

パッションフルーツ東アジアウイルスの  
分子生態学的研究

A molecular ecological study on  
*East Asian Passiflora virus*

鹿児島大学大学院連合農学研究科  
農水圏資源環境科学専攻

福元 智博

2012

## 目次

第 I 章 諸論 .....	1
第 II 章 材料および方法.....	8
1 EAPV-Ibusuki 株の全塩基配列決定 .....	8
1-1 供試ウイルス .....	8
1-2 RNA 抽出 .....	8
1-3 プライマーの設計.....	9
1-4 RT-PCR .....	9
1-5 Thermal Asymmetric Interlaced (TAIL)-PCR .....	9
1-6 5'-RACE .....	11
1-7 クローニング .....	11
1-8 シークエンシング .....	11
1-9 分子系統解析.....	12
2 南日本における EAPV の発生調査 .....	12
2-1 供試植物.....	12
2-2 系統特異的プライマーの設計 .....	12
2-3 RT-PCR .....	15
3 奄美大島における EAPV 集団の遺伝的構成と多様性調査 .....	15
3-1 供試ウイルス.....	15
3-2 RT-PCR .....	15
3-3 シークエンシング .....	18
3-4 分子系統解析および組み換え部位の解析 .....	20
3-5 遺伝的多様性と選択圧の解析 .....	20
3-6 中立平衡解析 .....	21
4 EAPV-YW 株の感染性 cDNA クローンの構築 .....	21

4-1	供試ウイルス.....	21
4-2	RNA 抽出、RT-PCR およびシーケンシング .....	22
4-3	cDNA クローンの構築.....	22
4-3-1	p35SYW $\Delta$ 29 の構築 .....	22
4-3-2	p35SYW の構築 .....	26
4-4	接種およびウイルスの検出.....	28
4-5	電子顕微鏡観察 .....	29
第Ⅲ章 結果 .....		30
1	EAPV-Ibusuki 株の全塩基配列決定および分子系統学的解析.....	30
1-1	EAPV-Ibusuki 株の全塩基配列.....	30
1-2	EAPV-Amami-O-shima 株および BCMV サブグループウイルスとの比較.....	30
1-2-1	ゲノム構成および相同性 .....	30
1-2-2	ポティウイルスモチーフ .....	34
1-2-3	タンパク質切断部位 .....	34
1-3	分子系統解析.....	38
1-4	小括 .....	41
2	南日本における EAPV の分布.....	44
2-1	RT-PCR による系統特異的検出.....	44
2-2	二系統の分布.....	44
2-3	小括.....	47
3	奄美大島における EAPV 集団の遺伝的構成と多様性調査 .....	48
3-1	分離株間の配列の相同性.....	48
3-2	遺伝的多様性と選択圧.....	49
3-3	分子系統樹および組み換え部位の解析.....	51

3-4	中立平衡解析 .....	54
3-5	小括.....	56
4	EAPV-YW 株の感染性 cDNA クローン の構築.....	59
4-1	YW 株の全塩基配列.....	59
4-2	cDNA クローン の構築.....	61
4-3	接種試験.....	62
4-3-1	cDNA クローン の感染性.....	62
4-3-2	子孫ウイルスの <i>P. foetida</i> に対する感染性 .....	63
4-3-3	p35SYW/29 由来ウイルスの <i>N. benthamiana</i> に対する感染性.....	68
4-4	小括.....	70
第IV章	総合考察 .....	74
	引用文献 .....	80
	摘要 .....	96
	謝辞 .....	98
	Summary .....	99

## 第 I 章 諸論

パッションフルーツ (*Passiflora edulis* Sims ; クダモノトケイ) は、500 種以上にのぼるトケイソウ科トケイソウ属植物の一種であり、つる性、多年生の常緑果樹である (Morton 1987)。果実の色により紫系 (*P. edulis*) と黄色系 (*P. edulis* f. *flavicarpa*) に分類され、前者は甘みが強く生食用としての需要が高く、後者は果汁が多いことから主に加工用原料として栽培されている。原産地は南アメリカとされ、ブラジルが世界最大の生産国として世界生産量のおよそ 70% を担っているが (Ferreira et al., 2010)、熱帯、亜熱帯地域を中心とする広い地域に分布しており、インド、ニュージーランド、オーストラリア、ハワイ、インドネシア、スリランカ、日本、台湾などでも商業的に栽培されている。日本への渡来は、1920 年代に鹿児島県指宿市へ持ち込まれたのが最初とされ、1950 年代後半からは栽培の中心が南西諸島に移動し、大規模な商業栽培は 1980 年代以降、鹿児島県奄美大島や沖縄本島で盛んになった (Iwai et al., 1996)。現在、国内におけるパッションフルーツの生産は、鹿児島県が栽培面積・生産量ともに国内最大であるが、加温ハウスの普及に伴い熊本県、岐阜県、東京都、栃木県、福島県など各地で栽培が盛んになりつつある。

Passionfruit woodiness disease (PWD) は、葉のモザイクや萎縮に加え果実の木質化を伴い、生産性を著しく低下させることから、パッションフルーツ生産において最も重要な病害の 1 つとされている (Nascimento et al., 2006)。これまでに、PWD の病原体として 4 種のポティウイルス、*Passionfruit woodiness virus* (PWV; McKnight, 1953)、*Cowpea aphid-borne mosaic virus* (CABMV; Nascimento et al., 2006)、*East Asian Passiflora virus* (EAPV; Iwai et al., 2006a) および *Ugandan Passiflora virus* (Ochwo-Ssemakula et al., 2012) が

報告されている。これらウイルスはそれぞれオーストラリア、南アメリカ、東アジアおよびウガンダでのみ発生が確認されており、同地域における 2 種以上の発生は報告されていない。

日本では、1986 年に鹿児島県奄美大島で栽培されるパッションフルーツ交配種 (*P. edulis* × *P. edulis* f. *flavicarpa*) において初めて PWD の発生が報告された。電子顕微鏡観察により長さ約 790 nm のひも状粒子の存在が認められ、また血清学的診断結果から本病原体は PWV の一系統と同定され PWV-奄美大島株と命名された (Iwai et al., 1996)。また、1997 年には、鹿児島大学指宿植物試験場内で栽培される *P. edulis* において葉のモザイクおよび萎縮を示すものの、果実に対しては表皮の斑紋のみを生じる株が発見され、本株から分離されたウイルスは PWV-奄美大島株と血清学的関係を示し、粒子形態も同様であったことから PWV-指宿株と命名された。しかし、その後これらの株のコートプロテイン (CP) コード領域の塩基配列が決定され、相同性の比較および分子系統解析により奄美大島株と指宿株はいずれも他の PWD の原因ウイルスと同様に bean common mosaic virus (BCMV) サブグループに属すものの、これら 2 株および PWV-台湾株は PWV や CABMV とは異なる新たな種を構成することが明らかとなり、EAPV と再命名された (Iwai et al., 2006b)。また、Iwai et al. (2006b) は、奄美大島株と指宿株ではパッションフルーツ果実に対する病徴および宿主範囲が異なることを明らかにし、それぞれを基準株とした 2 系統を提案した。つまり、EAPV 分離株を果実の奇形・木質化を生じる AO 系統と、これらの症状を生じない IB 系統に分類した (Fig. 1; Table 1)。さらにその後、奄美大島株の全塩基配列が決定され、ポリプロテインコード領域のアミノ酸配列を用いた分子系統解析によっても BCMV サブグループに属す独立した種であることが示された (Iwai et al., 2006b)。近年では、マレーシア (Abdullah et al., 2009)

およびフィリピン(宮田ら, 2012)においても EAPV の発生が確認されている。

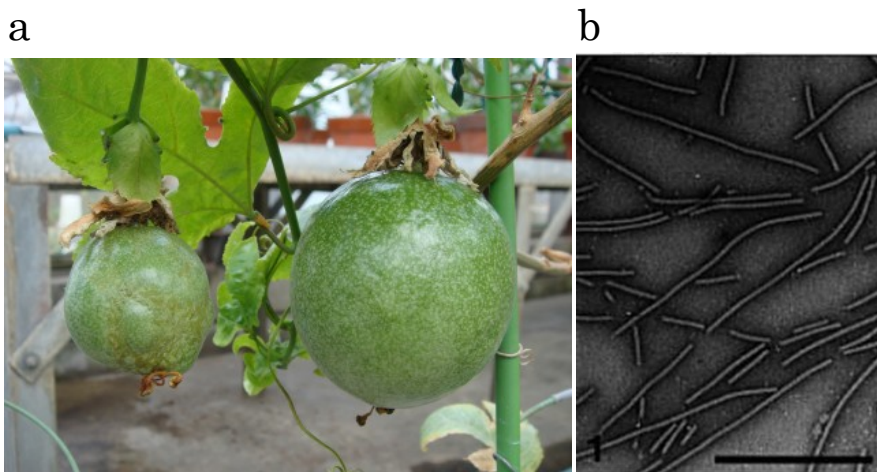
シーケンシング技術発達以前、ポティウイルス属内の種や系統の判別は、主に宿主範囲、病徴および血清学的性状の違いにより行われてきた。しかし、近年多くのウイルスについて CP コード領域あるいは全塩基配列が決定され、それらを用いた相同性の比較や分子系統解析が行われた結果、ポティウイルスの分類に関する研究は飛躍的に進歩した(Shukla and Ward, 1988; Frenkel et al., 1989; McKern et al., 1992; Monger et al., 2001; Desvieux and Lecoq, 2004; Ali et al., 2006)。そうした中、Adams et al. (2005) は、ポティウイルス科に属する 187 株の全塩基配列および 1220 株の CP コード領域の塩基配列を用いた解析により、ポリプロテインコード領域、非翻訳領域(UTR) および各タンパク質コード領域それぞれについてポティウイルス科内の属および種の分類基準となる相同性の値を提示しているが、その一方で、ウイルスゲノムの一部の配列のみを用いた分子分類の危険性についても言及している。そこで本研究ではまず、生物学的性状が奄美大島株と大きく異なるにもかかわらず、これまでにゲノムの一部の配列しか明らかにされていなかった指宿株について、その全塩基配列を決定し奄美大島株の配列と比較することで、系統間の分子レベルでの違いをより詳細に調査するとともに、分子系統解析により両分離株の種内および属内における系統発生的位置を明らかにした。また、1986 年の初発生以来、EAPV の被害は鹿児島県奄美大島において大きな問題となってきたが(岩井ら, 1997; 尾松ら, 2004)、近年のパッションフルーツ生産の拡大に伴い、EAPV の分布域もまた拡大することが懸念された。そこで、AO と IB それぞれの系統に対する特異的プライマーを設計し、鹿児島県を中心とした南日本での EAPV の発生状況を 2005 年から 2010 年にかけて RT-PCR により調査し、系統間で分布域に明確な違いがあることも明らかにした。さらに、この分布調査の際に採集した奄

美大島由来 EAPV 分離株について、その CP およびポリプロテインコード領域の塩基配列を決定し、集団遺伝学および地理系統学の観点から解析を行うことで、EAPV 集団の遺伝構造を調査した。

一方、EAPV の系統間における病徴や宿主範囲といった表現型の違いに関与するゲノム配列あるいはタンパク質について、分子生物学的手法を用いた直接的な研究は全く報告されていない。しかし、他種ポテivirusにおいては、こうした種内における表現型の違いに対して、ウイルスの完全長 cDNA クローンをを用いた研究が近年盛んに行われ、その結果ウイルスタンパク質の機能やウイルス-植物間の相互作用に関する多くの知見が得られている (Rao, 1999 ; Revers et al., 1999; Nishiguchi and Kobayashi, 2011)。Suehiro et al. (2004) は、宿主範囲の異なる *Turnip mosaic virus* (TuMV) 分離株間の組換えウイルスを作製することにより、P3 コード領域がウイルスの長距離移行に関与し、宿主適応性および病徴発現に影響を与えることを示した。また、*Zucchini yellow mosaic virus* (ZYMV)、*Potato virus Y* (PVY)、*Papaya ring spot virus* (PRSV)、*Tobacco etch virus* (TEV)、*Clover yellow vein virus* (CIYVV) など多くのポテivirus種においては、HC-Pro コード領域が病原性に関与することが示されており (Tribodet et al., 2005; Chiang et al., 2007; Lin et al., 2007; Shibolet et al., 2007; Torres-Barcelo et al., 2008; Yambao et al., 2008)、本タンパク質コード領域がポテivirus属内で共通した病原性因子である可能性が示唆されている。しかし、その一方で、Krause-Sakate et al. (2005) は *Lettuce mosaic virus* の P1 および CI コード領域が、特定のレタス品種に対する致死性の萎凋症状の誘導に関与することを示すとともに、その誘導がタンパク質ではなく RNA の二次構造に依存する可能性を示唆した。また、Spetz and Valkonen (2004) は、*Potato virus A* の 6K2 タンパク質が長距離移行と病徴発現それぞれに独立



に關与するが、その様式は宿主植物によって異なることを明らかにした。*Soybean mosaic virus* (SMV) においては、ダイズの *Rsv1* を介した抵抗性の打破に HC-Pro および P3 コード領域が關与することが明らかにされたが (Eggenberger et al., 2008; Hajimorad et al., 2008, 2011; Wen et al., 2011)、激しい病徴の誘導および *Rsv3* を介した抵抗性の打破に対しては CI コード領域が關与することが報告された (Zhang et al., 2009)。さらに、*Plum pox virus* (PPV) においては、宿主適応性に關与するアミノ酸残基がゲノム内の複数領域に分布することが示されている (Salvador et al., 2008)。したがって、病徴や宿主範囲といった形質の発現に關与するタンパク質、ゲノム領域およびそれらの作用機構は複数存在し、ウイルス種間ではもちろんのこと、種内においても宿主に対応して多様であると考えられる。そこで、本研究では、EAPV においてもこうした分子生物学的手法を用いてウイルス遺伝子の機能解析を行うための基礎として、AO 系統に属す EAPV-YW 株の感染性 cDNA クローンの構築にも取り組み、その過程において EAPV の 5'UTR が *Nicotiana benthamiana* に対する感染性に關与する可能性を示した。なお、結果の一部はすでに報告しているが (Fukumoto et al., 2012a, b)、全体をまとめて本論文とした。



**Fig. 1** (a) Differences of symptom on fruit between the *East Asian Passiflora virus* (EAPV) AO strain and the IB strain in passionfruit hybrid cultivar (*Passiflora edulis* × *P. edulis* f. *flavicarpa*). The AO strain causes fruit malformation and woodiness (left), while the IB strain only causes mottling (right). (b) Electron micrograph of purified particles of EAPV. Scale bar: 500 nm.

**Table 1** Reactions of test plants to two strains (AO and IB) of *East Asian Passiflora virus*

Host tested	Host leaf responses to inoculation	
	IB	AO
<i>Passiflora maliformis</i>	lat/M <sup>a</sup>	lat/M
<i>Passiflora edulis</i> (Purple passionfruit)	M, LC	M, R
<i>P.eduris</i> × <i>P.edulis</i> f. <i>flavicarpa</i> (Summer Queen)	M, LC	M, R
<i>Passiflora quadrangularis</i>	M	M
<i>Passiflora incarnata</i>	Mo,(lat)	—
<i>Passiflora suberosa</i>	—/—	—/—
<i>Phaseolus vulgaris</i>		
cvs. Rico 23 and Rosinha	LL/VN, R	LL/VN, R
cvs. Pinto 111 and Sujinashi Edogawa	LL/—	LL/—
cv. Carnaval and 2 cultivars	LL/—	—
cv. Master Piece and 3 cultivars	—	LL/—
cv. Top Crop and 3 cultivars	—	Lat
cv. Romano	LL/—	Lat
<i>Solanum melongena</i>		
cv. Kurume Onaga	—/—	lat/—
<i>Chenopodium amaranticolor</i>	—/—	LL/—
<i>Chenopodium quinoa</i>	—/—	LL/—

Modified from Iwai et al. (2006a).

<sup>a</sup> Inoculated leaves/upper leaves. Symbols: lat, latent infection; M, mosaic; LC, leaf curl; R, rugose; Mo, mottle; LL, local region; VN, vein necrosis; —, no infections.

## 第Ⅱ章 材料および方法

### 1 EAPV-指宿株の全塩基配列決定

#### 1-1 供試ウイルス

指宿株は、葉のモザイクおよび果実にわずかな斑紋を示すムラサキトケイソウ (*P. edulis*) から分離されたもの (Iwai et al., 2006a) を使用した。分離株は 18-36°C の温室内で挿し木または接木により維持した。

#### 1-2 RNA 抽出

まず、Dellaporta et al. (1983) の方法を一部改変し、指宿株に感染したパッションフルーツ葉 0.2 g から全核酸を抽出した。次に、抽出した全核酸に 10 mg のセルロースパウダー (CF-11) および 35% のエタノールを含む STE (0.1 M NaCl, 0.05 M Tris-HCl, 1 mM EDTA) 400  $\mu$ l を加え、懸濁後 15,000 rpm、4°C で 2 分間遠心分離した。さらに、得られたペレットに STE 400  $\mu$ l を加え懸濁し、15,000 rpm、4°C で 1 分間遠心分離した後、上清を新たなチューブへ移しエタノール沈殿を行った。その後、15,000 rpm、4°C で 10 分間遠心分離を行い、得られたペレットを真空乾燥後、ジエチルピロカーボネート処理水 20  $\mu$ l に溶解し、逆転写 (RT) 反応の鋳型として使用した。

### 1-3 プライマーの設計

PCR に用いたプライマーは、EAPV-奄美大島株および BCMV サブグループに属するポティウイルスの全ゲノム配列のアライメント結果に基づき設計した (Table 2)。

### 1-4 RT-PCR

一本鎖 cDNA は、指宿株感染葉より抽出した全 RNA を鋳型とし、ReverTra Ace (TOYOBO) と Oligo (dT) またはシーケンシング結果に基づいて設計した指宿株に特異的プライマーを用いて、42°C、20 分間の反応条件で合成した後、94°C で 5 分間逆転写酵素の失活を行った。

PCR には EX Taq polymerase (TaKaRa) を用い、変性 94°C、2 分を 1 サイクル、変性 94°C、30 秒、アニーリング 54°C、30 秒、伸長 72°C、2 分のセットを 30 サイクル、伸長 72°C、10 分を 1 サイクルの温度条件で反応を行った。

### 1-5 Thermal Asymmetric Interlaced (TAIL)-PCR

TAIL-PCR は Liu and Whittier (1995) の方法を一部改良した方法で行った。シーケンシングの結果に基づき設計した特異的アンチセンスプライマーと任意プライマーを用いて 1 回目の PCR を行った。この反応液を鋳型とし、1 回目と同じ任意プライマーと特異的ネステッドプライマーを用いて 2 回目の PCR を行った。

**Table 2** RT-PCR primers for genome amplification of the *East Asian Passiflora virus* Ibusuki isolate

Fragment	Primer	Sequence 5'-3'
5'UTR - P1	IB-S2-1 <sup>a</sup>	ACCAGGAACTGAACCTGG
	IB-S2-2 <sup>a</sup>	ATGCTTGCACTGTTGTGC
	IB-A2-1 <sup>a</sup>	TGCACTGTTTCACGGACC
	IB-A2-2 <sup>a</sup>	AAAGCTGACGGTCGTACC
	IB-RACE-RT2 <sup>a</sup>	AAACCGCTATCACCGCAC
P1 - HC-Pro	AD1 <sup>b</sup>	NGTCGASWGANAWGAA
	IB-A1 <sup>b</sup>	TTGGGTCCCCAGATGAAC
	IB-TAIL <sup>b</sup>	TTGCTCAACTTCTCCGCC
P1 - P3	T28	GCGCTTGATAAAGTCCTCCG
	T25	GCACCGATGGTGAAATCATAACC
HC-Pro - P3	T6	GAGCTHAAGAGTCCDACDAAG
	T53	CATGCTTAGTGAACGATGCC
P3 - CI	T9	TGGCGCGCDTTAAGCTKGTTGGAA
	T23	CCACTGTCTATTCCACCATTC
P3 - VPg	T32	GCTTACAATTGACTTTGATCTT
	T65	ATCCGTATGTCAACTCTGGGA
VPg - CP	F14	CAACMAYCATCTGAAATGGC
	T37	CCAAACTGGCGTTCTTGTC
	T39	CACAGCAACCTTCCGTATGCTC

D = A, G or T; H = A, C or T; K = G or T; M = A or C; N = A, C, G or T; S = G or T; W = A or T; Y = C or T.

<sup>a</sup> Primers for 5'-RACE.

<sup>b</sup> Primers for TAIL-PCR.

## 1-6 5'-RACE

5' 末端の cDNA 合成には、5'-Full RACE Core Set (TaKaRa) を用い、付属のプロトコールにしたがって反応を行った。特異的プライマーは、TAIL-PCR により得られた増副産物のシーケンシング結果に基づき設計した (Table 2)。

## 1-7 クローニング

種々の PCR により得られた増幅産物は、1%アガロースゲル電気泳動により分画後、目的とする分子量の DNA を切り出し、QIAquick Gel Extraction kit (Qiagen) を用いて精製した。精製した DNA は、pT7Blue Vector (Novagen) へ組み込んだ。分子量が大きく、全長をシーケンスできない DNA については、pT7Blue Vector へのクローニング後、適当な制限酵素を用いて pBluescript II SK (+) (Stratagene) へサブクローニングした。

## 1-8 シーケンシング

クローニングした DNA は、Big Dye Terminator version 3.1 Cycle Sequencing Ready Reaction DNA sequencing Kit (Applied Biosystems) を用いてシーケンス反応後、ABI Prism 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) により塩基配列を決定した。得られた塩基配列の解析には GENETYX Network ver. 8.2.1 (Genetyx Corp.) を用いた。

## 1-9 分子系統解析

決定した塩基配列および推定されるアミノ酸配列は、DDBJ/EMBL/GenBank データベースに報告されている代表的ポティウイルス種 (Table 3) の配列とともに、ClustalX2.0.5 (Larkin et al., 2007) を用いてアライメントを行った。作製したアライメントは、Sea View (Galtier et al., 1996) を用いて編集した。近隣結合法系統樹の作製には ClustalX2.0.5 を用い、NJ plot (Perriere and Gouy, 1996) により表示した。

## 2 南日本における EAPV の発生調査

### 2-1 供試植物

南日本における EAPV の分布は、2005 年から 2010 年にかけて鹿児島県本土および南西諸島を中心に調査した。2005 年には 14 地域、2007 年には 2 地域、2010 年には 12 地域からパッションフルーツの葉を採集した。また、2009 年には沖縄本島の 3 地域および小笠原諸島の 8 地域からも葉を採集した (Fig. 2)。

