



Title	ジャガイモSウイルスの感染性cDNAクローンの構築と分子性状比較
Author(s)	李, 莘
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(農学)
Dissertation Number	甲第13595号
Issue Date	2019-03-25
DOI	<a href="https://doi.org/10.14943/doctoral.k13595">https://doi.org/10.14943/doctoral.k13595</a>
Doc URL	<a href="https://hdl.handle.net/2115/91551">https://hdl.handle.net/2115/91551</a>
Type	doctoral thesis
File Information	Li_Xin.pdf



ジャガイモ S ウイルスの感染性 cDNA クローンの  
構築と分子性状比較

北海道大学 大学院農学院  
生物資源科学専攻 博士後期課程

李 莘

# 目次

第 I 章 緒言	1
第 II 章 研究史	3
II-1 カルラウイルス	3
II-2 ジャガイモ S ウイルス (PVS)	11
第 III 章 ジャガイモ S ウイルスの感染性 cDNA クローンの構築	16
III-1 目的	16
III-2 材料と方法	16
III-3 結果	42
3.1 PVS-H95 ゲノムの全長 cDNA クローンの構築及び感染性確認	
3.2 PVS-H00 ゲノムの全長 cDNA クローンの構築及び感染性確認	
3.3 PVS-H00 全ゲノム配列の解析及び PVS-H95 との比較	
3.4 pPVS-H-FL- $\beta$ と pPVS-H-FL-D 転写産物の共接種による PVS 複製補完の検討	
3.5 pPVS-H-FL- $\beta$ と pPVS-H-FL-H の ORF1 領域組み換え体からの転写 RNA の感染性	
3.6 PVS-Na1 ゲノムの全長 cDNA クローン pPVS-Na1-FL-A の構築及び感染性確認	
III-4 考察	87
第 IV 章 ジャガイモ S ウイルス普通系統およびアンデス系統の 全ゲノム配列と系統解析	97
IV-1 目的	97
IV-2 材料と方法	97
IV-3 結果	106
3.1 PVS-M 及び SoPLV-K-1 全ゲノム配列の解析	
3.2 日本における PVS 株の全ゲノム配列の比較	
3.3 世界中の PVS 株の全ゲノム配列を用いた系統解析	
III-4 考察	167

第V章 総合考察	171
摘要	179
謝辞	183
引用文献	184

## 第 I 章 緒言

ジャガイモ S ウイルス (potato virus S ; PVS) はジャガイモに病害を起こす主要なウイルスの一種であり、世界中のジャガイモ栽培地域に広く分布している。PVS がジャガイモに単独感染した場合、病徴が現われずに潜在感染することが多く、外観上無病徴のジャガイモでも、PVS に感染していることがあり、また PVS はジャガイモ塊茎を介して、または植物同士の接触によって伝搬されるため、圃場での伝搬速度が速く、広がりやすい。また、PVS が他のウイルスと混合感染した場合激症状化し、ジャガイモに大幅な減収を招くことが報告されている。ジャガイモのウイルスフリー化には茎頂培養が利用されているが、PVS は茎頂培養によって排除することが難しく、種イモ、栽培品種、在来品種に広く感染している (眞岡, 2017)。

PVS はカルラウイルス (*Carlavirus*) 属のウイルスであり、約 8.5 kb のプラス一本鎖の RNA をゲノムとし、その 5'末端にキャップ構造、3'末端にポリ A 配列を持ち、6 つのオープンリーディングフレーム (ORF) を有する (Foster and Mills, 1990a)。PVS のウイルス粒子は長さ約 650 nm、幅 12 nm の棒状粒子である (Wetter, 1971)。PVS は従来 *Chenopodium quinoa* での病原性から全身感染しない普通系統と全身感染するアンデス系統に大きく分けられ、アンデス系統は普通系統よりジャガイモでの病原性が強く、アブラムシ伝搬性も高いことが報告されている (Slack, 1983 ; Dolby and Jones, 1987)。

近年、PVS の分子性状に関する研究が進み、2005 年に最初の PVS の全ゲノム配列 (Matoušek *et al.*, 2005) が報告された後、世界中の PVS 株の全ゲノム配列が解析され、それらの多様性を調べた系統解析も多く報告されている。本研究室では、PVS 日本の 14 分離株を用いて、宿主範囲、病原性及び塩基配列解析などの研究が進められてきた。その中で、普通系統の PVS-H95、アンデス系統の PVS-Na1 の計 2 分離株の全長配列が決定された (古田, 1997 ; 八木橋, 2000 ; 久保, 2001 ; 今井, 2002 ; 上田, 2002 ; 上田ら, 2002 ; 畑谷ら, 2003)。しかしこれまでに、PVS の病原性メカニズムについての知見はほとんどなく、PVS の病原性メカニズムを明らかにし、複製や移行のメカニズムを研究するためには、PVS の感染性クーロンを構築する必要がある。そこで研究室の先行研究で日本産の PVS 分離株の感染性クーロンの構築が試みられた。ゲノム全塩基配列 (8485 塩基) が既に決定された普通系統 H95 株ゲノムに対する 8 つの cDNA クローンを繋ぎ合わせた全長

cDNA クローンが大腸菌プラスミドに構築されて、このクローンから転写されたキャップ付加 RNA を宿主である *Nicotiana occidentalis* に接種したものの感染性は認められなかった。そこで、この全長 cDNA クローンを改変して 3 アミノ酸置換を導入したクローンからの転写 RNA で 1 回目 25%, 2 回目 37.5% の感染性が認められた (李, 2014)。しかしながら、この全長クローンからの転写 RNA の感染性は低くて再現性が悪く、かなり不安定で、PVS の逆遺伝学的研究に用いるのは不適當であった。そこで本研究の第 3 章では再度高い感染性を持つ RNA を安定に転写できる全長 cDNA クローンの構築を行った。改良点の一つは鋳型ゲノムを PVS-H95 純化ウイルスから PVS-H00 感染葉から抽出した総 RNA に変更した。PVS-H00 は PVS-H95 から *C. quinoa* 葉での単病斑分離を 3 回繰り返して得た株である。もう一つは繋げる cDNA 断片長を長くした、2 つの RT-PCR 増幅断片を繋いでほぼ全長の cDNA クローンを構築し、3'末端は 66 個のポリ A 配列を有するように改変した。

また、研究室の先行研究では、1970 年代の研究でモザイク系統とされた分離株 (PVS-M) (堀尾, 1976) と 1980 年代に別種のジャガイモ南部潜在ウイルス (SoPLV) として報告された K-1 株 (小林ら, 1985) についてそれぞれゲノムの 3'末端側 2991 塩基と 1661 塩基が既に解析されていた。本研究の第 4 章では、この 2 株の未解析配列を解析し、全ゲノム塩基配列を決定した。そして、日本の 5 株及び世界各国 24 分離株の計 29 分離株の全ゲノム配列に基づいて系統解析及び相同性分析を行い、日本の 5 分離株の分類学的位置を明らかにした。

## 第Ⅱ章 研究史

### 1. カルラウイルス

#### 1.1. カルラウイルスの宿主範囲、伝搬及びウイルス粒子

カルラウイルスは *Betaflexiviridae* 科、*Quinvirinae* 亜科、*Carlavirus* 属に所属するウイルスで、タイプ種はカーネーション潜在ウイルス (Carnation latent virus) である。ICTV (International Committee on Taxonomy of Viruses) によって、2018 年までに計 53 種のウイルスがカルラウイルスに分類され (Virus Taxonomy, 2018 Release)、うち potato latent virus、potato virus H (PVH)、ジャガイモ M ウイルス (potato virus M ; PVM)、potato virus P、ジャガイモ S ウイルス (potato virus S ; PVS) の計 5 種のウイルスがジャガイモ (*Solanum tuberosum*) に感染する。

多くのカルラウイルスは草本植物に感染して比較的狭い宿主範囲を持ち、感染植物に弱い病徴を起こすものや無病徴感染するものが多い (Martelli *et al.*, 2007)。カルラウイルスは自然宿主から実験植物への機械接種が可能で、自然条件では機械伝搬以外にも、アブラムシによって非永続性伝搬されることもある (Wetter and Milne, 1981 ; Koenig, 1982)。また、cowpea mild mottle virus (CPMMV) はタバココナジラミ (*Bemisia tabaci*) によって伝搬される (Brunt *et al.*, 1996)。

カルラウイルスのウイルス粒子は長さ約 610-700 nm、幅 12-15 nm の、屈曲性に乏しいひも状粒子で (Foster, 1992; Martelli *et al.*, 2007)、PVS のウイルス粒子は長さが約 650 nm、幅が約 12 nm である (Wetter, 1971 ; Manzer *et al.*, 1978)。ウイルス粒子の表面には粒子と同じ長さの 1 本の溝状構造と、それに交差する螺旋状の溝状構造が存在する (Milne, 1984 ; Tollin and Wilson, 1988)。カルラウイルス感染細胞には、封入体が観察できず、代わりに大きな束状のウイルス凝集体が見られる。PVS が感染した *Chenopodium quinoa* の細胞質では PVS 粒子の凝集体が観察され (Hlruki and Shukla, 1973)、CPMMV 感染細胞の細胞質にもブラシ状のウイルス凝集体があることが報告された (Lesemann, 1988)。

#### 1.2. カルラウイルスのゲノム構造とタンパク質機能

カルラウイルスは約 7.4 - 8.5 Kb のプラス一本鎖 RNA (ssRNA) をゲノムとして持ち、核酸重量はウイルス粒子重の約 5% を占める (Adams, 2005)。カルラウイルスのゲノムは

5'末端にキャップ構造、3'末端にポリ A 配列を持ち、6つのオープンリーディングフレーム (open reading frame ; ORF) を有する (Foster and Mills, 1990a ; Cavileer *et al.*, 1994 ; Hillman and Lawrence, 1995)。唯一特殊な例として、sweet potato C6 virus では、ORF6 が存在しないことが報告された (De Souza *et al.*, 2013)。

ORF1 はゲノム長さの約 70% を占め、6つの機能領域を含む約 220 kDa の複製酵素をコードする。機能領域は複製酵素の N 末端から、メチルトランスフェラーゼ領域 (MTR)、AlkB 様領域、卵巣腫瘍プロテアーゼ類似タンパク質領域 (Ovarian Tumour -like peptidase ; O-PRO)、パパイン様システインプロテアーゼ領域 (papain-like cysteine protease ; P-PRO)、RNA ヘリカーゼ領域 (HEL)、RNA 依存性 RNA ポリメラーゼ領域 (POL) の 6つである (Martelli *et al.*, 2007)。MTR は複製酵素の N 末端の近くに存在し、ウイルス RNA のキャップ化に関わると言われている (Rozaanov *et al.*, 1992 ; Huang *et al.*, 2004)。POL は複製酵素の C 末端の近くに存在し、ウイルスゲノム RNA の複製に必要な不可欠な機能領域で、中心のモチーフは高く保存されている。*Potexvirus* 属の bamboo mosaic virus (BaMV) の POL 領域は 3'末端のシュードノット構造を認識し、マイナス鎖合成を開始させるため必要であることが報告された (Cheng *et al.*, 2002)。HEL は POL の上流に存在し、ウイルス RNA の高次構造をほどいて直鎖状にするために必要である (Gorbalenya and Koonin, 1993)。BaMV の HEL はキャップ構造の形成に関わっていると報告された (Li *et al.*, 2001)。P-PRO は動物ウイルス、特にアルファウイルスの複製酵素に広く存在することが報告された (Koonin *et al.*, 1993) が、カルラウイルスでは、blueberry scorch virus (BIScV) 複製酵素の研究によって、P-PRO が HEL の上流に存在することが報告された (Lawrence *et al.*, 1995)。BIScV では、P-PRO の自触媒的プロセッシングがウイルス RNA の複製に必要であると言われている (Lawrence *et al.*, 1995)。P-PRO のすぐ上流にはもう 1 種のプロテアーゼである O-PRO の存在が報告され、O-PRO はプロテアーゼの新しいスーパーファミリーに属し、ショウジョウバエの卵母細胞形態発生に関わる卵巣腫瘍 (Ovarian Tumor ; OTU) 遺伝子で典型的に見られることから命名された (Makarova *et al.*, 2000)。O-PRO はユビキチン依存性の経路に関わり、ウイルス-宿主の相互作用に重要な役割を果たすと推測されたが、カルラウイルスでの機能は未だ不明である (Makarova *et al.*, 2000 ; Martelli *et al.*, 2007)。AlkB 様領域は O-PRO の上流に存在することが報告された (Aravind and Koonin, 2001 ; Bratlie and Drabø, 2005) が、すべてのカルラウイルス複製酵素に存在する訳ではなく、BIScV や poplar mosaic virus (PopMV) の複製酵素には存在する一方で、PVS や PVM に

は存在しないことが報告された (Martelli *et al.*, 2007)。

ORF1 の下流にはトリプルジーンブロック (triple gene block; TGB) と呼ばれるオーバーラップした ORF2、ORF3、ORF4 が存在する。これらはそれぞれ約 25 kDa、約 12 kDa 及び約 7 kDa のタンパク質をコードし、ウイルスの細胞間移行に関与すると言われている。植物ウイルスの TGB は、細胞間移行におけるウイルス外被タンパク質の必要性によって大きく 2 種類に分かれ、calss I の hordei 様と calss II の potex 様が存在する (Callaway *et al.*, 2001)。Hordei 様の TGB では、ウイルスの細胞間移行に外被タンパク質は必要ではない (Schmitt *et al.*, 1992; McGeachy and Barker, 2000) が、potex 様の TGB では、ウイルスの細胞間移行に外被タンパク質を必要とし (Forster *et al.*, 1992; Sit and AbouHaidar, 1993)、カルラウイルスの TGB は後者の potex 様である (Morozov and Solovyev, 2003; Verchot-Lubicz *et al.*, 2010)。ORF2 がコードする TGBp1 は ssRNA と非特異的に結合することができ、TGBp1 の N 末端にある正電荷を持つアミノ酸残基が ssRNA との結合に必要であることが *Potexvirus* 属のウイルス (ポテックスウイルス)、特にタイプ種であるジャガイモ X ウイルス (potato virus X; PVX) について多く報告された (Rouleau *et al.*, 1994; Morozov *et al.*, 1999; Wung *et al.*, 1999)。また、TGBp1 には複製酵素の HEL に類似する HEL ドメインが存在し、これは ATP との結合に関わると言われており (Gorbalenya and Koonin, 1993; Kadaré and Haenni, 1997)、TGBp1 が RNA ヘリカーゼ活性を持つことは *in vitro* で証明された (Kalinina *et al.*, 2002)。PVX の TGBp1 は原形質連絡 (plasmodesm; PD) と相互作用し、排除分子量限界 (size exclusion limit; SEL) を増大させる機能があると報告され (Angell *et al.*, 1996; Yang *et al.*, 2000)、この機能は TGBp1 の ATP 結合活性に関わると推測された (Lough *et al.*, 1998; Morozov *et al.*, 1999)。また、TGBp1 は RNA サイレンシングサプレッサーとしての機能も持ち、この機能は PVX について多くの報告が成されている (Voinnet *et al.*, 2000; Bayne *et al.*, 2005; Chiu *et al.*, 2010)。また、PVM の TGBp1 も全身性 RNA サイレンシングに対しサプレッサー機能を有することが報告された (Senshu *et al.*, 2011)。一方、PVX と類似にカルラウイルスの ORF3 と ORF4 がコードする TGBp2 と TGBp3 にはそれぞれ 2 つと 1 つの疎水性配列が存在し、膜貫通タンパク質であることが予測されている (Morozov *et al.*, 1987, 1989, 1991)。緑色蛍光タンパク質 (green fluorescent protein; GFP) 等の蛍光標識を用い、PVX 等ポテックスウイルスの TGBp2 と TGBp3 の細胞内分布を調べた結果、両タンパク質は小胞体膜や細胞膜に局在することが多くの研究で報告された (Ju *et al.*, 2005; Samuels *et al.*, 2007; Bamunusinghe *et al.*, 2009; Lim *et al.*, 2010)。ま

た、PVX では、TGBp2 と TGBp3 がリボゾーム、ウイルス粒子、ウイルスの RNA 依存性 RNA ポリメラーゼと結合し、ウイルス複製複合体 (virus replication complex) を構成するという報告もある (Ju *et al.*, 2005 ; Bamunusinghe *et al.*, 2009 ; Tilsner *et al.*, 2012)。

TGB の下流に存在する ORF5 は、*in vitro* での翻訳や免疫実験の結果から、約 34 kDa の外被タンパク質 (coat protein; CP) をコードすることが確認された (Mackenzie *et al.*, 1989 ; Cavileer *et al.*, 1994 ;)。カルラウイルス CP のアミノ酸配列を解析したところ、N 末端は比較的多様性が高い領域で、ウイルス伝搬や宿主反応等に関与すると言われているが、中央部より C 末端側に保存領域があると認められた (Hataya *et al.*, 2001 ; Cox and Jones, 2010)。前述の通り、カルラウイルスの CP は細胞間移行に必要であり、CP は TGBp1、ウイルス RNA と結合して RNA 結合タンパク質複合体 (ribonucleoprotein complex) を形成することが *Potexvirus* 属のウイルスについて報告されている (Forster *et al.*, 1992; Sit and AbouHaidar, 1993 ; Lough *et al.*, 2000)。また、PVS の CP は全身性 RNA サイレンシングに対し、弱いサプレッサー能を持つことも報告されている (Karpova *et al.*, 2015)。

ORF 5 のすぐ下流には ORF 6 が続き、約 11 kDa のタンパク質をコードする。このタンパク質は 4 つのシステインを決まった配列 (Cys-X<sub>2</sub>Cys-X<sub>10-12</sub>-Cys-X<sub>4</sub>-Cys) で持つことからシスチンリッチタンパク質 (cysteine rich protein; CRP) と呼ばれ (Foster and Mills, 1992)、PVM の CRP にはジンクフィンガーモチーフ (zinc finger motif) が存在し、RNA 結合能を持つことが示唆された (Gramstat *et al.*, 1990)。*Hordeivirus* 属のムギ斑葉モザイクウイルス (barley stripe mosaic virus)、*Tobravirus* 属のタバコ茎えそウイルス (tobacco rattle virus) の CRP は病原性に影響を与えていると言われている (Donald and Jackson, 1994, 1996; Liu *et al.*, 2002)。カルラウイルスの CRP の機能は未だ不明である部分が多いが、ウイルスの病原性に関与する可能性が示唆されている。また、カルラウイルスの PVM、sweet potato chlorotic fleck virus の CRP には RNA サイレンシングサプレッサーとしての機能があると報告され (Senshu *et al.*, 2011 ; Deng *et al.*, 2015)、また、PVH の CRP も局所的な RNA サイレンシングを阻害することが報告されている (Li *et al.*, 2013)。しかし、キク B ウイルス (chrysanthemum virus B; CVB) の CRP を PVX ベクターに挿入して *Nicotiana benthamiana* に接種した場合は、病徴が激化したが、RNA サイレンシングサプレッサーとしての働きは認められなかったことが報告されている (Lukhovitskaya *et al.*, 2005)。

カルラウイルスの 5'末端非翻訳領域の塩基配列には高い同一性が認められ、保存性が高いモチーフ UAAACA が存在し、ゲノムの複製や翻訳に関わることが推察された (Cavileer

*et al.*, 1994 ; Monis and De Zoeten, 1990 ; Hataya *et al.*, 2001)。一方、3'末端非翻訳領域の塩基長は 50~100 nt とカルラウイルス種によって異なっているが、5'末端非翻訳領域と同様に保存性が高いモチーフが存在することが報告され、ゲノムの複製や翻訳制御、または 5'末端非翻訳領域との結合に関与すると推察された (Tsuneyoshi *et al.*, 1998 ; Hataya *et al.*, 2001)。

### 1.3. カルラウイルスのゲノム発現

カルラウイルスでは、キャップ化したゲノム RNA から直接発現する ORF は、最初でかつ最大の ORF1 のみである。その他の ORF はゲノムの 3'端側を含むサブゲノム RNA から発現すると言われている (Foster, 1992)。

BIScV、PVS、helenium virus S (HelVS) のカルラウイルス 3 種では、ウイルスゲノムの 3'末端を含む 2 つのサブゲノム RNA が存在することが報告された (Foster and Mills, 1990b, 1990c, 1991a)。2 つのサブゲノム RNA の 3'末端にはポリ A 配列が存在するが、5'末端にキャップ構造が付加していないと言われている (Foster and Mills, 1990d)。ポテックスウイルスでは、この 2 つのサブゲノム RNA はウイルス外被タンパク質に包まれている (Batten *et al.*, 2003)。

配列解析の結果から、ORF2 と ORF5 の上流には保存性の高い配列が存在し、これはサブゲノム RNA の 5'末端に相当することから、リボソーム認識部位が含まれていることが推測された (Foster and Mills, 1991b)。そのため、ORF2、5 はそれぞれ 2 つの異なるサブゲノム RNA から発現していることが考えられた。また、PVM の ORF6 はインターナルイニシエーション、リボソームのフレームシフトにより翻訳されることが報告された (Gramstat *et al.*, 1994)。ORF3、4 も類似のフレームシフトにより翻訳されることが推測された (Foster, 1992)。

### 1.4. カルラウイルスの分子性状解析と感染性クローンの構築

近年、カルラウイルスの分子性状についての研究が進み、全ゲノム配列が報告されたウイルスは 53 種のうち 36 種で、それらを表 II-1 にまとめた。全ゲノム配列が報告された 36 種のうち、日本で発生したものは計 12 種である。また、複数の分離株について全ゲノム配列が報告されたウイルスも存在するが、表 II-1 には調べる限り最初に全ゲノム配列が報告された文献を記載した。

感染性クローンの構築はウイルスのゲノム機能やウイルスと宿主植物の相互作用などの研究において、重要な役割を果たす。また、構築された感染性クローンは外来遺伝子の発現ベクターとしても広く利用されている。

感染性クローンの転写方法は主に二種類あり、一つは SP6 プロモーター、T3 プロモーターまたは T7 プロモーターの下流にウイルスの cDNA を繋げ、*in vitro* で RNA を転写する方法である (Nagyov áand Subr, 2007)。この方法で転写される感染性クローンは *in vitro* での RNA 合成が必要で、また、ゲノムにキャップ構造を持つウイルスの RNA を転写する時は、キャップ構造を付加する必要がある、利用コストが高い。もう一つの転写方法はカリフラワーモザイクウイルス (cauliflower mosaic virus ; CaMV) の 35S プロモーター等を利用し、*in vivo* で感染性 RNA を転写する方法である。この方法はより実用的で、コストも比較的安い、ジャガイモ Y ウイルス (potato virus Y) での接種試験ではバイオリスティック法に比べ機械接種での感染率がやや低下することが報告されている (Jakab *et al.*, 1997)。

カルラウイルスにおいて作製された最初の感染性クローンは、1994 年に報告された B1ScV の感染性転写 RNA である (Lawrence and Hillman, 1994)。しかし、それから 20 年以上経っていた今でも、報告されたカルラウイルスの感染性クローンの種類は限られている。PopMV (Naylor *et al.*, 2005)、PVM (Flatken *et al.*, 2008)、CVB (Ohkawa *et al.*, 2008)、CPMMV (Carvalho *et al.*, 2017)、pea streak virus (Nemchinov, 2017) では感染性クローンが作製されたが、PVS の感染性クローンはまだ作製されていない。

表II-1：全ゲノム配列が報告されたカルラウイルス

ウイルス名	和名	文献
<i>Aconitum latent virus</i>	トリカブト潜在ウイルス	Fuji <i>et al.</i> , 2002
<i>American hop latent virus</i>	-	Eastwell and Druffel, 2012
<i>Atractylodes mottle virus</i>	-	Zhao <i>et al.</i> , 2015
<i>Blueberry scorch virus</i>	-	Cavileer <i>et al.</i> , 1994
<i>Butterbur mosaic virus</i>	フキモザイクウイルス	Hashimoto <i>et al.</i> , 2009
<i>Chrysanthemum virus B</i>	キク B ウイルス	Ohkawa <i>et al.</i> , 2007
<i>Coleus vein necrosis virus</i>	-	Kraus <i>et al.</i> , 2008
<i>Cowpea mild mottle virus</i>	-	Menzel <i>et al.</i> , 2010
<i>Daphne virus S</i>	ジンチョウゲ S ウイルス	Lee <i>et al.</i> , 2006
<i>Gaillardia latent virus</i>	-	Menzel <i>et al.</i> , 2012
<i>Garlic common latent virus</i>	-	Song <i>et al.</i> , 2002
<i>Helleborus net necrosis virus</i>	-	Eastwell <i>et al.</i> , 2009
<i>Hippeastrum latent virus</i>	-	Chen <i>et al.</i> , 2012
<i>Hop latent virus</i>	ホップ潜在ウイルス	Hataya <i>et al.</i> , 2000
<i>Hop mosaic virus</i>	ホップモザイクウイルス	Poke, 2008
<i>Hydrangea chlorotic mottle virus</i>	-	Tang <i>et al.</i> , 2010
<i>Kalancho ëlatent virus</i>	-	Dinesen <i>et al.</i> , 2009
<i>Ligustrum necrotic ringspot virus</i>	-	Scott and Zimmerman, 2008
<i>Ligustrum virus A</i>	-	Igori <i>et al.</i> , 2016
<i>Lily symptomless virus</i>	ユリ潜在ウイルス	Choi and Ryu, 2003
<i>Melon yellowing-associated virus</i>	-	Costa <i>et al.</i> , 2017
<i>Mirabilis jalapa mottle virus</i>	-	Hatlestad <i>et al.</i> , 2011
<i>Narcissus common latent virus</i>	-	Zheng <i>et al.</i> , 2006
<i>Nerine latent virus</i>	ネリネ潜在ウイルス	Wylie and Jones, 2012
<i>Passiflora latent virus</i>	トケイソウ潜在ウイルス	Spiegel <i>et al.</i> , 2007
<i>Pea streak virus</i>	-	Su <i>et al.</i> , 2015
<i>Phlox virus B</i>	-	Hammond and Reinsel, 2011
<i>Phlox virus S</i>	-	Hammond and Reinsel, 2011
<i>Poplar mosaic virus</i>	-	Smith and Campbell, 2004
<i>Potato latent virus</i>	-	Nie, 2009
<i>Potato virus H</i>	-	Li <i>et al.</i> , 2013
<i>Potato virus M</i>	ジャガイモ M ウイルス	Zavriev <i>et al.</i> , 1991
<i>Potato virus P</i>	-	Massa <i>et al.</i> , 2006
<i>Potato virus S</i>	ジャガイモ S ウイルス	Matoušek <i>et al.</i> , 2005
<i>Red clover vein mosaic virus</i>	-	Larsen <i>et al.</i> , 2009
<i>Shallot latent virus</i>	シャロット潜在ウイルス	Wylie <i>et al.</i> , 2012
<i>Sweet potato C6 virus</i>	-	De Souza <i>et al.</i> , 2013
<i>Sweet potato chlorotic fleck virus</i>	-	Aritua <i>et al.</i> , 2009

和名に「-」で表示したものは日本で報告されていないウイルスである（植物ウイルス分類委員会がまとめた「日本に発生する植物ウイルス・ウイロイド（2014）」URL: [www.ppsj.org/pdf/mokuroku-viroid\\_2014.pdf](http://www.ppsj.org/pdf/mokuroku-viroid_2014.pdf) に基づく）。

複数の株について全ゲノム配列が報告されたウイルスに対しては、調べる限り最初に全ゲノム配列が報告された文献を記載した。

## 2. ジャガイモ S ウイルス (PVS)

### 2.1. PVS の宿主範囲及び伝搬方式

PVS はジャガイモに病害を起こす主要なウイルスの一種で、1950 年代に初めて報告され、世界中のジャガイモ栽培地域に広く分布している (De Bruyn, 1952)。PVS がジャガイモに単独感染した場合、病徴が現れないか、または病徴が現れても軽いことがほとんどであるが、最大で 20% のジャガイモの減収をもたらす (Wetter, 1971; Nyalugwe *et al.*, 2012)、他のウイルスと混合感染した場合は更に大幅な減収を招く (Lim *et al.*, 1966; Wright, 1970; Manzer *et al.*, 1978)。

これまでに多くの研究において PVS の宿主範囲が調べられ、各分離株や系統により多様な結果が得られているが、宿主と判明した植物の多くはアカザ科 (*Chenopodiaceae*) とナス科 (*Solanaceae*) で、宿主範囲は狭い。アカザ科の宿主植物において全身感染するかどうかは、PVS 系統によって異なることが報告されている (De Bokx, 1970; Hiruki, 1975; Slack, 1983; 今井, 2004)。また、トマト (*Solanum lycopersicum*) では品種によって、PVS 感受性のものと非感受性のものが存在することが報告された (De Bokx, 1970; Kowalska and Waś, 1976; Slack, 1983; 堀尾, 1976; Bratney *et al.*, 2002; 今井, 2004)。一方、*N. occidentalis* や *N. debneyi* は PVS の分離株に関わらず全身感染する宿主であることが報告されている (Bagnall and Larson, 1957; Bagnall *et al.*, 1959; De Bokx, 1970; MacKinnon and Bagnall, 1972; Kowalska and Waś, 1976; 古田, 1997; 今井, 2004)。

PVS はジャガイモ塊茎を介して伝染するため、PVS 罹病ジャガイモ塊茎の輸送によって、遠距離の伝搬が起きる。また、PVS は植物同士の接触によっても伝染するため圃場での伝搬速度が速く、汚染の範囲が広がり易い (De Bokx, 1972)。更に、PVS はアブラムシによっても伝搬され (Bode and Weidemann, 1971)、系統によってアブラムシの伝搬率が異なっていると言われている。PVS アンデス系統の PVS-An 株はモモアカアブラムシにより 10-27 % の伝搬率で非永続伝搬されるが、普通系統の PVS-T 株はモモアカアブラムシによって伝搬されないと報告された (Slack, 1983)。また、日本産普通系統株及びモザイク系統株は非常に低い伝搬率 (1.3-2 %) ながら非永続伝搬されたという報告もある (堀尾・田中, 1977)。

### 2.2. PVS 系統及び分子性状解析

*C. quinoa* は 1975 年から PVS が局部感染する検定植物として使われてきた (Hiruki, 1975)。

しかし、1973年には *C. quinoa* に全身感染する PVS 分離株が存在することが報告されており (Hinostroza-Orihuela, 1973)、1981年に Jones の提案により PVS のアンデス系統 (Andean strain ; PVS<sup>A</sup>) と命名された (Jones, 1981)。それに対し、*C. quinoa* に全身感染しない PVS は普通系統 (ordinary strain ; PVS<sup>O</sup>) と呼ばれた (Slack, 1983 ; Dolby and Jones, 1987)。2000年以後、PVS ゲノムの塩基配列の解析が進み、生物学的な *C. quinoa* への感染性だけではなく、分子系統樹解析に基づく PVS の分類を提唱されるようになった。

Matoušek らは、計 35 株の PVS について *C. quinoa* への接種実験及び CP 遺伝子配列に基づく系統解析から、*Chenopodium* 属植物に全身感染するが CP 遺伝子配列が普通系統に類似する PVS 株を CS (*Chenopodium systemic*) 系統 (PVS<sup>CS</sup>) とすることを提案した (Matoušek *et al.*, 2005)。その後、Cox と Jones は PVS 28 株の *C. quinoa* への接種実験及び 60 株の CP 遺伝子配列系統解析を行って、*Chenopodium* 属植物に全身感染するが CP 配列が普通系統に類似する PVS 株を O-CS (ordinary-*Chenopodium systemic*) 系統 (PVS<sup>O-CS</sup>) に、*Chenopodium* 属植物に全身感染しないが CP 配列がアンデス系統に類似する PVS 株の存在は未確認であるが、A-CL (Andean-*Chenopodium local*) 系統 (PVS<sup>A-CL</sup>) とすることを提案した (Cox and Jones, 2010)。

Cox と Jones は CP の N 末端アミノ酸配列が *Chenopodium* 属の植物への全身感染性を決定する要因であると考えられている (Cox and Jones, 2010) が、これに従わないチェコの分離株 PVS-Vltava が存在することから、この推論は必ずしも正しいとは言えない。PVS-Vltava 株の CP 遺伝子配列は系統解析の結果では、アンデス系統に属する (Cox and Jones, 2010 ; Lin *et al.*, 2009 ; Salari *et al.*, 2011) が、接種実験の結果では PVS-Vltava は *C. quinoa* に全身感染しないことが報告されている (Matoušek *et al.*, 2000)。後に、PVS-Vltava は普通系統とアンデス系統の組み換え体であることが報告されている (Duarte *et al.*, 2012)。また、*C. quinoa* に全身感染しないチリの 2 株は CP 配列を用いた系統解析によりアンデス系統に属することが報告された (Lin *et al.*, 2014)。これらのことから、PVS において *Chenopodium* 属植物への病原性を決定する因子は CP 配列ではないと考えられた。

Lambert らは PVS 44 株について *C. quinoa* への接種実験を行い、そのうちの 22 株が従来認識されていた *C. quinoa* への 2 種類の病原性、つまり *C. quinoa* に局部感染して接種葉に壞疽斑を現す PVS<sup>O</sup> と *C. quinoa* へ全身感染して上葉に褪緑斑やモザイク等の病徴を現す PVS<sup>A</sup> とは異なることを報告した。22 株の内、13 株は *C. quinoa* に局部感染するが接種葉に病徴がない、5 株は *C. quinoa* に全身感染するが接種葉にしか病徴がない、残りの 4

株は *C. quinoa* に全身感染するが接種葉も上葉もに病徴がないものである。彼らは *CP* 遺伝子配列の系統解析結果から、従来の 2 系統にあてはまらない 22 株のうち、*CP* 遺伝子配列が普通系統に類似し *Chenopodium* 属植物に無病徴で局部感染する PVS 株を ordinary-like (PVS<sup>O</sup>-like) に、*CP* 遺伝子配列が普通系統に類似し *Chenopodium* 属植物に全身感染する PVS 株を Andean-like (PVS<sup>A</sup>-like) とした (Lambert *et al.*, 2012)。

また、Vallejo らは栽培ジャガイモからではなく、南アメリカのアンデス山脈地域に自生するジャガイモ近縁種 *S. phureja* から PVS 2 株 (RVC 株と Dic2 株) を分離した。この 2 株に他の PVS 分離株を加えた計 11 株の全ゲノム配列を用いた系統解析の結果から、RVC 株と Dic2 株は新しい P (phureja) 系統とすることが提案された (Vallejo *et al.*, 2016)。

最初に報告された PVS の全ゲノム配列はドイツの分離株 PVS-Leona である (Accession No. AJ863509; Matoušek *et al.*, 2005)。その後全ゲノム配列が報告された PVS 分離株は：日本から PVS-H95 (上田, 2002 ; 上田ら, 2002)、PVS-Na1 (畑谷ら, 2003) の 2 株、中国から PVS-HB7 と PVS-HB24 (Accession No. KU896946 に KU896945; Wang *et al.*, 2016)、PVS-BY (Accession No. MF033144)、PVS-Yunnan YN (Accession No. KC430335) の 4 株、チェコから PVS-Vltava (Accession No. AJ863510 ; Matoušek *et al.*, 2005) の 1 株、ハンガリーから PVS-Bonita と PVS-9.369 (Accession No. LN851190 に LN851191 ; Pátlí, 2015)、PVS-HU1 (Accession No. HF571059; Pátlí, 2015) の 3 株、ポーランドから PVS-Ewa (Accession No. LN851194; Pátlí, 2015) の 1 株、ウクライナから PVS-Alex、PVS-Valery、PVS-Irena (Accession No. LN851189、LN851192、LN851193 ; Pátlí, 2015) の 3 株、スロバキアから PVS-T62 (Accession No. MF346599 ; Predajňa *et al.*, 2017) の 1 株、オーストラリアから PVS-SW-14 (Accession No. KP089978)、PVS-Qld-1 (Accession No. MF375506 ; Santillan *et al.*, 2018) の 2 株、ニュージーランドから PVS-NZ-O ab030 Lincoln と PVS-NZ-A ab030 Lincoln (Accession No. KU058656 と KU058657 ; Blouin *et al.*, 2016) の 2 株、アメリカから PVS-WaDef-US と PVS-Id4106-US (DDBJ Accession No. FJ813512 に FJ813513; Lin *et al.*, 2009) の 2 株、ブラジルから PVS-BB-AND (DDBJ Accession No. JQ647830; Duarte *et al.*, 2012) の 1 株、ペルーの国際ジャガイモセンター (CIP) から PVS-GAF318-16.1 (DDBJ Accession No. KU586451; Zheng *et al.*, 2017) の 1 株、コロンビアから PVS-Dic2 (DDBJ Accession No. KR152654; Vallejo *et al.*, 2016)、PVS-RVC (DDBJ Accession No. JX419379; Gutierrez *et al.*, 2013) の 2 株である。

これまでに報告された PVS の塩基配列情報から、地理的に近いヨーロッパの分離株間

でも塩基配列同一性が低く、ゲノム塩基配列に多様性があることがわかっている (Matoušek *et al.*, 2000 ; Lin *et al.*, 2014)。

### 2.3. 日本における PVS

日本で最初に PVS の発生を報告したのは秋元らである (秋元ら, 1958)。秋元らが *N. debneyii* を検定植物として日本のジャガイモ中の PVS 感染状況について調べた結果、多くのジャガイモ検体に PVS が潜在感染していることが判明した。その後、行本らは家兎を用いて PVS 抗血清を作製し、スライド法と沈降反応により PVS 感染状況を調べ、無病徴に見えるジャガイモに PVS が潜在感染していることが再確認された (行本ら, 1960)。また、1967 年には堀尾らがジャガイモにモザイク症状を引き起こす PVS が存在することを報告し、そのような分離株をモザイク系統 (PVS<sup>M</sup>)、従来のジャガイモに潜在感染する分離株を普通系統 (PVS<sup>N</sup>) とした (堀尾, 1976)。

1985 年には、日本の九州地方で栽培されたジャガイモから、*C. quinoa* に全身感染するカルラウイルスが分離され、これは当時日本で報告された PVS 株と異なる性状を示したことから、PVS に近縁であるが別種のウイルスと見なされ、ジャガイモ南部潜在ウイルス (southern potato latent virus; SoPLV) と命名された (小林ら, 1985)。彼らは SoPLV はほぼ同時期に報告された PVS のアンデス系統株 (Slack, 1983 ; Dolby and Jones, 1987) であるという可能性を考察しているが、その後の研究は行われなかった。

### 2.4. 本研究室における PVS の研究

本研究室では、PVS のウイルス純化と抗体作成をはじめとして、日本株の 14 分離株を用いて、宿主範囲、病原性、multiplex RT-PCR による PVS 検定法及び塩基配列解析などの研究が進められてきた。その中で、普通系統の PVS-H95、アンデス系統の PVS-Na1 の 2 株について全ゲノム配列、他の計 12 株については 3'末端側の約 1500 塩基が決定された (古田, 1997 ; 八木橋, 2000 ; 久保, 2001 ; 今井, 2002 ; 上田, 2002 ; 上田ら, 2002 ; 畑谷ら, 2003)。

更に、PVS-H95 の全ゲノム配列に基づき、8 つの部分長 cDNA クローンを繋いで、PVS-H95 ゲノムの全長 cDNA クローン pPVS-H-FL-AB を構築したが、そこから転写したキャップ付加 RNA には感染性が認められなかった (畑谷, 未発表)。その後、転写 RNA の感染性に影響する可能性がある配列を探索し、その配列を組換えによって入れ換え、ま

たは変異を導入することによって、感染性を持つキャップ構造を付加した RNA を転写できる PVS の cDNA クローン構築を試みた (李, 2014)。しかし、安定的かつ高い感染性を持つ RNA を転写できる全長 cDNA クローンは得られなかった。

本研究では、2000 年に PVS-H95 を接種した *C. quinoa* で単病斑分離を 3 回繰り返して得られた PVS-H00 を鋳型として、安定的かつ高い感染性を持つ RNA を転写できる PVS の cDNA クローンの構築を行い、全ゲノム配列を解析して PVS-H95 の配列と比較した。また、日本で PVS<sup>M</sup> として報告された株 (堀尾, 1976) 及び SoPLV の K-1 株 (小林ら, 1985) の全ゲノム配列を解析し、日本産 5 分離株と世界各国産 24 分離株の全ゲノム配列に基づいて系統解析を行い、PVS 系統の分子性状を分析した。

## 第三章

### ジャガイモ S ウイルスの感染性 cDNA クローンの構築

#### 1. 目的

これまでに、ジャガイモ S ウイルス (PVS) の病原性についての知見は少ない。PVS の複製や移行のメカニズムを研究し、病原性を明らかにするためには、PVS の感染性クローンを構築する必要がある。そこで日本産の PVS 分離株を用いて、感染性クローンの構築を試みた (李, 2014) が、当時構築した全長クローンからの転写産物の感染性は 25% 未満で低く、再現性が悪く、かなり不安定であった。このような全長クローンは PVS 病原性の研究に用いるのは不適當である。本研究では、2000 年に PVS-H95 を接種した *C. quinoa* で単病斑分離を 3 回繰り返して得られた PVS-H00 を鋳型として、安定的かつ高い感染性を持つ RNA が転写できる PVS-H の cDNA クローンを構築し、全長 cDNA クローンの感染性に影響する配列を考察する。

#### 2. 材料と方法

##### 2.1. ウイルス株

本研究で用いた PVS は普通系統の PVS-H00 とアンデス系統の PVS-Na1 の 2 分離株である。PVS-H95 は北海道で栽培されていたジャガイモ品種「アスタルテ」試料 No.17 (PVS 単独感染) から 1995 年に *Nicotiana occidentalis* に接種し、以降継代、純化を行った株 (古田, 1997) であり、PVS-H95 ゲノムの全塩基配列 (8485 塩基) は既に決定されている (上田ら, 2002)。PVS-H00 は 2000 年に PVS-H95 を接種した *Chenopodium quinoa* において、単病斑分離を 3 回繰り返して得られたもので、*N. occidentalis* や *C. quinoa* における病原性は PVS-H95 と同様である。PVS-Na1 は九州産のアンデス系統で、ゲノムの全塩基配列 (8486 塩基) は既に決定されており、PVS-H95 ゲノムと比べ、3'非翻訳領域が 1 塩基長い (畑谷ら, 2003)。

##### 2.2. PVS ゲノムの cDNA クローン

PVS ゲノムの cDNA クローンは pPVS-H-5T(Sal I Spe I)-Mut、pPVS-1P1M 及び pPVS-H-37P3ESpe2 (畑谷,未発表) を用いた。pPVS-H-5T(Sal I Spe I)-Mut は PVS-H95 を

鋳型として、5'端側から約 1.7 Kb を逆転写-ポリメラーゼ連鎖反応 (reverse transcription-polymerase chain reaction; RT-PCR) で増幅し、pBluescript II に挿入した後、192 番目の塩基チミン (Thymine ; T) をアデニン (adenine ; A) に置換して構築されたアミノ酸置換を伴う PVS-H95 の部分長 cDNA クローンである。pPVS-1P1M はプライマー PVS-1P と PVS-1M を用いて、PVS-H95 の ORF5 領域を RT-PCR で増幅し、得られた約 1Kb の cDNA (7162-8323 nt) を pGEM-T Easy (Promega) に挿入して構築された部分長 cDNA クローンである。pPVS-H-37P3ESpe2 はプライマー PVS-37P と PVS-3E-Spe2 を用いて、PVS-H00 の 3'端側を RT-PCR で増幅し、得られた約 4 Kb の cDNA を pCR-Blunt (Invitrogen) に挿入して構築された部分長 cDNA クローンである。このクローンの 3'末端には 66 個のアデニンからなる polyA 鎖直下に Spe I 切断部位を導入してある。なお、本研究で用いたプライマーは付録の表 S-1 にまとめた。

PVS-H ゲノムの全長 cDNA クローンは pPVS-H-FL-AB、pPVS-H-FL-V (畑谷,未発表)、及び pPVS-H-FL-C、pPVS-H-FL-D (李, 2014) を用いた。各全長 cDNA クローンの構造は図III-3-1 に示す。なお、上記 4 つの全長 cDNA クローンは全て PVS-H95 を鋳型として構築したもので、それらから転写されたキャップ付加 RNA には感染性が認められなかった。

### 2.3. 総 RNA 抽出

PVS 感染した *N. occidentalis* 上葉 0.1 g を TRIzol 試薬 (Life Technologies) 1 ml で磨砕し、1.5 ml 遠心チューブに移した。室温で 5 分間置き、4 °C 下 13,000 rpm で 5 分間遠心分離して得られた上清を新しい遠心チューブに移した。クロロホルムを 200 µl 加えて混合し、室温で 5 分間置き、4 °C 下 13,000 rpm で 15 分間遠心分離し、水層を新しい遠心チューブに移した。2-プロパノール 250 µl と High-Salt Precipitation Solution (1.2M 塩化ナトリウム、0.8M くえん酸ナトリウム) 250 µl を加えて混合し、室温で 10 分間置き、4 °C 下 13,000 rpm で 10 分間遠心分離した。得られた沈殿を 1 ml の 75 %エタノールで洗浄し、4 °C 下 9,900 rpm で 5 分間遠心分離した後、沈殿を乾燥させ、滅菌水に溶解した。抽出した総 RNA は-80 °C で保存した。

なお、Northern blot 用の総 RNA は TRIzol Plus RNA Purification Kit (invitrogen) を用い、説明書のプロトコールに従って抽出した。

また、抽出した総 RNA が処理が必要とする場合には、10×DNase I 緩衝液 (ニッポンジーン) を 10 µl、2 mg/ml BSA を 10 µl、RNase-free DNase I (ニッポンジーン; 1 U/µl) を

1.5  $\mu$ l 加えた 100  $\mu$ l の反応系で 37  $^{\circ}$ C にて 60 分間処理した。DNase I で処理したサンプルにフェノール：クロロホルム (1:1) を 100  $\mu$ l 加えて 3 分間攪拌し、20  $^{\circ}$ C 下 13,000 rpm で 5 分間遠心分離し、上層の水層を新しい遠心チューブに回収した。3 M 酢酸ナトリウム (pH 5.2) 10  $\mu$ l とエタノール 250  $\mu$ l を加えて混合し、氷上で 10 分間置いた後、4  $^{\circ}$ C 下 13,000 rpm で 10 分間遠心分離した。得られた沈殿を 1 ml の 75 %エタノールで洗浄し、4  $^{\circ}$ C 下 13,000 rpm で 5 分間遠心分離し、回収した沈殿を乾燥させ、滅菌水に溶解した。

## 2.4. RT-PCR

### 2.4-1. RT-PCR 産物をクローニングに用いた場合

PVS ゲノムの cDNA クローンを構築する場合、逆転写反応 (RT) は 20  $\mu$ l の反応系で行った。PVS-H00 感染葉から抽出した総 RNA 試料を 5  $\mu$ l または 2008 年に PVS-Na1 ウイルス粒子から抽出した RNA を 2  $\mu$ l、10  $\mu$ M リン酸化プライマーを 1  $\mu$ l、5 mM dNTP mix を 2  $\mu$ l、滅菌水を加えて混合し、65  $^{\circ}$ C で 10 分間反応させ、氷上で 2 分間静置した。5 $\times$ ReverTra Ace 緩衝液 (Toyobo) を 4  $\mu$ l、ReverTra Ace (Toyobo ; 100 U/ $\mu$ l) を 1  $\mu$ l 加えて混合し、42  $^{\circ}$ C で 60 分間反応後、99  $^{\circ}$ C で 5 分間加熱し、酵素を失活化させた。得られた cDNA を鋳型として、50  $\mu$ l の反応系でポリメラーゼ連鎖反応 (PCR) を行った。PVS-H00 ゲノムの cDNA クローンを構築する場合、反応系を以下に示す：10 $\times$ KOD Plus 緩衝液 (Toyobo) を 5  $\mu$ l、25mM MgSO<sub>4</sub> を 2  $\mu$ l、2mM dNTPs mix を 5  $\mu$ l、10  $\mu$ M プラス鎖プライマーを 1.5  $\mu$ l、10  $\mu$ M マイナス鎖プライマーを 1.5  $\mu$ l、KOD Plus (Toyobo ; 1 U/ $\mu$ l) を 1  $\mu$ l 加えて混合し、滅菌水で 50  $\mu$ l に調整した。サイクル反応は 94  $^{\circ}$ C で 2 分間後、94  $^{\circ}$ C で 15 秒間、50  $^{\circ}$ C で 30 秒間、68  $^{\circ}$ C で 5.5 分間を 30 サイクル行った後、68  $^{\circ}$ C で 3 分間延長した。一方、PVS-Na1 ゲノムの cDNA クローンを構築する場合、反応系を以下に示す：10 $\times$ LA 緩衝液 II (TaKaRa Bio) を 5  $\mu$ l、25mM MgCl<sub>2</sub> を 5  $\mu$ l、2.5mM dNTPs mix を 8  $\mu$ l、10  $\mu$ M プラス鎖プライマーを 1  $\mu$ l、10  $\mu$ M マイナス鎖プライマーを 1  $\mu$ l、LA Taq (TaKaRa Bio ; 5 U/ $\mu$ l) を 0.5  $\mu$ l 加えて混合し、滅菌水で 50  $\mu$ l に調整した。サイクル反応は 94  $^{\circ}$ C で 2 分間後、94  $^{\circ}$ C で 30 秒間、50  $^{\circ}$ C で 30 秒間、72  $^{\circ}$ C で 6.5 分間を 30 サイクル行った後、72  $^{\circ}$ C で 5 分間延長した。

なお、反応系に用いたプライマーはリン酸化済みのものである。プライマーのリン酸化は 20  $\mu$ l の反応系で行い、50  $\mu$ M プラス鎖プライマーを 15  $\mu$ l、10 mM rATP を 2  $\mu$ l、10 $\times$ PNK 緩衝液 (Takara Bio) を 2  $\mu$ l、T4 polynucleotide Kinase (Takara Bio; 10 U/ $\mu$ l) を 1  $\mu$ l 加えて混合し、37  $^{\circ}$ C で 60 分間反応後、95  $^{\circ}$ C で 5 分間加熱し、酵素を失活化させた。

#### 2.4-2. RT-PCR 産物を検出に用いた場合

PVS ゲノムの全長 cDNA クローンの転写産物接種葉から、子孫配列を調べる場合、逆転写反応は 20  $\mu$ l の反応系で行った。総 RNA 試料を 1-5  $\mu$ l (抽出した総 RNA または転写した PVS-H-FL- $\beta$  と PVS-H-FL-D)、10  $\mu$ M プライマー-PVS-47M を 1  $\mu$ l、2.5 mM dNTP mix を 4  $\mu$ l、滅菌水を 6  $\mu$ l 加えて混合し、65  $^{\circ}$ C で 10 分間熱変性後、氷上で 2 分間静置した。5 $\times$ M-MLV RTase 緩衝液 (ニッポンジーン) を 4  $\mu$ l、M-MLV RTase (ニッポンジーン ; 200 U/ $\mu$ l) を 1  $\mu$ l、0.1 M ジチオトレイトール (DTT) を 2  $\mu$ l 加えて混合し、42  $^{\circ}$ C で 60 分間反応後、99  $^{\circ}$ C で 5 分間加熱し、酵素を失活化した。得られた cDNA を鋳型として、PVS-44P と PVS-49M のプライマーペアを用い、50  $\mu$ l の反応系で PCR を行った。反応系を以下に示す : 10 $\times$ 緩衝液 (TaKaRa Bio) を 5  $\mu$ l、2.5 mM dNTP mix を 4  $\mu$ l、10  $\mu$ M プラス鎖プライマーを 1  $\mu$ l、10  $\mu$ M マイナス鎖プライマーを 1  $\mu$ l、Ex *Taq* DNA polymerase (TaKaRa Bio ; 5 U/ $\mu$ l) を 1  $\mu$ l 加えて混合し、滅菌水で 50  $\mu$ l に調整した。サイクル反応は 94  $^{\circ}$ C で 2 分間後、94  $^{\circ}$ C で 30 秒間、55  $^{\circ}$ C で 30 秒間、72  $^{\circ}$ C で 3 分間を 35 サイクル行い、約 2 Kb の DNA 断片を増幅した。

#### 2.5. 3'RACE

RNA 試料は 2008 年に PVS-Na1 ウイルス粒子から抽出した RNA を用いた。逆転写反応は 20  $\mu$ l の反応系で行った。RNA 試料を 2  $\mu$ l、10  $\mu$ M プライマー-AP4 を 1  $\mu$ l、滅菌水を 11  $\mu$ l 加えて混合し、65  $^{\circ}$ C で 10 分間反応させ、氷上で 2 分間静置した。5 $\times$ ReverTra Ace 緩衝液 (Toyobo) を 4  $\mu$ l、10 mM dNTP mix を 1  $\mu$ l 加えて混合し、42  $^{\circ}$ C で 2 分間反応させた。ReverTra Ace (Toyobo ; 100 U/ $\mu$ l) を 1  $\mu$ l 加えて混合し、42  $^{\circ}$ C で 60 分間反応後、95  $^{\circ}$ C で 5 分間加熱し、酵素を失活化させた。得られた cDNA を鋳型として、プライマーペア PVS-2P と 3NTRAP4 を用い、50  $\mu$ l の反応系で PCR を行った。反応系を以下に示す : 10 $\times$ KOD Plus 緩衝液 (Toyobo) を 5  $\mu$ l、25mM MgSO<sub>4</sub> を 2  $\mu$ l、2mM dNTPs mix を 5  $\mu$ l、10  $\mu$ M プラス鎖プライマーを 1.5  $\mu$ l、10  $\mu$ M マイナス鎖プライマーを 1.5  $\mu$ l、KOD Plus (Toyobo ; 1 U/ $\mu$ l) を 1.5  $\mu$ l 加えて混合し、滅菌水で 50  $\mu$ l に調整した。サイクル反応は 94  $^{\circ}$ C で 2 分間後、94  $^{\circ}$ C で 15 秒間、55  $^{\circ}$ C で 30 秒間、68  $^{\circ}$ C で 4 分間を 25 サイクル行った後、68  $^{\circ}$ C で 3 分間延長し、約 3 Kb の DNA 断片を増幅した。

## 2.6. 塩基変異の導入

### 2.6-1. Inverse PCR

PVS の全長 cDNA クローン 50 ng を鋳型として、3 組のプライマーペア : PVS-47P と PVS-63M、PVS-63P と PVS-H-3E-Spe2 または PVS-63P と 3NTRAP3 を用い、50  $\mu$ l の反応系で PCR を行った。反応系を以下に示す : 10 $\times$ KOD Plus 緩衝液 (Toyobo) を 5  $\mu$ l、25mM MgSO<sub>4</sub> を 2  $\mu$ l、2mM dNTPs mix を 5  $\mu$ l、10  $\mu$ M プラス鎖プライマーを 1.5  $\mu$ l、10  $\mu$ M マイナス鎖プライマーを 1.5  $\mu$ l、KOD Plus (Toyobo ; 1 U/ $\mu$ l) を 1  $\mu$ l 加えて混合し、滅菌水で 50  $\mu$ l に調整した。サイクル反応は 94  $^{\circ}$ C で 2 分間後、94  $^{\circ}$ C で 15 秒間、55  $^{\circ}$ C で 30 秒間、68  $^{\circ}$ C で 10 分間または 3.5 分間を 35 サイクル行った後、68  $^{\circ}$ C で 5 分間反応させた。プライマーペア PVS-47P と PVS-63M では約 9 Kb、プライマーペア PVS-63P と PVS-H-3E-Spe2 または PVS-63P と 3NTRAP3 では約 2.5 Kb の DNA 断片を増幅した。反応後、Dpn I (Toyobo ; 20 U/ $\mu$ l) を 1  $\mu$ l 加えて混合し、37  $^{\circ}$ C で 1 時間反応させて鋳型に用いたプラスミドを分解した。

### 2.6-2. QuickChang II XL Site-Directed Mutagenesis Kit

PVS の全長 cDNA クローン pPVS-H-FL- $\beta$ SiW の構築にはキット QuickChang II XL Site-Directed Mutagenesis Kit (Agilent Technologies) を用い、説明書のプロトコールに従った。全長 cDNA クローン pPVS-H-FL- $\beta$  (30 ng 使用) に、10 $\times$ reaction 緩衝液 (Agilent Technologies) を 5  $\mu$ l、dNTPs mix を 1  $\mu$ l、10  $\mu$ M PVS-63P を 1.6  $\mu$ l (約 125 ng)、10  $\mu$ M PVS-63M を 1.6  $\mu$ l (約 125 ng)、Quick Solution reaction (Agilent Technologies) を 3  $\mu$ l、PfuUltra HF (Agilent Technologies ; 2.5 U/ $\mu$ l) を 1  $\mu$ l 加えて混合し、滅菌水で 50  $\mu$ l まで調整して PCR を行った。サイクル反応は 94  $^{\circ}$ C で 1 分間後、95  $^{\circ}$ C で 50 秒間、60  $^{\circ}$ C で 50 秒間、68  $^{\circ}$ C で 12 分間を 18 サイクル行った後、68  $^{\circ}$ C で 7 分間延長した。反応後、Dpn I (Agilent Technologies ; 10 U/ $\mu$ l) を 1  $\mu$ l 加えて混合し、37  $^{\circ}$ C で 1 時間反応させて鋳型に用いたプラスミドを分解した後、3  $\mu$ l を形質転換に持ち込んだ。

## 2.7. 制限酵素処理および DNA のエタノール沈殿

制限酵素処理は各制限酵素の説明書の通りに行った。なお、完全切断が望ましい場合、各制限酵素の反応時間を 16 時間以上にした。1 種類の制限酵素を用いる場合、説明書に記載された各制限酵素の最適緩衝液を使用した。2 種類の制限酵素を同時に用いる場合、

TaKaRa Bio または New England BioLabs (NEB) の推奨条件に従って反応を行った。2つの酵素の反応条件を満たす緩衝液が見つからない場合、反応を順次行い、2つ目の制限酵素で処理する前に、1つ目の制限酵素を熱失活後、DNA をエタノール沈殿でんした。DNA エタノール沈殿は反応系に 1/10 倍量の 3 M 酢酸ナトリウム (pH5.2) と 2.5 倍量のエタノールを加えて混合し、氷上で 30 分間静置後、4 °C 下 14,000 rpm で 20 分間遠心分離した。遠心分離後の沈殿を 70 %エタノールで洗浄した後、4 °C 下 14,000 rpm で 5 分間遠心分離して得られた沈殿を乾燥後、滅菌水に溶解した。

## 2.8. ゲルからの DNA 回収

RT-PCR 産物または制限酵素処理後の DNA をアガロースゲル電気泳動で分離後、0.5 mg/ml エチジウムブロマイドで染色し、UV 照射下でカッターナイフを用いて目的のバンドをなるべく小さくゲルごと切り出した。切り出したアガロースゲルを 1.5 ml マイクロチューブに移し、DNA 回収キット MagExtractor PCR & Gel Clean up Kit (Toyobo) または QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) を使い、説明書のプロトコールに従って DNA を回収した。キットで回収した水溶液に Quick Precip (EdgeBio) を 1  $\mu$ l、3 M 酢酸ナトリウム (pH 5.2) を 10  $\mu$ l、エタノールを 250  $\mu$ l 加えて混合し、室温下 14,000 rpm で 10 分間遠心分離した。得られた沈殿を 70 %エタノールで洗浄し、乾燥後、滅菌水に溶解した。

## 2.9. ライゲーションおよび大腸菌の形質転換

制限酵素処理したプラスミドをセルフライゲーションをする場合、調整した回収産物のみをライゲーション反応に用いた。制限酵素処理して調整したベクター側のプラスミド DNA とインサート側の DNA をライゲーションをする場合、ベクター側のプラスミド DNA は Antarctic Phosphatase (NEB) を用いて脱りん酸化処理してからライゲーション反応を行った。脱りん酸化処理は 37 °C で 60 分間反応させ、75 °C で 15 分間置くことによって脱りん酸化酵素を失活させた。ライゲーションには 2 $\times$ Rapid 緩衝液 (Promega) を 5  $\mu$ l、ベクターとインサートを合わせて 4  $\mu$ l、T4 DNA リガーゼ (Promega ; 3 U/ $\mu$ l) を 1  $\mu$ l 加えて混合し、10  $\mu$ l 系にて室温下で 1 時間反応させた。インサート側の DNA が大きい場合、ライゲーションには 10 $\times$ 緩衝液 (Promega) を 1  $\mu$ l、ベクターとインサートを合わせて 8  $\mu$ l、T4 DNA リガーゼ (Promega ; 3 U/ $\mu$ l) を 1  $\mu$ l 加えて混合し、10  $\mu$ l 系にて 4 °C で 16 時間反応させた。

形質転換には大腸菌株 JM109 を用いた。1.5 ml マイクロチューブにコンピテントセル 100  $\mu$ l とライゲーション済みの DNA 溶液 10  $\mu$ l を加え、氷上で 30 分間静置し、42  $^{\circ}$ C のウォーターバスで 40 秒間加熱後、氷上で冷却した。SOC 培地 (2 % バクトトリプトン、0.5 % 酵母エキス、10 mM NaCl、2.5 mM KCl、10 mM  $MgCl_2 \cdot 6H_2O$ 、10mM  $MgSO_4 \cdot 7H_2O$ 、20mM グルコース) を 400  $\mu$ l 加えて混合し、37  $^{\circ}$ C で約 60 分間振盪培養後、100-400  $\mu$ l を LB 寒天培地 (Merck; 50  $\mu$ g/ml アンピシリンを含む) にスプレッドし、37  $^{\circ}$ C 下にて 15~16 時間倒置培養を行った。なお、 $\beta$ -ガラクトシダーゼ活性に基づく青色/白色選抜を行う時は、大腸菌をスプレッドする前に、LB 培地に 50  $\mu$ l の 100 mM イソプロピル-1-チオ- $\beta$ -D-ガラクトピロノシド (IPTG) と 100  $\mu$ l の 20 mg/ml 5-ブロモ-4-クロロ-3-インドリル- $\beta$ -D-ガラクトシド溶液 (X-gal) を塗布した。

#### 2.10. A 付加反応及び TA クローニング

RT-PCR に用いた耐熱性酵素は比較的正確性が高い KOD Plus を選択した場合、TA クローニングに持ち込むには A を付ける必要がある。A 付加反応は 15  $\mu$ l の反応系で行い、RT-PCR の回収産物に 25 mM  $MgCl_2$  を 0.9  $\mu$ l、1 mM dATP を 1.5  $\mu$ l、10 $\times$ Taq 緩衝液 (Sigma) を 1.5  $\mu$ l、Taq (Sigma; 5 U/ $\mu$ l) を 0.2  $\mu$ l 加えて混合し、72  $^{\circ}$ C で 60 分間反応した。

TA クローニングに A 付加した RT-PCR の回収産物を用い、ライゲーションには 2 $\times$ Rapid 緩衝液 (Promega) を 5  $\mu$ l、TA ベクターの pMD20 を 0.5  $\mu$ l、T4 DNA リガーゼ (Promega ; 3 U/ $\mu$ l) を 1  $\mu$ l 加えて混合し、10  $\mu$ l 系にて室温下で 2 時間反応させた。また、pPVS-Na1-FL-A の構築に TA-Enhancer Cloning Kit (ニッポンジーン) を用い、説明書のプロトコールに従った。回収産物に 5 $\times$ Ligation Mix (ニッポンジーン) を 4  $\mu$ l、TA ベクターの pANT (25 ng/ $\mu$ l) を 1.8  $\mu$ l、10 $\times$ Enhancer Solution (ニッポンジーン) を 2  $\mu$ l 加え混合し、20  $\mu$ l 系にて室温下で 1 時間反応させ、10  $\mu$ l を大腸菌の形質転換に用いた。

#### 2.11. プラスミド抽出

形質転換体コロニーを 2 ml プラスグロウ培地 (ナカライテスク; 50  $\mu$ g/ml アンピシリンを含む) に接種し、37  $^{\circ}$ C で 12~16 時間振盪培養した。

キットを使用しない場合、培養液を 1.5 ml マイクロチューブに移し、氷上で 5 分間静置後、4  $^{\circ}$ C 下 8,000 rpm で 2-3 分間遠心分離し、上清を取り除いた。沈殿に TEG (50 mM グルコース、25 mM トリス、10 mM EDTA pH 8.0) を 100  $\mu$ l 加えて懸濁し、0.2 N 水酸化

ナトリウム (NaOH) 1% ドデシル硫酸ナトリウム (SDS) 溶液 200  $\mu$ l を加えて転倒混和した。その後、3 M 酢酸カリウム (pH 4.8) 150  $\mu$ l を加えて転倒混和し、クロロホルム : イソアミルアルコール (24:1) 10  $\mu$ l を加えて転倒混和した。4  $^{\circ}$ C 下 14,000 rpm で 10 分間遠心分離し、上清を新しい遠心チューブに移した。フェノール : クロロホルム (1:1) 400  $\mu$ l を加えて 3 分間攪拌し、4  $^{\circ}$ C 下 14,000 rpm で 5 分間遠心分離し、上清を新しい遠心チューブに移した。そこに 2-プロパノール 400  $\mu$ l を加えて混合し、室温で 15 分間静置した。室温下 14,000 rpm で 5 分間遠心分離し、得られた沈殿を 70 % エタノールで洗浄し、4  $^{\circ}$ C 下 9,900 rpm で 5 分間遠心分離した。沈殿を乾燥させ、TE (10 mM Tris-HCl, 1mM EDTA, pH 8.0) 100  $\mu$ l を加えて攪拌し、溶解した。0.5 mg/ml RNase A (DNase フリー) 2  $\mu$ l を加えて混合し、37  $^{\circ}$ C で 1 時間置き、20 % PEG#6000-2.5 M NaCl 溶液 60  $\mu$ l を加えて混合し、氷上で 1 時間静置した。その後、4  $^{\circ}$ C 下 14,000 rpm で 5 分間遠心分離し、上清を取り除き、沈殿を 70 % エタノールで洗浄後、4  $^{\circ}$ C 下 14,000 rpm で 5 分間遠心分離し、得られた沈殿を乾燥後、滅菌水に溶解した。

抽出プラスミドを転写用の鋳型として使用する場合、プラスミド抽出は抽出キット Wizard Plus SV Minipreps DNA Purification System (Promega) を用い、説明書のプロトコールに従ってプラスミド DNA を精製した。まず、培養液を 2 ml マイクロチューブに移して氷上で 5 分間置いた後、4  $^{\circ}$ C 下 10,000 rpm で 5 分間遠心分離し、上清を取り除いた。Cell Resuspension Solution を 250  $\mu$ l 加えて、4 分間混合し、Cell Lysis Solution を 250  $\mu$ l 加えて 4 回以上転倒混和した。続いて、Alkaline Protease Solution を 10  $\mu$ l 加えて 4 回以上転倒混和し、室温で 5 分間静置し、Neutralization Solution を 300  $\mu$ l 加えて 4 回以上転倒混和した後に、室温下 14,000 rpm で 10 分間遠心分離した。Collection Tube に Spin Column をセットし、上清を Spin Column に移して室温下 14,000 rpm で 1 分間遠心分離した。廃液を棄て 750  $\mu$ l の Wash Solution を Spin Column に添加し、室温下 14,000 rpm で 1 分間遠心分離した。廃液を除き、さらに 250  $\mu$ l の Wash Solution を Spin Column に添加し、室温下 14,000 rpm で 2 分間遠心分離した。Spin Column を新しい 1.5 ml のマイクロ遠心チューブにセットし、50  $\mu$ l の Nuclease-Free Water を Spin Column メンブレン表面の中央に添加し、5 分間静置した後、室温下 14,000 rpm で 1 分間遠心した。再び 50  $\mu$ l の Nuclease-Free Water を Spin Column メンブレン表面の中央に添加し、2 分間静置し、室温下 14,000 rpm で 1 分間遠心した。得られたプラスミド DNA は -20  $^{\circ}$ C で保存した。

## 2.12. 塩基配列の解析

塩基配列解析は主に ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) を用い、一部が受託解析に出した。BigDye Terminator Ver1.1 cycle sequencing kit (Applied Biosystems) を使用した場合、1/8 希釈系で行い、BigDye Terminator を 1  $\mu$ l、5 $\times$ 緩衝液 (400 mM トリス pH 9.0、10 mM MgCl<sub>2</sub>) を 3.5  $\mu$ l、0.8  $\mu$ M プライマーを 1  $\mu$ l、プラスミド DNA を 150-300 ng 加え、20  $\mu$ l 系で反応した。また、BigDye Terminator Ver3.0 cycle sequencing kit (Applied Biosystems) を使用した場合、1/4 の希釈系で行い、BigDye Terminator を 2  $\mu$ l、5 $\times$ 緩衝液を 3  $\mu$ l、0.8  $\mu$ M プライマーを 2  $\mu$ l、プラスミド DNA を 150-300 ng 加え、20  $\mu$ l 系で反応した。サイクル反応は 96  $^{\circ}$ C で 1 分間の熱変性後、96  $^{\circ}$ C で 10 秒間、50  $^{\circ}$ C で 5 秒間、60  $^{\circ}$ C で 4 分間を 25 サイクル行った。反応後、反応液に 125 mM EDTA (pH 8.0) を 2  $\mu$ l、3 M 酢酸ナトリウム (pH 5.2) を 2  $\mu$ l、エタノールを 60  $\mu$ l 加えて混合し、15 分間室温で静置した。室温下 14,000 rpm で 20 分間遠心分離して得られた沈殿を 70 %エタノールで洗浄し、室温下 14,000 rpm で 5 分間遠心分離した。沈殿を乾燥し、25  $\mu$ l の HiDi ホルムアミド (Applied Biosystems) に溶解して、95  $^{\circ}$ C で 2 分間加熱し、アイスウォーターバスで 2 分間冷却した。反応液を専用チューブに移し、プログラム ABI PRISM310 Collection を使って、Ver1.1 の場合はサンプルリストを作製する時、「Matrix」は「dR0916 Matrix」、「Dye/Primer」は「DT POP6{BD set-Any Primery}」、Ver3.0 の場合はサンプルリストを作製する時、「Matrix」は「Matrix BDv3」、「Dye/Primer」は「DT310POP6{BDv3}V1.mob」を選択し、配列解析を行った。

塩基配列解析は受託解析 (ユーロフィンジェノミクス社) の場合、シーケンスプライマーを 9.6 pmol、抽出した候補プラスミド 150-300 ng または回収した RT-PCR 産物 60-150 ng 加え、21  $\mu$ l 系に調整して出した。

## 2.13. キャップ付加 RNA の合成

構築した PVS の全長クローンのプラスミド DNA 5  $\mu$ g を *Mlu* I (TaKaRa Bio; 10 U/ $\mu$ l) または *Spe* I (TaKaRa Bio; 10 U/ $\mu$ l) で 37  $^{\circ}$ C 一晩処理し、環状のプラスミドを線状化した。フェノール : クロロホルム (1:1) を 100  $\mu$ l 加えて 3 分間混合し、20  $^{\circ}$ C 下 13,000 rpm で 5 分間遠心分離し、上層の水層を新しい遠心チューブに回収した。そこに 3 M 酢酸ナトリウム (pH 5.2) 10  $\mu$ l とエタノール 250  $\mu$ l を加えて混合し、氷上で 10 分間置き、4  $^{\circ}$ C 下 13,000 rpm で 10 分間遠心分離した。得られた沈殿を 1 ml の 75 %エタノールで洗浄し、

4 °C下 13,000 rpm で5 分間遠心分離した後、回収した沈殿を乾燥させた。

精製した DNA に 5×緩衝液 (Life Technologies) を 4 µl、0.1 M DTT (Life Technologies) を 2 µl、各 20 mM rATP/rUTP/rCTP 溶液を 2 µl、2 mM rGTP を 2 µl、5 mM cap analog m7G(5')ppp(5') GrNTP 溶液 (Life Technologies) を 1 µl、RNase inhibitor (Wako; 40 U/µl) を 0.5 µl、T7 RNA polymerase (Life Technologies ; 50 U/µl) を 1 µl を加えて混合し、20 µl の反応系で 37 °C で 25 分間反応させた。その後、20 mM rGTP を 2 µl 加えて混合し、37 °C で 50 分間反応させた。RNase-free DNase I (TaKaRa Bio; 5 U/µl) を 1 µl または RNase-free DNase I (ニッポンジーン; 1 U/µl) を 1.5 µl 加え、37 °C で 15 または 30 分間反応させ、鋳型の DNA を分解した。滅菌水を 77 µl と 5 M 酢酸アンモニウム-100 mM エチレンジアミン四酢酸 (ethylenediaminetetraacetic acid ; EDTA) 溶液を 10 µl、フェノール：クロロホルム (1:1) を 100 µl 加えて 3 分間攪拌した後、20 °C 下 13,000 rpm で 5 分間遠心分離し、水層を新しい遠心チューブに移した。そこに 2-プロパノールを 100 µl 加えて混合し、-20 °C で 15 分間置き、4 °C 下 13,000 rpm で 15 分間遠心分離した。沈殿を 250 µl の 80 % エタノールで洗浄し、4 °C 下 13,000 rpm で 5 分間遠心分離し、得られた沈殿を乾燥させた。沈殿を Ambion RNA storage buffer (Life Technologies) または滅菌水に溶解し、分光光度計 NanoDrop-1000 (Thermo Fisher Scientific) を用いて RNA の濃度を測定後、約 0.5 µg の RNA に 5 µl 2×RNA sample loading buffer (66.6%ホルムアミド、23.4%ホルムアルデヒド、0.1 mM EDTA、20×MOPS、0.024%ブロモフェノールブルー、0.024%臭化エチジウム) を加え、80 °C で 10 分間熱変性し、アイスウォーターバスで冷却して、ホルムアルデヒド変性アガロースゲル電気泳動で確認した。

