

令和 2 年 6 月 3 日現在

機関番号：21401

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K07627

研究課題名(和文)トスポウイルスの変異・適応に媒介虫が果たす役割

研究課題名(英文)The role of viral vector on Tosspovirus mutation and adaptation

研究代表者

藤 晋一 (Fuji, Shin-ichi)

秋田県立大学・生物資源科学部・教授

研究者番号：40315601

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：ゲノム相同組み換えを生じたIYSVが発生する可能性を研究するために分節のゲノムのジェノタイピング法を開発した。本技術を用いて両遺伝子型のウイルス株を同時にキノアに接種し、生じた病斑の遺伝子型を解析した。その結果、各RNAにおいて両方が検出される、あるいは組換わった病斑が確認された。一方、保毒ネギアザミウマでは、わずかだが両方の遺伝子型を持つ個体、遺伝子型が組換わった個体が確認された。これら保毒成虫で媒介試験を行ったが、組換えウイルスは確認されなかった。以上のことから、組換えウイルスは出現できるが、その安定性は低く、自然界では淘汰されることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年発生が問題視されているウイルスはいずれも難防除害虫が媒介する。したがって、これらウイルス病の侵入・発生とその後の拡散における媒介虫の影響力は大きい。本研究の成果は、今後侵入が危惧されるトスポウイルスが侵入した際の防除対策を考える上で、有意義な知見となる。トスポウイルスの感染拡大は、アザミウマに依存している。したがって、ウイルスの選抜淘汰や変異に媒介虫がどのように関わっているかを明らかにすることは、トスポウイルスの封じ込めの有効手段を開発する上で、有意義な知見得ることとなる。

研究成果の概要(英文)：The discrimination method of IYSV genotypes using the single nucleotide polymorphism (SNP) was developed for the study on the possibility emerging reassortants in plants and thrips. The local lesions were developed on total eight NL x BR combination. The genotyping of these local lesion indicated that all RNA segment can coexist in a local lesion, although the isolates consisted from either genotype were predominated. As second trial, viruliferous adult thrips were tested. As result, genotype in a half of thrips (5 sample) was classified to NL type and either reassortant or 'mosaic' ones was detected from the other half. Typical IYSV symptom was occurred on nine impatiens leaf samples inoculated using viral acquired thrips. The genotype of these all leaf sample was classified to BR type and no detected reassortant and 'mosaic' ones. These results suggest that the recombinant can emerge in infected plants and viruliferous thrips but is unstable and get rid of the nature.

研究分野：植物病理

キーワード：植物病理学 ウイルス 媒介昆虫 進化

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

- (1) 1990年以降、トスポウウイルスの世界的な流行は、施設園芸作物を中心に壊滅的な被害をもたらしている。本研究で対象とする iris yellow spot virus (IYSV) はタマネギ、およびトルコギキョウで相次いで発生が確認されており、トルコギキョウではしばしば破壊的な被害が起こっている。
- (2) IYSV は土着種であるネギアザミウマによって媒介され、種のボーダーラインに位置する2つの遺伝子型(NL型、BR型)の存在が報告されている。日本での当初の発生地域では、この両遺伝子型が同一圃場に混在して発生している。しかしながら、東北地域をはじめとした、最近発生が確認された地域では、いずれかの遺伝子型のみが圃場内に蔓延している事例が多い。
- (3) IYSV は感染植物だけではなく、アザミウマ体内でも増殖するウイルスであり、ウイルスの蔓延にアザミウマが果たす役割は大きいと考えられる。
- (4) 人為的に両遺伝子型系統間でのゲノム相同組み換えウイルスは作出可能であるが、ウイルスの媒介能は非常に不安定で媒介能はすぐに欠失することから、ゲノム相同組み換えウイルスの成熟粒子は不安定であることが考えられる。

2. 研究の目的

本研究では難防除侵入ウイルスである IYSV の選抜・淘汰、変異における、媒介昆虫ネギアザミウマの影響力について、野生株ならびに、ゲノム相同組み換えによって作出した変異ウイルスを用いて明らかにする。また、本研究によって、新たなトスポウウイルス系統の出現の可能性を明らかにするとともに、成熟粒子の形成における、ウイルス構造タンパクの組み合わせの重要性を明らかにする。

