

## 2. 分節型ゲノムを持つラブドウイルス

近藤 秀樹

岡山大学資源植物科学研究所

ラブドウイルスは非分節型マイナス(−)鎖RNAをゲノムに持つモノネガウイルス目に所属し、ヒト、家畜、魚類、昆虫類、植物など多様な生物種に感染することが知られている。ランエそ斑紋ウイルス(OFV)はオンシツヒメハダニにより媒介され、世界のラン科植物の栽培地域に広く分布するが、発見当初から生物学的特性、粒子形態、細胞内所見の類似性などを根拠にラブドウイルスの一種と考えられていた。その後OFVが2分節型の(−)鎖RNAをゲノムに持つことが判明し、その遺伝子の構造や構成は植物ラブドウイルス、特にヌクレオラブドウイルス属に類似していることが示された。本総説では、モノネガウイルスに類似するユニークな2分節型ウイルスのゲノム構造や遺伝子発現様式、さらに核内封入体(viroplasm)の誘導機構に関わる最近の知見やOFVの分類動向を紹介する。

### はじめに

植物に感染するマイナス(−)鎖RNAウイルスは、多様な植物種に発生するヌクレオラブドウイルス属やサイトラブドウイルス属(ラブドウイルス科、モノネガウイルス目)、花きや野菜類で被害が大きいトスポウイルス属(ブニヤウイルス科)のメンバーがよく知られている。前者は非分節型、後者は分節型の(−)鎖RNAゲノムを持つ。また、科は未設定であるが、イネ科作物で問題になっているテヌイウイルス属(リフトバレー熱ウイルスで知られるブニヤウイルス科フレボウイルス属に近縁)やバラ科植物やイチジクなどに発生するエマラウイルス属(オルトブニヤウイルス属に近縁)などが知られている。これらは、動物ウイルスには認められない宿主植物の細胞間移行に必要な遺伝子(細胞間移行蛋白質)をコードしている。フレボウイルスではゲノムSセグメントが“両極性RNA”(アンビセンス構造)であるが、トスポウイルス(MおよびSセグメント)やテヌイウイルス(RNA2~4)も同様の両極性RNAセグメントを持つ<sup>1)</sup>。上記ウイルスの媒介には、

エマラウイルスでは節足動物のフシダニ類が、それ以外では昆虫類(アブラムシ、アザミウマ、ウンカ、ヨコバイなど)が関与し、さらに一部ウイルスは媒介昆虫の体内で増殖することが証明されている<sup>1-3)</sup>。その他、土壌生息菌で媒介されるユニークな分節型の紐状ウイルス(オフィオウイルス科)やその随伴ウイルス(バリコサウイルス属;後述)なども存在する<sup>1)</sup>。植物ウイルスの多くは被膜を持たない粒子を形成するが、植物ラブドウイルス、トスポウイルス、エマラウイルスはスパイク蛋白質やその前駆体をコードし、被膜を持つ典型的な成熟粒子を形成する。一方、テヌイウイルスやバリコサウイルスもスパイク蛋白質に類似した遺伝子を保有するが、感染細胞内に被膜粒子は観察されていない。このように、植物でも多様な(−)鎖RNAウイルスの存在が明らかになりつつあるが、その多くが動物(−)鎖RNAウイルスとの共通点を持っていることから、(−)鎖RNAウイルスの分子進化を理解する上で非常に興味深い研究材料である。

ラブドウイルスは、植物以外にもヒト、動物、昆虫、魚類など多様な生物種に存在することが知られている。そのウイルス粒子は被膜を持ち、桿菌・弾丸状(100-430nm×45-100nm)で、その内部に非分節型(−)鎖RNAゲノム(11-15kb)を包含している。分類上、ラブドウイルス科はフィロウイルス科、パラミクソウイルス科、ボルナウイルス科と共にモノネガウイルス目に所属し、リッサウイルス属、ベシクロウイルス属、エフェメロウイルス属、ノビラブドウイルス属、ヌクレオラブドウイルス属、サイトラブドウイルス属の6属が設定されている<sup>4)</sup>。また、2012年には新たに*Perhabdovirus*, *Sigamavirus*, *Tibrovirus*

### 連絡先

〒710-0046

岡山県倉敷市中央2-20-1

岡山大学資源植物科学研究所(植物研)

TEL: 086-434-1232

FAX: 086-434-1232

E-mail: hkondo@rib.okayama-u.ac.jp

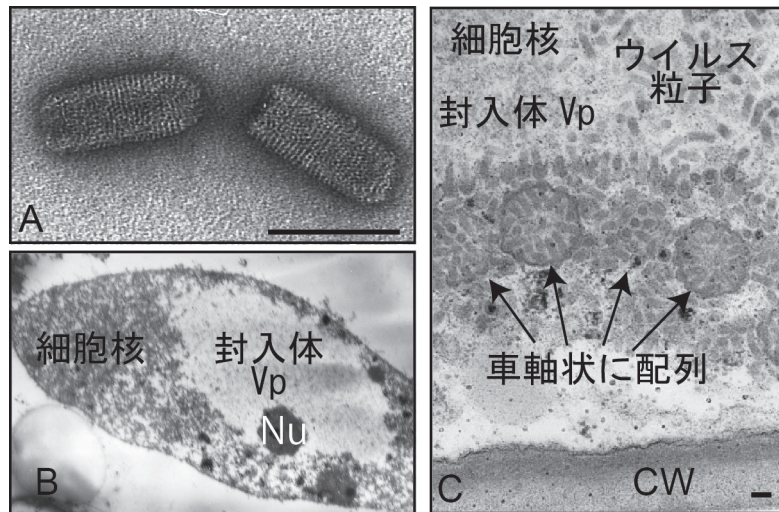


図1 ランエそ斑紋ウイルス (OFV) の粒子および感染細胞内の電子顕微鏡観察像

(A) OFV 精製ウイルス粒子のネガティブ染色像。精製粒子ではサイズは長さ 100-110nm, 幅 45-50nm, らせん構造のピッチは約 4.5nm である。また, 粒子の構成蛋白質として, N, P, M, L が同定されている<sup>13)</sup>。(B) OFV 感染ツルナ (*Tetragonia expansa*) 葉の細胞核内に形成された封入体 (Viroplasm, 核内で明るく見えている領域)。(C) 核膜間隙に観察される OFV 粒子の車軸状構造 (多くの場合, 核膜内膜に複数の粒子が車軸状に配列して包含され核膜間隙内に移行する)。Nu: 核小体, CW: 細胞壁, スケールバー: 100nm。

の 3 属が国際ウイルス分類委員会 (ICTV) で承認された (動物ラブドウイルスの一般的な性状については最近の総説<sup>5)</sup> をご参照頂きたい)。植物ラブドウイルスはその感染細胞内の所見から, 複製の場として核内が推定されるヌクレオラブドウイルス属と細胞質内が推定されるサイトラブドウイルス属に大別される<sup>6)</sup>。本総説で取り上げるランエそ斑紋ウイルス (orchid fleck virus, OFV) は, 分節型の (-) 鎖 RNA をゲノムに持つにも拘わらず, ゲノム構造, 遺伝子発現様式や細胞内所見がヌクレオラブドウイルスに類似したユニークなウイルスである<sup>7, 8)</sup>。しかし一方で, OFV 粒子はラブドウイルスに特徴的な被膜を欠く点, さらに節足動物のオンシツヒメハダニ (*Brevipalpus californicus*) で媒介される点で昆虫伝搬性の植物ラブドウイルスとは異なる<sup>8)</sup>。

本稿では, 分節型ウイルスとして独自の進化を遂げた OFV の基本性状, ゲノム構造と遺伝子発現様式を, 一般的な動物ラブドウイルスとの比較を交えて紹介する。さらに, OFV の複製戦略の一端 (核内封入体の誘導機構) や最近我々が関与した分類学上の提案についても概説する。

### 1. ランエそ斑紋ウイルス (OFV) の一般的な性状

OFV は, 本邦で 1969 年に “えそ斑紋症状” を示すラン科植物 (シンビジウム: *Cymbidium* sp.) から分離され, 1973 年にその命名がなされた<sup>9)</sup>。その後, OFV に類似したウイルスあるいは類似症状が, ドイツ, デンマーク, プ

