

令和 2 年 9 月 17 日現在

機関番号：82111

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H04887

研究課題名(和文) 経卵伝搬性ウイルスの虫体内増殖と世代間移行に影響を与える要因の解明

研究課題名(英文) Analysis of factors affecting multiplication and intergenerational transition of a plant virus on transovarial transmission

研究代表者

奥田 充 (Okuda, Mitsuru)

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・中央農業研究センター・上級研究員

研究者番号：50355640

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,000,000円

研究成果の概要(和文)：イネ縞葉枯ウイルス(RSV)のイネや媒介昆虫ヒメトビウンカ体内での増殖を定量RT-PCRを用いて解析するとともに、抵抗性誘導剤やRNA干渉(RNAi)が増殖に与える影響を解析した。RSVが経卵伝染したヒメトビウンカを解析し、幼虫体内の相対RSV量は、その発育期間中に変わらないこと、抵抗性品種が保毒虫率を下げる効果はないことを明らかにした。RSV感染イネを解析し、病徴型とRSV量の関係に基づいた簡便な発病指数を考案した。また、ASM噴霧処理はRSVの感染増殖の低減に効果が低いこと、RNAiの発現により抵抗性となった組換えイネの吸汁は、ヒメトビウンカ体内のRSV量に影響を与えないことが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

イネ縞葉枯ウイルスの伝染は、ヒメトビウンカとイネとの間の獲得・媒介という水平伝搬に加え、経卵伝搬という垂直伝搬を考慮する必要がある点において、他の植物ウイルスとは異なる特徴を持っている。イネ及びヒメトビウンカ体内のRSVを定量化することにより、水平及び垂直伝搬のメカニズムを解明し、本ウイルスによる被害を抑制するための防除方法を開発するための基礎知見とすることができた。

研究成果の概要(英文)：Rice stripe virus (RSV) is one of the most devastating pathogens of rice (*Oryza sativa* L.) in rice growing regions of East Asia. The amount of RSV maintained through transovarial transmission was analyzed during the development and reproduction of its vector, *Laodelphax striatellus*. The amount of RSV did not differ significantly throughout the nymphal stage or between adult females of different ages. The percentage of viruliferous insects was similar among rice cultivars fed. The increase in RSV accumulation in infected rice plants over time was analyzed, and the association between disease severity and RSV accumulation was evaluated. A new formula to estimate the range of disease severities with greater ease and practical value was proposed. Acibenzolar-S-methyl, an inducer of systemic acquired resistance did not stimulate resistance against RSV on rice. Transgenic rice resistant to RSV via RNA interference did not reduce RSV in *L. striatellus* bodies.

研究分野：植物ウイルス

キーワード：イネ縞葉枯病 ヒメトビウンカ

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

イネ縞葉枯病は、1960年～1970年に日本各地で流行し、我が国の稲作に大きな被害を与えた(鳥山, 2010)。その後、抵抗性品種の開発と普及により、2000年初頭まで徐々に発生が減少したが、温暖化等の影響から本病の発生面積は2004年ごろから再び増加に転じた。現在、主に関東以西の地域で大きな被害が生じており、その対策は急務である。本病の原因となるイネ縞葉枯ウイルス(rice stripe tenuivirus, RSV)は、主にヒメトビウンカ (*Laodelphax striatellus*) により伝搬される。RSVの伝染環においては、ヒメトビウンカとイネとの間におけるRSVの水平伝搬に加え、経卵伝染という垂直伝搬を考慮する必要があるが、増殖や伝搬に関する分子機構については未解明の部分が多い。

アシベンゾラルSメチル(ASM)等の抵抗性誘導剤は病原体に直接作用せず、防御応答の活性化により植物に抵抗性を発現させることが知られているが、ASMは植物ウイルスに対しても効果があることが報告されている(Takeshita et al., 2013)。また、RSV由来の遺伝子配列を導入することにより生じるRNA干渉(RNAi)を利用したRSV抵抗性イネが開発されている(Shimizu et al., 2011)。近年、RNAiは真核生物が普遍的に備える機構であり、昆虫の内在性遺伝子の発現を抑制するようなdsRNAを植物に発現させることにより、その植物が害虫抵抗性となることが報告されている(Huvenne and Smaghe, 2010)。