#### 2.14. 転写産物及びプラスミド DNA の接種

転写したキャップ付加 RNA の濃度を調整し、接種緩衝液 (100mM トリス pH7.5、10mM EDTA pH7.5、0.5mg/ml ベントナイト) を加えて混合し、接種液を作製した。供試植物は北海道大学大学院農学研究院総合研究棟 4 階恒温実験室内の照明付培養棚 (室温 24 °C、16 時間日長) で育生した *N. occidentalis* を用いた。供試植物 1 個体につき接種葉 2 枚を選択し、適量のカーボランダムを振りかけた。接種葉の葉面に供試植物 1 個体あたり接種液 2-2.5 µl (1 個体あたり 4 µg 転写 RNA) をマイクロピペットを用いて滴下し、指サックをはめた指で擦りこんだ後、直ちに脱イオン水で葉面を優しく洗浄した。なお、各全長 cDNA クローン転写 RNA の感染性を調べる場合では 1 種類以上の転写産物に対して供試植物 4

個体以上に接種した。一方、転写産物の接種量と感染率を調べる場合、転写産物を 5 µg/個体、2 µg/個体、1 µg/個体、0.5 µg/個体、0.2 µg/個体、0.1 µg/個体で各 4 個体以上の供試植物に、2 回以上の独立試験で接種した。また、pPVS-H-FL-β と pPVS-H-FL-D 転写 RNA の共接種では、転写した PVS ゲノム RNA (PVS-H-FL-β と PVS-H-FL-D と表記) の濃度を 2.5 µg/個体に調整し、PVS-H-FL-β または PVS-H-FL-D 単独で各 2 個体、PVS-H-FL-β と PVS-H-FL-D を混合して 6 個体に接種した。Mock 接種には供試植物 2 個体を用い、滅菌水と接種緩衝液を加えて混合したものを接種した。接種した植物は新聞紙などを用いて 1-2 日間遮光した。

35S プロモーターの PVS 全長 cDNA クローンを接種する場合、構築した全長 cDNA クローン p35S-PVS-H-FL-β に接種緩衝液 (100 mM トリス pH7.5、10 mM EDTA pH7.5) を加えて混合し、6 µg/個体で供試植物に接種した。p35S-PVS-H-FL-β を *Spe* I (TaKaRa Bio; 10 U/µl) で 37 °C 一晩処理し、線状化させ精製したもの、または濃度を調整した環状のプラスミドを、各供試植物 8 個体に接種した。

#### 2.15. 酵素結合抗体法 (enzyme-linked immunosorbent assay; ELISA)

96 穴のマイクロタイタープレートの各ウェルに PVS-H に対する抗体 (Ig G ; 炭酸重炭酸緩衝液で 1 µg/ml に希釈) を 100 µl 入れ、37 °C で 2~3 時間反応させ、抗体をウェル表面に吸着させた。検定する植物の葉 0.1 g を 500 µl の PBS-T (137 mM NaCl, 8.1 mM N<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 12H<sub>2</sub>O, 1.47 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 2.7 mM KCl, 3.1 mM NaN<sub>3</sub>, 0.5 % Tween) で磨砕し、磨砕液を作製した。マイクロタイタープレートの各ウェルを PBS-T で 3 回洗浄し、磨砕液を 4 °C 下 14,000 rpm で 5 分間遠心分離した遠心上清液を 100 µl 入れ、冷蔵庫内にて一晩静置した。翌日、ウェル内の試料液を捨て、PBS-T で 5 回洗浄し、酵素結合抗体 (Adgen ; 5000-8000 倍 PBS-T で希釈して使用) を 100 µl 入れ、37 °C で 2 時間以上反応させた。その後、PBS-T でウェルを 4 回洗浄し、結合しなかった抗体を取り除いた。酵素基質として p-ニトロフェニルリン酸二ナトリウム六水和物 (ジェットノールアミンで 1 mg/ml に調整) をマイクロタイタープレートのウェルに 100 µl ずつ添加した。その後、室温にて静置し、405 nm の吸光値を測定した。

#### 2.16. Northern blot

Northern blot 用 PVS の DIG-cRNA プローブは図III-2-1 に示したように、PVS の 3'末端

配列 (poly A 配列を除く) を鋳型とし、ゲノム配列の一部 (約 1.4 Kb) を PCR で増幅し、制限酵素処理により pBluescript II に挿入後、pBluescript II ベクターの T7 プロモーターによって転写して作製したの約 800 塩基。DIG 標識を付加したプローブの転写反応は 20  $\mu$ l の反応系で行い、精製した鋳型に 5 $\times$ 緩衝液 (Life Technologies) を 4  $\mu$ l、0.1 M DTT (Life Technologies) を 2  $\mu$ l、10 $\times$ DIG mix を 2  $\mu$ l、RNase inhibitor (Wako; 40 U/ $\mu$ l) を 1  $\mu$ l、T7 RNA polymerase (Life Technologies ; 50 U/ $\mu$ l) を 1  $\mu$ l 加えて混合し、37  $^{\circ}$ C で 2 時間反応させた。その後、0.2 M pH 8.0 EDTA を 2  $\mu$ l、4 M LiCl を 2.5  $\mu$ l、エタノールを 75  $\mu$ l 加えて混合し、-70  $^{\circ}$ C で 30 分間置き、4  $^{\circ}$ C 下 13,000 rpm で 15 分間遠心分離した。沈殿を 50  $\mu$ l の 70 % エタノールで洗浄し、4  $^{\circ}$ C 下 13,000 rpm で 5 分間遠心分離し、得られた沈殿を乾燥させた。沈殿を 100  $\mu$ l 滅菌水に溶解し、RNase inhibitor (Wako; 40 U/ $\mu$ l) を 0.5  $\mu$ l を加えて混合し、37  $^{\circ}$ C で 30 分間反応させた。

植物葉から抽出した総 RNA 10  $\mu$ g をホルムアルデヒド変性アガロースゲルで 50V、約 2 時間電気泳動した。なお、陽性コントロールとして、1 ng または 10 ng の PVS 全長 cDNA クローンからのキャップ付加転写産物を使用した。電気泳動済みのゲルサイズに合わせて、Hybond-N ナイロンメンブレン、ろ紙 (Whatman 3 MM) 及びペーパータオルを用意し、容器サイズに合わせて、大きいろ紙を用意した。ろ紙、メンブレンは 10 $\times$ SSC (1.5 M NaCl、0.15 M クエン酸三ナトリウム二水和物、pH7) で浸透させ、図III-2-2 に示したように、ゲルとメンブレンを設置した。メンブレン、ゲル及びろ紙の間の空気を抜き、オーバーナイトで転写した。転写完了後のメンブレンを風乾または 55  $^{\circ}$ C で乾燥させ、UV クロスリンカー (Bio-Rad 社 UV CHAMBER) にて 150 mJ/cm<sup>2</sup> の紫外線で RNA を固定後、ハイブリダイゼーションを行うまで、ろ紙に挟んでデシケーター内で保管した。ポリエチレンバック中に 12 ml (5 ml/30 cm<sup>2</sup>) の cRNA プローブ用プレハイブリダイゼーション液中でメンブレンを 1-4 時間 65  $^{\circ}$ C で保温し、100  $^{\circ}$ C で 1 分間加温変性した DIG-cRNA プローブ (10000 倍希釈) をポリエチレンバック中に加え、65  $^{\circ}$ C で一晩保温した。その後、2 $\times$ SSC を用いてメンブレンの洗浄 (室温、10 分間) を 2 回行い、新しいポリエチレンバック中 10 ml の 1  $\mu$ g/ml RNase A を含む 2 $\times$ SSC で室温で 15 分間反応した後、0.1 $\times$ SSC、0.1% SDS を用いてメンブレンの洗浄 (70  $^{\circ}$ C、10 分間) を 2 回行った。マレイン酸洗浄液 (0.1 M マレイン酸- 0.15 M NaCl pH7.5, 0.3% Tween20) を用いてメンブレンの洗浄 (室温、5 分間) を 1 回行い、新しいポリエチレンバック中 10 ml の 1% ブロッキングで室温で 30 分間静置した後、新しいポリエチレンバック中 7.5 ml の抗 DIG 抗体希釈液 (1% ブロッキング

液で希釈、CPP-star 使用時は 20000 倍) 中にて室温で 30 分間静置した。マレイン酸洗浄液でメンブレンの洗浄(室温、15 分間)を 2 回行い、20 ml AP 反応緩衝液(0.1 M Tris-HCl pH9.5, 0.1 M NaCl)で 2-5 分間反応した後、新しいポリエチレンバック中 0.5 ml の基質(CPP-star、AP 反応緩衝液で 100 倍希釈)でメンブレン表面を均一に覆い、室温で 5 分間静置した。化学発光検出に ImageQuant LAS-4000 (GE ヘルスケア)を使用した。プログラム LAS-4000 によって、[Focusing]でメンブレンの位置を調整した後、[increment]モードで[start]し、露光時間は 5 分間つづ重ね、適当な時間で停止して、画像を TIF ファイルとして保存した。

## 2.17. PVS ゲノムの全長 cDNA クローンの構築

各 PVS ゲノムの全長 cDNA クローンの構築戦略は図III-2-3~図III-2-7、図III-2-9 に示す。なお、TA クローンは制限酵素処理により挿入断片の方向性を確認した後、挿入した RT-PCR 産物の両末端配列を塩基配列解析により確認し、適したクローンを選択した。一方、プラスミドの制限酵素切断部位で繋げた部分、または変異配列を組み換えた部分は塩基配列解析によって確認し、適したクローンを選択した。

### 2.17-1. PVS-H95 ゲノムの全長 cDNA クローン pPVS-H-FL-G、pPVS-H-FL-H の構築

全長 cDNA クローン pPVS-H-FL-D の ORF5 領域上流部分(7233-8055 nt)を pPVS-1P1M の配列と入れ替え、新しい PVS-H の全長クローン pPVS-H-FL-G を構築した。構築戦略は図III-2-3 に示したように pPVS-H-FL-G を構築するため、pPVS-H-FL-D を *Hind*III で処理、得られた約 6 Kb の断片をセルフライゲーションした後、*Bam*H I と *Sph* I で処理し、同じく *Bam*H I と *Sph* I で処理した pPVS-1P1M の約 0.8 Kb の断片と入れ替えた。組み換えたクローンから *Fse* I と *Mlu* I 処理により約 2.5 Kb の断片を pPVS-H-FL-D に入れ替え、pPVS-H-FL-G を構築した。

PVS-H95 の全長配列と一致する全長 cDNA クローンを構築するため、192 番目の T を A に変異させた pPVS-H-5T(*Sal* I *Spe* I)-Mut の配列を pPVS-H-FL-C に入れ替え、pPVS-H-FL-H を構築した。構築戦略は図III-2-4 に示したように、pPVS-H-5T(*Sal* I *Spe* I)-Mut を *Sal* I と *Spe* I で処理後、切り出した断片を同じく *Sal* I と *Spe* I で処理した pPVS-H-FL-C に入れ換えることにより pPVS-H-FL-H を構築した。なお、回収した *Sal* I と *Spe* I 処理後の pPVS-H-5T(*Sal* I *Spe* I)-Mut 断片は pPVS-H-5T(*Sal* I *Spe* I)-Mut の混入

を排除するため、*Nae* I (pBluescript II に切断サイトあり) により処理し、再回収したものをライゲーションに用いた。

#### 2.17-2. PVS-H00 ゲノムの全長 cDNA クローン pPVS-H-FL- $\beta$ の構築

PVS-H00 を鋳型とした全長 cDNA クローン pPVS-H-FL- $\beta$  の構築戦略は図III-2-5 に示したように、プライマーペアの T7-PVS-H と PVS-37M、PVS-37P と PVS-38M を用い、PVS-H00 の 5'端側と 3'端側を別々に増幅した。増幅した約 4.5 Kb と 4 Kb の RT-PCR 産物は TA クローンによって pMD20 にクローンニングし、3'末端の部分はすでに構築した pPVS-H-37P3ESpe2 の一部を使用した。3'端側の cDNA クローン pPVS-H-37P38M は *Sna*B I と *Sse* 8387 I により pPVS-H-37P3ESpe2 由来の 3'末端配列と繋ぎ、更に *Eco*O65 I と *Sse* 8387 I により 5'端側の cDNA クローン pPVS-H-T737M と繋いで pPVS-H-FL- $\beta$  を構築した。

35S プロモーターの感染性 cDNA クローン p35S-PVS-H-FL- $\beta$  の構築戦略を図III-2-6 に示したように、p35S-PVS-H-FL- $\beta$  の構築にクローン 3'末端側の *Sse*8387 I サイトを用いるため、35S プロモーター配列の下流に *Sse*8387 I サイトが存在する pEnh35Spro2 を構築した。pEnh35Spro2 を *Stu* I と *Xba* I で処理し、*Xba* I で処理した約 2.3 Kb の PCR 産物 (プライマーペア PVS-H-5E2 と PVS-49M で増幅した) を挿入した。その後、*Mlu* I と *Sse* 8387 I により pPVS-H-FL- $\beta$  の 3'端側の配列を切り出し、入れ換えることによって p35S-PVS-H-FL- $\beta$  を構築した。なお、pEnh35Spro2 を構築するため、pEnh35Spro を *Sse*8387 I で処理し、KOD DNA ポリメラーゼによって平滑末端化した。平滑末端化反応は 10  $\mu$ l の反応系で行い、*Sse*8387 I で処理し精製したサンプルに 25 mM MgCl<sub>2</sub> を 0.6  $\mu$ l、2 mM dNTP を 1  $\mu$ l、10 $\times$ KOD 緩衝液 1 (Toyobo) を 1  $\mu$ l、KOD (Toyobo; 2.5 U/ $\mu$ l) を 1  $\mu$ l 加えて混合し、72  $^{\circ}$ C で 30 分間反応させた。

#### 2.17-3. pPVS-H-FL- $\beta$ と pPVS-H-FL-H の ORF1 領域組み換え体の構築

PVS-H00 を鋳型として構築した全長 cDNA クローン pPVS-H-FL- $\beta$  及び PVS-H95 を鋳型として構築した全長 cDNA クローン pPVS-H-FL-H の組み換え体である pPVS-H-FL- $\beta$ BsiW、pPVS-H-FL- $\beta$ H、pPVS-H-FL-H $\beta$  の構築戦略は図III-2-7 に示す。図III-2-7 に示したように、*Bsi*W I 認識サイトを導入したプライマーの PVS-63P、PVS-63M を用い、pPVS-H-FL- $\beta$  の配列を PCR で増幅し、*Bsi*W I 認識サイトを導入した pPVS-H-FL- $\beta$ BsiW を構築した。一方、組み換え体 pPVS-H-FL- $\beta$ H は、プライマーペアの PVS-47P と PVS-63M または PVS-63P

と PVS-H-3E-Spe2 で pPVS-H-FL- $\beta$  と pPVS-H-FL-H の配列を別々に増幅し、約 9 Kb と 2.5 Kb の増幅産物を *BsiW* I と *Spe* I により繋いで構築した。それと同様に、組み換え体 pPVS-H-FL-H $\beta$  は、プライマーペアの PVS-47P と PVS-63M または PVS-63P と 3NTRAP3 で pPVS-H-FL-H と pPVS-H-FL- $\beta$  の配列を別々に増幅し、約 9 Kb と 2.5 Kb の増幅産物を *BsiW* I と *Mlu* I により繋いで構築した。なお、pPVS-H-FL- $\beta$ BsiW、pPVS-H-FL- $\beta$ H 転写 RNA 接種植物における子孫配列の解析に用いたプライマーは図III-2-8 に示す。

#### 2.17-4. PVS-Na1 ゲノムの全長 cDNA クローン pPVS-Na1-FL-A の構築

PVS-Na1 を鋳型として全長 cDNA クローン pPVS-Na1-FL-A の構築戦略は図III-2-9 に示す。図III-2-9 に示したように pPVS-Na1-FL-A を構築するため、プライマーペアの T7-PVS-H と PVS-20M、PVS-2P と 3NTRAP4 を用い、PVS-Na1 の 5'端側と 3'端側を別々に増幅した。増幅した約 5.5 Kb と 3 Kb の RT-PCR 産物は TA クローンによって pANT にクローニングし、3'端側のクローンベクターを *Sma* I と *Sal* I により pNEB193 に入れ替えた。3'端側の cDNA クローン pPVS-2P&3Ein193 は *Nhe* I と *Sma* I により 5'端側の cDNA クローン pPVS-H-T7&20M と繋いで pPVS-Na1-FL-A を構築した。

#### 2.18. PVS-H00 全ゲノム配列の解析及び PVS-H95 との比較

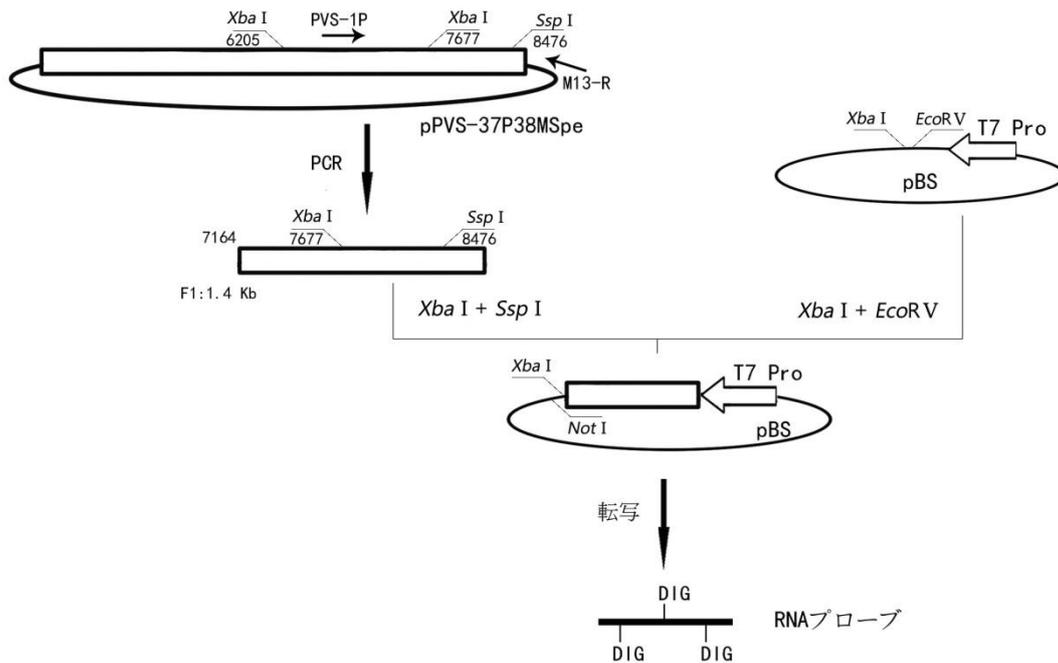
PVS-H00 全ゲノム配列の解析には pPVS-H-FL- $\beta$  を用いた。全ゲノム配列解析に用いたプライマーは図III-2-10 に示す。

PVS-H95 と PVS-H00 の配列を比較した。塩基配列の比較には DNASIS for Windows Ver2.1 (Hitachi Software Engineering Co., Ltd.) を用いた。アミノ酸配列の比較には Clustal Omega を用いた。アミノ酸置換性質差の評価は Structure-Genetic (SG) scoring system を参照して 0-5 の 6 レベルを使用し、レベル 0 は性質が最も異なるものであり、レベル 5 はほぼ変わらないものである (Feng *et al.*, 1985)。非同義置換・同義置換分析は KaKs\_Calculator 2.0 (Wang *et al.*, 2010) を用い、LPB 法 (Pamilo and Bianchi, 1993; Li, 1993) を採用した。

#### 2.19. pPVS-H-FL- $\beta$ と pPVS-H-FL-D 転写産物の共接種における PVS 複製補完の検討

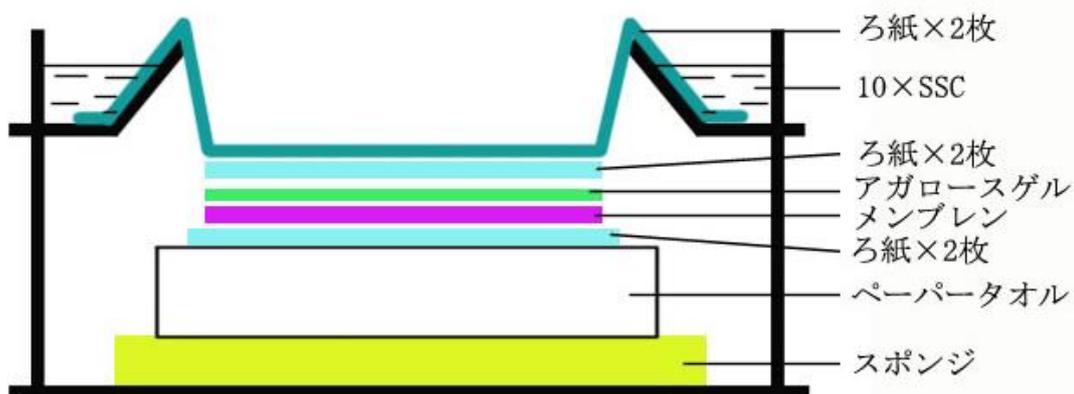
pPVS-H-FL- $\beta$  と pPVS-H-FL-D から転写した PVS ゲノム RNA (PVS-H-FL- $\beta$  と PVS-H-FL-D と表記) を *N. occidentalis* に接種し、接種後 7 日に抽出した総 RNA を子孫配列の由来の判断に用いた。判断する方法は図III-2-11 に示したように、プライマーペア

PVS-44P と PVA-49M で RT-PCR を行い、増幅産物を制限酵素処理した後のサイズから配列の由来を判断した。*Fba* I で RT-PCR 産物を処理し、約 0.3 Kb と 1.7 Kb の断片に切られたのは PVS-H-FL-D 由来のもの、切られないのは PVS-H-FL- $\beta$  由来のものと判断した。



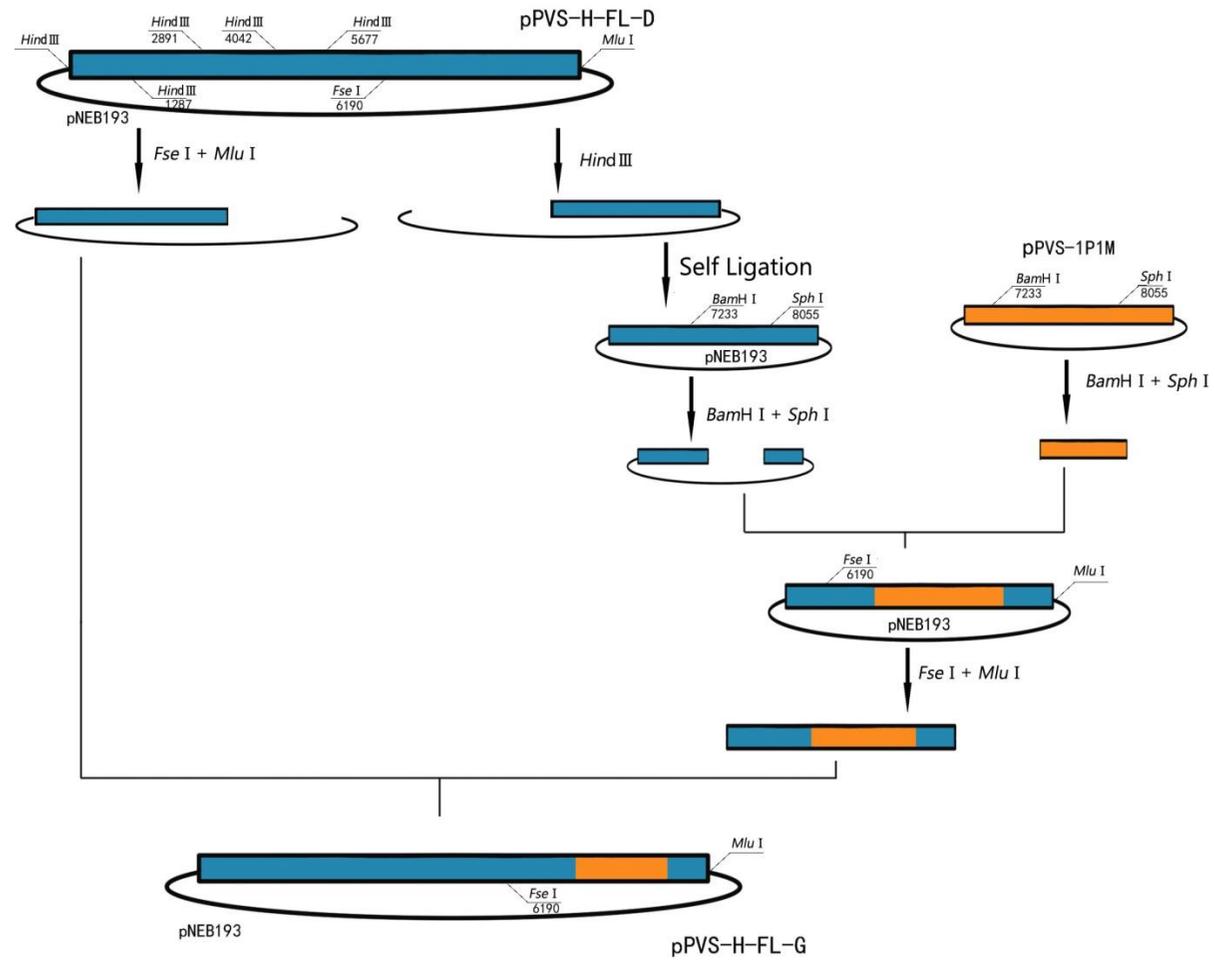
図III-2-1 PVS の DIG-cRNA プローブの作製

PVS-H00 の部分長クローン pPVS-37P38MSpe (PVS-H00 ゲノムの全長 cDNA クローン pPVS-H-FL-β の構築途中で得られ、由来は図III-2-5 に示す) を鋳型とし、プライマーペア PVS-1P と M13-R によって PCR 産物を増幅し、制限酵素処理により pBluescript II に挿入した。pBluescript II SK-(pBS) ベクターの T7 プロモーターから DIG 標識 RNA を合成し、DIG-cRNA プローブを作製した。



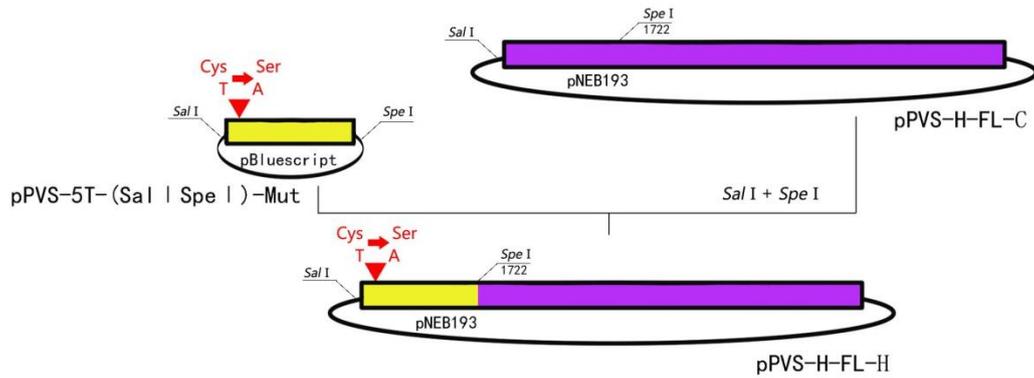
図III-2-2 Northern bolt におけるゲルからメンブレンへのキャピラリートランスファー G キャピラリブロッター (タイテック社) を利用した。

アガロースゲルは緑色、メンブレンは紫色、乾燥したろ紙 (Whatman 3MM) は明るい青色、緩衝液で濡らしたろ紙は青色で表示した。



図III-2-3 pPVS-H-FL-G の構築戦略図

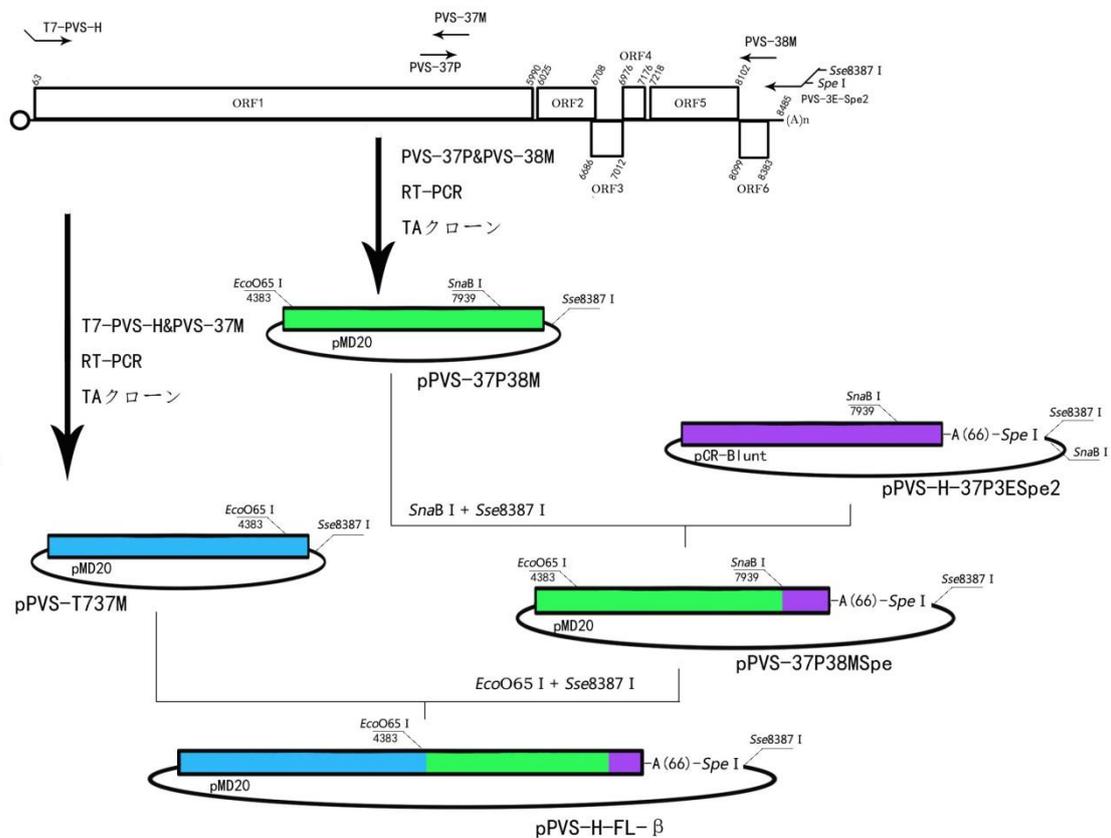
全長 cDNA クローン pPVS-H-FL-D 由来の配列は青色で示す。pPVS-1P1M 由来の配列は橙色で示す。



図III-2-4 pPVS-H-FL-H の構築戦略図

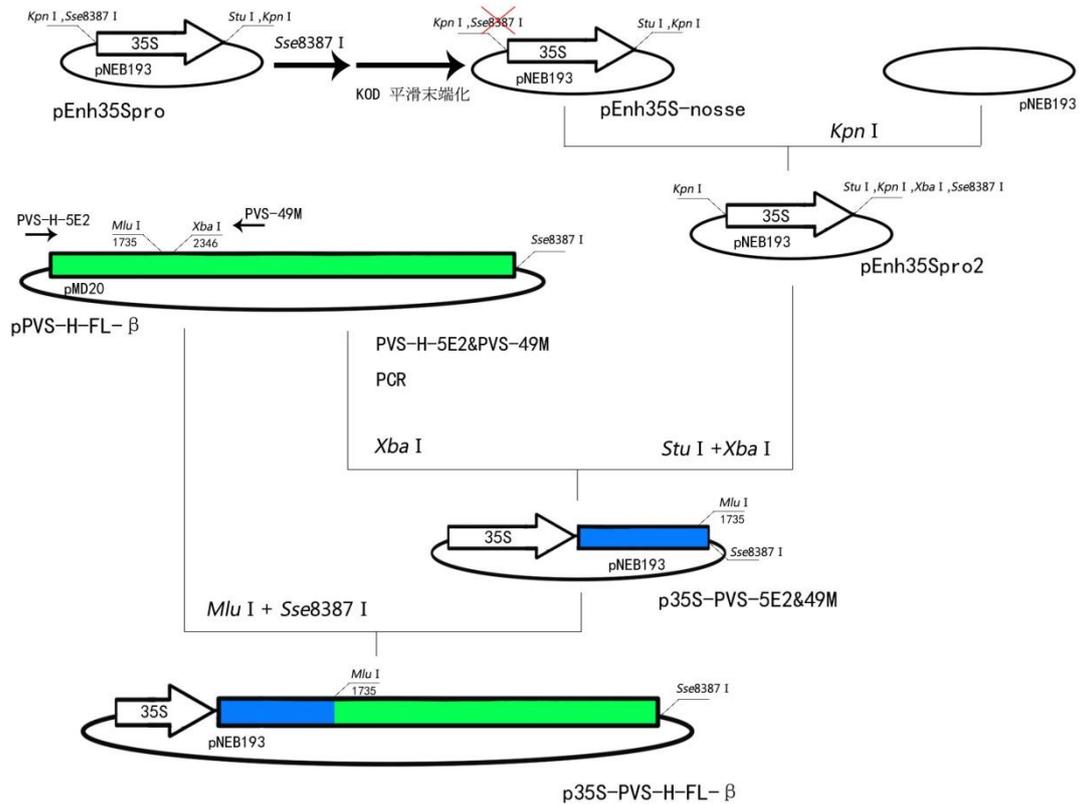
全長 cDNA クローン pPVS-H-FL-C 由来の配列は紫色で示す。pPVS-H-5T(Sal I Spe I)-Mut 由来の配列は黄色で示す。

赤い三角形で示したのは導入した変異配列である。192 番目の T が A に変異させることにより、アミノ酸配列はシステインからセリンに変化する。



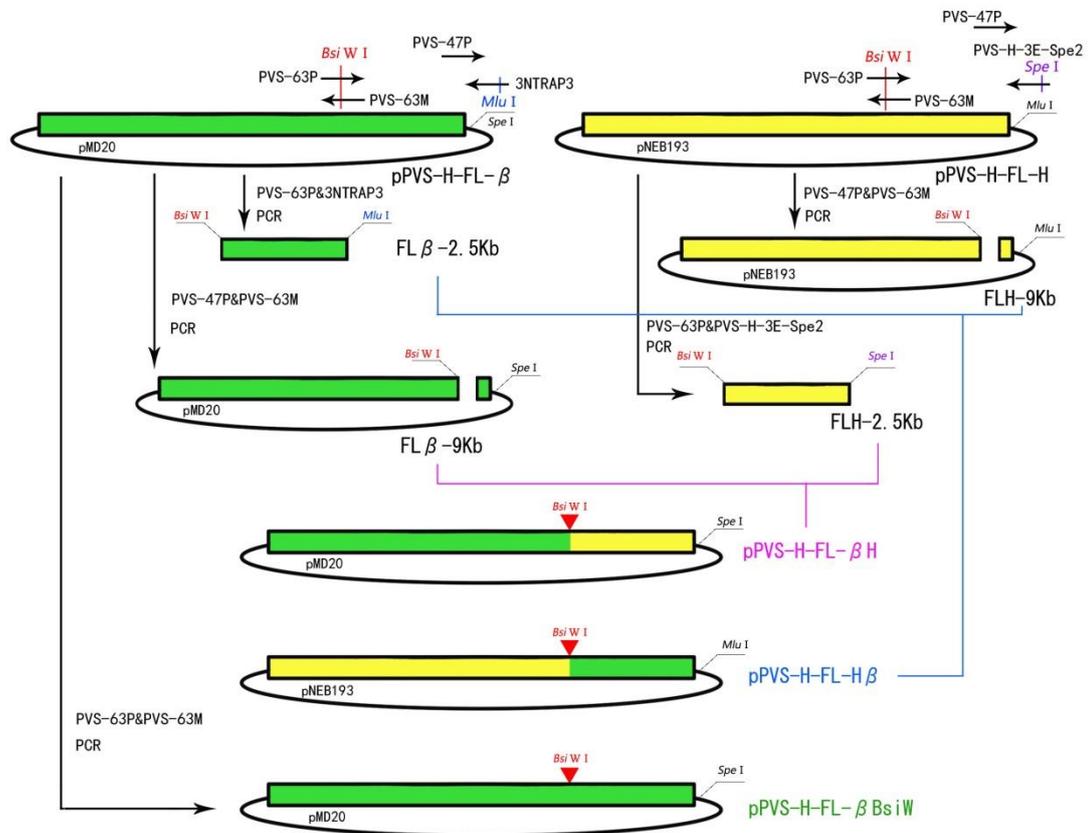
図III-2-5 pPVS-H-FL-β の構築戦略図

プライマーT7-PVS-H と PVS-37M を用いて、PVS-H00 の 5'端側を RT-PCR で増幅し得られた配列は青色で示す。プライマーPVS-37P と PVS-38M を用いて、PVS-H00 の 3'端側を RT-PCR で増幅し得られた配列は緑色で示す。pPVS-H-37P3ESpe2 由来の配列は紫色で示す。



図III-2-6 p35S-PVS-H-FL-βの構築戦略図

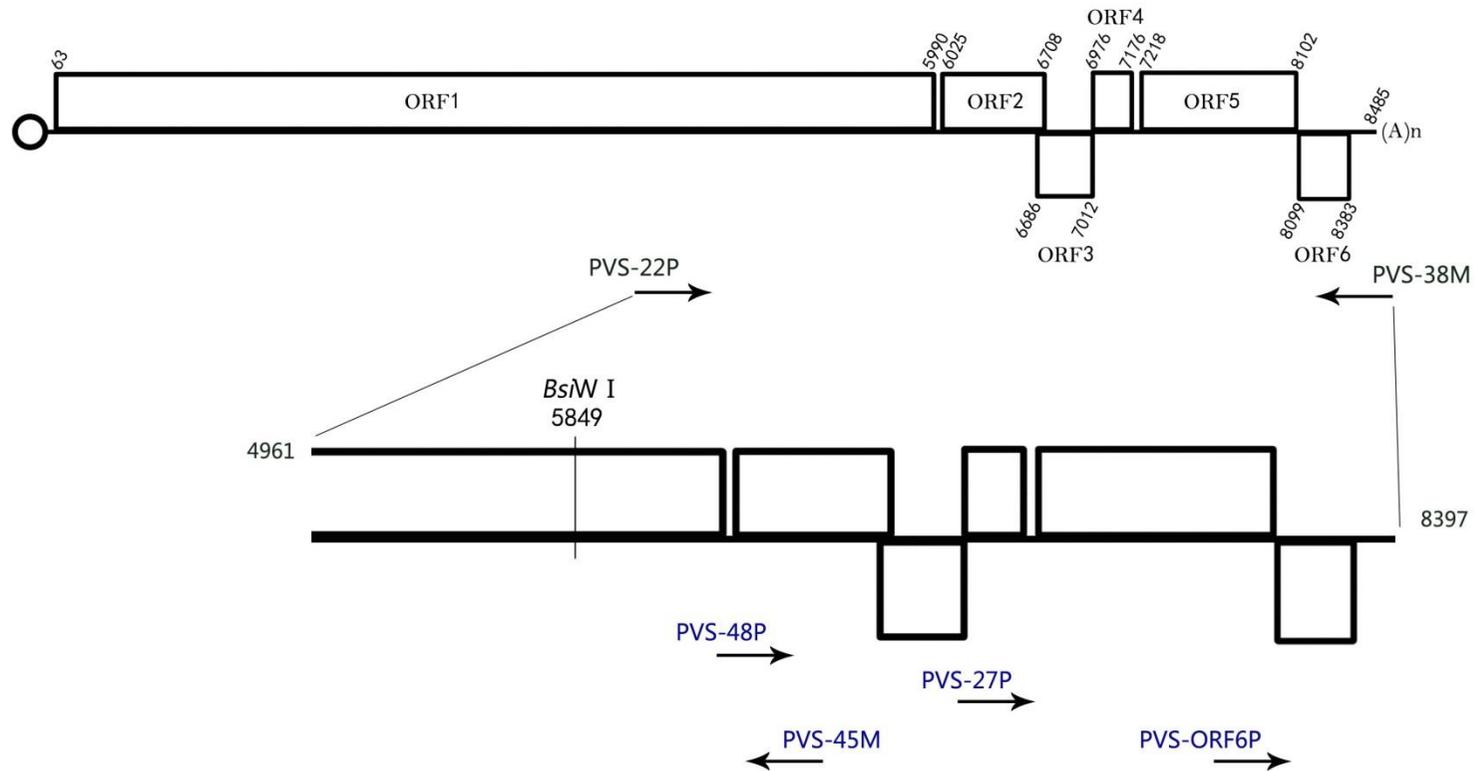
プライマーペア PVS-H-5E2 と PVS-49M を用いて、pPVS-H-FL-β の 5'端側を RT-PCR で増幅し得られた配列は青色で示す。pPVS-H-FL-β 由来の配列は緑色で示す。



図III-2-7 pPVS-H-FL-βBsiW、pPVS-H-FL-βH、pPVS-H-FL-Hβ の構築戦略図

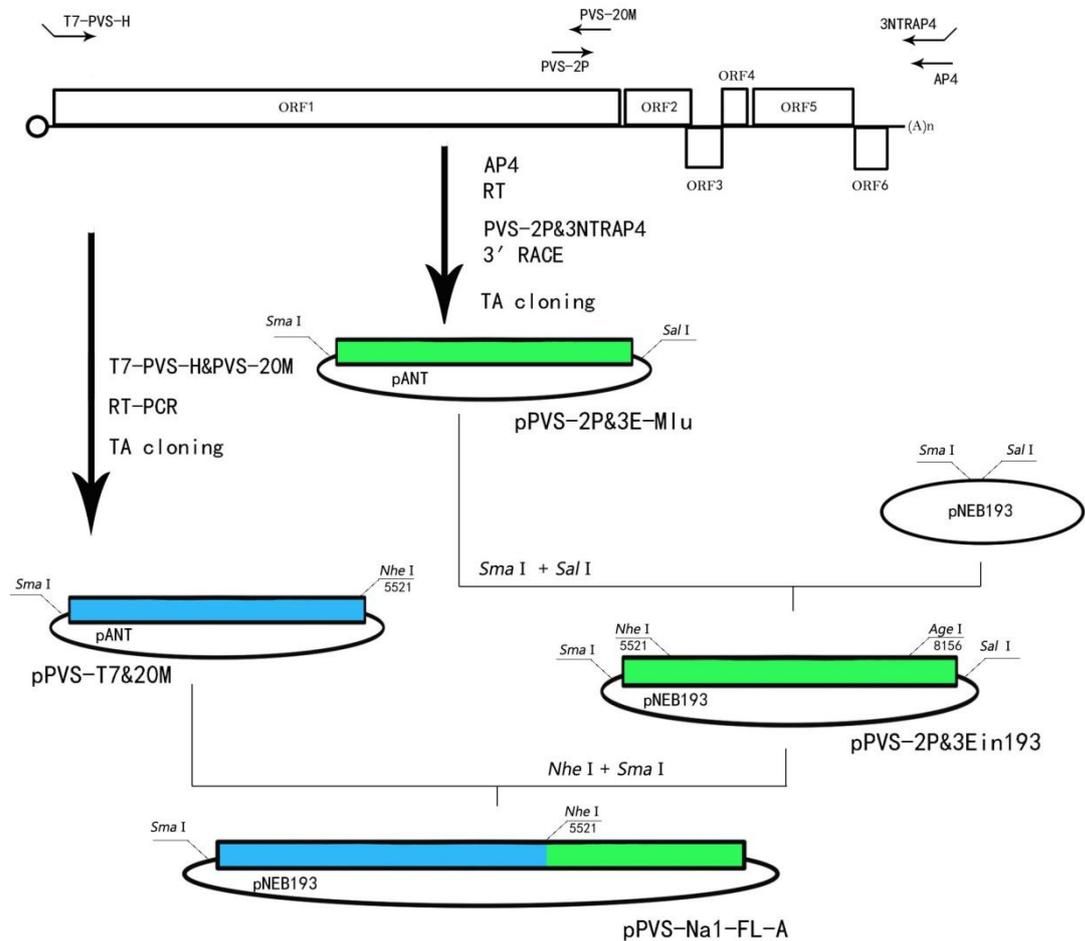
pPVS-H-FL-H から増幅し得られた配列は黄色、pPVS-H-FL-β から増幅し得られた配列は緑色で示す。

pPVS-H-FL-βH はピンク色の線で示した 2 つの断片、pPVS-H-FL-Hβ は青い線で示した 2 つの断片を繋いで構築した組み換え体である。



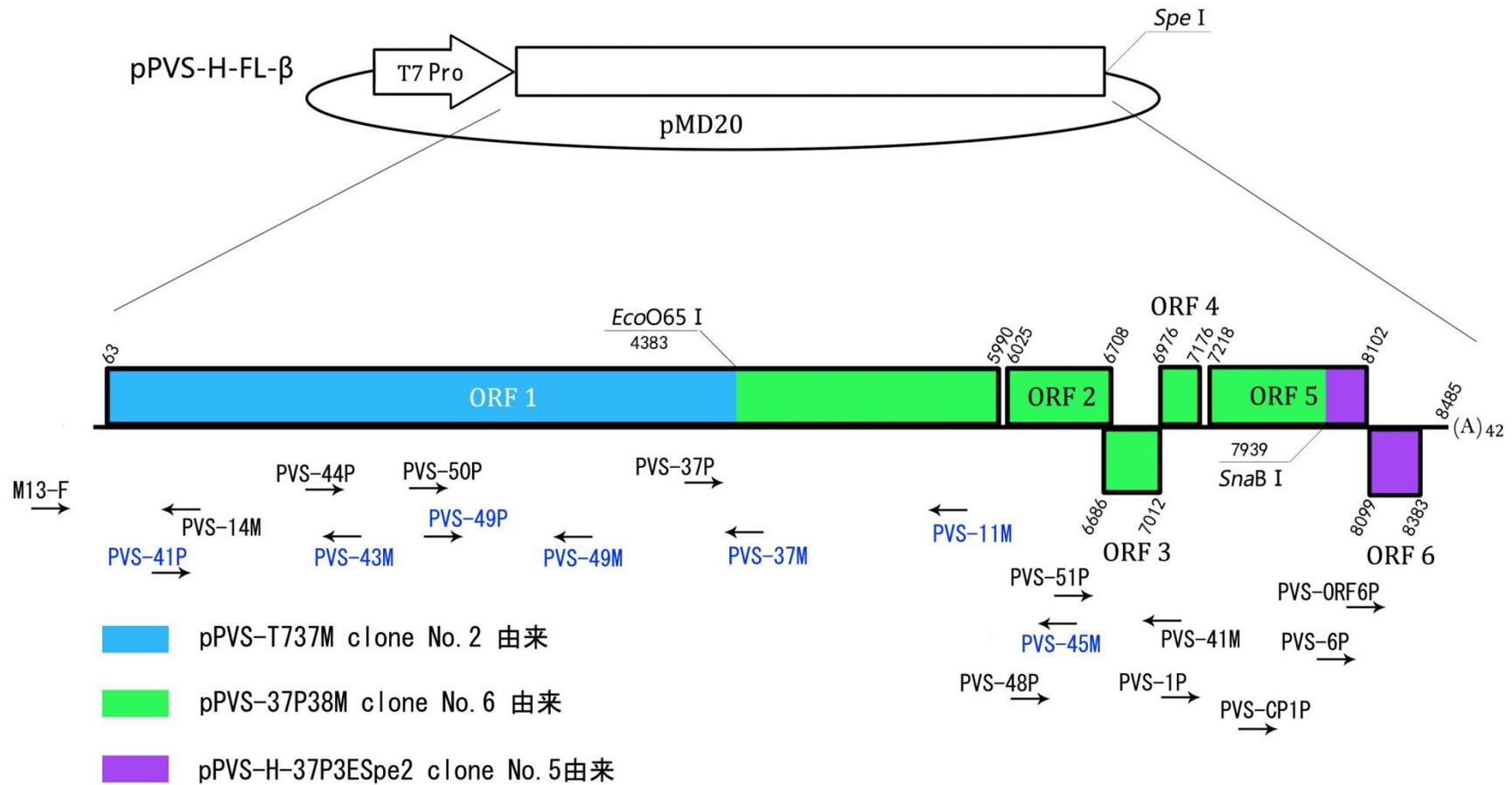
図III-2-8 pPVS-H-FL-β<sub>SiW</sub>、pPVS-H-FL-β<sub>H</sub> 子孫配列解析に用いたプライマー図

pPVS-H-FL-β<sub>SiW</sub>、pPVS-H-FL-β<sub>H</sub> 子孫配列は PVS-22P と PVS-38M プライマー対を用い RT-PCR により増幅した。青色で示すプライマーはシーケンスに用いたものである。



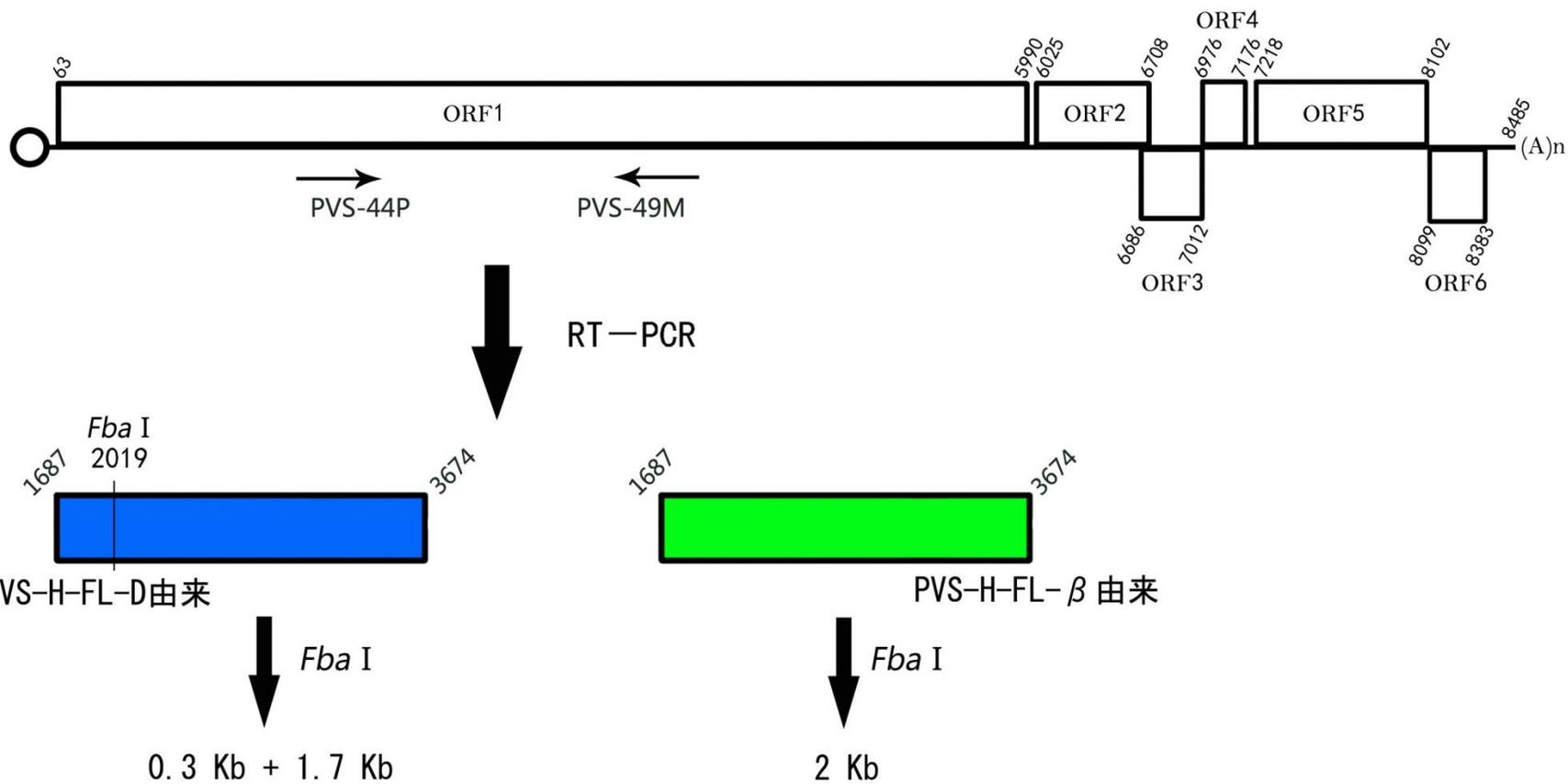
図III-2-9 pPVS-Na1-FL-A の構築戦略図

プライマーT7-PVS-HとPVS-20Mを用いて、PVS-Na1の5'端側をRT-PCRで増幅し得られた配列は青色で示す。プライマーPVS-2Pと3NTRAP4を用いて、PVS-Na1の3'端側を3'RACEで増幅し得られた配列は緑色で示す。



図Ⅲ-2-10 pPVS-H-FL-β の配列解析に用いたプライマーの位置

青色で示すプライマーは受託解析（ユーロフィンジェノミクス社）に出した際に用いたものである。



図III-2-11 PVS-H-FL-β、PVS-H-FL-D 由来配列の判別図

プライマーペア PVS-44P と PVS-49M を用いて、PVS-H-FL-D 由来で増幅した配列は青色、PVS-H-FL-β 由来で増幅した配列は緑色で示す。

### 3. 結果

#### 3.1. PVS-H95 ゲノムの全長 cDNA クローンの構築及び感染性確認

新たに2種類のPVS-H95の全長cDNAクローンpPVS-H-FL-GとpPVS-H-FL-Hを構築した。pPVS-H-FL-Gでは1個、pPVS-H-FL-Hでは2個の候補クローンが得られた。なお、本研究で構築したPVSの全長cDNAクローンについては表III-3-1にまとめた。また、李(2014)に加え本研究で構築したPVS-H95ゲノムの全長cDNAクローンの構造を図III-3-1に示した。最初に構築したPVS-H95ゲノムの全長cDNAクローンpPVS-H-FL-ABは8種の部分長cDNAクローンを繋いで作製したものである。pPVS-H-FL-ABはPVS-H95のコンセンサス配列との間に計3ヶ所のアミノ酸相違が見られ、その転写産物には感染性が認められなかった(畑谷, 未発表)。その後、部分長cDNAクローンの入れ替えによりpPVS-H-FL-Cを、変異の導入によりpPVS-H-FL-VとpPVS-H-FL-Dをそれぞれ作製した(畑谷, 未発表; 李, 2014)が、PVS-H95のコンセンサス配列との間に1ヶ所または2ヶ所のアミノ酸相違が見られる。本研究で構築したpPVS-H-FL-GはpPVS-H-FL-DのORF5領域上流部分をpPVS-1P1M-6由来の配列(橙色で示す)に入れ替えて作製したものである。pPVS-H-FL-GはPVS-H95のコンセンサス配列と比較すると、複製酵素の44番目(ピンク色で表示)、TGBp1の128番目(緑色で表示)、CPの54番目(オレンジ色で表示)、計3ヶ所のアミノ酸相違が見られる。一方、pPVS-H-FL-HはpPVS-H-FL-Vを構築する際に192塩基番目のTをAに変異した部分長cDNAクローンpPVS-H-5T(Sal I Spe I)-Mutを利用し、pPVS-H-FL-Cを入れ替えて作製したもので、pPVS-H-FL-Hのアミノ酸配列はPVS-H95のコンセンサス配列と一致する。

pPVS-H-FL-Gの1クローンを*Mlu* Iで処理して鋳型とし、キャップ付加RNA転写産物を電気泳動で確認したところ、図III-3-2-Aに示したように、約8.5 KbのPVSゲノムサイズのバンドが1本だけ観察されたので、この転写RNAを接種試験に用いた。転写したキャップ付加RNAを*N. occidentalis*に接種し(1個体に約4 µg)、24 °Cで約4週間育成後、ELISAでPVSの感染を確認した(図III-3-2-B 上図)。図III-3-2-Bに示すように、pPVS-H-FL-Gからの転写産物を計5個体の植物に接種したが、感染が確認できた植物個体はなかった。

一方、pPVS-H-FL-Hの2クローンを*Mlu* Iで処理して鋳型として、キャップ付加RNA転写産物を電気泳動で別々に確認したところ、図III-3-2-Aに示すように、いずれも約8.5 Kbのバンドが1本だけ観察されたので、この転写RNAを接種試験に用いた。転写した

キャップ付加 RNA 2 種類を混合し、*N. occidentalis* に接種し (1 個体に約 5  $\mu$ g)、24  $^{\circ}$ C で約 4 週間育成後、ELISA で PVS の感染を確認した (図III-3-2-B 下図)。図III-3-2-B に示すように、pPVS-H-FL-H からの転写産物を計 4 個体の植物に接種したが、感染が確認できた植物個体はなかった。

### 3.2. PVS-H00 ゲノムの全長 cDNA クローンの構築及び感染性確認

PVS-H00 を鋳型とし、3 つの部分長 cDNA クローンを繋ぐことにより全長 cDNA クローン pPVS-H-FL- $\beta$  を構築した。pPVS-H-FL- $\beta$  は 5'端側 2 種類と 3'端側 1 種類の組み合わせで 4 個の候補クローンが得られた。各クローン番号及び polyA の長さについて表III-3-1 にまとめた。

pPVS-H-FL- $\beta$  の 4 つのクローンを *Spe* I で処理して鋳型とし、転写したキャップ付加 RNA を電気泳動で確認したところ、図III-3-3-A に示すように、全てのレーンで約 8.5 Kb のバンドが 1 本だけ観察されたので、この転写 RNA を接種試験に用いた。転写したキャップ付加 RNA 4 種類を別々に *N. occidentalis* 各 4 個体に接種し、接種した植物は 24  $^{\circ}$ C で育成した。約 2 週間育成後、接种植物の上葉から総 RNA を抽出し、Northern blot で PVS ゲノム RNA を確認した (図III-3-3-B)。図III-3-3-B に示すように、pPVS-H-FL- $\beta$  からの転写産物 (レーン 2-5)、または PVS-H00 (レーン 6-7) を接種した植物における PVS ゲノム RNA の蓄積レベルには大差なかった。また、PVS のサブゲノム RNA と思われるバンドも検出できた。一方、ウイルス外被タンパク質 (CP) の検出は、接种植物を約 4 週間育成後、ELISA で確認した (図III-3-3-C)。図III-3-3-C に示すように、pPVS-H-FL- $\beta$  からの転写産物 4 種類を計 16 個体の植物に接種したところ、全ての接种植物上葉から PVS の CP を検出できた。

pPVS-H-FL- $\beta$  からの転写産物を接種した植物の病徴写真は図III-3-4 に示した。pPVS-H-FL- $\beta$  からの転写産物を接種した *N. occidentalis* の上葉にはモザイクや壊疽斑が見られ (図III-3-4-C)、それらの病徴は接種後約 2 週間で明瞭になり、PVS-H00 の汁液接種個体より約 5 日遅れた (図III-3-4-B) が、病徴の激しさに差は見られなかった。また、pPVS-H-FL- $\beta$  転写産物を接種した *N. occidentalis* を接種源として用い、*C. quinoa* に汁液接種した。接種した *C. quinoa* の接種葉には壊疽斑が見られ (図III-3-4-F) たが、上葉には病徴が現れず全身感染しなかった (図III-3-4-G)。この結果は PVS-H00 を接種した *C. quinoa* の病徴と一致した (図III-3-4-D と E)。これらの接種結果から、pPVS-H-FL- $\beta$  転写産物 RNA

の病原性は PVS-H00 と差がないと思われた。

pPVS-H-FL-β 転写 RNA の接種量 (1 個体当たり 5 μg、2 μg、1 μg、0.5 μg、0.2 μg、0.1 μg の 6 段階) と感染率の関係を調べた結果を表III-3-2 と図III-3-5 に示す。表III-3-2 からわかるように、pPVS-H-FL-β 転写 RNA の感染性が高く、0.1 μg/個体という低い濃度で *N. occidentalis* に接種しても、90%の接種個体で PVS が感染し、病徴の激しさに差はなかった。ところが、接種植物の発病時期は転写 RNA の接種量に影響され、表III-3-2 と図III-3-4-H からわかるように、1 μg/個体以上の濃度で接種試験を行った場合、2 週間以内の発病率は 80%以上で、感染個体は接種後 16 日以内に全て発病したが、転写 RNA の接種量が 1 μg/個体以下であった場合、2 週間以内の発病率は 50%以下に低下し、感染個体が全て発病するのは二日遅れた。

また、pPVS-H-FL-β のプロモーターを T7 から 35S に入れ替え、p35S-PVS-H-FL-β を構築した。p35S-PVS-H-FL-β に 3 個の候補クローンが得られ、各クローンの番号及び polyA の長さは表III-3-1 にまとめた。p35S-PVS-H-FL-β を 6 μg/個体で *N. occidentalis* に接種し、24 °C で約 4 週間育成後、ELISA で PVS の感染を確認した (図III-3-6)。Spe I 切断で線状化した p35S-PVS-H-FL-β を接種した場合、植物 8 個体中 2 個体に感染し、感染率は 25% であった (図III-3-6 上図)。一方、環状のプラスミドの p35S-PVS-H-FL-β を接種した場合、植物 8 個体中 1 個体が感染し、感染率は 12.5% であった (図III-3-6 下図)。

### 3.3. PVS-H00 全ゲノム配列の解析及び PVS-H95 との比較

感染性 cDNA クローン pPVS-H-FL-β をプラスミドシーケンスにより全塩基配列を解析し、PVS-H00 のゲノム配列とした。シーケンスプライマーによって計 19 個のオーバーラップ配列断片を解析した際に、用いたプライマー及びそれぞれの解析範囲を表III-3-3 にまとめた。表III-3-3 中に青色で示したプライマーは受託解析に用いたもので、解析範囲はやや広く約 800-900 bp 解析できた。

決定した PVS-H00 の全ゲノム配列を図III-3-7 にまとめた。PVS-H00 の全ゲノムはポリ A 鎖を除いて 8485 塩基で、5'末端非翻訳領域が 62 塩基、3'末端非翻訳領域が 102 塩基であり、ORF1 が 5928 塩基で 1975 アミノ酸の複製酵素、ORF2 が 684 塩基で 227 アミノ酸の TGBp1、ORF3 が 327 塩基で 108 アミノ酸の TGBp2、ORF4 が 201 塩基で 66 アミノ酸の TGBp3、ORF5 が 885 塩基で 294 アミノ酸の CP、ORF6 が 285 塩基で 94 アミノ酸の CRP をそれぞれコードしている。

PVS-H00 と PVS-H95 の全ゲノムを比較した結果を表III-3-4 にまとめた。全塩基数は PVS-H00 と PVS-H95 はともにポリ A 鎖を除いて計 8485 塩基で、非翻訳領域およびオーバーラッピング領域では両者に塩基相違は見られなかった。PVS-H00 と PVS-H95 には計 370 個（全塩基数の 4.4%）の塩基相違が見られ、うち 102 個の塩基相違がアミノ酸配列に影響を与えた。両者の塩基相違率が最も高いのは ORF1 の 5.4%で、ORF3 と ORF2 での塩基相違率がそれぞれ 4.3%と 3.9%で比較的高く、ORF4 と ORF6 ではそれぞれ 2.0%と 0.4%、塩基相違率が最も低いのは ORF5 の 0.3%であった。6 つの ORF に計 91（全アミノ酸数の 3.3%）アミノ酸相違が見られ、うちアミノ酸相違率が最も高いのは複製酵素の 4.1%で、TGBp1、TGBp3、CRP と TGBp2 はそれぞれ 3.1%、1.5%、1.1%と 0.9%、CP は 0.3%と最も低かった。PVS-H00 と PVS-H95 間の塩基相違を詳しく見るとトランジション (Ti) はトランスバージョン (Tv) の約 4 倍だが、ORF3 では Ti は Tv の 6 倍になり、ORF4 から ORF6 には Tv が見られなかった。PVS-H00 と PVS-H95 間の Ti、Tv 割合の分布を図III-3-8-A にまとめた。図III-3-8-A から分かるように、全ゲノム配列から見る Tv（濃い灰色のバーで表示）の割合は 20%以下になるが、400-600 nt の複製酵素 MTR コード領域、2200-2800 nt の複製酵素コード領域、4000-4200 nt の複製酵素 HEL コード領域及び 6000-6200 nt の TGBp1 N 末端コード領域では Tv の割合が高くなっていた。一方、1-400 nt のゲノム 5'末端、5400-5800 nt の複製酵素 POL コード領域及び ORF4 以後の領域では Tv が 0%であった。また、PVS-H00 と PVS-H95 との非同義置換・同義置換分析 (Ka/Ks 分析) を行った結果を図III-3-8-B にまとめた。Ka/Ks は進化の選択方向を反映し、1（点線で表示）を超えた場合、配列がポジティブな選択を受けていることが示唆されるのに対し、Ka/Ks が 1 以下の場合、配列がネガティブな選択を受けていることが示唆される。また、Ka/Ks が 1 に近い場合、配列がニュートラルな選択を受けていることが示唆される。PVS-H00 と PVS-H95 で比較した場合、全体の Ka/Ks は約 0.38、ORF3 では約 0.08 と非常に低く（表III-3-4）、強いネガティブな選択を受けていることが示唆された。しかし、複製酵素の MTR と O-PRO 間の領域（1885-2247 nt）は強いポジティブ選択を受けていることがわかった。また、複製酵素の MTR と O-PRO 間の領域（2425-2535 nt）及び HEL 領域の N 末端（3541-3615 nt）はニュートラルな選択を受けていることがわかった。

PVS-H00 と PVS-H95 のアミノ酸配列の比較結果を図III-3-9、アミノ酸相違性質差 (SG 値 0-5 で評価) の分布は図III-3-10 に示した。計 91 アミノ酸相違の分布は均一ではなく、約 90%のアミノ酸相違は複製酵素に存在している。更に複製酵素の中でも、アミノ酸相

違が集中して存在する領域があり、半分以上のアミノ酸相違は複製酵素 N 端側の MTR と O-PRO 領域の間に分布している (図III-3-9)。PVS-H00 と PVS-H95 の計 91 アミノ酸相違の大半は性質が近いものである (図III-3-10)。複製酵素領域に分布したアミノ酸相違 (図 III-3-10、菱形で表示) は、MTR 領域に 1 ヶ所、O-PRO と P-PRO 領域に各 2 ヶ所、P-PRO と HEL 間に 2 ヶ所、HEL 領域に 12 ヶ所、HEL と POL 間に 3 ヶ所存在した他、71.3% (57/80) のアミノ酸相違が MTR と O-PRO 間の領域に集中して分布している。複製酵素のアミノ酸相違の 45%は性質の近い (SG 値 5)、27.5%は性質やや近い (SG 値 4) もので、27.5%のアミノ酸相違は性質の遠い (SG 値 0-3) であった。TGBp1 に分布したアミノ酸相違 (図 III-3-10、青い三角形で表示) は、性質の近い 3 つの相違及び性質のやや遠い (SG 値 3) または性質の遠い (SG 値 2) 2 つの相違が見られた。TGBp2、TGBp3 に各 1 つのアミノ酸相違が見られ (図III-3-10、赤色または緑色の三角形で表示)、ともに性質の近いものであった。CP の N 末端には青い丸で表示したアミノ酸相違が 1 ヶ所見られ、性質のやや近いものであった。また、CRP にも赤い四角形で表示したアミノ酸相違が 1 ヶ所見られ、性質のやや遠いものであった。

また、アミノ酸相違が集中していた複製酵素の配列を詳しく調べるため、PVS-H95 と PVS-H00 で複製酵素にある 5 つの機能領域のアミノ酸配列を比較した (図III-3-11)。MTR には 3 つ、HEL には 7 つ、POL には 8 つの保存モチーフ (Hataya *et al.*, 2000)、O-PRO には 4 つの保存モチーフが存在し (Makarova *et al.*, 2000)、P-PRO 機能領域の範囲は Lawrence らの報告 (Lawrence *et al.*, 1995) を参考した。図III-3-11 からわかるように、PVS-H95 と PVS-H00 で 3 つの MTR 保存モチーフ (図III-3-11 下線を付けた緑色で表示) は一致し、アミノ酸相違は性質の近い 155 番の 1 ヶ所 (A155S ; 紫色で表示) しか見られなかった。O-PRO の保存モチーフ III と IV で各 1 ヶ所 (A937T と Y994F ; 紫色で表示) に性質の近いアミノ酸相違が見られ、その他の配列は一致している。P-PRO では、1 つの性質の近い相違 (V1059I ; 紫色で表示) と 1 つの性質のやや遠い相違 (Y1087H ; 赤色で表示) が見られるが、それ以外の配列は一致する。POL は 8 つの保存モチーフを含む全ての機能領域配列が一致している。一方、HEL に存在するアミノ酸相違は他の 4 機能領域より多く、保存モチーフ I に性質のやや遠い 1 つの相違 (M1186T ; 赤色で表示)、保存モチーフ I A に性質の近い 1 つの相違 (V1203I ; 紫色で表示)、保存モチーフ V に性質の近い 1 つの相違 (K1399R ; 紫色で表示) があり、他に計 9 つのアミノ酸相違 : 性質のやや遠い R1167Q と T1168E (赤色で表示)、性質のやや近い N1154K と I1337M (青色で表示)、性質の近い

V1170A、T1234A、A1245T、V1275A と S1336T (紫色で表示) が見られた。

#### 3.4. pPVS-H-FL-β と pPVS-H-FL-D 転写産物の共接種による PVS 複製補完の検討

pPVS-H-FL-β と pPVS-H-FL-D から転写したキャップ付加 RNA (PVS-H-FL-β と PVS-H-FL-D と表示) を 2.5 μg/個体の濃度で *N. occidentalis* に接種した。接種後 7 日目に、PVS-H-FL-β または PVS-H-FL-D を単独接種した植物各 1 個体、PVS-H-FL-β と PVS-H-FL-D を混合接種した個体 3 個体から総 RNA を抽出し、プライマーペア PVS-44P と PVS-49M を用い RT-PCR を行った。図III-3-12-A に示すように、PVS-H-FL-β を単独接種 (レーン 3)、PVS-H-FL-β と PVS-H-FL-D を混合接種 (レーン 5-7) した個体から約 2 Kb の目的断片が増幅できたが、PVS-H-FL-D を単独接種した個体 (レーン 4) からは目的断片が増幅できなかった。なお、コントロールの pPVS-H-FL-β と pPVS-H-FL-D からの転写 RNA を鋳型として行った RT-PCR では、いずれも約 2 Kb の目的断片が増幅できた (レーン 1-2)。これらの目的断片をアガロースゲルから回収し、*Fba* I で処理した結果が図III-3-12-B である。PVS-H-FL-D 由来の RT-PCR 産物は *Fba* I 切断により約 0.3 Kb と 1.7 Kb の断片に切断された (レーン 4) が、PVS-H-FL-β 由来 (レーン 5) または PVS-H-FL-β と PVS-H-FL-D を混合接種した個体 (レーン 1-3) の RT-PCR 産物では *Fba* I 切断された断片は認められなかった。このことは、PVS-H-FL-β と PVS-H-FL-D を混合接種した個体では、PVS-H-FL-β の配列が複製したが、PVS-H-FL-D の配列は一緒に複製することが出来なかったことを示す。

#### 3.5. pPVS-H-FL-β と pPVS-H-FL-H の ORF1 領域組み換え体からの転写 RNA の感染性

pPVS-H-FL-β と pPVS-H-FL-H の配列比較結果から、PVS の感染性に影響する要因を検討した。感染性が認められた全長 cDNA クローン pPVS-H-FL-β (PVS-H00 を鋳型) と感染性が認められなかった全長 cDNA クローン pPVS-H-FL-H (PVS-H95 コンセンサス配列) の ORF1 部分を入れ替え、組み換え体である pPVS-H-FL-βH と pPVS-H-FL-Hβ を構築した。その構築のため、アミノ酸配列に影響しないように 1 塩基置換により *Bsi*W I 認識サイトを導入した。この 1 塩基置換が感染性へ影響するか調べるため、pPVS-H-FL-β に *Bsi*W I 認識サイトを導入した pPVS-H-FL-β<sub>Bsi</sub>W も構築した。pPVS-H-FL-β<sub>Bsi</sub>W、pPVS-H-FL-βH は各 2 個、pPVS-H-FL-Hβ は 3 個の候補クローンが得られ、各クローンの番号及び polyA の長さは表III-3-5 にまとめた。

*Spe* I で切断した pPVS-H-FL-βBsiW と pPVS-H-FL-βH の各 2 クローン、*Mlu* I で切断した pPVS-H-FL-Hβ の 3 クローンから転写されたキャップ付加 RNA を電気泳動で確認した結果は図III-3-13-A である。全てにおいて約 8.5 Kb のバンドが 1 本だけ観察されたので、この転写 RNA を接種試験に用いた。転写したキャップ付加 RNA 7 種類は 2 クローンの産物を混合または単独で *N. occidentalis* に接種した。

pPVS-H-FL-βBsiW、pPVS-H-FL-βH と pPVS-H-FL-Hβ からの転写産物を接種した植物の上葉を図III-3-13-B に示す。pPVS-H-FL-βBsiW、pPVS-H-FL-βH からの転写産物を接種した *N. occidentalis* の上葉にはモザイクや壞疽斑が見られ、pPVS-H-FL-β からの転写産物を接種したものと同様であった。一方、pPVS-H-FL-Hβ からの転写産物を接種した植物の上葉には明らかな病徴が見られなかった。

