

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 25 年 5 月 28 日現在

機関番号：11201

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2012

課題番号：21580051

研究課題名（和文） ブルーベリーに発生するウイルスの病害防除に対する統合的研究

研究課題名（英文） Integrated investigation of blueberry viruses for disease protection

研究代表者

磯貝 雅道（ISOGAI MASAMICHI）

岩手大学・農学部・准教授

研究者番号：30312515

研究成果の概要（和文）：日本のブルーベリーから 4 種のウイルスを検出しその特性を解析した。その内の 2 種は、海外で発生しているブルーベリー赤色輪点ウイルスとブルーベリー潜在ウイルスであった。残りの 2 種は新種ウイルスで、ブルーベリー小球形潜在ウイルス(BLSV)とブルーベリーA ウイルス(BVA)と名付けた。BLSV は、ネポウイルス属グループ C の新規ウイルスであった。BVA は、クロステロウイルス科のどの属にも所属しない新規クロステロウイルスであることが系統樹解析により示された。

研究成果の概要（英文）：We detected four blueberry viruses in Japanese blueberry trees and analyzed their properties. Two out of the four viruses were identified with *Blueberry red ringspot virus* (BRRV) and blueberry latent virus (BBLV), which had been reported in other countries. The rest of the two viruses were new species, which were named *Blueberry latent spherical virus* (BLSV) and blueberry virus A (BVA). Characterization of BLSV revealed that it should be considered a new member of subgroup C in the genus *Nepovirus*. In a phylogenetic analysis of BVA genome, BVA was a new closterovirus which failed to group with any genus of the family *Closteroviridae*.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010 年度	800,000	240,000	1,040,000
2011 年度	800,000	240,000	1,040,000
2012 年度	800,000	240,000	1,040,000
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：植物ウイルス、ブルーベリー、病害防除、ブルーベリー潜在ウイルス、ブルーベリー赤色輪点ウイルス、ブルーベリー小球形潜在ウイルス、ブルーベリーAウイルス

1. 研究開始当初の背景

ブルーベリーは、世界的な健康志向の高まりから生産量が増加している。日本では、1997年に生産量・栽培面積が558トン・212ヘクタールであったが、2010年には生産量・栽培面積が2,258.5トン・1,040.6ヘクタールと急速に拡大している。世界的な生産量増加の一方で、海外ではブルーベリーにウイルスが発生し甚大な被害を与えている。そしてウイルス病と考えられている病原未同定の病気も報告されている。そのためアメリカでは、National Clean Plant Networkの中のBerries Clean Plant Networkにより国・州・産業・大学が連携してブルーベリーのウイルス病被害から生産者を保護している。一方、日本では、未だ圃場でどの様なウイルスが発生しているか解析されておらず、ウイルス検定、ウイルスフリー苗木の普及、ベクターのコントロールは行われていない。わが国のブルーベリーに感染するウイルスの学術的調査が必要である。

2. 研究の目的

これまで日本では、ブルーベリー樹へのウイルスの感染は報告されていなかったが、我々は果実生産に被害を及ぼすウイルスが日本でも発生していることを見出している。さらに、日本のブルーベリー樹には様々なウイルス病様の症状が観察されている。本研究では、ブルーベリーのウイルス病害防除を目的として、ブルーベリーに感染するウイルスの検出・同定および検定方法を解析する。さらに、それらウイルスの感染によるブルーベリー樹に及ぼす影響について統合的に研究する。

3. 研究の方法

(1) ブルーベリー圃場の調査および試料採集

日本のブルーベリー圃場には葉にクロロティックスポット・壊死斑点・モザイク症状・黄化など様々なウイルス病症状を呈する樹が多数存在する。そこで、ブルーベリー圃場でウイルス調査を行い、サンプル採集を実施する。

(2) 海外で発生しているウイルスの検定

海外で発生しているウイルスが、日本でも発生してブルーベリー樹に感染している可能性がある。そこで、方法(1)で採集したブルーベリーサンプルを血清学的診断法(ウエスタンブロット解析)および遺伝子診断法(PCR解析)を用いて検定する。

(3) ブルーベリーに感染しているウイルスを草本植物に分離・同定

方法(1)で採集したブルーベリーサンプルを種々の草本植物(*C. quinoa*, *N. benthamiana*, *N. occidentalis*など)に機械的接種し、ウイルスの分離を行う。さらに、分離したウイルスの同定を行う。

