

# 第1章 緒言

## 第1節 本研究の背景

テンサイ (甜菜, *Beta vulgaris* var. *saccharifera* Alefeld) は、アカザ科の二年生植物で、サトウキビに次いで世界の二大糖料作物をなし、世界の全砂糖生産高の約3割を占める。冷涼な気候を好むが、広域適応性を有し、FAOによると1998年には世界53カ国で栽培されており、その多くは北半球の国々である。日本では北海道でのみ作付されている日本の砂糖自給作物で、製糖原料として1880年には一般栽培が開始された。作付面積は1980年以降7万ha前後で推移し、畑作物作付面積の約1/4を占め、畑作農業における輪作体系の基幹作物となっている。1986年に、それまでのテンサイの根重による取引に変わって根中糖分による糖分取引制度が導入され、テンサイに高糖分、高品質、耐病性、多収性が求められることとなった。

テンサイの病害としては、30種類以上が日本有用植物病名目録に記載されている。テンサイそう

(叢)根病はテンサイの重要病害の一つで(阿部, 1987; Asher, 1993)、ビートえそ(壊疽)性葉脈黄化ウイルス(*Beet necrotic yellow vein virus* (BNYVV))の感染によって起こる(Tamada and Baba, 1973; Tamada, 1975)。以下の詳細は第2章「研究史」に譲るが、BNYVVはPlasmodiophorales(ネコブカビ科)に属する*Polymyxa betae*によって伝搬される(Tamada, 1975)。罹病テンサイは、根が肥大せず、主根および側根から細根が異常に増加(そう生)するそう根症状を示し(神沢・宇井, 1972)、多発すると著しい減収をもたらす、軽い場合でもテンサイの根中糖分を低下させる(宇井, 1973; 阿部, 1987)。ウイルスを保毒した*Polymyxa*菌が土壤中で10年以上生存し、また、発病により糖分が減少して直接経済的被害が生ずるため、北海道でもテンサイ栽培農家に大きな損失を与えている(阿部, 1987)。テンサイそう根病は、1950年代にイタリアで初めて発見され、その後、日本、ヨーロッパ、ロシア、中国、アメリカの各地で発生が確認されている(Asher, 1993)。汚染圃場の対策として、pH低下処理や土壌消毒が有効とされ、また、抵抗性品種が開発されているが、適用範囲は限られている(阿部, 1987; Asher, 1993)。

BNYVVは、分子量22kdaの外被タンパク質と一本鎖プラスセンスRNAから成る桿状ウイルスである(

Richards and Tamada, 1992)。ウイルス粒子の形態、媒介菌、遺伝子構成から*Furovirus* (fungus-transmitted rod-shaped virus)に含められていたが、遺伝子構造等の違いから、別属の*Benyvirus*として独立した(Torrance and Mayo, 1997; Tamada, 1999)。BNYVVのRNAは、大きさの順にRNA-1~RNA-5と名づけられている(Richards and Tamada, 1992)。ウイルスRNAは、5'末端にキャップ構造、3'末端にポリA配列をもつ(Putz *et al.*, 1983)。5'末端8~9塩基と3'末端の約70塩基に高い相同性が認められている(Bouzoubaa *et al.*, 1987)。RNA-3, RNA-4, RNA-5は、それ自身では複製することができず、これらのRNAが複製し粒子形成されるためにはRNA-1とRNA-2が必要である(Bouzoubaa *et al.*, 1985; Koenig *et al.*, 1986; Tamada *et al.*, 1989; Richards and Tamada, 1992)。RNA-1とRNA-2はすべての寄主に共通のhouse keeping機能を持ち、ウイルスの感染・増殖に必須であるのに対して、RNA-3とRNA-4は自然感染の過程で重要な役割を分担していると考えられる。すなわち、RNA-3およびRNA-4は野外分離株に常に存在し、発病とウイルスの伝搬に必要なものである(Koenig *et al.*, 1986; 1989; Kusuzala *et al.*, 1986; Tamada *et al.*, 1989)。RNA-5は、日本で初めて発見され、中国とヨーロッパの一部の分離株からも見つかっている(Tamada *et al.*, 1989; Koenig *et al.*, 1997; Miyanishi *et al.*, 1999)。

## 第2節 本研究の目的

本研究は、日本産BNYVVについて、ウイルスの病原性や伝搬性の遺伝子レベルの解析と遺伝子診断への応用を目的として、1987年よりBNYVVの遺伝子解析と遺伝子診断に取り組んできた。第3章「BNYVVの遺伝子解析」で述べるように、北海道産のS分離株について全塩基配列を決定し(Saito *et al.*, 1996; Kiguchi *et al.*, 1996)、また、維持・増殖中の室内分離株あるいは野外分離株に検出される欠変異について、変異RNAの塩基配列を解析した。次に、第4章「形質転換によるウイルス抵抗性植物の作出」で述べるように、近年進んでいる遺伝子工学的手法による抵抗性植物の作出を試みた。テンサイへの遺伝子導入は困難なため、遺伝子導入が比較的容易な検定植物 *Nicotiana benthamiana* を用い、BNYVVの移行タンパク質である triple gene block (

TGB) の遺伝子が抵抗性遺伝子として機能するかどうかを調べた。さらに、第5章「遺伝子診断」で述べるように、ウイルス RNA を特異的に検出する方法を確立した。なかでも、RNA-5 を含む分離株を識別するための診断法について検討した。まず、得られた cDNA クローンを非放射性的のジゴキシゲニンにより標識してウイルス RNA を検出する方法を検討し、野外分離株および室内分離株の RNA 組成を解析した (Saito *et al.*, 1997)。さらに、多サンプルの検定が可能で簡便な手法として RT-PCR (reverse transcription and polymerase chain reaction) による検出法を確立した。特に RNA-5 の検出法を確立し、北海道内における RNA-5 の分布を明らかにした。

し上げる。

### 第3節 謝辞

本研究のとりまとめに当たり、北海道立中央農業試験場生物工学部長玉田哲男博士 (現岡山大学資源生物科学研究所教授) には、テンサイそう根病ウイルスについての研究テーマをいただいたのに始まって、継続してご指導、ご助言、ご鞭撻を賜り、ご校閲をいただいた。北海道大学大学院農学研究科教授上田一郎博士には、有益なご指導、ご助言、ご校閲を賜った。北海道大学大学院農学研究科教授伴戸久徳博士、同教授増田税博士には懇切なご助言、ご校閲を賜った。北海道立中央農業試験場生物工学部遺伝子工学科の木口忠彦研究員、楠目俊三研究員および同場細胞育種科研究員原田竹雄博士 (現弘前大学農学部助教授) には、共同研究者として多大なご協力をいただいた。同場生物工学部遺伝子工学科の紙谷元一科長をはじめ生物工学部各位には、研究遂行上種々の便宜をおはかりいただきご協力をいただいた。同場遺伝子工学科臨時職員各位には、本研究遂行上、技術面のご助力をいただいた。さらに、「放射性同位元素を用いない遺伝子の検出法に関する研修」では、北海道大学薬学部元教授大塚栄子博士 (現北海道大学名誉教授) には遺伝子実験の基礎を教えていただいた。これらの方々のご尊名に付した所属・肩書きは、現職を付記しなかった場合を含め、それぞれのご恩義にあずかった当時のものである。

本報告を出版するにあたり、北海道立中央農業試験場農産工学部長村上紀夫博士、同場クリーン農業部長尾崎政春博士、北海道立北見農業試験場生産研究部長田村修博士には、ご助言、ご指導を賜った。

これらの方々に対し、ここに記して心からお礼申

## 第2章 研究史

### 第1節 テンサイそう根病概説

テンサイそう根病はテンサイの根に異常を起こす病気である(神沢・宇井, 1972; Tamada, 1975)。1950年代のイタリアでの発見以来, rhizomaniaと呼ばれて長い間原因不明の土壤病とされていたが(Asher, 1993), のちにこの病気がビートえそ性葉脈黄化ウイルス (*Beet necrotic yellow vein virus* (BNYVV)) の感染によって起こることが証明された(Tamada and Baba, 1973)。以後, そう根病は発生地域が拡大, 日本では, 1965年に北海道十勝支庁管内で発見され(増田ら, 1969), その後北海道各地に広がり, テンサイ圃場の20%以上が本病に汚染されている(阿部, 1987)。BNYVVは *Plasmodiophorales* (ネコブカビ科) に属する *Polymyxa betae* によって伝搬され(Tamada, 1975), ウイルス粒子は媒介菌である *P. betae* の遊走子, 休眠胞子の内部に存在し, 菌が根に感染する際にうつされると考えられている(Abe and Tamada, 1986)。ウイルスに感染したテンサイの主根を垂直に切ると, 導管の中央部分が褐変している(Asher, 1993)。ウイルスが根部から葉へ移行すると, 葉は葉脈が黄化し, えそが生じるが, この葉脈黄化の症状は自然感染では稀にしかみられない(Tamada and Baba, 1973)。汚染圃場の対策として, pH低下処理や土壤消毒が有効とされているが, 経済・環境上の問題から, 適用範囲は限られている(阿部, 1987; Asher, 1993)。また, 抵抗性品種が育成され導入されているが, 感受性の従来品種より収量性は劣る(Asher, 1993; 三浦, 1997)。

### 第2節 BNYVVの遺伝子構造

BNYVVフランス産分離株 (BNYVV-F2) のRNA-1~RNA-4の全塩基配列が決定され(Bouzoubaa *et al.*, 1985; 1986; 1987), さらに, 試験管内転写系が確立され, 機能解析が進められてきた(Richards and Tamada, 1992; Gilmer *et al.*, 1992a; 1992b; 1993; Jupin *et al.*, 1992; Schmitt *et al.*, 1992; Hehn *et al.*, 1995)。また, 日本産, 中国産およびフランス産分離株に含まれているRNA-5の塩基配列が決定された(Kiguchi *et al.*, 1996; Koenig *et al.*, 1997; Miyanishi *et al.*, 1999)。ウイルスRNAは, 5'末端にキャップ構造, 3'末端にポリA配列をもつ(Putz *et al.*, 1983)。BNYVVのRNA-1~RNA-5の3'末端の約70塩基は

相同性の高い領域(Aドメイン)で, この領域はダブルヘアピン構造をとる(Jupin *et al.*, 1990)。Aドメインの上流には, RNA-3, RNA-4, RNA-5では約150塩基の相同な領域(BおよびCドメイン)が, RNA-1とRNA-2には約100塩基の相同な領域(D, EおよびFドメイン)が認められる(Jupin *et al.*, 1990)。

BNYVVのRNA-1~RNA-5の遺伝子産物と性質および機能の一覧を表1に示した。

RNA-1 (6746塩基) は237kのタンパク質(P237)をコードしている(Bouzoubaa *et al.*, 1987)。RNA-2 (4612塩基) は6個のタンパク質をコードしている(Bouzoubaa *et al.*, 1986)。最も上流には外被タンパク質(CP (coat protein)) がコードされている。CPとフレームの合う54kの読み枠がアンバー終止コドンをはさんで存在し, *in vitro*でも, *in planta*でも, 翻訳の際にサブプレッションを受け, CPの読み過ぎタンパク質(P75)が翻訳される(Richards and Tamada, 1992)。このP75は, ウイルス粒子の一方の端に存在することが示されている(Haerberle *et al.*, 1994)。続いて, 42k (P42), 13k (P13), 15k (P15), 14k (P14)のタンパク質がコードされている。P14はZinc-fingerをもち, システインに富むタンパク質で, Bovine papilloma virusのE6タンパク質と相同性が認められている(Koonin *et al.*, 1991)。

RNA-3 (1773塩基) は25kのタンパク質(P25), RNA-4 (1467塩基) は31kのタンパク質(P31), RNA-5 (1342~1347塩基) は26kのタンパク質(P26)をそれぞれコードしている(Bouzoubaa *et al.*, 1985; Kiguchi *et al.*, 1996)。

### 第3節 BNYVVの遺伝子の機能

RNA-1にコードされているP237には, メチルトランスフェラーゼ・モチーフ, ヘリカーゼ・モチーフ, RNA依存RNAポリメラーゼに保存されているモチーフ配列が認められる(Bouzoubaa *et al.*, 1987; Koonin and Dolja, 1993)。これらのモチーフから, RNA-1は複製に関与しているとされている(Bouzoubaa *et al.*, 1987; Richards and Tamada, 1992)。

