

岩手県における網羅的 RNA ウイルス検出技術を用いた植物ウイルス病診断・防除の取り組み

岩手県農業研究センター ^{かん}菅 ^{ひろ}広 ^{かず}和
 岩手県病害虫防除所 ^さ佐 ^{とう}藤 ^み美 ^わ和 ^こ子
 岩手生物工学研究センター ^{しらかわ}白川 ^{あすか}明日佳・^{せきね}関根 ^{けんたろう}健太郎

はじめに

岩手県では、農業生産現場で発生する病害虫の防除を効果的なものとするため、現地指導機関などで対応できない病害虫診断の窓口を病害虫防除所とし、試験研究機関と連携して診断を行う体制を整備している(図-1)。病害虫防除所への病害虫診断依頼は、水稻・野菜・果樹・花き等の種々の作物において、病虫害だけでなく葉害・生理障害による生育不良も持込まれるため、診断業務経験の浅い担当者は正確な診断結果を得るため日々苦心している。なかでも、ウイルス病の診断は、症状が生理障害と類似しているものや、作物の品種によって症状が異なるものがあり、診断の難しいケースが多い。

一般的なウイルス検定法は、検定植物を用いた生物検定法、ELISA 法や TPI 法等の特異的抗体を用いた免疫学的検定法、RT-PCR 法等の塩基配列情報を用いた遺伝子診断法等が一般的で、本県における診断業務でも頻繁に用いられている。これらの方法は、診断の過程でウイルス種に特異的な抗体やプライマーを利用するため、病徴などにより既報のウイルス種と推定できる場合は有効である。しかし、既報のウイルス種に該当しない場合は未報告のウイルスまで想定した診断が必要となり、多くの時間とコストを要する。また、診断対象の植物について発生報告のないウイルスが病原である場合は、従来の診断方法では対応が困難である。

このようなウイルス病診断の難しさを克服するため、公益財団法人岩手生物工学研究センター(以下、岩手生工研)では「網羅的 RNA ウイルス検出技術」(略称: DECS 法)を開発した(Kobayashi et al., 2009)。植物ウイルスの多くは核酸として RNA をもち、増殖の過程で 2 本鎖 RNA (dsRNA) を作るため、これを検出するこ

とでウイルス感染の有無を判断できる。DECS 法は簡易な dsRNA の抽出と、その塩基配列の解析により、植物に感染しているウイルスを同定する技術である。

本稿では、DECS 法の概要と、岩手県の農業生産現場で発生した新奇病害等の診断に本法を活用した事例について紹介する。

I DECS 法の概要

DECS 法は以下の二つの工程 (DECS1 および 2) で構成される(図-2)。

DECS1: 岩手生工研が独自に開発した dsRNA 結合タ

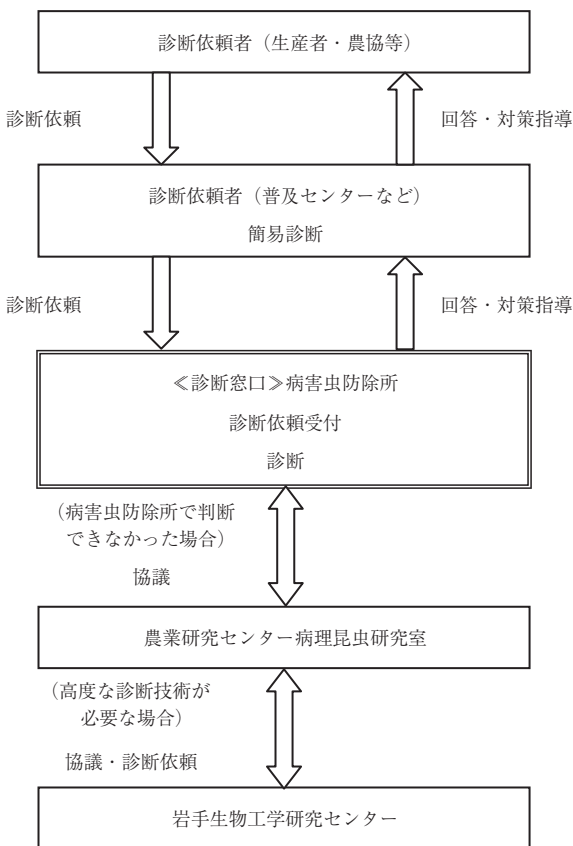


図-1 岩手県における病害虫診断体制

Approach of Diagnosis with dsRNA Universal Detection Method of Plant Virus in Iwate. By Hirokazu KAN, Miwako SATO, Asuka SHIRAKAWA and Ken-Taro SEKINE

