

氏 名(本籍)	さか 酒	い 井	じゅん 淳	いち 一
学位の種類	博 士 (農 学)			
学位記番号	農 第 6 8 2 号			
学位授与年月日	平 成 16 年 6 月 17 日			
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 2 項該当			

学位論文題目	サツマイモに発生するポティウイルスの遺伝子構造と診断法に関する研究			
--------	-----------------------------------	--	--	--

論文審査委員	(主 査)	教 授	羽 柴 輝 良
	(副 査)	教 授	池 上 正 人
		教 授	國 分 牧 衛

論文内容要旨

緒言

わが国の西南暖地ではサツマイモが重要な作物として位置づけられており、サツマイモ栽培面積のほぼ半分が九州・沖縄地域で占めている。

1979年、鹿児島県および宮崎県のサツマイモ塊根に帯状粗皮病（第1図A）と呼ばれる症状が発生し、サツマイモ産地では大きな被害を受けた。その後、帯状粗皮病の病原はサツマイモ斑紋モザイクウイルス（*Sweet potato feathery mottle virus: SPFMV*）の一系統であることが明らかにされた。現在ではウイルスフリー苗の普及により帯状粗皮病の発生はほとんどみられなくなったが、SPFMVは依然としてサツマイモの生産阻害要因のひとつとして挙げられている。SPFMVはポティウイルス科ポティウイルス属に分類されるひも状ウイルスであり（第1図B）、わが国には4つの系統がある。一方、SPFMV以外にポティウイルス属に分類されている Sweet potato virus G (SPVG) およびサツマイモ潜在ウイルス（Sweet potato latent virus: SPLV）も発生している。

本研究では、これらポティウイルスの遺伝子構造解析を行い、ウイルス種間または種内系統間の類縁関係を明らかにした。また、SPFMVの4系統およびSPVGについて遺伝子診断（RT-PCR-RFLP）法による同時検出・系統識別法を開発した。

1. サツマイモに発生するポティウイルスの遺伝子構造解析

(1) SPFMV 4 系統の遺伝子構造解析

サツマイモ帯状粗皮病の病原ウイルスである SPFMV 強毒系統 (SPFMV-S) のゲノム RNA の全塩基配列 10,820 塩基（ポリ A 配列を除く）を明らかにした。SPFMV-S のゲノム RNA の塩基配列から、3,493 アミノ酸からなるオープンリーディングフレーム (ORF) を見いだした。ポティウイルスの翻訳様式はゲノム RNA から polyprotein と呼ばれる ORF のタンパク質が翻訳され、その後、ウイルスが持つプロテアーゼによって個々の機能を持ったウイルスタンパク質に切断される（プロセッシング）ことが知られている。SPFMV-S の polyprotein には他のポティウイルスと同様なプロセッシング部位が見いだされたことか

ら、10個のウイルスタンパク質からなる SPFMV-S の遺伝子構造を推定した（第2図）。SPFMV-S のそれぞれのウイルスタンパク質および polyprotein のアミノ酸配列について、20種のポティウイルスと比較した（第1表）。SPFMV-S のウイルスタンパク質 CI、6k2、N1a-VPg、N1a-Pro、N1b および、polyprotein のアミノ酸配列は *Plum pox virus* (PPV) と 50～70%の相同性を示したが、他のポティウイルスとは低い相同性を示した。

SPFMV 普通系統 (SPFMV-O) のゲノム RNA の全塩基配列 10,895 塩基（ポリ A 配列を除く）を明らかにした。SPFMV-O のゲノム RNA は塩基配列から、3,518 アミノ酸からなる ORF をコードしていた。SPFMV-O は SPFMV-S と同様に 10 個のウイルスタンパク質からなる遺伝子構造を取っていた。

SPFMV 徳島系統 (SPFMV-T) ではゲノム RNA のほぼ全長の塩基配列を明らかにした。SPFMV-T は 3,466 アミノ酸からなる ORF を持ち、遺伝子構造は SPFMV-S および SPFMV-O と同様であった。

SPFMV-JC は本研究で新たに見いだした SPFMV の系統である。SPFMV-JC のゲノム RNA の 3'末端領域の塩基配列を解析し、外被タンパク質が 313 アミノ酸、3'末端非翻訳領域が 225 塩基からなることを明らかにした。

