

特集：菌類伝搬性ウイルス病

# レタスピッグベイン病に関連する 2種ウイルスの遺伝情報とゲノム構造

近畿中国四国農業研究センター特産作物部

笹 谷 孝 英\*

## はじめに

ビッグベイン病に感染したレタス中には、棒状と細いひも状の2種類のウイルスが絶えず存在する (NATSUAKI et al., 2002; ROGGERO et al., 2003)。当初、棒状のウイルスのみが電子顕微鏡で確認されたことより、この棒状ウイルスがビッグベイン病の病原であると考えられ、レタスピッグベインウイルスという名が付けられた。一方、ひも状ウイルスは電子密度が低く、さらにウイルス粒子が絡まって毛玉状となるため、電子顕微鏡観察では容易に確認できなかった。2000年 ROGGERO et al. (2000) は、ビッグベイン症を示したレタス中にひも状ウイルス粒子が存在することを報告し、ミラフィオリレタスウイルスと名付けた。さらに、このひも状ウイルスが単独でビッグベイン症を引き起こすことが明らかとなり、これらのひも状ウイルスがビッグベイン病の病原であることが示された (LOT et al., 2002)。一方、棒状ウイルスもビッグベイン症を示したレタス中に存在するが、この棒状ウイルスとビッグベイン病との関連は不明である。これらのことを踏まえ、国際ウイルス分類委員会第8次報告ではひも状ウイルスをミラフィオリレタスピッグベインウイルス (*Mirafiori lettuce big-vein virus*: MLBVV), 棒状ウイルスをレタスピッグベイン隨伴ウイルス (*Lettuce big-vein-associated virus*: LBVaV) とそれぞれ改名した。

ビッグベイン病の疫学的側面が明らかとなると同時に、これらビッグベイン病に関連するミラフィオリレタスピッグベインウイルス (MLBVV) およびレタスピッグベイン隨伴ウイルス (LBVaV) の遺伝子情報の解明も急速に進展した。本稿では、MLBVV と LBVaV についてウイルス学的側面からこれらウイルスを紹介する。

Genetic Information and Genome Organization of Two Big-Vein Associated Viruses, *Mirafiori lettuce big-vein virus* and *Lettuce big-vein-associated virus*. By Takahide SASAYA

(キーワード: ミラフィオリレタスピッグベインウイルス、レタスピッグベイン隨伴ウイルス、遺伝子情報、ゲノム構造)

\* 現所属: 農林水産省大臣官房企画評価課技術調整班

## I ミラフィオリレタスピッグベインウイルス (MLBVV) の性質

国際ウイルス分類委員会の7次報告書で、*Ophiovirus* 属という新属が設定され、MLBVV はその中に含まれる (VAN REGENMORTEL et al., 2000)。本ウイルスは *Olpidium* 属菌により伝搬する。MLBVV の形態はイネ縞葉枯ウイルスと似た大変細い屈曲性のあるひも状で、48 kDa の外被タンパクをもち、4 分節ゲノムからなる。本属のタイプウイルスはカンキツソローシスウイルス (CPSV) で、ラナンキュラスホワイトモットルウイルス (RWMV) チューリップ微斑モザイクウイルスなどがこの属に含まれる。

### 1 MLBVV 核酸の特性とゲノム構造

MLBVV 感染レタスからタバコの *Nicotiana benthamiana* や *N. hesperis* に比較的容易に汁液接種することができ、これらの植物からウイルス粒子を純化することができる。MLBVV ゲノムは四つに分かれた分節ゲノムで、そのゲノム核酸はマイナス鎖の RNA である。しかし、純化ウイルス中にはマイナス鎖と同等量のプラス鎖の RNA が含まれるため、純化ウイルスから精製したウイルス核酸を未変性条件で泳動するとプラス鎖とマイナス鎖が互いに結合し、2本鎖 RNA を形成する (VAN DER WILK et al., 2002)。

