

技術報告

農業生物資源ジーンバンクが保有する植物ウイルス株の外被タンパク質遺伝子の検出とその利用

一木 (植原) 珠樹^{1)*}, 藤 晋一²⁾, 杉本るり子¹⁾, 大橋美保¹⁾,
藪中恭子¹⁾, 北谷桃子²⁾, 山下一夫³⁾, 花田 薫¹⁾, 青木孝之¹⁾

¹⁾ 国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構 遺伝資源センター
〒305-8602 茨城県つくば市観音台 2-1-2

²⁾ 秋田県立大学生物資源科学部 〒010-0195 秋田県秋田市下新城中野街道端西 241-438

³⁾ 青森県産業技術センター野菜研究所 〒033-0071 青森県上北郡六戸町大字犬落瀬字柳沢 91

農業生物資源ジーンバンク微生物部門は、ウイルスの外被タンパク質をコードする領域の塩基配列を解析し、遺伝資源データベースで公開している。解析に使用した60対以上のプライマーと実験条件を報告する。これらのプライマー対では、特に分類の基準や検出の標的となることが多い外被タンパク質のコーディング領域を増殖させることができるため、感染の確認や増殖量の解析、他のウイルスとの識別、ウイルスゲノムの塩基配列解析等に利用できると考えられる。また塩基配列の解析結果を基に、*Necrovirus*, *Tobamovirus* および *Fabavirus* に属する複数株について再分類を行った。

1. はじめに

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構の農業生物資源ジーンバンク微生物部門は、食料・農業に係る微生物遺伝資源を扱う機関の中で、国内で唯一植物ウイルスの収集・保存・配布を担っている(花田, 2012, Tomioka *et al.*, 2012)。本部門では、2015年時点で、植物病原ウイルスのうち機械的接種が容易にできるウイルス12科26属330点を公開しており、日本で初めて発見されたアマゾンユリ微斑ウイルス Amazon lily mild mottle virus (Fuji *et al.*, 2013)、キュウリ斑紋ウイルス Cucumber mottle virus (Orita *et al.*, 2007)、メロン黄化えそウイルス Melon yellow spot virus (Kato *et al.*, 2000)、リンドウモザイクウイルス *Gentian mosaic virus* (Kobayashi *et al.*, 2005)、ソテツえそ萎縮ウイルス *Cycas necrotic stunt virus* (Hanada *et al.*, 1986)、コンニャクモザイクウイルス *Konjac mosaic virus* (下山ら, 1992)、アマゾンユリモザイクウイルス *Amazon lily mosaic virus* (Terami *et al.*, 1995)、メロンえそ斑点ウイルス *Melon necrotic spot virus* (岸, 1966)、*Lisianthus necrotic ringspot virus* (Shimomoto *et al.*, 2014)なども保存している。これらは、ガラスアンプルに格納

したものを-80℃で保存し、申請に応じて冷蔵便で配布している(花田, 2012)。

ウイルス株の配布申請時にユーザーが記入するウイルスの利用目的の内訳は、病害診断や検定、次いで、耐病性を目的とした新品種開発や遺伝子解析が多く、いずれの目的においても、ユーザーはウイルスを受領後、使用する前に、適切な緩衝液を用いて十分に磨砕し、感受性の高い植物に付傷接種することによりウイルスを増殖させることが必要である。また対象とするウイルスの病原性や宿主範囲などの性状解析を行う際には、目的に応じてウイルスの感染確認、増殖量や動態を明らかにすることが必要である。

そこで、ジーンバンクに登録されている植物ウイルス株について、解析を行う際の一助となる情報を提供するために、ウイルスの外被タンパク質を構成する主要タンパク質のコーディング領域部分の塩基配列を解読し、得られた塩基配列の公開を開始した。今回はその過程で設計し、ウイルスゲノムの外被タンパク質領域のcDNA化と増幅に成功した特異的プライマー情報を提供することで、ユーザーがジーンバンクから入手した植物ウイルス株の性状解析をする際のの一助としたい。

*Corresponding author

E-mail: tuehara@affrc.go.jp

2. 解析に供試したウイルス株

本部門において2015年12月時点で登録、公開され

表1 Scientific names, nature of the genome, and MAFF accession numbers of plant viruses preserved in the NARO Genebank

