

ブドウえそ果ウイルスのゲノム構造と分類学的所属

岩手大学農学部農業生命科学科生物機能科学講座 吉 川 信 幸

はじめに

ブドウえそ果病は、春先に新梢の節間がつまって萎縮し、新葉には奇形を伴うモザイクや線状斑を生じる病気である。本病に罹病したブドウでは、幼果に果肉内部まで達する濃緑色の小斑点が生じ、熟期になっても成熟せず、果肉は硬く小果で着色不良となり、商品価値は全くなってしまふ (寺井, 1994)。本病は、茨城県下の巨峰で初めて発見され、接木伝染性が証明されたが、その後、同様の症状は山梨県や青森県、秋田県、栃木県のブドウでも報告された (田中, 1984, 1985; 西島, 1984)。当初は葉に現れるモザイク症状から「ブドウモザイク病」と仮称されていたが、ブドウには既にペインモザイク病など類似の病名があること、また分離されたウイルスのブドウへの戻し接種により病徴が再現されたことから (柳瀬・寺井, 1987)、1992年に病名はブドウえそ果病、また病原ウイルスはブドウえそ果ウイルス (*Grapevine berry inner necrosis virus*, GINV) と命名された (寺井・柳瀬, 1992)。現在まで本病の海外での報告はなく、我が国固有の病気といえる。

柳瀬 (1985) は GINV をブドウから草本植物 *Chenopodium quinoa* に分離し、ウイルスの性状を明らかにした。GINV 粒子は長さ約 750 nm、幅 12 nm のひも状で、1 本鎖 RNA (分子量 2.5×10^6) と一種類の外被タンパク質 (分子量 22 K) からなり、当時はクロステロウイルスとみなされていた (柳瀬・柏崎, 1989; TERAJ et al., 1993)。筆者らは、山梨県の「巨峰」から分離した GINV を供試して、本ウイルスゲノムの全塩基配列を解析し、GINV がトリコウイルス属の新たな種であることを報告した (YOSHIKAWA et al., 1997; 板橋ら, 2000)。本稿では GINV の生物学的性状、ゲノムの構造とコードされるタンパク質の機能および分類学的所属について紹介する。

I GINV の生物学的性状

GINV の自然感染植物はこれまでブドウで報告され

ているのみである。ブドウの品種によって GINV 感染による病徴の程度は大きく異なる。西島ら (2000) の調査によると、「巨峰」、「ピオーネ」、「高尾」などの巨峰群品種や「キャンベル・アーリー」では、葉のモザイクや果実のえそ果などの明瞭な病徴が現れるが (図-1)、「紅富士」、「ネオ・マスカット」、「レッドクイーン」、「紅瑞宝」、「甲斐路」などでは極めて軽微な病徴しか現れない。一方、「デラウェア」や「甲州」、「マスカット・ベリー A」、「レッドポート」、「シナノベリー」、「セミヨン」、「メルロー」などは全く病徴が現れずに潜在感染する。筆者らが、GINV の草本植物における宿主域を調べたところ、明瞭な病徴を示す植物は *C. quinoa* と *Nicotiana occidentalis* の 2 種のみで、*C. quinoa* では接種葉にえそ斑点 (季節によっては現れない場合もある)、上葉に退緑斑点やモザイクが現れる。*N. occidentalis* では、接種葉は無病徴であるが、上葉に葉脈退緑やモザイクが生じる。その他の宿主としては、*C. murale* が無病徴で全身感染し、ハウレンソウとセンニチコウ、アマランサスでは病徴は現れないが、接種葉でのみウイルスの増殖が確認された。また *C. amaranticolor*、フダンソウ、ダイコン、トウモロコシ、キュウリ、セイヨウカボチャ、*Datura stramonium*、トマト (「世界一」)、*N. clelandii*、*N. debney*、*N. glutinosa*、*N. tabacum* (「サムスン」、「キサンチ」)、*N. rustica*、ピーマン、インゲンマメ (「トップクロープ」)、ササゲ (「黒種三尺」) では本ウイルスの感染は認められなかった (YOSHIKAWA et al., 1997)。

