

プラムポックスウイルスの高度診断技術の開発および分子疫学的研究

前島 健作（東京大学 大学院農学生命科学研究科）

amaejima@mail.ecc.u-tokyo.ac.jp

要旨

プラムポックスウイルス（plum pox virus, PPV）は、世界的に最も重要な果樹ウイルスのひとつとして、約 100 年にわたり欧州の核果類生産に甚大な被害を与えてきた。近年、世界各地で発生が相次ぎ各国で根絶が試みられているが、その診断は旧来の技術に依存しており、ウイルスの疫学的分析に基づいた防除対策も採られていないため、多くの場合、根絶は困難なものとなっている。我々は、日本への PPV の侵入を初めて発見し、これまでで最も簡易・迅速・高感度な診断キットを開発・実用化した。本キットは農林水産省の PPV 根絶事業に公式採用され、200 万本以上の検定で感染樹 2.5 万本以上が特定された。さらに、分子疫学的解析手法を開発し、PPV の国内外の伝播経路を初めて解明した。以上の成果を通じて、感染拡大の阻止に寄与した。

はじめに

あらゆる植物は、微生物による感染のリスクに晒されている。中でもウイルス病は治療手段がないため、果樹等の永年性植物や栄養繁殖性植物においては、持続的な被害に加えて、保毒苗の流通を通じた拡散が起こる。特に国際的に拡散した場合、侵入した先では病原ウイルスの特定や診断・防除のための備えがないために対策が遅れ、大規模な被害に発展する恐れがある。核果類果樹（ウメ、モモ、スモモ、アンズ、プルーン、オウトウなどのサクラ属果樹）生産に最も深刻な被害を引き起こすプラムポックスウイルス（plum pox virus, PPV）はその典型例であり、これまで発生は欧州に限定され国際的な検疫対象であったが、近年、南北アメリカやアジアでも発生が確認された。その拡散経路は不明であり、我が国では未発生の特定重要病害として特に侵入が警戒されていた。接ぎ木のほかアブラムシ

により伝染するため、早期診断と罹病樹の伐採による根絶が必要であるが、これまで簡便な高感度診断技術はなかった。本稿では、国内で PPV の発生を初めて明らかにした経緯と

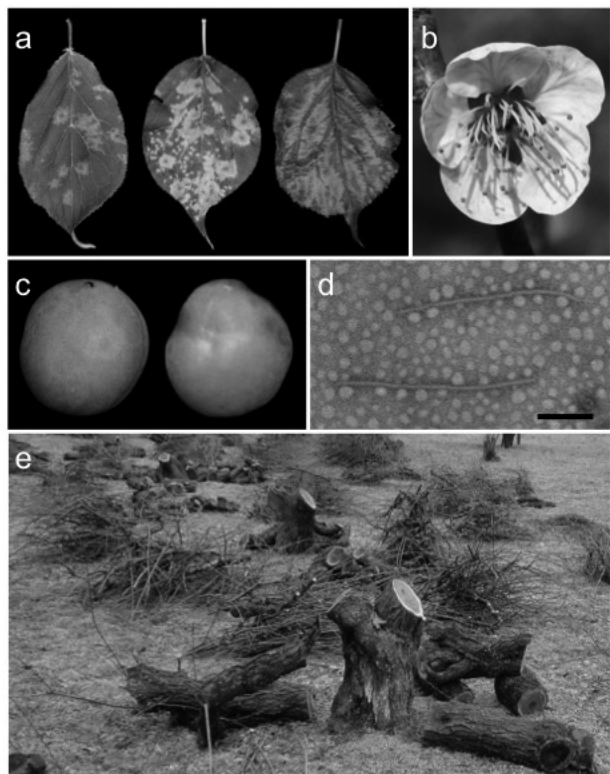


図1. 日本のウメに感染したプラムポックスウイルス(PPV)
a-c. ウメにおける病徴。d. PPVのひも状粒子。バーは200 nm。
e. PPVの感染が確認され伐採中の梅林。
(a-d: 引用文献4, e: 引用文献11)

