



Protein Island Matsuyama

プロテイン・アイランド・松山

植物ウイルスと農業被害

～ カンキツウイルス検査キットの開発～

プログラム・要旨集

日時 2020年11月9日(月) 15:00～17:15

会場 テクノプラザ愛媛 テクノホール

(松山市久米窪田町 337-1)

開催目的

愛媛大学、愛媛県、松山市、松山商工会議所、愛媛経済同友会は、「プロテイン・アイランド・松山」と銘打ち、愛媛大学が開発したコムギ無細胞タンパク質合成技術を愛媛の地域経済の活性化につなげる活動を行っています。その活動の一環として、愛媛県果樹研究センターと愛媛大学プロテオサイエンスセンターが開発した、**カンキツウイルスを高精度で検出する技術**をご紹介しますことになりました。

小林先生・青野先生をお招きして、植物に感染するウイルスやその被害状況などの解説を行っていただきます。農業に関係しない方々にも、検出技術の重要性を感じていただけたらと思います。

また、この技術を直に体験していただける**簡単な実験**も行います。検出技術を必要とされている関係者の方々はもちろん、この技術を現場で利用しやすくするための検査キットの開発や製品化にご興味のある方々にも、わかりやすくご紹介します。最先端の技術で、皆様と一緒に愛媛を盛り上げていきたいと思っておりますので、どうぞよろしくお願いいたします。

プログラム

時間	内容	所要時間	詳細
14:30	受付開始	30分	
15:00	開会	5分	主催者挨拶 愛媛大学プロテオサイエンスセンター長 坪井 敬文 (代理 副センター長 澤崎 達也)
15:05	講演 1	20分	小林 括平 (愛媛大学 農学部・教授) 植物のウイルス病：防除のために知っておくべきその多様性
15:25	質問票回収・休憩	10分	
15:35	講演 2	20分	青野 光男 (愛媛県農林水産研究所 果樹研究センター・主任研究員) 愛媛県におけるウイルスによるかんきつの被害について
15:55	質問票回収・休憩	10分	
16:05	講演 3	20分	野澤 彰 (愛媛大学プロテオサイエンスセンター・講師) カンキツウイルス検査キットの開発
16:25	質問票回収・休憩	10分	
16:35	実技	15分	野澤 彰 (愛媛大学プロテオサイエンスセンター・講師) カンキツウイルス検査キットの使い方について
16:50	質疑応答	20分	質疑応答 (適宜、質問票回収)
17:10	閉会挨拶	5分	閉会挨拶 愛媛県経済労働部産業支援局 局長 佐藤 努
17:15	閉会		

【講演 1】植物のウイルス病：防除のために知っておくべきその多様性



小林 括平（愛媛大学 農学部・教授）

昭和 60 年 京都大学農学部 卒業
平成 4 年 同大学院農学研究科博士後期課程 単位取得退学
平成 4 年 京都府立医科大学微生物学教室 助手
平成 11 年 スイス国 Friedrich Miescher Institute 博士研究員
平成 15 年 （財）岩手生物工学研究センター 研究員
平成 22 年 愛媛大学農学部 准教授
平成 28 年より現職

連絡先：kapei@ehime-u.ac.jp

それまで知られていなかった「ウイルス」が、タバコモザイク病の病原体として報告されてから 120 年以上が経過した。今では 6000 種以上のウイルスが知られるようになり、毎年のように流行するインフルエンザや、一昨年わが国で二十数年ぶりに発生の確認された豚コレラ、さらには 2020 年になって世界的流行(パンデミック)を引き起こして大きな問題となっている新型コロナウイルスなど、我々の生活はさまざまなウイルスの影響を受けている。一般消費者にはあまり知られていないと思われるが、ウイルスによる被害は豚や鶏などの家畜だけではなく、養殖用の仔魚生産においても問題となっており、また、全世界における植物ウイルスによる経済的損失は、毎年 1000 億円以上にのぼるとの説もある。このようにウイルス対策は、食料生産においても極めて重要な課題の一つとなっている。

