

【2018年日本ブドウ・ワイン学会 技術賞 受賞講演要旨】

**醸造用ブドウのウイルス診断受託事業化：
ウイルス感染に対する認識を高めるための試み**

鈴木 俊二

山梨大学ワイン科学研究センター

**2018 ASEV JAPAN TECHNICAL MERIT AWARD
Acceptance of grapevine virus inspection in Japan:
An attempt to promote the recognition of viral infection in grapevines**

Shunji SUZUKI

The Institute of Enology and Viticulture, University of Yamanashi

1. 植物ウイルス病とは

進化の過程において「動かない」という生存戦力を選択した植物は、自然界において様々な生物のおよび非生物のストレスに暴露される。これらストレスのうち、植物を病的状態にする原因を病原と呼ぶ。病原は、病害虫や細菌、カビなどの生物性病原、ウイルスに代表されるウイルス性病原、土壌条件や気象条件などの非生物性病原に大別される。

ウイルスはタンパク質の殻(コートタンパク質)とその内部に入っている核酸(ゲノム)からなる。ウイルスは自己を複製するために宿主の細胞を利用するため、生命の最小単位である細胞をもたない。そのため生物性病原とは異なる扱いとなる。ウイルスは自らを増殖する際に宿主細胞の代謝を利用するため、薬剤の標的になるべきウイルス特異的代謝系が凡そ存在しない。ウイルスの接触伝染を予防するレンテミン(農林水産省登録第17774号および第15584号)が抗ウイルス剤として市販されているが、宿主へ感染したウイルスに対して治療効果を示す薬剤が開発されていない現状において、ウイルス病に感染しないように伝染源を駆除することがウイルス病に対する唯一の対策となる。

2. ウイルス病によるブドウの生理的变化

ウイルス感染したブドウでは果房の生育不良、果実熟期の遅延、着色不良、などの果実品質に関わる生理的变化が誘導される(Espinoza et al. 2007)。また、ウイルス感染により葉緑体の光合成能が低下することも知られている(Bertamini et al. 2004)。さらに、植物の老化に関連するプロテアーゼやリパーゼなどがウイルス感染により誘導される(Lim et al. 2005)。現在のところ、何故ウイルス感染によりブドウ果実の品質が低下するのか、その分子機構までは明らかにされていないが、ブドウ栽培においてウイルス病は常に意識すべき重要な課題である。ただし、ウイルス病の症状はウイルスの種類およびブドウ品種によって異なり、かびによる病害に比べ劇的の症状が肉眼的に見られないことも少なくない。

3. 醸造用ブドウにおけるウイルス罹病例

我が国の醸造用ブドウにおけるウイルス罹病例として、甲州ブドウにおける味無果病は今でも記憶に新しい。1955年に初発報告がなされ、1960～1970年代に問題となった味無果病は、甲州ブドウで顕著に認められ、糖度低下、食味劣化あるいは着色不良を

引き起こした。山梨県果樹試験場によるウイルスフリー苗の提供により現在は味無果病が確認されることはなくなった。味無果病は接木伝染するためウイルス病であると判断された。病原に関しては2説あり、ひとつは未同定の球状ウイルスを病原とする説であり（難波ら 1979）、もうひとつはリーフロール病を引き起こすウイルスとフレック病を引き起こすウイルスの複合感染説である（寺井・矢野 1988）。

味無果病により醸造用ブドウが重大な被害を被ったこともあり、ウイルス病に対するワイナリーおよびブドウ農家の関心は高いものであるが、我が国の醸造用ブドウにおける最近のウイルス感染状況についての情報は乏しいのが現状である。

4. ウイルス診断法の変遷

圃場においてウイルス感染したブドウ樹を特定することはウイルス病の感染拡大を防ぐ意味をもつ。これまでウイルス病の診断には検定植物による生物検定法が用いられてきた。しかし、生物検定法は診断結果が出るまでに長い期間を必要とするとともに、多検体の試料を扱うのに適さなかった。そこで開発されたのが分子診断法である。先に述べたように、ウイルスは核酸とタンパク質の構造体である。近年では、抗ウイルス抗体を使用してウイルスの外被タンパク質を検出するELISA法（enzyme-linked immunosorbent assay, Komínek et al. 2005）、ウイルスの核酸をウイルス特異的PCRプライマーで検出するPCR法（polymerase chain reaction, Beuve et al. 2007）が開発・実用化されている。

5. ウイルス診断の流れ

我々のウイルス診断受託事業では我が国の醸造用ブドウで感染が確認された以下の7種のウイルスを対象としている。

Grapevine leafroll-associated virus 1 (GLRaV-1)

Grapevine leafroll-associated virus 2 (GLRaV-2)

Grapevine leafroll-associated virus 3 (GLRaV-3)

Grapevine virus A (GVA)

Grapevine virus B (GVB)

Rupestris stem pitting associated virus (RSPaV)

Grapevine fleck virus (GFkV)

これらのウイルスはすべてRNAをゲノムとするため、我々のウイルス診断ではウイルスRNAゲノムを直接検出するreverse transcription-polymerase chain reaction (RT-PCR)法を利用している。PCRに使用する各ウイルス特異的プライマーは先行研究から流用あるいは改変して設計した（Nakaune and Nakano 2005; Nassuth et al. 2000; Sabanadzovic et al. 2001; Stewart and Nassuth 2001）。以下にウイルス診断の流れを示す。

1) 診断用試料の受託

休眠枝を推奨している（図1）。葉でも診断は可能であるが、ウイルスの局在性の問題および再現性確保のため複数枚の葉を必要とする。

2) 試料の粉末化

休眠枝はおろし金で破碎した後、液体窒素下の入った乳鉢中で粉末化する。葉の場合は複数枚の葉を同時に液体窒素下で粉末化する。

3) RNA抽出

Fruit-mate for RNA purification（タカラバイオ）およびNucleoSpin RNA Plant（タカラバイオ）を使用し、RNAを精製する。