(2) SPVG の遺伝子構造解析

SPVG は本研究で新たに見いだしたウイルスである。SPVG のゲノム RNA の 3'末端領域の塩基配列を解析し、外被タンパク質が 355 アミノ酸、3'末端非翻訳領域が 221 塩基からなることを明らかにした。

(3) SPLV の遺伝子構造解析

SPLV のゲノム RNA の 3'末端領域の塩基配列を解析し、外被タンパク質が 293 アミノ酸、3'末端非翻訳領域が 197 塩基からなることを明らかにした。

本研究で明らかにした SPFMV 4 系統、SPVG および SPLV の遺伝子構造の詳細を第2表に示した。

2. サツマイモに発生するポティウイルスの分子系統学的解析

(1) 外被タンパク質のアミノ酸配列の相同性

SPFMV の 4 系統、SPVG および SPLV の外被タンパク質のアミノ酸配列を比較した (第 3 図)。外被タンパク質の N 末端部には多くの変異が認められたが、その他の部分では変異は少なく、相同性は高かった。SPFMV 系統内では相同性が 95.6~74.4% であり、高い遺伝的多様性が認められた。一方、SPFMV は別種のポティウイルスである SPVG とは 74.1~79.0%、SPLV とは 58.7~59.5% の相同性であった (第 3 表)。

(2) 外被タンパク質のアミノ酸配列をもとにした分子系統学的解析

わが国のサツマイモに発生している SPFMV の 4 系統、SPVG および SPLV と海外で発生している分離株の類縁関係を明らかにするため、外被タンパク質のアミノ酸配列をもとに分子系統樹を作成した (第 4 図)。SPFMV は 3 つのサブグループに分けられた。SPFMV-S および SPFMV-O はサブグループ 1 に、SPFMV-JC はサブグループ 2 に、SPFMV-T はサブグループ 3 に分けられた。サブグループ間の外被タンパク質のアミノ酸配列の相同性はサブグループ 1 と 2 では 79.5~84.4%、サブグループ 1 と 3 では 71.2~74.4%、サブグループ 2 と 3 では 70.2~73.3% であった。このことからサブグループ 3 に属す SPFMV-T は SPFMV とは別種のウイルスである可能性が示唆された。

(3) オープンリーディングフレーム (ORF) のアミノ酸配列をもとにした分子系統学的解析

SPFMV-T の分類上の位置付けを明らかにするため、ORF のアミノ酸配列をもとにして 20 種のポティウイルスを用いて分子系統樹を作成した (第 5 図)。SPFMV-T と SPFMV-S および SPFMV-O との分岐パターンから SPFMV-T は SPFMV とは別種のウイルスとして分類するのが妥当と判定した。

3. SPFMV および SPVG の診断法の開発

(1) 血清学的診断法

SPFMV-S および SPVG の外被タンパク質を大腸菌で発現させ、得られたそれぞれの外被タンパク質を家兎に免疫して抗血清を作製した。作製した SPFMV-S および SPVG の抗血清を用いて野外から採取した感染サツマイモ葉について DIBA (dot immuno binding assay) 法による血清学的診断を行い、同時に遺伝子診断法による系統識別を行い、作製した抗血清の特異性を検討した。DIBA 法による血清学的診断の場合、野外のサツマイモ葉では両ウイルスを特異的に検出することはできなかった。抗血清を用いた診断では特異性は外被タンパク質のアミノ酸配列の相同性に依存しており、SPFMV の複数の系統や SPVG が重複感染しているサツマイモではそれぞれを特異的に検出することは困難であった。

(2) 遺伝子診断法

RT-PCR-RFLP 法によって SPFMV 4 系統および SPVG を識別する方法を開発した。これらのウイルスを同時に検出するための共通プライマー (第 6 図) を用いて RT-PCR を行った後、制限酵素 *AluI* および *HhaI* でそれぞれ処理し、アガロースゲル電気泳動のバンドパターンから系統の判別を行った (第 4 表)。増幅 DNA を *AluI* で処理すると SPFMV-S、SPFMV-O および SPVG は異なった切断パターンを示したことから、識別できたが SPFMV-JC と SPFMV-T の識別はできなかった (第 7 図 A)。次に、*HhaI* で処理すると SPFMV-JC と SPFMV-T の識別が可能になった (第 7 図 B)。

