

平成 29 年 6 月 29 日現在

機関番号：12201

研究種目：基盤研究(B) (海外学術調査)

研究期間：2014～2016

課題番号：26304023

研究課題名(和文) 劇症ウイルス病多発のインドネシアにおける弱毒ウイルス探索とワクチン利用の展開

研究課題名(英文) Researching on attenuated isolates from severe viral crop diseases in Indonesia

研究代表者

夏秋 知英 (NATSUAKI, TOMOHIDE)

宇都宮大学・農学部・教授

研究者番号：10134264

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,200,000円

研究成果の概要(和文)：世界の農作物で難防除害虫が媒介するウイルス病が大問題となっている。特に周年で露地栽培しているインドネシアではウイルス病が激発しているため、その病原ウイルスの遺伝子の解析と弱毒ウイルス(ワクチン)の分離を検討した。その結果、クリニウイルス強毒株の病原性決定遺伝子を明らかにするとともに、インドネシアではベゴモウイルスの変異が頻発していること、媒介昆虫に対する天敵の利用が防除に適していることを見出した。また、タケとイチゴでインドネシア未記載のウイルスを見出した。

研究成果の概要(英文)：Geminiviruses and criniviruses causing severe problems in the world are transmitted by whiteflies that are very difficult to control. Especially economic loss is very big in Indonesia. The purpose of this project is to identify the pathogenic genes of viruses and to search attenuated isolates. As results, the silencing suppressor genes of criniviruses are identified, mutations on virus genes might occur highly frequently, and a natural enemy against whitefly was detected. Also unrecorded viruses in Indonesia were detected from bamboo and strawberry.

研究分野：植物病理学

キーワード：植物 ウイルス インドネシア ワクチン 防除

## 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、辛い料理の多いインドネシアではトウガラシが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インフェクシャスクロロシスウイルス (*Tomato infectious chlorosis virus: TICV*) やトマトクロロシスウイルス (*Tomato chlorosis virus: ToCV*) も激発していることが判明してきた。

わが国でも PYLCV に近縁のトマト黄化葉巻ウイルス (*Tomato yellow leaf curl virus: TYLCV*) がここ数年大問題となっている。また ToCV も栃木県で大発生して問題となっている。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全くない。また症状が生理的障害のような黄化のために、なかなかの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ある。しかし、露地栽培だけのインドネシアでは、適した安価で確実な防除法は確立されていない。

さらにインドネシアでの事前調査では、わが国で未発生のコナジラミ伝搬性の *Cowpea mild mottle virus (CpMMV)* がインドネシアのダイズで発生していることが判明した。また、ナス科のトマトやトウガラシだけでなく、ウリ科のキュウリやメロンでも同様にコナジラミ伝搬性ウイルスが大発生していた。

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露地で植えつけ、通年栽培している。このため、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、コナジラミ伝搬性やアブラムシ伝搬性のウイルスが激発する要因となっている。

## 2. 研究の目的

物流が国際化していることから、海外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。たとえば、前述のようにわが国へ ToCV が侵入し、栃木県などでは問題化している。そこで本研究ではまず、インドネシアのトマト、トウガラシ、メロン、ダイズなどで大発生して経済的に大問題となっている各種強毒ウイルスを採集して解析し、病原ウイルスの性状を明らかにする。

さらに、大発生している激発地だからこそ、多様な遺伝的変異が生じて弱毒株を発見する可能性が極めて大きいと考える。そこで、

インドネシアの激発露地圃場で無病徴のトマト、トウガラシ、メロン、ダイズなどを採し、無病徴株から弱毒ウイルスの分離を試みる。その上で、インドネシアでも弱毒株 (ワクチン) を利用した防除対策を確立できるかどうか、検討することを本研究の目的とした。

