

植物ウイルスの特性とその保存について

花 田 薫

農業生物資源研究所

1. はじめに

農業生物資源ジーンバンクでは、微生物を長い期間を通じて活性のある状態で維持保存し、研究や防除対策の検討などのために利用される方々に広く配布している。1985年にジーンバンク事業が発足すると同時に、植物ウイルスも保存・配布の対象として含められ、その活動を開始した。それ以来、四半世紀以上経過した2012年2月現在、植物ウイルスに関しては252種（ウイロイド16種を含む）が公開され、保存・配布の対象となっている（Tomioka et al., 2012）。保存・配布するウイルス感染葉の真空乾燥保存アンプルは、多くのウイルスについては5～10年は活性が安定している。しかし、保存機関としては将来的には50年、100年、あるいはそれを越える長い期間の安定保存が求められるので、真空乾燥保存だけでなく、感染葉を液体窒素気相中で保存することも併行して行っている。

日本国内で発生して分離同定された植物ウイルスのすべてをジーンバンクで保存・配布できればよいのだが、実施体制や予算には限りがあるほか、特性が類似したウイルス株を多数集めても利用価値や管理上の効率があまり高くないなどの理由から、取り扱うウイルス株を絞り込むこととなる。したがって、ジーンバンクでは、農業上重要と思われるウイルス株、何らかの特異性を持った株など、それらの重要度を個々に考慮して保存・配布株を選定している。

なお、本マニュアルでは、はじめに植物ウイルス全般に関する概要およびウイルス保存のための基礎的な手法について紹介した後、ウイルス保存に直接関わる手法について順次説明する。その後、ジーンバンクに保存されているウイルスの特徴、配布の実際、配布ウイルス標品使用の際の注意等について具体的に紹介する。なお、随所に出てくる別枠の【ミニコラム】という短い解説は、飛ばして読んで頂いてもよいが、私見とともに最新の情報もたくさん盛り込んでいるので、理解を深めるために読んでいただければと思う。

植物ウイルスの名称は、「そのウイルスが感染している植物の名前、病徴、ウイルス」の3要素を続けた形で表記される。そのためにウイルス名がたくさん出てくると長くなり、読みにくくなるとともに混乱も生じやすくなることから、通常はこれら3要素の英語の頭文字を並べて表記される。たとえば、植物ウイルスで最も有名なタバコモザイクウイルスは英語で *Tobacco mosaic virus* であり、これらの3つの頭文字をとって **TMV** と呼ばれる。他の植物ウイルスも同様である。ただし、同じ頭文字の組合せとなるウイルスが複数ある場合には、いずれかの要素の頭文字を長くすることで区別している。たとえば、3文字のみでは **TMV** となってしまうトマトモザイクウイルスはタバコモザイクウイルスと区別するために **ToMV** と略記する。本マニュアルに出てくる植物ウイルスの一覧を、広く使われている略称とともにまとめて表1に示した。なお、本文中で1度しか出てこないウイルスは文中でフルネーム表記としており、表1には含めていない。

2. 植物ウイルスとは何か

1) ウイルスとは

植物に病気を引き起こす病原は、菌類、細菌、およびウイルスに大別される。それらの中で最小のものがウイルスである。ウイルスは自らに親和性の生物体の中で自分と同じものを作らせることができる。ウイルスは

表 1. 本文中で用いた植物ウイルス・ウイロイドの略称と名称の対照表

略称	ウイルス名	ウイルス属名	ウイルス科名
AMV	アルファルファモザイクウイルス	アルファモウイルス	プロモウイルス科
AlsVX	アルストロメリア X ウイルス	ポテックスウイルス	アルファフレキシウイルス科
ArMV	アラビスモザイクウイルス	ネポウイルス	セコウイルス科
BBWV	ソラマメウイルトウイルス	ファバウイルス	セコウイルス科
BCMV	インゲンマメモザイクウイルス	ポティウイルス	ポティウイルス科
CaMV	カリフラワーモザイクウイルス	カウリモウイルス	カウリモウイルス科
CaLtV	カーネーション潜在ウイルス	カルラウイルス	ベータフレキシウイルス科
CaMtV	カーネーション斑紋ウイルス	カルモウイルス	トンプスウイルス科
CCYV	ウリ類退緑黄化ウイルス	クリニウイルス	クロステロウイルス科
CGMMV	スイカ緑斑モザイクウイルス	トバモウイルス	ビルガウイルス科
CMV	キュウリモザイクウイルス	ククモウイルス	プロモウイルス科
CVB	キク B ウイルス	カルラウイルス	ベータフレキシウイルス科
GMV	リンドウモザイクウイルス	ファバウイルス	セコウイルス科
IYSV	アイリス黄斑ウイルス	トスポウイルス	ブニアウイルス科
KGMMV	キュウリ緑斑モザイクウイルス	トバモウイルス	ビルガウイルス科
MNSV	メロンえそ斑点ウイルス	カルモウイルス	トンプスウイルス科
MYSV	メロン黄化えそウイルス	トスポウイルス	ブニアウイルス科
PMMoV	トウガラシ微斑ウイルス	トバモウイルス	ビルガウイルス科
PPV	ウメ輪紋ウイルス	ポティウイルス	ポティウイルス科
PSTVd	ジャガイモやせいもウイロイド	ポスピウイロイド	ポスピウイロイド科
PSV	ラッカセイわい化ウイルス	ククモウイルス	プロモウイルス科
PVX	ジャガイモ X ウイルス	ポテックスウイルス	アルファフレキシウイルス科
PVY	ジャガイモ Y ウイルス	ポティウイルス	ポティウイルス科
RDV	イネ萎縮ウイルス	ファイトレオウイルス	レオウイルス科
RMV	ダイコンモザイクウイルス	コモウイルス	セコウイルス科
RSV	イネ縞葉枯ウイルス	テヌイウイルス	未分類
SBMV	インゲンマメ南部モザイクウイルス	ソベモウイルス	未分類
SDV	温州萎縮ウイルス	サドワウイルス	セコウイルス科
SMV	ダイズモザイクウイルス	ポティウイルス	ポティウイルス科
SPFMV	サツマイモ斑紋モザイクウイルス	ポティウイルス	ポティウイルス科
SqMV	スカッシュモザイクウイルス	コモウイルス	セコウイルス科
TAV	トマトアスパーミィウイルス	ククモウイルス	プロモウイルス科
TbLcV	タバコ巻葉ウイルス	ベゴモウイルス	ジェミニウイルス科
TbRsV	タバコ輪点ウイルス	ネポウイルス	セコウイルス科
TBRV	トマト黒色輪点ウイルス	ネポウイルス	セコウイルス科
TCDVd	トマト退緑萎縮ウイロイド	ポスピウイロイド	ポスピウイロイド科
TMV	タバコモザイクウイルス	トバモウイルス	ビルガウイルス科
ToMV	トマトモザイクウイルス	トバモウイルス	ビルガウイルス科
TRV	タバコ茎えそウイルス	トブラウイルス	ビルガウイルス科
TSWV	トマト黄化えそウイルス	トスポウイルス	ブニアウイルス科
TuMV	カブモザイクウイルス	ポティウイルス	ポティウイルス科
TYLCV	トマト黄化葉巻ウイルス	ベゴモウイルス	ジェミニウイルス科
WMV	カボチャモザイクウイルス	ポティウイルス	ポティウイルス科
ZYMV	ズッキーニ黄斑モザイクウイルス	ポティウイルス	ポティウイルス科

本文中に 1 度しか出てこないウイルスは本表には含まれていない。

ウイルス名は日本植物病理学会植物ウイルス分類委員会の表記（学会のウェブサイト参照）に従った。

これまでに知られているものの中で最小の複製単位である。自らに必要な遺伝情報とそれを外界から守る構造物しか持っていないために、ウイルスのみで増えることはできず、自分に適合した生きた生物体の体内に入ることによって、はじめて増殖することができる。ウイルスの中で植物に感染して増殖するウイルスを植物ウイルスとよぶ。植物ウイルスは目には全く見えないのに、侵入した農作物に次のようないろいろな異常を引き起こして、さまざまなレベルの被害を与える。もちろん無病徴感染や非感染の場合もある。

- ①その作物を枯死させるか、激しい病徴を生じさせて収量を皆無としてしまう。
- ②明瞭な異常を引き起こしてその作物の収穫物の収量・品質を低下させる。
- ③顕著な病徴は出さないが収穫物の品質を低下させる。

さらに、これらの感染株から同種の他株あるいは別種の植物へ次々に伝染されて広がっていくために、ウイルス病はすべての農業にとって大きな生産阻害要因となっている。このようにウイルスは世界中の農作物の安定供給の大きな妨げとなっており、その発生は拡大しているのに、植物ウイルスに対する有効な対策は多くの場合まだ確立されていないのが現状である。

植物ウイルスは、遺伝子本体である核酸成分と、その周りを取り囲んで核酸を保護するタンパク質のみから基本的には構成されている。植物ウイルスに含まれる核酸成分は、DNA または RNA の一方のみであり、どちらを持っているかはウイルス種によって決まっている。DNA を持つウイルスには、カウリモウイルス科、ジェミニウイルス科およびナノウイルス科に属するウイルスがある。同じ DNA といっても、カウリモウイルスは2本鎖DNAを遺伝子として持っており、後の2つは1本鎖DNAを持つ。これらの3科のウイルス以外の多くの植物ウイルスはRNAを持つ。これらは、1本鎖RNAを持つウイルスと2本鎖RNAを持つウイルスとに分類され、前者はさらにプラスセンスとマイナスセンスを持つものに大別される。トスポウイルス属のウイルスはその最小のRNA成分が、遺伝子によってプラスセンスとマイナスセンスとなっていることから、アンビセンスウイルスとも呼ばれる。

タンパク質の設計図が遺伝子であるが、植物ウイルスの遺伝子本体は極度に合理化されているものが多く、植物ウイルスの代表であるTMVなどでは、以下の3つの遺伝子しか持っていない。

- ①ウイルスの増殖に必要な複製酵素タンパク質のための遺伝子
- ②感染植物体内で細胞から細胞への移行に必要な移行タンパク質のための遺伝子
- ③ウイルス遺伝子を周囲の攻撃から守る外被タンパク質のための遺伝子

これらの3つの必須遺伝子のウイルスRNAにおける並び方を図1に示した。ただし、ウイルスの複製は複雑な過程を経て行われるものであり、実際にはウイルス複製酵素タンパク質というのは1種類ではなく、複数の遺伝子が関与しているものが多い。図1のTMVでも実際のウイルス複製酵素遺伝子は2種類のものが一部オーバーラップして存在しているが、ここではわかりやすいように1つの遺伝子として表記している。移行タンパク質遺伝子や外被タンパク質遺伝子は多くの植物ウイルスでは1種類のみである。同じ植物ウイルスでも他のものではより複雑なものもあり、多くのウイルスタンパク質遺伝子を持つものもある。



図1. 植物ウイルスの遺伝子構成図（最も簡単なTMVの例）

REP：複製酵素タンパク質，MP：移行タンパク質，
CP：外被タンパク質。

植物ウイルスは自らが増殖できる植物に感染すると、ウイルス核酸を自分のタンパク質合成のための鋳型にさせて、植物に優先的にウイルスに必要なウイルスタンパク質を合成させながら、もう一方では植物に合成させたウイルス複製酵素によってウイルス核酸をどんどん作らせるのである。ウイルスタンパク質の中でも特に外被タンパク質を大量に合成させる。こうして感染植物体内で複製された莫大な数のウイルス核酸と外被タン

パク質が、植物細胞内で出会い合体してウイルス粒子が形成される。さらに、この間にぬかりなくウイルスのための移行タンパク質も合成させており、それを利用して、感染した細胞から他の細胞に移行し、植物体内にウイルスがあまねく広がって行く。こうして形成された新しいウイルス粒子が、次の植物を求めて外に出ていくこととなる、そのときにウイルス遺伝子を周囲のきびしい環境（たとえば核酸分解酵素や酸化酵素、過湿や乾燥など）から守ってくれる保護タンパク質が外被タンパク質である。そして、次の植物に伝搬される際に媒介生物で運ばれるために特異的なタンパク質を必要とするウイルスは、そのために必要なタンパク質まで、感染植物にちゃっかり合成させておいてそれを利用して、媒介生物の体内に入って、次の植物に運ばれていくこととなる。このように植物ウイルスは、きわめて巧妙なシステムを構築して、感染植物を自由に最大限利用しながら、増殖してひろがっていくのである。もちろん、植物側もだまってウイルスにされるがままになっているわけではないのであるが、その実態がわれわれ人間にもわかってきたのは、ごく最近になってのことであった。これについては長くなるので13ページ以降のRNAサイレンシングのところで説明する。驚いたことに、その植物の防御手段に対抗するための手段もウイルスはすでに持っているのである。

このように植物ウイルスは超スリムなものが多く、まさに独立の複製単位としての単純さの限界を極めているとあってよいと思われる。これら3つ1組の最低必須遺伝子以上の遺伝子を持ったウイルス粒子が媒介生物等によって植物体内に侵入し、各遺伝子が単独あるいは協調して植物宿主のシステムを巧みに利用して、植物体内での大規模な増殖を完遂する。しかし、侵入したところで増えただけでは、ウイルスはその細胞や植物体の死とともに途絶えてしまうことになる。それを防ぐために増殖したウイルスは他の宿主個体に移る必要があり、他の植物体に移ることがウイルスの伝染である。伝染によってウイルスは次の個体で増えることが可能となり、最初に増殖した生物が死滅してもウイルスは途絶えないですむこととなる。これらのサイクルを繰り返すことでウイルスの伝染環がつながり、ウイルスは消えてしまうことなく存在しつづけることができるのである。

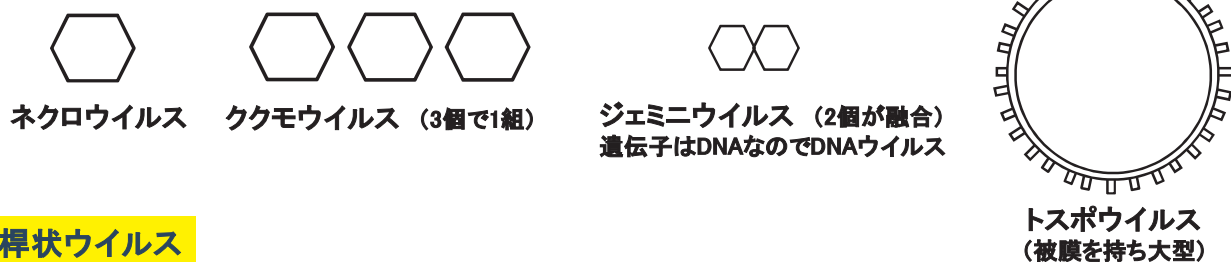
ウイルスの伝染を媒介する生物（媒介生物）として、通常は植物以外の生物である昆虫、糸状菌、線虫などがあり、これらの助けを借りて植物ウイルスは自らが増殖できる植物から植物へ伝搬されて行くこととなる。多くのウイルスはそのために必要な特別な遺伝子を自ら保持している。しかし、例外的に最も単純なウイルスの一つであるTMVの仲間では、ウイルス感染植物の葉や根が近くの健全植物の葉や根との接触やこすれあうことで植物から植物に伝搬されるために、媒介生物を必要としないので伝搬のための特別な遺伝子は持っていない。その代わりにTMVは極めて安定なウイルス外被タンパク質とウイルスRNAの構造体（すなわち、ウイルス粒子）からできており、いつでも接触によって近隣の植物に移ることができるようになっているのである。また、キュウリ等にモザイク病を生じるCMVでは、媒介してくれるアブラムシが植物の師部に口針を差し込む際に、ウイルス粒子が単独で付着することで次の植物に伝搬されることから、こちらも伝搬のための特別な遺伝子は持っていない。

2) 植物ウイルスの特徴

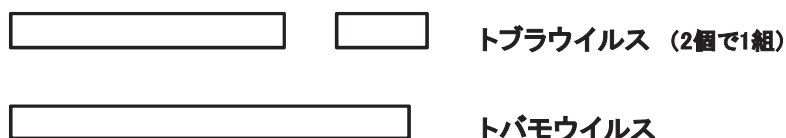
ウイルスの特徴は周知のように、何といてもその小ささにある。とにかく小さくて肉眼ではとても見ることはできない。光学顕微鏡を用いても見ることは不可能で、電子顕微鏡を使うことでようやく見る事ができるものである。それらの中で植物に感染するものが植物ウイルスである。

植物ウイルスは、他の動物ウイルスや細菌ウイルス（バクテリオファージ）と同じく、遺伝子本体である核酸とそれを取り囲んでいるタンパク質からなる粒子として通常は存在している。植物ウイルスの粒子は、電子顕微鏡によって100万倍程度に拡大するとわれわれが通常見ているものの大きさになる。ピンポン玉程度の大きさになる球形ウイルス、割箸くらいの大きさになる棒状ウイルス、それらをひき伸ばしたひものような形になるひも状ウイルスなどが多い。変わったものでは、細菌のような形のもの、弾丸状のもの、被膜を持つウイルスもある。それらの概略図を図2に示した。植物ウイルスの一つの特徴は、遺伝子がRNAであるものが多いという点である。もちろん、遺伝子としてDNAを持つものもあり、その中の一つであるジェミニウイルス科に属するウイルスは、ウイルス種の数と感染植物の種類及び発生地域を最近になって急速に拡大している。それらの中でもベゴモウイルス属のウイルスは、病徴が激しいうえにコナジラミできわめて効率よく伝搬され

球形ウイルス



桿状ウイルス



ひも状ウイルス

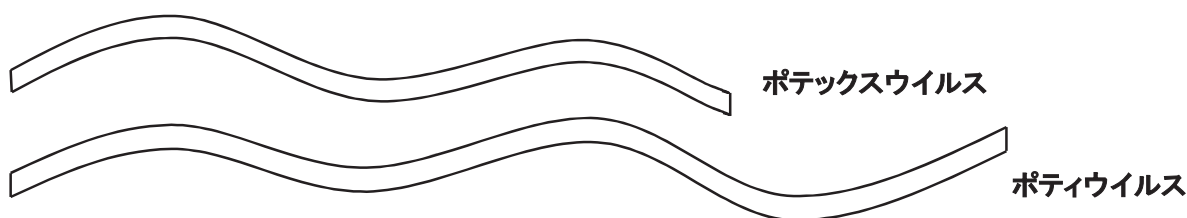


図 2. 代表的な植物ウイルス粒子の形態

ここに示したウイルス名は科または属の名称である。個別のウイルス名は表 1 を参照。ジェミニウイルス以外は RNA ウィルスであり、複数個の粒子からなるものは多粒子性ウイルスである。

るために、エマージングウイルスの一つとして世界の農業にとっての大きな脅威となっている (25 ページを参照)。

植物ウイルスの種類は驚くほど多く、世界中では、国際ウイルス命名委員会 ICTV (International Committee on Taxonomy of Viruses) で承認されたものだけでもほぼ 1,000 種に達しており (21 ページの表 3)、日本でも 300 種を超えるものがすでに報告されている。ウイルスは基本的には種の単位で命名されて分類される。種より上位の分類階級として、他の生物と同様に属・科・目がある。1つの種を、ウイルス遺伝子の塩基配列等の違いによってさらに分けることが必要な時には、サブグループとするのが最近の原則である。また、特殊な病徴を示すウイルス株や特定の植物に感染するウイルス株・集団を区別したい時には、□□ウイルスの○○系または○○系統とよぶ。たとえば、CMV の黄斑系やマメ科系統などとする。

ウイルスは植物に感染すると通常は 5 ～ 14 日程度でものすごい数にまで増殖し、感染された植物はウイルス病特有のモザイク、えそ、萎縮、黄化などの症状を呈する。これらの病徴によってウイルスは農作物に被害を与えることとなり、通常は病徴が激しいほど被害も大きくなってしまふ。病徴以外には、植物に目立った変化がみえないのもウイルス病の特徴の一つである。

植物ウイルスでは、発病している植物の葉の磨砕液を、細かい傷を付けた健全植物の葉に擦りつけることで、病原となっているウイルスを伝染させることができるものが比較的多い。このような接種によってウイルスを伝染させる方法は機械的接種とよばれ、糸状菌や細菌による病害ではできない接種法であるために、機械的接種ができるというのはウイルス病の特徴の一つとなっている。また、植物ウイルスの中には、乾燥した感

染葉の中で通常の温度のもとで数年間活性を持ち続けることができるものが多い。特に TMV のように感染葉磨碎液中では 10 分間以上沸騰させないと死滅しないような異常に強い耐熱性を有しているものもある。このように超安定性を示す植物ウイルスもあるが、逆にきわめて不安定なウイルスもあるので注意が必要である。

ウイルス病が全く発生しない作物はないといってよいであろう。現在までに発生報告がないものもあるかもしれないが、それは調査不足のためと思われる。それらの作物の中でウイルスの発生する種類が多くて特にウイルスに弱いと思われる作物がある。2012 年に改訂された日本植物病理学会の病名目録から集計すると、わが国の作物の中で発生するウイルスの種類が多く、その種が 10 を越える植物は、多い順にトウガラシ（ピーマン）・トマト、ダイズ・トルコギキョウ、エンドウ、タバコ、ジャガイモ・メロン、ソラマメ・スイセン、キュウリである。ここで中点によって区切ったものは、同じ数のウイルスに感染されるものである。これらを植物の科で見ると、ナス科作物が最も多く、次がマメ科であり、これらの植物は特にウイルスに弱いと言ってよいであろう。

これらのウイルスによる病徴は多種多様で多岐にわたっているが、もっとも多いのはモザイク症状である。葉の緑色部に葉脈に沿った濃淡を生じるのがモザイクであり、多くのウイルスと植物の組み合わせで病名がモザイク病となっている。全く異なるウイルスであるにもかかわらず、同じような病徴を出す例はかなり多い。たとえばピーマンのモザイク病を見てみると、ピーマンでは実に 11 種ものウイルスがモザイク病の病原とな



図 3. 代表的な植物ウイルスによる植物の病徴

ることがわかっている。他の野菜や花きでも同様な例は多く、モザイク病というだけではウイルスを特定できない。逆に、ある1種のウイルスが、多くの植物にモザイク病を引き起こすこともある。それらの中でも特にCMVは実に多くの植物にモザイク病を引き起こす。このようにウイルスの種と植物の病名とは必ずしも1対1に対応するわけではないので、注意が必要である。もちろん、1対1に対応しているものもある。モザイク病に類似した病徴にモットル症状があるが、モットルは葉脈と関係なく葉に生じる退色症状である。ウイルス病でモザイクやモットルの次に多いのが、黄化やえそ症状、萎縮や葉巻症状を示すものである。一方、全く病徴を出さない無病徴感染をする組合せもあり、その場合には、感染植物には被害は殆ど出ないが、病徴を生じる他種の植物への伝染源となるのでやはり注意が必要となる。ウイルスによる代表的な植物の病徴写真を図3に示す。

ウイルスは、それまでに最小の病原とされていた細菌よりさらに小さい病原として1898年に発見された。その際に見つかったのは今日でも植物ウイルスの代表であるTMVであった。植物ウイルスに感染したという植物の最古の記録は、17世紀のヨーロッパのチューリップの斑入り（モザイク病）の絵画であると長い間考えられてきた。しかし、比較的最近になってわが国の研究者が、ずっと古い8世紀の日本の万葉集の中で感染植物が詠まれていることを紹介した（井上, 1983）。すなわち、「この里は継ぎて霜や置く 夏の野にわが見し草は黄葉（もみ）ちたりけり」の黄葉こそが、ウイルス感染により葉が美しく黄化したヒヨドリバナを指し、世界最古の記録であるとしている。生物である限りウイルス感染は避けられないので、すべての生物には感染するウイルスがあると現在では考えられている。ウイルスはDNAかRNAの一方しか有しておらず、自分では増えられないことから無生物とされている。しかし、自然界には多種多様なものがあるわけで、小さいものにはさらに小さいものがあることが明らかにされている。本マニュアルの10ページで紹介するように、これらの小さいウイルスを利用するさらに小さなウイルスや低分子核酸も見つかっている。さらに他のウイルスの助けは必要としないでずっと裸で過ごす極小の病原ウイロイドというものもあって、植物ウイルス界というのは、探してみたら何でも見つかりそうな「微小化コンテスト」の世界のようである。

【ミニコラム：ウイルス研究への植物の利用について】

ジャガイモやピーマンなどのナス科作物には、多くのウイルスが全身的に感染して病徴を出すために大きな被害を与えている。一方、ウイルス感染が殆ど知られていない作物もある。アカザ科の植物には多くのウイルスが感染して局部病斑を生じるが、感染は局部にとどまることから、その接種葉の病斑にばかり目が行きがちとなる。しかし、これらの植物ほど多種のウイルスに感染する植物もめずらしい。アカザ科の植物に全身感染するウイルスもあるし、全く病徴を生じないウイルスもある。ここ10年くらい、*Nicotiana benthamiana* が多くのウイルスに全身感染することから注目され、近年ではウイルス研究に多用されている（Goodin et al., 2008）が、異常にウイルスが感染してしまう植物種での解析では十分な解析ができない心配もある。また、植物サイドの遺伝子解析が容易な*Arabidopsis* の利用も進んでいて植物側遺伝子の解明に役立っているが、ウイルス研究者にとってはこの植物がアブラナ科植物であるために感染するウイルス種が少ないのが物足りないし、モデル植物としての域を出ない面も多くありそうである。

これらに対して、アカザ科の植物をモデル植物を越えた観点からのウイルス遺伝子の機能やその関連遺伝子の解析に利用すればよいのではないかと思う。アカザ科の植物を使えば、あるウイルスは局部的感染でとどまるのに、なぜ他のウイルスは全身感染してモザイク・モットル・えそなどの全身症状を生じるのか、なぜこのウイルスは全く感染しないのかなどの、各種要因の解析が可能であると思う。そのために植物側のRNAサイレンシングやウイルス側のサブレッサーなど（13ページ参照）とウイルスの感染増殖移行とを直接関連付けた比較研究ができると思われる。世界にはアカザ科の植物として100属1,400種があるというので、代表的な種でのウイルスの反応を追ってみるだけでも新発見につながりそうである。ようやくごく最近になって、これらの機構の解明への植物側からのアプローチがアマランティカラーを用いて始まった（Zhang et al., 2012）。今後の成果が期待される。

3) 植物ウイルスの形と多様性

植物ウイルスのほとんどは球形、棒状、ひも状などの形をしている（図2）。ウイルスの形はウイルス種に特有であり、種によって決まっている。異なる種であっても同じ属のものは類似の形態を持っている。これまでに見つかっている一番小さな粒子形態を持つ植物ウイルスは、ナノウイルスとよばれている直径 16 nm（ナノメートル）の球形ウイルスである。また、これが双子のように2個くっついたジェミニウイルスという一風変わった双子型のものもある。球形で種類が多いのは直径約 30 nm のものであり、粒子の形だけでは種を識別することは不可能である。これらは厳密には球形ではなく正 20 面体である。球形の植物ウイルスの中で最大のものは直径約 130 nm のもので植物ウイルスには珍しく糖タンパク質からなる被膜を持っていて、その表面には多数の突起がある。棒状の植物ウイルスは長さ 300 nm で幅 15 nm のものが多く、粒子としての安定性がきわめて高い。これより少し短い粒子もある。棒状のウイルスより少し細く幅 12 nm のひも状の粒子からなるウイルスにも多くの種があり、それらの長さは 500 nm ～ 2,000 nm と多岐にわたっていて、長さ 700 ～ 800 nm のものが種としてもっとも多い。植物ウイルスの中で最も長い粒子は、世界の柑橘類に大きな被害を与えているトリステザウイルスであり、その長さは最長 2,000 nm である。なお、代表的なウイルスの電子顕微鏡写真を図4に示す。これらの他に細菌型の粒子を持つウイルスや弾丸状の形をしたものもあり、植物ウイルスの形は実に多種多様である。

ところで世の中、上には上があるものである。小さなもの同士の比較であるから、小には小があるものである。植物ウイルスは植物に寄生するが、その植物ウイルスに寄生するウイルスが見ついている。これらはサテライトウイルス（SV）とよばれ、タバコエソウイルスにおいて世界で最初に見出された。サテライトという名称は、惑星の廻りを廻る衛星のようなものという意味で命名されたが、惑星の廻りをただ廻るのではなく、惑星を自分の増殖のために利用する曲者であった。SV は、自身の外被タンパク質遺伝子は自身のゲノムにコードして持っているが、複製酵素や移行タンパク質は宿主ウイルス（ヘルパーウイルス、つまり惑星）のものを借用する。これまでのところ、植物ウイルスの SV では遺伝物質として RNA を有するものしか見つ

【ミニコラム：超広宿主域ウイルス】

これまでに発見された植物ウイルスの中で、宿主域がきわめて広くて約 1,000 種もの多様な植物に感染できるウイルスは、植物ウイルスの種が多いといっても TSWV と CMV のみである。他のウイルスの多くは通常数種から多くても 20 ～ 30 種程度の植物に感染するのみである。この2種ウイルスのみがなぜ、このように特別に広い宿主域をもっていて、本当に多くの植物に感染できるのか、その機構はまだ十分には解明されていないが、最近になって急速に研究が進んでいるところである。この後で解説するサプレッサーや移行タンパク質、長距離移行にも関与している外被タンパク質などがウイルス側の要因と思われるが、植物側の抑制要因（こちらはウイルス感染阻止作用・増殖抑制作用を持つものである）についてはようやく解明がはじまったところである。この植物側要因にはかなり多くのものがあると思われるが、どのようにしてそれらのすべてを、これらの小さくスリムなウイルスがブロックしたり、いかくぐったり、打ち破ったりできるのであろうか。驚くべき現象がミクロの世界で起きていることは間違いない。一方、宿主域の狭いジェミニウイルスやポティウイルスでは異なる種の植物に感染するために、突然変異等によって変異したウイルスが、植物体内で選抜されてよりよく増殖するものが残ってくるために種の分化が進んでいるのかもしれない。ウイルスにとっては CMV・TSWV 方式でもジェミニ・トスポ方式のどちらでもかまわない。とにかく、できるだけたくさん自分の遺伝子を増やして残していくために、ウイルスは今日も全力でがんばっている。超広域宿主域ウイルスの謎は深いままで。

ちなみに CMV と TSWV ではどちらの方が宿主域がより広いかを調べてみると、アメリカ植物病理学会のサイトでは、CMV が 1,200 種で TSWV は 1,000 種と記載されており、CMV の方が現時点では広いらしい。ところが、CMV にも TSWV にも親戚の仲間がいる。宿主域の広さから見ると CMV の子供である PSV や TAV を含めても宿主域はあまりひろがりそうにもないが、TSWV の親戚である 15 種のウイルスを加えると宿主域は広がることとなる。親戚も含めての両ウイルス家の食糧獲得範囲拡大競争はこれからも続いていくのであろう。

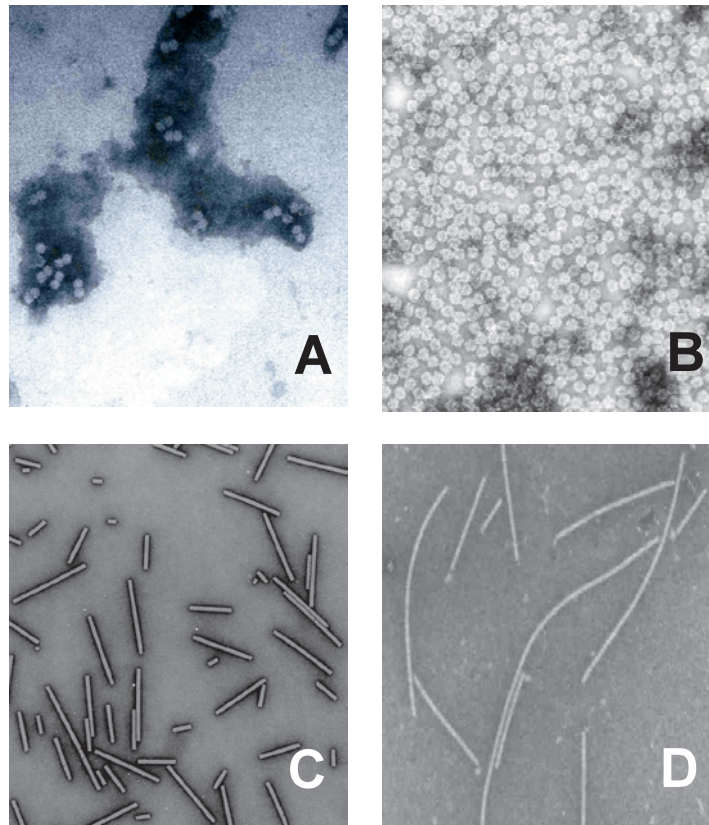


図4. 代表的な植物ウイルスの電子顕微鏡写真

- A) TYLCV：トマト黄化葉巻ウイルス（双球形）【ベゴモウイルス属】
 B) CMV：キュウリモザイクウイルス（小球形）【ククモウイルス属】
 C) PMMoV：トウガラシ微斑ウイルス（棒状）【トバモウイルス属】
 D) SCMV：サトウキビモザイクウイルス（ひも状）【ポティウイルス属】.

