

九州で発生したトマト黄化葉巻ウイルスの分子的特徴とその特異的検出

大貫正俊¹⁾・小川哲治²⁾・内川敬介²⁾・加藤公彦³⁾・花田 薫⁴⁾

(2003年9月24日 受理)

要 旨

大貫正俊・小川哲治・内川敬介・加藤公彦・花田 薫 (2004) 九州で発生したトマト黄化葉巻ウイルスの分子的特徴とその特異的検出。九州沖縄農研報告 44:55-77。

1996年、長崎県大村市において葉縁および葉脈間の黄化と葉巻、縮葉、小葉化等の症状を伴うトマトの新病害が発生した。感染株の抽出核酸からはベゴモウイルスのゲノムDNAに由来する特異的なPCR産物が得られ、また、血清試験および媒介虫による伝搬試験によっても本症状はベゴモウイルスに起因することが確認された。特異的PCR産物の塩基配列を解析したところ、イスラエルで報告のあるトマト黄化葉巻ウイルス (*Tomato yellow leaf curl virus-Israel*, TYLCV-Is) との相同性が塩基配列レベルで98%と極めて高く、本ウイルスは、九州で初発生したTYLCV-Isであり [TYLCV-Is 長崎株 (Ng) と呼称]、東海および関東で発生したTYLCV-Is 株群とは遺伝的に別系統と判断された。わが国にはTYLCV-Isと同属で、トマトでの病徴が類似のタバコ巻葉ウイルスが既に発生している。そこで、TYLCV-Is 特異的検出用プライマーおよびTYLCV-Isの2系統を識別するためのプライマーを作製した。これらのプライマーを用いたPCRにより、TYLCV-Isの種レベルならびに系統レベルでの検出が可能になった。

キーワード：トマト黄化葉巻病、ウイルスゲノム、PCR、TYLCV-Is、特異的検出技術。

1. 緒 言

1996年、長崎県大村市においてトマトの新病害が発生した。この病害は葉縁および葉脈間の黄化と葉巻ならびに縮葉が顕著で、上位部における小葉化、節間短縮、株の萎縮も認められた。病徴発現した節位より上位節では茎葉が全体に黄化し、著しく生育が抑制される特徴的な症状を示した。本病は接ぎ木やシルバーリーフコナジラミにより伝搬されることからウイルス病であることが示唆された。

1996年には静岡、愛知両県下でも同様なトマト病害が発生し、病原ウイルスの塩基配列の解析結果からジェミニウイルスであるTYLCV-Isマイルド株 (TYLCV-Is.M) と近縁であることが報告された (Kato et al., 1998)。

ジェミニウイルス (*Geminiviridae*) は熱帯・亜熱帯では農作物への被害が大きいウイルスとして知られ

ているが (Brown and Bird, 1992)、近年は温帯での発生も無視できないものになっている (Brown, 1994)。ジェミニウイルスは環状1本鎖DNAをゲノムとして有し、宿主植物および媒介虫の種類ならびにゲノム構造により、*Mastrevirus* (マストレウイルス)、*Curtovirus* (クルトウイルス)、*Begomovirus* (ベゴモウイルス) および *Topocovirus* (トポクウイルス) の4属に分けられている (Fauquet et al., 2003)。このうち、ベゴモウイルスはタバココナジラミ (*Bemisia tabaci* Genn.) およびシルバーリーフコナジラミ (*B. argentifolii* Bellows & Perring) により伝搬され、ジェミニウイルスのなかでは最も種数が多い。

トマトを宿主とするベゴモウイルスには、従来から地中海沿岸諸国を中心に発生していたTYLCV、インド、台湾、オーストラリアで報告のあるTomato leaf curl virus (ToLCV)、中南米で発生しているTomato golden mosaic virus (TGMV)、Tomato mottle

九州沖縄農業研究センター地域基盤研究部病害遺伝子制御研究室：861-1192 熊本県菊池郡西合志町大字須屋2421

1) 現、国際農林水産業研究センター沖縄支所

2) 長崎県総合農林試験場

3) 静岡県農業試験場

4) 現、農業生物資源研究所

virus (ToMoV) などがある。これらのベゴモウイルスのなかで TYLCV は旧大陸から新大陸へと分布拡大し (POLSTON and ANDERSON, 1997; POLSTON et al., 1999), 近年とくに問題になっているウイルスの一つである。

トマト黄化葉巻病は, 1996年に長崎県で新発生が確認された後, 1999年には佐賀, 熊本, 福岡県で, 2001年には宮崎県で, 2002年には鹿児島県で, 2003年には大分県で相次いで発生が確認され, 九州全域で急速に拡大した。本病は病徴の激しさとトマト果実の著しい減収により, 生産現場では最も警戒すべきウイルス病として認識されている。

本研究は九州で発生した TYLCV-Is の分子的特徴を明らかにし, 得られた塩基配列情報を基に TYLCV-Is の種特異的, 系統特異的検出について検討するなど, ベゴモウイルスに起因するトマト病害の診断精度の向上を目指して実施したものである。

II. 長崎県大村市のトマトに発生したウイルスの生物学的諸性質

1. 材料および方法

1) ウイルス源: 実験に供試したウイルス罹病株は 1996年長崎県大村市のトマト (品種: ハウス桃太郎) の上位葉に黄化と葉巻症状を示した1株であり, これを接ぎ木あるいは挿し木により 28°C のガラス室内で維持した (写真1)。比較のために 1996年静岡県清水市で発生し, 同様な病徴を示したトマト株 (品種: 木熟麗玉2号) を供試した。なお, 本論文では長崎県大村市由来のウイルス株を Ng, 静岡県清水市由来のウイルス株を Sz と略称した。



写真1 ガラス室内で維持したトマト黄化葉巻症状株 (品種, ポンデローザ)

2) シルバーリーフコナジラミによる伝搬試験: 九州農業試験場 (現九州沖縄農業研究センター) 内のダイズ圃場で採集したコナジラミは, ウリ科やヒルガオ科植物に明瞭なシルバーリーフ症状を示したことから, シルバーリーフコナジラミと判断された。この個体群を健全ダイズ上で飼育, 維持した。ダイズ植物体上で孵化, 生育させた成虫を黄化葉巻症状のトマト上で2日間獲得吸汁させ, これを健全トマト (品種: 桃太郎) に1株当たり約10頭移して2日間接種吸汁させた。接种植物は殺虫剤 (ピリダベン水和剤およびイミダクドプリド粒剤) 施用後, 28°C, 14時間明条件のガラス室内で管理した。接種4週間後に病徴発現の有無を調査した。ジェミニウイルスの感染を確認するために, ジェミニウイルスのゲノム A 成分を増幅するためのユニバーサルプライマー (BRIDDON and MARKHAM, 1994) を用いて PCR (Polymerase chain reaction) を実施した。PCR のためのトマトからの全核酸抽出法および PCR の実施条件は次章の材料および方法に詳述した。

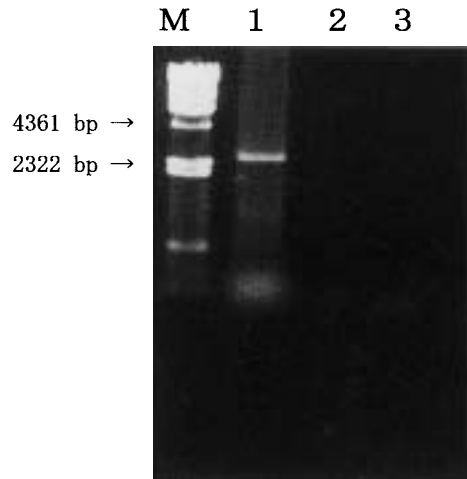
3) TAS-ELISA によるウイルス検定: TAS-ELISA (Triple antibody-sandwich enzyme-linked immunosorbent assay) 法により, Ng, Sz の血清学的検出を試みた。TAS-ELISA は TYLCV TAS-ELISA キット (ADGEN) に添付されている TYLCV ポリクローナル抗体, *African cassava mosaic virus* に対するモノクローナル抗体 (Mab) (SCR18, -20, -23), *Indian cassava mosaic virus* に対する Mab (SCR55, -60) およびアルカリフォスファターゼ標識抗マウスウサギ抗体 (コンジュゲート) を用い, 下記の手順 (B. D. Harrison 私信) に従った。まず, 0.05M 炭酸緩衝液 (pH 9.6) で 1,000 倍希釈した TYLCV ポリクローナル抗体を 96 穴 ELISA 用ポリスチレンプレート (DYNATECH) のウエル当たり 100 μ l ずつ分注し, 37°C, 2時間静置して抗体をコーティングした。プレートを PBST (2mM KH₂PO₄, 8mM Na₂HPO₄, 0.14M NaCl, 2mM KCl, pH 7.4, 0.05% Tween-20) で3回洗浄後, Ng, Sz に感染したトマトおよび健全トマトの上位葉を 10 倍量の抽出用緩衝液 [50mM Tris-HCl, pH 8.0, 5mM EDTA, 2%ポリビニルピロリドン K-30 (PVP), 0.05% Tween-20] で磨砕し, その磨砕液をウエル当たり 100 μ l ずつ分注した。このプレートを 4°C, 1夜静置し, 翌日, PBST で3回洗浄した。PBST-PVP (PBST, 2% PVP) でスキ

ムミルクを5%濃度に溶解してブロッキング液とし、ウエル当たり200 μ lずつ分注した。プレートに37°C、30分間静置した後、ブロッキング液を除去した。5種類のMab (SCR18, -20, -23, -55, -60) をPBST-PVPで10倍希釈し、ウエル当たり100 μ lずつ分注し、37°C、2時間静置後、プレートを洗浄した。コンジュゲート用緩衝液 (PBST-PVP, 0.2% 卵白アルブミン) で1,000倍希釈したコンジュゲートをウエル当たり100 μ lずつ分注し、37°C、2時間静置後、プレートを洗浄した。10%ジエタノールアミン溶液 (pH 9.8) に *p*-ニトロフェニルリン酸錠剤 (Sigma) を1mg/ml濃度に溶解して基質液を調製し、その150 μ lを各ウエルに分注した。プレートを室温下に1時間保った後、4°Cに1夜静置して405 nmにおける吸光度をマイクロプレートリーダー (モデル550, BIO-RAD) で測定した。なお、実験は1試料につき2つのウエルを用い、これを2回繰り返した。基質液をブランクとした。

2. 結果および考察

1) シルバーリーフコナジラミによる伝搬試験: Ng感染株を用いて保毒させたシルバーリーフコナジラミを健全トマトに接種し、4週間後に病徴発現の有無を確認した。供試したトマト4株のうち、1株で明瞭な黄化葉巻症状が認められた。そこで、病徴発現の認められた株、認められなかった株および健全トマト株から全核酸を抽出し、ジェミニウイルス用ユニバーサルプライマーを用いたPCRを実施した。PCR増幅産物をアガロースゲル電気泳動した結果を第1図に示した。約2.7 kbpの特異産物が得られたのは黄化葉巻症状を示したトマトの抽出DNAからのみであった。外見健全の接種株および無処理健全トマトから抽出したDNAからは特異的なPCR産物は得られなかった。以上、トマトの黄化葉巻症状はシルバーリーフコナジラミを用いた虫媒接種により病徴が再現され、その株の抽出核酸からはジェミニウイルスのゲノムA成分に由来する特異的なDNA断片が増幅されたことから、本症状はジェミニウイルス科のベゴモウイルスに起因することが判明した。

2) TAS-ELISAによるウイルス検定: 基質添加1夜後の各試料の405 nmにおける吸光度 (A_{405nm}) を0 (<0.3), 1 (0.3 - 0.6), 2 (0.61 - 1.2), 3 (1.21 - 1.8), 4 (>1.8) の5段階に分けて第1表に示した。Ng, Szの感染トマト葉の汁液はMab, SCR18に対



第1図 シルバーリーフコナジラミによる接種後、黄化葉巻症状を示したトマト株および外見健全株から抽出した核酸のPCR

注) M: DNA分子量マーカー, λ /Hind III

1: 接種後、黄化葉巻症状を示した株

2: 接種後も外見健全であったトマト株

3: 健全対照トマト株

してともに2の段階の吸光度を示した。その他の4種Mabに対する特異反応は認められなかった。健全トマト葉の汁液はいずれのMabとも反応しなかった。この結果からNg, Szはいずれもベゴモウイルスであることが強く示された。

本キットは5種類のMabを用いて検定ウイルスの抗原決定基の類別 (epitope profile) を行うものである。一般にジェミニウイルスは同属間においてその多くが血清学的類縁関係を有している (ROBERTS et al., 1984) ため、重要なジェミニウイルスに関しては、TAS-ELISAによる抗原決定基の類別が行われている (KONATE et al., 1995; SWANSON et al., 1998)。本キットは既にTYLCVであることが判明しているウイルス間の抗原性の比較に利用可能と考えられるが、本キットの5種Mabは実際はTYLCVに対するものではなく、ACMVおよびICMVに対するものであるため、TYLCV以外のベゴモウイルスとも反応することが予想された。事実、本キットは筆者らが既にTYLCVと別種であることを分子的データから示したヒヨドリバナのベゴモウイルス (EuGV) (ONUKI and HANADA, 2000; 大貫, 2000b) やスイカズラのベゴモウイルス (大貫, 2000b) とともにNg, Szと全く同様に反応した (データ未表示)。このような結果から、本キットはTYLCVの抗原決定基の類別というよりもベゴモウイルス感染の有無を知る上で有用であると考えられる。