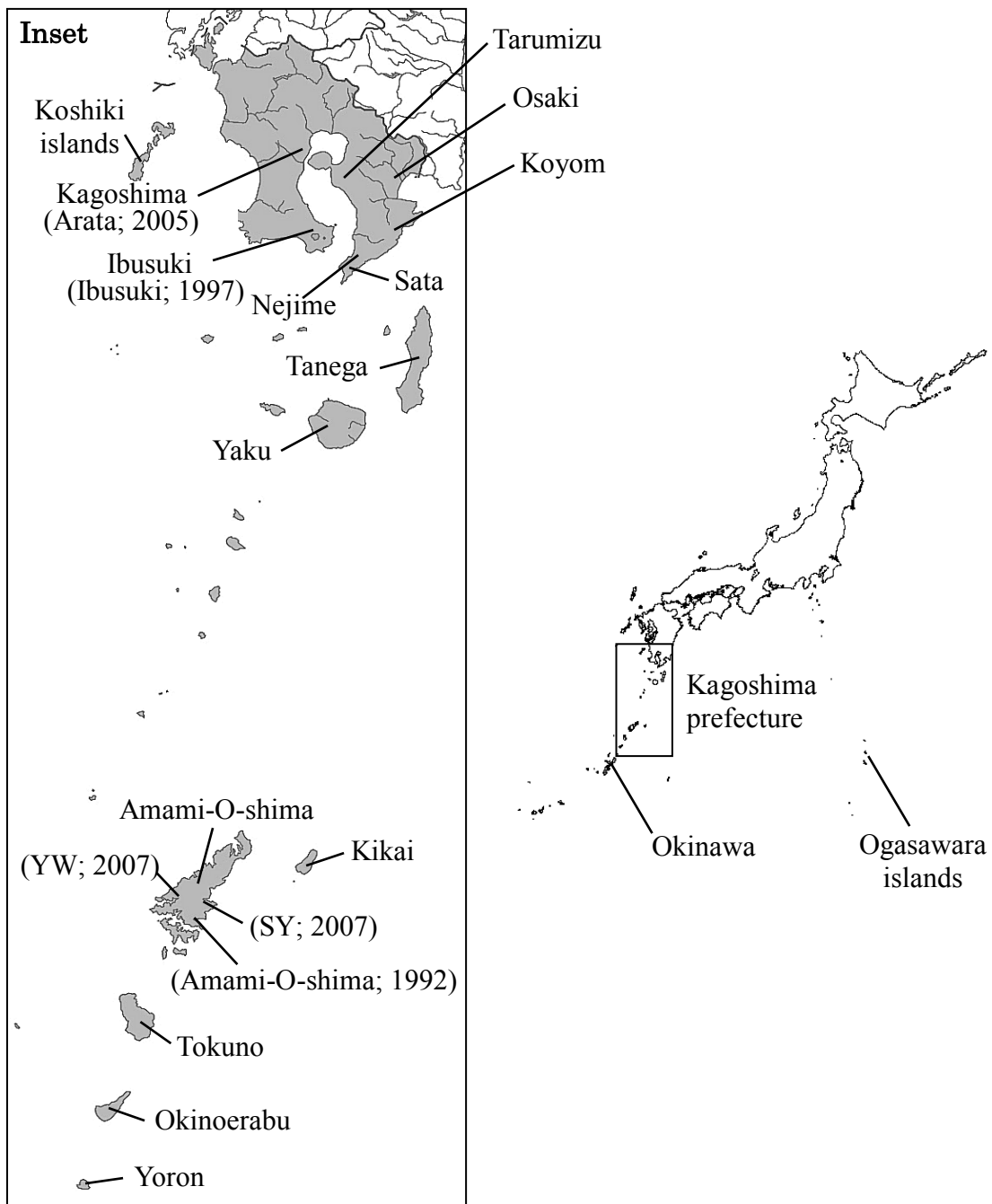
### 2-2 系統特異的プライマーの設計

2 系統の EAPV を区別するためのプライマーは、それぞれの系統の基準株である奄美大島株および指宿株の配列を基に設計した。



**Table 3** Potyvirus sequences used for constructing phylogenetic trees

Abbreviation	Species	Accession number
BCMNV	<i>Bean common mosaic necrosis virus</i>	U19287
BCMV	<i>Bean common mosaic virus</i>	AJ312437
BYMV	<i>Bean yellow mosaic virus</i>	AY192568
BtMV	<i>Beet mosaic virus</i>	AY20639
CIYVV	<i>Clover yellow vein virus</i>	AB011819
CABMV	<i>Cowpea aphid-borne mosaic virus</i>	AF348210
DsMV	<i>Dasheen mosaic virus</i>	AJ298033
JYMV	<i>Japanese yam mosaic virus</i>	AB027007
JGMV	<i>Johnsongrass mosaic virus</i>	Z26920
LYSV	<i>Leek yellow stripe virus</i>	AJ307057
LMV	<i>Lettuce mosaic virus</i>	X97704
MDMV	<i>Maize dwarf mosaic virus</i>	AJ001691
OYDV	<i>Onion yellow dwarf virus</i>	AJ510223
PRSV	<i>Papaya ringspot virus</i>	X67673
PWV	<i>Passionfruit woodiness virus</i>	HQ122652
PSV	<i>Peanut stripe virus</i>	U34972
PSbMV	<i>Pea seed-borne mosaic virus</i>	D10930
PepMoV	<i>Pepper mottle virus</i>	M96425
PTMV	<i>Peru tomato mosaic virus</i>	AJ516010
PVY	<i>Potato virus Y</i>	X12456
SrMV	<i>Sorghum mosaic virus</i>	U57358
SMV	<i>Soybean mosaic virus</i>	S42280
TEV	<i>Tobacco etch virus</i>	M15239
TuMV	<i>Turnip mosaic virus</i>	AF169561
WMV	<i>Watermelon mosaic virus</i>	AY437609
WPMV	<i>Wild potato mosaic virus</i>	AJ437279
WVMV	<i>Wisteria vein mosaic virus</i>	AY656816
ZYMV	<i>Zucchini yellow mosaic virus</i>	L31350



**Fig. 2** Geographical locations of the collected samples for distribution survey of the *East Asian Passiflora virus* (EAPV) by RT-PCR. Inset shows enlarged map of the Kagoshima mainland and islands of Kagoshima prefecture. Isolates of the EAPV used for construction of the phylogenetic tree based on the CP nucleotide sequences are shown with the isolation years in the parentheses.

## 2-3 RT-PCR

RT反応には Oligo (dT)プライマーを用い、前述の方法で cDNA 合成を行った。PCR には EX Taq polymerase を用い、変性 94°C、2 分を 1 サイクル、変性 94°C、30 秒、アニーリング 56°C、30 秒、伸長 72°C、1 分 30 秒のセットを 30 サイクル、伸長 72°C、5 分を 1 サイクルの条件で反応を行った。

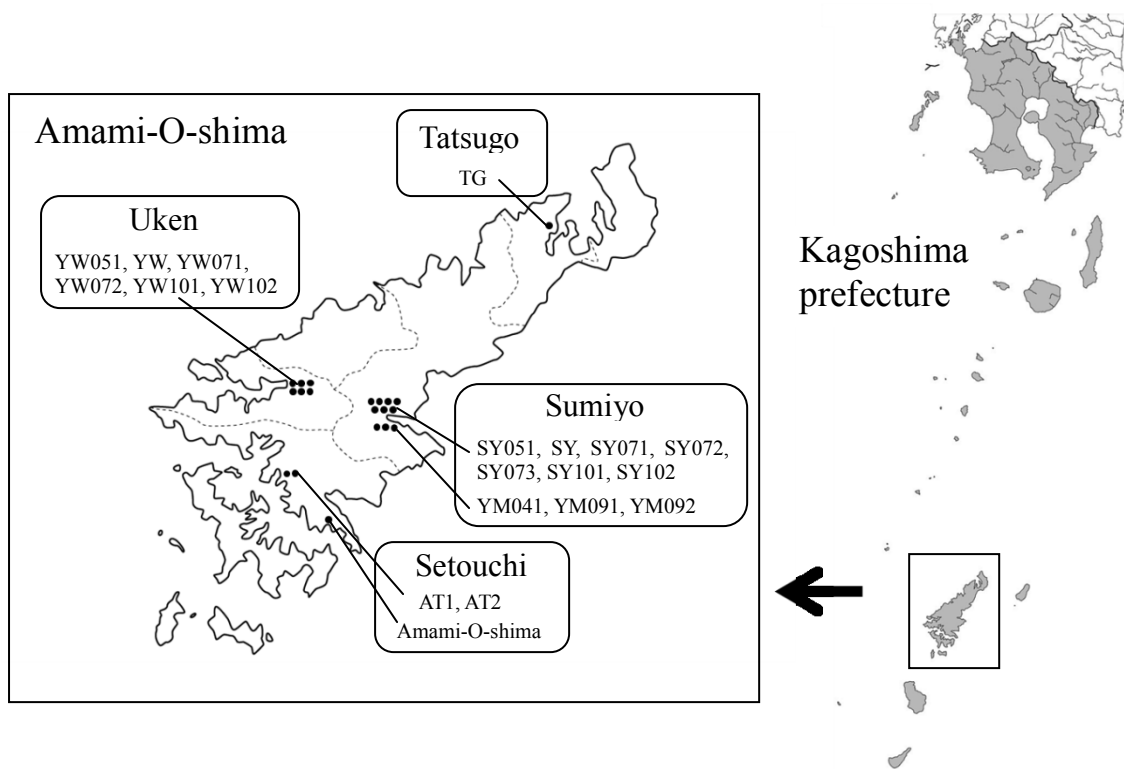
## 3 奄美大島における EAPV 集団の遺伝的構成と多様性調査

### 3-1 供試ウイルス

2005 年から 2010 年にかけての EAPV の分布調査の際に奄美大島の 4 地域から採集し、RT-PCR 検定により AO 系統の感染が認められた 19 株の塩基配列を決定した (Fig. 3)。EAPV は *Phaseolus vulgaris* (cvs Pinto 111 およびすじなし江戸川)、*Chenopodium amaranticolor* または *C. quinoa* を用いて単病斑分離を行ったが、パッションフルーツへの戻し接種に成功しなかった。また、本研究で供試した株は奄美大島株が全身感染する *P. vulgaris* (cvs Rico 23 および Rosinha) に全身感染しなかったことから、本研究ではこれら 19 株をそのまま分離株とみなした。分離株の詳細については Table 4 に示す。

### 3-2 RT-PCR

CP コード領域の増幅は前述の方法で行い、アガロース電気泳動による分画お



**Fig. 3** Geographical locations of the *East Asian Passiflora virus* isolates collected in Amami-O-shima. Enlarged map of Amami-O-shima and its location in Kagoshima prefecture, Japan.

**Table 4** Isolates used for analyzing the genetic structure and variability of *East Asian Passiflora virus* population

Isolate	Location	Year of collection	Genomic region used for analyses	Reference and accession no.
Amami-O-shima	Amami, Setouchi Katetsu, Japan	1992	polyprotein	Iwai et al. 2006a, AB256773
Arata	Kagoshima, Arata, Japan	2005	CP	Fukumoto et al. 2012a, AB627435
AT1	Amami, Setouchi Atetsu, Japan	2005	CP	This study, AB690439
AT2	Amami, Setouchi Atetsu, Japan	2005	CP	This study, AB690440
DSMZ PV-0292	Taiwan	-	CP	Ochwo-Ssemakula et al. 2012 FR694184
Ibusuki	Kagoshima, Ibusuki, Japan	1997	polyprotein	Fukumoto et al. 2012a, AB604610
MPV <sup>a</sup>	Malaysia	-	CP	Abdullah et al. 2009, EU035271
SY 051	Amami, Sumiyo Yakugachi, Japan	2005	CP	This study, AB690443
SY 071	Amami, Sumiyo Yakugachi, Japan	2007	polyprotein	This study, AB690448
SY 072	Amami, Sumiyo Yakugachi, Japan	2007	polyprotein	This study, AB690449
SY 073	Amami, Sumiyo Yakugachi, Japan	2007	polyprotein	This study, AB690450
SY 101	Amami, Sumiyo Yakugachi, Japan	2010	polyprotein	This study, AB690451
SY 102	Amami, Sumiyo Yakugachi, Japan	2010	CP	This study, AB690447
SY	Amami, Sumiyo Yakugachi, Japan	2010	CP	Fukumoto et al. 2012a, AB627437
Taiwan	Taiwan	-	CP	AF208662
TG	Amami, Tatsugo, Japan	2005	CP	This study, AB690441
YM 051	Amami, Sumiyo Yanma, Japan	2005	CP	This study, AB690444
YM 101	Amami, Sumiyo Yanma, Japan	2010	CP	This study, AB690446
YM 102	Amami, Sumiyo Yanma, Japan	2010	polyprotein	This study, AB690452
YW 051	Amami, Uken Yuwan, Japan	2005	CP	This study, AB690442
YW 071	Amami, Uken Yuwan, Japan	2007	polyprotein	This study, AB690453
YW 072	Amami, Uken Yuwan, Japan	2007	polyprotein	This study, AB690454
YW 101	Amami, Uken Yuwan, Japan	2010	polyprotein	This study, AB690455
YW 102	Amami, Uken Yuwan, Japan	2010	CP	This study, AB690445
YW	Amami, Uken Yuwan, Japan	2010	CP	Fukumoto et al. 2012a, AB627436

<sup>a</sup>Malaysian Passiflora virus.

よび DNA 精製後に pT7Blue Vector へ組み込んだ。ポリプロテインコード領域の増幅については、まず、2 つの特異的プライマー (f1-R、fc-R) と oligo (dT) を用いて一本鎖 cDNA を合成した。次に、5'末端、中央そして 3'末端に相当する 3 つの大きな断片をそれぞれ T42/T21、T20/T57 および f2-F/f3'-R のプライマー対 (Table 5) を用いて PCR 増幅した。これらの断片は、同一ゲノムから増幅されたことを確認するため、それぞれ少なくとも 100bp ずつオーバーラップするようにプライマーを設計した。PCR には KOD-Plus-Neo DNA polymerase (TOYOBO) を用い、変性 96°C、2 分を 1 サイクル、変性 94°C、30 秒、アニーリング 58°C、30 秒、伸長 68°C、4 分を 30 サイクル、伸長 68°C、10 分を 1 サイクルの条件で行った。

### 3-3 シークエンシング

CP コード領域は、それぞれの分離株について最低 3 クローンの配列をシークエンシングし決定した。ポリプロテインコード領域に対応する 3 つの断片については、アガロース電気泳動による分画および DNA 精製後、奄美大島株の配列を基に設計したプライマー AO-direct 1-13 (Table 5) を用いてダイレクトシークエンシングを行った。それぞれの分離株について少なくとも 2 つの独立した RT-PCR 産物のシークエンシングを行い、配列を決定した。また、ウイルスの分離操作が困難であったことから、それぞれの断片のオーバーラップ領域を含む 2000bp の断片を増幅し、同様のシークエンシングを行い配列が同一であることを確認した。

**Table 5** Primers used for RT-PCR amplification of different fragments of the *East Asian Passiflora virus* genome and their direct sequencing

Primer	Sequence 5'-3'	Position (nt) <sup>a</sup>
f1-R	TGCTCCCCAAACGTTTCGCTCCATTGTGTAATC	6173-6141
fc-R	TCCTCTCTGGGCTGTTCATCAACGAGGTTG	7306-7277
oligo dT	TTTTTTTTTTTTTTTTTTT	-
T42	AAAAATCGATCAAGCAATC	1-19
T21	TGCACACATTAAGTAGATGC	3585-3566
T20	CTTTGTGAGCGCGTGCTTCA	3413-3432
T57	GATATCCAGTGGATCCAAAATG	7066-7045
f2-F	AGCGCTGTGCCCAGAACAATTGCAATCATT	5616-5646
f3'-R	(T) <sub>25</sub> AGGACAACAAACG	10046-10034
AO-direct 1	TCAAGAAATGGTACCAGC	439-422
AO-direct 2	TGCTTTGCAAGTCGGAGG	1066-1049
AO-direct 3	TGACTATCTCCATTGACG	1791-1774
AO-direct 4	ACAATCACATCTCTGACC	2548-2531
AO-direct 5	ACAAACCCATTGTGCGCTC	3226-3209
AO-direct 6	GAGTTTCTTGTCTACCTC	4043-4026
AO-direct 7	TTGAACCTGTCCCCTGTG	4722-4705
AO-direct 8	TGCCTATCATACTCACGC	5437-5420
AO-direct 9	TCTCGTCTCAGTACTGCC	6215-6198
AO-direct 10	TTAACTGGCTGGCGAAAG	6946-6929
AO-direct 11	CCTTTATACTGTGCTCCC	7768-7751
AO-direct 12	ACTCCTATCCCATTCTAG	8639-8622
AO-direct 13	TTGTCAATGCACCACACC	9349-9332

<sup>a</sup> The positions of the nucleotide correspond to those of the Amami-O-shima isolate (AB246773).

### 3-4 分子系統解析および組換え部位の解析

まず、決定した塩基配列をアミノ酸配列に翻訳し、ClustalX2 を用いてアライメントを行った。この際、BLAST 検索の結果 P1、HC-Pro および CP コード領域において EAPV に最も近縁であった *Watermelon mosaic virus* (WMV; JF273468) およびそれ以外のコード領域で最も近縁であった *Peanut stripe virus* (PSV; U34972) の配列をアウトグループとして用いた。次に、アライメントによって生じたギャップを取り除き、このアミノ酸配列を塩基配列に再変換し以下の解析に用いた。EAPV 分離株間の分子系統関係は、MEGA 5 (Tamura et al., 2011) における近隣結合法および最尤法を用いて解析した。近隣結合法には Kimura's two-parameter method (Kimura, 1980) を、最尤法には Hasegawa-Kishino-Yano model (Hasegawa et al., 1985) をそれぞれ適用した。各分枝の信頼度は 1000 ブートストラップサンプリングにより算出した。作製した系統樹は MEGA 5 内の TreeExplorer を用いて表示した。組換え部位の解析には RDP 3 (Martin et al., 2010) を用い、Ohshima et al. (2007) の方法にしたがって行った。

### 3-5 遺伝的多様性と選択圧の解析

各タンパク質コード領域の遺伝的多様性は MEGA 5 の maximum composite likelihood (MCL) method を用いて解析し、各 EAPV 分離株間の座位毎の塩基置換平均数として算出した。

選択圧は  $dn/ds$  比を算出することで推定した。 $dn$  は非同義サイトあたりの非同義置換数の平均値、 $ds$  は同義サイトあたりの同義置換数の平均値を表す。 $dn$



および  $ds$  の値は MEGA 5 における Pamilo-Bianchi-Li method (Li, 1993; Pamilo and Bianchi, 1993) を用いて個別に算出した。

### 3-6 中立平衡解析

Tajima's  $D^*$  (Tajima, 1989)、Fu and Li's  $D^*$  および  $F^*$  (Fu and Li, 1993) テストおよびハプロタイプの多様性は、DNASP v5 (Librado and Rozas, 2009) を用いて算出した。Tajima's  $D^*$  テストの値は塩基配列の多様性の平均値と多型サイト数の相違により算出される。Fu and Li's  $D^*$  テストの値は塩基配列間の変異の総数と塩基配列間で 1 塩基のみ認められる変異 (singleton) 数の相違により算出され、Fu and Li's  $F^*$  テストの値は塩基配列の各ペア間の塩基相違の平均値と singleton 数の相違により算出される。また、ハプロタイプの多様性は集団におけるハプロタイプの数と頻度により算出される。

## 4 EAPV-YW 株の感染性 cDNA クローンの構築

### 4-1 供試ウイルス

供試ウイルスとして 2007 年に奄美大島宇検村湯湾にて採取し、系統特異的プライマーを用いた RT-PCR により AO 系統であることを確認した YW 株を用いた。YW 株はトケイソウ科の野生種である *P. foetida* の実生個体に機械接種し、増殖および維持を行った。

## 4-2 RNA 抽出、RT-PCR およびシーケンシング

YW 株に感染した *P. foetida* からの全 RNA の抽出、RT-PCR によるポリプロテインコード領域の増幅およびそのシーケンシングは前述の方法で行った。5'末端の配列は、5'-Full RACE Core Set を用い、付属のプロトコールにしたがって増幅した。3'末端の配列は EAPV AO-F および oligo (dT)を用いて増幅した。これら末端の配列は、pBluescript II SK (+)へクローニング後、少なくとも 3 クローンの配列をシーケンシングして決定した。

## 4-3 cDNA クローンの構築

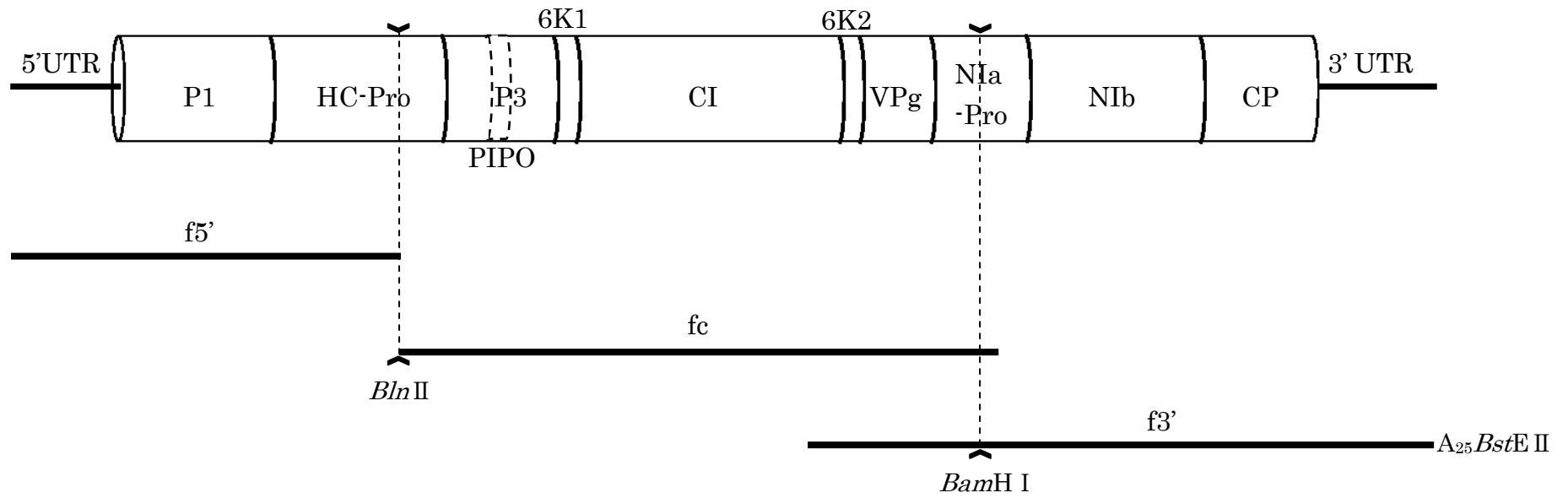
### 4-3-1 p35SYW $\Delta$ 29 の構築

はじめに、バイナリーベクター pBI121 (Chen et al., 2003) 内に存在するカリフラワーモザイクウイルス由来 35S プロモーター領域を、プライマー pBI35S-F/35S-R (Table 6) を用いて増幅した。プライマー 35S-R には、本プロモーターの転写開始地点にウイルスゲノムの 5'末端を連結できるよう *Stu* I サイトを付加した。この断片を *Pst* I 処理し、*Pst* I および *Hinc* II 処理した pUC19 (TaKaRa) へ組み込み pUC35S を構築した。続いて、奄美大島株の配列に基づき設計したプライマー (Table 6) を用いて YW 株の cDNA を 3 つの断片に分けて PCR 増幅し (Fig. 4)、35S プロモーターと nopalin synthase (NOS) 3'UTR の間に組み込むことで、植物体内で YW 株のゲノム RNA を転写可能な cDNA クローンを構築した (Fig. 5)。まず、YW 株を接種した *P. foetida* の葉から抽出した全 RNA を鋳型として、特異的プライマー AO-direct 6 (Table 5) お

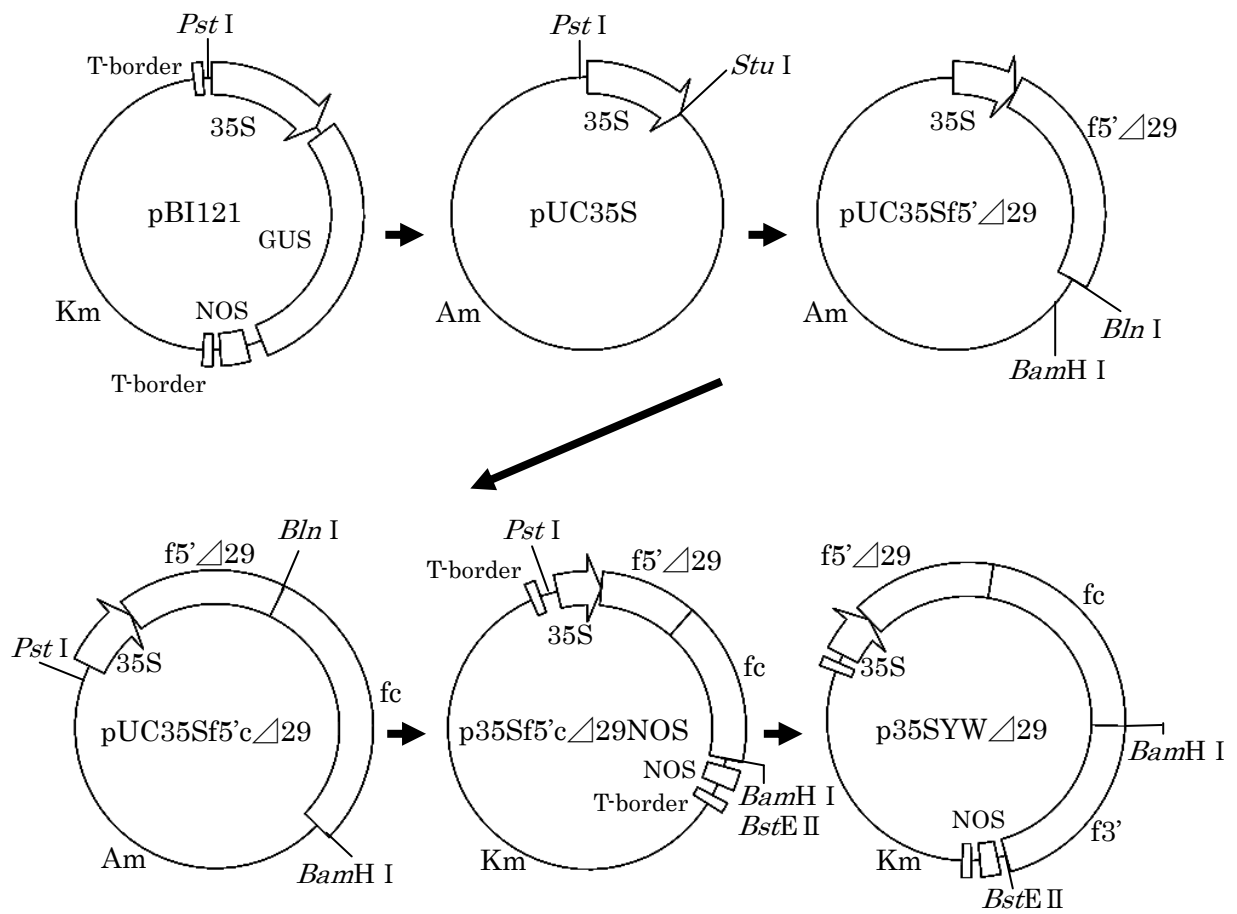
**Table 6** PCR primers for construction of cDNA clone

Fragment	Primer	Sequence 5'-3'	Position <sup>a</sup>
f5'	f5'-F	AAAAATCGATCAAGCAATCTCTCAGTCTCTCAG	1-33
	f5'-R	CTAAAATCCTAGGTAATTCAGCATTGCG	2655-2628
fC	fC-F	TGCTGAATTACCTAGGATTTTAGTAGATCATGC	2633-2665
	fC-R	TCCTCTCTGGGCTGTTCATCAACGAGGTTG	7306-7277
f3'	f3'-F	AGCGCTGTGCCCAGAACAATTGCAATCATTG	5616-5646
	f3'-R	ACTGGTGACC(T) <sub>25</sub> AGGACAACAAACG	10046-10034
35S-Pro	pBI35S-F	CCTAGGTGATTACGCCAAGCTTGC	-
	35S-R	GCGAGGCCTCTCCAAATGAAATG	-

<sup>a</sup> The positions of the nucleotide correspond to those of the Amami-O-shima isolate (AB246773).



