

氏 名(本籍)	こ 今	た 辰	や 哉
学位の種類	博 士 (農 学)		
学位記番号	農 博 第 8 5 3 号		
学位授与年月日	平 成 1 8 年 3 月 2 4 日		
学位授与の要件	学位規則第 4 条第 1 項該当		
研究科専攻	農学研究科応用生命科学専攻 (博士課程)		
学位論文題目	トマト巻葉病の病原ベゴモウイルスの多様性とサテライ ト DNA の病原性に関する研究		
論文審査委員	(主 査)	教 授	池 上 正 人
	(副 査)	教 授	西 尾 剛
		教 授	前 忠 彦

論文内容要旨

緒言

植物 DNA ウイルスの一種であるジェミニウイルス科ペゴモウイルス属のウイルスは世界各地で農業上重要な作物に被害を与えている。ペゴモウイルスは 2 分節ゲノム型 (DNA-A, DNA-B)、単一ゲノム型 (DNA-A)、単一ゲノム/サテライト DNA 型 (DNA-A, DNA-β) に分けられる。サテライト DNAβ は単一ゲノム型ペゴモウイルスに附随し、病徴発現に関与しているが、遺伝的起源や病原性発現機構は不明である。世界各地のトマト栽培において発生するトマト巻葉病はペゴモウイルスによる重要病害の一つである。しかし、遺伝的に異なる単一ゲノム型ペゴモウイルスとサテライト DNAβ の複合体によって引き起こされるトマト巻葉病の病因についてはほとんど知られていない。従って、トマト巻葉病に関与する単一ゲノム型ペゴモウイルスとサテライト DNAβ の分子特性を明らかにすることは、ウイルス生態学、疫病学、病害防除の研究に有意義な情報を与えるものと思われる。

本研究では、インドネシアにおいて発生するトマト巻葉病株から 2 種類の単一ゲノム型ペゴモウイルス (*Tomato leaf curl Java virus*, ToLCJAV; *Ageratum yellow vein virus*-[Java], AYVV-[Java]) 及びサテライト DNAβ (DNAβ01, DNAβ02) を分離し、トマト巻葉病が単一ゲノム型ペゴモウイルスとサテライト DNAβ の複合体によって引き起こされ、サテライト DNAβ のコードする βC1 遺伝子が病徴発現と RNA サイレンシング抑制に関与することを明らかにした。さらに、トマト栽培地付近に自生する雑草の *Ageratum conyzoides* から ToLCJAV と AYVV-[Java] の間で遺伝的組換えによって生じたペゴモウイルスを分離し、トマト巻葉病の病態系について考察した。

第 1 章 トマト巻葉病株から分離されたペゴモウイルス、サテライト DNAβ、組換え DNA の分子特性

1-1: 2 種類の異なる単一ゲノム型ペゴモウイルスのゲノム構造及び分子系統解析

本章ではインドネシア、ジャワのトマト栽培に発生する巻葉病の病原ペゴモウイルスの分子特性を明らかにする目的で、トマト巻葉病株より分離されたペゴモウイルスとサテライト DNAβ の解析を行った。

トマト巻葉病株から抽出した全 DNA を鋳型に PCR クローニングにより塩基配列の異なる 2 種類のペゴモウイルス (Java virus-1, Java virus-2) が得られた。全塩基配列を決定したところ Java virus-1 は 2752 塩基、Java virus-2 は 2735 塩基からなっていた。Java virus-1 と Java virus-2 は共に単一ゲノム (DNA-A) からなり、6 つの ORF (V1, V2, C1, C2, C3, C4) と遺伝子間非翻訳領域にステム・ループ構造が確認された (Fig. 1-1)。ステム・ループ構

造近傍には C1 複製関連タンパク質(replication associated-protein: Rep)の結合部位と考えられる繰り返し配列(iteron) (Java virus-1, GGTCTCAA; Java virus-2; GGAGACA)が存在した。

Java virus-1 と Java virus-2 ゲノム DNA-A 成分の全塩基配列を基にした分子系統解析では、アジア地域で分離されたトマトや *A. conyzoides* 感染単一ゲノム型ペゴモウイルスグループに属することが示された(Fig. 1-2)。V1 外被タンパク質(coat protein: CP)のアミノ酸配列を基にした分子系統解析では、Java virus-1 はトマトから分離されたペゴモウイルスグループとクラスターを形成し、Java virus-2 は *A. conyzoides* から分離されたペゴモウイルスグループとクラスターを形成した(Fig. 1-3)。Java virus-1 の全塩基配列の比較では、既報の *Ageratum yellow vein virus* (AYVV)と 87%、Java virus-2 と 85%の相同性を示し、Java virus-2 は AYVV と 92%の高い相同性を示した。Java virus-1 の CP アミノ酸配列の比較では、AYVV、Java virus-2 と 87%の相同性を示し、Java virus-2 は AYVV と 97%の高い相同性を示した。DNA-A 成分の全塩基配列、CP のアミノ酸配列の相同性が 90%以上を同種とするペゴモウイルス分類・命名基準に従い、Java virus-1 を *Tomato leaf curl Java virus* (ToLCJAV)、Java virus-2 を *Ageratum yellow vein virus*-[Java] (AYVV-[Java])と命名した。

1-2: 2種類の異なるサテライト DNA β と組換え DNA の解析

ToLCJAV 及び AYVV-[Java]混合感染トマト株の全 DNA を鋳型に PCR クローニングにより塩基配列の異なる 2 種類のサテライト DNA β (DNA β 01, DNA β 02)が得られた。DNA β 01 は全長が 1346 塩基、DNA β 02 は全長が 1354 塩基からなっていた。DNA β 01 と DNA β 02 には 1 つの ORF (β C1)が存在し、ToLCJAV と AYVV-[Java]に類似したステム・ループ構造が確認された(Fig. 1-1)。また、DNA β 01 と DNA β 02 には 200 塩基程度のアデニンに富む領域(A-rich region, ~65% A)が存在し、ステム・ループ構造近傍には ToLCJAV と AYVV-[Java]に類似した iteron 様配列(GGTGTGTA, GGTAGAAA, GGAGAAG)が存在した。全塩基配列を基にした分子系統解析では、DNA β 01 と DNA β 02 は AYVV DNA β と同じクラスターを形成した(Fig. 1-4)。DNA β 01 と DNA β 02 全塩基配列の比較では、93%の高い相同性を示し、AYVV DNA β とはそれぞれ 81%の相同性を示した。DNA β 01 と DNA β 02 は ToLCJAV、AYVV-[Java]との相同性はなく、ペゴモウイルスゲノム DNA に由来する成分ではないことが考えられた。

