

## 東京都に発生したアイリス黄斑ウイルスについての研究

遠藤, 恵 / ENDO, Kei

---

(出版者 / Publisher)

法政大学大学院理工学・工学研究科

(雑誌名 / Journal or Publication Title)

法政大学大学院紀要. 理工学・工学研究科編 / 法政大学大学院紀要. 理工学・工学研究科編

(巻 / Volume)

55

(開始ページ / Start Page)

1

(終了ページ / End Page)

3

(発行年 / Year)

2014-03-24

(URL)

<https://doi.org/10.15002/00010388>

# 東京都に発生した アイリス黄斑ウイルスについての研究

ANALYSIS OF *IRIS YELLOW SPOT VIRUS* ASSOCIATED WITH A DISEASE  
IN *EUSTOMA GRANDIFLORUM* IN TOKYO

遠藤 恵

Kei ENDO

指導教員 西尾 健

法政大学大学院理工学研究科生命機能学専攻修士課程

In Japan, some tospoviruses have newly emerged in several agricultural crops and ornamental plants, recently. In July 2011 *Eustoma grandiflorum* exhibiting characteristic symptoms of chlorotic spot on the leaves in Tokyo was observed. Field-infected plant samples were tested by multiplex reverse transcription-polymerase chain reaction (multiplex RT-PCR) to detect five tospoviruses: *Tomato spotted wilt virus* (TSWV); *Impatiens necrotic spot virus* (INSV); *Chrysanthemum stem necrotic spot virus* (CSNV); *Capsicum chlorosis virus* (CaCV); *Iris yellow spot virus* (IYSV). As a result, IYSV was detected in the samples. There are two IYSV strains in the world; the Dutch strain and the Brazilian strain, and the nucleotide sequence of N gene in the IYSV Tokyo isolate indicated that, it was closely related to Brazilian strain. Mechanical inoculation test to several plants resulted in the infection only to *Chenopodium quinoa*. *Eustoma grandiflorum* the inoculation leaves of *C. quinoa*, necrotic local lesions developed 1-2 week postinoculation. To prevent IYSV infection, an accurate detection method is essential and I compared serological method (Immuno-filter paper assay) with molecular method (real-time PCR).

**Key Words** : *Iris yellow spot virus*(IYSV), *Tospovirus multiplex RT-PCR*, *real-time PCR*

## 1. アイリス黄斑ウイルス

アイリス黄斑ウイルス (*Iris yellow spot virus*; IYSV) はブニヤウイルス科トスポウイルス属に属し、ウイルス粒子は外膜を有する直径 100 nm の球形粒子である。アンピセンス 1 本鎖 RNA ウィルスで、S, M, L の 3 分節構造を持つ。5 つの ORF を持ち、6 つのタンパク質をコードしている。日本でこれまでに確認されたトスポウイルスは 7 種類 (TSWV, INSV, MYSV, WSMoV, IYSV, CaCV, CSNV) である。種によって宿主範囲が異なり、TSWV が広い宿主範囲を持つのに対し、IYSV はユリ科を中心として比較的狭い宿主範囲を持つことが知られている。IYSV は日本で 2000 年にアルストロメリアから初めて検出され、媒介虫はネギアザミウマである。以降、発生地域が急速に拡大しており、東京都では 2005 年に初発生を確認している。海外においても研究が進んでおらず、諸性質の解明が待たれている。

## 2. 東京都での IYSV 発生

2011 年 7 月東京都農林総合研究センターから、トルコギキョウのウイルス様の症状について、診断を依頼された。調布および狛江市の栽培農家のトルコギキョウから、葉脈沿いの斑紋と退緑輪紋からは CMV、かすり状の症状からは BBWV が検出された。一方で、現地で最も発生がみられていた円形輪紋症状 (図 1) からは CMV, BBWV は検出されなかった。この円形輪紋症状について、原因を探るべく診断を行った。

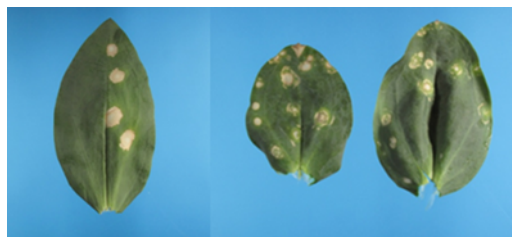


図 1 トルコギキョウの葉で見られた円形輪紋症状  
Uga, et al. (2005) を参考にマルチプレックス PCR 用の

トスポウイルス検出プライマー（表 1）で RT-PCR を実施した。このマルチプレックス PCR では 5 種類のトスポウイルス IYSV, TSWV, INSV, CSNV, CaCV を単一チューブ内で同時に検出することができる。これは S-RNA 3' 末端にトスポウイルスの共通プライマー、各ウイルスで DNA 断片が異なる長さとなる特異的プライマーとで構成されている。この PCR を行い、増幅断片を解析したところ、IYSV が検出された。

