

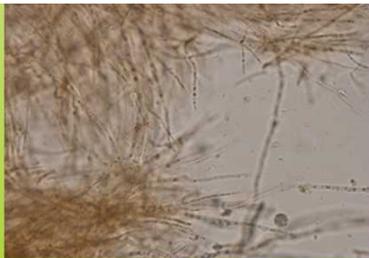
植物ウイルス診断技術開発と 病害防除に関する地域連携を実現する沖縄作物保護ネットワーク

琉球大学農学部植物病理学研究室 関根健太郎

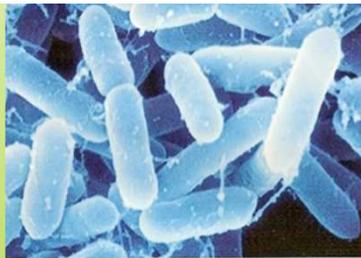
農作物の病気



カビによる病気

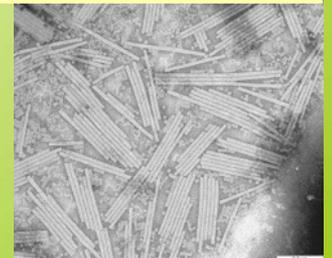


細菌による病気



ウイルスによる病気

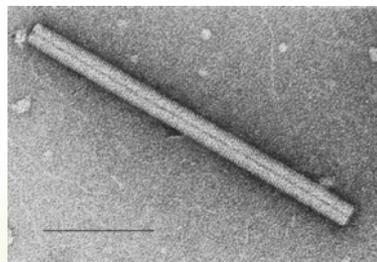
診断が
難しい



病害防除の基本的な流れ



病気の発生



病原体の単離



健全植物へ接種

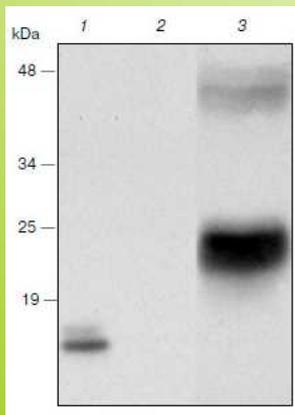


病徴の再現

病原体の同定



病原体の検出（既知の病原体の場合）



病原体特有の組織や、タンパク質、
遺伝子断片などの有無を検定する

診断技術開発



発症機構解明



防除技術開発

ー ウイルス病害診断の一例 ー

リンドウ

A

B



タンパク質; 抗体 など

ELISA法

A

B



国内で報告されているウイルス

- ① キュウリモザイクウイルス
- ② ソラマメウルトウイルス
- ③ クローバ葉脈黄化ウイルス
- ④ インゲンマメ黄斑モザイクウイルス
- ⑤ タバコ茎えそウイルス
- ⑥ インパチェンスネクロティックスポットウイルス
- ⑦ リンドウモザイクウイルス

