

## 日本におけるソラマメウルトウイルス1および ソラマメウルトウイルス2の検出

小林有紀<sup>1</sup>・御子柴義郎<sup>2</sup>・本田要八郎・大村敏博  
(中央農業総合研究センター)

### Detection of *Broad bean wilt virus 1* and *Broad bean wilt virus 2* in Japan

Yuki O. KOBAYASHI<sup>3</sup>, Yoshiro MIKOSHIBA, Yohachiro HONDA and Toshihiro OMURA

#### Abstract

Of the 34 isolates of Broad bean wilt virus collected from 18 prefectures in Japan during 1962 to 1999, and 122 field samples collected from 9 prefectures in 1997 to 2000, a large number of samples reacted strongly with an antiserum against *Broad bean wilt virus 2* (BBWV-2) in a double-antibody sandwich enzyme-linked immunosorbent assay. One of these isolates that reacted strongly with the antiserum against BBWV-2 and also reacted weakly with an antiserum against *Broad bean wilt virus 1* (BBWV-1), was used for further analysis. Sequence analysis of the coat protein genes indicated that they belonged to BBWV-2. Thus, all the plants in 15 kinds of plant species collected from 20 prefectures in Japan were found to be infected with BBWV-2.

ソラマメウルトウイルス (Broad bean wilt virus : BBWV) の感染に起因する野菜, 花き類の病気は, 我が国においても数多く報告されている。海外で検出されたBBWVには寒天ゲル内二重拡散法により識別される2種の血清型が存在し (Uyemoto and Provvidenti, 1974), 国際ウイルス分類委員会第6次報告書 (Goldbach et al., 1995) から, これら血清型は *Broad bean wilt virus 1* (BBWV-1) および *Broad bean wilt virus 2* (BBWV-2) という二つの異なるウイルス種として扱われるようになった。日本で検出されたBBWVでも, 上記手法において異なる血清反応を示す分離株の存在が報告されているが (石川ら, 1986; 岩木・花田, 1986; 与那覇ら, 1993), 海外の分離株と比較していないため, どの血清型に属するかは不明であり, 依然としてBBWVというウイルス名が使用されてきた。近年になって, 指標となる海外の分離株との血清学的性

質および分子情報に基づく異同が比較されるようになり, いくつかの分離株で種が明らかにされたが (Kobayashi et al., 1999; Kuroda et al., 2000; Nakamura et al., 1998; 山下ら, 2001), 未だ多くの分離株は種が不明なままである。著者らは, これまでの研究において, 寒天ゲル内二重拡散法では本ウイルスの種を見誤る可能性があること, 一方, 外被タンパク質遺伝子の塩基配列を決定し, 推測されるアミノ酸配列を比較することにより的確な識別ができることを明らかにした (Kobayashi et al., 1999)。しかし, 塩基配列の決定は容易ではないため, 多数の分離株ならびに圃場試料の検定には適さない。そこで本研究では, 二重拡散法よりも確実であり, 塩基配列の解析よりも容易に種を識別できる方法として enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) 法を用い, これまでにBBWVと同定されていたウイルス株および日本各地よ

1 現在, 北海道農業研究センター

2 現在, 畜産草地研究所

3 Address : National Agricultural Research Center for Hokkaido Region, Shinsei, Memuro, Hokkaido 082-0071, Japan  
2004年4月30日受領

り収集したBBWV感染の疑いのある罹病植物体を検定し、我が国におけるBBWV-1およびBBWV-2による病害の発生状況を調査した。血清反応では種が不明確であったウイルス株については、外被タンパク質遺伝子の塩基配列を決定し、種を確認した。