2011 年 10 月再び診断依頼を受け、全 11 サンプル（表 2）の植物にマルチプレックス PCR を実施したところ、やはりトルコギキョウにて IYSV が検出された（図 3）。

表 1 マルチプレックス PCR プライマー構成

IYSV837	Forward 各20μM
TSWV709	
INSV589	
CSNV485	
CaCV366	
Tos-R15	Reverse

表 2 2011 年 10 月診断結果

サンプル番号	植物	場所	QIAGEN抽出	ISOGEN抽出
1-10	トルコギキョウ	あきる野市	×	×
1-11	トルコギキョウ	あきる野市	×	×
6-3	キク	羽村市	×	×
14-2	トルコギキョウ	東村山市	○	○
18-1	トルコギキョウ	狛江市	○	○
21-1	ナデシコ	武蔵野市	×	×
21-6	ピーマン	武蔵野市	×	×
21-7	キク	武蔵野市	×	×
21-8	キク	武蔵野市	×	×
21-9	キク	武蔵野市	×	×
21-11	キク	武蔵野市	×	×



図 3 トスポマルチプレックス PCR 電気泳動写真

左から Lane1~11 各サンプル Lane12 IYSV positive control Lane13 健全葉 Lane14 100bp マーカー

2012 年 7 月東京都農林総合研究センターから再度トスポウイルス感染が疑われるサンプルを提供されたが、トスポウイルス特異的マルチプレックス PCR(2)と CMV イムノストリップを行ったところ、トスポウイルスには感染していなかった(表 3)。

表 3 各植物サンプルの検出結果

場所	植物	CMV	トスポウイルス特異的プライマー
武蔵野	トウガラシ	○	×
三鷹	シントウ	×	×
農総研	トウガラシ	○	×
青梅	トウガラシ	○	×

場所	植物	よく似た症状	トスポウイルス特異的プライマー
不明	ピーマン	INSV	×
不明	ペーペナ	INSV	×
不明	ニチニチソウ	TSWV	×

### 3. 日本で報告されている系統とブラジル、オランダ系統との関係

IYSV は世界中の国で発生が報告されており、日本では静岡県、佐賀県でトルコギキョウ、千葉県でタマネギなどこれまで 11 県での発生が報告されている。IYSV はオランダ系統 (IYSV<sub>NL</sub>) とブラジル系統 (IYSV<sub>BR</sub>) の二つの系統が存在し、IYSV<sub>NL</sub> と IYSV<sub>BR</sub> 間では N タンパク質のアミノ酸配列の相同性が 90% と比較的低いため、IYSV<sub>NL</sub> あるいは IYSV<sub>BR</sub> として種内系統の存在が議論されている(1)。そこで、今回得られた IYSV がどちらに属するか N 遺伝子の塩基配列を解析したところ、東京都でトルコギキョウに感染した IYSV の 14-2、18-1、A2 はアメリカのテキサスから発見された系統に最も高い相同性を示し(表 4)、系統樹を作成したところ、IYSV<sub>BR</sub> のグループに入ることが明らかとなった(図 5)。

表 4 テキサス系統との相同性とサンプル間の相同性

	14-2	18-1	A2
IYSV(Texas) との相同性	98	94	99
14-2 相同性(%)		92	98
18-1 相同性(%)	92		94
A2 相同性(%)	98	94	

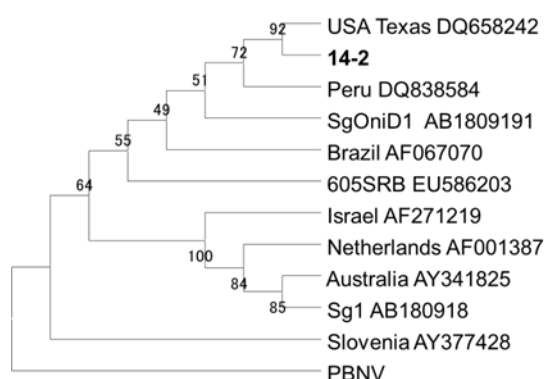


図 5 N 遺伝子のアミノ酸配列に基づく系統樹 (PBNV はアウトグループ)

### 4. IYSV の全ゲノム解読

IYSV のゲノムは S, M, L の 3 分節に分かれているが、S-RNA に比べ、M-RNA や L-RNA は日本において解析がなされていないため、今回検出された系統についてゲノムを解読することとした。

