

ラン科植物に発生するポチウイルスの外被蛋白質遺伝子の同定と分子系統学的解析

¹近藤秀樹・¹I Wayan Gara・²前田孚憲・¹丸山和之・¹松本純一・^{1,3}井上成信・¹鈴木信弘
¹岡山大学資源生物科学研究所 〒710-0046 岡山県倉敷市中央 2-20-1
²日本大学生物資源学部 〒252-8510 神奈川県藤沢市亀井野 1866
³岡山大学名誉教授

Molecular and phylogenetic analyses of the coat protein gene of orchid-infecting potyviruses in Japan

¹Hideki Kondo, ¹I Wayan Gara, ²Takanori Maeda, ¹Kazuyuki Maruyama, ¹Jun-ichi Matsumoto, ^{1,3}Narinobu Inouye and ¹Nobuhiro Suzuki
¹Research Institute for Bioresources, Okayama University, Kurashiki, Okayama 710-0046, Japan
²College of Bioresource Sciences, Nihon University, Fujisawa 252-8510, Japan.
³Professor Emeritus, Okayama University

Summary

The genus *Potyvirus* is one of the largest and most economically important groups of plant viruses. Based upon serological biological analyses, five definitive and three tentative members of the genus were identified earlier in orchids in Japan: *Bean yellow mosaic virus* (BYMV), *Calanthe mild mosaic virus* (CalMMV), *Clover yellow vein virus* (CIYVV), *Turnip mosaic virus* (TuMV), *Watermelon mosaic virus* (WMV, formerly WMV2), *Dendrobium mosaic virus-Japanese isolate* (DeMV-J), *Dendrobium severe mosaic virus* (DeSMV), and *Habenaria mosaic virus* (HaMV). In this study, the CP genes of potyviruses isolated from *Calanthe*, *Dendrobium*, *Habenaria* and *Orchis* orchids in Japan were analyzed by RT-PCR followed by direct sequencing of amplified fragments. Sequence analyses revealed that Japanese isolates, tentatively classified into CalMMV, DeMV-Japan, DeSMV, and HaMV, belong to new species of the genus *Potyvirus*. We also determined the CP gene sequences of several isolates of BYMV, CIYVV, TuMV from *Calanthe*, and WMV from *Orchis* plants. Phylogenetic analyses revealed a considerable variability among isolates of CalMMV and BYMV.

緒言

ラン科植物を栽培する上でウイルス病の制御は重要な課題の一つである。特に病原ウイルスの遺伝子情報を解明することは、ラン科植物に発生するウイルスの分類や病害診断の基礎知見として必要不可欠となっている。ラン科植物の主要な病原ウイルスとしては、シンビジウムモザイクウイルス(CymMV)、オドントグロッサムリングスポットウイルス(ORSV)ならびにランエソ斑紋ウイルス(OFV)が知られており、これらは世界のラン栽培地域に広く分布していると考えられている(近藤ら, 2009)。さらに、球状やひも状ウイルスの発生も多数知られているが(井上, 2001; Gibbs et al., 2000)、特にポチウイルス属については、ランに発生するウイルスの中で最も多い27種以上が記載されている(表1)。このポチウイルス属は、植物ウイルスの属の中では最大であり、農業生産上、最も被害をもたらすウイルス群の一つとされている。

我が国のラン科植物では、デンドロビウムモザイクウイルス(DeMV)がはじめて報告されたポチウ

ルスである(Inouye 1976)(表1)。その後、デンドロビウム(*Dendrobium* sp.)から別種のポチウイルス *Dendrobium sever mosaic virus* が分離されている(Gara et al., 1998a)(表1, 図1)。エビネ属(*Calanthe*)植物からはインゲン黄斑モザイクウイルス(BYMV)、エビネ微斑モザイクウイルス(CalMMV)、クローバー葉脈黄化ウイルス(CIYVV)およびカブモザイクウイルス(TuMV)(Gara et al., 1998b; Inouye et al., 1988; 松本ら, 1993; Matsumoto et al., 1999)が、サギソウ(*Habenaria radiata* (Thunberg) Sprengel)からはサギソウモザイクウイルス(HaMV)ならびにカボチャモザイクウイルス(WMV, 旧 WMV-2)が報告されている(Gara et al., 1997; Inouye et al., 1998)(表1, 図1)。これらのウイルス多くは、血清学的類縁性、宿主域、細胞内所見など生物学的性状により同定されており、外被蛋白質(CP)遺伝子の情報がほとんどないため、正確な分類的位置づけや系統関係については不明確のままであった。