わが国ではウイルス病防除対策の一つとして、弱毒ウイルス (ワクチン) の利用が広がりがつある。しかし、ワクチン株は他国から輸入すべきでなく、その国で選抜しなければならない。そこで本研究では、ウイルス病激発地のインドネシアで難防除害虫のコナジラミ、アブラムシが媒介する強毒ウイルスの性状を明らかにし、さらに弱毒株を探索し、ワクチンとして圃場レベルで利用する防除法の可能性を検討するとともに、強毒株・弱毒株を遺伝子レベルで比較・解析して、世界で通用する弱毒株の選抜法と防除法の確立を目指す。

## 3. 研究の方法

### (1) 病原ウイルスの分離・同定

毎年インドネシアを訪問し、現地の海外共同研究者とともにウイルス病が発生しているトマト、トウガラシ、ナス、メロン等の圃場にてサンプルを採集する。サンプルは症状の激しいものと無病徴のものを含む。帰国後、サンプルから核酸抽出し、その塩基配列を決定して同定し、DNA データベースに登録されている世界の分離株と比較し、病原ウイルスを同定する。

### (2) 媒介虫の検討

インドネシアの圃場では、植物ウイルスを媒介すると考えられる昆虫も多数採集し、その種類や発生密度等を検討し、ウイルス媒介昆虫の効率的な防除法を検討する。なお、インドネシアでのウイルス病発生圃場の確保や圃場試験、現地での案内は海外共同研究者が行う。

### (3) 病原ウイルスの遺伝子解析

病原ウイルスの遺伝子を解析し、病原性を決定している遺伝子を解明できれば、それを目印に弱毒ウイルス (ワクチン) を容易に検出できる。そこで、病原ウイルスごとに感染性クローンを構築して接種してその病原性を確認し、あるいは PVX ベクターに病原ウイルス遺伝子をひとつずつ挿入して、遺伝子ごとの機能や病原性を解析する。

## 4. 研究成果

以上の目的、方法で本研究を開始した。その成果は病原ウイルスごとに記述する。

### (1) *Tomato infectious chlorosis virus* のサイレンシングサプレッサーの探索

温暖化によるコナジラミ分布域の拡大に伴い、媒介されるクリニウイルスの発生地域も急速に広まっているが、クリニウイルスの遺伝子解析は進んでいない。そこで本実験では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)のインドネシア分離株を用いてサイレンシングサプレッサーの探索を行った。GFPを導入した *Nicotiana benthamiana* (16c系統)にTICV RNA1のORF2 (p27)とGFPをアグロインフィルトレーション法により共接種したところ、強いiGFP蛍光が観察され、野生型 *N. benthamiana*にp27とGFPとhairpin GFP (hpGFP)を共接種してもGFP蛍光は観察された。以上から、p27はsense-transgene induced PTGS (S-PTGS)とinverted repeat induced PTGS (IR-PTGS)を抑制するサイレンシングサプレッサーであることが示された。また、p27を *Potato virus X* (PVX)ベクターに組み込み *N. benthamiana*に接種したところ、PVXベクターのみを接種した時より激症化とCP蓄積量の増加がみられた。このようなTICVでのサイレンシングサプレッサーの報告は世界初であり、現在投稿論文を執筆中である。また、これまで確立してきたウイルスのワクチン株ではサイレンシングサプレッサーが変異して弱毒化していることから、TICVの弱毒株(ワクチン)の探索でもp27遺伝子の変異している分離株を探ることが重要であると考えられた。

