

## アイリス黄斑ウイルスの弱毒候補株作出・選抜

伊藤弓佳\*、三村裕\*\*、静川幸明\*\*、木村重光\*\*\*、古谷規行\*\*

キーワード: IYSV、ワクチン、タバコ (*Nicotiana benthamiana*)、トルコギキョウ、全身感染

### I 緒言

アイリス黄斑ウイルス(IYSV)は、ブニヤウイルス科トスポウイルス属のウイルスであり(Ullman *et al.* 1997)、オランダにおいて 1992 年からダッチ・アイリスで発生が確認され、初めて分離された(Cortes *et al.* 1998)。日本では、2000 年前後から、ネギ、タマネギ、ニラ、ラッキョウ等のユリ科の作物や、アリストロメリアやトルコギキョウ等の植物に感染することが報告されている(土井ら 2003、善ら 2005)。

本ウイルスはネギアザミウマ(*Thrips tabaci* Lindeman)により媒介され、一度ウイルスを獲得したネギアザミウマの個体は、永続的にウイルスを伝搬する(Ullman *et al.* 1993、Wijkamp *et al.* 1993)。経卵伝染、土壌伝染、種子伝染は確認されていない。

IYSV が感染したネギの葉身には、不明瞭な退緑斑が発生し、その後淡黄色～白色のえそ条斑を呈し、「ネギえそ条斑病」と命名された(福田・中山 2007)。また、トルコギキョウでは、茎葉のえそ斑点やえそ輪紋の症状を呈する(Kritzman *et al.* 2001)。

府内においては、2014 年 6 月、ネギ産地においてネギえそ条斑病の発生が確認された(京都府 2014)。ネギが IYSV に感染すると、出荷の際に、えそ条斑を呈する葉身の除去が必要となり、出荷調製の負担や商品化率の低下による収益の減少が問題となっている。現在、本ウイルス病に効果のある農薬は実用化されておらず、媒介虫のネギアザミウマの薬剤感受性も低下している(相澤 2018)。

そこで、ウイルス病防除技術として実用性が示されている弱毒ウイルス(小坂 1997、梁ら 2010)、いわゆる「植物ワクチン」開発のため、本研究では発生地で採取した自然株(強毒株)から病原性の極めて弱い弱毒株(無病徴～軽微な病斑程度)を作出し、これら弱毒株から予防効果を有するワクチン有望株の選抜を進めた。

### II 材料と方法

#### 1 弱毒株の作出

京都市内のほ場から IYSV の病徴により採取した露地ネギの葉身を用い、カーボランダム法によりサンプルの 10 倍希釈汁液を、接種が容易で短期間でウイルスの増殖が可能なタバコ (*Nicotiana benthamiana*) に接種した(Kritzman *et al.* 2001, Bag and Pappu 2009)。タバコは、本葉 5～6 葉展開株を使用した。加温設定 22℃、換気設定 30℃のガラス温室にて、14 日間栽培を行い、病徴観察及び DAS-ELISA 検定を行なった。各代において、病徴の弱いものを選抜し、継代接種を行い、極めて弱い病徴を呈する株が発現するまで、接種試験を続けた。第 1 回、第 2 回及び第 4 回以降の継代接種では、0.1M リン酸緩衝液(pH7.2)に還元剤(ジチオトレイトール)0.1%を添加した緩衝液、第3回目の継代株接種試験においては、0.1M リン酸緩衝液(pH7.2)に還元剤(ジチオトレイトール)および界面活性剤(Tween20)0.05%を添加した緩衝液を使用した。

なお、DAS-ELISA 検定は、日本植物防疫協会製の IYSV コーティング抗体(IgG)および同抗体から作成した酵素結合抗体(コンジュゲート)を 500 倍希釈で使用し、基質液添加後に吸光度(405nm)を測定し、陽性判定を行った。

#### 2 弱毒有望株の一次選抜

##### (1) 弱毒 32 株の病徴および増殖性による選抜

タバコへの継代接種で得られた弱毒株 32 株をタバコに接種して、病徴を基に選抜を行った。

精密温室内で 25℃恒温条件において、本葉 5～6 葉展開したタバコ 20 個体に各弱毒株を接種し、接種1週間後の各植物体全体に発生するえそ病斑数および接種後4週間の病徴発生個体数を基に一次選抜を行った。

