

論文の内容の要旨

論文題名 温州萎縮ウイルスおよびその近縁ウイルスに関する分類学的研究

氏 名 岩波 徹

温州萎縮ウイルス(*Satsuma dwarf virus*, SDV)は我が国のカンキツに深刻な被害を与えている重要なウイルスである。本ウイルスは日本に広く分布しているほか、中国、韓国、トルコで発生が確認されている。SDV は発見以来その重要性のため、多くの研究がなされてきたが、分類学的研究に関して、次のような重要な2つの課題が未解決であった。すなわち、第1に、SDV はその生物学的性状、粒子形状、細胞内所見および理化学的性状よりコモウイルス科のコモウイルス属、ファバウイルス属あるいはネボウイルス属に近縁であることが示唆されていたが、その正式な分類学的位置は確定していなかった。第2はSDV と近縁ウイルスとの関係についてである。我が国のカンキツではSDV に加えて、これまでにカンキツモザイクウイルス(*Citrus mosaic virus*, CiMV)、ネーブル斑葉モザイクウイルス(*Navel orange infectious mottling virus*, NIMV)、およびナツカン萎縮ウイルス(*Natsudaidai dwarf virus*, NDV)の3種のウイルスが報告されている。これらは検定植物の反応より、SDV の近縁ウイルスとされてきたが、SDV の系統とするべきか、近縁な別種のウイルスとするべきかについての根拠が曖昧であった。また、近年になって、典型的なSDV とは性状の異なる分離株が多く見いだされ、これらをSDV または近縁ウイルスの中のどのウイルスの系統とするべきか、または別種のウイルスにするべきかの明確な分類基準がなく、混乱をきたしていた。

近年では、これまで所属未定であったウイルスも、塩基配列や、遺伝子構造の相同性により、分類的位置を推定することが可能となった。

そこで、本研究においては、SDV の標準株について、ゲノム核酸の全塩基配列を決定

し、それから推定される遺伝子構造をコモウイルス属、ファバウイルス属、ネポウイルス属およびその他のウイルスと比較し、SDV との類縁関係を考察した。また、SDV と近縁のウイルスである、CiMV, NIMV, NDV および近年発見された 2 系統の分離株の生物学的、血清学的および理化学的性状を詳細に解析し、SDV との比較検討を行った。さらに、これらの株について、外被タンパク質遺伝子の塩基配列および推定されるアミノ酸配列を比較した。最後に、これらを総合して、SDV とその近縁ウイルスにおけるウイルスの種と系統の分類基準を確立し、これにもとづいて、これらのウイルスの再分類を行った。主な研究成果は以下の通りである。

1. 温州萎縮ウイルスの遺伝子構造と分類学的位置

1) 理化学的性状

SDV の標準株 S-58 の外被タンパク質および核酸の性状を調べた。SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動で分析した結果、外被タンパク質は約 42K (大サブユニット)、および 22K (小サブユニット) の 2 成分であることが判明した。また、変性アガロースゲル電気泳動により、ウイルス核酸は約 7.0 kb (RNA1) および 5.4 kb (RNA2) の 2 成分の 1 本鎖 RNA であり、また、オリゴ d(T)セルロースカラムとの親和性により、いずれも 3' 末端にポリ A 配列が付加されているものと考えられた。

