

神奈川県で分離したカブモザイクウイルス(TuMV)の特性

野村 研・植草秀敏・北 宜裕

Characterization of Turnip Mosaic Virus (TuMV) isolated from Kanagawa Prefecture

Ken NOMURA, Hidetoshi UEKUSA, Nobuhiro KITA

摘 要

神奈川県平塚市内で栽培されているダイコン及びキャベツのモザイク症状株からTuMV-KR株及びKC株を分離し、これらの性質について、TuMV-JO株と比較検討した。JO株及びKR株はいずれもダイコンに感染したが、KC株は感染しなかった。一方、KC株はキャベツには全身感染したが、JO株及びKR株は感染しなかった。次に分離株間の血清関係をウエスタンブロット法により比較したところ、3分離株とも明確な反応を示すとともに、外被タンパク質(CP)の泳動度にも差は認められなかった。分離株間のCP遺伝子の相同性は、JO株とKR株とは87.9%、JO株とKC株とは96.7%、KR株とKC株とは88.8%を示し、KC株はJOとより近縁であることが示された。

キーワード：カブモザイクウイルス，ポティウイルス，外被タンパク質

Summary

Two pathotypes of Turnip mosaic virus (TuMV) isolates KR and KC, were isolated from Japanese radish and cabbage, respectively, showing mosaic symptoms in their leaves in a field of Hiratsuka city, Kanagawa Prefecture and the pathogenicity was determined in comparison with TuMV JO isolate. KR and JO were pathogenic to Japanese radish while KC was not. On the contrary, KC infected cabbage and induced slight mosaic symptoms in the leaves whereas KC did not. Both KR and KC isolated showed positive reaction by Western blot analysis using antibody of JO with no difference in the electrophoretic pattern of the coat protein (CP). Sequence comparison of the CP gene showed that JO and KC are closely related than KR, suggesting that CP genes is not the determinant the difference of the pathogenicity to the Japanese radish and cabbage.

Key word : TuMV, Potyvirus, coat protein gene

緒 言

カブモザイクウイルス(Turnip Mosaic Virus: TuMV)はダイコン、カブ等の野菜や菜種など、主にアブラナ科作物に感染するウイルスであり、日本を含むアジアの他、アフリカ、アメリカ、ヨーロッパなど世界各国でも発生し、野菜における重要ウイルスの一つとされている

(Tomlinson, 1987)。TuMVが属するPotyvirus属は植物ウイルス全体の30%を占める最大グループで、アブラムシによって非永続伝搬され、長さ700-750nm、幅11-12nmのひも状粒子である(Brandes and Berchs, 1965)。そのゲノムは約10000bpの一本鎖RNAで構成され(Hollings and Brunt, 1981)、ウイルスゲノムは大きなポリタン

パク質前駆体として翻訳された後、自身のコードする加水分解酵素によって約10のタンパク質に切断される。その順序は5'側からPIプロテアーゼ(first protein), HC(helper component), P3(third protein), 6K1(6K first protein), CI(cylindrical inclusion protein), 6K2(6K second protein), NIa-VPg (small nuclear inclusion protein-genome linked protein), NIa-プロテアーゼ, NIb(large nuclear inclusion protein), 外被タンパク質(CP:coat protein)である。Potyvirusのゲノム情報と塩基配列は、分類上の有力な手掛かりとなっており、Potyvirus遺伝子の機能が推定されてきているが、多くのPotyvirusにおける遺伝子の機能と病原性の違いについては未だ不明な部分が多い。TuMVにおいてはこれまでに多くの分離株について塩基配列が決定されてきた。NicolasとLaliberte(1992)はカナダ分離株の全塩基配列を、大島ら(1996, 2002)は日本分離株の全塩基配列を決定し、それぞれ9830及び9833ヌクレオチドから構成されていることを示すとともに、世界各地から収集したTuMVの76分離株におけるCP遺伝子とPI遺伝子の塩基配列を比較し、これらの分離株が分子系統学的に大きく4つのグループに分類できることを示した。また、近年、TuMVの感染性クローンが作出され、病原性に関与する遺伝子の解析が急速に進められている(Sanchez et al 1998, Jenner et al 2003, Suehiro et al 2004)。ウイルス遺伝子を解析し、系統を比較することは、地域において発生しているウイルスの特性を知り、防除法を確立する上でも極めて重要である。特に、CPはウイルス粒子の主要な遺伝子産物であり、粒子の90~95%を占め、その性状はPotyvirusの分類にも重要な因子となっている。そこで本研究ではTuMVの農水省ジーンバンク保存株(MAFF01-04035:以下JO株、柄原1965, Nomura et al. 2004)を対照に、本県で分離したKR株及びKC株の病原性や血清学的性質について比較するとともに、CP及びNIb遺伝子の一部を含む3'末端側の部分塩基配列を決定し、解析した結果を報告する。