本法を用いて野外から採取した感染サツマイモ葉を用いて系統判別を行ったところ、SPFMV の 4 系統および SPVG が重複感染している場合でも、これらのウイルスの検出・識別が可能であった。

4. まとめ

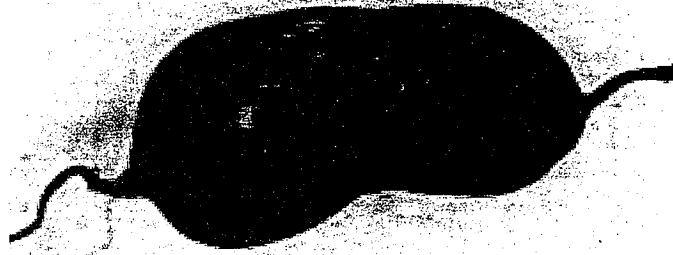
本研究ではわが国のサツマイモに発生しているポティウイルス、SPFMV の 4 系統、SPVG および SPLV の遺伝子構造解析を行い、これら 3 種のポティウイルスの種間および SPFMV

系統間の類縁関係を明らかにした。外被タンパク質のアミノ酸配列をもとにして作成した分子系統樹からは SPFMV 系統内で遺伝的多様性が示された。さらに、ORF のアミノ酸配列をもとにして作成した分子系統樹から SPFMV-T は SPFMV とは別種のウイルスとして分類するのが妥当であると結論づけた。

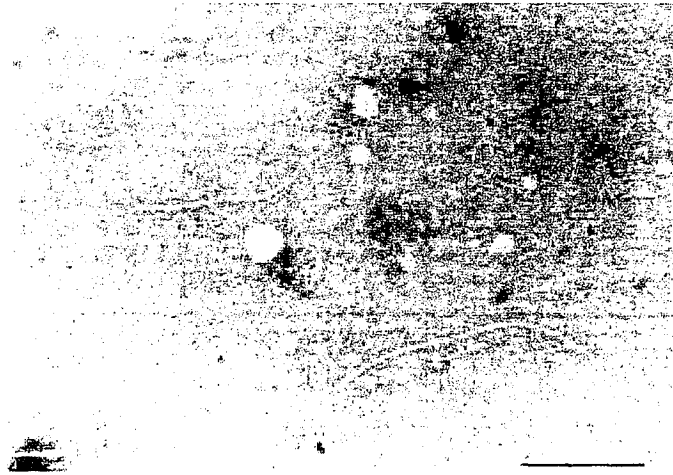
SPFMV の 4 系統および SPVG で明らかにした塩基配列をもとに遺伝子診断法を開発した。本遺伝子診断法はこれらウイルスの同時検出・系統識別を 1 回の実験操作で行うことができ、抗血清を用いた血清学的診断法と比較して簡便・高精度な診断法として利用できることを示した。

サツマイモは栄養繁殖性であるため、複数のウイルスまたはウイルス系統に重複感染している場合が多い。特に SPFMV はウイルスの分離が困難であることから、SPFMV の系統の性状に関する詳細な研究はほとんど行われていなかった。本研究では、近年進展著しい分子生物学的手法を用いることにより SPFMV の系統の遺伝的特性を明らかにした。これらの SPFMV の系統に関する基礎的データは今後 SPFMV 系統間の相互作用や病原性を解明する上で大いに貢献すると考えられる。さらに、遺伝子診断法の活用により、ウイルスフリー苗などのウイルス検定を効率よく行うことができ、SPFMV による帯状粗皮病の防除に寄与するものと期待される。

A

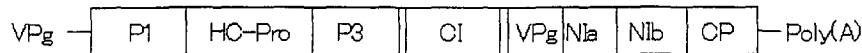


B



第1図 SPFMV-Sによるサツマイモ帯状粗皮病.
A: 帯状粗皮病に罹病したサツマイモ塊根
B: 帯状粗皮病の病原ウイルスであるSPFMV-Sの
電子顕微鏡写真、バーは500nm.

6K1 6K2 NIa



第2図 SPFMV-SのゲノムRNAの遺伝子構造.

CP: 外被タンパク質

第1表 SPFMV-Sと他のポティウイルスの各タンパク質のアミノ酸配列の相同性(%) .