2. 研究の目的

(1) イネやヒメトビウンカの体内に存在するRSVを定量解析することにより、水平及び垂直伝染のメカニズムを解明する。

(2) ASMによる抵抗性誘導が植物中のRSVの増殖に与える影響を解明する。

(3) RNAi型ウイルス抵抗性イネの吸汁がヒメトビウンカ体内のRSVに与える影響を解明する。

3. 研究の方法

(1) - 1 累代飼育しているRSV保毒ヒメトビウンカを用いて、孵化2、9、13、16日後の幼虫及び羽化0、7、14、21日後の成虫よりそれぞれRNAを抽出し、18S rRNA遺伝子を内在コントロールとして、リアルタイムRT-PCRによりRSVの外被タンパク質(CP)領域の発現量を相対定量することでウイルス蓄積量を推定した。また、RSV抵抗性遺伝子Stv-bi、Stv-aまたはStv-b遺伝子を持つイネ品種上で発育したヒメトビウンカ体内のRSVを定量解析し、RSV抵抗性と虫体内ウイルス量及び経卵伝染率との関係を解析した。

(1) - 2 RSV保毒ヒメトビウンカを用いてRSVを接種したイネ(品種: コシヒカリ)の第1葉鞘先端部および各葉身の中央部を経時的に採取し、アクチン遺伝子または伸長因子(EF1a)遺伝子を内在コントロールとしてリアルタイムRT-PCRによりウイルス濃度を解析した。また、鷲尾ら(1968)の発病程度の分類に準じたイネの病徴と植物体中のウイルス濃度を比較した。

(2) 抵抗性誘導剤のRSV感染に対する効果を解析するため、2～3葉期のイネ(品種: コシヒカリ)にASM(0、25、50、100 ppm)を噴霧した。2日後にRSV保毒ヒメトビウンカの雄成虫を1週間吸汁させた。2週間後、イネの最上位葉と第1葉鞘先端部から試料を採取し、EF1a遺伝子を内在コントロールとしてリアルタイムRT-PCRにより、宿主抵抗性の指標となるPR1a遺伝子領域とRSVのCP領域の発現量を定量解析し、ASM処理がRSV増殖に与える影響を解析した。

(3) RNAi実験用バイナリーベクターのコピキチンプロモーター下流に接続したRSVの部分配列を導入し、RSV抵抗性となった遺伝子組換えイネ(品種: タチアオバ及びたちすがた)(Shimizu et al., 2011)を用いて、RSV保毒ヒメトビウンカを飼育し、当該個体及びその次世代の虫体内RSVをリアルタイムRT-PCRにより定量解析した。なお、遺伝子組換え実験は関連法規に従い、所属機関の承認を得て行った。

4. 研究成果

(1) - 1 経卵伝染によりRSVを保毒したヒメトビウンカにおいて、幼虫体内の相対ウイルス量は、その発育期間中にほとんど変わらなかったことから、幼虫の発育に伴い総ウイルス量が増加したことが示唆された。成虫では、雄は雌に比べ約2倍のウイルス濃度であることが示された。また、成虫(雌)の相対ウイルス量は世代間で統計的有意な差は見られなかった。RSVに対し抵抗性と感受性のイネ品種の上でそれぞれ4世代累代飼育したヒメトビウンカ個体群の保毒虫率に差はなかった(図1)ことから、抵抗性品種が直接的に保毒虫率を下げる効果はないことが示唆された。

(1) - 2 イネ組織中のウイルス濃度は、接種後日数に応じて高くなり、同一個体における第一葉鞘を含む茎部と最上位葉の相対ウイルス濃度は高い相関を示した(図2)。鷲尾ら(1968)による病徴の類型において病徴型 A, B および Bt を示すイネ幼苗は概ねウイルス濃度が高いが、これらの間のウイルス濃度に統計的有意差は見られなかった。病徴型 C と Cr は個体間のばらつきが大きかった。病徴型 D はウイルス濃度が低く、A, B, Bt と比べて有意に低かった。このことから、RSV に感染したイネの病徴型とウイルス濃度の関係に基づき簡便な発病指数(図4)を考案した。

(2) ASM を処理したイネと無処理のイネのいずれも RSV の蓄積は基部において高い蓄積量を示した。また、*PR1a* の転写物の蓄積量も基部において高くなる傾向が示された。しかし、ASM 処理区と非処理区との間で RSV 濃度に差異が認められなかったため、イネ幼苗への ASM 噴霧処理は RSV の感染増殖の低減に関し、効果が低いと考えられた。

$$SDI = \frac{80 \times N_A + 35 \times N_B}{\text{総株数}}$$

図3. 病徴とウイルス濃度の関係から考案した発病指数 (N_A 、 N_B はそれぞれ枯死または黄化した個体、淡黄色～条斑状の病斑を示す株数)

(3) RNAi の発現により RSV 抵抗性となった遺伝子組換えイネ(#136-1-5 系統)を用いて RSV 保毒ヒメトビウンカを飼育し、その後代の幼虫、成虫(雌雄別)の RSV 濃度を親系統であるタチアオバを用いて飼育したヒメトビウンカと比較したところ、RSV 濃度に顕著な差は認められなかった。