【ミニコラム：新規ウイルス】

遺伝子の一部や特性がかなり変わった新規ウイルスはこれまで時折見つかってきた。たとえばレオウイルスに例を取ってみると、レオウイルスというのは植物ではイネ科のみに発生する球形ウイルスでヨコバイによって伝搬されるウイルスであるとずっと言われてきたし、教科書にもそのように記されてきていた。ところが、1999年には葉巻症状を呈していたタバコからレオウイルスが見つかったのである(Rey et al., 1999)。さらに、最近になってアブラムシが媒介するレオウイルスがイチゴから分離された(Quito-Avila et al., 2012)。これらは我々の常識や固定観念をあざわらうかのような事実であった。眼には見えないウイルスというものは知識をもって対処すべき相手であるが、これらの新規ウイルスを相手にする時には、先入観に凝り固まっていたは我々に勝ち目のないことを教えてくれている。

果樹など木本性植物のウイルス研究史を振り返ってみると、対象が木本植物なので関連する木本植物のみへの機械的接種がずっと試み続けられていたために、1960年代はじめまでは、カンキツ類・核果類・イチゴ等のウイルスのこれらの植物への機械的接種は不可能か非常に困難とされていた。しかし、発想を変えて機械的接種を草本植物に試みたところ多くのウイルスで比較的容易に感染し、しかもその感染した草本植物から元の感染植物である木本植物に戻し接種ができたのである。これによって、多くのネポウイルスやイラルウイルス、カピロウイルスが見つかり、その特性解明も飛躍的に進んだ。しかし、果樹などの木本植物のウイルスには、草本には機械的接種では感染しないウイルスも残されているはずである。ごく最近になって、木本性作物で新規ウイルスの発見が相次いでいるのは興味深い。今後、次世代シーケンス技術の利用の進展にともなって、新しいこれまでの常識を越えたようなウイルスも含めて、果樹などから新ウイルスや新ウイロイドが続々と見つかる可能性がある。イチゴ・バラ・ランなどについても研究の余地が多く残されていると思われる。

かっていない。

驚いたことに、SV よりさらに寄生度の高いものとしてサテライト核酸とよばれるものが見つかった。サテライト核酸は、複製酵素はもちろん、自身の外被タンパク質までヘルパーウイルスのものを利用するというもので、SV よりさらに寄生性が進んだものといえる。サテライト核酸には DNA のものと RNA のものがあり、核酸の種類 (DNA か RNA か) はヘルパーウイルスと一致している。サテライト RNA は最初は CMV で報告されたが、その後多くの植物ウイルスで見つかってきており、すでに 24 種の植物ウイルスでその存在が確認されている。小さいタイプと大きいタイプがあり、小型のサテライト RNA はタンパク質はコードしていないと言われているが、大きいサテライト RNA は何らかのタンパク質をコードしている。最も研究が進んでいる CMV のサテライト RNA (小型) については 100 種を超えるものの塩基配列がすでに明らかにされている (花田, 2008)。一方、サテライト DNA はジェミニウイルスで最初に見つかり、その後バブウイルスやナノウイルスでも見つかった (Briddon and Stanley, 2006)。これらは α (アルファ) と β (ベータ) に大別されていて、これまでに少なくとも α には 40 種、 β には 61 種の存在が確認されている。

これらサテライト核酸の中の小型サテライト RNA は、タンパク質をコードしている配列はないようであり、自分では自己維持のための本当に最低限のものしか持っておらず、なんでも植物や他のウイルスから借りてすませようというタイプである。一方、サテライト DNA や大型のサテライト RNA は何らかの遺伝子をコードしているものが多く、同じサテライトでも大きさばかりでなく質的にも異なるタイプのものが存在しているということになる。

4) ウイロイド

1970 年代になって、ウイルスと同様に植物に感染して独自で増殖して他の植物にも伝搬する能力を持った、ウイルスよりもさらに一桁小さな病原であるウイロイドが見つかった。驚いたことにウイロイドはウイルスよりかなり小さいのに、裸で感染植物細胞内に存在しており、裸のままで単独で感染性を有している。ウイロイドはウイルスに似ているが、本質的に異なる点があるために‘ウイルスもどき’ウイロイドと命名され、その略記はウイルス V と区別するために Vd とされている。世界最小の病原であるウイロイドは、外被タンパク質を持たない裸の RNA として、やせイモ症状を呈するジャガイモの病原として最初に見つかった (Diener, 2003)。ウイロイドは最小の植物ウイルスの 1/10 以下の大きさのゲノムしか有していないが、植物に感染するとウイルスと同様に複製増殖することができる。ウイロイドはこれまで見つかった範囲ではすべて RNA のみであり、多くは機械的接触によってのみ伝搬されるが、中には種子伝染するものもある。

ウイロイドにはカンキツやブドウなど栄養繁殖で増やす果樹に寄生するものが多く、現在では ICTV に 2 科 8 属 31 種ものウイロイドが登録されている (表 3 の 2 つの科である *Avsunviroidae* と *Pospiviroidae* を参照)。ウイロイド RNA は裸で感染性を維持できるために、外被タンパク質は全く不要でタンパク質は全く持っていない。大きさやこれらの特性だけを見ると、ウイロイドはサテライト RNA と類似したものと思われるが、両者は本質的に異なるものである。サテライト RNA は裸では存在できず、ヘルパーウイルスの外被タンパク質を必ずまとっている点、またその増殖にはヘルパーウイルスとの重複感染が必要である点が明確に違う。ウイロイドは自身の RNA 分子内の高次構造によって単独でも安定した分子となっていて、単独で植物に感染して増殖し、単独で植物から植物へも伝搬される。

現在までに、日本で発生しているウイロイドの種が最も多いのはカンキツ類である。ブドウやリンゴでも多くの種類が報告されている。ほとんどのウイロイドは栄養繁殖性作物に多く発生しているが、ウイルスと異なりウイルス粒子のような安定した保護体を持っていないために、植物から植物への伝搬が比較的好く、これがこの一因であろう。栄養繁殖性植物なら、植物から植物への伝搬が必要でないからである。ただし、最近ではトマトや種子繁殖性の花きなどでのウイロイドの発生も増えてきている。ウイロイドによる病徴としては、トマトなどでは激しい場合には萎縮モットル症状を示すが、マイルドな退緑モザイクとなるものもあり、ほとんど病徴を生じないものもある。トマトのウイロイドには他の植物に感染しても病徴を殆ど出さないものが多い。果樹などではほぼ無病徴感染のものも多いので、特に管理作業や株分け等の際には注意が必要である。キクではわい化ウイロイドに感染すると背丈が低くなって開花が不揃いになりやすいが、大輪のキクでは

一般に病徴が出にくいなど、植物ごとの特性によって病徴が異なることがある。

5) 植物ウイルスのゲノムと塩基配列

(1) 植物ウイルスのゲノム

動物ウイルスの中にはかなり大きなゲノムを持つウイルスも多く存在しているが、これまでに解説したように植物ウイルスのゲノムの特徴はまずそのサイズにあり、小さく簡単な構造のことが多い。この小ささは、たまたまこれまでに見つかった植物ウイルスが小さいものであったということの一時的な反映である可能性が全くないとは言いきれないが、ICTV で正式に承認された植物ウイルス種は、すでに約 1,000 種に達していることから、小さいゲノムを持つウイルスの方が植物では都合がよいのだと考えられる。

植物ウイルスで最小の自立性ウイルスである 1 成分性ジェミニウイルスは 3 種類のタンパク質をコードしていて、その DNA ゲノムサイズは約 2.6 kb (約 2,600 個の塩基からなる) である。同様なゲノムサイズの 3 タンパク質のみの RNA ウイルスも多数存在している。ウイロイドや小型サテライト RNA は 350 個程度の塩基 (0.35 kb) から構成されており、ジェミニウイルスよりずっと小さく、これらはタンパク質は全くコードしていないといわれている。大きい方を見てみると、ポティウイルスは植物ウイルスとしては比較的大きなゲノムを有していて、10 種類のウイルスタンパク質をコードしているが、それでも大型動物ウイルスと比べるとずっと小さい。既知の植物ウイルスで最長の長さで最大のゲノムを持つカンキツトリステザウイルスでも、ウイルス粒子は最長 2,000 nm と長いが、その 1 成分からなるゲノムは約 12 種類のタンパク質をコードし、サイズは 19.3 kb である。

また、植物ウイルスのゲノムの大きな特徴の一つが、ゲノムがしばしば複数の成分から成るという点であり、これらのゲノム構造は分節ゲノム **Multi-partite genome** とよばれていて、ヒトや動物などのウイルスでは殆ど知られていない。つまり、植物ウイルスでは必須の成分が 2 ~ 3 の複数成分に分かれているものが多いということである。それらにはウイルスの種によって、ウイルス粒子レベルで長さや密度などで明確に区別で

【ミニコラム：新奇ウイルス】

これまでに見つかった植物ウイルスとは全く異なる新奇な植物ウイルスはまだあるのであろうか。新奇ウイルスとは、全く新しいこれまでの常識を大きくくつがえすような奇抜なウイルスのことであり、新規ウイルスよりさらに変わったもののことである。ウイロイドおよびウイルスに寄生するウイルスが発見された時は、これらはまさに新規性のかたまりで新奇であったし、RSV のような特殊な形態を持つウイルスの発見にも皆が驚いたものであった。ジェミニウイルスのように 2 玉ウイルスでしかも DNA ウイルスというのも十分に興味と驚きを持って迎えられた。これら以上に変わったウイルスあるいはそれに近いものはこれから見つかるのであろうか。海にはずいぶん変わったウイルスやファージがいることがわかってきているので、先入観をもたないで検討を進めていけば新奇ウイルスが見つかるかもしれない。ウイルスというのがこのようなものでなければいけないという固定観念を持つのは間違っているということは、ウイルス研究史が教えてくれている。ウイルス自身がまさにそうであった。

ごく最近になって、熱水温泉中に、その外被タンパク質遺伝子は植物 RNA ウイルス由来でその複製酵素遺伝子は動物シロウイルス由来のものを、DNA として持つという奇妙なウイルスが見つかったという報告が出された (Diemer and Stedman, 2012) が、これは確認されれば十分に新奇ウイルスといえるであろう。報告者によると他の場面でも同様なウイルスは見つかることであるから、今後のさらなる解析が待たれる。Roossinck (2011) が最近の総説で述べているように、ウイルスにはリボソームがないために、細菌などのような共通プライマーが作れないという指摘はうなずけるものがある。ウイルスにもこれからどこかで普遍的なまったく新しい何かがみつかるのであろうか。ウイルスハンターにはとっておきのスーパー道具は存在しないのか、まだ見つかっていないだけなのか。植物ウイルスの世界だけを見ても、これまで見落とされていた重要な遺伝子が最近になって見つかった例もいくつかあり、凝り固まった先入観は無用である。

きるものと、粒子では区別できず RNA にしたときにはじめて区別できるものがある。特に粒子レベルで区別できるものは多粒子性ウイルスと呼ばれる。多粒子性ウイルスでは、異なる粒子の中に含まれている RNA 成分の大きさが異なっているために、異なる粒子成分として分けることができるのである。Multi-partite genome を持つウイルスの RNA 成分は、5' 及び 3' の両末端に共通配列を有しており、それらの成分数はウイルスの種や属に特異的であり、複数の成分がウイルスの感染増殖伝搬に必須である。たとえば、ネボウイルスやトブラウイルスでは 2 成分、クモウイルスでは 3 成分が必須であるといった具合である。これらではウイルスの遺伝子が複数の核酸成分の上に分かれてコードされている。一方、文節ゲノムを持たない単一ゲノム Mono-partite genome を有するトバモウイルスやトンプスウイルスでは 1 成分のみが必須であり、必要なウイルス遺伝子はすべてその上にのっている。

(2) 植物ウイルスの遺伝子と塩基配列

植物ウイルス遺伝子の塩基配列は、すでに説明した 3つのウイルス必須遺伝子を含めて、その遺伝子の 5' 側から 3' 側に向けて、以下のような順番に並んでいるのが基本である。ウイルスの各種タンパク質遺伝子はその両端を非翻訳領域というタンパク質には翻訳されない塩基集団で守られている。両末端の非翻訳配列領域はそれぞれ、ウイルスタンパク質合成のためやウイルス複製のための重要な機能も担っている。

【5' 末端非翻訳配列】－【複製酵素遺伝子】－【移行タンパク質遺伝子】

－【外被タンパク質遺伝子】－【3' 末端非翻訳配列】

これらの他に非翻訳領域に存在しているものとして、5' 最末端には Cap と呼ばれる構造をもつウイルスが多く、中には特別なタンパク質である Vpg を持つウイルスもある。また、3' 最末端にはポリ A テイルや tRNA 様構造を持つウイルスがある。3つの必須遺伝子以外のウイルス遺伝子としては、伝搬のために必要な遺伝子などがあり、他にも多くの名前をついた遺伝子があるが、それらの機能は必須遺伝子を補完するものが多い。両末端の非翻訳配列や各タンパク質遺伝子の塩基配列およびそれから決定されるアミノ酸配列は、類縁

【ミニコラム：役に立つウイルス】

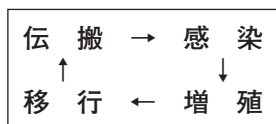
悪玉ばかりのウイルスだが、植物やヒトにとって役に立つウイルスというものはないのであろうか。これまで、ウイルス研究者は病害をはじめとして何らかの不具合や異常とばかり、植物ウイルスを関連付けて研究してきたきらいがある。そのために、生育が早くなるウイルス、収穫物が大きくなるウイルス、糖度が増すウイルスについては、探す努力すらしてこなかった。これまでに報告されていて有用性があると思われるのは、花卉の色変わりや葉のきれいな黄化などであり、これらについては最近、Valverde ら (2012) がこれまでの研究をとりまとめている。わが国では弱毒ウイルス関連で CMV に感染したトマトなどでビタミン C の含量が少しアップすることが示されているくらいである (佐山, 2003)。一方、ウイルス遺伝子の一部を切り出したものが役に立っている例はすでにいくつかある。特に CaMV の 35S プロモーターは、組換え植物作出の研究の初期にはこれしかないというくらい頻繁に利用され、多くの外来遺伝子の植物葉での発現を強力にサポートしてきたことは、皆さん周知の事実である。また、他のウイルスのプロモーターが根での外来遺伝子の発現や発現量のアップに有効であるとの報告もある。TMV の Ω 配列などのように、外来遺伝子の発現量を高めうる配列の存在も知られている。最近になって、植物の RNA サイレンシングによる外来遺伝子の発現低下を植物ウイルスのサプレッサーで抑えようというトライアルの成功が報告された (Saxena et al., 2011)。しかし、これらのものはあくまで細かいものであり、ウイルスのほんの一部の利用でしかない。もっと大きく役立つものはないのであろうか、ウイルスのままでヒト様のお役にたてるようなものは、もしかすると次世代シーケンスで見出されてきている、あるいは今後見いだされてくるであろうウイルス様配列を持ったものの中にみつかるかもしれない。もっと視野を広げてさがす事が可能なら、膨大な海洋中の微生物の中あるいは空気中の未知微生物中にあるであろうウイルスの中にあるかもしれない。もちろん、すでに植物ウイルスとして認定されている 2 本鎖 RNA 配列やレトロトランスポゾン様配列を持つものの中にすでに役立っているもの、あるいは役立てられるものが発見される可能性もある。

関係の近いもののほど相互に類似している。複数ウイルスの相互の関係をj知るために、類縁関係の近いウイルス間で比較する際には、外被タンパク質遺伝子の塩基配列やアミノ酸配列の相同性を比較し、遠縁のウイルス間では非翻訳領域塩基配列や複製酵素遺伝子で比較することになる。これは、タンパク質に翻訳される部位には変異が生じやすいが、非翻訳配列では共通性が保存されるために遠縁のウイルスの間でも類似性が高いためであり、また、同じ必須タンパク質でも外被タンパク質遺伝子には変異が生じやすく、複製酵素遺伝子は変わりにくいからである。

植物ウイルスがウイルスとして存在し続けていくために必須の3遺伝子についてもう少し説明しておこう。ウイルスの本体は複製酵素ということになるだろうから、ウイルスにとってこれが最重要である。移行タンパク質遺伝子は、ウイルスが増殖した細胞から隣の細胞に移動する際に必須であり、これがないか機能しないとウイルスはその細胞内に閉じ込められてしまうことになる。このタンパク質は細胞と細胞をつないでいる原形質連絡の穴を大きくする作用を持つことが証明されている。外被タンパク質（CP）遺伝子は、内部の特に複製酵素遺伝子核酸を外界から守るばかりでなく、種々の機能を担っており、病徴決定機能、遠距離移行機能、被伝搬機能などをあわせ持っている。CPが1種類だけのものが殆どであるというのも植物ウイルスの大きな特徴であるが、1種類しかないことと多機能を併せ持っていることは密接な関連があると思われる。CP遺伝子がウイルスにとって外界と直接接する部分であることもあり、CP遺伝子がウイルスの分類において特に重要な基準となっていることもうなずける。

理解を深めるために、特殊なケースをあげてみると、以下のような例がある。複製酵素を持たないウイルスはウイルスとはいえないであろう。一方、移行タンパク質については、TRVなどで外被タンパク質がなくても、複製酵素タンパク質と移行タンパク質のみで植物体内で増殖して全身に広がりうることが知られているが、そこから他の植物に自然界で伝搬されることはない。また、CP遺伝子については、CPを取り除いてRNAだけにしても感染性を示すウイルスは多くあるが、一度増殖したウイルスはすべてCPを被っており、CPで包まれることによってはじめて自然界での他の植物への伝搬が可能となる。

これらの3必須遺伝子と伝搬に必要な遺伝子のすべてを、植物に作らせる能力を完備した植物ウイルスは、以下のようなサイクルを繰り返しながら、野外やハウスなどで植物から植物へと次第に広がっていくことになる。特に圃場やハウスでは、植物の生育や品種までそろっているので、ウイルスには信じられないほど有り難い好条件となる。



ウイルス病の防除のためには、このサイクルをどこかで断ち切ってしまえばよいのであるが、それは必ずしも容易ではない。容易に遮断されうるものはとくにウイルスとして存在していないはずである。

(3) 植物ウイルスで新たに見つかった重要な遺伝子

植物ウイルスの遺伝子についてこれまで説明してきた以外に、最近になって、新たに重要なウイルス遺伝子が見つかり、普遍的に植物ウイルスが持っていることが判ってきた。ウイルスが植物に感染して細胞内に侵入して増殖を始めるまでは、当然のことながら、植物もさまざまなバリエーションを設けていて抵抗する、それが抵抗性の主要なものと考えられていた。つまり、ウイルス増殖開始まではいろいろと抵抗するが、ウイルスが一度増殖を始めると植物は黙ってなされるがままにウイルス遺伝子の指示に従うのだとずっと考えられてきた。しかし、実はそうではなく、植物はウイルスが侵入してきて増殖を始めると、そのウイルスRNAを分解してしまう仕組みを広く有していることが、しだいにわかってきたのである。しかも、それはウイルスに対して作用するばかりでなく、広く植物に入ってくる外来遺伝子一般に対して作用することが判明し、この作用は広くRNAサイレンシングと呼ばれるようになった。

このような機構がサイレンシングといわれるようになったのは、「特定のRNAを分解してだまらせてしまう」という意味からである。このサイレンシングによって、植物自身が持っているRNAを分解してしまっ

は、植物自身が困ってしまうので、新たに外から侵入してきた RNA を、その配列を標的として分解してしまうという防御機構の発見であった。これは、動物のように逃げ隠れできない植物が、他の生物や遺伝子によって操られないために作られてきた機構と思われる。最近になるまでわれわれ人間が知らなかっただけで、植物はずいぶん前からこのすぐれた防御機構を持っていた、その強化や改良も進めてきたものと思われる。植物ウイルスもこの強力な RNA サイレンシングには困ったようで、これに対する対応策を講じないとウイルスとして残っていけないほど、強力なウイルス対抗策でもあったと思われる。

しかし、このサイレンシングに対抗するすべを植物ウイルスはすでに持っていることも、その後になって判ってきたのである。ウイルス側はこの厄介な RNA サイレンシングを抑えるためのサプレッサーとよばれるウイルスタンパク質の1つを植物に作らせ、すでに対抗してきている。現在では、ほとんどの植物ウイルスがこのサプレッサー遺伝子を持っていることが証明され、ウイルスがサイレンシングに対する抑制効果を有していることが判明している。サプレッサー機能を持つタンパク質を持っていないウイルスは、植物に感染してもウイルスとはなりえないと考えてよい。もちろん、われわれのまだ知らない他の対抗手段を持つウイルスもあるかもしれない。最近になるまでウイルスサイドからこの遺伝子の存在が見つけられなかったのは、このタンパク質のコーディング領域が他の既知の遺伝子の一部であったり、既知の遺伝子の別機能であることが多かったためであった（志村・増田，2012）。

【ミニコラム：沈黙の激闘】

多くの植物は、ウイルスも含めて外部から侵入してくる遺伝子の発現を防止するための強力な防御機構 RNA サイレンシングを有している。動物のように免疫機構もなく、動いて逃げることもできない植物は、このサイレンシングによって他生物の遺伝子による操りから逃れているのであろう。ところが、多くの植物ウイルスはサイレンシングが起きることをすでに知っており、そのサイレンシングを抑えるタンパク質であるサプレッサーを準備している。ウイルスが感染した植物体内では、増殖しようとするウイルスとそれを抑えようとする植物のサイレンシング、そしてそのサイレンシングに対抗するウイルスのサプレッサーとの三つどもえの激しいつばぜり合いが、われわれの目には見えないところで行われているのである。感受性植物の場合は、その結果としてウイルスが勝利して、膨大な量のウイルスが植物体内に蓄積されてくる。植物側が勝てば、ウイルスはそこで増殖を止められて途絶えてしまうことになる。さらに、ごく最近になってウイルスのサプレッサーを押さえる機構も植物は持っていて、それを強化すればウイルス抵抗性は高まるということが報告された（Nakahara et al., 2012）。まさにこれらの機構はそれだけでも複雑きわまりないものであり、植物とウイルスとの戦いはそれほど時間と手間と犠牲をかけておこなわれてきているものであり、それに勝ち残ったものだけが生き残ってきていて、さらにお互いに相手を乗り越えるための進化をめざしているのである。これだけを見ても、生物が生き残るということは本当に大変なことなのだ！と実感させられる。植物から見ると自死などとてもないことで、生きる可能性がある限り精一杯生きるのが自然で当然だということ。

6) 植物ウイルスの伝染方法

植物ウイルスの伝染方法は多種多様であるが、その方法はウイルスによって決まっていて、ウイルスは特定の媒介生物によってのみ伝搬される。具体的には、媒介生物、種子、土壌、接触などによって伝染が行われている。生物を介する伝染法として代表的なのは植物に寄生する小さな昆虫による伝搬である。伝搬する昆虫の種類としては、アブラムシ、アザミウマ、コナジラミ、ヨコバイなどが多く、一般的には、これらの虫が感染植物に飛来して吸汁する際にウイルスも虫の体内に入って、ウイルスが増殖した後、その虫が次の健全な植物を吸汁する時にウイルスが植物体内にはき出されることによってウイルスが運ばれて、感染が成立し伝搬が起きることになる。これらとは異なり、アブラムシの体内には入らないで、その口針に一時的にくっつくだけで、アブラムシが次の植物の汁を吸うときには離れてしまうことで伝染するような巧妙な機構を確立しているウイルスもある。前者のようにウイルスが虫の体内に入ってから伝搬されるウイルスは長期間にわたって伝搬

されることになることから永続的伝搬とよばれ、後者は短い期間しか伝搬されないことから非永続伝搬と呼ばれている。

植物ウイルスを媒介する昆虫あるいはそれに近い節足動物は、かなり多岐にわたっており、これまでに確認されたものだけでも 80 種以上のアブラムシ、6 種のアザミウマ、2 種のコナジラミ、3 種のウンカ、2 種のヨコバイ、4 種のダニ、1 種のハムシ、2 種のカイガラムシなど多種多様なものが知られており、これらの数も増えてきている。これらの主要なウイルスと媒介生物の関係を表 2 にまとめておいた。

土壌中の糸状菌や線虫がウイルスを媒介することもあり、この場合はウイルス感染が土壌中で植物の根を通じて起こるために土壌伝染とよばれている。ウイルスを伝染する糸状菌には、ポリミキサ、オルピディウム、スポンゴスポラが知られていて、特定の糸状菌が特定のウイルスを伝搬する。これらの糸状菌が媒介するウイルス病にはオオムギ縮萎縮病やメロンえそ斑点病などがあり、いずれも防除が困難な重要土壌病害である。一方、線虫が媒介するウイルスにはネポウイルスやトブラウイルスがあり、*Xiphinema* や *Longidorus* などの 3 属 10 種以上の線虫が特異的に媒介する。最近のわが国ではウイルスを伝染する線虫は比較的少なく、線虫伝染性のウイルス病の発生は限定的で被害もそれほど大きくはない。

一方、生物を介さない伝搬法として代表的なものには、ウイルスに感染した葉が隣の植物の葉と機械的にこすりあわされるだけで伝染するという方法があり、これを接触伝染という。安定性の高い粒子を持つウイルス

【ミニコラム：ウイルスに操られる虫】

虫の行動を操るウイルスについては驚くべき新しい知見が最近になって続々と報告されている。植物ウイルスについても興味深いウイルスによる媒介虫の高度な操りが、ウイルスの効率的な媒介者であるアブラムシとアザミウマで報告されている。一つは CMV とそれを媒介するアブラムシの関係である。CMV 感染のために本当はまづくなってしまう感染植物が CMV に無理に出すようにし向けられている「私はおいしいエサですよ」という偽りの臭いに惹かれて、アブラムシが感染植物の方に飛んでくるとの報告である。これは全く想定されていなかった驚くべき発見であった。こうしてアブラムシにとって美味しくもなく、栄養的にも劣る感染植物のシグナルにだまされて、アブラムシは自ら好んで、おいしい健全植物よりもまずい CMV 感染植物を吸汁してしまうという (Mauck et al., 2010)。ウイルスというのはヒトや植物をだますばかりでなく、媒介生物までだますものらしい、実に手強いこまった存在である。アブラムシが 1 分でも吸汁してくれれば CMV はその口針にくっついて伝搬されるのだから、CMV にとってはちょっと吸ってくれば十分なのである。むしろアブラムシが同じ感染植物に長居するよりも、そのまずさに気づいてさっさと他の植物に移ってくれた方が CMV にとってベターなのである。驚くばかりの適応というか、まさにだまし上手なのである。「こっちの水があーまいぞ」と誘われて、のせられてしまう。もう一つは TSWV とアザミウマの間で同様な現象が報告された (Stafford et al., 2011)。こちらは美味しいという臭いを出させられているのかどうかは不明であるが、やはり発病植物の方に健全植物より 3 倍も多く虫が惹かれてきてしまうというものである。ここまでくると、ウイルスを伝搬する他の小昆虫であるコナジラミやダニでも類似の現象がありそうな気がしてくるのは、私だけではないであろう。もしかすると昆虫とは全く異なる植物ウイルス媒介者である線虫や糸状菌も、ウイルスに操られて、こちらの方がおいしいと思いこまされて、ウイルス感染植物に好んで移動しているのかもしれない。誠におそろしい程のウイルスの知恵策略である。

それにしても、小昆虫媒介性のウイルスは一番はじめにはどのようにして被伝搬能を獲得したのだろうか。被伝搬能を持ったものの中からウイルスができてきたとは考えにくい、むしろ、被伝搬能のないウイルスがはじめにあって、それが何らかの原因で、伝染に利用できるタンパク質を獲得して伝搬されるようになり、その効率を向上させながらやがてウイルスとして大成したと考える方が容易だと思われる。ひとつできれば、その後は重複感染などで他のウイルスにも被伝搬能が広がっていったのではないだろうか。昆虫媒介性ウイルスはヒトや動物ウイルスにも多数あり、どのような道筋をたどってきたのかというのは興味深いテーマである。最近のウイルスによる虫の操りの発見はウイルス伝搬の研究をさらに奥深いものとした。

では、感染した植物の根やその周囲の土の中で、ウイルスが長期に渡って感染性を維持していて、その根や土壌に健全植物の根が接触した時にウイルスに感染することがある。これも土壌中でウイルスが伝染することから、糸状菌による伝染と同じ土壌伝染に含められている。トマトやピーマンなどの重要ウイルスであるトバモウイルス（TMV, ToMV, PMMoV 等）がこのような伝染をするために感染植物さえあれば伝搬してしまい、他のウイルスのように媒介生物の防除等による対策がとれないことから、防除がむずかしく、一度発生すると大問題となりやすい。

また、他の生物を介しないもう一つの重要な伝染法として、発病した植物にできた種子の内部にウイルスが

表 2. 代表的な植物ウイルスとその媒介虫

媒介虫	日本で発生している主なウイルス
アブラムシ	CMV, PSV, PVY, CVB
コナジラミ	TYLCV, CCYV
アザミウマ	TSWV, MYSV
ウンカ	RSV
ヨコバイ	RDV
ダニ	OFV
カイガラムシ	ブドウウイルス3種（GLRaV-3, GVA, GVB）
ハムシ	SqMV, RMV

ウイルス名：以下のウイルス以外は表1を参照。

- OFV：ランエソ斑紋ウイルス
- GLRaV-3：ブドウ葉巻随伴ウイルス3
- GVA：ブドウ A ウイルス
- GVB：ブドウ B ウイルス

【ミニコラム：多様なヘルパー】

サテライトウイルスやサテライト核酸の増殖をサポートするウイルスをヘルパーウイルスとよぶことはすでに 8 ページで説明したところである。以下に紹介するように他の場合にもヘルパー成分やヘルパーウイルスという名称を使うので注意しておく必要がある。ヘルパーは多様でかつあちこち多忙なのである。

ひも状ウイルスであるポティウイルスの RNA は、ウイルス遺伝子の一つとしてヘルパー成分（HC）とよばれるタンパク質をコードしている。この HC は多機能タンパク質であり、ウイルスの複製や RNA サイレncing のサブレッサー（14 ページ）として機能する。その上さらに、ポティウイルスがアブラムシに伝搬される際に、まずこの HC がアブラムシの口針に付着して、そこにウイルス粒子がくっつくことによって伝搬が効率的になるように働くのである。そのために、このポティウイルスのタンパク質はヘルパー成分とよばれる。このようなタンパク質はどこからきてどのように進化してきたのかは不明である。

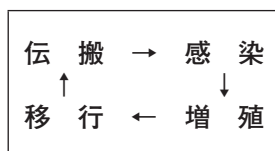
一方、単独ではアブラムシで伝搬されないウイルスの中には、全く別種のウイルスと重複感染したときにのみアブラムシで伝搬されるものがあり、この伝搬を助けるウイルスのことをヘルパーウイルスとよぶ。また、他のウイルスの植物体内での移行を助けるウイルスもあり、それもヘルパーウイルスとよばれている。一方、ウイルス RNA の一部が欠失し、複製能を失った DI-RNA（Defective-interfering RNA）と呼ばれるものの存在が知られているが、この場合には全長を持ち複製できる同種のウイルスと一緒に感染したときにのみ DI-RNA の増殖が可能となり、この場合にも全長ウイルスがヘルパーウイルスとよばれる。このように、増殖、移行、伝搬の各ステップのどこかで不能となることはウイルスの存続にとって致命的なことであり、それを乗り越えてウイルスとして存続していくためにはヘルパーウイルスの存在が必須となる。何か利用できるものがあれば、何でも利用するのがウイルス精神である。

残っていて、その種子から発芽した次世代の植物が発病するというものがあり、これを種子伝染とよぶ。特にダイズなどのマメ科植物のウイルスに多く、これらでは種子内部に活性を持ったウイルスが残っていて、それが種子から発芽した次世代の植物に感染する。一方、トマト・ピーマン・キュウリ・メロンなどではウイルスによっては、感染植物にできた種子の表面にウイルスが残り、発芽するときに種皮表面に残存していたウイルスが侵入して発病することがあり、こちらは見かけの種子伝染とよばれている。たとえこれらの種子伝染そのものは低率であっても、種子伝染性ウイルスにはアブラムシや接触伝染で広がるものが多いために、1株でも種子伝染すると、その感染株から二次伝染によってウイルスが広がってしまうことがある。したがって、低率だからといって、決して軽視することはできない。それどころか一次伝染率がごく低率であっても、その後の重大な被害となる大きな原因となってしまうことがあるのである。また種子伝染はウイルスの次代植物への移行のために媒介者を必要としないことから、ウイルスにとっては効率的で確実な伝染法である。種子伝染の1方法として花粉を介しての伝染があり、特に区別して花粉伝染とよばれ、果樹等を主要な宿主とするイラルウイルスなどで顕著な現象として古くから知られている。

ウイロイドは種子伝染や接触伝染して、多くの植物－ウイロイドの組合せではほぼ無病徴感染する。ウイロイドが、たまたま特定の作物、場合によっては特定の品種に感染したときに激しい病徴を出して大きな問題となる。植物工場と同じく野菜などの水耕栽培においても、ウイロイドは特に警戒が必要な病原である。土や植物残渣がない清潔な状況で栽培しているのでウイロイドの持ち込みはありえないと思いこんでいると、気がつかないうちに種子やヒトを通じてウイロイドを持ち込んでしまう可能性があるからである。ウイロイドは、ウイルスを想定した診断では検出ができない点も重要である。もちろん、TMVのように接触伝染能の高いウイルスについても、植物工場や水耕栽培では持ち込み完全防止に細心の注意が肝要である。

7) ウイルス病の防除法

ウイルス病の防除には発生させないことが一番であるが、ウイルスも自身の効率的な感染、増殖、伝染のために種々工夫をしているわけで、いつのまにか侵入して発生していることが多い。一度、発生してしまったウイルス病の防除のためには、第一にウイルスの以下の伝染環をどこかで断つことが必要であり、それができた



【ミニコラム：抗ウイルス剤】

最近になって、ヒトではウイルス特異的かつ薬害を生じにくい抗ウイルス剤が治療に用いられるようになってきており、その利用は確実に拡大している。たとえば、ヘルペスウイルス、インフルエンザウイルス、HIV-1 等に対する実用的な抗ウイルス薬が見出されて、実際の治療に使われている。HIV-1 については治療薬どころか、すでに予防薬まで作製され米国では承認されたという。植物ウイルスではそのようなものはまだ全くないのが、実情である。農家のハウスや圃場でウイルス病が発生して被害が出たときに専門家が確認や対応指導に行っても、これまでと同じく「発病株は全部抜いてきちんと捨ててください、媒介生物に有効な農薬を散布してください。抵抗性品種があるものではそれを使ってください」といつまでたっても言うだけでは、進歩がない。農家にたいして誠に申し訳ない。ウイルス側および植物側の遺伝子のいろんなことが判ってきたのだから、そろそろ何らかのブレークスルーが見つかるのではないかと考えているのは私だけではないであろう。発病後の病徴を軽減するための治療剤や手法の探索も農家にとって大助かりである。発病株の症状を抑えるとか、発病を遅らせるとかだけでも、収穫間近の作物の収穫までの急場しのぎになり、農家は大いに助かるわけで、「すぐにこれを使ってください」といえる何かが必要となっている。すでに、CMV のサプレッサーである 2b タンパク質関連成分によるウイルスの抑制や、光による TSWV の抑制など光がみえてきそうなものは出てきつつあるが。

ら今度は細心の注意を払って再侵入をきちんと防止することがウイルス防除に必須である。この点はウイロイドでも同様である。

ウイルス病の場合には、糸状菌による病気のような農薬による防除法は確立されていない。また、ヒトのウイルスでは最近になって、有効で安全な抗ウイルス剤が実用的に用いられるようになってきているが、植物ウイルスではそのような抗ウイルス剤はまだ見つかっていないのが現状である。共通的に用いることができる植物ウイルスの防除法には、耕種的防除法とよばれる方法がある。耕種的防除法には、非感染性作物を含めた輪作体系の導入・抵抗性品種や台木の利用・無病苗の使用・感染植物や被害残さの除去・栽培環境の適正化およびその保持・播種期の移動等がある。虫が媒介するウイルス病の場合には媒介虫の防除という観点から殺虫剤を使って防除するという化学的防除も可能であるし、また、シルバーマルチや防虫ネットなどを張って媒介虫の侵入を防止するという物理的防除法も使うことができる。もちろん、これらは直接ウイルスをたたいていくわけではなく、ウイルスを媒介する虫を寄せ付けないようにするのである。

土壌中の菌やウイルスが土壌中に残って伝搬されるウイルスでは、土壌くん蒸剤等の処理によって菌や残根中のウイルス密度を下げることでウイルス病の発生拡大を防止できるので、これまで高い防除効果をあげてきた。しかし、土壌くん蒸剤として広く利用されてきた臭化メチルは、そのオゾン層破壊性の故に国際条約によって、日本では2013年から全く使用できなくなるので注意が必要である。以前から他の農薬などが代用できるものについては対応策が検討され確立されてきたが、臭化メチル以外には有効な対策が見つかっていなかったものについて、個別の代替策が農林水産省の実用技術の重要課題として検討され、課題別にきちんとしたマニュアルが2012年12月に公開された。臭化メチル全廃で問題となりうるウイルスとしてはピーマンのPMMoV、キュウリのKGMMV、メロンのMNSVがあげられており、これらが発生した場合の個別の対応策がくわしく適切に紹介されている。具体的な内容については、中央農業総合研究センターのサイトに示してある「臭化メチルにたよらない新規栽培マニュアル」http://www.naro.affrc.go.jp/narc/contents/post_methylbromide/index.htmlを参照されたい。どのような防除法を適用する場合であっても、発病株を早期に除去して伝染源をきちんと取り除くことはウイルス病の発生拡大防止や次作での発生防止には一番重要なことである。

一部のウイルスと作物の組み合わせでは、ウイルス病の防除に、野生植物などが持つ抵抗性遺伝子が交配などによって栽培品種に導入され、有効かつ実用的な抵抗性遺伝子を持つ品種が、すでにいくつかの作物で広く市販されている。抵抗性遺伝子は一度植物に安定的に入れてしまうと、最も簡単かつ有効な防除法であるために、世界中で広く探索研究されている。日本における現時点での抵抗性遺伝子の主たる利用はトマトやピーマ

【ミニコラム：最新農業】

均一条件下で同じ遺伝子を持つ同一品種を同じ時期に播種して栽培する最近の作物栽培方法は、ウイルスからみるとまさに品質および生育のそろったごちそうをたっぷりと準備してもらっているという状況なのではないだろうか。すべてで高収量、高品質をめざしているために、葉は柔らかく、ウイルスも虫も感染増殖しやすい条件となっていて、生育もピタリとそろっている。これほど、特定の虫やウイルスにとって好適な状況はないと言えよう。もっと、条件をヘテロにすることがウイルスや虫の発生抑制に役立つと思われるが、いかがだろう。ヘテロな栽培条件の導入、たとえば異なる作物の混植栽培、複数品種の混合栽培、播種時期をずらした栽培などが大いに検討されるべきである。過去の例を調べてみると、コンニャク栽培で大きな生産阻害要因となってきたCMVによるえそ萎縮病は、エンバクなどの障壁作物を畦間に作ることで被害を防止できることがわかり、主産地では効果をあげている。最近導入がすすみ、その数や面積が増加してきている植物工場などは、さらに均一度が高まっており、ウイルスやウイロイドにとってまさに夢のごちそうといえるかもしれないので、最新の高度かつ細心の対応が重要となってくる。接触伝染性ウイルスやウイロイドが種子伝染や持ち込みによって1株でも感染すると、その後の管理収穫作業の間に瞬くうちに拡大することとなりかねないからである。

ン等の一部ウイルスに限定されている。抵抗性品種の利用に際しては、早いものでは2～3年でその抵抗性を打破するウイルスの新系統が出現することを前提とする必要があり、遺伝的背景の異なる抵抗性遺伝子の利用や感受性品種との混植などを考慮しながら進めて行けば抵抗性品種は長持ちすると言われている。このような延命対策はウイルス以外の病原では実際に検討されているが、抵抗性遺伝子が少ないウイルスではなぜかあまり検討されていない。トマトで発生すると大きな被害を与えてしまうトバモウイルスのToMVに対する効果的な抵抗性遺伝子であるTm-2aは例外的にきわめて安定である。これは長い間、広い地域に渡って多用されてきているのに、ごくまれに抵抗性打破株が出現するのみで、その発生が広がった例はこれまでのところまったくないのである。本ウイルスのように安定かつ強力なウイルスに対して、1つの抵抗性遺伝子がなぜこのように安定して長期間にわたってブレイクダウン（抵抗性の崩壊）を起こさないで利用され続けているのか実に不思議な現象である。これら抵抗性遺伝子の構造や機能についての研究が進んできており、今後は適用範囲の拡大なども可能となるかもしれない。

ジェミニウイルスであるTYLCVの最近のわが国のトマトにおける発生拡大に伴って、野生トマトから導入されたTYLCV抵抗性遺伝子を持つ抵抗性品種の利用がかなり急速に進んできている。すでに日本ではTYLCVイスラエル系統とマイルド系統の2系統が主に発生し広がっているために、1個の抵抗性遺伝子しか有していないトマトではいずれか一方のみにしか抵抗性を示さないの、その利用に際しては現地で発生しているウイルスの系統の確認がまず前提となる。最近になって両系統に同時に抵抗性を示す品種が市販されるようになってきており、これらを利用する方が安定的に被害を軽減できると思われる。しかし、これらのTYLCV抵抗性は、ウイルスには感染するが、病徴が出にくい、あるいは軽いというものであるために、市販の抵抗性品種を栽培していてもウイルスはある程度増殖することになるので、媒介虫の防除や侵入阻止は必須である。