そこで、本研究では我が国のランに発生するポチウイルスについて、研究室に保存している分離株を中心に、ゲノム RNA から CP 遺伝子領域の塩

表 1. ラン科植物に発生するポチウイルスのリスト

Virus name ^a	Reference ^c
Bean common mosaic virus, BCMV	Grisoni et al. 2004
Bean yellow mosaic virus, BYMV	Lesemann & Koenig 1985
Calanthe mild mosaic virus, CalMMV	Gara et al. 1998b
Ceratobium mosaic virus, CerMV	Mackenzie et al. 1998
Clover yellow vein virus, CIYVV	Inouye et al. 1988
Colombian datura virus, CDV	Fry et al. 2004
Cowpea aphid-borne mosaic virus ^b , CABMV	Grisoni et al. 2006
Cypripedium virus Y ^b , CypVY	Gibbs et al. 2000
Dasheen mosaic virus, DsMV	Jordan et al. 2002
Dendrobium mosaic virus, DeMV	
Japanese isolate	Inouye 1976
Hawaiian isolate (BCMV subgroup)	Hu et al. 1995
Dendrobium sevir mosaic virus, DeSMV	Gara et al., 1998a
Diurus virus Y ^b , DiVY	Gibbs et al. 2000
Habenaria mosaic virus, HaMV	Inouye et al. 1998
(formerly pecteilis mosaic virus)	
Ornithogalum mosaic virus ^b , OrMV	Grisoni et al. 2006
Phalaenopsis chlorotic spot virus, PhCSV	Zheng et al. 2009
Pleione virus Y ^b , PlVY	Gibbs et al. 2000
Pterostylis virus Y ^b , PtVY	Gibbs et al. 2000
(=Ornithogalum mosaic virus)	
Rhopalanthus virus Y ^b , RhoVY	Gibbs et al. 2000
Sarcochilus virus Y ^b , SarVY	Gibbs et al. 2000
Spiranthes mosaic virus 2, SpiMV2	Guaragna et al. 2006
(Freesia mosaic virus, FrMV)	
Spiranthes mosaic virus 3, SpiMV3	Guaragna et al. 2006
Turnip mosaic virus, TuMV	Lesemann & Vetten 1985
Vanilla mosaic virus, VaMV	Wisler et al. 1987
(=Dasheen mosaic virus)	
Vanilla necrosis virus, VNV	Pearson & Pone 1988
(=Watermelon mosaic virus)	
Vanilla distortion mosaic virus, VDMV	unpublished
Watermelon mosaic virus, WMV	Gara et al. 1997
(formerly Watermelon mosaic virus 2)	
Wisteria vein mosaic virus ^b , WVMV	Grisoni et al. 2006

a. イタリアック体のウイルス名は国際ウイルス分類委員会 ICTV により種として承認されたウイルス
 b. RT-PCR による配列解析で同定されたウイルス
 c. 海外で報告されたウイルスに関する文献は Gibbs et al. (2000), Grisoni et al. (2004), Zheng et al. (2009)を参照

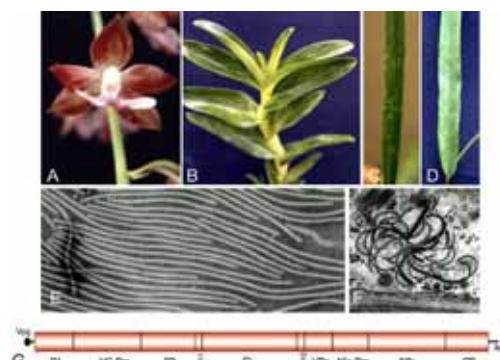


図 1. A-D ポチウイルス感染したラン科植物の原株病徴. A, CalMMV (*Calanthe* sp.); B, DeSMV (*Dendrobium* sp.); C, HaMV (*Habenaria radiata*); D, WMV (*Orchis graminifolia*); E, WMV の精製ウイルス粒子 (長さ約 700nm); F, HaMV 感染細胞の細胞質に誘導される風車状封入体; G, ポチウイルスのゲノム構造(単一 ORF からポリ蛋白質が翻訳され、自己蛋白質の持つプロテアーゼ活性により 10 種の機能蛋白に切断される)

基配列を決定した。得られた情報と我々の既報のデータ(Gara et al., 1997; 1998b; Ikegami et al., 1995)をもとに、CP 遺伝子に基づくランのポチウイルスの分子分類、分子系統解析を行った。