ほとんどすべてのウイルスでは、さまざまな要因で宿主範囲が厳密に決められており、植物ウイルスが動物に疾患を引き起こすことはないと考えられる。さらに、植物ウイルスの中でもすべての植物に感染して病害を引き起こすものは知られておらず、多くの場合、あるウイルスは特定の一ないし少数の植物種にしか感染しない。例えば、上述のタバコモザイクウイルスは、タバコと同じナス科のさまざまな植物に感染して病害を引き起こすが、イネやコムギ、ダイズなどには感染しない。また、ウイルスによって感染経路が異なることも知られており、ヒト病原ウイルスのうち、日本脳炎やデング熱などは蚊によって媒介されるが、コロナウイルスは昆虫によって伝播されることはない。同様に植物ウイルスでも、タバコモザイクウイルスのように物理的接触のみによって伝播されるものだけでなく、昆虫や菌類によって伝播されるものが知られている。ウイルスとそれを運ぶ昆虫の間にも厳密な関係性があり、トマト栽培で問題となっているウイルスのうち、黄化葉巻ウイルスはコナジラミ、キュウリモザイクウイルスはアブラムシ、トマト黄化えそウイルスはアザミウマによって媒介されるが、それらのウイルスが他の昆虫によって媒介された例は知られていない。

ヒトのウイルス疾患では多様な抗ウイルス薬が開発されているが、植物ウイルスに対する抗ウイルス農薬は、これまでに実用化されたものはない。そのため、植物ウイルス病の防除は、抵抗性品種の利用や媒介生物の防除に依存するところが大きい。上述のようにウイルスの種類によって伝播経路はさまざまである。特に昆虫媒

介性ウイルスは大きな被害をもたらしやすい傾向にあり、ウイルスの種類が分からなければ、防除すべき昆虫も見当がつかないということになる。そのため、ウイルス病の防除に向けた第一歩は、その病害の原因となっているウイルス種を特定することであるといえる。

ウイルス病の診断に用いられる検出法も進歩を続けており、PCR 法や LAMP 法などの遺伝子診断法はその検出感度の高さから、さまざまなウイルスの診断に応用されるようになった。遺伝子診断法の特徴として、その検出感度の高さが注目されがちであるが、その検出の特異性の高さも特筆に値する。例えば、新型コロナウイルスの診断に用いられている定量 PCR 法は、従来の「普通の風邪」の原因となるコロナウイルスと肺炎を起こす新型ウイルスを区別することができる。しかし、その特異性の高さが仇となり、突然変異を起こしたウイルスが診断の網の目から漏れてしまう事例もある。本講演では、ウイルスの遺伝的多様性にまつわる話題を提供する。それぞれの地域、作物や栽培目的に合わせた植物ウイルス病の防除に向けた診断法を選択する際の一助となれば幸いである。

【講演 2】愛媛県におけるウイルスによるかんきつの被害について



青野 光男

(愛媛県農林水産研究所 果樹研究センター・主任研究員)

平成 12 年入庁、御荘農業改良普及センター、果樹試験場(虫害)、本庁、病害虫防除所を経て、平成 27 年から現職。

かんきつ、キウイフルーツを中心とした果樹の病害防除に従事。

連絡先: aono-mitsuo@pref.ehime.lg.jp

愛媛県は年間を通じて温暖で晴れの日が多く、土壌の条件にも恵まれており、かんきつの栽培に適した環境が揃っています。愛媛県のみかん栽培は江戸時代の終わり頃に宇和島市吉田町で始まったとされています。現在では県内各地で様々な品種のかんきつが栽培されており、うんしゅうみかんと伊予柑、甘平、愛媛果試第 28号(紅まどんな)などの中晩柑をあわせた生産量は全国一位であることから、かんきつ王国と呼ばれています。

高品質なかんきつを安定的に生産するには、剪定や施肥といった栽培管理だけでなく、様々な病害虫による被害を防ぐため、年間を通じた防除が必要です。かんきつに病気を引き起こす糸状菌(カビ類)や細菌は、農薬を中心とした対策を実施することで、被害を低減することができます。しかし、ウイルスやウイロイドについては、有効な農薬がなく、感染してしまうと樹体から除去することができないため、防除が非常に困難です。

果樹研究センターで確認できた最も古いウイルスに関する記録は昭和 25 年度の業務報告で、伊予郡で十数年前から発生していた原因不明の萎縮性病害の病原がウイルスであった旨の記載が見られます。このことから、かんきつ栽培においてウイルスの被害が長期にわたって問題となっていることがうかがえます。発生面積や被害額は、調査が困難なことから把握できていませんが、果樹研究センターのこれまでの事例を中心に愛媛県におけるウイルスによるかんきつの被害について紹介します。

現在、愛媛県で被害が問題となるウイルスは「温州萎縮ウイルス及びその近縁ウイルス(以下 SDV グループ)」、「カンキツトリステザウイルス(同 CTV)」、「リンゴステムグービングウイルス(同 ASGV)」が知られています。

