

# 新規ネポウイルスの発見

(独)農研機構 中央農業総合研究センター <sup>とみたか</sup>富高 <sup>やすひろ</sup>保弘・<sup>つだ</sup>津田 <sup>しんや</sup>新哉

## はじめに

メロンは世界の温帯や亜熱帯地域で広く栽培されており、我が国でも主要農作物の一つである。国内生産のメロンは、2009年には約1万ヘクタールで栽培され、約18万トンが出荷されている(農林水産省, 2010)。近年、メキシコなどからの輸入メロンが増加してきたことで、国内の栽培面積およびその生産量は減少傾向にある。しかし一方で、経済成長著しい香港、上海等の東アジア地域への輸出量が増大し、2009年には約85トンにまで達している(財務省, 2010)。日本農業の戦略的輸出作物の一翼を担っている農作物でもある。

我が国で栽培されるメロンには、青肉種ネットメロン、赤肉種ネットメロン、ノーネット系メロンおよびマクワウリ等がある(SAKATA and SUGIYAMA, 2002)。それらのなかでも、ネットメロンとマクワウリの交雑によって作出されたノーネット系メロンは、種子が安価に手に入りやすいことや栽培しやすい作目であることから、品種開発された1960年以降に急速な勢いで生産が広がった。一時は、メロンのシェアの50%を超える程の人気を誇り、メロンの新時代を築いたと言っても過言ではない。近年では、ネットメロンの普及に伴いその栽培面積は減少したが、今でも根強い人気がある。現在では、その種苗の生産を諸外国に依存し、さらなる低コスト栽培を図っている。

我が国で栽培されるメロンには、細菌や糸状菌、ウイルス等による多くの病害が発生している(日本植物病理学会, 2000)。特にウイルス病は、これまでにキュウリモザイクウイルス(*Cucumber mosaic virus*; CMV)、スイカ緑斑モザイクウイルス(*Cucumber green mottle mosaic virus*; CGMMV)、メロンえそ斑点ウイルス(*Melon necrotic spot virus*; MNSV)、スカッシュモザイクウイルス(*Squash mosaic virus*; SMV)、タバコ輪点ウイルス(*Tobacco ringspot virus*; TRSV)、トマト輪点ウイルス(*Tomato ringspot virus*; ToRSV)、カボチャモザイクウイルス(*Watermelon mosaic virus*; WMV)、ズッキーニ黄斑モザイクウイルス(*Zucchini yellow mosaic*

*virus*; ZYMV)、メロン黄化えそウイルス(*Melon yellow spot virus*; MYSV)、ウリ類退緑黄化ウイルス(*Cucurbit chlorotic yellows virus*; CCYV)による病害が報告されている(YOSHIDA et al., 1980; 日本植物病理学会, 2000)。これらのウイルスは、いずれもメロンの葉や果実にえそやモザイク等の激しい症状を引き起こす。

2008年に鳥取県のハウス内で栽培されていた輸入苗のノーネット系メロンにウイルス病様の症状を示す株が散見された。発病株は生育初期の生長点付近の本葉に微斑症状を呈していたが、生育が進行するに伴い徐々に消失した。本症状はその後の生育へは全く影響せず、収穫した果実も通常出荷できたことから経済的損失はなかった。しかしながら、本症状は一連の状況から推察すると明らかに病的であり、その原因は感染症であることが容易に想定された。ところがその症状は、既報の病原体が引き起こす症状のいずれとも全く異なっていた。そこで、本病害の病原体を究明し、その生物学的並びに遺伝学的解析を行った。

## I 病原体の宿主範囲、形態およびゲノムサイズ

病原体によって引き起こされる植物の病徴は多様であるが、モザイクや微斑等の症状は一般的にウイルス感染によって生じる。鳥取県のノーネット系メロンは葉に微斑症状を呈していたことから、直ちにウイルス感染が疑われた(口絵①)。そこで、典型的な症状を示すメロン葉の粗汁液を *Chenopodium quinoa* に機械接種したところ、3~4日後の接種葉上にえそ斑点が出現した。その病斑の分離を数回繰り返した後、原株と同じノーネット系メロンの品種に接種したところ、原病徴が再現された。

