

論 文 審 査 の 結 果 の 要 旨

申請者氏名 前島 健作

ウメ輪紋ウイルス (plum pox virus, PPV) は、果樹生産に最も深刻な被害を引き起こす病原体の一つである。宿主範囲は広く、様々なサクラ属植物に感染する。感染すると早期落果や果肉の変質、果実の輪紋、奇形を生じ、商品価値を著しく損なう。アブラムシと接ぎ木により伝染する。治療手段がなく、病徴からウイルス感染を判断することは困難である。従って、防除のためには高感度な検出法による早期診断と病樹の伐採が必須であるが、これまで簡便な高感度検出技術はなかった。PPV による病害はこれまでにヨーロッパのほぼ全域、中東、北アメリカ、南米、北米、アジアの諸国においても発生が確認されている。これまでの研究から、分子系統学的に判別可能な 7 系統の PPV が報告されており、D 系統は世界で最も広く発生している主要な系統である。しかし、D 系統の世界各地への拡散経路に関しては明らかになっていない。我が国ではこれまで PPV の発生は報告されておらず、特に侵入が警戒されていた。本研究では、日本における PPV の発生を初めて確認するとともに、PPV の防除に向けて各種分子生物学的解析を行った。

1. 我が国に初発生した PPV の検出と同定

東京都青梅市において、1990 年代からウメの葉に輪紋や斑紋症状を伴う原因不明の障害が多発し、問題視されていた。2008 年 7 月に本件に対する診断依頼を受け、2008 年から 2009 年にかけて発生状況の調査を行った。現地生産圃場では、葉の退緑症状が認められ、花卉の斑入り症状、果実の輪紋、奇形症状も認められた。これらの症状は、PPV に感染したサクラ属果樹の諸症状と酷似していた。罹病組織の電子顕微鏡観察を行ったところ、PPV 様のひも状粒子が観察されたため、PPV との関連性が強く疑われた。そこで、PPV の外被タンパク質 (coat protein: CP) 遺伝子領域の一部を増幅するプライマーセットを用いて RT-PCR 検定を行った結果、症状を呈するウメから特異的な増幅産物が得られ、データベース上の PPV の CP 遺伝子の塩基配列と一致した。以上の結果より、青梅市のウメに対する PPV の感染を証明した。PPV はヨーロッパを中心に発生しているウイルスであったため、東アジアで栽培されているウメへの自然感染例はこれまでなく、本事例は世界初の報告となった。また、日本における PPV の発生は初めてであったことから、その感染宿主と症状に因み、本ウイルスの和名として「ウメ輪紋ウイルス」を提案した。

2. イムノクロマトグラフィー法による PPV 診断系の開発

国内における PPV の発生を受け、農林水産省による全国規模の調査および防除事業の開始が決定され、実用的な PPV の診断手法の開発が必要となった。ウイルス病の診断において一般的に用いられる ELISA 法や RT-PCR 法は、迅速性に著しく欠ける上に複雑な操作と高額な専用機器を必要とし、栽培現場での即時診断は不可能であった。そこで本研究では、イムノクロマトグラフィー法に着目した。本法は、試験紙に予め抗体が含まれており、抗原の吸い上げと併行して抗原抗体反応が進行し、ラインの出現により目視で判定ができるため、非常に迅速かつ簡便に利用できるという特徴がある。

まず、青梅市の 1 分離株 (Ou1 分離株) の CP を抗原としてポリクローナル抗体を作出した。ウェスタンブロットによりこの抗体が PPV の CP に対して高い特異性を持つことが確認できたため、本抗体によるイムノクロマトグラフィー試験紙を作製した。本試験紙を用いて、PPV に罹病したウメの葉、花卉、果実、枝に

ついて検定した結果、いずれの粗汁液からも 15 分以内に陽性を示す明瞭なラインが確認され、PPV の検出が可能であった。一方、健全なウメに対する非特異的反応は全く認められなかった。また、PPV 感染ウメの凍結試料についても陽性反応を示した。さらに、市販の ELISA 法と検出感度を比較した結果、常に ELISA 法と同等以上の感度を示した。以上の結果から、本法の有用性が確認されたため、本法による PPV 診断キットを製品化した。このキットは実際の調査に採用され、診断の簡易、迅速化に貢献している。

3. PPV 日本分離株の分子疫学的解析

2009 年の全国調査の結果、東京都西部地域および神奈川県、茨城県の一部において PPV の発生が確認された。PPV の日本への侵入経路、国内での拡散経路は不明であったため、防除上の基盤となるデータがなく大きな問題となったことから、全塩基配列に基づいた、国内外の分離株の分子疫学的解析を試みた。

まず、Oul 分離株について全塩基配列を決定し、既報の 7 系統の塩基配列と比較解析を行った結果、D 系統との間に最も高い相同性 (98.1-99.4%) を示した。同様に、国内の各発生地域から収集した 36 分離株についても全塩基配列を決定した。その結果、日本分離株間における塩基配列の多様性は最大で 0.8% と低く、全て D 系統に属することが明らかになった。

次いで、D 系統 (国内 37 分離株、海外 25 分離株) の全塩基配列を用いて、複数の樹形探索法により分子系統解析を行った。いずれの樹形探索法においても、高いブートストラップ値で支持される相同な分子系統樹が得られた。発生国間の PPV の系統関係を解析したところ、ヨーロッパの分離株は単系統群を形成しなかった一方で、アメリカ合衆国、カナダ、日本の分離株はそれぞれ高いブートストラップ値により支持される単系統群を形成した。このことから、日本に侵入した PPV はアメリカやカナダに由来するウイルスではないと考えられた。

国内における系統関係については、神奈川県、茨城県の分離株が、それぞれの青梅市の親木からの分離株と最も近縁であったことから、本解析による系統関係の再現性は高いと考えられた。東京都内の分離株は、系統樹上においても発生地域ごとに比較的まとまっており、各地域においてアブラムシによる漸次的な伝搬が起きていると考えられた。一方で、地理的に離れた分離株同士が分子系統学的に近縁である場合もあり、穂木等による人為的な拡大経路が複数存在している可能性が強く示唆された。また、いくつかの分離株に関しては伝搬経路の推定が困難であったが、さらに多くの分離株を解析することにより、推定できると考えられた。

以上を要するに、本研究では我が国における PPV の防除体制構築に向けた基盤的研究を行った。まず、我が国における PPV の発生を初めて確認するとともに、CP 遺伝子配列の決定により抗原型が D 系統であることを明らかにした。また、特異的抗体を作出し、これを用いてイムノクロマトグラフィー法による簡易、迅速、高感度な PPV 診断系を開発し製品化した。さらに、国内の各発生地域から採集した 37 分離株に関して全塩基配列を決定し、PPV において初めてとなる分子疫学的解析により、我が国への侵入経路および国内における拡散経路の一端を解明した。本研究の成果は、学術上また応用上きわめて価値が高い。よって審査委員一同は本論文が博士 (農学) に値するものと認めた。