PVS の感染は接種植物を約 4 週間育成後、ELISA で確認した(図III-3-13-C)。図III-3-13-C に示すように、pPVS-H-FL-βBsiW、pPVS-H-FL-βH からの転写産物を各 6 個体の植物に接種し、pPVS-H-FL-βBsiW では全て、pPVS-H-FL-βH では 5 個体の接種植物上葉から PVS の CP タンパク質が検出された。一方、pPVS-H-FL-Hβ からの転写産物を各 6 個体の植物に接種したが、感染が確認できた植物個体はなかった。再度 pPVS-H-FL-βBsiW、pPVS-H-FL-βH と pPVS-H-FL-Hβ 各クローンからの転写産物を単独で接種した結果を表III-3-5 にまとめてしめた。pPVS-H-FL-βBsiW 転写産物 2 種類を混合接種または単独接種で計 14 個の *N. occidentalis* に接種したところ、全ての個体で感染し、発病時期や病徴の激しさは pPVS-H-FL-β からの転写産物接種個体と同様であった。接種個体から抽出した PVS 子孫配列を調べた結果、*Bsi*W I 認識サイトが維持されていることが確認できた(表III-3-6)。そのことから、pPVS-H-FL-β に C5850G の 1 塩基置換を導入しても、感染性には影響しないことが明らかになった。また、pPVS-H-FL-βH の 2 クローンからの転写産物を混合接種した場合、約 83.8%の感染率を示し、病徴の激しさは pPVS-H-FL-β 転写産物接種個体と同様であったが、発病が約 4 日遅れた。そこで、pPVS-H-FL-βH 各クローンからの転写産物を単独接種すると、クローン番号 13 由来の転写 RNA 接種個体は 100%の感染率を示し、発病時期や病徴の激しさは pPVS-H-FL-β からの転写産物接種個体と同様であったのに対し、クローン番号由来の転写 RNA 接種個体は発病せず、感染しなかった。感染個体から抽出した PVS 子孫配列を調べた結果、*Bsi*W I 認識サイト、pPVS-H-FL-H 由来の配列が維持されていることが確認できた(表III-3-6)。このことから、pPVS-H-FL-H の ORF1 下流の配列(pPVS-H-FL-β と計 11 個のアミノ酸相違)は、PVS 感染性には影響しないこ

とが明らかになった。それに対し、pPVS-H-FL-H $\beta$  からの転写産物 3 種類を混合接種または単独接種で計 22 個体の *N. occidentalis* に接種したが、感染個体は得られなかった。これらの結果から、pPVS-H-FL-H の ORF1 配列 (pPVS-H-FL- $\beta$  に計 80 個のアミノ酸相違) は PVS 感染性に影響することが示唆された。

また、pPVS-H-FL- $\beta$ H クローン番号 3 と番号 13 の転写産物の感染性の差は polyA 配列の長さによって決められたが否かを確認するために、pPVS-H-FL- $\beta$ H polyA 配列の組み換え体を構築した。図III-3-14-A に示したように、polyA 配列の組み換えに用いた制限酵素は *Sna*B I 及び *Spe* I である。pPVS-H-FL- $\beta$ H クローン番号 3 にクローン番号 13 の polyA 配列を入れ替え、pPVS-H-FL- $\beta$ H313 を構築した。一方、pPVS-H-FL- $\beta$ H クローン番号 13 にクローン番号 3 の polyA 配列を入れ替え、pPVS-H-FL- $\beta$ H133 を構築した。pPVS-H-FL- $\beta$ H313、pPVS-H-FL- $\beta$ H133 は各 2 個の候補クローンが得られ、各クローンの番号及び PolyA の長さは表III-3-1 にまとめた。

*Spe* I で処理した pPVS-H-FL- $\beta$ H313、pPVS-H-FL- $\beta$ H133 に各 2 個のクローンを鋳型として、転写されたキャップ付加 RNA を電気泳動で確認した結果は図III-3-14-B である。図III-3-14-B に示したように、全てにおいて約 8.5 Kb のバンドが 1 本だけ観察されたので、この転写 RNA を接種試験に用いた。転写したキャップ付加 RNA 4 種類は 2 クローンの産物を混合で各 4 個体の *N. occidentalis* に接種した。

pPVS-H-FL- $\beta$ H133 からの転写産物を接種した *N. occidentalis* の上葉にはモザイクや壊疽斑が見られ、pPVS-H-FL- $\beta$ BsiW 転写産物を接種したものと同様であった。一方、pPVS-H-FL- $\beta$ H313 からの転写産物を接種した植物の上葉には明らかな病徴が見られなかった。PVS の感染は接種植物を約 4 週間育成後、ELISA で確認した (図III-3-14-C)。pPVS-H-FL- $\beta$ H133、pPVS-H-FL- $\beta$ H313 からの転写産物を各 4 個体の植物に接種し、pPVS-H-FL- $\beta$ H133 では全ての接種植物上葉から PVS の CP タンパク質が検出されたが、pPVS-H-FL- $\beta$ H313 転写産物を接種した植物から感染が確認できた個体はなかった。これらの結果から、pPVS-H-FL- $\beta$ H クローン番号 3 と番号 13 の転写産物の感染性の差に影響するのは polyA 配列の長さではなかった。

### 3.6. PVS-Na1 ゲノムの全長 cDNA クローン pPVS-Na1-FL-A の構築及び感染性確認

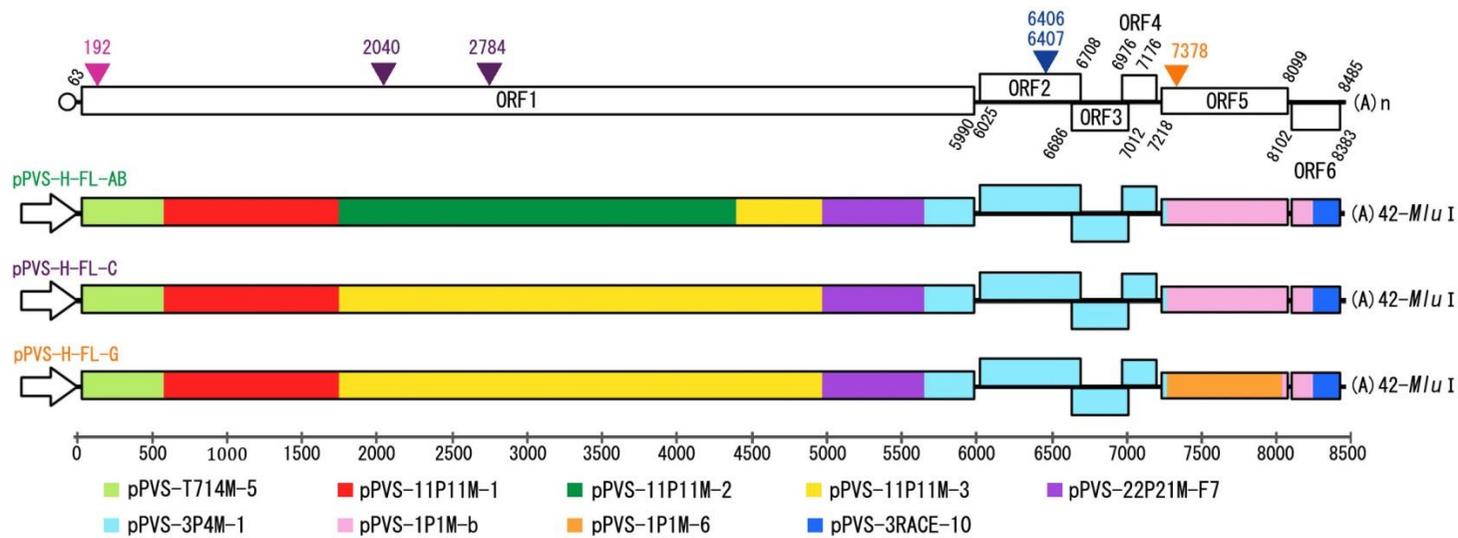
PVS-Na1 ゲノムを鋳型とし、2 つの部分長 cDNA クローンを繋ぐことにより全長 cDNA クローン pPVS-Na1-FL-A を構築した。pPVS-Na1-FL-A は 5'端側 2 種類と 3'端側 3 種類の

組み合わせで6個の候補クローンを得た。各クローンの番号及び polyA の長さについては表III-3-1 にまとめた。

*Mlu* I で切断した pPVS-Na1-FL-A の6個のクローンを鋳型として、転写されたキャップ付加 RNA を電気泳動で確認した結果が図III-3-15-A である。約 8.5 Kb のバンドが1本だけ観察されたので、この転写 RNA を *N. occidentalis* に接種し(1個体当たり約 4 µg)、24 °C で約 4 週間育成後、ELISA で PVS の感染を確認した。図III-3-15-B に示すように、pPVS-Na1-FL-A からの転写産物6種類を各4個体または6個体、計28個体の植物に接種したが、感染が確認できた植物個体はなく、全長 cDNA クローン pPVS-Na1-FL-A からの転写 RNA には感染性が認められなかった。

表III-3-1：構築した各 PVS の全長 cDNA クローン

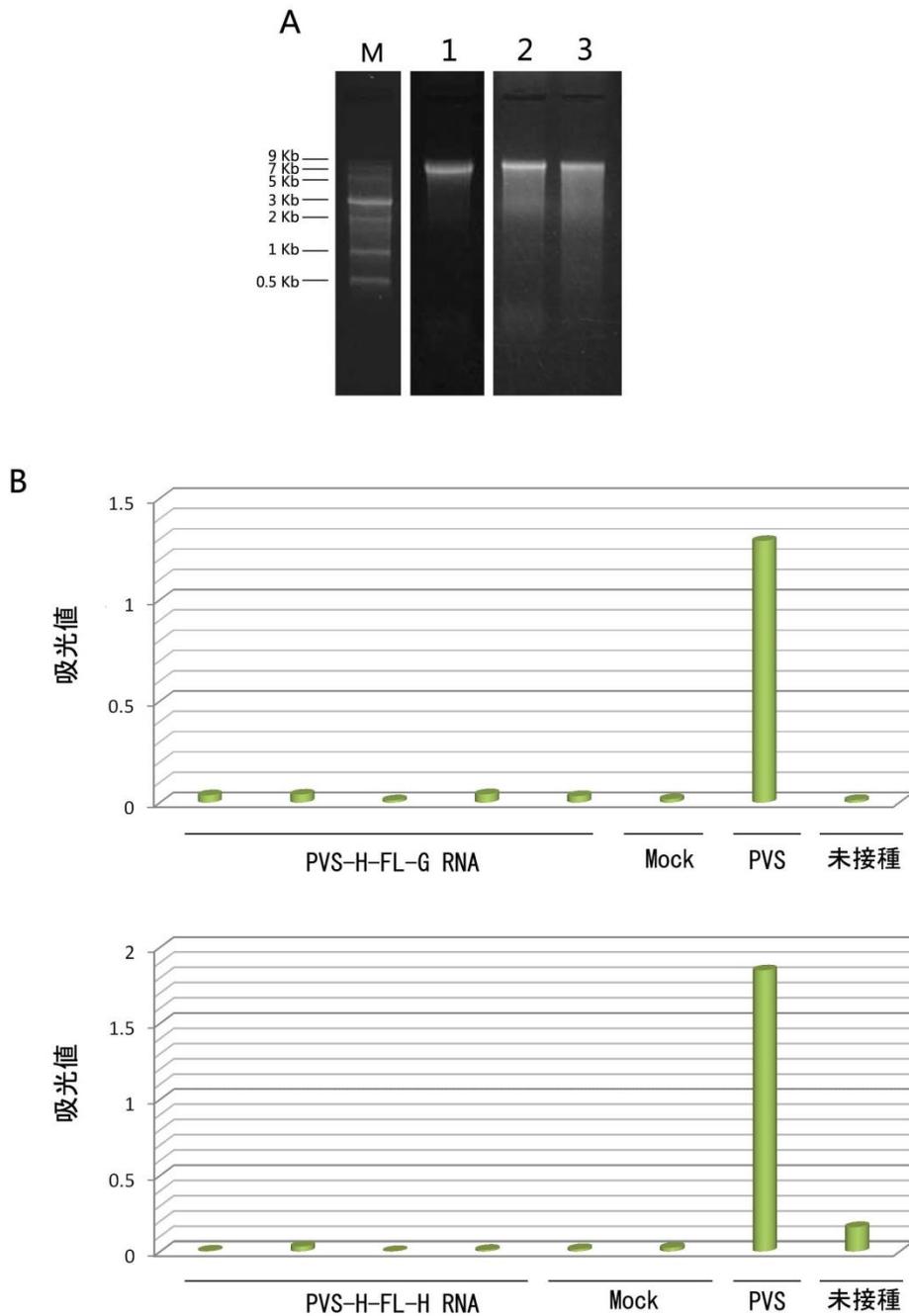
全長 cDNA クローン名	クローン番号	polyA の長さ	polyA 直後の制限酵素サイト
pPVS-H-FL-G	10	42	<i>Mlu</i> I
pPVS-H-FL-H	21	42	<i>Mlu</i> I
	111	42	<i>Mlu</i> I
pPVS-H-FL-β	1	66	<i>Spe</i> I
	2	66	<i>Spe</i> I
	3	66	<i>Spe</i> I
	5	66	<i>Spe</i> I
p35S-PVS-H-FL-β	12	66	<i>Spe</i> I
	14	66	<i>Spe</i> I
	15	66	<i>Spe</i> I
pPVS-H-FL-βBsiW	1	70	<i>Spe</i> I
	6	68	<i>Spe</i> I
pPVS-H-FL-βH	3	35	<i>Spe</i> I
	13	67	<i>Spe</i> I
pPVS-H-FL-Hβ	2	59	<i>Mlu</i> I
	3	70	<i>Mlu</i> I
	4	66	<i>Mlu</i> I
pPVS-H-FL-βH313	1	67	<i>Spe</i> I
	2	-	<i>Spe</i> I
pPVS-H-FL-βH133	1	35	<i>Spe</i> I
	3	-	<i>Spe</i> I
pPVS-Na1-FL-A	23	27	<i>Mlu</i> I
	25	27	<i>Mlu</i> I
	28	27	<i>Mlu</i> I
	53	27	<i>Mlu</i> I
	55	27	<i>Mlu</i> I
	58	27	<i>Mlu</i> I



	ORF1 (replicase)			ORF2 (TGBp1)	ORF5 (CP)
	192 (44)	2040 (660)	2784 (908)	6406, 6407 (128)	7378 (54)
pPVS-H-FL-AB	T (Cys)	G (Val)	C (Pro)	GT (Val)	A (Glu)
pPVS-H-FL-V	A (Ser)	G (Val)	C (Pro)	GT (Val)	A (Glu)
pPVS-H-FL-C	T (Cys)	A (Ile)	T (Ser)	GT (Val)	A (Glu)
pPVS-H-FL-D	T (Cys)	A (Ile)	T (Ser)	AG (Arg)	A (Glu)
pPVS-H-FL-G	T (Cys)	A (Ile)	T (Ser)	AG (Arg)	G (Gly)
* pPVS-H-FL-H	A (Ser)	A (Ile)	T (Ser)	GT (Val)	A (Glu)

図III-3-1 構築した PVS-H95 ゲノムの全長 cDNA クローン

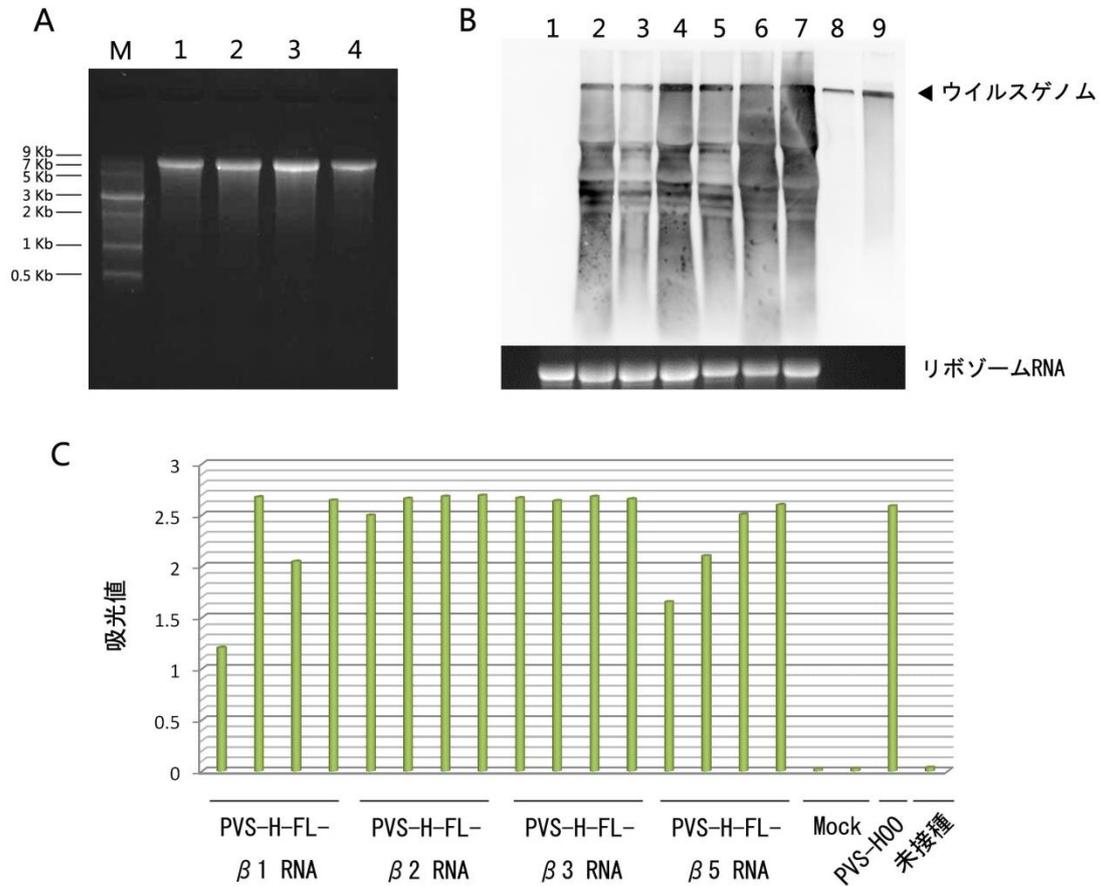
各全長 cDNA クローン構築に用いた部分長 cDNA クローンは異なる色で表記した。pPVS-H-FL-H のアミノ酸配列は PVS-H95 コンセンサス配列と一致する。



図III-3-2 PVS-H95 ゲノム全長 cDNA クローンからの転写 RNA の感染性確認

A は構築した PVS-H95 ゲノム全長 cDNA クローンからのキャップ付加転写産物のホルムアルデヒド変性アガロースゲル電気泳動解析。M: ssRNA marker (New England Biolabs) ; 1: pPVS-H-FL-G からの転写産物 ; 2-3: pPVS-H-FL-H クローン番号 21 (レーン 2) とクローン番号 111 (レーン 3) からの転写産物。

B は PVS-H95 ゲノム全長 cDNA クローン pPVS-H-FL-G (上)、pPVS-H-FL-H (下) からの転写 RNA を接種した *N. occidentalis* の ELISA 検定結果。



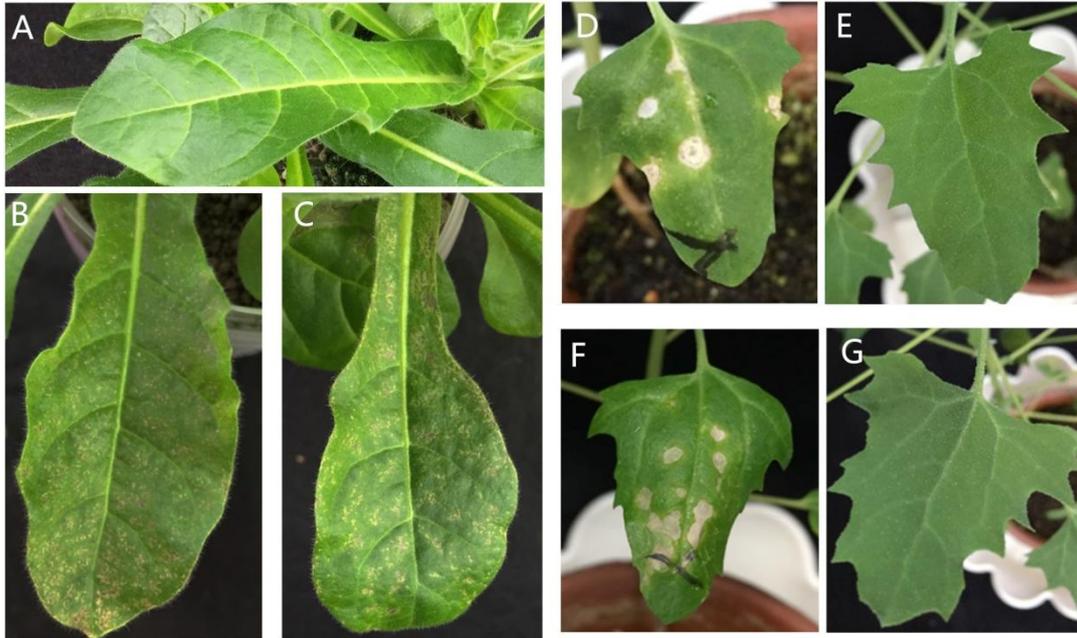
図III-3-3 PVS-H00 ゲノム全長 cDNA クローン pPVS-H-FL-β からのキャップ付加転写 RNA

の感染性確認

A は構築した pPVS-H-FL-β からの転写産物のホルムアルデヒド変性アガロースゲル電気泳動解析。M: ssRNA marker (NEB) ; 1-4 : pPVS-H-FL-β からの転写産物。

B は pPVS-H-FL-β からの転写 RNA または PVS-00 を接種した *N. occidentalis* の Northern blot 解析。接種後 14 日に上葉から抽出した総 RNA を用いた。1: Mock 接種個体 ; 2-5 : pPVS-H-FL-β クローン番号 3 からの転写産物接種個体 ; 6-7: PVS-H00 汁液接種個体 ; 8-9: pPVS-H-FL-β 転写産物 1 ng (レーン 8) と 10 ng (レーン 9)。

C は pPVS-H-FL-β からの転写 RNA を接種した *N. occidentalis* の ELISA 検定。



図III-3-4 接種植物における病徴

Mock (A)、PVS-H00 (B)、pPVS-H-FL- $\beta$  転写産物 (C) を接種をした *N. occidentalis* の上葉で、B は接種後 10 日目、A と C は接種後 15 日目。

PVS-H00 を接種した *C. quinoa* の接種後 17 日目の接種葉 (D) と上葉 (E)。

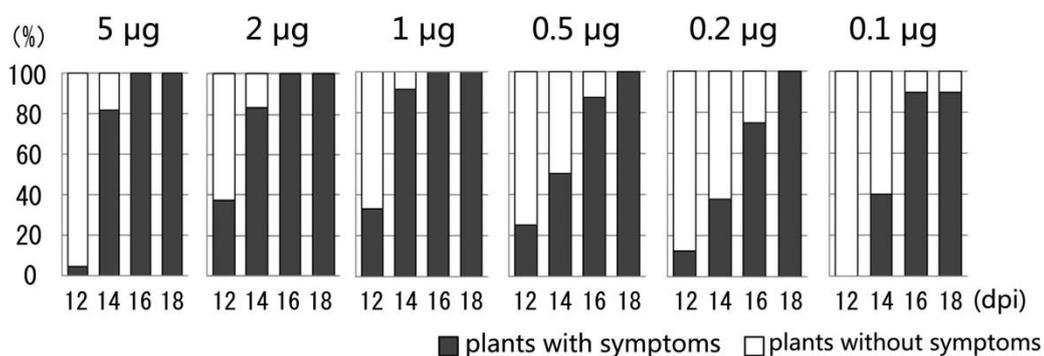
pPVS-H-FL- $\beta$  転写産物接種をした *N. occidentalis* を接種源として用いた *C. quinoa* の接種後 17 日目の接種葉 (F) と上葉 (G)。

表III-3-2 : pPVS-H-FL-β 転写産物接種量の検討

転写産物接種量(μg/個体)	感染個体数/接種個体数*	感染率(%)	2週間以内の発病率(%)	病徴
5	22/22	100	81.8	M, N
2	12/12	100	83.3	M, N
1	12/12	100	91.7	M, N
0.5	8/8	100	50	M, N
0.2	8/8	100	37.5	M, N
0.1	9/10	90	40	M, N

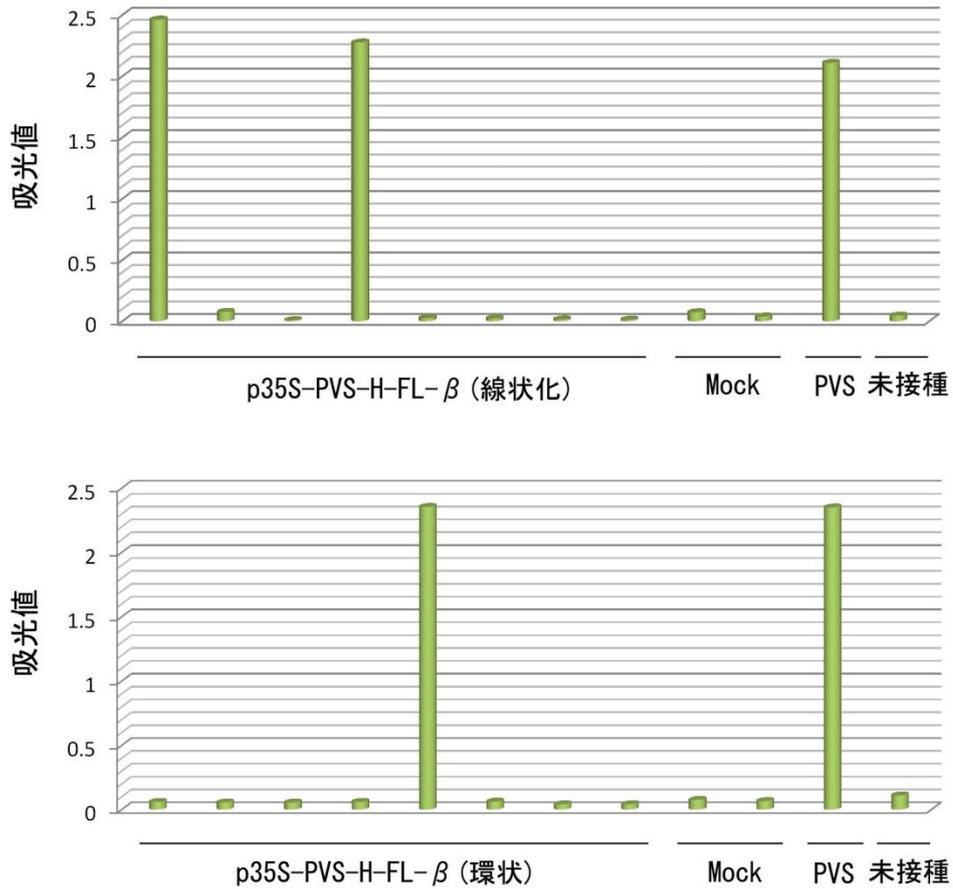
M: モザイク ; N: 壊疽斑

\*:二回以上の独立した接種試験における結果を合計した



図III-3-5 pPVS-H-FL-β 転写産物の接種量と *N. occidentalis* での発病時期の検討

転写産物の接種量は1個体当たり5 μg、2 μg、1 μg、0.5 μg、0.2 μg、0.1 μgを用い、接種後12、14、16、18日目での *N. occidentalis* の発病率を示した。発病した個体は黒いバー、発病していない個体は白いバーで表示した。



図III-3-6 p35S-PVS-H-FL-β の感染性確認

*Spe* I 切断で線状化した p35S-PVS-H-FL-β (上) を、下図は環状プラスミドの p35S-PVS-H-FL-β (下) を接種した *N. occidentalis* 8 個体の ELISA 検定。

表III-3-3 : 各シーケンス用プライマーにより解析した配列範囲

PVS-H00	
プライマー	範囲(nt)
M13-F	1～364
PVS-14M	225～531
PVS-41P	517～1410
PVS-43M	839～1721
PVS-44P	1713～2129
PVS-50P	2086～2558
PVS-49P	2472～3396
PVS-49M	2747～3632
PVS-37M	3561～4449
PVS-37P	4354～4916
PVS-11M	4637～5487
PVS-45M	5365～6235
PVS-48P	6050～6506
PVS-51P	6428～6879
PVS-41M	6805～7243
PVS-1P	7185～7673
PVS-CP1P	7598～8118
PVS-6P	7987～8470
PVS-ORF6P	8256～8485

配列解析を受託解析で用いたプライマーは青字で示した。

9            18            27            36            45            54  
 5' GAU AAA CAC UCC CGA AAA UAA UUU GAC UUA AAC AAC GCG ACA GUU CAA GCA AAU  
  
 63            72            81            90            99            108  
 UAC UUA ACA UGG CAC UUA CUU ACA GAA GUC CAA UCG AGG AAG UGU UAA CAC UAC  
 ORF1→ Met Ala Leu Thr Tyr Arg Ser Pro Ile Glu Glu Val Leu Thr Leu Leu  
  
 117            126            135            144            153            162  
 UAG AGC CUA AUG CUC AAU CCC UAA UUU CCA ACG UCG CCA CCA GCA GCU UUC AAG  
 Glu Pro Asn Ala Gln Ser Leu Ile Ser Asn Val Ala Thr Ser Ser Phe Gln Glu  
  
 171            180            189            198            207            216  
 AGA GUG AGA AGG AUA ACU UCG CCU GGU UUA GCU ACC AUG UGU CGG CUA GCG CCA  
 Ser Glu Lys Asp Asn Phe Ala Trp Phe Ser Tyr His Val Ser Ala Ser Ala Lys  
  
 225            234            243            252            261            270  
 AGG AAC ACC UUA GUA GAG CAG GAA UUU ACC UAA GCC CCU AUU CGG GGU AUC CUC  
 Glu His Leu Ser Arg Ala Gly Ile Tyr Leu Ser Pro Tyr Ser Gly Tyr Pro His  
  
 279            288            297            306            315            324  
 AUU CUC ACC CGG UGU GCA AGA CAU UGG AAA ACU ACC UAC UGU ACA AAG UCC UAC  
 Ser His Pro Val Cys Lys Thr Leu Glu Asn Tyr Leu Leu Tyr Lys Val Leu Pro  
  
 333            342            351            360            369            378  
 CAC CAC UUG UAA AUA ACA CCU UUU ACU UUG UAG GAA UAA AAG AAU UCA AGC UCA  
 Pro Leu Val Asn Asn Thr Phe Tyr Phe Val Gly Ile Lys Glu Phe Lys Leu Asn  
  
 387            396            405            414            423            432  
 AUU UUC UUA AGA AGA GGA UCA AAC AAA UGA GCA UGA UUC AAG CUA UAA AUA GGU  
 Phe Leu Lys Lys Arg Ile Lys Gln Met Ser Met Ile Gln Ala Ile Asn Arg Tyr  
  
 441            450            459            468            477            486  
 AUG UGA GCA GUG CCG AUA AAU UGC GAU AUG GCA AUG AGU UCG UGA UCA AAU UCG  
 Val Ser Ser Ala Asp Lys Leu Arg Tyr Gly Asn Glu Phe Val Ile Lys Phe Gly  
  
 495            504            513            522            531            540  
 GCG CGG CUU CGC CCG AAC UCA AGC GGC ACC AUG GAU AUU CAC UGG AUC CUG CCU  
 Ala Ala Ser Pro Glu Leu Lys Arg His His Gly Tyr Ser Leu Asp Pro Ala Leu  
  
 549            558            567            576            585            594  
 UGC GUG AUC UCU UAC CGA ACA UAA AGA GGG AUU CUA AUC UCU UCU UCC ACG AUG  
 Arg Asp Leu Leu Pro Asn Ile Lys Arg Asp Ser Asn Leu Phe Phe His Asp Glu

図III-3-7 PVS-H00 の全ゲノム配列 (次ページに続く)

603	612	621	630	639	648
AGA UGC AUU AUU GGG AAA AGA ACC AGU UGA UCC ACU UCU UGG AAC AAU GCA GAC					
Met His Tyr Trp Glu Lys Asn Gln Leu Ile His Phe Leu Glu Gln Cys Arg Pro					
657	666	675	684	693	702
CCA AUA CGU GCU UGU GCA CCA UUG UGU ACC CAA CAG AGA UAU UCG UUG GGG CCC					
Asn Thr Cys Leu Cys Thr Ile Val Tyr Pro Thr Glu Ile Phe Val Gly Ala Arg					
711	720	729	738	747	756
GAC GUU CUU UGA AUC CGU GGG CAU ACG AGU UUG AGA UCA AGA GAG ACA AAC UGC					
Arg Ser Leu Asn Pro Trp Ala Tyr Glu Phe Glu Ile Lys Arg Asp Lys Leu Leu					
765	774	783	792	801	810
UCU UUU ACC CAG AUG GGG UGC GUA GUG AAG GCU AUG AGC AGC CAG UCA ACU GUG					
Phe Tyr Pro Asp Gly Val Arg Ser Glu Gly Tyr Glu Gln Pro Val Asn Cys Gly					
819	828	837	846	855	864
GGU AUC UCC UCC GCA CUA GAA AGA UAU UGC UAA GGG AUG GCA CUA UGU ACA GCG					
Tyr Leu Leu Arg Thr Arg Lys Ile Leu Leu Arg Asp Gly Thr Met Tyr Ser Val					
873	882	891	900	909	918
UUG AUC UAG UGU GCA GUA AAU UCG CCC AUC AUC UAA UAG CAA UCA CCA AGG GCG					
Asp Leu Val Cys Ser Lys Phe Ala His His Leu Ile Ala Ile Thr Lys Gly Asp					
927	936	945	954	963	972
AUU UGA UCA CCC CGA CUU ACC GUA GCU UCG GCC CUU UUG AGG CGA UCA AAA GUG					
Leu Ile Thr Pro Thr Tyr Arg Ser Phe Gly Pro Phe Glu Ala Ile Lys Ser Ala					
981	990	999	1008	1017	1026
CGG GCU UGC AGG GGA UAA GCA AAG GUA GGC CGA AAU UCU ACC CUG UAC CGU GCC					
Gly Leu Gln Gly Ile Ser Lys Gly Arg Pro Lys Phe Tyr Pro Val Pro Cys His					
1035	1044	1053	1062	1071	1080
ACA UGA UUU CUC GUU UAU ACA GGU ACU UAC GGU CUC UAA AGA AAC CCG ACA AGC					
Met Ile Ser Arg Leu Tyr Arg Tyr Leu Arg Ser Leu Lys Lys Pro Asp Lys Gln					
1089	1098	1107	1116	1125	1134
AGU CCG CAA UGG CAA AAU UCU CGC AGA UGU GCC CGG AGC CAA GUG GUG ACA UGA					
Ser Ala Met Ala Lys Phe Ser Gln Met Cys Pro Glu Pro Ser Gly Asp Met Ile					

図III-3-7 PVS-H00 の全ゲノム配列 (次ページに続く)

1143	1152	1161	1170	1179	1188												
UAA	GGU	UUA	UUG	AGG	AAC	UGA	GUG	AUU	UGA	UAA	UCA	ACA	CUG	GUA	CUU	UGA	GGG
Arg	Phe	Ile	Glu	Glu	Leu	Ser	Asp	Leu	Ile	Ile	Asn	Thr	Gly	Thr	Leu	Arg	Val
1197	1206	1215	1224	1233	1242												
UCA	UGA	UCG	AUG	CGG	AGC	UGU	GCA	AAA	AUU	UCU	UUG	GUA	AUC	UGG	GUC	UGG	CCU
Met	Ile	Asp	Ala	Glu	Leu	Cys	Lys	Asn	Phe	Phe	Gly	Asn	Leu	Gly	Leu	Ala	Leu
1251	1260	1269	1278	1287	1296												
UAC	CGG	CCA	CUC	UUG	CGU	CAA	AGA	UUG	AAA	GUA	CCC	GCG	CAG	UAA	GCC	UAG	AAG
Pro	Ala	Thr	Leu	Ala	Ser	Lys	Ile	Glu	Ser	Thr	Arg	Ala	Val	Ser	Leu	Glu	Ala
1305	1314	1323	1332	1341	1350												
CCU	UUG	UAG	CCU	CGC	UUG	AGC	CGC	UUG	UCG	UUG	AUU	GCG	AAC	UGC	AGA	CCA	UCU
Phe	Val	Ala	Ser	Leu	Glu	Pro	Leu	Val	Val	Asp	Cys	Glu	Leu	Gln	Thr	Ile	Ser
1359	1368	1377	1386	1395	1404												
CGU	GGG	CCG	UAC	CGC	UGG	CGC	AGC	UGU	UGU	UCA	GUG	AAU	CAC	CGG	AUG	AUC	CCC
Trp	Ala	Val	Pro	Leu	Ala	Gln	Leu	Leu	Phe	Ser	Glu	Ser	Pro	Asp	Asp	Pro	Pro
1413	1422	1431	1440	1449	1458												
CGG	AGG	ACA	UGA	UUG	AAG	CAA	UGG	AUA	GGA	AGU	GGG	UGG	GUA	GUA	GCA	CGA	UGU
Glu	Asp	Met	Ile	Glu	Ala	Met	Asp	Arg	Lys	Trp	Val	Gly	Ser	Ser	Thr	Met	Leu
1467	1476	1485	1494	1503	1512												
UGA	GCG	ACA	GGG	UCC	CGG	CAC	CUU	ACC	GUG	GGA	AUA	UGU	GGA	GCG	AAA	CAU	CCC
Ser	Asp	Arg	Val	Pro	Ala	Pro	Tyr	Arg	Gly	Asn	Met	Trp	Ser	Glu	Thr	Ser	Arg
1521	1530	1539	1548	1557	1566												
GCG	CAA	UGA	GCU	UUU	GGG	GCA	UAG	AUU	UUC	AGC	GGA	UCA	AGU	UUC	UGA	GAG	GGC
Ala	Met	Ser	Phe	Trp	Gly	Ile	Asp	Phe	Gln	Arg	Ile	Lys	Phe	Leu	Arg	Gly	Leu
1575	1584	1593	1602	1611	1620												
UGA	UGG	AUU	UGU	ACG	UGG	AUA	GUA	UGU	GCA	CAG	AAG	GCC	UUG	CAA	CUC	CCG	UGA
Met	Asp	Leu	Tyr	Val	Asp	Ser	Met	Cys	Thr	Glu	Gly	Leu	Ala	Thr	Pro	Val	Thr
1629	1638	1647	1656	1665	1674												
CUU	UUG	AGU	CUU	ACG	UGG	CUC	AGG	UCG	CGU	CGU	GUU	GCU	CGC	UUC	UCG	GGC	UCG
Phe	Glu	Ser	Tyr	Val	Ala	Gln	Val	Ala	Ser	Cys	Cys	Ser	Leu	Leu	Gly	Leu	Ala

図III-3-7 PVS-H00 の全ゲノム配列 (次ページに続く)

1683	1692	1701	1710	1719	1728
CAU UGA UUA AAU GCC UAA CUG UUG CCG AGU AUG CUG AGG UGG CCC GAA UGG UGA					
Leu Ile Lys Cys Leu Thr Val Ala Glu Tyr Ala Glu Val Ala Arg Met Val Ser					
1737	1746	1755	1764	1773	1782
GCA ACA CGC GUU UGA UUG AUG UGC UCU UUA CUG CUG GGG ACC UUC GUU GGU UCC					
Asn Thr Arg Leu Ile Asp Val Leu Phe Thr Ala Gly Asp Leu Arg Trp Phe Arg					
1791	1800	1809	1818	1827	1836
GCG CCA CCC GAC ACU CCA GGC AUA ACG UUA AGU UCU UGG ACG AAA CGG CCG AUU					
Ala Thr Arg His Ser Arg His Asn Val Lys Phe Leu Asp Glu Thr Ala Asp Trp					
1845	1854	1863	1872	1881	1890
GGG CAA GGU ACA AAA GCG AGU UCG AAU GCG CAA CAU AUG CAA AGC CCA AAG GAA					
Ala Arg Tyr Lys Ser Glu Phe Glu Cys Ala Thr Tyr Ala Lys Pro Lys Gly Thr					
1899	1908	1917	1926	1935	1944
CAU GUC AUA UGG GUU AUC UCC AAA ACA CUG UGU ACA GUU UUC ACG GAG UAG GGG					
Cys His Met Gly Tyr Leu Gln Asn Thr Val Tyr Ser Phe His Gly Val Gly Ala					
1953	1962	1971	1980	1989	1998
CAC GAU GGU CGU UUG ACC CCG GCU ACU GCA GCG AAG GUG AUU CUG AGG CCA UCC					
Arg Trp Ser Phe Asp Pro Gly Tyr Cys Ser Glu Gly Asp Ser Glu Ala Ile Leu					
2007	2016	2025	2034	2043	2052
UCC CUG ACU ACA GCG UAG UUG AUU GCC CCA AAA CUG CGC CAA UGA ACU CAG AAG					
Pro Asp Tyr Ser Val Val Asp Cys Pro Lys Thr Ala Pro Met Asn Ser Glu Gly					
2061	2070	2079	2088	2097	2106
GAA CUU UGC UCC AAG GGA CAU GGA UGG GGA GAG CGC UGA GCU GCG CAU GUG GGC					
Thr Leu Leu Gln Gly Thr Trp Met Gly Arg Ala Leu Ser Cys Ala Cys Gly Leu					
2115	2124	2133	2142	2151	2160
UGC AAU CUG UAA CAA GGG UGU UAG CGU ACC CCA CGG AAC AUG GAU UCA AUU UGG					
Gln Ser Val Thr Arg Val Leu Ala Tyr Pro Thr Glu His Gly Phe Asn Leu Glu					
2169	2178	2187	2196	2205	2214
AGA AGG GGG UUU CAG GCG AGC GUG CUG CAU GGU AUU GCA GGG GUC AGA UCA AUU					
Lys Gly Val Ser Gly Glu Arg Ala Ala Trp Tyr Cys Arg Gly Gln Ile Asn Tyr					

図III-3-7 PVS-H00 の全ゲノム配列 (次ページに続く)

2223	2232	2241	2250	2259	2268
AUA CAU CCG GAG CUG UUU GCC AUG AGU ACU CGG GCU GGC CAA GAU GGU UAA GCC					
Thr Ser Gly Ala Val Cys His Glu Tyr Ser Gly Trp Pro Arg Trp Leu Ser Gln					
2277	2286	2295	2304	2313	2322
AGU GGA UGG AAU UGC AUG AGA UAG AUG AGA CGU ACU AUA AUA GCA UGC UGG CCC					
Trp Met Glu Leu His Glu Ile Asp Glu Thr Tyr Tyr Asn Ser Met Leu Ala Gln					
2331	2340	2349	2358	2367	2376
AGG AAU UUC CUG CUG GCG GAG CUC UAG AGU GUG AAG UGG GUG AUG GAG GCC AGU					
Glu Phe Pro Ala Gly Gly Ala Leu Glu Cys Glu Val Gly Asp Gly Gly Gln Phe					
2385	2394	2403	2412	2421	2430
UCA UCC CAG GCU CAA AUG UGG CCA UAG CUG AAG UUG GAG GUC AGU CCC AGG UCU					
Ile Pro Gly Ser Asn Val Ala Ile Ala Glu Val Gly Gly Gln Ser Gln Val Ser					
2439	2448	2457	2466	2475	2484
CGU UUA GCU GUG CGG CGG GAA CUG GGC AAU UGU UGC UGG AAU UGG GGG AUU UCA					
Phe Ser Cys Ala Ala Gly Thr Gly Gln Leu Leu Leu Glu Leu Gly Asp Phe Ile					
2493	2502	2511	2520	2529	2538
UUG AAU UGC CUG GUC CAU GUU GGA GUA AGC ACC AUC UUC AUA UGC GCU GUA GCG					
Glu Leu Pro Gly Pro Cys Trp Ser Lys His His Leu His Met Arg Cys Ser Glu					
2547	2556	2565	2574	2583	2592
AAU CGC GCG GGG UGA UAU UUA UCU UCA GGC AAA UUA AGG UUC CAG ACU CAG UGG					
Ser Arg Gly Val Ile Phe Ile Phe Arg Gln Ile Lys Val Pro Asp Ser Val Val					
2601	2610	2619	2628	2637	2646
UGA AUG CCG CCG UGG UGC AGA UCG CAA CGC CUG CCG CAA CUG CAG GUG CGG GGG					
Asn Ala Ala Val Val Gln Ile Ala Thr Pro Ala Ala Thr Ala Gly Ala Gly Gly					
2655	2664	2673	2682	2691	2700
GGU CCA AGU UCA ACG AGC AUG AUG CCC ACC ACA CAC GAG AGG GGG UCG CAG UGC					
Ser Lys Phe Asn Glu His Asp Ala His His Thr Arg Glu Gly Val Ala Val His					
2709	2718	2727	2736	2745	2754
AUG CAU CCG GCA AGU GCC CUG CAG CAA AGA AAU UCC AUA GGG UAC CUA AUG CUG					
Ala Ser Gly Lys Cys Pro Ala Ala Lys Lys Phe His Arg Val Pro Asn Ala Gly					

図III-3-7 PVS-H00 の全ゲノム配列 (次ページに続く)

2763	2772	2781	2790	2799	2808
GUG GGG GAG AUU GCU UUU GGC UGG CCA UCU CGC ACU UCA CAG GGG UAA GCG UGC					
Gly Gly Asp Cys Phe Trp Leu Ala Ile Ser His Phe Thr Gly Val Ser Val Gln					
2817	2826	2835	2844	2853	2862
AGG ACA UGA AAC AGG GAU UGC AAC AGC UGG AGU GGG AGA GUG AUG CGU UCA GCG					
Asp Met Lys Gln Gly Leu Gln Gln Leu Glu Trp Glu Ser Asp Ala Phe Ser Ala					
2871	2880	2889	2898	2907	2916
CCG AGC UAA CCU UGC AAU UAA AAC CAC AAG CUU GGG CUG AAG AGG AGG CCA UUA					
Glu Leu Thr Leu Gln Leu Lys Pro Gln Ala Trp Ala Glu Glu Glu Ala Ile Ile					
2925	2934	2943	2952	2961	2970
UCG CGA CAA GCA AGC AAU ACC GGU ACA GGA UCG UGG UGC UGA GUG CCG AUA AAG					
Ala Thr Ser Lys Gln Tyr Arg Tyr Arg Ile Val Val Leu Ser Ala Asp Lys Glu					
2979	2988	2997	3006	3015	3024
AGC AAA CAG UUA UUU AUA GUC CGA AGU GUG AGG CGG UGC AGU CCA UGG UUC UAU					
Gln Thr Val Ile Tyr Ser Pro Lys Cys Glu Ala Val Gln Ser Met Val Leu Tyr					
3033	3042	3051	3060	3069	3078
ACC ACG CCG GGG CCC ACU UUG AGG CAG CUU UGC CCC GGA ACG ACU GCG UGC UUG					
His Ala Gly Ala His Phe Glu Ala Ala Leu Pro Arg Asn Asp Cys Val Leu Val					
3087	3096	3105	3114	3123	3132
UGG CCG UUG CGU CUG UCU UGC GGA GAC GAG UUG AAG AAG UGC UUU CAA UUC UAG					
Ala Val Ala Ser Val Leu Arg Arg Arg Val Glu Glu Val Leu Ser Ile Leu Gly					
3141	3150	3159	3168	3177	3186
GCG CGC AGU UGG GUA AUG AGU UUC UCC AGG AUG UAC UAA AGG GUG AAG GAA UUA					
Ala Gln Leu Gly Asn Glu Phe Leu Gln Asp Val Leu Lys Gly Glu Gly Ile Asn					
3195	3204	3213	3222	3231	3240
AUC GGG ACA AAU UGG CCG UGG UCU UUA AAC UCU UCG AUA UCU GCG CAC ACA UAC					
Arg Asp Lys Leu Ala Val Val Phe Lys Leu Phe Asp Ile Cys Ala His Ile His					
3249	3258	3267	3276	3285	3294
AUG CGG AGG GUG AGG UUU UCG UGA UAA AUU CUG AAG GUA GAU UGC ACG GCA CAU					
Ala Glu Gly Glu Val Phe Val Ile Asn Ser Glu Gly Arg Leu His Gly Thr Phe					

図III-3-7 PVS-H00 の全ゲノム配列 (次ページに続く)

3303	3312	3321	3330	3339	3348
UCA AUC UGA GCA AGG AUC AUA UUG AGC AUU GUA AGA GCA AAC CGA UGG GAA UAA					
Asn Leu Ser Lys Asp His Ile Glu His Cys Lys Ser Lys Pro Met Gly Ile Thr					
3357	3366	3375	3384	3393	3402
CCA AGU UCA CAA GUG UGC AUG AUG CUA GCU GUG AGA UUA AGC AGG AAA CAC UCG					
Lys Phe Thr Ser Val His Asp Ala Ser Cys Glu Ile Lys Gln Glu Thr Leu Ala					
3411	3420	3429	3438	3447	3456
CCA UGC UUA AAG CCA UGU GCA CGU UAC UAC CGU ACA AUC CAU GUG GGC UUA GAG					
Met Leu Lys Ala Met Cys Thr Leu Leu Pro Tyr Asn Pro Cys Gly Leu Arg Ala					
3465	3474	3483	3492	3501	3510
CGA GAG UGC UCG CUG AUA GCC UAA AUG CAG GCA GUA CUG GGG UCC UAU GCG ACG					
Arg Val Leu Ala Asp Ser Leu Asn Ala Gly Ser Thr Gly Val Leu Cys Asp Glu					
3519	3528	3537	3546	3555	3564
AGU UGU UCA AUA AGG UCG GGA AUU UAC UCG AGG CAA AUG AGG GGC GGC UGC AGG					
Leu Phe Asn Lys Val Gly Asn Leu Leu Glu Ala Asn Glu Gly Arg Leu Gln Glu					
3573	3582	3591	3600	3609	3618
AGA AUG CUA GAG AGG UGG GUU GCU UGC UUG GAA CUU UUG GAG CUG GGA AGA GCA					
Asn Ala Arg Glu Val Gly Cys Leu Leu Gly Thr Phe Gly Ala Gly Lys Ser Thr					
3627	3636	3645	3654	3663	3672
CGG UCU UUA GGA AAG UGC UAA GUA GCA AUC UUG GGA AGA GCA UCA UCU ACA UAU					
Val Phe Arg Lys Val Leu Ser Ser Asn Leu Gly Lys Ser Ile Ile Tyr Ile Ser					
3681	3690	3699	3708	3717	3726
CCC CAA GGA AGC AUC UGG CAG AUU CAU UCA AUG AGC UUG UGA AGU CUA UCA AGC					
Pro Arg Lys His Leu Ala Asp Ser Phe Asn Glu Leu Val Lys Ser Ile Lys Gln					
3735	3744	3753	3762	3771	3780
AGC AAG AGG GGG CCG CAA GUG UGC AAG GAU UCC GCG CUU UCA CGU UCG AGA GAG					
Gln Glu Gly Ala Ala Ser Val Gln Gly Phe Arg Ala Phe Thr Phe Glu Arg Ala					
3789	3798	3807	3816	3825	3834
CAC UCC UGA AGA GCA CGC AAU UUA GGC CGG AUG CAA CGA UCA UCA UUG AUG AAA					
Leu Leu Lys Ser Thr Gln Phe Arg Pro Asp Ala Thr Ile Ile Ile Asp Glu Ile					

図III-3-7 PVS-H00 の全ゲノム配列 (次ページに続く)

3843            3852            3861            3870            3879            3888  
 UUC AGC UGU UCC CAC CAG GUU ACU UGG AUC UAU UCU CUA UGU UGG CGC CAG CGG  
 Gln Leu Phe Pro Pro Gly Tyr Leu Asp Leu Phe Ser Met Leu Ala Pro Ala Gly

3897            3906            3915            3924            3933            3942  
 GGG UGC ACA UGU UCU UGG UGG GCG AUC CGU GCC AAA GCG ACU AUG ACU CAG AAA  
 Val His Met Phe Leu Val Gly Asp Pro Cys Gln Ser Asp Tyr Asp Ser Glu Lys

3951            3960            3969            3978            3987            3996  
 AAG AUC GGA GCC UGU UUC AAG CCA UGA AAU CCG ACA UCA AUC UCC UGU UGG AUG  
 Asp Arg Ser Leu Phe Gln Ala Met Lys Ser Asp Ile Asn Leu Leu Leu Asp Asp

4005            4014            4023            4032            4041            4050  
 AUG CGG AUU AUG AUU UUA AUU GCA GGA GUC GCA GAU UCA AGG AUA AGC UUU UUG  
 Ala Asp Tyr Asp Phe Asn Cys Arg Ser Arg Arg Phe Lys Asp Lys Leu Phe Asp

4059            4068            4077            4086            4095            4104  
 AUG GCC GUU UGC CAU GCA CUA UGG GAC CCA UGG AAG GGG AGC CAU CCA AGU UCA  
 Gly Arg Leu Pro Cys Thr Met Gly Pro Met Glu Gly Glu Pro Ser Lys Phe Thr

4113            4122            4131            4140            4149            4158  
 CAA UCA UUG AGG GCA UUG AAA AUU GUA AAG CCA UUC ACU CAC AGG CCG AAG UUU  
 Ile Ile Glu Gly Ile Glu Asn Cys Lys Ala Ile His Ser Gln Ala Glu Val Cys

4167            4176            4185            4194            4203            4212  
 GUU UAG UGU CCU CGU UUG AUG AAA AGA AGA UAG UGC AGA CUU ACU UCC CGA GCU  
 Leu Val Ser Ser Phe Asp Glu Lys Lys Ile Val Gln Thr Tyr Phe Pro Ser Ser

4221            4230            4239            4248            4257            4266  
 CUU GCC AUU GCU UCA CUU UUG GAG AAU CAA CGG GGA UGA CAU ACA GGU CUG GAG  
 Cys His Cys Phe Thr Phe Gly Glu Ser Thr Gly Met Thr Tyr Arg Ser Gly Val

4275            4284            4293            4302            4311            4320  
 UGA UAC UGA UCA CAG ACA CCU CAC AAU ACA CCA GUG AGA GGA GGU GGU UAA CUG  
 Ile Leu Ile Thr Asp Thr Ser Gln Tyr Thr Ser Glu Arg Arg Trp Leu Thr Ala

4329            4338            4347            4356            4365            4374  
 CCC UGA GCC GCU UCU CAC AUU CAA UCG CCU UCG UGA AUG CAA CCG GUG GAA ACA  
 Leu Ser Arg Phe Ser His Ser Ile Ala Phe Val Asn Ala Thr Gly Gly Asn Ile

図III-3-7 PVS-H00 の全ゲノム配列 (次ページに続く)

4383            4392            4401            4410            4419            4428  
 UUC AGU UGG UGA CCA GGU UAU ACC AAA AUA GGG UUC UAG GUC GAU UUC UGC UCA  
 Gln Leu Val Thr Arg Leu Tyr Gln Asn Arg Val Leu Gly Arg Phe Leu Leu Lys

4437            4446            4455            4464            4473            4482  
 AAA CGG CAA AGA UUG AUG ACC UUA AGA UGU UGU UGC CUG GUA GGC CAU GCU UUA  
 Thr Ala Lys Ile Asp Asp Leu Lys Met Leu Leu Pro Gly Arg Pro Cys Phe Lys

4491            4500            4509            4518            4527            4536  
 AAG AGG GUU UUG GGG GCG AAA GGA UUG GCG CAG AUG AGG GCA AGA GAG AGU UCA  
 Glu Gly Phe Gly Gly Glu Arg Ile Gly Ala Asp Glu Gly Lys Arg Glu Phe Lys

4545            4554            4563            4572            4581            4590  
 AGU UGG AGG GUG AUC CGU GGU UGA AAA CAA UGC UAG AUC UAC UAC AGA AAG AGG  
 Leu Glu Gly Asp Pro Trp Leu Lys Thr Met Leu Asp Leu Leu Gln Lys Glu Asp

4599            4608            4617            4626            4635            4644  
 AUC AGG AGG AGG UCG AGG AAG CUG UUG UUG AAC UUG GUG AGG AGU GGU UUC GCA  
 Gln Glu Glu Val Glu Glu Ala Val Val Glu Leu Gly Glu Glu Trp Phe Arg Thr

4653            4662            4671            4680            4689            4698  
 CAC AUC UAC CGC AAU GCG AGC UGG AGG GCG UCA GAG CAA GGU GGG UUG AAA AGA  
 His Leu Pro Gln Cys Glu Leu Glu Gly Val Arg Ala Arg Trp Val Glu Lys Ile

4707            4716            4725            4734            4743            4752  
 UAC UGG CAA AAG AAG UCC GUG AGA AAA GGA UGG GGC UAU UGG UCU CAG AGC AAU  
 Leu Ala Lys Glu Val Arg Glu Lys Arg Met Gly Leu Leu Val Ser Glu Gln Phe

4761            4770            4779            4788            4797            4806  
 UCA CAG ACG AGC AUU CAA AGC AGU UGG GGA AGC AAA UCA CAA AUG CCG CCG AGA  
 Thr Asp Glu His Ser Lys Gln Leu Gly Lys Gln Ile Thr Asn Ala Ala Glu Arg

4815            4824            4833            4842            4851            4860  
 GGU UUG AAA CUA UCU ACC CGC GGC ACA GAG CUG CGG ACA CAG UCA CUU UCA UCA  
 Phe Glu Thr Ile Tyr Pro Arg His Arg Ala Ala Asp Thr Val Thr Phe Ile Met

4869            4878            4887            4896            4905            4914  
 UGG CUG UGA GGA AAA GAU UGA GGU UUU CGG ACC CAA UUA GAG AGA GUG CAA AGC  
 Ala Val Arg Lys Arg Leu Arg Phe Ser Asp Pro Ile Arg Glu Ser Ala Lys Leu

図III-3-7 PVS-H00 の全ゲノム配列 (次ページに続く)

4923            4932            4941            4950            4959            4968  
 UCC GGG UUG CAG AGA UGU AUG GGC CCU UCC UAC UGA AAG AAU UUC UCA AGC AUG  
 Arg Val Ala Glu Met Tyr Gly Pro Phe Leu Leu Lys Glu Phe Leu Lys His Val

4977            4986            4995            5004            5013            5022  
 UGC CAC UGA AAC CAA UGC AUG AUA CUA GAA UGA UGG CUG AGG CAA AGU UUG AUU  
 Pro Leu Lys Pro Met His Asp Thr Arg Met Met Ala Glu Ala Lys Phe Asp Phe

5031            5040            5049            5058            5067            5076  
 UUG AGG AGA AGA AGA CGC AGA AGA GCG CAG CCA CAA UUG AGA ACC ACA GCA ACA  
 Glu Glu Lys Lys Thr Gln Lys Ser Ala Ala Thr Ile Glu Asn His Ser Asn Arg

5085            5094            5103            5112            5121            5130  
 GAU CUU GCA GGG ACU GGC UGG UCG ACA UGG GUA UGG UUU UCU CAA AGU CUC AAC  
 Ser Cys Arg Asp Trp Leu Val Asp Met Gly Met Val Phe Ser Lys Ser Gln Leu

5139            5148            5157            5166            5175            5184  
 UCU GCA CAA AGU UUG ACA AUC GGU UCA GGG AUG CGA AAG CAG CAC AAA CCA UUG  
 Cys Thr Lys Phe Asp Asn Arg Phe Arg Asp Ala Lys Ala Ala Gln Thr Ile Val

5193            5202            5211            5220            5229            5238  
 UCU GUU UCC AAC AUA GCG UCC UAU GCC GCU UUG CUC CAU ACA UGA GGU ACA UUG  
 Cys Phe Gln His Ser Val Leu Cys Arg Phe Ala Pro Tyr Met Arg Tyr Ile Glu

5247            5256            5265            5274            5283            5292  
 AAA AGA AAC UCA AUG AAG UAU UAC CGG CAA GGU UUU ACA UUC AUU CAG GCA AAG  
 Lys Lys Leu Asn Glu Val Leu Pro Ala Arg Phe Tyr Ile His Ser Gly Lys Gly

5301            5310            5319            5328            5337            5346  
 GCU UGG AAG AGC UAA AUA AAU GGG UCA UAG AAU CCA AAU UCG ACG GGC UGU GCA  
 Leu Glu Glu Leu Asn Lys Trp Val Ile Glu Ser Lys Phe Asp Gly Leu Cys Thr

5355            5364            5373            5382            5391            5400  
 CAG AGU CUG ACU AUG AAG CCU UCG ACG CUA GUC AAG ACC AGU ACA UAG UGG CGU  
 Glu Ser Asp Tyr Glu Ala Phe Asp Ala Ser Gln Asp Gln Tyr Ile Val Ala Phe

5409            5418            5427            5436            5445            5454  
 UUG AGC UAG CAU UGA UGA GGU AUU UGG GCU UGC CCA AUG AUC UCA UAG AGG AUU  
 Glu Leu Ala Leu Met Arg Tyr Leu Gly Leu Pro Asn Asp Leu Ile Glu Asp Tyr

図III-3-7 PVS-H00 の全ゲノム配列 (次ページに続く)

5463            5472            5481            5490            5499            5508  
 ACA AGU ACA UCA AAA CGC ACC UGG GCU CAA AGU UGG GGA AUU UUG CCA UAA UGC  
 Lys Tyr Ile Lys Thr His Leu Gly Ser Lys Leu Gly Asn Phe Ala Ile Met Arg

5517            5526            5535            5544            5553            5562  
 GUU UCU CCG GUG AGG CUA GCA CCU UCU UGU UCA ACA CAA UGG CCA AUA UGC UUU  
 Phe Ser Gly Glu Ala Ser Thr Phe Leu Phe Asn Thr Met Ala Asn Met Leu Phe

5571            5580            5589            5598            5607            5616  
 UCA CAU UCU UAA GAU ACA AGU UGA AAG GGG AUG AGC GAA UAU GCU UCG CUG GUG  
 Thr Phe Leu Arg Tyr Lys Leu Lys Gly Asp Glu Arg Ile Cys Phe Ala Gly Asp

5625            5634            5643            5652            5661            5670  
 AUG ACA UGU GCG CCA ACA GAG CUC UGU UCA UUA AAG ACA CUC AUG AGG GCU UCC  
 Asp Met Cys Ala Asn Arg Ala Leu Phe Ile Lys Asp Thr His Glu Gly Phe Leu

5679            5688            5697            5706            5715            5724  
 UCA AGA AGC UUA AGU UGA AGG CGA AGG UUG AUA GGA CAA ACC GAC CAA GUU UCU  
 Lys Lys Leu Lys Leu Lys Ala Lys Val Asp Arg Thr Asn Arg Pro Ser Phe Cys

5733            5742            5751            5760            5769            5778  
 GCG GGU GGA GCU UGU GCU CAG AUG GGA UUU AUA AGA AGC CGC AGC UGG UCU UUG  
 Gly Trp Ser Leu Cys Ser Asp Gly Ile Tyr Lys Lys Pro Gln Leu Val Phe Glu

5787            5796            5805            5814            5823            5832  
 AGA GGC UUU GUA UCG CCA AGG AAA CGG CCA ACU UGG CCA AUU GCA UCG ACA AUU  
 Arg Leu Cys Ile Ala Lys Glu Thr Ala Asn Leu Ala Asn Cys Ile Asp Asn Tyr

5841            5850            5859            5868            5877            5886  
 AUG CAA UUG AGG UAU CCU ACG CCU ACA AGC UCG GAG AGA GGA UUA AGG AGC GCA  
 Ala Ile Glu Val Ser Tyr Ala Tyr Lys Leu Gly Glu Arg Ile Lys Glu Arg Met

5895            5904            5913            5922            5931            5940  
 UGU CAG AGG AGG AAC UGG AUG CUU UCU ACA AUU GCG UGA GGG UGA UUA UUA AGC  
 Ser Glu Glu Glu Leu Asp Ala Phe Tyr Asn Cys Val Arg Val Ile Ile Lys His

5949            5958            5967            5976            5985            5994  
 AUA AGC AUU UGC UGA AGU CUG AGA UUC GCU GUG UGU AUG AGG AUG UUU GAU AGC  
 Lys His Leu Leu Lys Ser Glu Ile Arg Cys Val Tyr Glu Asp Val \*

図III-3-7 PVS-H00 の全ゲノム配列 (次ページに続く)

6003	6012	6021	6030	6039	6048
UUA GGU AAU CAG CUU AGU	AGU AUU GAA UAU AUG GAU GUG UUU UUG CAA GUU UUG	ORF2→	Met Asp Val Phe Leu Gln Val Leu		
6057	6066	6075	6084	6093	6102
AAU AAA UAU AAG UUU GAG CGU GUU AGU AGU ACU UUA AAU AAA CCA AUA GUU AUU	Asn Lys Tyr Lys Phe Glu Arg Val Ser Ser Thr Leu Asn Lys Pro Ile Val Ile				
6111	6120	6129	6138	6147	6156
CAU AGU GUC CCG GGA GCU GGU AAA AGU UCC GCU AUU CGG GAG UUG CUU AAG UUA	His Ser Val Pro Gly Ala Gly Lys Ser Ser Ala Ile Arg Glu Leu Leu Lys Leu				
6165	6174	6183	6192	6201	6210
GAU AGU AGG UUU GAG UGC AUU ACC CGU GGC CGG CCA GAC AUC CCG AAU CUA GAG	Asp Ser Arg Phe Glu Cys Ile Thr Arg Gly Arg Pro Asp Ile Pro Asn Leu Glu				
6219	6228	6237	6246	6255	6264
GGG GCU UUC AUC AAG GCU GAG CGU AGU GGG GAG AAU AAA UUG CUG CUG GUU GAU	Gly Ala Phe Ile Lys Ala Glu Arg Ser Gly Glu Asn Lys Leu Leu Leu Val Asp				
6273	6282	6291	6300	6309	6318
GAG UAC AUA GAA GGG CCG GUC CCA GAG GAC GCC UUU GCA AUC UUU GCA GAU CCA	Glu Tyr Ile Glu Gly Pro Val Pro Glu Asp Ala Phe Ala Ile Phe Ala Asp Pro				
6327	6336	6345	6354	6363	6372
CUU CAG AGU ACC GCU GUG AGC CAA UAC CGG GCG CAC UUC AUC AAA ACA UUG AGC	Leu Gln Ser Thr Ala Val Ser Gln Tyr Arg Ala His Phe Ile Lys Thr Leu Ser				
6381	6390	6399	6408	6417	6426
CAU CGC UUC GGC AAG UGU ACC GCU UCC CUU UUG AGA GAU UUG GGU UGG GAC GUG	His Arg Phe Gly Lys Cys Thr Ala Ser Leu Leu Arg Asp Leu Gly Trp Asp Val				
6435	6444	6453	6462	6471	6480
CAG GCA GAA GGU CAA GAU UCA GUU CAA AUU GCA GAU AUC UUC ACA AUU GAU CCU	Gln Ala Glu Gly Gln Asp Ser Val Gln Ile Ala Asp Ile Phe Thr Ile Asp Pro				
6489	6498	6507	6516	6525	6534
AGG AAU ACU AUU GUG UAC UUC GAG CCG GAA GUU GGA GAG UUA CUG AGG AGC CAC	Arg Asn Thr Ile Val Tyr Phe Glu Pro Glu Val Gly Glu Leu Leu Arg Ser His				

図III-3-7 PVS-H00 の全ゲノム配列 (次ページに続く)

6543            6552            6561            6570            6579            6588  
 GGU GUC GAG GCG AGC UGC AUU GGU GAG GUG CGC GGG GCC ACU UUC GAA CAC GUA  
 Gly Val Glu Ala Ser Cys Ile Gly Glu Val Arg Gly Ala Thr Phe Glu His Val

6597            6606            6615            6624            6633            6642  
 ACC UUC GUC ACU UCU GAG AAC GGU CCG CUG GUU GAU AAG GCU GCU GCU UUU CAG  
 Thr Phe Val Thr Ser Glu Asn Gly Pro Leu Val Asp Lys Ala Ala Ala Phe Gln

6651            6660            6669            6678            6687            6696  
 UGC UUG ACG AGG CAC ACC AAG AGC UUG CUC AUA UUG UGC CCU GAU GCC ACU UAC  
 Cys Leu Thr Arg His Thr Lys Ser Leu Leu Ile Leu Cys Pro Asp Ala Thr Tyr  
 ORF3→ Met Pro Leu Thr

6705            6714            6723            6732            6741            6750  
 ACC GCC GCC UAA CUA CAC AGG GUU AUA CAU UGC UGC AGC UUU GGG AGC GUC CCU  
 Thr Ala Ala \*  
 Pro Pro Pro Asn Tyr Thr Gly Leu Tyr Ile Ala Ala Ala Leu Gly Ala Ser Leu

6759            6768            6777            6786            6795            6804  
 UGC CGC CGU AGU AGC AUU GUU CAC UAG GAG UAC ACU ACC AAU UGU UGG GGA UUC  
 Ala Ala Val Val Ala Leu Phe Thr Arg Ser Thr Leu Pro Ile Val Gly Asp Ser

6813            6822            6831            6840            6849            6858  
 GCA GCA CAA CCU CCC ACA CGG GGG GCG GUA UCG CGA CGG CAC UAA AGC UAU UGA  
 Gln His Asn Leu Pro His Gly Gly Arg Tyr Arg Asp Gly Thr Lys Ala Ile Asp

6867            6876            6885            6894            6903            6912  
 UUA CUU UAA ACC CGC GAA GUU GAA UUC UGU UGA GCC UGG UAA UCA CUG GUA CGC  
 Tyr Phe Lys Pro Ala Lys Leu Asn Ser Val Glu Pro Gly Asn His Trp Tyr Ala

6921            6930            6939            6948            6957            6966  
 UCA ACC UUG GCU GCU AGU UUU ACU UCU AGU UGC GCU CAU CUG CUU AUC AGG GCG  
 Gln Pro Trp Leu Leu Val Leu Leu Leu Val Ala Leu Ile Cys Leu Ser Gly Arg

6975            6984            6993            7002            7011            7020  
 UCA UGC UCC AUG CUG UCC AAG GUG CAA CCG AGU GCA CAG UGC UUA AUG GUU UUC  
 His Ala Pro Cys Cys Pro Arg Cys Asn Arg Val His Ser Ala \*  
 ORF4→ Met Leu Ser Lys Val Gln Pro Ser Ala Gln Cys Leu Met Val Phe

7029            7038            7047            7056            7065            7074  
 AUC UUA GCA UUC GCG CUA AGU UGG UAU GUG CUC AGG CCA GGA AAU ACA AGC UGC  
 Ile Leu Ala Phe Ala Leu Ser Trp Tyr Val Leu Arg Pro Gly Asn Thr Ser Cys

図III-3-7 PVS-H00 の全ゲノム配列 (次ページに続く)

7083	7092	7101	7110	7119	7128
GUU CUA CUC AUC ACU GGG GAA UCA GUC CGG CUA GUC AAU UGC GAG CUC ACA AGA					
Val Leu Leu Ile Thr Gly Glu Ser Val Arg Leu Val Asn Cys Glu Leu Thr Arg					
7137	7146	7155	7164	7173	7182
GAU CUA GUG GAG GCC GUA GCA ACA UUG GGG CCG UUG AAG CAC CUU UAG GUU CAC					
Asp Leu Val Glu Ala Val Ala Thr Leu Gly Pro Leu Lys His Leu *					
7191	7200	7209	7218	7227	7236
AGG UAA GAG UUC GAA GAA ACU GUC CCA CAG AGA AAA UGC CGC CCA AAC CGG AUC					
			ORF5→	Met Pro Pro Lys Pro Asp Pro	
7245	7254	7263	7272	7281	7290
CAA CAA GCU CAG GAG AGA CAC CAC AAA CUA UAC CGC UUG UGC CGC CGC CCA GGA					
Thr Ser Ser Gly Glu Thr Pro Gln Thr Ile Pro Leu Val Pro Pro Pro Arg Asn					
7299	7308	7317	7326	7335	7344
ACG UAG AGG AGC AUA GAG UUG GCC CAA AUC AAG GGC ACG GGC AGA AUG AAG AGG					
Val Glu Glu His Arg Val Gly Pro Asn Gln Gly His Gly Gln Asn Glu Glu Ala					
7353	7362	7371	7380	7389	7398
CUA UGC UGG AGC AGA GGC UCA UCG GAU UGA UUG GAC UCA UGG CCU CGA AAA GGC					
Met Leu Glu Gln Arg Leu Ile Gly Leu Ile Gly Leu Met Ala Ser Lys Arg His					
7407	7416	7425	7434	7443	7452
ACA AUU CAA CAU UGA GCA ACA UCU CUU UCG AGA UAG GUA GGC CCU CGC UUG AGC					
Asn Ser Thr Leu Ser Asn Ile Ser Phe Glu Ile Gly Arg Pro Ser Leu Glu Pro					
7461	7470	7479	7488	7497	7506
CGA CCC CUG AAA UGC GGA GGA AUC CGG AGA ACC CAU ACU CGC GGU UUU CAA UAG					
Thr Pro Glu Met Arg Arg Asn Pro Glu Asn Pro Tyr Ser Arg Phe Ser Ile Asp					
7515	7524	7533	7542	7551	7560
AUG AGC UGU UCA AAA UGG AAA UCC GAU CUG UGU CCA ACA ACA UGG CGA ACA CCG					
Glu Leu Phe Lys Met Glu Ile Arg Ser Val Ser Asn Asn Met Ala Asn Thr Glu					
7569	7578	7587	7596	7605	7614
AGC AAA UGG CAC AAA UCA CUG CUG ACA UCG CUG GAC UUG GGG UAC CCA CUG AAC					
Gln Met Ala Gln Ile Thr Ala Asp Ile Ala Gly Leu Gly Val Pro Thr Glu His					

図III-3-7 PVS-H00 の全ゲノム配列 (次ページに続く)

7623            7632            7641            7650            7659            7668  
 AUG UUG CAG GGG UCA UAC UGA AAG UGG UGA UCA UGU GUG CAA GCG UGA GUA GUU  
 Val Ala Gly Val Ile Leu Lys Val Val Ile Met Cys Ala Ser Val Ser Ser Ser

7677            7686            7695            7704            7713            7722  
 CAG UUU AUC UAG AUC CAG CAG GGA CUG UGG AGU UCC CAA CAG GCG CAG UGC CCU  
 Val Tyr Leu Asp Pro Ala Gly Thr Val Glu Phe Pro Thr Gly Ala Val Pro Leu