MLBVV の塩基配列の解読については日本とオランダで精力的に行われ (KAWAZU et al., 2002; VAN DER WILK et al., 2002), MLBVV の RNA1 は 7,794 塩基、RNA2 は 1,788 塩基、RNA3 は 1,515 塩基、RNA4 は 1,402 塩基であることが明らかとなった。MLBVV のゲノム構造を図-1 に示した。RNA1 には二つのタンパク質がコードされており、263 kDa の大きなタンパク質はウイルスの複製酵素である。RNA3 にコードされている 48.5 kDa のタンパク質がウイルスの外被タンパク質であるが、他のタンパク質の機能については不明である。

また、RNA2 のプラス鎖に 10 kDa の小さなタンパク質がコードされているが、実際発現していないと考えら

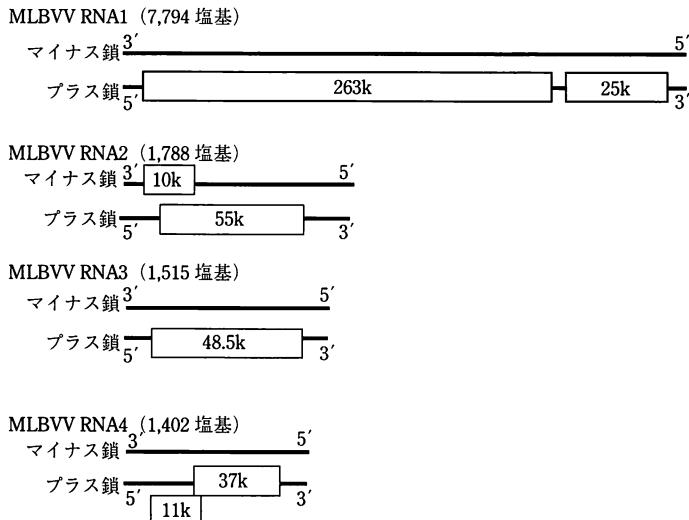


図-1 ミラフィオリレタスピッグペインウイルス (MLBVV) のゲノム構造

	プレモチーフ A	モチーフ A	モチーフ B	モチーフ C	モチーフ D
<b>非分節ゲノムウイルス (Mononegavirales 目)</b>					
BDV	376 REKELVKVGKFPE-SKQTLAIEIYQVVAEAA<38> VINIDQYSSWCNGFR<55> CAVGKTGMGEGRQKLWLTILTSCWE<12> ILGQDNTI<51> FRGPVPVPGCIRQL				
MARV	556 KREKELNII-GRTF-PLRQKLNLAER<58> SFVTDLRLKVNQTLAEL<47> AYHYHLCGEGLOQKLWICSCAQI<12> SSVMDNCI<60> LNVGVLPOSILEKTM				
SeV	543 RKEKEIKOEGCRHL-AKMTYKMRPAVQVLAET<87> FLTTDILKQYCLNWR<58> FHNPRGRCGLGVCQCLWFLISIASI<12> AMVODDNIAI<60> YDGKILPQCLKAL				
TRTV	554 NARELSV-GMFM-AMAPQGKQRQVQVILAEL<49> SIVTDLSKFNFQAFR<58> LYRFHMGCGLGWCQWMMTEAISLL<12> SLNQDNGSI<59> SEGVMPYPAALTKV				
VSIV	530 RERELKLACGF-PLMSWKLR-EYFVTEYL<42> ANHIDYERWNHHOR<57> CWOCQECGLEGGLRQGWTILNLLVI<12> VLAQGDNWVII<63> FRGVIRGLETEKRW				
RABV	543 RERELKKGEGPF-ALMSWNRLR-YLYVTFITKL<42> APFHLDYERWNHHOR<59> CWNGQDGCLGGGLRQGWTILNLLMI<12> VLAQGDNWVII<63> FRGVNLVPESKRW				
IHNV	494 NAMELKIKKGPF-GLMTFMPNLLQVLRRESI<40> NKSIDININFCTTSQR<68> VFSGLKGGLGGLGCVWVTCIICLLLRV<12> IIAQGDNWVII<62> HCPQHLLTIAINKA				
SYNV	567 REREMKTKAEPFF-SLMSYKLRMVMVTTSTEEL<41> SMNIDFSKRNQNQMR<55> SRTGDESCKEGLRLQGWTITVCDI<12> LIGGGDNWVII<63> YSGVPLRGRLEKVI				
<b>分節型ゲノムウイルス</b>					
LBVaV	518 RERELKVAAPNY-SLMTERMRY-YFVLTTEGL<39> NINIDFSTWNTNNMR<55> CYRGHLLGGFEDLRQGWTATVCLL<12> IMQGDNTI<64> LDPRQLPQWVKT				
FLUAV	229 RERAEERGKHLRAIAFPGMQLRFGFYVYFETL<42> TITCDDTNTWNENON<85> TASLSPGMMGFMGNMLSTVGLVSIL<15> GLQSSDDDFAL<22> LHGJNM-SKRSNSY				
THOV	231 RERLERGRMLRTIATPLSMLEIYQFVKEVEDA<36> ELSQDQEFNFNECLD<73> SISCRIGMFMGMYMNLTSTLLALISI<8> HVESSDDFIH<22> LVGJNM-SPSNSCI				
