

# 本邦のジャガイモ Y ウイルスの集団遺伝構造と 弱毒ウイルスに関する研究

小川 哲治

A study on the genetic structures of populations of *Potato virus Y* in Japan  
and the attenuated mutant

Tetsuji Ogawa

## 目 次

諸言	3
第1章本邦のジャガイモ Y ウイルスの集団遺伝構造	6
1) 実験材料および実験方法	6
(1) 供試ウイルス	6
(2) 二重抗体サンドイッチ酵素結合抗体法	6
(3) 塩基配列の決定	6
ア) ウイルス RNA の抽出	6
イ) 逆転写-ポリメラーゼ連鎖反応	8
a) 合成プライマーの設計	8
b) 逆転写反応	8
c) ポリメラーゼ連鎖反応	8
d) DNA の精製	8
e) 塩基配列の決定	8
(4) 分子進化的解析	8
ア) 組換え部位の解析	8
イ) 分子系統学的解析	17
ウ) 遺伝的類似性および多様性解析	17
2) 結果	17
(1) 本邦産分離株の生物学的性質および分子的性状	17
(2) 組換え部位解析	18
(3) 分子系統解析	22
(4) 遺伝的類似性および多様性解析	22
3) 考察	28
第2章 ジャガイモ Y ウイルス塊茎えそ系統分離株の弱毒ウイルス	33
1) 実験材料および実験方法	33
(1) 供試ウイルス	33
(2) 二重抗体サンドイッチ酵素結合抗体法	33
(3) 弱毒株作出	33
ア) 低温処理	33

i) 亜硝酸ナトリウム処理	33
ii) 組織培養変異誘発法	36
(4) ウイルス蓄積量調査	36
(5) 遺伝的な安定性調査	36
(6) 塩基配列の決定	36
i) ウイルス RNA の抽出	36
ii) 逆転写-ポリメラーゼ連鎖反応	36
a) 合成プライマーの設計	36
b) 逆転写反応	38
c) ポリメラーゼ連鎖反応	38
d) DNA の精製	38
e) 集団の塩基配列の決定	38
(7) 準種の塩基配列解析	38
(8) 干渉作用調査	39
2) 結果	39
(1) 弱毒株の作出	39
i) 低温処理	39
ii) 亜硝酸ナトリウム処理	39
iii) 組織培養変異誘発法	42
(2) ウイルス蓄積量	42
(3) 弱毒株の遺伝的な安定性調査	42
(4) 集団間の塩基配列の比較	42
(5) 準種の塩基配列	50
(6) 干渉作用調査	50
3) 考察	53
総合考察	56
要約	59
謝辞	60
引用文献	61
Summary	68

## 諸言

ジャガイモ Y ウイルス (*Potato virus Y*; PVY) は、ポティウイルス科の中で最も大きな属であるポティウイルス属のタイプ種であり<sup>20), 39)</sup>, 複数のナス科農作物において経済的に被害を与える最も重要な病原体の一つである。PVY は約 9.7kb のプラス 1 本鎖 RNA をゲノムとして持ち、ゲノムに単一のオープンリーディングフレーム (ORF) がコードされており、そのポリタンパク質から自身のプロテアーゼ活性によりプロセッシングを受けて少なくとも 10 種の成熟したタンパク質が産出される<sup>39)</sup>。第 3 タンパク質 (protein 3; P3) にはフレームシフト (+2) による *Pretty Interesting Potyvirus ORF* (PIPO) と呼ばれる単一の小さな ORF がある<sup>9)</sup>。PVY は複数の宿主における病徴の違いを基にした生物学的性質、血清学的性質および遺伝学的性質によって、PVY<sup>0</sup>, PVY<sup>C</sup>, PVY<sup>N</sup>, PVY<sup>Z</sup> および PVY<sup>E</sup> の 5 系統グループに分けられる (Table 1)<sup>91)</sup>。PVY<sup>N</sup> 系統グループは、タバコおよびジャガイモ塊茎での病徴の違い、血清学的性質および遺伝学的性質により、PVY<sup>N</sup>, PVY<sup>NTN</sup> および PVY<sup>N-Wi</sup> (北米では PVY<sup>N-0</sup>) の 3 系統に分けられる。

植物ウイルスの集団遺伝構造を研究することは、ウイルスと宿主間の相互作用やウイルスの地理学的な拡散を理解する上で重要である<sup>18), 20), 21)</sup>。これまでポティウイルス属の一種であるカブモザイクウイルス (*Turnip mosaic virus*; TuMV)<sup>71), 97), 98), 99)</sup>, カボチャモザイクウイルス (*Watermelon mosaic virus*; WMV)<sup>56)</sup> およびダイズモザイクウイルス (*Soybean mosaic virus*; SMV)<sup>87)</sup>, ベゴモウイルス属のトマト黄化葉巻ウイルス (*Tomato yellow leaf curl virus*; TYLCV)<sup>47)</sup>, ソベモウイルス属の *Rice yellow mottle virus* (RYMV)<sup>100)</sup> の集団遺伝構造に関する研究が報告されてきた。これらには、選択圧、創始者効果あるいはゲノムの組換え現象によりウイルス集団が形成されたことが報告されている。

PVY は、遺伝学的に多様であることが報告されている<sup>36), 58), 74)</sup>。多くの PVY<sup>0</sup> と PVY<sup>N</sup> 系統グループの分離株について全ゲノムの塩基配列が決定されているが、両系統の分離株間の塩基配列の相違は 8% 程度である。ウイルスゲノムの組換え現象は、病原性の変化などのウイルスの生物学的性質を変化させる決定要素の一つであると考えられている

<sup>106), 107)</sup>。これまで複数の PVY 分離株のゲノム構造解析結果より、PVY のゲノム内に組換え部位を有する組換え体が存在することが報告されている<sup>8), 22), 28), 51), 52), 62), 86)</sup>。PVY の組換え体の多くは PVY<sup>NTN</sup> および PVY<sup>N-Wi</sup> 系統分離株であり、PVY<sup>0</sup> 系統と PVY<sup>N</sup> 系統分離株のゲノムを親型に持つが、PVY<sup>N</sup> 系統分離株間のゲノムの組換えも認められている<sup>52)</sup>。複数の組換え体のゲノム構造を比較した結果、組換えパターンの多様性はある程度限られており、組換えパターンの一部は複数の分離株間で共通していた<sup>28), 51), 52), 86)</sup>。PVY<sup>NTN</sup> 系統分離株ゲノムの組換えパターンとしてはゲノム内に 3 から 4 ヶ所の組換え部位を持つ場合が多く、PVY<sup>N-Wi</sup> 系統分離株ではゲノム内に 1 から 2 ヶ所の組換え部位を持つ場合が多いことが知られている<sup>22), 28), 51), 52), 62), 86)</sup>。以上のように、これまで PVY のゲノム構造解析に関する報告は多数あるが、集団遺伝構造の解析は行われていなかった。

本邦においては、PVY<sup>0</sup> 系統、PVY<sup>N</sup> 系統分離株<sup>26), 69)</sup> および PVY<sup>NTN</sup> 系統分離株<sup>70)</sup> の外被タンパク質遺伝子 (coat protein; CP) の塩基配列が報告されているが、PVY 分離株の全ゲノムの塩基配列データを用いた集団遺伝構造に関する研究はなかった。そこで本研究では、本邦に発生する PVY 分離株の集団遺伝構造を明らかにすることを目的に、国内の複数の地域から採集した PVY<sup>0</sup> および PVY<sup>N</sup> 系統グループ (PVY<sup>N</sup> 系統および PVY<sup>NTN</sup> 系統) の合計 20 分離株を採集し、それらの全塩基配列を明らかにし、組換え部位解析、分子系統解析および集団多様度を解析した。なお、ヨーロッパ、北米および本邦産の GenBank に登録されている約 150 の PVY 分離株のゲノム配列データを用いて再評価し、世界における PVY 分離株集団の進化と拡散についても考察した。これらについては、「第 1 章 本邦のジャガイモ Y ウイルスの集団遺伝構造」で記述する。

植物ウイルス病の防除方法には、健全種苗の利用、抵抗性品種の利用、アブラムシや線虫類などの媒介者の制御および弱毒ウイルスの利用などがある<sup>60)</sup>。植物があるウイルスに感染すると干渉作用があることが知られており、同種または近縁種のウイルスによる二次感染が抑制される。この現象を利用して、病原性がほとんどない弱毒ウイルスを人工的に植物に感染させ、自然界から感染する強毒ウイルスを回避する技術が一部の植物ウイ

Table 1. *Potato virus Y* isolates collected in Japan

Isolate	Original host	Location (Prefecture, island)	Collection year	Symptom <sup>a</sup>	Strain group <sup>b</sup>	Strain	Accession No.
NTND6	<i>Solanum tuberosum</i> cv. Dejima	Nagasaki, Kyushu	1995	VC, VN	PVY <sup>ns</sup>	PVY <sup>ns</sup>	AB331515
NTNH1R3	<i>S. tuberosum</i> cv. Bareisho Norin 1	Hiroshima, Honshu	2009	VC, VN	PVY <sup>ns</sup>	PVY <sup>ns</sup>	AB711143
NTNH090	<i>S. tuberosum</i> cv. Irish Cobbler	Hokkaido, Hokkaido	1998	VC, VN	PVY <sup>ns</sup>	PVY <sup>ns</sup>	AB331517
NTNGAM1	<i>S. tuberosum</i>	Kagoshima, Kyushu	2007	VC, VN	PVY <sup>ns</sup>	PVY <sup>ns</sup>	AB711144
NTNGAM2	<i>S. tuberosum</i>	Kagoshima, Kyushu	2007	VC, VN	PVY <sup>ns</sup>	PVY <sup>ns</sup>	AB711145
NTNN99	<i>S. tuberosum</i> cv. Nishiyutaka	Nagano, Honshu	1997	VC, VN	PVY <sup>ns</sup>	PVY <sup>ns</sup>	AB331518
NTNOK105	<i>S. tuberosum</i> cv. Nishiyutaka	Okinawa, Okinawa	1999	VC, VN	PVY <sup>ns</sup>	PVY <sup>ns</sup>	AB331516
NTN0N92	<i>S. tuberosum</i> cv. Nishiyutaka	Kagoshima, Kyushu	< 1998	VC, VN	PVY <sup>ns</sup>	PVY <sup>ns</sup>	AB331519
NTNTK1	<i>S. tuberosum</i>	Ibaragi, Honshu	2007	VC, VN	PVY <sup>ns</sup>	PVY <sup>ns</sup>	AB711146
OA021	<i>S. tuberosum</i>	Aomori, Honshu	2010	Mo, VC	PVY <sup>o</sup>	PVY <sup>o</sup>	AB711147
OA022	<i>S. tuberosum</i>	Aomori, Honshu	2010	Mo, VC	PVY <sup>o</sup>	PVY <sup>o</sup>	AB711148
O <sub>h</sub>	<i>S. tuberosum</i>	Hokkaido, Hokkaido	Unknown	Mo, VC, VB	PVY <sup>o</sup>	PVY <sup>o</sup>	AB714134
OH037 <sup>c</sup>	<i>S. tuberosum</i>	Hokkaido, Hokkaido	1989	Mo, VC	PVY <sup>o</sup>	PVY <sup>o</sup>	AB711149
OKUM4	<i>S. tuberosum</i> cv. Andesuaka	Kumamoto, Kyushu	2010	Mo, VC	PVY <sup>o</sup>	PVY <sup>o</sup>	AB711150
ONGI3	<i>S. tuberosum</i> cv. May Queen	Nagasaki, Kyushu	2010	Mo, VC	PVY <sup>o</sup>	PVY <sup>o</sup>	AB711151
ONGOB6	<i>S. tuberosum</i>	Nagasaki, Kyushu	2001	Mo, VC	PVY <sup>o</sup>	PVY <sup>o</sup>	AB711152
OUNKA3	Unknown	Unknown	< 1984	Mo, VC	PVY <sup>o</sup>	PVY <sup>o</sup>	AB711153
OUNKG	Unknown	Unknown	< 1981	Mo, VC	PVY <sup>o</sup>	PVY <sup>o</sup>	AB711154
OUNKS	Unknown	Unknown	< 1987	Mo, VC	PVY <sup>o</sup>	PVY <sup>o</sup>	AB711155
T <sub>13</sub> <sup>d</sup>	<i>S. tuberosum</i>	Hokkaido, Hokkaido	1989	VC, VN, NL	PVY <sup>ns</sup>	PVY <sup>ns</sup>	AB714135

<sup>a</sup> Symptoms produced on *Nicotiana tabacum* cv. Xanthi nc; VC, vein clearing; VN, vein necrosis; Mo, mottle; VB, vein banding; NL, necrotic lesion.

<sup>b</sup> The strain groups and strains are proposed by Singh et al. (2008).

<sup>c</sup> OH037 was isolated from PVY-36 (Ohshima et al. 1990).

<sup>d</sup> T<sub>13</sub> was obtained from PVY-T<sub>13</sub> isolate collected in Japan in 1986. This isolate was not examined for inducing potato tuber necrotic ringspot disease.

ルス種において実用化されている。

弱毒ウイルスは自然環境下において植物に感染している場合があることから、極軽微な病徴を示す植物から分離されることもあるが<sup>109)</sup>、通常より高温あるいは低温条件下で育成したウイルス感染植物から弱毒ウイルスを選抜する温度処理<sup>41), 42), 59)</sup>により作出することができ、強毒ウイルス感染植物からの粗汁液や純化ウイルスまたは精製したウイルス核酸を用いて亜硝酸ナトリウム処理<sup>79), 88), 112)</sup>あるいは紫外線処理<sup>37), 104)</sup>を行うことにより、ウイルスゲノムに変異を誘発させ、弱毒株を作出することが報告されている。これまで弱毒ウイルスや、その作出が報告されているウイルスとしては、トバモウイルス属のトマトモザイクウイルス (*Tomato mosaic virus*; ToMV)<sup>23)</sup>、スイカ緑斑モザイクウイルス (*Cucumber green mottle virus*; CGMMV)、トウガラシマイルドモットルウイルス (*Pepper mild mottle virus*; PMMoV)、ククモウイルス属のキュウリモザイクウイルス (*Cucumber mosaic virus*; CMV)<sup>84)</sup>およびポテウイルス属のインゲンマメモザイクウイルス (*Bean yellow mosaic virus*; BYMV)<sup>59)</sup>、クローバー葉脈黄化ウイルス (*Clover yellow vein virus*; CIYVV)<sup>111)</sup>、ネギ萎縮ウイルス (*Onion yellow dwarf virus*; OYDV)<sup>93)</sup>、パパイア輪点ウイルス (*Papaya ringspot virus*; PRSV)<sup>112)</sup>、SMV<sup>41)</sup>、サツマイモ斑紋モザイクウイルス (*Sweet potato feathery mottle virus*; SPFMV)<sup>109)</sup>およびズッキーニ黄斑モザイクウイルス (*Zucchini yellow mosaic virus*; ZYMV)<sup>42), 46)</sup>などがある。本研究の対象であるPVYについては、これまで弱毒ウイルスを作製することが困難であり、後述する様に干渉作用も不完全であるため報告はなかった。

ポテウイルスの弱毒化にはヘルパー成分プロテアーゼ (helper-component proteinase; HC-Pro) タンパク質遺伝子内のアミノ酸の置換<sup>6), 12), 50), 89), 111)</sup>や欠失<sup>93)</sup>、第1タンパク質 (protein 1; P1) 遺伝子内の組換え現象<sup>110)</sup>などの遺伝的な変化が関与することが報告されている。PRSVではP1タンパク質遺伝子内のC末端領域の2ヶ所のアミノ酸またはHC-Proタンパク質遺伝子内の2ヶ所のアミノ酸が、パパイアの病徴を弱毒化することが知られている<sup>6)</sup>。CIYVVでは、HC-Proタンパク質遺伝子内の2ヶ所のアミノ酸置換がウイルスの病原

性とRNAサイレンシングの抑制能力に関係しており、弱毒化の原因であることが報告されている<sup>111)</sup>。

干渉作用は古典的なウイルス分類に基準として、現在の系統、種および属の分類基準に相当する検定植物における病徴、宿主範囲および血清学的性質とともにウイルスの性質を調査する際の指標の一つとして利用されており<sup>61)</sup>、植物ウイルス病の防除技術の一つとして利用されてきた<sup>40), 60)</sup>。これまでCMV<sup>84)</sup>、ZYMV<sup>42), 46)</sup>、PRSV<sup>112)</sup>、BYMV<sup>59)</sup>およびSPFMV<sup>109)</sup>などで強毒ウイルスに対する弱毒ウイルスの干渉作用が報告されている。本研究の対象であるPVYの干渉作用について、これまでPVY<sup>0</sup>系統とPVY<sup>A</sup>系統の分離株間あるいはPVY<sup>A</sup>系統グループ内の分離株間での干渉作用が調査されているが、いずれも分離株や宿主によって干渉作用の程度は異なっており、干渉作用が認められないか、部分的な干渉作用が認められるだけであった<sup>45), 48), 92), 96), 102)</sup>。

本研究では、PVYの塊茎えそ系統分離株を材料に、従来の弱毒ウイルス作出方法である低温処理および亜硝酸ナトリウム処理を用いて弱毒ウイルスを作出した。さらに、これまでの方法とは異なる新たな方法「組織培養変異誘発法 (mutagenesis-in-tissue culture method; MITC法)」による弱毒ウイルスの作出を試みた。この方法は、感染植物内に存在するウイルス集団から弱毒ウイルスと思われる変異株を得ると考えられる<sup>16), 43), 72), 85)</sup>。弱毒株の材料に用いた塊茎えそ系統強毒株は、タバコにおいて黄斑えそ病、ジャガイモにおいて塊茎えそ病の病原である。本研究では、タバコにおいて弱毒変異株を作出した後、その弱毒株を材料にしてタバコとジャガイモの両方の植物において弱毒化した変異株 (タバコ-ジャガイモ弱毒株) の作出を試みた。さらに本ウイルスの弱毒化に関与する遺伝子領域を探索するために、作出した弱毒株の塩基配列およびアミノ酸配列を決定した。これらについては、「第2章 ジャガイモ Y ウイルス塊茎えそ系統分離株の弱毒ウイルス」で記述する。

## 第1章 本邦のジャガイモ Y ウイルスの集団遺伝構造

本章では、本邦の PVY 分離株の集団遺伝構造を明らかにすることを目的に、国内の様々な地域から採集した PVY<sup>0</sup> および PVY<sup>N</sup> 系統グループ (PVY<sup>N</sup> 系統および PVY<sup>NTN</sup> 系統) の合計 20 分離株について全塩基配列を決定し、それらの組換え部位解析、分子系統解析および集団多様度解析を調査した。さらに、ヨーロッパ、北米および本邦産の約 150 の PVY 分離株のゲノム配列データを用いてそれらの集団遺伝構造についても評価し、世界における PVY 分離株集団の進化と拡散について考察した。

### 1) 実験材料および実験方法

#### (1) 供試ウイルス

本研究では PVY の 2 系統, PVY<sup>0</sup>, PVY<sup>NTN</sup> 系統の分離株を用いて試験を行った。供試 PVY 分離株の採取地、宿主植物、系統および GenBank のアクセシオン番号について Table 1 に示した。PVY<sup>0</sup> 系統分離株は、1981 年から 2010 年にかけて佐賀大学において凍結乾燥保存された試料、ジャガイモ栽培圃場よりモザイク症状などのウイルス病様症状を示すジャガイモ葉を採集した試料と適量の 0.02M リン酸緩衝液 (pH7.4) を乳鉢に入れて磨砕し、カーボラダム (600 メッシュ) を用いて *C. amaranticolor* に塗沫接種した。接種した植物はガラス室内で管理し、病徴を観察した。接種葉に形成された局部病斑を個別に切り取り、タバコ (品種; Xanthi nc) に接種した。接種 2 週間後に二重抗体サンドイッチ酵素結合抗体法 (Double antibody sandwich-enzyme linked immunosorbent assay; DAS-ELISA)<sup>10)</sup> によりウイルス感染の有無を確認し、陽性株を単一病斑分離株とした。単一病斑分離株はタバコ (品種; Xanthi nc) を用いてガラス室内で増殖し、-80°C の超低温庫での凍結保存、凍結乾燥保存あるいはシリカゲルを用いて乾燥保存した。PVY<sup>NTN</sup> 系統の分離株については、以下の方法により単一病斑分離を行った。最初に、1989 年から 2010 年にかけて本邦のジャガイモ産地からジャガイモ塊茎えそ病の症状を示す塊茎を採集した。採集した塊茎を個別にポリポットに植付け、出芽後に成長した葉と適量の 0.02M リン酸緩衝液 (pH7.4) を乳鉢に入れて磨砕し、カーボラ

ダム (600 メッシュ) を用いてジャガイモ (品種; 根系 59 号) に塗沫接種し、接種葉に形成されたえそ斑点を個別に切り取ってタバコ (品種; Xanthi nc) に接種した。タバコに接種後は PVY<sup>0</sup> 系統分離株の単一病斑分離作業と同様に DAS-ELISA によりウイルス感染の有無を確認し、陽性株を単一病斑分離株とした。単一病斑分離株はタバコ (品種; Xanthi nc) を用いてガラス室内で増殖し、-80°C の超低温庫での凍結保存、凍結乾燥保存あるいはシリカゲルを用いて乾燥保存した。PVY<sup>0</sup> 系統および PVY<sup>NTN</sup> 系統の単一病斑分離株は、タバコ (品種; Xanthi nc) に再度接種し、約 1 ヶ月間ガラス室内で管理し、病徴を調査した。

#### (2) 二重抗体サンドイッチ酵素結合抗体法

PVY 分離株の接種植物におけるウイルス感染の有無を確認するため DAS-ELISA を行った (Fig. 1)。DAS-ELISA ではマイクロウェルプレート MAXISORP442404 (ヌンク) を用い、吸光度はマイクロプレートリーダー MPR-A4i II (東ソー) を用いて光波長 405nm で測定した。一次抗体およびコンジュゲートについては、日本植物防疫協会茨城研究所より販売されている製品を用いた。DAS-ELISA の実験手順としては、初めに炭酸・重炭酸緩衝液 (pH 9.6) で 1 次抗体液を 500 倍希釈した溶液をマイクロウェルプレートに 200  $\mu$ l ずつ分注し、37°C で 4 時間静置した。その後、プレートに吸着しなかった抗体を除くため、0.05% の Tween-20 を含んだ 0.02M リン酸緩衝生理食塩水 (PBS-Tween) で 3 回洗浄した後、磨砕した粗汁液を 200  $\mu$ l ずつ分注し、4°C で一晩静置した。次に 1 次抗体と結合しなかった抗原を除くため、0.02M PBS-Tween で 3 回洗浄した後、0.02M PBS-Tween で 500 倍希釈したコンジュゲート液を 200  $\mu$ l ずつ分注し、37°C で 4 時間静置した。抗原と反応しなかった抗体を除くため、0.02M PBS-Tween で 3 回洗浄した後、p-ニトロフェニルリン酸二ナトリウム六水和物 (1mg/ml) を溶解したジエタノールアミン溶液を 200  $\mu$ l ずつ分注した後、室内で静置して 60 分後および 120 分後に吸光度を測定し、陰性対照の 2~3 倍以上の値を示した試料を陽性反応とした。

#### (3) 塩基配列の決定

##### ア) ウイルス RNA の抽出

PVY 各分離株に感染したタバコ葉からの全 RNA

Micro plate (96 well) (NUNC)

↓ Add IgG diluted with 0.05 M sodium carbonate bicarbonate buffer (pH 9.6)\*

↓ Incubate at 37 °C for 3 hours

↓ Wash with 0.02 M PBS-Tween† for 3 minutes, 3 times

↓ Add 200 μl sap homozinized with 0.02 M PBS-Tween

↓ Incubate at 4 °C for overnight

↓ Wash with 0.02 M PBS-Tween for 3 minutes, 3 times

↓ Add conjugate diluted with 0.02 M PBS-Tween

↓ Incubate at 37 °C for 3 hours

↓ Wash with 0.02 M PBS-Tween for 3 minutes, 3 times

↓ Add substrate (p-nitrophenyl phosphate) diluted with 10 % diethanol amine stock solution (pH 9.8) ‡

↓ Incubate at room temperature for 30 minutes to 2 hours

Measure absorbance at 405 nm

\* 0.05 M sodium carbonate bicarbonate buffer (pH 9.6)

Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	0.795 g
NaHCO <sub>3</sub>	1.465 g
NaN <sub>3</sub>	0.100 g
DW	300 ml

Adjust pH with HCl and fill up to 500 ml with DW

0.1 M PBS stock solution (pH 7.4)

NaCl	43.5 g
NaHPO <sub>4</sub> · 12H <sub>2</sub> O	32.8 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.8 g
KCl	1.0 g
NaN <sub>3</sub>	1.0 g

Fill up to 1000 ml with DW

↓ diluted 5 times with DW

0.02M PBS

† 0.02 M PBS-Tween

0.02 M PBS	1000 ml
Tween 20 (Polyoxyethylene 20 sorbitan monolaurate)	0.5 ml

‡ 10 % diethanol amine stock solution (pH 9.8)

Diethanol amine (2, 2' Iminodiethanol)	50 ml
DDW	300 ml

Adjust pH with HCl and fill up to 500 ml with DW

Fig. 1. Procedure for double antibody sandwich enzyme linked immunosorbent assay (DAS-ELISA).

の抽出は ISOGEN (ニッポンジーン) を用いた (Fig. 2). 抽出した全 RNA を DEPC-Treated Water (アンピオン) に溶解して分光光度計 GeneQuant pro (アマシャムファルマシアバイオテック) で吸光度を測定し, OD260=20 を  $1 \mu\text{g}/\mu\text{l}$  とし, 全 RNA 濃度を算出した.

#### 1) 逆転写-ポリメラーゼ連鎖反応

##### a) 合成プライマーの設計

逆転写反応, ポリメラーゼ連鎖反応および塩基配列の決定に用いたプライマーについては, インターネット上の DNA データベースより収集した PVY ゲノムの塩基配列を基に設計した (Table 2).

##### b) 逆転写反応

PVY のゲノム RNA を鋳型にして, モロニーマウス白血ウイルス (*Moloney murine leukemia virus*; MMLV) 逆転写酵素 (PrimeScript® reverse transcriptase; タカラバイオ) を用いて  $42^\circ\text{C}$  で 1 時間静置し, 一本鎖相補 DNA (ss cDNA) を合成した (Fig. 3).

##### c) ポリメラーゼ連鎖反応

逆転写反応で得られた ss cDNA から二本鎖相補 DNA (ds cDNA) を増幅させるためポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) を行った. PCR は Platinum™ Pfx DNA polymerase (インビトロジェン) および DNA 増幅機 PC812 (アステック) を用い, 変性  $94^\circ\text{C}$  (2 分) を 1 サイクル, 変性  $94^\circ\text{C}$  (15 秒) - アニーリング  $40^\circ\text{C}$  (30 秒) - 伸長  $68^\circ\text{C}$  (3 分) のセットを 40 サイクル, 伸長  $4^\circ\text{C}$  (10 分) を 1 サイクルの条件下で行った (Fig. 5). なお, PCR 反応に用いた Platinum™ Pfx DNA polymerase は複製の際のエラー率が  $1.1 \times 10^{-4}$  塩基未満であることが確認されている<sup>95)</sup>. PCR 終了後, 反応液  $50 \mu\text{l}$  中  $2 \mu\text{l}$  を 0.7% アガロースゲル電気泳動に供試し (Fig. 4), 目的とする ds cDNA の増幅を確認した.

##### d) DNA の精製

PCR によって得られた ds cDNA は 0.7% アガロースゲル電気泳動に供試した後, 光波長 365nm の UV ランプ照射下で目的とするバンドを切り出した. その後, QIAquick Gel Extraction Kit (キアゲン) を用いてプロトコールに従って DNA を精製した (Fig. 5). カラムから DNA を抽出する際は  $50 \mu\text{l}$  の 10mM Tris-HCl (pH8.5) を用いた.

##### e) 塩基配列の決定

塩基配列決定のために, PVY 全ゲノムをカバー

するように合計 5DNA 断片を精製した. それぞれの DNA 断片は, 相互に少なくとも 200bp 以上はオーバーラップするように設定した. 塩基配列の決定には, BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (アプライドバイオシステムズ) を用いた. 精製した DNA, DDW, プライマー ( $1\text{pmol}/\mu\text{l}$ ,  $2\text{pmol}/\mu\text{l}$ ,  $4\text{pmol}/\mu\text{l}$ ,  $8\text{pmol}/\mu\text{l}$ ),  $5 \times$  BigDye Sequence Buffer および Ready Reaction Premix を加えて混和後, DNA 増幅機 PC812 (アステック) を用い, 変性  $96^\circ\text{C}$  (1 分) を 1 サイクル, 変性  $96^\circ\text{C}$  (10 秒) - アニーリング  $50^\circ\text{C}$  (5 秒) - 伸長  $60^\circ\text{C}$  (75 秒) のセットを 15 サイクル, 変性  $96^\circ\text{C}$  (10 秒) - アニーリング  $50^\circ\text{C}$  (5 秒) - 伸長  $60^\circ\text{C}$  (90 秒) のセットを 5 サイクル, 変性  $96^\circ\text{C}$  (10 秒) - アニーリング  $50^\circ\text{C}$  (5 秒) - 伸長  $60^\circ\text{C}$  (2 分) のセットを 5 サイクル, 伸長  $4^\circ\text{C}$  (10 分) を 1 サイクルの条件下で行った (Fig. 6). その後, 余分な蛍光 ddNTP を除くためエタノール沈殿を行い乾燥後, 使用するまで試料を  $-80^\circ\text{C}$  で遮光保存した (Fig. 6). 試料は使用直前に沈殿を  $40 \mu\text{l}$  の Hi-Di™ Formamide (アプライドバイオシステムズ) に溶解し, 2 分間煮沸後, 急冷により DNA を変性させ,  $20 \mu\text{l}$  をジェネティックアナライザー用サンプルチューブに移し, ジェネティックアナライザー-310 およびジェネティックアナライザー-3130 (アプライドバイオシステムズ) で塩基配列の解析を行った. 塩基配列の決定および推測されるアミノ酸配列の解析には DNASIS ver. 3.5 (日立) および BioEdit ver. 5.0.9<sup>25)</sup> を使用した.

#### (4) 分子進化的解析

##### 7) 組換え部位の解析

本研究で塩基配列を決定した分離株および既に塩基配列が報告されている合計 149 分離株 (Table 3) の全塩基配列データを用いて組換え部位の検索を行った. 外群として分子系統学的解析において PVY と最も近縁なウイルスと考えられる *Pepper severe mosaic virus* (PepSMV) の 1 分離株<sup>1)</sup> を用いた<sup>20)</sup>. それぞれの分離株のポリタンパク質翻訳領域の塩基配列は BioEdit ver. 5.0.9 を用いてアミノ酸配列に変換した後, Clustal X2<sup>44)</sup> によりアライメントを行った. その後, それぞれのアミノ酸配列に見られたギャップをソフトウェア TRANSALIGN ver. 1.0 (Willer 博士より分譲)



0.05 g - 0.1 g PVY infected leaves  
↓ Add 1 ml ISOGEN (Nippon Gene)  
↓ Homogenized with a mortar and a pestle  
↓ Transfer into 1.5 ml tube  
↓ Store at room temperature for 5 minutes  
↓ Centrifuge 14,000 rpm at 4°C for 10 minutes  
Transfer supernatant into 1.5 ml tube  
↓ Add 200  $\mu$ l chloroform  
↓ Vortex at 15 sec  
↓ Store at room temperature for 2 minutes  
↓ Centrifuge 14,000 rpm at 4 °C for 10 minutes  
Transfer supernatant into 1.5 ml tube  
↓ Add 500  $\mu$ l isopropanol  
↓ Mix gently with hand at 10 times  
↓ Store at room temperature for 10 minutes  
↓ Centrifuge 14,000 rpm at 4 °C for 10 minutes  
Pellet  
↓ Dry up at 7 minutes  
↓ Add 100  $\mu$ l DEPC-Treated Water (Ambion)  
↓ Add 10  $\mu$ l 3 M NaOAC  
↓ Add 250  $\mu$ l 100% EtOH (ice-cold)  
Store at - 80 °C for 60 minutes  
↓ Centrifuge 14,000 rpm at 4 °C for 15 minutes  
Pellet  
↓ Rinse with 75 % EtOH (ice-cold)  
↓ Centrifuge 14,000 rpm at 4 °C for 5 minutes  
Pellet  
↓ Dry up at 7 minutes  
↓ Add 20 - 40  $\mu$ l DEPC-Treated Water (Ambion)  
Use for reverse transcription - polymerase chain reaction (RT-PCR)

Fig. 2. Procedure for total RNA extraction from PVY infected leaves by ISOGEN (Nippon Gene).

