

論文の内容の要旨

論文題目 タバココナジラミのトマト黄化葉巻ウイルス 媒介機構に関する研究

氏 名 内堀 美和

【序論】

植物ウイルスの多くは、それぞれ特定の媒介昆虫によって媒介されるが、媒介昆虫特異性のメカニズムは解明されていない。トマト黄化葉巻ウイルス (*Tomato yellow leaf curl virus*; TYLCV) は、1 本鎖環状 DNA をゲノムとするジェミニウイルス科ベゴモウイルス属のウイルスであり、葉の黄化、葉巻、落果などの病徴をひきおこすトマト黄化葉巻病の重要病原である。TYLCV は、唯一の媒介昆虫であるタバココナジラミによって循環型・非増殖型様式で特異的に媒介される。タバココナジラミは、TYLCV 感染植物の篩管液を吸汁することにより TYLCV を獲得する (獲得吸汁)。獲得された TYLCV は、食道とフィルターチャンバーを通過し、盲のうから下行中腸へと運ばれ、中腸円筒細胞から血体腔へと侵入し、血体腔内を血リンパの流れにのって循環し、唾液腺に特異的に侵入し、唾液とともに次の吸汁行動 (接種吸汁) で次の宿主植物に感染すると考えられている (図 1)。TYLCV の媒介には、中腸および唾液腺の細胞の通過が必須であり、この通過の可否が TYLCV 媒介能を決定する要因であると考えられる。しかし、TYLCV 侵入に関する詳細な機構は不明である。

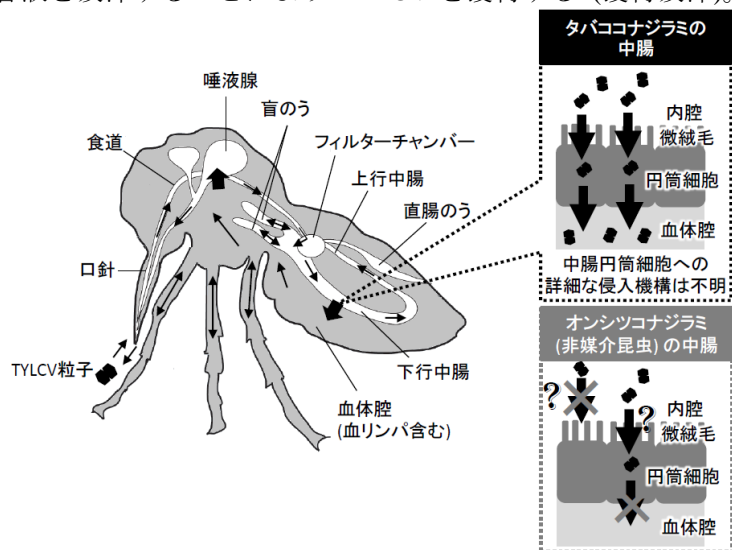


図1. タバココナジラミ内部形態と中腸円筒細胞からのTYLCV侵入

一般に、エンベロープを持たない動物ウイルスは宿主細胞内にエンドサイトーシス (EC) を介して侵入する。ジェミニウイルスと同じように DNA をゲノム核酸として持つ Simian virus 40 はカベオラ・脂質ラフト仲介型 EC によって宿主サル細胞に侵入する。また、循環型・増殖型様式で媒介される RNA ウイルスであるイネ萎縮ウイルスはクラスリン仲介型 EC によってヨコバイの培養細胞に侵入する。これらのことからタバココナジラミ中腸円筒細胞への TYLCV 侵入には、いずれかの EC 機構が関与していると予想されるが、現在までに解析は行われていない。

そこで本研究では、TYLCV 媒介昆虫であるタバココナジラミと非媒介昆虫であるオンシツコナジラミの消化管における TYLCV の様態および EC に着目し、消化管の細胞への TYLCV 侵入機構の解明を試みた。

【結果および考察】

タバココナジラミおよびオンシツコナジラミの血リンパからの TYLCV 検出

媒介昆虫特異性に関与する組織を特定するために中腸から血体腔への通過に着目し、タバココナジラミおよび非媒介昆虫である同科異属のオンシツコナジラミに TYLCV 感染植物を吸汁させ、血リンパを含む脚から TYLCV ゲノム DNA を PCR 法により検出した。その結果 (図 2)、オンシツコ