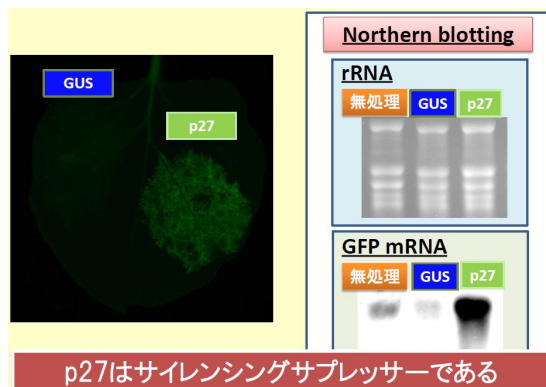


図 TICV p27 がサイレンシングサプレッサーである確認  
p27 を接種した領域で GFP が発光している

### (2) *Tomato chlorosis virus*のサイレンシングサプレッサーの探索

クリニウイルス属のトマト退緑ウイルス(*Tomato chlorosis virus*, ToCV)は、トマトに感染し、その被害が世界中で急激に拡大していることから新興ウイルス(emerging virus)として大問題となっている。ToCVはRNA1とRNA2をゲノムに持ち、13個のORFをコードしているが、多くのタンパク質の機能は未だ不明である。そこで本実験では各ORFがコードするタンパク質の機能の解明を目指した。前述のPVXベクターをトマトに接種すると弱いモザイク症状しか示さないの、ToCVの病原性に関与する領域を解析するために、ToCVの各ORFをPVXベクターに組み込んでトマトへ接種した。その結果、RNA2-ORF1(p4)

などを挿入したPVXベクターはPVX単独と同様の弱いモザイク症状しか生じなかった。一方、RNA1-ORF2(p22)を挿入したものでは壊疽を伴った激しいモザイク症状を示し、枯死する個体もみられた。さらに、(1)と同様にGFPを利用した実験で、このp22がサイレンシングサプレッサーであることが判明した。さらに、このp22は温度によって示す病徴が異なることを新たに見出した。RNA1-ORF2(p22)をPVXベクターに組み込んで *Nicotiana benthamiana*に接種した報告はこれまでもあったが、トマトでも激症化の確認と、温度により病徴が変化する現象は世界初の報告であり、現在投稿論文を執筆中である。また、TICVと同様に、ToCVの弱毒株(ワクチン)の探索でもp22遺伝子の変異している分離株を探ることが重要であると考えられた。

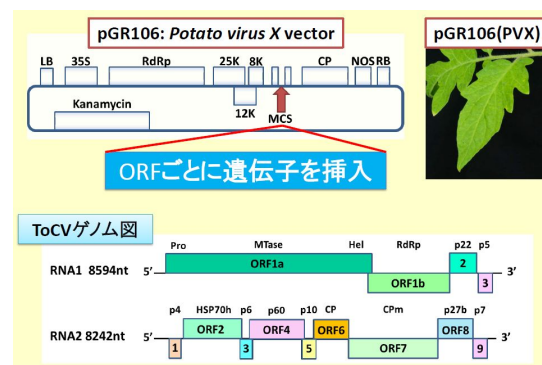


図 PVXベクターとToCVのゲノム構造図

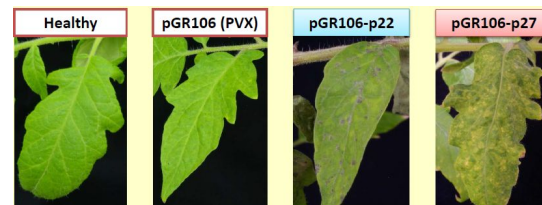


図 ToCV-p22 および TICV-p27 がトマトに黄化とえそ症状を生じる

### (3) ナスの白化症状・黄化症状から検出されるベゴモウイルス

ベゴモウイルス属のメンバーであるトウガラシ黄化葉巻ウイルス(*Pepper yellow leaf curl virus*, PYLCV)やトマト黄化葉巻ウイルス(*Tomato yellow leaf curl virus*, TYLCV)はコナジラミで伝搬され、近縁のウイルスがインドネシアでは多発している。本研究の調査で、インドネシアで日本向けに輸出するために栽培している紫のナスに黄化症状・白化症状が大発生していることが判明したので、その病原ウイルスを調査した。その結果、ナスからは *Tomato yellow leaf curl Kanchanaburi virus* (TYLCKaV)が、トウガラシからは *Pepper yellow leaf curl Indonesia virus* (PepYLCIDV)が検出同定された。不思議なことに隣どうして生えていて同一の症状を示すナスとトウガラシからも異なるウ

