

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 16 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2016

課題番号：15K18644

研究課題名(和文)植物茎頂組織へのウイルス侵入を阻むRNAサイレンシングメカニズムの解明

研究課題名(英文) Study of RNA silencing as a defense response for virus infection in plant meristem tissues

研究代表者

志村 華子 (Shimura, Hanako)

北海道大学・農学研究院・助教

研究者番号：20507230

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：免疫組織化学法を用いてアスパラガスに感染するAV-1およびAV-2の局在を調べた。AV-1とAV-2は表皮に強く感染し、分裂組織近傍の維管束にも感染していた。雄花組織の感染も調べたところ、AV-2は花芽分化初期から組織全体で検出され、花粉形成時のタペータムにも強く感染していた。AV-1は花粉四分時期以降で検出された。これまでAV-1は虫媒伝染とされていたが、AV-2のように種子伝染する可能性が示唆された。また、アスパラガスから分離したAV-1の全塩基配列を決定した。さらにAV-1感染性クローンの構築に成功し、*Nicotiana benthamiana*での全身感染性を確認することができた。

研究成果の概要(英文)：Asparagus virus 1 (AV-1) and Asparagus virus 2 (AV-2) are major viruses that infect asparagus. AV-1 is aphid transmission, while AV-2 is seed-borne virus. To study virus localization in asparagus, AV-1 and AV-2 were immunohistochemically examined. AV-1 and AV-2 were mainly detected in epidermal tissues and also detected in vascular tissues near meristem of lateral buds. AV-1 and AV-2 in flower buds were also examined immunohistochemically using male plants at different developmental stages. AV-2 was detected in entire bud tissues in all developmental stages and strongly detected in tapetum layer tissues at pollen development stage. AV-1 was not detected in earlier stage but detected after pollen tetrad stage, suggesting a possible seed transmission of AV-1. In addition, complete genome sequences of AV-1 isolated from asparagus spear were newly determined, and an infectious clone for AV-1 was developed and then confirmed systemic infection in *Nicotiana benthamiana*.

研究分野：植物ウイルス学

キーワード：植物ウイルス RNAサイレンシング RNAサイレンシングサプレッサー 茎頂分裂組織 アスパラガス

1. 研究開始当初の背景

アスパラガスに感染する主要なウイルスには Asparagus virus 1 (AV-1) と Asparagus virus 2 (AV-2) があり、AV-1 は虫媒伝染、AV-2 は種子伝染によって伝搬する。これらのウイルスが単独または重複感染すると、若茎収量の低下や株の経年劣化が早まるとされている。これまでに、ウイルスフリー化に一般的に用いられる茎頂培養を行っても AV-1 と AV-2 は除去できないことを見出しており、ウイルス感染は分裂組織にまで侵入する可能性が示唆された。しかし、アスパラガスを用いてウイルスの局在を詳細に調べた研究例はない。また、植物におけるウイルス感染防御メカニズムである RNA サイレンシングが茎頂分裂組織で働き、そのことが茎頂組織へのウイルス感染を防いでいると考えられている。しかし、その具体的なメカニズムは明らかになっていなく、ウイルスが持つ RNA サイレンシングサブレッサーの機能と茎頂組織への移行能力との関連は分かっていない。AV-2 では感染性クロンの構築や RNA サイレンシングサブレッサーの解析がこれまで進められてきたが (Shimura et al. 2013, Kawamura et al. 2014)、AV-1 は塩基配列の情報が少なく、AV-2 との重複感染による相互作用の影響を解析するための感染性クロンは存在しない。また、Potyvirus である AV-1 の RNA サイレンシングサブレッサーは HC-Pro であると考えられるが、その活性についての研究例は全くなかった。

2. 研究の目的

アスパラガスにおけるウイルス感染動態は未解明な部分が多く、ウイルスフリーアスパラガスを作成する妨げとなっている。そこで本研究では、PCR や免疫組織学的手法を用いてアスパラガス植物体内のウイルス局在を調べ、AV-1 と AV-2 の感染動態、特に分裂組織や生殖器官における感染分布を明らかにすることを目的とした。また、AV-1 と AV-2 の重複感染によるウイルスの感染性への影響を調べるために、AV-1 の全塩基配列を決定した後に AV-1 の感染性クロンを構築することを試みた。さらに、RNA サイレンシングサブレッサーの機能と茎頂組織への移行能力との関連を明らかにするため、AV-1 と AV-2 の RNA サイレンシングサブレッサー機能を評価する実験系の構築を検討した。