ラジル, オーストラリア, 南アフリカ, 韓国などで, 様々なラン科植物 (50 属以上) から報告されている<sup>10-12)</sup>。現在ではラン科植物の生産 (栽培) 上, 最も注意すべきウイルスの一つとして認識されている。OFV 粒子は長さ 100-150nm, 幅 32-40nm の短桿菌状粒子で, しばしば弾丸状粒子も観察される<sup>9, 13)</sup> (図 1A)。感染細胞では, 核内に特徴的な封入体 “Viroplasm” (Vp) が誘導され (図 1B), Vp の内部や周囲には多数のウイルス粒子が観察される<sup>9)</sup>。OFV の粒子形態は小型であり, その構造はラブドウイルスのヌクレオキャプシド (スケルトン構造) によく似ている。前述の通り細胞内所見も植物のヌクレオラブドウイルスに類似性を示す<sup>8)</sup>。しかし OFV は, ヌクレオラブドウイルスの様に単独で核膜間隙へ出芽して成熟粒子が形成されることは稀で, 核膜内膜に取り付いた粒子の集団が核膜間隙に向け押し出され, 車軸状に配列した粒子を含む小胞が形成される (図 1C)。OFV はオンシツヒメハダニにより媒介され, 保毒成虫は少なくとも 20 日以上ウイルス伝搬能力を保持する<sup>8)</sup>。その伝搬様式は永続型と想定されるが, 循環型, 増殖型のいずれであるかは不明である。

### 2. OFV のゲノム構造と遺伝子発現様式

OFV 日本産分離株 (So) のゲノムは 2 分節の (-) 鎖 RNA で, RNA1 が 6, 413 塩基, RNA2 が 6, 001 塩基からなる<sup>7)</sup>。RNA1 と RNA2 の末端はそれぞれ相補的であり, 最初の 6 塩基 (3'-UGUGUC----GACACA-5') は両者で共通である。RNA1 のゲノム相補鎖 (vc) には, その 5' 側から N

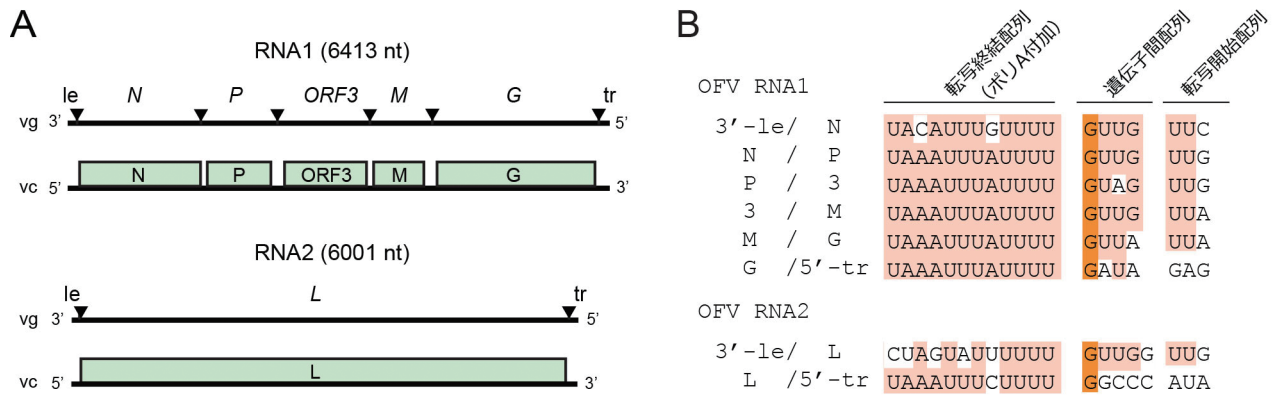


図2 OFVの遺伝子構造(A)と遺伝子結合領域(B)

(A) OFVの各RNAセグメント上段はウイルスゲノム鎖(-)鎖RNA, vg], 下段はウイルスゲノム相補鎖[(+)鎖RNA, vc]を示す。ゲノム鎖上の矢尻は遺伝子結合領域を, ゲノム相補鎖上のボックスは各ORFを表す。le:leader RNA領域; tr:trailer RNA領域。(B) 遺伝子結合領域はウイルスゲノム鎖で, そのうちすいオレンジの影付は保存配列を示す。転写終結配列:mRNA 3'末端配列(ポリA付加部)の相補配列; 遺伝子間配列:転写されない領域; 転写開始配列(保存配列Gはオレンジの影付): mRNA 5'末端配列の相補配列。

(nucleocapsid protein/ORF1), P(推定 phosphoprotein/ORF2), ORF3(推定 movement protein), M(推定 matrix protein/ORF4)およびG(推定 glycoprotein/ORF5)の5種の蛋白質をコードするORFが, RNA2にはL(RNA-dependent RNA polymerase, RdRp)蛋白質ORFが座上する(図2A)。OFVの遺伝子はそれぞれのmRNAがモノシストロニックに発現する<sup>14)</sup>。RNA1の遺伝子(mRNA転写ユニット)は並列に位置し, その遺伝子連結領域には3'-UAAAUUUAUUUUGU(U/A)(G/A)UU-5'の18塩基からなる保存配列が認められる(図2B)。前半の3'-UAAAUUUAUUUU-5'は上流の遺伝子の転写終結配列/ポリA付加部で, 最後の3'-UU-5'は下流の遺伝子の転写開始配列である。また両者の間の4塩基3'-GU(U/A)(G/A)-5'は遺伝子連結配列であり転写されない。同様にRNA2のL遺伝子の前後にも類似配列が存在する。各mRNAの5'末端はCap構造と推測されているが(RLM-RACE/オリゴキャッピング法での検証), ゲノム上に存在しない1~2塩基のA配列がCapの下流(ウイルスmRNA 5'末端配列の直前)に付加されている<sup>14)</sup>。興味深いことに, 単子葉植物に感染するヌレオラブドウイルス[rice yellow stunt virus (RYSV)とmaize fine streak virus (MFSV)]でも, 同様にmRNAの5'末端に数塩基が付加される<sup>15, 16)</sup>。OFVの宿主であるラン科植物も単子葉植物であり, この共通点は興味深い。一方, 動物ラブドウイルスや双子葉植物のヌレオラブドウイルス[sonchus yellow net virus (SYNV), potato yellow dwarf virus (PYDV)]およびサイトラブドウイルス[lettuce necrotic yellows virus (LNYV), lettuce yellow mottle virus]ではこのような配列付加の報告はない<sup>17-20)</sup>。この付加配列の由来や存在意義は不明で

あるが, 付加が数塩基でしかも特定配列(主にA)に限られているので, 分節型(-)鎖RNAウイルスで広く知られている“キャップ・スナッチング機構”(宿主mRNAの5'キャップ構造と一部の配列を借用する)は関わらないと考えられる。本件に関して, L蛋白質に係る可能性については次項(3. OFVのウイルス蛋白質)をご参照頂きたい。

OFVゲノムの3'および5'末端領域には遺伝子領域に含まれないleader(le, 158 nt)とtrailer(tr, 133nt)領域が存在する(図2A)。3'末端側のleader/N遺伝子の連結部には上述の転写終結/ポリA付加配列が存在し, ポリAを有する短いRNA[(+)leader RNA]が転写される<sup>14)</sup>。さらに, ゲノム相補鎖(+)RNAの3'leader(trailerの相補鎖)領域から同様なポリAを持つ短いRNA[(-)leader RNA]の転写も示唆された。OFV(-)RNAゲノムの転写終結/ポリA付加配列に続く遺伝子間の領域は, 常にGで始まる(図2B)。この位置のG塩基はラブドウイルスゲノムでも保存されていることから, 効率的な転写終結に重要とされている<sup>21, 22)</sup>。OFVのleader RNAの終結部位はA/U豊富配列があることから, 他の遺伝子と同様にこの領域でウイルス複製酵素の“transcript slippage”が生じ, 末端部にポリAが付加されるのであろう<sup>23)</sup>。以上, OFVでは各遺伝子ならびにleader RNAの転写ユニットは特徴的な転写終結・開始配列で制御されている。これはラブドウイルスを含むモノネガウイルスで広く知られているmRNAとleader RNAの発現様式であり<sup>6)</sup>、トスポウイルスなどの分節型(-)鎖RNAウイルスとは明らかに異なる。

(+)leader RNAの転写は動物ラブドウイルスの水疱性口炎ウイルス(vesicular stomatitis virus, VSV; ベシクロウイルス属), Chandipura virus (CHAV; ベシクロウイル



ス属)や狂犬病ウイルス (rabies virus, RABV; リッサウイルス属)で報告があるが、いずれも末端にポリ A 配列を持っていない<sup>24-26)</sup>。これらウイルスの leader/N 遺伝子接合領域では、他の遺伝子間領域に認められるような転写終結/ポリ A 付加配列が保存されていない<sup>27)</sup>。これに対し、植物のヌクレオラブドウイルス (RYSV や SYNV) では、leader/N 接合領域の配列が保存されており、ポリ A が付加された (+) leader RNA が検出されている<sup>28-30)</sup>。このポリ A 付加は、(+) leader RNA の細胞内局在性 (核外への移行) などに関与するのではないかとされている。ラブドウイルスの leader RNA の機能については、ウイルス複製や転写の制御に関わると考えられている<sup>31)</sup>。CHPV (動物ラブドウイルス) では、(+) leader RNA と P が結合することで、ウイルスの L ポリメラーゼ活性を転写から複製へ切り替える機構が存在する<sup>24, 32, 33)</sup>。最近になり、分節型 (-) RNA ウイルスであるインフルエンザウイルス (オルソミクソウイルス科) で、ゲノムの 5' 末端領域由来の small RNA (22-27 nt) が複製酵素に作用し、転写から複製へのスイッチングを行うという例が報告された<sup>34, 35)</sup>。以上から、leader RNA (さらに 5' 領域の small RNA) は、(-) RNA ウイルスが進化的に共通に保持する転写・複製の制御機構を担っているのではないかと指摘されている<sup>24)</sup>。