7731            7740            7749            7758            7767            7776  
 UGG ACU CGA UCA UUG CAA UUA UGA AGA AUC GCG CGG GAU UGA GGA AAG UGU GCA  
 Asp Ser Ile Ile Ala Ile Met Lys Asn Arg Ala Gly Leu Arg Lys Val Cys Arg

7785            7794            7803            7812            7821            7830  
 GGC UGU AUG CUC CAG UUG UGU GGA AUU ACA UGC UAG UCC AGA AUA GGC CAC CUU  
 Leu Tyr Ala Pro Val Val Trp Asn Tyr Met Leu Val Gln Asn Arg Pro Pro Ser

7839            7848            7857            7866            7875            7884  
 CGG AUU GGC AGG CUA UGG GAU UCC AGU GGA AUG CAC GUU UCG CCG CAU UUG ACA  
 Asp Trp Gln Ala Met Gly Phe Gln Trp Asn Ala Arg Phe Ala Ala Phe Asp Thr

7893            7902            7911            7920            7929            7938  
 CAU UCG AUU AUG UGA CUA AUG GGG CUG CAA UCC AGC CCG UAG AGG GGC UCA UAC  
 Phe Asp Tyr Val Thr Asn Gly Ala Ala Ile Gln Pro Val Glu Gly Leu Ile Arg

7947            7956            7965            7974            7983            7992  
 GUA GGC CCA CGC CUG AGG AAA CAA UAG CUC ACA AUG CCC ACA AGA GUA UGG CAA  
 Arg Pro Thr Pro Glu Glu Thr Ile Ala His Asn Ala His Lys Ser Met Ala Ile

8001            8010            8019            8028            8037            8046  
 UUG ACA AGU CGA ACA GAA AUG AGC GGU UGG CCA ACA CUA AUG UUG AGU ACA CUG  
 Asp Lys Ser Asn Arg Asn Glu Arg Leu Ala Asn Thr Asn Val Glu Tyr Thr Gly

8055            8064            8073            8082            8091            8100  
 GAG GCA UGC UUG GCG CUG AGA UUG UGC GCA AUC ACC GUA AUG CGA UCA ACC AAU  
 Gly Met Leu Gly Ala Glu Ile Val Arg Asn His Arg Asn Ala Ile Asn Gln \*  
 ORF6→ Met

8109            8118            8127            8136            8145            8154  
 GAA GGC AGA CCG UUU AGC CAC GUU GUU AUU GUG UGU CCA UCG ACU GGG AUA UGU  
 Lys Ala Asp Arg Leu Ala Thr Leu Leu Leu Cys Val His Arg Leu Gly Tyr Val

図III-3-7 PVS-H00 の全ゲノム配列 (次ページに続く)

8163	8172	8181	8190	8199	8208
GGU	GCC	AGU	UGA	AAU	UUG
UGU	AAA	UAU	AAU	AAG	CCU
AAG	CGC	AGG	UCC	AAU	UUC
Val	Pro	Val	Glu	Ile	Cys
Val	Asn	Ile	Ile	Ser	Leu
Ser	Ala	Gly	Pro	Ile	Ser
8217	8226	8235	8244	8253	8262
UGG	GGG	UCG	UUC	CAC	UUA
CGC	UCG	UAA	GCG	GAG	GGC
CCG	CAG	CAU	UGG	GCG	AUG
Gly	Gly	Arg	Ser	Thr	Tyr
Ala	Arg	Lys	Arg	Arg	Ala
Arg	Ser	Ile	Gly	Arg	Cys
8271	8280	8289	8298	8307	8316
CUG	GCG	AUG	UUA	UCG	UGU
CUA	UCC	ACC	UAU	CUG	UAA
UUC	UAA	GUG	UGA	UAA	UAG
Trp	Arg	Cys	Tyr	Arg	Val
Tyr	Pro	Pro	Ile	Cys	Asn
Ser	Lys	Cys	Asp	Asn	Arg
8325	8334	8343	8352	8361	8370
AAC	GUG	CCG	UCC	AGG	CAU
UAG	UCA	AAA	UCA	UAA	AGU
AGU	GAC	UUU	CAU	UCG	GGG
Thr	Cys	Arg	Pro	Gly	Ile
Ser	Gln	Asn	His	Lys	Val
Val	Val	Thr	Phe	Ile	Arg
Gly					
8379	8388	8397	8406	8415	8424
UUG	GAG	UAA	CUG	AGG	UGA
UAC	CAC	CCA	UGG	UGC	AAA
GUC	AGA	GUU	UCG	CAU	AAA
Trp	Ser	Asn	*		
8433	8442	8451	8460	8469	8478
ACU	UAA	AUA	AUA	UAU	AAG
UGU	GCA	ACU	AUA	AAG	AAA
AUA	UGU	UUU	UAA	AAU	AUU
8485					
UUA	GCA	U	3'		

図III-3-7 PVS-H00 の全ゲノム配列

PVS-H00 のゲノム配列は塩基数、塩基配列、アミノ酸配列の順番で示す。

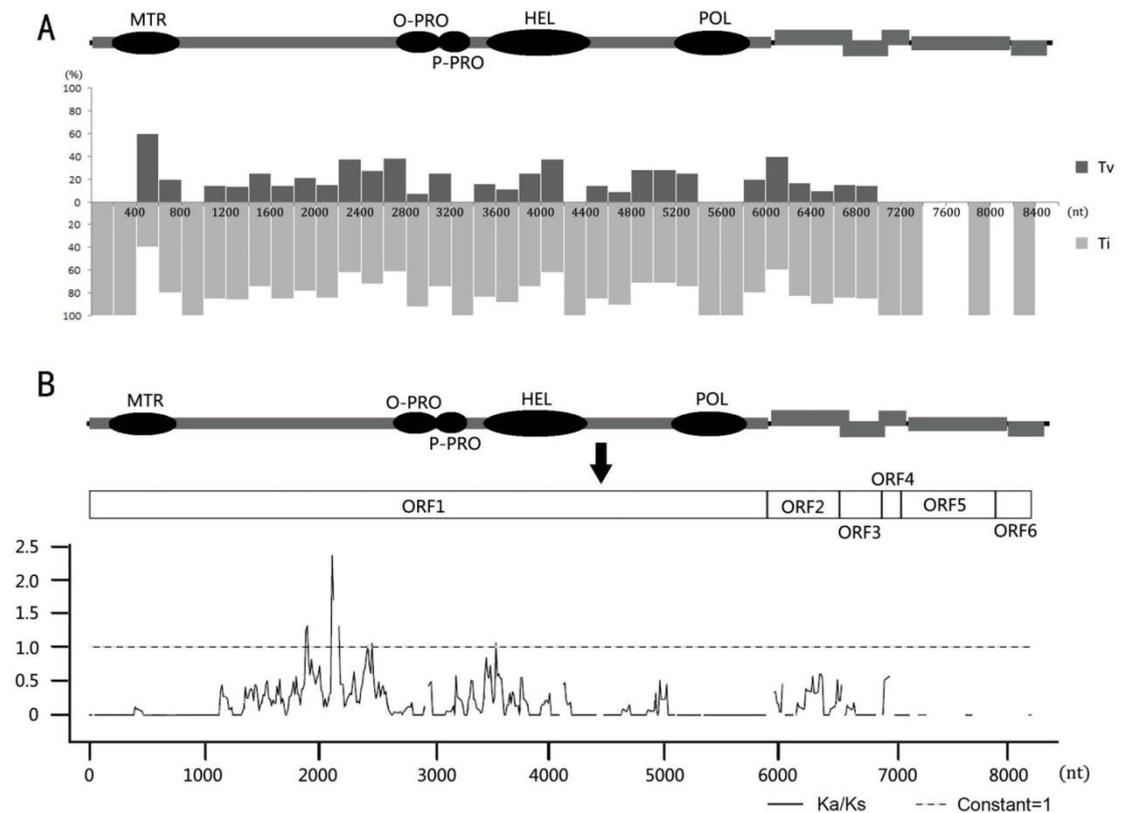
各 ORF の始まりは「→」で示し、終わりは「\*」で示す。

表III-3-4 : PVS-H00 と PVS-H95 のゲノム配列比較

		ORF1		ORF2		ORF3		ORF4		ORF5		ORF6		全配列	
		nt	(%)	nt	(%)	nt	(%)	nt	(%)	nt	(%)	nt	(%)	nt	(%)
塩基	Ti	260	81.0	22	81.5	12	85.7	4	100	3	100	1	100	302	81.6
	Tv	61	19.0	5	18.5	2	14.3	0	0	0	0	0	0	68	18.4
	Ti/Tv	4.26		4.40		6.00		-		-		-		4.44	
	S	232	72.3	18	66.7	13	92.9	3	75	2	66.7	0	0	268	72.4
	NS	89	27.7	9	33.3	1	7.1	1	25	1	33.3	1	100	102	27.6
	Ka/Ks	0.38		0.50		0.08		0.33		0.50		-		0.38	
	全体	321	5.4	27	3.9	14	4.3	4	2.0	3	0.3	1	0.4	370	4.4
		複製酵素		TGBp1		TGBp2		TGBp3		CP		CRP		全配列	
		aa	(%)	aa	(%)	aa	(%)	aa	(%)	aa	(%)	aa	(%)	aa	(%)
アミノ酸	0-3	22	27.5	2	28.6	0	0	0	0	0	0	1	100	25	27.5
	4	22	27.5	0	0	0	0	0	0	1	100	0	0	23	25.3
	5	36	45.0	5	71.4	1	100	1	100	0	0	0	0	43	47.3
	全体	80	4.1	7	3.1	1	0.9	1	1.5	1	0.3	1	1.1	91	3.3

Ti: トランジション ; Tv: トランスバージョン ; S: アミノ酸に影響しない塩基相違 ; NS: アミノ酸置換を伴う塩基相違 ;

アミノ酸置換の性質差は SG 値 (Feng *et al.*, 1985) に基づいてレベル 0-5 で表示し、0 はアミノ酸の性質が最も異なるものであるのに対し、5 はほぼ変わらないものである。

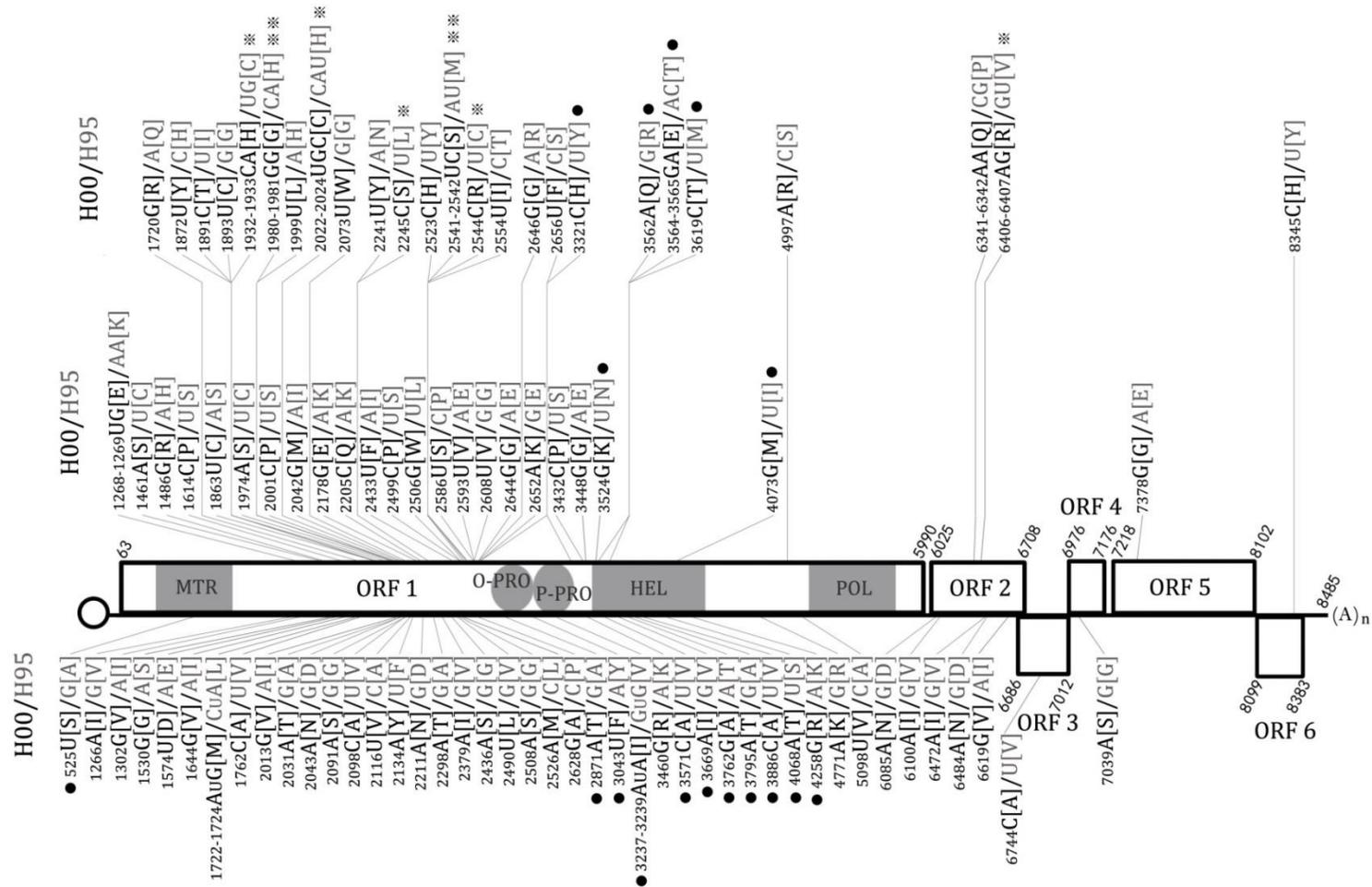


図III-3-8 PVS-H00 と PVS-H95 間のゲノム配列相違

A はトランジション (Ti ; 薄い灰色のバーで表示) とトランスバージョン (Tv ; 濃い灰色のバーで表示) の割合を示したものである。

B は PVS-H00 と PVS-H95 間の Ka/Ks 分析の結果である。PVS ゲノムの全 ORF コード領域を繋いだ配列を Ka/Ks 分析に用いた。Ka/Ks : 同義置換に対する非同義置換の割合 (黒い線で表示) は進化の選択方向を反映する。

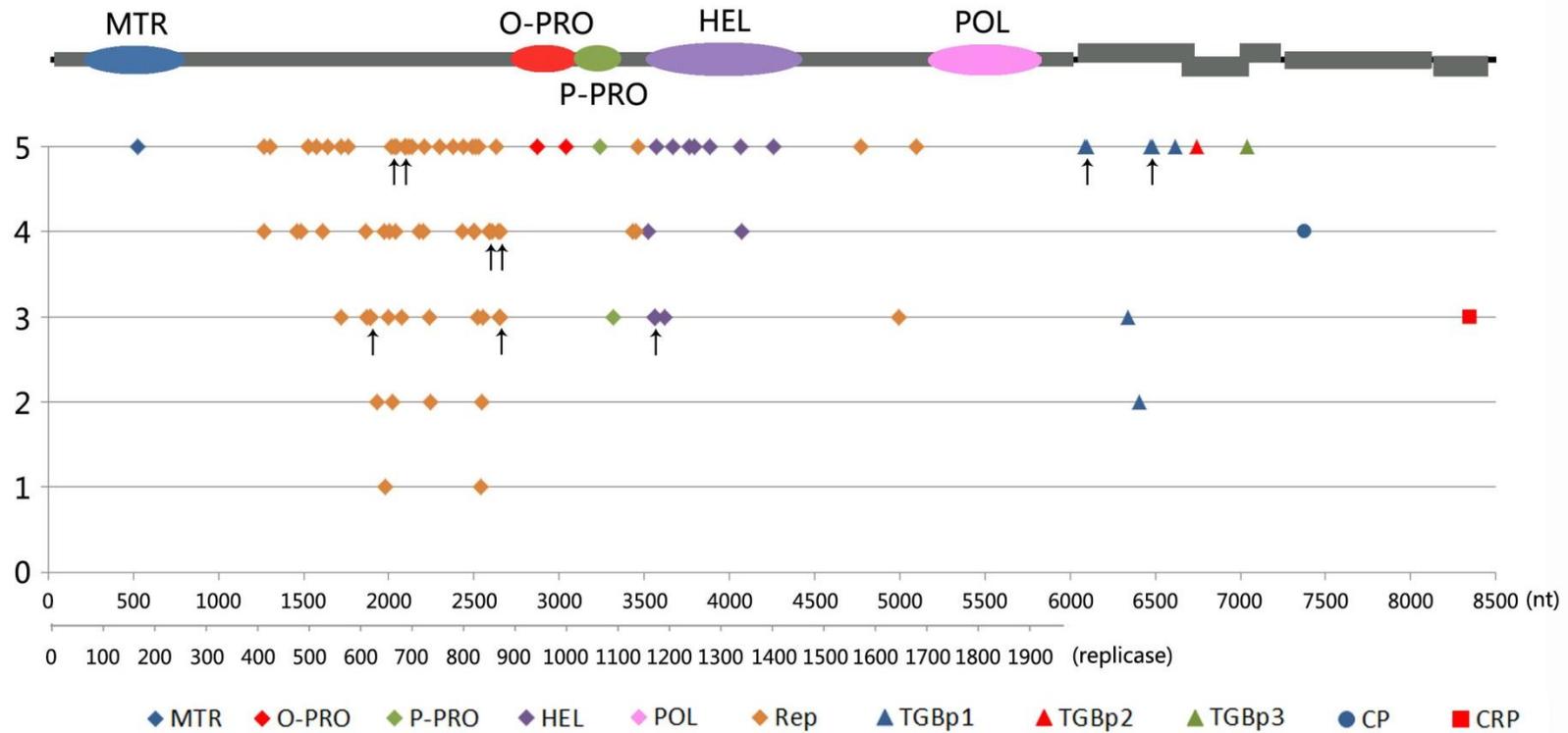
Ka/Ks 分析は LPB 法 (Pamilo and Bianchi, 1993; Li, 1993) を使用し、Window Length : 75 bp, Step Length: 12 bp に設定した。



図III-3-9 PVS-H00 と PVS-H95 間アミノ酸配列に影響する塩基相違分布図

PVS-H00 の配列は黒色、PVS-H95 の配列は灰色で表示した。複製酵素の機能領域は灰色の背景で示した。

アミノ酸相違の性質差は SG 値 0-5 で表示し、0 は性質が最も異なるものであり、5 はほぼ変わらないもので、分布図の上段、中段、下段それぞれ、SG 値 1-3 (SG 値 1 を※※、SG 値 2 を※で示す)、SG 値 4、SG 値 5 のアミノ酸相違がそれぞれ表示された。黒い丸を付けたアミノ酸は機能領域に分布したものである。



図III-3-10 PVS-H00 と PVS-H95 間のアミノ酸配列比較

各領域に分布したアミノ酸相違を異なる記号で表示している。複製酵素領域には菱形、TGB 領域には三角形、CP 領域には丸、CRP 領域には四角形で表示。黒い矢印は2つのアミノ酸相違が重なっていることを意味する。

アミノ酸置換の差は SG 値 0-5 で表示し、0 は性質が最も異なるものであり、5 はほぼ変わらないものである。

MTR : メチルトランスフェラーゼドメイン ; O-PRO : 卵巣腫瘍プロテアーゼ類似タンパク質ドメイン ; P-PRO : パパイン様システインプロテアーゼドメイン ; HEL : RNA ヘリカーゼドメイン ; POL : RNA 依存性 RNA ポリメラーゼドメイン ; Rep : 複製酵素。

**A**

	<b>MTR motif I</b>	
PVS-H95	YLSPYSGYPHSHPVCKTLENYLLYKVLPPLVNNTFYFVG I KEFKLNFLKRR I KQMSMIQA	120
PVS-H00	YLSPYSGYPHSHPVCKTLENYLLYKVLPPLVNNTFYFVG I KEFKLNFLKRR I KQMSMIQA	120
	*****	
	<b>MTR motif II</b>	
PVS-H95	INRYVSSADKLR YGNEFVIKFGAASPELKRHHGYALDPALRDLLPNIKRDSNLFFHDEM	180
PVS-H00	INRYVSSADKLR YGNEFVIKFGAASPELKRHHGYSLDPALRDLLPNIKRDSNLFFHDEM	180
	*****	
	<b>MTR motif III</b>	
PVS-H95	YWEKNQL IHFLEQCRPNTCLCTIYYPTEIFVGARRSLNPWAYEFEIKRDKLLFYPDGYRS	240
PVS-H00	YWEKNQL IHFLEQCRPNTCLCTIYYPTEIFVGARRSLNPWAYEFEIKRDKLLFYPDGYRS	240
	*****	
	<b>MTR motif III</b>	
PVS-H95	EGYEQPVNCGYLLRTRKILLRDGMTYSVDLVCSKFAHHLIAITKGDLITPTYRSFGPFEA	300
PVS-H00	EGYEQPVNCGYLLRTRKILLRDGMTYSVDLVCSKFAHHLIAITKGDLITPTYRSFGPFEA	300
	*****	

**B**

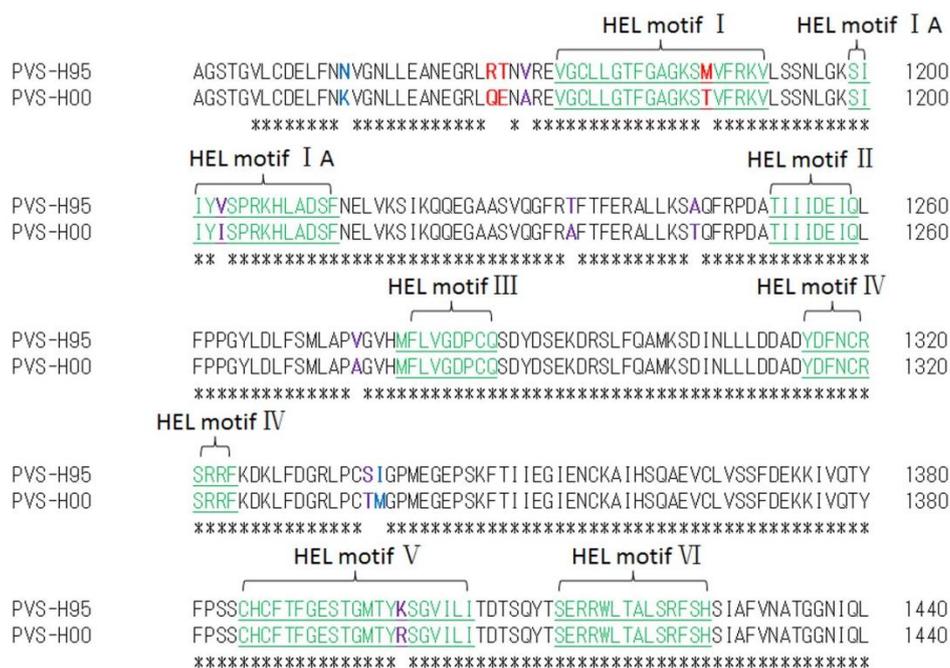
		<b>O-PRO motif I</b>		
PVS-H95	DPVENAAVGGIATPAPTAGAERSESNEDAHHTREGVAVHASGKCPAAK	FHRVPNAGGG	900	
PVS-H00	DSVVNAAVVG IATPAA TAGAGGSKFNEHDAHHTREGVAVHASGKCPAAK	FHRVPNAGGG	900	
		*****		
	<b>O-PRO motif I</b>	<b>O-PRO motif II</b>	<b>O-PRO motif III</b>	<b>O-PRO motif III</b>
PVS-H95	DCFWLAI SHFTGYSVQDMKQGLQOLEWE SDAFSAELALQLKPOAWA EEEA I IATSKOYRY			960
PVS-H00	DCFWLAI SHFTGYSVQDMKQGLQOLEWE SDAFSAELTLQLKPOAWA EEEA I IATSKOYRY			960
	*****			
	<b>O-PRO motif III</b>	<b>O-PRO motif IV</b>		
PVS-H95	RIVVL SADKEQTVIYSPKCEAVQSMVLYHAGAHYE AALPRNDCV L VAVASVLR RRRV E E V L			1020
PVS-H00	RIVVL SADKEQTVIYSPKCEAVQSMVLYHAGAHFE AALPRNDCV L VAVASVLR RRRV E E V L			1020
	*****			

**C**

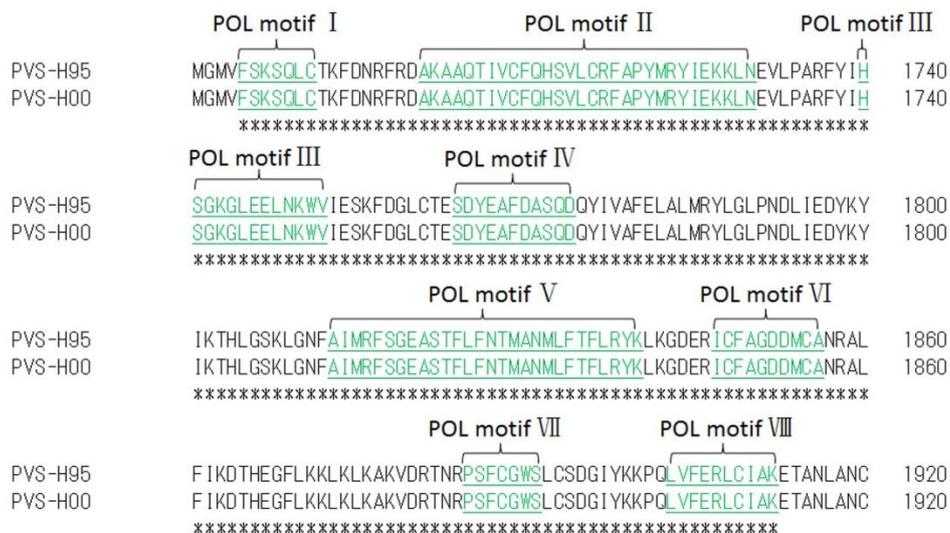
PVS-H95	RIVVL SADKEQTVIYSPKCEAVQSMVLYHAGAHYE AALPRNDCV L VAVASVLR RRRV E E V L	1020
PVS-H00	RIVVL SADKEQTVIYSPKCEAVQSMVLYHAGAHFE AALPRNDCV L VAVASVLR RRRV E E V L	1020
	*****	
PVS-H95	SILGAQLGNEFLQDVLK GEG INRDKLAVVFKLFD ICAHVHAEGEVFV INSEGRLHGTFNL	1080
PVS-H00	SILGAQLGNEFLQDVLK GEG INRDKLAVVFKLFD ICAHIHAEGEVFV INSEGRLHGTFNL	1080
	*****	
PVS-H95	SKDHI EYCKSKPMG I TKFTSVHDASCE I KQETLAMLKAMCTLLSYNPCELRAKVLADSLN	1140
PVS-H00	SKDHI EHCCKSKPMG I TKFTSVHDASCE I KQETLAMLKAMCTLLSYNP CGLRARVLADSLN	1140
	***** **	

図III-3-11 PVS-H95 と PVS-H00 間の複製酵素の機能領域におけるアミノ酸比較（次ページに続く）

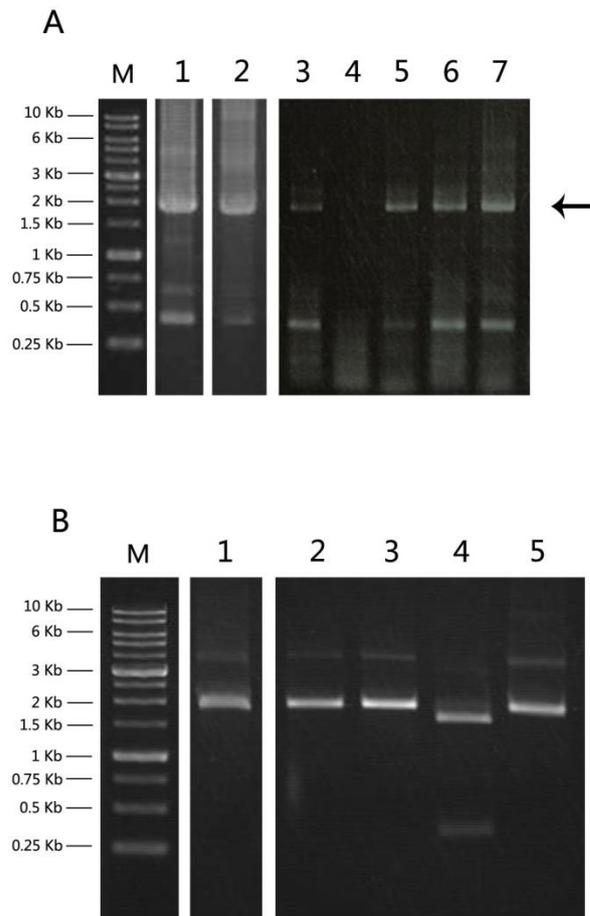
D



E



図III-3-11 PVS-H95 と PVS-H00 間の複製酵素の機能領域におけるアミノ酸比較  
 A から E は複製酵素の各機能領域：MTR (A)、O-PRO (B)、P-PRO (C)、HEL (D) と  
 POL (E) の配列を比較した。各機能領域の保存モチーフ配列は下線の緑色で表示した。  
 アミノ酸相違は性質差により異なる色で表示し、紫色、青色及び赤色はそれぞれ性質の近  
 い、やや近い、やや遠いアミノ酸相違を示す。一致するアミノ酸配列は「\*」で示す。



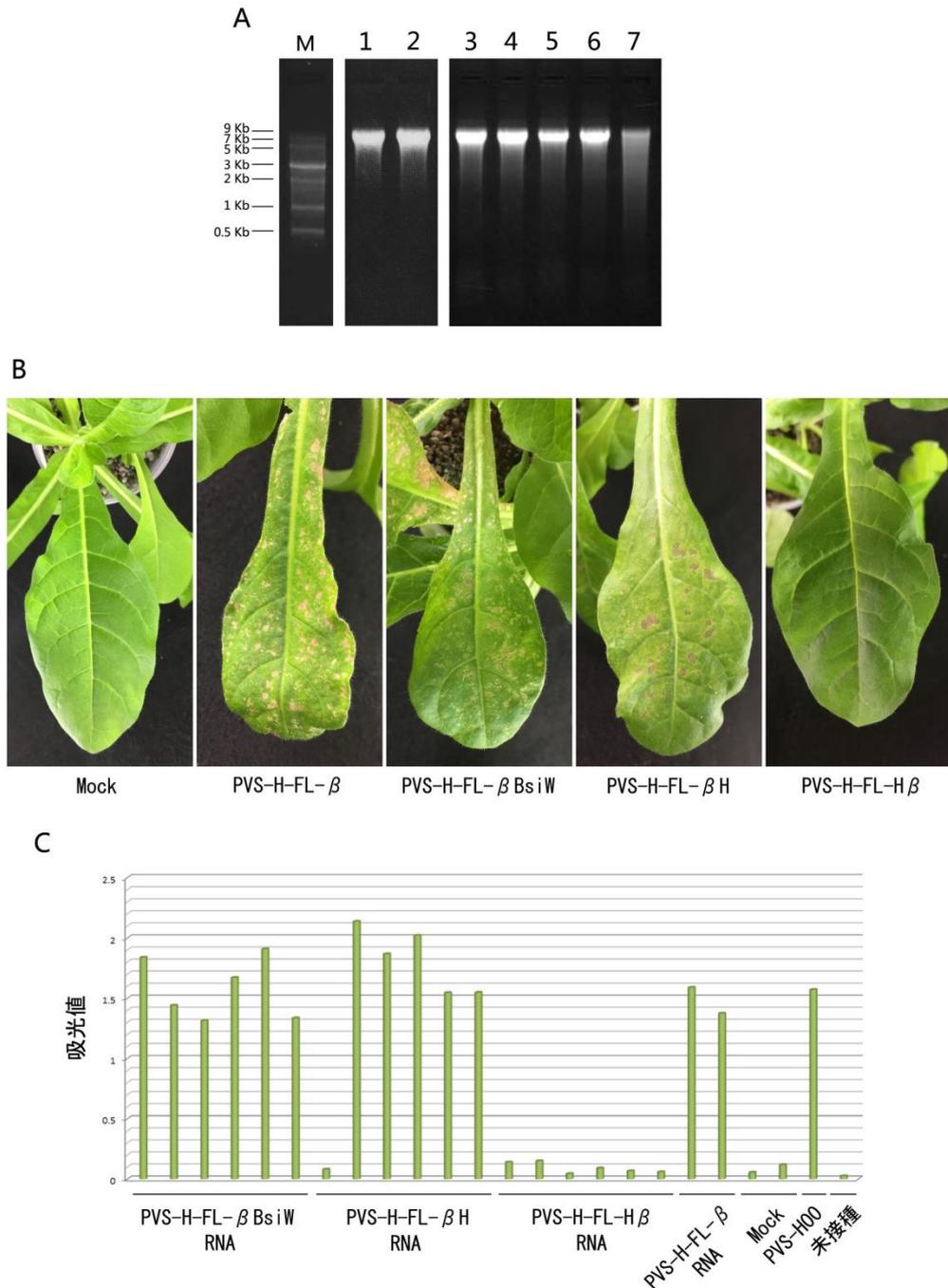
図III-3-12 PVS-H-FL- $\beta$  RNA による PVS-H-FL-D RNA の複製補完の確認

A はプライマーペア PVS-44P と PVS-49M を用いた RT-PCR 産物のアガロースゲル電気泳動像。標的の増幅バンドは黒い矢印で示した。M: 1 Kbp DNA marker (GeneDirex) ; 1-2 : 転写した PVS-H-FL- $\beta$  (レーン 1) と PVS-H-FL-D (レーン 2) を鋳型としたもの ; 3-4 : PVS-H-FL- $\beta$  (レーン 3) と PVS-H-FL-D (レーン 4) 単独接種した個体から抽出した総 RNA を鋳型としたもの ; 5-7 : PVS-H-FL- $\beta$  と PVS-H-FL-D を混合接種した個体から抽出した総 RNA を鋳型としたもの。

B は *Fba* I で処理した RT-PCR 産物のアガロースゲル電気泳動像。M: 1 Kbp DNA marker (GeneDirex) ; 1-3 : PVS-H-FL- $\beta$  と PVS-H-FL-D を混合接種した個体からの増幅産物 ; 4 : 転写した PVS-H-FL-D からの増幅産物 ; 5 : 転写した PVS-H-FL- $\beta$  からの増幅産物。

表III-3-5 : 構築した pPVS-H-FL- $\beta$  と pPVS-H-FL-H の組み換え体のまとめ

全長 cDNA クローン名	クローン番号	polyA	感染個体数/ 接種個体数	感染率(%)	発病日(dpi)
pPVS-H-FL- $\beta$ BsiW	1 + 6	-	6/6	100	13-15
	1	70	6/6	100	12-14
	6	68	2/2	100	12-13
pPVS-H-FL- $\beta$ H	3 + 13	-	5/6	83.3	17-21
	3	35	0/6	0	-
	13	67	6/6	100	13-14
pPVS-H-FL-H $\beta$	2 + 3	-	0/6	0	-
	2	59	0/6	0	-
	3	70	0/6	0	-
	4	66	0/4	0	-



図III-3-13 pPVS-H-FL-β と pPVS-H-FL-H 組み換え体からの転写 RNA の感染性

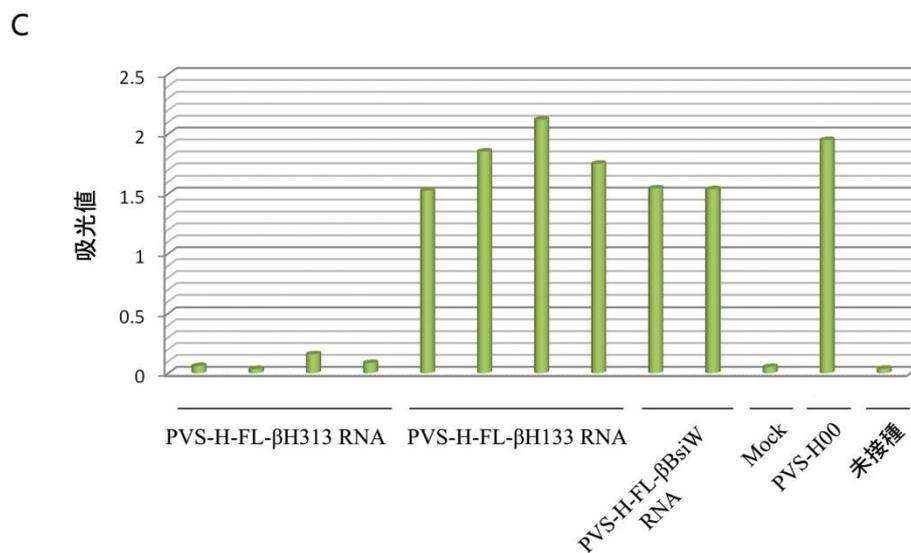
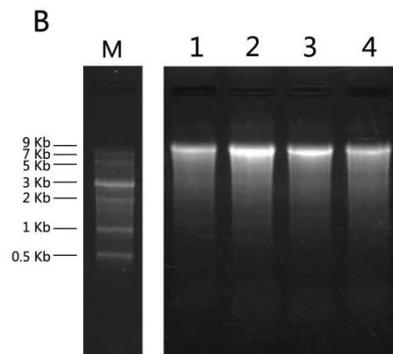
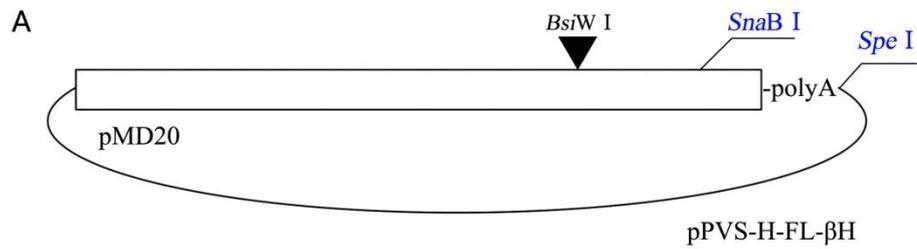
A は構築した組み換え体からの転写産物のホルムアルデヒド変性アガロースゲル電気泳動像。M: ssRNA marker (NEB) ; 1-2 : pPVS-H-FL-βBsiW クローン番号 1 と 6 からの転写産物 ; 3-4 : pPVS-H-FL-βH クローン番号 3 と 13 からの転写産物 ; 5-6 : pPVS-H-FL-Hβ クローン番号 2、3 と 4 からの転写産物。

B は左から右に順に、Mock、pPVS-H-FL-β、pPVS-H-FL-βBsiW、pPVS-H-FL-βH、pPVS-H-FL-Hβ それぞれ 2 クローンからの転写産物混合して接種した *N. occidentalis* 上葉 (接種後 25 日)。

C は組み換え体からの転写 RNA を接種した *N. occidentalis* の ELISA 検定。

表III-3-6: pPVS-H-FL-β と pPVS-H-FL-H の組み換え体からの転写産物接種 *N. occidentalis* における子孫配列の解析結果

接種源	解析用プライマー	塩基番号	塩基配列	アミノ酸	配列の由来
pPVS-H-FL-β <i>BsiW</i>	PVS-45M	5846	G	Ser	<i>BsiW</i> I
	PVS-45M	5846	G	Ser	<i>BsiW</i> I
	PVS-48P	6085	G	Asp	pPVS-H-FL-H
	PVS-48P	6100	G	Val	pPVS-H-FL-H
	PVS-48P	6341-6342	CG	Pro	pPVS-H-FL-H
	PVS-48P	6406-6407	GT	Val	pPVS-H-FL-H
	PVS-48P	6472	G	Val	pPVS-H-FL-H
pPVS-H-FL-βH	PVS-48P	6484	G	Asp	pPVS-H-FL-H
	PVS-48P	6619	A	Ile	pPVS-H-FL-H
	PVS-48P	6744	T	Val	pPVS-H-FL-H
	PVS-27P	7039	G	Gly	pPVS-H-FL-H
	PVS-27P	7378	A	Glu	pPVS-H-FL-H
	PVS-ORF6P	8345	T	Tyr	pPVS-H-FL-H

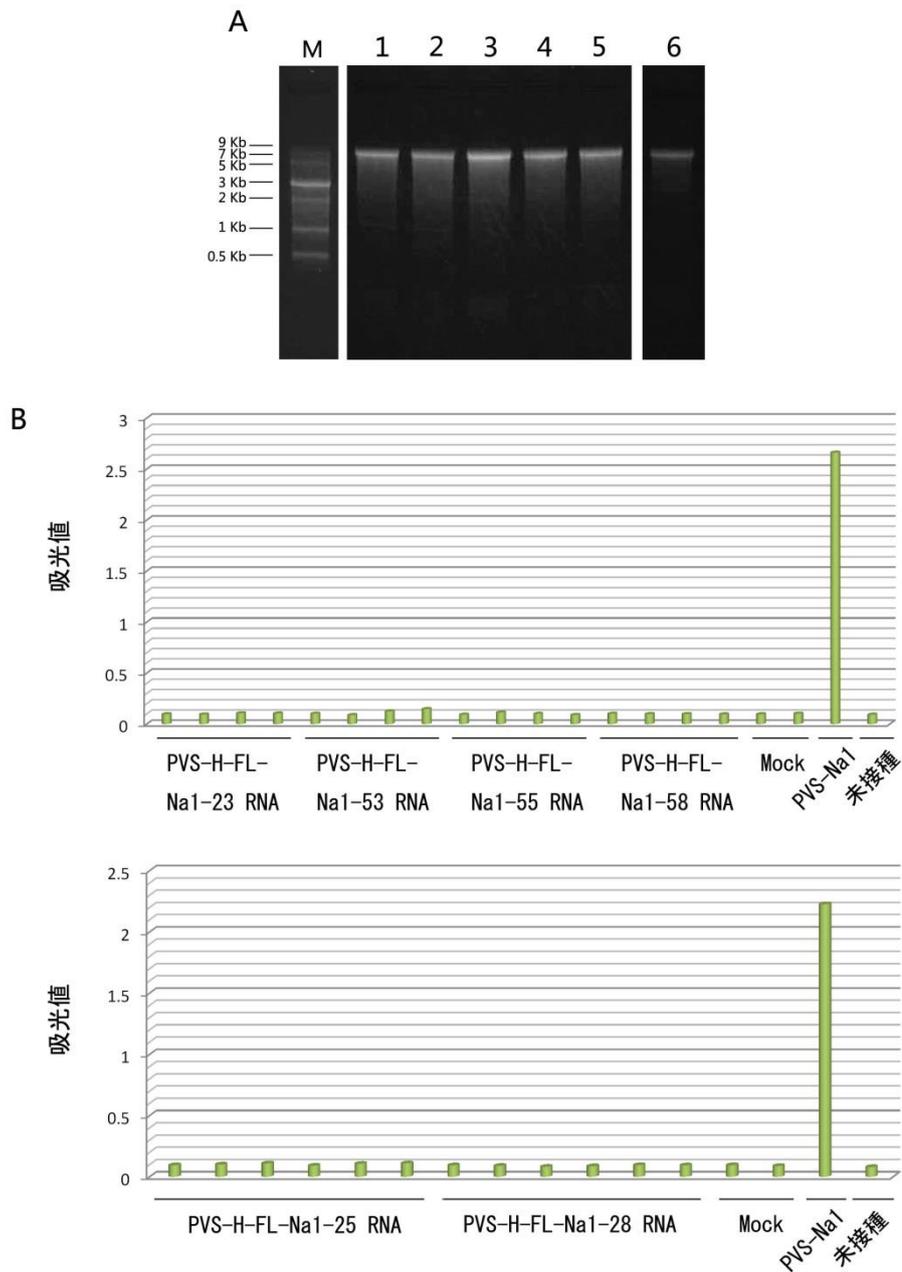


図III-3-14 pPVS-H-FL-βH の polyA 配列組み換え体からの転写 RNA の感染性

A は pPVS-H-FL-βH の polyA 配列組み換え体の構築図である。構築に用いた制限酵素のは青色で示す。

B は構築した組み換え体からの転写産物のホルムアルデヒド変性アガロースゲル電気泳動像。M: ssRNA marker (NEB) ; 1-2 : pPVS-H-FL-βH313 クローン番号 1 と 2 からの転写産物 ; 3-4 : pPVS-H-FL-βH133 クローン番号 1 と 3 からの転写産物。

C は組み換え体からの転写 RNA を接種した *N. occidentalis* の ELISA 検定。



図III-3-15 PVS-Na1 ゲノム全長 cDNA クローン pPVS-Na1-FL-A からの転写 RNA の感染性

A は構築した PVS-Na1 ゲノム全長 cDNA クローンからの転写産物のホルムアルデヒド変性アガロースゲル電気泳動像。M: ssRNA marker (NEB) ; 1-6 : pPVS-H-FL-Na1 クローン番号 23、53、25、55、58、28 からの転写産物。

B は PVS-Na1 ゲノム全長 cDNA クローンからの転写 RNA を接種した *N. occidentalis* の ELISA 検定結果。

#### 4. 考察

感染性クローンの構築はウイルスゲノムの機能やウイルスと宿主植物の相互作用などの研究において、重要な役割を果たす。しかし、構築した PVS ウイルスゲノムの全長クローンは必ずしも感染性を持つ訳ではなかった。複数の制限酵素サイトで PVS-H95 の 7~8 個の部分長 cDNA クローンを繋げて構築した全長 cDNA クローンをベースとして、これまでにいくつかの全長 cDNA クローンを構築したが、それらから転写した RNA には感染性が認められなかった (図III-3-1 と図III-3-2)。一方、PVS-H00 を鋳型とし、主に 2 つの大きい RT-PCR 増幅産物を繋いで構築した全長 cDNA クローンから転写した RNA には感染性が認められた (図III-3-3 と図III-3-4)。類似な現象はコムギモザイクウイルス (*Chinese wheat mosaic virus*, genus *Furovirus*) 感染性クローンの構築でも報告され、single-step PCR を用いて一気にウイルスの全ゲノム配列を増幅すること以外の方法で構築された全長クローンには感染性が認められなかった (Yang *et al.*, 2016)。これらのことから、ゲノム全長クローンを構築する際に用いた部分長 cDNA クローンの由来が単一であればあるほど、感染性を持つ全長クローンになる可能性が大きいということが示唆された。

pPVS-H-FL- $\beta$  から転写した RNA を接種した *N. occidentalis* では、PVS-H00 を接種した個体と同様に上葉でモザイクや壊疽斑などの病徴が見られ、感染植物内のウイルスゲノム RNA 及び CP の蓄積レベルも同程度であった (図III-3-3 と図III-3-4-B,C)。転写 RNA を接種した *N. occidentalis* の発病時期が PVS-H00 を接種した個体より約 5 日遅れていたが、PVS 転写 RNA を感染させた *N. occidentalis* の磨砕液を接種源として使用した場合、PVS-H00 接種個体との発病時期が一致した (図III-3-4-D~G)。このことから、発病時期の差は接種源がウイルス粒子であるかウイルスゲノム RNA であるかの違いによるものであり、pPVS-H-FL- $\beta$  から転写した RNA と PVS-H00 のゲノム RNA の病原性には差がないと考えられた。また、転写 RNA の接種量は *N. occidentalis* での発病時期に影響するが、病徴には影響しないことが示唆された (表III-3-2 と図III-3-5)。

本研究で構築した安定した高感染性を有する PVS 全長 cDNA クローン pPVS-H-FL- $\beta$  は PVS で報告された最初の感染性クローンである。pPVS-H-FL- $\beta$  のプロモーターを T7 から 35S に入れ替え、p35S-PVS-H-FL- $\beta$  を構築したが、その感染率は pPVS-H-FL- $\beta$  と比べて 25%未滿に減少した (図III-3-6)。また、線状化した p35S-PVS-H-FL- $\beta$  の感染率は環状プラスミドの p35S-PVS-H-FL- $\beta$  よりも高いことが確認された。p35S-PVS-H-FL- $\beta$  の感染では、

接種 DNA が宿主細胞核内に導入され、そこから *in vivo* でウイルス RNA が転写される必要があるため、直接転写 RNA を接種した場合より効率が低いことが考えられた。以前本研究室で構築された PVM の感染性クローンも、トマトに接種した場合、*in vitro* 転写 RNA の感染率が 35S プロモーター下の cDNA より高いことが報告された（鈴木, 2010）。このことから、PVS の感染性クローン接種実験には、*in vitro* で転写したウイルス RNA が接種源として適していると考えられた。

PVS-H00 は PVS-H95 と同様にポリ A 鎖を除いて計 8485 塩基で、両者の間には計 370 塩基相違（4.4%）と計 91 アミノ酸相違（3.3%）が見られた。塩基相違率が最も高いのは ORF1（複製酵素）の 5.4%、最も低いのは ORF5（CP）の 0.3%、また、アミノ酸相違率が最も高いのも複製酵素で 4.1%、最も低いのも CP の 0.3%であり、非翻訳領域および ORF 間のオーバーラッピング領域では塩基相違が見られなかった（表III-3-4）。PVS-H95 は *N. occidentalis* に継代し続け、2000 年に *C. quinoa* に接種して単病斑分離を 3 回繰り返して PVS-H00 が分離された。その分離前の PVS-H95 感染乾燥葉を用い、PVS-H95 の部分配列を RT-PCR 産物のダイレクトシーケンスによって解析した結果、多くの箇所で二種類の波形の重なりが見られ、それらのほとんどは PVS-H00 と PVS-H95 に見られた塩基相違と一致した（表III-4-1 を参照）。一方、2000 年の単病斑分離より後にシリカゲル保存された PVS-H00 感染乾燥葉を用い、PVS-H00 の部分配列をダイレクトシーケンスによって解析した結果、二重波形がほぼ見られなかった（表III-4-1 を参照）。これらのことから、PVS-H95 は単一のゲノム配列からなる集団ではなく、複数のゲノム配列が混在している集団と考えられ、PVS-H00 は単病斑分離のボトルネック効果によって、比較的単一のゲノム配列を持つ集団であることが示唆された。

PVS-H95 と PVS-H00 のアミノ酸相違の分布を調べた結果、計 91 アミノ酸相違の分布には偏りが見られ、約 90%のアミノ酸相違は複製酵素に存在し、更に複製酵素の中でも、71.3%のアミノ酸相違は複製酵素 N 端側の MTR と O-PRO 領域の間に集中して分布していた（図III-3-9 と図III-3-10）。また、PVS-H00 と PVS-H95 のウイルスゲノム全体の Ka/Ks 値は約 0.38 で強いネガティブ選択を受けていたが、複製酵素の HEL 領域の N 末端はニュートラルな選択、複製酵素の MTR と O-PRO 間の領域は強いポジティブ選択を受けていることがわかった（図III-3-8-B）。コロンビア産 PVS 株である PVS-RVC と PVS-Dic2 の Ka/Ks 分析結果からも、PVS ゲノム配列全体は強いネガティブ選択を受けていることが示唆され、複製酵素の HEL 領域の N 末端は強いポジティブ選択、複製酵素の MTR と O-PRO

間の領域はニュートラルな選択を受けていることが報告された (Vallejo *et al.*, 2016)。これらのことから、複製酵素の MTR と O-PRO 間は多様性領域であり、この領域はアミノ酸の変化を積極的に受け入れていると考えられた。一方、PVS-H00 と PVS-H95 で高く保存された 5'末端、3'末端の非翻訳領域、ORF2~ORF4 のオーバーラッピング領域、複製酵素の POL 領域は強いネガティブ選択を受け、有害変異が排除されていることが考えられた。

PVS-H00 と PVS-H95 を鋳型として別々に構築した感染性を持つ pPVS-H-FL- $\beta$  と、感染性を持たない pPVS-H-FL-H の全長配列に計 91 アミノ酸相違が存在し、これらのアミノ酸相違が感染性に影響を与えたと推定された。PVS-H95 と PVS-H00 のアミノ酸相違の性質差を調べた結果、計 91 アミノ酸相違の 47%は性質が近いものであった (図III-3-10)。アミノ酸相違率が 4.1%と最も高かった複製酵素の 5 つの機能領域を詳しく調べた結果、MTR 領域に 1 ヶ所、O-PRO と P-PRO 領域に各 2 ヶ所、HEL 領域に 12 ヶ所のアミノ酸相違が見られ、POL 領域の配列は完全に一致した。3 つの MTR 保存モチーフは一致した一方、O-PRO の保存モチーフには計 2 ヶ所 (A937T と Y994F) のアミノ酸相違が見られたが、2 ヶ所とも性質の近いものであった。また、HEL の保存モチーフにも計 3 ヶ所 (M1186T、V1203I と K1399R) のアミノ酸相違が見られたが、うち 2 ヶ所が性質の近いものであった (図III-3-11)。アミノ酸相違の箇所と性質差を考慮すると、複製酵素で生じていたアミノ酸相違のうち全長クローンの感染性に影響を与える可能性が高いものは、性質がやや遠い P-PRO の 1 ヶ所 (Y1087H)、と HEL 保存モチーフ I の 1 ヶ所 (M1186T) である可能性が特に考えられた。しかし、TGBp1 に生じていた性質のやや遠い 1 ヶ所 (P106Q) と性質の遠い 1 ヶ所 (V128R)、及び CRP に生じていた性質のやや遠い 1 ヶ所 (Y83H) も全長クローンの感染性に影響を与える可能性が高いと考えられた。

そこで、全長クローンの感染性に影響を与える配列を検討するため、pPVS-H-FL- $\beta$  と pPVS-H-FL-H の ORF1 領域の組み換え体を構築した。pPVS-H-FL- $\beta$  に BsiW I 認識サイトを導入した pPVS-H-FL- $\beta$ BsiW と、pPVS-H-FL-H の ORF1 領域を pPVS-H-FL- $\beta$  に組み換えた pPVS-H-FL- $\beta$ H から転写した RNA を接種した *N. occidentalis* の上葉では、pPVS-H-FL- $\beta$  から転写した RNA を接種した時と同様のモザイクや壊疽斑が見られ、ELISA でもウイルス CP の蓄積を確認できた (図III-3-13)。pPVS-H-FL- $\beta$ BsiW と pPVS-H-FL- $\beta$ H からの転写 RNA はそれぞれ 100%と 83.3%以上の感染率を示したが、pPVS-H-FL- $\beta$  の ORF1 領域を pPVS-H-FL-H に組み換えた pPVS-H-FL-H $\beta$  から転写した RNA には感染性が認められなか

った。pPVS-H-FL-βBsiW、pPVS-H-FL-βH 接種個体から抽出した PVS 子孫配列を調べた結果、BsiW I 認識サイト、及び組み換えた pPVS-H-FL-H 由来の配列が維持されていることが確認できた (表III-3-6)。これらのことから、全長クローンの感染性に影響を与えるのは ORF1 (複製酵素) の配列で、ORF1 の下流に存在する 11 個のアミノ酸相違は PVS の感染性に影響を与えないことが示唆された。

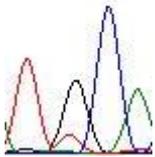
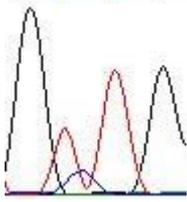
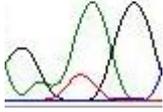
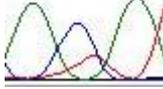
pPVS-H-FL-βH のクローン番号 3 と 13 からの転写 RNA を *N. occidentalis* に混合接種した場合の発病時期が約 4 日遅れたが、pPVS-H-FL-βH のクローン番号 13 からの転写 RNA を単独接種した場合の発病時期や病徴の激しさは、pPVS-H-FL-β からの転写 RNA を接種した場合と同様であった。しかし、pPVS-H-FL-βH のクローン番号 3 由来の転写 RNA を単独接種した個体では感染が成立しなかった (表III-3-5)。従って、混合接種した場合の発病の遅れは、転写 RNA 接種量の差によって起きたと考えられた。一方、pPVS-H-FL-βH クローン番号 3 に感染性が無かった要因としてクローンを構築する過程で行った PCR によって polyA 配列が 35 個と短くなっていたことが考えられたが、pPVS-H-FL-βH クローン番号 3 にクローン番号 13 の長い polyA 配列 (67 個) を入れ換え構築した pPVS-H-FL-βH313 に感染性が無く、逆に pPVS-H-FL-βH クローン番号 13 にクローン番号 3 の短い polyA 配列 (35 個) を入れ換え構築した pPVS-H-FL-βH133 が感染性を示した (図III-3-14) ことから、polyA 配列の長さは pPVS-H-FL-βH クローン番号 3 の感染性に影響しないことが示唆された。それらのことから、pPVS-H-FL-βH クローン番号 3 を構築する過程で、PCR によって感染性に影響を与える変異配列が持ち込まれた可能性が高かったと考えられる。

感染性を持つ pPVS-H-FL-β と感染性を持たない pPVS-H-FL-D 由来の転写 RNA を *N. occidentalis* に共接種した場合、子孫配列には pPVS-H-FL-β 由来と同じ配列のみが検出された (図III-3-12)。このことから、pPVS-H-FL-β からの転写 RNA は pPVS-H-FL-D からの転写 RNA の複製機能を補完することができず、PVS の複製は *in cis* で行われていることが考えられた。

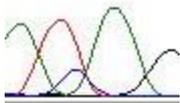
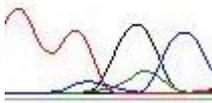
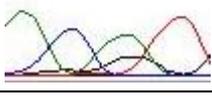
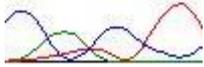
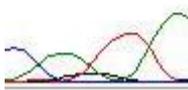
また同様に PVS-Na1 株を鋳型とし、2 つの部分長 cDNA クローンを繋ぐことによって全長 cDNA クローン pPVS-Na1-FL-A を構築した。5'端側 2 クローンと 3'端側 3 クローンの組み合わせで 6 種の候補全長クローンが得られ、各クローンから転写してキャップを付加した RNA を計 28 個体の *N. occidentalis* に接種したが、6 種のクローン全てで感染性が認められなかった (図III-3-15)。6 種の Na1 ゲノム全長クローンを構築する際は、単一ゲ

ノム由来のクローンが望ましいので、5'端側と3'端側の部分長 cDNA クローンをできるたび組み合わせて試したが、感染性が認められなかった。その要因として、RT-PCR で部分長 cDNA クローンを増幅した際に、感染性に影響する変異を持ち込んだ可能性と、5'端側と3'端側の cDNA クローンがそれぞれ異なるゲノム RNA 集団由来で、キメラクローンを構築した可能性が考えられた。また、polyA 配列の長さが pPVS-Na1-FL-A の感染性に影響を与えた可能性も考えられた。pPVS-Na1-FL-A の polyA は 27 個で、*in vitro* 転写型の感染性クローンである PVX の pTXS の 24 個 (Chapman *et al.*, 1992) よりは多いが、BBScV の pBS.T4 の 50 個 (Lawrence and Hillman, 1994)、PVM の pT7PVM-FL の 36 個 (鈴木, 2010) よりは少なかった。感染性が認められた pPVS-H-FL- $\beta$  の polyA は 66 個、pPVS-H-FL- $\beta$ H133 の polyA は 35 個であることから、PVS の感染性クローンには、27 個より長い polyA 配列が必要であるという可能性も考えられた。

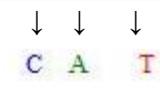
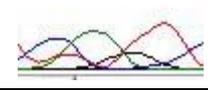
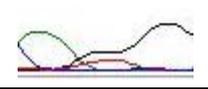
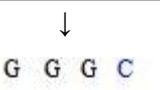
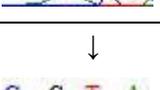
表III-4-1：ダイレクトシーケンシングで解析した H95 株の 2 塩基の重なり（次ページに続く）

塩基番号	塩基置換 H95/H00	アミノ酸置換 H95/H00	H95 の波形図
			↓ T G C A
525	G / U	Ala / Ser	
			↓ C A C
1720	A / G	Gln / Arg	
			↓ G T T G
1762	U / C	Val / Ala	
			↓ G A G
1863	A / U	Ser / CYS	
			↓ A C A
1872	C / U	His / Tyr	

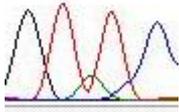
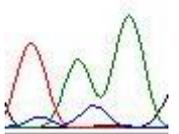
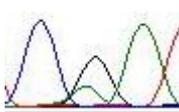
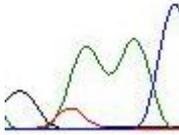
表III-4-1：ダイレクトシーケンシングで解析した H95 株の 2 塩基の重なり（次ページに続く）

塩基番号	塩基置換 H95/H00	アミノ酸置換 H95/H00	H95 の波形図
			↓ A T A G
1891	U / C	Ile / Thr	
			↓ ↓ T T G C
1932-1933	UG / CA	Cys / His	
			↓ ↓ A C A T
1980-1981	CA / GG	His / Gly	
			↓ C A C T
1999	A / U	His / Leu	
			↓ C A T A
2013	A / G	Ile / Val	

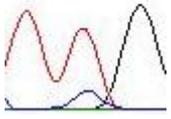
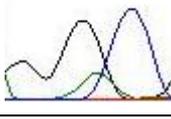
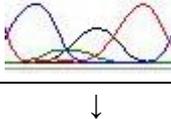
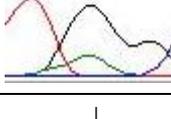
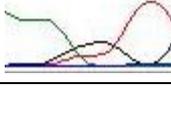
表III-4-1：ダイレクトシーケンシングで解析した H95 株の 2 塩基の重なり（次ページに続く）

塩基番号	塩基置換 H95/H00	アミノ酸置換 H95/H00	H95 の波形図
			
2022-2024	CAU / UGC	His / Cys	
			
2073	G / U	Gly / Trp	
			
2091	G / A	Gly / Ser	
			
2098	U / C	Val / Ala	
			
2116	C / U	Ala / Val	

表III-4-1：ダイレクトシーケンシングで解析した H95 株の 2 塩基の重なり（次ページに続く）

塩基番号	塩基置換 H95/H00	アミノ酸置換 H95/H00	H95 の波形図
			↓ G T T C
2134	U / A	Phe / Tyr	
			↓ C A A G
2178	A / G	Lys / Glu	
			↓ T A A
2205	A / C	Lys / Gln	
			↓ C G A T
2211	G / A	Asp / Asn	
			↓ G A A C
2241	A / U	Asn / Tyr	

表III-4-1：ダイレクトシーケンシングで解析した H95 株の 2 塩基の重なり

塩基番号	塩基置換 H95/H00	アミノ酸置換 H95/H00	H95 の波形図
			↓ T T G
2245	U / C	Leu / Ser	
			↓ G G C
2298	G / A	Ala / Thr	
			↓ C G T
2379	G / A	Val / Ile	
			↓ T G G
2436	G / A	Gly / Ser	
			↓ A G T
2490	G / U	Val / Leu	

## 第IV章

# ジャガイモ S ウイルス普通系統およびアンデス系統の全ゲノム配列と系統解析

### 1. 目的

研究室の先行研究によって、日本で PVS<sup>M</sup>として報告された分離株（堀尾, 1976）PVS-M 及び別種ウイルスとして報告された SoPLV の K-1 株（小林ら, 1985）はそれぞれゲノムの 3'末端側 2991 と 1661 塩基が既に解析されていた。本研究で 2 株の未解析配列を解析し、全ゲノム配列を決定する。また、それら 2 株及び本研究第III章で全ゲノム配列を解析した PVS-H00 を含む日本産 5 分離株と世界各国 24 分離株で全ゲノム配列に基づいて系統解析を行い、PVS 系統の分子性状を分析する。

### 2. 材料と方法

#### 2.1. ウイルス株

本研究で用いたウイルスはジャガイモにモザイク症状が現れる PVS<sup>M</sup>として報告された PVS-M 及び別種ウイルスとして報告されたジャガイモ南部潜在ウイルス（southern potato latent virus; SoPLV）の K-1 株の合計 2 分離株である。PVS-M は北海道十勝地方で栽培されたジャガイモ（品種：男爵薯）の PVS 感染個体から分離し、農林水産省種苗管理センター北海道中央農場より分譲されたもので、ORF5 の下流配列は既に決定済みで、普通系統の配列に類似している（古田ら, 1997）。SoPLV K-1 株は農林水産省横浜植物防疫所より分譲されたもので、ゲノム 3'末端領域約 1.6 kb の配列は既に決定済みで、PVS アンデス系統と推測された（畑谷ら, 2003）。

#### 2.2. PVS-M 及び SoPLV K-1 全ゲノム配列の解析

PVS-M ORF1 の 3'末端側から下流の配列は既に解析済みで、本研究では残りの約 5500 塩基の配列を解析した。PVS-M 全ゲノム配列解析に用いたプライマーは図IV-2-1 に示したように、ゲノム未知部分の配列は黒い矢印で示すプライマーで 3 つの大きな cDNA 断片を RT-PCR で増幅し、ゲノムの 5'末端には 5'RACE（Rapid Amplification of cDNA End）で増幅した。

SoPLV K-1 ORF3 の 3'末端側から下流の配列は既に解析済みで、本研究では残りの約 6900 塩基の配列を解析した。SoPLV K-1 全ゲノム配列解析に用いたプライマーは図IV-2-2 に示したように、ゲノム未知部分の配列は黒色と赤色で示すプライマーで 5 つの cDNA 断片を RT-PCR で増幅し、ゲノムの 5'末端は 5'RACE で増幅した。

#### 2.2-1. RT-PCR

RNA 試料は 1996 年に PVS-M ウイルス粒子から抽出した RNA (78.5 ng / $\mu$ l) を 2.5  $\mu$ l または 2008 年に SoPLV K-1 ウイルス粒子から抽出した RNA (1.8  $\mu$ g / $\mu$ l) を 0.5  $\mu$ l 用いた。逆転写反応は 20  $\mu$ l の反応系で行った。RNA 試料に 12.5  $\mu$ M ランダムプライマーを 2  $\mu$ l、2.5 mM dNTP mix を 8  $\mu$ l、滅菌水を加えて混合し、65 °C で 10 分間反応させ、氷上で 2 分間静置した。5 $\times$ ReverTra Ace 緩衝液 (Toyobo) を 4  $\mu$ l、ReverTra Ace (Toyobo ; 100 U/ $\mu$ l) を 1  $\mu$ l 加えて混合し、42 °C で 60 分間反応後、99 °C で 5 分間加熱し、酵素を失活化した。

逆転写産物を鋳型として、PVS-M の場合では 3 組のプライマーペア : PVS-7P と PVS-40M、PVS-44P と PVS-37M、PVS-37P と PVS-11M、SoPLV K-1 の場合では 5 組のプライマーペア : PVS-7P と PVS-55M、PVS-56P と PVS-57M、PVS-58P と PVS-59M、PVS-60P と PVS-20M、PVS-2P と PVS-53M を用い、50  $\mu$ l の反応系で PCR を行った。反応系を以下に示す : 10 $\times$ KOD Plus 緩衝液 (Toyobo) を 5  $\mu$ l、25mM MgSO<sub>4</sub> を 2  $\mu$ l、2mM dNTPs mix を 5  $\mu$ l、10  $\mu$ M プラス鎖プライマーを 1.5  $\mu$ l、10  $\mu$ M マイナス鎖プライマーを 1.5  $\mu$ l、KOD Plus (Toyobo ; 1 U/ $\mu$ l) を 1  $\mu$ l 加えて混合し、滅菌水で 50  $\mu$ l まで調整した。サイクル反応は 94 °C で 2 分間後、94 °C で 15 秒間、55 °C または 50 °C で 30 秒間、68 °C で 3 分間を 30 サイクル行った後、68 °C で 3 分間延長した。使用するプライマーペアによって増幅した DNA 断片を表IV-2-1 にまとめた。

#### 2.2-2. 5'RACE

5'RACE は FirstChoice RLM-RACE Kit (Ambion) を用い、説明書のプロトコールに従って行った。1996 年に PVS-M ウイルス粒子から抽出した RNA (78.5 ng / $\mu$ l) 6.4  $\mu$ l (0.5  $\mu$ g) または 2008 年に SoPLV K-1 ウイルス粒子から抽出した RNA (1.8  $\mu$ g / $\mu$ l) 0.3  $\mu$ l (0.5  $\mu$ g) を用い、CIP (calf intestinal phosphatase) を 2  $\mu$ l、10 $\times$ CIP 緩衝液を 2  $\mu$ l 加えて混合し、20  $\mu$ l の反応系で 37 °C にて 1 時間反応し、CIP によりキャップを持たない RNA の 5'末端リン酸基を除去した。反応液に Ammonium Acetate Solution を 15  $\mu$ l、滅菌水を 115  $\mu$ l、酸性フ

エノールを 150  $\mu$ l 加えて混合し、室温下 14,000 rpm で 5 分間遠心分離し、上清を新しい遠心チューブに移した。クロロホルムを 150  $\mu$ l 加えて混合した後、室温下 14,000 rpm で 5 分間遠心分離し、回収した上清に 2-プロパノールを 150  $\mu$ l 加えて混合し、氷上で 10 分間静置した。14,000 rpm で 20 分間遠心分離し、得られた沈殿を 70 %エタノールで洗浄し、乾燥後、滅菌水 11  $\mu$ l に溶解した。

CIP 処理サンプル 5  $\mu$ l を用い、TAP (tobacco acid pyrophosphatase) を 2  $\mu$ l、10 $\times$ TAP 緩衝液を 1  $\mu$ l 加えて混合し、10  $\mu$ l の反応系で 37  $^{\circ}$ C に 1 時間反応し、TAP により RNA の 5' 末端キャップ構造を除去した。TAP 処理サンプル 2  $\mu$ l を用い、10 $\times$ RNA リガーゼ緩衝液を 1  $\mu$ l、5'RACE アダプターを 1  $\mu$ l、T4 RNA リガーゼ (2.5 U/ $\mu$ l) を 2  $\mu$ l 加え混合し、10  $\mu$ l 系にて 37  $^{\circ}$ C で 1 時間ライゲーション反応した。その後、ライゲーション済み RNA 2  $\mu$ l を用い、ランダムプライマーを 2  $\mu$ l、2.5 mM dNTP mix を 4  $\mu$ l、10 $\times$ M-MLV RTase 緩衝液を 2  $\mu$ l、RNase inhibitor を 1  $\mu$ l、M-MLV RTase (ニッポンジーン ; 200 U/ $\mu$ l) を 1  $\mu$ l を加えて混合し、20  $\mu$ l の反応系で 42  $^{\circ}$ C で 60 分間逆転写反応を行った。逆転写反応産物を 1  $\mu$ l 用い、10 $\times$ Ex *Taq* 緩衝液 (TaKaRa Bio) を 5  $\mu$ l、2.5 mM dNTP mix を 4  $\mu$ l、10  $\mu$ M 5'RACE Outer プライマーを 2  $\mu$ l、10  $\mu$ M PVS-8M (PVS-M の場合) または PVS-19M (SoPLV K-1 の場合) を 2  $\mu$ l、Ex *Taq* DNA polymerase (TaKaRa Bio ; 5 U/ $\mu$ l) を 0.25  $\mu$ l 加えて混合し、50  $\mu$ l の反応系で PCR を行った。サイクル反応は 94  $^{\circ}$ C で 3 分間後、94  $^{\circ}$ C で 30 秒間、55  $^{\circ}$ C で 60 秒間、72  $^{\circ}$ C で 1 分間を 35 サイクル行った後、72  $^{\circ}$ C で 7 分間延長した。その PCR 産物 2  $\mu$ l を用い、5'RACE Inner プライマーと PVS-9M でネステッド PCR (nested PCR) を同様の反応条件で行った。

### 2.2-3. RT-PCR 産物の回収

RT-PCR 産物または制限酵素処理後の DNA をアガロースゲル電気泳動で分離後、0.5 mg/ml エチジウムブロマイドで染色し、UV 照射下でカッターナイフを用いて目的のバンドをなるべく小さくゲルごと切り出した。切り出したアガロースゲルを 1.5 ml マイクロチューブに移し、DNA 回収キット MagExtractor PCR & Gel Clean up Kit (Toyobo) または QIAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) を用い、説明書のプロトコールに従って DNA を回収した。なお、5'RACE 増幅産物の回収には前者が使用した。キットで回収した水溶液に Quick Precip (EdgeBio) を 1  $\mu$ l、3 M 酢酸ナトリウム (pH 5.2) を 10  $\mu$ l、エタノールを 250  $\mu$ l 加えて混合し、室温下 14,000 rpm で 10 分間遠心分離した。得られた沈殿を 70 %エ

タノールで洗浄し、乾燥後、滅菌水に溶解した。

#### 2.2-4. 配列解析

塩基配列解析は主に ABI PRISM 310 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) を用い、一部が受託解析に出した。BigDye Terminator Ver1.1 cycle sequencing kit (Applied Biosystems) を 1/8 希釈系で用い、BigDye Terminator を 1  $\mu$ l、5 $\times$ 緩衝液 (400 mM トリス pH 9.0、10 mM MgCl<sub>2</sub>) を 3.5  $\mu$ l、0.8  $\mu$ M プライマーを 1  $\mu$ l、アガロースゲルから回収した RT-PCR 産物を 10-50 ng 加え、20  $\mu$ l の反応系で行った。サイクル反応は 96 °C で 1 分間の熱変性後、96 °C で 10 秒間、50 °C で 5 秒間、60 °C で 4 分間を 25 サイクル行った。反応後、反応液に 125 mM EDTA (pH 8.0) を 2  $\mu$ l、3 M 酢酸ナトリウム (pH 5.2) を 2  $\mu$ l、エタノールを 60  $\mu$ l 加えて混合し、15 分間室温で静置した。室温下 14,000 rpm で 20 分間遠心分離して得られた沈殿を 70 %エタノールで洗浄し、室温下 14,000 rpm で 5 分間遠心分離した。沈殿を乾燥し、25  $\mu$ l の HiDi ホルムアミド (Applied Biosystems) に溶解して、95 °C で 2 分間加熱し、アイスウォーターバスで 2 分間冷却した。反応液を専用チューブに移し、プログラム ABI PRISM310 Collection を使って、サンプルリストを作製する時、「Matrix」は「dR0916 Matrix」、「Dye/Primer」は「DT POP6{BD set-Any Primery}」を選択、「run time」を 40 分間まで延長し、配列解析を行った。