3. 研究の方法

(1) アスパラガス無菌培養物を用いた AV-1 および AV-2 感染動態の解析：北大圃場で栽培管理しているアスパラガスから AV-1 と AV-2 が重複感染している株を選抜し、切り出した側芽に滅菌処理を行って無菌培養物を作製した。培養物から再生したシュートを用いて RT-PCR によるウイルス検定を行い、AV-1 と AV-2 の重複感染が確認できた株はさらに基部のみを残すようにして継代培養し

た。AV-1 と AV-2 が重複感染しているアスパラガス培養物から伸長したシュートは上下に分けて、あるいは、同一株から伸長したシュートは 1 本ずつ分けてフェノールクロロホルム法により核酸を抽出した。RT-PCR および Nested PCR の後に電気泳動を行い、バンドの有無によりウイルス感染を判定した。

(2) 免疫組織化学法による AV-1 および AV-2 感染動態の解析：前述のようにして得られたアスパラガス無菌培養物のうち、AV-1 および AV-2 の感染量が少なかった培養株、また、AV-1 および AV-2 の感染量が多い圃場栽培株から、側芽や花芽 (雄花) 組織を採取した。雄花は花芽分化初期から開花直前期まで異なる発達段階で採取した。組織は固定処理を行い、脱水後にパラフィンに包埋しミクロトームを用いて切片を作製した。脱パラフィン後、一次抗体に抗 AV-1 CP 抗体または抗 AV-2 CP 抗体、二次抗体に Goat AP-Anti-rabbit IgG を用いてウイルスを標識し、染色処理を行った後に顕微鏡を用いて観察した。

(3) AV-1 全塩基配列の決定および感染性クロンの構築：AV-1 の RNA サイレンシングサブレッサーは HC-Pro であると予想されるが、その配列は不明であったことから、北海道大学の圃場のアスパラガスから分離した AV-1 をクローニングし全ゲノム配列の決定を行った。AV-1 配列はまず部分的に増幅し、配列を確認した後に PCR によって全長配列を結合してベクターに挿入した。ベクター作製後、約 10kb の全塩基配列を決定した。AV-1 全塩基配列を含むベクターを用いて、T7 プロモーターおよびポリ A 配列を含むプライマーを用いて Long PCR を行った。得られた PCR 産物を鋳型として *in vitro* 転写を行い、AV-1 のゲノム RNA を作製した。RNA は播種後約 5 ヶ月後の *Nicotiana benthamiana* に接種し、病徴の観察および RT-PCR により感染の確認を行った。また、AV-1 全塩基配列から決定した HC-Pro の配列をもとに、プロトプラストで一過的に HC-Pro を発現させるための発現ベクターを作製した。

(4) 感染性クロンを用いた AV-1 および AV-2 重複感染系の確立および感染性への影響の解析：AV-2 感染性クロンを接種した *N. benthamiana* は、その後さらに汁液接種を行って AV-2 感染株を継代維持した。AV-2 感染 *N. benthamiana* から採取した凍結葉を以後の実験の AV-2 接種源とした。凍結感染葉を磨砕して得た汁液と同時に、AV-1 感染性クロンを *N. benthamiana* に接種し、それぞれの単独感染と比べてウイルス感染や移行に違いがあるかを調べた。AV-1 単独感染区を 3 株、AV-2 単独感染区を 4 株、AV-1 と AV-2 重複感染区を 4 株用意した。ウイルス検定は RT-PCR および Nested PCR で行った。

4. 研究成果

(1) AV-1 と AV-2 が重複感染しているアスパラガス培養体を用いて、AV-1 と AV-2 の局在を RT-PCR および Nested PCR で調べた。その結果、AV-1 はどのアスパラガス系統に由来する培養物でもシュートの上部で検出された。また、同一株内でも、成長して長くなったシュートほど AV-1 はよく検出され、新しく短いシュートでは検出されないこともあった。AV-2 は系統によっては上部での感染率が高いものもあったが、全体的にはシュートの部位で検出率は変わらなかった。同一株内のシュート間の AV-2 感染はまばらであり、シュート長との関連はみられなかった。アスパラガス培養体は、上部は体積あたりの細胞量が多く、下部は大きく伸長した細胞が多い。AV-1 は細胞数の多いシュート上部に局在し、シュートが伸長するにつれて下部へも感染を広げていく、一方 AV-2 は、低濃度ながらも、細胞数が少ない下部や短いシュートでも広く感染していると考えられた。

