特集：ウイルスの遺伝子解析〔3〕

近年発見された小球形の1本鎖DNA植物ウイルス
——レンゲ萎縮ウイルス（MDV）を中心に——

新潟大学大学院自然科学研究科　佐野義孝
新潟大学農学部　小島誠

はじめに

現在，国際ウイルス分類委員会（ICTV）において認められている植物ウイルスの中で，1本鎖DNA（ssDNA）をゲノムとして持つものは唯一ジェミニウイルス科（*Geminiviridae*）のみである（都丸，1996）。ジェミニウイルスは単一あるいは2分節の環状ssDNA（2.5～2.9 Kb）をゲノムとし，特異な双球状の粒子構造を持っており，ヨコバイやコナジラミにより伝搬される。ゲノムDNAの数や媒介虫をもとにジェミニウイルスはさらに三つのサブグループに類別されている。しかし，近年，このジェミニウイルスとは明らかに性状が異なる，約1 Kbの環状ssDNAを持つ，直径約20 nmの小球形ウイルスが世界各地から相次いで報告されている。Subterranean clover stunt virus（SCSV，Chu and Helms, 1988），Coconut foliar decay virus（CFDV，Randles et al., 1987），Banana bunchy top virus（BBTV，Harding et al., 1991），Faba bean necrotic yellows virus（FBNYV，Katul et al., 1993）およびレンゲ萎縮ウイルス（MDV，磯貝ら，1992）の5種である（表-1）。

これらのウイルスはいずれも特定の媒介虫（ベクター，CFDV以外はすべてアブラムシ）により永続的（循環型）に伝搬され，感染植物に黄化・萎縮やえそ症を引き起こす点で共通しており，特にSCSVとFBNYV，およびMDVはベクター（マメアブラムシ）と宿主（マメ科植物）が共通である。また，このうちSCSVとBBTV，およびMDVの3者はその病原が長い間不明であったため，病徴や伝搬様式が酷似するルテオウイルスグループ[1]の候補メンバー（possible member）とされてきたという歴史を持つ。純化ウイルス標品を用いた生物検定（膜吸汁法）ではいずれのウイルスにも感染性が認められていないことから，現在，未分類であるが，DNAゲノム構造の類似性から，これらのウイルスは同一のグループに属すると考えられる。本稿では，筆者らが取り扱っているMDVを中心に，小球形ウイルスについて，その発見の経緯および最近得られたゲノムDNAの構造に関する知見を紹介する。

I　レンゲに萎縮症を引き起こすウイルス

病害としてのレンゲ萎縮症の発見は古く，昭和20年代にさかのぼる。昭和24（1949）年早春に山形県下のレンゲ圃場で発生した黄化萎縮病について，松浦（1953）はそのベクターや伝染法を調査した結果，この病原が汁液接種では感染せず，マメアブラムシによって永続的に伝搬されるウイルスによるものであると報告しており，これが本病に関する初記載である。当時レンゲは緑肥として稲作後の水田で広く栽培されており，同様なレンゲの萎縮症が東北から関東・北陸にかけて発生することが報告されている。その後，同じウイルスによると思われるマメ科作物の萎黄症が本州西南域において発生した。井上ら（1968）は，和歌山県下のエンドウ圃場で発生した萎黄症の病原ウイルスが，マメアブラムシで永続的に伝搬され，レンゲやソラマメ，ダイズ等に黄化・萎縮を引き起こすことから，このウイルスをレンゲ萎縮ウイルス（MDV）と命名した。また，マメアブラムシを用いて行った接種試験の結果から，MDVの伝搬様式が，当時まだ病原が単離されていなかったジャガイモ葉巻ウイルス（現在，ルテオウイルス）のモモアカアブラムシによる伝搬様式と類似していることが指摘された（井上ら，1968）。

さらにMDV感染ソラマメ組織切片の電子顕微鏡観察により，篩部え死などの病理学的変化とともに，篩部柔細胞中に小球形粒子が観察された（大木ら，1975）。感染植物中の篩部組織内でウイルスが局在する性質は，アブラムシによる永続型の伝搬特性や黄化萎縮型の病徴とともにルテオウイルスグループの特徴である。MDVはこれまでに報告された知見，すなわちその生物学的諸性質からルテオウイルスグループに属するものと考えられてきた。

わが国に発生するルテオウイルスの中でマメ科植物に感染するものとして，ジャガイモヒゲナガアブラムシで

Novel Plant Viruses with Small Isometric Particles Containing Circular Single-stranded DNAs. ——Characterization of Milkvetch Dwarf Virus——. By Yoshitaka Sano and Makoto Kojima

[1] アブラムシにより永続伝搬する小球形ssRNAウイルス.

