

令和 2 年 7 月 8 日現在

機関番号：11201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K07664

研究課題名(和文)花粉伝染を制御する植物ウイルスのホールマーク遺伝子の解明

研究課題名(英文)Elucidation of viral hallmark genes facilitating horizontal pollen transmission of plant viruses

研究代表者

磯貝 雅道(Isogai, Masamichi)

岩手大学・農学部・准教授

研究者番号：30312515

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文):ラズベリー黄化ウイルス(RBDV)の1b遺伝子の発現を停止させた変異体(RBdel1bstop)は、野生型RBDVと比較して、花粉によるウイルスの水平伝染率が低下した。RBdel1bstopに感染した植物由来の花粉は、野生型RBDV感染植物の花粉よりもウイルスゲノム蓄積量が減少した。そして、1bを発現する植物にRBdel1bstopを感染させて得た花粉は、花粉によるウイルスの水平伝染率およびウイルスゲノム蓄積量が増加した。また、1bにより、花粉管から排出されるウイルスゲノム量が増加することが示唆された。さらに、1bはRNAサイレンシングサプレッサー活性を持つことが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

世界的にラズベリー栽培で問題となっているラズベリー黄化ウイルス(RBDV)が、東北地方において、日本で初めて発生したことを報告した。RBDVは、花粉によって伝搬するウイルスである。ラズベリーは受粉なしでは果実発達しないうえ、風やミツバチなどの訪花昆虫により花粉が運ばれることから、RBDVは圃場で、その感染を急速に広げる。東北地方のRBDV発生地域では、従来栽培されていた品種の果実収量がRBDVの感染により大幅に減少し、抵抗性品種への変更を余儀なくされている。RBDVの花粉による水平伝染機構の解明およびその成果を利用した防除法の確立が求められている。

研究成果の概要(英文):Pollen transmission of raspberry bushy dwarf virus mutant (RBdel1bstop) to healthy plants was significantly decreased compared with that of the wild-type raspberry bushy dwarf virus (wtRBDV). When we assessed accumulation of viral genomic (g) RNAs in pollen grains from RBdel1bstop-infected plants, the pollen grains had less viral gRNAs than in those from wtRBDV-infected plants. In addition, pollen grains from 1b-expressing transgenic plants (1b-plants) infected with RBdel1bstop transmitted the mutant virus to healthy plants after pollination more efficiently than did pollen from RBdel1bstop-infected wild-type plants (wt-plants), and more viral gRNAs had accumulated in pollen grains from RBdel1bstop-infected 1b-plants than in pollen from RBdel1bstop-infected wt-plants. We suggest that 1b promotes discharge of the viral gRNAs from the germinating pollen grains. Furthermore, we found that the 1b had RNA silencing suppressor activity.

研究分野：植物病理学

キーワード：植物ウイルス 花粉伝染 花粉による水平伝染 ラズベリー黄化ウイルス リンドウ子房輪紋ウイルス  
ブルーベリー小球形潜在ウイルス

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

世界的にラズベリー栽培で問題となっているラズベリー黄化ウイルス(raspberry bushy dwarf virus, RBDV)が、東北地方において、日本で初めて発生したことを報告した。RBDV は、花粉によって伝搬するウイルスである。ラズベリーは受粉なしでは果実発達しないうえ、風やミツバチなどの訪花昆虫により花粉が運ばれることから、RBDV は圃場で、その感染を急速に広げる。東北地方の RBDV 発生地域では、従来栽培されていた品種の果実収量が RBDV の感染により大幅に減少し、抵抗性品種への変更を余儀なくされている。RBDV の花粉による水平伝染機構の解明およびその成果を利用した防除法の確立が求められている。

## 2. 研究の目的

本研究は、花粉伝染を制御する植物ウイルスのホールマーク遺伝子を解明する。これまで、植物ウイルスの花粉による水平伝染を促進するウイルス遺伝子、さらにはその機能に関する報告はない。本研究では、RBDV の 1b 遺伝子の花粉による水平伝染効率の促進効果、花粉伝染における 1b 遺伝子の役割および機能を解明する。加えて、RBDV と異なるウイルス種の花粉による水平伝染機構を解析し、共通性・普遍性についての知見を得る。