**Fig. 4** A schematic representation of *East Asian Passiflora virus* genome, and fragments synthesized by RT-PCR and restriction sites used to construct cDNA clones.

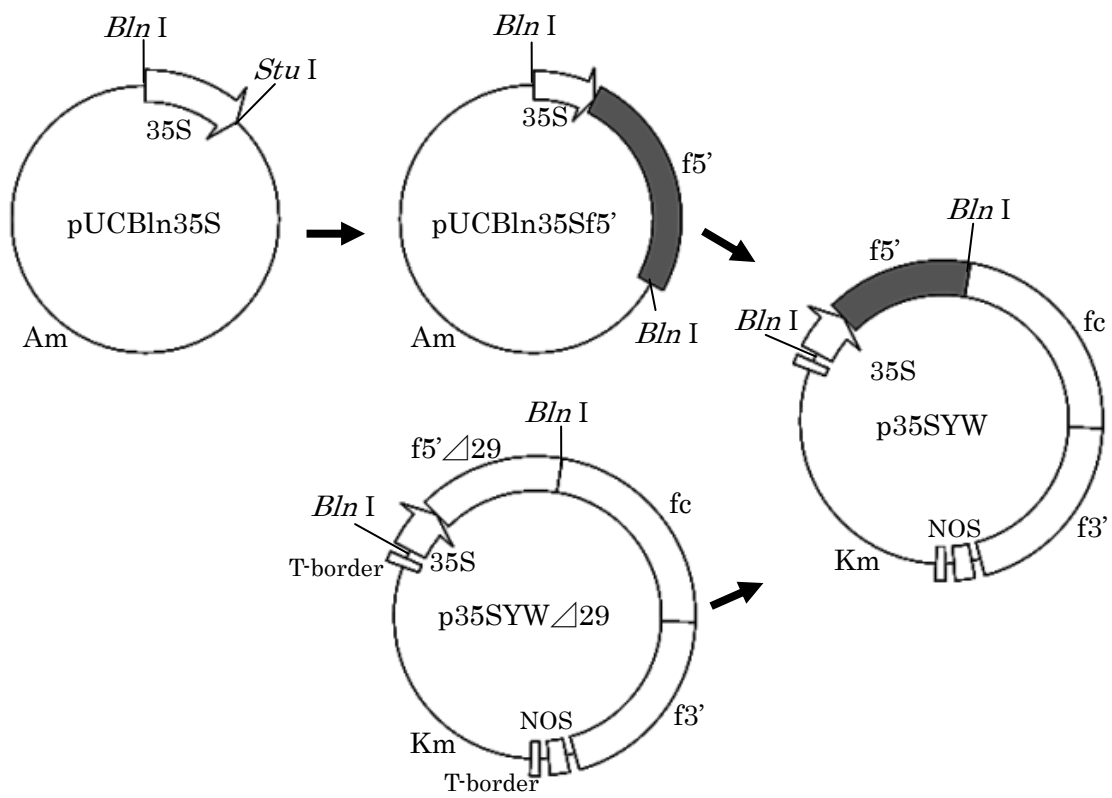


**Fig. 5** Construction of cDNA clone of *East Asian Passiflora virus* YW isolate, p35SYW  $\Delta$ 29, which has the first 29 nt deleted cDNA.

よび oligo (dT) を用いて 2 断片の一本鎖 cDNA (fragment I および II) を合成した。この fragment I を鋳型とし、f5'-F/f5'-R を用いて 5'UTR から HC-Pro コード領域に相当し 5'末端の 29 塩基を欠いた f5'断片 (f5'△29) を PCR により増幅し、*Stu* I 処理した pUC35S へ組み込むことで pUC35Sf5'△29 を構築した。この際、プライマー f5'-R を用いた同義置換変異により、f5'△29 には野生株のゲノム上には存在しない *Bln* I 制限酵素サイトを導入し、野生株と cDNA クローン由来ウイルスを区別できるようにした。次に、fragment II を鋳型として、HC-Pro から NIa-Pro コード領域および 6K2 コード領域から 3'UTR に相当する 2 つの断片 (fc および f3') を、プライマー対 fc-F/fc-R と f3'-F/f3'-R を用いてそれぞれ増幅した。この fc を *Bln* I および *Bam*H I で処理し、同酵素で処理した pUC35Sf5'△29 へ組み込むことで pUC35Sf5'c△29 を構築した。続いて、*Pst* I および *Bam*H I を用いて pUC35Sf5'c△29 内の 35S プロモーターから fc までの領域をバイナリーベクター pCAMBIA0390 (Cambia) 内の NOS3'UTR 上流に組み込み、p35Sf5'c△29NOS を構築した。最後に、f3'を *Bam*H I および *Bst*E II で処理後、同酵素で処理した p35Sf5'c△29NOS へ組み込み、完成したプラスミドを p35SYW△29 とした。

#### 4-3-2 p35SYW の構築

完全長 cDNA クローン p35SYW は、p35SYW△29 内の 35S プロモーターから f5'に相当する領域を組換えることで構築した (Fig. 6)。まず、前述の方法で増幅した 35S プロモーター領域をそのまま pUC19 の *Hinc* II サイトへ組み込んだ。このプラスミドは、35S プロモーター上流に *Bln* I サイトを持つことから pUCBln35S とした。次に、決定した YW 株の配列を基に設計したプライマー



**Fig. 6** Construction of full length cDNA clone of *East Asian Passiflora virus* YW isolate.

f5'-Fnew (5'-AAAATTAAAACATCTCATAAAGACATAACAG-3') および f5'-R を用いて 5'末端の断片 (f5') を増幅後、pUCBln35S 内の *Stu* I サイトを利用して 35S プロモーターと連結し、pUCBln35Sf5'とした。最後に、*Bln* I サイトを利用して p35SYW  $\Delta$ 29 の 35S プロモーターから f5'までの領域を pUCBln35Sf5'の同領域と置き換えることにより p35SYW を構築した。なお、本クローンも p35SYW  $\Delta$ 29 と同様に、野生株にはない *Bln* I サイトを HC-Pro コード領域内に有する。

#### 4-4 接種およびウイルスの検出

構築したクローンの接種にはアグロインフィルトレーション法を用いた。エレクトロポレーション法により p35SYW、p35SYW  $\Delta$ 29 および *Tombusvirus* 属由来ジーンサイレンシングサプレッサーp19 のコード領域を保持するバイナリーベクターpBIN61:p19 (Cambridge 大学 David Baulcombe 博士より分譲) それぞれを用いて *Agrobacterium tumefaciens* strain GV2260 を形質転換後、Vives et al. (2008) の方法にしたがって接種源の調整を行った。cDNA クローンと p19 の共接種では、それぞれ等量の調整液を接種直前に混合し接種源とした。接種植物には本葉が 2 枚から 4 枚展開した *Nicotiana benthamiana* および *P. foetida* を使い、2 ml のシリンジを使用して接種源を葉の裏から細胞間隙へ注入した。野生株のウイルスをカーボランダム法により接種した植物体を陽性対照、pBIN61:p19 および *A. tumefaciens* の懸濁に用いた溶液それぞれをインフィルトレーションした植物体を陰性対照とした。cDNA クローンの感染性は、接種 14 日後の上位葉から RNA を抽出し、AO 系統に特異的プライマーを用いた RT-PCR を行うことで評価した。また、接種植物体内で複製された子孫ウイ



ルスは、cDNA クローンに特有の *Bln* I サイトの有無を調査することでクローン由来であるかを確認した。*N. benthamiana* における p19 の一過的発現には上記と同様のアグロインフィルトレーション法を用い、ウイルスの接種はインフィルトレーション 3 日後にカーボランダム法にて行った。

#### 4-5 電子顕微鏡観察

p35SYW、p35SYW/29 由来の子孫ウイルスおよび野生株をカーボランダム法により接種後、病徴が確認された *P. foetida* の上位葉を電子顕微鏡観察に用いた。それぞれの葉の粗汁液は、2%リンタングステン酸溶液を用いてネガティブ染色した。鹿児島大学自然科学教育研究支援センター機器分析施設の高分解能・分析透過電子顕微鏡 JEM-3010（日本電子）を用い、100 kV の加速電圧でウイルス粒子の観察を行った。

## 第Ⅲ章 結果

### 1 EAPV-指宿株の全塩基配列決定および分子系統学的解析

#### 1-1 EAPV-指宿株の全塩基配列

決定した EAPV-指宿株のゲノムは、3'末端に付属するポリ A 配列を除き 9982 塩基で構成されていた。ゲノム内には、ポティウイルスに特徴的な単一の open reading frame (ORF) が存在し、3224 残基のアミノ酸から成るポリプロテインをコードしており、その推定分子量は 366891.45 Da であった。5'UTR および 3' UTR はそれぞれ 53 塩基と 257 塩基であった。ゲノムの塩基組成はアデニン 31.34%、シトシン 17.90%、グアニン 23.68%、ウラシル 27.08%であった。

#### 1-2 EAPV-奄美大島株および

##### BCMV サブグループウイルスとの比較

##### 1-2-1 ゲノム構成および相同性

指宿株と奄美大島株のゲノム構成および株間の相同性を Table 7 に示す。指宿株の 3' UTR は奄美大島株のものと比較して 1 塩基長いものの、ゲノム内で最も高い相同性 (85.7%) を示した。一方、5'UTR は奄美大島株のものに比べて 75 塩基短く、相同性も 29.7%と最も低かった。ORF 内の各タンパク質コード領域について比較すると、IB 株の P1 と CP コード領域は 9 塩基長く、NIb コード領域は 6 塩基短かった。奄美大島株と指宿株間における全長配列の相同性は、

**Table 7** Sequence identity (%) shared by two isolates (Amami-O-shima and Ibusuki) of *East Asian Passiflora virus*

Isolate	Region												
	full	5'UTR	P1	HC-Pro	P3	6K1	CI	6K2	VPg	NIa-Pro	NIb	CP	3'-UTR
Amami-O-shima	10046/3220 <sup>a</sup>	128/-	1305/435	1371/457	1041/347	156/52	1902/634	159/53	570/190	729/243	1557/519	870/290	258/-
Ibusuki	9982/3224	53/-	1314/438	1371/457	1041/347	156/52	1902/634	159/53	570/190	729/243	1551/517	879/293	257/-
Identity	77.2/82.4 <sup>b</sup>	29.7/-	63.3/56.2	74.9/82.7	75.2/76.1	84.0/92.3	81.9/94.0	81.1/81.1	80.2/82.1	80.7/90.5	81.6/88.6	80.9/84.0	85.7/-

<sup>a</sup> Number of nucleotide/amino acid.

<sup>b</sup> Identities of nucleotide/amino acid.

核酸レベルで 77.2%、アミノ酸レベルで 82.4%であった。この値は、Adams et al. (2005) により提唱されている種の分類基準値（核酸レベルで 76%、アミノ酸レベルで 82%）を上回っており、指宿株が奄美大島株と同一種であることが確認された。各タンパク質コード領域のアミノ酸配列相同性を比較すると、CI コード領域が最も高い相同性（94.0%）を示した。対照的に、P1 と P3 コード領域の相同性はそれぞれ 56.2%と 75.1%であり、他のコード領域に比べて著しく低かった。また、HC-Pro コード領域はアミノ酸レベルで 82.7%の相同性を示したが、核酸レベルでは 74.9%の相同性しかなく、この値は同種内における相同性の基準値（76.0% ; Adams et al., 2005）を下回っていた。これらのことから、指宿株あるいは奄美大島株が種内または種間での組換え体である可能性が考えられた。

次に、奄美大島株と近縁である BCMV サブグループウイルスに対する両株のアミノ酸相同性を比較した（Table 8）。ポリプロテインの相同性は、*Wisteria vein mosaic virus* (WVMV) が奄美大島株に対して、WMV が指宿株に対して最も高い値を示した。タンパク質コード領域間の比較では、CP コード領域において *Bean common mosaic necrosis virus* (BCMNV) に対する相同性に大きな差がみられたが（奄美大島株 81.9%、指宿株 72.0%）、その他のタンパク質コード領域ではそのような差はみられなかった。そこでより詳細に組換え部位を調査するために、Genetic algorithms for recombination detection (GARD ; Kosakovsky Pond et al., 2006) および Simplot ver. 3.5.1 (Lole et al., 1999) を用いた解析を行ったが、指宿株と奄美大島株または他の BCMV サブグループウイルスとの間で明瞭な組み換え部位は検出されなかった（データ未掲載）。

**Table 8** Amino acid sequence identities (%) between Amami-O-shima or Ibusuki isolate and other bean common mosaic virus subgroup viruses

Region	Virus						
	SMV	WMV	WVMV	BCMV	BCMNV	CABMV	ZYMV
Polyprotein	71.5/69.1 <sup>a</sup>	71.5/71.6	72.7/69.6	69.6/67.1	70.0/67.9	66.6/64.0	63.3/61.2
P1	30.6/26.1	39.2/42.1	34.5/26.5	39.4/33.0	35.6/27.4	29.6/21.5	25.4/21.5
HC-Pro	77.0/76.2	77.0/77.2	75.8/76.2	72.0/72.0	75.0/76.8	72.0/73.7	66.5/69.2
P3	57.9/54.5	59.9/54.2	60.6/56.8	54.8/52.5	55.6/54.8	53.3/50.0	47.8/45.7
6K1	78.4/73.1	76.5/78.9	82.0/80.8	80.4/75.0	80.0/79.5	74.5/76.9	70.6/69.2
CI	81.4/83.1	81.9/82.0	82.7/83.6	77.3/77.1	78.7/75.9	76.2/75.9	73.8/74.9
6K2	73.6/73.6	75.5/75.5	75.5/75.5	64.2/62.3	72.0/69.8	64.2/60.4	60.4/58.5
NIa-VPg	74.2/75.3	72.6/75.3	76.3/77.4	73.7/72.6	72.6/74.7	69.5/70.5	68.4/68.4
NIa-Pro	81.5/81.5	83.1/83.1	83.5/81.9	81.9/81.5	78.2/77.4	75.3/75.3	65.8/66.3
NIb	80.9/81.0	82.2/82.0	80.7/81.2	76.5/76.6	78.0/78.5	72.4/75.9	74.3/74.7
CP	73.8/72.0	72.6/72.7	71.9/70.0	74.0/73.8	81.9/72.0	69.9/67.6	66.7/66.6

<sup>a</sup> Amino acid identity against Amami-O-shima isolate/Ibusuki isolate.

### 1-2-2 ポティウイルスモチーフ

指宿株のポリプロテイン配列およびその中に保存されていた代表的ポティウイルスモチーフを Fig. 7 に示す。奄美大島株と指宿株間では P1 および HC-Pro コード領域の相同性が他の領域に比べて低かったものの、これら領域内のモチーフは 1 つを除き全て同一であった。P1 タンパク質においては、セリンプロテアーゼの活性部位である GWSG モチーフが GDSG として保存されていた。また、HC-Pro タンパク質においては長距離移行に関与する IGN モチーフおよびアブラムシ伝搬性に関与する KITC モチーフがそれぞれ IGS および KLSC として保存されていた。P1 タンパク質の C 末端に位置し、RNA 結合モチーフとされている FI(V)VRG モチーフのみが、奄美大島株では FVIRG であったのに対し指宿株では多くのポティウイルスと同様に FVVRG であり、株間で異なっていた。また、他のタンパク質においても多くのポティウイルスモチーフがみられたが、全て奄美大島株と同一であった。

### 1-2-3 タンパク質切断部位

指宿株における各タンパク質の切断部位は、奄美大島株および他の BCMV サブグループウイルスを用いたアライメント解析により推定した (Table 9)。切断部位前後のアミノ酸配列 (前 5 残基、後 1 残基) を比較すると、CI/6K2 と VPg/N1a-Pro 切断部位では同一であったが、他の部位では奄美大島株、指宿株間でそれぞれ 1 残基ずつ異なっていた。また、指宿株については、P1/HC-Pro 切断部位で CABMV と、HC-Pro/P3 切断部位で SMV、WMV、WVMV、BCMV、BCMNV および ZYMV と、6K1/CI 切断部位で SMV および WMV と、CI/6K2

MASIVFGSFSAPLVKTTAVVKAKRMVPSTMTVVKKLVETVPVSVSMKEISLGCSTRCAGLKA  
 YTKTSLRRAIKEGDLTSSGACHVCGLRGLVGEGRERVQLVPFVEYVQKEVLHTEEVPCMVE  
 EEYDVETPIFVMPADEVKETNSEVVSPGAKFCAPVKSELMAQEKPQIKQVFGKLRQSFVAI  
 KEYDNMMAKFDKSLQQNSELKKRFLVNKYSPIQQKKNQAVQLRKISYAQAQRRLKMDQL  
 ATEKARFLSGRYENREYAGQACIPLMKNKTGTTVSFKTVNFKRSVKQCIQKREQRTICITDRGA  
 LDKILRLTKDLKPLIEFIGNGKQKPLRAHFIKKGTEVLPKVHLAHVDGVYKNQELNLGCVSQ  
 MLALLCKYTKPSNLRSEQIQCGDSGLVFDRRSTITCSNTDLPFFVVRGRREGKLVNALDFIR  
 EKESVQHYSQTPEAQFFTGWKKAFDKMVPHQTTTHSCTVDFNNEQCQGEIAAIIISQTLFPVKK  
**LSCTSCRRHL**QELSWEEYKQFLVEHMGCCDDIWNVSDKIQGVELVEKFVQQATLESKDLED  
 ATEIVKLTQNYTTTPMLQIQDINKALMKGSSATSQELGKATKQLEEMTRWWKNHMSLTDED  
 ALK**VFRNK**RSSKAMINPSLLCDNQLDRNGNFVWGERGRHSKRFFSNFFKEIIPSEGYSKYIV  
 RRNPNGQRKLA**IGSL**LIVPLDFSRARLALQGESITKEPLTLACISRQNGNFVYP**CCC**VTHDDG  
 KPYHSELKS**SPTK**RHLVVGSSGDPKYIDLPSIDRMVIAKEGYCYLNIFLAMLVNVNEQDAK  
 DFTKMVRDVIVPRLGTWPSMMDVATAAYILTVFHPETRSAELPRILVDHATQTMHVIDSFGSL  
 TVGYHVLKAGTVNQLIQFASNDLQEMKFYRVGGEVEQRMRCETALISSIFKPRRMIQLLNE  
**DPY**ILLG**MVSP**AV**L**IHMVYMRHFEEKGIQTWVHKDQNIKIFIILEQLTKKVVLNDVLIDQL  
 QVISGSSGHLEVLSSCPTHSHSYRPALGMLTQFLERDLTNKQLSDNGFIDLHENLFIEVEKIF  
 VQRLSPEWRALSWEKSSVTWQLKKFSHCTETSLTKKVAEGKEEFSKSFVSACFMNARSHL  
 RNARISFSRRCESAYTAVIRKCVNLLRSVHRCYSDILYLVNVCIIIFSLVQMSTTLHGVVKRI  
 QIDRAILHRMKQGEENTITHMYDLFVKAEGGTPTMASFTKHVESVRPDLPLTKKMTNQQ  
 EDVTCQAKTSVQCNEKIVAFMALLTMCIDNERSDAIFKILNKLKVVFTMGEDVKVQSLDE  
 IEDIEEDK**K**L**T**IDFDLETNKELSSVSFDVKFEWWNRQLQQNRVVPHYRTTGEFLEFTRETAA  
 KVANQIAISTPEFLVRGAVGSGKSTGLPHHLSKKGKVLLEPTRPLAENVSEQLNGDPFYQ  
 MVTLRMRGLSKFGSSNITVMTSGFAFYVNNPNQLAEFDYIIIDECHVLDSSSTIAFNALKE  
 YEFSGKLIKVSATPPGRECEFTTQHPVKLKMEDQISFQHFVHAQGTGSNADMIQHGHNLLVY  
 VASYNEVDQLARLLIERQFKVTKVDGRMVKGNVEIVTSGIEGKPHFIVATNIIENGVTIDVD

**Fig. 7** Amino acid sequence of the polyprotein of *East Asian Passiflora virus* Ibusuki isolate. The motifs conserved among potyviruses are underlined and the cleavage sites of each protein are shown by black arrow.