表-1　環状1本鎖DNAを持つ小球形植物ウイルス

	宿主植物	媒介虫	粒子径	ゲノムサイズ	外被タンパク質分子量	複製関与タンパク質分子量
MDV	マメ科植物	*Aphis craccivora* (マメアブラムシ)	18 nm	0.98～1.0 kb 分節ゲノム (7種以上)	20 K	32 K
FBNYV	マメ科植物	*Acyrthosiphon pisum* *A. craccivora* (エンドウヒゲナガアブラムシおよびマメアブラムシ)	18 nm	1.0 kb 分節ゲノム	22 K	32 K
SCSV	マメ科植物	*A. craccivora* (マメアブラムシ)	17～19 nm	0.98～1.0 kb 7分節	20 K	32 K
BBTV	バナナ	*Pentalonia nigronervosa* (バナナアブラムシ)	18 nm	1.0～1.1 kb 6分節	20 K	33 K
CFDV	ココヤシ	*Myndus taffini* (ウンカの1種)	20 nm	1.3 kb 単一ゲノム	25 K	33 K

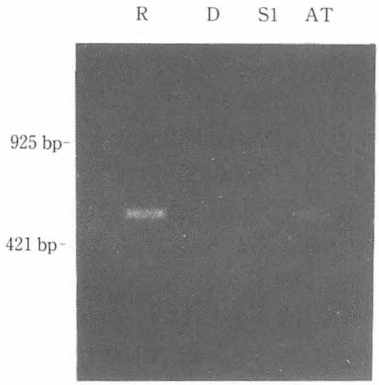


図-1　MDV-DNAのヌクレアーゼ分解試験
R：RNase A, D：DNase I, S1：S1ヌクレアーゼ, AT：ATP依存DNaseを示す．各酵素で37°C1 hr処理した後，アガロースゲル電気泳動にかけた．左端の数字は分子量マーカー（λ-DNA/Sty I分解物）の相対移動度を示す．

媒介されるダイズ矮化ウイルス（SDV）が知られているが（玉田ら，1969），SDVを含めたルテオウイルスとMDVとの類縁関係は不明であった。一方，海外では，オーストラリアのマメ科牧草を冒すSCSVが古くから知られていた（Grylls and Butler, 1956）。SCSVもマメアブラムシにより媒介され，宿主範囲や病徴がMDVとよく似ているが，病原ウイルスは長い間不明で，その生物学的性質からルテオウイルスであると考えられていた。SCSV感染植物から，はじめてssDNAを含む小球形ウイルス粒子が精製されたのは1988年のことである（Chu and Helms, 1988）。

筆者らは，新潟県内のソラマメ圃場から分離したMDV株を用いて，病原の同定を試みてきたが，ルテオウイルス様の球形粒子は認められず，またMDV感染エンドウ葉からは，ssRNAウイルスの感染・増殖に伴って合成される複製型2本鎖RNAが検出されなかった。MDV感染葉から部分精製した標品中にDNAを含む直径約18 nmの小球形粒子が見いだされたのはごく近年のことである（磯貝ら，1992）。この小球形粒子に含まれる核酸は，DNaseIのほか，S1ヌクレアーゼに感受性を示し，またRNaseAおよび直鎖状DNAの3′末端に特異的なATP依存DNaseにも抵抗性を示すことから環状のssDNAであることが判明した（図-1）。プラスミドベクターを用いてクローニングした，このDNAインサート（1 Kb）をプローブとしてドットハイブリダイゼーションを行ったところ，MDV感染葉および保毒アブラムシと特異的に反応した（Sano et al., 1993）。

これまでに圃場感染したレンゲおよび矮化症状を呈すダイズ株からこのMDV-DNAが検出されている（佐野ら，1995）。

II　環状DNAのゲノム構造

1　マルチパータイトなゲノム構成

MDV粒子からフェノール抽出した環状ssDNAを鋳型とし，ランダムプライマーとKlenow酵素を用いて2本鎖DNAを合成し，種々の制限酵素を用いて線状化した。これをプラスミドへ挿入して作製したMDV-DNAクローン・ライブラリーについての塩基配列から，MDVゲノムは，サイズが1 Kbで配列の異なる複数の環状DNAから構成されることが判明した（佐野ら，1995）。いずれのDNA上にもヘアピン状の二次構造をとるステム・ループ領域とタンパク質をコードすることが可能な読み枠（ORF）が1か所ずつ存在し，各ORFの開始コド