ともに、その根絶に向けた高度診断技術の開発と、侵入・拡散経路の分子疫学的解析に関するこれまでの成果を概説する。

我が国への PPV 侵入の発見

東京都青梅市において、1990年代からウメの葉に原因不明の障害が発生し、その拡大が問題となっていた。東京大学では2008年に国内初の植物病院[®]を開設し、植物病診断サービスを提供しており、同年7月に東京都から青梅市のウメに発生している障害について診断依頼を受けた。翌年春にかけて調査した結果、国内で発生報告のある病害とは一致しなかった一方で、ウメの症状がPPVに感染した核果類果樹の諸症状と酷似することが明らかになり(図1. a-c)、電子顕微鏡下でPPVに似たひも状のウイルス粒子が観察されたため(図1. d)、PPVの感染が疑われた。PPVに対する海外製抗血清による検定では結論が得られなかったものの、RT-PCRによる検定の結果、症状の有無と相関した特異的な増幅産物が得られ、PPVのゲノムRNAの配列と一致していた。以上より、東京都青梅市のウメに発生した原因不明の病害の原因として、国内未確認のPPVを発見した(和名は「ウメ輪紋ウイルス」と命名)⁴⁾。ウメは東洋特有の核果類であり、PPVのウメへの自然感染例はこれが初めてであった。核果類は国内の年間産出額が1,000億円を超える重要産業で、PPVの発生は極めて重要な事案であったため、農林水産省によるPPVの全国発生調査および植物防疫法に基づく根絶事業が、本発見を契機に直ちに開始された(図1. e)。

高度診断技術の開発および実用化

植物ウイルス病の診断は一般にELISA法やRT-PCR法などにより行なわれ、高価な設備と技術・時間・労力を要するが、PPVの全国発生調査および根絶事業推進のための大規模な診断には不適であり、現場での診断に適した簡易・迅速性と高い検出感度を兼ね備えた診断技術の開発が急務であった。我々は、株式会社ニッポンジーン

の協力のもと、イムノクロマトグラフィー法およびRT-LAMP法を用いたPPVの診断技術を開発し、栽培現場においてそれぞれ15分および60分以内に診断可能な

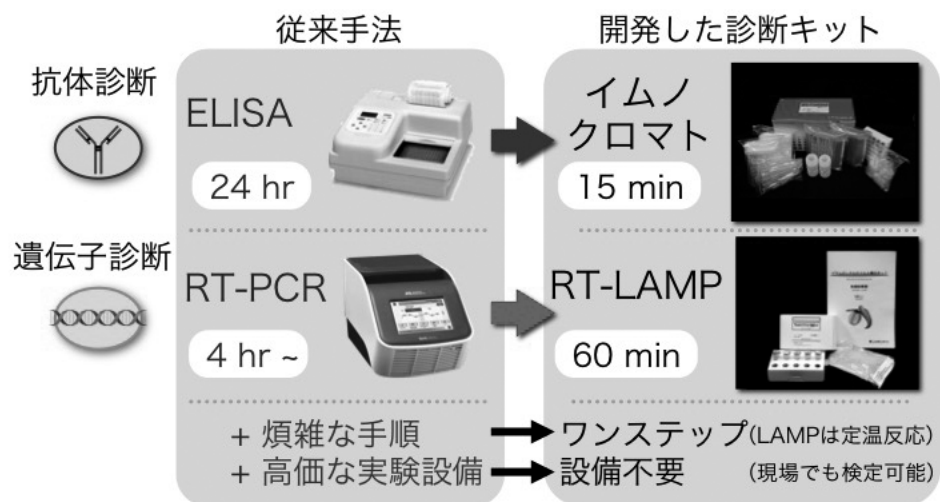


図2. PPVの抗体診断キットおよび遺伝子診断キット従来法と比較して時間、手間、設備を必要としない(引用文献7)