各分節ゲノムについて既報の塩基配列を得てコンセンサス配列をつくり、これをもとにプライマーの設計を行い、解読を進めた。

### 5. IYSV の系統と宿主植物の関係

IYSV<sub>NL</sub> と IYSV<sub>BR</sub> をはじめ IYSV の系統により宿主植物の範囲や宿主への反応に違いがあることがわかっており(3, 4)、本ウイルス系統に関しても様々な植物へ接種試

験を行った(表5)。その結果、*Chenopodium quinoa* では接種葉に退緑と壞疽斑点が見られたものの、他の植物には感染しなかった(図6)。

表5 IYSV<sub>NL</sub>とIYSV<sub>BR</sub>の宿主植物の関係

	IYSV <sub>BR</sub>	IYSV <sub>NL</sub>
<i>N.rustica</i>	全身感染	なし
<i>Datura stramonium</i>	LL	全身感染
<i>Petunia hybrida</i>	なし	LL

表6 検定植物への接種試験結果

検定植物	結果(接種葉/上位葉)
<i>Nicotiana tabacum</i> cv. Xanthi nc	-/-
<i>N.benthamiana</i>	-/-
<i>N.tabacum</i> cv. White Burley	-/-
<i>Salvia clevelandii</i>	-/-
<i>Chenopodium quinoa</i>	LLn, Chl /-
<i>Datura stramonium</i>	-/-
<i>Eustoma grandiflorum</i>	-/-
<i>Allium cepa</i>	-/-
<i>Petunia hybrida</i>	-/-



図6 *C.quinoa* における接種試験(1week,2week,3week)

## 6. IYSVの検出方法の検討

IYSVは日本ではトルコギキョウやタマネギなどに発生が報告されており(5,6,7)、ウイルスによる経済的損失は計り知れない。迅速な対応をするためにも、ウイルスの高感度な早期診断技術が必要不可欠である。

そこで、よりIYSVを簡易に高感度で検出する方法を調べるべく、検出方法を検討した。遺伝子学的手法において感度の高い診断法として知られているリアルタイムPCRを行うため、IYSVのN遺伝子をターゲットにプライマーを設計し、実行したところ、検出することが可能となった。

## 7. 考察

日本のIYSVはIYSV<sub>NL</sub>とIYSV<sub>BR</sub>が一般的なのに対し、今回調べたIYSVはテキサスに近い系統であり、日本への侵入経路が異なるのではないかと考えられた。また、系統により宿主範囲や植物上での反応が大きく異なることがわかった。接種試験が難航した理由として媒介虫であるネギアザミウマを介さず、汁液接種を行ったことが考

えられる。広範囲のIYSV感染を防ぐためにも、媒介虫の防除や、早期診断における技術の両者が必要である。

謝辞：東京都農林総合研究センターの小野剛様にはサンプルを提供していただきました。鍵和田講師をはじめ、植物医科学領域の先生方には6年間本当にお世話になりました。植物を育ててくださった技術員の方々や、実験を陰ながら支えてくださった全ての人に感謝いたします。

## 参考文献

- Pozzer et al. : Characterization of a Tospovirus Isolate of Iris Yellow Spot Virus Associated with a Disease in Onion Fields in Brazil PD 83,345 - 350 1999
- Katsuya Kuwabara, Naoto Yokoi, Takehiro Ohki, Shinya Tsuda :Improved multiplex reverse transcription-polymerase chain reaction to detect and identify five tospovirus species simultaneously Journal of General Plant Pathology , Volume 76, Issue 4, pp 273-277 2010
- Cortés I, Livieratos IC, Derks A : Molecular and serological characterization of iris yellow spot virus, a new and distinct tospovirus species Phytopathology. 88(12):1276-82 1998
- T. Ghotbi N. Shahraeen et al :Occurrence of Tospoviruses in Ornamental and Weed Species in Markazi and Tehran Provinces in Iran Plant Disease Vol 89, 4 PP425 - 429 2005
- 津田新哉 トスポウイルス属(Tospovirus). 植物防疫 60, 597-601 2006
- 土井 誠・善正二郎・奥田 充・中村宏子・加藤公彦・花田 薫 Iris yellow spot virus (IYSV) によるトルコギキョウ (*Eustoma grandiflorum*) えそ輪紋病 日植病報 69, 181-188 2003
- 福田 充, 中山 喜一, 本田 要八郎 アイリスイエロースポットウイルス (IYSV) によるニラえそ条斑病 (新称) の発生 日植病報 Vol. 73 No. 4 PP 311-313 2007