選抜
3. ZYMVワクチン株の製剤化
4. 産学官連携体制と今後の課題

干渉効果 (cross protection)

植物に免疫系はないが、あるウイルスに全身感染するとその後は同種の近縁なウイルスに感染しなくなるという現象がある

干渉効果の研究史

- 1929年 McKinney: タバコモザイクウイルス (TMV) とタバコの組み合わせで最初の報告
- 1933年 Salaman: ジャガイモXウイルス (PVX) とジャガイモの組み合わせで弱毒系が強毒系の感染を防ぐことを報告
- 1949年 Mathews: "cross protection" を提案
- 1951年 Grant and Costa: カンキツトリステザウイルス (CTV) でウイルス病の防除に利用できることを報告
- 1952年 Webbら: 汁液接種でえず師部局在のジャガイモ葉巻ウイルス (PLRV) で報告
- 1955年 Posnette and Todd: Cacao swollen shoot disease で防除に応用できることを報告

干渉効果の研究史(続)

- ★干渉効果は近縁のウイルス間で起き、強毒系統間でも起きる
1950年代 干渉効果はウイルスの系統を調べる重要な試験
- ★干渉効果はDNAウイルスでもみられる
1978年 Tomlinson and Shepherd : カリフラワーモザイクウイルス (CaMV) で干渉効果を報告
2004年 Owor ら: キャッサバモザイク病で報告
- ★干渉効果はウイロイド(裸のRNA)でもみられる
1978年 Niblettら: ウイロイドで干渉効果を報告
⇒干渉効果に外被タンパク質は必須でない?
- ★これまでに弱毒ウイルスを防除に用いる試みが多数報告された
- ★干渉効果の原理に関していくつかの仮説が提案された

弱毒ウイルスの利用例

- ・トマトモザイクウイルス (TMV-L11A)
- ・キュウリモザイクウイルス
- ・トウガラシマイルドモットルウイルス (TMV-P)
- ・スイカ緑斑モザイクウイルス
- ・ズッキーニ黄斑モザイクウイルス
- ・ヤマノイモえそモザイクウイルス
- ・ダイズモザイクウイルス
- ・カンキツトリステザウイルス

日本デルモンテのCMVワクチンは有名
海外ではパパイアリングスポットウイルスなども

★静岡県のマスクメロンの例

キュウリ緑斑モザイクウイルス (CGMMV) のワクチン (弱毒ウイルス) の利用

第2表 弱毒化CGMMVの使用実績

年	弱毒ウイルス 配布頭数	弱毒ウイルス 配布枚数	弱毒ウイルス 接種面積(ha)
1983年	0	-	0
1984年	10982	-	145
1985年	5700	-	72.5
1986年	2016	-	26.6
1987年	3080	-	40.7
1988年	2500	-	33
1989年	2141	-	28.3
1990年	2000	-	26.4
1991年	2401	-	31.7
1992年	2100	-	27.7
1993年	1400	-	18.5
1994年	1200	-	15.9
1995年	1000	-	13.2
1996年	906	93	12
1997年	908	87	12
1998年	740	65	9.8
1999年	590	37	7.8
2000年	659	46	8.7
2001年	511	26	6.7
2002年	638	33	8.4
2003年	696	21	9.2



ハウスの入口では靴や手を消毒する

弱毒ウイルス利用上の注意事項

- 弱毒ウイルスは、凍結しておけば保存できるが、凍結、融解を繰り返せばウイルスは不活化(死滅)します。
- 弱毒ウイルスの濃縮は、なるべく低温で行います。
- 弱毒ウイルスの感染力が悪いことがあるので、弱毒ウイルスをすりつけ接種する場合にはカーボンダラムをすりつけて丁寧にすりつけます。
- 弱毒ウイルス接種メロンは、生育がやや抑制される。苗葉が悪い、根腐りがある、葉害を受けやすくなるなどの欠点があるので、選別を厳密にして生育を促進する。水を十分に調整して接種をよくなる。薬剤の使用濃度を守って散布するなど栽培管理に注意します。
- 弱毒ウイルスの使用期間は、接種が難しい事件の連続で、接種が弱い状態では接種が大変なので注意が必要と思われる。
- 弱毒ウイルスの使用回数、試験中で結論が得られていないが、全温室がひとわり以上接種されることが必要。
- 弱毒ウイルスの接種は、出入口の戸や窓の網のチェーンなど雑草を無くする対策などによって伝染源となり発生するので、雑草をCMVウイルス株のように徹底をします。

