

植物防疫基礎講座：植物ウイルスの分類学(2)

トスポウイルス属 (*Tospovirus*)

中央農業総合研究センター 津 田 新 哉

はじめに

トスポウイルス属のタイプウイルスであるトマト黄化えそウイルス (*Tomato spotted wilt virus*; TSWV) は、1915年にオーストラリアで初めて発見された。植物ウイルスとして認知されてからの歴史は古いが、完全ウイルス粒子の精製が困難であったことから、進展著しいタバコモザイクウイルスなどと比較して研究が立ち遅れていた。しかし、分子生物学的解析技術の発展に伴い植物ウイルス学研究で使われる手法も大きく変化し、そのため本ウイルスのゲノム配列など遺伝的性質も明らかにされてきた。トスポウイルス属は、1990年ベルリンで開催された国際ウイルス分類委員会において、動物ウイルスを中心とする *Bunyaviridae* 科に第5番目の属として新設された (SCHMALJOHN et al., 1995)。トスポウイルスの特徴は *Bunyaviridae* 科の他のウイルスと同様に、外被膜を有する直径約 80 ~ 120 nm の球状ウイルスであり、その中に長さの異なる三分節の開環ひも状のヌクレオキャプシドが包含されている (ULLMAN et al., 2002)。

第8次国際ウイルス分類委員会報告では、トスポウイルス属には TSWV を筆頭に候補も含め 14 種のウイルスが記載されている (表-1; NICHOL et al., 2005)。それらは、熱帯、亜熱帯および日本を含む温帯地域を中心に発生し、微小昆虫アザミウマ類により永続的に媒介される (表-2; ULLMAN et al., 2002)。トスポウイルス属の宿主域は双子葉、単子葉植物併せて 1,000 種類以上と植物ウイルスの中では群を抜いて広く、世界中で主要農作物に甚大な被害を与えている (http://www.oznet.ksu.edu/tospovirus/old_files/hostlist_old.html)。我が国では、種苗の広域流通化並びに媒介昆虫アザミウマ類の発生地域拡大に伴い、トマト、ピーマン、メロン、キュウリ等の作物をはじめ、キク、トルコキキョウ、シクラメン、リンドウ等の花き植物で全国的な猛威を振るっている (津田, 2006)。近年のガーデニングブームに乗って花き植物の流通が盛んになったことから、媒介昆虫や保毒植物

も知らず知らずのうちに全国的に拡がったと推察されている。

I トスポウイルスの分類基準

1990年, Law and MOYER は、鑑賞植物ニューギニアインパチエンス (*Impatiens* sp.) 分離株の M および S RNA がその当時のアメリカ産 TSWV の普通系統と分子生物学的に明らかに異なっていることを報告し、翌年にインパチエンスえそ斑紋ウイルス (現行和名: インパチエンスネクロティックスポットウイルス, 学名: *Impatiens necrotic spot virus*; INSV) と名付けた (Law et al., 1992)。本ウイルスの分類報告が契機となり、トスポウイルス属という新たな概念の元でこの類のウイルスが国際的に細分化されていくことになった。INSV が報告されて以来、トスポウイルスと思われるウイルスは N タンパク質遺伝子の塩基配列同一性を基準にして種別されている (NICHOL et al., 2005)。それ以前に分離されたトスポウイルスの命名は、N タンパク質遺伝子から推定されるアミノ酸配列の同一性と N タンパク質に対する血清型が検討され、国際ウイルス分類委員会の規定 (対象作物名+病徴+ウイルス) に則って種名が付けられてきた。しかしながら、近年の新種トスポウイルス発見ラッシュにより血清型の区別は省略され、いきなり N タンパク質遺伝子の同一性から種として分類する動きが定着するようになってしまった。

トスポウイルス属内のウイルス種とする基準は、先にも述べたように N タンパク質遺伝子並びにそれから推定されるアミノ酸配列の同一性である。N タンパク質遺伝子を選んだ理由としては、その遺伝子がコードされている S RNA が感染細胞内で大量に複製されることから格好の解析材料になりうること以外に、N タンパク質とウイルスゲノム RNA がヌクレオキャプシドを形成しウイルス遺伝子の複製・翻訳・粒子形成に深く関わる重要なタンパク質であることが考えられているからである。現在のところ、N タンパク質遺伝子の相同性から種分けをする際の目安としては、90%前後であれば系統、80 ~ 90%であれば他の性質 (例えば、宿主植物域、媒介昆虫種等) も併せて考慮して系統もしくは種とする検討をしている。80%以下の同一性であればいきなり種