トマトに発生するベゴモウイルスとして、わが国ではタバコ巻葉ウイルス (*Tobacco leaf curl virus*, TLCV) が既に発生しており、トマト黄化萎縮病として知られているが、1996年の静岡、愛知両県下でのトマト黄化葉巻ウイルスの発生確認によって、病徴がよく似た2種のベゴモウイルスが存在することが確実になった。NgはPCR検定を含む虫媒伝搬試験およびTAS-ELISAにより、そしてSzはTAS-ELISAによりいずれもベゴモウイルスであることが判明したが、これらがTYLCVであるのかTLCVであるのかを明らかにするためにはウイルスのゲノム塩基配列を解析する必要があると判断された。

かを明らかにするためにはウイルスのゲノム塩基配列を解析する必要があると判断された。

III. 長崎県大村市のトマトに発生したベゴモウイルスの塩基配列の解析

1. 材料および方法

1) 核酸抽出: 感染および健全トマトからの全核酸の抽出法はDELLAPORTA et al. (1983)の方法に準じて、第2図に示した手順に従った。

2) PCR: 塩基配列解析のため、BRIDDON and MARKHAM (1994)が考案したジェミニウイルスのゲノムA成分増幅のためのユニバーサルプライマー (BMプライマー, 第2表)を用いたPCRを行った。一般にベゴモウイルスはA, B2成分から成る2粒子分節ゲノムのものである。そこで、B成分の有無を確認するためにROJAS et al. (1993)が考案したB成分増幅のための2組のプライマー (PBL1v2040/PCRC1 および PBL1v2040/PCRC154) (第2表)を用いたPCRを実施した。NgおよびSzのA成分の全塩基配列を決定するには、BMプライマーがアニールするウイルスゲノム近傍の塩基配列

第1表 5種類のモノクローナル抗体 (MAB) に対する Ng および Sz 感染トマト株の反応 (TAS-ELISA)

ウイルス株	MAB SCR18	-20	-23	-55	-60
Ng	2	0	0	0	0
Sz	2	0	0	0	0
健全対照	0	0	0	0	0

注) A_{405nm} の値を 0: < 0.3, 1: 0.3-0.6, 2: 0.61-1.2, 3: 1.21-1.8, 4: > 1.8 の5段階に分けた。SCR18, -20, -23は *African cassava mosaic virus* に対するMAB, SCR55, -60は *Indian cassava mosaic virus* に対するMAB

- 1) 展開中の感染生葉 (1 cm²) を抽出用 buffer (50 mM EDTA, 0.5 M NaCl, 10 mM 2-メルカプトエタノール) 1 ml で磨砕する。
- 2) 磨砕汁液 500 μ l を微量遠心チューブに採り、33 μ l の 20% SDS を加え混合する。65 $^{\circ}$ C で 10 分間処理後、160 μ l の 5 M 酢酸カリウムを加えて混合し、10,000 g で 10 分間遠心する。
- 3) 上清 450 μ l を新しいチューブに採り、10,000 g で 5 分間遠心する。上清を新しいチューブに移し、半量のイソプロパノールを加えて 10,000 g で 5 分間遠心する。
- 4) 沈殿を 70% エタノールで洗浄し、10,000 g で 5 分間遠心する。沈殿を減圧乾燥後、20 ~ 30 μ l の滅菌蒸留水に懸濁し、このうち 1 μ l を PCR に供試する。

【 以上のステップでトマトからの全核酸抽出は可能であるが、沈殿が褐変している場合は以降のステップを追加する。 】

- 5) 上記4)で減圧乾燥した沈殿を 500 μ l の滅菌蒸留水に懸濁し、等量のフェノール-クロロホルム (1:1) を加えて 5 分間、転倒混和し、核酸を抽出する。
- 6) 10,000 g で 5 分間遠心後、水層を採り、1/10 量の 3 M 酢酸ナトリウム および 2 ~ 2.5 倍量の 100% エタノールを加える。-80 $^{\circ}$ C に 15 ~ 20 分間置く。
- 7) 10,000 g で 5 分間遠心する。沈殿を 70% エタノールで洗浄後、減圧乾燥し滅菌蒸留水 20 μ l に懸濁する。1 μ l を PCR に供試する。

第2図 トマトからの全核酸簡易抽出法

第2表 TYLCV のゲノム成分の増幅に用いたプライマー

プライマーの名称	配 列
BRIDDON and MARKHAM(1994)のプライマー (BM プライマー)	
virus sense(BM-V)	5' -KSGGGTCGACGTCATCAATGACGTTTAC-3'
complementary sense(BM-C)	5' -AARGAATTCATKGGGGCCARARRGACTGGC-3'
ROJAS et al.(1993)のプライマー (R プライマー)	
PCRC1 ^{a)}	5' -CTAGCTGCAGCATATTTACRARWATGCCA-3'
PCRC154 ^{a)}	5' -GGTAATATTATAHCGGATGG-3'
PBL1v2040 ^{a)}	5' -GCCTCTGCAGCARTGRTCKTCTTCATACA-3'
TYGAP プライマー	
virus sense	5' -TCTCTGCCTGAGGAGCACTG-3'
complementary sense	5' -TGTGGACATCTAGACCTAAG-3'

注) a) プライマーの名称は ROJAS et al. (1993) の表記に従った。
 プライマー配列の表記は IUPAC ambiguity code に従った。H=A,C,T; K=G,T; N=A,C,G,T;
 R=A,G; S=G,C; W=A,T; Y=C,T

を明らかにする必要がある。そこで、それぞれのベ
 ゴモウイルスの一部塩基配列を決定し、Ng, Sz に特
 異的でおかつ、BMプライマーがアニールする部位
 とその前後、約 460 bp の領域を増幅させるためのプ
 ライマー (TYGAP プライマー) を設計した (第 2
 表)。PCR に供した DNA ポリメラーゼは *Ex Taq*
 (TaKaRa) を用い、dNTP および塩類濃度は添付の
 プロトコールに従った。PCR サーマルサイクラーは
 PROGENE (TECHNE) を用いた。BM プライマーお
 よび ROJAS et al. (1993) による 2 組のプライマーを
 用いた PCR の温度条件は、95°C、2 分間を 1 回、次
 いで (95°C、50 秒) → (50°C、1 分) → (72°C、3
 分) の反応を 35 回繰り返す、最後に 72°C、10 分間
 処理した。TYGAP プライマーによる PCR は 95°C、
 2 分処理後、(95°C、50 秒) → (55°C、1 分) → (72
 °C、1 分) の反応を 35 回繰り返す、最後に 72°C、10
 分間処理した。PCR 産物の有無は TAE 緩衝液 (40
 mM Tris-acetate, pH 8.0, 1 mM EDTA) を用いた
 1%アガロースゲル電気泳動および臭化エチジウム
 染色により調べた。

3) PCR 産物のクローニングと塩基配列の決定：
 BM プライマーおよび TYGAP プライマーによる
 PCR 産物をフェノール抽出、エタノール沈殿して濃

縮し、微量の TE 緩衝液 (10 mM Tris-HCl, pH 8.0,
 1 mM EDTA) に再懸濁後、その一部をクローニング
 に供試した。クローニングは pCR-Script Amp SK (+)
 クローニングキット (STRATAGENE) を用い、PCR
 産物の末端を *Pfu* DNA ポリメラーゼで平滑化し、プ
 ラスミドベクター、pCR-Script Amp SK (+) の *Srf*
 I 部位に挿入した。これをコンピテントセル (大腸菌、
 XL1-Blue) に受容させて形質転換した。陽性と思わ
 れる白色の大腸菌コロニーを釣菌し、50 µg/ml のア
 ンピシリンを含む 2 × YT 液体培地 (1.6% トリプト
 ン、1%酵母エキス、0.5% NaCl) で 1 夜培養し、ア
 ルカリ法によりプラスミドを抽出した。蛍光 DNA
 シーケンサー (373A, ABI) を用いたダイデオキシ
 法 (SANGER et al., 1977) により DNA 塩基配列を決
 定した。

4) 塩基配列、推定アミノ酸配列の解析および分子
 系統樹の作製：Ng, Sz について決定した A 成分の
 全塩基配列およびそれらから推定されるアミノ酸配
 列の解析には DNA 解析ソフトウェア、DNASIS (日
 立ソフトウェアエンジニアリング) を用いた。塩基
 配列およびアミノ酸配列の多重配列比較は
 CLUSTAL W (THOMPSON et al., 1994) のアルゴリ
 ズムに従い、これを基に近隣結合法による分子系統

樹を作製した。比較のために用いたベゴモウイルスの塩基配列は第3表に示したとおりである。なお、ウイルス名をイタリックで示したものは、国際ウイルス分類委員会 (International Committee of Taxonomy of Viruses) 第7次報告において *Begomovirus* 確定種とされたものであり、その他は *Begomovirus* の暫定種である (RYBICKI et al., 2000)。また、ウイルス略称名の後の記号は DNA データベース (GenBank, EMBL, DDBJ) のアクセッション番号を示したものである。

2. 結果および考察

1) Ng, Sz の塩基配列, 推定アミノ酸配列の解析および分子系統樹の作製: Ng, Sz とも ROJAS et al. (1993) が設計したゲノム B 成分増幅用の 2 組のプライマー (PBL1v2040/PCRC1 および PBL1v2040/PCRC154) では特異的な PCR 産物は増幅されず, BM プライマーおよび TYGAP プライマーでのみそれぞれ約 2.7 kbp, 460 bp の産物が得られたことから両株は 2 粒子分節ゲノムではなく, 単一ゲノムのベゴモウイルスと推定された (データ未表示)。そこで, BM

プライマーおよび TYGAP プライマーによる PCR 産物の DNA 塩基配列から両株のゲノム塩基配列を決定した。それぞれのゲノム塩基配列を第3図および第4図に示した。Ng は 2774 塩基, Sz は 2791 塩基から成っていた。Ng, Sz ともウイルス鎖側に 2 つのオープンリーディングフレーム (ORF) V1, V2, 相補鎖側に 4 つの ORF, C1 ~ C4 および約 300 塩基から成る遺伝子間領域 (intergenic region, IR) を有していた。

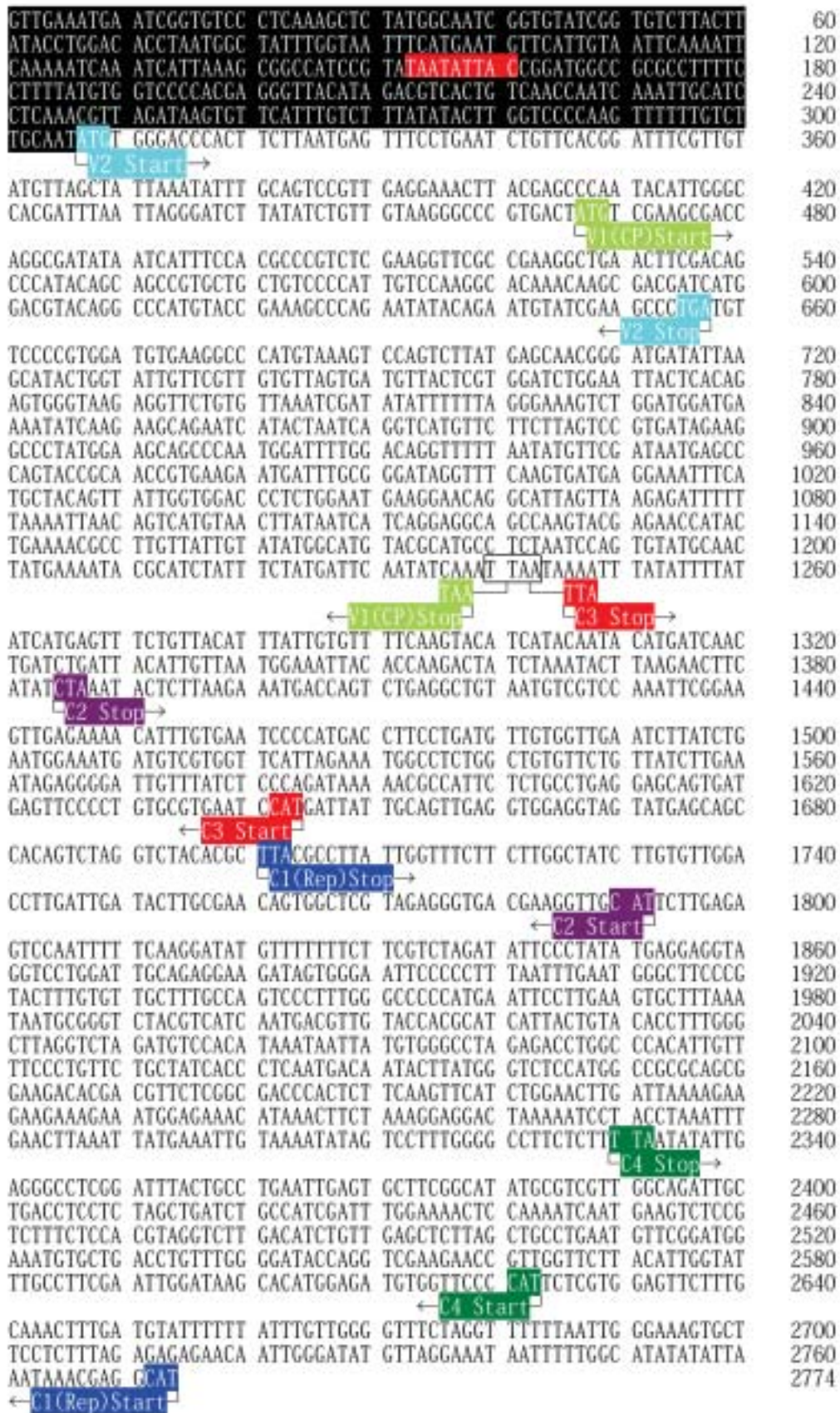
なお, 他のベゴモウイルスとの比較から V1 は外被タンパク質 (coat protein, CP) をコードする ORF であり, C1 はウイルス DNA の複製に必須である複製関連タンパク質 (replication-associated protein, Rep) をコードする ORF と推定されることから, V1 を CP, C1 を Rep と併記した。