Table 2. Nucleotide primers used in this study

Primer <sup>a</sup>	Nucleotide sequence (5' to 3')	Position <sup>b</sup>	Sense
5' untranslated region			
<b>PVY5T4P</b>	AAATTAACAACCTCAATACAACATAA	1-27	+
PVY5T50P	AACAACCTCAATACAACATAAG	8-28	+
P1 gene			
NTN4T5M	CACTCTGGATGTACGGAC	364-382	-
PVYP15P	CGATACAAGACTGATG (C/T) CCAGA	397-418	+
N-P152P	ACATATCACACGCCAAAGTTG	595-615	+
O-P151P	AAGTTGACAGAAGGCCAGATG	610-630	+
NTN5T6M	CAAAACGACTGCGCGATGTG	737-755	-
PVYP16P	GAGAGTGGACTT (C/T) CG (A/G) TGTGATA	783-805	+
PVYP17M	GATATCTCATT (C/T) GTGCCCAATT	1078-1100	-
PVYP18P	AATTGGGCAC (A/G) AATGAGATATC	1078-1100	+
HC-Pro gene			
PVYHC53P	ATAACCTGCC (C/T) AC (C/T) TGTGC	1192-1211	+
PVYHC9P	TACAGCTC (A/G) TGAATGGCAGGT	1476-1497	+
PVYHC39M	TTCGAGAAAAACCGTTGGC	1682-1701	-
PVYHC10P	GCTGAGTTTAGGC (A/G) TTGATGA	1813-1834	+
PVYHC54P	TTAGGC (A/G) GAAGATGAAAGGTG	1820-1840	+
<b>PVYHC55P</b>	CG (C/T) GACATGTGTGTGCC (A/G) AA	2140-2159	+
PVYHC11M	GTTGGCCAGGTTCGAAGCTT	2158-2177	-
PVYHC12P	AAGCTTGGAACCTGGCCAAC	2158-2177	+
PVYHC56P	CA (C/T) TATAGAGTTGGTGGT (A/G) TTC	2395-2416	+
PVYHC13P	ATAATGTCTGAGTC (A/G) GCAGC	2473-2492	+
P3 gene			
NTNP31P	CGAGTGTGACGACGAGAAACA	2704-2724	+
PVYP314P	CAGAT (C/T) ATGGAAAAAATTATCTAA	2911-2935	+
<b>PVYP357M</b>	TGCGGATAATTTTC (C/T) CGCC	2969-2988	-
PVYP358P	ACTCATA (A/G) GCAAA (A/G) CGCTC	2996-3017	+
NTNP32P	AGGGTTGAATGAGCGACTCAA	3129-3149	+
PVYP315M	ATTATTGC (C/T) TGACACACTGC	3277-3296	-
PVYP316P	GCAGTGTGCA (A/G) GCAATAAT	3277-3296	+
PVYP342M	CGCTGATGCCGACATTATA	3487-3506	-
NTNP33P	CTCCACACCAGGTGTTAAGAA	3507-3527	+
<b>PVYP359P</b>	TCATG (A/G) TT (T/C) GATGCTGAAAG	3563-3584	+
CI gene			
O-CI60P	GATGCTGAAAGGAGTATTGC	3574-3594	+
N-CI61P	CATGAAGTTAGACACCAG	3643-3660	+
PVYCI17P	GATGT (A/G) ATCAAGAATTT (C/T) GATGA	3670-3692	+
PVYCI18P	TCAAGAAGCCAACACTGCG	4042-4061	+
PVYCI174P	CATGTTCT (A/G) GATCCTTC (C/T) GC	4189-4208	+
NTNC14P	AAGGTATCAGCCACTCCTGT	4261-4280	+
PVYCI19M	ACTTCATTGTA (A/G) CTCGACAC	4423-4442	+
PVYCI120P	GTGTGAG (C/T) TACAATGAAGT	4423-4442	+
NTNC15P	TTGGGCTTAAAGTCTCACCG	4625-4644	+
<b>PVYCI161M</b>	GCAATGCTCCTATTGTCAA	4655-4673	-
PVYCI21P	GC (T/G) CTTGC (T/G) TGCTTTGCATA	4816-4835	+
PVYCI140M	CAATTGCCAATGAGGCTAGT	4867-4886	-
PVYCI175P	ATTGGCAATTGACTGT (T/G) CG	4876-4895	+
NTNC16P	GGATCAATGCATCCTGTGTC	4963-4980	+
<b>PVYCI162P</b>	GATCAATGCATCCTGTGTCATA	4964-4983	+
PVYCI122P	GAAATGCTTTGGGAAAC (A/G) GT	5170-5189	-
PVYCI141M	TACACACTGCGCACTGATCTT	5254-5274	-
NTNC17P	AGGAACGAGTGAACAGA	5321-5338	+
NTNC18M	TCTGTTCACTCGTTCCT	5321-5338	-
PVYCI163P	TGCAA (A/G) GATTACAC (C/T) GCAGA	5421-5441	+
PVYCI123M	TT (C/T) TCCTCACATGCAGA (A/G) CCAT	5498-5519	-
PVYCI124P	ATGG (C/T) TCTGCATGTGAGGA (A/G) AA	5498-5519	+

<sup>a</sup> Boldface shows the primer used in reverse transcription and polymerase chain reaction.

<sup>b</sup> The nucleotide position for primers corresponds to the nucleotide sequence of PVY<sup>NTND6</sup> isolate.

Table 2. (Continued)

Primer <sup>a</sup>	Nucleotide sequence (5' to 3')	Position <sup>b</sup>	Sense
<b>N1a gene</b>			
NTNNA9P	CTCACCAGGGCAAGAACA	5711-5728	+
NTNNA10M	TGTTCTTGCCCTGGTGAG	5711-5728	-
PVYVP64P	CA (A/G) TTCGTTGATCC (A/G) CTCAC	5941-5960	+
PVYNIA25P	TTCGTTGATCC (A/G) CTCACTGG	5944-5963	+
NTNNA11P	TGCCACACAACCCACTCA	6143-6160	+
PVYNIA26P	CCAATTGC (C/T) CAAACAGTTTG	6319-6338	+
NTNNA12P	CGATCAAAGGCAGAGACA	6509-6526	+
<b>N-NIA65M</b>	ATGTCTCTGCCTTTGATCG	6509-6527	-
<b>O-NIA66M</b>	GATGAGGATGATATCCCTAC	6518-6537	-
N-NIA67P	GAGAGGATTTGTTGGTTGG	6601-6620	+
O-NIA68P	CGATCATCACAGAAACAAGC	6650-6669	+
PVYNIA27M	GTTTCAATCCAATGCTCCA (A/G) AA	6697-6719	-
PVYNIA28P	TT (C/T) TGGAAAGCATTGGATTGAAAC	6697-6719	+
<b>N1b gene</b>			
PVYNIB29P	ACAGG (A/G) AATTTGCAAGCTGT	7048-7067	+
NTNIB15P	TCTTCAGGCCTTTGATGGATG	7166-7186	+
NTNIB16M	CATCCATCAAAGCCCTGAAGA	7166-7186	-
<b>PVYNIB71P</b>	CTTTGATGGATGC (T/G) TATGG	7175-7196	+
PVYNIB30P	ATGAAAGCTGC (A/T) GTCGGAGC	7384-7403	+
PVYNIB41M	TCTTTGCACCGAAGTTCTGC	7531-7550	-
NTNIB17P	GGACATTCACCTGCTGCAC	7574-7591	+
NTNIB18M	GTGCAGCAGTGAATGTCC	7574-7591	-
PVYNIB70P	CTCA (C/T) CAGAAGCACATAC	7807-7824	+
PVYNIB31M	CTTCCATGTATGTGCTTCTGAT	7813-7837	-
PVYNIB32P	ATCAGAAGCACATACATGGAAG	7813-7837	+
<b>PVYNIB64M</b>	AATTGTTCCATCTGGAGTTG	7897-7916	-
NTNIB19P	TCCTTGCTATGCATTACGCTC	7985-8005	+
PVYNIB33P	TATGATTT (C/T) TCGTC (A/G) AGAACAAG	8152-8174	+
PVYNIB72P	TAAC (A/G) CACCAAATCAGGAG	8354-8372	+
<b>CP gene</b>			
PVYCP34P	ACCATCAAG (C/G) AAATGACACAAT	8564-8585	+
NTNCP21P	ATGCCCAAGAGTAAGGGTGCA	8737-8757	+
PVYCP35M	TTGGCGAGGTCCATTTTCAAT	8929-8950	-
PVYCP36P	ATTGAAAAATGGAACCTCGCCAA	8929-8950	+
PVYCP73P	GGAGTTTGGTTATGATGGA	8959-8978	+
NTNCP22P	ACATCACGGACACCAGTG	9187-9204	+
PVYCP37P	CCAAGTATGCATACTCTACTTG	9337-9658	+
<b>3' untranslated region</b>			
<b>PVY3T77M</b>	AGTCCTCTGT (17)	9693- Poly (A)	-
<b>PVY3T9M</b>	GGGGCGGCCGCT (30)	Poly (A)	-

A. RT-mixture

DEPC-Treated Water	X $\mu$ l
10 mM dNTPs	1.0 $\mu$ l
5 $\times$ RT buffer	4.0 $\mu$ l
Minus sense primer (50 pmol/ $\mu$ l)	1.0 $\mu$ l
RNA (5 $\mu$ g/ $\mu$ l)	Y $\mu$ l
PrimeScript™ Reverse Transcriptase (TAKARA)	0.7 $\mu$ l
Total	20.0 $\mu$ l

↓ Incubate at 42 °C for 1 hour

B. PCR reaction

DDW	29.7 $\mu$ l
10 mM dNTPs	1.0 $\mu$ l
50 mM MgSO <sub>4</sub>	2.0 $\mu$ l
10 $\times$ Pfx Amplification buffer	5.0 $\mu$ l
10 $\times$ PCR enhancer solution	5.0 $\mu$ l
Plus sense primer (10 pmol/ $\mu$ l)	1.5 $\mu$ l
Minus sense primer (10 pmol/ $\mu$ l)	1.5 $\mu$ l
1 st cDNA (RT-mixture)	4.0 $\mu$ l
PLATINUM™ Pfx DNA polymerase (Invitrogen)	0.3 $\mu$ l
Total	50.0 $\mu$ l

↓

PCR cycle

94 °C (2 min)	1 cycle
94 °C (15 sec) - 40 °C (30 sec) - 68 °C (3 min)	40 cycles
4 °C (10 min) - 25 °C ( $\infty$ )	1 cycle

Fig. 3. Procedure for reverse transcription and polymerase chain reaction using Platinum™ Pfx DNA polymerase.

## 0.7% Agarose gel 20 ml

Agarose S (Nippon gene)	1.4 g
50×Tris-Acetate- Ethlenediamine tetra-acetic acid (TAE)*	400.0 $\mu$ l
Ethidium bromide (250 $\mu$ g/ml)	20.0 $\mu$ l
DDW	20.0 ml

## 1×TAE

50×TAE	8 ml
Ethidium bromide (250 $\mu$ g/ml)	400 $\mu$ l
DDW	392 ml

## \* 50×TAE

Tris hydroxymethyl aminomethane	60.5 g
0.5 M EDTA	25.000 ml
Acetic acid	14.275 ml
DDW	210.000 ml

Fig. 4. Composition of agarose gel and 1×TAE buffer for electrophoresis.

## Agarose gel used for electrophoresis

↓ Excise the DNA fragment from the agarose gel

↓ Add 3 volumes of Buffer QG

↓ Incubate at 50 °C for 10 minutes

## Apply the sample to the QIAquick column

↓ Centrifuge 12,000 rpm at room temperature for 1.5 minutes

## Discard flow-through

↓ Add 500  $\mu$ l of Buffer QG

↓ Store at room temperature for 5 minutes

↓ Centrifuge 12,000 rpm at room temperature for 1.5 minutes

## Discard flow-through

↓ Centrifuge 13,000 rpm at room temperature for 1.5 minutes

## Place QIAquick column into 1.5 ml tube

↓ Add 50  $\mu$ l of 10 mM Tris-HCl (pH 8.5)

↓ Store at room temperature for 1 minutes

↓ Centrifuge 13,000 rpm at room temperature for 1.5 minutes

## Electrophoresis with 0.7 % agarose gel

Fig. 5. Procedure for QIAquick Gel Extraction Kit (QIAGEN).

## PCR reaction

DDW	X $\mu$ l
Ready Reaction Premix (Applied Biosystems)	0.5 $\mu$ l
5 $\times$ BigDye Sequencing Buffer (Applied Biosystems)	2.0 $\mu$ l
cDNA (66 ng)	Y $\mu$ l
Primer (1-4 pmol/ $\mu$ l)	1.5 $\mu$ l
Total	10.0 $\mu$ l

↓ Vortex and flashing

## PCR cycle

96 °C (1 min)	1 cycle
96 °C (10 sec) - 50 °C ( 5 sec) - 60 °C (75 sec)	15 cycles
96 °C (10 sec) - 50 °C ( 5 sec) - 60 °C (90 sec)	5 cycles
96 °C (10 sec) - 50 °C ( 5 sec) - 60 °C ( 2 min)	5 cycles
4 °C (10min) - 25 °C ( $\infty$ )	1 cycle

↓ Add 2  $\mu$  l 125 mM EDTA (pH 8.0)

↓ Add 2  $\mu$  l 3 M Sodium acetate (pH 4.6)

↓ Add 50  $\mu$  l 100 % EtOH

↓ Vortex and flashing

↓ Incubate at 27 °C for 15 minutes

↓ Centrifuge 13,700 rpm at room temperature for 20 minutes

Pellet

↓ Add 400  $\mu$  l 70 % EtOH

↓ Centrifuge 13,700 rpm at room temperature for 5 minutes

Pellet

↓ Dry up for 20 minutes

Store at - 80 °C

Fig. 6. Procedure for polymerase chain reaction and EtOH/EDTA/sodium acetate precipitation for sequencing.

Table 3. *Potato virus Y* isolates analyzed in this study

Isolate	Origin	Country	Strain group <sup>a</sup>	Strain <sup>b</sup>	Synonymous code <sup>c</sup>	Accession no.
<b>Asia (33 isolates)</b>						
Guiding-3	Unknown	China	PVY <sup>st</sup>	PVY <sup>st</sup>		HM590405
HC-2	Unknown	China	PVY <sup>st</sup>	PVY <sup>st</sup>		HM590406
HN1	<i>Solanum tuberosum</i>	China	PVY <sup>st</sup>	PVY <sup>st</sup>		HQ631374
HN2	<i>S. tuberosum</i>	China	PVY <sup>st</sup>	PVY <sup>st</sup>		GQ200836
NTND6	<i>S. tuberosum</i>	Japan	PVY <sup>st</sup>	PVY <sup>st</sup>	PVY-J-NTN	AB331515
NTNHR3	<i>S. tuberosum</i>	Japan	PVY <sup>st</sup>	PVY <sup>st</sup>	PVY-J-NTN	AB711143
NTNH090	<i>S. tuberosum</i>	Japan	PVY <sup>st</sup>	PVY <sup>st</sup>	PVY-J-NTN	AB331517
NTNKGAM1	<i>S. tuberosum</i>	Japan	PVY <sup>st</sup>	PVY <sup>st</sup>	PVY-J-NTN	AB711144
NTNKGAM2	<i>S. tuberosum</i>	Japan	PVY <sup>st</sup>	PVY <sup>st</sup>	PVY-J-NTN	AB711145
NTNKN99	<i>S. tuberosum</i>	Japan	PVY <sup>st</sup>	PVY <sup>st</sup>	PVY-J-NTN	AB331518
NTNOK105	<i>S. tuberosum</i>	Japan	PVY <sup>st</sup>	PVY <sup>st</sup>	PVY-J-NTN	AB331516
NTNOK92	<i>S. tuberosum</i>	Japan	PVY <sup>st</sup>	PVY <sup>st</sup>	PVY-J-NTN	AB331519
NTNTK1	<i>S. tuberosum</i>	Japan	PVY <sup>st</sup>	PVY <sup>st</sup>	PVY-J-NTN	AB711146
QAO21	<i>S. tuberosum</i>	Japan	PVY <sup>o</sup>	PVY <sup>o</sup>		AB711147
QAO22	<i>S. tuberosum</i>	Japan	PVY <sup>o</sup>	PVY <sup>o</sup>		AB711148
Q <sub>4</sub>	<i>S. tuberosum</i>	Japan	PVY <sup>o</sup>	PVY <sup>o</sup>		AB714134
OH037	<i>S. tuberosum</i>	Japan	PVY <sup>o</sup>	PVY <sup>o</sup>		AB711149
OKUM4	<i>S. tuberosum</i>	Japan	PVY <sup>o</sup>	PVY <sup>o</sup>		AB711150
ONGI3	<i>S. tuberosum</i>	Japan	PVY <sup>o</sup>	PVY <sup>o</sup>		AB711151
ONGOB6	<i>S. tuberosum</i>	Japan	PVY <sup>o</sup>	PVY <sup>o</sup>		AB711152
OUNKA3	Unknown	Japan	PVY <sup>o</sup>	PVY <sup>o</sup>		AB711153
OUNKG	Unknown	Japan	PVY <sup>o</sup>	PVY <sup>o</sup>		AB711154
OUNKS	Unknown	Japan	PVY <sup>o</sup>	PVY <sup>o</sup>		AB711155
PVY-12	<i>S. tuberosum</i>	Syria	PVY <sup>st</sup>	PVY <sup>st</sup>		AB185833
PVY-27	Unknown	Syria	PVY <sup>st</sup>	PVY <sup>st</sup>		AB461450
SD1	Unknown	China	PVY <sup>st</sup>	PVY <sup>st</sup>		EU182576
SYR-III-L4	Unknown	Syria	Unknown			AB461454
SYR-NB-16	<i>S. tuberosum</i>	Syria	PVY <sup>st</sup>	PVY <sup>st</sup>	PVY <sup>st</sup> -st	AB270705
SYR-II-2-8	<i>S. tuberosum</i>	Syria	PVY <sup>st</sup>	PVY <sup>st</sup>	PVY <sup>st</sup> -st	AB461451
SYR-II-Bo1	<i>S. tuberosum</i>	Syria	PVY <sup>st</sup>	PVY <sup>st</sup>	PVY <sup>st</sup> -st	AB461452
SYR-II-DrH	<i>S. tuberosum</i>	Syria	PVY <sup>st</sup>	PVY <sup>st</sup>	PVY <sup>st</sup> -st	AB461453
T <sub>1</sub>	<i>S. tuberosum</i>	Japan	PVY <sup>st</sup>	PVY <sup>st</sup>		AB714135
WA-13	Unknown	China	PVY <sup>o</sup>	PVY <sup>o</sup>		HM590407
<b>Europe (30 isolates)</b>						
12-94	<i>S. tuberosum</i>	Poland	PVY <sup>st</sup>	PVY <sup>st</sup>		AJ889866
156	<i>S. tuberosum</i>	Germany	PVY <sup>st</sup>	PVY <sup>st-1</sup>	PVY <sup>st-1</sup>	AJ889867
156vari	<i>S. tuberosum</i>	Germany	PVY <sup>st</sup>	PVY <sup>st-1</sup>		AJ889868
261-4	<i>S. tuberosum</i>	Germany	PVY <sup>st</sup>	PVY <sup>st-1</sup>	PVY <sup>st-1</sup>	AN113988
34/01	<i>S. tuberosum</i>	Poland	PVY <sup>st</sup>	PVY <sup>st</sup>		AJ890342
Adgen-C	<i>S. tuberosum</i>	France	PVY <sup>c</sup>	PVY <sup>c</sup>		AJ890348
CH-605	<i>S. tuberosum</i>	Switzerland	PVY <sup>st</sup>	PVY <sup>st</sup>		X97895
Ditta	<i>S. tuberosum</i>	Poland	Unknown	PVY <sup>st</sup>		AJ890344
Foggia	Unknown	Italy	Unknown			EU482153
Gr99	<i>Nicotiana tabacum</i>	Poland	PVY <sup>st</sup>	PVY <sup>st-1</sup>		AJ890343
Isol5	<i>S. tuberosum</i>	Germany	PVY <sup>st</sup>	PVY <sup>st-1</sup>		AJ890350
LW	<i>S. tuberosum</i>	Poland	PVY <sup>st</sup>	PVY <sup>st-1</sup>	PVY <sup>st-1</sup>	AJ890349
LYE84. 2	<i>Lycopersicon esculentum</i>	Spain	PVY <sup>c</sup>	PVY <sup>c</sup>		AJ439545
Linda	<i>S. tuberosum</i>	Germany	PVY <sup>st</sup>	PVY <sup>st</sup>		AJ890345
N Nysa	Unknown	Poland	PVY <sup>st</sup>	PVY <sup>st</sup>		FJ666337
N-Fr	<i>S. tuberosum</i>	France	PVY <sup>st</sup>	PVY <sup>st</sup>		NC001616
NIB-NTN	<i>S. tuberosum</i>	Slovenia	PVY <sup>st</sup>	PVY <sup>st</sup>		AJ585342
Nicola	<i>S. tuberosum</i>	Germany	PVY <sup>st</sup>	PVY <sup>st</sup>	PVY <sup>st-1</sup>	AJ890346
Nnp	<i>Capsicum annuum</i>	Italy	PVY <sup>c</sup>	PVY <sup>c</sup>		AF237963
PRI-509	<i>S. tuberosum</i>	Netherlands	PVY <sup>c</sup>	PVY <sup>c</sup>		EU563512
SASA-110	<i>S. tuberosum</i>	UK	PVY <sup>o</sup>	PVY <sup>o</sup>		AJ585195
SASA-207	<i>S. tuberosum</i>	UK	PVY <sup>st</sup>	PVY <sup>st-1</sup>		AJ584851
SASA-61	<i>S. tuberosum</i>	UK	PVY <sup>st</sup>	PVY <sup>st</sup>		AJ585198
SCRI-N	<i>S. tuberosum</i>	UK	PVY <sup>st</sup>	PVY <sup>st</sup>		AJ585197
SCRI-O	<i>S. tuberosum</i>	UK	PVY <sup>o</sup>	PVY <sup>o</sup>		AJ585196
Satina	<i>S. tuberosum</i>	Germany	PVY <sup>st</sup>	PVY <sup>st</sup>		AJ890347
Son41	<i>Solanum nigrum</i>	France	PVY <sup>c</sup>	PVY <sup>c</sup>		AJ439544
Thole	<i>S. tuberosum</i>	Hungary	PVY <sup>st</sup>	PVY <sup>st</sup>		M95491
Wilga	Unknown	Poland	PVY <sup>st</sup>	PVY <sup>st-1</sup>	PVY <sup>st-1</sup>	EF568545
v942490	<i>S. tuberosum</i>	UK	PVY <sup>st</sup>	PVY <sup>st</sup>		EF016294
<b>North America (79 isolates)</b>						
423-3	<i>S. tuberosum</i>	USA	PVY <sup>st</sup>	PVY <sup>st</sup>		AY884982
A95	<i>S. tuberosum</i>	USA	PVY <sup>st</sup>	PVY <sup>st-1</sup>	PVY <sup>st-1</sup>	HQ912866
Alt	<i>S. tuberosum</i>	USA	PVY <sup>st</sup>	PVY <sup>st-1</sup>	PVY <sup>st-1</sup>	AY884985
CO1750	<i>S. tuberosum</i>	USA	PVY <sup>o</sup>	PVY <sup>o</sup>	PVY <sup>o</sup>	HQ912910
CO1801	<i>S. tuberosum</i>	USA	PVY <sup>o</sup>	PVY <sup>o</sup>	PVY <sup>o</sup>	HQ912898
CO1827	<i>S. tuberosum</i>	USA	PVY <sup>o</sup>	PVY <sup>o</sup>	PVY <sup>o</sup>	HQ912912
CO1898	<i>S. tuberosum</i>	USA	PVY <sup>o</sup>	PVY <sup>o</sup>	PVY <sup>o</sup>	HQ912906
CO1960	<i>S. tuberosum</i>	USA	PVY <sup>o</sup>	PVY <sup>o</sup>	PVY <sup>o</sup>	HQ912915
CO2081	<i>S. tuberosum</i>	USA	PVY <sup>o</sup>	PVY <sup>o</sup>		HQ912913
CO2122	<i>S. tuberosum</i>	USA	PVY <sup>o</sup>	PVY <sup>o</sup>		HQ912897
CO2140	<i>S. tuberosum</i>	USA	PVY <sup>o</sup>	PVY <sup>o</sup>		HQ912914

<sup>a</sup> The strain group are proposed into five groups, PVY<sup>o</sup>, PVY<sup>st</sup>, PVY<sup>c</sup>, PVY<sup>st-1</sup> and PVY<sup>st-2</sup>.

<sup>b</sup> The strain are proposed into seven strains, PVY<sup>o</sup>, PVY<sup>st</sup>, PVY<sup>st-1</sup>, PVY<sup>st-2</sup>, PVY<sup>c</sup>, PVY<sup>st-3</sup> and PVY<sup>st-4</sup>.

<sup>c</sup> Synonymous codes were described in previous study (Ogawa et al. 2008; Singh et al. 2008; Chikh-Ali et al. 2010b, Kerlan et al. 2011).

<sup>d</sup> PVY-AGA and PVY-MON isolates were described as the PVY<sup>st</sup> strain isolates (Galvio-Costa et al. 2012).

Table 3. (Continued)

Isolate	Origin	Country	Strain group <sup>a</sup>	Strain <sup>b</sup>	Synonymous code <sup>c</sup>	Accession no.
C02146	<i>S. tuberosum</i>	USA	PVY <sup>0</sup>	PVY <sup>0</sup>	PVY <sup>05</sup>	HQ912907
C02194	<i>S. tuberosum</i>	USA	PVY <sup>0</sup>	PVY <sup>0</sup>	PVY <sup>05</sup>	HQ912901
C02247	<i>S. tuberosum</i>	USA	PVY <sup>0</sup>	PVY <sup>0</sup>	PVY <sup>05</sup>	HQ912899
C02272	<i>S. tuberosum</i>	USA	PVY <sup>0</sup>	PVY <sup>0</sup>	PVY <sup>05</sup>	HQ912900
C02294	<i>S. tuberosum</i>	USA	PVY <sup>0</sup>	PVY <sup>0</sup>	PVY <sup>05</sup>	HQ912903
C02352	<i>S. tuberosum</i>	USA	PVY <sup>0</sup>	PVY <sup>0</sup>	PVY <sup>05</sup>	HQ912902
C02374	<i>S. tuberosum</i>	USA	PVY <sup>0</sup>	PVY <sup>0</sup>	PVY <sup>05</sup>	HQ912908
C0284	<i>S. tuberosum</i>	USA	PVY <sup>0</sup>	PVY <sup>0</sup>	PVY <sup>05</sup>	HQ912905
C0286	<i>S. tuberosum</i>	USA	PVY <sup>0</sup>	PVY <sup>0</sup>	PVY <sup>05</sup>	HQ912911
C0289	<i>S. tuberosum</i>	USA	PVY <sup>0</sup>	PVY <sup>0</sup>	PVY <sup>05</sup>	HQ912904
C0303	<i>S. tuberosum</i>	USA	PVY <sup>0</sup>	PVY <sup>0</sup>	PVY <sup>05</sup>	HQ912909
CW	<i>S. tuberosum</i>	USA	PVY <sup>0</sup>	PVY <sup>0</sup>		HQ912865
FL	<i>S. tuberosum</i>	Canada	PVY <sup>0</sup>	PVY <sup>0</sup>		HM367075
HR-1	<i>S. tuberosum</i>	USA	PVY <sup>0</sup>	PVY <sup>05</sup>		FJ204166
ICTA	<i>S. tuberosum</i>	USA	PVY <sup>0</sup>	PVY <sup>0</sup>		HQ912864
ID-1	<i>S. tuberosum</i>	USA	PVY <sup>0</sup>	PVY <sup>05</sup>	PVY <sup>05</sup>	DQ157178
ID1010	<i>S. tuberosum</i>	USA	PVY <sup>0</sup>	PVY <sup>0</sup>	PVY <sup>05</sup>	HQ912887
ID11_27_57B	<i>S. tuberosum</i>	USA	PVY <sup>0</sup>	PVY <sup>0</sup>	PVY <sup>05</sup>	HQ912885
ID1269	<i>S. tuberosum</i>	USA	PVY <sup>0</sup>	PVY <sup>0</sup>	PVY <sup>05</sup>	HQ912882
ID130	<i>S. tuberosum</i>	USA	PVY <sup>0</sup>	PVY <sup>0</sup>		HQ912888
ID14_2_14a	<i>S. tuberosum</i>	USA	PVY <sup>0</sup>	PVY <sup>05</sup>	PVY <sup>05</sup>	HQ912870
ID155	<i>S. tuberosum</i>	USA	PVY <sup>0</sup>	PVY <sup>05</sup>		HQ912869
ID1_5_62A	<i>S. tuberosum</i>	USA	PVY <sup>0</sup>	PVY <sup>0</sup>		HQ912890
ID243	<i>S. tuberosum</i>	USA	PVY <sup>0</sup>	PVY <sup>0</sup>		HQ912895
ID253	<i>S. tuberosum</i>	USA	PVY <sup>0</sup>	PVY <sup>0</sup>	PVY <sup>05</sup>	HQ912880
ID269	Unknown	USA	PVY <sup>0</sup>	PVY <sup>0</sup>	PVY <sup>05</sup>	FJ643477
ID281	<i>S. tuberosum</i>	USA	PVY <sup>0</sup>	PVY <sup>0</sup>		HQ912893
ID315	<i>S. tuberosum</i>	USA	PVY <sup>0</sup>	PVY <sup>0</sup>	PVY <sup>05</sup>	HQ912881
ID331	<i>S. tuberosum</i>	USA	PVY <sup>0</sup>	PVY <sup>0</sup>	PVY <sup>05</sup>	HQ912879
ID431	<i>S. tuberosum</i>	USA	PVY <sup>0</sup>	PVY <sup>05</sup>	PVY <sup>05</sup>	HQ912862
ID883	<i>S. tuberosum</i>	USA	PVY <sup>0</sup>	PVY <sup>0</sup>		HQ912894
ID968	<i>S. tuberosum</i>	USA	PVY <sup>0</sup>	PVY <sup>0</sup>	PVY <sup>05</sup>	HQ912886
ID988	<i>S. tuberosum</i>	USA	PVY <sup>0</sup>	PVY <sup>0</sup>	PVY <sup>05</sup>	HQ912883
L26	<i>S. tuberosum</i>	USA	PVY <sup>0</sup>	PVY <sup>05</sup>	PVY <sup>05</sup> -NTN	FJ204164
LR	<i>S. tuberosum</i>	USA	PVY <sup>0</sup>	PVY <sup>05</sup>		HQ912896
ME120	<i>S. tuberosum</i>	USA	PVY <sup>0</sup>	PVY <sup>0</sup>		HQ912892
ME131	<i>S. tuberosum</i>	USA	PVY <sup>0</sup>	PVY <sup>05</sup>	PVY <sup>05</sup>	HQ912874
ME142	<i>S. tuberosum</i>	USA	PVY <sup>0</sup>	PVY <sup>05</sup>	PVY <sup>05</sup>	HQ912871
ME162	<i>S. tuberosum</i>	USA	PVY <sup>0</sup>	PVY <sup>05</sup>	PVY <sup>05</sup>	HQ912872
ME173	Unknown	USA	PVY <sup>0</sup>	PVY <sup>0</sup>	PVY <sup>05</sup>	FJ643479
ME178	<i>S. tuberosum</i>	USA	PVY <sup>0</sup>	PVY <sup>0</sup>	PVY <sup>05</sup>	HQ912875
ME200	<i>S. tuberosum</i>	USA	PVY <sup>0</sup>	PVY <sup>0</sup>		HQ912889
ME227	<i>S. tuberosum</i>	USA	PVY <sup>0</sup>	PVY <sup>0</sup>	PVY <sup>05</sup>	HQ912877
ME236-4	<i>S. tuberosum</i>	USA	PVY <sup>0</sup>	PVY <sup>0</sup>		HQ912891
ME236-77	<i>S. tuberosum</i>	USA	PVY <sup>0</sup>	PVY <sup>0</sup>	PVY <sup>05</sup>	HQ912873
ME27	<i>S. tuberosum</i>	USA	PVY <sup>0</sup>	PVY <sup>0</sup>	PVY <sup>05</sup>	HQ912878
ME286-58	<i>S. tuberosum</i>	USA	PVY <sup>0</sup>	PVY <sup>0</sup>	PVY <sup>05</sup>	HQ912884
ME56	Unknown	USA	PVY <sup>0</sup>	PVY <sup>0</sup>	PVY <sup>05</sup>	FJ643478
ME89-107	<i>S. tuberosum</i>	USA	PVY <sup>0</sup>	PVY <sup>0</sup>	PVY <sup>05</sup>	HQ912876
M <sup>N</sup>	<i>N. tabacum</i>	USA	Unknown			AF463399
Mont	<i>S. tuberosum</i>	USA	PVY <sup>0</sup>	PVY <sup>0</sup>		AY884983
N-Jg	<i>S. tuberosum</i>	Canada	PVY <sup>0</sup>	PVY <sup>0</sup>		AY166867
N1	<i>S. tuberosum</i>	USA	PVY <sup>0</sup>	PVY <sup>05</sup>		HQ912863
N3	<i>S. tuberosum</i>	USA	PVY <sup>0</sup>	PVY <sup>05</sup>		HQ912868
N4	<i>S. tuberosum</i>	USA	PVY <sup>0</sup>	PVY <sup>05</sup>		FJ204165
N:O L56	<i>S. tuberosum</i>	Canada	PVY <sup>0</sup>	PVY <sup>05</sup>	PVY <sup>05</sup>	AY745492
N:O Mb112	<i>S. tuberosum</i>	Canada	PVY <sup>0</sup>	PVY <sup>05</sup>	PVY <sup>05</sup>	AY745491
NC57	<i>N. tabacum</i>	USA	Unknown			DQ309028
NE-11	<i>S. tuberosum</i>	USA	PVY <sup>0</sup>	PVY <sup>05</sup>		DQ157180
O-139	<i>S. tuberosum</i>	Canada	PVY <sup>0</sup>	PVY <sup>0</sup>		U09509
OR-1	<i>S. tuberosum</i>	USA	PVY <sup>0</sup>	PVY <sup>05</sup>	PVY <sup>05</sup>	DQ157179
Oz	<i>S. tuberosum</i>	USA	PVY <sup>0</sup>	PVY <sup>0</sup>		EF026074
PB209	Unknown	USA	PVY <sup>0</sup>	PVY <sup>05</sup>	PVY <sup>05</sup>	EF026076
PB312	Unknown	USA	PVY <sup>0</sup>	PVY <sup>05</sup>		EF026075
PN10A	Unknown	USA	Unknown			DQ008213
RB	<i>S. tuberosum</i>	Canada	PVY <sup>0</sup>	PVY <sup>0</sup>		HM367076
RRA-1	<i>S. tuberosum</i>	USA	PVY <sup>0</sup>	PVY <sup>05</sup>	PVY <sup>05</sup> -NTN	AY884984
Tu660	<i>S. tuberosum</i>	Canada	PVY <sup>0</sup>	PVY <sup>05</sup>		AY166866
Others (7 isolates)						
AGA <sup>4</sup>	<i>S. tuberosum</i>	Brazil	PVY <sup>0</sup>	PVY <sup>0</sup>		JF928459
AST	<i>S. tuberosum</i>	Brazil	PVY <sup>0</sup>	PVY <sup>05</sup>		JF928460
Chile3	<i>Capsicum baccatum</i>	Chile	Unknown			FJ214726
Egypt	Unknown	Egypt	PVY <sup>0</sup>	PVY <sup>0</sup>		AF522296
MON <sup>4</sup>	<i>S. tuberosum</i>	Brazil	PVY <sup>0</sup>	PVY <sup>0</sup>		JF928458
NZ	<i>S. tuberosum</i>	New Zealand	PVY <sup>0</sup>	PVY <sup>0</sup>		AM268435
Patent	Unknown	Unknown	Unknown			A08776