トマト巻葉病株全 DNA を鋳型に PCR クローニングによりサテライト様 DNA が分離された。全塩基配列は 1299 塩基からなり、1 つの ORF (β C1)とステム・ループ構造が確認された(Fig. 1-1)。また、ステム・ループ構造近傍には AYVV-[Java]と同じ iteron (GGAGACA)が存在した。サテライト様 DNA について、遺伝学的組換え解析を行ったところ、ToLCJAV では nt. 77-1213 ($P=2.580 \times 10^{-5}$)と nt. 190-216 ($P=3.670 \times 10^{-4}$)、AYVV-[Java]では nt. 1155-39 ($P=2.870 \times 10^{-13}$)、DNA β 01 では nt. 367-883 ($P=9.981 \times 10^{-5}$)、DNA β 02 では nt. 450-1110 ($P=$

4.210x10⁹)の領域で遺伝的組換えが生じていた(Fig. 1-5)。従って、サテライト様 DNA は 4 種の成分に由来する組換え DNA (recombinant DNA: recDNA)であることが明らかになった。

第 2 章 サテライト DNA β の病原性と宿主応答解析

2-1: ペゴモウイルス、サテライト DNA β 、組換え DNA によるトマト巻葉病の誘導

本章では、トマト巻葉病を引き起こす原因となるペゴモウイルスとサテライト DNA β の感染性及び病徴誘導について検討した。

ToLCJAV、AYVV-[Java]、DNA β 01、DNA β 02、recDNA の感染性クローンをバイナリーベクターに構築した(Fig. 2-1)。感染性クローンは *Agrobacterium tumefaciens* を介して、トマト(*Lycopersicon esculentum* cv. Hausumomotaro)に接種した。ToLCJAV、AYVV-[Java]の接種区ではウイルスが全身感染したが無病徴であった(Fig. 2-2)。ToLCJAV/DNA β 01、AYVV-[Java]/DNA β 01の接種区では軽い巻葉症状が見られ、ウイルスゲノム DNA、DNA β が共に検出された(Fig. 2-2)。ToLCJAV/DNA β 02、AYVV-[Java]/DNA β 02の接種区では、自然感染株と同様の巻葉症状が見られ、ウイルスゲノム DNA、DNA β が共に検出された(Fig. 2-2)。ToLCJAV/Rec、AYVV-[Java]/Recの接種区では、無病徴であり、AYVV-[Java]の存在下のみで recDNA が検出された(Fig. 2-2)。ToLCJAV/AYVV-[Java]/DNA β 01/DNA β 02/recDNA 接種区では、ToLCJAV/DNA β 02、AYVV-[Java]/DNA β 02の接種区と同様の巻葉症状が見られた(Fig. 2-2)。

DNA β にはヘルパーウイルスゲノム DNA に特異的な iteron が存在しないが、DNA β 01 及び DNA β 02 は共に異なる種のペゴモウイルスでも複製した。ペゴモウイルスの iteron の塩基数、配列はウイルスに特異的であるが、iteron 中に共通して保存される GGA または GGT の 3 塩基が、Rep タンパク質の結合に重要である。ToLCJAV の iteron (GGTCTCAA) と AYVV-[Java]の iteron (GGAGACA) と DNA β の 3 つの iteron 様配列 (GGTGTGTA, GGTAGAAA, GGAGAAG)には共に GGT または GGA の保存配列が存在する。DNA β の複製においては Rep タンパク質が iteron 様配列の全ての塩基を認識するのではなく、特定の塩基配列を認識し、結合が起ると考えられる。

2-2: サテライト DNA β のコードする β C1 遺伝子の機能解析

トマト巻葉病が ToLCJAV/DNA β 02 または AYVV-[Java]/DNA β 02 の複合体によって引き起こされ、DNA β 02 が病徴誘導に重要であることが明らかになった。そこで DNA β 02 のコードする β C1 遺伝子の機能解析及び病原性について検討した。

$\beta C1$ 遺伝子の開始コドンに frame-shift 変異を導入した感染性クローン (ToLCJAV/DNA $\beta 02m\beta C1$, AYVV-[Java]/DNA $\beta 02m\beta C1$) を構築し、*Nicotiana benthamiana* へ接種を行った。ToLCJAV 接種区では軽い下巻の巻葉症状、ToLCJAV/DNA $\beta 02$ 接種区では激しい下巻の巻葉症状が現れた (Fig. 2-3)。ToLCJAV/DNA $\beta 02m\beta C1$ 接種区においては、ToLCJAV 接種区と同様に軽い下巻の巻葉症状が現れた (Fig. 2-3)。AYVV-[Java] 接種区では激しい上巻の巻葉症状、AYVV-[Java]/DNA $\beta 02$ 接種区では激しい下巻の巻葉症状が現れた (Fig. 2-3)。AYVV-[Java]/DNA $\beta 02m\beta C1$ 接種区においては、AYVV-[Java] 接種区と同様に激しい上巻の巻葉症状が現れた (Fig. 2-3)。

Potato virus X (PVX) ベクターにより *N. benthamiana* 中で $\beta C1$ 遺伝子を発現させたところ、ヘルパーウイルスが存在しなくても、ToLCJAV/DNA $\beta 02$ 、AYVV-[Java]/DNA $\beta 02$ 感染 *N. benthamiana* と同様なウイルス様病徴を示した (Fig. 2-4)。多くの植物ウイルスの病原性遺伝子が RNA サイレンシングの抑制因子 (サプレッサー) として機能することが知られている。そこで、GFP を発現する *N. benthamiana* line 16c に PVX ベクターを用いて、GFP 遺伝子と $\beta C1$ 遺伝子を共発現させたところ、RNA サイレンシングの抑制活性が認められた (Fig. 2-5)。以上の結果から、 $\beta C1$ 遺伝子は宿主植物での病徴発現と病徴の進展に必要な遺伝子であり、さらに RNA サイレンシングのサプレッサーとして機能することが明らかになった。