材料及び方法

1. ダイコン及びキャベツからのTuMVの分離

神奈川県農業技術センター内圃場で栽培されているダイコンのモザイク症状株及び平塚市内の圃場で栽培されていたキャベツのモザイク症状を示す病葉をカーボランダム法によりアカザに汁液接種し、単一局部病斑を分離して*Nicotiana benthamiana*に全身感染させた。接種後、モザイク・萎縮症状を示した上葉を再び接種源とし、検定植物に接種した。なお、対照にはJO株を用いた。

2. 血清試験

JO株を全身感染させたコカブを用い、Choiら(1977)の方法に準じてJO株の精製を行った。純化ウイルスを家兎に注射し、TuMV抗血清を得た。ウイルス分離株の血清試験はウエスタンブロット法により行った。Lammler(1970)の方法に従い、試料をSDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動(SDS-PAGE)後、PVDFメンブレンに転写した。次に精製した γ -グロブリンまたはCMV抗体(日本植物防疫協会)を1次抗体、アルカリフォスファターゼ結合抗ウサギ抗体(BIO-RAD)を2次抗体に用いてシグナルを検出した。

3. CP及びNIb遺伝子のクローニング

TuMV各分離株のRNAを純化試料から抽出し、RT-PCRの試料とした。RT-PCRはタカラRNA LA PCRキットを用いて行った。逆転写にはOligo dTプライマーを用い、キットのプロトコールに基づいて42°C、30分間反応させた後、99°C、5分間処理して逆転写酵素を不活化させた。逆転写によって得られたcDNAを鋳型にしたPCR反応には既知配列を基にNIb遺伝子内に設計したフォワードプライマー(TuNIb:GACAAGTTAACTCACGAGA)とOligo dTプライマーを用い、熱変性94°C、30秒、アニーリング反応49°C、30秒、伸長反応72°C、1分30秒の条件で35サイクル反応させた。得られたPCR産物はアガロースゲル電気泳動で分離し、予想される大きさである1.2kbp

の増幅DNA断片を切り出し、精製した後、ligation kit ver.2(タカラ)を用いてpT7Blueベクターに連結し、コンピテントセルDH5α(タカラ)に形質転換した。形質転換したDH5αからプラスミド調整後、制限酵素処理してインサートの有無を確認した。インサートの確認されたプラスミドをフェノール・クロロフォルム精製し、DNAシーケンサー(ABI373)を用いてダイデオキシシクルシーケンス法により塩基配列を決定した。塩基配列決定後、DNASY(日立)を用いてTuMVの各種系統との相同性比較を行った。

結果及び考察

汁液接種試験の結果を第1表に示した。KR株及びKC株はいずれも*Chenopodium amaranticolor*及び*C.quinoa*の接種葉にTuMV-JO株と同様の局