ウイルスが検出され、両ウイルスの混合感染は見いだされなかった。なお、インドネシアでは緑か白のナスが販売され、紫のナスは食されていない。



図 黄化症状を示すトウガラシ(左)とナス(右)。

トウガラシからは PepYLCIDV、ナスからは TYLCKaV と異なるウイルスが検出された。

#### (4) インドネシアのメロンで見出された *Tomato leaf curl New Delhi virus* と *Squash leaf curl China virus*

インドネシアでは、野菜類は一年中露地栽培されているため、伝染源となるウイルス感染植物と媒介昆虫が絶えることがない。このため、ウイルス病が急激に蔓延する。タバココナジラミで媒介されるウイルス病は前述のナス科作物だけでなく、キュウリやメロンといったウリ科の重要作物でも多発している。そこで、中部ジャワ地区のメロンを調査したところ、*Tomato leaf curl New Delhi virus* (ToLCNDV) と *Squash leaf curl China virus* (SLCCNV) の2種のベゴモウイルスが検出された。両ウイルスの全塩基配列を決定し、既報のベゴモウイルスと比較したところ、ToLCNDV 分離株は DNA-A の AV1 と AV2 の領域で変異が見られ、系統樹解析からこの領域で SLCCNV と組換え (recombination) を起こしていると考えられた。さらに、感染性クローンを構築して接種したところ、ToLCNDV 分離株はウリ科植物には感染するが、ナス科植物には感染しないことが判明した。ToLCNDV は、もとはトマトから分離されたウイルスであるが、現在、世界中で ToLCNDV が急速に変異して宿主植物を変えながら分布を拡大していると思われる。変異の多いウイルスに対するワクチンは効果が低いことから、ベゴモウイルスに対するワクチン開発は難しいと考えられた。

一方、ナス科やウリ科でコナジラミ伝搬性ウイルスが大発生しているインドネシアの圃場で、ウイルス病があまり発生していない圃場が見出された。その圃場では、コナジラミの密度が低く、逆にタバコカスミカメに似た昆虫の密度が高かった。タバコカスミカメ

はわが国においてコナジラミの天敵として知られており、今回の調査中に見出された昆虫もコナジラミの天敵である可能性が高い。天敵の利用はワクチンよりも効率がよいと考えられるので、次年度以降はタバコカスミカメに似た昆虫の採集と同定、天敵としての利用法の開発をインドネシアの研究協力者と検討する予定である。



図 ToLCNDV が検出されたメロンのモザイク症状

#### (5) トマト黄化葉巻ウイルスの非虫媒性

トマト黄化葉巻ウイルス (*Tomato yellow leaf curl virus*, TYLCV) の分離株 (17G) はタバココナジラミによる媒介能を失った非虫媒株である。さらに 17G 感染トマトは、虫媒株 (イスラエル系統) の二次感染を阻止することが判明している。そこで 17G が非虫媒性である原因を遺伝子レベルで明らかにするため、17G と虫媒株の間でキメラウイルスを作製して虫媒試験を行ったところ、CP 領域が非虫媒性に参与していることが示唆された。そこでさらに、17G と虫媒株の間で異なるアミノ酸変異に着目していくつかのキメラウイルスを作製して虫媒試験を行ったところ、非虫媒性に参与するアミノ酸変異は、外被タンパク質における3か所のアミノ酸に絞り込まれた。弱毒(ワクチン)株の選抜では、ワクチン株が虫媒伝染すると圃場中に広がってしまうため、非虫媒株を選抜する必要がある。このため、ベゴモウイルスの外被タンパク質で共通する虫媒性決定機構の分子メカニズムの解明が重要である。