を用いて塩基配列中に挿入し、BioEdit ver. 5.0.9 を用いてギャップが認められた領域を除いた。5' UTR と P1 あるいは 3' UTR と CP タンパク質翻訳領域の間での組換え部位を検索するために、それぞれの分離株のポリタンパク質翻訳領域に 5' および 3' UTR 配列を結合した。その結果、塩基配列は RT-PCR 時の 5' 末端側のプライマー 27 塩基を除いた 9570 塩基で構成された。それらの塩基配列を結合して得られた配列を RDP3<sup>54)</sup> ソフトウェアに統合されている組換え検出プログラムである RDP<sup>53)</sup>、GENECONV<sup>82)</sup>、BOOTSCAN<sup>80)</sup>、MAXCHI<sup>55)</sup>、CHIMAERA<sup>76)</sup> および SISCAN プログラム<sup>19)</sup> を用いて解析した。それら組換え検出プログラムは基礎となるアルゴリズムにより、3 グループに分類することができる。BOOTSCAN<sup>80)</sup>、RDP<sup>53)</sup> および SISCAN<sup>19)</sup> プログラムは系統学的方法、GENECONV<sup>82)</sup>、MAXCHI<sup>55)</sup> および CHIMAERA<sup>76)</sup> プログラムは置換法、PHYLPRO<sup>105)</sup> プログラムは距離法に分類される。組換え部位解析の結果、3 種の異なる方法での *P* 値が  $1 \times 10^{-6}$  以下の値を示した場合には、「明瞭な」組換え部位と判断した。組換えの可能性のある部位については全て、原版の SISCAN version 2<sup>18)</sup> を用いて再度組換え部位の検索を行った。

#### 1) 分子系統学的解析

本邦の PVY 分離株と海外の PVY 分離株の分子系統学的な関係について 2 種類の方法により調査した。PhyML ver. 2.4.4<sup>24)</sup> における最尤法 (Maximum likelihood method; ML 法) および PHYLIP ver. 3.5<sup>15)</sup> における近隣結合法 (Neighbour-joining; NJ 法) を用いて分子系統樹を作成した。組換え部位解析の結果、ポリタンパク質翻訳領域内に組換え部位が検出されなかった合計 85 の PVY 分離株と外群として PepSMV の 1 分離株<sup>1)</sup> の塩基配列を用いて前述の Clustal X2 と TRANSALIGN ver. 1.0 を用いてアライメントを行った。得られた塩基配列は 9165 塩基で構成された。ML 法では得られた塩基配列について、jModelTest ver. 0.1.1<sup>77)</sup> を用いて最適なモデルを調べ、最適なモデルの GTR +  $\Gamma_4$  モデルにより分子系統樹を作成した。ML 系統樹におけるブートストラップ値は 100 もしくは 1000 ブートストラップサンプリングにより算出した。NJ 法では DNADIST において Kimura's two-parameter option<sup>38)</sup> を用いて距離マトリックスを作成し、近隣結合法により分子系統樹を作成

した。NJ 系統樹におけるブートストラップ値は SEQBOOT<sup>15)</sup> を用いて 1000 ブートストラップサンプリングにより算出した。それぞれの方法によって作成した系統樹は TREEVIEW<sup>73)</sup> を用いて表示した。

#### 2) 結果

分子系統学的解析結果より構成されたゲノム型グループ集団あるいは分離株の分離地域により構成された集団について、各集団内および集団間の塩基配列およびアミノ酸配列の類似性 (遺伝子類似性)、各集団内の塩基配列およびハプロタイプの多様性 (遺伝的多様性) を解析した。遺伝子類似性については、Kimura two-parameter method<sup>38)</sup> および Dayhoff PAM 250 matrix<sup>11)</sup> を用いて MEGA ver. 5<sup>94)</sup> により解析した。塩基配列の遺伝的多様性は Kimura two-parameter method<sup>38)</sup> を用いて、MEGA ver. 5<sup>94)</sup> により解析した。ハプロタイプの多様性は、DNASP ver. 5<sup>49)</sup> を用いて集団におけるハプロタイプの数と頻度により解析した。

#### 2) 結果

##### (1) 本邦産分離株の生物学的性質および分子的性状

本研究では国内の主なジャガイモ栽培地域である九州地方から 7 分離株、本州地方から 5 分離株、沖縄地方から 1 分離株および北海道地方から 5 分離株、採集地域が不明な 3 分離株、合計 20 分離株を用いて調査した。それらのうち 10 株は PVY<sup>0</sup> 系統分離株であり、残りの 10 株は PVY<sup>N</sup> 系統あるいは PVY<sup>NTN</sup> 系統分離株であった。PVY<sup>0</sup> 系統分離株について、*C. amaranticolor* を用いてタバコ (品種; Xanthi nc) に単一病斑分離後に病徴を観察した結果、いずれの分離株もモザイクおよび葉脈透過症状を示した。病徴を示したタバコについて DAS-ELISA により PVY 感染を調査した結果、陽性反応を示したことから、これらの病徴は PVY<sup>0</sup> 系統分離株の感染によるものであると判断した。一方 PVY<sup>N</sup> 系統あるいは PVY<sup>NTN</sup> 系統分離株は、ジャガイモ (品種; 根系 59 号) を用いてタバコに単一病斑分離後に病徴を観察した結果、葉脈透過および葉脈えそ症状を示した。PVY<sup>0</sup> 系統分離株と同様に病徴を示したタバコについて DAS-ELISA により PVY 感染を調査した結果、病徴を示す株は陽性反応を示した。供試した PVY<sup>0</sup>、PVY<sup>N</sup> および PVY<sup>NTN</sup> 系統分離株は、いずれも既報の分離株と同様にタバコに

において各系統の典型的な症状を示した (Table 3).

上記の 20 分離株の全塩基配列を解析した. 本邦産 PVY<sup>0</sup> 系統分離株 (0A021, 0A022, 0<sub>h</sub>, 0H037, OKUM4, ONGI3, ONGOB6, OUNKA3, OUNKG および OUNKS) の 5' 末端側のプライマー27 塩基を除いた全塩基数は, 全て 9672 塩基であった. PVY<sup>N</sup> および PVY<sup>NTM</sup> 系統分離株では分離株によって全塩基数は異なっており, NTNKGAM2, NTNTK1 および T<sub>13</sub> は 9676 塩基, NTNHIR3 は 9682 塩基, それら以外の分離株は 9674 塩基であった. 組換え解析, 分子系統解析および塩基多様度解析は, 5' 末端側のプライマー27 塩基の配列を除いて解析した.

本研究において本邦産 PVY 分離株の P1, HC-Pro, P3, PIP0, 6K1, CI, 6K2, VPg, NIa-Pro, NIb および CP タンパク質遺伝子の塩基配列を解析した結果, 各遺伝子の塩基配列は, それぞれ 852, 1368, 1095, 228, 156, 1902, 156, 564, 732, 1557 および 801 塩基であった. 本研究に用いた分離株においても, 既報の他のポティウイルス属のウイルスにおいて報告されているモチーフが認められた. 解析した本邦産 PVY 分離株の塩基配列は DDBJ, EMBL および GenBank データベースに登録した (アクセッション番号 AB711143-AB711155, AB714134-AB714135).

## (2) 組換え部位解析

本邦産 20 分離株と既に GenBank に登録されている合計 129 の PVY 分離株, 合計 149 分離株の全ゲノム構造のデータを用いて組換え部位の解析を行った. 組換え部位解析については, 塩基配列だけではなく同義置換部位および非同義置換部位をそれぞれ分けて調査するために, 最初に 5' および 3' UTR の配列を全塩基配列から除いたポリタンパク質翻訳領域を用いて行った. ポリタンパク質翻訳領域の塩基配列からギャップを除いた後, RDP3 によって組換え部位を検索した. 組換え部位として検出された分離株の塩基部位については, それぞれ RDP3 により親型と評価された分離株との関係を組換え検出プログラムの中で系統学的手法である SISCAN version 2 によって再度確認した. また, ポリタンパク質翻訳領域での解析により検出された組換え部位については, 5' および 3' UTR 領域の配列をアライメントした後, ポリタンパク質翻訳領域配列と結合させ, 全塩基配列として再度評価した.

各組換え検出プログラムによって支持された本邦産分離株の組換え部位を Table 4 に示した. SISCAN version 2 を用いて解析した NTNHIR3 分離株の結果を一例として Fig. 7 に示し, それらをまとめた組換え体型を Fig. 8 に示した. 全ての本邦産 PVY<sup>0</sup> 系統分離株のゲノムには  $P$  値が  $1 \times 10^{-6}$  以下の明瞭な組換え部位は検出されず, それらの分離株は組換え体ではないと考えられた. PVY<sup>NTM</sup> 系統分離株のなかで, NTNHIR3, NTNKGAM2 および NTNTK1 分離株については, おおよそ HC-Pro と P3 タンパク質遺伝子間の塩基部位 2416, VPg タンパク質遺伝子内の N 末端側の塩基部位 5826 および CP タンパク質遺伝子内の C 末端側の塩基部位 9176 にそれぞれ 1 ヶ所, 合計 3 ヶ所に組換え部位が認められた. 例えば NTNHIR3 分離株の塩基部位 2416 では RDP ( $1.712 \times 10^{-169}$ ), GENCONV ( $3.953 \times 10^{-163}$ ), BOOTSCAN ( $2.813 \times 10^{-163}$ ), MAXCHI ( $7.660 \times 10^{-51}$ ), CHIMAERA ( $6.128 \times 10^{-35}$ ), SISCAN ( $6.125 \times 10^{-57}$ ) により組換え部位が支持されていた (Table 5). 他の 2 ヶ所についても, ほとんどのプログラムにより  $10^{-6}$  以下の  $P$  値を示し, 支持されていた (Table 4). さらに, SISCAN version 2 で組換え解析を行ったところ, NTNHIR3 分離株ゲノムでは CH-605 分離株 (N リネージ) と ME173 分離株 (O リネージ) の塩基配列が親型様の塩基配列として示され, それらの塩基配列の  $Z$  値が 3 以上であったことから, RDP3 の解析結果と同様に組換え部位は支持されていた (Table 4, Fig. 7, 8). これらの 3 ヶ所の組換え部位は, 同様に NTNKGAM2 および NTNTK1 分離株のゲノム内において  $10^{-6}$  以下の  $P$  値を示し, 支持されていた. ほぼ同じ位置に組換え部位が検出されたこれら 3 分離株は, O リネージと N リネージの異なるリネージの分離株が親型として検出されたことから, これらは明瞭なリネージ間組換え体と考えられた. 一方, これら 3 分離株以外の PVY<sup>NTM</sup> 系統分離株 (NTND6, NTNHO90, NTNKGAM1, NTNNN99, NTNOK105 および NTNON92) のゲノム内には, 明瞭な組換え部位が検出されなかった. PVY<sup>N</sup> 系統の T<sub>13</sub> 分離株については, CP タンパク質遺伝子内の塩基部位 9140 に組換え部位が認められ, RDP ( $2.008 \times 10^{-81}$ ), GENCONV ( $6.469 \times 10^{-81}$ ), BOOTSCAN ( $7.115 \times 10^{-83}$ ), MAXCHI ( $2.503 \times 10^{-14}$ ), CHIMAERA ( $4.557 \times 10^{-5}$ ), SISCAN ( $4.290 \times 10^{-20}$ ) により組換え部位が支持

Table 4. Recombination sites in the *Potato virus Y* genomes detected by recombination detection programs

Recombinant	Gene and recombination site <sup>a</sup>		Parental isolate	Parental sublineage <sup>b</sup>	Programs detected by <sup>c</sup>	<i>P</i> -value <sup>d</sup>	<i>Z</i> -value <sup>e</sup>
	Gene	Site					
NTNHIR3	HC-Pro/P3	nt 2416	CH-605 x ME173	N-1 x 0-3	<u>RGBMCS<sub>R</sub>S<sub>0</sub></u>	1.712 x 10 <sup>-169</sup>	9.06
	VPg	nt 5826	ME173 x CH-605	0-3 x N-1	<u>RGBMCS<sub>R</sub>S<sub>0</sub></u>	1.712 x 10 <sup>-169</sup>	8.58
	CP	nt 9176	CH-605 x CW	N-1 x 0-2	<u>RGBMS<sub>R</sub>S<sub>0</sub></u>	6.311 x 10 <sup>-58</sup>	8.09
NTNKGAM2	HC-Pro/P3	nt 2416	CH-605 x ME173	N-1 x 0-3	<u>RGBMCS<sub>R</sub>S<sub>0</sub></u>	2.015 x 10 <sup>-164</sup>	8.76
	VPg	nt 5826	ME173 x CH-605	0-3 x N-1	<u>RGBMCS<sub>R</sub>S<sub>0</sub></u>	2.015 x 10 <sup>-164</sup>	8.58
	CP	nt 9176	CH-605 x CW	N-1 x 0-2	<u>RGBMS<sub>R</sub>S<sub>0</sub></u>	4.914 x 10 <sup>-61</sup>	8.09
NTNTK1	HC-Pro/P3	nt 2416	CH-605 x ME173	N-1 x 0-3	<u>RGBMCS<sub>R</sub>S<sub>0</sub></u>	2.033 x 10 <sup>-166</sup>	8.76
	VPg	nt 5826	ME173 x CH-605	0-3 x N-1	<u>RGBMCS<sub>R</sub>S<sub>0</sub></u>	2.033 x 10 <sup>-166</sup>	8.58
	CP	nt 9176	CH-605 x CW	N-1 x 0-2	<u>RGBMS<sub>R</sub>S<sub>0</sub></u>	1.107 x 10 <sup>-60</sup>	8.09
T <sub>13</sub>	CP	nt 9140	RRA-1 x C02122	N-2 x 0-3	<u>RGBMS<sub>R</sub>S<sub>0</sub></u>	7.115 x 10 <sup>-83</sup>	8.09

<sup>a</sup> Recombination sites detected in the PVY genomes by the recombination-detecting programs, from the aligned sequences of the likely recombinant and its 'parental isolates'. The nucleotide position shows locations of individual genes numbered as in Ditta genome.

<sup>b</sup> Parental sublineage estimated from the comparison using non-recombinant sequences. For details of the sublineages of the isolates, see Fig. 9.

<sup>c</sup> Recombinant isolates identified by the recombination detecting programs: R (RDP), G (GENECONV), B (BOOTSCAN), M (MAXCHI), C (CHIMAERA) and S<sub>R</sub> (SISCAN) programs in RDP3 software (programs greater than *P*-values 1.0 x 10<sup>-6</sup> are listed), and S<sub>0</sub> (SISCAN total nucleotide site analysis) in original SISCAN version 2 software. The analyses done using default settings and a Bonferroni-corrected *P*-values cut-off of 0.01 in RDP3 software.

<sup>d</sup> The reported *P*-value is for the program in bold type and underlined in RDP3, and is the greatest *P*-value among the isolates calculated for the region in question.

<sup>e</sup> One of the parents of the recombination sites had *Z*-values greater than three in an analysis of all nucleotide sites in S<sub>R</sub> of the RDP3 program; thus, lower *Z*-values of one of the parents identified in S<sub>0</sub> of the SISCAN version 2 software are shown.

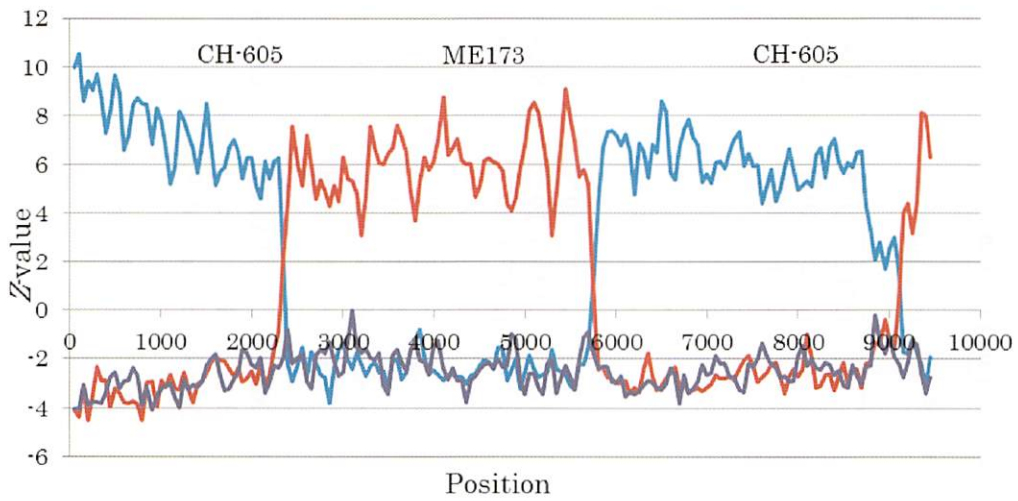


Fig. 7. Graphs showing SISCAN version 2 analysis of the sequence of NTNHIR3 isolate with that of CH-605 (blue line) and that of ME173 (red line). For the graph each window comparison involved sub-sequences of 50nts with a step between window positions of 100nts. Accession numbers of nucleotide sequences of CH-605 and ME173 isolates in GenBank are X97895 and FJ643479, respectively.

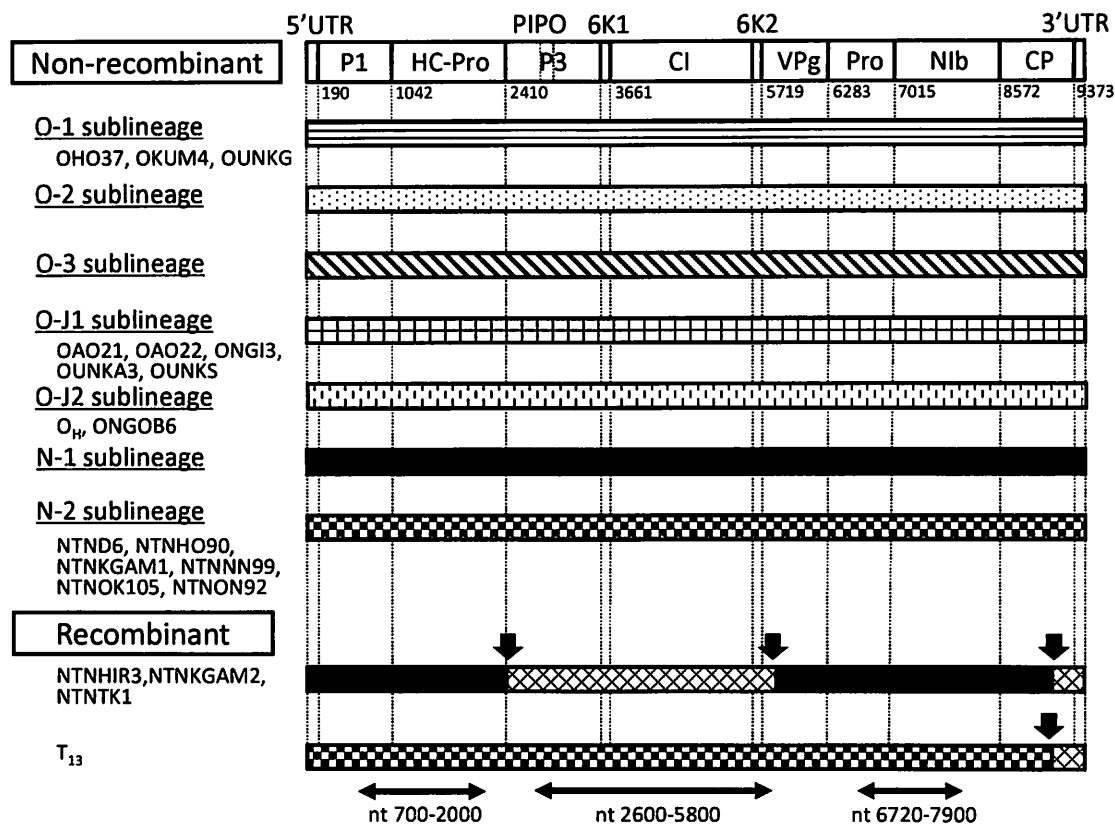


Fig. 8. Recombination maps of *Potato virus Y* genomes of Japanese isolates; the estimated nucleotide positions of the recombination sites are shown relative to the 5' end of the genome using numbering of the sequence of the Ditta isolate. The vertical arrows show approximate recombination sites and the site positions were estimated from data analyzed using the PHYLPRO, SISCAN Version 2 programs and also RDP 3 software. The horizontal arrows show the regions used to construct trees from non-recombinant sequences (Fig. 11). The Japanese isolates, NTNHIR3, NTNKGAM2 and NTNTK1, fell into an independent O-NTN sublineage in nt 2600-5800 phylogenetic tree and clustered with European and American recombinant isolates (Fig. 11b). Although the O-3 sublineage sequences were found as parental sequences in the regions of nt 2416-5826 by RDP3 software when we only used non-recombinant sequences (Table 4), we were unable to identify which sublineage is closer to the O-NTN sublineage in O lineage in this study. Similarly, we were unable to identify which sublineages are closer to the C-terminal region of coat protein genes of NTNHIR3, NTNKGAM2, NTNTK1 and T<sub>13</sub> isolates in O lineage.

されていた (Table 4, Fig. 8). この結果は既報<sup>78)</sup>において示された結果と一致していた. 他の海外産分離株において認められた組換え部位は, 以前の報告<sup>29), 51)</sup>において認められた部位と同じであった.

### (3) 分子系統解析

組換え解析において組換え体と同定された分離株も含めた合計 149 分離株のポリタンパク質の塩基配列データを用いて分子系統樹を作成した. しかしながら, 作成された分子系統樹は以前の報告<sup>68), 70)</sup>と系統的に一致せず, 主要なリネージが低いブートストラップ値で支持された. リネージ間組換え体を含めて分子系統解析を行った際にこれらの矛盾が認められることが報告されており<sup>97)</sup>, リネージ間組換え体を除いた 85 分離株のデータを用いて, ML および NJ 法により再度分子系統関係を解析した. 上記の方法で作成した分子系統樹はいずれも同様の位相を示したため, ML 法により作成した分子系統樹のみを Fig. 9 に示し, NJ 法の解析結果はブートストラップ値のみを ML 系統樹の枝上に示した. それらの系統樹は, 以前に報告された N, C および O リネージの主要な 3 リネージ<sup>29), 36), 51), 68)</sup>を形成した. O リネージはさらに 6 サブリネージを形成した. 本邦産 PVY<sup>0</sup> 系統分離株である OH037, OKUM4 および OUNKG 分離株は, 北米およびイギリスの ME120, ME236-4 および SASA-110 分離株とともに O-1 サブリネージを形成し, 高いブートストラップ値で支持されていた. 他の本邦産 PVY<sup>0</sup> 系統分離株については, 本邦産分離株のみで形成された O-J1 および O-J2 サブリネージに分類された. 以上のように本邦産 PVY<sup>0</sup> 系統分離株集団は, 非組換え体により少なくとも 3 サブリネージを形成した. 一方 N リネージは, 非組換え体により 2 サブリネージ, N-1 および N-2 サブリネージを形成した<sup>64)</sup>.

以上の結果を確認するため, 組換え部位がほとんど検出されなかった 3 ゲノム領域, 塩基部位 700-2000, 塩基部位 2600-5800 および塩基部位 6720-7900 について, 合計 147 分離株の塩基配列データを用いて分子系統樹を作成した (Fig. 10). 組換え解析に用いた 149 分離株のうち 2 分離株, Nicola および SD-1 分離株はそれぞれ塩基部位 3389 および 7042 に組換え部位が検出されたため, 分子系統解析には使用しなかった. 3 ゲノム領域

の分子系統樹全てにおいて C リネージは 1 集団から形成され, N リネージは明瞭に 2 サブリネージを形成し, それらはそれぞれ高いブートストラップ値により支持されていた. 多くのヨーロッパ産分離株 (Ditta, Linda, NIB-NTN, Satina, Thole および v942490), 北米産分離株 (423-3, HR-1, ID155, L26, N4 および PB312) および本邦産分離株 (NTNHIR3, NTNKGAM2 および NTNTK1) は, P1 の中央から HC-Pro タンパク質遺伝子領域に相当する塩基部位 700-2000 は N リネージに属し (Figs 10a), P3 タンパク質遺伝子の N 末端から VPg タンパク質遺伝子領域に相当する塩基部位 2600-5800 は O リネージに属していた (Fig. 10b). また, ヨーロッパ, 北米およびニュージーランド産の非組換え体の PVY<sup>N</sup> 系統分離株は, N-1 サブリネージに属し, 本邦, 北米およびイギリス産の非組換え体の PVY<sup>N</sup> あるいは PVY<sup>TM</sup> 系統分離株は, 3 ゲノム領域全てで N-2 サブリネージに属していた (Fig. 10). 塩基部位 700-2000 を用いた分子系統樹 (Fig. 10a) において, O リネージは 7 サブリネージ (O-05, O-1, O-2, O-3, O-4, O-J1 および O-J2) を形成し, 塩基部位 2600-5800 の系統樹では既報<sup>36)</sup>と同様にさらに 3 サブリネージ (O-N-Wi, O-N:O および O-NTN) を形成した (Fig. 12b). O-2, O-3, O-N-Wi および O-N:O サブリネージの属していた分離株は, 塩基部位 6720-7900 の系統樹では 1 集団として分類された (Fig. 10c). 全ての本邦産 PVY<sup>0</sup> 系統分離株は, O-1, O-J1 および O-J2 サブリネージに分類され, それらはおそらく独自の祖先に由来するものであると考えられた. 本邦産 PVY<sup>0</sup> 系統分離株のなかで OH037, OKUM4 および OUNKG 分離株は, 北米およびイギリスの ME120, ME236-4 および SASA-110 分離株と共に, 3 ゲノム領域の系統樹全てにおいて O-1 サブリネージに属した.

### (4) 遺伝的類似性および多様性解析

分子系統解析結果より分類された C, O および N 各リネージ内の分離株間の遺伝子類似性について, 塩基配列では Kimura two-parameter method<sup>38)</sup>を用いて, アミノ酸配列では Dayhoff PAM 250 matrix<sup>11)</sup>をそれぞれ用いて算出した. リネージ内遺伝子類似性は, リネージに属する分離株間の全ての対での遺伝的距離の相加平均値である. O リネージに属する分離株間の類似度は, 塩基配列で

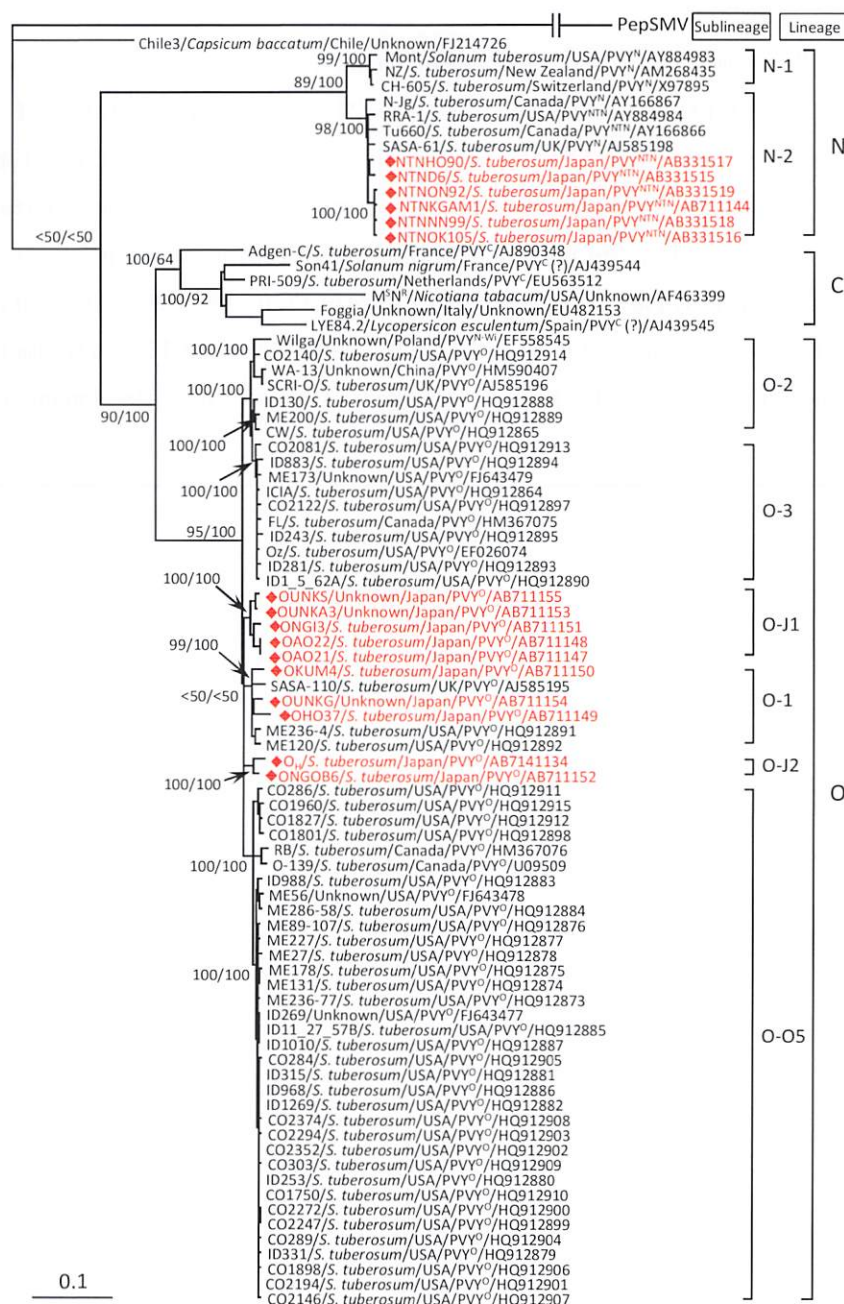
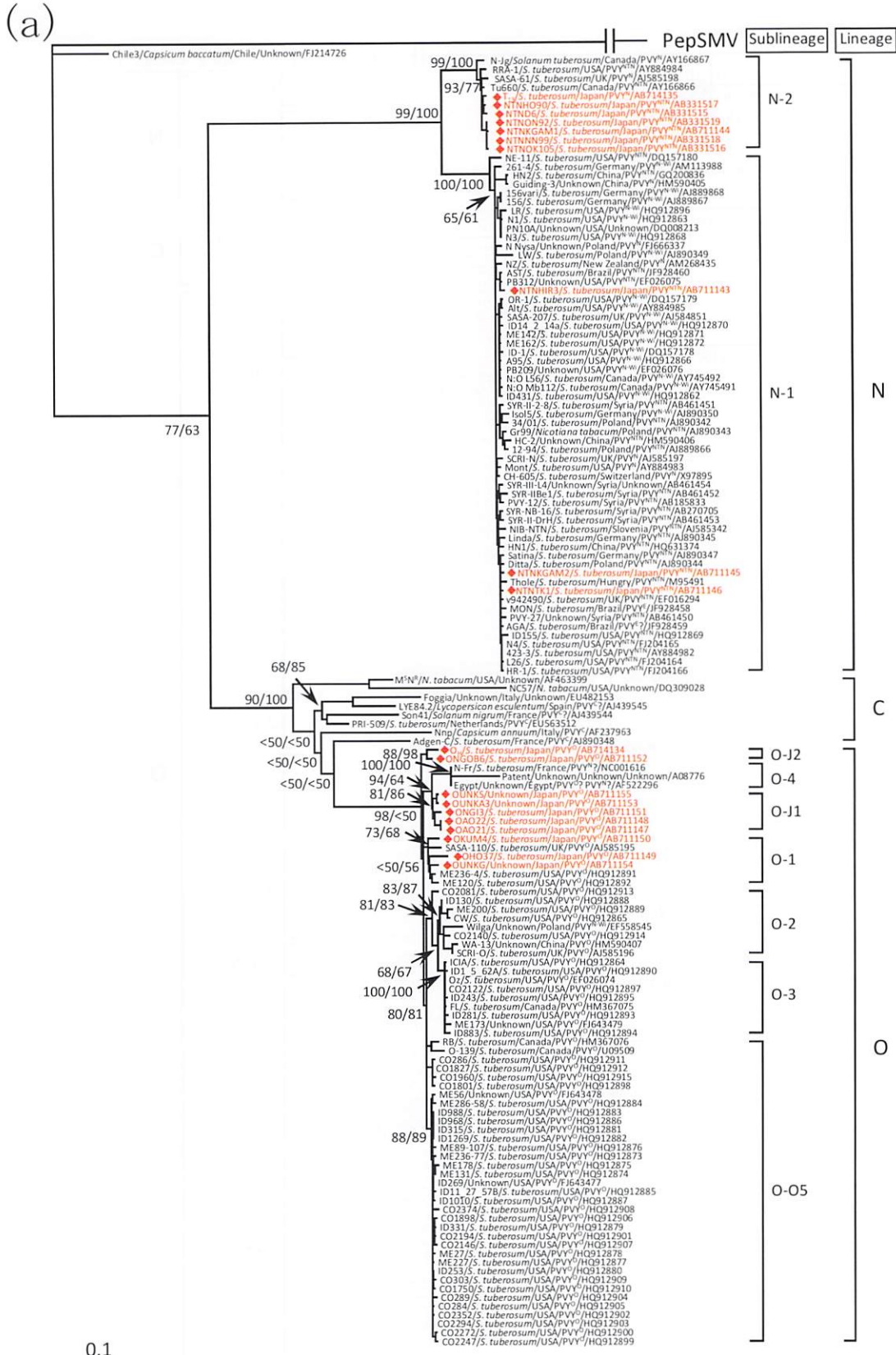


Fig. 9. Maximum-likelihood tree calculated from the polyprotein sequences of 85 isolates of *Potato virus Y* discarding recombinants identified in this study. Numbers at each node indicate the percentage of supporting puzzling steps (or bootstrap samples) in maximum-likelihood and neighbour-joining trees. Horizontal branch length is drawn to scale with the bar indicating 0.1 nt replacements per site. The homologous sequences of an isolate of *Pepper severe mosaic virus* (PepSMV) was used as the outgroup. Two sublineages N-1 and N-2 have been called N-Europe and N-North America sublineages in earlier studies. Isolate Wilga (GenBank Accession Code EF558545) originated in Poland and passaged for 30 years. This isolate was described as serotype 0 and PVY<sup>N-wi</sup> strain. Isolates with (red) diamond indicate Japanese isolates.

