

効率的な植物ウイルス検出技術の開発

関根 健太郎¹, 柳澤 広宣^{2,3}, 永井 秀典⁴

¹琉球大学農学部

〒903-0213 沖縄県中頭郡西原町千原 1

²農研機構 中央農業研究センター

〒305-8666 茨城県つくば市観音台 2-1-18

³岩手大学大学院連合農学研究科

〒020-8550 岩手県盛岡市上田 3-18-8

⁴産業技術総合研究所

〒563-8577 大阪府池田市緑丘 1-8-31

Ken-Taro Sekine¹, Hironobu Yanagisawa^{2,3}, Hidenori Nagai⁴

Development of efficient diagnostic methods detecting plant viruses

Key words: *deep sequencing, metagenomics, plant virus, virus diagnosis, virus hunting*

¹University of the Ryukyus, Nishihara, Okinawa, 903-0213, Japan

²Central Region Agricultural Research Center, National Agriculture and Food Research Organization (NARO), Tsukuba, Ibaraki, 305-8666, Japan

³The United Graduate School of Agricultural Sciences, Iwate University, Morioka, Iwate, 020-8550, Japan

⁴Biomedical Research Institute, National Institute of Advanced Industrial Science and Technology (AIST), Ikeda, Osaka, 563-0026, Japan

DOI: 10.24480/bsj-review.8a1.00107

1. はじめに

農作物に病害を起こす原因は、害虫による食害や、糸状菌、細菌、ウイルスなどの病原微生物の感染や無生物的ストレスによる生理障害が挙げられる。長い農業の歴史から、頻発する病害についての原因が明らかにされ、耐病性作物の育種や防除技術の開発が進められてきた。近年は、大飢饉のような大規模被害は見られなくなっているが、栽培作物の多様化によって、病害も多様化しており、国際化により地球規模で対策しなければならない病害も増えている。このような病害に対する最も有効な防除手段は、早期に発見し、未然に蔓延を防ぐこと、すなわち『病害診断』である。特に多年生の花きや果樹における病害は、その翌年以後にまで影響を及ぼし、中でも感染後の治療が不可能なウイルスによる病害は壊滅的な被害を起こしかねない。糸状菌や細菌は光学顕微鏡レベルの観察で発見できるのに対し、ウイルスは電子顕微鏡レベルの観察が必要であり、診断の指標となる病徴についても生理障害との区別が非常に難しい。従来、ウイルス病の診断は、個々のウイルスの基本骨格である核酸またはタンパク質を特異的な検出方法（例えば PCR や ELISA など）を用いて検知するものであり、限られた病害情報をもとに、病原ウイルスを類推して検定を行う。このため、想定外のウイルスや未知のウイルスが感染していた場合には、その病原ウイルスを検出することはできない。未知のウイルスを同定するためには、ウイルス

ゲノム配列を決定する必要があるが、粒子の単離精製など専門的な知識・技術、多大な時間と労力を要する。したがって、これまで主要作物の重要病害を中心に原因ウイルス究明がなされており、マイナークロップや、栽培作物以外の植物に感染するウイルスについての知見は非常に限定されていた。一方で、分子生物学のめざましい発展とともに、網羅的なウイルス検出技術が様々に開発されてきた (Kobayashi et al. 2012)。近年では、次世代シーケンシング技術を用いてウイルスの感染が疑われる宿主（または環境中など）の大量の遺伝子配列情報中に含まれるウイルスゲノム配列情報の探索が行われている (Barba et al. 2014, Roossinck et al. 2015)。言い換えれば、遺伝子情報のビッグデータを扱うことで比較的簡単にウイルスを見出すことが可能となった。読者の中でも、植物のゲノム解析やトランスクリプトーム解析において、期せずしてウイルスの配列が検出された経験を持つ方も少なくないのではないだろうか。また、このようなゲノム解析研究から、メガウイルス、パンドラウイルスなどのそれまでウイルスと認識されていなかった巨大ウイルスの存在も明らかにされている。未だ知り得ぬウイルスの姿が、今後さらに明らかにされていくことが予想される。本稿では、植物病原ウイルス探索の現状と課題、並びに今後の展望について、主として農学、特に植物保護の観点から議論したい。