本試験を実施するにあたり、全国の各種BBWV株および罹病植物の収集にご協力いただいた高知県農業技術センターの竹内繁治氏、元北海道農業研究センターの後藤忠則氏、埼玉県農業総合研究センターの庄司俊彦氏、宇賀博之氏、日本植物防疫協会研究所の河野敏郎氏、元同研究所の高橋幸吉氏、元近畿中国四国農業研究センター（現力ネコ種苗）の小金澤碩城氏、同研究センターの笹谷孝英氏、元同研究センターの山本孝彦氏、岡山県農業総合センターの井上幸次氏、宮城県農業・園芸総合研究所の中村茂雄氏、元長野県野菜花き試験場（現長野県病害虫防除所）の清水時哉氏、元岡山大学の井上忠男氏、井上成信氏、大阪府立大学の木理氏、千葉県農業総合研究センターの中村靖弘氏、海老原克介氏、植松清次氏、元同研究センター（現千葉県病害虫防除所）の塩田あづさ氏、元岩手生物工学研究センター（現新潟県農業総合研究所）の黒田智久氏、フラワーセンター21あもりの杉山悟氏、青森県農林総合研究センターグリーンバイオセンターの山下一夫氏、福島県農業試験場の平子喜一氏、元山口県農業試験場（現山口県徳山農林事務所）の井上興氏、元山口大学の亀谷満朗氏、元九州沖縄農業研究センター（現農業生物資源研究所）の花田薫氏、沖縄県農業試験場の内藤孝氏、中央農業総合研究センターの田中穰氏、元琉球大学の与那覇哲義氏、京都府農業資源研究センターの小坂能尚氏に厚くお礼申し上げます。

#### 材料および方法

##### 1. ELISA検定

American Type Culture Collection (ATCC) から購入したBBWV-1 (PV132, PV176株) およびBBWV-2 (PV131株) と、我が国で検出され、これまでの研究 (Kobayashi et al., 1999) においてBBWV-2であることを確認したIP株 (元広島県農業試験場の井本征史氏より分譲; 井本, 1975), E, L株 (亀谷満朗氏より分譲; 岩木・花田, 1986), 1-2株 (宇賀博之氏より分譲) を供試し、BBWV-1 (PV132株) およびBBWV-2 (PV131株) に対するポリクローナル抗体を用いて間接ELISA法 (Takeuchi et al., 2000) とdouble-antibody sandwich (DAS)-ELISA法 (Clark and Adams, 1977)

を行い、各種分離株の検出程度の差異を比較した。各手法において、ウイルス試料は4で一晚、抗体およびアルカリフォスファターゼ標識抗体は37で1時間反応させ、反応基質液を加えて室温で1時間静置した後に、405nmの吸光度値が健全葉の2倍以上であった試料を陽性と判定した。

1962年から1999年にかけて国内18道府県において13種の植物から検出され、BBWVと同定された34種のウイルス株と、1997年から2000年にかけて9府県、11種の植物より採集した、ウイルス感染様症状を呈する植物葉122試料を供試して、BBWV-1 (PV132株) およびBBWV-2 (PV131株) 抗血清を用いたDAS-ELISA検定を行った。各試料はTPBS (0.8% NaCl, 0.02% KCl, 0.29% Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.02% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.02% NaN<sub>3</sub>, 0.05% Tween 20, pH7.4) で磨砕し、10倍および100倍に希釈した液を抗原として用いた。各抗血清との反応が弱いために種の判定が困難であった試料については、*Chenopodium quinoa*葉に接種してウイルス濃度を高めた後に再度DAS-ELISA検定を行った。

##### 2. 外被タンパク質遺伝子の解析

異なる血清反応を示したJP92V2株 (河野ら, 1995) については、外被タンパク質遺伝子の塩基配列を解析した。RNeasy Plant Mini Kit (キアゲン) を用いてウイルス感染 *C. quinoa*葉から全RNAを抽出し、RT-PCRの鋳型とした。BBWV-1 [PV132 (Accession番号: AB084451), PV176株 (AB018703)] およびBBWV-2 [E (AB018699), IP (AB018698), L (AB018700), MB7 (AB013616), PatMMV (AB011007), 1-2株 (AB018701)] のRNA-2の3'側非翻訳領域に比較的高く保存されていた配列を基に設計したIP-3474Lプライマー (5'-ACCCATTTTAATGGGAGGCT-3') と、IP-1093dUプライマー (Kobayashi et al., 1999) を用いて外被タンパク質遺伝子領域を含むRNA-2の3'側の配列を増幅した。得られたcDNA断片は、1%アガロースゲルとTBE緩衝液を用いて電気泳動した後、目的のサイズのバンドを切り出してQIAquick Gel Extraction Kit (キアゲン) を用いて精製し、pGEM<sup>®</sup>-T Easy Vector (プロメガ) にクローニングしてそれぞれ3クローンの塩基配列を決定した。塩基配列データは、GENETYX-MACプログラム (ソフトウェア開発) で解析した。

