

# 温州萎縮ウイルスグループの遺伝子解析

独立行政法人農業技術研究機構果樹研究所 いわ なみ とおる  
岩 波 徹

## はじめに

温州萎縮ウイルス (Satsuma dwarf virus, SDV) は我が国のカンキツに深刻な被害を与えているウイルスである (宇杉・斉藤, 1977)。SDV がウンシュウミカン (*Citrus unshiu*) に感染すると、春枝の葉が萎縮し、舟形葉、さじ型葉などを呈する温州萎縮病を引き起こす (図-1)。SDV は圃場において隣接樹に伝搬し、非常に防除対策の困難なウイルスである。温州萎縮病はトルコ (AZERI, 1973) と中国 (CHU et al., 1991) での発生が報告されており、また、韓国の主要カンキツ生産地である済州島においても発生が認められている。

カンキツの増産にともない、生産性の大きな阻害要因であるウイルス病に対して関心が持たれ、新しいウイルス性病害が見いだされた (今田, 1977)。カンキツモザイク病の主症状はウンシュウミカンの果実における斑紋である (図-2)。ネーブル斑葉モザイク病はネーブルオレンジに発生する病害で、成葉におけるえそを伴うモザイクが特徴である。ナツカン萎縮病はナツミカンに発生する病害で、罹病したナツミカンの新葉はモザイクを生じ、萎縮叢生する。

これらの病害の病原ウイルスは、それぞれカンキツモザイクウイルス (*Citrus mosaic virus*, CiMV)、ネーブル斑葉モザイクウイルス (*Navel orange infectious mottling virus*, NIMV)、ナツカン萎縮ウイルス (*Natusdaidai dwarf virus*, NDV) と命名されたが、いずれもウンシュウミカンに接種すると温州萎縮病と同様の萎縮症状を生じる (TANAKA and YAMADA, 1972)。その後、粒子形状も類似していることが判明し (IMADA, 1984; TANAKA and IMADA, 1976)、また SDV と CiMV との間では血清関係が認められている (宇杉ら, 1986)。以上の理由からこれらのウイルスは SDV の近縁ウイルスと考えられ、温州萎縮グループとしてまとめられている (今田, 1977)。

近年著者らは上記のウイルスの他に、温州萎縮ウイルスの近縁ウイルスを分離した (Az-1 株, LB-1 株)。Az-1 株は静岡県清水市東町で典型的な温州萎縮病を呈しているウンシュウミカンから分離されたが、血清反応が SDV, CiMV のいずれとも弱かった (Az は東町の Azuma の略)。LB-1 は大分県で栽培されているネーブルオレンジ (*Citrus sinensis*) で、未記載と思われる激しい葉のモザイク症状を呈している樹から分離された (IWANAMI et al., 1993) (LB は leaf blotch の略)。LB-1 は CiMV と強い血清学的関係が認められた。これらの株の発見は温州萎縮ウイルスグループが従来考えられていた以上に多様性を持つグループであることを示唆した。また、CiMV, NDV, NIMV は SDV に近縁であるとされていたが、一つのウイルスの系統であるのか、

