

令和元年6月11日現在

機関番号：17701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07620

研究課題名(和文) 西太平洋におけるパッションフルーツ奇形果の原因ウイルスの発生生態の解明と制御

研究課題名(英文) Elucidation and control of the outbreak ecology of the causative virus of passionfruit deformation in the western Pacific Ocean

研究代表者

岩井 久 (Iwai, Hisashi)

鹿児島大学・農水産獣医学域農学系・教授

研究者番号：90183194

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：パッションフルーツからポティウイルス属の新ウイルスを検出した。宿主範囲やゲノムの系統解析により、ウツチネス病を起こすEast Asian Passiflora virus (EAPV)とは異なることが判り、East Asian Passiflora distortion virus (EAPDV)と命名した。Passiflora foetidaは沖縄を含む東南アジアの雑草である。海外では多くのウイルスの中間宿主であり、EAPVやEAPDVの保有宿主の可能性もある。両ウイルスを混合感染させ、増殖量をreal-time PCRで調べたところ、EAPDVはEAPVの共存で単独感染の数十倍になった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

日本のパッションフルーツに果実奇形を起こすポティウイルス属には著者が2006年に命名したEAPVが存在するが、新たにEAPDVが加わった。合わせて両ウイルスを識別できるように設計したRT-PCR用のprimer setsは、早期診断を通して果実生産の向上に貢献する。栽培が盛んな西オーストラリアや西スマトラに、目下は両ウイルスとも分布していないが、EAPVは既に台湾や韓国などに分布しており、今後注視していく必要がある。またP. foetidaへの混合感染試験では、EAPVのEAPDVへのシナジー効果が強く、単独感染では軽微なEAPDVの病徴が深刻化する可能性があり、本知見は防除対策上重要である。

研究成果の概要(英文)：Viruses assumed to a new species of Potyvirus genus were detected in passionfruit collected from three prefectures of Japan. By a host-range test and phylogenetic analysis using genome sequences, these were revealed to be different from East Asian Passiflora virus (EAPV) inducing "woodiness disease" in Japan. I proposed East Asian Passiflora distortion virus (EAPDV) as the new species name. Passiflora foetida is a weed plant of Southeast Asia including the Okinawa islands. This species has been recognized as an intermediate host of many viruses overseas, and has the potential as the reservoir of EAPV and EAPDV. Therefore, P. foetida was inoculated mixedly with EAPV and EAPDV, and the accumulation of both was measured by real-time PCR and compared with a single infection. As a result, the accumulation of EAPDV increased several tens of times by the coexistence of EAPV. On the other hand, EAPV was not affected. P. foetida was estimated as an important intermediate host for both viruses.

研究分野：農学

キーワード：病害発生 植物ウイルス パッションフルーツ トケイソウ 西太平洋 果樹 診断 防除

## 1. 研究開始当初の背景

パッションフルーツ (*Passiflora edulis*) は熱帯・亜熱帯地域の重要な果樹であるが、縮葉や果実奇形が特徴のパッションフルーツウツディネス病 (PWD) が、世界中の生産地で問題となっていた。本病の原因は、プラス 1 本鎖 RNA をゲノムにもつ、長さ 760~800nm のひも状を呈する *Potyvirus* 属ウイルス (potyvirus; ポティウイルス) である。中でも発生地域を異にする以下の 3 種が重要であった。即ちオーストラリアにおける *Passionfruit woodiness virus* (PWV)、ブラジルの *Cowpea aphid-borne mosaic virus* (CABMV)、そして筆者らが 1992 年に奄美大島から初記載し 2006 年に命名した、西太平洋一帯に分布すると考えられるトケイソウ東アジアウイルス (*East Asian Passiflora virus*; EAPV) である。EAPV には果実奇形を起こす EAPV-AO (奄美大島) 系統と奇形を伴わない EAPV-IB (指宿) 系統があり、分布範囲が広く被害が大きいのは AO 系統であった。AO 系統は 1997 年の時点で奄美本島全域の栽培園で認められていたが、1998 年に、本ウイルスが存在しなかった喜界島に、無病苗育成用の隔離ハウスを建設し、そこで増殖し ELISA (酵素結合抗体法) で検査した無毒苗を栽培農家に安価で配布したことにより、2010 年以降は宇検村の一部地区でのみ残存するに至った。しかし、近年、秋田や沖縄など国内の数地域で、新たな遺伝子型のポティウイルス (*Passiflora virus* と仮称し PV と略記する) が出現しており、病原同定や対策の必要性が出てきた。さらに EAPV 自体も、台湾、マレーシア、韓国 (済州島) 等で発生の報告が続いている。

