

ウメから検出されたCycas necrotic stunt virusについて

MARUYAMA, Chihiro / 丸山, 千尋

(出版者 / Publisher)

法政大学大学院理工学・工学研究科

(雑誌名 / Journal or Publication Title)

法政大学大学院紀要. 理工学・工学研究科編

(巻 / Volume)

56

(開始ページ / Start Page)

1

(終了ページ / End Page)

3

(発行年 / Year)

2015-03-24

(URL)

<https://doi.org/10.15002/00011447>

ウメから検出された *Cycas necrotic stunt virus*について

DETECTION OF CYCAS NECROTIC STUNT VIRUS IN PRUNUS MUME

丸山 千尋

Chihiro MARUYAMA

指導教員 西尾健

法政大学大学院理工学研究科生命機能学専攻植物医科学領域修士課程

An undescribed spherical virus ca. 25nm in diameter that showed systemic necrotic symptoms to *Chenopodium quinoa* was isolated from *Prunus mume*. The virus had a relatively wide host range and had a relatively stable in crude sap. Purified virus preparations contained two RNA components and the protein similar to coat protein of *Cycas necrotic stunt virus* (CNSV). Its nucleotide sequence of the coat protein gene had 89% common identity with that of CNSV isolated from *Cycas revoluta*.

Also, 'nishiki-sei' that a feature of several variety of *Prunus mume* show yellow blotches on branch, it is likely that the 'nishiki-sei' is caused by the CNSV infection.

Key Words: *cycas necrotic stunt virus*, *nepvirus*, *prunus mume*

1. 目的

ウメに感染するウイルスの調査を目的として、2012年に市販ウメ苗木42品種からウイルスの分離を試みたところ、品種「日光梅」から *Chenopodium quinoa* に全身えそ症状を呈するウイルスが分離された。このウイルスの同定を目的として、諸性質の調査を行ってきた。2013年度からは、塩基配列の解析や、ベクターの探索などを中心に調査を行った。

また、「日光梅」に見られた枝がまだらに黄化する現象は、「錦性」と呼ばれる品種特異的な特徴であり、いくつかのウメ品種にも見られることが分かった。その様相から、ウイルスにより引き起こされていることが疑われたため、「錦性」と本ウイルスとの関係を明らかにするため調査を行った。

2. 材料及び方法

本ウイルスが分離されたのは、2011年に購入した「日光梅」の苗木である。また、錦性品種等の本ウイルスの感染状況調査には、2011年と2014年に購入した41品種と、東京都、大阪府、神奈川県、三重県において採取した錦性を示す品種「罎出錦」「錦性罎出の鷹」「罎出の鷹」「東錦」等を含めた10品種を供試した。

ウイルス学的諸性質は、汁液接種による宿主範囲調査、物理学的性質試験、ウイルスの粒子精製、電子顕微鏡観察、抽出RNAと外被タンパク質の解析、塩基配列の解析、

系統解析等を行い、種を同定した。また、線虫伝染試験には、キイチゴオオハリセンチュウ *Xiphinema bakeri* を使用し、供試した線虫は接種前にふるい分けベルマン法による分離・形態同定を行った。

また各試験における本ウイルスの感染確認には、本ウイルス特異的プライマーを用いたつまようじ multiplex RT-PCR (tm RT-PCR) を用いた。



図1. 「日光梅」に見られるまだらに黄化した錦性の枝 (A) 葉脈黄化症状 (B)

3. 結果

(1) ウイルスの同定と特徴

a) 宿主範囲と病徴

12 科 24 属 32 種の草本植物に汁液接種を行い、アカザ科、ナス科などを中心に 5 科 8 属 13 種に感染が確認された。*C. quinoa* には退緑斑点、えそ、奇形、*Nicotiana tabacum* ‘White burley’ には葉脈透過、つるなには輪紋症状が見られた。

b) 物理学的性質試験

本ウイルスの耐希釈性は 10^{-3} ~ 10^{-4} 、耐熱性（10 分間）は 65~70℃、耐保存性（20℃）は 78~89 日であり、核果類に感染する他のウイルスと比べて比較的強いことが分かった。

c) ウイルスの部分純化・電子顕微鏡（TEM）観察

本ウイルス感染 *C. quinoa* からウイルスの部分純化を行った。10-40%ショ糖密度勾配遠心では、2 本のバンドが確認され（図 2A）、部分純化試料から直径約 25nm の球状粒子が観察された（図 2B）。

d) 核酸の解析

部分純化試料から抽出した RNA を電気泳動したところ、約 6000nt と約 4800nt の二本のバンドが確認された。このことから、本ウイルスは二分節の RNA を持つウイルスであると考えられた。

e) 外被タンパク質の解析

部分純化試料の SDS-PAGE と CBB 染色を行ったところ、約 65kDa と約 58kDa の二つのタンパク質が確認された。両方のタンパク質を MALDI-TOFMS 解析したところ、いずれも *Nepovirus* 属 Subgroup B の *Cycas necrotic stunt virus* (CNSV) の外被タンパク質に類似していることが分かった。*Nepovirus* 属ウイルスの外被タンパク質は本来 1 種類であることが分かっているが、花田ら（1986）の報告から、58kDa のタンパク質は 65kDa のタンパク質が分解されたものである可能性が高いと考えられた。