BUNV	938 RNNKEFSEFTFFNKGQKTAKDREIF-VCEFE<64> EINADMDSKWSAQDV<66> YVQ1KRKNWLGQNLNRCSSLFGVAMS<19> SMVHSDDONOT<27> TECQ-A-NMKHTY				
HTNV	884 RYQTEA-DEGFFIT-TLP-TSCRLTEIDY<57> YVSADATKHWSPGDN<67> HGEVKGNWLQGNNLNGVWV<19> FAHHSSDDALF<48> LNSLISKPRKTT				
DUGV	2361 RERLQGGS-BEDLQVQETG-TKVKIATTIEF<54> CISDNTKWHGPPIQ<66> AMNSYNNIMCGQHJTHATSSLTTSMA<23> HAGSSDDYAK<34> RRCCMDKSDAATL				
RVFV	918 RKKQHGT-DREIYVNGA-EERIIVQVNGQHF<49> YLETTTTGMMGCLILHYTSLSLHTIHQ<26> MMQGSDDSM<29> GYVLLAIYPSERST				
TSWV	1282 RYQRTK-T-DREIYLMVNGA-KVMMYFIEPT<49> FLSADQPSWSASGL<69> TYPVPSMWLQCNINLYSSVYHSCAM<18> WIVHSDDONAT<32> KSFCTILNPNSY				
RStV	1341 RNNQHGG-DREIYVNLIF-DEIMQKTVDEDF<41> STSDASAEWQHNGQY<67> YIETETGMMGCLILHYTSSLFHAIFL<31> NMESSDDDSF<31> GTYLGIVYSPERST				
CPSV	635 RERELKTEG-FYVGAWSFKLKLWISSTMENI<36> TLFIDYPSGHNTSQR<50> WSKRQKGALEGNGFGLQGQSQQLM<13> GTTYSDSCG<51> YFDKPIDTSVRI				
MLBVV	575 RERELKTAARFYGIAFSKLKLWISSTMENI<36> SLFLDYSCHNTSQR<50> ISQGQGLALEGNGFGLQGQSQQLM<13> GTTYSDSCG<51> YKCPMDMSIHKM				
RWMV	- REREROKKIAARFYGIAFSKLKLWISSTMENI<36> SLFLDYSCHNTSQR<50> YSKGQGLALEGNGFGLQGQSQQLM<13> GTTYSDSCG<51> YKQGPIEMTLEKVI				

図-2 マイナス鎖 RNA ウィルスの複製酵素で保存されているアミノ酸モチーフの比較

最初の列に表した数字は複製酵素中のプレモチーフ A の最初のアミノ酸 (リシン) の位置を、カッコで示した数字は表中に示されていないアミノ酸数を示す。四角で囲んだ太字はマイナス鎖 RNA ウィルス間で、アンダーラインの斜体は非分節ゲノムウイルス間で、アンダーラインの太字は分節ゲノムウイルス間で保存されているアミノ酸を示す。BDV: *Borna disease virus*, MARV: *Marburg virus*, SeV: *Sendai virus*, TRTV: *Turkey rhinotracheitis virus*, VSIV: *Vesicular stomatitis Indiana virus*, RABV: *Rabies virus*, IHNV: *Infectious hematopoietic necrosis virus*, SYNV: *Sonchus yellow net virus*, LBVaV: *Lettuce big-vein-associated virus*, FLUAV: *Influenza A virus*, THOV: *Thogoto virus*, BUNV: *Bunyamwera virus*, HTNV: *Hantaan virus*, DUGV: *Dugbe virus*, RVFV: *Rift Valley fever virus*, TSWV: *Tomato spotted wilt virus*, RStV: *Rice stripe virus*, CPSV: *Citrus psorosis virus*, MLBVV: *Mirafiori lettuce big-vein virus*, RWMV: *Ranunculus white mottle virus*.

