

イチゴマイルドイエローエッジウイルス外被タンパク質遺伝子の多様性

解析と全長 cDNA クローンの構築

生物資源科学専攻 植物育種科学講座 植物病原学 高橋 香帆

1. 緒言

永年性植物のイチゴに長期間感染しているイチゴマイルドイエローエッジウイルス (SMYEV) 集団のゲノム RNA では、複製酵素の取り込みミスによる遺伝的変異が蓄積している事が予測される。本研究では温室保存の日本産 SMYEV 株について外被タンパク質 (CP) 遺伝子の多様性を調べ、諸外国株と比較した。また、SMYEV の全長 cDNA クローンを構築し、感染性クローンの作製を試みた。

2. 方法

1) CP 遺伝子の多様性解析 日本産 SMYEV 7 株について CP 遺伝子を RT-PCR によって増幅し、RT-PCR 産物のダイレクトシーケンス (DS) および同じ RT-PCR 産物から得られた 3 個~5 個のクローンシーケンス (CS) を解析して比較した。後志 2-1 と山形 D-3 株では DS の経時的な変化を見た。また、諸外国の株の配列と共に近隣結合法により系統解析を行った。

2) 全長 cDNA クローンの構築 先行研究において全塩基配列が解析された後志 2-1 株には 2 種類のゲノムタイプ (A と B) が存在するため、それぞれを CaMV 35S プロモーター下に、また、T7 プロモーター下に A タイプの全長 cDNA を構築した。それぞれプラスミド DNA または転写 RNA をバイオリスティック法によってイチゴ実生個体に接種し、30~120 日間育成後にイチゴ葉から RNA を抽出し、RT-PCR によってウイルス検定を行った。

3. 結果と考察

1) CP 遺伝子の多様性解析 DS では、7 株中 3 株で 2 塩基シグナルが重なる箇所が見られた。他の 4 株では重なる箇所は見られず、3~5 個の CS のコンセンサス配列と DS が一致し、そのうち山形 D-3 株のコンセンサス配列は、15 年間で同義 2 塩基置換が見られたのみであった。一方 2 塩基が重なる箇所が見られた 3 株のうち大滝 HS 株では、DS と CS の比較から、相同性が 92% と低い 2 つのジェノタイプが共存しており、2 種類の SMYEV 株が混合感染したと推察された。またこれら 3 株の DS において 2 塩基が重なり、かつ 2 個以上の CS で見られた点変異によって生じる化学的性質の大きく異なるアミノ酸は、全て CP の N 末端側 32 アミノ酸内に位置した。1 クローンのみで見られた 1~6 個の点変異の殆どは、一時的に生じたと考えられた。また、外国株配列を含めた系統樹で分かれた 5 グループのうち、日本株はグループ I, V に含まれ、近縁関係と地理的要因に関連は無かった。

2) 全長 cDNA クローンの感染性試験 CaMV 35S または T7 プロモーター下に構築した全長 cDNA 配列はいずれも感染性が無かった。原因として、多様性が大きい後志 2-1 株の 2~7 つの部分 cDNA を繋ぎ合わせた事でキメラゲノムになり、増殖能力の無い配列になってしまった事が考えられた。

4. まとめ

DS と CS の比較から、1 つの SMYEV 株において、相同性が低い 2 つのジェノタイプが共存している場合は、2 種類の SMYEV 株が混合感染したと推察された。外国株を含めた系統解析では日本株は 2 つのグループに分かれた。全長 cDNA クローンに感染性が無かった後志 2-1 株では多様性が大きいために、キメラゲノムを構築した可能性が高いと考えられた。