

学 位 論 文 要 旨	
氏 名	福元 智博
題 目	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 <i>East Asian Passiflora virus</i> )
<p>本研究では、パッションフルーツ東アジアウイルス (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。</p> <p>まず、IB 系統の基準株である指宿株の全塩基配列を決定し、AO 系統の基準株である瀬戸内由来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。</p> <p>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 &gt;98.5%、ポリプロテインコード領域において &gt;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。</p> <p>さらに、EAPV における遺伝子機能の解明を目的とし、AO 系統に属す宇検由来 YW 株の cDNA クロンを構築した。構築にあたり、YW 株の全塩基配列を決定し瀬戸内由来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ン (p35SYW) ともたないクロン (p35SYW<math>\Delta</math>29) を構築しアグロインフィルトレーション法を用いて <i>Nicotiana benthamiana</i> に接種したところ、p35SYW は高い感染性を示したのに対し、p35SYW<math>\Delta</math>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 <i>N. benthamiana</i> に対する感染性に関与する可能性が示唆された。</p>	

## 学 位 論 文 要 旨

氏 名 Tomohiro Fukumoto

題 目 A molecular ecological study on *East Asian Passiflora virus*  
(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)

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 originated in Setouchi, 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 collected from Uken, EAPV-YW, was constructed. The complete genome sequence of YW isolate was determined and compared with that of Amami-O-shima isolate originated in Setouchi, 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*.