## 2. 研究の目的

パッションフルーツの国内における生産は、鹿児島県が栽培面積・生産量ともに最大であるが、30 年ほど前から今日まで PWD が問題となっている。筆者はこの病因が新種のポティウイルスであることを明らかにし、2006 年にトケイソウ東アジアウイルス (EAPV) と命名した。さらに家兎を用いて EAPV の抗体を作成し、県や生産組合の協力を得て、1998 年から ELISA による検査体制の確立による保毒苗の除去に努め、経済的損失の軽減に貢献した。

しかしまだ奄美本島の一部地域では、EAPV による被害が続いているため、研究目的のひとつとして、根本的な防除を講じるための実証試験を行うこととした。

一方で近年、国内の数地域において、EAPV に類似の症状ではあるものの、遺伝子的に異なる新たなポティウイルス (PV) による被害が認められている。本研究では、PV の同定を行うとともに、西太平洋地域における EAPV や PV の分布を調査した。

さらに、EAPV と PV は、沖縄県のパッションフルーツにおいて、しばしば混合感染している (鹿児島県では混合感染は認められていない)。一方で、研究上の増殖作業において、パッションフルーツは通常のカーボランダム法で両ウイルスに感染し難いが、*Passiflora foetida* (クサトケイソウ) は容易に感染し、生育速度も速いので、種々の試験のための propagation host (増殖宿主) として有用である。*P. foetida* は元々、インドネシアなどのアジア諸国のみならず沖縄諸島でも、サトウキビ畑などに帰化植物として繁茂しているが、圃場管理が行き届いた現在、里で見かけることが少なくなり、山林地域に後退している。しかし諸外国では、多くのウイルスのリザーバープラントであることが報告されている。そこで、*P. foetida* を EAPV と PV に混合感染させ、両ウイルスがどのように影響し合うのかを調査した。

## 3. 研究の方法

### (1) EAPV によって引き起こされるパッションフルーツ奇形果 (PWD) の制御

2015 年 (平成 27 年) 6 月に、奄美大島宇検村湯湾地区に実証試験用の隔離圃場 (9 アール) を設け、筆者が育成し ELISA 検定した健全株 (品種サマークイーン) を 7m 間隔で 12 本栽植した。その後 4 ヶ月ごとに新展開葉を採取し、ウイルス感染の有無を、ELISA と RT-PCR で調査した。

### (2) パッションフルーツに奇形果を起す新たな *Potyvirus* 属ウイルス (ポティウイルス) の記載

日本国内の 4 ヶ所から集めた、EAPV の検出法で捕捉できないポティウイルスを、同定試験の材料とした (前述のように、これらウイルスを仮称 *Passiflora virus*、略記 PV とした)。

採種した PV 初期株をインゲン品種 “Pinto 111” の初生葉にカーボランダムを用いて機械接種し、単病斑分離を 2 回繰り返した後、それらを *P. foetida* に接種すると、全身感染しモザイク症状を示したので、これらを分離株とした。即ち、2013 年の秋田市由来の PV-AK 株、2014 年の沖縄県名護市由来の PV-OK 株、そして 2015 年の鹿児島県の与論町とさつま町それぞれに由来の PV-YO 株ならびに PV-SA 株である。以降、分離株の維持は、*P. foetida* ならびにこれらを接ぎ木接種して元病徴を再現した実生のトケイソウ (Purple passionfruit; *P. edulis*) を用いて行い、適宜実験に供試した。