### 3. OFV のウイルス蛋白質

一般に動物ラブドウイルスは、ゲノム相補鎖 (vc) の 5' 末端から、N (ヌクレオキャプシド蛋白質)、P (複製酵素コファクター)、M (形態形成や出芽に関与)、G (スパイク蛋白質)、L (複製酵素) の 5 種の構造蛋白質をコードする。植物ラブドウイルスは、それらに加え少なくとも移行蛋白質を P-M 間にコードする<sup>6, 37)</sup>。OFV はこの植物ラブドウイルスゲノムを G と L 遺伝子間で二分した構造をとる (図 2A)。OFV RNA1 の N、G および RNA2 の L 蛋白質は植物ヌクレオラブドウイルスの N、G、L との間に 21 ~ 38% の配列相同性が認められる<sup>7)</sup>。また、L 蛋白質の RdRp コア保存配列を用いた分子系統解析では、OFV はヌクレオラブドウイルスと共に独立クレードを形成する<sup>7)</sup> (図 3)。OFV の N 蛋白質は、ウイルス粒子に最も多く含まれる構造蛋白質でゲノム RNA に結合している<sup>13)</sup>。OFV の P (ORF2) と M (ORF4) 蛋白質は粒子のマイナーな構成蛋白質であるが、植物ラブドウイルスの P と M 蛋白質との配列類似性は認められない。感染植物や粒子から得られた “viral ribonucleoprotein” (vRNP) には、N、P 蛋白質とごく微量な L 蛋白質が検出されるが、M 蛋白質は殆ど検出されない。このことから、OFV の P 蛋白質は N や L と共に vRNP を形成し、M 蛋白質はヌクレオキャプシド粒子の巻き上げ (形態形成) に関わると考えられる<sup>13)</sup>。このようなヌクレオキャプシド形成に関わるウイルス蛋白質の構成や機能は、植物ラブドウイルスでも同様と考えら

れる<sup>6)</sup>。OFV の G (ORF5) 蛋白質はラブドウイルス G 蛋白質と共通の特徴 (N 末端のシグナル配列、C 末端側近くの膜貫通配列にそれぞれ類似したドメイン) を持つ。ラブドウイルスの G 蛋白質は粒子の被膜上にスパイクとして存在するが、多くの OFV 粒子は被膜を持たない裸の状態 で存在することから G 蛋白質の役割は不明である。ただし、OFV 粒子は小胞内で車軸状に配列することから、G は部分的にその形成に関与しているかもしれない (図 1C, 図 4 参照)。あるいは、もし OFV が媒介生物であるヒメハダニで複製する場合は、G 蛋白質はこの動物宿主での成熟粒子形成に必要なかもしれない。RYSV (ヌクレオラブドウイルス) の P3 遺伝子産物は細胞間移行蛋白質であり<sup>38, 39)</sup>、これに対応する OFV の ORF3 蛋白質にも類似の機能が想定される。

ラブドウイルスと他のモノネガウイルスの L 蛋白質には、共通する 6 箇所の保存領域 (I ~ VI) が存在する<sup>40)</sup>。領域 III はいわゆる RdRp のコアモチーフで、OFV の L 蛋白質にも存在する<sup>7)</sup>。その他の領域のうち、V 領域 (polyribonucleotidyltransferase, PRNTase) と VI 領域 (methyltransferase, MTase) は mRNA のキャッピングとグアニン N7-メチル化、ヌクレオシド 2'-O-メチル化に関与する<sup>41,42)</sup>。VSV の場合、L 蛋白質による mRNA キャップ形成は真核生物の細胞核酵素 (GMP 転移型) とは異なるユニークな機構 (GDP 転移型) で行なわれ、これは他の多くのモノネガウイルスでも共通であると考えられている。興味深いことに、PRNTase モチーフの histidine-arginine (HR) ドメインは他のラブドウイルス同様 OFV にも存在するが、MTase モチーフは OFV とヌクレオラブドウイルス (SYNV 以外) には確認されていない<sup>14)</sup>。VSV *hr1* (host range 変異体) は L 蛋白質 MTase モチーフが D<sub>1671</sub> → V<sub>1671</sub> に置換しており、ウイルス mRNA のキャップをメチル化が出来ない。しかし、宿主の MTase 活性が相対的に高い BHK 細胞では、宿主依存的にウイルス mRNA のキャップがメチルされることで翻訳が可能となり感染が成立する<sup>43,44)</sup>。このことから、OFV やヌクレオラブドウイルスの mRNA でも、宿主 MTase (あるいは L 蛋白質上の未知 MTase ドメイン) によりキャップがメチル化されると考えることも可能であろう。先に述べたウイルス mRNA の 5' 末端への非ウイルス A 配列の付加は、この様なウイルス L 蛋白質のユニークな特性や宿主因子の関与により行われるのかもしれない。

### 4. OFV の核内封入体 (Viroplasm) 誘導機構と粒子の形態形成モデル

OFV 感染細胞を透過型電子顕微鏡下で観察すると、他の植物ヌクレオラブドウイルス同様、核内に電子密度が異なる巨大な “封入体” (Viroplasm, Vp) が観察される<sup>9,12)</sup> (図 1B)。この OFV 感染葉の核画分からは主に N と P 蛋

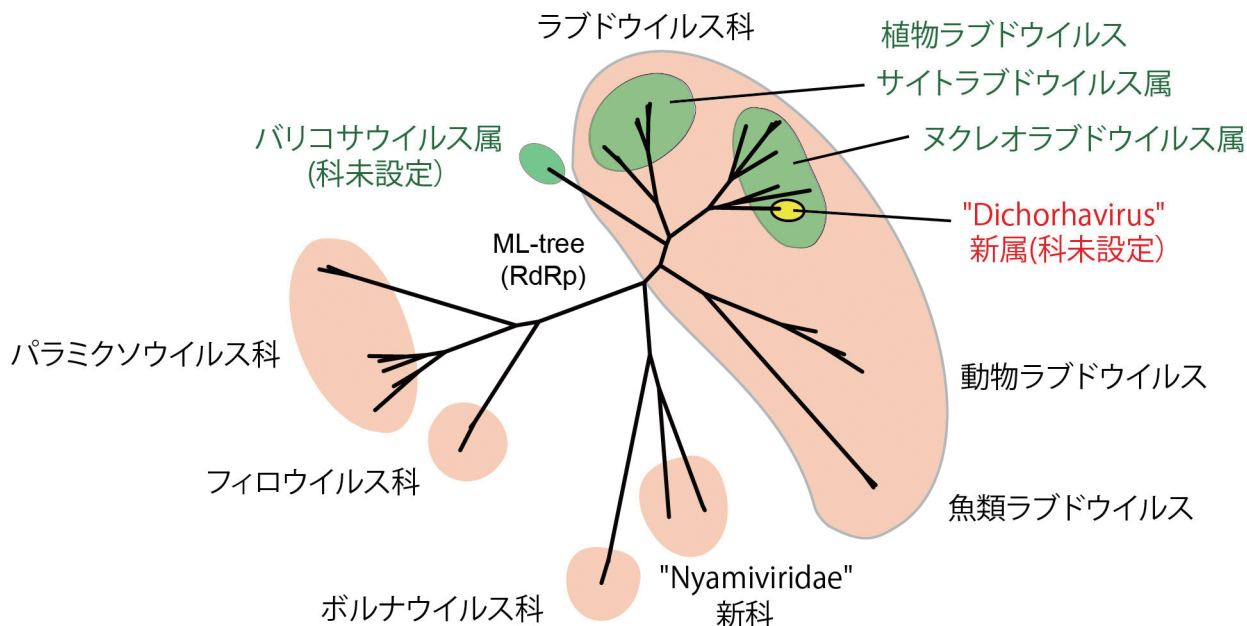


図3 OFV と植物ラブドウイルス並びに代表的なモノネガウイルスの分子系統樹

OFV (dichorhavirus), 植物ラブドウイルス, バリコサウイルスならびにモノネガウイルス代表種(タイプ種)のL蛋白質(RdRp コア領域)のマルチプルアライメントをもとに最尤法(Maximum likelihood method)により作成した分子系統樹(文献72より改変, 作図に用いたウイルス名は割愛した). 尚, モノネガウイルス目では新科"Nyamiviridae"がICTVに提案されている<sup>88)</sup>. 我々はこのウイルスや植物ラブドウイルスに類縁性のあるユニークな(-)鎖RNAウイルスを植物病原糸状菌で(菌類ではじめて)発見している<sup>100)</sup>.

