

平成 21 年 5 月 21 日現在

研究種目：基盤研究（C）
 研究期間：2007～2008
 課題番号：19580052
 研究課題名（和文） アザミウマの腸管細菌がトスポウイルスの獲得・伝搬に及ぼす影響
 研究課題名（英文） Effects of gut bacteria in thrips on acquisition and transmission of Tospoviruses
 研究代表者
 前田 孚憲（MAEDA TAKANORI）
 日本大学・生物資源科学部・教授
 研究者番号：10038309

研究成果の概要：日本各地で採集したミカンキイロアザミウマなどから腸管細菌を分離した。分離された細菌のコロニータイプ、グラム染色性、形態、生化学的性質、16S rDNAの塩基配列などを調べた結果、いずれの個体からも少なくとも数種の細菌が分離された。また、1頭あたりの細菌数、細菌の種類には同一集団内での個体差、地域差が認められた。腸管細菌がウイルスの獲得・伝搬に及ぼす影響については、研究を継続中である。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	2,400,000	720,000	3,120,000
2008年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農学・植物病理学

キーワード：トスポウイルス、アザミウマ、腸管細菌、伝搬

1. 研究開始当初の背景

(1)アザミウマは多くの種が知られているが、わが国ではミカンキイロアザミウマ、ネギアザミウマ、ヒラズハナアザミウマ、ミナミキイロアザミウマなどが生息しており、トマト、ナスなどの野菜類、カキ、ブドウなどの果類、トルコギキョウなどの花卉類などに、食害による深厚な被害を与えている。特に、日本に1900年代後半に外国から侵入したミカンキイロアザミウマ (*Frankliniella occidentalis*) は多くの植物を寄主としており (polyphagous)、日本のみならず、北米、

ヨーロッパなどの地域においても難防除害虫として大きな問題となっている。

(2) また、アザミウマは食害のみならず、トスポウイルスの媒介者であることから世界各国で大きな問題となっている。トマト黄化えそウイルス (*Tomato spotted wilt virus*: TSWV) を代表種とするトスポウイルスは熱帯、亜熱帯および日本を含む温帯地域に広く分布しており、野菜類、花卉類などの作物に甚大な被害を及ぼしている。わが国では、TSWV、インパチエンスネクロティックスポットウイルス (INSV) などが知られているが、

これらのウイルスによる被害の拡大が懸念されている。

(3) アザミウマは幼虫のみがウイルスを獲得し、腸管上皮細胞に感染する。その後、中腸細胞、筋細胞、じん帯、唾液腺細胞で増殖した後、成虫が終生ウイルスを伝搬する。アザミウマによるトスポウイルスの伝搬様式は永続伝搬であり、伝搬効率が非常に高いことが問題となっている。

(4) アザミウマの生活環を明らかにすることは、トスポウイルスを制御する上で非常に重要である。本研究ではアザミウマの腸管細菌相を調べることにアザミウマの生活環を明らかにするとともに、腸管細菌のトスポウイルスの獲得・伝搬に及ぼす影響を明らかにし、トスポウイルス制御のための基礎知見を得ることを目的としている。このような視点に立った研究はほとんど行なわれておらず、この点に特色があり、独創的であると考えられる。

2. 研究の目的

(1) わが国では、TSWV、インパチェンスネクロティックスポットウイルス (INSV) などのトスポウイルスが知られているが、これらのウイルスによる被害は甚大であり、日本全国への拡大が懸念されている。アザミウマは幼虫のみがウイルスを獲得し、成虫は終生ウイルスを伝搬する。アザミウマによるトスポウイルスの伝搬様式は永続伝搬であり、伝搬効率が非常に高いことが問題となっている。さらに、アザミウマ類は薬剤耐性がつきやすく防除が困難である。

アザミウマの生活環を明らかにすることは、トスポウイルスを制御する上で非常に重要である。本研究ではアザミウマの腸管細菌相を明らかにし、腸管細菌がアザミウマによるウイルスの獲得・伝搬に及ぼす影響を明らかにすることを目的としている。