##### (2) 弱毒有望株の二次選抜

一次選抜した弱毒株 13 株をタバコおよびトルコギキョウに接種して、病徴および感染を基に選抜を行った。

前述と同じ温室内において、一次選抜時より低い 23℃恒温条件において、タバコ 10 個体および栽培植物で機械接

\* 生物資源研究センター (現 明治大学農学部)

\*\* 生物資源研究センター

\*\*\* 生物資源研究センター (現 流通ブランド戦略課)

種が可能で、かつウイルスの移行性が報告されるトルコギキョウ (*Srinivasan et al.* 2011) の品種‘一番星’ 12 個体に弱毒株を接種し、接種後4週間の病徴観察および接種4週間後に上位葉(接種葉の 3~6 枚上の葉)を用いて DAS-ELISA 検定を行った。トルコギキョウの DAS-ELISA 検定陽性個体を後述する RT-PCR 法によりウイルス感染を再確認の上、病徴と感染を基に二次選抜を行った。

なお、RNA 抽出は、*Suehiro et al.*(2005)の方法を用い、IYSV 判定の RT-PCR には *Uga and Tsuda*(2005)の IYSV 用プライマーを用い、PCR 条件は、50°C30 分、95°C15 分の後、94°C30 秒、56°C30 秒、72°C1 分を 40 サイクルとした。

### 3 二次選抜した弱毒有望株の特性調査

#### (1) 弱毒有望株の病徴と感染(追試)

前項と同じ温室において、23°C条件下で、二次選抜した弱毒株 4 株をタバコ 10 個体およびトルコギキョウ品種‘一番星’ 12 個体に接種し、接種 2 日後から 27°C条件下で管理し、接種後4週間の病徴観察および接種4週間後に上位葉(接種葉の 3~6 枚上の葉)を用いて DAS-ELISA 検定を行った。トルコギキョウの DAS-ELISA 検定陽性個体を RT-PCR 法によりウイルス感染の再確認を行った。

#### (2) 選抜弱毒株の干渉効果

25°C恒温条件の精密温室内で、二次選抜した弱毒株 4 株をタバコに接種(一次接種)した。その後、RT-PCR により感染を確認したそれぞれ 10 個体および弱毒を接種しないタバコ 10 個体を供試し、弱毒株接種3週間後に、一次接種葉より 3~4 枚上位の葉へ強毒株のチャレンジ接種を行い、10 日後の病徴を観察した。

## III 結果

### 1 弱毒株の作出

タバコでの1~2回目の IYSV 継代株においては、露地ほ場から採取したネギ葉に感染していた IYSV 強毒株と同様に接種葉および上位葉とも多数のえそ病斑の病徴を呈し、多くの株が枯死した。しかし、3回目の IYSV 継代接種においては、えそ病斑数や病徴の広がりが少なく、かつ DAS-ELISA 検定で IYSV 陽性が示された IYSV 感染タバコ株を、32 株得ることができた。その後、4~5 回目の継代接種をおこなったところ、病徴の強毒株への復帰は認められず、弱い病徴が維持された。

### 2 弱毒有望株の一次選抜

#### (1) 弱毒 32 株の病徴および増殖性による選抜

タバコへの継代で得られた 32 株の弱毒株をタバコへ接種し、病徴を観察したところ、接種 1 週間後の接種葉における病斑数および接種後4週間の病徴発現個体数について大きな違いが認められた(表1)。強毒株との対比で上位葉に病徴が確認されたタバコの個体数が 15 個体で5%有意水準付近となるため(フィッシャーの正確確率検定)、病徴のある個体数が 14 個体以下であった 15 株のうち、有効な接種源が得られた病斑数の少ない 13 株を一次選抜した。