白質が検出された<sup>36)</sup>. そこで, アグロバクテリアを用いた蛋白質の一過的発現実験(ベンサミアナタバコ葉)を行ったところ, NとP蛋白質を同時に発現させることで核内にVp様の封入体が形成された. 他のヌクレオラブドウイルスでも, NとPの共発現下で両者が核内にVp様の局在を示し<sup>17,45-48)</sup>, サイトラブドウイルス(LNYV)の場合は細胞質内でNとPがVp様に凝集するようである<sup>49)</sup>(いずれも蛍光蛋白質タグによる検証のみで, 電顕観察は行われていない). また, パラミクソウイルスのhuman parainfluenza virus type 3においても, NとPが細胞質封入体形成に関わる(この場合, N単独ではなくN-RNAが関与することが判明している)<sup>50)</sup>. ラブドウイルスのN-P蛋白質間の相互作用は, 植物ラブドウイルス<sup>15,46,48,49)</sup>, 動物ラブドウイルス<sup>51,52)</sup>で知られているが, OFVでもBimolecular fluorescence complementation (BiFC) および酵母 Two-hybrid法でN-Pの相互作用が確認されている<sup>36)</sup>. OFVや植物ラブドウイルスのVpはウイルスの複製場所と推定されているが<sup>12,36,53)</sup>, 上記からその誘導にはNとPの両者が必要であると考えられた. しかし, このVp領域にどのような宿主植物因子が関与しているかはよく分かっていない. 一方, 動物ラブドウイルスのRABVでは"ネグリ小体"(Negri body)と呼ばれる細胞質封入体がウイルスの転写や複製の場であり, その形成にはHsp70やToll-Like

Receptor 3の関与が示唆されている<sup>54,55)</sup>. このうち, Hsp70はRABVの感染を正に制御する因子でもある<sup>56)</sup>. また, VSVやエボラウイルス(フィロウイルス属)の細胞質封入体も複製の場であることが示されている<sup>57,58)</sup>.

ヌクレオラブドウイルスはN蛋白質のC末端側にbipartite classの核局在化シグナル(NLS)(MFSV, PYDV, RYSV, SYNVなど)あるいはmonopartite class(他のヌクレオラブドウイルス)のNLSを持つ<sup>15,47,48)</sup>. 一方, OFV N蛋白質はNLSを持たず単独では主に細胞質に存在する<sup>36)</sup>. ラブドウイルスのN蛋白質はN末側に短いdisordered領域を持つが, OFV Nの該当領域はそれらより若干長い<sup>59)</sup>. SYNVのN蛋白質のN末領域はN-N間の相互作用に必要とされているので<sup>60)</sup>, OFV NのN末部(disordered領域)もN-N間相互作用への関与が想定される. OFVのP蛋白質には典型的なNLS(124PPPKRKH130)が存在する. 一般に, NLS依存的な蛋白質の細胞核への移行・蓄積には宿主植物の"Importin  $\alpha$ "と呼ばれる輸送因子が関わる<sup>61)</sup>. 実際, OFV P蛋白質はベンサミアタバコのImportin  $\alpha$ ホモログ(NbImp  $\alpha$  1, NbImp  $\alpha$  2)<sup>62)</sup>と相互作用することがBiFC解析で判明している. ヌクレオラブドウイルスのP蛋白質では, RYSVなどで典型的なmonopartite NLS配列が存在し, 逆にSYNV, PYDV, MFSVなどではNLSは検出されない<sup>15,48)</sup>. 後者のPYDV

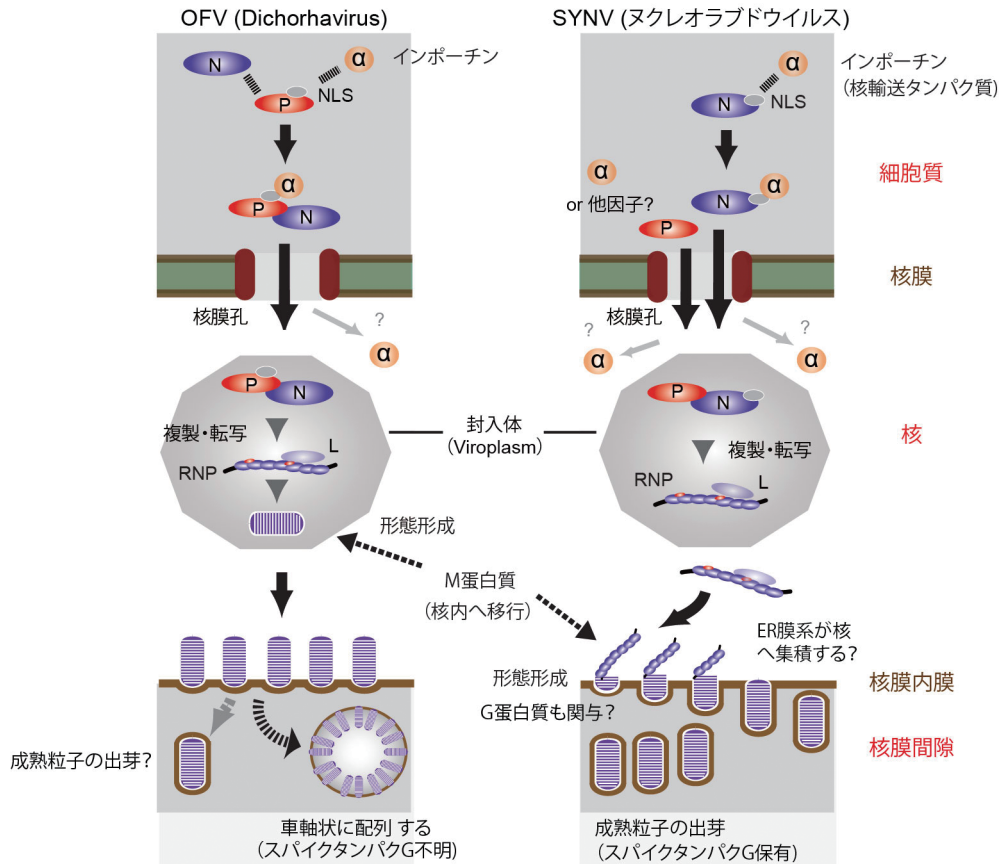


図4 OFV とヌクレオラブドウイルスの核内封入体 (Viroplasm) ならびに粒子形成モデル

(文献 36 より改変). 核内封入体 (Vp) を形成する主要構成因子 N と P 蛋白質の核輸送から, ウイルス複製と粒子化, 出芽までの過程を順に図解した. 左は OFV を, 右はヌクレオラブドウイルス (SYNIV) で現在提唱されているモデルを示す.

P 蛋白質は核に局在化し, SYNIV P 蛋白質は核 - 細胞質間をシャトリングするが, ともに既知 Importin  $\alpha$  に相互作用しないため, 未知の核輸送因子 (あるいは別の機構) の関与が指摘されている<sup>45)</sup>. 核で増殖する動物の (-) 鎖 RNA ウイルスとしてはインフルエンザウイルスやボルナウイルス (ボルナウイルス科) が知られているが, それらのゲノム (vRNP) の核への輸送は N (NP) 蛋白質の NLS 依存的に行われる<sup>63,64)</sup>. ヌクレオラブドウイルスでは同様のゲノム輸送様式が期待されるが, OFV では N 蛋白質ではなく NLS を持つ P 蛋白質がその役割を担うのであろう. 以上のように, OFV とヌクレオラブドウイルスは一部で異なる核輸送因子を用いており, さらに Vp 形成に必要な N 蛋白質の核への移行様式も異なる.