ブドウえそ果病は、接木伝染以外に自然伝搬することが認められていた。寺井 (1989) の報告によると、「巨

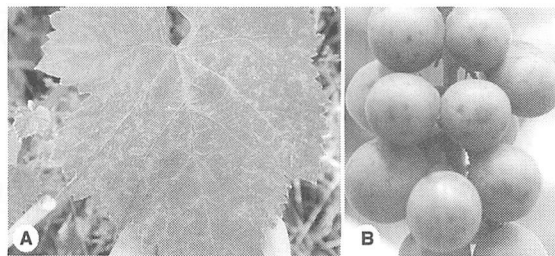


図-1 ブドウえそ果病の病徴

A: 葉のモザイク症状 (品種:「巨峰」), B: 果実のえそ斑点 (品種:「ピオーネ」) (山梨県果樹試験場の寺井氏の好意による)。

Genome Structure and Taxonomy of Grapevine Berry Inner Necrosis Virus. By Nobuyuki YOSHIKAWA

(キーワード: ブドウえそ果ウイルス, ゲノム構造, トリコウイルス, ダニ伝搬)

峰'や'ピオーネ'の罹病樹の抜根跡地にウイルスおよびウィロイドフリーの'巨峰'および'ピオーネ'の樹を定植したところ、翌年から発病が見られ、3年目にはすべての樹で病徴が確認された。その後、媒介昆虫の探索が行われた結果、ブドウハモグリダニ [*Colomerus vitis* (Pagenstecher)] によって伝搬されることが明らかにされた(切刀ら, 1997, 2000; 宮下ら, 1999)。山梨県での調査によると、ブドウハモグリダニの発生程度は地域間で大きく異なり、本ダニの多生息地域とえそ果病の多発地域がよく一致している(切刀ら, 2000)。ブドウに感染するウイルスは、世界的には数十種類報告されているが、ダニで媒介されるウイルスはGINVが初めてである。

感染植物の電子顕微鏡観察では、GINV粒子は葉肉細胞および師部やその周辺細胞の細胞質において小集塊で観察された(YOSHIKAWA et al., 1997)。ウイルス感染による師部細胞のえ死やクロステロウイルスに特徴的な小胞の形成、またポチウイルスなどの感染細胞で認められる封入体は観察されない(YOSHIKAWA et al., 1997)。

II GINV ゲノムの構造と機能

柳瀬(1985)は感染 *C. quinoa* 葉からベントナイトによる清澄化によりGINV粒子の精製に成功している。筆者らが分離したGINVを柳瀬の方法に準じて感染 *C. quinoa* 葉から精製しようと試みたが、インタクトな粒子を十分量精製することは困難であった。これは清澄化や超遠心分離による濃縮後に、ウイルス粒子の凝集と断片化が起こることが原因と考えられた。ウイルスゲノムのクローニングでは通常、精製ウイルスから抽出した核

酸を鋳型にcDNA合成を行うが、GINVの精製が困難であったため、筆者らはcDNAサブトラクションキット(クローンテック社)を用いてゲノムcDNAの合成を行った。まずGINV感染 *C. quinoa* 葉から抽出したpoly(A)⁺RNAを鋳型としてcDNAを合成し、これから健全葉cDNAを差し引いて感染特異的cDNAを得る方法である。この方法によりGINV特異的なcDNA断片がクローニングされ、その配列を基に作製したプライマーを用いて、3'レース法と5'レース法によりゲノム全体のcDNAを合成し、全塩基配列を解析した。

GINV-RNAは3'末端のポリA配列を除いて7243塩基からなっていた。オープンリーディングフレーム(ORF)の探索では、互いに一部オーバーラップする三つのORF(1, 2, 3)が存在していた(図-2)。5'末端非翻訳領域(104塩基)に続くORF1は、塩基番号105番目のAUGから5,708番目のTGAまでにわたり、1868アミノ酸からなる分子量214Kのタンパク質をコードしている。そのアミノ酸配列にはN末端側からメチルトランスフェラーゼ(MET)、パパイン様プロテアーゼ(P-PRO)、ヘリカーゼ(HEL)およびRNAポリメラーゼ(POL)の保存モチーフが認められ(図-2)、ウイルスゲノムの複製に関与するタンパク質であると考えられた。ORF2がコードする39Kタンパク質(39KP)は、植物細胞のプラズモデスマータに局在すること、それ自身が細胞間移行能を保持すること、またプロトプラストで発現させると細胞表面にチューブル構造の形成を誘導するなど、植物ウイルスの細胞間移行タンパク質(MP)の性質を有している(寺田ら, 1998)。ORF3は22Kの外被タンパク質(CP)をコードして

