

亜熱帯果樹のウイルスについての  
集団遺伝学的研究

Study of the population genetics on  
the subtropical fruit viruses

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

千秋 祐也

2016

第Ⅰ章	緒論.....	1
第Ⅱ章	材料および実験方法.....	9
1	スマトラ島における BBTV の遺伝構造と多様性の解析.....	9
1-1	供試ウイルス.....	9
1-2	DNA 抽出.....	9
1-3	PCR.....	9
1-4	クローニング.....	15
1-5	シーケンシング.....	15
1-6	DNA-U3 のステムループ領域の 2 次構造の決定.....	16
1-7	系統学的解析.....	16
1-8	組換え解析.....	16
1-9	遺伝的多様性と選択圧の解析.....	16
1-10	中立平衡解析.....	17
1-11	遺伝的分化および遺伝子流動解析.....	17
2	BBTV の集団遺伝学的解析.....	17
2-1	供試ウイルス.....	17
2-2	遺伝的多様性と選択圧の解析.....	18
2-3	中立平衡解析.....	21
2-4	遺伝的分化および遺伝子流動解析.....	21
3	奄美大島における EAPV の集団遺伝学的解析.....	21
3-1	供試ウイルス.....	21
3-2	RNA 抽出、RT-PCR およびシーケンシング.....	21
3-3	組換え解析.....	25
3-4	系統学的解析.....	25
3-5	遺伝的多様性、選択圧の解析および中立平衡解析.....	25
3-6	遺伝的分化および遺伝子流動解析.....	25
第Ⅲ章	結果.....	26
1	スマトラ島における BBTV の遺伝構造と多様性の解析.....	26

1-1	各コンポーネントのシーケンシング.....	26
1-1-1	DNA-R の解析.....	26
1-1-2	DNA-S の解析.....	30
1-1-3	DNA-U3 の解析.....	30
1-1-4	DNA-R、-S、-U3 の遺伝的多様性の解析.....	32
1-2	系統学的解析.....	32
1-3	組換え解析.....	38
1-4	遺伝的多様性と選択圧の解析.....	38
1-5	中立平衡解析.....	41
1-6	遺伝的分化および遺伝子流動解析.....	41
2	BBTV の集団遺伝学的解析.....	44
2-1	遺伝的多様性と選択圧の解析.....	44
2-2	中立平衡解析.....	44
2-3	遺伝的分化および遺伝子流動解析.....	46
3	奄美大島における EAPV の集団遺伝学的解析.....	51
3-1	塩基配列およびアミノ酸の相同性.....	51
3-2	組換え解析.....	53
3-3	遺伝的多様性と選択圧の解析.....	56
3-4	中立平衡解析.....	56
3-5	系統学的解析.....	59
3-6	遺伝的分化および遺伝子流動解析.....	59
第IV章	考察.....	66
1	スマトラ島における BBTV の遺伝構造と多様性の解析.....	66
2	BBTV の集団遺伝学的解析.....	69
3	奄美大島における EAPV の集団遺伝学的解析.....	70
第V章	総合考察.....	73
	参考文献.....	80
	摘要.....	92

謝辭.....	94
Abstract.....	95

## 第 I 章 緒論

亜熱帯果樹であるバナナ (*Musa* spp.) とパッションフルーツ (*Passiflora edulis* Sims) の生産において、世界各国で、ウイルス病が重大な問題となっている。バナナに感染するウイルスとしては、*Banana bunchy top virus* (BBTV) (Harding et al., 1991)、*Banana bract mosaic virus* (BBrMV) (Bateson and Dale, 1994)、*Banana streak virus* (BSV) (Lockhart, 1986)、*Cucumber mosaic virus* (CMV) (Singh et al., 1995) の 4 種が報告されており、その生産を阻む原因となっている。一方、パッションフルーツに感染するウイルスは、*Potyvirus* 属、*Cucumovirus* 属の CMV (Taylor et al., 1964)、*Carlavirus* 属の *Passiflora latent virus* (Spiegel et al., 2007)、*Tymovirus* 属の *Passion fruit yellow mosaic virus* (Crestani et al., 1986, Morales et al., 2002)、*Tobamovirus* 属の *Maracuja mosaic virus* (Song et al., 2006)、*Tomato ringspot virus* (Koenig and Fribourg, 1986)、*Geminivirus* 属の *Passiflora leaf mottle virus* (Brown et al., 1993)、*Begomovirus* 属の *Passion flower little leaf mosaic virus* (Novaes et al., 2003)、*Passionfruit severe leaf distortion virus* (Ferreira et al., 2010)、*Euphorbia leaf curl virus* (Cheng et al., 2014)、*Papaya leaf curl Guangdong virus* (Cheng et al., 2014) 等、数多く報告されているが、その中でも特に、*Potyvirus* 属によるパッションフルーツウッドィネス病(PWD)は、生産において大きな脅威となっており、この病気を引き起こす原因として、*Cowpea aphid borne mosaic virus* (CABMV) (McKern et al., 1994)、*East Asian Passiflora virus* (EAPV) (Iwai et al., 2006b)、*Passionfruit woodiness virus* (PWV) (McKnigh, 1953)、*Ugandan Passiflora virus* (Ochwo-Ssemakula et al., 2012) の 4 種が報告されている。

植物ウイルスにおいて、集団遺伝学的解析を行うことは、ウイルスの進化や、植物とウイルスの相互作用を解明するための重要な知見であると考えられている (García-Arenal et al., 2003)。これまでに、植物ウイルスの集団遺伝学的解析は、RNA ウイルスを中心に行われており、DNA ウイルスにおける例は少ない。RNA ウイルスにおいては、*Potyvirus* 属で、詳しく研究されており、*Potato virus Y*

(PVY) (Ogawa et al., 2008, Karasev et al., 2011, Ogawa et al., 2012)、*Tobacco vein banding virus* (TVBMV) (Zhang et al., 2011)、*Sugarcane mosaic virus* (SCMV) (Li et al., 2013)、*Banana bract mosaic virus* (BBrMV) (Balasubramanian and Selvarajan, 2014)、*Turnip mosaic virus* (TuMV) (Ohshima et al., 2002, Tomimura et al., 2004, Tomitaka and Ohshima, 2006, Nguyen et al., 2013)などで、ウイルス集団の遺伝構造や多様性が研究されている。一方、DNA ウィルスでは、主に *Geminivirus* 科において、ウイルス集団の遺伝構造や多様性が研究されている (Sánchez-Campos et al., 2002, Ge et al., 2007, Ribeiro et al., 2007, Moriones and Navas-Catillo, 2008, Lefeuvre et al., 2010, Rocha et al., 2013)。また、わずかではあるが、本研究で用いた *Nanovirus* 科においても、ウイルス集団の多様性や進化に関する報告がある (Hu et al., 2006, Grigoras et al., 2010, Stainton et al., 2012, Stainton et al., 2015)。

一般的に、ウィルスは、突然変異、組換え、再集合の3要素によって、進化し、宿主へ適応していると考えられている。特にRNA ウィルスの場合、コードしているRNA 依存性RNA ポリメラーゼには修復機能が無いため、DNA ウィルスと比較して、突然変異が起こりやすいとされる (Drake 1993, Domingo and Holland, 1997, Drake and Holland, 1999)。また、RNA ウィルスは、突然変異率が高く、1世代の周期も短いことから、遺伝子の進化と表現型の進化を同時に調べるための、最適なモデルであると考えられている (渡辺ら, 2008)。

植物ウィルスにおける組換えは、近年盛んに研究されるようになり、本研究で用いた *Babuvirus* 属と *Potyvirus* 属においても、いくつかの種のウィルスで組換えを起こしていることが確認されている。*Babuvirus* 属においては、BBTV において研究されており、進化の過程において、多くの分離株間で組換えが起きていることが報告されている (Hyder et al., 2011, Stainton et al., 2011, Stainton et al., 2015)。*Potyvirus* 属においては、*Turnip mosaic virus* (TuMV)で詳しく研究されており、TuMV の分子進化や新たな宿主への適応には組換えが関与している可能性が報告された (Ohshima et al., 2007)。

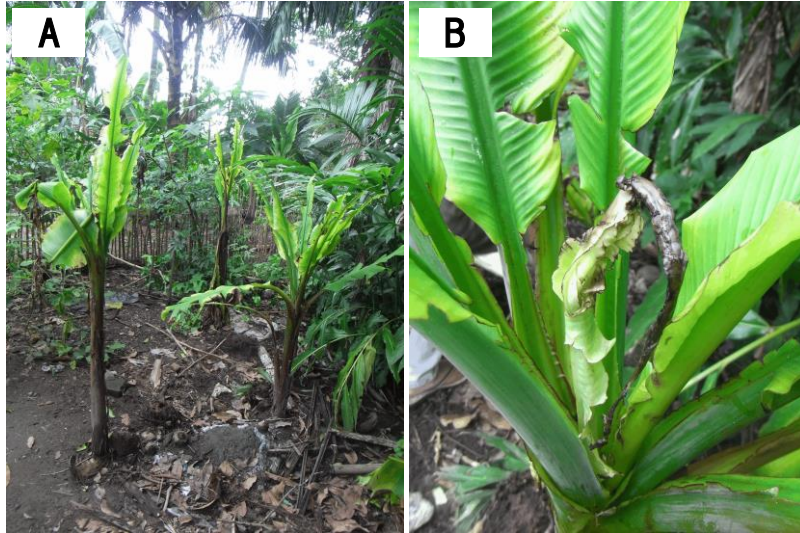
このように、ウイルス集団の遺伝構造や、多様性を研究することは、ウィルス

の進化や宿主適応の解明、および防除法を検討する上で重要な基礎的知見となり得る。そこで、本研究では、世界各国でバナナバンチートップ病 (BBTD)を引き起こす原因となっている BBTV と、主に日本において PWD の原因となっている EAPV を対象に集団遺伝学的解析を行った。

BBTV の宿主であるバナナは、バショウ科バショウ属に属する多年生草本作物であり、熱帯から亜熱帯地域の国において栽培され、食料および輸出作物として非常に重要な役割を果たしている。現在食用とされているバナナは、マレー半島原産の *M. acuminata* (AA ゲノム)とフィリピン原産の *M. balbisiana* (BB)ゲノム)に由来しており、突然変異や、これらの交雑によって生じた種無し株である、3 倍体品種 (AAA、AAB、ABB ゲノム)が主に利用されている (中村, 1991)。本研究で調査の対象としたインドネシアは、世界で 6 番目のバナナの生産国である (FAOSTAT, 2011)。しかし、近年、インドネシアのバナナプランテーションにおいて、BBTD が非常に大きな脅威となっている。

BBTD は *Nanovirus* 科、*Babuvirus* 属の BBTV によって引き起こされる病気であり、アブラムシ (*Pentalonia nigronervosa*)によって伝搬される (Dale, 1987)。BBTV に感染したバナナは、萎縮症状や、葉の退緑、葉枯れ症状などを呈し、果実が結実不良となるため、経済的な被害が非常に大きい (Fig. 1)。BBTV のゲノムは DNA-R、-U3、-S、-M、-C、-N と呼ばれる 6 つの環状 1 本鎖 DNA で構成されており、それぞれが直径 18-20nm の粒子に格納されている (Vetten et al., 2012)。DNA-R は Replication initiation protein (M-Rep)、DNA-S は Coat protein (CP)、DNA-M は Movement protein (MP)、DNA-C は Cell cycle link protein (Clink)、そして DNA-N は Nuclear shuttle protein (NSP)を、それぞれコードしているが、DNA-U3 がコードしているタンパク質の機能については、未だ解明されていない (Vetten et al., 2012)。また、BBTV は、すべてのコンポーネントを用いた系統学的解析によって、Asian group と South Pacific group の 2 つのグループに分類されることが報告されている (Karan et al., 1994, Wanitchakorn et al., 2000, Vishnoi et al., 2009)。

BBTV のすべてのコンポーネントには、Stem-loop common region (CR-SL) およ



**Fig. 1** Symptoms of BBTV in banana plants in the field in Pariaman, West Sumatra: (A) stunting and leaf chlorosis; (B) leaf blight.



び Major common region (CR-M)と呼ばれる、2つの共通領域の存在が報告されている (Harding et al., 1993, Burns et al., 1995)。CR-SL は、ステムループ構造と、F1、F2、R と呼ばれる反復配列を含んでおり、BBTV の複製において重要な役割を持つことが報告されている (Herrera-Valencia et al., 2006)。CR-M には、GC リッチ領域が含まれていることが報告されているが、その機能は明らかになっていない (Burns et al., 1995)。

現在まで、インドネシアにおける BBTV の研究は、ジャワ島とバリ島のウイルス株について行われており、DNA-R を用いた系統学的解析の結果、Asian group に属することが報告されている (Furuya et al., 2004, Pinili et al., 2011)。しかしスマトラ島は、バナナの主要な生産地の1つであるにもかかわらず、現在まで、BBTV の調査が行われていなかった。そこで、まず、本研究では、スマトラ島のバナナに、BBTV が感染しているかどうかを調べ、検出されたウイルスに対し、DNA-R、-U3、-S の塩基配列を決定した。その後、それらのデータを基に、スマトラ島の BBTV 集団の遺伝構造と多様性を解析した。

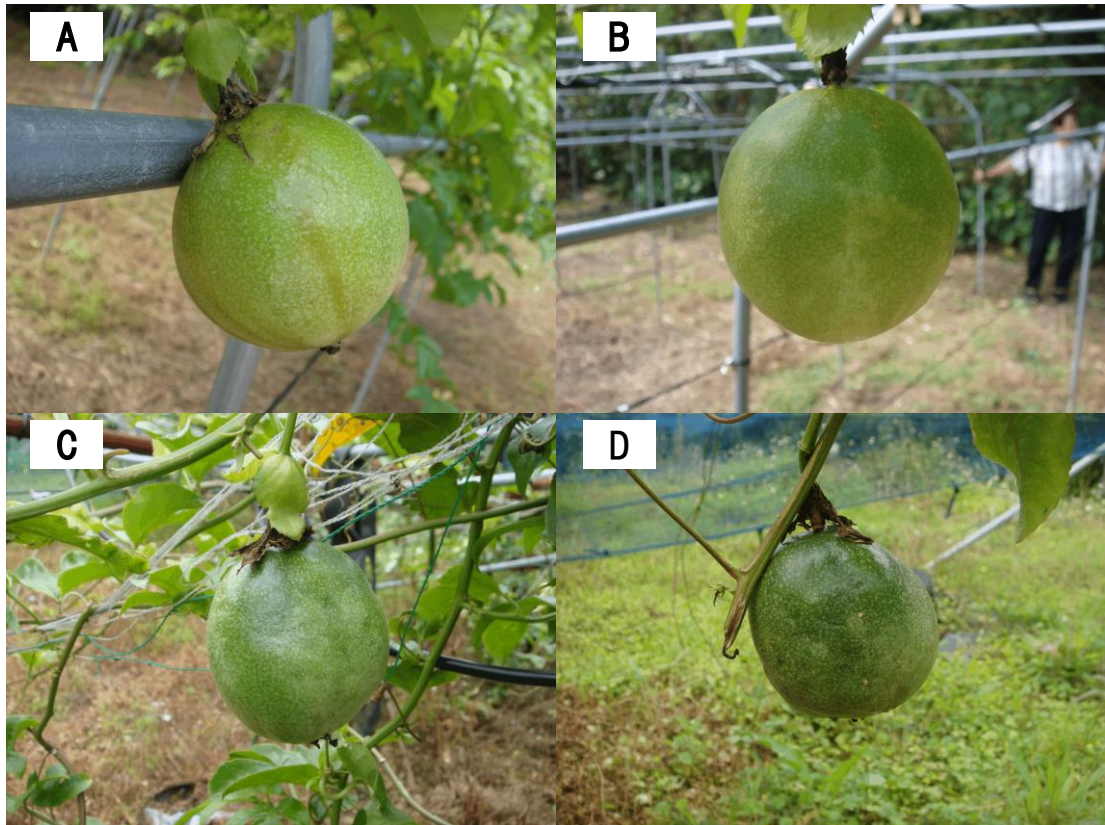
さらに、これまでは、BBTV において、各国集団の配列データを用いた網羅的な集団遺伝学的解析は行われていなかった。故に、本研究では、これらの配列データに、スマトラ集団の配列データを加え、各国集団の集団遺伝学的解析を行い、各ウイルス集団の交流について考察した。

EAPV の宿主であるパッションフルーツは、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。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、後者は酸味が強く、果汁が多いことから、主に加工原料として利用されている。日本での栽培は、1920 年代に鹿児島県指宿市へ渡来したものが最初とされ、その後 1950 年代後半から栽培の中心が南西諸島に移動し、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)。

日本において、PWD は、1986 年に、奄美大島で栽培されるパッションフルー

ツの交配種 (*P. edulis*×*P. edulis* f. *flavicarpa*)で初めて認められた (Iwai et al., 1996)。電子顕微鏡観察により、長さ約 790nm のひも状粒子の存在が認められ、血清学的診断の結果から、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。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、葉にモザイクおよび縮葉症状を示すものの、果実に対しては表皮の斑紋のみを生じるウイルス株が発見され、PWV-奄美大島株と血清学的関係を示し粒子形態も類似していたことから、PWV-指宿株と命名された。しかし、その後、両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、相同性解析および系統学的解析により、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るものの、これら 2 株および別に報告されていた PWV-台湾株は、PWV および CABMV とは異なる新たな種を構成することが明らかとなり、*East Asian Passiflora virus* と再命名された (Iwai et al., 2006b)。さらにその後、奄美大島株の全塩基配列が決定され、ポリプロテイン領域のアミノ酸配列を用いた分子系統解析においても、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., 2006a)。

EAPV は 1986 年に、奄美大島の瀬戸内町で初めて確認された後、1997 年には奄美大島全域のパッションフルーツで感染が確認された (Iwai et al., 1996, Iwai et al., 1997)。また、発生当初は、本島全域において症状に違いは認められなかった。しかし、その後病害発生圃場の全株植え替えが進められた結果、現在、EAPV の存在は、奄美大島の宇検村湯湾および奄美市住用町の 2 箇所のみとなった。ところが興味深いことに、それぞれの地域における病徴が大きく異なることが認められている。湯湾における病徴は、発生当初と変わらず、縮葉症状や果実の奇形および木質化が認められるが、住用町における病徴は次第に変化してきており、現在では、縮葉症状やモザイクが軽微であり、果実の木質化や奇形が認められない (Fig. 2)。そこで、本研究では、この現象の原因を調査するために、2014 年に両地域から、EAPV に感染しているパッションフルーツを採取し、2010 年以前のウイルスと、ゲノムの塩基配列を比較することにより、両地域における EAPV 集団の遺伝構造の変化を解析した。



**Fig. 2** Symptoms of EAPV in passionfruit in the field in Yakugachi area of Sumiyo town, Amami city (A, B) and Yuwan area of Uken village (C, D)

最後に、これら2種のウイルスの遺伝構造や多様性についての調査結果を基に、両ウイルスの進化や宿主への適応についても考察した。

なお、結果の一部はすでに報告しているが (Chiaki et al., 2015, 2016)、全体をまとめて本論文とした。

## 第Ⅱ章 材料および実験方法

### 1 スマトラ島における BBTV の遺伝構造と多様性の解析

#### 1-1 供試ウイルス

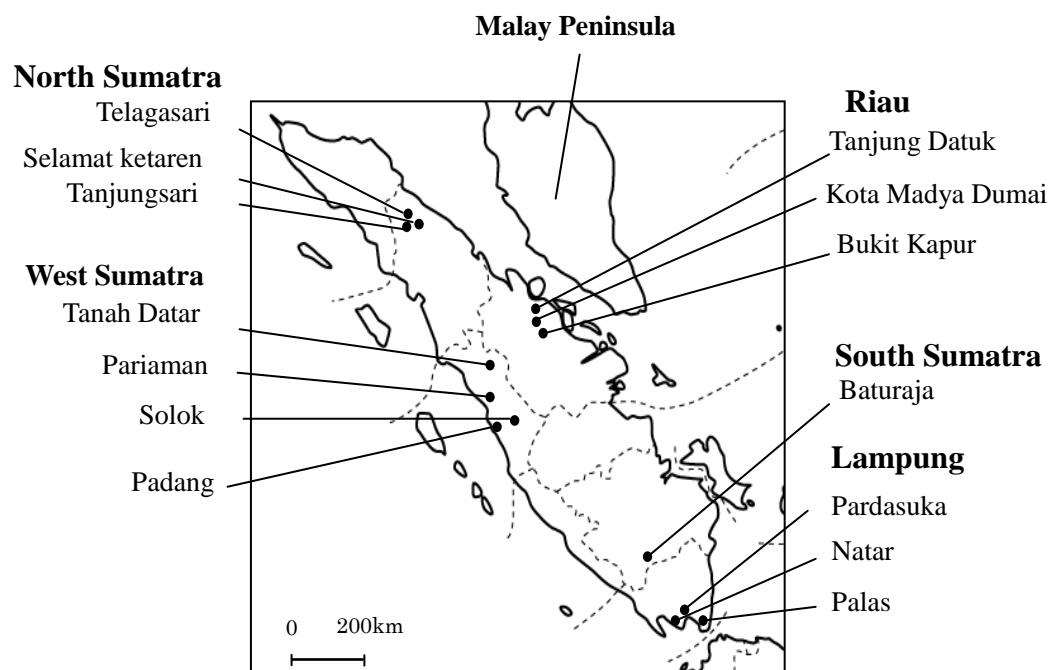
2010 年から 2012 年に、著者ならびに共同研究者は、スマトラ島において、典型的な BBTD 症状を呈した、61 株のバナナの葉を採取した。採取した葉は、シリカゲルにて乾燥後、農林水産省の許可のもとで輸入し、4℃で保存した。採取した州、地域およびバナナ品種は Fig. 3 および Table 1 に示した。

#### 1-2 DNA 抽出

バナナの乾燥葉 0.01g から、DNeasy Plant Mini Kit (QIAGEN)を使用して全 DNA を抽出した。抽出した DNA は使用するまでの間、-20℃で保存した。

#### 1-3 PCR

抽出した全 DNA を鋳型とし、DNA-R、-U3、および-S の PCR 増幅を行った。各コンポーネントの増幅に用いたプライマーは、Table 2 に示した。DNA-R および DNA-S の増幅には *EX Taq polymerase* (TaKaRa, エラー率:  $62 \times 10^{-4}$ )を、多様性が高いとされる DNA-U3 の増幅には正確性の高い *Platinum® Pfx* (Invitrogen, エラー率:  $1.58 \times 10^{-6}$ )を用い、変性温度 94℃で、2 分を 1 サイクル、変性温度 94℃で、1 分、それぞれのプライマーに対応するアニーリング温度 (Table 2)で、1 分、



**Fig. 3** Banana leaf sampling locations for the detection of BBTV.

**Table 1** Description of BBTV Sumatra isolates used in this study

Planting area of host banana		Host			Accession NO. of determined genome of BBTV		
State	Location	Variety	Genotype	Isolate name	DNA-R	DNA-U3	DNA-S
North Sumatra	Selamat Ketaren	Pisang Cavendish	AAA	SK-1	AB847570	AB848015	AB848052
	Tanjungsari	Pisang Cavendish	AAA	TN-1	AB847573	AB848018	AB848055
	Telagasari	Pisang Jantan	AAB	TE-1	AB847571	AB848016	AB848053
		Pisang Cavendish	AAA	TE-2	AB847572	AB848017	AB848054
West Sumatra	Padang	Pisang Cavendish	AAA	PD-1	AB847574	AB848019	AB848056
		Pisang Cavendish	AAA	PD-2	AB847575	AB848020	AB848057
		Pisang Manis	AA	PD-3	AB847576	—	AB848058
		Unknown	Unknown	PD-4	AB847577	—	AB848059
		Pisang Manis	AA	PD-5	AB847578	—	AB848060
		Pisang Manis	AA	PD-6	AB847579	—	AB848061
		Pisang Manis	AA	PD-7	AB847580	—	AB848062
		Pisang Manis	AA	PD-8	AB847581	AB848021	AB848063
	Pariaman	Pisang Cavendish	AAA	PR-1	AB847582	AB848022	AB848064
		Pisang Jantan	AAB	PR-2	AB847583	AB848023	AB848065
		Jari Buaya	AA	PR-3	AB847584	—	AB848066
		Pisang Manis	AA	PR-4	AB847585	—	AB848067
		Pisang Jantan	AAB	PR-5	AB847586	—	AB848068
		Pisang Jantan	AAB	PR-6	AB847587	AB848024	AB848069
		Pisang Jantan	AAB	PR-7	AB847588	—	AB848070
	Solok	Sirandah	AAA	SL-1	AB847589	AB848025	AB848071