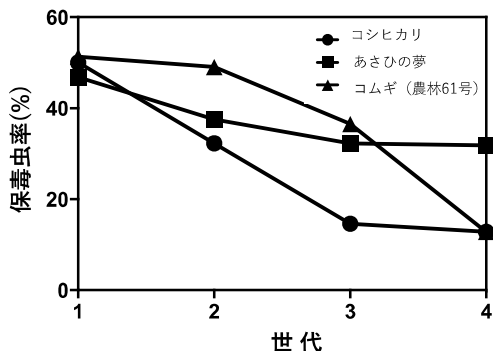


図1. 抵抗性の異なる植物上で累代飼育したヒメトビウンカの保毒率の変化

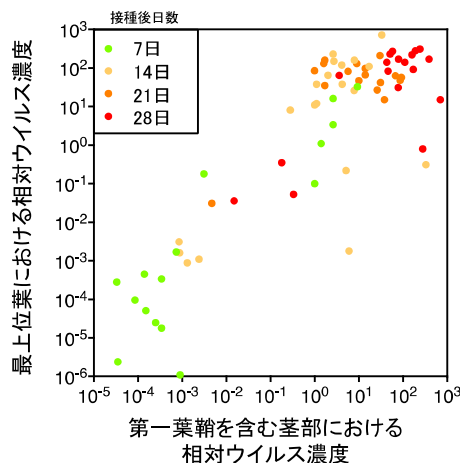


図2. 接種後日数と RSV 濃度の関係

【参考文献】

- Huvenne, H. and Smaghe, G. (2010) *Journal of Insect Physiology* 56: 227-235.
 Shimizu, T. et al (2011) *Plant Biotechnology Journal* 9: 503-512.
 Takeshita, M. et al (2013) *Phytopathology* 103: 960-965.
 鳥山重光 (2010) 水稻を襲ったウイルス病 創風社 pp. 306.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Okuda Mitsuru, Shiba Takuya, Hirae Masahiro	4. 巻 53
2. 論文標題 Quantitative analysis of Rice stripe virus in a transovarial transmission cycle during the development and reproduction of its vector, <i>Laodelphax striatellus</i>	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 Virus Genes	6. 最初と最後の頁 898 ~ 905
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s11262-017-1473-8	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Okuda Mitsuru, Shiba Takuya, Hirae Masahiro, Masunaka Akira, Takeshita Minoru	4. 巻 109
2. 論文標題 Analysis of Symptom Development in Relation to Quantity of Rice stripe virus in Rice (<i>Oryza sativa</i>) to Simplify Evaluation of Resistance	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Phytopathology	6. 最初と最後の頁 701 ~ 707
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.1094/PHYTO-07-18-0277-R	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 椎葉美里・奥田 充・竹下 稔
2. 発表標題 イネ幼苗の病徴型に基づいたRice stripe virusの相対蓄積量の解析
3. 学会等名 平成29年度日本植物病理学会九州部会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 奥田充・柴卓也・平江雅宏
2. 発表標題 イネ縞葉枯ウイルスの多発要因の解明と新たな防除対策への取り組み
3. 学会等名 第13回植物ウイルス病研究会（招待講演）
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 奥田充
2. 発表標題 イネ縞葉枯ウイルスに感染したイネ科雑草及び牧草からのヒメトビウンカによるウイルス獲得
3. 学会等名 平成29年度日本植物病理学会大会
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 奥田充・花田薫・柴卓也・平江雅宏・浅井元朗・小林浩幸
2. 発表標題 イネ縞葉枯病発生現地におけるイネ縞葉枯ウイルスのイネ科雑草への感染実態
3. 学会等名 平成30年度日本植物病理学会大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Mitsuru Okuda, Takuya Shiba, Masahiro Hirae
2. 発表標題 Control strategy for Rice stripe virus transmitted by Small brown plant hopper (Laodelphax striatellus)
3. 学会等名 2018 International Symposium on Proactive Technologies for Enhancement of Integrated Pest Management on Key Crop (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Mitsuru Okuda
2. 発表標題 Study on epidemic factors of rice stripe virus and current controlling measures in Japan
3. 学会等名 3rd International conference on Agricultural and Food Sciences(Agripace 2018) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 草場大河・奥田充・竹下稔
2. 発表標題 イネ幼苗における rice stripe virus の蓄積傾向と抵抗性誘導剤処理
3. 学会等名 令和元年度日本植物病理学会大会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>イネ縞葉枯病に関する情報 https://ml-wiki.sys.affrc.go.jp/rsv_web/rsv/start イネ縞葉枯病に関する情報 https://ml-wiki.sys.affrc.go.jp/rsv_web/rsv/start</p>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	竹下 稔 (Takeshita Minoru) (00304767)	宮崎大学・農学部・教授 (17601)	
研究分担者	増中 章 (Masunaka Akira) (80466010)	国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・西日本農業研究センター・主任研究員 (82111)	