RNA-2にコードされているP75の読み過ぎし部分は菌による伝搬に必須で, 菌伝搬性を支配する決定因子(Tamada and Kusume, 1991) およびウイルス粒

表1 BNYVV RNA の遺伝子産物と性質および機能

RNA種 <sup>1)</sup> (塩基数)	遺伝子産物 <sup>1)</sup> (タンパク質)	性 質	機 能	文 献
RNA-1 (6746b)	P237	メチルトランスフェラーゼ・モチーフ ヘリカーゼ・モチーフ GDDモチーフ	複製	Bouzoubaa <i>et al.</i> (1987) ; Koonin and Dolja (1993) ; Richards and Tamada (1992)
RNA-2 (4612b)	P21	P21の読み過ぎタンパク質 粒子の一方の端に存在	外被タンパク質 (CP)	Bouzoubaa <i>et al.</i> (1986)
	P75		菌伝搬性・粒子形成	Tamada and Kusume (1991) ; Richards and Tamada (1992) ; Schmitt <i>et al.</i> (1992) ; Haerberle <i>et al.</i> (1994) ; Tamada <i>et al.</i> (1996b)
	P42	ヘリカーゼ・モチーフ	細胞間移行	Bouzoubaa <i>et al.</i> (1986) ; Gilmer <i>et al.</i> (1992a) ; Koonin and Dolja (1993)
	P13	Zinc-finger <i>in vitro</i> で亜鉛イオンに結合 システイン豊富	細胞間移行	Bouzoubaa <i>et al.</i> (1986) ; Gilmer <i>et al.</i> (1992a)
	P15		細胞間移行	Bouzoubaa <i>et al.</i> (1986) ; Gilmer <i>et al.</i> (1992a)
P14	RNA-2転写量とCP発現量の制御		Niesbach-Kloesgen <i>et al.</i> (1990) ; Koonin <i>et al.</i> (1991) ; Hehn <i>et al.</i> (1995)	
RNA-3 (1773b)	P25		病原性 (そう根症状) ・ ウイルスの増殖・ 抵抗性品種の根におけるウイルス 増殖抑制	Tamada <i>et al.</i> (1989; 1990; 1999) ; Koenig <i>et al.</i> (1991) ; Jupin <i>et al.</i> (1992)
RNA-4 (1467b)	P31		菌伝搬性の効率化	Tamada and Abe (1989)
RNA-5 (1342~1347b)	P26		病原性 (粗皮症状)	Tamada <i>et al.</i> (1989; 1996a)

1) RNA-1~RNA-4の塩基配列 : Bouzoubaa *et al.* (1985; 1986; 1987) ; RNA-5の塩基配列 : Kiguchi *et al.* (1996)

子形成に必要な領域 (Schmitt *et al.*, 1992) がある。Tamada *et al.* (1996b) は、P75のC末端側のKTERモチーフが菌伝搬に重要な役割を果たしていることを明らかにした。RNA-2のほぼ中央にコードされているP42, P13, P15はトリプル・ジーン・ブロック (TGB) とよばれ、*Hordeivirus*に属する*Barley stripe mosaic virus* (BSMV), *Potexvirus*, *Carlavirus*など他の桿状ウイルスにも見つかっており、ウイルスの細胞間移行に関与している (Richards and Tamada, 1992; Mushegian and Koonin, 1993)。TGBの間には、部分的に相同性が認められる (Morozov *et al.*, 1989)。Gilmer *et al.* (1992a) は、BNYVVにおいてもTGBがウイルスの移行に関与していることを示した。RNA-2の3'末端側にコードされているP14は、*in vitro*で亜鉛イオンに結合する (Niesbach-Kloesgen *et al.*, 1990)。Hehn *et al.* (1995) は、P14がRNA-2の複製量とCPの発現量の制御に関与していることを明らかにした。P14と同様にシステインに富むタンパク質は、いくつかの植物RNAウイルスに共通にみられ、亜鉛イオンを介してウイルスか植物細胞の核酸と相互作用していると考えられている (Koonin *et al.*, 1991)。

RNA-3は、テンサイにそう根症状を起こし、感染が起こった根でのウイルスの増殖を促進する (Tamada *et al.*, 1990; 1999; Koenig *et al.*, 1991)。また、全長のRNA-3は、検定植物ツルナの接種葉の黄色斑形成、*Beta macrocarpa*における全身感染にも関与している (Tamada *et al.*, 1989; 1990)。さらに、RNA-3は、抵抗性品種の根におけるウイルスの増殖抑制にも関与している可能性が示されている (Tamada *et al.*, 1999)。検定植物での黄色斑形成にはP25の発現に関与しているが、P25のORFの大部分が欠失してわずか11~67塩基しか残っていない変異でも病斑が形成される (Jupin *et al.*, 1992)。この場合の病斑は、黄色斑ではなくえそ斑である (Jupin *et al.*, 1992)。この変異では、P25のORFが正常に発現する場合には抑えられている177塩基 (1052~1228塩基) のORF (N gene) が発現すると考えられている (Jupin *et al.*, 1992)。RNA-4は、*P. betae*菌による伝搬の効率を高める機能をもつ (Tamada and Abe, 1989)。RNA-5はRNA-3と同様根の病徴を強める機能をもつが、その病原性はRNA-3とは異なり、テンサイに粗皮症状を起こす (Tamada *et al.*, 1989; 1996a)。

Jupin *et al.* (1990) および Gilmer *et al.* (1992b)

は、RNA-3とRNA-4の複製に必要な *cis*領域について解析している。その結果によると、BNYVVのポリAの前の67塩基 (ドメインA) およびRNA-3の5'末端側約300塩基とRNA-4の5'末端側約400塩基は複製に必須で、この部分が欠失すると複製が起こらない。しかし、この両末端の内部を人為的に欠失させても各RNAは十分複製する (Jupin *et al.*, 1990; Gilmer *et al.*, 1992b)。また、RNA-3の5'末端には、8~10塩基の相補的な配列が3組存在し (Gilmer *et al.*, 1992b)、これらの配列がステムとなって5'末端の約300塩基が安定な二次構造をとり、この二次構造が複製に重要であることが示された (Gilmer *et al.*, 1993)。しかし、RNA-4については、このような二次構造はみられない (Gilmer *et al.*, 1992b)。RNAの3'末端のドメインAの67塩基は、すべて、同様の二次構造をとると考えられている (Jupin *et al.*, 1990)。

#### 第4節 BNYVVの変異

BNYVVの分離株の間には、血清学的な違いは見つかっていない (Kuszala *et al.*, 1986; Torrance *et al.*, 1988; Tamada, 1999)。しかし、Kruse *et al.* (1994)、Koenig *et al.* (1995) は、BNYVVのRNA-1~RNA-4のRT-PCR産物のRFLP (restriction fragment length polymorphism)・SSCP (single-strand conformation polymorphism) 解析から、ヨーロッパを中心とした地域の分離株が大きく2つのグループ (A型, B型) に分けられることを示した。A型は、アジア, アメリカ, ヨーロッパに広く分布しているのに対して、B型は、ドイツ・フランスの限られた地域に分布している (Kruse *et al.*, 1994; Koenig *et al.*, 1995)。Koenig *et al.* (1995) は、さらに、中国の分離株 (C型) およびフランスのPithivierから分離されたRNA-5を含む分離株 (P型) を別のグループに分けた。Miyanishi *et al.* (1999) は、日本, 中国およびフランスの分離株に含まれるRNA-5を解析し、アミノ酸配列から、3つのグループ、すなわち、大部分の日本産分離株と中国産分離株、一部の日本産分離株、フランス産分離株に分けた。

#### 第5節 形質転換によるウイルス抵抗性植物の作出

近年、遺伝子工学的な手法により、多くのウイルス抵抗性植物の作出が報告されており、用いられる遺伝子は、ウイルス遺伝子、酵母由来の遺伝子など多岐にわたっている (石田・小川, 1997)。ウイル

ス由来の遺伝子を導入したウイルス病抵抗性の植物が多くのウイルス病-植物の系で作出されており、植物ウイルスのどの部分でも潜在的に pathogen-derived resistance (PDR) になり得ると考えられている (Wilson, 1993 ; Lomonosoff, 1995 ; Baulcombe, 1996)。病原体自身の遺伝子による抵抗性の付与を植物ウイルスで最初に証明したのは Powell-Abel *et al.* (1986) で、*Tobacco mosaic virus* (TMV) の外被タンパク質を導入したタバコが発病の遅延を示した。その後、ウイルスの外被タンパク質 (Hackland *et al.*, 1994) に加えて、複製酵素, プロテアーゼ, 3' 非翻訳領域, defective interfering (DI) RNA の遺伝子を用いてウイルス抵抗性の植物が作られている (Lomonosoff, 1995)。また、移行タンパク質 (movement protein (MP)) によるウイルス抵抗性の植物も報告されている (Malysenko, 1993; Lapidot *et al.*, 1993 ; Beck *et al.*, 1994 ; Cooper *et al.*, 1995 ; Seppanen *et al.*, 1997)。

BNYVVでは、CP遺伝子を導入したテンサイがプロトプラストレベルでウイルス抵抗性を示したという報告 (Kallerhoff *et al.*, 1990) 以来、CP遺伝子導入によるそう根病抵抗性テンサイ作出の研究が進められている。Bartsch *et al.* (1996) は、2年間にわたって形質転換体の圃場試験を実施したが、従来の抵抗性品種に優る結果は得ていない。Mannerloef *et al.* (1996) の報告では、CP遺伝子を導入した植物体は非形質転換体に比べて明らかにウイルス蓄積量が少なかった。また、Fecker *et al.* (1997) は、BNYVVのCPの抗体遺伝子を導入した *Nicotiana benthamiana* ではウイルスの感染が遅れることを示した。

## 第6節 ウイルスの検出・診断

テンサイそう根病は土壌伝染性病害のため、防除対策上、圃場の土壌診断が重要である。この診断により発病圃場の早期発見, 病土対策, 抵抗性品種作付の指導が行われる。そう根病は地上部の黄化, 地下部のそう根症状が診断の目安であるが、正確に診断するためには、テンサイの根を ELISA (enzyme-linked immunosorbant assay) 法 (Clark and Adams, 1977) で検定する手法が一般的に用いられる (Asher, 1993)。また、根におけるウイルスの存在部位を調べるためには、tissue-print 法 (Kaufmann *et al.*, 1992), immunogold-silvergold stain 法 (Scholten *et al.*, 1994) 等が用いられている。汚染土壌を検定

する場合には、被検定土壌に捕捉植物 (bait plant) を植えて2~3週間後にその根を ELISA法で検定する方法が採られている (内野ら, 1990 ; 阿部ら, 1991)。

近年、molecular hybridization あるいは PCR (polymerase chain reaction) 法 (Saiki *et al.*, 1988) によりウイルス遺伝子そのものを検出する遺伝子診断法がウイルス検出の手段として多く用いられるようになった (Miller and Martin, 1988 ; Henson and French, 1993 ; Fenby *et al.*, 1995)。遺伝子診断では、photobiotin, biotin, ジゴキシゲニン等のような非放射性標識法による検出方法が開発され、診断への応用性が高まった (Miller and Martin, 1988 ; Fenby *et al.*, 1995)。BNYVVの検出には、当初は放射性標識法が用いられ、Kuszala *et al.* (1986) および Burgermeister *et al.* (1986) は、cDNAプローブを用いて分離株のRNA組成を解析した。Lemaire and Merdinoglu (1988) は、cRNAプローブにより検出する手法を確立した。Kummert (1993) は、非放射性標識法を採用してジゴキシゲニン標識法による BNYVVの検出法を検討し、ドット・プロット・ハイブリダイゼーションで、0.4-10pgの検出感度を得た。Klyachenko *et al.* (1994) は、ELISA, <sup>32</sup>Pによる放射性標識法およびピオチン標識による検出法の三者を比較し、ピオチン標識法が診断に利用できることを示した。Rush *et al.* (1994) は RT-PCRにより BNYVVと *Beet soilborne mosaic virus* (BSBMV) とを検出する手法を確立した。Henry *et al.* (1995) は、BNYVVのRNA-2のP75の読み過ごし部分にプライマーを設定して特異性を高め、RT-PCR法により BNYVVを検出する方法を開発し、通常の ELISAの800倍の感度を得、また、土壌に植えた bait plantからの検出では、従来7週間かかっていたものを4週間に短縮した。Fenby *et al.* (1995) は、BNYVVの検出のためにプライマー等種々の条件を検討し、RT-PCRによる診断法を確立した。