ヌクレオラブドウイルス (SYNIV) では, 次のような複製・粒子形成モデルが提案されている<sup>6,60)</sup> (図 4). まず, SYNIV の初期の転写・翻訳 (詳細は不明) が行われた後, N が Importin  $\alpha$  依存的に核に移行する. 同時に SYNIV の P が N とは異なる輸送系を介して核へ移行する. N と P が核内に Vp を誘導し, 引き続き複製が行われる. 新たに

産生されたヌクレオキャプシドは核膜内膜へ移行し, 形態形成を伴って核膜間隙へ出芽し, G 蛋白質を保持した成熟粒子となる. この過程は, SYNIV 感染プロトプラストに糖鎖修飾阻害剤 (tunicamycin) を処理すると粒子の出芽が阻害され, さらに核内にヌクレオキャプシドが蓄積することから<sup>65)</sup>, 実験的に支持されている. OFV の場合も類似モデルが想定されるが, 以下のような明確な相違点がある. まず, 前述の様に OFV の N-P 複合体は P の NLS 依存的に Importin  $\alpha$  輸送系で核に移行し, Vp を形成する. 核内の Vp 領域内には OFV の粒子 (ヌクレオキャプシドに相当) が集積・散在することから<sup>9)</sup>, 形態形成は出芽とは関係なく Vp 内部で進行する (図 4). ラブドウイルスでは N-RNA の巻き上げに M 蛋白質が関わるが<sup>66)</sup>, OFV の M も粒子の形態維持に関与することが示唆されている<sup>13)</sup>. しかし, OFV の M 蛋白質は NLS を持たないことから, 他のウイルス蛋白質 (P など) の助けを借りて Vp 領域に移行し形態形成に関与すると想定している. これらの OFV の粒子は SYNIV の様に単独で出芽することは稀で, 核膜内膜由来の小胞に車軸上に配列したユニークな構造体



を作って核膜間隙内に集積する (図 1C, 図 4). スクレオラドウイルス (SYNV と PYDV) では, ウイルス感染によりベンサミアナタバコの細胞膜系 (主に ER 膜) が核内へ取り込まれるが<sup>67,68</sup>, OFV 感染下ではこの現象は観察されない. G 蛋白質がアンカーされる ER 膜系の核への集積は, スクレオラドウイルスが核内で出芽 (成熟) するために必要であるとされている<sup>65</sup>. 一方, OFV では ER 膜系が核へ集積出来ない (G 蛋白質が核へ集積するかは不明である) ため, 単独での効率的な出芽は行われず, 複数の粒子が小胞に包含されて間隙に集積するのかもしれない. 尚, OFV の小胞 (車軸状配列) がラドウイルスの成熟粒子に相当する役割を持つかはわかっていない. OFV 粒子とラドウイルスのスクレオキャプシド形態形成機構や粒子の詳細な構造解析 (VSV の先行例は文献<sup>69</sup>) を参照されたい) などは, 今後の興味深い研究課題である.

### 5. OFV の分類学的な動向と関連ウイルス

OFV は, ICTV の第 6 次報告 (1995 年) においてラドウイルス科の項目の中で “被膜を欠くラドウイルス様粒子” (non-enveloped rhabdovirus like particles) として記載された<sup>70</sup>. これは, OFV の生物学的特性, 粒子 (スクレオキャプシド) 構造, 細胞内所見 (核内に巨大な Vp を誘導) に基づいている. その後, OFV の遺伝子構造や推定される発現様式なども植物のスクレオラドウイルスに類似していることが判明したことで, 筆者は OFV を分節型のラドウイルスとする提案 (新属 “Dichorhabdovirus” 創設) を論文上で行った<sup>71</sup>. しかし, ラドウイルス科を含むモノネガウイルス目は非分節型 (-) RNA をゲノムとし, さらに被膜を持つウイルスであるという分類学上の定義と相反するため未分類ウイルス (unassigned virus) のままであった<sup>71</sup>. そこで, Dietzgen 博士らと共同で OFV をタイプ種とするラドウイルス科から独立した属 “Dichorhavirus” の創設を論文上で提案した<sup>72</sup>. 分類学的にラドウイルスとの混乱を避けるために, 名前を一部変更している.

ヒメハダニ (*Brevipalpus* 属) が媒介するウイルスは, OFV のように核内に Vp や粒子が観察されるタイプ (nuclear type) と細胞質に粒子の集積が確認されるタイプ (cytoplasmic type) に大別される<sup>73,74</sup>. 後者は, シレイウイルス属 (科未設定) に分類される分節型のプラス (+) 鎖 RNA ウイルスで<sup>75</sup>, 代表種の citrus leprosis virus-cytoplasmic type (CiLV-C) はブラジルのカンキツ生産で最も重要な病害の一つ “leprosis 病” を引き起こす<sup>76</sup>. 一方, OFV と同じ nuclear type のウイルスとしては, CiLV nuclear type (CiLV-N), coffee ringspot virus (CoRSV), *Viola* ringspot virus, *Clerodendrum* chlorotic spot virus (CICSV) などが知られている<sup>73,77-81</sup>. 上記の *Dichorhavirus* 属の提案には, その構成メンバーとして OFV に加えて

CoRSV と CICSV の 2 種が含まれる. 尚, 最近の報告で CiLV-N (メキシコ系統) は OFV と塩基配列相同性が 90% 以上であることが判明し, 現在は OFV の一系統 (カンキツ系統) と考えられている<sup>82</sup>. CiLV-N はブラジルやアメリカ (フロリダ州) でも確認されているが, カンキツ類における被害状況は不明である<sup>78,83</sup>.

興味深いことに, 笹谷らはレタスビックベイン随伴ウイルス (LBVaV, バリコサウイルス属のタイプ種) が, サイトラドウイルスに類似した分節型 (-) 鎖 RNA ウイルスであることを報告している<sup>84-87</sup>. LBVaV は OFV と類似しているが, ゲノムの 3' 末端領域には OFV やモノネガウイルスのような (+) leader RNA に対応する領域を持たない (3' 末端の 2 塩基直下がすぐに下流遺伝子の転写開始配列となる). このゲノム 3' 末端構造の相違点以外にも, LBVaV は OFV や植物ラドウイルスとは異なり菌類の一種であるオルピディウム (*Olpidium virulentum*) により土壌伝染し, ウイルス粒子は膜を持たない緩やかなコイル状 (棒状) である. この様な相違は, LBVaV とラドウイルスの分子系統学的な関係が OFV とラドウイルスの場合に比べて明らかに遠縁である (進化的に離れている) ことを反映しているのかもしれない (図 3).

尚, 現状の分類体系では *Dichorhavirus* やバリコサウイルスをモノネガウイルス目であるラドウイルス科に包含することは困難であるため, より高次な分類 (科や目の設定) に向けて, モノネガウイルス目やラドウイルス科の再編を行う必要がある<sup>72</sup>.

### おわりに

以上のように, OFV やバリコサウイルスはこれまでのラドウイルスやモノネガウイルスの範疇には収まらないユニークなゲノム構造 (分節型ゲノム) を持つ. にもかかわらず, 少なくとも OFV は遺伝子の発現様式や複製戦略においては植物スクレオラドウイルスとの共通点が多く見出されている. しかし, OFV やバリコサウイルスがなぜモノネガウイルスの特徴を維持しながら分節ゲノムを持つかは不明である. 一般に植物では分節型の (+) 鎖 RNA ウイルスも多く存在することから, ゲノムの分節化は宿主 (植物) 環境にウイルスが適応するための一つの戦略かもしれない. 興味深いことに, 動物のパラミクソウイルスでは人工的にゲノムを分節化した組換えウイルスが宿主に安定的に感染することが報告されている<sup>89,90</sup>. つまり, モノネガウイルスにとって (その一部かもしれないが), 自身が複製する上でゲノムの分節化は大きな障害にならないことを示唆している. このことは, 動物や他の生物種でもモノネガウイルスと共通起源の分節 (-) RNA ウイルスが存在することを期待させる. 尚, OFV をはじめ植物の (-) 鎖 RNA ウイルスでは, リバースジェネティクス (逆遺伝学) 系が確立していなかったため, ウイルスの複製や病原性等

の解析が極めて困難であった。しかし、最近になりヌクレオラブドウイルス (SYNV) でミニゲノムを用いた逆遺伝学系が初めて確立された<sup>91)</sup>。同実験系により植物 (-) 鎖 RNA ウイルスの複製に関する研究が格段に進展すると期待される。

最後にもう一点、注目すべき研究成果に触れておきたい。多くの読者が既にご存じであると思うが、非レトロ RNA ウイルスであるボルナウイルスの“古の感染記録”(いわゆるウイルス化石) がヒトやほ乳類のゲノム上に存在することが2010年に発見された<sup>92)</sup>。さらに、フィロウイルス (フィロウイルス科) の類似配列も複数のほ乳類ゲノムに、またラブドウイルスの類似配列がネッタシマカ、クロアシマダニやショウジョウバエなどの節足動物ゲノムに複数コピー見出されている<sup>93-96)</sup>。植物においても非レトロ RNA ウイルスの類似配列が核ゲノムに相次いで発見され<sup>97-100)</sup>、その中には植物ラブドウイルスやバリコサウイルスの N 蛋白質の類似配列も含まれていた (多くがバリコサウイルスタイプであった)。興味深いことに、バリコサウイルスはこれまでレタス (キク科) とタバコ (ナス科) での発生が知られているだけであったが、ウイルス類似配列がアブラナ科、マメ科植物、さらにバラ科の果樹などのゲノムからも見出された<sup>97)</sup>。これは、当該植物の祖先種に嘗てバリコサウイルスの祖先種が感染していたことを示唆し、現存するバリコサウイルスがより広範な植物種に存在することを想像させる。今後、宿主の核ゲノムに内在するモノネガウイルスや関連ウイルスの感染記録をさらに紐解くことで、OFV やバリコサウイルス含む (-) 鎖 RNA ウイルスの知られざる分子進化や宿主との闘ぎ合いの歴史に迫ることができると期待される。