CVVDFGQKVAVLSDCRCVRYNKKPVTYGERIQRLGRVGRCKPGFALRIGHTEKGIEEIP  
FIATEAAFLSFAYGLPVTTQSVSTSILSRCTTKQARNALNFELTPFFSIHFYKIDGSMHPKIH  
LKPFLRESEMLLNKLAIPYQYVNQWLTVREYDRQGIHVHCGENTRIPFYAHGIPDKLFEAL  
WDTVCKYKSDAGFGRISSASAAKVSYTLSTDPSAVPRTIAIIDHLLAEEMMKKNHFDTIGSSV  
TGYSFSLAGIAEGFRKRYMKDYTQHNIAILQAKAQLLEFDSTKVDINNLHGIEGIGVLNAV  
QLQSKHEVCKFLGLEKWDGKKFMNDVAVVIFALIGGGWMLWEFFTKMKKEAVVTQGKK  
RA**▲**FQKLKFRDAYDRKMGREYADDDTMERTFGEAYTKRGKRKGNTETRGMGRKTRNF**▲****H**  
**MYG**IEPENYSMIRFVDPITGHTMDENPRVDIRIVQEEFGEIRRQMLADDQIEKQHVISNPGLQ  
AYFFGKNTEDVLKIDLTPHRPTLLCANSNAIAGFPEREDELRTGLPQRVPAEVPKNERVE  
LESKSVYKGRDYSAIATLICQLTNASDGHRETIYGIGYGAYIITNG**H**LFRRNNGVLTVRTWH  
**▲**GEFVINNTTQLRIHFIEGK**D**AILIRMPKDFPPFAKRSFFRQPLKEERVCMVGTNFQEKSLRATV  
SESSLIVPEGVGSFWIHWITTQEGF**C**GLPLVSVNDGFIVGFHGLASNDSEKNFFVPFIDNFESK  
YLKNVDTLTWDKHWFWQPKVAWGSNLVDEQPREEFKISKLISDLFGDSVIVQSKRERWV  
LDAMEGNLVACGQAESALVTKHVIK GKCPHFQYLQHEDA AKFFRPLMGAY**▲**QPSKLNRE  
AFKKDFFKYNKPIVLNEVDFAFEQAVCGVKYMMMEYGFHDCAYVTDPEIFNSLNMKAA  
VGAQYKGGKSEYLAGMDQFDRERLLYLSSERLFYGGKGLWNGSLKAELRPNEKVLANKTR  
TFTAAPIDTLLGAKVCVDDFNNQFYNMNLACPWTVGMTKFGYGGWDKLMRSLPDGWLY**C**  
**HADGS**QFDSSLTPLLLNAVLDIRFFMEDWWVGQEMLENLYAEIVYTPILAPDGTVFKKFRG  
NN**SG**QPS**T**VVD**N**TLMVVIAVYYSCYKQGWDEDEIDKRLVFFAN**GDD**IILAVREEDSWLYDK  
LGPSFAELGLNYTFNDRSKKREELWFMSHTAIEVEGMYIPKLEPERIVSILEWDRSKEIMHRT  
EAICAAMIEAWGYTDLLREIRKFYLWLWVQKDEFKELAAAGKTPYIAETALKKLYTDKNASL  
DELQEYLRVLD FEHTEGCCESVS**Q**SSTGKDKEEESKDT**DAG**GGGRKDKEKEKRTGTLA  
TLENPNPINPNGDGSSLRDKDVNAGSKGRVVPRLQKITKKMNLPTVKGRVILNLDHLIEY  
APNQVDLYNTRATKSQFESWYSAVQKEYELDDNQMSVIMNGFMVWCIDNGTSPNINGMW  
VMMDGDEQIEYPLKPLVENAQPTLRQIMHHFSDAAEAYIEMRNSKEPYMPRYGTLRNLRLD  
SLARYAFDFYEVTSKTPNRAREAVAQMKAALANVSTRFLGLDGNVSTNSENTERHTARDV  
NQNMHTLLGMGPPQ

**Fig. 7** Continued.



**Table 9** Putative cleavage sites of two isolates of *East Asian Passiflora virus* and other bean common mosaic virus subgroup viruses

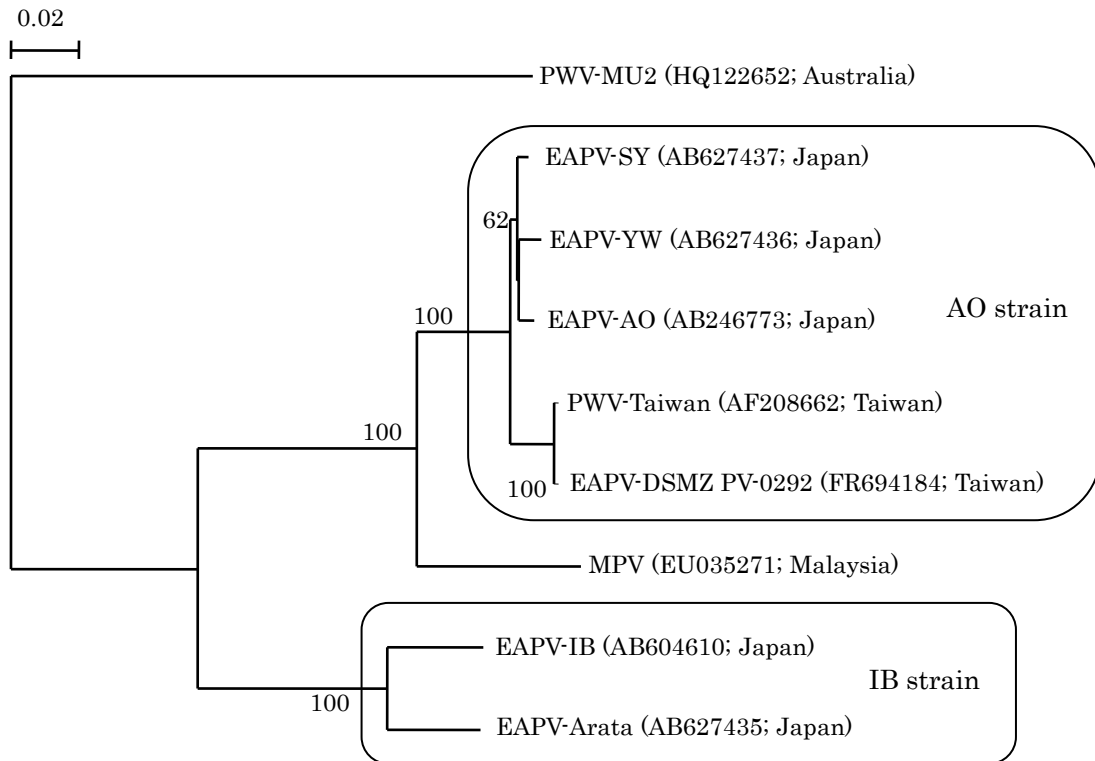
	P1/HC-Pro	Hc-Pro/P3	P3/6K1	6K1/CI	CI/6K2	6K2/VPg	VPg/NIa-Pro	NIa-Pro/NIb	NIb/CP
EAPV-Amami-O-shima	VVHY/S	YKVG/G	VSCQ/A	VKIQ/S	VQLQ/S	VSTQ/G	VELE/S	VVVQ/S	VSLQ/T
EAPV-Ibusuki	VQHY/S	YRVG/G	VTCQ/A	VKVQ/S	VQLQ/S	VVTQ/G	VELE/S	VIVQ/S	VSLQ/S
SMV	IQ(V, I)H(Q)Y(F)/S	Y(C)RVG/G	VSA(V)Q/A(V, T)	VKVQ/S	VQLQ/S	VSTQ/G	VEME/S	VTVQ/G	VSLQ/S
WMV	IQHY/S	YRVG/G	VSAQ/A	VKVQ/S	VQLQ/S	VTTQ/G	VELE/S	VAVQ/S	V(A)S(Y)LQ/S
WVMV	IQHY/S	YRVG/G	VSMO/A	VKAQ/S	VQLQ/S	VSTQ/G	VELE/S	VSVQ/S	VSLQ/S
BCMV	IHHY/S	YRVG/G	VSVQ/A	VQM(I)Q/S	VRLQ/G(S)	VT(A)TQ/G	VA(D)V(I)E/S	V(L)A(E)TQ/S(I)	VHLQ/S
BCMNV	IEHY/T	YRVG/G	V(G)DTQ/A	VRPQ/S	VRLQ/G	VSTQ/G	VELE/S	VSVQ/S	VSTQ/S
CABMV	VQHY/S	YKVG/G	GRHQ/A	VRVQ/G	VCLQ/S	VTTQ/G	VGVE/S	GCTQ/S	VV(M, R)LQ/S
ZYMV	VD(E)HY(S)/S	YRVG/G	VA(T, S)T(P)Q/A	VRLQ/G	VVLQ/S	VRVE/S	VELE/S	VETQ/S	VM(I, K)LQ/S

切断部位で SMV、WMV および WVMV と、VPg/NIa-Pro 切断部位で BCMNV および ZYMV とそれぞれ同一であった。

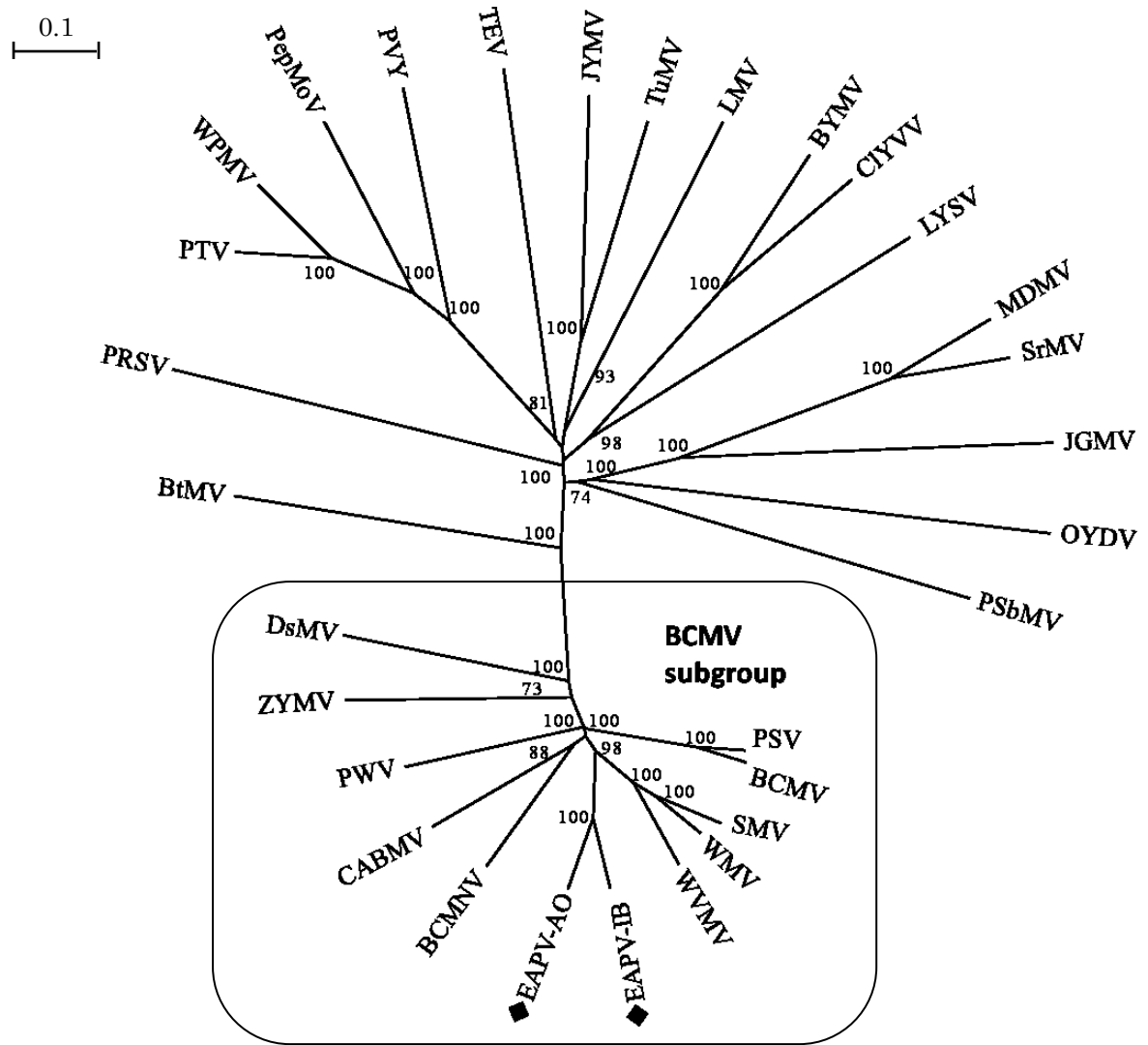
### 1-3 分子系統解析

これまでに、CP コード領域の配列を用いた分子系統解析により、PWV-台湾株と本邦で報告されている 2 系統の EAPV が同種であることが明らかとなっている (Iwai et al., 2006a)。しかし、近年報告されたマレーシア株 (MPV; Abdullah et al., 2009) および台湾株 (DSMZ PV-0292; Ochwo-Ssemakula et al., 2012) との系統学的関係については明らかにされていない。そこで、これまでに報告されており DDBJ/EMBL/GenBank データベースに配列が登録されている 8 株の EAPV について、CP コード領域の配列を用いて近隣結合法系統樹を作製することで種内における分離株間の分子系統学的関係を調査した (Fig. 8)。作製した系統樹において、指宿市および鹿児島市から分離された 2 株 (指宿株および荒田株) が独立したクレードを形成し、IB 系統であると考えられた。また、マレーシア株を除く残りの 5 株は奄美大島株とともに 1 つのクラスターを形成し、AO 系統であると考えられた。MPV のみが AO 系統と IB 系統の中間に位置し、両系統の中間型と考えられた。

次に、ポティウイルス属内における EAPV の分子系統学的位置を明らかにするために、奄美大島株および指宿株と DDBJ/EMBL/GenBank データベースに登録されている代表的なポティウイルス 27 種のポリプロテイン配列を用いて近隣結合法系統樹を作製した (Fig. 9)。その結果、EAPV 分離株はいずれも BCMV サブグループに属し、WVMV、WMV および SMV と比較的近縁であることが明らかとなった。さらに、EAPV の系統間における系統学的距離は比較的遠い



**Fig. 8** Neighbour-joining tree showing relationships of the Ibusuki isolate with other *East Asian Passiflora virus* isolates. Coat protein encoding nucleotide sequences were used to construct and that of *Passionfruit woodiness virus* MU2 isolate was used as the out group. The bootstrap value (%) of 1,000 replications is given above each node. Accession numbers of the sequences from the DDBJ/EMBL/GenBank databases and isolated countries are in brackets.



**Fig. 9** Unrooted neighbor-joining tree constructed using polyprotein amino acid sequences of representative potyviruses. The level of support for each node, evaluated by 1,000 bootstrap replications, is given as percentage.

ことが明らかとなった。こうした系統関係は、P1 コード領域を除くいずれのタンパク質コード領域を用いた系統樹でも同様であった（データ未掲載）。

#### 1-4 小括

EAPV 内にはパッションフルーツ果実に対する病徴および宿主範囲の異なる 2 系統が存在する。これまでに、果実の奇形および木質化を生じる AO 系統の基準株奄美大島株については全塩基配列が決定されていた (Iwai et al., 2006b)。しかし、パッションフルーツに感染するものの果実に対してこれらの症状を生じない IB 系統については、基準株である指宿株の N1b コード領域の 3'末端から 3'UTR までの配列が報告されているのみであった (Iwai et al., 2006a) そこで、本研究では指宿株の全塩基配列を決定し、その配列を奄美大島株のものと比較した結果、系統間では 5'UTR および P1 コード領域の配列に顕著な違いが存在することが明らかとなった。特に、5'UTR においては、指宿株の塩基配列は奄美大島株に比べ 75 塩基短く、最も相同性が低かった。5'UTR の機能について、PPV では 39 から 145 塩基までの領域がウイルスの複製に必ずしも必要ではないが、病徴の進展あるいは植物体内における同種ウイルス間の競合性に関与することが報告されている (Simon-Buela et al., 1997)。また、*Tobacco etch virus* および PVY においては、5'UTR が翻訳のエンハンサー機能を有することが示されている (Carrington and Freed, 1990; Yang et al., 1997)。したがって、EAPV における 5'UTR の機能は明らかではないが、系統間の病徴の違いに関与している可能性が考えられる。また、タンパク質コード領域間で比較を行うと、P1 コード領域の相同性が最も低く、核酸レベルで 63.3%、アミノ酸レベルで 56.2% であった。P1 タンパク質は、セリンプロテアーゼ、細胞間移行または宿主範囲

決定など複数の機能を持つことが示唆されており (Verchot and Carrington, 1995)、PVY においては生物学的性状の異なる系統間で P1 コード領域の相同性が低く、PPV および *Tobacco vein mottling virus* 間では、P1 コード領域を入れ替えることで宿主範囲が変化することが報告されている (Salvador et al., 2008)。また、SMV においては、P1 タンパク質と宿主の Rieske Fe/S タンパク質間の相互作用が病原性の発揮に重要であることが示唆されている (Shi et al., 2007)。EAPV の P1 タンパク質についても同様の機能を有するとすれば、系統間での宿主範囲の違いに関与する可能性が大いに考えられる。一方、NIa-Pro、CI および 6K1 コード領域は高い相同性を示した。NIa-Pro タンパク質はプロテアーゼであり、CI タンパク質は VPg タンパク質や NIb タンパク質と会合し、膜結合して複製複合体を形成する。また、6K タンパク質は疎水性アミノ酸領域が存在することや、ピコルナウイルスの 2B や 3A ペプチドと配列が同様であることから、RNA 複製に関与すると考えられている (Riechmann et al., 1992)。したがって、いずれのタンパク質もウイルスの複製に極めて重要であるため、系統間でも高く保存されていると考えられた。一方、こうしたタンパク質コード領域間での相同性の差には、それぞれのタンパク質機能の重要度の差の他に、ポティウイルス間でのリコンビネーションが関与している可能性も考えられた。そこで、GARD および Simplot ver. 3.5.1 を用いて組換え部位の解析を行ったが、明確な組換え部位は検出できなかった。しかし、今回解析に用いた BCMV サブグループウイルスのいずれもパッションフルーツ分離株ではなかったことから、種間での組換え部位の解析については今後精査していく必要がある。

CP コード領域の塩基配列を用いた系統解析では、台湾の分離株 (DSMV PV-0292) が AO 系統に属すること、マレーシアの分離株 (MPV) が AO 系統と IB 系統の中間に位置すること、そして IB 系統はこれまでに日本でしか発生

が認められていないことが明らかとなった。2 系統の中間型と考えられる MPV については、その生物学的・血清学的性質および CP コード領域より上流の配列に興味を持たれるが、これらについては未だ明らかにされていない。したがって、MPV の生物学的性質の調査および全塩基配列の決定は EAPV の分子進化の歴史および遺伝子機能を理解するために極めて重要である。奄美大島株と指宿株は、全長配列の相同性が核酸レベルで 77.2%あり、ポティウイルスにおける同種の基準を満たしているものの、ポリプロテインを用いた分子系統解析において、両株間の距離は SMV-WMV 間のそれよりも遠かった。SMV と WMV の関係についても、相同性の観点では同種の基準を満たしている。しかし、WMV が BCMV/PSV 間の組換え体であること、宿主範囲および血清学的性質がウイルス間で大きく異なることから、その分類に関して議論がなされ、現在これらのウイルスは International Committee on Taxonomy of Viruses により別種と認められている。これらの点を奄美大島株と指宿株について考えると、宿主範囲および血清学的性質は株間で異なっているが (Iwai et al., 2006a)、その差異は SMV-WMV 間のものほど明確なものではなく、また、他種ウイルスとの間での組換えは確認できなかった。さらに、各タンパク質コード領域間の比較においてこれら 2 株は P1、HC-Pro および P3 の相同性こそ低かったものの、他のコード領域の相同性は十分高く、配列長にも大きな違いはなかった。したがって、奄美大島株と指宿株については現行の分類通り同種とみなすことが妥当であると考えられた。

## 2 南日本における EAPV の分布

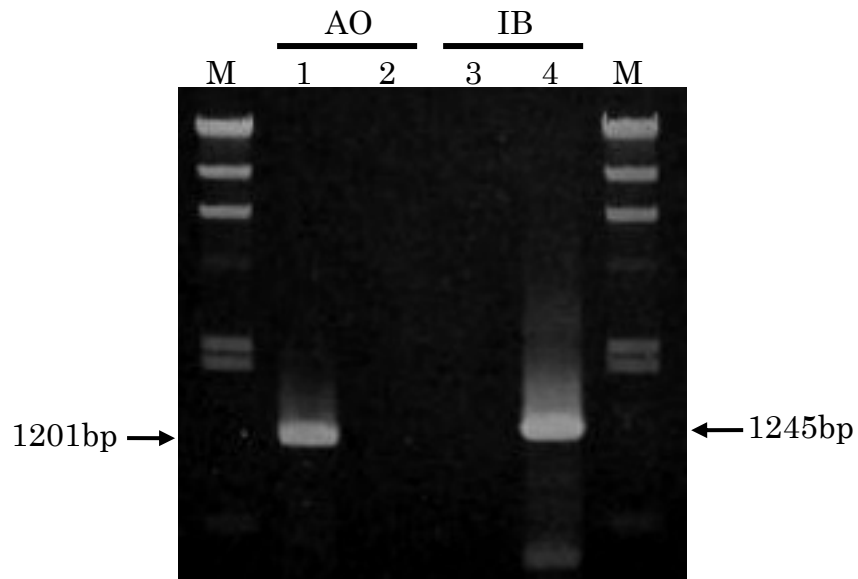
### 2-1 RT-PCR による系統特異的検出

国内で報告されている 2 系統の EAPV について、それぞれの地理的分布を調査するために、NIb コード領域の 3'末端の配列に基づく 2 つの系統特異的センスプライマー (EAPV AO-F: 5'-TGCATGTCCTAGACCTC-3'、EAPVIB-200: 5'-GACAAGAACGCCAGTTTG-3') および 3'UTR の配列に基づく共通のアンチセンスプライマー (EAPV-AOIB200: T<sub>16</sub> AGG ACA AC) を設計した。これらプライマーの特異性を調査するために、AO 系統と IB 系統それぞれを接種したパッションフルーツから抽出した RNA を鋳型として、RT-PCR を行った。その結果、それぞれのセンスプライマーは目的とする系統に対して高い特異性を有し、他の系統の RNA を鋳型に用いた場合には反応しないことが明らかとなった。したがって、本プライマーを用いることで系統別に EAPV を検出可能であると考えられた (Fig. 10)。

### 2-2 2 系統の分布

設計したプライマーを用いた RT-PCR により、2 系統の EAPV の南日本（主に鹿児島県と南西諸島）における分布を 2005 年から 2010 年にかけて調査した (Table 10)。AO 系統の発生が最初に報告された奄美大島で採取した植物からは、いずれの調査時においても AO 系統のみが検出された。また、2005 年に鹿児島市と指宿市、2007 年に大崎町で採取した植物からも AO 系統が検出され、鹿児島県本土への分布域の拡大がみられた。しかし、2010 年の調査では奄美大





**Fig. 10** Strain-specific detection of *East Asian Passiflora virus* by RT-PCR using primers EAPV AO-F (lane 1 and 3) or EAPVIB-200 (lane 2 and 4) and EAPV-AOIB200. *M* DNA standard marker [ $\lambda$  DNA / *Hind* III digest (TOYOBO)], lanes 1 and 2 passionfruit sample infected by the AO strain, 3 and 4 passionfruit sample infected by the IB strain.

**Table 10** Distribution of *East Asian Passiflora virus* in three surveys conducted by RT-PCR with strain specific primers

Location	2005				2007				2010			
	AO	IB	Both	None	AO	IB	Both	None	AO	IB	Both	None
Koshiki island	0	0	0	3	-	-	-	-	-	-	-	-
Kagoshima	0	1	5	0	-	-	-	-	0	0	0	14
Tarumizu	-	-	-	-	-	-	-	-	0	0	0	2
Osaki	0	0	0	9	5	0	0	61	0	0	0	6
Koyama	0	4	0	4	-	-	-	-	0	0	0	2
Ibusuki	4	2	4	3	-	-	-	-	0	0	0	19
Nejime	0	0	0	1	-	-	-	-	0	0	0	4
Sata	0	0	0	9	-	-	-	-	0	0	0	4
Tanega	0	0	0	31	-	-	-	-	0	0	0	5
Yaku	0	0	0	9	-	-	-	-	0	0	0	5
Amami-O-shima	6	0	0	0	23	0	0	29	17	0	0	11
Kikai	0	0	0	2	-	-	-	-	-	-	-	-
Tokuno	0	0	0	2	-	-	-	-	0	0	0	3
Okinoerabu	0	0	0	1	-	-	-	-	-	-	-	-
Yoron	0	0	0	4	-	-	-	-	0	0	0	3
Total	10	7	9	78	28	0	0	90	17	0	0	78

— not surveyed.