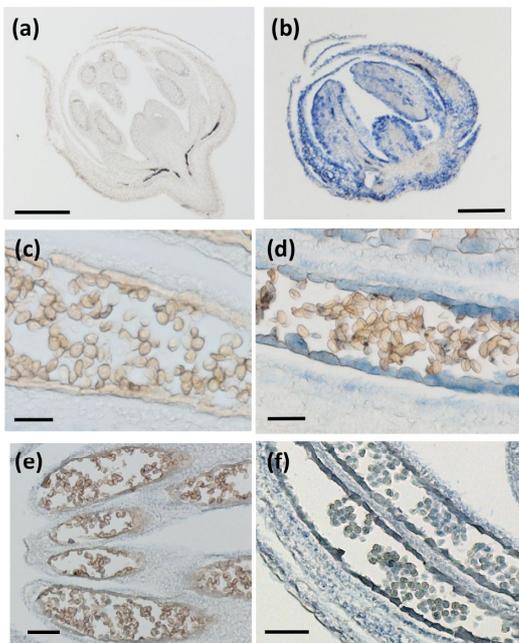


図1. 免疫組織染色によるAV-1およびAV-2の検出.

(a) 発達初期の雄花. Bar=500 μm .

(b) 発達初期の雄花. Bar=200 μm .

(c), (d) 花芽形成後期の雄花. Bar=50 μm .

(e) 花芽形成後期の雄花. Bar=100 μm .

(f) 花粉四分分子期の雄花. Bar=100 μm .

※ (a), (c), (e)はAV-1&AV-2弱感染株

(b), (d), (f)はAV-1&AV-2強感染株.

※ (a)~(d)はAV-2、(e)と(f)はAV-1を検出.

青く染色されている部分がウイルス感染を示す.

(2) 無菌培養により得られた AV-1 と AV-2 の弱感染株および北大圃場で栽培している AV-1 と AV-2 の強感染株を材料とし、それぞれの株から側芽と花芽 (雄花) 組織を採取した。免疫組織化学染色法を用いて AV-1 と AV-2 の組織内局在を観察したところ、AV-1

と AV-2 は表皮付近に多く検出された。また、どちらのウイルスも、分裂組織中心での感染はみられなかったが、分裂組織近傍の維管束にまで感染が及ぶことが分かった。また、組織観察に先立ち、RT-PCR により開花直前の雄花を用いてウイルス検定を行ったところ、AV-2 に加えて AV-1 も葯組織から検出されることが分かった。雄花の発達段階ごとに AV-1 と AV-2 の感染を調べたところ、AV-2 は雄花の分化初期から花芽全体で検出され、花粉形成時はタペータムに強い感染がみられた (図 1)。一方、AV-1 は花芽形成初期では明確な感染は確認できなかったが、花粉四分分子期以降では感染が確認できた (図 1)。これまでに、種子から育成したアスパラガス実生から AV-1 が検出されることがあり、AV-2 のように AV-1 も種子伝搬しているのではないかと考えられたが、今回の免疫組織観察の結果より、AV-1 は虫媒伝染だけでなく、AV-2 のように種子伝染もする可能性もあることが示唆された。また、AV-2 は雄花のタペータム層に強く感染していた。花粉発達とともに葯室内へ AV-2 粒子が放出されることが考えられ、このために花粉表面へ AV-2 が附着しやすいのではないかと考えられた。

(3) 北海道大学圃場のアスパラガスから分離した AV-1 をクローニングし ORF 全長と末端の配列を決定した。相同性検索の結果、これまでに一つだけ報告例のある AV-1 の塩基配列と比べると 90% の相同性であることが分かった。また、in vitro 転写により作製した AV-1 のゲノム RNA には *N. benthamiana* への感染性があることが確認できた。AV-1 は上葉でも検出され、10 dpi の上葉では、PCR を 1 回行うのみでも AV-1 が検出された。AV-1 の RNA を *Chenopodium quinoa* に接種した場合では、上葉での感染は検出されなかったが、接種葉での necrotic spot の出現を確認した。本研究で全長配列を決定した AV-1 の各タンパク質の相同性を既知の AV-1 配列のそれらと比較すると、RNA サイレncing サブレッサーである HC-Pro の相同性が最も低く、塩基配列で 84%、アミノ酸で 91% の相同性を示した。既知の AV-1 配列はアスパラガスではなく *N. benthamiana* 感染株から分離されたものでありアスパラガスへの感染性は不明であるが、現在の圃場で感染を広げている AV-1 とは HC-Pro の性質に違いがある可能性も考えられた。今回決定した AV-1 全長配列をもとに、HC-Pro をプロトプラストで一過発現させるためのベクターを作製した。今後、この HC-Pro 発現ベクターを用いて AV-1 HC-Pro の RNA サイレncing 活性を評価する予定である。

