特集：植物ウイルス

6. カピロウイルスゲノムの構造と分子変異

吉川 信幸

(岩手大学農学部応用生物学科)

はじめに

リングステムグルーピングウイルス (ASGV) をタイプ種とするカピロウイルス (*Capillovirus*) 属のウイルスは、長さ600~700nmの屈曲性に富んだひも状ウイルスで、単一の一本鎖RNAとそれを取り囲む一種類の外被タンパク質 (CP) から構成されている^{9,22)}。属名のカピロは髪の毛を意味するラテン語 (*capillus*) に由来する。カピロウイルスは主に果樹類から分離され、これまで ASGV 以外に、カンキツタターリーフウイルス (CTLV) (最近 ASGV と同種のウイルスとみなされた)、Cherry virus A (CVA) が報告されている^{4,9)}。ASGV はリングをはじめ、ニホンナシ、セイヨウナシ、アンズ、オウトウ、ウメなどバラ科の果樹類から、また CTLV (ASGV カンキツ株) はカンキツ類に広く分布し、またユリからも分離されている^{3,18)}。これらのウイルスは通常果樹類に潜在感染している場合が多いが、わが国の果樹栽培で用いられている台木植物に病原性を示し、ASGV はミツバカイドウなどを台木に用いたリングに「高接病」を、CTLV はカラタチとその交雑種を台木にしたカンキツに接木部異常病を引き起こす病原として有名である^{11,17)}。媒介ベクターは存在せず、主に接ぎ木により広まったと考えられている。

一般にウイルス RNA を合成する RNA ポリメラー

ゼはブルーフリーディング機構を持たないため、RNA ウイルスが複製する際にポリメラーゼのエラーにより高頻度で塩基置換を生じ、多様な遺伝子変異を有する多数の変異株が同一細胞や組織内に混在した状態 (quasispecies) が形成される^{13,14)}。動物ウイルス (hepatitis C virus や human immunodeficiency virus など) ではクアジスピーシーズ (quasispecies) の中から、宿主内の環境に最も適合した変異体が次第に優勢となり、宿主の免疫監視機構からの逃避、抗ウイルス療法への抵抗性、組織親和性への変化など様々な生物学的性質に関与していると考えられている²⁾。植物ウイルスでは、ウイルス分離株間でのゲノム構造の比較に関しては多数の報告があるが、同一植物体内やウイルス株内の quasispecies の解析に関する報告は少ない。

筆者らは、各種果樹類に感染している ASGV ゲノムの変異について、ゲノムの PCR 産物のシーケンスと single-strand conformation polymorphism (SSCP) 法²⁾を用いて解析した。ここでは、ASGV ゲノムの果樹体内における変異の実体について紹介する。

1. カピロウイルスのゲノム構造

現在までに ASGV のリング分離株 (P-209) とユリ分離株 (L と Li-23) の計3分離株、および CVA のゲノムの全塩基配列が明らかにされている^{4,12,16,20)}。ASGV の3分離株は、いずれも3'末端のポリ (A) 配列を除いて6496塩基からなり、分離株間の塩基配列の相同性は、P-209とLi-23間およびP-209とL間で83%、Li-23とL間で98%であった¹⁶⁾。ASGV ゲノムには2つのタンパク質読み枠 (ORF 1 と ORF 2) が存在し (図1)、ORF 1 はゲノムのほぼ全領域 (塩基番号37-6352) にわたり、主に複製に関与する241K (2105アミノ酸) のタンパク質をコードしている。このタンパク質には、N末端側からメチルトランスフェラーゼ (MET)、パパイン様プロテアーゼ (P-PRO)、

Structure and molecular variability of capillovirus genomes.

Nobuyuki Yoshikawa

Department of Bioscience and Technology, Faculty of Agriculture, Iwate University,

Ueda 3-18-8, Morioka 020-8550

〒020-8550 盛岡市上田 3-18-8

電話/FAX : 019-621-6150

E-mail : yoshikawa@iwate-u.ac.jp

ASGV (P-209) -RNA (6496nt)

図1 カピロウイルス (ASGV) のゲノム編成

MET, メチルトランスフェラーゼ; P-PRO, パパイン様プロテアーゼ; HEL, NTP 結合ヘリカーゼ; POL, RNA ポリメラーゼ; V, V-領域; CP, 外被タンパク質, ; MP, 細胞間移行タンパク質

