

令和 2 年 5 月 25 日現在

機関番号：32675

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K07671

研究課題名(和文)ネポウイルスと媒介線虫研究のための実験系の確立と相互作用の解明

研究課題名(英文) Establishment of an experimental system for studying nepoviruses and nematode transmission and its use for the elucidation of nepovirus-nematode interactions

研究代表者

鍵和田 聡 (Kagiwada, Satoshi)

法政大学・生命科学部・講師

研究者番号：20431835

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：ネポウイルスの媒介線虫に関する研究は、わが国においては1970年代以降ほとんど進んでいない。この分野の研究を進めるためには、国内のネポウイルスと線虫による媒介性試験を行うための実験系の確立が必要と考えられる。このため、日本固有のネポウイルスと考えられるソテツえそ萎縮ウイルスや国内産のウイルスを対象に媒介線虫の研究を行った。その結果、線虫および検定植物からのウイルスの検出手法を確立して、線虫によるウイルスの獲得および健全な検定植物への媒介を確認して、線虫によるウイルスの媒介性試験の実験系を確立した。さらに、確立した実験系を用いて、国内の3種線虫によるウイルス媒介性が確認された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の成果によって、今後、国内産のネポウイルスの線虫媒介能の評価や高率に媒介する線虫の探索などの媒介線虫の研究を進めて行くことが可能と考えられる。一方、わが国の農産物の輸出振興政策が進み、盆栽等の輸出が増える中、EUは日本からの線虫媒介性ウイルスとその媒介線虫の侵入を阻止する目的で厳格な線虫検診などを求めている。しかし、この分野の研究が進んでいないため、この線虫検診等には対応できずに問題となっている。この分野の研究が進むことで、この問題への対応が可能になると考えられる。

研究成果の概要(英文)：Virtually no progress has been made in research on nematode transmission of nepoviruses in Japan since the 1970s. The establishment of an experimental system for testing the transmission of nepoviruses by nematodes found in Japan is required for advancing research in this field. Therefore, we studied nematode transmission of Cycas necrotic stunt virus, a nepovirus considered to be indigenous to Japan, and viruses isolated in Japan. After establishing a method for virus detection from nematodes and test plants, we confirmed the acquisition of viruses by nematodes and nematode transmission of viruses to healthy test plants. In addition, we established an experimental system for testing nematode-mediated transmission of viruses. Moreover, we successfully used the experimental system thus established to confirm virus transmission by three different nematodes in Japan.

研究分野：植物ウイルス学

キーワード：ネポウイルス ソテツえそ萎縮ウイルス アラピスモザイクウイルス キイチゴオオハリセンチュウ  
媒介線虫 RT-nested PCR Xiphinema Longidorus

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

(1) ネポウイルス属は線虫媒介性の植物ウイルスで、欧米諸国においてはブドウ、キイチゴなどの果樹で大きな被害があることから、その防除のため、媒介線虫の探索やその生態、媒介メカニズムなどに関する研究が進められている。ネポウイルスを媒介する線虫は、土壌中に生息する植物寄生性線虫の Longidoridae 科のオオハリセンチュウ (*Xiphinema* 属) やナガハリセンチュウ (*Longidorus* 属) などであり、ウイルスと媒介する線虫との間には特異的な関係がある。

(2) 一方、我が国におけるネポウイルスの線虫媒介に関する研究は、1970年代に、キイチゴオオハリセンチュウ (*X. bakeri*) など3種の線虫が、アラビシモザイクウイルス (ArMV) など3種のネポウイルスを、各々媒介することが明らかとなったが、その後、植物ウイルスの線虫媒介性に関する研究は行われていない。このような中で、我が国の農産物輸出振興政策が進み、盆栽類などの輸出が増大する中、EU は日本からのネポウイルスとその媒介線虫の侵入を阻止する目的で厳格な線虫検診などを求めている。この線虫検診に対応するには、媒介する線虫種の特定や判別法の開発などが必要であるが、この分野の研究がほとんど行われていない現状ではその対応は困難であり、問題となっている。

(3) ここ数年、日本産の各種植物から植物ウイルスの分離同定を実施する中で、ウイルス症状を示す国内各地のジンチョウゲ、ウメなどからネポウイルスのソテツえそ萎縮ウイルス (CNSV) が検出され、その発生はソテツ、アオキ、ウメなど広範囲で宿主範囲は広く、CNSV は日本固有のウイルスと考えられている。日本においてこの分野の研究が進まない原因は、国産のウイルス、線虫による媒介試験を行うための実験系が確立されていないことにあると考えられる。