## 第3章 BNYVVの遺伝子解析

### 第1節 構造解析

#### 目的

BNYVVには4種のRNAが存在し、分離株によってはさらにRNA-5が含まれている。RNA-1とRNA-2はウイルスの感染に必須ですべての寄主に共通のhouse keeping機能をもつが、他の短いRNA (RNA-3,4,5) は、検定植物に機械的接種した場合はサテライト様である (Bouzoubaa *et al.*, 1985 ; Koenig *et al.*, 1986 ; Tamada *et al.*, 1989 ; Richards and Tamada, 1992)。BNYVVのフランス産分離株F2のRNA-1~RNA-4の全塩基配列が決定された (Bouzoubaa *et al.*, 1985 ; 1986 ; 1987)。ウイルス分離株の間には血清学的な差異は認められていない (Kuszala *et al.*, 1986 ; Torrance *et al.*, 1988 ; Tamada, 1999)。しかし、Kruse *et al.* (1994) およびKoenig *et al.* (1995) は、BNYVVのRT-PCR産物の解析からBNYVVの分離株には少なくとも2つのグループ (A型とB型) があることを示した。B型はドイツ・フランスの限られた地域に分布しているが、他の大部分の分離株はA型に属する。全塩基配列が決定されたフランス産F2分離株はB型に属する。本節では、日本産 (北海道産) BNYVVの遺伝子構造を明らかにするため、BNYVVのS分離株の全塩基配列を決定し、さらに、すでに塩基配列が決定されている他の分離株と比較した。

#### 材料および方法

##### 1) ウイルス分離株, 増殖, 接種

BNYVVの野外分離株Sから局部病斑分離により得られ、北海道立中央農業試験場で継代・保存してきたBNYVV室内分離株S-3 (RNA-1+2+3), S-4 (RNA-1+2+4), S-0 (RNA-1+2), BNYVV野外分離株Dから局部病斑分離により得たBNYVV室内分離株D-5 (RNA-1+2+5), D-5a (RNA-1+2+5a) およびBNYVV野外分離株R83, S44, K79を用いた。

##### 2) ウイルスの純化とRNAの抽出

ウイルスは、接種後約2週間のツルナ *Tetragonia expansa* 接種葉から Tamada *et al.* (1989) の方法で部分純化した。すなわち、植物組織を20倍量のほう酸バッファー (0.5M ほう酸ナトリウム (pH9.0), 1mM EDTA-Na<sub>2</sub>) 中で磨砕し低速遠心し (10, 000rpm, 10分), 上清にトライトン X-100を2%にな

るように加えて混合し、超遠心して (45,000rpm, 90分), 沈澱を滅菌水に溶解し (通常, 根 1mgあたり 0.25  $\mu$ l), 部分純化ウイルス溶液とした。この溶液は、-20°Cで保存した。このウイルス溶液から、SDS-フェノール法でRNAを抽出した (Tamada *et al.*, 1989)。すなわち、2%SDS, 30mMリン酸ナトリウム (pH7.2), 1mM EDTA-Na<sub>2</sub>中で60°C5分間処理して粒子を破碎し、フェノール抽出により除タンパクし、エタノール沈澱した。

##### 3) cDNAの合成とクローニング

ウイルスRNAから、ポリA画分のRNAを精製した。cDNAは、Gubler and Hoffman (1983) の方法により、cDNA合成システム (Amerhsam) を用いて作成した。すなわち、プライマーとAMV (avian myeloblastosis virus) 逆転写酵素を用いてウイルスRNAに相補的なcDNAを合成し、大腸菌DNAポリメラーゼ I と大腸菌リボヌクレアーゼ Hによりセカンド・ストランドを合成した。プライマーには、オリゴdT, ランダムヘキサマー, 合成プライマー 2B (5'-CTACCTCACTCGACAT-3', RNA-2のnucleotides (nt) 145-161に相補的) を用いた (Fig.1-1)。cDNAは、T4DNAポリメラーゼで平滑末端化し、フェノール抽出, エタノール沈澱により精製し、プラスミドpUC19またはpUC119の *Hin* cII 部位に挿入し、大腸菌NM522に形質転換した。

##### 4) RT-PCR クローニング

RNA-1とRNA-2の5'末端側は、RT-PCRによってクローニングした (Sambrook *et al.*, 1989)。プライマーは、Fig.1-1に示すように、1A/1C, 1B/1D, 2A/2Cの組み合わせを用いた: 1A (5'-GGAGTGGCTC CAAAGCATCT-3', RNA-1のnt 61-80), 1B (5'-CCTGGTTCAAAGATGGGTACTG-3', RNA-1のnt 1645-1666), 2A (5'-tttAAATTCTAACTATTATC-3', RNA-2のnt 1-17, *Dra* I 認識部位を付加, ミスマッチ塩基は小文字), 1C (5'-GTCCCGTTAAATC CACTTCAAC-3', RNA-1のnt 1786-1807に相補的), 1D (5'-CCCTCTTGAATACCAGTCTGCT-3', RNA-1のnt 3257-3278に相補的), 2C (5'-ACCCCGTTCCATTTATACCC-3', RNA-2のnt 2289-2308に相補的)。ファーストストランドをファーストストランド合成キット (Amerhsam) あるいは

スーパースクリプト II (Moloney Murine Leukemia Virus 逆転写酵素, GIBCO-BRL) を用いて合成し, 94°C, 5分熱処理して逆転写酵素を失活させ, PCRを行った。PCRは, 94°C-1分, 50°C-1分, 72°C-2分, のサイクルを35回行った。PCR産物をプロテイナーゼK処理し, T4 DNAポリメラーゼで平滑末端化し, T4ポリヌクレオチドキナーゼでリン酸を付加し, SUPREC-02 (宝酒造) でプライマーを除去し, pUC119の*Hin* cII部位に挿入して大腸菌 NM522 に形質転換した。

#### 5) クローンのインサートの解析

コロニーを竹串でかきとって2×TY培地で培養し, アルカリ溶菌法により大腸菌からプラスミドDNAを調製した (Maniatis *et al.*, 1982)。インサートの大きさは, 調製したプラスミドDNAを制限酵素 (*Xba* Iと*Pst* I) で切断して調べた。あるいは, M4プライマー (5'-GTTTTCCAGTCACGAC-3') とRVプライマー (5'-CAGGAAACAGCTATGAC-3') をそれぞれ10pmol用い, 爪楊枝で大腸菌のコロニーから菌体をかき取ってPCR反応液に懸濁し, PCRにより調べた。4つのcDNAクローン (pMSD8, pMSD22, pMSD49, pMSD96) をジゴキシゲニン標識して, 第5章第1節で述べる方法でノーザン・プロット・ハイブリダイゼーションを行い, 由来のRNAを調べた。また, 得られたcDNAクローンの物理地図を作成した (Fig.1-1)。

#### 6) シーケンシング

cDNAクローンから, cDNAのインサートを制限酵素で切断して作成したサブクローンおよびキロ・シーケンス・デレーション・キット (宝酒造) を用いてexonuclease IIIとmungbean nucleaseにより作成したサブクローンを用いた (Sambrook *et al.*, 1989)。塩基配列は, ラジオアイソトープまたはDNAシーケンサーにより決定した。ラジオアイソトープ ( $\alpha$  <sup>32</sup>P-dCTP) の場合には, pUC119に添付のKO7ファージ (TAKARA) を用いて一本鎖DNAを調製し, シーケネス (東洋紡) によりシーケンシング反応を行い, 電気泳動後, ゲルを乾燥させ, オートラジオグラムを取ってラダーを目で読みとった。DNAシーケンサー (ABI, 373A) の場合には, アルカリ溶菌 (Maniatis *et al.*, 1982) によりプラスミドDNAを調製し, 蛍光プライマー・サイクル・シーケンシングキット (ABI) によりシーケンシング反応を行

い, 電気泳動し, 塩基配列データを得た。

RNAの5'末端の塩基配列は, DeBorde *et al.* (1986) の方法を改変した方法 (Kiguchi *et al.*, 1996) により決定した。プライマーには, R1, R2, R3, R4, R5aおよびR5bを用いた: R1 (5'-CGTCGTCTTAGGTGAAGTC-3' (RNA-1のnt104-122に相補的), R2 (5'-TTCTGGACGGCGGCTAC-3', RNA-2のnt113-129に相補的), R3 (5'-TTGAGACGAGGTACTTGGAT-3', RNA-3のnt111-130に相補的), R4 (5'-TCAAGGATCTACAAAGCTGA-3' (RNA-4のnt93-112に相補的), R5a (5'-CCCTTTTACTTACACTCGT-3', RNA-5のnt128-147に相補的), R5b (5'-ATTACTGCATCCAGCTCCCC-3', RNA-5のnt72-91塩基に相補的)。

#### 7) 塩基配列の解析

塩基配列は, GENETYX-MACを用いて解析した。BNYVV-SのRNA-1~RNA-4の塩基配列の一部または全部を, フランス産分離株 BNYVV-F2 (Bouzoubaa *et al.*, 1985; 1986; 1987), 中国産分離株 BNYVV-NM (Yao *et al.*, 1993), ユーゴスラビア産分離株 BNYVV-Yu2 (Kruse *et al.*, 1994) およびドイツ産分離株 BNYVV-Rg1 (Kruse *et al.*, 1994) と比較した。また, BNYVV-D5のRNA-5の塩基配列を, フランス産分離株 BNYVV-F28およびBNYVV-F72のRNA-5 (Koenig *et al.*, 1997) と比較した。RNA-1~RNA-4の全塩基配列は, フランス産分離株 F2, F13で決定されているが, F13は, F2分離株から局部病斑分離によって得られた分離株なので, 本研究では, フランス産分離株はF2とした。

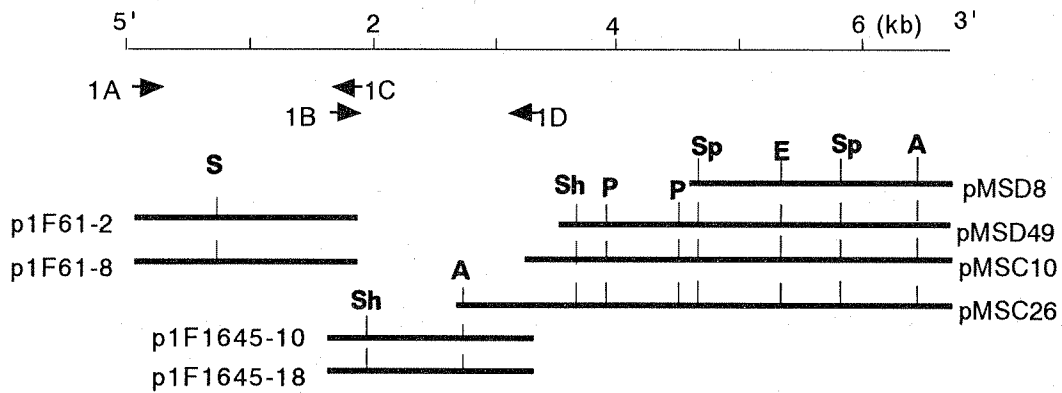
## 結果

### 1) RNA-1の解析

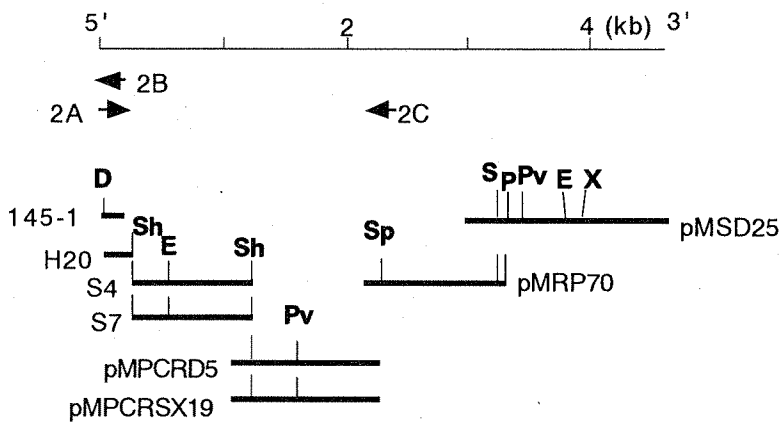
RNA-1のcDNAクローンの位置はFig.1-1Aに示す通りである。オリゴdTプライマーを用いてS-4分離株から得られたpMSD8 (2.2kbp) とpMSD49 (3.0kbp), S-3分離株から得られたpMSC10 (3.5kbp) とpMSC26 (4.0kbp) は, ノーザン解析によりRNA-1由来であることがわかった。制限酵素切断部位から, これらの4クローンはRNA-1の3'末端領域を含むと考えられた (Fig. 1-1A)。1A/1Cおよび1B/1Dの2組のプライマーを用いてRT-PCRによりS-0分離株からRNA-1の5'末端側をクローニングし, p1F61-2およびp1F61-8と, p1F1645-10およびp1F1645-18が得られた (Fig. 1-1A)。pMSD8, pMSD49, pMSC10,



