

# ウメ (*Prunus mume* Sieb. et Zucc.) から分離された *Cucumber mosaic virus* は Subgroup I に属すが血清学的に区別される

栗原 潤\*・津田新哉\*\*・切田雅信\*\*\*・夏秋啓子\*\*\*\*・都丸敬一\*\*\*\*\*

(平成 17 年 5 月 23 日受付/平成 17 年 7 月 20 日受理)

**要約:** 和歌山県紀南地域のウメに発生するウメ葉縁えそ病の罹病株から *Cucumber mosaic virus* (CMV) が分離された。この分離株はウメに単独ではほとんど病徴を生じないが, *Prunus necrotic ringspot virus* 類似ウイルスとの重複感染によって葉縁えそ, 黄斑, 不稔などの病徴を示した。この分離株 (CMV-Um) は, RNA3 の塩基配列ではアミノ酸で subgroup I の分離株 (CMV-O, -Y) と 94-95% の, また subgroup II (CMV-m2) とは同様に 80% の相同性を示し subgroup I と考えられた。しかしながら血清学的には, 間接 ELISA, DAS-ELISA および寒天ゲル拡散法のいずれでも, 一部に subgroup I, II と異なる特異な抗原決定基を持つことが認められ, RNA の塩基配列と血清反応による分類が異なった。

**キーワード:** キュウリモザイクウイルス, ウメ葉縁えそ病, サブグループ I

## 緒 言

和歌山県田辺市, 南部町, 南部川村を含む紀南地域は日本有数のウメの産地として古くから知られている。この地域のウメ葉縁えそ病 (Mume leaf margin necrosis = Mume leaf edge necrosis を改名) 罹病樹 (品種南高) からキュウリモザイクウイルス (CMV) およびプルヌスネクロティックリングスポットウイルス類似の *Ilarvirus* 属の 1 ウイルス (*Prunus necrotic ringspot like virus*: PNRLV と仮称) が分離された (KURIHARA *et al.* 1996)<sup>6)</sup>。

CMV ウメ分離株 (CMV-Um) は単独では南高ウメにはほとんど病徴を示さないが, PNRLV と重複感染すると葉の脈間黄化や花器異常, 葉縁えそ, 不稔などの症状を現した<sup>10)</sup>。

この CMV-Um について, 既報のタバコなど他の宿主からの CMV 分離株と比較すると, ウイルス RNA の外被タンパク質遺伝子の塩基配列は subgroup I と相同性が高かったが, 血清学的には区別された<sup>7)</sup>。この事実, 遺伝子 RNA の塩基配列の相同性に基づく分類と血清反応に基づくものが必ずしも一致しない事例のひとつと考えられた。本報告は CMV-Um の諸性質について他の CMV 分離株との比較検討の結果である。なお, 本研究は主として東京農業大学総合研究所で実施された。筆頭著者栗原 潤の修士論文の一部である。

## 実験材料および方法

### 1) 供試ウイルス

紀南地域の 3 箇所の異なる梅園 (TO, TM および NS の各園) の罹病樹から脈間黄化などを示す葉を採取し, -80°C に凍結・保存した。この試料に, 2% ニコチンおよびジエチルジチオカルバミン酸ナトリウム添加 0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) の 2-3 倍量を加えて磨砕した。この磨砕汁を 2 重のガーゼでろ過した液を接種液として, 予めカーボランダムを散布した葉に, 接種液に浸した綿球をなすり付け接種した。接種後直ちに葉面を水洗した。接種用具はすべて冷却し, 手早く接種するようにした。

検定植物としてタバコ (*Nicotiana tabacum*, 品種 Sam-sunNN, バーレー 21), ササゲ (*Vigna sesquipedalis*, 品種黒種三尺), *Nicotiana clevelandii*, *Chenopodium quinoa*, *Physalis floridana* 等を用いた。これらの植物は, 25°C, 14 時間蛍光灯照明下のガラスチャンバー内で育て, 接種後も 3 週間以上そのまま観察を継続した。

3 箇所の梅園からのウイルス試料はこれらの植物にほぼ同様な反応を示したので, それらのうち 1 株 (TO 株) を, その後の試料とした。*P. floridana* は CMV には全身感染するが PNRLV には全身感染しないので, この植物の全身感染葉から分離されたウイルスを, ササゲの初生葉に接種して生じた局部病斑を用いて単一病斑分離を 3 回繰り返し

\* 東京農業大学大学院農学研究科農学専攻 (現 長野県野菜花き試験場佐久支場)

