

学 位 論 文 題 名

ETIOLOGY AND STRAIN CHARACTERIZATION OF RICE VIRUS DISEASES IN THE PHILIPPINES

(フィリッピンにおけるイネ病害ウイルスの同定とその系統の諸性質に関する研究)

学位論文内容の要旨

フィリッピンのイネウイルス病害がウンカ・ヨコバイで伝搬される 4 種類のウイルス、即ち rice tungro spherical virus (RTSV)、rice tungro bacilliform virus (RTBV)、rice grassy stunt virus (RGSV)、およびイネ萎縮ウイルス(RDV)によって起こることをまず明らかにした。さらに RTSV、RTBV、および RGSV については、同じウイルス種であってもイネの品種によって反応が異なったり、ウイルスに抵抗性と考えられていた品種に感染する系統が存在することを示した。これらのウイルスに系統が存在することは、それまで知られていなかったもので、イネのウイルス病害抵抗性品種の開発に重要な知見をもたらした。

1) イネツングロー病の病原体の同定

イネツングロー病は、イネに葉の黄化と草丈の萎縮を起こす。フィリピンに発生する本病が RTSV と RTBV の混合感染によって起こることを証明した。RTSV は単独でタイワンツマグロヨコバイによって半永続的に伝搬される。しかし RTBV は単独では伝搬されず、タイワンツマグロヨコバイがまず RTSV を獲得した後に獲得されてはじめて伝搬された。よって、RTSV は RTBV の虫媒伝搬のヘルパーウイルスとして働いていた。こうして接種したイネには、RTSV と RTBV の両ウイルスが同時に感染していたが、まれに RTSV あるいは RTBV に単独感染した株もあった。イネは、両ウイルスの同時感染でツングロー病を起こし、RTBV 単独感染でやや萎縮して軽い葉の黄化を起こし、RTSV 単独感染では病徴を示さなかった。

2) RTBV と RTSV の純化と血清診断法の確立とゲノムの種類

RTSV の純化法を確立して、純化ウイルスより抗 RTSV 血清を作成した。RTBV は RTSV を獲得したヨコバイでのみ伝搬するので、RTBV に単独感染した材料を得るのが困難であった。そこで、RTSV と RTBV を獲得したヨコバイに抗 RTSV 血清を吸汁させて RTSV を不活化させ、RTBV のみをイネに感染させることに成功した。こうして得られた RTBV 単独感染株よりウイルスを純化し、抗 RTBV 血清を作成した。これに

より、E L I S A法を用いて両ウイルスを特異的に検出、診断する事ができた。

純化ウイルスよりゲノム核酸を抽出して、RNA 分解酵素耐性および DNA 制限酵素切断試験を行い、RTSV と RTBV のゲノムが各々分子量約 3.7×10^6 の ssRNA と約 8 キロ塩基対の環状 dsDNA であると結論した。

3) RTBV の系統に関する研究

RTBV にはイネ品種 FK135 と TN1 の反応の差異から 4 つの系統 (L、G1、G2、Ic) があることを明らかにした。L 系統は FK135 と TN1 に激しい黄化と萎縮を、G1 は FK135 と TN1 に軽い萎縮のみを、G2 は FK135 に軽い萎縮と TN1 に激しい黄化と萎縮を、Ic は FK135 に激しい黄化と萎縮を起こし TN1 に軽い萎縮を起こした。

4) RTBV G2 系統ゲノムのクローニングと塩基配列の解析

G2 系統のゲノムの全長をバクテリアのプラスミドに挿入してクローニングし、その全塩基配列を決定した。G2 系統のゲノムは 8,001 塩基対で構成され、四つの ORF をコードしていた。既報の JPN および JII 系統とは、各 ORF のアミノ酸配列で 98.7 から 100% の高い相同性を示した。最も変異に富むと思われる ORF4 について、さらに G1、L、Ic 系統のゲノムからクローニングして塩基配列を決定し比較した。全系統ともアミノ酸配列でわずかに異なっていたが、お互いに 98% 以上の相同性を保っていた。

5) RTBV の系統判別法の確立

RTBV 系統を、実験室で簡便迅速に識別する方法を開発した。まずゲノム DNA の 806 塩基を P C R で増幅した。L、G1、G2 はこの増幅断片の *EcoRI* と *EcoRV* による切断パターンで識別出来た。また全ゲノムの RFLP 解析でも L、G1、G2 を識別することが出来た。しかし G1 と Ic はどちらの方法によっても同一のパターンを示した。

6) RTSV 抵抗性を打破する系統に関する研究

イネ栽培品種 TKM6 は従来の RTSV 系統に抵抗性であったが、ミンダナオの圃場でツングロー病症状を示す本イネ品種を発見し、E L I S A法でこのイネの RTSV 感染を確認した。そこで TKM6 に感染しない系統を A、感染する系統を Vt6 と命名した。抵抗性イネ 60 品種について両系統の接種試験を行ったところ、一つの例外を除いて全てが A 系統に抵抗性で、Vt6 系統に対しては、抵抗性から感受性まで様々な反応を示した。Vt6 に対して高い感染性を持つ品種はすべて TKM6 に由来する抵抗性遺伝子を持っており同時にタイワンツマグロヨコバイに対する抵抗性遺伝子をもっていなかった。よって、Vt6 系統は、それまでの RTSV 抵抗性を打破する系統と結論した。

7) RGSV 抵抗性を打破する系統に関する研究

RGSV に対する抵抗性は現在全て野生イネ *Oryza nivara* の遺伝子に由来する。本研究でこの抵抗性を打破する RGSV の新系統を分離した。本ウイルスは圃場よりツング