2. 植物ウイルスの網羅的検出技術

ウイルスの感染を疑い、種を同定するためには、ウイルスのゲノム配列情報を得ることが最も重要である。ウイルスの粒子の観察や感染性、伝搬性を調べることでウイルス種を類推することは可能であるが、ゲノム配列情報を得なければ、種を特定できないからである。網羅的なウイルス検出技術とは、ウイルスの核酸やタンパク質に対して、種特異的に検出するプライマーや抗体を用いる方法とは異なり、一回の検定によって、ウイルスのゲノム配列やタンパク質のアミノ酸配列を直接解析することで、感染ウイルス種の回答を得る技術である。ウイルスの分類における「属」間で保存された遺伝子配列がある場合には、この属に含まれるウイルス種を包括的に検出可能なユニバーサルプライマーを用いた PCR による検定方法が開発されているが (Okuda & Hanada 2001, Vlugt & Berendsen 2002)、全ウイルスを対象とする PCR 検定法は確立されていない。仮に微生物相解析で用いられているような種を特定可能な遺伝子領域 (ミトコンドリア COI 領域やリボソーム ITS 領域など) があれば、シーケンシングによって種を判別可能であるが、残念ながら全てのウイルスゲノムに共通するようなコンセンサス配列が見つからないためである。一方、植物ウイルスの多くはゲノム情報を RNA として有し、その感染サイクルの中で 2 本鎖 RNA (dsRNA) の状態を必ずつくり、いわば dsRNA の蓄積はウイルス感染マーカーとして利用できる。すなわち dsRNA を特異的に抽出することで、ウイルスのゲノム RNA の存在を効率的に検出することが可能である (Atsumi et al. 2015a, Okada et al. 2015)。著者らは、NGS が今ほど普及する以前に、サンガーシーケンサーの利用を前提として開発された網羅的ウイルス検出技術「DECS 法」の実用化を推進してきた (Kobayashi et al. 2009)。DECS 法は、植物の dsRNA 結合タンパク質を用いてウイルス由来の dsRNA を抽出し、この逆転写産物を網羅的に増幅した後、クローニングしてシーケンス解析 (サンガー法) することで、得られた塩基配列情報からウイルス種を特定、または、類推する技術である (図 1)。DECS 法を用いて植物ウイルスとウイロイドを検出した実績を表 1 にまとめた。最近では、次世代シーケンシング (NGS) 解析と組み合わせることでウイルス検出効率を飛躍的に高めた DECS-C 法を活用して、*Blueberry shoestring virus* のゲノム配列全長を決定した (Yanagisawa et al. 2016)。

網羅的ウイルス検出技術は、主としてオミックス技術を用いて、既報のウイルスゲノム情報を利用して、ウイルス種を同定するため、対象となるウイルス種はデータベースに登録されている