Fig. 10. Maximum-likelihood trees calculated from the partial genomic sequences: (a) nt 700-2000 (b) nt 2600-5800 and (c) nt 6720-7900 of 147 isolates of *Potato virus Y*. Numbers at each node indicate the percentage of supporting puzzling steps (or bootstrap samples) in maximum-likelihood and neighbour-joining trees. Horizontal branch length is drawn to scale with the bar indicating 0.1 nt replacements per site. The homologous sequences of an isolate of *Pepper severe mosaic virus* (PepSMV) was used as the outgroup. Two sublineages N-1 and N-2 have been called as N-Europe and N-North America sublineages in the earlier studies. Isolates with (red) diamond indicate Japanese isolates.

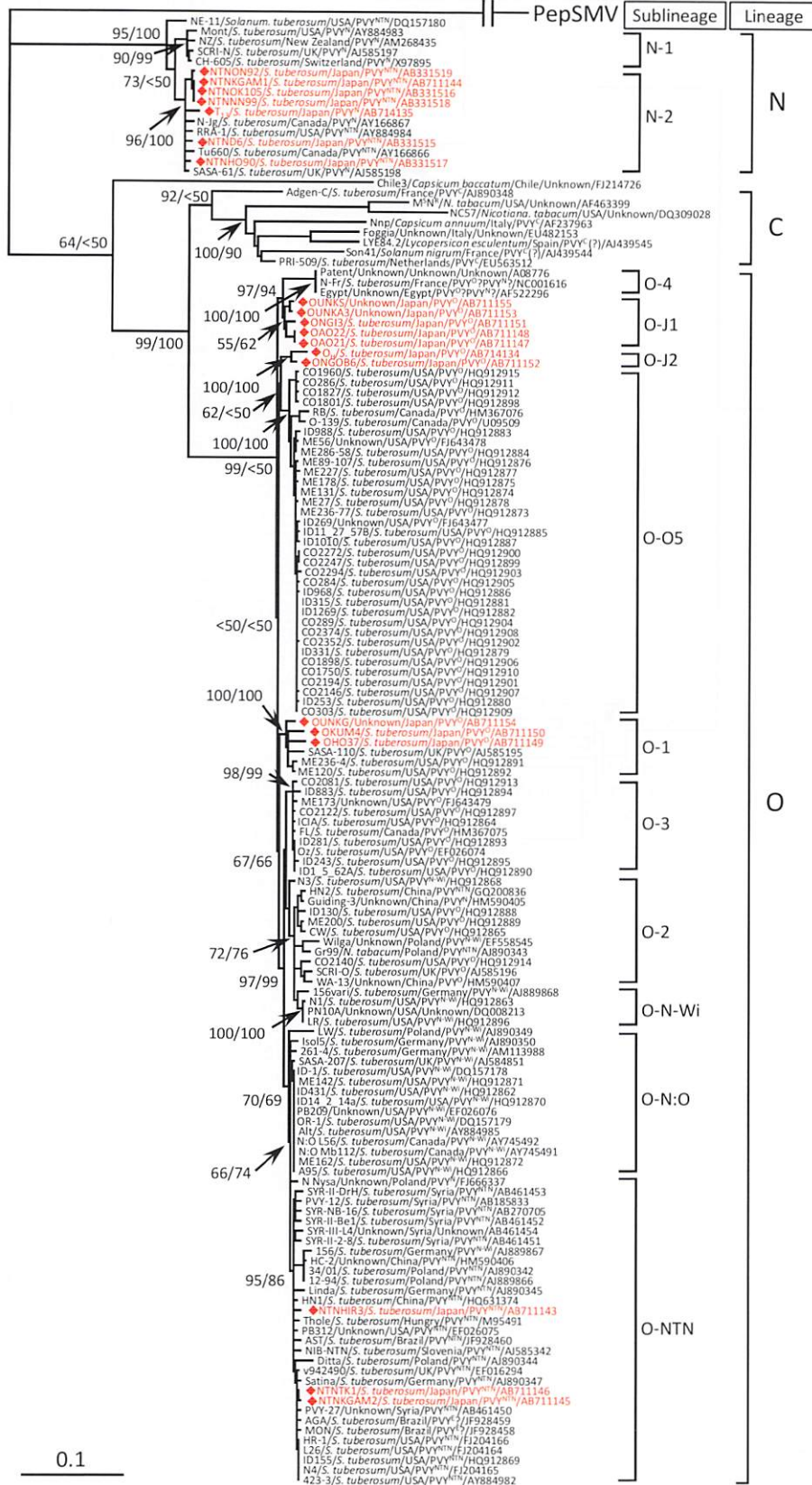




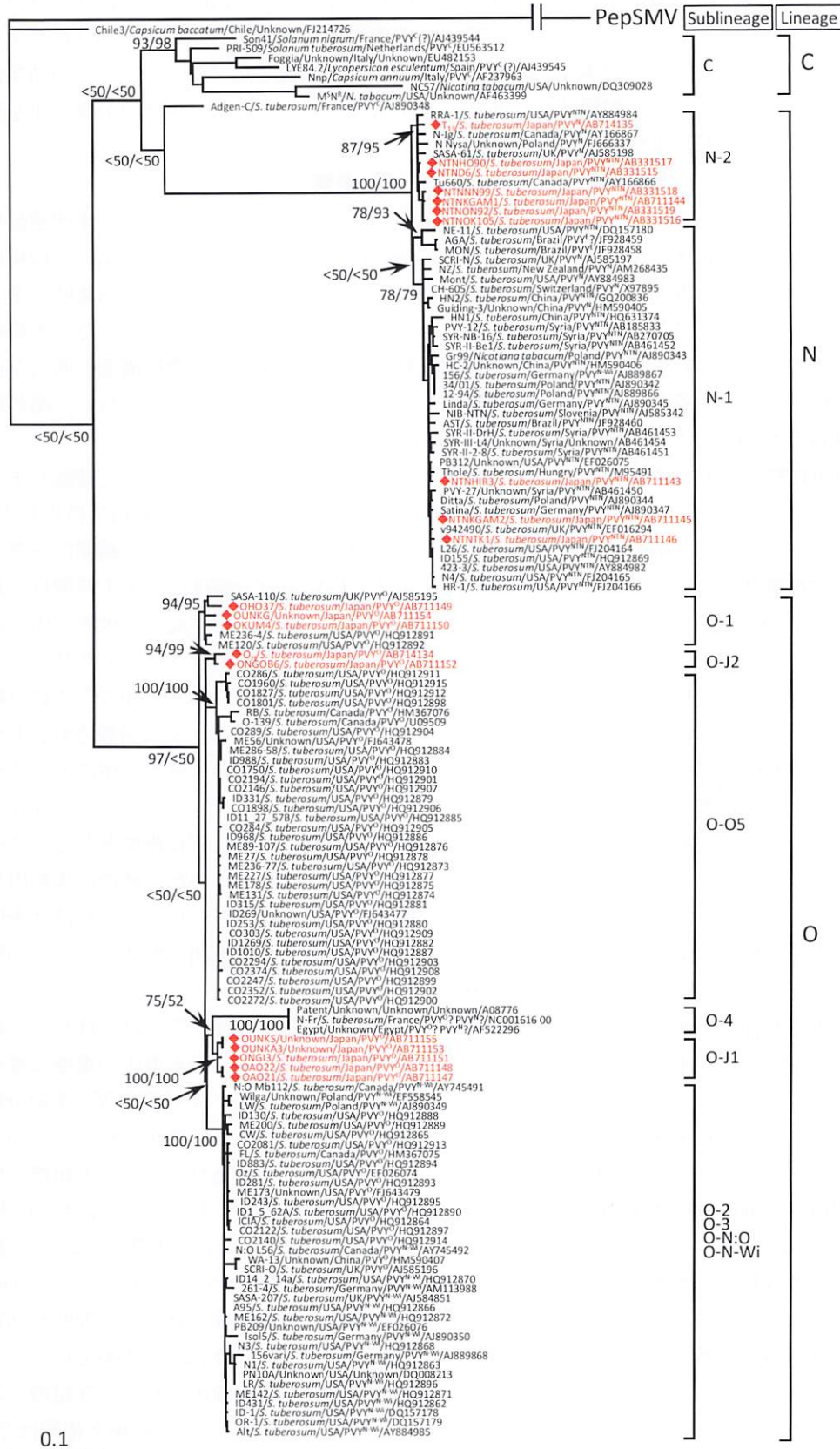


0.1

(b)



(c)



は0.01931 (標準誤差  $\pm 0.00079$ ), アミノ酸配列では0.01077 ( $\pm 0.00097$ )であった。一方, Nリネージに属する分離株間の類似度は, 塩基配列では0.01923 ( $\pm 0.00072$ ), アミノ酸配列では0.01097 ( $\pm 0.00109$ )であった。対照的にCリネージに属する分離株間の類似度は, 塩基配列では0.09791 ( $\pm 0.00237$ ), アミノ酸配列では0.04682 ( $\pm 0.00273$ )であった。0およびNリネージ内の各類似度の数値はわずかに違っていたが, Cリネージ内での類似度の数値は0およびNリネージ内の値よりも大きかった。サブリネージ間の塩基配列およびアミノ酸配列について遺伝子類似度を算出した結果, 0リネージの各サブリネージ間の類似度は0.01465-0.02863であったのに対し, Nリネージでは0.03797となり, 両リネージで数値に差が認められた (Table 5)。

アジア, ヨーロッパおよび北米産のPVY<sup>0</sup>系統グループの各分離株集団について, 塩基配列の遺伝的多様性を Kimura two-parameter method<sup>38)</sup>を用いて, ハプロタイプの多様性を DNASP ver. 5<sup>49)</sup>を用いてそれぞれ算出し, 比較した (Table 6)。塩基部位 700-2000 を用いた各サブ集団内の塩基多様度 (アジア : 0.04500, ヨーロッパ : 0.06505, 北米 : 0.02364) は, 塩基部位 2600-5800 を用いた数値 (アジア : 0.09946, ヨーロッパ : 0.06302, 北米 : 0.06896) と比較した結果, 両者間の差はわずかであった。このことは, これらの遺伝子領域の各地域間での遺伝的相違は小さいことを示唆していた。対照的に塩基部位 6720-7900の各地域でのサブ集団内の塩基多様度の数値は, アジア (0.01488) と比較してヨーロッパ (0.10330) および北米 (0.10330) は明らかに大きな数値を示し, この遺伝子領域では地域間で遺伝的相違があることが認められた。PVY<sup>0</sup>系統グループでは, 塩基部位 700-2000, 塩基部位 2600-5800 および塩基部位 6720-7900 の3遺伝子領域全てにおいて本邦産分離株集団の数値は, 北米産 (主にアメリカ産) よりも大きな数値を示したが, 解析に用いた本邦産分離株の数は北米産よりも少なかったため, 判然としなかった。ポリタンパク質翻訳領域を用いて塩基多様度を算出した場合も同様の結果が得られた。以上のような遺伝的な相違は, 本邦産PVY<sup>0</sup>系統分離株が2グループ (0-J1および0-J2 サブリネージ) に分けられることの原因と

なっていることを示唆していた (Fig. 9)。さらにPVYの各リネージ内のアジア, ヨーロッパおよび北米産分離株集団について, ハプロタイプと塩基多様度を比較した (Table 7)。その結果は, 分子系統樹における各サブ集団の分類結果を反映していた。

### 3) 考察

これまで本邦のPVY分離株の集団遺伝構造については, ゲノムの一部領域を用いた解析は行われていたが, 複数の分離株による集団の全ゲノムを用いた解析は行われていなかった。本研究では本邦のPVY分離株の集団遺伝構造を明らかにすることを目的に, 全塩基配列を解析し, 海外産分離株と共に評価した。

本研究により明らかになった結論をまとめると以下の4点に集約される。第1に, PVY<sup>0</sup>およびPVY<sup>NTN</sup>系統分離株は本邦において広範囲に分布していた。第2にPVY<sup>0</sup>系統分離株は分子系統解析において複数のサブリネージを形成し, 世界全体では6サブリネージ, 本邦では少なくとも3サブリネージが形成された。第3に本邦のPVY<sup>NTN</sup>系統分離株は少なくとも2サブリネージに分類され, 1サブリネージはNリネージの非組換え体によって形成され, 別の1サブリネージは0リネージとNリネージに属する分離株がそれぞれ親型となるリネージ間組換え体で形成されていた。最後に本邦のPVY分離株集団の一部は, ヨーロッパまたは北米産の分離株集団とは異なる集団を形成したことが明らかになった。

組換え現象はPVY<sup>64), 68)</sup>だけではなく, 他のポテイウイルス種においても進化の重要な推進力である<sup>20)</sup>。本研究では, 本邦産PVY<sup>NTN</sup>系統分離株において本邦ではこれまで確認されていないゲノムの新たな組換え型を発見した。その組換え型は, ヨーロッパの各国およびアメリカにおいて既に認められている (Fig. 8)。本研究において調査したPVY<sup>NTN</sup>系統分離株の中で1995年から2000年にかけて採集した分離株 (NTND6, NTNHO90, NTNKGAM1, NTNNN99, NTNOK105およびNTNON92) は全てゲノム内に組換え部位が検出されず, 非組換え体であると思われた。一方, 新たな組換え体型は2000年以降に採集された分離株において認められた。最近, 北海道において, 本研究と同様の組換えパターンをゲノムに持つ分離株について, マルチプレック

Table 5. Comparison of nucleotide and amino acid similarities in polyprotein encoding region between subpopulations of *Potato virus Y*

Lineage <sup>b</sup>	N	C	O									
Sublineage				N-1	N-2	C	O-1	O-2	O-3	O-J1	O-J2	O-05
N [n=13] <sup>c</sup>		0.20900	0.20794									
C [n=6]	0.08858		0.13142									
O [n=65]	0.09275	0.05929										
N-1 [n=3]					0.03797	0.20905	0.20591	0.20468	0.20412	0.20595	0.20686	0.20762
N-2 [n=10]				0.01973		0.20899	0.20898	0.20748	0.20626	0.20819	0.20842	0.20909
C [n=6]				0.09055	0.08800		0.13129	0.13150	0.12945	0.13047	0.13034	0.13219
O-1 [n=6]				0.09119	0.09254	0.05865		0.02841	0.02553	0.02598	0.02677	0.02701
O-2 [n=7]				0.09369	0.09493	0.06077	0.01628		0.01465	0.02698	0.02863	0.02792
O-3 [n=10]				0.08906	0.09091	0.05642	0.01058	0.00862		0.02413	0.02530	0.02509
O-J1 [n=5]				0.09126	0.09197	0.05920	0.01397	0.01664	0.01120		0.02455	0.02457
O-J2 [n=2]				0.09275	0.09338	0.05917	0.01575	0.01850	0.01354	0.01417		0.02483
O-05 [n=35]				0.09257	0.09341	0.05995	0.01521	0.01729	0.01248	0.01449	0.01586	

<sup>a</sup> The nucleotide (above diagonal) and amino acid (below diagonal) similarities were assessed using Kimura two-parameter (Kimura 1980) and Dayhoff PAM250 matrix (Dayhoff et al. 1983).

<sup>b</sup> N, C and O lineage isolates, and N-1, N-2, O-1, O-2, O-3, O-J1, O-J2 and O-05 sublineage isolates are listed in Fig. 10.

<sup>c</sup> The number of sequences.

Table 6. Haplotype and nucleotide diversities of subpopulations in *Potato virus Y* strain groups

Strain group and district	Polyprotein			Nucleotide region*			6720-7900		
	H <sup>b</sup>	π <sup>c</sup>	H	H	π	H	H	π	
<b>All strain groups</b>	1.000 ± 0.009	0.10692 ± 0.00199	0.998 ± 0.009	1.000 ± 0.009	0.08348 ± 0.00302	0.998 ± 0.009	1.000 ± 0.009	0.10425 ± 0.00742	
Asia [n=30] <sup>d</sup>	1.000 ± 0.126	0.06307 ± 0.00187	1.000 ± 0.126	1.000 ± 0.126	0.01485 ± 0.00154	1.000 ± 0.126	1.000 ± 0.126	0.08607 ± 0.00667	
China [n=5]	1.000 ± 0.016	0.11439 ± 0.00241	0.995 ± 0.018	1.000 ± 0.016	0.10602 ± 0.00976	0.995 ± 0.018	1.000 ± 0.016	0.11318 ± 0.00828	
Japan [n=20]	1.000 ± 0.126	0.01540 ± 0.00072	1.000 ± 0.126	1.000 ± 0.126	0.09904 ± 0.00173	1.000 ± 0.126	1.000 ± 0.126	0.09804 ± 0.00171	
Syria [n=5]	1.000 ± 0.010	0.10685 ± 0.00206	0.997 ± 0.010	1.000 ± 0.010	0.14264 ± 0.00767	0.992 ± 0.013	1.000 ± 0.010	0.13016 ± 0.00773	
Europe [n=28]	1.000 ± 0.096	0.05201 ± 0.00182	0.933 ± 0.122	1.000 ± 0.096	0.01051 ± 0.00171	1.000 ± 0.096	1.000 ± 0.096	0.12300 ± 0.00956	
Germany [n=6]	1.000 ± 0.076	0.06399 ± 0.00194	1.000 ± 0.076	1.000 ± 0.076	0.08881 ± 0.00554	0.952 ± 0.096	1.000 ± 0.076	0.13008 ± 0.00969	
Poland [n=7]	1.000 ± 0.096	0.12285 ± 0.00243	1.000 ± 0.096	1.000 ± 0.096	0.16905 ± 0.00958	1.000 ± 0.096	1.000 ± 0.096	0.10089 ± 0.00780	
UK [n=6]	1.000 ± 0.002	0.06440 ± 0.00149	0.997 ± 0.003	1.000 ± 0.002	0.13070 ± 0.00785	0.988 ± 0.007	1.000 ± 0.002	0.06424 ± 0.00465	
North America [n=76]	1.000 ± 0.076	0.11502 ± 0.00247	1.000 ± 0.076	1.000 ± 0.076	0.17602 ± 0.01029	1.000 ± 0.076	1.000 ± 0.076	0.10749 ± 0.00805	
Canada [n=7]	1.000 ± 0.002	0.05851 ± 0.00143	0.997 ± 0.004	1.000 ± 0.002	0.12450 ± 0.00757	0.985 ± 0.008	1.000 ± 0.002	0.05994 ± 0.00433	
USA [n=69]	1.000 ± 0.126	0.09285 ± 0.00268	1.000 ± 0.126	1.000 ± 0.126	0.11276 ± 0.00689	1.000 ± 0.126	1.000 ± 0.126	0.09373 ± 0.00640	
<b>PVY<sup>c</sup> strain group</b>									
Europe [n=5]	1.000 ± 0.017	0.05297 ± 0.00172	1.000 ± 0.017	1.000 ± 0.017	0.04500 ± 0.00388	1.000 ± 0.017	1.000 ± 0.017	0.01488 ± 0.00194	
<b>PVY<sup>g</sup> strain group (PVY<sup>gsm</sup>, PVY<sup>g*1</sup>)</b>									
Asia [n=19]	1.000 ± 0.177	0.02273 ± 0.00129	1.000 ± 0.177	1.000 ± 0.177	0.04389 ± 0.00239	1.000 ± 0.177	1.000 ± 0.177	0.01189 ± 0.00220	
China [n=4]	1.000 ± 0.045	0.04889 ± 0.00183	1.000 ± 0.045	1.000 ± 0.045	0.04123 ± 0.00382	1.000 ± 0.045	1.000 ± 0.045	0.01213 ± 0.00201	
Japan [n=10]	1.000 ± 0.126	0.01540 ± 0.00072	1.000 ± 0.126	1.000 ± 0.126	0.09904 ± 0.00173	1.000 ± 0.126	1.000 ± 0.126	0.09804 ± 0.00171	
Syria [n=5]	1.000 ± 0.015	0.07417 ± 0.00151	0.995 ± 0.016	1.000 ± 0.015	0.06505 ± 0.00363	0.986 ± 0.022	1.000 ± 0.015	0.10330 ± 0.00723	
Europe [n=21]	1.000 ± 0.096	0.05201 ± 0.00182	0.933 ± 0.122	1.000 ± 0.096	0.01051 ± 0.00171	1.000 ± 0.096	1.000 ± 0.096	0.12300 ± 0.00977	
Germany [n=6]	1.000 ± 0.076	0.06399 ± 0.00194	1.000 ± 0.076	1.000 ± 0.076	0.08881 ± 0.00554	0.952 ± 0.096	1.000 ± 0.076	0.13008 ± 0.00969	
Poland [n=7]	1.000 ± 0.177	0.09539 ± 0.00230	1.000 ± 0.177	1.000 ± 0.177	0.04543 ± 0.00416	1.000 ± 0.177	1.000 ± 0.177	0.10672 ± 0.00799	
UK [n=4]	1.000 ± 0.011	0.05774 ± 0.00161	0.997 ± 0.012	1.000 ± 0.011	0.02364 ± 0.00194	0.990 ± 0.016	1.000 ± 0.011	0.10330 ± 0.00785	
North America [n=25]	1.000 ± 0.177	0.10798 ± 0.00296	1.000 ± 0.177	1.000 ± 0.177	0.05187 ± 0.00509	1.000 ± 0.177	1.000 ± 0.177	0.13140 ± 0.01039	
Canada [n=4]	1.000 ± 0.015	0.06018 ± 0.00149	0.995 ± 0.016	1.000 ± 0.015	0.11552 ± 0.00147	0.986 ± 0.022	1.000 ± 0.015	0.10258 ± 0.00800	
USA [n=21]	1.000 ± 0.039	0.02330 ± 0.00097	0.982 ± 0.046	1.000 ± 0.039	0.02512 ± 0.00257	0.982 ± 0.046	1.000 ± 0.039	0.02412 ± 0.00256	
<b>PVY<sup>g</sup> strain group</b>									
Asia [n=11]	1.000 ± 0.045	0.02180 ± 0.00091	0.978 ± 0.054	1.000 ± 0.045	0.02236 ± 0.00253	0.978 ± 0.054	1.000 ± 0.045	0.02122 ± 0.00255	
China [n=1]	1.000 ± 0.004	0.01521 ± 0.00075	0.995 ± 0.006	0.999 ± 0.004	0.01447 ± 0.00175	0.975 ± 0.015	0.999 ± 0.004	0.01667 ± 0.00208	
Japan [n=10]	1.000 ± 0.004	0.01521 ± 0.00075	0.995 ± 0.006	0.999 ± 0.004	0.01447 ± 0.00175	0.975 ± 0.015	0.999 ± 0.004	0.01667 ± 0.00208	
North America [n=51]	1.000 ± 0.004	0.01453 ± 0.00074	0.994 ± 0.007	0.999 ± 0.004	0.01344 ± 0.00110	0.972 ± 0.017	0.999 ± 0.004	0.01589 ± 0.00210	
Canada [n=3]	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	
USA [n=48]	1.000 ± 0.004	0.01453 ± 0.00074	0.994 ± 0.007	0.999 ± 0.004	0.01344 ± 0.00110	0.972 ± 0.017	0.999 ± 0.004	0.01589 ± 0.00210	

\* Isolates used for the analyses in the polyprotein and nucleotide sequence regions are listed in Fig. 11.

<sup>b</sup> Haplotype diversity (H).

<sup>c</sup> Nucleotide diversity (π).

<sup>d</sup> The number of sequences.

\* Not determined.

Table 7. Haplotype and nucleotide diversities of subpopulations in *Potato virus Y* lineages

Lineage / district	Nucleotide position*				Polyprotein			
	n <sup>b</sup>	H <sup>c</sup>	π <sup>d</sup>	π	n	H	π	π
All lineages								
Asia								
China	17	1.000±0.020	0.1105±0.00247	0.14738±0.00639	32	1.000±0.008	0.08700±0.00292	0.10133±0.00714
Japan	16	ND	ND	0.1902±0.00762	5	1.000±0.126	0.1485±0.00154	0.08607±0.00667
Syria	0	1.000±0.022	0.11289±0.00255	0.16962±0.00976	20	1.000±0.016	0.10729±0.00380	0.11318±0.00328
Europe	10	ND	ND	0.09528±0.00153	7	1.000±0.076	0.07729±0.00397	0.06648±0.00138
Germany	0	1.000±0.045	0.13821±0.00255	0.14840±0.00790	29	1.000±0.009	0.08573±0.00261	0.13271±0.00785
Poland	0	ND	ND	0.10151±0.00171	6	1.000±0.096	0.14466±0.00140	0.12300±0.00936
UK	0	ND	ND	0.08881±0.00554	7	1.000±0.076	0.12149±0.00183	0.152±0.006
North America	3	ND	ND	0.16905±0.00958	6	1.000±0.096	0.12349±0.00149	0.10259±0.00780
USA	56	1.000±0.003	0.04615±0.00098	0.16905±0.00958	6	1.000±0.096	0.12349±0.00149	0.13008±0.00669
	5	1.000±0.126	0.13339±0.00203	0.13645±0.00774	79	0.999±0.002	0.14531±0.00144	0.10749±0.00466
	51	1.000±0.004	0.03487±0.00083	0.17602±0.01029	7	1.000±0.076	0.10888±0.00402	0.10749±0.00466
				0.13128±0.00765	72	0.999±0.002	0.03692±0.00133	0.06693±0.00445
C lineage								
Europe	5	1.000±0.126	0.08556±0.00234	0.11481±0.00657	6	1.000±0.096	0.08749±0.00294	0.08928±0.00603
North America	2	ND	ND	ND	2	ND	ND	ND
N lineage								
Asia								
China	6	1.000±0.096	0.06523±0.00049	0.04339±0.00379	7	1.000±0.076	0.00709±0.00692	0.01476±0.00137
Japan	0	ND	ND	0.01359±0.00239	0	ND	ND	0.01195±0.00222
Syria	6	1.000±0.096	0.06523±0.00049	0.04123±0.00382	7	1.000±0.076	0.00709±0.00692	0.01213±0.00294
Europe	0	ND	ND	0.09528±0.00153	0	ND	ND	0.0494±0.00128
Germany	3	ND	ND	0.04409±0.00254	3	1.000±0.272	0.01256±0.00161	0.01899±0.00162
Poland	0	ND	ND	0.01051±0.00171	0	ND	ND	ND
UK	0	ND	ND	0.08881±0.00554	2	ND	ND	0.01442±0.00231
North America	1	ND	ND	0.04543±0.00416	5	1.000±0.126	0.01933±0.00166	0.01611±0.00223
USA	4	1.000±0.177	0.02400±0.00109	0.02314±0.00193	11	ND	ND	0.01332±0.00198
	2	ND	ND	0.05187±0.00509	2	ND	ND	ND
	2	ND	ND	0.01525±0.00142	3	ND	ND	ND
O lineage								
Asia								
China	11	1.000±0.039	0.02330±0.00097	0.02512±0.00257	25	1.000±0.011	0.01971±0.00172	0.02312±0.00258
Japan	1	ND	ND	ND	5	1.000±0.126	0.01485±0.00154	0.02172±0.00264
Syria	10	1.000±0.045	0.02180±0.00090	0.02236±0.00253	13	1.000±0.030	0.02177±0.00135	0.02172±0.00264
Europe	0	ND	ND	ND	7	1.000±0.076	0.00729±0.00387	0.06619±0.00395
Germany	2	ND	ND	ND	20	1.000±0.016	0.01886±0.00126	0.10676±0.00823
Poland	0	ND	ND	ND	6	1.000±0.096	0.02149±0.00140	ND
UK	0	ND	ND	ND	7	1.000±0.076	0.02149±0.00140	ND
North America	2	ND	ND	ND	4	1.000±0.177	0.02188±0.00200	ND
USA	51	1.000±0.004	0.01521±0.00077	0.01447±0.00175	72	0.999±0.002	0.01623±0.00172	0.01931±0.00242
	3	ND	ND	ND	5	1.000±0.126	0.01848±0.00152	0.02477±0.00335
	48	1.000±0.004	0.01453±0.00074	0.01377±0.00169	67	0.999±0.003	0.01597±0.00121	0.01774±0.00246

\* Isolates used for the analyses in the polyprotein are listed in Fig. 10, and in the regions are listed in Fig. 12.

<sup>b</sup> The number of sequences.

<sup>c</sup> Haplotype diversity (H).

<sup>d</sup> Nucleotide diversity (π).

\* Not determined.

ND was estimated by the average pairwise difference between sequences in a sample, based on all sites.

ス RT-PCR 法を用いて調査した結果が報告されている<sup>7)</sup>。このことは、ゲノム構造の異なる新しい PVY 分離株のサブグループ集団が現在、本邦において拡散しつつあること、そして組換え体サブグループ集団が形成する際の創始者効果が起きていたことを示していると思われる。以上から、PVY<sup>NTN</sup> 系統分離株をはじめ、PVY 各系統分離株の本邦における発生生態を解明するには、今後、広範囲な地域より網羅的に分離株を採集し、ゲノム構造や生物学的性質などについて詳細な調査が必要であると考えられる。

分子系統樹は、ウイルス分離株集団間の進化的な関係を示している。本研究において全ゲノムの一部を用いて作成した分子系統樹は、チリからの 1 分離株を 1 集団として考慮するならば、PVY には少なくとも合計 14 のサブグループ集団が存在することを示していた (Fig. 9)。それらのサブグループの中で、本邦産 PVY<sup>0</sup> 系統分離株の OH037, OKUM4 および OUNKG 分離株は、アメリカおよびイギリス産分離株とともに 0-1 サブリネージに属し、そのサブリネージの分枝は高いブートストラップ値で支持されていた<sup>36)</sup> (Fig. 9)。他の本邦産 PVY<sup>0</sup> 系統分離株は、本邦産分離株のみで独立した 2 サブリネージを形成した。このことは、本研究において初めて明らかになったことである。これらの PVY<sup>0</sup> 系統分離株が本邦由来のものであるか、あるいは海外から 1 度あるいは複数の機会により本邦に侵入し、その後国内で拡散したかどうかは不明であるが、本邦に侵入する経路の 1 つとして PVY に感染したジャガイモが種いもとして導入された可能性が考えられる。ジャガイモは 16 世紀から 17 世紀にかけて、オランダの商人によりインドネシアから本邦に運び込まれたことが知られている<sup>27)</sup>。また、19 世紀の後半にアメリカおよびヨーロッパの国々から新しい品種が育種のために導入された<sup>27)</sup>。分子系統樹において本邦産の PVY<sup>0</sup> 系統分離株の枝の長さは、本邦産 PVY<sup>NTN</sup> 系統分離株の枝の長さよりも長かった。このことは、PVY<sup>0</sup> 系統分離株が PVY<sup>NTN</sup> 系統分離株よりも早い時期に本邦に侵入した可能性が高いことを示しており、PVY<sup>NTN</sup> 系統分離株集団が最小の選択圧下で、最近、出現したことを示唆していた。本邦への PVY の侵入経路を明らかにするには、ジャガイモが本邦へ運び込まれた際の経路上の地域、例えば東南アジアの

ような近隣諸国からの PVY 分離株の全塩基配列データが必要であると思われる。

本研究の分子進化的研究によって、本邦、ヨーロッパおよび北米地域の PVY 分離株集団が遺伝的浮動の後で形成された可能性があること、個々の地域に限定される別個のリネージを形成することが明らかになった。新しい分離株の侵入および新しい遺伝子型を持つ分離株の出現は、組換え現象だけが原因ではなく、ゲノムの突然変異現象も高い危険性を持つことが本研究において示され、ウイルス病の防除対策を構築する上で病原ウイルスのゲノム構造や集団遺伝構造を考慮することが重要であると思われた。現在、栽培現場での PVY の防除対策は、ウイルスに感染していない健全な種いもへの更新、PVY の媒介昆虫であるアブラムシの薬剤防除、栽培圃場周辺のウイルスに感染した野良いも等の伝染源の除去が実施されている<sup>66)</sup>。しかし、アブラムシの薬剤防除は、PVY 伝染防止対策としては不十分であることが報告されており<sup>32), 83)</sup>、現時点では宿主の抵抗性遺伝子を従来の手法あるいは遺伝子組換え技術を用いて導入した抵抗性品種を育成し、それらを利用することが最も効果的であると考えられている。これまで PVY の系統の違いや、同じ系統の中でも分離株のゲノム構造の違いによって、ジャガイモの茎葉や塊茎での症状の現れ方や発病程度が異なることが報告されている<sup>8), 52), 74), 81)</sup>。従って、今後ともそれぞれの国および地域における PVY 分離株の集団遺伝構造を解明することは、抵抗性品種の育成などの防除対策を戦略的に構築する上で非常に重要なことであると考えられる。



## 第2章 ジャガイモ Y ウイルス塊茎えそ系統分離株の弱毒ウイルス

本章では、PVY の塊茎えそ系統分離株を材料に従来の弱毒ウイルス作出方法である低温処理および亜硝酸ナトリウム処理、これまでの方法とは異なる新たな方法「組織培養変異誘発法 (MITC 法)」による弱毒ウイルスの作出を試みた。弱毒株の材料に用いた塊茎えそ系統は、タバコにおいて黄斑えそ病、ジャガイモにおいて塊茎えそ病の病原ウイルスである。そこで本研究では、タバコにおいて病徴が弱毒化した変異株 (タバコ弱毒株) の作出を試みた。ウイルスの弱毒化に關与する遺伝子領域を探索するために、作出した弱毒ウイルスと材料とした強毒ウイルスまたは変異株間で塩基配列およびアミノ酸配列を比較した。作出した弱毒株の一部については、PVY の防除手段としての弱毒株の利用を考慮し、タバコでの強毒ウイルスに対する干渉作用の有無を調査した。

### 1) 実験材料および実験方法

#### (1) 供試ウイルス

ジャガイモ塊茎えそ病の症状を示す塊茎から分離した PVY<sup>NTN</sup> 系統の PVY<sup>NTD6</sup> 強毒株 (NTND6)<sup>70)</sup> を弱毒ウイルス作出の材料とした。NTND6 強毒株は、タバコ (品種; Xanthi nc) を用いて 25°C のガラス室内で継代または保存してきたため、保存期間中に変異株集団を形成している可能性が考えられた<sup>71), 72)</sup>。そこで弱毒変異株 (以下、弱毒株) を作出する直前の NTND6 を NTND6B-0r, NTND6B-0r1 および NTND6A 強毒株と名付けた (Fig. 11)。