#### (2) 弱毒有望株の二次選抜

一次選抜した 13 株について、23°C条件下での病徴観察により上位葉への感染を確認した。その結果、タバコでは DAS-ELISA により、弱毒株 10 株で上位葉への感染する個体が確認された。このうち 4 株においては、DAS-ELISA および IYSV 検定用のプライマーを用いた RT-PCR によりトルコギキョウにおいても上位葉のウイルス感染を確認したため、これら 4 株を二次選抜した(表2)。

### 3 二次選抜した弱毒有望株の特性調査

#### (1) 弱毒有望株の病徴と感染(追試)

二次選抜した弱毒株 4 株を接種し、27°C条件下で栽培すると、タバコでは上位葉に病徴が見られたが、トルコギキョウでは、上位葉に病徴が全く見られなかった(図1)。しかし、病徴が発生しないものの弱毒株 No.7および No.42 では、DAS-ELISA および RT-PCR により、トルコギキョウ上位葉のウイルス感染を確認した(表3)。

#### (2) 選抜弱毒株の干渉効果

二次選抜した弱毒株 4 株を接種し感染を確認したタバコでは、いずれも強毒株をチャレンジ接種後も、顕著な病徴は発生しなかった。一方、強毒株のみを接種したタバコでは、すべての個体において明確な病斑が発生した(図2)。

## IV 考察

ガラス温室でタバコを用いた継代接種により、病徴の弱い IYSV 弱毒株 32 株を得ることができた。うち 2 株は、接種葉から上位葉への感染が2回の接種試験で確認され、かつチャレンジ接種により強毒株に対する干渉効果が確かめられたため、ワクチン有望株として選抜された。

これまで、弱毒ウイルスは、熱、紫外線照射及び亜硝酸ナトリウムによる人為的処理やこれらを組み合わせた処理、ウイルス RNA の導入あるいは交換によって作出されてきた (*Holmes, 1934* ; *大島ら, 1965* ; *本吉・西口, 1984* ; *Yeh and Gonsalves, 1984* ; *後藤ら, 1984* ; *Yoshida ら, 1985* ;

Montasser *et al.*, 1991 ; Sayama *et al.*, 1993, Kobori *et al.* 2005)。変異誘発処理後の感染植物には、通常、弱毒株と強毒株が混在するとされている(小川, 2014)。また、IYSV の属するトスポウイルスは、接種継代を繰り返すと感染植物の病徴に変化を与えることがあるとされる (Resende *et al.*, 1991)。これらのことより、今後、本研究で得られたワクチン候補株については、局部病斑を呈するインパチェンス等の植物に接種し、局所病斑分離等を重ね、同一の変異を持つ弱毒株として単離を進める必要がある(福田・中山 2007)。

今回の接種試験では、強毒株は、いずれの試験でもタバコではすべての株が感染し、トルコキキョウでも大半の個体が感染した一方、弱毒株では、感染率が比較的低かった。Srinivasan ら(2011)は、異なる温度条件で、IYSV 機械接種の感染率やウイルスの移行性が異なることを報告していることから、弱毒株接種試験においてもさらに温度条件検討の上、評価することが必要と考えられた。

IYSV のネギへの人為接種については、成功していない(善ら 2005、福田・中山 2007)。また、保毒アザミウマの吸汁により感染した IYSV は、局所化することが報告されている(福田・中山, 2007)。これらのことから、ネギでは、効率的な人為的接種方法の開発そのものが難しく、開発されても局所感染で全身感染しないためワクチンの予防効果が得られないことが予想される。

一方、*Datura stramonium* に IYSV とトマト黄化えそウイルス(TSWV)を混合接種すると、TSWV のサブレッサーがサイレンシングを抑制することで IYSV 単独では見られないウイルスの全身移行性を獲得すること(Bag *et al.* , 2012)や、TSWV の NS<sub>s</sub>プロテインがポティウイルスの全身移行性を助けることが確認されている(Garcia-Ruiz *et al.*, 2018)。IYSV を局在させるネギの RNA サイレンシングを抑制するサブレッサーを持つウイルスを混合感染させることで、IYSV をネギに全身感染させることが可能になると推察される。ネギの場合は、ネギに全身感染するネギ萎縮病ウイルス SYSV と IYSV の混合接種による感染性や全身移行性への影響を検討することは、ワクチン実用化に向けた可能性模索として価値があると考えられる。なお、SYSV は、ポチウイルスであり、弱毒ウイルス作出方法も確立されている(Kosaka and Fukunishi., 1993; Kobori *et al.*, 2005)。

