

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和元年6月7日現在

機関番号：32665
研究種目：挑戦的萌芽研究
研究期間：2016～2018
課題番号：16K14947
研究課題名(和文) 森林生態系のグローバル・バイロームの解明

研究課題名(英文) Global virome in forests

研究代表者

井上 みずき (INOUE, Mizuki)

日本大学・文理学部・准教授

研究者番号：80432342

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：近年、ヒトの体内や海洋中など様々な場所でウイルス相の研究が進められているが森林や草地で植物ウイルスについて網羅的に明らかにした研究はほぼない。そこで森林や草地などの自然生態系にどのような植物ウイルスが存在するかを調べるために、東京大学田無演習林で採取した野外植物の葉からウイルスRNAをDECS法を用いて抽出し、網羅的逆転写反応後にシーケンスし、BLAST検索を行う方法と、特定のウイルスの有無を調べるRT-PCRを用いたがいずれの方法でもウイルスを検出することはできなかった。本研究で対象にしたRNAはdsRNAであり、採取時期によっては抽出しにくい可能性があると思われた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

近年、ヒトの体内や海洋中など様々な場所でウイルス相の研究が進められているが森林や草地で植物ウイルスについて網羅的に明らかにした研究はほぼない。農地に侵入する病害性のある植物ウイルスの出どころとしては、森林や草地だと考えられるが、その自然状態を捉ええた研究はなかったが、本研究ではその解明を試みた点で社会的意義があると考えられる。

研究成果の概要(英文)：In these days, virome has been clarified in various places such as in human and in the ocean. However, there is few research that clarified plant viruses wholely in forests and grasslands. To find out what kinds of plant viruses exist in ecosystems such as forest and grasslands, we collected leaves of wild plants existed in forest belonging to Tokyo university, Tanasahi. We extracted viral RNA using DECS. When seqencing after whole reverse transcription, we performed BLAST. Otherwise, RT-PCR was performed. However, we did not find any virus. The target RNA in this study was dsRNA. It might have been difficult to extract depending on the time of collection of leaves.

研究分野：生態学

キーワード：生態学 分子生態学 植物病理学

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

これまでのウイルス学は主に「病害」があるウイルスを対象に研究が進められてきた。ある種で見つかったウイルス群集をパイロームと呼ぶ。近年、人の生体内(Reyes et al. 2010 Nature) や海洋中(Kristensen et al. 2009 Trends Microbiol) のウイルス群集の網羅的な多様性解析がおこなわれ、従来、発見されていたウイルスが氷山の一角であることがわかってきた。野生植物については Plant Virus Biodiversity and Ecology Project (Wren et al 2006 PLOS Biol) としてアメリカの草原群集で精力的に調べられはじめた。しかし、樹木を含めた森林群集におけるウイルスの多様性に着目した研究はない。

植物ウイルスは、樹木と草本間で感染可能な場合もある。樹木は冬季もウイルスを樹体内に保持し、そのベクターであるアブラムシなどの越冬の場となり、春以降の一年性野生草本や花卉野菜へのウイルス伝搬のソースとなっている可能性がある。どのウイルスが将来、農業現場でアウトブレイクするかを予測するうえでも、森林のグローバル・パイロームの把握は重要である。代表者らは基盤 C (2011 - 2014 年度) において森林に自生する多年生草本ヤマノイモが 2 種のポティウイルスに感染する程度や伝搬拡大様式などを明らかにしてきた。その中で病徴を示さないが、ウイルスに感染している植物個体が多く存在すること、該当のウイルスがヤマノイモの近縁のオニドコロにも感染していることを示した。また、分担者の藤は農作物に被害を及ぼすキュウリモザイクウイルスの自生エビネでの感染を明らかにした(Kawakami et al. 2007 Am J Bot)。つまり、ウイルスは野生植物に潜伏し、植物個体間・植物種間でウイルスが伝搬している。

2. 研究の目的

里山林において、高木種とその近傍の低木・草本類の葉をサンプリングし、Total RNA を抽出後、二本鎖 RNA のみを単離しウイルスの有無を判定する。ウイルスが存在するサンプルについては cDNA を網羅的に増幅し、シーケンスし、データベース検索を行う。1) 森林群集の植物ウイルスの多様性、2) 樹木や多年生草本と 1 年生草本の間で共有されている植物ウイルスの有無、の 2 点を明らかにする。

3. 研究の方法

野外調査

2016 年、2017 年に農地と林地が接する東京大学田無演習林 (海拔高役 60m、北緯 35.7 度、東経 139.5 度、年平均気温: 14.8、年平均降水量 1,610mm) において、40 × 15 メートルのプロットを作成し、植生調査を行った。植生調査で出現した草本・木本について、種あたり 10 個体の葉を採取した。採取した葉は、低温ですみやかに研究室に持ち帰り冷凍保存した。葉のウイルス病徴の有無を写真と目視で記録した。