\*\* 独立行政法人 農業・生物系特定産業技術研究機構中央農業総合研究センター病害研究部

\*\*\* アサヒビール株式会社研究開発センター未来技術研究所

\*\*\*\* 東京農業大学国際食料情報学部国際農業開発学科

\*\*\*\*\* 東京農業大学元教授

て分離株 CMV-Um を得た。これをタバコ (SamsunNN) および *P. floridana* に接種して保存した。

比較のために、CMV-O, CMV-Y, (いずれも subgroup I, 当研究室保存)<sup>18)</sup>, および CMV-P (subgroup II, フキ分離株, 農業研究センター藤澤氏より分譲)<sup>16)</sup> のウイルス, CMV-m2 (subgroup II, タバコ分離株, 九州大学高浪氏より分譲)<sup>15)</sup> を用いた。

## 2) ウイルスの精製

FRANCKI (1979)<sup>1)</sup> の方法に従い、一部改変して CMV を精製した。CMV-Um に感染した SamsunNN タバコ葉を 0.2% メルカプトエタノールを含む 0.5 M クエン酸ナトリウム緩衝液 (pH 6.5) で磨砕した (2 ml/g)。ガーゼでろ過し、ろ液に 1/5 量のクロロホルムを加え 10 分間攪拌の後、低速遠心分離 (国産遠心機 H-200N, IN ローター, 9,500 rpm, 10 分) を行って上清を回収した。これに塩化ナトリウムを最終濃度 0.1 M, ポリエチレングリコール 6000 を最終濃度 8% となるように加えて遠心分離 (同上, IN ローター, 9,500 rpm, 10 分) し、沈殿を 0.1 M ほう酸緩衝液に再懸濁し、最終濃度 0.2% となるようにトリトン X-100 を加えた。この懸濁液を遠心分離し (同上, FN ローター, 12,000 rpm, 20 分), 上清を 20% しょ糖を含む 0.1 M ほう酸緩衝液上に重層し、クッション超遠心分離した (Beckman L-8M, 70Ti ローター, 35,000 rpm, 120 分)。さらに 10-40% のしょ糖密度勾配遠心を行ない (同上, SW28 ローター, 25,000 rpm, 120 分) 純化ウイルスを得た。

## 3) 血清反応

CMV-Um の精製ウイルス 0.25 mg を 0.5 ml の 5 mM ホウ酸緩衝液 (pH 9.0) に懸濁し 0.5 ml のフロイント不完全アジュバント (Freund's incomplete adjuvant) とともに乳化し、ウサギ (品種ニュージーランドホワイト) の後肢に筋肉注射した。これを 1 週間ごとに 3 回繰り返した。2 か月後に 2 回の筋肉注射を追加し、ブースターとして 0.125 mg のウイルスを静脈注射した後、1 週間後に採血して抗血清 (As-CMV-Um) を得た。力価は間接 ELISA で調べた。なお、CMV-Um 以外の CMV の各分離株の抗血清 (As-CMV-O, As-CMV-P) は当研究室保存あるいは分離株の分譲と同時に分譲を受けて使用した。各抗血清を生理的食塩水で 2 段階希釈し、各分離株との反応限界点から CMV-Um の血清型を既報の分離株と比較した、間接 ELISA の結果は 405 nm の吸光度で測定した。

抗原分析は寒天ゲル 2 重拡散法によった。0.01 M リン酸緩衝液に寒天を 0.7%,  $\text{NaN}_3$  を 0.02% 加えて加熱溶解後シャーレに注ぎ、ゲル化後、直径約 4 mm の孔を中心に 1 個、周辺に 6 個等間隔に開け、周辺部の孔に 15  $\mu\text{l}$  の純化ウイルスを 1 mg/ml として添加した。25°C で 4 時間おいた後、中心の孔に 15  $\mu\text{l}$  の各抗血清を添加した。各抗血清は原液を用いた。

抗体吸収試験<sup>9)</sup> によって CMV 各系統の抗原の差異を DAS-ELISA を用いて調べた。CMV-Um の IgG は硫酸塩析法 (VAN REGENMORTEL *et al.* 1993)<sup>21)</sup> によって作製し、

グルタルアルデヒド 1 段階法 (前田ら, 1996)<sup>8)</sup> によって CMV-Um 抗体とアルカリフォスファターゼ (ALP) 結合抗体を作った。

抗体吸収は抗 CMV-Um-IgG および ALP コンジュゲート (0.1 mg/ml) と CMV-Um, -O および -m2 の各精製ウイルス (0.1 mg/ml) を 1:4 に混合し、37°C で 2 時間、さらに 4°C で 1 晩おいた後、遠心分離して得られた上清を用いた。IgG およびコンジュゲートはそれぞれ段階希釈して供試した。抗原として CMV-Um 純化ウイルス (0.1  $\mu\text{g/ml}$ ) を用いた。