Plant Virus Classification. (2) The genus *Tospovirus*. By Shinya TSUDA

(キーワード: 外被膜, アザミウマ, アンビセンスゲノム, 血清診断法, 遺伝子診断法)

表-1 第8次国際ウイルス分類委員会報告で発表されたトスポウイルス種一覧（候補含む）

ウイルス英名	ウイルス和名（本邦発生ウイルス）	略称
<i>Capsicum chlorosis virus</i>	トウガラシ退緑ウイルス	CACV
<i>Chrysanthemum stem necrosis virus</i>		CSNV
<i>Groundnut bud necrosis virus</i>		GBNV
<i>Groundnut chlorotic fan-spot virus</i>		GCFSV
<i>Groundnut ringspot virus</i>		GRSV
<i>Groundnut yellow spot virus</i>		GYSV
<i>Impatiens necrotic spot virus</i>	インパチエンスえそ斑紋ウイルス	INSV
<i>Iris yellow spot virus</i>	アイリス輪紋ウイルス	IYSV
<i>Physalis severe mottle virus</i>		PhySMV
（上記異名： <i>Melon yellow spot virus</i> ）	メロン黄化えそウイルス	MYSV
<i>Tomato chlorotic spot virus</i>		TCSV
<i>Tomato spotted wilt virus</i>	トマト黄化えそウイルス	TSWV
<i>Watermelon bud necrosis virus</i>		WBNV
<i>Watermelon silver mottle virus</i>	スイカ灰白色斑紋ウイルス	WSMoV
<i>Zucchini lethal chlorosis virus</i>		ZLCV

表-2 トスポウイルスを媒介するアザミウマ類一覧

アザミウマ学名	和名	伝搬ウイルス
<i>Ceratothripoides claratris</i> , SHUMSHER	—	CaCV
<i>Frankliniella fusca</i> , HINDS	—	TSWV
<i>Frankliniella intonsa</i> , TRYBOM	ヒラズハナアザミウマ	GRSV, INSV, TSWV
<i>Frankliniella occidentalis</i> , PERGANDE	ミカンキイロアザミウマ	CSNV, GRSV, INSV, TCSV, TSWV
<i>Frankliniella schultzei</i> , TRYBOM	—	CSNV, GRSV, INSV, TCSV, TSWV
<i>Frankliniella bispinosa</i> , MORGAN	—	TSWV
<i>Frankliniella zucchini</i> , NAKAHARA & MONTEIRO	—	ZLCV
<i>Scirtothrips dorsalis</i> , HOOD	チャノキイロアザミウマ	GBNV, GCFSV, GYSV
<i>Thrips palmi</i> , KARNY	ミナミキイロアザミウマ	MYSV, WBNV, WSMoV
<i>Thrips setosus</i> , MOULTON	ダイズウスイロアザミウマ	TSWV
<i>Thrips tabaci</i> , LINDEMAN	ネギアザミウマ	IYSV, TSWV

として扱うことができる（GOLDBACH and KUO, 1996）。

II 我が国で発生しているトスポウイルス

日本で分離されたトスポウイルスは、S RNA 上にコードされる N タンパク質遺伝子の配列の違いから 6 種が確認されている（表-1；奥田，2006）。

1 トマト黄化えそウイルス（TSWV）

1990 年以前に我が国で分離されたトスポウイルスは、塩基配列、ウイルス粒子内のヌクレオキャプシドの生化学的特性および感染宿主植物域の違いから、2 種が確認されるのみであった（津田，1999）。九州以北で発生し