なお、本研究は平成 30 年度研究成果展開事業 A-STEP 機能検証フェーズ(平成 30~令和元年度: グラント番号 VP30118066786)により実施した。

## V 引用文献

- (1) 相澤美里、2018、ネギアザミウマの異なる生殖系統における合成ピレスロイド剤抵抗性機構と広域的・局所的分布に関する分子生態学的研究、香川県農試研報、69:1-30
- (2) Bag, S. and Pappu, H. R. (2009) Symptomatology of Iris yellow spot virus in selected indicator Hosts. *Plant Health Progress*, 10(1): doi:10.1094/PHP-2009-0824 -01- BR
- (3) Bag, S., Mitter, N., Eid, S., and Pappu, R. H. (2012). Complementation between two Tosopoviruses facilitates the systemic movement of a plant virus silencing suppressor in an otherwise restrictive host. *PLOS ONE* 7(10): e44803.
- (4) Cortes, I., Livieratos, I.C., Derks, A., Peters, D. and Kormelink, R. (1998) Molecular and serological characterization of Iris yellow spot virus, a new and distinct tospovirus species. *Phytopathology* 88: 1276-1282
- (5) 土井誠・善正二郎・奥田充・中村宏子・加藤公彦・花田薫、2003、*Iris yellow spot virus* によるトルコギキョウ (*Eustoma grandiflorum*) えそ輪紋病. 日植病報、69: 181-188
- (6) Holmes, F.O. (1934) A masked strain of tobacco mosaic virus. *Phytopathology* 24, 845-873
- (7) 福田充・中山喜一、2007、アイリスイエロースポットウイルス(IYSV)によるネギえそ条斑病(新称)、関東病虫研報、54:39-42
- (8) Grasia-Ruiz, H., Sergio, M., and Patricia A. (2018) Tomato spotted wilt virus NSs Protein Supports Infection and systemic movement of a potyvirus and is a symptom determinant. *Viruses* 10, 129; doi:10.3390/ v10030129
- (9) 後藤忠則・飯塚典男・小餅昭二、1984、タバコモザイクウイルス・トウガラシ系の弱毒ウイルス作出とその利用、日植病報、50 : 221-228.
- (10) 小坂能尚、1997、ダイズウイルス病の病原ウイルスと防除法に関する研究、京都農研報、20:1-100
- (11) Kosaka, Y. and Fukunishi, T. (1993) Attenuated isolates of soybean mosaic virus derived at a low temperature. *Plant Dis.* 77: 882-886
- (12) Kobori, T., Ryang, B.-S., Natsuaki, T. and Kosaka, Y. (2005) A New Technique to Select Mild Strains of Cucumber mosaic virus. *Plant Dis.* 89: 879-882
- (13) Kritzman, A., Lampel M., Raccach, B. and Gera A. (2001) Distribution and Transmission of Iris yellow spot virus. *Plant Dis.* 85: 838-842