Ng, Sz の 6 ORF のアミノ酸配列を第5図 A ~ F に並列して示した。CP の最初の 20 アミノ酸配列中には, KUNIK et al. (1998) が TYLCV の CP アミノ酸配列中で見出した核移行シグナル (nuclear localization signal) と推定されるモチーフが認められ

第3表 比較対象とした既知のベゴモウイルス群の A 成分塩基配列

ウイルス名	略称	データベース アクセッション番号	文献
<i>Abutilon mosaic virus</i>	AbMV	X15983	FRISCHMUTH et al. (1990)
<i>African cassava mosaic virus-Kenya</i>	ACMV-Ke	J02057	STANLEY and GAY (1983)
<i>African cassava mosaic virus-Nigeria</i>	ACMV-Ni	X17095	MORRIS et al. (1990)
<i>Ageratum yellow vein virus</i>	AYV	X74516	TAN et al. (1995)
<i>Bean golden mosaic virus-Puerto Rico</i>	BGMV-PR	M10070	HOWARTH et al. (1985)
<i>Indian cassava mosaic virus</i>	ICMV	Z24758	HONG et al. (1993)
<i>Indian tomato leaf curl virus</i>	IToLCV	Z48182	HONG and HARRISON (1995)
<i>Mungbean yellow mosaic virus</i>	MYMV	AB017341	KANG and IREGAMI, unpublished
<i>Tomato leaf curl virus-Australia</i>	ToLCV-Au	S53251	DRY et al. (1993)
<i>Tomato leaf curl virus-Bangalore II</i>	ToLCV-Ban II	U38239	CHATCHAWANKANPHANICH et al., unpublished
<i>Tomato leaf curl virus-Bangladesh</i>	ToLCV-Bg	AF188481	SHIH et al. (1998)
<i>Tomato leaf curl virus-D1</i>	ToLCV-D1	AF084006	BEHJATNIA et al., unpublished
<i>Tomato leaf curl virus-D2</i>	ToLCV-D2	AF084007	BEHJATNIA et al., unpublished
<i>Tomato leaf curl virus-Laos</i>	ToLCV-La	AF195782	TSAI et al., unpublished
<i>Tomato leaf curl virus-New Delhi 1</i>	ToLCV-NDe 1	U15015	PADIDAM et al. (1995)
<i>Tomato leaf curl virus-New Delhi 2</i>	ToLCV-NDe 2	U15016	PADIDAM et al. (1995)
<i>Tomato leaf curl virus-Taiwan</i>	ToLCV-Tw	U88692	CHIANG et al., unpublished
<i>Tomato yellow leaf curl virus-Israel</i>	TYLCV-Is	X15656	NAVOT et al. (1991)
<i>Tomato yellow leaf curl virus-Israel, mild isolate</i>	TYLCV-Is.M	X76319	ANTIGNUS and COHEN (1994)
<i>Tomato yellow leaf curl virus-Israel, Portugal isolate</i>	TYLCV-Is.Po	AF105975	NAVAS-CASTILLO et al. (2000)
<i>Tomato yellow leaf curl virus-Israel, Spain isolate</i>	TYLCV-Is.Sp	AF071228	NAVAS-CASTILLO et al. (2000)
<i>Tomato yellow leaf curl virus-Israel, Cuba isolate</i>	TYLCV-Is.Cu	AJ223505	BEJARANO et al., unpublished
<i>Tomato yellow leaf curl virus-Israel, Dominican Republic isolate</i>	TYLCV-Is.DR	AF024715	NAKHLA et al. (1997)
<i>Tomato yellow leaf curl virus-Israel, Aichi isolate</i>	TYLCV-Is.A	AB014347	KATO et al. (1998)
<i>Tomato yellow leaf curl virus-Israel, Shizuoka isolate</i>	TYLCV-Is.S	AB014346	KATO et al. (1998)
<i>Tomato yellow leaf curl virus-Sardinia</i>	TYLCV-Sar	X61153	KHEYR-POUR et al. (1991)
<i>Tomato yellow leaf curl virus-Sardinia, Almeria isolate</i>	TYLCV-Sar.Al	L27708	REINA et al., unpublished
<i>Tomato yellow leaf curl virus-Sardinia, Murcia isolate</i>	TYLCV-Sar.Mu	Z25751	NORIS et al. (1994)
<i>Tomato yellow leaf curl virus-Sardinia, Sicily isolate</i>	TYLCV-Sar.Si	Z28390	CRESPI et al. (1995)
<i>Tomato yellow leaf curl virus-Thailand</i>	TYLCV-Th	X63015	ROCHESTER et al. (1994)

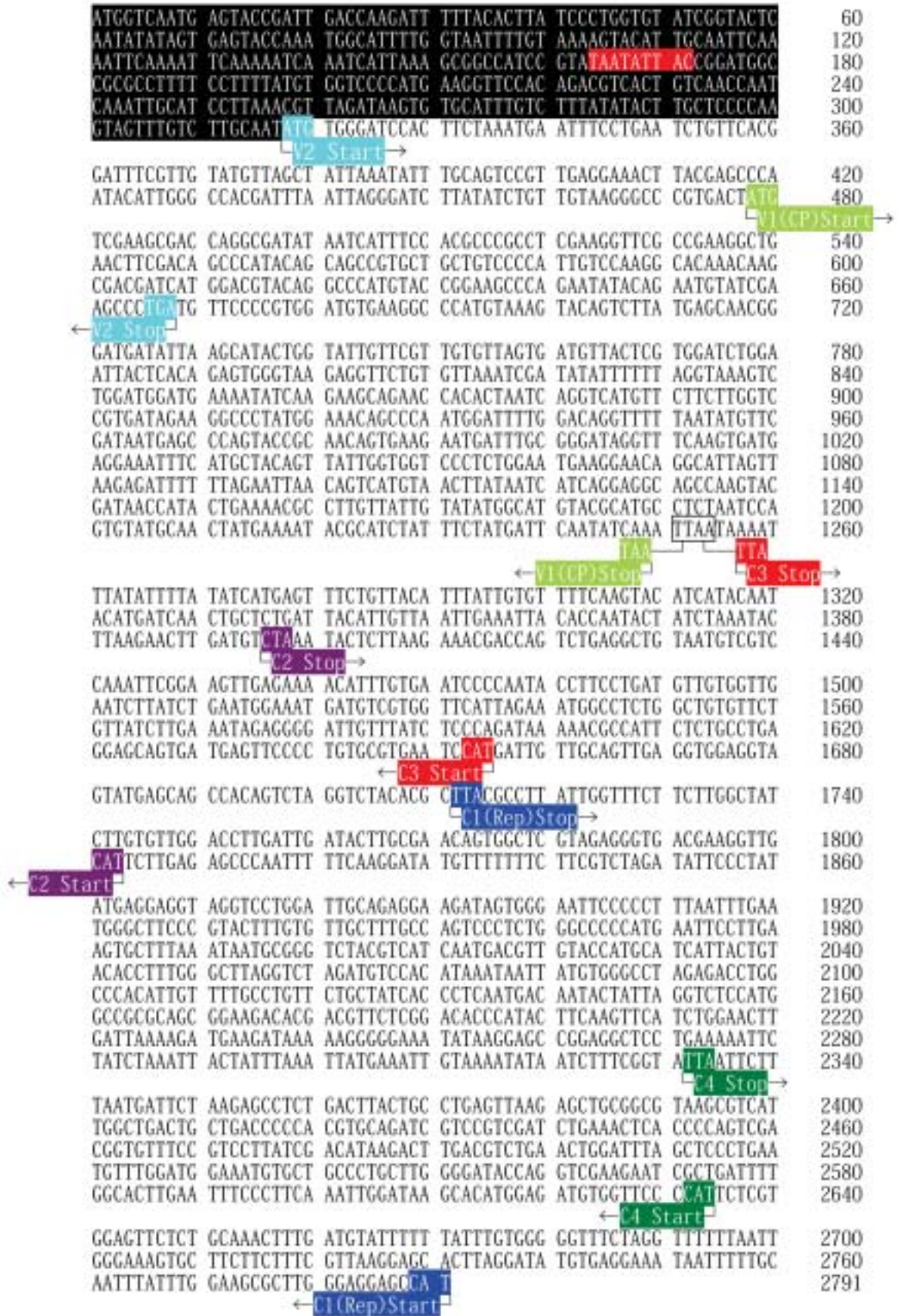
注) 表中ウイルス名のイタリック体および立体の違いは, 基本的に国際ウイルス分類委員会 (ICTV) 第7次報告の表記に従った。イタリック体は確定種および塩基配列の上から確定種と同種であることを示し, 立体は, ICTV 第7次報告時において未認定であることを示している (Tomato leaf curl virus-Bangladesh, Tomato leaf curl virus-D1, D2, Tomato leaf curl virus-Laos)。



第3図 Ng A成分の2774塩基の配列と推定 ORF の位置

注) 黒反転色で示した塩基番号 1 から 306 は遺伝子間領域 (IR), IR 中の 9 塩基の保存配列は赤の反転文字で示した。

Start → : ウイルス鎖側 ORF の開始コドンの位置, ← Start : 相補鎖側 ORF の開始コドンの位置, Stop : 終止コドンの位置



第4図 Sz A成分の2791塩基の配列と推定ORFの位置

注) 黒反転色で示した塩基番号1から317はIR, IR中の9塩基の保存配列は赤の反転文字で示した。

Start → : ウイルス鎖側 ORF の開始コドンの位置, ← Start : 相補鎖側 ORF の開始コドンの位置, Stop : 終止コドンの位置

た。核移行シグナルは(1)動物ウイルスであるSV40の large T 抗原 NLS (Arg Lys Lys Lys Arg Lys Val) タイプと (2) 二つの塩基性領域から構成されるモチーフを持つタイプが知られているが、Ng, Sz の CP アミノ酸配列中には赤の反転文字で示したように (2) のタイプの推定核移行シグナルが認められた。Rep のアミノ酸配列中には KOONIN and ILYNA (1992) が報告したモチーフ I, II, III から成る DNA-nicking モチーフが認められ、各モチーフの基本的に重要な領域は青の反転文字で示した。

FARIA et al. (1994), HANSON et al. (1991) は BGMV ドミニカ共和国株 (Acc. No. L01635), BGMV グアテマラ株 (Acc. No. M91604) の Rep アミノ酸配列中で NTP-binding モチーフを見出した。そのモチーフは以下のような特徴を有していた。即ち、(β -鎖) Glu Asp XXXX Gly Lys Thr (α -ヘリックス) X₃₂ (β -鎖) Asp Asp X₄₃ Asn (X は任意のアミノ酸残基) である。Ng, Sz の Rep 中にも緑の反転文字で示したように、(β -鎖) Glu Gly XXXX Gly Lys Thr (α -ヘリックス) X₃₂ (β -鎖) Asp Asp X₄₁ Asn のほぼ同様な配列が認められ、NTP-binding モチーフと推定された。なお、下線はアミノ酸の置換あるいはアミノ酸の数が BGMV のそれらと異なることを示している。C2 アミノ酸配列中にはシステインあるいはヒスチジン残基に富む領域が見出され、この領域は DNA 結合能を有する亜鉛フィンガー (Zinc-finger) モチーフと推定された。ベゴモウイルスのゲノム DNA はローリングサークル型の複製様式を取るが、上記の各モチーフは他のベゴモウイルスにおいても良く保存されており、DNA 複製の上で重要な働きをされると考えられている (GUTIERREZ, 1999)。

Ng, Sz 間の 6 ORF のアミノ酸配列はウイルス鎖方向の配列に関しては相同性が極めて高く (第 5 図 A, B), 一方、相補鎖方向の ORF では C2, C3 の相同性は高いものの (第 5 図 D, E), Rep では 180 番までのアミノ酸残基で変異がみられた (第 5 図 C)。C4 では全体の配列に不一致がみられ著しい相同性の低下を示した (第 5 図 F)。

次に Ng の塩基および推定アミノ酸配列を基にして、第 3 表に示したベゴモウイルス群との配列比較を行った。Ng は全塩基配列レベルで TYLCV-Is, -Is.Cu および -Is.DR といずれも 98% の相同性が認められた。