GINV(I)-RNA(7243nt)



ACLSV(P-205)-RNA(7552nt)



CMLV(Sal162-21)-RNA(8003nt)



GVA(Is 151)-RNA(7349nt)



図-2 GINVとトリコウイルス(ACLSVとCMLV)、ビティウイルス(GVA)のゲノム編成

いる (YOSHIKAWA et al., 1997; 板橋ら, 2000)。GINV はダニ伝搬性ウイルスであることから, 当初筆者らはダニ伝搬に必要なタンパク質のコード領域が存在するのではないかと考えていたが, それらしい ORF は存在しなかった。CP の表面構造がダニによる伝搬に重要なかもしれない。各タンパク質のアミノ酸配列を, 粒子形態の類似したトリコウイルス属やピティウイルス属, カピロウイルス属のウイルスと比較したところ, トリコウイルス属のタイプ種であるリンゴクロロティックリーフスポットウイルス (ACLSV) と最も高い相同性が認められ, 214 K タンパク質の各保存モチーフ; MET (アミノ酸番号 1~150), HEL (1052~1200), POL (1621~1773) と ACLSV の 216 K タンパク質の各領域とはそれぞれ 40.5%, 49.2%, 60.7%の相同性が認められた。また両ウイルスの MP 間では 35.7%, CP 間では 35.8%の相同性であった (YOSHIKAWA et al., 1997; 板橋ら, 2000)。

III GINV の分類学的所属

GINV が ACLSV と近縁なウイルスで, トリコウイルス属に分類された経緯については以前に本誌で報告した (吉川, 1998)。表-1 には GINV と粒子形態あるいは自然感染植物がよく類似している ACLSV, cherry mottle leaf virus (CMLV), ブドウ A ウイルス (GVA) およびブドウ B ウイルス (GVB) の諸性状を,

また図-2 にはこれらウイルスのゲノム編成を示した。ACLSV と GINV は, 実験的な宿主域や検定植物での病徴も類似しており, 粒子長 (740~760 nm) や CP のサイズもほぼ同じである。先に述べたようにゲノム編成も一致し, また ORF 1 にコードされるタンパク質の POL 領域および CP のアミノ酸配列に基づいた系統解析の結果も GINV が ACLSV と近縁なウイルスであることを示した (柳瀬ら, 1986; YOSHIKAWA et al., 1997; 吉川, 1998)。一方, ブドウから分離され, 以前はトリコウイルス属の暫定種とされていた GVA や GVB は, 汁液接種が難しいことやコナカイガラムシで伝搬されること, ウイルス粒子が感染植物の師部に局在するなどの生物学的性状に加え, 特有のゲノム編成 (GVA や GVB ゲノムには五つの ORF が存在) を示すことから, 新設のピティウイルスに分類された (表-1, 図-2) (MINAFRA et al., 1994, 1997; SILDARALLI et al., 1996; VAN REGENMORTEL et al., 2000; 吉川, 1998)。

トリコウイルス属には現在, ACLSV, GINV, ジャガイモ T ウイルス (PVT) の 3 種が正式メンバーとして分類されている (VAN REGENMORTEL et al., 2000)。これら 3 種のウイルスは粒子形態やゲノム編成は一致しているが, 自然界での伝搬に関して大きな違いがある。ACLSV や PVT は媒介生物による伝搬は報告されていない。例えば ACLSV は, リンゴの穂木とともに我が国に侵入し, その後接ぎ木でまん延したと考えられてい