Scientific name	Nature of the genome	MAFF accession Nos.
<i>Alfalfa mosaic virus</i>	ssRNA(+)	104001,104002, 104069, 260125, 260126
<i>Alstroemeria mosaic virus</i>	ssRNA(+)	104102~104105, 104120
<i>Alstroemeria virus X</i>	ssRNA(+)	104109
Amazon lily mild mottle virus	ssRNA(+)	104118
<i>Amazon lily mosaic virus</i>	ssRNA(+)	104117
<i>Arabidopsis mosaic virus</i>	ssRNA(+)	104003, 307006
<i>Asparagus virus 2</i>	ssRNA(+)	715030
<i>Asparagus virus 3</i>	ssRNA(+)	715029
<i>Barley stripe mosaic virus</i>	ssRNA(+)	307038, 307039
<i>Bean common mosaic virus</i>	ssRNA(+)	104042, 104043, 105007, 715049
<i>Bean yellow mosaic virus</i>	ssRNA(+)	104054
<i>Beet necrotic yellow vein virus</i>	ssRNA(+)	307054
<i>Broad bean wilt virus 2</i>	ssRNA(+)	104049, 104050, 104080, 104111, 260092~260098, 307009, 307015, 715032
Butterbur mosaic virus	ssRNA(+)	104006
<i>Carnation mottle virus</i>	ssRNA(+)	104008, 260191
<i>Carnation vein mottle virus</i>	ssRNA(+)	104009
<i>Cauliflower mosaic virus</i>	dsDNA	104018~104022
<i>Clover yellow vein virus</i>	ssRNA(+)	104075, 715041~715043
<i>Cocksfoot mottle virus</i>	ssRNA(+)	104072, 104073, 307042, 307049, 307050, 307051
<i>Cucumber green mottle mosaic virus</i>	ssRNA(+)	104026, 260018, 260019, 260026, 260078, 307029, 307056, 307057
<i>Cucumber mosaic virus</i>	ssRNA(+)	104010~104014, 104016, 104058~104062, 104070, 104081, 104087~104089, 104106~104108, 104113~104116, 260099~260118, 260151~260167, 260188, 260189, 307008, 307040, 307041, 715038~715040, 715050, 715053, 715055~715058, 715064
Cucumber mottle virus	ssRNA(+)	260144
<i>Cycas necrotic stunt virus</i>	ssRNA(+)	260063, 307036, 307037
<i>Gentian mosaic virus</i>	ssRNA(+)	104068
<i>Grapevine algerian latent virus</i>	ssRNA(+)	104126
Iris yellow spot virus	ssRNA(-)	260179
<i>Konjac mosaic virus</i>	ssRNA(+)	104056
<i>Kyuri green mottle mosaic virus</i>	ssRNA(+)	104024, 104025, 715061
<i>Lettuce mosaic virus</i>	ssRNA(+)	715025
Lisianthus necrotic ringspot virus	ssRNA(-)	260170
<i>Melon necrotic spot virus</i>	ssRNA(+)	104044, 104045, 104094, 104097, 104125, 260030
<i>Narcissus mosaic virus</i>	ssRNA(+)	307001
<i>Nerine virus X</i>	ssRNA(+)	104121
<i>Odontoglossum ringspot virus</i>	ssRNA(+)	260142, 260143
<i>Olive latent virus 1</i>	ssRNA(+)	260086, 307005, 307013
<i>Olive mild mosaic virus</i>	ssRNA(+)	307011
<i>Papaya ringspot virus</i>	ssRNA(+)	260090, 260091
<i>Peanut mottle virus</i>	ssRNA(+)	307044
<i>Peanut stunt virus</i>	ssRNA(+)	104041, 260119, 260120~260122, 260168, 260169, 260187, 715037, 715044
<i>Pepper mild mottle virus</i>	ssRNA(+)	104032, 104086, 104099, 715065
<i>Potato mop-top virus</i>	ssRNA(+)	260141
<i>Potato virus A</i>	ssRNA(+)	307028
<i>Potato virus S</i>	ssRNA(+)	307026
<i>Potato virus X</i>	ssRNA(+)	260048, 307022, 307023, 715063
<i>Potato virus Y</i>	ssRNA(+)	104046, 104074, 104077, 307024, 307025
<i>Radish mosaic virus</i>	ssRNA(+)	104028

<i>Ryegrass mottle virus</i>	ssRNA(+)	307043
<i>Sikte waterborne virus</i>	ssRNA(+)	260150
<i>Sorghum mosaic virus</i>	ssRNA(+)	260088, 260089
<i>Soybean mosaic virus</i>	ssRNA(+)	104029, 104030, 104063~104067, 260049, 260139
<i>Squash mosaic virus</i>	ssRNA(+)	260055, 260127
<i>Sugarcane mosaic virus</i>	ssRNA(+)	260177, 260087
<i>Tobacco mild green mosaic virus</i>	ssRNA(+)	104036
<i>Tobacco mosaic virus</i>	ssRNA(+)	260014, 260015, 260025, 260031, 260053, 260054, 260056, 260061, 260064~260066, 260069, 307032
<i>Tobacco necrosis virus A</i>	ssRNA(+)	260085, 307007
<i>Tobacco ringspot virus</i>	ssRNA(+)	104031
<i>Tomato aspermy virus</i>	ssRNA(+)	104038, 260123, 260124, 715036
<i>Tomato mosaic virus</i>	ssRNA(+)	104034, 260001, 260002, 260004~260013, 260017, 260022, 260023, 260051, 260052, 260062, 260067, 260068, 260072, 260073, 260075~260077, 307019, 715016, 715017, 715051, 715052
<i>Tomato ringspot virus</i>	ssRNA(+)	307002
<i>Tomato spotted wilt virus</i>	ssRNA(-)	104085, 260050, 260145~260149
<i>Turnip mosaic virus</i>	ssRNA(+)	104047, 260133~260137, 715027, 715054, 715062, 715066
<i>Wasabi mottle virus</i>	ssRNA(+)	104033
<i>Watermelon mosaic virus</i>	ssRNA(+)	104039, 260138, 307031, 715059
<i>Youcai mosaic virus</i>	ssRNA(+)	104110, 260003, 260058, 260172
<i>Zucchini yellow mosaic virus</i>	ssRNA(+)	104048, 104057, 104071, 260020, 260027, 715045~715048