(2) アザミウマの伝搬試験にはウイルス獲得のために、ウイルス濃度の高い感染葉を常時準備する必要があり、多大の労力を必要とする。そこで、感染葉汁液に各種の糖、還元剤、酸化防止剤等を加え、ウイルスを部分精製し、低温化で長期間保存する技術を確立できれば、これまでネックとなっていたトスポウイルスの伝搬機構の解明が飛躍的に進展することが期待される。

3. 研究の方法

(1) 供試アザミウマ

主にミカンキイロアザミウマを用いた。各地で採集したアザミウマは村井氏、松浦氏から分譲していただいた。一部のアザミウマは当研究室で採集した。アザミウマの飼育はレースバト用のソラマメ催芽種子を餌として

プラスチック製の容器で飼育した。飼育および実験は約 25℃の人工飼育室で行った。採卵にはマツの花粉と蜂蜜をパラフィルムを通して吸汁させ、卵を採取した。孵化した 1 齢幼虫はマツの花粉で飼育し、ヨウウシュチヨウセンアサガオ (*Datura stramonium*) の感染葉を吸汁させることにより、ウイルスを獲得させた。

(2) 供試ウイルス

TSWV はピーマン由来の分離株を用いた。ウイルスは *Datura stramonium* あるいは、*Nicotiana rustica* で汁液接種により増殖させた後、感染葉を -80℃で保存した。

(3) TSWV の伝搬試験

汁液接種後 6-10 日目の明瞭な病徴が現れた *Datura stramonium* の葉片をエッペンチューブに入れ、孵化後 0-8 時間齢の 1 齢幼虫を入れ、約 16 時間吸汁させた。アザミウマの伝搬能力はペチュニア葉を用いたリーフディスク法により検定した。リーフディスクは蒸留水を入れた 24 穴のマルチウェルプレートに 3 日間浮かべ、TSWV 感染意より生じるえそ斑点の有無により判定した。

(4) ELISA 法によりアザミウマ内における TSWV 量の測定

アザミウマ体内のウイルス量はポリクローナル抗体とモノクローナル抗体を用いた TAS-ELISA 法 (三重抗体法) により行った。

(5) アザミウマの腸管細菌の分離と同定

① 腸管細菌の分離

人工飼育したアザミウマを 1 頭づつ取り出し、70%エタノールで表面殺菌後、蒸留水で洗浄した。アザミウマを滅菌水 300 μl を入れた 2ml のエッペンチューブに移し、磨砕棒を用いて磨砕した。これを原液として 3 段階の希釈液を作製した。各希釈液 100 μl を普通寒天培地 (NA) 培地あるいは LB 寒天培地に滴下し、コンラージ棒で塗布した後、28℃で培養した。糸状菌の分離が多い場合には、抗生物質のシクロヘキシミドを添加し、糸状菌の生育を抑制した。生じた単コロニーは滅菌ツマヨウジでつりあげ、グリセロールを加えた NA 培地に懸濁し、-80℃で保存した。

(6) 細菌の同定

分離した細菌はグラム染色法および KOH 法により、グラム判定を行った。さらに、グラム染色後、イマージンオイルを用いた光学顕微鏡下で細菌の形状の観察を行った。また、生化学的性質として、カタラーゼ活性、オキシダーゼ活性、OF テストを行った。

抽出したゲノム DNA を鋳型とした 16S rDNA の増幅は真性細菌用の universal プライマーを用いた。また、場合によっては nested PCR を行った。LB 培地で培養した細菌から CTAB 法により、ゲノム DNA を抽出し、PCR を行った。PCR 産物を pGEM-T Easy vector にライゲーションしたのち、大腸菌に形質転換した。

プラズミドを精製後、dideoxy 法により、塩基配列を決定した。決定した塩基配列は DDBJ 当により相同性の検索を行った。

⑦ TSWV の部分精製

TSWV に感染した病徴の明瞭な *Datura stramonium* からウイルスを部分精製した。感染葉を各種添加物を含む 50mM リン酸緩衝液 (pH 7.0) で磨砕し、二重のガーゼで搾汁し、低速遠心した。遠心上清を蔗糖クッション遠心にかけて、沈殿を緩衝液に懸濁した。懸濁液をペチュニア葉に接種し、生じたえそ斑点からウイルス活性を判定した。