植物ウイルスにおいても、ヒトのインフルエンザ予防に利用されているワクチンと同様な手法で防除が可能なものもあって、植物ワクチンと呼ばれる効果的な弱毒ウイルスがすでに実用化されている。しかし、植物ワクチンや弱毒ウイルスはごく限られた作物とウイルスの組み合わせでしか利用できないのが現状である。最近になって、有効な弱毒ウイルスについて農薬登録をとって微生物農薬として市販することが始まっており、ZYMVのキュウリでのワクチン株キュービオZY-02がそれに当たる（Kosaka et al., 2006）。植物ワクチンは野外の強毒株の感染前に処理しておけば有効であるが、治療効果はないので、発病後に接種しても効果はない。ウイルス病治療については、最近になって早野ら（2010）がトマトでのCMVの治療にサテライトRNAが利用できることを報告しており、我々も同様なことを確認した。植物ウイルスの発病後の治療についてはこ

【ミニコラム：植物ワクチン】

世界中で弱毒ウイルスが最も広く利用されている国は日本である。というのは、大島・後藤らが最初に作成したToMVの弱毒ウイルスL11A（大島ら，1965）の有効性が広く認められたのが世界で最初であり、その後に大沢らが開発したCGMMVの弱毒であるSH33b（大沢ら，1984）が続いたからである。その後、開発されたサテライトRNAを含むCMV弱毒株を接種したトマト苗（Sayama et al., 1993）は、家庭菜園でも人気があって広く売れているとのことである。キュービオZY-02も健闘しているという。ピーマンのPMMoV弱毒株も脱臭化メチル対策の一環として微生物農薬の登録に向けて検討が進められているところであり、弱毒王国日本は今後も健在で有り続けていくと思われる。しかし、ワクチンについてほとんど一般に知られていなかった時代、つまり実際にはじめて農家で使ってもらう際には、ワクチンを作った研究者自身が農家の説得のために大変な努力をされたのだということは記憶にとどめておくべきである。その弱毒の開発者はいつも辞表を懐にいれて、ウイルスが発生した農家一戸ずつを廻って、弱毒ウイルスを使うように依頼して廻ったというのである。それほど、当時の農家にとって、弱毒といえども自分たちから進んで、病気でもない自分の大切な作物にウイルスを接種するということは、理解を超えたとんでもないことだったのである。もちろん、その効果が実証されて行くにつれて農家の理解が進んだことはいうまでもない。

れから研究が進むことが期待される。

ウイルスの感染を抑える物質である抗ウイルス剤の探索については、植物ウイルスでも古くから多くの研究がなされてきているが、植物ウイルスでは明確な安定した効果を示すものはまだ見つかっていない。シイタケ菌糸体抽出物であるレンテミンの接触伝染防止についての有効性が広く認められているくらいである。ほとんどの研究者は有望なものが見つからないので、抗ウイルス剤の探索についてはあきらめ気味というのが実情のようである。

一方、栄養繁殖性作物では、ウイルス感染植物にウイルスフリー化処理をして得られるウイルスを含まないウイルスフリー苗を作って、実際の栽培に利用することも有効な被害回避法であり、ジャガイモ、イチゴ、サツマイモなどで広く利用されている。ウイルス感染株を高温処理や生長点培養によってフリー化することができるのである。しかし、ウイルスフリー苗の安定的な栽培のためにはウイルス再感染への対策や栽培条件変更の検討などの必要がある。

3. 植物ウイルスの最新の分類

1) 植物ウイルスの命名法と種

2011 年までに ICTV に登録されたヒトや動物も含めたウイルスの総数は 2,420 種であり、それらの特性によって 395 の属に分類されている。それらの属の中で共通する特性を持つものは 94 科にまとめられ、さらに 6 つの目に整理されている。これら 2,420 の中には分類学的位置が確定していない種が多数あるとともに、今日も新しいウイルス種が見つかることから、まだ完成された分類体系ではないと思われる。

本マニュアルの**はじめに**でも簡単に紹介したように、植物ウイルスの命名に関しては、一般の生物で広く採用されている 2 名法はなじまないということで、ずっと以前から植物ウイルスは以下の 3 つを順番に並べた名称でよばれている。そして、表記はラテン語ではなく英語であり、植物名の頭文字は大文字とする。

【感染植物名】～【代表的な病徴の種類】～【ウイルス】

たとえばタバコにモザイクを生じるウイルスなのでタバコ～モザイク～ウイルスだから単純に *Tobacco mosaic virus* (短くするときには 3 つの頭文字をとって TMV)、キュウリにモザイクを出すウイルスなので *Cucumber mosaic virus* (CMV) などである。日本語での命名も同様に行われている。感染植物名や病名は日本語で表記されて *virus* はすべてウイルスとなるので、TMV はタバコモザイクウイルス、CMV はキュウリモザイクウイルスと呼ばれている。一部にはジャガイモ A ウイルス (PVA)、ジャガイモ M ウイルス (PVM)、ジャガイモ X ウイルス (PVX)、ジャガイモ Y ウイルス (PVY) など、またアスパラガスウイルス I (AspVI)、アスパラガスウイルス II (AspVII)、アスパラガスウイルス III (AspVIII) などのように単なるアルファベットや順番でよばれているウイルスもある。

植物ウイルスやウイロイドの新種の和名は、新種の発見者が日本植物病理学会の命名委員会に提案し、そこで審査されて決定される。この学会が 2012 年に発行した日本植物病名目録第 2 版に最新の和名も含めてすべて掲載されている。一方、英名については ICTV で決定されており、その最新版は 2009 年に改訂された第 9 次報告であり、その概要は ICTV の HP (<http://www.ictvonline.org/virusTaxonomy.asp?version=2009&bhcp=1>) で見ることができ、その内容は随時更新されている。また、その詳細は ICTV が 2011 年に発行した特に分厚い本である ‘Virus Taxonomy’ (King et al., 2011) で知ることができる。

2012 年 2 月に更新された ICTV による最新のウイルスの分類によると、植物に感染する植物ウイルスは 17 科 79 属に分類されている。その概要を表 3 に示した。なお、ICTV の分類では、Partitiviridae 科の後に来る Phycodnaviridae 科のウイルスは、藻類や植物プランクトンに感染することから植物ウイルスに含める研究者もいるが、一般の植物ウイルスとはいえないのでここでは省略した。一方、本マニュアルの 2-4) ウイロイドで紹介したウイロイドはその遺伝子の小ささと粒子を形成しない故に、ウイルスではなく Subviral Agents として分類されている。サテライトウイルスやサテライト核酸はそれ単独では増殖できないため、同様に Subviral Agents に含まれているが、これらは単独では感染性を示さず一人前のウイルスでないと考えられるので、表 3 には掲載しなかった。

表 3. 植物ウイルスの分類 (2012 年 ICTV より) (その 1)

ウイルス門・科・属の名称	Type virus	種数
Order: <i>Mononegavirales</i> (1/4 Families)		
Family: <i>Rhabdoviridae</i> (2/6 Genera)		
Genus: <i>Cytorhabdovirus</i> (9 Species)	<i>Lettuce necrotic yellows virus</i>	9
Genus: <i>Nucleorhabdovirus</i> (9 Species)	<i>Potato yellow dwarf virus</i>	9
Order: <i>Picornavirales</i> (1/5 Families)		
Family: <i>Secoviridae</i> (1 Subfamily + 5 Genera)		
Subfamily: <i>Comovirinae</i> (3 Genera)		
Genus: <i>Comovirus</i> (15 Species)	<i>Cowpea mosaic virus</i>	15
Genus: <i>Fabavirus</i> (4 Species)	<i>Broad bean wilt virus 1</i>	4
Genus: <i>Nepovirus</i> (34 Species)	<i>Tobacco ringspot virus</i>	34
5 Genera not in a Subfamily (5 Genera)		
Genus: <i>Cheravirus</i> (3 Species)	<i>Cherry rasp leaf virus</i>	3
Genus: <i>Sadwavirus</i> (1 Species)	<i>Satsuma dwarf virus</i>	1
Genus: <i>Sequivirus</i> (3 Species)	<i>Parsnip yellow fleck virus</i>	3
Genus: <i>Torradovirus</i> (2 Species)	<i>Tomato torrado virus</i>	2
Genus: <i>Waikavirus</i> (3 Species)	<i>Rice tungro spherical virus</i>	3
Genus: <i>Unassigned</i> (3 Species)		3
Order: <i>Tymovirales</i> (3/4 Families)		
Family: <i>Alphaflexiviridae</i> (4/6 Genera)		
Genus: <i>Allexivirus</i> (8 Species)	<i>Shallot virus X</i>	8
Genus: <i>Lolavirus</i> (1 Species)	<i>Lolium latent virus</i>	1
Genus: <i>Mandarivirus</i> (1 Species)	<i>Indian citrus ringspot virus</i>	1
Genus: <i>Potexvirus</i> (35 Species)	<i>Potato virus X</i>	35
Family: <i>Betaflexiviridae</i> (7 Genera)		
Genus: <i>Capillovirus</i> (2 Species)	<i>Apple stem grooving virus</i>	2
Genus: <i>Carlavirus</i> (43 Species)	<i>Carnation latent virus</i>	43
Genus: <i>Citrivirus</i> (1 Species)	<i>Citrus leaf blotch virus</i>	1
Genus: <i>Foveavirus</i> (4 Species)	<i>Apple stem pitting virus</i>	4
Genus: <i>Tepovirus</i> (1 Species)	<i>Potato virus T</i>	1
Genus: <i>Trichovirus</i> (5 Species)	<i>Apple chlorotic leaf spot virus</i>	5
Genus: <i>Vitivirus</i> (6 Species)	<i>Grapevine virus A</i>	6
Genus: <i>Unassigned</i> (6 Species)		6
Family: <i>Tymoviridae</i> (3 Genera)		3
Genus: <i>Maculavirus</i> (1 Species)	<i>Grapevine fleck virus</i>	1
Genus: <i>Marafivirus</i> (4 Species)	<i>Maize rayado fino virus</i>	4
Genus: <i>Tymovirus</i> (25 Species)	<i>Turnip yellow mosaic virus</i>	25
Virus families not assigned to an order (19/65 Families)		
Family: <i>Ausunviroidae</i> (3 Genera)		
Genus: <i>Ausunviroid</i> (1 Species)	<i>Avocado sunblotch viroid</i>	1
Genus: <i>Elaviroid</i> (1 Species)	<i>Eggplant latent viroid</i>	1
Genus: <i>Pelamoviroid</i> (2 Species)	<i>Peach latent mosaic viroid</i>	2
Family: <i>Bromoviridae</i> (6 Genera)		
Genus: <i>Alfamovirus</i> (1 Species)	<i>Alfalfa mosaic virus</i>	1
Genus: <i>Anulavirus</i> (1 Species)	<i>Pelargonium zonate spot virus</i>	1
Genus: <i>Bromovirus</i> (6 Species)	<i>Brome mosaic virus</i>	6
Genus: <i>Cucumovirus</i> (3 Species)	<i>Cucumber mosaic virus</i>	3
Genus: <i>Ilarvirus</i> (16 Species)	<i>Tobacco streak virus</i>	16
Genus: <i>Oleavirus</i> (1 species)	<i>Olive latent virus 2</i>	1
Family: <i>Bunyaviridae</i> (1/5 Genera)		
Genus: <i>Tospovirus</i> (8 Species)	<i>Tomato spotted wilt virus</i>	8
Family: <i>Caulimoviridae</i> (7 Genera)		
Genus: <i>Badnavirus</i> (18 Species)	<i>Commelina yellow mottle virus</i>	18
Genus: <i>Caulimovirus</i> (8 Species)	<i>Cauliflower mosaic virus</i>	8
Genus: <i>Cavemovirus</i> (2 Species)	<i>Cassava vein mosaic virus</i>	2
Genus: <i>Petuvirus</i> (1 Species)	<i>Petunia vein clearing virus</i>	1
Genus: <i>Solendovirus</i> (2 Species)	<i>Tobacco vein clearing virus</i>	2
Genus: <i>Soymovirus</i> (3 Species)	<i>Soybean chlorotic mottle virus</i>	3
Genus: <i>Tungrovirus</i> (1 Species)	<i>Rice tungro bacilliform virus</i>	1

() 内が整数の場合：全部のウイルスが植物に感染する。

() 内が分数の場合：植物に感染するウイルス科・属・種の数 / 全部の科・属・種の数。

* タイプウイルスは菌類に感染するウイルスであり、植物には感染しない。

表 3. 植物ウイルスの分類 (2012 年 ICTV より) (その 2)

ウイルス門・科・属の名称	Type virus	種数
Family: <i>Closteroviridae</i> (3 Genera)		
Genus: <i>Ampelovirus</i> (8 Species)	<i>Grapevine leafroll-associated virus 3</i>	8
Genus: <i>Closterovirus</i> (9 Species)	<i>Beet yellows virus</i>	9
Genus: <i>Crinivirus</i> (12 Species)	<i>Lettuce infectious yellows virus</i>	12
Genus: <i>Unassigned</i> (1 Species)		1
Family: <i>Endornaviridae</i> (1 Genus)		
Genus: <i>Endornavirus</i> (6 Species)	<i>Vicia faba endornavirus</i>	6
Family: <i>Geminiviridae</i> (4 Genera)		
Genus: <i>Begomovirus</i> (196 Species)	<i>Bean golden yellow mosaic virus</i>	196
Genus: <i>Curtovirus</i> (7 Species)	<i>Beet curly top virus</i>	7
Genus: <i>Mastrevirus</i> (14 Species)	<i>Maize streak virus</i>	14
Genus: <i>Topocuvirus</i> (1 Species)	<i>Tomato pseudo-curly top virus</i>	1
Family: <i>Luteoviridae</i> (3 Genera)		
Genus: <i>Enamovirus</i> (1 Species)	<i>Pea enation mosaic virus-1</i>	1
Genus: <i>Luteovirus</i> (6 Species)	<i>Barley yellow dwarf virus-PAV</i>	6
Genus: <i>Polerovirus</i> (13 Species)	<i>Potato leafroll virus</i>	13
Genus: <i>Unassigned</i> (8 Species)		8
Family: <i>Metaviridae</i> (1/3 Genera)		
Genus: <i>Metavirus</i> (3/21 Species)	<i>Saccharomyces cerevisiae Ty3 virus *</i>	3
Family: <i>Nanoviridae</i> (2 Genera)		
Genus: <i>Babuvirus</i> (3 Species)	<i>Banana bunchy top virus</i>	3
Genus: <i>Nanovirus</i> (3 Species)	<i>Subterranean clover stunt virus</i>	3
Genus: <i>Unassigned</i> (1 Species)		1
Family: <i>Ophioviridae</i> (1 Genus)		
Genus: <i>Ophiovirus</i> (6 Species)	<i>Citrus psorosis virus</i>	6
Family: <i>Partitiviridae</i> (2/4 Genera)		
Genus: <i>Alphacryptovirus</i> (16 Species)	<i>White clover cryptic virus 1</i>	16
Genus: <i>Betacryptovirus</i> (4 Species)	<i>White clover cryptic virus 2</i>	4
Family: <i>Pospiviroidae</i> (5 Genera)		
Genus: <i>Apscaviroid</i> (10 Species)	<i>Apple scar skin viroid</i>	10
Genus: <i>Cocadviroid</i> (4 Species)	<i>Coconut cadang-cadang viroid</i>	4
Genus: <i>Coleviroid</i> (3 Species)	<i>Coleus blumei viroid 1</i>	3
Genus: <i>Hostuviroid</i> (1 Species)	<i>Hop stunt viroid</i>	1
Genus: <i>Pospiviroid</i> (9 Species)	<i>Potato spindle tuber viroid</i>	9
Family: <i>Potyviridae</i> (7 Genera)		
Genus: <i>Brambyvirus</i> (1 Species)	<i>Blackberry virus Y</i>	1
Genus: <i>Bymovirus</i> (6 Species)	<i>Barley yellow mosaic virus</i>	6
Genus: <i>Ipomovirus</i> (4 Species)	<i>Sweet potato mild mottle virus</i>	4
Genus: <i>Machuravirus</i> (6 Species)	<i>Machura mosaic virus</i>	6
Genus: <i>Potyvirus</i> (143 Species)	<i>Potato virus Y</i>	143
Genus: <i>Rymovirus</i> (3 Species)	<i>Ryegrass mosaic virus</i>	3
Genus: <i>Tritimovirus</i> (4 Species)	<i>Wheat streak mosaic virus</i>	4
Genus: <i>Unassigned</i> (3 Species)		3
Family: <i>Pseudoviridae</i> (2/3 Genera)		
Genus: <i>Pseudovirus</i> (15/20 Species)	<i>Saccharomyces cerevisiae Ty1 virus *</i>	15
Genus: <i>Sirevirus</i> (5 Species)	<i>Glycine max SIRE1 virus</i>	5
Genus: <i>Unassigned</i> (1 Species)		1
Family: <i>Reoviridae</i> (2 Subfamilies)		
Subfamily: <i>Sedoreovirinae</i> (1/6 Genera)		
Genus: <i>Phytoreovirus</i> (3 Species)	<i>Wound tumor virus</i>	3
Subfamily: <i>Spinareovirinae</i> (2/9 Genera)		
Genus: <i>Fijivirus</i> (8 Species)	<i>Fiji disease virus</i>	8
Genus: <i>Oryzavirus</i> (2 Species)	<i>Rice ragged stunt virus</i>	2
Family: <i>Tombusviridae</i> (8 Genera)		
Genus: <i>Aureusvirus</i> (4 Species)	<i>Pothos latent virus</i>	4
Genus: <i>Avenavirus</i> (1 Species)	<i>Oat chlorotic stunt virus</i>	1
Genus: <i>Carmovirus</i> (16 Species)	<i>Carnation mottle virus</i>	16
Genus: <i>Dianthovirus</i> (3 Species)	<i>Carnation ringspot virus</i>	3
Genus: <i>Machlomovirus</i> (1 Species)	<i>Maize chlorotic mottle virus</i>	1
Genus: <i>Necrovirus</i> (7 Species)	<i>Tobacco necrosis virus A</i>	7
Genus: <i>Panicovirus</i> (1 Species)	<i>Panicum mosaic virus</i>	1
Genus: <i>Tombusvirus</i> (17 Species)	<i>Tomato bushy stunt virus</i>	17
Genus: <i>Unassigned</i> (2 Species)		2

表 3. 植物ウイルスの分類 (2012 年 ICTV より) (その 3)

ウイルス門・科・属の名称	Type virus	種数
Family: <i>Virgaviridae</i> (6 Genera)		
Genus: <i>Furovirus</i> (5 Species)	<i>Soil-borne wheat mosaic virus</i>	5
Genus: <i>Hordeivirus</i> (4 Species)	<i>Barley stripe mosaic virus</i>	4
Genus: <i>Pecluvirus</i> (2 Species)	<i>Peanut clump virus</i>	2
Genus: <i>Pomovirus</i> (4 Species)	<i>Potato mop-top virus</i>	4
Genus: <i>Tobamovirus</i> (25 Species)	<i>Tobacco mosaic virus</i>	25
Genus: <i>Tobravirus</i> (3 Species)	<i>Tobacco rattle virus</i>	3
Family: <i>Unassigned</i> (10/13 Genera)		
Genus: <i>Benyvirus</i> (2 Species)	<i>Beet necrotic yellow vein virus</i>	2
Genus: <i>Cilevirus</i> (1 Species)	<i>Citrus leprosis virus C</i>	1
Genus: <i>Emaravirus</i> (1 Species)	<i>European mountain ash ringspot-associated virus</i>	1
Genus: <i>Idaeovirus</i> (1 Species)	<i>Raspberry bushy dwarf virus</i>	1
Genus: <i>Ourmiavirus</i> (3 Species)	<i>Ourmia melon virus</i>	3
Genus: <i>Polemovirus</i> (1 Species)	<i>Poinsettia latent virus</i>	1
Genus: <i>Sobemovirus</i> (13 Species)	<i>Southern bean mosaic virus</i>	13
Genus: <i>Tenuivirus</i> (6 Species)	<i>Rice stripe virus</i>	6
Genus: <i>Umbravirus</i> (7 Species)	<i>Carrot mottle virus</i>	7
Genus: <i>Varicosavirus</i> (1 Species)	<i>Lettuce big-vein associated virus</i>	1
Genus: <i>Unassigned</i> (2 Species)		2
種の合計数		990

() 内が整数の場合：全部のウイルスが植物に感染する。

() 内が分数の場合：植物に感染するウイルス科・属・種の数 / 全部の科・属・種の数。

* タイプウイルスは菌類に感染するウイルスであり、植物には感染しない。

2) 植物ウイルスの科・属・種

植物ウイルスでは、比較的最近までは共通した性質を示すものをまとめてグループとして分類していた。最近になって他の生物の分類に近づくべく、グループという表現はやめて、複数の種をその形・伝染方法・宿主域・塩基配列などによってまとめて属とし、類似した属をさらにまとめて科としてまとめるようになった。こうして植物ウイルスは他の生物と同様に科・属・種に分類されるようになり、それらの数は着実に増えてきており、それらの科・属の名称もラテン語表記となっている。しかし、その基盤となる種名については、他の生物のような 2 名法やラテン語が使われる見込みは当分の間ないと思われる。

最新の第 9 次 ICTV 報告では、植物ウイルスについては新たに発見確認された種の追加のために新しい科や属が追加されたり、既知のものに含められたりしている。1 属 1 種のユニークなウイルスについては、科に分類されている属だけを見ても 20 属以上あるが、これらは単に探索が遅れているだけかもしれない。すでに Fuji et al. (2013) などは単独種の属に新種の追加提案をしている。一方、植物ウイルスのすべての属の中で、特に種の数が多いものから 5 つを並べると表 4 のようになり、ジェミニウイルス科の中のベゴモウイルス属やポティウイルス科のポティウイルス属で 100 を越える種が見つかっており、これらの 2 属で特に種の分化が進んでいることがわかる。これら多くの種に分化しているウイルスは、現代農業で広く栽培されている作物種やそれらの栽培条件などにうまくマッチしながら、その変異を拡大して発生範囲を広げ、感染した植物に自分と同じウイルスをどんどん作らせていっている。これらのウイルスの今後の大発生への警戒やモニタリングが特に重要となっている。多種属ウイルスの収集についてジーンバンクでも特に積極的に取り組んで行く必要があると考えているが、そのためには機械的接種ができないジェミニウイルスについては何らかの工夫が必要である。

表 4. 特に種の数が多い植物ウイルス属

ウイルス属	各属の所属する科	種数	代表的なウイルス
ベゴモウイルス属	ジェミニウイルス科	192	TYLCV, TbLeV
ポティウイルス属	ポティウイルス科	146	PVY, TuMV
カルラウイルス属	ベータフレキシウイルス科	43	CaLtV, CVB
ポテックスウイルス属	アルファフレキシウイルス科	35	PVX, AlsVX
ネポウイルス属	セコウイルス科	34	TbRsV, TBRV

ウイルスの分類基準は、ICTV の専門家が提案し、相互に協議してわかりやすく、かつ数字などで明確に表示できる塩基配列の相同性や生物学的特性を基準として合理的に決定されているので、ぶれることはほとんどなく、新種候補がみつければその基準にそって検討され新種として認定される。新種認定の基準となる相同性の数値や遺伝子の部位は属により異なっている。たとえば、トスポウイルスでは N タンパク質遺伝子の相同性が 90% 未満のウイルスがみつければ新種となるが、ジェミニウイルスでは原則として全塩基配列の相同性が 75% 未満というのが新種の基準とされている。もちろん遺伝子の相同性だけではなく他の生物学的特性も重要であり、それらも新種かどうかの判断基準として考慮される。科属ごとの分類基準は、個々の分類単位で少しずつ異なっており、ICTV の冊子 ‘Virus Taxonomy’ にきちんと掲載されているので、それを参照されたい。なお、ICTV で種として認定されたウイルスはイタリックで表記されるので、本解説もそれにならっている。

【ミニコラム：ウイルスの宿主と分類】

ウイルスを属の単位でまとめて考えたときに、感染する宿主の範囲が最近になって拡大してきており、宿主の分類基準を飛び越えて感染するものも見つかってきている。たとえば菌類にのみ感染していたウイルス属の中に植物に感染するものが見つかったなど。この傾向は今後もウイルスの研究が進むにつれてさらに強まっていき、そのためにウイルス分類は境界にいるものが増えてきてしまい、次第にわかりにくいものになっていくと思われる。以前のように植物ウイルスだけを切り離していたときは植物ウイルス研究者にとってわかりやすい点も多くあった。ウイルス全体をまとめていこうという現在の ICTV の方針は、全体を統一して見ていくことにつながりウイルス全体を理解するためには重要であるが、わかりにくい点をふやしているという側面も生じてくるであろう。分類というのは元来、その時点で最も合理的と思われる所で線を引いて人間が区分しているものであり、よく考えて線を引いた後しばらくは明瞭に区分できるが、研究が進めばその引いた線の近辺にもいろんなものが見つかるためどちらにいったらよいかわからなくなっていく。自然とはそういうものであり、不便な面が大きくなるとまた全く新たな分類基準をヒトは作る事となる。もちろん、だからといって分類することが無駄な訳ではない、全体を整理して理解するためにはきわめて重要な助けとなるのだから。

4. 主要な植物ウイルスとその特性

ここでは、最近になってわが国で特に問題となっているウイルスについて、それらの概要を紹介する。特にエマージングウイルスとして世界中で問題となっている小昆虫媒介性ウイルスが現状では最も重要である。もちろん、これら以外のウイルスの中にも重要なウイルスはあるし、これから突然大きな問題となってくるウイルスもありうることはつねに考慮に入れておく必要がある。イネのウイルスももちろん重要であるが、機械的接種が不可能なウイルスが殆どであるために、現在ではジーンバンクの配布対象となっていないのでここでは解説に含めていない。

1) ジェミニウイルス

ジェミニウイルスはコナジラミやヨコバイによって永続的に長期間媒介（14 ページ参照）される小球形ウイルス粒子 2 個がくっついた双子型（ジェミニ）ウイルスの総称でジェミニウイルス科にすべて属する。ジェミニウイルス科の中でも特にコナジラミ伝搬性のベゴモウイルス属のウイルスは、近年急速に多くの種に分化が進んでおり、かつ世界中で分布を拡大して多発している大きなウイルス集団である。特にトマトでは多くの種が発生しており、被害も大きくトマト栽培の大きな阻害要因となっている。日本では特にトマトでの TYLCV の発生が最も多く、被害も大きくて、2012 年 4 月現在 37 都府県で発生が報告されている。わが国での TYLCV の発生初期には関東東海地域はマイルド系統、西日本はイスラエル系統と明確に分かれて発生していたが、現在は両方が発生しているところも増えてきており、系統の複雑化が生じている。TYLCV に感染して発病するとトマトの果実が殆ど収穫できなくなるので、トマト栽培農家にとって大きな脅威となっている。

これまでの懸命な防除対策の検討によって、媒介虫であるタバココナジラミの徹底防除や網目の細かい防虫ネットを利用した侵入阻止によって、トマトの TYLCV は防除可能であることが判明した。しかし、トマトハウスに保毒虫がただ 1 頭でも入ってくるとかなりの発病率となることもあり、その防除には細心の注意が必要である。野生トマトの持つ TYLCV 抵抗性品種の利用も進んできており、はじめは一方の系統のみに抵抗性のものが利用されたが、最近になって両系統に抵抗性を示す品種も作出され利用が始まった。TYLCV はまたトルコギキョウでも発生し葉巻症状を引き起こして被害を与えている。TYLCV の他に日本で主要農作物に発生しているジェミニウイルスには、TbLcV やカッコウアザミ葉脈黄化ウイルスなどがある。これらはトマトにも感染して病徴を出すうえに、これらに含まれているサテライト DNA が存在すると TYLCV の抵抗性を打破するかもしれないという報告も出されており、今後、これらと TYLCV との混合感染による変異に対する十分な警戒が必要であると思われる。

ジェミニウイルスの遺伝子は 1 本鎖の DNA であり、1 成分のものと 2 成分のものがある。TYLCV のように同じウイルスでも分離株によって 1 成分と 2 成分のものがあるようなウイルスも存在している。その中でも特にベゴモウイルス属は、爆発的といっても良いくらいウイルス種の数が増加してきている、2012 年 3 月現在で 193 種がすでに ICTV に登録されており、最近までずっと植物ウイルス界でトップに君臨し続けていたポティウイルスを抜き去って、植物ウイルスでは最大の属となっている。ベゴモウイルスでは類縁関係の比較的近いウイルスが重複感染して発生することもあり、また感染には必須ではないサテライト DNA を含むウイルス株もあって、その遺伝子解析や病徴決定因子の解析をむずかしくしている。さらに最近になって急速にサテライト DNA を含むジェミニウイルスが増加しており、これがジェミニウイルスの急速な変異や種の増加にも関連していると考えられている。

ジェミニウイルスについては、以前は熱帯から亜熱帯にかけての発生が多く、温帯地域での発生は問題とらなかったが、最近は温帯においても世界中で発生がほぼ同時多発的に起こっている。日本では、これまでのところトマトやトルコギキョウで被害が報告されているだけであるが、世界的にみるとトマトやピーマンなどのナス科作物ばかりでなく、キャッサバやワタ、ウリ科やマメ科作物でも各国で多発して被害も大きく大きな問題となっている。ジェミニウイルスに感染した植物では、特にその病徴が萎縮叢生という形で現れてくるものが多いために被害が激しく収量への影響が大きい。そのために、一度発生すると大きな被害を与えてしまうので、植物におけるエマーシングウイルスの一つとして恐れられている。幸いなことに、諸外国で発生して問題となっているマメ科、ウリ科、イネ科などの作物に被害をあたえるジェミニウイルスはまだ日本では発生していない。これらのジェミニウイルスの今後の侵入防止と万一侵入した場合の可能な早期撲滅対策を考えておくことが重要である。

2) トスポウイルス

トスポウイルスは、動物ウイルスが多いブニavirus科に属する植物ウイルスの属であり、アザミウマによって永続的に伝搬される、被膜を持った直径 100 nm 以上の大型球型ウイルスの総称である。発生しているトスポウイルスの種数はこここのところ急速に増加してきており、各ウイルスは世界的に多発しているために、トスポウイルスもジェミニウイルスとともにエマーシングウイルスとよばれて、その緊急の発生拡大防止

と防除対策の確立が緊急の重要課題となっている。

日本で発生しているトスポウイルスだけでも、TSWV、MYSV、IYSV、スイカ灰白色斑紋ウイルス (WSMoV)、インパチエンスネそ斑点ウイルス (INSV)、キク茎えそウイルス (CSNV)、トウガラシ退緑ウイルス (CaCV) の7種類がある。最近では、タイプウイルスであるTSWVの多数の作物での急速かつ全国的な発生拡大に続いて、トルコギキョウやネギ類 (ネギ、タマネギ、ワケギ) でのIYSVの発生、キュウリやメロンでのMYSVの発生などとその被害が拡大している。その後、さらにトマトなどでのCSNVやCaCVの発生も報告されている。また、各ウイルスが発生する作物の種類も増加してきているので、これからトスポウイルスへのさらなる警戒が必要である。

TSWVは1960年代にわが国に侵入し一部の県でピーマンやトマトで問題となったが、全国的な大発生には至らなかった。しかし、ミカンキイロアザミウマという新種の媒介虫の日本への侵入と発生拡大に伴って超広宿主域のTSWVは本当に多くの作物での全国的な発生となり、その被害の拡大と継続が心配され続けてきた。しかし、最近になって原因は不明であるが、なぜかTSWVの発生は沈静化してきている。もちろんまだまだ油断はできない。一方、ネギ類でのIYSVやウリ科でのMYSVの発生は、特に最近になって拡大し被害も大きくなってきている。

MYSVは静岡県の子実メロンにおいて世界で初めて見つかったウイルスであり、すぐに被害の激しさが想定されたこと、メロンでの発生しか認められていなかったことから、静岡県とメロン生産組合の連携協力によって発病株の早期抜き取りと媒介虫の防除が徹底的に行われた結果、本ウイルスの発生を完全になくすことができた。このように一度発生した植物ウイルスを撲滅したという事例は世界でも殆ど知られておらず、本ウイルスの撲滅は世界的にも希有なすぐれた防除例となった (池田ら, 2001)。しかし残念なことに、本ウイルスはその後、他地域のキュウリで発生して広がってしまい、ごく最近になって静岡県のキュウリにも発生してしまったということである。

網目の細かい防虫ネットを用いることで媒介アザミウマの侵入阻止が可能であり、これらのトスポウイルスによる被害軽減のために、細かい網目のネット利用が全国的に進んでいる。トスポウイルスは、世界的にはこれまでにすでに16種が見つかっており、今後もその種数と発生地域は増加拡大していくと思われ、その宿主域の広さもからんで、これからも突然の発生拡大と大被害が懸念される重要なウイルス属である。

【ミニコラム：ウイルスの宿主域と進化】

ベゴモウイルスやポティウイルスには、宿主域は限られているものも多く、1つのウイルスが植物の属を越えて感染することはほとんど無い。このように、種の数の特に多いウイルスたちは、個々の種が感染できる植物の範囲を限定しており、他の植物に感染するためには変異を起こして (あるいは起きてくる変異を利用して)、ウイルス種の数を増やしていくという戦略をとって成功してきていると思われる。これらに対して、CMVやTSWVは、1種のみで植物種のほとんどすべてに感染するという逆の戦略をとっている。両ウイルスはもちろん単独で思う存分広がっており、ウイルス戦略としてすぐれた成功者である。ところで、後の方の天才的な2ウイルスでも感染できない植物種がいくつかあると思われるが、それらの植物はどのような戦略あるいは特性を持っていて、これらの天才ウイルスの感染から免れているのであろうか。そのような植物の抵抗性機構の解明が進めば、新たな強力な植物ウイルス抵抗性につながるかもしれない。

3) ポティウイルス

ポティウイルスはウイルスがコードするHC成分の助けを借りることでアブラムシなどで容易に非永続的に伝搬される (16 ページ参照) 長さ 700 ~ 850 nm のほそ長いひも状の形態をしたウイルスの総称であり、ジェミニウイルスについて多くの種に分化している重要なウイルスである。タイプウイルスはPVYであり、世界中のジャガイモに広く発生している。ポティウイルスには病徴の激しいウイルスもあり、それらが特に農業上は大きな問題となる。ポティウイルスは宿主側から見て種特異性が比較的高く、ある作物ではこのポティウイ

ルス種が発生するが、他の作物では他のポティウイルス種が発生するという性格が強いのが一般的である。たとえば、アブラナ科作物で発生が多いのは TuMV、マメ科作物一般では BCMV、ダイズでは SMV、ウリ科では ZYMV や WMV、ジャガイモでは PVY、コムギでは WYMV、オオムギでは BaYMV などといった具合である。ポティウイルスの遺伝子である 1 本鎖 RNA は、植物ウイルスとしてはサイズが大きく、その遺伝子構造は複雑で 9 つもの遺伝子を有していて、それらの機能は現在でも十分に解明されたとは言い難い。その特徴の一つはアブラムシなどで媒介されるために必要なウイルスタンパク質 HC をコードしているという点である。そのためもあって、ポティウイルスはアブラムシ伝染しやすいので、防除に際しては特に注意が必要である。日本ではこれまでに上にあげた 8 種のポティウイルスが主として問題となってきた。最近になって、発生が確認されて新たに問題となっているものとしてウメの仲間が発生する PPV があり、核果類果樹に被害発生が懸念されるところから、その蔓延防止のために感染ウメ樹の伐採が行われている。

【ミニコラム：サテライト核酸とサブゲノミック RNA】

サテライト RNA は、いろんな植物ウイルスで見つかったが、それ単独では感染増殖ができない病原であり、ヘルパーウイルスを必要とする低分子 RNA の総称である。サテライト RNA には、小さい 300-400 塩基からなる CMV 依存のもの他に、ネポウイルスであるアラビシモザイクウイルス等に依存する約 1,500 塩基からなる大きなものまである。これらの中には、ヘルパーウイルスの病徴に影響するものとししないものがある。サテライト RNA はサイレンシング標的決定機能等を持つ 20-25 塩基からなる低分子 RNA よりかなり大きい。これらの 300-500 塩基程度の大きさの RNA も植物体内で重要な機能を持つものがあると考えられ、その機能の解明の足がかりとして、ウイロイドやサテライト RNA の植物への影響や植物因子との相互作用の解明は役立つことが期待される。2012 年になって、単独で接種された CMV のサテライト RNA が核内に移動し、そこで一部複製されることが明らかとなり、ウイロイドとサテライト RNA との類似性が高まるとともに、これらはもともと何らかの機能を持っていたのではないかということが示唆される報告が出された (Choi et al., 2012)。

サテライト DNA はベゴモウイルス依存のものが多く、 α と β にわけられており、その大きさはヘルパーウイルスのほぼ半分の約 1,350 塩基である。これらにもヘルパーウイルスの病徴に影響するものとししないものがある。 α はナノウイルスの複製酵素遺伝子を含むもので、移行と昆虫伝搬にヘルパーが必須である。 β はナノウイルスとも無関係で複製・移行・伝搬のすべてにヘルパーを必須としている。