#### (2) 二重抗体サンドイッチ酵素結合抗体法

NTND6 強毒株または作出された弱毒株の接種植物におけるウイルス感染の有無を確認するため DAS-ELISA を行った (Fig. 1)。DAS-ELISA ではマイクロウェルプレート MAXISORP442404 (ヌンク) を用い、吸光度はマイクロプレートリーダー MPR-A4i II (東ソー) を用いて光波長 405nm で測定した。一次抗体およびコンジュゲートは、日本植物防疫協会茨城研究所より販売されている製品を用いた。DAS-ELISA は、第1章で記載した実験手順と同様に行った。

#### (3) 弱毒株作出

本研究では、低温処理、亜硝酸ナトリウム処理

および組織培養変異誘発法の3方法を用いて弱毒株の作出を試みた。各方法の手順は Fig. 11 に示した。

#### 7) 低温処理

低温処理では弱毒株の材料として NTND6B-0r 強毒株を用いた。NTND6B-0r 強毒株感染タバコ葉と10倍量の0.02Mリン酸緩衝液 (pH7.4) を乳鉢に入れて磨砕し、カーボランダム (600 メッシュ) を用いて健全なタバコ (品種; Xanthi nc) の上位から3番目の葉に塗沫接種した。接種後のタバコは直ちに13~14°Cの低温条件下で管理された人工気象器内に移動し、生育させた (Fig. 11, Table 8)。接種10~14日後に DAS-ELISA 法によりウイルス感染を確認し、感染葉からの粗汁液を用いて再度、健全タバコに接種し、低温条件下で栽培管理した。この手順を5回繰り返した後、タバコ感染葉からの粗汁液を用いて、PVY 接種時に局部病斑 (えそ斑点) を形成するジャガイモ (品種; 根系 59 号) に接種した。ジャガイモ接種葉に形成された局部病斑を個別に切り取り、それぞれを磨砕した後、健全タバコに接種した。接種後のタバコは25°Cのガラス室内で管理し、継続的に病徴を調査した。接種約2~3週間後に茎葉を観察し、極軽いモットル症状または無病徴のタバコについて DAS-ELISA によりウイルス感染の有無を確認し、陽性株を弱毒株として選抜した (Fig. 11)。

#### 4) 亜硝酸ナトリウム処理

亜硝酸ナトリウム処理は、弱毒株の材料として NTND6B-0r1 および NTND6A 強毒株を用い、既報<sup>112)</sup>の方法を改変して行った。試験はそれぞれ亜硝酸ナトリウム溶液との混和時間や感染葉磨砕時の希釈条件などを変えて合計4回行った (Fig. 11, Table 8)。試験1では、NTND6B-0r1 強毒株を感染させたタバコ (品種; Xanthi nc) あるいは *N. occidentalis* の接種葉より上位の葉を等量の滅菌蒸留水と乳鉢に入れて磨砕し、磨砕液と等量の0.2M酢酸ナトリウム (pH6.0) を含む0.8M亜硝酸ナトリウム溶液と混和後、直ちにカーボランダム (600 メッシュ) を用いて健全なジャガイモ (品種; 根系 59 号) に塗沫接種した。試験2では粗汁液調製後、試験1と同様に亜硝酸ナトリウム溶液と混和し、5分間静置後にジャガイモに接種した。試験3では、感染葉を3倍量の滅菌蒸留水で磨砕し、等量の亜硝酸ナトリウム溶液と混和し、5分

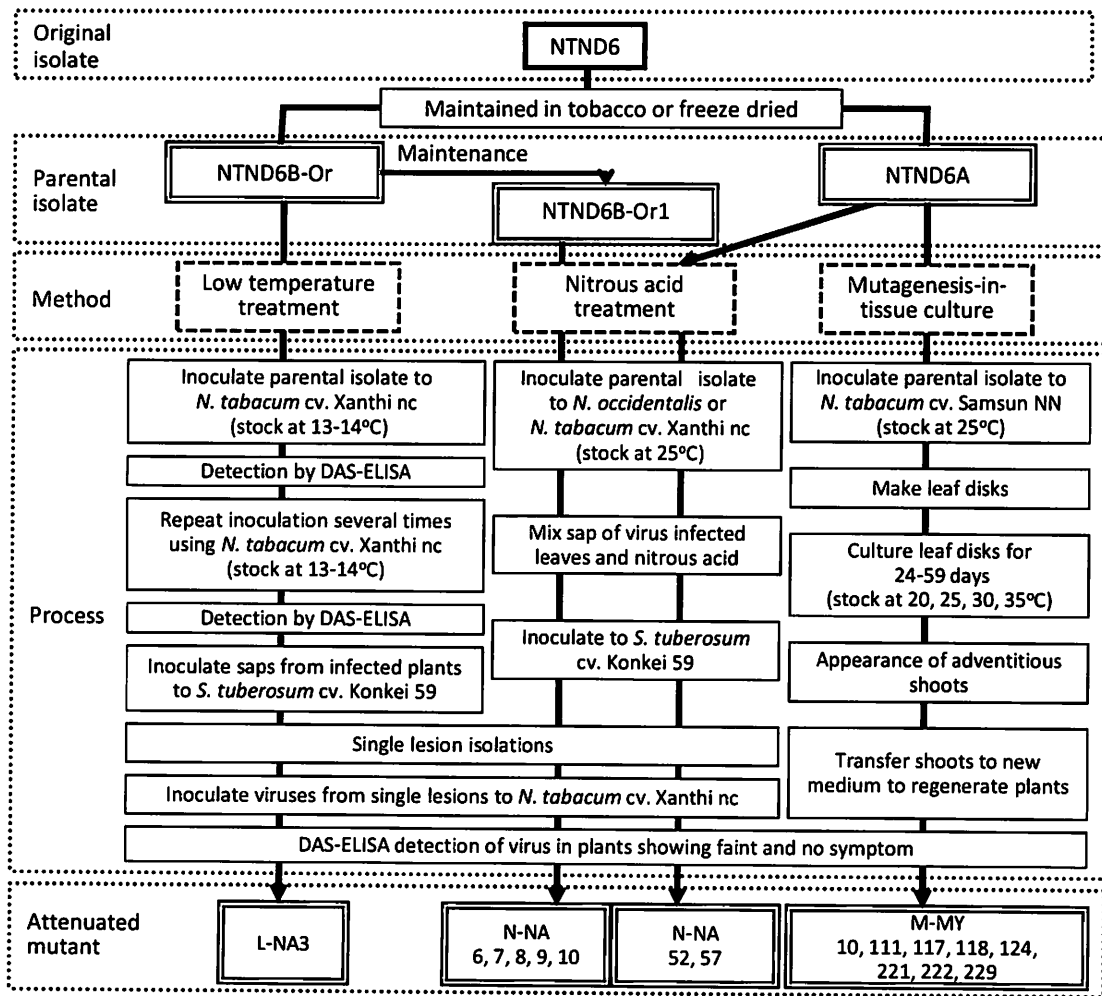


Fig. 11. Schema of the pipeline for producing attenuated mutants of *Potato virus Y*. Parental isolates NTND6B-Or, NTND6B-Or1 and NTND6A were obtained after the maintenance of original isolate NTND6 in a greenhouse and stock at  $-80^{\circ}\text{C}$ . The full-length sequence of the genomic RNA of original isolate NTND6 was reported (accession code: AB331515). A total of 16 attenuated mutants were successfully produced and the genomic sequences of all the parental isolates and attenuated mutants were determined.

Table 8. History of attenuated mutants obtained in this study

a. Low temperature treatment method						
Batch <sup>a</sup>	Number of plants <sup>b</sup>				Attenuated mutant	
	Total	Severe symptom <sup>c</sup>	Faint or no symptom <sup>d</sup>			
		Infected	Infected	Not infected		
1	40	18	3	19	L-NA3	
Total	40	18	3	19		

b. Nitrous acid treatment method						
Batch <sup>a</sup>	Number of plants <sup>b</sup>				Attenuated mutant	
	Total	Severe symptom <sup>c</sup>	Faint or no symptom <sup>d</sup>			
		Infected	Infected	Not infected		
1	30	11	1	18	N-NA6	
2	14	3	1	10	N-NA7	
3	40	6	3	31	N-NA8, 9, 10	
4	84	75	2	7	N-NA52, 57	
Total	168	95	7	66		

c. Mutagenesis-in-tissue culture (MITC) method						
Batch <sup>a</sup>	Temperature for leaf disk culture <sup>e</sup>	Number of regenerated plants <sup>f</sup>				Attenuated mutant
		Total	Severe symptom	Faint or no symptom <sup>d</sup>		
			Infected	Infected	Not infected	
1	25 °C	400	344	2	54	M-MY10
2	20 °C	70	66	0	4	M-MY111
	25 °C	469	442	6	21	
	30 °C	301	176	2	123	
	35 °C	57	14	0	43	
Subtotal		897	698	8	191	
3	20 °C	172	166	3	3	M-MY117, 118
	25 °C	571	541	18	12	
	30 °C	415	338	1	76	M-MY124
	35 °C	64	14	0	50	
Subtotal		1222	1059	22	141	
4	40 °C→25 °C	1162	1133	22	7	M-MY221, 222
	25 °C	462	445	7	10	
Subtotal		1624	1578	29	17	
Total	20 °C	4143	3679	61	403	

<sup>a</sup> All the batches using nitrous acid treatment and MITC methods were done independently on different days.

<sup>b</sup> Number of tobacco plants (*Nicotiana tabacum* cv. Xanthi nc) inoculated with viruses from single local lesions appeared on leaves of *Solanum tuberosum* cv. Konkei 59 after the treatments by the nitrous acid.

<sup>c</sup> Severe symptom; veinal necrosis.

<sup>d</sup> Tobacco plants obtained by nitrous acid treatment or regenerated tobacco plants obtained by MITC methods showing faint or no symptom were examined by DAS-ELISA.

間静置後にジャガイモに接種した。試験4では、NTND6A強毒株を感染させたタバコ葉を2倍量の亜硝酸ナトリウム溶液で磨砕し、5分間静置した後、ジャガイモに接種した。最後に対照試験として、NTND6B-0r1強毒株感染タバコ葉を等量の滅菌蒸留水で磨砕し、ジャガイモに接種した。各試験においてジャガイモ接種葉に形成された局部病斑は個別に切り取り、それぞれを磨砕した後、健全タバコに接種した。接種後のタバコは25℃のガラス室内で管理し、継時的に病徴を調査した。接種14～17日後に茎葉を観察し、ごく軽いモットル症状または無病徴のものについてDAS-ELISAによりウイルス感染の有無を確認し、陽性株を弱毒株として選抜した (Fig. 11)。

#### ウ) 組織培養変異誘発法

MITC法は弱毒株の材料としてNTND6A強毒株を用いた。試験は合計4回行った (Fig. 11, Table 8)。NTND6A強毒株接種タバコ (品種; Samsun NN) において、接種葉よりも上位で葉脈えそ症状を起こす直前の葉を約7mm四方に切り取り、表面殺菌した後、Murashige & Skoog (MS) 培地 (0.1mg/l NAA, 1mg/l BA, 30g/l sucrose, 7.5g/l agar, pH 5.8) 上に置床し、不定芽形成を誘導させた。試験1～3では、葉片を20℃、25℃、30℃および35℃の異なる温度条件下で、24～58日間培養した。試験4では最初に40℃の高温条件下で2～7日間培養した後、25℃条件下で28～59日間培養した。培養後、病徴を不定芽は再分化培地 (1/2MS, 15g/l sucrose, 7.5g/l agar, pH5.8) に移植し、再分化個体を形成させた。再分化個体のなかで葉脈えそ症状や黄化症状を示さない個体についてDAS-ELISAによりウイルス感染の有無を調査した。陽性反応を示した再分化個体については、弱毒株が感染していたと判断し、再分化個体からの粗汁液をタバコ (品種; Samsun NN) に接種し、病徴が弱毒化していることおよびDAS-ELISAにより再度ウイルス感染が確認されたものを弱毒株として選抜した (Fig. 11)。

#### (4) ウイルス蓄積量調査

弱毒株とNTND6強毒株のタバコにおけるウイルス蓄積量を比較した。本葉3～4枚のタバコ (品種; Xanthi nc) に各弱毒株およびNTND6A強毒株を汁液接種し、接種2週間後に接種葉から上位に2番目、3番目および4番目の葉を0.3gずつ切り

取り、DAS-ELISAに供試するまで-80℃の超低温庫内で保存した。試験では各弱毒株およびNTND6A強毒株について、それぞれタバコ3個体を用いた。DAS-ELISAでは、各サンプルを3mlの0.05%のTween-20を含んだ0.02Mリン酸緩衝生理食塩水 (PBS-Tween) で磨砕したものをを用いた。基質と反応させた際の吸光度については、基質注入2時間後にマイクロプレートリーダーMPR-A4i II (東ソー) を用いて光波長405nmで測定し、3個体分の結果より平均値を算出した。ウイルス蓄積量については、各弱毒株とNTND6A強毒株の吸光度平均値を相対的に比較し、Student's *t* test ( $P < 0.05$ ) により統計処理を行った。

#### (5) 遺伝的な安定性調査

弱毒株は継代接種により、病原性が復帰する可能性がある<sup>35)</sup>。本研究において作出した弱毒株の遺伝的な安定性を評価するため、N-NA10弱毒株およびM-MY10弱毒株をタバコにおいて継代接種し、タバコでの病徴の変化の有無を調査した (Fig. 12)。N-NA10弱毒株を接種し、凍結乾燥保存したタバコ (品種; Xanti nc) からの粗汁液を健全タバコに接種し、ガラス室内で15日間栽培管理した。DAS-ELISAによりウイルス感染を確認した後、感染葉を接種源として別の健全タバコに継代接種し、ガラス室内で45日間栽培管理した。M-MY10弱毒株は、凍結乾燥保存タバコからの粗汁液を健全タバコに接種し、その後3回継代接種した。各継代時の栽培管理期間は、それぞれ20日、24日、15日および40日間であった。栽培期間中に接種したタバコの病徴を継時的に調査した。継代前後のそれぞれの弱毒株のゲノムの一部領域について塩基配列を解析し、継代前後での変異部位の有無について調査した。

#### (6) 塩基配列の決定

##### 7) ウイルスRNAの抽出

各弱毒株および強毒株に感染したタバコ葉からの全RNAの抽出はISOGEN (ニッポンジーン) を用いた (Fig. 2)。抽出した全RNAをDEPC-Treated Water (アンピオン) に溶解して分光光度計GeneQuant pro (アマシャムファルマシアバイオテック) で吸光度を測定し、OD260=20を1 $\mu$ g/ $\mu$ lとし、全RNA濃度を算出した。

##### 1) 逆転写-ポリメラーゼ連鎖反応

###### a) 合成プライマーの設計

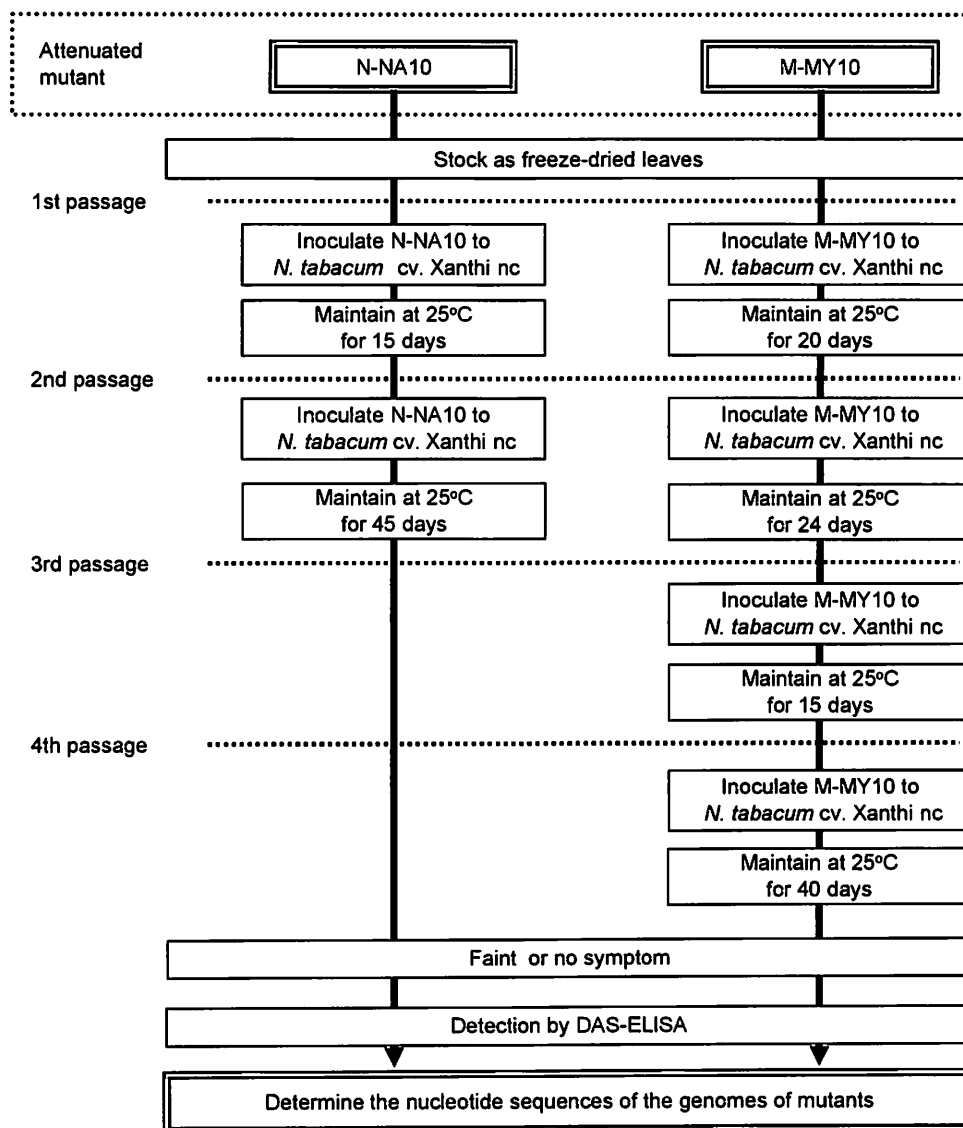


Fig. 12. Schema of the pipeline for the passage of attenuated mutants of *Potato virus Y* (PVY). An attenuated mutant N-NA10 was produced by the nitrous acid treatment method, and an attenuated mutant M-MY10 was produced by the mutagenesis-in-tissue culture (MITC) method. The attenuated mutants N-NA10 and M-MY10 showed faint or no symptom in tobacco after passages.

逆転写反応、ポリメラーゼ連鎖反応および塩基配列の決定に用いたプライマーについては、インターネット上の DNA データベースより収集した PVY ゲノムの塩基配列を基に設計した (Table 1).

#### b) 逆転写反応

PVY のゲノム RNA を鋳型にして、モロニーマウス白血病ウイルス (*Moloney murine leukemia virus*; MMLV) 逆転写酵素 (PrimeScript® reverse transcriptase; タカラバイオ) を用いて 42°C で 1 時間静置し、一本鎖相補 DNA (ss cDNA) を合成した (Fig. 3).

#### c) ポリメラーゼ連鎖反応

逆転写反応で得られた ss cDNA から ds cDNA を増幅させるため PCR を行った. PCR では Platinum™ Pfx DNA polymerase (インビトロジェン) および DNA 増幅機 PC812 (アステック) を用い、変性 94°C (2 分) を 1 サイクル、変性 94°C (15 秒) - アニーリング 40°C (30 秒) - 伸長 68°C (3 分) のセットを 40 サイクル、伸長 4°C (10 分) を 1 サイクルの条件下で行った (Fig. 3). なお、PCR 反応に用いた Platinum™ Pfx DNA polymerase は複製の際のエラー率が  $1.1 \times 10^{-4}$  塩基未満であることが確認されている<sup>95)</sup>. PCR 終了後、反応液 50  $\mu$ l 中 2  $\mu$ l を 0.7% アガロースゲル電気泳動に供試し (Fig. 4), 目的とする ds cDNA の増幅を確認した.

#### d) DNA の精製

PCR によって得られた ds cDNA は 0.7% アガロースゲル電気泳動に供試した後、光波長 365nm の UV ランプ照射下で目的とするバンドを切り出した. その後、QIAquick Gel Extraction Kit (キアゲン) を用いてプロトコールに従って DNA を精製した (Fig. 5). カラムから DNA を抽出する際は 50  $\mu$ l の 10mM Tris-HCl (pH8.5) を用いた.

#### e) 集団の塩基配列の決定

塩基配列決定のために、PVY 全ゲノムをカバーするように合計 5 DNA 断片を精製した. それぞれの DNA 断片については、相互に少なくとも 200bp 以上はオーバーラップするように設計した. 塩基配列の決定には、BigDye Terminator v3.1 Cycle Sequencing Ready Reaction Kit (アプライドバイオシステムズ) を用いた. 精製した DNA, DDW, プライマー (1 pmol/ $\mu$ l, 2 pmol/ $\mu$ l, 4 pmol/ $\mu$ l), 5×Sequence buffer および Ready Reaction Premix を加えて混和後、DNA 増幅機 (PC812; アス

テック) を用い、変性 96°C (1 分) を 1 サイクル、変性 96°C (10 秒) - アニーリング 50°C (5 秒) - 伸長 60°C (75 秒) のセットを 15 サイクル、変性 96°C (10 秒) - アニーリング 50°C (5 秒) - 伸長 60°C (90 秒) のセットを 5 サイクル、変性 96°C (10 秒) - アニーリング 50°C (5 秒) - 伸長 60°C (2 分) のセットを 5 サイクル、伸長 4°C (10 分) を 1 サイクルの条件下で行った (Fig. 6). その後、余分な蛍光 ddNTP を除くためエタノール沈殿を行い乾燥後、使用するまで試料を -80°C で遮光保存した (Fig. 6). 試料は使用前に沈殿を 40  $\mu$ l の Hi-Di™ Formamide (アプライドバイオシステムズ) に溶解し、2 分間煮沸後、急冷により DNA を変性させ、20  $\mu$ l をジェネティックアナライザー用サンプルチューブに移し、ジェネティックアナライザー-310 およびジェネティックアナライザー-3130 (アプライドバイオシステムズ) で塩基配列の解析を行った. 塩基配列の決定および推測されるアミノ酸配列の解析には DNASIS ver. 3.5 (日立) および BioEdit ver. 5.0.9<sup>25)</sup> を使用した.

#### (7) 準種の塩基配列解析

RNA ウイルスのゲノムは単一の遺伝子型ではなく、少しずつ遺伝子配列の異なる変異体の集団によって構成されており、これは準種 (quasispecies) と呼ばれている<sup>13), 14), 17), 72)</sup>. 弱毒株ゲノムに認められた塩基置換は、材料とした強毒株の準種に含まれる変異体のゲノム配列に由来する可能性がある. そこで、弱毒株の材料とした NTND6A 強毒株の準種のゲノム構造を調査するため、ポティウイルスゲノムの中で最も変化に富んだ P1 タンパク質遺伝子と HC-Pro タンパク質遺伝子領域をクローニングし、それらの塩基配列を解析した. NTND6A 強毒株に感染したタバコ葉からの全 RNA の抽出は ISOGEN (ニッポンジーン) を用いた (Fig. 2). NTND6A 強毒株ゲノム RNA を鋳型にして、MMLV PrimeScript® reverse transcriptase と NTND6 強毒株ゲノムの P3 タンパク質遺伝子領域の 5' 末端側 (塩基部位 2530-2551) に結合するように設計したプライマー PVYP3NOT3M (5' -GGGGCGGCCGCCTAATAGTAACTGTCTCATCAC-3') を用いて 42°C で 1 時間インキュベートし、ss cDNA を合成した (Fig. 3). 逆転写反応で得られた ss cDNA から ds cDNA を増幅させるため PCR を行った. PCR は NTND6 強毒株ゲノムの 5' 末端の非翻訳遺伝

子領域の 5' 末端側の部位 (塩基部位 1-27) に結合するように設計したプライマー-PVY5TNOT1P (5' -GGGCGGCCGCAAATTAACAACACTCAATACAACATAA-3') と Platinum™ Pfx DNA polymerase (インビトロジェン) および DNA 増幅機 PC812 (アステック) を用い, 変性 94°C (2 分) を 1 サイクル, 変性 94°C (15 秒) -アニーリング 40°C (30 秒) -伸長 68°C (3 分) のセットを 40 サイクル, 伸長 4°C (10 分) を 1 サイクルの条件下で行った (Fig. 5). PCR に用いたプライマーには制限酵素 *Not* I 切断部位 (上記プライマー配列内の下線部) を付加させた. PCR 終了後, 反応液 50  $\mu$ l 中 2  $\mu$ l を 0.7% アガロースゲル電気泳動に供試し, 目的とする 2551 塩基 (塩基部位 1-2551) の ds cDNA の増幅を確認した (Fig. 4). プラスミド pZErO™-2 の *Not* I 部位に RT-PCR 後の増幅産物を挿入し, 大腸菌 (*Escherichia coli*) DH5  $\alpha$  を形質転換し, クローニングした. 得られた各クローンについては, 前述と同様の方法 (1.6.2.5. 弱毒株集団の塩基配列の決定) により塩基配列を決定した.

### (8) 干渉作用調査

NTND6 強毒株に対する弱毒株のタバコにおける干渉作用の有無を調査した. 弱毒株として, N-NA10 および M-MY10 弱毒株を用いた. 本葉 3~4 枚の健全タバコ (品種; Xanthi nc) に N-NA10 または M-MY10 感染タバコ葉と 10 倍量の 0.02M リン酸緩衝液 (pH7.4) を乳鉢に入れて磨砕して得られた粗汁液をカーボランダム (600 メッシュ) を用いて塗抹接種した. 接種 14~18 日後に DAS-ELISA により弱毒株の感染の有無を確認し, 弱毒株感染株には NTND6 を 2 次接種した. 2 次接種 24~28 日後まで継時的に病徴を調査した. 接種上位葉での干渉作用の有無を評価するため, 最終調査時に上位葉から抽出した核酸を用いて前述と同様の方法 (1.6.2.5. 弱毒株集団の塩基配列の決定参照) により塩基配列を解析した. M-MY10 弱毒株では, NTND6 強毒株の CI タンパク質遺伝子内の 4654 番目の塩基が A から G に変異しており, この部位の変異に伴って制限酵素 *Hinc* II 切断部位を有していた (Fig. 13). このことから *Hinc* II 切断部位を挟むようにゲノムの一部を増幅し, 増幅産物の *Hinc* II 切断の有無を電気泳動パターンにより M-MY10 弱毒株と NTND6 強毒株とを識別する RT-PCR-RFLP の利用が可能であると思われた. そこで, M-

MY10 弱毒株および NTND6 強毒株ゲノムの CI タンパク質遺伝子領域の 3' 末端側 (塩基部位 5485-5515) に結合するように設計したプライマー-PVYCI-RF-M [5' -CCTC(A/G)CATGCAGA(A/G)CCAT(C/T)(C/T)A(A/G)ATTTGAGAA-3' ] を用いて逆転写反応により ss cDNA を合成した. 逆転写反応で得られた ss cDNA から ds cDNA を増幅させるため PCR を行った. PCR では Platinum™ Pfx DNA polymerase (インビトロジェン) と CI タンパク質遺伝子領域の 5' 側の部位 (塩基部位 4039-4067) に結合するように設計したプライマー-PVYCI-RF-P [5' -TT(C/T)TTCAAGAA(A/G)CC(A/G)AC(A/G)(C/T)TGCG(C/T)ATGCG-3' ] を用いた. PCR 終了後, 反応液 50  $\mu$ l 中 2  $\mu$ l を 0.7% アガロースゲル電気泳動に供試し, 目的とする ds cDNA の増幅を確認した (Fig. 4). 増幅が確認された ds cDNA は *Hinc* II (タカラバイオ) 制限酵素と混和し, 37°C で 4 時間静置した. *Hinc* II 反応液については 0.7% アガロースゲル電気泳動に供試し, ds cDNA の泳動パターンにより *Hinc* II による切断の有無を調査した (Fig. 13).

## 2) 結果

### (1) 弱毒株の作出

#### 7) 低温処理

NTND6B-Or 強毒株を材料として低温処理を行い, ジャガイモ (品種; 根系 59 号) 接種後に形成された局部病斑から合計 40 個体のタバコ (品種; Xanthi nc) に単一病斑分離を行った. 40 個体のうち 18 個体は NTND6B-Or 強毒株と同様に葉脈えそ症状を示した. 一方, 他の 22 個体は極軽いモットル症状か無病徴であったので, ウイルス感染の有無を DAS-ELISA により調査したところ, 3 個体が感染していた. 3 個体の中で最も症状が軽い個体に感染したウイルスを弱毒株として選抜し, L-NA3 弱毒株とした (Table 8a, Figs. 11 and 14).

#### 4) 亜硝酸ナトリウム処理

亜硝酸ナトリウム処理では, 合計 4 回試験を行った (Table 8b). 材料として NTND6B-Or1 強毒株と NTND6A 強毒株を用い, ジャガイモ (品種; 根系 59 号) 接種後に形成された局部病斑から合計 168 個体のタバコ (品種; Xanthi nc) へ単一病斑分離を行った. 全体の中で 73 個体は極軽いモットル症状か無病徴であったので, ウイルス感染の有無を DAS-ELISA により調査したところ, 7 個体が感染

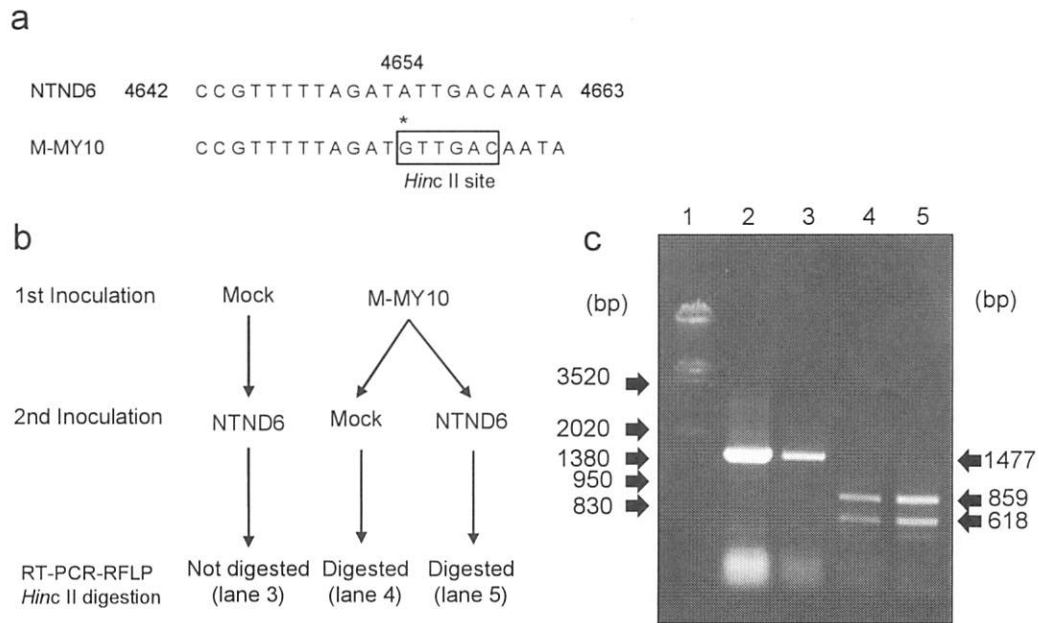


Fig. 13. The cross-protection test of the attenuated mutant M-MY10 against original isolate NTND6. One nucleotide difference at position nt 4654 (A to G) in the cylindrical inclusion protein (CI) encoding region between NTND6 isolate and M-MY10 mutant generated a restriction enzyme *Hinc* II site (a). In the cross-protection test, *Nicotiana tabacum* cv. Xanthi nc plants were inoculated with an original isolate NTND6 and an attenuated mutant M-MY10 (b). 0.7% agarose gel electrophoresis (c). Lane 1, Lambda DNA digested by *Hind* III and *Eco* RI, lane 2, RT-PCR products from the leaves infected with buffer (mock) for 1st inoculation and isolate NTND6 for 2nd inoculation, lane 3, digestion by *Hinc* II of RT-PCR products from the leaves infected with buffer (mock) for 1st inoculation and isolate NTND6 for 2nd inoculation, lane 4, digestion by *Hinc* II of RT-PCR products from the leaves infected with mutant M-MY10 for 1st inoculation and buffer (mock) for 2nd inoculation, and lane 5, digestion by *Hinc* II of RT-PCR products from the leaves infected with mutant M-MY10 for 1st inoculation and isolate NTND6 for 2nd inoculation.



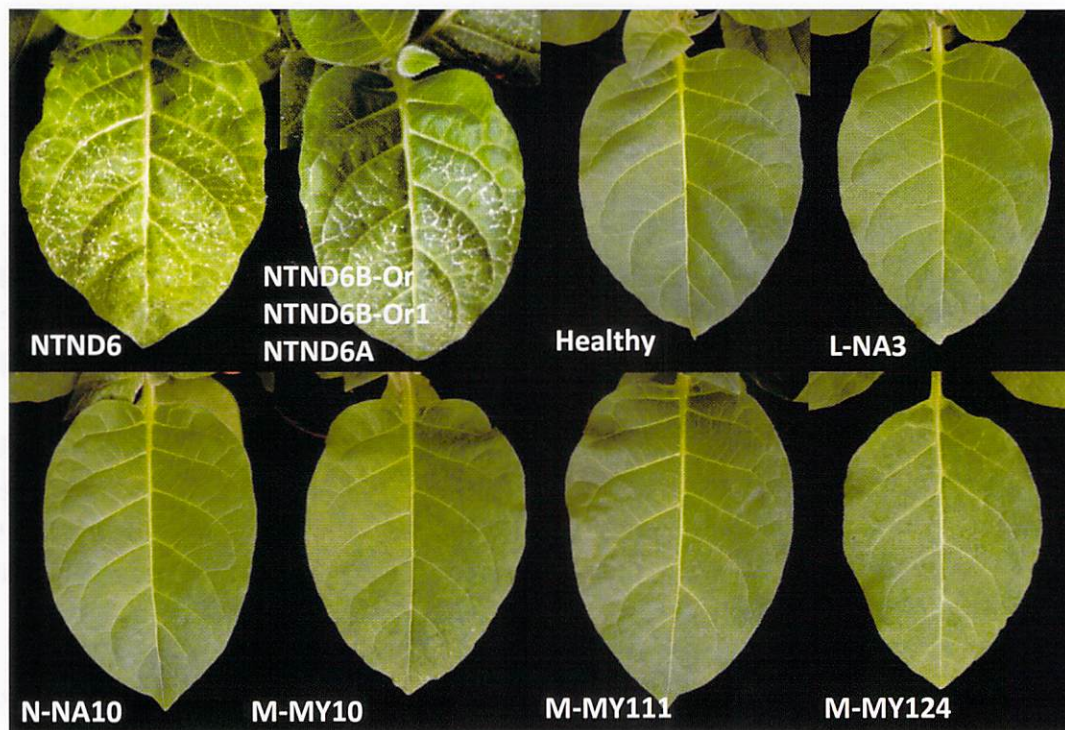


Fig. 14. Symptoms induced by attenuated mutants and original isolate NTND6 in *Nicotiana tobacum* cv. Xanthi nc two weeks after inoculation. An original isolate NTND6 and parental isolates NTND6B-Or, NTND6B-Or1 and NTND6A induced severe veinal necrosis. The attenuated mutants induced faint mottling or very weak vein clearing. An attenuated mutant L-NA3 was produced by the low temperature treatment method, an attenuated mutant N-NA10 was produced by the nitrous acid treatment method, and attenuated mutants M-MY10, 111 and 124 were produced by the mutagenesis-in-tissue culture method.