##### 結果および考察

##### 1. ELISA検定

間接ELISA法では、BBWV-1 (PV132株) 抗血清は

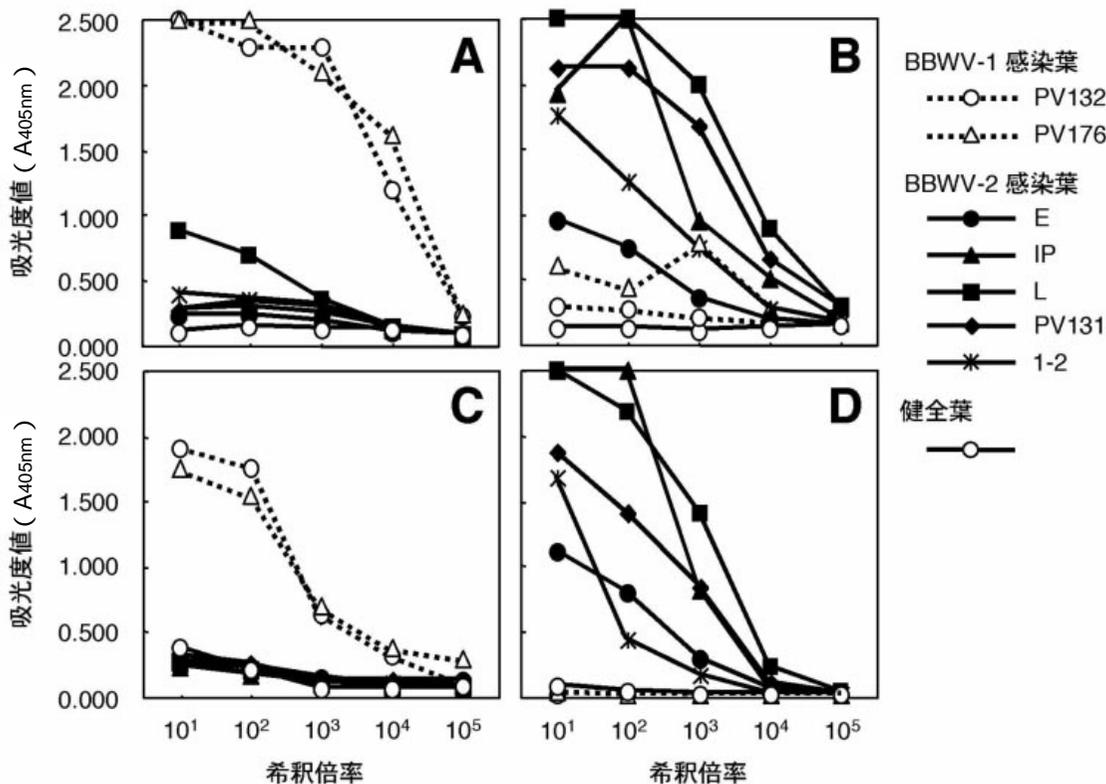
BBWV-1 (PV132, PV176株) 感染葉と, BBWV-2 (PV131株) 抗血清はBBWV-2 (E, IP, L, PV131, 1-2株) 感染葉と, それぞれ強く反応する傾向にあったが, 弱いながらも異種分離株とも反応したため, 本手法により明瞭に種を識別することは困難と考えられた(第1図A, B)。一方, DAS-ELISA法では, BBWV-1抗血清はBBWV-1感染葉のみと, BBWV-2抗血清はBBWV-2感染葉のみと反応し, 両抗血清とも異種分離株との反応は認められなかった(第1図C, D)。本試験に供試したBBWV-2の5株は, 寒天ゲル内二重拡散法では, スパーを形成するか否かにより, 《PV131》, 《IP》, 《E, L, 1-2》の三つにグループ分けすることができる(Kobayashi et al., 1999)。拡散法でスパーを形成するBBWV-1およびBBWV-2分離株が, 両者の抗血清を用いたDAS-ELISA法でそれぞれ特異的に検出されることが既に報告されているが(Xu et al., 1988), 本試験で行ったDAS-ELISA法では, 二重拡散法でスパーを形成したBBWV-2分離株全てがBBWV-2抗血清とのみ特