## 4) CMV-RNA 3 の塩基配列の比較

CMV-Um-RNA の外被タンパク質遺伝子の塩基配列を調べ、既報の CMV 分離株と比較検討した。CMV-RNA は SAMBROOK ら (1989)<sup>13)</sup> に従い SDS-phenol 処理によって調製した。逆転写ポリメラーゼ連鎖反応法による cDNA のクローニングのために、プライマーとして 5'-GACGTT-AGCAGCTGGTTCGTC-3' および 5'-GCGGCATACTGATAAACCA-3' を用いた。増幅された cDNA は、Plasmid pBlueScript II KS+Pst I /Bam HI (Stratagene, USA) にクローニングした。塩基配列には、Dye primer 法 Dideoxy chain termination 法 (Taq Dye Primeo Cycle Sequencing Core Kit- Perkin Elmer), fluorescent DNA sequencer (377A, Applied Biosystem, USA) を用いた。これらによって得られた結果は既報の CMV 分離株の塩基配列とコンピュータプログラム (DNASIS, Hitachi, Japan) によって相同性を検討した。

## 実験結果

### 1) CMV-Um による判別植物の病徴

CMV-Um を接種したタバコ (品種 SamsunNN および バーレー 21) は全身的に葉脈透化や軽いモザイクを示すが、CMV-O などの場合に較べて症状は軽く、注意しないと見逃すことがある。ササゲ, ソラマメ, *Chenopodium amaranticolor*, *C. quinoa* などでは CMV-O の場合と同様に接種葉にえそ斑点を生じ、全身感染しなかった。ササゲでは添加したニコチンによる微小なえそ斑点と見分けにくかったが、ウイルスによるものはこれより大型の斑点となった。ウメ葉から直接に検定植物への接種が困難なときは、*P. floridana* などの全身感染葉を接種源とするとニコチンなしでも感染が得られた。*P. floridana* は PNRLV には全身感染せず、ウメが PNRLV に重複感染しているときでも CMV のみの分離が可能であった。CMV-Um はウメ (品種南高) に感染したが、実生苗には幼苗に葉脈黄化を示す他はほとんど病徴を示さなかった<sup>10)</sup>。

### 2) ウイルスの精製

200 g の感染タバコ葉から 7.8 mg の純化ウイルスが得られた。密度勾配遠心によって、白色のバンドが 1 本認められた。このバンドの再度超遠心後の沈渣は A260/80 = 1.82, Amax/Amin = 1.51 を示した。この純化標品をホルマリン固定し、リンタングステン酸でネガティブ染色した

後、透過型電子顕微鏡 (JEM-100CX, 日本電子) 観察によって既報と同様な直径約 28 nm の球状粒子が認められた。

### 3) 血清反応

#### a) CMV-Um および各分離株の各抗血清に対する反応

結果を Table 1 および Fig. 1 に示した。As-CMV-Um は CMV-Um に最強に反応し、 $2^{10}$  (256,000) が限界値であった。同様に As-CMV-O, As-CMV-P は homologous な組み合わせで最も強く反応し、heterologous な組み合わせでは反応は低く、CMV-Um は As-CMV-O および As-CMV-P とは各希釈段階のいずれでも中間的な反応を示した。各抗血清の希釈限界値 ( $\log_2 N$ ) の差から血清学的判別指数 (SDI) を求め、Table 1 に示した。

#### b) 寒天ゲル二重拡散法

As-CMV-O (subgroup I) では、CMV-O と CMV-m2 との間に m2 にむかって延びた分枝が、CMV-O と CMV-Um との間では、Um に向かって分枝を生じた。また、CMV-Um と CMV-m2 の間に交叉する沈降帯を示した (Fig. 2-A)。As-CMV-Um では CMV-O と CMV-m2 の間に m2 に向かって、また CMV-O と CMV-Um の間に Um に向かってそれぞれ分枝を生じた。CMV-Um と CMV-m2 の間に交叉する沈降帯を生じた (Fig. 2-B)。As-CMV-P (subgroup II) では CMV-m2 と CMV-O との間に O に向かって、また CMV-m2 と CMV-Um の間に -Um に向かう分枝がそれぞれ観察された (Fig. 2-C)。

#### c) CMV 各分離株の抗体吸収と DAS-ELISA

Fig. 3 に結果を示した。精製 CMV-Um で吸収した -Um 抗体は各希釈倍率区で陽性反応限界値以下であったので -Um 抗体は吸収によって除去されたことを示した。一方、CMV-m2 で吸収した Um 抗体、また CMV-O で吸収した Um 抗体は非吸収の対照と同様にいずれも -Um に対して高い吸光値を示し、IgG 希釈倍数 100,000 倍まで反応した。しかし、各希釈倍数区における吸光値は -m2 吸収抗体より低く、一部の抗体が吸収されていた。