- (14) 京都府、2014、発生予察特殊報第1号、京都府病害虫防除所
- (15) Montasser, M. S., Tousignant, M. E., and Kaper, J. M. (1991). Satellite-mediated Protection of tomato against cucumber mosaic virus : I. Greenhouse experiments and simulated epidemic conditions in the field. *Plant Disease* 75: 86-92.
- (16) 本吉総男・西口正通、1984、ウリ類モザイク病防除のための弱毒ウイルスの作出、植物防疫、38 : 9-13.
- (17) 大島信行・小餅昭二・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、北海道農試彙報、85 : 23-33.
- (18) 小川哲治、2014、本邦のジャガイモ Y ウイルスの集団遺伝構造と弱毒ウイルスに関する研究、長崎農技特研報、5:1-69
- (19) Resende,R.de O., de Haan, P., de Avila, A. C., Kitajima,E. W., Kormelink, R., Goldbach, R., and Peters,D. (1991) Generation of envelope and defective interfering RNA mutants of tomato spotted wilt virus by mechanical passage. *J. Gen. Virol.*72, 2375-2383
- (20) 梁宝成・片桐伸行・安原壽雄・小坂能尚、2010、植物ウイルス病ワクチンの製品化と普及展開、植物防疫、64(12):822-825
- (21) Sayama, H., Sato, T., Kominato, M., Natuaki, 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
- (22) Srinivasan, R., Diffie, Stan. And Sundaraj, S. (2011) Evaluation of Lisianthus as an indicator host for Iris yellow spot virus. *Plant Dis.* 95:1520-1527
- (23) Suehiro, N., Matsuda, K., Okuda, S. and Natsuaki T. (2005) A simplified method for obtaining plant viral RNA for RT-PCR. *Journal of Virological Methods.* 125: 67-73
- (24) Uga, H. and Tsuda, S (2005) A one-step reverse transcription-polymerase chain reaction system for the simultaneous detection and identification of multiple Tospo virus infections. *Phytopathology* 95:166-171
- (25) Ullman, D. E., German, T. L., Sherwood, J. L., Westcot, D. M., and Cantone, F. A. (1993) Tospovirus replication in insect vector cells immune cytochemical evidence that the nonstructural protein encoded by the S RNA of tomato spotted wilt tospovirus is present in thrips vector cells. *Phytopathology*83, 456-463
- (26) Ullman, D. E., Sherwood, J. L., and German, T. L., (1997) Thrips as vectors of plant pathogens. (Lewis T. ed.), *Thrips as Crop Pests*, CAB International, Cambridge University Press, Cambridge, UK., pp 539-565
- (27) Wijkamp, I., Van Lent, J., Kormelink, R., Goldbach,R., and Peters, D. (1993) Multiplication of tomatospotted wilt virus in its insect vector *Frankliniella occidentalis*. *J. Gen. Virol.* 74, 341-349
- (28) Yeh, S. -D., and Gonsalves, D. (1984) Evaluation of induced mutants of papaya ringspot virus for control by cross protection. *Phytopathology* 74: 1086-1091
- (29) Yoshida, K., Goto, T. and Iizuka, N. (1985) Attenuated isolates of cucumber mosaic virus produced by satellite RNA and cross protection between attenuated isolates and virulent ones. *Ann. Phytopath. Soc. Japan* 51: 238-242
- (30) 善正二郎・奥田充・海老原克介・植松清治・花田薫・岩波徹・中島貞彦、2005、タマネギ (*Allium cepa*) から分離された *Iris yellow spot virus* (IYSV) の遺伝的特性および IYSV2 系統のタマネギおよびネギ (*Allium schoenoprasum*) に対する病原性、日植病報、71:123-126.



図1. トルコキキョウでの弱毒株評価  
 (左) 激しい病徴の強毒株  
 (右) 上位葉に病徴が見られない弱毒株



図2 *N. benthamiana*へのチャレンジ接種10日後の病徴  
 (左) 強毒のみ接種した接種葉 (右) 弱毒接種後に強毒株を接種した葉

表1 IYSV強毒株および弱毒候補32株の接種による *N. benthamiana*の病徴発現程度

強毒および弱毒株No.	病徴がある個体数		病斑数 (数/個体)
	接種葉	上位葉	
強毒株	20	20	48.4
2	2	2	0.1
4	2	1	0.1
5	1	1	0.1
7	0	0	0.0
8	3	1	0.3
9	4	3	0.2
13	0	0	0.0
14	19	19	1.9
15	9	8	0.7
16	5	5	0.2
18	18	18	4.0
19	7	2	0.4
22	15	15	1.5
23	2	1	0.1
25	17	17	1.7
29	15	15	2.5
31	12	12	0.6
32	18	18	6.1
33	16	16	0.9
34	18	18	3.6
35	16	14	4.5
36	20	20	13.5
37	20	19	10.7
39	18	14	8.7
41	18	15	5.1
42	4	3	0.2
43	20	20	14.4
44	18	17	6.1
45	20	19	32.2
47	20	20	50.2
49	20	20	48.4
50	20	20	25.6