Ng は IR, CP, V2, Rep, C2 ~ C4 の各領域で -Is, -Is.Cu, -Is.DR のそれらとは塩基配列で 98 ~ 99%, アミノ酸配列で 97% 以上、とくに V2 ではいずれも 100% の相同性を示した (第 4 表)。この結果、Ng はこれら 3 ウイルスとは明らかに同種であることが判明した。一方、Ng は -Is.M, -Is.Po, -Is.Sp, -Is.A, -Is.S, Sz とは全塩基配列では 92% の相同性であり、先の 3 ウイルスに比べると相同性はやや低下した。ただし、CP, V2, C2, C3 の領域では塩基配列、アミノ酸配列レベルで高い相同性が維持されていた。これに対し、Rep の一部から C4, IR の領域では相同性は明らかに低下した。Rep, IR とも塩基配列の相同性は 80% 台に落ち、とくに C4 では塩基配列が 75 ~ 77%, アミノ酸配列では 49 ~ 50% と著しく低い値を示した (第 4 表)。

ジェミニウイルスの分類基準として、いくつかの案が提示されているが (PADIDAM et al., 1995; Van REGENMORTEL et al., 1997; MAYO and PRINGLE, 1998), いずれもゲノム A 成分の全塩基配列、CP の塩基配列あるいはアミノ酸配列の相同性に着目したものである。Ng は -Is, -Is.Cu, -Is.DR, および -Is.M, -Is.Po, -Is.Sp, -Is.A, -Is.S, Sz とはゲノム塩基配列の相同性が 90% を越え、CP の塩基配列およびアミノ酸配列も最低 97% であることから、いずれの分類案に照らしても Ng とこれらは同種と判断され、ウイルス種としてはベゴモウイルス属の確定種である *Tomato yellow leaf curl virus-Israel* (TYLCV-Is) に統合されると考えられる。ただし、TYLCV-Is は、Rep の一部から C4, IR にかけて変異がみられ、明らかに二つの遺伝子型、即ち二つの系統から成ると推定される。この変異の多い領域を大貫 (2000b) は可変領域と呼んでとくに注目しているが、本論文においても可変領域と呼称する。次に可変領域内で最も変異の集中する C4 のアミノ酸配列を基に分子系統樹を作製した (第 6 図)。C4 の分子系統樹は TYLCV-Is と同種ウイルス群が二つのクラスターに分かれることを明確に示した。即ち、-Is, -Is.Cu, -Is.DR, Ng が一方のクラスターを形成し、他方のクラスターには -Is.M, -Is.Po, -Is.Sp, -Is.A, -Is.S, Sz が含まれた。それぞれのクラスターの成員は第 4 表の結果を裏付け、TYLCV-Is の 2 系統の存在を強く示唆した。

次に IR の変異について検討した。IR は非翻訳領域であるがウイルス DNA の複製開始点が存在し

Ng	MSRPGDIII	STPVS	NRNR	LNFDSPYSSR	AAVPIVQGTN	KRRSWTYRPM	YRKPRIYRMY	60
Sz	MSRPGDIII	STPAS	NRNR	LNFDSPYSSR	AAVPIVQGTN	KRRSWTYRPM	YRKPRIYRMY	60
	*****	***	*****	*****	*****	*****	*****	
Ng	RSPDVPRGCE	GPCVKQSYEQ	RDDIKHTGIV	RCVSDVTRGS	GITHRVGKRF	CVKSIYFLGK		120
Sz	RSPDVPRGCE	GPCVKQSYEQ	RDDIKHTGIV	RCVSDVTRGS	GITHRVGKRF	CVKSIYFLGK		120
	*****	*****	*****	*****	*****	*****		
Ng	VWMDENIKKQ	NHTNQVMFFL	VRDRRPYGSS	PMDFGQVFNH	FDNEPSTATV	KNDLRDRFQV		180
Sz	VWMDENIKKQ	NHTNQVMFFL	VRDRRPYGNS	PMDFGQVFNH	FDNEPSTATV	KNDLRDRFQV		180
	*****	*****	*****	*	*****	*****	*****	
Ng	MRKFHATVIC	GPSGMKEQAL	VKRFFKINSH	VTYNHQEAAK	YENHTENALL	LYMACTHASN		240
Sz	MRKFHATVIC	GPSGMKEQAL	VKRFFRINSH	VTYNHQEAAK	YDNHTENALL	LYMACTHASN		240
	*****	*****	*****	****	*****	*	*****	*****
Ng	PVYATMKIRI	YFYDSISN						258
Sz	PVYATMKIRI	YFYDSISN						
	*****	*****						

A

Ng	MNDPLLNEFP	ESVHGFRCLM	AIKYLSVEE	TYEPNTLGH	LIRDLISVVR	ARDYVEATRR		60
Sz	MNDPLLNEFP	ESVHGFRCLM	AIKYLSVEE	TYEPNTLGH	LIRDLISVVR	ARDYVEATRR		60
	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	
Ng	YNHFHARLEG	SPKAELRQPI	QQPCCPHCP	RHKQATIMDV	QAHVPAQNI	QNVSKP		116
Sz	YNHFHARLEG	SPKAELRQPI	QQPCCPHCP	RHKQATIMDV	QAHVPEAQNI	QNVSKP		116
	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****	

B

			motif I			motif II			
Ng	W--PRLFNLY	AKNY	LTTPN	SLSKEEALS	QLKNLETPTN	KKYIKVCKEL	HENGEP	LLIV	60
Sz	MAPPKRQFIN	CKNY	LTTPK	SLTKEEALS	QLKNLETPTN	KKYIKVCREL	HENGEP	LLIV	60
	* * *	*****	***	*****	*****	*****	**	*****	
						motif III			
Ng	LI	FEGKYQC	KNQRFFDLVS	PNRSAHFHPN	IQAASSTDV	KT	VE	DGDF	120
Sz	LI	FEGKFKC	QNQRFFDLVS	PSRAAHFHPN	IQAASSTDV	KS	VD	DGNT	120
	*****	*	*****	*	*****	**	***	**	*****
Ng	RSARGGQSA	NDAYAEALNS	GSKSEALNLI	KEKAPKDYIL	QFHNLSSNLG	RIFSPPLEVY		180	
Sz	RSARGGQSA	NDAYAAALNS	GSKSEALRII	KELIPKDYIL	QFHNLNSNLD	RIFQEPPAPY		180	
	*****	*****	*****	*	**	*****	*****	**	*
Ng	VSPFLSSSFN	QVPDELEEV	AENVVSSAAR	PWRPISIVI	E	QDSRT	U	K	240
Sz	ISPFLSSSFN	QVPDELEV	SENVVSSAAR	PWRPNSIVI	E	QDSRT	U	K	240
	*****	*****	**	*****	***	*****	*****	*****	
Ng	CGHLDLSPKV	YSNDAWYNVI	D	VDPHYLKH	FKEFMGAQRD	WQSNTKYGKP	IQIKGGIPTI	300	
Sz	CGHLDLSPKV	YSNDAWYNVI	D	VDPHYLKH	FKEFMGAQRD	WQSNTKYGKP	IQIKGGIPTI	300	
	*****	*****	*****	*****	*****	*****	*****		
Ng	FLC	PGPTSS	YREYLDEEKN	ISLKNWTLKN	ATFVTLYEPL	FASINQGPTQ	DSQEETNKA	359	
Sz	FLC	PGPTSS	YREYLDEEKN	ISLKNWALKN	ATFVTLYEPL	FASINQGPTQ	DSQEETNKA	359	
	*****	*****	*****	***	*****	*****	*****		

C

Ng	MQPSSPSTSH CSQVSIKVQH KIAKKKPIRR KRVDLDGCS YYLILMNNI GFTIRGTIII	60
Sz	MQPSSPSTSH CSQVSIKVQH KIAKKKPIRR KRVDLDGCS YYLILMNNI GFTIRGTIII	60

Ng	SSGREWRFYL GDKQSPLFQD NRTQPEAISN EPRHHFHS DK IQPQH QEGHG DSQMFSQLPN	120
Sz	SSGREWRFYL GDKQSPLFQD NRTQPEAISN EPRHHFHS DK IQPQH QEGIG DSQMFSQLPN	120
	***** * *****	
Ng	LDDITASDWS FLKSI	135
Sz	LDDITASDWS FLKSI	135
	***** *****	
D		
Ng	MDSRTGELIT APQAENG VFI WEINNPLYFK ITEHSQRPF L MNHDIISIQI RFNHNIRKVM	60
Sz	MDSRTGELIT APQAENG VFI WEINNPLYFK ITEHSQRPF L MNHDIISIQI RFNHNIRKVL	60

Ng	G I H K C F L N F R I W T T L Q P Q T G H F L R V F R Y E V L K Y L D S L G V I S I N N V I R S V D H V L Y D V L E N T	120
Sz	G I H K C F L N F R I W T T L Q P Q T G R F L R V F R H Q V L K Y L D S I G V I S I N N V I R A V D H V L Y D V L E N T	120
	***** * ***** ** *****	
Ng	I N V T E T H D I K Y K F Y	134
Sz	I N V T E T H D I K Y K F Y	134
	***** ****	
E		
Ng	MGNHISMCLS NSKANTNVRT NGSSTWYPQT GQHISIRTF R QLRAQQMSRP TWRKTETSLI	60
Sz	MGNHISMCLS NLKGNSSAKI SDSSTWYPQA GQHISIQTF R ELNPVQTSSL MSIRTEPST	60
	***** * * * ***** * * * * * * * * * * * * * * * * * *	
Ng	-LEFSKSMAD QLEEVSNLPT THMPKHSIQA VNPR—PSI Y	101
Sz	GVSFR—STDD LHVCVSSQPM TLTPQLLTQA VSQRLLLES LK N	101
	* * * * * * * * * * * * *	
F		

第5図 Ng, Sz A成分の推定アミノ酸配列の多重配列

注) A : CP, B : V2, C : Rep, D : C2, E : C3, F : C4 CPの最初の20個のアミノ酸配列中に含まれる核移行シグナル(NLS)のドメインは赤の反転文字で示した。Repの推定アミノ酸配列に含まれるDNA-nicking motif (motif I, II, III)は青の反転文字で、NTP-binding motifは緑の反転文字で示した。C2の推定アミノ酸配列中で認められたシステインおよびヒスチジンに富む領域は黒の反転文字で示した。アスタリスクは同一のアミノ酸残基であることを示している。

(LAZAROWITZ et al., 1992), ウイルス遺伝子の発現の上でも重要な役割を担っていることから (FONTES et al., 1994; AKBAR BEHJATNIA et al., 1998), この領域の比較はジェミニウイルス間の類縁性を知る上で有益であるとされる (PADIDAM et al., 1995; HONG and HARRISON, 1995)。そして、ウイルスDNAの複製に際し、複製関連タンパク質であるRepがIR中の反復配列に結合すること (FONTES et al., 1994; AKBAR BEHJATNIA et al., 1998), 反復配列のうち、GGの2塩基がとくに重要であることが明らかにされている (FONTES et al., 1994)。ARGUELLO-ASTORGA et al.

(1994)はこの反復配列をアイテロン (iteron) と称し、アイテロンの配列が構造的にジェミニウイルスごとに保存されていることを示した。そこで、-Isおよびそれと同種である9つのウイルスのアイテロンの配列、数と方向を調べた。-Is, -Is.Cu, -Is.DR, Ngのアイテロンのうち、極めて保存性の高い配列 (コア配列) はいずれもGGTGTであった。一方、-Is.M, -Is.Po, -Is.Sp, -Is.A, -Is.S, Szのアイテロンのコア配列はいずれもGGTであった (第7図)。アイテロンのコア配列から TYLCV-Isは2つのグループに分けることができ、第4表および第6図のC4系統樹のグ

第4表 Ngの塩基配列および推定アミノ酸配列の他のベゴモウイルスとの相同性比較

ベゴモウイルス	TN	IR	CP	(A)V2	Rep	(A)C2	(A)C3	(A)C4
AbMV	66	52	71/68	—	65/69	49/69	53/71	50/71
ACMV-Ke	74	63	81/77	72/78	72/73	66/79	71/79	32/55
ACMV-Ni	75	63	82/79	77/80	73/73	67/78	71/80	32/58
AYVV	75	65	78/76	75/75	80/78	58/74	66/76	52/74
BGMV-PR	66	55	69/69	—	63/67	52/67	58/69	48/70
ICMV	71	56	78/74	71/74	75/72	62/76	62/72	52/78
MYMV	68	57	71/70	44/51	73/71	51/65	44/63	66/80
IToLCV	75	67	73/73	68/74	78/80	68/77	67/76	73/87
ToLCV-Au	76	70	77/76	59/72	82/79	63/74	66/77	50/78
ToLCV-Ban II	76	70	76/75	72/75	79/80	67/76	72/78	69/75
ToLCV-Bg	77	69	77/76	71/75	80/80	65/76	71/77	72/87
ToLCV-D1	76	69	76/77	59/72	80/78	62/75	68/77	51/77
ToLCV-D2	76	67	76/77	58/72	80/78	62/74	69/77	52/77
ToLCV-La	76	65	80/77	62/74	80/81	65/76	62/75	53/77
ToLCV-NDe1	71	61	76/74	61/72	74/74	55/68	66/72	48/56
ToLCV-NDe2	72	60	76/74	61/71	75/75	55/68	64/73	58/58
ToLCV-Tw	75	65	78/76	73/73	80/80	64/77	66/75	68/85
TYLCV-Sar. A1	77	64	87/81	79/80	76/78	66/79	68/79	46/75
TYLCV-Sar. Mu	77	64	88/82	82/82	77/78	66/79	66/79	46/75
TYLCV-Sar	77	65	86/81	82/81	76/78	66/78	65/79	51/77
TYLCV-Sar. Si	77	63	88/81	82/81	75/77	66/78	66/79	48/74
TYLCV-Th	75	64	73/74	70/73	78/79	60/74	66/75	64/79