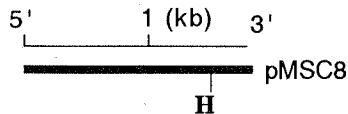
### A (RNA-1)



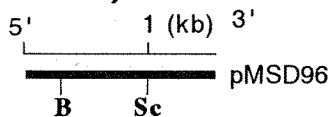
### B (RNA-2)



### C (RNA-3)



### D (RNA-4)



### E (RNA-5)

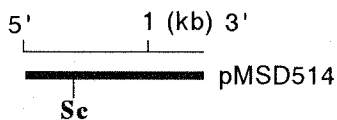


Fig. 1-1. Location of cDNA fragments used for sequencing BNYVV RNA-1 (A), RNA-2 (B), RNA-3 (C), RNA-4 (D) and RNA-5 (E). The thin lines represent the BNYVV RNAs with 3' poly(A) tail and length in kb. Arrows indicate the positions of primers, rightward-facing arrows are virus-sense primers, leftward-facing arrows are minus-sense primers. Thick lines indicate the cloned cDNA inserts. Vertical bars on the lines indicate the restriction enzyme sites. The following enzymes were used: A *Acc* I; B *Bam* HI; D *Dra* I; E *Eco* RI; H *Hap* II; P *Pma* CI; Pv *Pvu* II; S *Sac* I; Sc *Sca* I; Sh *Sph* I; Sp *Spe* I; X *Xba* I

pMSC26, p1F61-2およびp1F1645-10の各クローンから作成したサブクローンを用いて塩基配列を決定した。p1F61-8とp1F1645-18は、両末端の約400塩基を決定した。

RNA-1は6746塩基から成り、154~6480塩基に2109個のアミノ酸から成る分子量237kdaのタンパク質(P237)をコードするORFが存在していた(DDBJ accession number : D84410) (Fig. 1-2)。Fig. 1-2に示すように、P237のN末端側(216-418のアミノ酸)にメチルトランスフェラーゼドメイン(Koonin and Dolja, 1993)が、ほぼ中央(937-1176アミノ酸)にdNTP結合・ドメインとモチーフ(GXXGXGKS/T) (Koonin and Dolja, 1993)が、さらに、C末端側(AA1757-1989番目のアミノ酸)にRNA依存RNAポリメラーゼドメインとGDDモチーフ(Koonin and Dolja, 1993)が認められ、Sindbis-like supergroupのウイルスの感染に必要な非構造タンパク質(Goldbach and Wellink, 1988)にみられる領域と相同性が認められた。また、dNTP結合ドメインとRNA依存RNAポリメラーゼモチーフとの間には、papain-like cystein proteaseモチーフ(Koonin and Dolja, 1993)が認められた。

## 2) RNA-2の解析

RNA-2のcDNAクローンは、Fig. 1-1Bに示した。オリゴdTプライマーを用いてS-4分離株から得られたpMSD25 (1.7kbp)とランダムプライマーを用いてS-0分離株から得られたpMRP70 (1.0kbp)は、ノーザン解析から、RNA-2由来であることがわかった。制限酵素切断部位の解析から、これらの2クローンは部分的にオーバーラップし、RNA-2の3'末端側半分を含むと考えられた(Fig. 1-1B)。5'末端側領域をRT-PCRによりクローニングした。S-0分離株からプライマー2A/2Cを用いて得られたPCR産物をDraI・SpeIで切断してpMPCRD5 (1.2kbp)とpMPCRSX19 (1.2kbp)、DraI・SphI切断でH20 (0.2kbp)、SphI切断でS4 (0.9kbp)とS7 (0.9kbp)の各クローンが得られた。さらに、S-0分離株からプライマー2Bを用いてGubler and Hofman (1983)の方法により5'末端近傍をクローニングし、145-1 (0.2kbp)が得られた。これらのクローンは、RNA-2のほぼ全長を占めていると推測された(Fig. 1-1B)。pMPCRSX19以外のすべてのクローンから作成したサブクローンを用いて塩基配列を決定した。pMPCRSX19は、両末端の約400塩基について塩基

配列を決定した。

RNA-2は4609塩基から成り、6個のORFが存在していた(DDBJ accession number : D84411) (Fig. 1-2)。145~708塩基には22kdaの外被タンパク質(P22, CP)がコードされていた(Fig.1-2)。CPには、桿状粒子の構造タンパク質に見られるモチーフ、保存配列が認められた(Koonin and Dolja, 1993)。CPのすぐ下流には、アンバー終止コドンを経して、709~2214塩基に54kdaのORF(CPの読み過ごしとして75kのタンパク質が翻訳される)が存在していた(Fig.1-2)。2130~3281塩基には42kdaのタンパク質(P42)、3284~3637塩基に13kdaのタンパク質(P13)、3624~4019塩基に15kdaのタンパク質(P15)がコードされていた(Fig.1-2)。これら3つのタンパク質は、配列相同性の解析から Bouzoubaa *et al.* (1986)の提唱するトリプル・ジーン・ブロックであった。P42 (118~347アミノ酸)には、dNTP結合・ドメインとモチーフ(Koonin and Dolja, 1993)が認められた(Fig.1-2)。4035塩基から4420塩基には、14kdaのタンパク質(P14)がコードされていた(Fig.1-2)。P14はシステインに富み(127個のアミノ酸のうちシステインは9個)、Zincフィンガー配列が認められた。

## 3) RNA-3の解析

RNA-3のcDNAクローンは、Fig.1-1Cに示した。BNYVVのS-3分離株(RNA-1+2+3)に含まれるRNA-3をアガロースゲルから溶出し、オリゴdTプライマーを用いてcDNAを合成し、ほぼ完全長と思われる1.8kbpのクローンpMSC8およびpMSC9が得られた(Fig.1-2)。pMSC8を用いて全塩基配列を決定した。RNA-3は1774塩基から成り、445~1101塩基に25kdaのタンパク質(P25)をコードしていた(DDBJ accession number : D84412) (Fig.1-2)。

## 4) RNA-4の解析

RNA-4のcDNAクローンは、Fig.1-1Dに示した。オリゴdTプライマーを用いてS-4分離株から得られたpMSD22 (1.1kbp)は、ノーザン解析によりRNA-4由来であることが分かった。これをプローブとしてドット・プロット・ハイブリダイゼーションによりS-4分離株由来のcDNAクローンをスクリーニングし、ほぼ完全長のクローンpMSD96 (1.5kbp)が得られ(Fig.1-1D)、これを用いて全塩基配列を決定した。RNA-4は1465塩基から成り、377~1222塩基

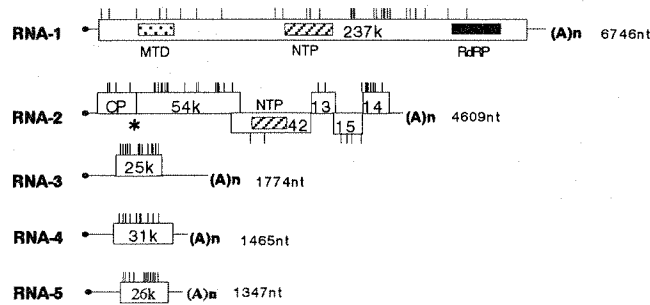


Fig. 1-2. Genetic map of RNA-1, -2, -3, -4 and -5 of BNYVV of Japanese isolates and dissimilarity of amino acids between Japanese and French isolates. The boxes indicate ORFs and the asterisk indicates a readthrough amber termination codon. Vertical bars on the ORFs indicate the positions of amino acid residues of BNYVV of Japanese isolate which are different from French isolate. Abbreviations are: cap structure at the 5' end (Cap), poly (A) tails at the 3' end ((A)n), methyl transferase domain (MTD), putative dNTP-binding domain (NTP), putative RNA-dependent RNA polymerase domain (RDRP), coat protein (CP) and amber stop codon (\*).

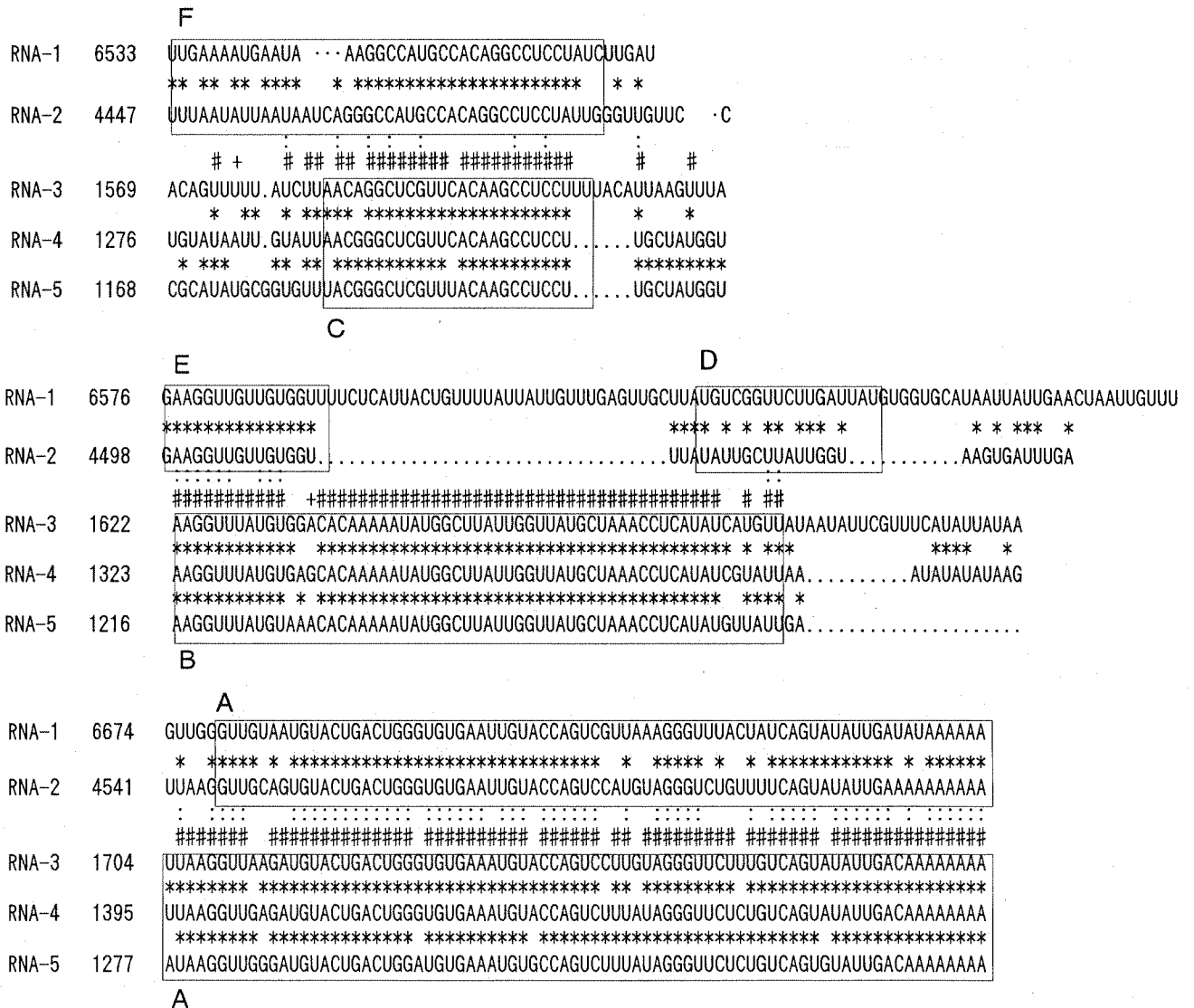


Fig. 1-3. Sequence identity at the 3' termini of BNYVV RNA-1, -2, -3, -4 and -5. (\*) Matches between RNA-1 and -2, -3 and -4 or -4 and -5; (+) matches between RNA-3 and -5; (#) positions where RNA-3, -4 and -5 sequences are identical; (:) positions where all five sequences are identical. The A, B, C, D, E and F domains of identity referred to by Jupin et al. (1990b) are boxed.