塩基配列解析は受託解析 (ユーロフィンジェノミクス社) の場合、シーケンスプライマーを 9.6 pmol、回収した RT-PCR 産物を 30-150 ng 加え、21  $\mu$ l に調整した。

#### 2.3. 日本における PVS 株全ゲノム配列の比較

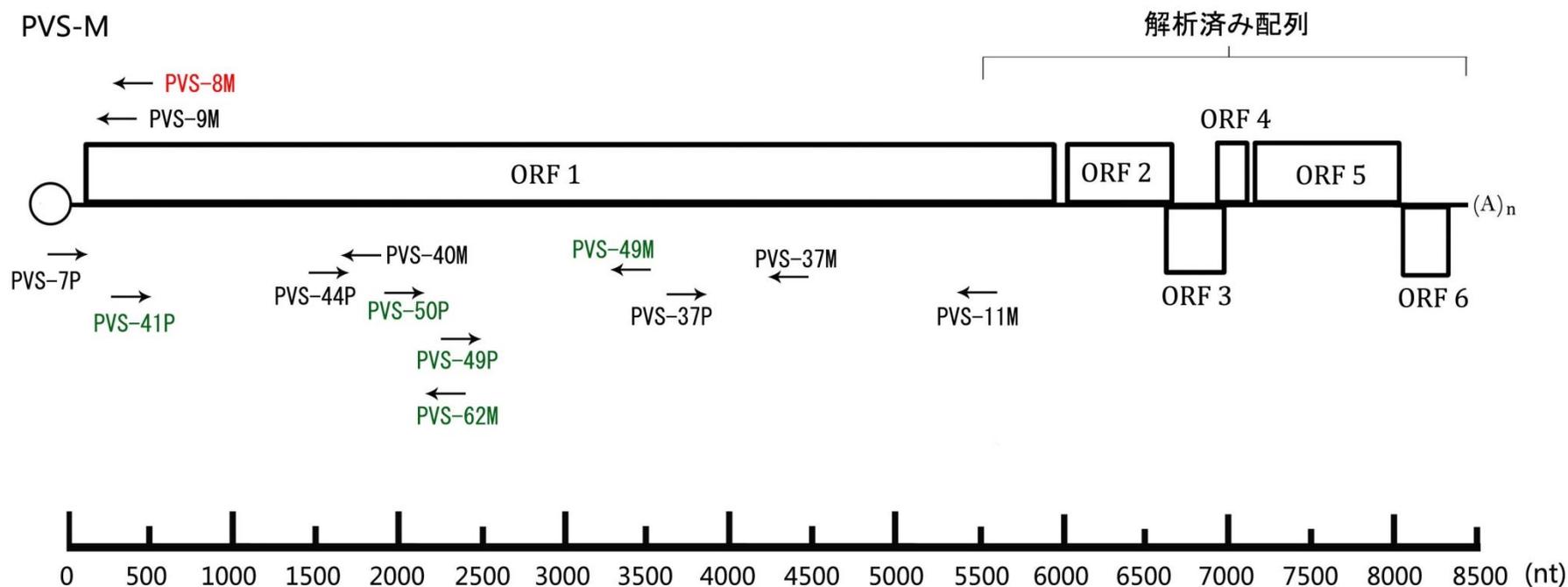
日本産の PVS 普通系統 H95、H00 の 2 株と PVS アンデス系統の Na1 株に本研究にて全ゲノム配列を解析した PVS-M と SoPLV K-1 を含めて配列を比較した。塩基配列の比較には DNASIS for Windows Ver2.1 (Hitachi Software Engineering Co., Ltd.) を用いた。アミノ酸配列のアライメントには Clustal Omega を用いた。アミノ酸置換の性質差は Structure-Genetic (SG) scoring system によって、0 から 5 の 6 段階に評価した。SG 値 0 は性質が最も異なるものであり、SG 値 5 はほぼ変わらないものである (Feng *et al.*, 1985)。非同義置換・同義置換分析は KaKs\_Calculator 2.0 (Wang *et al.*, 2010) を用い、LPB 法 (Pamilo and Bianchi, 1993; Li, 1993)、MLPB 法 (Tzeng *et al.*, 2004) または MYN 法 (Zhang *et al.*, 2006) で行った。PVS 株間の相同性解析は SimPlot (Ver 3.5.1) を用い、Kimura 2-parameter 法

(Kimura, 1980) で行った。

#### 2.4. 世界中の PVS 株の全ゲノム配列に基づく系統解析

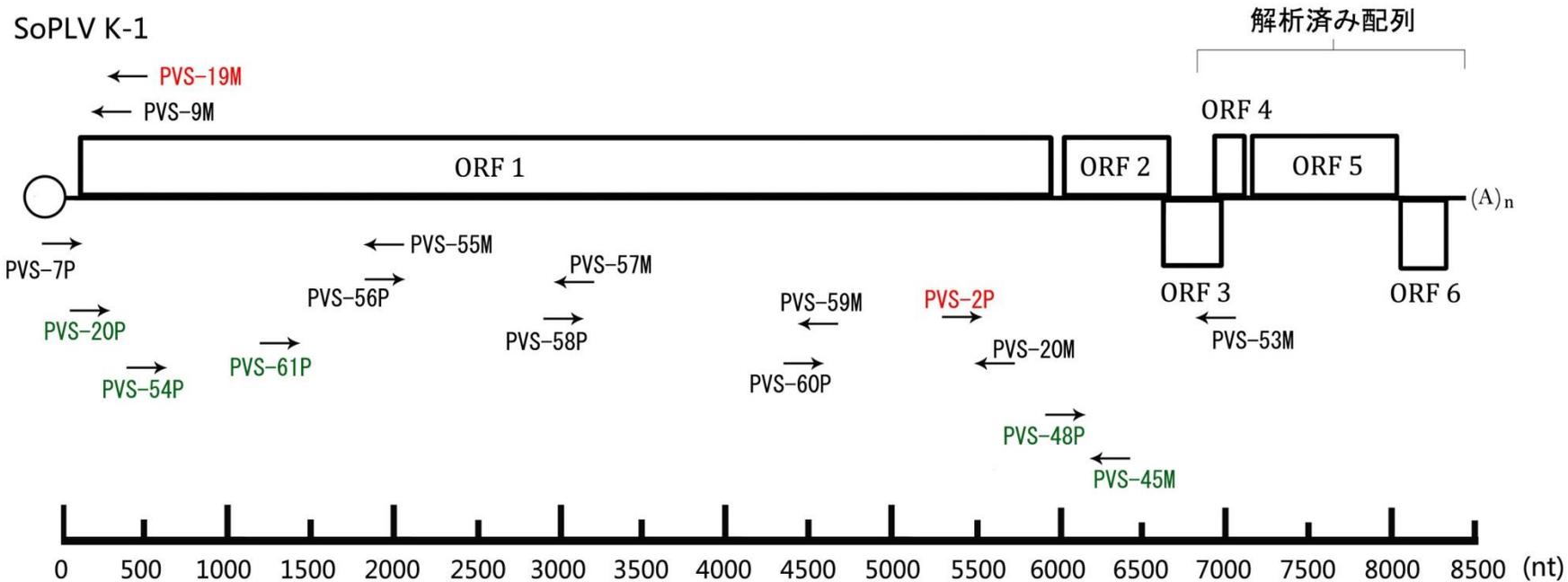
DNA Data Bank of Japan (DDBJ) DNA データベースに登録されている計 24 株の PVS 全ゲノム配列と日本産 5 分離株の全ゲノム配列、合計 29 株の全ゲノム配列を用いて PVS の系統解析を行った。表IV-2-2 にまとめたように、29 株の内訳は日本の 5 株、中国の 4 株、ドイツの 1 株、チェコの 1 株、ハンガリーの 3 株、ポーランドの 1 株、ウクライナの 3 株、スロバキアの 1 株、オーストラリアの 2 株、ニュージーランドの 2 株、アメリカの 2 株、ブラジルの 1 株、ペルーの国際ジャガイモセンター (CIP) の 1 株、コロンビアの 2 株である。

塩基配列の比較には DNASIS for Windows Ver2.1 を使い、アミノ酸配列のアライメントには Clustal Omega を用いた。また、PVS 株間の相同性解析には SimPlot (Ver 3.5.1) を用いた。29 株各 2 株間の塩基配列同一性及びアミノ酸配列類似性計算は NovoProt 社の相同性計算プログラム ([http://www.novopro.cn/tools/ident\\_sim.html](http://www.novopro.cn/tools/ident_sim.html)) を用いた。系統分析は MEGA (Molecular Evolutionary Genetics Analysis) 6.06 の Neighbor-Joining tree (Saitou and Nei, 1987) を使い、Bootstrap を 1000 に設定、70%以下の枝を切った。



図IV-2-1 PVS-M 全ゲノム配列解析に用いたプライマーの位置

ORF1 の3'末端側から下流約 3 Kb の配列は既に解析済み。黒色で示すプライマーは cDNA 断片の増幅及びシーケンス両方に利用したもので、緑色で示すプライマーはシーケンスのみに用いたプライマー。赤色で示すプライマーは 5'RACE のみに用いた。



図IV-2-2 SoPLV K-1 全ゲノム配列解析に用いたプライマーの位置

SoPLV K-1 のゲノム 3'末端領域約 1.6 kb の配列は既に解析済み。黒色で示すプライマーは cDNA 断片の増幅及びシーケンス両方に利用したもので、緑色で示すプライマーはシーケンスのみに用いたプライマー。赤色で示すプライマーは 5'RACE または PCR のみに用いた。

表IV-2-1：シーケンス解析に用いた RT-PCR によって増幅した DNA 断片

ゲノム	プライマーペア	増幅範囲 (nt)	断片長 (Kb)	シーケンス用プライマー
PVS-M	PVS-7P&PVS-40M	6~1810	1.8	PVS-7P,PVS-41P,PVS-40M
	PVS-44P&PVS-37M	1687~4495	2.8	PVS-44P,PVS-49P,PVS-50P, PVS-37M,PVS-49M,PVS-62M
	PVS-37P&PVS-11M	4330~5100	1.2	PVS-37P,PVS-11M
SoPLV K-1	PVS-7P&PVS-55M	5~2028	2	PVS-7P,PVS-20P,PVS-54P, PVS-61P,PVS-55M
	PVS-56P&PVS-57M	1946~3338	1.4	PVS-56P,PVS-57M
	PVS-58P&PVS-59M	3240~4642	1.4	PVS-58P,PVS-59M
	PVS-60P&PVS-20M	4538~5525	1	PVS-60P,PVS-20M
	PVS-2P&PVS-53M	5429~6915	1.5	PVS-48P,PVS-45M,PVS-53M

表IV-2-2 系統解析に用いた PVS 世界株

地域	Accession Number	分離株	系統*	原宿主	
Japan	LC375227	H95	O	<i>Solanum tuberosum</i>	
	LC375228	H00	O	<i>Solanum tuberosum</i>	
	-	Na1	A	<i>Solanum tuberosum</i>	
Asia	-	M	O	<i>Solanum tuberosum</i>	
	-	SoPLV K-1	A	<i>Solanum tuberosum</i>	
	China	KU896946	HB7	A	<i>Solanum tuberosum</i>
		KU896945	HB24	O	<i>Solanum tuberosum</i>
MF033144		BY	?	<i>Solanum tuberosum</i>	
KC430335		Yunnan YN	?	<i>Solanum tuberosum</i>	
Oceania	Australia	KP089978	SW-14	?	<i>Solanum tuberosum</i>
		MF375506	Qld-1	?	<i>Solanum tuberosum</i>
	New Zealand	KU058656	NZ-O ab030 Lincoln	O	<i>Solanum tuberosum</i>
		KU058657	NZ-A ab030 Lincoln	A	<i>Solanum tuberosum</i>
Europe	Czech Republic	AJ863510	Vltava	Re	<i>Solanum tuberosum</i>
	Germany	AJ863509	Leona	?	<i>Solanum tuberosum</i>
	Hungary	LN851190	Bonita	O	<i>Solanum tuberosum</i>
		LN851191	9.369	O	<i>Solanum tuberosum</i>
		HF571059	HU1	?	<i>Solanum tuberosum</i>
	Poland	LN851194	Ewa	O	<i>Solanum tuberosum</i>
	Ukraine	LN851189	Alex	O	<i>Solanum tuberosum</i>
		LN851192	Valery	O	<i>Solanum tuberosum</i>
		LN851193	Irena	O	<i>Solanum tuberosum</i>
	Slovakia	MF346599	T62	?	<i>Solanum lycopersicum</i>
North America	USA	FJ813512	WaDef-US	O	<i>Solanum tuberosum</i>
		FJ813513	Id4106-US	O	<i>Solanum tuberosum</i>
Brazil	JQ647830	BB-AND	A	<i>Solanum tuberosum</i>	
South America	Peru (CIP)	KU586451	GAF318-16.1	?	<i>Solanum tuberosum</i>
Colombia	KR152654	Dic2	P	<i>Solanum phureja</i>	
	JX419379	RVC	P	<i>Solanum phureja</i>	

\*:接種試験または報告に基づく系統。

O: 普通系統, A: アンデス系統, P: *Solanum phureja* から分離した系統, Re: Duarte らの分子性状解析により普通系統株とアンデス系統株の組み換え体であることが判明した (Duarte *et al.*, 2012)、接種試験では普通系統に属する (Matoušek *et al.*, 2000) , ?: 系統不明。

### 3. 結果

#### 3.1. PVS-M 及び SoPLV K-1 全ゲノム配列の解析

PVS-M の未知配列約 5.5 Kb を 3 つの RT-PCR 産物と 5'RACE 産物からダイレクトシーケンシングにより解析した。それぞれの解析した範囲を表IV-3-1 にまとめた。ダイレクトシーケンシングによって解析した PVS-M の配列には 2 つの塩基の波形が重なっている箇所が 2 つあった。それぞれ両方向で確認され、その結果を表IV-3-2 に示した。その 2 箇所の 2166 番目と 2307 番目における塩基相違はいずれもアミノ酸配列に影響するものである。2166 番目では G と A の 2 つの波形が重なっており、G の場合はグリシン、A の場合はアルギニンである。しかし、G の波形は A より遥かに高いので、2166 番目は G に決定した。2307 番目では A と G の 2 つの波形が重なっており、A の場合はチロシン、G の場合はシステインである。しかし、A の波形は G より 2 倍以上高いので、2307 番目は A に決定した。既に決定済みの 2991 塩基と合わせて決定した PVS-M の全ゲノム配列を図IV-3-1 にまとめた。PVS-M の全ゲノムはポリ A 鎖を除いて 8486 塩基で、5'末端非翻訳領域が 62 塩基、3'末端非翻訳領域が 103 塩基であり、ORF1 が 5928 塩基で 1975 アミノ酸の複製酵素、ORF2 が 684 塩基で 227 アミノ酸の TGBp1、ORF3 が 327 塩基で 108 アミノ酸の TGBp2、ORF4 が 201 塩基で 66 アミノ酸の TGBp3、ORF5 が 885 塩基で 294 アミノ酸の CP、ORF6 が 285 塩基で 94 アミノ酸の CRP をそれぞれコードしている。

SoPLV K-1 の未知配列約 6.9 Kb を 5 つの RT-PCR 産物と 5'RACE 産物からダイレクトシーケンシングによって解析した。それぞれの解析した範囲を表IV-3-1 にまとめた。ダイレクトシーケンシングによって解析した SoPLV K-1 の配列には 2 つの塩基の重なっている箇所が 4 つあり、それぞれを両方向で確認され、その結果を表IV-3-3 に示した。その 4 箇所の内、1433 番目、1610 番目と 6462 番目の 3 ヶ所はアミノ酸配列に影響しないが、1732 番目の 1 ヶ所はアミノ酸配列に影響する。1433 番目は G と A、1610 番目は A と T の波形が重なっていることが、1433 番目では G、1610 番目では A の波形が遥かに高いので、それぞれ G と A に決定した。6462 番目では PVS-48P プライマーでの解析では、C と T の波形はほぼ同じレベルで N と判定されたが、PVS-53M プライマーで解析した結果では C と判定されたため、6462 番目は C に決定した。一方、1732 番目では両方向の解析で G と A の波形がほぼ同じレベルで重なっており、G の場合はセリン、A の場合はアスパラギンである。PVS-61P プライマーでの解析では N と判定されたが、PVS-55M プライマーで解析した結果では G と判定されたため、1732 番目は G に決定した。既に決定済みの

1661 塩基と合わせて決定した SoPLV K-1 の全ゲノム配列は図IV-3-2 にまとめた。SoPLV K-1 の全ゲノムはポリ A 鎖を除いて 8486 塩基で、5'末端非翻訳領域が 62 塩基、3'末端非翻訳領域が 103 塩基であり、ORF1 が 5928 塩基で 1975 アミノ酸の複製酵素、ORF2 が 684 塩基で 227 アミノ酸の TGBp1、ORF3 が 327 塩基で 108 アミノ酸の TGBp2、ORF4 が 201 塩基で 66 アミノ酸の TGBp3、ORF5 が 885 塩基で 294 アミノ酸の CP、ORF6 が 285 塩基で 94 アミノ酸の CRP をそれぞれコードしている。

### 3.2. 日本における PVS 株の全ゲノム配列の比較

日本産の PVS 普通系統の H95 と H00 の 2 株、PVS アンデス系統の Na1 そして PVS-M 株と SoPLV K-1 株の全ゲノム配列を比較した。PVS-H95 と PVS-Na1 ゲノムの全塩基配列は既に決定されて（上田ら, 2002 ; 畑谷ら, 2003）、PVS-H00 ゲノムの全塩基配列は本論文の第III章で決定された。

PVS-H95 を基準とした SimPlot による株間の相同性解析の結果を図IV-3-3 に示す。赤色で表示した H00 株と紫色で表示した M 株はともに PVS-H95 と高い相同性を示した。一方、黄色で表示した Na1 株と緑色で表示した SoPLV K-1 はともに PVS-H95 と低い相同性を示した。従って、日本における全ゲノム配列決定済みの 5 株の分子性状は大きく 2 つのグループに分かれ、M 株は H95 株、H00 株ともに PVS 普通系統、SoPLV K-1 は別種ウイルスではなく、Na1 株同様 PVS のアンデス系統であることが示唆された。そこで M 株を H95 株と H00 株、SoPLV K-1 を Na1 株とそれぞれ配列を比較した。

PVS-M と PVS-H95、PVS-H00 の全ゲノムを比較した結果を表IV-3-4 にまとめた。PVS-M は PVS-H95 と PVS-H00 より 3'非翻訳領域が 1 塩基長かったが、その他の非翻訳領域およびオーバーラッピング領域では塩基相違が見られなかった。PVS-M 全 8486 塩基中、PVS-H95 とは計 363 個（全体の 4.3%）、PVS-H00 とは計 99 個（全体の 1.2%）の塩基相違が見られ、その内 PVS-H95 では 93 個、PVS-H00 では 34 個の塩基相違がアミノ酸配列に影響した。6つの ORF にコードされるタンパク質では、PVS-H95 と計 85 個（全体の 3.1%）、PVS-H00 と計 34 個（全体の 1.2%）のアミノ酸相違が見られた。PVS-M と PVS-H95 の間で塩基相違率が最も高いのは ORF1 の 5.2%で、次いで ORF3 と ORF2 でそれぞれ 4.0%と 3.8%と比較的高く、そして ORF4 と ORF5 ではそれぞれ 1.0%と 0.9%で、最も低いのは ORF6 の 0.7%であった。また、PVS-M と PVS-H95 のアミノ酸相違率が最も高いのは複製酵素の 3.8%で、TGBp1、TGBp3、CP ではそれぞれ 1.8%、1.5%、1.4%で、TGBp2 と CRP

のアミノ酸配列は完全に一致した。一方、PVS-M と PVS-H00 の間で塩基相違率が最も高いのは ORF6 の 1.4% で、ORF1、ORF2、ORF4、ORF5 ではそれぞれ 1.2%、1.3%、1.0%、1.2% で、最も低いのは ORF3 の 0.3% であった。また、PVS-M と PVS-H00 のアミノ酸相違率が最も高いのは TGBp1 の 2.2% で、複製酵素、TGBp2、CP、CRP ではそれぞれ 1.1%、0.9%、1.7%、1.1% であり、TGBp3 のアミノ酸配列は一致した。

PVS-M、PVS-H95、PVS-H00 の 3 株のアミノ酸配列の比較結果を表 IV-3-5 に、各株の特異的なアミノ酸分布を図 IV-3-4 に示した。表 IV-3-5 では 3 株のアミノ酸配列を比較し、他の 2 株と異なるアミノ酸を 1 つの株特異的なアミノ酸として赤色で表示した。その結果、3 株間のアミノ酸相違は ORF1 がコードする複製酵素に最も多く見られ、3 株のアミノ酸相違の多くは性質が近いものであった。2541-2542 番目の塩基相違のみ 3 株のアミノ酸配列がそれぞれ異なり、H95 株と H00 株、H00 株と M 株、M 株と H95 株のアミノ酸相違の性質差がそれぞれ SG 値 1、5、3 になっていた。図 IV-3-4 に示すように、青色の菱形で表示する PVS-H95 に特異的なアミノ酸が最も多く見られ、それらのアミノ酸配列は複製酵素の MTR と O-PRO 間の領域に集中して分布した。赤色の四角で表示する PVS-H00 の特異的なアミノ酸配列の分布は偏りが少なかった。緑色の三角で表示する PVS-M の特異的なアミノ酸配列は複製酵素の HEL 領域周囲及び CP の N 末端に多く分布していた。

SoPLV K-1 と PVS-Na1 の全ゲノム比較結果は表 IV-3-6 にまとめた。SoPLV K-1 は PVS-Na1 と同様ポリ A 鎖を除いて計 8486 塩基で、両者の非翻訳領域およびオーバーラッピング領域では塩基相違が見られなかった。SoPLV K-1 と PVS-Na1 の間には計 77 個（全体の 0.9%）の塩基相違が見られ、うち 28 個の塩基相違がアミノ酸配列に影響する。両者の塩基相違率が最も高いのは ORF6 の 1.1% で、ORF1、ORF2、ORF4 の塩基相違率はいずれも 1.0%、ORF3 は 0.6% と比較的 low、塩基相違率が最も低いのは ORF5 の 0.5% である。全ゲノム配列を見ると SoPLV K-1 と PVS-Na1 間のトランジションはトランスバージョンの約 2 倍だが、ORF2 では約 1.3 倍とトランスバージョンが若干多く、ORF3 と ORF4 にはトランスバージョンが見られなかった。6 つの ORF に計 26（全体の 0.9%）アミノ酸相違が見られ、うちアミノ酸相違率が最も高いのは TGBp3 の 3.0% で、複製酵素と TGBp1 はそれぞれ 1.0% と 1.3%、CP は 0.3% と比較的 low、TGBp2 と CRP のアミノ酸配列は完全に一致した。

SoPLV K-1 と PVS-Na1 アミノ酸配列の比較結果は表 IV-3-7、アミノ酸相違の分布は図 IV-3-5 に示した。計 26 アミノ酸相違の大半は性質が近いものであった。複製酵素領域に分

布したアミノ酸相違（図IV-3-5、菱形で表示）は、MTR 領域に 2ヶ所、O-PRO と P-PRO 領域に各 1ヶ所、HEL 領域に 3ヶ所、HEL と POL 間に 2ヶ所存在した他、およそ半数のアミノ酸相違が MTR と O-PRO 間の領域に集中して分布していた。TGBp1 に分布したアミノ酸相違（図IV-3-5、青い三角形で表示）は、性質の近い（SG 値 5）またはやや近い（SG 値 4）2つの相違と性質のやや遠い（SG 値 3）の 1つの相違が見られた。TGBp3 はアミノ酸相違率としては最も高い領域となるが、見られた 2アミノ酸相違（図IV-3-5、緑色の三角形で表示しているが近接しているため重なっている）は性質の近いものであった。CP の N 末端には青い丸で表示したアミノ酸相違が 1ヶ所見られ、性質のやや遠いもの（SG 値 3）であった。

日本における PVS の 5 株を用いて非同義置換・同義置換分析（Ka/Ks 分析）を行った結果を図IV-3-6にまとめた。M 株と H95 株、M 株と H00 株、SoPLV K-1 と Na1 株及び M 株と SoPLV K-1 の Ka/Ks 分析を行い、図中では非同義置換の Ka は緑の線、同義置換の Ks は青い線、Ka/Ks の割合は紫の線で表示した。Ka/Ks は進化の選択方向を反映し、1（赤い線で表示）を超えた場合、配列がポジティブな選択を受けていることが示唆されるのに対し、Ka/Ks が 1 以下の場合、配列がネガティブな選択を受けていることが示唆される。また、Ka/Ks が 1 に近い場合、配列がニュートラルな選択を受けていることが示唆される。M 株と H95 株で比較した場合、複製酵素の MTR と O-PRO 間の領域、HEL 領域周囲及び CP の N 末端に強いポジティブ選択を受けていることがわかった。一方、M 株と H00 株で比較した場合、複製酵素の HEL と POL 間の領域、TGBp1 及び CP の N 末端に強いポジティブ選択を受けていたが、複製酵素の MTR と O-PRO 間の領域及び HEL 領域周囲はニュートラルな選択を受けていることがわかった。SoPLV K-1 と Na1 株では、非同義置換が比較的少なく、緑の線のピークがほぼ見られなかったが、複製酵素の MTR と O-PRO 間の領域に強いポジティブ選択を受けていることがわかった。また、M 株と SoPLV K-1 で比較した場合、青い線で表示した同義置換が非常に高いピークを示し、複製酵素の MTR と O-PRO 間の領域及び HEL 領域周囲に強いポジティブ選択を受けていることがわかった。

### 3.3. 世界中の PVS 株の全ゲノム配列を用いた系統解析

DDBJ DNA データベースに登録されている計 24 株の PVS に日本産 5 株を加えた計 29 株を PVS 系統解析に用いた。PVS 株の全ゲノム配列を用いて作成した系統樹を図IV-3-7 に示した。計 29 株は大きく 2つのグループに分かれ、普通系統に属するものは 21 株、ア

ンデス系統に属するものは 8 株であった。紫色の円で印を付けた日本産 5 株の内、H00、H95 と M 株は普通系統として報告された株（図IV-3-7、緑の星で印を付けた）と同じグループに属し、Na1 株と SoPLV K-1 はアンデス系統として報告された株（図IV-3-7、赤い星で印を付けた）と同じグループに属した。P (phureja) 系統として報告した株（図IV-3-7、黄色い三角形で印を付けた）は他のアンデス系統の株から少々離れていたが、アンデス系統の中に属した。組み換え株の Vltava はアンデス系統とは異なるグループに属したが、他の普通系統とも異っていた。PVS 株の各タンパク質のアミノ酸配列を繋げた全アミノ酸配列を用いて作成した系統樹を図IV-3-8 に示す。全アミノ酸配列を用いても、計 29 株は大きく 2 つの系統に分けられ、普通系統とアンデス系統に属する株は変わらなかった。但し、組み換え株の Vltava は図IV-3-7 の結果と少し異なり、他の普通系統の株と同じグループとなった。また、PVS 株の複製酵素のアミノ酸配列を用い、図IV-3-9 の系統樹を作成した。その結果は図IV-3-8 の結果と大きな違いはない。最後に、PVS 株の CP のアミノ酸配列を用いて系統樹を作成し、その結果を図IV-3-10 に示した。組み換え株の Vltava は図IV-3-8、図IV-3-9 では普通系統のグループに属したが、CP 配列を用いた場合はアンデス系統のグループに属した。それ以外の株は前述 3 つの系統解析結果と大きな変化はなかった。

SimPlot を用いて相同性解析を行うに当たり 29 株では数が多過ぎで結果が判別困難なため、便宜上計 29 株の系統や地理情報を考慮して 17 株を 2 パターン抽出して行った。普通系統の M 株を基準として、16 株との相同性解析した結果が図IV-3-11 と図IV-3-12 である。図IV-3-11 では、M 株以外の 16 株は Vltava 株（図中、黒い線で表示）を除き、大きく 2 つに分かれ、M 株に高い相同性スコアを示した株は系統解析では普通系統に属したものであったに対し、M 株に比較的低い相同性スコアを示した株は系統解析ではアンデス系統に属したものであった。また、Vltava は ORF1 領域までは M 株に高い相同性スコアを示したが、その下流の配列では M 株との相同性スコアが減少しアンデス系統の株同様の相同性スコアを示し、組み換え体であることが確認できた（図IV-3-11）。また、図IV-3-12 でも M 株以外の 16 株は普通系統株とアンデス系統株の 2 つに分かれた。アンデス系統の SoPLV K-1 を基準として、16 株との相同性解析した結果が図IV-3-13 と図IV-3-14 である。図IV-3-13 では、抽出グループ 1 の 16 株は黒い線で表示する Vltava 株を除き、大きく 2 つに分かれた。SoPLV K-1 に対し高い相同性スコアを示した株は系統解析ではアンデス系統に属したものであり、SoPLV K-1 に対し比較的低い相同性スコアを示した株は

系統解析では普通系統に属した株と P 系統として報告された RVC 株であった。Vltava 株は ORF1 領域までは SoPLV K-1 に対し比較的低い相同性スコアを示したが、その下流の配列では SoPLV K-1 との相同性スコアが少し増加していることが見られた。また、図 IV-3-14 では、グループ 2 の 16 株も SoPLV K-1 との相同性スコアにより 2 つに分かれ、比較的低い相同性スコアを示した株には普通系統以外に、P 系統として報告された Dic2 株もあった。そのことから、P 系統として報告した 2 株は系統解析でアンデス系統に属するようには見えたが、アンデス系統とは少々異なっている分子性状であることが示唆された。

計 28 株の全ゲノム配列を用い、各 2 株間の全塩基配列及び各タンパク質のアミノ酸配列を繋げた全アミノ酸配列の同一性を計算した結果を表 IV-3-8 にまとめた。表 IV-3-8 において、普通系統、アンデス系統または P 系統内の比較結果は黒い字で表示、普通系統とアンデス系統系統間の比較結果は赤い字で表示、P 系統と他の系統間の比較結果は青い字で表示、組み換え体株と他の株での比較結果は黄色で表示した。表 IV-3-8 の右上半分に示した 2 株間の塩基配列同一性にに基づき、普通系統 20 株、アンデス系統 6 株、P 系統 2 株を用いて PVS 系統内・系統間の同一性を解析した結果は図 IV-3-15 のようになった。普通系統内の株間の塩基配列同一性は 91.8%-99.8% で、アンデス系統内の株間の塩基配列同一性はやや高く 95.2%-99.1%、P 系統の 2 株の塩基配列同一性は 95.4% であった。一方、普通系統株とアンデス系統株の系統間の同一性は 77.7%-79.5%、普通系統株と P 系統株の系統間の同一性は 78.2%-79.5%、P 系統株とアンデス系統株の系統間の同一性は 78.5%-79.6% で、いずれも 80% 以下であった。

表IV-3-1 : RT-PCR 産物のダイレクトシーケンシングによる解析範囲

PVS-M			SoPLV K-1		
RT-PCR 産物	プライマー	解析範囲 (nt)	RT-PCR 産物	プライマー	解析範囲 (nt)
PVS-7P&40M	PVS-9M	1~225	PVS-7P&55M	PVS-9M	1~227
	PVS-7P	28~587		PVS-7P	28~460
	PVS-41P	520~1397		PVS-20P	223~718
	PVS-40M	896~1753		PVS-54P	620~1570
PVS-44P&37M	PVS-44P	1718~2282	PVS-56P&57M	PVS-55M	1031~1986
	PVS-50P	2079~2630		PVS-56P	1986~2892
	PVS-49P	2461~3381		PVS-57M	2377~3298
	PVS-49M	3093~3642		PVS-58P	3287~4180
PVS-37P&11M	PVS-37M	3540~4455	PVS-58P&59M	PVS-59M	3663~4605
	PVS-37P	4391~5274		PVS-60P	4587~5469
	PVS-11M	4957~5507		PVS-20M	5080~5491
				PVS-2P&53M	PVS-45M
			PVS-48P	6049~6567	
			PVS-53M	6358~6890	

青字で示すプライマーは受託解析に用いた。

表IV-3-2:PVS-M のダイレクトシーケンシング解析で見られた2つの塩基の重なり箇所

塩基 番目	プライマー	波形図	塩基	アミノ酸
		2166		
		A A G G G G G T		
	PVS-44P			
2166	PVS-50P	G A A G G G G T	G(A)	Gly(Arg)
		A C C C C C T T C		
	PVS-62M			
	PVS-50P	2307		
		A C G T A C T A		
2307			A(G)	Tyr(Cys)
	PVS-62M	T A T A G T A C G T		

アミノ酸配列に影響するものは紫色で示す。

9            18            27            36            45            54  
 5' GAU AAA CAC UCC CGA AAA UAA UUU GAC UUA AAC AAC GCG ACA GUU CAA GCA AAU  
  
 63            72            81            90            99            108  
 UAC UUA ACA UGG CAC UUA CUU ACA GAA GUC CAA UCG AGG AAG UGU UAA CAC UAC  
 ORF1→ Met Ala Leu Thr Tyr Arg Ser Pro Ile Glu Glu Val Leu Thr Leu Leu  
  
 117            126            135            144            153            162  
 UAG AGC CUA AUG CUC AAU CCC UAA UUU CCA ACG UCG CCA CCA GCA GCU UUC AAG  
 Glu Pro Asn Ala Gln Ser Leu Ile Ser Asn Val Ala Thr Ser Ser Phe Gln Glu  
  
 171            180            189            198            207            216  
 AGA GUG AGA AGG AUA ACU UCG CCU GGU UUA GCU ACC AUG UGU CGG CUA GCG CCA  
 Ser Glu Lys Asp Asn Phe Ala Trp Phe Ser Tyr His Val Ser Ala Ser Ala Lys  
  
 225            234            243            252            261            270  
 AGG AAC ACC UUA GUA GAG CAG GAA UUU ACC UAA GCC CCU AUU CGG GGU AUC CUC  
 Glu His Leu Ser Arg Ala Gly Ile Tyr Leu Ser Pro Tyr Ser Gly Tyr Pro His  
  
 279            288            297            306            315            324  
 AUU CUC ACC CGG UGU GCA AGA CAU UGG AAA AUU ACC UAC UGU ACA AAG UCC UAC  
 Ser His Pro Val Cys Lys Thr Leu Glu Asn Tyr Leu Leu Tyr Lys Val Leu Pro  
  
 333            342            351            360            369            378  
 CAC CAC UUG UAA AUA ACA CCU UUU ACU UUG UAG GAA UAA AAG AAU UCA AGC UCA  
 Pro Leu Val Asn Asn Thr Phe Tyr Phe Val Gly Ile Lys Glu Phe Lys Leu Asn  
  
 387            396            405            414            423            432  
 AUU UUC UUA AGA AGA GGA UCA AAC AAA UGA GCA UGA UUC AAG CUA UAA AUA GGU  
 Phe Leu Lys Lys Arg Ile Lys Gln Met Ser Met Ile Gln Ala Ile Asn Arg Tyr  
  
 441            450            459            468            477            486  
 AUG UGA GCA GUG CCG AUA AAU UGC GAU AUG GCA AUG AGU UCG UGA UCA AAU UCG  
 Val Ser Ser Ala Asp Lys Leu Arg Tyr Gly Asn Glu Phe Val Ile Lys Phe Gly  
  
 495            504            513            522            531            540  
 GCG CGG CUU CGC CCG AAC UCA AGC GGC AUC AUG GAU AUU CAC UGG AUC CUG CCU  
 Ala Ala Ser Pro Glu Leu Lys Arg His His Gly Tyr Ser Leu Asp Pro Ala Leu  
  
 549            558            567            576            585            594  
 UGC GUG AUC UCU UAC CGA ACA UAA AGA GGG AUU CUA AUC UCU UCU UCC ACG AUG  
 Arg Asp Leu Leu Pro Asn Ile Lys Arg Asp Ser Asn Leu Phe Phe His Asp Glu

図IV-3-1 PVS-M の全ゲノム配列 (次ページに続く)

603	612	621	630	639	648
AGA UGC AUU AUU GGG AAA AGA ACC AGU UGA UCC ACU UCU UGG AAC AAU GCA GAC					
Met His Tyr Trp Glu Lys Asn Gln Leu Ile His Phe Leu Glu Gln Cys Arg Pro					
657	666	675	684	693	702
CCA AUA CGU GCU UGU GCA CCA UUG UGU ACC CAA CAG AGA UAU UCG UUG GGG CCC					
Asn Thr Cys Leu Cys Thr Ile Val Tyr Pro Thr Glu Ile Phe Val Gly Ala Arg					
711	720	729	738	747	756
GAC GUU CUU UGA AUC CGU GGG CAU ACG AGU UUG AGA UCA AGA GAG ACA AAC UGC					
Arg Ser Leu Asn Pro Trp Ala Tyr Glu Phe Glu Ile Lys Arg Asp Lys Leu Leu					
765	774	783	792	801	810
UCU UUU ACC CAG AUG GGG UGC GUA GUG AAG GCU AUG AGC AGC CAG UCA ACU GUG					
Phe Tyr Pro Asp Gly Val Arg Ser Glu Gly Tyr Glu Gln Pro Val Asn Cys Gly					
819	828	837	846	855	864
GGU AUC UUC UCC GCA CUA GAA AGA UAU UGC UAA GGG AUG GCA CUA UGU ACA GCG					
Tyr Leu Leu Arg Thr Arg Lys Ile Leu Leu Arg Asp Gly Thr Met Tyr Ser Val					
873	882	891	900	909	918
UUG AUC UAG UGU GCA GCA AAU UCG CCC AUC AUC UAA UAG CAA UCA CCA AGG GCG					
Asp Leu Val Cys Ser Lys Phe Ala His His Leu Ile Ala Ile Thr Lys Gly Asp					
927	936	945	954	963	972
AUU UGA UCA CCC CGA CUU ACC GUA GCU UCG GCC CUU UUG AGG CGA UCA AAA GUG					
Leu Ile Thr Pro Thr Tyr Arg Ser Phe Gly Pro Phe Glu Ala Ile Lys Ser Ala					
981	990	999	1008	1017	1026
CGG GCU UGC AGG GGA UAA GCA AAG GUA GGC CGA AAU UCU AUC CUG UAC CGU GCC					
Gly Leu Gln Gly Ile Ser Lys Gly Arg Pro Lys Phe Tyr Pro Val Pro Cys His					
1035	1044	1053	1062	1071	1080
ACA UGA UUU CUC GUU UAU ACA GGU ACU UAC GGU CUC UAA AGA AAC CCG ACA AGC					
Met Ile Ser Arg Leu Tyr Arg Tyr Leu Arg Ser Leu Lys Lys Pro Asp Lys Gln					
1089	1098	1107	1116	1125	1134
AGU CCG CAA UGG CAA AAU UCU CGC AGA UGU GCC CGG AGC CAA GUG GUG ACA UGA					
Ser Ala Met Ala Lys Phe Ser Gln Met Cys Pro Glu Pro Ser Gly Asp Met Ile					

図IV-3-1 PVS-M の全ゲノム配列 (次ページに続く)

1143	1152	1161	1170	1179	1188
UAA GGU UUA UUG AGG AAC UGA GUG AUU UGA UAA UCA ACA CUG GCA CUU UGA GGG					
Arg Phe Ile Glu Glu Leu Ser Asp Leu Ile Ile Asn Thr Gly Thr Leu Arg Val					
1197	1206	1215	1224	1233	1242
UCA UGA UCG AUG CGG AGC UGU GCA AAA AUU UCU UUG GUA AUC UGG GUC UGG CCU					
Met Ile Asp Ala Glu Leu Cys Lys Asn Phe Phe Gly Asn Leu Gly Leu Ala Leu					
1251	1260	1269	1278	1287	1296
UAC CGG CCA CUC UCG CGU CAA AGA UAA AAA GCA CCC GCG CAG UAA GCC UAG AAG					
Pro Ala Thr Leu Ala Ser Lys Ile Lys Ser Thr Arg Ala Val Ser Leu Glu Ala					
1305	1314	1323	1332	1341	1350
CCU UUG UAG CCU CGC UUG AGC CGC UUG UCG UUG AUU GCG AAC UGC AGA CCA UCU					
Phe Val Ala Ser Leu Glu Pro Leu Val Val Asp Cys Glu Leu Gln Thr Ile Ser					
1359	1368	1377	1386	1395	1404
CGU GGG CCG UAC CGC UGG CGC AGC UGU UGU UCA GUG AAU CAC CGG AUG AUC CCC					
Trp Ala Val Pro Leu Ala Gln Leu Leu Phe Ser Glu Ser Pro Asp Asp Pro Pro					
1413	1422	1431	1440	1449	1458
CGG AGG ACA UGA UUG AAG CAA UGG AUA GGA AGU GGG UGA GUA GUA GCA CGA UGU					
Glu Asp Met Ile Glu Ala Met Asp Arg Lys Trp Val Ser Ser Ser Thr Met Leu					
1467	1476	1485	1494	1503	1512
UGA GCG ACA GGG UCC CGG CAC CUU ACC GUG GGA AUA UGU GGA GCG AAA CAU CCC					
Ser Asp Arg Val Pro Ala Pro Tyr Arg Gly Asn Met Trp Ser Glu Thr Ser Arg					
1521	1530	1539	1548	1557	1566
GCG CAA UGA GCU UUU GGG GCA UAG AUU UUC AGC GGA UCA AGU UUC UGA GAG GGC					
Ala Met Ser Phe Trp Gly Ile Asp Phe Gln Arg Ile Lys Phe Leu Arg Gly Leu					
1575	1584	1593	1602	1611	1620
UGA UGG AAU UGU ACU UGG AUA GUA UGU GCA CAG AAG GCC UUG CAA CCC CCG UGA					
Met Glu Leu Tyr Leu Asp Ser Met Cys Thr Glu Gly Leu Ala Thr Pro Val Thr					
1629	1638	1647	1656	1665	1674
CUU UUG AGU CUU ACG UGG CUC AGG UCG CGU CGU GUU GCU CGC UUC UCG GGC UCG					
Phe Glu Ser Tyr Val Ala Gln Val Ala Ser Cys Cys Ser Leu Leu Gly Leu Ala					

図IV-3-1 PVS-M の全ゲノム配列 (次ページに続く)

1683	1692	1701	1710	1719	1728
CAU UGA UUA AAU GCC UAA CUG UUG CUG AGU AUG CUG AGG UGG CCC GAA UGG UGA					
Leu Ile Lys Cys Leu Thr Val Ala Glu Tyr Ala Glu Val Ala Arg Met Val Ser					
1737	1746	1755	1764	1773	1782
GCA ACA CGC GUU UGA UUG AUG UGC UCU UUA CUG CUG GGG ACC UUC GUU GGU UCC					
Asn Thr Arg Leu Ile Asp Val Leu Phe Thr Ala Gly Asp Leu Arg Trp Phe Arg					
1791	1800	1809	1818	1827	1836
GCG CCA CCC GAC ACU CCA GGC AUA ACG UUA AGU UCU UGG ACG AAA CGG CCG AUU					
Ala Thr Arg His Ser Arg His Asn Val Lys Phe Leu Asp Glu Thr Ala Asp Trp					
1845	1854	1863	1872	1881	1890
GGG CAA GGU ACA AAA GCG AGU UCG AAU GCG CAA CAU AUG CAA AGC CCA AAG GAA					
Ala Arg Tyr Lys Ser Glu Phe Glu Cys Ala Thr Tyr Ala Lys Pro Lys Gly Thr					
1899	1908	1917	1926	1935	1944
CAG GUC AUA UGG GUU AUC UCC AAA ACA CUG UGU ACA GUU UUC ACG GAG UGG GGG					
Gly His Met Gly Tyr Leu Gln Asn Thr Val Tyr Ser Phe His Gly Val Gly Ala					
1953	1962	1971	1980	1989	1998
CAC GAU GGU CUU UUG ACC CCG GCU ACU GCA GCG AAG GUG AUU CUG AGG CCA UCC					
Arg Trp Ser Phe Asp Pro Gly Tyr Cys Ser Glu Gly Asp Ser Glu Ala Ile Leu					
2007	2016	2025	2034	2043	2052
UCC CUG ACU ACA GCG UAG UUG AUU GUC CCA AAG CUG CGC CAA UGA ACU CAG AAG					
Pro Asp Tyr Ser Val Val Asp Cys Pro Lys Ala Ala Pro Met Asn Ser Glu Gly					
2061	2070	2079	2088	2097	2106
GGA CUU UGC UCC AAG GGA CAG GGA UGG GGA GAG CGC UGA GCU GCG CAU GUG GGC					
Thr Leu Leu Gln Gly Thr Gly Met Gly Arg Ala Leu Ser Cys Ala Cys Gly Leu					
2115	2124	2133	2142	2151	2160
UGC AAU CUG UAA CAA GGG UGU UAG CGU ACC CCA CGG AAC ACG GAU UCA AUU UGG					
Gln Ser Val Thr Arg Val Leu Ala Tyr Pro Thr Glu His Gly Phe Asn Leu Glu					
2169	2178	2187	2196	2205	2214
AGA AGG GGG UUU CAG GCG AGC GUG CUG CAU GGU AUU GCA GGG GUC AGA UCA AUU					
Lys Gly Val Ser Gly Glu Arg Ala Ala Trp Tyr Cys Arg Gly Gln Ile Asn Tyr					

図IV-3-1 PVS-M の全ゲノム配列 (次ページに続く)

2223	2232	2241	2250	2259	2268
AUA CAU CCG GAG CUG UUU GCC AUG AGA ACU UGG GCU GGC CAA GAU GGU UAA GCC					
Thr Ser Gly Ala Val Cys His Glu Asn Leu Gly Trp Pro Arg Trp Leu Ser Gln					
2277	2286	2295	2304	2313	2322
AGU GGA UGG AAU UGC AUG AGA UAG AUG AGA CGU ACU AUA AUA GCA UGC UGG CCC					
Trp Met Glu Leu His Glu Ile Asp Glu Thr Tyr Tyr Asn Ser Met Leu Ala Gln					
2331	2340	2349	2358	2367	2376
AGG AAU UUC CUG CUG GCG GAG CUC UAG AGU GUG AAG UGG GUG AUG GAG GCC AGU					
Glu Phe Pro Ala Gly Gly Ala Leu Glu Cys Glu Val Gly Asp Gly Gly Gln Phe					
2385	2394	2403	2412	2421	2430
UCA UCC CAG GCU CAA AUG UGG CCA UAG CUG AAG UUG GAG GUC AGU CCC AGG UUU					
Ile Pro Gly Ser Asn Val Ala Ile Ala Glu Val Gly Gly Gln Ser Gln Val Ser					
2439	2448	2457	2466	2475	2484
CGU UUA GCU GUG CGG CGG GAA CUG GGC AAU UGU UGC UGG AAU UGG GGG AUU UCA					
Phe Ser Cys Ala Ala Gly Thr Gly Gln Leu Leu Leu Glu Leu Gly Asp Phe Ile					
2493	2502	2511	2520	2529	2538
UUG AAU UGC CUG GUC CAU GUU GGA GUA AGC ACC GUC UUC AUA UGC GCU GUA GCG					
Glu Leu Pro Gly Pro Cys Trp Ser Lys His Arg Leu His Met Arg Cys Ser Glu					
2547	2556	2565	2574	2583	2592
AAA CGC GCG GGG UGA CAU UUA UCU UCA GGC AAA UUA AGG UUC CAG ACU CUG UGG					
Thr Arg Gly Val Thr Phe Ile Phe Arg Gln Ile Lys Val Pro Asp Ser Val Val					
2601	2610	2619	2628	2637	2646
UGA AUG CCG CCG UGG UGC AGA UCG CAA CGC CUG CCG CAA CUG CAG GUG CGG GGG					
Asn Ala Ala Val Val Gln Ile Ala Thr Pro Ala Ala Thr Ala Gly Ala Gly Gly					
2655	2664	2673	2682	2691	2700
GGU CCA AGU UCA AUG AGC AUG AUG CCC ACC ACA CAC GAG AGG GGG UCG CAG UGC					
Ser Lys Phe Asn Glu His Asp Ala His His Thr Arg Glu Gly Val Ala Val His					
2709	2718	2727	2736	2745	2754
AUG CGU CCG GCA AGU GCC CUG CAG CAA AGA AAU UCC AUA GGG UAC CUA AUG CUG					
Ala Ser Gly Lys Cys Pro Ala Ala Lys Lys Phe His Arg Val Pro Asn Ala Gly					

図IV-3-1 PVS-Mの全ゲノム配列 (次ページに続く)

2763	2772	2781	2790	2799	2808
GUG GGG GAG AUU GCU UUU GGC UGG CCA UCU CGC ACU UCA CAG GGG UGA GCG UGC					
Gly Gly Asp Cys Phe Trp Leu Ala Ile Ser His Phe Thr Gly Val Ser Val Gln					
2817	2826	2835	2844	2853	2862
AGG AUA UGA AAC AGG GAU UGC AAC AGC UGG AGU GGG AGA GCG AUG CGU UCA GCG					
Asp Met Lys Gln Gly Leu Gln Gln Leu Glu Trp Glu Ser Asp Ala Phe Ser Ala					
2871	2880	2889	2898	2907	2916
CCG AGC UAG CCU UGC AAU UGA AAC CAC AAG CUU GGG CUG AAG AGG AGG CCA UUA					
Glu Leu Ala Leu Gln Leu Lys Pro Gln Ala Trp Ala Glu Glu Glu Ala Ile Ile					
2925	2934	2943	2952	2961	2970
UCG CGA CAA GCA AGC AAU ACC GGU ACA GGA UCG UGG UGC UGA GUG CCG AUA AAG					
Ala Thr Ser Lys Gln Tyr Arg Tyr Arg Ile Val Val Leu Ser Ala Asp Lys Glu					
2979	2988	2997	3006	3015	3024
AGC AAA CAG UUA UUU AUA GCC CGA AGU GUG AGG CGG UGC AGU CCA UGG UUC UAU					
Gln Thr Val Ile Tyr Ser Pro Lys Cys Glu Ala Val Gln Ser Met Val Leu Tyr					
3033	3042	3051	3060	3069	3078
ACC ACG CCG GGG CCC ACU UUG AGG CAG CUU UGC CCC GGA ACG ACU GCG UGC UUG					
His Ala Gly Ala His Phe Glu Ala Ala Leu Pro Arg Asn Asp Cys Val Leu Val					
3087	3096	3105	3114	3123	3132
UGG CUG UUG CGU CUG UCU UGC GGA GAC GAG UUG AAG AAG UGC UUU CAA UUC UAG					
Ala Val Ala Ser Val Leu Arg Arg Arg Val Glu Glu Val Leu Ser Ile Leu Gly					
3141	3150	3159	3168	3177	3186
GCG CGC AGU UGG GUA AUG AGU UUC UUC AGG AUG UAC UAA AGG GUG AAG GAA UUA					
Ala Gln Leu Gly Asn Glu Phe Leu Gln Asp Val Leu Lys Gly Glu Gly Ile Asn					
3195	3204	3213	3222	3231	3240
AUC GGG ACA AAU UGG CCG UGG UCU UUA AAC UCU UCG AUA UCU GCG CAC ACA UAC					
Arg Asp Lys Leu Ala Val Val Phe Lys Leu Phe Asp Ile Cys Ala His Ile His					
3249	3258	3267	3276	3285	3294
AUG CGG AGG GUG AGG UUU UCG UGA UAA AUU CUG AAG GUA GAU UGC ACG GCA CAU					
Ala Glu Gly Glu Val Phe Val Ile Asn Ser Glu Gly Arg Leu His Gly Thr Phe					

図IV-3-1 PVS-M の全ゲノム配列 (次ページに続く)

3303            3312            3321            3330            3339            3348  
 UCA AUC UGA GCA AGG AUC AUA UUG AGC AUU GUA AGA GCA AAC CGA UGG GAA UAA  
 Asn Leu Ser Lys Asp His Ile Glu His Cys Lys Ser Lys Pro Met Gly Ile Thr

3357            3366            3375            3384            3393            3402  
 CCA AGU UCA CAA GUG UGC AUG AUG CUA GCU GUG AGA UUA AGC AGG AAA CAC UCG  
 Lys Phe Thr Ser Val His Asp Ala Ser Cys Glu Ile Lys Gln Glu Thr Leu Ala

3411            3420            3429            3438            3447            3456  
 CCA UGC UUA AAG CCA UGU GCA CGU UAC UAC CGU ACA GUC CAU GUG GGA UUA GAG  
 Met Leu Lys Ala Met Cys Thr Leu Leu Pro Tyr Ser Pro Cys Gly Ile Arg Ala

3465            3474            3483            3492            3501            3510  
 CGA GAG UGC UCG CUG AUA GCC UAA AUG CAG GCA GCA CUG GGG UCC UAU GCG ACG  
 Arg Val Leu Ala Asp Ser Leu Asn Ala Gly Ser Thr Gly Val Leu Cys Asp Glu

3519            3528            3537            3546            3555            3564  
 AGU UAU UCA AUA AGG UCG GGA AUU UAC UCG AGG CAA AUG AGG GGC GGC UGC AGG  
 Leu Phe Asn Lys Val Gly Asn Leu Leu Glu Ala Asn Glu Gly Arg Leu Gln Glu

3573            3582            3591            3600            3609            3618  
 AGA AUG CUA GAG AGG UAG GUU GCU UGC UUG GAA CUU UUG GAG CUG GGA AGA GCA  
 Asn Ala Arg Glu Val Gly Cys Leu Leu Gly Thr Phe Gly Ala Gly Lys Ser Thr

3627            3636            3645            3654            3663            3672  
 CGG UCU UUA GGA AAG UGC UAA GUA GCA AUC UCG GGA AGA GCA UCA UCU ACA UAU  
 Val Phe Arg Lys Val Leu Ser Ser Asn Leu Gly Lys Ser Ile Ile Tyr Ile Ser

3681            3690            3699            3708            3717            3726  
 CCC CAA GGA AGC AUC UGG CAG AUU CAU UCA AUG AGC UUG UGA AGU CUA UCA AGC  
 Pro Arg Lys His Leu Ala Asp Ser Phe Asn Glu Leu Val Lys Ser Ile Lys Gln

3735            3744            3753            3762            3771            3780  
 AGC AAG AGG GGG CCG CAA GUG UGC AAG GAU UCC GCA CUU UCA CGU UCG AGA GAG  
 Gln Glu Gly Ala Ala Ser Val Gln Gly Phe Arg Thr Phe Thr Phe Glu Arg Ala

3789            3798            3807            3816            3825            3834  
 CAC UCC UGA AGA GCA CGC AAU UUA GGC CGG AUG CAA CGA UCA UCA UUG AUG AAA  
 Leu Leu Lys Ser Thr Gln Phe Arg Pro Asp Ala Thr Ile Ile Ile Asp Glu Ile

図IV-3-1 PVS-M の全ゲノム配列 (次ページに続く)

3843            3852            3861            3870            3879            3888  
 UUC AGC UGU UCC CAC CAG GUU ACU UGG AUC UAU UCU UUA UGU UGG CGC CAG CGG  
 Gln Leu Phe Pro Pro Gly Tyr Leu Asp Leu Phe Phe Met Leu Ala Pro Ala Gly

3897            3906            3915            3924            3933            3942  
 GGG UGC ACG UGU UCU UGG UGG GCG AUC CGU GCC AAA GCG ACU AUG ACU CAG AAA  
 Val His Val Phe Leu Val Gly Asp Pro Cys Gln Ser Asp Tyr Asp Ser Glu Lys

3951            3960            3969            3978            3987            3996  
 AAG AUC GGA GCC UGU UUC AAG CCA UGA AAU CCG ACA UCA AUC UCC UGU UGG AUG  
 Asp Arg Ser Leu Phe Gln Ala Met Lys Ser Asp Ile Asn Leu Leu Leu Asp Asp

4005            4014            4023            4032            4041            4050  
 AUG CGG AUU AUG AUU UCA AUU GCA GGA GUC GCA GAU UCA AGG AUA AGC UUU UUG  
 Ala Asp Tyr Asp Phe Asn Cys Arg Ser Arg Arg Phe Lys Asp Lys Leu Phe Asp

4059            4068            4077            4086            4095            4104  
 AUG GCC GUU UGC CAU GCU CUA UGG GAC CCA UGG AAG GGG AGC CAU UCA AGU UCA  
 Gly Arg Leu Pro Cys Ser Met Gly Pro Met Glu Gly Glu Pro Phe Lys Phe Thr

4113            4122            4131            4140            4149            4158  
 CAA UCA UUG AGG GCA UUG AAA AUU GUA AAG CCA UUC ACC CAC AGG CUG AAG UUU  
 Ile Ile Glu Gly Ile Glu Asn Cys Lys Ala Ile His Pro Gln Ala Glu Val Cys

4167            4176            4185            4194            4203            4212  
 GUU UAG UGU CCU CGU UUG AUG AAA AGA AGA UAG UGC AGA CUU ACU UCC CGA GCU  
 Leu Val Ser Ser Phe Asp Glu Lys Lys Ile Val Gln Thr Tyr Phe Pro Ser Ser

4221            4230            4239            4248            4257            4266  
 CUU GCC AUU GCU UCA CUU UUG GAG AAU CAA CGG GGA UGA CAU ACA GGU CUG GAG  
 Cys His Cys Phe Thr Phe Gly Glu Ser Thr Gly Met Thr Tyr Arg Ser Gly Val

4275            4284            4293            4302            4311            4320  
 UGA UAC UAA UCA CAG ACA CCU CAC AAU ACA CCA GUG AGA GGA GGU GGU UAA CUG  
 Ile Leu Ile Thr Asp Thr Ser Gln Tyr Thr Ser Glu Arg Arg Trp Leu Thr Ala

4329            4338            4347            4356            4365            4374  
 CCC UGA GCC GCU UCU CAC AUU CAA UCG CCU UCG UGA AUG CAA CCG GUG GAA ACA  
 Leu Ser Arg Phe Ser His Ser Ile Ala Phe Val Asn Ala Thr Gly Gly Asn Ile

図IV-3-1 PVS-M の全ゲノム配列 (次ページに続く)

4383            4392            4401            4410            4419            4428  
 UUC AGU UGG UGA CCA GGU UAU ACC AAA AUA GGG UUC UAG GUC GAU UUC UGC UCA  
 Gln Leu Val Thr Arg Leu Tyr Gln Asn Arg Val Leu Gly Arg Phe Leu Leu Lys

4437            4446            4455            4464            4473            4482  
 AAA CGG CAA AGA UUG AUG ACC UUA AGA UGU UGU UGC CUG GUA GGC CAU GCU UUA  
 Thr Ala Lys Ile Asp Asp Leu Lys Met Leu Leu Pro Gly Arg Pro Cys Phe Lys

4491            4500            4509            4518            4527            4536  
 AAG AGG GUU UUG GGG GCG AAA GGA UUG GCG CAG AUG AGG GCA AGA GAG AGU UCA  
 Glu Gly Phe Gly Gly Glu Arg Ile Gly Ala Asp Glu Gly Lys Arg Glu Phe Lys

4545            4554            4563            4572            4581            4590  
 AGU UGG AGG GUG AUC CGU GGU UGA AAA CAA UGC UAG AUC UAC UAC AGA AAG AGG  
 Leu Glu Gly Asp Pro Trp Leu Lys Thr Met Leu Asp Leu Leu Gln Lys Glu Asp

4599            4608            4617            4626            4635            4644  
 AUC AGG AGG AGG UCG AGG AAG CCG UUG UUG AAC UUG GUG AGG AAU GGU UUC GCA  
 Gln Glu Glu Val Glu Glu Ala Val Val Glu Leu Gly Glu Glu Trp Phe Arg Thr

4653            4662            4671            4680            4689            4698  
 CAC AUC UAC CGC AAU GCG AGC UGG AGG GCG UCA GAG CAA GGU GGG UUG AAA AGA  
 His Leu Pro Gln Cys Glu Leu Glu Gly Val Arg Ala Arg Trp Val Glu Lys Ile

4707            4716            4725            4734            4743            4752  
 UAC UGG CAA AAG AAG UCC GUG AGA AAA GGA UGG GGC UAU UGG UCU CAG AGC AAU  
 Leu Ala Lys Glu Val Arg Glu Lys Arg Met Gly Leu Leu Val Ser Glu Gln Phe

4761            4770            4779            4788            4797            4806  
 UCA CAG ACG AGC AUU CAA AGC AGU UGG GGA AGC AAA UCA CAA AUG CCG CCG AGA  
 Thr Asp Glu His Ser Lys Gln Leu Gly Lys Gln Ile Thr Asn Ala Ala Glu Arg

4815            4824            4833            4842            4851            4860  
 GGU UUG AAA CUA UCU ACC CGC GGC ACA GAG CUG CGG ACA CAG UCA CUU UCA UCA  
 Phe Glu Thr Ile Tyr Pro Arg His Arg Ala Ala Asp Thr Val Thr Phe Ile Met

4869            4878            4887            4896            4905            4914  
 UGG CUG UGA GGA AAA GAU UGA GGU UUU CGG ACC CAA UUA GAG AGA GUG CAA AGC  
 Ala Val Arg Lys Arg Leu Arg Phe Ser Asp Pro Ile Arg Glu Ser Ala Lys Leu

図IV-3-1 PVS-M の全ゲノム配列 (次ページに続く)

4923            4932            4941            4950            4959            4968  
 UCC GGG UUG CAG AGA UGU AUG GGC CCU UCC UAC UGA AAG AAU UUC UCA AGC AUG  
 Arg Val Ala Glu Met Tyr Gly Pro Phe Leu Leu Lys Glu Phe Leu Lys His Val

4977            4986            4995            5004            5013            5022  
 UGC CAC UGA AAC CAA UGC AUG AUA CAA GAA UGA UGG CUG AGG CAA AGU UUG AUU  
 Pro Leu Lys Pro Met His Asp Thr Arg Met Met Ala Glu Ala Lys Phe Asp Phe

5031            5040            5049            5058            5067            5076  
 UUG AGG AGA AGA AGA CGC AGA AGA GCG CAG CCA CAA UUG AGA ACC ACA GCA ACC  
 Glu Glu Lys Lys Thr Gln Lys Ser Ala Ala Thr Ile Glu Asn His Ser Asn Arg

5085            5094            5103            5112            5121            5130  
 GAU CUU GCA GGG ACU GGC UGG CCG ACA UGG GUA UGG UUU UCU CAA AGU CUC AAC  
 Ser Cys Arg Asp Trp Leu Ala Asp Met Gly Met Val Phe Ser Lys Ser Gln Leu

5139            5148            5157            5166            5175            5184  
 UCU GCA CAA AGU UUG ACA AUC GGU UCA GGG AUG CGA AAG CAG CAC AAA CCA UUG  
 Cys Thr Lys Phe Asp Asn Arg Phe Arg Asp Ala Lys Ala Ala Gln Thr Ile Val

5193            5202            5211            5220            5229            5238  
 UCU GUU UCC AAC AUA GCG UCC UAU GCC GCU UUG CUC CAU ACA UGA GGU ACA UUG  
 Cys Phe Gln His Ser Val Leu Cys Arg Phe Ala Pro Tyr Met Arg Tyr Ile Glu

5247            5256            5265            5274            5283            5292  
 AAA AGA AAC UCA AUG AAG UAU UAC CAG CAA GGU UUU ACA UUC AUU CAG GCA AAG  
 Lys Lys Leu Asn Glu Val Leu Pro Ala Arg Phe Tyr Ile His Ser Gly Lys Gly

5301            5310            5319            5328            5337            5346  
 GCU UGG AAG AGC UAA AUA AAU GGG UCA UAG AGU CCA AAU UCG ACG GGC UGU GCA  
 Leu Glu Glu Leu Asn Lys Trp Val Ile Glu Ser Lys Phe Asp Gly Leu Cys Thr

5355            5364            5373            5382            5391            5400  
 CAG AGU CUG ACU AUG AAG CCU UCG ACG CUA GUC AAG ACC AGU ACA UAG UAG CGU  
 Glu Ser Asp Tyr Glu Ala Phe Asp Ala Ser Gln Asp Gln Tyr Ile Val Ala Phe

5409            5418            5427            5436            5445            5454  
 UUG AGC UAG CAU UGA UGA GGU AUU UGG GCU UGC CCA AUG AUC UCA UAG AGG AUU  
 Glu Leu Ala Leu Met Arg Tyr Leu Gly Leu Pro Asn Asp Leu Ile Glu Asp Tyr

図IV-3-1 PVS-M の全ゲノム配列 (次ページに続く)

5463            5472            5481            5490            5499            5508  
 ACA AGU ACA UCA AAA CGC ACC UGG GCU CAA AGU UGG GGA AUU UUG CCA UAA UGC  
 Lys Tyr Ile Lys Thr His Leu Gly Ser Lys Leu Gly Asn Phe Ala Ile Met Arg

5517            5526            5535            5544            5553            5562  
 GUU UCU CUG GUG AGG CUA GCA CCU UCU UGU UCA ACA CAA UGG CCA AUA UGC UUU  
 Phe Ser Gly Glu Ala Ser Thr Phe Leu Phe Asn Thr Met Ala Asn Met Leu Phe

5571            5580            5589            5598            5607            5616  
 UCA CAU UCU UAA GAU ACA AGU UGA AAG GGG AUG AGC GAA UAU GCU UCG CUG GUG  
 Thr Phe Leu Arg Tyr Lys Leu Lys Gly Asp Glu Arg Ile Cys Phe Ala Gly Asp

5625            5634            5643            5652            5661            5670  
 AUG ACA UGU GCG CCA ACA GAG CUC UGU UCA UUA AAG AUA CUC AUG AGG GCU UCC  
 Asp Met Cys Ala Asn Arg Ala Leu Phe Ile Lys Asp Thr His Glu Gly Phe Leu

5679            5688            5697            5706            5715            5724  
 UCA AAA AGC UUA AGU UGA AGG CGA AGG UUG AUA GGA CAA ACC GAC CAA GUU UCU  
 Lys Lys Leu Lys Leu Lys Ala Lys Val Asp Arg Thr Asn Arg Pro Ser Phe Cys

5733            5742            5751            5760            5769            5778  
 GCG GGU GGA GCU UGU GCU CAG AUG GGA UUU AUA AGA AGC CGC AGC UGG UCU UUG  
 Gly Trp Ser Leu Cys Ser Asp Gly Ile Tyr Lys Lys Pro Gln Leu Val Phe Glu

5787            5796            5805            5814            5823            5832  
 AGA GAC UUU GUA UCG CCA AGG AAA CGG CCA ACU UGG CCA AUU GCA UUG ACA AUU  
 Arg Leu Cys Ile Ala Lys Glu Thr Ala Asn Leu Ala Asn Cys Ile Asp Asn Tyr

5841            5850            5859            5868            5877            5886  
 AUG CAA UUG AGG UAU CCU AUG CCU ACA AGC UCG GAG AGA GGA UUA AGG AGC GCA  
 Ala Ile Glu Val Ser Tyr Ala Tyr Lys Leu Gly Glu Arg Ile Lys Glu Arg Met

5895            5904            5913            5922            5931            5940  
 UGU CAG AGG AGG AAC UGG AUG CCU UCU ACA AUU GUG UGA GGG UGA UUA UUA AGC  
 Ser Glu Glu Glu Leu Asp Ala Phe Tyr Asn Cys Val Arg Val Ile Ile Lys His

5949            5958            5967            5976            5985            5994  
 AUA AGC AUU UGC UGA AGU CUG AGA UUC GCU GUG UGU AUG AGG AUG UUU GAU AGC  
 Lys His Leu Leu Lys Ser Glu Ile Arg Cys Val Tyr Glu Asp Val \*

図IV-3-1 PVS-M の全ゲノム配列 (次ページに続く)

6003	6012	6021	6030	6039	6048
UUA GGU AAU CAG CUU AGU	AGU AUU GAA UAU AUG GAU GUG UUU UUG CAA GUU UUG	ORF2→	Met Asp Val Phe Leu Gln Val Leu		
6057	6066	6075	6084	6093	6102
AAU AAA UAU AAG UUU GAG CGU GUU AGU AGU ACU UUA AAU AAA CCA AUA GUU GUU	Asn Lys Tyr Lys Phe Glu Arg Val Ser Ser Thr Leu Asn Lys Pro Ile Val Val				
6111	6120	6129	6138	6147	6156
CAU AGU GUC CCG GGA GCU GGU AAA AGU UCC GCU AUU CGG GAG UUG CUU AAA UUA	His Ser Val Pro Gly Ala Gly Lys Ser Ser Ala Ile Arg Glu Leu Leu Lys Leu				
6165	6174	6183	6192	6201	6210
GAU AGU AGG UUU GAG UGC AUU ACC CGU GGC CGG CCA GAC AUC CCG AAU CUA GAG	Asp Ser Arg Phe Glu Cys Ile Thr Arg Gly Arg Pro Asp Ile Pro Asn Leu Glu				
6219	6228	6237	6246	6255	6264
GGG GCU UUC AUC AAG GCU GAG CGU AGU GGG GAG AAU AAA UUG CUG CUG GUU GAU	Gly Ala Phe Ile Lys Ala Glu Arg Ser Gly Glu Asn Lys Leu Leu Leu Val Asp				
6273	6282	6291	6300	6309	6318
GAG UAC AUA GAA GGG CCG GUC CCA GAG GAC GCC UUU GCA AUC UUU GCA GAU CCA	Glu Tyr Ile Glu Gly Pro Val Pro Glu Asp Ala Phe Ala Ile Phe Ala Asp Pro				
6327	6336	6345	6354	6363	6372
CUC CAG AGU ACC GCU GUG AGC CCA CAC CGG GCG CAC UUC GUC AAA ACA UUG AGC	Leu Gln Ser Thr Ala Val Ser Pro His Arg Ala His Phe Val Lys Thr Leu Ser				
6381	6390	6399	6408	6417	6426
CAU CGC UUU GGC AAG UGU ACC GCU UCC CUU UUG AGA GAU UUG GGU UGG GAC GUG	His Arg Phe Gly Lys Cys Thr Ala Ser Leu Leu Arg Asp Leu Gly Trp Asp Val				
6435	6444	6453	6462	6471	6480
CAG GCA GAA GGU CAA GAU UCA GUU CAA AUU GCA GAU AUC UUC ACA GUU GAU CCU	Gln Ala Glu Gly Gln Asp Ser Val Gln Ile Ala Asp Ile Phe Thr Val Asp Pro				
6489	6498	6507	6516	6525	6534
AGG GAU ACU AUU GUG UAC UUC GAG CCG GAA GUU GGA GAG UUA CUG AGG AGC CAC	Arg Asp Thr Ile Val Tyr Phe Glu Pro Glu Val Gly Glu Leu Leu Arg Ser His				

図IV-3-1 PVS-M の全ゲノム配列 (次ページに続く)

6543            6552            6561            6570            6579            6588  
 GGU GUC GAG GCG AGC UGC AUU GGU GAG GUG CGC GGG GCC ACU UUC GAA CAC GUA  
 Gly Val Glu Ala Ser Cys Ile Gly Glu Val Arg Gly Ala Thr Phe Glu His Val

6597            6606            6615            6624            6633            6642  
 ACC UUC GUC ACU UCU GAG AAC GGU CCG CUG GUU GAU AAG GCU GCU GCU UUU CAG  
 Thr Phe Val Thr Ser Glu Asn Gly Pro Leu Val Asp Lys Ala Ala Ala Phe Gln

6651            6660            6669            6678            6687            6696  
 UGC UUG ACG AGG CAC ACC AAG AGC UUG CUC AUA UUG UGC CCU GAU GCC ACU UAC  
 Cys Leu Thr Arg His Thr Lys Ser Leu Leu Ile Leu Cys Pro Asp Ala Thr Tyr  
 ORF3→ Met Pro Leu Thr

6705            6714            6723            6732            6741            6750  
 ACC GCC GCC UAA CUA CAC AGG GUU AUA CAU UGC UGC AGC UUU GGG AGU GUC CCU  
 Thr Ala Ala \*  
 Pro Pro Pro Asn Tyr Thr Gly Leu Tyr Ile Ala Ala Ala Leu Gly Val Ser Leu

6759            6768            6777            6786            6795            6804  
 UGC CGC CGU AGU AGC AUU GUU CAC UAG GAG UAC ACU ACC AAU UGU UGG GGA UUC  
 Ala Ala Val Val Ala Leu Phe Thr Arg Ser Thr Leu Pro Ile Val Gly Asp Ser

6813            6822            6831            6840            6849            6858  
 GCA GCA CAA CCU CCC ACA CGG GGG GCG GUA UCG CGA CGG CAC UAA AGC UAU UGA  
 Gln His Asn Leu Pro His Gly Gly Arg Tyr Arg Asp Gly Thr Lys Ala Ile Asp

6867            6876            6885            6894            6903            6912  
 UUA CUU UAA ACC CGC GAA GUU GAA UUC UGU UGA GCC UGG UAA UCA CUG GUA CGC  
 Tyr Phe Lys Pro Ala Lys Leu Asn Ser Val Glu Pro Gly Asn His Trp Tyr Ala

6921            6930            6939            6948            6957            6966  
 UCA ACC UUG GCU GCU AGU UUU ACU UCU AGU UGC GCU CAU CUG CUU AUC AGG GCG  
 Gln Pro Trp Leu Leu Val Leu Leu Leu Val Ala Leu Ile Cys Leu Ser Gly Arg

6975            6984            6993            7002            7011            7020  
 UCA UGC UCC AUG CUG UCC AAG GUG CAA CCG AGU GCA CAG UGC UUA AUG GUU UUC  
 His Ala Pro Cys Cys Pro Arg Cys Asn Arg Val His Ser Ala \*  
 ORF4→ Met Leu Ser Lys Val Gln Pro Ser Ala Gln Cys Leu Met Val Phe

7029            7038            7047            7056            7065            7074  
 AUC UUG GCA UUC GCG CUA AGU UGG UAU GUG CUC AGG CCA GGA AAU ACA AGC UGC  
 Ile Leu Ala Phe Ala Leu Ser Trp Tyr Val Leu Arg Pro Gly Asn Thr Ser Cys