さまざまな理由でワクチンの実用化例、商品化例は少なかった

以前の干渉効果に関する仮説

- ウイルスの外被タンパク質による二次ウイルスRNAの隔離(encapsidation)
- 一次ウイルスRNA複製酵素による二次ウイルスRNAの隔離(複製阻害)
- 代謝異常による植物のストレス(複製の場やリボソーム、増殖素材の不足)
- 一次ウイルスによって誘発される防御物質

①脱外被タンパク質-RNA複製酵素の翻訳
 ②ウイルスのRNA複製酵素によるウイルスRNAの複製
 ③その他のウイルスタンパク質の合成
 ④ウイルス粒子の形成
 ⑤隣接細胞への細胞間移行(cell to cell movement)、再び複製増殖
 ⑥長距離移行(long distance movement)により植物の全身に感染

- イントロダクション
平成以前の弱毒ウイルス研究の歴史
- 弱毒ウイルスの分子作用機構
- ZYMVIにおける優良ワクチン株の選抜
- ZYMVワクチン株の製剤化
- 産学官連携体制と今後の課題

「弱毒性」と「干渉効果」を分けて考える

二つのタイプの弱毒ウイルスが実用化

- 京都タイプ
- デルモンテタイプ

「弱毒性」と「干渉効果」を分けて考える

二つのタイプの弱毒ウイルスが実用化

- 京都タイプ
- デルモンテタイプ

何が違うのか？

- 京都タイプは製剤で販売
- 接種苗で販売

「弱毒性」のメカニズムが異なる

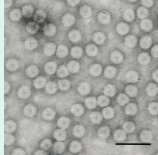
二つのタイプの弱毒ウイルスが実用化

- 京都タイプ
強毒ウイルスの持つサイレンシング サプレッサーが壊れている
- デルモンテタイプ
ウイルスに寄生するRNAを利用

デルモンテのCMVワクチンはCMVに寄生するサテライトRNAを含んでいる

CMVの性状

- キュウリモザイクウイルス (*Cucumber mosaic virus*, CMV) はプロモウイルス科ククモウイルス属に属する
- 植物ウイルスにおいて最大の宿主範囲を持ち、単子葉植物から双子葉植物まで1,000種以上の植物に感染する
- 100種以上のアブラムシによる非永続伝搬する

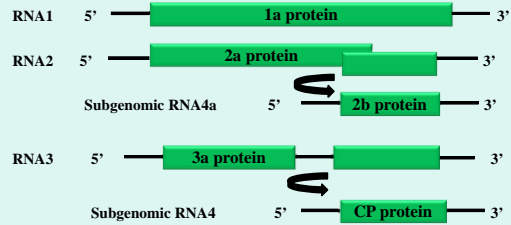


CMV粒子 Bar 100nm



CMVのゲノム構造

一本鎖(+)RNA 3分節



1a,2a protein - RNA複製とサブゲノムRNAの合成に関与
 2b protein - RNAサイレンシングに関与(病徴に関与)
 3a protein, CP - 細胞間移行とウイルス感染に関与

CMVのサテライトRNA

- 300~400塩基の一本鎖RNA
- CMVに寄生して増殖
- CMVの病徴に影響

以前はsatRNAがCMVのウイルスRNAの複製酵素を乗っ取るために、CMVの増殖が抑制されると考えられていた

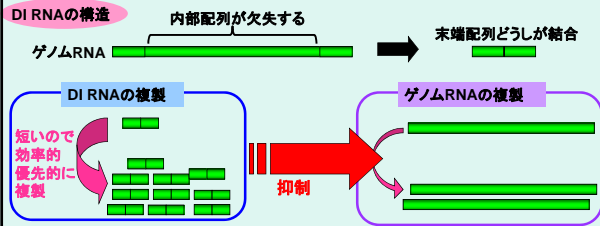
2011年に複数の論文が、satRNAから生じるsiRNAが植物のRNAやCMVのRNAに影響を与えることを報告した