表-1 ブドウえそ果ウイルスと近縁ウイルスの諸性状の比較

	GINV	ACLSV	CMLV	GVA	GVB
自然感染植物	ブドウ	リンゴ, スモモ, オウトウなど	オウトウ, モモ, アプリコットなど	ブドウ	ブドウ
主な草本植物	<i>C. quinoa</i> <i>N. occidentalis</i>	<i>C. quinoa</i> <i>N. occidentalis</i>	<i>C. quinoa</i>	<i>N. clevelandii</i>	<i>N. occidentalis</i>
粒子形態 (nm)	ひも状 (700~760)	ひも状 (740~760)	ひも状 (760)	ひも状 (800)	ひも状 (800)
ゲノム (ssRNA)	7243 塩基	7549~7561 塩基	8003 塩基	7349 塩基	7598 塩基
外被タンパク質	22.1 K	21.4 K	21.6 K	21.5 K	21.6 K
ゲノム編成	OFR 1, 2, 3	OFR 1, 2, 3	OFR 1, 2, 3, 4	OFR 1, 2, 3, 4, 5	OFR 1, 2, 3, 4, 5
伝搬	接木, 汁液, ブドウハモグリダニ (<i>Colomerus vitis</i>)	接木, 汁液	接木, 汁液, フシダニの一種 (<i>Eriophyes inaequalis</i>)	接木, 汁液, コナイガラムシ (<i>Planococcus</i> 属, <i>Pesudococcus</i> 属, <i>Neopulvinaria innumerabilis</i>)	接木, 汁液, コナイガラムシ (<i>Planococcus</i> 属, <i>Pseudococcus</i> 属)
組織・細胞内所在	葉肉細胞, 師部細胞の細胞質	葉肉細胞, 師部細胞の細胞質および核		師部細胞, 小胞形成	師部細胞, 小胞形成
血清関連	ACLSV, GVA と関連なし	GINV, GVA と関連なし	ASGV, ASPV, ACLSV, PVT, GVA と関連なし	GINV, ACLSV, GVB と関連なし	GVA と関連なし
分類所属	トリコウイルス属	トリコウイルス属 (タイプ種)	(トリコウイルス属)	ピティウイルス属 (タイプ種)	ピティウイルス属

る。これに対して、GINV は前述したとおりブドウハモグリダニによって伝搬される (功刀ら, 1997)。

北米で問題となっているアウトウ mottle leaf 病の病原ウイルス CMLV のゲノム構造が最近報告された (JAMES et al., 2000)。CMLV は長さ約 760 nm の比較的屈曲性に富んだひも状ウイルスで、粒子の形態や表面構造、CP のサイズはトリコウイルスやピティウイルスに類似していた (表-1) (JAMES and MUKERJI, 1993)。また、本ウイルスはフシダニの一種 (*Eriophyes inaequalis*) で伝搬されることが明らかにされている。CMLV のゲノム編成を見ると、ORF 1~3 にコードされるタンパク質のサイズは ACLSV にコードされるタンパク質のサイズと非常によく似ているが、ゲノムの 3' 末端側に一つ余分な ORF 4 が存在している点が異なる (図-2)。ORF 4 がコードする 15 K タンパク質は核酸結合ドメインをもっているが、機能については不明である。CMLV ゲノムにコードされたタンパク質は ACLSV のタンパク質と非常に高い相同性を持ち、両ウイルス間で、ORF 1 がコードするタンパク質の POL 領域間では 62.9~63.6%、MP 間では 46.7~49.9%、CP 間では 52.8~54.5% の相同性であった (JAMES et al., 2000)。図-3 にトリコウイルス (ACLSV と GINV)、ピティウイルス (GVA と GVB)、カピロウイルス [リンゴステ

ムグループウイルス (ASGV) と Cherry virus A (CVA)] と CMLV の POL 領域アミノ酸配列に基づいた系統樹を示した。ゲノム編成が異なるにもかかわらず CMLV は ACLSV にかなり近縁のウイルスで、現時点ではトリコウイルス属に分類されるのが妥当である。