核酸; PCR、LAMP など

PCR法

A

B



目的：未知ウイルスを検出

ねらい

— 現行のウイルス診断技術 —

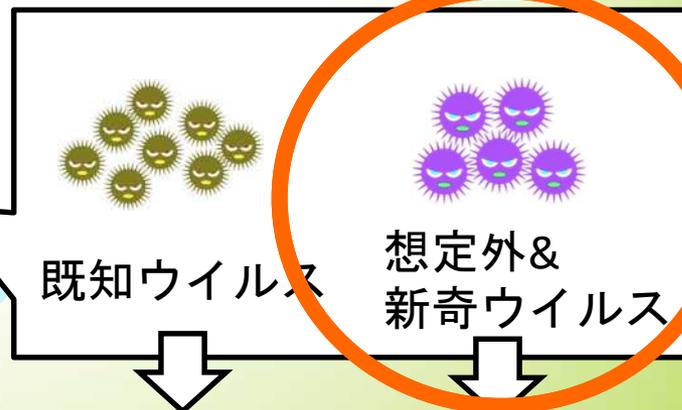
既知ウイルスを種特異的に検出する
1 検定あたり = 1 から数ウイルス種



想定外 & 新奇のウイルスに弱い



弱点を克服する技術開発

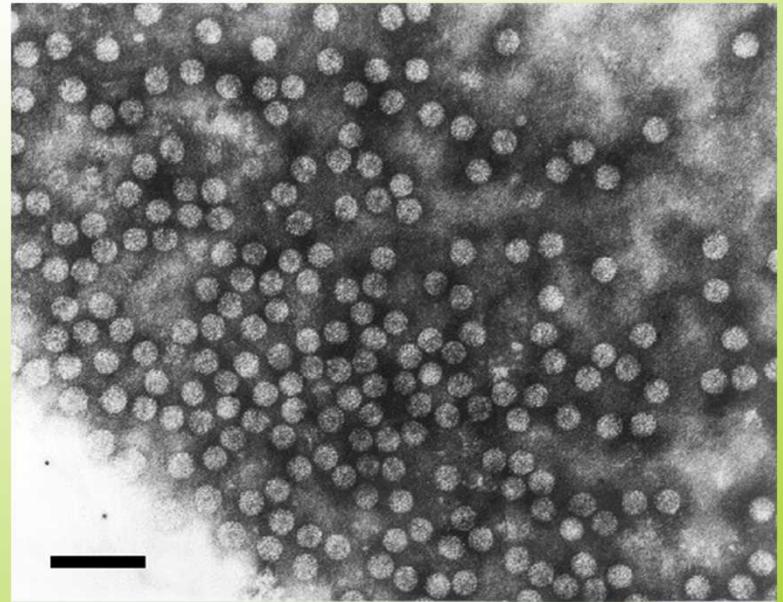
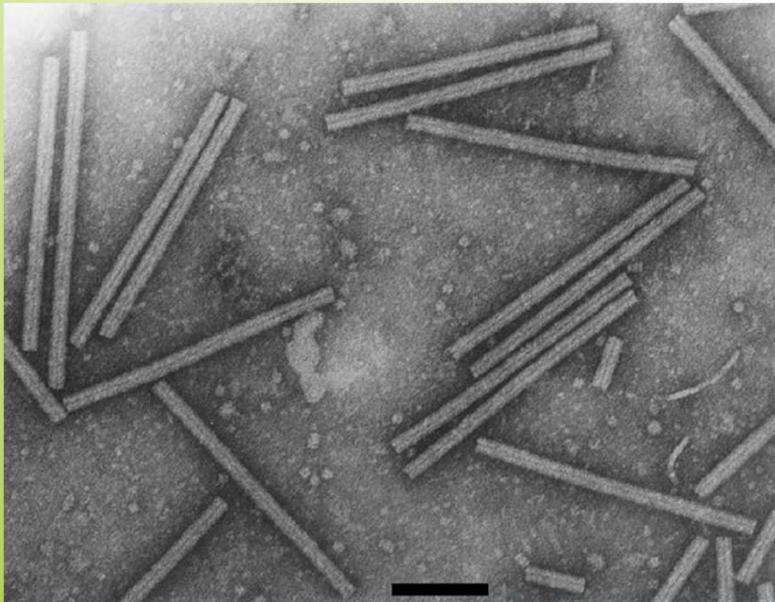
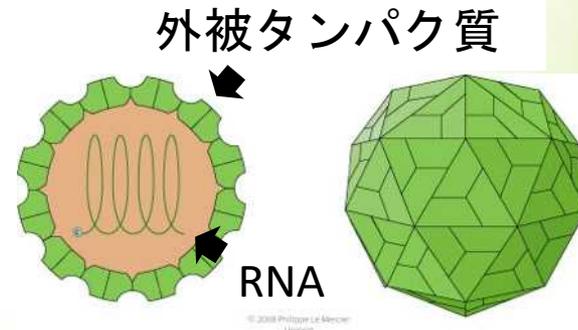
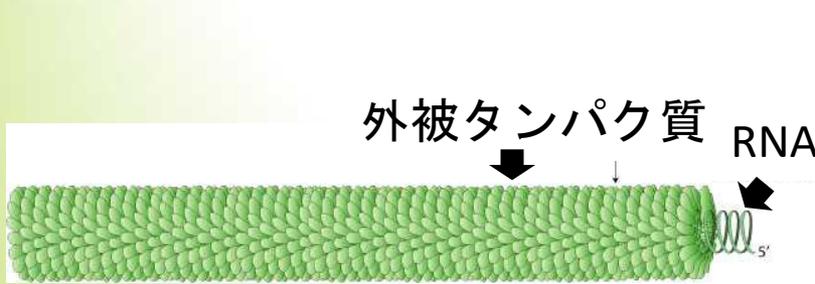