れている (VAN DER WILK et al., 2002)。

## 2 MLBVV の複製酵素の性状

近年、ウイルス遺伝子の解析が急速に進展したことより、多くのウイルスの複製酵素遺伝子の比較が可能となった。ウイルス複製酵素の相同性はウイルス間の類縁関係および進化を論じるうえで重要な手掛かりとなっている。かけ離れたウイルスでも、複製酵素には酵素の活性

中心となる共通の保存されたアミノ酸配列があり、プレモチーフ A とモチーフ A から D の五つのアミノ酸モチーフが報告されている(図-2)。特に、モチーフ C の G-D-N は非分節ゲノム型のマイナス鎖 RNA ウィルス特有で、分節ゲノム型では S-D-D, プラス鎖 RNA ウィルスでは G-D-D, リバーストランスクリプターゼでは N-D-D というように、同じ祖先から分歧し、それ

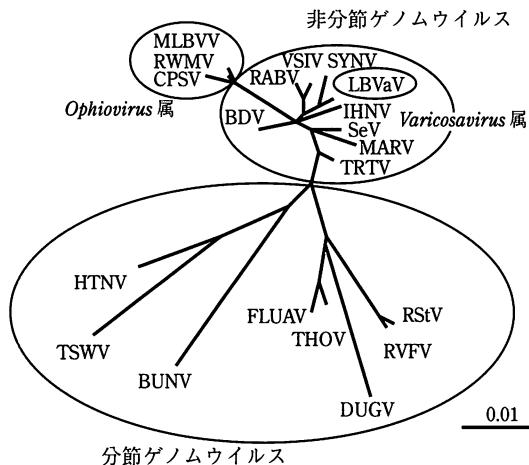


図-3 複製酵素の保存モチーフを用いて作成した系統樹  
ウイルスの略称は図-2を参照。

ぞれ異なる進化の道をたどって現在に至ったと考えられる。さらに、モチーフ近傍のアミノ酸配列を用いて系統樹を作成すると、マイナス鎖 RNA ウィルスは非分節ゲノムと分節ゲノムウイルスで明瞭に分かれれる。

MLBVV の複製酵素は 2,279 アミノ酸からなり、当初、粒子の形状などから *Tenuiviridae* 属のイネ縞葉枯ウイルス (RSV) の複製酵素と相同性が高いと考えられていた。しかし、MLBVV は分節ゲノムウイルスであるにもかかわらず、非分節ゲノムウイルスの複製酵素と高い相同意が認められた。特に、複製酵素の活性中心と考えられるアミノ酸モチーフを用いて系統樹を作成すると、MLBVV を含む *Ophiovirus* 属のウイルスは分節ゲノム型であるにもかかわらず非分節ゲノムウイルス内にクラスターを形成する(図-3)。さらに、非分節ゲノムウイルス特有の保存されたアミノ酸の一部が、*Ophiovirus* 属のウイルスの複製酵素中に保存されていた(プレモチーフ A の K-E-X-E やモチーフ B の E-G-X<sub>5</sub>-W)(図-2)。

### 3 MLBVV ゲノム核酸の両末端配列

マイナス鎖 RNA ウィルスの両末端は相補性配列をもち、この部分がウイルス複製のためのプロモーターとして働くと考えられているが、MLBVV の四つの核酸の両末端にはこのような相補性配列が見当らない。しかし、MLBVV の核酸の両末端はインフルエンザウイルスを含む *Orthomyxoviridae* 属で報告されているコルク栓抜き状の構造を取り、*Orthomyxoviridae* 属のウイルスと同じ複製様式で MLBVV のゲノム複製が行われると推察されている(VAN DER WILK et al., 2002)。