ている植物ウイルス 330 点のうち、解析中の株とサブバンクで保存されている株以外の植物ウイルス株 285 点を用いた (表 1)。これらは *Cauliflower mosaic virus* を除いてすべてゲノムを RNA にもつ、いわゆる RNA ウイルスである。配布用にアンプル化して保存されている凍結乾燥サンプルから RNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN) を用いてプロトコールに従い total RNA を精製し、濃度を計測した後、供試するま -20°C で保存した。プライマーは、既報のユニバーサルプライマーあるいは GenBank から対象ウイルスの複数系統の塩基配列情報を取得後、GENETYX 上のプログラムあるいは Oligo Evaluator (Sigma Aldrich) を用いて特異的なプライマー対を設計した。使用した試薬と反応条件は以下の二通りの方法を採用した。1. PrimeScript One Step RT-PCR Kit Ver. 2 (Takara) を用いてプロトコールの組成に従い反応液を調整後、50°C 30 min, 95°C 3 min one cycle, 94°C 1 min, 50°C 1 min, 72°C 3 min 35 cycles, 72°C 5 min one cycle で RT-PCR, または 2. One-Step RT-PCR kit (QIAGEN) を用いてプロトコールの組成に従い反応液を調整後、50°C 30 min, 95°C 15 min one cycle, 94°C 1 min, 50°C 1 min, 72°C 1 min 30 cycles, 72°C 10 min で RT-PCR を行った。得られた PCR 産物の確認は、予想される増幅断片長にあわせて、2.0, 1.5 ま

たは 1.0% のアガロースゲルに泳動して行った。

3. 各ウイルス株の外被タンパク質遺伝子の増幅

各ウイルスの特異的プライマー配列、反応条件、および予想される増幅断片のサイズを表 2 に示した。ウイルス株間での変異が大きい場合は、縮重プライマーを設計した。供試したすべてのウイルスにおいて予測したサイズの増幅断片が得られ、バンドが薄かった複数のウイルス株 (*Arabidopsis mosaic virus*, *Butterbur mosaic virus*, *Lettuce mosaic virus*, *Potato virus S*) についても、PCR 反応数を 5 サイクル程度増やすことで増幅が改善された。増幅の程度に差が現れた理由として鋳型となるウイルス由来の RNA 量が少量であった可能性や、宿主成分による反応阻害が考えられる。植物ウイルスは人工培地などでの培養ができないため、それぞれのウイルスに最も適しているとされる植物に接種し増殖させるが、提供するアンプルのウイルス量については、現在のところ解析しておらず、今後ユーザーに提供する情報の一つとして検討する価値があるだろう。今回検討を行ったウイルスのうち唯一 DNA をゲノムとする *Cauliflower mosaic virus* についても 2 の実験方法で予測された増幅断片長が得られた。なお RT 反応を省略した PCR のみの増幅は検討しなかった。

表 2 Information on the primer pairs, predicted PCR product of plant viruses preserved in the NIAS Genebank