3. 研究の方法

- (1) 遺伝子型の判別を効率的に行う方法として、各ゲノム(S、M、L)についてのリアルタイムPCRを利用した SNP タイピング法を開発する。
- (2) 宿主植物内での組み換えウイルスの安定性を明らかにするため、様々な分離株の組み合わせで *Chenopodium quinoa* (キノア) に混合感染させ、形成した局部病斑ごとに RNA を抽出し、各ゲノムについてリアルタイム RT-PCR による SNP タイピングによる組み換えウイルスの検出頻度を解析する。さらに形成した局部病斑を再度キノアに接種し、形成した病斑について同様の解析を行い、組み換えウイルスの植物内での安定性を解析する。
- (3) NL 型の IYO 株と BR 型の Ohdate 株が混合感染したキノア葉上で、ネギアザミウマの1齢幼虫を24時間摂食させ、ウイルスを獲得させる。獲得させた幼虫は成虫になるまでソラマメで飼育する。成虫はウイルス媒介に關与する唾腺を含む頭部とそれ以外の部分とを切り離し、それぞれから RNA を抽出し、各ゲノムについてリアルタイム RT-PCR による SNP タイピングを行う。
- (4) 同様にウイルスを獲得させたネギアザミウマ成虫を48時間インパチエンス葉で飼育し、媒介試験を行った。48時間後新たなインパチエンスにネギアザミウマを移し再度接種試験を行う。

4. 研究成果

- (1) IYSV の3分節ゲノム(S、M、L)それぞれの遺伝子型を判定できる SNP ジェノタイピングを開発した(図1 図2)。開発したジェノタイピング法について、ジーンバンク(MAFF)保存株を含む4分離株で解析した結果、各分離株ともにNタンパク質のアミノ酸配列に基づく遺伝子型と同じ遺伝子型にタイピングされた。これら分離株の各ゲノムの遺伝子型は全て同一で、組換え個体は検出されなかった。
- (2) NL 型の CbAlsD1 株と BR 型の Ohdate 株から抽出した totalRNA を 1:9 から 9:1 の割合で混合した RNA を鋳型としてジェノタイピングを行ったところ全てのゲノムにおいて、2つの遺伝子型が混在している “Mosaic”型と判別され、この方法が IYSV のジェノタイピングの解析法として利用できることが明らかとなった。
- (3) NL 型と BR 型の8種類の組み合わせ(IY-O x IY-GO、IY-O x Ohdate、IY-O x Kagawa、AlsD1 x IY-B、IY-N x Ohdate、IY-N x Kagawa、AlsD1 x Ohdate および AlsD1 x Kagawa)で混合感染させたキノア葉に形成した局部病斑からは、全てのゲノムにおいて両遺伝子型が検出された。しかしながら、いずれの組み合わせにおいてもどちらか

の遺伝子型が優占となっていた（表 1a）。優占となった分離株は遺伝子型に依存していなかった。しかしながら、組換えウイルスの出現割合は低く、高い確率で両方の遺伝子型が検出され“Mosaic”型となった（表 1a）。

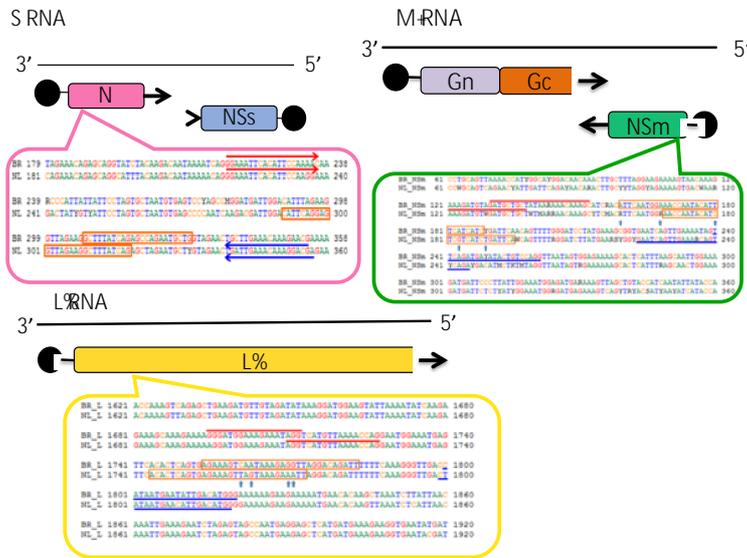


図1 各ゲノムセグメントに設計したプライマー（矢印）とプローブ（囲い線）

- (4) IY-O x IY-GO、IY-O x Ohdate、IY-O x Kagawa および AlsD1 x IY-B の組み合わせで形成した局部病斑を再度キノアに接種し形成した病斑を解析した結果、組み換えウイルスや“Mosaic”型の出現頻度は減少し、いずれかの遺伝子型が優占となった（表 1b）。