**Table 1** continued

Planting area of host banana		Host			Accession NO. of determined genome of BBTV		
State	Location	Variety	Genotype	Isolate name	DNA-R	DNA-U3	DNA-S
West Sumatra	Solok	Pisang Cavendish	AAA	SL-2	AB847590	—	AB848072
		Pisang Cavendish	AAA	SL-3	AB847591	—	AB848073
		Sirandah	AAA	SL-4	AB847592	—	AB848074
		Pisang Cavendish	AAA	SL-5	AB847593	AB848026	AB848075
		Pisang Kepok	ABB	SL-6	AB847594	AB848027	AB848076
		Raja Serai	AAB	SL-7	AB847595	AB848028	AB848077
		Pisang Kepok	ABB	SL-8	AB847596	AB848029	AB848078
		Pisang Cavendish	AAA	SL-9	AB847597	AB848030	AB848079
		Pisang Cavendish	AAA	SL-10	AB847598	AB848031	AB848080
		Pisang Mas	AA	SL-11	AB847599	AB848032	AB848081
		Pisang Cavendish	AAA	SL-12	AB847600	—	AB848082
		Pisang Lidi	AA	SL-13	AB847601	—	AB848083
		Unknown	Unknown	SL-14	AB847602	—	AB848084
		Pisang Cavendish	AAA	SL-15	AB847603	—	AB848085
		Pisang Lidi	AA	SL-16	AB847604	—	AB848086
		Sirandah	AAA	SL-17	AB847605	AB848033	AB848087
	Tanah Datar	Pisang Cavendish	AAA	TD-1	AB847606	—	AB848088
		Masak Sahari	AA	TD-2	AB847607	—	AB848089
		Pisang Cavendish	AAA	TD-3	AB847608	AB848034	AB848090
		Pisang Godok	ABB	TD-4	AB847609	—	AB848091



**Table 1** continued

Planting area of host banana		Host			Accession NO. of determined genome of BBTV		
State	Location	Variety	Genotype	Isolate name	DNA-R	DNA-U3	DNA-S
Riau	Bukit Kapur	Pisang Cavendish	AAA	BK-1	AB847610	AB848042	AB848092
		Pisang Cavendish	AAA	BK-2	AB847611	AB848041	AB848093
		Pisang Kepok	ABB	BK-3	AB847612	AB848040	AB848094
		Pisang Kepok	ABB	BK-4	AB847613	AB848039	AB848095
	Kota Madya Dumai	Pisang Lidi	AA	KM-1	AB847614	AB848038	AB848096
		Pisang Lidi	AA	KM-2	AB847615	AB848037	AB848097
	Tanjung Datuk	Pisang Jantan	AAB	TA-1	AB847616	AB848036	AB848098
		Masak Sahari	AA	TA-2	AB847617	AB848035	AB848099
South Sumatra	Baturaja	Muli	AA	BA-1	AB847630	AB848043	AB848100
Lampung	Natar	Pisang Kepok	ABB	NA-1	AB847629	AB848044	AB848101
		Pisang Cavendish	AAA	NA-2	AB847628	AB848045	AB848102
		Pisang Jantan	AAB	NA-3	AB847627	—	AB848103
	Palas	Pisang Jantan	AAB	PL-1	AB847626	AB848046	AB848104
		Pisang Jantan	AAB	PL-2	AB847625	AB848047	AB848105
		Raja	AAB	PL-3	AB847624	—	AB848106
	Paradasuka	Muli	AA	PS-1	AB847623	AB848048	AB848107
		Pisang Jantan	AAB	PS-2	AB847622	AB848049	AB848108
		Pisang Jantan	AAB	PS-3	AB847621	—	AB848109
		Muli	AA	PS-4	AB847620	AB848050	AB848110
		Nangka	AAB	PS-5	AB847619	AB848051	AB848111
		Muli	AA	PS-6	AB847618	—	AB848112

**Table 2** Primers used in PCR detection for BBTV

Components	Sequence of Primers	Annealing	Reference
		temperature	
DNA-R	F:5' GGAAGAAGCCTCTCATCTGCTTCAGAGARC 3'	55°C	Karan et al., 1994
	R:5' TCCCCAGGCGCACACCTTGAGAAACGAAAG 3'		
DNA-U3	F:5' GGACGGACCGAAATACT 3'	50°C	Zhuang and Zhi-Xin, 2005
	R:5' ACGTGTCTTACGAATTAA 3'		
DNA-S	F: 5' GGTATTTTCGGATTGAGCCTAC 3'	49°C	Furuya et al., 2004
	R:5' TTGACGGTGTTTTCAGGAACC 3'		

伸長温度 72°C (*EX Taq*)もしくは 68°C (Platinum® *Pfx*)で 2 分のセットを 40 サイクル、伸長温度 72°C (*EX Taq*)もしくは 68°C(Platinum® *Pfx*)で、10 分を 1 サイクルの温度条件で反応を行った。

また、本研究では、既報の BBTV 研究に基づいて、複製に関与すると考えられている DNA-R と、CP をコードしている DNA-S、ならびにコンポーネント中で最も多様性があることが知られている DNA-U3 を以降の解析に用いた。

#### 1-4 クローニング

それぞれの増幅産物は、1%アガロースゲル電気泳動により分画し、目的とする長さの DNA を切り出し、Fast Gene Gel/PCR Extraction Kit (Genetics)を用いて精製した。精製した DNA-R および-S の断片は、pMD20 vector (TaKaRa)へ、DNA-U3 の断片は、*Sma* I で切断した pBluescript SK(+) (Agilent Technologies)へ、T4DNA Ligase (TaKaRa)を用いて組み込んだ。その後、これらのプラスミドを *Escherichia coli* JM109 へ導入し、100mg/ml アンピシリン、2%X-gal、100mM IPTG を添加した LB 寒天培地を用い、37°Cで 15 時間培養することで、ブルー/ホワイト選択を行った。得られた白色コロニーを、100mg/ml アンピシリンを 3μl 加えた LB 培地 3ml に移植し、37°Cで 15 時間振とう培養した。その後、illustra plasmidPrep Mini Spin Kit (GE Healthcare)を使用してプラスミドを抽出した。

#### 1-5 シークエンシング

得られたプラスミド DNA は、Big Dye Terminator Ver3.1 (Applied Biosystems)を用いてシーケンス反応を行った後、ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems)により、塩基配列を決定した。各分離株につき、少なくとも 3 クローンの配列を調べ、塩基配列を決定した。得られた塩基配列の解析には GENETYX version 11 (GENETYX CORP)を用いた。

## 1-6 DNA-U3 のステムループ領域の 2 次構造の決定

DNA-U3 のステムループ領域の 2 次構造の決定は、the mfold Web Server (Zugker, 2003)を用いて行った。

## 1-7 系統学的解析

各コンポーネントの塩基配列を、MEGA5 (Tamura et al., 2011)内の ClustalW を用いて、アライメントした。系統樹の作成には、Kimura's two parameter method (Kimura, 1980)による近隣結合法 (Saitou and Nei, 1987)を用い、各分枝の信頼度は 1000 回のブートストラップ法で算出した。また、アウトグループとして *Abaca bunchy top virus* (ABTV)の塩基配列を使用した。作成した系統樹は MEGA5 内の Tree Explorer を用いて表示した。

## 1-8 組換え解析

組換え部位の推定は、RDP4 (Martin et al., 2010)内の RDP (Martin and Ribicki, 2000)、GENECONV (Padidam et al., 1999)、BOOTSCAN (Salminen et al., 1995)、MAXCHI (Smith, 1992)、CHIMAERA (Posada and Crandall, 2001)、SISCAN (Gibbs et al., 2000)および 3SEQ (Boni et al., 2007)を用いて行った。

## 1-9 遺伝的多様性と選択圧の解析

各コンポーネントの相同性解析には GENETYX version 11 内の Fasta Homology Searchを用いた。また、遺伝的多様性はMEGA5内の maximum composite likelihood (MCL) method を用いて、各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、 $d_N/d_S$  比を算出することで推定した。 $d_N$  は非同義サイトあたりの非同義置換数の平均値、 $d_S$  は同義サイトあたりの同義置換数の平均値を表す。 $d_N$  および  $d_S$  値は、MEGA5 内の Pamilo-Bianchi-Li method (Li, 1993; Pamilo and Bianchi,

1993)を用いて、個別に算出した。

## 1-10 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 version 5 (Librad 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の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。

## 1-11 遺伝的分化および遺伝子流動解析

遺伝的分化は、Hudson (2000)に示された 3 つの統計値 ( $Ks^*$ 、 $Z$  および  $Snn$ )を用いて推定した。遺伝子流動は、DnaSP version 5 を用いて Fixation index ( $F_{ST}$ )を算出することで解析した (Librado and Rozas, 2009)。

## 2 BBTV の集団遺伝学的解析

### 2-1 供試ウイルス

集団遺伝学的解析に用いた既報ウイルス株は Table 3 に示した。本試験を行うには、まとまった数のウイルス株が必要であるため、インドネシア、日本、台湾、中国、ベトナム、インド、パキスタン、およびトンガの集団を用いた。

## 2-2 遺伝的多様性と選択圧の解析

遺伝的多様性、および選択圧の解析は 1-10 項に示した方法で行った。

**Table 3** Description of BBTv used in population genetics analysis

Country	Component	Accession number
China	DNA-R	AF110266, AF238874, AF238875, AF246123, AY450396, FJ463042, GQ374514, HQ378190, HQ616074, U97525
	DNA-S	AF238876, AF238877, AF246122, AF330706, AY337715, AY494786, FJ463044, HQ378191, HQ616076
India	DNA-R	AF416470, AM055641, DQ256267, DQ285570, DQ285571, DQ640741, DQ640742, DQ656118, DQ656119, EU140342, FJ009238, FJ009240, FJ606506, HM120718
	DNA-S	AY534140, DQ515970, DQ996466, EF584544, EF687856, EU190965, EU190966, EU190967, EU190968, EU598459, FJ168538, FJ650507, FJ664270, FJ664271, GU125406, GU125407, GU125408, GU125409, GU125410, GU125411, GU125412, GU125413, GU125414, JN243753, JN250599, JX171699, KC466374, KF246091, KJ513017
Indonesia	DNA-R	AB186924, AB186925, AB186926, AB847570, AB847571, AB847572, AB847573, AB847574, AB847575, AB847576, AB847577, AB847578, AB847579, AB847580, AB847581, AB847582, AB847583, AB847584, AB847585, AB847586, AB847587, AB847588, AB847589, AB847590, AB847591, AB847592, AB847593, AB847594, AB847595, AB847596, AB847597, AB847598, AB847599, AB847601, AB847602, AB847603, AB847604, AB847605, AB847606, AB847607, AB847608, AB847609, AB847610, AB847611, AB847612, AB847613, AB847614, AB847615, AB847616, AB847617, AB847618, AB847619, AB847620, AB847621, AB847622, AB847623, AB847624, AB847625, AB847626, AB847627, AB847628, AB847629, AB847630, JN003631, JN003632, JN003633
	DNA-S	AB186927, AB186928, AB186929, AB848052, AB848053, AB848054, AB848055, AB848056, AB848057, AB848058, AB848059, AB848060, AB848061, AB848062, AB848063, AB848064, AB848065, AB848066, AB848067, AB848068, AB848069, AB848070, AB848071, AB848072, AB848073, AB848074, AB848075, AB848076, AB848077, AB848078, AB848079, AB848080, AB848081, AB848082, AB848081, AB848082, AB848083, AB848084, AB848085, AB848086, AB848087, AB848088, AB848089, AB848090,

**Table 3** continued

Country	Component	Accession number
Indonesia	DNA-S	AB848091, AB848092, AB848093, AB848094, AB848095, AB848096, AB848097, AB8480998, AB848099, AB848100, AB848101, AB848102, AB848103, AB848104, AB848105, AB848106, AB848107, AB848108, AB848109, AB848110, AB848111, AB848112
Japan	DNA-R	AB108452, AB108453, AB108454, AB108455, AB108456, AB108457, AB108458
	DNA-S	AB078023, AB108449, AB108450, AB108451
Pakistan	DNA-R	AF996562, AM418534, AM418535, AM418536, AM418537, AM418538, AM418539, FJ859722, FJ859723, FJ859724, FJ859725, FJ859726, FJ859727, FJ859728, FJ859729, FJ859730, FJ859731, FJ859732, FJ859733, FJ859734
	DNA-S	AM418565, AM418566, AM418567, EF593169, FJ859735, FJ859736, FJ859737, FJ859738, FJ859739, FJ859740, FJ859741, FJ859742, FJ859743, FJ859744, FJ859745, FJ859746, FJ859747
Philippine	DNA-R	AB189067, AB250953, AB250954, AB250955, AF416469
	DNA-S	AB189068, AB250956, AB250957, AB250958, AF148068
Taiwan	DNA-R	AF416468, DQ826390, EF095161, EF095162, EU366169
	DNA-S	AF148942, DQ826393, EF095164, EU366171
Tonga	DNA-R	AF416467, JF957625, JF957626, JF957627, JF957628, JF957629, JF957630, JF957631, JF957632, JF957633, JF957634, JF957635, JF957636
	DNA-S	JF957649, JF957650, JF957651, JF957652, JF957653, JF957654, JF957655, JF957656, JF957657, JF957658, JF957659, JF957660
Vietnam	DNA-R	AB113660, AF416464, AF416472, AF416473, AF416474, AF416475, AF416476, AF416477, AF416478, AF416479
	DNA-S	AB113661, AB113662, AF148945



## 2-3 中立平衡解析

中立平衡解析は 1-11 項に示した方法で行った。

## 2-4 遺伝的分化および遺伝子流動解析

遺伝的分化および遺伝子流動解析は 1-12 項に示した方法で推定した。

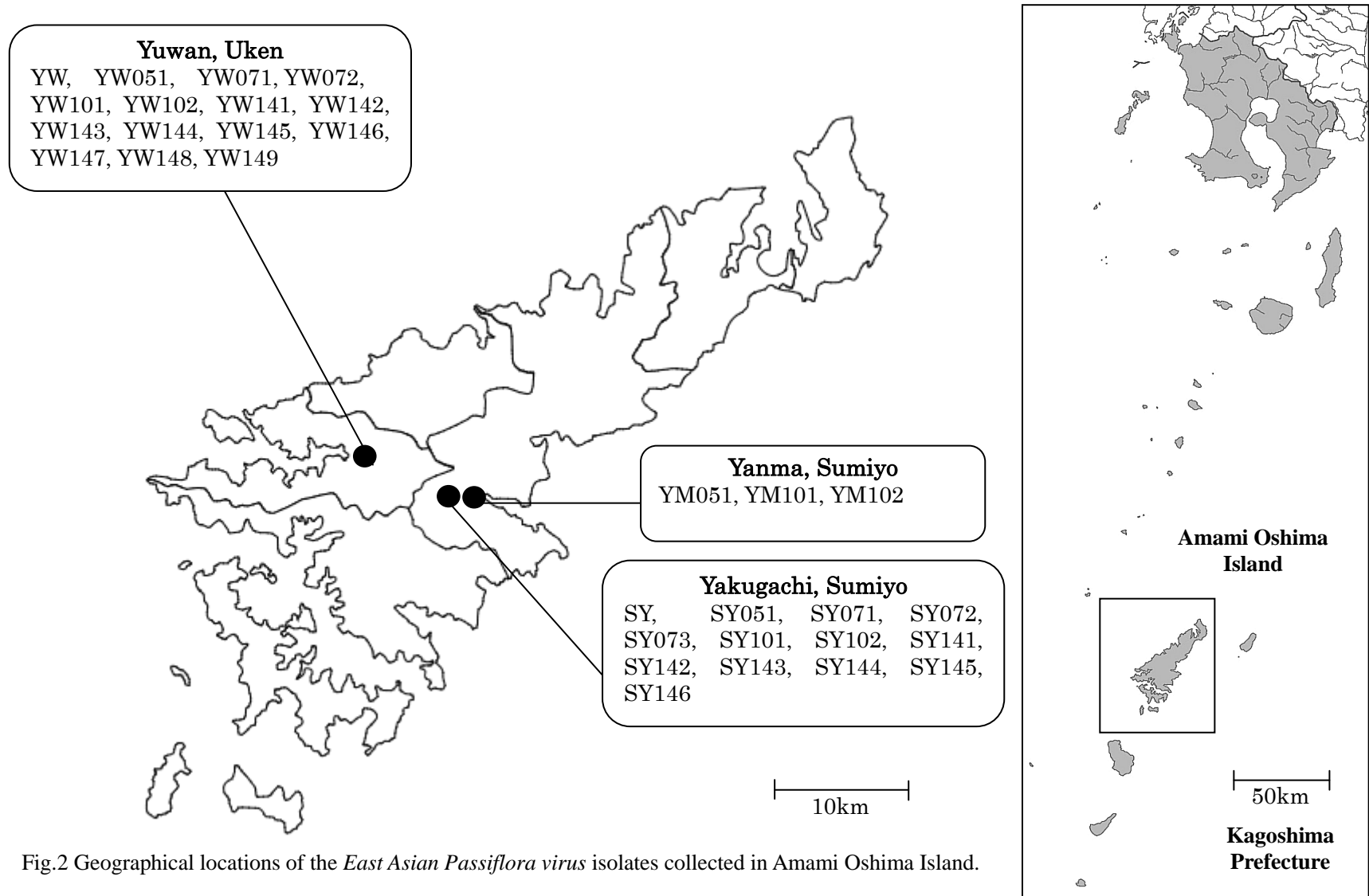
# 3 奄美大島における EAPV の集団遺伝学的解析

## 3-1 供試ウイルス

2014 年に奄美大島の西部の宇検村湯湾地区および、東部の奄美市住用町役勝地区から採集した、EAPV に感染しているパッションフルーツ葉、15 サンプルを用いた (Fig. 4)。先行研究 (Fukumoto et al., 2012a) で、EAPV は *Phaseolus vulgaris* (品種 Pinto 111 およびすじなし江戸川)、*Chenopodium amaranticolor* および *C. quinoa* を用いて単一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ことから、本研究でも同様に、これら 15 サンプル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 に示した。

## 3-2 RNA 抽出、RT-PCR およびシーケンシング

RNA 抽出、RT-PCR およびシーケンシングについては、Fukumoto et al. (2012a, b) に示された内容で行った。なお、5'末端領域の PCR 増幅にはプライマー T21 の代わりに T23 (5'-CCACTGTCTATTCCACCATTC-3') を用いた。決定した配列は GENETYX (GENETYX corp) で解析した。



**Table 4** EAPV isolates analyzed in this study

Isolates	Location	Year of collection	Genomic region used for analysis	Reference and accession no.
AO	Katetsu, Setouchi, Japan	1992	Polyprotein	Iwai et al. 2006a; AB246773
Arata	Arata, Kagoshima, Japan	2005	CP	Fukumoto et al., 2012b; AB627435
AT1	Atetsu, Setouchi, Japan	2005	CP	Fukumoto et al., 2012a; AB690439
AT2	Atetsu, Setouchi, Japan	2005	CP	Fukumoto et al., 2012a; AB690440
Ibusuki	Ibusuki, Japan	1997	Polyprotein	Fukumoto et al., 2012b; AB604610
MPV	Malaysia	-	CP	Abdullah et al. 2009; EU035271
SY	Yakugachi, Sumiyo, Amami, Japan	2010	CP	Fukumoto et al., 2012b; AB627437
SY051	Yakugachi, Sumiyo, Amami, Japan	2005	CP	Fukumoto et al., 2012a; AB690443
SY071	Yakugachi, Sumiyo, Amami, Japan	2007	Polyprotein	Fukumoto et al., 2012a; AB690448
SY072	Yakugachi, Sumiyo, Amami, Japan	2007	Polyprotein	Fukumoto et al., 2012a; AB690449
SY073	Yakugachi, Sumiyo, Amami, Japan	2007	Polyprotein	Fukumoto et al., 2012a; AB690450
SY101	Yakugachi, Sumiyo, Amami, Japan	2010	Polyprotein	Fukumoto et al., 2012a; AB690451
SY102	Yakugachi, Sumiyo, Amami, Japan	2010	CP	Fukumoto et al., 2012a; AB690447
SY141	Yakugachi, Sumiyo, Amami, Japan	2014	NIb, CP	This study; LC038068
SY142	Yakugachi, Sumiyo, Amami, Japan	2014	NIb, CP	This study; LC038069
SY143	Yakugachi, Sumiyo, Amami, Japan	2014	Polyprotein	This study; LC038070
SY144	Yakugachi, Sumiyo, Amami, Japan	2014	Polyprotein	This study; LC038071
SY145	Yakugachi, Sumiyo, Amami, Japan	2014	Polyprotein	This study; LC038072
SY146	Yakugachi, Sumiyo, Amami, Japan	2014	Polyprotein	This study; LC038073
Taiwan	Taiwan	-	CP	AF208662
TG	Tatsugo, Japan	2005	CP	Fukumoto et al., 2012a; AB690441
YM051	Yanma, Sumiyo, Amami, Japan	2005	CP	Fukumoto et al., 2012a; AB690444
YM101	Yanma, Sumiyo, Amami, Japan	2010	CP	Fukumoto et al., 2012a; AB690446
YM102	Yanma, Sumiyo, Amami, Japan	2010	Polyprotein	Fukumoto et al., 2012a; AB690452
YW	Yuwan, Uken, Japan	2010	CP	Fukumoto et al., 2012b; AB627436
YW051	Yuwan, Uken, Japan	2005	CP	Fukumoto et al., 2012a; AB690442
YW071	Yuwan, Uken, Japan	2007	Polyprotein	Fukumoto et al., 2012a; AB690453
YW072	Yuwan, Uken, Japan	2007	Polyprotein	Fukumoto et al., 2012a; AB690454
YW101	Yuwan, Uken, Japan	2010	Polyprotein	Fukumoto et al., 2012a; AB690455

**Table 4** continued

Isolates	Location	Year of collection	Genomic region used for analysis	Reference and accession no.
YW102	Yuwan, Uken, Japan	2010	CP	Fukumoto et al., 2012a;AB690445
YW141	Yuwan, Uken, Japan	2014	NIb, CP	This study; LC038074
YW142	Yuwan, Uken, Japan	2014	NIb, CP	This study; LC038075
YW143	Yuwan, Uken, Japan	2014	NIb, CP	This study; LC038076
YW144	Yuwan, Uken, Japan	2014	Polyprotein	This study; LC038077
YW145	Yuwan, Uken, Japan	2014	Polyprotein	This study; LC038078
YW146	Yuwan, Uken, Japan	2014	Polyprotein	This study; LC038079
YW147	Yuwan, Uken, Japan	2014	Polyprotein	This study; LC038080
YW148	Yuwan, Uken, Japan	2014	Polyprotein	This study; LC038081
YW149	Yuwan, Uken, Japan	2014	Polyprotein	This study; LC038082

### 3-3 組換え解析

組換え解析は、本研究で決定した配列と、既報の EAPV 分離株の配列のすべてを用いて、1-9 項に示した方法で行った。

### 3-4 系統学的解析

系統学的解析は、本研究で決定した EAPV 分離株の配列と既報の塩基配列を用いて行った。系統樹の作成には、MEGA6 (Tamura et al., 2013)を用い、近隣結合法 (Kimura, 1980)および最尤法 (Hasegawa, 1985)を用いて解析した。各分枝の信頼度は 1000 回のブートストラップ法によって算出した。また、アウトグループとして、*Peanut stripe virus* (PStV: U34972)および *Watermelon mosaic virus* (WMV: JF273468)を用いた。