NTP 結合ヘリカーゼ (HEL) および RNA ポリメラーゼ (POL) の共通保存配列が認められる (図1)。ASGV の CP はこの 241K タンパク質の C-末端領域に位置している (図1)。CVA のゲノムは 7383 塩基からなり, ASGV のゲノム編成と同様に 2 つの ORF, すなわち 266K タンパク質をコードする ORF 1 とこれとオーバーラップして 52K タンパク質をコードする ORF 2 が認められる¹⁾。ASGV の 241K タンパク質に認められるプロテアーゼ (P-PRO) がどの領域の切断に関与するかは不明であるが, ASGV と進化的に近いカルラウイルスでは, HEL 領域と POL 領域の間を切断することが明らかにされている⁵⁾。

カピロウイルスのゲノム編成上の特徴は, CP が 241K タンパク質の一部としてコードされていることである。筆者らは, ゲノムの異なる領域に対応する種々の RNA プローブを用いて, ASGV 感染組織から抽出した 2 本鎖 RNA (dsRNA) を分析したところ, ゲノムの複製型に相当する dsRNA 以外に, ゲノムの 3' 末端側に位置する約 2 キロ塩基対 (kbp) と 1 kbp の 2 本の感染特異的 dsRNA が検出され, また, 大腸菌で, 241K タンパク質の 1869 番目のメチオニンから発現したタンパク質のサイズは CP のそれと一致した⁶⁾。以上から, CP 遺伝子の発現は, 241K タンパク質の一部として翻訳されるというより, 1 kb のサブゲノム RNA を介して行われると考えられる。後に詳しく述べるように, POL 領域と CP 領域間の 284 アミノ酸は, 分離株間で多数の変異の蓄積が認められる領域で, 筆者らはこの領域を variable region (V-領域) と名づけた^{8, 19, 21)}。V-領域の機能は不明であるが, これまでに解析されたすべての株において, この領域にストップコドンに変わるような変異が存在しないことから, ウイルスの生存にとって何らかの機能を持っていると推定される。同一ウイルスの分離株間で, V-領域のように広範囲に多数の変異の蓄積が認められる現象は植物ウイルスの中でもユニークである。

表1 各種果樹類から分離した ASGV に含まれる塩基配列変異株

ASGV 分離株	樹種	塩基配列変異株
AF38	リンゴ	AF38-CO AF38-3
AAK	リンゴ	AAK-CO AAK-3
JP 3	ニホンナシ	JP 3-CO JP 3-3-1 JP 3-3-2 JP 3-3-3
JP 4	ニホンナシ	JP 4-CO JP 4-3-1 JP 4-3-2
V 3	ニホンナシ	V 3-1 V 3-2
EPBL	セイヨウナシ	EPBL-CO EPBL-3
EPFL	セイヨウナシ	EPLF-CO EPLF-3
OKITSU-WASE	ウンシュウミカン	—
BUC-neg.No-3	Citrus sp.	—
P-209	リンゴ	—
Li-23	ユリ	—

2. 果樹類に感染している ASGV ゲノムの不均一性

筆者らは, リンゴ, ニホンナシ, セイヨウナシおよびカンキツの葉を磨砕し, これを実験植物であるタバコの仲間 (*Nicotiana occidentalis*) に汁液接種して ASGV を分離した。これらの感染葉から RNA を抽出後, 種々のプライマーの組み合わせで, 各分離株に含まれる ASGV ゲノムの 3' 末端領域 (ORF 2 領域と CP 遺伝子を含む約 1700 塩基) を PCR で増幅後, クローニングで得られた各 cDNA クローンの塩基配列 (1 分離株当たり 6~32 クローン) を解析した。その結果, 供試したほとんどの分離株において, 1 分離株から得られたクローンの中に顕著に塩基配列が異なるクローンが少なくとも 2~4 種類存在していた⁸⁾。例えば,

図3 各種果樹類から分離した ASGV の V-領域アミノ酸配列に基づいた系統樹 (近隣結合法) 各分離株および塩基配列変異株の由来は表 1 に示している。

と比較的高い保存性が認められたが, V-領域タンパク質の相同性は15株間で53.2-99.3%で, すべての株で共通のアミノ酸はわずか20.4%であった (図2)。変異の分布は V 領域タンパク質の全域にわたっていた。V-領域は36K タンパク質をコードする ORF 2 とフレームが異なった同一領域に位置しており, 同じ領域にコードされた2つのタンパク質間で保存性に大きな差があることは, 両者が異なった進化的選択圧を受けていることを意味している。