## II レタスビッグベイン隨伴ウイルス(LBVaV)の性質

LBVaV も国際ウイルス分類委員会の7次報告書で、*Varicosaviruses* 属という新属が設定され、LBVaV はそのタイプウイルスである(VAN REGENMORTEL et al., 2000)。本ウイルスは膜構造をもたない 320 ~ 360 nm × 18 nm の棒状で非常に不安定なウイルスである。48 kDa の外被タンパクをもち、当初は 7.0 と 6.5 kbp の 2 分節の 2 本鎖 RNA ウィルスと考えられていたが、プラス鎖を相当量粒子内にもつたマイナス鎖 RNA ウィルスである(SASAYA et al., 2000)。*Olpidium* 属菌により伝搬し、汁液接種は難しい。LBVaV 以外に本属には、タバコわい化ウイルス、ツバキ斑葉ウイルスなどが暫定種として含まれるが、外被タンパク質遺伝子の相同性からタバコわい化ウイルスは LBVaV の系統であることが明らかとなっている(SASAYA et al., 2005)。

### 1 LBVaV 核酸の特性とゲノム構造

レタス葉中の LBVaV の量が少ない。ウイルス粒子が不安定である。また、ウイルス粒子が互いに結合してしまい低速遠心により容易に沈殿してしまうなど、LBVaV の純化は非常に困難である。そのため、1980 年代にウイルス粒子がビッグベイン症を示したレタス葉で確認されたが、LBVaV の遺伝情報の解明はあまり進展しなかった。しかし、ウイルス純化量は少ないがウイルスをコンスタントに純化する方法が開発されたことより、LBVaV の遺伝子情報の解明は急速に進展した。その結果、LBVaV のゲノムは二つに分かれた分節ゲノムで、そのゲノム核酸はマイナス鎖の RNA であることが明らかとなった。また、MLBVV と同様に、純化ウイルス中にはマイナス鎖以外にプラス鎖の RNA も多量に含むため、純化ウイルスから精製したウイルス核酸を未変性条件で泳動するとプラス鎖とマイナス鎖が互いに結合し、2 本鎖 RNA を形成する。そのため当初、本ウイルスは 2 本鎖 RNA ウィルスであると誤認されたと考えられる。

LBVaV の全塩基配列は RNA1 が 6,797 塩基、RNA2 は 6,081 塩基であった(図-4)。RNA1 には 0.6 kDa の小さなタンパク質と、ウイルスの複製酵素である 232 kDa の大きなタンパク質がコードされていた。一方、RNA2 には五つのタンパク質がコードされており、3' 末端の 44 kDa のタンパク質は外被タンパク質である。2 番目の 36 kDa のタンパク質はリン酸化部位や N 末端のアミ