TYLCV-Is	98	95	97/98	100/99	98/99	98/99	98/99	98/98
TYLCV-Is. Cu	98	95	99/98	100/99	97/98	98/99	97/98	98/99
TYLCV-Is. DR	98	96	99/98	100/99	97/98	98/99	97/98	98/99

TYLCV-Is. M	92	81	99/99	100/99	88/87	97/98	97/98	50/78
TYLCV-Is. Po	92	82	98/98	99/98	88/87	98/98	94/97	49/77
TYLCV-Is. Sp	92	82	98/98	98/98	88/87	97/98	94/97	49/77
TYLCV-Is. A	91	80	98/98	99/98	88/87	97/98	94/97	49/77
TYLCV-Is. S	92	82	98/98	99/98	88/87	99/99	95/98	49/77
Sz	92	82	98/98	99/98	88/87	99/99	95/98	49/77

注) ベゴモウイルスの略称は第3表に従う。TN: (A成分) 全塩基配列

CP以下の各ORFの数字で、分母は塩基配列、分子はアミノ酸配列の相同性を示す。

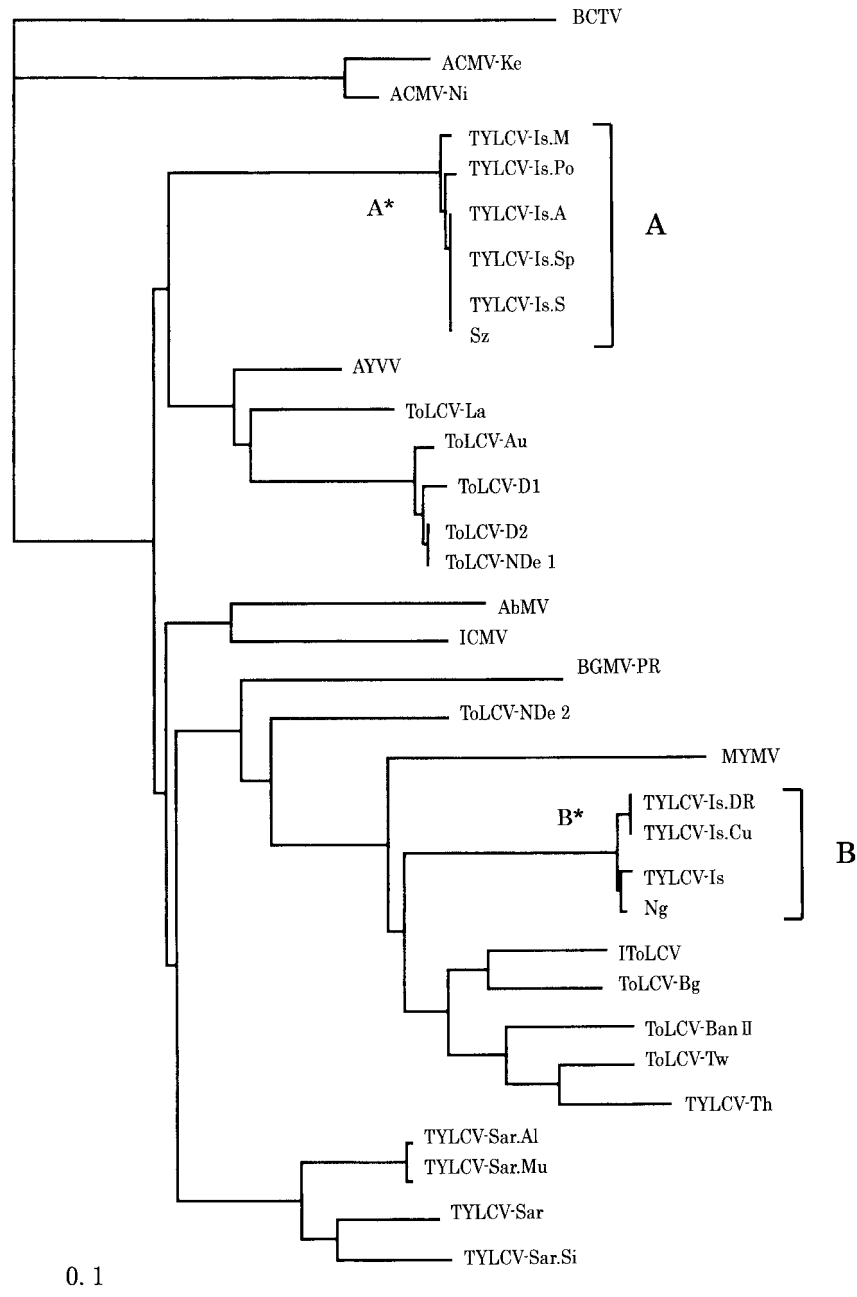
—: 対応するORFが認められない。

ループと完全に一致した。以上の結果から、TYLCV-Isには遺伝的に少なくとも2つの系統が存在することが明らかになった。

別系統であるNgとSzの病理学的な差異は詳しくは調べられていないが、宿主範囲の違いを示唆する報告がいくつかなされている。即ち、Ngと同系統の分離株でトルコギキョウへの感染がイスラエル(COHEN et al., 1995)および日本(内川ら, 2000)で確認されており、その一方でSzと同系統であるTYLCV-Is.Sを用いた接種試験ではトルコギキョウへの感染は確認されなかった(KATO et al., 1998)。また、KATO et al. (1998)はTYLCV-Is.Sのヒャクニチソウへの感染を明らかにしているが、筆者らのNgを用いた接種試験ではヒャクニチソウへの感染は確認されていない(未発表)。南スペインではSz

と同系統であるTYLCV-Is.Poによるインゲンマメへの自然感染が問題になり(NAVAS-CASTILLO et al., 1999)、新たにピーマンへの感染も報告される(REINA et al., 1999)など、系統によっては作物への被害が顕著になっている。

Ng, Szに代表されるTYLCV-Isの2系統間ではC4領域が最も異なっているが、他の単一ゲノムベゴモウイルスであるTomato leaf curl virus-Australiaの病徴の強弱にC4が関与すると考えられることや(RIGDEN et al., 1994)、同じく単一ゲノムベゴモウイルスであるTLCVのC4が宿主範囲の決定因子と想定されている(YAHARA et al., 1998)ことから、TYLCV-IsにおいてもC4の変異と宿主範囲の差異とは密接に関係するものと考えられる。



第6図 ベゴモウイルスの(A) C4 推定アミノ酸配列を基に作成した分子系統樹(近隣結合法)

注) 各ウイルスの略称は第3表に従った。クルトウイルス属の *Beat curly top virus* の1系統 (Acc. No. U56975) をアウトグループとした。TYLCV-Isは2つのクラスター(A, B)に分けられ、A*, B*のブートストラップ確率はいずれも1000/1000であった。

左下線: 0.1 アミノ酸置換/座位

IV. TYLCVの種特異的, 系統特異的検出およびPCR-RFLPによる系統識別

1. 材料および方法

1) TYLCV種特異的, 系統特異的検出: Ng, Szに由来するDNA塩基配列を解析した結果, NgとSzは系統を異にする同種ウイルスであることが判明した。そこで, Ng, Szをともに検出するためのTYLCV

種特異的プライマー(TYプライマー)を設計した。本プライマーは日本に発生するTYLCVあるいはその近縁ウイルスと推定される複数のウイルス株のゲノム塩基配列(未発表)とはアニールしないように設計した(第5表)。TYプライマーを用いる場合のPCRの温度条件は95°C, 2分処理を1回, 次いで(95°C, 50秒) → (55°C, 1分) → (72°C, 1分30秒)の反応を35回繰り返す。最後に72°C, 10分間処理した。

ウイルス株	アイテロンのコア配列	アイテロンの配置
TYLCV-Is TYLCV-Is.Cu TYLCV-Is.DR Ng	GGTGT GGTGT GGTGT GGTGT	→ →→ TATA← → →→ TATA← → →→ TATA← → →→ TATA←
TYLCV-Is.M TYLCV-Is.Sp TYLCV-Is.Po TYLCV-Is.A TYLCV-Is.S Sz	GGT GGT GGT GGT GGT GGT	→ →→ TATA← → →→ TATA← → →→ TATA← → →→ TATA← → →→ TATA← → →→ TATA←

第7図 TYLCV-Isの各株のIR中に認められたアイテロンのコア配列と配置

注) GGTGT および GGT はアイテロンのコア配列を示す。→ : アイテロンはウイルス鎖方向, ← : アイテロンは相補鎖方向, TATA : TATA ボックス配列

また, Ng, Sz の系統識別を目的として, 可変領域内の Ng と Sz 間で異なる塩基配列を基に系統特異的プライマーを設計した (NTG および STG プライマー, 第5表)。これらのプライマーを用いて Ng, Sz ならびに長崎, 佐賀, 福岡, 熊本, 静岡, 三重, 群馬県下で採集された黄化葉巻病の推定感染株について PCR を実施した。NTG および STG プライマーを用いた PCR の温度条件は 95°C, 2 分処理を 1 回, 次いで (95°C, 50 秒) → (58°C, 1 分) → (72°C, 3 分) の反応を 35 回繰り返し, 最後に 72°C, 10 分間処理した。その他の実験条件は III 節, PCR の項と同様とした。

2) PCR-RFLP : 各地から採集したトマト黄化葉巻病の推定感染株を BM プライマーを用いて DNA 増幅後, 4 種類の制限酵素 (*Bam*HI, *Sac*I, *Sal*I, *Msp*I) を用いてその切断パターンを調べた。

2. 結果および考察

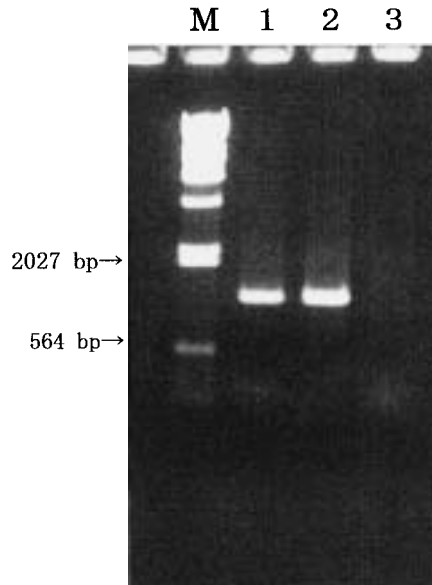
1) TYLCV 種特異的, 系統特異的検出 : TY プライマーにより Ng, Sz 感染株からは約 1.3 kbp の特異的な DNA 増幅断片が検出された (第8図)。一方, 九州および四国から採集した多くの TLCV 近縁ベゴモウイルスからは TY プライマーによる 1.3 kbp の特異産物は増幅されず, その代わりに別に設計した TLCV 検出用プライマー (配列示さず) でのみ特異産物が得られた。第9図にはこれらのうち, 塩基配列の解析まで行った一部の分離株について, 両プライマーによる PCR 増幅パターンの差異を示したが, これらの結果から TY プライマーを用いることによって TYLCV-Is の特異的検出が可能であると判断された。

系統特異的プライマーを用いた PCR 産物の電気泳動図を第10図に示した。系統特異的プライマーによ

第5表 TYLCV のゲノム成分の増幅に用いたプライマー

プライマーの種類 (名称)	プライマー配列
⊙ TY プライマー	
virus sense (TYV)	5' -CTCGAAGGTTCCGCCGAAGG-3'
complementary sense (TYC)	5' -TTGAAAAATTGGRCTCTCAA-3'
⊙ NTG プライマー	
virus sense (NTG-V)	5' -CTCAAAGCTCTATGGCAATC-3'
complementary sense (NTG-C)	5' -GACTTCATTTGATTITGGAGT-3'
⊙ STG プライマー	
virus sense (STG-V)	5' -TGACCAAGATTTTTACACTTA-3'
complementary sense (STG-C)	5' -AAACACCGTCGACTGGGGTGA-3'

注) プライマーの塩基配列の表記は IUPAC ambiguity code に従った。K=G,T; R=A,G; S=C,G; W=A,T; Y=C,T
TY プライマーによる増幅産物の大きさは約 1.3kbp, NTG および STG プライマーによる増幅産物の大きさは約 2.4kbp