一方、サブゲノミック RNA というのは、ウイルス RNA からウイルスタンパク質が合成される時に、その一部が mRNA として合成され、そこからウイルスタンパク質が合成されるようになるものをいい、特に大量に合成されるウイルスの外被タンパク質の合成のために利用されることが多い。サブゲノミック RNA は、完全にウイルス RNA の一部であり、ヘルパーウイルスの塩基配列とは全く異なる配列を持つサテライト RNA とは明確に異なるものである。

4) ククモウイルス

ククモウイルスは、アブラムシによって極めて効率的に媒介される直径約 30 nm の小さな球形ウイルスの総称である。その代表が CMV であり、他に PSV と TAV がある。これらは世界の温帯地域において、CMV は特に野菜や花き類で、PSV はマメ科作物で多発している。TAV は一部トマト、ピーマン、キクなどで発生している。ククモウイルスはアブラムシで容易に非永続的に伝搬されるが、ポティウイルスとは異なり、そのために必要なヘルパータンパク質は有しておらず、ウイルス粒子があればアブラムシ伝搬されるのである。ククモウイルスの粒子は、アブラムシの口針が植物師管内に入ってくると、すぐに単独で付着し、アブラムシが次に健全植物を吸汁する際にはその口針からすぐに離れることができ、それによって簡単にウイルスの伝搬が行われるというきわめて単純で上品な無駄のないすぐれたシステムを持っている。ククモウイルスのゲノムは 1 本鎖 RNA であり、3 つの感染に必須な成分から構成されているのが大きな特徴である (図 2)。長い間、ククモウイルスには上記の 3 種しかなかった。しかし、最近になってククモウイルスの新種と思われるゲイフェ

ザーマイルドモザイクウイルスが、後で紹介する deep sequencing によって発見された。

CMV にはサブグループ I と II があり、両者は別種のウイルスとしてもよいほど類縁関係が離れており、各種植物での病徴も異なっている。CMV には感染しやすい植物によって、マメ科系・ダイズ系・ラゲナリア系・ユリ系などの系統がある。CMV の複数系統の重複感染などによって、これらの RNA 成分を交換した新しい組換え株 Reassortant ができることがあり、それが CMV の変異を増加させ、その幅を拡大していると考えられている。ウイルス株によってはこれらの他に感染には必須でないサテライト RNA を含むものもあり、特に CMV で多くの株が報告されている。サテライト RNA の多くは、CMV の病徴を軽減することが多いことから CMV の防除に利用されている（佐山，2003）。一方、サテライト RNA の中にはトマトの全身えそ症や葉の白化など顕著な異常を引き起こすものもあるので、その利用の際には十分な注意が必要である。

5) トバモウイルス

トバモウイルスは長さ約 300 nm の棒状粒子を持つウイルスの総称である。各ウイルスの宿主域は比較的狭く、ウイルス種によって決まっている。トバモウイルスは接触伝染や土壌伝染で発生を急速に拡大するために、一度発生するとその防除は難しいのが一般的である。タイプウイルスは TMV であり、その安定性及び純化精製の容易さの故に世界のウイルス研究を長い間リードしてきたウイルスである（岡田，2004）。わが国で 1970 年代にキュウリ及びスイカで大発生して大きな問題となった CGMMV や、日本のラン科植物に発生しているオドントグロッサム輪点ウイルス（ORSV）もこの仲間であり、その強い接触伝染力故に防除の面から見ると手強いウイルスたちである。

トバモウイルスは、小昆虫や菌類などによっては伝搬されず、作物の管理作業や収穫作業による苗どうしの接触やウイルスに汚染された土と根の接触によって容易に伝染される。そのため、トバモウイルスの防除は、トマトやピーマンでは抵抗性品種のあるものではその利用、ないものでは臭化メチルによる土壌消毒などで行われてきている。しかし、臭化メチルはそのオゾン破壊性のために国際条約によって 2013 年度からは日本では全く使えなくなるので、注意が必要である。抵抗性品種のないものでは臭化メチルの代替策として弱毒ワクチンなどの利用の検討が進められている（18 ページを参照）。

6) ウイロイド

ウイロイドは裸の 1 本鎖の小さな RNA 分子からなる病原体の総称である。日本では、比較的古くから知られているキクの矮化ウイロイドや、カンキツ類のエクソコーティスウイロイドなどが問題となっており、カンキツやブドウでは多くのウイロイドの発生が確認されている。ごく最近になって、わが国のトマトにおいて重要な 2 種のウイロイドの発生が報告された。一つは TCDVd で、もう一つは世界のジャガイモで問題となっている PSTVd である。早期に適切な対策をとったおかげで TCDVd については 2 県のみで発生でいちおう落ちつき、その後の発生報告はない。一方、PSTVd ははじめに見つかったトマトでは対応できたが、その後、見つかったダリアでは保毒ダリア苗がすでにいくつかの県に移動してしまっていたために、今後の対策が必要となっている。また、キクでも新しくキク退緑斑紋ウイロイドの発生が確認された。

ウイロイドは外被タンパク質を持たない裸の小さな RNA であるが、その高次構造のゆえに安定性は RNA にしては高いので、裸でしかも RNA だから不安定で発生拡大の心配はないと油断してはいけない病原である。ウイロイドは土壌伝染しないと思われているが、栄養繁殖性作物で株分けや挿し木・接ぎ木によって容易に伝搬し発生拡大するものが多く、また種子伝染するものがあるので注意が必要である。接触伝染もするが、特にトマトなどでは管理や収穫などの日常の作業によっても急速に発生が拡大するおそれがある。ウイロイドは病徴が不明瞭なことが多いので、まったく気がつかないうちに大発生となっていたという恐れもあるために、その対応にはトバモウイルスにも増した注意が必要である。ウイロイドでは特に無病徴感染植物が伝染源として重要となるので、近くにある植物について、ウイロイド感染が報告されていない種であるからと思って伝染源となりうる植物から除外して残しておいてよいと判断しないで、まず、感染の有無をきちんと遺伝子診断等で確認すべきである。なお次章でも説明するように、ウイロイドは外被タンパク質を持たないために抗血清診断では検出できないので、遺伝子診断か病徴の出る植物に接種して検出することとなる。

【ミニコラム：Top10 ウイルス】

British Society for Plant Pathology が発行している Molecular Plant Pathology 誌が世界の 250 人以上の植物ウイルス研究者にアンケート調査を行って分子生物学的に最重要と思われる Top 10 の植物ウイルスを選定している。その結果は 2011 年の第 9 号に掲載されている (Scholthof et al., 2011) が、TMV, TSWV, TYLCV, CMV, PVY, CaMV, ACMV, PPV, BMV, PVX のウイルスが順に選ばれている。ここでいう ACMV は African cassava mosaic virus, BMV はプロモモザイクウイルスのことである。日本で選ぶと一部は異なってくるであろうが、大きくは同じであろう。TMV がトップなのはさすがであり植物ウイルス研究の発展をこれまでずっと牽引してきたことが最大の理由であろう。タバコさえあればものすごく大量に増やすことができ、安定性がきわめて高く、純化精製も簡単、感染性の定量も *Nicotiana glutinosa* に接種すれば可能等等、数え上げるときりがなほどの研究面のメリットをもっているのが TMV である。しかし、これから 10 年後には状況はかわっているであろう、その時には違ったウイルスがトップにくることになる可能性が高い。TMV が利用される頻度は明らかに低下してきているためである。今回の選定で、ジェミニウイルスとポティウイルスから 2 種が選ばれているのは単に種の数が多いためばかりではなく、その農業上の重要性の反映であろう。PVX や BMV はその分子遺伝学的な研究面での重要性の故に選ばれたものと思われる。なお、当然これには続編があり、2012 年になって菌類や細菌の各 Top 10 の選定結果も掲載されている。

7) クリニウイルス

日本では 2008 年までは、コナジラミで永続伝搬されるひも状ウイルスとしては、オンシツコナジラミ媒介性のキュウリ黄化ウイルス (*Beet pseudoyellows virus*) が関東や四国地方の一部で問題となっていただけであったが、2009 年頃からタバココナジラミで媒介される CCYV が九州・四国・関東のメロンやキュウリで次々に発生して大きな問題となっている。この新規ウイルスはキュウリやメロンの葉を激しく黄化させてしまい、収量や糖度に悪影響を及ぼす。なお、最近になって本ウイルスの発生が確認されたスイカでは、えそを生じ枯死することもあるので注意が必要である。

一方、トマトでは 2008 年から栃木県でクリニウイルスに属するトマト退緑ウイルス (Tomato chlorosis virus) の発生が始まった。その後、隣の群馬県や九州の一部地域へと発生を拡大している。外国では本ウイルスのピーマンでの発生も報告された。困ったことに本ウイルスは、オンシツコナジラミ及びタバココナジラミの両方によって媒介されるので、今後の発生拡大に特に注意が必要と思われる。

5. 植物ウイルス実験法：特に保存に関連する重要な手法

本マニュアルは植物ウイルス保存をテーマとしているので、ここではその前提となるウイルスの特性解明や保存についての基本的な実験法（高価な機器を必要としない大切な手法）に重点をおいて解説する。特にこれまであまり解説されていないと思われる植物を使う手法である「1) ウイルスの接種法」～「4) 病徴観察」についてはできるだけ詳細に解説した。その他の「5) 植物ウイルス病の診断法」以降については、その冒頭で紹介している参考書等に詳しく解説されているので、重複する部分については本書では詳細は割愛した。詳しい解説やマニュアル等はそれらを参照されたい。本マニュアルの重要なテーマである植物ウイルス保存の具体的な手法については、本解説の「6. 植物ウイルスの保存マニュアル」で詳しく紹介する。

1) ウイルスの接種法：特に機械的接種法について

植物ウイルスの接種は、基本的には目的とするウイルスが、自然界で何によってどのように他の植物に移されるのかを調べ、それを再現することで行うこととなる。しかし、媒介虫や媒介菌を常に良好な状態で維持するためには、それに必要な施設や機器が必要であり、そのために時間も手間も経費も必要となる。一方、虫や菌類で伝搬されるウイルスの中には、機械的接種によって伝搬されるものも多い。そこで、ウイルスの接種のために最も多用されるのは、簡便な機械的接種ということになる。ジーンバンクでこれまでに配布されている

植物ウイルスもすべて機械的接種が可能なウイルスのみとなっているので、ここではこの機械的接種法についてのみ解説する。他の手法については他の実験法に関する参考書(37 ページに示した 2 冊等)を参照されたい。

機械的接種とは、植物の葉に細かい研磨剤などで機械的に傷をつけながら感染葉磨砕液を塗布することによってウイルスを接種するものであり、この接種法が容易で確実なことから多くの植物ウイルスで広く利用されている。葉に傷をつけるのは、植物ウイルスの細胞内への侵入口を作ってやるのが目的であり、これがないと植物ウイルスは細胞内にまれにしか入れないためほとんど感染できないことになるので、ウイルス接種にとってきわめて重要なポイントである。植物葉に傷をつけるための研磨剤としては、炭化ケイ素からできているカーボランダム (SiC) が一般に用いられており、他にパーライトなども使うことができる。市販されている SiC には、その粒子のサイズが異なるものがいくつかあるが、通常は 400 か 600 メッシュであり、このくらいの大きさのもので植物ウイルスの接種に十分に使える。より細かい粒子のものや粗いものもあり、特殊な場合にはそれらを使った方がよいこともある。

通常は、SiC を三角フラスコ等に 1/3 ～ 1/4 程度まで入れ、その口にガーゼ (通常の薬局で市販されているもの) をフラスコの口を十分にカバーできる大きさに切って 4 重～6 重にして、周囲を輪ゴムやタコ糸などでしっかりと止めておく。雑菌や植物ウイルスのコンタミネーション (汚染) の心配があるときは、ガーゼをとめる前に乾熱滅菌処理をしてから使用する。しばらく使っていると、ガーゼが目詰まりを起こして SiC の出が悪くなるので、適宜新しいものと交換する。

機械的接種の具体的な手順を図 5 に示す。接種源となる植物または感染葉、並びにその磨砕液を接種するためのウイルスに感染する植物を準備する。接種する植物は、窒素がやや過多気味で水をあまりきらせないように育てたものがよく、接種する葉としては柔らかい若い葉が向いており、古い下葉は避けた方がよい。接種の

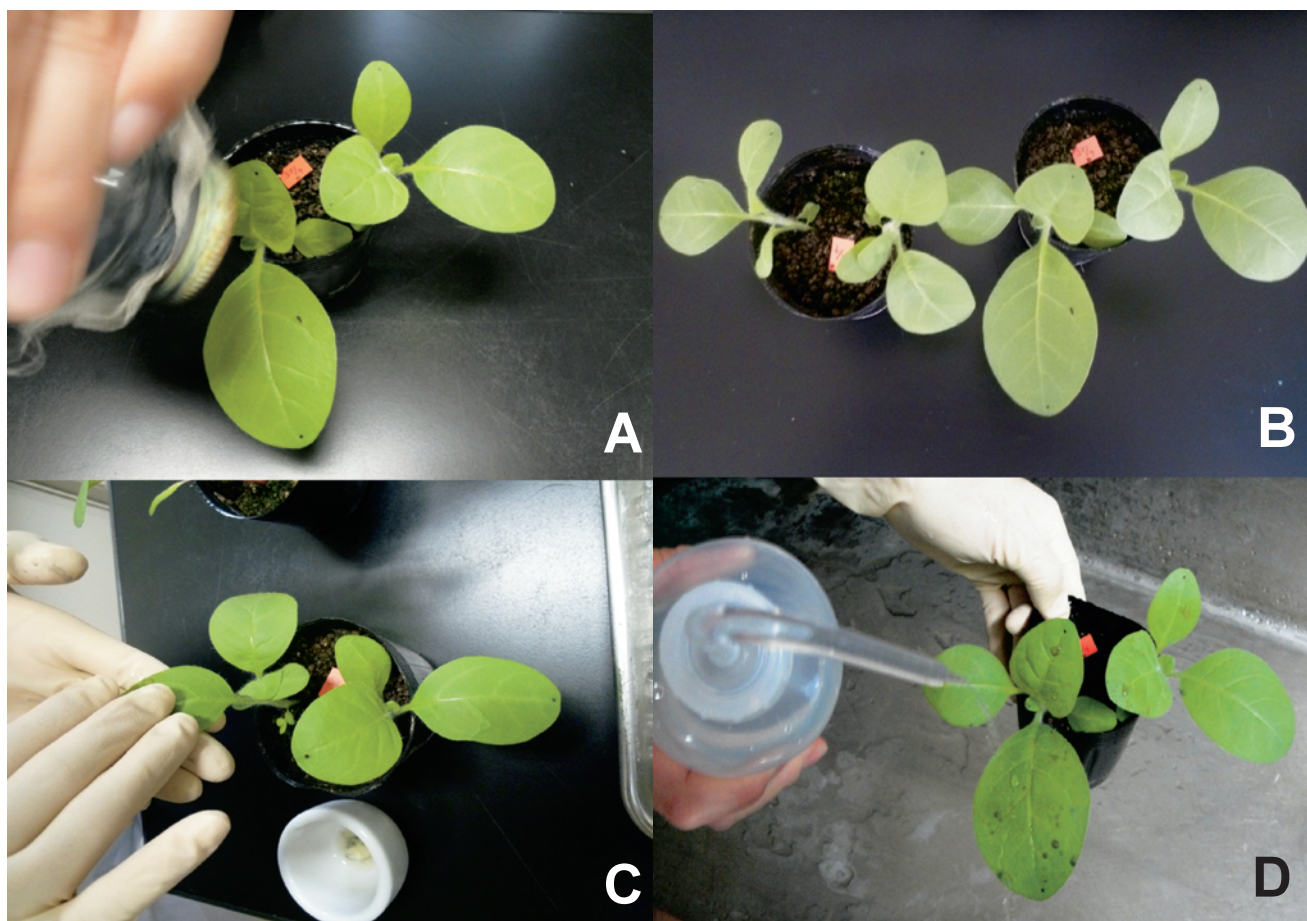


図 5. 機械的接種の具体的な手順

A : 接種植物へ SiC を振りかけているところ, B : SiC をかけ終わったところ,
C : 磨砕液を接種しているところ, D : 接種後の洗浄.

際にはエイジもあまり進んでいない若い植物を選んで接種に用いる。これは、エイジの進んだ古い植物は一般にはウイルス感受性が低下するためである。接種する植物と葉が決まったら、接種しようと思う葉に、三角プラスチックを逆さにして SiC を少量ずつ、できるだけ均一になるようにふりかけておく。SiC は保存の際は湿気を避けて保管するとよいが、デシケーターなどに入れておく必要はない。

ここまで準備ができたところで、感染葉の磨砕に進む。この際には、必ずオートクレーブか乾熱滅菌してしましておいた清潔な乳鉢と乳棒を用いることが肝要である。これは他のウイルスのコンタミネーションを防止するために極めて重要である。TMV のように *in vivo* でも *in vitro* でも安定なウイルスでは問題とならないが、安定性が低いウイルスの場合には、感染葉を磨砕する際に、緩衝液に何らかの酸化防止剤を添加することとなる。これは、植物葉に含まれるポリフェノールオキシダーゼをはじめとする酸化酵素が磨砕液中に出てきてウイルスの感染性を低下させるので、それらの働きを抑えるためである。

感染葉の磨砕の際に用いる緩衝液としては中性のリン酸緩衝液を用いるのが一般的であるが、それはリン酸が植物のウイルス感受性を増強するという事実に基づいている。保護剤としては、以前はメルカプトエタノール (ME) などが頻繁に使われていたが、現在では ME は毒物の指定を受けていて保管や使用に特別の許可が必要となっており使いにくいのが実状である。亜硫酸ナトリウムやアスコルビン酸は、水にとけやすく使いやすいので、いずれかを 0.5 ～ 1% 程度添加して使用するとよい。特に安定性の低いトスポウイルスではこれを加用すべきである。磨砕する乳鉢や乳棒はあらかじめ氷に浸けておいて冷やしたものをを用いるとよいことが多い。少量の葉の磨砕には、乳鉢乳棒でなく、市販されている使い捨てのフィンガーマッシャー (井出ら, 2011) を用いてもよい。これなら、自分の指ではさんで擦りあわせるだけで十分に磨砕できるし、どの程度磨砕できたかを指で感じるができる。いずれにしても、感染葉は十分に磨砕しておくことが肝要である。もちろん、乳鉢乳棒、手袋や綿棒等はウイルス株やウイルス種ごとに新しい物と取り替えながら接種していくことは当然なことである。

これらの準備ができたところで、ようやく接種を行うこととなる。通常は感染葉磨砕液に浸した綿棒で、SiC をふりかけた葉を『力をいれすぎない程度にしっかりと』こすりつける。この『』の中が重要なところであり、こすりつける力が強すぎると後で葉の接種部がえそを起こして枯れてしまい、ウイルス感染もおこりにくくなる。一方、力が弱すぎると傷がつかないために、ウイルスが侵入できず、やはり接種に失敗する。この力加減は経験で会得するしかないが、それほど難しいことではない。接種のために葉を擦る際には、感染植物磨砕液をしみこませた綿棒 (通常の薬局などで販売しているものでよい) で擦ってもよいし、使い捨ての新品のビニル手袋や実験に用いる薄手の手袋を着用して磨砕液に人差し指を浸して、その指でこすってもよい。接種する植物の葉がタバコの大きい葉のように面積が広い時は、1 本の指ではなく、4 本の指を磨砕液に浸して接種してもよい。接種が終わったら、新鮮な水道水で SiC を洗い流す感じで接種した葉をやさしく洗浄する。その後、しばらくはエアコンの風や自然の風が直接あたらないところに置いておく。もちろん、直射日光は厳禁である。心配な場合は 2 時間～1 夜清潔な新聞紙などをかけておくともよい。

接種した植物は、虫などがはいらないガラス温室やビニル温室の中で、ウイルスが増えるまで一定期間おいておく必要がある。温室内に虫が入ってしまうと、その中には検定対象としていないウイルスを保毒伝搬するものがあり、温室内のウイルス感染植物から健全植物へウイルスを伝搬する虫がいたりして、実験をだめにしてしまう危険が生じるからである。もちろん、葉を食されても困る。虫に対する注意ばかりでなく、TMV のように容易に接触伝染するウイルスに感染しているものに触れた時には、コンタミネーション防止のために、事前に十分に手指を石けん等で洗浄してから、接種や観察を行うようにすることも重要である。

ウイルス感染が疑われる植物から接種する際に特に気をつけるべき一般的な事項として以下の点があるので、参考にされたい。

- ① ウイルス濃度の高そうな部位を選ぶこと：えそ症状が進んでいる葉や下葉は避け、できるだけ若い葉で新鮮と思われる病徴部位を選んで接種源とする。葉 1 枚や半葉とかにこだわらないで、病徴の特に明瞭な部分のみを集めて接種源とするようにした方がよい。
- ② 大きな植物や葉から接種するときには、特に磨砕中にも酸化が進み褐変しやすいので、必ず酸化防止剤 (31 ページ) を加用し、氷で冷やしながら磨砕して接種すること。花が咲いていれば、新鮮な花卉

を磨碎して接種するとよい場合もある。

- ③ ピーマンなどのトウガラシ類から接種するときには、これらの葉には感染阻害物質 (IS) が含まれているので、必ず同じ種であるピーマンなどにも接種しておく方がよい。というのは、一般的に IS は同種の植物には作用しにくい、近縁な植物であっても他種には作用するためである。たとえば、ピーマンの IS は同じナス科のタバコなどには IS が働いてしまい、接種しても感染しないことが多い。アカザ科植物から接種するときも同様で、必ず、アカザ科植物にも接種しておく。これらの IS を多く含む植物からタバコなどに接種する際には、PEG を加え沈殿させたウイルス (47 ページ) を緩衝液に懸濁して接種するとよい。もし、対象作物に花が咲いていれば花卉には IS が少ないので、新鮮な花卉や蕾の花弁部を接種源としてみるとよい。感染葉を凍結乾燥してから接種源とするとうまくいくこともある。

- ④ 上のような植物でなくとも、通常はウイルス調査が行われていない植物などでは、同様に感染阻害物質を含んでいる可能性がある、③と同様な注意が必要である。たとえば、オシロイバナやリンドウ等には強力な感染阻害物質が含まれているという報告がある。

次に一度接種して発病した植物から感染葉をとって、他の健全苗に接種する際に留意する点として以下のポイントがある。ポティウイルスなどではウイルス接種によって軽いモザイク症状などが接種 5 日くらいで現れることがあるが、ウイルスはまだきちんと増殖していないために、それから継代接種してもウイルス感染が起きないことがあるので、8 日以上経過してから継代接種を行うようにする。逆にえそ症状が激しい他のウイルスの場合には、接種後日数が経過しすぎると、病原性が低下して、継代できなくなるので注意が必要である。一度接種して病徴の出た植物から接種すると、ウイルス濃度が高くなっていることなどのために、病徴が最初のときよりも早く出やすいことや、植物種によっては病徴が少し変化する場合もあることは知っておいた方がよい。

2) ウイロイドおよびウイルス RNA の接種法

ウイロイドはその遺伝子 RNA の周囲に外被タンパク質を有していないために、一般の植物ウイルスと同様な手法で接種しても、磨碎液の中に含まれる主に植物由来の RNA 分解酵素等によって分解されてしまつてほとんど感染性しないことから、接種には特別な注意が必要となる。ウイロイドの接種は以下のように行う。あらかじめ氷冷しておいた滅菌乳鉢乳棒を用い、病徴の明瞭な感染植物葉に高圧滅菌した緩衝液を加えて磨碎してえた磨碎液を、滅菌した綿棒またはガラスのヘラにつけて、滅菌カーボランダムを表面に散布した検定植物の葉にこすりつける。また、別の接種法として、感染植物の茎葉を切り付けたナイフの刃で、健全な植物の茎葉を数回切りつけるという方法でも、ウイロイドは接種可能である。

植物ウイルスの多くは 1 本鎖 RNA のプラスセンスのゲノムを有することから、ウイルス RNA のみを接種してもウイルスが増殖してくる。ウイルス RNA を接種する場合も、上のウイロイドと同様に行えばよいが、切り付け法は成功しにくい。RNA やウイロイド接種の際の緩衝液としては、pH 8.4 ~ 9.0 の弱アルカリ性のリン酸緩衝液かトリス緩衝液を用いる方が感染率が高くなる。多くの植物ウイルスは、純化ウイルスや感染植物葉から、フェノール抽出などでウイルスや植物由来のタンパク質を除いて得た核酸を、RNA 接種法により接種すると感染させることができる。しかし、中にはそのような処理をすると感染性を示さない、マイナスセンス RNA や 2 本鎖 RNA を持つウイルスもあるので注意が必要である。たとえば、トスポウイルスはタンパク質を取り除いた RNA では感染性を示さない。また、DNA ウイルスであるカリモウイルスやジェミニウイルスのウイルス粒子から抽出した DNA も感染性を示さない。

いずれにしても、遺伝子実験でも同様であるが、RNA を取扱う際に注意すべき以下のことは RNA 接種に際しても重要である。① RNA 分解酵素はヒトの手や汗や唾液の中にも含まれているので、直接実験器具にふれないこと、②実験器具や緩衝液などはすべて滅菌しておき、実験台は常に清潔にしておくこと、③使用する水は滅菌水に限定すること、④ RNA を扱う実験機器や器具はできる限り DNA やタンパク質用のものとは区別して専用のものとしておくこと。

3) 植物ウイルスの分離法・単離法

植物にウイルスの感染が疑われ、そのウイルスの特性を解明することによってウイルス種を特定するときには、まず単病斑分離（1個の局部病斑を接種源として接種すること）を繰り返して、ウイルスを単離してから研究を進める方が効率的な事が多い、また科学的にもそのようにすべきであるので、その単離方法について紹介する。野外の植物はもちろん、ハウス内の植物でも複数ウイルスに重複感染していることが比較的多く、それらを個別のウイルスに分離して、個々のウイルスについて研究を進め、それらを総合して全体を解析することで再現性を担保することができる。また、変異をおこしているウイルス等が共存している場合に変異ウイルスを除く場合、サテライトウイルスやサテライト核酸など解析を複雑にするものをひとまず取り除く場合にも、以下に紹介する単離法は有効である。

ウイルスを単離するためには、まずそのウイルスが感染した場合に局部病斑を形成する宿主植物を見つける必要がある。最も可能性が高いのはアカザ科のキノア *Chenopodium quinoa* やアマランティカラー *C. amaranticolor* であり、まずはこれらの苗を育成して上で紹介したように機械的に接種してみる。いずれか1種でもよいので、ウイルスの実験をする間はこれらのアカザ科の植物苗を少数ずつ継続して育てておくといよい。接種後2-10日ぐらいで接種葉にえそ性あるいは退緑性の斑点（病斑）が生じてくればしめたものである。早めに病斑が出る場合にはえそ性であることが多く、病斑内でウイルスの増殖が停止するものが多い。退緑性の病斑の場合には、病斑が肉眼で明瞭に見える時とみえにくい場合があるので、気をつける必要がある。退緑斑の場合には、ウイルス病斑の外でも増殖が進み、ウイルスが広がってしまい後になって全身感染することが多い。

これら2種のアカザ科の植物をまず使うのは、アカザ科の植物は多くのウイルスに対して局部病斑を生じやすいことがわかっているからである。まれにはキノアはだめでアマランティカラーでないと明瞭な局部病斑を作らないウイルスや系統もある。どちらも駄目な場合には、他のアカザ科植物、ササゲ、センニチコウ、キンギョソウ、タバコ、ソラマメなどに接種して試してみるとよい。これらの植物は、植物ウイルスを接種して局部病斑を作ったという報告があるからである。もし、原宿主でえそ斑や退緑斑が出ていたなら、同じ植物で健全な苗に接種する。原宿主でえそ斑や退緑斑が出ていない場合でも同種植物の異なる品種や野生種、類縁植物に接種してみると良いこともある。同じ植物種でも、品種によってその反応が大きく異なることは、植物ウイルスではよくあるからである。どうしても局部病斑植物が見つからない場合には、手間がかかるが、感染ウイルス単離のために以下の③のように全身感染植物を使うことになる。

これらの調査を行った結果は以下の3つのいずれかになる：①接種葉に明瞭なえそ病斑のみを作る場合、②接種葉に退緑病斑を作る場合、③局部病斑植物が見つからなかった場合。以下にそれぞれの場合にわけて単離法を説明する。病斑を切り出す際には、手袋をした両手で両刃のカミソリの刃をまず中央で2つに折って、さらに各片方を2つか3つに折ったものを多数作っておいて使うと良いので、以下ではこれを折刃とよぶこととする。カミソリの刃なので、怪我をしないようにつねに注意して扱うことは当然である。

- ① えそ病斑のみの場合：最も簡単に単離ができる。接種後、病斑が明瞭になってきたら、その病斑より少し大きめに病斑部を中心に折刃で切り出す。えそが進んでいるところでは、植物細胞死が起こっていて、ウイルスも失活している可能性が高く感染性が低いことが多いので、病斑部のみをギリギリで切り出してしまうのはあまり良くない。少し廻りの健全と思われる部分も一緒に切り出すとよい。もちろん、その際に隣の病斑に近づきすぎたのでは、単病斑分離にならないので、接種葉全体を見て病斑が相互に十分に離れた部分の病斑を選んで切り出すようにする。その際に、葉の下には通常のスライドグラスなどをあてて支えとして用いる。切り出した病斑をスモーク付きのスライドグラスのスモーク部分に静かに置き、中性リン酸緩衝液を1,2滴たらし、一端を押しつぶして平らにしたガラスヘラなどで押しつぶし、その磨砕液をつけた同じヘラで機械的に健全な他の局部病斑植物の葉に接種する。局部病斑を磨砕する時には、厚手のスライドグラスの一部を丸く切り取ったものや、小さめの乳鉢乳棒を使ってもよい。もちろん、これら使用する器具はすべて乾熱滅菌をしておくか、新品を新品の手袋などで扱ったものを使用すること。ここで、トバモウイルスやCMVなどを混入させてしまえば、その後の仕事はすべて無駄となる。

病斑磨砕液を接種した葉に病斑が現れたら、同じことをもう一度繰り返して行って、再度分離する。そして再分離に用いた葉に病斑がでたら、もう一度だけ分離を繰り返す。3度目の病斑がでてきたら、その病斑を切り出して磨砕した液を今度は全身感染植物に接種して発病させる。それが発病したところで単病斑分離株として解析に用いることができる。このように単病斑分離は少なくとも3回は繰り返す必要があり、6回くらい繰り返す場合もある。ここで注意することは、えそ斑が出てから日数が経過しすぎるとウイルスの活性が低下してしまい、磨砕液を接種しても病原性がなくなっていることが多いので、病斑が見えてきたら早めに磨砕して接種することである。

- ② 退緑病斑の場合：局部病斑がほぼ明瞭になってきた時点で、①と同様にして病斑を切りだして、磨砕して接種する。この際に気をつけることは、退緑斑の場合にはウイルスは、その部分にのみ局在しておらず、周囲にも広がっている可能性があるということである。病斑が出現してからあまり日数が経過すると単病斑とはいえなくなるので、早めに行う方がよい。その他の点は、①と同様に折刃とスライドグラスなどを使って行うとよい。
- ③ 局部病斑植物がない場合：全身感染植物の感染葉を磨砕して、通常は10倍ずつの段階希釈液を作成する。それを各々10本ずつ程度の健全植物に接種する。発病したら感染率を調査し、希釈が高い区ほど発病株が少ないことを確認し、1～2株のみ発病した区の発病株から、感染葉を取って最初と同様に接種する。そして同様に1～2株のみ発病した区の発病株から、感染葉を取って同様に接種する。この分離を3回以上行って最終的に発病した株を分離株とする。もちろん、この方法はあくまで便法であり、えられた株は厳密には単病斑分離株ではないことを理解しておく必要がある。ウイルス濃度が低いと思われる場合には10倍ではなく5倍ずつかそれ以下の段階希釈とする。
- ④ 異なるウイルスが重複感染している場合：このような場合には、上の単病斑分離の前に目的のウイルスをあらかじめ単離しておく必要がある。運がよい場合には、対象植物の磨砕液を接種した *Chenopodium* spp. の接種葉にえそ性と退緑性の2種の病斑が出てくれて、それらをくりかえして別々に分離すればよいという場合もある。また、一方のみがこれらに局部病斑を作る場合もあり、このような場合には局部病斑を作ったウイルスの方は問題なく単離できる。2種ウイルスが両方ともえそ斑を生じる場合、退緑斑を生じる場合も同様に単離できる。これらの場合には病斑の現れるまでの日数なり、外観などが多少とも異なることが多いので、それらの違いを利用することによってどちらのウイルスかを識別できる。もちろん、それぞれのウイルスの宿主域が異なる場合には、一方のウイルスAのみが増殖する植物種Aに接種してウイルスAを分離し、ウイルスBのみが感染する植物種Bに接種してウイルスBを分離できるので簡単に単離できてしまう。トバモウイルスがポティウイルスやポテックスウイルスと重複感染している場合、ポテックスウイルスとポティウイルスが重複感染している場合がこれに当たる。3種以上の重複の場合も同様に行うとよい。

しかし、実際の現場で複数ウイルスが対象作物に重複感染しているという場合には、CMVとポティウイルスの重複感染というのが最も多い。ちょっと考えると *Chenopodium* spp. に磨砕液を接種すれば、接種葉にCMVによる早めのえそ病斑とポティウイルスによる遅めの退緑病斑が出てくれてラッキーということで簡単に分離できるように思えるが、実際にはそうはいかない場合がほとんどである。通常はCMVの方がずっとよく増殖しているために、早めにできてくるCMVによる病斑が多すぎて、ポティウイルスによる遅く出てくる病斑が現れてこないか、たとえ現れてもCMVのものと重なって分離できない場合が多いので困ってしまう。この場合には希釈度を高くして接種してもほとんど解決にはならない。また、CMVの宿主域が広すぎるために、CMVとポティウイルスではポティウイルスが増殖する植物すべてにおいて、CMVも増殖することがほとんどである。このような場合には重複感染ウイルスの宿主域が重なってしまって、植物種を選ぶ方法では簡単には両ウイルスを分離できない。このようなケースの対処法について次に考えてみよう。

ポティウイルスとCMVの重複感染植物では、CMVを分離するのは濃度が高いので比較的簡単である。感染葉磨砕液を段階希釈して、キノアかササゲに接種して早めに形成されてくる局部病斑を切り出してタバコやトマトに接種すればよい。これをもう1度繰り返せば通常はポティウイルスは落ちてしま

う。ところが、逆にポティウイルスを分離するという場合は簡単ではない。そのためには、全身感染葉の磨砕液の段階希釈液に CMV の抗血清を加えて、1 夜冷蔵保存した後、低速遠心で清澄化したものを分離したいポティウイルスが全身感染する植物に接種してみるとよいことがある。CMV 抗血清処理によって CMV の濃度が低下しても、一部に残った CMV が増殖してしまうために、これで必ずしもうまくいくという保証はない。しかし、抗血清の濃度を 3 段階くらいとっておくと、うまく CMV をのぞける場合もあるので、他に手段が見つからない場合にはこれでやってみてほしい。もちろん、媒介生物を用いた分離も原理的には可能であり、CMV とポティウイルスでもアブラムシを用いて分離することはできないことはないが、ここでも CMV の濃度の高さが障害となろう。

他の複数ウイルスの重複感染の場合に、どのようなウイルスが重複感染しているか推定できるときには、それらのウイルスによって明確に異なる他の特性を利用することも可能である。たとえば、有機溶媒に対する耐性が明確に異なる場合、耐熱性が異なる場合など、それらの違いを利用して分離することが可能であろう。たとえば、トバモウイルスを分離したいときは、磨砕液を 80℃ くらいの温度で 10 分処理してから、そのトバモウイルスが感染する植物に段階希釈して接種するとよい。媒介生物が異なる場合には、それを用いた分離も可能である。ウイルスが推定できない場合には、異なる特性を探すことからはじめ、見つけた違いを利用して同様にすることとなる。

4) 植物ウイルスの病徴とその観察

接種して一定の日数が経過するとそれぞれのウイルス種に特徴的な病徴が、植物の種に応じて現れてくる。病徴には全身に現れる全身病徴と接種葉にのみ現れる局部病徴とがある。植物ウイルスで最も一般的な全身病徴はモザイク症状である。葉脈に沿って、葉の緑色が薄くなったり、逆に濃くなったりする。葉脈のみの緑色が濃くなる病徴を葉脈緑帯、逆に葉脈の緑色が薄くなるのを葉脈透過という。一方、葉脈とは無関係にこれらの症状がでる場合があるが、そのときにはモザイクとは区別してモットル症状とよぶ。局部病徴のうちの斑点となる局部病斑は Local Lesion とよばれ、その数はウイルス濃度に比例することから、ウイルスの感染性の検定に広く用いられている。局部病斑の病斑数が少ない場合には、各病斑は均一なウイルス集団から形成されると考えられるので、ウイルスの分離に利用できる。