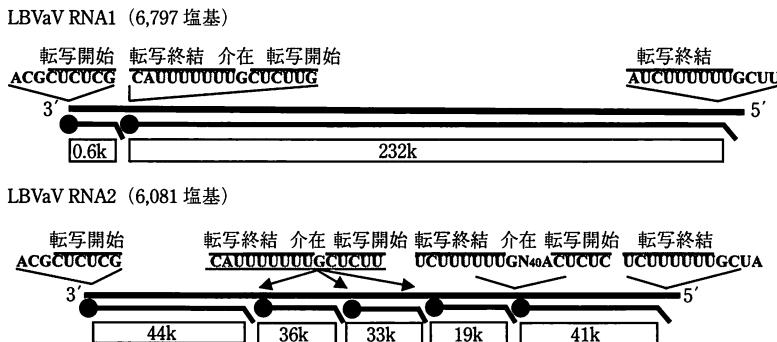


図-4 レタスピッグペイン隨伴ウイルス (LBVaV) のゲノム構造と転写様式

ノ酸配列から *Rhabdoviridae* 科のウイルスのリンタンパク質と相同であると推察された ( 笹谷, 2005 )。

## 2 LBVaV の RNA 複製酵素の性状

LBVaV の複製酵素は 2,040 アミノ酸からなり, MLBVV と同様に, LBVaV も分節ゲノムウイルスであるにもかかわらず, 非分節ウイルス, 特に, LBVaV の場合は *Rhabdoviridae* 科のウイルス (RABV, VSIV, SYNV および IHNV) の複製酵素と高い相同意を示した。さらに、非分節ゲノムウイルス特有であるアミノ酸モチーフを LBVaV の複製酵素はすべて保存していた ( プレモチーフ A の K-E-X-E, モチーフ B の G-X-E-G-X-X-Q-K-X-W およびモチーフ C の G-D-N ) ( 図-2 )。一方、分節ゲノムウイルスの複製酵素間のみで保存されているアミノ酸は LBVaV の複製酵素中には保存されていなかった。これらのアミノ酸モチーフを用いて系統樹を作成すると、LBVaV は *Rhabdoviridae* 科のウイルスのクラスター内に存在し、特に、植物ラブドウイルス (SYNV) と近縁であった ( 図-3 )。

## 3 LBVaV の転写様式

マイナス鎖 RNA ウィルスのタンパク質合成は、5' 末端にキャップ構造、3' 末端には Poly (A) テールをもつメッセンジャー RNA (mRNA) を介して行われる。非分節ゲノムウイルスの遺伝子間には転写終結/開始シグナル配列が存在し、mRNA の発現量、mRNA へのキャップの付加、キャップのメチル化および Poly (A) テール付加などの一連の転写反応を調整している。一方、分節ゲノム型ウイルスの転写は、宿主の mRNA から 5' 末端のキャップ構造を含む十数塩基の断片を切り出し、これをプライマーとしてウイルスの RNA を転写するキャップスナッティング機構がとられている。そのため、分節ゲノムウイルスの mRNA の 5' 末端にはウイルスの配列には関連のない付加配列をもっている。

LBVaV の転写もマイナス鎖 RNA ウィルスと同様に mRNA の形で行われている。LBVaV の両末端を詳細に解析したところ、LBVaV の mRNA は 5' 末端にキャップ構造、3' 末端には 100 塩基以上の Poly (A) テールがついており、分節ゲノムウイルスの mRNA のような 5' 末端の付加配列は認められなかった。さらに、LBVaV の遺伝子間には非分節ゲノムウイルスと同様に転写終結/開始シグナル配列が存在し ( 図-4 )、LBVaV の転写開始シグナル配列は *Rhabdoviridae* 科 *Cytorhabdovirus* 属のウイルスと同じ 3'-CUCU-5' であった。以上より、LBVaV は分節ゲノムウイルスではあるが、LBVaV の転写様式は非分節ゲノムウイルスと同じであることが明らかとなった ( SASAYA et al., 2004 )。

## 4 LBVaV ゲノム核酸の両末端配列

マイナス鎖 RNA ウィルスの両末端の十数塩基は相補的であるが、LBVaV の両末端にはそのような相補性配列が見当たらない。しかし、LBVaV の RNA1 の 23 ~ 38 塩基と 6,759 ~ 6,774 塩基、RNA2 の 12 ~ 24 塩基と 6,047 ~ 6,059 塩基のところが相補的であった。この相補的な部分は 3'-ACUAAAAA-5' の二つの繰り返しからできており、同様の配列が *Cytorhabdovirus* 属のウイルスの同じ箇所にも存在し、この部分がウイルス複製のためのプロモーターとして働いていると推察された ( SASAYA et al., 2004 )。

## 5 LBVaV とラブドウイルスの関連

LBVaV は分節ゲノムウイルスであるにもかかわらず、そのゲノム構造は *Rhabdoviridae* 科のウイルスのゲノム構造とよく似ていた。さらに、LBVaV の複製酵素もまた、*Rhabdoviridae* 科のウイルスと高い相同意を示し、*Rhabdoviridae* 科のウイルスと同じアミノ酸モチーフを保存していた。また、LBVaV の転写様式も *Rhabdoviridae* 科のウイルスと同じであり、同じ複製プロモーター配列