4 分離株それぞれを、7 科 12 種の植物に接種し、宿主範囲を既知の EAPV と比較した。

*P. foetida* の罹病葉 0.2g より全 RNA を抽出し、Oligo-dT を用いた cDNA 合成と、ポティウイルス用の universal primers (Zheng et al. 2008) を用いた PCR によって、ウイルスゲノム由来の一部断片 (NIb 領域の一部 ~ CP 領域の N 端) を増幅した。次に、ポリプロテインを

コードするゲノムのほぼ全域をカバーする 5 つの DNA 断片を、BCMV subgroup に属す potyvirus のアライメントに基づいて設計した primers sets を用いた PCR によって増幅した。5'-NCR は 5' SMARTER RACE 5/3 kit (TaKaRa)、3'-NCR は 3' full RACE Core set (TaKaRa) ならびに、それぞれに隣接する cDNA に基いた primers を用いて増幅した。

上記の 8 つの cDNA 断片を T-vector pMD20 (Novagen, Merck, Darmstadt, Germany) と pBluescript II SK(+) (Agilent, Santa Clara, CA, USA) に組み込み、*E. coli* strain XL-1 Blue High Efficiency Competent Cells (Agilent) で増幅した。Recombinant cDNA clones は T7 もしくは M13M4 ならびに M13RV primers を用い、ABI PRISM 3100 genetic analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA) によって配列決定した。完成した配列は BLAST algorithm (Altschul et al. 1990) を用いて GenBank database と照合した。さらに GENETYX 6.0 program や EMBOSS pairwise alignment algorithm program ([http://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss\\_needle](http://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_needle)) を用いて核酸やアミノ酸配列の相同性検索を行った。最後に、MEGA ver. 7.0 program (Kumar et al. 2016) から提供される最小節約法を用いて、近縁ウイルスとの分子系統樹を作成し分類の決め手とした。

### (3) 未調査地域における EAPV や新ウイルス PV の分布調査

海外の研究者の協力を得つつ、2017 年度に西オーストラリア (パース市) で、2018 年度に西スマトラ地域 (パダン市、ソロック市周辺) で、パッションフルーツならびにトケイソウ科野生種における EAPV や近縁ウイルスの分布の有無を調査した。パース市内で採取したムラサキトケイソウはマードック大学で検定、また西スマトラ地域で採取したモザイク様症状を示すムラサキトケイソウや野生種は門司植物防疫所の許可を得て国内に輸入し、鹿児島大で検定した。これらより全 RNA を抽出し、結果に示す特異的 primer sets を用いた RT-PCR によりウイルス感染の有無を調査した。

### (4) EAPV と PV の *P. foetida* での混合感染による相互作用

予備試験として EAPV と PV を *P. foetida* に接種し、接種 2 週間後の頂葉より 3 葉位目の新展開葉のウイルス RNA 量を、real time PCR で調べた。PV の RNA 量は EAPV の 20 倍程度に達していたので、接種用緩衝液 (0.025M リン酸緩衝液 pH 7.6) によって同濃度に調整し接種源とした。

5 通りの接種区を設けた。即ち、EAPV 単独接種、PV 単独接種、EAPV と PV の混合接種 (同時接種)、EAPV 接種の 6 日後に上位新展開葉に PV を接種、そして PV 接種の 6 日後に上位葉に EAPV を接種、以上の 5 通りの接種区である。

Real time PCR に際して、標準曲線用の primers は、*Passiflora alata* の glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) に基づいて設計した。

EAPV 用 primers は CP コード領域内の 159bp、PV 用 primers は CP コード領域内の 203bp を標的とした。

分析は、Light-Cycler 480 Real-time PCR system (Roche Diagnostics GmbH, Penzberg, Germany) を用いて行い、上記 5 通りの接種区それぞれにおいて、最初の接種から 24 時間後、1 週間後、2 週間後、3 週間後、4 週間後のウイルス RNA 量を記録し比較考察した。