異的に反応したことから, 本手法により, 多数の試料について容易にBBWVの検出および種の識別ができるものと考えられた。

そこで, 日本各地より採集された34株のBBWVと, 病徴, 発生状況等から判断してBBWV感染の可能性が推測された11種の罹病植物についてDAS-ELISA検定を行った結果, 29株と5種の罹病植物がBBWV-2抗血清と強く反応した(第1表)。これら29株のうち12株は, BBWV-1抗血清ともわずかに反応した。長野県で分離されたアルストロメリア株と岡山県で分離されたトルコギキョウおよび3種リンドウ株はBBWV-2抗血清と弱い反応が認めれたが, 保存葉を*C. quinoa*葉に接種しても病徴が生じなかったため, ウイルス濃度を高めた試料を用いてELISAによる再検定を行うことはできなかった。

2. 外被タンパク質遺伝子の解析

BBWV-2抗血清と強く反応しながらも, BBWV-1抗血清ともわずかに反応した12株のうち, スターチスカ



第1図 間接ELISAおよびDAS-ELISAによる感染葉からのBBWV-1およびBBWV-2の検出  
AおよびB: 間接ELISA, CおよびD: DAS-ELISA, AおよびC: BBWV-1 (PV132株) 抗血清, BおよびD: BBWV-2 (PV131株) 抗血清。

ら分離されたJP92V2株についてRNA-2の3'末端の2,283 1およびBBWV-2が保持するRNA-2 の3'側には, LCP塩基を決定した ( Accession番号: AB076671 )。 BBWV- ( Large coat protein ) およびSCP ( Small coat protein ) と

第1表 国内各地より採集されたBBWV株と罹病植物から新たに検出されたBBWVのDAS-ELISA検定結果

科名	感染植物 植物名	株名 ( 採取地, 文献 )	ELISA反応	
			BBWV-1 抗血清 <sup>a)</sup>	BBWV-2 抗血清 <sup>b)</sup>
アカザ科	ハウレンソウ	ハウレンソウ ( 京都府 )	-	++
		( 埼玉県 )	-	+++
イソマツ科	スターチス	JP92V2 ( 山梨県; 河野ら, 1995 )	( + )	++
キク科	マリーゴールド	( 香川県 )	-	+++
		リアトリス ( 香川県; 山本ら, 1994 )	-	+++
キンボウゲ科	デルフィニウム	デルフィニウム ( 千葉県; 中村ら, 1994 )	-	+++
シソ科	モルセラ	モルセラ ( 千葉県 )	( + )	+++
トケイソウ科	パッションフルーツ	Pa ( 沖縄県; 与那覇ら, 1993 )	-	+++
ナス科	シシトウガラシ	O・9234 ( 高知県; 竹内・古谷, 1994, 1996 )	-	+++
		広7 ( 広島県; 井本ら, 1970 ), GP ( 北海道; 後藤, 1986 ; 岩木・花田, 1986 ), G ( 高知県 ), 1A・6A ( 長野県 )	-	+++
ヒガンバナ科	スイセン	D ( 千葉県; 岩木・小室, 1972 )	-	+++
ヒユ科	ハナスベリヒユ	JP97V4 ( 鹿児島県; 河野ら, 1998 )	-	+++
マメ科	エンドウ	P108 ( 岡山県; 井上・井上, 1963 )	( + )	+++
		( 大阪府 )	-	+++
		クヨタリア ( 香川県 )	-	++
		ソラマメ Y-50-3 ( 愛媛県 ), 91-1 ( 香川県; 笹谷ら, 1992 )	-	+++
リンドウ科	トルコギキョウ	ME2 ( 宮城県 )	-	++
		AFV2 ( 青森県 ), SA・34B・KH-BB-1・14A・No.12・A29 ( 埼玉県 ), リンドウ ( 山口県 )	( + )	+++
		3-10 ( 岩手県 )	( + )	++
		( 岩手県 )	-	++
		5n1 ( 熊本県 ), ( 福島県 )	-	+++
ユリ科	アルストロメリア	アルストロメリア ( 長野県 )	-	+
リンドウ科	トルコギキョウ	トルコギキョウ ( 岡山県 )	-	( + )
		リンドウ	リンドウ 1・3・12 ( 岡山県 )	-