SDV グループは、病原性や抗原性が異なる系統や近縁種が確認されています。接ぎ木や土壌から伝染するとされていますが、土壌中でウイルスを媒介するベクターはこれまでのところ確認されておらず、詳細はわかりません。春葉では「さじ型」や「舟型」になり、葉が小型化する症状や節間がつまって萎縮する症状が見られますが、夏秋梢ではこれらの症状は見られません。果実では、果実の腰高変形やモザイク症状が現れます。また、健全樹の果実と比べて小型化、着色不良、低糖酸高といった果実品質の低下が見られます。さらに、萎縮症状により樹冠が拡大できず、収量が低下します。

CTV は、世界的に大きな被害をもたらしてきたウイルスで、接ぎ木と虫媒で伝染します。強毒系統と弱毒系統があり、強毒系統は樹勢の衰弱、小玉果、生産量の低下、虎斑症状(伊予柑、ユズ)といった被害を引き起

こします。広く存在しているアブラムシ類(ミカンクロアブラムシ)により容易に伝搬されることから、国内で栽培されているほぼ全ての樹が感染しており、無毒の樹を植栽した場合でも短時間で再感染する可能性が高くなります。そのため、弱毒ウイルスの干渉効果を利用した被害回避が行われています。ただし、その干渉効果は永続的なものではないため、アブラムシ類の防除も必要になります。

ASGV は、接ぎ木で伝染します。一般に用いられているカラタチ台では台木と穂木の接木部に界層が発生します。それにより養水分の流れが妨げられることで、樹勢の衰弱と収量減をもたらし、症状が進むと枯死することがあります。

かんきつの品種更新には、カラタチ台に穂木を接いだ苗木を植栽する方法と既植の樹に高接ぎをする方法がありますが、愛媛県で問題となっている 3 種のウイルスは全て接木伝染することから、更新に使用される穂木が感染しているとウイルスがまん延します。カンキツモザイクウイルス汚染苗木が流通されて全国的な調査と対策が実施された宮本早生の事例(愛媛県でも発生が確認)、愛媛県で SDV グループによる萎縮症状が問題となった楠本早生での事例はいずれも新品種の増殖・導入の過程で起こっています。

健全な穂木や苗木の使用が非常に重要ですが、感染していても症状が現れないことがあり、品種による病徴の違いもあることから、肉眼で感染の有無を判断することは非常に困難です。ウイルス感染の診断には、白ごまや実生苗といった検定植物の使用、血清的診断法である ELISA 法、イムノクロマト法や PCR を用いた遺伝子診断法が用いられます。果樹研究センターでは関係機関と連携して母樹候補樹のウイルス検定を PCR で実施し、健全な穂木の確保に努めています。全てを検定することは不可能ですので、信頼のおける業者からの購入を徹底することも防除対策の一つとなります。

ウイルスによる被害が出始めると生産性が大きく低下することから、被害の大きい樹は伐採・抜根が行われます。再感染の危険性もありますので、改植時には残渣を丁寧に取り除き、土を入れ替えるなどの対策(土壌伝染の防止)が必要となることもあります。再植しても果実が収穫できるようになるには長い年月と多大な労力がかかります。そのため、ウイルスを園地に持ち込まないことが最も重要となります。

最後に、今後は分析技術の向上による新規ウイルスの発見や世界的な流通の活発化による海外からの侵入ウイルスによる被害も予想されます。そのため、既知のウイルスに対する知見の集積と被害防止対応を継続するとともに、産地からの情報収集に努めるなど、新たなウイルスへの警戒も必要と考えています。

【講演 3】カンキツウイルス検査キットの開発



野澤 彰

(愛媛大学プロテオサイエンスセンター・講師)