## 4. 研究成果

### (1) EAPV によって引き起こされるパッションフルーツ奇形果 (PWD) の制御

2015 年 6 月に、奄美大島宇検村湯湾地区に、実証試験用の隔離露地栽培園 (9 アール) を設け、その後 4 ヶ月ごとに新展開葉を採取し、ウイルス感染の有無を、ELISA と RT-PCR で調査した。その結果、2018 年 3 月時点 (2 年 9 ヶ月後) には感染を認めなかったが、2018 年 12 月時点 (3 年 6 ヶ月後) の調査で、全ての個体が RT-PCR で陽性 (ELISA は陰性) となった。即ち、圃場全体に健全苗を植栽したとしても、露地栽培においては、約 3 年後までに、多くの植物体が再感染すると考えられた (先行研究によるとノゲシフクレアブラムシによる媒介の可能性が高い)。ウイルス病の蔓延を防ぐために、3 年後を目途に総植え替えすべきと結論した。以上の結果に基づいて、2019 年 2 月に宇検村生涯学習センターにおいて、農家や役場職員を対象に栽培法に関する研修会を実施した。

### (2) パッションフルーツに奇形果を起す新たな *Potyvirus* 属ウイルス (ポティウイルス) の記載

インゲン 13 品種を供試した宿主範囲試験の結果、4 品種 (Black Eye、本金時、改良大手亡、Masterpiece) は PV の 4 分離株に全身感染したが EAPV には全身感染しなかった。その一方で、2 品種 (Rico 23、Rosinha) が PV の 4 分離株に全身感染せず EAPV に全身感染した。さらに、ササゲ品種 “黒種三尺” は、PV の 4 分離株に全身感染し明瞭なモザイク症状を示したが、EAPV には免疫性を示し局部感染もしなかった。即ち、“黒種三尺” のみに、取り敢えずの接種を行うだけで、両ウイルスを簡易識別することも可能と考えた。

PV の 4 分離株のゲノムの完全長は、poly(A)を除いて 9973 塩基であり、3217 アミノ酸からなる polyprotein をコードしていた。5'-noncoding region は 129 塩基 (PV-OK, YO, SA) もしくは 130 塩基 (PV-AK) であり、3'-noncoding region は 193 塩基であった。全ゲノムの塩

基配列やアミノ酸配列は、PV4 分離株が同一種であることを示唆した。既知の potyvirus で全塩基配列が PV 分離株に最も近い種は watermelon mosaic virus (スイカモザイクウイルス)であり、相同性は 68.1%であった。一方、EAPV-AO に対する相同性は 65.3%にとどまった。PV 分離株が EAPV と遺伝的に遠縁であることは、最小節約法を用いた分子系統樹 (Fig. 1) でも支持され、ICTV (国際ウイルス命名委員会) の命名規約に基づき *Potyvirus* 属の新種であると判断できた。よって著者は、これら分離株の種名として East Asian Passiflora distortion virus (EAPDV)、そして和名として、トケイソウ東アジア奇形ウイルスを提案した。