た分離株のうち、トマト、ピーマンおよびタバコ分離株は、ヌクレオキャプシドの抗原性、S RNA の同一性が相互に高く、N タンパク質と S RNA の電気泳動的易動度が同様であることから、TSWV（普通系統；O 系統）とされた。この TSWV の N タンパク質遺伝子は、その当時三分節のゲノムすべての塩基配列が明らかとなっていた BR-01（ブラジル普通系統）のそれとの同一性が 98% 以上と極めて高かった。このことから、この分離株は国際的にも標準的な TSWV と判断された。

2 スイカ灰白色斑紋ウイルス（WSMoV）

一方、沖縄県のスイカおよび鹿児島県のトウガンから

分離されたトスポウイルスは、TSWVの局部病原宿主であるペチュニアにおいて、接種葉に局部えそ斑を生じさせた後全身感染、ウリ科植物で全身感染（普通系統では局部感染）、さらに全身感染宿主のタバコで接種葉に黄色斑点後軽い全身感染症状を呈した。これらの病徴はTSWVにより引き起こされるものとは明らかに異なっていた。また、媒介昆虫もTSWVを媒介しないミナミキイロアザミウマであると確認された。一方、生化学的実験において、ヌクレオキャプシド上に特異的抗原決定基の存在、並びにS RNA間に相互反応が認められないことが証明された。また、Nタンパク質およびS RNAの電気泳動的易動度も異なることから、明らかに別種であることが証明された（津田, 1999）。本病原ウイルスは台湾のスイカなどにも発生しており、そのS RNAの塩基配列の解析からもTSWVとは一線を画すべきとして、スイカ灰白色斑紋ウイルス (*Watermelon silver mottle virus*; WSMoV) と命名された（津田, 1994）。

3 メロン黄化えそウイルス (MYSV)

1992年、静岡県袋井市の温室メロンにトスポウイルスの感染によると思われる病害が発生した（池田ら, 2001）。メロン栽培圃場での発生経過、並びに静岡県農業試験場での圃場再現試験の結果から、本病害がミナミキイロアザミウマで媒介されることが強く疑われ、沖縄県などのウリ科作物で発生したWSMoVの本州への感染拡大が危惧された。しかし、本病原ウイルスを分析すると、トスポウイルスとしては若干大形の粒子で、先のWSMoVの抗体には反応しなかった。この時点で、本ウイルスは新種トスポウイルスであると疑われた。本ウイルスが感染しているキュウリ葉から抽出したヌクレオキャプシド分画を電気泳動で分離すると三分節の核酸成分が検出され、その最小成分の全塩基配列を解析すると、紛れもなくトスポウイルスS RNAが保有するアンピセンス構造であった。トスポウイルスの種を識別するNタンパク質遺伝子から推定されるアミノ酸配列の同一性は、TSWVと29%、WSMoVとは58%と軒並み低く、この時点で新種トスポウイルスと断定された。本ウイルスの和名はメロン黄化えそウイルス、学名は *Melon yellow spot virus* (MYSV) と提唱された（加藤・花田, 2000）。しかし極めて残念なことに、本ウイルスは、1998年オランダの研究グループから新種トスポウイルスとして報告された *Physalis sever mottle virus* (PhySMV) のNタンパク質推定アミノ酸配列と99.6%という極めて高い同一性を示した（加藤・花田, 2000）。MYSVの報告はPhySMVの発表に比べ一足遅かったがために、第8次国際ウイルス分類委員会が取りまとめたトスポ

ウイルス属の中ではPhySMVの陰に隠れてしまった（表-1）。その後の本ウイルスによる被害発生状況を鑑み、オランダの研究グループはPhySMVをMYSVと改名することに賛同していることから、近い将来、国際ウイルス分類委員会の報告においても改められると推察される。

4 インパチエンスえそ斑紋ウイルス (INSV)

INSVは、南九州で発生したWSMoVと同時期（1990年以前）に世界の舞台に登場してきたウイルスで、先述したとおり *Bunyaviridae* 科内にトスポウイルス属を確立するうえで重要な役割を果たした。我が国におけるINSVの登場は、1998年の静岡県でのバーベナである（入山ら, 1999）。その後、岡山県、福岡県および秋田県で確認され、さらに神奈川県、栃木県、長野県、山梨県、群馬県および千葉県とその勢力を全国に拡大している。被害作物は主として花き類が中心で、インパチエンス、バーベナ、シクラメン、シネリリア、トルコギキョウ等、34科の植物で発生が報告されている（河野, 2006）。