Scientific name (genus)	Primer pairs sense/antisense	Approximate size of PCR product (bp)	Reaction condition*	Reference
<i>Alfalfa mosaic virus</i> (<i>Alfamovirus</i>)	TGGAGTCCCGAAAAGGGTTTAC/TAATCCACCCAGTGGAGGTCA	840	2	
<i>Aistroemia mosaic virus</i> (<i>Potyvirus</i>)	ATGGCAATTTCAACCGTTAATTC/GACATACGGGAAAAACCCGATA	960	2	
<i>Alstroemia virus X</i> (<i>Potyvirus</i>)	TAGATAAATGCCCCGACACAG/CACACACATAGTATATTA GTGA	890	2	
Amazon lily mild mottle virus (<i>Bromovirus</i>)	CTTAGCTCAAAGCCCTGAAC/AAGAGCATAACCAATGAACCA	830	2	
<i>Amazon lily mosaic virus</i> (<i>Potyvirus</i>)	ATGAATTCGAAGAATACCTG/AACAGACGTACAGGAAAATC	970	2	
<i>Arabis mosaic virus</i> (<i>Nepovirus</i>)	AGCGYGAATCTWTDATYCGCT/CAATACACTGTCCCACTAA	2080	2	
<i>Asparagus virus 2</i> (<i>Ilarvirus</i>)	TGTCGGGAGGAGATTGT/ACCACAAGTGTTCGAAGCA	830	1	
<i>Asparagus virus 3</i> (<i>Potyvirus</i>)	GAACGGGTTAAGTTTCC/TGATAGTCTGCTGTGGGA	840	1	
<i>Barley stripe mosaic virus</i> (<i>Hordeivirus</i>)	GYTGTGTTGACGCTATACTA/CAATACATCTAGTTAAMGCCGTA	750	2	
<i>Bean common mosaic virus</i> (<i>Potyvirus</i>)	ARRRAARRATTGARGARTTRG/CCACACTGAAAACAAAAGAGAAC	1030	2	
<i>Bean yellow mosaic virus</i> (<i>Potyvirus</i>)	GGNAAYAAAYAGYGGNCARCC/oligo dT	1600	1	(Yamamoto & Fuji, 2008)
<i>Beet necrotic yellow vein virus</i> (<i>Benyvirus</i>)	GGCGAAGCTTAAATTTCTAACTATTATCTCC/CAGCTAATTTGGTATTGTC	710	1	(Ehlers <i>et al.</i> , 1991)
<i>Broad bean wilt virus 1</i> (<i>Fabavirus</i>)	TTTGCYCTGATGAGCAAGT/TTAATGGGAGGCTKGGTGCT	2140	1	
<i>Broad bean wilt virus 2</i> (<i>Fabavirus</i>)	AATGARRTKGNTCTCAAYTA/TTAATGGRRGGCTAGTGACC	1190	1	(Kondo <i>et al.</i> , 2005)
Butterbur mosaic virus (<i>Carlavirus</i>)	TGAATTAGTAGAAAAGTGT/CTAACGATAAATTAATAAGATC	1150	2	
<i>Carnation motile virus</i> (<i>Carmovirus</i>)	GAAAGAGTGTATTACAAC/ATGGTTAATATCGATCCATCTY	1200	2	
<i>Carnation vein motile virus</i> (<i>Potyvirus</i>)	GGNAAYAAAYAGYGGNCARCC/oligo dT	1700	1	(Yamamoto & Fuji, 2008)
<i>Cauliflower mosaic virus</i> (<i>Caulimovirus</i>)	AACCTAAAGAAAAAGGCAAG/TGAAGCTCTATCTTCTTGTAT	1680	2	
<i>Clover yellow vein virus</i> (<i>Potyvirus</i>)	TAGAAGTGTACAATAAGATC/TAAAAACCTCACTTAACATAG	960	2	
<i>Cocksfoot mottle virus</i> (<i>Sobemovirus</i>)	AAGCTTGGAGATGGAGCTAA/TGGAGTTAGATTTCCAAAGTG	930	2	
<i>Cucumber green mottle mosaic virus</i> (<i>Tobamovirus</i>)	AAGAGATCCCAGTTATAGGTCTA/ACCGTTCGATTTAAGTGAAC	680	2	
<i>Cucumber mosaic virus</i> (<i>Cucumovirus</i>)	YASYTTDRGGTTCAAATCC/GACTGACCAATTTTAGCCG	950	2	(Choi <i>et al.</i> , 1999)
<i>Cucumber mottle virus</i> (<i>Tobamovirus</i>)	CCGATGTCGTGGTGGTTCT/TCAAAGTCATCACCTTCACAG	820	1	
<i>Cycas necrotic stunt virus</i> (<i>Nepovirus</i>)	GACATTTGGGAGCTTAGAG/CATTAGATGGATAAGTCG	1900	2	
<i>Gentian mosaic virus</i> (<i>Fabavirus</i>)	TGCACTACCCGGGGACAAGGA/oligo dT	1200	1	
<i>Grapevine Algerian latent virus</i> (<i>Tombusvirus</i>)	GACTCCGGCTAGCTTGACC/GGTTTATTGACTTGTTCGTATTTCAG	1240	1	(Koenig <i>et al.</i> , 2004)
<i>Iris Yellow Spot Virus</i> (<i>Tospovirus</i>)	CTTAACATAACAATACTG/AGAGCAATCGAGGTATAAAAAC	930	1	(善ら, 2005)
<i>Konjac mosaic virus</i> (<i>Potyvirus</i>)	CTATCTAGACCGTGATGCTAAT/CATGGCAGATAAAATACGACT	1010	2	
<i>Kyuri green mottle mosaic virus</i> (<i>Tobamovirus</i>)	GGTCCCAGTCTGCTGTACG/TTCGGTAGAAAACCCGGTAAAG	680	2	
<i>Lettuce mosaic virus</i> (<i>Potyvirus</i>)	GTTAGAAAAATACATGGAAG/TGCATACATAAACATAAAAG	1000	2	
<i>Lisianthus necrotic ringspot virus</i> (<i>Tospovirus</i>)	GCCCTTGATTTGCCCTCAGAAG/GACGAAAATCCCTTGCACACA	950	1	
<i>Melon necrotic spot virus</i> (<i>Carmovirus</i>)	CTCTGGCCCCGGGGATTACTC/TACGGCGTAAATGGTTAGCC	1440	2	