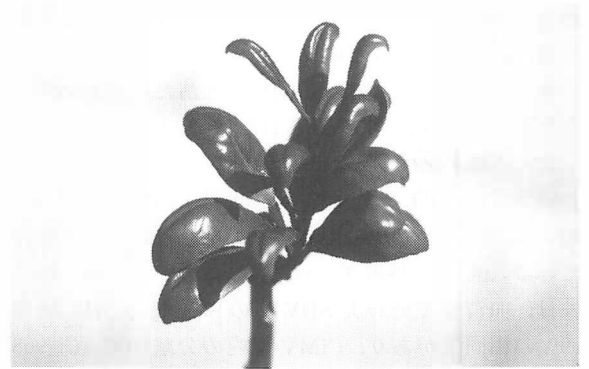


図-1 温州萎縮病の病状  
春枝に舟形葉の葉が叢生している。

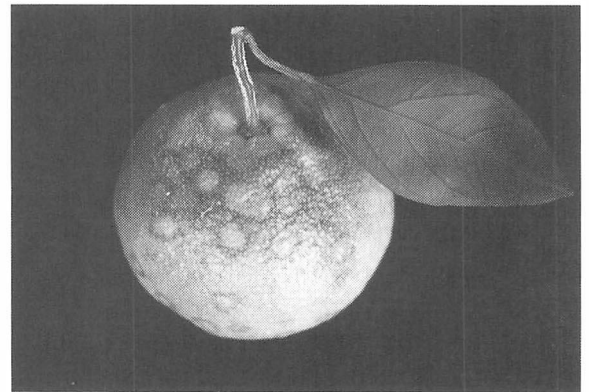


図-2 カンキツモザイク病に罹病した果実の斑紋病状

Phylogenetic Analysis on Satsuma Dwarf Related Viruses,  
By Toru Iwanami

(キーワード: 温州萎縮ウイルスグループ, カンキツモザイクウイルス, ネーブル斑葉モザイクウイルス, 遺伝子解析)

(併任) 農林水産省農林水産技術会議事務局

(併任) 文部科学省研究振興局

近縁の別種ウイルスであるのかが明瞭ではなかった。そこで、著者らはこれらのウイルス株の血清学的性状の比較 (IWANAMI et al., 1993) に加えて、ウイルス遺伝子の解析を行い、系統的な分類体系を構築した (IWANAMI and Ieki, 1996; IWANAMI et al., 1998; IWANAMI et al., 1999; IWANAMI et al., 2001)。さらに本研究の成果は、従来検出が困難であったウイルス株をもカバーする遺伝子診断法の開発の基盤になり、またウイルス抵抗性を持った遺伝子改変カンキツの作出へと応用されてきている。以下に一連の研究概要と今後の展望を述べたい。

**I 温州萎縮ウイルスグループ内の性状比較と分類体系の確立**

**1 血清学的性状の比較**

供試株として、SDVのS-58株(標準株)と由来の異なるSDV分離株であるMIE 88株, CiMV, NDV, NIMVの各標準株Ci-968株, ND-1株, NI-1株およびAz-1株とLB-1株を用いた。血清学的には、SDV型(S-58株, MIE 88株), CiMV型(Ci-968株, ND-1株, Az-1株, LB-1株)およびNIMV型(NI-1株)の3型が確認された。Az-1はエライザ法ではSDV抗血清, CiMV抗血清との反応が極めて弱かったが、ウェスタンブロット法ではCiMV抗血清とわずかに反応したため、CiMV型に入れられた。

**2 外被タンパク質遺伝子の比較**

供試株はいずれの分離株もS-58株と同様に、RNA 2の3'末端に大小2成分の外被タンパク質がコードされている(図-3)。外被タンパク質全体のアミノ酸の相同性は、血清型で分けたSDV型のS-58株とMIE 88は99%の相同性があり、CiMV型内の分離株間(Ci-968株, ND-1株, Az-1株, LB-1株)では90~98%の相同性を示したが、NIMV型のNI-1株はいずれの型とも80~84%の相同性しか示さなかった(表-1)。従って供試株は、外被タンパク質のアミノ酸配列の相同性で、SDV型(S-58株, MIE-88株), CiMV型(Ci-968株, LB-1株, Az-1株, ND-1株)およびNIMV型(NI-1株)に分けることができた。さらに詳細に検討するため、外被タンパク質全体のアミノ酸配列について、進化系統樹を作成したところ、やはりSDVグループ(S-58株, MIE-88株), CiMVグループ(Ci-968株, LB-1株, Az-1株, ND-1株)およびNIMVグループ(NI-1株)の三つのクラスターが形成され、さらにCiMVグループのクラスターの中が(Ci-968株, LB-1株)と(Az-1株, ND-1株)の二つに明らかに分かれた(図-4)。

RNA 2の3'非翻訳領域の塩基配列を各分離株間で比較したところ、67%~99%の相同性が認められたが(表-2)、外被タンパク質と同様のグループ分けが可能であった。

以上のように、供試分離株は、血清学および分子生物学的性状のいずれによっても、SDV型(S-58株,

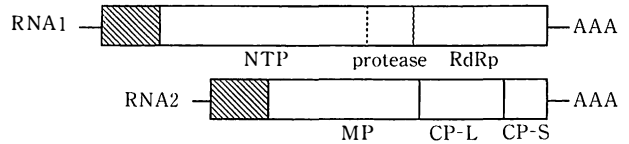


図-3 温州萎縮ウイルスの遺伝子構造  
 (RNAポリメラーゼ), MP(細胞間移行タンパク質, CP-L, CP-S(大小2成分の外被タンパク質)).