図IV-3-1 PVS-M の全ゲノム配列 (次ページに続く)

7083	7092	7101	7110	7119	7128
GUU CUA CUC AUC ACU GGG GAA UCA GUC CGG CUA GUC AAU UGC GAG CUC ACA AGA					
Val Leu Leu Ile Thr Gly Glu Ser Val Arg Leu Val Asn Cys Glu Leu Thr Arg					
7137	7146	7155	7164	7173	7182
GAU UUA GUG GAG GCC GUA GCA ACA UUG GGG CCG UUG AAG CAC CUU UAG GUU CAC					
Asp Leu Val Glu Ala Val Ala Thr Leu Gly Pro Leu Lys His Leu *					
7191	7200	7209	7218	7227	7236
AGG UAA GAG UUC GAA GAA ACU GUC CCA CAG AGA AAA UGC CGC CCA AAC CGG AUC					
			ORF5→	Met Pro Pro Lys Pro Asp Pro	
7245	7254	7263	7272	7281	7290
CGA CAA GCU CAG GAG AGA CAC CAC AAA CUA UGC CGC UUG UGC CGC CGC CCA GGA					
Thr Ser Ser Gly Glu Thr Pro Gln Thr Met Pro Leu Val Pro Pro Pro Arg Asn					
7299	7308	7317	7326	7335	7344
ACG CAG AGG AGC AUA GAG UUG GCC CAA AUC AAG GGC ACG GGC AAA AUG AAG AGG					
Ala Glu Glu His Arg Val Gly Pro Asn Gln Gly His Gly Gln Asn Glu Glu Ala					
7353	7362	7371	7380	7389	7398
CUA UGC UGG AGC AGA GGC UCA UCA GAU UGA UUG AAC UCA UGG CCU CGA AAA GGC					
Met Leu Glu Gln Arg Leu Ile Arg Leu Ile Glu Leu Met Ala Ser Lys Arg His					
7407	7416	7425	7434	7443	7452
ACA AUU CAA CAU UGA GCA ACA UCU CUU UCG AGA UAG GUA GGC CCU CGC UUG AGC					
Asn Ser Thr Leu Ser Asn Ile Ser Phe Glu Ile Gly Arg Pro Ser Leu Glu Pro					
7461	7470	7479	7488	7497	7506
CGA CCC CUG AAA UGC GGA GGA AUC CGG AGA ACC CAU ACU CGC GGU UUU CAA UAG					
Thr Pro Glu Met Arg Arg Asn Pro Glu Asn Pro Tyr Ser Arg Phe Ser Ile Asp					
7515	7524	7533	7542	7551	7560
AUG AGC UGU UCA AAA UGG AAA UCC GAU CUG UGU CCA ACA ACA UGG CGA ACA CCG					
Glu Leu Phe Lys Met Glu Ile Arg Ser Val Ser Asn Asn Met Ala Asn Thr Glu					
7569	7578	7587	7596	7605	7614
AGC AAA UGG CAC AAA UCA CUG CUG ACA UCG CUG GAC UUG GGG UAC CCA CUG AAC					
Gln Met Ala Gln Ile Thr Ala Asp Ile Ala Gly Leu Gly Val Pro Thr Glu His					

図IV-3-1 PVS-M の全ゲノム配列 (次ページに続く)

7623	7632	7641	7650	7659	7668
AUG UUG CAG GGG UCA UAC UGA AAG UGG UGA UCA UGU GUG CAA GCG UGA GUA GUU					
Val Ala Gly Val Ile Leu Lys Val Val Ile Met Cys Ala Ser Val Ser Ser Ser					
7677	7686	7695	7704	7713	7722
CUG UUU AUC UAG AUC CAG CAG GGA CUG UGG AGU UCC CAA CAG GCG CAG UGC CCU					
Val Tyr Leu Asp Pro Ala Gly Thr Val Glu Phe Pro Thr Gly Ala Val Pro Leu					
7731	7740	7749	7758	7767	7776
UGG ACU CGA UCA UUG CAA UUA UGA AGA AUC GCG CGG GAU UGA GGA AAG UGU GCA					
Asp Ser Ile Ile Ala Ile Met Lys Asn Arg Ala Gly Leu Arg Lys Val Cys Arg					
7785	7794	7803	7812	7821	7830
GGC UGU AUG CUC CAG UCG UGU GGA AUU ACA UGC UAG UCC AGA AUA GGC CAC CUU					
Leu Tyr Ala Pro Val Val Trp Asn Tyr Met Leu Val Gln Asn Arg Pro Pro Ser					
7839	7848	7857	7866	7875	7884
CGG AUU GGC AGG CUA UGG GAU UCC AGU GGA AUG CAC GUU UCG CCG CAU UUG ACA					
Asp Trp Gln Ala Met Gly Phe Gln Trp Asn Ala Arg Phe Ala Ala Phe Asp Thr					
7893	7902	7911	7920	7929	7938
CAU UCG AUU AUG UGA CUA AUG GGG CUG CAA UCC AGC CCG UAG AGG GGC UCA UAC					
Phe Asp Tyr Val Thr Asn Gly Ala Ala Ile Gln Pro Val Glu Gly Leu Ile Arg					
7947	7956	7965	7974	7983	7992
GUA GGC CCA CGC CUG AGG AAA CGA UAG CUC ACA AUG CCC ACA AGA GUA UGG CAA					
Arg Pro Thr Pro Glu Glu Thr Ile Ala His Asn Ala His Lys Ser Met Ala Ile					
8001	8010	8019	8028	8037	8046
UUG ACA AGU CGA ACA GAA AUG AGC GGU UGG CCA ACA CUA AUG UUG AGU ACA CUG					
Asp Lys Ser Asn Arg Asn Glu Arg Leu Ala Asn Thr Asn Val Glu Tyr Thr Gly					
8055	8064	8073	8082	8091	8100
GAG GGA UGC AUG GCG CUG AGA UUG UGC GCA AUC ACC GUA AUG CGA UCA ACC AAU					
Gly Met His Gly Ala Glu Ile Val Arg Asn His Arg Asn Ala Ile Asn Gln *					
					ORF6→ Met
8109	8118	8127	8136	8145	8154
GAA GGC AGA CCG UUU AGC CAC GUU GUU AUU GUG UGU CCA UCG ACU GGG AUA UGU					
Lys Ala Asp Arg Leu Ala Thr Leu Leu Leu Cys Val His Arg Leu Gly Tyr Val					

図IV-3-1 PVS-M の全ゲノム配列 (次ページに続く)

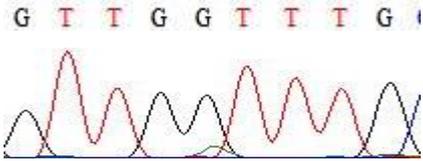
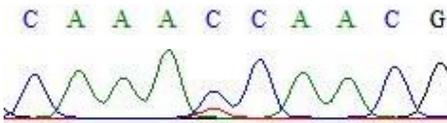
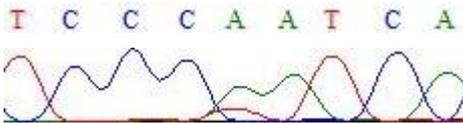
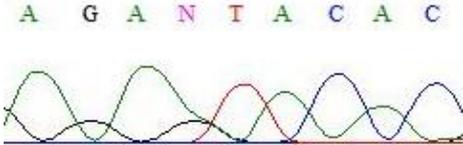
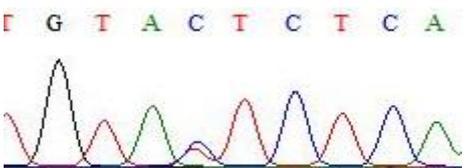
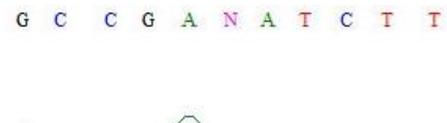
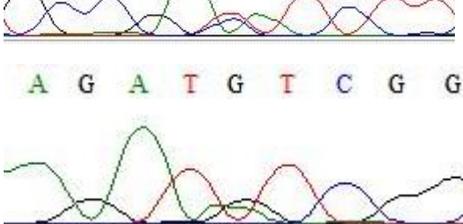
8163	8172	8181	8190	8199	8208
GGU GCC AGU UGA AAU UUG UGU AAA UAU AAU AAG CCU AAG CGC AGG UCC AAU UUC					
Val Pro Val Glu Ile Cys Val Asn Ile Ile Ser Leu Ser Ala Gly Pro Ile Ser					
8217	8226	8235	8244	8253	8262
UGG GGG GCG UUC CAC UUA CGC UCG CAA GCG GAG GGC CCG CAG CAU UGG GCG AUG					
Gly Gly Arg Ser Thr Tyr Ala Arg Lys Arg Arg Ala Arg Ser Ile Gly Arg Cys					
8271	8280	8289	8298	8307	8316
CUG GCG AUG UUA UCG UGU CUA UCC ACC UAU UUG UAA UUC UAA GUG UGA UAA UAG					
Trp Arg Cys Tyr Arg Val Tyr Pro Pro Ile Cys Asn Ser Lys Cys Asp Asn Arg					
8325	8334	8343	8352	8361	8370
AAC GUG CCG UCC AGG CAU UAG UCA AAA UUA UAA AGU AGU GAC UUU CAU UCG GGG					
Thr Cys Arg Pro Gly Ile Ser Gln Asn Tyr Lys Val Val Thr Phe Ile Arg Gly					
8379	8388	8397	8406	8415	8424
UUG GAG UAA CUG AGG UGA UAC CAC CCA UGG UGC AAA GUC AGA GUU UCG CAU AAA					
Trp Ser Asn *					
8433	8442	8451	8460	8469	8478
ACU UAA AUA AUA UAU AAG UGU GCA ACU AUA AAG AAA AUA UGU UUU UAA AAU AUU					
8486					
UUA GCA UU 3'					

図IV-3-1 PVS-M の全ゲノム配列

PVS-M のゲノム配列は塩基番号、塩基配列、アミノ酸配列の順に示す。

各 ORF の始まりは「→」で示し、終わりは「\*」で示す。

表IV-3-3： SoPLV K-1 のダイレクトシーケンシング解析で見られた2つの塩基の重なり箇所

塩基 番目	プライマー	波形図	塩基	アミノ酸
		1433		
	PVS-61P		G(A)	Gln
1433	PVS-55M			
		1610		
	PVS-61P		A(U)	Pro
1610	PVS-55M			
		1732		
	PVS-61P		G(A)	Ser(Asn)
1732	PVS-55M			
		6462		
	PVS-48P		C(U)	Asp
6462	PVS-53M			

アミノ酸配列に影響するものは紫色で示す。

9            18            27            36            45            54  
 5' GAU AAA CAC UCC CGA AAA UAA UUU GAC UUA AAC AAC UCG ACA GUU CAA GCA AAU  
  
 63            72            81            90            99            108  
 UAC UUA AAA UGG CAC UUA CUU ACA GAA GUC CAA UCG AGG AAG UGU UAA CAC UAC  
 ORF1→ Met Ala Leu Thr Tyr Arg Ser Pro Ile Glu Glu Val Leu Thr Leu Leu  
  
 117           126           135           144           153           162  
 UAG AGC CCA AUG CUC AAU CUC UGA UCU CCA ACG UUG CCA CCA GCA GCU UCC AAG  
 Glu Pro Asn Ala Gln Ser Leu Ile Ser Asn Val Ala Thr Ser Ser Phe Gln Glu  
  
 171           180           189           198           207           216  
 AGA GUG AGA AGG AUA ACU UCG CUU GGU UUU GCU ACC AUG UGC CCG CUA ACG CCA  
 Ser Glu Lys Asp Asn Phe Ala Trp Phe Cys Tyr His Val Pro Ala Asn Ala Lys  
  
 225           234           243           252           261           270  
 AGG AAC AUC UUA GCA AAG CCG GAA UUU ACC UAA GCC CAU ACU CAG GGU AUC CUC  
 Glu His Leu Ser Lys Ala Gly Ile Tyr Leu Ser Pro Tyr Ser Gly Tyr Pro His  
  
 279           288           297           306           315           324  
 AUU CUC ACC CAG UGU GCA AAA CAU UGG AGA AUU ACC UAC UGU ACA AAG UCU UAC  
 Ser His Pro Val Cys Lys Thr Leu Glu Asn Tyr Leu Leu Tyr Lys Val Leu Pro  
  
 333           342           351           360           369           378  
 CAC CAC UUG UAA AUA ACA CCU UUU ACU UCG UAG GAA UUA AAG AAU UUA AGU UAA  
 Pro Leu Val Asn Asn Thr Phe Tyr Phe Val Gly Ile Lys Glu Phe Lys Leu Asn  
  
 387           396           405           414           423           432  
 AUU UUC UUA AGA AAA GAA UCA AGC AAA UGA GCA UGA UUC AAG CAA UAA AUA GGU  
 Phe Leu Lys Lys Arg Ile Lys Gln Met Ser Met Ile Gln Ala Ile Asn Arg Tyr  
  
 441           450           459           468           477           486  
 AUG UGA GCA GUG CCG AUA AGU UGA GGU ACG GCA AUG AGU UUG UUA UUA AAU UCG  
 Val Ser Ser Ala Asp Lys Leu Arg Tyr Gly Asn Glu Phe Val Ile Lys Phe Gly  
  
 495           504           513           522           531           540  
 GCA CUG CAU CAG CUG AGC UCA AGC GUC AUC AUG GUU ACU CAC UGG ACC CAG CAU  
 Thr Ala Ser Ala Glu Leu Lys Arg His His Gly Tyr Ser Leu Asp Pro Ala Leu  
  
 549           558           567           576           585           594  
 UGC GUG AUC UUU UGC CCA ACA UAA AGA GGG ACU CUA AUC UCU UCU UCC ACG AUG  
 Arg Asp Leu Leu Pro Asn Ile Lys Arg Asp Ser Asn Leu Phe Phe His Asp Glu

図IV-3-2 SoPLV K-1 の全ゲノム配列 (次ページに続く)

603            612            621            630            639            648  
 AGA UGC ACU AUU GGG AAA AGA AUC AAC UGA UCA AUU UCU UGG AAC AUU GUC GGC  
 Met His Tyr Trp Glu Lys Asn Gln Leu Ile Asn Phe Leu Glu His Cys Arg Pro

657            666            675            684            693            702  
 CCA ACA CGU GCU UAU GCA CAA UUG UGU AUC CUA CUG AGA UAU UCG UUG GGG CUC  
 Asn Thr Cys Leu Cys Thr Ile Val Tyr Pro Thr Glu Ile Phe Val Gly Ala Arg

711            720            729            738            747            756  
 GGC GAU CCU UGA ACC CAU GGG CAU AUG AGU UUG AGA UAA AAA GGG AUA AGC UGC  
 Arg Ser Leu Asn Pro Trp Ala Tyr Glu Phe Glu Ile Lys Arg Asp Lys Leu Leu

765            774            783            792            801            810  
 UUU UCU ACC CAG ACG GGG UGC GCA GCG AAG GUU AUG AGC AGC CGG UCA ACU GCG  
 Phe Tyr Pro Asp Gly Val Arg Ser Glu Gly Tyr Glu Gln Pro Val Asn Cys Gly

819            828            837            846            855            864  
 GGU AUC UGC UUC GCA CAA GGA AGA UAU UGC UUA GGG ACG GUA CUG UGU ACA GCG  
 Tyr Leu Leu Arg Thr Arg Lys Ile Leu Leu Arg Asp Gly Thr Val Tyr Ser Val

873            882            891            900            909            918  
 UUG AUC UCG UGU GCA GCA AAU UUU CCC ACC ACC UGG UAG CUA UCA CCA AGG GGG  
 Asp Leu Val Cys Ser Lys Phe Ser His His Leu Val Ala Ile Thr Lys Gly Asp

927            936            945            954            963            972  
 AAU UGA UCA CCC CAG CCU AUC GCA GUU UUG GCC CUU UCG AAG CGA UCA AGA GCG  
 Leu Ile Thr Pro Ala Tyr Arg Ser Phe Gly Pro Phe Glu Ala Ile Lys Ser Ala

981            990            999            1008            1017            1026  
 CAG GUU UGC AAG GGA UAA GUA AAG GUA GAC CGA AGU UCU ACC CGG UAC CAU GCC  
 Gly Leu Gln Gly Ile Ser Lys Gly Arg Pro Lys Phe Tyr Pro Val Pro Cys His

1035            1044            1053            1062            1071            1080  
 ACA UGA UUU CCA GGU UGU ACA GGU ACU UGC GCU CAU UGA AGA AAC CGG AUA AGC  
 Met Ile Ser Arg Leu Tyr Arg Tyr Leu Arg Ser Leu Lys Lys Pro Asp Lys Gln

1089            1098            1107            1116            1125            1134  
 AAU CUG CAA UGG CGA AGU UCU CCC AGA UGU GCC CAG AAC CCA GUG GAG AUA UGA  
 Ser Ala Met Ala Lys Phe Ser Gln Met Cys Pro Glu Pro Ser Gly Asp Met Ile

図IV-3-2 SoPLV K-1 の全ゲノム配列 (次ページに続く)

1143	1152	1161	1170	1179	1188
UCA GAU UUA UUG AAG AAU UGA GUG AUU UGA UCA UAA AUA CCG GCA CCC UAA GGG					
Arg Phe Ile Glu Glu Leu Ser Asp Leu Ile Ile Asn Thr Gly Thr Leu Arg Val					
1197	1206	1215	1224	1233	1242
UAA UGA UUG AUG CAG AUU UGU GCA AGA AUU UCU UUG GCA AUC UCG GAU UAG CCU					
Met Ile Asp Ala Asp Leu Cys Lys Asn Phe Phe Gly Asn Leu Gly Leu Ala Leu					
1251	1260	1269	1278	1287	1296
UAC CUG CUG CAC UCG CAU CAA AGA UUC GAA GUA CAC GCG CCG UGA GCU UAG AGG					
Pro Ala Ala Leu Ala Ser Lys Ile Arg Ser Thr Arg Ala Val Ser Leu Glu Ala					
1305	1314	1323	1332	1341	1350
CCU UCA UUG CUU CAC UGG AAC CGC UGG UGG UCG ACU GCG AAU UGC AAA CCA UUU					
Phe Ile Ala Ser Leu Glu Pro Leu Val Val Asp Cys Glu Leu Gln Thr Ile Ser					
1359	1368	1377	1386	1395	1404
CUU GGG CUG UAC CGC UCC UGC CCC UGC UGU UCA GCG AAA UUC CCG AUG AAC CAC					
Trp Ala Val Pro Leu Leu Pro Leu Leu Phe Ser Glu Ile Pro Asp Glu Pro Pro					
1413	1422	1431	1440	1449	1458
CUG AGG AUG CCC UUG AGA CUA UGG AGC AGA GGU GGG AGG GCC GCG UUG GUU UGC					
Glu Asp Ala Leu Glu Thr Met Glu Gln Arg Trp Glu Gly Arg Val Gly Leu Leu					
1467	1476	1485	1494	1503	1512
UGA GUG AUC GGA UUC CUG CGC CGU ACC GUG GGG AUA UGU GGA GUG AGU CUA CCC					
Ser Asp Arg Ile Pro Ala Pro Tyr Arg Gly Asp Met Trp Ser Glu Ser Thr Arg					
1521	1530	1539	1548	1557	1566
GCC AGA UGA GCU ACU GGC GCA UUG AUC ACC AGA AAG UCA AAU UUC UGA GAG GGC					
Gln Met Ser Tyr Trp Arg Ile Asp His Gln Lys Val Lys Phe Leu Arg Gly Leu					
1575	1584	1593	1602	1611	1620
UGA UGA GAC UGU AUG UCG ACA GCA UGU GCA CUG AGG GCC UCC CAA UCA CCA CAA					
Met Arg Leu Tyr Val Asp Ser Met Cys Thr Glu Gly Leu Pro Ile Thr Thr Thr					
1629	1638	1647	1656	1665	1674
CUU UUG AAG CCU AUA UUG CUA AGC UUA UAU CGU GCU GUU CCU UGC UCG GGU UGA					
Phe Glu Ala Tyr Ile Ala Lys Leu Ile Ser Cys Cys Ser Leu Leu Gly Leu Thr					

図IV-3-2 SoPLV K-1 の全ゲノム配列 (次ページに続く)

1683            1692            1701            1710            1719            1728  
 CUU UGA UUA AAU GCA UAA CUA CCG CAG AGU AUG CUG AAG UGU CCC UAA UUG UUG  
 Leu Ile Lys Cys Ile Thr Thr Ala Glu Tyr Ala Glu Val Ser Leu Ile Val Glu

1737            1746            1755            1764            1773            1782  
 AGA GUA CAC GCU UGC UCG AUG UGU UAU UCG CAA UUG GGG AUG UCC GCU GGU UCC  
 Ser Thr Arg Leu Leu Asp Val Leu Phe Ala Ile Gly Asp Leu Arg Trp Phe Leu

1791            1800            1809            1818            1827            1836  
 UUG CCA CUC GCC AUU CCA GGU AUA AUG CUA AAU UCU UGG AUG AAA CGA CUG ACU  
 Ala Thr Arg His Ser Arg Tyr Asn Ala Lys Phe Leu Asp Glu Thr Thr Asp Trp

1845            1854            1863            1872            1881            1890  
 GGG CGA GGU ACA AAA GUG AGU UCG AGU GUG CAA CAU ACG AGA AGC CCC GAG GAC  
 Ala Arg Tyr Lys Ser Glu Phe Glu Cys Ala Thr Tyr Glu Lys Pro Arg Gly Leu

1899            1908            1917            1926            1935            1944  
 UUG GCC AUA CUG GCU ACC UUC AGA CUU CUG UGU AUA GUU UUU GUG GUG UGA GUA  
 Gly His Thr Gly Tyr Leu Gln Thr Ser Val Tyr Ser Phe Cys Gly Val Ser Thr

1953            1962            1971            1980            1989            1998  
 CCC GCU GGU CAU UCA ACU CUA ACU ACC UUG GUG AGG AAG AUC UUG GAA UUA ACA  
 Arg Trp Ser Phe Asn Ser Asn Tyr Leu Gly Glu Glu Asp Leu Gly Ile Asn Thr

2007            2016            2025            2034            2043            2052  
 CUU UCG ACU GUG GUA CAA UGG GCA AUU CUG AAC ACC AAC CAU CAA CUG CAU UAG  
 Phe Asp Cys Gly Thr Met Gly Asn Ser Glu His Gln Pro Ser Thr Ala Leu Glu

2061            2070            2079            2088            2097            2106  
 AAU GUG CAC CAC AGG GGC UCA CAA UGG GGG AUU CCU UAA GUU GCG CUU GCG AAG  
 Cys Ala Pro Gln Gly Leu Thr Met Gly Asp Ser Leu Ser Cys Ala Cys Glu Ala

2115            2124            2133            2142            2151            2160  
 CGC GAC UGA GUA UCC GAA UUC UGG CGU UUC CAA CGG AGC AUG GGU UCA ACU UUG  
 Arg Leu Ser Ile Arg Ile Leu Ala Phe Pro Thr Glu His Gly Phe Asn Phe Glu

2169            2178            2187            2196            2205            2214  
 AGA GAA GGG GGU CAG AUG AUC GCG CCA CUU GGU ACU GCA AGA GUC AUC UCG AUU  
 Arg Arg Gly Ser Asp Asp Arg Ala Thr Trp Tyr Cys Lys Ser His Leu Asp Tyr

図IV-3-2 SoPLV K-1 の全ゲノム配列 (次ページに続く)

2223            2232            2241            2250            2259            2268  
 AUG UGC ACA AGG AUA CCC ACU AUG AGA AUC AGG GUU GGC CCA CAU GGU UAA GCA  
 Val His Lys Asp Thr His Tyr Glu Asn Gln Gly Trp Pro Thr Trp Leu Ser Lys

2277            2286            2295            2304            2313            2322  
 AAU GGA UGG AGU UAC AUG ACA UUG AUG AAG CAU ACU AUG AUA GCA UGU UCG CUC  
 Trp Met Glu Leu His Asp Ile Asp Glu Ala Tyr Tyr Asp Ser Met Phe Ala Gln

2331            2340            2349            2358            2367            2376  
 AAG AAC UCC CCG CUG GUG GAA CCU UAG AGC AUG AAG UGA GCG CAG AGG GCU UGU  
 Glu Leu Pro Ala Gly Gly Thr Leu Glu His Glu Val Ser Ala Glu Gly Leu Phe

2385            2394            2403            2412            2421            2430  
 UUG CCC CCG AUU CGC GCA UAG CCA UAG CCG AGG UAG GAG GUG AAU CCC UGG UUU  
 Ala Pro Asp Ser Arg Ile Ala Ile Ala Glu Val Gly Gly Glu Ser Leu Val Ser

2439            2448            2457            2466            2475            2484  
 CGA UUG AGU GUG CCU UGG GGA AGA GAA CAA GAA UGC UGA GAU UGG GCG AGU UCC  
 Ile Glu Cys Ala Leu Gly Lys Arg Thr Arg Met Leu Arg Leu Gly Glu Phe Leu

2493            2502            2511            2520            2529            2538  
 UUG AAA UGC CCG AAU UGU GUC GGA GCU CGC AUC GGC UAC GCA UGC AUU GCU UCG  
 Glu Met Pro Glu Leu Cys Arg Ser Ser His Arg Leu Arg Met His Cys Phe Ala

2547            2556            2565            2574            2583            2592  
 CAU CAA GUG GAG UCA CAU UUA CAU UCA GGC AGA UCA GUU CGC UAG AUU CUG CAG  
 Ser Ser Gly Val Thr Phe Thr Phe Arg Gln Ile Ser Ser Leu Asp Ser Ala Val

2601            2610            2619            2628            2637            2646  
 UGG GGA UUG AUG UGG GGC AGA GCU UAG CGC CGC CGC CGC CUG UAA UGA GUG AAG  
 Gly Ile Asp Val Gly Gln Ser Leu Ala Pro Pro Pro Pro Val Met Ser Glu Ala

2655            2664            2673            2682            2691            2700  
 CGC CCA AGG CUA ACC CGA AUG AUG UUC ACC AUA CGC GGG AAG GGG UUG CGG UGC  
 Pro Lys Ala Asn Pro Asn Asp Val His His Thr Arg Glu Gly Val Ala Val His

2709            2718            2727            2736            2745            2754  
 AUG CAU CCG GCA AGU GCC CGA AUU CUG AGA AAU UUC ACA GGG UAC CCA AUG CUG  
 Ala Ser Gly Lys Cys Pro Asn Ser Glu Lys Phe His Arg Val Pro Asn Ala Gly

図IV-3-2 SoPLV K-1 の全ゲノム配列 (次ページに続く)

2763            2772            2781            2790            2799            2808  
 GGG GGG GUG AUU GCU UUU GGU UGG CAA UCU CUC ACU UCA CUG GAG UUA GUG UGC  
 Gly Gly Asp Cys Phe Trp Leu Ala Ile Ser His Phe Thr Gly Val Ser Val His

2817            2826            2835            2844            2853            2862  
 AUG AUA UGA AGC AAG GGU UAC AGC AGC UGA CUU GGG AAA GUG AGG CCU UUG AUU  
 Asp Met Lys Gln Gly Leu Gln Gln Leu Thr Trp Glu Ser Glu Ala Phe Asp Phe

2871            2880            2889            2898            2907            2916  
 UUG AGC UCA GCC AAC AAU UGA AAC CGA AGG CAU GGG CAG AGG AGG AAG CAA UCA  
 Glu Leu Ser Gln Gln Leu Lys Pro Lys Ala Trp Ala Glu Glu Glu Ala Ile Ile

2925            2934            2943            2952            2961            2970  
 UAG CUA CAA GUA AGC AGU ACC GGU ACA GGA UAG UGG UCU UGA GCG CAG AUA AAG  
 Ala Thr Ser Lys Gln Tyr Arg Tyr Arg Ile Val Val Leu Ser Ala Asp Lys Glu

2979            2988            2997            3006            3015            3024  
 AGC AAA CAG UGA CCU AUA GCC CAA AAC CGG AAG CAG UGC AGU CCA UGG UUC UAU  
 Gln Thr Val Thr Tyr Ser Pro Lys Pro Glu Ala Val Gln Ser Met Val Leu Tyr

3033            3042            3051            3060            3069            3078  
 ACC AUG CCG GAG CUC ACU UUG AGG CAG CUU UGC CCA GGA AUG AUU GUG UGC UCG  
 His Ala Gly Ala His Phe Glu Ala Ala Leu Pro Arg Asn Asp Cys Val Leu Val

3087            3096            3105            3114            3123            3132  
 UUG CUG UAG CAU CAG UCU UGA GGA GGC GUA UUG AGG AGG UGC UUU CGA UCC UGG  
 Ala Val Ala Ser Val Leu Arg Arg Arg Ile Glu Glu Val Leu Ser Ile Leu Gly

3141            3150            3159            3168            3177            3186  
 GUG CGC AAU UGG GUU CAG AAU UUC UCC AGG AUG UGU UGA AGG GGG AGG GCA UCA  
 Ala Gln Leu Gly Ser Glu Phe Leu Gln Asp Val Leu Lys Gly Glu Gly Ile Asn

3195            3204            3213            3222            3231            3240  
 AUC GGG AUC AGU UGG CUG UGG UGU UCA AGC UCU UUG ACA UCU GUG CGC ACA UUC  
 Arg Asp Gln Leu Ala Val Val Phe Lys Leu Phe Asp Ile Cys Ala His Ile His

3249            3258            3267            3276            3285            3294  
 AUG CUG AGA GCG AGG CAU UCG UUG UAA AUC CGG AUG GCA GAU UAC AUG GCA CAU  
 Ala Glu Ser Glu Ala Phe Val Val Asn Pro Asp Gly Arg Leu His Gly Thr Phe

図IV-3-2 SoPLV K-1 の全ゲノム配列 (次ページに続く)

3303            3312            3321            3330            3339            3348  
 UCA AUU UGA GUA AGG AUC ACA UAG AGC AUU GCA AGA GCA AGC CGA UAG GGG UUA  
 Asn Leu Ser Lys Asp His Ile Glu His Cys Lys Ser Lys Pro Ile Gly Val Thr

3357            3366            3375            3384            3393            3402  
 CUA AGU AUA CGA GUG UGC AUG AUG CAA GCU GCG AAA UAA AGC CGG AAA CAC UUU  
 Lys Tyr Thr Ser Val His Asp Ala Ser Cys Glu Ile Lys Pro Glu Thr Leu Ser

3411            3420            3429            3438            3447            3456  
 CUA UGC UGA AAG CUA UGU GCA CGA UGC UUC CUU ACA GUC CAU GCA AGC UUA GAG  
 Met Leu Lys Ala Met Cys Thr Met Leu Pro Tyr Ser Pro Cys Lys Leu Arg Ala

3465            3474            3483            3492            3501            3510  
 CUA AAG UGC UGG CCG AUA GCC UAA AUG CUG GAA GCA CUG GGG UGC UAU GUG AUG  
 Lys Val Leu Ala Asp Ser Leu Asn Ala Gly Ser Thr Gly Val Leu Cys Asp Glu

3519            3528            3537            3546            3555            3564  
 AAC UGU UCA ACA AGG UCG GGA AUC UGU UAG AAG CCA AUG AGG GGA GAU UGC AAG  
 Leu Phe Asn Lys Val Gly Asn Leu Leu Glu Ala Asn Glu Gly Arg Leu Gln Glu

3573            3582            3591            3600            3609            3618  
 AAG GUC CGC GGG AAG UGG GUU GCU UGC UAG GGA CUU UUG GAG CAG GGA AGA GCA  
 Gly Pro Arg Glu Val Gly Cys Leu Leu Gly Thr Phe Gly Ala Gly Lys Ser Met

3627            3636            3645            3654            3663            3672  
 UGG UAU UUA GGA AGG UCC UGA ACA AUA AUC UCG GGA AAA GUA UAC UUU ACA UUU  
 Val Phe Arg Lys Val Leu Asn Asn Asn Leu Gly Lys Ser Ile Leu Tyr Ile Ser

3681            3690            3699            3708            3717            3726  
 CCC CAA GGA AGC ACU UGG CCG ACU CGU UCA AUG AGC UGA UUA AGG CAA UCA AGC  
 Pro Arg Lys His Leu Ala Asp Ser Phe Asn Glu Leu Ile Lys Ala Ile Lys Gln

3735            3744            3753            3762            3771            3780  
 AGA AGG AGG GUG CUA CCA GUG UGC AAG GAU UUC GCA CAU UUA CCU UUG AGC GGG  
 Lys Glu Gly Ala Thr Ser Val Gln Gly Phe Arg Thr Phe Thr Phe Glu Arg Ala

3789            3798            3807            3816            3825            3834  
 CGA UUC UGA AAA GCC CAC AGU UCA GGC CUG AUG CAA CAA UCA UAG UGG AUG AAA  
 Ile Leu Lys Ser Pro Gln Phe Arg Pro Asp Ala Thr Ile Ile Val Asp Glu Ile

図IV-3-2 SoPLV K-1 の全ゲノム配列 (次ページに続く)

3843            3852            3861            3870            3879            3888  
 UAC AGC UGU UCC CAC CGG GUU ACC UGG AUC UAU UCG CAU UGC UGG UAC CUG GAG  
 Gln Leu Phe Pro Pro Gly Tyr Leu Asp Leu Phe Ala Leu Leu Val Pro Gly Gly

3897            3906            3915            3924            3933            3942  
 GGG UGC AUA UAU UCU UAG UGG GGG AUC CCU GCC AGA GCG AUU AUG AUU CGG AGA  
 Val His Ile Phe Leu Val Gly Asp Pro Cys Gln Ser Asp Tyr Asp Ser Glu Lys

3951            3960            3969            3978            3987            3996  
 AGG AUA GAA GCC UCU UUC AAG CAA UGA AGU CUG ACA UUA ACC UCU UGU UGG ACG  
 Asp Arg Ser Leu Phe Gln Ala Met Lys Ser Asp Ile Asn Leu Leu Leu Asp Asp

4005            4014            4023            4032            4041            4050  
 AUG CUG ACU AUA ACU UCA AUU GCA GAA GUC GUA GGU UCA AGG AUA AGA UCU UCG  
 Ala Asp Tyr Asn Phe Asn Cys Arg Ser Arg Arg Phe Lys Asp Lys Ile Phe Glu

4059            4068            4077            4086            4095            4104  
 AGG GUC GUC UGC CGU GCA CUA UGG GAU CCA UGG AAG GGG AAG CGU CCA AAU UCA  
 Gly Arg Leu Pro Cys Thr Met Gly Ser Met Glu Gly Glu Ala Ser Lys Phe Thr

4113            4122            4131            4140            4149            4158  
 CGA UCG UAG AGG GUG UGG AAA AUU GUA AGG CUA UUC ACC CCA AUG CUG AAG UGU  
 Ile Val Glu Gly Val Glu Asn Cys Lys Ala Ile His Pro Asn Ala Glu Val Cys

4167            4176            4185            4194            4203            4212  
 GCU UGG UCU CUU CUU UCG AUG AGA AAA AGA UUG UGC AAA CCU ACU UCC CAA ACU  
 Leu Val Ser Ser Phe Asp Glu Lys Lys Ile Val Gln Thr Tyr Phe Pro Asn Ser

4221            4230            4239            4248            4257            4266  
 CUU GCC ACU GUU UUA CAU UUG GAG AGU CCA CGG GCA UGA CAU ACA AGU CUG GAG  
 Cys His Cys Phe Thr Phe Gly Glu Ser Thr Gly Met Thr Tyr Lys Ser Gly Val

4275            4284            4293            4302            4311            4320  
 UAA UAC UGA UAA CCG ACA CUU CGC AAU ACA CUA GUG AGA GAA GGU GGC UAA CGG  
 Ile Leu Ile Thr Asp Thr Ser Gln Tyr Thr Ser Glu Arg Arg Trp Leu Thr Ala

4329            4338            4347            4356            4365            4374  
 CUC UGA GCC GCU UCU CAC AUU CGA UUG CUU UUG UAA AUG CAA CCG GUG GUA AUA  
 Leu Ser Arg Phe Ser His Ser Ile Ala Phe Val Asn Ala Thr Gly Gly Asn Ile

図IV-3-2 SoPLV K-1 の全ゲノム配列 (次ページに続く)

4383            4392            4401            4410            4419            4428  
 UUC AGU UGG UGA CUA AAC UGU ACC AGA AUA GAG CCC UAG GCC GAU UUU UGC UCC  
 Gln Leu Val Thr Lys Leu Tyr Gln Asn Arg Ala Leu Gly Arg Phe Leu Leu Arg

4437            4446            4455            4464            4473            4482  
 GAA CCG CAA GGG UUG AGG ACC UUA AAU CUC UAU UAC CGG GAA GAC CAA ACU UCA  
 Thr Ala Arg Val Glu Asp Leu Lys Ser Leu Leu Pro Gly Arg Pro Asn Phe Arg

4491            4500            4509            4518            4527            4536  
 GAG AGA GUU UCG AAG GUG AAA GAA UUG GGG CAG AUG AGG GAA AGA GGG AAU UCA  
 Glu Ser Phe Glu Gly Glu Arg Ile Gly Ala Asp Glu Gly Lys Arg Glu Phe Lys

4545            4554            4563            4572            4581            4590  
 AGC UGG AGG GUG ACC CAU GGU UGA AGA CUA UGC UGG AUC UGC UUC AAA AGG AGG  
 Leu Glu Gly Asp Pro Trp Leu Lys Thr Met Leu Asp Leu Leu Gln Lys Glu Asp

4599            4608            4617            4626            4635            4644  
 AUC AAG AGG AAG UCG AAG AAG CCG UGA UUG AGC UAG GUG AGG AAU GGU UCC GCA  
 Gln Glu Glu Val Glu Glu Ala Val Ile Glu Leu Gly Glu Glu Trp Phe Arg Thr

4653            4662            4671            4680            4689            4698  
 CAC AUC UAC CAC AGU GCG AAC UAG AGG GAG UGA GAG CAA GGU GGG UGG AGA AAA  
 His Leu Pro Gln Cys Glu Leu Glu Gly Val Arg Ala Arg Trp Val Glu Lys Ile

4707            4716            4725            4734            4743            4752  
 UAC UGG CUA AGG AGG UAC GCG AAA AGC GCA UGG GCC UGC UGG UUU CUG AAC AAU  
 Leu Ala Lys Glu Val Arg Glu Lys Arg Met Gly Leu Leu Val Ser Glu Gln Phe

4761            4770            4779            4788            4797            4806  
 UCA CGG AUG AGC AUU CAA AGC AAU UGG GGA AGC AGA UCA CAA AUG CAG CCG AGA  
 Thr Asp Glu His Ser Lys Gln Leu Gly Lys Gln Ile Thr Asn Ala Ala Glu Arg

4815            4824            4833            4842            4851            4860  
 GGU UCG AAA CAA UCU ACC CAA GGC ACA GGG CUG CGG ACA CGG UCA CAU UCA UCA  
 Phe Glu Thr Ile Tyr Pro Arg His Arg Ala Ala Asp Thr Val Thr Phe Ile Met

4869            4878            4887            4896            4905            4914  
 UGG CUG UGA GGA AGA GGU UGC GUU UUU CAG AUC CAA UAA GAG AGA GUG CUA AAC  
 Ala Val Arg Lys Arg Leu Arg Phe Ser Asp Pro Ile Arg Glu Ser Ala Lys Leu

図IV-3-2 SoPLV K-1 の全ゲノム配列 (次ページに続く)

4923            4932            4941            4950            4959            4968  
 UCC GGG CAG CAG AGA UGU AUG GGC CGU UCC UAC UUA AGG AAU UCC UCA AGC AUG  
 Arg Ala Ala Glu Met Tyr Gly Pro Phe Leu Leu Lys Glu Phe Leu Lys His Val

4977            4986            4995            5004            5013            5022  
 UAC CAC UCA AAC CUA UGC ACG ACA CGU GCA UGA UGG CUG AAG CAA AGU UCG AUU  
 Pro Leu Lys Pro Met His Asp Thr Cys Met Met Ala Glu Ala Lys Phe Asp Phe

5031            5040            5049            5058            5067            5076  
 UUG AGG AGA AGA AGA CUC AGA AGA GUG CAG CCA CAA UUG AGA AUC AUA GCA ACA  
 Glu Glu Lys Lys Thr Gln Lys Ser Ala Ala Thr Ile Glu Asn His Ser Asn Arg

5085            5094            5103            5112            5121            5130  
 GGU CUU GCA GGG AUU GGC UUG CAG AUG UCG GUA UGG UGU UUU CAA AGU CUC AGC  
 Ser Cys Arg Asp Trp Leu Ala Asp Val Gly Met Val Phe Ser Lys Ser Gln Leu

5139            5148            5157            5166            5175            5184  
 UCU GCA CAA AGU UUG ACA ACA GGU UCA GAG ACG CAA AAG CCG CGC AGA CCA UCG  
 Cys Thr Lys Phe Asp Asn Arg Phe Arg Asp Ala Lys Ala Ala Gln Thr Ile Val

5193            5202            5211            5220            5229            5238  
 UUU GCU UUC AGC ACA GCG UCC UGU GCC GCU UCG CUC CAU ACA UGA GGU ACA UAG  
 Cys Phe Gln His Ser Val Leu Cys Arg Phe Ala Pro Tyr Met Arg Tyr Ile Glu

5247            5256            5265            5274            5283            5292  
 AGA AGA AGC UCA AUG AGG UGU UGC CCG CUA GAU UUU AUA UCC AUU CAG GCA AGG  
 Lys Lys Leu Asn Glu Val Leu Pro Ala Arg Phe Tyr Ile His Ser Gly Lys Gly

5301            5310            5319            5328            5337            5346  
 GUC UGG AAG AGC UGA ACA AGU GGG UCA UUG AGU CCA AGU UUG AGG GGG UGU GCA  
 Leu Glu Glu Leu Asn Lys Trp Val Ile Glu Ser Lys Phe Glu Gly Val Cys Thr

5355            5364            5373            5382            5391            5400  
 CAG AGU CCG AUU AUG AGG CUU UUG AUG CCA GUC AAG AUC AAU ACA UUG UAG CGU  
 Glu Ser Asp Tyr Glu Ala Phe Asp Ala Ser Gln Asp Gln Tyr Ile Val Ala Phe

5409            5418            5427            5436            5445            5454  
 UCG AAU UAG CGC UAA UGC GGU AUU UGG GCC UGC CCA AUG AUC UCA UAG AGG ACU  
 Glu Leu Ala Leu Met Arg Tyr Leu Gly Leu Pro Asn Asp Leu Ile Glu Asp Tyr

図IV-3-2 SoPLV K-1 の全ゲノム配列 (次ページに続く)

5463            5472            5481            5490            5499            5508  
 ACA AGU ACA UCA AGA CAC ACC UUG GUU CCA AGU UGG GGA ACU UUG CUA UAA UGC  
 Lys Tyr Ile Lys Thr His Leu Gly Ser Lys Leu Gly Asn Phe Ala Ile Met Arg

5517            5526            5535            5544            5553            5562  
 GCU UCU CGG GUG AGG CUA GCA CAU UCU UAU UCA ACA CUA UGG CUA ACA UGC UGU  
 Phe Ser Gly Glu Ala Ser Thr Phe Leu Phe Asn Thr Met Ala Asn Met Leu Phe

5571            5580            5589            5598            5607            5616  
 UUA CCU UCU UGA GGU ACA AGU UGA AGG GGG AUG AGA GGA UAU GCU UUG CUG GGG  
 Thr Phe Leu Arg Tyr Lys Leu Lys Gly Asp Glu Arg Ile Cys Phe Ala Gly Asp

5625            5634            5643            5652            5661            5670  
 AUG AUA UGU GUG CAA AUA GGG CUC UUU UCA UCA AGG ACA CAC AUG AGG GCU UCC  
 Asp Met Cys Ala Asn Arg Ala Leu Phe Ile Lys Asp Thr His Glu Gly Phe Leu

5679            5688            5697            5706            5715            5724  
 UCA AGA AGU UGA AGU UGA AAG CUA AGG UGG ACA GGA CAA ACA GAC CAA GUU UCU  
 Lys Lys Leu Lys Leu Lys Ala Lys Val Asp Arg Thr Asn Arg Pro Ser Phe Cys

5733            5742            5751            5760            5769            5778  
 GCG GGU GGA GUU UGU GCU CAG AUG GGA UUU ACA AAA AAC CAC AAC UUG UCU UUG  
 Gly Trp Ser Leu Cys Ser Asp Gly Ile Tyr Lys Lys Pro Gln Leu Val Phe Glu

5787            5796            5805            5814            5823            5832  
 AGA GGC UCU GCA UCG CAA AAG AGA CAG CCA AUU UGG CCA AUU GCA UAG AUA AUU  
 Arg Leu Cys Ile Ala Lys Glu Thr Ala Asn Leu Ala Asn Cys Ile Asp Asn Tyr

5841            5850            5859            5868            5877            5886  
 AUG CGA UCG AGG UGU CCU AUG CGU ACA AGC UCG GAG AGA GGA UUA AAG AGC GCA  
 Ala Ile Glu Val Ser Tyr Ala Tyr Lys Leu Gly Glu Arg Ile Lys Glu Arg Met

5895            5904            5913            5922            5931            5940  
 UGU CAG AGG AGG AAC UAG AUG CUU UCU ACA ACU GUG UGA GGG UUA UUA UCA AAC  
 Ser Glu Glu Glu Leu Asp Ala Phe Tyr Asn Cys Val Arg Val Ile Ile Lys His

5949            5958            5967            5976            5985            5994  
 ACA AGC AUC UAC UCA AGU CUG AAA UCC GCA GUG UGU AUG AGG AGG UUU GAC AGC  
 Lys His Leu Leu Lys Ser Glu Ile Arg Ser Val Tyr Glu Glu Val \*

図IV-3-2 SoPLV K-1 の全ゲノム配列 (次ページに続く)

6003	6012	6021	6030	6039	6048
UUA GGU AAU CAG CUU AGU	AGU AUU GAA UAA AUG GAU GUG UUU UUA CAA GUU UUG	ORF2→	Met Asp Val Phe Leu Gln Val Leu		
6057	6066	6075	6084	6093	6102
AAU AAA UAC AAG UUU GAG CGU AUU AGU AGU GCU UUG AAU AAA CCA AUA GUU GUA	Asn Lys Tyr Lys Phe Glu Arg Ile Ser Ser Ala Leu Asn Lys Pro Ile Val Val				
6111	6120	6129	6138	6147	6156
CAU AGC GUU CCA GGU GCU GGU AAA AGU UCC GCA AUC AGG GAG CUA CUG AAG UUA	His Ser Val Pro Gly Ala Gly Lys Ser Ser Ala Ile Arg Glu Leu Leu Lys Leu				
6165	6174	6183	6192	6201	6210
GAU AGU AGG UUU GAG UGC AUC ACC CGC GGC CGG CCA GAU AUU CCC AAU CUA GAG	Asp Ser Arg Phe Glu Cys Ile Thr Arg Gly Arg Pro Asp Ile Pro Asn Leu Glu				
6219	6228	6237	6246	6255	6264
GGU GCU UUC AUC AAG GGC GAA CGU AGU GGU GAG GAU AAG CUG UUG CUG GUU GAC	Gly Ala Phe Ile Lys Gly Glu Arg Ser Gly Glu Asp Lys Leu Leu Leu Val Asp				
6273	6282	6291	6300	6309	6318
GAG UAC AUA GAG GGG CCC GUU CCA GAA GAC GCU UUU GCA AUC UUU GCA GAU CCG	Glu Tyr Ile Glu Gly Pro Val Pro Glu Asp Ala Phe Ala Ile Phe Ala Asp Pro				
6327	6336	6345	6354	6363	6372
CUG CAG AGC ACA GCU GUU AGC CCA UAU AGA GCG CAU UUC AUC AAA ACA CUA AGC	Leu Gln Ser Thr Ala Val Ser Pro Tyr Arg Ala His Phe Ile Lys Thr Leu Ser				
6381	6390	6399	6408	6417	6426
CAU CGC UUU GGC AAG UGU ACU GCU UCG CUC UUA AGG GAU UUG GGU UGG GAC GUG	His Arg Phe Gly Lys Cys Thr Ala Ser Leu Leu Arg Asp Leu Gly Trp Asp Val				
6435	6444	6453	6462	6471	6480
CAA GCU GAG GGU CAG GAU UCA GUA CAA AUU GCC GAC AUC UUC ACG GUU GAC CCU	Gln Ala Glu Gly Gln Asp Ser Val Gln Ile Ala Asp Ile Phe Thr Val Asp Pro				
6489	6498	6507	6516	6525	6534
AAA GAA ACA GUU GUU UAC UUU GAG CCG GAA GUC GGA GAG UUG CUG AGG AAC CAC	Lys Glu Thr Val Val Tyr Phe Glu Pro Glu Val Gly Glu Leu Leu Arg Asn His				

図IV-3-2 SoPLV K-1 の全ゲノム配列 (次ページに続く)

6543            6552            6561            6570            6579            6588  
 GGC GUU GAG GCG AGU UGC AUU GGU GAG GUG CGA GGA GCU ACU UUU GAG CAC GUG  
 Gly Val Glu Ala Ser Cys Ile Gly Glu Val Arg Gly Ala Thr Phe Glu His Val

6597            6606            6615            6624            6633            6642  
 ACG UUC GUC ACU UCU GAA AAC AGC CCA CUA GUU GAU AAG GCC GCC GCC UUC CAG  
 Thr Phe Val Thr Ser Glu Asn Ser Pro Leu Val Asp Lys Ala Ala Ala Phe Gln

6651            6660            6669            6678            6687            6696  
 UGC UUA ACG AGG CAC ACC AAG AGC UUG CUC AUA CUG UGC CCA GAU GCC ACU UAC  
 Cys Leu Thr Arg His Thr Lys Ser Leu Leu Ile Leu Cys Pro Asp Ala Thr Tyr  
 ORF3→ Met Pro Leu Thr

6705            6714            6723            6732            6741            6750  
 ACC ACC GCC UAA UUA CAC AGG GUU AUA CAU CGC GGC GGC ACU AGG UGU AUC UCU  
 Thr Thr Ala \*  
 Pro Pro Pro Asn Tyr Thr Gly Leu Tyr Ile Ala Ala Ala Leu Gly Val Ser Leu

6759            6768            6777            6786            6795            6804  
 AGC GGC AGU AGU AGC ACU AUU CAC UAG AAG UAC AUU GCC AAU CGU AGG GGA UUC  
 Ala Ala Val Val Ala Leu Phe Thr Arg Ser Thr Leu Pro Ile Val Gly Asp Ser

6813            6822            6831            6840            6849            6858  
 ACA GCA CAA CCU CCC ACA CGG GGG UCG GUA UCG UGA CGG UAC UAA GGC CAU UGA  
 Gln His Asn Leu Pro His Gly Gly Arg Tyr Arg Asp Gly Thr Lys Ala Ile Asp

6867            6876            6885            6894            6903            6912  
 UUA UUU CAA GCC CGC GAA AUU GAA UUC UGU GGA ACC GGG CAA UUA CUG GUA CAC  
 Tyr Phe Lys Pro Ala Lys Leu Asn Ser Val Glu Pro Gly Asn Tyr Trp Tyr Thr

6921            6930            6939            6948            6957            6966  
 CCA ACC UUG GCU GUU GGU CUU GCU UUU GGU UGC GCU CAU CUG UCU AUC UGG GCG  
 Gln Pro Trp Leu Leu Val Leu Leu Leu Val Ala Leu Ile Cys Leu Ser Gly Arg

6975            6984            6993            7002            7011            7020  
 UCA UGC UCA AUG UUG CCC AAG GUG CAA UCG AGU GCA CAG UGC UUA AUA GUG UUU  
 His Ala Gln Cys Cys Pro Arg Cys Asn Arg Val His Ser Ala \*  
 ORF4→ Met Leu Pro Lys Val Gln Ser Ser Ala Gln Cys Leu Ile Val Phe

7029            7038            7047            7056            7065            7074  
 GCC UUG GCU UUC GCC CUA AGU UGG UAU GUU CUA AGG CCG GGG AAU ACA AGU UGU  
 Ala Leu Ala Phe Ala Leu Ser Trp Tyr Val Leu Arg Pro Gly Asn Thr Ser Cys

図IV-3-2 SoPLV K-1 の全ゲノム配列 (次ページに続く)

7083            7092            7101            7110            7119            7128  
 GUU UUG CUA AUC ACU GGA GAG UCA GUC AGG CUG GUC AAU UGC GAG CUC ACA AAA  
 Val Leu Leu Ile Thr Gly Glu Ser Val Arg Leu Val Asn Cys Glu Leu Thr Lys

7137            7146            7155            7164            7173            7182  
 GAU CUA GUG GAG GCC GUG GCC ACA CUA AGG CCA UUG AAA CAC CUU UAG GUU CAC  
 Asp Leu Val Glu Ala Val Ala Thr Leu Arg Pro Leu Lys His Leu \*

7191            7200            7209            7218            7227            7236  
 AGG UAA AAG CUC GAA UAA ACU GUU UCA CAG AGA GAA UGC CGC CUA AAC CAG AUC  
 ORF5→ Met Pro Pro Lys Pro Asp Pro

7245            7254            7263            7272            7281            7290  
 CUU CUA GUU CAG GGG AAG UGC CAC AAG CUA UGC CAC CUG CAC CAC CUC CGC GCA  
 Ser Ser Ser Gly Glu Val Pro Gln Ala Met Pro Pro Ala Pro Pro Pro Arg Asn

7299            7308            7317            7326            7335            7344  
 AUU CGG AAG GGC ACA GAU CCG CGC AAU CGG AGG CGC CAG GGC AAA AUG AAG AAG  
 Ser Glu Gly His Arg Ser Ala Gln Ser Glu Ala Pro Gly Gln Asn Glu Glu Ala

7353            7362            7371            7380            7389            7398  
 CCA UGC UGG AAC AAA GGC UCG UUC GAU UGA UUG AGC UUA UGG CCA AAA AGA GGC  
 Met Leu Glu Gln Arg Leu Val Arg Leu Ile Glu Leu Met Ala Lys Lys Arg His

7407            7416            7425            7434            7443            7452  
 ACA ACU CGA CAU UGA GUA ACA UCU CCU UUG AGA UAG GUA GGC CCA GUU UGG AAC  
 Asn Ser Thr Leu Ser Asn Ile Ser Phe Glu Ile Gly Arg Pro Ser Leu Glu Pro

7461            7470            7479            7488            7497            7506  
 CAA CAC CCG AGA UGA GAA GGA AUC CGG AAA AUC CAU ACU CUC GAU UCU CAA UUG  
 Thr Pro Glu Met Arg Arg Asn Pro Glu Asn Pro Tyr Ser Arg Phe Ser Ile Asp

7515            7524            7533            7542            7551            7560  
 ACG AGC UGU UCA AAA UGG AAA UCC GGU CGG UGU CGA ACA ACA UGG CCA AUA CUG  
 Glu Leu Phe Lys Met Glu Ile Arg Ser Val Ser Asn Asn Met Ala Asn Thr Glu

7569            7578            7587            7596            7605            7614  
 AAC AAA UGG CAC AGA UCA CUG CAG AUA UUG CCG GGC UCG GUG UUC CCA CUG AGC  
 Gln Met Ala Gln Ile Thr Ala Asp Ile Ala Gly Leu Gly Val Pro Thr Glu His

図IV-3-2 SoPLV K-1 の全ゲノム配列 (次ページに続く)

7623	7632	7641	7650	7659	7668
AUG UUG CUG GCG UCA UAC UGA AGG UCG UGA UCA UGU GCG CAA GCG UGA GCA GUU					
Val Ala Gly Val Ile Leu Lys Val Val Ile Met Cys Ala Ser Val Ser Ser Ser					
7677	7686	7695	7704	7713	7722
CUG UCU ACC UAG ACC CUG CAG GAA CUG UUG AGU UCC CCA CUG GAG CAG UCC CUU					
Val Tyr Leu Asp Pro Ala Gly Thr Val Glu Phe Pro Thr Gly Ala Val Pro Leu					
7731	7740	7749	7758	7767	7776
UGG ACU CCA UAA UUG CAA UCA UGA AAA AUC GUG CUG GAC UGA GGA AGG UGU GCA					
Asp Ser Ile Ile Ala Ile Met Lys Asn Arg Ala Gly Leu Arg Lys Val Cys Arg					
7785	7794	7803	7812	7821	7830
GGC UGU AUG CCC CGG UCG UCU GGA AUU ACA UGC UCG UUC AGA ACA GGC CUC CUU					
Leu Tyr Ala Pro Val Val Trp Asn Tyr Met Leu Val Gln Asn Arg Pro Pro Ser					
7839	7848	7857	7866	7875	7884
CGG ACU GGC AGG CAA UGG GGU UUC AAU GGA AUG CAC GCU UCG CCG CUU UUG ACA					
Asp Trp Gln Ala Met Gly Phe Gln Trp Asn Ala Arg Phe Ala Ala Phe Asp Thr					
7893	7902	7911	7920	7929	7938
CAU UUG AUU AUG UGA CUA ACG GCG CCG CGA UCC AGC CUG UCG AGG GGC UAA UCC					
Phe Asp Tyr Val Thr Asn Gly Ala Ala Ile Gln Pro Val Glu Gly Leu Ile Arg					
7947	7956	7965	7974	7983	7992
GUA GGC CCA CGC CUG AGG AGA CGA UAG CUC ACA ACG CUC ACA AGA GCA UGG CAA					
Arg Pro Thr Pro Glu Glu Thr Ile Ala His Asn Ala His Lys Ser Met Ala Ile					
8001	8010	8019	8028	8037	8046
UUG AUA AGU CUA ACA GAA AUG AAA GGC UGG CCA ACA CCA ACG UUG AAU ACA CCG					
Asp Lys Ser Asn Arg Asn Glu Arg Leu Ala Asn Thr Asn Val Glu Tyr Thr Gly					
8055	8064	8073	8082	8091	8100
GGG GCA UGC UCG GCG CUG AGA UCG UGC GUA ACC AUC GGA AUG CAG CAA ACC AAU					
Gly Met Leu Gly Ala Glu Ile Val Arg Asn His Arg Asn Ala Ala Asn Gln *					
					ORF6→ Met
8109	8118	8127	8136	8145	8154
GAG AGC GGA ACG UCU AAA UAU GUU ACU UCU GUG UGU UUA CCG ACU GGG UUA UAU					
Arg Ala Glu Arg Leu Asn Met Leu Leu Leu Cys Val Tyr Arg Leu Gly Tyr Ile					

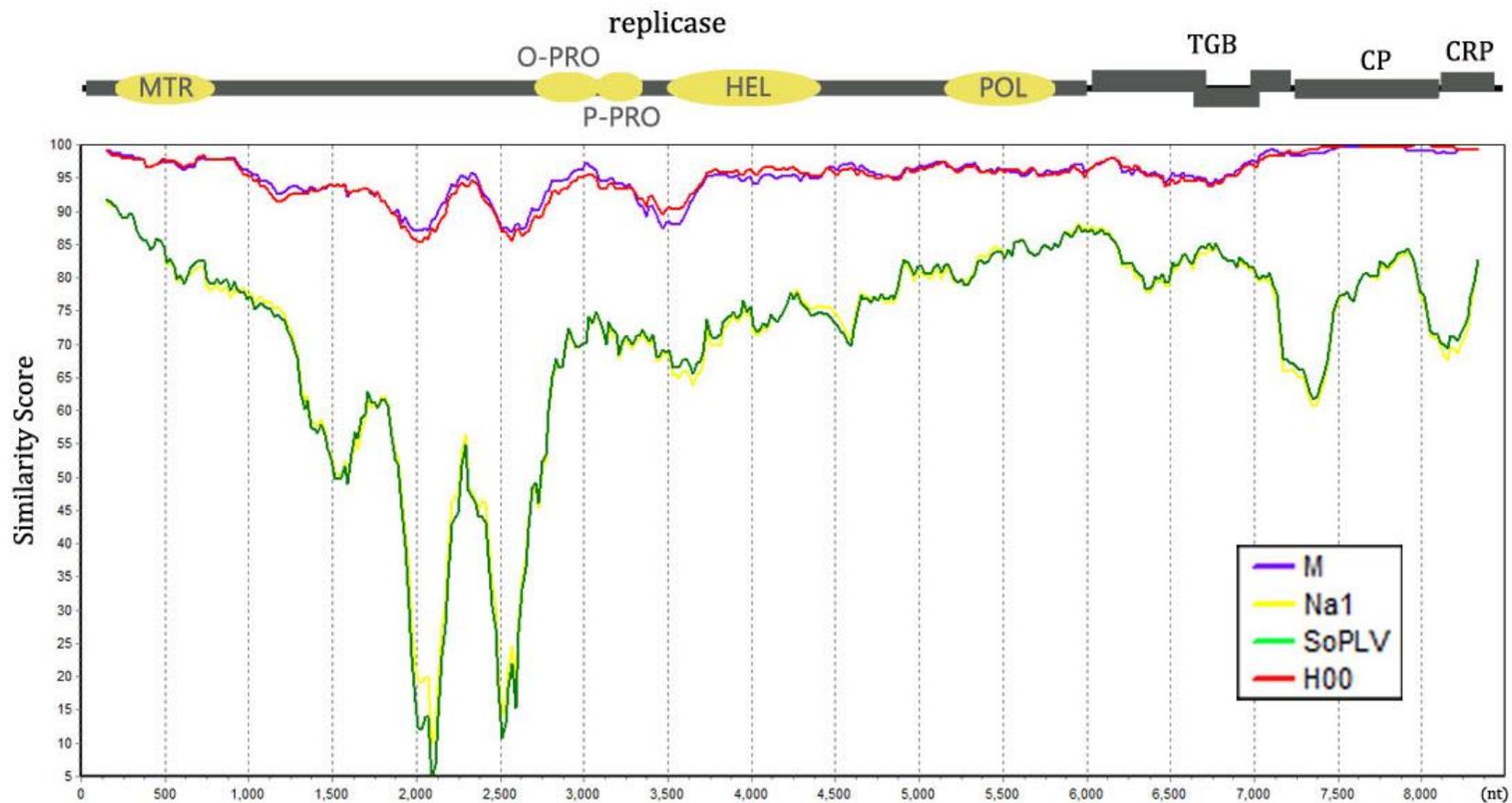
図IV-3-2 SoPLV K-1 の全ゲノム配列 (次ページに続く)

8163	8172	8181	8190	8199	8208
CUU GCC GGU CGA UGU GUG UAU UAA AAU AAU AAG UGC UAG UGC AGG UCC AGU UUC					
Leu Pro Val Asp Val Cys Ile Lys Ile Ile Ser Ala Ser Ala Gly Pro Val Ser					
8217	8226	8235	8244	8253	8262
CAG GGG UCA UUC AAC UUA CUC ACG UAA GCG AAG GGC UCG CAG UAU UGG CCG AUG					
Arg Gly His Ser Thr Tyr Ser Arg Lys Arg Arg Ala Arg Ser Ile Gly Arg Cys					
8271	8280	8289	8298	8307	8316
CUG GCG UUG UUA CCG AGU CUA UCC ACC AGU UUG UAA UUC UAA GUG UGA UAA UAG					
Trp Arg Cys Tyr Arg Val Tyr Pro Pro Val Cys Asn Ser Lys Cys Asp Asn Arg					
8325	8334	8343	8352	8361	8370
GAC AUG UCG UCC AGG CAU AAG UCC AAA CUA UAA AGU AAU GGC UUU CAU UCG AGG					
Thr Cys Arg Pro Gly Ile Ser Pro Asn Tyr Lys Val Met Ala Phe Ile Arg Gly					
8379	8388	8397	8406	8415	8424
UUG GAG UAA CUG AGG UGA UAC CAC CAG GAA UAG AAA GUC UAA GUU UCG CAU AAA					
Trp Ser Asn *					
8433	8442	8451	8460	8469	8478
GCU UAA AUA AUA UAU AAG UGU GCA ACU AUA AAA AAA GUA UGU UUU UAA AAU AUU					
8486					
UUA GCA UU 3'					

図IV-3-2 SoPLV K-1 の全ゲノム配列

SoPLV K-1 のゲノム配列は塩基番号、塩基配列、アミノ酸配列の順に示す。

各 ORF の始まりは「→」で示し、終わりは「\*」で示す。



図IV-3-3 日本における PVS 株間の相同性解析

日本産の PVS 分離株 H95、H00、Na1、M 及び SoPLV K-1 を用いた。SimPlot (Ver 3.5.1) によって解析し、PVS-H95 を基準とした。

Windows: 300 bp, Step: 20 bp, CapStrip: off, Kimura (2-parameter) , T/t: 4.58

表IV-3-4 : PVS-M と PVS-H95 または PVS-H00 との全ゲノム配列比較

		ORF1・複製酵素	ORF2・TGBp1	ORF3・TGBp2	ORF4・TGBp3	ORF5・CP	ORF6・CRP	全配列
PVS-H95	塩基	228+83/5928	21+5/684	13+0/327	1+1/201	4+4/885	2+0/285	270+93/8486
		5.2 %	3.8 %	4.0 %	1.0 %	0.9 %	0.7 %	4.3 %
	アミノ酸	76/1975	4/227	0/108	1/66	4/294	0/94	85/2764
		3.8 %	1.8 %	0 %	1.5 %	1.4 %	0 %	3.1 %
PVS-H00	塩基	49+22/5928	4+5/684	0+1/327	2+0/201	6+5/885	3+1/285	65+34/8486
		1.2 %	1.3 %	0.3 %	1.0 %	1.2 %	1.4 %	1.2 %
	アミノ酸	22/1975	5/227	1/108	0/66	5/294	1/94	34/2764
		1.1 %	2.2 %	0.9 %	0 %	1.7 %	1.1 %	1.2 %

「塩基（またはアミノ酸）相違数/全塩基（またはアミノ酸）数」で比較結果を表示した。

赤色で示した数字はアミノ酸配列に影響する塩基相違数である。

青色で示した数字はアミノ酸相違数である。

表IV-3-5 : PVS-M、PVS-H95、PVS-H00 の3株のアミノ酸配列比較のまとめ  
(次ページに続く)

ORF 領域	塩基番号	PVS-H95	PVS-H00	PVS-M	SG 値
ORF1	525	G(Ala)	U(Ser)	U(Ser)	5
ORF1	1266	G(Val)	A(Ile)	A(Ile)	5
ORF1	1269	A(Lys)	G(Glu)	A(Lys)	4
ORF1	1302	A(Ile)	G(Val)	G(Val)	5
ORF1	1443	G(Ser)	G(Ser)	A(Gly)	5
ORF1	1461	U(Cys)	A(Ser)	A(Ser)	4
ORF1	1486	A(His)	G(Arg)	G(Arg)	4
ORF1	1530	A(Ser)	G(Gly)	G(Gly)	5
ORF1	1574	A(Glu)	U(Asp)	A(Glu)	5
ORF1	1581	G(Val)	G(Val)	U(Leu)	5
ORF1	1614	U(Ser)	C(Pro)	C(Pro)	4
ORF1	1644	A(Ile)	G(Val)	G(Val)	5
ORF1	1720	A(Gln)	G(Arg)	G(Arg)	3
ORF1	1722 1724	CUA(Leu)	AUG(Met)	AUG(Met)	5
ORF1	1762	U(Val)	C(Ala)	C(Ala)	5
ORF1	1863	A(Ser)	U(Cys)	U(Cys)	4
ORF1	1872	C(His)	U(Tyr)	U(Tyr)	3
ORF1	1891	U(Ile)	C(Thr)	C(Thr)	3
ORF1	1893	G(Gly)	U(Cys)	G(Gly)	3
ORF1	1932-1933	UG(Cys)	CA(His)	CA(His)	2
ORF1	1974	U(Cys)	A(Ser)	A(Ser)	4
ORF1	1980-1981	CA(His)	CG(Gly)	CG(Gly)	3
ORF1	1999	A(His)	U(Leu)	U(Leu)	3
ORF1	2001	U(Ser)	C(Pro)	C(Pro)	4
ORF1	2013	A(Ile)	G(Val)	G(Val)	5
ORF1	2022-2023	CA(His)	UG(Cys)	UG(Cys)	2
ORF1	2031	G(Ala)	A(Thr)	G(Ala)	5
ORF1	2042	A(Ile)	G(Met)	G(Met)	4
ORF1	2043	G(Asp)	A(Asn)	A(Asn)	5
ORF1	2073	G(Gly)	U(Trp)	G(Gly)	3
ORF1	2091	G(Gly)	A(Ser)	A(Ser)	5
ORF1	2098	U(Val)	C(Ala)	C(Ala)	5
ORF1	2116	C(Ala)	U(Val)	U(Val)	5
ORF1	2134	U(Phe)	A(Tyr)	A(Tyr)	5
ORF1	2178	A(Lys)	G(Glu)	G(Glu)	4
ORF1	2205	A(Lys)	C(Gln)	C(Gln)	4
ORF1	2211	G(Asp)	A(Asn)	A(Asn)	5
ORF1	2241	A(Asn)	U(Tyr)	A(Asn)	3
ORF1	2245	U(Leu)	C(Ser)	U(Leu)	2
ORF1	2298	G(Ala)	G(Thr)	G(Thr)	5
ORF1	2379	G(Val)	A(Ile)	A(Ile)	5

表IV-3-5 : PVS-M、PVS-H95、PVS-H00 の3株のアミノ酸配列比較のまとめ  
(次ページに続く)

ORF 領域	塩基番目	PVS-H95	PVS-H00	PVS-M	SG 値
ORF1	2433	A(Ile)	U(Phe)	U(Phe)	4
ORF1	2436	G(Gly)	A(Ser)	A(Ser)	5
ORF1	2490	G(Val)	U(Leu)	U(Leu)	5
ORF1	2499	U(Ser)	C(Pro)	C(Pro)	4
ORF1	2506	U(Leu)	G(Trp)	G(Trp)	4
ORF1	2508	G(Gly)	A(Ser)	A(Ser)	5
ORF1	2518	A(His)	A(His)	G(Arg)	4
ORF1	2523	U(Tyr)	C(His)	C(His)	3
ORF1	2526	C(Leu)	A(Met)	A(Met)	5
ORF1	2541-2542	AU(Met)	UC(Ser)	AC(Thr)	1/5/3
ORF1	2544	U(Cys)	C(Arg)	C(Arg)	2
ORF1	2554	C(Thr)	U(Ile)	C(Thr)	3
ORF1	2586	C(Pro)	U(Ser)	U(Ser)	4
ORF1	2593	A(Glu)	U(Val)	U(Val)	4
ORF1	2608	G(Gly)	U(Val)	U(Val)	4
ORF1	2628	C(Pro)	G(Ala)	G(Ala)	5
ORF1	2644	A(Glu)	G(Gly)	G(Gly)	4
ORF1	2646	A(Arg)	G(Gly)	G(Gly)	3
ORF1	2652	G(Glu)	A(Lys)	A(Lys)	4
ORF1	2656	C(Ser)	U(Phe)	U(Phe)	3
ORF1	2871	G(Ala)	A(Thr)	G(Ala)	5
ORF1	3043	A(Tyr)	U(Phe)	U(Phe)	5
ORF1	3237 3239	GU(GVal)	AUA(Ile)	AUA(Ile)	5
ORF1	3321	U(Tyr)	C(His)	C(His)	3
ORF1	3432	U(Ser)	C(Pro)	C(Pro)	4
ORF1	3439	A(Asn)	A(Asn)	G(Ser)	5
ORF1	3448	A(Glu)	G(Gly)	G(Gly)	4
ORF1	3450	C(Leu)	C(Leu)	A(Ile)	5
ORF1	3460	A(Lys)	G(Arg)	G(Arg)	5
ORF1	3524	U(Asn)	G(Lys)	G(Lys)	4
ORF1	3562	G(Arg)	A(Gln)	A(Gln)	3
ORF1	3564-3565	AC(Thr)	GA(Glu)	GA(Glu)	3
ORF1	3571	U(Val)	C(Ala)	C(Ala)	5
ORF1	3619	U(Met)	C(Thr)	C(Thr)	3
ORF1	3669	G(Val)	A(Ile)	A(Ile)	5
ORF1	3762	A(Thr)	G(Ala)	A(Thr)	5
ORF1	3795	G(Ala)	A(Thr)	A(Thr)	5
ORF1	3871	C(Ser)	C(Ser)	U(Phe)	3
ORF1	3886	U(Val)	C(Ala)	C(Ala)	5
ORF1	3897	A(Met)	A(Met)	G(Val)	4
ORF1	4068	U(Ser)	A(Thr)	U(Ser)	5