a) 405nmの吸光度値が - : 0.2以下, ( + ): 0.2 ~ 0.3。

b) 405nmの吸光度値が - : 0.1以下, ( + ): 0.1 ~ 0.2, + : 0.2 ~ 0.5, ++ : 0.5 ~ 1.0, +++ : 1.0 ~ 2.5。

第2表 異なる血清反応を示したJP92V2株とBBWV-1, BBWV-2, CPMVの外被タンパク質 ( LCP, SCP ) のアミノ酸配列の相同性

株名 ( 種名 )	領域	各種ウイルスとの相同性 ( % )							
		BBWV - 1		BBWV - 2				CPMV	
		PV132	PV176	E	IP	L	PV131		1 - 2
JP92V2	LCP	64.4	64.9	99.0	95.0	92.0	96.8	92.0	20.8
	SCP	59.9	59.4	98.0	91.4	89.9	- <sup>a)</sup>	87.8	19.1
PV132 ( BBWV - 1 )	LCP	...	95.5	64.7	63.9	65.2	64.7	65.2	21.2
	SCP	...	93.4	59.9	57.9	59.9	-	58.4	19.9
IP ( BBWV - 2 )	LCP	63.9	64.9	95.0	...	91.3	94.0	91.0	20.8
	SCP	57.9	58.4	90.4	...	89.8	-	88.8	20.7

a) PV131 株のSCP領域の塩基配列が不明であるため比較不能。

呼ばれる2種類の外被タンパク質がコードされている (Kobayashi et al., 1999)。これらウイルスと塩基配列から推測されるアミノ酸配列を比較することにより、JP92V2株が外被タンパク質をコードしている領域を推定し、BBWV-1 (PV132, PV176株), BBWV-2 (E, IP, L, PV131, 1-2株), さらにBBWV-1およびBBWV-2と同科異属に分類されている *Cowpea mosaic virus* (CPMV) の外被タンパク質との相同性を比較した結果を第2表に示す。JP92V2株の外被タンパク質にはBBWV-1と共通の抗原決定基が存在したためBBWV-1抗血清と若干の反応が認められたと考えられるが、本株のLCPとSCPのアミノ酸配列はBBWV-2に属するIP株と同様に、BBWV-2とは87%以上、BBWV-1とは60%程度の相同性を示したことから、本株はBBWV-2であると考えられた。本株と同様の血清反応を示した他の11株も、同様にBBWV-2であると考えられる。

以上の結果から、国内20道府県で採集された11科15種の野菜、花き類 (第1表) でBBWV-2の感染が確認された。2000年に青森県において、ヨーロッパから導入されたデルフィニウムにウイルス様症状が発生し、罹病株からBBWV-1が検出されているが (山下ら, 2001), 本試験で供試した試料からはBBWV-1は検出されず、日本ではBBWV-2による病害の発生が優勢であると考えられた。

BBWV-1およびBBWV-2抗血清を用いたELISA検定では、間接ELISA法よりもDAS-ELISA法の方が反応特異性が高いが、DAS-ELISA法でも別の種を検出してしまう可能性が残されるため、どちらか1つの抗血清を用いて反応が認められたとしても、その反応が弱い場合には別種である可能性を考え、他種の抗血清を用いて再度検定する必要がある。

