

## 新潟市のミツバから分離されたpotyvirusについて

佐野 義孝

Yoshitaka SANO:

A potyvirus isolated from Japanese hornwort in Niigata City

Key words: ミツバモザイクウイルス, コンニャクモザイクウイルス, ポティウイルス, Japanese hornwort mosaic virus, *Konjac mosaic virus*, potyvirus

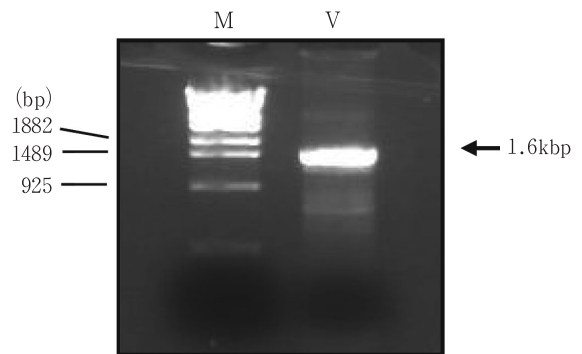
2006年8月、新潟市東区の農家の圃場周囲に自生するミツバに縮葉や葉脈緑帯を伴ったモザイク症状を呈する株が見られた(第1図)。そこで、この罹病株から病原ウイルスを分離し、同定を試みるとともに、塩基配列の解析を行った。

日本でミツバに発生するウイルスとしては、これまでに *Cucumovirus* 属に属するキュウリモザイクウイルス (*Cucumber mosaic virus*, CMV)<sup>5)</sup> と、 *Potyvirus* 属に属するミツバモザイクウイルス (Japanese hornwort mosaic virus, JHMV) が報告されている<sup>2,8)</sup>。採取した本罹病株がこの2種類のウイルスのいずれかを明らかにするため、まずCMV (R83, ダイコン分離株)<sup>9)</sup> に対する抗体を用いたDIBA法 (dot immunobinding assay) による検定を行った結果、陰性であった。そこで、JHMVとの異

同を明らかにするため、本罹病株より分離したウイルス株 (JH06N) を感染させたミツバ葉より ISOGEN (ニッポンジーン) を用いて全RNAを抽出した。得られた全RNA標品を鋳型として、potyvirusゲノム3'端領域の保存配列に特異的なユニバーサルプライマー (5'-ACCACAGGATCCGGBAAYAAYAGYGGDCARCC-3', 5'-CACGGATCCCCGGG (T)<sub>17</sub>V-3')<sup>4)</sup> を用い、RT-PCRによる増幅の有無を調べた。すなわち、TaKaRa One Step RNA-PCR Kit (タカラバイオ) を用いて、50℃で30分間の逆転写反応の後、熱変性94℃で30秒間、アニーリング58℃30秒間、伸長反応72℃3分間を35サイクル、最後に74℃10分間の伸長反応を行ったところ、約1.6kbpのDNA断片の増幅が確認された(第2図)。得られたDNAは、プラスミドベクターpGEM-T Easy (プロ



第1図 新潟市内で観察されたモザイク罹病ミツバ株



第2図 新潟市のミツバから分離したウイルスのRT-PCR産物の電気泳動図

注) M: DNAマーカー ( $\lambda$ -DNA/Sty I 消化物)  
V: ウイルスを接種したミツバ葉組織由来の増幅産物

メガ)と大腸菌JM109株(タカラバイオ)を用いてクローニングし, ABI PRISM 3100 DNA シークエンサー(アプライドバイオシステムズ)により塩基配列を決定し, GENETYX ver.8 プログラム(ゼネティクス)を用いて解析した。増幅されたDNA断片は, ポリア配列を除いたサイズが1606ヌクレオチドで, RNAポリメラーゼ(NIb)遺伝子の一部と外被タンパク質(CP)遺伝子の全領域を含む連続した翻訳領域1479ヌクレオチドと127ヌクレオチドの3'非翻訳(3'-NC)領域からなっており, 推定されるタンパク質のN末端領域にはRNAポリメラーゼ遺伝子に見られる保存配列(S/TGXXXTXXXNS/TX<sub>18-37</sub> GDD, 下線部はプライマー領域)が存在した<sup>4)</sup>。

DDBJデータベースに登録されているpotyvirusと配列の比較を行った結果, JHMV, コンニャクモザイクウイルス(*Konjak mosaic virus*, KoMV)<sup>7)</sup>および*Zantedeschia mosaic virus* (ZaMV)<sup>6)</sup>の3種と高い相同性が認められ, 九州で分離されたJHMV<sup>8)</sup>および青森県のセリから分離されたJHMV2分離株(FK1, FK2)<sup>3,10)</sup>とのCP領域のアミノ酸配列比較において90.1%~97.6%が保存されていた(第1表)。また, KoMV((F分離株)<sup>7)</sup>とは85.7%, ZaMVの韓国株(KR)およびブラジル株(BR)とは各々87.4および89.5%のアミノ酸同一性が見られた。また, 3'-NC領域の比較においても, JH06Nはこれらのウイルスと87.5%以上の極めて高い塩基配列相同性を示した。一方, その他の代表的な数種potyvirus, インゲンマメ黄斑モザイクウイルス(BYMV), セルリーモザイクウイルス(CeMV), ユリ微斑ウイルス(LMoV), ズッキーニ黄斑モザイクウイルス(ZYMV)およびジャガイモYウイルス(PVY)と