### 謝辞

本総説で取り上げた OFV 並びに関連する研究成果は、鈴木信弘博士、玉田哲男博士、千葉壮太郎博士、Ida Bagus Andika 博士との共同研究として行われました。また研究を遂行するにあたり、前田孚憲博士、白子幸男博士、Adrian J. Gibbs 博士、井上成信博士には有益なご助言を、丸山和之氏、光畑興二氏、廣門知紗女史、中村玲子女史、野田瑞紀女史をはじめ関連諸氏に多くのご協力を頂きました。あわせて厚くお礼申し上げます。

### 引用文献

- 1) King AMQ, Adams MJ, Carstens EB, Lefkowitz EJ. 2011. Virus taxonomy. Ninth report of the international committee on taxonomy of viruses. Elsevier Academic Press, London, San Diego.
- 2) Hogenhout SA, Ammar ED, Whitfield AE, Redinbaugh MG. 2008. Insect vector interactions with persistently transmitted viruses. *Annu Rev Phytopathol* 46:327-359.
- 3) Hogenhout SA, Redinbaugh MG, Ammar ED. 2003. Plant and animal rhabdovirus host range: a bug's view. *Trends Microbiol* 11:264-271.
- 4) Dietzgen RG, Calisher CH, Kurath G, Kuzmin IV, Rodriguez LL, Stone DM, Tesh RB, Tordo N, Walker PJ, Wetzel T, Whitfield AE. 2011. Family *Rhabdoviridae*, p. 686-714. In King AMQ, Adams MJ, Carstens EB, Lefkowitz EJ (ed.), *In Virus Taxonomy: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Oxford: Elsevier Academic Press.
- 5) 西園 章, 山田 健. 2012. ラブドウイルス. *ウイルス* 62:183-196.
- 6) Jackson AO, Dietzgen RG, Goodin MM, Bragg JN, Deng M. 2005. Biology of plant rhabdoviruses. *Ann Rev Phytopathol* 43:623-660.
- 7) Kondo H, Maeda T, Shirako Y, Tamada T. 2006. Orchid fleck virus is a rhabdovirus with an unusual bipartite genome. *J Gen Virol* 87:2413-2421.
- 8) Kondo H, Maeda T, Tamada T. 2003. Orchid fleck virus: *Brevipalpus californicus* mite transmission, biological properties and genome structure. *Exp Appl Acarol* 30:215-223.
- 9) Chang MU, Doi Y, Yora K, Arai K. 1976. Morphology and intracellular appearance of orchid fleck virus. *Ann Phytopathol Soc Jpn* 42:156-167.
- 10) Peng DW, Zheng GH, Zheng ZZ, Tong QX, Ming YL. 2013. Orchid fleck virus: an unclassified bipartite, negative-sense RNA plant virus. *Arch Virol* 158:313-323.
- 11) Blanchfield AL, Mackenzie AM, Gibbs A, Kondo H, Tamada T, Wilson CR. 2001. Identification of *Orchid fleck virus* by reverse transcriptase-polymerase chain reaction and analysis of isolate relationships. *J Phytopathol* 149:713-718.
- 12) Kitajima EW, Kondo H, Mackenzie A, Rezende JAM, Glorla R, Gibbs A, Tamada T. 2001. Comparative cytopathology and immunocytochemistry of Japanese, Australian and Brazilian isolates of *Orchid fleck virus*. *J Gen Plant Pathol* 67:89-96.
- 13) Kondo H, Maeda T, Tamada T. 2009. Identification and characterization of structural proteins of orchid fleck virus. *Arch Virol* 154:37-45.
- 14) Kondo H, Maruyama K, Chiba S, Andika IB, Tamada T, Suzuki N. Transcriptional mapping of the messenger and leader RNAs of orchid fleck virus, a bisegmented negative-sense RNA virus. in preparation.
- 15) Tsai CW, Redinbaugh MG, Willie KJ, Reed S, Goodin M, Hogenhout SA. 2005. Complete genome sequence and in planta subcellular localization of maize fine streak virus proteins. *J Virol* 79:5304-5314.
- 16) Luo ZL, Fang RX. 1998. Structure analysis of the rice yellow stunt rhabdovirus glycoprotein gene and its mRNA. *Arch Virol* 143:2453-2459.
- 17) Bandyopadhyay A, Kopperud K, Anderson G, Martin K, Goodin M. 2010. An integrated protein localization and interaction map for *Potato yellow dwarf virus*, type species of the genus *Nucleorhabdovirus*. *Virology* 402:61-71.
- 18) Heim F, Lot H, Delecolle B, Bassler A, Krczal G, Wet-



- zel T. 2008. Complete nucleotide sequence of a putative new cytorhabdovirus infecting lettuce. *Arch Virol* 153:81-92.
- 19) Wetzels T, Dietzgen RG, Dale JL. 1994. Genomic organization of lettuce necrotic yellows rhabdovirus. *Virology* 200:401-412.
  - 20) Heaton LA, Hillman BI, Hunter BG, Zuidema D, Jackson AO. 1989. Physical map of the genome of sonchus yellow net virus, a plant rhabdovirus with 6 genes and conserved gene junction sequences. *Proc Natl Acad Sci USA* 86:8665-8668.
  - 21) Whelan SPJ, Barr JN, Wertz GW. 2000. Identification of a minimal size requirement for termination of vesicular stomatitis virus mRNA: Implications for the mechanism of transcription. *J Virol* 74:8268-8276.
  - 22) Barr JN, Whelan SPJ, Wertz GW. 1997. Role of the intergenic dinucleotide in vesicular stomatitis virus RNA transcription. *J Virol* 71:1794-1801.
  - 23) Schubert M, Keene JD, Herman RC, Lazzarini RA. 1980. Site on the vesicular stomatitis virus genome specifying polyadenylation and the end of the L gene mRNA. *J Virol* 34:550-559.
  - 24) Roy A, Mukherjee M, Mukhopadhyay S, Maity SS, Ghosh S, Chattopadhyay D. 2013. Characterization of the chandipura virus leader RNA-phosphoprotein interaction using single tryptophan mutants and its detection in viral infected cells. *Biochimie* 95:180-194.
  - 25) Colonna RJ, Banerjee AK. 1978. Complete nucleotide-sequence of leader RNA synthesized invitro by vesicular stomatitis-virus. *Cell* 15:93-101.
  - 26) Kurilla MG, Cabradilla CD, Holloway BP, Keene JD. 1984. Nucleotide-sequence and host La protein interactions of rabies virus leader RNA. *J Virol* 50:773-778.
  - 27) Conzelmann KK. 1998. Nonsegmented negative-strand RNA viruses: Genetics and manipulation of viral genomes. *Annu Rev Genet* 32:123-162.
  - 28) Wagner JDO, Choi TJ, Jackson AO. 1996. Extraction of nuclei from sonchus yellow net rhabdovirus-infected plants yields a polymerase that synthesizes viral mRNAs and polyadenylated plus-strand leader RNA. *J Virol* 70:468-477.
  - 29) Zuidema D, Heaton LA, Hanau R, Jackson AO. 1986. Detection and sequence of plus-strand leader RNA of sonchus yellow net virus, a plant rhabdovirus. *Proc Natl Acad Sci USA* 83:5019-5023.
  - 30) Wang Q, Chen X-Y, Luo Z-L, Fang R-X. 1999. Sequence analysis of leader and trailer regions of rice yellow stunt rhabdovirus and characterization of their in vivo transcripts. *Sci China C Life Sci* 42:50-56.
  - 31) Banerjee AK. 1987. Transcription and replication of rhabdoviruses. *Microbiol Rev* 51:66-87.
  - 32) Basak S, Mondal A, Polley S, Mukhopadhyay S, Chattopadhyay D. 2007. Reviewing chandipura: A vesiculovirus in human epidemics. *Biosci Rep* 27:275-298.
  - 33) Basak S, Raha T, Chattopadhyay D, Majumder A, Shaila MS, Chattopadhyay DJ. 2003. Leader RNA binding ability of Chandipura virus P protein is regulated by its phosphorylation status: a possible role in genome transcription-replication switch. *Virology* 307:372-385.
  - 34) Umbach JL, Yen HL, Poon LLM, Cullen BR. 2010. Influenza A virus expresses high levels of an unusual class of small viral leader RNAs in infected cells. *MBio* 1: e00204-10.
  - 35) Perez JT, Varble A, Sachidanandam R, Zlatev I, Manoharan M, Garcia-Sastre A, tenOever BR. 2010. Influenza A virus-generated small RNAs regulate the switch from transcription to replication. *Proc Natl Acad Sci USA* 107:11525-11530.
  - 36) Kondo H, Chiba S, Andika IB, Maruyama K, Tamada T, Suzuki N. 2013. Orchid fleck virus structural proteins N and P form intranuclear viroplasm-like structures in the absence of viral infection. *J Virol* 87:7423-7434.
  - 37) Redinbaugh MG, Hogenhout SA. 2005. Plant rhabdoviruses *Curr Top Microbiol Immunol*. 292:143-63.
  - 38) Hiraguri A, Hibino H, Hayashi T, Netsu O, Shimizu T, Uehara-Ichiki T, Omura T, Sasaki N, Nyunoya H, Sasaya T. 2012. The movement protein encoded by gene 3 of rice transitory yellowing virus is associated with virus particles. *J Gen Virol* 93:2290-2298.
  - 39) Huang YW, Geng YF, Ying XB, Chen XY, Fang RX. 2005. Identification of a movement protein of rice yellow stunt rhabdovirus. *J Virol* 79:2108-2114.
  - 40) Poch O, Blumberg BM, Bougueleret L, Tordo N. 1990. Sequence comparison of five polymerases (L-proteins) of unsegmented negative-strand RNA viruses: theoretical assignment of functional domains. *J Gen Virol* 71:1153-1162.
  - 41) Ogino T, Yadav SP, Banerjee AK. 2010. Histidine-mediated RNA transfer to GDP for unique mRNA capping by vesicular stomatitis virus RNA polymerase. *Proc Natl Acad Sci USA* 107:3463-3468.
  - 42) Ogino T, Banerjee AK. 2007. Unconventional mechanism of mRNA capping by the RNA-dependent RNA polymerase of vesicular stomatitis virus. *Mol Cell* 25:85-97.
  - 43) Horikami SM, Ferra FDe, Moyer SA. 1984. Characterization of the infections of permissive and nonpermissive cells by host range mutants of vesicular stomatitis virus defective in RNA methylation. *Virology* 138:1-15.
  - 44) Grdzlishvili VZ, Smallwood S, Tower D, Hall RL, Hunt DM, Moyer SA. 2005. A single amino acid change in the L-polymerase protein of vesicular stomatitis virus completely abolishes viral mRNA cap methylation. *J Virol* 79:7327-7337.
  - 45) Martin K, Kopperud K, Chakrabarty R, Banerjee R, Brooks R, Goodin MM. 2009. Transient expression in *Nicotiana benthamiana* fluorescent marker lines provides enhanced definition of protein localization, movement and interactions in planta. *Plant J* 59:150-162.
  - 46) Goodin MM, Austin J, Tobias R, Fujita M, Morales C, Jackson AO. 2001. Interactions and nuclear import of the N and P proteins of sonchus yellow net virus, a plant nucleorhabdovirus. *J Virol* 75:9393-9406.
  - 47) Anderson G, Wang R, Bandyopadhyay A, Goodin M.