Virus	P1	HC-Pro	P3	6K1	CI	6K2	NIaVPg	NIaPro	NIb	CP	Polyprotein
BCMVV	23.7	51.4	24.4	52.9	57.3	24.5	57.1	50.4	60.4	57.1	48.9
BYMV	25.9	50.7	26.3	46.2	58.0	43.4	50.8	47.3	65.0	59.7	50.2
CIYVV	25.0	50.2	29.0	48.1	57.4	32.1	47.6	46.9	62.9	55.6	48.9
JGMV	21.9	44.0	21.5	48.8	53.3	36.5	53.5	36.0	60.0	52.8	45.6
JYMV	23.0	53.8	28.7	53.8	60.5	41.5	57.4	56.8	62.5	63.5	52.0
LMV	26.6	53.5	24.0	51.9	53.6	45.3	47.9	56.4	67.2	56.9	49.4
MDMV	19.3	47.9	24.9	42.3	56.2	44.2	48.1	41.3	60.0	53.5	47.0
PepMoV	27.3	49.3	27.1	48.0	53.4	46.2	53.5	51.2	60.0	57.5	48.6
PPV	25.4	53.1	30.7	51.9	61.7	50.9	58.1	66.3	69.1	60.0	54.3
PRSV	25.8	51.9	28.4	51.9	55.5	30.2	51.9	48.5	60.8	57.6	47.7
PSbMV	23.0	46.8	21.0	31.4	56.9	32.1	50.3	47.3	61.8	54.4	46.5
PStV	23.8	52.1	30.9	43.1	57.3	26.4	56.2	52.5	61.1	58.0	49.6
PVA	21.9	57.2	27.9	54.9	57.2	37.7	50.8	56.8	61.3	60.2	50.9
PVY	30.8	48.2	25.2	40.0	54.7	44.2	50.8	51.0	61.6	58.6	48.8
SMV	23.8	51.0	25.1	45.1	57.3	28.3	56.2	50.0	62.1	58.3	49.3
TEV	23.7	54.3	27.2	42.3	55.6	41.5	48.4	54.1	63.9	61.2	50.1
TuMV	22.4	55.5	26.5	57.7	59.8	37.7	58.9	62.1	66.3	59.4	52.1
TYMV	23.5	56.2	27.8	56.9	56.2	30.2	52.7	49.4	61.3	55.8	50.0
YMV	28.7	52.2	30.9	54.0	58.2	44.2	57.3	53.9	65.4	54.0	51.9
ZYMV	27.3	49.4	23.5	49.0	55.0	20.8	51.9	45.0	61.2	55.4	47.6

赤字は各タンパク質での相同性の最大値を示す

第2表 SPFMV 4系統、SPVGおよびSPLVの遺伝子構造と各タンパク質のアミノ酸数.

Virus	P1	HC-Pro	P3	6K1	CI	6K2	NIa-VPg	NIa-Pro	NIb	CP
SPFMV-S	664	458	352	52	643	53	192	243	521	315
SPFMV-O	689	458	352	52	643	53	192	243	521	315
SPFMV-T	618	458	352	52	643	53	194	243	521	332
SPFMV-JC	-	-	-	-	-	-	-	-	-	313
SPVG	-	-	-	-	-	-	-	-	-	355
SPLV	-	-	-	-	-	-	-	-	-	293