(4) RNAウイルス感染特異的な二本鎖RNAの検出およびウイルス同定

果樹のウイルスの中には、草本植物を宿主としないものが多数存在する。そこで、方法(1)で採集したブルーベリーサンプルから高分子の二本鎖RNA(dsRNA)を抽出し、クロニングすることでウイルス検出・同定を行う。

(5) 分離されたウイルスのブルーベリー樹への影響を解析

ブルーベリーは永年性作物であるため、マイナーな被害を及ぼすウイルスも無視できない。本研究で検出されたウイルスのブルーベリー樹への感染による影響について解析する。

4. 研究成果

(1) ブルーベリー赤色輪点ウイルス(BRRV)によるブルーベリー赤色輪病の発生

ブルーベリー圃場調査により、海外で発生するブルーベリー赤色輪点病と類似の症状を示すブルーベリー樹を発見した。しかし、BRRVは検定手段が確立していなかった。そこで、データベースのBRRVゲノム塩基配列からPCR検定用のプライマーを設計し、PCR検定法を開発した。開発したPCR検定法により、ブルーベリー赤色輪点病と類似の症状を示すブルーベリー樹を検定したところ、予想される位置に増幅産物が検出された。増幅産物の塩基配列を解析すると、BRRVと95.7~97.7%の塩基配列の同一性を示した。このことから、日本でBRRVがブルーベリーに被害を及ぼしていることがわかった。本病および本ウイルスは日本初報告であったので、ブルーベリー赤色輪点ウイルス(BRRV)によるブルーベリー赤色輪点病と名付けた。この結果により、岩手県・千葉県・宮城県・山梨県でブルーベリー赤色輪点病が発生していることが確認され、千葉県・宮城県・山梨県において、BRRVに対して病害虫発生予察特殊報が出された。

BRRV発生圃場でウイルス伝搬について調査すると、圃場での自然伝搬は確認されなかった。そこで、日本でのBRRV感染の拡大について調査したところ、BRRV感染樹を母樹とした挿し木による苗木生産が原因であることが判

明した。また、BRRV の感染により、品種ブルーレイとシエラでは光合成速度が低下し花芽数に影響が出ることが示唆された。

(2) ブルーベリー樹からのブルーベリー潜在ウイルス (BBLV) の検出および病原性の解析

アメリカで Blueberry fruit drop disease の病原であると考えられている Blueberry fruit drop associated virus (BFDaV) が、調査圃場の約 3 割のブルーベリー樹に感染していることを逆転写 PCR (RT-PCR) 検定により明らかにした。アメリカでは、BFDaV に感染した樹は、成熟前に果実が落果すると考えられていた。そこで、日本の BFDaV 感染樹の果実保持率を調査したが、BFDaV 感染による落果は観察されなかった。これと並行してアメリカの Martin ら (2011) のグループから、BFDaV は Blueberry fruit drop disease の病原ではないと訂正され、BFDaV は Blueberry latent virus (BBLV) へとウイルス名が変更された。

BBLV はブルーベリー葉から dsRNA を抽出するとウイルスゲノムである dsRNA が検出されるというのみで、植物ウイルスである証拠はなかった。また、BBLV ゲノムは、原生動物と糸状菌のウイルスから構成されるトチウイルス科のゲノムと類似していた。そのため、BBLV はブルーベリーに感染するエンドファイトのウイルスである可能性があった。そこで、ブルーベリー組織および細胞内での BBLV の検出を *in situ* hybridization および金コロイド免疫電子顕微鏡を用いて行った。その結果、BBLV が柵状組織、海綿状組織、維管束組織の細胞に存在すること、BBLV ゲノムの ORF 1 は 48kDa のタンパク質としてブルーベリー細胞中の細胞質内に不定形塊として局在することを明らかにした。このことから、BBLV はブルーベリーに感染する潜在性ウイルスであることを示した。BBLV は、日本で未記載であるので和名をブルーベリー潜在ウイルスと名付けた。