長野県のアルストロメリア株と岡山県のトルコギキョウおよびリンドウ株はBBWV-2抗血清と反応したが、その反応は弱かったため、BBWV-1およびBBWV-2とも異なる近縁のウイルスである可能性も考えられた。しかし、本株は保存中にウイルス活性が失われており、*C. quinoa*葉で増殖し再試することができなかつたため、血清反応が弱かった原因を特定しウイルス種を推定することはできない。

海外では、BBWV-1はヨーロッパで、BBWV-2はオーストラリアおよび北アメリカ、中国等で多く検出されている (Lisa and Boccardo, 1996)。本研究では我が国においてBBWV-1による病害の発生を確認すること

はできなかった。本結果は、我が国で初めて報告されたBBWV-1 (山下ら, 2001) は海外から侵入した可能性があるという事実を支持するものである。このため、輸入植物の取り扱いにおいては、検疫を徹底化する、感度の高いウイルス検出法を確立する、輸入後も当面は隔離栽培をする等、海外から侵入するウイルスを抑制するための対策をたてる必要がある。国内外の種苗流通が発達している今日、BBWV-1およびBBWV-2による病害が今後各地に広まっていく可能性は十分に考えられる。ウイルス病の発生を防ぎ、また被害を最小限に抑えるためには的確な病気の診断が不可欠である。BBWV-1 およびBBWV-2による病害は、発生生態や罹病植物の病徴等から識別するのは困難であるが (Lisa and Boccardo, 1996), 両種の抗血清を用いたELISA検定を行えば迅速な診断が可能である。これまでBBWVという1つのウイルス名で扱われてきたBBWV-1 およびBBWV-2は国際ウイルス分類委員会が承認した別種のウイルスであることを認識し、正しい病気の診断が行えるよう留意しなければならない。

#### 引用文献

- Clark, M.F. and A.N. Adams (1977) J. Gen. Virol. 34 : 475 - 483.
- Goldbach, R. et al. (1995) Virus Taxonomy (F.A. Murphy ed.). Springer-Verlag, Wien, New York. pp. 341 - 347.
- 後藤忠則 (1986) 北海道農試研成績 S60 - 61 : 病71.
- 井本征史ら (1970) 日植病報 36 : 185 (講要).
- 井本征史 (1975) 広島農試報告 36 : 57-66.
- 井上忠男・井上成信 (1963) 科研成績 S37 : 23 - 46.
- 石川亮ら (1986) 日植病報 52 : 97 (講要).
- 岩木満朗・小室康雄 (1972) 日植病報 38 : 137 - 145.
- 岩木満朗・花田薫 (1986) 日植病報 52 : 97 - 98 (講要).
- 河野敏郎ら (1995) 茨城病虫研報 34 : 58 - 61.
- 河野敏郎ら (1998) 関東病虫研報 45 : 101 - 104.
- Kobayashi, Y.O. et al. (1999) Arch. Virol. 144 : 1429 - 1438.
- Kuroda, T. et al. (2000) Arch. Virol. 145 : 787 - 793.
- Lisa V. and G. Boccardo (1996) The Plant Viruses, vol 5 (B.D Harrison ed). Plenum Press, New York. pp. 229 - 250.
- Nakamura, S. et al. (1998) Ann. Phytopathol. Soc. Jpn. 64 : 565 - 568.

- 中村靖弘ら (1994) 関東病虫研報 41 : 175 - 176 .
- 笹谷孝英ら (1992) 日植病報 58 : 134 - 135 ( 講要 ).
- 竹内繁治・古谷眞二 (1994) 日植病報 60 : 782 - 783 ( 講要 ).
- 竹内繁治・古谷眞二 (1996) 高知農技セ研報 5 : 1 - 8 .
- Takeuchi, S. et al. (2000) J. Gen. Plant Pathol. 66 : 153 - 158 .
- Uyemoto, J.K. and R. Provvidenti (1974) Phytopathology 64 : 1547 - 1548.
- Xu, Z.G. et al. (1988) Ann. Appl. Biol. 113 : 287 - 296.
- 山本孝猪ら (1994) 四国植防 29 : 71 - 76 .
- 山下一夫ら (2001) 日植病報 67 : 174 ( 講要 ).
- 与那覇哲義ら (1993) 日植病報 59 : 335 ( 講要 ).