### 3-5 遺伝的多様性、選択圧の解析および中立平衡解析

遺伝的多様性、選択圧の解析、および中立平衡解析は、1-10 および 1-11 項に示した方法で行った。

### 3-6 遺伝的分化および遺伝子流動解析

遺伝的分化および遺伝子流動は、1-12 項に示した方法で推定した。

### 第Ⅲ章 結果

#### 1 スマトラ島における BBTV の遺伝構造と多様性の解析

##### 1-1 各コンポーネントのシーケンシング

DNA-R と DNA-S は、実験に用いた 61 サンプル全てから、DNA-U3 は 37 サンプルから PCR 増幅断片を得、それぞれの塩基配列を決定した。

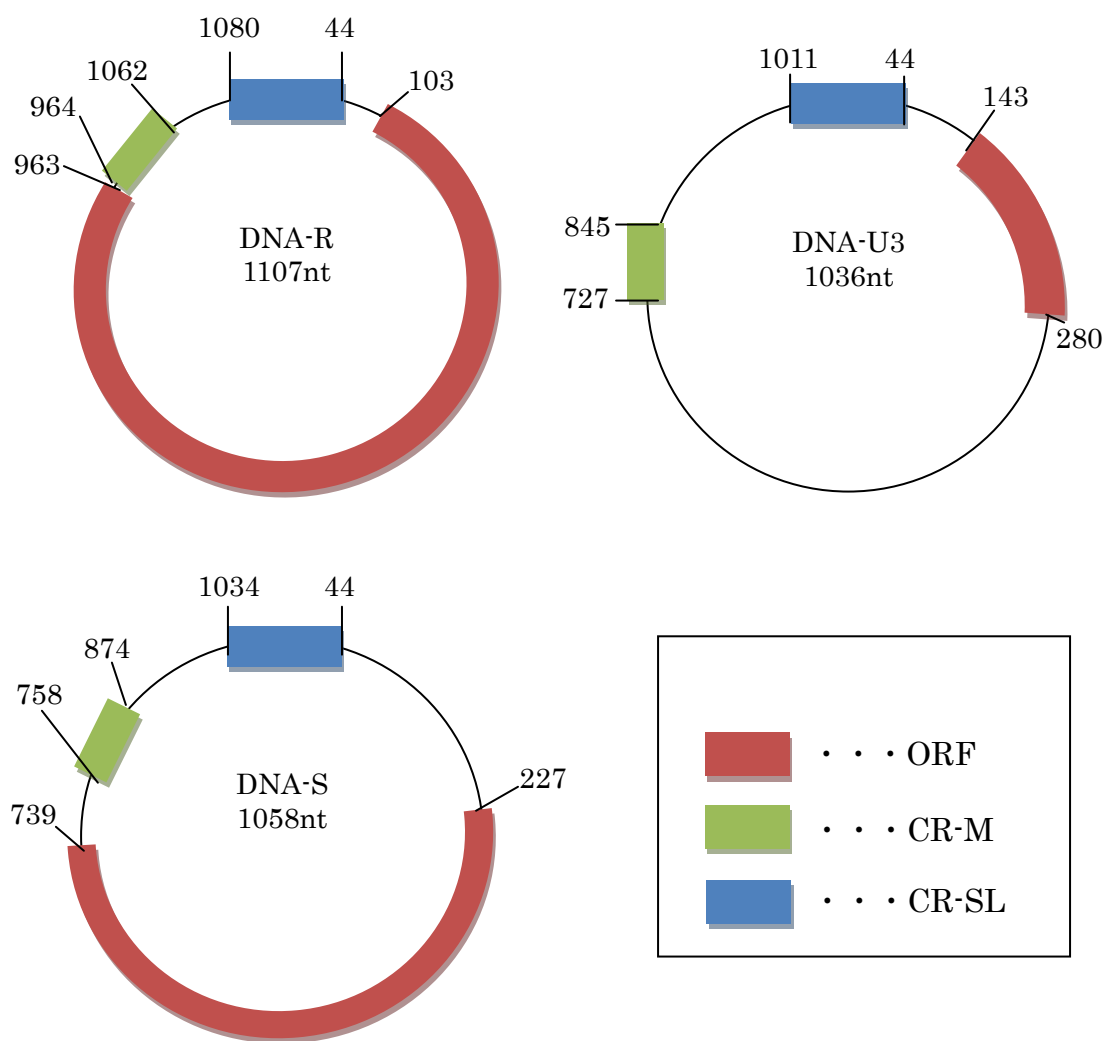
##### 1-1-1 DNA-R の解析

スマトラ島における BBTV の DNA-R はすべて 1104 塩基で構成されていた。M-Rep タンパク質をコードしている ORF は 103-963 塩基に存在しており、287 アミノ酸で構成されていることが確認された。これらの ORF はすべて、既報の分離株と同様に NTP binding motif である “GGEGKT” を保持していた (Fig. 5)。

DNA-R の CR-SL 領域は、1080-44 塩基に存在していた。ステムループ構造は 1-31 塩基に存在しており、共通配列である “TATTATTAC” も確認された。また、CR-SL 領域内には、特徴的な反復配列である、F1、F2 および R 配列が認められ、それぞれ、33-37 塩基、38-42 塩基および 1036-1040 塩基に存在していた。CR-M は、964-1062 塩基に存在しており、CR-M 内の GC リッチ領域は 1044-1058 塩基に存在していた。

スマトラ島分離株内の、DNA-R の塩基配列の相同性は 98.7-100%、アミノ酸配列の相同性は 98.6-100%であった (Table 5)。

スマトラ島分離株と他地域分離株の DNA-R の相同性を調べたところ、Asian group に属す分離株との相同性が、South pacific group の分離株よりも高かった (Table 6)。また、日本、台湾、インドネシア、フィリピン分離株との相同性が、中国やベトナムの分離株よりも高かった。



**Fig. 5** Genome organization of BBTV Smatra isolates.

**Table 5** Sequence identity (%) shared by BBTV isolates of each region

Region	Components	Region			
		North Sumatra	West Sumatra	Riau	South Region <sup>b</sup>
North Sumatra	DNA-R	99.8-100/99.6-100 <sup>a</sup>			
	DNA-U3	99.6-99.9/100			
	DNA-S	99.8-100/100			
West Sumatra	DNA-R	99.4-100/98.6-100	99.3-100/98.6-100		
	DNA-U3	99.1-99.6/95.5-100	99.1-100/95.5-100		
	DNA-S	99.5-100/100	99.2-100/100		
Riau	DNA-R	99.7-100/99.3-100	99.3-100/98.9-100	99.6-100/100	
	DNA-U3	98.9-99.6/97.7-100	98.8-100/93.3-100	99.2-100/97.7-100	
	DNA-S	99.7-100/100	99.4-100/100	99.8-100/100	
South Region	DNA-R	99.4-100/99.3-100	98.8-100/98.9-100	99.0-100/99.6-100	98.7-99.9/99.3-100
	DNA-U3	98.8-99.1/95.5-100	98.3-99.1/91.1-100	98.0-99.1/93.3-100	99.4-100/95.5-100
	DNA-S	99.4-100/99.8-100	99.1-100/99.8-100	99.5-100/99.8-100	99.4-100/99.8-100

<sup>a</sup> Identities of nucleotide/amino acid<sup>b</sup> South region is consisted form South Sumatra and Lampung



**Table 6** Sequence identity(%) of each component of BBTv within Sumatra isolates and between Sumatra and other region isolates

Components	Region									
	Sumatra	Japan	Indonesia	Philippines	Taiwan	China	Vietnam	India	Pakistan	Tonga
DNA-R	98.7-100/98.6-100 <sup>a</sup>	98.5-99.7/97.9-100	98.2-99.5/98.2-100	98.0-99.3/98.2-100	89.6-99.2/93.3-100	94.7-97.5/94.4-97.9	92.1-96.5/93.7-97.9	89.0-91.0/93.0-95.1	89.2-90.3/93.7-94.7	90.2—91.1/94.0-95.1
DNA-U3	98.0-100/91.1-100	— <sup>b</sup>	—	—	77.8-97.9/80.5-100	83.3-96.0/90.6-97.1	—	73.4-80.0/69.4-82.8	78.7-80.0/77.7-80.0	77.2-80.6/80.5-85.7
DNA-S	99.1-100/99.8-100	98.8-99.5/98.2-100	98.9-99.5/98.8-100	99.1-99.6/98.2-100	87.1-99.3/97.6-99.4	93.3-98.3/93.5-100	92.4-93.4/97.0-100	85.7-87.5/96.4-98.2	86.7-88.1/95.2-98.8	86.2-87.3/95.8-98.8

<sup>a</sup> Identity of nucleotide/amino acid

<sup>b</sup> No data

### 1-1-2 DNA-S の解析

スマトラ島分離株の DNA-S はすべて、1058 塩基で構成されていた。CP をコードしている ORF は 227-739 塩基に存在しており、171 アミノ酸で構成されていた(Fig. 5)。

DNA-S の CR-SL 領域は、1034-44 塩基に存在しており、ステムループ領域、F1、F2 および R 領域は、それぞれ、1-31 塩基、33-37 塩基、38-42 塩基および、1036-1040 塩基に存在していた。CR-M は 758-874 塩基に存在しており、GC リッチ領域は 857-870 塩基に確認された。

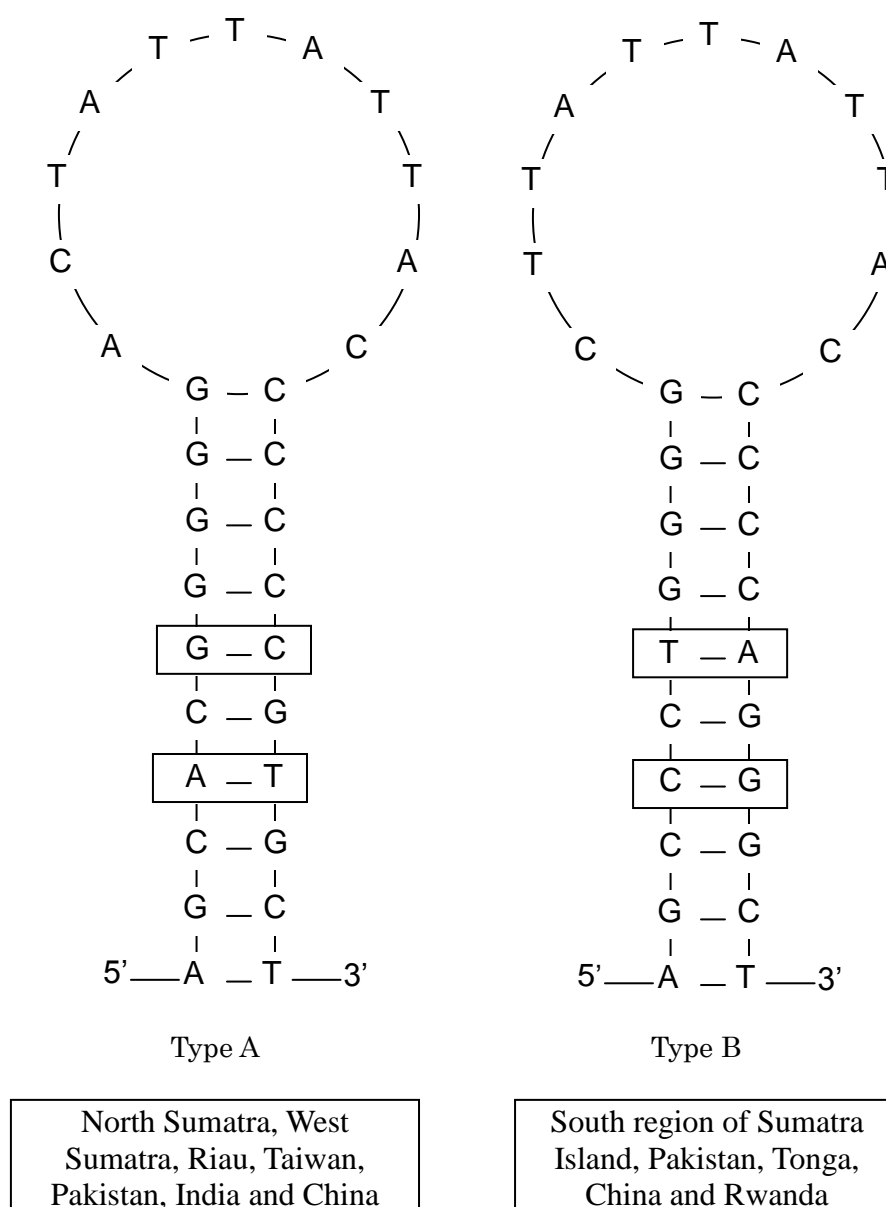
スマトラ島分離株内の、DNA-S の塩基配列の相同性は 99.1-100%、アミノ酸配列の相同性は 99.8-100%であった (Table 5)。

スマトラ島分離株と他地域分離株の DNA-S の相同性を調べたところ、DNA-R と同様に、Asian group に属す分離株との相同性が、South pacific group の分離株よりも高く (Table 6)、日本、台湾、インドネシア、フィリピン分離株との相同性が、中国やベトナムの分離株よりも高かった。

### 1-1-3 DNA-U3 の解析

スマトラ分離株の DNA-U3 の多くは、1036 塩基で構成されていたが、BA-1、SK-1、TE-1、TE-2、TN-1、TA-2、および BK-2 は 1037 塩基で構成されていた。本実験では、ウイルスにおいては非常に稀な例であるが、スマトラ島分離株の開始コドンを UUG と考えて解析を行った (Fig. 5)。その結果、スマトラ分離株の DNA-U3 の ORF は 143-280 塩基に存在しており、46 アミノ酸で構成されていた。

DNA-U3 の CR-SL は、1011-44 塩基に存在していた。ステムループ領域、F1、F2、および R 配列は、14-22 塩基、32-36 塩基、36-40 塩基および 1016-1020 塩基に確認された。興味深いことに、DNA-U3 のステムループ領域には 2 種類の配列 (TypeA および TypeB)が存在していたが (Fig. 6)、両配列共ステムループの形



**Fig. 6** The secondary structure of the stem-loop region of DNA-U3 in BBTV Sumatra isolates. Sequence differences are indicated with boxes.

は維持していた。また、Lampung 州および South Sumatra 州由来の分離株のみが TypeB の配列を有していた。CR-M は 727-825 塩基に存在しており、GC リッチ領域は 793-806 塩基に確認された。

スマトラ島分離株内の、DNA-U3 の塩基配列の相同性は 98.0-100%、アミノ酸配列の相同性は 91.1-100%であった (Table 5)。

スマトラ島分離株と他地域分離株の DNA-U3 の相同性を調べたところ、他のコンポーネントと同様に、Asian group に属す分離株との相同性が、South pacific group の分離株よりも高かった (Table 6)。

#### 1-1-4 DNA-R、-S、-U3 の遺伝的多様性の比較

DNA-R、-S、-U3 の各遺伝的多様性を調査したところ、他国集団に比べ、スマトラ集団は、いずれも多様性が低いことが示された (Table 7)。

#### 1-2 系統学的解析

本研究で塩基配列を決定したスマトラ分離株と、データベースに登録されている分離株を使用して、近隣結合法による、系統学的解析を行った。各コンポーネントの系統学的解析の結果は、Fig. 7 に示した。この結果より、スマトラ島分離株はすべて Asian group に属することが確認され、Asian group の中でも特に、日本、台湾、インドネシア、フィリピン分離株と近縁であることが確認された。

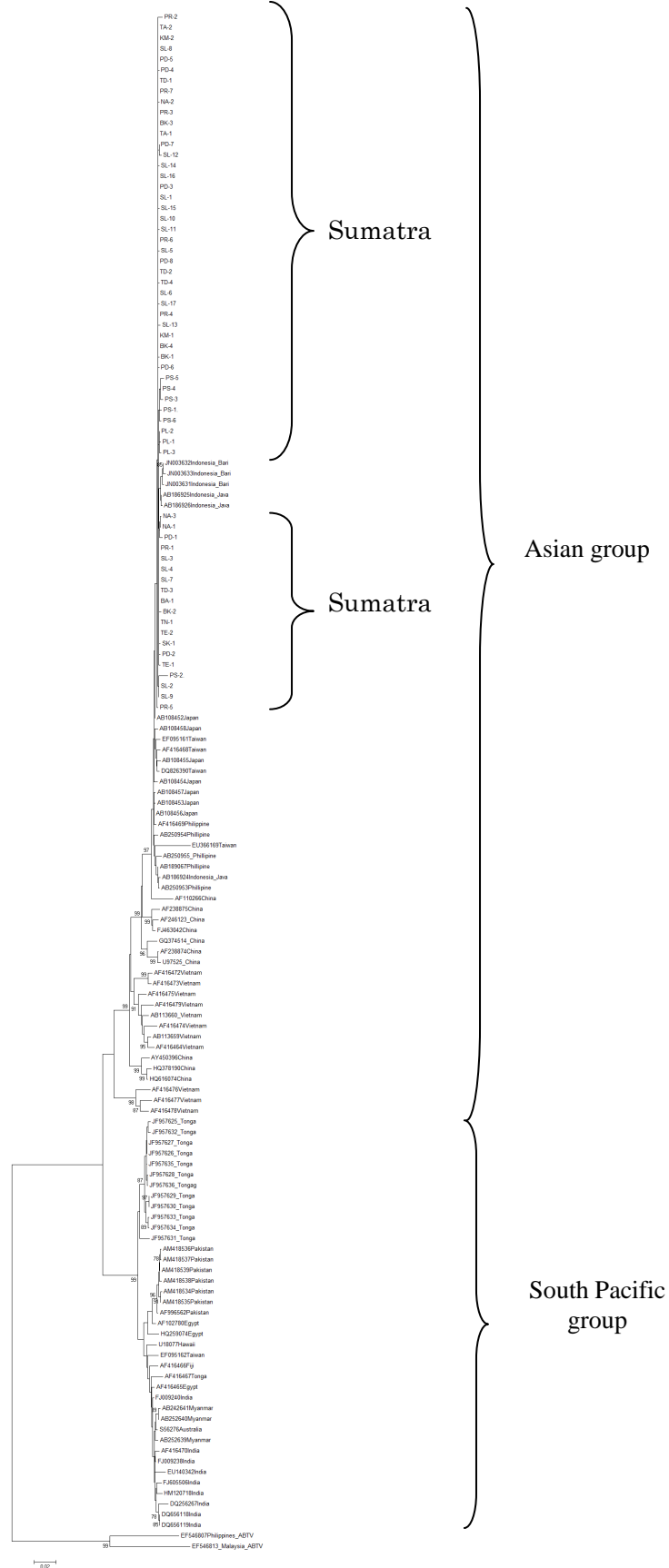
**Table 7** Nucleotide distance of each component of the BBTV regional population

Group	Region	Average nucleotide distance		
		DNA-R	DNA-U3	DNA-S
Asian	Sumatra	0.00183 (0.00057) <sup>a</sup>	0.00518 (0.00139)	0.00121 (0.00030)
	Indonesia	0.00460 (0.00173)	— <sup>b</sup>	0.00065 (0.00061)
	Japan	0.00341 (0.00135)	—	0.00656 (0.00205)
	Philippines	0.00444 (0.00183)	—	0.00117 (0.00061)
	Taiwan	0.04160 (0.01034)	0.16814 (0.02558)	0.08280 (0.00866)
	China	0.02655 (0.00709)	0.06824 (0.00944)	0.04557 (0.00470)
	Vietnam	0.03009 (0.00754)	—	0.01655 (0.00321)
South Pacific	India	0.00729 (0.00231)	0.06606 (0.00887)	0.03364 (0.00517)
	Pakistan	0.00252 (0.00119)	0.00632 (0.00182)	0.00619 (0.00158)
	Tonga	0.00795 (0.00231)	0.03035 (0.00477)	0.01198 (0.00030)

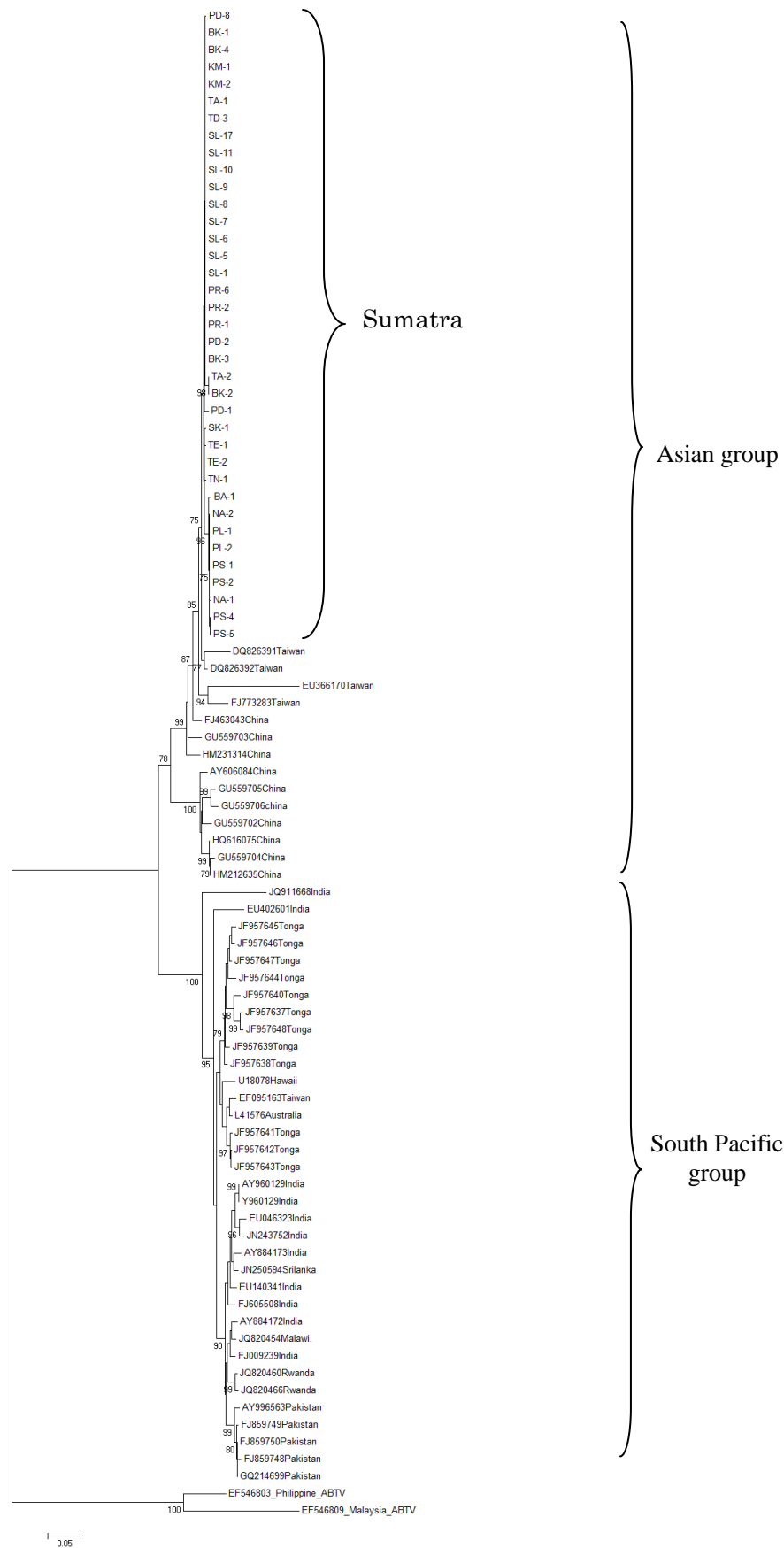
<sup>a</sup> The numbers in the parentheses are the standard error.

<sup>b</sup> No data

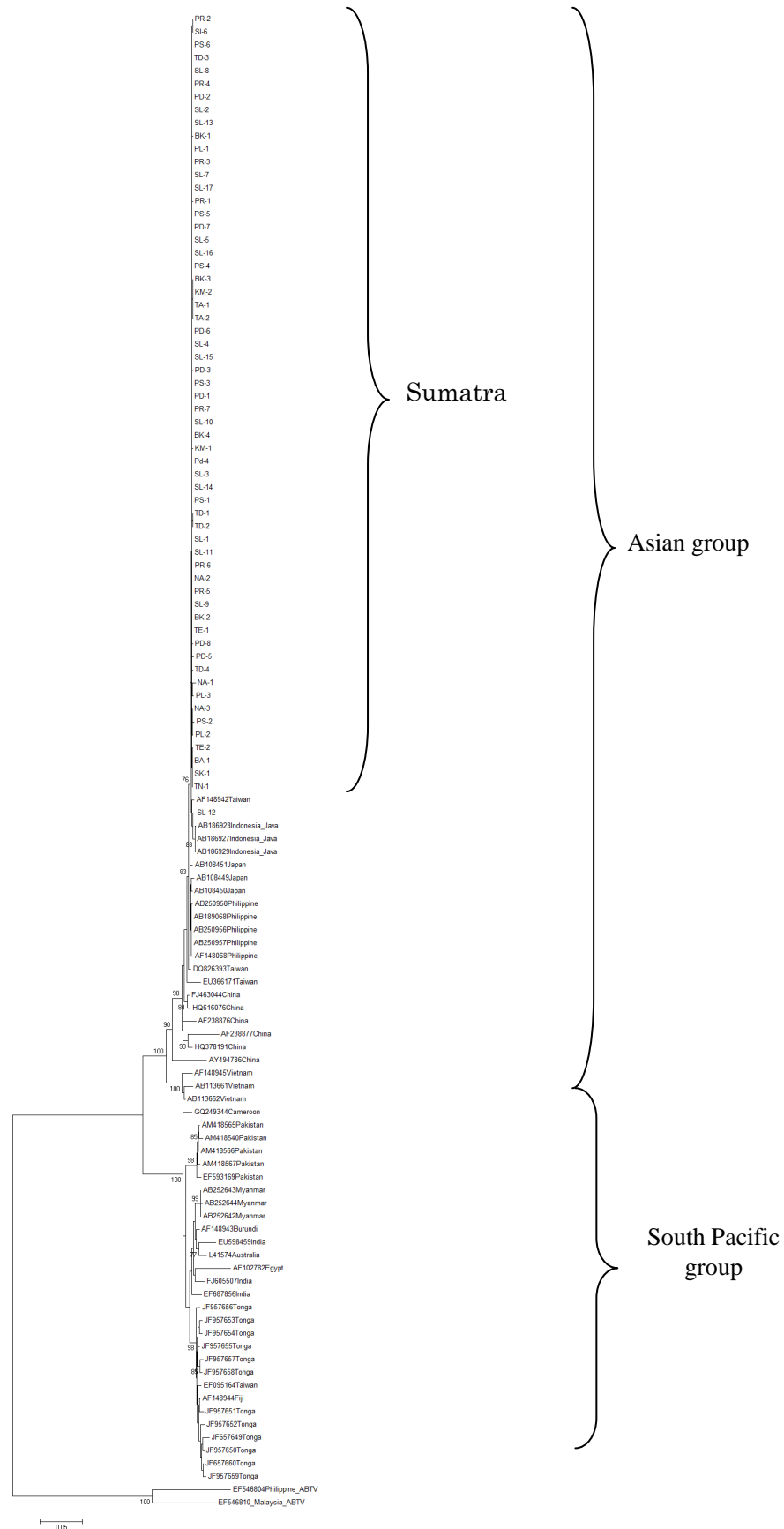
(A)



(B)



(C)





**Fig. 7** Phylogenetic analysis of BBTV Sumatra isolates and the isolates of other regions based on the full length of nucleotide sequences of (A) DNA-R, (B) DNA-U3 and (C)DNA-S. The nucleotide sequences of ABTV are used as an outgroup. The number of each node indicates a bootstrap percentage based on 1000 replications (only values >75% are shown) in NJ.