(3) 新種ネポウイルスの同定および特性の解析

ブルーベリー樹の葉の汁液を草本植物 (*Chenopodium quinoa*) に機械的接種したところ、新種のネポウイルス (*Blueberry latent spherical virus*; BLSV) が分離された。BLSV は 55 kDa の単一の外被タンパク質からなる直径約 30 nm の球形粒子を持っていた。ウイルスのゲノムは 2 分節の一本鎖プラス鎖 RNA (RNA1, RNA2) をゲノムに持ち、RNA1 は 7,960 塩基、RNA2 は 6,344 塩基からなっていた。RNA1 と RNA2 の 3' 非翻訳領域は 1,379 塩基と 1,392 塩基であった。BLSV はネポウイルス属サブグループ C に所属するウイルスと最も高いアミノ酸の類似性を示し、ポリメラー

ゼと外被タンパク質はそれぞれ 57% と 43% であった。さらに、ウイルスゲノム編成および系統樹解析から、BLSV はネポウイルス属サブグループ C に所属する新種であることを示した。これまで報告されたネポウイルス属を含むセコウイルス科に所属するウイルスは、システインプロテアーゼをゲノムにコードしているが、BLSV はセリンプロテアーゼをゲノムにコードする特徴があった。

BLSV 発生圃場内のブルーベリー樹に対して RT-PCR 検定を行ったところ、ハイブッシュブルーベリー品種パークレイ、ブルークロップ、ブルージェイ、コリンズ、コビル、ハーバート、ジャージー、ペンバートン、ルーベルに BLSV の感染が確認された。それら品種における感染樹を観察したが、ウイルス病の症状は観察されなかった。BLSV はブルーベリーに機械的接種が困難であるため、BLSV 感染樹から得た穂木を用いて、品種パークレイ、ブルークロップ、ブルージェイ、ブルーレイ、ハーバート、ルーベルに接木接種し病徴を解析した。その結果、接木接種から 3 年以上経過しても病徴は観察されなかった。このことから、BLSV は潜在感染性のウイルスであることが示唆され、種名を *Blueberry latent spherical virus*、和名をブルーベリー小球形潜在ウイルスと名付けた。

(4) 新種のクロステロウイルスの全塩基配列と病原性の解析

黄化症状を呈するハイブッシュブルーベリー品種スパータンから dsRNA を抽出したところ、数樹から 17 kbp 以上の長さを持つ単一の dsRNA が検出された。この dsRNA をクローニングして全塩基配列を解析した。ゲノム編成およびヒートショックタンパク質 70 ホモログ (HSP70h) をコードすることから、クロステロウイルス科に所属することが分かった。そこで、このウイルスを *Blueberry virus A* (BVA) と名付けた。BVA ゲノムは、マイナー外被タンパク質をコードしていない特徴を持っていた。また、クロステロウイルス科のウイルスとの間で最も高いアミノ酸の同一性を示したが、そのアミノ酸の同一性は RNA 依存 RNA ポリメラーゼ、HSP70h、メジャー外被タンパク質で、それぞれ 61.2%、27.6%、20.9% であった。このことから BVA は、新種のクロステロウイルスであることが分かった。さらに、系統樹解析を行うと、現時点で BVA はクロステロウイルスのどの属にも所属しない新種ウイルスであることが分かった。

BVA 感染と黄化症状との関係について解析した。黄化症状発生圃場から黄化症状のスパ

ータンおよび黄化症状のないスパータンを採集してRT-PCR検定によりBVAの感染を解析した。その結果、BVAが、黄化症状の33樹中13樹、黄化症状のない28樹中15樹から検出された。さらに、黄化症状の発生がない圃場のスパータン樹からもBVAが検出された。このことから、BVAは黄化症状の直接的な原因ではないことが分かった。次に、接木試験によりBVAの病原性解析を行った。BVAはブルーベリー実生に汁液接種困難であったため、BVA感染樹から得た穂木を用いて、品種ブルーレイ、シエラ、スパータンに接木接種した。接木から3年以上経過したが病徴は観察されないことから、潜在感染性のウイルスであると考えられた。

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 9 件)

①Masamichi Isogai, Saki Muramatu, Manabu Watanabe, Nobuyuki Yoshikawa. Complete nucleotide sequence and latency of a novel blueberry-infecting closterovirus. *Journal of General Plant Pathology*, 査読有, 79, 2013, 123-127.
DOI 10.1007/s10327-013-0431-0