本病原の宿主範囲を調べるため、5科18種の植物に接種試験を行った(表-1)。その結果、主にウリ科植物に全身感染したが、感染植物のほとんどが無病徴であった。本病原が感染したノーネット系メロンおよびマクワウリだけがその感染初期に現地圃場で見受けられた症状と同一の微斑症状を示したが、「はじめに」で述べたとおり、植物の生育に伴ってそれは消失した。さらに、本病原はタバコなどのナス科植物にも無病徴感染した。マメ科植物では、ササゲに感染し退緑斑点を示しただけで、ソラマメ、インゲンマメには感染しなかった。

The Discovery of a New Nepovirus Species. By Yasuhiro TOMITAKA and Shinya TSUDA

(キーワード: ネポウイルス, セコウイルス科, メロン)

表-1 メロン微斑ウイルスの宿主範囲

供試植物			病徴		
科	種	品種	接種葉	上位葉	
<i>Amaranthaceae</i>	<i>Gomphrena globosa</i>	—	NS	+	
<i>Chenopodiaceae</i>	<i>Chenopodium amaranticolor</i>	—	NS	NS	
	<i>C. quinoa</i>	—	NS	Ma, M	
	<i>Spinacia oleracea</i>	Atlas	+	+	
		Titan	+	+	
		Mahoroba	+	+	
<i>Cucubitaceae</i>	<i>Benincasa hispida</i>	Daimaru	+	—	
	<i>Cucumis melo</i>	Arnest shunzhu	+	+	
		Arlus knight shunzhu	+	+	
		Arlus seu	+	+	
		Benechia harutachi	+	+	
		Einea	+	+	
		Miyabi	+	+	
		Mone	+	+	
		Prince	+	Mo*	
		<i>C. melo</i> var. <i>conomon</i>	Sanuki shirouri	—	—
		<i>C. melo</i> var. <i>makuwa</i>	Kintaro	+	Mo*
		<i>C. sativa</i>	Akimidori	—	—
		<i>Cucubita pepo</i>	Ebisu	—	—
		<i>Citrullus lanatus</i>	Kabuki	—	—
			New Kodama	—	—
Don-K	—		—		
<i>Fabaceae</i>	<i>Lagenaria siceraria</i>	Don-K	—	—	
	<i>Phaseolus vulgaris</i>	Kentucky wonder	—	—	
	<i>Vicia fava</i>	Ryosei issun	—	—	
	<i>Vigna unguiculata</i>	Akatane sanshaku	CS	CS*	
<i>Solanaceae</i>	<i>Datura stramonium</i>	—	+	—	
	<i>Nicotiana benthamiana</i>	—	CS	Mo*	
	<i>N. clevelandii</i>	—	+	+	
	<i>N. tabacum</i>	Samsun	+	+	
		Xanthi nc	+	+	
	<i>S. lycopersicum</i>	Momotaro	+	+	

NS；えそ斑点，Ma；奇形，M；モザイク，Mo；モットル，CS；退緑斑点，+；無病徴感染，—；非感染。アスタリスクは感染初期の病徴を示し，のちにマスキングしたことを示す。TOMITAKA et al. (2011) より，一部改変して引用。

本病原体の形態を確認するため，最も顕著な症状を示したメロン葉の粗汁液を Dip 法により電子顕微鏡観察した。しかし残念ながら，病原体らしき構造物は何も観察されなかった。そこで，病葉の粗汁液を *Nicotiana benthamiana* に機械接種して病原体を増殖させたのち，感染葉を材料としてショ糖密度勾配超遠心分離法で本病原体の濃縮試料を調整した。その結果，超遠心分離後のチューブの中には三つの異なるバンドが出現した。それら三つのバンドをそれぞれ PTA 染色して電子顕微鏡で観察したところ，いずれのバンドからも直径約 28 nm のウイルス様球形粒子が観察された (図-1)。これらの観察結果から，本病原体は *Secoviridae* 科 *Comoviridae*