に31kdaのタンパク質 (P31) をコードしていた (DDBJ accession number : D84413) (Fig.1-2)。

#### 5) RNA-5の解析

RNA-5のcDNAクローンは、Fig.1-1Eに示した。オリゴdTプライマーを用いてD-5分離株から得られたRNA-5のほぼ完全長の2つのcDNAクローンのうちのpMSD514 (1.4kbp) を用いて全塩基配列を決定した。RNA-5は1347塩基から成り、449~1132塩基に分子量26kdaのタンパク質 (P26) をコードしていた (DDBJ accession number : D63759) (Fig.1-2)。RNA-5の塩基配列と予想されるアミノ酸配列をデータベースで比較したが、有意な相同性のある遺伝子はなく、BNYVVの新しいRNA種であった。RNA-5のP26のアミノ酸6残基 (アミノ酸154-159残基, FRGPGN) は、RNA-3の25kのアミノ酸146-151残基と相同であった。他の3分離株 (R83, S44, K79) についてもRNA-5の塩基配列を解析した (Kiguchi *et al.*, 1996 ; DDBJ accession number : D63935, D63936, D63937)。全塩基数は、1342-1347塩基であった。ORFはいずれも684塩基で、228アミノ酸から成る分子量26kのタンパク質 (P26) をコードしていた。

#### 6) RNA-1~RNA-5の5'末端および3'末端

BNYVVのRNA-1~RNA-5の5'末端の塩基配列をDeBorde *et al.* (1986) の方法を改変した方法 (Kiguchi *et al.*, 1996) で解析した結果、最初の6塩基はすべてAAAUUCであった。それに続く非翻訳領域はATに富む配列であった。

BNYVVのRNA-1~RNA-5の3'末端には、Jupin *et al.* (1990) の示した相同性の高い領域が保存されていた (Fig.1-3)。すなわち、RNA-1からRNA-5の間には、約70塩基の相同な領域 (Aドメイン) であるダブルヘアピンモチーフ (Jupin *et al.*, 1990) が、その上流には、RNA-3からRNA-5の間に約150塩基の相同な領域 (BおよびCドメイン) が、RNA-1とRNA-2との間に約100塩基の相同な領域 (D, EおよびFドメイン) が認められた (Jupin *et al.*, 1990)。

#### 7) BNYVV分離株間の塩基配列の比較

日本産分離株の全塩基配列を、フランス産分離株 (BNYVV-F2) のRNA-1~RNA-4 (Bouzoubaa *et al.*, 1985 ; 1986 ; 1987) , フランス産分離株 (BNYVV-F28, BNYVV-F72) のRNA-5 (Koenig *et al.*, 1997

) , 中国産分離株 BNYVV-NMのCP (Yao *et al.*, 1993) , ユーゴスラビア産分離株 BNYVV-Yu2のCPとTGB (Kruse *et al.*, 1994) およびドイツ産分離株 BNYVV-Rg1のTGB (Kruse *et al.*, 1994) と比較した。日本産分離株とフランス産分離株とのアミノ酸の違いをFig. 1-2に示した。

RNA-1の塩基配列を比較すると、BNYVV-SとBNYVV-F2の塩基数、ORFは同一で、塩基配列の違いは1.7%であった。また、P237の塩基配列の違いは1.6%、アミノ酸配列の違いは1.4%であった。メチル・トランスフェラーゼ・モチーフ、ヘリカーゼ・モチーフ、RNA依存RNAポリメラーゼモチーフの活性部位には、アミノ酸の置換はなかった。アミノ酸の置換頻度は、ヘリカーゼ・モチーフとRNA依存RNAポリメラーゼ・モチーフとの間の領域で比較的高かった (Fig. 1-2)。

RNA-2の塩基配列を比較した。BNYVV-SのRNA-2 (4609塩基) はBNYVV-F2より3塩基短かった。この3塩基の違いは、BNYVV-F2の54k ORFの2011塩基から2013塩基までの欠失によるものであった。また、BNYVV-F2の4038塩基のCが、BNYVV-SではT (4035塩基) に置換して開始コドンが生じたため、BNYVV-Sの14kORFは、2アミノ酸多かった。RNA-2の塩基配列の違いは4.1%であった。BNYVV-SとBNYVV-F2とのRNA-2のアミノ酸の置換の頻度は、P42とP13で比較的低く、54k ORFとP14で比較的高かった (Fig.1-2)。各遺伝子別に具体的に比較すると次の通りである。

CP (564塩基) の塩基配列の違いは、BNYVV-SとBNYVV-F2との間で20塩基 (3.5%) , BNYVV-SとBNYVV-Yu2との間で4塩基 (0.7%) , BNYVV-SとBNYVV-NMとの間で8塩基 (1.4%) であった (Table 1-1)。BNYVV-SとBNYVV-Yu2の間にはアミノ酸配列の違いはなかった (Table 1-1)。これに対して3~5アミノ酸の違いが他の分離株との間に認められ、BNYVV-SとBNYVV-F2との間で4アミノ酸 (2.1%) , BNYVV-SとBNYVV-NMとの間で5アミノ酸 (2.7%) 異なっていた (Table 1-1)。BNYVV-SのCPは、BNYVV-F2よりBNYVV-Yu2と非常によく似ていた。また、BNYVV-F2とBNYVV-NMの間にも違いが認められた。

54k ORF (1506塩基) の塩基配列の違いは、BNYVV-SとBNYVV-F2との間で5.7%、アミノ酸配列の違いは3.4%であった。

P42 (1152塩基) の塩基配列の違いは、BNYVV-S

Table 1-1 Differences of nucleotide and amino acid sequences of coat protein gene and the triple gene block of RNA-2 among BNYVV-S, -F2, -NM, -Rg1 and -Yu2<sup>a)</sup>

Gene	Number of nucleotides	Number of amino acids	BNYVV isolate	F2	NM	Rg1	Yu2
CP	564	188	S	20 (4) <sup>b)</sup>	8 (5)	—	4 (0)
			F2	—	19 (3)	—	20 (4)
			NM	—	—	—	10 (5)
P42	1152	384	S	34 (2)	—	34 (2)	9 (2)
			F2	—	—	0 (0)	37 (2)
			NM	—	—	—	37 (2)
P13	354	118	S	12 (2)	—	11 (1)	6 (3)
			F2	—	—	1 (1)	16 (5)
			NM	—	—	—	15 (4)
P15	396	132	S	15 (4)	—	14 (4)	3 (1)
			F2	—	—	1 (0)	16 (3)
			NM	—	—	—	15 (3)
TGB total	1922	634	S	62 (8)	—	60 (7)	19 (6)
			F2	—	—	2 (1)	71 (10)
			NM	—	—	—	69 (9)

a) Sequence data for isolates: S (this paper); F2 (Bouzoubaa et al., 1986); NM (Yao et al., 1993); Rg1 and Yu2 (Kruse et al., 1994).

b) Figures show the number of nucleotide sequence differences (amino acid sequence differences).

とBNYVV-F2との間で3.0%，BNYVV-SとBNYVV-Yu2との間で0.8%，BNYVV-SとBNYVV-Rg1との間で3.0%であった（Table 1-1）。BNYVV-SのP42のアミノ酸配列は，BNYVV-F2，BNYVV-Yu2，BNYVV-Rg1いずれとも2アミノ酸（0.5%）異なっていた（Table 1-1）。P13（354塩基）の塩基配列の違いは，BNYVV-SとBNYVV-F2との間で3.4%，BNYVV-SとBNYVV-Yu2との間で1.7%，BNYVV-SとBNYVV-Rg1との間で3.1%であった（Table 1-1）。P13のアミノ酸配列の違いは，BNYVV-SとBNYVV-F2との間で1.7%，BNYVV-SとBNYVV-Yu2との間で2.5%，BNYVV-SとBNYVV-Rg1との間で0.8%であった（Table 1-1）。P15（396塩基）の塩基配列の違いは，BNYVV-SとBNYVV-F2との間で3.8%，BNYVV-SとBNYVV-Yu2との間で0.8%，BNYVV-SとBNYVV-Rg1との間で3.5%であった（Table 1-1）。P15のアミノ酸配列の違いは，BNYVV-SとBNYVV-F2との間で3.0%，BNYVV-SとBNYVV-Yu2との間で0.8%，BNYVV-SとBNYVV-Rg1との間で3.0%であった（Table 1-1）。P42，P13およびP15を含むTGB領域（1922塩基）の塩基配列を比較すると，BNYVV-SとBNYVV-Yu2との間で19塩基（1.0%），BNYVV-SとBNYVV-F2との間で62塩基（3.2%），BNYVV-SとBNYVV-Rg1との間で60塩基（3.1%），BNYVV-F2とBNYVV-Rg1との間で2塩基（0.1%）異なっていた（Table 1-1）。すなわち，TGB領域では，BNYVV-SとBNYVV-Yu2とはBNYVV-F2よりよく似ていた。

P14（387塩基）の塩基配列を比較すると，BNYVV-SとBNYVV-F2との違いは4.4%，アミノ酸配列の違いは7.0%であった。

RNA-3の塩基配列を比較すると，BNYVV-SのRNA-3（1774塩基）はBNYVV-F2より1塩基長かった。これは，3'非翻訳領域の1塩基の挿入によるものであった。塩基配列の違いは2.9%，P25の塩基配列の違いは3.8%，アミノ酸配列の違いは6.4%であった。

RNA-4の塩基配列を比較すると，BNYVV-SのRNA-4（1465塩基）はBNYVV-F2のRNA-4より2塩基短かった。BNYVV-Sは，5'非翻訳領域に4塩基，3'非翻訳領域に3塩基の欠失，5'非翻訳領域に1塩基，3'非翻訳領域に4塩基の挿入が認められた。塩基配列の違いは3.6%，P31の塩基配列の違いは2.8%，アミノ酸配列の違いは3.5%であった。

RNA-5については，日本産分離株（D-5，R83，

S44，K79）とフランス産分離株（BNYVV-F28）とを比較した。4種の日本産分離株（D-5，R83，S44，K79）のRNA-5は，互いにかなり似ていたが，S44とK79は，挿入・欠失があり，他の2つとわずかに異なっていた。D-5とR83との違いは4塩基で，そのうちの1つがアミノ酸の置換を伴った。D-5とS44とは12塩基異なり，そのうちの3塩基はアミノ酸の置換を伴っていた。D-5とK79とは11塩基異なり，アミノ酸の置換は2個であった。それに対して，日本産分離株（D-5）とフランス産分離株F28（Koenig *et al.*, 1997）を比較すると，塩基数はほぼ同一であったが，5'非翻訳領域に1塩基の挿入と13塩基の欠失が認められ，P26には12塩基（4アミノ酸）の欠失が認められた。BNYVV-F28では，446塩基めのGからAへの置換によりアミノ酸がメチオニンとなり，N末端側に1アミノ酸付加されていた。塩基配列の違いは3.6%で，P26の塩基配列の違いは3.7%，アミノ酸配列の違いは4.8%であった。また，D-5分離株のRNA-5は，BNYVV-F28（Koenig *et al.*, 1997）より1塩基短く，5'非翻訳領域に2塩基の挿入と13塩基の欠失，26kORFに12塩基の欠失が認められた。塩基配列の違いは3.5%で，P26の塩基配列の違いは3.4%，アミノ酸配列の違いは3.9%であった。