V 領域のアミノ酸配列に基づいて, 分離株あるいは塩基配列変異株の系統解析を行ったところ, 4つの大きなクラスター (I, II, III, IV) にわかれた (図3)。当初, 同じ樹種から分離された株は分子進化的に近いと想定していたが, ニホンナシ分離株 (JP4) 内の2種類の塩基配列変異株 (JP4-CO と JP4-3-1) が異なるクラスターに入り, またカンキツからの分離株がリンゴやニホンナシからの株と同じクラスターに所属していることから, 系統解析による各クラスターと宿主の種類とは関連性が認められなかった。わが国では, カンキツ類とリンゴやナシなどバラ科の果樹類の栽培地は明確に分かれているにもかかわらず, カンキツからの分離株がリンゴやナシからの分離株や塩基配列変異株と近縁であったことは興味深い。おそらく生物に見られる平行進化と同様に, 生存可能な変異の蓄積には方向性 (たとえば ASGV の V-領域には4つの方向) があり, その限られた方向に変異を蓄積した

図4 ASGV 感染リンゴ (F38), ニホンナシ (N4) およびセイヨウナシ (Bartlett と LaFrance) から採取した葉に含まれる塩基配列変異株の SSCP による分析

M はマーカー, a, b, c, d は各樹の4本の枝から採取した葉試料を示す。右のローマ数字は検出された塩基配列変異株を示す。

結果, 栽培地が隔離されたリンゴとカンキツに感染している ASGV が両者とも同じクラスターに入ったのであろう。

3. 果樹樹体内での ASGV 変異株の分布

各種果樹類から分離した ASGV 分離株は複数の塩基配列変異株を含むことが明らかになったが, さらに果樹樹体内に存在する塩基配列変異株の全体像を明らかにする目的で, 変異が多数蓄積している V 領域に特異的なプライマーを用いて, 果樹 (リンゴ, ニホンナシおよびセイヨウナシ) の葉から直接イムノカプチャー RT-PCR¹⁾によりゲノム DNA 断片を増幅し, 各試料に含まれる塩基配列変異株の構成を SSCP 法で調

図5 草本宿主 (*C. quinoa*) で継代した ASGV 分離株の塩基配列変異株構成の変化
M はマーカー, 0 は感染果樹葉を汁液接種した *N. occidentalis* 葉, 1, 5, 10, 15 は *C. quinoa* での継代回数を示す。右のローマ数字は検出された塩基配列変異株を示す。

べた⁷⁾。図4に示したように、各樹の4本の枝から葉を採取してSSCP分析したところ、リンゴ (AF38) からは計4本のバンド、ニホンナシ (N4) からは計2本のバンド、セイヨウナシ (Bartlett) から2本、同じくセイヨウナシ (La France) からは計3本のバンドが検出され、PCRクローニングの結果と同様に、すべての個体から2-4種類の塩基配列変異株が検出された。さらに、興味あることに、同じ個体でも採取した葉 (枝) が異なると、塩基配列変異株の構成や量比に違いが認められた (図4)。以上の結果から、ASGV塩基配列変異株の樹体内での分布は均一なものではなく、枝や葉によってその構成が異なることが明らかになった。果樹では一度感染するとウイルスは長期間生存し、その間に変異が蓄積して複数の塩基配列変異株が形成されていくのであろう。また、変異株すべてが樹体内に均一に広がっているのではなく、ある変異株は特定の部位 (枝や葉) に局在していると考えられる。

4. ASGV 変異株の宿主適合

動物ウイルスで認められるような宿主内環境への特定の変異体の適合が植物ウイルスでも認められるであろうか。筆者らは、複数の塩基配列変異株を含む分離株 (JP3とAAK) を草本植物 (*Chenopodium quinoa*) に汁液接種し、継代を繰り返すことで、各分離株に含まれている塩基配列変異株の構成が変化するかどうか