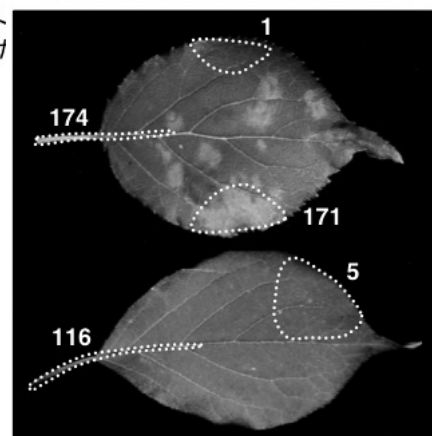


図3. ウメの葉におけるPPVの局在性。数字はイムノクロマト試験のシグナル値(10以上の場合にPPV陽性)。(引用文献8)

抗体診断キットおよび遺伝子診断キットを 2009 年夏までに製品化した (図 2)¹⁵⁾。また、2013 年には検出時間を 30 分に短縮した遺伝子診断キットを製品化した。さらに、診断キットの利用により、PPV の樹体内における分布を解析し、葉の主脈・葉柄部分が検定に最適であることを明らかにした (図 3)⁸⁾。これらの診断キットは現在でも世界で最も簡易・迅速・高感度な PPV 診断技術であり、農林水産省の根絶事業における公式検査方法として、これまで 200 万本以上の診断に利用され、2.5 万本以上の感染樹が特定され、PPV のまん延阻止および根絶事業推進に大きく貢献した。

分子疫学的手法による侵入・拡散経路の解明

PPV は世界的に重要な植物病原体であるが、その侵入・拡散経路の特定は困難とされ、解析手法は確立されていなかった。国内における発生調査でも、これまでに 12 都府県で PPV の分布が確認されているが、多くの場合で発生の

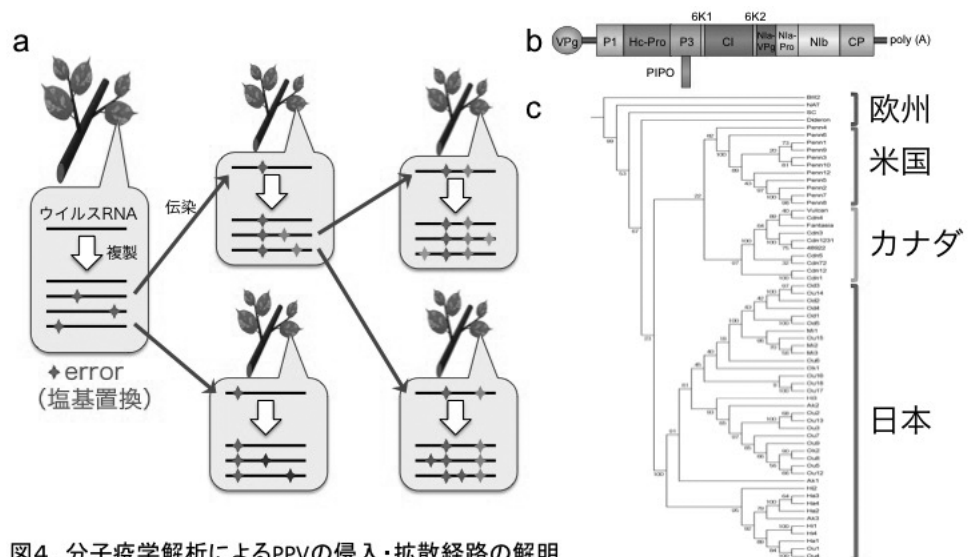


図4. 分子疫学解析によるPPVの侵入・拡散経路の解明

a. ウイルスの分子疫学解析の原理。ウイルスは複製時にゲノム上にランダムかつウイルスの生存に影響のないようなエラー(塩基置換)を生じる。そのウイルスのうちごく一部が新たな植物に伝染し、塩基置換を保持したまま複製するため、当該塩基置換が集団内に固定される。これら塩基置換の有無を辿ることで、ウイルスの系譜を調べることができる。b. PPVのゲノム構造図。ゲノムは全長約1万塩基の1本鎖RNAからなる。c. PPVの全ゲノム情報を利用した高精度な分子系統樹。