## 論議

本研究では、日本産のBNYVV分離株のゲノム構造を明らかにするためにS分離株 (BNYVV-S) に含まれるRNA-1~RNA-4, D-5分離株および3種の野外分離株に含まれるRNA-5の塩基配列を決定した。その結果、RNA-1は6746塩基で、237kdaのタンパク質 (P237) をコードする一つのORFを有していた。P237にはN末端側からメチルトランスフェラーゼ・ドメイン, dNTP結合・ドメイン, ポリメラーゼ・ドメインが認められた。RNA-2は4609塩基で、6個のORFを有し、5'末端からORF1は21kdaの外被タンパク質 (CP), ORF2にはCPのシストロンのアンバー終止コドンからその読み過ぎタンパク質として54kdaがコードされている。これはCPとの融合タンパク質75kda (P75) として翻訳される。ORF3, 4, 5には、それぞれ42kda (P42), 13kda (P13), 15kda (P15) の、トリプル・ジーン・ブロック (TGB) と呼ばれるタンパク質がコードされていた。ORF6には、システイン豊富な14kdaのタンパク質 (P14) がコードされていた。RNA-3は1774塩基で、25kdaのタンパク質 (P25), RNA-4は1465塩基で、31kdaのタンパク質 (P331), RNA-5は1347~1342塩基で、26kdaのタンパク質 (P26) をそれぞれコードしていた。RNA-1~4の遺伝子構造は、すでに報告のあるフランス産分離株F2と極めてよく似ていた。

Koenigらのグループ (Kruse *et al.*, 1994; Koenig *et al.*, 1995) は、RFLPとSSCP解析によって世界各地に分布するBNYVVを大きく2つのグループ (A型とB型) に分けた。A型にはヨーロッパのほとんどの国、アメリカ、中国、日本からの分離株が属し、B型にはフランスとドイツの分離株が属している (Kruse *et al.*, 1994; Koenig *et al.*, 1995)。さらに、フランスの一部の地域では、RNA-5を含む分離株が存在し、それをP型として区別している (Koenig *et al.*, 1995)。フランス産分離株BNYVV-F2とドイツ産分離株BNYVV-Rg1はB型、ユーゴスラビア産分離株BNYVV-Yu2と中国産分離株BNYVV-NMはA型に分類されている (Kruse *et al.*, 1994)。

BNYVV-Sの塩基配列を、全塩基配列が決定されているBNYVV-F2のRNA-1~RNA-4およびいくつかの分離株で塩基配列が決定されているCP遺伝子、TGB遺伝子の塩基配列と比較した (Table 1-1, Table 1-2)。その結果、BNYVV-Sは、BNYVV-Yu2との類似性、BNYVV-F2との違いから、A型のグ

ループに属すると考えられる。BNYVVのA型 (BNYVV-S) とB型 (BNYVV-F2) とのRNA-1~RNA-4の塩基の違いはそれぞれ、1.7%, 4.1%, 2.9%, 3.6%で、アミノ酸の置換の頻度はORFごとにさまざまであった。アミノ酸の置換を遺伝子別に比較すると、RNA-1のコードするP237は1.4%, RNA-2のコードするCPは2.1%, P42は0.5%, P13は1.7%, P15は3.0%, P14は7.0%, RNA-3のコードするP25は6.4%, RNA-4のコードするP31は3.5%あった。これは、複製、外被タンパク質、移行など、ウイルスの生存にとって必須な遺伝子では変異が比較的少なく、サテライト様であるが病原性や菌伝搬性に関与する遺伝子ではアミノ酸の置換が大きいことを示している。

Kruse *et al.* (1994) によりA型に属するとされているドイツ産G1分離株 (BNYVV-G1) は、RNA-3とRNA-4に内部欠失がある分離株である (Bouzoubaa *et al.*, 1985)。欠失領域を除いてRNA-4の塩基配列を比較すると、BNYVV-SとBNYVV-F2との間で3.4%, BNYVV-SとBNYVV-G1の間で3.0%異なっていた。これに対してBNYVV-F2とBNYVV-G1とは、異なるグループに属するのに1.5%の違いしかなく、他の分離株とのBNYVV-SのRNA-4の塩基配列の違いは、他のRNAのA型とB型との違いに匹敵するほど大きかった。ヨーロッパの分離株のそれぞれのグループ内の塩基配列の差異は非常に小さく、B型に属するBNYVV-F2とBNYVV-Rg1とのTGBの違いは2塩基 (0.1%)・1アミノ酸 (0.2%) であった (Kruse *et al.*, 1994)。また、A型に属するBNYVV-Yu2のCPの塩基配列 (Kruse *et al.*, 1994) は、ベルギー産分離株BNYVV-BOZ (Meulewater *et al.*, 1989)、チェコスロバキア産分離株BNYVV-KWS (Meulwater *et al.*, 1989) と全く同じであった。これらの違いに比べると、同じA型に属するBNYVV-SとBNYVV-Yu2, BNYVV-NMとのCPの塩基配列の違いは大きく (Table 1-1), BNYVV-SとBNYVV-G1とのRNA-4の違いはさらに大きい (Table 1-2)。BNYVVの分離株間の塩基配列の違いを明らかにするためには、異なるグループに属する多くの分離株の塩基配列の比較が必要である。

日本では、そう根病は1965年に初めて発見され、その後北海道の主要なテンサイ栽培地帯に広がっている (阿部, 1987)。塩基配列を決定した北海道産S分離株はA型に属しているので、起源はおそらくA型の存在しているヨーロッパのどこかであると考え

られる。Miyanishi *et al.* (1999) は、RNA-5を含む日本、中国およびフランスの分離株の RNA-5とCP遺伝子の塩基配列を解析し、CPの塩基配列から、日本産分離株の中にもA型の他にB型の分離株が存在することを明らかにし、P型に属するとされた2つのフランス産分離株のCPの塩基配列が、A型に非常に似ていることを示した。さらに、日本で発見されたRNA-5は、塩基配列の違いから少なくとも2つのグループに分けられ、フランス産分離株のRNA-5とは異なっているが (Miyanishi *et al.*, 1999), RNA-5はヨーロッパでは限られた地域からしか検出されていない (Koenig *et al.*, 1997)。今後、さらに多くの分離株を用いてウイルスの変異と分子進化についての研究を行う必要がある。



## 第2節 BNYVV欠失変異株の解析

### 目的

4~5種のRNAゲノムをもつBNYVVは*Polymyxa betae*によって媒介されるが、ウイルス分離株は検定植物の葉への機械的接種により増殖させることが可能である。BNYVVでは、検定植物に対して汁液による機械的接種を繰り返すと、RNA-3, RNA-4, RNA-5のどれか、あるいはすべてが欠落、または各RNAに欠失変異が生じることが報告されている (Bouzoubaa *et al.*, 1985; 1988; 1991; Kuszala *et al.*, 1986; Burgermeister *et al.*, 1986; Koenig *et al.*, 1986; Tamada *et al.*, 1989; Kiguchi *et al.*, 1996)。このような内部欠失変異は、RNA-2のコードする外被タンパク質の読み過ぎタンパク質 (P75) の読み過ぎ領域にも生じる (Tamada and Kusume, 1991)。同様の現象は、菌類で媒介される他の桿状ウイルス (*Soil-borne wheat mosaic virus* (SBWMV), *Peanut clump virus* (PCV), *Potato mop-top virus* (PMTV)) でも、一般的な現象として知られている (Shirako and Brakke, 1984; Hsu and Brakke, 1985; Manohar *et al.*, 1993; Chen *et al.*, 1994; 1995; Reavy *et al.*, 1998; Torrance *et al.*, 1999)。本研究では、北海道各地から集めた野外分離株を検定植物ツルナで継代接種を行い生じた欠失変異株について、欠失領域を特定し、欠失の分子機構を明らかにする目的でこれらのRNA分子の塩基配列の解析を行った。

### 材料および方法

#### 1) ウイルス分離株

BNYVV室内分離株として、RNA-2の欠失変異を含む分離株S-0a (RNA-1+2a), G-0b (RNA-1+2b), RNA-3の欠失変異を含む分離株S-3c (RNA-1+2+3c), T-3d (RNA-1+2+3d), およびRNA-5の欠失変異を含む分離株D-5a (RNA-1+2+5a) を用いた。

BNYVV野外分離株として、1991年に道内各地より集めた病土から回収されたウイルス分離株, SH1, O8, O11, O13, U23, H31, H34, T37, T41, S42, S43, S44, H45, H48, B52, K53, K55, S58, Y60, Y63, N64, S75, W77, K79, K80, K81, K82, R83, M87, M89, M90, N92, N98, T100, T101, T102, D104, D108, S110およびS113を用いた。各ウイルス分離株を保有したテンサイの根を接種源として、ツルナに汁液接種した。塩基配列の解析には、5回継代接種した分離株を用いた。

#### 2) ノーザン・プロット・ハイブリダイゼーション

第3章第1節で述べた方法でツルナ接種葉からウイルスを部分純化した。第5章第1節に述べる方法で、このウイルスからTSバッファーを用いて核酸を調製し、ジゴキシゲニン標識プローブを用いてノーザン・プロット・ハイブリダイゼーションを行い、発色によりシグナルを検出した。

#### 3) 変異RNAのクローニング

第3章第1節に述べた方法に従って、ウイルスを部分純化し、第5章第1節に述べる方法で、このウイルスからTSバッファーを用いて核酸を調製し、ファーストストランド合成キット (アマシャム) を用いて、変異RNAをRT-PCRによりクローニングした。プライマーは、変異RNA-2には第3章第1節でRNA-2の5'末端側のクローニングと同様2A/2Cを用いた (Fig. 2-1)。また、変異RNA-3には3B/3D, 変異RNA-4には4B/4C, 変異RNA-5には5B/5Dを10pmol用いた: 3B (5'-cgaatTCATGGGTGATATATTA-3', RNA-3のnt 445-459にEco RI認識部位を付加, ミスマッチ塩基は小文字), 3D (5'-GTGATAACTCTAA TC-3', RNA-3のnt 1099-1113に相補的), 4B (5'-ACA ACTAGTCGTGAACG-3', RNA-4のnt 647-663), 4C (5'-CCACTAATCGTGATA-3', RNA-4のnt 1214-1228に相補的), 5B (5'-ATGAAGATTAAGAC TAT-3', RNA-5のnt 635-651), 5D (5'-CGTCACAA ACGATCA-3', RNA-5のnt 1133-1147に相補的) (Fig. 2-1)。各クローンのインサートの大きさは、第3章第1節に述べた方法に従ってPCRにより調べた。

#### 4) DNAのシーケンシングと塩基配列の解析

塩基配列は、第3章第1節で述べた方法に従って、ラジオアイソトープまたはDNAシーケンサーにより決定した。1つの変異について、少なくとも2つのクローンの塩基配列を解析した。

## 結果

### 1) RNA-2の欠失変異の解析

Tamada and Kusume (1991) によって得られたRNA-2の欠失変異株S-0aとG-0bについて、欠失領域を解析した。その結果、RNA-2aは1438~1917塩基が、RNA-2bは1407~1985塩基が欠失していた (Fig. 2-1A)。欠失領域はいずれもCPの読み過ぎタン