材料および方法

供試したウイルス分離株

本研究では、当研究室に保存されている以下のウイルス罹病株の凍結葉試料を用いた。デンドロビウム (*Dendrobium* sp) (供試株名: Japanese, De97-2, De97-8), ウチョウラン (*Orchis graminifolia* (Reichenbach f.) Tang et Wang) (Orc 07-5 株), アワチドリ (*O. graminifolia* var. *suzukiana* Ohwi) (Orc09-1 株), エビネ属植物(分離株名: Cal90-2,

表 2. ポチウイルスが検出されたラン科植物のリスト

Host	Isolate	Virus	Location
<i>Dendrobium</i> sp.	Japanese	DeMV	Okayama
<i>Dendrobium</i> sp.	De97-2	DeSMV	Okayama
<i>Dendrobium</i> sp.	De97-8	DeSMV	Okayama
<i>Habenaria radiata</i>	Ha-1	HaMV	Okayama
<i>Orchis graminifolia</i>	Orc07-5	WMV	Ehime
<i>O. graminifolia</i> var. <i>suzukiana</i>	Orc09-1	WMV	Chiba
<i>Calanthe</i> sp.	Cal90-2	BYMV	Yamaguchi
<i>Calanthe</i> hybrid	Cal90-11	BYMV	Yamaguchi
<i>C. discolor</i> x <i>C. aristulifera</i>	Cal92-4	CIYVV	Yamaguchi
<i>C. discolor</i> x <i>C. tricarinata</i>	Cal92-18	CalMMV	Yamaguchi
<i>C. discolor</i> var. <i>bicolor</i>	Cal92-23	TuMV	Yamaguchi
<i>C. discolor</i>	Cal93-16	BYMV	Kyoto
<i>C. discolor</i>	Cal93-17	BYMV	Kyoto
<i>C. discolor</i>	Cal93-18	BYMV	Kyoto
<i>C. discolor</i>	Cal93-19	BYMV	Kyoto
<i>C. tricarinata</i> x <i>C. striata</i>	Cal94-15	CalMMV	Yamaguchi

90-11, 92-4, 92-18, 93-16, 93-17, 93-18, 93-19, 94-15)(表 2)。以下、実験用宿主 *Chenopodium quinoa* (Ha-1 株), コカブ(Cal92-23 株)。

CP 遺伝子領域の塩基配列解析

ポチウイルスの CP 遺伝子領域の増幅は RT-PCR により以下の様に行なった。原株あるいは罹病植物葉(約 50 100mg)から全 RNA を抽出した。これを M-MLV(Invitrogen)による逆転写反応の鋳型とし、dT-Not I プライマー (5'-AAGAATTCGCGCCGCAGGAAT₁₈₋₃) を用いて相補的 DNA を作製した。PCR 用プライマーは、ポチウイルスの共通プライマーである potyvirus-2 (5'-GGBAAYAYAGYGGCARCC-3) と Not I-Anchor プライマー (5'-GGAAAATTCGC GGCCGCAGGA-3) のセットを用いた。PCR 反応には Quick Taq HS Dye Mix (Toyobo) を使い、94 2 分間の熱変性後、DNA 変性 94 10 秒、アニーリング 50 20 秒、DNA 伸長 72 2 分のサイクル 30 回の後、72 10 分の伸長反応を行った。PCR 反応液を 1~1.5% アガロースゲルで電気泳動し、臭化エチジウム染色により目的配列の増幅を確認した。塩基配列決定は ABI PRISM 3100-Avant Genetic Analyzer (PE Applied Biosystems) を使い、精製した PCR 産物のダイレクトシーケンシング法で決定した。必要に応じてウイルス特異的なプライマーを合成し、配列解析に

用いた。CP 遺伝子の同源性検索は NCBI の BLAST サイトにて行った。配列情報を直接比較する場合は、GENETYX-MAC (SDC)を用いた。

ウイルス遺伝子配列を用いた分子系統解析

CP 遺伝子領域を用いた分子系統解析は、ClustalW 法による推定アミノ酸配列の多重整列後、近接結合法により系統樹とした。ポチウイルスの配列情報は GenBank/EMBL/DDBJ データベースより入手した (表 3)。