(キーワード: ウイルス病, 網羅的 RNA ウイルス検出技術, DECS 法, 診断)

ンパク質「GST-DRB4* (スターと読む)」を用いて、ごくわずかな植物組織 (数百 mg) からウイルス由来の dsRNA を抽出する。その後、dsRNA 抽出液を電気泳動することにより dsRNA のバンドを検出し、ウイルスの感染を確認する (図-3)。この工程に要する時間はおよそ3~4時間と非常に迅速性が高く、作業も容易である。本稿では実験手順の紹介は割愛するが、dsRNA の抽出法については Atsumi et al. (2015 a) の文献を参照願いたい。また、DECS1 の工程に必要な試薬はキットとして製品化されている (株式会社医学生物学研究所)。

DECS2: DECS1 で得られた dsRNA を鋳型として逆転

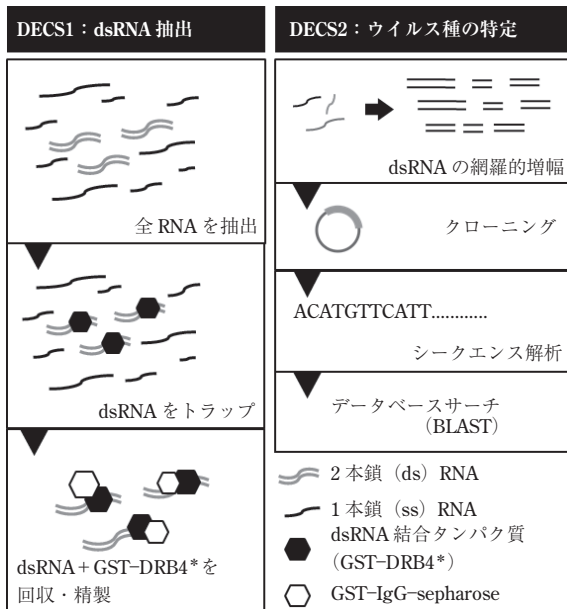


図-2 網羅的 RNA ウイルス検出技術 (DECS 法) の概略

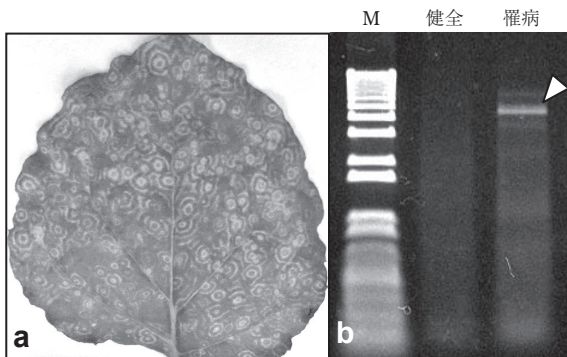


図-3 DECS1 で抽出した dsRNA の電気泳動像

a: リンドウ子房輪紋ウイルス (GORV) による *Nicotiana benthamiana* の罹病葉。
b: a の罹病葉および健全植物から抽出した dsRNA の電気泳動像。

写反応を行い、cDNA を得る。次に、この cDNA を網羅的に増幅し、プラスミドベクターにクローニングする。クローニングされた dsRNA 由来の cDNA の塩基配列をシーケンサーを利用して決定する。得られた塩基配列情報から BLAST などのプログラムを用いて、データベースに登録されたウイルスの塩基配列情報との相同性検索を行い、診断対象の植物に感染しているウイルス種を同定する。

以上のように、DECS 法は診断対象の植物に感染しているウイルスの見当がつかない場合でも、少量の植物サンプルをもとに簡便かつ迅速にウイルスの感染を確認でき、さらに塩基配列の解読によりウイルスの同定までを可能にした。また、ウイルス感染を確認することだけが目的であれば DECS1 の工程だけでも検定できるため、シーケンサーを有しない機関でも活用できる。

