

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 6 日現在

機関番号：12201
研究種目：基盤研究(B)
研究期間：2011～2013
課題番号：23405020
研究課題名(和文) 虫媒性劇症ウイルス発生地インドネシアにおける耕種的防除法の確立

研究課題名(英文) Control of insect born virus in Indonesia

研究代表者

村井 保 (Murai, Tamotsu)

宇都宮大学・農学部・教授

研究者番号：90284091

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,600,000 円、(間接経費) 4,380,000 円

研究成果の概要(和文)：本研究において4つのRNAウイルスをインドネシアで分離し、その性状を解析した。その結果、3種のウイルスについては全塩基配列を決定した。いずれもインドネシアでは最初の報告で、世界でも2例目に当たる。また、トマト退緑ウイルスに対するペプチド抗体を作製し、日本でもインドネシアでもウイルス検出に用いることが出来た。以上の結果は、病原ウイルスの検出同定を正確に行い、防除法を確立するための基礎となるであろう。

研究成果の概要(英文)：In this project we have isolated four plant RNA viruses in Indonesia, three of which were newly recorded in Indonesia. We have determined complete nucleotide sequence of Tomato infectious chlorosis virus (TICV), Cowpea mild mottle virus (CPMMV) and Pepper vein yellows virus (PeVYV), and also developed an anti-peptide antibody against Tomato chlorosis virus (ToCV) to detect the virus by ELISA. These results can help to identify the causal agents of viral diseases of vegetable crops in Indonesia and to propose the control methods for insect vectors because these new viruses are transmitted by different kinds of insects.

研究分野：植物保護学

科研費の分科・細目：農学・応用昆虫学

キーワード：植物ウイルス コナジラミ アザミウマ トマト トウガラシ 耕種的防除 昆虫媒介 インドネシア

1. 研究開始当初の背景

インドネシアのトウガラシやトマトではタバココナジラミ伝搬のトウガラシ黄化葉巻ウイルス (*Pepper yellow leaf curl virus: PYLCV*) が大発生し、ほとんど収穫のない畑もある。感染株は黄化して葉が巻いて縮れ、株全体が萎縮する。発病後は結実せずに、収量が激減し、産地全体が壊滅的な被害に陥る。このため、トウガラシの消費の多いインドネシアでは価格が3倍に値上がりしている。また最近になり、このような黄化症状には、PYLCV 以外にタバココナジラミとオンシツコナジラミで伝搬されるトマトクロロシスウイルス (*Tomato chlorosis virus: ToCV*) が混在していることが判明してきた。PYLCV に近縁のトマト黄化葉巻ウイルス (*Tomato yellow leaf curl virus: TYLCV*) はわが国でも多発しており (本多、2007)、また ToCV も栃木県で大発生して問題となった (Hirota *et al.*, 2010)。特に TYLCV はわが国でここ数年大問題となっている。これらのウイルスは汁液伝染せず、難防除のコナジラミで永続伝搬され、実用的な抵抗性品種もほとんどない。また症状が生理的障害のような黄化のために、なかなか的確に診断もできない。わが国の施設栽培では、コナジラミ類を「入れない、出さない、増やさない」対策を基本にしてなんとかしのいでいるのが現状で、露地栽培に適した安価で確実な防除法は確立されていない。さらに本年、インドネシアで調査したところ、わが国で未発生のコナジラミ伝搬性の *Cowpea mild mottle virus (CpMMV)* がインドネシアで大発生していることが判明した。

インドネシアはいうまでもなく熱帯で、年に3回はトマトやトウガラシを路地で植えつけ、通年栽培している。このため、コナジラミ伝搬性ウイルスに限らず、圃場から作物とウイルス病およびその媒介虫が姿を消すことがなく、激発する要因となっている。