4. 研究成果

(1) 各地で採集したミカンキイロアザミウマを催促芽ソラマメで集団飼育し、アルコールで表面殺菌した後、各個体の細菌数とコロニータイプを調べた結果は以下のとおりであった。

- 静岡-1 (透明:0、乳白色:0、ピンク:0)
 - 2 (透明:1,000、乳白色:0、ピンク:0)
 - 3 (透明:4,000、乳白色:0、ピンク:0)
 - 4 (透明:0、乳白色:8,000、ピンク:0)
 - 5 (透明:0、乳白色:0、ピンク:0)
 - 6 (透明:0、乳白色:90、ピンク:0)
- 広島-1 (透明:3,000、乳白色:30、ピンク:0)
 - 2 (透明:3000、乳白色:2,000、ピンク:0)
 - 3 (透明:3、乳白色:0、ピンク:0)
 - 4 (透明:12,000、乳白色:0、ピンク:0)
 - 5 (透明:920、乳白色:20、ピンク:0)
 - 6 (透明:10、乳白色:0、ピンク:0)
 - 7 (透明:10、乳白色:20、ピンク:0)
 - 8 (透明:40,000、乳白色:500、ピンク:0)
- 高知-1 (透明:1,370、乳白色:10、ピンク:0)
 - 2 (透明:0、乳白色:0、ピンク:0)
 - 3 (透明:0、乳白色:0、ピンク:0)
 - 4 (透明:0、乳白色:500、ピンク:0)
 - 5 (透明:0、乳白色:460、ピンク:0)
 - 6 (透明:0、乳白色:14,000、ピンク:0)
 - 7 (透明:0、乳白色:960、ピンク:0)
- 島根-1 (透明:0、乳白色:500、ピンク:3,000)
 - 2 (透明:3000、乳白色:2,000、ピンク:0)
 - 3 (透明:3、乳白色:0、ピンク:0)
 - 4 (透明:15,000、乳白色:0、ピンク:0)
 - 5 (透明:0、乳白色:4,000、ピンク:40,000)
 - 6 (透明:30,000、乳白色:0、ピンク:0)
 - 7 (透明:0、乳白色:100、ピンク:15,000)

以上のように、異なる地域から採集したアザミウマから分離される細菌は、透明、乳白色、ピンクの3コロニータイプに分けられた。

なお、同じ個体群内で、個体により分離される細菌のタイプ、コロニー数が大きく異なっていた。特に、島根株は他の地域のアザミウマに比較して細菌数が多かった。

(2) 各個体群の TSWV の伝搬効率

各個体群の TSWV の伝搬効率をペチュニアリーフディスク法を用いて調べた。各個体群あたり約 100 頭を供試した。その結果、静岡株:♂(10.2%)、♀(13.0%)、広島株-1:♂(31.6%)、♀(6.3%)、広島株-2:♂(18.5%)、♀(18.0%)、島根株♂(0.0%)、♀(1.7%)であった(桜井ら)。このように採集地によって地域差が見られた。特に、島根株は伝搬効率が他の個体群に比較して低かった。

(3) 腸管細菌の同定

各個体群から分離された細菌の同定を試みた。グラム染色性、カタラーゼ活性、オキシダーゼ活性、16s DNA の塩基配列から、細菌の同定を試みた結果、*Erwinia*、*Staphylococcus*、*Bacillus* 属菌などが同定されたが、供試個体数が少なかったため、正確な優占種を明らかにすることはできなかった。また、種レベルの細菌の同定には API テストを併用する必要があると考えられた。