### 4) CMV-Um の RNA 3 外被タンパク質 (CP) 領域の塩基配列

CMV-Um の RNA3 にコードされる CP 領域の塩基配列は 657 塩基からなり、アミノ酸配列に置換すると 218 残基であった (Fig. 4)。得られた CP 領域の塩基およびアミノ酸配列を塩基配列解析プログラム (DNASIS) を用い、既報分離株の subgroup I : (CMV-O, -Y, -M, -Fny), subgroup II : (CMV-Q, -WL) 分離株の同領域との相同性を調べた (Table 2)。その結果、subg. I とは塩基配列で 91-93%、アミノ酸配列で 94-95% の相同性を、一方、subg. II とは同様に 74-75% および 80% の相同性を示した。しかし、subg. I および subg. II のそれぞれの分離株間の相同性は塩基配列で 96.3-99.5 および 99.2% であり (PALUKAITIS *et al.* 1992)<sup>12)</sup>、それらと比較すると、CMV-Um の subg. I に対する相同性はやや低かった。

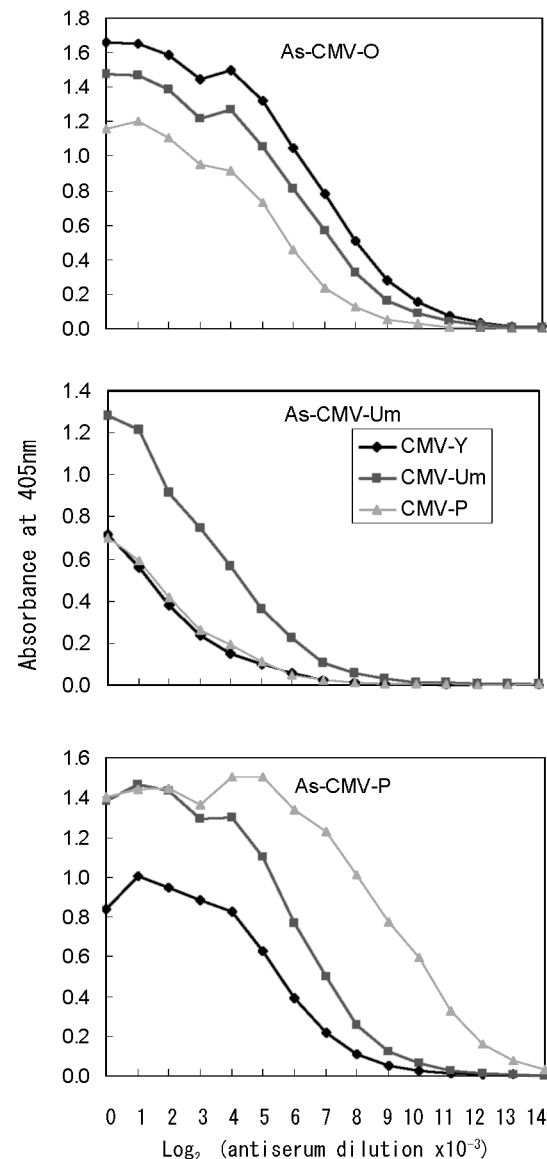
ウイルスタンパク質や抗原タンパク質の抗原性は、親水

**Table 1** ELISA titer of antisera against CMV-Y (subgroup I), CMV-Um and CMV-P (subgroup II) in reciprocal test

Antigen (0.1 $\mu$ g/ml)	Antiserum dilution ( $\times 10^3$ )		
	As-CMV-O (subg. I)	As-CMV-Um	As-CMV-P (subg. II)
CMV-Y (subg. I)	<u>2,048</u> <sup>a)</sup>	64 (2) <sup>b)</sup>	512 (5)
CMV-Um	1,024 (1)	<u>256</u>	1,024 (4)
CMV-m2 (subg. II)	256 (3)	64 (2)	<u>8,192</u>

a) Figures underlined refer to homologous reactions.

b) Serological differentiation index ; SDI.



