

ズッキーニ黄斑モザイクウイルス (ZYMV) 弱毒株 2S142a6 の3'末端塩基配列の解析

外間也子・酒井淳一・花田 薫 (沖縄県農業試験場・九州農業試験場)

Nariko HOKAMA, Jun-ichi SAKAI and Kaoru HANADA : Nucleotide Sequence of the 3'-terminal Region of a Mild Strain of Zucchini Yellow Mosaic Virus

ズッキーニ黄斑モザイクウイルス (ZYMV) はカボチャにモザイクや奇形葉などの激しい症状を現わし、果実にはコブを生じる。そのため、露地栽培カボチャは欠株を生じたり、コブ果となって商品価値を失うなどして著しい被害を受ける。その ZYMV の被害を軽減するため、ZYMV の弱毒ウイルスの作出、研究を行い、弱毒株 2S142a6 を分離した。この株はカボチャにおける病徴が軽く、野外の ZYMV に対して顕著な干渉効果がある¹⁾。また、ZYMV はアブラムシによって非永続的に伝搬されるが、本弱毒株はこれまでの試験でアブラムシによる伝搬は認められず、アブラムシ非伝搬性であると考えられる。この弱毒株の塩基配列を解析して、他の ZYMV 強毒株と比較するために cDNA のクローニングを行い、3'末端側の塩基配列を解析した。

1. 試験方法

2S142a6 の純化は接種後約 2 週間のカボチャ葉を用い、佐古ら²⁾の方法に準じて行った。純化標品をさらに塩化セシウムを用いた密度勾配遠心分離によって精製した。純化ウイルスを SDS、プロテナーゼ K で処理した後、フェノール処理によりウイルス RNA を抽出した。oligo dT プライマーを用いて Gubler-Hoffman 法によりウイルス RNA から二本鎖 cDNA を合成した。これをプラスミドベクター Bluescript II SK (+) の EcoRV 部位に挿入した後、大腸菌 JM109 を形質転換した。大腸菌からプラスミド DNA を調製し、アガロースゲル電気泳動により cDNA のサイズを推定した後、2S142a6 のウイルス RNA とハイブリダイゼーションを行い、特異的に反応するコロニーを選抜した。約 2.8kb の大きさのインサートを含むクローンから Promega 社の Erase-a-Base キットを用いてデリーションクローンを得た。塩基配列の決定は蛍光 DNA シークエンサー (ABI 社) を用い、ジデオキシ法により行った。

2. 結果及び考察

クローニングされていた cDNA は 3'末端部のポリ A を除き 2731 塩基対であった。塩基配列よりアミノ酸配列を推定したところ 839 アミノ酸からなっていた。他のポテウイルスの報告³⁾から、C 末端部から 279 番目に N1b と CP の切断部位が、796 番目に N1a と N1b の切断部位が推定された。N1b は 517 アミノ酸、CP は 279 アミノ酸からなっていた。N1b は RNA ポリメラーゼに特徴的な Gly-Asp-Asp 配列が確認された。

CP 領域のアミノ酸の相同性を海外の ZYMV 2 分離株、ZYMV-CT⁴⁾及び ZYMV-NAT⁵⁾と比較したところ、それぞれ 94% と高い相同性がみられた。第 1 図に ZYMV-NAT と比較した結果を示す。CP 領域にはアブラムシ伝搬に関与すると思われる Asp-Ala-Gly 配列⁶⁾が見いだされた。本分離株はアブラムシ非伝搬性であるが、Asp-Ala-Gly 配列が保存されていることから、この性質は CP に起因するものではないと推察された。また、ポリ A を除く 3'末端の非翻訳領域は 211 塩基よりなり、ZYMV-CT および ZYMV-NAT とほとんど同一であった。

引用文献

- 1) 外間也子・河野伸二・与那覇哲義：日植病報 56, 534-535, 1990.
- 2) 佐古宣道・松尾和敏・野中副次：日植病報 46, 639-646, 1980.
- 3) Riechmann, J. L., Lain, S. and Garcia, J. A. : *J. Gen. Virol.* 73, 1-16, 1992.
- 4) Gal-On, A., Antignus, Y., Rosner, A. and Raccach, B. : *Gene* 87, 273-277, 1990.
- 5) Grumet, R. and Fang, G. : *J. Gen. Virol.* 71, 1619-1622, 1990.
- 6) Atreya, P. L., Atreya, C. D. and Pirone, T. P. : *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88, 7887-7891, 1991.

| | | | | | | | |
|----------|-----------------|-------------------|---------------------|------------------|--------------------|----------|-----|
| | 10 | 20 | 30 | 40 | 50 | 60 | 70 |
| ZYMV-NAT | N-SGTQPTVADT | GATKKDKEDDKGK | KNKVDVTS | GSSEKTVAAVTKDK | DVNAGSHGKIVPRLSKIT | KKMSLPRV | |
| 2S142a6 | N-SDTKTTVADAGAT | KKDKEDDKGK | KNKDVASNS | SGEKVVAATKDK | DVNAGSHGKIVPRLSKIT | KKMSLPRV | |
| | 80 | 90 | 100 | 110 | 120 | 130 | 140 |
| ZYMV-NAT | KGNVILDIDHLL | EYKPDQIELYNTRASH | QQFASWFNQVKTEYDLNE | QQMGVVMNGFMVVC | IENGTSPDIN | | |
| 2S142a6 | KGKVIDIDHLL | EYKPDQIELYNTRASH | QQFSSWFNQVTRTEYDLDE | QQMGVVMNGFMVVC | IENGTSPDIN | | |
| | 150 | 160 | 170 | 180 | 190 | 200 | 210 |
| ZYMV-NAT | GVVWMMDCNEQVEY | PLKPIVENAKPTLRQIM | HHFSDAAEAYIEMR | NAEAPYMPRYGLLRN | LRDRSLARYA | | |
| 2S142a6 | GVWFMMDCNEQVEY | PLKPIVENAKPTLRQIM | HHFSDAAEAYIEMR | NAEAPYMPRYGLLRN | LRDRSLARYA | | |
| | 220 | 230 | 240 | 250 | 260 | 270 | |
| ZYMV-NAT | FDIFYEVNSKTPERA | EAVAQMKAAALS | SNVSSRLFLGLDGNV | ATTSSEDTERTHTARD | VNRNMHTLLGVNT | MTQ-C | |
| 2S142a6 | FDIFYEVNSKTPERA | EAVAQMKAAALS | SNVSSRLFLGLDGNV | ATTSSEDTERTHTARD | VNRNMHTLLGVNT | MTQ-C | |

第1図 外被タンパク質 (CP) 領域のアミノ酸配列の比較

注) * : 2分離株で共通するアミノ酸