

九州で発生したトマト黄化えそウイルス (TSWV) の S RNA 3' 末端の比較

奥田 充・酒井 淳一・花田 薫
(九州沖縄農業研究センター)

Comparison of the nucleocapsid genes and the 3' non-transcriptional regions of the S RNA among *Tomato spotted wilt virus* isolates from Kyushu. Mitsuru Okuda, Jun-ichi Sakai and Kaoru Hanada (National Agricultural Research Center for Kyushu Okinawa Region, Nishigoshi, Kumamoto 861-1192, Japan)

緒 言

トマト黄化えそウイルス (*Tomato spotted wilt virus*, TSWV) は直径約100nmの外膜を持つ1本鎖RNAウイルスである。TSWVはブニヤウイルス科トスポウイルス属のタイプウイルスであり、ゲノムRNAはNSs遺伝子とヌクレオカプシド(N)遺伝子をコードするS RNA, NSm遺伝子とグリコプロテインをコードするM RNA, RNA依存RNA合成酵素をコードするL RNAの3分節構造を取っている。このうちS RNAとM RNAは遺伝子がウイルス鎖とウイルス相補鎖にコードされるアンビセンス構造となっている(Lawson et al., 1997)。日本におけるTSWVの発生は1972年に岡山県のダリアで確認された。TSWVはアザミウマ類により永続的に媒介されることと、極めて広い宿主範囲を持つことから農業上極めて重要なウイルスとして位置づけられている。九州においても1990年代以降、TSWVの発生が問題となっており、特にキク、トマト、ピーマンなどの野菜および花卉類に突発的に発生し、被害が及んでいる(花田, 1999)。本研究では九州各地で発生したTSWVのN遺伝子を含むS RNA 3' 末端非翻訳領域をRT-PCRにより増幅し、塩基配列から予想されるN遺伝子のアミノ酸配列の比較と3' 末端非翻訳領域の比較に基づき、分離作物の異なるTSWVの系統分化の可能性について遺伝子レベルの解析を行った。

材料および方法

1. ウイルス株

ウイルス株は1997~2000年に九州各地で採集したえそ症状を示すトマト、キク、ピーマンおよびパブリカのTSWV感染株を用いた(表1)。本研究で得られた塩基

配列と比較するために既報のTSWV-C(加藤・花田, 2000)およびCPNH1(De Haan et al., 1990)の塩基配列を使用した。

2. RT-PCR

罹病組織よりCF11セルローズパウダー(Whatman)を用いた方法(大貫・花田, 1996)により全RNAを抽出した。RT-PCRはGeneAmp RNA PCR Kit(PE-ABI, USA)とサーマルサイクラーProgene(Techné, UK)を使用した。全RNAを鋳型として下流プライマー(TsCP3', 5'-AGAGCAATTGTGTCAAATTTT-3')を用いて42℃下で30分逆転写反応を行った後、TsCP3'と上流プライマー(TsCP5', 5'-CTGCTTTAAGCAA GTTCTGC-3')を用いて96℃-30秒, 50℃-30秒, 72℃-1分を1サイクルとする反応を40サイクル行った。反応後、電気泳動により増幅DNA断片の確認を行った。

第1表 供試TSWV株

ウイルス株	分離宿主	採取地	分離年
MzChTs1	キク	宮崎県	1997
KmChTs1	キク	熊本県	1998
KmToTs1	トマト	熊本県	1999
KmGpTs1	ピーマン	熊本県	1999
KgChTs1	キク	鹿児島県	1998
NsChTs1	キク	長崎県	1999
SgChTs1	キク	佐賀県	1999
OiGpTs1	ピーマン	大分県	1999
OiGpTs2	ピーマン	大分県	1999
FoPaTs1	パブリカ	福岡県	2000
TSWV-C* ¹	キク	静岡県	(2000)
CPNH1* ¹	トマト	ブラジル	(1989)

*1 比較に用いた既報TSWV株、括弧内の年号は雑誌掲載年を表す

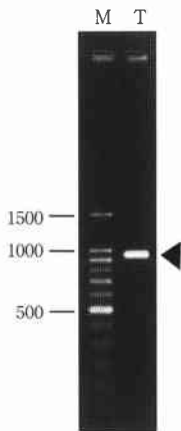
3. 塩基配列解析

増幅産物をスピンカラム (Suprec-02, 宝酒造) で精製し, ABI PRISM Dye Terminator Cycle Sequencing Kit (PE ABI) と373DNA Sequencing system (PEABI) を用いてダイレクトシーケンスにより塩基配列を決定した。あるいはPCR産物をプラスミドベクター pBluescript SK+ (Stratagene社) に法定に従い (中山, 1996), TA クローニング後, 塩基配列を決定した。プラスミドにクローニングした増幅断片については最低3クローンについて塩基配列の同定を行った。得られた塩基配列の多重整列と塩基置換度の推定にはClustal Xプログラム (Thompson et al., 1997) を用いた。各配列間の塩基置換度から近隣接合法 (Saitou and Nei, 1987) により系統樹を作成した。なお, アウトグループとして同じトスポウイルスに属する別種とされている (De Avila et al., 1993) Groundnut ring spot virus (GRSV) のN遺伝子の塩基配列を使用した。