IYSV各株に対して*N.benthamiana*20個体接種した2葉/個体の病斑数を接種1週間後に調査  
 病徴個体数は接種4週間後までの調査

表2 23°C恒温条件におけるIYSV強毒株および弱毒候補13株の接種による *N. benthamiana* およびトルコキキョウの病徴発現程度

強毒および弱毒株No.	<i>N. benthamiana</i>			トルコキキョウ		
	病徴がある個体数		ELISA 陽性個体数	病徴がある個体数		ELISA 陽性個体数
	接種葉	上位葉		接種葉	上位葉	
強毒株	10	10	10	8	8	8
2	0	0	0	0	0	0
4	0	0	1	0	0	0
5	2	0	2	0	0	0
7	3	0	2	2	0	2*
8	3	0	2	1	0	1*
9	3	0	2	1	0	1*
13	5	0	4	0	0	0
15	2	0	2	0	0	0
19	1	0	1	0	0	0
23	1	0	0	0	0	0
35	10	1	7	0	0	0
39	0	0	0	0	0	0
42	7	1	6	2	1	2*

IYSV各株に対して*N.benthamiana*10個体、トルコキキョウ12個体  
 病徴個体数は接種4週間後までの調査

ELISA検定には上位葉を使用  
 \* : RT-PCRによりIYSVを確認

表3 23°C→27°C温度条件におけるIYSV強毒株および弱毒候補4株の接種による*N. benthamiana*およびトルコキキョウの病徴発現程度

強毒および弱毒株No.	<i>N. benthamiana</i>			トルコキキョウ		
	病徴がある個体数		ELISA	病徴がある個体数		ELISA
	接種葉	上位葉	陽性個体数	接種葉	上位葉	陽性個体数
強毒株	10	10	10	12	12	12
7	4	3	1	2	0	2*
8	6	4	6	0	0	0
9	5	5	8	0	0	0
42	4	1	0	2	0	2*

IYSV各株に対して*N.benthamiana*10個体、トルコキキョウ12個体

病徴個体数は接種4週間後までの調査

ELISA検定には上位葉を使用

\* : RT-PCRによりIYSVを確認

## Production and selection of Attenuated Strain Candidates of Iris Yellow Spot Virus

Yumika ITO, Yutaka MIMURA, Yoshiaki SHIZUKAWA, Shigemitsu KIMURA,  
Noriyuki FURUTANI

### Summary

Iris yellow spot virus (IYSV), a tospovirus transmitted by thrips, has wide range of host plants and causes a serious disease in these hosts such as onion and Welsh onion. No direct method has been developed to control IYSV. Therefore, we started to develop attenuated strain of IYSV for prevention of the disease. IYSV inoculum was obtained by an infected Welsh onion in Kyoto. The attenuated virus was selected by low-temperature treatment and passage from IYSV-infected Welsh onion. The test plants, tobacco (*Nicotianabenthamiana*), were inoculated with juice inoculum by the carborundum method. After two weeks of inoculation, symptom observation and DAS-ELISA test were carried out for detecting IYSV infection.

As a result, 32 attenuated candidate strains were obtained in the 3rd subculture by subculture treatment from infected tobacco.

Using these 32 strains, the symptom of inoculation to tobacco was observed again, and 13 strains with a small number of lesion-causing individuals were primarily selected.

Next, these 13 strains were inoculated to tobacco and lisianthus (*Eustoma grandiflorum*) at a temperature of 23 ° C. Among the attenuated strains that were confirmed to be infected in tobacco, 4 strains that have systemic infection in lisianthus were selected and vaccinated again to lisianthus, and the migratory ability was similarly observed on some plants of two strains, No. 7 and No. 42. These strains were also confirmed and showed little symptom as a result of the challenge inoculation in tobacco. So these were selected as attenuated candidates.

Key-words : IYSV, plant vaccine, *Nicotiana benthamiana*, Lisianthus, systemic infection