温州萎縮病をめぐる最近の話題

農林水産省果樹試験場興津支場 **岩** 波

はじめに

わが国のカンキツ栽培上被害が大きいウイルス病は, 温州萎縮病、ステムピッティング病、接木部異常病など が知られている。これらの病害の発生生態、病原ウイル スの性状、及び防除対策については多くの研究がされ、 ステムピッティング病に関しては弱毒ウイルスを利用し た防除技術が実用化に近いレベルで確立しつつある。し かし、その他のウイルス病ではウイルスフリー樹の圃場 での再感染防止技術が未開発のうえ、近年新たな発生生 態が知られるようになり、取り組むべき課題はますます 大きくなってきている。さらに, 昨今人気品種の急速な 高接ぎ増殖と全国規模での苗木の移動は、これまで比較 的局地的な発生と考えられていた温州萎縮病のまん延な ど、新たな問題を生じてきている。本稿においては、筆 者らの研究室において中心的に取り組んできた温州萎縮 病について, 最近の成果を含む二, 三の話題を述べてみ たい。

I 温州萎縮病のまん延

温州萎縮病は、ウンシュウミカン(Citrus unshiu Marc.)で新葉の萎縮、節間短縮を起こし、樹勢を低下させる被害の大きい病害である。罹病樹では果実の収量が低く、品質も悪い。病原の温州萎縮ウイルス(satsuma dwarf virus, SDV)は直径約28 nm の球状ウイルスであるが、その性状は不明の部分が多く、未分類ウイルスとされてきた。最近の分子生物学的研究により、コモウイルス属やネポウイルス属に比較的近縁である新しい属に分類されるべき可能性が示唆されている(Iwanami and Ieki, 1996 a)。

温州萎縮病は、接ぎ木伝染のほかに土壌伝染するとされるが、そのベクターは不明である。この土壌伝染の速度は数年で隣接樹に伝染するほど緩慢であるので、栽培者が自ら保毒穂木を圃場に持ち込まない限り、その産地では問題とならなかった。ウンシュウミカンでは、上述のように枝の萎縮症状が顕著であり、栽培者が無意識に保毒穂木を避けていたので、温州萎縮病の発生は局地的なものであった。

ところが,近年,中晩性カンキツへの品種更新に伴い,保毒穂木が一部で出回るようになってきた。これは 保毒樹で穂木が高接ぎ増殖されたのが原因と考えられる。SDV が昨今,全国的に急速に広がったのは,中晩性 カンキツは比較的,枝の萎縮症状が軽いので,栽培者が 気付かないまま保毒穂木を圃場に持ち込む場合が多かっ たためと考えられる。SDV は中晩性カンキツにおいて, 枝の萎縮症状は軽いが,果実の収量や品質はウンシュウ ミカン同様,著しく低下させるので,問題となってきて いる。

Ⅱ 温州萎縮ウイルスの近縁ウイルスと系統

1 近縁ウイルス

温州萎縮ウイルスには、これまで以下の3種が近縁ウイルスとして報告されている(田中、1969)。

・カンキツモザイクウイルス (Citrus mosaic virus, CiMV)

SDV 同様にウンシュウミカンの葉を萎縮させるほか,果実に特徴的な斑紋(トラミカン)を起こす。

・ナツカン萎縮ウイルス(Natsudaidai dwarf virus, NDV)

ナツミカン(Citrus natsudaidai HAYATA)の葉を萎縮させる。ウンシュウミカンに人工接種すると、SDV と同様な萎縮症状を起こす。

・ネーブル斑葉モザイクウイルス (navel orange infectious mottling virus, NIMV)。

ネーブルオレンジ (Citrus sinensis Osbeck var. brasiliensis Tanaka)の葉に一部にネクロシスを伴うモットリングを生ずる。ウンシュウミカンに人工接種すると,SDV と同様な萎縮症状を起こす。

これらのウイルスはカンキツ及び草本植物における反応の共通性から、SDV の近縁ウイルスとされてきたが、血清関係やウイルスの理化学的性状の解明は不十分であったので、それらの比較検討を行った。

(1) 血清関係

SDV と近縁ウイルスとの血清関係については,寒天ゲル内拡散法による実験が数例報告されているが,結果は必ずしも一致していない(今田ら,1977;字杉ら,1986)。寒天ゲル内拡散法は血清関係を決定する最も標準的な方法であるが,高純度の純化標品を用いた場合の