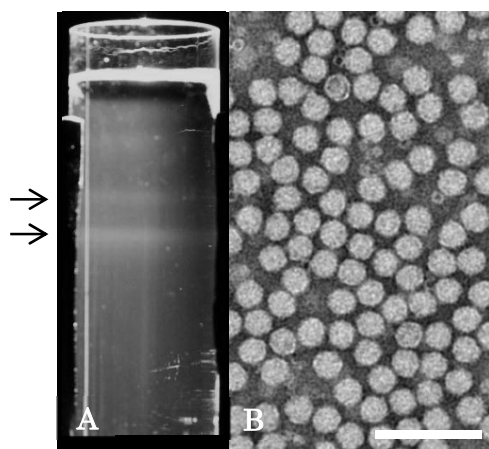


図 2. 10-40%ショ糖密度勾配遠心で確認された 2 本のバンド (A)

部分純化試料中に認められた球状粒子 (B)

※Bar は 100nm

f) サブグループの特定

Nepovirus 属 Subgroup 特異的プライマー (Ting Wei *et al.*, 2008) を用いて RT-PCR を行ったところ、Subgroup B のプライマーを用いた本ウイルス感染 *C. quinoa* のサンプルで、目的の位置に約 220bp の増幅産物が認められた。このことから、本ウイルスは *Nepovirus* 属 Subgroup B のウイルスであることが確認された。

g) 塩基配列の解析

CNSV ソテツ分離株の全塩基配列 (Han *et al.*, 2002) からプライマーを作製し、プライマーウォーキングにより塩基配列を決定した。CNSV ソテツ分離株のアミノ酸配列と CP 領域で 95%、Pro-Pol 領域で 94% の相同性を示した。また、CNSV のグラジオラス分離株 (Hanada *et al.*, 2006)、ユリ分離株 (Wylie *et al.*, 2012)、ジンチョウゲ分離株 (Otake, 2011) とも高い相同性を示した。

h) 系統解析

Coat protein 領域のアミノ酸配列に基づき、系統樹を作製したところ、CNSV の各分離株と同一のクラスターを形成することが確認された。（図 3）

(2) CNSV 各分離株間の Co-Pro 領域の相同性

CNSV 各分離株間の Co-Pro 領域の相同性が他の領域と比べて低いことから、CNSV 各分離株間でアミノ酸配列の比較を行った。本ウイルスの Co-Pro 領域の C 末端側のアミノ酸配列は、CNSV ソテツ分離株と 93% 以上の相同性を示した。それに対し N 末端側のアミノ酸配列は、ソテツ分離株に対してジンチョウゲ分離株では 76%、本ウイルスでは 32% の相同性であり、特に本ウイルスの N 末端側のアミノ酸配列が大きく異なることが分かった。

(3) 線虫伝染試験

CNSV のベクターは線虫と考えられているが、まだ実証されていない (Han *et al.*, 2002) という報告から、*Petunia × hybrida* への線虫伝染試験を行った。Nested RT-PCR を用いて、CNSV 感染 *C. quinoa* に放飼した線虫の CNSV 保持検定を行ったところ、陽性を示し、キイチゴオオハリセンチュウが CNSV を保持したことが確認された。しかし、現段階でキイチゴオオハリセンチュウによる *Petunia × hybrida* への CNSV 伝搬は確認されていない。

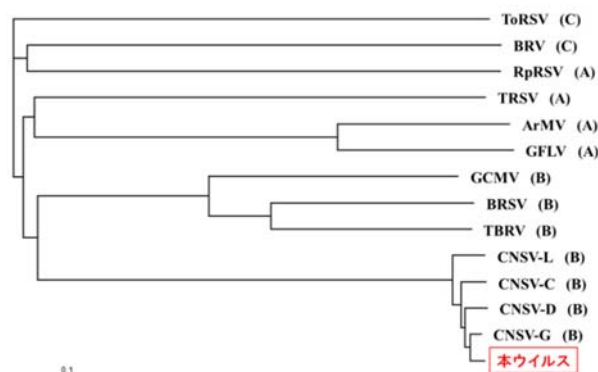


図 3. CP 領域のアミノ酸配列に基づく系統樹

(4) ウメの「錦性」と CNSV との関係

a) 錦性品種等の CNSV 感染状況調査

購入又は各地の公園等で採取した錦性を示す‘日光梅’の葉又は枝を、CNSV 特異的プライマーを用いた tm RT-PCR を用いて検定したところ、すべての株で CNSV が検出された (9/9 株)。このことから、CNSV が錦性に関係している可能性があると考えられた。