2012. The nucleocapsid protein of *Potato yellow dwarf virus*: protein interactions and nuclear import mediated by a non-canonical nuclear localization signal. *Front Plant Sci* 3: 14. doi: 10.3389/fpls.2012.00014.
- 48) Ghosh D, Brooks RE, Wang RY, Lesnaw J, Goodin MM. 2008. Cloning and subcellular localization of the phosphoprotein and nucleocapsid proteins of *Potato yellow dwarf virus*, type species of the genus *Nucleorhabdovirus*. *Virus Res* 135:26-35.
- 49) Martin KM, Dietzgen RG, Wang RY, Goodin MM. 2012. Lettuce necrotic yellows cytorhabdovirus protein localization and interaction map, and comparison with nucleorhabdoviruses. *J Gen Virol* 93:906-914.
- 50) Zhang S, Chen L, Zhang G, Yan Q, Yang X, Ding B, Tang Q, Sun S, Hu Z, Chen M. 2013. An amino acid of human parainfluenza virus type 3 nucleoprotein is critical for template function and cytoplasmic inclusion body formation. *J Virol* in press. doi: 10.1128/JVI.01565-01513.
- 51) Chenik M, Chebli K, Gaudin Y, Blondel D. 1994. *In vivo* interaction of rabies virus phosphoprotein (P) and nucleoprotein (N): existence of two N-binding sites on P protein. *J Gen Virol* 75:2889-2896.
- 52) Davis NL, Arnheiter H, Wertz GW. 1986. Vesicular stomatitis virus N and NS proteins form multiple complexes. *J Virol* 59:751-754.
- 53) Martins CRF, Johnson JA, Lawrence DM, Choi TJ, Pisi AM, Tobin SL, Lapidus D, Wagner JDO, Ruzin S, McDonald K, Jackson AO. 1998. *Sonchus* yellow net rhabdovirus nuclear viroplasms contain polymerase-associated proteins. *J Virol* 72:5669-5679.
- 54) Lahaye X, Vidy A, Pomier C, Obiang L, Harper F, Gaudin Y, Blondel D. 2009. Functional characterization of Negri bodies (NBs) in rabies virus-infected cells: Evidence that NBs are sites of viral transcription and replication. *J Virol* 83:7948-7958.
- 55) Menager P, Roux P, Megret F, Bourgeois JP, Le Sourd AM, Danckaert A, Lafage M, Prehaud C, Lafon M. 2009. Toll-like receptor 3 (TLR3) plays a major role in the formation of rabies virus negri bodies. *Plos Pathog* 5: e1000315.
- 56) Lahaye X, Vidy A, Fouquet B, Blondel D. 2012. Hsp70 protein positively regulates rabies virus infection. *J Virol* 86:4743-4751.
- 57) Hoenen T, Shabman RS, Groseth A, Herwig A, Weber M, Schudt G, Dolnik O, Basler CF, Becker S, Feldmann H. 2012. Inclusion bodies are a site of ebolavirus replication. *J Virol* 86:11779-11788.
- 58) Heinrich BS, Cureton DK, Rahmeh AA, Whelan SPJ. 2010. Protein expression redirects vesicular stomatitis virus RNA synthesis to cytoplasmic inclusions. *Plos Pathog* 6: e1000958.
- 59) Cleveland SB, Davies J, McClure MA. 2011. A bioinformatics approach to the structure, function, and evolution of the nucleoprotein of the order *Mononegavirales*. *Plos One* 6: e19275.
- 60) Deng M, Bragg JN, Ruzin S, Schichnes D, King D, Goodin MM, Jackson AO. 2007. Role of the *sonchus* yellow net virus N protein in formation of nuclear viroplasms. *J Virol* 81:5362-5374.
- 61) Krichevsky A, Kozlovsky SV, Gafni Y, Citovsky V. 2006. Nuclear import and export of plant virus proteins and genomes. *Mol Plant Pathol* 7:131-146.
- 62) Kanneganti TD, Bai XD, Tsai CW, Win J, Meulia T, Goodin M, Kamoun S, Hogenhout SA. 2007. A functional genetic assay for nuclear trafficking in plants. *Plant J* 50:149-158.
- 63) Cros JF, Palese P. 2003. Trafficking of viral genomic RNA into and out of the nucleus: influenza, Thogoto and Borna disease viruses. *Virus Res* 95:3-12.
- 64) Boulo S, Akarsu H, Ruigrok RWH, Baudin F. 2007. Nuclear traffic of influenza virus proteins and ribonucleoprotein complexes. *Virus Res* 124:12-21.
- 65) Vanbeek NAM, Lohuis D, Dijkstra J, Peters D. 1985. Morphogenesis of *sonchus* yellow net virus in cowpea protoplasts. *J Ultrastruct Res* 90:294-303.
- 66) Newcomb WW, Brown JC. 1981. Role of the vesicular stomatitis virus matrix protein in maintaining the viral nucleocapsid in the condensed form found in native virions. *J Virol* 39:295-299.
- 67) Goodin M, Yelton S, Ghosh D, Mathews S, Lesnaw J. 2005. Live-cell imaging of rhabdovirus-induced morphological changes in plant nuclear membranes. *Mol Plant-Microbe Interact* 18:703-709.
- 68) Goodin MM, Chakrabarty R, Yelton S, Martin K, Clark A, Brooks R. 2007. Membrane and protein dynamics in live plant nuclei infected with *Sonchus* yellow net virus, a plant-adapted rhabdovirus. *J Gen Virol* 88, 1810-1820.
- 69) Ge P, Tsao J, Schein S, Green TJ, Luo M, Zhou ZH. 2010. Cryo-EM model of the bullet-shaped vesicular stomatitis virus. *Science* 327:689-693.
- 70) Wunner WH, Calisher CH, Dietzgen RG, Jackson AO, Kitajima EW, Lafon M, Leong JC, Nichol ST, Peters D, Smith JS, Walker PJ. 1995. Family *Rhabdoviridae*, p. 275-288. *In* Murphy FA, Fauquet, C. M., Bishop, D. H. L., Ghabrial, S. A., Jarvis, A. W., Martelli, G. P., Mayo, M. A. and Summers M. D. (ed.), *Virus Taxonomy, Sixth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Springer., Vienna.
- 71) Adams MJ, Christian P, Ghabrial SA, Knowles NJ, Lavigne R. 2011. The Unassigned Viruses, p. 1197-1207. *In* King AMQ, Lefkowitz E, Adams MJ, Carstens EB (ed.), *Virus Taxonomy: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. Elsevier, San Diego, CA.
- 72) Dietzgen RG, Kuhn JH, Clawson AN, Freitas-Astúa J, Goodin MM, Kitajima EW, Kondo H, Wetzel T, A.E. W. 2013. *Dichoravirus*: a proposed new genus for *Brevipalpus* mite-transmitted, nuclear, bacilliform, bipartite, negative-strand RNA plant viruses. *Arch Virol* in press. <http://10.1007/s00705-013-1834-0>
- 73) Kitajima EW, Chagas CM, Rodrigues JCV. 2003. *Brevipalpus*-transmitted plant virus and virus-like diseases: cytopathology and some recent cases. *Exp Appl Acarol* 30:135-160.
- 74) Kubo KS, Freitas-Astua J, Machado MA, Kitajima EW. 2009. Orchid fleck symptoms may be caused naturally

