

江戸東京野菜「東京ウド」に発生した新種植物ウイルスの特性解明とゲノム配列の決定

山村, ゆり奈 / YAMAMURA, Yurina

(出版者 / Publisher)

法政大学大学院理工学研究科

(雑誌名 / Journal or Publication Title)

法政大学大学院紀要. 理工学研究科編

(巻 / Volume)

64

(開始ページ / Start Page)

1

(終了ページ / End Page)

3

(発行年 / Year)

2023-03-24

(URL)

<https://doi.org/10.15002/00026456>

江戸東京野菜「東京ウド」に発生した 新種植物ウイルスの特性解明とゲノム配列の決定

CHARACTERIZATION AND GENOME SEQUENCE OF A NEW PLANT VIRUS PRESUMED TO BE CLASSIFIED IN THE GENUS PELARSPOVIRUS ISOLATED FROM ARALIA CORDATA, “TOKYO UDO”, AS ONE OF “EDO-TOKYO VEGETABLE”

山村ゆり奈

Yurina YAMAMURA

指導教員 津田新哉

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

A virus disease showing mosaic symptoms was observed on *Aralia cordata* in a production field in Tokyo. Mechanical inoculation with crude sap to test plants showed necrotic or chlorotic spots on *Chenopodium quinoa* inoculated leaves, followed by establishment of isolates in each. Both isolates were purified by sucrose density gradient centrifugation, and spherical particles of about 35 nm in diameter were observed under a transmission electron microscope. In addition, a specific protein of about 37 kDa and RNA of 4~5 kb were observed in both. RT-PCR with a commercially available PCR Primer for Carmovirus-Pelarspovirus (Agdia) amplified the DNA fragment, which was used as the basis for deciphering a portion of the genome by primer walking. The sequences of both isolates were generally identical, and BLAST searches showed about 60% homology with viruses of the genus *Pelarspovirus*, which is in agreement with the criteria for species identification of the genus (both of homologies for amino acid sequence of RNA dependent RNA polymerase and coat protein <75%, respectively), indicating that this virus is likely to be a new species.

Key Words : *Aralia cordata*, *Tokyo Udo*, host range, RT-PCR, genome sequence, *Pelarspovirus*

1. 緒言

都内生産圃場で栽培している栽培1年目のウドの一部の葉にモザイク症状が発生した。ウドに発生する病害に菌類病はあるが、ウイルス病の発生報告はない。現在この症状による減収などの目立った被害はないが、ウドは栄養繁殖により増殖されるため今後の影響も考え、ウイルス種を特定し防除する必要がある。

Tombusviridae 科は植物ウイルスを分類する科の一つで、構造、遺伝子、ポリメラーゼ(RdRp)の3つを基準として18属96種に分類されている。この属に属すウイルスはゲノムが二分割されている *Dianthovirus* を除く全ての種が、約3.7-4.8kbの(+)一本鎖RNAを持ち、直径28~35nmの球状粒子であることなどが知られている。また、双子葉類、単子葉類いずれかの植物に感染する広範囲な土壌伝染性ウイルスが属している。近年、*Pelarspovirus* 属という新しい属がこの科に加わり、タイプ種とされている *Pelargonium line pattern virus* を含む8つのウイルスがその属に分類された。本研究で解析した

2つの分離株はその属と近縁だとされた。

本研究では、ウドにモザイク症状を示す病原ウイルスを分離し、宿主範囲や物理学的性状、外部形態の観察および一部のゲノなどを調査する。それにより、本ウイルスの分類位置を明らかにすることを目的とした。

2. 材料および方法

モザイク症状を呈していたウド‘都香’(図1-A)を材料に *C. quinoa* で単病斑分離したところ、接種葉にのみえそ斑点株を示すえそ斑点株と接種葉および上位葉のいずれにも退緑斑点を示す退緑斑点株の2つの分離株が得られた(図1-B, C)。これらの系統を用いて機械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、外被タンパク質の解析、電子顕微鏡観察、塩基配列の解析、さらに最尤法を用いた系統樹解析等を行い、本ウイルス種の特性を明らかにした。