### 1-3 組換え解析

組換え解析は、RDP4 を用いて行った。いくつかのプログラムにおいて、組換え部位が推定されたが、いずれも有意なものではなかったため、すべてのスマトラ分離株は、組換えを起こしていないと判断した。

### 1-4 遺伝的多様性と選択圧の解析

スマトラ島における BBTV 集団の遺伝的多様性を調査するために、各コンポーネントの遺伝的距離の平均値を解析した (Table 8)。なお、本研究では、Lampung 州および South Sumatra 州由来の分離株を統合し、南部集団として解析に用いた。その他の集団については、各州由来の分離株のみで構成されており、それぞれ、北スマトラ集団、西スマトラ集団、リアウ集団とした。この結果、南部集団が、他地域の集団に比べ、多様性があることが認められた。さらに、各集団の選択圧を、DNA-R と DNA-S の  $d_S/d_N$  比を用いることで解析した (Table 8)。その結果、 $d_S/d_N$  値は 1 よりも小さく、両コンポーネントとも、負の選択圧を受けていることが認められた。しかし、負の選択圧の程度は各コンポーネントによって異なっていた。DNA-R においては、リアウ集団と南部集団が、他地域集団に比べ、強い負の選択圧をうけていることが認められた。一方、DNA-S においては、北スマトラ、西スマトラ、リアウ集団が、南部集団に比べ、強い負の選択圧を受けていることが認められた。

さらに本実験では、宿主バナナのゲノム型が、ウイルスの多様性や、選択圧に影響しているかどうかを調査した (Table 9)。その結果、AAB および ABB のバナナに感染しているウイルスのほうが、AA および AAA に感染しているウイルスよりも、多様性があることが認められた。また、DNA-R における選択圧は、ほぼ同様であったが、DNA-S においては、AAB および ABB に感染しているウイルスのほうが弱い負の選択圧を受けていた。

**Table 8** Nucleotide distance and selection pressures of each component of BBTV in each region

Component	Region	Average nucleotide distance	d <sub>N</sub>	d <sub>S</sub>	d <sub>N</sub> /d <sub>S</sub>
DNA-R	North ( <i>n</i> =4)	0.00136(0.00075) <sup>a</sup>	0.00058(0.00056)	0.00242(0.00243)	0.239669
	South ( <i>n</i> =13)	0.00488(0.00106)	0.00121(0.00054)	0.02181(0.00583)	0.055479
	West ( <i>n</i> =36)	0.00185(0.00040)	0.00072(0.00026)	0.00637(0.00237)	0.113030
	Riau ( <i>n</i> =8)	0.00113(0.00046)	0(0)	0.00641(0.00329)	0
DNA-S	North ( <i>n</i> =4)	0.00095(0.00066)	0(0)	0.00466(0.00474)	0
	South ( <i>n</i> =13)	0.00177(0.00059)	0.00116(0.00088)	0.00634(0.00371)	0.182965
	West ( <i>n</i> =36)	0.00089(0.00024)	0(0)	0.00259(0.00108)	0
	Riau ( <i>n</i> =8)	0.00101(0.00057)	0(0)	0.00765(0.00572)	0

<sup>a</sup>Numbers in parentheses are the standard errors.

**Table 9** Nucleotide distance and selection pressures of each component of BBTV in each genome type of banana.

Component	Genome type	Average nucleotide distance	$d_N$	$d_S$	$d_N/d_S$
DNA-R	AA, AAA ( $n = 39$ )	0.00201(0.00048) <sup>a</sup>	0.00059(0.00023)	0.00826(0.00300)	0.068445
	AAB, ABB ( $n = 20$ )	0.00352(0.00067)	0.00100(0.00054)	0.01463(0.00357)	0.068353
DNA-S	AA, AAA ( $n = 39$ )	0.00104(0.00032)	0(0)	0.00387(0.00166)	0
	AAB, ABB ( $n = 20$ )	0.00164(0.00051)	0.00075(0.00055)	0.00686(0.00313)	0.109329

<sup>a</sup> Numbers in parentheses are the standard errors.

## 1-5 中立平衡解析

各地域の集団サイズの増加および縮小を調べるために、Tajima's  $D$ 、Fu and Li's  $D$  および  $F$  テストを行い、各集団における塩基配列の多型を解析した (Table 10)。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状態にあることを意味する。検定の結果、全ての集団における Tajima's  $D$ 、Fu and Li's  $D$  および  $F$  は、負の値であったが、有意な値となったのは西スマトラ集団のみであったことから、この集団のサイズが増加傾向にあることが示された。

## 1-6 遺伝的分化および遺伝子流動

スマトラ島における、各地域集団の遺伝的分化および遺伝子流動を調べた (Table 11)。遺伝的分化の解析には、Hudson (2000) で示された 3 つの統計学的解析 ( $K^*$ 、 $Z$ 、 $Snn$ ) を用いた。これらの検定値が有意な値となれば、両集団が遺伝的に分化していることを示している。その結果、DNA-R を用いた解析では北スマトラ集団とリアウ集団および西スマトラ集団と南部集団の間に有意な遺伝的分化が認められた。DNA-S では、西スマトラ集団とリアウ集団間およびリアウ集団と南部集団の間に遺伝的分化が認められた。しかし、両コンポーネント共に遺伝的分化を示した集団は確認できなかった。

次に、 $F_{ST}$  値を用いた遺伝子流動解析を行った (Table 11)。通常、 $F_{ST}$  値が 0.33 以下となれば、両集団間の交流が頻繁であることを示し、0.33 以上となれば、交流が稀であることを示す。北スマトラ集団とリアウ集団および西スマトラ集団と南部集団間の DNA-R の  $F_{ST}$  値は 0.33 を超えていた。しかし、DNA-S においては、すべての検定値が 0.33 以下となった。

**Table 10** Neutrality test, haplotype and nucleotide diversity of each BBTV population on Sumatra Island

Component	Region	Fu & Li's <i>D</i>	Fu and Li's <i>F</i>	Tajima's <i>D</i>	Nucleotide diversity	Number of haplotype	Haplotype diversity
DNA-R	North ( <i>n</i> =4)	-0.75445	-0.67466	-0.75445	0.00136(0.00033) <sup>a</sup>	4	1.000(0.177)
	South ( <i>n</i> =13)	-1.68022	-1.85173	-1.45361	0.00485(0.00091)	13	1.000(0.030)
	West ( <i>n</i> =36)	-4.37509*	-4.40959*	-2.44006**	0.00160(0.00029)	18	0.822(0.063)
	Riau ( <i>n</i> =8)	-1.73524***	-1.87594***	-1.59524***	0.00113(0.00049)	4	0.643(0.184)
DNA-S	North ( <i>n</i> =4)	-0.70990	-0.60427	-0.70990	0.00095(0.00032)	3	0.833(0.222)
	South ( <i>n</i> =13)	-1.27588	-1.49038	-1.39693	0.00177(0.00053)	7	0.731(0.133)
	West ( <i>n</i> =36)	-3.87659*	-4.00465*	-2.40723**	0.00089(0.00028)	11	0.522(0.102)
	Riau ( <i>n</i> =8)	-0.63230	-0.61011	-0.30441	0.00101(0.00025)	4	0.750(0.139)

\**P* < 0.02, \*\**P* < 0.01, \*\*\*0.10 > *P* > 0.05<sup>a</sup>Numbers in parentheses are the standard errors.

**Table 11** Gene differentiation and gene flow of each BBTV population on Sumatra island

Gene	Population	Parameter (P-value)				
		$Ks^*$	$Z$	$Snn$	$F_{ST}$	$Nm$
DNA-R	North vs East	0.53861 (0.0090**)	25.22173 (0.0090**)	0.91667 (0.0050**)	0.42857	0.33
	North vs West	0.78489 (0.0090**)	368.30018 (0.0080**)	0.87054 (0.0510ns)	0.34286	0.48
	North vs south	1.46646 (0.3140ns)	66.79389 (0.3200ns)	0.72157 (0.1320ns)	0.19355	1.04
	East vs West	0.74960 (0.6940ns)	477.47879 (0.8290ns)	0.68506 (0.5730ns)	-0.00985	-25.64
	East vs South	1.22306 (0.0130*)	101.73309 (0.0650ns)	0.64286 (0.0150*)	0.07407	3.13
	West vs South	0.99420 (0.0000***)	546.55794 (0.0010**)	0.74539 (0.0010**)	0.06043	3.89
DNA-S	North vs East	0.48285 (0.1940 ns)	30.47768 (0.1940 ns)	0.61667 (0.2060 ns)	0.24490	0.77
	North vs West	0.18289 (0.3980 ns)	386.87266 (0.4200 ns)	0.80239 (0.9970 ns)	-0.03704	-7.00
	North vs south	0.47977 (0.5450 ns)	68.98718 (0.7260 ns)	0.54525 (1.0000 ns)	-0.09009	-3.03
	East vs West	0.22651 (0.0000***)	436.85744 (0.0000***)	0.84309 (0.0000***)	0.28052	0.64
	East vs South	0.51256 (0.0040**)	97.32881 (0.0050**)	0.70330 (0.0020**)	0.19520	1.03
	West vs South	0.25410 (0.0790 ns)	584.57042 (0.1210 ns)	0.60029 (0.5160 ns)	0.00639	38.88

\*\*\*  $P < 0.001$ , \*\*  $0.001 < P < 0.01$ , \*  $0.01 < P < 0.05$

$Ks^*$ ,  $Z$ , and  $Snn$  represent the most powerful sequence based statistical tests for genetic differentiation and are recommend for use in cases of high mutation rate and small sample size (Hudson 2000). The  $Z$  statistic value results from ranking distances between all pairs of sequences.  $Snn$  the frequency with which the nearest neighbors of sequences are found in the same locality;  $F_{ST}$ , coefficient of gene differentiation or fixation index, which measures inter-population diversity;  $Nm$  can be interpreted as the effective number of migrants exchanged between demes per generation (Balasubramanian and Selvarajan 2014).

## 2 BBTV の集団遺伝学的解析

これまで BBTV において、各地域集団を用いた、網羅的な集団遺伝学的解析は行われていない。そこで本項では、筆者が配列を決定したスマトラ島分離株および、既報の BBTV 分離株を用いて、各国の BBTV 集団間での遺伝的分化および遺伝子流動を解析した。なお、これらの解析には、各集団において、豊富にデータ量のある、DNA-R および DNA-S を用いた。

### 2-1 遺伝的多様性と選択圧の解析

まず、各集団における遺伝的多様性と選択圧を解析した (Table 12)。

DNA-R において、Asian group と South Pacific group の遺伝的多様性を比較したところ、これらの値はほぼ同様であった。また、各集団の遺伝的多様性を比較すると、中国、台湾およびベトナム集団は、他地域の集団に比べ、多様性があることが確認された。

次に DNA-S において、Asian group と South Pacific group の遺伝的多様性を比較したところ、South Pacific group の方が、Asian group に比べて多様性が高いことが認められた。また、各集団の遺伝的多様性を比較すると、中国、トンガおよび台湾集団が他地域集団に比べ多様性が高いことが認められた。

$d_N/d_S$  値を用いて、各集団の選択圧を解析したところ、すべての集団の両コンポーネントで 1 以下の値となり、負の選択圧を受けていることが認められた。しかし、負の選択圧の程度は、各集団間で異なっており、DNA-R においてはフィリピン集団、DNA-S においてはインドネシア集団が、それぞれ最も強い負の選択圧を受けていた。

### 2-2 中立平衡解析

各地域の集団サイズの拡散および縮小を調べるために、Tajima's  $D$ 、Fu and Li's



**Table 12** Nucleotide diversity and selection pressure of each population of BBTv

Component	Region	Average of nucleotide distance	d <sub>N</sub>	d <sub>S</sub>	d <sub>N</sub> /d <sub>S</sub>
DNA-R	All isolates (n=151)	0.02705 (0.00945) <sup>a</sup>	0.01422 (0.00267)	0.17718 (0.02539)	0.08026
	Asian group (n=104)	0.01183 (0.00401)	0.00651 (0.00127)	0.08052 (0.01265)	0.08085
	South Pacific (n=47)	0.01010 (0.00386)	0.00523 (0.00149)	0.07517 (0.01620)	0.06958
	Japan (n=7)	0.00293 (0.00141)	0.00165 (0.00099)	0.01520 (0.00531)	0.10855
	Indonesia (n=67)	0.00170 (0.00068)	0.00101 (0.00029)	0.01008 (0.00215)	0.10020
	Philippine (n=5)	0.00236 (0.00165)	0.00053 (0.00049)	0.01775 (0.00794)	0.02986
	China (n=10)	0.02030 (0.00722)	0.01261 (0.00246)	0.11878 (0.01859)	0.10616
	Vietnam (n=10)	0.02422 (0.00840)	0.01202 (0.00254)	0.16790 (0.02370)	0.07159
	Tonga (n=13)	0.00553 (0.00223)	0.00404 (0.00122)	0.02891 (0.00683)	0.13974
	Taiwan (n=5)	0.02553 (0.00914)	0.01517 (0.00301)	0.15211 (0.02264)	0.09973
	India (n=14)	0.00568 (0.00217)	0.00540 (0.00113)	0.03004 (0.00850)	0.17976
	Pakistan (n=20)	0.00088 (0.00061)	0.00083 (0.00036)	0.00383 (0.00192)	0.21671
	All isolates (n=147)	0.03460 (0.00607)	0.00640 (0.00224)	0.15669 (0.02830)	0.04084
DNA-S	Asian (n=89)	0.00958 (0.00161)	0.00205 (0.00044)	0.04209 (0.00738)	0.04870
	South pacific (n=58)	0.01796 (0.00389)	0.00237 (0.00058)	0.06843 (0.01721)	0.03463
	Japan (n=4)	0.00653 (0.00265)	0.00155 (0.00160)	0.01553 (0.00711)	0.09980
	Indonesia (n=64)	0.00140 (0.00053)	0.00024 (0.00018)	0.00796 (0.00367)	0.03015
	Philippine (n=5)	0.00156 (0.00108)	0.00091 (0.00093)	0.00216 (0.00206)	0.42130
	China (n=9)	0.03477 (0.00571)	0.00947 (0.00241)	0.14134 (0.02670)	0.06700
	Vietnam (n=3)	0.00522 (0.00248)	0.00568 (0.00324)	0.00955 (0.00926)	0.59476
	Tonga (n=12)	0.01014 (0.00272)	0.00462 (0.00184)	0.02712 (0.00990)	0.17035
	Taiwan (n=4)	0.03731 (0.00645)	0.01091 (0.00352)	0.15879 (0.03652)	0.06870
	India (n=29)	0.00979 (0.00179)	0.00260 (0.00071)	0.03372 (0.00794)	0.07711
	Pakistan (n=17)	0.00463 (0.00146)	0.00182 (0.00097)	0.01681 (0.00752)	0.10827

<sup>a</sup> Number in parentheses are the standard errors.

*D* および *F* テストを行い、各集団における塩基配列の多型を解析した(Table 13)。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状態にあることを意味する。まず、Asian group と South Pacific group について検定を行ったところ、両コンポーネントにおいて、両集団共に負の値となり、集団のサイズが増加傾向にあることが示された。しかし、Asian group のすべての検定値が有意であったのに対し、South Pacific group は有意な値とならなかった。

次に、各国集団について検定を行ったところ、各国集団共、両コンポーネントにおいて、検定値は負の値となり、集団のサイズが増加傾向であることが示された。その中でも、インドネシアおよびインド集団は、両コンポーネントにおいて、検定値が有意な値となり、近年突発的に拡散した集団であることが確認された。

## 2-3 遺伝的分化および遺伝子流動解析

遺伝的分化の解析には、Hudson (2000)で示された3つの統計学的解析法 ( $K^*$ 、 $Z$ 、 $Snn$ )を用いた (Table 14)。これらの検定値が有意な値となれば、両集団が遺伝的に分化していることを示している。まず、Asian group と South Pacific group 間で調べたところ、両コンポーネントで、すべての値が有意となり、これらの集団は遺伝的に分化していることが示された。次に、各国集団間について遺伝的分化を調べた。その結果、DNA-R においては、日本と台湾、DNA-S においては、インドネシアとフィリピン、日本とフィリピン、日本と台湾、日本と中国、台湾と中国、台湾とベトナムのそれぞれの集団間には有意な分化は認められなかったが、他のすべての集団間において有意な分化が認められた。総合的に、Asian group の集団間では有意な分化が認められにくい傾向にあり、South Pacific group の集団間には明確な分化が認められた。

次に、 $F_{ST}$  値を用いた遺伝子流動解析を行った (Table 14)。検定の結果、両コン

**Table 13** Neutrality test of each BBTV population

Gene	Population	Fu&Li's <i>D</i>	Fu&Li's <i>F</i>	Tajima's <i>D</i>
DNA-R	All isolates (n=151)	-3.62505**	-2.79277*	-0.88215
	Asian group (n=104)	-3.54985**	-3.50871**	-2.12624*
	South Pacific (n=47)	-2.60640*	-2.34855***	-0.86573
	Japan (n=7)	-1.27255	-1.37953	-1.19248
	Indonesia (n=67)	-5.12412 **	-4.95065**	-2.55448****
	Philippine (n=5)	-0.44037	-0.46117	-0.44037
	China (n=10)	-0.53941	-0.62771	-0.60333
	Vietnam (n=10)	-0.04727	-0.06531	-0.09193
	Tonga (n=13)	-0.82899	-1.07777	-1.25101
	Taiwan (n=5)	-1.04970	-1.15238	-1.10363
	India (n=14)	-2.29002*	-2.48586*	-1.83173*
	Pakistan (n=20)	-2.86688*	-2.97679*	-1.83189*
DNA-S	All isolates (n=147)	-3.38123**	-2.65215*	-0.81633
	Asian (n=89)	-3.69539**	-3.78695**	-2.38749*****
	South pacific (n=58)	-2.44035*	-2.36009***	-1.21092
	Japan (n=4)	0.17969	0.17272	0.17969
	Indonesia (n=64)	-3.67842**	-3.69013**	-2.03618*
	Philippine (n=5)	-0.97256	-0.95440	-0.97256
	China (n=9)	-0.37722	-0.47743	-0.57469
	Vietnam (n=3)	-	-	-
	Tonga (n=12)	-1.45440	-1.51331	-0.97581
	Taiwan (n=4)	-0.68793	-0.72571	-0.68593
	India (n=29)	-2.14455***	-2.52052***	-2.12295*
	Pakistan (n=17)	-1.24970	-1.44397	-1.25735

\*\*P<0.02 , \*P<0.05, \*\*\* 0.05<P<0.10, \*\*\*\*P<0.001, \*\*\*\*\*P<0.01

**Table 14** Gene differentiation and gene flow of each population of BBTv

Gene	Population	Parameter (P-value)				
		<i>Ks</i> *	<i>Z</i>	<i>Snn</i>	<i>F<sub>ST</sub></i>	<i>Nm</i>
DNA-R	Asia vs South	2.31997 (0.0000***)	3342.88947 (0.0000***)	0.99338 (0.0000***)	0.75597	0.08
	Indonesia vs Japan	1.13104 (0.0000***)	1195.25619 (0.0000***)	0.98649 (0.0000***)	0.50538	0.24
	Indonesia vs Philippine	1.10865 (0.0000***)	1143.30126 (0.0000***)	0.98611 (0.0000***)	0.61133	0.16
	Indonesia vs Taiwan	1.18680 (0.0000***)	1165.04566 (0.0000***)	0.98553 (0.0000***)	0.19520	1.03
	Indonesia vs China	1.33674 (0.0000***)	1266.80176 (0.0000***)	0.98701 (0.0000***)	0.46101	0.29
	Indonesia vs Vietnam	1.32673 (0.0000***)	1233.34715 (0.0000***)	1.00000 (0.0000***)	0.57221	0.19
	Indonesia vs India	1.25823 (0.0000***)	1259.91166 (0.0000***)	1.00000 (0.0000***)	0.91753	0.02
	Indonesia vs Pakistan	1.01379 (0.0000***)	1147.04993 (0.0000***)	1.00000 (0.0000***)	0.97149	0.01
	Indonesia vs Tonga	1.21110 (0.0000***)	1215.44874 (0.0000***)	1.00000 (0.0000***)	0.91129	0.02
	Japan vs Philippine	1.55387 (0.0240*)	29.20565 (0.0190*)	0.86111 (0.0020**)	0.15873	1.33
	Japan vs Taiwan	2.21810 (0.0060**)	27.64405 (0.0060*)	0.56250 (0.2250ns)	0.06568	3.56
	Japan vs China	2.66345 (0.0000***)	55.43346 (0.0070**)	0.94118 (0.0010**)	0.41048	0.36
	Japan vs Vietnam	2.71394 (0.0000***)	39.06151 (0.0000***)	1.00000 (0.0000***)	0.53217	0.22
	Japan vs India	1.99566 (0.0000***)	51.70394 (0.0000***)	1.00000 (0.0000***)	0.90417	0.03
	Japan vs Pakistan	0.92119 (0.0000***)	115.03509 (0.0000***)	1.00000 (0.0000***)	0.95824	0.01
	Japan vs Tonga	1.81790 (0.0000***)	48.19918 (0.0000***)	1.00000 (0.0000***)	0.89937	0.03
	Philippine vs Taiwan	2.32676 (0.0070**)	17.47500 (0.0070**)	0.85000 (0.0070**)	0.13545	1.60
	Philippine vs China	2.80370 (0.0000***)	45.14141 (0.0000***)	0.93333 (0.0040**)	0.43619	0.32
	Philippine vs Vietnam	2.87831 (0.0010**)	31.12472 (0.0010**)	1.00000 (0.0010**)	0.55334	0.20
	Philippine vs India	2.00947 (0.0000***)	46.04890 (0.0000***)	1.00000 (0.0000***)	0.91182	0.02
	Philippine vs Pakistan	0.82872 (0.0000***)	105.79474 (0.0000***)	1.00000 (0.0000***)	0.96498	0.01
	Philippine vs Tonga	1.80730 (0.0000***)	42.08059 (0.0000***)	1.00000 (0.0000***)	0.90683	0.03
	Taiwan vs China	3.28678 (0.0020**)	43.80808 (0.0040**)	0.86667 (0.0180*)	0.19869	1.01
	Taiwan vs Vietnam	3.40969 (0.0000***)	35.84861 (0.0000***)	0.92857 (0.0080**)	0.27881	0.65
	Taiwan vs India	2.36372 (0.0000***)	59.45582 (0.0000***)	0.94737 (0.0000***)	0.61810	0.15
	Taiwan vs Pakistan	1.08176 (0.0000***)	112.59286 (0.0000***)	0.96000 (0.0000***)	0.69189	0.11
	Taiwan vs Tonga	2.18686 (0.0000***)	52.65797 (0.0000***)	0.88889 (0.0080**)	0.60887	0.16
	China vs Vietnam	3.39847 (0.0000***)	67.00741 (0.0000***)	1.00000 (0.0000***)	0.23578	0.81
	China vs India	2.61680 (0.0000***)	71.49758 (0.0000***)	1.00000 (0.0000***)	0.71870	0.10
	China vs Pakistan	1.52297 (0.0000***)	130.60913 (0.0000***)	1.00000 (0.0000***)	0.77412	0.07
	China vs Tonga	2.49980 (0.0000***)	63.90825 (0.0000***)	1.00000 (0.0000***)	0.69474	0.11