図 非虫媒性検定に用いた TYLCV-17G 感染性クローンの接種実験の概要

#### (6) インドネシアで分離された *Bamboo mosaic virus* の解析

インドネシアでは、タケは日常生活だけでなく農業の圃場や建築現場など様々な場面

で有効利用され、さらにタケの苗木は輸出されている。一方、タケの病原ウイルスである *Bamboo mosaic virus* (BaMV) は、*Alphaflexiviridae* 科、*Potexvirus* 属のメンバーで、BaMV の唯一の自然宿主はタケであり、感染するとモザイク、白色壊疽斑紋、条斑、退色などの病徴が見られ、植物死を引き起こすこともある。本研究を遂行中にインドネシアでタケのモザイク病が見出され、インドネシアの研究協力者から解析を依頼された。そこで、BaMV の 2 分離株で全塩基配列を決定した。

決定した全塩基配列とアミノ酸配列をそれぞれ既報の BaMV 系統の配列と比較した結果、インドネシア分離株は中国分離株よりも台湾分離株と相同性が高いことが示された。また、分子系統樹を作製したところ、全長の塩基配列を基にした系統樹では、インドネシアの 2 分離株、BaMV-Yogya1 と BaMV-Yogya2 は同じクラスターに属するが、ORF3、4 のアミノ酸配列を基にした系統樹では、BaMV-Yogya2 は BaMV-V と近縁だった。そこで組換え解析を行った結果、ORF1 に位置するおよそ 600~800 塩基に 1 箇所、そして 4000 塩基以降の 4 箇所組換えが起きていることが示唆された。

BaMV の発生は世界の様々な地域で報告されているにも関わらず、GenBank に登録されている全塩基配列は、台湾分離株 6 系統 (BaMV-V, BaMV-S, BaMV-O, BaMV-Pu, BaMV-Au, BaMV-Bo)、中国分離株 3 系統 (BaMV-JXYBZ1, BaMV-MUZHUBZ2, BaMV-YTHSL14) の計 9 系統のみである。すなわち本実験では、台湾、中国以外の地域で、そしてインドネシアを含む熱帯の国からは初めてとなる BaMV の全塩基配列の決定であり、現在投稿論文を執筆中である。

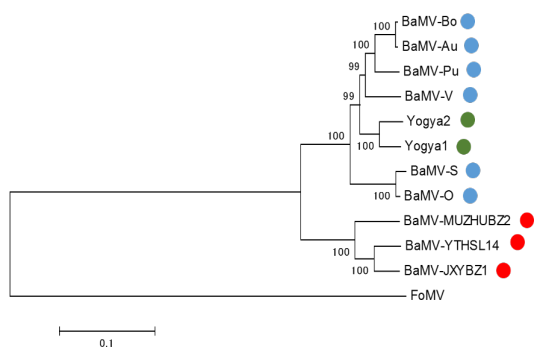


図 BaMV の系統樹

インドネシアの 2 分離株(緑)は台湾株(青)に近縁で、中国株(赤)とは別のクラスターを形成する

### (7) インドネシアのイチゴ苗からのウイルス検出

近年の消費者の嗜好の変化から、インドネシアの高地ではイチゴが栽培されるようになってきた。本研究を遂行中にインドネシア

でウイルス感染と思われるイチゴ苗が見出され、インドネシアの研究協力者から解析を依頼された。そこで、サンプルを持ち帰って、イチゴの大産地である栃木県の宇都宮大学で解析したところ、イチゴマイルドイエローエッジウイルス (Strawberry mild yellow edge virus, SMYEV) とイチゴ斑紋ウイルス (Strawberry mottle virus, SMoV) が検出された。今後、インドネシアにおけるイチゴ栽培が盛んになるにつれて問題となると考えられ、今後、防除方法をインドネシアの研究協力者と協議する予定である。