経緯が不明であり、根絶事業の推進に向けて、PPV の由来に関する科学的裏付けが必要であった。我々は、ウイルスゲノム上にランダムに蓄積する塩基置換を利用した分子疫学的解析 (図 4. a) により PPV の侵入・拡散経路を高精度に推定する手法を開発した⁶⁾。国内各地の PPV を全ゲノム解読し (図 4. b)、その遺伝子情報を海外のウイルス株の情報とともに比較したところ、欧州由来の PPV が日本および米国、カナダにそれぞれ独立の経路により侵入したことが明らかになり、PPV の国際的な伝播経路が初めて示された (図 4. c)。また、国内での感染苗木の流通経路についても遺伝子情報をもとに特定することができた。本研究により感染苗木による PPV の侵入が特定された神奈川県小田原市では、直ちに根絶事業が実施され、全国で初めて PPV の根絶が達成された。また、茨城県水戸市では日本三名園「偕楽園」の苗木圃場における発生が特定され、本園への侵入阻止に寄与した。

おわりに

本研究では、植物病理学の先端的知見・技術を農業生産現場に橋渡しすることにより、PPV の発見から数年でわが国の農業生産保護に向けた実用的成果を得るに至った。また、

本研究を通じて得られた、地球規模でのウイルスの分布拡大と進化のダイナミクスに関する知見は、植物病理学上の重要な基礎的知見でもあるため、今後は世界中の研究者の協力により全体像が解明されていくことが期待される。このように、ローカルな実用の現場とグローバルな基礎研究の間に相互のフィードバックがあることは、農学研究の醍醐味のひとつであると実感している。今後、基礎・応用・実用という研究の枠にこだわることなく、相互の発展を目指して農学研究を展開していきたい。

謝辞

本研究の機会を与えて頂いた東京大学大学院農学生命科学研究科教授の難波成任先生には、学生時代より終始温かいご指導とご鞭撻を賜りました。心より感謝申し上げます。濱本宏先生(現法政大学)、東京都農業総合研究センターの星秀男氏をはじめ、研究室員諸氏、植物防疫関係諸氏、(株)ニッポンジーン諸氏には本研究に多大なご協力・ご支援を賜りました。この場を借りて厚く御礼申し上げます。また、本賞にご推薦下さいました日本植物病理学会の桑田茂会長をはじめ、関連の先生方に深く御礼申し上げます。

引用文献等

- 1) 前島健作・萱野佑典・姫野未紗子・濱本 宏・山次康幸・難波成任:植物防疫 63: 578-582 (2009).
- 2) 前島健作・難波成任:植物ウイルス病研究会レポート 10: 45-54 (2010).
- 3) 前島健作・難波成任:植物防疫所病害虫情報 91: 3-4 (2010).
- 4) Maejima K., Hoshi H., Hashimoto M., Himeno M., Kawanishi T., Komatsu K., Yamaji Y., Hamamoto H. and Namba S.: J Gen Plant Pathol 76: 229-231 (2010).
- 5) Maejima K., Shiraishi T. and Namba S.: Acta Hort 899: 39-43 (2011).
- 6) Maejima K., Himeno M., Komatsu K., Takinami Y., Hashimoto M., Takahashi S., Yamaji Y., Oshima K. and Namba S.: Phytopathology 101: 567-57 (2011).
- 7) 前島健作・根津 修・姫野未紗子・難波成任:農業および園芸 98: 1087-1092 (2014).
- 8) Maejima K., Himeno M., Netsu O., Ishikawa K., Yoshida T., Fujita N., Hashimoto M., Komatsu K., Yamaji Y. and Namba S.: J Gen Plant Pathol 80: 176-183 (2014).
- 9) 星 秀男・前島健作・難波成任:樹木医学研究 19: 13-15 (2015).
- 10) 前島健作・根津 修・姫野未紗子・濱本 宏・難波成任:樹木医学研究 19: 3-6 (2015).
- 11) 前島健作・根津 修・姫野未紗子・難波成任:森林科学 76: 21-26 (2016).
- 12) 前島健作:日本植物病理学会報 82: 167 (2016).
- 13) Maejima K.: J Gen Plant Pathol 82: 340-341 (2016).
- 14) 前島健作・濱本 宏・山次康幸・難波成任:植物防疫 (印刷中).
- 15) 東京大学農学生命科学研究科プレスリリース:
http://www.a.u-tokyo.ac.jp/topics/namba4_090727.html