

令和 4 年 6 月 6 日現在

機関番号：12201

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2021

課題番号：19K15839

研究課題名（和文）植物ゲノムに潜む内在ウイルス配列による病徴発現メカニズムの解明

研究課題名（英文）Analysis of symptom expression mechanisms induced by plant endogenous viral sequence

研究代表者

煉谷 裕太郎（Neriya, Yutaro）

宇都宮大学・農学部・助教

研究者番号：30773551

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）：近年の次世代シーケンス解析により、植物ゲノム中に植物ウイルスに似た配列が含まれていることが明らかになりつつある。この内在ウイルス配列の存在が植物に与える影響は明らかでない。そこで本研究では、ダリアやナデシコなどの花きを対象として内在ウイルス様配列の有無を調べた。さらに、内在ウイルス配列と進化的に近縁な植物DNAウイルスの解析を行い、日本国内における新たなDNAウイルスの同定も行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

パピローマウイルスがヒトのゲノム中に配列が挿入されるように、植物ゲノム中のウイルス様配列の存在も近年明らかになりつつある。しかし、その詳細の解析は満足でない。本研究ではダリアやナデシコなど観賞用植物に存在する内在ウイルス様配列の有無を解析し、これら植物のゲノム中にも多様なウイルス様配列が存在することを明らかにした。さらに、植物ゲノム中に内在しない、通常の植物ウイルスについても国内初発生のウイルスを同定し、感染性クローン構築により病徴の再現を行った。本研究成果により、花での内在ウイルス様配列の存在を明らかにし、初発生のウイルスを同定したことから今後の検査体制に改善の余地があることを示唆した。

研究成果の概要（英文）：Recently, next-generation sequencing analyses are revealing the presence of endogenous pararetroviral sequences in plant genomes. The effect of the presence of this sequence on plants is not clear. Therefore, in this study, we examined the presence of endogenous viral-like sequences in flowering plants such as dahlia and dianthus. We also analyzed plant DNA viruses that are evolutionarily closely related to the endogenous viral sequences and identified newly reported DNA virus in Japan.

研究分野：植物ウイルス

キーワード：ダリア ナデシコ 内在ウイルス様配列 カリモウイルス 感染性クローン LAMP法

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

近年の次世代シーケンス解析により、植物ゲノム中にウイルスに似た配列が含まれていることが明らかになりつつある。この内在ウイルス配列は環境の変化や他のウイルスの感染によって発現し、病徴に関与すると考えられているが、発病メカニズムや防除法は不明である。そこで本研究では、内在ウイルス配列を持つとされるダリアやナデシコ科の植物を用いて、①内在ウイルス配列の同定、②内在ウイルス以外のウイルスの解析を行い、内在ウイルス配列の配列解析およびウイルス接種系や迅速検出系の確立を目的とした。

2. 研究の目的

本研究では、ダリアやカーネーションなどの花きを対象として、内在ウイルス様配列の有無を調査した。さらに、内在ウイルス以外の通常の植物ウイルスについても性状の解析や感染性クローンの構築により、人工的に接種可能な実験系の構築を目指した。

3. 研究の方法

ダリアやカーネーションから核酸抽出を行い、内在ウイルス様配列と類似の配列を持つ *Caulimovirus* 属ウイルス (カリモウイルス) の検出を行った。また、カリモウイルス以外のウイルスについても次世代シーケンス解析を行うことで存在の有無を検証した。得られた内在ウイルス様配列および通常のウイルスについて、プラスミド内にウイルス配列を挿入し、植物内に導入することで人工的にウイルス感染の状況を模倣できる感染性クローンの構築を行った。さらに、日本で初めて報告が確認されたウイルスについては、等温核酸増幅手法の Loop-mediated isothermal amplification (LAMP)法を用いて簡易迅速検出法の確立を行った。

4. 研究成果

(1) ダリアの内在性ウイルス様配列 (DvEPRS) の多様性解析

栃木県内において採取したダリアの葉から DNA を抽出し、次世代シーケンサー (NGS) 解析を行ったところ、ダリアモザイクウイルス (DMV) および DMV に近縁のダリアコモモンモザイクウイルス (DCMV) に類似した配列であるダリア内在性ウイルス様配列 (DvEPRS) が得られた。DvEPRS はモザイク病徴の有無に関わらず検出され、ダリアでのモザイク病徴の発現に直接的には関与していないと考えられた。NGS 解析により DvEPRS 配列としてカリモウイルスに特徴的な配列を有する部分長配列が 15 断片得られたが、ウイルス全長には相当しなかったため、DvEPRS はゲノム中に短い断片として多数存在することが示唆された。そこで、既報の配列情報が豊富な ORF1, ORF4, ORF6 について PCR 増幅した断片の配列をサンガーシーケンスにより解析したところ、複数の異なる配列断片が得られ、ゲノム中に DvEPRS 配列が多数存在することが強く示唆された (図 1)。