Table 14 continued

DNA-R	Vietnam vs India	2.64623 (0.0000***)	68.29171 (0.0000***)	1.00000 (0.0000***)	0.66316	0.13
	Vietnam vs Pakistan	1.50158 (0.0000***)	126.20222 (0.0000***)	1.00000 (0.0000***)	0.71552	0.10
	Vietnam vs Tonga	2.52436 (0.0000***)	60.56660 (0.0000***)	1.00000 (0.0000***)	0.63949	0.14
	India vs Pakistan	1.29661 (0.0000***)	172.76778 (0.0000***)	1.00000 (0.0000***)	0.61179	0.16
	India vs Tonga	2.03467 (0.0000***)	90.99630 (0.0000***)	0.96296 (0.0000***)	0.66663	0.13
	Pakistan vs Tonga	1.17443 (0.0000***)	148.27157 (0.0000***)	0.96970 (0.0000***)	0.80455	0.06
DNA-S	Asia vs South	1.54105(0.0000***)	2968.77114(0.0000***)	0.97959(0.0000***)	0.75676	0.08
	Indonesia vs Japan	0.43520(0.0000***)	1077.21119(0.0000***)	0.95588(0.0000***)	0.13443	1.61
	Indonesia vs Philippine	0.40938 (0.2580ns)	1168.60302 (0.2670ns)	0.87132 (0.2270ns)	0.01316	18.74
	Indonesia vs Taiwan	0.47280(0.0000***)	1062.07532(0.0000***)	0.94178(0.0000***)	0.03158	7.67
	Indonesia vs China	0.64367(0.0000***)	1148.48344(0.0000***)	0.99315(0.0000***)	0.31965	0.53
	Indonesia vs Vietnam	0.41686(0.0000***)	1019.99132(0.0000***)	1.00000(0.0000***)	0.85913	0.04
	Indonesia vs India	0.70274(0.0000***)	1318.32328(0.0000***)	1.00000(0.0000***)	0.90946	0.02
	Indonesia vs Pakistan	0.50510(0.0000***)	1129.15964(0.0000***)	1.00000(0.0000***)	0.94687	0.01
	Indonesia vs Tonga	0.59441(0.0000***)	1148.42444(0.0000***)	1.00000(0.0000***)	0.91121	0.02
	Japan vs Philippine	0.87949 (0.0470ns)	15.36000 (0.0320ns)	0.61111 (0.1560ns)	0.06061	3.88
	Japan vs Taiwan	2.01169 (0.2100ns)	13.00000 (0.3040ns)	0.41667 (0.4410ns)	-0.00775	-32.50
	Japan vs China	2.46675 (0.0710ns)	36.45833 (0.1680ns)	0.96154 (0.0040**)	0.25101	0.75
	Japan vs Vietnam	1.34994 (0.0230*)	4.00000 (0.0230*)	1.00000 (0.0230*)	0.76316	0.08
	Japan vs India	1.39073(0.0000***)	206.25449(0.0000***)	1.00000(0.0000***)	0.87065	0.04
	Japan vs Pakistan	0.98122(0.0000***)	72.61231(0.0000***)	1.00000(0.0000***)	0.90417	0.03
	Japan vs Tonga	1.71543 (0.0010**)	33.78788 (0.0020**)	1.00000 (0.0030**)	0.87367	0.04
	Philippine vs Taiwan	1.36076 (0.0150*)	14.68000 (0.0150*)	0.61111 (0.0380*)	0.03367	7.17
	Philippine vs China	2.09578 (0.0030**)	40.49167 (0.0330*)	1.00000 (0.0030**)	0.32442	0.52
	Philippine vs Vietnam	0.70172 (0.0140*)	6.09167 (0.0150*)	1.00000 (0.0150*)	0.85635	0.04
	Philippine vs India	1.30294(0.0000***)	197.56079(0.0000***)	1.00000(0.0000***)	0.90866	0.03
	Philippine vs Pakistan	4.06609(0.0000***)	70.60821(0.0000***)	1.00000(0.0000***)	0.94510	0.01
	Philippine vs Tonga	1.48786(0.0000***)	33.77075(0.0000***)	1.00000(0.0000***)	0.91046	0.02
	Taiwan vs China	2.73412 (0.2200ns)	37.90123 (0.3020ns)	0.94872 (0.0080**)	0.01610	15.27
	Taiwan vs Vietnam	2.15206 (0.0540ns)	7.94444 (0.0650ns)	0.85714 (0.0780ns)	0.40284	0.37
	Taiwan vs India	1.47371(0.0000***)	218.04752(0.0000***)	0.96970(0.0000***)	0.58803	0.18
	Taiwan vs Pakistan	1.12277 (0.0010**)	77.06257 (0.0010**)	0.95238 (0.0050**)	0.60227	0.17
	Taiwan vs Tonga	1.91596 (0.0060**)	45.23106 (0.0040**)	0.81250 (0.0340*)	0.57105	0.19

**Table 14** continued

DNA-S	China vs Vietnam	2.57627 (0.0020**)	27.07986 (0.0090**)	1.00000(0.0070**)	0.53673	0.22
	China vs India	1.67328(0.0000***)	243.77501(0.0000***)	1.00000(0.0000***)	0.68954	0.11
	China vs Pakistan	1.51096(0.0000***)	96.56347(0.0000***)	1.00000(0.0000***)	0.70292	0.11
	China vs Tonga	2.18503(0.0000***)	54.20752(0.0000***)	1.00000(0.0000***)	0.67986	0.12
	Vietnam vs India	1.38359(0.0000***)	203.49493(0.0000***)	1.00000(0.0000***)	0.87930	0.03
	Vietnam vs Pakistan	0.94314 (0.0010**)	69.60639 (0.0010**)	1.00000 (0.0020**)	0.91303	0.02
	Vietnam vs Tonga	1.72678 (0.0020**)	32.71074(0.0000***)	1.00000 (0.0020**)	0.87367	0.04
	India vs Pakistan	1.22313(0.0000***)	299.21099(0.0000***)	1.00000(0.0000***)	0.74464	0.09
	India vs Tonga	1.49394(0.0000***)	277.40006(0.0000***)	1.00000(0.0000***)	0.63713	0.14
	Pakistan vs Tonga	1.26502(0.0000***)	104.81756(0.0000***)	1.00000(0.0000***)	0.70666	0.10

\*\*\* P<0.001, \*\*0.001<P<0.01, \*0.01<P<0.05

$Ks^*$ ,  $Z$ , and  $Snn$  represent the most powerful sequence based statistical tests for genetic differentiation and are recommend for use in cases of high mutation rate and small sample size (Hudson 2000). The  $Z$  statistic value results from ranking distances between all pairs of sequences.  $Snn$  the frequency with which the nearest neighbors of sequences are found in the same locality;  $F_{ST}$ , coefficient of gene differentiation or fixation index, which measures inter-population diversity;  $Nm$  can be interpreted as the effective number of migrants exchanged between demes per generation (Balasubramanian and Selvarajan 2014).

ポーネント共に交流が頻繁であることを示す 0.33 以下を示したのは、インドネシアと台湾、日本とフィリピン、日本と台湾、フィリピンと台湾、台湾と中国の各集団間であった。全体的に、台湾集団は、Asian group の各集団との間に交流があることが認められた。

### 3 奄美大島における EAPV の集団遺伝学的解析

#### 3-1 塩基配列およびアミノ酸配列の相同性

2014 年の 4 月と 9 月に、奄美大島の宇検村湯湾と奄美市住用町から採取した EAPV に感染したパッションフルーツの葉を用いて、各遺伝子領域を RT-PCR により増幅した (Table 4, Fig. 4)。4 月に採取した湯湾の 3 試料と、住用の 2 試料から得られた N1b および CP 領域の塩基配列をまず決定した。先行研究において、2007 年以降、湯湾集団の CP 領域の末端の 1 アミノ酸が欠失していることが認められている (Fukumoto et al., 2012)。我々はまず、この 1 アミノ酸欠失が 2014 年の湯湾集団においても認められるかを確認した (Fig. 8)。その結果、すべての湯湾株において、この 1 アミノ酸欠失が認められた。また、住用集団においては、これまでの結果と同様、このアミノ酸欠失は認められなかった。

さらに、2014 年に採取した両地域集団に特徴的な相異の有無を確認した (Fig. 8)。その結果、湯湾集団 (YW141-143)においては、2010 年以前の既報の分離株と比較して特徴的な変異は認められなかった。一方、2014 年の住用集団 (SY141 および SY142)においては、既報の分離株と比較して、CP 領域内に 4 箇所の非同義置換が一樣に認められた。また、N1b 領域においては、両集団とも特徴的な変異は確認できなかった。

2014 年 4 月に採取した分離株において、住用集団の CP 領域に 4 箇所の特徴的な非同義置換を確認したので、それ以外の領域において、このような変異の存在を確認するために、同年 9 月に採取した分離株においては、両集団とも、ポリプロテイン領域の塩基配列を決定し、既報の分離株と比較した。その結果、





4月に採取した分離株と同様の非同義置換が、9月に採取した分離株(SY143-146)においても一様に認められた。一方、湯湾集団においては、4月の分離株と同様に、特徴的な変異は確認できなかった。また、住用集団においてはさらに、P3領域に1箇所の非同義置換が、一様に認められた (Fig. 9)。

さらに、塩基配列およびアミノ酸配列の相同性を調べた (Table 15, 16)。その結果、2014年に採取した湯湾集団と住用集団の相同性は、塩基配列で99%以上、アミノ酸配列で97%以上であった。また、既報の分離株と比較すると、2014年の湯湾集団と、2005-2010年の湯湾集団のCP領域の相同性が塩基配列、アミノ酸配列ともに99%以上である一方で、2014年の住用集団と、2005-2010年の住用集団は塩基配列で98-99%、アミノ酸配列で97-98%であった。ポリプロテイン領域の相同性は両集団とも、既報の分離株と比較して、塩基配列、アミノ酸配列共に、98%以上を示した。

### 3-2 組換え解析

RDP4を用いて組換え解析を行ったところ、すべての分離株において、組換えは確認できなかった。



**Fig. 9** Amino acid sequence alignment of the P3 coding region of EAPV from Sumiyo.

**Table 15** Sequence identities (%) of the nucleotide and amino acid of CP region of EAPV.

Isolates	Yuwan 2014	Sumiyo 2014	Yuwan 2005-2010	Sumiyo 2005-2010
Yuwan 2014	99-100/100 <sup>a</sup>	98/97-98	99/99-100	98-99/99
Sumiyo 2014	-	99-100/99-100	98-99/97-98	98-99/97-98

<sup>a</sup> Identity of nucleotide/amino acid**Table 16** Sequence identities (%) of the nucleotide and amino acid of polyprotein of EAPV.

Isolates	Yuwan 2014	Sumiyo 2014	Yuwan 2005-2010	Sumiyo 2005-2010
Yuwan 2014	99/99	99/98-99	99/99	99/98-99
Sumiyo 2014	-	99/99	99/98-99	99/99

<sup>a</sup> Identity of nucleotide/amino acid

### 3-3 遺伝的多様性と選択圧の解析

前述した結果より、両集団に対する選択圧や、変異のスピードが異なることが考えられたので、遺伝的距離を用いた多様性解析と、 $d_N/d_S$  値を用いた選択圧の解析を行った (Table 17)。

多様性解析の結果、両集団共に、ポリプロテインおよび各タンパク質コード領域の多様性は低かった。その中で、最も多様性があつたのは 6K2 領域であり、これは先行研究 (Fukumoto et al., 2012a)と同様の結果であつた。また、両集団共、6K1 および VPg 領域には多様性が無かつた。

$d_N/d_S$  値を用いて選択圧を解析したところ、湯湾集団の HC-Pro 領域を除いて、1 未満を示し、両集団共、負の選択圧を受けているが、その程度は各タンパク質コード領域で異なっていることが示された。湯湾集団の HC-Pro 領域の値は 1 以上を示しており、この領域のみが正の選択圧を受けていることが示された。両集団の 6K1、湯湾集団の CI、VPg および CP 領域の値は 0 であり、強い負の選択圧を受けていることが確認された。総合的には、湯湾集団のほうが住用集団に比べて、強い負の選択圧を受けていた。また、湯湾集団の NIa-Pro 領域には、非同義置換のみが認められたため、 $d_N/d_S$  値は計算できなかった。

### 3-4 中立平衡解析

各集団の拡散と縮小を判別するため、CP 領域およびポリプロテイン領域の塩基配列を用いて、Tajima's  $D$ 、Fu and Li's  $D$  および  $F$  テストを行い各集団における塩基配列の多型を解析した (Table 18)。これらの検定値が負であつた場合、その集団のサイズが増加傾向にあることを示し、一方、正であつた場合は、集団サイズの減少、もしくは、集団が平衡状態であることを示す。検定の結果、湯湾集団のポリプロテインおよび 6 つのタンパク質コード領域は負の値を示したので、湯湾集団のサイズが増加傾向であることが示された。一方、住用集団の検定値は、ポリプロテインおよび 5 つのタンパク質コード領域で正の値となり、

**Table 17** Nucleotide distance and selection pressures of EAPV collected in 2014

	Region	Length of sequence	Average of nucleotide distance	d <sub>N</sub>	d <sub>S</sub>	d <sub>N</sub> /d <sub>S</sub>
Polyprotein	Sumiyo (n=4)	9663nt	0.00277 (0.00045) <sup>a</sup>	0.00149 (0.00031)	0.00771 (0.00151)	0.1933
	Yuwan (n=6)	9660nt	0.00122 (0.00025)	0.00093 (0.00149)	0.00232 (0.00075)	0.0401
P1	Sumiyo (n=4)	1305nt	0.00218 (0.00101)	0.00180 (0.00101)	0.00428 (0.00291)	0.4206
	Yuwan (n=6)	1305nt	0.00102 (0.00050)	0.00066 (0.00044)	0.00118 (0.00116)	0.5593
HC-Pro	Sumiyo (n=4)	1371nt	0.00378 (0.00118)	0.00294 (0.00116)	0.00697 (0.00330)	0.4218
	Yuwan (n=6)	1371nt	0.00258 (0.00091)	0.00266 (0.00106)	0.00232 (0.00154)	1.1466
P3	Sumiyo (n=4)	1041nt	0.00193 (0.00098)	0.00060 (0.00059)	0.00724 (0.00418)	0.0829
	Yuwan (n=6)	1041nt	0.00283 (0.00112)	0.00249 (0.00109)	0.00522 (0.00333)	0.4770
6K1	Sumiyo (n=4)	156nt	0.00000 (0.00000)	0.00000 (0.00000)	0.00000 (0.00000)	0.0000
	Yuwan (n=6)	156nt	0.00000 (0.00000)	0.00000 (0.00000)	0.00000 (0.00000)	0.0000
CI	Sumiyo (n=4)	1902nt	0.00202 (0.00082)	0.00078 (0.00052)	0.00677 (0.00288)	0.1152
	Yuwan (n=6)	1902nt	0.00018 (0.00017)	0.00000 (0.00000)	0.00084 (0.00078)	0.0000
6K2	Sumiyo (n=4)	159nt	0.00849 (0.00581)	0.00517 (0.00539)	0.02388 (0.02559)	0.2165
	Yuwan (n=6)	159nt	0.00549 (0.00395)	0.00259 (0.00269)	0.01912 (0.01927)	0.1355
VPg	Sumiyo (n=4)	570nt	0.00411 (0.00209)	0.00111 (0.00109)	0.01568 (0.00878)	0.0708
	Yuwan (n=6)	570nt	0.00000 (0.00000)	0.00000 (0.00000)	0.00000 (0.00000)	0.0000
NIa-Pro	Sumiyo (n=4)	729nt	0.00344 (0.00177)	0.00086 (0.00083)	0.01674 (0.00907)	0.0514
	Yuwan (n=6)	729nt	0.00046 (0.00043)	0.00057 (0.00054)	0.00000 (0.00000)	-
NIb	Sumiyo (n=6)	1557nt	0.00236 (0.00084)	0.00101 (0.00059)	0.00787 (0.00238)	0.1283
	Yuwan (n=9)	1557nt	0.00110 (0.00049)	0.00069 (0.00038)	0.00280 (0.00153)	0.2464
CP	Sumiyo (n=6)	870nt	0.00115 (0.00067)	0.00048 (0.00047)	0.00378 (0.00261)	0.1270
	Yuwan (n=9)	867nt	0.00026 (0.00026)	0.00000 (0.00000)	0.00125 (0.00121)	0.0000

<sup>a</sup> Number in parentheses are the standard errors.

**Table 18** Neutrality test and haplotype diversity of two EAPV populations collected in 2014

Gene	Region	Fu & Li's <i>D</i>	Fu and Li's <i>F</i>	Tajima's <i>D</i>	Number of haplotype	Haplotype diversity
polyprotein	Sumiyo (n=4)	0.21516	0.22823	0.21516	4	1.000 (0.177) <sup>a</sup>
	Yuwan (n=6)	-0.38317	-0.43307	-0.44480	6	1.000 (0.096)
P1	Sumiyo (n=4)	0.37186	0.35139	0.37186	4	1.000 (0.177)
	Yuwan (n=6)	-1.32453	-1.39621	-1.29503	4	0.800 (0.172)
HC-Pro	Sumiyo (n=4)	-0.52807	-0.52801	-0.52807	4	1.000 (0.177)
	Yuwan (n=6)	0.07769	0.07721	0.04995	5	0.933 (0.122)
P3	Sumiyo (n=4)	-0.78012	-0.72052	-0.78012	3	0.833 (0.222)
	Yuwan (n=6)	-0.13770	-0.17373	-0.25127	5	0.933 (0.122)
6K1	Sumiyo (n=4)	-	-	-	0	0.000 (0.000)
	Yuwan (n=6)	-	-	-	0	0.000 (0.000)
CI	Sumiyo (n=4)	0.03892	0.03791	0.03892	3	0.833 (0.222)
	Yuwan (n=6)	-0.95015	-0.96473	-0.93302	2	0.333 (0.215)
6K2	Sumiyo (n=4)	1.89306*	1.61138	1.89306	2	0.667 (0.204)
	Yuwan (n=6)	0.06221	0.03984	-0.05002	3	0.733 (0.155)
VPg	Sumiyo (n=4)	0.65010	0.60044	0.65010	3	0.833 (0.222)
	Yuwan (n=6)	-	-	-	0	0.000 (0.000)
NIa-Pro	Sumiyo (n=4)	1.36522	1.26092	1.36522	3	0.833 (0.222)
	Yuwan (n=6)	-0.95015	-0.96473	-0.93302	2	0.333 (0.215)
NIb	Sumiyo (n=6)	-0.43366	-0.46330	-0.41545	5	0.933 (0.122)
	Yuwan (n=9)	-0.83787	-0.87785	-0.62990	4	0.714 (0.181)
CP	Sumiyo (n=6)	-1.15529	-1.19511	-1.13197	2	0.333 (0.251)
	Yuwan (n=9)	-1.18990	-1.28293	-1.08823	2	0.222 (0.166)

<sup>a</sup> Number in parentheses are the standard errors.

\*0.1&gt;P&gt;0.05

- no data

住用集団のサイズは減少傾向、もしくは平衡状態であることが示された。この結果は、住用集団のサイズが増加傾向であった 2010 年以前の解析結果 (Table 19) (Fukumoto et al., 2012a) と異なった。

### 3-5 系統学的解析

系統学的解析は、2014 年の分離株に加え、既報の分離株も用いて、最尤法および近隣結合法を用いて行った(Fig. 10, 11)。系統樹の作成には、CP 領域およびポリプロテインの塩基配列を用いた。その結果、両方法で作成した系統樹は、同様の樹形を示した。また、湯湾集団および住用集団は、共に異なるクレードを形成し、両集団が明確に分化していることが示された。

### 3-6 遺伝的分化および遺伝子流動解析

本解析は、2014 年の分離株に加え、両集団の既報の分離株を用いて行った(Table 20)。まず、遺伝的分化の解析には、Hudson (2000)で示された 3 つの統計学的解析法 ( $K^*$ 、 $Z$ 、 $Snn$ )を用いた。これらの検定値が有意な値となれば、両集団が遺伝的に分化していることを示している。検定の結果、ポリプロテインおよびほぼすべてのタンパク質コード領域で、有意な値となり、湯湾集団と住用集団が遺伝的に分化していることが示された。

次に、 $F_{ST}$  値を用いた遺伝子流動解析を行った (Table 20)。検定の結果、ポリプロテインおよびほぼすべてのタンパク質コード領域で、 $F_{ST}$  値が 0.33 以上となり、両集団間に交流がほぼないことが示された。これらの結果は、上記の系統学的結果によっても支持される。

**Table 19** Neutrality tests, haplotype and nucleotide diversity of each East Asian *Passiflora* virus population in Amami-O-Shima, Japan

Geographical group	Fu & Li's <i>D</i>	Fu and Li's <i>F</i>	Tajima's <i>D</i>	Nucleotide diversity	Number of haplotype	Haplotype diversity
Amami (n=20)	-1.31680	-1.52164	-1.28314	0.00339 (0.00140)	19	0.955 (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)

Derived from Fukumoto et al. (2012a).

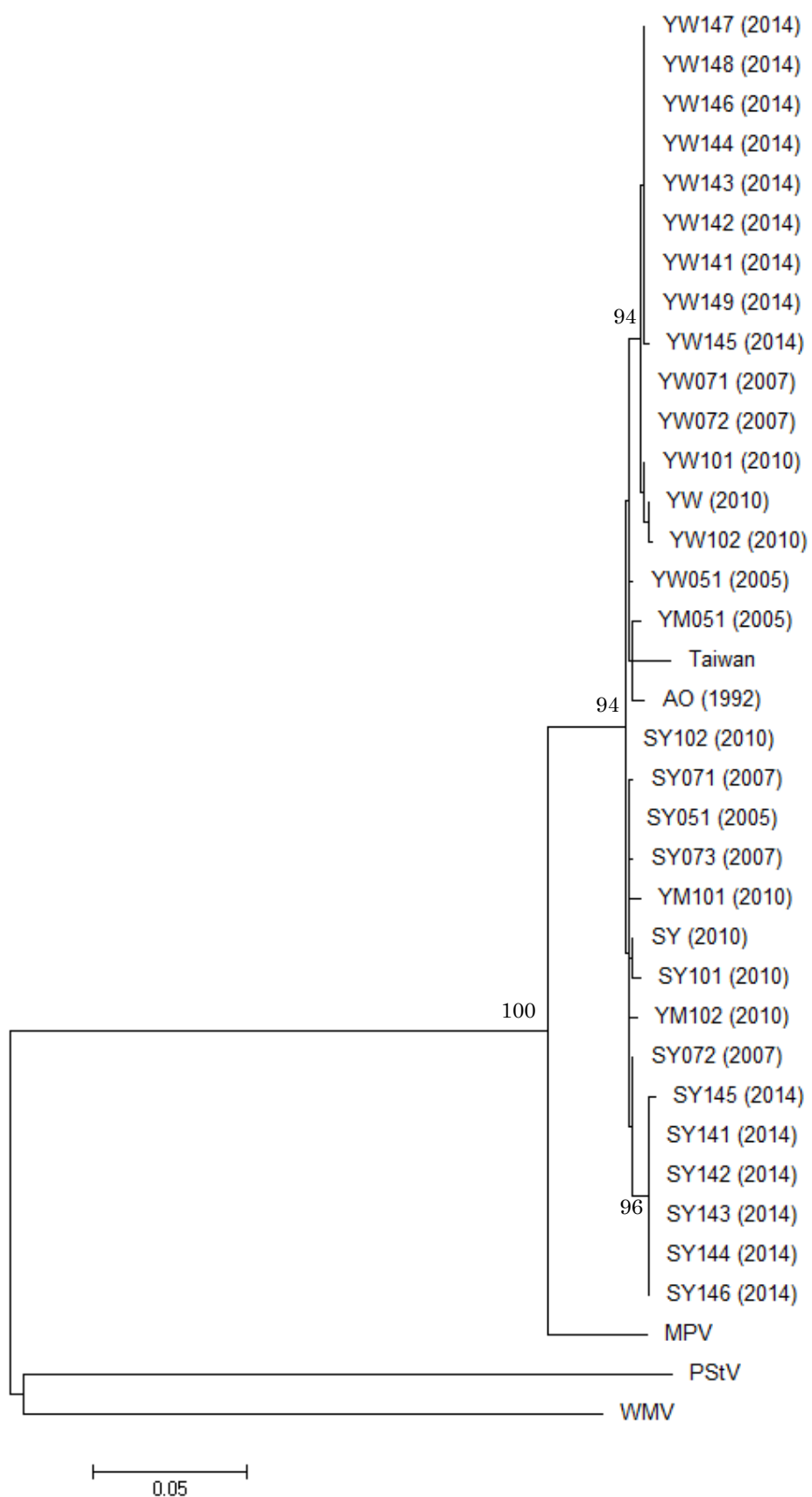
\*0.10>P>0.05, \*\*P<0.05

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

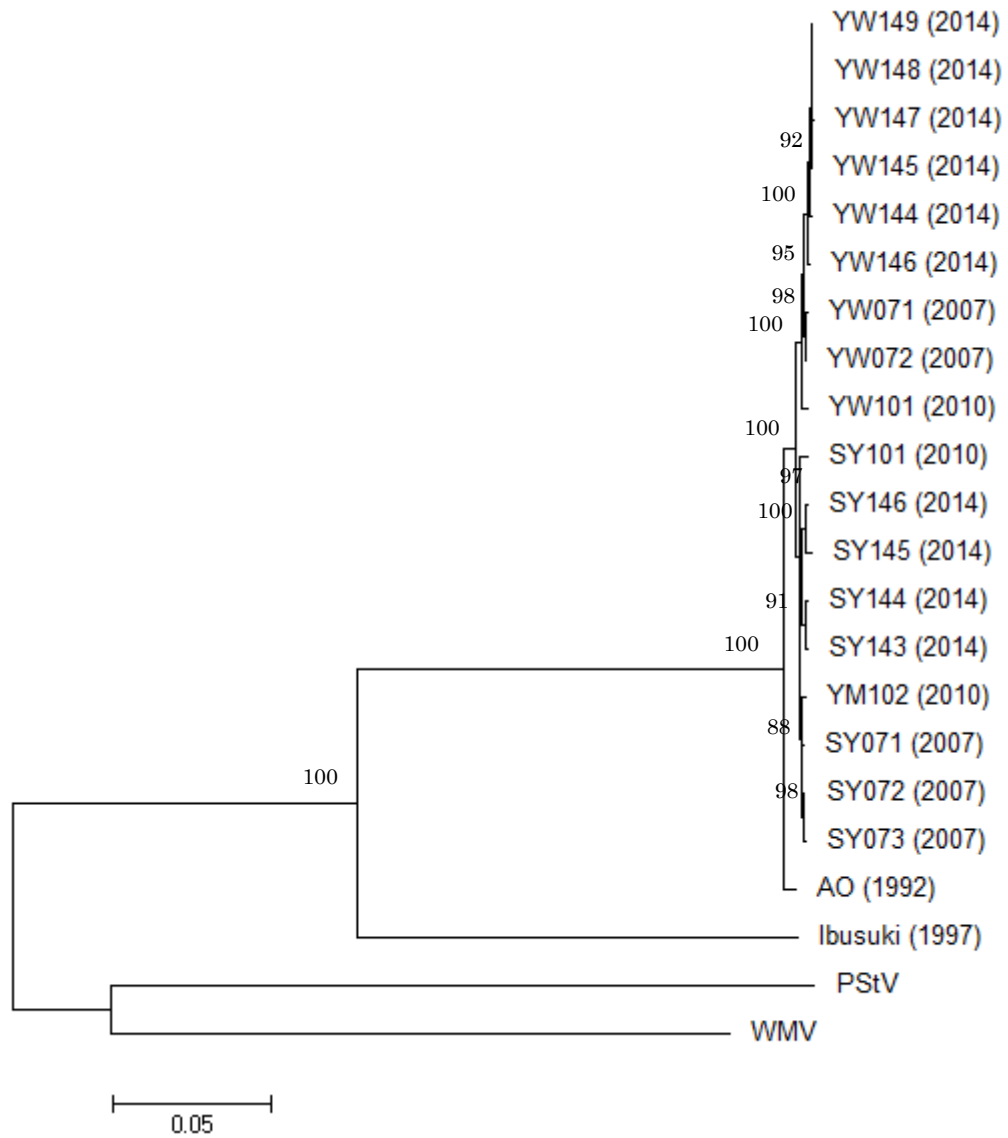
<sup>b</sup> The numbers in the parentheses are standard errors.