をSSCP法で解析した⁷⁾。その結果、継代1回目の試料では4種類の塩基配列変異株 (I~IV) が検出されたJP3分離株では、5回の継代接種以後の試料では1種類の塩基配列変異株 (III) しか検出されず、同様に4種類の塩基配列変異株 (I~IV) から構成されていたAAKでも、継代を繰り返すことにより、塩基配列変異株 (III) が検出レベル以下となり、これとは逆にIVは継代が進むにつれてバンドが強く検出されるようになった (図5)。このように、果樹の葉の中で複数の塩基配列変異株から構成されていたウイルス分離株が、異なる環境 (異なる宿主植物) を通過させることで、ある特定の変異株が優勢になったり、逆に検出レベル以下に減少することが明らかになった。当研究室で数十回におよぶ継代を草本植物で繰り返してきたP-205およびLi-23分離株がもともと複数の塩基配列変異株から構成されていたか、あるいは単一であったかはわからないが、現在はSSCPで単一のバンドとして検出される。少なくとも *C. quinoa* では、ASGVの複製サイクルの中でV領域に変異が蓄積し、新たに塩基配列変異株が出現するようなことは起こりにくいと考えられる。

おわりに

自然界で感染しているウイルスのゲノムが複数の塩基配列変異株からなる不均一な集団からなる現象は、植物ウイルス、特に果樹のような永年性の作物に感染するウイルスでは普遍的な現象であろう。ASGV以外にもリンゴクロロティックリーフスポットウイルス (ACLSV) のモモ分離株には3種類の塩基配列変異株が含まれていることが報告されている¹⁾。筆者らも同一のリンゴ樹から、草本植物に対する病原性の大きく異なる3種類のACLSV変異株を分離している (未発表)。また、テンサイから分離されたジェミニウイルス (beet curly top virus) の4つの分離株が、それぞれ少なくとも2-3種類の変異株 (全塩基配列の相溶性が互いに79.0~82.8%) からなること¹⁵⁾、同じくテンサイから分離されたルテオウイルス (beet mild yellowing virus) 株にも2種類の変異株が含まれることが報告されている¹⁰⁾。

果樹類に感染しているASGVゲノムの不均一性はどのようにして生じたのであろうか。一つは前に述べたように、RNAポリメラーゼによる複製の誤りで生じたクアジスピーシーズの状態から、長い時間をかけて変異が蓄積し、いくつかの塩基配列変異株が優勢になってきたことが考えられる。もう一つは、リンゴな

どの果樹栽培で品種更新のために一般的に行われている接ぎ木が、複数の変異株を一本の果樹個体に集積させたのかもしれない。いずれにせよ、果樹に感染しているウイルスには多様な遺伝子変異を有する塩基配列変異株が混在しており、この中から、例えば宿主が変わるとその環境に適した株が優勢となり、やがて病原性や宿主域などの生物学的性質が異なる様々な系統が生じていくのであろう。