-は未解析


```

1 60
SPFMV-S SSERTEFKDAGAN.....PP..APKQNI PP.....PP
SPFMV-O SGKTEFKDAGAN.....PP..DPKSKI NPP.....PP
SPFMV-JC SGNPSEFKDAGAN.....PP..APKPKGPT.....AP
SPFMV-T .SGTEETKQAGTPTPGKLVKTR.....TGQTQPLKAP..EGSMQPTD.....PP.....PP
SPVG ..SACEI YDAGKT..GNTGRGRGRTVPPPPPPGAPRTGDLPPAVQTGPLPPGAASKPP
SPLV ..ADDTILDAGKV.....

61 120
SPFMV-S TITEVTDPEDPKQAAALRAARAKQPATIP.....ESYGRDTSKEKESI VGASSK
SPFMV-O TITEVTDPEDPKQAAALRAARAKQPATIP.....ESYGRDTSKEKESI VGTSSK
SPFMV-JC EITEVTEPEDPKQAAALREARQKQPAVIP.....ESYGRD...SEKPMRSVSPQ
SPFMV-T TVEEIIEETPAQKALREARQKQPAK.....QPSYTYGRDTGPRSPRQVT..TTS
SPVG IIEEILQEPSPRAKALREARQKQPATIPDSRGVDTSQIPSFPTGROQT..MTPTQR..TST
SPLV ...DTKRNRNTGETSQSSTAPQPRVED.....KGKEIAPVGGGEVA..RT

121 180
SPFMV-S GARDKQVWVGTVGTFFVPRVKNANKKQKQPMVNGRAIIFNQHLSTYEPEQYEVANTRSTQ
SPFMV-O GVRDKQVWVGTVGTFFVPRVKNANKKQKQPMVNGRAIIFNQHLSTYEPEQYEVANTRSTQ
SPFMV-JC RVKDKQVWVGTGTTFVPRVKNLHLSKMRQPRI NGI SVVNLQHLATYEPEQHNIGNTRSTQ
SPFMV-T GVRDRDWNAGTVGTFFVPRLQITSSKKLPI VDRPVI NLDHLAVYDPEQTNLANTRSTQ
SPVG GVRDRDWNAGTVGTFFVPRLQITSSKKRPMANGRI VVNLHLTI YDPEQTSLSNTRATRQ
SPLV SELORDINTGTLGTFQVPRLRAIPTKIRLPLVKSQAALNLDHLLVYKPSQLDITNAKATR

181 240
SPFMV-S EQFQAWYEGVKGDYGVDDTGMI LLNGLMWCIENTGSPNINGVWITMDGDEQVYPI KP