しており、N-NA6, N-NA7, N-NA8, N-NA9, N-NA10, N-NA52 および N-NA57 弱毒株とした (Table 8b, Figs. 11 and 14).

#### ウ) 組織培養変異誘発法

MITC 法では、合計 4 回試験を行った (Table 9c). 材料として NTND6A 強毒株を用い、感染タバコ葉からの葉片上に形成した不定芽から 4143 個の再分化個体が得られた。それらの中で、極軽いモットル症状または無病徴の個体について DAS-ELISA によりウイルス感染の有無を調査したところ、合計 8 個体が感染しており、M-MY10, M-MY111, M-MY 117, M-MY 118, M-MY 124, M-MY 221, M-MY 222 および M-MY 229 弱毒株とした (Table 8c, Figs. 11 and 14). 試験 1~4 で弱い病徴を示した再分化個体の割合は、それぞれ 0.5%, 0.9%, 1.8% および 1.8% であった。試験 2 および 3 では培養温度と培養期間の影響についても調査した結果、最も多く不定芽が得られたのは 25°C で、次いで 30°C, 20°C, 35°C の順であった (Table 8c). 培養温度別に弱い病徴を示した再分化個体の割合は、25°C (2.3%) が最も高く、20°C (1.2%), 30°C (0.4%), 35°C (0%) の順であった。25°C で培養した際、培養初期に形成された不定芽では強毒株と同様の症状を示す個体が含まれていたが、培養期間が長くなると弱い病徴を示す個体の割合が増加した。試験 4 では培養初期に変異を誘発するように高温 (40°C) 処理を培養期間の長さ (2, 4 および 7 日間) を変えて試験した。その結果、高温処理を行わない場合と比較して不定芽の形成数はわずかに減少したが、弱い病徴を示す不定芽が形成される割合に大きな違いは認められなかった。

#### (2) ウイルス蓄積量

低温処理、亜硝酸ナトリウム処理および MITC 法により作成した弱毒株をタバコに接種すると、いずれも軽いモットル症状あるいは無病徴であった。各弱毒株感染タバコ葉でのウイルス蓄積量を、DAS-ELISA の吸光度の平均値から相対的に評価した (Fig. 15). 各弱毒株と NTND6A 強毒株との間で吸光度の平均値を比較した時、統計処理により 5% 水準で有意差が認められたのは、L-NA3, N-NA-6, M-MY221, M-MY222 および M-MY229 弱毒株であったが、それらは供試した 3 ヶ所の葉全てで差が認められたわけではなく、一部の葉でのみ差が認められた。また、弱毒株の中で NTND6A 強毒株よりも吸

光度が低かったのは M-MY229 弱毒株の 3 葉目のみで、それ以外の葉の吸光度は高かった。有意差が認められなかった他の弱毒株の吸光度は、NTND6A 強毒株とほぼ同じ値を示した。

#### (3) 弱毒株の遺伝的な安定性調査

N-NA10 弱毒株と M-MY10 弱毒株を継代接種し、病原性の変化について調査した (Fig. 12). N-NA10 弱毒株は 2 回の継代接種を行い、合計 60 日間タバコで病徴調査を行ったが、強毒株の病徴に復帰することはなかった。また、M-MY10 弱毒株は 4 回の継代接種を行い、合計 90 日間タバコで病徴調査を行ったが、N-NA10 弱毒株と同様に強毒株の病徴に復帰することかはなかった。さらに、それぞれの弱毒株ゲノムにおいて強毒株から変異した部位について、継代後の弱毒株の塩基配列を解析し、強毒株配列への復帰の有無を調査した結果、弱毒株の変異部位が強毒株の配列に復帰する現象は認められなかった。

#### (4) 集団間の塩基配列の比較

弱毒株の材料とした NTND6 強毒株を、ガラス室内でタバコにおいて継代し維持するか、あるいはジャガイモ (品種; 根系 59 号) での単一病斑分離後に凍結乾燥処理を行い、保存した<sup>70)</sup>。ウイルスを継代する途中で変異が起きる可能性がある<sup>71)72)</sup>。このことから、材料とした強毒株ゲノムについて、弱毒株作出のための変異誘発処理の前に起きた変異の有無を確認するため、弱毒株の材料とした NTND6B-Or, NTN6B-Or1 および NTND6A 強毒株ゲノムの塩基配列を決定し、NTND6 強毒株と比較した (Table 9). NTND6B-Or, NTN6B-Or1 および NTND6A 強毒株は、いずれも NTND6 強毒株を由来とするものである (Fig. 11). これら 3 分離株と NTND6 強毒株の塩基配列を比較した結果、P1, P3, CI タンパク質遺伝子および 3' UTR 遺伝子領域内に複数の変異が起きており、それらの変異部位は弱毒株作出方法に関係なく、ほとんどの弱毒株ゲノムに認められた変異部位と同じであった。また、それらの塩基配列の変異では、単一の塩基への変異が起きており、異なる 2 塩基への変異は認められなかった。

本研究において作出した合計 16 の弱毒株のゲノムについて、5' 末端の増幅プライマーに用いた 27 塩基分の配列を除いた合計 9674 塩基を決定し、NTND6 強毒株ゲノムの塩基配列およびアミノ酸配

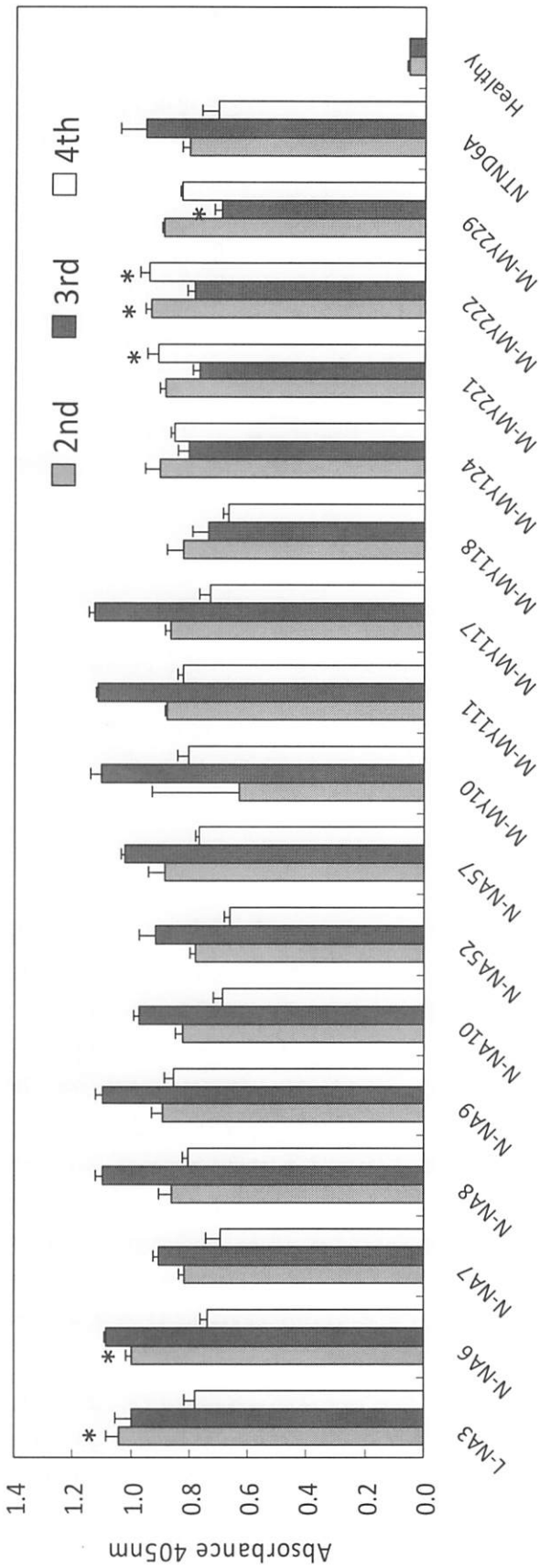


Fig. 15. Comparison of the virus accumulation of PVY<sup>NTN</sup> attenuated mutants and parental severe NTND6A isolate in the infected tobacco plants by DAS-ELISA. 0.3 gram of the 2nd, 3rd and 4th upper uninoculated leaves from the inoculated leaves of *Nicotiana tabacum* cv. Xanthi nc was homogenized with 3 ml of phosphate buffered saline containing Tween-20, 2 weeks post-inoculation. 3-4 leaf stage of the three tobacco plants was inoculated. Absorbance values were mean of three independent experiments. The viral CP accumulation was measured at 2 hr after adding substrate. Vertical thin bar indicates standard errors of means. Mock was healthy plant that was inoculated with 0.01 M potassium phosphate buffer (pH 7) instead of viruses. Asterisk indicates a significant difference between each attenuated mutant and severe NTND6A isolate based on the Student's *t* test ( $P < 0.05$ ).

Table 9. Comparison of the nucleotide and amino acid sequences of the genomes of the original isolate NTND6 and those of parental severe isolates used to produce attenuated mutants

Parental isolate	Region <sup>a</sup>	Nucleotide		Amino acid	
		Position <sup>b</sup>	Substitution	Position <sup>b</sup>	Substitution <sup>c</sup>
NTND6B-Or	P1	367 <sup>d</sup>	C→c/U <sup>e</sup>	60	R→R/H or Y
	P1	368 <sup>d</sup>	G→g/A	60	R→R/C or Y
	3' UTR	9497	A→A/g	—	—
NTND6B-Or1	P1	355	C→c/U	56	L→L/F
	P1	367	C→C/U	60	R→R/H or Y
	P1	368	G→G/a	60	R→R/C or Y
	P3	2796	U→U/C	—	—
	P3	3226	G→G/a	1013	V→V/I
	3' UTR	9497	A→a/G	—	—
NTND6A	P3	3287	A→A/g	1033	Q→Q/R
	CI	4194	U→U/C	—	—
	CI	5004	U→U/c	—	—
	CI	5109	G→G/a	—	—
	CP	8781	A→A/g	—	—

<sup>a</sup> P1, protein 1; P3, protein 3; CI, cylindrical inclusion protein; CP, coat protein; UTR, untranslated region.

<sup>b</sup> The positions of the nucleotide and amino acid correspond to those of the NTND6 genome.

<sup>c</sup> L (Leu), F(Phe), R (Arg), H (His), Y (Tyr), C (Cys), V (Val), I (Ile) and Q (Gln).

<sup>d</sup> If nucleotide positions at 367 and 368 are simultaneously changed, the amino acid changes from R (Arg) to Y (Tyr).

<sup>e</sup> Double mutations. Greater peak of nucleotide is written using uppercase letter.

列との相違部位を示した (Table 10). ほとんどの弱毒株ゲノムは、5' 末端のプライマー配列を除いた塩基配列の合計が 9674 塩基であり、各タンパク質遺伝子領域内には塩基の挿入や欠失は認められなかったが、M-MY221 および M-MY222 弱毒株では 5' UTR 遺伝子領域内に 2 塩基分の欠失が認められた。PVY ゲノムの合計 10 種のタンパク質遺伝子領域の中で、6K2 タンパク質遺伝子領域を除いた 9 種のタンパク質遺伝子領域において、合計 94 の塩基置換が認められた (Table 11). 塩基置換全体の約半分が同義置換、残り半分は非同義置換であり、9 種のタンパク質遺伝子のうち VPg タンパク質遺伝子を除く 8 種のタンパク質遺伝子において認められた。非同義置換について、全体の 65%は P1 および HC-Pro タンパク質遺伝子内に認められ、P3, 6K1, CI, NIa-Pro, NIb および CP タンパク質遺伝子内に、それぞれ 3, 2, 5, 2, 5 および 1 認められた。P1 タンパク質遺伝子内で認められた合計 19

の塩基置換のうち 15 (79%), HC-Pro タンパク質遺伝子内の 21 の塩基置換のうち 17 (81%) が、それぞれ非同義置換であった。上述の変異に関する数値は、各弱毒株の材料である NTND6B-Or, NTND6B-Or1 および NTND6A 強毒株が NTND6 強毒株から変異した部位は除いて算出した結果である。各塩基置換について、転移型 (transition) と転換型 (transversions) に分けてみると、合計 94 の塩基置換のうち 78 (83%) が転移型、16 (17%) は転換型であった。また転移型置換のうち、25 は C→U へ、21 が G→A, 21 が A→G, 11 が U→C であった (Table 12).

弱毒株の HC-Pro タンパク質遺伝子内に認められた非同義置換は全部で以下の 14ヶ所、<sub>302</sub>R→G, <sub>417</sub>N→S, <sub>443</sub>E→A, <sub>484</sub>D→N, <sub>496</sub>Y→H, <sub>517</sub>A→V, <sub>524</sub>P→S, <sub>546</sub>R→W, <sub>567</sub>D→G, <sub>605</sub>Q→P, <sub>616</sub>E→G, <sub>670</sub>T→A, <sub>728</sub>D→N および <sub>729</sub>E→K であった。また、<sub>443</sub>E→A と <sub>605</sub>Q→P はそれぞれ、M-MY117弱毒株と M-MY118弱毒株、N-NA8

Table 10. Comparison of the nucleotide and amino acid sequences between the genomes of parental severe isolates and those of attenuated mutants

Mutant	Region <sup>a</sup>	Nucleotide		Amino acid	
		Position <sup>b</sup>	Substitution <sup>c</sup>	Position	Substitution
Low temperature treatment L-NA3	(P1)	(367)	(c/U→C)	—	—
	(P1)	(368)	(g/A→G)	—	—
	HC-Pro	1825	C→U	546	R→W
	CI	5126	U→C	1646	I→T
	VPg	6135	U→C	—	—
	N1a-Pro	6870	C→U	—	—
	N1b	8019	C→U	—	—
	(3' UTR)	(9497)	(A/g→G)	—	—
Nitrous acid treatment N-NA6	(P1)	(355)	(c/U→U)	(56)	(L→F)
	(P1)	(367)	(C/U→C)	—	—
	(P1)	(368)	(G/a→G)	—	—
	HC-Pro	1739	C→U	517	A→V
	(P3)	(2796)	(U/C→C)	—	—
	(P3)	(3226)	(G/a→A)	(1013)	(V→I)
	N1b	8509	A→G	2774	T→A
	(3' UTR)	(9497)	(a/G→G)	—	—
N-NA7	(P1)	(355)	(c/U→U)	(56)	(L→F)
	(P1)	(367)	(C/U→C)	—	—
	(P1)	(368)	(G/a→G)	—	—
	HC-Pro	1639	G→A	484	D→N
	HC-Pro	2197	A→G	670	T→A
	(P3)	(2796)	(U/C→U)	—	—
	(P3)	(3226)	(G/a→G)	—	—
	CP	8673	G→A	—	—
(3' UTR)	(9497)	(a/G→G)	—	—	
N-NA8	(P1)	(355)	(c/U→U)	(56)	(L→F)
	(P1)	(367)	(C/U→C)	—	—
	(P1)	(368)	(G/a→G)	—	—
	P1	523	C→U	112	P→S
	HC-Pro	2003	A→C	605	Q→P
	(P3)	(2796)	(U/C→C)	—	—
	(P3)	(3226)	(G/a→A)	(1013)	(V→I)
	CI	4195	C→U	—	—
N1a-Pro	6621	A→G	—	—	
(3' UTR)	(9497)	(a/G→G)	—	—	
N-NA9	(P1)	(355)	(c/U→U)	(56)	(L→F)
	(P1)	(367)	(C/U→C)	—	—
	(P1)	(368)	(G/a→G)	—	—
	P1	523	C→U	112	P→S
	HC-Pro	2003	A→C	605	Q→P
	(P3)	(2796)	(U/C→C)	—	—
	(P3)	(3226)	(G/a→A)	(1013)	(V→I)
	CI	4195	C→U	—	—
N1a-Pro	6621	A→G	—	—	
(3' UTR)	(9497)	(a/G→G)	—	—	
N-NA10	(P1)	(355)	(c/U→U)	(56)	(L→F)
	(P1)	(367)	(C/U→C)	—	—
	(P1)	(368)	(G/a→G)	—	—
	HC-Pro	2374	G→A	729	E→K
	(P3)	(2796)	(U/C→C)	—	—
	(P3)	(3226)	(G/a→A)	(1013)	(V→I)
	N1b	7554	G→A	—	—
	(3' UTR)	(9497)	(a/G→G)	—	—
N-NA52	HC-Pro	1521	G→A	—	—
	HC-Pro	1759	C→U	524	P→S
	P3	2698	G→U	837	A→S
	(P3)	(3287)	(A/g→A)	—	—
	(CI)	(4194)	(U/C→U)	—	—
	(CI)	(5004)	(U/c→U)	—	—
	(CI)	(5109)	(G/a→G)	—	—
	(CP)	(8781)	(A/g→A)	—	—
N-NA57	HC-Pro	1439	A→G	417	N→S
	HC-Pro	1521	G→A	—	—
	HC-Pro	1675	U→C	496	Y→H
	P3	2698	G→U	837	A→S
	(P3)	(3287)	(A/g→A)	—	—
	(CI)	(4194)	(U/C→U)	—	—
	(CI)	(5004)	(U/c→U)	—	—
	(CI)	(5109)	(G/a→G)	—	—
CI	5470	A→G	1761	S→G	
N1a-Pro	6351	G→A	—	—	
(CP)	(8781)	(A/g→A)	—	—	

<sup>a</sup> P1, protein 1; HC-Pro, helper-component proteinase; P3, protein 3; 6K1, 6kDa 1 protein; CI, cylindrical inclusion protein; 6K2, 6kDa 2 protein; VPg, genome-linked viral protein; N1a-Pro, nuclear inclusion-proteinase protein; N1b, nuclear inclusion b protein; CP, coat protein and UTR, untranslated region.

<sup>b</sup> The positions of the nucleotide and amino acid correspond to those of the NTND6 genome (Ogawa et al. 2008).

<sup>c</sup> Region, position, nucleotide and amino acid in parentheses are where substitutions were already seen in the parental severe isolates used to produce attenuated mutants (see Table 10).

Table 10. (Continued)

Mutant	Region <sup>a</sup>	Nucleotide		Amino acid	
		Position <sup>b</sup>	Substitution <sup>c</sup>	Position	Substitution
mutagenesis-in-tissue culture (MITC) method					
M -MY10	5' UTR	70	C→U	—	—
	P1	355	C→U	56	L→F
	P1	915	U→C	—	—
	HC-Pro	2036	A→G	616	E→G
	(P3)	(3287)	(A/g→A)	—	—
	CI	3766	G→A	1193	G→S
	(CI)	(4194)	(U/C→C)	—	—
	CI	4654	A→G	1489	I→V
	(CI)	(5004)	(U/c→U)	—	—
	(CI)	(5109)	(G/a→A)	—	—
	VPg	6069	A→A/g	—	—
	(CP)	(8781)	(A/g→G)	—	—
	3' UTR	9497	A→A/G	—	—
M -MY111	P1	355	C→U	56	L→F
	HC-Pro	2371	G→A	728	D→N
	(P3)	(3287)	(A/g→A)	—	—
	(CI)	(4194)	(U/C→C)	—	—
	(CI)	(5004)	(U/c→U)	—	—
	CI	5025	G→A	—	—
	(CI)	(5109)	(G/a→A)	—	—
	NIb	8010	U→A	—	—
	NIb	8334	A→G	—	—
	(CP)	(8781)	(A/g→G)	—	—
M -MY117	5' UTR	70	C→U	—	—
	HC-Pro	1191	A→G	—	—
	HC-Pro	1517	A→C	443	E→A
	P3	2748	U→C	—	—
	(P3)	(3287)	(A/g→A)	—	—
	P3	3477	A→G	—	—
	6K1	3653	G→A	1155	R→K
	(CI)	(4194)	(U/C→C)	—	—
	(CI)	(5004)	(U/c→U)	—	—
	(CI)	(5109)	(G/a→A)	—	—
	(CP)	(8781)	(A/g→G)	—	—
	CP	9130	G→A	2981	V→I
	3' UTR	9514	G→A	—	—
M -MY118	5' UTR	70	C→U	—	—
	P1	355	C→U	56	L→F
	HC-Pro	1517	A→C	443	E→A
	HC-Pro	2283	C→U	—	—
	P3	2748	U→C	—	—
	(P3)	(3287)	(A/g→A)	—	—
	P3	3477	A→G	—	—
	(CI)	(4194)	(U/C→C)	—	—
	(CI)	(5004)	(U/c→U)	—	—
	(CI)	(5109)	(G/a→A)	—	—
	(CP)	(8781)	(A/g→G)	—	—
	M -MY124	5' UTR	101	C→U	—
(P3)		(3287)	(A/g→A)	—	—
6K1		3570	G→A	1127	M→I
(CI)		(4194)	(U/C→C)	—	—
CI		4596	A→G	—	—
(CI)		(5004)	(U/c→U)	—	—
(CI)		(5109)	(G/a→A)	—	—
NIa-Pro		6799	G→A	2204	V→M
NIb		7073	C→A	2295	T→K
(CP)		(8781)	(A/g→G)	—	—
3' UTR		9497	A→a/G	—	—
3' UTR	9498	U→U/c	—	—	

Table 10. (Continued)

Mutant	Region <sup>a</sup>	Nucleotide		Amino acid		
		Position <sup>b</sup>	Substitution <sup>c</sup>	Position	Substitution	
M -MY221	5' UTR	164	Deletion	-	-	
	5' UTR	165	Deletion	-	-	
	5' UTR	170	U→C	-	-	
	P1	217	U→A	10	F→I	
	P1	246	C→U	-	-	
	P1	255	C→U	-	-	
	P1	319	G→A	44	E→K	
	P1	355	C→U	56	L→F	
	P1	692	U→C	168	I→T	
	P1	826	A→C	213	K→Q	
	HC-Pro	1889	A→G	567	D→G	
	(P3)	(3287)	(A/g→A)	-	-	
	(C1)	(4194)	(U/C→C)	-	-	
	(C1)	(5004)	(U/c→U)	-	-	
	(C1)	(5109)	(G/a→A)	-	-	
	CI	5471	G→g/A	1761	S→S/N	
	NIa-Pro	6399	G→A	-	-	
	NIb	7073	C→A	2295	T→K	
	NIb	7449	G→A	-	-	
	(CP)	(8781)	(A/g→G)	-	-	
3' UTR	9515	C→U	-	-		
M -MY222	5' UTR	164	Deletion	-	-	
	5' UTR	165	Deletion	-	-	
	5' UTR	170	U→U/c	-	-	
	P1	255	C→U	-	-	
	P1	319	G→A	44	E→K	
	P1	355	C→U	56	L→F	
	P1	826	A→C	213	K→Q	
	HC-Pro	1889	A→G	567	D→G	
	(P3)	(3287)	(A/g→A)	-	-	
	(C1)	(4194)	(U/C→C)	-	-	
	(C1)	(5004)	(U/c→U)	-	-	
	(C1)	(5109)	(G/a→A)	-	-	
	NIb	7073	C→A	2295	T→K	
	NIb	7449	G→A	-	-	
	(CP)	(8781)	(A/g→G)	-	-	
	3' UTR	9515	C→U	-	-	
	M -MY229	P1	355	C→U	56	L→F
		P1	826	A→C	213	K→Q
		HC-Pro	1093	A→G	302	R→G
		P3	2767	C→A	860	L→I
(P3)		(3287)	(A/g→A)	-	-	
(C1)		(4194)	(U/C→C)	-	-	
(C1)		(5004)	(U/c→U)	-	-	
(C1)		(5109)	(G/a→A)	-	-	
VPg		5826	U→C	-	-	
NIa-Pro		6529	A→A/g	2114	I→I/V	
NIb		7073	C→A	2295	T→K	
(CP)		(8781)	(A/g→G)	-	-	
3' UTR		9497	A→G	-	-	

Table 11. Number of non-synonymous and synonymous substitutions in each gene of the 16 attenuated mutants obtained in this study

Substitution	No. of mutations in each region <sup>a</sup>												Total
	5' UTR	P1	HC-Pro	P3	6K1	CI	6K2	VPg	NIa-Pro	NIb	CP	3' UTR	
% of genome <sup>b</sup>	1.7	8.8	14.1	11.3	1.6	19.7	1.6	5.8	7.6	16.1	8.3	3.4	100
Non-synonymous	-	15	17	3	2	5	0	0	2	5	1	-	50
Synonymous	-	4	4	4	0	4	0	3	5	6	1	-	31
Total no (%)	6 (6.4)	19 (20.2)	21 (22.3)	7 (7.4)	2 (2.1)	9 (9.6)	0 (0.0)	3 (3.2)	7 (7.4)	11 (11.7)	2 (2.1)	7 (7.4)	94

<sup>a</sup> UTR, untranslated region; P1, protein 1; HC-Pro, helper-component proteinase; P3, protein 3; 6K1, 6kDa 1 protein; CI, cylindrical inclusion protein; 6K2, 6kDa 2 protein; VPg, genome-linked viral protein; NIa-Pro, nuclear inclusion-proteinase protein; NIb, nuclear inclusion b protein and CP, coat protein.

<sup>b</sup> Twenty-five nucleotides used for primer sequence in 5' UTR are excluded.



Table 12. Number of transition and transversion substitutions observed in the genomes of each attenuated mutant

mutant	No. of mutations <sup>a</sup>				Transition						Transversion					
	Total	N	S		A→G	G→A	C→U	U→C	A→C	A→U	G→C	G→U	C→A	C→G	U→A	U→G
L-NA3	5	2	3		0	0	3	2	0	0	0	0	0	0	0	0
N-NA6	2	2	0		1	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
N-NA7	3	2	1		1	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
N-NA8	4	2	2		1	0	2	0	1	0	0	0	0	0	0	0
N-NA9	4	2	2		1	0	2	0	1	0	0	0	0	0	0	0
N-NA10	2	1	1		0	2	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
N-NA52	3	2	1		0	1	1	0	0	0	0	1	0	0	0	0
N-NA57	6	4	2		2	2	0	1	0	0	0	1	0	0	0	0
Subtotal	24	15	9		6	7	6	1	2	0	0	2	0	0	0	0
M-MY10	6 (2) <sup>b</sup>	4	2 (2)		4 (1)	1	2 (1)	1	0	0	0	0	0	0	0	0
M-MY111	5	2	3		1	2	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0
M-MY117	6 (2)	3	3 (2)		2	3 (1)	1 (1)	1	1	0	0	0	0	0	0	0
M-MY118	5 (1)	2	3 (1)		1	0	3 (1)	1	1	0	0	0	0	0	0	0
M-MY124	4 (3)	3	1 (3)		2 (1)	2	1 (1)	1 (1)	0	0	0	0	1	0	0	0
M-MY221	12 [2], (2)	8	4 (2)		1	4	4 (1)	2 (1)	1	0	0	0	1	0	1	0
M-MY222	7 [2], (2)	5	2 (2)		1	2	3 (1)	1 (1)	1	0	0	0	1	0	0	0
M-MY229	7 (1)	6	1 (1)		3 (1)	0	1	1	1	0	0	0	2	0	0	0
Subtotal	52 (13)	33	19 (13)		15 (3)	14 (1)	16 (6)	8 (3)	5	0	0	0	5	0	2	0
Total	81 [4], (13)	50	31 (13)		21 (3)	21 (1)	25 (6)	11 (3)	7	0	0	2	5	0	2	0

<sup>a</sup> N; non-synonymous substitution, S; synonymous substitution.

<sup>b</sup> Number in parentheses indicates the number of mutations in 5' and 3' untranslated regions.

<sup>c</sup> Number in brackets indicates the number of deletions in 5' untranslated region at nt 164 and 165.

弱毒株とN-NA9弱毒株の2弱毒株間で共通した変異であった (Table 10). これらの非同義置換のほとんどは, HC-Proタンパク質遺伝子の中央領域に位置しており,次にC末端領域に位置していた (Fig. 16). 一方,弱毒株のなかでMITC法により作出したM-MY124弱毒株では,唯一HC-Proタンパク質遺伝子内に非同義置換が認められなかった.

あるアミノ酸部位で全く同じアミノ酸の変化が2系統で別々に生じることを平行進化 (parallel evolution) というが,本研究において作出した弱毒株ゲノムにおいて平行進化と思われるアミノ酸変異が認められた. NTND6 強毒株の CI タンパク質遺伝子内の塩基部位 5470 と 5471 の塩基は,それぞれ A と G であったが, N-NA57 弱毒株では塩基部位 5470 が G, M-MY221 弱毒株では塩基部位 5471 が A であり,塩基置換に伴いそれぞれ異なるアミノ酸 (アミノ酸部位 1761 の S が, N-NA57 では G に, M-MY221 では N) に変異しており,明瞭な平行進化部位と思われた. それら以外にも同じ弱毒株作出方法であるが,試験実施時期が異なる条件で作出した弱毒株間において共通する塩基置換が全ゲノムの中で以下の4ヶ所,5' UTR 内の塩基部位 70, P1 タンパク質遺伝子内の塩基部位 355, NIb タンパク質遺伝子内の塩基部位 7073 および 3' UTR 内の塩基部位 9497 において認められ,これらは不明瞭な平行進化と思われた. PIP0 遺伝子領域では塩基置換が認められなかった.

#### (5) 準種の塩基配列

弱毒株の材料とした NTND6A 強毒株の準種のゲノム構造を調査するため,5' UTR, P1 および HC-Pro タンパク質遺伝子領域のクローニングにより得られた合計 32 のクローンについて塩基配列を解析した. その結果,各クローンは塩基置換部位,置換ヶ所数およびそれらの組み合わせが異なる合計 13 タイプに分けられた (Table 13). MITC 法により作出した弱毒株の P1 および HC-Pro タンパク質遺伝子内で認められた変異は,NTND6A 強毒株のクローンにおいて認められなかった. 弱毒株で認められた変異の中で NTND6A 強毒株のクローンにおいても認められた変異は,MITC 法により作出された弱毒株の 5' UTR 内の塩基部位 70 と亜硝酸処理で作出した弱毒株の HC-Pro タンパク質遺伝子内の塩基部位 1521 で認められた変異のみであった. これらの塩基変異は,同義置換であるた

めアミノ酸変異は起きていなかった.

#### (6) 干渉作用調査

本研究により作出された弱毒株の強毒株に対する干渉作用について評価した (Fig. 13, Table 14). 試験は,本葉 3~4 枚のタバコに N-NA10 弱毒株または M-MY10 弱毒株を 1 次接種し,その 14~18 日後に弱毒株接種葉の 2 枚上の葉に NTND6 強毒株を 2 次接種した. 2 次接種 24~28 日後に葉を採集し,ウイルスゲノムの一部領域 (P1 および HC-Pro タンパク質遺伝子) の塩基配列解析,あるいは RT-PCR-RFLP により植物体内での弱毒株および強毒株の存在状況を調査した. M-MY10 弱毒株はゲノム内の CI タンパク質遺伝子領域内に制限酵素 *Hinc* II の切断部位を有していたので,NTND6 強毒株と M-MY10 弱毒株との干渉作用の有無は RT-PCR-RFLP により評価した. RT-PCR-RFLP において,NTND6 強毒株と M-MY10 弱毒株感染タバコからの核酸を用いた RT-PCR により 1477bp (CI タンパク質遺伝子内の塩基部位 4039~5515 に相当) の増幅産物が得られるが, M-MY10 弱毒株の増幅産物のみが *Hinc* II 処理により 859 bp と 618 bp の 2 断片に切断された. 干渉作用試験において,この 2 断片は M-MY10 を単独で接種した植物,あるいは M-MY10 弱毒株を強毒株に対する防御ウイルスとして 1 次接種に用いた時に認められたことから, M-MY10 弱毒株は NTND6 強毒株に対して十分な干渉作用を有していると考えられた. N-NA10 弱毒株を 1 次接種後に NTND6 強毒株を 2 次接種したタバコにおいて, N-NA10 弱毒株ゲノムの一部領域の塩基配列のみが認められ, NTND6 強毒株の塩基配列は認められなかった. このことは N-NA10 弱毒株が NTND6 強毒株に対して干渉作用を有していることを示していた. 同様の干渉作用は, M-MY10 弱毒株および N-NA10 弱毒株の接種を行っていない上位の葉において認められただけでなく,接種葉においても認められた.