ン (ATG) の上流に TATA ボックスが，また終止コドンの近傍に poly(A)シグナル (AATAAA) が認められた(図-2)。すなわち，複数の環状 DNA がおのおの異なるタンパク質を一種ずつコードしており，同様のゲノム構成が SCSV，BBTV および FBNYV でも報告されている。SCSV ではウイルスのゲノム DNA として 7 種の環状 DNA が同定されており，これらすべてに単一の ORF が認められた (Boevink et al., 1995)。BBTV では 6 種の DNA が同定されているが，このうち 1 種には ORF が認められない (Burns et al., 1995)。MDV と FBNYV について，ゲノムが合計何種類の DNA から構成されるかは，現在，明らかではないが，MDV に関して筆者らは 7 種の異なる DNA を同定しており，少なくとも 7 種以上の DNA から MDV ゲノムが構成されると考えている。また FBNYV では，ゲノム解析とともにモノクローン抗体が作製されており，MDV との間に血清学的類縁関係があることが確認されている (Katul et al., 1993)。一方，CFDV は以上のウイルスとは異なり，単一の DNA からゲノムが構成される。ややサイズの大きな環状 DNA (1,291 塩基) 上に計 6 個の ORF が存在する (Rohde et al., 1990)。

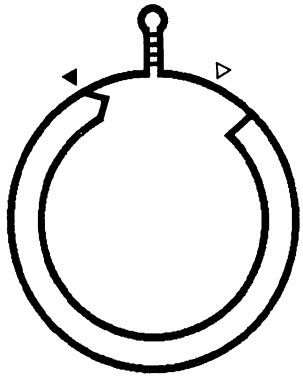
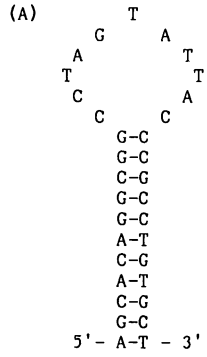


図-2　MDV-DNA の模式図
環状 DNA 内のボックスで囲まれた領域は ORF. ▽は TATA ボックス　▼は poly A シグナルを示す.

2　ステム・ループ配列と複製に関するタンパク質

MDV の DNA 上に認められるステム・ループ領域の塩基配列を図-3(A)に示した。ステムの部分は G や C 塩基の多い 10〜12 塩基の相補配列からなり，その中央に開いた 12 塩基のループ域には A や T 塩基が多い。ステム部分の配列は異なる MDV-DNA 間で保存されていないが，ループの下流域の 9 塩基は配列が決定されているすべての MDV-DNA 間で一致していた (5′-TAGTATTAC-3′)。このステム・ループ配列とループ域中の 9 塩基の保存配列は他の小球形 DNA ウイルスのほか，ジェミニウイルスにおいても見られる (図-3(B))。おのおのの DNA によってコードされるタンパク質の中で，分子量が最も大きな 32 K ダルトンのタンパク質のアミノ酸配列中には，DNA-nicking モチーフおよびNTP-binding モチーフと呼ばれる特徴的なアミノ酸配列が含まれることから，この 32 K タンパク質は DNA の複製に関与するものと考えられる。これら二つのアミノ酸モチーフは，ともにジェミニウイルスの複製関与タンパク質内に認められており，前者はローリング・サークル型の DNA 複製開始の際，環状 DNA に切れ目 (ニック) を入れる活性に，また後者は DNA ヘリカーゼ(2 本鎖鋳型のらせん構造をときほぐす酵素) 活性におのおの関与すると考えられている (Merits et al., 1995)。図-4 に示した各ウイルスの複製関与タンパク質間ではアミノ酸全体で 40%以上の配列相同性が見られるが，ジェミニウイルスのものと比べると分子量がやや異なり (ジェミニウイルスでは約 40 K ダルトン)，相同性も 20%前後と低い。し



(B)

MDV	-TAGTATTAC-
FBNYV	-TAGTATTAC-
SCSV	-T/CAGTATTAC-
BBTV	-TATTATTAC-
CFDV(-鎖)	-TAATACTAG-
Gemini viruses	-TAATATTAC-

図-3　MDV-DNA 上に認められるステム・ループ領域の塩基配列(A)およびループ領域内に存在する 9 塩基の保存配列の比較(B)

MDV	(11) F T L N F	(41) D H L Q G	(79) D Y A M K E	(173) G P Q G G E G K T S
FBNYV	(9) F T R N F	(38) D H I Q G	(78) A Y V Q K E	(171) G P D G G E G K S V
SCSV2	(5) F T L N Y	(44) K H L Q G	(75) D Y C C K E	(166) G S D G G E G K T S
BBTV	(8) F T I N N	(40) R H V Q G	(78) S Y C M K E	(179) G P N G G E G K T T
CFDV	(8) F T L N Y	(48) R H L Q G	(88) D Y C S K E	(181) G R D G G D G K S V
	★	★★	★ ★	