結 果

表 3. 系統解析に用いたポチウイルス株のリスト

Virus Isolate ^a	(GenBank/EMBL/DDBJ accession No)
BYMV-Ditrus	(AF185962), -Masdevallia (AF185961), -Pterostylis (AF185960), -VM0 (AY845011), -Vm23 (AY845012), CalMMV (AB011404), CerMV-13 (AF022442), -1 (AF022443), -6 (AF022444), -18 (AF022445), -19 (AF022446), CiiVY (AF228515), CIYVV-OM (AF185959), CypVY-CP (AF185954), -CF (AF185955), DiVY (AF203527), PleVY (AF185958), PtVY-Pterostylis (AF185964), -Eriochilus (AF185965), RhoVY (AF185956), SarVY (AF185957), TuMV-OM (AF185963), VanMV-FP (AJ616719), -CI-AT (AJ616720), CI-NAT (AJ616721), WMV-Habenaria (AB001994), -Tonga (L22907), VDMV-VM40 (AY943944), -VMM1 (AY943945), -VM27 (AY943946), -VM34 (AY948437), -VM36 (AY948436)

a ラン以外の植物から分離されたウイルス, 系統は割愛した

デンドロビウムに発生するポチウイルス2種のCP遺伝子の解析

DeMV に関しては, Hu et al. (1995)が BCMV (*Bean common mosaic virus*) subgroupに属すウイルスを分離し, DeMVと記載している。しかし, 我々の予備実験により, Inouye (1976)の報告したタイプ種はこの分離株と性状が明らかに異なることが判明している。そこで, 本研究では両者を区別するため前者を Hawaiian, 後者を Japanese 分離株 (DeMV-J)とした。研究室に保存している DeMV-J に感染したデンドロビウム (*Dendrobium* sp.)葉から (表1, 表2), 全RNAを抽出し, RT-PCRで Nib領域を含む遺伝子断片を増幅した。この増幅DNAを用いCP遺伝子領域の塩基配列解析を行った。その結果, DeMV-JのCP遺伝子は798塩基からなり, 分子量30kDaの蛋白質をコードすると推定された (表4)。CPの推定切断配列はVLLQ/Gと考えられ, その直下にはアブラムシ伝搬性に必要なDAG配列が確認された。DeMV-JのCP配列を用いたBLAST検索では, ラン科植物から分離された *Rhopalanthe virus* Y (RhoVY)と塩基レベルで80%の同源性を示した。アミノ酸配列レベルでは, RhoVY と82%, CalMMVと74%の同源性が認められたが, 他のポチウイルスとの同源性は67%以下であった。一般に, 独立したポチウイルス種との場合, CP遺伝子のアミノ酸配列の同源性は81~82%程度がボーダーラインであると考えられている。このことから, DeMV-Jは新種のウイルスであると考えられるが,

RhoVYとの関係については今後さらに検討を進めたい。

*Dendrobium sever mosaic virus*は1996年, 岡山県下で明瞭なモザイク症状を示すデンドロビウムより分離されたウイルスで, DeMV-Jと血清学的な類縁関係が無いことなどから, 新規ポチウイルスと記載された (Gara et al., 1998a) (表1, 図1B)。原株 De97-2, De97-8 (表2)の凍結感染葉から全RNAを抽出し, RT-PCRでCP遺伝子の配列解析を行った。その結果, DeSMVのCP遺伝子は両分離株とも816塩基からなり, 分子量31kDaの蛋白質をコードすると考えられた (表4)。前出のDAG配列上流には, CPの推定切断配列VVHQ/Mが存在したが, Q/Mはこれまでポチウイルス属では報告のない配列であった。DeSMVの分離株間の同源性は塩基配列で96%, アミノ酸配列で97%であった。BLAST検索では, DeSMV各分離株は, RhoVYやCalMMVのCPアミノ酸配列と61~62%の同源性を示した。CP全長領域の同源性がこれを超えるウイルスは認められず, DeSMVは新規のウイルス種であることが確認された。なお, DeSMVは機械的接種で *Dendrobium nobil*に感染したが, 原株のような激しい病徴は再現できなかった (未発表データ)。このことから, 病原性試験の追試やウイルス名の変更などの検討が必要であろう。