記録があれば
検出できる

検出可能!

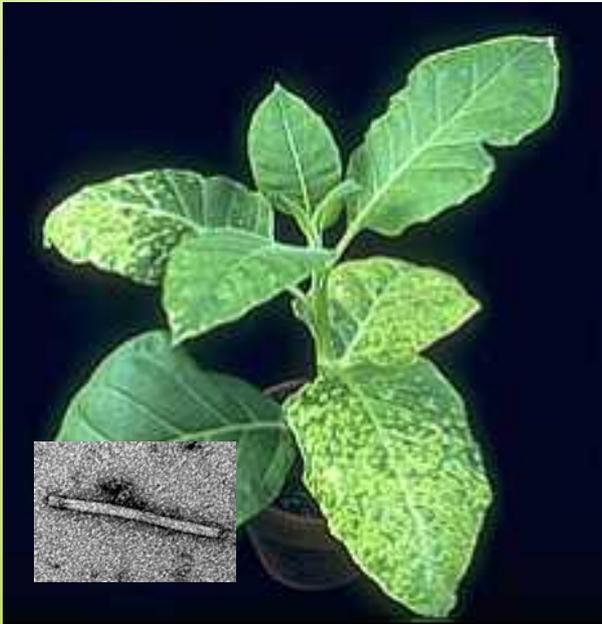
マイナー作物ほど
ウイルスの情報がない
例えば地域特産作物
(パイナップル, マンゴーなど)
特に沖縄の農作物は病原体未同定の病害が多い

ウイルスの構成成分



(Viral Zone & DPVより改変)

目標：未知のウイルスも検出可能な網羅的ウイルス検出技術の確立



宿主，ウイルス両者の核酸



大量のシーケンスデータ（NGS解析）



ウイルス由来の遺伝子配列を抽出

◎ ウイルスを定義付けるコンセンサス配列がない！？

∴ 既知のウイルス配列との相同性から新規ウイルスを探索する

RNA-seqデータ解析パイプライン

| Job Number | 作業内容 | 使用したツール |
|------------|---------------------------|-------------|
| 01 | Rawデータのクオリティチェック | fastqc |
| 02 | アダプタートリミング | cutadapt |
| 03-05 | phiX174配列のトリミング | bwa |
| 06 | クオリティフィルタリング | trimmomatic |
| 07 | <i>De novo assembly</i> | Trinity |
| 08 | tRNA配列の除去 | tRNA-SE |
| 09 | 植物ミトコンドリア・プラスチド由来配列の除去 | blastn |
| 10 | rRNA配列の除去 | blastn |
| 11 | FASTAファイル生成 | |
| 12 | Nucleotide blast 検索 | |
| 13-14 | Taxidからドメイン名を取得し“Virus”抽出 | Taxtool |
| 15 | Job 12でヒットしなかったコンティグを抽出 | |
| 16 | tblastx | |

ウイルス種同定

新規ウイルスの探索

オンサイト網羅的ウイルス検出技術の開発



MinION (※「ミナイオン」と発音)

- ・ 一分子長鎖シーケンシング (数10kbp)
- ・ リアルタイムベースコーリング
- ・ ポータブル (USBデバイス)
→ スマートフォンにつけるタイプもある (SmidgION)
- ・ 大きな初期投資不要