平成5年 東京理科大学基礎工学部卒業

平成7年 名古屋大学大学院農学研究科修了

平成12年 東京大学大学院理学系研究科修了

平成12年 奈良先端科学技術大学院大学遺伝子教育研究センター研究員

平成14年 岡山大学資源生物科学研究所研究員

平成15年 東京大学生物生産工学研究センター研究員

平成18年 愛媛大学無細胞生命科学工学研究センター助手

平成19年 愛媛大学無細胞生命科学工学研究センター助教

平成26年より現職

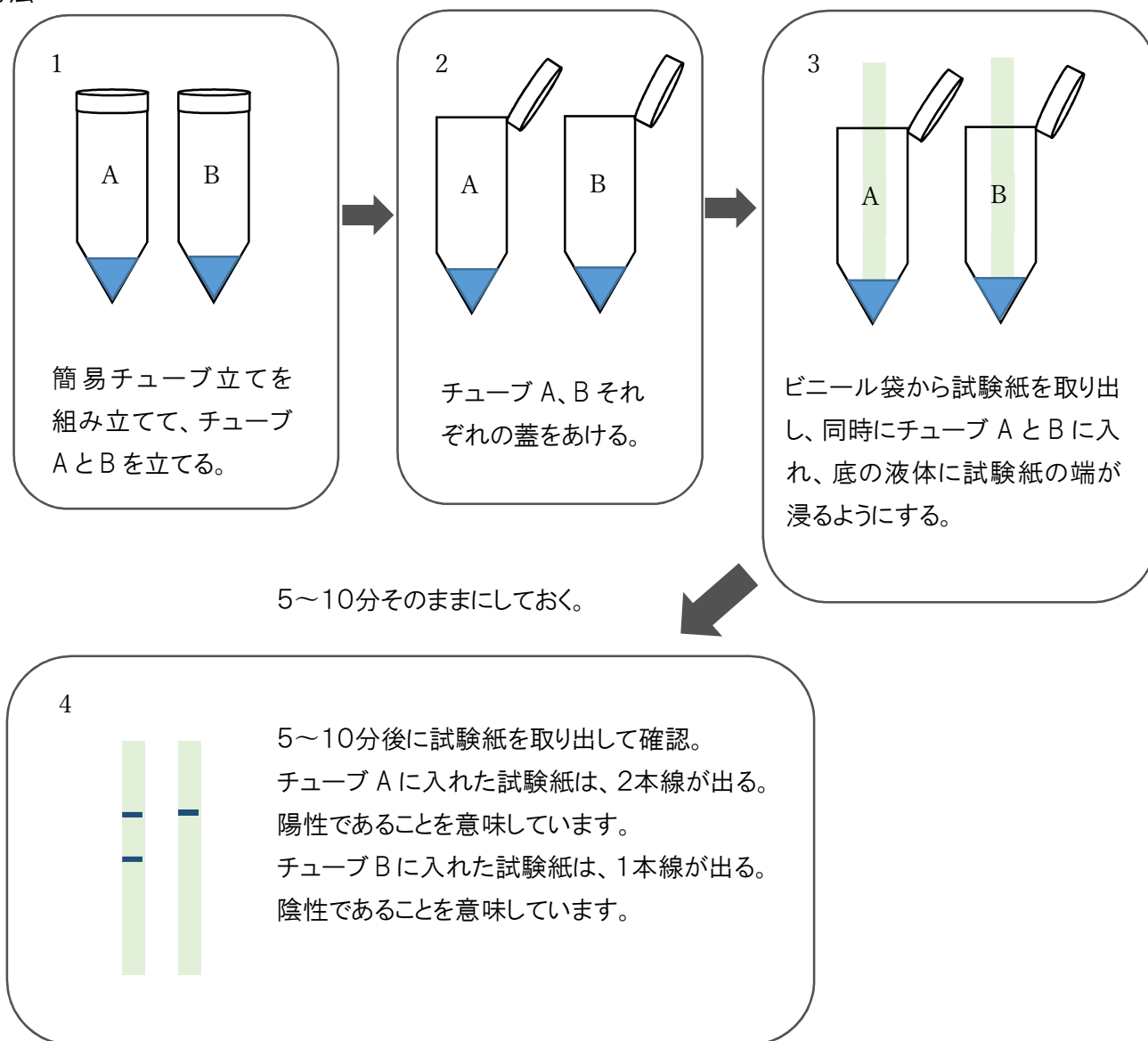
連絡先: nozawa.akira.my@ehime-u.ac.jp

カンキツの栽培現場で問題になっている病害の一つにカンキツウイルス病があります。これはカンキツウイルスの感染により引き起こされ、発病樹では樹勢が低下し果実の糖度が低下するなどの症状が現れるものです。現在、感染樹からウイルスを除去する技術が存在しないことから、感染被害の拡大を阻止するためには、感染樹の早期発見が重要になります。カンキツウイルスの感染を農業の現場で検出する方法として、ウイルスに対する特異抗体を利用したウイルス検査キットを用いる方法があります。しかし、現在、市販されている検査キットでは、愛媛県で問題になっているカンキツモザイクウイルス(CiMV Az-1 系統)の検出が難しいという問題がありました。本研究では、CiMV の Az-1 系統を検出可能な検査キットの開発を目標に実験を開始しました。まず、CiMV を認識するモノクローナル抗体取得のために、CiMV の Az-1 系統のコートプロテインスモールサブユニットの配列を基にしたペプチドを抗原としてウサギに免疫し、33 種の抗体遺伝子候補を取得しました。これらの遺伝子から培養細胞を用いて抗体を産生し、4) コムギ無細胞タンパク質合成系を利用して作成した抗原タンパク質に対する結合活性を AlphaScreen 法により検討しました。その結果、3 種の異なる抗体遺伝子が取得できたことが明らかになりました。次に Biacore を利用して、これらの抗体と抗原との親和性を解析した結果、これら 3 種の抗体は抗原に対し非常に高い親和性を有することが明らかになりました。また、Dot-blot 解析において、感染葉中の CiMV とその近縁種を検出できることが確認されました。ここまでの解析で抗原に対して最も高い親和性が確認された抗体 No. 20 を利用してイムノクロマト法によるカンキツウイルス検査キットを試作しました。健全葉と CiMV 感染葉のサンプルを用いて試作キットでの検出能を検討した結果、感染葉サンプルの方で特異的なシグナルが検出され、試作キットでウイルス感染を検出できることが確認できました。

【実技】

- 配布物：1. ウイルス感染葉からの抽出物が入ったチューブ A 1本
2. 健全葉からの抽出物が入ったチューブ B 1本
3. 試験紙(今回取得した抗体 No.20 が付いています) 2枚
4. 簡易チューブ立て 1個

方法



【用語説明】

1) カンキツウイルス病