結果

1. RT-PCRによるTSWV 3'末端領域の特異的増幅

TSWV罹病組織より抽出した全RNAのRT-PCRによって約950塩基対のDNA断片の増幅が確認された (図1)。増幅DNA断片の塩基配列を決定したところ, 供試した全ての増幅DNA断片において既に報告されているTSWVのS RNA塩基配列と95%以上の相同性が認められた。これら塩基配列中の読み枠 (ORF) を推定したところ, ウイルス相補鎖に259アミノ酸からなるORFをコードしていた。しかし, C末端の3残基についてはプライマー部分と重なるため同定できなかった。



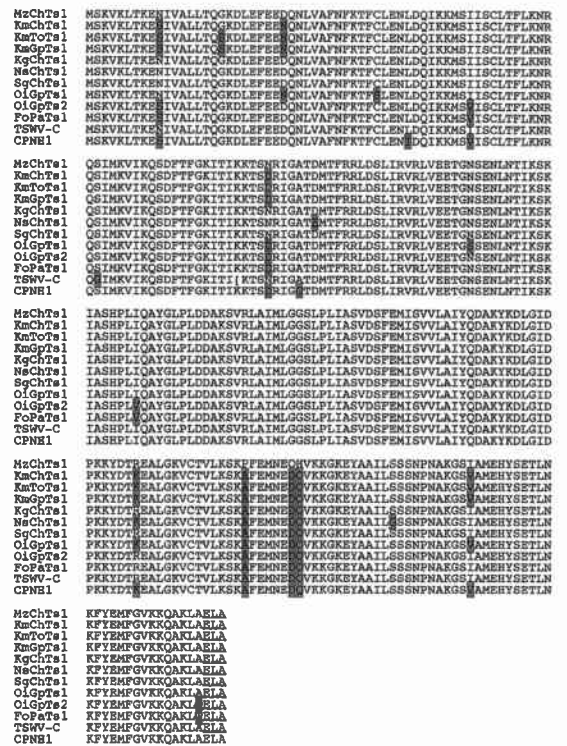
第1図 RT-PCRによるTSWVのS RNA 3'末端領域の増幅。レーンTはRT-PCR産物, レーンMは分子量マーカーを泳動した。

2. N遺伝子のアミノ酸配列の比較

供試ウイルス株のN遺伝子のアミノ酸配列を比較したところ, 互いに96~100%の相同性を示し, 供試株が極めて類似していることが明らかとなった。アミノ酸配列の多重整列の結果を図2に示す。これらの配列は既報のTSWVであるTSWV-C株およびCPNH1株とも96~98%の高い相同性を示した。一方, 同属他種であるGRSVとの相同性は77~78%となった。アミノ酸置換率より系統樹を作成した結果, 大きく2つのグループに分かれた (図3)。佐賀 (SgChTs1株), 長崎 (NsChTs1株), 宮崎 (MzChTs1株), 鹿児島 (KgChTs1株) のキクから分離した株が一つのグループN-Bを形成し, 静岡のキクより分離したTSWV-C株もこのグループに含まれた。また, 熊本のキクより分離した株 (KmChTs1株) とトマト, ピーマン, パプリカより分離された株はグループN-Aを形成した。N-AはさらにN-A1とN-A2の2つのサブグループに分かれた。ブラジルのトマトより分離されたCPNH1株はN-A1に含まれた。

3. 3'末端非翻訳領域の塩基配列の比較

3'末端非翻訳領域の塩基配列の結果, 供試株は互いに92~



第2図 N遺伝子の推定アミノ酸配列の多重整列。影付きの文字はMzChTs1株と異なるアミノ酸残基を示す。下線はプライマー配列と重なるため同定していない配列を表す。