の配列相同性はCPおよび3'-NC領域の何れにおいても65%未満であった。

汁液接種による戻し接種の結果, JH06Nはミツバ(*Cryptotaenia japonica*)へ全身感染し, モザイク症状が再現された。また, セリ科のパセリー(*Petroselinum crispum*)とナス科の*Nicotiana benthamiana*では無病徴で全身感染することがRT-PCRで確認された。これらセリ科および*N. benthamiana*における感染性は, 藤田らが報告したpotyvirusやJHMVの九州分離株および青森分離株(FK1, FK2)とよく一致した<sup>2,3,8,10)</sup>。

以上, 新潟市のミツバから得られたJH06N分離株は配列の相同性が高く, 感染性もよく一致しており, 九州および青森県で分離されたJHMVと極めて近縁でこれらと同一のpotyvirusと考えられる。

*Potyvirus*属は植物ウイルスの中で最大のGenusであり, 110種以上が含まれる。*Potyvirus*属の分類基準では, 2種のウイルス株が同一種かどうかを識別する分子基準として, 外被タンパク質のアミノ酸配列相同性が80%以上であること, および全ゲノムの塩基配列相同性が85%以上であること, の2点が用いられている<sup>1)</sup>。第8版国際ウイルス分類委員会ではZaMVについては決定を保留したものの, ZaMVとKoMVは別種として扱われており, JHMVをZaMVの系統としている<sup>1)</sup>。2006年にKoMVの全塩基配列が決定され, 前述の分子基準に従うとKoMV, ZaMV, JHMVの3種のウイルスは全て同一のウイルス種であり, このうち初記載が最も早いKoMVを種名とするべきであると指摘された<sup>7)</sup>。これに従い, 本試験で得られたJH06Nの配列データもKoMVの系統としてDDBJに登録した(アクセッション番号: AB302326)。*Potyvirus*属において, 宿主範囲は系統分類に用いられる

第1表 新潟市のミツバから分離したウイルスJH06N株と他のpotyvirusとの配列相同性(%)

分離株	CP aa	CP nuc	3'-NC	アクセッション番号
JHMV	90.1	86.3	89.8	AB081518
JHMV-FK1	98.0	91.8	98.4	AB181353
JHMV-FK2	97.6	90.3	100.0	AB181354
KoMV-F	85.7	86.1	87.5	AB219545
ZaMV-KR	87.4	87.1	93.7	AB081519
ZaMV-BG	89.5	86.2	93.7	AY026463
BYMV-GDD	55.3	60.8	56.7	AY192568
CeMV-Hol	62.9	61.3	46.4	AF203531
LMoV-Hangzhou	64.3	60.0	50.0	AJ310203
ZYMV-2002	55.8	60.1	59.5	AB188116
PVY-N	58.1	61.0	54.0	X97895

注) 数値は各々外被タンパク(CP)領域における推定アミノ酸配列(aa)と塩基配列(nuc)および3'-非翻訳(NC)領域の塩基配列比較における同一性を示す。

ことから、今後は同一種と考えられるJHMV, KoMV, ZaMVの系統分類を行うにあたり、JH06Nを含めてJHMVのZantedeschia (カラー) やコンニャク等のサトイモ科植物に対する感染性の調査が必要と考えられる。

### 引用文献

- 1) Berger, P. H., Adams, M. J., Barnett, O. W., Brunt, A. A., Hammond, J., Hill, J. H., Jordan, R. L., Kashiwazaki, S., Rybicki, E., Spence, N., Stenger, D. C., Ohki, S. T., Uyeda, I., van Zaayen, A., Valkonen, J. and Vetten, H. J. (2005) *Potyviridae*. Virus Taxonomy : 819~841, Elsevier Academic Press.
- 2) 藤田 隆・雑賀朋恵・山形 翼・原田幸雄 (1999) ミツバ (*Cryptotaenia japonica*) のモザイク株から見出されたPotyviridaeに属するウイルス. 日植病報 65 : 661.
- 3) 福井要子・山下一夫 (2004) セリから分離されたミツバモザイクウイルス (JHMV) の病原性. 日植病報 70 : 263.
- 4) Gibbs, A. and Mackenzie, A. (1997) A primer pair for amplifying part of the genome of all potyvirids by RT-PCR. J. Virol. Methods 63 : 9~16.
- 5) 小室康雄・明日山秀文 (1955) キュウリ・モザイク病ウイルスに関する研究. II 東京附近における各種植物のモザイク症状株からの分離. 日植病報 20 : 77~82.
- 6) Kwon, S. B., Ha, J. H., Yoon, J. Y. and Ryu, K. H. (2002) Zantedeschia mosaic virus causing leaf mosaic symptom in calla lily is a new potyvirus. Arch. Virol. 147 : 2281~2289.
- 7) Nishiguchi, M., Yamasaki, S., Lu, X.-Z., Shimoyama, A., Hanada, K., Sonoda, S., Shimono, M., Sakai, J., Mikoshiba, Y. and Fujisawa, I. (2006) Konjak mosaic virus: the complete nucleotide sequence of the genomic RNA and its comparison with other potyviruses. Arch. Virol. 151 : 1643~1650.
- 8) Okuno, K., Hama, T., Takeshita, T., Furuya, N. and Takanami, Y. (2003) New potyvirus isolated from *Crytonia japonica*. J. Gen. Plant Pathol. 69 : 138~142.
- 9) 佐野義孝・関川正規・小島 誠 (1986) 新潟砂丘地における有翅アブラムシの発消長とダイコンのモザイク病について. III ダイコンから分離されたキュウリモザイクウイルスについて. 北陸病虫研報 34 : 45~48.
- 10) 山下一夫・福井要子 (2004) セリから分離されたミツバモザイクウイルスについて. 日植病報 70 : 51.

(2007年10月16日受領)