部病斑を形成した。また、カラシナ、カブの接種葉にはえそ病斑を生じた後、上葉に激しいモザイク症状を引き起こし、全身感染した。その他、マメ科、ナス科の検定植物にもJO株と同様の局部病斑を生じた。これに対し、ダイコン及びキャベツに対する反応は分離株間で異なっていた。JO株及びKR株はいずれもダイコンに全身感染したが、JO株は軽いモザイク症状を示しただけなのに対してKR株は激しいモザイク症状を示した。しかしいずれの分離株もキャベツには感染しなかった。これに対し、KC株はキャベツ全身感染し、わずかにモザイク症状を示したものの、ダイコンには感染しなかった。この結果から、JO株とKR株の方がKC株よりもより近縁であることが示された。

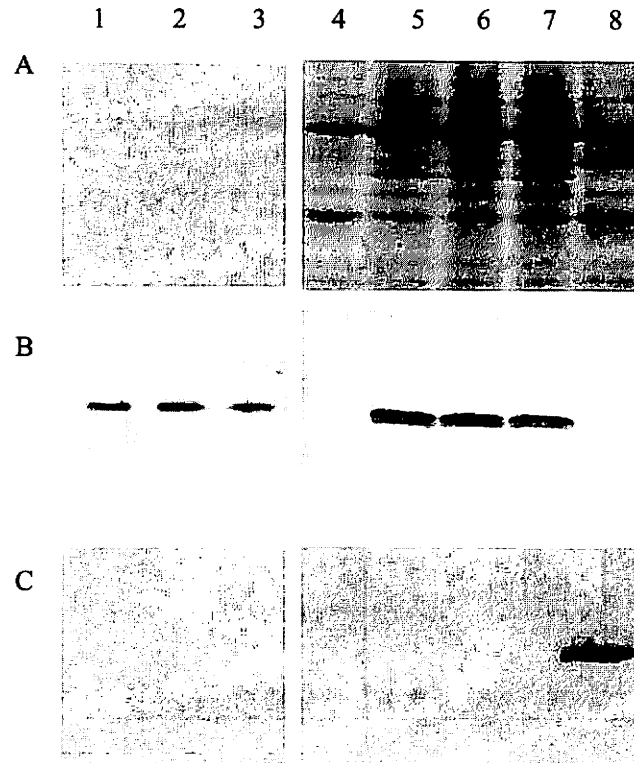
第1表 検定植物のTuMV分離株に対する反応

接種植物	病 徴		
	KR	KC	JO
アカザ科			
<i>Chenopodium amaranticolor</i>	N/-	N/-	N/-
<i>C.quinoa</i>	N/-	N/-	N/-
アブラナ科			
ダイコン(<i>Raphanus sativus</i>)	NS/M	-/-	NS/m
キャベツ(<i>Brassica oleracea</i>)	-/-	CS/m	-/-
カラシナ(<i>B.juncea</i>)	NS/M	NS/M	NS/M
カブ(<i>B.campestris</i>)	NS/M	NS/M	NS/M
マメ科			
ソラマメ(<i>Vicia Faba</i>)	NS/-	NS/-	NS/-
ササゲ(<i>Vigna unguiculata</i>)	NS/-	NS/-	NS/-
ナス科			
<i>Nicotiana tabacum</i>	CS/-	CS/-	CS/-
<i>Nicotiana glutinosa</i>	NS/-	NS/-	NS/-

接種葉/上葉の病徴を表す。N:えそ, NS:えそ斑点, M:モザイク, m:弱いモザイク, CS:退緑斑点, -:無病徴

JO株, KR株及びKC株を感染させたコカブから純化したウイルス粒子及び感染植物をDN法により電子顕微鏡観察したところ, いずれもPotyvirusに特有のひも状のウイルス粒子が確認

された(データ不掲載). ウェスタンブロットによる血清反応を調べた結果, いずれの試料も作成したTuMV抗体と明確な反応を示した. なお, CMV抗体とは反応しなかった(第1図).