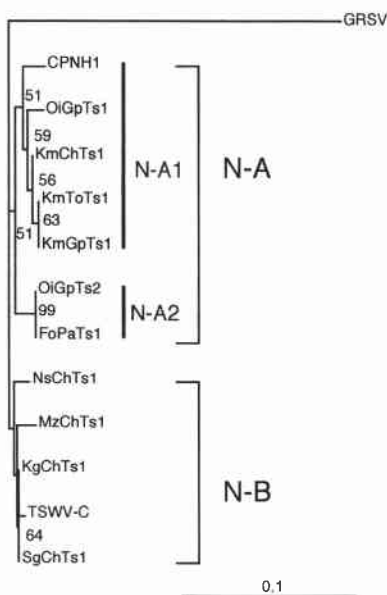
100%の相同性を示した。既報の TSWV 株との相同性は TSWV-C 株とは93~100%であったのに対し、CPNH1株とは89~93%と低かった。塩基置換率より系統樹を作成した結果、供試株はN遺伝子のグループとほぼ対応した3つのグループに分かれた(図4)。NTR-AはN-A2と、NTR-CはN-Bとそれぞれ同じ構成となった。NTR-BはN-A2のCPNH1株以外の全てが含まれた。しかし、CPNH1株はどのグループにも入らなかった。Bootstrap試行の結果、ほとんどの分岐においてBootstrap推定値が80%以上となった。

考 察

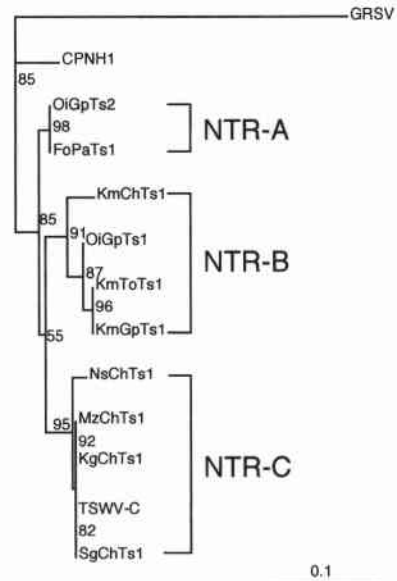
現在、トスポウイルスは血清学的反応およびN遺伝子のアミノ酸配列の相同性により13種に類別されている(Moyer, 2000)。日本ではTSWVの発生以外にもスイカ灰白色斑紋ウイルス(Iwaki et al., 1984)とメロン黄化えそウイルス(Kato et al., 2000)がウリ科作物に大きな被害を与えている他、近年観賞作物で新たにインパチェンス黄化えそウイルス(谷名ら, 2001)が報告されている。これらは血清反応のみでなく、宿主範囲、媒介するアザミウマの種類などを異にしている(Van Regenmortel et al., 2000)。一方、TSWVはトスポウイルスの中でも特に広い宿主範囲を持ち、実験的には500種以上の植物に感染することが知られている。日本でも

ナス科作物以外ではアルストロメリア(高橋ら, 1999)、トルコギキョウ(黒田ら, 2000)、キク(加藤・花田, 2000)など花卉類に多くの発生が報告されているが、これらの分離株は全てTSWV抗血清に反応し、またキク分離株とトルコギキョウ分離株に関しては同定されたN遺伝子の一部塩基配列の相同性が90%以上であることから同一種と判断されている。しかし、同一種内でも適応宿主の違いによる系統が生じている可能性がある。

本研究で供試したキク、トマト、ピーマンおよびパプリカから分離したTSWV10株のN遺伝子の推定アミノ酸配列は全ての株においてよく保存されており、既報のTSWV株と比較しても大きな差異は認められなかった。これらのアミノ酸配列の相同性は90%以上であり、供試株は全てTSWVと同定される。アミノ酸配列の類似性において2つの遺伝的グループが認められ、熊本県で栽培されたキクから分離された株を例外としてキクに感染する株は一つの遺伝的グループを形成することが示唆された。このグループは3'末端非翻訳領域に基づく系統樹においても同一のものとなった。静岡のキクから分離したTSWV-C株もこのグループに入ったことから地理的な局在のみに由来するものではないと思われる。供試した罹病キクの由来が明らかでないため親株の無病徴感染や育苗床での感染も否定できないが、これらがキクに感染しやすい系統である可能性が示唆された。KmChTs1



第3図 N-J法を用いたN遺伝子のアミノ酸置換率に基づく系統樹
分岐間の数値は1,000回のBootstrapによる検定値(50%以上を示したもののみを表示)



第4図 N-J法を用いた3'末端非翻訳領域の塩基置換率に基づく統計樹
分岐間の数値は1,000回のBootstrapによる検定値(50%以上を示したもののみを表示)

株は他のキクから分離した TSWV とは異なり、ナス科から分離した TSWV のグループに分けられた。TSWV の媒介中であるミカンキロアザミウマはキクの重要害虫であるため、近隣の罹病トマト等より虫媒伝染したと思われる。