図－4　複製関与タンパク質のアミノ酸配列の比較
（　）内の数字はアミノ末端からの残基数を，★はDNA-nickingモチーフを，またボックス内のアミノ酸配列はNTP-bindingモチーフを示す．

かし，ステム・ループ領域に見られる9塩基の保存配列とこれらタンパク質間の相同性から，ローリング・サークルの機構でDNA複製が行われることが示唆される。ジェミニウイルスの一種，African cassava mosaic virus (ACMV) では，ローリング・サークル型のDNA複製に際し，9塩基の保存配列中にニックが導入されることが報告されている（TAATATT ↓ AC）（Stanley, 1995）。この複製関与タンパク質以外のウイルスタンパク質については，ジェミニウイルスや他の植物ウイルスとの間に有意な相同性は認められず，それらの機能等は不明のままであるが，SCSVでは，7種のDNAのうちのセグメント5にコードされた20Kダルトンのタンパク質がウイルス外被タンパク質であることが確認されている（Chu, 1995）。また，SCSVでは複製関与タンパク質をコードするDNA（セグメント2）を直列に2連結させて構築した組み換えプラスミドをエレクトロポレーション法で導入したプロトプラスト中で，単位長の2本鎖DNAが生成することが確認された（Chu, 1995）。CFDVでも同様な手法で，感染オオムギプロトプラスト中で，poly A鎖が付加されたORF 1（複製関与タンパク質）のRNA転写物が同定されている（Merits et al., 1995）。

おわりに

本稿で紹介した植物ssDNAウイルス以外では，1982年にブタの培養細胞から1.7 Kbの環状ssDNAを含む小球形ウイルス（Porcine circovirus, PCV, Tischer et al., 1982）が発見されており，またほかに鳥類から2種類の小球形ssDNAウイルスが分離されている（Chicken anaemia agent, CAAおよびPsittacine beak and feather disease virus, PBFDV）。

これら3種の動物ssDNAウイルスは，いずれも単一ゲノム構造を持ち，現在circovirusと呼ばれているが，3者の間で血清学的類縁関係や塩基配列相同性は見いだされていない（Todd et al., 1991）。環状ssDNAをゲノムとする球形ウイルスとしては，他はバクテリオファージの *Microviridae*（タイプ種・ϕX 174）1科が知られているだけで，全体を通してみて，極めて少数であることがわかる。植物で発見された5種の小球形ssDNAウイルスと動物のcircovirusとの間の正確な分類学的な類縁関係を論ずるためには，環状DNAゲノムの複製や発現様式など，さらに詳細な研究が必要である。

おわりに，本研究を進めるに当たり，数々の有益なご助言とご協力をいただいた農林水産省農業環境技術研究所の鳥山重光博士に厚くお礼申し上げる。

引用文献

1) Boevink, P. et al. (1995) : Virology 207 : 354～361.
2) Burns, T. M. et al. (1995) : J. Gen. Virol. 76 : 1471～1482.
3) Chu, P. W. G. and K. Helms (1988) : Virology 167 : 38～49.
4) ——— (1995) : "Non-geminated single-stranded DNA plant viruses" in Pathogenesis and Host Specificity in Plant Diseases. vol III. PERGAMON, Elsevier Science Ltd.
5) Grylls, N. E. and F. C. Butler (1956) : J. Aust. Inst. Agric. Sci. 22 : pp.73.
6) Harding, R. M. et al. (1991) : J. Gen. Virol. 72 : 225～230.
7) 井上忠男ら (1968) : 日植病報 34 : 28～35.
8) 磯貝雅道ら (1992) : 同上 58 : 631～632 (講要).
9) Katul, L. et al. (1993) : Ann. Appl. Biol. 123 : 629～647.
10) 松浦 義 (1953) : 日植病報 17 : 65～68.
11) Merits, A. et al. (1995) : Virology 211 : 345～349.
12) 大木 理ら (1975) : 日植病報 41 : 508～510.
13) Randles, J. W. et al. (1987) : J. Gen. Virol. 68 : 273～280.
14) Rohde, W. et al. (1990) : Virology 176 : 648～651.
15) Sano, Y. et al. (1993) : Abstracts of 6th ICPP in Montreal pp.305.
16) 佐野義孝ら (1995) : 日植病報 61 : 290. (講要).
17) Stanley, J. (1995) : Virology 206 : 707～712.
18) 玉田哲男ら (1969) : 日植病報 35 : 282～285.
19) Tischer, I. et al. (1982) : Nature 295 : 64～66.
20) Todd, D. et al. (1991) : Arch. Virol. 117 : 129～135.
21) 都丸 敬一 (1996) : 植物防疫 50 : 26～29.