サギソウならびにウチョウランに発生するポチウイルスのCP遺伝子の解析

表 4. 本研究により解明されたポチウイルス CP 遺伝子の詳細

Virus	Isolate	CP gene			Proteolytic cleavage site
		nt	aa	kDa	
DeMV	Japanese	798	266	30	VLLQ/G
DeSMV	De97-2, -8	816	272	31	VVHQ/M
HaMV	Ha-1	864	288	33	VLHQ/A
WMV	Orc07-3, -5, Habenaria ^b	849	283	32	VYLQ/S
	Orc09-1	843	281	31	VYLQ/S
CalMMV	Cal94-15, -18, J ^c	813	268	30-31	VTLQ/G
BYMV	Cal90-2, -11, Cal93-19	819	273	31	CRFQ/S
	Cal93-16-18	819	273	31	CRFQ/S
CIYVV	Cal92-4	813	271	31	FVFQ/S
	C ^d	915	305	35	FVFQ/S
TuMV	Cal92-23	864	288	33	VYHQ/A

a.ポチウイルスの CP はポリ蛋白質で翻訳され, その後上流の Nib(RdRp)遺伝子との間で切断される。その推定切断配列は Q/A, Q/G, Q/S が多い (/:切断部位)。

b, Gara et al., 1997; c, Gara et al., 1998b; d, Ikegami et al., 1997

HaMV (Ha-1分離株)は1974年に岡山県下のサギソウから分離されたウイルスである (井上ら, 1998) (表1, 表2, 図1C)。本実験では, Ha-1の実験宿主 *Chenopodium quinoa*の接種葉から全RNAを抽出し, ウイルス核酸の配列を解析した。Ha-1のCP遺伝子は864塩基で, 分子量33kDaの蛋白質をコードした (表4)。Ha-1の場合, CPの推定切断配列VLHQ/Aの下流には, 既知配列DAGでなくDAT配列が確認された。BLAST解析では, *Iris*

mild mosaic virus (DQ436919)のCPと塩基レベルで79%, アミノ酸配列レベル(CPのN末端を除く領域)で81%と最も相関性が高かった。以上から, HaMVは独立したポチウイルス種であることが証明された。

ウチョウランにはモザイク症状を引き起こす未同定ポチウイルスの発生が知られている(井上, 2001)(図1D)。本研究ではこれと類似症状を示すウチョウラン株(Orc07-3, -5)を愛媛県で, 萎縮症状を示すアワチドリ(Orc09-1株)を千葉県で採取し供試した(表2)。この原株葉を用いたRT-PCRにより, 各株から WMVを検出した。ウチョウラン株 Orc07-3 (Orc07-5は同一配列)のCP遺伝子は849塩基で, 分子量32kDaの蛋白質をコードし, アワチドリ株 Orc09-1ではN末側近傍がそれより2アミノ酸残基短く, 分子量は31kDaと推定された(表4)。BLAST検索では, ウチョウラン株はHabenaria株とアミノ酸配列で98%(塩基配列で99%)の相関性があった。さらに我が国のカボチャ株S96-6 (AB076499)とはアミノ酸配列が一致した(塩基配列で99%の相関性)。一方, アワチドリ株はサギソウのHabenaria株と96%(塩基配列で94%)の相関性で, フランス株Fr (AY437609)とはアミノ酸配列が一致した(塩基配列で97%)。

エビネ属植物に発生するポチウイルスのCP遺伝子の解析

CalMMV(Japanese 分離株)は1997年に広島県のエビネ属植物から分離されたポチウイルスである(Gara et al., 1998b)(表1, 図1A)。今回, 同時期に山口県で採集したエビネ交雑種の前株葉(Cal94-15, 92-18)(表2)からRT-PCRでCalMMVを検出した。Cal94-15 (Cal92-18はほぼ同配列である)は, 既報のCalMMV-JとCPの遺伝子領域は同サイズであったが(表4), 両者の相関性は, 塩基配列では85%, アミノ酸配列では87%であった。Cal94-15とRhoVYの間と相関性はアミノ酸配列では73%であり, その他のポチウイルスとの相関性は67%以下であった。

BYMVはMatsumoto et al. (1999)によりエビネ属植物から報告されている。今回, この分離株を含む6株からRT-PCRによりBYVVを検出した(表2)。CP遺伝子の酸配を調べたところ, 我が国のエビネ分離株は山口県と京都府で採集した Cal90-2, Cal90-11, Cal93-19と京都府で採集した Cal93-16, Cal93-17, Cal93-18の2グループに分けられた(表4)。グループ内の分離株間では数塩基程度の違いであったが, グループ間では塩基配列で約87%, アミノ酸配列で約91%の相関性を示した。前者のグループは, ランのBYMV-Diurus株(Gibbs et al., 2000)とアミノ酸配列で97%(塩基配列で