<i>Narcissus mosaic virus (Potexvirus)</i>	CCGTGGAACGGGTTAAGTTT/GTTTATTTTATTTATTTGATAGTGG	840	2
<i>Nerine virus X (Potexvirus)</i>	TGGTTAACGGCGTTCAAAATC/TGTTAGCACGTGAAAACCCAG	810	2
<i>Odontoglossum ringspot virus (Tobamovirus)</i>	GTGTGTAGATGATATTGTG/GAAAAACCCCTTCGATTTAAGT	730	2
<i>Olive latent virus 1 (Alphanecrovirus)</i>	AGYWCAAYACATTWCIATC/AGCCTGTTTCCCAGGATCCG	950	1
<i>Olive mild mosaic virus (Alphanecrovirus)</i>	AGYWCAAYACATTWCIATC/AGCCTGTTTCCCAGGATCCG	930	1
<i>Papaya ringspot virus (Potyvirus)</i>	GGNAAYAYAGYGGNCARCC/oligo dT	1800	1 (守川ら, 2006) (Yamamoto & Fujii, 2008)
<i>Peanut mottle virus (Potyvirus)</i>	ACAGATGTAGAACTTGAAGAG/CCAACACACGATAAACATAA	1040	2
<i>Peanut stunt virus (Cucumovirus)</i>	YASYTTDRGGTTCAATTCC/GACTGACCAATTTAGCCG	950	2 (Choi <i>et al.</i> , 1999)
<i>Pepper mild mottle virus (Tobamovirus)</i>	AAGGGAAGCTGTTTGATAAG/AACCCTTCGATTTAAGTGG	640	2
<i>Potato mop-top virus (Pomovirus)</i>	CGGGATCCTATGCAACAGCCAGCGT/TCGGATCCTCTCGGATACCCCTT	550	1 (Mayo <i>et al.</i> , 1996)
<i>Potato virus A (Potyvirus)</i>	CAAGTACTGAACCTGGAAAAG/AGACAAGGATACTAACAGG	940	2
<i>Potato virus S (Carlavirus)</i>	CCGTTGAAGCACCTTTAGGTT/ATAHCCCAGTCGRFRRACACA	990	2
<i>Potato virus X (Potexvirus)</i>	TGCAGAACTATCAGAGCCA/ATTCATACAAATCAAACCAG	850	2
<i>Potato virus Y (Potyvirus)</i>	GC TTTCAC TGAATGATGGT/GATAAAAAGTAGACAGGAAAAGC	950	2
<i>Radish mosaic virus (Comovirus)</i>	GARMCVTCRGCATTTGAAAG/GTACAACATCATTCCACACACC	1280	2
<i>Ryegrass mottle virus (Sobemovirus)</i>	GGAGTCTGGAAAATGGAATTAG/CGAAGTGGCATTGGGTATT	860	2
<i>Sikte waterborne virus (Tombusvirus)</i>	GACTCCGGCTAGCTTGACC/GGTTTATTGACTTGTTCGTATTGACG	1240	1 (Koenig <i>et al.</i> , 2004) (Yamamoto & Fujii, 2008)
<i>Sorghum mosaic virus (Potyvirus)</i>	GGNAAYAYAGYGGNCARCC/oligo dT	2140	1
<i>Soybean mosaic virus (Potyvirus)</i>	GTGACTACAAAGATATCTTGA/AGTGCAACTACTATATTATAG	940	2
<i>Squash mosaic virus (Comovirus)</i>	ACAGTGTGATAAATGAAGTAG/CCATCCAAATGGATTATAAAGT	1250	2
<i>Sugarcane mosaic virus (Potyvirus)</i>	GGNAAYAYAGYGGNCARCC/oligo dT	950	1 (Yamamoto & Fujii, 2008)
<i>Tobacco mild green mosaic virus (Tobamovirus)</i>	AAGTTGAGGAAATTGAGGA/ACTGCTGATTTTGGTATCA	630	2
<i>Tobacco mosaic virus (Tobamovirus)</i>	TAATCGATGATGATTCGGA/AAAAACACTATGGGTTATCG	610	2
<i>Tobacco necrosis virus A (Alphanecrovirus)</i>	AGYWCAAYACATTWCIATC/AGCCTGTTTCCCAGGATCCG	940	1
<i>Tobacco ringspot virus (Nepovirus)</i>	CCCTACAATCCAAACCAG/GGGCTACCAATCCCTGGTTAGAAG	1650	2
<i>Tomato aspermy virus (Cucumovirus)</i>	YASYTTDRGGTTCAATTC/GACTGACCAATTTTAGCCG	950	2 (Choi <i>et al.</i> , 1999)
<i>Tomato mosaic virus (Tobamovirus)</i>	TTTGATTGAAGATGAAGCCGA/AAAAACACTGTACGTTATC	610	2
<i>Tomato ringspot virus (Nepovirus)</i>	CGATAGGACCGCAGCAGGGAAC/GAGGCCACCTTTTGGAAAGCTG	1820	2
<i>Tomato spotted wilt virus (Tospovirus)</i>	ACACACTAAGCAAGCACAAAGC/AGTTGTACTTTCGCACCTTGA	920	2
<i>Turnip mosaic virus (Potyvirus)</i>	CCAGCTCAAGAGGACCTCAC/CCCATAGCGAGAATACTAACGAG	1010	2
<i>Wasabi mottle virus (Tobamovirus)</i>	GAAGATTGGAGGAAGGATGT/ACGGCGTAAGAATACCTCTTC	630	2
<i>Watermelon mosaic virus (Potyvirus)</i>	AATTGCAAAAATACCTTGAAG/TATAGAAAACTTGTAAACGAC	970	2
<i>Youcai mosaic virus (Tobamovirus)</i>	AGTATAGATA TAGACCCGGAG/ATTACACCGTAAGTATATCTC	600	2
<i>Zucchini yellow mosaic virus (Potyvirus)</i>	ACCTACAAGCCCTCCATCAAG/TAGAAATTACGTCGGGAGCGA	950	2

Reaction condition* is 1. RT-PCR with PrimeScript One Step RNA PCR Kit Ver. 2 (Takara), and 2. RT-PCR with One-Step RT-PCR kit (QIAGEN). See the materials and methods for details.

