

機関番号：21401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20580047

研究課題名（和文） トスポウウイルスの発生に媒介虫個体群が与える影響力

研究課題名（英文） Influence of vector population to occurrence of Tospovirus

研究代表者

藤 晋一 (FUJI SHIN-ICHI)

秋田県立大学 生物資源科学部 准教授

研究者番号：40315601

研究成果の概要（和文）： Iris yellow spot virus(IYSV)の媒介虫であるネギアザミウマの媒介特性において、アザミウマのハプロタイプとウイルス系統との間に関連は認められず、媒介特性の違いは、アザミウマ個体群の違いが最も大きく影響していることが明らかとなった。また、本ウイルスの未発生地域にも、媒介効率の高いアザミウマが広く分布していることも明らかとなった。IYSV の 2 つの系統(NL, BR)間での組み換えウイルスが発生する可能性を調査した結果、実験的には組み換えウイルスが作出可能であることが明らかとなった。

研究成果の概要（英文）： The relationships with Iris yellow spot virus (IYSV) and its vector species, *Thrips tabaci*, were investigated. The transmission efficiencies did not have closed relationship between haplotypes of the thrips and viral strain, but its difference depended on the population of thrips. Additionally, thrips population with high transmission efficiencies already inhabited in viral no invaded areas. In this study, its also demonstrated that two strains (NL an BR) classified from its genetic diversity, can be pseudorecombined under the experimentally condition.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
2009 年度	700,000	210,000	910,000
2010 年度	600,000	180,000	780,000
年度			
年度			
総計	2,900,000	870,000	3,770,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農学・植物病理学

キーワード：Iris yellow spot virus ネギアザミウマ トスポウウイルス シュードリコンビナント 個体群構造

1. 研究開始当初の背景

(1)1990 年以降、トスポウウイルスの世界的な流行は、施設園芸作物を中心に壊滅的な被害をもたらしている。本研究で対象とする Iris yellow spot virus (IYSV) はタマネギ、およびトルコギキョウで相次いで発生が確認されており、トルコギキョウではしばしば破壊的な被害が起こっている。

(2)IYSV は土着種であるネギアザミウマによって媒介され、種のボーダーラインに位置する 2 つの遺伝子型 (NL 型、BR 型) の存在が報告されている。日本では両遺伝子型が同一圃場に混在して発生しているが、九州では BR 型が優占しているのに対し、関東東海地域では NL 型が優占している。

(3)ネギアザミウマは国内に 5 つのハプロタイプ（遺伝子型）が存在することが報告されている。トスポウウイルスの媒介能力はアザミウマの個体群の違いによって大きく異なることが報告されており、IYSV でもその可能性は高い。

(4)2 つの遺伝子型アザミウマ媒介に大きく関与すると予想される、ウイルス外被膜の構造タンパク（Gn）に大きな違いを認めており、両遺伝子型の分布の違いが、アザミウマ個体群の違いと関連づけられる可能性が高い。

2. 研究の目的

(1) 本研究では全国から採集した IYSV とネギアザミウマについて、それぞれの遺伝子型を解析し、IYSV とアザミウマの個体群の分布が相互に密接な関係を持っているかどうかを明らかにする。

(2) IYSV 両遺伝子型を混合感染させることによってゲノム相同組み換えを起こした変異ウイルスを作出する。野外から分離された野生型ウイルス、および得られた変異ウイルスの伝搬能力について様々なアザミウマ個体群を用いて解析し、IYSV とアザミウマの個体群との組み合わせが媒介特性に与える影響、およびウイルスのゲノム変異が媒介虫適応の変化に与える影響を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 全国からアザミウマを収集し人工飼育により累代飼育を行う。また、収集アザミウマのミトコンドリア COI 領域の塩基配列を解析し、個体群の分類を行った。