亜科のウイルスと疑われた。*Secoviridae* 科は，従来の *Sequiviridae* 科と *Comoviridae* 科をまとめた科として，最近国際ウイルス分類委員会によって新設された科である。本亜科に属するウイルスは 2 分節の長さの異なる RNA (RNA1 および RNA2) をゲノムとして持つが，それら RNA は異なるウイルス粒子にそれぞれ格納されている。一つの粒子内に 2 分節の RNA が一緒に格納されているわけではない。先のショ糖密度勾配超遠心分離法で試料濃縮した際に三つのバンドが出現したが，それは比重の異なる RNA1 と RNA2 が別々の粒子に格納されているため二つのバンドとなり，さらに RNA を含まない空の粒子により一つのバンドが形成されたからであ

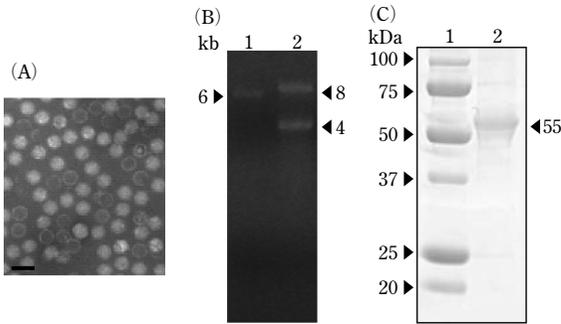


図-1 メロン微斑ウイルスの粒子形態 (A), ゲノムサイズ (B) および外被タンパク質のサイズ (C) スケールバーは 50 nm を示す (A)。レーン 1 およびレーン 2 はそれぞれ分子量マーカーおよび新規ネボウイルス試料を示す (B および C)。TOMITAKA et al. (2011) より、改変して引用。

る。これは *Secoviridae* 科に属するウイルスの特徴として知られており、本実験結果はその特徴を反映したものであった。その後、純化したウイルス様粒子を含む画分をノーネット系メロンに接種したところ原病徴が再現された。このことから、ノーネット系メロンの生育初期に現れた微斑症状は、本ウイルス様粒子が病原体として引き起こした症状であると結論付けられた。

次に、本ウイルスのゲノムサイズを明らかにするため、純化ウイルス試料から抽出した核酸をアガロースゲル電気泳動法で解析した。その結果、本試料内には約 8,000 および 4,000 塩基から成る 2 種類の核酸が含まれていた (図-1)。また両核酸は、RNase A で消化されたことから RNA であることも判明した。さらに純化粒子を材料に SDS-PAGE 法で構成タンパク質を解析した結果、本ウイルスの外被タンパク質 (CP) は単一成分でその分子量は約 55 kDa であった (図-1)。

本ウイルスの粒子形態、ゲノムの分節数およびそれらのサイズ、CP のサイズ等の一連の解析結果から、本ウイルスは *Secoviridae* 科ネボウイルス属に分類されるものと判断された。

## II 全長塩基配列の決定および同一性、分子系統関係

これまでの解析により、本ウイルスはネボウイルスに分類されることが示唆された。そこで、本ウイルスの全塩基配列の決定並びに遺伝学的解析を行った。GenBank などのデータベース上で既報のネボウイルスの塩基配列をもとに RNA1 および RNA2 のそれぞれを増幅するプライマーを設計した。それらを用いた RT-

PCR 法でウイルス遺伝子を増幅した後、ダイレクトシーケンス法により全塩基配列を決定した。

RNA1 の塩基配列は、ポリ A 配列を除き 7,727 塩基であり、ひとつの翻訳領域 (ORF) をコードしていると推定された。ORF は 112 から 7,056 塩基にコードされており、推定されるポリペプチドの分子量は約 252 kDa であった。ORF にはプラス鎖 RNA ウイルスの RNA 依存 RNA ポリメラーゼに保存されている共通モチーフ I ~ VIII (Koonin and Dolja, 1993) 並びに NTP 結合ヘリカーゼのモチーフ A ~ C (Gorbalenya et al., 1990) が認められた。さらに、ORF にはシステインプロテアーゼに保存されているヒスチジン、グルタミン酸/アスパラギン酸、システインの配列があった。また、1,412 塩基目には、MARGIS and PINCK (1992) によって指摘されている一部のネボウイルスに共通なプロテアーゼの基質結合サイト (ロイシン) がコードされていた。