**Fig. 1** Comparison of indirect ELISA values for CMV isolates in homologous and heterologous antiserum



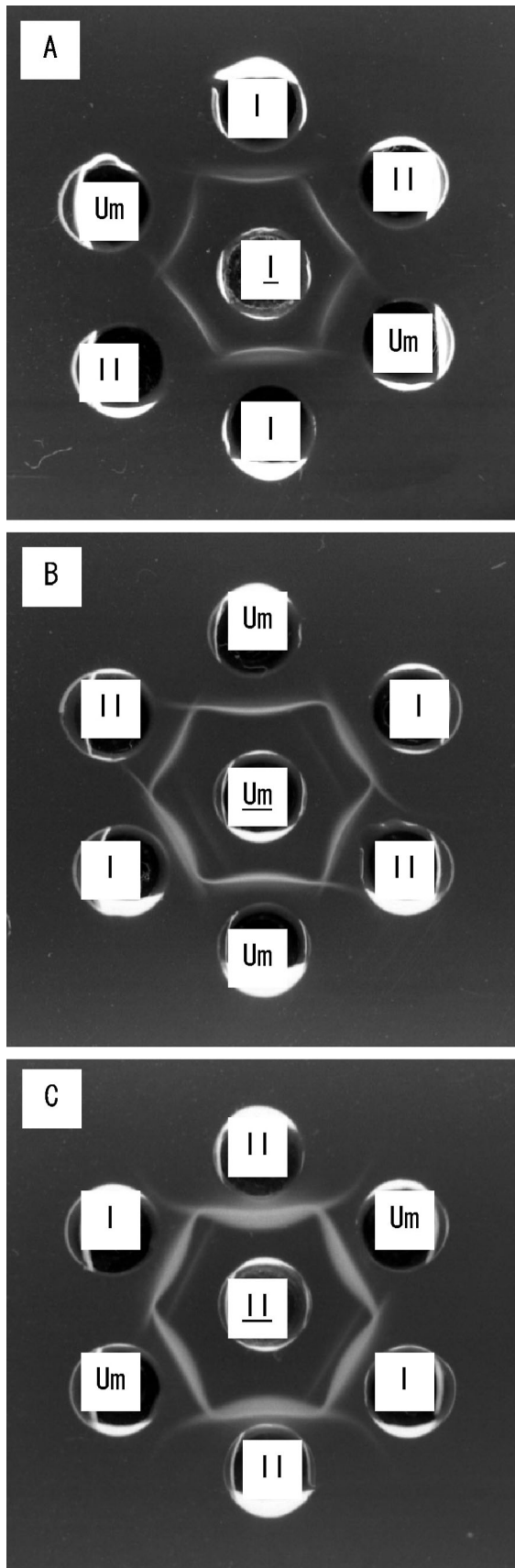


Fig. 2 Agar-gel double diffusion test using anti-sera to CMV-O (I), CMV-Um (Um) and CMV-P (II) against homologous and heterologous purified antigens

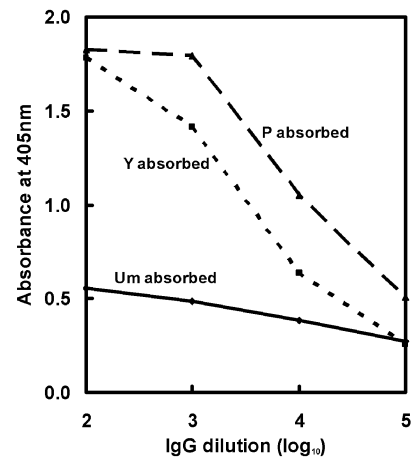


Fig. 3 Cross absorption tests of CMV-Um antibody with purified virus isolates of CMV serotypes Y, P and Um, respectively, by DAS-ELISA

1	ATGGACAAATCTGAATCAACCAGTGCCGGTCGTAATCGTCGACGTCGTCGCCGTTCCGCGT	60
1	M D K S E S T S A G R N R R R R P R S R	20
61	TCCCGCTCAGTTCCTCCTCCGCTGATGCTACTTTTAGAGTCTGTCCGAACATCTTTGG	120
21	S R S A S S S A D A I F R V L S Q H L S	40
121	CGACTTAATAAGAGGTTAGCAGCTGGTCGCTACTATTAACCACCCAACTTTGTGGGT	180
41	R L N K T L A A G R P T I N H P T F V G	60
181	AGTGAGCGTTGTA AACCTGGGTACAGCTTACATCTATTACCCTGAAACCTCCGAAAATA	240
61	S E R C K P G Y T F T S I T L K P P K I	80
241	GACCGTGGGCTTATTATGGTAAAAGTTGTTGCTTCTGATTCACTCACTGAGTTCGAT	300
81	D R G S Y Y G K R L L L P D S V T E F D	100
301	AAGAAGCTTGTTTCGCGCATTCAAATTCGAGTTAATCCTTTGCCGAAATTTGATTCTACT	360
101	K K L V S R I Q I R V N P L P K F D S T	120
361	GTGTGGGTGACAGTCGGTAAAGTTCCCTCCCTCCGACTTATCCGTTCCGCCATCTCT	420
121	V W V T V R K V P A S S D L S V S A I S	140
421	GCTATGTTTCCGGACGGAGCCTCACCAGTACTGTTTATCAGTATGCCGATCCGGAGTT	480
141	A M F A D G A S P V L V Y Q Y A A S G V	160
481	CAAGCTAACAACAATTTGTTGATGATCTTTCCGGCATGCGCGCTGATATAGGTGACATG	540
161	Q A N N K L L Y D L S A M R A D I G D M	180
541	CGAAAGTACGCCGCTCCTCGTGTATTCAAAGACGATGCGCTCGAGACAGACGAGCTGGTA	600
181	R K Y A V L V Y S K D D A L E T D E L V	200
601	CTGCATGTTGACATCGAGCACCACGATTTCCACATCTGGAGTGTCCAGTTTGA	657
201	L H V D I E H Q R I P T S G V L P V *	218