図 CMVから検出される3種のsatRNA
 大きさはI-IIIが各約370, 335, 300塩基(A)。塩基配列に相同性が認められ(B-D)、大きいものがCMVに弱毒性を付与できる。

欠損性干渉RNA (Defective interfering RNA, DI-RNA)

DI RNAは、ゲノムRNAの内部配列が欠失してかなり短い。ゲノムRNAより効率的・優先的に複製されるので、ゲノムRNAの複製を抑制し、病原性を抑えると考えられていた。



DI RNAでも、最近では植物のサイレンシングを誘導するためにウイルスの増殖が抑えられるのではないかと考えられている。

⇒ satRNAはCMVのみであるが、DI RNAは幅広く適用できるので、今後の利用が考えられる

0. イントロダクション
平成以前の弱毒ウイルス研究の歴史
1. 弱毒ウイルスの分子作用機構
2. ZYMVにおける優良ワクチン株の選抜
3. ZYMVワクチン株の製剤化
4. 産学官連携体制と今後の課題

ズッキーニ黄斑モザイクウイルス (ZYMV) 全国のキュウリで被害が多発



果実にモザイクや奇形を起こす
 → 著しい商品価値の低下
 接ぎ木栽培では急性萎凋や枯死も起こる

ズッキーニ黄斑モザイクウイルス(ZYMV)


- ・長さ約750nm、幅約13nmのひも状
- ・アブラムシ伝播
- ・汁液接種容易
- ・宿主範囲はほぼウリ科植物
- ・ポティウイルス科ポティウイルス属
- ・約1万塩基の一本鎖RNAゲノム



ZYMVのゲノム構造

PI HC-Pro P3 6K1 CI 6K2 Vpg NIaPro NIB CP An

京都府内のキュウリ分離したZYMVより優良弱毒株ZYMV-2002を選抜



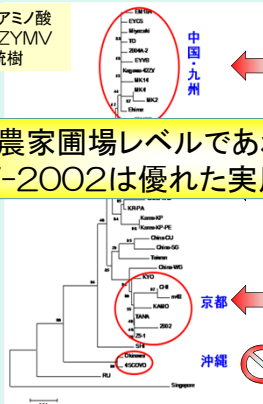
弱毒株 元の強毒株 無接種

ZYMV-2002の実用性(まとめ)

- ・アブラムシで媒介されない
(他のウリ科作物に実害が出る可能性はほとんどない)
- ・長期栽培でも弱毒性が変化しない
- ・他のウイルスが混合感染しても病原性が強くない
- ・各地で実用的な防除効果を示す
- ・激発条件では防除効果に地域差が出るのが予想される
- ・少発生となっても、接種苗の導入リスク(収量・品質への影響)は小さい

温室内接種試験による各地ZYMV分離株に対する干渉効果

HC-PROの氨基酸配列に基づくZYMV分離株の系統樹



中国九州 干渉効果 ○

京都 干渉効果 ◎

沖縄 干渉効果 ▲

発生が農家圃場レベルであれば他県でもZYMV-2002は優れた実用性を示す

0. イントロダクション
平成以前の弱毒ウイルス研究の歴史
1. 弱毒ウイルスの分子作用機構
2. ZYMVにおける優良ワクチン株の選抜
3. ZYMVワクチン株の製剤化
4. 産学官連携体制と今後の課題

初めて農薬登録された弱毒ウイルス (CUBIO ZY-02)