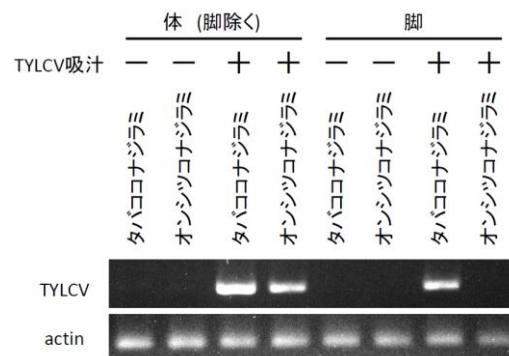


図2. TYLCV感染植物を吸汁させたタバココナジラミ(媒介昆虫)、オンシツコナジラミ(非媒介昆虫)からのTYLCV検出

ナジラミの血リンパを含む脚から TYLCV ゲノム DNA が検出されないことから、TYLCV が中腸内腔から中腸を通過し血体腔へ移行できるか否かが昆虫の TYLCV 媒介能を決定する一因であると考えられた。

植物／コナジラミ細胞内の TYLCV の様態

1) TYLCV 感染 *Nicotiana benthamiana* 観察

免疫電子顕微鏡法を確立するため、アグロバクテリウム法により TYLCV 感染性クローンを *Nicotiana benthamiana* に接種し、10 日後の接種葉を化学固定後、Spurr 樹脂包埋した。ウェスタンブロット法で特異性を確認した抗 TYLCV 抗体と金コロイドを用いて免疫電子顕微鏡法により観察した (図 3)。その結果、健全な *N. benthamiana* の核では観察されない免疫反応のある電子密度の高い構造物が TYLCV 感染植物の核内で観察された。このことから、この構造物が TYLCV であることが推察された。

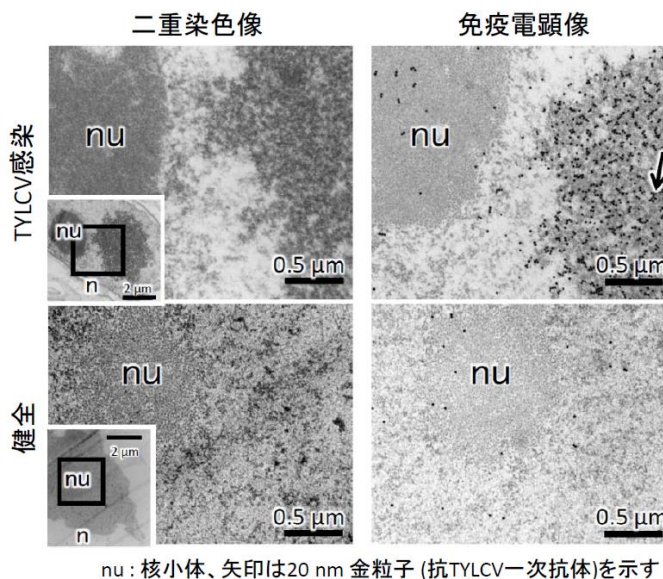


図3. *N. benthamiana* 細胞内の免疫電顕観察

2) コナジラミ消化管観察

媒介昆虫であるタバココナジラミの中腸 (下行中腸、上行中腸)および盲のう内の TYLCV 局在を調べるために、TYLCV 感染植物あるいは健全植物を7日間吸汁させたタバココナジラミのメス成虫の消化管の断面を透過型電子顕微鏡 (TEM)により観察した。その結果、TYLCV 感染植物を吸汁した昆虫の下行中腸、上行中腸、盲のうにおいて細胞内の小胞様構造の中に電子密度の高い構造物が観察された。抗 TYLCV 抗体と金コロイドを用いた免疫電子顕微鏡法で (図 4)、この構造物が TYLCV であることが推察され、TYLCV は下行中腸、上行中腸、盲のうのいずれから侵入し、小胞に局在することが示唆された。さらに、3 個の中腸について約 1 μm 間隔で切片を作製し、TYLCV の含まれる小胞様構造の小胞全体に占める割合を計測した結果 (図 5)、最も割合の高かった下行中腸前部と盲のうが TYLCV の主な侵入部位であることが示唆された。