一般に被害が激しいのは全身症状でしかもえそ症状を伴う場合である。葉脈にそって生じる葉脈えそ、葉がかれてしまうえそ、全身が枯れてしまう枯死などの段階に分けて区別される。全身枯死の場合には当然、その後の収穫は皆無となってしまうので、被害は甚大となる。また、萎縮やわい化といった症状は、植物の高さが明瞭に低くなり、生育が遅れてくる症状をいうが、これらも被害が大きい。萎縮の場合には、叢生といって無数の脇芽などが無秩序に出てくる症状を伴うこともあり、萎縮叢生症状とよばれてほとんど収穫皆無となることが多い。黄化は葉が黄色くなることで葉脈のみの黄化を葉脈黄化と呼んで区別する。ウイロイドについてもそれらの病徴は、ウイルスの場合と同様に記載する。

全身的に現れる病徴は、ウイルス種に特異的なものと、ウイルス種によらず多くのウイルスで現れる病徴とがある。局部病斑は、えそ性のものと退緑斑や黄斑に分けられるが、局部病斑が拡大して全身症状となることもある。このように全身に拡大するかどうかは、ウイルス種と植物種の組合せによることが多いが、たまたま植物が日照不足などで軟弱に育った場合に全身症状となることもある。このような場合には再現性に乏しいので、安定した特性とはいえない。局部病斑もウイルス種と植物種の組合せによって基本的には決まっている。全身病徴についても局部病斑についても、同じ植物種でも品種によっては、同一ウイルスに対してもウイルス株によって病徴が大きく異なってくる場合もある。それらが安定して再現できれば、植物の場合には抵抗性品種や高感度判別品種として利用できる可能性があり、ウイルスでは特異系統となる。

各種ウイルスによる代表的な病徴は図 3 に示しておいた。これらの病徴は、ウイルスと植物が同じでも接種時期、環境条件、接種濃度、品種などによって変化しうること、異なるウイルスでも同様な病徴を生じることがあるので病徴だけからウイルスを特定することは困難な場合が多いことなどに注意する必要がある。しかし、これらの病徴の中でウイルス特異的な病徴も一部にはあり、39 ページの「(3) 生物学的診断法」で示したような組合せでは病原ウイルスを推定できる。もちろん、これに頼りすぎてはいけないうえ、あくまで最

終診断は、以下で説明する抗血清診断か遺伝子診断によるべきである。

植物ウイルスの接種及びその後の病徴観察に関して、もう一つ大切なポイントがある。それは接種してから明瞭な病徴が出るまでの間に、その植物を置いておく温度である。通常は 20-30℃程度の温度で育成する必要があり、いつも 30℃を越えるような温度条件やいつも 20℃以下では通常のウイルス検定には不向きである。ところが、ウイルスによっては通常の 25-30℃では病徴を出さないものがある。たとえば、ネポウイルスではウイルスによっては 25℃をこえると全く病徴を出さないで、それ以下の温度で置いておくとはじめて明瞭な病徴を出すものがある。また、ムギのウイルスでは 15℃以下でないと感染しないし、もちろん病徴も出ないウイルスが多い。これらは事前の知識として知っておく必要がある。一方、ウイロイドではかなり高温でないと病徴が出にくいものがある。これらの低温や高温を好むウイルスやウイロイドおよびそれに近いと思われるものを扱う際には、接種した植物を発病に適した温度で育成しないと、接種葉でもウイルスが増殖しないことが多いため、ウイルスの維持継代にすら失敗してしまつてウイルス株をなくしてしまうことになりかねないので、十分に注意する必要がある。

【ミニコラム：珍しい病徴】

ウイルスに感染した植物にできた種子に病徴が現れることがある。もっとも有名なのはダイズ種子表面に見られる褐斑粒である。これは種子表面に形成されるいろんな模様の褐色の斑点やすじのことであり、感染していたウイルスの種によってそのタイプが異なる。CMV-ダイズ系、PSV、AMV、SMV などの感染によって生じることがあきらかになっており、褐斑粒がでるとその種子の市場価格は大きく下がってしまう。その種子からウイルスが検出されないものでも褐斑粒となるので、その被害は大きくなりやすい。一方、ポティウイルスである SPFMV に感染したサツマイモ植物では、形成された塊根に帯状粗皮とよばれる、イモ表面に帯状のザラザラしたすじができることが多く、これもウイルス感染によることが証明されていて、発生したイモの市場価値は大きく低下する。このような帯状粗皮が発生するのは SPFMV の中でもその強毒系統に感染した場合のみであることが知られている。また、ウイルスに感染した植物の花びらに斑入りが生じ、場合によっては健全で均一な色の花弁よりも美しくみえるようになる場合がある。この見かけの美しさがウイルス感染が原因であることが知られていなかった時代には、このような花の咲くチューリップの球根が金と同じくらいの値段で取引された時代もあったというが、今では、そのようなことは通用しない。現在では、チューリップにも多くのウイルスの存在が知られており、農家は如何にしてウイルスフリーの球根を安定して作るかに多くの労力を費やしている。もちろん、現在でもウイルスやウイロイドのお陰で美しい模様（病徴）を出しているために高価な値段で取引されている植物がないとは言い切れないのであるが、

5) 植物ウイルス病の診断法

ウイルス病による病害が何というウイルスによって引き起こされているかを調べるのがウイルス病の診断である。各種植物における病徴だけからウイルスを正確に特定することはできないし、場合によっては原因ウイルスをまちがえてしまうことも多く危険である。同じような病徴を出していても全く異なるウイルスが原因であることも多いためである。間違った診断をしてしまうと、誤った防除法を採用することにつながりやすく、間違った防除によって逆にウイルス病の発生を拡大させてしまったり、防除を困難にになってしまう場合もあるので、正確な診断はきわめて重要である。ウイルス病の主な診断法には生物検定、抗血清診断、遺伝子診断の3つがある。これらの個々の手法については具体的なプロトコルが開発され利用されている。研究者の方々やメーカーなどから詳しいプロトコルの紹介や解説がすでになされているものについては、関係の単行本や HP、メーカー各社のプロトコルなどを参照されたい。ここでは、特にわかりやすく書かれている 2 冊の単行本を下記にあげておいた。また、特に農研機構の以下の 2 つの HP を推薦する。本マニュアルでは、これらと重複する内容についてはできるだけ図表は省き、説明も簡略にした。ただし、他に詳しい解説がないと思われるゲル内拡散法、ウイルスの特定法、遺伝子診断のための共通プライマー配列などについては、本マニュアルの中で詳しく解説するとともに、診断法全体の流れや個々の診断法の基本的な考え方・特徴・使い分

けなどについても詳しく説明する。

- ・大木 理 (1997) 植物ウイルス同定のテクニックとデザイン. 日本植物防疫協会, pp.184.

本書の改訂版として「植物ウイルス同定の基礎」が出版される予定である。

- ・脇本 哲監修 (1993) 植物病原性微生物実験法. ソフトサイエンス社, pp.553.

- ・ウイルス病検定マニュアル ver. 2

http://www.naro.affrc.go.jp/org/karc/VM/uirusu_bing_jian_dingmanyuaru.html

- ・マクロアレイマニュアル [Maoka et al., 2010 に基づいて作成されたもの]

<http://www.ncss.go.jp/main/gyomu/.../h22macroaraymanu.pdf>

(1) 対象地域・対象作物でのウイルスの発生状況

ウイルス診断を行う場合には、まず対象となっている作物に、わが国のどこでどのようなウイルスが多く発生しているかを予備知識として知っておく必要がある。それによって効率的に診断を行うことができるからである。もちろん、対象となっている地域での発生状況がわかればそれに越したことはない。また、日本で未報告のウイルスかもしれないと考えられる場合には、当然諸外国の情報も必要となってくる。一方、外国でウイルス診断を行う場合には、その国におけるウイルスの発生状況をまずつかんでおくことが前提となる。対象ウイルスが未知の新規ウイルスであるかもしれないと思われた場合には、その特性をきちんと調べて既知のウイルスとの違いを明確にする必要がある。その進め方については本章の「(7) 未知のウイルスの特定法」で紹介する。ここではまず日本での主要なウイルスの発生状況について概要を紹介する。

これまでに日本で多く発生しているウイルスの名称と略称およびその重要特性を表5にまとめておいた。わが国で最も多く発生してきているウイルスといえばクモウイルスに属するCMVであろう。CMVはイネ以外の作物ではほとんどすべての種類の作物および雑草で発生していて、単子葉植物でも広く発生しており、ユ

表5. 日本で発生する主な植物ウイルスとその特性

ウイルス	略称	所属する属	形態	大きさ	主な伝染方法	主な発生作物
キュウリモザイクウイルス	CMV	Cucumovirus	小球形	直径30nm	アブラムシ	殆どの野菜や花き
トマト黄化えそウイルス	TSWV	Tospovirus	球形	直径100nm	アザミウマ	殆どの野菜や花き
タバコモザイクウイルス	TMV	Tobamovirus	棒状	長さ300nm, 幅15nm	接触・土壌	タバコ
トマト黄化葉巻ウイルス	TYLCV	Begomovirus	双球形	各々の直径 18nm	コナジラミ	トマト, トルコギキョウ
ウリ類退緑黄化ウイルス	CCYV	Crinivirus	ひも状	長さ800nm	コナジラミ	キュウリ, メロン, スイカ
メロンえそ斑点ウイルス	MNSV	Carmovirus	小球形	直径30nm	糸状菌	メロン, スイカ
ジャガイモYウイルス	PVY	Potyvirus	ひも状	長さ700nm, 幅12nm	アブラムシ	ジャガイモ
イネ縞葉枯ウイルス	RSV	Tenuivirus	ひも状	細長いひも状	ウンカ	イネ
オオムギ縞萎縮ウイルス	BaYMV	Baymovirus	小球形	直径30nm	糸状菌	オオムギ
トウガラシ微斑ウイルス	PMMoV	Tobamovirus	棒状	長さ300nm, 幅15nm	接触・土壌	トウガラシ, ピーマン
温州萎縮ウイルス	SDV	Sadwavirus	小球形	直径30nm	不明	カンキツ類
リンゴクロテッククリーフスポットウイルス	ACLSV	Closterovirus	ひも状	長さ600nm, 幅12nm	不明	リンゴ
メロン黄化えそウイルス	MYSV	Tospovirus	球形	直径120nm	アザミウマ	キュウリ, メロン, スイカ
アイリス黄斑ウイルス	IYSV	Tospovirus	球形	直径120nm	アザミウマ	ネギ, タマネギ, ニラ, トルコギキョウ
ズッキーニ黄斑モザイクウイルス	ZYMV	Potyvirus	ひも状	長さ700nm, 幅12nm	アブラムシ	キュウリ, メロン
ソラマメウィルトウイルス2	BBWV-2	Fabavirus	小球形	直径30nm	アブラムシ	多くの野菜や花き

本表では特に重要と思われるウイルスを選んだ。

リ、ラン、ショウガ、サトイモらの仲間でも自然発生している。イネ科でもトウモロコシでは CMV が発生している。もちろん、表 5 に掲載したウイルス以外にもたくさんのウイルスが各種作物で発生して被害を与えているのは言うまでもない。これらの代表ウイルスの中でも特に重要なものについては属ごとにまとめて、「4. 主要な植物ウイルスとその特性」の代表ウイルス属各論で解説している。

各種作物での個別ウイルスの発生の有無については、日本植物病名目録第 2 版を参照されたい。また、この目録を元に作られた日本植物病名データベース (http://www.gene.affrc.go.jp/databases-micro_pl_diseases.php) は、最新の情報を掲載しているだけでなく、ジーンバンク所蔵のウイルス株や、ウイルス病の病徴などが載ったサイトとリンクしているため、予備知識を得るには大変便利である。さらに、雑誌「植物防疫」には、農業にとってその時点で大きな問題となっているウイルスの特性や発生状況が個別に適切な時期に解説されているので、それらも大いに参考になる。

(2) 各種診断法の特徴

生物検定とは、ウイルスに特徴的な病徴を出す種類の植物に、現地から採取してきた発病植物からの摩砕液を接種したり、現地で発生していた昆虫で伝搬させてみたりして、後で現れてくる病徴などからウイルスの種類を決める検定法である。最も簡便にできる手法であり、他の診断法が使えない場合にはこれに頼ることになる。しかし、本法は類似した病徴を出す複数のウイルスがある場合には誤診につながりやすいこと等に常に留意しておく必要がある。

抗血清診断は、各種ウイルスに対する抗血清をあらかじめ作っておいてそれを用いてウイルスを診断する方法であり、その特異性の高さや簡便さからもっとも広く利用されてきている診断法のひとつである。シャーレに流し込んだアガロースに穴をあけて行うゲル内拡散法、96 穴のマイクロプレートを用いるエライザ法、ニトロセルロースのようなプラスチック性薄膜を用いるダイバ法やティッシュプリント法、最も簡便な方法としてリトマス試験紙のような紙を用いるリパ法などがある。現在では、多数の試料の検定にはエライザ法がもっとも適しており広く用いられている。

遺伝子診断法は、ウイルス遺伝子の一部を核酸合成酵素を用いて増幅させ検出する方法であり、特異性は高く少数の検定では有用性が高いが、手間がかかってコストも高い点で多数の検定には現状では不向きである。しかし、抗血清診断法では検定対象のウイルスが何のウイルスであるかを知ることができるが、それ以上の情報はあまり得られないのに対し、遺伝子診断では、その産物の塩基配列を解析して既知の配列と比較することにより、それが既知のどの株にどの程度近いのか、発生しているウイルスは一種のみか複数種か、なども比較的容易に判定できる。また、類似のウイルスの報告がなければ、新系統あるいは新種と推定できる。

生物検定では、一般に複数のウイルスが重複感染している場合には、それらのウイルスの感染を的確に診断することは困難なことが多い。単離していないウイルスを用いた場合には、特に特定の植物の病徴からだけではウイルスの特定がむずかしくなり、その結果は信頼度が低い。もちろん、ササゲにえそ性の特徴的な局部病斑を作ることから CMV であると判定する場合などは生物検定のみでほぼ可能だが、そのようなケースはまれである。一方、抗血清診断や遺伝子診断を用いる場合には、複数の異なるウイルスが重複感染していても、それらが既知のウイルスであり、診断に利用できる抗血清やプライマーがあれば、それらを一つ一つ単離しなくとも検出することはできる。

しかし、抗血清診断や遺伝子診断でもいずれも限界があることはしっかり認識しておく必要がある。現在、多用されている遺伝子診断や抗血清診断でも、新種のウイルスは検出できない場合があるということである。既知のウイルスと遠くてもよいので類縁関係があることがわかれば、保存性の高い領域の共通プライマーを作ることによって遺伝子診断ができるようになる可能性はある。もちろん、全く新しいウイルスや類縁関係がかなり遠いウイルスの場合には、ウイルスの遺伝子配列が不明な間は遺伝子診断のためのプライマーを作ることができないので、遺伝子診断も無力である。つまり、診断とは既知のウイルスとの比較で行えるものである。

それでは、新種のウイルスの場合にはどうやって新種かどうかを判定し、診断法を確定すればよいのであろうか。具体的な新規ウイルスの特定方法と手順については以下の「(7) 未知のウイルスの特定法」で説明するので、ここでは簡単に概要を紹介しておく。生物検定のみでも既知のウイルスと明確に異なる宿主域や特定の植物で特有の病徴を出すウイルスが見つかった場合には、新種かもしれないと考えて検討を進めていくこと

となる．そのためにはウイルス粒子の形態や媒介生物などの特性も検討が必要となる．類似のウイルスに対する抗血清を用いた検討でも，その作製に用いられたウイルスと明確に異なる反応を示すことが確認できれば，さらに新種に近づくこととなる．しかし，現在では新種であると言うためには，最終的には遺伝子レベルで既知のウイルスすべてと異なることの確認が必要となる．抗血清による検定だけでは，既知のウイルスのすべては網羅できないためであり，また抗血清はウイルスの外被タンパク質の特性を反映しているだけで，他の特性については何もわからないためである．そこで，そのウイルスを純化するなり，ウイルス核酸を分離精製するなりして，ウイルス特異的な配列を特定し，既知のウイルス配列と比較して，新規ウイルスであるかどうかを確認することとなる．

これらの検討を経た上で新種であることが確認できたなら，農林水産省が2012年9月に発表した重要病害虫発生時対応基本指針（農林水産省や日本植物病理学会のHPに掲載されている）に沿って検討した上で，それを公表することとなる．その際にすでに海外では発生しているウイルスなのか，外国でも発生していないウイルスなのかも大切なポイントとなる．新種のウイルスの場合には，そのインパクトは大きい場合が多いことが想定される．防除法も従来とは異なった新しい手法が必要となるかもしれないし，どんな作物に被害が出るかもわからないからである．その後に大量の植物の検定が必要となる場合には，ウイルス抗血清を作成して，抗血清診断法を確立する必要がある．もし，あまり多数の検定は必要でないということならば，ウイルス遺伝子の塩基配列の一部を利用して，それから特異的プライマーを合成し，遺伝子診断を行えるようにしておけばよい．

以下にこれら3つの診断法の具体的手順を紹介する．

(3) 生物学的診断法

検定植物を用いた診断法が生物学的診断法である．通常は，その病原ウイルスを同定しようとしている植物の明瞭な病徴を示す葉を磨砕し，検定植物に接種して発病してきた検定植物の病徴を調査し，その代表的な植物の病徴から病原ウイルスを特定するという手順で行う．接種の具体的なやり方や病徴の表示法については前章の「1) ウイルスの接種法」で説明しているので参照されたい．特に現地から採取してきた罹病植物では，ウイルスが1種のみ感染しているとは限らないので，複数のウイルスが感染している可能性も十分に考慮しながら診断を進めていくことが重要である．複数ウイルスの単離法についても前章を参照のこと．

ウイルスを植物に接種して特徴的な病徴が現れてもそれだけで病原ウイルスを特定することは困難である．一般的なモザイク症状では，ウイルスが原因であるとは判定できても何というウイルスが病原であるかは多くの場合に特定することはできない．たとえば，トマトで萎縮叢生の激しい病徴が出た場合を例にとって考えて見よう．このような病徴を生じるものとして，これまで知られているウイルスだけでも，TYLCV, TSWV, CMVといった発生が多いウイルスがあり，さらにウイロイドであるTCDVdの可能性もある．もちろん，新規ウイルスや既知ウイロイドの新系統かもしれないし，これらの病原の重複感染の可能性もある．これらのうちどれであるかを決定するためには，後述の血清学的診断法か遺伝子診断によるしかないのである．

しかし，ウイルスを植物に接種した際に，以下のような植物に特異的な病徴を生じた場合には，そこに記しているウイルスによるものといちおう判断して良いと思われる．しかし，未知のウイルスや新系統についてはこの限りではないので，注意されたい．

- ・糸葉 Fern-Leaf：糸のように見える細くなった葉．CMVのトマトでの病徴としてよく見られる．

例：トマト / CMV-サブグループ I（ただし，同じCMVでもサブグループ II では軽度のモザイク症状のみを示す）

- ・帯状粗皮 Russet Crack：サツマイモでのみ見られる塊根表面に帯状のひび割れが入った状態．

例：サツマイモ / サツマイモ斑紋モザイクウイルス強毒系（同じSPFMVでも普通系や徳島系では退色症状は出ることがあっても，ひび割れにはならない）

- ・やせイモ Spindle：細長くやせた状態．ジャガイモでの特定のウイロイドによる病徴．

例：ジャガイモ / PSTVd（わが国のジャガイモでは未発生）

- ・Big vein：レタスで見られる葉の葉脈が太く濃くなる症状．

例：レタス / レタスビッグベインミラフィオーリーウイルス

すでに述べたように、ウイルスを検定している間は、接種のための健全なキノアやタバコ植物を育成して維持しておくことはきわめて重要である。これらの植物苗は播種してから使用できるようになるまでにかなりの日数がかかるため、1-2週間おきに播種して育成しておく、いろんなウイルスで局部病斑の形成やウイルスの増殖に使える場合が多い。一方、ササゲやメロンなどは種子が比較的大きく、播種後10日以内に接種できるので、接種検定を行う際に播種しても少し待てば利用できて便利である。ササゲでは、CMVの多くが接種2-3日後には接種葉にえそ性の局部病斑を生じるので、この病徴がCMVの簡易な診断基準として広く利用されている。中には全身感染してモザイクとなるマメ科系CMVもあるので、その点は注意が必要である。メロンに接種した時には、ウリ科に感染するポティウイルス(WMV, ZYMV)、通常のCMV, SqMVなどで明瞭かつ特徴的なモザイクやモットル症状を示し、MNSVでは接種葉に特異的な大きなえそ斑点を生じるなどそれぞれ特徴のある病徴を出す。しかし、CMVのラグナリア系もMNSVの病徴と類似の病徴を出すので、メロンの病徴だけからではウイルスを特定できない。このように、特定の植物の病徴だけでウイルスを同定することは困難な場合もあり、他のウイルスについても同様な場合があるので注意する。そのためにも1種類のみの検定植物ではなく、複数の検定植物を使って生物検定を行っていく必要がある。こうして進めていけば、対象ウイルスの感染性を確認しながら、他のウイルスのコンタミネーションが起きていないことも確かめつつ研究を進めていけるという点で生物検定は有益である。

検定植物による診断方法で忘れてならないことは、感染しない検定植物も重要な診断基準となるということである。たとえば、PSVはウリ科植物に感染しないし、TSWVも同様である。CMVの多くはササゲの接種葉にのみえそ斑のみを生じて全身感染しない。WMVはマメ科植物に感染するが、ZYMVは感染しないなどが知られている。

(4) 血清学的診断法

遺伝子診断法が広く利用されるようになるまでは、血清学的診断法がウイルス同定の主流となっており、そのための多くの手法が開発されて広く用いられてきたが、最近では遺伝子診断法が主流となっていて、血清学的診断法(血清診断法や抗血清診断などもよばれる)はかなり押され気味である。それでも血清学的診断法はきわめて有用な手法であり、簡易でコストも低く抑えられることから、重要な手法であることに変わりはない。ここでは、現在でも広く用いられていて、かつ使いやすいものにしばって解説する。

用いる抗血清の種類としては、抗血清作製に使用した動物の種によってウサギ抗血清、マウス抗血清などが一般的である。通常の抗血清はポリクローナル血清であり、抗原として用いたウイルスの複数の抗原決定基と反応する。特殊なマウスとシステムを用いて作出したものはモノクローナル抗体と呼ばれ、ウイルスの1個の抗原決定基のみと反応するという特性を持っている。モノクローナル抗体は特殊な場合の利用に限定されており、通常の診断ではポリクローナル抗体の使用で特に問題はない。なお、ウイロイドは外被タンパク質を持たないために血清診断はできず、遺伝子を利用した診断のみ可能なので注意する。

抗血清や抗体は純化ウイルスをウサギやマウスに接種して自分で作製することも可能であるが、市販されているものも多くあるので、それらについては購入して利用することが可能である。植物ウイルスに対する抗血清を市販しているのは国内では日本植物防疫協会であり、主要なウイルスの抗血清は一通りそろっていて、さらに後で説明するエライザ法のためのキットも同時に販売している。また、外国の会社の抗血清などは国内の試薬取り扱い会社を通じて購入できる。アメリカのATCC(American Type Culture Collection)でも植物ウイルス抗血清を販売している。研究者が自分で純化ウイルスや大腸菌での特異的発現タンパク質を準備して、抗体作製会社に抗体作製のみを依頼することもできる。

抗血清は、以下の手順で作製されるのが一般的である。まず健全なウサギやマウスに純化したウイルスを注射することによってウイルスに対する抗体を作らせる。これらの動物から抗体を含む血液を採取し血球成分を固まらせて除去して上清(これが血清である)を得れば、その中には注射したウイルスに対する抗体が多量に含まれている。注射したウイルスとの反応の程度を力価とよび、抗血清の特異性ととも重要な特性となる。以下に個々の血清診断法を具体的に紹介する。

① ゲル内拡散法

アガロースを緩衝液(通常は中性のリン酸緩衝液を利用)に溶かして固めたゲルにコルクボーラー

などで穴（ウェル）をあけて、そこにウイルス感染葉磨碎液と想定されるウイルスに対する抗血清を入れて静置しておき、2-3 日後に肉眼で観察して沈降線ができるかどうかで、ウイルスを同定する方法である。診断の結果を 2-3 日後に肉眼で判定できる点がこの方法の利点である。抗血清は上で紹介した市販のものを購入して用いることができる。具体的な結果を図 6 に示す。

各種ウイルスに対する抗血清は、はじめに注射したウイルスと同じか近縁のウイルスに出会うと結合して凝集させるという性質を持っている。抗血清とウイルスを同じゲル内の異なるウェルに入れて静かにおいておくと、抗血清とウイルスがゲル内を浸透して行き、両者が出会ったところで会合して沈降帯を作る。この沈降帯はやがて白い沈降線となって肉眼で見えるようになる（図 6）。簡単に言うと、この沈降線を肉眼で観察して、検定対象ウイルスが抗血清の作製もととなったウイルスと同一または類似のウイルスであると判定する。なお、沈降線が融合した例は図 6 には例示していない。一方、沈降線が見えないときには検定対象ウイルスが抗血清作製に用いたウイルスと全く異なるウイルスであると判定するのがゲル内拡散法である（図 6 の d と e）。このように、本法は明瞭で一目で判定が可能で、抗血清さえあれば簡便に行うことができる。以下にもう少し詳しく解説することとする。

抗血清作製ウイルスを A とし、検定対象ウイルスを B として、中央のウェルに A ウイルス抗血清を入れ、周囲の隣り合ったウェルにそれぞれの純化ウイルス（a と b）を入れた場合で説明しよう（図 6A）。両ウイルスが近縁なウイルスの場合はちょっと複雑になるが、もう少し多くの情報を得ることができる。この場合には、沈降線同士が融合して 1 本の線になる場合と、どちらか一方のみが外側に伸長していわゆるスパーク（突起）を形成する場合のいずれかとなる。スパークができず完全に融合したときには、A と B は血清学的に同一なウイルスであり、スパークができたときには（図 6A のウェル a, b を参照）、A と B は一部が異なる性質を持つ近縁なウイルスと判定できる。抗血清とウイルスの組み合わせを逆にするとスパークの向きが逆転する（図 6B のウェル a, b を参照）。このスパークという現象は、ウイルス粒子が複数の抗原決定基を持つために生じるものであり、モノクローナル抗体を用いた場合にはできてこない。形成されるスパークの大きさがそれを形成する両ウイルスの類縁関係の

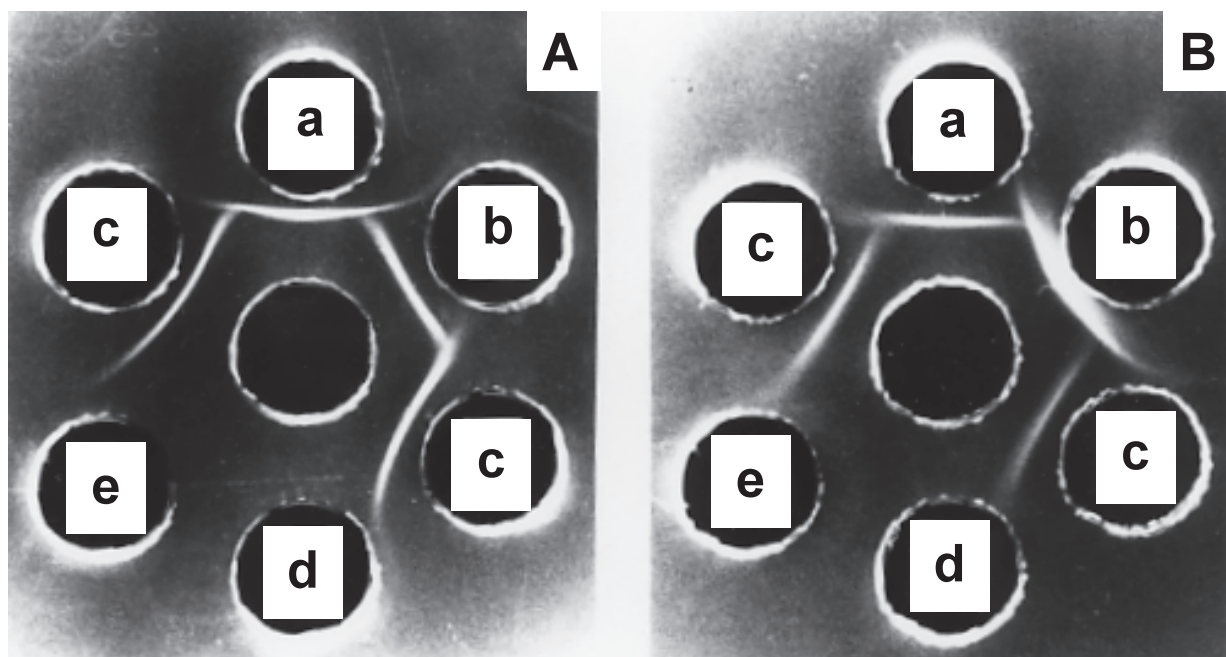


図 6. ゲル内拡散法による血清型の判定

A: CMV-A ウイルスに対する抗血清を中央のウェルに入れた。

B: CMV-B ウイルスに対する抗血清を中央のウェルに入れた。

周囲のウェルには以下の純化ウイルスを入れた: a, CMV-A; b, CMV-B; c, CMV-C; d, PSV; e, TAV.

近さと反比例している。類縁関係が遠いもの同士ほどより大きなスパーを形成することになる（図6のbとcではcの方がbよりaに対して近縁である）。

ゲル内拡散法で用いるウイルス試料としては、感染植物葉内でのウイルス濃度が高くなりやすいウイルスでは、感染葉磨砕液をガーゼ等でろ過したものでよいが、そうでないウイルスの場合には、PEGなどで濃縮（48 ページ）したウイルス試料か精製ウイルスを用いる方がよい。また、球形ウイルスでは必要でないが、ひも状ウイルスではウイルスがアガロース内を粒子のままでは通りぬけられないので、アガロースに粒子をバラバラにするためのタンパク質変性剤を添加しておくことが必要となる。

精製ウイルス等を用いて自分で抗血清を作製した場合や市販のものを購入した場合、抗血清によっては健全植物成分とも反応してしまい、非特異反応が出てしまう場合が結構ある。その時には、健全植物葉磨砕液で抗血清を希釈して、健全植物成分と反応するものを吸収してから使ってみるとよい。どの程度の濃度のものでも吸収するかは抗血清によって違ってくるので、まずやってみることである。何度も使うことになる、あるいは定量性が必要になる場合には、健全葉をウイルスと同じ手順で部分純化レベルまで処理したものを再懸濁した液を抗血清と混合して1晩5℃に静置し、低速遠心分離で清澄化したものを用いるとよい。以下に紹介するエライザ法でもダイバ法でも、健全植物成分で吸収したものをを用いるとバックグラウンドが低くなって定量化しやすくなることがある。

② エライザ法

エライザ法（Enzyme-Linked Immunosorbent Assay : ELISA）は Clark and Adams が考案した酵素結合抗体法と日本語に訳されている検定法であり、血清反応を酵素反応で増幅して検出感度を高めたところがポイントである。抗血清から精製したγ-グロブリンに酵素をラベルしたコンジュゲイトを作製しておき、最終的にはその酵素による基質の分解に伴う発色反応の有無で、元の試料内のウイルスの有無を検定する。また、その発色の程度がウイルス濃度と比例することから、ウイルス濃度を比較・定量することもできる。本法は検出感度が高く、しかも非特異反応も出にくい優れた方法であり、酵素反応の有無をマイクロプレートを用いて検定するために多数の検体のウイルス感染のチェックに適しており、現在では圃場やハウスなどでの多検体からのウイルス検定に広く用いられている。エライザ法には直接法と間接法があり、それぞれ特性が異なっているので、使用目的に応じて使い分ける必要がある（花田，1991）。直接法は、最初にウイルス抗血清をウェルに入れて開始するもので、間接法は最初に植物葉磨砕液を入れて始めるものである。前者は特異性が高く検出感度も高く、後者は少し血清学的類縁関係の離れたウイルスでも検出できるというメリットがある。後者はウイルス毎にコンジュゲイトを準備する必要がないが、ウイルス抗血清を作製した動物以外のグロブリンに対する抗血清のコンジュゲイトを購入しておく必要がある。これらより簡便な方法として、感染葉磨砕液とコンジュゲイトまたはウイルス抗血清を同時にウェルに入れておく簡易法もあり、検定に要する時間を短縮できる。これらの詳しい手順については37 ページの両参考書を参照されたい。

なお、直接エライザ法（二重抗体サンドイッチ法ともよぶ）では、検定対象植物ウイルス別のウイルス抗血清かそれから精製したグロブリン、さらにそのグロブリンに酵素を結合させたコンジュゲイトが必要となるが、わが国の主要なウイルスについては、ウイルスごとにグロブリンとコンジュゲイトのセットが日本植物防疫協会から市販されている。また、同協会では市販されていないウイルスについては Agdia 社で購入できるものがある。また、磨砕しにくい果樹などの多数の植物試料の磨砕にはフィンガーマッシャーを用いるとよい場合がある（井出ら，2011）。なお、アジ化ナトリウムは植物ウイルス検定で広く用いられているエライザのための酵素の反応を阻害するので、一般のエライザ法では使わない方がよい。

また、一定量の植物葉に一定量の緩衝液を加えて磨砕した磨砕液を段階的に希釈して検定することにより、複数の試料のウイルス濃度を比較することができる。つまり、エライザ法には定量性があるので、これにより同じ作物の品種別抵抗性の比較、生育時期や栽培方法などによるウイルスの増殖程度などを直接比較できる。

③ ダイバ法及びその他の手法

ダイバ法 (Dot-immunobinding Assay : DIBA 法) は、日比 (1984) が考案したエライザ法の簡便法であり、マイクロプレートの代わりにニトロセルロースシートを用いる点が特徴であり、洗浄や反応を1ウエル毎に行う必要がないために、手早く効率的に検定を行うことができる。本法でも段階希釈することで、ウイルスの定量は可能である。また、ウイルスタンパク質を電気泳動したゲルをニトロセルロースフィルターなどに電氣的にうつし取ったものをウイルス抗血清と反応させるウェスタンブロット法というものもあり、ウイルス特異的なタンパク質の特性解明に役立つ。

最近では葉や茎を磨砕することなく、それらを切断直後に出てくる汁液をシートに直接つけて検定する手法—ティッシュブロット法も考案されている。この方法だと磨砕する必要はなくなるので、一定量の植物葉を一定量の緩衝液を加えて磨砕した磨砕液の一定量を計ってエライザプレートやシートにアプライするという、手間と時間が短縮できる。本法では定量性は落ちてしまうが、最終反応の濃淡である程度のウイルス濃度の比較は可能である。植物の葉や茎内部のウイルスの分布状況を検定する際にはティッシュブロット法が有効である。

リパ法 (Rapid immuno-filter paper assay : RIPA 法) は、着色ラテックスを結合させたウイルス抗体をろ紙の一部に塗布して乾燥させておき、そのろ紙の一端から検定対象の植物磨砕液を吸わせて、そのウイルスに感染していれば、ラテックスが集まることでラテックスの色がろ紙の上で肉眼で見えるようになることを利用したウイルス診断法であり、pH 試験紙の感覚で簡易に利用できる。今日では多くの重要ウイルスについて RIPA 診断が可能となっており、日本植物防疫協会や Agdia 社からそのキットが市販されている。

(5) 遺伝子診断法：特に PCR 法を中心として

遺伝子診断は遺伝子増幅法とハイブリダイゼーション法に大別され、それぞれがまたいくつかの手法に分けられるが、ここでは、診断のために現在広く用いられている PCR (Polymerase Chain Reaction) 増幅法についてのみ解説する。比較的簡便なマイクロプレートでのハイブリダイゼーションを用いる手法は、エライザ法やダイバ法において抗血清の代わりに核酸プローブを用いるような感じで利用できるという利点を持つが、その解説についてはここでは割愛する。必要なら 37 ページの Maoka et al. の論文等を参照されたい。ここで1つだけ紹介しておきたいのは 2012 年に出された論文についてであり、ハイブリダイゼーションのためのプローブとして、異なる 10 種のウイルスやウイロイドの配列をタンデムにつないだリボプローブを用いて 10 種すべてを安定して検出できるという報告である (Perio et al., 2012)。本法を用いれば1つのプローブだけで 10 種を検出できるわけで、今後のハイブリダイゼーション利用法の新しい方向を示すものと思われる。

ウイルス感染植物から何らかの手法 (市販の植物核酸抽出キットを用いることが多いので、その詳細につ

【ミニコラム：手動 PCR】

遺伝子診断には PCR 反応が利用され、それによって特定遺伝子を百万倍程度に増幅する。はじめに熱変性によって DNA の高次構造を壊し、次にアニーリングでプライマーをくっつけ、最後に相補的 DNA を伸ばすという反応サイクルを繰り返すのが PCR である。現在ではそのための機器が多数開発され市販されている。筆者がはじめたころはそのような機器はなく、1.5ml 用のチューブ用のインキュベーター3台を横に並べて、それぞれ 95℃、45℃、70℃で各 1~2 分ずつ、PCR を行うチューブを自分で移動させて反応させた。これを 40 サイクル一人でやるのであるから、かなりの我慢である。試しに時間を計るだけでもやってみてもらおうとわかってもらえると思うが、1~2 分という時間の何回もの繰り返しというのは何かするには短すぎ、じっと待っているには長すぎるのである。論文でも読みながらやれば良いと思って軽い気持ちで始めると、どこか面白いところが出てくるとつい時間を忘れてしまっってチューブの移し替えを忘れてしまうのである。また何もしないで、チューブを移動させるというだけの緊張を維持しながら 2~3 時間を過ごすのはかなり辛いことである。この大変さを一度経験しておくといいのではないかという気もするが、いかなものだろう。