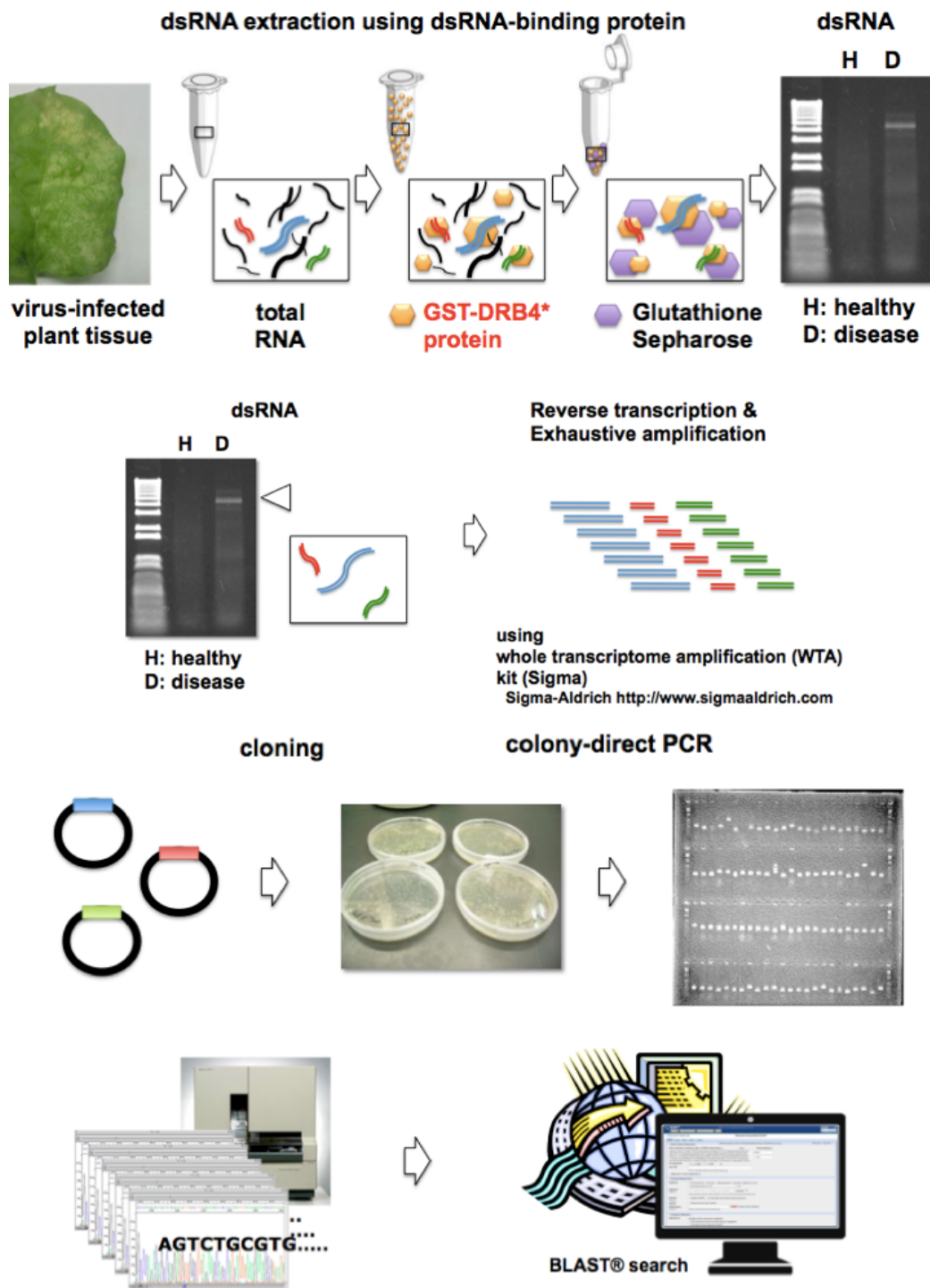


図1. 網羅的RNAウイルス検出技術DECS法の実験の流れ

感染植物から全RNAを抽出し、GST-DRB4*タンパク質と2本鎖RNA(dsRNA)を結合させる。Glutathione sepharoseとGST-DRB4*を結合させて、dsRNAを回収する。この一連の流れはPlant dsRNA enrichment kitとして株式会社医学生物学研究所(MBL)より販売されている。アガロース電気泳動によりdsRNAの存在の有無を確認。得られたdsRNAをWhole transcriptome amplification kit(Sigma)を用いて逆転写および、網羅的に増幅する。このcDNA断片を大腸菌へクローニングして、シーケンシングを行う。得られた遺伝子配列情報をBLAST検索にかけ、ウイルス様配列を検出する。

表1 DECS 法によるウイルス検出事例(学会発表を含み公表されたものに限る)

host	virus	references
bell pepper	bell pepper endornavirus	
blueberry	BSSV, Blueberry virus A	Yanagisawa et al. 2016
chrysanthemum	CSVd	
eustoma	IYSV, LNRV	Shimomoto et al. 2014, 菅ら 2016
gentian	BBWV2, GeMV, GKaV, GORV	Atsumi et al. 2015b, Kobayashi et al. 2013
hop	AMV, HLV	
tobacco	BBWV2, CMV, PMMoV, PVX, TMV, ToMV	Kobayashi et al. 2009
tomato	CMV, TSWV	

BSSV: *Blueberry shoestring virus*, CSVd: *Chrysanthemum stunt viroid*, IYSV: *Iris yellow spot virus*, LNRV: *Lisianthus necrotic ringspot virus*, BBWV: *Broad bean wilt virus 2*, GeMV: *Gentian mosaic virus*, GKaV: *Gentian koku-sho associated virus*, GORV: *Gentian ovary ringspot virus*, AMV: *Apple mosaic virus*, HLV: *Hop latent virus*, HLVd: *Hop latent viroid*, CMV: *Cucumber mosaic virus*, PMMoV: *Pepper mild mottle virus*, PVX: *Potato virus X*, TMV: *Tobacco mosaic virus*, ToMV: *Tomato mosaic virus*, TSWV: *Tomato spotted wilt virus*