(2) IYSV 発生地域より収集した罹病植物からウイルスを分離し、RT-PCR-RFLP 法ならびに塩基配列解析により、分離ウイルスの遺伝子型を判別した。

(3) 人工飼育したアザミウマ個体群とウイルス分離株の組み合わせを変えて、ウイルス媒介試験を行い、成虫時における媒介率の調査を行った。

(4) NL 型の CbAlsD1 株、長野株、BR 型の SgOniD1 株、秋田株を、様々な組み合わせ、混合比率でベンサミアーナタバコに接種した。上位葉に生じた病葉をキノアに汁液接種し、単病斑分離を 2-3 回行った。得られた単病斑からウイルス RNA を抽出後 RT-PCR により S 遺伝子中の N タンパク領域並びに M 遺伝子中の G タンパク領域を増幅した。増幅断片は、制限酵素処理を行い、それぞれのゲノム遺伝子が NL 型、BR 型由来かを判別し、NL、BR

間の組み換えウイルスの選抜を行った。

(5) 得られた組み換えウイルスについては、媒介効率の高いアザミウマ個体群を用いて、媒介試験を行った。

4. 研究成果

(1)

① 本研究で 9 県より採集した 32 個体群を用い、アザミウマ個体群を COI 遺伝子の配列に基づいて、ハプロタイプ分類を行った。その結果、産雌性生殖遺伝子型のハプロタイプ 12、13、14 が広く分布しており、採集した個体のうち、秋田県の 1 地域から採集されたもののみが、産雄性生殖遺伝子型のハプロタイプ 1、2、6、と未記載のハプロタイプから構成されていた。

② ハプロタイプと採集した地域での IYSV との間には関連性は全く認められなかった。

(2) 本研究において、新たに、長野県のタマネギ(2 分離株)、トルコギキョウ(1 分離株)、神奈川県のとろこぎキョウ(1 分離株)、秋田県のとろこぎキョウ、タマネギ(6 分離株)、香川県のタマネギ(2 分離株)を得た。これらの分離株について、RT-PCR-RFLP による遺伝子型の判別を行うとともに、その後の試験に供した分離株については N タンパク遺伝子領域、および G タンパク領域の塩基配列を決定した。その結果、長野県のとろこぎキョウ株（以下長野株）、神奈川県のとろこぎキョウ株（以下神奈川株）が NL 型、長野県のタマネギ株、香川県のタマネギ株（以下香川株 1、2）、秋田県のとろこぎキョウ株（5 分離株）、トルコギキョウ株（以下秋田株）が BR 型であった。以上の結果は、これまでと同様、両遺伝子型が混在して分布している地域があるものの、優占して分布しているウイルス株が異なることが明らかとなった。加えて、これまで九州、四国地域には BR 型が優先して、中部から東北地域にかけては NL 型が優占して分布していることが示唆されていたが、秋田県からは BR 型が分離されたことにより、この分布が地理的に発生地域を徐々に拡大しているのではないことが示唆された。

(3)

① アザミウマ個体群の媒介試験については、試験当初、ウイルス獲得植物として、既報のベンサミアーナタバコ葉を用いて行った。しかしながら、個体群によっては、ウイルス獲得吸汁時にアザミウマの死虫率が高く、本方法では十分な媒介試験が行えないことが示唆された。そこで、ウイルス獲得植物として、局部病斑植物であるキノア葉を用い、獲得吸汁時間を 48 時間とすることで、アザミウマ

が十分ウイルスを獲得可能であることが明らかとなった。

②上記試験方法を用い、はじめに NL 型 CbA1sD1 株をウイルス材料として、個体群の違いが媒介効率に及ぼす影響を調査した。その結果、IYSV が未発生地域から採集した、2 個体群の成虫媒介率が 20%以下であったが、未発生地域からも発生地域と同等の成虫の媒介率を示す個体群が見いだされた (図 1)。

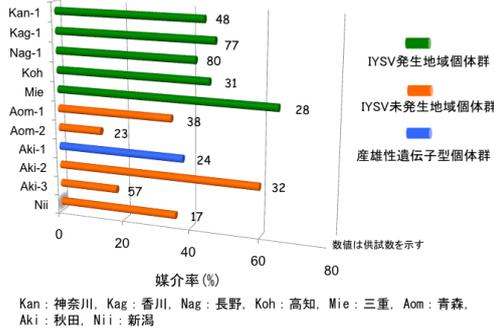


図1 アザミウマ個体群の違いが媒介率に与える影響

ハプロタイプと成虫の媒介率との間にも関連性は見いだされなかった。また、産雄性生殖遺伝子型の個体群も IYSV を媒介可能であることと、その媒介効率については、産雌生殖遺伝子型の個体と明らかな差は認められなかった。