RNA2 の塩基配列はポリ A 配列を除き 3,854 塩基であり、一つの ORF をコードすると推定された。ORF は 122 から 3,484 塩基にコードされており、推定されるポリペプチドの分子量は約 122 kDa であった。CP の塩基配列を確定するため、気相アミノ酸シーケンス法により CP の N 末端側からそのアミノ酸配列を決定した。その結果、N 末端側からアラニン/アスパラギン酸/システイン/プロリン/イソロイシンの配列であり、RNA2 の ORF 上に推定される CP 領域開始点のアミノ酸配列と一致した。塩基配列から推定される CP の分子量は約 58 kDa で、上述の SDS-PAGE 法での解析結果とはほぼ一致した。

CP 遺伝子の 5' 末端配列を ORF の推定アミノ酸配列と照らし合わせると、CP 領域の上流に隣接する移行タンパク質との切断サイトがメチオニン/アラニンであると判明した。ネボウイルスにおいて、この部分の切断サイトは多様であり、これまでにリジン/アラニン、リジン/セリン、アルギニン/グリシン、アルギニン/アラニン、システイン/アラニン、システイン/セリンあるいはグリシン/グルタミン酸の組合せが報告されている。しかし、既報には本ウイルスが持つメチオニン/アラニンの切断サイトはなく、今回初めて確認された配列であった。CP の C 末端側にはネボウイルス共通に保存されている FYGR モチーフが認められた。さらに、移行タンパク質ドメインにはロイシン-プロリン-ロイシン (LPL) モチーフも認められた。

ネボウイルスはゲノムの長さによってサブグループ A, B, C に細分される (Fauquet et al., 2005)。本ウイルスのゲノムサイズは約 8,000 および 4,000 塩基であった

表-2 メロン微斑ウイルスと既報のネボウイルス間のアミノ酸配列の同一性

ウイルス種	RNA1- 翻訳領域	RNA2- 翻訳領域	Pro-Pol 領域	外被 タンパク質
Sub-group A				
<i>Arabid mosaic virus</i> (ArMV)	35.3	15.7	49.9	25.3
<i>Grapevine deformation virus</i> (GDeV)	—	15.9	—	25.9
<i>Grapevine fan leaf virus</i> (GFLV)	35.7	16.8	52.2	26.1
<i>Raspberry ringspot virus</i> (RpRSV)	25.2	19.6	31.3	—
<i>Tobacco ringspot virus</i> (TRSV)	32.1	26.1	45.4	27.4
Sub-group B				
<i>Beet ringspot virus</i> (BRSV)	26.0	20.5	42.7	23.0
<i>Cycas necrotic stunt virus</i> (CNSV)	26.3	20.1	45.4	21.8
<i>Grapevine chrome mosaic virus</i> (GCMV)	22.7	23.1	43.7	26.9
<i>Olive latent ringspot virus</i> (OLRSV)	—	16.4	—	25.4
<i>Tomato black ring virus</i> (TBRV)	27.0	20.9	44.6	23.7
Sub-group C				
<i>Black current reversion virus</i> (BRV)	27.9	23.1	47.0	25.8
<i>Blueberry leaf mottle virus</i> (BLMoV)	—	23.0	—	23.7
<i>Cherry leaf roll virus</i> (CLRV)	—	21.5	—	23.5
<i>Peach rosette mosaic virus</i> (PRMV)	15.2	—	39.4	—
<i>Tomato ringspot virus</i> (ToRSV)	23.8	14.3	43.3	22.1
<i>Artichoke yellow ringspot virus</i> (AYRSV)	—	19.1	—	22.2

TOMITAKA et al. (2011) より, 改変して引用.

ことから, サブグループ A あるいは B のどちらかに分類されると推測された。また, サブグループ間ではゲノムの 3' 末端非翻訳領域の長さが異なることも知られている (FAUQUET et al., 2005)。すなわち, サブグループ A および B に属するウイルス種はその長さが 1 kb 未満, サブグループ C は約 1.4 kb である。本ウイルスのそれらは RNA1 で 671 塩基, RNA2 で 370 塩基であった。

*Secoviridae* 科に属するウイルス種は, Pro-Pol 領域 (プロテアーゼ遺伝子のシステイン-グリシン (CG) モチーフからポリメラーゼ遺伝子のグリシン-アスパラギン酸-アスパラギン酸 (GDD) モチーフ間の領域) および CP 領域の同一性によって分類される (FAUQUET et al., 2005)。そこで, 本ウイルスと既報のネボウイルス種間の当該遺伝子のアミノ酸配列の同一性を算出した。その結果, Pro-Pol 領域における本ウイルスとネボウイルスサブグループ A ~ C 間の同一性は, それぞれ 31.3 ~ 52.2%, 42.7 ~ 45.4%, 39.4 ~ 47.0% であった。さらに, CP 遺伝子におけるそれらの同一性は, それぞれ 25.3 ~ 26.1%, 21.8 ~ 26.9%, 22.1 ~ 25.8% であった (表-2)。ネボウイルスの種の分類基準は, Pro-Pol 領域および CP 遺伝子のアミノ酸配列の同一性がそれぞれ 80% および 75% 以下とされている (FAUQUET et al., 2005)。本ウイルスと既報のネボウイルス種の同一性はいずれの領域でも基準値より極めて低い値を示した。次に, ネボウイル

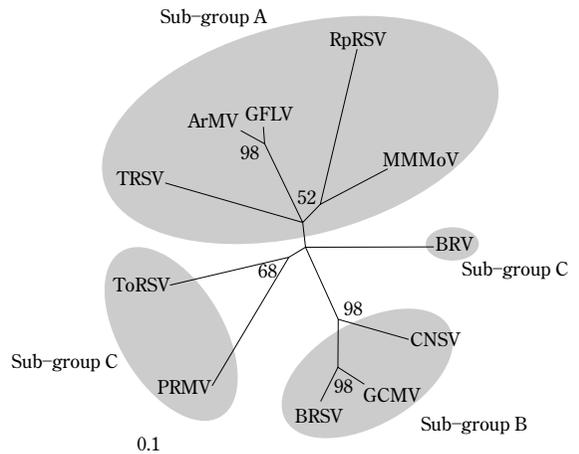


図-2 メロン微斑ウイルスおよび既報のネボウイルスの分子系統樹

Pro-Pol 領域のアミノ酸配列を基に最尤法により作成した。ブートストラップ値が 50% 以上の場合のみ樹上に示した。TOMITAKA et al. (2011) より, 改変して引用。

スの系統分類に用いられる Pro-Pol 領域について分子系統解析を行った。その結果, 本ウイルスはサブグループ A に属するウイルス種とクラスターを形成した (図-2)。

以上の結果から、本ウイルスは *Secoviridae* 科ネボウイルス属のサブグループ A に分類される新種のウイルスとして位置付けられることが判明した。そこで、本ウイルスの和名をメロン微斑ウイルス、英名を *Melon mild mottle virus* (MMMoV) として日本植物病理学会病名委員会に提案した。

ネボウイルスは、ナガハリセンチュウ (*Longidorus*, *Paralongidorus*) やオオハリセンチュウ (*Xiphinema*) 属のセンチュウによって媒介されることが知られている (TAYLOR and BROWN, 1997)。筆者らは本ウイルスが発生したメロン栽培圃場の土からそれらセンチュウの検出を試みたが、すべて陰性であった。ネボウイルスはセンチュウ媒介のほか、種子や花粉によっても媒介される。本ウイルスがどのような経緯で、鳥取県で顕在化したか、その伝播を明らかにする必要がある。ここに一つの手がかりがある。宿主範囲の調査において、本ウイルスは多くのウリ科植物に感染したが、ユウガオへの感染は認められなかった。現地生産圃場において、ユウガオはノーネット系メロンの台木として使用されていることから、栽培期間中にセンチュウを介して土壌伝染したとは考え難い。つまり、本ウイルスは現地発生圃場において土壌中のセンチュウによって伝染したのではなく、むしろ海外生産されたノーネット系メロンの感染種苗などで現地に持ち込まれた可能性が高いと推察される。