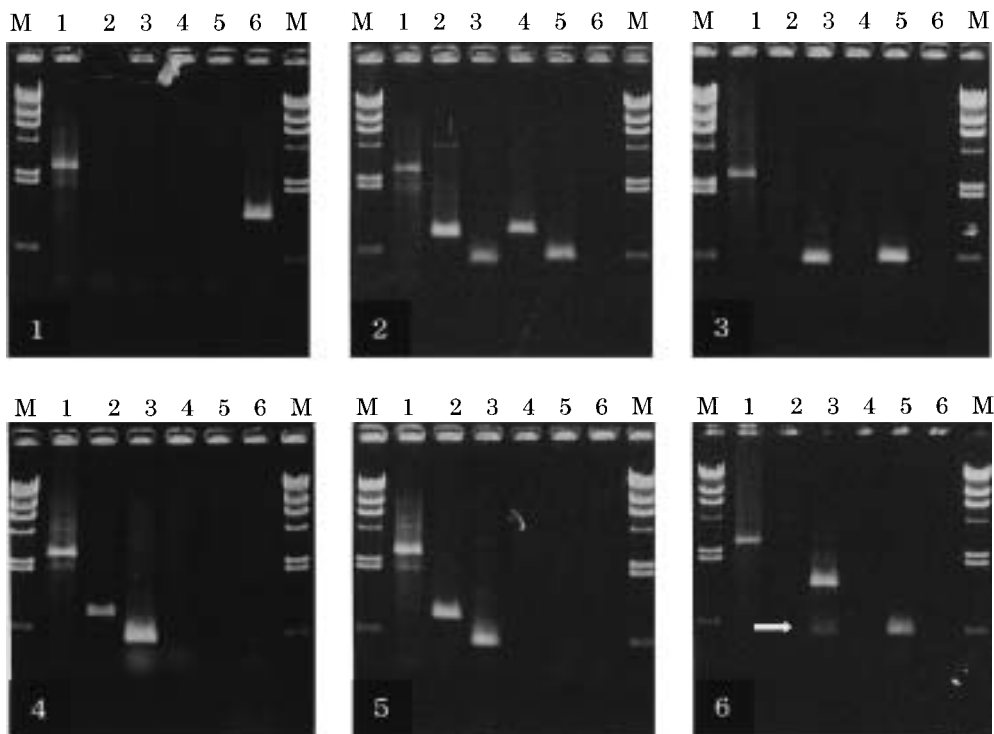


第8図 Ng および Sz 感染株から TY プライマーにより増幅された特異的 PCR 産物

注) M : DNA 分子量マーカー, λ /Hind III
 1 : Ng 感染株由来の PCR 産物
 2 : Sz 感染株由来の PCR 産物
 3 : 健全対照

り, Ng は Ng 特異的プライマー (NTG プライマー) でのみ, Sz は Sz 特異的プライマー (STG プライマー) でのみ特異的な PCR 産物が得られた (第10図A)。また, 長崎県の2カ所 (佐世保市, 琴海町) および佐賀県の6カ所 (川副町2カ所および東与賀町4カ所) から採集された株はいずれも Ng と同様な反応を示した (第10図B)。

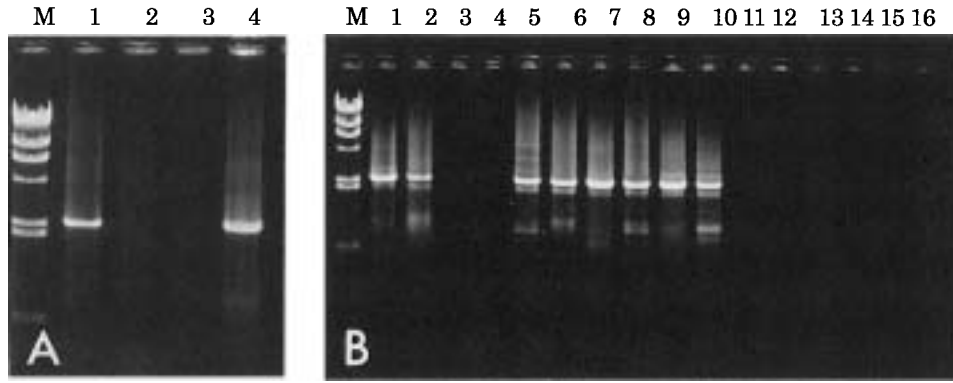
2) PCR-RFLP : TYLCV 感染株の BM プライマーによる産物を4種類の制限酵素を用いて切断したパターンを第11図に示した。Ng と Sz は4種類の制限酵素に対する反応がそれぞれ異なっていた。そして第10図に示した長崎 (2カ所), 佐賀 (6カ所) の感染株の反応は4種類の制限酵素に対し Ng と全く同一であった。長崎, 佐賀の株に加えて福岡, 熊本, 静岡, 三重および群馬県から採集された黄化葉巻株について同様な実験を行ったところ, それら採集株からはすべて TY プライマーによる特異産物が検出され, TYLCV-Is の感染が確認された。そして, 九州4県からの採集株についての系統特異的 PCR およ



第9図 TY プライマーおよび TYLCV 検出用プライマーを用いた場合の分離株ごとの PCR 増幅反応

注) 1 : Ng, 2 : TYLCV 近縁大分株 (Ot), 3 : 同鹿児島株 (Kg), 4 : 同香川株 A (KwA), 5 : 同香川株 B (KwB), 6 : 同高知株 (Kc)

レーン1 : BM プライマーによる産物, レーン2~5 : 複数の TYLCV 検出用プライマーの組み合わせにより得られた産物, レーン6 : TY プライマーによる産物, 6 の白矢印は特異産物を示している。Ot, Kg, KwA, KwB, Kc は塩基配列を解析し, TYLCV に近縁なベゴモウイルスであることを確認した。



第10図 系統特異的プライマーを用いたPCRによるNg, Szおよびそれらと同系統株の特異検出

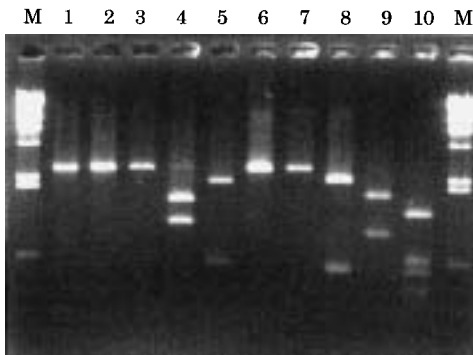
注) M: DNA分子量マーカー, λ /Hind III

A

- 1: Ng 感染トマト / NTG プライマー
- 2: Ng 感染トマト / STG プライマー
- 3: Sz 感染トマト / NTG プライマー
- 4: Sz 感染トマト / STG プライマー

B

- | | | |
|---------------|----------------|-----------------|
| 1: 佐世保株 / NTG | 5: 東与賀①株 / NTG | 11: 東与賀①株 / STG |
| 2: 琴海株 / NTG | 6: 東与賀②株 / NTG | 12: 東与賀②株 / STG |
| 3: 佐世保株 / STG | 7: 東与賀③株 / NTG | 13: 東与賀③株 / STG |
| 4: 琴海株 / STG | 8: 東与賀④株 / NTG | 14: 東与賀④株 / STG |
| | 9: 川副①株 / NTG | 15: 川副①株 / STG |
| | 10: 川副②株 / NTG | 16: 川副②株 / STG |



制限酵素	TYLCV 系 統	
	Ng (lane 1)	Sz (lane 2)
<i>Bam</i> HI	No cut (lane 3)	1.12, 1.65 kbp (lane 4)
<i>Sac</i> I	0.51, 2.25 kbp (lane 5)	No cut (lane 6)
<i>Sal</i> I	No cut (lane 7)	0.46, 2.31 kbp (lane 8)
<i>Msp</i> I	0.95, 1.81 kbp (lane 9)	0.27, 0.46, 0.70, 1.35 kbp (lane 10)

第11図 4種類の制限酵素 (*Bam*HI, *Sac*I, *Sal*I, *Msp*I) によるNg, Sz由来のPCR産物の切断パターン

注) BMプライマーによるPCR産物の切断後の断片の大きさを表に示した。

M: DNA分子量マーカー, λ /Hind III

びPCR-RFLPの結果はNgのそれらと完全に一致した(第6表)。これに対し、東海および関東からの採集株はすべてSzと同じ反応を示した(第6表)。以上の結果から、TYLCV-Is2系統の識別には系統特異的プライマーによるPCRおよびPCR-RFLPの2つの方法がともに有効であることが明らかになった。Ng, Szに代表されるTYLCV-Isの系統はこれまでの知見から宿主範囲を異にする可能性があり(KATO et al., 1998), 系統識別を行うことは農業上も有意義と考えられる。現在までに九州では全県でトマト黄化葉巻病が発生し、新たに宮崎県で確認された株もNgと同系統であることが既に判明している(川越ら, 2002)。

1996年の初発生以来の病原ウイルスの分布拡大の実態およびここで明らかにした系統識別の結果から、九州では単一系統のみ発生していると推定される。今後、東海地方で発生しているSzと同じ系統が九州に侵入してきた場合も、その系統識別は本論文で明らかにしたPCRおよびPCR-RFLPの手法を用いることにより迅速に対応できるものと考えられる。

第6表 種および系統特異的 PCR ならびに PCR-RELP による TYLCV 株の系統識別

株名	プライマー			制限酵素			
	TY	NTG	STG	<i>Bam</i> HI	<i>Sac</i> I	<i>Sal</i> I	<i>Msp</i> I
Sz	+	-	+	Sz	Sz	Sz	Sz
静岡県小笠郡大東町	+	-	+	Sz ^{a)}	Sz	Sz	Sz
小笠郡浜岡町	+	-	+	Sz	Sz	Sz	Sz
浜松市1	+	-	+	Sz	Sz	Sz	Sz
浜松市2	+	-	+	Sz	Sz	Sz	Sz
浜名郡雄踏町	+	-	+	Sz	Sz	Sz	Sz
三重県 I	+	-	+	Sz	Sz	Sz	Sz
K	+	-	+	Sz	Sz	Sz	Sz
M	+	-	+	Sz	Sz	Sz	Sz
群馬県 1	+	-	+	Sz	Sz	Sz	Sz
2	+	-	+	Sz	Sz	Sz	Sz
3	+	-	+	Sz	Sz	Sz	Sz
Ng	+	+	---	Ng	Ng	Ng	Ng
長崎県佐世保市	+	+	-	Ng ^{b)}	Ng	Ng	Ng
西彼杵郡琴海町	+	+	-	Ng	Ng	Ng	Ng
北高来郡森山町	+	+	-	Ng	Ng	Ng	Ng
佐賀県佐賀郡東与賀町 1	+	+	-	Ng	Ng	Ng	Ng
東与賀町 2	+	+	-	Ng	Ng	Ng	Ng
東与賀町 3	+	+	-	Ng	Ng	Ng	Ng
東与賀町 4	+	+	-	Ng	Ng	Ng	Ng
川副町 1	+	+	-	Ng	Ng	Ng	Ng
川副町 2	+	+	-	Ng	Ng	Ng	Ng
唐津市	+	+	-	Ng	Ng	Ng	Ng
小城郡三日月町	+	+	-	Ng	Ng	Ng	Ng
熊本県宇土市網田	+	+	-	Ng	Ng	Ng	Ng
熊本市小島 1	+	+	-	Ng	Ng	Ng	Ng
小島 2	+	+	-	Ng	Ng	Ng	Ng
小島 3	+	+	-	Ng	Ng	Ng	Ng
小島 4	+	+	-	Ng	Ng	Ng	Ng
小島 5	+	+	-	Ng	Ng	Ng	Ng
小島 6	+	+	-	Ng	Ng	Ng	Ng
小島 7	+	+	-	Ng	Ng	Ng	Ng
福岡県柳川市	+	+	-	Ng	Ng	Ng	Ng
大川市	+	+	-	Ng	Ng	Ng	Ng
山門郡大和町 A	+	+	-	Ng	Ng	Ng	Ng
山門郡大和町 B	+	+	-	Ng	Ng	Ng	Ng

注) + : PCR 産物あり, - : PCR 産物なし。

a) : Sz と同じ制限酵素切断パターンを示す。

b) : Ng と同じ制限酵素切断パターンを示す。

V. 総合考察

長崎県大村市で発生したトマトの新病害は生物学的, 血清学のおよび分子生物学的なデータから九州では新発生ウイルスである TYLCV-Is に起因することが判明した。KATO et al. (1998) によりトマト黄化葉巻病 (Tomato yellow leaf curl disease) と命名された本病は, 世界的にも流行を続けており, 地中海沿岸諸国, 中近東, アフリカ, 東アジア, アメリカ合衆国, カリブ海沿岸諸国での発生が確認されている (PICO et al., 1996; POLSTON and ANDERSON, 1997)。なお, 本病類似のトマト病害はイスラエルにおいて

1939 ~ 1940 年に報告があり (COHEN and ANTIGNUS, 1994; PICO et al., 1996), その後, COHEN and HARPAZ (1964) によってタバココナジラミ (*Bemisia tabaci* Gennadius) による伝搬が認められた。TYLCV がジェミニウイルスであることは CZOSNEK et al. (1988) によって明らかにされた。

ゲノム塩基配列の分子的特徴から長崎で発生した Ng は-Is に代表される系統群に含まれ, 一方, 静岡で発生した Sz は-Is.M に代表される一群に含まれることが判明した。これらの結果は, わが国で発生した TYLCV が侵入ウイルスであることを端的に示している。わが国に発生した TYLCV の起源は文献上の

記載からイスラエルあるいはその周辺地域と推定される。ただし、起源となる地域から病原ウイルスが世界的に分布拡大した現在では(Pico et al., 1996), 日本へ直接侵入した経路を正確に知ることは困難である。また、わが国に発生した TYLCV-Is は長崎系統、静岡系統と分子的に明らかに異なるため、これらは別々の経路でわが国に侵入した可能性が高い。TYLCV-Is がわが国において急激に分布域を拡大した背景には、重要なウイルス媒介虫であるシルバーリーフコナジラミが 1989 年以後、国内に広く定着していた事実があげられる(大泰司・岡田, 1995)。同様なシルバーリーフコナジラミの侵入・定着とその後の TYLCV-Is の分布拡大はアメリカ合衆国においても認められている(POLSTON et al., 1999)。