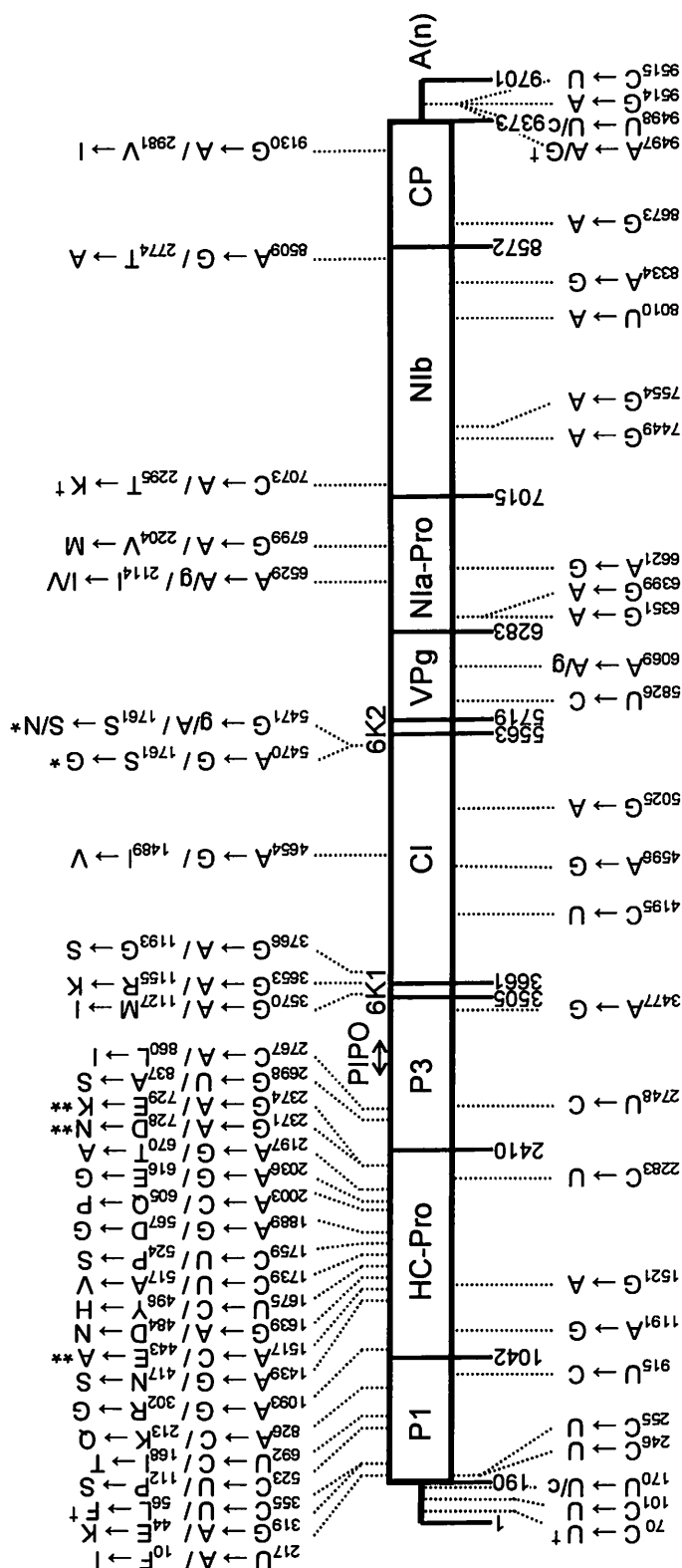


Fig. 16. Substitution map of the genomes of attenuated *Potato virus Y* mutants. The nucleotide positions of the substitutions found in the attenuated mutants are shown relative to the 5' end of the genome. The positions of the nucleotide correspond to those of the original isolate of NTND6 sequence and refer to the data shown in Table 11. Nucleotides with non-synonymous substitutions show the amino acid changes, whereas the nucleotide positions only synonymous substitutions are shown. Nucleotides and amino acids marked by symbols indicate where clear and temporal 'parallel evolution' substitutions have occurred respectively; i.e. amino acid substitutions are found in the genomes of the both of attenuated mutants produced by different attenuated mutants-producing methods (\*) and by the same producing methods but different batches (†). Nucleotides and amino acids without symbols indicate independent substitutions obtained in attenuated mutants but include substitutions obtained by same batches in same methods.

Table 13. Comparison of the nucleotide and amino acid sequences of 5' UTR, P1 and HC-Pro encoding regions of the NTND6A isolate and its clones

Type <sup>a</sup>	No. of clones	Position and mutation <sup>b</sup>		
		5' UTR <sup>c</sup>	P1 <sup>c</sup>	HC-Pro <sup>c</sup>
1	12	—	—	—
2	2	70 C→U	—	—
3	1	70 C→U, 144 U→C	—	—
4	1	70 C→U	348 G→A	1293 A→C
5	1	70 C→U	—	1704 U→C
6	2	70 C→U	604 A→G/139 T→A <sup>d</sup> , 606 G→A, 1011 A→G	1521 G→A, 1615 U→C/476 Y→H
7	1	—	221 G→A/11 G→D	—
8	1	—	258 U→C	—
9	1	—	—	1293 A→C
10	7	—	—	1521 G→A
11	1	—	—	1521 G→A, 2325 U→C
12	1	—	—	1701 C→U
13	1	—	—	2303 G→U/705 G→V
Total	32	—	—	—

<sup>a</sup> The clone of NTND6A was used to categorize 13 types by their sequences. The clones of type 1 had same sequence as NTND6A, but other types differed in their 5' UTR, P1 and HC-Pro encoding regions.

<sup>b</sup> The positions of the nucleotide and amino acid correspond to sites in the NTND6 genome.

<sup>c</sup> UTR, untranslated region; P1, protein 1 and HC-Pro, helper-component proteinase.

<sup>d</sup> nucleotide change/ amino acid change.

Table 14. Cross-protection effectiveness of the attenuated mutants against the severe isolate

1st inoculation	2nd inoculation	Number of test plants <sup>a</sup>	Number of tobacco plants showing <sup>b</sup>	
			Severe symptom	Faint or no symptom
N-NA10	Mock <sup>c</sup>	10	0	10
Mock	NTND6 <sup>d</sup>	10	10	0
N-NA10	NTND6	20	0	20
M-MY10	Mock	10	0	10
Mock	NTND6	10	10	0
M-MY10	NTND6	20	0	20

<sup>a</sup> Total number of test plants of the two experiments.

<sup>b</sup> Severe symptom, vein necrosis; Faint symptom, very weak vein clearing or mottling. Virus infections were also checked by DAS-ELISA, restriction fragment length polymorphism (RT-PCR-RFLP) and sequencing RT-PCR products from a part of the viral genomes.

<sup>c</sup> Inoculated with 0.01M potassium phosphate buffer (pH7.0).

<sup>d</sup> The tobacco plants inoculated with isolate NTND6 showed vein necrosis 14 dpi.

### 3) 考察

本研究では、これまで弱毒株の作出方法として報告されている低温処理<sup>41), 59)</sup>および亜硝酸ナトリウム処理<sup>112)</sup>に加えて、植物ウイルスとして新しい方法であるMITC法を用いてPVY弱毒株の作出を試みた。低温処理および亜硝酸ナトリウム処理は、処理後のウイルス感染植物または感染植物からの粗汁液に弱毒株と強毒株が混在することから、弱毒株を得るためには単一病斑分離が必要であるが、MITC法では培養前に強毒株ウイルス集団に感染していた植物組織から単一病斑分離を行うことなしに、培養中に病原性が異なる変異体が作出されたことから、本法では単一病斑分離は必要ないと考えられた。事実、MITC法により作出したM-MY10弱毒株とM-MY111弱毒株について単一病斑分離を行い、それらの塩基配列を解析し、単一病斑分離前の弱毒株の塩基配列と比較したところ、両者間に相違は認められなかった。亜硝酸ナトリウム処理では特定の塩基の置換が起りやすく、その結果としてウイルスゲノムに変異が誘発される<sup>9)</sup>。低温処理およびMITC法により弱毒株が作出されるメカニズムについては、ウイルス感染植物内に存在する様々な変異体の集団〔準種 (quasispe-

cies)]<sup>13), 14), 17), 72)</sup>が関係している可能性がある。弱毒株の材料とした強毒株のウイルス集団において、各処理を行う前に既に弱毒株が集団内に存在しており、各処理によって弱毒株の選抜が促進されたと考えられた。本研究ではMITC法を行う前に既に弱毒株が強毒株ウイルス集団内に存在しているかどうかを確かめるため、材料としたNTND6A強毒株のウイルス集団の多様性を調査した。その結果、弱毒株ゲノムにおいて非同義置換が多く認められたP1およびHC-Proタンパク質遺伝子について、強毒株ウイルス集団内に弱毒株で認められた変異を探索したが見つからなかった (Table 13)。しかし、本研究では合計32クローンしか解析に使用できなかったことから、弱毒化に関係する変異が強毒株ウイルス集団内にまだ隠されており、MITC法の際に選択によって弱毒株がクローンとなった可能性も否定できない。本研究において作出した弱毒株ゲノムの塩基配列の変異数は、亜硝酸ナトリウム処理と比較してMITC法の方が多かった (Table 12)。このことから、カルス形成や不定芽からの再分化は、ウイルス複製中の変異率を高めているのかもしれない。MITC法における組織培養時に、培養期間が長くなるほどウイルスフリーになる不定芽の数が増加したことから、RNAサ

イレレンシングが影響している可能性も考えられる。以上のように、現時点では低温処理および MITC 法による弱毒株作出のメカニズムには不明な点が多く、その解明には処理前後のウイルス集団の多様性について本研究よりも多数のクローンをを用いて調査する必要がある。

MITC 法では、これまで弱毒株作出方法として利用されてきた低温処理および亜硝酸ナトリウム処理よりも変異部位が多い変異株を作出できた。本法において不定芽形成に必要なスペースはポット栽培の植物体を扱う場合よりも小さく、同時に大量に取り扱うことが可能であることから、従来の方法よりも多数の変異株を容易に作出することができる。MITC 法では前述のように単一病斑分離が必要ないことも含めて考慮すると、本法は植物ウイルスの変異株作出方法として、従来の方法よりも優れたものであると考えられた。

本研究において弱毒株ゲノムに認められた変異は、ウイルス複製途中での RdRp のエラー、あるいはシーケンス時の RT-PCR エラーが原因である可能性もある。本研究では cDNA 増幅時に正確性の高いポリメラーゼを使用した。本研究で使用したポリメラーゼの正確性について、既に配列が明らかになっている cDNA クローンを増幅させ、PCR 産物を用いて合計 37,175 塩基を解析し、元の配列と比較することによりエラー率を算出した。その結果、PCR 時のエラー率は、 $0.268 \times 10^{-4}$  よりも低かった。MMLV 逆転写酵素の最大誤取込率は、1 塩基あたり  $0.36 \times 10^{-4}$  と評価されている<sup>34)</sup>。逆転写と PCR 時を合わせた 1 塩基あたりのエラー率は、 $0.63 \times 10^{-4}$  となる。本研究において作出した合計 16 の弱毒株の塩基配列解析に用いた 154,784 塩基について、このエラー率を用いて算出した塩基の間違いの総数は 10 塩基よりも少ないことになる。

作出した弱毒株と材料とした強毒株間の HC-Pro タンパク質遺伝子におけるアミノ酸置換部位は、既報の PVY のタバコ葉脈えそ症状に関係するアミノ酸部位および他のポティウイルスで報告されているウイルスの弱毒化に関係するアミノ酸部位を示した。HC-Pro タンパク質は多機能なタンパク質として知られており、その機能としてアブラムシ伝搬性、ウイルスの細胞間および長距離移動、ウイルス複製、病徴発現、他のウイルスとの相乗効果、20S タンパク質分解酵素複合体

(proteasome) とシステイン型タンパク質加水分解との相互作用、ジーンサイレンシングの抑制<sup>89), 103)</sup> などがある。ポティウイルスの弱毒化に HC-Pro タンパク質遺伝子内の塩基置換や欠失が関係していることが、OYDV<sup>93)</sup>、PRSV<sup>6)</sup>、C1YVV<sup>111)</sup> および ZYMV<sup>12), 89)</sup> において報告されている。他にも HC-Pro タンパク質遺伝子全体を通して、ウイルスの弱毒化に関係するアミノ酸変異が発見されている。PVY ではタバコに葉脈えそ症状に関係する 3ヶ所のアミノ酸部位が同定されている<sup>30), 101)</sup>。ZYMV では HC-Pro タンパク質遺伝子の CDNQLD モチーフが弱毒化に関与していることが報告されており<sup>12)</sup>、本研究で作出した N-NA7 弱毒株の同モチーフ内にアミノ酸変異 (アミノ酸部位 484 の D→N) が認められた。弱毒株の他の HC-Pro タンパク質遺伝子内のアミノ酸変異は、主に中央領域に位置していた。興味深いことに、弱毒株の中で N-NA10 弱毒株は HC-Pro タンパク質遺伝子内の 1ヶ所 (アミノ酸部位 729 の E→K) のみがアミノ酸変異を起こしているだけで、他のタンパク質遺伝子にはアミノ酸変異は認められなかった。このことは、単独のアミノ酸変異だけでも病徴の弱毒化が可能であることを示していた。P1 タンパク質遺伝子内の 56 番目および NIb タンパク質遺伝子内の 2295 番目のアミノ酸、5' UTR 内の 70 番目および 3' UTR 内の 9497 番目の塩基置換は、平行進化部位の可能性があり、ウイルスの弱毒化に影響していると思われる<sup>4)95)</sup>。しかし、P1 タンパク質遺伝子内の 56 番目のアミノ酸置換と 3' UTR 内の 9497 番目の塩基置換は、弱毒株の材料とした強毒株においても認められたことから、これらの部位は弱毒化に対して重要ではないと考えられた。M-MY111 弱毒株および M-MY118 弱毒株は、HC-Pro タンパク質遺伝子内の 728 番目と 443 番目のアミノ酸がそれぞれ変異していたが、両弱毒株は P1 タンパク質遺伝子内の 56 番目のアミノ酸も変異していた。この P1 タンパク質遺伝子内のアミノ酸変異は、亜硝酸ナトリウム処理の材料とした NTND6B-Or1 強毒株においても認められたことから、HC-Pro タンパク質遺伝子内のそれぞれのアミノ酸変異が弱毒化に関係する部位であることが示唆された (Table 9)。ほとんどの弱毒株において、HC-Pro タンパク質遺伝子内に少なくとも 1ヶ所のアミノ酸変異が起きていたことから、他のタンパク質遺伝子で認められた

アミノ酸変異は全て、HC-Pro タンパク質遺伝子内の変異と関連があり、弱毒化を補助している可能性があることが示唆された。興味深いことに、MITC 法により作出された M-MY124 弱毒株は、HC-Pro タンパク質遺伝子内に非同義置換が認められなかった。そのため、複数回この弱毒株のタバコでの病徴を調査したが、いずれの調査においても軽いモットル症状を示し、強毒株のような葉脈えそ症状を起こすことはなかった。タバコでのウイルス蓄積量調査において M-MY124 弱毒株は、他の弱毒株および強毒株とほぼ同程度の蓄積量が認められた (Fig. 15)。M-MY124 弱毒株ゲノムのアミノ酸変異は、6K1, NIa-Pro および NIb タンパク質遺伝子内にそれぞれ 1 ヶ所、合計 3 ヶ所において認められた。このことは、6K1, NIa-Pro および NIb タンパク質遺伝子内のアミノ酸変異が P1 および HC-Pro タンパク質遺伝子と同様に弱毒化に重要な遺伝子部位であることを示していた。以上のようにウイルスの弱毒化に関与する遺伝子部位として、特に HC-Pro タンパク質遺伝子が関与していると考えられるが、PVY では病原性に HC-Pro タンパク質遺伝子以外の遺伝子部位が関係していることが報告されている<sup>3), 31)</sup>。弱毒化の原因となる単一のアミノ酸部位を同定するには、PVY の感染性クローンをを用いて点突然変異を利用した実験が必要である。

これまで PVY<sup>0</sup> 系統と PVY<sup>N</sup> 系統の分離株間あるいは PVY<sup>N</sup> 系統グループ内の分離株間での干渉作用が調査されているが、いずれも分離株や宿主によって干渉作用の程度は異なっており、干渉作用が認められないか、部分的な干渉作用が認められるだけであった<sup>2), 45), 48), 92), 96), 102)</sup>。対照的に本研究において作出した弱毒株では、タバコにおいて強毒株に対する干渉作用が認められことから、防除素材として利用できる可能性が示された。しかし本研究で作出したタバコ弱毒株は、いずれもタバコでは弱毒化していたが、ジャガイモには強毒株と同様に茎葉にえそ症状を起こした。PVY<sup>NTN</sup> 系統の L26 分離株では、既報の PVY<sup>NTN</sup> 系統分離株と同様のゲノム構造を有していたが、タバコ感染時には PVY<sup>NTN</sup> 系統の特徴である葉脈えそ症状を示さず、ジャガイモ塊茎にはえそ症状を起こしたことから、タバコとジャガイモでのえそ症状にはウイルスのそれぞれ異なる遺伝子部位が関係していることが示唆された<sup>30)</sup>。本研究のタバコ弱毒株についても、ジ

ャガイモでの弱毒化にはタバコでの弱毒化とは別の遺伝子部位が関係しており、宿主によって病原性に関係する遺伝子部位が異なるものと考えられた。

## 総合考察

本研究では、本邦の PVY 分離株を採集し、それらゲノムの全塩基配列を決定後、ヨーロッパおよび北米地域の分離株集団と共に解析し、本邦の PVY 集団遺伝構造の解析だけでなく、北米やヨーロッパの集団遺伝構造とも比較した。ウイルスゲノムの組換え現象は、病原性の変化などのウイルスの生物学的性質を変化させる決定要素の一つであると考えられており、ポティウイルスにおいても進化の重要な推進力である<sup>20), 106), 107)</sup>。本研究では本邦産 PVY<sup>NTN</sup> 系統分離株において、本邦ではこれまで確認されていないゲノムの新たな組換え型を示す分離株が存在することを明らかにした<sup>64), 65), 68)</sup>。本研究において調査した PVY<sup>NTN</sup> 系統分離株の中で 1995 年から 2000 年にかけて採集した分離株のゲノム構造は全て非組換え体であり、新たな組換え体は 2000 年以降に採集された分離株において認められた。最近、北海道において、本研究と同様の組換えパターンをゲノムに持つ分離株の発生が報告されており<sup>7)</sup>、本研究での結果と併せて考えると、ゲノム構造の異なる新しい PVY 分離株のサブグループ集団が本邦において拡散しつつあること、そして組換え体サブグループ集団が形成する際の創始者効果が起きていることが推測された<sup>64)</sup>。

これまでに TuMV では集団遺伝構造および遺伝的多様性が世界レベルまたは地域レベルで詳細に調査され、地理系統学的解析により、TuMV の起源地はヨーロッパを含めた南西ヨーロッパ地方と考えられ、それらの地域から突然変異、組換え、宿主適応、地理的隔離を受けながら世界中に拡散してきたと推測されている<sup>71), 97), 98), 99)</sup>。本研究の分子系統解析において作成した分子系統樹では、本邦産の PVY<sup>0</sup> 系統分離株の枝の長さが本邦産 PVY<sup>NTN</sup> 系統分離株の枝の長さよりも長かった。このことは、PVY<sup>0</sup> 系統分離株が PVY<sup>NTN</sup> 系統分離株よりも早い時期に本邦に侵入した可能性が高いことを示しており、PVY<sup>NTN</sup> 系統分離株集団は最小の選択圧下で、最近出現したことを示唆していた<sup>64), 68)</sup>。ジャガイモの青果物の本邦への輸入は植物防疫上の規制により行われていないが、ジャガイモあるいは PVY が感染可能な他の農作物を通じて PVY<sup>NTN</sup> 系統分離株が比較的最近本邦に侵入した可能性を否定できないことから、植物防疫分野での現状の対策

について考慮する必要がある。いずれにせよ本研究において、PVY<sup>0</sup> 系統および PVY<sup>NTN</sup> 系統分離株が本邦に侵入した時期が異なる可能性が示されたことから、本邦への PVY の侵入経路や時期を明らかにするには、ジャガイモが本邦へ導入された際の経路の一部と推測される東南アジアのような近隣諸国からの PVY 分離株の全塩基配列データが必要であると考えられる。

以上のように、本研究において本邦の PVY 分離株の集団遺伝構造が明らかになったため、実際の農業現場の防除に利用できる強毒ウイルス（強毒株）に対して干渉作用を示す弱毒ウイルス（弱毒株）の開発と応用研究へ発展させた。

本研究では、タバコやジャガイモに最も被害を与えている PVY<sup>NTN</sup> 系統の強毒株を材料に、従来の弱毒株作出方法である低温処理<sup>41), 59)</sup> および亜硝酸ナトリウム処理<sup>112)</sup>に加えて、新たな方法である MITC 法を用いて弱毒株の作出を試みた結果、タバコ<sup>67)</sup> およびジャガイモでの弱毒株の作出に成功した。MITC 法は低温処理および亜硝酸ナトリウム処理と比較して、同時に大量の検体を取り扱うことが可能であり、ゲノム内の変異部位が多い変異株を作出できる。MITC 法では単一病斑分離を行う必要がないことから、局部病斑形成植物がないウイルス種や汁液接種が困難なウイルス種の弱毒株を作出することに利用できる。これらの利点から、MITC 法は植物ウイルスの変異株作出方法として従来の方法よりも優れたものであると考えられた。

これまで複数のポティウイルスにおいて HC-Pro タンパク質遺伝子内の塩基置換<sup>6), 12), 89), 111)</sup> や欠失<sup>93)</sup> が弱毒化に関与していることが報告されている。PVY ではタバコの葉脈えそ症状に関係する 3 ヶ所のアミノ酸部位が同定されている<sup>30), 101)</sup>。本研究では作出した弱毒株ゲノムの全塩基配列を解析し、弱毒化に関与する領域を探索した結果、HC-Pro タンパク質遺伝子が PVY のタバコおよびジャガイモでの弱毒化に関係する重要な遺伝子であることが示唆された。弱毒株の HC-Pro タンパク質遺伝子内のアミノ酸変異については、既報の病原性の変化に関与するアミノ酸部位と一致する部位が認められなかったことから、既報とは異なる部位にもポティウイルスの弱毒化に関与する作用があることが明らかになった<sup>67)</sup>。弱毒株の HC-Pro タンパク質遺伝子内のアミノ酸変異部位



は、ウイルスの RNA サイレンシングや RNA 結合能力、細胞間移行に関係している中央領域<sup>63), 75)</sup>に位置している場合が多かった。これまでポテトウイルスの弱毒化の原因の一つとして、RNA サイレンシング機能の低下が関係していることが報告されている<sup>89), 108), 111)</sup>。CIYVV では、HC-Pro タンパク質遺伝子内の 2ヶ所のアミノ酸置換が弱毒化の原因であり、RNA サイレンシングの抑制能力の低下に伴いウイルスの蓄積量も低下した<sup>111)</sup>。ZYMV では、HC-Pro タンパク質遺伝子内の 2ヶ所のアミノ酸置換が弱毒化に関与しているが、これらの置換は RNA サイレンシング抑制活性には影響しておらず、病徴の弱毒化には RNA サイレンシング抑制能力の低下が必ず関係しているわけではないことが報告されている<sup>50)</sup>。本研究で作出した弱毒株の RNA サイレンシング機能については今後詳細に調査する必要があるが、タバコ感染時に弱毒株の蓄積量低下が認められなかったことから、RNA サイレンシング抑制能力の低下以外に PVY の病原性を弱毒化させるメカニズムが存在すると考えられた。本研究において作出した弱毒株の一部では、HC-Pro タンパク質遺伝子内にはアミノ酸変異が認められず、6K1, NIa-Pro および NIb タンパク質遺伝子内に変異が認められた。ウイルスの宿主特異性の決定因子として、PRSV では NIa-Pro タンパク質遺伝子<sup>5)</sup>、PVY では CP タンパク質遺伝子<sup>3), 31)</sup>の関与が示唆された。PVY では NIb タンパク質遺伝子が宿主のウイルス抵抗性遺伝子に対して非病原性因子であり、NIb タンパク質遺伝子内の 1ヶ所の塩基変異によってウイルスの病原性が変化することが報告されている<sup>33)</sup>。本研究の結果より、PVY の弱毒化に関与する遺伝子部位は HC-Pro タンパク質遺伝子以外にも存在し、弱毒化のメカニズムは複雑であると考えられるが、原因となる遺伝子部位やアミノ酸部位を同定するには、感染性クローンを用いて点突然変異を利用した実験が必要である。

PVY の防除技術としては、宿主の抵抗性遺伝子を従来の手法あるいは遺伝子組換え技術を用いて導入した抵抗性品種を育成し、それらを利用することが最も効果的であると考えられている。現在の本邦のジャガイモにおける PVY 抵抗性品種の育成は、PVY<sup>0</sup> および PVY<sup>N</sup> 系統 (PVY-T) を対象として長年評価、選抜されてきたため、近年発生が拡大している PVY<sup>TM</sup> 系統に対する既報の PVY 抵抗性

遺伝子の効果については十分な調査が行われておらず、抵抗性を評価する際の対象ともされていない。本研究の集団遺伝構造解析結果より、本邦のジャガイモに発生する PVY<sup>TM</sup> 系統にはゲノム構造が異なる 2 サブ集団が、PVY<sup>0</sup> 系統には 3 サブ集団が存在することが明らかになった<sup>64)</sup>。これまで PVY では系統の違いや、同じ系統の中でも分離株のゲノム構造の違いにより、ジャガイモ<sup>52), 74), 81)</sup>、*C. amaranticolar*<sup>36)</sup> および *P. floridana*<sup>3), 31)</sup> での症状の現れ方や発病程度が変化することが報告されている。このことから本邦に発生している PVY についても、ゲノム構造やサブグループの違いにより、ジャガイモでの病徴や既存の PVY 抵抗性遺伝子に対する反応が既報の分離株とは異なる分離株が存在する可能性がある。今後 PVY に対する抵抗性品種の育成には、本邦の PVY が遺伝的に多様であることをジャガイモの育種に携わる研究者と共通の認識として共有し、既存の抵抗性遺伝子の評価やゲノム構造の違いがジャガイモの抵抗性に与える影響などを詳細に調査する必要がある。本研究の結果より、本邦の PVY 分離株の集団遺伝構造を調査することは、性質の異なる PVY 分離株の本邦での分布状況を明らかにするために必要なことであり、今後も PVY に対する防除対策を戦略的に構築する上で非常に重要なことであると考えられた。

前述のように植物ウイルス病の防除技術として、抵抗性品種の利用とともに弱毒ウイルスの利用がある。これまで複数の弱毒ウイルスについては、農作物の生産現場においてウイルス病の防除手段として実用化されている<sup>40), 60)</sup>。PVY の干渉作用については、これまでの報告では部分的な干渉作用を示すだけか、あるいは干渉作用は認められなかった<sup>2), 45), 48), 92), 96), 102)</sup>。これらの報告とは対照的に本研究において作出した弱毒株は、強毒株に対して干渉作用を示し、強毒株による病気の発生を抑制したことから、防除技術の素材として実用化の可能性も示された。

ジャガイモの病害虫抵抗性品種の育成では、単独の病害虫に対して抵抗性を示すことよりも複数の病害虫に対して抵抗性を示す複合抵抗性品種の育成が目標の一つとされており、近年では各種病害虫抵抗性遺伝子に対する DNA マーカーを用いた効率的な手法が利用されている<sup>57)</sup>。ジャガイモの

品種育成では病害虫抵抗性だけでなく、同時に高い収量性や品質が重要な形質とされており、多くの条件を同時に満たす品種の育成は困難な状況にある。本研究の結果より、弱毒ウイルスはPVY抵抗性遺伝子を持たない既存品種あるいは新品種に対して、比較的容易にPVYに対する抵抗性を付加させる手段として利用できると考えられた。このことから、本研究で作出した弱毒ウイルスの実用化には改良すべき点が複数あるが、これまでPVYの防除戦略において検討されることがなかった弱毒ウイルス利用の可能性を見出した本研究の意義は非常に大きい。

以上のように本研究では、本邦のPVYの集団遺伝構造を初めて明らかにし、新たな弱毒株作出方法を開発後、自然条件下でも利用できるPVY弱毒株の作出に成功した。これらの成果は、本ウイルスだけでなく他の植物ウイルスにも応用できる弱毒株作出技術を開発しただけでなく、本研究で作出した弱毒株が実用化できる可能性をも示唆した。本研究により得られた成果は、将来の植物防疫や抵抗性品種の育成研究にも応用できることから、植物病理学上の基礎から応用まで幅広く貢献できると思われる。

## 要約

植物ウイルスの集団遺伝構造に関する研究は、ウイルスの進化を理解する上で非常に重要である。ポティウイルス科、ポティウイルス属のタイプ種であるジャガイモ Y ウイルス (PVY) は、世界各地のジャガイモ産地において大きな被害を起こす重要なウイルスである。PVY は生物学的性質や血清学的性質、ゲノム構造の違いなどにより複数の系統グループに分けられ、主なものとして PVY<sup>0</sup>、PVY<sup>N</sup> および PVY<sup>C</sup> がある。また最近、PVY<sup>N</sup> 系統グループに属する新たな系統として PVY<sup>NTN</sup> および PVY<sup>N-TI</sup> が報告されており、これら 2 系統の一部はジャガイモ塊茎えそ病を起こす。これまで幾つかのポティウイルスについて集団遺伝構造解析が行われているが、PVY に関する解析は行われていなかった。そこで本研究では、本邦において PVY<sup>N</sup> 系統グループ (PVY<sup>N</sup> および PVY<sup>NTN</sup>) の 10 分離株および PVY<sup>0</sup> 系統の 10 分離株を採集し、それらゲノムの全塩基配列を決定後、ヨーロッパおよび北米地域の分離株集団と共に解析し、本邦の PVY 集団遺伝構造の解析だけでなく、北米やヨーロッパの集団遺伝構造とも比較した。

PVY<sup>N</sup> 系統グループ分離株の集団遺伝構造解析の結果、北米、ヨーロッパおよび本邦の集団には 2 サブ集団が存在していた。一方、PVY<sup>0</sup> 系統分離株の集団遺伝構造解析の結果、北米集団には 4 サブ集団、ヨーロッパ集団には 2 サブ集団、本邦集団には 3 サブ集団が認められた。また、PVY<sup>N</sup> 系統グループの分離株の多くは、PVY<sup>0</sup> および PVY<sup>N</sup> 系統の配列を親型に持つ多様な組換え体であったが、PVY<sup>0</sup> 系統分離株は、3 集団全てにおいて非組換え体であった。さらに、塩基多様度および分子系統解析結果より、本邦産分離株の一部はヨーロッパおよび北米集団とは異なる集団を形成していた。

これまで、PVY<sup>NTN</sup> 系統分離株の弱毒ウイルス (以下、弱毒株) に関する研究は報告されていない。そこで本研究では、タバコ感染時に葉脈えそ症状を起こす PVY<sup>NTN</sup> 系統の強毒 NTND6 分離株を材料に、従来の弱毒株作出方法である低温および亜硝酸処理に加えて、新たに強毒株感染植物の組織培養を利用した「組織培養変異誘発法」により弱毒株の作出を試みた。その結果、タバコでの病徴が弱毒化した合計 16 の弱毒株を作出した。さらに弱毒株ゲノムの全塩基配列を解析し、弱毒化に関与する

領域を探索した。その結果、ほとんどの弱毒株においてアミノ酸変異が最も多かった領域は、ヘルパープロテアーゼ (HC-Pro) タンパク質遺伝子であった。これらの結果は、HC-Pro タンパク質遺伝子が PVY の弱毒化に関係する重要な遺伝子であることを示唆していた。また、本研究により作出した弱毒株について、強毒株 NTND6 に対する干渉作用の有無を調査した。その結果、弱毒株の一部は強毒株に対して強い干渉作用を示した。

## 謝辞

本研究を遂行するにあたり終始懇篤なる御指導を賜りました佐賀大学農学部教授 大島一里博士に深厚なる感謝の意を表します。博士論文の審査において鹿児島大学農学部教授 岩井久博士、佐賀大学農学部准教授 草場基章博士、琉球大学農学部教授 諸見里善一博士ならびに佐賀大学農学部准教授 徳田誠博士には副査として多大なる御助言を賜りました。また、元佐賀大学学長 佐古宣道博士には多大なる御助言と御指導を賜りました。本研究に関する投稿論文作成において、元オーストラリア国立大学名誉教授 Adrian Gibbs 博士には、多大なる御助言を賜りました。ここに感謝の意を表し厚く御礼申し上げます。

独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構 仲川晃生博士ならびに同機構北海道農業研究センター 佐山充博士には多大なる御指導と御支援を賜りました。ここに感謝の意を表し厚く御礼申し上げます。

本研究において宮城県産業技術総合センター 中村茂雄博士ならびに長崎県老岐振興局 茶谷正孝氏には弱毒ウイルス作出に際し、多大なる御協力と御支援を賜りました。独立行政法人青森県産業技術センター 山下一夫博士、広島県立総合技術研究所 松浦昌平博士ならびに熊本県農業研究センター 森山美穂氏には貴重な試料を御提供頂きました。ここに厚く御礼申し上げます。

本研究の一部は農林水産省の「新たな農林水産政策を推進する実用技術開発事業」において取り組みました。本事業において北海道農業研究センター 眞岡哲夫博士には多大なる御助言と御支援を賜りました。キリンアグリバイオ株式会社 大西昇氏ならびに間宮幹士博士には弱毒ウイルス保有マイクロチューバーの作成に際し、多大なる御協力と御支援を賜りました。ここに厚く御礼申し上げます。

本研究の遂行にあたり、佐賀大学総合分析実験センター 永野幸生博士には塩基配列解析実験について御助言と御支援を賜りました。同大学農学部 横尾緑氏には投稿論文作成の際に御助言を賜りました。同大学農学部植物ウイルス病制御学教室の諸氏に多大なる御協力と御支援を頂きました。特に富村健太博士（現 独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構 果樹研究所）、冨高保弘博

士（現 独立行政法人農業・食品産業技術総合研究機構 中央農業総合研究センター）、博士課程3年の Huy Duc Nguyen 氏、修士2年の副島健太氏、修士1年の本田裕貴氏、卒業生の深川裕史氏（現株式会社 MTG）、平石千賀子氏、瀬戸口裕美氏、奥園絵里氏、古賀涼子氏、池末睦氏、早田裕子氏、梶山裕美氏、明石真幸氏（現 佐賀県茶業試験場）には実験の遂行にあたり多大なる御協力と御支援を頂きました。ここに厚く御礼申し上げます。佐賀大学農学部植物ウイルス病制御学教室ならびに植物病制御学教室の諸氏と共に貴重な時間を過ごせたことに感謝の意を表します。

本研究の長崎県における遂行にあたり、長崎県農林技術開発センター 衞宜渉所長をはじめ同センター関係職員の方々に御協力を賜りました。元同センター所長 江頭正治氏には多大なる御支援を賜りました。ここに厚く御礼申し上げます。