本稿で報告したプライマー対は、いずれもジーンバンクで公開中の植物ウイルス株のゲノムのうち、特に分類の基準や検出の標的となることが多い外被タンパク質のコーディング領域を増幅させることができるため、感染の確認や増殖量の解析、他のウイルスとの識別、ウイルスゲノムの塩基配列解析等に利用できると考えられる。また得られたRT-PCR産物の塩基配列を、ダイレクトシーケンス法を用いて解析し、外被タンパク質を構成する主要タンパク質のコーディング領域部分の塩基配列として順次ジーンバンクの遺伝資源データベースで公開している (<https://www.gene.affrc.go.jp/databases.php>)。このデータベースでは、個々の株に付与されているMAFF番号を検索することで、その来歴や宿主、採取された時期、また株に関する文献を知ることができる。

4. 外被タンパク質遺伝子の塩基配列解析とウイルス株の学名変更

植物ウイルス研究の初期においては、形状や宿主範囲等から分類がなされていたが、遺伝子解析技術の進歩によりウイルスゲノムの塩基配列の解析が行われ、それに伴いウイルスの分類も変更を重ねてきている。塩基配列の解析結果から学名変更が必要と判断された

ジーンバンクのウイルス株を表3にまとめた。

例えば1995年に発刊された国際ウイルス分類委員会 (International Committee on Taxonomy of Viruses, ICTV) の6次報告において *Tombusviridae* 科には *Tobacco necrosis virus* (TNV) 1種のみが報告されており、*Tobacco necrosis virus A* (TNV-A) と *Tobacco necrosis virus D* (TNV-D) は系統として位置づけられていた。現在ではこれらは別種として扱われており、2011年に発刊された9次報告においては、*Tombusvirus* 属や *Necrovirus* 属など8属と2種の暫定種が記載されている。そこでジーンバンクで登録・公開あるいは未公開株の *Necrovirus* 属として保存されてきたMAFF260085, MAFF260086, MAFF307005, MAFF30007, MAFF307011 および MAFF307013 の各ウイルス株について、外被タンパク質の遺伝子配列の解析を行い、ICTVの新分類と比較検討した結果、MAFF260085 と MAFF307007 は *Necrovirus* 属の TNV-A に、MAFF260086, MAFF307005 および MAFF307013 は *Necrovirus* 属の *Olive latent virus 1* (OLV1) に、MAFF307011 は *Necrovirus* 属の *Olive mild mosaic virus* (OMMV) に再分類され登録・公開されている (藤ら, 2011)。

Tobacco mosaic virus として登録、公開されていた

表3 Reclassified plant viruses by the analysis of viral capsid/coat protein genes

MAFF accession Nos.	Formerly indicated scientific name	Corrected scientific name
104049	<i>Broad bean wilt virus 1</i>	<i>Broad bean wilt virus 2</i>
104050	<i>Broad bean wilt virus 1</i>	<i>Broad bean wilt virus 2</i>
104068	<i>Broad bean wilt virus 1</i>	<i>Gentian mosaic virus</i>
307009	<i>Broad bean wilt virus 1</i>	<i>Broad bean wilt virus 2</i>
307015	<i>Broad bean wilt virus 1</i>	<i>Broad bean wilt virus 2</i>
715032	<i>Broad bean wilt virus 1</i>	<i>Broad bean wilt virus 2</i>
260017	<i>Tobacco mosaic virus</i>	<i>Tomato mosaic virus</i>
260067	<i>Tobacco mosaic virus</i>	<i>Tomato mosaic virus</i>
260068	<i>Tobacco mosaic virus</i>	<i>Tomato mosaic virus</i>
260070	<i>Tobacco mosaic virus</i>	<i>Tomato mosaic virus</i>
104033	<i>Tobacco mosaic virus</i>	<i>Wasabi mottle virus</i>
104036	<i>Tobacco mosaic virus</i>	<i>Tobacco mild green mosaic virus</i>
260003	<i>Tobacco mosaic virus</i>	<i>Youcai mosaic virus</i>
260008	<i>Tobacco mosaic virus</i>	<i>Tomato mosaic virus</i>
260058	<i>Tobacco mosaic virus</i>	<i>Youcai mosaic virus</i>
260085	<i>Tobacco necrosis virus</i>	<i>Tobacco necrosis virus A</i>
260086	<i>Tobacco necrosis virus</i>	<i>Olive latent virus 1</i>
307005	<i>Tobacco necrosis virus</i>	<i>Olive latent virus 1</i>
307007	<i>Tobacco necrosis virus</i>	<i>Tobacco necrosis virus A</i>
307011	<i>Tobacco necrosis virus</i>	<i>Olive mild mosaic virus</i>
307013	<i>Tobacco necrosis virus</i>	<i>Olive latent virus 1</i>

ウイルスの外被タンパク質遺伝子の塩基配列についても検討した結果、一部は別の種であることが示唆されたため、河野ら (2005) による血清学的分類検証の結果も参考にして MAFF104033 は *Wasabi mottle virus*, 104036 は *Tobacco mild green mosaic virus*, MAFF260003 および MAFF260058 は *Youcai mosaic virus*, また MAFF260008, MAFF260017, MAFF260067, MAFF260068 および MAFF260070 は *Tomato mosaic virus* として再分類した (一木ら, 2015). *Tobacco mosaic virus* が属するタバコウイルスの分類については、大木 (2005) によって概説されているように、かつて *Wasabi mottle virus* はタバコモザイクウイルス-ワサビ系, *Tobacco mild green mosaic virus* はタバコモザイクウイルス-U 系統, *Youcai mosaic virus* はタバコモザイクウイルス-アブラナ科系, *Tomato mosaic virus* はタバコモザイクウイルス-トマト系として分類されていたこと、またジーンバンクにおいて保存維持されていた株は 1970 年から 1980 年代という、遺伝子解析による分類が現在ほど進んでいない時期に分離されていたことから、今回のような結果が生じたと考えられる。

またソラマメウルトウイルス (*Broad bean wilt virus*, BBWV) が、血清学的特性が異なる *Broad bean wilt virus 1* (BBWV-1) および *Broad bean wilt virus 2* (BBWV-2) という二つの異なるウイルス種に分類されるようになったことから (Goldbach *et al.*, 1995), ジーンバンクのウイルス株についても外被タンパク質遺伝子の塩基配列を解析した結果, MAFF104049, MAFF104050, MAFF307009, MAFF307015, MAFF715032 は BBWV-2 に再分類された (藤ら, 2013). また BBWV-1 として登録されていた MAFF104068 はリンドウモザイクウイルス (*Gentian mosaic virus*, GeMV) に分類された (Kobayashi *et al.*, 2005).