そこで、錦性を示す 4 品種を含むウメ 50 品種 53 検体の CNSV 感染状況調査を行ったところ、錦性を示す品種はすべての株で CNSV 陽性となり、錦性を示さない品種はすべての株で陰性となった。このことから、ウメの錦性は CNSV がウメに感染することにより引き起こされている可能性が高いと考えられた。

4. 考察

CNSV は、いままでソテツ、アオキ、グラジオラス、ユリ、ジンチョウゲ、ネギ等から分離された報告があり、木本から草本にまたがる比較的広い宿主範囲を持っている。また、いずれも日本産の植物から検出されていることから、日本に広く分布するウイルスである可能性が考えられる。今後、CNSV の伝染経路を明らかにするため、日本産のオオハリスンチュウやナガハリスンチュウを中心に、ベクター（線虫）の探索がさらに必要であると考えられる。

ウメは中国から弥生時代に渡来したとされ、また、錦性品種は江戸時代に著された『草木奇品家雅見』（金太, 1827）に記載されており、古くから全国各地に植栽されていたものと考えられる。錦性品種は、ウイルスの感染による影響のためか、樹勢が弱く栽培には注意が必要とされているが、その花色と錦のコントラストの美しさか

ら珍重され、現在まで接ぎ木などで増殖され錦性が維持されてきたと考えられる。本ウイルスは、接木接種や汁液接種によるウメ実生への戻し接種が成功していないことから、他のウメ品種への感染性はそれほど強くないウイルスであると考えられるが、品種維持の目的以外で感染株を他の品種へ接木しないこと、感染株の根元の土を移動させないこと等の対策が必要と考えられる。

謝辞

本研究を行うにあたりご指導いただいた法政大学応用植物医科学研究所の西尾健教授に深く感謝し、御礼申し上げます。また、キイチゴオオハリスンチュウを分譲していただいた横浜植物防疫所の久井潤也様、錦性についてご指導いただいた東京大学大学院理学系研究科附属植物園山口正様に深く感謝いたします。また、本研究を行うにあたり、ご指導、ご助言をいただいた川合昭様、遠藤三千雄様、永吉秀光様、太田智子様、前野絵里子様、鍵和田聡専任講師に深く御礼申し上げます。

引用文献

- 1) Han, S.S., Karasev, A.V., Ieki, H., Iwanami, T. (2002) Nucleotide sequence and taxonomy of *Cycas necrotic stunt virus*. Archives of Virology 147: 2207-2214
- 2) Hanada, K., Kusunoki, M., Iwaki, M. (1986) Properties of virus particles, nucleic acid and coat protein of *cycas necrotic stunt virus*. The Phytopathological Society of Japan 52: 422-427
- 3) Hanada, K., Fukumoto, F., Kusunoki, M., Kameya-Iwaki, M., Tanaka, Y., Iwanami, T. (2006) *Cycas necrotic stunt virus* isolated from gladiolus plants in Japan. Journal of General Plant Pathology. 72: 383-386
- 4) Wei, T., Clover, G. (2008) Use of primers with 5'non-complementary sequences in RT-PCR for the detection of nepovirus subgroups A and B. Journal of Virological Methods. 153: 16-21
- 5) Wylie, S.J., Luo, H., Li, H., Jones, M.G.K. (2012) Multiple polyadenylated RNA viruses detected in pooled cultivated and wild plant samples. Archives of Virology. 157: 271-284
- 6) 大嶽正樹 (2011) ジンチョウゲに感染する病原ウイルスの解析. 法政大学生命科学部生命機能学科植物医科学専修卒業論文
- 7) 金太撰輯 (1827) 草木奇品家雅見 3 巻

表 1. 錦性と CNSV 感染との関係

品種名	錦性	CNSV検出 (tm RT-PCR)
日光梅	有 (9/9株)	+
埴出錦	有 (3/3)	+
錦性埴出の鷹	有 (1/1)	+
埴出の鷹	有 (1/1)	+
東錦	有 (1/1)	+
その他46品種	無 (0/47)	-

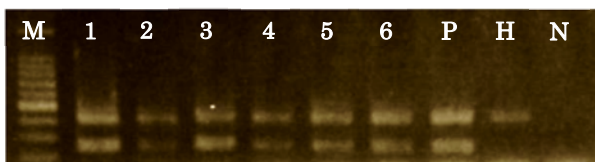


図 4. 錦性品種の tm RT-PCR 結果

(上バンド：18S rRNA 下バンド：CNSV)

1：埴出錦 枝 2：埴出錦 葉 3：錦性埴出の鷹 枝
4：錦性埴出の鷹 葉 5：東錦 枝 6：東錦 葉
M：100bp DNA Ladder P：positive control
H：healthy control N：negative control