ウイルスの感染により柑橘類に引き起こされる病気。カンキツウイルス病の発病樹では、葉が小型化・変形し、樹勢が低下する。また、果実の小玉化・糖度の低下などにより品質が低下し、収量も減少する。愛媛県では、愛媛果試第 28 号(紅まどんな)に感染する CiMV によるカンキツモザイク病が問題になっている。

2) CiMV (Citrus Mosaic Virus)

カンキツモザイク病の病原ウイルス。接木や土壌伝染により感染する。現在、感染樹からウイルスを取り除く方法が存在しないため、カンキツウイルス病が発生した場合、感染拡大を防ぐには感染樹の伐採抜根が必要となる。

3) モノクローナル抗体

単一の抗体産生細胞に由来するクローンから得られる抗体。様々な抗体産生細胞に由来するポリクローナル抗体と異なり、均一な抗体分子の集団である。通常は、抗体産生細胞と骨髄腫細胞を融合させてクローン化したハイブリドーマ細胞を作成して生産される。

4) コムギ無細胞タンパク質合成系

愛媛大学の遠藤弥重太特別栄誉教授らによって開発されたコムギ胚芽抽出液を用いた *in vitro* タンパク質合成システム。タンパク質合成阻害物質を除去したコムギ胚芽抽出液に、アミノ酸などの基質と目的 mRNA を加えるだけで、微生物から高等生物、さらに人工タンパク質に至るまで安定して高効率にタンパク質を合成する技術。

5) イムノクロマト法

毛細管現象と抗原抗体反応を利用した抗原の迅速検査法。金コロイド粒子を付加した抗体と抗原を反応後、生成した抗原抗体複合体を毛細管現象によりメンブレン上を移動させ、固定化した抗体で捕捉することで抗原を検出する。インフルエンザの診断や妊娠検査に利用されている。

【問合せ先】

【内容に関して】

愛媛大学 プロテオサイエンスセンター
無細胞生命科学部門 講師 野澤 彰
Mail: nozawa.akira.my@ehime-u.ac.jp
TEL: 089-927-8275
住所: 〒790-8577 愛媛県松山市文京町3番

【運営に関して】

プロテイン・アイランド・松山 実行委員会 事務局
Mail: pim2020@pim-sympo.jp

★愛媛県 経済労働部 産業支援局 産業創出課
TEL: 089-912-2483 FAX: 089-912-2469
住所: 〒790-8570 愛媛県松山市一番町四丁目 4-2

★愛媛大学 プロテオサイエンスセンター 事務
TEL: 089-927-9686 FAX: 089-927-8528
住所: 〒790-8577 愛媛県松山市文京町3番

【最新情報について】

プロテイン・アイランド・松山 公式ウェブサイト
<https://pim-sympo.jp/>



プロテイン・アイランド・松山

Protein Island Matsuyama

【PIM ロゴの意味】

プロテイン・アイランド・松山の核となる先端技術「コムギ無細胞タンパク質合成法」を、タンパク質の螺旋構造と、松山の頭文字「M」で、表現しています。この技術をベースに、新たなる可能性を求めて上昇し、広がり行く様を、主催5団体の集りからなる麦の穂先で表現しています。