## 3. 研究の方法

### (1) 花粉管における RBDV とリンドウ子房輪紋ウイルス(gentian ovary ring-spot virus, GORV)のゲノム RNA の蓄積量の解析

RBDV および GORV に感染した植物から花粉を採取した。採取した花粉は、花粉管発芽液体培地中に入れ、13 等分に分けて静置し花粉管を伸長させた。13 等分に分けた花粉を、0 時間から 12 時間まで 1 時間おきに経時的に全 RNA を抽出し、花粉管伸長に伴う全 RNA に含まれるウイルスゲノム量を定量逆転写ポリメラーゼ連鎖反応(RT-qPCR)により解析した。

### (2) RBDV の 1b 遺伝子による花粉による水平伝染率促進の解析

野生型 RBDV と RBdel1bstop に感染した植物から採取した花粉を用いて、人工授粉した植物のウイルス感染率を比較することで、1b 遺伝子による花粉による水平伝染率の変化を解析した。さらに、1b 遺伝子を発現する形質転換植物(1b 植物)に RBdel1bstop を感染した植物から採取した花粉を用いて、人工授粉した植物のウイルス感染率の変化を解析し、1b 遺伝子による花粉による水平伝染率への影響についての相補実験を行った。

1b 遺伝子の RBDV の花粉による水平伝染の促進の理由を明らかにするため、野生型 RBDV および RBdel1bstop に感染した非形質転換植物および 1b 植物から採取した花粉を用いて、花粉でのウイルス局在およびウイルスゲノム蓄積量をそれぞれ Chromogenic *in situ* hybridization (CISH) 法および RT-qPCR により解析した。

### (3) RBDV の 1b 遺伝子の機能の解析

1b 遺伝子の翻訳産物(1b)の N 末端側半分を大腸菌体内で発現させ、ウサギに免疫して 1b に対する抗体を作製した。この抗体を用いたウエスタンブロットング解析により、RBDV 感染植物から 1b の検出を行った。さらに、1b の無細胞タンパク質合成実験は、コムギ胚芽抽出物を用いて行った。

1b の機能解析のため、1b 遺伝子の発現を停止させた RBDV 変異体(RBdel1bstop)を作出して、野生型 RBDV と病原性および葉組織でのウイルスゲノム蓄積量を比較した。ウイルスゲノム量

は RT-qPCR により解析した。さらに、1b の RNA サイレンシングサブレッサー活性は、アグロインフィルトレーションアッセイにより行った。

#### (4) ブルーベリー小球形潜在ウイルス(blueberry latent spherical virus, BLSV)の花粉による水平伝染機構の解析

BLSV 感染植物から花粉を採取し、健全植物へ人工授粉することで、ウイルスが授粉した植物へ水平伝染することを証明した。さらに、異種の植物間での人工授粉における、各種花粉の柱頭上での動態についてはアニリンブルー染色法により解析した。また、BLSV に感染した花粉からウイルスを蓄積した花粉管が柱頭に侵入し、柱頭に初期ウイルス感染部位が形成されることを、CISH 法、whole-mount *in situ* hybridization (whole-mount ISH)法、tissue blot hybridization 法により解析した。

### 4 . 研究成果

#### (1) 花粉管における RBDV と GORV のゲノム RNA の蓄積量解析

これまでの RBDV と GORV の花粉による水平伝染メカニズム研究で、授粉した花粉から発芽したウイルスを蓄積した花粉管の柱頭への侵入が、授粉された植物がウイルスに感染することに関与することを突きとめた。さらに、ウイルスが花粉管の侵入した柱頭に感染し、花柱へとウイルス感染が進行することを明らかにした。これらのことから、ウイルスを蓄積した花粉管が、柱頭へ侵入および伸長する際、花粉管からウイルスが放出され、放出されたウイルスが柱頭でのウイルス感染を引き起こすと考えられた。この成果は、Isogai et al., *Virology*, 2017 により発表した。

このことから、さらに RBDV と GORV に感染した花粉を花粉管発芽培地に入れ、継時的にウイルスゲノム量を解析した。さらに、ウイルスゲノムが花粉あるいは液体培地中のどちらに存在するか解析した。その結果、RBDV では花粉管発芽培地に入れて 1 時間後、GORV では 3 時間後にウイルスゲノム量が最大となり、花粉中よりも花粉管発芽培地中に多くのウイルスゲノムが存在することが示唆された。これらのことから、RBDV と GORV のゲノムが、花粉管を発芽した花粉から排出される可能性を示唆した。この成果は、Isogai et al., *J. Gen. Plant Path*, 2018 により発表した。