全ウイルスであり、感染植物からウイルス由来のペプチド断片をプロテオーム解析によって検出する方法や、DNA や RNA の塩基配列情報を網羅的に解析し、ウイルスゲノム配列を探索する方法などが挙げられる。既知ウイルスのアミノ酸配列又はゲノム配列情報との相同性から新規ウイルスの存在を見出すことも可能である。上述の DECS-C 法同様、NGS の普及とともに、メタゲノミクス手法を用いた網羅的ウイルス検出技術は、世界中で様々な活用されており、既に多くのウイルスの発見に貢献している (Hadidi et al. 2017)。DECS 法では dsRNA を出発材料としているが、全 DNA または全 RNA を用いた解析がある。特に small RNA を用いた NGS 解析では、RNA ウイルスだけでなく DNA ウイルスも同時に検出できることから、「網羅的」という目的には、より合致した手法であるといえる。NGS 解析の一回のランで得られる出力データ量は、年々増加しているため、ウイルスの検出効率(ウイルス由来リード数/総リード数)が低くても、総データ量を増やすことで検出感度を上げられる。反対に、解析に用いるデータ量が多くなると、そこからウイルス由来のリードを検出する解析にかかる計算量が増えるため、解析時間が増大するという課題もある。検出感度が上がると、擬陽性(感染しているか疑わしいウイルスの断片が検出される)やコンタミネーションのリスクが増える。また、ウイルス様配列を検索するために用いるリファレンスデータベースの信頼性の精査も課題である(公のデータベースであっても懷疑的な配列が登録されている場合がある)。データ解析のアルゴリズムを変えることで、ウイルス検出効率、信頼性や計算速度が変わるため、以上の課題を克服すべく、最適化していく必要がある。相同性検索により新規ウイルス配列の検出限界、すなわち新種/新属/新科のどこまでのウイルスを検出可能な解析アルゴリズムを構築できるかという挑戦は続いている。新規ウイルス探索という観点からは、既知ウイルスとのゲノム配列相同性に依存しない新たなウイルス検出法開発への期待も大きい (Wu et al. 2015)。また、DECS 法を用いて病原ウイルスを早期に発見し、病害発生現場での防除に成功した事例(病害発見より 2 週間以内に防除対策ができた)があるが(菅ら, 2016)、初動対応の迅速さは病害防除の成否を左右するため、想定外の既知病原ウイルスを早期に発見するという目的では、解析時間の早さと解析精度が、病害診断に携わる現場のニーズとして挙げられることも忘れてはならない。

3. 病原ウイルスの探索

網羅的ウイルス検出技術などで、罹病植物から新規ウイルスの存在を見出したとしても、病原体としての証明が次の課題となる。植物ウイルスは、ウイルスとして最初に見つかったタバコモザイクウイルスをはじめとして、接種や病徴再現などの種々の知見の上で病原体の存在が示唆され、その原因究明の