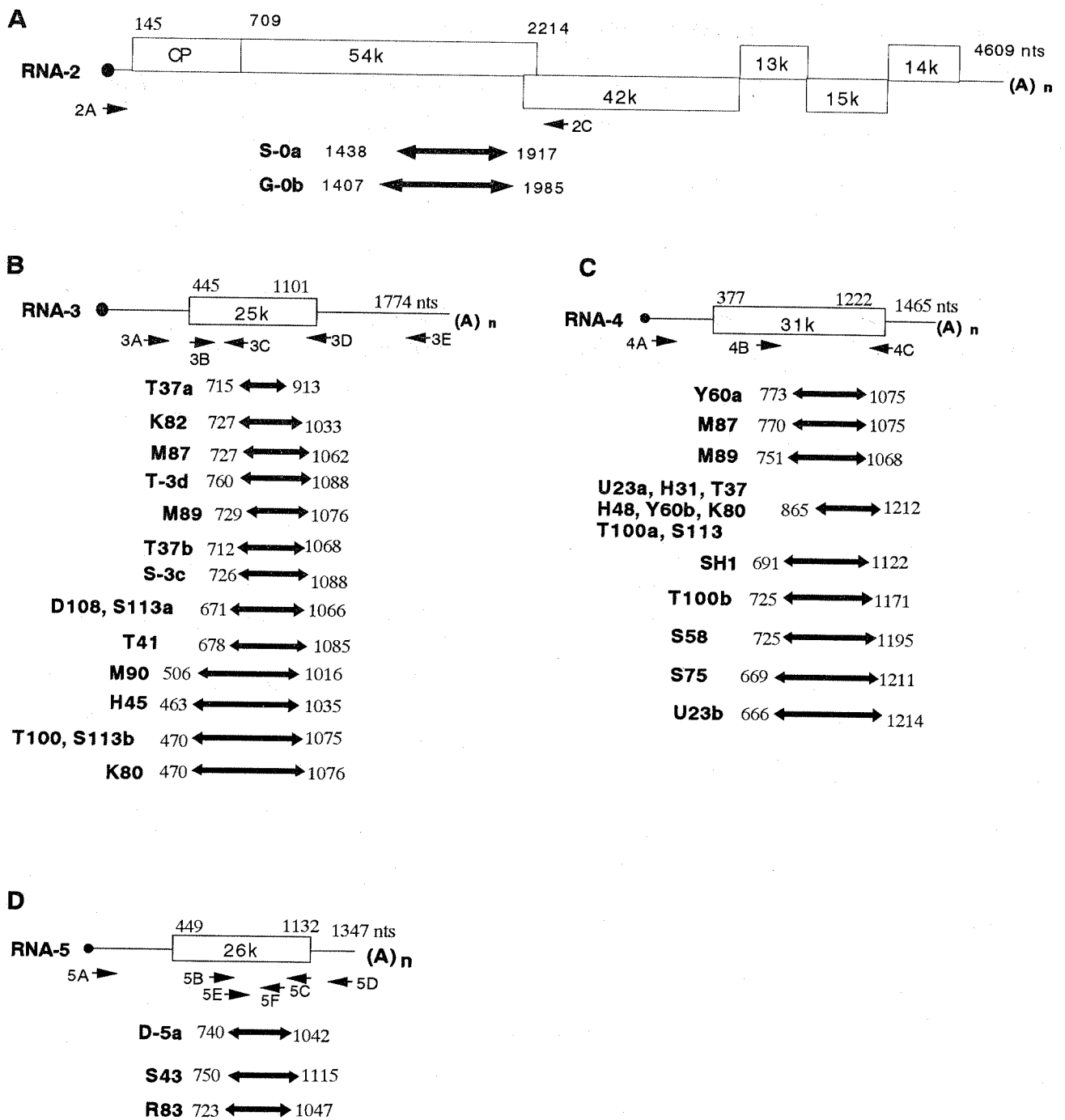


FIG. 2-1 Deleted regions of mutant RNA-2 (A), RNA-3 (B), RNA-4 (C) and RNA-5 (D). Thick bars with arrowheads indicate deleted regions and numbers indicate the nucleotide position of deleted regions. Primer positions and orientations are shown by arrows.

パク質 (54kd) のC末端側であった。

## 2) 欠失変異株の出現と検出

40株の野外分離株について、ジゴキシゲニン標識したRNA-3, RNA-4, RNA-5のcDNAプローブによりノーザン・ブロット・ハイブリダイゼーションを行った。ツルナに1回継代した各分離株のRNA組成について調べたところ、すべて完全長のRNA-3とRNA-4が検出された。また、12分離株 (SH1, S42, S43, S44, H48, K79R83, R84, T101, T102, D104およびS110) からRNA-5が検出された (Table 2-1)。しかし、T41, H45, T100からは完全長の他に短いRNA-3, R83からは短いRNA-5が検出された (Table 2-1)。これらの分離株をツルナで5回継代後、同様にハイブリダイゼーションを行った結果、12分離株 (T37, T41, H45, K55, K80, K82, M87, M89, M90, T100, D108およびS113) からは短いRNA-3が検出された (Fig. 2-2, Table 2-1)。13分離株 (SH1, U23, H31, T37, H48, S58, Y60, S75, K80, M87, M89, T100およびS113) から短いRNA-4が、2分離株 (S43およびR83) から短いRNA-5が検出された (Table 2-1)。このように、汁液接種により継代接種すると多くの分離株のRNA-3, RNA-4, RNA-5に正常より短い大きさのRNA (欠失変異) が生じることがわかった。

## 3) 変異RNAのクローニングと塩基配列の解析

室内分離株および野外分離株に含まれていた変異RNAをRT-PCRによりクローニングして塩基配列を解析した。RT-PCRでは、ノーザン・ブロット・ハイブリダイゼーションで検出されたRNAに相当する大きさのPCR産物が検出された。分離株T37およびS113は2種類の変異RNA-3を、分離株U23, Y60, T100は2種類の変異RNA-4を含んでおり、長い方をa, 短い方をbとした (Fig. 2-1B, C)。

変異RNA-3を含む室内分離株2分離株および野外分離株15分離株のうちの13分離株に含まれる変異RNA-3の塩基配列を調べた結果、69~607塩基の内部欠失が認められた (Fig. 2-1B)。欠失はP25のORF内に起こっていた (Fig. 2-1B)。11分離株 (分離株S-3c, T-3d, T37b, T41, K80, M87, M89, T100, D108, S113a, S113b) の欠失変異で欠失領域の3'側ジャンクションが1062~1088塩基に集中していた (Fig. 2-1B)。欠失領域の5'側ジャンクションは、463~470塩基 (分離株H45, T100, S113b,

K80) および712~729塩基 (分離株T37b, T37a, S-3c, K82, M87, M89) に集中していた (Fig. 2-1B)。分離株D108とS113a, 分離株T100とS113bの内部欠失RNA-3の欠失領域は、それぞれ全く同じであった (Fig. 2-1B)。また、分離株K80の内部欠失RNA-3の欠失領域は、分離株T100およびS113bと5'側ジャンクションが同じで、3'側ジャンクションが1塩基下流であった (Fig. 2-1B)。また、分離株T-3d, T37, K80, K82, M90の5分離株の内部欠失RNA-3では、欠失によりP25のORFにフレームシフトが起こっていた。

13分離株の変異RNA-4には、P31のORF内に303~549塩基の内部欠失が認められた (Fig. 2-1C)。8分離株 (U23a, H31, T37, H48, Y60b, K80, T100a, S113) に含まれていた変異RNA-4の欠失領域は全く同じであった (Fig. 2-1C)。欠失領域の3'側は1068~1075塩基 (分離株M89, Y60a, M87) と1195~1214塩基 (分離株S58, S75, U23b, 欠失領域が全く同じの8分離株) に集中していた (Fig. 2-1C)。RNA-4の欠失変異には、フレームシフトは起こっていなかった。

D-5分離株の継代中にRNA-5のcDNAプローブと反応するRNA-5より短いRNA (1.0kb, RNA-5a) を含む分離株D-5aが得られ、この分離株に含まれていたRNA-5aからGubler and Hoffman (1983) の方法によりcDNAをクローニングして塩基配列を決定した。RNA-5aはP26のORF内の740~1042塩基が欠失していたが、他の領域は同一であった。また、S43, R83に含まれていた変異RNA-5には、366塩基、325塩基の内部欠失が認められた (Fig. 2-1D)。3変異株のRNA-5の欠失領域は、欠失領域の5'側が近接していた (Fig. 2-1D)。また、分離株R83で欠失によりP26のORFにフレームシフトが起こっていた。

## 4) 欠失領域のジャンクション近傍の解析

12分離株の欠失変異RNAの欠失領域の5'側ジャンクションの上流側と3'側ジャンクションとに4~16塩基の一部不完全な反復配列が認められた (Fig. 2-3A)。RNA-3の欠失変異株2分離株 (H45, M87) の反復配列は、それぞれ、16塩基 (うち3塩基 mismatches), 4塩基であった (Fig. 2-3A)。RNA-4の8分離株の欠失変異 (U23a, H31, T37, H48, Y60b, K80, T100a, S113) に共通の欠失領域に認められた反復配列は、10塩基 (1塩基の mismatches) であった (Fig. 2-3A)。分離株D-5aおよび43の欠失変

Table 2-1 Detection of RNA-3, RNA-4 and RNA-5 in field isolates by Northern blot hybridization.

Isolate type	Isolate	Manual inoculation			Manual inoculation		
		1st transfer			5th transfer		
		RNA-3	RNA-4	RNA-5	RNA-3	RNA-4	RNA-5
N-type	O8	+	+		+	+	
	O11	+	+		+	+	
	O13	+	+		+	+	
	U23	+	+		+	+	(+)
	H31	+	+		+	+	(+)
	H34	+	+		+	+	
	T37	+	+		+	+	(+)
	T41	+	(+)	+	+	(+)	+
	H45	+	(+)	+	+	(+)	+
	B52	+	+		+	+	
	K53	+	+		+	+	
	K55	+	+		+	(+)	+
	S58	+	+		+		(+)
	Y60	+	+		+	+	(+)
	Y63	+	+		+	+	
	N64	+	+		+	+	
	S75	+	+		+	+	(+)
	W77	+	+		+	+	
	K80	+	+		+	(+)	(+)
	K81	+	+		+	+	
	K82	+	+		+	(+)	+
	M87	+	+		+	(+)	(+)
	M89	+	+		+	(+)	(+)
	M90	+	+		+	(+)	+
	N92	+	+		+	+	
	N98	+	+		+	+	
	T100	+	(+)	+	+	(+)	(+)
D108	+	+		+	(+)	+	
S113	+	+		+	(+)	(+)	
F-type	SH1	+	+	+	+	+	(+)
	S42	+	+	+	+	+	+
	S43	+	+	+	+	+	+
	S44	+	+	+	+	+	+
	H48	+	+	+	+	+	(+)
	K79	+	+	+	+	+	+
	R83	+	+	+	+	+	(+)
	T101	+	+	+	+	+	+
	T102	+	+	+	+	+	+
	D104	+	+	+	+	+	+
	S110	+	+	+	+	+	+

Detection of RNA species is shown by +. Deleted RNA species in parentheses.

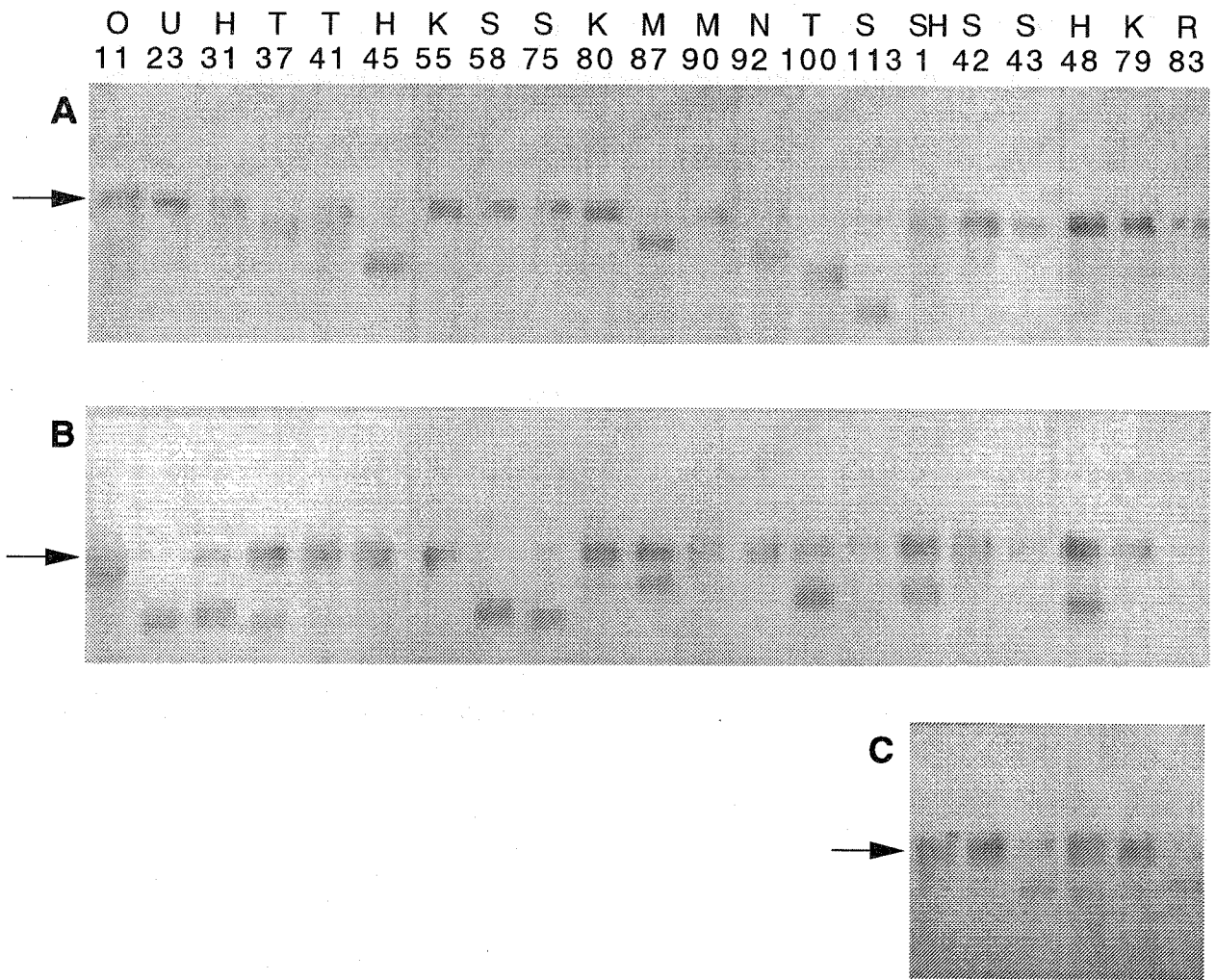


Fig. 2-2 Detection of RNA-3 (A), RNA-4 (B) and RNA-5 (C) of BNYVV field isolates by Northern blot hybridization. Isolate names are shown above. The arrowheads indicate the positions of each normal-sized RNA species.