一方、タバココナジラミと同様に TYLCV 感染植物を7日間吸汁させたオンシツコナジラミのメス成虫では、小胞様構造は観察されたものの免疫反応のある電子密度の高い構造物は見られなかった (図 4)。したがって TYLCV はオンシツコナジラミの中腸に侵入しないことが示唆された。

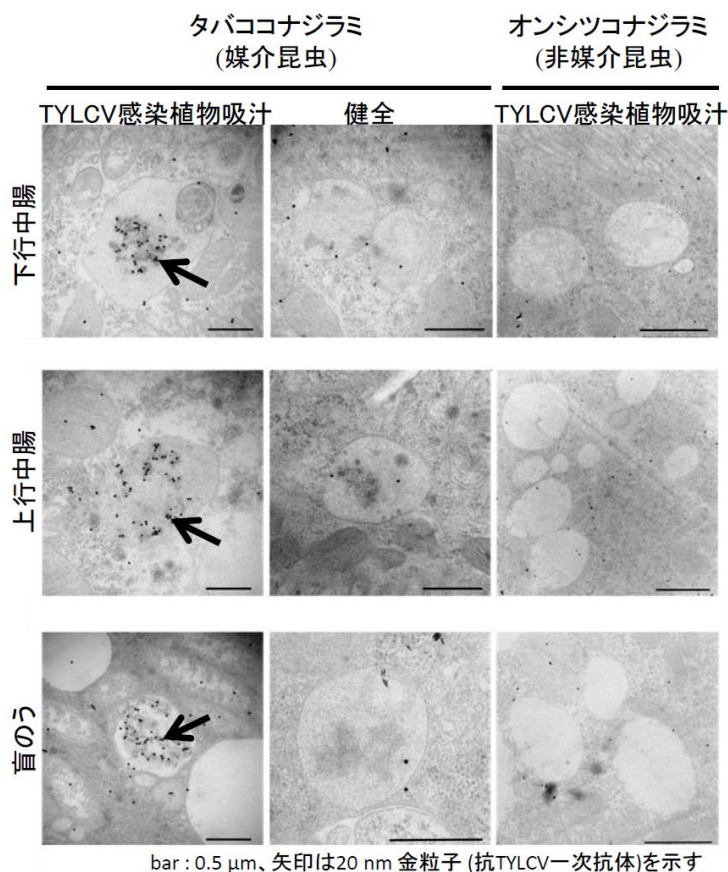


図4. TYLCV感染植物を吸汁させたタバココナジラミ (媒介昆虫)、オンシツコナジラミ (非媒介昆虫) の消化管の免疫電顕観察

コナジラミの盲のうの機能

1) 透過型電子顕微鏡による構造観察

盲のうは食べ物を小腸へ送り出すポンプとして機能し、クチクラ内膜があるために TYLCV 侵入に向かない器官であると考えられてきたが、上記のように盲のうが主要な TYLCV 侵入組織のひとつであることが明らかになったため、盲のうの構造を詳細に再調査した。TYLCV 感染植物を7日間吸汁させたタバココナジラミのオス成虫の盲のう、食道、直腸のうの内部構造をTEM観察した(図6)。その結果、食道および直腸のうの内腔側にはクチクラ内膜が存在したが、盲のうにはクチクラ内膜は存在せず、微絨毛が存在する中腸と類似の構造であった。

2) pH 測定

pH 指示薬で中腸と盲のうの pH の違いを調べた結果、中腸が中性から弱酸性であったのに対し、盲のうは酸性であった。このことから、盲のうには何らかの消化機能があることが示唆された。

3) 盲のうの位置

タバココナジラミオス成虫およびメス成虫の消化管の位置の違いを、食用色素を混和した30%スクロース液を吸汁させることで調べた。その結果、中腸は雌雄に関わらず腹部に位置していたが、盲のうはオスでは腹部に、メスでは胸部の唾液腺付近に位置していた。さらに、オス成虫とメス成虫を分けて媒介実験を行った結果、媒介効率にはメス成虫の方が高かった。これらの結果から、盲のうと唾液腺の距離が媒介効率に影響する一因である可能性が示唆された。