5 アイリス輪紋ウイルス (IYSV)

アイリス輪紋ウイルス（現行和名：アイリスイエロースポットウイルス、学名：*Iris yellow spot virus*; IYSV）は、2000年に千葉県のアルストロメリアで初発生が確認された。本ウイルスは、既にオランダのダッチアイリス、ブラジルのタマネギ、イスラエルのトルコギキョウから発生報告がされていたため、本邦での同定もさほど時間を要さなかった（Okuda and Hanada, 2001）。千葉県での発生後、静岡県・佐賀県でのトルコギキョウ、千葉県でのタマネギなど昨年までに11県での発生が報告されている（東京都病虫害防除所発生予察情報特殊報平成17年度第四号）。本ウイルスの特徴として、ユリ科を中心として比較的狭い宿主範囲並びにネギアザミウマが媒介昆虫であることが知られている（Ullman et al., 2002）。IYSVは、オランダ分離株とブラジル分離株間で、Nタンパク質推定アミノ酸配列に約90%程度の開きがあることが認められており、このことからIYSV_{NL}あるいはIYSV_{BR}として種内系統の存在が議論されるようになってきている（Pozzer et al., 1999）。我が国でも、静岡県・佐賀県のトルコギキョウから分離されたINSVの分離株中に推定アミノ酸配列の同一性が約90%となる複数の株が認められ、先の系統の存在が本国内でも示唆された（土井ら, 2003）。興味深いことに、トルコギキョウには、これら二つの系統に対して感染性を異にする品種の存在が認められた。系統判別品種として、あるいは本ウイルス抵抗性品種としての利用価値が示唆されている（土井ら, 2003）。

6 トウガラシ退緑ウイルス (CaCV)

2002年12月、高知県安芸郡の施設栽培ピーマンでこれまでのトスポウイルスによる被害とは異なった退緑斑紋や極めて明瞭な輪紋症状が発生し、翌年に南国市、さらに2004年では香美郡および土佐市のピーマンへと発生拡大した。本ウイルス種を同定したところ、日本では未確認のトウガラシ退緑ウイルス (*Capsicum chlorosis virus*; CaCV) であることが判明した (奥田ら, 2005)。CaCVは、2001年にオーストラリアのトウガラシ類とトマトで発生した新種トスポウイルスであり (McMICHAEL et al., 2002), また日本では未確認のアザミウマ (*Ceratothripoides claratris*) により媒介されるとの報告がある (PREMACHANDRA et al., 2005)。なぜ高知県で発生したのか、謎多きトスポウイルスである。

III トスポウイルスの同定法

トスポウイルスが感染した植物で認められる症状は、いずれのウイルスでもほぼ同様である。トスポウイルスの種を同定する方法として、近年開発された最も信頼のおける血清診断法あるいは遺伝子診断法を紹介する。

1 血清診断同定法

トスポウイルス属の14種ウイルス間には、血清関係が認められる種と認められない種が混在している。幸いにも、現時点で本邦に発生しているトスポウイルス6種は相互に血清反応を示さない。それら6種のうち、CaCVを除く5種までの診断用抗血清が(社)日本植物防疫協会から市販されている。同社の技術情報のウェブページに記載されているDAS-ELISA法の手順に従い血清診断することができる (<http://www.jpnp.ne.jp/kenkyusho/index.html>)。本手法は、最低限の器具としてELISAプレートのみが必要であり、それ以外の特殊な器具・機材がなくても、ウイルス種を特定するなどの定性的反応であればいかなる場所でも十分実行可能な方法である。

2 遺伝子診断同定法

多くの研究機関では、ウイルス検出法として日常的にRT-PCR法が利用されている。近年開発されたトスポウイルスの種を同定するRT-PCR法を紹介する。

(1) L RNAを対象とした同定法 (CHU et al., 2001)

トスポウイルスが保有する三分節ゲノムのうち、それらの塩基配列の共通性がトスポウイルス属内で最も保存されているのはL RNAである。その性質を利用して、L RNA配列の中で属内共通性の高い配列をコンピュータで検索し、その配列に対して結合するディジェネレーションプライマーを利用してPCR反応を仕掛ける方法で