2) 核酸の全塩基配列と遺伝子構造

SDV のゲノム核酸 RNA1 および RNA2 についてそれぞれの cDNA を合成し、塩基配列の解読を行った。5'末端の数十塩基については、RNA を鋳型にし、特異的プライマーを用いたプライマーエクステンション法により、直接、塩基配列を解析した。以上により、RNA1, RNA2 について、それぞれ 6795 塩基、5345 塩基の全塩基配列を決定した。その結果、RNA1 と RNA2 との間で 5'末端の 991 塩基および 3'末端の 238 塩基は、それぞれ 80.4%および 96.2%の相同性が認められた。推定されるアミノ酸配列より RNA1, RNA2 はそれぞれ 6246 塩基、4725 塩基からなる一つの大きな読みとり枠(open reading frame, ORF)を持ち、遺伝子産物はいずれもポリプロテインとして翻訳されると考えられた。RNA1 の 5'末端非翻訳領域は 301 塩基、3'末端非翻訳領域は 248 塩基で、RNA2 のそれらはそれぞれ 302 塩基および 318 塩基であった。RNA1 と RNA2 のコードするタンパク質の中で、それぞれの最初のアミノ酸から 103 番目のアミノ酸までは相互に完全に一致しており、また、104 番目より 138 番目のアミノ酸までは 69%の相同性を示した。従って、RNA1 と RNA2 の 5'側領域に互いに類似したタンパク質 (5'共通タンパク質) が重複してコードされていると推定された。RNA1 の ORF がコードするポリプロテインには、アミノ末端側の 5'共通タンパク質に続いて、順に、NTP 結合タンパク質、プロテアーゼおよび RNA 依存 RNA ポリメラーゼの各モチーフ配列が認められた。一方、外被タンパク質のエドマン分解によって得られたアミノ酸配列との比較により、RNA2 の ORF がコードするポリプロテインのカルボキシル末端に 2 種の外被タンパク質が含まれていると考えられた。さらに、5'共通タンパク質と外被タンパク質との間に、細胞間移行タンパク質のモチーフ配列が認められた。

3) 他のウイルスとの遺伝子構造の比較

SDV では、RNA1 の ORF に上流より順に、5'共通タンパク質、NTP 結合タンパク質、プロテアーゼおよび RNA 依存 RNA ポリメラーゼが、また RNA2 の ORF に上流より順に細胞間移行タンパク質、外被タンパク質（大サブユニット、小サブユニット）がコードされており、この遺伝子構造はコモウイルス属、ファバウイルス属およびネポウイルス属のウイルスとかなり類似していた。しかし、SDV にはコモウイルス属、ファバウイルス属には存在しない 5'共通タンパク質が認められ、これらのウイルスとは明らかに区別された。また、両方の RNA に 5'共通タンパク質がコードされている点はネポウイルス属の中でもサブグループ C に所属するトマト輪点ウイルス (*Tomato ringspot virus, ToRSV*) にのみ認められ、この点において SDV の遺伝子構造は同サブグループに類似していたが、SDV の RNA1 および RNA2 の 3'非翻訳領域はそれぞれ 248 塩基および 318 塩基で、同サブグループの特徴である 1300 塩基以上の 3'非翻訳領域に比べ、著しく短かった。また、TomRSV を含むネポウイルス属のウイルスはすべて単一成分の外被タンパク質であるのに対し、SDV は 2 成分の外被タンパク質を有する。従って、SDV の遺伝子構造は既知のいずれのウイルス属とも明らかに異なっている。SDV とコモウイルス属、ネポウイルス属のウイルスとの間で、最も保存されていたのは RNA ポリメラーゼで、アミノ酸レベルで約 30% の相同性が認められたが、単一ゲノムを持つセクイウイルス科の *Parsnip yellow fleck virus, Maize chlorotic dwarf virus* およびイネわい化ウイルス (*Rice tungro spherical virus*) とはこれよりやや高い相同性が認められた。さらに、RNA ポリメラーゼのアミノ酸配列の相関性に基づく分子系統樹分析の結果、SDV は同じ 2 分節ゲノムのコモウイルス科より単一ゲノムのセクイウイルス科にやや近縁であることなど、これまで知られているコモウイルス科のコモウイルス属、ファバウイルス属、ネポウイルス属とは明らかに区別された。以上の結果から、SDV は新しいウイルス属を代表するウイルスと考えられ、コモウイルス科に SDV (*satsuma dwarf virus*) を代表種とするサドワウイルス属 (*Sadwavirus*) を新設することを提唱した。