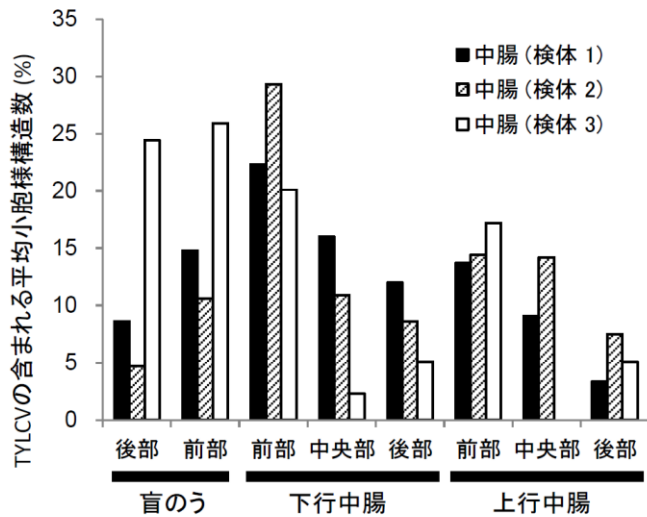


図5. 各中腸におけるTYLCVの含まれる平均小胞様構造数

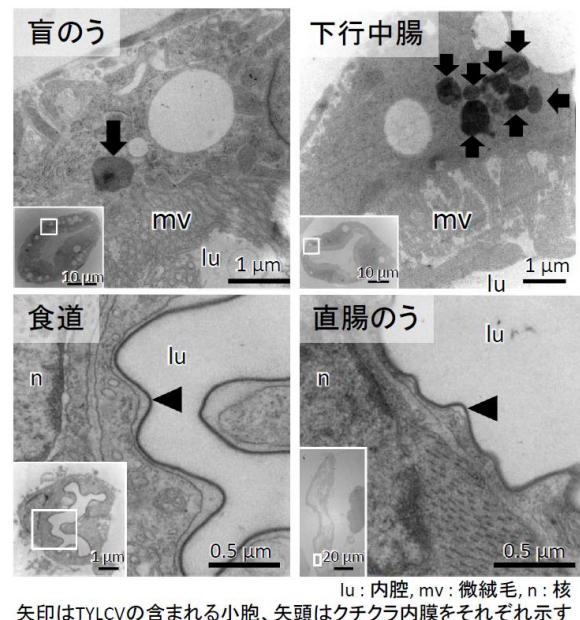


図6. タバココナジラミ消化管の透過型電子顕微鏡観察

タバココナジラミ中腸細胞への TYLCV 侵入経路

1) 内部移行マーカの取り込みに対する阻害剤の効果

タバココナジラミ中腸円筒細胞への TYLCV 侵入経路として EC に着目した。カベオラ・脂質ラフト仲介型 EC により細胞に取り込まれる標識コレラトキシンβサブユニット (CT-B) およびクラスリン仲介型 EC により細胞に取り込まれる標識トランスフェリン (TF) をそれぞれタバココナジラミに吸汁させ、中腸細胞への取り込みを共焦点レーザー顕微鏡で観察したところ、CT-B の取り込みは 0.16 mM ナイスタチンにより、TF の取り込みは 1.6 mM クロルプロマジンにより、それぞれ特異的に阻害された。

2) エンドサイトーシス阻害剤による血リンパへの移行阻害

タバココナジラミ中腸円筒細胞への TYLCV 侵入にカベオラ・脂質ラフト仲介型 EC あるいはク

ラスリン仲介型 EC が関与するか推定するために、各 EC 阻害剤である 0.16 mM ナイスタチンあるいは 1.6 mM クロルプロマジンを、粗精製した TYLCV 粒子とともにタバココナジラミに吸汁させた。中腸内腔から円筒細胞を通り血リンパへ移行した TYLCV は、そのゲノム DNA を nested PCR により脚から検出した (図 7)。その結果、吸汁 3 時間後では、阻害剤未処理区 (DMSO、純水) およびクロルプロマジン処理区で TYLCV が脚から検出されたものの、ナイスタチン処理区では検出されなかった。一方、吸汁 24 時間後では全ての処理区において脚から TYLCV が検出された。

この結果から、0.16 mM ナイスタチンにより TYLCV の中腸から血体腔への TYLCV 移行が一定期間阻害されることが示唆され、TYLCV が脂質ラフト仲介型 EC を用いて中腸円筒細胞へ侵入していることが示唆された。