ある。反応後に得られる増幅DNAをHind III, Xba IおよびEcoR Iの三つの制限酵素により消化し、電気泳動パターンに現れる多型の差異により種を同定する。本手法を報告した論文では、TSWV, INSV, WSMoV等を含む5種トスポウイルスを種別することが可能であったとしている。

(2) S RNAを対象とした同定法, その1 (OKUDA and HANADA, 2001)

本法は、上記L RNAを対象とした同定法と同様の発想で、対象ゲノムをS RNAとした手法である。トスポウイルスゲノムS RNAの3'末端8塩基までは属内で完全に一致する。また、3'末端から上流にあるNタンパク質遺伝子領域には、転写開始から約90残基あたりに、トスポウイルス属内で共通性の高い8残基のアミノ酸配列が認められる。この3'末端の配列と、Nタンパク質遺伝子の共通配列から考案されたディジェネレーションプライマーを用いてRT-PCR法を実行することにより、多くのトスポウイルスを検出することが可能となった。この得られた増幅DNA断片をDra I, Hind III, Alu IおよびTaq Iなどの制限酵素で処理し、その後の電気泳動で観察されるパターンの違いによりウイルス種を同定する。2004年に高知県で本邦新発生したCaCVは、この方法で増幅されたDNA断片の塩基配列を解析したことによりウイルス種が判明した。

(3) S RNAを対象とした同定法, その2 (UGA and TSUDA, 2005)

上記2種類の方法では、RT-PCR法で増幅したDNA断片を制限酵素により消化して電気泳動するか、もしくは増幅DNA断片の塩基配列を解読してコンピュータ上で他のトスポウイルスの配列と比較する必要がある。三番目に紹介する手法は、先と同様にディジェネレーションプライマーを用いるが、RT-PCR反応後に増幅されるDNA断片の大きさがウイルス種ごとに異なるため、電気泳動するだけで原因ウイルスの同定が可能となるものである。これまでに我が国で発生が認められたTSWV, WSMoV, MYSV, INSVおよびIYSVの5種を対象に、それらS RNAの3'末端15塩基までのディジェネレーションプライマーと、その上流に当たるNタンパク質遺伝子内にウイルス種に特異的に反応する5種類のプライマーの合計6種類のプライマーを混合してRT-PCR反応を実行すると、ウイルス種ごとに長さの異なるDNA断片が増幅される。本手法は、未知のトスポウイルスを検出することは困難であるが、圃場内に発生している5種トスポウイルス種の同定、あるいはウイルス種ごとの発生頻度等を求めるのには好適な手法である。

おわりに

ウイルス種とアザミウマ種間には、WSMoV並びにMYSVとミナミキイロアザミウマ、IYSVとネギアザミウマといったように、特定の組み合わせが認められる傾向にある。もちろんTSWVのように多くのアザミウマ種を媒介生物とするウイルスもある。しかしながら、トスポウイルスの種を同定することは、病原体を明らかにする学術的意義とともにそのトスポウイルスを媒介するアザミウマ種に卓効のある農業を選択するという本ウイルス病の防除戦略上重要な情報を提供することにも繋がる。本紙面で紹介した種々の手法を使いながら現在猛威を振っているトスポウイルス種を同定するとともに、いまだ見ぬ新種トスポウイルスの発生にいち早く対応できる診断・同定技術を農業現場の最前線で整備する必要がある。

引用文献

1) CHU, F.-H. et al. (2001): *Phytopathology* 91:361 ~ 368.