(4) ウイルス獲得試験の簡便化

トスポウイルスは非常に不安定なウイルスであり、粗汁液中では数時間で活性を失う。トスポウイルスの吸汁・獲得実験には常時、ウイルス濃度の高い植物を準備する必要があり、トスポウイルスの伝搬機構の解明のネックとなっている。そこで、抽出用緩衝液に各種酸化防止剤、還元剤、アミノ酸、糖類等を添加し、ウイルスを部分精製した結果、高い活性を有する部分標品を得ることができた。特に、従来の報告どおりシステイン等で高い保護効果が認められた。本実験で保護効果が認められた添加物を組み合わせ、ウイルスを部分精製した後、極低温保存あるいは凍結乾燥することにより、常時獲得実験に使用できるものと考えられる。本技術は TSWV をはじめとする多くのトスポウイルスに適用でき、ウイルスの伝搬機構の解明に大きく貢献できることが期待される。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計3件)

① Imura Y, Oka H, Kimata K, Nasu M, Nakahama K, Maeda T, Comparisons of complete RNA-2 sequences, pathological and serological features among three Japanese isolates of *Arabis mosaic virus*, *Virus genes*, 37, 333-341, 2008, 査読有

② Kondo H, Maeda T, Tamada T,

Identification and characterization of structural proteins of orchid fleck virus, Archives of Virology, 154, 37-45, 2008, 査読有

③近藤秀樹、前田孚憲、玉田哲男、分節型ラブド様ウイルス、ランエそ斑紋ウイルスの分子生物学および分子系統学的解析、植物ウイルス研究会レポート、9、27-35、2008、査読無

〔学会発表〕(計7件)

①近藤秀樹、野田瑞紀、広田恵介、前田孚憲、玉田哲男、鈴木信弘、徳島県のシンビジウムから分離されたランエそ斑紋ウイルス(O F V)の塩基配列の解析、平成20年度日本植物病理学会大会、2009.3.22、山形大学

②城所 聡、圓山恭之進、中島一雄、井村喜之、他4名、シロイナズナにおける低温ストレス誘導因子遺伝子DREB1の転写制御解析、第31回日本分子生物学会年会、2008.12.12、札幌コンベンションセンター

③城所 聡、圓山恭之進、中島一雄、井村喜之、他4名、シロイナズナにおける低温ストレス誘導因子遺伝子DREB1の転写機構の解析、第49回日本植物生理学会年会、2008.3.22、札幌コンベンションセンター

④桑原繁和、鳴瀬鉄人、井村善之、前田孚憲、アラビシモザイクウイルス3分離株の病原性の相違および全塩基配列の比較、平成20年度日本植物病理学会関東部会、2008.9.14、日本大学

⑤天野翔大、中村友紀、武者恭佳、天野政史、井村善之、前田孚憲、ズッキーニ黄斑モザイクウイルスに対するキュウリ抵抗性機構と翻訳開始因子との関連性、平成20年度日本植物病理学会関東部会、2008.9.14、日本大学

⑥城所 聡、圓山恭之進、中島一雄、井村喜之、他4名、シロイナズナにおける低温ストレス誘導因子遺伝子DREB1の転写制御機構のカイセキ、第30回日本分子生物学会年会、2007.12.11、パシフィコ横浜

⑦皆川倫子、森重健太郎、井村善之、前田孚憲、モザイク・奇形症状を示すサザンカから検出されたdsRNAの解析、平成19年度日本植物病理学会関東部会、2007.9.14、東京農業大学

〔図書〕(計1件)

①前田孚憲、当面の話題「猛威を振るう植物ウイルス」、養賢堂、農業および園芸、2007、2

〔その他〕

①近藤秀樹、前田孚憲、野田瑞紀、鈴木信弘、玉田哲男、ランエそ斑紋ウイルスのダニ伝搬様式、分子系統および診断技術に関する研究、2009名古屋国際ラン会議記録、2009、8-13

6. 研究組織

(1) 研究代表者

前田 孚憲 (MAEDA TAKANORI)
日本大学・生物資源科学部・教授
研究者番号：10038309

(2) 研究分担者

井村 善之 (IMURA YOSHIYUKI)
日本大学・生物資源科学部・助手
研究者番号：50366621