中で発見されてきた。病原体は、コッホの原理によって、1) 病原体を単離、2) 健全植物へ接種、3) 病徴を再現、4) 再び病患部より病原体が単離できることと定義付けられている。ウイルスについても同様に、感染・発症の生理学的な知見からその存在が示唆された後、単病斑分離によってウイルスを純化し、ウイルス粒子を精製した上で、接種による病徴再現試験、加えて、粒子に含まれるゲノム配列情報を決定することが、典型的なウイルス種の同定過程である。したがって、ウイルスを接種によって増殖できない場合、粒子を単離しにくい場合や、病徴が顕著に現れない場合などは、同定が困難となる。著者らは、30年以上原因が分かっていない病害であるリンドウこぶ症の罹病株より、DECS法を用いてリンドウこぶ症関連ウイルス (*Gentian kobu-sho associated virus*; GKaV) を発見している (Kobayashi et al. 2013; Atsumi et al. 2013a)。GKaVについては、人工的な接種方法は接木のみ成功しているが、粒子の単離には成功しておらず、また病徴発現までに数年かかるなどの理由から、コッホの原理を満たすことができていないため、病原体であることの証明が非常に困難である。国内の様々な栽培地から採集したこぶ症発病株と健全株について、GKaV感染の有無を検定した結果、発症との強い相関が認められたことから、こぶ症の病原体である可能性は非常に高いが、実験的に如何に証明するかは大きな問題である。同様にDECS法を用いて発見した新規ウイルスのリンドウ子房輪紋ウイルス (*Gentian ovary ringspot virus*; GORV) は、粒子の単離、接種試験も可能であったが、花粉を介してウイルスが感染した後に、子房に輪紋症状を呈するため、病徴の再現に多大な苦勞を要した (Atsumi et al. 2015b)。どちらもリンドウから新規ウイルスを発見した事例であるが、これ以外にいくつかのウイルス性病害と疑われるリンドウについて、ウイルス探索を実施したものの、明確な結果が得られなかった事例についても紹介したい。リンドウまだら退色症状については、DECS法の結果、ソラマメウィルトウイルス (*Broad bean wilt virus 2*; BBWV2) およびリンドウモザイクウイルス (*Gentian mosaic virus*; GeMV) が検出された。これらのウイルスはフィールドの大部分のリンドウに潜在感染 (無病徴感染) しており (Atsumi et al. 2013b)、どちらのウイルスについても、まだら退色症状の発症との相関が見られず、病害への関与はないものと判断した。ウイルス以外の原因を追求した結果、生理障害である可能性が高いと考えられた (Takahashi et al. in press)。他の未解決のリンドウ病害においてもBBWV2およびGeMVは高い確立で検出されており、厄介なことに、これらのウイルスはリンドウで病害を誘起する系統が報告されているため、病害への関与を完全に否定はできないのである。また、リンドウも含め多年生の花きや果樹でDECS法を用いると、複数のウイルスが同時に検出されることが多い。この場合は、個々のウイルスを病原体の候補として考えるのみならず、複数のウイルスの感染の結果、病害が激症化している可能性についても考慮しなければならない。したがって、個々のウイルスの病原性、宿主応答など、病理学的研究の重要性は、ウイルス検出技術がいくら進歩しても何ら変わらない。

4. おわりに

網羅的ウイルス検出法の結果、病原ウイルスの候補が得られた場合に、まず行うことは、実際にその結果を検証するため、元のサンプルからこのウイルスが検出されるか検定する。その次に病徴とウイルス感染の有無について相関が見られるかを確認する。したがって、個別ウイルスの検定方法が必要となる。対象とするウイルスに対して、既製品の抗体など確立された検定方法が手元にあるとは限らないため、個別の検定方法を短期間に確立しなければならない。網羅的ウイルス検出法の利点は、ウイルスの遺伝子配列情報を取得するため、対象とするウイルスを特異的に検出するためのPCRプライマーが即時に設計できることである。個別のウイルス検定に必要なことは、迅速性と正確性である。特に農業生

産現場で検定可能なイムノクロマトグラフィー法や LAMP 法などは大いに活用されている。最近, Furutani et al. (2016) は, 携行可能な小型の高速リアルタイム PCR 装置を開発した。マイクロ流路を利用して 2 種類の温度間を反応液が往復する送液型のサーマルサイクル反応を採用しており, 送液時に検出器によってリアルタイムで PCR 産物量を測定するため, 高速化と装置の小型化を実現している (図 2)。リアルタイム PCR では, 目的とする遺伝子配列の特異性を上げるだけではなく, プライマーとプローブのデザインの仕方で, 複数種のウイルスをターゲットとする汎用的な検出も可能である (Yanagisawa et al. in press)。また, 蛍光を複数利用した複数のウイルス種を同時に判別するマルチプレックス化など可能性は広がる。網羅的ウイルス検出法と高速ウイルス検出法の開発によって, 病原ウイルスの探索が効率化できると考えられ, また, これらの技術は植物の遺伝子発現解析などに広く応用されていくものと期待される。さらに, 新たに発見されたウイルスも遺伝子資源としての活用も期待できる。上述の BBWV2 は, リンドウに無病徴感染する特性を利用した遺伝子発現ベクターとして応用され, 花芽形成機構などの基礎的な植物生理学研究的ツールとして利用されている (Tasaki et al. 2016)。また, GORV は, ウイルスの花粉伝染機構解明のモデル材料として活用されている (Isogai et al. 2017)。本稿で紹介した技術などによって, ウイルスの検出が比較的容易になったものの, 病害の防除には, 病原ウイルスとしての病原性の証明, ウイルスの性状解析, 伝染経路の探索や植物の病徴発現機構, 植物の持つ病害抵抗性機構を理解する必要がある。今後の病害防除に向けた植物ウイルス研究の進展により得られる分子生物学的な知見や関連技術の応用は, 植物保護の分野に留まらず, 植物科学全般の研究推進に大いに貢献するものと期待される。