TYLCV は、わが国に侵入してから比較的短時日しか経過していないが、これまでに九州や東海地域等、発生が認められた地域では黄化葉巻病はトマトの最重要病害の一つとして認識されている。ところで、わが国には従来から黄化葉巻病と病徴が酷似したトマト黄化萎縮病(Tomato yellow dwarf disease)が散発的に発生しているが、トマト黄化萎縮病の病原ウイルスである TLCV と TYLCV-Is は同じベゴモウイルス属に含まれ、ウイルスのゲノム構造もともに単一ゲノムであるなど、性状も類似している。そこで、TAS-ELISA 法により TYLCV-Is と TLCV の識別を試みたが、本論文で用いた 5 種類の市販 Mab に対し、TYLCV-Is および TLCV と同種と推定される数分離株は同一の反応を示した(データ未表示)。このように血清学的手法を用いた TYLCV-Is の種同定には、なお改良すべき点が残されていると判断された。一方、PCR 法による遺伝子診断はプライマーの設計次第で種特異的あるいは系統特異的検出が可能であることが確認された。これまで九州、東海、関東地方で発生した TYLCV は本論文で明らかにした TYLCV 種特異的プライマー(TY プライマー)によりすべて検出できた。従って、トマト黄化葉巻病と疑われた感染株から TY プライマーにより特異的な PCR 産物が得られない場合はトマト黄化萎縮病に感染している可能性が高い。事実、そのような場合には TLCV 検出用プライマーによってのみ特異的な PCR 産物が得られている。

長崎、佐賀県下で発生した TYLCV-Is は静岡のそれとは異なる系統であることが PCR および PCR-

RFLP により簡易に判定できた。TYLCV-Is2 系統間で宿主範囲がやや異なることは過去のデータから推測できることから、地域ごとにどの系統が発生しているのか知ることは農業上、重要な情報となる。TYLCV-Is と同種のウイルスはイスラエル以外にもスペイン、ポルトガル、アメリカ合衆国、キューバ、ドミニカ共和国で発生しており、これらは分子的には本論文で示した Ng, Sz のいずれかと同系統であった。このように、TYLCV-Is に関しては世界的にみても二つの系統に大別できると推測される。

日本に発生した TYLCV-Is 2 系統間で最も差異が認められたのは可変領域と称した C1 の一部から C4, IR の一部までの領域で、とくに C4 は分子系統樹に示したとおり、別種ウイルス以上に隔たった関係にあった。この変異の大きさは可変領域において過去に組み換え(recombination)が起こったことを示唆している。これに関連して TYLCV-Is と TLCV はともに単一ゲノムであることやトマトを共通の宿主とすることから、今後両ウイルス間での組み換えの可能性が指摘されている(大貫, 2000a)。TLCV は雑草であるスイカズラ(*Lonicera japonica* Thunb.)に発生することが知られているが(尾崎ら, 1979; OSAKI and INOUE, 1981), TYLCV-Is, TLCV の 2 ウイルス種間での組み換えが起これば宿主範囲や病徴にも影響を及ぼすと考えられるため、農業上も重要な問題となる。このようなジェミニウイルスの組み換えの問題は他のベゴモウイルスでも論議されている。即ち、*African cassava mosaic virus* (ACMV) と *East African cassava mosaic virus* (EACMV) との組み換えにより生じたウガンダ変異株は元のウイルスよりも病徴が激しいことが知られている(ZHOU et al., 1997)。さらに、ACMV と EACMV との組み換えにより生じた複数の変異株の重複感染が病徴発現の相乗作用(synergism)を引き起こすことがカメルーンにおいて認められた(FONDONG et al., 2000)。また、パキスタンのワタで問題になっている *Cotton leaf curl virus* (CLCuV) も組み換えにより複数のタイプの分子が混在して発生していることが明らかにされている(ZHOU et al., 1998)。CLCuV の場合も TYLCV-Is と同様、C4 と同じ機能を有すると考えられる AC4 タンパク質が最も変異が多いことが分かっている。そして CLCuV の IR は組み換えを起こし易い領域と推定されている(ZHOU et al., 1998)。このような知

見はジェミニウイルスの進化上、組み換えが重要な要因であることを示している。

現在トマト黄化葉巻病の防除は媒介虫であるシルバーリーフコナジラミの制御を主眼に組み立てられているが、海外では耐病性品種の開発研究が積極的に進められ (LAPIDOT et al., 1997; MICHELSON et al., 1994; VIDAVSKY and CZOSNEK, 1998), 一部商品化もされている。わが国でも本病の防除に向けて抵抗性、耐病性品種の開発が待たれるが、抵抗性検定を進める上で、病原ウイルスの効率の検出が一つの課題になると考えられる。本論文で明らかにした TYLCV 種特異的プライマーを用いた PCR 検出は抵抗性検定を行う上での基礎技術として活用できると考えられる。筆者らは PCR 法に基づく TYLCV の種特異的および系統特異的検出をトマト黄化葉巻病の高精度診断の基礎技術として位置付けているが、PCR 法に関しては多くの派生的な手法が考案されており、今後もより簡便で効率の検出技術の開発に向けて検討を加える予定である。

日本で発生している TYLCV は種としては TYLCV-Is 1 種であるが、この他、1999 年時点で TYLCV とされるウイルス 8 種がベゴモウイルス属の確定種として記載されている (FAUQUET and MAYO, 1999)。それらは TYLCV-Is ほどには分布域が拡大していないものの、侵入を警戒する必要がある。なぜならば、侵入ジェミニウイルスあるいはそれと土着のジェミニウイルスとの組み換えによる雑種ウイルスが示す病徴は概して激しく、いわゆる新興ウイルス (emerging virus) としての性格が強く現れるからである。

TYLCV-Is の新発生とその被害の拡大は侵入病害の重要性を改めて提起することとなったが、日本での TYLCV に関する研究はまだ緒に就いたばかりであり、今後解明すべき多くの点が残されている。

VI. 摘 要

1. 九州で発生したトマトの新病害はシルバーリーフコナジラミによる伝搬試験および TAS-ELISA による血清学的検定により、ジェミニウイルス科ベゴモウイルス属のウイルスに起因することが明らかとなった。

2. 本ベゴモウイルスの塩基配列を解析し、その構造を明らかにした。本ウイルスは TYLCV-Is と同種

であるが、東海地方で発生した TYLCV-Is とは分子的に異なる系統であることが判明した。

3. TYLCV の種特異的および系統特異的 PCR プライマーを設計し、その有効性を確認した。また、PCR-RFLP によっても系統識別が可能であることを明らかにした。

4. 以上、PCR 法に基づくトマト黄化葉巻病の高精度診断のための基礎技術が確立された。

引用文献

- 1) AKBAR BEHJATNIA, S.A., DRY, I.B. and ALI REZAIAN, M. (1998) Identification of the replication-associated protein binding domain within the intergenic region of tomato leaf curl geminivirus. *Nucl. Acids Res.* **26**: 925-931.
- 2) ANTIGNUS, Y. and COHEN, S. (1994) Complete nucleotide sequence of an infectious clone of a mild isolate of tomato yellow leaf curl virus (TYLCV). *Phytopathology* **84**: 707-712.
- 3) ARGUELLO-ASTORGA, G.R., GUEVARA-GONZALES, R.G., HERRERA-ESTRELLA, L.R. and RIVERA-BUSTAMANTE, R.F. (1994) Geminivirus replication origin have a group-specific organization of iterative elements: a model for replication. *Virology* **203**: 90-100.
- 4) BRIDDON, R.W. and MARKHAM, P.G. (1994) Universal primers for the PCR amplification of dicot-infecting geminiviruses. *Mol. Biotechnol.* **1**: 202-205.
- 5) BROWN, J.K. (1994) Current status of *Bemisia tabaci* as a plant pest and virus vector in agro-ecosystems worldwide. *FAO Plant Prot. Bull.* **42**: 3-31.
- 6) BROWN, J.K. and BIRD, J. (1992) Whitefly-transmitted geminiviruses and associated disorders in the Americas and the Caribbean basin. *Plant Dis.* **76**: 220-225.
- 7) COHEN, S. and ANTIGNUS, Y. (1994) Tomato yellow leaf curl virus, a whitefly-borne geminivirus of tomatoes. *Adv. Dis. Vector Res.* **10**: 259-288.
- 8) COHEN, J., GERA, A., ECKER, R., BEN JOSEPH, R., PERLSMAN, M., GOKKES, M., LACHMAN, O. and ANTIGNUS, Y. (1995) Lisianthus leaf curl a new disease of lisianthus caused by tomato yellow leaf curl virus. *Plant Dis.* **79**: 416-420.
- 9) COHEN, S. and HARPAZ, I. : Periodic, rather than continual acquisition of new tomato virus by its vector, the tobacco whitefly (*Bemisia tabaci* Gennadius). *Entomol. Exp. Appl.* **7**: 155-166, 1964.
- 10) CRESPI, S., NORIS, E., VAIRA, A. and ACCOTTO,

- G. (1995) Molecular characterization of cloned DNA from a tomato yellow leaf curl virus isolate from Sicily. *Phyto. Medit.* **34**:93-99.
- 11) CZOSNEK, H., BER, R., ANTIGNUS, Y., COHEN, S., NAVOT, N. and ZAMIR, D. (1988) Isolation of Tomato yellow leaf curl virus, a geminivirus. *Phytopathology* **78**: 508-512.
 - 12) DELLAPORTA, S.L., WOOD, J. and HICKS, J.B. (1983) A plant DNA miniprep: version II. *Plant Mol. Biol. Rep.* **1**: 19-21.
 - 13) DRY, I.B., RIGDEN, J.E., KRAKE, L.R., MULLINEAUX, P.M. and REZAIAN, M.A. (1993) Nucleotide sequence and genome organization of tomato leaf curl geminivirus. *J. Gen. Virol.* **74**: 147-151.
 - 14) FARIA, J.C., GILBERTSON, R.L., HANSON, S.F., MORALES, F.J., AHLQUIST, P., LONIELLO, A.O. and MAXWELL, D.P. (1994) Bean golden mosaic geminivirus type II isolates from the Dominican Republic and Guatemala. *Phytopathology* **84**: 321-329.
 - 15) FAUQUET, C.M., BISARO, D.M., BRIDDON, R.W., BROWN, J.K., HARRISON, B.D., RYBICKI, E.P., STENGER, D.C. and STANLEY, J. (2003) Revision of taxonomic criteria for species demarcation in the family *Geminiviridae*, and an updated list of begomovirus species. *Arch. Virol.* **148**: 405-421.
 - 16) FAUQUET, C.M. and MAYO, M.A. (1999) Abbreviations for plant virus names-1999. *Arch. Virol.* **144**: 1249-1273.
 - 17) FONDONG, V.N., PITA, J.S., REY, M.E.C., de KOCHKO, A., BEACHY, R.N. and FAUQUET, C.M. (2000) Evidence of synergism between African cassava mosaic virus and a new double-recombinant geminivirus infecting cassava in Cameroon. *J. Gen. Virol.* **81**: 287-297.
 - 18) FONTES, E.P.B., EAGLE, P.A., SIPE, P.S., LUCKOW, V.A. and HANLEY-BOWDOIN, L. (1994) Interaction between a geminivirus replication protein and origin DNA is essential for viral replication. *J. Biol. Chem.* **269**: 8459-8465.
 - 19) FRISCHMUTH, T., ZIMMAT, G. and JESKE, H. (1990) The nucleotide sequence of Abutilon mosaic virus reveals prokaryotic as well as eukaryotic features. *Virology* **178**:461-468.
 - 20) GUTIERREZ, C. (1999) Geminivirus DNA replication. *Cell. Mol. Life Sci.* **56**: 313-329.
 - 21) HANSON, S.F., GILBERTSON, R.L., AHLQUIST, P.G., RUSSELL, D.R. and MAXWELL, D.P. (1991) Site-specific mutations in codons of the putative NTP-binding motif of the AL1 gene of bean golden mosaic geminivirus abolish infectivity. *Phytopathology* **81**: 1247 (Abstr.) .
 - 22) HONG, Y.G. and HARRISON, B.D. (1995) Nucleotide sequences from tomato leaf curl viruses from different countries: evidence for three geographically separate branches in evolution of the coat protein of whitefly-transmitted geminiviruses. *J. Gen. Virol.* **76**: 2043-2049.
 - 23) HONG, Y.G., ROBINSON, D.J. and HARRISON, B.D. (1993). Nucleotide sequence evidence for the occurrence of three distinct whitefly-transmitted geminiviruses in cassava. *J. Gen. Virol.* **74**: 2437-2443.
 - 24) HOWARTH, A.J., CATON, J., BOSSERT, M. and GOODMAN, R.M. (1985) Nucleotide sequence of bean golden mosaic virus and a model for gene regulation in geminivirus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **82**:3572-3576.
 - 25) KATO, K., ONUKI, M., FUJI, S. and HANADA, K. (1998) The first occurrence of tomato yellow leaf curl virus in tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill.) in Japan. *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.* **64**: 552-559.
 - 26) 川越洋二・中岡直士・今村幸久・三浦猛夫 (2002) 宮崎県におけるトマト黄化葉巻病の発生について. 九病虫研会報 **48**: 88 (講要) .
 - 27) KHEYR-POUR, A., BENDAHMANE, M., MATZEIT, V., ACCOTTO, G.P., CRESPI, S. and GRONENBORN, B. (1991) Tomato yellow leaf curl virus from Sardinia is a whitefly-transmitted monopartite geminivirus. *Nucleic Acids Res.* **19**: 6763-6769.
 - 28) KONATE, G., BARRO, N., FARGETTE, D., SWANSON, M. M. and HARRISON, B. D. (1995) Occurrence of whitefly-transmitted geminiviruses in crops in Burkina Faso, and their serological detection and differentiation. *Ann. Appl. Biol.* **126**: 121-129.
 - 29) KOONIN, E.V. and ILYINA, T.V. (1992) Geminivirus replication proteins are related to prokaryotic plasmid rolling circle DNA replication initiator proteins. *J. Gen. Virol.* **73**: 2763-2766.
 - 30) KUNIK, T., PALANICHELVAI, K., CZOSNEK, H., CITOVSKY, V. and GAFNI, Y. (1998) Nuclear import of the capsid protein of tomato yellow leaf curl virus (TYLCV) in plant and insect cells. *Plant J.* **13**: 393-399.
 - 31) LAPIDOT, M., FRIEDMANN, M., LACHMAN, O., YEHEZKEL, A., NAHON, S., COHEN, S. and PILOWSKY, M. (1997) Comparison of resistance level to tomato yellow leaf curl virus among commercial cultivars and breeding lines. *Plant Dis.* **81**: 1425-1428.
 - 32) LAZAROWITZ, S.G., WU, L.C., ROGERS, S.G. and ELMER, J.S. (1992) Sequence-specific interaction with the viral AL1 protein identifies a geminivirus