(4) AV-1 の感染性クローンを用いて、AV-2 との重複感染が及ぼすそれぞれのウイルスの感染性への影響を調べた。*N. benthamiana* 上葉での斑点の出現は、AV-1 単独感染よりも

AV-1AV-2 重複感染の株で遅れていた。RT-PCR によるウイルス検定では、重複感染株よりも単独感染株の方が AV-1 の上葉移行が早まる傾向があることが分かった。

<引用文献>

Shimura H, Masuta C, Yoshida N, Sueda K, Suzuki M. (2013) The 2b protein of Asparagus virus 2 functions as an RNA silencing suppressor against systemic silencing to prove functional synteny with related cucumoviruses. *Virology*. 442: 180-188.

Kawamura R, Shimura H, Mochizuki T, Ohki ST, Masuta C. (2014) Pollen transmission of *Asparagus virus 2* (AV-2) may facilitate mixed infection by two AV-2 isolates in asparagus plants. *Phytopathology*. 104: 1001-1006.

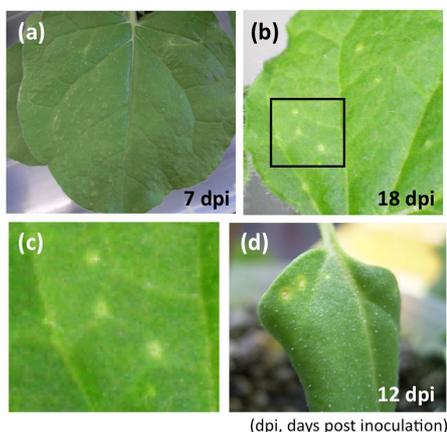


図2. AV-1感染クローン接種時の病徴
(a) *N. benthamiana* 接種葉. 小さなnecrotic ring spotが出現.
(b) 上葉のnecrotic ring spot.
(c) (b)の四角部分の拡大.
(d) *C. quinoa* 接種葉のnecrotic spot.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計4件)

Murota K, Shimura H, Takeshita M, Masuta C. Interaction between *Cucumber mosaic virus 2b* protein and plant catalase induces a specific necrosis in association with proteasome activity. *Plant Cell Reports*. 査読有, vol. 36, 2017, pp. 37-47.

志村華子, 増田税. 植物ウイルスの病徴発現における宿主 RNA サイレンシングのかかわり. *化学と生物*. 査読無, vol. 55, 2016, pp. 42-48.

志村華子, 大森康弘, 大沢陽子, 佐野慎亮, 増田税. アスコルビン酸(ビタミンC)誘導体の抗ウイルス剤としての利用. *植物防疫(社)日本植物防疫協会*, 査読無, 第70巻7号, 2016, pp. 15-21.

Shimura H, Masuta C. Plant subviral RNAs

as a long noncoding RNA (lncRNA):

Analogy with animal lncRNAs in host-virus interactions. *Virus Research*. 査読有, vol. 212, 2016, pp. 25-29.

〔学会発表〕(計3件)

阿部小繭, 増田税, 平田智恵子, 園田高広, 実山豊, 鈴木卓, 志村華子. アスパラガスにおけるウイルス感染局在の解析および重複感染による局在への影響. 園芸学会平成28年度秋季大会. 2016.9.10~2016.9.12. 名城大学(名古屋市)

武井俊大, 平田智恵子, 園田高広, 実山豊, 鈴木卓, 志村華子. ビタミンCを利用したアスパラガスのウイルスフリーへの改良およびウイルス感染が及ぼす内生成成分への影響の解析. 園芸学会平成28年度秋季大会. 2016.9.10~2016.9.12. 名城大学(名古屋市)

武井俊大, 鈴木卓, 実山豊, 志村華子. ビタミンC前駆体処理が及ぼすビタミンC蓄積とウイルス感染への影響. 北海道園芸研究談話会平成28年度研究発表会. 2016.12.5. 北海道大学(札幌市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

志村 華子 (SHIMURA, Hanako)
北海道大学・大学院農学研究院・助教
研究者番号: 20507230