SPFMV-O EQFQAWYEGVKGDYGVDDTGMI LLNGLMWCIENTGSPNINGVWITMDGDEQVYPI KP
SPFMV-JC EQFQAWYEGVKGDYGVDDAGMA LLNGLMWCIENTGSPNINGVWITMDGDEQVYPI KP
SPFMV-T EQFKAWYDGVKGDYGVSDAEMGI LLNGLMWCIENTGSPNINGMVMMDGDEQVYPI KP
SPVG EQFNAWYEGVREDYGVNDEQMG LLNGLMWCIENTGSPNINGMVMMDGDEQVYPI KP
SPLV SQFNQWYEGVKNAVEVDDQMS LLNGLMWCIENTGSPNINGMVMMDGDTQVSYPI KP

241 300
SPFMV-S LLDHAYPTFRQIMTHFSVVAEAYIEMFNRTKAYMPRYGLQRNLDMSLARYAFDFYELHS
SPFMV-O LLDHAYPTFRQIMTHFSVVAEAYIEMFNRTKAYMPRYGLQRNLDMSLARYAFDFYELHS
SPFMV-JC LLDHAYPTFRQIMTHFSVVAEAYIEMFNRTKAYMPRYGLQRNLDMSLARYAFDFYELHS
SPFMV-T LLDHAYPTFRQIMTHFSVVAEAYIEMFNRTKAYMPRYGLQRNLDMSLARYAFDFYELHS
SPVG LLDHAYPTFRQIMTHFSVVAEAYIEMFNRTKAYMPRYGLQRNLDMSLARYAFDFYELHS
SPLV LIDFAAPTFRQIMKHFSDVAEAYIQMNAEQPYMPRYGLQRNLDMSLARYAFDFYEVTS

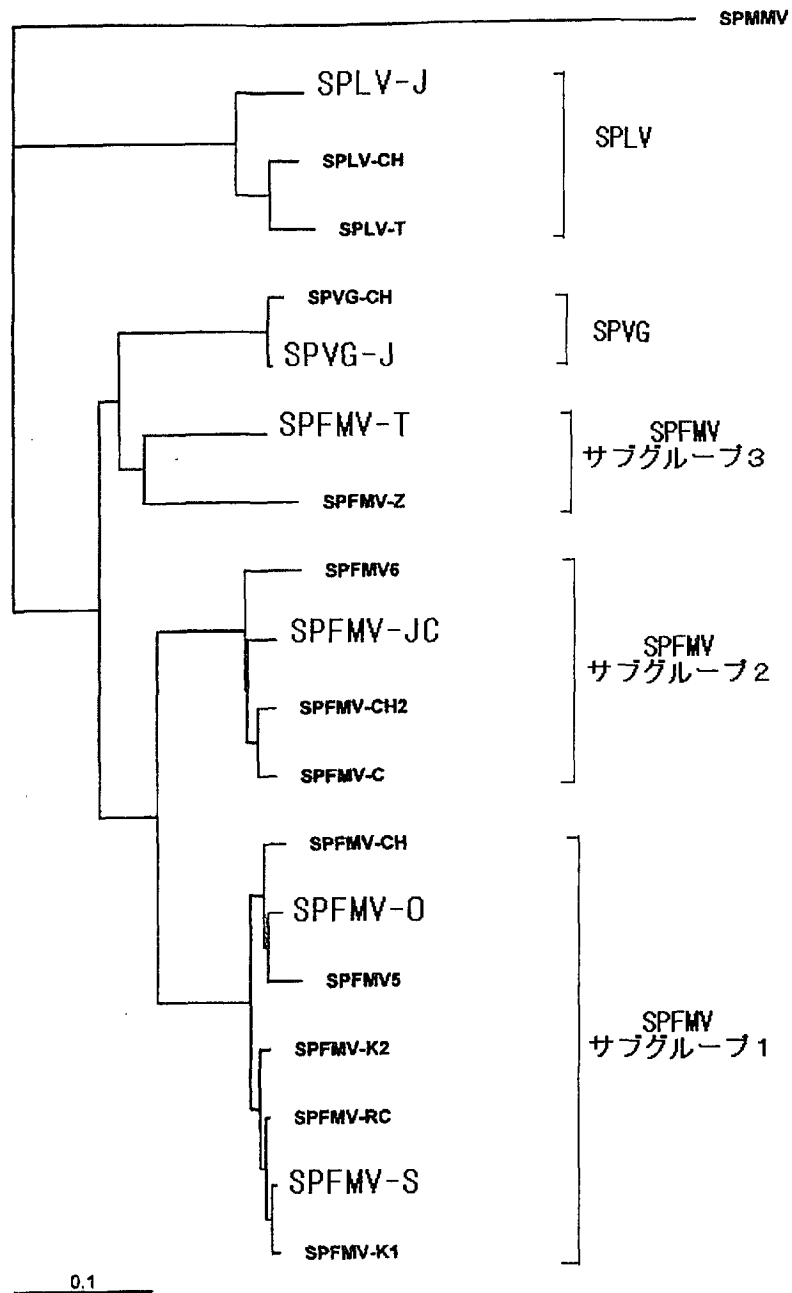
301 361
SPFMV-S TTPARAKEAHLQMKAAALKNAKRNRLFGLDGNVSTQEEDTERHTTDTVTRNI HNLGMRGVQ
SPFMV-O TTPARAKEAHLQMKAAALKNAKRNRLFGLDGNVSTQEEDTERHTTDTVTRNI HNLGMRGVQ
SPFMV-JC TTPARAKEAHLQMKAAALKNAKRNRLFGLDGNVSTQEEDTERHTTDTVTRNI HNLGMRGVQ
SPFMV-T NTPVAREAHMNMKAAALKNAKRNRLFGLDGNVSTQEEDTERHTTDTVTRNI HNLGMRGVQ
SPVG NTPVAREAHMNMKAAALKNAKRNRLFGLDGNVSTQEEDTERHTTDTVTRNI HNLGMRGVQ
SPLV RTPIRAKEAYFQMKAAALTNTHRLFGLDGNVSTTEENTERHTATDVTRNI HTLLGMRGIH