### 2. 研究の目的

本研究は、日本固有のネポウイルスと考えられるウメから検出された CNSV および国内産のスイセンから検出された ArMV に対して、線虫によるウイルス媒介性の実験系を確立することを目的に、*X. bakeri* による両ウイルスの媒介性試験を行った。また、確立した実験系により国内発生3種の線虫による CNSV の媒介性を試験した。線虫のウイルス媒介性の実験系を確立することで、国内産ネポウイルスの線虫媒介能の評価や高率に媒介する線虫の探索などの媒介線虫の研究を進めて行くことが期待できると考えられる。

### 3. 研究の方法

(1) 線虫によるウイルス媒介性試験は、CNSV および ArMV の各ウイルスを *X. bakeri* の線虫に獲得させ、ウイルスを獲得した線虫を健全な検定植物の *Chenopodium quinoa* に接種してウイルスの感染を検定して線虫によるウイルス媒介性を確認した。さらに、確認した実験系を用いて、国内産の *X. bakeri*、*X. americanum* 種群の一種および *L. martini* の3種線虫 (図1) による CNSV の媒介性試験を行った。

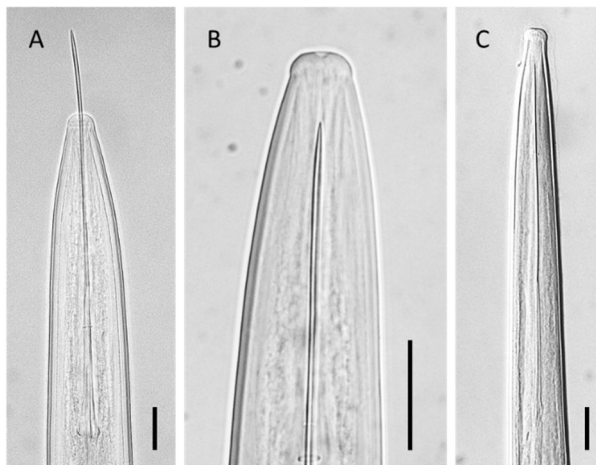


図1. 媒介性試験に用いた線虫の頭部形態  
A: *Xiphinema bakeri*, B: *X. americanum* 種群の一種, C: *Longidorus martini*, いずれも雌成虫, スケールは20 $\mu$ m

(2) 供試した線虫の採取、増殖およびウイルス無毒の確認

供試した *X. bakeri* は、クワで継代飼育した線虫をクワ実生苗木の根回土壌に放飼して増殖した。*X. americanum* 種群の一種はウメ、*L. martini* はケヤキの野外樹木からそれぞれ採取した。供試した3種線虫はウイルスを保持していないことを後述の(3)の方法で検定して確認後に、線虫による媒介性試験に用いた。

(3) *X. bakeri* の線虫によるウイルス媒介性試験

#### *X. bakeri* のウイルス獲得・保持

CNSV および ArMV の各ウイルスを汁液接種法により鉢植え *C. quinoa* 苗の葉に感染させてから根に移行させ、根回土壌に線虫を放飼して2週間育成することで、線虫に根からウイルスを獲得吸汁して保持させた。根のウイルス検定は、根を液体窒素で粉砕

し、RNA をキット (RNeasy plant mini kit, Qiagen) で抽出、ウイルスの特異的プライマーによる RT-PCR 法と RT-nested PCR 法で検定した。線虫のウイルス保持は、根回り土壌から線虫を分離後滅菌水で洗浄・回収、ピーズ式細胞破碎装置で虫体を破碎し、抽出キットで RNA を抽出して、ウイルスの特異的プライマーによる RT-PCR 法と RT-nested PCR 法で検定した。

#### 保毒した *X. bakeri* によるウイルス媒介性の確認

保毒した線虫は根回土壌から分離・洗浄・回収して、健全な *C. quinoa* の根部に接種して3週間育成した。*C. quinoa* の病徴観察とウイルス検定を行い、線虫のウイルス媒介性を確認した。健

全 *C. quinoa* の葉の感染確認は、前述の根と同様な方法で検定した。また、線虫による *C. quinoa* の根の加害により根に形成されたゴール数を育成終了時に調査して、ゴール数を保毒線虫の媒介の有無で比較した。