**A RNA-3**

573nt  
 H45 TATATTAGGCGCAGTTTATGATTTAG ---TGGTTTGTATGCAGGTGATGTTTTAG

336nt  
 M87 CATCCCTATCAATGGATCTCG .....GTGGATAATAATGTTATTCAAG

**RNA-4**

348nt  
 U23a, H31, T37  
 H48, Y60b, K80 CTTGTTATGGTTATCATGATGTT .....GGTTTGTCTTTTATCACGATTAG  
 T100a, S113

**RNA-5**

303nt  
 D-5a TCCTGTGCTTCTTGGGTAA .....CCGATAGTGTGTCCTGGGTACA

366nt  
 S43 TTCTGGGTTAATGACGGGTG .....CTACCAGATCATGATAATGA

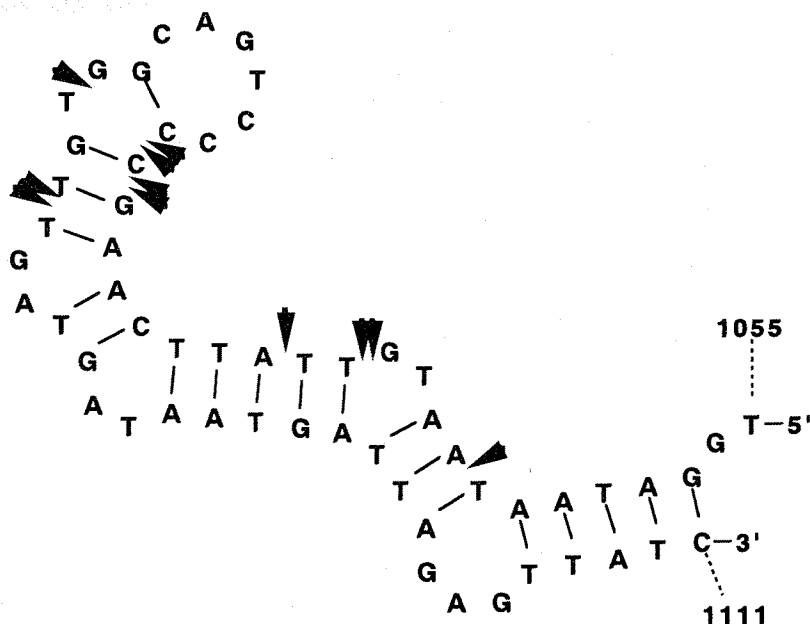
**B**

Fig. 2-3. Analysis of deletion boundaries. (A) Sequence repeats at the junction boundaries of deletion mutants of RNA-3, RNA-4 and RNA-5. Sequence repeats are indicated by thick bars and mismatched sequences are shown by dots under the residue. Deleted regions are indicated by thin bars and numbers of deleted nucleotides are indicated above the bars. (B) Secondary structure from nucleotide 1055 to nucleotide 1111 of RNA-3 predicted nucleotides between 800 and 1300. The structure was drawn by GENETYX-MAC. Arrowheads indicate right side junction points of deletion in isolates. Numbers indicate nucleotide position.

異RNA-5の反復配列は、それぞれ、8塩基、4塩基であった (Fig. 2-3A)。

11分離株 (T-3d, S-3c, M87, K80, M89, T37b, D108, S113, T41, T100, S113b) に含まれていたRNA-3の変異では、欠失領域の3側ジャンクションが1062~1088塩基の間に集中しており (Fig. 2-3B), この領域を含む801~1300塩基の二次構造予測 (-256.40Kcal/mol) から、この領域は安定なステムループ構造 (Fig. 2-3B) をとり得ると考えられ、1062~1088塩基はこの二次構造上近いところに位置していた。

## 論議

BNYVVは、RNA-1~RNA-4のゲノムをもち、自然界では *Polymyxa betae* によって伝搬される。しかし、汁液接種を行うとRNA-1とRNA-2のみによってウイルスの感染・増殖が成立し、RNA-3, RNA-4, RNA-5はサテライト様の行動をとる (Richards and Tamada, 1992)。また、汁液による機械的接種を繰り返すと、RNA-2, RNA-3, RNA-4, RNA-5には内部欠失変異が生じることが知られている (Bouzoubaa *et al.*, 1985; 1988; 1991; Kuszala *et al.*, 1986; Burgermeister *et al.*, 1986; Koenig *et al.*, 1986; Tamada *et al.*, 1989; Tamada and Kusume, 1991; Kiguchi *et al.*, 1996)。本研究では、多くの野外分離株および室内分離株で出現した欠失変異について解析した。

RNA-2については、すでに、Tamada and Kusume (1991) は欠失RNA-2 (RNA-2a, RNA-2b) をそれぞれS-0, G-0の継代接種によって得、欠失領域はいずれもCPリードスルー領域内の54k ORFに生じていることが *in vitro* translation によって確かめられている。本研究では、その領域の塩基配列を解析したところ、54K ORFのC末端側に480~579塩基の欠失が生じていることがわかった。なお、これらの欠失変異は *Polymyxa* 菌で全く伝搬されないことが確認されている (Tamada and Kusume, 1991)。このようにCP読み越し領域に欠失が生じる現象は、他の菌媒介ウイルスSBWMV, PCV, PMTVでも認められており、この読み越し領域は菌伝搬に必要な領域とされている (Shirako and Brakke, 1984; Hsy and Brakke, 1985; Manohar *et al.*, 1993; Chen *et al.*, 1994; 1995; Reavy *et al.*, 1998)。

次に、RNA-3, RNA-4, RNA-5について解析を行った。北海道各地から集めたそう根病発生圃場の

土壌にテンサイを植え、ウイルスの感染が認められたその根を検定植物ツルナに接種し、そこに生じた病斑をさらにツルナに接種して増殖させた。それを材料としてノーザン・ブロット・ハイブリダイゼーションにより解析した結果、40野外分離株中29分離株からRNA-3とRNA-4, 11分離株からは、さらにRNA-5が検出された。すべての分離株から、正常の大きさのRNAが検出されたが、3分離株で短いRNA-3が、1分離株で短いRNA-5が検出された。5回連続してツルナに機械的接種を繰り返し、同様にノーザン・ブロット・ハイブリダイゼーションにより解析した。Table 2-1に示すように、欠失RNA-3が12分離株、欠失RNA-4が13分離株、欠失RNA-5が2分離株から検出された。S58のように、正常のRNA-4が消失している分離株もあった。このようにして生じた変異株の欠失領域について解析したところ、すべての欠失はORF内に起こっていることがわかった (Fig. 2-1)。

BNYVVの野外分離株40分離株中、すべてに欠失が起こるとは限らず、正常の大きさのRNAが維持される場合もあった (Table 2-1)。単一局部病斑分離を行って得た正常のRNA-3を含む分離株を10~15回継代させても欠失は起こらず、欠失変異の起こる頻度は高くないとの実験例もある (玉田, 未発表)。以上の結果を総合すると、Table 2-1に示した5回の継代接種で得られた欠失変異の大部分は、もともと、圃場から分離した野外分離株に少量含まれていたものが継代接種中に増幅されたものと考えらる。

一方、Bouzoubaa *et al.* (1991) は、BNYVVの感染性クローンからの転写産物をキノアに接種し、RNA-3とRNA-4の欠失変異の出現について調べた。それによると、RNA-3では、2回めの継代で欠失変異 (RNA-3a) が検出された。RNA-4では、1回めの継代で2つの欠失変異 (RNA-4a, RNA-4b) が検出された。感染性クローンのもととなった自然分離株を3年間にわたってバルクで30回継代した分離株では、全長のRNAに加えてRNA-3aに相当する大きさのRNAとそれより短い変異RNA (RNA-3b) が含まれていた。RNA-4では、RNA-4bに相当する大きさのRNAのみが含まれていた。転写産物の接種で得られたいくつかの病斑について、一つ一つの病斑を調べると、RNA-3については、全長のRNA-3のみ、あるいはそれに加えて2種類のRNA-3の欠失変異のうちどちらか一方の変異が含まれていた。RNA-4については、全長のみの病斑が大部分であったが、全

長のRNA-4が検出されない病斑2つのうちの1つから変異RNA-4 (RNA-4b) に相当する大きさのRNAが検出された。これらの欠失変異株の欠失領域を解析すると、すべて内部欠失で、さらに、RNA-4bには、欠失塩基数がわずかに異なる2種類の変異がみられた。Bouzoubaa *et al.* (1991) は、この結果から、変異は継代接種中に *de novo* で生じたとした。

ゲノムやサブゲノムの複製をRNA依存RNAポリメラーゼに依存しているウイルスは、核酸に塩基の置換、欠失、付加などの変異が起こり得る (Simon and Bujarski, 1994)。塩基の欠失、付加などの変異は、RNA recombination (RNA組換え) によって起こるとされている (Lai, 1992; Simon and Bujarski, 1994)。そのメカニズムとしては、複製後の切断と再結合や複製でのコピー・チヨイスが考えられている (Simon and Bujarski, 1994)。コピーチヨイスは、複製酵素がRNA合成の間に休止して2番めのテンプレートに切り替わり、結果的に組換えが起こるといふもので、RNA組換えの主要なメカニズムとされている (Simon and Bujarski, 1994)。本研究で解析した欠失領域を詳細にみると、欠失領域の5'側ジャンクションあるいは3'側ジャンクションが近接している分離株があり、変異の集中している領域 'hot spot' が認められた。RNA-3の2分離株、RNA-4の8分離株、RNA-5の2分離株に含まれていた欠失変異に反復配列の存在が認められたが (Fig. 2-3A)、その他の欠失変異には顕著な特徴が認められず、ランダムに欠失が起こったと考えられる。反復配列は Bouzoubaa *et al.* (1988; 1991) の解析した変異にも認められている。また、turnip crinkle virus (TCV) にみられるモチーフ配列 (Cascone *et al.*, 1990; 1993)、Bouzoubaa *et al.* (1991) によって解析された変異に認められたイントロンに特徴的な配列、スプライシングに特徴的な配列 (Brown, 1986) などは認められなかった。このことから、BNYVVのRNAの複製の間にジャンクションの反復配列や高次構造による複製酵素のジャンプ (template switching) が起こったと考えられ、変異のメカニズムは、Bouzoubaa *et al.* (1991) が述べているように、「複製でのコピーチヨイス」 (Simon and Bujarski, 1994) であることが示唆される。

転写産物から出発した Bouzoubaa *et al.* (1991) の結果と野外分離株を解析した本研究の結果とでは、内部欠失という現象そのものには共通性がみられるが、欠失変異がいつどれぐらいの頻度で起こるかに

ついては、さらに解析が必要である。