Direct RNA sequencing

キット販売開始 (2017年)

→ poly A tail のRNAを直接読む

MinIONにより取得されるfastqファイル

```
@6d4e5eab-6219-408c-b035-ad0e7ef9ecbd runid=5cacac7f8b80bd9f062b099ef578776fb0ad67b8 read=8 ch=7  
start_time=2018-02-27T06:46:48Z
```

```
UACGGAAUAUGAUAAAGAAAACUUGUUUGCGCAUUCAAUUUUGGGUUAUCCUUGCCGAAAUUGAUUUUACCGUGUGGUG  
ACAGUCCGUAAAAGUUCUGCCUCCUCGGACUUAUCCGUUGCCGCCAUCUGCUAUGGUUUGCAGACGGAGCCUCACCGGUACU  
GGGUUUUAUCAGUAUGCUGCAUCUGGAGUCCAAGCUAACAACAAAUUGUAUGAUUCGGCGAUGUGCAGUAUAGGUGACCGAGU  
GGUACGCCGUCCAUGUAUUCAAAAAGGACGAUGUGCCGAAGACGGACGAGUAAGUACUJCAUGUUGACGUCGAGCACCAACGC  
UACCCGCAAAGCGUUCCCCAGUCUGAUUCCGCGACCCAGAACCUCACCAGAUUCUUGGCGUGGAGCUGAGUUAGUGGUCACU  
GCUAUAACUACCUGAAGUCAACGAUCGGUGAACGGGUUGUCCAUCCAGCUUACGGCUAAAUGGUCAGUCGUAGAGAAAUCUA  
CGCCAAGUAAACUJACAAGUUUUGAGGCACCUUUGAAACCAUCUCCUAAGGUUACUUUAGAGAAGGACUCAUGGACCGUGUAC  
UUCUAGCACAACGUGCUAGUUUUGAGAACAGUGCUCUCAACUGUGAAGGGGCCUJAAAAGGGAGACAUAUUUCCAUJCCA  
CAACAACCAUCCUCUAUUUAUUUAUUCUAUAUUAUCCACAUCCUAUJCCUJAAAACA
```

```
+  
$%&(,08***)4;5//8=0,-/09=1..+)(*5)+4+84-,52648+*(-)00)+62-;2**/23690/./,(%)(-)*1%-../31/0@@3+2&01;9<-  
,,*%(+,++1502440(21A@8:2(**)/(0,"+.10#$%')*+11/63)'$%'"*")"()1/1,,.12-/,,,.*1-,'+$1-1**+04:1.-,1-  
,/2+0<1+))&$'+*5/+3/.,+)$*&%,(&%$-,,$$$&'1.-/6-+++/3/+8)##')26*,<@32*9%$'"%-*+0/,"0,+04,022//+  
0..,20+(*06=83320/220125450./-&%(.3+/-*)'(%&0?A850.+3014)0+)%&%$(.)+8:6)-<1""5;)'-%$-*%,3%)(0+  
..7#4)%++)'*01.,+0.'+,-/*,-*).62**%''%-1,119?3;;1/=6116963-1(*'+/(254+-%**('-.*,(())+873/3///16*0*'+.)&-  
+*,0<9,,('%&(5,-5,/;.+3;12,0*%)%*$"#((-(&-.*&'%)1)),-*&%$%3+)-  
+*'%$/.*,&)*00&+13*+),+2661/+(%&())%#&($('#*+(',+%$$$&+')1231)*($(-'+*')'$&*45-'(#&(-.*)*&('#'#&#$+-  
'*$$(/+91(&%&'*+.,&%$'$(%&+'0*'((,20/+"$
```

```
@41599c84-1494-4b1a-888f-5fbe1d73bb3c runid=5cacac7f8b80bd9f062b099ef578776fb0ad67b8 read=14 ch=257  
start_time=2018-02-27T06:46:53Z
```

```
UCUGAUUGGCUUUGAAGGGCUGGCACGGCAAGCUCCAUJCCCGAACCCGUCGGCUGUCGGUGGACUGCUJCGAGCUJCUACCCG  
CUGGGCAGAGAGAGCGGGUCGCCGCGUGCCGGCCGGGGACGGACUGGGAAACGGUUCGGGGGCCUJCCCGGGCGUCAAUCCA  
UCCUAUAACAACCCAUJAAAUJAAUJAAUCUAUAUJCGCCACUGCUJCCAUAAGAAUACCACU
```

```
+
```