4) cDNA合成

PrimeScript RT Master Mix (Perfect Real Time)（タカラバイオ）を使用し、RNAからcDNA (complementary DNA) を合成する。

5) PCR法

ウイルス特異的プライマーおよびTaKaRa Ex Taq Hot Start Version（タカラバイオ）によりウイルスRNAゲノム由来のPCR産物を増幅する。



図1 ウイルス診断用試料の例

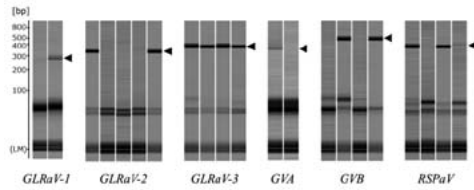


図2 ウイルス感染検出例

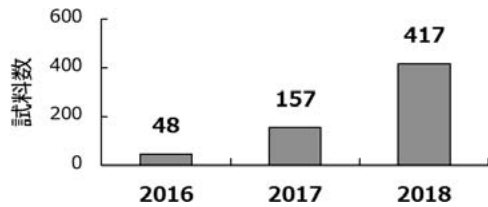


図3 ウイルス診断受託検体数

6) キャピラリ電気泳動

DNA/RNA 分析用マイクロチップ電気泳動装置 MultiNA（島津製作所）の protocols に従い、PCR 産物を電気泳動する。

7) ウイルス感染の判断基準

期待されるサイズの DNA 断片が増幅された試料はウイルス感染ありと判断する（図2）。

6. ウイルス診断受託事業の現状

2016年からウイルス診断を受託し、2018年は400検体を超えるに到った（図3）。ウイルス診断の目的は「ウイルス病の疑いのある樹の特定」と「接ぎ木用の母樹の検定」である。前者の場合、多くは何らかのウイルスに感染しており、ウイルス病に対する栽培家の経験値、観察力および意識の高さを実感している。後者ではウイルス感染がわずかながら認められる場合もあり、ウイルス病の拡大を抑制する重要な役割を果たしている。

7. 最後に

注意事項として、どのような場合においてもウイルス診断はウイルスフリーを保証するものでないことにご留意頂きたい。我々のウイルス診断受託事業は診断するウイルスの種類に限られており、それら以外のウイルスが感染している可能性は排除できない。また、いかなる診断技術においても検出限界が存在するため、ウイルス感染初期の試料からはウイ

ルスを検出できないことも想定される。以上のことを念頭に置いて頂き、ウイルス診断事業を活用して頂ければ幸いである。

ウイルス診断受託事業に関する問い合わせ先

山梨大学ワイン科学研究センター 鈴木俊二

e-mail: suzukis@yamanashi.ac.jp

TEL: 055-220-8394

謝 辞

技術賞の授与にあたり、松本信彦会長をはじめ、推薦および選考に携わっていただきました諸先生方に厚く御礼申し上げます。

ウイルス診断受託事業化は、山梨大学ワイン科学研究センター果実遺伝子工学研究部門の卒業生、在校生および研究スタッフ諸氏の努力の賜物である。ここで改めて感謝の意を表す。

引用文献

- Bertamini M, Muthuchelian K and Nedunchezian N. 2004. Effect of grapevine leafroll on the photosynthesis of field grown grapevine plants (*Vitis vinifera* L. Lagrein). *J Phytopathol* **152**: 145–152.
- Beuve M, Sempé L and Lemaire O. 2007. A sensitive one-step real-time RT-PCR method for detecting Grapevine leafroll-associated virus 2 variants in grapevine. *J Virol Methods* **141**: 117–124.
- Espinoza C, Medina C, Somerville S and Arce-Johnson P. 2007. Senescence-associated genes induced during compatible viral interactions with grapevine and *Arabidopsis*. *J Exp Bot* **58**: 3197–3212.
- Komínek P and Bryxiová M. 2005. Comparison of three techniques for detection of grapevine leafroll-associated virus 1. *Acta Virol* **49**: 37–43.
- Lim PO and Nam HG. 2005. The molecular and genetic control of leaf senescence and longevity in *Arabidopsis*. *Curr Top Dev Biol* **67**: 49–83.
- 難波成任, 山下修一, 土居養二, 與良清. 1979. 甲州ブドウの味無果病で見出される小球形ウイルス. *日本植物病理学会報* **45**: 70–73.
- Nakaune R and Nakano M. 2006. Efficient methods for sample processing and cDNA synthesis by RT-PCR for

the detection of grapevine viruses and viroids. *J Virol Methods* **134**: 244–249.

Nassuth A, Pollari E, Helmezczy K, Stewart S and Kofalvi SA. 2000. Improved RNA extraction and one-tube RT-PCR assay for simultaneous detection of control plant RNA plus several viruses in plant extracts. *J Virol Methods* **90**: 37–49.

Sabanadzovic S, Ghanem-Sabanadzovic NA, Saldarelli P and Martelli GP. 2001. Complete nucleotide sequence and genome organization of Grapevine fleck virus. *J Gen Virol* **82**: 2009–2015.

Stewart S and Nassuth A. 2001. RT-PCR based detection of *Rupestris stem pitting associated virus* within field-grown grapevines throughout the year. *Plant Dis* **85**: 617–620.

寺井康夫, 矢野龍. 1988. ブドウ味無果病の再現, ウイルスフリー甲州種へのリーフロール病とフレックの接木接種. *日本植物病理学会報* **54**: 397.