一方、すでに ToCV の侵入がわが国で確認された (Hirota *et al.*, 2010) ように、物流が国際化していることから、現在インドネシアで問題となっている病原ウイルスが、インフルエンザウイルスのようにいずれはわが国へ侵入することが危惧される。そこで申請者らは、激発地では媒介虫の天敵や、変異して弱毒化したウイルス株を発見する可能性が大きいと考え、本課題を申請した。インドネシアの露地栽培圃場でウイルス媒介虫とその天敵や弱毒ウイルス株を探索するとともに各種栽培的防除試験を実施し、インドネシアでも通用するような総合的防除対策を確立できれば、わが国の将来においても適用できる防除対策の基本となりうると考える。すなわち、ウイルス病の激発地をフィールドとして研究を進めてこそ、多くの知見が得られると確信している。

2. 研究の目的

最近わが国では、コナジラミ伝搬性のトマト黄化葉巻ウイルスとトマトクロロシスウイルスが大問題となっている。一方、インドネシアでもコナジラミ伝搬性ウイルスの劇症系統が大発生し、露地栽培のトマトやトウガラシ、ダイズが大打撃を受けている。物流が国際化している現在、このようなインドネシアをはじめとする諸外国の難防除虫媒性の強毒ウイルスがわが国に侵入するのは時間の問題である。そこで本研究では、激発地のインドネシアで難防除害虫のコナジラミ、アザミウマ、アブラムシおよびその天敵を探索し、圃場レベルの各種耕種的防除法 (障壁植物、ネット、農薬、抵抗性品種など) を検討するとともに、病原ウイルスを遺伝子レベルで比較・解析して弱毒株を選抜し、インドネシア・日本の双方で通用する総合防除法の確立を目指す。

3. 研究の方法

1) ウイルス媒介虫の発生生態の解明と天敵

の探索

本研究では前述の5名の海外共同研究者を得て、インドネシアのウイルス病激発圃場で採集を行う。この中ではまず、トマト、トウガラシ、ダイズにおけるコナジラミ類、アザミウマ類、アブラムシ類を対象を絞り、これらの種類及びバイオタイプ、分布、発生生態を調査する。種類及びバイオタイプは形態的観察とDNAにより比較鑑定する。さらに、天敵の種類、発生状況を調査し、有望な天敵を採集し、防除に用いることが出来るか検討するとともに、インドネシアに発生するアザミウマのトスポウイルス媒介性についても Inoue et al. (2010)の方法で検討する。なお、この部分は村井と大学院生が担当する。

2) ウイルスの総合的防除法の確立

5箇所の異なった場所に実験圃場を設け、多数の品種の抵抗性検定、媒介虫の飛来を防ぐための障壁植物の種類、高さ、密度、および防虫ネットの高さ、目の細かさ、色、さらには黄色テープなどの誘引資材など、インドネシア産および日本産の資材を多数用いて防除法を検討する。障壁植物として、コナジラミ伝搬性ウイルスが多発する圃場ではトウモロコシ、豆類、ナスなどを植えて、コナジラミの誘引度合いを調査する。同様に、アザミウマとアブラムシについても障壁植物や忌避植物を検討する。世界各地よりウイルス病抵抗性品種を取り寄せ、試験栽培する。この部分は、前記のインドネシア海外共同研究者が実際の圃場試験を担当する。村井など日本側研究者はアイデアを出し、毎年2回ずつ現地圃場を訪問して防除対策の効果を調査する。なお、この部分は全員が担当する。

なお、わが国で最近利用され始めたトマト黄化葉巻ウイルスに対するトマトの抵抗性品種は、予備的な調査ではインドネシアでは全く抵抗性を示さなかった。

3) 病原ウイルスの遺伝子の解析と弱毒ウイルスの選抜

対象とする PYLCV、ToCV、CpMMV では全塩基配列が決定されていないので、まず全塩基配列を決定する。さらにポティウイルス、CMV も含めて多数の分離株を得て、次に感染性全長クローンの構築を目指す。すなわち、アグロバクテリウム法かパーティクルガン法によってDNAによるウイルス接種法を確立する。これにより、採集したウイルス株の病原性を確認し、弱毒株を探索する。なお、ウイルス遺伝子を増幅するPCRマシーン、塩基配列を決定するための各種装置やシーケンサは現有する。なお、この部分は研究分担者の西川と大学院生が担当する。