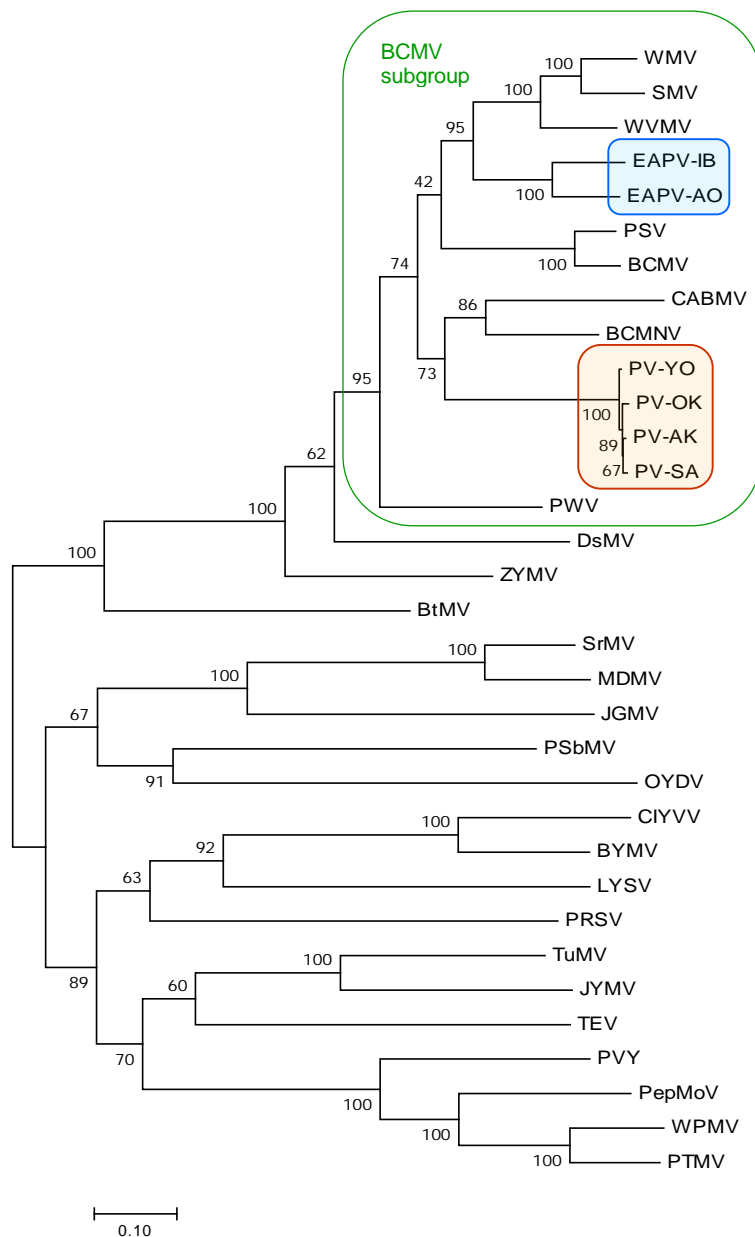


Fig.1 Phylogenetic tree of PV isolates and representative 28 potyviruses constructed with maximum likelihood algorithm using polyprotein sequences. The percentage of total isolates clustered together was measured by 1,000 bootstrap replications. Sequence alignments and phylogenetic tree were generated by the program MEGA 7.0. Accession numbers of the sequences used for constructing this tree are BCMNV (U19287), BCMV (AJ312437), BtMV (AY206394), BYMV (AY192568), CABMV (AF348210), CIYVV (AB011819), DsMV (AJ298033), EAPV-AO (AB246773), EAPV-IB (AB604610), JGMV (Z26920), JYMV (KJ789140), LYSV (AJ307057), MDMV (AJ001691), OYDV (AJ510223), PSV (U34972), PepMov (M96425), PTMV (AJ516010), PSbMV (D10930), PRSV (X67673), PVY (X12456), PVV (HQ122652), SMV (S42280), SrMV (U57358), TEV (M15239), TuMV (AF169561), WMV (DQ399708), WPMV (AJ437279), WVMV (AY656816), and ZYMV (L31350).

(3) 未調査地域における EAPV や新ウイルス (PV あらため EAPDV) の分布調査

RT-PCR によって EAPV と EAPDV を識別するプライマーを改良した結果、次に示す配列の primer sets が最も感度が高かった。

EAPV 検出用 (増幅断片 736bp)

EAPV-Sp-F: 5'-CGACGAATCCAAATCCCAAT

EAPV-Sp-R: 5'-ATGTTCTGATTGACATCCCG

EAPDV 検出用 (増幅断片 806bp)