農薬登録第22152号
登録名称: キュービオZY-02
登録品名: キュービオZY-02
登録内容: 弱毒ウイルスワクチン

株式会社 農産物化学研究所
〒600-0001 京都府京都市中京区錦町24-74番地

株式会社 農産物化学研究所

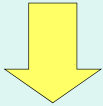
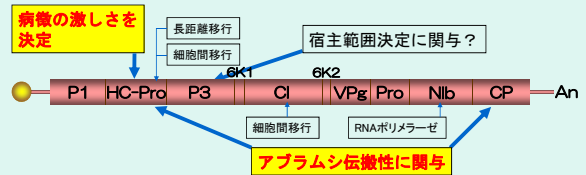
0. イントロダクション
平成以前の弱毒ウイルス研究の歴史

1. 弱毒ウイルスの分子作用機構
2. ZYMVにおける優良ワクチン株の選抜
3. ZYMVワクチン株の製剤化
4. 産学官連携体制と今後の課題

ZYMV弱毒株の「ワクチン性」を決定している遺伝子を解明

HC-Proタンパク質における4つの塩基の変異が病原性(弱毒性)とアブラムシ伝搬性を決定している⇒アブラムシに伝播されないワクチン株を天然の変異株の中から選抜できる

選抜したワクチン株を塩基配列を用いて特許申請する
開発したワクチン株を保護する
他種ウイルスへの応用を考える



塩基番号	1187	2046	2337	2421	1402	1987
アミノ酸番号	350	636	733	761		
Z5-1	A	L	L	K	C	T
2002	T	S	S	R	G	A

HC-Proにおける弱毒株2002に特異的な塩基とアミノ酸配列の変異

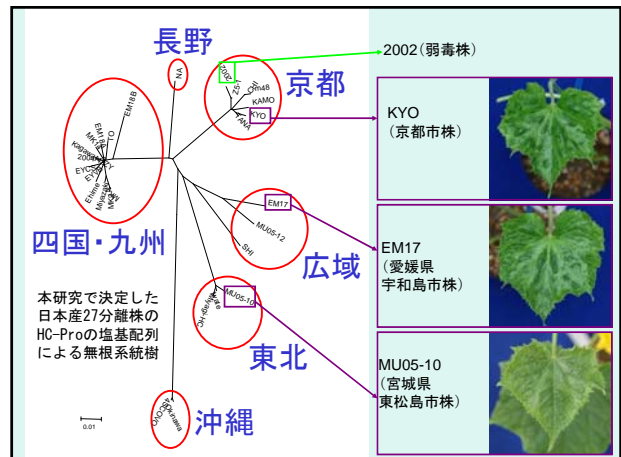
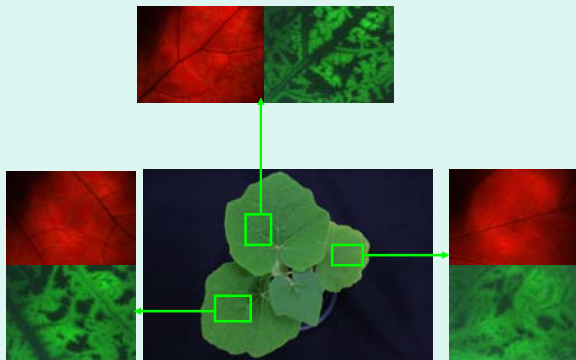
☆HC-Pro領域がキュウリにおけるZYMVの病原性に関与している。