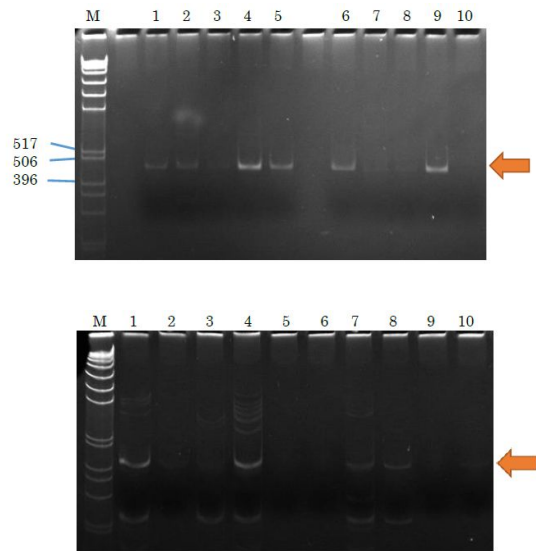


図 インドネシアのイチゴ苗からの RT-PCR 法による SMoV(上)と SMYEV(下)の検出

### 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 件)

〔学会発表〕(計 9 件)

- Takano, A., Nishigawa, H. and Natsuaki, T. (2014.10.22-24). Analyses of whitefly non-transmissibility TYLCV isolate 17G. The 3rd Korea-Japan Joint Symposium & The 2014 KSPP Fall Meeting on Plant Pathology. Busan, Korea
- Mashiko, T., Wang, W-Q., Hartono, S., Suastica, G., Murai, T., Nishigawa, H. and Natsuaki, T. (2014.10.22-24) Complete nucleotide sequence of Indonesian Tomato infectious chlorosis virus. The 3rd Korea-Japan Joint Symposium & The 2014 KSPP Fall Meeting on Plant Pathology. Busan, Korea

阿部里海・王 蔚芹・Sedyo Hartono・Gede Suastica・西川尚志・夏秋知英。(2016.3.21～23)。インドネシア産 Bamboo mosaic virus の検出。平成 28 年度日本植物病理学会大会（岡山市）

Wilisiani, F., Mashiko, T., Wang, W-Q., Alfyani, E. Sulandari, S., Hartono, S., Somowiyarjo, S., Nishigawa, H. and Natsuaki, T. (2016.3.21～23). First report of Tomato leaf curl New Delhi virus and Squash leaf curl China virus detected from melon in Indonesia. 平成 28 年度日本植物病理学会大会（岡山市）

益子嵩章・王 蔚芹・Sedyo Hartono・Gede Suastica・西川尚志・夏秋知英。(2016.3.21～23)。インドネシア産 Tomato infectious chlorosis virus のサイレンシングサプレッサーの探索。平成 28 年度日本植物病理学会大会（岡山市）

Fariha Wilisiani・夏秋知英。(2016.12.2)。インドネシアの野菜に激発するウイルス病。第 28 回栃木県病害虫研究会(宇都宮市)

阿部里海・夏秋知英。(2016.12.2)。インドネシアで分離された Bamboo mosaic virus。第 28 回栃木県病害虫研究会(宇都宮市)

Wilisiani, F., Morita, Y., Ayaka, O., Mashiko, T., Wang, W-Q., Hartono, S., Suzuki, T., Neriya, Y., Nishigawa, H. and Natsuaki, T. (2017.4.26～28)。The occurrence and molecular characterization of begomoviruses infecting eggplant and pepper plants in Indonesia. 平成 29 年度日本植物病理学会大会（盛岡市）

益子嵩章・王 蔚芹・西川尚志・夏秋知英。(2017.4.26～28) Tomato chlorosis virus がコードするタンパク質の機能解析。平成 29 年度日本植物病理学会大会（盛岡市）

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 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 0 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

夏秋知英 (TOMOHIDE NATSUAKI)  
宇都宮大学・農学部・教授  
研究者番号：10134264

### (2) 研究分担者

村井 保 (MURAI TAMOTU)  
宇都宮大学・農学部・名誉教授  
研究者番号：90284091

西川 尚志 (NISHIGAWA HISASHI)  
宇都宮大学・農学部・准教授  
研究者番号：60361614

### (3) 連携研究者

### (4) 研究協力者

Gede Suastica  
Bogor Agriculture University, Bogor,  
Indonesia

Sedyo Hartono  
Gadjah Mada University, Yogyakarta,  
Indonesia