目的：未知ウイルスを検出

— 現行のウイルス診断技術 —

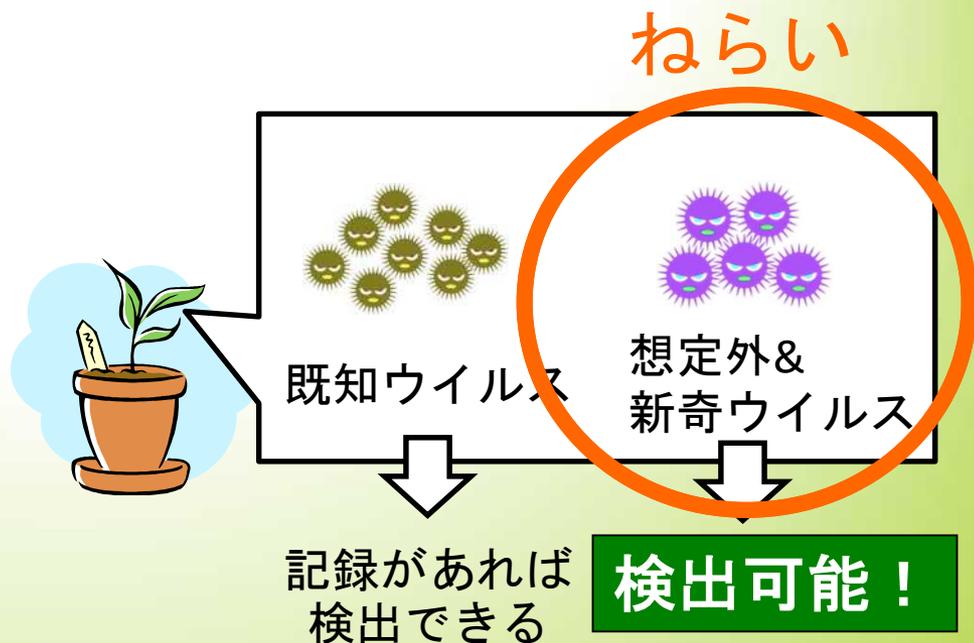
既知ウイルスを種特異的に検出する
1 検定あたり = 1 から数ウイルス種



想定外 & 新奇のウイルスに弱い



弱点を克服する技術開発



個別診断法を開発（PCRなど）



個別診断技術のニーズ

迅速性・簡便性・正確性

—個別診断技術 On site PCR—

キーテクノロジー：超高速RT-qPCR装置

共同研究：(国研)産業技術総合研究所



- ① 高速な遺伝子増幅&検出 5～8分
- ② ポータブル A4アタッシュケースでバッテリー内蔵
- ③ 軽量 約4kg
- ④ 超高感度 10-100個/サンプル
- ⑤ 微量分析 1-5 μ L