### おわりに

本稿では、我が国のノーネット系メロンで発生した新規ネボウイルスの発見の経緯とその特徴について述べた。新規ネボウイルスによる病害が 2008 年に突発的に発生したが、このウイルスが在来のものなのか、あるいは海外侵入病原体なのかは推測の域を出ない。ちなみに、国内のウリ科作物において発生報告のあるネボウイルスは ToRSV のみである。

近年、我が国では省力化、低コスト化を図るが故に、安価な海外生産種苗を利用する傾向にある。ウリ科作物

について品目別にみると、スイカが最も多く、次いでキュウリ、カボチャ、メロンの順で輸入苗が使われている。それらの輸入相手国は、アメリカ合衆国やメキシコ等の北中米、タイ、インドネシアおよび中国等の東アジア諸国である (農林水産省, 2010)。一方で、それら輸入農作物から検出される病害虫の数は増加の一途をたどっている (農林水産省植物防疫所)。農作物やその種苗の国際的な取引量が急増する中、我が国未発生の病害虫が侵入する機会は年々増加するものと思われる。それら病害虫の侵入を未然に防ぎ国内農作物の持続的安定生産を担保するためには水際の防疫措置が極めて重要である。また、万一国内未発生の病害が侵入したとしても、可及的迅速な国内検疫措置によりそのまん延を最小限に抑える努力も必須である。我が国の植物防疫に携わる関係部局は、新病害の発生に対する警戒意識を一層高めるとともに、拡大防止策につながる新技術の開発や実行体制の整備を急がねばならない。

最後に、本研究に用いたウイルス試料並びに現地圃場におけるメロンの病徴写真を、鳥取県農林総合研究所の安田文俊博士並びに岡山裕志氏よりご提供いただいた、ここに記して感謝の意を表する。

### 引用文献

- 1) FAUQUET, C. E. et al. (2005): Virus Taxonomy. Eighth report of the international committee on Taxonomy of viruses. Elsevier Academic Press, San Diego, California, p. 807 ~ 816.
- 2) GORBALENYA, A. E. et al. (1990): FEBS Lett. **262**: 145 ~ 148.
- 3) KOONIN, E. V. and V. V. DOLJA (1993): Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol. **28**: 375 ~ 430.
- 4) MARGIS, R. and L. PINCK (1992): Virology **190**: 884 ~ 888.
- 5) 日本植物病理学会 (2000): 日本植物病名目録. 日本植物防疫協会, 東京, p. 220 ~ 224.
- 6) 農林水産省 (2010): 農林水産統計データ.
- 7) 農林水産省植物防疫所植物検疫統計.
- 8) SAKATA, Y. and M. SUGIYAMA (2002): Acta Hort. **588**: 195 ~ 203.
- 9) TAYLOR, C. E. and D. J. E. BROWN (1997): Nematode vectors of plant viruses. Wallingford, UK, CAB, International, p. 7 ~ 12.
- 10) TOMITAKA, et al. (2011): Phytopathology, DOI: 10.1094/PHYTO-06-10-0150.
- 11) YOSHIDA, K. et al. (1980): Ann. Phytopath. Soc. Japan. **46**: 339 ~ 348.
- 12) 財務省 (2010): 貿易統計.

## 農林水産省プレスリリース (23.2.16 ~ 23.3.15)

農林水産省プレスリリースから、病害虫関連の情報を紹介します。

<http://www.maff.go.jp/j/press/syouan> の後にそれぞれ該当のアドレスを追加してご覧下さい。

◆ 平成 22 年度病害虫発生予報第 10 号の発表について (2/17)

/syokubo/110217.html