

## 熊本県のリンドウから分離されたソラマメウイルト ウイルス 2 の RNA2 の塩基配列

酒井 淳一<sup>1)</sup>・田中 正美<sup>2)</sup>・花田 薫<sup>1)</sup>

(<sup>1)</sup>九州・沖縄農業研究センター・<sup>2)</sup>熊本県農業研究センター農産園芸研究所)

**The nucleotide sequence of RNA2 of Broad bean wilt virus 2 isolated from gentian in Kumamoto prefecture.** Junichi Sakai<sup>1)</sup>, Masami Tanaka<sup>2)</sup> and Kaoru Hanada<sup>1)</sup> (1) National Agricultural Research Center for Kyushu Okinawa Region, Nishigoshi, Kumamoto 861-1192, Japan. (2) Agriculture and Horticulture Research Institute, Kumamoto Prefectural Agricultural Research Center, Koshi, Kumamoto 861-1113, Japan)

**Key words:** Broad bean wilt virus 2, Fabavirus, gentian, nucleotide sequence, RNA2

1998年、熊本県菊池郡合志町の熊本県農業センター内で栽培されているリンドウに黄化・えそ症状が確認された。検定植物を用いた接種試験ならびに血清試験の結果から、このリンドウはソラマメウイルトウイルス 2 (*Broad bean wilt virus 2*: BBWV-2) に感染していることが明らかとなった。

BBWV は コモウイルス科 (*Comoviridae*) の *Fabavirus* 属に属す球形ウイルスでアブラムシにより非永続的に伝搬される。また、本ウイルスはソラマメなどのマメ科植物をはじめとして、多くの双子葉植物に感染することが知られている。BBWV は 2 種の一本鎖 + 鎖 RNA (RNA 1, RNA 2) をゲノムとして持つ 2 粒子性ウイルスである。RNA 1 にはプロテアーゼおよびポリメラーゼが、RNA 2 には移行タンパク質および外被タンパク質がそれぞれコードされている。最近になって、BBWV は BBWV-1 と BBWV-2 の 2 種の血清型に分類されるようになった (Goldbach et al., 1995)。

*Comoviridae* 科のうち *Comovirus* 属および *Nepovirus* 属に属しているウイルスについてはこれまでに比較的よく研究がなされている一方で、*Fabavirus* 属に属しているウイルスについては分子生物学的アプローチを用いた研究はまだ数少ない。そこで本研究では、熊本県のリンドウから分離された BBWV-2 (以下、BBWV-2-KU) の RNA 2 の cDNA クローニングを行い、その塩基配列を決定し、これまでに報告されている *Fabavirus* 属のウイルスとの比較を行った。

### 材料および方法

1998年、熊本県農業研究センター内で黄化・えそ症状

を呈するリンドウを採取した。当初、病徴からウイルスによる病害と考えられたので、このリンドウ葉の粗汁液を用いて機械的接種を行ったところ、*Chenopodium quinoa*, *Nicotiana benthamiana* およびソラマメにそれぞれ全身感染し、上位葉にえそを生じた。さらに、このリンドウの粗汁液を用いてウエスタンブロットを行ったところ、BBWV-2 の抗血清と反応したことから、このリンドウに感染しているウイルスは BBWV-2 と同定された。このリンドウから *C. quinoa* を用いて局部病斑分離を行い、BBWV-2 の分離株 (以下、BBWV-2-KU) を得た。BBWV-2-KU を *C. quinoa* で増殖した後、Kobayashi et al. (1999) の方法に準じて純化した。純化ウイルスから RNA 2 を抽出し、oligo (dT) を用いて逆転写反応を行った後、Gubler-Hoffman 法を用いて二本鎖 cDNA を合成した。これをプラスミドベクター pBluescript II SK (+) (STRATAGENE) にクローニングし、ABI373 シークエンサー (PE ABI) を用いて塩基配列を決定した。塩基配列から ORF のアミノ酸配列を推定し、これまでに報告されている *Fabavirus* 属のウイルスと比較した。多重配列解析には Clustal X (Thompson et al., 1997) を用いた。

### 結果および考察

BBWV-2-KU の RNA 2 の cDNA クローニングを行い、約 3.6kb のインサートを含むプラスミドクローンを得た。このインサートの全塩基配列を決定したところ、3576 塩基からなっていた。これを BBWV-MB7 (Nakamura et al., 1998) と比較した結果、BBWV-2-KU の 3576 塩基の塩基配列は BBWV-2-MB7 の RNA



## 引用文献

- Goldbach T. R., G. P. Martelli and R. G. Milme (1995) Family *Comoviridae*. In : Virus Taxonomy (Murphy F. A. eds). Springer (New York) : pp.341-347.
- Kobayashi, Y. O., M. Nakano, S. Kashiwazaki, T. Naito, Y. Mikoshiba, A. Shiota, M. Kameya-Iwaki and Y. Honda (1999) Sequence analysis of RNA-2 of different isolates of broad bean wilt virus confirms the existence of two distinct species. Arch. Virol. 144 : 1429-1438.
- Kuroda, T., A. Okumura, I. Takeda, Y. Miura and K. Suzuki (2000) Nucleotide sequence and synthesis of infectious RNA from cloned cDNA of broad bean wilt virus 2 RNA 2. Arch. Virol. 145 : 787-793.
- Nakamura, S., T. Iwai and R. Honkura (1998) Complete nucleotide sequence and genome organization of broad bean wilt virus 2. Ann. Phytopathol. Soc. Jpn. 64 : 565-568.
- Thompson, J. D., T. J. Gibson, F. Plewniak, F. Jeanmougin and D. G. Higgins (1997) The CLUSTAL\_X windows interface: flexible strategies for multiple sequence alignment aided by quality analysis tools. Nucleic Acids Res. 25 : 4876-4882.

(2001年4月30日 受領)