以上の結果は、IYSV が発生していない地域には、IYSV の媒介効率が高い個体群が存在するものの、発生地域と同等の媒介率を示す個体群も存在していることから、今後、IYSV 未発生地域にウイルスが侵入した際には、これら個体群によって、ウイルスの蔓延が短期間で起こる可能性を示唆する結果となった。

③ウイルス系統の違いが媒介率に与える影響を明らかにするため、7 ウイルス系統を用いと産雄性生殖遺伝子型個体群を含む個体群との 17 個体群を用いて試験を行った。その結果、ウイルス系統とアザミウマ個体群との間における関連性は認められず、媒介効率はウイルス分離株と個体群との組み合わせの違いによって異なることが示唆された (図 2 ウイルス媒介試験に供した成虫の個体数が確保された、信頼性の高いデータのみ抜粋した)。

以上の結果から、各地域に分布するウイルス系統の優占が、分布するアザミウマ個体群の分布の違いによることが想定されたが、ウイルス系統とアザミウマ個体群の分布に関連性が無いことが示唆された。今回、アザミ

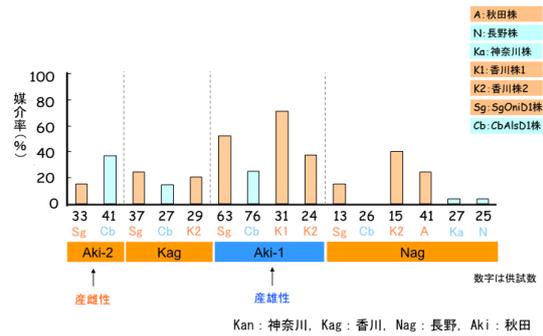


図2 ウイルス系統の違いが媒介率に与える影響

ウマ個体群分類は COI 遺伝子に基づいた分類を行った。ネギアザミウマ個体群の中には、合成ピレスロイドに対して抵抗性を持つ個体が近年増加している。今後、これら個体群の合成ピレスロイドに対する感受性を調査し、IYSV 媒介効率との関連性を調査する必要がある。また、今回は成虫媒介効率のみを対象に、媒介効率を調査した。研究期間中に、2 令幼虫でも高率に媒介可能であることが報告されたことから、これら個体群とウイルス系統との組み合わせにおいて、幼虫時での媒介効率についても調査していく必要があると考えられる。

(4)BR 型 SgOniD1 と NL 型 CbA1sD1 株の感染葉粗汁液を 1:2, 2:1, 1:2 の割合で混合接種した。いずれにおいても上位葉に病徴が進展したが、SgOniD1:CbA1sD1=2:1 株が最も早く (接種 10 日後)、1 日遅れて 1:1, さらに 2 日遅れて 1:2 が発病した。これら感染上位葉を用いて、キノア上での単病斑分離により、再分離株を得た。分離株について、S および M 遺伝子のゲノム型を RT-PCR-RFLP を用いて判別したが、いずれの株も SgOniD1 と同じゲノム型を示し、組み換え体は得られなかった。これは、SgOniD1 株の病原性が高いことと、1:2 の比率でも CbA1sD1 株が有意とならないことを示した。そこで、感染粗汁液の比率を 1:1~1:20 の割合で混合し、同様の方法でウイルスの再分離を行った。その結果、いずれの比率で混合感染させた場合も、単病斑分離当初は、S, M 遺伝子それぞれ両ゲノム型由来のゲノムを混在して保有するモザイク型が得られた。しかしながら、モザイク型の病斑を用いて、単病斑を繰り返すと S, M 遺伝子ともにいずれかの同一遺伝子型となり、組み換え体は容易には得られなかった。さらに、本実験を繰り返す行う中で、キノア上の病斑に通常の病斑よりも 1-2 日遅れて形成される病斑の存在が明らかとなった。そこで、これらの病斑を中心に解析を行った結果、その結果、BR 型 SgOniD1 株と NL 型 CbA1sD1 株、な