Fig. 4 Nucleotide and putative amino acid sequence of CMV-Um RNA 3 CP coding region (DDBJ accession no. AB0706622). Conservative amino acid changes in CMV-Um as compared to both CMV subgroup I (-O, -Y, -Fny, -C) and II (-Q, -WL) are underlined

**Table 2** Sequence homology of both nucleotide and amino acid in RNA 3 coat protein coding region among CMV isolates

Subgroup	Homology(%)	
	Nucleotide	Amino acid
subg. I / subg. I	96.3-99.5	94.0-99.1
subg. II / subg. II	99.2	98.6
subg. I / subg. II	76.0-77.5	79.5-83.2
subg. I / CMV-Um	91.0-93.0	94.0-95.0
subg. II / CMV-Um	75.0-76.0	80.0

subgroup I:(CMV-O,-Y,-M,-Fny), subgroup II:(-Q, -WL)

性値の高いアミノ酸領域となる場合が多いことが報告されている<sup>3,5)</sup>ので、その方法に従ってCMV-Umのアミノ酸配列の親水性率を解析し、既報分離株と比較した。高親水性ドメインでは、CMV-Umはsubg. Iとは5, subg. IIとは11のアミノ酸がそれぞれ異なっていた。subg. Iおよびsubg. IIを含めてCMVはTyr99およびArn137をもつが、一方、CMV-UmはPhn99およびSer137を示した。

## 考 察

わが国におけるCMVの既報分離株は血清反応から2系統に分類されていた(Y type および P type)<sup>16)</sup>。WAHYUNI (1992)<sup>22)</sup>はわが国の分離株、CMV-Y および CMV-Pを含む18分離株について、cDNA ドットプロット核酸雑種形成法によって、subg. I と subg. II の RNA 交叉反応はなく、血清反応による分類と一致しているという。しかし、いずれの血清型とも異なる分離株も数株が報告されている。HANADA and TOCHIHARA (1982)<sup>2)</sup>はダイズ萎縮系統(CMV-SB)<sup>14)</sup>について、また前田、井上(1986)<sup>9)</sup>もエビネからの分離株が血清学的にsubg. Iあるいはsubg. IIのいずれでもなく、その中間的な反応を示したとしている。一方、オーストラリアのルーピン(*Lupinus angustifolius*)からの分離株(CMV-YwA)<sup>4)</sup>は、血清学的にsubg. Iおよびsubg. IIと異なるが、cDNA 雑種形成法からはsubg. IIに近縁であるという。

本報告では、寒天ゲル二重拡散法で、CMV-UmはCMV-O(subgroup I)やCMV-m2(subgroup II)などの各分離株との間に分枝を生じた。この結果、CMV-Um分離株は既報のsubg. Iおよびsubg. IIの分離株とは血清学的に一部共通抗原をもつが、異種抗原を持ち、血清型が異なる可能性が示唆された。CMV-Um, subg. I および subg. IIの推定される抗原決定基はTable 3のようになり、3分離株に共通する(a), subg. IとCMV-Umに共通する(b)および各分離株に特異的な抗原決定基(subg. Iにc, subg. IIにd, e および CMV-Umにf)の存在が考えられた。

間接ELISAでは、CMV-Umの両subgroup分離株抗血清に対する反応は中間的であり、homologousが示す吸光値より低くheterologousな反応より高い吸光値を示した。一方、CMV-Um抗血清に対して両subgroup分離株は低い吸光値を示した。

CMV-Um抗体を用いたDAS-ELISAによって、各分離

**Table 3** Antigenic determinants of CMV subgroup I, II and CMV-Um expected from reciprocal agar-gel double diffusion and ELISA

Subgroup	Putative antigenic Determinants
subgroup I	a, b, c
subgroup II	a, d, e
CMV-Um	a, b, f

株精製ウイルスによる抗体吸収を行なった結果、CMV-Umウイルス吸収-Um抗体では、抗体は吸収除去されたが、P吸収-Um抗体では-Um抗体が残存し、高い吸光値を示した。また、CMV-Oウイルス吸収-Um抗体は両者の中間の吸光値であった。したがって、血清学的にはCMV-Um株はsubg. Iおよびsubg. IIと異なる抗原決定基を持つが、既報分離株とはsubg. IIよりsubg. Iに近縁であると思われた。これは血清型判別指数の結果とも一致する(Table 1)。この指数は2およびそれ以下であれば、同一のウイルスspeciesに属するかstrainであることを強く示唆する(VAN REGENMORTEL, 2000)<sup>20)</sup>ことから、CMV-Umがsubgroup Iに属し、またその抗原性がその他の分離株と部分的に異なることを示している。

CMV-Um RNA3外被タンパク質領域の塩基配列は、subg. Iとの相同性が91.0-93.0%、アミノ酸で94-95%と高く、遺伝子型でもsubg. Iに近縁であった。一方subg. IIとは同様に75.0-76.0%および80%であり、subg. I, II間の相同性(Table 2)と同様であった。国際ウイルス分類委員会(ICTV)の第7次報告<sup>19)</sup>によると、CMVのsubgroupは、普通には少なくとも65%の塩基配列の相同性が必要であるとしている。また、polythetic species(多型的種)<sup>17)</sup>やsubgroupの論議からは分類には、アミノ酸配列のみでなく血清反応を含む各種の性質を考慮する必要がある。PotyviridaeやGeminiviridaeがその事例として取り上げられている。これらの論議からもCMV-Umはsubgroup Iに属すが、血清反応では区別されるとしてよいであろう。

塩基配列から得られたアミノ酸の親水性値を解析し、親水性率の最高の領域、N末端側の31残基で、subg. Iとは5アミノ酸、subg. IIとは11アミノ酸の置換が認められた。また99番目、137番目で-Umと両subg.と異なるアミノ酸残基があった。これらのアミノ酸の変化が上記の分離株間における各CPの抗原決定基の差異と関連する可能性を示唆している。

以上の結果はCMV-Um分離株は遺伝子配列からはsubg. Iに属するが、血清学的には相違があることを示し、遺伝子配列による分類と血清型の分類結果が必ずしも一致しない一例になると考えられる。

なお、本研究では-Umのアブラムシによる伝搬試験は行ななかったが、RNA3の塩基配列の168番のアミノ酸が伝搬性に関与するという既報の結果<sup>11)</sup>とCMV-Umの168

番目のアミノ酸がチロシンであることから、CMV-Um はアブラムシ伝搬性を持つと推定される。また、CMV-Um はその RNA に通常の 4 種のほかサテライト RNA を持つことが明らかにされているが、詳細は別報に記す予定である。

#### 付記

本報告の要旨の一部は第 10 回国際ウイルス学会議 (1996, エルサレム) で発表した<sup>7)</sup>。

謝辞: 本研究を遂行するにあたって、日本たばこ産業株式会社生命科学研究所桑田 茂博士 (現在, 明治大学農学部), 鈴木 匡博士 (現在, 東京大学大学院新領域創成科学研究科) には CMV-O および CMV-Y 精製ウイルスを, 九州大学農学部高浪洋一教授には CMV-m2 精製ウイルスを, 農林水産省農業研究センター藤澤一郎博士 (現在, 鯉湖学園) には CMV-P 抗血清をそれぞれ分譲していただいた。ここに記して感謝の意を表する。