②Masamichi Isogai, Nakamura Tatuto, Chiaki Ujiie, Manabu Watanabe, Nobuyuki Yoshikawa. Identification and characterization of blueberry latent spherical virus, a new member of subgroup C in the genus Nepovirus. *Archives of Virology*, 査読有, 157, 2012, 297-303.
DOI 10.1007/s00705-011-1177-7

③Masamichi Isogai, Mari Yoshida, Hiroyuki Imanishi, Nobuyuki Yoshikawa. First report of raspberry yellows disease caused by raspberry bushy dwarf virus in Japan. *Journal of General Plant Pathology*, 査読有, 78, 2012, 360-363.
DOI 10.1007/s10327-012-0392-8

④Masamichi Isogai, Tatuto Nakamura, Koji Ishii, Manabu Watanabe, Noriko Yamagishi, Nobuyuki Yoshikawa. Histochemical detection of Blueberry latent virus in highbush blueberry plant. *Journal of General Plant Pathology*, 査読有, 77, 2011, 304-306.
DOI 10.1007/s10327-011-0323-0

⑤磯貝雅道, Blueberry red ringspot virus の日本における発生, 植物防疫, 査読有, 64, 2010, 31-34.

<http://www.jppa.or.jp/shuppan/images-txt/20100207.pdf#search='Blueberry+red+ringspot+virus%E3%81%AE%E6%97%A5%E6%9C%AC%E3%81%AB%E3%81%8A%E3%81%91%E3%82%8B%E7%99%BA>

%E7%94%9F'

⑥ Masamichi Isogai, Koji Ishii, Seisaku Umemoto, Manabu Watanabe, Nobuyuki Yoshikawa. First report of blueberry red ringspot disease caused by Blueberry red ringspot virus in Japan. *Journal of General Plant Pathology*, 査読有, 64, 2009, 140-143.
DOI 10.1007/s10327-009-0145-5

[学会発表] (計 27 件)

①村松佐紀、渡邊学、吉川信幸、磯貝雅道、わが国のブルーベリーから検出された新規クロステロウイルスの全ゲノム塩基配列、日本植物病理学会東北部会、2011.10.31、青森市民ホール (青森市)

②磯貝雅道、中村達都、渡邊学、吉川信幸、ネポウイルス属サブグループCに所属する新規ウイルスの特性、日本植物病理学会東北部会、2011.10.31、青森市民ホール (青森市)

③Masamichi Isogai, Saki Muramatu, Tatuto Nakamura, Manabu Watanabe, Nobuyuki Yoshikawa, Blueberry viruses detected in blueberry trees in Japan. International Congress of Virology, 2011.9.11-2011.9.16, Sapporo Convention Center (Hokkaido, Japan)

④磯貝雅道、中村達都、渡邊学、山岸紀子、吉川信幸、Blueberry latent virus の日本のハイブッシュブルーベリーからの検出、日本植物病理学会、2011.3.27、東京農工大学 (東京都)

⑤磯貝雅道、石井厚次、村松佐紀、渡邊学、吉川信幸、黄化症状を呈したブルーベリーから検出されたクロステロウイルス様RNA、日本植物病理学会東北部会、2010.10.5、コラッセ福島 (福島市)

⑥磯貝雅道、吉川信幸、日本のブルーベリーから検出されたトチウイルス様2本鎖RNAの解析、日本植物病理学会、2010.4.18、国立京都国際会館 (京都府)

⑦渡邊学、磯貝雅道、村上政伸、佐川了、Blueberry red ringspot virus および Blueberry fruit drop associated virus に感染したブルーベリー樹の生育、園芸学会、2010.3.22、日本大学 (東京都)

⑧磯貝雅道、石井厚次、渡邊学、吉川信幸、日本での Blueberry fruit drop associated virus の検出、日本植物病理学会東北部会、2009.9.30、宮城大学 (宮城県)

[図書] (計 1 件)

①磯貝雅道、全国農村教育協会、インターネット版 日本植物病害大辞典 (ブルーベリー類 赤色輪点病)、2013

[その他]

ホームページ等

<http://news7a1.atm.iwate-u.ac.jp/cgi-bin/list/list.c>

gi?id=117

6. 研究組織

(1)研究代表者

磯貝 雅道 (ISOGAI MASAMICHI)

岩手大学・農学部・准教授

研究者番号：30312515

(2)研究分担者

渡邊 学 (WATANABE MANABU)

岩手大学・農学部・助教

研究者番号：00361048