み、再現性のある結果が得られる。SDV と近縁ウイルス のように高度の純化標品が得にくいウイルスにおいて は、特異反応と非特異反応との識別が容易な方法が適当 である。したがって、筆者はウエスタンブロット法を用 いて、外被タンパク質の分子量及び抗原性を比較した (岩波ら, 1993, 以下 NDV に関して、未公表データを含 む)。その結果、SDV と近縁ウイルスの外被タンパク質は いずれも大小2成分であり、大きい成分の分子量は約43 K/Da でほぼ一定であったが、小さい成分の分子量は SDV で22 K/Da, CiMV と NDV で23 K/Da, NIMV で 22.5 K/Da であった。また, SDV 抗血清を用いたウエ スタンブロット法では、SDV が強く、CiMV と NDV が やや弱く反応し、NIMV は全く反応しなかった。さら に、CiMV 抗血清を用いた場合は、CiMV 及び NDV が 強く、SDV がやや弱く反応し、NIMV の大きい成分は全 く反応しなかった。したがって、SDV と CiMV, NDV は 互いに血清関係があるが、NIMV は全く血清関係のな い、やや離れたウイルスであることが示唆された。すな わち、外被タンパク質の分子量及び血清関係で分類する と、{SDV、(CiMV、NDV)}、NIMVとなる。

(2) 外被タンパク質のアミノ酸配列

外被タンパク質(coat protein, CP)のアミノ酸配列の相同性は、ウイルス間の類縁関係を論ずる重要な手がかりとして近年注目されている。現在までに、CiMVの全アミノ酸配列(大きい成分 439 残基,小さい成分 217 残基)が明らかにされているが、その他のウイルスは大、小2成分とも N 末端の $10\sim10$ 数残基の配列のみ明らかになっている段階で、相同性の比較は十分に行われていない(岩波・家城、1994;Iwanami and Ieki, 1996 b)。解読されたこの 10 数残基のアミノ酸配列をもとに比較した限りでは、血清関係と同じ $\{SDV, (CiMV, NDV)\}$, NIMV という類縁関係が可能であった。

(3) RNA 依存性 RNA ポリメラーゼ

RNA 依存性 RNA ポリメラーゼ(RNA dependent RNA polymerase, RdRp) 遺伝子のアミノ酸配列レベル

での相同性は、外被タンパク質と並んで、分類上の重要な指標とされる。これまでに SDV と CiMV について、全塩基配列が決定され、推定されるアミノ酸配列は SDV が 682 残基、CiMV が 683 残基で、その相同性は 78%と比較的高く、SDV と CiMV が系統進化のうえで近縁であることが明らかとなった。

(4) 遺伝子構造

SDV, CiMV, NDV, NIMV のいずれもウイルス核酸は約7.0 kb, 及び約5.4 kb の2成分から成り, 3′末端にポリA配列を持つRNAであり, それぞれRNA1, RNA2と呼ばれる(Iwanami and Ieki, 1996 a)。これまで, SDVとCiMVについて, RdRp遺伝子がRNA1の3′末端に, CP遺伝子がRNA2の3′末端にコードされていることが明らかになり, 両ウイルスの遺伝子構造が類似していることが示唆されている(図-1)。NDV, NIMVの遺伝子構造の解明はまだ未着手である。

(5) CiMV, NDV はSDV の系統か?

以上の結果より、現在のところ、SDV と近縁ウイルス は {SDV, (CiMV, NDV)}, NIMV と分類するのが妥 当であると考えられる。ここで、血清関係を重視して、 { }内の3種のウイルスは一つのウイルスとしたほうが 適切であると思われる。一般の植物ウイルスの分類基準 から見て, カンキツ品種の反応の差だけで別のウイルス とするのは無理があり、可能な限りまとめたほうがよい と考えられるからである。SDV と CiMV の RdRp 遺伝 子の78%というアミノ酸配列の相同性は,他の植物ウイ ルスの分類の例から見ても、CiMV が SDV の系統であ ることを示す証拠と考えられる。NIMV は SDV と血清 関係が全くなく, ノーザンブロット法による分析でも, SDV と NIMV の間の RdRp 遺伝子の相同性は比較的 低いことが示唆されているので (岩波, 未発表), これは 別ウイルスとしたほうが適切である。そして、NIMV は SDV に共通する性状を持っているので、これが本当の意 味での近縁ウイルスである。以上の考察を図-2にまとめ た。

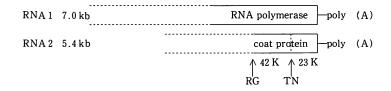


図-1 SDV 及び CiMV の遺伝子構造

SDV, CiMV とも RNA 1 の 3[°] 末端の非翻訳領域の上流に RNA 依存性 RNA ポリメラーゼ遺伝子を持つ。CiMV の RNA 2 の 3[°] 末端の非翻訳領域の上流には外被タンパク質遺伝子がある。→は CiMV における推定される proteinase cleavage sites。

温州萎縮ウイルス 温州萎縮系統

(典型的な温州萎縮タイプ) カンキツモザイク系統 (カンキツモザイクウイルス, ナツカン萎縮ウイルス その他)

近縁ウイルス

ネーブル斑葉モザイクウイルス

図-2 温州萎縮ウイルスの系統と近縁ウイルス () 内は一つのウイルスの範囲を示す.