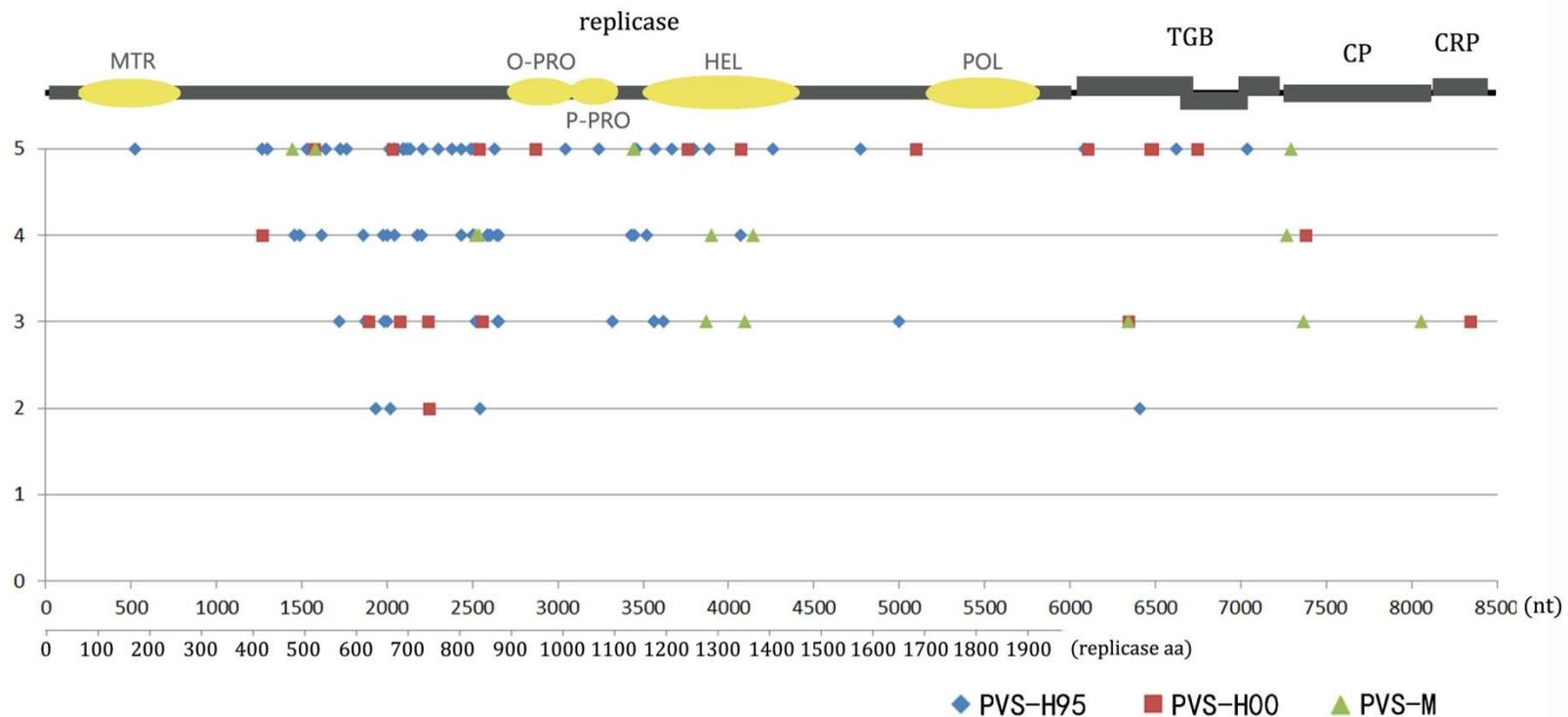
表IV-3-5 : PVS-M、PVS-H95、PVS-H00 の3株のアミノ酸配列比較のまとめ

ORF 領域	塩基番目	PVS-H95	PVS-H00	PVS-M	SG 値
ORF1	4073	U(Ile)	G(Met)	G(Met)	4
ORF1	4096	C(Ser)	C(Ser)	U(Phe)	3
ORF1	4143	U(Ser)	U(Ser)	C(Pro)	4
ORF1	4258	A(Lys)	G(Arg)	G(Arg)	5
ORF1	4771	G(Arg)	A(Lys)	A(Lys)	5
ORF1	4997	C(Ser)	A(Arg)	A(Arg)	3
ORF1	5098	C(Ala)	U(Val)	C(Ala)	5
ORF2	6085	G(Asp)	A(Asn)	A(Asn)	5
ORF2	6100	G(Val)	A(Ile)	G(Val)	5
ORF2	6341	C(Pro)	A(Gln)	C(Pro)	3
ORF2	6343	U(Tyr)	U(Tyr)	C(His)	3
ORF2	6406-6407	GU(Val)	AG(Arg)	AG(Arg)	2
ORF2	6472	G(Val)	A(Ile)	G(Val)	5
ORF2	6484	G(Asp)	A(Asn)	G(Asp)	5
ORF2	6619	A(Ile)	G(Val)	G(Val)	5
ORF3	6744	U(Val)	C(Ala)	U(Val)	5
ORF4	7039	G(Gly)	A(Ser)	A(Ser)	5
ORF5	7268	A(Ile)	A(Ile)	G(Met)	4
ORF5	7294	U(Val)	U(Val)	C(Ala)	5
ORF5	7368	G(Gly)	G(Gly)	A(Arg)	3
ORF5	7378	A(Gln)	G(Gly)	A(Gln)	4
ORF5	8056	U(Leu)	U(Leu)	A(His)	3
ORF6	8345	U(Tyr)	C(His)	U(Tyr)	3

赤色で示したのは各分離株特異的なアミノ酸相違である。

アミノ酸相違の性質差は SG 値 0-5 で表示し、0 は性質が最も異なるものであり、5 はほぼ変わらないものである。

2541-2542 番目の SG 値にある 3 つの数字はそれぞれ H95 株と H00 株、H00 株と M 株、M 株と H95 株の順にアミノ酸相違の性質差を表示している。



図IV-3-4 PVS-M、PVS-H95、PVS-H00 間のアミノ酸配列比較

各分離株特異的なアミノ酸相違の分布を異なる記号で表示している。特異的なアミノ酸を PVS-H95 では青い菱形、PVS-H00 では赤い四角形、PVS-M では緑の三角形で表示。

アミノ酸置換の差は SG 値 0-5 で表示し、0 は性質が最も異なるものであり、5 はほぼ変わらないものである。

MTR : メチルトランスフェラーゼドメイン ; O-PRO : 卵巣腫瘍プロテアーゼ類似タンパク質ドメイン ; P-PRO : パパイン様システインプロテアーゼドメイン ; HEL : RNA ヘリカーゼドメイン ; POL : RNA 依存性 RNA ポリメラーゼドメイン。

表IV-3-6 : PVS-Na1 と SoPLV K-1 の全ゲノム配列比較

		ORF1・複製酵素		ORF2・TGBp1		ORF3・TGBp2		ORF4・TGBp3		ORF5・CP		ORF6・CRP		全配列	
		nt	(%)	nt	(%)	nt	(%)	nt	(%)	nt	(%)	nt	(%)	nt	(%)
塩基	Ti	40	67.8	4	57.1	2	100	2	100	3	75	2	66.7	52	67.5
	Tv	19	32.2	3	42.9	0	0	0	0	1	25	1	33.3	25	32.5
	S	37	62.7	4	57.1	2	100	0	0	3	75	3	100	49	63.6
	NS	22	37.3	3	42.9	0	0	2	100	1	25	0	0	28	36.4
	全体	59	1.0	7	1.0	2	0.6	2	1.0	4	0.5	3	1.1	77	0.9
アミノ酸	0-3	8	40.0	1	33.3	0	0	0	0	1	100	0	0	10	38.5
	4	7	35.0	1	33.3	0	0	0	0	0	0	0	0	8	30.8
	5	5	25.0	1	33.3	0	0	2	100	0	0	0	0	8	30.8
	全体	20	1.0	3	1.3	0	0	2	3.0	1	0.3	0	0	26	0.9

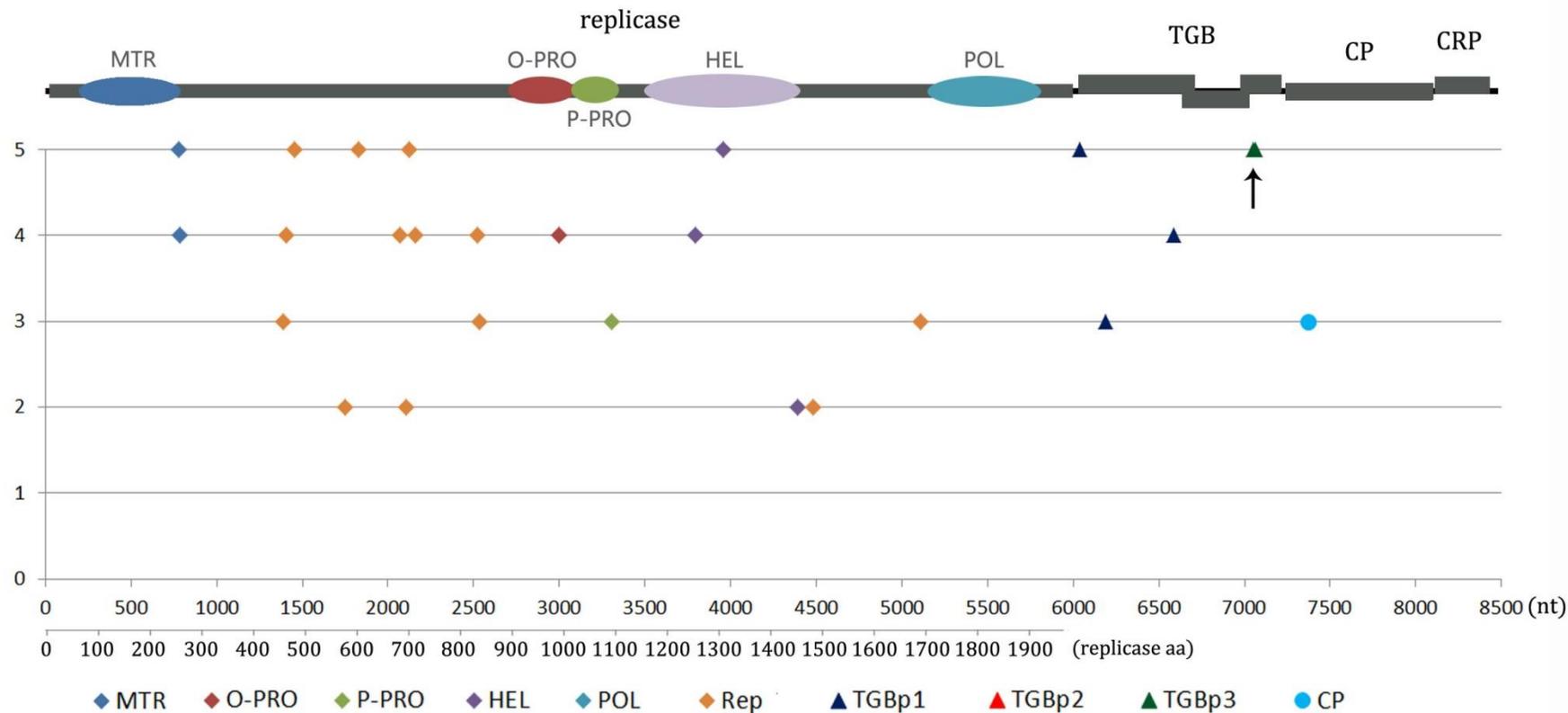
Ti: トランジション ; Tv: トランスバージョン ; S: アミノ酸に影響しない塩基相違 ; NS: アミノ酸を伴う塩基相違 ;

アミノ酸置換の差は SG 値 0-5 で表示し、0 はアミノ酸の性質が最も異なるものであるのに対し、5 はほぼ変わらないものである。

表IV-3-7 : PVS-Na1 と SoPLV K-1 のアミノ酸相違のまとめ

ORF 領域	塩基番目	塩基相違		SG 値
		PVS-Na1/SoPLV K-1	アミノ酸相違 PVS-Na1/SoPLV K-1	
ORF1	781-782	CG / GC	Thr / Ser	5
ORF1	783	A / G	Lys / Glu	4
ORF1	1390	C / U	Thr / Ile	3
ORF1	1404	U / C	Ser / Pro	4
ORF1	1455	A / U	Met / Leu	5
ORF1	1753	C / U	Ser / Leu	2
ORF1	1830	G / A	Ala / Thr	5
ORF1	2071	U / C	Phe / Leu	4
ORF1	2106-2107	CG / GC	Arg / Ala	2
ORF1	2124	G / A	Val / Ile	5
ORF1	2159	G / U	Leu / Phe	4
ORF1	2524	A / G	His / Arg	4
ORF1	2536	G / U	Cys / Phe	3
ORF1	2997	U / C	Ser / Pro	4
ORF1	3304	A / G	Asp / Ser	3
ORF1	3795	U / C	Ser / Pro	4
ORF1	3958	A / U	Tyr / Phe	5
ORF1	4390	G / A	Arg / Cys	2
ORF1	4483	A / G	Cys / Arg	2
ORF1	5110	C / U	Thr / Met	3
ORF2	6039	G / A	Ala / Thr	5
ORF2	6188	C / G	Pro / Arg	3
ORF2	6587	A / U	Glu / Val	4
ORF4	7049	C / U	Ala / Val	5
ORF4	7063	G / A	Asp / Asn	5
ORF5	7369	A / G	Gln / Arg	3

アミノ酸相違の性質差は SG 値 0-5 で表示し、0 は性質が最も異なるものであるに対し、5 はほぼ変わらないものである。

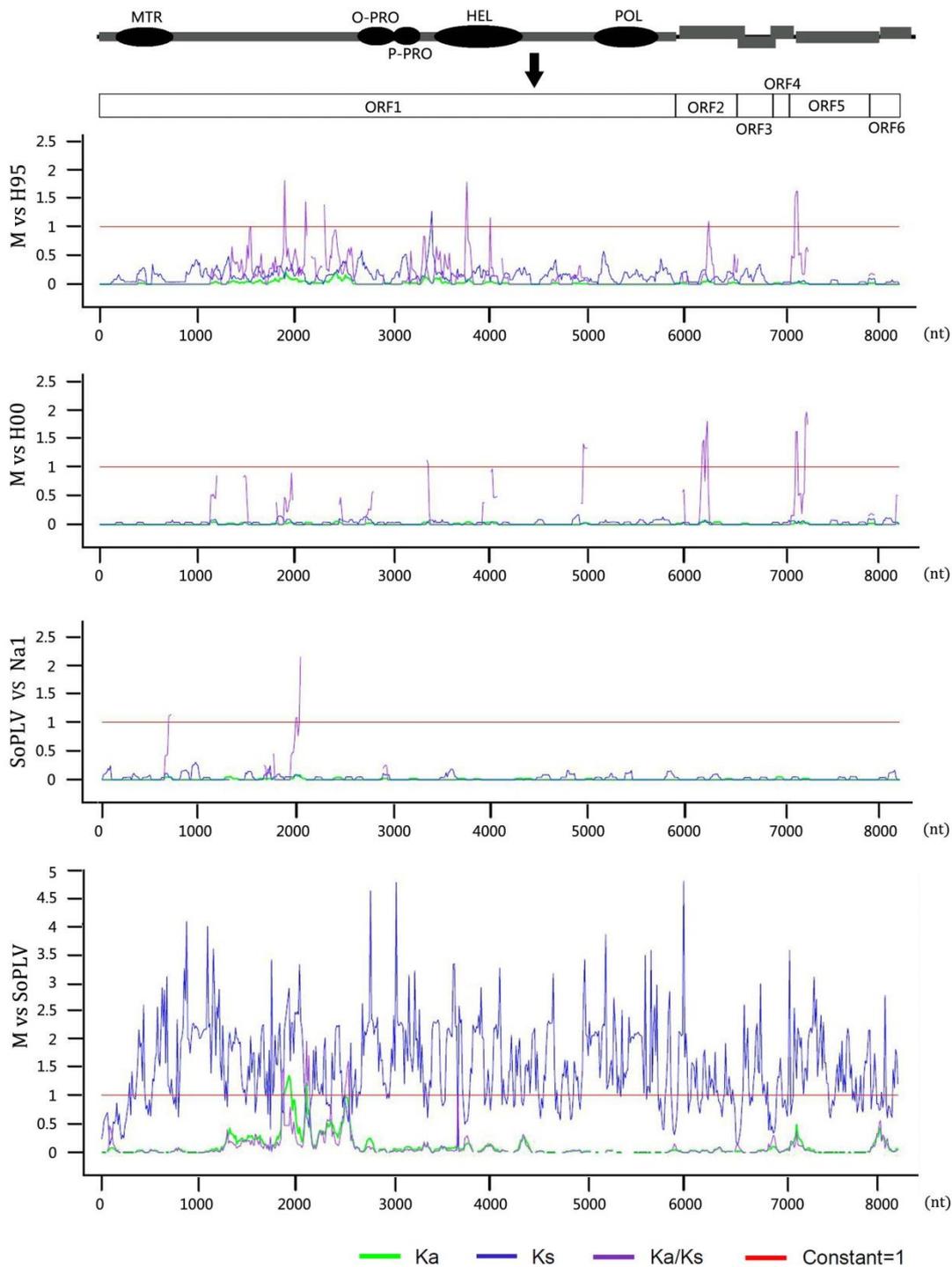


図IV-3-5 SoPLV K-1 と PVS-Na1 間のアミノ酸配列比較

各領域に分布したアミノ酸相違を異なる記号で表示している。複製酵素領域には菱形、TGB 領域には三角形、CP 領域には丸で表示。黒い矢印は2アミノ酸相違が重なっていることを意味する。

アミノ酸置換の差は SG 値 0-5 で表示し、0 は性質が最も異なるものであり、5 はほぼ変わらないものである。

MTR: メチルトランスフェラーゼドメイン; O-PRO: 卵巣腫瘍プロテアーゼ類似タンパク質ドメイン; P-PRO: パパイン様システインプロテアーゼドメイン; HEL: RNA ヘリカーゼドメイン; POL: RNA 依存性 RNA ポリメラーゼドメイン; Rep: 複製酵素。



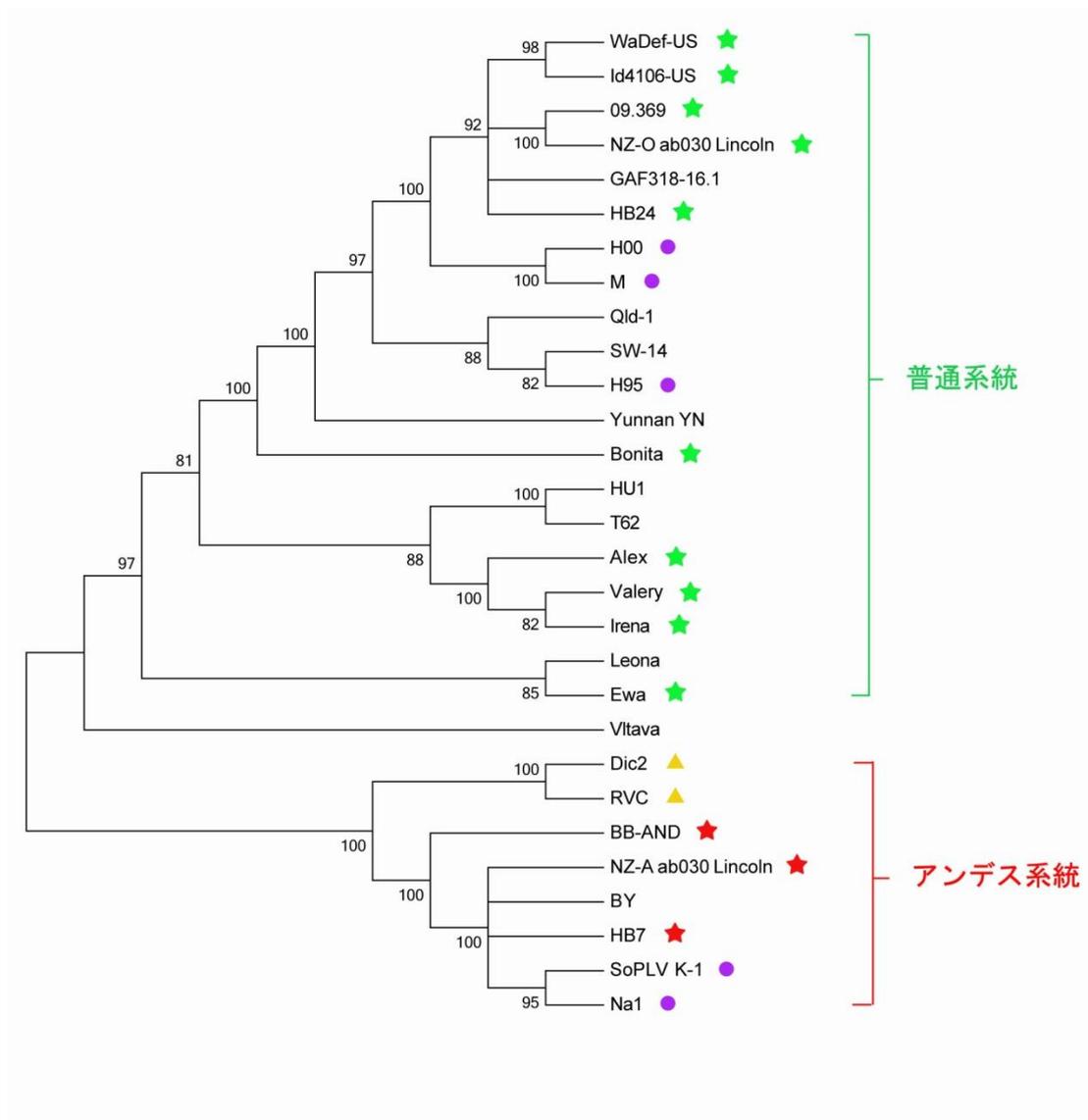
図IV-3-6 日本における PVS 株間の Ka/Ks 分析

日本産 PVS 分離株 M と H95、M と H00、Na1 と SoPLV K-1 及び M と SoPLV K-1 ゲノムの全 ORF コード領域を繋いだ配列を Ka/Ks 分析に用いた。

**Ka** : 非同義置換で緑の線で表示。**Ks** : 同義置換で青い線で表示。**Ka/Ks** : 非同義置換と同義置換の割合で紫の線で表示し、進化の選択方向を反映する。

M と H95、M と H00 は LPB 法 (Pamilo and Bianchi, 1993; Li, 1993)、Na1 と SoPLV K-1 は MLPB 法 (Tzeng *et al.*, 2004)、M と SoPLV K-1 は MYN 法 (Zhang *et al.*, 2006) を利用した。

Window Length : 75 bp, Step Length: 12 bp に設定した。

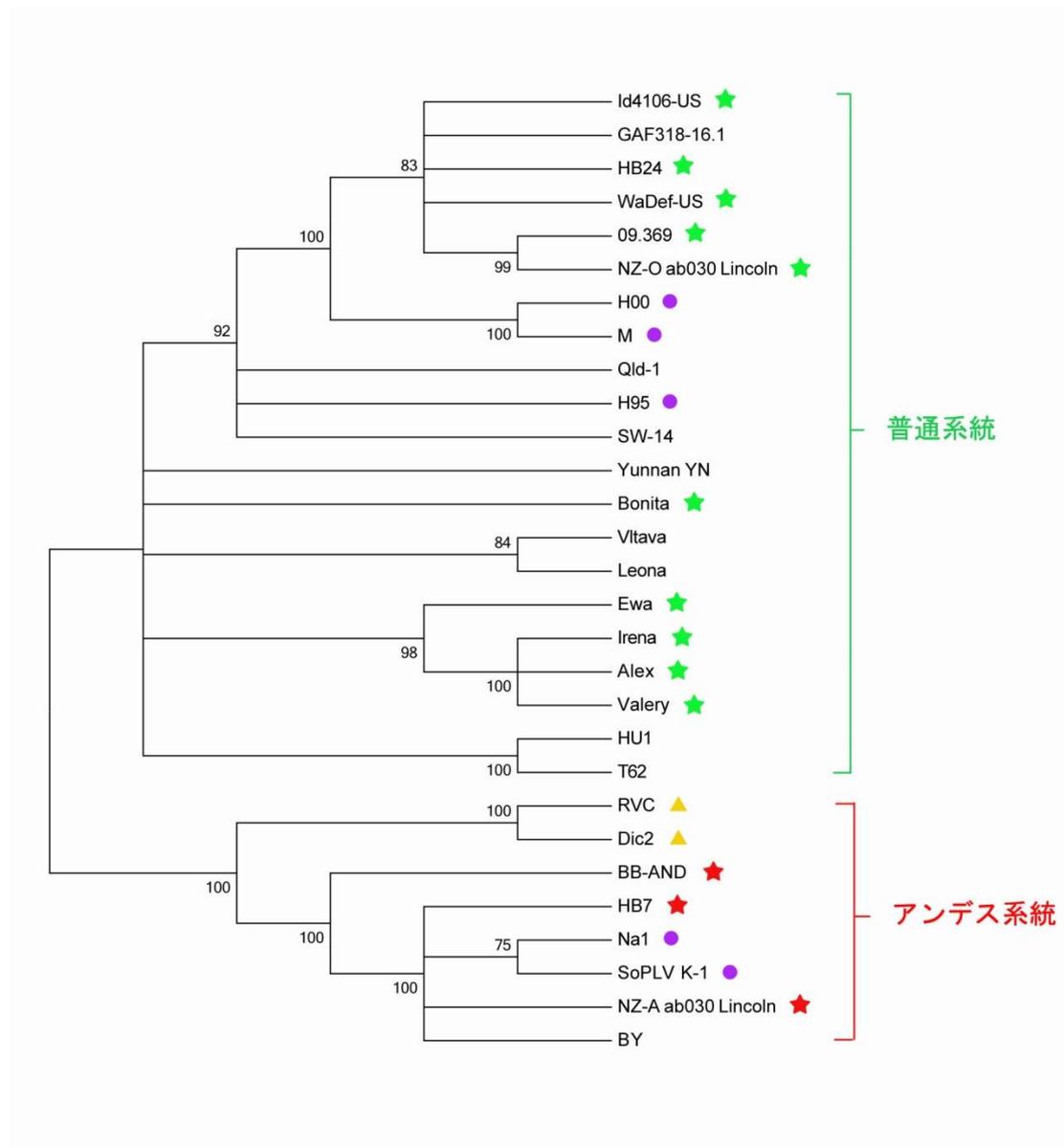


図IV-3-7 全ゲノム配列を用いた PVS 系統樹解析

計 29 株の全ゲノム配列を用いて作成した PVS 系統樹。

日本株は紫色の丸印を付けた。普通系統として報告された株は緑色の星印を付けた。アンデス系統として報告された株は赤い星印を付けた。P (phureja) 系統として報告された株は黄色の三角形印を付けた。

系統樹の作成に Neighbor-Joining 法を用い、Bootstrap は 1000 に設定し、70%以下の枝は切った。

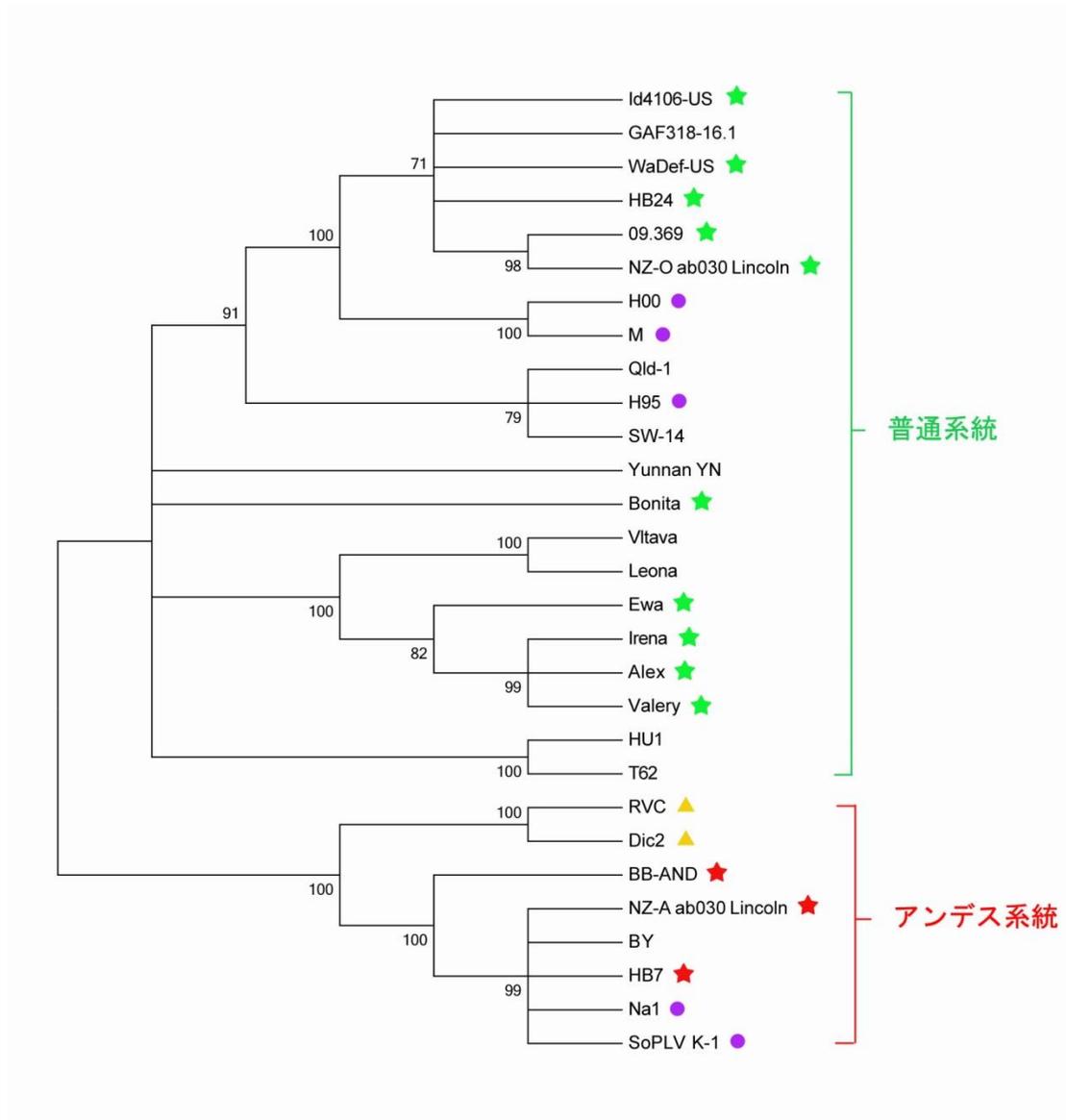


図IV-3-8 全アミノ酸配列を用いた PVS 系統樹解析

計 29 株の各タンパク質のアミノ酸配列を繋げた全アミノ酸配列を用い作成した PVS 系統樹。

日本株は紫色の丸印を付けた。普通系統として報告された株は緑色の星印を付けた。アンデス系統として報告された株は赤い星印を付けた。P (phureja) 系統として報告された株は黄色の三角形印を付けた。

系統樹の作成に Neighbor-Joining 法を用い、Bootstrap は 1000 に設定し、70%以下の枝は切った。

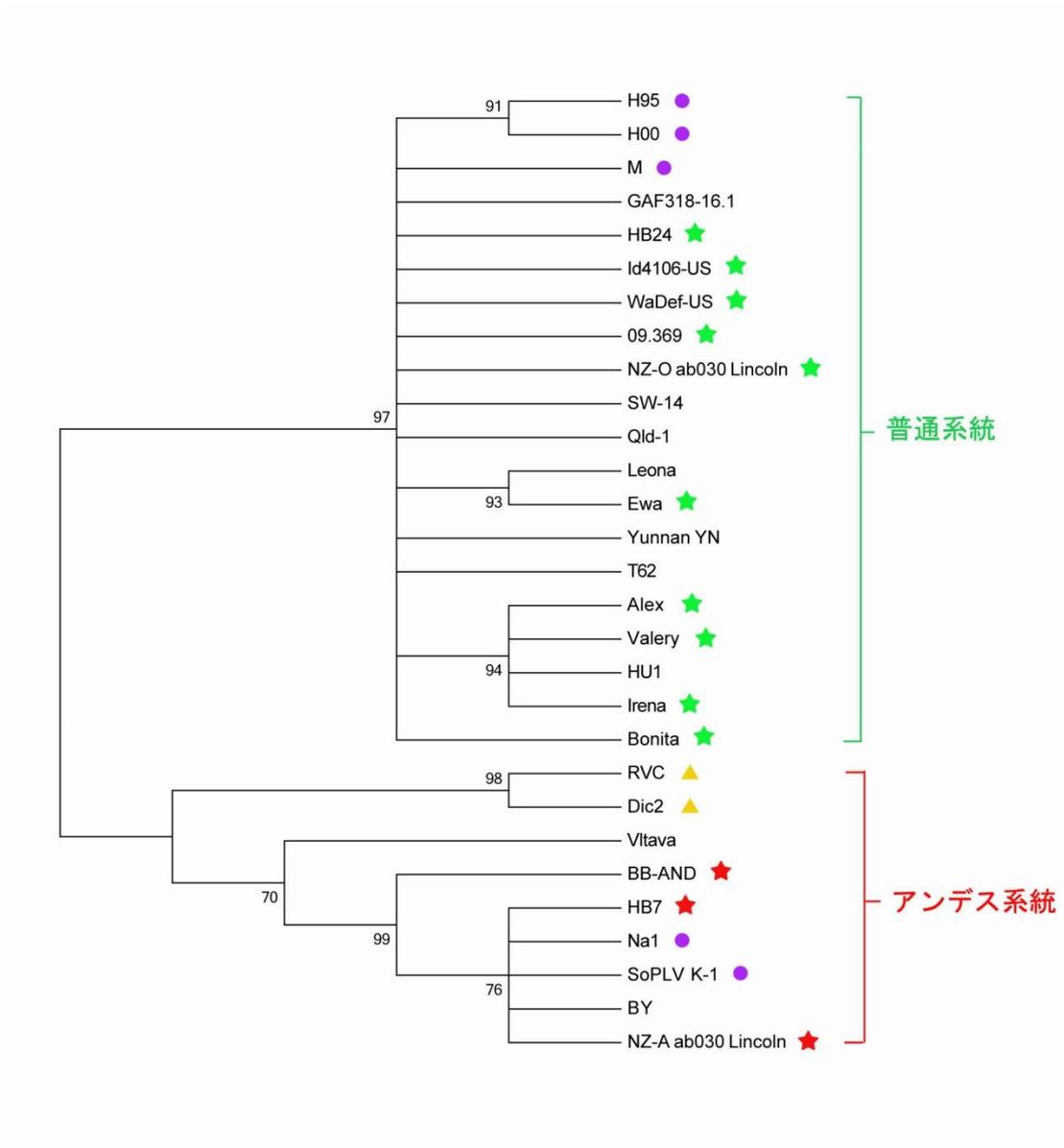


図IV-3-9 複製酵素のアミノ酸配列による PVS 系統樹解析

計 29 株の複製酵素のアミノ酸配列を用いて作成した PVS 系統樹。

日本株は紫色の丸印を付けた。普通系統として報告された株は緑色の星印を付けた。アンデス系統として報告された株は赤い星印を付けた。P (phureja) 系統として報告された株は黄色の三角形印を付けた。

系統樹の作成に Neighbor-Joining 法を用い、Bootstrap は 1000 に設定し、70%以下の枝は切った。

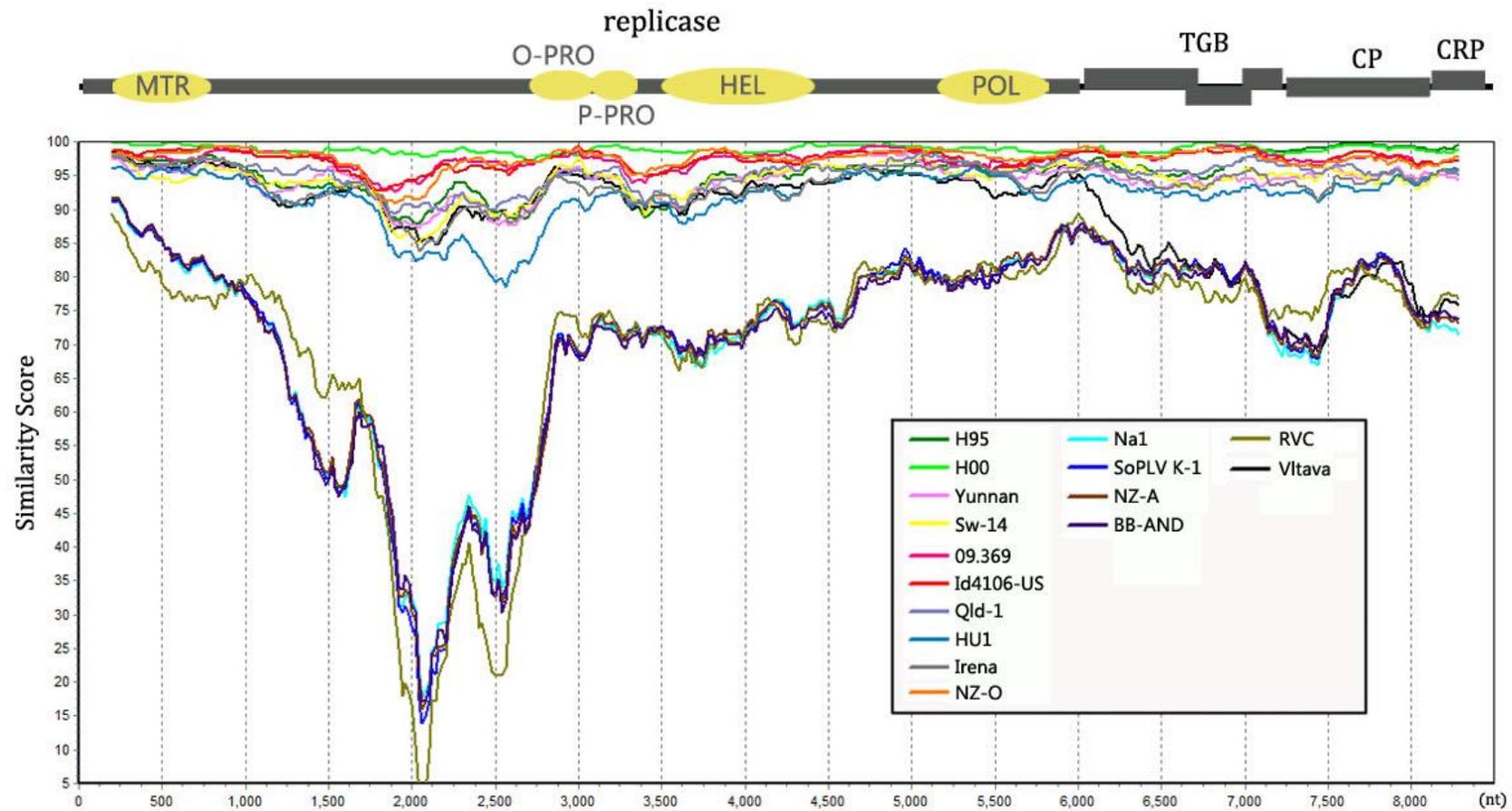


図IV-3-10 外被タンパク質のアミノ酸配列を用いた PVS 系統樹解析

計 29 株の外被タンパク質のアミノ酸配列を用いて作成した PVS 系統樹。

日本株は紫色の丸印を付けた。普通系統として報告された株は緑色の星印を付けた。アンデス系統として報告された株は赤い星印を付けた。P (phureja) 系統として報告された株は黄色の三角形印を付けた。

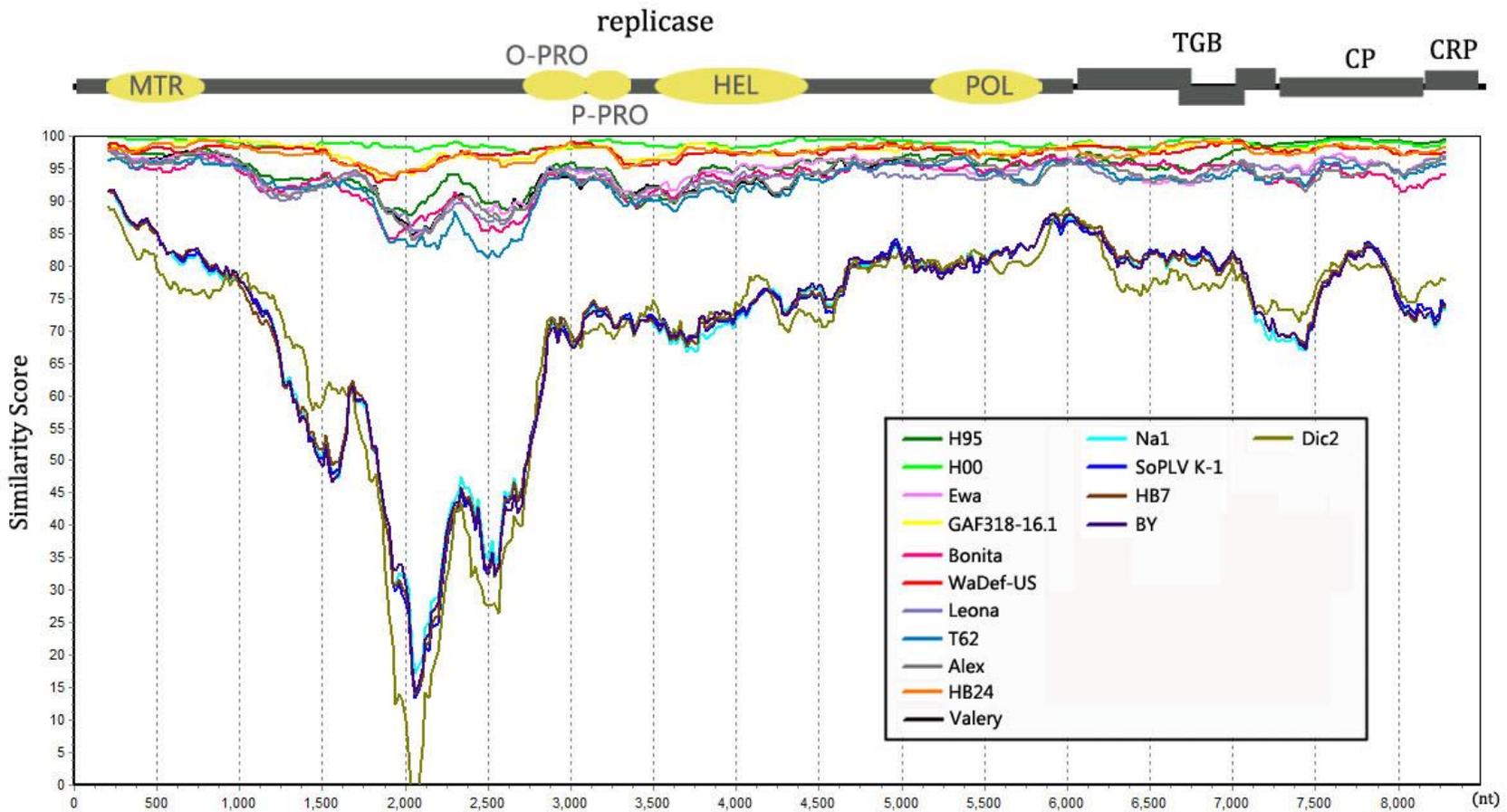
系統樹の作成に Neighbor-Joining 法を用い、Bootstrap は 1000 に設定し、70%以下の枝は切った。



図IV-3-11 抽出したグループ1のPVS株とPVS-Mとの相同性解析

計29株の世界中PVS分離株の17株を用いPVS-Mを基準として、SimPlot (Ver 3.5.1) によって解析した。

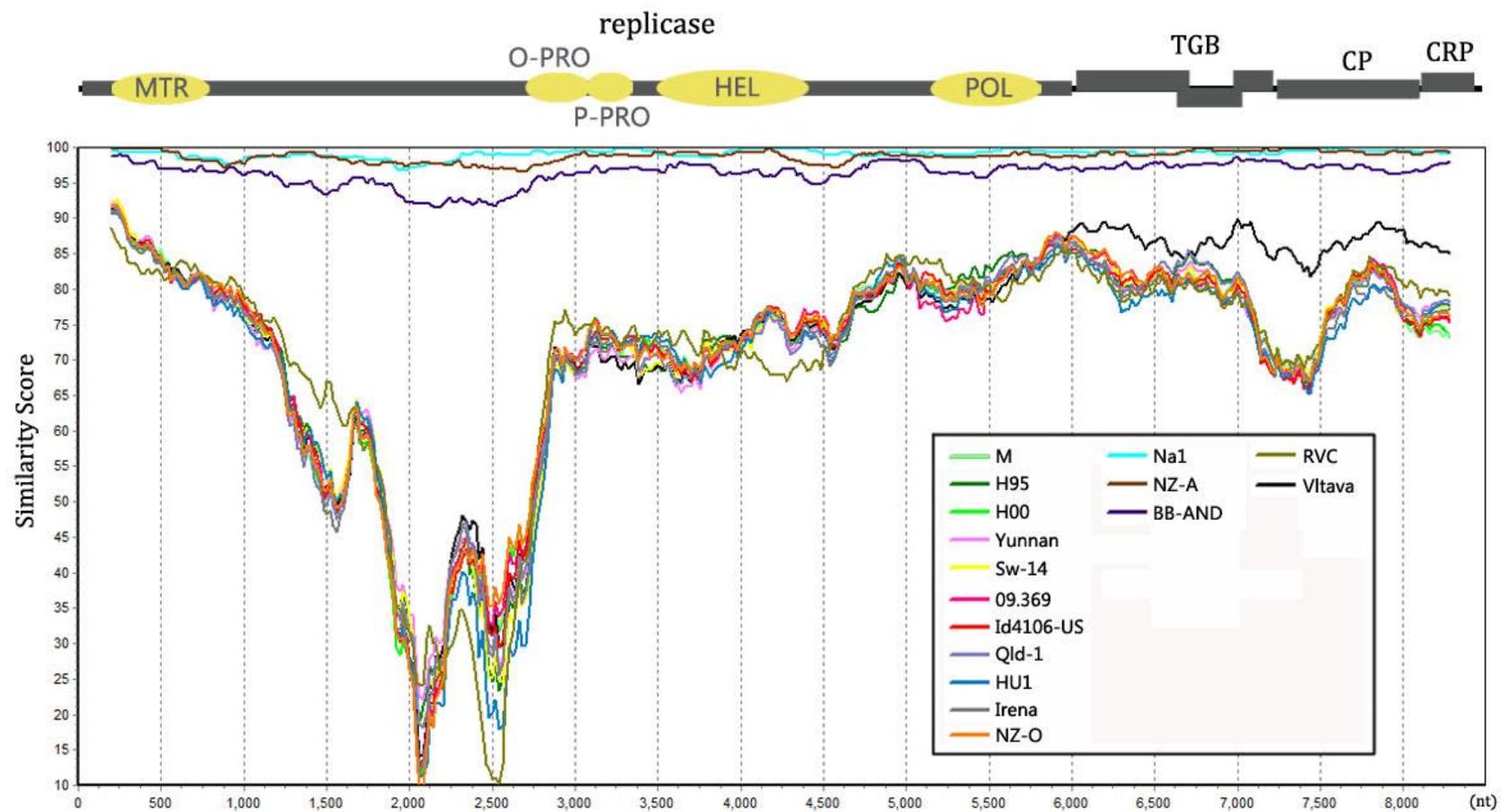
Window: 400 bp, Step: 20 bp, CapStrip: off, Kimura (2-parameter) , T/t: 5.06



図IV-3-12 抽出したグループ2のPVS株とPVS-Mとの相同性解析

計29株の世界中PVS分離株の17株を用いPVS-Mを基準として、SimPlot (Ver 3.5.1) によって解析した。

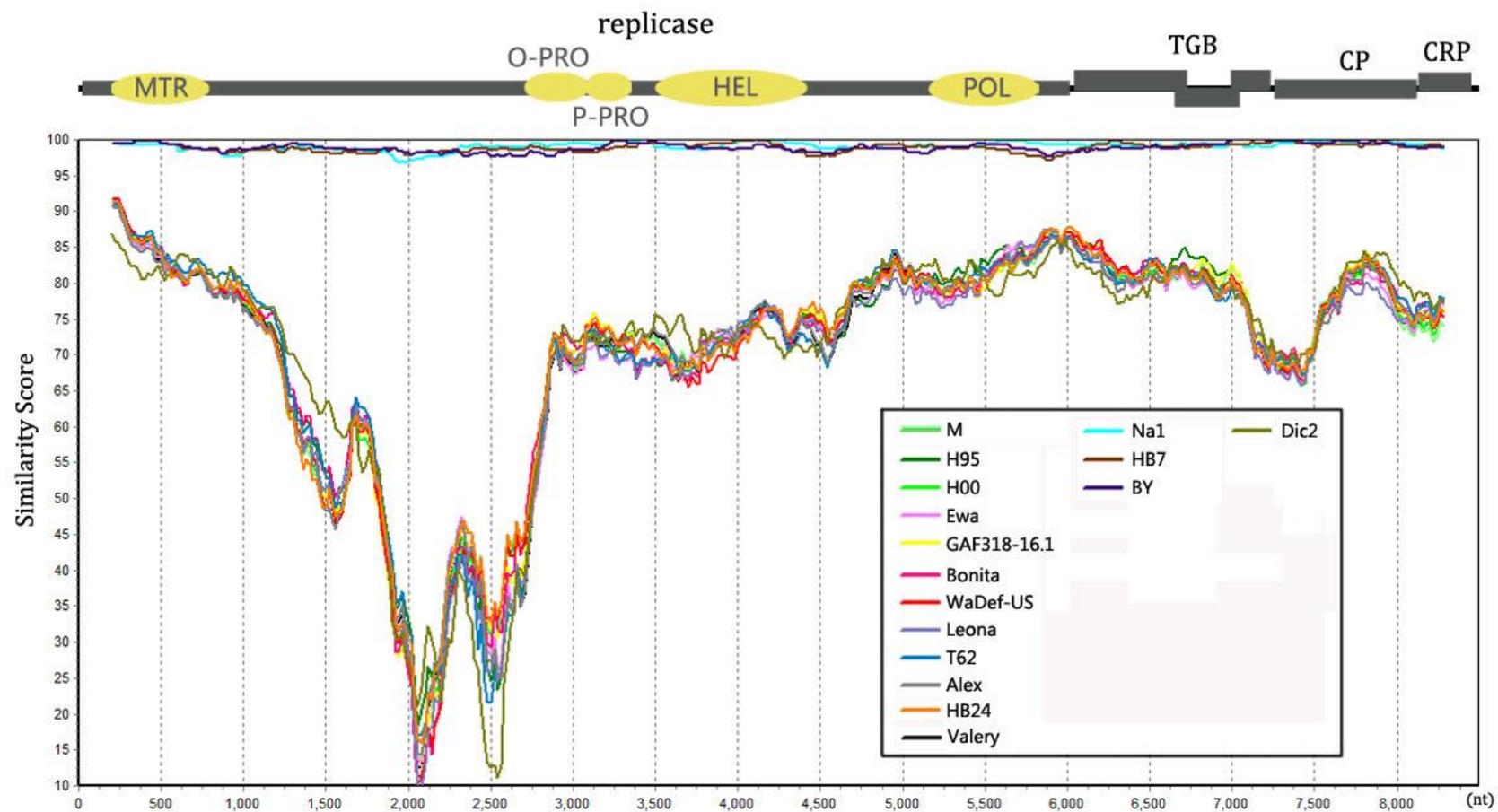
Window: 400 bp, Step: 20 bp, CapStrip: off, Kimura (2-parameter) , T/t: 5.06



図IV-3-13 抽出したグループ1のPVS株とSoPLV K-1との相同性解析

計29株の世界中PVS分離株の17株を用いSoPLV K-1を基準として、SimPlot (Ver 3.5.1) によって解析した。

Window: 400 bp, Step: 20 bp, CapStrip: off, Kimura (2-parameter) , T/t: 5.06



図IV-3-14 抽出したグループ 2 の PVS 株と SoPLV K-1 との相同性解析

計 29 株の世界中 PVS 分離株の 17 株を用い SoPLV K-1 を基準として、SimPlot (Ver 3.5.1) によって解析した。

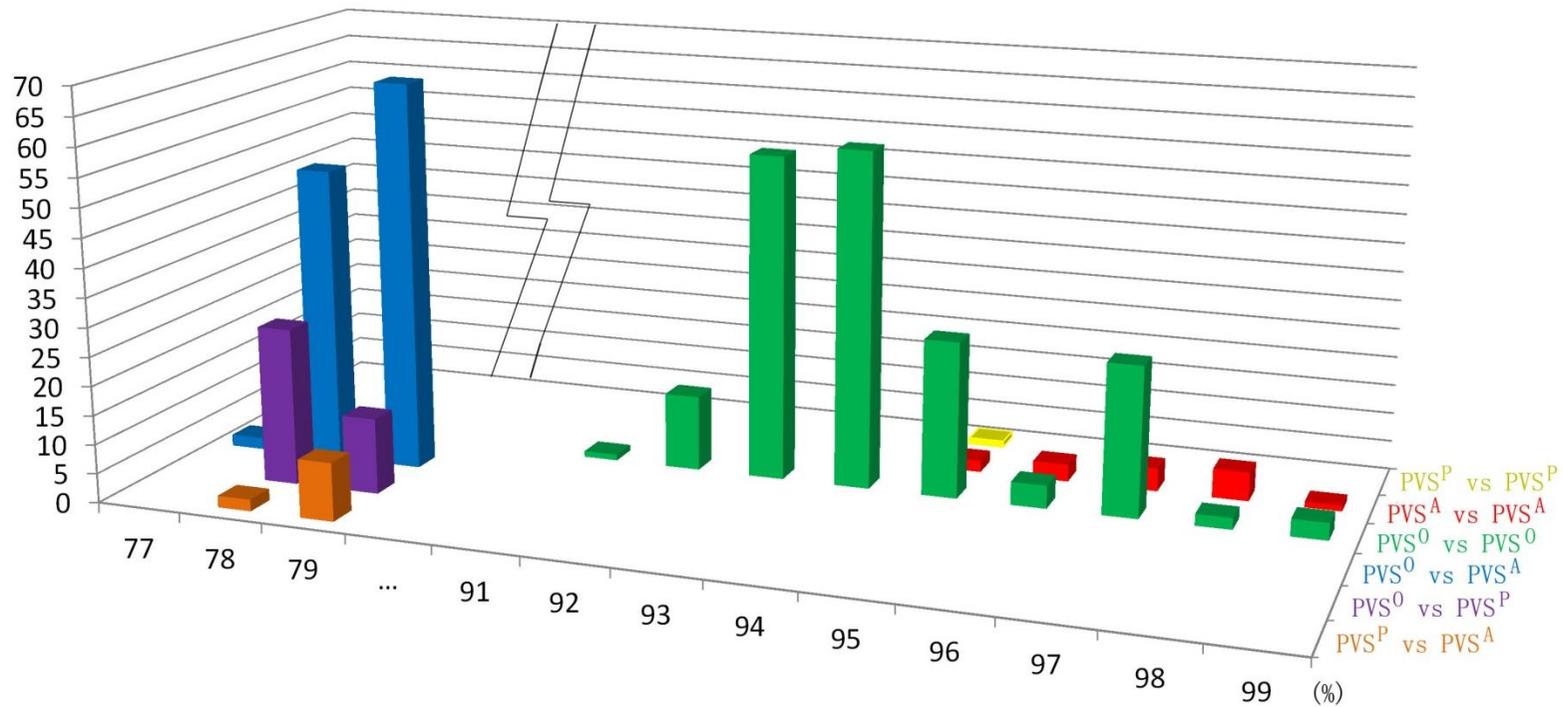
Window: 400 bp, Step: 20 bp, CapStrip: off, Kimura (2-parameter) , T/t: 5.06

表IV-3-8 : PVS 株 2 株間の同一性及び類似性比較

	H95	H00	M	Na1	SoPLV	Dic	RVC	BB-AND	Vltava	Leona	Yunnan YN	HU1	SW-14	WaDef -US	Id4106 -US	NZ-0 ab030 Lincoln	NZ-A ab030 Lincoln	GAF318 -16.1	HB7	HB24	Alex	Bonita	9.369	Valery	Irena	Ewa	BY	T62	Qld-1
H95	-	95.6	95.7	79.4	79.4	78.6	79.0	79.0	90.1	93.8	94.8	92.9	95.5	95.3	95.3	95.0	78.5	95.5	79.1	95.1	94.2	94.2	95.4	94.3	94.3	94.7	79.5	93.5	95.8
H00	97.3	-	98.8	79.2	79.3	78.6	78.9	78.9	89.8	93.4	94.5	92.5	94.4	97.3	97.2	97.0	78.2	97.4	78.9	96.9	93.9	93.8	97.3	94.0	94.0	94.3	79.2	93.0	95.3
M	97.4	99.2	-	79.4	79.4	78.7	79.0	79.1	90.1	93.6	94.7	92.8	94.7	97.6	97.5	97.2	78.4	97.7	79.1	97.2	94.2	94.0	97.5	94.2	94.2	94.6	79.4	93.2	95.4
Na1	86.0	86.0	86.1	-	99.1	79.2	79.5	96.1	80.4	78.7	79.3	78.7	79.1	79.3	79.3	79.1	97.4	79.3	98.3	79.0	79.2	79.5	79.4	79.2	79.2	79.0	98.7	79.2	79.3
SoPLV	86.1	86.1	86.2	99.4	-	79.3	79.5	96.4	80.5	78.7	79.3	78.7	79.3	79.3	79.3	79.2	97.7	79.4	98.5	79.1	79.2	79.6	79.4	79.1	79.2	79.0	98.9	79.3	79.3
Dic	85.6	85.7	85.7	86.0	86.0	-	95.4	79.3	78.0	78.2	78.6	78.5	78.8	78.5	78.6	78.6	78.5	78.6	79.0	78.6	78.8	78.6	78.6	78.7	78.7	78.8	79.3	79.1	78.9
RVC	85.8	85.9	85.9	86.2	86.2	96.9	-	79.4	78.4	78.6	78.9	78.9	79.2	78.8	78.9	78.8	78.6	79.0	79.1	78.8	79.1	79.0	79.0	79.0	79.1	79.1	79.6	79.5	79.5
BB-AND	85.8	85.8	85.9	97.6	97.9	85.9	86.1	-	80.3	78.7	78.9	78.3	79.0	78.9	79.0	78.8	95.2	79.1	95.8	78.7	78.8	79.2	79.0	78.7	78.7	78.7	96.3	78.9	79.1
Vltava	93.4	93.3	93.4	86.6	86.7	85.1	85.3	86.6	-	93.5	90.1	88.6	89.6	89.9	89.9	89.8	79.5	90.0	80.2	89.6	90.9	89.8	90.2	90.9	90.9	92.3	80.5	89.7	90.9
Leona	96.1	96.0	96.1	85.6	85.6	85.5	85.7	85.7	95.5	-	93.7	91.8	93.3	93.5	93.6	93.3	77.7	93.6	78.4	93.2	94.4	93.1	93.7	94.4	94.5	96.3	78.7	92.9	94.4
Yunnan YN	96.8	96.6	96.8	86.0	86.0	85.7	85.8	85.8	93.4	96.1	-	92.6	94.3	94.6	94.7	94.5	78.4	94.8	79.0	94.5	93.9	93.9	94.7	94.0	94.0	94.7	79.4	93.3	95.2
HU1	95.8	95.6	95.8	85.7	85.8	85.7	85.9	85.4	92.7	95.1	95.6	-	92.4	92.8	92.7	92.3	77.8	92.7	78.5	92.2	95.6	92.3	92.7	95.4	95.5	93.4	78.8	95.8	93.3
SW-14	97.3	96.5	96.7	85.8	85.9	85.7	85.9	85.7	93.1	95.8	96.4	95.5	-	94.5	94.7	94.4	78.3	94.6	78.9	94.2	93.5	93.6	94.6	93.6	93.6	93.9	79.2	93.0	95.4
WaDef-US	97.2	98.4	98.6	86.0	86.0	85.6	85.8	85.8	93.3	96.0	96.8	95.9	96.7	-	98.0	97.5	78.4	97.9	79.0	97.3	94.0	93.9	97.8	94.1	94.1	94.6	79.4	93.2	95.4
Id4106-US	97.3	98.4	98.5	86.1	86.1	85.6	85.9	85.9	93.3	96.0	96.9	95.7	96.7	98.9	-	97.4	78.4	97.8	79.0	97.3	94.0	93.9	97.7	94.1	94.1	94.6	79.4	93.2	95.5
NZ-0 ab030 Lincoln	97.0	98.1	98.3	85.8	85.9	85.5	85.7	85.6	93.1	95.8	95.6	95.5	96.5	98.5	98.5	-	78.9	97.5	79.5	97.7	93.7	93.8	98.1	93.7	93.7	94.3	79.2	93.1	95.1
NZ-A ab030 Lincoln	85.0	84.9	85.1	97.9	98.2	85.1	85.2	96.6	85.6	84.5	84.9	84.6	84.8	84.9	85.0	85.5	-	78.5	97.9	78.8	78.3	78.4	78.5	78.2	78.3	78.0	97.6	78.5	78.4
GAF318-16.1	97.4	98.4	98.6	86.1	86.1	85.6	85.9	85.9	93.4	96.0	96.8	95.8	96.7	98.8	98.7	98.4	85.0	-	79.1	97.5	94.0	94.0	97.8	94.1	94.1	94.6	79.4	93.3	95.5
HB7	85.6	85.6	85.7	98.7	98.9	85.7	85.8	97.3	86.3	85.2	85.6	85.4	85.4	85.6	85.7	86.1	98.4	85.7	-	79.5	78.9	79.2	79.1	78.9	78.9	78.7	98.3	79.1	79.0
HB24	96.9	97.9	98.1	85.8	85.8	85.5	85.7	85.6	92.9	95.6	96.5	95.2	96.3	98.2	98.2	98.7	85.4	98.3	86.1	-	93.7	94.0	97.3	93.7	93.7	94.3	79.1	93.0	95.3
Alex	96.4	96.3	96.5	86.0	86.0	85.9	86.0	85.7	93.9	96.5	96.3	97.4	95.9	96.4	96.4	96.1	84.9	96.4	85.6	96.0	-	93.6	94.0	99.7	99.7	96.9	79.2	95.4	94.5
Bonita	96.4	96.3	96.4	86.0	86.1	85.7	86.0	85.8	93.1	95.7	96.3	95.5	96.0	96.5	96.4	96.1	84.9	96.4	85.7	96.1	96.1	-	93.9	93.7	93.7	94.1	79.5	93.0	94.4
9.369	97.2	98.3	98.5	86.0	86.0	85.6	85.8	85.7	93.3	96.0	96.8	95.7	96.6	98.6	98.6	98.7	84.2	98.6	85.6	98.1	96.3	96.3	-	94.1	94.1	94.6	79.4	93.2	95.4
Valery	96.4	96.3	96.5	86.0	86.0	85.8	86.0	85.7	93.9	96.5	96.3	97.3	95.9	96.5	96.4	96.2	84.9	96.4	85.6	96.0	99.8	96.2	96.4	-	99.8	97.0	79.2	95.3	94.6
Irena	96.4	96.3	96.5	86.0	86.0	85.9	86.0	85.7	94.0	96.5	96.3	97.4	95.9	96.5	96.4	96.2	84.9	96.5	85.6	96.0	99.8	96.1	96.4	99.9	-	97.0	79.3	95.3	94.6
Ewa	96.7	96.5	96.7	85.9	85.9	85.8	86.0	85.8	94.7	97.6	96.7	96.2	96.1	96.7	96.6	96.5	84.8	96.7	85.5	96.3	98.3	96.3	96.6	98.4	98.4	-	79.0	93.9	95.1
BY	86.0	86.0	86.1	99.2	99.4	86.0	86.2	97.8	86.7	85.6	86.0	85.7	85.8	86.1	86.1	85.9	98.1	86.1	98.8	85.8	86.0	86.0	86.0	86.0	86.0	85.9	-	79.3	79.3
T62	95.7	95.4	95.8	87.4	87.6	87.2	87.5	87.3	92.2	95.2	96.0	97.3	95.9	95.8	96.0	96.1	87.5	96.2	87.8	95.9	97.1	95.6	95.7	97.0	97.0	96.6	87.8	-	93.9
Qld-1	97.1	96.5	95.8	87.6	87.8	86.9	97.2	87.4	92.3	95.6	96.0	95.4	97.4	96.7	97.1	97.0	87.7	97.1	88.0	97.0	96.7	96.2	96.7	96.6	96.7	97.1	87.8	96.3	-

PVS 株間の塩基配列同一性は表の右上に表示。PVS 株間のアミノ酸配列同一性は表の左下に表示。

普通系統、アンデス系統または P (phureja) 系統内の計算結果は黒い字で示す。普通系統とアンデス系統間の計算結果は赤い字で示す。P 系統と他の系統間の計算結果は青い字で示す。組み換え株 Vltava と他の系統間の計算結果は橙色で示す。



図IV-3-15 PVS 系統内・系統間の同一性解析

全ゲノム配列を用い、PVS 系統内・系統間の同一性を解析した。組み換え体である Vltava 株を除いた計 28 株のうち普通系統 (PVS<sup>0</sup>) は 20 株、アンデス系統 (PVS<sup>A</sup>) は 6 株、P (phureja) 系統 (PVS<sup>P</sup>) は 2 株である。

普通系統内の比較結果は緑色、アンデス系統内の比較結果は赤色、P 系統内の比較結果は黄色で表示。P 系統とアンデス系統間の比較結果は橙色、普通系統とアンデス系統間の比較結果は紫色、普通系統と P 系統間の比較結果は青色で表示。

#### 4. 考察

PVS-Mの未知配列約 5.5 Kb 及び SoPLV K-1 の未知配列約 6.9 Kb をダイレクトシーケンシングによって解析した。解析した配列で 2 つの塩基の重なりが見られた箇所は、PVS-M で 2 ヶ所、SoPLV K-1 で 4 ヶ所存在した (表IV-3-2 と表IV-3-3)。PVS-M の 2 ヶ所の塩基はアミノ酸配列に影響するもので、いずれも複製酵素の MTR と O-PRO の間に分布した。SoPLV K-1 の 4 ヶ所のうち 1 ヶ所の塩基はアミノ酸配列に影響するもので、その 1 ヶ所を含め計 3 ヶ所の塩基が複製酵素の MTR と O-PRO の間に分布した。このことから PVS-M と SoPLV K-1 はともに単一のゲノム配列からなるウイルス集団ではなく、いくつかのゲノム配列が混在しているウイルス集団と考えられた。

日本産の PVS 普通系統 H95 を基準として、PVS 普通系統の H00 株、アンデス系統の Na1 株、M 株と SoPLV K-1 で株間の相同性解析を行った結果、H95 株、H00 株、M 株が同じグループで、Na1 株、SoPLV K-1 が同じグループであった (図IV-3-3)。このことから M 株は PVS 普通系統であり、SoPLV K-1 は別種ウイルスではなく、PVS のアンデス系統に属することが確かめられた。PVS-M、SoPLV K-1 の全ゲノムはポリ A 鎖を除き、ともに PVS-Na1 と同じ 8486 塩基で、PVS-H95 と PVS-H00 より 3'非翻訳領域が 1 塩基長かった (図IV-3-1 と図IV-3-2)。全ゲノム配列が決定された日本産の PVS 5 株は 3'末端の非翻訳領域以外、各非翻訳領域と ORF の塩基長は一致した。また、PVS-M は以前日本で報告された PVS の k-1 株 (中野ら, 1997) より 21 塩基長かったが、ORF1 の塩基長は一致した。

PVS-M と PVS-H95 に計 363 塩基相違 (4.3%) と計 85 アミノ酸相違 (3.1%)、PVS-M と PVS-H00 に計 99 塩基相違 (1.2%) と計 34 アミノ酸相違 (1.2%) が見られた。PVS-M と PVS-H95 の塩基相違率が最も高いのは ORF1 (複製酵素) の 5.2%、最も低いのは ORF6 (CRP) の 0.7%であったが、PVS-M と PVS-H00 の塩基相違率が最も高いのは ORF6 (CRP) の 1.4%、最も低いのは ORF3 (TGBp2) の 0.3%であった (表IV-3-4)。また、PVS-M と PVS-H95 のアミノ酸相違率が最も高いのも複製酵素で 3.8%、最も低いのは TGBp2 と CRP の 0%であったのに対し、PVS-M と PVS-H00 のアミノ酸相違率が最も高いのは TGBp1 の 2.2%、最も低いのは TGBp3 の 0%であった (表IV-3-4)。一方、SoPLV K-1 と PVS-Na1 に計 77 塩基相違 (0.9%) と計 26 アミノ酸相違 (0.9%) が見られ、塩基相違率が最も高いのは ORF6 (CRP) の 1.1%、最も低いのは ORF5 (CP) の 0%だが、アミノ酸相違率が最も高いのは TGBp3 の 3%、最も低いのは TGBp2 と CRP の 0%であった (表IV-3-6)。従って、各 ORF における塩基相違率とアミノ酸相違率はウイルス株間でことになっていた。ブ

ラジルの BB-AND 株とヨーロッパやアメリカの 4 株を比較した場合も同様の結果が報告されている (Duarte *et al.*, 2012)。

株間のアミノ酸相違の分布傾向を特定するため、PVS-M と PVS-H95 と PVS-H00、また、SoPLV K-1 と PVS-Na1 のアミノ酸相違の分布を調べた (表IV-3-5 と表IV-3-7、図IV-3-4 と図IV-3-5)。普通系統 3 株、アンデス系統 2 株のアミノ酸相違は ORF1 がコードする複製酵素に最も多く見られ、MTR と O-PRO 間の領域に集中的に分布したが、POL 領域では全く見られなかった。このことから、PVS 複製酵素の MTR と O-PRO 間に多様性領域が存在し、PVS 複製酵素の RNA 依存性 RNA ポリメラーゼは保存性が非常に高いと考えられる。また、日本の PVS 普通系統 3 株、アンデス系統 2 株間のアミノ酸相違の多くは性質が近いものであることが明らかになった。

日本における PVS の 5 株を用いた非同義置換・同義置換分析 (Ka/Ks 分析) 結果 (図IV-3-6) から、いずれの株間においても PVS 複製酵素は強いネガティブ選択を受けているが、MTR と O-PRO 間の多様性領域は強いポジティブ選択またはニュートラルな選択を受けていることが明らかになり、前述の株間アミノ酸相違の分布結果と一致した。このことから、複製酵素の多様性領域 (MTR と O-PRO 間の領域) はアミノ酸の変化を積極的に受け入れていて、このアミノ酸多様性には何らかの意味合いがあるように思われた。また、普通系統株間では CP の N 末端も強いポジティブ選択を受けていた。

日本産 5 分離株と世界各国 24 分離株の計 29 株で全ゲノム配列、全アミノ酸配列、複製酵素または CP アミノ酸配列にもとづいて系統解析を行った結果から (図IV-3-7~図IV-3-10)、PVS-M は PVS-H96・PVS-H00 とともに普通系統に属し、SoPLV K-1 は PVS-Na1 とともに PVS アンデス系統に属することが改めて確認された。

4 つの系統樹 (図IV-3-7~図IV-3-10) では、P (*phureja*) 系統として報告されていた 2 株 (RVC と Dic2 ; Vallejo *et al.*, 2016) は他のアンデス系統株よりやや遠縁であったが、アンデス系統の中に属した。しかし、PVS 29 株との相同性解析を行った結果、RVC と Dic2 は普通系統の M 株に対してもアンデス系統の SoPLV K-1 に対しても、比較的低い相同性スコアを示した (図IV-3-11~図IV-3-14)。このことから、RVC と Dic2 はアンデス系統に近いが若干異なるということが明らかになった。RVC と Dic2 が *Chenopodium* 属の植物に全身感染するか否か生物学性状は報告されていないが、RVC と Dic2 では他の PVS 株とは異なり、*S. phureja* から分離された (Vallejo *et al.*, 2016) ことから、アンデス系統から宿主に適応し進化した系統である可能性が考えられた。

PVS 29 株の系統解析及び相同性解析から、Vltava 株では ORF2 領域内で組み換えが起こり、ゲノムの 5'末端側は普通系統株由来の配列であるのに対し、3'末端側はアンデス系統株由来の配列であることが明らかになり、これは Duarte らが報告した結果 (Duarte *et al.*, 2012) と一致した。以前の PVS 系統分析研究は、PVS の CP の塩基配列かアミノ酸配列に基づいたものが多く、Vltava 株がアンデス系統に分類されている報告も多い (Cox and Jones, 2010 ; Lin *et al.*, 2009 ; Salari *et al.*, 2011) が、Vltava 株が *Chenopodium* 属の植物へ全身感染ができないことが報告されている (Matoušek *et al.*, 2000) ことから、Vltava 株は生物学的にはアンデス系統ではない。また、全ゲノム配列に基づいた系統解析から、Vltava 株の分子性状もアンデス系統ではない (Vallejo *et al.*, 2016)。

Matoušek らは、*Chenopodium* 属の植物に全身感染するが CP 配列が普通系統に類似する PVS 株を CS (*Chenopodium systemic*) 系統 (PVS<sup>CS</sup>) に分類した (Matoušek *et al.*, 2005)。また、Cox and Jones は *Chenopodium* 属の植物に全身感染するが CP 配列が普通系統に類似する PVS 株を O-CS (ordinary- *Chenopodium systemic*) 系統 (PVS<sup>O-CS</sup>) に、未確認だが *Chenopodium* 属の植物に全身感染しないが CP 配列がアンデス系統に類似する PVS 株を A-CL (Andean- *Chenopodium local*) 系統 (PVS<sup>A-CL</sup>) と名付けた (Cox and Jones, 2010)。Lin らは *Chenopodium* 属の植物への病原性ではなく、CP 領域の配列を PVS 系統分類のための基準として使用すべきとする提案した (Lin *et al.*, 2014)。しかし、これらの分類法の基準となる PVS 配列は CP 領域のみで、実際組み換え体の存在を考慮すると、不適切であると考えられる。また、Lambert らは CP 配列が普通系統に類似し *Chenopodium* 属の植物に全身感染せず、接種葉に病徴が現れない PVS 株を ordinary-like 系統 (PVS<sup>O-like</sup>) に、CP 配列が普通系統に類似するが *Chenopodium* 属の植物に全身感染する PVS 株を Andean-like 系統 (PVS<sup>A-like</sup>) に分類した (Lambert *et al.*, 2012)。Lambert らの分類法も PVS 配列の CP 領域のみを参照したものであるが、系統分類に参考した *Chenopodium* 属植物への病原性を従来の全身感染するか否かより、接種葉や上葉の病徴も考慮し更に細かく分類したので、PVS 系統分類における PVS 病原性性状の分け方に対して、非常に参考になると考えられた。

計 28 株の全ゲノム配列を用い、各 2 株間の塩基配列同一性を計算した結果から、普通系統 20 株の系統内の同一性は 91.8%以上、アンデス系統 6 株、P 系統 2 株の系統内の同一性はそれよりやや高い 95.2%以上であった。また、普通系統株、アンデス系統株、P 系統株の系統間の同一性はいずれも 77%以上 80%以下であった (表IV-3-8 と図IV-3-15)。こ