島以外のいずれの地域からも検出されず、県本土における AO 系統の発生は一時的なものであると思われた。一方、IB 系統は、2005 年に鹿児島市、指宿市および高山町で検出されたものの、その後の調査ではいずれの調査地においても確認されなかった。2005 年の鹿児島市および指宿市においては、両系統の重複感染株が存在した。奄美大島を除く鹿児島県の南西諸島（種子島、屋久島、喜界島、徳之島、沖永良部島および与論島）、沖縄本島および小笠原諸島の植物からはいずれの系統の EAPV も検出されなかった。

### 2-3 小括

日本で発生が確認されている 2 系統の EAPV は、その分子生物学的性状だけでなく分布域も異なることが明らかとなった。2005 年から 2010 年にかけての分布調査の結果、IB 系統は 2005 年に鹿児島県本土（鹿児島市と指宿市）で検出されたものの、2007 年、2010 年の調査ではいずれの地域からも検出されなかった。一方、AO 系統は、奄美大島での発生がいずれの調査時においても確認されるとともに 2005 年と 2007 年には、一時的ではあるが鹿児島県本土への拡がりもみられた。こうした系統間の分布の違いについては、パッションフルーツの栽培体系が関与している可能性が考えられる。2005 年以前、鹿児島県本土で栽培されるパッションフルーツの多くは、既に AO 系統の発生が問題となっていた奄美大島で栽培された苗木に由来していた。そのためウイルスに感染した苗の持ち込みにより、鹿児島県本土での AO 系統の発生に至ったと考えられている。こうした状況を受け、1997 年頃より奄美大島の東 30 km に位置する喜界島において、ウイルスフリーのパッションフルーツ苗の隔離生産が開始された（岩井・尾松，2002）。そして、ELISA 検定によりウイルスフリーであるこ

とが確認された苗が鹿児島県本土へ導入され、さらに、ウイルス病の蔓延を防ぐため少なくとも2年毎に植物体を更新する栽培体系が推奨された。その結果、鹿児島県本土ではAO系統だけでなくIB系統の発生もみられなくなったと考えられる。一方、奄美大島においては、ウイルスフリー苗を利用せず、自身の圃場内で挿し木や接ぎ木といった栄養繁殖により植物体を維持・増殖している農家が存在することから、いまだAO系統の発生が続いている。このことは、短時間で植物体を更新することが、EAPVの防除法として非常に有効であることを示している。したがって、安価で安定したウイルスフリー苗の供給を可能とする技術開発が今後の大きな課題の一つであると考えられる。

### 3 奄美大島における EAPV 集団の遺伝構造

#### 3-1 分離株間の配列の相同性

2005年から2010年にかけて採取したEAPV 19分離株（龍郷町1株、宇検村6株、住用町10株および瀬戸内町2株）のCPコード領域の塩基配列を決定した。これらの分離株はすべて、以前の分布調査の際に系統特異的プライマーを用いたRT-PCRによりAO系統に分類されることが明らかになっている。その結果を精査するため、決定した17株のCPコード領域の配列をAO系統の基準株である奄美大島株およびIB系統の基準株である指宿株のものと比較した。決定した多くの株のCPコード領域の長さは870塩基であり、奄美大島株と同様であったが、宇検村由来の4株（YW071、YW072、YW101およびYW102）は867塩基であった。そして、奄美大島株および指宿株に対する塩基配列の相

同性はそれぞれ 98.5–99.4%と 80.9–81.7%であった。

次に、19 株中 8 株 (YM102、SY071、SY072、SY073、SY101、YW071、YW072、YW101 および YW102) のポリプロテインコード領域の配列を決定し、同様の比較を行った。多くの分離株のポリプロテインコード領域の長さは、9660 塩基であり、奄美大島株と同様であったが、前述の宇検村由来の 4 株は CP コード領域が 3 塩基短いために 9657 塩基の長さであった。奄美大島株および指宿株に対する塩基配列の相同性はそれぞれ 98.8%–98.9%と 77.2–77.3%であった。タンパク質コード領域毎の比較でも、これら 8 株は全て指宿株よりも奄美大島株に対して高い相同性を示した (データ未掲載)。以上の結果から、今回調査した株は全て AO 系統であると考えられた。

### 3-2 遺伝的多様性と選択圧

奄美大島における EAPV 集団の遺伝的多様性を推定するため、今回決定した 8 株に既報の奄美大島株 (Iwai et al., 2006b) を加えた 9 株の塩基配列を用いて、各タンパク質コード領域の遺伝的距離の平均値を MCL 法により算出した (Table 11)。その結果、分離株間の多様性は低いものの、その値はタンパク質コード領域間で有意に異なっていた。最も低い値を示したのは 6K1 コード領域、次いで NIa コード領域であったのに対し、HC-Pro、6K2 および P3 コード領域では比較的高い値がみられた。CP コード領域については、今回決定した 19 株に奄美大島株を加えた 20 株を用いた解析も同様に行ったが、前述の 9 株を用いて算出した値と有意な差はなかった。遺伝的距離に加え、 $dn/ds$  比を算出することで各タンパク質コード領域の選択圧についても推定を行った。全てのタンパク質コード領域において  $dn$  値は  $ds$  値よりも小さく、 $dn/ds$  比は 1 未満であっ

**Table 11** Nucleotide distances and selection pressures of different protein encoding regions of *East Asian Passiflora virus* population in Amami-O-shima

Region	Average nucleotide distance		$d_N$		$d_S$		$d_N/d_S$
P1	0.00376 <sup>a</sup>	(0.00170) <sup>c</sup>	0.00367	(0.00131)	0.00800	(0.00248)	0.4581
HC-Pro	0.00908 <sup>a</sup>	(0.00290)	0.00747	(0.00179)	0.01507	(0.00419)	0.4962
P3	0.00862 <sup>a</sup>	(0.00290)	0.00502	(0.00142)	0.00847	(0.00299)	0.5923
6K1	0.00000 <sup>a</sup>	(0)	0.00000	(0)	0.00435	(0.00465)	0.0000
CI	0.00229 <sup>a</sup>	(0.00104)	0.00217	(0.00070)	0.00992	(0.00284)	0.2189
6K2	0.02949 <sup>a</sup>	(0.01690)	0.01364	(0.00748)	0.01739	(0.01406)	0.7844
VPg	0.00206 <sup>a</sup>	(0.00209)	0.00321	(0.00150)	0.01468	(0.00490)	0.2184
NIa	0.00092 <sup>a</sup>	(0.00094)	0.00082	(0.00057)	0.00666	(0.00289)	0.1232
NIb	0.00423 <sup>a</sup>	(0.00182)	0.00213	(0.00094)	0.01281	(0.00343)	0.1659
CP	0.00238 <sup>a</sup>	(0.00136)	0.00357	(0.00133)	0.00945	(0.00363)	0.3775
	0.00346 <sup>b</sup>	(0.00145)	0.00406	(0.00124)	0.01356	(0.00383)	0.2996

<sup>a</sup> Calculated using the nine isolates, Amami-O-shima, YW071, YW072, SY071, SY072, SY073, SY102, YW101 and YM101.

<sup>b</sup> Calculated using twenty isolates originated from Amami-O-shima, Japan.

<sup>c</sup> The numbers in the parentheses are standard errors.

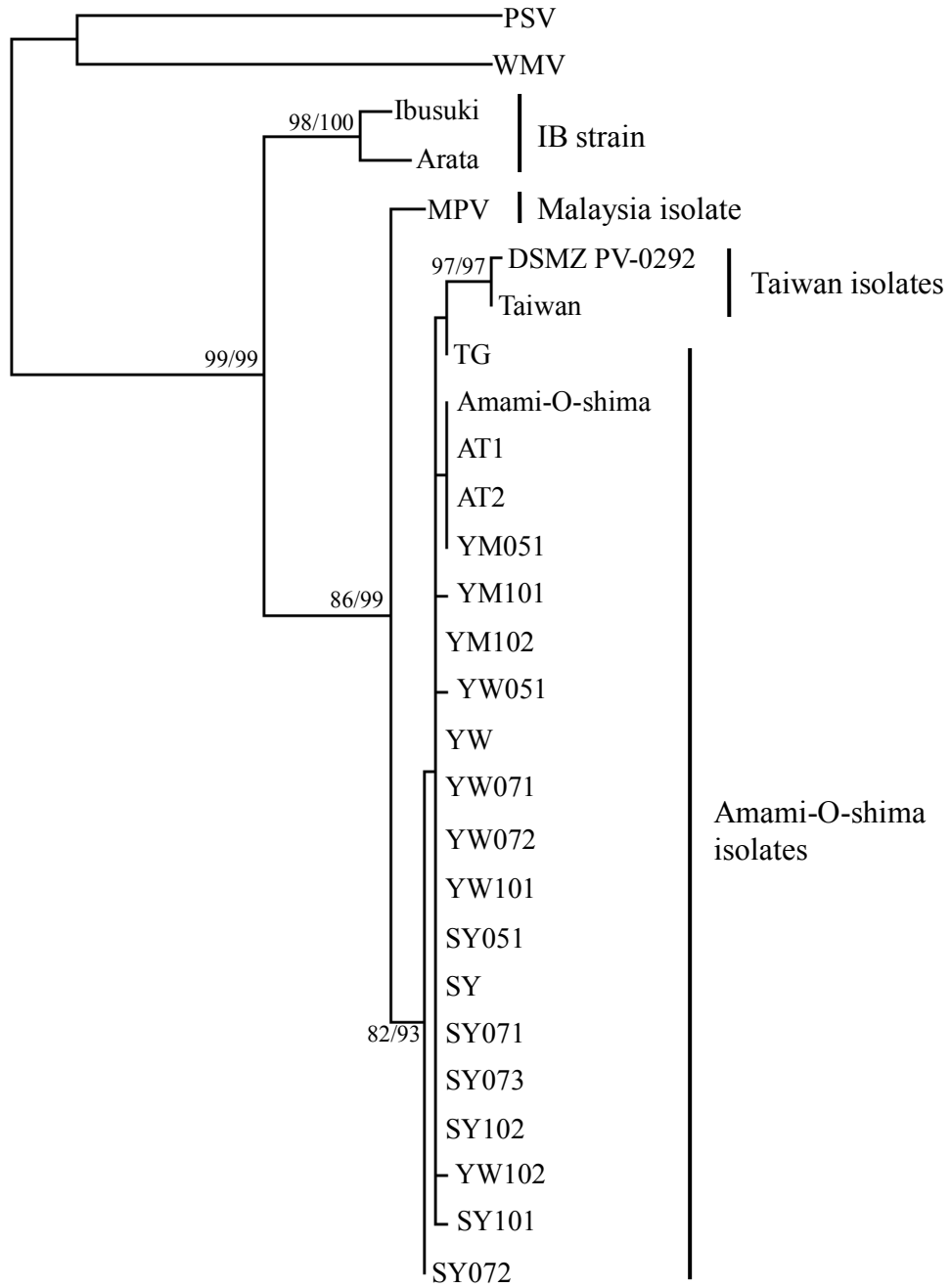
た (Table 11)。しかし、その値はタンパク質コード領域間で異なっており、6K2 コード領域で最も高く、NIa コード領域で最も低かった。このことは、全ての領域が負の選択圧下にあるものの、その強度が領域間で異なることを示している。

### 3-3 分子系統樹および組換え部位の解析

前述の 20 分離株にデータベースに登録されている台湾由来株 2 株 (AF208662; FR694184)、マレーシア株 1 株 (Abdullah et al., 2009) および IB 系統に属す 2 株 (指宿株と荒田株) を合わせた計 25 分離株の CP コード領域、そして、今回配列を決定した 8 株の奄美大島由来株に既報の奄美大島株および指宿株を加えた計 10 株のポリプロテインコード領域の塩基配列を用いて分子系統解析を行った。まず、WMV および PSV の対応する領域の配列と共にアライメントを行い、生じたギャップを取り除いた結果、CP コード領域 816 塩基、ポリプロテインコード領域 9618 塩基の配列が得られた。この配列を基に ML 法および NJ 法を用いて分子系統樹を作製した結果、いずれの方法で作製した系統樹も同様の系統関係を示した。ML 法による系統樹を Fig. 11 に示す。

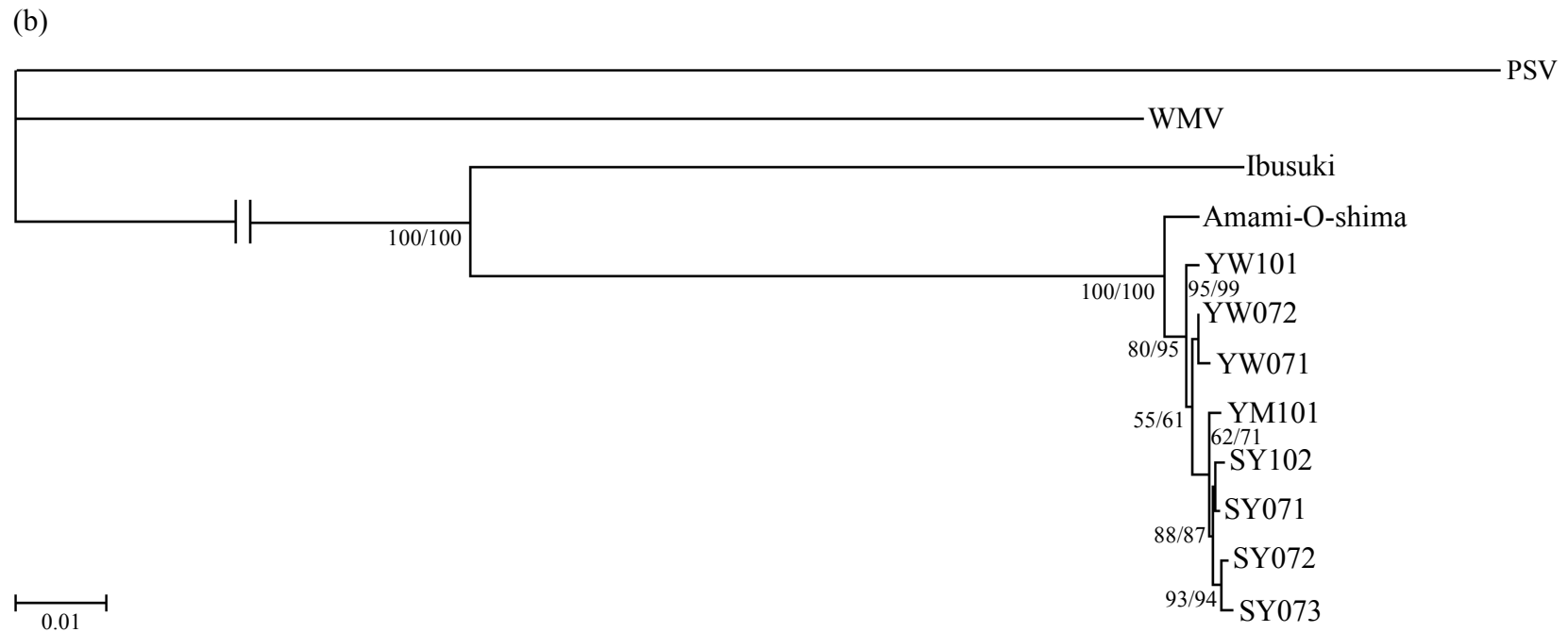
CP コード領域を用いた系統樹では、奄美大島で採取した全ての株が奄美大島株と極めて近縁であり、指宿株とは異なるクラスターを形成したことから、これら分離株が AO 系統に属することが支持された。しかし、AO 系統内の多くの分離株は星状系統関係を示し、採取地域を反映する分枝はみられなかった。海外の分離株については、これまでの系統解析結果と同様に台湾株が AO 系統に属し、マレーシア株が AO 系統と IB 系統の中間に位置することが確認された。ポリプロテインコード領域を用いた系統解析によっても、今回解析を行った住用

(a)



0.05





**Fig. 11** Phylogenetic trees calculated from the nucleotide sequences of coat protein (a) and polyprotein (b) encoding regions of *East Asian Passiflora virus* isolates by the maximum likelihood (ML) method. Numbers at each node indicate bootstrap percentage based on 1000 replications (only values >50 % are shown) in ML and neighbor joining, respectively. The corresponding sequences of *Watermelon mosaic virus* (WMV) and *Peanut stripe virus* (PSV) were used as outgroup.

および宇検由来株の全てが AO 系統に属することが明らかとなった。この系統樹においては、AO 系統の分離株が地理的に異なる 2 つのグループを形成すると思われ、同様の系統関係は NJ 法による系統樹でも確認できた。また、各タンパク質コード領域を用いた系統解析では、P1、P3 および N1b コード領域において同様の採取地域を反映する分枝がみられたが、他の領域ではみられなかった（データ未掲載）。Tomimura et al. (2004) は、組換え体の配列が系統関係の不一致を引き起こすことを報告している。そこで、本解析の信頼性を評価するために、系統解析に使用した CP およびポリプロテインコード領域の配列を用いて組換え部位の解析を行った。しかし、明瞭な組換え部位は検出されず（データ未掲載）、タンパク質コード領域間での系統関係の不一致は組換え体の存在以外の要因によると考えられた。

#### 3-4 中立平衡解析

個体群の拡散と縮小を判別するため、分離株の採取地に基づいて 10 株 (YM051、YM101、YM102、SY051、SY、SY071、SY072、SY073、SY101 および SY102) を住用グループ、6 株 (YW051、YW、YW071、YW072、YW101 および YW102) を宇検グループとし、CP コード領域の配列を用いてそれぞれのグループおよび全ての奄美大島由来株から成る奄美大島集団について Tajima's  $D^*$ 、Fu and Li's  $D^*$  および  $F^*$  テストを行い、各サブ集団における塩基配列の多型を解析した (Table 12)。これらの検定値が負であった場合、その集団サイズが増加傾向にあることを意味し、一方、正であった場合には集団サイズの減少もしくはその集団が平衡選択状態にあることを意味する。検定の結果、全ての集団またはグループにおける Tajima's  $D^*$ 、Fu and Li's  $D$  および  $F^*$

**Table 12** Neutrality tests, haplotype and nucleotide diversity of each *East Asian Passiflora virus* population in Amami-O-shima, Japan

Geographical group <sup>a</sup>	Fu & Li's $D^*$	Fu & Li's $F^*$	Tajima's $D^*$	Nucleotide diversity	Number of Haplotype	Haplotype diversity
Amami (n=20)	-1.31680	-1.52164	-1.28314	0.00339 (0.00140) <sup>b</sup>	19	0.995 (0.018)
Sumiyo (n=10)	-1.87772*	-2.08124*	-1.75538**	0.00289 (0.00139)	10	1.000 (0.045)
Uken (n=6)	-0.56645	-0.59357	-0.50439	0.00241 (0.00164)	5	0.933 (0.122)

\* $0.10 > P > 0.05$ , \*\*  $P < 0.05$ .

<sup>a</sup> The populations with less than four isolates were discarded.

<sup>b</sup> The numbers in the parentheses are standard errors.

テストの値は負であったが、奄美大島集団および宇検グループの P 値は 0.1 以上であり、有意性があるとはいえなかった。しかし、住用グループの P 値は  $0.1 > P > 0.05$  または 0.05 未満であったことから、このグループが拡散傾向にあることが示唆された。奄美大島集団、住用グループ、宇検グループのハプロタイプの多様性はそれぞれ 0.955、1.000 および 0.933 であった。

### 3-5 小括

これまでの研究では、系統特異的プライマーを用いた RT-PCR 検定により、2005 年から 2010 年にかけて奄美大島で発生した EAPV は全て AO 系統に属することが示唆された。そこでこの結果を精査するため、奄美大島における EAPV 集団の遺伝的構成と多様性を CP およびポリプロテインコード領域の塩基配列を用いて評価した。まず、RT-PCR により AO 系統であることが示唆された奄美大島由来の 17 株の EAPV について CP コード領域の塩基配列を決定し、AO 系統および IB 系統それぞれの基準株と比較した。その結果、17 株全てが AO 系統の基準株と高い相同性を示した。また、これらの奄美大島由来分離株のうち 8 株のポリプロテインコード領域の配列を決定し比較を行った場合にも同様の結果が得られ、奄美大島における EAPV 集団が AO 系統のみで構成されることが明らかとなった。興味深いことに、2007 年以降に宇検村から採取した分離株の CP コード領域は、グルタミンもしくはプロリンをコードする最後のコドンが終止コドンへ変異しているため、1 アミノ酸短くなっていた。この変異がウイルスの性状に与える影響は不明であるが、宇検村の EAPV が独特な進化集団である可能性を示しているのかもしれない。

次に、既報の奄美大島株を含む 9 株のポリプロテインコード領域の塩基配列

を用いて、各タンパク質コード領域の遺伝的多様性を調査した。同様の集団遺伝学的解析は TuMV (Tomimura et al., 2004)、PVY (Ogawa et al., 2008)、SMV (Seo et al., 2009) および *Tobacco vein banding virus* (Zhang et al., 2011) など、多くのポテウイルス種で行われているが、これらと比較して、6K2 コード領域を除く全ての領域において EAPV の多様性は低いことが明らかとなった。この原因として、調査地の範囲と解析株数の関与があげられる。上記の他種ポテウイルスに関する多様性の報告は、調査範囲が大陸もしくは国レベルのものである。一方、今回調査を行った奄美大島の面積は約 700 km<sup>2</sup> 程度であり、解析株数も 9 株であった。そのため、これら解析規模の違いが結果に影響を与えている可能性が考えられる。しかし、算出した EAPV の多様性はタンパク質コード領域間で有意に異なっており、領域間で進化的制約の程度が異なることが示唆された。このことは、領域間で dn/ds 比が異なることから示されている。多くのポテウイルス種においてコード領域間の dn/ds を比較した場合に P1 コード領域が最も高い値を示すことが報告されている (Moreno et al., 2004 ; Tomimura et al., 2004 ; Ogawa et al., 2008 ; Seo et al., 2009)。しかし、奄美大島の EAPV 集団では、6K1 コード領域の値が最も高く、P1 コード領域の値は比較的低かった。これには、奄美大島で栽培されるパッションフルーツの品種が影響しているかもしれない。現在奄美大島では交配種 (*P. edulis* × *P. edulis* f. *flavicarpa*) である ‘Summer Queen’ が主に栽培されており、本研究に用いた EAPV 分離株の多くがこの品種に感染しているウイルスであった。P1 コード領域は、宿主の決定や適応といったウイルス-宿主間の相互作用に深く関与する例が報告されている (Shi et al., 2007 ; Salvador et al., 2008)。したがって、奄美大島内で栽培されるパッションフルーツ品種の均一化が P1 コード領域の多様性を制限し、その結果低い dn/ds 比を示した可能性がある。

奄美大島の EAPV 集団が AO 系統のみで構成されることは、分子系統解析においても支持された。CP コード領域を用いた系統樹では、分離株の地理系統学的近縁性はみられなかったが、ポリプロテインコード領域では採取地を反映していると思われる分枝がみられた。採取地を反映した分枝は、P1、P3 および N1b コード領域の系統樹においてもみられたが、他の領域ではその傾向がなかったことから、EAPV 集団内での組換えの可能性が示唆された。ゲノムの組換えは植物ウイルスにおける主要な進化の原動力と考えられており (Garcia-Arenal et al., 2003 ; Roossinck 2003)、特にポティウイルスにおいては一般的な現象である (Cervera et al., 1993 ; Bousalem et al., 2000 ; Moury et al., 2002 ; Moreno et al., 2004 ; Ohshima et al., 2007 ; Valli et al., 2007)。そこで、EAPV 集団についても RDP 3 を用いて組換え部位の解析を行った。しかし、いずれのゲノム領域においても明瞭な組換え部位は検出されなかったことから、EAPV においては自然変異がより一般的であると考えられた。タンパク質コード領域間で遺伝的制約の程度が異なっていることと、ゲノム全域を通して塩基配列の多様性が低いことを考慮すると、採取地の環境要因に影響を受け易い配列はわずかであり、大半のゲノム領域には地理的要因により分離株を区別するために十分な量の変異がまだ蓄積していないと思われる。その結果、タンパク質コード領域間で系統樹の樹形に違いが生じたのではないだろうか。また、もう一つの可能性として人為的な影響が考えられる。パッションフルーツは栄養繁殖が容易であり、接木や挿し木による栄養繁殖が EAPV の伝搬の最も大きな要因の 1 つである。つまり、EAPV 感染植物の人為的な移動と拡散が、分離株の採取地が系統関係に与える影響を小さくしている可能性も十分に考えられる。

中立平衡テストにおいては、住用の EAPV 集団が突発的に拡散したことが示

唆された。このことは CP コード領域の配列を用いた系統樹が星状系統を示したことからも支持される。住用由来の分離株の多くは他の地域由来の分離株と比較して病徴が軽微であり、また、無病徴感染している株も存在した。前述したように、これら住用由来株はいくつかのタンパク質コード領域の系統樹において、Fig. 2b に示すような独立した 1 つのクレードを形成した。したがって、住用町の EAPV はより奄美大島のパッションフルーツに適応した結果、突発的に拡散した新しい集団なのかもしれない。もしそうであれば、住用由来株のゲノム内には病原性や宿主適応に関与する変異が生じており、その変異は系統解析により独立したクレードの形成がみられた領域に存在する可能性が高い。住用由来株の生物学的性状とゲノム配列の関係については、今後、より詳細な調査が必要である。

#### 4 EAPV-YW 株の感染性 cDNA クローン の構築

##### 4-1 YW 株の全塩基配列

奄美大島株と指宿株の全塩基配列の比較および分離株の遺伝構造の解析により、EAPV の病原性に関与する可能性のあるタンパク質コード領域がいくつか推定された。そこで、それら領域の機能を明らかにするための基礎となる完全長 cDNA クローン の構築に取り組んだ。そのためにまず、CP コード領域のシーケンシング結果から AO 系統に分類されることが明らかとなっていた YW 株の全塩基配列を決定した。その結果、YW 株のゲノムは 3'末端のポリ A 配列を除き 10,075 塩基で構成されており、その中には単一の ORF が存在し、3219 ア

```

Amami-O-shima  1:-----AAAAATCGATCAAGCAATCTCTCAGTCTCTC 31
YW             1:AAAATTA AACATCTCATAAAGACATAACAGAAATCGATCAAGCAATCTCTCAGTCTCTC 60
                                     * *****
Amami-O-shima 32:AGTTTACAGCAATCTTTGCAAACACACGAACCACAAACTCAGTTTCATAACTTTCAACAA 91
YW            61:AGTTTACAGCAATCTTTGCAAACACACGAACCACAAACTCAGTTTCATAACTTTCAACAA 120
                                     *****
Amami-O-shima 92:GAATTTTCTCTTCATTCCATACTTTCAAACATTCTCA 128
YW           121:GAATTTTCTCTTCATTCCATACTTTCAAACATTCTCA 157
                                     *****