2 温州萎縮ウイルスの新系統

従来より報告のあった近縁ウイルスに加えて,近年いくつかの SDV の新系統と考えられる分離株が発見されている(Iwanami et al., 1991, 1993)。

• Az-1

静岡県下のウンシュウミカンより分離された。典型的な温州萎縮病の症状を起こすが、SDV 及び CiMV 抗血清を用いた DAS-ELISA 法による検定では全く検出できない。

• LB-1

大分県下のネーブルオレンジより分離された。ネーブル,バレンシア,マダムバイナスなどのスイートオレンジ(Citrus sinensis Osbeck)の新梢に特有なモザイク症状を生ずる。

これらの分離株は、従来の考え方をすれば SDV の新しい近縁ウイルスとされるべきであるが、図-2 に示した分類体系の中に整理できるかどうか検討してみた。

その結果、草本植物上での反応、ウイルス粒子の形状、外被タンパク質及び核酸の分子量は、Az-1、LB-1 のいずれも CiMV と類似していた。また、ウエスタンプロット法の結果では、Az-1、LB-1 は CiMV 抗血清に弱く反応した。外被タンパク質の N 末端のアミノ酸配列は、Az-1、LB-1 のいずれも CiMV に近かったが、いくつかの置換が認められ、その頻度は Az-1 のほうが多かった。以上の結果から、Az-1、LB-1 のいずれも CiMV に近い系統であると考えられた。図-2 にまとめたように CiMV は SDV の系統とする分類に従えば、Az-1、LB-1 もこの系統の中に入ることになる。すなわち、これらの分離株を SDV を基準とした近縁関係に基づいて順に並べると、SDV→CiMV→LB-1→Az-1→NDV→NIMV となる。

これらのウイルスの RNA1, RNA2の3 末端の非翻 訳領域の塩基配列の相同性を比較したところ, 同様の傾 向の近縁関係が示された(岩波ら 未発表)。

ここで Az-1 と CiMV との血清関係について考察してみたい。Az-1 は純化標品をウエスタンプロット法では弱いながらも陽性であったが,カンキツ粗汁液からの DAS-ELISA では CiMV 抗血清とは全く反応しなかったのである。これは,Az-1 と CiMV の血清関係がやや遠いことに加え,カンキツ組織中でのウイルス濃度が低いことが原因と考えられる。

以上の温州萎縮ウイルスの近縁ウイルスと系統に関する知見をまとめてみた。

- ・従来 SDV の近縁ウイルスとされてきた CiMV, NDV は, SDV の系統とすべきであり, NIMV のみが近縁ウイルスである。
- ・新しい分離株の性状の変異が SDV と NDV の範囲内であれば、これは SDV の系統である。 SDV と NIMV の差異よりさらに大きい場合は、新しい近縁ウイルスである。 SDV と NIMV の中間的な分離株の場合は、より近いほうに入れて SDV または NIMV の系統とすべきである。

筆者の研究室では、毎年 10 数株の分離株を全国のカンキツ産地より採集調査しているが、ほとんどが SDV の系統に含まれるもので、NIMV の系統あるいは新しい近縁ウイルスと同定されるものはまれである。

Ⅲ 温州萎縮ウイルスの分類学上の位置

SDV の分類に関して、IIで述べた近縁ウイルスとの関係と並んで重要な課題は、SDV の分類学上の位置である。SDV は他の植物ウイルスとの関係が不明瞭で未分類ウイルスである。これまで、生物学的性状、粒子形状、細胞内所見、理化学的性状よりコモウイルスまたはネポウイルスに近いと推定されたが、確定的な証拠は得られなかった(宇杉・斉藤、1977)。最近発表された国際ウイルス分類委員会の分類によると、SDV はコモウイルス科のネポウイルスの暫定的な(tentative)メンバーとされているが、その確かな論拠は見当たらない。そこでわれわれの研究室では、SDV とこれらのウイルスの関係を明らかにするため、SDV の遺伝子構造に関する研究に着手した。