の結果と PVS 29 株の相同性解析結果から、RVC と Dic2 が代表する P 系統の存在が改めて示唆され、Vallejo *et al.* の報告 (Vallejo *et al.*, 2016) に賛同する。

以上をまとめると、従来認識されていた *Chenopodium* 属植物へ全身感染するか否かを PVS 系統分類の根拠にする提案は不十分であると考えられた。普通系統、アンデス系統以外、P 系統も存在するため、PVS 系統分類の基準にゲノム分子性状も考慮する必要があると考えられた。なお、組み換え株の存在を考慮し、PVS のゲノム分子性状は単独の ORF 塩基配列やタンパク質アミノ酸配列だけではなく、全ゲノム配列を参考にする必要があると考えられた。

## 第V章 総合考察

### 1. PVS 分離株には複数のゲノム配列型が存在する

PVS-H95 と PVS-H00 のゲノム配列を比較した結果、計 370 塩基相違 (4.4%) と計 91 アミノ酸相違 (3.3%) が見られた (表III-3-4)。PVS-H00 は、PVS-H95 を接種源として 2000 年に *C. quinoa* における単病斑分離によって得られたものである。その単病斑分離前にシリカゲル保存された感染乾燥葉から、PVS-H95 の部分配列をダイレクトシーケンシングによって解析すると、2 塩基の重なり箇所が多く見られ、その箇所は PVS-H00 と PVS-H95 に見られた塩基相違箇所と一致した (表III-4-1)。一方、単病斑分離後にシリカゲル保存された感染乾燥葉から、PVS-H00 の部分配列をダイレクトシーケンシングによって解析した結果、2 塩基の重なり箇所はほぼ見られなかった (表III-4-1)。また、PVS-M の未知配列約 5.5 Kb、SoPLV の未知配列約 6.9 Kb をダイレクトシーケンシングによって解析すると、2 塩基の重なりが見られた箇所は、PVS-M で 2 ヶ所、SoPLV で 4 ヶ所存在した (表IV-3-2 と表IV-3-3)。これらのことから、PVS 分離株内のウイルスゲノムは単一のゲノム配列集団ではなく、複数のゲノム配列が混在している集団と考えられた。また、PVS-H00 は PVS-H95 より PVS-M との同一性が高い (表III-3-4 と表IV-3-4) ことから、PVS 分離株内のウイルスゲノム配列の高い多様性が示唆された。

Pepino mosaic virus (genus *Potexvirus*) でも、計 10 分離株のゲノム配列を調べた結果、各株内に複数のゲノム配列が存在していることが報告された (Hasiów-Jaroszewska *et al.*, 2010)。このような複数のゲノム配列の混在は RNA ウイルスに多く見られ、ウイルスゲノムが宿主細胞内で増殖する際に突然変異や組み換えが起こることによって生じると考えられている。ゲノム配列が競争し選択されることによって一連の遺伝的変異体が生じ、このような遺伝関係が近いゲノム変異体集団を *quasispecies* と呼ばれている (Arias *et al.*, 2001 ; Domingo *et al.*, 2006)。ウイルスの RNA ポリメラーゼの低い正確性、短い複製サイクル、膨大な子孫ウイルスの存在が、分離株内に複雑な *quasispecies* を構成すると考えられる。*Quasispecies* のウイルスはポジティブまたはネガティブ選択を受け、変化する環境に適応する強い能力を備え、環境変化が激しい場合でも生き残ることが可能であると考えられている。

植物ウイルスにおける *quasispecies* の多様性は宿主因子に影響され、一年生植物と永年

生植物に感染するウイルスではそれぞれの *quasispecies* の多様性が大きく異なっている。クロステロウイルス科 (*Closteroviridae*) のウイルスは一年生または永年生植物に感染するが、永年生植物である柑橘類の植物に感染するカンキツトリステザウイルス (*citrus tristeza virus*; genus *Closterovirus*) 内のゲノム突然変異頻度は約 0.142 で、一年生植物であるトマトに感染するトマト退緑ウイルス (*tomato chlorosis virus*; genus *Crinivirus*) の  $0.90 \times 10^{-4}$ - $15.8 \times 10^{-4}$  の約千倍高いことが報告された (Kong *et al.*, 2000; Lozano *et al.*, 2009)。また、異なる宿主に感染する同じウイルスでも、*quasispecies* の多様性が異なることがある。ビートネソ性葉脈黄化ウイルス (*beet necrotic yellow vein virus*; genus *Benyvirus*) は感受性てんさいにおけるウイルス集団ではゲノム変異型の種類が多く、互いに比較的近縁であったのに対し、抵抗性てんさいの抵抗性を打破して感染しているウイルス集団ではゲノム変異型の種類は少なく、互いに比較的遠縁であった (Acosta-Leal *et al.*, 2008)。更に、カブモザイクウイルス (*turnip mosaic virus*; genus *Potyvirus*) UK1 株の感染性クローンを用いた継代接種実験では、*Brassica rapa* から *Raphanus sativus* に継代したウイルスのゲノム集団は *Brassica rapa* のみで継代しているゲノム集団より高い塩基相違率、及びより多くの非同異置換が見られた (Ohshima *et al.*, 2010)。継代宿主の交代によってゲノム集団の多様性が大きくなる結果は、*yellow tailflower mild mottle virus* (genus *Tobamovirus*) とイネ縞葉枯ウイルス (*rice stripe virus*; genus *Tenuivirus*) でも報告された (Koh *et al.*, 2017; Huang *et al.*, 2015)。これらのことから、PVS のゲノム集団の多様性も宿主因子に影響される可能性が考えられた。複数のゲノム配列が混在している PVS-H95 が *C. quinoa* での単病斑分離によるボトルネック効果により、比較的単一のゲノム配列からなる集団として PVS-H00 が得られたと考えられる。

## 2. PVS 複製酵素の MTR と O-PRO 領域の間に多様性領域が存在する

一般的に、ウイルスの複製酵素はウイルスの複製に関わる重要なタンパク質で、保存性が比較的高いと考えられる。PVS の複製酵素は全体で見ると強いネガティブ選択を受け (図III-3-8-B と図IV-3-6)、アミノ酸の変化率が低く、有害変異が排除されていることが考えられた。また、PVS-H95 と PVS-H00 の複製酵素にある既知の 5 つの機能領域 MTR、O-PRO、P-PRO、HEL、POL でのアミノ酸相違を調べた結果、HEL 以外の 4 つの機能領域での保存性は非常に高く、特に POL 領域の配列が完全に一致していた (図III-3-9～図III-3-11)。PVS-M と PVS-H95 と PVS-H00、また、SoPLV と PVS-Na1 のアミノ酸相違を調

べた場合も同じような結果になった (図IV-3-4 と図IV-3-5)。一方、他の 4 機能領域と比較すると、HEL の保存性はやや低く、計 12 アミノ酸相違が PVS-H95 と PVS-H00 間に見られ、うち性質のやや遠い3つのアミノ酸相違はHELのN末端に分布していた(図III-3-11)。PVS-RVC と PVS-Dic2 を比較した場合も、複製酵素の HEL 領域の N 末端が強いポジティブ選択を受けていることが報告された (Vallejo *et al.*, 2016)。

コロンビア産の PVS-RVC を他の PVS 5 株 (BB-AND、WaDef-US、Leona、Vltava、Id4106-US) の配列と比較した場合でも、ORF1 領域の同一性が 80%以下と最も低いことが報告されている (Gutiérrez *et al.*, 2013)。PVS-H95 と PVS-H00 のアミノ酸相違の分布を調べた結果、計 91 アミノ酸相違の約 90%は複製酵素に存在し、更に複製酵素の中でも、約 70%のアミノ酸相違が複製酵素 N 端側の MTR と O-PRO 領域の間に分布していた (図 III-3-9 と図III-3-10)。また、PVS-H00 と PVS-H95 の Ka/Ks 分析結果から、ゲノム全体で見ると強いネガティブ選択を受けているが、複製酵素の MTR と O-PRO 間の領域だけを見ると強いポジティブ選択を受けていることがわかった (図III-3-8-B)。また、ダイレクトシーケンシングで 2 塩基の重なりが見られた PVS-M の 2 ヶ所、SoPLV の 4 ヶ所のうち、3 ヶ所が複製酵素の MTR と O-PRO の間に分布した。(表IV-3-2 と表IV-3-3)。PVS-M と PVS-H95 と PVS-H00、及び SoPLV と PVS-Na1 のアミノ酸相違の分布を調べた場合でも、アミノ酸相違が複製酵素に最も多く見られ、MTR と O-PRO 間の領域に集中的にアミノ酸相違が分布した (図IV-3-4 と図IV-3-5)。日本産 PVS の 5 株を用いた Ka/Ks 分析の結果から、いずれの株間においても PVS 複製酵素は強いネガティブ選択を受けているが、MTR と O-PRO 間の多様性領域は強いポジティブ選択またはニュートラルな選択を受けていることが明らかになった (図IV-3-6)。更に、PVS 27 株の相同性解析結果から、各分離株間、特に系統が異なる株間では、複製酵素の MTR と O-PRO 間の領域の相同性スコアが非常に低いことが示された (図IV-3-11~図IV-3-14)。これらのことから、複製酵素の MTR と O-PRO 間は多様性領域であり、アミノ酸の変化を積極的に受け入れ、この領域での非常に高い多様性には何らかの意味合いがあると考えられた。

複製酵素の MTR と O-PRO 間の領域には機能領域や保存モチーフの存在が報告されておらず、PVS の複製サイクル、感染メカニズムにおけるこの多様性領域の機能については明らかになっていない部分が多かった。

### 3. PVS 病原性の決定因子及び系統分類

日本の過去の研究では、PVS はジャガイモにモザイク症状を引き起こすモザイク系統 (PVS<sup>M</sup>) とジャガイモに潜在感染する普通系統 (PVS<sup>N</sup>) の 2 系統に分類され (堀尾, 1976)、PVS に近縁で *C. quinoa* に全身感染するウイルスは別種の SoPLV として報告された (小林ら, 1985)。日本産の PVS-H95、PVS-H00、PVS-M、PVS-Na1 と SoPLV-K1 の全ゲノム配列及び諸外国の PVS 株を用いた相同性解析及び系統解析の結果から、PVS-H95、PVS-H00、PVS-M は普通系統であり、PVS-Na1 と SoPLV-K1 はアンデス系統に属することが確かめられた (図IV-3-3、図IV-3-7～図IV-3-14)。

ジャガイモではなく *S. phureja* から分離した PVS RVC 株と Dic2 株の 2 株は系統解析の結果、新しい P (phureja) 系統に属することが提案された (Vallejo *et al.*, 2016)。本研究で PVS 29 株の相同性解析を行った結果 (図IV-3-11～図IV-3-14) から RVC 株と Dic2 株は普通系統の M 株に対してもアンデス系統の SoPLV K-1 に対しても、比較的低い相同性スコアを示した。また、計 28 株の全ゲノム配列を用い各 2 株間の塩基配列同一性を計算した結果 (表IV-3-8 と図IV-3-15) から、RVC 株と Dic2 株は普通系統株、アンデス系統株に対し、ともにの同一性を示した。これらのことから、RVC 株と Dic2 株は新しい系統に属することに賛同する。また、系統解析及び PVS-M のゲノム配列を基準にした相同性解析の結果から、PVS-Vltava は ORF2 領域内で組み換えが起こり、ゲノムの 5'末端側は普通系統株由来の配列であるのに対し、3'末端側はアンデス系統由来の配列であることが確認され (図IV-3-7～図IV-3-12)、これは Duarte らが報告した結果 (Duarte *et al.*, 2012) と一致した。

PVS の *Chenopodium* 属植物への全身感染性を決定する病原因子は未だ明らかになっていないが、CP 配列がアンデス系統に属する PVS-Vltava (図IV-3-10 ; Cox and Jones, 2010 ; Lin *et al.*, 2009 ; Salari *et al.*, 2011) は *Chenopodium* 属植物に全身感染しないことから、PVS の CP 配列がその病原因子ではないことが考えられた。一方、Lambert らは PVS が感染した *Chenopodium* 属植物の病徴には従来認識されていた *C. quinoa* に局部感染して接種葉に壞疽斑を現す及び *C. quinoa* へ全身感染して上葉に褪緑斑やモザイク等の病徴を現すこととは異なるものがあり、*Chenopodium* 属植物への病原性を、従来の全身感染するか否かよりも、更に *C. quinoa* に局部感染する場合の接種葉病徴の有無を考慮し、細かく分類した (Lambert *et al.*, 2012)。

上記のことから、PVS の系統分類を行うには病原性と分子性状の両方を基準とし、PVS による *Chenopodium* 属植物への病原性を全身感染性に接種葉や上葉の病徴の有無を加え詳細に分類し、分子性状は単独の ORF やタンパク質配列ではなく全ゲノム配列に基づく

必要があると考えられた。

#### 4. PVS 感染性クローンの構築

7個の部分長 cDNA クローンを制限酵素サイトで繋いで構築した PVS-H95 の全長 cDNA クローン pPVS-H-FL-H から転写した RNA には感染性が認められなかったが、大部分を2つの大きな RT-PCR 増幅産物を繋いで構築した PVS-H00 の全長 cDNA クローン pPVS-H-FL-β から転写した RNA には感染性が認められた (図III-3-1~図III-3-4)。一方、pPVS-H-FL-H の ORF1 領域を pPVS-H-FL-β の ORF1 領域と入れ換えて構築した組み換え体 pPVS-H-FL-βH から転写した RNA には感染性が認められたが、pPVS-H-FL-β の ORF1 領域を pPVS-H-FL-H の ORF1 領域と入れ換えた組み換え体 pPVS-H-FL-Hβ から転写した RNA には感染性が認められなかった (表III-3-5 と図III-3-13)。これらのことから、全長クローンを構築する際に用いた部分長 cDNA クローンの由来が単一ゲノムであるほど、全長クローンが感染性を有する可能性が大きく、PVS-H95 の全長クローンの感染性に影響を与えるのは ORF1 (複製酵素) の配列であるということが示唆された。

複製酵素における計 80 アミノ酸相違の中、感染性に影響を与える可能性が高い配列を考察した。4つの機能領域 MTR、O-PRO、P-PRO 及び HEL 領域に着目して PVS-H95 と他の PVS 28 株 (日本の 4 株と世界各国の 24 株) の複製酵素機能領域のアミノ酸配列を比較した結果、MTR の 155A、O-PRO の 994Y、P-PRO の 1087Y、HEL の 1234T は PVS-H95 特有の配列である。4 アミノ酸の内、MTR の A155S、O-PRO の Y994F は性質の近いアミノ酸相違 (SG 値 5) で、感染性に影響を与える可能性が低いと考えられる。一方、P-PRO の Y1087H と HEL の T1234E は性質のやや遠いアミノ酸相違 (SG 値 3) で、1087 番目では 28 株全てがヒスチジン (H) で、1234 番目では Qld-1 株を除く 27 株全てがグルタミン酸 (E) である。これらのことから、複製酵素で生じていたアミノ酸相違のうち全長クローンの感染性に影響を与えるものは、P-PRO の 1ヶ所 (Y1087H)、と HEL の 1ヶ所 (T1234E) である可能性が最も考えられる。また、HEL に性質のやや近い (SG 値 4) I1337M は、T62 株を除く 27 株全てがメチオニン (M) であり、このアミノ酸相違も感染性に影響を与える可能性があると考えられる。

また、pPVS-H-FL-βH クローン番号 13 から転写した RNA には感染性があったが、クローン番号 3 には感染性がなかった (表III-3-5)。pPVS-H-FL-βH クローン番号 3 にクローン番号 13 の長い polyA 配列 (67 個) を入れ換えて構築した pPVS-H-FL-βH313 に感染性が

無く、逆に pPVS-H-FL-βH クローン番号 13 にクローン番号 3 の短い polyA 配列 (35 個) を入れ換え構築した pPVS-H-FL-βH133 が感染性を示した (図III-3-14)。これらのことから、PVS の感染性クローンには 35 個以上の polyA 配列が揃えば十分で、クローン番号 3 では構築する過程で行った PCR によって感染性に影響を与える変異が持ち込まれたことが考えられる。

## 5. まとめ

本研究では、PVS-H00 を鋳型として、安定的でかつ高い感染性を持つ RNA を転写できる PVS の cDNA クローンの構築に成功した。これは最初の PVS 感染性クローンとなり、今後 PVS のゲノムにコードされるタンパク質の機能、ウイルスの複製や移行、*Chenopodium* 属植物における病原性因子の決定、宿主植物との相互作用などの研究に役立つものである。また、これまでに PVS の分離株内における多様性を調べた報告はなかったが、本研究では、PVS-H00 と PVS-H95 の全ゲノム配列を比較することで、PVS にも quasispecies が存在し、複製酵素の MTR と O-PRO 領域の間に多様性領域が存在することを明らかにした。更に、日本産 5 分離株と世界各国産 24 分離株の全ゲノム配列に基づいて系統解析及び相同性分析を行い、PVS 系統の分子性状を分析した。これらの結果は PVS のゲノム集団や進化を研究するための重要な資料となり、PVS の系統分類に *Chenopodium* 属植物への病原性及び全ゲノム配列による分子性状両方を基準とすることを提唱する。

表 S-1 : 本研究で用いたプライマーのまとめ (次ページに続く)

プライマー名	配列 5' - 3' *	結合位置	センス	用途#
PVS-1P	TTGAAGCACCTTTAGGAACA	7162 - 7181	+	PCR
PVS-2P	GCCCAATGATCTCATAGAGG	5432 - 5451	+	PCR
PVS-6P	GCTCACAAYGCYCACAAGAG	7965 - 7984	+	Seq
PVS-7P	ACACTCCGAAAATAATTTGAC	6 - 27	+	PCR, Seq
PVS-20P	ATGTGCCCGCTAACGCCAAGG	199 - 219	+	Seq
PVS-37P	GCTTCTCACATTCAATCGCCTTCG	4330 - 4353	+	PCR, Seq
PVS-41P	ATGAGTTCGTGATCAAATTCGGCGCGGCTT	466 - 495	+	Seq
PVS-44P	GCTTAAGTGTTCGCGAGTATGCTG	1687 - 1710	+	PCR, Seq
PVS-47P	TAAAGTAGTGACTTTCATTGGGGTTGG	8347 - 8374	+	PCR,
PVS-48P	ATGGATGTGTTTTGCAAGTTTTG	6025 - 6048	+	Seq
PVS-49P	CCCAGGTTTCAATTGGCTGTGC	2422 - 2443	+	Seq
PVS-50P	TTTGCTCCAAGGGACAGGGATG	2057 - 2078	+	Seq
PVS-51P	AGAGATTTGGGTTGGGACGTAC	6406 - 6427	+	Seq
PVS-54P	CTCTTCTCCACGATGAGATGCAC	579-602	+	Seq
PVS-56P	CCGCTGGTCATTCAACTCTAAC	1946-1967	+	PCR, Seq
PVS-58P	CATGCTGAGAGCGAGGCATTTCG	3240-3261	+	PCR, Seq
PVS-60P	GTGACCCATGGTTGAAGACTATGC	4546-4569	+	PCR, Seq
PVS-61P	CTTGGGCTGTACCGCTCCTGCC	1352-1373	+	Seq
PVS-63P	GAGGTWTCGTACGCCTACAAGCTCG	5841-5865	+	PCR
PVSCP1P	TACTGCTGACATCGCTGG	7576 - 7594	+	Seq
PVSORF6P	AAGCGGAGGGCCCGCAGCATTG	8234 - 8255	+	Seq
PVS-H-5E2	GATAAACACTCCGAAAATAATTTGAC	1-27	+	PCR
T7-PVS-H	CGATTAAT <i>JAA</i> TACGACTCACTATA GATAAACACTCCGAAAATAATTTGACTT	<i>Pac</i> I +T7+ 1-29	+	PCR
PVS-1M	GCATGTCCTATTATCACACT	8304 - 8323	-	PCR
PVS-8M	GTGAGAATGAGGATACCCCG	259 - 278	-	PCR
PVS-9M	ATAGGGGCTTAGGTAAATCC	237 - 257	-	PCR, Seq
PVS-11M	AAGGTGCTAGCCTCACCGGAG	5513 - 5533	-	PCR, Seq
PVS-14M	TTATGTTCCGTAAGAGATCACGCAGG	539 - 564	-	Seq
PVS-19M	GTGAGAATGAGGATACCCTG	259 - 278	-	PCR
PVS-20M	GCTAGCCTCACCAGAGAAGCG	5508 - 5528	-	PCR, Seq
PVS-37M	CCAAATCCCTCTTTGAAGCATGGC	4472 - 4495	-	PCR, Seq
PVS-38M	TGGGTGGTATCACCTCAGTTACTC	8374 - 8397	-	PCR
PVS-40M	ACGTTATGCCTGGAATGTGC	1791 - 1810	-	PCR, Seq
PVS-41M	AGCGGTATAGTTTGTGGTGTCTCTCCTGAG	7244 - 7273	-	Seq
PVS-43M	CACATCAATCAAACGTGTGTTGCTC	1727 - 1751	-	Seq
PVS-45M	GGCCCTTCTATGACTCATCAACC	6258 - 6281	-	Seq
PVS-49M	GGATACGTAGATGATGCTCTTCC	3652 - 3674	-	PCR, Seq
PVS-52M	GGTTTATTTAAAGTACTACTAACACGCTC	6064 - 6092	-	Seq
PVS-53M	GGTTGGGTGTACCAGTAATTGCC	6896-6918	-	PCR, Seq
PVS-55M	CAGAATTGCCATTGTGCCACAG	2006-2028	-	PCR, Seq

表 S-1 : 本研究で用いたプライマーのまとめ

プライマー名	配列 5' - 3' *	結合位置	センス	用途 <sup>#</sup>
PVS-57M	CGGCTTGCTCTTGCAATGCTC	3318-3338	-	PCR, Seq
PVS-59M	CGGAACCATTCCTCACCTAGCTC	4620-4642	-	PCR, Seq
PVS-62M	CCTCCAACCTTCAGCTATGGCCAC	2421-2398	-	Seq
PVS-63M	CGAGCTTGTAGGCGTACGAWACCTC	5841-5865	-	PCR
3NTRAP3			-	PCR
3NTRAP4			-	PCR
PVS-H-3E-Spe2	CACCTGCAGGCACTAGITTTTTTTTTT	ポリ A + <i>Spe</i> I + <i>Sse</i> 8387 I	-	PCR
M13-F	GTTTTCCCAGTCACGACGTTG			Seq
M13-R	GCTATGACCATGATTACGCCAAGC			Seq

\*:W は A または T である。T7 プロモーター配列は斜体で表示。

制限酵素サイトは下線で表示。

# : P は PCR 用プライマー、S は配列解析用プライマーである。

PVS-H95、PVS-H00、PVS-M に適したものは青色、PVS-Na1、SoPLV に適したものは橙色、上記 5 株全てに適したものは緑色で示した。

## 摘要

1. 先に構築された PVS-H95 の全長 cDNA クローンを改変した 5 種類に加え、新たに 2 種類の pPVS-H-FL-G と pPVS-H-FL-H を構築した。pPVS-H-FL-G は PVS-H95 のコンセンサス配列と 3 アミノ酸相違が見られ、pPVS-H-FL-H は PVS-H95 のコンセンサス配列と完全に一致するものである。それらの全長 cDNA クローンからのキャップ付加転写 RNA を *N. occidentalis* に接種し、ELISA で PVS の外被タンパク質の検出を行ったが、感染が確認できた植物個体はなかった。
2. *C. quinoa* 葉において PVS-H95 から単病斑分離を 3 回繰り返して得た H00 株のゲノムを鋳型とし、2 つの長い RT-PCR 増幅断片を繋いでほぼ全長の cDNA クローンを構築し、3' 末端は 66 個のポリ A 配列を有するように改変した pPVS-H-FL- $\beta$  を構築した。そこから転写したキャップ付加 RNA を *N. occidentalis* に接種した結果、上葉で PVS-H00 接種と同様のえそ病徴などが観察され、発病葉から ELISA 法で PVS 外被タンパク質、ノーザンブロット法でウイルスゲノム RNA とサブゲノム RNA が検出されたことから、転写 RNA の感染性が認められた。
3. pPVS-H-FL- $\beta$  転写 RNA の接種量 (1 個体当たり 5  $\mu$ g、2  $\mu$ g、1  $\mu$ g、0.5  $\mu$ g、0.2  $\mu$ g、0.1  $\mu$ g の 6 段階) と感染率の関係を調べた結果、pPVS-H-FL- $\beta$  転写 RNA の感染性は高く、0.1  $\mu$ g/個体という低い接種量で 90% の接種 *N. occidentalis* 個体が PVS に感染し、同程度の病徴が見られた。しかし、接種植物の発病時期は転写 RNA の接種量に影響され、1  $\mu$ g/個体以上の接種量の場合、2 週間以内の発病率は 80% 以上であったが、接種量が 1  $\mu$ g/個体以下の場合、2 週間以内の発病率は 50% 以下に低下した。
4. pPVS-H-FL- $\beta$  のプロモーターを T7 プロモーターを CaMV 35S プロモーターに入れ替え、p35S-PVS-H-FL- $\beta$  を構築したが、6  $\mu$ g/個体で *N. occidentalis* に接種した結果、感染率は 25% 以下であった。
5. PVS-H00 と PVS-H95 の全ゲノムを比較した結果、全塩基数はともにポリ A 鎖を除い

て 8485 塩基で、非翻訳領域およびオーバーラッピング領域では両者に塩基相違は見られなかった。PVS-H00 と PVS-H95 には計 370 個（全塩基数の 4.4%）の塩基相違が見られ、うち 102 個の塩基相違がアミノ酸配列に影響を与えた。両者の塩基相違率が最も高いのは ORF1 の 5.4%で、最も低いのは ORF5 の 0.3%であった。6 つの ORF に計 91（全アミノ酸数の 3.3%）アミノ酸相違が見られ、うちアミノ酸相違率が最も高いのは複製酵素の 4.1%で、CP は 0.3%と最も低かった。

6. PVS-H00 と PVS-H95 との非同義置換・同義置換分析（Ka/Ks 分析）を行った結果、全体の Ka/Ks は約 0.38 で、強いネガティブ選択を受けていることが示唆された。しかし、複製酵素の MTR と O-PRO 間の領域（1885-2247 番目の塩基）は強いポジティブ選択を受け、複製酵素の MTR と O-PRO 間の領域（2425-2535 番目の塩基）及び HEL 領域の N 末端（3541-3615 番目の塩基）はニュートラルな選択を受けていることがわかった。

7. PVS-H00 と PVS-H95 のアミノ酸配列を比較すると、計 91 アミノ酸相違の分布は均一ではなく、約 90%のアミノ酸相違は複製酵素に存在している。更に複製酵素の中でも、MTR 領域に 1 ヶ所、O-PRO と P-PRO 領域に各 2 ヶ所、P-PRO と HEL 間に 2 ヶ所、HEL 領域に 12 ヶ所、HEL と POL 間に 3 ヶ所存在した他、71.3%（57/80）のアミノ酸相違が MTR と O-PRO 間の領域に集中して分布している。なお、POL 領域の配列は完全に一致した。

8. 感染性を持つ pPVS-H-FL-β 転写 RNA と感染性を持たない pPVS-H-FL-D 転写 RNA を *N. occidentalis* に共接種した場合、子孫配列には pPVS-H-FL-β 由来と同じ配列のみが検出された。このことから、pPVS-H-FL-β からの転写 RNA は pPVS-H-FL-D からの転写 RNA の複製機能を補完することができず、PVS の複製は *in cis* で行われていることが考えられた。

9. pPVS-H-FL-H の ORF1 領域を pPVS-H-FL-β の ORF1 領域と入れ換えて構築した組み換え体 pPVS-H-FL-β H から転写した RNA には感染性が認められたが、pPVS-H-FL-β の ORF1 領域を pPVS-H-FL-H の ORF1 領域と入れ換えた組み換え体 pPVS-H-FL-H β から転写した RNA には感染性が認められなかった。これらのことから、感染性に影響している

のは ORF2 より下流にコードされるタンパク質に存在する 11 アミノ酸相違ではなく、ORF1 の複製酵素に存在する 80 アミノ酸相違であることが明らかとなった。

10. pPVS-H-FL- $\beta$ H クローン番号 13 から転写した RNA には感染性があつたが、クローン番号 3 から転写した RNA には感染性がなかつた。pPVS-H-FL- $\beta$ H クローン番号 3 にクローン番号 13 の長い polyA 配列 (67 個) を入れ換えて構築した pPVS-H-FL- $\beta$ H313 からの転写 RNA に感染性が無く、逆に pPVS-H-FL- $\beta$ H クローン番号 13 にクローン番号 3 の短い polyA 配列 (35 個) を入れ換えて構築した pPVS-H-FL- $\beta$ H133 からの転写 RNA が感染性を示した。このことから、PVS の転写 RNA の感染性には 35 個の polyA 配列で十分で、pPVS-H-FL- $\beta$ H クローン番号 3 では、PCR によって構築する過程で感染性に影響を与える変異配列が持ち込まれたと結論した。

11. アンデス系統の PVS-Na1 株を鋳型とし、2 つの部分長 cDNA クローンを繋ぐことによって全長 cDNA クローン pPVS-Na1-FL-A を構築した。3'末端は 3'RACE 産物由来で polyA 配列は 27 個であつた。そこから転写してキャップを付加した RNA を *N. occidentalis* に接種したが、感染性は認められなかつた。

12. PVS-M の未解析配列約 5.5 Kb、SoPLV K-1 の未解析配列約 6.9 Kb をダイレクトシーケンシングにより決定した。両者の全ゲノム塩基数はともにポリ A 鎖を除いて計 8486 塩基である。

13. PVS-H95 を基準とした SimPlot による株間のゲノム相同性解析の結果から、全ゲノム配列決定済みの日本の 5 株の分子性状は大きく 2 つのグループに分かれ、M 株は H95 株、H00 株ともに PVS 普通系統、SoPLV K-1 は別種ウイルスではなく、Na1 株同様 PVS のアンデス系統であることが示唆された。

14. PVS-M と PVS-H95 に計 363 塩基相違 (4.3%) と計 85 アミノ酸相違 (3.1%)、PVS-M と PVS-H00 に計 99 塩基相違 (1.2%) と計 34 アミノ酸相違 (1.2%) が見られた。一方、SoPLV K-1 と PVS-Na1 に計 77 塩基相違 (0.9%) と計 26 アミノ酸相違 (0.9%) が見られた。

15. PVS-M と PVS-H95 と PVS-H00、SoPLV K-1 と PVS-Na1 のアミノ酸相違の分布を調べた結果、アミノ酸相違は ORF1 がコードする複製酵素に最も多く見られ、MTR と O-PRO 間の領域に集中的に分布したが、POL 領域では全く見られなかった。また、日本の PVS 普通系統 3 株、アンデス系統 2 株間のアミノ酸相違の多くは性質が近いものであることが明らかになった。

16. 日本における PVS の 5 株を用いた非同義置換・同義置換分析 (Ka/Ks 分析) 結果から、いずれの株間においても PVS 複製酵素は強いネガティブ選択を受けているが、MTR と O-PRO 間の多様性領域は強いポジティブ選択またはニュートラルな選択を受けていることが明らかになった。

17. 日本の 5 分離株と世界各国の 24 分離株の計 29 株で全ゲノム配列、全アミノ酸配列、複製酵素または外被タンパク質のアミノ酸配列にもとづいて系統解析を行った結果から、PVS-M は PVS-H96、PVS-H00 とともに普通系統に属し、SoPLV K-1 は PVS-Na1 とともに PVS アンデス系統に属することが改めて示された。

18. 日本の 5 株に世界各国の 24 株を加えた計 29 分離株の相同性解析した結果から、PVS の複製酵素 MTR と O-PRO 間の多様性領域及び外被タンパク質の N 末端での相同性が低いことが明らかになった。

19. 組み換え体の Vltava 株を除いた計 28 株の全ゲノム配列を用い、各 2 株間の全塩基配列の同一性を計算した結果、普通系統 20 株内の株間の塩基配列同一性は 91.8%-99.8% で、アンデス系統 6 株内の株間の塩基配列同一性は 95.2%-99.1%、P 系統の 2 株の塩基配列同一性は 95.4% であった。一方、普通系統株、アンデス系統株、P 系統株の系統間の同一性はいずれも 80% 以下であった。

## 謝辞

本研究を行うにあたり、ご指導ご鞭撻を頂いた北海道大学農学研究院基盤研究部門生物資源科学分野植物病原学研究室の畑谷達児講師に心より感謝の意を表します。また、本論文を御校閲・御助言下さいました植物病原学研究室の増田税教授、北海道大学農学研究院基盤研究部門応用生命科学分野植物育種研究室の貴島祐治教授に厚く御礼申し上げます。研究において適切な御助言を賜りました、植物病原学研究室の中原健二講師に大変感謝しております。本論文の文章について助言を頂いた上田健太氏、高橋香帆氏に感謝申し上げます。さらに、学生生活の様々な場面で助けてくださった本研究室の皆様、ならびに農学総合研究棟3階学生部屋の皆様に感謝しております。留学生活で御世話になった北海道大学農学研究院連携研究部門連携推進分野の王秀峰准教授に厚く感謝申し上げます。最後に留学を認め、応援し、生活を支えて下さった両親に心から感謝しております。

## 引用文献

- Acosta-Leal R., Fawley M. W., Rush C. M. (2008). Changes in the intrasolate genetic structure of *Beet necrotic yellow vein virus* populations associated with plant resistance breakdown. *Virology* 376, 60-68.
- Adams M. J. (2005). Family *flexiviridae*. In *Virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses*. ed. Fauquet C.M., Mayo M.A., Maniloff J., Desselberger U., Ball L.A.. Eighth report of the international committee on taxonomy of viruses, pp. 1089-1124. Amsterdam: Elsevier/Academic.
- Angell S. M., Davies C., Baulcombe D. C. (1996). Cell-to-cell movement of potato virus X is associated with a change in the size-exclusion limit of plasmodesmata in trichome cells of *Nicotiana clevelandii*. *Virology* 216, 197-201.
- Aravind L., Koonin E. V. (2001). The DNA-repair protein AlkB, EGL-9, and leprecan define new families of 2-oxoglutarate- and iron-dependent dioxygenases. *Genome Biology* 2, research0007-1.
- Arias A., Lázaro E., Escarmís C., Domingo E. (2001). Molecular intermediates of fitness gain of an RNA virus: characterization of a mutant spectrum by biological and molecular cloning. *Journal of General Virology* 82, 1049-1060.
- Aritua V., Barg E., Adipala E., Vetten H. J. (2009). The complete sequence of the RNA genome of Sweet Potato Chlorotic Fleck Virus. In *Infection Genetics and Evolution* 9, 377-377.
- 秋元喜宏・松沢運夫・栗原実 (1958). 馬鈴薯 S ウイルスについて 日本植物病理学会報 23,42 (講演要旨)
- Bagnall R. H., Larson R. H. (1957). Potato virus S. *Phytopathology* 47, 2-3.
- Bagnall R. H., Wetter C., Larson R. H. (1959). Differential host and serological relationships of Potato virus M, Potato virus S, and Carnation latent virus. *Phytopathology* 49, 435-442.
- Bamunusinghe D., Hemenway C. L., Nelson R. S., Sanderfoot A. A., Chang M. Y., Silva M. A., Payton M., Verchot-Lubicz J. (2009). Analysis of potato virus X replicase and TGBp3 subcellular locations. *Virology* 393, 272-285.
- Batten J. S., Yoshinari S., Hemenway C. (2003). *Potato virus X*: a model system for virus replication, movement and gene expression. *Molecular Plant Pathology* 4, 125-131.
- Bayne E. H., Rakitina D. V., Morozov S. Y., Baulcombe D. C. (2005). Cell-to-cell movement of *Potato Potexvirus X* is dependent on suppression of RNA silencing. *The Plant Journal* 44, 471-482.
- Blouin A. G., Ross H. A., Hobson-Peters J., O'Brien C. A., Warren B., MacDiarmid R. (2016). A new virus discovered by immunocapture of double-stranded RNA, a rapid method for virus enrichment in metagenomic studies. *Molecular Ecology Resources* 16, 1255-1263.

- Bode O., Weidemann H. L. (1971). Investigations on aphid transmission of potato viruses M and S. *Potato Research* 14, 119-129.
- Bratlie M. S., Drabløs F. (2005). Bioinformatic mapping of AlkB homology domains in viruses. *BMC Genomics* 6, 1-15.
- Bratley C., Badge J. L., Burns R., Foster G. D., George E., Goodfellow H. A., Mulholland V., McDonald J. G., Jeffries C. J. (2002). Potato latent virus: a proposed new species in the genus *Carlavirus*. *Plant Pathology* 51, 495-505.
- Brunt A. A., Crabtree K., Dallwitz M. J., Gibbs A. J., Watson, L. (1996). *Viruses of Plants. Descriptions and Lists from the VIDE Database*. Wallingford, UK: CAB International. pp. 1484.
- Callaway A., Giesman-Cookmeyer D., Gillock E. T., Sit T. L., Lommel S. A. (2001). The multifunctional capsid proteins of plant RNA viruses. *Annual Review of Phytopathology* 39, 419-460.
- Carvalho S. L., Nagata T., Junqueira B. R., Zanardo L. G., Paiva A. C., Carvalho C. M. (2017). Construction of a full-length infectious cDNA clone of *Cowpea mild mottle virus*. *Virus Genes* 53, 137-140.
- Cavileer T. D., Halpern B. T. Lawrence D. M., Podleckis E. V., Martin R. R., Hillman B. I. (1994). Nucleotide sequence of the carlavirus associated with blueberry scorch and similar diseases. *Journal of General Virology* 75, 711-720.
- Chapman S., Kavanagh T., Baulcombe D. (1992). Potato virus X as a vector for gene expression in plants. *The Plant Journal* 2, 549-557.
- Chen S. C., Tai C. M., Wang H. L. (2012). Characterization of *Hippeastrum latent virus*, HiLV. *Plant Pathology Bulletin* 21, 259-268.
- Cheng J. H., Peng C. W., Hsu Y. H., Tsai, C. H. (2002). The synthesis of minus-strand RNA of bamboo mosaic potexvirus initiates from multiple sites within the poly(A) tail. *Journal of Virology* 76, 6114-6120.
- Chiu M. H., Chen I., Baulcombe D. C., Tsai C. H. (2010). The silencing suppressor P25 of *Potato virus X* interacts with Argonaute1 and mediates its degradation through the proteasome pathway. *Molecular Plant Pathology* 11, 641-649.
- Choi S. A., Ryu K. H. (2003). The complete nucleotide sequence of the genome RNA of *Lily symptomless virus* and its comparison with that of other carlaviruses. *Archives of Virology* 148, 1943-1955.
- Costa T. M., Blawid R., da Costa Junior A. C., Lima M. F., de Aragão F. A., de Andrade G. P., Pio-Ribeiro G., Aranda M. A., Inoue-Nagata A. K., Nagata T. (2017). Complete genome sequence of melon yellowing-associated virus from melon plants with the severe yellowing disease in Brazil. *Archives of Virology* 162, 3899-3901.

- Cox B. A., Jones R. A. (2010). Genetic variability in the coat protein gene of *Potato virus S* isolates and distinguishing its biologically distinct strains. *Archives of Virology* 155, 1163-1169.
- De Bokx J. A. (1970). Reactions of various plant species to inoculation with potato virus S. *Netherlands Journal of Plant Pathology* 76, 70-78.
- De Bokx J. A. (1972). Spread of potato virus S. *Potato Research* 15, 67-70.
- De Bruyn O. (1952). A new potato virus. In *Proceedings of the Conference on Potato Virus Diseases*, Wageningen-Lisse. pp. 83-84.
- De Souza J., Fuentes S., Savenkov E. I., Cuellar W., Kreuze, J. F. (2013). The complete nucleotide sequence of sweet potato C6 virus: a carlavirus lacking a cysteine-rich protein. *Archives of Virology* 158, 1393-1396.
- Deng X. G., Peng X. J., Zhu F., Chen Y. J., Zhu T., Qin S. B., Xi D. H., Lin H. H. (2015). A critical domain of *Sweet potato chlorotic fleck virus* nucleotide-binding protein (NaBp) for RNA silencing suppression, nuclear localization and viral pathogenesis. *Molecular Plant Pathology* 16, 365-375.
- Dinesen M., Lundmark M., Albrechtsen M. (2009). Complete genome sequences of two isolates of *Kalanchoë latent virus*. *Archives of Virology* 154, 1173-1175.
- Dolby C. A., Jones R. A. C. (1987). Occurrence of the Andean strain of potato virus S in imported potato material and its effects on potato cultivars. *Plant Pathology* 36, 381-388.
- Domingo E., Martin V., Perales C., Grande-Perez A., Garcia-Arriaza J., Arias A. (2006). Viruses as quasispecies: biological implications. In *Quasispecies: Concept and Implications for Virology*. ed. Domingo E. pp. 51-82. Springer, Berlin, Heidelberg: Springer-Verlag.
- Donald R. G., Jackson A. O. (1994). The barley stripe mosaic virus gamma b gene encodes a multifunctional cysteine-rich protein that affects pathogenesis. *The Plant Cell* 6, 1593-1606.
- Donald R. G., Jackson A. O. (1996). RNA-binding activities of barley stripe mosaic virus  $\gamma$ b fusion proteins. *Journal of General Virology* 77, 879-888.
- Duarte P. D. S. G., Galvino-Costa S. B. F., de Paula Ribeiro S. R. R., dos Reis Figueira A. (2012). Complete genome sequence of the first Andean strain of Potato virus S from Brazil and evidence of recombination between PVS strains. *Archives of Virology* 157, 1357-1364.
- Eastwell K. C., Druffel K. L. (2012). Complete genome organization of American hop latent virus and its relationship to carlaviruses. *Archives of Virology* 157, 1403-1406.
- Eastwell K. C., Du Toit L. J., Druffel K. L. (2009). *Helleborus* net necrosis virus: a new *Carlavirus* associated with 'black death' of *Helleborus* spp. *Plant Disease* 93, 332-338.
- Feng D. F., Johnson M. S., Doolittle R. F. (1985). Aligning amino acid sequences: comparison of commonly used methods. *Journal of Molecular Evolution* 21, 112-125.
- Flatken S., Ungewickell V., Menzel W., Maiss E. (2008). Construction of an infectious full-length cDNA clone of potato virus M. *Archives of Virology* 153, 1385-1389.

- Foster G. D. (1992). The structure and expression of the genome of carlaviruses. *Research in Virology* 143, 103-112.
- Foster G. D., Mills P. R. (1990a). Investigation of the 5' terminal structures of genomic and subgenomic RNAs of potato virus S. *Virus Genes* 4, 359-366.
- Foster G. D., Mills P. R. (1990b). Evidence for the role of subgenomic RNAs in the production of potato virus S coat protein during *in vitro* translation. *Journal of General Virology* 71, 1247-1249.
- Foster G. D., Mills P. R. (1990c). Evidence for the role of subgenomic RNA species in the production of Helenium virus S coat protein during *in vitro* translation. *Virus Research* 17, 61-69.
- Foster G. D., Mills P. R. (1990d). Investigation of the 5' terminal structures of genomic and subgenomic RNAs of potato virus S. *Virus Genes* 4, 359-366.
- Foster G. D., Mills P. R. (1991a). Evidence for subgenomic RNAs in leaves infected with an Andean strain of potato virus S. *Acta Virologica* 35, 260-267.
- Foster G. D., Mills P. R. (1991b). Occurrence of chloroplast ribosome recognition sites within conserved elements of the RNA genomes of carlaviruses. *FEBS Letters* 280, 341-343.
- Foster G.D., Mills P.R. (1992). The 3'-nucleotide sequence of an ordinary strain of potato virus S. *Virus Genes* 6, 213-220.
- Forster R. L., Beck, D. L., Guilford, P. J., Voot, D. M., Van Dolleweerd, C. J., & Andersen, M. T. (1992). The coat protein of white clover mosaic potexvirus has a role in facilitating cell-to-cell transport in plants. *Virology* 191, 480-484.
- Fuji S., Yamamoto H., Inoue M., Yamashita K., Fukui Y., Furuya H., Naito H. (2002). Complete nucleotide sequence of the genomic RNA of Aconitum latent virus (genus Carlavirus) isolated from *Delphinium* sp. *Archives of Virology* 147, 865-870.
- Gorbalenya A. E., Koonin E. V. (1993). Helicases: amino acid sequence comparisons and structure-function relationships. *Current Opinion in Structural Biology* 3, 419-429.
- Gramstat A., Courtpozanis A., Rohde W. (1990). The 12 kDa protein of potato virus M displays properties of a nucleic acid-binding regulatory protein. *FEBS Letters* 276, 34-38.
- Gramstat A., Prüfer D., Rohde W. (1994). The nucleic acid-binding zinc finger protein of potato virus M is translated by internal initiation as well as by ribosomal frameshifting involving a shifty stop codon and a novel mechanism of P-site slippage. *Nucleic Acids Research* 22, 3911-3917.
- Gutiérrez P., Alzate J.F., Marin-Montoya M.A. (2013). Complete genome sequence of a novel potato virus S strain infecting *Solanum phureja* in Colombia. *Archives of Virology* 159, 2205-2208.
- Hammond J., Reinsel M. (2011). Mixed infections and novel viruses in various species of phlox. DOI: 10.17660/ActaHortic.2011.901.15.

- Hashimoto M., Komatsu K., Maejima K., Yamaji Y., Okano Y., Shiraishi T., Takahashi S., Kagiwada S., Namba S. (2009). Complete nucleotide sequence and genome organization of butterbur mosaic virus. *Archives of Virology* 154, 1955-1958.
- Hasi ów-Jaroszewska B., Jackowiak P., Borodynko N., Figlerowicz M., Pospieszny H. (2010). Quasispecies nature of *Pepino mosaic virus* and its evolutionary dynamics. *Virus Genes* 41, 260-267.
- Hataya T., Arimoto R., Suda N., Uyeda I. (2001). Molecular characterization of *Hop mosaic virus*: its serological and molecular relationships to *Hop latent virus*. *Archives of Virology* 146, 1935-1948.
- Hataya, T., Uchino, K., Arimoto, R., Suda, N., Sano, T., Shikata, E., Uyeda, I. (2000). Molecular characterization of *Hop latent virus* and phylogenetic relationships among viruses closely related to carlaviruses. *Archives of Virology* 145, 2503-2524.
- Hatlestad G. J., Elam L., Gonzalez A., Lloyd A. M. (2011). *Mirabilis jalapa* mottle virus: a new carlavirus infecting four o'clocks. *Archives of Virology* 156, 2109.
- 畑谷達児・上田浩司・今井杏子・八木橋悠・久保真一・佐藤仁敏・大島一里・上田一郎 (2003). ジャガイモ S ウイルスのアンデス系統と普通系統の分子性状比較と分子識別 日本植物病理学会報 69,76 (講演要旨)
- Hillman B. I., Lawrence D. M. (1995). Carlaviruses. In *Pathogenesis and host specificity in plant diseases*. ed. Singh R. P., Singh U. S., Kohmoto K. histopathological, biochemical, genetic and molecular bases. Vol III: Viruses & viroids. Pergamon, London, pp. 35-50.
- Hinostroza-Orihuela A. M. (1973). Some properties of potato virus S isolated from Peruvian potato varieties. *Potato Research* 16, 244-250.
- Hiruki C. (1975). Factors affecting bioassay of potato virus S in *Chenopodium quinoa*. *Phytopathology* 65, 1288-1292.
- Hiruki C., Shukla P. (1973). Intracellular location of potato virus S in leaf tissue of *Chenopodium quinoa*. *Canadian Journal of Botany* 51, 1699-1702.
- 堀尾英弘 (1976). ジャガイモ M ウイルス病および S ウイルス病に関する研究 馬鈴薯原原種農場調査研究報告 第 12 号
- 堀尾英弘・田中智 (1977). ジャガイモ M ウイルスおよび S ウイルスのアブラムシ伝染について 日本植物病理学会報 43,124 (講演要旨)
- Huang L., Li Z., Wu J., Xu Y., Yang X., Fan L., Fang R., Zhou X. (2015). Analysis of genetic variation and diversity of Rice stripe virus populations through high-throughput sequencing. *Frontiers in Plant Science* 6, 176.
- Huang Y. L., Han Y. T., Chang Y. T., Hsu Y. H., Meng M. (2004). Critical residues for GTP methylation and formation of the covalent m7GMP-enzyme intermediate in the capping enzyme domain of *bamboo mosaic virus*. *Journal of Virology* 78, 1271-1280.

- 古田和義 (1997). ジャガイモ S ウイルスの性状解析 平成8年度 北海道大学大学院農学研究科農業生物専攻 修士論文
- 古田和義・畑谷達児・上田一郎・佐藤仁敏・堀尾英弘 (1996). ジャガイモ S ウイルスゲノムの3'末端領域の塩基配列 日本植物病理学会報 62,646 (講演要旨)
- Igori D., Lim S., Zhao F., Baek D., Park J. M., Cho H. S., Kim H. S., Kwon S., Moon J. S. (2016). The complete sequence and genome organization of ligustrum virus A, a novel carlavirus. Archives of Virology 161, 3593-3596.
- 今井杏子 (2002). ジャガイモ S ウイルス 11 分離ゲノム ORF 6 解析及び ORF 6 形質転換植物作成のための遺伝子構築と *N. occidentalis* の組織培養 平成 13 年度 北海道大学農学部生物資源科学科 卒業論文
- 今井杏子 (2004). ジャガイモ S ウイルス二系統の生物学的性状解析と分子識別法の開発 平成 15 年度 北海道大学農学院農学研究科応用生命科学専攻 修士論文
- Jakab G., Droz E., Brigneti G., Baulcombe D., Malno ě P. (1997). Infectious *in vivo* and *in vitro* transcripts from a full-length cDNA clone of PVY-N605, a Swiss necrotic isolate of potato virus Y. Journal of General Virology 78, 3141-3145.
- Jones R. A. C. (1981) The ecology of viruses infecting wild and cultivated potatoes in the Andean regions of South America. In Pests, Pathogens and Vegetation. ed. Thresh J. M. pp. 89-107. Pitman, London.
- Ju H. J., Samuels T. D., Wang Y. S., Blancaflor E., Payton M., Mitra R., Krishnamurthy K., Nelson R.S., Verchot-Lubicz J. (2005). The potato virus X TGBp2 movement protein associates with endoplasmic reticulum-derived vesicles during virus infection. Plant Physiology 138, 1877-1895.
- Kadar ě G., Haenni A. L. (1997). Virus-encoded RNA helicases. Journal of Virology 71, 2583.
- Kalinina N. O., Rakitina D. V., Solovyev A. G., Schiemann J., Morozov S. Y. (2002). RNA helicase activity of the plant virus movement proteins encoded by the first gene of the triple gene block. Virology 296, 321-329.
- Karpova O., Kryldakov R., Aleksandrova A., Nargilova R., Iskakov, B. (2015). Capsid protein of potato virus S can suppress systemic RNA-silencing. Journal of Biotechnology 208, S113-S114.
- 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.
- Koenig R. (1982). Carlavirus group. CMI/AAB Descriptions of plant viruses No. 259. Commonw. Mycol. Inst., Assoc. Appl. Biol., Kew, Surrey, England.
- Koh S. H., Li H., Sivasithamparam K., Admiraal R., Jones M. G., Wylie S. J. (2017). Evolution of a wild-plant tobamovirus passaged through an exotic host: Fixation of mutations and increased replication. Virus Evolution 3, vex001.

- Kong P., Rubio L., Polek M., Falk B. W. (2000). Population structure and genetic diversity within California Citrus tristeza virus (CTV) isolates. *Virus Genes* 21, 139-145.
- Koonin E. V., Dolja V. V., Morris T. J. (1993). Evolution and taxonomy of positive-strand RNA viruses: implications of comparative analysis of amino acid sequences. *Critical Reviews in Biochemistry and Molecular Biology* 28, 375-430.
- Kowalska A., Waś M. (1976). Detection of potato virus M and potato virus S on test plants. *Potato Research* 19, 131-139.
- 小林敏郎・木村伸司・西尾建・元島俊治・松濤美文 (1985). ジャガイモから分離された Carlavirus 植物防疫所調査研究報告 21,41-46
- Kraus J., Tzanetakis I. E., Putnam M. L., Martin, R. R. (2008). Complete nucleotide sequence of an isolate of coleus vein necrosis virus from verbena. *Archives of Virology* 153, 381-384.
- 久保真一 (2001). ジャガイモ S ウイルス系統間の生物的性状および分子性状の比較 平成 12 年度 北海道大学農学部生物資源科学科 卒業論文
- Lambert S. J., Scott J. B., Pethybridge S. J., Hay F. S. (2012). Strain characterization of *Potato virus S* isolates from Tasmania, Australia. *Plant Disease* 96, 813-819.
- Larsen R. C., Wyatt S. D., Druffel K. L. (2009). The complete nucleotide sequence and genome organization of red clover vein mosaic virus (genus *Carlavirus*). *Archives of Virology* 154, 891-894.
- Lawrence D.M., Hillman B.I. (1994). Synthesis of infectious transcripts of blueberry scorch carlavirus *in vitro*. *Journal of General Virology* 75, 2509-2512.
- Lawrence D. M., Rozanov M. N., Hillman B. I. (1995). Autocatalytic processing of the 223-kDa protein of blueberry scorch carlavirus by a papain-like proteinase. *Virology* 207, 127-135.
- Lee B. Y., Min B. E., Ha J. H., Lee M. Y., Paek K. H., Ryu, K. H. (2006). Genome structure and complete sequence of genomic RNA of Daphne virus S. *Archives of Virology* 151, 193-200.
- Lesemann D. E. (1988). Cytopathology. In *The plant viruses*. ed. Milne R. G. The Filamentous Plant Viruses. pp. 179-235. New York: Plenum.
- Li W. H. (1993). Unbiased estimation of the rates of synonymous and nonsynonymous substitution. *Journal of Molecular Evolution* 36, 96-99.
- Li Y. I., Shih T. W., Hsu Y. H., Han Y. T., Huang Y. L., Meng M. (2001). The helicase-like domain of plant potyvirus replicase participates in formation of RNA 5' cap structure by exhibiting RNA 5'-triphosphatase activity. *Journal of Virology* 75, 12114-12120.
- Li Y. Y., Zhang R. N., Xiang H. Y., Abouelnasr H., Li D. W., Yu J. L., McBeath J. H., Han C. G. (2013). Discovery and characterization of a novel carlavirus infecting potatoes in China. *PLoS ONE* 8, e69255.

- Lim H. S., Vaira A. M., Bae H., Bragg J. N., Ruzin S. E., Bauchan G. R., Dienel M.M., Owens R.A., Hammond J. (2010). Mutation of a chloroplast-targeting signal in *Alternanthera* mosaic virus TGB3 impairs cell-to-cell movement and eliminates long-distance virus movement. *Journal of General Virology* 91, 2102-2115.
- Lim S. M., Thompson N. R., Hooker W. J. (1966). The effect of latent virus mosaic diseases on the growth, yield and quality of Sebago potatoes. *American Journal of Potato Research* 43, 344-345.
- Lin Y.H., Druffel K.L., Whitworth J., Pavek M.J., Pappu H.R. (2009). Molecular characterization of two potato virus S isolates from late-blight-resistant genotypes of potato (*Solanum tuberosum*). *Archives of Virology* 154, 1861-1863.
- Lin Y. H., Abad J. A., Maroon-Lango C. J., Perry K. L., Pappu H. R. (2014). Molecular characterization of domestic and exotic potato virus S isolates and a global analysis of genomic sequences. *Archives of Virology* 159, 2115-2122.
- Liu H., Reavy B., Swanson M., MacFarlane S. A. (2002). Functional replacement of the tobacco rattle virus cysteine-rich protein by pathogenicity proteins from unrelated plant viruses. *Virology* 298, 232-239.
- 李華 (2014). ジャガイモ S ウイルスゲノムの全長 cDNA クローンからの転写産物の感染性に影響を及ぼす配列の同定 平成 25 年度 北海道大学農学院生物資源科学専攻 修士論文
- Lough T. J., Shash K., Xoconostle-Cázares B., Hofstra K. R., Beck D. L., Balmori E., Forster R. L., Lucas W. J. (1998). Molecular dissection of the mechanism by which potexvirus triple gene block proteins mediate cell-to-cell transport of infectious RNA. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 11, 801-814.
- Lough T. J., Netzler N. E., Emerson S. J., Sutherland P., Carr F., Beck D. L., Lucas W. J., Forster R. L. (2000). Cell-to-cell movement of potexviruses: evidence for a ribonucleoprotein complex involving the coat protein and first triple gene block protein. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 13, 962-974.
- Lozano G., Grande-Pérez A., Navas-Castillo J. (2009). Populations of genomic RNAs devoted to the replication or spread of a bipartite plant virus differ in genetic structure. *Journal of Virology* 83, 12973-12983.
- Lukhovitskaya N. I., Solovyev A. G., Koshkina T. E., Zavriev S. K., Morozov S. Y. (2005). Interaction of the Carlavirus cysteine-rich protein with the plant defense system. *Molecular Biology* 39, 785-791.
- Mackenzie D. J., Tremaine J. H., Stace-Smith R. (1989). Organization and interviral homologies of the 3'-terminal portion of potato virus S RNA. *Journal of General Virology* 70, 1053-1063.

- MacKinnon J. P., Bagnall R. H. (1972). Use of *Nicotiana debneyi* to detect viruses S, X and Y in potato seed stocks and relative susceptibility of six common varieties to potato virus S. *Potato Research* 15, 81-85.
- Makarova K. S., Aravind L., Koonin E. V. (2000). A novel superfamily of predicted cysteine proteases from eukaryotes, viruses and *Chlamydia pneumoniae*. *Trends in Biochemical Sciences* 25, 50-52.
- Manzer F. E., Merriam D. C., Hepler P. R. (1978). Effects of potato virus S and two strains of potato virus X on yields of Russet Burbank, Kennebec, and Katahdin cultivars in Maine. *American Potato Journal* 55, 601-609.
- Maoka T., Nakayama T., Taniguchi M., Kano Y., Suzuki A., Sato M., Hataya T., Koizumi E., Noguchi K. (2013). Multivirus detection from Japanese landraces of potato by reverse transcription–polymerase chain reaction–microplate hybridization. *Potato Research* 56, 147-156.
- Martelli G. P., Adams M. J., Kreuze J. F., Dolja V. V. (2007). Family *Flexiviridae*: a case study in virion and genome plasticity. *Annual Review of Phytopathology* 45, 73–100.
- Massa G. A., Segretin M. E., Colavita M., Riero M. F., Bravo-Almonacid F., Feingold, S. (2006). Biological and sequence data suggest that potato rough dwarf virus (PRDV) and potato virus P (PVP) are strains of the same species. *Archives of Virology* 151, 1243-1247.
- Matoušek J., Schubert J., Dědič P., Ptáček J. (2000). A broad variability of potato virus S (PVS) revealed by analysis of virus sequences amplified by reverse transcriptase - polymerase chain reaction. *Canadian Journal of Plant Pathology* 22, 29-37.
- Matoušek J., Schubert J., Ptáček J., Kozlová P., Dědič P. (2005). Complete nucleotide sequence and molecular probing of potato virus S genome. *Archives of Virology* 49, 195-205.
- McGeachy K. D., Barker H. (2000). *Potato mop-top virus* RNA can move long distance in the absence of coat protein: evidence from resistant, transgenic plants. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 13, 125-128.
- Menzel W., Winter S., Vetten H. J. (2010). Complete nucleotide sequence of the type isolate of *Cowpea mild mottle virus* from Ghana. *Archives of Virology* 155, 2069-2073.
- Menzel W., Hamacher J., Winter S. (2012). Characterization of a new *Carlavirus* from *Gaillardia aristata*. DOI: 10.17660/ActaHortic.2015.1072.15.
- Milne R. G. (1984). Electron microscopy for the identification of plant viruses in *in vitro* preparations. *Methods in Virology* 7, 87-120.
- Monis J., De Zoeten G. A. (1990). Molecular cloning and physical mapping of potato virus S complementary DNA. *Phytopathology* 80, 446-450.
- Morozov S. Y., Lukasheva L. I., Chernov B. K., Skryabin K. G., Atabekov J. G. (1987). Nucleotide sequence of the open reading frames adjacent to the coat protein cistron in potato virus X genome. *FEBS Letters* 213, 438-442.

- Morozov S. Y., Dolja V. V., Atabekov J. G. (1989). Probable reassortment of genomic elements among elongated RNA-containing plant viruses. *Journal of Molecular Evolution* 29, 52-62.
- Morozov S. Y., Miroshnichenko N. A., Solovyev A. G., Zelenina D. A., Fedorkin O. N., Lukasheva L. I., Grachev, S. A., Chernov B. K. (1991). *In vitro* membrane binding of the translation products of the carlavirus 7-kDa protein genes. *Virology* 183, 782-785.
- Morozov S. Y., Solovyev A. G., Kalinina N. O., Fedorkin O. N., Samuilova O. V., Schiemann J., Atabekov J. G. (1999). Evidence for two nonoverlapping functional domains in the potato virus X 25K movement protein. *Virology* 260, 55-63.
- Morozov S. Y., Solovyev A. G. (2003). Triple gene block: modular design of a multifunctional machine for plant virus movement. *Journal of General Virology* 84, 1351-1366.
- 眞岡哲夫 (2017) . ジャガイモのウイルス病 日本植物病理学会北海道部会年報 45,12-19
- Nagyová A., Subr Z. (2007). Infectious full-length clones of plant viruses and their use for construction of viral vectors. *Acta Virologica* 51, 223-237.
- Naylor M., Reeves J., Cooper J. I., Edwards M. L., Wang H. (2005). Construction and properties of a gene-silencing vector based on Poplar mosaic virus (genus *Carlavirus*). *Journal of Virological Methods* 124, 27-36.
- Nemchinov L. G. (2017). Development and characterization of the first infectious clone of alfalfa latent virus, a strain of *Pea streak virus*. *European Journal of Plant Pathology* 149, 1019-1022.
- Nie X. (2009). The complete nucleotide sequence and genome structure of potato latent virus. *Archives of Virology* 154, 361-364.
- Nyalugwe E. P., Wilson C. R., Coutts B. A., Jones R. A. (2012). Biological properties of *Potato virus X* in potato: effects of mixed infection with *Potato virus S* and resistance phenotypes in cultivars from three continents. *Plant Disease* 96, 43-54.
- 中野剛・徐正君・上田健治・松本勤・井上正保 (1997). ジャガイモ S ウイルス k-1 株(PVS K-1)のゲノム全塩基配列 日本植物病理学会報 63,487 (講演要旨)
- Ohkawa A., Yamada M., Sayama H., Sugiyama N., Okuda S., Natsuaki T. (2007). Complete nucleotide sequence of a Japanese isolate of *Chrysanthemum virus B* (genus *Carlavirus*). *Archives of Virology* 152, 2253-2258.
- Ohkawa A., Ishikawa-Suehiro N., Okuda S., Natsuaki T. (2008). Construction of an infectious full-length cDNA clone of *Chrysanthemum virus B*. *Journal of General Plant Pathology* 74, 434-437.
- Ohshima K., Akaishi S., Kajiyama H., Koga R., Gibbs A. J. (2010). Evolutionary trajectory of turnip mosaic virus populations adapting to a new host. *Journal of General Virology* 91, 788-801.
- Pamilo P., Bianchi N. O. (1993). Evolution of the *Zfx* and *Zfy* genes: rates and interdependence between the genes. *Molecular Biology and Evolution* 10, 271-281.

- Pájtli É. (2015). Whole genome molecular analysis of *Potato virus S* (PVS) isolates. Doctoral dissertation, Ph. D. thesis, Corvinus University of Budapest, Budapest, Hungary.
- Poke F. S. (2008). Hop mosaic virus: complete nucleotide sequence and relationship to other carlaviruses. *Archives of Virology* 153, 1615-1619.
- Predajňa L., Šoltys K., Kraic J., Mihálik D., Glasa M. (2017). First report of potato virus S infecting tomato in Slovakia. *Journal of Plant Pathology* 99, 811.
- Rouleau M., Smith R. J., Bancroft J. B., Mackie G. A. (1994). Purification, properties, and subcellular localization of foxtail mosaic potexvirus 26-kDa protein. *Virology* 204, 254-265.
- Rožanov M. N., Koonin E. V., Gorbalenya, A. E. (1992). Conservation of the putative methyltransferase domain: a hallmark of the 'Sindbis-like' supergroup of positive-strand RNA viruses. *Journal of General Virology* 73, 2129-2134.
- Saitou N., Nei M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecular Biology and Evolution* 4, 406-425.
- Salari K., Massumi H., Heydarnejad J., Pour A. H., Varsani A. (2011). Analysis of Iranian *Potato virus S* isolates. *Virus Genes* 43, 281-288.
- Samuels T. D., Ju H. J., Ye C. M., Motes C. M., Blancaflor E. B., Verchot-Lubicz J. (2007). Subcellular targeting and interactions among the *Potato virus X* TGB proteins. *Virology* 367, 375-389.
- Santillan F. W., Fribourg C. E., Adams I. P., Gibbs A. J., Boonham N., Kehoe M. A., Maina S., Jones R. A. C. (2018). The biology and phylogenetics of *Potato virus S* isolates from the Andean region of South America. *Plant Disease* 102, 869-885.
- Schmitt C., Balmori E., Jonard G., Richards K. E., Guilley H. (1992). *In vitro* mutagenesis of biologically active transcripts of beet necrotic yellow vein virus RNA 2: evidence that a domain of the 75-kDa readthrough protein is important for efficient virus assembly. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 89, 5715-5719.
- Scott S. W., Zimmerman M. T. (2008). The complete sequence of ligustrum necrotic ringspot virus, a novel carlavirus. *Archives of Virology* 153, 393-396.
- Senshu H., Yamaji Y., Minato N., Shiraiishi T., Maejima K., Hashimoto M., Chihiro Miura C., Neriya Y., Namba, S. (2011). A dual strategy for the suppression of host antiviral silencing: two distinct suppressors for viral replication and viral movement encoded by potato virus M. *Journal of Virology* 85, 10269-10278.
- Sit T. L., AbouHaidar M. G. (1993). Infectious RNA transcripts derived from cloned cDNA of papaya mosaic virus: effect of mutations to the capsid and polymerase proteins. *Journal of General Virology* 74, 1133-1140.
- Slack S.A. (1983). Identification of an isolate of the Andean strain of potato virus S in North America. *Plant Disease* 67, 786-789.

- Smith C. M., Campbell, M. M. (2004). Complete nucleotide sequence of the genomic RNA of *poplar mosaic virus* (Genus *Carlavirus*). *Archives of Virology* 149, 1831-1841.
- Song S. I., Choi J. N., Song J. T., Ahn J. H., Lee J. S., Kim M., Cheong J. J., Choi Y. D. (2002). Complete genome sequence of garlic latent virus, a member of the carlavirus family. *Molecules and Cells* 14, 205-213.
- Spiegel S., Zeidan M., Sobolev I., Beckelman Y., Holdengreber V., Tam Y., Bar Joseph M., Lipsker Z., Gera A. (2007). The complete nucleotide sequence of Passiflora latent virus and its phylogenetic relationship to other carlaviruses. *Archives of Virology* 152, 181-189.
- Su L., Li Z., Bernardy M., Wiersma P. A., Cheng Z., Xiang, Y. (2015). The complete nucleotide sequence and genome organization of pea streak virus (genus *Carlavirus*). *Archives of Virology* 160, 2651-2654.
- 鈴木翔多朗 (2010). ジャガイモ M ウイルスの感染性転写産物の作製及びトマトにおけるジャガイモ S ウイルス抵抗性に関する研究 平成 21 年度 北海道大学大学院農学院生物資源専攻 修士論文
- Tang J., Harper S. J., Wei T., Clover G. R. (2010). Characterization of hydrangea chlorotic mottle virus, a new member of the genus *Carlavirus*. *Archives of Virology* 155, 7-12.
- Tilsner J., Linnik O., Wright K. M., Bell K., Roberts A. G., Lacomme C., Cruz S. S., Oparka K. J. (2012). The TGB1 movement protein of *Potato virus X* reorganizes actin and endomembranes into the X-body, a viral replication factory. *Plant Physiology* 158, 1359-1370.
- Tollin P., Wilson H. R. (1988). Particle structure. In *The plant viruses*. ed. Milne R. G. *The Filamentous Plant Viruses*. pp. 51-83. New York: Plenum.
- Tsuneyoshi T., Matsumi T., Deng T. C., Sako I., Sumi S. (1998). Differentiation of *Allium* carlaviruses isolated from different parts of the world based on the viral coat protein sequence. *Archives of Virology* 143, 1093-1107.
- Tzeng Y. H., Pan R., Li W. H. (2004). Comparison of three methods for estimating rates of synonymous and nonsynonymous nucleotide substitutions. *Molecular Biology and Evolution* 21, 2290-2298.
- 上田浩司 (2002). ジャガイモ S ウイルスの分子性状解析 平成 13 年度 北海道大学大学院農学研究科応用生命科学専攻 修士論文
- 上田浩司・畑谷達児・上田一郎 (2002). ジャガイモ S ウイルス普通系統ゲノムの全塩基配列 日本植物病理学会報 68,104 (講演要旨)
- Vallejo C., Gutiérrez S., Andrés P., Marín M. (2016). Genome characterization of a *Potato virus S* (PVS) variant from tuber sprouts of *Solanum phureja* Juz.et Buk. *Agronomía Colombiana* 34, 51-60.
- Verhot-Lubicz J., Torrance L., Solovyev A. G., Morozov S. Y., Jackson A. O., Gilmer D. (2010). Varied movement strategies employed by triple gene block-encoding viruses. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 23, 1231-1247.

Virus Taxonomy 2018 Release: EC 50, Washington, DC, July 2018. Email ratification October 2018 (MSL #33).

[https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv\\_9th\\_report/positive-sense-rna-viruses-2011/w/posrna\\_viruses/241/betaflexiviridae](https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_9th_report/positive-sense-rna-viruses-2011/w/posrna_viruses/241/betaflexiviridae)

Voignet O., Lederer C., Baulcombe D. C. (2000). A viral movement protein prevents spread of the gene silencing signal in *Nicotiana benthamiana*. *Cell* 103, 157-167.

Wang D., Zhang Y., Zhang Z., Zhu J., Yu J. (2010). KaKs\_Calculator 2.0: a toolkit incorporating gamma-series methods and sliding window strategies. *Genomics, Proteomics & Bioinformatics* 8, 77-80.

Wang J., Meng F., Chen R., Liu J., Nie X., Nie B. (2016). RT-PCR differentiation, molecular and pathological characterization of Andean and ordinary strains of *Potato virus S* in potatoes in China. *Plant Disease* 100, 1580-1585.

Wetter C. (1971). Potato virus S. CMI/AAB Description of Plant Viruses. No.60. Commonw. Mycol. Inst., Assoc. Appl. Biol., Kew, Surrey, England.

Wetter C., Milne R. G. (1981). Carlaviruses. In *Handbook of Plant Virus Infections and Comparative Diagnosis*. ed. Kurstak E. pp. 696-730. Amsterdam: Elsevier/North Holland.

Wright N. S. (1970). Combined effects of potato viruses X and S on yield of Netted Gem and White rose potatoes. *American Potato Journal* 47, 475-478.

Wung C. H., Hsu Y. H., Liou D. Y., Huang W. C., Lin N. S., Chang B. Y. (1999). Identification of the RNA-binding sites of the triple gene block protein 1 of bamboo mosaic potyvirus. *Journal of General Virology* 80, 1119-1126.

Yang Y., Ding B., Baulcombe D. C., Verchot J. (2000). Cell-to-cell movement of the 25K protein of *Potato virus X* is regulated by three other viral proteins. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 13, 599-605.

Wylie S. J., Jones M. G. (2012). Complete genome sequences of seven carlavirus and potyvirus isolates from *Narcissus* and *Hippeastrum* plants in Australia, and proposals to clarify their naming. *Archives of Virology* 157, 1471-1480.

Wylie S. J., Luo H., Li H., Jones M. G. (2012). Multiple polyadenylated RNA viruses detected in pooled cultivated and wild plant samples. *Archives of Virology* 157, 271-284.

Yang J., Zhang F., Xie L., Song X. J., Li J., Chen J. P., Zhang H. M. (2016). Functional identification of two minor capsid proteins from Chinese wheat mosaic virus using its infectious full-length cDNA clones. *Journal of General Virology* 97, 2441-2450.

八木橋悠 (2000). ジャガイモ S ウイルス 1 系統のゲノム解析 平成 11 年度 北海道大学農学部生物資源科学科 卒業論文

行本峰子・小林豊・興良清・戸倉幸三 (1960). わが国のジャガイモ品種における S ウイルスの検出 日本植物病理学会報 25, 216-217

- Zavriev S. K., Kanyuka K. V., Levay K. E. (1991). The genome organization of potato virus M RNA. *Journal of General Virology* 72, 9-14.
- Zhang Z., Li J., Yu J. (2006). Computing Ka and Ks with a consideration of unequal transitional substitutions. *BMC Evolutionary Biology* 6, 44.
- Zhao F., Igori D., Lim S., Yoo R. H., Lee S. H., Moon J. S. (2015). Nucleotide sequence and genome organization of atractylodes mottle virus, a new member of the genus *Carlavirus*. *Archives of Virology* 160, 2895-2898.
- Zheng H. Y., Chen J., Adams M. J., Chen, J. P. (2006). Complete nucleotide sequence and affinities of the genomic RNA of Narcissus common latent virus (genus *Carlavirus*). *Archives of Virology* 151, 1667-1672.
- Zheng Y., Gao S., Padmanabhan C., Li R., Galvez M., Gutierrez D., Fuentes S., Ling K. S., Kreuze J., Fei, Z. (2017). VirusDetect: An automated pipeline for efficient virus discovery using deep sequencing of small RNAs. *Virology* 500, 130-138.