図-3 温州萎縮ウイルスの遺伝子構造

非翻訳領域を横線で、読みとり枠を囲み枠で示した。読みとり枠内の縦線はプロテアーゼ切断部位を示す。

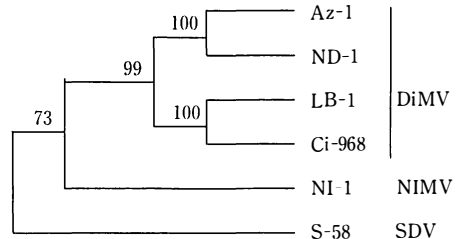


図-4 温州萎縮ウイルスグループ外被タンパク質遺伝子の進化系統樹

分岐部の数字はブートストラップ法100回行った時の再現率(%)を示す。

表-1 外被タンパク質のアミノ酸配列の相同性 (%)

分離株	S-58	MIE-88	Ci-968	LB-1	Az-1	ND-1	NI-1
S-58		99	81	81	81	81	80
MIE-88			82	81	81	81	80
Ci-968				98	91	91	83
LB-1					92	91	84
Az-1						97	84
ND-1							84
NI-1							

表-2 3'非翻訳領域の塩基配列の相同性 (%)

	S-58	MIE-88	Ci-968	LB-1	Az-1	ND-1	NI-1
S-58		99	78	76	68	68	68
MIE-88			78	75	68	68	68
Ci-968				96	96	93	73
LB-1					92	92	73
Az-1						93	67
ND-1							67
NI-1							

MIE-88株), CiMV型 (Ci-968株, LB-1株, ND-1株, Az-1株) および NIMV型 (NI-1株) の3系統に分けられた。

NIMVは他のウイルスと血清関係がなく、かつ外被タンパク質アミノ酸の他の分離株との相同性が84%以下であり、RNA 1および2の3'非翻訳領域の相同性も73%以下と低いので、SDVの系統ではなく、別種のウイルスとすべきと考えられる。CiMVグループのウイルスはSDVグループと血清関係があるが、両グループのウイルスの外被タンパク質のアミノ酸配列の相同性は81%以下で、3'非翻訳領域の塩基配列の相同性も78%以下であるので、やはりSDVとは別種のウイルスと考えられた。すなわち、上記の三つの型はそれぞれ別の3種のウイルスに相当すると結論された。

CiMVの中では、さらに (Ci-968株, LB-1株), (ND-1株, Az-1株) の二つに分けられたが、これは一つの種内における分化と考えられる。

## II CiMV, NDV, NIMV に関する新知見

### 1 CiMVの多様性

CiMVはカンキツモザイク病の病原として知られており、特に極早生有望品種‘宮本早生’とともにひろがった‘トラミカン’騒動は有名である (YAMAMOTO and YAMAGUCHI, 1980)。本研究では、NDV, LB-1株, Az-1株などのウイルス性状が比較的CiMVの標準株Ci-968株に近いことが明らかになったが、NDV, LB-1株, Az-1株はいずれもウンシュウミカン果実にモザイク症状は起こさない。以上の結果から、ウンシュウミカン果実に必ずしもモザイク症状を起こさないCiMVの系統が多数存在することが明らかになった。

### 2 NDVの蔓延

NDVは山口県で栽培されているナツミカンに局地的に感染していると考えられていたが (今田, 1977), 本研究においてはNDVに極めて性状の類似している株であるAz-1株が、静岡県清水市のウンシュウミカンから分離された。したがって、NDVおよびそれに類似したウイルス株が、各地のカンキツ栽培地にまん延している可能性が充分考えられる。

### 3 NIMVは拡散しているか?

NIMVはこれまでのところ、和歌山県のネーブルオレンジにのみ発生が認められており (今田, 1977), 本研究で用いた分離株NI-1も同町で採取したものである。本研究で明らかになったようにNIMVは、SDVやCiMVと血清関係がないので、これらの抗血清を用いた検定では見落としていた可能性も考えられ、今後調査