98%)の相関性を示した。後者はアミノ酸配列ではマメ科のLupinus株(EU082124)と98%の相関性であった(塩基配列で約88%)。

TuMVは, 松本ら(1993)が山口県で採集した葉脈条斑を示すエビネ(タカネ)で報告している。そこで, この分離株(Cal92-23)(表2)に感染したコカブ葉からRT-PCRを行った。CP遺伝子の配列(表4)を既報の分離株と比較したところ, 我が国のアブラナ類(*Brassica* spp.)の分離株 ON16J(AB076499)と塩基配列で99%, アミノ酸配列は全く一致した。一方, *Orchis militaris*分離株 OM(Gibbs et al., 2000)とは塩基配列で83%, アミノ酸配列で90%の相関性であった。

CIYVVはIkegami et al.(1997)によりエビネ分離株(C)の配列が解析されている(表2)。今回調べた92-4株のCP遺伝子(表4)はC株とアミノ酸配列で96%(塩基配列で98%)の相関性を示し, 我が国のソラマメ(*Vicia faba*)株 MB3(D89538)とアミノ酸配列が一致した(塩基配列で99%の相関性)。

ランに発生するポチウイルスのCP遺伝子アミノ酸配列を用いた分子系統解析

本研究で明らかにした8種16分離株のウイルスおよび系統(表2)を含む, 27種のランのポチウイルスについて, CPアミノ酸配列をもとに分子系統樹を作成した(図2)。ランのポチウイルスは, BCMV subgroupに属すウイルスと, その他の独立したウイ

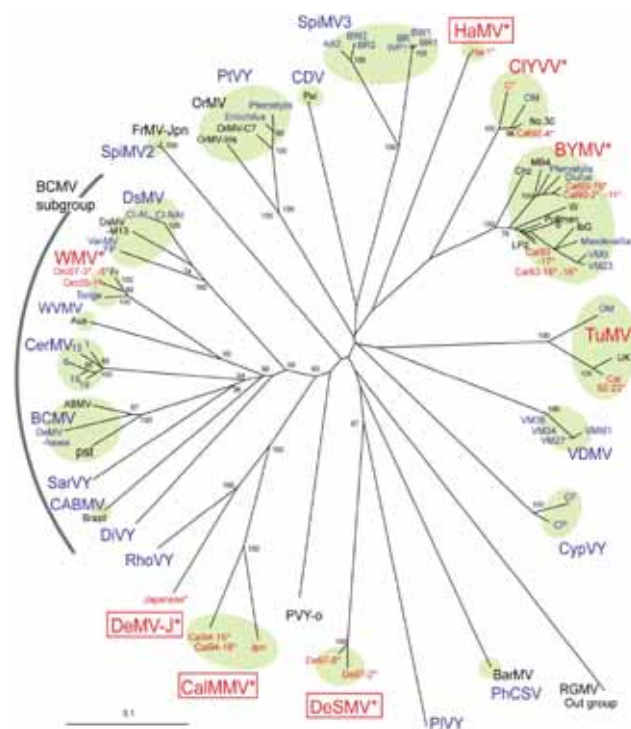


図2. ラン科植物に発生するポチウイルスの外被蛋白質遺伝子アミノ酸配列を用いた分子系統樹。ボックスは日本のランにのみ発生するウイルス。*印は日本のランに発生するウイルスあるいは分離株を示す。円内は分離株・系統を示す。なお, 詳細は本文参照のこと。OutgroupはRymovirus属のRGMV。

ルス群に大別された(図 2). サギソウやウチョウランの WMV は我が国のランのウイルスとしては唯一このグループに含まれた. BYMV やその近縁種である CIYVV のエビネ分離株は, 他の作物種から分離された既報のウイルス株とクラスターを形成した.

新規のウイルスであるデンドロビウムの DeMV-J は, エビネの CalMMV ならびに後述の RhoVY と同一クラスターを形成した(図 2). また, DeMV-J は前出の DeMV-Hawaiian とは別のクラスターで, 系統進化的に異なることが確認された. 一方, サギソウの HaMV やデンドロビウムの DeSMV は, 既報のランのウイルスとは明確なクラスターを形成しなかった(図 2). BYMV や CalMMV は, 分離株間で CP 遺伝子のアミノ酸置換が多数認められ, 分子系統樹上でも明瞭に分岐した(図 2).

考 察

本研究では, 我が国のラン科植物のうち, デンドロビウム, エビネ属植物, サギソウ, ウチョウランに発生するポチウイルス属のウイルスに関して, 外被蛋白質 CP 遺伝子の配列解析を行った. 我々の既報のデータとあわせ, DeMV-J, DeSMV, HaMV, CalMMV の 4 種のポチウイルスがこれまでに報告のない新規のウイルス種であることが確認された. さらに, ウチョウランの新病害として WMV をはじめて同定した. BYMV や TuMV では, 我が国のランの分離株ではじめてそれらの配列を決定し, CalMMV, DeSMV ならびに CIYVV の新たな分離株の配列を決定した. これらの成果は, ランのポチウイルスの分類に貢献するだけではなく, ラン科植物における病原ウイルスの正確な診断および同定の重要な基礎データになると期待される.

ランのポチウイルスは, 宿主域からラン以外の植物種にも発生するウイルス種と, ランでのみ発生が知られているものに大別される. 前者は, 我が国では BYMV, CIYVV, TuMV や WMV が該当するが, これらは主にマメ科, アブラナ科, ウリ科植物などで発生が知られている. 海外では, 特に WMV を含む BCMV subgroup のウイルス種がバニラ属植物で多数報告されている(図 2). この中には, BCMV や *Dasheen mosaic virus* など, 我が国の別の作物種(マメ科やサトイモ科)で発生するものが含まれているが, これらウイルスが我が国のランで発生するかは不明である. これまでの BYMV の塩基配列による系統解析では, 分離される宿主に対応して 7 グループに分けられている. 海外では *Diurus maculata*, *Pterostylis curta* から General タイプが, *Masdevallia* sp. *Vanilla fragrans* から Monocoto タイプ(グラジオラスなどの分離株の一部が含まれる)が検出されている(Gibbs et al., 2000 など)(図 2). これに対して, 我が国のエビネでは

General タイプだけでなく, ランでははじめて Lupin タイプに類似な系統の発生が確認された. その他, 海外では TuMV が *Orchis* sp. で報告されている.

一方, ランでのみ確認されているウイルスとしては, 我が国では DeMV-J, DeSMV, HaMV, CalMMV がある. このうち, DeMV-J, DeSMV, HaMV の発生は, 今のところ岡山県以外では確認されていない. 一方, CalMMV は少なくとも西日本に広く分布し, 調査したエビネ属植物 168 個体のうち 51 個体(30%)からウイルスが検出されている(Gara et al., 1998b). 海外におけるこれらのウイルスの発生状況は不明であるが, インドでは *Cymbidium elegans* から CalMMV 様ウイルス(AJ871476)が検出されている. また, DeMV-J に類縁な RhoVY は, オーストラリアで *Denerobium* 属の亜属 *Rhopalanthe* に発生したウイルスである(Gibbs et al., 2000). ところで, オーストラリアではラン科植物でのみ発生する *Ceratobium mosaic virus* (CerMV)が 19 属, *Pleione virus Y* (PtVY)が 5 属のランから検出されている(Gibbs et al., 2000). これらの詳細は不明であるが, 我が国のユリ科植物より PtVY に近縁な *Ornithogalum mosaic virus* (OrMV)の系統 C7(AB079647)が分離されている(図 2). その他, 韓国などで発生するネジバナ(*Spiranthes sinensis*)の *Spiranthes mosaic virus 2* (SpiMV2)に近縁な *Freesia mosaic virus* が, 我が国のフリージア(*Freesia refracta*)から検出された(Kondo, 未発表)(図 2). この様に, ラン科植物に感染するポチウイルスの中には, ユリ科やアヤメ科などの花卉球根類に発生するウイルス種に近縁な系統やウイルス種の発生が知られている. これら花卉球根類の分離株のラン科植物への感染性については, ウイルスの伝染源を考える上で今後検討する必要がある.

本研究では, 本邦のランのポチウイルスについて, CP 遺伝子の配列情報をもとにした分類ならびに分子系統解析を行った. 今回明らかとなった新規のポチウイルスについては, そのゲノム RNA の全塩基配列の解析を進行中で, そのうち HaMV と DeMV-J は配列解析をほぼ終了している. 現在, 得られた配列データを他のポチウイルスと比較することで, ランのポチウイルスのゲノムワイドな分子進化について解析中である.

最後に, 本研究で取り上げたように, エビネ属植物の一部やサギソウ, ウチョウランといった我が国の稀少なラン科植物には, 栽培環境下では多様なポチウイルスの感染が示唆された. そのため, これらの植物を栽培する場合, あるいはそれらを自生地へ植戻す場合などには, ポチウイルスを拡散(蔓延)させないように十分留意する必要がある.