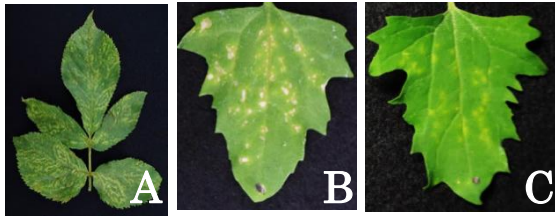


図1 ウドの原株に現れたモザイク症状(A)と得られた分離株の *C. quinoa* 接種葉上のえそ斑点症状(B)と退緑斑点症状(C)

3. 結果

a) 宿主範囲と病徴

本分離株を6科15種の草本植物に機械接種したところ、えそ斑点株では *C. quinoa* と *Chenopodium murale*, *Nicotiana tabacum* cv. Xanthi nc, *Nicotiana clelandii* の接種葉にえそ斑点, *Sesamum indicum* の接種葉にえそ斑点, *Chenopodium foetidum* の接種葉に退緑 *Chenopodium amaranticolor* の接種葉に退緑斑点が確認された。一方退緑斑点株では *C. quinoa* の接種葉及び上位葉に退緑斑点, *N. clelandii*, *C. amaranticolor*, *C. murale* の接種葉に退緑斑点, *S. indicum* の接種葉に退緑斑点, *N. tabacum* cv. Xanthi nc の接種葉に退緑, 上位葉にモザイクが確認された。

b) 物理学的性状

本ウイルスの物理学的性質として、耐熱性(10分間)は80°C、耐保存性(20°C)は80日であった。

c) SDS-PAGEによる外被タンパク質の解析

本ウイルス接種 *C. quinoa* 葉を材料にウイルスの粒子精製を行った。10-40%ショ糖密度勾配遠心でできた分画を対象に SDS-PAGE にてウイルスの構造タンパク質の分子量を解析したところ、約 37kDa 付近に単一バンドが確認された(図2-A,B)。

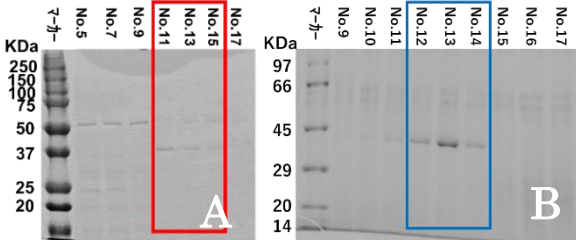


図2 えそ斑点株の SDS-PAGE で確認された特異バンド (A) と退緑斑点株で確認されたバンド(B)

d) 透過型電子顕微鏡によるウイルス粒子の観察

その分画を電子顕微鏡観察したところ、直径約 35nm の球状粒子が観察された(図2-A,B)。

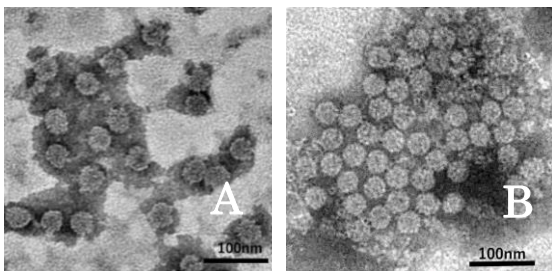


図3 図2(A)の溶液中に認められた球状粒子 (A) ※Bar=100nm
図2(B)の溶液中に認められた球状粒子 (B) ※Bar=100nm

e) ゲノム核酸の塩基配列の解析

粒子精製した両分離株の溶液から RNA を抽出し、PCR Primer for Carmovirus-Pelarspovirus(Agdia 社)で RT-PCR したところ、それぞれ RdRp の領域の想定される DNA 断片が増幅された。BLAST 検索により相同性の高いウイルス3種 (*Tombusviridae* 科 *Pelarspovirus* 属の *Pelargonium ringspot virus* : PeIRSV, *Elderberry latent virus* : ELV および同科 *Betacarmovirus* 属の *Hibiscus chlorotic ringspot virus*) とのユニバーサルプライマーを設計し、プライマーウォーキングにより本分離株の塩基配列を決定した。解析した両株由来断片の塩基配列は概ね一致し、BLAST 検索の結果、*Pelarspovirus* 属のウイルスの可能性が大きく示唆された。本研究で解読した領域を *Pelarspovirus* 属のタイプ種である *Pelargonium line pattern virus* の構造に当てはめると図4のようになる。また、解読した領域を ORF ごとに BLAST 検索すると、ORF1bis(RdRp)は PeIRSV と塩基配列で 67%、ELV と 59%の相同性、ORF2(MP1)は ELV と塩基配列で 61%、アミノ酸配列で 69%の相同性、ORF3(MP2)は PeIRSV と塩基配列で 66%、ELV とアミノ酸配列で 66%の相同性を示した。