が進むにつれ、他の地域における発生が確認されることが考えられる。

## III 実用的な側面

### 1 遺伝子診断

近年、逆転写反応 (Reverse Transcription) とポリメラーゼ連鎖反応 (Polymerase Chain Reaction) を組み合わせたRT-PCR法により、微量なRNAを検出する方法が発達してきている。温州萎縮ウイルスグループの検定には、これまで血清反応を利用したエライザ法などが用いられてきたが、抗血清が有限であること、血清型が異なるNIMVや血清反応がやや弱いAz-1などが検出されにくいなどの欠点があった。また、エライザ法は、葉や果実などからのウイルス検出は可能であるが、穂木からの検出には感度が不十分であった。RT-PCR法による検出はエライザ法のこれらの欠点を補う有力な方法となると期待される。本稿で述べた温州萎縮ウイルスグループの遺伝子解析により、グループのウイルス株に共通な塩基配列をターゲットにしたRT-PCR法の開発が可能となった。本法が実用化されればより検出スペクトラムの広い、高感度な検定法として価値は非常に高いと考えられる。

### 2 抵抗性カンキツ

#### (1) 組み換えカラタチ

外被タンパク質遺伝子などを導入した組み換え植物がウイルスに抵抗性を示すことは、多くの例がある。著者らも、SDVおよびCiMVの外被タンパク質遺伝子等をカラタチに導入する実験を進めており、すでにCiMVに抵抗性を示すカラタチを数系統得ている (岩波ら, 未発表)。SDVやCiMVは、媒介生物 (ベクター) が不明であるが、土壌を介して伝搬することはほぼ確実であるので、台木であるカラタチに抵抗性を付与することは実用的な意味が大きいといえる。また、組み換え食品に抵抗性を示す消費者にも、台木のみ遺伝子組み換えは受け入れられるであろう。現在認めている抵抗性は、人工的にウイルス接種した後の増殖遅延であるが、自然感染した場合にも遅延が認められるかどうかは、野外試験の結果を待たなければならない。

#### (2) ナツミカンの抵抗性

SDVは、ほとんどのカンキツ属の植物 (*Citrus* spp.) に感染するほか、*Fortunella* 属 (キンカン), *Murraya* 属 (ゲッキツ), *Poncirus trifoliata* (カラタチ) などのカンキツ近縁植物にも感染が認められている (宮川, 1969)。通常これらの植物にSDVを接ぎ木接種すると、約1か月後には、接ぎ木上部に生じてくる新芽

からウイルスが検出されるようになる。ところがナツミカン (*Citrus natsudaidai*) 実生苗に SDV を接ぎ木した場合は、6 か月までは、ウイルスの移行が認められない (山口, 1984)。すなわち、ナツミカンでは、SDV の移行ないし増殖が遅延しているのである。なお、もともとナツミカンから分離された NDV をナツミカン実生苗に接種した場合は、1 か月後には移行、増殖が認められる (岩波ら, 未発表)。SDV は 8 か月後には、移行増殖するので (岩波ら, 未発表)、ナツミカンは完全に SDV に対して抵抗性というわけではない。しかし、圃場での自然感染は、隣接樹への感染に数年を要するほど接ぎ木接種に比べ緩慢である。したがってナツミカンを台木に用いた場合、実用的なレベルで増殖遅延が期待できる。ただし、ナツミカンをそのまま台木に使用することは、樹勢が強くなるなどの問題がある。そこで、ナツミカンと通常の台木であるカラタチとの交配種を育成し、自然条件下でのウイルス増殖遅延に関する調査がされている (未発表、本研究は静岡県柑橘試験場との共同研究)。

## おわりに

温州萎縮ウイルスグループの血清学的性状の解明に加えて、遺伝子解析が行われた。その結果、混沌としていた本グループの分類体系が確立され、特に CiMV が従来考えられていた以上に多様性を持つことが明らかになってきている。今後は海外で発生する株との比較調査が

進み、本グループ変異の全容が明らかにされるであろう。遺伝子解析で明らかにされた塩基配列情報は、高感度遺伝子診断法の開発につながり、より完全な診断体制が可能となった。さらに遺伝子工学的手法等で、圃場における感染防止が試みられている。本グループの防除法確立に向けて、一層研究が加速化するであろう。