ロー病様の病徴を示すイネからトビイロウンカで媒介されるウイルスとして分離された。血清反応と電子顕微鏡による粒子形態観察より RGSV と同定した。本ウイルスは、野生イネ *Oryza nivara* とこれに由来する抵抗性イネ品種の全てに感染した。

8) RDV の分離と同定

イネ萎縮ウイルスは、日本をはじめ、韓国・中国・ネパールの温帯の稲作地帯で古くから発生が知られているが、東南アジアやフィリピンの稲作地帯には発生しないとされてきた。しかし本研究によって、ミンダナオ島で本ウイルスが発生していることがはじめて確認された。本ウイルスはクロスジツマグロヨコバイによって低率ながら媒介され、直径約 65 nm の球形粒子であった。また RDV 抗血清と強く反応した。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 上 田 一 郎
副 査 教 授 生 越 明
副 査 教 授 喜久田 嘉 郎

学 位 論 文 題 名

ETIOLOGY AND STRAIN CHARACTERIZATION OF RICE VIRUS DISEASES IN THE PHILIPPINES

(フィリッピンにおけるイネ病害ウイルスの同定とその系統の諸性質に関する研究)

本論文は、10章で構成され、図30、表18、引用文献132、総頁数147の英文論文で、他に参考論文30編が添えられている。

本研究によって、フィリッピンのイネウイルス病害がウンカ・ヨコバイで伝搬される4種類のウイルス、即ち rice tungro spherical virus (RTSV)、rice tungro bacilliform virus (RTBV)、rice grassy stunt virus (RGSV)、およびイネ萎縮ウイルス(RDV)によって起こることを明らかにした。さらに RTSV、RTBV、および RGSV について新系統を発見し、これらが従来の系統と著しく異なる反応をイネ品種に示すことを明らかにした。主な研究成果は以下のようにまとめられる。

1) イネツングロー病の病原体の同定

フィリッピンに発生するイネツングロー病が RTSV と RTBV の混合感染によって起こることを証明した。RTSV は単独でタイワンツマグロヨコバイによって半永続的に伝搬される。しかし RTBV は単独では伝搬されず、タイワンツマグロヨコバイが RTSV を獲得した後に獲得されてはじめて伝搬された。よって、RTSV は RTBV の虫媒伝搬のヘルパーウイルスとして働いていた。こうして接種したイネには、RTSV と RTBV の両ウイルスが同時に感染していたが、まれに RTSV あるいは RTBV に単独感染した株もあった。イネは、両ウイルスの同時感染でツングロー病を起こし、RTBV 単独感染ではやや萎縮して軽い葉の黄化を起こし、RTSV 単独感染では病徴を示さなかった。

2) RTBV と RTSV の純化と血清診断法の確立とゲノムの種類

RTSV の共存下でのみ虫媒伝搬するために RTBV 単独感染株の作成は困難であったが、これを可能にして、RTBV と RTSV の単独純化に成功した。純化ウイルスより抗血清を作成し、それぞれを特異的に検出・診断する血清学的診断法を確立した。

純化ウイルスよりゲノム核酸を抽出して、RNA 分解酵素耐性および DNA 制限酵素切断試験を行い、RTSV と RTBV のゲノムが各々分子量約 3.7×10^6 の ssRNA と約 8 キロ塩基対の環状 dsDNA であると結論した。

3) RTBV の系統比較に関する研究

RTBV をイネ品種 FK135 と TN1 の反応の差異から、4 系統 (L、G1、G2、Ic) に識別した。これらの系統についてゲノムレベルの比較も行った。まず G2 系統の全塩基配列を決定した。G2 系統のゲノムは 8,001 塩基対で、4 つの ORF をコードしていた。さらに G1、L、Ic 系統のゲノムから ORF4 の領域をクローニングして塩基配列を決定し比較した。全系統ともアミノ酸配列でわずかに異なっていたが、お互いに 98% 以上の相同性を保っていた。

4) RTBV の系統判別法の確立

RTBV 系統を、実験室で簡便迅速に識別する方法を開発した。全ゲノムの制限酵素切断地図を作成し、RFLP 解析で L、G1、G2 を識別出来るようにした。しかし G1 と Ic は同一のパターンを示した。

5) RTSV 抵抗性を打破する系統に関する研究

イネ栽培品種 TKM6 は従来の RTSV 系統に抵抗性であったが、ミンダナオの圃場でツングロー病症状を示す本イネ品種を発見し、血清診断法でこのイネの RTSV 感染を確認した。そこで TKM6 に感染しない従来系統を A、感染する系統を Vt6 と命名した。A 系統に抵抗性のイネ 60 品種について Vt6 系統の接種試験を行ったところ、TKM6 に由来する抵抗性遺伝子を持っている品種は全て感受性であることが明らかになった。

6) RGSV 抵抗性を打破する系統に関する研究

RGSV に対する抵抗性は現在全て野生イネ *Oryza nivara* の遺伝子に由来する。本研究でこの抵抗性を打破する RGSV の新系統を分離した。本ウイルスは、野生イネ *Oryza nivara* とこれに由来する抵抗性イネ品種の全てに感染した。

7) RDV の分離と同定

RDV は、日本をはじめ、韓国・中国・ネパールの温帯の稲作地帯で古くから発生が知られているが、東南アジアやフィリピンの稲作地帯には発生しないとされてきた。しかし本研究によって、ミンダナオ島で本ウイルスが発生していることが初めて確認された。

以上のように本研究は、ウイルス病原を同定して、新系統を発見し、ウイルス抵抗性イネ品種の開発に大きく貢献したものである。よって審査員一同は、ペピト クイントス カバウアタンが博士（農学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認めた。