(A)

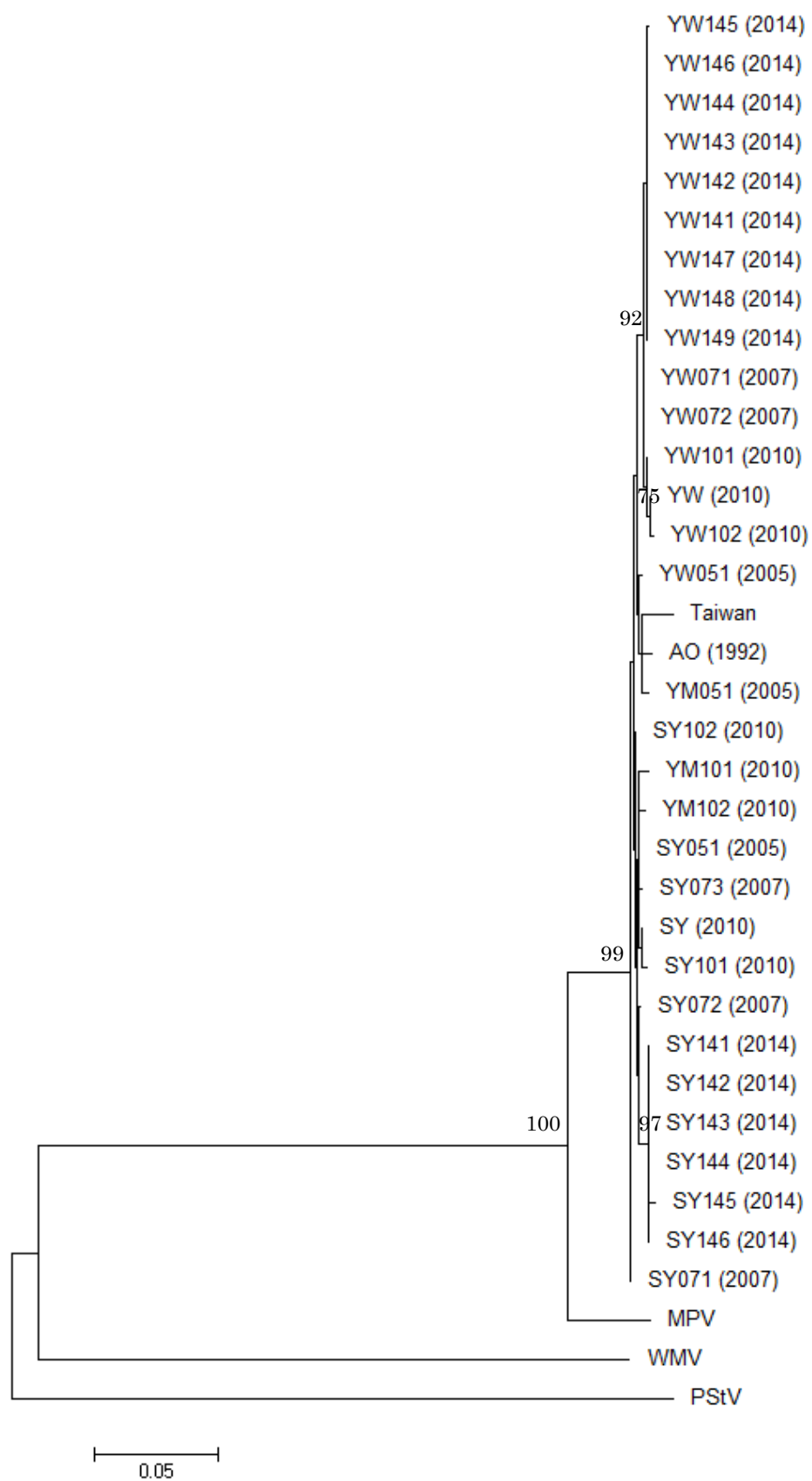


(B)

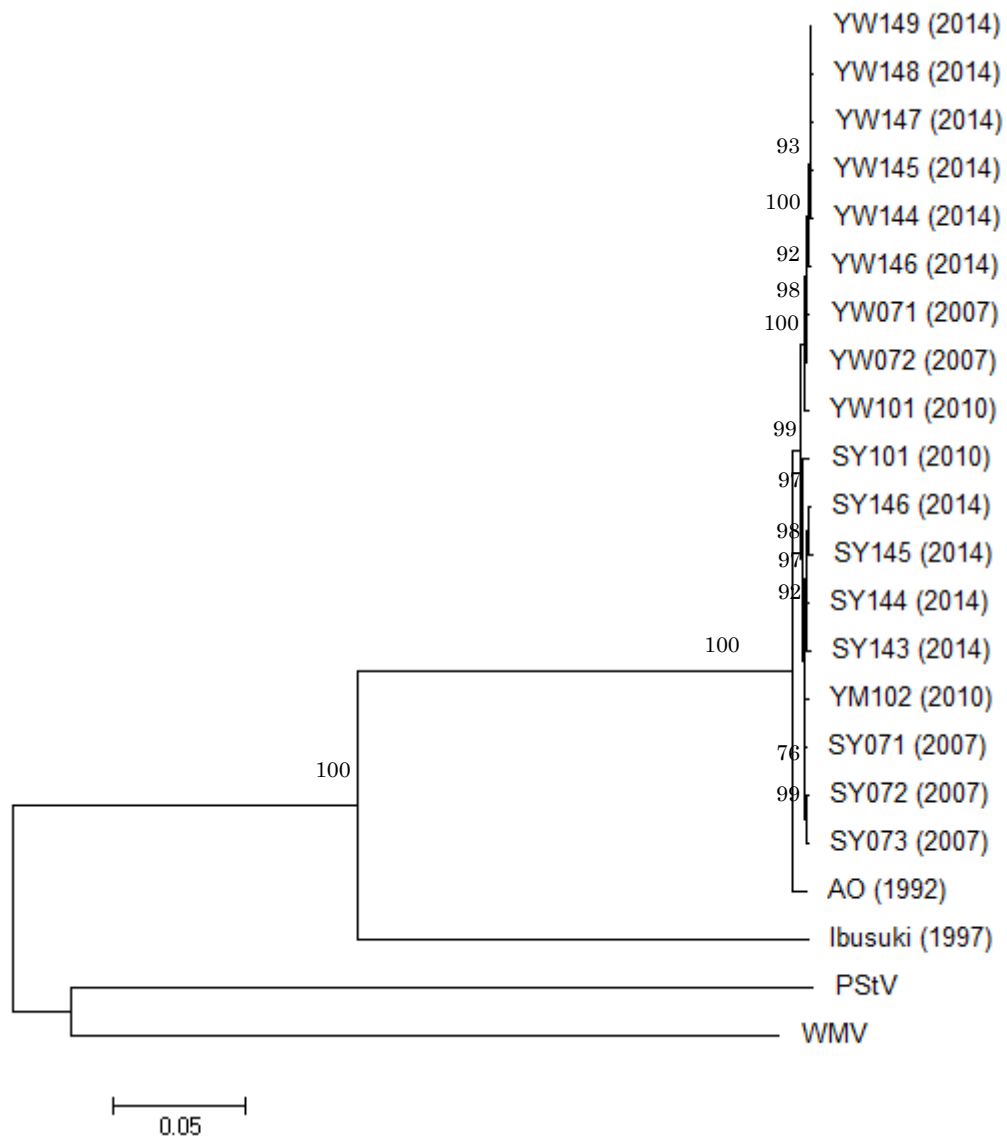


**Fig. 10** Maximum likelihood phylogenetic tree of EAPV Amami Oshima Island isolates using CP region (A) and polyprotein (B). The nucleotide sequences of PStV and WMV were used as outgroups. The number of each node indicates a bootstrap percentage based on 1000 replications (only >75% are shown).

(A)



(B)



**Fig. 11** Neighbor-joining phylogenetic tree of EAPV Amami Oshima island isolates using CP region (A) and polyprotein (B). The nucleotide sequences of PStV and WMV were used as outgroups. The number of each node indicates a bootstrap percentage based on 1000 replications (only >75% are shown).

**Table 20** Genetic differentiation and gene flow of EAPV in Amami Oshima Island

Gene	Region	Parameter <sup>a</sup>				
		$K_s^*$ (P-value)	Z (P-value)	Snn (P-value)	$F_{ST}$	Nm
Polyprotein	Sumiyo (n=9) vs Yuwan (n=9)	3.23016 (0.0000 <sup>†</sup> )	35.61111 (0.0000 <sup>†</sup> )	1.00000 (0.0000 <sup>†</sup> )	0.61289	0.16
P1	Sumiyo (n=9) vs Yuwan (n=9)	1.19389 (0.0000 <sup>†</sup> )	36.11111 (0.0000 <sup>†</sup> )	1.00000 (0.0000 <sup>†</sup> )	0.72074	0.10
HC-Pro	Sumiyo (n=9) vs Yuwan (n=9)	1.75669 (0.0000 <sup>†</sup> )	36.57639 (0.0000 <sup>†</sup> )	1.00000 (0.0000 <sup>†</sup> )	0.67034	0.12
P3	Sumiyo (n=9) vs Yuwan (n=9)	1.32909 (0.0000 <sup>†</sup> )	41.01389 (0.0000 <sup>†</sup> )	1.00000 (0.0000 <sup>†</sup> )	0.59936	0.17
6K1	Sumiyo (n=9) vs Yuwan (n=9)	-	-	-	-	-
CI	Sumiyo (n=9) vs Yuwan (n=9)	1.42406 (0.0000 <sup>†</sup> )	39.50000 (0.0000 <sup>†</sup> )	1.00000 (0.0000 <sup>†</sup> )	0.55120	0.20
6K2	Sumiyo (n=9) vs Yuwan (n=9)	0.85724 (0.0000 <sup>†</sup> )	43.22695 (0.0000 <sup>†</sup> )	1.00000 (0.0000 <sup>†</sup> )	0.48598	0.26
VPg	Sumiyo (n=9) vs Yuwan (n=9)	0.61228 (0.0000 <sup>†</sup> )	65.56250 (0.0040 <sup>††</sup> )	0.72262 (0.0020 <sup>††</sup> )	0.26471	0.69
NIa-Pro	Sumiyo (n=9) vs Yuwan (n=9)	0.89739 (0.0000 <sup>†</sup> )	47.68056 (0.0000 <sup>†</sup> )	1.00000 (0.0000 <sup>†</sup> )	0.52273	0.23
NIb	Sumiyo (n=11) vs Yuwan (n=12)	1.26296 (0.0000 <sup>†</sup> )	76.38852 (0.0000 <sup>†</sup> )	1.00000 (0.0000 <sup>†</sup> )	0.58038	0.22
CP	Sumiyo (n=16) vs Yuwan (n=15)	1.21909 (0.0000 <sup>†</sup> )	130.20608 (0.0000 <sup>†</sup> )	0.95699 (0.0000 <sup>†</sup> )	0.62098	0.15

<sup>a</sup>  $K_s^*$ , Z, and Snn represent the most powerful sequence based statistical tests for genetic differentiation and are recommend for use in cases of high mutation rate and small sample size (Hudson 2000). The Z statistic value results from ranking distances between all pairs of sequences. Snn the frequency with which the nearest neighbors of sequences are found in the same locality;  $F_{ST}$ , coefficient of gene differentiation or fixation index, which measures inter-population diversity; Nm can be interpreted as the effective number of migrants exchanged between demes per generation (Balasubramanian and Selvarajan 2014).

<sup>†</sup>  $P < 0.001$ , <sup>††</sup>  $0.001 < P < 0.01$

## 第IV章 考察

### 1 スマトラ島における BBTV の遺伝構造と多様性の解析

これまでにインドネシアにおいて、BBTV はジャワ島とバリ島から検出されており、それらの DNA-R と DNA-S の塩基配列が解析されていた (Furuya et al., 2004; Pinili et al., 2011)。インドネシアにおいて BBTV は、1978 年にジャワ島で初めて検出されたが (Salyo and Muharam, 1985)、スマトラ島への侵入時期については不明である。スマトラ島はバナナの主要な生産地の一つであり、BBTD も認められていたが、現在まで調査が行われていなかった。本研究では、スマトラ島より BBTD を呈するバナナを採取し、BBTV61 分離株の DNA-R および DNA-S の全塩基配列を決定し、さらに、その中から 37 分離株の DNA-U3 の全塩基配列も決定した。先行研究において、いくつかの中国分離株で、通常の ORF の開始コドンが AUG から UUG に変わっており、その下流に GUG を開始コドンに持つ ORF が存在していることが知られている (Yu et al., 2012)。スマトラ分離株もこれらと同様に、通常の開始コドンの場所が UUG に置換しており、さらに、その下流に GUG コドンも存在している。しかし、GUG を開始コドンとすると、中国分離株よりも ORF が非常に長く、かつ、ORF 内にポリ A シグナルを含む。よって、本研究では、ウイルスにおいては極めて稀な例ではあるが、UUG を開始コドンとして解析を行った。また、インドネシアの BBTV において DNA-U3 の塩基配列は現在までに解析されておらず、本研究が初めての例となった。

先行研究において、DNA-R と DNA-S は他のコンポーネントに比べ、塩基配列の多様性が低いことが報告されている (Amin et al., 2008, Vishnoi et al., 2009; Stainton et al., 2011)。また、インドネシアの分離株においても、各コンポーネントの相同性が 98%以上であることが報告されている (Furuya et al., 2004, Pinili et al., 2011)。本研究においても、スマトラ集団の、各コンポーネントの相同性は 98%以上となり、先行研究と同様の結果となった (Table 5)。特に、DNA-S においては、NA-1 株を除いて、アミノ酸配列が 100%の相同性を示した。NA-1 株は、

アミノ酸配列の 40 番目 (N→K)と 42 番目 (V→P)が、それぞれ、他の分離株と比べて、変異を起こしていた。しかし、DNA-S のアミノ酸配列は 99.8%以上と非常に高く保存されていた。これは、DNA-S がコードする CP が、植物体内におけるウイルスの生存に不可欠なものと関係していると考えられる。

一方、DNA-U3 は BBTV の全コンポーネントの中で最も多様性が高いことが知られている (Hyder, 2009)。先行研究において相同性解析が行われており、Asian group では 68.1-94.3%、South Pacific group では 75.7-99.9%であった(Hyder et al., 2011)。これは、他のコンポーネントの相同性と比べて著しく低い値である。また、DNA-U3 の多様性は各集団によって異なっていた。例えば、インド、中国、台湾集団の DNA-U3 は多様性が高い (それぞれ、75.3-97.0%、83.5-99.7%、72.4-94.8%)。一方、パキスタン、トンガ集団の DNA-U3 は多様性が低い (それぞれ、98%以上、96%以上)。スマトラ島集団の DNA-U3 の相同性は非常に高く、これはパキスタンやトンガ集団と同様の結果となった。また、インドネシアの BBTV から、DNA-U3 の塩基配列を決定した例はこれまでに無く、本研究は、今後のインドネシアにおける BBTV の研究に有用なものになると考えられる。

DNA-U3 の CR-SL を解析したところ、南部集団のステムループ構造の配列が、他地域集団と異なっていることが認められた (Fig. 6)。BBTV において、CR-SL は、複製に重要であることが知られている (Harding et al., 1993, Hafner et al., 1997)。しかし、これらの変異挿入に関わらず、南部集団のステムループの 2 次構造は維持されていたことから、ステムループの機能も変化していないと考えられた。この南部集団の DNA-U3 のステムループ領域は、地理的隔離によってたまたま、この地域に定着した配列であると考えられた。

組換え解析の結果、スマトラ島集団の DNA-R、-S、-U3 は組換えを起こしていないことが認められた。この結果より、スマトラ集団内に生じている変異は、すべて自然変異であることが示唆された。さらに、各地域間の遺伝的分化と遺伝子流動を解析したところ、明確な遺伝的分化は確認されず、頻繁な交流が確認されたことから、スマトラ島には 1 つのゲノム型の BBTV のみが存在していると考えられた (Table 11)。これまでスマトラ島において、BBTV に有効な抵抗

性バナナ品種が無かったことが、島内における BBTV の多様性を低くした原因であるとも考えられる。よって、今後スマトラ島において、BBTV に抵抗性を持つバナナ品種を育成する際は、この 1 ゲノム型の BBTV に的を絞った育種を行うことが、早い抵抗性品種の作出につながるかもしれない。

本研究では、宿主バナナのゲノム型が、ウイルスの多様性や、選択圧に及ぼす影響についても調査した。その結果、AAB および ABB のバナナに感染しているウイルスのほうが、AA および AAA に感染しているウイルスよりも、多様性があることが認められた (Table 9)。また、DNA-R における選択圧は、ほぼ同様であったが、DNA-S においては、AAB および ABB に感染しているウイルスのほうが弱い負の選択圧を受けていた (Table 9)。これまでの研究で、ゲノム型に B ゲノムを持つ品種は、A ゲノムのみで構成される品種よりも、BBTV に対して抵抗性があるという報告がある (Hooks et al., 2009, Furuya et al., 2012)。本研究で調査した品種の中に、BBTV に抵抗性を示すものが含まれており、その品種に適応するために、ウイルスに変異が挿入された結果、B ゲノムを含む品種に感染している BBTV の方が、多様性が増す傾向があるものと考えられる。

中立平衡解析の結果、西スマトラ集団が、近年突発的に拡散したことが示された (Table 10)。西スマトラ州は、スマトラ島内で最も新しくバナナの栽培を始めた地域である。西スマトラ州で栽培されている品種は、他地域で栽培されているものとほぼ同様であるため、この現象の原因は、品種の違いというよりはむしろ、西スマトラ州特有の、栽培環境などの要因によるものであると考えられる。例えば、西スマトラ州では、近年、新規の大規模プランテーション農園が増加しており、それに伴って積極的なウイルスフリー苗の配布が行われている。それらの健全なバナナに、土着の BBTV が感染し拡散することで、西スマトラ集団のサイズが増加傾向にあると考えられる。

スマトラ島の BBTV について、遺伝子流動解析を行った結果、DNA-R においては、 $F_{ST}$  値が 0.33 以上となる場合も認められたが、DNA-S においては、すべての地域間で 0.33 以下を示した (Table 11)。BBTV はすべてのコンポーネントが、それぞれ個別のウイルス粒子に格納されていることから、DNA-S はすべての地



域間で交流しているが、DNA-R が交流していない地域も存在することを示唆している。もしくは、DNA-S は各地域間の相同性が非常に高いことから、仮に交流が起こっていたとしても、検定値に反映されていない可能性もある。よって、今後 BBTB において遺伝子流動解析を行う際は、DNA-R のみを用いる方が正確な結果を得られるのではないかと考えられる。

## 2 BBTB の集団遺伝学的解析

これまで、BBTB において、網羅的な集団遺伝学的解析による、各集団の遺伝構造や多様性の比較は行われていなかった。本研究では、遺伝的多様性、選択圧、中立平衡解析、遺伝的分化および遺伝子流動の指標を用い、各集団の遺伝構造および多様性を解析し比較した。

まず遺伝的多様性を比較したところ、中国および台湾集団の両コンポーネントの多様性が高いことが確認された (Table 12)。中国においてバナナの栽培は福建省、雲南省、広東省、海南省など、広い範囲で行われており (中村 1991)、海南省と雲南省からは、BBTB の感染も報告されている (Yu et al., 2012)。中国の BBTB 集団の多様性が高いのは、各栽培地域によって、気候や栽培環境に違いがあり、それに適応する過程で遺伝型が選択されたと考えられる。

また、台湾集団においては、1 つの植物体から、Asian group と South Pacific group の両方のコンポーネントを持つ分離株 (TW4 株)が検出された例がある (Hu et al., 2007)。TW4 株は、非常に興味深い株であり、Asian group の DNA-M と South Pacific group の DNA-U3、-S、-C、そして両グループの DNA-R で構成されており、DNA-N が欠落している。要するに、Asian group と South Pacific group の分離株がリアソータントを起こし、その結果 DNA-N を持たなくても、植物体内で増殖、生存ができるように進化した株であると考えられる (Hu et al., 2007)。また、台湾でのバナナ栽培は、18 世紀のころ、中国福建省から移植されたのが最初といわれており、その後 1911 年に、マレーシア、インドネシア、フィリピンなどから様々な品種が持ち込まれ、試作されていたという報告がある (中村,

1991)。すなわち、台湾はかつて、様々な地域から、様々な品種を導入しており、その過程で、各地域の BBTV が持ち込まれ、それらが、変異、組換え、リアソータントなどを繰り返す中で、多様性が高くなったと考えられる。この仮説は、遺伝子流動解析からも裏付けられ、台湾集団とアジア各国集団の  $F_{ST}$  値は 0.33 以下となっていることがほとんどであり、交流が認められている (Table 14)。

一方、South Pacific group の各国集団間では、明確な遺伝的分化が認められると同時に、交流がほとんど無いことも示された (Table 14)。BBTV の各グループの分布域を見ると、Asian group は東シナ海、南シナ海に面している国であるのに対し、South Pacific group は、アフリカ大陸、西アジア、オーストラリア、トンガ、フィジーと幅広い。本研究では用いていないが、アフリカ大陸、ミャンマー、フィジー、オーストラリアの BBTV 集団も、例外なく South Pacific group に分類される。また、これらの分布域は、バナナの伝来経路との関わりを示している。バナナは、フィリピンやマレー半島から、海路でアジア諸国へ伝来された経路と、フィリピンやマレー半島からインドシナ半島経由で、主に陸路で西アジア、アフリカ大陸へ、順に伝わった経路があるとされている (中村, 1991)。要するに、South Pacific group の各国集団は、バナナの伝来と共に、各地域へ定着し、その後は外部の集団と交流を持たないまま、各国の気候や、環境要因に適応するようにゲノムを変異させてきたと考えられる。これを裏付けるように、本研究では、South Pacific group の各国集団間で、明確な遺伝的分化が認められると同時に、交流がほとんど無いことが示された。将来的に、バナナの伝来と BBTV 集団の関係をより深く調べることで、BBTV の起源や、拡散ルートも解明できると考えられる。