## 引用文献

- 1) AZERI, T. (1973): *Plant Dis. Repter.* 57: 149~153.
- 2) CHU, P. F. et al. (1991): *Plant Dis.* 75: 242~244.
- 3) 今田 準 (1977): *植物防疫* 31: 399~402.
- 4) IMADA, J. (1984): *Bull. Fruit Tree Res. Stn.* E5: 55~59.
- 5) IWANAMI, T. et al. (1991): *ibid.* 21: 75~83.
- 6) IWANAMI, T. et al. (1993): *Ann. Phytopathol. Soc. Jpn.* 59: 642~650.
- 7) IWANAMI, T. and IEKI, H. (1996): *Virus Res.* 42: 181~186.
- 8) IWANAMI, T. et al. (1998): *Arch. Virol.* 143: 405~412.
- 9) IWANAMI, T. et al. (1999): *J. Gen. Virol.* 80: 793~797.
- 10) IWANAMI, T. et al. (2001): *Arch. Virol.* (in press).
- 11) 宮川経邦 (1969): *日植病報* 35: 224~233.
- 12) TANAKA, H. and J. IMADA, (1976): *Proc. 7th Conf. IOCV, IOCV, Riverside, Calif.* pp. 116~118.
- 13) TANAKA, H. and S. YAMADA, (1972): *Proc. 5th Conf. IOCV, University of Florida Press, Florida,* pp. 71~76.
- 14) 宇杉富雄・齊藤康夫 (1977): *日植病報* 43: 137~144.
- 15) 宇杉富雄ら (1986): *同上* 52: 349~354.
- 16) 山口 昭 (1984): *果樹試験場報告 B11:* 63~69.
- 17) YAMAMOTO, S. and A. YAMAGUCHI, (1980): *Proc. 8th Conf. IOCV, IOCV, Riverside, California,* pp. 230~231.

## 中央だより

### ○農薬安全使用基準の一部改正について

農林水産省は、農薬の安全かつ適正な使用の確保を図るため、農薬取締法に基づき農薬安全使用基準を平成13年4月27日付けで一部を改正した。

#### 1. 農薬残留に関する安全使用基準

##### (1) 追加・変更 (13 農薬)

###### ①作物の追加 (6 農薬)

アセフェート剤、シフルトリン剤、DCIP 剤 (殺虫剤: 3 剤)、トリフルミゾール剤、フルジオキソニル剤 (殺菌剤: 2 剤)、アジムスルフロン剤 (除草剤: 1 剤)

###### ②農作物等 (栽培方法) の変更 (1 農薬)

ジメトモルフ剤 (殺菌剤: 1 剤)

###### ③剤型の追加 (3 農薬)

アセタプリミド剤、アセフェート剤 (殺虫剤: 2 剤)、グリホサートイソプロピルアミン塩剤 (除草剤: 1 剤)

###### ④使用時期の変更 (5 農薬)

ダイアジノン剤 (殺虫剤: 1 剤)、イミノクタジナルベシル酸塩剤、ジメトモルフ剤、テトラコナゾール剤、フルトラニル剤 (殺菌剤: 4 剤)

##### (2) 安全使用基準の削除 (3 農薬)

ピリミホスメチル剤の稲 (粉剤)、BPMC 剤のりんご

及び茶の安全使用基準を削除 (殺虫剤: 2 剤)

メバニピリム剤のさやいんげんの安全使用基準を削除 (殺菌剤: 1 剤)

#### 2. 水産動物の被害防止に関する安全使用基準

農薬の追加 (1 農薬)

カズサホス剤 (殺虫剤: 1 剤)

### ○農薬登録保留基準の一部改正について

環境省は、農薬取締法に基づき農薬登録保留基準の一部を平成13年4月26日付けで改正した。

#### 1. 作物残留に係る登録保留基準 (変更1 薬剤)

プロシミドン剤 (殺菌剤: スミレックス)

みかん: 1 ppm, みかん以外のかんきつ類: 0.5 ppm, 第一大粒果実類: 5 ppm, 第二大粒果実類: 0.5 ppm, 小粒果実類: 5 ppm, 第一果菜類: 5 ppm, 第二果菜類: 5 ppm, 第一葉菜類: 0.5 ppm, 第二葉菜類: 5 ppm, 鱗茎類: 0.5 ppm, いも類: 0.5 ppm, 大豆: 2 ppm, 大豆以外の豆類: 5 ppm.

#### 2. 水質汚濁に係る登録保留基準 (追加4 薬剤)

チアクロプリド剤 (殺虫剤: バリアード) 0.3 mg/l

ベンゾピシクロン剤 (除草剤: ショウエース) 0.4 mg/l

MCPB エチル剤 (植物成長調整剤: MCPB) 0.9 mg/l

SAP 剤 (除草剤: ロンパー, ジェイサン) 1 mg/l