らびに BR 型秋田株と NL 型 CbAlsD1 株を 1:1 混合接種したものから、M 遺伝子が NL 型、S 遺伝子が BR 型、ならびに M 遺伝子が BR 型、S 遺伝子が NL 型の個体がそれぞれ、4 病斑、1 病斑から得ることができた (図 3)。

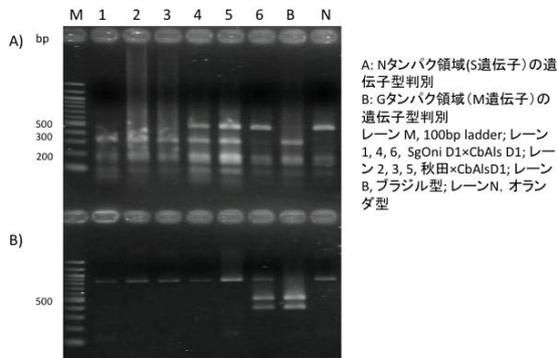


図3 RT-PCR-RFLPによる混合接種株から分離されたウイルス株の判別

そこで、組み換え個体が確認できた罹病葉粗汁液(M 遺伝子 NL 型・S 遺伝子 BR 型)をキノアに接種し、感染葉を用いてアザミウマによる媒介試験を行った。3 個体群 (高知、長野、神奈川) を供試した結果、いずれの個体群においても、接種吸汁植物のインパティエンスに典型的な病斑を形成した。媒介個体は、それぞれ 6/16、7/29、12/36 個体であった。これら個体により形成したインパティエンス葉の病斑を引き起こしたウイルス系統が、組み換え体であるかどうかを明らかにするため、RT-PCR-RFLP によるゲノム型判別を行った。その結果、M 遺伝子はいずれの個体も NL 型であったが、S 遺伝子は、BR 型、NL 型、モザイク型の 3 つのパターンが認められた (図 4)。

以上の結果は、単病斑分離によって得られた、組み換え型罹病葉には、NL 型の S 遺伝子が存在していることが示唆された。一方で、アザミウマの媒介試験により組み換え個体が得られたことから、組み換え個体がヌcleoキャプシドの状態ではなく、アザミウマ伝搬可能な、外被膜を持った成熟した粒子を形成していることが明らかとなった。

(5) 本研究において、トスポウウイルスの分類学上のボーダーラインである IYSV の 2 つの系統、NL 型と BR 型において、実験的に組み換え体を得られることが明らかとなった。野外での発生は確認されていないが、2 つの系統が同一圃場で混在している場合があることから、今後野外でも発生する可能性は、十分に考えられる。また、本ウイルスの 2 系統が種のボーダーライン上に位置していたが、組み換え体が生じることから、2 系統が

同一種として分類されることを、あらためて

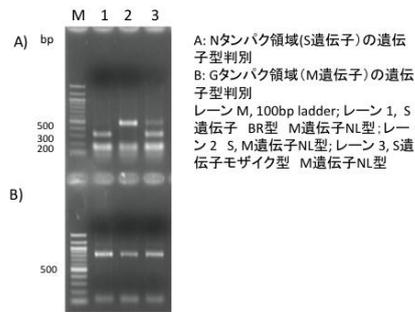


図4 アザミウマによって媒介されたウイルス株のRT-PCR-RFLPによる判別

支持する結果を得ることができた。今回得られた組み換えウイルスの病原性をはじめとした諸特性については、不明な点が多いため、今後さらなる解析が必要である。

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)

[学会発表] (計 2 件)

- ① 藤 晋一 ネギアザミウマのハプロタイプ並びに IYSV 発生の有無と成虫媒介効率との関連性 日本植物病理学会 2010 年 10 月 4 日 コラッセ福島 (福島市)
- ② 横山 咲 (藤 晋一) 秋田県に分布するネギアザミウマの個体群構造 北日本病害虫研究会 2010 年 2 月 17-18 日 戦災復興会館 (仙台市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤 晋一 (FUJI SHIN-ICHI)

秋田県立大学 生物資源科学部 准教授
研究者番号: 40315601

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし