

# カンキツウイルスの病原性、診断法および国内での分布

農林水産省果樹試験場カンキツ部 伊 藤 隆 男

## はじめに

ウイルスは、現在知られている最も小さい植物病原原体であり、その本体はRNAのみの環状1本鎖の構造からなる。非常に安定な高次構造を持つため不活性化しにくく、接ぎ木はもとより、ナイフやハサミの接触によっても容易に伝染していく。カンキツ、ブドウ、リンゴなどの果樹は永年的に栽培され、また接ぎ木なども頻繁に行われるため、ウイルスの好適な宿主となりやすく、これまで多くのウイルスが発見されている。筆者らは、特にカンキツの保毒するウイルス(カンキツウイルス)の研究を進めているが、本稿では、その過程で得られた知見も含めて、病原性、診断法、そして国内での分布状況について紹介する。

## I カンキツウイルスとその病原性

カンキツウイルスとしては、カンキツエクソコーティス病の病原であるカンキツエクソコーティスウイルス(CEVd)が最もよく知られている。カンキツエクソコーティス病は、カラタチやその交雑種の各種シトレンジの樹皮に激しい剥皮症状を示し、それらを台木としたカンキツを矮化させ果実収量の低下をもたらす、衰弱、時には枯死させる(図-1)。本ウイルスは、検定植物

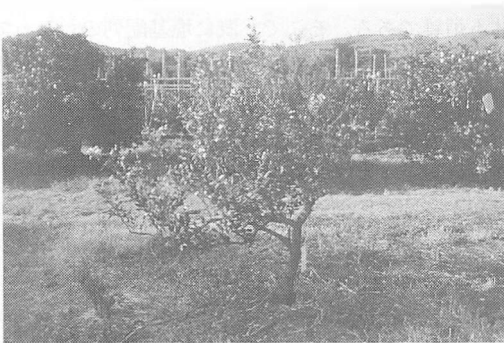


図-1 カンキツエクソコーティス病の症状を呈し衰弱しているカラタチ台カンキツ樹

Pathogenicity and Diagnosis of Citrus Viroids, and their Distribution in Japan. By Takao Ito

(キーワード:カンキツウイルス, カンキツエクソコーティスウイルス, カンキツカクヘキシアウイルス, 生物検定, マルチプレックスRT-PCR, 不知火)

であるエトログシロン上に、葉のエピナスティー、葉脈や葉柄の褐変あるいは壞疽、樹体の萎縮症状などを呈する。CEVd以外のカンキツウイルスは圃場栽植樹あるいはエトログシロン上での症状の程度が比較的軽微であったため、以前はCEVdの弱毒系統と考えられていた(加納, 1985)。しかし近年、塩基配列の相同性あるいは宿主範囲の違いなどによって別種に分類され、カンキツウイルス(CVd)-I, CVd-II, CVd-III及びCVd-IVと呼ばれている。CEVdで369~377塩基、CVd-Iで315~328塩基、CVd-IIで299~303塩基、CVd-IIIで294~297塩基、そしてCVd-IVで284~286の、分子長や塩基配列の異なる多様な変異株が報告されており、また他にも電気泳動度の異なる変異株がいくつか存在する(畑谷, 1997)。CVd-IIは分類学的にはホップ矮化ウイルスと同一種であるが、その変異株の一部に、カンキツカクヘキシア病を引き起こすカンキツカクヘキシアウイルス(CCaVd)が存在する(LEVY and HADDI, 1993)。カンキツカクヘキシア病は、主にいくつかのマングリン類、タンゼロ類などの樹皮下にピットINGを生じるとともに、樹脂を漏出する。激症樹は萎縮、葉の黄化を示し、衰弱、枯死する場合もある。その他、CVd-IおよびCVd-IIIの変異株の一部並びにCCaVdでない型のCVd-IIは、単独あるいは混合感染によってカラタチ台バレンシアオレンジを矮化させるとともに、台木部にピットING、樹皮の亀裂または線紋などの症状を引き起こすことが報告されている(ROISTACHER et al., 1993; SEMANCIK et al., 1997)。この矮化効果は、CVd-IIIとカラタチ台クレメンティンなどとの組み合わせでも見られ(POLIZZI et al., 1991)、カラタチ台木の反応によるものと考えられている(SEMANCIK et al., 1997)。台木では他にサワーオレンジやトロイヤシトレンジなどでもいくつかのカンキツウイルスによる矮化の影響が報告されている(ROISTACHER et al., 1991)。矮化にともなう果実の収量や品質の変化については、SEMANCIK et al. (1997)による上述のカラタチ台バレンシアオレンジの例では、CVd-Iと、CVd-IIIで収量が低下したが、CVd-IIでは増加し、糖酸比や果実の大きさなどについては、いずれも影響はなかったとされている。その他、最近、CVd-III類似の電気泳動度を持つウイルスが、カラタチ台グレープフルーツなどの矮

化と台木にピットィングと樹脂漏出症状を呈するガムボケット病に関与することが報告された (MARAIS et al., 1996)。また、スイートオレンジの樹皮下に樹脂を漏出するガミーバーク病など、ウイロイドの関与が疑われる病気が海外で他にいくつか報告されている (SEMÁNCIK and DURAN-VILA, 1991; ÖNELGE et al., 1996)。さらに、国内のカンキツより、海外でも報告のない新規な塩基配列を持つ2種のウイロイド、F 10 CVd (仮称) と OSCVd (仮称) が検出された (伊藤ら, 1997b)。F 10 CVd は327塩基からなり、塩基配列の相同性がCVd-Iと最も高く約84%であった。一方、OSCVdは331塩基からなり、塩基配列の相同性はCVd-IIIと最も高く約63%であった。これらF 10 CVdとOSCVdは、カンキツウイロイドの多様性をさらに証明するものであるが、栽培カンキツ樹への病原性は現在のところ不明であり、今後検討する必要がある。

## II カンキツウイロイドの診断法

カンキツウイロイドを診断するうえで、まず利用可能なのが木本検定を中心とした生物検定法である。木本検定については、特に感受性として選抜されたエトログシトロン系統アリゾナ 861-S 1 が有効であり、カンキツウイロイドの感染に対して葉のエピナスティーおよび下垂、葉脈・葉柄の褐変、樹皮の亀裂、萎縮などの症状を現す。特にCEVd感染あるいはいくつかのCVdの混合感染により激しい病徴を示す (SEMÁNCIK and DURAN-VILA, 1991) (図-2)。本検定は精度が高い反面、病徴が激しくなるには高温条件 (30°C前後) が必要であり、かつ、各CVdの単独感染の場合は病徴が軽微で発病までの期間も長くなるため、正確な判定には1~9か月程度



図-2 カンキツウイロイドによるエトログシトロン系統アリゾナ 861-S 1 上の病徴  
 (右): CEVd, CVd-II および CVd-III の混合感染  
 (中): CVd-II, CVd-III および OSCVd の混合感染  
 (左): CVd-III の単独感染

の観察を要する。特に CVd-II の単独感染は、反応が極めて軽微なため、より慎重に判定する必要がある (DURAN-VILA et al., 1993)。また、F 10 CVd は単独で葉の下垂などの症状を示すものの、OSCVd の単独感染による病徴は現在のところ明らかではなく、検定できるかどうかは不明である。他に木本検定では、パーソンスペシャルマンダリンが特に CCaVd に用いられ、陽性の場合には接き木部に樹脂の漏出が認められる (ROISTACHER, 1991)。しかし、CCaVd にも病原性の強弱があり、検定に1年以上を要する場合もある。その他の生物検定については、CEVd および CVd-II に対して、いくつかの草本植物での発病が確認されている (畑谷ら, 1997)。

次に、その他の検定法として、ポリアクリルアミドゲル電気泳動法 (PAGE)、核酸ハイブリダイゼーション法、逆転写-ポリメラーゼ連鎖反応法 (RT-PCR) など、ウイロイド RNA を特異的に検出する方法がいくつか挙げられる。PAGE は、分子構造の違いを利用してウイロイド RNA 分子と植物由来の他の RNA 分子とを分離して検出するものであり、このうちには、未変性ゲルと変性ゲルでの電気泳動を同方向に逐次的に行うシーケンシャル PAGE (sPAGE) がある。本法は分離能が特に高く、混合感染状態で存在するカンキツの数種ウイロイドであっても同時に検出できる (DURAN-VILA et al., 1988)。また環状1本鎖の構造を持つ RNA 分子を特異的に検出できるため、塩基配列未知のウイロイドであっても検出できる。ただし、本法によって検出できる濃度と純度のウイロイド RNA を抽出するには、エトログシトロン以外のカンキツでは困難な場合が多く、操作自体も煩雑である。そこで、既に塩基配列のわかっているウイロイドを検出する場合は、その遺伝情報を利用するハイブリダイゼーション法や RT-PCR 法などの遺伝子診断法のほうが簡便かつ迅速である。これらの遺伝子診断法は、ウイルスと異なり抗原抗体反応を利用した血清診断を行うことのできないウイロイドでは、大量検定を行うための手段として特に重要である。ハイブリダイゼーション法は、ウイロイドの cDNA (cRNA) をプローブとして用いて、ナイロン膜などに固定された被検植物の抽出核酸と反応させ、目的とするウイロイドを検出する方法である (ROMERO-DURBÁN et al., 1995; FONSECA et al., 1996; 中原ら, 1998; NAKAHARA et al., 1999)。プローブの標識に放射性同位体を用いない非放射性的検出系も開発されており、いずれもプローブさえあれば利用できる。RT-PCR 法はウイロイド RNA の塩基配列をもとに PCR 用のプライマーを設計し、まず逆転写反応

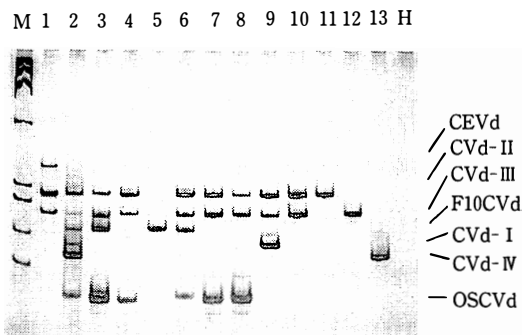


図-3 マルチプレックス RT-PCR による 7 種カンキツウイロイドの検出 (RT-PCR 増幅産物の 6% ポリアクリルアミドゲル電気泳動後の銀染色像); レーン M:  $\phi$ X-174/Hae III, レーン H: 健全エトログシトン, レーン 1~13: カンキツウイロイド保毒株

により被検核酸試料中のウイロイドの cDNA を合成し、さらにそれを鋳型にした PCR を行い、ウイロイド特異的増幅産物を電気泳動やプローブとのハイブリダイゼーションなどによって検出するものである (YANG et al., 1992; 斉藤ら, 1994; NAKAHARA et al., 1999)。筆者らは、現在、市販の RNA 抽出試薬 ISOGEN (ニッポンジーン社) を用いてカンキツより全 RNA を抽出し、RT-PCR 法によって増幅した産物をポリアクリルアミドゲル電気泳動し、銀染色によって検出する方法を行っている (伊藤・家城, 1996)。本法は、核酸抽出も簡便で、検出感度も非常に高いため、エトログシトンを材料に用いた場合はもちろん、圃場の栽培カンキツからでも、CEVd, CVd-I, CVd-II, CVd-III, CVd-IV, F10 CVd および OSCVd の正確な診断が可能である。さらに本法を改良し、一度の RT-PCR で、これらのウイロイドを同時に検出するマルチプレックス RT-PCR も開発した (伊藤ら, 1998) (図-3)。本法ではカンキツの重要な病原であるカンキツタターリーフウイルスも同時に検出できる。海外でも同様のマルチプレックス RT-PCR が開発されてきているが (TESSITORI et al., 1996)、本法は手間と労力を大幅に軽減できるため、簡易な大量検定を可能にするものと期待している。

### III 国内のカンキツウイロイド

日本国内でも CEVd, CVd-I, CVd-II, CVd-III および CVd-IV のカンキツウイロイドが存在し (畑谷ら, 1997; 伊藤ら, 1997 a), さらに、海外では報告のない F10 CVd と OSCVd が検出されている (伊藤ら, 1997 b)。これら国内のカンキツウイロイドにも海外同様に電気泳動度や塩基配列の異なる多様な変異株が存在する

(伊藤ら, 1996, 1997 a)。CEVd は、我が国で最も広範に用いられているカラタチ台木に激しい剥皮症状を引き起こすため、我が国のカンキツ栽培において最も重要な病原の一つとして警戒されてきた。その CEVd は 1900~40 年代に欧米諸国から導入された樹で保毒が多いことが田中・山田 (1971) によって報告されているが、筆者らは、これら CEVd 保毒樹と考えられていた樹や加納 (1985) により報告された CEVd の弱毒系統保毒樹にも、他のカンキツウイロイドが混合あるいは単独感染している例が多く見られることを確認した。また、国内の CVd-I, CVd-II および CVd-III の中には、海外でカラタチ台パレンシアオレンジを矮化させた株とほとんど同じ塩基配列を持っている株も検出されている (SANO et al., 1988; HATAYA et al., 1998; 中原ら, 1998)。しかし、CVd-II の変異株の一部である CCaVd の存在は確認されておらず、CCaVd は現在も植物検疫上の特定重要病害虫に指定されている。最近、REANWARAKORN and SEMANCIK (1998) は CVd-II の感染性クローンを用いた実験を行い、CCaVd に特徴的な塩基置換を明らかにした。この塩基置換を持つ株が国内に存在するのかどうか、今後調査を進めて明らかにしていく必要がある。その他、ガムポケット病を引き起こす病原ウイロイドも国内では確認されていない。

国内のカンキツウイロイドは、上述のように、海外から導入したカンキツから検出される例が多く、試験場の導入カンキツ保存園や古い導入カンキツ園などで、保毒樹が多く認められる。また、検定不十分な穂木が流通することで、カンキツウイロイドは各地の圃場にも広がっている。筆者らが、日本各地のカンキツ栽培産地の温州ミカンやタンカンなどを検定した結果、無毒樹が多いものの、CVd-II, CVd-III および OSCVd の混合感染あるいは CVd-II の単独感染樹が多く確認された。とりわけ、「デコボン」の愛称で消費者および栽培者間で人気の高いカンキツ品種「不知火」は、流通初期に未検定の穂木・苗木が特に多く出回ったため、保毒するウイロイドの種類も多く、CVd-II, CVd-III および OSCVd の上に、F10 CVd, さらに加えて CVd-I あるいは CVd-IV の 3~5 種の混合感染をしているものや、これら 6 種をすべて保毒しているものもあった (伊藤ら, 1998; 難波・伊藤, 1999) (図-4)。穂木の複製段階での高接更新を繰り返す過程で、これらを徐々に保毒していったものと考えられる。筆者らが調べた範囲では CEVd 保毒の不知火はなかったが、中原ら (1998) はドットプロットハイブリダイゼーション法により CEVd プローブと反応する個体を確認している。不知火 (特にカラタチ台

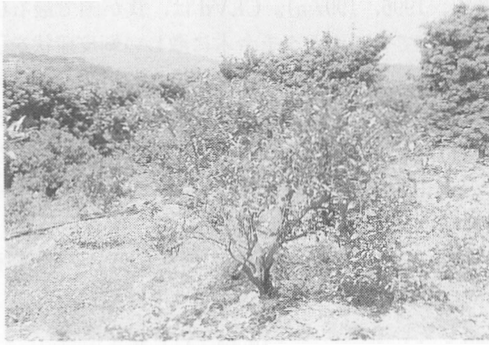


図-4 CEVd以外の6種カンキツウイルスを保有するカラタチ台「不知火」

で)の栽培の難しさについては、品種特性、肥培管理上の問題、さらにカンキツウイルスの影響などを含めて、その原因究明が行われている。筆者らも、各カンキツウイルスを単独あるいは混合して接種したカラタチ台不知火を圃場に定植した。樹勢等にどの程度の影響があるのか、今後調査していく予定である。

### おわりに

現在、カンキツウイルスの防除を考えるうえで、予防に勝る手段はない。ウイルス・ウイルス検定を行った苗木の供給体制も、不知火を含めて整ってきており、そのような苗木を積極的に品種更新に用いていくべきである。検定手法も今後、より進化した手法を取り込んでいくことで、さらに簡便化していくことが期待される。一方、海外では、カンキツウイルスを矮化効果因子などとして利用する研究も行われており (SEMÁNCIK et al., 1997)、その病原性を有効活用する場面も考えられている。しかし、その場合でも、栽培現場への実際の応用には研究者間で意見の相違があり、否定的意見も多く、もし利用するとした場合も、病原性が弱く安定していることを確認したうえで十分な管理のもとに行う必要がある。実際、カンキツウイルスの病原性については、変異の多様性との関連や、異なる組み合わせでの混合感染の影響、さらに様々な栽培カンキツ種に対する影響など、今後明らかにしていくべき点が多い。そして、いまだ国内で報告はない CCaVd およびガムポケット病ウイルスや、その他の新たな病原ウイルスが国内で発見される可能性もあり、今後とも慎重に対応していく必要がある。

なお、本稿で述べた研究を行うにあたり、ご協力をい

ただいた果樹試験場の家城洋之博士および岩波 徹氏、南九州大学園芸学部の尾崎克己教授、長崎県病害虫防除所の難波信行氏、ご指導・ご助言をいただいた北海道大学農学部の畑谷達児博士および秋田県立大学附属生物工学研究所の中原健二博士、ウイルス保毒樹のご提供をいただいた各県試験場の皆様、ならびに本稿の校閲をいただいた果樹試験場カンキツ部の伊藤伝病害研究室長に、深謝の意を表す。

### 引用文献

- 1) DURAN-VILA, N. et al. (1988): J. Gen. Virol. 69: 3069~3080.
- 2) ——— et al. (1993): Proc. 12th Conf. IOCV, IOCV, Riverside, pp. 202~211.
- 3) FONSECA, M. E. N. et al. (1996): J. Virol. Methods 57: 203~207.
- 4) 畑谷達児 (1997): 植物防疫 51: 163~167.
- 5) HATAYA, T. et al. (1998): Arch. Virol. 143: 971~980.
- 6) 伊藤隆男ら (1996): 日植病報 62: 321 (講要).
- 7) ———・家城洋之 (1996): 同上 62: 614~615 (講要).
- 8) ———ら (1997 a): 同上 63: 193 (講要).
- 9) ———ら (1997 b): 同上 63: 484~485 (講要).
- 10) ———ら (1998): 同上 64: 425 (講要).
- 11) 加納 健 (1985): 植物防疫 39: 365~369.
- 12) LEVY, L. and A. HADIDI (1993): Proc. 12th Conf. IOCV, IOCV, Riverside, pp. 180~186.
- 13) MARAIS, L. J. et al. (1996): Proc. 13th Conf. IOCV, IOCV, Riverside, pp. 236~244.
- 14) 中原健二ら (1998): 日植病報 64: 532~538.
- 15) NAKAHARA, K. et al. (1999): J. Virol. Methods 77: 47~58.
- 16) 難波信行・伊藤隆男 (1999): 日植病報 65: 393~394 (講要).
- 17) NEELGE, N. et al. (1996): Proc. 13th Conf. IOCV, IOCV, Riverside, pp. 245~248.
- 18) POLIZZI, G. et al. (1991): Proc. 11th Conf. IOCV, IOCV, Riverside, pp. 230~233.
- 19) REANWARAKORN, K. and J. S. SEMÁNCIK (1998): J. Gen. Virol. 79: 3163~3171.
- 20) ROISTACHER, C. N. (1991): Graft-transmissible diseases of citrus: Handbook for detection and diagnosis, FAO, Rome, pp. 81~89.
- 21) ——— et al. (1991): Proc. 11th Conf. IOCV, IOCV, Riverside, pp. 234~239.
- 22) ——— et al. (1993): Proc. 12th Conf. IOCV, IOCV, Riverside, pp. 173~179.
- 23) ROMERO-DURBÁN, J. et al. (1995): J. Virol. Methods 55: 37~47.
- 24) 齊藤範彦ら (1994): 植物防疫 48: 169~173.
- 25) SANO, T. et al. (1988): Nucleic Acids Res. 16: 347.
- 26) SEMÁNCIK, J. S. and N. DURAN-VILA (1991): Proc. 11th Conf. IOCV, IOCV, Riverside, pp. 178~188.
- 27) ——— et al. (1997): J. Hortic. Sci. 72: 563~570.
- 28) 田中寛康・山田峻一 (1971): 園試報 B11: 149~155.
- 29) TESSITORI, M. et al. (1996): Proc. 13th Conf. IOCV, IOCV, Riverside, pp. 230~235.
- 30) YANG, X. et al. (1992): Phytopathology 82: 279~285.