第3章 葉脈黄化症状を示す *Ageratum conyzoides* から分離されたペゴモウイルス、サテライト DNA β の分子特性

トマト巻葉病発生地付近にはペゴモウイルスの感染により葉脈黄化症状を示す *A. conyzoides* が自生し、トマト巻葉病の伝染源となる可能性が示唆されている。本章では、葉脈黄化症状を示す *A. conyzoides* より分離されたペゴモウイルスの分子特性とトマト巻葉病との関連性について検討した。

葉脈黄化症状を示す *A. conyzoides* から抽出した全 DNA を鋳型に PCR クローニングによりペゴモウイルス (Java virus-3) を分離した。Java virus-3 は単一ゲノム (DNA-A) で全長が 2747 塩基からなっていた。Java virus-3 には 6 つの ORF (V1, V2, C1, C2, C3, C4)、ステム・ループ構造、iteron (GGAGACA) が存在した (Fig. 3-1)。Java virus-3 ゲノム DNA-A 成分の全塩基配列を基にした分子系統解析では、アジア地域のトマトや *A. conyzoides* から分離された単一ゲノム型ペゴモウイルスグループに属し、ToLCJAV と同じクラスターを形成した (Fig. 3-2)。Java virus-3 ゲノム DNA-A 成分の全塩基配列の比較では、ToLCJAV と 91%、AYVV-[Java] と 89% の相同性を示し、CP のアミノ酸配列の比較では、ToLCJAV と 98%、AYVV-[Java] と 87% の相同性を示した (Table 3-1)。遺伝学的組換え解析を行ったところ、Java virus-3 ゲノム DNA の nt. 2389-2692 領域は ToLCJAV の ORF C1, C4、遺伝

子間非翻訳領域の 5'末端側が AYVV-[Java]との間で遺伝的組換え(3.739×10^{-10})が生じていることが明らかになった(Fig. 3-3)。従って、Java virus-3 を *Tomato leaf curl Java virus-[Ageratum]* (ToLCJAV-[Ageratum])と命名した。

ToLCJAV-[Ageratum]感染 *A. conyzoides* よりサテライト DNA β (DNA β 03)を分離した。DNA β 03 の全長は 1360 塩基からなり、1つの ORF (β C1)、ステム・ループ構造、A-rich region、iteron 様配列 (GGTGTGTA, GGTAGAAA, GGAGAAG) が存在した (Fig. 3-1)。DNA β 03 の全塩基配列を基にした分子系統解析では、ToLCJAV/AYVV-[Java] DNA β 01 及び DNA β 02 を含む AYVV DNA β とクラスターを形成した(Fig. 3-4)。DNA β 03 の全塩基配列の比較では、ToLCJAV/AYVV-[Java] DNA β 01 及び DNA β 02 とそれぞれ 94%、87%の高い相同性を示した。

摘要

1. インドネシアにおいて巻葉症状を示すトマトから ToLCJAV、AYVV-[Java]、DNA β 01、DNA β 02、recDNA を分離した。ToLCJAV、AYVV-[Java]は単一ゲノムからなり、DNA β 01 は病徴の進展に関与せず、DNA β 02 は ToLCJAV または AYVV-[Java] の存在下でトマトに巻葉症状を誘導した。遺伝学的組換え解析から recDNA は ToLCJAV、AYVV-[Java]、DNA β 01、DNA β 02 の 4 種の DNA 成分に由来する組換え DNA であり、AYVV-[Java] の存在下でのみ複製した。
2. DNA β 02 のコードする β C1 遺伝子は変異解析から、病徴発現に関与していることが明らかになった。 β C1 遺伝子はヘルパーウイルスが存在しなくとも宿主植物にウイルス様病徴を誘導し、さらに RNA サイレンシングの抑制活性が認められた。
3. 葉脈黄化症状を示す *A. conyzoides* から分離された ToLCJAV-[Ageratum]は、ToLCJAV と AYVV-[Java]のゲノム DNA 成分に由来し、異なる 2 種類のベゴモウイルスの混合感染により新種のベゴモウイルスが生じることが示唆された。

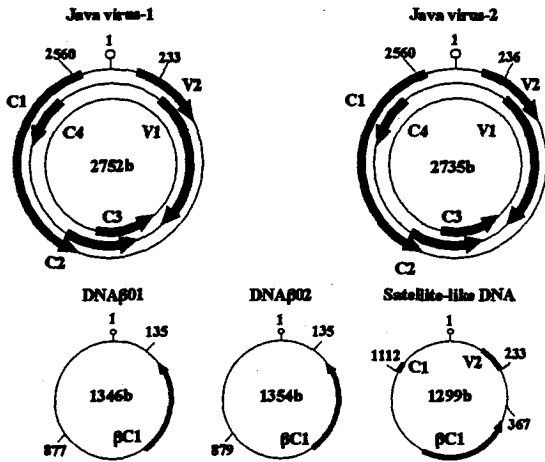


Fig. 1-1. The genome organizations of Java virus-1, Java virus-2, DNA β 01 (DNA β 01 and DNA β 02), and satellite-like DNA. The open circles indicate the stem loop-forming region containing the conserved nonanucleotide TAATATT⁺AC. Nucleotide numbering starts from the nick site (\downarrow) within the conserved nonanucleotide. The arrows represent predicted ORFs in both orientations ('C' for complementary and 'V' for viral sense) and potentially encoded proteins are shown as black arrows. The region of satellite-like DNA from nt. 1112-233 originates from Java virus-1 (nt. 2560-233) and Java virus-2 (nt. 2560-236) genomic DNAs. The sequences of the satellite-like DNA (nt. 367-1112), DNA β 01 (nt. 135-877) and DNA β 02 (nt. 135-879) have high sequence identity.

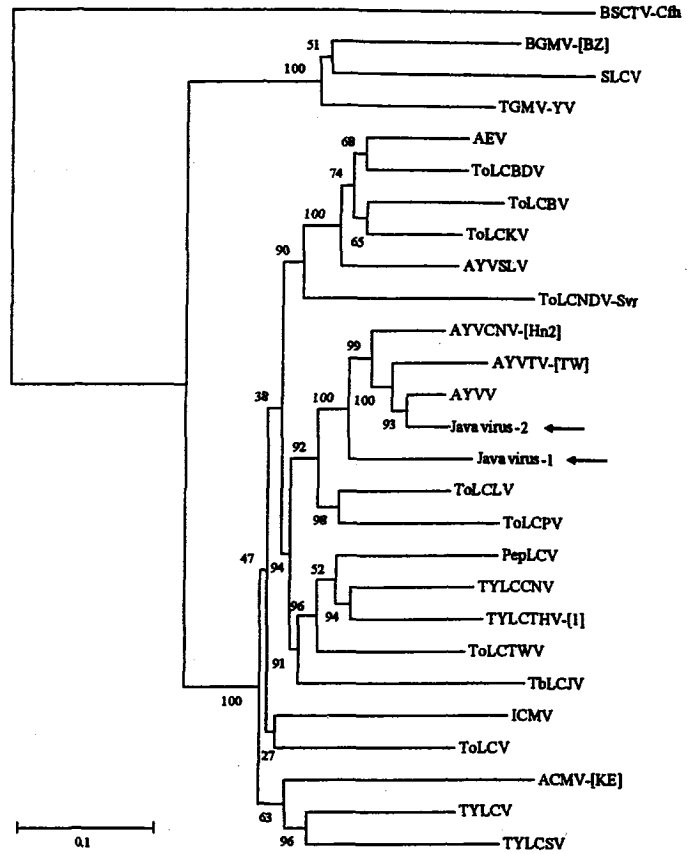


Fig. 1-2. Neighbor-joining phylogenetic tree obtained from the complete nucleotide sequences of Java virus-1, Java virus-2, and other begomovirus DNA-A components. The vertical distances are arbitrary and the horizontal distances are proportional to the calculated mutation distances. The tree was rooted on the sequence of *Beet severe curly top virus-Cfh* (BSCTV-Cfh; accession no. U02311), belonging to the distinct genus *Curtovirus*. The following sequences were obtained from GenBank and used for comparisons and phylogenetic analysis: *African cassava mosaic virus-Kenya virus* (ACMV-[KE]: J02057, DNA-A), *Ageratum enation virus* (AEV: AJ437618), *Ageratum yellow vein China virus-[Hainan 2]* (AYVCNV-[Hn2]: AJ495813), *Ageratum yellow vein Sri Lanka virus* (AYVSLV: AF314144), *Ageratum yellow vein Taiwan virus-[Taiwan]* (AYVTV-[TW]: AF307861), *Ageratum yellow vein virus* (AYVV: X74516), *Bean golden mosaic virus-[Brazil]* (BGMV-[BZ]: M88686, DNA-A), *Indian cassava mosaic virus* (ICMV: Z24758, DNA-A), *Pepper leaf curl virus* (PepLCV: AF134484), *Squash leaf curl virus* (SLCV: M38182, DNA-A), *Tobacco leaf curl Japan virus* (TbLCJV: AB028604), *Tomato golden mosaic virus-Yellow vein* (TGMV-YV: K02029, DNA-A), *Tomato leaf curl Bangalore virus* (ToLCBV: Z48182), *Tomato leaf curl Bangladesh virus* (ToLCBDV: AF188481), *Tomato leaf curl Karnataka virus* (ToLCKV: U38239), *Tomato leaf curl Laos virus* (ToLCLV: AF195482), *Tomato leaf curl New Delhi virus-Severe* (ToLCNDV-Svr: U15015, DNA-A), *Tomato leaf curl Philippines virus* (ToLCPV: AB050597), *Tomato leaf curl Taiwan virus* (ToLCTWV: U88692), *Tomato leaf curl virus* (ToLCV: S53251), *Tomato yellow leaf curl China virus* (TYLCCNV: AF311734), *Tomato yellow leaf curl Sardinia virus* (TYLCSV: X61153), *Tomato yellow leaf curl Thailand virus-[1]* (TYLCTHV-[1]: X63015, DNA-A), *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV: X15656).

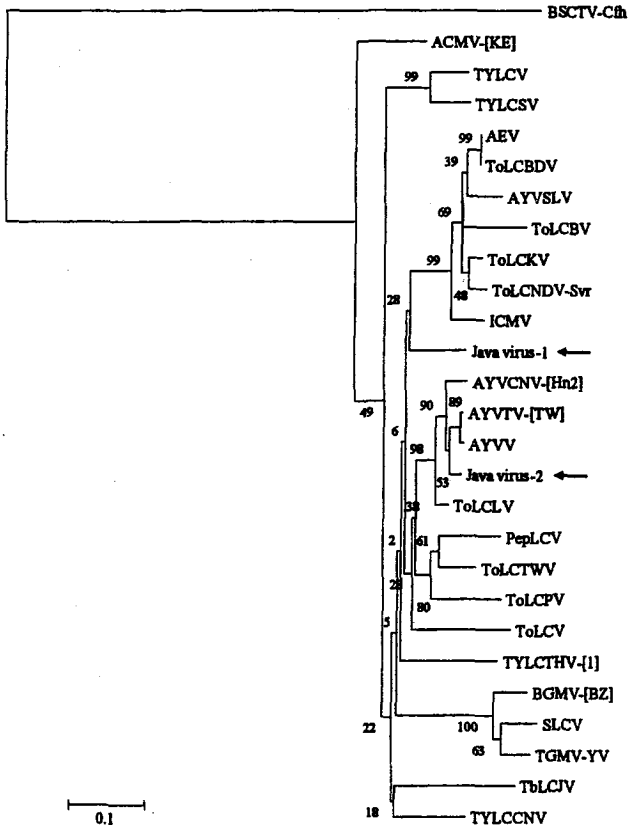


Fig. 1-3. Neighbor-joining phylogenetic tree obtained from the amino acid sequences of the coat proteins of Java virus-1, Java virus-2, and other begomoviruses. The vertical distances are arbitrary and the horizontal distances are proportional to the calculated mutation distances.

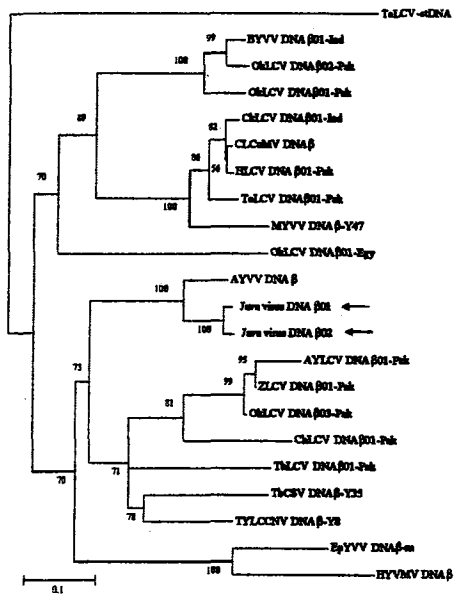
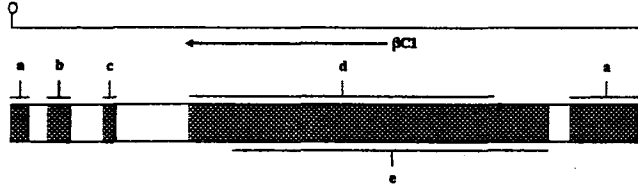


Fig. 1-4. Neighbor-joining phylogenetic tree obtained for DNA β 01, DNA β 02, and other begomovirus DNA β molecules. The tree was rooted on the sequence of *Tomato leaf curl virus* satellite DNA (ToLCV-stDNA: accession no. U74627), a distinct sequence in the DNA β of other begomoviruses. The vertical distances are arbitrary and the horizontal distances are proportional to the calculated mutation distances. The following sequences were obtained from the GenBank or EMBL databases and used for comparisons and phylogenetic analysis: *Ageratum yellow leaf curl virus* DNA β 01-Pakistan (AYLCV DNA β 01-Pak: AJ316026), AYVV DNA β (AJ252072), *Bhendi yellow vein mosaic virus* DNA β (BYVMV DNA β : AJ308425), *Chili leaf curl virus* DNA β 01-Pak (ChLCV DNA β 01-Pak: AJ316032), *Cotton leaf curl Multan virus* DNA β (CLCuMV DNA β : AJ292769), *Cotton leaf curl virus* DNA β 01-India (CLCuV β 01-Ind: AJ316038), *Eupatorium yellow vein virus* DNA β (EpYVV DNA β -m: AJ438938), *Hibiscus leaf curl virus* DNA β 01-Pakistan (HLCV DNA β 01-Pak: AJ297908), *Honeysuckle yellow vein virus* DNA β (HYVMV DNA β : AJ316040), *Malvastrum yellow vein virus* DNA β (MYVV DNA β -Y47: AJ421482), *Okra leaf curl virus* DNA β 01-Egypt (OkLCV DNA β 01-Egy: AF397217), *Okra leaf curl virus* DNA β 01-Pakistan (OkLCV DNA β 01-Pak: AJ316029), *Okra leaf curl virus* DNA β 02-Pakistan (OkLCV DNA β 02-Pak: AJ316030), *Okra leaf curl virus* DNA β 03-Pakistan (OkLCV DNA β 03-Pak: AJ316031), *Tobacco curly shoot virus-Y35* DNA β (TbCSV DNA β -Y35: AJ421484), *Tobacco leaf curl virus* DNA β 01-Pakistan (TbLCV DNA β 01-Pakistan: AJ316033), *Tomato leaf curl virus* DNA β 01-Pakistan (ToLCV DNA β 01-Pak: AJ316035), *Tomato yellow leaf curl China virus* DNA β -Y8 (AJ421622), *Zinnia leaf curl virus* DNA β 01-Pakistan (ZLCV DNA β 01-Pak: AJ316041).

RecDNA

1/1299b



Event	Region	Origin	P-value
a	nt. 1153-39	AYVV-[Java] (nt. 2633-63)	2.870×10^{-19}
b	nt. 77-123	ToLCJAV (nt. 81-129)	2.580×10^{-6}
c	nt. 190-216	ToLCJAV (nt. 218-246)	3.670×10^{-4}
d	nt. 367-883	DNA β 01 (nt. 135-650)	9.981×10^{-6}
e	nt. 450-1110	DNA β 02 (nt. 219-879)	4.210×10^{-6}

Fig. 1-5. A schematic representation of the recombinant regions in recDNA. Potential recombination break points and the probability (P) that the indicated regions do not have a recombination origin are presented. The shading patterns indicate the viral genomic DNA or satellite DNA origins of the recombinant region. The open circle indicates the stem loop-forming region. The β C1 ORF is indicated with an arrow.

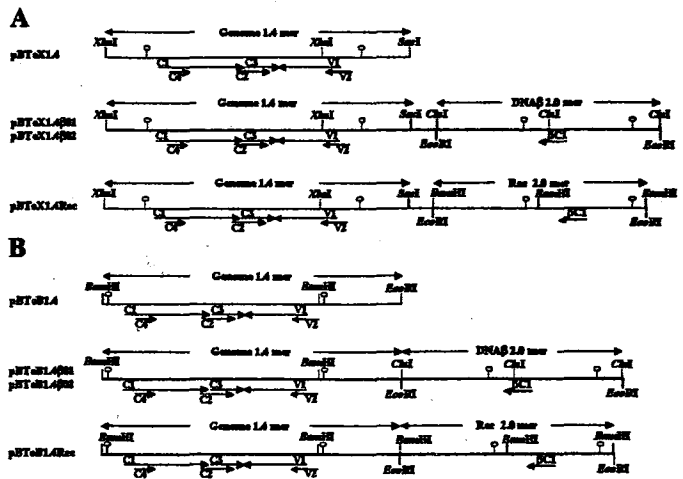


Fig. 2-1. Construction of infectious clones of ToLCJAV, AYVV-[Java], DNA β s (DNA β 01 and DNA β 02), and recDNA. The open circles indicate the stem loop-forming region. The arrows represent predicted ORFs in both orientations ('C' for complementary and 'V' for viral sense). The restriction sites used for cloning are shown: (A) *Xba*I (nt. 528) and *Sac*I (nt. 2144) on ToLCJAV genome DNA, *Clal* (nt. 314) on DNA β 01 and 02, and *Bam*HI (nt. 136) on recDNA, (B) *Bam*HI (nt. 139) and *Eco*RI (nt. 1783) on AYVV-[Java] genome DNA, *Clal* (nt. 314) on DNA β 01 and 02, and *Bam*HI (nt. 136) on recDNA.



Fig. 2-2. Tomato plants inoculated with (a) mock-agroinoculation, (b) ToLCJAV alone, (c) AYVV-[Java] alone, (d) DNA β 01 alone, (e) ToLCJAV + DNA β 01, (f) AYVV-[Java] + DNA β 01, (g) DNA β 02 alone, (h) ToLCJAV + DNA β 02, (i) AYVV-[Java] + DNA β 02, (j) recDNA alone, (k) ToLCJAV + recDNA, (l) AYVV-[Java] + recDNA, (m) ToLCJAV + AYVV-[Java] + DNA β 01 + DNA β 02 + recDNA. The plants were photographed 25 days postinoculation.

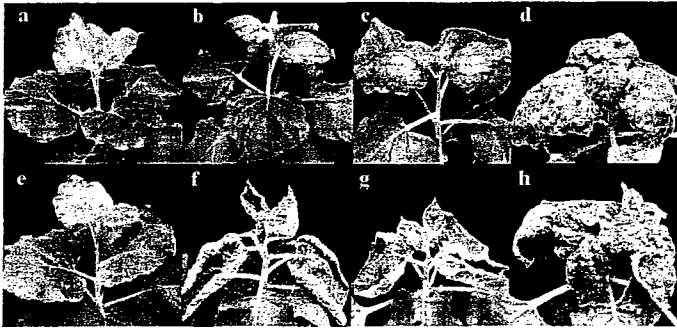


Fig. 2-3. *Nicotiana benthamiana* plants that were mock-agroinoculated (a), or agroinoculated with ToLCJAV alone (b), ToLCJAV with DNAβ02mβC1 (c), ToLCJAV with DNAβ02 (d), DNAβ02 alone (e), AYVV-[Java] alone (f), AYVV-[Java] with DNAβ02mβC1 (g), or AYVV-[Java] with DNAβ02 (h). Plants were photographed 21 days post-inoculation (dpi).

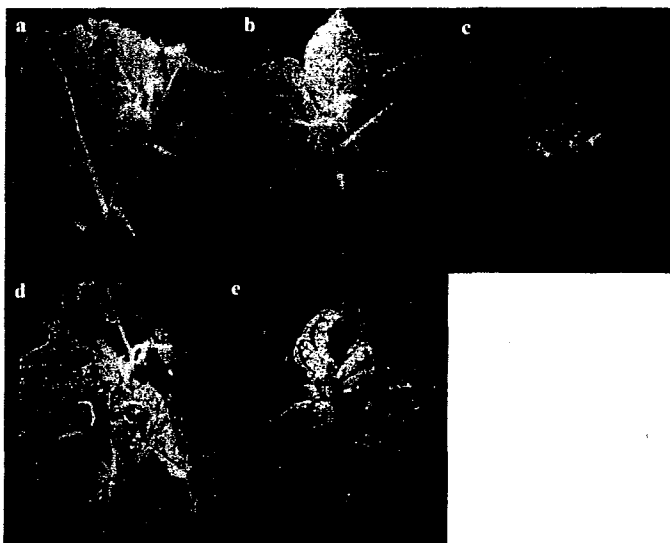


Fig. 2-4. Suppression of PTGS by βC1 protein. *N. benthamiana* line 16c plants expressing GFP and mock-inoculated (a), or inoculated with PVX alone (b), PVX-GFP (c), PVX-GFP/PVX-βC1 (d), or PVX-GFP/PVX-mβC1 (e). Plants were photographed under long-wavelength UV lamp through a yellow filter at 21 dpi.

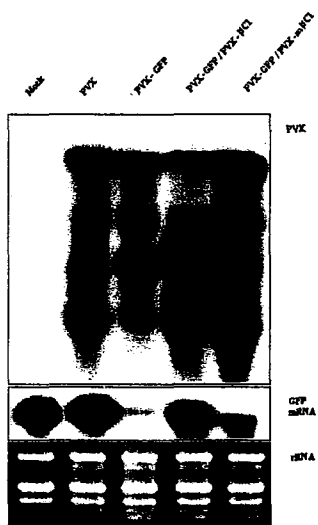


Fig. 2-5. Analysis of virally infected plants using Northern blot hybridization. Total plant RNA was extracted from *N. benthamiana* line 16c plants at 21 dpi, separated on a 1.2% agarose gel, and hybridized with cloned PVX and GFP-gene-specific DIG-labeled probes. The rRNA band following ethidium bromide staining indicates the relative quantities of RNA analyzed.

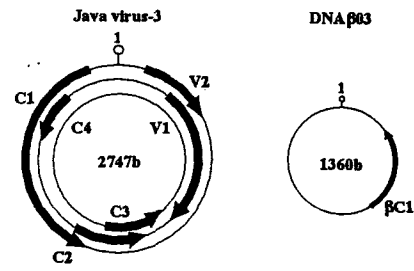


Fig. 3-1. The genome organizations of Java virus-3, and DNAβ03. The open circles indicate the stem loop-forming region containing the conserved nonanucleotide TAATATTAC. Nucleotide numbering starts from the nick site (↓) within the conserved nonanucleotide. The arrows represent predicted ORFs in both orientations ('C' for complementary and 'V' for viral sense) and potentially encoded proteins are shown as black arrows.