謝 辞

本研究の一部は植田正浩氏, 光畑興二氏との共同研究で行った。また, 玉田哲男博士, Ida Bagus Andika 博士には有益なご助言をいただいた。罹病個体の採集には, 田原望武氏, 澤山陽一氏, 橋本季正氏にご協力を頂いた。なお, 本研究の一部は文部科学省の科学研究補助費の援助で行われた。以上, 記して感謝申し上げる。

引用文献

- Gara IW, Kondo H, Maeda T, Tamada T, Inouye N (1997) Stunt disease of *Habenaria radiata* caused by a strain of watermelon mosaic virus 2. *Ann Phytopathol Soc Jpn* 63:113-117
- Gara, IW, Kondo H, Maeda T, Tamada T (1998a) Dendrobium sever mosaic virus, a distinct member of potyvirus genus. *Ann Phytopathol Soc Jpn* 64:422
- Gara IW, Kondo H, Maeda T, Tamada T, Inouye N (1998b) *Calanthe mild mosaic virus*, a new potyvirus from *Calanthe* Orchid. *J Phytopathol* 146:357-363
- Gibbs A, Mackenzie A, Blanchfield A, Cros P, Wilson C, Kitajima EW, Nightingale M, Clements M (2000) Viruses of orchids in Australia: Their identification, biology and control. *Aus Orchid Rev* 65:10-21
- Grisoni M, Moles M, Farreyrol K, Rassaby L, Davis R, Pearson M (2006) Identification of potyviruses infecting vanilla by direct sequencing of a short RT-PCR amplicon. *Plant Pathol* 55:523-529
- Ikegami M, Isomura Y, Maeda T, Inouye N (1995) The nucleotide sequence of the 3'-terminal region of clover yellow vein potyvirus isolated from *Calanthe* sp.. *J phytopathl* 143:385-390
- Inouye N (1976) Dendrobium mosaic virus. *Ber Ohara Inst landw Biol Okayama Univ* 16:165-174
- 井上成信 (2001) 原色ランのウイルス病 診断・検定・防除. 農山漁村文化協会, 東京. pp196
- Inouye N, Maeda T, Mitsuata K (1988) A strain of clover yellow vein virus isolated from *Calanthe* sp. *Acta Hort* 234:61-68
- 井上成信, 前田孚憲, Gara IW (1998) サギソウから検出された新ひも状ウイルス岡大資生研報 5:155-168
- 近藤秀樹, 前田孚憲, 野田瑞紀, 鈴木信弘, 玉田哲男 (2009) ランえそ斑紋ウイルスのダニ伝搬様式, 分子系統および診断技術に関する研究. NIOC 2009記録 8-13
- 松本純一, 前田孚憲, 井上成信, 田原望武 (1993) エビネから分離されたturnip mosaic virusについて. *日植病報* 59: 333-334

- Matsumoto J, Maeda T, Inouye N (1999) Some properties of bean yellow mosaic virus isolated from *Calanthe* sp. (Orchidaceae) in Japan. *Bull Res Inst Bioresour Okayama Univ* 6:43-51
- Zheng YX, Chen CC, Chen YK, Ja FJ (2008) Identification and characterization of a potyvirus causing chlorotic spots on *Phalaenopsis* orchids. *Eur J Plant Pathol* 121:87-95

摘 要

ポチウイルス属は植物ウイルスの属で最大であり, 農業生産上最も被害をもたらすウイルス群の一つである。ラン科植物でも, 記載されているウイルスのうち, ポチウイルスの種類が最も多い。我が国のラン科植物では, これまでに7種のポチウイルスが報告されている。しかし, 外被蛋白質(CP)遺伝子の情報がほとんどないため, ランのポチウイルスの正確な診断や分類は困難であった。そこで, 本研究では, 岡山大学資源生物科学研究所に保存しているウイルス分離株を用い, 各ウイルスのCP遺伝子領域をRT-PCRにより増幅後, 塩基配列を決定した。その結果, DeMV-J, DeSMV, HaMV, CalMMVの4種のポチウイルスはこれまでに報告のない新規のウイルス種であることが確認された。さらに, ウチョウランの新病害としてWMVをはじめて同定した。BYMVやTuMVでは, 我が国のランの分離株ではじめてその配列を決定し, CalMMV, DeSMVならびにCIYVVの新たな分離株の配列も決定した。また, BYMVやCalMMVでは, 分離株間でCP遺伝子に顕著な多様性のあることが確認された。