EAPDV-Sp-F: 5'-CAGAACCCATACCAAGTAAT

EAPDV-Sp-R: 5'-ACTCAATGCTGGGGACGCTC

2017年に西オーストラリア(パース市)で、2018年に西スマトラ地域(パダン市、ソロック市周辺)で、葉のモザイク症状や果実の奇形を呈するパッションフルーツならびにトケイソウ科野生種における EAPV や EAPDV の分布の有無を調査した。その結果、西オーストラリアに分布する potyvirus は passionfruit woodiness virus (PWV) のみであり日本で認められている EAPV と EAPDV は存在していなかった。これらのことから、パッションフルーツにウイルス性の症状を起こす potyvirus は、国や大陸によってかなり異なっており、それぞれの分布域は限定されているようである。

(4) EAPV と EAPDV の *P. foetida* での混合感染による相互作用

EAPV (A) と EAPDV (D) の混合感染は、宿主 *P. foetida* が両ウイルスに感染するタイミングの違いにより、それぞれの増殖や蓄積の程度が大きく異なった。

同時混合感染 (A+D) と EAPV を接種した後に EAPDV を接種した区 (A→D) は病徴が激しく、EAPDV を接種した後に EAPV を接種した区 (D→A) は A+D や A→D よりも病徴が軽く、EAPDV の単独感染の病徴が最も軽微であった。

ウイルス RNA の量比分析によると、EAPDV は単独感染に比較し、D→A、A→D、A+D のそれぞれで 168.5 倍、23.4 倍、30.4 倍の量に達した。EAPV の RNA 量は一貫して EAPDV よりも低く推移した。

以上のことから、混合感染によって、病徴的にも増殖量でも、より大きな影響を受けるのは EAPDV であると考えられた。

注：(4)に関する研究成果は現在論文投稿中であり詳細の公表は差し控えたい(12月までに公開予定である)

## 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 1件)

Riska, Yuka Sato, Kanami Inudo, Masayuki Nakamura, Tomohiro Fukumoto, Tetsuya Takushi, Shin-ichi Fuji, Hisashi Iwai (2019) East Asian Passiflora distortion virus: a novel potyvirus species causing deformation of passionfruits in Japan. Journal of General Plant Pathology 85:221-231 (<https://doi.org/10.1007/s10327-019-00842-0>) (査読有り)

[学会発表](計 4件)

International Symposium on Virus Diseases of Important Crops (2019年9月,台中市) Iwai H. Potyvirus causing passionfruit malformation in the Western Pacific region

平成 31 年度 日本植物病理学会大会 (2019 年 3 月, つくば市 つくば国際会議場) Riska, Nakamura M., and Iwai H. Effects of the double infection of East Asian Passiflora virus and East Asian Passiflora distortion virus on *Passiflora foetida*

平成 29 年度 日本植物病理学会大会 (2017 年 4 月, 盛岡市 マリオス/アイーナ・いわて県民情報交流センター) 犬童奏実・佐藤佑華・リスカ・中村正幸・福元智博・澤岷哲也・藤 晋一・岩井 久 日本国内のパッションフルーツに果実奇形を起こすポティウイルスを新種 East Asian Passiflora distortion virus として提案する

平成 28 年度 日本植物病理学会九州部会 (2016 年 11 月, 佐賀市 ホテルグランデはぐくれ) 犬童奏実・佐藤佑華・中村正幸・リスカ・千秋祐也・澤岷哲也・藤 晋一・岩井 久 モザイク葉や果実変形を呈するパッションフルーツに感染している新種のポティウイルス



〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

取得状況(計 0件)

〔その他〕

ホームページ等

## 6. 研究組織

(1)研究分担者 なし

(2)研究協力者

研究協力者氏名：犬童奏実，大西弘也，佐藤佑華，澤岷哲也，千秋祐也，中村正幸，福元智博，藤 晋一，Riska (リスカ)，Wylie Steve J (スティーブ・ワイリー)

ローマ字氏名：Inudo Kanami, Ohnishi Hiroya, Sato Yuka, Takushi Tetsuya, Chiaki Yuya, Nakamura Masayuki, Fukumoto Tomohiro, Fuji Shin-ichi, Risuka, Wylie Steve J

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。