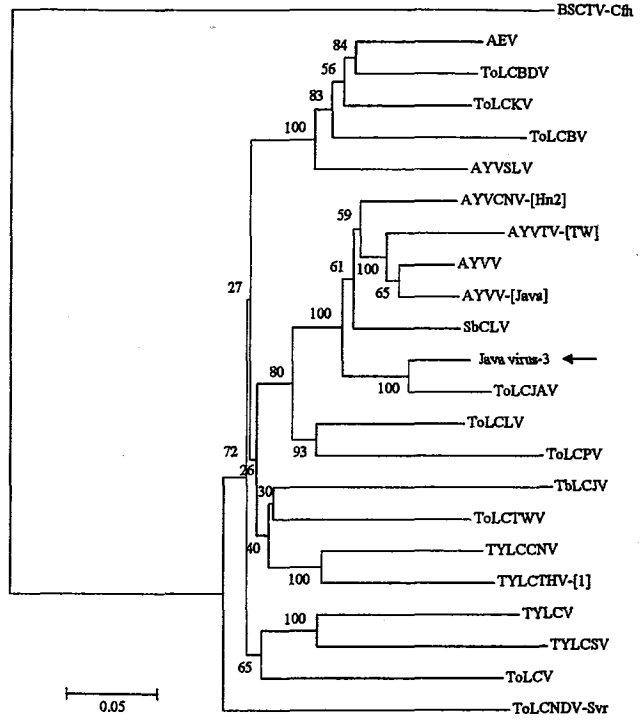


Fig. 3-2. Neighbor-joining phylogenetic tree obtained from the complete nucleotide sequences of Java virus-3, and other begomovirus DNA-A components. The vertical distances are arbitrary and the horizontal distances are proportional to the calculated mutation distances. The tree was rooted on the sequence of *Beet severe curly top virus-Cfh* (BSCTV-Cfh; accession no. U02311), belonging to the distinct genus *Curtovirus*. The following sequences were obtained from GenBank and used for comparisons and phylogenetic analysis: *Ageratum enation virus* (AEV: AJ437618), *Ageratum yellow vein China virus* [Hainan 2] (AYVCNV-[Hn2]: AJ495813), *Ageratum yellow vein Sri Lanka virus* (AYVSLV: AF314144), *Ageratum yellow vein Taiwan virus* [Taiwan] (AYVTV-[TW]: AF307861), *Ageratum yellow vein virus* (AYVV: X74516), *Ageratum yellow vein virus* [Java] (AYVV-[Java]: AB100305), *Soybean crinkle leaf virus* (SbCLV: AB050781), *Tobacco leaf curl Japan virus* (TbLCJV: AB028604), *Tomato leaf curl Bangalore virus* (ToLCBV: Z48182), *Tomato leaf curl Bangladesh virus* (ToLCBDV: AF188481), *Tomato leaf curl Java virus* (ToLCJAV: AB100304), *Tomato leaf curl Karnataka virus* (ToLCKV: U38239), *Tomato leaf curl Laos virus* (ToLCLV: AF195482), *Tomato leaf curl New Delhi virus* [Severe] (ToLCNDV-Svr: U15015, DNA-A), *Tomato leaf curl Philippines virus* (ToLCPV: AB050597), *Tomato leaf curl Taiwan virus* (ToLCTWV: U88692), *Tomato leaf curl virus* (ToLCV: S53251), *Tomato yellow leaf curl China virus* (TYLCCNV: AF311734), *Tomato yellow leaf curl Sardinia virus* (TYLCSV: X61153), *Tomato yellow leaf curl Thailand virus* [1] (TYLCTHV-[1]: X63015, DNA-A), *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV: X15656).

Table 3-1. Nucleotide and amino acid sequence identities (%) between Java virus-3 and other begomoviruses

Virus	Total	IR	LIR	RIR	V1	V2	C1	C2	C3	C4
	nt	nt	nt	nt	aa	aa	aa	aa	aa	aa
AEV	77	68	68	67	82	74	84	62	63	64
AYVCNV-[Hn2]	83	74	72	76	86	76	84	90	92	42
AYVSLV	78	69	69	70	82	71	83	63	70	47
AYVTV-[TW]	84	78	68	88	88	90	76	91	93	47
AYVV	88	78	69	90	87	91	93	91	94	88
AYVV-[Java]	89	84	82	78	87	90	<u>95</u>	88	94	<u>91</u>
SbLCV	86	<u>73</u>	<u>72</u>	74	86	94	84	88	88	88
TbLCV	75	67	74	60	73	68	82	61	62	58
ToLCBDV	78	71	74	68	82	76	80	64	70	51
ToLCBV	75	70	70	70	76	65	78	63	64	50
ToLCJAV	<u>91</u>	<u>84</u>	<u>75</u>	<u>96</u>	<u>98</u>	<u>97</u>	<u>89</u>	<u>94</u>	<u>96</u>	67
ToLCKV	78	71	70	72	83	76	79	63	66	49
ToLCLV	82	79	75	84	87	68	91	75	69	78
ToLCNDVsvr	74	65	64	60	81	62	79	49	62	42
ToLCPV	77	60	61	59	77	53	87	68	69	67
ToLCTWV	78	67	63	71	82	69	81	72	70	49
ToLCV	77	65	65	65	80	60	85	65	67	72
TYLCCNV	77	74	71	77	82	70	79	69	69	45
TYLCSV	76	65	66	63	77	70	80	60	60	72
TYLCTHV-[1]	76	72	71	74	78	69	78	71	70	46
TYLCV	75	66	67	65	77	70	81	59	64	78

Nt; nucleotide, aa; amino acid.
 IR; intergenic region, LIR; left intergenic region, RIR; right intergenic region.
 Highest values are in bold and underlined.

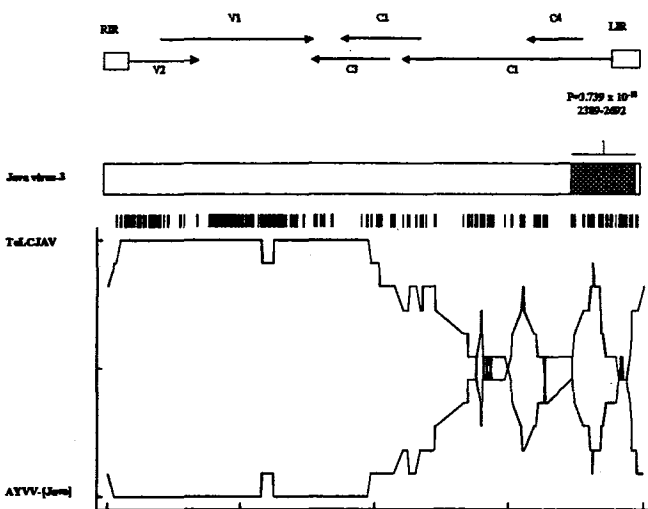


Fig. 3-3. A schematic representation of the recombinant regions in Java virus-3. Potential recombination break points and the probability (P) that the indicated regions do not have a recombination origin are presented. The shading patterns indicate the viral genomic DNA of the recombinant region. The open circle indicates the stem loop-forming region.