一方、圃場試験では、病原ウイルスを簡易に検出・同定するためにELISA法で利用できる抗血清が必要である。しかし、PYLCV、ToCV、CpMMVでは抗血清がないため、インドネシア側の研究者は大量のサンプルを用いての試験が出来ない。そこで大腸菌の発現ベクターを用いてウイルス外被タンパク質を融合タンパク質として発現し、精製してウイルス検出用の抗血清を作製する。なお、この部分は研究分担者の夏秋と大学院生が担当する。

4. 研究成果

(1) トマトインフェクシャスクロロシスウイルスの全塩基配列決定

トマトインフェクシャスクロロシスウイルス(*Tomato infectious chlorosis virus*, TICV)は*Crinivirus*属に属し、オンシツコナジラミで伝搬されてトマトに黄化症状を示し、世界各地に分布している。本研究で、2012年にインドネシアのボゴール市近郊でTICV感染トマトを採集した。そこで本ウイルスのゲノムRNA1とRNA2の全塩基配列を決定したところ、RNA1とRNA2の間では5'非翻訳領域では最初の5塩基が同一で、3'非翻訳領域では相同性が約73%であった。他のTICV分離株と比較したところ、全てのORFにおけるアミノ酸配列の相同性がアメリカ株と98.9~100%、ス

ペイン株と99.4~100%と高く、TICVは急速に世界中に広まったことが示唆された。TICVの全塩基配列決定はアメリカ株に次いで世界で2例目である。次に、RNA1のORF2(p27)において、他のクリニウイルスで silencing suppresser である p22 と部分的に相同性が高かったので、PVXベクターを用いて p27 を *Nicotiana benthamiana* で発現させたところ、病徴が激化した。このことより、p27 が silencing suppresser であることが示唆された。

(2) ペプチド抗体を用いたトマト退緑ウイルスの検出法の開発

トマト退緑ウイルス (*Tomato chlorosis virus*, ToCV) は、コナジラミによって媒介され、トマトに感染して下葉からの脈間黄化や壊死、葉巻を引き起こし、収量減を引き起こす。ToCV は 1998 年にフロリダで発見されて以来世界中で急速に蔓延し、インドネシアでも日本でも広く分布している。ToCV の検出法は現在のところ RT-PCR のみで、両国で利用できる抗体はない。そこで、栃木株の外被タンパク質 (CP) 領域のアミノ酸配列をもとに、平均疎水性値や電荷密度などをもとに抗原部位を予測し、14 残基のペプチドを 3 か所選択した。もっとも N 末端に近いペプチドは単独で、他の 2 つは混合してウサギを免疫し、抗ペプチド抗体を得た。前者の抗体は健全トマト葉と強く反応し不適であったが、後者は ELISA 法で ToCV 感染葉と強く反応したが健全葉とはほとんど反応しなかったことからせず、実用的な ToCV 抗体であった。さらに作成した抗体は ToCV インドネシア株とも良く反応し、現在はインドネシアでの検出同定に用いられている。今後は、作製した抗ペプチド抗体で発生圃場周辺の雑草や他の作物などを検定し、ToCV の伝染環を明らかにしたい。

(3) *Cowpea mild mottle virus* の全塩基配列決定

Cowpea mild mottle virus (CPMMV) は *Carlavirus* 属に属するが、アブラムシではなくコナジラミで伝搬され、世界各地に分布している。本研究でインドネシアのジャワ島において得られたサンプルを汁液接種したダイズは葉にモザイク、黄化、萎縮を示し、電子顕微鏡観察で長さ約 650nm のひも状粒子が見出され、*Carlavirus* 属共通プライマーを用いた RT-PCR 産物の配列解析により CPMMV であることが確認された。そこで本ウイルスのゲノム RNA の全塩基配列を決定し、データベース中の他の CPMMV 分離株の塩基およびアミノ酸配列と比較したところ、ORF 2, 3, 4, 6 におけるアミノ酸配列の相同性は、アフリカ株とは 52~60% と低く、一方南米株とは 81~97% と高かった。ORF 5 (CP) ではアフリカ株とは 95%、南米株とは 96~97% だった。3'非翻訳領域はアフリカ株とは 91%、南米株とは 99~100% だった。以上より、インドネシア分離株はアフリカ株より南米株に近縁であることが示唆された。CPMMV の全塩基配列決定はアフリカ株に次いで世界で 2 例目である。