第1図 純化試料及びウイルス感染植物のウェスタンブロット解析

A. SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動像。B. TuMV抗体によるウェスタンブロット解析。C. CMV抗体によるウェスタンブロット解析。レーン1. TuMV-JO株の純化試料 2. TuMV-KR株の純化試料 3. TuMV-KC株の純化試料 4. *N.benthamiana*健全葉 5. TuMV-JO株に感染した *N.benthamiana* 6. TuMV-KR株に感染した *N.benthamiana* 7. TuMV-KC株に感染した *N.benthamiana* 8. CMV-Yに感染した *N.benthamiana*

アブラナ科野菜に感染するウイルスにはTuMVの他, CMVがあり, まれにカリフラワーモザイクウイルス(CaMV)も検出される. 栃原(1965)は, 日本各地のダイコンからモザイク症状株を収集し, 病原ウイルスを同定したところ, その多くはTuMV単独か, またはTuMVとCMVの混合感染株であった. また, 植草ら(2003)は神奈川県内ダイコンのえそ症状株をTuMVと

CMVを同時に検出できるマルチプレックスPCR法により検定したところ, 全ての個体からTuMVが検出される他, 約30%の個体からCMVが同時に検出されることを示した. これらの結果から, 本研究においてダイコン及びキャベツのモザイク症状から *Chenopodium amaranticolor* の局部病斑を経て分離したウイルスにはTuMVの他, CMVが混在する可能性が考えられる. しかしTuMV

の病斑とCMVの*Chenopodium amaranticolor*における局部病斑は明確に識別が可能であり(栃原1965), 純化ウイルスの粒子形態がひも状であることや, 全身感染植物を用いたウエスタンブロット解析でもCMV抗体には反応しなかったことから, TuMVのみが分離されたものと考えられる. また, 汁液接種試験の結果, JO, KR, KC株の病原性の違いはダイコン及びキャベツにおいてのみ認められ, KR株及びKC株の病徴がダイコン及びキャベツで再現されたことは, 本実験で採集した植物の圃場における病徴は, 主にTuMVによるものであることを示している.

既報のTuMV配列を基に設計したプライマー(TuNib)とOligo dTプライマーを用いて純化ウイルスから抽出したRNAを鋳型にしてRT-PCRを行い, アガロースゲル電気泳動した結果, 1.2kbpの位置に明確な増幅DNAが検出された. これをクローニングし, 塩基配列の解析を行った結果, JO株, KR株及びKC株は既報のTuMVのUK1株(Sanchez et al 1998)とそれぞれ96.5%, 89.8%及び97.3%の相同性を示した. 次にJO株, KR株及びKC株の塩基配列について, Nib領域とCP領域に分けて比較したところ, NibについてはJO株とKR株では85.3%, JO株とKC株では95.0%, KR株とKC株では85.9%の相同性を示した. また, CPについてはJO株とKR株では87.9%, JO株とKC株では96.7%, KR株とKC株では88.8%を示した(第2表). 以上のように, 今回供試したTuMV分離株は, 血清学的には違いは認められず, 3'末端側の塩基配列では共にダイコンに感染性を示すJO株とKR株の相同性よりも, ダイコン及びキャベツに対する感染性の異なるJO株とKC株の相同性の方が高い値を示すことが明らかとなった. これらの結果は, TuMVのダイコン及びキャベツに対する病原性の違いは, CPやNib以外の遺伝子によって決定されていることを示唆している. 近年, TuMVの遺伝子解析が急速に進み, 病原性に関与する遺伝子が特定されはじめている(Jenner et al 2003, Suehiro et al 2004, Tan et al 2005). ウイルスの分類は, 病原性や血清関係,

塩基配列を基に行われているが, 特に病原性を診断することは重要であり, このような遺伝子解析結果を応用することはウイルスの病原性を特定する遺伝子診断を行う上でも有効になると考えられる.