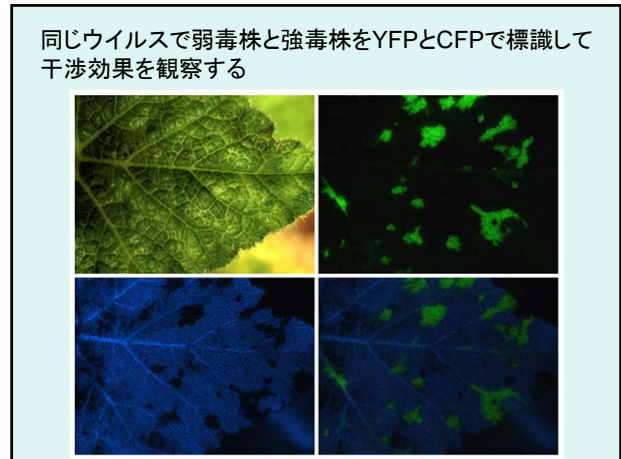
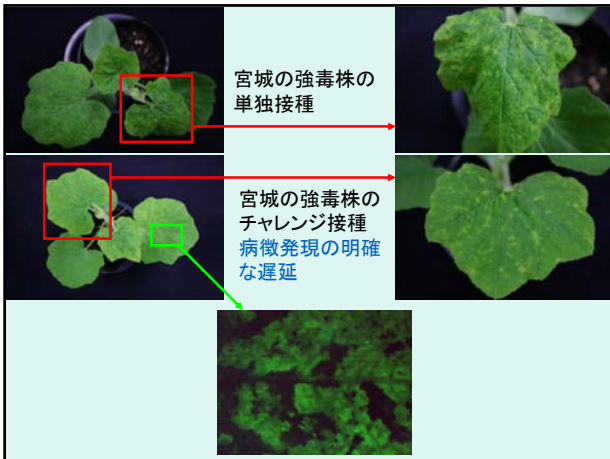
☆ 強毒株Z5-1 を実用的に弱毒化にするにはHC-Proにおける4カ所のアミノ酸変異のうち、少なくとも3ヶ所が必須であり、4カ所の導入が望ましい。

☆以上の結果から、HC-Proにおける4カ所のアミノ酸変異による弱毒株2002の弱毒化はより安定であり、かつ実用的であることが示された。
→特許申請

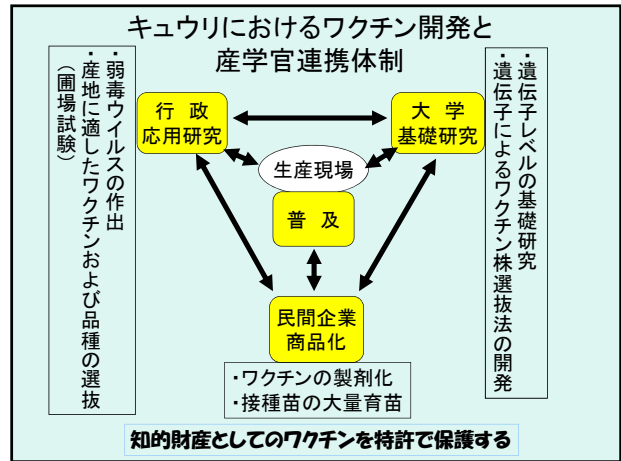
☆また、この4種の変異がZYMVのカボチャでのえそ症状、キノアでの局部病斑形成、そしてアブラムシ伝搬性を決定していることが示された。

2002-YFP接種苗の蛍光写真





- ★ポティウイルスではジーンサイレンシングサプレッサーのHC-Proが弱毒化を大きく決定している
- ★他のウイルスでもサプレッサーが弱毒性に関与している
- ★サテライトRNAや欠損性干渉RNAが弱毒性をもたらす場合もある
- ★TMVではゲノムRNAの構造が弱毒性を決定したり、サプレッサー以外の要因で弱毒化も起きる
- ★干渉効果にサイレンシングが関与しているが、HC-Proは干渉効果を決定してはいない
- ★干渉効果の決定に外被タンパク質が関与する例もある
- ★「一次ウイルスと二次ウイルスの競争」も考えられる



- さいごに
植物ウイルス病ワクチン開発のこれからの課題
1. 接種方法をより簡単に
 2. 1種のワクチンですべてのウイルス病を防除できない
例) キュウリでは
ズッキーニ黄斑モザイクウイルス
キュウリモザイクウイルス
カボチャモザイクウイルス
パパイヤリングスポットウイルス
⇒混合ワクチンの開発が急務
 3. 抵抗性品種や天敵利用といった他の防除方法との組み合わせ
IPM (integrated pest management) の考え方が大切
 4. 汁液接種できないウイルスのワクチンをどうするか
 5. 遺伝子組み換え技術との兼ね合い(競争)