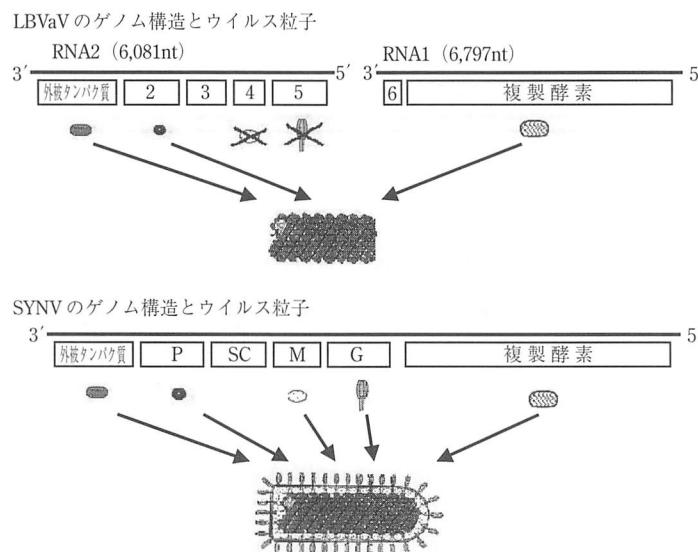


図-5 LBVaVとRhabdoviridae科のウイルス(SYNV)のゲノム構造と粒子形態

P, SC, MおよびGはそれぞれリンタンパク質、移行タンパク質、マトリックスタンパク質および糖タンパク質を示す。

も存在した。しかし、Rhabdoviridae科のウイルスで膜構造形成に重要な働きをしているマトリックスタンパク質と糖タンパク質と、LBVaVでこれらのタンパク質と相同であると考えられるRNA2の4番目と5番目のタンパク質を比較すると、マトリックスタンパク質で重要な膜結合シグナル配列をLBVaVの4番目のタンパク質はもっていなかった。さらに、Rhabdoviridae科のウイルスの糖タンパク質で重要なシグナル配列および膜透過配列も、LBVaVの5番目のタンパク質は保持していなかった。このことより、LBVaVはRNA2の4番目と5番目のタンパク質が膜形成能力を失い、さらにRhabdoviridae科のウイルスゲノムが複製酵素の手前で2分節化したウイルスであると考えられた(図-5)。

### おわりに

植物ウイルスの約80%がプラス鎖RNAウイルスであるのに対して、マイナス鎖RNAウイルスはインフルエンザウイルス、エボラ出血熱ウイルスおよび狂犬病ウイルスなどの人間や動物に感染し重篤な症状を示すものが多い。そのため動物ウイルスの分野で研究が非常に進んでいる。マイナス鎖RNAウイルスはゲノムの分節の有無によって非分節と分節ゲノムウイルスに分けられる。

前者は互いに似たゲノム構造をもち、しかも同じ複製・転写様式をもつことにより、Mononegavirales目を形成する。ビッグベイン病の研究で明らかとなったMLBVVおよびLBVaVは、分節ゲノムウイルスでありながら非分節ゲノムウイルスの性質をもつ非常にユニークなウイルスであることが明らかとなった。特に、LBVaVは膜構造を失い2分節化したRhabdoviridae科のウイルス的な存在であり、これらのウイルスの研究はマイナス鎖RNAウイルスの進化を考えるうえで大変興味深い事例となると考えられる。

### 引用文献

- KAWAZU, Y. et al. (2003) : J. Gen. Plant Pathol. 69 : 55 ~ 60.
- NATSUAKI, K. T. et al. (2002) : Jpn. J. Phytopathol. 68 : 309 ~ 312.
- LOT, H. et al. (2002) : Phytopathology 92 : 288 ~ 293.
- ROGGERO, P. et al. (2000) : Arch. Virol. 145 : 2629 ~ 2642.
- et al. (2003) : Euro. J. Plant Pathol. 109 : 261 ~ 267.
- SASAYA, T. et al. (2001) : J. Gen. Virol. 82 : 1509 ~ 1515.
- et al. (2002) : Virology 297 : 289 ~ 297.
- et al. (2004) : J. Gen. Virol. 85 : 2709 ~ 2717.
- et al. (2005) : Arch. Virol. 150 : (印刷中).
- 笹谷孝英 (2005) : 新しい作物保護の展開 (羽柴輝良編), ソフトサイエンス社, 東京, p. 18 ~ 29.
- VAN DER WILK, F. et al. (2002) : J. Gen. Virol. 83 : 2869 ~ 2877.
- VAN REGENMORTEL, M. H. V. et al. (2000) : Virus Taxonomy, Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses, Academic Press, San Diego, 1162 pp.