- DNA replication origin. *Plant Cell* **4**: 799-809.
- 33) MAYO, M.A. and PRINGLE, C.R. (1998) Virus taxonomy-1997. *J. Gen. Virol.* **79**: 649-657.
- 34) MICHELSON, I., ZAMIR, D. and CZOSNEK, H. (1994) Accumulation and translocation of tomato yellow leaf curl virus (TYLCV) in a *Lycopersicon esculentum* breeding line containing the *L. chilense* TYLCV tolerance gene *Ty-1*. *Phytopathology* **84**: 928-933.
- 35) MORRIS, B., COATES, L., LOWE, S., RICHARDSON, K. and EDDY, P. (1990) Nucleotide sequence of the infectious cloned DNA component of African cassava mosaic virus (Nigerian strain). *Nucleic Acids Res.* **18**:197-198.
- 36) NAKHLA, M.K., MAXWELL, D.P., MARTINEZ, R.T., CARVALHO, M.G. HOU, Y.M. and GILBERTSON, R.L. (1997) Complete nucleotide sequence of an infectious clone of tomato yellow leaf curl geminivirus from the Dominican Republic. *Phytopathology* **87**: S84 (Abstr.).
- 37) NAVAS-CASTILLO, J., SANCHEZ-CAMPOS, S., DIAZ, J.A., SAEZ-ALONSO, E. and MORIONES, E. (1999) Tomato yellow leaf curl virus-Is causes a novel disease of common bean and severe epidemics in tomato in Spain. *Plant Dis.* **83**: 29-32.
- 38) NAVAS-CASTILLO, J., SANCHEZ-CAMPOS, S., NORIS, E., LOURO, D., ACCOTTO, G.P. and MORIONES, E. (2000) Natural recombination between *Tomato yellow leaf curl virus-Is* and *Tomato leaf curl virus*. *J. Gen. Virol.* **81**: 2797-2801.
- 39) NAVOT, N., PICHERSKY, E., ZEIDAN, M., ZAMIR, D. and CZOSNEK, H. (1991) Tomato yellow leaf curl virus, a whitefly-transmitted geminivirus with a single genomic component. *Virology* **185**:151-161.
- 40) NORIS, E., HIDALGO, E., ACCOTTO, G.P. and MORIONES, E. (1994) High similarity among the tomato yellow leaf curl virus isolated from the west Mediterranean basin: the nucleotide sequence of an infectious clone from Spain. *Arch. Virol.* **135**: 165-170.
- 41) 大貫正俊 (2000a) トマト黄化葉巻病. 農業および園芸 **75**: 108-113.
- 42) 大貫正俊 (2000b) 日本に発生する begomovirus (*Geminiviridae*) の種とその分子的特徴. 植物ウイルス病研究会レポート **5**: 40-49.
- 43) ONUKI, M and HANADA, K. (2000) Genomic structure of a geminivirus in the genus *Begomovirus* from yellow vein-affected *Eupatorium makinoi*. *J. Gen. Plant Pathol.* **66**: 176-181.
- 44) 大泰司誠・岡田忠虎 (1995) 生理生態の解明. 「タバココナジラミの防除に関する研究」 p.8-24. 農林水産技術会議事務局, 東京.
- 45) OSAKI, T. and INOUE, T. (1981) Tobacco leaf curl virus. *CMI/AAB Description of Plant Viruses* No.232.
- 46) 尾崎武司・小島博文・井上忠男 (1979) タバコ巻葉ウイルスによるスイカズラ (*Lonicera japonica* Thunb.) の葉脈黄化症状. 日植病報 **45**: 62-69.
- 47) PADIDAM, M., BEACHY, R.N. and FAUQUET, C.M. (1995) Classification and identification of geminiviruses using sequence comparisons. *J. Gen. Virol.* **76**: 249-263.
- 48) PICO, B., DIEZ, M.J. and NUEZ, F. (1996) Viral disease causing the greatest economic losses to the tomato crops. II .The Tomato yellow leaf curl virus - a review. *Scientia Hortic.* **67**: 151-196.
- 49) POLSTON, J.E. and ANDERSON, P.K. (1997) The emergence of whitefly-transmitted geminiviruses in tomato in the Western Hemisphere. *Plant Dis.* **81**: 1358-1369.
- 50) POLSTON, J.E., MCGOVERN, R.J. and BROWN, L.G. (1999) Introduction of tomato yellow leaf curl virus in Florida and implications for the spread of this and other geminiviruses of tomato. *Plant Dis.* **83**: 984-988.
- 51) REINA, J., MORILLA, G., BEJARANO, E.R., RODRIGUEZ, M.D. and JANSSEN, D. (1999) First report of *Capsicum annuum* plants infected by tomato yellow leaf curl virus. *Plant Dis.* **83**: 1176.
- 52) RIGDEN, J.E., KRAKE, L.R., REZAIAN, M.A. and DRY, I.B. (1994) ORF C4 of tomato leaf curl geminivirus is a determinant of symptom severity. *Virology* **204**: 847-850.
- 53) ROBERTS, I.M., ROBINSON, D.J. and HARRISON, B.D. (1984) Serological relationships and genome homologies among geminiviruses. *J. Gen. Virol.* **65**: 1723-1730.
- 54) ROCHESTER, D.E., DePAULO, J.J., FAUQUET, C.M. and BEACHY, R.N. (1994) Complete nucleotide sequence of the geminivirus tomato yellow leaf curl virus, Thailand isolate. *J. Gen. Virol.* **75**: 477-485.
- 55) ROJAS, M.R., GILBERTSON, R.L., RUSSELL, D.R. and MAXWELL, D.P. (1993) Use of degenerate primers in the polymerase chain reaction to detect whitefly-transmitted geminiviruses. *Plant Dis.* **77**: 340-347.
- 56) RYBICKI, E.P., BRIDDON, R.W., BROWN, J.K., FAUQUET, C.M., MAXWELL, D.P., HARRISON, B.D., MARKHAM, P.G., BISARO, D.M., ROBINSON, D. and STANLEY, J. (2000) Family *Geminiviridae*. In *Virus Taxonomy, Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses* (van Regenmortel, M.H.V.

- et al., eds.), Academic Press, California, pp.285-297.
- 57) SANGER, F., NICKLEN, S. and COULSON, A.R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **74**: 5463-5467.
- 58) SHIH, S.L., TSAI, W.S., NAKHLA, M.K., MAXWELL, D.P., RASHID, M.H. and GREEN, S.K. (1998) Molecular comparison of two tomato leaf curl viruses from Bangladesh. *Zhijiu Baohuxue Hui Huikan* **40**:436-437.
- 59) STANLEY, J. and GAY, M.R. (1983) Nucleotide sequence of cassava latent virus DNA. *Nature* **301**:260-262.
- 60) SWANSON, M.M., VALAND, G.B., MUNIYAPPA, V. and HARRISON, B.D. (1998) Serological detection and antigenic variation of two whitefly-transmitted geminiviruses: tobacco leaf curl and croton yellow vein mosaic viruses. *Ann. Appl. Biol.* **132**: 427-435.
- 61) TAN, P.H., WONG, S.M., WU, M., BEDFORD, I.D., SAUNDERS, K. and STANLEY, J. (1995) Genome organization of ageratum yellow vein virus, a monopartite whitefly-transmitted geminivirus isolated from a common weed. *J. Gen. Virol.* **76**: 2915-2922.
- 62) THOMPSON, J.D., HIGGINS, D.G. and GIBSON, T.J. (1994) CLUSTAL W:improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucl. Acids Res.* **22**: 4673-4680.
- 63) 内川敬介・大貫正俊・田中俊憲・道添英昭・平田憲二・難波信行・早田栄一郎 (2000) TYLCVによるトルコギキョウの葉巻症状. 九病虫研会報 **46**: 147 (講要) .
- 64) Van REGENMORTEL, M.H.V., BISHOP, D.H.L., FAUQUET, C.M., MAYO, M.A., MANILOFF, J. and CALISHER, C.H. (1997) Guideline to the demarcation of virus species. *Arch. Virol.* **142**: 1505-1518.
- 65) VIDAVSKY, F. and CZOSNEK, H. (1998) Tomato breeding lines resistant and tolerant to tomato yellow leaf curl virus issued from *Lycopersicon hirsutum*. *Phytopathology* **88**: 910-914.
- 66) YAHARA, T., OOI, K., OSHITA, S., ISHII, I. and IKEGAMI, M. (1998) Molecular evolution of a host-range gene in geminiviruses infecting asexual populations of *Eupatorium makinoi*. *Genes Genet. Syst.* **73**: 137-141.
- 67) ZHOU, X., LIU, Y., CALVERT, L., MUNOZ, C., OTIM-NAPE, G.W., ROBINSON, D.J. and HARRISON, B.D. (1997) Evidence that DNA-A of a geminivirus associated with severe cassava mosaic disease in Uganda has arisen by interspecific recombination. *J. Gen. Virol.* **78**: 2101-2111.
- 68) ZHOU, X., LIU, Y., ROBINSON, D.J. and HARRISON, B.D. (1998) Four DNA-A variants among Pakistani isolates of cotton leaf curl virus and their affinities to DNA-A of geminivirus isolates from okra. *J. Gen. Virol.* **79**: 915-923.

Molecular Characterization and Strain-specific Detection of the Tomato Yellow Leaf Curl Virus Occurring in Kyushu, Japan

Masatoshi ONUKI¹⁾, Tetsuji OGAWA²⁾, Keisuke UCHIKAWA²⁾, Kimihiko KATO³⁾
and Kaoru HANADA⁴⁾

Summary

A new viral disease affecting tomatoes and causing yellow leaf curl symptom has been a serious problem in Kyushu, Japan, since 1996. Biological, serological and molecular evidence has shown that the disease is caused by a geminivirus belonging to the genus *Begomovirus*. The nucleotide sequence of the viral genomic DNA was determined and compared with sequences obtained from other tomato-infecting begomoviruses. The nucleotide sequence exhibited 98% similarity to a *Tomato yellow leaf curl virus* sourced from Israel (TYLCV-Is), indicating the begomovirus that currently affects tomato plantation in Kyushu, Japan, is in fact TYLCV-Is. Our results also suggest that the virus, designated as TYLCV-Ng (Ng), has a monopartite type genome composed of two virus-sense open reading frames (ORFs) [V1 (CP) and V2], four complementary-sense ORFs [C1 (Rep), C2, C3 and C4] and a non-coding region termed the intergenic region (IR). We also analyzed the nucleotide sequence of another TYLCV isolate (TYLCV-Sz, Sz) collected from Shizuoka Prefecture in Tokai area, Japan. The Ng and Sz types were found to belong to the same species, and were classified as TYLCV-Is in accordance with the current classification system for geminiviruses. However, clear molecular differences were found in the nucleotide sequences of the Ng and Sz types, especially in the region from the C1 ORF to the IR, which in this paper we tentatively refer to as the "variable region". Based on our results, we concluded that Ng and Sz represent different strains of TYLCV-Is. In Japan, there is another related tomato-infecting begomovirus, known as *Tobacco leaf curl virus* (TLCV), which causes symptoms that are very similar to those caused by TYLCV-Is. We therefore designed several primer sets for species- and strain-specific detection of TYLCV-Is. We found that differences in the restriction endonuclease digestion patterns of PCR products between Ng and Sz types are useful for distinguishing between TYLCV-Is viruses at the sub-species level. Species- and strain-specific detection of TYLCV-Is provides a useful method for the identification of virus diseases that affect tomatoes.

Key words: tomato yellow leaf curl disease, begomovirus genome, PCR, TYLCV-Is, species- and strain-specific detection.

Plant Protection Division, National Agricultural Research Center for Kyushu Okinawa Region, Nishigoshi, Kumamoto 861-1192, Japan.

1) Present address, Japan International Research Center for Agricultural Sciences, Okinawa Subtropical Station.

2) Nagasaki Prefectural Agricultural and Forestry Experiment Station.

3) Shizuoka Prefectural Agricultural Experiment Station.

4) Present address, National Institute of Agrobiological Sciences.