```

**Fig. 12** Sequence alignment of the 5'UTRs of Amami-O-shima and YW isolates.



ミノ酸から成るポリプロテインをコードしていることが明らかとなった。AO 系統の基準株である奄美大島株に対する YW 株の全長配列の相同性は、核酸レベルで 98.6%、アミノ酸レベルで 98.8%であった。また、奄美大島株にみられるポティウイルスモチーフも全て保存されていた（データ未掲載）。ゲノム構成を比較すると、YW 株は前述の宇検由来株と同様に CP コード領域が 3 塩基短いことに加え、5'UTR の 5'末端に奄美大島株よりも 29 塩基長い配列が存在することが明らかとなった（Fig. 7）。3'UTR および CP 以外のタンパク質コード領域の塩基数は全て奄美大島株と同数であった。

#### 4-2 cDNA クローンの構築

全塩基配列の比較によって明らかとなった 5'UTR の配列長の違いが EAPV の性状に与える影響を調査するために、2 種類の cDNA クローンを構築した。まず、奄美大島株の配列に基づくプライマーを用いて、5'UTR の 5'末端 29 塩基を欠失させた YW 株の cDNA を 3 つの断片に分けて増幅後、バイナリーベクター pCAMBIA0390 内の NOS3'UTR 上流にカリフラワーモザイクウイルス由来 35S プロモーターと共に組み込むことで、p35SYW $\Delta$ 29 を構築した。また、この cDNA クローンの一部を組換えることにより YW 株の完全長 cDNA をもつクローン p35SYW を構築した。これらのクローンはいずれも 35S プロモーターの転写開始地点にウイルス cDNA の最初の塩基が位置しており、転写産物の 5'末端にはウイルスゲノム以外の配列が一切含まれないようにした。また、同義置換（2677 番目のアデニンをグアニンに置換）により野生株のゲノム上に存在しない *Bln* I サイトを導入することで、cDNA クローン由来ウイルスの標識を行った。ウイルス cDNA の 3'末端には 25 塩基のアデニン鎖および *Bst*E II サイトを

付加した。

### 4-3 接種試験

#### 4-3-1 cDNA クローンの感染性

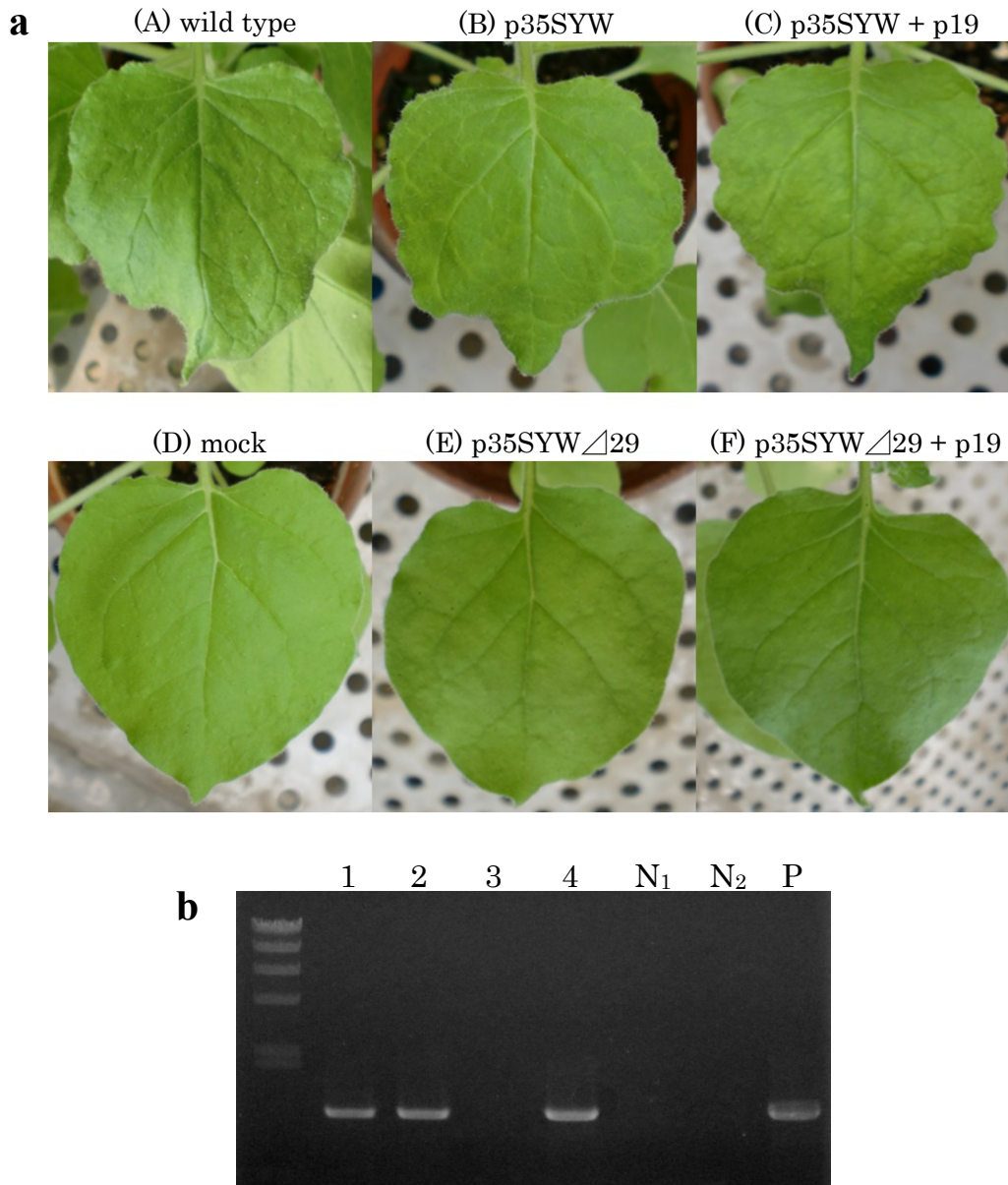
*Agrobacterium* を介した植物体内における外来遺伝子の一過性発現系は、簡便かつ低コストであり、非常に有用な遺伝子の発現解析法である (Kapila et al., 1997; Bhaskar et al., 2009)。また、比較的配列の長い遺伝子に対しても適用可能なことから、ウイルス cDNA クローンの接種法としても有用であることが報告されており (Grimsley et al., 1987; Leiser et al., 1992; Turpen et al., 1993; English et al., 1997; Vives et al., 2008)、その際、接種植物として多数のウイルスに対して高い感受性を有し、接種も容易である *N. benthamiana* がよく利用されている。したがって、同様の発現系が本研究にも適用可能であるかを判断するため、まずカーボランダム法を用いた接種試験により YW 株の *N. benthamiana* に対する感染性を調査した。その結果、接種後約 2 週間で接種個体全てに縮葉、モザイクおよび葉脈透過の症状が現れ、RT-PCR を用いた検定により YW 株の全身感染が確認されたため、*N. benthamiana* を利用した発現系が適用可能であると考えられた。また、EAPV の本来の宿主であるトケイソウ科の植物に対する感染性も同時に調査するために、トケイソウ科の中でも比較的 EAPV に対する感受性の高い *P. foetida* も同様に接種試験に供試した。

p35SYW、p35SYW $\Delta$ 29 および、それぞれに p19 を加えた 4 つの接種源を調整し接種試験に用いた。p19 は *Tombusvirus* 属ウイルスのゲノム内にコードされるジーンサイレンシングサプレッサーであり (Voinnet et al., 1999; Silhavy

et al., 2002; Qiu et al., 2002; Qu and Morris, 2002)、目的遺伝子と共に植物に導入することでその発現量を飛躍的に上昇させることが報告されている (Voinnet et al., 2002)。それぞれの cDNA クローンおよび p19 との混合液を *N. benthamiana* および *P. foetida* に接種し、病徴の観察を行った。その結果、p35SYW および p35SYW と p19 の混合液を接種した *N. benthamiana* は全て、接種 2 週間後に上位葉において野生株と同様のモザイク、萎縮および葉脈透過症状が確認されたのに対し、p35SYW $\Delta$ 29 および p35SYW $\Delta$ 29 と p19 の混合液を接種した *N. benthamiana* では明確な病徴は確認できなかった (Fig. 13a)。一方、接種植物に *P. foetida* を用いた場合には、いずれのクローンおよび p19 との混合液を接種した場合にも、病徴は一切確認できなかった (データ未掲載)。そこで、*N. benthamiana*、*P. foetida* いずれについても接種 2 週間後の上位葉から RNA を抽出し、AO 系統に特異的プライマーを用いた RT-PCR 検定を行ったところ、*N. benthamiana* において p35SYW または p35SYW と p19 の混合液を接種した全ての個体と p35SYW $\Delta$ 29 と p19 の混合液を接種した一部の個体から EAPV が検出され (Fig. 13b; Table 13)、p35SYW $\Delta$ 29 も p19 の存在下では低効率ながらも感染性を有することがわかった。一方、*P. foetida* においては全ての接種個体が陰性を示し、EAPV の感染は確認されなかった (Table 13)。

#### 4-3-2 子孫ウイルスの *P. foetida* に対する感染性

接種試験において YW 株の完全長 cDNA クローン p35SYW は、*N. benthamiana* に対して 100% の感染性を示したものの、*P. foetida* に対しては一切感染が認められなかった。また、29 塩基欠失クローン p35SYW $\Delta$ 29 も、p19 の存在下では *N. benthamiana* に感染したが、*P. foetida* には同条件下でも感染



**Fig. 13** (a) Comparison of symptoms in *Nicotiana benthamiana* inoculated with wild type virus (A), cDNA clones (B, C, E and F) or mock (D). The upper noninoculated leaves at 14 days post inoculation (dpi) were photographed. (b) Detection of progeny virus in upper leaves of *N. benthamiana* plants inoculated with cDNA clones, p35SYW (lane 1), p35SYW + p19 (lane 2), p35SYW $\Delta$ 29 (lane 3) and p35SYW $\Delta$ 29 + p19 (lane 4) by RT-PCR. Mock (N<sub>1</sub>) and p19 (N<sub>2</sub>) inoculated plants or mechanically inoculated with the EAPV-YW isolate (P) were used as control.

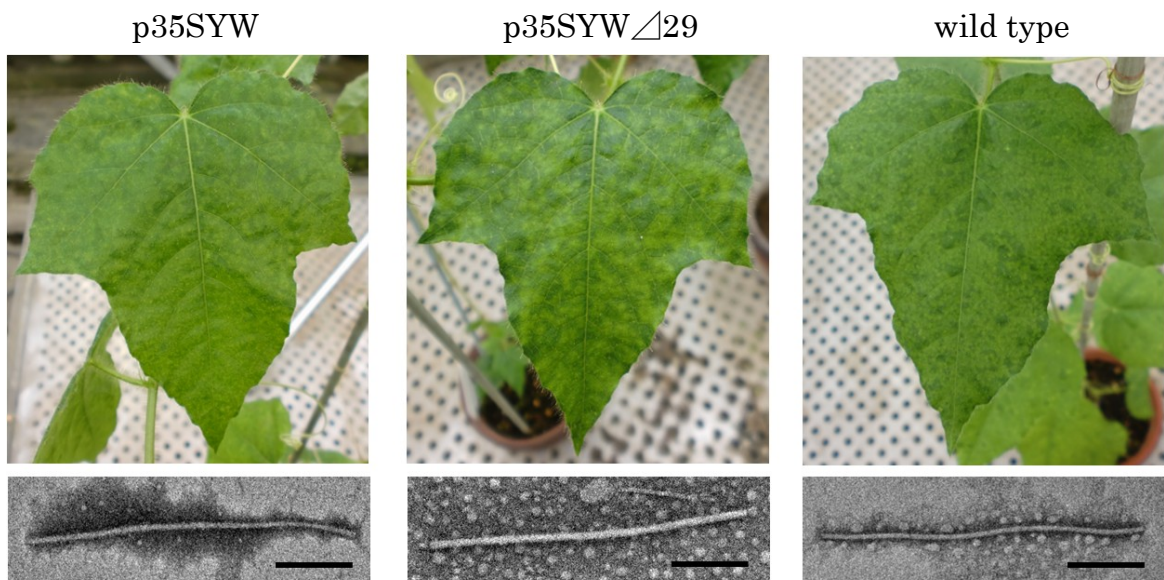
**Table 13** Infectivity of the cDNA clones to *Nicotiana benthamiana* and *Passiflora foetida* by agroinfiltration

Host	p35SYW		p35SYW $\Delta$ 29	
	only	+ p19	only	+ p19
<i>P. foetida</i>	0/5 <sup>a</sup>	0/5	0/5	0/5
<i>N. benthamiana</i>	10/10	10/10	0/25	7/42

<sup>a</sup> Data shown are number of infected plants/inoculated plants. Total RNAs were extracted from upper non-inoculated leaves at 14 dpi, and viral infection was detected by RT-PCR using the primers specific for the AO strain.

しなかった。アグロインフィルトレーションによる接種では、このように宿主によってクローンの感染性が異なる例が *Citrus tristeza virus* および *Citrus leaf blotch virus* において報告されており (Gowda et al., 2005; Vives et al., 2008)、接種植物と *Agrobacterium* の系統の組み合わせが最適でないことがその原因の一つと考えられている。そこで、p35SYW および p35SYW $\Delta$ 29 をアグロインフィルトレーションにより *N. benthamiana* 内で転写・複製させた後、その子孫ウイルスについて *P. foetida* に対する感染性を調査した。p35SYW および p35YW と p19 の混合液をアグロインフィルトレーション後、RT-PCR によりウイルスの転写・複製が行われていることを確認した *N. benthamiana* の葉を接種源とし、カーボランダム法を用いてそれぞれ 4 個体の *P. foetida* へ接種したところ、2 週間後に全ての接種個体において上位葉のモザイク症状が観察された (Fig. 14)。また、RT-PCR 検定でも全ての個体からウイルスが検出されたことから、p35SYW および p35SYW $\Delta$ 29 いずれについてもその子孫ウイルスは *P. foetida* に対する感染性を有することが明らかとなった。さらに、ネガティブ染色法を用いて電子顕微鏡によるウイルス粒子の観察を行った結果、いずれの子孫ウイルスを接種した *P. foetida* においても長さ約 790 nm のひも状の粒子が観察され、野生株の粒子と比較しても明確な形態的差異は認められなかった (Fig. 14)。

これらの接種植物から検出されたウイルスが cDNA クローン由来であることを確認するため、ゲノム内の *Bln* I サイトの有無を調査した。前述の通り、cDNA クローンは HC-Pro コード領域に野生株には存在しない *Bln* I サイトを有することから、その有無により野生株と cDNA クローン由来ウイルスの区別が可能である。それぞれの子孫ウイルスを接種した *P. foetida* およびその接種源に用いた *N. benthamiana* から抽出した RNA を鋳型として RT-PCR により HC-Pro



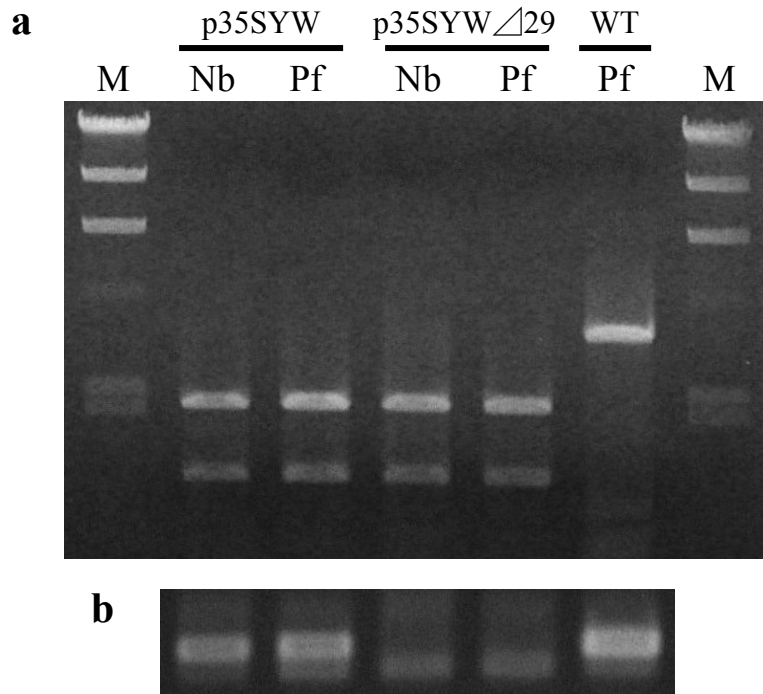
**Fig. 14** Symptoms of *Passiflora foetida* mechanically inoculated with crude sap of *Nicotiana benthamiana* agroinfiltrated with p35SYW or mixture of p35SYW $\Delta$ 29 and pBIN61:p19 and that inoculated with wild-type virus, and virions observed in crude extracts from each infected plant. The upper non-inoculated leaves at 14 dpi were photographed. Virions were negatively stained with 2% phosphotungstic acid. Scale bar: 200 nm.

コード領域を含む約 3000bp の断片を増幅し、*Bln* I 処理を行った。その後、アガロース電気泳動により DNA を分画しその長さを確認したところ、対照として用いた野生株由来の DNA 断片は切断されていないのに対し、cDNA クローンまたはその子孫ウイルスを接種した植物内のウイルスに由来する DNA 断片はいずれも一箇所切断されており、予想される位置に *Bln* I サイトが存在すると考えられた (Fig. 15a)。また、p35SYW $\Delta$ 29 由来ウイルスについては、欠失領域内 (YW 株の nt6-24 に相当) に設計したセンスプライマー (YW- $\Delta$ 5:5'-TAAAACATCTCATAAAGAC-3') および P1 コード領域に設計したアンチセンスプライマー (AO-direct 1; Table 5) を用いた RT-PCR により、末端の欠失が復帰していないことを確認した (Fig. 15b)。以上の結果から、p35SYW および p35SYW $\Delta$ 29 由来ウイルスはいずれも *P. foetida* に対する感染性を有し、野生株と同様のウイルス粒子を生産可能であることが明らかとなった。また、今回接種に用いた *Agrobacterium* の系統 GV 2260 と *P. foetida* の組み合わせが適切でないために、アグロインフィルトレーションではウイルスの感染が成立しなかったと考えられた。

#### 4-3-3 p35SYW $\Delta$ 29 由来ウイルスの *N. benthamiana* に対する感染性

アグロインフィルトレーションによる接種では、p35SYW $\Delta$ 29 は *N. benthamiana* に対してジーンサイレンシングサプレッサー p19 の存在下でのみわずかに感染性を示した。しかし、その感染植物を接種源とした場合には *P. foetida* に対して 100% の確率で感染し、しかもその際に p19 の存在は必要でなかった。そこで、p35SYW $\Delta$ 29 の感染性に対する p19 の必要性が *N. benthamiana* に特異的であるかを調査するため、p19 をアグロインフィルトレ





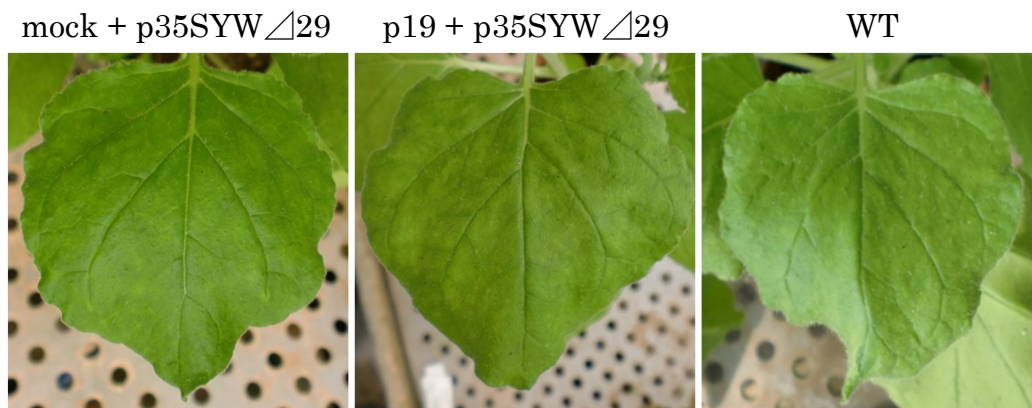
**Fig. 15** Molecular analysis of progeny virus detected in *Nicotiana benthamiana* (Nb) agroinfiltrated with p35SYW or mixture of p35SYW $\Delta$ 29 and pBIN61:p19, and in *Passiflora foetida* (Pf) mechanically inoculated with crude sap from the agroinfiltrated plants. *P. foetida* mechanically inoculated with wild-type virus (WT) was used as control. (a) Detection of *Bln* I restriction site. The fragments correspond to HC-Pro and P3 encoding regions of each virus were amplified by RT-PCR and digested with *Bln* I. M: molecular size marker. (b) RT-PCR amplification of the 5' terminal region of the genome. The forward primer was designed in the first 29 nt of the genome of YW isolate.

ーションにより一過的に発現させた植物体と野生型の植物体それぞれ 12 個体に対して、p35SYW/29 由来の子孫ウイルスを機械接種し感染率を調査した。その結果、ウイルス接種 2 週間後に p19 を一過的に発現させた植物体および野生型の植物体いずれにおいても葉のモザイク、萎縮および葉脈透過が観察され (Fig. 16a)、RT-PCR 検定により全ての個体からウイルスが検出された。また、12 個体の接种植物の中からそれぞれ 3 個体ずつを無作為に選び、RT-PCR を用いて 5'末端の欠失の有無を調査したところ、いずれのウイルスも欠失が保存されていた (Fig. 16b)。したがって、一度植物体内で転写・複製された p35SYW/29 由来ウイルスは、*N. benthamiana* に対しても p19 の存在無しに十分感染可能であり、p19 の存在は *N. benthamiana* に対する感染性に特異的に必要なのではなく、むしろ *Agrobacterium* を介した感染過程において必要なのではないかと考えられた。

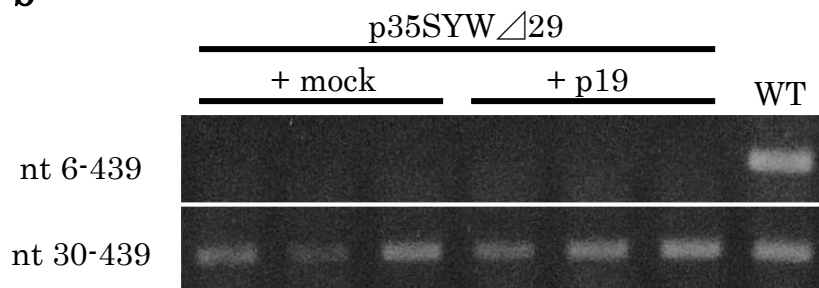
#### 4-4 小括

ウイルスの感染性 cDNA クロンの構築は、そのウイルスに対する分子生物学的アプローチの基礎となるものであり、遺伝子機能の解明、ウイルス-植物間相互作用の理解、さらには弱毒ウイルス作出による生物的防除やウイルスベクターを用いた有用タンパク質の生産といった幅広い利用が可能である。今回感染性 cDNA クロンの構築に用いた YW 株は、基準株である奄美大島株に比べて 29 塩基長い 5'UTR を有していたことから、この配列の有無により 2 つの cDNA クロンを構築しそれらの感染性を調査した。*N. benthamiana* を対象としたアグロインフィルトレーション法による接種試験では、完全長 cDNA クロンの p35SYW が 100%の感染率を示したことから、本クロンが EAPV におけ

**a**



**b**



**Fig. 16** Symptoms on *Nicotiana benthamiana* caused by progeny virus of p35SYW $\Delta$ 29 (a) and confirmation of the deletion of the 5' terminal of the viral genome by RT-PCR (b). (a) Progeny virus of p35SYW $\Delta$ 29 was mechanically inoculated 3 days after infiltration of mock or *Agrobacterium* transformed with pBIN61:p19. The upper non-inoculated leaves at 14 dpi were photographed. (b) Total RNA was extracted from the leaves and the 5' terminal of the viral genome was amplified by RT-PCR with two primer pairs correspond to nucleotide (nt) position 6-439 and 30-439 of YW isolate.