5. まとめ

ジーンバンクにおいてウイルスの保存、配布が開始されたのは 1985 年であり、それ以前に分離されたウイルスも多数保存している。そのため、分離後再分類が提案されたウイルスについては、今回の塩基配列解析により改めて新しい学名に修正されるべき株が複数存在する。遺伝子解析による分類検証は、ジーンバンクで公開されているウイルスの正確な学名を周知するだけでなく、抵抗性品種の育種や検出法の開発等、植物ウイルスの防除や利用に関する研究を始める際に必

要な基本情報を提供する重要な作業である。

これまでに配布された植物ウイルス株のうち、特に配布希望の多かったウイルス株は *Cucumovirus* 属, *Potyvirus* 属, *Tobamovirus* 属に属するウイルスであった。また最近の傾向として、近年問題となっている *Tomato spotted wilt virus* の配布申込も増えている。今後、農業生産環境の変化、農作物の流通の増加、外国産農作物や種苗の輸入の拡大等に伴い、新たなウイルス病害や再興ウイルス病害が発生、増加する傾向がある (Tsuda & Sano, 2014)。このような農業生産に関する懸案に対応するためにも、登録株の受け入れを積極的に行い、公開配布するウイルス株を充実するとともに、遺伝子解析に基づいた各ウイルス株についての正確な情報を提供していくこととしている。

文 献

- Choi, S.K., Choi, J.K., Park, W.M. & Ryu, K.H. 1999. RT-PCR detection and identification of three species of cucumoviruses with a genus-specific single pair of primers. *J. Virol. Methods* **83**: 67-73.
- Ehlers, U., Commandeur, U., Frank, R., Landsmann, J., Koenig, R. & Burgermeister, W. 1991. Cloning of the coat protein gene from beet necrotic yellow vein virus and its expression in sugar beet hairy roots. *Theor. Appl. Genet.* **81**: 777-782.
- Fuji, S., Kikuchi, S., Ueda, S., Toda, T., Furuya, H., Fukumoto, F. & Hanada, K. 2013. Characterization of a new anulavirus isolated from Amazon lily plants. *Arch. Virol.* **158**: 201-206.
- 藤 晋一, 原 祐介, 福本文良, 藤永真史, 大段隆史, 戸田 武, 古屋廣光, 花田 薫 2013. 日本産ソラマメウルトウイルス 2 (BBWV2) の遺伝的多様性. *日本植物病理学会報* **79**: 224.
- 藤 晋一, 大段隆史, 花田 薫 2011. 農業生物資源ジーンバンクに保存されているタバコネクロシウイルスの分子分類. *日本植物病理学会報* **77**: 227.
- Goldbach, R., Martelli, G.P. & Milne, R.G. 1995. Family *Comoviridae*. In Murphy, F.A., Fauquet, C.M., Bishop, D.H.L., Ghabrial, S.A., Jarvis, A.W., Martelli, G.P., Mayo, M.A., Summers, M.D. (eds.), *Virus Taxonomy*, p. 341-347, Springer, Wien.
- 花田 薫 2012. 植物ウイルスの特性とその保存について. *微生物遺伝資源利用マニュアル* **31**: 1-66.
- Hanada, K., Kusunoki, M. & Iwaki, M. 1986. Properties of virus particles, nucleic acid and coat