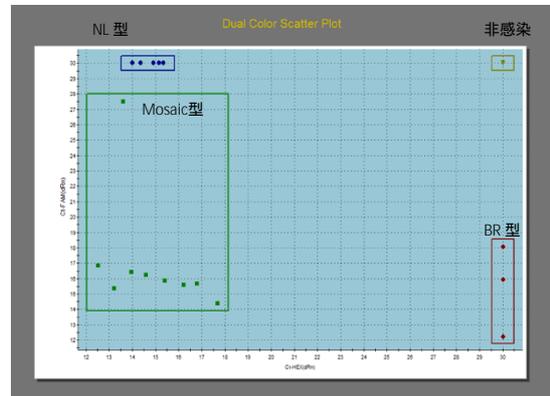


図2 SNPジェノタイピングによる解析結果

表1 混合感染させたキノア葉に形成した局部病斑のジェノタイプ

a) 回目		供試分離株		組み換えウイルス																Mosaic型									
NL型	BR型	NNN	BBB	NNB	NBB	NBN	BNN	BBN	NBN	MMN	MNN	NMN	NNM	MMN	NMM	MNM	MBB	BMB	BBM	MMB	BMM	MBM	NBM	NMB	BMN	BNM	MNB	MBN	
IY-O	IY-GO	11		5						2	4	2	1		1	1													
IY-O	Ohdate		1							9						4					3								
IY-O	Kagawa		9							1							4				4	1	1						
IY-N	Ohdate	5									3			1															
IY-N	Kagawa		6								1							5			1								1
AlsD1	IY-B	24		1									1	1															
AlsD1	Ohdate		2					1									1	1			2			4					
AlsD1	Kagawa		4												1			6	4	1	5				1				2

b) 単病斑の再接種		供試分離株		組み換えウイルス																Mosaic型									
NL型	BR型	NNN	BBB	NNB	NBB	NBN	BNN	BBN	NBN	MMN	MNN	NMN	NNM	MMN	NMM	MNM	MBB	BMB	BBM	MMB	BMM	MBM	NBM	NMB	BMN	BNM	MNB	MBN	
IY-O	IY-GO	14																											
IY-O	Ohdate		6																										3
IY-O	Kagawa		8											2															6
AlsD1	IY-B	4													1														

S遺伝子M遺伝子L遺伝子の順に示し、NはNL型、BはBR型、MはMosaic型を示す

- (5) NL型のIYO株とBR型のOhdate株が混合感染したキノア葉上でウイルスを獲得させた48頭のネギアザミウマを頭部とそれ以外の部分に分けてジェノタイピングを行った結果、頭部からは18個体それ以外からは20個体でウイルスが検出されたが、全てBR型であった。再度80頭のネギアザミウマを用いて解析を行った結果、10個体でウイルスが検出された。そのうち5個体はNL型で、頭部からは3個体で組換えウイルスが、それ以外の部分からは4個体で組換えウイルスが検出された。“Mosaic”型は頭部からは1個体、それ以外の部分からも1個体検出された（表 2）。

表2 混合感染キノアでIYSVを獲得したネギアザミウマ体内でのジェノタイプ

供試分離株		NL BR		組み換えウイルス																Mosaic型										ND ^a
NL型	BR型	NNN	BBB	NNB	NBB	NBN	BNN	BBN	NBN	MMN	MNN	NMN	NNM	MMN	NMM	MNM	MBB	BMB	BBM	MMB	BMM	MBM	NBM	NMB	BMN	BNM	MNB	MBN		
IY-O	Ohdate		16/20 ^b																										32/28	
IY-O	Ohdate	3/5		1/1		1/2		1/1		1/0					0/1														58/54	

^a S遺伝子M遺伝子L遺伝子の順に示し、NはNL型、BはBR型、MはMosaic型を示す

^b 検出されず

^c 頭部/それ以外の部分

- (6) ウイルスを獲得させた 180 個体のネギアザミウマについてインパチェンスで媒介試験を行った。その結果、9 サンプルでウイルス症状を呈した。これらのサンプルについてジェノタイピングを行った結果、全て BR 型であった。
- (7) 以上の結果から、IYSV には種のボーダーラインに位置する 2 つの遺伝子型 (NL 型、BR 型) が存在するが、これら両遺伝子型での組み換えウイルスは、植物体内では形成可能であるものの不安定であり、世代を繰り返すことによっていずれかの遺伝子型が優占となることが示された。また、媒介虫であるネギアザミウマ体内でも不安定であり、以前の結果も合わせて考えると、組み換えウイルスの媒介能力は極めて低く、両遺伝子型が混発している圃場において、組み換えウイルスが形成されても自然淘汰されていることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 平林哲也・対馬大希・戸田 武・古屋廣光・藤 晋一
2. 発表標題 アイリス黄斑ウイルス系統の混合感染によって組換えウイルスが発生する可能性
3. 学会等名 平成31年度日本植物病理学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 藤 晋一・平林哲也・対馬大希・戸田 武・古屋廣光
2. 発表標題 リアルタイムRT-PCRを利用したアイリス黄斑ウイルスの遺伝子型判別
3. 学会等名 日本植物病理学会東北部会
4. 発表年 2017年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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