る分子生物学的研究を行っていく上で十分有用であると考えられた。また、29塩基欠失クローン p35SYW $\Delta$ 29 はジーンサイレンシングサプレッサーである p19 の存在下でのみわずかに感染性を示したことから、5'UTR 末端の 29 塩基が *N. benthamiana* に対する十分な感染性を発揮するために必要であることが示唆された。一方、同様の接種試験を *P. foetida* に対して行くと、いずれのクローンも一切感染性を示さなかったが、*N. benthamiana* 内で転写・複製させた子孫ウイルスをカーボランダム法により接種した場合には、5'UTR の末端配列および p19 の存在の有無に関係なく感染し、病徴の発現が認められた。したがって、他種ウイルスの cDNA クローンで報告されているように (Gowda et al., 2005; Vives et al., 2008) 構築したクローンの問題ではなく、接種に用いた *Agrobacterium* の系統 (GV2260) と接種植物 (*P. foetida*) の組み合わせに問題があり、*Agrobacterium* の効率的な感染および T-DNA 領域の導入が行われなかったため、*P. foetida* ではウイルスゲノムの転写量が感染成立に必要な量まで達しなかったと考えられる。また、アグロインフィルトレーション法では、T-DNA 領域が核内にて転写され、スプライシングやキャップ構造およびポリ A 鎖の付加といった種々の修飾を受けた後、核外へと輸送されタンパク質合成の鋳型となる。しかし、こうした RNA の修飾および核からの輸送は、本来ウイルスの生活環に存在しない過程である。したがって、植物ゲノム内に組み込まれたウイルス cDNA が転写後、スプライシングを受けてしまい完全長のウイルスゲノムとして存在できなかった、あるいは核外への輸送が正常に行われず複製ができなかった可能性がある。実際、*Tobacco mosaic virus* の感染性 cDNA クローンでは、ウイルス cDNA 内の複数個所に植物由来のイントロンを挿入することで、感染率が飛躍的に上昇した例が報告されている (Marillonnet et al., 2005)。こうした RNA の修飾に関与するタンパク質は、植物種間で構造や特異

性が異なると考えられ、*N. benthamiana* においては cDNA の転写および細胞質への輸送が正常に行われたが、*P. foetida* においてはいずれかの過程で異常が生じたため、感染が成立しなかったのかもしれない。

一方、p35SYW と p35SYW $\Delta$ 29 ではアグロインフィルトレーション法による接種の場合にのみ感染率に差がみられたことから、5'UTR の 5'末端 29 塩基の配列が植物の核内におけるウイルスゲノムの転写効率に影響している可能性が考えられる。さらに、p35SYW $\Delta$ 29 は p19 の存在下でのみ感染性を示したことから、この 29 塩基はジーンサイレンシングの抑制あるいはゲノム RNA の安定化に関与する可能性もあり、これらの推定的機能が単独もしくは複合的に影響し、p35SYW $\Delta$ 29 の感染率が低下したと考えられる。つまり、ウイルスの感染が成立するためには植物細胞内におけるウイルス蓄積量がある一定の域値に達しなくてはならず、p35SYW $\Delta$ 29 は植物の核内における転写効率が低い、または転写された RNA が転写後型ジーンサイレンシングによる分解を受けやすいためその域値にウイルス蓄積量が達しにくく、感染率が低かったのではないだろうか。また、5'UTR は翻訳のエンハンサーとして機能することが示されており (Carrington and Freed, 1992; Yang et al., 1997)、配列内に internal ribosome entry site の存在が示唆されている (Basso et al., 1994)。したがって、5'UTR の二次構造と感染性の関連性についても今後調査が必要である。

#### 第IV章 総合考察

ポテivirus科ポテivirus属は、植物ウイルスの中で最も大きなグループであり、140以上の種が存在する(Shukla et al., 1994; Fauquet et al., 2005; Valli et al., 2007)。本属ウイルスは、地理的にも生物学的にも非常に広い範囲の植物に感染し、農業生産上重要なウイルス種を多く含むことから(Tomlinson 1987)、病原性に関与する遺伝子の機能が盛んに研究され宿主植物との相互作用機構が明らかにされつつある。しかし、PWDについては原因となるウイルスが世界の広い地域で報告されているにも関わらず、その発病機構やそれに関わる遺伝子は明らかにされていない。そこで本研究では、PWDの原因ウイルスの一種であり、日本でも発生が報告されているEAPVについてその系統間の性質の差異、地理系統学的関係、遺伝構造および多様性を分子生物学的観点から調査するとともに、それらにより示唆される遺伝子機能を解明する上での基礎となる感染性cDNAクローンの構築を行った。

まず、EAPVの中でも比較的病徴が軽微であり、パッションフルーツ果実に対して奇形・木質化症状を生じないIB系統の基準株である指宿株の全塩基配列を決定し、果実に対しそれらの病徴を生じるAO系統の基準株である奄美大島株のものと比較した結果、ゲノムの5'側の配列の相同性が低いことが明らかとなった。タンパク質コード領域の中でP1コード領域は最も相同性が低く、系統間での宿主範囲の違いに関与している可能性が示唆された。また、HC-ProおよびP3コード領域の相同性も比較的低かったことから、他種ウイルスで報告されているように(Hajimorad et al., 2008; Nishiguchi and Kobayashi 2011; Lin et al., 2007)、系統間における病徴の差異にこれらの領域が関与している可能性がある。HC-Proは多機能タンパク質であり、20Sプロテアソームとの相互作用お

よびセリン型タンパク質分解、アブラムシ伝搬性、細胞間および長距離移行、ウイルスの増殖、病徴発現、他のウイルスに対するシナジー効果、RNAサイレンシングの抑制など実に多くの機能を有することが報告されている (Maia et al., 1996; Plisson et al., 2003, Shibolet et al., 2007)。したがって、それぞれの系統の増殖や移行の速度、サイレンシング抑制能等について調査することが、今後果実に対する病原性の違いを理解する上で重要となるかもしれない。一方、タンパク質をコードしない 5'UTR においても、系統間では顕著な配列の違いが認められた。本研究で構築した AO 系統の感染性 cDNA クローン p35SYW を用いた実験では、5'UTR の末端の配列が *N. benthamiana* に対する感染性および病徴発現に関与する可能性が示されたことから、IB 系統においても 5'UTR がウイルスの表現型に何らかの影響を及ぼしている可能性が考えられる。また、5'UTR の末端の配列は、植物体内におけるウイルス間の競合性もしくは宿主に対する適応性に関与する例が報告されている。Simon-Buela et al. (2007) は、PPV の感染性 cDNA クローンを用いて、5'UTR の nt 39 から 145 までの領域における欠失はウイルスの感染性および蓄積量に影響を与えないが、野生株と共接種すると競合できないことを示した。Pacha and Ahlquist (1992) は、*Cowpea chlorotic mottle virus* (CCMV) の RNA3 の 5'UTR 内の 144 塩基が全身感染には必須ではないが、他の遺伝型の CCMV と競合するための相対的適合性において重要な役割を担うことを示唆している。今後は、今回構築した AO 系統の感染性 cDNA クローンを用いて組換えウイルスを作製することにより、これら系統間で配列が顕著に異なる領域の表現型への関与をより具体的に明らかにすることができるだろう。また、EAPV の 5'UTR も PPV や CCMV と同様の機能を有するとすれば、系統間で分布の推移が異なることを分子生物学的観点から説明できる。2005 年から 2010 年にかけて行った RT-PCR による EAPV の分布調

査では、2007 年以降 IB 系統の発生はいずれの地域でも確認できなかった。つまり、元来 IB 系統は鹿児島県本土に分布していたが、植物体内での競合性または適応性が AO 系統と比較して相対的に劣るため、AO 系統の本土への拡大に伴い淘汰されてしまったと考えられる。また、パッションフルーツの栽培の歴史を考慮すると、AO 系統の発生以前には奄美大島にも IB 系統は分布していた可能性があり、果実への病徴が軽微なことから、顕在化しないまま AO 系統の発生と拡大に伴い淘汰されたとも考えられる。今後、両系統をパッションフルーツに共接種し、それぞれの系統の植物体内での分布、増殖量、ゲノム内の変異蓄積の推移を調査することは非常に興味深く、系統間での分布の違いを解釈するうえでの新たな知見が得られるかもしれない。

続いて、RT-PCR による分布調査の結果を精査するとともに、EAPV の遺伝構造を明らかにするため、奄美大島における EAPV 集団について、集団遺伝学および地理系統学的手法を用いた解析を行った。ポティウイルスをはじめとする RNA ウイルスは、植物ウイルスの中で最も大きなグループであり、校正機能を持たない RNA-dependent RNA polymerase を用いて自身のゲノムを複製するため (Steinhauser et al., 1992)、DNA ウイルスに比べて非常に大きな変異率を示す (Drake, 1993; Drake and Holland, 1999)。そのため、植物 RNA ウイルス集団の遺伝構造および多様性は、ウイルスの進化過程を理解する上での良いモデルの一つとして盛んに研究が行われている (Fraile et al., 1996; Garcia-Arenal et al., 2003; Fargette et al., 2004; Jridi et al., 2006; Gibbs and Ohshima, 2010)。中でも、TuMV においては集団構造および遺伝的多様性が地域レベル、世界レベルで詳細に調査され、地理系統学的解析によりその進化史の一部が明らかにされており (Ohshima et al., 2002; Tomimura et al., 2004; Tomitaka and Ohshima, 2006)、こうした研究はウイルスの進化の過程を理解



するだけでなく、ウイルス病を制御する上でも非常に重要である。今回、17株の奄美大島由来 EAPV の CP コード領域および、その中の 8 株のポリプロテインコード領域の塩基配列を決定し、AO、IB 両系統の基準株の配列と比較を行ったところ、系統特異的プライマーを用いた RT-PCR による分布調査で示された通り、2005 年から 2010 年にかけて採取した奄美大島由来 EAPV は全て AO 系統であることが明らかとなった。また、これらの配列を用いて EAPV 集団の遺伝的多様性および選択圧を解析した結果、比較的低い多様性がゲノム全体を通して認められ、全てのタンパク質コード領域が負の選択圧下にあることが示唆された。しかし、この結果は今回解析した EAPV 集団が奄美大島という限られた範囲から採集されたものであり、さらに、その集団サイズも小さかったことに起因する可能性がある。また、EAPV の発生が最初に確認されたのが 1986 年と、比較的最近であること、奄美大島が周りを海に囲まれた離島であり他の地域からのウイルスの侵入が制限されていることも影響していると考えられる。その一方で、EAPV の持つ RNA 依存型 RNA ポリメラーゼ (RdRp) の正確性が他のポティウイルスのものに比べて高く、ゲノム配列が比較的安定である可能性も否定できない。実際、ポリオウイルスにおいては、正確性の高い RdRp を持つ変異体が発見され、アミノ酸の置換により正確性の改変が可能であることが示唆されている (Pfeiffer and Kirkegaard, 2003; Arnold et al., 2005)。また、Levi et al. (2010) は、Coxsackie virus B3 において正確性の高い RdRp を持つ変異体がアミロライドに対して抵抗性を示すことを発見し、二価の陽イオンの濃度が RdRp の正確性に影響を与えることを示した。したがって、RdRp の正確性あるいはパッションフルーツの細胞内における二価の陽イオン濃度が、EAPV の多様性が低いことに関与しているかもしれない。いずれにしてもこの結果を精査するためには、日本に限らず台湾や近年 EAPV の発生が確認された

マレーシアおよびフィリピンの分離株も用いた解析を行い、それぞれの地域集団および全 EAPV 集団の遺伝構造および多様性を解析することが必要である。また、EAPV は BCMV サブグループに属することが明らかとなっているが、本サブグループの起源は東南アジアである可能性が示唆されており、さらに、EAPV が祖先ウイルスから分化した年代はパッションフルーツがアジアへ伝播する以前であったと推定されている (Gibbs et al., 2008)。したがって、アジアの広い地域から収集した分離株を用いた解析は、EAPV の進化および伝播過程を明らかにすることにもつながるであろう。中立平衡解析においては、AO 系統の中でも比較的軽微な病徴を示す住用の EAPV 集団が近年突発的に拡散したことが示唆された。Iwai et al. (2006c) は、AO 系統に対する IB 系統の干渉作用を調査し、IB 系統は AO 系統の増殖をある程度抑制するものの、完全な干渉能力は有さないことを報告している。一般的に、干渉効果は遺伝的に近縁なウイルス間で効果が高いことから、奄美大島株と指宿株間のゲノムの相同性や分子系統解析で示されているように、これら 2 系統が遺伝的に遠縁であることが不完全な干渉作用の原因と考えられる。したがって、AO 系統でありながら病徴が軽微な住用由来株は、有用な弱毒株として強毒株の防除に利用できるかもしれない。また、本研究で構築した感染性クローンは強毒株であることから、住用由来株のゲノム内に見られるアミノ酸変異をこのクローンに導入することで、EAPV の病徴発現に関与するタンパク質あるいはアミノ酸を明らかにすることができ、より有用な弱毒株の作出にもつながるであろう。

本研究では、EAPV の分子生物学的性状を明らかにし、地理系統学および集団遺伝学的手法を用いて本ウイルス集団の遺伝構造を解析した。また、これらの解析により示唆された EAPV の遺伝子機能に対して、分子生物学的手法による直接的研究を可能とする感染性 cDNA クローンの構築も行った。以上の成果

は、EAPV の効果的防除法確立の基礎となるとともに、PWD を引き起こす他種ウイルスの研究に対しても今後大きく貢献するものと思われる。

## 引用文献

1. Abdullah, N., Ismail, I., Pillai, V., Abdullah, R. and Sharifudin, S. A. (2009). Nucleotide sequence of the coat protein gene of the Malaysian Passiflora virus and its 3' non-coding region. *Am. J. Appl. Sci.* 6: 1633-1636.
2. Abubakar, Z., Ali, F., Pinel, A., Traore, O., N'Guessan, P., Notteghem, J. L., Konate, G. and Fargette, D. (2003). Phylogeography of *Rice yellow mottle virus* in Africa. *J. Gen. Virol.* 84: 733-743.
3. Adams, M. J., Antoniw, J. F. and Fauquet, C. M. (2005). Molecular criteria for genus and species discrimination within the family *Potyviridae*. *Arch. Virol.* 150: 459-479.
4. Ali, A., Natsuaki, T. and Okuda, S. (2006). The complete nucleotide sequence of a Pakistani isolate of *Watermelon mosaic virus* provides further insights into the taxonomic status in the *Bean common mosaic virus* subgroup. *Virus Genes* 32: 307-311.
5. Arnold, J. J., Vignuzzi, M., Stone, J. K., Andino, R. and Cameron, C. E. (2005). Remote site control of an active site fidelity checkpoint in a viral RNA-dependent RNA polymerase. *J. Biol. Chem.* 280: 25706-25716.
6. Basso, J., Dallaire, P., Charest, P. J., Devantier, Y. and Laliberte, J. F. (1994). Evidence for an internal ribosome entry site within the 5' non-translated region of turnip mosaic potyvirus RNA. *J. Gen. Virol.* 75: 3157-3165.
7. Bateson, M. F., Lines, R. E., Revill, P., Chaleeprom, W., Ha, C. V., Gibbs, A. J. and Dale, J. L. (2002). On the evolution and molecular epidemiology of the potyvirus *Papaya ringspot virus*. *J. Gen. Virol.* 83: 2575-2585.

8. Bhaskar, P. B., Venkateshwaran, M., Wu, L., Ane, J. M. and Jiang, J. (2009). *Agrobacterium*-mediated transient gene expression and silencing: a rapid tool for functional gene assay in potato. PLoS ONE 4: e5812.
9. Bousalem, M., Douzery, E. J. and Fargette, D. (2000). High genetic diversity, distant phylogenetic relationships and intraspecies recombination events among natural populations of *Yam mosaic virus*: a contribution to understanding potyvirus evolution. J. Gen. Virol. 81: 243-255.
10. Briddon, R. W., Bull, S. E., Amin, I., Mansoor, S., Bedford, I. D., Rishi, N., Siwatch, S. S., Zafar, Y., Abdel-Salam, A. M. and Markham, P. G. (2004). Diversity of DNA 1: a satellite-like molecule associated with monopartite begomovirus-DNA  $\beta$  complexes. Virology 324: 462-474.
11. Carrington, J. C. and Freed, D. D. (1990). Cap-independent enhancement of translation by a plant potyvirus 5' nontranslated region. J. Virol. 64: 1590-1597.
12. Cervera, M. T., Riechmann, J. L., Martin, M. T. and Garcia, J. A. (1993). 3'-Terminal sequence of the plum pox virus PS and o6 isolates: evidence for RNA recombination within the potyvirus group. J. Gen. Virol. 74: 329-334.
13. Chen, P. Y., Wang, C. K., Soong, S. C. and To, K. Y. (2003). Complete sequence of the binary vector pBI121 and its application in cloning T-DNA insertion from transgenic plants. Mol. Breed. 11: 287-293.
14. Chiang, C. H., Lee, C. Y., Wang, C. H., Jan, F. J., Lin, S. S., Chen, T. C., Raja, J. A. J. and Yeh, S. D. (2007). Genetic analysis of an attenuated *Papaya ringspot virus* strain applied for cross-protection. Eur. J. Plant Pathol. 118: 333-348.
15. Dellaporta, S. L., Wood, J. and Hicks, J. B. (1983). A plant DNA miniprep: Version II. Plant Mol. Biol. Rep. 1: 19-21.

16. Desbiez, C. and Lecoq, H. (2004). The nucleotide sequence of *Watermelon mosaic virus* (WMV, *Potyvirus*) reveals interspecific recombination between two related potyviruses in the 5' part of the genome. *Arch. Virol.* 149: 1619-1632.
17. Drake, J. W. (1993). Rates of spontaneous mutation among RNA viruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 4171-4175.
18. Drake, J. W. and Holland, J. J. (1999). Mutation rates among RNA viruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 13910-13913.
19. Eggenberger, A. L., Hajimorad, M. R. and Hill, J. H. (2008). Gain of virulence on *Rsv1*-genotype soybean by an avirulent *Soybean mosaic virus* requires concurrent mutations in both P3 and HC-Pro. *Mol. Plant Microbe Interact.* 21: 931-936.
20. English, J. J., Davenport, G. F., Elmayan, T., Vaucheret, H. and Baulcombe, D. (1997). Requirement of sense transcription for homology-dependent virus resistance and trans-inactivation. *Plant J.* 12: 597-603.
21. Fargette, D., Pinel, A., Abubakar, Z., Traore, O., Brugidou, C., Fatogoma, S., Hebrard, E., Chisy, M., Sere, Y., Fauquet, C. and Konate, G. (2004). Inferring the evolutionary history of *Rice yellow mottle virus* from genomic, phylogenetic, and phylogeographic studies. *J. Virol.* 78: 3252-3261.
22. Ferreira, S. S., Barros, D. R., de Almeida M. R. and Zerbini F. M. (2010). Characterization of Passionfruit severe leaf distortion virus, a novel begomovirus infecting passionfruit in Brazil, reveals a close relationship with tomato-infecting begomoviruses. *Plant Pathol.* 59: 221-230.
23. Fraile, A., Malpica, J. M., Aranda, M. A., Rodrigues-Cerezo, E. and Garcia-Arenal, F. (1996). Genetic diversity in tobacco mild green mosaic tobamovirus infecting the wild plant *Nicotiana glauca*. *Virology* 223: 148-155.

24. Frenkel, M. J., Ward, C. W. and Shukla, D. D. (1989). The use of 3' non-coding nucleotide-sequences in the taxonomy of potyviruses – application to Watermelon mosaic virus-2 and Soybean mosaic virus-N. *J. Gen. Virol.* 70: 2775-2783.
25. Fu, Y. X. and Li, W. H. (1993). Statistical tests of neutrality of mutations. *Genetics* 133: 693-709.
26. Fukumoto, T., Nakamura, M., Rikitake, M. and Iwai, H. (2012a). Molecular characterization and specific detection of two genetically distinguishable strains of *East Asian Passiflora virus* (EAPV) and their distribution in southern Japan. *Virus Genes* 44: 141-148.
27. Fukumoto, T., Nakamura, M., Ohshima, K. and Iwai, H. (2012b). Genetic structure and variability of *East Asian Passiflora virus* population in Amami-O-shima, Japan. *J. Phytopathol.* 160: 404-411.
28. Galtier, N., Gouy, M. and Gautier, C. (1996). SEAVIEW and PHYLO\_WIN: two graphic tools for sequence alignment and molecular phylogeny. *Comput. Appl. Biosci.* 12: 543- 548.
29. Garcia-Arenal, F., Fraile, A. and Malpica, J. M. (2003). Variation and evolution of plant virus populations. *Int. Microbiol.* 6: 225-232.
30. Gibbs, A. and Ohshima K. (2010). Potyviruses and the digital revolution. *Annu. Rev. Phytopathol.* 48: 205-223.
31. Gibbs, A. J., Trueman, J. W. H. and Gibbs, M. J. (2008). The bean common mosaic virus lineage of potyviruses: where did it arise and when? *Arch. Virol.* 153: 2177-2187.
32. Gowda, S., Satyanarayana, T., Robertson, C. J., Garnsey, S. M. and Dawson, W. O. (2005). Infection of citrus plants with virions generated in *Nicotiana benthamiana*

- plants agroinfiltrated with a binary vector based *Citrus tristeza virus*. Proceedings of the 16th Conference of the International Organization of Citrus Virologists pp. 23-33.
33. Grimsley, N., Hohn, T., Davies, J. W. and Hohn, B. (1987). *Agrobacterium*-mediated delivery of infectious maize streak virus into maize plants. *Nature* 325: 177-179.
  34. Hajimorad, M. R., Eggenberger, A. L. and Hill, J. H. (2008). Adaptation of *Soybean mosaic virus* avirulent chimeras containing P3 sequences from virulent strains to *Rsv1*-genotype soybeans is mediated by mutations in HC-Pro. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 21: 937-946.
  35. Hajimorad, M. R., Wen, R. H., Eggenberger, A. L., Hill, J. H. and Saghai Maroof, M. A. (2011). Experimental adaptation of an RNA virus mimics natural evolution. *J. Virol.* 85: 2557-2564.
  36. Hasegawa, M., Kishino, H. and Yano, T. (1985). Dating of the human-ape splitting by a molecular clock of mitochondrial DNA. *J. Mol. Evol.* 22: 160-174.
  37. Iwai, H., Ohmori, T., Kurokawa, Y., Muta, T. and Arai, K. (1996). New record of Passionfruit woodiness virus in Japan. *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.* 62: 459-465.
  38. Iwai, H., Sakai, J., Hanada, K. and Arai, K. (1997). Nucleotide sequence of the coat protein gene and 3'-noncoding region of the passionfruit woodiness virus-Amami Ohshima isolate. *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.* 63: 475-478.
  39. 岩井久・西菜穂子・和田行央・野島秀伸・和泉勝一・荒井啓 (1997). 奄美大島におけるパシヨンフルーツウッドィネスウイルスの発生実態について. *日植病報* 63: 484 (講要).
  40. 岩井久・尾松直志 (2002). 我が国のパシヨンフルーツに発生する



*Passionfruit woodiness virus*. 植物防疫 56: 110-113.