- ウイルスの有無を現地で簡易に調べられる
- 遺伝子情報があればプライマーを設計可能
→アプリケーション（ウイルス種）は無限

1. 網羅的診断
(遺伝子情報収集)
↓プライマーデザイン
2. 個別検知技術

作物保護検討会，診断技術研修会

内閣府沖縄総合事務局
農林水産省那覇植物防疫事務所
沖縄県農業研究センター
沖縄県病害虫防除技術センター
(国研) 農研機構
琉球大学

2018/11/23
沖縄作物保護研究会2日目。簡易的な遺伝子診断技術のワークショップを行いました。参加者は、実験結果に一喜一憂。実験は楽しいものです。特別セミナー2は東洋大学佐々木伸大先生の果樹育種に関するお話。植物育種学研究室の先生にもご参加いただきました。大トリは九州沖縄農研の富高保弘氏に微小昆虫とウイルスの遺伝子診断の現状と課題について問題提起をしていただきました。来年度、新たな風がふく予感がしました。
「ともすれば開催者側の一人よがりになりがちなシンポジウムですが、本会は参加者の方々が満足できる会でした」と、特別講師の先生からお褒めの言葉をいただきました。というわけで、来年度も開催することが決まりました！盛り上げてまいります。
琉球大学の平成30年度戦略的地域連携推進経費、地域協働プロジェクト推進事業「地域農業振興に資する沖縄作物保護ネットワークの基盤構築」の一環で行いました。



第5回（2018/11/22）の様子



63 リーチした人数 43 エンゲージメント数 [投稿を宣伝](#)

8 [コメント2件](#)

[いいね!](#) [コメント](#) [シェアする](#)

地域農業振興に貢献する 沖縄作物保護ネットワーク

農学部 沖縄作物保護ネットワーク準備室

お問い合わせ : k-sekine@agr.u-ryukyu.ac.jp

琉球大学をハブとした産学官の研究者や地方自治体、生産者団体が情報交換可能なネットワーク（人と人のつながり）を構築し、「地域作物の保護」という課題に協働で取り組みやすいシステムをつくります。