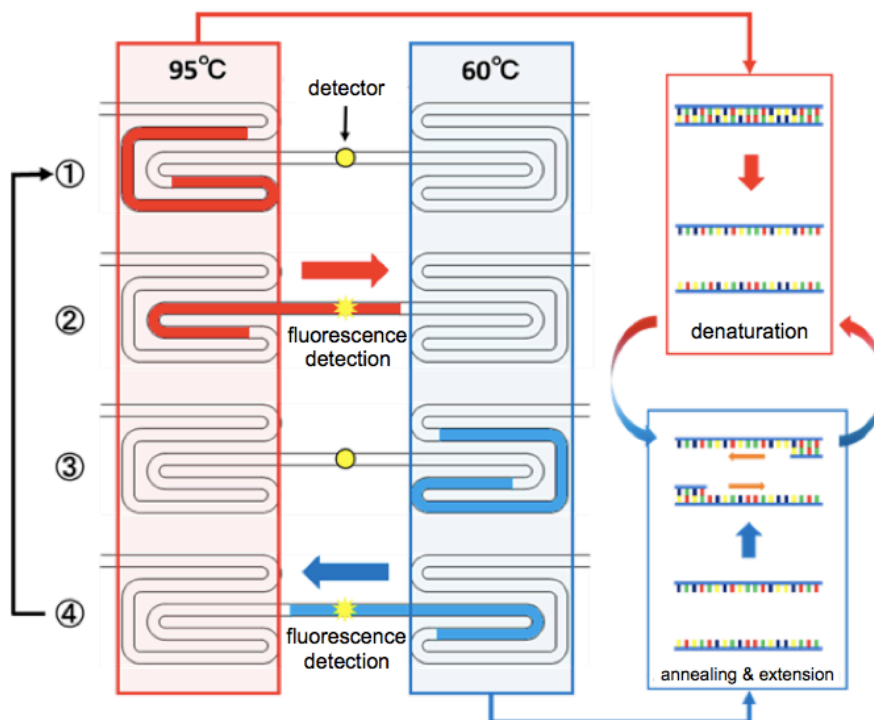


図 2. 高速リアルタイム PCR の原理

① 2 本鎖 DNA を 1 本鎖に分離, ②高温部から低温部へ送液, ③ 1 本鎖を 2 本鎖に複製, ④低温部から高温部へ送液 (①に戻る), ①~④を繰り返すことで遺伝子を増幅する。RNA の場合には, ①の前に逆転写反応に適した温度の部位を用意することで, 逆転写反応をしてから①へ送液することで RT-PCR も可能である。

5. 謝辞

本稿で紹介した著者らの研究は、「農林水産省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」および「農林水産省革新的技術開発・緊急展開事業（うち地域戦略プロジェクト）マイナークロップにおける高速ウイルス診断技術の実証研究」により行われたものである。