1 SDV の遺伝子構造

前述のように、SDV 及び CiMV について、RNA 1 及び RNA 2 にはいずれも上流より続く読み取り枠(open reading frame、ORF)があり、その C 末端にそれぞれ RdRp 遺伝子及び CP 遺伝子がコードされている。すなわち、これまで明らかにされた遺伝子構造は、コモウイルス属やネポウイルス属のウイルスと共通している。ま

たRNA1とRNA 2の3 非翻訳領域 の塩基配列の相同 性がきわめて高い こと, ポリA配列 を持つことなども 共通している。し かし、コモウイル ス属やネポウイル ス属の中では, RdRp 遺伝子及び CP 遺伝子のアミ ノ酸配列が比較的 良く保存されてい るのに対して, SDV, CiMV とコ モウイルス属また はネポウイルス属 との間では、これ らの遺伝子の相同 性は非常に低いの で, SDV, CiMV は新しい属として 分類するのが適当 であると考えられ た (Iwanami and

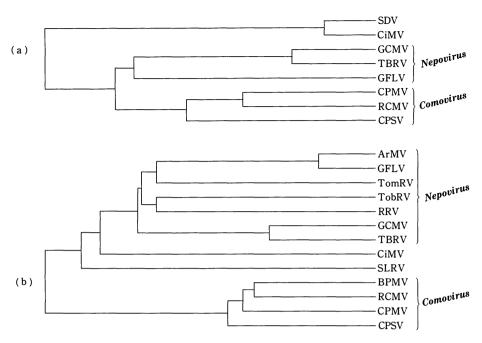


図-3 SDV, CiMV, コモウイルス属, ネポウイルス属の RNA 依存性 RNA ポリメラーゼ 遺伝子(a)及び外被タンパク質遺伝子(b)の系統樹

ArMV (arabis mosaic virus), BPMV (bean pod mottle virus), CPMV (cowpea mosaic virus), CPSMV (cowpea severe mosaic virus), GCMV (grapevine chrome mosaic virus), GFLV (grapevine fanleaf virus), RCMV (red clover mottle virus), RRV (rasberry ringspot virus), SDV (satsuma dwarf virus), SLRV (strawberry latent ringspot virus), TBRV (tomato black ring virus), TobRV (tobacco ringspot virus), TomRV (tomato ringspot virus).

IEKI, 1996 a, b)。当然, SDV の近縁ウイルスの項で述べたように, CiMV は SDV の系統と考えられるので, SDV, CiMV は一つの属にまとめることが可能である。この新しい属は、性状の類似性から、コモウイルス科の中に置くべきであろう。このように、コモウイルス属とネポウイルス属のいわば中間的な例は SDV のほかに最近strawberry latent ringspot virus で報告された(EVERETT et al., 1994)。これらを含めたコモウイルス科内に所属すると考えられるウイルスの RdRp 遺伝子及び CP遺伝子の進化系統樹を図-3 に示した。

おわりに

SDV はトルコ、中国等で相当の被害が報告され、韓国、イタリア等でもその発生が示唆されているが、主な発生はわが国であり、いわば日本特有のウイルスで、今後とも本ウイルスの先導的研究は、日本人研究者に期待されているところが大きい。本稿で紹介したように、SDV と近縁ウイルスに関する分子生物学的研究は近年

相当な進歩が見られたが、まだ未解明の部分も多く、取り組むべき課題は多い。近い将来これらの研究が進展し、その成果を応用した高感度遺伝子診断法や抵抗性カンキツの創出あるいは効果的な弱毒ウイルスの選抜・作出などにより、温州萎縮病の実用的な防除対策が確立することを望みたい。

引用文献

- 1) EVERETT, K. R. et al. (1994): J. Gen. Virol. 75: 1821 ~1825.
- 2) 今田 準ら (1977): 日植病報 43:101.
- IWANAMI, T. et al. (1991): Bull. Fruit Tree Res. Stn. 21: 75~83.
- 4) ——et al. (1993): Ann. Phytopathol. Soc. Jpn. 59: 642∼650.
- 5) 岩波 徹・家城洋之 (1994): 日植病報 60:781~782.
- 6) IWANAMI, T. and H. IEKI (1996 a): Ann. Phytopathol. Soc. Jpn. (印刷中)
- 7) (1996 b):投稿中
- 8) 田中寛康 (1969): 農及園 44:22~25.
- 9) 宇杉富雄・斉藤康夫 (1977): 日植病報 43:137~144.
- 10) ――――ら(1986):日植病報 52:349~354.