### 3 奄美大島における EAPV の集団遺伝学的解析

先行研究において、2005-2010 年の奄美大島における EAPV の多様性が解析され、いずれの年においても塩基配列の相同性が非常に高いことが示された (Fukumoto et al., 2012a)。この傾向は、本研究でも同様であり、島内の EAPV の

塩基配列の相同性は高かった (Table 15, Table 16)。しかし、本研究では、2014 年の住用集団の CP コード領域に 4 ヶ所、P3 コード領域内に 1 ヶ所の一様な非同義置換を確認した。CP 領域の 3 ヶ所の非同義置換は、本研究で初めて確認されたが、99 番目のアミノ酸変異は 2007 年の 1 分離株 (SY072) おいて認められている (Fig. 8)。このことより、同様の配列を保持したウイルスは当時から存在していたが、少なくとも 2010 年までは優勢な配列ではなかったことが示唆される。さらに、2010 年から 2014 年の間に、合計 5 ヶ所の非同義置換が起こったウイルスが、優勢種になったと考えられる。

上記で示した、住用集団内の非同義置換は、病徴に関与している可能性がある。実際に、住用町における病徴は、一様に軽微であり、宇検村湯湾における病徴は、一様に激しい。また、両地域には環境的な違いはほとんど無く、栽培している品種も同じであるため、この病徴の違いは、ウイルスの変異によるものである可能性が高い。本研究では、住用集団の CP 領域だけでなく、P3 領域にも特徴的な変異を認めた (Fig. 9)。Potyvirus 属において P3 領域は、病徴や、抵抗性の打破に関与しているという報告があり (Suehiro et al., 2004, Eggenberger et al., 2008)、住用集団の P3 領域に確認された変異は病徴の違いに関与している可能性がある。一方、Potyvirus 属において、CP 領域が病原性に関与しているという報告は無いが、細胞間移行や長距離移行に関与しているという報告がある (Dolja et al., 1994, Dolja et al., 1995, Rojas et al., 1997)。よって、住用集団の CP 領域に認められた 4 ヶ所の非同義置換は、ウイルスの移行や蓄積量に関与している可能性がある。しかし、これらのことは、配列データから予測したものであり、今後ピンポイントに変異を加えた cDNA クローンを構築するなどして、確かめる必要がある。

選択圧解析の結果、両集団は負の選択圧を受けていたが、その程度は、各タンパク質コード領域によって異なっていた (Table 17)。湯湾集団の NIa-Pro 領域には、同義置換が無く、非同義置換のみが認められたことが特異であるが、サンプル数が少ないことも影響していると考えられる。先行研究において、各タンパク質コード領域の中で、6K2 領域の  $d_N/d_S$  値が最も高く、負の選択圧の程度

が、各領域によって異なっていることが報告されている (Fukumoto et al., 2012a)。本研究でも、同様の結果となり、各領域によって負の選択圧の程度が異なっていた。しかし、先行研究においては、すべての領域の  $d_N/d_S$  値が 1 以下であったが、本研究では、湯湾集団の HC-Pro 領域のみ、1 以上を示した。これは、2010 年から 2014 年までの 4 年間で、湯湾集団の HC-Pro 領域における選択圧の強さが変わったからであると考えられる。また、住用集団は湯湾集団に比べて、弱い負の選択圧を受けていた。これは、中立平衡解析の結果によっても裏付けられている。

中立平衡解析の結果、有意な値とはならなかったものの、住用集団のポリプロテイン領域の値が正の値であったのに対して、湯湾集団では負の値となった (Table 18)。よって、住用集団のサイズは縮小しているか、平衡状態であり、湯湾集団のサイズは増加していると考えられる。2010 年以前の住用集団のサイズは増加傾向にあった (Fukumoto et al., 2012a) ことから、近年住用集団への選択圧に変化が生じ、ゲノムに急激な変異が起こり、5 つの非同義置換を有したウイルスが優勢種となったと考えられる。

遺伝的分化と、遺伝子流動解析の結果、両集団は分化しており、互いに交流が無いことが示された (Table 20)。これらの結果は、系統学的解析によっても支持された (Fig. 10, Fig. 11)。これまでに、*Potyvirus* 属において、いくつかの国の間、もしくは一つの国内のいくつかの地域間における、遺伝的分化と遺伝子流動が解析されてきた (Zhang et al., 2011, Nguyen et al., 2013, Balasubramanian and Selvarajan, 2014)。本研究は、非常に小さな島の中に、2 つの分化したウイルス集団が存在していることを明らかにした、極めて珍しい例である。この理由について以下の 2 点が考えられる。1 点は、これら 2 地域では、現在でもパッションフルーツ農家が、クローン苗を自家採取しているため、両地域のウイルスに交流が無いと考えられる。2 点は、これら 2 地域は、標高約 400m の山々で隔てられており、自然界のベクターであるノグシフクレアブラムシの往来が無いことも影響していると考えられる。これらと宿主の管理法など他の要因が複合的に影響して、2 つの集団はそれぞれの地域内で独立的に進化してきたと考えられる。

## 第V章 総合考察

本研究では、世界各国で BBTB の原因となっている BBTB と、主に日本において PWB の原因となっている EAPV について、遺伝的構造と多様性を解析した。

本研究では、スマトラ島と、奄美大島という比較的に限られた地域内におけるウイルス集団の多様性を調査した。まず、両ウイルス集団の遺伝的多様性を調べたところ、両集団共、遺伝的多様性が非常に低いという結果であった。BBTB を含む一本鎖環状 DNA ウイルスは、宿主の DNA ポリメラーゼを用いてローリングサイクルメカニズムによって複製を行っている (Laufs et al., 1995, Gronenborn, 2004)。宿主の DNA ポリメラーゼを用いる DNA ウイルスは、修復機能を保持していない RNA 依存性 RNA ポリメラーゼを用いる RNA ウイルスに比べ突然変異が挿入されにくいと考えられている (Domingo and Holland, 1997)。本研究で解析したスマトラ島の BBTB 集団は、DNA-R、-S、-U3 の多様性が、他地域の集団に比べて低かった。これは、スマトラ島が、海に囲まれている離島であり、外部からのウイルスの侵入が制限されていることが影響していると考えられる。このような他地域のウイルス集団との交流が限られた島の中で、正確性の高い宿主の DNA ポリメラーゼを用いて複製していることが、スマトラ島の BBTB 集団の多様性を低くしている一因であると考えられる。しかし、中国、台湾の BBTB 集団のように、他地域の集団に比べ格段に多様性が高い例もある。これらの集団に関して、中国ではバナナが栽培されている地域が広く、それぞれの環境に適応したゲノム型が誕生した可能性が考えられ、台湾はかつてより、多くの地域からバナナ品種を導入し試作していた例があることから (中村, 1991)、様々な地域の BBTB が混在している可能性が示唆される。つまり、DNA ポリメラーゼの正確性が高いにも関わらず、これらの集団の多様性が高いことは、人為的な力によっていくつかのゲノム型の BBTB が 1 つの国・地域に混在してきたことが、結果として多様性を高めた原因であると考えられる。また、遺伝的分化と、遺伝子流動の解析から、South Pacific group の各国集団は、

それぞれ遺伝的に分化しており、交流が無いことも示された。また、それぞれの集団内の遺伝的多様性も低いことから、これらの地域では、BBTV はバナナの移動と共にいったんは各地域へ侵入したが、各地域へ定着する過程で環境や宿主へ適応した後、外部との交流がなくなり、突然変異がほとんど挿入されないまま複製・増殖を続け、現在まで低い多様性を保っているものと考えられる。

一方、一般的に、校正機能を保持していない RNA 依存性 RNA ポリメラーゼで複製する RNA ウイルスは、DNA ウイルスに比べ、突然変異が挿入されやすいという報告があることから (Domingo and Holland, 1997)、EAPV 集団の方が、BBTV 集団よりも多様性が高い傾向にあることが予想された。しかし、解析の結果、両集団の遺伝的多様性はほとんど変わらなかった。EAPV 集団の多様性が低いことは、Fukumoto et al. (2012a)も既に報告しており、本研究の結果もそれと同様の傾向を示した。この結果に関して、福元 (2012)は以下の事例を引用して考察している。1 例目は、ポリオウイルスにおいて正確性の高い RNA 依存性 RNA ポリメラーゼを持つ変異体が発見されており、この場合アミノ酸置換によって正確性の改変が可能であることから (Pfeiffer and Kirkegaard, 2003, Arnold et al., 2005)、EAPV のコードしている RNA 依存性 RNA ポリメラーゼも、他のウイルスより正確性が高い可能性があること。2 例目は、Coxsackie virus B3 において、2 価の陽イオンが RNA 依存性 RNA ポリメラーゼの正確性に影響を与えていることから (Levi et al., 2010)、パッションフルーツ内の 2 価の陽イオンが EAPV の RNA 依存性 RNA ポリメラーゼの正確性に影響している可能性である。本研究における結果でも、EAPV 集団の遺伝的多様性は先行研究と変わらず低く、EAPV の RNA 依存性 RNA ポリメラーゼの正確性が非常に高いことが改めて示された。また、本研究では、湯湾集団と住用集団という 2 集団の進化についても考察した。2014 年に採取し、解析した湯湾集団のアミノ酸配列は、既報の分離株とほぼ変わらないのに対し、住用集団は P3 領域が 1 箇所、CP 領域が 4 箇所、既報の分離株と一様に異なっていた。しかし、2014 年に解析した両集団内の多様性は非常に低かった。つまり、住用集団は、何らかの要因によって、2010 年から 2014 年の間に、5 箇所の非同義置換が挿入され、固定されたゲノム型が、現在、

正確性の高いポリメラーゼにより、安定して複製されていると考えられる。実際、本研究で解析した住用集団には、5 箇所のうち、1、2 箇所のみ置換している分離株は発見されず、すべての分離株が、一様に 5 箇所の非同義置換を保持していた。同様に、湯湾集団では、2005 年まで確認されていた CP 領域の 290 番目のアミノ酸が、2007 年以降終始コドンに置換し、現在でもそれが維持され続けている。CP の C 末端部分は、ウイルス粒子の表面に露出しており (Shukla et al., 1988)、細胞間移行に関与している報告もあることから (Dolja et al., 1995)、湯湾集団で確認されたこの置換は、これらをより安定的に行うように進化した可能性も考えられる。前述の住用集団と同様に、湯湾集団でも、この地域に定着した集団が、正確性の高い RNA ポリメラーゼで安定的に複製しているため、多様性が低いと考えられる。

これらのことから、本研究で用いた、2 種のウイルスが複製の際に用いているポリメラーゼは正確性が高く、これが、両ウイルス種内における集団の多様性を低くしている一因であると考えられた。また、本研究で解析したそれぞれのウイルス集団は、海や山等で隔てられている地域に存在しており、外部のウイルス集団との交流がほとんど無いことで、多様性が低くなっているとも考えられる。

BBTV 集団と EAPV 集団の選択圧を解析した結果、すべての集団が、負の選択圧を受けていることが示された。これまでの研究で、ウイルスが受ける選択圧は、ゲノムが DNA か RNA かに関わらず、ほぼすべての例で、負の選択圧であることが報告されている (García-Arenal et al., 2003)。本研究においても、BBTV 集団と EAPV 集団が示す  $d_N/d_S$  値に大きな差は無く、ほぼ同程度の負の選択圧を受けていると考えられた。また、両種の集団のゲノムの一部には、非常に強い負の選択圧を受けている領域も見受けられ (BBTV の DNA-S、EAPV の 6K1、CI、および CP 領域)、これもまた両種のウイルス集団に共通する現象であることが確認された。BBTV において、現在までに選択圧が解析されているのは、アフリカの集団のみであるが、本研究と同様に、DNA-S が非常に強い負の選択圧

を受けていることが示されている (Kumar et al., 2011)。*Potyvirus* 属における選択圧の研究は数多く行われており、アルゼンチンの *Sunflower chlorotic mottle virus* 集団では、本研究の EAPV の住用集団と同様、すべてのタンパク質コード領域において、負の選択圧を受けていることが確認された (Bejerman, 2013)。一方、*Potato virus Y* においては、CP 領域 (Moury, 2002, Moury, 2011)、韓国の *Pepper mottle virus* 集団においては 6K2 領域のみが、全タンパク質コード領域の中で、正の選択圧を受けていることが報告された (Kim et al., 2009)。本研究で解析した EAPV の湯湾集団は、ポリプロテイン領域全体としての選択圧は負であるが、HC-Pro 領域は正の選択圧を受けていることが示され、上述の先行研究と同様、一部のタンパク質コード領域が、正の選択圧を受けているという結果となった。またこれらの事例により、正の選択圧を受ける領域がウイルスの種によって異なることが考えられた。また、ベネズエラの *Papaya ringspot virus* 集団 (Fernández-Rodríguez et al., 2008)、オーストラリアの ZYMV 集団 (Coutts et al., 2011)、中国の *Sugarcane streak mosaic virus* 集団 (He et al., 2014) などでは、CP 領域や P1 領域における選択圧が解析されており、いずれも負の選択圧を受けていることが示された。これは、本研究で解析した EAPV の両集団にも共通していた。

これらのことより、本研究で用いた 2 種のウイルス集団も、先行研究の結果とほぼ同様に、負の選択圧を受けており、その程度がタンパク質コード領域によって異なっていることが示された。

BBTV 集団と EAPV 集団について、中立平衡解析を行ったところ、BBTV 集団では、例外なく負の値を示したのに対し、EAPV 集団においては、住用集団では正の値を、湯湾集団では負の値を、それぞれ示した。要するに、BBTV 集団は各地域において、集団のサイズが増加傾向であるのに対し、EAPV 集団においては、集団のサイズが増加している集団と、減少もしくは平衡状態にある集団が小島の中に共存していることが明らかになった。集団のサイズが減少傾向にあるということはすなわち、ウイルスゲノムに変異が挿入されやすい状態であること



を示しており、実際に住用集団のゲノムには 2010 年から 2014 年までの間に、5 箇所のアミノ酸置換が認められている。また、この間に、パッションフルーツに現れる症状が、次第に軽微になってきている。この現象は、集団サイズが増加している湯湾集団では観察されておらず、住用集団がゲノムに変異を挿入しつつ、進化してきた結果であるとも考えられる。しかし、これらの両集団が存在している地域（奄美市および宇検村）には、気候や、栽培されているパッションフルーツの品種等に違いは無く、両集団の進化様式が異なる原因は不明である。唯一異なる点は、それらの栽培法であるが、その点については後述する。

一方、BBTV 集団は、どの地域の集団もサイズが増加傾向にあることを示した。これまでに、BBTV における中立平衡解析は、Muhire et al. (2014)のみが行っているが、すべてのコンポーネントにおいて集団サイズが増加することを示している。本研究では、DNA-R と -S を用いて行ったが、先行研究とほぼ同様の結果を示した。これらにより、BBTV の各集団のサイズは増加傾向にあり、地域ごとに固定されたゲノムの集団のサイズが増加していると考えられる。

本研究では、スマトラ島に 1 つのゲノム型の BBTV が蔓延していること、奄美大島では病徴型が異なる 2 つのゲノム型の EAPV が存在していることを明らかにした。スマトラ島における BBTD の病徴は典型的なものであったが、先行研究において、BBTV-TW4 株が示す病徴は、他の分離株に比べ軽微であることが確認されている (Hu et al., 2007)。この分離株の特徴は、Asian group と South Pacific group の間で再集合を起こしていること、DNA-N を欠失していること、アブラムシによって伝搬されないことである。再集合は、ウイルスの表現型を決定する重要な要素として、インフルエンザウイルスなどで詳しく研究されている。宿主範囲や病徴型の異なるインフルエンザウイルスが、共通の宿主に同時に感染し再集合を起こすことで、元のウイルスと異なる表現型のウイルスが誕生することが報告されている (Tian et al., 1985, Ito et al., 1998, Karasin et al., 2000, Moreno et al., 2011)。BBTV-TW4 株は、Asian group と South Pacific group の間で再集合や組換えを起こしたことが、表現型を変える一因になったと考えら

れる。また、組換えや再集合を起こした理由としては、前述した通り、台湾におけるバナナの栽培環境が大きく影響していると考えられる。また、台湾以外の地域では、Asian group と South Pacific group 間における組換えや再集合は確認されておらず(Stainton et al., 2012)、病徴が変化した報告もないことから、これら 2 系統間での組換えや再集合が BBTV の表現型に与える影響が大きいと考えられる。また、別の台湾分離株である BBTV-TW3 株は、10 年間にわたり、同一のバナナ個体内で維持される過程で、病徴が軽微になったと報告されている (Fu et al., 2009)。TW3 株も前述の TW4 株と同様に、DNA-N が欠失しており、アブラムシによる伝搬ができないことから、DNA-N が病徴やアブラムシ伝搬に関与している可能性が高いが (Fu et al., 2009)、現在までにこの原因は解析されていない。本研究で解析したスマトラ島の BBTV 集団は、組換えを起こしておらず、1 つのゲノム型のウイルスのみが島内に蔓延していることが認められ、また、頻繁にバナナ苗の更新が行われていることが、BBTV の病徴が変化しない原因であると考えられる。

一方、奄美大島では、病徴型の異なる 2 つの EAPV 集団が存在していることが確認された。宇検村湯湾におけるパッションフルーツの病徴に変化は無いが、奄美市住用町における病徴は次第に軽微になってきている。栽培法の背景として、湯湾においては EAPV が感染しているパッションフルーツを定期的に (2 年ごとに) 健全苗へ更新しているのに対し、住用町においては EAPV が感染しているパッションフルーツを長期間にわたって (少なくとも 4 年以上) 維持している。上記の BBTV の例が示すように、ウイルスを長期間にわたって同一の宿主内で維持すると、病徴が次第に軽微になり、アブラムシによって伝搬されなくなることが報告されている (Fu et al., 2009)。また、動物に感染するデングウイルスにおいても、アメリカの DENV-2 および-3 集団は、病原性が低下し、蚊による伝搬効率も低下したが、アジアの集団にはこのような現象は起きていないという報告がある (Wilder-Smith et al., 2010)。これらの例が示すように、ウイルスは、同一の宿主や、集団内で長期間維持されることで、ベクターによる媒介効率や、病原性を低下させ、宿主に適応する傾向が認められている。本研究

で確認された、住用集団が示す病徴の変化は、ウイルスが長期間同一宿主内で維持された間に宿主へ適応する過程で、ゲノムに変化が生じて、起きたものであることも考えられる。

本研究では、スマトラ島では 1 つのゲノム型の **BBTV** が蔓延しており、奄美大島では病徴型が異なる 2 つのゲノム型の **EAPV** が存在していることを明らかにした。今後それぞれのウイルスに対して、病害制御を策定するためには、異なったアプローチが考えられる。スマトラ島の **BBTV** に対しては、ウイルスのゲノム型が単純であることから、当面、数種類の抵抗性遺伝子の導入で対応できる可能性が高い。また、**EAPV** の住用集団は感染しているパッションフルーツに軽微な病徴を示すことから、今後、植物ワクチンの開発に有用な弱毒株として利用できる可能性がある。

本研究では、**BBTD** の原因となっている **BBTV** と、**PWD** の原因となっている **EAPV** の集団について、集団遺伝学的手法を用いて、遺伝構造や多様性について解析した。特に、**BBTV** における網羅的な集団遺伝学的解析は、現在までに行われていなかったため、本研究が初めての報告となった。以上の結果は、両ウイルスの効果的防除法確立の基礎的知見となると共に、両ウイルスの病原性進化の研究に対しても、今後大きく貢献すると思われる。

## 参考文献

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. Amin, I., Qazi, J., Mansoor, S., Ilyas, M. and Briddon, W. R. (2008). Molecular characterization of *Banana bunchy top virus* (BBTV) from Pakistan. *Virus Genes* 36:191-198
3. 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.
4. Balasubramanian, V. and Selvarajan, R. (2014). Genetic diversity and recombination analysis in the coat protein gene of *Banana bract mosaic virus*. *Virus Genes* 48: 509–517.
5. Bateson, M. F. and Dale, J. L. (1994). Banana bract mosaic virus: characterisation using potyvirus specific degenerate PCR primers. *Arch. Virol.* 140:515-527.
6. Bejerman, N., Giolitti, F., De Breuil, S. and Lenardon, S. (2013). Sequencing of two Sunflower chlorotic mottle virus isolates obtained from different natural hosts shed light on its evolutionary history. *Virus Genes* 46: 105-110.
7. Boni, M. F., Posada, D. and Feldman, M. W. (2007). An exact nonparametric method for inferring mosaic structure in sequence triplets. *Genetics* 176: 1035-1047.
8. Brown, J. K., Bird, J. and Fletcher, D. C. (1993). First report of passiflora leaf mottle disease caused by a whitefly-transmitted geminivirus in Puerto Rico. *Plant Dis.* 77: 1264.
9. Burns, T. M., Harding, R. M. and Burns, J. L. (1995). The genome organization of banana bunchy top virus: analysis of six ssDNA components. *J. Gen. Virol.* 76:1471-1482.
10. Crestani, O. A., Kitajima, E. W., Lin, M. T. and Marinho, V. L. A. (1986). Passion fruit yellow mosaic virus, a new tymovirus found in Brazil. *Phytopathology* 76:951-955.

11. Cheng, Y. H., Deng, T. C., Chen, C. C., Chiang, C. H. and Chang, C. A. (2014). First Report of Euphorbia leaf curl virus and Papaya leaf curl Guangdong virus on Passion Fruit in Taiwan. *Plant Dis.* 98:1746.
12. Chiaki, Y., Fukumoto, T., Nakamura, M. and Iwai, H. (2016). Population genetics analysis of *East Asian Passiflora virus* on Amami Oshima Island. *Eur. J. Plant Pathol.* 144: 109-120.
13. Chiaki, Y., Nasir, N., Herwina, H., Jumjunidang, Sonoda, A., Fukumoto, T., Nakamura, M. and Iwai, H. (2015). Genetic structure and diversity of the *Banana bunchy top virus* population on Sumatra Island, Indonesia. *Eur. J. Plant Pathol.* 143:113-122.
14. Coutts, B. A., Kehoe, M. A., Webster, C. G., Wylie, S. J. and Jones, R. A. C. (2011). Zucchini yellow mosaic virus: biological properties, detection procedures and comparison of coat protein gene sequences. *Arch. Virol.* 156: 2119-2131.
15. Dale J. L. (1987). Banana bunchy top: an economically important tropical plant virus disease. *Advances in Virus Research* 33: 301-325.
16. Dolja, V. V., Haldeman, R., Robertson, N. L., Dougherty, W. G. and Carrington J. C. (1994). Distinct functions of capsid protein in assembly and movement of tobacco etch potyvirus in plants. *EMBO J.* 13: 1482-1491.
17. Dolja, V. V., Haldeman-Cahill, R., Montgomery, A. E., Vandenbosch, K. H. and Carrington J. C. (1995). Capsid protein determinants involved in cell-to-cell and long distance movement of tobacco etch potyvirus. *Virology* 206: 1007-1016.
18. Domingo, E. and Holland, J. J. (1997). RNA virus mutations and fitness for survival. *Annu. Rev. Microbiol.* 51: 151–78.
19. Drake, J. W. (1993). Rates of spontaneous mutation among RNA viruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 4171-4175.
20. Drake, J. W. and Holland, J. J. (1999). Mutation rates among RNA viruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 13910-13913.
21. Eggenberger, A. L., Hajimorad, M. R. and Hill, J. H. (2008). Gain of virulence on *RsvI*-genotype soybean by an avirulent *Soybean mosaic virus* requires concurrent mutations in both P3 and HC-Pro. *Mol. Plant Microbe Interact.* 21: 931-936.

22. F.A.O.S.T.A.T. Anonymous. (2011). ProdSTAT: Crop. UN Food and Agriculture Organization, p.567. <http://faostat.fao.org/site/567/DesktopDefault.aspx?PageID=567> (Accessed date 27 August 2013).
23. Fernánde z-Rodríguez, T., Rubio, L., Carballo, O. and Marys, E. (2008). Genetic variation of papaya ringspot virus in Venezuela. Arch. Virol. 15: 343-349.
24. 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.
25. Fu, H. C., Hu, J. M., Hung, T. H., Su, H. J. and Yeh, H. H. (2009). Unusual events involved in Banana bunchy top virus strain evolution. Phytopathology 99: 812-822.
26. Fu, Y. X. and Li, W. H. (1993). Statistical tests of neutrality of mutations. Genetics 133: 693-709.
27. 福元智博. (2012). 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. 鹿児島大学大学院連合農学研究科 学位論文.
28. Fukumoto, T., Nakamura, M., Ohshima, K. and Iwai, H. (2012a). Genetic structure and variability of *East Asian Passiflora virus* population in Amami-O-shima, Japan. J. Phytopathol. 160: 404-411.
29. Fukumoto, T., Nakamura, M., Rikitake, M. and Iwai, H. (2012b). 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.
30. Furuya, N., Somowiyarjo, S. and Natsuaki, K. T. (2004). Virus detection from local banana cultivars and the first molecular characterization of *Banana bunchy top virus* in Indonesia. Jour. Agri. Sci., Tokyo Univ. of Agric. 49: 75-81.
31. Furuya, N., Kawano, S. and Natsuaki, K. T. (2012). Evaluation of resistance of Japanese fibre banana cv. Itobasho (*Musa balbisiana* var. *liukuensis*) to *Banana bunchy top virus*. Jpn. J. Phytopathol. 78:108-110.
32. García-Arenal, F., Fraile, A. and Malpica, J. M. (2003). Variation and evolution of plant virus populations. Int. Microbiol. 6: 225-232.