TSWV の宿主範囲は広く、様々な植物が栽培される現在の施設園芸作物では新たな問題が発生することも危惧される。本研究において TSWV の系統が生じている可能性が示唆されたため、これらの宿主範囲、病徴等の差異を詳細に検討する必要がある。TSWV では塩基配列の変異と病徴や宿主範囲との間に具体的な相関は報告されていないが、宿主範囲が遺伝子の 1 アミノ酸の変異や非翻訳領域の 1 塩基の変異により変化することは十分考えられる。トスポウイルスの遺伝子を人為的に改変する技術は確立していないが、TSWV の宿主に対する感染性や病原性に関するゲノムの特定が人為的なアソートメントを利用して進められている (Quiら, 1998)。今後、MRNA, LRNA を含むゲノム全体を対象とした遺伝子解析により宿主と遺伝的系統の詳細な関係が明らかになるとと思われる。

引用文献

- De Avila, A.C., P. de Haan, R. Kormelink, R. de O. Resende, R.W. Goldbach and D. Peters (1993) Classification of tospoviruses based on phylogeny of nucleoprotein gene sequences. *J. Gen. Virol.* 74 : 153-159.
- De Haan, P., L. Wagemakers, D. Peters and R. Goldbach (1990) The S RNA segment of tomato spotted wilt virus has an ambisense character. *J. Gen. Virol.* 71 : 1001-1007.
- 花田 薫 (1999) 西日本におけるトマト黄化えそウイルス (TSWV) の発生動向とその特徴. *植物防疫* 53 : 312-315.
- Iwaki, M., Y. Honda, K. Hanada, H. Tochiyama, T. Yonaha, K. Hokama and T. Yokoyama (1984) Silver Mottle Disease of Watermelon Caused by Tomato Spotted Wilt Virus. *Plant Dis.* 68 : 1006-1008.
- 加藤公彦・花田 薫 (1999) 日本に発生したトマトトマト黄化えそウイルス (TSWV) によるキク (*Chrysanthemum morifolium* Ramat.) えそ病. *九病虫研究会報* 45 : 61-65.
- Kato, K., K. Hanada and M. Kameya-Iwaki (2000) Melon yellow spot virus: A distinct species of the genus *Tospovirus* isolated from melon. *Phytopathology* 90 : 422-426.
- 黒田智久・勝部和則・鈴木一実 (2000) トマト黄化えそウイルス (TSWV) によるトルコギキョウ (*Eustoma grandiflorum* (Raf.) Shinn.) 黄化えそ病. *九病虫研究会報* 46 : 61-65.
- Lawson, R. H., M. M. Dienelt and H. T. Hsu (1997) The cytopathology of tospovirus-host-plant interactions. *Acta. Horticult.* 431 : 267-290.
- Moyer, J.W. (1999) Tospoviruses (*Bunyaviridae*). In: *Encyclopedia of virology* 3rd edition eds. R. Webster and A. Granoff. Academic Press : pp. 1803-1807.
- 中山弘樹 (1996) バイオ実験イラストレイテッド第 3 巻 本当に増える PCR. 秀潤社 : pp. 184.
- 大貫正俊・花田 薫 (1996) RT-PCR 法を利用したサツマイモウイルス病の高感度簡易診断. *植物防疫* 50 : 102-105.
- Qiu, W.P., S.M. Geske, C.M. Hickey and J.W. Moyer (1998) Tomato spotted wilt tospovirus genome reassortment and genome segment-specific adaptation. *Virology* 244 : 186-194.
- Saitou, N. and M. Nei (1987) The neighbor-joining method : a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4 : 406-425.
- 高橋義行・高橋吉幸・小田九二夫・河野敏郎 (1999) トマト黄化えそウイルス (TSWV) によるアルストロメリア黄化えそ病 (新称). *関東東山病虫研報* 46 : 77-79.
- 谷名光治・井上幸次・伊達寛敬・奥田 充・花田 薫・那須英夫・粕山新二 (2001) インパチエンスネクロティックスポットウイルス (INSV) によるシネラリアえそ斑紋病. *日植病報* 67 : 42-45.
- 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.* 24 : 4876-4882.
- Van Regenmortel, M.H., C.M. Fauquet, D.H.L. Bishop, E.B. Cartstens, M.K. Estes, S.M. Lemon, J. Maniloff, M.A. Mayo, D.J. McGeoch, C.R. Pringle and R.B. Wickner eds. (2000) Family *Bunyaviridae*. In: *Virus Taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses: Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Academic Press : pp. 1162.