いては各社のマニュアルを参照) によって核酸成分を抽出した後、既知の想定されるウイルスの塩基配列の一部を参考にして作成した短い DNA (プライマーとよぶ) を加えた遺伝子増幅系を用いて、DNA ウイルスならはじめてから PCR を行う。RNA ウイルスならまず逆転写 (Reverse transcription, RT) を行って RNA を DNA に変換した後で PCR を行う必要があるので RT-PCR とよぶ。ウイルスによってこれらの手法を使い分けることで、DNA ウイルスでも RNA ウイルスでもウイルス遺伝子の一部を増幅することができる。遺伝子増幅のためには、耐熱性の DNA 合成酵素を加えた後で、温度を繰り返し急速に変換できる恒温器を用いて 95℃, 70℃, 50℃程度の温度での短時間処理を 40 回程くりかえす。このような PCR によって特定の遺伝子が増幅されたことを確認することにより、プライマー配列の元となっていたウイルスが感染していたと判定するのが、PCR による遺伝子診断である。RNA ウイルスの場合には PCR の前に逆転写を行う必要があるが、以下では、特に区別が必要な場合を除いて RT-PCR も PCR と区別しないで PCR とよぶこととする。

遺伝子の増幅が実際に起きたかどうかは、その反応産物の一部をとって、アガロースゲルなどを用いての電気泳動を行った後で、Ethidium bromide などの核酸染色剤で染色してから、紫外線照射下でバンドが見えるかどうかで判定するのが一般的である。なお、Ethidium bromide は変異原であり、紫外線は目に有害であるので、注意して取り扱う必要がある。泳動の際に分子量マーカーを入れておけば、その増幅産物のサイズも確認できる。以下で解説するように増幅産物のサイズも遺伝子診断の重要な結果となる。複数の異なる植物から同一プライマーを用いて同様なサイズの増幅産物が得られた時には、それらの産物を制限酵素で切断したものを泳動してそれらの大きさを比較することによって、複数の植物が同じウイルス株に感染していたかどうかはある程度まで判断することも可能である。この手法は PCR-RFLP とよばれている。

PCR で遺伝子の増幅が起きると白濁化が起きるようにしておく PCR 系も開発されていて、これを用いればウイルス感染の有無は反応後の電気泳動なしで判定できるが、プライマーの選定がやや複雑である。また、通常の PCR では感染植物中のウイルス濃度を測定することはできないが、リアルタイム PCR を用いるとウイルス密度も定量することができる。通常の PCR でも、増幅に用いる感染植物からの核酸調製液を段階希釈しておくことで、およそのウイルス濃度を推定することは可能であるが、あくまでアバウトである。

20 ～ 30 塩基がつながったプライマーとして用いる 2 種の DNA の配列は、ウイルスの遺伝子配列のどの部分を用いても良い。20 ～ 30 個の塩基がつながったウイルスセンス側とそれに相補的なものの両方をプライマーセットとしてプライマー作製会社に合成を依頼することになるが、現在では比較的安価で入手できる。一般には、GC 含量が高すぎない部分で、反復配列のない部分を選び、それ自身では高次構造をとりにくい配列が良いなどいくつかの基本的な選定条件があるが、結局はやってみて増幅バンドが得られるかどうかであり、バンドが得られなければどうしようもない。

どのような配列のプライマーを用いるかは遺伝子診断を行った際にえられる結果にとってきわめて重要となる。どの部分の配列を利用するかによって、検出できるウイルスの系統や種の範囲が決定されるばかりでなく、反応の特異性や容易さが左右されるためである。さらに、用いるプライマーの選定部位によって、増幅されてくるウイルス遺伝子のひろがり具合 (スペクトラム) も決まってくる。プライマーのスペクトラムによって、あるウイルスの特定系統のみ検出するための系統特異的プライマー、ウイルス種ごとにすべての既知の系統を検出できる種特異的プライマー、複数の種を検出できるグループ特異的プライマー、属特異的プライマー、科特異的プライマーなどと呼ばれ、目的に応じてデザインして作製すれば、それぞれの識別に利用できる。

複数の系統や種以上のものを検出できるプライマーを共通プライマーと呼び、複数の同一種内の系統や複数の種以上のウイルスを検出する場合には、それらの間で共通する配列部分をプライマーとするか、複数のプライマーを作製して混合して PCR に用いることとなる。複数のプライマーセットを用いる場合には以下の 2 つのやり方がある。

一つは、複数の検定対象となる系統やウイルスがある場合に、それらの異なる配列部分の塩基を混合して作製する Degenerate primer 縮重プライマーを使う方法であり、一度で数種ウイルスの感染の有無を判定でき有用である。混合塩基のアルファベット表記は統一されており、表 6 の下の方に示しておいた。Degenerate primer を用いた RT-PCR によって、たとえウイルスを厳密に特定できなくとも、トスポウイルスであると

表 6. 各種植物ウイルス検出のための共通プライマー

ウイルス属等	プライマー名称と配列	産物のサイズ	文献	特徴・使用の際の注意
RNA 球形ウイルス				
クモウイルス 共通	CPTALL-5' 5'-YASYTTTDRGGTTCAATTCC-3' CPTALL-3' 5'-GCCGATTTTACCAGTCAG-3'	950bp	Choi et al. (1999)	CMV, PSV, TAV の 3 種に共通
トスボウイルス 共通	gM410 for F 5'-AACTGGAAAAATGATTYNYTTGTTTCG-3' gM870c for RT 5'-ATTAGYTTGCAKGCCTTCAATNAARGG-3'	500bp	Chen et al. (2012)	他のプライマーセットも有り
ファバウイルス 共通	Fab5'R1F 5'-AAATATTAAACAAACAGCTTTCGTT-3' Fab5'R1R 5'-TTCAAAGCTCGTGCCATNTYATTKGC-3'	320, 350, 390bp	Ferrer et al. (2007)	Gentian mosaic viruss も検出可
BBWV-1, -2 共通	BBWVKMRM 5'-TDGWDCCATCVAGICKCATTTT-3' BBWVVSSP 5'-GTBTCDAGTGCTYTDGAAGG-3'	320bp	Kondo et al. (2005)	
イラルウイルス 共通	Ilar2F5 5'-TCRAYRTTYGAYAARTCNCA-3' Ilar2R9 5'-GGTTGRTTRTGHGGRAAYTT-3'	380bp	Untiveros et al. (2010)	
ネポウイルス A group 共通	NepoA-F 5'-ACDTCWGARGGTTAYCC-3' NepoA-R 5'-RATDCCYACYTGRCWIGGCA-3'	340bp	Wei and Clover (2008)	
ネポウイルス B group 共通	NepoB-F 5'-TCTGGTTTTGCTTTRACRGT-3' NepoB-R 5'-CTTRTCATVCCATCRGTAA-3'	250bp	Wei and Clover (2008)	
RNA 棒状ひも状ウイルス				
トバモウイルス 共通	tobamo1 5'-TGATHAARMGDAAYWTBAAAYDCDCC-3' tobamo2 for RT 5'-TTBGCYTCRAARTTCCA-3'	850bp	Gibbs et al. (1998)	
ポテックスウイルス 共通1	potex2 for RT 5'-TCDGTRTTDGCRTCRAADGT-3' potex1 5'-CAYCARCARGCXAAARGAYSA-3'	800bp	Gibbs et al. (1998)	
ポテックスウイルス 共通2	potex5' 5'-CAYCARCARGCMAARGAYGA- potex1RC 5'-TCAGTRTTDGCRTCRAARGT-3' potex2RC 5'-AGCATRGCNSCRTCTYTG-3	600bp	Rene et al. (2002)	RT には2種類混合して使用
カルラウイルス 共通	Caqr-F2b 5'-GGRCTDGGDGTVCNACTGA-3' Car-R 5'-CCWCATYSRCTCSRCTWTGG-3'	800-850bp	Nie et al. (2008)	ジャガイモ感染ウイルスのみ
ポティウイルス 共通	Potyvird primer 2 5'-GGBAAYAAAGYGGDCARCC-3' Potyvird primer 1 5'-CACGGATCCTTTTTTTTTTTTTTTTTTV-3'	1,600 - 2,100bp	Gibbs and Mackenzie (1997) Gibbs et al. (2003)	最も頼りになるプライマー
ウイロイド				
PSTVd & TCDVd	MpPTC-F 5'-CGGTGGGGAGTGCCTC-3' MpPCT-F 5'-CGGTGGGGAGTGCCTC-3' MpPTA-F 5'-CGGTGGGGAGTGCCTA-3' RT用Mp-R 5'-TCAGGTGTGAACCACAGGAA-3'	271bp : PSTVd 191bp : TCDVd	Matsushita et al. (2010)	F 用は3種混合使用とされているが, degenerate でもよい可能性あり 事前に非特異反応の有無を確認する
DNA ウィルス				
カウリモウイルス 共通	C4281 5'-WWGGRTTTTTCWRAACWWACT-3 Caulimo3'cpF 5'-GAARRHCATTATGCMAAYGARTGTCCW-3'	840bp	Pappu and Druffel (2009)	
ベゴモウイルス 共通	BM-V 5'-KSGGGTCGACGTCATCAATGACGTTTAC-3' BM-C 5'-AARGAATTCATKGGGGCCCARRRGACTGGC-3'	2,600 - 2,800bp	Briddon and Markham (1994)	

プライマーの配列が報告された以降に見つかったウイルスについては、これらのプライマーで検出できるとは限らないので、事前に配列などで確認すること。

ATGC 以外の文字は以下の縮重配列である：K=G or T, M = A or C, R=A or G, W= A or T, S= C or G, Y= C or T, B=C or G or T; V=A or C or G, H=A or C or T, D=A or G or T, N=A or G or C or T.

かジェミニウイルスであるとかが判明するだけで防除対策がたてられることも多いことから、Degenerate primer を用いた検討は簡便でかつ有用なことが多い。そこで、これまでに報告されている各ウイルス属等に共通な代表的プライマーの具体例を表6に示す。

もう一つの方法は、複数の種特異的プライマーセットを用い、増幅されてくるバンドのサイズをあらかじめウイルスによって異なるように設定しておき、増幅されてきたバンドのサイズからウイルス種まで決定することができるようにするものであり、Multiplex 法と呼ばれている。これは1種の宿主植物に複数の異なる種のウイルスが発生しているときには一度のPCRで複数のウイルスの種まで特定できるので有効な手法で、ウイルス種ごとの詳しい発生調査などの際にはきわめて有効な手段となる。なお、PCR増幅の際には、特にアニーリングの温度（プライマーのT_m値と関連）や各プライマーの濃度が増幅の特異性やバンドの濃さに大きく影響してくる場合もあるので本法を用いる場合には、最適プライマー濃度やプライマーの一次構造などからの最適アニーリング温度をきちんと設定しておくことが特に重要となる。

PCR増幅を行った場合には、得られた増幅産物の塩基配列を決定することによって、そのウイルスの特性についての情報を、血清学的診断の場合よりたくさん知ることができる。たとえば、外被タンパク質遺伝子を増幅できるようなプライマーを用いた場合には、その増幅バンドの塩基配列を決定することによって、配列既知のウイルスと比較することができ、発生しているウイルスの分類学的な位置を考察できる。現在では、ウイルスの分類には外被タンパク質遺伝子の配列が最も重要視され、頻繁に用いられ多くの情報が蓄積されているからである。また、非翻訳領域の配列を増幅してその配列を決定すれば、種を越えたより大きな分類への手がかりをえることもできる。このような点が、PCR増幅による遺伝子診断の利用が血清診断を超えた利点であり、遺伝子診断の利用が増えてきている理由でもある。

一方、PCRでは試薬キットや機器にコストがかかる、電気泳動したあとで特殊な染色剤で染色して、紫外線をあてないと結果がわからないなどの欠点がある。これらの点は最近の一部改良されてきており、次の簡易診断キットでもその工夫が見られる物がある。PCR機も最近はかなり廉価になってきており、ごく最近になって22万円程度の機器が市販されたとのことである。上で述べたように通常のPCRでは、ウイルスの定量はほとんどできない。その欠点を補うために開発された定量PCRという手法があるが、それについては、そのために用いる試薬や機器によって異なる点も多いので、各種キットや機器を販売している各社のマニュアルを参照されたい。また、本章で説明したこと以外のPCRについての情報や具体的なプロトコールについては、37ページに紹介したウイルス検定マニュアルHP等を参照されたい。

(6) 簡易診断キット

簡易診断キットは基本的には上の2種の診断法、血清学的診断法か遺伝子診断法のいずれかを利用したもの

表7. 主な簡易診断キット

名称	メーカー	利用原理	価格	反応時間	対象ウイルス
蘭のウイルス診断キット	日本植物防疫協会	血清反応	5回で5,250円	5分	ランウイルス2種
Immuno-strip	Agdia 社	血清反応	25回で19,000円	5-30分	ウイルス別
SDV クロマト	ミズホメディー	血清反応	10回で11,000円	15分	温州萎縮ウイルス
PPV 検出キット	ニッポンジーン	血清反応	50回で28,000円	15分	ウメ輪紋ウイルス
PPV 検出キット	ニッポンジーン	遺伝子診断	48回で47,900円	60分	ウメ輪紋ウイルス
TYLCV 検出キット	ニッポンジーン	遺伝子診断	50回で33,300円	60分	トマト黄化葉巻ウイルス
CCYV 検定試薬	日本植物防疫協会	血清反応	1千ウエル用で21,000円	1-2日	ウリ類退緑黄化ウイルス
TSWV 検定試薬	日本植物防疫協会	血清反応	2.5千ウエル用で50,000円	1-2日	トマト黄化えそウイルス
エライザキット	日本植物防疫協会	血清反応	2.5千ウエル用で44,000円	1-2日	多数の植物ウイルス
エライザキット	Agdia 社	血清反応	不明：和光純薬	1-2日	多数の植物ウイルス
ウイルス抗血清	ATCC	血清反応	不明：住商ファーマ	1-2日	多数の植物ウイルス
ウイルス抗血清	日本植物防疫協会	血清反応	2.5千ウエル用で25,000円	1-2日	多数の植物ウイルス
ウイルス抗血清	Agdia 社	血清反応	不明：和光純薬	1-2日	多数の植物ウイルス

で、それらの操作を簡便化したものである。現在では多くのものが市販されているので、代表的なものを表7に示しておいた。それらの中から使用目的や検定数及びコスト等の条件によって選んで使うことになる。これらの簡易キットは、少数の検定の場合には結果が安定しているものが多く有用であるが、判定結果の解釈をまちがわないために原理をよく理解してから使うようにすべきである。この表に掲載しているもの以外にもいろいろな種類のキットがたくさんあるので、各社に問い合わせられたい。

(7) 未知のウイルスの特定法

未知のウイルスというのは新規ウイルスのことで、既知のウイルスとかなり類縁関係が遠いウイルスで、既存の抗血清による診断ができなかったり、既知ウイルスのプライマーによって検出できないウイルスをさす。それを診断するというのはちょっとおかしい感じがするので、ここでは特定という言葉を使うこととする。もちろん、新規ウイルスでも種々の純化精製法を検討してきちんと精製して研究を進めていくのが一番のぞましいことであるが、一度やってみるとわかるように新規ウイルスではこの正道を歩むのはかなり大変である。どのようなウイルスであるか見当をつけることができればこの種の研究は大きく進展することとなる。そのためのヒントをここでは紹介する。これまで述べてきた手法はすべて対象が既知のウイルスと同一種であるか、比較的近縁なウイルスの場合には有効であるが、既知のウイルスとかなり離れたウイルスや全く新規なウイルスである場合には役に立たないことが多いのである。各種の検定植物での病徴から、どのウイルスに近いかが推定できる場合には、その想定されるウイルス種を含む表6に揚げた共通プライマーを用いることで、新規ウイルスでも増幅断片をえることができる場合もあるので、是非試していただきたい。これらのプライマーは、特に種の多いジェミニウイルスやポティウイルスでは幅広く活用できることがすでに確認されている。増幅断片が得られれば、その塩基配列を知ることができ、そのウイルスの分類学的所属や特性解明、それに確実な診断法の開発は大きく進むこととなる。

植物ウイルスであると思われるのに、既存の各種抗血清を用いても反応しないときや共通プライマーを用いたPCRでバンドが出ない時には、以下のようにPEG濃縮でうまくいくことある。酸化防止剤を加えて作製した感染葉磨砕液をウイルスの感染性を低下させない有機溶媒等で処理後に、低速遠心して得た上清に、10%程度のポリエチレングリコール(PEG)を加えて氷冷した後で低速遠心して得た沈殿を、少量の20 mM程度の中性リン酸緩衝液に完全に溶解する。PEGを加える前に1%程度のトライトンX-100を加えておくと植物由来の膜成分等が除去されて濃縮試料がきれいになるばかりでなく、ウイルスによってはウイルス密度が高まることがある。CMVなどでは再懸濁液に少量のEDTAを加えておくとよいが、EDTAで解離してしまうウイルスでは加えない。再懸濁液の泡立ちが激しい場合やトライトンが次のステップの反応を阻害する心配がある場合には、沈殿を溶かさないように再懸濁液を静かに加えて沈殿の周囲を洗浄し、その洗浄液を慎重に完全に取り除いてから、新たに再懸濁液を加えて沈殿を溶かす。また再懸濁液の濁りが激しい場合には、もう一度低速遠心を行って沈殿を除いてから、次の解析に進むとよい。

こうして得られた試料を電気泳動で分離解析してウイルス核酸のおよその大きさと成分数を知ることによって、対象ウイルスがどんなウイルスに近いかを推定することができる。多くの植物ウイルスの場合には、その核酸成分の数がいくつあるかが判明すれば、およそのウイルス同定のための大きな助けとなるからである。研究対象としている未知のウイルスが、ポティウイルスであるなら泳動度の小さなところに1本のバンド、トバモウイルスならポティウイルスより早く泳動する1本のバンド、ククモウイルスやAMVならトバモウイルスより先に泳動する3-4本のバンド(いずれも大きい2成分の分離がよくないことが多いため)、BBWVやネポウイルスなら離れた2本のバンドが現れる。サテライトRNAを含むCMVではかなり早く泳動するバンドの数が1本増える(図7)。同じ数のバンドとなるウイルスであっても属が異なれば相対的な泳動度が異なるので、識別可能な場合もある。泳動するときには、CMVとTMVは対照レーンで同時に流しておく。これらがいないときには核酸の分子量マーカーをいれておくことで、およそのウイルス核酸の大きさを推定できる。核酸の成分数ばかりでなく、そのサイズも同定の重要な助けとなるのである。

なお、通常は部分純化試料にはウイルス粒子が含まれているために、核酸抽出処理を行ってからでないと、ウイルス核酸の泳動を行うことはできない。そこで、試料からの核酸抽出を行う手間を省くとともに、それに伴うロスを減らすために、以下のようにSodium dodecyl sulfate(SDS)を用いるとよい。電気泳動緩衝液

に 0.1%SDS をいれておき、泳動する前に 15 分程度予備泳動を行ってゲル内に SDS を入れておく。各試料にも 0.5-1% 程度の SDS をあらかじめ加えておき、ネポウイルスなどのようにウイルス粒子がこわれにくいものでは 70℃程度での 5 分間の熱処理をしておくといよい。なお、SDS は Ethidium bromide による核酸の染色を阻害するので、泳動終了後はゲルを蒸留水中で軽く浸透しながらの洗浄を 2 回行ってから染色することが重要である。

同じウイルスの異なる系統の識別など、より詳細な違いを検討したいときには、本法においてアガロースゲルではなく、より細かい泳動度の違いが明確になるアガロースとアクリルアミドからなる複合ゲルを用いるとよい場合もある (図 7)。これは通常のウイルス核酸の分離に好適な 2% 程度のアクリルアミドゲル単独では強度が弱く扱いにくいので、強度を高めるために 0.8% 程度のアガロースを混合して用いる泳動であり、他の点では通常の電気泳動と変わらない。泳動度が近接しているために通常のアガロースゲルでは分離が不十分な CMV-RNA の大きい方の 2 成分も、この複合ゲルでは分離がよくなることが確認されており、系統によっては系統間の識別も可能となる。なお、わずかな違いしかないものの比較を行う際

には、ウイルス試料中のウイルス濃度が高すぎると分離が不十分になるので、最適な密度を事前にチェックしてから行うようにする。この試料濃度の事前チェックは電気泳動に限らず他の種々の比較を行う時にも、大切なポイントのひとつである。もちろん、アガロースやアクリルアミドの最適濃度もあるので、細かい比較のためにはさまざまなファクターについて最適化を検討しておくことが必要となる。

同様なウイルス濃縮試料を用いての解析を 10% 程度のアクリルアミドゲルを用いた電気泳動で行って、タンパク質レベルで検定してみることもウイルスの特定に役立つこともある。ただし、残念ながら植物ウイルスは外被タンパク質 (CP) は 1 成分のものが殆どであり、かつ健全植物の大量に含まれる Rubisco と類似の大きさのものも多いために、あまり多くの情報はえられないというのがタンパク質レベルでの解析による通常の結果である。しかし、CP を 2 種類持つ SqMV をはじめとしたコモウイルスの大半や BBWV を含むファバウイルス、1 種類のみでも大きな CP を持つネポウイルス、トバモウイルスのように特に小さな CP をもつものでは、タンパク質泳動はウイルス属の特定に有用である。

感染葉から核酸を抽出して、それに含まれているウイルス核酸を直接、電気泳動で分離検出して、上の部分濃縮ウイルスを用いた方法と同様に解析することも可能である。しかし、全核酸を用いた場合には健全植物由来の核酸成分がウイルス核酸と同様な位置に泳動されてきて、解析のじゃまをすることが多い。それを防ぐためには、ウイルス感染植物細胞内に形成されるウイルス特異的 2 本鎖核酸を濃縮するとよい。その詳細については脇本 (1993) に掲載された実験法を参照されたい。ウイロイドは感染植物での濃度が低いが、外被タンパク質を持たないために、PEG 遠心で部分濃縮 (47 ページ参照) することはできない。しかし、RNA として強い高次構造を有しているので 2 本鎖 RNA の精製法と同様な手法で濃縮することができる。

(8) 次世代シーケンサーによる診断

最近になって、次世代シーケンスによって従来の手法では特定できなかった病原ウイルスを特定できたとい

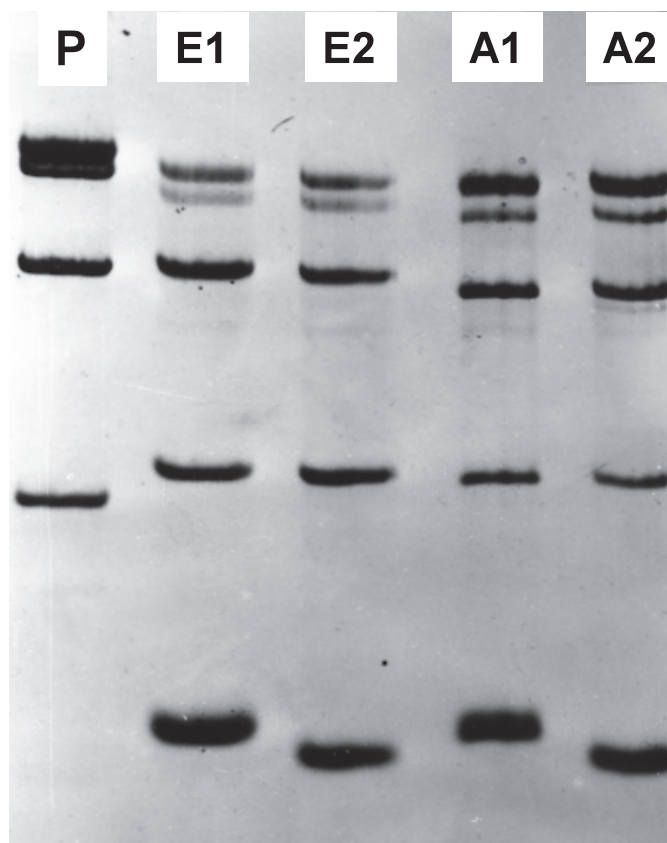


図 7. ウイルス RNA の電気泳動図の例

複合ゲルを用いて SDS を加えて CMV を泳動した。P : CMV-P, E1 と E2 : CMV-E, A1 と A2 : CMV-A. P のみ一番下のサテライト RNA を含んでいない。

う報告、また、ディープシーケンシングの利用によってこれまでに見つかっていなかった新しいウイルスが見つかったという報告が出されるようになってきている。特にこれまで病原を特定できにくかった果樹のウイルスやウイロイドでは、本法は強力な助けになると思われるが、ここではその詳細は割愛する。その手法の詳細や解説は最近の文献を参照されたい (Adams et al., 2009 ; Studholme et al., 2009)。

次世代シーケンサーによって得られた膨大かつ比較的短い配列データの山から既知の配列を除き、残った配列を対象としてデータベース検索とつなぎ合わせによって新規ウイルス様配列が得られたからといって、それだけで、それが病害の原因となっているウイルスであるということを断定することはむろんできない。もちろん、ウイルスの精製や単離が困難であったために取り残されていたものもありうるのであるが、これから次世代シーケンスによって見出されてくる新規ウイルス様配列については、その単離やそれが真の病原であることの証明は困難なものが多いと思われる。しかし、伊藤ら (2012) が果樹に関して報告しているように、新たに検出されたウイルス様配列が接ぎ木で健全植物に伝染することを証明しながら進めていくという方法は、これらの困難に立ち向かうための比較的簡便でかつ有効な手法となるとと思われる。草本植物のウイルスに対してもこの接ぎ木手法は有効と思われ、今後の次世代シーケンスと接ぎ木等を利用した感染性の証明による、新規ウイルスの発見競争に大いに期待したい。

6. 植物ウイルスの保存マニュアル

1) ウイルスの保存法

植物ウイルスは研究者個人が必要な間だけ使うものであれば、特に長期の保存は考えなくてよいと思われる。しかし、研究者が分離し特性を調べて解析したウイルスは、その後になっていろいろな役に立つことを忘れないでほしいのである。たとえば、その後になって見つかるウイルスとの塩基配列や各種特性の比較、各種品種での病徴や増殖度の比較など、ウイルスの解析や防除対策のためにいろいろな情報が必要となってくる。その際に、過去の類似ウイルスとの比較解析が、新発生ウイルスの更なる特性解明や防除に直接つながってくるのである。ウイルスを分離した研究者本人が以下に解説する方法できちんと保存しておいてくれたなら、しばらくの間はそのウイルスを分譲してもらえる可能性はある。しかし、時間が経つとそのような幸運はありえないであろう。また、「しばらく」とはどれくらいの期間なのか実際にはわからないのである。したがって、どこかきちんと長期保存ができるところでウイルスを保存しておく必要がある。そのための機関がジーンバンク微生物部門である。ここでは、研究者自身におこなって頂きたい比較的簡単な保存方法とジーンバンクでの実際に行っている長期保存方法について詳しく紹介する。

植物ウイルスの保存には以下のような方法がある。まず、用いる素材によって感染葉の乾燥葉保存、感染葉の磨砕液保存および純化ウイルス保存に分けられる。そして保存方法により、乾燥葉保存、凍結乾燥保存、真空乾燥保存、凍結保存、液体窒素保存に分類される。一般には、感染葉やその磨砕液の中で安定して感染性を保持できるウイルスほど長期保存に耐えうるといってよい。

最初に見つけたウイルスに感染していた植物 (原株) をそのまま生かして置いておくのが、簡単かつ有効な

【ミニコラム：ウイルスの安定性】

ウイルスの安定性を考える上で忘れてならないことは、*in vitro* での安定性というのは機械的接触で伝染するウイルスにとってはきわめて重要なことであるが、媒介生物を介して伝搬するウイルスにとっては全くどうでもよいことなのである。つまり、安定性がよくないから弱いウイルスという考え方は正しくない。安定性が高い方がよいというのは、人間がウイルスを取り扱う際に扱いやすいというだけのことであり、虫や菌類で媒介されるウイルスにとっては重要なことは、彼ら媒介してくれる生物が来たときに如何に効率よく媒介生物の吸着部にくっつき、次の植物に移った際に如何に安全 (感染力を保持したまま) に離れることができるかということである。葉が磨砕されたときにどうなろうとこれらのウイルスにとっては知ったことではないのである。

保存方法であると思われるかもしれない。しかし、現実には、原株は他のウイルスにも感染している可能性があること、生きた植物体内ではいつウイルスに変異が生じるかわからないこと、ウイルス濃度が時間の経過とともに低下する可能性があること、他のウイルスが混入する危険性が常にあることなどの点から、原株のそのままの保存は推奨できないのである。もちろん、以下にのべる方法でも変異や他ウイルスの混入などは生じる可能性があるため、その点については常に念頭においておき、多少でも異常が認められた場合にはすぐに一つ前に戻って変異や異常のないウイルスを保存しなおすことが肝要である。

保存に用いる感染葉として適しているのは、すべての方法を通じて以下のものである。窒素をやや多めに与えて柔らかめに育てた大きくならずすぎている植物の、若い方の葉の複数枚に接種したものであること。また、接種後あまりに日数が経過した葉ではウイルス濃度が低下していることも多いので、発病後の適切な時期に採取した葉であることである。病徴が出るものでは病徴が明瞭な部位のみを選んでおくことが重要である。CMV やトスポウイルスなどでは、一般に病徴が出始めたころ採葉して保存すると良いが、ポティウイルスなどでは、ウイルスの増殖が遅いために、病徴が出た直後の葉を保存すると感染性がきわめて低くうまくいかない場合もあるので注意する。ウイルスによって保存に最適な時期が異なるのである。いずれにしても採取後に速やかに保存した葉を検定植物に接種して病原性を確認しておくことが絶対に必要である。

(1) 乾燥葉による保存

乾燥葉を用いた保存法が最も簡便であり、比較的安定なウイルスであればこれでよい。TMV などでは問題なくこの方法で可能である。大切なことは、保存材料として十分に対象ウイルスが増殖しているウイルス濃度の高い新鮮な葉を用いることである。タバモウイルスでは風乾した葉を用いればよく、あまり細かい点は気にしなくてよいが、水分が多いと腐敗しやすくなってよくないので注意する。また、他のウイルスへのコンタミネーションの原因となるので、その扱いには注意する。ククモウイルスでは、風乾葉ではどのくらいのあいだ感染性を保持できるか心許ない。そこで、ククモウイルスでは感染葉を細長く刻んで紙などでくるみ、シリカゲルや炭酸カルシウムなどの乾燥剤とともに袋に入れて、葉の内部までよく乾燥するように注意するなど、ウイルス濃度の高い感染葉を十分に乾燥した状態で保存することが、長期安定保存には重要である。乾燥剤は吸水によって色が変わるようなものを用い、色が少し変わってきたら早めに新しい乾燥剤と交換する。

保存中は、しっかりと封のできる袋や箱に入れておく。冷蔵庫に入れておくのが望ましい。タバモウイルスなら湿気の多いところや高温にならない部屋であれば通常の室内で数年間程度の保存なら問題ない。しかし、タバモウイルスといえども直射日光や高温はもちろん禁物である。

(2) 感染葉磨砕液の凍結保存

アスコルビン酸などの酸化防止剤を1%程度添加した中性のリン酸緩衝液で感染葉を磨砕した液をアンプルやきちんとふたのできるチューブなどに小分けして、凍結保存することによって、長期間安定して保存できるウイルスもある。液状とすることによって、感染葉を細切してアンプルなどにいれる手間や時間を大きく減らすことが可能となる。保存のために感染葉を磨砕する際に、ウイルスの種類に応じて表8のような添加物を加えておくと、多くのウイルスでその保存性が高まることがわかっている(福本, 1987)。対象ウイルスに応じてリジン、ぶどう糖、またはしょ糖を0.5～5%程度を添加するとよい。ペプトンは0.5%、グリセリンは3% (V/V)、ビタミンCは1%が有効とされている。なお、グリセリンを使用する場合は、古くなったものや等級の低いものはウイルスを失活させてしまう危険があるので、新しいpHが中性付近の特級以上ものを使うのがポイントである。

(3) 純化ウイルスの凍結・凍結乾燥保存

ウイルス濃度を一定にして再現性の高い試験などを行う時には、ウイルスを純化精製して定量し、その濃度を測定して一定濃度で分注したものを冷凍保存や凍結乾燥保存しておくことが便利である。ウイルスの感染性を定量比較する際の絶好の対照として利用できるからである。その際にはウイルスの活性が低下しないような条件で保存しておく必要があるため、福本(1987)がまとめた表8の添加物を利用するとよい。ポティウイルスではリジン、ククモウイルスならショ糖という具合である。保存に有効なことが判明しているこれらの添加物を混合して添加しておくと、多くのウイルスの保存に有効な添加物となると思われる。

表 8. 植物ウイルス保存のための添加物^{a)}

ウイルス名	凍結保存で有効添加物	凍結乾燥保存で有効な添加物	備 考
CMV (クモウイルス属)	N T	しょ糖, イノシトール	TAV, PSV も同様
TBRV (ネポウイルス属)	ペプトン, グリセリン	しょ糖, イノシトール, ペプトン	
ArMV (ネポウイルス属)	N T	ソルビトール, ぶどう糖	TBRV も同様
AMV (アルフモウイルス属)	しょ糖, ペプトン, グリセリン	しょ糖, イノシトール	
RMV (コモウイルス属)	ペプトン, グリセリン	ソルビトール, ぶどう糖, ビタミンC	
SqMV (コモウイルス属)	N T	ソルビトール, リジン, ビタミンC	
CaMtV (カルモウイルス属)	ペプトン, グリセリン	リジン, しょ糖, ペプトン	
SBMV (ソベモウイルス属)	ペプトン, グリセリン	リジン	
TuMV (ポティウイルス属)	ペプトン	リジン, ペプトン	
TSWV (トスポウイルス属)	しょ糖, グリセリン	システイン	

NT, 未調査

a) 福本 (1987) を改変したもので, 使用濃度は0.5 ~ 5% (各添加物の推奨使用濃度は50ページを参照).

(4) 感染葉の真空乾燥保存

通常の植物ウイルスの長期保存には真空乾燥が最適な方法であるが, 真空凍結乾燥機および感染葉を詰める硬質ガラスアンプルが必要となる. 硬質ガラスアンプルは継ぎ目があるとその部分から空気がもれやすいので, 継ぎ目のないものが望ましいが, 継ぎ目なしアンプルでは小さいために中に入れられる感染葉の量が少ないので不便なこともある.

真空乾燥には一般にウイルス感染葉を利用する. 上で述べたようにして作製したウイルス濃度の高い感染葉を細長く切って, ガラスアンプルに詰めて, 真空凍結乾燥機でまず低温条件下で真空にしておくことで十分に乾燥したのち, 真空条件下で溶封したものは, 長期間にわたって安定してウイルス活性を保持できることから, 植物ウイルスの長期安定保存に広く利用されている. 図 8 に代表的な真空凍結乾燥機および具体的な真空乾燥の手順を示す. ウイルスの長期安定保存のためには注意すべきことがいくつもあるので, 以下に実際に真空乾燥を行う際に注意すべき点を記しておく.

◎保存の材料として, 十分にウイルス活性の高い新鮮な若い葉を用いることが重要である. 一般的には病徴が出始めたばかりの葉が最適だが, ウイルスによっては病徴が出てからしばらく経過しないと感染性が低いウイルスもあるので注意が必要である. 扱ったことのない新しいウイルスを扱う時にはその点を事前にチェックしておくことが重要である. 取り違えのないように, アンプルには中にいれる試料の情報が書かれたラベルをあらかじめ貼っておく.

◎アンプルにいれる葉はできるだけ細長く切ったものとする. 大きな葉を丸ごと無理矢理にアンプル内にいれるのでは, 傷がついて植物細胞が壊されてしまう上に, 試料の乾燥が不十分・不均一となってしまう, ウイルスの感染性を保持できなくなるからである. アンプルにいれる葉の量は多すぎると乾燥が不十分となりやすい上に相互にすれあって傷がつきやすいためよくないので, ウイルスがよく増えた若い葉を適量入れるようにする.

◎水分をとばすための真空吸引は低温で行い, 1 晩程度は継続して行う.

◎アンプルを溶封する時に, 感染葉の入ったアンプルを多岐管に付け替えることがあるが, その際には付け替えた後も十分に真空が上がってから溶封を開始し, 溶封している間に空気漏れがおきないように注意すること. 溶封のためにガスバーナーなどを使用することになるが, バーナーの熱をアンプル内の感染葉にできるだけあてないようにする. もちろん, やけどをしないように十分に注意する. 特に溶封直後のアンプルは一瞬さわるだけで激しいやけどをするほど熱いので, 十分にさましてから次の作業に移るようにする.