```

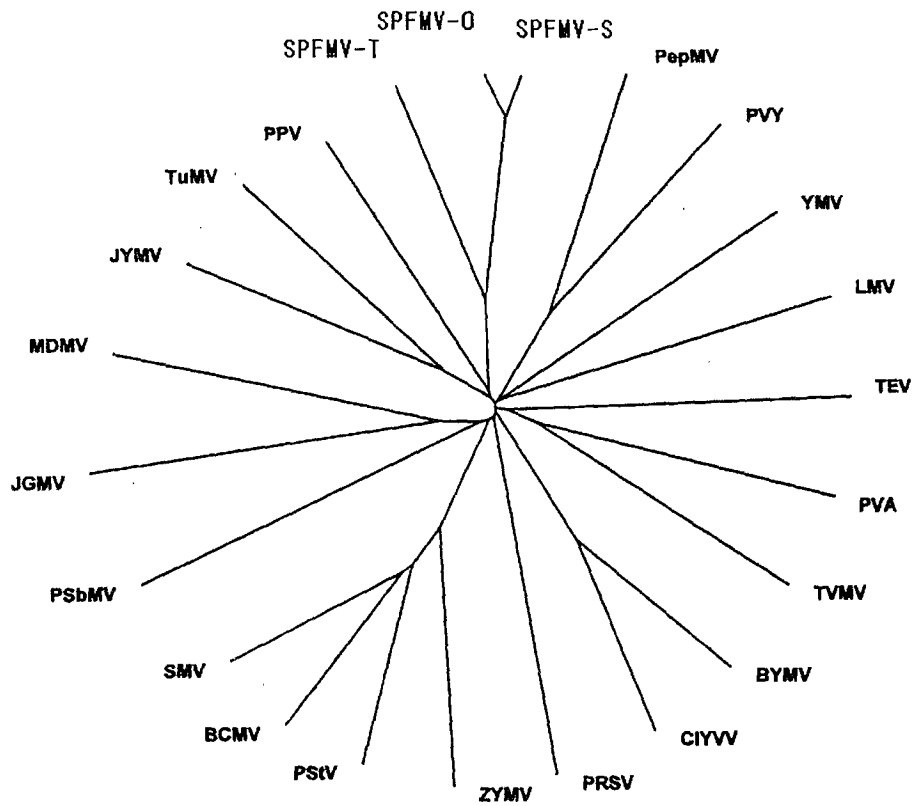
第3図 SPFMV 4 系統、SPVG および SPLV の外被タンパク質のアミノ酸配列の比較。赤字は共通のアミノ酸を示す。

第3表 SPFMV 4 系統、SPVG および SPLV の外被タンパク質のアミノ酸配列の相同性 (%)。

Virus	1	2	3	4	5	6
1. SPFMV-S		95.6	83.1	75.2	74.6	59.0
2. SPFMV-O			82.4	75.5	74.6	58.7
3. SPFMV-JC				74.4	74.1	59.5
4. SPFMV-T					79.0	58.8
5. SPVG						59.2
6. SPLV						



第4図 わが国および海外のサツマイモに発生しているポティウイルスの外被タンパク質のアミノ酸配列をもとに作成した分子系統樹。分子系統樹の作成にはClustal Xを用いた。



第5図 ポティウイルスのORFのアミノ酸配列をもとに作成した分子系統樹.
分子系統樹の作成にはClustal Xを用いた.

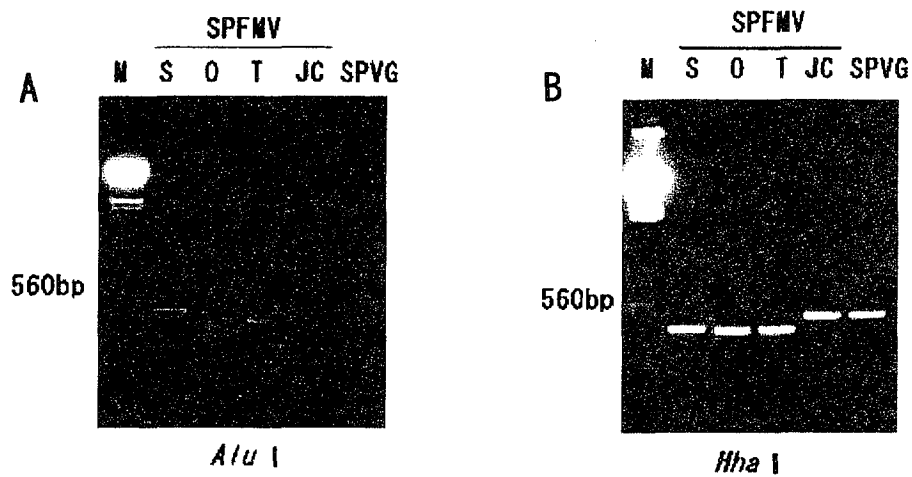
ファーストストランド合成用
 5' -GATTTAGGTGACACTATAG (T)₁₇G-3'

PCR反应用

Forward : 5' -ATGAGTCTTGCGCGATATGC-3'

Reverse : 5' -GATTTAGGTGACACTATAG-3'

第6図 遺伝子診断に用いた共通プライマーの塩基配列.