33. Ge, L., Zhang, J., Zhou, X. and Li, H. (2007). Genetic structure and population variability of tomato yellow leaf curl China virus. *J. Virol.* 81:5902-5907.
34. Gibbs, M. J., Armstrong, J. S. and Gibbs A. J. (2000). Sister-scanning: a Monte Carlo procedure for assessing signals in recombinant sequences. *Bioinformatics* 16: 573–582.
35. Grigoras, I., Timchenko, T., Grande-Pérez, A., Katul, L., Vetten, H. J. and Gronenborn, B. (2010). High variability and rapid evolution of a nanovirus. *J. Virol.* 84: 9105-9117.
36. Gronenborn, B. (2004). Nanoviruses: genome organisation and protein function. *Vet. Microbiol.* 98: 103-109.
37. Hafner, G. J., Stafford, M. R., Wolter, L. C., Harding, R. M. and Dale, J. L. (1997). Nicking and joining activity of banana bunchy top virus replication protein in vitro. *J. Gen. Virol.* 78:1795-1799.
38. Harding, R. M., Burns, T. M. and Dale, J. L. (1991). Virus-like particles associated with banana bunchy top disease contain small single-stranded DNA. *J. Gen. Virol.* 72:228-230.
39. Harding M. R., Burns T. M., Hafner G. J., Dietzgen R. G. and Dale J. L. (1993). Nucleotide sequence of one component of the banana bunchy top virus genome contains a putative replicase gene. *J. Gen. Virol.* 74:323-328.
40. 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.
41. He, Z., Li, W., Yasaka, R., Huang, Y., Zhang, Z., Ohshima, K. and Li, S. (2014). Molecular variability of sugarcane streak mosaic virus in China based on an analysis of the P1 and CP protein coding regions. *Arch.Virol.* 159: 1149-1154.
42. Herrera-Valencia, V. A., Dugdale, B., Harding, R. M. and Dale J. L. (2006). An iterated sequence in the genome of *Banana bunchy top virus* is essential for efficient replication. *J. Gen. Virol.* 87: 3409-3412.
43. Hooks, C. R. R., Manandhar, R., Perez, E. P., Wang, K. H. and Almeida, R. P. P. (2009). Comparative susceptibility of two banana cultivars to Banana Bunchy Top virus under the laboratory and field environments. *J. Econ. Entmol.* 102:897-904.
44. Hu, J. M., Fu, H. C., Lin H. C., Su H. J. and Yeh H. H. (2007). Reassortment and concerted evolution in *Banana bunchy top virus* genomes. *J. Virol.* 81:1746-1761.

45. Hudson, R. R. (2000). A new statistic for detecting genetic differentiation. *Genetics* 155: 2011-2014.
46. Hyder M. Z. (2009). Sequencing and genetic characterization of major DNA components of *Banana bunchy top virus*. Pir Mehr Ali Shah, Arid Agriculture University Rawalpindi, Pakistan, Ph.D. Thesis.
47. Hyder, M. Z., Shah, S. H., Hameed, S. and Naqvi, S. M. S. (2011) Evidence of recombination in the *Banana bunchy top virus* genome. *Infect. Genet. Evol.* 11: 1293-1300.
48. Ito, T., Couceiro, J. N. S., Kelm, S., Baum, L. G., Krauss, S., Castrucci, M. R., Donatell, I., Kida, H., Paulson, J. C., Webster, R. G. and Kawaoka, Y. (1998). Molecular basis for the generation in pigs of influenza A viruses with pandemic potential. *J. Virol.* 72: 7367-7373.
49. 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.
50. Iwai, H., Nishi, N., Wada, Y., Nojima, H., Izumi, S. and Arai, K. (1997). Incidence of passionfruit woodiness virus in Amami main island. *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.* 63: 484.
51. Iwai, H., Terahara, R., Yamashita, Y., Ueda, S. and Nakamura, M. (2006a). Complete nucleotide sequence of the genomic RNA of an Amami-O-shima strain of East Asian Passiflora potyvirus. *Arch. Virol.* 151: 1457-1460.
52. Iwai, H., Yamashita, Y., Nishi, N. and Nakamura, M. (2006b). 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.
53. Karan, M., Harding, R. M. and Dale J. L. (1994). Evidence for two groups of banana bunchy top virus isolates. *J. Gen. Virol.* 75:3541-3546.
54. Karasev, A. V., Hu, X., Brown, C. J., Kerlan, C., Nikolaeva, O. V., Crosslin, J. M. and Gray, S. M. (2011). Genetic diversity of the ordinary strain of Potato virus Y (PVY) and origin of recombinant PVY strains. *Phytopathology* 101: 778-785.
55. Karasin, A. I., Schutten, M. M., Cooper, L. A., Smith, C. B., Subbarao, K., Anderson, G. A., Carman, S. and Olsen, C. W. (2000). Genetic characterization of



- H3N2 influenza viruses isolated from pigs in North America, 1977–1999: evidence for wholly human and reassortant virus genotypes. *Virus Res.* 68: 71-85.
56. Kim, Y. J., Jonson, M. G., Choi, H. S., Ko, S. J. and Kim, K. H. (2009). Molecular characterization of Korean Pepper mottle virus isolates and its relationship to symptom variations. *Virus Res.* 144: 83-88.
  57. 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.
  58. Kumar, P. L., Hanna, R., Alabi, O. J., Soko, M. M., Oben, T. T., Vangu, G. H. P. and Naidu, R. A. (2011). Banana bunchy top virus in sub-Saharan Africa: investigations on virus distribution and diversity. *Virus Res.* 159: 171-182.
  59. Koenig, R. and Fribourg, C. E. (1986). Natural occurrence of tomato ringspot virus in *Passiflora edulis* from Peru. *Plant Dis.* 70: 244-245.
  60. Laufs, J., Jupin, I., David, C., Schumacher, S., Heyraud-Nitschke, F. and Gronenborn, B. (1995). Geminivirus replication: genetic and biochemical characterization of Rep protein function, a review. *Biochimie* 77: 765-773.
  61. Lefeuvre, P., Martin, D. P., Harkins, G., Lemey, P., Gray, A. J., Meredith, S., Lakay, F., Monjane, A., Lett, J., Varsani, A. and Heydarnejad, J. (2010). The spread of Tomato yellow leaf curl virus from the Middle East to the world. *PLoS Pathog.* 6: e1001164.
  62. Levi, L. I., Gnädig, 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
  63. Li, W. H. (1993). Unbiased estimation of the rates of synonymous and nonsynonymous substitution. *J. Mol. Evol.* 36:96-99.
  64. Li, Y., Liu, R., Zhou, T. and Fan, Z. (2013). Genetic diversity and population structure of *Sugarcane mosaic virus*. *Virus Res.* 171: 242-246.
  65. Librado, P. and Rozas, J. (2009). DnaSP v5: A software for comprehensive analysis of DNA polymorphism data. *Bioinformatics* 25: 1451-1452.
  66. Lockhart, B. L. E. (1986). Purification and serology of a bacilliform virus associated with banana streak disease. *Phytopathology* 76:995-999.

67. McKern, N. M., Strike, P. M., Barnett, O. W., Dijkstra, J., Shukla, D. D. and Ward, C. W. (1994). Cowpea aphid borne mosaic virus-morocco and south african *passiflora* virus are strains of the same potyvirus. Arch. Virol. 136:207-217
68. Martin, D. and Rybicki, E. (2000). RDP: detection of recombination amongst aligned sequences. Bioinformatics 16, 562–563.
69. Martin, D. P., Lemey, P., Lott, M., Moulton, V. and Posada, D. (2010). RDP3: a flexible and fast computer program for analyzing recombination. Bioinformatics 26: 2462–2463.
70. McKnight, T. (1953). The woodiness virus of the passion vine (*Passiflora edulis* Sims). Qd. J. Agric. Sci. 10: 4-35.
71. Morales, F. J., Lozano, I., Castaño, M., Arroyave, J., Velasco, A. C. and Varon, F. (2002). Partial characterization of a tymovirus infecting passion fruit in Colombia, South America. J. Phytopathol. 150: 292-296.
72. Moreno, A., Di Trani, L., Faccini, S., Vaccari, G., Nigrelli, D., Boniotti, M. B., Chiapponi, C., Sozzi, E. and Cordioli, P. (2011). Novel H1N2 swine influenza reassortant strain in pigs derived from the pandemic H1N1/2009 virus. Vet. Microbiol. 149: 472-477.
73. Moriones, E. and Navas-Castillo, J. (2008). Rapid evolution of the population of begomoviruses associated with the tomato yellow leaf curl disease after invasion of a new ecological niche. Span. J. Agric. Res. 6: 147-159.
74. 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.
75. Moury, B. and Simon, V. (2011). dN/dS-based methods detect positive selection linked to trade-offs between different fitness traits in the coat protein of potato virus Y. Mol. Biol. Evol. 28: 2707-2717.
76. Muhire, B. M., Golden, M., Murrell, B., Lefeuvre, P., Lett, J. M., Gray, A., Poon, A. Y. F., Ngandu, N. K., Semegni, Y., Tanov, E. P., Monjane, A. L., Harkins, G. W., Varsani, A., Shepherd, D. N. and Martin, D. P. (2014). Evidence of pervasive biologically functional secondary structures within the genomes of eukaryotic single-stranded DNA viruses. J. Virol. 88: 1972-1989.
77. Nguyen, H. D., Tran, F. T. N. and Ohshima, K. (2013). Genetic variation of the

*Turnip mosaic virus* population of Vietnam: A case study of founder, regional and local influences. *Virus Res.* 171: 138-149.

78. 中村武久 (1991). バナナ学入門. 丸善株式会社.
79. Novaes, Q. S., Freitas - Astua, J., Yuki, V. A., Kitajima, E. W., Camargo, L. E. A. and Rezende, J. A. M. (2003). Partial characterization of a bipartite begomovirus infecting yellow passion flower in Brazil. *Plant Pathol.* 52: 648-654.
80. 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.
81. Ogawa, T., Tomitaka, T., 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.
82. Ogawa, T., Nakagawa, A., Hataya, T. and Ohshima, K. (2012). The genetic structure of populations of *Potato virus Y* in Japan; based on the analysis of 20 full genomic sequences. *J. Phytopathol.* 160: 661-673.
83. 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, J. (2002). Molecular evolution of *Turnip mosaic virus*: evidence of hostadaptation, genetic recombination and geographical spread. *J. Gen. Virol.* 83: 1511-1521.
84. 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.
85. Padidam, M., Sawyer, S. and Fauquet C. M. (1999). Possible emergence of new geminiviruses by frequent recombination. *Virology* 265:218-225.
86. 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.
87. 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. USA* 100: 7289-7294.

88. Pinili, M. S., Nyana, D. N., Suastika, G. and Natsuaki, T. K. (2011). Molecular analysis of *Banana bunchy top virus* first isolated in Bali, Indonesia. Jour. Agri. Sci., Tokyo Univ. of Agric. 56: 125-134.
89. Posada, D. and Crandall, K. A. (2001). Evaluation of methods for detecting recombination from DNA sequences: Computer simulations. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 98: 13757–13762.
90. Ribeiro, S. G., Martin, D. P., Lacorte, C., Simões, I. C., Orlandini, D. R. and Inoue-Nagata, A. K. (2007). Molecular and biological characterization of Tomato chlorotic mottle virus suggests that recombination underlies the evolution and diversity of Brazilian tomato begomoviruses. Phytopathology 97: 702-711.
91. Rocha, C. S., Castillo-Urquiza, G. P., Lima, A. T., Silva, F. N., Xavier, C. A. D., Hora-Júnior, B. T., Beserra-Junior, J. E. A., Malta, A. W. O., Martin D. P., Varsani, A., Alfenas-Zerbini, P., Mizubuti, E. S. G. and Zerbini, F. M. (2013). Brazilian begomovirus populations are highly recombinant, rapidly evolving, and segregated based on geographical location. J. Virol. 87: 5784-5799.
92. Rojas, M. R., Zerbini, F. M., Allison, R. F., Gilbertson, R. L. and Lucas, W. J. (1997). Capsid protein and helper component-proteinase function as potyvirus cell-to-cell movement proteins. Virology 237: 283-295.
93. Salminen, M. O., Carr, J. K., Burke, D. S. and McCutchan, F. E. (1995). Identification of breakpoints in intergenotypic recombinants of HIV type 1 by Bootscanning. AIDS Res. Hum. Retroviruses 11: 1423–1425.
94. Salyo, Y., and Muharam, A. (1985) In: K. G. Singh, Paul L. Manalo (eds) proceeding of the regional conference on plant quarantine support for agricultural development, Kuala Lumpur, Malaysia, 10-12 December 1985: 297-299.
95. Sánchez-Campos, S., Diaz, J. A., Monci, F., Bejarano, E. R., Reina, J., Navas-Castillo, J., Aranda, M. A. and Moriones, E. (2002). High genetic stability of the begomovirus Tomato yellow leaf curl Sardinia virus in southern Spain over an 8-year period. Phytopathology 92: 842-849.
96. Saitou, N. and Nei, M. (1987). The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. Mol. Biol. Evol. 4: 406–425.
97. Shukla, D. D., Strike, P. M., Tracy, S. L., Gough, K. H. and Ward, C. W. (1988). The N and C termini of the coat proteins of potyviruses are surface-located and the

- N terminus contains the major virus-specific epitopes. J. Gen. Virol. 69: 1497-1508.
98. Singh, Z., Jones, R. A. C. and Jones, M. G. K. (1995). Identification of cucumber mosaic virus subgroup I isolates from banana plants affected by infectious chlorosis disease using RT-PCR. Plant Dis. 79:713-716.
  99. Smith, J. M. (1992). Analyzing the mosaic structure of genes. J. Mol. Evol. 34:126-129.
  100. Song, Y. S., Min, B. E., Hong, J. S., Rhie, M. J., Kim, M. J. and Ryu, K. H. (2006). Molecular evidence supporting the confirmation of Maracuja mosaic virus as a species of the genus *Tobamovirus* and production of an infectious cDNA transcript. Arch. Virol. 151: 2337-2348.
  101. Spiegel, S., Zeidan, M., Sobolev, I., Beckelman, Y., Holdengreber, V., Tam, Y., Bar Joseph, M., Lipsker, Z. and Gera, A. (2007). The complete nucleotide sequence of Passiflora latent virus and its phylogenetic relationship to other carlaviruses. Arch. Virol. 152: 181-189.
  102. Stainton, D., Kraberg, S., Walters, M., Witshire, E. J., Rosario, K., Halafihi, M., Lolohea, S., Katoa, I., Faitua, T. H., Aholelei, W., Taufa, L., Thomas, J. E., Collings, D. A., Martin, D. P. and Varsani, A. (2011) Evidence of inter-component recombination, intra-component recombination and reassortment in banana bunchy top virus. J. Gen. Virol. 93: 1103-1119.
  103. Stainton, D., Martin, D. P., Muhire, B. M., Lolohea, S., Lepoint, P., Blomme, G., Crew, K. S., Sharman, M., Kraberg, S., Dayaram, A., Walters, M., Collings, D. A., Mabvakure, B., Lemey, P., Harkins G. W., Thomas J. E. and Varsani, A. (2015). The global distribution of Banana bunchy top virus reveals little evidence for frequent recent, human-mediated long distance dispersal events. Virus Evol. 1: 1-16.
  104. 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.
  105. Tajima, F. (1989). Statistical method for testing the neutral mutation hypothesis by DNA polymorphism. Genetics 123: 585-595.
  106. 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.

107. Tamura, K., Stecher, G., Peterson, D., Filipski, A. and Kumar, S. (2013). MEGA6: molecular evolutionary genetics analysis version 6.0. *Mol. Biol. Evol.* 30: 2725-2729.
108. Taylor, R. H. and Kimble, K. A. (1964). Two unrelated viruses which cause woodiness of passion fruit (*Passiflora edulis* Sims). *Crop Pasture Sci.* 15: 560-570.
109. Tian, S. F., Buckler-White, A. J., London, W. T., Reck, L. J., Chanock, R. M. and Murphy, B. R. (1985). Nucleoprotein and membrane protein genes are associated with restriction of replication of influenza A/Mallard/NY/78 virus and its reassortants in squirrel monkey respiratory tract. *J. Virol.* 53: 771-775.
110. 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.
111. 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.
112. Vetten, H. J., Grigoras, I., Harding, R., Randles, J. W., Sano, Y., Thomas, J. E., Timchenko, T. and Yeh H. H. (2012) In virus taxonomy – ninth report of the international committee on taxonomy of viruses. In A. M. Q. King, M. J. Adams, E. B. Carstens, & E. J. Lefkowitz (Eds.), *Babuvirus* (pp. 400-404). San Diego: Associated Press, Elsevier Inc.
113. Vishnoi, R., Raj, S. K. and Prasad, V. (2009). Molecular characterization of an Indian isolate of *Banana bunchy top virus* based on six genomic DNA components. *Virus Genes* 38:334-344.
114. Wanitchakorn R., Harding R. M., Dale J. L. (2000). Sequence variability in the coat protein gene of two groups of banana bunchy top isolates. *Archives of Virology* 145: 593-602.
115. 渡部輝明, 徐泰健, 岸野洋久. (2008). 遺伝子型の分子進化と表現型の適応進化. *統計数理* 56: 55-66.
116. Wilder-Smith, A., Ooi, E. E., Vasudevan, S. G. and Gubler, D. J. (2010). Update on dengue: epidemiology, virus evolution, antiviral drugs, and vaccine

- development. Curr. Infect. Dis. Rep. 12: 157-164.
117. Yu, N. T., Zhang, Y. L., Feng, T. C., Wang, J. H., Kulye, M., Yang, W. J., Lin, Z. S., Xiong, Z. and Liu, Z. X. (2012). Cloning and sequence analysis of two *banana bunchy top virus* genomes in Hainan. Virus Genes 44: 488-494.
118. Zhang, C., Gao, R., Wang, J., Zhang, G., Li, X. and Liu, H. (2011). Molecular variability of *Tobacco vein banding mosaic virus* populations. Virus Res. 158: 188-198.
119. Zhuang Jun, T. E. and Zhi-Xin, L. (2005). Cloning and sequencing of DNA components of Banana bunchy top virus Hainan isolate. Chin. J. Agric. Biotech. 2: 91-97.
120. Zuker, M. (2003). Mfold web server for nucleic acid folding and hybridization prediction. Nucleic. Acids Res. 31:3406-3415.

## 摘要

本研究では *Banana bunchy top virus* (BBTV) と、*East Asian Passiflora virus* (EAPV) の遺伝構造と多様性を調査し、集団遺伝学的解析を行った。

まず、インドネシア、スマトラ島における BBTV の遺伝構造と多様性を調査した。スマトラ島より採取した 61 の分離株の BBTV について、DNA-R と DNA-S の塩基配列を決定し、その内の 37 分離株については DNA-U3 の塩基配列も決定した。これらの相同性は、南部集団の DNA-U3 の配列がわずかに異なっていたものの、各コンポーネント共、バナナの品種や採集された地域に関係なく、高かった。系統学的解析の結果、スマトラ集団は Asian group に属していること、他地域集団に比べ多様性が低いこと、ならびに組換えを起こしていないことが示された。また、選択圧解析の結果、スマトラ集団は負の選択圧を受けていることが示された。また、AA および AAA ゲノムの品種に感染しているウイルスに比べ、AAB および ABB ゲノムの品種に感染しているウイルスの方が、多様性が高く、負の選択圧の程度も弱いことが示された。中立平衡解析を行ったところ、西スマトラ集団が、近年突発的に拡散したことが示唆された。

さらに、各国の BBTV 集団の塩基配列を用いて、集団遺伝学的解析を行った。まず、遺伝的多様性を調べたところ、中国および台湾の集団が、他地域の集団に比べ、多様性が高いことが示された。選択圧を解析したところ、すべての集団が負の選択圧を受けていたが、その程度は地域ごとに異なっていた。さらに、遺伝的分化と遺伝子流動を解析したところ、Asian group の集団は互いに交流が認められたが、South Pacific group の集団は交流が認められなかった。

次に、奄美大島の EAPV の 2 集団（住用集団および湯湾集団）について、遺伝構造と多様性を解析した。両地域より EAPV が感染したパッションフルーツを採取し、10 分離株のポリプロテイン領域と、5 分離株の NIb および CP 領域の塩基配列を決定した。まず、相同性解析の結果、それぞれの集団内でも集団間でも相同性は非常に高かった。しかし、住用集団は既報分離株と比べ、合計 5



箇所の塩基が一様に非同義置換を起こしていることが確認された。また、奄美大島の EAPV も、組換えを起こしていないことが確認された。選択圧解析の結果、両集団は負の選択圧を受けていることが確認された。中立平衡解析の結果、湯湾集団ではサイズの増加が示唆されたが、住用集団のサイズは減少傾向もしくは平衡状態であることが示唆された。遺伝的分化と遺伝子流動を解析したところ、両集団は遺伝的に分化しており、互いに交流が無いことが示された。これらの結果より、住用と湯湾の集団はそれぞれの地域で独立的に進化してきたことが示唆された。

## 謝辞

本研究を遂行しまとめるにあたり、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 岩井久博士に、心より感謝申し上げます。博士論文の審査において、鹿児島大学農学部教授 津田勝男博士、佐賀大学農学部教授 大島一里博士、鹿児島大学農学部准教授 中村正幸博士ならびに佐賀大学農学部准教授 草場基章博士には副査として多大なる御指導を受け賜り、心より感謝申し上げます。Andalas 大学の Nasril Nasir 博士、Henny Herwina 博士、Indonesian Tropical Fruits Research Institute の Jumjunidang 氏には、供試植物の採集に協力していただいた。鹿児島大学農学部准教授 坂巻祥孝博士には系統学的解析について、適切な御指導と御助言をいただいた。鹿児島大学国際島嶼教育研究センター准教授 山本宗立博士には筆者にスマトラ島での採集旅行の機会を与えていただいた。また、鹿児島県農業開発総合センター 福元智博博士には、本研究を遂行するにあたり、終始適切な御助言をいただいた。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、家族からは学位取得に対する理解と暖かい支援をもらった。ここに記し、感謝の意を表する。

## Abstract

The genetic structure and diversity of *Banana bunchy top virus* (BBTV) and *East Asian Passiflora virus* (EAPV) were investigated using population genetics methods.

The genetic structure and diversity of BBTV on Sumatra Island were clarified first: 61 isolates of BBTV were collected, and the sequences of DNA-R, DNA-S and DNA-U3 were determined. Although these isolates showed different sequences in the stem-loop region in DNA-U3, they were generally very similar, with little or no variation according to planting area or the varieties and genome types of the host. The genetic diversity analysis showed that the Sumatra population has very low diversity compared to other areas. The phylogenetic analysis showed that the Sumatra isolates belonged to the Asian group. A recombination analysis revealed no evidence of recombination in the Sumatra population. The selection pressure analysis indicated that all of the Sumatra isolates underwent negative selection. The selection pressure among the viruses infecting the banana varieties with the genotypes of AAB or ABB underwent weaker negative selection compared to the viruses infecting the varieties with AA or AAA genotypes. A neutrality test suggested the sudden expansion of the West Sumatra population.

Next, a population genetics analysis of each population of BBTV from nine countries was conducted. The genetic diversity analysis showed that the China, Taiwan and Vietnam populations had higher diversity than the other populations. The selection pressure analysis showed that all nine populations underwent negative selection. The neutrality test suggested that the sizes of all of the populations were increased. The gene flow analysis suggested that gene flow occurred frequently in the Asian group and infrequently in the South Pacific group.

The genetic structure and diversity of EAPV on Amami Oshima Island was investigated next: 15 isolates of EAPV from two different areas of Amami Oshima Island (the Yuwan area of Uken village, and Sumiyo town of Amami city) were collected. The sequences of polyproteins from 10 of the isolates and the NIb and CP regions of the other five isolates were determined. The nucleotide and amino acid sequence identities of polyproteins within each population were very high, and those between isolates from both areas were also high. However, five characteristic

nonsynonymous substitutions were uniformly observed in the P3 and CP regions of the Sumiyo isolates. A recombination analysis revealed that there was no evidence of recombination in any of the isolates from Amami Oshima Island. The selection pressure analysis showed that as a whole, the EAPVs of both populations underwent negative selection, but the extent of the negative selection varied. These results were supported by a neutrality test. The gene differentiation and gene flow analyses suggested that the Sumiyo and Yuwan populations were clearly differentiated and that gene flow occurred only infrequently. These results were supported by a phylogenetic analysis. We concluded that the two populations evolved independently in each respective area.