◎十分に冷ました溶封アンプルを, 袋に小分けして, -70°C から -20°C の冷凍庫に保存すること. これらの冷凍庫がないときは, 冷蔵庫でも保存可能であるが, その保存可能期間は冷凍庫の場合より短くな

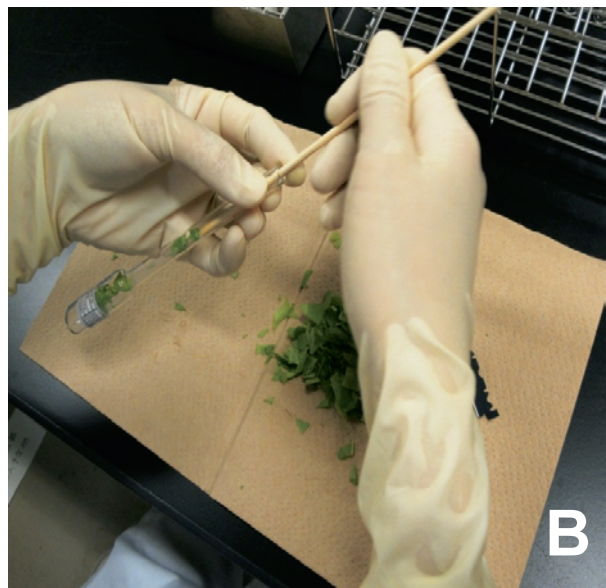
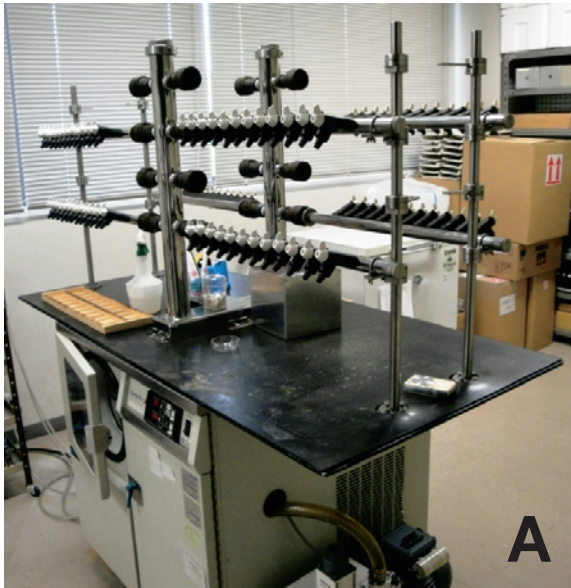


図 8. ジーンバンクでの真空乾燥保存アンプルの作製手順

A: 真空凍結乾燥機, B: 細く切った感染葉をアンプルに詰める,

C: アンプルを真空凍結乾燥機に取り付ける, D: 乾燥後にアンプルを溶封する.

るものと思われるので注意する。ククモウイルスについては、真空乾燥後、数年間は冷蔵庫に放置しても感染性は十分に残っていたが、他のウイルスについては個々の検証が必要であり、冷凍保存を優先すべきである。

◎真空乾燥保存したアンプルを接種するために開封する際に、アンプルに傷を付けて折った時、通常は真空アンプルの中に空気が入るのでポーンという音がするわけであるが、音が殆どしない場合がまれにある。この場合には、アンプルのどこかから空気が漏れ入っていたことが否めず、トバモウイルス以外では病原性が失われていることもあるので、留意する必要がある。

◎最後に忘れてならないことは、真空乾燥が終わったらできるだけ早く、アンプルのうちの1本を開封し感受性植物に接種して、ウイルス活性をきちんと確認しておくことである。もし、複数本のアンプルで確認してみて病原性がないときは、保存のために用いる感染葉をつくるための接種からやりなおすべきである。数年後に、はじめて保存アンプルを出してきて接種したが病原性がなかったという場合、保管がきちんとしていたならば、もとの接種か真空乾燥の際に失敗していた可能性が高いことになるが、もう後の祭りである。その可能性を除くために、アンプル標品のウイルス活性は保管前に必ず確認しておくことが肝要である。

(5) 感染葉磨砕液の凍結乾燥保存

本手法は、感染葉の磨砕液をアンプルに分注して凍結した後、真空条件下で乾燥するものである。その利点としては、細切した葉をアンプルに詰める必要がないので、大量のアンプルを一度に比較的容易に作成できること、感染葉を用いた場合には不安定なウイルスでも、本手法では磨砕液に福本の保護剤（表 8）を添加しておくことで安定性を高めることができる点などである。ただし、本手法では、多岐管に凍結アンプルをつけて真空にする際に試料が一部でも溶けていると、真空にする際に突沸などによる試料の噴き出しに注意する必要がある。アンプルに磨砕液を分注した後、真空にする前に十分に凍結させた試料を用いることとし、真空にする際にできるだけゆっくりと真空にしていくことが大切である。できれば冷凍チャンバーの中で一晩真空にして水分を飛ばした後で、多岐管につけなおして再度真空吸引を行った後で溶封を行うとよい。ただし、その場合にも乾燥した汁液の固まりが真空にする際に吸い出されないように、ゆっくりと真空にすることが大切である。

(6) 乾燥アンプルの保存

以上のようにして作製した乾燥アンプルは、通常は -20°C の冷凍庫で保存すれば十分であり、少なくとも数年間は感染性を十分に保持している。もちろん、作製した時に感染性が低いものではすぐに失活するものも出てくるので、くどいようだが、ウイルスが十分に増殖した葉を乾燥処理に用いることをいつも心がけてほしい。ジーンバンクでは安全を考慮して、乾燥直後にすみやかにアンプルの感染性を検定植物を用いて検定するとともに、すべて -70°C の超低温槽（図 9）で保管している。



図 9. ジーンバンクでの乾燥アンプルの保存

A : 保存に使用している超低温槽（ -70°C ），B : 超低温槽の内部。

(7) 感染葉の液体窒素中での保存

ウイルス感染植物葉を液体窒素で保存するのは、長期保存に適した方法として期待されているところである。ジーンバンクでは、特に安定なトバモウイルスを除き、感染葉を真空乾燥するのと併行して、耐凍性のプラスチックチューブに感染葉を小分けして入れ、液体窒素気相中（約 -165°C ）にも保存することとしている（図 10）。

液体窒素気相中で保存した場合、実際に植物ウイルスがどのくらいの期間にわたって感染性を維持できるのかを、特に不安定であると考えられているトスポウイルスについて確認を試みた。その結果、TSWV については 10 年前の保存標品でも高い感染性が保持されていることが判明した。また、グラジオラスからの CMV についても検定したが、問題は認められなかった。現在、ジーンバンクに保存されている植物ウイルスが、50 年あるいは 100 年後にその感染性を検定される日がくるのが待たれる。

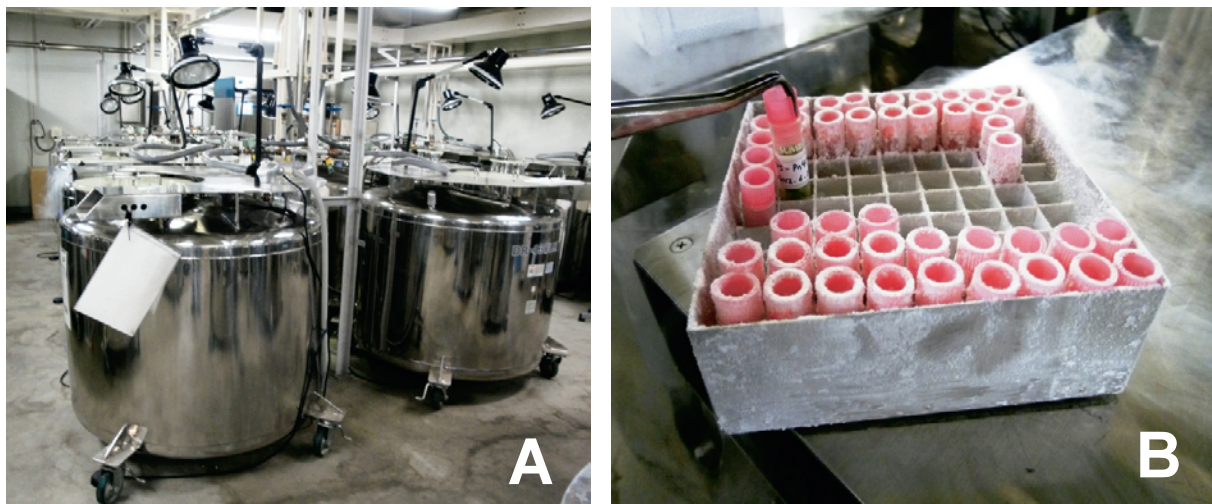


図 10. ジーンバンクにおける感染葉の液体窒素気相中での保存

A: 保存に使用している液体窒素タンク（約 -165°C ），B: 感染葉を細切してチューブへ入れ，タンクに格納している．

2) 感染性の定量

ウイルスを保存した場合あるいはこれから保存しようとする場合を含めて，供試するウイルス試料中のウイルスの感染性を比較定量することが必要となることがある．また，多くの研究においてウイルスの感染性の比較定量は必須の手法となっている．植物ウイルスの感染性の検定には植物に接種するのが一般的であり，それによってウイルスの感染力を比較判定できる．植物への接種法については「5-1) ウイルスの接種法」で説明しているので参照されたい．接種による定量の際には対象ウイルスで局部病斑を作る植物が知られている場合には，局部病斑植物を用いる．たとえば，多くのウイルスではアカザ科植物，TMV ではグルチノーザ，CMV ではササゲ初生葉，PVX ではセンニチコウなどである．これは，接種した葉に形成される局部病斑数が，ウイルスの感染性に比例することを利用するものである．植物は生育のそろった感受性の高い状態のものを使う必要があり，接種源を2倍ずつ，5倍ずつ，あるいは10倍ずつなど段階的に希釈したものを接種に用いる．検定植物の葉を半分ずつ接種する半葉法と1枚ずつ使う全葉法とがあり，接種区の数や植物数によって使い分けることになるが，半葉法の方がデータのそろいがよくなることが多い．具体的な配置は37ページ記載の参考書（脇本，1993）を参照されたい．接種区を設定したら，間違わないように対応する葉に油性インクで数字を書き込んでおくといよい．

局部病斑植物が見つからないウイルスでは，アカザ科植物の反応が未確認の場合には，まずはアカザ科の植物であるキノアやアマランティカラーに接種してみる．これらの植物は多くのウイルスに対して局部病斑を作るからである．これらが局部病斑を作らない場合には，他の植物に接種して探索することとなる．それでもみつからない時には全身感染植物を用いることになる．この場合にももちろん生育の十分にそろった感受性の高い植物を使うことは大切であり，不揃いの植物を使うと再現性が低下する．全身感染植物を用いる場合には，接種区の1区につき，最低5株の植物を供試する．発病率で感染性を判定するためには，希釈倍率を変えた区を用いることは局部病斑植物の場合よりも重要となる．接種する葉の枚数やそれらの葉位などを同一の条件でそろえて接種し，全身感染し発病してくるまで待ち，発病してきたところでその発病株数を調査して，区で比較することによって相対的な感染性を知ることができる．発病までの日数もウイルス濃度と関連することが多いので調査しておくといよい．上の局部病斑植物を用いる場合も含めて，感染性が安定な純化ウイルスを試験区の中に入れておくと，それに応じた感染性がわかるので，異なる時に用いた接種区の感染性を純化ウイルス区との相対的な数値として比較することができる．

7. ジーンバンク登録植物ウイルスと世界のバンク

1) 農業生物資源ジーンバンクの植物ウイルス

本マニュアルのはじめにも書いたとおり、農業生物資源ジーンバンクでは1985年から植物ウイルスの保存配布を開始しており、2012年2月現在で、ウイロイド16株を含めて植物ウイルス252株を保存・配布している。ウイルス種（英名）ごとの保存株数を表9に示す。これらのウイルスには菌類や細菌などと同様にすべて固有のMAFF番号がつけられている。これらの植物ウイルスのあらゆる情報はデータベースで管理されており、個々のウイルス株の分離年・分離植物名・品種名・採取地・他の重要特性なども検索できるシステムとなっている。データベースに収録されていない情報も一部付記した上で、ジーンバンクが配布している植物ウイルス・ウイロイド株を表10・11に示した。

ジーンバンクに登録済みの植物ウイルスの中で、現時点で株数として最多のものがCMVの39株であり、次がToMVの27株、TMVの15株の順となっている。これらの株は同種ウイルスであっても、ウイルスの特性、原宿主植物の種類、発生地域、発生年度などが異なっているユニークなものばかりである。ポティウイルス属のウイルスとしては16種、計60株がそろっており、その中で最多のZYMVが11株で、次がSMVの8株である。他のウイルスでは、MNSVやCGMMVおよびBBWVが各7株などとなっている。これら配布しているウイルス株の中で特に注目して頂きたいウイルスとしては、変異の豊富なCMV、わが国で初めて見つかった新種ウイルスであるアマゾンユリ微斑ウイルス *Amazon lily mild mottle virus* (Fuji et al., 2013)、キュウリ斑紋ウイルス *Cucumber mottle virus* (Orita et al., 2007)、メロン黄化えそウイルス *Melon yellow spot virus* (Kato et al., 2000)、リンドウモザイクウイルス *Gentian mosaic virus* (Kobayashi et al., 2005)、ソテツえそ萎縮ウイルス *Cycas necrotic stunt virus* (Hanada et al., 1988) などがある。今後はトスポウイルスやポティウイルスについてできるだけ保存株を増やしていく方針である。

機械的接種が容易にできるウイルスが、現時点でジーンバンクの配布対象となっているウイルスである。これらの農業上の重要性からこれまでに対象ウイルスとして特に重点的に取り組んできたものとして、トバモウイルス、トスポウイルス、ククモウイルス、ポティウイルスなどがある。虫でしか伝搬されないウイルスでは、真空乾燥によって植物組織が破壊されてしまうために、媒介虫に真空乾燥標品からウイルスを獲得させることはまず不可能であることから、虫媒介性のウイルスはこれまで配布の対象となつてこなかった。しかし、一部の虫媒性ウイルスについては機械的接種の方法をいろいろと工夫することで機械的接種を可能にできると思われる。特にルテオウイルスやジェミニウイルスでは、その可能性が高いと思われる。いろいろな工夫や利用場面を考えることによって、ジーンバンクの対象ウイルスを今後さらに増やしていく方向で検討していくこととしている。

2) ジーンバンクでのウイルスの配布について

ジーンバンクへのウイルス配布の申込は、ジーンバンクのウェブサイト (http://www.gene.affrc.go.jp/index_j.php) からいつでも可能である。申し込んだ株の配布を受けて使用される場合には、以下の点に特に留意してほしい。まず、アンプルからの接種の際には、「5－1) ウイルスの接種法」を参考にして、適正な緩衝液を用いること、十分に葉を磨砕すること、その際に冷やしておくこと、感受性の高い植物に接種することなどに特に注意する。感受性の高い植物というのは、柔らかい葉を持つ若い植物のことであり、固いゴツゴツした葉の植物に接種しても、ウイルス感受性が低いために、発病しないことが多くなってしまうからである。接種する際に適正な量のカーボランダムをかけておくこと、強くこすりすぎないこと、逆に接種圧が弱すぎないようにすることも大切である。

ジーンバンクに依頼されて送ってきたアンプルの葉が少なすぎると心配になられる方もおられるかもしれないが、ジーンバンクの試料はそのままでは大量接種用には作られていないので、注意してほしい。保存や移動によってウイルス濃度が低下していることもありうるので、必ず一度は増殖用植物に接種してから利用していただきたい。大量検定に使われる際には、受け取られた後で必ず一度若い感受性の高い植物苗に接種してウイルスが十分に増殖した葉を、大量検定のための接種原として利用するようにしてほしい。これらはジーンバンクのウイルスを利用して頂く上で大切なポイントである。

これまでに実際にジーンバンクに配布依頼があったウイルスについて 2007 ～ 2011 年度の配布実績を調査集計した。その結果、配布要望の多かったトップ 3 は、CMV、SMV、TMV の順であった。ウイルス属別に見てもククモウイルス属、ポティウイルス属、トバモウイルス属の順であった。最近の傾向として近年問題となっている TSWV の依頼が増えている。トスポウイルスについては、この TSWV しか現時点では登録されていないので、TSWV のみの依頼が増加していると思われる。これから他のトスポウイルスについても至急そろえていくこととしている。すでにトスポウイルスである MYSV や IYSV については準備ができています。また、配布先としては大学、国・独法、民間の順であり、大学の基礎研究、民間の抵抗性検定などに多く利用されている。

ジーンバンクは植物ウイルス研究のためのシーズとして存在しているのであるから、これからますます、皆さんに興味を持っていただけるウイルス株の収集およびそれらの株の情報収集と提供に力を入れていく必要があると考えている。これまでの配布実績から見て、株が多くそろっているウイルスほど需要が多い傾向が明瞭であるので、重要なウイルスについてはさらに配布可能株数を増やしていく予定である。なお、2012 年 7 月までは、依頼のあったアンプル試料は夏場でも通常の宅配便で送っていた。これまで特に問題があるといったご意見は頂いていないものの、2012 年 8 月からは、万全を期すために夏場は冷蔵便でお送りすることにした。

3) 植物ウイルスの世界における入手先

日本国内で植物ウイルスの収集・保存・配布を行っている施設は、農業生物資源ジーンバンクのみである。植物ウイルス抗血清については、茨城県牛久市にある日本植物防疫協会の研究所で、現在 39 種類の重要なウイルスの診断に利用可能なウイルス抗血清を販売している。特に重要なウイルスについては、エライザ検定用のコンジュゲートも一緒に販売しており、いつでも大量診断に利用できるようシステムになっていて便利である。協会の HP で確認の上、積極的に利用していただきたい。

国外では、菌類や細菌については多数の機関が収集配布を行っているが、ウイルスの特性を公表した上で配布業務を行っているのは ATCC (American Type Culture Collection) のみである。ATCC は 1925 年に米国に設立された世界最大級の微生物保存機関であり、日本の業者を通じてウイルス株の分譲を受けることができる。ATCC の他には韓国の Plant Virus GenBank も植物ウイルスの配布を行っている。また、ATCC は植物ウイルス抗血清の配布も行っている。ATCC の 2012 年 2 月現在の配布対象ウイルスは 158 株（ウイロイドも含む）である。

抗血清や植物ウイルス検出キットを市販している団体や会社には、ATCC の他には、USA の Agdia 社やイタリアの IIPADLAB 社など世界的にいくつかある。これらの会社ではウイルス抗血清のポジティブコントロールとして感染植物磨砕液を配布している。ATCC のウイルス試料や外国の会社からの対照ウイルス株については、わが国の植物防疫法による規制のために購入者が植物に接種してウイルスをふやすことは勝手にはできないので注意が必要である。これらは外国のウイルスの日本への侵入防止のための輸入禁止品に相当するので、大臣許可をとってから輸入し、隔離可能な温室などで実験を行い、定期的に植物防疫所の検査を受けるなどの必要がある。

4) ジーンバンクのウイルスの塩基配列

菌類については、すでに多くの登録株についてその rDNA-ITS 領域などの塩基配列をジーンバンクの HP から MAFF 番号別に公開しているところであり、植物ウイルスについてもそれに習って外被タンパク質遺伝子の塩基配列を順次公開することとしている。現時点ではウイルスでの公開例はまだまだ少ないが、鋭意その拡大に努めていくこととしているのでご利用頂きたい。ジーンバンクのウイルス株は長い間保存・継代されているために、どこかで取り違えやコンタミネーションがおきてしまう可能性を完全に排除することはできない。そこで、増殖したウイルスの特に外被タンパク質遺伝子の配列を確認していくことによってこれらの防止ができると考えている。このためにも保存ウイルスの塩基配列を明らかにしておくことは有意義である。

8. 終わりに

ジーンバンクにこれまでに多くの植物ウイルス株が保存され、希望者への配布を続けてこられたのは、多くの植物ウイルス研究者の方々から、各位の貴重なウイルス株を提供していただいた賜である。ここに記して心からお礼申しあげる。今後も、50年、100年後の植物ウイルスの研究及び防除対策への活用の可能性について考えていただき、一人でも多くの方々から、解析が終わったウイルスの1株でも多くをジーンバンクに積極的に提供して頂きたい。まさに各位のウイルス株の一つ一つが貴重な遺伝資源なのである。

ウイルスはきちんと管理保管されていてはじめて活性を維持できるものであるのに、昨今は研究の継続性が重要視されなくなってきたり、研究者の異動や退職によって研究試料が散り散りになったり、廃棄されてしまう危険性がかなり高くなってきていると思われる。そのために、貴重なウイルス株の喪失が大いに危惧される事態となっている。このような状況だからこそ、研究者の方々にジーンバンクへの積極的な提供を是非ともお願いしたい。来週、来月あるいは来年くらいまでなら、誰かがあなたが使っているウイルス株が必要となったときに、あなた自身で対応できるかもしれない。しかし、10年後、50年後、100年後に誰かがそれを必要とした際には、おそらくあなた自身では対応できないのではないだろうか。あなたの研究の後継者もいるかどうかかわからないし、もしポストを継承できたとしても同じ研究をするとは限らない。あなたが使ってきたウイルスは廃棄されるかどこかの冷凍庫のかたすみで失活を待つだけとなりかねない。

しかし、ジーンバンクに連絡して送って頂ければ、今後ジーンバンク事業が継続される限りはあなたの大切なウイルスは活性をもった状態で保存され、利用の要請があればいつでも対応でき、将来のウイルス研究に役立つこととなる。研究に利用したいと思った研究者は誰でもジーンバンクでウイルスのリストを調べ、MAFF 番号を連絡すれば入手できるのである。次に使ったときにジーンバンクに連絡して送ろうではなく、できるだけ早くお願いしたい。もちろん、まだ研究が完了していない場合やライバルには渡したくないウイルスもあると思われる。その際には、まだ研究中や論文発表予定ということで、5年先までは非公開とすることもできる。ジーンバンクでは海外からの要請があれば送ることとなっているので、あなたの競争相手にも送られてしまう可能性があるが、非公開としておけば、そのような懸念はないということは知っておいていただきたい。ジーンバンクの植物ウイルス・ウイロイドのリストを見て頂いて保存されていないウイルス・ウイロイドならなんでも提供して頂きたい。すでにリストにあるウイルスでも、リストのウイルス・ウイロイドと何らかの特性が異なるものであれば、その旨を明記して送って頂きたい。ルテオウイルスやジェミニウイルスなども、現状では少なくともプローブなどでの利用はできるわけであり、今後、凍結乾燥試料からのウイルスの接種法なども検討していきたいので、すぐに公開することはできないと思われるが、お送り頂きたい。ただし、DNA クローンなどの遺伝子組換えウイルスについては現状では受け入れできないので、ご了解頂きたい。

真空乾燥のアンプル1本ずつに、必要十分な量の細かく切った感染葉を詰めるのは結構大変な仕事である。また、ガスバーナーで1本ずつ火傷しないように溶封した上で、真空や温度もチェックしながら保存するなど、1本のアンプル作成にはかなりの手間と時間と注意がかけられており、それなりのコストもかかっている。また、コンタミネーションや取り違えの防止などのために細心の注意が払われているので、利用されるときには1本1本を大切に扱って頂けると幸いである。また、ウイルス・ウイロイドの増殖植物や分離のための植物がなかなか入手できないことも多いと思われるが、ジーンバンクの植物遺伝資源部門で植物を検索して依頼していただければ、国内外の多くの植物種や品種の種子をすみやかに入手できる。微生物部門と同じサイトにあるHPを見ていただきこちらもあわせて利用して頂ければ大いに植物ウイルス研究の進展に役立つことが期待される。

表 9. ジーンバンクで配布中の植物ウイルスの種別株数（その 1）

ウイルス	株数		株数
2本鎖 DNA			
<i>Caulimoviridae</i>		<i>Cucumovirus</i>	
<i>Caulimovirus</i>		<i>Cucumber mosaic virus</i>	39
<i>Cauliflower mosaic virus</i>	5	<i>Peanut stunt virus</i>	3
		<i>Tomato aspermy virus</i>	2
マイナスセンス 1 本鎖 RNA			
<i>Bunyaviridae</i>		<i>Apple mosaic virus</i>	1
<i>Tospovirus</i>		<i>Asparagus virus 2</i>	1
<i>Tomato spotted wilt virus</i>	2	<i>Closteroviridae</i>	
		<i>Ampelovirus</i>	
		<i>Grapevine leafroll-associated virus 3</i>	6
プラスセンス 1 本鎖 RNA			
<i>Alphaflexiviridae</i>		<i>Closterovirus</i>	
<i>Potexvirus</i>		<i>Citrus tristeza virus</i>	6
<i>Alstroemeria virus X</i>	1	<i>Luteoviridae</i>	
<i>Asparagus virus 3</i>	1	<i>Polerovirus</i>	
<i>Narcissus mosaic virus</i>	1	<i>Citrus vein enation virus</i> ^{UN}	2
<i>Nerine virus X</i>	1	<i>Potyviridae</i>	
<i>Potato virus X</i>	4	<i>Potyvirus</i>	
<i>Betaflexiviridae</i>		<i>Alstroemeria mosaic virus</i>	5
<i>Capillovirus</i>		<i>Amazon lily mosaic virus</i>	1
<i>Apple stem grooving virus</i>	1	<i>Bean common mosaic virus</i>	4
<i>Carlavirus</i>		<i>Bean yellow mosaic virus</i>	2
<i>Butterbur mosaic virus</i> ^{UN}	1	<i>Carnation vein mottle virus</i>	1
<i>Potato virus M</i>	1	<i>Clover yellow vein virus</i>	4
<i>Potato virus S</i>	1	<i>Dasheen mosaic virus</i>	1
<i>Vitivirus</i>		<i>Konjac mosaic virus</i>	2
<i>Grapevine virus A</i>	3	<i>Lettuce mosaic virus</i>	1
<i>Grapevine virus B</i>	2	<i>Peanut mottle virus</i>	1
<i>Bromoviridae</i>		<i>Potato virus A</i>	1
<i>Alfavirus</i>		<i>Potato virus Y</i>	5
<i>Alfalfa mosaic virus</i>	3	<i>Soybean mosaic virus</i>	8
<i>Bromovirus</i>		<i>Turnip mosaic virus</i>	6
<i>Amazon lily mild mottle virus</i> ^{UN}	1	<i>Watermelon mosaic virus</i>	5
		<i>Zucchini yellow mosaic virus</i>	11

UN : ICTV 未認定ウイルス.

Tomioka et al. (2012) より改変.

表 9. ジーンバンクで配布中の植物ウイルスの種別株数 (その 2)

	株数		株数
<i>Secoviridae</i>		<i>Tobamovirus</i>	
<i>Comovirus</i>		<i>Cucumber green mottle mosaic virus</i>	7
<i>Radish mosaic virus</i>	1	<i>Kyuri green mottle mosaic virus</i>	3
<i>Squash mosaic virus</i>	1	<i>Odontoglossum ringspot virus</i>	1
<i>Fabavirus</i>		<i>Pepper mild mottle virus</i>	4
<i>Broad bean wilt virus 2</i>	7	<i>Tobacco mosaic virus</i>	15
<i>Gentian mosaic virus</i>	1	<i>Tomato mosaic virus</i>	27
<i>Nepovirus</i>		<i>Youcai mosaic virus</i>	1
<i>Arabis mosaic virus</i>	2	<i>Tobravirus</i>	
<i>Cycas necrotic stunt virus</i>	3	<i>Tobacco rattle virus</i>	2
<i>Mulberry ringspot virus</i>	2	<i>Families are undefined.</i>	
<i>Tobacco ringspot virus</i>	1	<i>Benyvirus</i>	
<i>Tomato ringspot virus</i>	1	<i>Beet necrotic yellow vein virus</i>	1
<i>Sadwavirus</i>		<i>Sobemovirus</i>	
<i>Satsuma dwarf virus</i>	1	<i>Cocksfoot mottle virus</i>	6
<i>Tombusviridae</i>		<i>Ryegrass mottle virus</i>	1
<i>Carmovirus</i>		<i>Southern bean mosaic virus</i>	2
<i>Carnation mottle virus</i>	1	<i>ウイロイド</i>	
<i>Melon necrotic spot virus</i>	7	<i>プラスセンス 1 本鎖 RNA</i>	
<i>Necrovirus</i>		<i>Pospiviroidae</i>	
<i>Olive latent virus 1</i>	2	<i>Apscaviroid</i>	
<i>Olive mild mosaic virus</i>	1	<i>Apple fruit crinkle viroid</i>	1
<i>Tobacco necrosis virus</i> ^{UN}	1	<i>Apple scar skin viroid</i>	4
<i>Tombusvirus</i>		<i>Citrus bent leaf viroid</i>	1
<i>Grapevine Algerian latent virus</i>	1	<i>Citrus viroid III</i>	1
<i>Tymoviridae</i>		<i>Citrus viroid original source</i> ^{UN}	1
<i>Maculavirus</i>		<i>Cocadviroid</i>	
<i>Grapevine fleck virus</i>	1	<i>Citrus viroid IV</i>	1
<i>Virgaviridae</i>		<i>Hostuviroid</i>	
<i>Hordeivirus</i>		<i>Hop stunt viroid</i>	1
<i>Barley stripe mosaic virus</i>	2	<i>Pospiviroid</i>	
		<i>Chrysanthemum stunt viroid</i>	5
		<i>Citrus exocortis viroid</i>	1

UN : ICTV 未認定ウイルス.
Tomioka et al. (2012) より改変.

表 10. ジーンバンクにおける植物ウイルス公開株リスト（ウイルス種別）（その 1）

MAFF 番号	種 名（属 名）	株 名	分離源植物	採集地	特 性
104001	<i>Alfalfa mosaic virus</i> (Alfamovirus)	千葉 1	シロクロバ	千葉	104002と血清型異なる
104002	<i>Alfalfa mosaic virus</i> (Alfamovirus)	PP84-1	ペピーノ	神奈川	104001と血清型異なる
104069	<i>Alfalfa mosaic virus</i> (Alfamovirus)	C-1	ツノナス	千葉	
104102	<i>Alstroemeria mosaic virus</i> (Potyvirus)	V	アルストロメリア属	北海道	
104103	<i>Alstroemeria mosaic virus</i> (Potyvirus)	A4-SF13	アルストロメリア属	愛知	
104104	<i>Alstroemeria mosaic virus</i> (Potyvirus)	M1B	アルストロメリア属	北海道	
104105	<i>Alstroemeria mosaic virus</i> (Potyvirus)	HK511	アルストロメリア属	北海道	
104120	<i>Alstroemeria mosaic virus</i> (Potyvirus)	GT-E	アルストロメリア属	北海道	
104109	<i>Alstroemeria virus X</i> (Potexvirus)	HK9CSA	アルストロメリア属	北海道	
104118	<i>Amazon lily mild mottle virus</i>	ES	アマゾンユリ	沖縄	プロモウイルス科に属する
104117	<i>Amazon lily mosaic virus</i> (Potyvirus)	EF2	アマゾンユリ	沖縄	
642007	<i>Apple mosaic virus</i> (Ilarvirus)	P-133	リンゴ	不明	
642006	<i>Apple stem grooving virus</i> (Capilovirus)	MO-84	マルバカイドウ	岩手	
104003	<i>Arabis mosaic virus</i> (Nepovirus)	広島 1	フキ	広島	
307006	<i>Arabis mosaic virus</i> (Nepovirus)		クレソン他	新潟	
715030	<i>Asparagus virus 2</i> (Ilarvirus)		アスパラガス	北海道	
715029	<i>Asparagus virus 3</i> (Potexvirus)		アスパラガス	北海道	
307038	<i>Barley stripe mosaic virus</i> (Hordeivirus)	Im 系統	六条オオムギ	岡山	
307039	<i>Barley stripe mosaic virus</i> (Hordeivirus)	7039	六条オオムギ	岡山	
104042	<i>Bean common mosaic virus</i> (Potyvirus)	千葉	ラッカセイ	千葉	
104043	<i>Bean common mosaic virus</i> (Potyvirus)	千葉	ラッカセイ	千葉	
105007	<i>Bean common mosaic virus</i> (Potyvirus)	12	インゲンマメ	北海道	
715049	<i>Bean common mosaic virus</i> (Potyvirus)	Pn-F	ラッカセイ	三重	
104005	<i>Bean yellow mosaic virus</i> (Potyvirus)	茨城 1	グラジオラス	茨城	
104054	<i>Bean yellow mosaic virus</i> (Potyvirus)	O	エンドウ	岩手	
307054	<i>Beet necrotic yellow vein virus</i> (Benyvirus)	S 系統	テンサイ（多胚）	北海道	
715032	<i>Broad bean wilt virus 2</i> (Fabavirus)		ニンジン	北海道	
104049	<i>Broad bean wilt virus 2</i> (Fabavirus)	G	ピーマン他	高知	
104050	<i>Broad bean wilt virus 2</i> (Fabavirus)	O	ピーマン他	高知	
104080	<i>Broad bean wilt virus 2</i> (Fabavirus)	2002/1/2	リンドウ	埼玉	
104111	<i>Broad bean wilt virus 2</i> (Fabavirus)	RS-A	アルストロメリア属	長野	
307009	<i>Broad bean wilt virus 2</i> (Fabavirus)	E	エンドウ	埼玉	
307015	<i>Broad bean wilt virus 2</i> (Fabavirus)	IP（フィリ系）	ピーマン他	広島	
104006	<i>Butterbur mosaic virus</i> (Carlavirus)	長久手 1	フキ	愛知	
104008	<i>Carnation mottle virus</i> (Carmovirus)	千葉 2	カーネーション	千葉	
104009	<i>Carnation vein mottle virus</i> (Potyvirus)	神奈川 4	カーネーション	神奈川	
104018	<i>Cauliflower mosaic virus</i> (Caulimovirus)	M	キャベツ	東京	アブラムシ伝搬性
104019	<i>Cauliflower mosaic virus</i> (Caulimovirus)	S1	セイヨウワサビ他	長野	
104020	<i>Cauliflower mosaic virus</i> (Caulimovirus)	S2	セイヨウワサビ他	長野	
104021	<i>Cauliflower mosaic virus</i> (Caulimovirus)	UV-1	キャベツ	茨城	アブラムシ非伝搬性
104022	<i>Cauliflower mosaic virus</i> (Caulimovirus)	UV-2-6	キャベツ	茨城	
652002	<i>Citrus tristeza virus</i> (Closterovirus)	M-16A	カンキツ類雑種	静岡	
652009	<i>Citrus tristeza virus</i> (Closterovirus)	1417	グレープフルーツ	長崎	
652010	<i>Citrus tristeza virus</i> (Closterovirus)	1513	スイートオレンジ	長崎	
652011	<i>Citrus tristeza virus</i> (Closterovirus)	1595	スイートオレンジ	長崎	
652017	<i>Citrus tristeza virus</i> (Closterovirus)	M15A	サワーオレンジ他	静岡	
672003	<i>Citrus tristeza virus</i> (Closterovirus)	1597	カンキツ類雑種	長崎	
672004	<i>Citrus vein enation virus</i> (Polerovirus)	1605	カンキツ類雑種	長崎	
672005	<i>Citrus vein enation virus</i> (Polerovirus)	2120	カンキツ類雑種	長崎	
104075	<i>Clover yellow vein virus</i> (Potyvirus)	S	スターチス	長野	
715041	<i>Clover yellow vein virus</i> (Potyvirus)	ソラマメ-A	ソラマメ	三重	
715042	<i>Clover yellow vein virus</i> (Potyvirus)	ソラマメ-H	ソラマメ	兵庫	
715043	<i>Clover yellow vein virus</i> (Potyvirus)	ソラマメ-T	ソラマメ	三重	
104072	<i>Cocksfoot mottle virus</i> (Sobemovirus)	M（岩手株）	オーチャードグラス他	岩手	
104073	<i>Cocksfoot mottle virus</i> (Sobemovirus)	I（長野株）	オーチャードグラス他	長野	
307042	<i>Cocksfoot mottle virus</i> (Sobemovirus)	7042	オーチャードグラス他	青森	
307049	<i>Cocksfoot mottle virus</i> (Sobemovirus)	7049	オーチャードグラス他	青森	
307050	<i>Cocksfoot mottle virus</i> (Sobemovirus)	7050	オーチャードグラス他	岩手	
307051	<i>Cocksfoot mottle virus</i> (Sobemovirus)	7051	オーチャードグラス他	北海道	
104026	<i>Cucumber green mottle mosaic virus</i> (Tobamovirus)	W-1	スイカ	千葉	
260018	<i>Cucumber green mottle mosaic virus</i> (Tobamovirus)	SH	メロン他	静岡	
260019	<i>Cucumber green mottle mosaic virus</i> (Tobamovirus)	SH33b	メロン他	不明	メロンでの有効な弱毒株
260026	<i>Cucumber green mottle mosaic virus</i> (Tobamovirus)	SHY	メロン他	不明	
307029	<i>Cucumber green mottle mosaic virus</i> (Tobamovirus)	スイカ系	ユウガオ	栃木	
307056	<i>Cucumber green mottle mosaic virus</i> (Tobamovirus)	L85-1	ユウガオ	栃木	