II 岩手県における DECS 法の活用事例

1 トルコギキョウえそ輪紋病

2012年6月に盛岡市内の施設栽培トルコギキョウで、葉にえそ症状を呈する株がハウス内全体に見られた。症状は、葉の黄化、えそ斑点、えそ輪紋、茎のえそ条斑および株の萎縮等であり、品種によって異なった (口絵①)。藤永ら (2009) によれば、トルコギキョウに感染するウイルスは日本国内で14種報告されており、その病徴も類似することから、原因となっているウイルスが絞り込めない状況では、従来、このようなケースでは、検定植物による生物検定の実施や、複数種類の ELISA キットの新規購入など、診断結果を得るまでに時間と費用を要すると考えられた。そこで、岩手生工研で DECS 法により診断したところ、アイリス輪紋ウイルス (*Iris yellow spot virus*: IYSV) が検出され、トルコギキョウえそ輪紋病と診断された。そこで、本病発生圃場周辺を調査した結果、露地栽培ネギの中に斑点症状を呈した株が見つかり、ELISA 法によって IYSV が検出された。IYSV はネギアザミウマによって媒介されるため、本病の感染拡大を防ぐにはネギアザミウマの防除を徹底することが重要と考えられたことから、発生農家に対してアザミウマを対象とした防除対策を指導し、まん延防止を図った。なお、本ウイルスは県内で初確認であったことから、2012年8月 (発生確認の2か月後) に発生予察特殊報を発表し (岩手県病害虫防除所, 2012)、本ウイルスへの注意喚起と防除対策の周知を行った。

2 リンドウこぶ症関連ウイルス

岩手県は生産量、栽培面積ともに全国一のリンドウ産地であるが、1980年代から県内各地のリンドウ栽培圃

場において「こぶ症」と呼ばれる生育障害が発生し、発生圃場も拡大している(岩館ら, 2006)。こぶ症の特徴は、葉基部の茎に「こぶ」が形成されることであり、被害株は節間が短縮し草丈が短く、商品価値を全く失う(口絵②)。そのほかにも茎頂葉の黄化、越冬芽基部の肥大、クラウン部の癌腫症状等多様な外観症状を示す。こぶ症は、定植2年目から見られる事例もあるため、農家の生産意欲の減退を招き、産地の維持・拡大の阻害要因となっている。

岩手県では、これまで多くの試験研究機関や関係機関と連携しながら「こぶ症」の発生原因や防除対策についての研究に取り組んできたが、長きにわたって原因が解明できず、そのため、有効な対策も提示できない状況にあった。

近年、リンドウこぶ症が接木伝染するという発見(千葉ら, 2008)を契機として、ウイルス性の病害である可能性を疑い、岩手生工研において DECS 法による検定を行った。その結果、こぶ症発症株から新規ウイルスが見いだされた。県内外のリンドウ圃場のこぶ症発症株と健全株を大規模に調査したところ、こぶ症の発症と本ウイルスの存在に相関が見られたため、リンドウこぶ症関連ウイルス(*Gentian Kobu-sho-associated virus*: GKaV)として報告した(KOBAYASHI et al., 2013; ATSUMI et al., 2013)。

リンドウこぶ症の原因がウイルスである可能性が示されたことから、その後も岩手生工研では GKaV の病原性因子の探索などを行い、GKaV がリンドウこぶ症の原因であることを裏付けるための研究を継続している。また、岩手県農業研究センターでは、GKaV の伝搬経路の遮断による合理的な防除対策の確立を目指し、現在は GKaV のリンドウへの感染経路(媒介生物や花粉・種子伝染性等)の解明に取り組んでいる。

3 リンドウ子房輪紋症

2009年に岩手県内のリンドウの採種圃場で親株の子房表面に輪紋症状(図-4)を呈するものが確認され、症状からウイルスが病原と疑われたものの、既報にない症状であったことから、新奇のウイルスが関与していること想定し、DECS法を用いた検定を行った。その結果、*Plectuvirus* 属などと相同性を持つ新奇ウイルス様配列が輪紋症状発症株から特異的に検出され、棒状粒子が観察された。

さらに、本症状の再現および伝搬経路を明らかにするため、健全な子房親へ上記のウイルスを保毒した花粉を交配したところ、RT-PCR法により子房親への感染が確認された。以上から、本ウイルスをリンドウ子房輪紋症



図-4 リンドウ輪紋ウイルス (GORV) による子房の輪紋症状

の病原体とし、リンドウ子房輪紋ウイルス(*Gentian ovary ring-spot virus*: GORV)と同定した(ATSUMI et al., 2015 b)。また、RT-PCR法により花粉のウイルス検定を行い、無毒花粉を交配に用いることでウイルスの伝搬を防ぐことができることを確認し(岩手県農業研究センター, 2013)、対策として実施した。