同センター馬鈴薯研究室中尾敬室長をはじめとする職員の皆様には多大なる御支援と御協力を賜りました。特に元愛野馬鈴薯支場長 小村国則氏、元環境科長 平田憲二氏、元馬鈴薯研究室 菅康弘博士（現 病害虫防除所）、大井義弘氏（現 長崎県農林部）、迎田幸博氏（現 農林技術センター環境研究部門）、現在の研究室の片山北海氏、小無田さゆり氏、松尾悦子氏、田中廣子氏、田原ゆかり氏ならびに酒井由梨氏には大学での研究で忙しい時に長崎県での業務において常に心温まる御支援を賜りました。ここに心より御礼申し上げます。

本研究ならびに長崎県における研究業務において多くの方々より御助言と御支援を賜りました。特に長崎県農林技術開発センター 松尾和敏博士（現 病害虫防除所）、寺本健氏には長崎県での業務において多大なる御助言を賜りました。元福岡県農業総合試験場 野口保弘氏には終始多大なる御助言と御支援を賜りました。鹿児島県農業開発総合センター 西八束氏にはパレイショ病害に関する研究において多大なる御助言と御支援を賜りました。ここに厚く御礼申し上げます。

本研究の一部は、鹿児島大学大学院博士課程において取り組みました。大学院への就学に際し、長崎県研究人材育成プログラム推進事業により多大なる御支援を賜りました。関係者の方々へ厚く御礼申し上げます。

## 引用文献

- 1) Ahn HI, Yoon JY, Hong JS, Yoon HI, Kim MJ, Ha JH, Rhie MJ, Choi JK, Park WM, Ryu KH (2006) The complete genome sequence of pepper severe mosaic virus and comparison with other potyviruses. *Archives of Virology*, 151, 2037-2045.
- 2) Beczner L, Horvath J, Romhanyi I, Forster H (1984) Studies on the etiology of tuber necrotic ringspot disease in potato. *Potato Research*, 27, 339-352.
- 3) Bukovinszki A, Gotz R, Johansen E, Maiss E, Balazs E (2007) The role of the coat protein region in symptom formation on *Physalis floridana* varies between PVY strains. *Virus Research*, 127, 122-125.
- 4) Bull JJ, Badgett MR, Wichman HA, Huelsenbeck JP, Hillis DM, Gulati A, Ho C, Molineux IJ (1997) Exceptional convergent evolution in a virus. *Genetics*, 147, 1497-1507.
- 5) Chen KC, Chiang CH, Raja JAJ, Liu FL, Tai CH, Yeh SD (2008) A single amino acid of NIaPro of *Papaya ringspot virus* determines host specificity for infection of papaya. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 21, 1046-1057.
- 6) Chiang CH, Lee CY, Wang CH, Jan FJ, Lin SS, Chen TC, Raja JAJ, Yeh SD (2007) Genetic analysis of an attenuated *Papaya ringspot virus* strain applied for cross-protection. *European Journal of Plant Pathology*, 118, 333-348.
- 7) Chikh Ali M, Maoka T, Natsuaki KT, Natsuaki T (2010a) The simultaneous differentiation of *Potato virus Y* strains including the newly described strain PVY<sup>NTN-NW</sup>, by multiplex PCR assay. *Journal of Virological Methods*, 165, 15-20.
- 8) Chikh Ali M, Maoka T, Natsuaki T, Natsuaki KT (2010b) PVY<sup>NTN-NW</sup>, a novel recombinant strain of *Potato virus Y* predominating in potato field in Syria. *Plant Pathology*, 59, 31-41.
- 9) Chung BYW, Miller WA, Atkins JF, Firth AE (2008) An overlapping essential gene in the *Potyviridae*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105, 5897-5902.
- 10) Clark MF, Adams AN (1977) Characteristics of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for the detection of plant viruses. *Journal of General Virology*, 34, 475-485.
- 11) Dayhoff MO, Barker WC, Hunt LT (1983) Establishing homologies in protein sequences. *Methods in Enzymology*, 91, 524-545.
- 12) Desbiez C, Girard M, Lecoq H (2010) A novel natural mutation in HC-Pro responsible for mild symptomatology of *Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV, *Potyvirus*) in cucurbits. *Archives of Virology*, 155, 397-401.
- 13) Domingo E, Escarmis C, Menéndez-Arias L, Perales C, Herrera M, Novella S, Holland JJ (2008) Viral quasispecies: dynamics, interactions, and pathogenesis. In: *Origin and Evolution of Viruses*, 2nd ed. (ed. Domingo E, Parrish CR, Holland JJ), Elsevier Academic Press, pp 87-118.
- 14) Eigen M, Biebricher CK (1988) Sequence space and quasispecies distribution. In *RNA Genetics*, vol. 3, (ed. Domingo E, Ahlquist P, Holland JJ, Boca Raton, FL: CRC), Press, pp. 211-245.
- 15) Felsenstein J (1993) PHYLIP (Phylogeny Interference Package), Version 3.5. Department of Genetics, University of Washington, Seattle, Washington, USA.
- 16) French R, Stenger DC (2003) Evolution of wheat streak mosaic virus: dynamics of population growth within plants may explain limited variation. *Annual Review of Phytopathology*, 41, 199-214.
- 17) French R, Stenger DC (2005) Population structure within lineages of *Wheat streak mosaic virus* derived from a common founding event exhibits stochastic variation inconsistent with the deterministic quasi-species model. *Virology*, 343, 179-189.

- 18) García-Arenal F, Fraile A, Malpica JM. (2001) Variability and genetic structure of plant virus populations. *Annual Review of Phytopathology*, 39, 157-186.
- 19) Gibbs MJ, Armstrong JS, Gibbs AJ (2000) Sister-scanning: a Monte Carlo procedure for assessing signals in recombinant sequences. *Bioinformatics*, 16, 573-582.
- 20) Gibbs AJ, Ohshima K (2010) Potyviruses and the digital revolution. *Annual Review of Phytopathology*, 48, 205-223.
- 21) Gibbs AJ, Ohshima K, Gibbs M, García-Arenal F (2008) More about plant virus evolution: past, present and future. In: Origin and Evolution of Viruses, 2nd ed, (ed. Domingo E, Parrish CR, Holland JJ), Elsevier Academic Press, pp. 229-249.
- 22) Glais L, Tribodet M, Kerlan C (2002) Genomic variability in *Potato potyvirus Y* (PVY): evidence that PVY<sup>NW</sup> and PVY<sup>NTN</sup> variants are single to multiple recombinants between PVY<sup>0</sup> and PVY<sup>NTN</sup> isolates. *Archives of Virology*, 147, 363-378.
- 23) 後藤忠則, 根本正康 (1971) 弱毒ウイルスによるウイルス病の防除-安定弱毒ウイルスの選出と各種植物に対する影響. 北海道農業試験場彙報, 99, 67-76.
- 24) Guindon S, Gascuel O (2003) A simple fast and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Systems Biology*, 52, 696-704.
- 25) Hall TA (1999) BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium*, Ser. 41, 95-98.
- 26) Hataya T, Inoue AK, Ohshima K, Shikata E (1994) Characterization and strain identification of a Potato virus Y isolate non-reactive with monoclonal antibodies specific to the ordinary and necrotic strains. *Intervirology*, 37, 12-19.
- 27) 堀尾英弘 (2012) ジャガイモの起源と伝播 (2) 国内での広がり. ジャガイモ事典 (財団法人いも類振興会編), 全国農村教育協会, 東京, pp61-65.
- 28) Hu X, He C, Xiao Y, Xiong X, Nie X (2009a) Molecular characterization and detection of recombinant isolates of *potato virus Y* from China. *Archives of Virology*, 154, 1303-1312.
- 29) Hu X, Karasev AV, Brown CJ, Lorenzen JH (2009b) Sequence characteristics of potato virus Y recombinants. *Journal of General Virology*, 90, 3033-3041.
- 30) Hu X, Meacham T, Ewing L, Gray SM, Karasev AV (2009c) A novel recombinant strain of *Potato virus Y* suggests a new viral genetic determinant of vein necrosis in tobacco. *Virus Research*, 143, 68-76.
- 31) Hu X, Nie X, He C, Xiong X (2011) Differential pathogenicity of two different recombinant PVY<sup>NTN</sup> isolates in *Physalis floridana* is likely determined by the coat protein gene. *Virology Journal*, 8, 207.
- 32) 井上平, 坂口荘一 (1986) 暖地の春秋2期作ジャガイモにおける葉巻病及びジャガイモYウイルスによるモザイク病の防除. 長崎県総合農林試験場研究報告, 14, 31-59.
- 33) Janzac B, Montarry J, Palloix A, Navaud O, Moury B (2010) A point mutation in the polymerase of *Potato virus Y* confers virulence toward the *Pvr4* resistance of pepper and a high competitiveness cost in susceptible cultivar. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 23, 823-830.
- 34) Ji JP, Loeb LA (1992) Fidelity of HIV-1 Reverse transcriptase copying RNA in vitro. *Biochemistry*, 31, 954-958.
- 35) 神田絢美, 久保田健嗣, 山崎修一, 藤澤一郎, 津田新哉 (2009) トウガラシマイルドモットルウイルス弱毒株の干渉効果と農家圃場での経済性評価. 日本植物病理学会報, 75, 230 (講要).
- 36) Karasev AV, Hu X, Brown CJ, Kerlan C, Nikolaeva OV, Crosslin JM, Gray SM (2011) Genetic diversity of the ordinary strain of *Potato virus Y* (PVY) and origin of recombinant PVY strains. *Phytopathology*, 101, 778-785.

- 37) 河野勉, 花田薫, 庄司俊彦, 亀谷満朗, 善林六朗, 栃原比呂志 (1989) キュウリにおけるキュウリモザイクウイルス弱毒株の探索. 関東東山病害虫研究会年報, 36, 52-53.
- 38) Kimura M (1980) A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. *Journal of Molecular Evolution*, 16, 111-120.
- 39) King, AMQ, Adams MJ, Carstens EB, Lefkowitz EJ (2012) Virus Taxonomy, Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Elsevier Academic Press, San Diego, California, pp1327.
- 40) 小坂能尚 (2005) 野菜類ウイルス病ワクチンの現状と今後の展開方向. 植物防疫, 59, 1-4.
- 41) Kosaka Y, Fukunishi T (1993) Attenuated isolates of soybean mosaic virus derived at a low temperature. *Plant Disease*, 77, 882-886.
- 42) Kosaka Y, Ryang BS, Kobori T, Shiomi H, Yasuhara H, Kataoka M (2006) Effectiveness of an attenuated *Zucchini yellow mosaic virus* isolate for cross-protecting cucumber. *Plant Disease*, 90, 67-72.
- 43) Kurath G, Palukaitis P (1989) RNA sequence heterogeneity in natural populations of three satellite RNAs of cucumber mosaic virus. *Virology*, 173, 231-240.
- 44) Larkin MA, Blackshields G, Brown NP, Chenna R, McGettigan PA, McWilliam H, Valentin F, Wallace IM, Wilm A, Lopez R, Thompson JD, Gibson TJ, Higgins DG (2007) CLUSTAL W and CLUSTAL X version 2.0. *Bioinformatics*, 23, 2947-2948.
- 45) Latorre BA, Flores V (1985) Strain identification and cross-protection of potato virus Y affecting tobacco in Chile. *Plant Disease*, 69, 930-932.
- 46) Lecoq H, Lemaire JM, Wipf-Scheibel C (1991) Control of zucchini yellow mosaic virus in squash by cross protection. *Plant Disease*, 75, 208-211.
- 47) Lefeuvre P, Martin DP, Harkins G, Lemey P, Gray AJ, Meredith S, Lakay F, Monjane A, Lett JM, Varsani A, Heydarnejad J (2010) The spread of *Tomato yellow leaf curl virus* from the Middle East to the world. *PLoS Pathogens*, 6, e1001164.
- 48) Le Romancer M, Kerlan C, Nedellec M (1994) Biological characterisation of various geographical isolates of potato virus Y inducing superficial necrosis on potato tubers. *Plant Pathology*, 43, 138-144.
- 49) Librado P, Rozas J (2009) DnaSP v5: a software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics*, 25, 1451-1452.
- 50) Lin SS, Wu HW, Jan FJ, Hou RF, Yeh SD (2007) Modifications of the helper component-protease of *Zucchini yellow mosaic virus* for generation of attenuated mutants for cross protection against severe infection. *Phytopathology*, 97, 287-296.
- 51) Lorenzen JH, Meacham T, Berger PH, Shiel PJ, Crosslin JM, Hamm PB, Kopp H (2006) Whole genome characterization of *Potato virus Y* isolates collected in the western USA and their comparison to isolates from Europe and Canada. *Archives of Virology*, 151, 1055-1074.
- 52) Lorenzen J, Nottle P, Martin D, Pasche JS, Gudmestad NC (2008) NE-11 represents a new strain variant class of *Potato virus Y*. *Archives of Virology*, 153, 517-525.
- 53) Martin D, Rybicki E (2000) RDP: detection of recombination amongst aligned sequences. *Bioinformatics*, 16, 562-563.
- 54) Martin DP, Lemey P, Lott M, Moulton V, Posada D, Lefeuvre P (2010) RDP3: a flexible and fast computer program for analyzing recombination. *Bioinformatics*, 26, 2462-2463.
- 55) Maynard-Smith J (1992) Analyzing the mosaic structure of genes. *Journal of Molecular Evolution*, 34, 126-129.
- 56) Moreno IM, Malpica JM, Diaz-Pendon JA,

- Moriones E, Fraile A, Garcia-Arenal F (2004) Variability and genetic structure of the population of watermelon mosaic virus infecting melon in Spain. *Virology*, 318, 451-460.
- 57) Mori K, Sakamoto Y, Mukojima N, Tamiya S, Nakao T, Ishii T, Hosaka K (2011) Development of a multiplex PCR method for simultaneous detection of diagnostic DNA markers of five disease and pest resistance genes in potato. *Euphytica*, 180, 347-355.
- 58) Moury B, Morel C, Johansen E, Jacquemond M (2002) Evidence for diversifying selection in *Potato virus Y* and in the coat protein of other potyviruses. *Journal of General Virology*, 83, 2563-2573.
- 59) Nakazono-Nagaoka E, Sato C, Kosaka Y, Natsuaki T (2004) Evaluation of cross-protection with an attenuated isolate of *Bean yellow mosaic virus* by differential detection of virus isolates using RT-PCR. *Journal of General Plant Pathology*, 70, 359-362.
- 60) 夏秋啓子 (2009) ウイルス病の防除. 植物ウイルス学 (池上正人ほか編), 朝倉書店 (東京), pp168-178.
- 61) 難波成任 (2009) ウイルスの分類. 植物ウイルス学 (池上正人ほか編), 朝倉書店 (東京), pp45-55.
- 62) Nie X, Singh RP, Singh M (2004) Molecular and pathological characterization of N:O isolates of the *Potato virus Y* from Manitoba, Canada. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 26, 573-583.
- 63) Nishiguchi M, Kobayashi K (2011) Attenuated plant viruses: preventing virus diseases and understanding the molecular mechanism. *Journal of General Plant Pathology*, 77, 221-229.
- 64) Ogawa T, Nakagawa A, Hataya T, Ohshima K (2012a) The genetic structure of populations of *Potato virus Y* in Japan: based on the analysis of 20 full genomic sequences. *Journal of Phytopathology*, 160, 661-673.
- 65) 小川哲治, 仲川晃生, 大島一里 (2011) 鹿児島県奄美地方の塊茎えそ病を示すジャガイモから分離したジャガイモYウイルスのゲノム構造. 九州病害虫研究会報, 57, 19-25.
- 66) 小川哲治, 仲川晃生, 佐山充, 大島一里 (2008) ジャガイモ塊茎えそ病の発生生態と防除. 植物防疫, 62, 481-484.
- 67) Ogawa T, Nakamura S, Sayama M, Ohshima K (2012b) Attenuated mutants of *Potato virus Y* necrotic strain produced by nitrous acid treatment and mutagenesis-in-tissue culture methods. *European Journal of Plant Pathology*, doi: 10.1007/s10658-012-0115-1.
- 68) Ogawa T, Tomitaka Y, Nakagawa A, Ohshima K (2008) Genetic structure of a population of *Potato virus Y* inducing potato tuber necrotic ringspot disease in Japan: comparison with North American and European populations. *Virus Research*, 131, 199-212.
- 69) 大島一里, 畑谷達児, 佐野輝男, Inoue AK, 四方英四郎 (1991) ジャガイモYウイルス普通系統およびえそ系統の外被タンパク質のアミノ酸配列と生物学的, 血清学的比較. 日本植物病理学会報, 57, 615-622.
- 70) Ohshima K, Sako K, Hiraishi C, Nakagawa A, Matsuo K, Ogawa T, Shikata E, Sako N (2000) Potato tuber necrotic ringspot disease occurring in Japan: its association with *Potato virus Y* necrotic strain. *Plant Disease*, 84, 1109-1115.
- 71) Ohshima K, Yamaguchi Y, Hirota R, Hamamoto T, Tomimura K, Tan Z, Sano T, Azuhata F, Walsh JA, Fletcher J, Chen J, Gera A, Gibbs A (2002) Molecular evolution of *Turnip mosaic virus*: evidence of host adaptation, genetic recombination and geographical spread. *Journal of General Virology*, 83, 1511-1521.
- 72) Ohshima K, Akaishi S, Kajiyama H, Koga R, Gibbs AJ (2010) Evolutionary trajectory of turnip mosaic virus populations adapting to a new host. *Journal of General Virology*, 91, 788-801.
- 73) Page RDM (1996) Treeview: an application to display phylogenetic trees on personal



- computer. *Computer Applications in Biosciences*, 12, 357-358.
- 74) Piche LM, Singh RP, Nie X, Gudmestad NC (2004) Diversity among *Potato virus Y* isolates obtained from potatoes grown in the United States. *Phytopathology*, 94, 1368-1375.
- 75) Plisson C, Drucker M, Blanc S, German-Retana S, Le Gall O, Thomas D, Bron P (2003) Structural characterization of HC-Pro, a plant virus multifunctional protein. *The Journal of Biological Chemistry*, 278, 23753-23761.
- 76) Posada D, Crandall KA (2001) Evaluation of methods for detecting recombination from DNA sequences: computer simulations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 98, 13757-13762.
- 77) Posada D (2008) jModelTest: phylogenetic model averaging. *Molecular Biology and Evolution*, 25, 1253-1256.
- 78) Revers F, Le Gall O, Candresse T, Le Romancer M, Dunez J (1996) Frequent occurrence of recombinant potyvirus isolates. *Journal of General Virology*, 77, 1953-1965.
- 79) Robinson DJ (1973) Inactivation and mutagenesis of Tobacco rattle virus by nitrous acid. *Journal of General Virology*, 18, 215-222.
- 80) Salminen MO, Carr JK, Burke DS, McCutchan FE (1995) Identification of breakpoints in intergenotypic recombinants of HIV type 1 by Bootscanning. *AIDS Research and Human Retroviruses*, 11, 1423-1425.
- 81) 佐藤仁敏 (2001) 馬鈴しょ原原種増殖体系におけるウイルス病の診断法に関する研究. 種苗管理センター調査研究報告, 4, 1-81.
- 82) Sawyer SA (1999) GENECONV: a computer package for the statistical detection of gene conversion. Distributed by the Author. Department of Mathematics. Washington University, St Louis, available at <http://www.math.wustl.edu/~sawyer>.
- 83) 佐山充, 小川哲治, 迎田幸博 (2005) アルミ蒸着テープおよび防虫ネットがバレイシヨの *Potato virus Y* の感染に及ぼす影響. 九州病害虫研究会報, 51, 6-10.
- 84) Sayama H, Sato T, Kominato M, Natsuaki T, Kaper JM (1993) Field testing of a satellite-containing attenuated strain of cucumber mosaic virus for tomato protection in Japan. *Phytopathology*, 83, 405-410.
- 85) Schneider WL, Roossinck MJ (2001) Genetic diversity in RNA virus quasispecies is controlled by host-virus interactions. *Journal of Virology*, 75, 6566-6571.
- 86) Schubert J, Fomitcheva V, Sztangret-Wisniewska J (2007) Differentiation of *Potato virus Y* strains using improved sets of diagnostic PCR-primers. *Journal of Virological Methods*, 140, 66-74.
- 87) Seo JK, Ohshima K, Lee HG, So M, Choi HS, Lee SH, Sohn SH, Kim KH (2009) Molecular variability and genetic structure of the population of *Soybean mosaic virus* based on the analysis of complete genome sequences. *Virology*, 393, 91-103.
- 88) Sehgal OP, Krause GF (1968) Efficiency of nitrous acid as inactivating and mutagenic agent of intact Tobacco mosaic virus and its isolated nucleic acid. *Journal of Virology*, 2, 966-971.
- 89) Shibolet Y, Haronsky E, Leibman D, Arazi T, Wassenegger M, Whitham SA, Gaba V, Gal-On A (2007) The conserved FRNK box in HC-Pro, a plant viral suppressor of gene silencing, is required for small RNA binding and mediates symptom development. *Journal of Virology*, 81, 13135-13148.
- 90) Singer B, Fraenkel-Conrat H (1974) Correlation between amino acid exchanges in coat protein of TMV mutants and the nature mutagens. *Virology*, 60, 485-490.
- 91) Singh RP, Valkonen JPT, Gray SM, Boonham N, Jones RAC, Kerlan C, Schubert J (2008) Discussion paper: the naming of *Potato virus Y* strains infecting potato. *Archives of*

- Virology*, 153, 1-13.
- 92) 鈴木郁男, 都丸敬一, 沢幸男, 荒木幹男 (1983) ジャガイモYウイルスえそ系によるタバコ黄斑えそ病 第2報 青森県のバーレー種における発生. 盛岡たばこ試験場報告, 17, 97-106.
- 93) Takaki F, Sano T, Yamashita K (2006) The complete nucleotide sequence of attenuated onion yellow dwarf virus: a natural potyvirus deletion mutant lacking the N-terminal 92 amino acids of HC-Pro. *Archives of Virology*, 151, 1439-1445.
- 94) Tamura K, Peterson D, Peterson N, Stecher G, Nei M, Kumar S (2011) MEGA5: Molecular Evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution*, 28, 2731-2739.
- 95) Tan Z, Gibbs AJ, Tomitaka Y, Sánchez F, Ponz F, Ohshima K (2005) Mutations in *Turnip mosaic virus* genomes that have adapted to *Raphanus sativus*. *Journal of General Virology*, 86, 501-510.
- 96) 都丸敬一 (1983) ジャガイモYウイルスえそ系によるタバコ黄斑えそ病 第1報 香川県の黄色種における発生. 盛岡たばこ試験場報告, 17, 87-96.
- 97) Tomimura K, Späk J, Katis N, Jenner CE, Walsh JA., Gibbs AJ, Ohshima K (2004) Comparisons of the genetic structure of populations of *Turnip mosaic virus* in West and East Eurasia. *Virology*, 330, 408-423.
- 98) Tomitaka Y, Ohshima K (2006) A phylogeographic study of the *Turnip mosaic virus* population in east Asia reveals an 'emergent' lineage in Japan. *Molecular Ecology*, 15, 4437-4457.
- 99) Tomitaka Y, Yamashita T, Ohshima K (2007) The genetic structure of populations of *Turnip mosaic virus* in Kyushu and central Honshu, Japan. *Journal of General Plant Pathology*, 73, 197-208.
- 100) Traore O, Sorho F, Pinel A, Abubakar Z, Banwo O, Maley J, Hebrard E, Winter S, Sere Y, Konate G, Fargette D (2005) Processes of diversification and dispersion of *Rice yellow mottle virus* inferred from large-scale and high-resolution phylogeographical studies. *Molecular Ecology*, 14, 2097-2110.
- 101) Tribodet M, Glais L, Kerlan C, Jacquot E (2005) Characterization of *Potato virus Y* (PVY) molecular determinants involved in the vein necrosis symptom induced by PVY<sup>N</sup> isolates in infected *Nicotiana tabacum* cv. Xanthi. *Journal of General Virology*, 86, 2101-2105.
- 102) 宇田川晃 (1993) わが国におけるタバコ・ウイルス病の発生と病原ウイルスの同定・診断に関する研究. 神奈川県農業総合研究所研究報告, 135, 1-86.
- 103) Urcuqui-Inchima S, Haenni AL, Bernardi F (2001) Potyvirus proteins: a wealth of functions. *Virus Research*, 74, 157-175.
- 104) Van Volten-Doting L, Hasrat JA, Oosterwijk E, Van' t Sant P, Schoen MA, Roosien J (1980) Description and complementation analysis of 13 temperature-sensitive mutants of Alfalfa mosaic virus. *Journal of General Virology*, 46, 415-426.
- 105) Weiller GF (1998) Phylogenetic profiles: a graphical method for detecting genetic recombinations in homologous sequences. *Molecular Biology and Evolution*, 15, 326-355.
- 106) Worobey M, Holmes EC (1999) Evolutionary aspects of recombination in RNA viruses. *Journal of General Virology*, 80, 2535-2543.
- 107) Worobey M, Holmes EC (2001) Homologous recombination in GB virus C/hepatitis G virus. *Molecular Biology and Evolution*, 18, 254-261.
- 108) Wu HW, Lin SS, Chen KC, Yeh SD, Chua NH (2009) Discriminating mutations of HC-Pro of *Zucchini yellow mosaic virus* with differential effects on small RNA pathways involved in viral pathogenicity and symptom development. *Molecular*

*Plant-Microbe Interactions*, 23, 17-28.

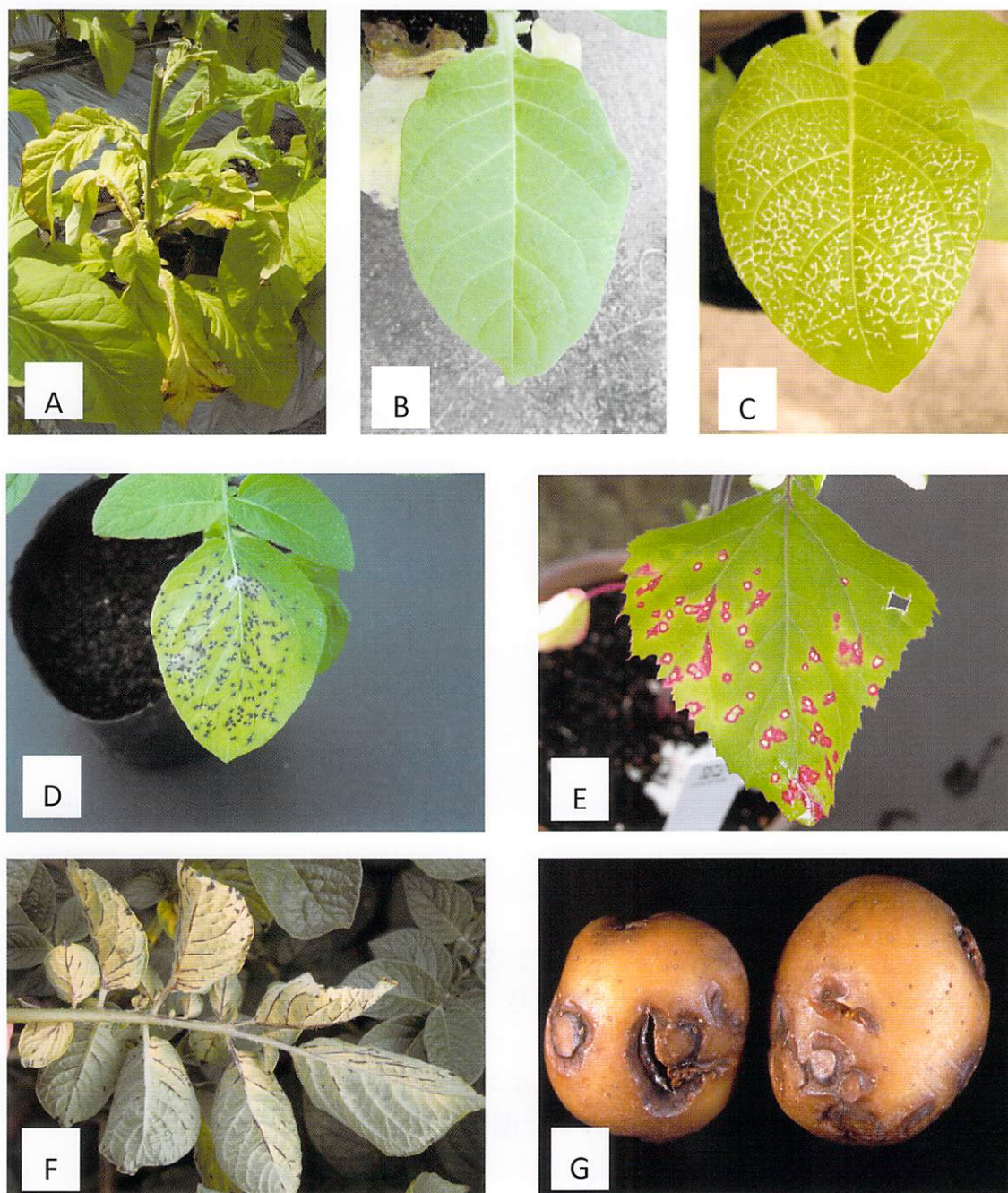
- 109) Yamasaki S, Sakai J, Kamisoyama S, Goto H, Okuda M, Hanada K (2009) Control of russet crack disease in sweetpotato plants using a protective mild strain of *Sweet potato feathery mottle virus*. *Plant Disease*, 93, 190-194.
- 110) Yamasaki S, Sakai J, Fuji S, Kamisoyama S, Emoto K, Ohshima K, Hanada K (2010) Comparisons among isolates of *Sweet potato feathery mottle virus* using complete genomic RNA sequences. *Archives of Virology*, 155, 795-800.
- 111) Yambao MLM, Yagihashi H, Sekiguchi H, Sekiguchi T, Sasaki T, Sato M, Atsumi G, Tachashi Y, Nakahara KS, Uyeda I (2008) Point mutations in helper component protease of clover yellow vein virus are associated with the attenuation of RNA-silencing suppression activity and symptom expression in broad bean. *Archives of Virology*, 153, 105-115.
- 112) Yeh SD, Gonsalves D (1984) Evaluation of induced mutants of papaya ringspot virus for control by cross protection. *Phytopathology*, 74, 1086-1091.

### Summary

Studies of the genetic structure of populations of plant viruses are important for understanding the evolution of virus. *Potato virus Y* (PVY) is the type member of the genus *Potyvirus* in the family *Potyviridae*, and it induces severe damage for potato production all over the world. PVY isolates have been categorized into several distinct strain groups based on symptoms induced in indicator plants, on serological responses and genome structures. The PVY<sup>0</sup>, PVY<sup>N</sup> and PVY<sup>C</sup> are well established three PVY strain groups. Recently two new strains belonged to PVY<sup>N</sup> strain group have been isolated and named, PVY<sup>NTN</sup> and PVY<sup>N-wi</sup>. Some of these strain isolates cause potato tuber necrotic ringspot disease (PTNRD). In earlier study, the genetic structures of populations of some potyviruses have been reported, however those of PVY are largely unknown. In this study, ten isolates of PVY<sup>N</sup> strain group (PVY<sup>N</sup> and PVY<sup>NTN</sup> strain) and ten isolates of PVY<sup>0</sup> strain were collected in Japan and the genetic structures of the populations were analysed together with the PVY populations from Europe and North America.

The genetic structures of PVY<sup>N</sup> strain group showed that there were two subpopulations in the North American, European populations and Japanese populations. On the other hand, the genetic structure of PVY<sup>0</sup> strain group showed that there were four and two subpopulations in the North American and European populations, whereas Japanese populations were comprised of three subpopulations. Many PVY<sup>N</sup> strain group isolates were multiple recombinants of PVY<sup>0</sup> and PVY<sup>N</sup> sequence parents whereas all the PVY<sup>0</sup> strain isolates were non-recombinants in all three populations. Studies on nucleotide diversities of populations and phylogenetic relationships of the isolates showed that Japanese PVY populations were in part distinct from the European and North American populations.

The attenuated mutants of PVY<sup>NTN</sup> strain isolate have not been reported. In this study, NTND6 isolate of a PVY<sup>NTN</sup> strain which induces veinal necrosis in tobacco was used for producing attenuated mutants. A total of 16 attenuated mutants were obtained from host infected with NTND6, not only by traditional methods of nitrous acid and low temperature treatments, but also by a novel method called the "mutagenesis-in-tissue culture method". The attenuated mutants showed only faint or no symptoms on tobacco. Nucleotide and amino acid sequences of the genomes of the attenuated mutants were compared with those parental severe isolates. Many non-synonymous changes were found in the helper-component protease protein (HC-Pro) encoding region of most of the attenuated mutants. The results indicated that HC-Pro encoding regions might be important for viral attenuation. Furthermore, the cross-protective abilities of the attenuated mutants obtained in this study were evaluated. Some mutants were effective in cross-protection against the original severe isolate NTND6.



Color Figure

(A) Severe veinal necrosis symptoms induced by *Potato virus Y* (PVY) tobacco veinal necrosis strain group (PVY<sup>N</sup>) in tobacco. (B) Vein clearing and mottle symptoms induced by PVY ordinary strain group (PVY<sup>0</sup>) in tobacco cv. Xanthi nc. (C) Severe veinal necrosis symptoms induced by PVY tuber necrosis strain (PVY<sup>NTN</sup>) in tobacco cv. Xanthi nc. (D) Necrotic spot symptoms induced by PVY<sup>0</sup> in potato cv. Nishiyutaka. (E) Local lesions induced by PVY<sup>0</sup> in *Chenopodium amaranticolor*. (F) Severe veinal necrosis symptoms induced by PVY<sup>NTN</sup> in potato cv. Nishiyutaka. (G) Tuber symptoms in potato cv. Nishiyutaka induced by PVY<sup>NTN</sup>.

長崎県農林技術開発センター特別研究報告  
第5号

本邦のジャガイモYウイルスの集団遺伝構造と  
弱毒ウイルスに関する研究

印刷 平成26年 6月

発行 平成26年 6月

編集兼 長崎県農林技術開発センター

発行者 長崎県諫早市貝津町3118番地

〒854-0063 TEL 0957(26)3330

FAX 0957(26)9197

印刷所 有限会社 正文社印刷所

長崎県長崎市魚の町6番6号

〒850-0874 TEL 095(826)0211

FAX 095(825)0538