(4) ピーマン葉脈黄化ウイルスインドネシア株の全塩基配列決定

本研究において、インドネシアのバリ島において激しい黄化症状を示すトウガラシから検出されたルテオウイルスの部分塩基配列は、沖縄で報告された *Luteoviridae* 科 *Polerovirus* 属のピーマン葉脈黄化ウイルス (*Pepper vein yellows virus*, PeVYV) と相同性を示した。そこで、PeVYV など既存の *Poleroviruses* の塩基配列を基にしてゲノムの全長をカバーするようにプライマーを設計し、インドネシア株の全塩基配列を決定した。その全長は 6125nt で、ORF0~ORF5 からなる 6 つの ORF をコートしており、典型的な *Poleroviruses* のゲノム構造を持つ。その配列を既知の *Polerovirus* 属ウイルスと比較したところ、全塩基配列では PeVYV と

Pepper yellow leaf curl virus (PYLCV) が最も相関性が高く 85.5%と 89.9%であった。各 ORF 領域のアミノ酸配列は PeVYV と 87 ~ 98%の相関性を示した。以上の結果より、インドネシアのトウガラシから検出されたルテオウイルスは PeVYV の一系統であることが明らかとなった。

以上の4つの研究内容は全て学会で発表し、その一部は論文としてもインドネシア側と発表した。現在、論文を執筆あるいは投稿中である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 1 件)

Suastica, G., Hartono, S., Nyana, I.D.N. and Natsuaki, T. () First report on Polorovirus infection on chilipeper in Bali, Indonesia. *J. Fitopathol. Indonesia* 査読有 8巻、2012、151 154

〔学会発表〕(計 5 件)

小松 慶貴・松原祥子・王 蔚芹・Sedyo Hartono・Gede Suastica・村井 保・西川尚志・夏秋 知英 インドネシア産 *Cowpea mild mottle virus* の全塩基配列決定 平成 24 年度日本植物病理学会関東部会 2012 年 9 月 13 日法政大学 (東京都) Natsuaki, T. Viral attenuation and cross protection to control plant viral diseases FFTC-TUA International Seminar on Emerging Infectious Diseases of Food Crops in Asia 2012 年 10 月 20 日東京農業大学 (東京都)

土田 遼・西川尚志・夏秋知英 抗ペプチド抗体を用いたトマト退緑ウイルスの検出 平成 25 年度日本植物病理学会大会 2013 年 3 月 29 日岐阜大学 (岐阜県)

西川尚志・井上登志郎・新子泰規・佐山春樹・斉藤渉・名畑宏香・村井保・夏秋知英 非虫媒性トマト黄化葉巻ウイルス 17G の非虫媒性に関するアミノ酸 平成 25 年度日本植物病理学会大会 2013 年 3 月 29 日岐阜大学 (岐阜県)

益子 嵩章・王 蔚芹・Sedyo Hartono・Gede Suastica・村井 保・西川 尚志・夏秋 知英 (2014). インドネシア産 *Tomato infectious chlorosis virus* の全塩基配列決定. 平成 25 年度日本植物病理学会関東部会 2013 年 9 月 12 日法政大学 (東京都)

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕
出願状況 (計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況 (計 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

村井 保 (MURAI Tamotsu)
宇都宮大学・農学部・教授
研究者番号：9 0 2 8 4 0 9 1

(2) 研究分担者

夏秋 知英 (NATSUAKI Tomohide)
宇都宮大学・農学部・教授
研究者番号：1 0 1 3 4 2 6 4

西川 尚志 (NISHIGAWA Hisashi)
宇都宮大学・農学部・准教授
研究者番号：6 0 3 6 1 6 1 4

(3) 連携研究者

()

研究者番号：