41. Iwai, H., Yamashita, Y., Nishi, N. and Nakamura, M. (2006a). The potyvirus associated with the dappled fruit of *Passiflora edulis* in Kagoshima prefecture, Japan is the third strain of the proposed new species East Asian Passiflora virus (EAPV) phylogenetically distinguished from strains of *Passionfruit woodiness virus*. Arch. Virol. 151: 811-818.
42. Iwai, H., Terahara, R., Yamashita, Y., Ueda, S. and Nakamura, M. (2006b). Complete nucleotide sequence of the genomic RNA of an Amami-O-shima strain of East Asian Passiflora potyvirus. Arch. Virol. 151: 1457-1460.
43. Iwai, H., Takano, M., Rikitake, M. and Nakamura, M. (2006c). The delay of multiplication of East Asian Passiflora virus-Amami-O-shima isolate (EAPV-AO) by the pre-inoculation of EAPV-Ibusuki isolate (EAPV-IB). Mem. Fac. Agr. Kagoshima Univ. 41: 1-8.
44. Jridi, C., Martin, J. F., Marie-Jeanne, V., Labonne, G. and Blanc, S. (2006). Distinct viral populations differentiate and evolve independently in a single perennial host plant. J. Virol. 80: 2349-2357.
45. Kapila, J., Rycke, R. D., Montagu, M. V. and Angenon, G. (1997). An *Agrobacterium*-mediated transient gene expression system for intact leaves. Plant Sci. 122: 101-108.
46. Kimura, M. (1980) A simple method for estimating evolutionary rates of base substitutions through comparative studies of nucleotide sequences. J. Mol. Evol. 16: 111-120.
47. Kosakovsky Pond, S. L., Posada, D., Gravenor, M. B., Woelk, C. H. and Frost, S. D. W. (2006). Automated phylogenetic detection of recombination using genetic

- algorithm. *Mol. Biol. Evol.* 23: 1891-1901.
48. Krause-Sakate, R., Redondo, E., Richard-Forget, F., Jadao, A. S., Houvenaghel, M. C., German-Retana, S., Pavan, M. A., Candresse, T., Zerbini, F. M. and Gall, O. L. (2005). Molecular mapping of the viral determinants of systemic wilting induced by a *Lettuce mosaic virus* (LMV) isolate in some lettuce cultivars. *Virus Res.* 109: 175-180.
  49. Larkin, M. A., Blackshields, G., Brown, N. P., Chenna, R., McGettigan, P. A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I. M., Wilm, A., Lopez, R., Thompson, J. D., Gibson, T. J. and Higgins, D. G. (2007). Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics* 23: 2947-2948.
  50. Leiser, R. M., Ziegler-Graff, V., Reutenauer, A., Herrbach, E., Lemaire, O., Guilley, H., Richards, K. and Jonard, G. (1992). Agroinfection as an alternative to insects for infecting plants with beet western yellows luteovirus. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89: 9136-9140.
  51. Levi, L. I., Gnadig, N. F., Beaucourt, S., McPherson, M. J., Baron, B., Arnold, J. J. and Vignuzzi, M. (2010). Fidelity variants of RNA dependent RNA polymerases uncover an indirect, mutagenic activity of amiloride compounds. *PLoS Pathog.* 6: e1001163.
  52. Li, W. H. (1993). Unbiased estimation of the rates of synonymous and nonsynonymous substitution. *J. Mol. Evol.* 36: 96-99.
  53. Librado, P. and Rozas, J. (2009). DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25: 1451-1452.
  54. Lin, S. S., Wu, H. W., Jan, F. J., Hou, R. F. and Yeh, S. D. (2007). Modifications of the helper component-protease of *Zucchini yellow mosaic virus* for generation of

- attenuated mutants for cross protection against severe infection. *Phytopathology* 97: 287-296.
55. Liu, Y. G. and Whittier, R. F. (1995). Thermal asymmetric interlaced PCR: automatable amplification and sequencing of insert fragment from P1 and YAC clones for chromosome walking. *Genomics* 25: 674-681.
56. Lole, K. S., Bollinger, R. C., Paranjape, R. S., Gadkari, D., Kulkarni, S. S., Novak, N. G., Ingersoll, R., Sheppard, H. W. and Ray, S. C. (1999). Full-length human immunodeficiency virus type 1 genomes from subtype C-infected seroconverters in India, with evidence of intersubtype recombination. *J. Virol.* 73: 152-160.
57. Maia, I. G., Haenni, A. L. and Bernardi, F. (1996). Potyviral HC-Pro: a multifunctional protein. *J. Gen. Virol.* 77: 1335-1341.
58. Martin, D. P., Lemey, P., Lott, M., Moulton, V., Posada, D. and Lefevre, P. (2010). RDP3: a flexible and fast computer program for analyzing recombination. *Bioinformatics* 26: 2462-2463.
59. Martin, S., Sambade, A., Rubio, L., Vives, M. C., Moya, P., Guerri, J., Elena, S. F. and Moreno, P. (2009). Contribution of recombination and selection to molecular evolution of *Citrus tristeza virus*. *J. Gen. Virol.* 90: 1527-1538.
60. McKern, N. M., Shukla, D. D., Barnett, O. W., Vetten, H. J., Dijkstra, J., Whittaker, L. W. and Ward C. W. (1992). Coat protein properties suggest that azuki bean mosaicvirus, blackeye cowpea mosaic virus, peanut stripe virus, and 3 isolates from soybean are all strains of the same potyvirus. *Intervirology* 33: 121-134.
61. McKnight, T. (1953). The woodiness virus of the passion vine. *Qd. J. Agric. Sci.* 10: 4-35.
62. 宮田朋枝・夏秋啓子・岩井 久・ピニリマリータサンフエゴ (2012). フィリ

ピンのパッションフルーツから検出された 2 種のウイルス. 日植病報 78: 233 (講要).

63. Monger, W. A., Spence, N. J. and Foster, G. D. (2001). Molecular evidence that the aphid-transmitted *Tomato mild mottle virus* belongs to the *Potyviridae* family but not the *Potyvirus* genus. *Arch. Virol.* 146: 2435-2441.
64. Moreno, I. M., Malpica, J. M., Diaz-Pendon, J. A., Moriones, E., Fraile, A. and Garcia-Arenal, F. (2004). Variability and genetic structure of the population of Watermelon mosaic virus infecting melon in Spain. *Virology* 318: 451-460.
65. Morton J. F. (1987). *Fruits of warm climates*. Creative Resource Systems, Inc. pp.320-328. Miami.
66. Moury, B., Morel, C., Johansen, E. and Jacquemond, M. (2002). Evidence for diversifying selection in *Potato virus Y* and in the coat protein of other potyviruses. *J. Gen. Virol.* 83: 2563-2573.
67. Nascimento, A. V. S., Santana, E. N., Braz, A. S. K., Alfenas, P. F., Pio-Ribeiro, G., Andrade, G. P., de Carvalho, M. G. and Murilo Zerbini, F. (2006). Cowpea aphid-borne mosaic virus (CABMV) is widespread in passionfruit in Brazil and causes passionfruit woodiness disease. *Arch. Virol.* 151: 1797-1809.
68. Nishiguchi, M. and Kobayashi, K. (2011). Attenuated plant viruses: preventing virus disease and understanding the molecular mechanism. *J. Gen. Plant Pathol.* 77: 221-229.
69. Ochwo-Ssemakula, M., Sengooba, T., Hakiza, J. J., Adipala, E., Edema, R., Redinbaugh, M. G., Aritua, V. and Winter, S. (2012). Characterization and distribution of a *Potyvirus* associated with passion fruit woodiness disease in Uganda. *Plant Dis.* 96: 659-665.

70. Ogawa, T., Tomitaka, Y., Nakagawa, A. and Ohshima, K. (2008). Genetic structure of a population of *Potato virus Y* inducing potato tuber necrotic ringspot disease in Japan; comparison with North American and European populations. *Virus Res.* 131: 199-212.
71. Ohshima, K., Yamaguchi, Y., Hirota, R., Hamamoto, T., Tomimura, K., Tan, Z., Sano, T., Azuhata, F., Walsh, J. A., Fletcher, J., Chen, J., Gera, A. and Gibbs, A. (2002). Molecular evolution of *Turnip mosaic virus*: evidence of host adaptation, genetic recombination and geographical spread. *J. Gen. Virol.* 83: 1511-1521.
72. Ohshima, K., Tomitaka, Y., Wood, J. T., Minematsu, Y., Kajiyama, H., Tomimura, K. and Gibbs, A. J. (2007). Patterns of recombination in turnip mosaic virus genomic sequences indicate hotspots of recombination. *J. Gen. Virol.* 88: 298-315.
73. 尾松直志・岩井久・瀬戸口脩・鳥越博明・牟田辰朗・野島秀伸 (2004). 奄美大島におけるパッションフルーツウツディネス病の発生生態. 鹿試研究報告 32: 41-54.
74. Pamilo, P. and Bianchi, N. O. (1993). Evolution of the *Zfx* and *Zfy* genes: rates and interdependence between the genes. *Mol. Biol. Evol.* 10: 271-281.
75. Perrière, G. and Gouy, M. (1996). WWW-query: An on-line retrieval system for biological sequence banks. *Biochimie* 78: 364-369.
76. Pfeiffer, J. K. and Kirkegaard, K. (2003). A single mutation in poliovirus RNA-dependent RNA polymerase confers resistance to mutagenic nucleotide analogs via increased fidelity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100: 7289-7294.
77. Plisson, C., Drucker, M., Blanc, S., German-Retana, S., Le Gall, O., Thomas, D. and Bron, P. (2003). Structural characterization of HC-Pro, a plant virus multifunctional protein. *J. Biol. Chem.* 278: 23753-23761.

78. Qiu, W., Park, J. W. and Scholthof, H. B. (2002). Tombusvirus P19-mediated suppression of virus-induced gene silencing is controlled by genetic and dosage features that influence pathogenicity. *Mol. Plant Microbe Interact.* 15: 269-280.
79. Qu, F. and Morris, T. J. (2002). Efficient infection of *Nicotiana benthamiana* by *Tomato bushy stunt virus* is facilitated by the coat protein and maintained by p19 through suppression of gene silencing. *Mol. Plant Microbe Interact.* 15: 193-202.
80. Rao, A. L. N. (1999). Molecular basis of symptomatology. In *Molecular Biology of Plant Virus*, pp. 201-210. Edited by C. L. Mandahar. Norwell: Kluwer Academic.
81. Revers, F., Le Gall, O., Candresse, T. and Maule, A. J. (1999). New advances in understanding the molecular biology of plant/potyvirus interactions. *Mol. Plant Microbe Interact.* 12: 367-376.
82. Riechmann, J. L., Lain, S. and Garcia, J. A. (1992). Highlights and prospects of potyvirus molecular biology. *J. Gen. Virol.* 73: 1-16.
83. Roossinck, M. J. (2003). Plant RNA virus evolution. *Curr. Opin. Microbiol.* 6: 406-409.
84. Rubio, L., Ayllon, M. A., Kong, P., Fernandez, A., Polek, M., Guerri, J., Moreno, P. and Falk, B. W. (2001). Genetic variation of *Citrus tristeza virus* isolates from California and Spain: evidence for mixed infections and recombination. *J. Virol.* 75: 8054- 8062.
85. Salvador, B., Delgadillo, M. O., Saenz, P., Garcia, J. A. and Simon-Mateo, C. (2008). Identification of *Plum pox virus* pathogenicity determinants in herbaceous and woody hosts. *Mol. Plant Microbe Interact.* 21: 20-29.
86. Salvador, B., Saenz, P., Yanguéz, E., Quiot, J. B., Quiot, L., Delgadillo, M. O., Garcia, J. A. and Simon-Mateo, C. (2008). Host-specific effect of P1 exchange

- between two potyviruses. *Mol. Plant Pathol.* 9: 147-155.
87. Seo, J. K., Ohshima, K., Lee, H. G., Son, M., Choi, H. S., Lee, S. H., Sohn, S. H. and Kim, K. H. (2009). Molecular variability and genetic structure of the population of *Soybean mosaic virus* based on the analysis of complete genome sequences. *Virology* 393: 91-103.
  88. Shi, Y., Chen, J., Hong, X., Chen, J. and Adams, M. J. (2007). A potyvirus P1 protein interacts with the Rieske Fe/S protein of its host. *Mol. Plant Pathol.* 8: 785-790.
  89. Shibolet, Y. M., Haronsky, E., Leibman, D., Arazi, T., Wassenegger, M., Whitham, S. A., Gaba, V. and Gal-On, A. (2007). The conserved FRNK box in HC-Pro, a plant viral suppressor of gene silencing, is required for small RNA binding and mediates symptom development. *J. Virol.* 81: 13135-13148.
  90. Shukla, D. D., McKern, N. M. and Ward, C. W. (1988). Coat protein of potyviruses. 5. Symptomatology, serology, and coat protein sequences of three strains of passionfruit woodiness virus. *Arch. Virol.* 102: 221-232.
  91. Shukla, D. D. and Ward, C. W. (1988). Amino acid sequence homology of coat proteins as a basis for identification and classification of the potyvirus group. *J. Gen. Virol.* 83: 895-906.
  92. Silhavy, D., Molnar, A., Lucioli, A., Szittyá, G., Hornyik, C., Tabazza, M. and Burgyan, J. (2002). A viral protein suppresses RNA silencing and binds silencing-generated, 21- to 25-nucleotide double-stranded RNAs. *EMBO J.* 21: 3070-3080.
  93. Simon-Buela, L., Guo, H. S. and Garcia, J. A. (1997). Long sequences in the 5' noncoding region of plum pox virus are not necessary for viral infectivity but

- contribute to viral competitiveness and pathogenesis. *Virology* 233: 157-162.
94. Sokhandan, N., Gillings, M. R. and Bowyer, J. W. (1997). Polymerase chain reaction detection and assessment of genetic variation in New South Wales isolates of passionfruit woodiness potyvirus. *Australas. Plant Pathol.* 26: 155-164.
  95. Spetz, C. and Valkonen, J. P. T. (2004). Potyviral 6K2 protein long-distance movement and symptom-induction functions are independent and host specific. *Mol. Plant Microbe Interact.* 17: 502-510.
  96. Steninhauser, D. A., Domingo. E. and Holland, J. J. (1992). Lack of evidence for proofreading mechanisms associated with an RNA virus polymerase. *Gene* 122: 281-288.
  97. Suehiro, N., Natsuaki, T., Watanabe, T. and Okuda, S. (2004). An important determinant of the ability of *Turnip mosaic virus* to infect *Brassica* spp. and/or *Raphanus sativus* is in its P3 protein. *J. Gen. Virol.* 85: 2087-2098.
  98. Tajima, F. (1989). Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. *Genetics* 123: 585-595.
  99. Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M. and Kumar, S. (2011). MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol. Biol. Evol.* 28: 2731-2739.
  100. Tomimura, K., Spak, J., Katis, N., Jenner, C. E., Walsh, J. A., Gibbs, A. J. and Ohshima, K. (2004). Comparisons of the genetic structure of populations of *Turnip mosaic virus* in West and East Eurasia. *Virology* 330: 408-423.
  101. Tomitaka, Y. and Ohshima K. (2006). A phylogeographical study of the *Turnip mosaic virus* population in East Asia reveals an 'emergent' lineage in Japan. *Mol.*



- Ecol. 15: 4437-4457.
102. Tomlinson, J. A. (1987). Epidemiology and control of virus disease of vegetables. *Ann. App. Biol.* 110: 661-681.
103. Torres-Barcelo, C., Martin, S., Daros, J. A. and Elena, S. F. (2008). From hypo- to hypersuppression: effect of amino acid substitutions on the RNA-silencing suppressor activity of the *Tobacco etch potyvirus* HC-Pro. *Genetics* 180: 1039-1049.
104. Traore, O., Sorho, F., Pinel, A., Abubakar, Z., Banwo, O., Maley, J., Hebrard, E., Winter, S., Sere, Y., Konate, G. and Fargette, D. (2005). Processes of diversification and dispersion of *Rice yellow mottle virus* inferred from large-scale and high-resolution phylogeographical studies. *Mol. Ecol.* 14: 2097-2110.
105. Tribodet, M., Glais, L., Kerlan, C. and Jacquot, E. (2005). Characterization of *Potato virus Y* (PVY) molecular determinants involved in the vein necrosis symptom induced by PVY<sup>N</sup> isolates in infected *Nicotiana tabacum* cv. Xanthi. *J. Gen. Virol.* 86: 2101-2105.
106. Tsompana, M., Abad, J., Purugganan, M. and Moyer, J. W. (2005). The molecular population genetics of the *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) genome. *Mol. Ecol.* 14: 53-66.
107. Turpen, T. H., Turpen, A. M., Weinzettl, N., Kumagai, M. H. and Dawson, W. O. (1993). Transfection of whole plants from wounds inoculated with *Agrobacterium tumefaciens* containing cDNA of tobacco mosaic virus. *J. Virol. Methods* 42: 227-239.
108. Valli, A., Lopez-Moya, J. J. and Garcia, J. A. (2007). Recombination and gene duplication in the evolutionary diversification of P1 proteins in the family

*Potyviridae*. J. Gen. Virol. 88: 1016-1028.

109. Verchot, J. and Carrington, J. C. (1995). Evidence that the potyvirus P1 proteinase functions in *trans* as an accessory factor for genome amplification. J. Virol. 69: 3668-3674.
110. Vives, M. C., Martin, S., Ambros, S., Renovell, A., Navarro, L., Pina, J. A., Moreno, P. and Guerri, J. (2008). Development of a full-genome cDNA clone of *Citrus leaf blotch virus* and infection of citrus plants. Mol. Plant Pathol. 9: 787-797.
111. Voinnet, O., Rivas, S., Mestre, P. and Baulcombe, D. (2002). An enhanced transient expression system in plants based on suppression of gene silencing by the p19 protein of tomato bushy stunt virus. Plant J. 33: 949-956.
112. Voinnet, O., Pinto, Y. M. and Baulcombe, D. C. (1999). Suppression of gene silencing: a general strategy used by diverse DNA and RNA viruses of plants. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 96: 14147-14152.
113. Wen, R. H., Saghai Maroof, M. A. and Hajimorad, M. R. (2011). Amino acid changes in P3, and not the overlapping pipo-encoded protein, determine virulence of *Soybean mosaic virus* on functionally immune *Rsv1*-genotype soybean. Mol. Plant Pathol. 12: 799-807.
114. Yambao, M. L. M., Yagihashi, H., Sekiguchi, H., Sekiguchi, T., Sasaki, T., Sato, M., Atsumi, G., Tachashi, Y., Nakahara, K. S. and Uyeda, I. (2008). Point mutations in helper component protease of clover yellow vein virus are associated with the attenuation of RNA-silencing suppression activity and symptom expression in broad bean. Arch. Virol. 153: 105-115.
115. Yang, L. J., Hidaka, M., Sonoda, J., Masaki, H. and Uozumi, T. (1997). Mutational analysis of potato virus Y 5' untranslated region for alteration in translational

- enhancement in tobacco protoplasts. *Biosci. Biotech. Biochem.* 61: 2131-2133.
116. Zhang, C., Hajimorado, M. R., Eggenberger, A. L., Tsang, S., Whitham, S. A. and Hill, J. H. (2009). Cytoplasmic inclusion cistron of *Soybean mosaic virus* serves as a virulence determinant on *Rsv3*-genotype soybean and symptom determinant. *Virology* 391: 240-248.
117. Zhang, C. L., Gao, R., Wang, J., Zhang, G. M., Li, X.D. and Liu, H. T. (2011). Molecular variability of *Tobacco vein banding mosaic virus* populations. *Virus. Res.* 158: 188-198.

## 摘要

本研究では、パッションフルーツ東アジアウイルス (*East Asian Passiflora virus*; EAPV) 分離株の分子生物学的性状、地理系統学的相互関係および遺伝構成について調査を行った。

まず、果実の奇形・木質化を生じない IB 系統の基準株である指宿株の全塩基配列を決定し、それらの症状を生じる AO 系統の基準株である奄美大島株のものと比較した結果、5'非翻訳領域 (UTR) および P1 コード領域における塩基配列の多様性が高いことが明らかとなり、これらの領域が系統間における病徴および宿主範囲の違いに関与することが示唆された。また、二系統の EAPV を RT-PCR により区別するプライマーを設計し、鹿児島県を中心とする南日本における EAPV の分布調査を 2005 年から 2010 年にかけて行った。その結果、AO 系統は 2005 年と 2007 年に奄美大島および鹿児島県本土での発生がみられたが、2010 年の調査では奄美大島に限られていた。一方、IB 系統は 2005 年に鹿児島県本土で発生が確認されたものの、その後の調査ではいずれの地域からも検出されなかった。

次に、RT-PCR による分布調査の結果を精査するため、2005 年から 2010 年にかけて奄美大島の 4 地域 (龍郷、宇検、住用および瀬戸内) から採取した EAPV 分離株について、コートプロテイン (CP) およびポリプロテインコード領域の塩基配列を決定し、遺伝構造と多様性を解析した。決定した塩基配列の AO 系統基準株に対する相同性は、CP コード領域において >98.5%、ポリプロテインコード領域において >98.8% であり、全ての分離株が AO 系統であることが再確認された。このことは分子系統解析においても支持され、AO 系統と IB 系統は同種でありながらもその系統学的距離は遠いことが明らかとなった。奄美大

島分離株間における明確な地理系統学的関係性はみられなかった。奄美大島の EAPV 集団における遺伝的多様性は比較的低いものの、その値はタンパク質コード領域間で有意に異なっていた。また、選択圧の解析では、全てのタンパク質コード領域が負の選択圧を受けていることが示唆されたが、その強度もまた領域間で有意に異なっていた。中立平衡テストにおいては、住用地域の EAPV 集団が有意な負の値を示し、近年突発的に拡散したことが示唆された。

さらに、EAPV における遺伝子機能の解明を目的とし、AO 系統に属す YW 株の cDNA クローンを構築した。構築にあたり、YW 株の全塩基配列を決定し奄美大島株のものと比較した結果、YW 株の 5'UTR が 29 塩基長いことが明らかとなった。そこで、この 29 塩基の配列をもつクローン (p35SYW) ともたないクローン (p35SYW $\Delta$ 29) を構築しアグロインフィルトレーション法を用いて *Nicotiana benthamiana* に接種したところ、p35SYW は高い感染性を示したのに対し、p35SYW $\Delta$ 29 はジーンサイレンシングサプレッサー (p19) の存在下でのみ感染性が確認された。このことから、5'UTR が EAPV の *N. benthamiana* に対する感染性に関与する可能性が示唆された。

## 謝辞

本研究を行うにあたり、終始懇篤なる御指導、御鞭撻を賜った鹿児島大学農学部教授 岩井久博士、同准教授 中村正幸博士、佐賀大学農学部教授 大島一里博士、温かい激励と多大なる御助言を賜った鹿児島大学農学部教授 津田勝男博士、同准教授 坂巻祥孝博士、また、本論文の周密なる御校閲を頂いた琉球大学農学部教授 諸見里善一博士、佐賀大学准教授 草場基章博士に衷心より感謝の意を表す。鹿児島県農業開発総合センター 野島秀伸氏、沖縄県農業研究センター 河野伸二博士、東京都農林総合研究センター 近藤健氏には供試植物の採集に協力していただいた。岡山大学資源植物研究所助教 近藤秀樹博士には p19 を利用した RNA サイレンシングの抑制に関する御助言を頂き、Cambridge 大学 David Baulcombe 博士には pBIN61:p19 を分譲していただいた。また、当研究室の学生諸氏には数々の御支援と御協力をいただいた。最後に、妻および家族には学位取得に対する理解と温かい支援をもらった。ここに記して心より感謝の意を表す。

## Summary

In this study, the molecular biological properties, phylogeographical relationships and genetic structure of *East Asian Passiflora virus* (EAPV) isolates were investigated.

At the beginning, the complete nucleotide sequence of EAPV-Ibusuki isolate, the type isolate of the IB strain, was determined and compared with that of EAPV-Amami-O-shima isolate, the type isolate of the AO strain. The result showed that they have great sequence diversity at their 5'UTRs and P1 encoding regions, suggesting that these regions are involved in the differences of their symptoms on fruit and host ranges. Then, the strain-specific primers which can distinguish the two strains of EAPV by RT-PCR were designed and their distributions in southern Japan, mainly in Kagoshima prefecture were investigated from 2005 to 2010. The AO strain was detected in the samples from the Kagoshima mainland and Amami-O-shima both in 2005 and 2007, but in the 2010 survey, the incidence was restricted to Amami-O-shima. In contrast, the IB strain was found only in the Kagoshima mainland in 2005, and this strain is now extinct even in the region.

Next, to evaluate the results of distribution surveys by RT-PCR, the nucleotide sequences of coat protein (CP) and polyprotein encoding regions of the EAPV isolates collected from four different regions (Tatsugo, Uken, Sumiyo and Setouchi) in Amami-O-shima between 2005 and 2010 were determined, and their genetic structure and variability were analysed. The identities of resultant CP and polyprotein encoding nucleotide sequences against the type isolate of the AO strain were >98.5% and >98.8%, respectively, confirming that all the isolates are of the same genetic group. This result was also supported by phylogenetic analyses, and it was revealed that the AO and IB

strains are the same species but they have a distant relationship. Among the isolates originated in Amami-O-shima, no clear phylogeographical relationship was observed. Estimates of nucleotide diversity showed that the EAPV population in Amami-O-shima had low diversity through the genome and all the genes were under negative selection, but the genetic constraints were varied between different protein-encoding regions. The values of neutrality tests for Sumiyo group were consistently negative, suggesting that this group have expanded recently.

Finally, for the basis of gene function analysis of EAPV, the infectious cDNA clone of an isolate of the AO strain, EAPV-YW, was constructed. The complete genome sequence of YW isolate was determined and compared with that of Amami-O-shima isolate, revealing that YW isolate has the extra sequence consisted of 29 nt at the 5'UTR region. Therefore, two types of the cDNA clone, p35SYW (full length cDNA clone) and p35SYW $\Delta$ 29 (the first 29 nt deleted cDNA clone), were constructed and inoculated to *Nicotiana benthamiana* by agroinfiltration. The results revealed that p35SYW has high infectivity but p35SYW $\Delta$ 29 is only infectious under the presence of a gene silencing suppressor (p19), suggesting that the 5'UTR of EAPV might be involved in the infectivity to *N. benthamiana*.