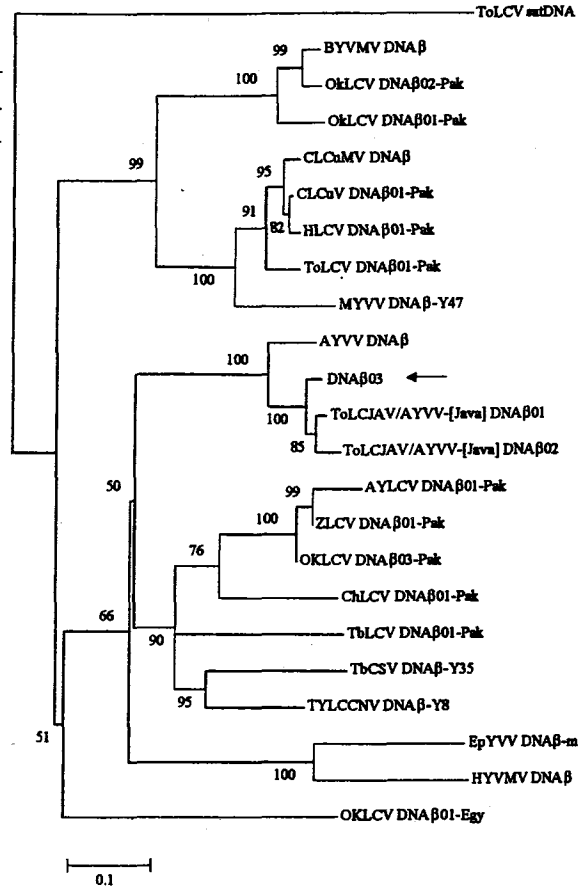


Fig. 3-4. Neighbor-joining phylogenetic tree obtained for DNAβ3, and other begomovirus DNAβ molecules. The tree was rooted on the sequence of Tomato leaf curl virus satellite DNA (ToLCV-satDNA: accession no. U74627), a distinct sequence in the DNAβ of other begomoviruses. The vertical distances are arbitrary and the horizontal distances are proportional to the calculated mutation distances. The following sequences were obtained from the GenBank or EMBL databases and used for comparisons and phylogenetic analysis: *Ageratum yellow leaf curl virus* DNAβ01-Pakistan (AYLCV DNAβ01-Pak: AJ316026), *AYVV* DNAβ (AJ252072), *Bhendi yellow vein mosaic virus* DNAβ (BYVMV DNAβ: AJ308425), *Chili leaf curl virus* DNAβ01-Pak (ChLCV DNAβ01-Pak: AJ316032), *Cotton leaf curl Multan virus* DNAβ (CLCuMV DNAβ: AJ292769), *Cotton leaf curl virus* DNAβ01-India (CLCuVβ01-Ind: AJ316038), *Eupatorium yellow vein virus* DNAβ (EpYVV DNAβ-m: AJ438938), *Hibiscus leaf curl virus* DNAβ01-Pakistan (HLCV DNAβ01-Pak: AJ297908), *Honeysuckle yellow vein virus* DNAβ (HYVMV DNAβ: AJ316040), *Malvastrum yellow vein virus* DNAβ (MYVV DNAβ-Y47: AJ421482), *Okra leaf curl virus* DNAβ01-Egypt (OkLCV DNAβ01-Egy: AF397217), *Okra leaf curl virus* DNAβ01-Pakistan (OkLCV DNAβ01-Pak: AJ316029), *Okra leaf curl virus* DNAβ02-Pakistan (OkLCV DNAβ02-Pak: AJ316030), *Okra leaf curl virus* DNAβ03-Pakistan (OkLCV DNAβ03-Pak: AJ316031), *Tobacco curly shoot virus-Y35* DNAβ (TbCSV DNAβ-Y35: AJ421484), *Tobacco leaf curl virus* DNAβ01-Pakistan (TbLCV DNAβ01-Pakistan: AJ316033), *ToLCJAV/AYVV-[Java]* DNAβ01 and DNAβ02 (AB100306 and AB113651), *Tomato leaf curl virus* DNAβ01-Pakistan (ToLCV DNAβ01-Pak: AJ316035), *TYLCCNV* DNAβ-Y8 (AJ421622), and *Zinnia leaf curl virus* DNAβ01-Pakistan (ZLCV DNAβ01-Pak: AJ316041).

論文審査結果要旨

ベゴモウイルス（環状一本鎖 DNA ウイルス）による重要病害の一つであるトマト巻葉病は、世界各地のトマト栽培地域において発生し、深刻な被害を与えている。本研究ではトマト巻葉罹病株から病原ベゴモウイルスとサテライト DNA を単離してそれらの分子特性を解析し、トマト巻葉病の病因を明らかにした。

インドネシアにおいて採取したトマト巻葉病株より 2 種類の単一ゲノム型ベゴモウイルス (virus-1, virus-2), サテライト DNA β (DNA β 01, DNA β 02) 及びサテライト様 DNA を分離した。全塩基配列に基づいた分子系統解析から virus-1 は新種のベゴモウイルス (*Tomato leaf curl Java virus*, ToLCJAV) であり, virus-2 は *Ageratum yellow vein virus* (AYVV) の一系統であることから *Ageratum yellow vein virus*- [Java] (AYVV- [Java]) と命名した。サテライト様 DNA は遺伝学的解析から ToLCJAV, AYVV- [Java], DNA β 01, DNA β 02 の 4 種類に由来する組換え DNA (recombinant DNA : recDNA) であることが明らかになった。

ToLCJAV, AYVV- [Java], DNA β 01, DNA β 02, recDNA についてそれぞれの感染性クローンを構築してトマトに接種実験を行い, どのような病徴を誘導するかを調べた。その結果, ToLCJAV または AYVV- [Java] はトマトにおいて無病徴であったが, ToLCJAV / DNA β 02 または AYVV- [Java] / DNA β 02 接種トマトにおいては自然感染株と同様な巻葉症状が認められた。ToLCJAV / DNA β 01 または AYVV- [Java] / DNA β 01 接種トマトでは, 軽い巻葉症状が現れ, ToLCJAV / recDNA または AYVV- [Java] / recDNA 接種トマトでは, 無病徴であった。このようにトマト巻葉病の病原ウイルスの多様性が明らかになった。また, DNA β 02 のコードする *β CI* 遺伝子は病徴発現に関与するとした。さらに, RNA サイレンシングは植物が本来もっているウイルス感染防御機構であるが, *β CI* 遺伝子はこの RNA サイレンシングを抑制することが明らかになった。

インドネシアのトマト巻葉病発生地付近に自生し, 葉脈黄化症状を示す *Ageratum conyzoides* から, ベゴモウイルスとサテライト DNA β を分離した。このウイルスは単一ゲノムからなり, 遺伝学的組換え解析から ToLCJAV と AYVV- [Java] との間での組換えによって生じたことが明らかになった。このように, 異種ベゴモウイルスの混合感染に伴う組換えにより, 新規のベゴモウイルスが生じる可能性を示唆した。また, *Ageratum conyzoides* のような雑草が, トマト巻葉病の伝染源になっていることを示唆した。

本研究は, トマト巻葉病における病原ベゴモウイルスとサテライト DNA の分子特性とトマト巻葉病の病因の一端を明らかにした。これらの知見は, 単一型ベゴモウイルスの生態学, 疫学, 病害防除の研究に有意義な情報を提供するものと思われる。従って, 審査員一同は, 本研究者が博士 (農学) の学位を授与するに値するものと認定した。