2. 温州萎縮ウイルスとその近縁ウイルスとの分類学的関係

1) 生物学的・血清学的性状の比較

供試株として、SDV の S-58 株（標準株）と MIE88 株、CiMV、NDV、NIMV の各標準株 Ci-968 株、ND-1 株、NI-1 株および近年分離された種未同定の Az-1 株と LB-1 株を用いた。いずれの分離株も、ゴマ (*Sesamum indicum*)、*Physalis floridana* に全身感染し、激しい症状を起こした。S-58 株に対する抗血清を用いたエライザおよびウェスタンブロットでは S-58 株と MIE88 株が強く、Ci-968 株、ND-1 株が弱く反応し、NI-1 株が全く反応しなかった。Ci-968 株に対する抗血清を用いた場合は Ci-968 株、ND-1 株の順に強く、S-58 株、MIE88 株がやや弱く反応し、NI-1 株とは全く反応が認められなかった。Az-1 株は草本およびカンキツでの反応は SDV に最も似ていたが、血清反応では Ci-968 株に最も近かった。また、LB-1 株はスイートオレンジの新葉に特異的なモザイクを生じ、病原性においてはいずれの近縁ウイルスとも異なっていたが、血清学的性状は Ci-968 株に最も近かった。従って血清学的には、SDV 型 (S-58 株、MIE88 株)、CiMV 型 (Ci-968 株、ND-1 株、Az-1 株、LB-1 株) および NIMV 型 (NI-1 株) の 3 型が確認された。

2) 核酸・タンパク質の比較

供試株はいずれも2成分のウイルス核酸を持ち、分離株間でアガロースゲルにおける電気泳動度に差は認められなかった。いずれの分離株からもサテライト RNA は検出されなかった。また、オリゴ d(T)セルロースカラムとの親和性および逆転写反応により cDNA が合成されることから、いずれのウイルス核酸も 3'末端にポリ A 配列を持つ1本鎖 RNA であると推定された。一方、タンパク質については、SDS-ポリアクリルアミドゲル電気泳動により、いずれの分離株でも2成分の外被タンパク質が認められ、その分子量は S-58 株と MIE88 株で約 4.2 kDa と 2.2 kDa, Ci-968 株, ND-1 株, Az-1 株, LB-1 株で約 4.2 kDa と 2.1 kDa, NI-1 株では約 4.2 kDa と 2.15 kDa であった。

3) 外被タンパク質遺伝子の比較

各々の分離株の純化標品より抽出したウイルス RNA (RNA 1, RNA2) よりオリゴ d Tプライマーを用いて cDNA を合成し、得られたクローンからノーザンハイブリダイゼーションにより RNA2 特異的なクローンを選抜し、それらの塩基配列を決定した。これから推定されるアミノ酸配列中に、各々の分離株の外被タンパク質のエドマン分解で得られた配列と一致する部位が認められ、いずれの分離株も S-58 株と同様に、RNA2 の 3'末端に大小2成分の外被タンパク質がコードされていると考えられた。外被タンパク質は S-58 株と MIE88 株で 443 残基 (大サブユニット) と 218 残基 (小サブユニット) のアミノ酸からなり、Ci-968 株, Az-1 株, LB-1 株および NI-1 株のそれはいずれも 439 残基と 217 残基, ND-1 株では 439 残基と 218 残基であった。外被タンパク質のアミノ酸配列は大サブユニットに 82~99%, 小サブユニットに 76~99%の相同性が認められた。外被タンパク質全体のアミノ酸の相同性は、血清型で分けたSDV型のS-58株とMIE88株は99%の相同性があり、CiMV型内の分離株間 (Ci-968 株, ND-1 株, Az-1 株, LB-1 株) では90~98%の相同性を示したが、NIMV型のNI-1株はいずれの型とも80~85%の相同性しか示さなかった。すなわち、外被タンパク質のアミノ酸配列の相同性は、同一血清型内では 90%以上であったが、異なる血清型間では 85%以下であった。

4) 以上の結果から、SDVと近縁ウイルスは、生物学的性状、血清関係および外被タンパク質の相同性より、SDV, CiMV, NIMVの3種のウイルスに分類されることが考えられる。すなわち新たに提唱したサドワウイルス属は、3種のウイルスが分類される。従来SDVの近縁ウイルスとされたNDVや近年発見されたAz-1株, LB-1株はいずれもCiMV種であり、CiMVの多様性が明らかになった。CiMV はさらに外被タンパク質の相同性より、CiMV-Ci系統 (Ci-968株, LB-1株) とCiMV-ND系統 (ND-1株, Az-1株) に分けられると考えられた。

以上を要するに、我が国の重要カンキツウイルスである温州萎縮ウイルス (SDV) およびその近縁ウイルスについて、その性状を主として血清学および分子生物学的手法を用いて詳細に解析し、SDV が既報のコモウイルス科のどのウイルス属とも異なることを明らかにし、SDV を代表種とする新たなウイルス属を提唱するとともに、本ウイルスおよび近縁ウイルスの種と系統に関する分類基準を確立し、再分類を行った。