表 10. ジーンバンクにおける植物ウイルス公開株リスト（ウイルス種別）（その 2）

MAFF 番号	種 名（属 名）	株 名	分離源植物	採集地	特 性
307057	<i>Cucumber green mottle mosaic virus (Tobamovirus)</i>	GA-30	ユウガオ	栃木	
104010	<i>Cucumber mosaic virus (Cucumovirus)</i>	千葉 1	ダイコン	千葉	
104011	<i>Cucumber mosaic virus (Cucumovirus)</i>	神奈川 PP 84-5	ベビーノ	神奈川	Subgroup 1 に属する
104012	<i>Cucumber mosaic virus (Cucumovirus)</i>	P-1	フキ	広島	Subgroup 2 に属する
104013	<i>Cucumber mosaic virus (Cucumovirus)</i>	Gun	トマト	群馬	Subgroup 2 に属する
104014	<i>Cucumber mosaic virus (Cucumovirus)</i>	K	トマト	栃木	Subgroup 1 に属する
104016	<i>Cucumber mosaic virus (Cucumovirus)</i>	SRO	ホウレンソウ	SR 由来	Subgroup 1 に属する
104058	<i>Cucumber mosaic virus (Cucumovirus)</i>	S-2(SA)	ダイズ	岩手	ダイズ萎縮ウイルス A 系統
104059	<i>Cucumber mosaic virus (Cucumovirus)</i>	Y68-4(SAE)	ダイズ	山形	ダイズ萎縮ウイルス Ae 系統
104060	<i>Cucumber mosaic virus (Cucumovirus)</i>	SB-35(SB)	ダイズ	埼玉	ダイズ萎縮ウイルス B 系統
104061	<i>Cucumber mosaic virus (Cucumovirus)</i>	SB-109(SC)	ダイズ	埼玉	ダイズ萎縮ウイルス C 系統
104062	<i>Cucumber mosaic virus (Cucumovirus)</i>	SV-253(SD)	ダイズ	埼玉	ダイズ萎縮ウイルス D 系統
104070	<i>Cucumber mosaic virus (Cucumovirus)</i>	G	グラジオラス属	長野	Subgroup 1 に属する
104081	<i>Cucumber mosaic virus (Cucumovirus)</i>	Alst	アルストロメリア属	千葉	
104087	<i>Cucumber mosaic virus (Cucumovirus)</i>	42CM	キュウリ	香川	Subgroup 1 に属する
104088	<i>Cucumber mosaic virus (Cucumovirus)</i>	P(No.7)+Sat55-1	トマト	北海道	Subgroup 2 に属する
104089	<i>Cucumber mosaic virus (Cucumovirus)</i>	P(No.7)+Sat28-19	トマト	北海道	Subgroup 2 に属する
104092	<i>Cucumber mosaic virus (Cucumovirus)</i>	ツワブキ	ツワブキ	三重	
104106	<i>Cucumber mosaic virus (Cucumovirus)</i>	GTF	アルストロメリア属	長野	Subgroup 1 に属する
104107	<i>Cucumber mosaic virus (Cucumovirus)</i>	C21	アルストロメリア属	長野	Subgroup 1 に属する
104108	<i>Cucumber mosaic virus (Cucumovirus)</i>	R11	アルストロメリア属	長野	Subgroup 1 に属する
104113	<i>Cucumber mosaic virus (Cucumovirus)</i>	G93	トリカブト	群馬	Subgroup 2 に属する
104114	<i>Cucumber mosaic virus (Cucumovirus)</i>	Ac21	トリカブト	群馬	Subgroup 2 に属する
104115	<i>Cucumber mosaic virus (Cucumovirus)</i>	G81	トリカブト	群馬	Subgroup 2 に属する
104116	<i>Cucumber mosaic virus (Cucumovirus)</i>	Ra	ラナンキュラス	三重	
104119	<i>Cucumber mosaic virus (Cucumovirus)</i>	ES-A1	アマゾンユリ	沖縄	多くの植物での病徴が軽い
307008	<i>Cucumber mosaic virus (Cucumovirus)</i>		リョクトウ	不明	Subgroup 1 に属する
307040	<i>Cucumber mosaic virus (Cucumovirus)</i>	Ta9	トマト	東京	Subgroup 1 に属する
307041	<i>Cucumber mosaic virus (Cucumovirus)</i>	Ta8	トマト	東京	Subgroup 2 に属する
307045	<i>Cucumber mosaic virus (Cucumovirus)</i>	7045	グラジオラス	茨城	Subgroup 1 に属する
715038	<i>Cucumber mosaic virus (Cucumovirus)</i>	CMV	ダイコン	千葉	Subgroup 1 に属する
715039	<i>Cucumber mosaic virus (Cucumovirus)</i>	Ta-17	トマト	東京	Subgroup 1 に属する
715040	<i>Cucumber mosaic virus (Cucumovirus)</i>		アマゾンユリ	沖縄	
715050	<i>Cucumber mosaic virus (Cucumovirus)</i>	To-Gi-7	トマト	岐阜	
715053	<i>Cucumber mosaic virus (Cucumovirus)</i>	Me-92-2	メロン他	三重	
715055	<i>Cucumber mosaic virus (Cucumovirus)</i>	PEAN	エンドウ	和歌山	エンドウに単独でえそ症状
715056	<i>Cucumber mosaic virus (Cucumovirus)</i>	PB1	エンドウ	和歌山	エンドウに単独でえそ症状
715057	<i>Cucumber mosaic virus (Cucumovirus)</i>	PE3A	エンドウ	和歌山	エンドウに WMV と重複感染でえそ症状
715058	<i>Cucumber mosaic virus (Cucumovirus)</i>	PE2	エンドウ	和歌山	エンドウに WMV と重複感染でえそ症状
715064	<i>Cucumber mosaic virus (Cucumovirus)</i>	PM-N	トウガラシ	三重	
260063	<i>Cycas necrotic stunt virus (Nepovirus)</i>	SV-115	ダイズ	青森	
307036	<i>Cycas necrotic stunt virus (Nepovirus)</i>	7036	グラジオラス	茨城	
307037	<i>Cycas necrotic stunt virus (Nepovirus)</i>	7037	ソテツ	千葉	
104052	<i>Dasheen mosaic virus (Potyvirus)</i>	D-1	サトイモ	群馬	
104068	<i>Gentian mosaic virus (Fabavirus)</i>	N-1	リンドウ属	長野	
104126	<i>Grapevine Algerian latent virus (Tombusvirus)</i>	8E	ツノナス	千葉	
662015	<i>Grapevine fleck virus (Maculavirus)</i>	AQ27	ブドウ近縁種	広島	
662002	<i>Grapevine leafroll-associated virus 3 (Ampelovirus)</i>	3 FE5	ヨーロッパブドウ	岡山	
662005	<i>Grapevine leafroll-associated virus 3 (Ampelovirus)</i>	3 FE6L	ヨーロッパブドウ	岡山	
662008	<i>Grapevine leafroll-associated virus 3 (Ampelovirus)</i>	3 KSEK	ヨーロッパブドウ	山梨	
662009	<i>Grapevine leafroll-associated virus 3 (Ampelovirus)</i>	3 HB22	ブドウ類雑種	広島	
662012	<i>Grapevine leafroll-associated virus 3 (Ampelovirus)</i>	3 SP15	ブドウ近縁種	広島	
662014	<i>Grapevine leafroll-associated virus 3 (Ampelovirus)</i>	3 AQ7	ブドウ近縁種	岡山	
662003	<i>Grapevine virus A (Vitivirus)</i>	Var	ヨーロッパブドウ	広島	
662006	<i>Grapevine virus A (Vitivirus)</i>	CA8	ヨーロッパブドウ	山梨	
662011	<i>Grapevine virus A (Vitivirus)</i>	FE6A	ヨーロッパブドウ	岡山	
662004	<i>Grapevine virus B (Vitivirus)</i>	Sek	ヨーロッパブドウ	山梨	
662013	<i>Grapevine virus B (Vitivirus)</i>	HS3	ブドウ近縁種	広島	
104051	<i>Konjac mosaic virus (Potyvirus)</i>	K-2	コンニャク	群馬	
104056	<i>Konjac mosaic virus (Potyvirus)</i>	F	コンニャク	福島	
104024	<i>Kyuri green mottle mosaic virus (Tobamovirus)</i>	余戸系 /Y-1	キュウリ	徳島	
104025	<i>Kyuri green mottle mosaic virus (Tobamovirus)</i>	Cu 66-1	キュウリ	徳島	
715061	<i>Kyuri green mottle mosaic virus (Tobamovirus)</i>	Aichi	キュウリ	愛知	
715025	<i>Lettuce mosaic virus (Potyvirus)</i>		レタス	北海道	
104044	<i>Melon necrotic spot virus (Carmovirus)</i>	NK	メロン他	長崎	

表 10. ジーンバンクにおける植物ウイルス公開株リスト（ウイルス種別）（その3）

MAFF 番号	種 名（属 名）	株 名	分離源植物	採集地	特 性
104045	<i>Melon necrotic spot virus (Carmovirus)</i>	NH	メロン他	長崎	
104094	<i>Melon necrotic spot virus (Carmovirus)</i>	Chiba1	メロン他	千葉	
104095	<i>Melon necrotic spot virus (Carmovirus)</i>	Kochi1	メロン他	高知	
104097	<i>Melon necrotic spot virus (Carmovirus)</i>	mel 山口1	メロン他	山口	
104125	<i>Melon necrotic spot virus (Carmovirus)</i>	Chiba	メロン他	千葉	
260030	<i>Melon necrotic spot virus (Carmovirus)</i>	J strain	メロン他	静岡	世界で初めて発見された株
307014	<i>Mulberry ringspot virus (Nepovirus)</i>		トウグワ	埼玉	
307018	<i>Mulberry ringspot virus (Nepovirus)</i>	黄葉株	トウグワ	埼玉	
307001	<i>Narcissus mosaic virus (Potexvirus)</i>		クレソン他	東京	
104121	<i>Nerine virus X (Potexvirus)</i>	Ag11	ムラサキクンシラン他	北海道	
104037	<i>Odontoglossum ringspot virus (Tobamovirus)</i>	H-1	シンビジューム類	広島	
307005	<i>Olive latent virus 1 (Necrovirus)</i>		イチゴ	宮城	以前は Tobacco necrosis virus として登録
307013	<i>Olive latent virus 1 (Necrovirus)</i>	SN	タバコ	神奈川	以前は Tobacco necrosis virus として登録
307011	<i>Olive mild mosaic virus (Necrovirus)</i>	Fv 株	イチゴ	栃木	以前は Tobacco necrosis virus として登録
307044	<i>Peanut mottle virus (Potyvirus)</i>	7044	ラッカセイ	岡山	
104041	<i>Peanut stunt virus (Cucumovirus)</i>	P-1	ラッカセイ	千葉	
715037	<i>Peanut stunt virus (Cucumovirus)</i>		エンドウ	岐阜	
715044	<i>Peanut stunt virus (Cucumovirus)</i>	Pn-T	ラッカセイ	三重	
104032	<i>Pepper mild mottle virus (Tobamovirus)</i>	野栄 1	ピーマン他	千葉	
104086	<i>Pepper mild mottle virus (Tobamovirus)</i>	Pa18	ピーマン他	北海道	
104099	<i>Pepper mild mottle virus (Tobamovirus)</i>	pep 八幡1	ピーマン他	岩手	
715065	<i>Pepper mild mottle virus (Tobamovirus)</i>		トウガラシ	高知	
307028	<i>Potato virus A (Potyvirus)</i>		パレイショ	岡山	
307027	<i>Potato virus M (Carlavirus)</i>		パレイショ	群馬	
307026	<i>Potato virus S (Carlavirus)</i>	モザイク系統	パレイショ	北海道	
260048	<i>Potato virus X (Potexvirus)</i>	環紋系, No.5	パレイショ	北海道	
307022	<i>Potato virus X (Potexvirus)</i>	PVX-b 系統	パレイショ	北海道	
307023	<i>Potato virus X (Potexvirus)</i>	PVX-O	パレイショ	群馬	
715063	<i>Potato virus X (Potexvirus)</i>	PVX-TO	トマト	愛知	
104046	<i>Potato virus Y (Potyvirus)</i>	K-1	トマト	神奈川	
104074	<i>Potato virus Y (Potyvirus)</i>	C	ツノナス	千葉	
104077	<i>Potato virus Y (Potyvirus)</i>	PVY-Y7	パレイショ	北海道	
307024	<i>Potato virus Y (Potyvirus)</i>	普通系統	パレイショ	群馬	
307025	<i>Potato virus Y (Potyvirus)</i>	えそ系統	パレイショ	群馬	
104028	<i>Radish mosaic virus (Comovirus)</i>	大曲 5	ダイコン	秋田	もとの Radish enation mosaic virus
307043	<i>Ryegrass mottle virus (Sobemovirus)</i>	7043	イタリアンライグラス	栃木	
652018	<i>Satsuma dwarf virus (Sadwavirus)</i>	SDV-LB1	ワシントンネーブル	大分	
307034	<i>Southern bean mosaic virus (Sobemovirus)</i>	7034	ダイズ	山形	
307035	<i>Southern bean mosaic virus (Sobemovirus)</i>	7035	ダイズ	京都	
104029	<i>Soybean mosaic virus (Potyvirus)</i>	SB 84-27	ダイズ	茨城	
104030	<i>Soybean mosaic virus (Potyvirus)</i>	SB 84-1	ダイズ	茨城	
104063	<i>Soybean mosaic virus (Potyvirus)</i>	S-1 (A 系統)	ダイズ	岩手	
104064	<i>Soybean mosaic virus (Potyvirus)</i>	SV-18 (B 系統)	ダイズ	岩手	
104065	<i>Soybean mosaic virus (Potyvirus)</i>	SV-15 (C 系統)	ダイズ	岩手	
104066	<i>Soybean mosaic virus (Potyvirus)</i>	SV-70 (D 系統)	ダイズ	岩手	
104067	<i>Soybean mosaic virus (Potyvirus)</i>	SV-127 (E 系統)	ダイズ	秋田	
260049	<i>Soybean mosaic virus (Potyvirus)</i>	AS	ダイズ	千葉	
260055	<i>Squash mosaic virus (Comovirus)</i>	Y (夕張)	メロン他	北海道	
104033	<i>Tobacco mosaic virus (Tobamovirus)</i>	栃木 1	ワサビ	栃木	
104036	<i>Tobacco mosaic virus (Tobamovirus)</i>	千葉 1	ピーマン他	千葉	
260003	<i>Tobacco mosaic virus (Tobamovirus)</i>	C	キレハイヌガラシ他	北海道	
260008	<i>Tobacco mosaic virus (Tobamovirus)</i>	Chiba No.3	トマト	千葉	
260014	<i>Tobacco mosaic virus (Tobamovirus)</i>	OM8		不明	
260015	<i>Tobacco mosaic virus (Tobamovirus)</i>	OM12		不明	
260017	<i>Tobacco mosaic virus (Tobamovirus)</i>	C32	トマト	不明	
260025	<i>Tobacco mosaic virus (Tobamovirus)</i>	OMY	タバコ	不明	
260031	<i>Tobacco mosaic virus (Tobamovirus)</i>	O		北海道	
260056	<i>Tobacco mosaic virus (Tobamovirus)</i>	OM Ni9	タバコ	千葉	
260058	<i>Tobacco mosaic virus (Tobamovirus)</i>	NA23		千葉	
260061	<i>Tobacco mosaic virus (Tobamovirus)</i>	Y	タバコ	千葉	
260068	<i>Tobacco mosaic virus (Tobamovirus)</i>	LFD-L	トマト	千葉	
260070	<i>Tobacco mosaic virus (Tobamovirus)</i>	Chiba no.1	トマト	千葉	
307032	<i>Tobacco mosaic virus (Tobamovirus)</i>	7032	トマト	長野	
307007	<i>Tobacco necrosis virus (Necrovirus)</i>		チューリップ	富山	
307003	<i>Tobacco rattle virus (Tobravirus)</i>		クレソン他	東京	

表 10. ジーンバンクにおける植物ウイルス公開株リスト（ウイルス種別）（その 4）

MAFF 番号	種 名（属 名）	株 名	分離源植物	採集地	特 性
307017	<i>Tobacco rattle virus (Tobravirus)</i>	HSN	タバコ	神奈川	
104031	<i>Tobacco ringspot virus (Nepovirus)</i>	茨城 1	グラジオラス	茨城	
104038	<i>Tomato aspermy virus (Cucumovirus)</i>	浜松 9	キク	静岡	
715036	<i>Tomato aspermy virus (Cucumovirus)</i>	1系統	トマト	群馬	
104034	<i>Tomato mosaic virus (Tobamovirus)</i>	T	トマト	千葉	
260001	<i>Tomato mosaic virus (Tobamovirus)</i>	L	トマト	北海道	
260002	<i>Tomato mosaic virus (Tobamovirus)</i>	L11	トマト	北海道	
260004	<i>Tomato mosaic virus (Tobamovirus)</i>	L11A	トマト	北海道	実用的な弱毒株
260005	<i>Tomato mosaic virus (Tobamovirus)</i>	L11A 237	トマト	茨城	実用的な弱毒株
260006	<i>Tomato mosaic virus (Tobamovirus)</i>	Ls1	トマト	千葉	
260007	<i>Tomato mosaic virus (Tobamovirus)</i>	Chiba No.2	トマト	千葉	
260009	<i>Tomato mosaic virus (Tobamovirus)</i>	L11Y	トマト	不明	
260010	<i>Tomato mosaic virus (Tobamovirus)</i>	L11Y 237	トマト	不明	
260011	<i>Tomato mosaic virus (Tobamovirus)</i>	L11Y 236	トマト	不明	
260012	<i>Tomato mosaic virus (Tobamovirus)</i>	L11Y 254	トマト	不明	
260013	<i>Tomato mosaic virus (Tobamovirus)</i>	L11Y 390	トマト	不明	
260022	<i>Tomato mosaic virus (Tobamovirus)</i>	Ltb1	トマト	不明	トマト抵抗性品種打破株
260023	<i>Tomato mosaic virus (Tobamovirus)</i>	Lta1	トマト	不明	トマト抵抗性品種打破株
260051	<i>Tomato mosaic virus (Tobamovirus)</i>	LFD-ST	トマト	千葉	
260062	<i>Tomato mosaic virus (Tobamovirus)</i>	LY	タバコ	千葉	
260072	<i>Tomato mosaic virus (Tobamovirus)</i>	L11Y237.236	トマト	千葉	
260073	<i>Tomato mosaic virus (Tobamovirus)</i>	L11Y236.237.254	トマト	千葉	
260074	<i>Tomato mosaic virus (Tobamovirus)</i>	CH2-mild	トマト	千葉	
260075	<i>Tomato mosaic virus (Tobamovirus)</i>	CH2/254-1	トマト	千葉	
260076	<i>Tomato mosaic virus (Tobamovirus)</i>	CH2/254-2	トマト	千葉	
260077	<i>Tomato mosaic virus (Tobamovirus)</i>	CH2/254-Y	トマト	千葉	
307019	<i>Tomato mosaic virus (Tobamovirus)</i>	N（トマト系）	トマト	長野	
715016	<i>Tomato mosaic virus (Tobamovirus)</i>	strain 0	トマト	愛知	
715017	<i>Tomato mosaic virus (Tobamovirus)</i>	strain 1	トマト	奈良	
715051	<i>Tomato mosaic virus (Tobamovirus)</i>	To-Gi-1	トマト	岐阜	
715052	<i>Tomato mosaic virus (Tobamovirus)</i>	To-Gi-11	トマト	岐阜	
307002	<i>Tomato ringspot virus (Nepovirus)</i>		クレソン他	千葉	
104085	<i>Tomato spotted wilt virus (Tospovirus)</i>	宮城トマト	トマト	宮城	
260050	<i>Tomato spotted wilt virus (Tospovirus)</i>		シネラリア	東京	
104047	<i>Turnip mosaic virus (Potyvirus)</i>	15	ハクサイ	長崎	
715026	<i>Turnip mosaic virus (Potyvirus)</i>		ダイコン	北海道	
715027	<i>Turnip mosaic virus (Potyvirus)</i>		ダイコン	北海道	
715054	<i>Turnip mosaic virus (Potyvirus)</i>	Ra-2	ダイコン	三重	
715062	<i>Turnip mosaic virus (Potyvirus)</i>	F1	ナタネ他	福井	
715066	<i>Turnip mosaic virus (Potyvirus)</i>		ストック	千葉	
104039	<i>Watermelon mosaic virus (Potyvirus)</i>	W-80	アレチウリ	香川	
104055	<i>Watermelon mosaic virus (Potyvirus)</i>	I-9	セイヨウカボチャ	茨城	
307031	<i>Watermelon mosaic virus (Potyvirus)</i>		ユウガオ	栃木	
715059	<i>Watermelon mosaic virus (Potyvirus)</i>	PEW	エンドウ	和歌山	
715060	<i>Watermelon mosaic virus (Potyvirus)</i>	亀井株	キュウリ	愛知	
104110	<i>Youcai mosaic virus (Tobamovirus)</i>	722	アルストロメリア属	北海道	アブラナ科植物に感染
104040	<i>Zucchini yellow mosaic virus (Potyvirus)</i>	ZY-8(E)	キュウリ	愛媛	
104048	<i>Zucchini yellow mosaic virus (Potyvirus)</i>	山2	キュウリ	山梨	
104057	<i>Zucchini yellow mosaic virus (Potyvirus)</i>	91	セイヨウカボチャ	茨城	
104071	<i>Zucchini yellow mosaic virus (Potyvirus)</i>	O-20-02-T	ペポカボチャ	不明	
260020	<i>Zucchini yellow mosaic virus (Potyvirus)</i>	emmb	メロン他	不明	
260027	<i>Zucchini yellow mosaic virus (Potyvirus)</i>	E	キュウリ	愛媛	
307030	<i>Zucchini yellow mosaic virus (Potyvirus)</i>		ユウガオ	栃木	
715045	<i>Zucchini yellow mosaic virus (Potyvirus)</i>	Cu	キュウリ	三重	
715046	<i>Zucchini yellow mosaic virus (Potyvirus)</i>	Pn	カボチャ近縁種	三重	
715047	<i>Zucchini yellow mosaic virus (Potyvirus)</i>	レイシ	ニガウリ	三重	
715048	<i>Zucchini yellow mosaic virus (Potyvirus)</i>	トウガン	トウガン	三重	

表 11. ジーンバンクにおけるウイロイド公開株リスト (種類別)

MAFF 番号	学名	株名	分離源植物	採集地	特性
104023	<i>Chrysanthemum stunt viroid</i> (Pospiviroid)	三重 1	キク	三重	キク品種 'Mistletoe' に黄斑
260079	<i>Chrysanthemum stunt viroid</i> (Pospiviroid)	CSV-IB1	キク	鹿児島	キク品種 'Mistletoe' に黄斑
260080	<i>Chrysanthemum stunt viroid</i> (Pospiviroid)	CSV-IB2	キク	鹿児島	キク品種 'Mistletoe' に黄斑
260081	<i>Chrysanthemum stunt viroid</i> (Pospiviroid)	CSV-OK1	キク	鹿児島	キク品種 'Mistletoe' に黄斑
260082	<i>Chrysanthemum stunt viroid</i> (Pospiviroid)	CSV-OK2	キク	鹿児島	キク品種 'Mistletoe' に黄斑
642001	<i>Apple scar skin viroid</i> (Apscaviroid)	P-112	栽培リンゴ	青森	
642002	<i>Apple scar skin viroid</i> (Apscaviroid)	PI-1	栽培リンゴ	長野	
642003	<i>Apple scar skin viroid</i> (Apscaviroid)	PK-6	栽培リンゴ	岩手	
642004	<i>Apple scar skin viroid</i> (Apscaviroid)	P-128	栽培リンゴ	岩手	
642005	<i>Apple fruit crinkle viroid</i> (Apscaviroid)	P-196	リンゴ	岩手	
672007	<i>Citrus exocortis viroid</i> (Pospiviroid)	ADG	レモン	長崎	
672008	<i>Citrus bent leaf viroid</i> (Apscaviroid)	TS	タンゴール	長崎	
672009	<i>Hop stunt viroid</i> (Hostuviroid)	TS	タンゴール	長崎	
672010	<i>Citrus viroid III</i> (Apscaviroid)	TS	タンゴール	長崎	
672011	<i>Citrus viroid IV</i> (Cocadviroid)	TS	タンゴール	長崎	
672012	<i>Citrus viroid original source</i> (Apscaviroid)	TS	タンゴール	長崎	

9. 参考文献

- Adams, I.P., Glover, R.H., Monger, W.A., Mumford, R., Jackeviciene, E., Navalinskiene, M., Samuitiene, M. and Boonham, N. (2009). Next-generation sequencing and metagenomic analysis: a universal diagnostic tool in plant virology. *Mol. Plant Pathol.* 10: 537-545.
- Briddon, R.W. and Markham, P.G. (1994). Universal primers for the PCR amplification of dicot-infecting geminiviruses. *Mol. Biotechnol.* 1: 202-205.
- Briddon, R.W. and Stanley, J. (2006). Subviral agents associated with plant single-stranded DNA viruses. *Virology* 344: 198-210.
- Chen, T.-C., Li, J.-T., Lin, Y.-P., Yeh, Y.-C., Kang, Y.-C., Huang, L.-H. and Yeh, S.-D. (2012). Genomic characterization of calla lily chlorotic spot virus and design of broad-spectrum primers for detection of tospoviruses. *Plant Path.* 61: 183-194.
- Choi, S.H., Seo, J., Kwon, S. and Rao, A.L.N. (2012). Helper virus-independent transcription and multimerization of a satellite RNA associated with cucumber mosaic virus. *J Virol.* 86: 4823-4832.
- Choi, S.K., Choi, J.K., Park, W.M. and Ryu K.H. (1999). RT-PCR detection and identification of three species of cucumoviruses with a genus-specific single pair of primers. *J.Virol. Methods* 83: 67-73.
- Diemer, G.S. and Stedman, K.M. (2012). A novel virus genome discovered in an extreme environment suggests recombination between unrelated groups of RNA and DNA viruses. *Biology Direct* 7: (<http://www.biology-direct.com/content/7/1/13> 14pp).
- Diener, T.O. (2003). Discovering viroids : a personal perspective. *Nat. Rev. Microbiol.* 1: 75-80.
- Ferrer, R.M., Luis-Arteaga, M., Guerri, J. Moreno, P., and Rubio, L. (2007). Detection and identification of species of the genus Fabavirus by RT-PCR with a single pair of primers. *J. Virol. Methods* 144: 156-160.
- Fuji, S., Kikuchi, S., Ueda, S., Toda, T., Furuya, H., Fukumoto, F. and Hanada, K. (2013). Characterization of a new Anulavirus isolated from Amazon lily plants. *Arch. Virol.* 158: 201-206.
- 福本文良 (1987). 植物ウイルスの保存法. *植物防疫* 41: 243-248.
- Gibbs, A., Armstrong, J., Mackenzie, A.M. and Weiller, G.F. (1998). The GPRIME package : computer programs for identifying the best regions of aligned genes to target in nucleic acid hybridization-based diagnostic tests, and their use with plant viruses. *J. Virol. Methods* 74: 67-76.
- Gibbs, A. and Mackenzie, M. (1997). A primer pair for amplifying part of the genome of all potyvirids by RT-PCR. *J. Virol. Methods* 63: 9-16.
- Gibbs, A.J., Mackenzie, M. and Gibbs, M.J. (2003).

- The 'potyvirid primers' will probably provide phylogenetically informative DNA fragments from all species of Potyviridae. J. Virol. Methods 112: 41-44.
- Goodin, M.M., Zaitlin, D., Naidu, R.A. and Lommel, S.A. (2008). *Nicotiana benthamiana*: Its history and future as a model for plant-pathogen interactions. Mol. Plant-Microbe Interact. 21: 1015-1026.
- Hanada, K., Kusunoki, M. and Iwaki, M. (1986). Properties of virus particles, nucleic acid and coat protein of cycas necrotic stunt virus. Ann. Phytopath. Soc. Japan 52: 422-427.
- 花田薫 (1991). 植物ウイルスの検定②. 植物細胞工學 3: 393-398.
- 花田薫 (2008). 植物ウイルスサテライトRNAの多様性とそのウイルス病防除への利用. 植物防疫 62: 14-19.
- 早野由里子・眞岡哲夫・河辺邦正・岩崎真人 (2010). キュウリモザイクウイルスのサテライトRNAによるトマトモザイク病の病徴軽減. 北海道農業研究センター報告 192: 15-23.
- 日比忠明 (1984). DIBA法による植物ウイルスの検出法. 植物防疫 38: 380-384.
- 井出洋一・布川竜也・島田滋明・榎原謙次・田代暢哉・口本文孝 (2011). 植物ウイルスのELISA診断に供試する多数のサンプルを同時に磨砕するための自動磨砕装置の開発. 日植病報 77: 295-298.
- 池田二三高・加藤公彦・塚本剛弘 (2001). 静岡県におけるメロン黄化えそ病根絶の経過. 植物防疫 55: 397-400.
- 井上忠男 (1983). 最も古くて最も新しい植物ウイルス. 化学と生物 21: 114-115.
- 伊藤隆男・須崎浩一・中野正明・佐藤明彦 (2012). ディープシーケンシングによりカキから検出されたウイルスおよびウイロイド. 日植病報 78: 266. (講要)
- Kato, K., Hanada, K. and Kameya-Iwaki, M. (2000). Melon yellow spot virus: a distinct species of the Genus Tospovirus isolated from melon (*Cucumis melo* L.). Phytopathology 90: 422-426.
- King, A.M.O., Lefkowitz, E., Adams, M.J. and Carstens, E.B. (2011). Virus Taxonomy: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Academic Press pp.1327.
- Kobayashi, Y.O., Kobayashi, A., Hagiwara, K., Uga, H., Mikoshiba, Y., Naito, T., Honda, Y. and Omura, T. (2005). Gentian mosaic virus: A new species in the Genus Fabavirus. Phytopathology 95: 192-197.
- Kondo, T., Fuji, S., Yamashita, K., Dong-Kyoon, K. and Moo-Ung, C. (2005). Broad bean wilt virus 2 in yams. J. Gen. Plant Pathol. 71: 441-443.
- Kosaka, Y., Ryang, B., Kobori, T., Shiomi, H., Yasuhara, H. and Kataoka, M. (2006). Effectiveness of an attenuated zucchini yellow mosaic virus isolate for cross-protecting cucumber. Plant Dis. 90: 67-72.
- Matsushita, Y., Usugi, T. and Tsuda, S. (2010). Development of a multiplex RT-PCR detection and identification system for Potato spindle tuber viroid and Tomato chlorotic dwarf viroid. Eur. J. Plant Pathol. 128: 165-170.
- Mauck, K.E., De Moraes, C.M. and Mescher, M.C. (2010). Deceptive chemical signals induced by a plant virus attract insect vectors to inferior hosts Proc. Natl. Acad. Sci. USA 107: 3600-3605.
- Maoka, T., Sugiyama, S., Maruta, Y. and Hataya, T. (2010). Application of cDNA macroarray for simultaneous detection of 12 potato viruses. Plant Dis. 94: 1248-1254.
- Nakahara, K.S., Masuta, C., Yamada, S., Shimura, H., Kashihara, Y., Wada, T.S., Meguro, A., Goto K., Tadamura, K., Sueda, K., Sekiguchi, T., Shao, J., Itchoda, N., Matsumura, T., Igarashi, M., Ito, K., Carthew, R.W. and Uyeda, I. (2012). Tobacco calmodulin-like protein provides secondary defense by binding to and directing degradation of virus RNA silencing suppressors. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 109: 10113-10118.
- Nie, X., Bai, Y., Molen, T.A. and Desjardins, D.C. (2008). Development of universal promoters for detection of potato calraviruses by RT-PCR. J. Virol. Methods 149: 209-216.
- 日本植物病理学会・農業生物資源研究所編 (2012). 日本植物病名目録 (第2版). CD-ROM判 pp.1524.
- 岡田吉美 (2004) タバコモザイクウイルス研究の100年. 東京大学出版会. pp.275.

- Orita, H., Sakai, J., Kubota, K., Okuda, M., Tanaka, Y., Hanada, K., Imamura, Y., Nishiguchi, M., Karasev, A.V., Miyata, S. and Iwanami, T. (2007). Molecular and serological characterization of cucumber mottle virus, a new cucurbit-infecting tobamo-like virus. *Plant Dis.* 91: 1574-1578.
- 大沢高志・古木市重郎・森田儔・鈴木春夫 (1984). 温室メロンのCGMMVに対する弱毒ウイルスSH33bの効果. *日植病報* 50: 436. (講要)
- 大島信行・子餅昭二・後藤忠則 (1965). 弱毒ワクチンによるウイルス病の防除 (1) トマトモザイク病の防除. *北海道農業試験場彙報* 85: 23-33.
- Pappu, H.R. and Druffel, K.L. (2009). Use of conserved genomic regions and degenerate primers in a PCR-based assay for the detection of members of the genus *Caulimovirus*. *J. Virol. Methods* 157: 102-104.
- Peiró, A., Pallás, V. and Sánchez-Navarro, J.A. (2012). Simultaneous detection of eight viruses and two viroids affecting stone fruit trees by using a unique polyprobe. *Eur. J. Plant Pathol.* 134: 469-475.
- Quito-Avila, D.F., Lightle, D., Lee, J. and Martin, R.R. (2012). Transmission biology of raspberry latent virus, the first aphid-borne reovirus. *Phytopathology* 102: 547-553.
- Rene, A. A., Van Vlugt and Berendsen, M. (2002). Development of a general potexvirus detection method. *Eur. J. Plant Pathol.* 108: 367-371.
- Rey M.E., D'Andrea, E., Calvert-Evers, J., Paximadis, M. and Boccoardo, G. (1999). Evidence for a phyto-reovirus associated with tobacco exhibiting leaf curl symptoms in South Africa. *Phytopathology*. 89: 303-307.
- Roossinck, M. J. (2011). The big unknown: plant virus biodiversity. *Current Opinion in Virology* 1: 63-67.
- Saxena, P., Hsieh, Y., Alvarado, V.Y., Sainsbury, F., Saunders, K., Lomonossoff, G.P. and Scholthof, H.B. (2011). Improved foreign gene expression in plants using a virus-encoded suppressor of RNA silencing modified to be developmentally harmless. *Plant Biotechnol. J.* 9: 703-712.
- 佐山春樹 (2003). 植物ワクチン. *化学と生物* 41: 454-459.
- Sayama, H., Sato, T., Kominato, M. Natsuaki, T. and Kaper, J.M. (1993). Field testing of a Satellite-containing attenuated strain of cucumber mosaic virus for tomato protection in Japan. *Phytopathology* 83: 405-410.
- Scholthof, K.G., Adkins, S., Czosnek, S.H., Palukaitis, P., Jacquot, E., Hohn, T., Hohn, B., Saunders, K., Candresse, T., Ahlquist, P., Hemenway, C. and Foster, G.D. (2011). Top 10 plant viruses in molecular plant pathology. *Mol. Plant Pathol.* 12: 938-954.
- 志村華子・増田税 (2012). 植物のRNAサイレンシングとウイルスの病徴誘導. *ウイルス* 62: 19-26.
- Stafford, C.A., Walker, G.P. and Ullman, D.E. (2011). Infection with a plant virus modifies vector feeding behavior. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 108: 9350-9355.
- Studholme, D.J., Glover, R.H. and Boonham, N. (2009). Application of high-throughput sequencing in phytopathology. *Ann. Rev. Phytopath.* 49: 87-105.
- Tomioka, K., Sato, T., Hanada, K., Yamasaki, F., Nagai, T., Sawada, H., Takeya, M. and Aoki, T. (2012). Plant viruses and viroids released from the NIAS Genebank Project, Japan. *Microbiol. Cult. Coll.* 28: 35-40.
- Untiveros, M., Perez-Egusquiza, Z. and Clover, G. (2010). PCR assays for the detection of members of the genus *Ilarvirus* and family *Bromoviridae*. *J. Virol. Methods* 165: 97-104.
- Valverde, R.A., Sabanadzovic, S. and Hammond, J. (2012). Viruses that enhance the aesthetics of some ornamental plants: Beauty or Beast? *Plant Dis.* 96: 600-611.
- Wei, T. and Clover, G. (2008). Use of primers with 5' non-complementary sequences in RT-PCR for the detection of nepovirus subgroups A and B. *J. Virol. Methods* 153: 16-21.
- Zhang, Y., Pei, X., Zhang, C., Lu, Z., Wang, Z., Jia, S. and Li, W. (2012). *De novo* foliar transcriptome of *Chenopodium amaranticolor* and analysis of its gene expression during virus-induced hypersensitive response. *PLoS One*. 7, e45953.

生 物 研 資 料

平成 24 年 12 月
December, 2012

微生物遺伝資源利用マニュアル (31)

2012 年 12 月 24 日 印刷
2012 年 12 月 25 日 発行

編集兼
発行者 独立行政法人農業生物資源研究所

National Institute of Agrobiological Sciences
〒 305-8602 茨城県つくば市観音台 2-1-2

植物ウイルスの特性とその保存について

花 田 薫
農業生物資源研究所

目 次

1. はじめに	1
2. 植物ウイルスとは何か	1
3. 植物ウイルスの最新の分類	20
4. 主要な植物ウイルスとその特性	24
5. 植物ウイルス実験法：特に保存に関連する重要な手法	29
6. 植物ウイルスの保存マニュアル	49
7. ジーンバンク登録植物ウイルスと世界のバンク	55
8. 終わりに	57
9. 参考文献	64

2012 年 12 月
編集兼発行者 独立行政法人 農業生物資源研究所