#### (2) RBDV の 1b 遺伝子による花粉による水平伝染率促進

1b 遺伝子の翻訳を停止させた RBdel1bstop は、野生型 RBDV と比較して、花粉による水平伝染率が低下することを見出した。そこで、野生型 RBDV と RBdel1bstop の感染花粉でのウイルスゲノム蓄積量、花粉管からのウイルスゲノム排出量を比較した。その結果、RBdel1bstop は野生型 RBDV と比較して、花粉のウイルスゲノム蓄積量、花粉管からのウイルスゲノム排出量が低下することが示唆された。さらに、1b 遺伝子を発現する 1b 植物を用い、RBdel1bstop の花粉による水平伝染率、花粉のウイルスゲノム蓄積量、花粉管からのウイルスゲノム排出量について解析した。その結果、RBdel1bstop に感染した 1b 遺伝子発現植物由来の花粉を健全植物に授粉すると、RBdel1bstop に感染した非形質転換植物由来の花粉を授粉した場合と比較して、花粉による水平伝染率が上昇した。そして、RBdel1bstop に感染した 1b 遺伝子発現植物由来の花粉は、RBdel1bstop に感染した非形質転換植物由来の花粉と比較して、ウイルスゲノム蓄積量は増加し、花粉管からのウイルス排出量も増加することが示唆された。これらのことから、1b 遺伝子が、RBDV の花粉での蓄積量および花粉管からのウイルス排出量を上昇させることで、花粉による

水平伝染の効率を上昇させることが示唆された。この成果は、Isogai et al., Virology, 2020 により発表した。

### (3) RBDV の 1b 遺伝子の機能解析

RBDV の 1b 遺伝子の翻訳産物(1b)に対する抗体を作出し、RBDV 感染植物から 1b の検出を行った。その結果、感染特異的に 14 kDa のタンパク質が検出された。さらに、無細胞タンパク質合成実験で、1b 遺伝子が翻訳されることを確認した。これらのことから、1b 遺伝子が植物体中で翻訳されていることを証明した。

次に、1b の機能を解析するため、1b 遺伝子の翻訳を停止させた(RBdel1bstop)を作出した。RBdel1bstop を接種した葉でのウイルスゲノム蓄積量を、野生型 RBDV と比較すると、RBdel1bstop は、野生型 RBDV と比較して接種葉でのウイルスゲノム蓄積量が減少していた。さらに、RBdel1bstop は、野生型 RBDV と比較して、ウイルスの全身感染が遅延することが示唆された。そこで、RBdel1bstop を、1b 植物に接種し、ウイルスゲノム蓄積量を解析した。その結果、1b 植物では、ウイルスゲノム蓄積量が増加していた。このことから、1b が感染葉でのウイルス蓄積量を増加させることが示唆された。そして、1b の RNA サイレンシングサプレッサー(RSS)活性を持つことを明らかにした。このことから、RBDV の花粉による水平伝染の促進において、1b の RSS 活性が 1b による花粉でのウイルス量の増加、および花粉管からのウイルス排出量の増加に関与すること、さらに、花粉による水平伝染の初期感染部位である柱頭でのウイルス感染を支援することが考えられた。この成果は、Isogai et al., Virology, 2019 により発表した。

### (4) ブルーベリー小球形潜在ウイルス(blueberry latent spherical virus, BLSV)の花粉による水平伝染機構解析

花粉により水平伝染する植物ウイルスは 18 種存在する。しかしながら、これまで RBDV と GORV の花粉による水平伝染メカニズムが解析されているのみで、他の 16 種については不明であった。これら 16 種は RBDV および GORV とウイルス分類において異なるウイルス科に所属し、その内 5 種がセコウイルス科ネポウイルス属に所属するウイルスである。さらに本研究では、ネポウイルス属に所属する BLSV が、花粉により水平伝染することを見出した。そこで、BLSV を供試ウイルスとして、ネポウイルスの花粉による水平伝染メカニズムを解析した。