- 2) 土井 誠ら (2003): 日植病報 69(3):181 ~ 188.
- 3) GOLDBACH, R. and G. KUO (1996): *Acta Hort.* 431:21 ~ 26.
- 4) 池田二三高ら (2001): 植物防疫 55:397 ~ 400.
- 5) 入山敬一ら (1999): 日植病報 65(3):379.
- 6) 加藤公彦・花田 薫 (2000): 同上 66(3):252 ~ 254.
- 7) 河野敏郎 (2006): 農業技術 61(2):73 ~ 75.
- 8) LAW, M. D. et al. (1992): *Virology* 188:732 ~ 741.
- 9) McMICHAEL, L. A. et al. (2002): *Aust. Plant Pathol.* 31:231 ~ 239.
- 10) NICHOL, S. T. et al. (2005): *Virus Taxonomy*, Elsevier Academic Press, San Diego, p. 695 ~ 716.
- 11) 奥田 充ら (2005): 日植病報 71(3):235.
- 12) ——— (2006): 農業技術 61(2):82 ~ 86.
- 13) OKUDA, M. and K. HANADA (2001): *J. Virol. Methods* 96:149 ~ 156.
- 14) POZZER, L. et al. (1999): *Plant Dis.* 83:345 ~ 350.
- 15) PREMACHANDRA, W. T. S. D. et al. (2005): *Phytopathology* 95:659 ~ 663.
- 16) SCHMALJOHN, C. S. et al. (1995): *Virus Taxonomy*, Arch. Virol. (suppliment 10), Springer-Verlag Wien, New York, p. 300 ~ 315.
- 17) 津田新哉 (1994): 植物防疫 48:497 ~ 501.
- 18) ——— (1999): ウイルス 42(2):119 ~ 130.
- 19) ——— (2006): 農業技術 61(2):57 ~ 62.
- 20) UGA, H. and S. TSUDA (2005): *Phytopathology* 95:166 ~ 171.
- 21) ULLMAN, D. et al. (2002): *Advances in Botanical Research*, Academic Press, London, 36, p. 113 ~ 140.

書評

樹の中の虫の不思議な生活
—穿孔性昆虫研究への招待—
柴田叡弐・富樫一巳 編著

A5変型, 290ページ 2,940円(税込み)
東海大学出版会(2006年9月20日)発行

大阪府の「お茶とりんごと蚕以外はなんでもある」多品目少量生産の農林業, また, 庭園・家屋・食品・不快・畜産(ミツバチ)害虫等々の都市的ニーズのおかげで, 多様な害虫を相手にさせてもらった幸運な(不幸な?)書評子は, 害虫に関してある「スペクトル」観を持つようになった。

庭園害虫以下は美観をはじめ, 被害を金額に換算しにくい問題があり, 二次元以上のスペクトルが必要なためここでは省略し, 「花卉・野菜・水稻・果樹・林業」という一次元スペクトルである。左に向かうほど栽培サイクルが短く, 要防除水準が低く, 殺虫剤による迅速な対応が求められる傾向がある。

そして, 果樹と林業の間には格別大きな距離がある。林業では苗木を除いて殺虫剤を事実上使用しない(費用対効果の問題によりできない)ためである。すなわち, 林業害虫では長期の視点で害虫や天敵の生理・行動・生

態をじっくり調査・研究し, 対策を講じるほかはない。

そのうちでも, 樹木内部の害虫を調査することがどのくらい時間と労力を要し, また, 得られる結果が少ないかということは, 害虫研究にたずさわった人にはすぐ想像がつくだろう。果樹でも樹木内部で生活する害虫は多く, 生理・生態に関する情報が少なく, さらに, 殺虫剤がターゲットに届きにくいいため, 対策が容易でないことはご承知のとおりである。水稻・野菜・花卉でも植物体内に潜る害虫は同様の傾向がある。

本書では樹木内部で生活するカミキリムシ・ゾウムシ・キクイムシ・クワガタムシ・キバチ・ハマキガ・シロアリ類およびその天敵などの生理・行動・生態について, 樹木側の生理・生態と合わせて研究した非常に興味深い結果が多数紹介されている。断片的に知っていることも多いが, 総説になると全体がよく見える。今回あらためて, 新鮮な感動をいくつも覚えた。

果樹では樹木内部の害虫研究を本書のレベルで行うことはありえず(このレベルのじっくりした研究が実際上許されない), 短期的結果を求められる昨今ではなおさらである。林業害虫の研究は農業害虫担当者にあまり知られていないが, IPMのアイデアの宝庫でもある。紙面の関係で詳述しないが, 本書を農業害虫(とくに果樹害虫)担当者に強く勧めたい。

(田中 寛 大阪府立食とみどりの総合技術センター)