文 献

- 1) Candresse, T., Lanneau, M., Revers, F., Macquire, G., German, S., Dunez, J., Grasseau, N., and Malinovsky, T. (1995). An immunocapture PCR assay adapted to the detection and the analysis of the molecular variability of apple chlorotic leaf spot virus. *Acta Hort.* **386** : 136-147.
- 2) Emoto, N., Kurosaki, M., Tanaka, Y., Marumo, F., and Sato, C. (1994). Fluctuation of hepatitis C virus quasispecies in persistent infection and interferon treatment revealed by single-strand conformation polymorphism analysis. *J. Gen. Virol.* **75** : 1361-1369.
- 3) Inouye, N., Maeda, T., and Mitsuhata, K. (1979). Citrus tatter leaf virus isolated from lily. *Ann. Phytopathol. Soc. Japan* **45** : 712-720.
- 4) Jelkmann, W. (1995). Cherry virus A : cDNA cloning of dsRNA, nucleotide sequence analysis and serology reveal a new plant capillovirus in sweet cherry. *J. Gen. Virol.* **76** : 2015-2024.
- 5) Lawrence, D. M., Rozanov, M. N., and Hillman, B. I. (1995). Autocatalytic processing of the 223-kDa protein of blueberry scorch carlavirus by a papain-like proteinase. *Virology* **207** : 127-135.
- 6) Magome, H., Terauchi, H., Yoshikawa, N., and Takahashi, T. (1997). Analysis of double-stranded RNA in tissues infected with apple stem grooving capillovirus. *Ann. Phytopathol. Soc. Japan* **63** : 450-454.
- 7) Magome, H., Yoshikawa, N., and Takahashi, T. (1999). Single-strand conformation polymorphism analysis of apple stem grooving capillovirus sequence variants. *Phytopathology* **89** : 136-140.
- 8) Magome, H., Yoshikawa, N., Takahashi, T., Ito, T., and Miyakawa, T. (1997). Molecular variability of the genomes of capilloviruses from apple, Japanese pear, European pear, and citrus trees. *Phytopathology* **87** : 389.
- 9) Martelli, G. P., Agranovski, A. A., Bar-Joseph, M., Boscia, D., Candresse, T., Coutts, R. H. A., Dolja, V. V., Duffs, J. E., Falk, B. W., Gonsalves, D., Jelkmann, W., Karasev, A. V., Minafra, A., Murant, A., Namba, S., Niblett, C. L., Vetten, H. J., and Yoshikawa, N. (1999). Genus *Capillovirus*. In *Virus Taxonomy. Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses* (Eds. : van Regenmortel, M. H., Fauquet, C. M., and Bishop, D. H. L.), Academic Press, San Diego, CA. (in press).
- 10) Miranda, J. R., Stevens, M., Bruyne, E., Smith, H. G., Bird, C., and Hull, R. (1995). Beet luteovirus coat protein sequence variation. *Ann. Appl. Biol.* **127** : 113-124.
- 11) 宮川経邦 (1988). カンキツタターリーフウイルス研究の現状と課題. *植物防疫* **42** : 159-164.
- 12) Ohira, K., Namba, S., Rozanov, M., Kusumi, T., and Tsuchizaki, T. (1995). Complete nucleotide sequence of an infectious cDNA clone of citrus tatter leaf virus RNA : Comparative sequence analysis of capillovirus genomes. *J. Gen. Virol.* **76** : 2305-2309.
- 13) Smith, D. B., McAllister, J., Casino, C., and Simmonds, P. (1997). Virus 'quasispecies' : making a mountain out of a molehill. *J. Gen. Virol.* **78** : 1511-1519.
- 14) Steinhauer, D. A. and Holland, J. J. (1987). Rapid revolution of RNA viruses. *Ann. Rev. Microbiol.* **41**, 409.
- 15) Stenger, D. C. and Ostrow, K. M. (1996). Genetic complexity of a beet curly top virus population used to assess sugar beet cultivar response to infection. *Phytopathology* **86** : 929-933.
- 16) Terauchi, H., Magome, H., Yoshikawa, N., Takahashi, T., and Inouye, N. (1997). Construction of an infectious cDNA clone of the apple stem grooving capillovirus (isolate Li-23) genome containing a cauliflower mosaic virus 35S RNA promoter. *Ann. Phytopathol. Soc. Japan* **63**, 432-436.
- 17) Yanase, H. (1974). Studies of apple latent viruses in Japan. *Bull. Fruit Tree Res. Stn. Jpn. Ser. C* **1** : 47-109.
- 18) Yoshikawa, N. (1999). Apple stem grooving virus. CMI/AAB Descriptions of Plant Viruses on CD-ROM. (in press).
- 19) Yoshikawa, N., Imaizumi, M., Takahashi, T. and Inouye, N. (1993). Striking similarities between the nucleotide sequence and genome organization of citrus tatter leaf and apple stem grooving capilloviruses. *J. Gen. Virol.* **74** : 2743-2747. 31.
- 20) Yoshikawa, N., Sasaki, E., Kato, M. and Takahashi, T. (1992). The nucleotide sequence of apple stem grooving capillovirus genome. *Virology* **191** : 98-105. 32.
- 21) Yoshikawa, N., Sasamoto, K., Sakurada, M., Takahashi, T., and Inouye, N. (1999). Apple stem grooving virus. CMI/AAB Descriptions of Plant Viruses on CD-ROM. (in press).

- hashi, T. and Yanase, H.(1996). Apple stem grooving and citrus tatter leaf Capilloviruses obtained from a single shoot of Japanese Pear (*Pyrus serotina*). Ann. Phytopathol. Soc. Jpn. **62** : 119-124.
- 22) Yoshikawa, N. and Takahashi, T.(1988). Properties of RNAs and proteins of apple stem grooving and apple chlorotic leaf spot viruses. J. Gen. Virol. **69** : 241-245. 30.