#### 引用文献

- FRANCKI, R.I.B., MOSSOP, D.W. and HATTA, T., 1979. Cucumber mosaic virus. CMI/AAB Description of plant viruses, No. 213.
- HANADA, K. and TOCHIHARA, H., 1982. Some properties of an isolate of the soybean stunt strain of cucumber mosaic virus. *Phytopathology*, **72**, 761-764.
- HOPP, T.P. and WOODS, K.R., 1981. Prediction of protein antigenic determinants from amino acid sequence. *Natl. Sci., USA* **78**, 3824-3828.
- JONES, R.A.C., 1988. Seed-borne cucumber mosaic virus infection of narrow-leaved lupin (*Lupinus angustifolius*) in Western Australia. *Ann. Appl. Biol.* **113**, 507-518.
- 亀井碩哉, 1991. パソコンによる蛋白質の解析, 共立出版, 東京, 128-138.
- KURIHARA, J., TOMARU, K., OTSUBO, T., ARIMOTO, Y., TSUDA, S. and KIRITA, M., 1998. A new disease of *Prunus mume* (Japanese apricot) caused by multiple infection with cucumber mosaic cucumovirus and prunus necrotic ringspot related Ilarvirus. Proc. 17<sup>th</sup> Intn. Symposium on virus and virus-like diseases of temperate fruits crops. Edited by Hadidi, A., *Acta Hort.* **472**, ISHS 183-193.
- KURIHARA, J., TSUDA, S., KIRITA, M., OTSUBO, T. and TOMARU, K., 1996. Cucumber mosaic cucumovirus isolated from *Prunus mume* belongs to subgroup I but distinct in serology. Abstracts of Xth Intern. Congress of Virology. 157. (Jerusalem)
- 前田学憲・井上成信, 1986. 酵素抗体結合法 (ELISA) によるキュウリモザイクウイルスの検出 二重抗体法における種々の酵素標識抗体の評価, 農学研究, **61**, 119-127.
- MAEDA, T. and INOUE, N., 1987. Differentiation of two serotypes of cucumber mosaic virus in Japan by F(ab')<sub>2</sub> ELISA with cross absorbed antibodies. *Ber. Ohara Inst. Landbw Biol., Okayama Univ.* **19**, 149-157.
- 大坪孝之・栗原 潤・榊原 学・都丸敬一, 2002. ウメ葉緑えそ病病原ウイルスの汁液接種によるウメ品種南高における病徴再現の確認, 東京農大農学集報, **47**, 11-16.
- OWEN, J., SHINTAKU, M., AESCHLEMAN, P., BEN TAHAR, S. and PALUKAITIS, P., 1990. Nucleotide sequence and evolutionarily relationships of cucumber mosaic virus (CMV) strains: CMV RNA 3. *Journal of General Virology*, **71**, 2243-2249.
- PALUKAITIS, P., ROOSSIONCK, M.J., DIETZGEN, R.G. and FRANCKI, R.I.B., 1992. Cucumber mosaic virus, *Advances in Virus Research* **41**, 281-348.
- SAMBROOK, J., FRITSH, E.F. and MANIATIS, T.A. 1989. Molecular cloning: A Laboratory Manual. 2<sup>nd</sup> ed. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y.
- 高橋幸吉・田中敏夫・飯田 格・津田保昭, 1980. 日本におけるダイズのウイルス病と病原ウイルスに関する研究, 東北農試研究報告, **62**, 1-130.
- TAKANAMI, Y., KIKUHARA, K. and TAKESHITA, M., 1998. Two isolates of cucumber mosaic cucumovirus expressing mild mosaic symptoms on tobacco plants. *J. Fac. Agr. Kyusyu Univ.*, **43**, 53-58.
- 栃原比呂志・田村 実, 1976. フキのウイルス, 日本植物病理学会会報, **42**, 533-539.
- 都丸敬一, 1991. 植物ウイルス分類の現状と問題点, 植物防疫, **45**, 396-400.
- 都丸敬一・日高 醇, 1960. タバコから得られたキュウリモザイクウイルスの系統 第 1 報 普通系, 第 3 報 黄斑系, 秦野たばこ試験場報告, **46**, 125-134, 143-149.
- VAN REGENMORTEL, M.H.V., FAUQUET, C.M., BISHOP, D.H.L. CARSTENS, ESTES, M.K., LEMON, S.M., MANILOFF, J., MAYO, M.A., MCGEOCH, D.J., PRINGLE, C.R. and WICKNER, R.B., 2000. Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. **99**. 1162.
- VAN REGENMORTEL, M.H.V., 2000. Introduction to the species concept in virus taxonomy. 3-16.
- VAN REGENMORTEL, M.H.V. and DUBS, M.C. 1993. Serological Procedures. In Diagnosis of Plant Virus Diseases (MATTHEWS, R.E.F., ed.). CRC Press, Boca Raton. pp.159-214.
- WAHYNI, W.S., DIETZGEN, R.G. HANADA, K. and FRANCKI, R. I.B., 1992. Serological and biological variation between and within subgroup I and II strains of cucumber mosaic virus. *Plant Pathology*, **41**, 282-297.

# *Cucumber Mosaic Virus* Isolated from *Prunus mume* (Japanese Apricot) Belongs to Subgroup I but is Distinct in Serology

By

Jun KURIHARA\*, Shinya TSUDA\*\*, Masanobu KIRITA\*\*\*, Keiko T. NATSUAKI\*\*\*\*  
and Keiichi TOMARU\*\*\*\*\*

(Received May 23, 2005/Accepted July 20, 2005)

**Summary** : Japanese apricot isolate of *Cucumber mosaic virus* (CMV-Um) was isolated from Japanese apricot (*Prunus mume* Sieb. et Zucc.) showing leaf margin necrosis and abortion syndrome, together with prunus necrotic ringspot like ilarvirus. Serotype of CMV-Um was shown as neither subg. I nor II by both agar gel double diffusion and ELISA tests. Nucleotide sequence in RNA3 coat protein (CP) coding region of CMV-Um was determined and compared with the previous reports of other CMV-RNA3. Sequence homologies of nucleotides and putative amino acids between Um and subg. I isolates showed 91–93% and 94–95%, respectively. On the other hand, homology between Um and subg. II isolates showed similarly 75–76% and 80%. Hydrophilicity analysis of amino acid sequence, at the regions of high average hydrophilicity of CMV-Um CP indicated 4 amino acids changes in both subgroups in common, suggesting a few amino acids changes caused variation of CMV serotype. In conclusion, CMV-Um belongs to subg. I in sequence but is different from subg. I and II in serotype.

**Key words** : *Prunus mume*, Cucumber mosaic virus, Mume leaf margin necrosis, Subgroup I.

---

\* Nagano Vegetable and Ornamental Crop Experiment Station Saku Branch

\*\* National Agricultural Research Center, Department of Plant Pathology

\*\*\* ASAHI BREWERIES, LTD. Research & Development Center, Fundamental Research Laboratory

\*\*\*\* Department of International Agricultural Development, Faculty of International Agriculture and Food Studies, Tokyo University of Agriculture

\*\*\*\*\* Formerly Tokyo University of Agriculture