#### (4) 3種線虫による CNSV の媒介性試験

前述(3)の および と同じ方法で検定(ゴール数は未調査)して、*X. bakeri*、*X. americanum* 種群の一種および *L. martini* の 3 種線虫による CNSV の媒介性を試験した。

### 4. 研究成果

#### (1) 供試した線虫の増殖およびウイルス無毒の確認

*X. bakeri* の線虫をクワ実生苗に放飼して 6 ヶ月間育成した結果、線虫頭数は平均約 18 倍に増加した。供試した *X. bakeri*、*X. americanum* 種群の一種および *L. martini* の線虫から両ウイルスは検出されなかった。

#### (2) *X. bakeri* によるウイルス媒介性試験

##### *X. bakeri* によるウイルスの獲得保持



図 2 CNSVを保持した *Xiphinema bakeri* を接種した *Chenopodium quinoa* の退緑斑点症状

CNSV および ArMV の各ウイルスを感染させた *C. quinoa* の根回土壤に *X. bakeri* を放飼して 2 週間育成した結果、すべての株で根のウイルス移行を確認した。また、*X. bakeri* 30 頭の検定で両ウイルスは RT-PCR 法および RT-nested PCR 法で陽性となり、*X. bakeri* のウイルス保持を確認した。

##### 保毒した *X. bakeri* によるウイルス媒介性の確認

各ウイルスを保毒した *X. bakeri* を健全な *C. quinoa* の根回土壤に 100 頭前後接種して 3 週間育成した結果、CNSV では健全 *C. quinoa* の葉にウイルス症状が観察されて RT-nested PCR 法で陽性となった。ArMV では *C. quinoa* の葉のウイルス症状は観察されなかったが、RT-PCR 法で陽性となった。以上の結果、両ウイルスは *X. bakeri* により媒介が確認された。両ウイルスの陽性結果から、*X. bakeri* のウイルス媒介能は CNSV よりも ArMV で大きい可能性が示唆された。また、*X. bakeri* による *C. quinoa* の根のゴール形成数は、保毒

線虫の媒介の有無による違いはみられなかった。

#### (3) 3種線虫による CNSV の媒介性の確認

##### 線虫によるウイルスの獲得保持

CNSV を感染させた *C. quinoa* の根回土壤に *X. bakeri*、*X. americanum* 種群の一種および *L. martini* の線虫を放飼して獲得吸汁させ 2 週間育成した。*X. bakeri* 30 頭、*X. americanum* 種群の一種 4 頭および *L. martini* 4 頭の線虫の検定では、*X. bakeri* は RT-PCR 法で陽性、他の 2 種線虫は RT-nested PCR 法で陽性となり、CNSV の保持を確認した。

##### 保毒線虫によるウイルス媒介性の確認

CNSV を獲得して保毒した *X. bakeri* 135 頭、*X. americanum* 種群の一種 10 頭および *L. martini* 6 頭の線虫を健全な *C. quinoa* の根回土壤に接種育成した結果、いずれも RT-nested PCR 法で陽性となった。*X. bakeri* では *C. quinoa* の葉に病徴が観察された(図 2)。その他の線虫では病徴は観察されなかった。以上の結果、3 種線虫による CNSV の媒介を確認した。

(4) 本研究では、ネポウイルスの CNSV および ArMV を *X. bakeri* の線虫に獲得保持させて、ウイルスを保毒した線虫を健全な検定植物の *C. quinoa* に接種して、線虫および *C. quinoa* からウイルスを検出する技術を確認して、ネポウイルスの線虫による媒介性試験の実験系を確立した。さらに、確立した実験系を用いて、日本固有と考えられるネポウイルスの CNSV を国内の発生線虫によって媒介性を確認することができた。今後、本研究により確立した手法によって、国内産ネポウイルスの線虫媒介能の評価や高率に媒介する線虫の探索など媒介線虫の研究を進めて行くことが可能になると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 稲橋直樹・松浦卓也・石原加奈子・丸山千尋・平田賢司・川合 昭・西尾 健
2. 発表標題 Cycas necrotic stunt virusの媒介線虫に関する調査
3. 学会等名 樹木医学会第22回大会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	平田 賢司  (Hirata Kenji)  (70793991)	法政大学・その他部局等・講師    (32675)	
研究分担者	西尾 健  (Nishio Takeshi)  (90356288)	法政大学・その他部局等・名誉教授    (32675)	