病虫害防除

作物の栽培体系改良

作物の高付加価値化

人材育成

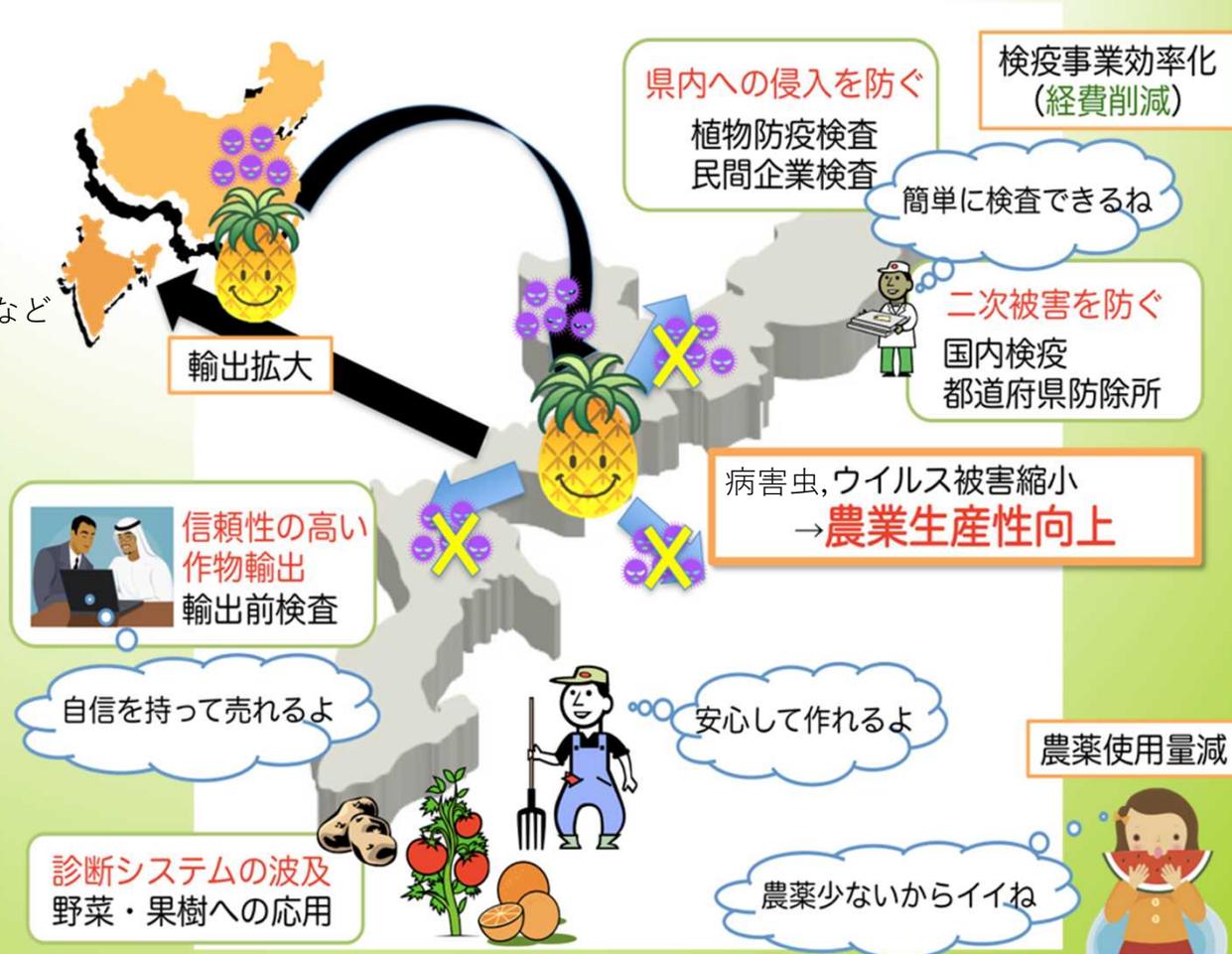
目標：科学技術で生産者をサポートし産地を守る

① 病害虫の被害を減らす研究

病気の原因を探る研究をしています。

共同研究先

- 那覇植物防疫事務所
- 沖縄県農業研究センター
- 沖縄県病害虫防除技術センター
- 岩手県農業研究センター
- 神奈川県農業研究センター
- 岡山県生物研究センター
- (国研) 農研機構 九冲農研/中央農研など
- (国研) 産業技術総合研究所
- 内閣府沖縄総合事務局
- (財) 美ら島財団
- (財) 岩手生物工学研究センター
- (株) バイオジェット
- (株) ファスマック
- (株) ローカルランドスケープ
- 琉球大学工学部
- 鹿児島大学
- 東京農工大
- 岩手大学
- 東北大学
- 琉大マングロウ部 (仮)
- 沖縄県立南部農林高校



② 安定供給・増産を目指した栽培体系を確立する研究

③ 作物の高付加価値化を目指した機能性成分評価と新たな資源探索

情報交換サイト Facebook「沖縄作物保護ネットワーク」

https://www.facebook.com/OSANPOnet/?modal=admin_todo_tour

沖縄作物保護ネットワーク

いいね! フォローする シェア

沖縄作物保護ネットワーク
11月25日 16:07

2019/11/25
沖縄作物保護ネットワーク本部より報告。
沖縄作物保護ネットワークキックオフシンポジウムを開催しています。参加者50人。第一部、南部農林高校、琉大作物研、沖縄農業研究センター。大盛況！
追記
第二部、美ら島財団、請福酒造、バイオジェット。圧巻！... もっと見る

7
リーチした人数

5
エンゲージメント数

投稿を宣伝

OSANPO net

沖縄作物保護ネットワーク
@OSANPOnet

ホーム
投稿
レビュー
さらに表示
広告を出す
広告を管理

ページではページを公開しています。この人が実行したアクション
ページの作成E

日本語・English (U)
Português (Brasil)

プライバシー・規約
その他
Facebook © 2019



令和元年11月25日（月）

沖縄作物保護ネットワーク
キックオフシンポジウム

おもろまち合同庁舎会議室

参加者60名（満員御礼）



講演者

1. 関根 （趣旨説明）
2. 南部農林高校
3. 琉球大学 諏訪氏
4. 沖縄県農業研究センター 清水氏
5. 沖縄美ら島財団 佐藤氏
6. 請福酒造 漢那氏
7. バイオジェット 塚原氏
8. 琉球大学 具志堅氏（修士2年）
9. 東京農工大学 小松氏