3) 内部移行マーカーと TYLCV の共局在

カベオラ・脂質ラフト仲介型 EC 内部移行マーカーである CT-B を TYLCV とともに獲得吸汁させたタバココナジラミの中腸を、抗 TYLCV 抗体と抗コレラトキシン抗体、各抗体に対する金コロイドを用いて免疫電子顕微鏡観察した (図 8)。その結果、TYLCV の含まれる小胞様構造に CT-B の免疫反応が認められ、TYLCV と CT-B が共局在することが示唆された。

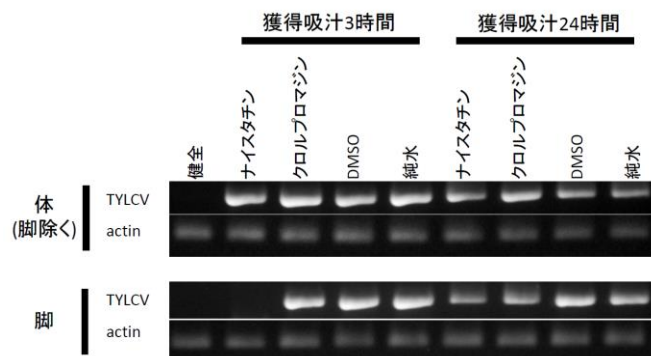
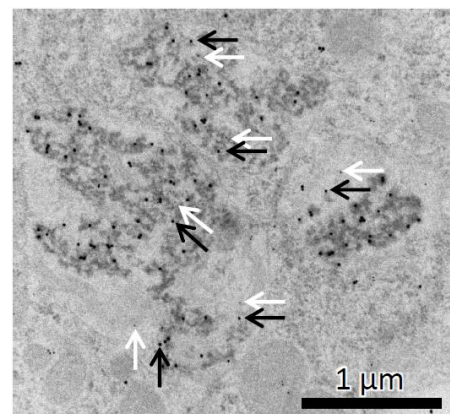


図7. エンドサイトーシス阻害剤およびTYLCVを獲得吸汁させたタバココナジラミからのTYLCV検出



矢印 (黒) は20 nm 金粒子 (抗TYLCV一次抗体)を示す
矢印 (白) は12 nm 金粒子 (抗CT-B一次抗体)を示す

図8. TYLCVとCT-Bの共局在観察

【結論】

非媒介昆虫のオンシツコナジラミとの比較から、TYLCV の媒介昆虫特異性には中腸から血体腔にかけての通過の可否が関与すると考えられた。TEM 観察により、TYLCV はタバココナジラミの下行中腸、上行中腸の円筒細胞あるいは盲のうの上皮細胞から侵入し、小胞様構造に局在することが示唆された。TYLCV を含む小胞様構造数の割合は、下行中腸前部および盲のう前部で多く、これらの部位が主要な TYLCV 侵入部位であることが示唆された。一方、オンシツコナジラミの中腸円筒細胞では小胞様構造は観察されるものの TYLCV の免疫反応は観察されず、TYLCV の媒介昆虫特異性は中腸細胞への侵入の可否に起因することが示唆された。さらに、タバココナジラミの盲のうは、内腔側に微絨毛を持つ中腸と類似の組織であり、酸性 pH を有することから何らかの消化機能を持つ可能性が示唆された。メス成虫の盲のうは胸部に位置し唾液腺との近さから TYLCV の媒介効率に影響する組織である可能性があった。最後に、タバココナジラミの中腸円筒細胞で TYLCV と CT-B が同じ小胞様構造に共局在し、中腸内腔から血リンパへの TYLCV 移行がナイスタチンにより阻害されたことから、TYLCV の中腸円筒細胞への侵入にカベオラ・脂質ラフト仲介型 EC が関与していることが示唆された。

【発表論文】

Uchibori, M., Hirata, A., Suzuki, M., and Ugaki, M. Tomato yellow leaf curl virus accumulated in vesicle-like structures in descending and ascending midgut epithelial cells of a vector whitefly, *Bemisia tabaci*, but not in those of a non-vector whitefly, *Trialeurodes vaporariorum*. *Journal of General Plant Pathology*. 79 (2): 115-122.

Uchibori, M., Hirata, A., Suzuki, M., and Ugaki, M. Gastric caecum epithelial cells of *Bemisia tabaci* are TYLCV entry site and are involved in digestion. *Archives of Virology*. in preparation