BLSV に感染したブルーベリー、*Nicotiana glauca*、*Nicotiana glauca*、*Nicotiana glauca*由来の花粉を、*Nicotiana benthamiana* の柱頭に人工授粉すると、BLSV が授粉した *N. benthamiana* に感染することを見出した。*N. benthamiana* 柱頭上での BLSV に感染したブルーベリー、*N. glauca*、*N. glauca*由来の花粉の動態を観察すると、それら花粉は発芽し、花粉管が *N. benthamiana* 柱頭に侵入していた。さらに、whole-mount ISH および CISH 解析から、BLSV に感染したブルーベリー花粉が *N. benthamiana* 柱頭上で発芽し、ウイルスを蓄積した花粉管を柱頭に侵入させることが明らかになった。加えて、柱頭に初期ウイルス感染部位が形成され、柱頭および花柱の通道組織へとウイルス感染を拡大することが明らかとなった。これらのことから、ウイルスを蓄積した花粉管を柱頭に侵入させることで、柱頭にウイルス感染を確立させ、柱頭および花柱の通道組織へと細胞間移行し、長距離移行することが示唆された。BLSV は、GORV および RBDV とウイルス分類で異なる科に所属しているが、花粉による水平伝染のメカニズムは類似していることを明らかにした。この成果についての原著論文を、現在、執筆中である。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

|   |                       |
|---|-----------------------|
| 1. 著者名<br>Masamichi Isogai, Takanori Matsudaira, Kotaro Miyoshi, Takuya Shimura, Sayaka Torii, Nobuyuki Yoshikawa                   | 4. 巻<br>542           |
| 2. 論文標題<br>The raspberry bushy dwarf virus 1b gene enables pollen grains to function efficiently in horizontal pollen transmission  | 5. 発行年<br>2020年       |
| 3. 雑誌名<br>Virology  | 6. 最初と最後の頁<br>28-33   |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1016/j.virol.2020.01.005  | 査読の有無<br>有            |
| オープンアクセス<br>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<br>-             |
| 1. 著者名<br>Masamichi Isogai, Youhei Suzuki, Takanori Matsudaira, Nobuyuki Yoshikawa  | 4. 巻<br>84            |
| 2. 論文標題<br>Genomic RNA accumulation of gentian ovary ring-spot virus and raspberry bushy dwarf virus in pollen tubes.               | 5. 発行年<br>2018年       |
| 3. 雑誌名<br>Journal of General Plant Pathology  | 6. 最初と最後の頁<br>376-380 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1007/s10327-018-0795-2  | 査読の有無<br>有            |
| オープンアクセス<br>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<br>-             |
| 1. 著者名<br>Masamichi Isogai, Takanori Matsudaira, Makoto Ito, Nobuyuki Yoshikawa   | 4. 巻<br>526           |
| 2. 論文標題<br>The 1b gene of raspberry bushy dwarf virus is a virulence component that facilitates systemic virus infection in plants. | 5. 発行年<br>2019年       |
| 3. 雑誌名<br>Virology  | 6. 最初と最後の頁<br>222-230 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>10.1016/j.virol.2018.10.025  | 査読の有無<br>有            |
| オープンアクセス<br>オープンアクセスとしている（また、その予定である）   | 国際共著<br>-             |
| 1. 著者名<br>磯貝雅道  | 4. 巻<br>13            |
| 2. 論文標題<br>ラズベリー黄化ウイルスの花粉伝染   | 5. 発行年<br>2018年       |
| 3. 雑誌名<br>植物ウイルス病研究会レポート  | 6. 最初と最後の頁<br>1-10    |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）<br>なし   | 査読の有無<br>無            |
| オープンアクセス<br>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<br>-             |

|  |                     |
|--|---------------------|
| 1. 著者名<br>磯貝雅道                         | 4. 巻<br>72          |
| 2. 論文標題<br>国内で発生するブルーベリー&ラズベリーのウイルス病   | 5. 発行年<br>2018年     |
| 3. 雑誌名<br>農耕と園芸                        | 6. 最初と最後の頁<br>22-25 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子)<br>なし         | 査読の有無<br>無          |
| オープンアクセス<br>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<br>-           |

〔学会発表〕 計23件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件)