おわりに

GINV ゲノムの構造解析により、本ウイルスがトリコウイルス属に所属するウイルスであることが明らかになった。さらに、本属のタイプ種である ACLSV が接木伝染で広がるのに対し、GINV はダニ伝搬性であるという相違点も明確になった。上述したように、フシダニの一種で伝搬される CMLV のトリコウイルス属への分類が最近新たに提案されたことから、本属の分類基準 (特にベクターやゲノム編成) については今後検討を加えていく必要がある。植物ウイルスのなかで、ダニ伝搬性のウイルスは種類が少なく、特に伝搬機構に関する研究はあまり多くない。GINV や CMLV のダニ伝搬に関与するタンパク質やその伝搬機構の解明はトリコウイルスの進化や分類にとっても重要なテーマである。

GINV のベクターが明らかにされたことから、山梨県ではブドウハモグリダニの防除の徹底で、えそ果病の発生は減少している (寺井, 私信)。しかし、無病徴感染の品種では GINV は広く分布している可能性があり、今後とも注意を払う必要があろう。

引用文献

- 1) 板橋達彦ら (2000): 日植病報 66: 152.
- 2) JAMES, D. and S. MUKERJI, (1993): Plant Dis. 77: 271~275.
- 3) JAMES, D. et al. (2000): Arch. Virol. 145: 995~1007.
- 4) 功刀幸博ら (1997): 日植病報 63: 504.
- 5) ——— (2000): 山梨果試研報 10: 57~64.
- 6) MINAFRA, A. et al. (1994): Arch. Virol. 137: 249~261.
- 7) ——— (1997): ibid. 142: 417~423.
- 8) 宮下享子ら (1999): 日植病報 65: 381.
- 9) 西島 隆ら (1984): 同上 50: 433~434.
- 10) ———ら (2000): 山梨果試研報 10: 47~56.
- 11) SILDARELLI, P. et al. (1996): J. Gen. Virol. 77: 2645~2652.
- 12) 寺田道人ら (1998): 日植病報 64: 606.
- 13) 田中寛康 (1984): 日植病報 50: 133.
- 14) ——— (1985): 同上 51: 362.
- 15) 寺井康夫 (1994): 今月の農業 8月号: 96~99.
- 16) ——— (1989): 日植病報 55: 536.
- 17) ———・柳瀬春夫 (1992): 同上 58: 617~618.
- 18) TERAI, Y. et al. (1993): Abstract 11th Meeting ICVG., pp. 77~78.
- 19) VAN REGENMORTEL, M. H. V. et al. (2000): Virus Taxonomy Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Academic Press, Tokyo, pp. 1162.
- 20) 柳瀬春夫 (1985): 日植病報 51: 362.
- 21) ———・柏崎 哲 (1989): 同上 55: 536.
- 22) ———・寺井康夫 (1987): 同上 53: 423.
- 23) ———ら (1986): 同上 52: 550.
- 24) 吉川信幸 (1998): 植物防疫 52: 448~451.
- 25) YOSHIKAWA, N. et al. (1997): Arch. Virol. 142: 1351~1363.

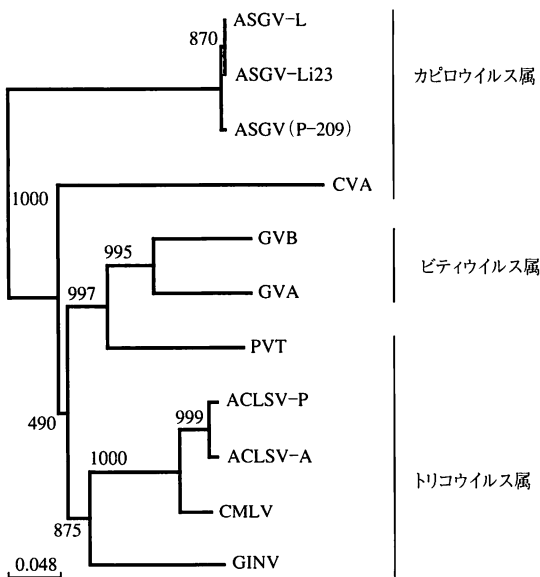


図-3 トリコ、カピロおよびピティウイルスの POL 領域アミノ酸配列に基づいた系統樹 (近隣結合法)
図中の数字はブートストラップ検定 (1,000 反復) の結果である。図の下スケールは部位当たりのアミノ酸の置換数を示す。