ウイルス RNA 抽出実験方法の確立

ウイルスに感染していることが明らかな葉を用いて以下の 1)、2) の実験を行った。

1) VLP-VNA 法

実験室にて、ウイルス粒子を遠心分離を利用して濃縮しウイルスの RNA を抽出する VLP-VNA 法という方法を試した。

2) DECS 法

Total RNA を抽出し、DECS 法(Kobayashi et al. 2009 J General Pl Pathol)により二

本鎖 RNA を抽出した。Total RNA 抽出には4つのキットをためした。

網羅的ウイルス探索

dsRNA を網羅的逆転写反応によって cDNA を作成し、その cDNA を作成し、クローニングした。また、特定のウイルスの有無を調べる逆転写 PCR も行った。

4. 研究成果

野外調査

東京大学田無演習林および付属農場にまたがった 40×15 メートルのプロットの植生調査において、木本 35 種、草本 34 種、シダ植物 3 種の計 72 種の維管束植物が見つかった。農地と林地で同じ植物種は出現しなかった。

これらの維管束植物の葉を採取し、このうち、2016 年には 70 種 74 サンプル、2017 年には 40 種 40 サンプルからウイルス RNA 抽出をおこなった。

ウイルス RNA 抽出実験方法の確立

方法 1) の VLP - VNA 法で抽出した RNA を用いて逆転写 PCR を行ったが、ウイルスの有無は確認できなかった。

方法 2) で4つのキットのうち、2つで網羅的に RNA を抽出し、DECS 処理を行ったところ、逆転写 PCR の結果より、二本鎖 RNA が単離できることが明らかとなった。そのなかでも、TRIZOL を使用した場合に逆転写 PCR が良好であった。

方法 1) & 方法 2) の結果より、Total RNA については、TRIZOL 用いて抽出し、DECS 処理を行い、ウイルスの二本鎖 RNA に単離する手法を採用することになった。

網羅的ウイルス探索

ウイルス RNA 抽出実験方法の確立で述べた手法により、野生植物 114 サンプルから二本鎖 RNA を抽出した。この手法によりウイルス RNA が単離できたかどうかは網羅的逆転写反応後にクローニングしシーケンスした後に BLAST 検索を行う方法と、特定のウイルスの有無を調べる逆転写 PCR がある。しかし、いずれの方法でも、野生植物サンプルからウイルスを検出することはできなかった。検出できなかった理由としては、そもそもウイルスが感染していない葉を用いてしまった可能性、ウイルス抽出に失敗した可能性、サンプル採取時期の問題が考えられた。

については、二本鎖 RNA 抽出を試みた野外植物のうち、ヤマノイモに関してはヤマノイモモザイクウイルス病の病徴がみられていたため、供した野外植物のすべてがウイルスに感染していなかったとは考えられない。ただし、ヤマノイモモザイクウイルスについてはそもそも DECS 法には不向きだった可能性はある。というのも、ヤマノイモモザイクウイルスの RNA は 9000 塩基を超える比較的長い配列を持っているため、DECS 法のようにタンパク質粒子に RNA を吸着させる方法では吸着しきれない可能性がある。

については、ウイルス RNA 抽出実験手法の確立で検証しており、問題はないと考えられるが、異なるキットを用いてさらに検証することは可能であろう。

に関連して、本研究で対象にした dsRNA は RNA ウイルスが複製される際に作られるものである。ただ付着しているのではなく、植物体内で感染増幅していることがはっきりとわかる反面、ウイルスの複製時期を逃すと捉えにくいものである可能性がある。農地などでは最適な時

期を見極め、採取するために問題とはならないが、野外でかつ網羅的な植物サンプリングを行う場合は、それぞれのウイルスにとって最適な感染増幅期ではない可能性があり、採取時期によっては抽出しにくかったかもしれない。今後は採取時期の違いによる鋭敏さを考慮する必要があるだろう。

結果的には、当初の目的であった森林群集のウイルスの多様性や樹木と草本の間で共有されている植物ウイルスの有無を確かめることはできなかったため、今後、～で考えられた要因を一つずつ検討し、再度、最終目的にアタックする必要がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 0 件)

〔学会発表〕(計 0 件)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年：
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：藤 晋一

ローマ字氏名：FUJI Shinichi

所属研究機関名：秋田県立大学

部局名：生物資源科学部

職名：教授

研究者番号(8桁): 40315601

(2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。