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>三吉航太郎・松平昂士・鳥井彩花・吉川信幸・磯貝雅道                |
| 2. 発表標題<br>ラズベリー黄化ウイルスの花粉による水平伝染を導くウイルス感染部位の組織化学的解析 |
| 3. 学会等名<br>日本植物病理学会東北部会                             |
| 4. 発表年<br>2020年                                     |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>吉越瑞奈・吉川信幸・磯貝雅道                            |
| 2. 発表標題<br>ラズベリー黄化ウイルスのNicotiana benthamianaにおける種子伝染 |
| 3. 学会等名<br>日本植物病理学会                                  |
| 4. 発表年<br>2020年                                      |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>三吉航太郎・松平昂士・鳥井彩花・吉川信幸・磯貝雅道                |
| 2. 発表標題<br>ラズベリー黄化ウイルスの花粉による水平伝染を導くウイルス感染部位の組織化学的解析 |
| 3. 学会等名<br>日本植物病理学会東北部会                             |
| 4. 発表年<br>2019年                                     |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>松平昂士・相馬隆之・志村拓哉・吉川信幸・磯貝雅道                       |
| 2. 発表標題<br>ラズベリー-黄化ウイルスゲノムに予想される1b 遺伝子に由来する翻訳産物の感染植物からの検出 |
| 3. 学会等名<br>平成30年度日本植物病理学会東北部会                             |
| 4. 発表年<br>2018年   |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>松平昂士・吉川信幸・磯貝雅道                     |
| 2. 発表標題<br>ラズベリー-黄化ウイルスの1b 遺伝子の花粉による水平伝染を促進する |
| 3. 学会等名<br>平成30年度日本植物病理学会東北部会                 |
| 4. 発表年<br>2018年                               |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>三吉航太郎・吉川信幸・磯貝雅道                    |
| 2. 発表標題<br>ブルーベリー-小球形潜在ウイルス(BLSV)の花粉による水平伝染解析 |
| 3. 学会等名<br>平成30年度日本植物病理学会東北部会                 |
| 4. 発表年<br>2018年                               |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>三吉航太郎・吉川信幸・磯貝雅道                                 |
| 2. 発表標題<br>ブルーベリー-小球形潜在ウイルスの花 粉による水平伝染を導くウイルス感染 部位の組織化学的解析 |
| 3. 学会等名<br>平成31年度日本植物病理学会大会                                |
| 4. 発表年<br>2019年  |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>松平昂士・吉川信幸・磯貝雅道                                 |
| 2. 発表標題<br>ラズベリー黄化ウイルス (RBDV) の1b遺伝子は効率的な花粉による水平 伝染に必要である |
| 3. 学会等名<br>平成31年度日本植物病理学会大会                               |
| 4. 発表年<br>2019年   |

|                              |
|------------------------------|
| 1. 発表者名<br>磯貝雅道              |
| 2. 発表標題<br>ラズベリー黄化ウイルスの花粉伝染  |
| 3. 学会等名<br>植物ウイルス病研究会 (招待講演) |
| 4. 発表年<br>2018年              |

|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>松平昂士、志村拓哉、吉川信幸、磯貝雅道              |
| 2. 発表標題<br>ラズベリー黄化ウイルスのゲノムにコードされる1b遺伝子の機能解析 |
| 3. 学会等名<br>日本植物病理学会大会                       |
| 4. 発表年<br>2017年                             |

|  |
|--|
| 1. 発表者名<br>磯貝雅道、鈴木庸平、鎌田美咲、松平昂士、吉川信幸                                |
| 2. 発表標題<br>ラズベリー黄化ウイルスとリンドウ子房輪紋ウイルスの花粉管発芽に伴う花粉でのウイルスRNA蓄積レベルの経時的変化 |
| 3. 学会等名<br>日本植物病理学会大会  |
| 4. 発表年<br>2018年  |



|   |
|---|
| 1. 発表者名<br>松平昂士、吉川信幸、磯貝雅道                                 |
| 2. 発表標題<br>ラズベリー黄化ウイルスのゲノムにコードされる1b遺伝子のRNAサイレンシングサプレッサー活性 |
| 3. 学会等名<br>日本植物病理学会東北部会                                   |
| 4. 発表年<br>2017年   |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

研究室紹介 植物病理学分野 植物病理学研究室 (植物生命科学科)  
<http://www.agr.iwate-u.ac.jp/lab/%E6%A4%8D%E7%89%A9%E7%97%85%E7%90%86%E5%AD%A6%E7%A0%94%E7%A9%B6%E5%AE%A4/>  
 How viruses hitch a ride on pollen  
<http://www.elsevierblogs.com/virology/how-viruses-hitch-a-ride-on-pollen-to-infect-plants/>  
 植物的性病?!  
<https://pansci.asia/archives/58284>

|         |                           |                       |    |
|---------|---------------------------|-----------------------|----|
| 6. 研究組織 |                           |                       |    |
|         | 氏名<br>(ローマ字氏名)<br>(研究者番号) | 所属研究機関・部局・職<br>(機関番号) | 備考 |