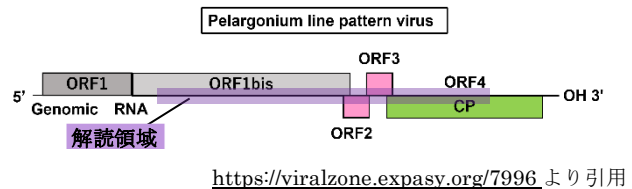


図4 *Pelarspovirus* 属のゲノム構造と本研究で解読した領域
ORF1 : リードスルータンパク質,
ORF1bis : RdRp, ORF2 : MP1, ORF3 : PM2, ORF4 : CP

f) 系統解析

RdRp の ORF 領域の塩基配列に基づき、最尤法を用いて系統樹を作成したところ、本ウイルスは *Pelarspovirus* 属と同じクラスターを形成した(図5)。

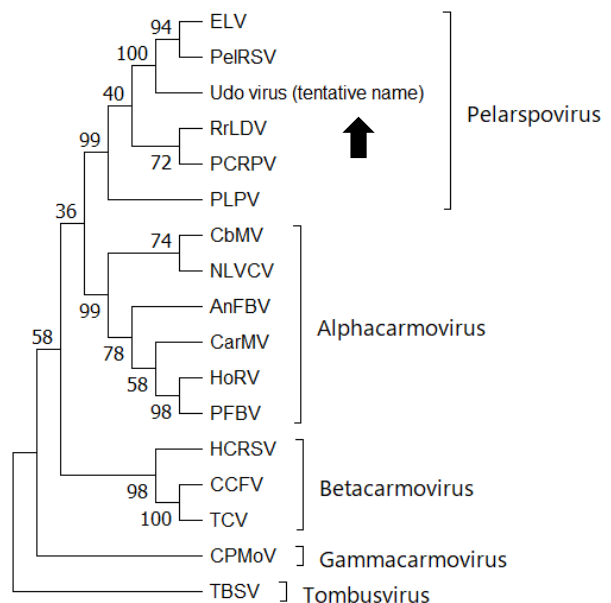


図5 RdRp の塩基配列に基づく系統樹
※*Tombusviridae* 科に属するウイルス配列(16種)を用いた

4. 考察

えそ斑点株と退緑斑点株の宿主範囲について、*C.quinoa* ではそれぞれ局所えそ斑点、全身退緑斑点、*N.clevelandii* では局所えそ斑点、局所退緑斑点という結果になった。ゲノム配列の相同性が高かった PeIRSV と ELV は、本ウイルスと同様に *C.quinoa* で局所退緑斑点ではあったが *N.clevelandii* では全身無病徴感染である(1)。この違いは、科の異なる *Cucumber mosaic virus* では、CP が宿主植物における局所的な病徴発現および全身移行の決定因子であることから、本ウイルスの *C.quinoa* における局所えそ斑点の要因も CP にあるのかも知れない(2)。

また、ウイルス粒子形態については *Tombusviridae* 科の特徴と一致し、耐熱性等の物理的特性も、同科 *Carmovirus* 属、*Tombusvirus* 属とほぼ同じ値を示した。

塩基配列およびアミノ酸配列の BLAST 検索では PeIRSV、ELV と約 60% 以上の相同性を示した。*Pelarspovirus* 属の種の境界基準は RdRp 間のアミノ酸配列相同性<75%、CP 間のアミノ酸配列相同性<75%であり(1)、ORF1bis を対象とした系統樹解析の結果から、本ウイルスが新種となる可能性が示唆された。

参考文献

- 1) Kay, S. et al. *Pelarspovirus*, a proposed new genus in the family *Tombusviridae*. (2015) *Arch Virol.* 160:2385-2393.
- 2) Takashi, K. Amino Acid 129 of Cucumber mosaic virus Coat Protein Determines Local Symptom Expression and Systemic Movement in *Tetragonia expansa*, *Momordica charantia*- and *Physalis floridana* (2002) *Journal of General Plant Pathology.* 68:81-88