第7図 RT-PCR-RFLP法によるSPFMV 4系統とSPVGの識別.

A : 増幅DNAを*Afl*Iで処理後、2%アガロースゲル電気泳動

B : 増幅DNAを*Hha*Iで処理後、2%アガロースゲル電気泳動

第4表 RT-PCR-RFLP法によるSPFMV 4系統とSPVGの識別.

Virus	PCR fragment length (bp)		
	No cut	<i>Afl</i> I cut	<i>Hha</i> I cut
SPFMV-S	490	40/450	100/390
SPFMV-O	490	40/210/240	110/380
SPFMV-JC	490	40/50/400	110/380
SPFMV-T	490	90/400	490
SPVG	490	40/300/150	490

論文審査結果要旨

わが国の西南暖地ではサツマイモが重要な作物として位置づけられている。サツマイモの生産阻害要因としてウイルス病が挙げられるが、栄養繁殖性作物であるサツマイモには複数のウイルスが重複感染している場合が多く、特にサツマイモ斑紋モザイクウイルス (Sweet potato feathery mottle virus : SPFMV) をはじめとするポティウイルスはウイルスの分離が困難であることなどから、その特性に関する詳細な研究はこれまで行われていなかった。本研究では、サツマイモに発生するポティウイルスとして、SPFMV, Sweet potato virus G (SPVG) およびサツマイモ潜在ウイルス (Sweet potato latent virus : SPLV) について、ウイルスの遺伝子構造解析を行った。また、得られた遺伝子情報に基づいて、これらウイルスの診断法の検討を行った。

サツマイモに発生するポティウイルスの遺伝子構造解析を行った結果、サツマイモ帯状粗皮病の病原ウイルスである SPFMV 強毒系統 (SPFMV-S) および SPFMV 普通系統 (SPFMV-O) のゲノム RNA の全塩基配列を決定し、それぞれ 10,820 塩基および 10,895 塩基からなることを明らかにした。SPFMV 徳島系統 (SPFMV-T) ではゲノム RNA のほぼ全長の塩基配列を明らかにした。塩基配列から推定されるアミノ酸配列を解析したところ、10 個のウイルスタンパク質からなる遺伝子構造を明らかにした。SPFMV-S のそれぞれのウイルスタンパク質のアミノ酸配列を他のポティウイルスと比較したところ、*Plum pox virus* (PPV) と最も高い相同性を示した。本研究で新たに見いだした SPFMV の系統である SPFMV-JC, SPVG および SPLV については、ゲノム RNA の 3 末端領域の塩基配列を決定し、外被タンパク質のアミノ列を明らかにした。SPFMV の 4 系統, SPVG および SPLV の外被タンパク質のアミノ酸配列を比較したところ、SPFMV 系統内では相同性が 95.6 ~ 74.4% であり、高い遺伝的多様性が認められた。また、SPFMV は別種のポティウイルスである SPVG とは 74.1 ~ 79.0% の相同性であったことから、SPFMV の系統および SPVG の分類について、さらに分子系統学的解析により検討を行った。外被タンパク質およびオープンリーディングフレーム (ORF) のアミノ酸配列をもとに分子系統樹を作成したところ、SPFMV-T は SPFMV とは別種のウイルスとして分類するのが妥当であると判定した。

SPFMV および SPVG の診断法として、遺伝子診断法により、SPFMV4 系統および SPVG を識別する方法 (RT-PCR-RFLP 法) を開発した。本遺伝子診断法は、これらのウイルスを同時に検出するための共通プライマーを用いて RT-PCR を行った後、2 種類の制限酵素でそれぞれ処理し、電気泳動のバンドパターンから系統の判別を行うものである。野外から採取した感染サツマイモ葉を用いて本法による系統判別を行ったところ、SPFMV の 4 系統および SPVG が重複感染している場合でも、これらのウイルスの検出・識別ができることから、高精度な診断法として利用できる可能性を示した。

以上のように、本研究は、サツマイモに発生しているポティウイルスについて、分子生物学的手法を用いて、その遺伝的特性解明および分類上の位置づけを行い、あわせて簡便、高精度な診断法を提示し、今後のウイルス病防除技術の構築に大きく寄与するものである。

よって、審査員一同は、本論文は博士 (農学) の学位を授与するに値するものと判断した。