6. 引用文献

- Atsumi, G., Tomita, R., Kobayashi, K., & Sekine, K.-T. 2013a. Prevalence and genetic diversity of an unusual virus associated with Kobu-sho disease of gentian in Japan. *J. General Virol.* 94: 2360-2365.
- Atsumi, G., Tomita, R., Kobayashi, K., & Sekine, K.-T. 2013b. Establishment of an agroinoculation system for broad bean wilt virus 2. *Arch. Virol.* 158: 1549-1554.
- Atsumi, G., Sekine, K.-T., & Kobayashi, K. 2015a. New method to isolate total dsRNA. *Methods in Molecular Biology* 1236: 27-37.
- Atsumi, G., Tomita, R., Yamashita, T., & Sekine, K.-T. 2015b. A novel virus transmitted through pollination causes ring-spot disease on gentian (*Gentiana triflora*) ovaries. *J. General Virol.* 96: 431-439.
- Barba, M., Czonsnek, H., & Hadidi, A. 2014. Historical perspective, development and applications of next-generation sequencing in plant virology. 6: 106-136.
- Furutani, S., Naruishi, N., Hagihara, Y., Nagai, H. 2016. Development of an on-site rapid real-time polymerase chain reaction system and the characterization of suitable DNA polymerases for TaqMan probe technology. *Anal. Bioanal. Chem.* 408: 5641-5649
- Hadidi, A., Flores, R., Candresse, T., & Barba, M. 2017. Next-generation sequencing and genome editing in plant virology. *Front. Microbiol.* 8: 45 doi: 10.3389/fmicb.2016.01325
- Isogai, M., Kamata, Y., Ando, S., Kamata, M., Shirakawa, A., Sekine, K.-T. & Yoshikawa, N. 2017. Horizontal pollen transmission of *Gentian ovary ring-spot virus* is initiated during penetration of the stigma and style by infected pollen tubes. *Virology* 503: 6-11.
- 菅広和・佐藤美和子・白川明日佳・関根健太郎 2016. 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. *植物防疫 (70)*: 19-22.
- Kobayashi, K., Atsumi, G., Iwadate, Y., Tomita, R., Chiba, K., Akasaka, S., Nishihara, M., Takahashi, H., Yamaoka, N., Nishiguchi, M., and Sekine, K.-T. 2013. Gentian Kobu-sho-associated virus: a tentative, novel double-stranded RNA virus that is relevant to gentian Kobu-sho syndrome. *J. Gen. Plant Pathol.* 79: 56-63.
- Kobayashi, K., Atsumi, G., Yamaoka, N., & Sekine, K.-T. 2012. Sequencing-based virus hunting and virus detection. *Japan Agr. Res. Quart.* 46:123-128.
- Kobayashi, K., Tomita, R. & Sakamoto, M. 2009. Recombinant plant dsRNA-binding protein as an effective tool for the isolation of viral replicative form dsRNA and universal detection of RNA viruses. *J. Gen. Plant Pathol.* 75: 87-91.
- Okada, R., Kiyota, E., Moriyama, H., Fukuhara, T., & Natsuaki, T. 2015. Simple and rapid method to purify viral dsRNA from plant and fungal tissue. *J. Gen. Plant Pathol.* 81:103-107.

- Okuda, M., & Hanada, K. 2001. RT-PCR for detecting five distinct Tospovirus species using degenerate primers and dsRNA template. *J. Virol. Methods* 96: 149-156.
- Roossinck, M.J., Martin, D.P., & Roumagnac, P. 2015. Plant virus metagenomics: advances in virus discovery. *Phytopathology* 105: 716-727.
- Shimomoto, Y., Kobayashi, K., & Okuda, M. 2014. Identification and characterization of Lisanthus necrotic ringspot virus, a novel distinct tospovirus species causing necrotic disease of Lisanthus (*Eustoma grandiflorum*). *J. Gen. Plant Pathol.* 80: 169-175.
- Takahashi, H., Abe, H., Fujita, K. & Sekine, K.-T. in press. The use of metabolome analysis to identify the cause of an unexplained disease of Japanese gentians (*Gentiana triflora*). *Metabolomics* DOI: 10.1007/s11306-017-1192-0
- Tasaki, K., Atsumi, G., Nishihara, M., & Sekine, K.-T. 2016. Development of a *Broad bean wilt virus 2*-based expression vector for gentian. *Scientia Horticulture* 201: 279-286.
- Yanagisawa, H., Tomita, R., Katsu, K., Uehara, T., Atsumi, G., Tateda, C., Kobayashi, K., & Sekine, K.-T. 2016. Combined DECS analysis and next-generation sequencing enable efficient detection of novel plant RNA viruses. *Viruses* 8: 70.
- Yanagisawa, H., Shiki, Y., Matsushita, Y., Ooishi, M., Takaue, N., & Tsuda, S. in press. Development of a comprehensive detection and identification molecular based system for eight pospiviroids. *Eur. J. Plant Pathol.* DOI 10.1007/s10658-017-1157-1
- Vlugt, R.A.A., & Berendsen, M. 2002 Development of a general potexvirus detection method. *Eur. J. Plant Pathol.* 108: 367-371.
- Wu, Q., Ding, S.W., Zhang, Y., & Zhu, S. 2015. Identification of viruses and viroids by next-generation sequencing and homology-dependent and homology-independent algorithms. *Annu. Rev. Phytopathol.* 53: 425-444