- protein of cycas necrotic stunt virus. *Ann. Phytopath. Soc. Japan* **52**: 422-427.
- 一木 (植原) 珠樹, 花田 薫, 藪中恭子, 大橋美保, 杉本るり子, 青木孝之, 澤田宏之, 永井利郎, 根本博 2015. 農業生物資源ジーンバンクが保有する植物ウイルス株の特性評価—塩基配列解析による *Tobacco mosaic virus* の登録学名変更—. *日本植物病理学会報* **81**: 281.
- Kato, K., Hanada, K. & Kameya-Iwaki, M. 2000. *Melon yellow spot virus*: a distinct species of the Genus *Tospovirus* isolated from melon (*Cucumis melo* L.). *Phytopathology* **90**: 422-426.
- 河野敏郎, 高橋幸吉, 高橋義行 2005. 旧タバコモザイクウイルス保存株の血清学的な検証. *関東東山病害虫研究会報* **52**: 13-18.
- 岸 国平 1966. メロンえそ斑点病. *日本植物病理学会報* **32**: 138-144.
- Kobayashi, Y.O., Kobayashi, A., Hagiwara, K., Uga, H., Mikoshiba, Y., Naito, T., Honda, Y. & Omura, T. 2005. Gentian mosaic virus: A new species in the Genus *Fabavirus*. *Phytopathology* **95**: 192-197.
- Koenig, R., Verhoeven, J.T., Fribourg, C.E., Pfeilstetter, E. & Lesemann, D.E. 2004. Evaluation of various species demarcation criteria in attempts to classify ten new tombusvirus isolates. *Arch. Virol.* **149**: 1733-1744.
- Kondo, T., Fuji, S., Yamashita, K., Kang, D.K. & Chang, M.U. 2005. *Broad bean wilt virus 2* in yams. *J. Gen. Plant Pathol.* **17**: 441-443.
- Mayo, M.A., Torrance, L., Cowan, G., Jolly, C.A., Macintosh, S.M., Orrega, R., Barrera, C. & Salazar, L.F. 1996. Conservation of coat protein sequence among isolates of potato mop-top virus from Scotland and Peru. *Arch. Virol.* **141**: 1115-1121.
- 守川俊幸, 多賀由美子, 向井 環, 堀井香織, 兼松誠司, 棚橋 恵, 大木健広, 津田新哉 2006. チューリップから分離されるネクロウイルスの種類と病原性. http://www.naro.affrc.go.jp/org/narc/seika/kantol8/14/18_14_13.html. 最終訪問日 2015 年 11 月 25 日.
- 奥田 充 2015. ウイルス病検定マニュアル Ver. 3 (更新 2015 年 9 月 30 日). https://ml-wiki.sys.affrc.go.jp/okuda_wiki/manuals. 最終訪問日 2015 年 11 月 25 日.
- 大木 理 2005. 日本に発生するトバモウイルスの再分類の経緯. *植物防疫* **59**: 25-28.
- Orita, H., Sakai, J., Kubota, K., Okuda, M., Tanaka, Y., Hanada, K., Imamura, Y., Nishiguchi, M., Karasev, A.V., Miyata, S. & Iwanami, T. 2007. Molecular and serological characterization of cucumber mottle virus, a new cucurbit infecting tobamo-like virus. *Plant Dis.* **91**: 1574-1578.
- Shimomoto, Y., Kobayashi, K. & Okuda, M. 2014. Identification and characterization of *Lisianthus necrotic ringspot virus*, a novel distinct tospovirus species causing necrotic disease of *lisianthus* (*Eustoma grandiflorum*). *J. Gen. Plant Pathol.* **80**: 169-175.
- 下山 淳, 亀谷満朗, 花田 薫, 郡司孝志 1992. コンニャクモザイクウイルス-コンニャクに発生した新 potyvirus について. *日本植物病理学会報* **58**: 706-712.
- Terami, F., Honda, Y. & Fukumoto, F. 1995. Amazon Lily Mosaic Virus, a New Potyvirus Infecting Amazon Lily (*Eucharis grandiflora*). *日本植物病理学会報* **61**: 1-6.
- Tomioka, K., Sato, T., Hanada, K., Yamasaki, F., Nagai, T., Sawada, H., Takeya, M. & Aoki, T. 2012. Plant viruses and viroids released from the NIAS Genebank Project, Japan. *Microbiol. Cult. Coll.* **28**: 35-40.
- Tsuda, S. & Sano, T. 2014. Threats to Japanese agriculture from newly emerged plant viruses and viroids. *J. Gen. Plant Pathol.* **80**: 2-14.
- Yamamoto, H. & Fuji, S. 2008. Rapid determination of the nucleotide sequences of potyviral coat protein genes using semi-nested RT-PCR with universal primers. *J. Gen. Plant Pathol.* **74**: 97-100.
- 善正二郎, 奥田 充, 海老原克介, 植松清次, 花田 薫, 岩波 徹, 中島貞彦 2005. タマネギ (*Allium cepa*) から分離された *Iris yellow spot virus* (IYSV) の遺伝的特性および IYSV2 系統のタマネギおよびネギ (*Allium schoenoprasum*) に対する病原性. *日本植物病理学会報* **71**: 123-126.

Detection and application of viral capsid/coat protein genes of plant viruses preserved in the NARO Genebank (MAFF)

Tamaki Uehara-Ichiki¹⁾, Shin-ichi Fuji²⁾, Ruriko Sugimoto¹⁾, Miho Ohashi¹⁾, Kyoko Yabunaka¹⁾, Momoko Kitaya²⁾,
Kazuo Yamashita³⁾, Kaoru Hanada¹⁾ and Takayuki Aoki¹⁾

¹⁾Genetic Resources Center, National Agriculture and Food Research Organization,

²⁾Bioresource Sciences, Akita Prefectural University,

³⁾Vegetable Research Institute, Aomori Prefectural Industrial Technology Research Center

The Genebank Project at the National Agriculture and Food Research Organization (NARO) is working to conserve and promote agrobiological genetic resources. The Microorganism section of the Genebank collects, characterizes, preserves, and distributes microorganism genetic resources such as fungi, bacteria, and plant viruses. These resources, which are assigned descriptors called MAFF numbers, totaled about 32,500 strains as of 2016. Plant virus strains in the Microorganism section have been classified on the basis of scientific data from depositors and their experimental characterization in comparison with reports of the International Committee on Taxonomy of Viruses. To improve the convenience of use and reliability of virus strains, we are working on determining and providing the base sequences of the capsid/coat protein (CP) genes of virus strains. Here, we demonstrate the successful use of over 60 gene-specific primer pairs for sequence definition of viral CP genes, as well as the experimental conditions used for RT-PCR.

By using these primer pairs we were able to completely amplify the CP genes of the target virus strains. We also report several virus strains belonging to *Necrovirus*, *Tobamovirus*, and *Fabavirus* that were re-identified on the basis of their CP gene sequences.