第2表 TuMV分離株間におけるCP及Nib遺伝子の相同性(%)

TuMV分離株	JO	KR	KC
JO:CP	100	87.9	96.7
Nib	100	85.3	95.0
KR:CP	-	100	88.8
Nib	-	100	85.9
KC:CP	-	-	100
Nib	-	-	100

GeneBank accession numbers . JO:AF312909,

KR:AF312910, KC:AF312911

引用文献

- Brandes ,J and Bercks,R.1965. Gross morphology and serology as a basis for classification of elongated plant viruses. *Adv. Virus Res.* 11:1-24.
- F., and Adams, A. N. 1977. Characteristic of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *J. Gen. Virol.* 34:475-483.
- Hollings,M and Brunt,A.A. 1981.Potyvirus. In *Handbook of Plant virus Infections: Comparative Diagnosis* (E. Kurstak, ed), pp.731-807, Elsevier/North-Holland, Amsterdam.
- Jenner, C. E., Tomimura, K., Ohshima, K., Hughes, S. L., and Walsh, J. A. 2002. Mutations in *Turnip mosaic virus* P3 and cylindrical inclusion proteins are separately required to overcome two *Brassica napus* resistance genes. *Virology* 300:50-59.
- Laemmli, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature (Lond.)* 227:680-685.
- Nicolas, O., and Laliberte, J. F. 1992. The complete nucleotide sequence of turnip mosaic potyvirus RNA. *J. Gen. Virol.* 73:2785-2793.
- Nomura,K., Ohshima,K., Anai,T., Uekusa,H.,and Kita,N. 2004.RNA silencing of the introduced coat protein gene

- of turnip mosaic virus confers broad-spectrum resistance in transgenic *Arabidopsis*. *Phytopathology* 94:730-736.
- Ohshima, K., Tanaka, M., and Sako, N. 1996. The complete nucleotide sequence of turnip mosaic virus RNA Japanese strain. *Arch. Virol.* 141:1991-1997.
- Ohshima, K., Yamaguchi, Y., Hirota, R., Hamamoto, T., Tomimura, K., Tan, Z., Sano, T., Azuhata, F., W Choi, J. K., Maeda, T., and Wakimoto, S. 1977. An improved method for purification of turnip mosaic virus. *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.* 43:440-448.
- Clark, M. alsh, J. A., Fletcher, J., Chen, J., Gera, A., and Gibbs, A. 2002. Molecular evolution of *Turnip mosaic virus*: evidence of host adaptation, genetic recombination and geographical spread. *J. Gen. Virol.* 83:1511-1521.
- Sanchez, F., Martinez-Herrera, D., Aguilar, I., and Ponz, F. 1998. Infectivity of turnip mosaic potyvirus cDNA clones and transcripts on the systemic host *Arabidopsis thaliana* and local lesion hosts. *Virus Res.* 55:207-219.
- Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. 1989. *Molecular cloning: A Laboratory Manual*. 2nd ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY.
- Shattuck, V. I. 1992. The biology, epidemiology and control of turnip mosaic virus. *Plant Breed. Rev.* 14:199-238.
- Suehiro, N., Natsuaki, T., Watanabe, T., and Okuda, S. 2004. An important determinant of Turnip mosaic virus to infect *Brassica* spp. And/or *Raphanus sativus* is in its P3 protein. *J. Gen. Virol.* 85:2087-2098.
- Tan, Z., Gibbs, A. J., Tomitaka, Y., Sanchez, F., Ponz, F., and Ohshima, K. 2005. Mutations in Turnip mosaic virus genomes that have adapted to *Raphanus sativus*. *J. Gen. Virol.* 86:501-510.
- 栃原比呂志 1960. ダイコンのモザイク病を起因するウイルスの同定ならびに血清学的比較研究. *農技研報* C18:1-52.
- Tomlinson, J. A. 1987. Epidemiology and control of virus diseases of vegetables. *Ann. Appl. Biol.* 110:661-681.
- 植草秀敏・野村 研・北 宜裕 2003. RT-PCRによる植物ウイルスの検出. *神奈川県農業総合研究所研究報告* 143:61-69.