- by two different viruses transmitted by *Brevipalpus*. J Gen Plant Pathol 75:250-255.
- 75) Locali-Fabris EC, Freitas-Astua J, Souza AA, Takita MA, Astua-Monge G, Antonioli-Luizon R, Rodrigues V, Targon M, Machado MA. 2006. Complete nucleotide sequence, genomic organization and phylogenetic analysis of Citrus leprosis virus cytoplasmic type. J Gen Virol 87:2721-2729.
  - 76) Bastianel M, Novelli VM, Kitajima EW, Kubo KS, Basanezi RB, Machado MA, Freitas-Astua J. 2010. Citrus leprosis: centennial of an unusual mite-virus pathosystem. Plant Dis 94:284-292.
  - 77) Kitajima EW, Kubo KS, Ferreira PDO, de Alcantara BK, Boari AJ, Gomes RT, Freitas-Astua J, Rezende JAM, de Moraes GJ, Salaroli RB. 2008. Chlorotic spots on *Clerodendrum*, a disease caused by a nuclear type of *Brevipalpus* (Acari : Tenuipalpidae) transmitted virus. Sci Agric 65:36-49.
  - 78) Kitajima EW, Müller GW, Costa AS, Yuki W. 1972. Short, rod-like particles associated with Citrus leprosis. Virology 50:254-258.
  - 79) Rodrigues JCV, Childers CC. 2013. *Brevipalpus* mites (Acari: Tenuipalpidae): vectors of invasive, non-systemic cytoplasmic and nuclear viruses in plants. Exp Appl Acarol 59:165-175.
  - 80) Chagas CM, Kitajima EW, Rodrigues JCV. 2003. Coffee ringspot virus vectored by *Brevipalpus phoenicis* (Acari : Tenuipalpidae) in coffee. Exp Appl Acarol 30:203-213.
  - 81) Gowanlock DH, Dietzgen RG. 1995. Small rhabdovirus-like particles in violet (*Viola* spp). Aust Plant Pathol 24:215-216.
  - 82) Roy A, Stone A, Otero-Colina G, Wei G, Choudhary N, Achor D, Shaoe J, Levyf L, Mark K, Nakhlad MK, Hollingsworth CR, Hartunge JS, Schneiderb WL, Brlansky RH. 2013. Genome assembly of citrus leprosis virus nuclear type reveals a close association with orchid fleck virus. Genome Announc 1:e00519-00513.
  - 83) Kitajima EW, Chagas CM, Harakava R, Calegario RF, Freitas-Astua J, Rodrigues JCV, Childers CC. 2011. Citrus leprosis in Florida, USA, appears to have been caused by the nuclear type of citrus leprosis virus (CiLV-N). Virus Res 161:1-5.
  - 84) Kormelink R, Garcia ML, Goodin M, Sasaya T, Haenni AL. 2011. Negative-strand RNA viruses: The plant-infecting counterparts. Virus Res 162:184-202.
  - 85) Sasaya T, Ishikawa K, Koganezawa H. 2002. The nucleotide sequence of RNA1 of *Lettuce big-vein virus*, genus *Varicosavirus*, reveals its relation to nonsegmented negative-strand RNA viruses. Virology 297:289-297.
  - 86) Sasaya T, Kusaba S, Ishikawa K, Koganezawa H. 2004. Nucleotide sequence of RNA2 of *Lettuce big-vein virus* and evidence for a possible transcription termination/initiation strategy similar to that of rhabdoviruses. J Gen Virol 85:2709-2717.
  - 87) Sasaya T, Ishikawa K, Koganezawa H. 2001. Nucleotide sequence of the coat protein gene of *Lettuce big-vein virus*. J Gen Virol 82:1509-1515.
  - 88) Kuhn JH, Bekal S, Cai Y, Clawson AN, Domier LL, Herrel M, Jahrling PB, Kondo H, Lambert KN, Mihindukulasuriya KA, Nowotny N, Radoshitzky SR, Schneider U, Staeheli P, Suzuki N, Tesh RB, Wang D, Wang L-F, Dietzgen RG. 2013. *Nyamiviridae*: proposal for a new family in the order *Mononegavirales*. Arch Virol 158:2209-2226.
  - 89) Takeda M, Nakatsu Y, Ohno S, Seki F, Tahara M, Hashiguchi T, Yanagi Y. 2006. Generation of measles virus with a segmented RNA genome. J Virol 80:4242-4248.
  - 90) Gao Q, Park MS, Palese P. 2008. Expression of transgenes from Newcastle disease virus with a segmented genome. J Virol 82:2692-2698.
  - 91) Ganesan U, Bragg JN, Deng M, Marr S, Lee MY, Qian S, Shi M, Kappel J, Peters C, Lee Y, Goodin MM, Dietzgen RG, Li Z, Jackson AO. 2013. Construction of a *Sonchus yellow net virus* minireplicon: A step toward reverse genetic analysis of plant negative-strand RNA viruses. J Virol 87:10598-10612.
  - 92) Horie M, Honda T, Suzuki Y, Kobayashi Y, Daito T, Oshida T, Ikuta K, Jern P, Gojobori T, Coffin JM, Tomonaga K. 2010. Endogenous non-retroviral RNA virus elements in mammalian genomes. Nature 463:84-90.
  - 93) Ballinger MJ, Bruenn JA, Taylor DJ. 2012. Phylogeny, integration and expression of sigma virus-like genes in *Drosophila*. Mol Phylogenet Evol 65:251-258.
  - 94) Fort P, Albertini A, Van-Hua A, Berthomieu A, Roche S, Delsuc F, Pasteur N, Capy P, Gaudin Y, Weill M. 2012. Fossil rhabdovirus sequences integrated into arthropod genomes: ontogeny, evolution, and potential functionality. Mol Biol Evol 29:381-390.
  - 95) Katzourakis A, Gifford RJ. 2010. Endogenous viral elements in animal genomes. Plos Genetics 6: e1001191.
  - 96) Belyi VA, Levine AJ, Skalka AM. 2010. Unexpected inheritance: Multiple integrations of ancient bornavirus and ebolavirus/marburgvirus sequences in vertebrate genomes. Plos Pathog 6:e1001030.
  - 97) Chiba S, Kondo H, Tani A, Saisho D, Sakamoto W, Kanematsu S, Suzuki N. 2011. Widespread endogenization of genome sequences of non-retroviral RNA viruses into plant genomes. Plos Pathog 7:e1002146.
  - 98) Liu HQ, Fu YP, Jiang DH, Li GQ, Xie JT, Cheng JS, Peng YL, Ghabrial SA, Yi XH. 2010. Widespread horizontal gene transfer from double-stranded RNA viruses to eukaryotic nuclear genomes. J Virol 84:11876-11887.
  - 99) Kondo H, Hirano S, Chiba S, Andika IB, Hirai M, Maeda T, Tamada T. 2013. Characterization of burdock mottle virus, a novel member of the genus *Benyvirus*, and the identification of benyvirus-related sequences in the plant and insect genomes Virus Res 177:75-86.
  - 100) Kondo H, Chiba S, Toyoda K, Suzuki N. 2013. Evidence for negative-strand RNA virus infection in fungi. Virology 435:201-209.



## Plant rhabdoviruses with bipartite genomes

**Hideki KONDO**

Institute of Plant Science and Resources (IPSR), Okayama University, Kurashiki, 710-0046, Japan.  
hkondo@rib.okayama-u.ac.jp

Members of the family *Rhabdoviridae* (order *Mononegavirales*) have a broad range of hosts, including humans, livestock, fish, plants, and invertebrates. They have a nonsegmented negative-sense RNA as the genome. Orchid fleck virus (OFV) is distributed world-wide on several orchid plants and transmitted by the false spider mite, *Brevipalpus californicus*. Based on its virions morphology and cytopathic effects in the infected cells, OFV was tentatively placed as unassigned plant rhabdoviruses in the sixth ICTV Report. However, the molecular studies revealed that OFV has a unique two-segmented negative-sense RNA genome that resembles monopartite genomes of plant nucleorhabdoviruses. In this review, we describe the current knowledge on the genome structure and gene expression strategy of OFV, the possible mechanism of nuclear viroplasm formation, and the taxonomical consideration of the virus as well.