4 リンドウまだら退色症状

2012年に奥州市内の一部りんどう栽培圃場で葉のえ死斑点および退緑症状(リンドウまだら退色症状)を呈する株が確認され(口絵③)、症状が上位葉に及んだ圃場では出荷に影響を与えた。葉の症状から、ウイルス病または生理障害が疑われたため、病害虫防除所および農業研究センターにおいて、ELISA法やTPI法による診断を行った。その結果、ソラマメウルトウイルス(*Broad bean wilt virus*: BBWV)やキュウリモザイクウイルス(*Cucumber mosaic virus*: CMV)が一部の株から検出されたものの、発症株に共通したウイルスの検出は見られなかった。本症状がBBWVやCMVによる症状と異なることと併せて、これらが原因ではないと診断した。そこで、リンドウで未報告あるいは未知のウイルスの可能性を考え、DECS法による診断を試みた。しかし、一部の株から県内初確認のリンドウモザイクウイルス(*Gentian mosaic virus*: GeMV)が検出されたものの、発症株に共通した検出ではなく、症状も異なるため、本症状の原因がウイルスである可能性は低いと考えられた。そこで、本症状を生理障害と仮定し、土壌・作物養分に関する調査および県内主要産地における発生実態調査を行った結果、土壌物理性と本症状との関連が示唆されたため、今後はこの点に注目して発症機構の解明を目指すこととしている(阿部ら, 2015)。

おわりに

以上のように、多数のウイルスが病原として報告されていいて検定対象のウイルスが絞り込めない場合（トルコギキョウえそ輪紋病の事例）や、未知のウイルスが原因となっている場合（リンドウこぶ症関連ウイルス、リンドウ子房輪紋症の事例）についても、DECS法を用いることにより効率的に診断結果を得ることができる。また、DECS法は検定対象を絞らずにウイルスを検出できることから、ウイルスが病原か不明な症状の原因を絞り込むことにも活用することができる（リンドウまだら退色症状の事例）。

特に、品目や品種が多様な花きや野菜等の園芸品目においては、病原となるウイルスや症状も多様であることから、診断の際にDECS法が強力なツールになると考えられる。

また、岩手生工研では、DECS法を応用したウイロイドの検出技術確立にも取り組んでいる。これまでに県内のキクからキクわい化ウイロイド (*Chrysanthemum stunt viroid*: CSVd) の検出に成功しており、今後、本技

術がさらに幅広く活用されることが期待される。

謝辞 本稿を取りまとめるにあたり、今回紹介した事例の診断に携わった岩手生工研および岩手県病害虫防除所ならびに岩手県農業研究センターの諸氏には多大なるご助言をいただいた。ここに厚く御礼申し上げる。

また、本稿で紹介した試験の一部は農林水産省が措置して農研機構生研センターが実施する「革新的技術創造促進事業（異分野融合共同研究事業）理学・工学との連携による革新的ウイルス対策技術の開発」により行われたものである。

引用文献

- 1) 阿部 弘ら (2015): 園学研 14 別 2: 245 (講要).
- 2) ATSUMI, G. et al. (2013): J. Gen. Virol. 94: 2360 ~ 2365.
- 3) ——— et al. (2015 a): Plant Virology Protocols, Methods in Molecular Biology 1236: 27 ~ 37.
- 4) ——— et al. (2015 b): J. Gen. Virol. 96: 431 ~ 439.
- 5) 千葉賢一ら (2008): 北日本病虫研報 59: 74 ~ 76.
- 6) 藤永真史ら (2009): 植物防疫 63: 423 ~ 428.
- 7) 岩館康哉ら (2006): 同上 60: 518 ~ 522.
- 8) 岩手県病害虫防除所 (2012): 平成 24 年度病害虫発生予察情報 特殊報第 2 号.
- 9) 岩手県農業研究センター (2013): 平成 25 年度 岩手県農業研究センター試験研究成果書 (指-18-1).
- 10) KOBAYASHI, K. et al. (2009): J. Gen. Plant Pathol. 75: 87 ~ 91.
- 11) ——— et al. (2013): ibid. 79: 56 ~ 63.

発生予察情報・特殊報 (27.11.1 ~ 11.30)

各都道府県から発表された病害虫発生予察情報のうち、特殊報のみ紹介。発生作物：発生病害虫（発表都道府県）発表月日。都道府県名の後の「初」は当該都道府県で初発生の病害虫。

※詳しくは各県病害虫防除所のホームページまたは JPP-NET (<http://www.jpnp.net/>) でご確認下さい。

- ゴマ、ササゲ、オクラ、ナス：ミナミアオカメムシ（神奈川県：初）11/2
- なし：キクイムシ類（サクセスキクイムシ、ハンノキキクイムシ）（宮城県：初）11/10
- メボウキ（バジル）：メボウキ（バジル）べと病（仮称）（神奈川県：初）11/17
- 日本なし：ニホンナシハモグリダニ（仮称）（長野県：初）11/20
- サツマイモ：ヨツモンカメノコハムシ（愛媛県：初）11/20
- モモ：果実赤点病（福岡県：初）11/20
- ナシ：ヒメボクトウ（福岡県：初）11/20
- マンゴー：キイロワタフキカイガラムシ（鹿児島県：初）11/20
- トマト：退緑萎縮病（茨城県：初）11/30