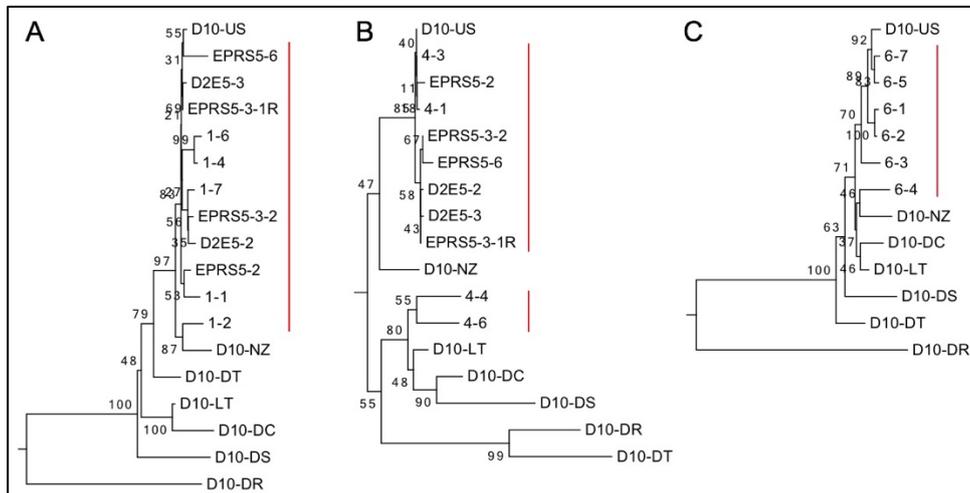


図 1 DvEPRS の塩基配列多様性

ORF1 (A), ORF4 (B), ORF6 (C)に相当する配列で近隣結合法により作成した分子系統樹。赤線の配列が本研究によって決定した断片配列。アウトグループには DCMV-NZ の配列を用いた。

(2) ダリアに感染する DNA ウイルスの同定・クローン構築

ダリアに感染する DNA ウイルスにはカリモウイルスの DMV と DCMV があり、国内では DMV 感染ダリアの報告はあるが、DCMV 感染ダリアの報告は無かった。栃木県内においてモザイク病徴を示すダリアを発見した (図 2)。葉から抽出した DNA を用いて PCR および次世代シーケンサーで検出・解析を行ったところ、DMV および DCMV をそれぞれ検出した。これらのウイルスが病原性を持つことを確かめるため、それぞれの感染性クローンを構築した。構築した感染性クローンのプラスミドを金粒子に付着させ、遺伝子銃 (パーティクルガン) を用いてダ

リアの複数品種に接種したところ、いくつかの品種では半数以上の植物に全身感染した。ウイルスが検出された植物の中には黄化や葉の奇形といった病徴が観察されるものもあった（図3）。一方、接種したすべての植物でウイルスが検出されない品種もあり、その品種は DMV と DCMV で異なったことから、ウイルス感染の可否には品種間差が存在する可能性が示唆された。両ウイルスの感染性クローン構築は世界初であり、感染性クローンによりウイルス感染が再現できることを明らかにできた。一方、品種により感染性の違いが生じる原因については明らかでないので、今後はこの違いについて詳細な解析を行う。



図2 栃木県内で発見したダリア

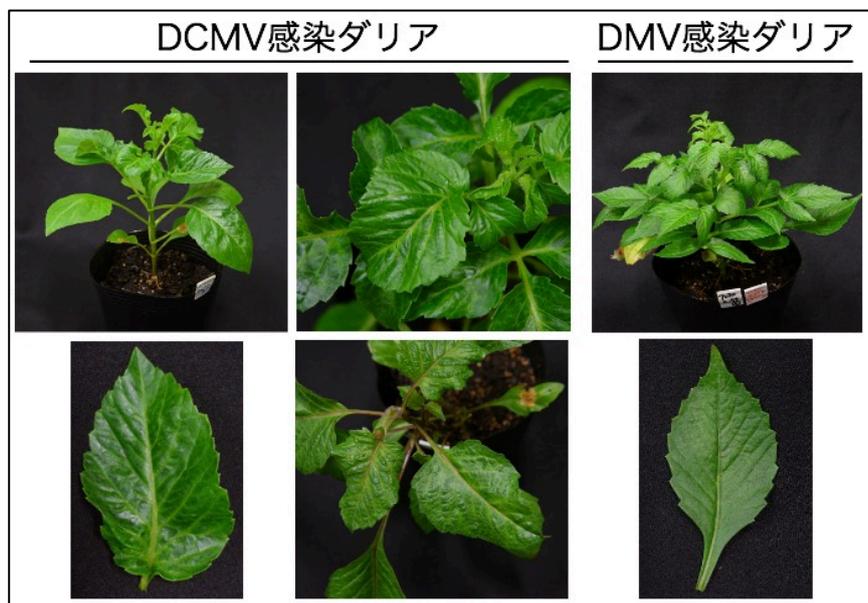


図3 DCMV および DMV の感染性クローンを接種して感染が確認されたダリアの病徴

(3) DCMV を検出する簡易迅速検出系の確立

DMV については既に等温拡散増幅手法 (LAMP) 法による迅速検出系の報告があるが、DCMV には無い。そのため、DCMV の感染性クローンおよびその接種個体を用いて、高検出感度のウイルス検出系の確立に取り組んだ。まず、DCMV 感染植物の DNA を用いて LAMP 用プライマーの選定を行った。さらに、感染性クローンを接種した植物で検出が可能かどうか調べたところ、PCR による検出で非感染とされた個体でも、LAMP による検出では DNA 増幅が認められた。そのため、PCR と LAMP による検出感度を比較したところ、LAMP 法は PCR よりも 10 倍程度、検出感度が高いことが分かった（図4）。さらに、抽出 DNA ではなく、感染葉を爪楊枝で突いて得られた粗汁液を用いた LAMP でも DCMV の検出が可能だったため、DCMV を簡易迅速に検出する手法を世界で初めて確立した。さらに、感染性クローンの接種実験で観察された、ウイルス感染性の品種間差異はウイルス蓄積量の違いによる可能性が示唆された。

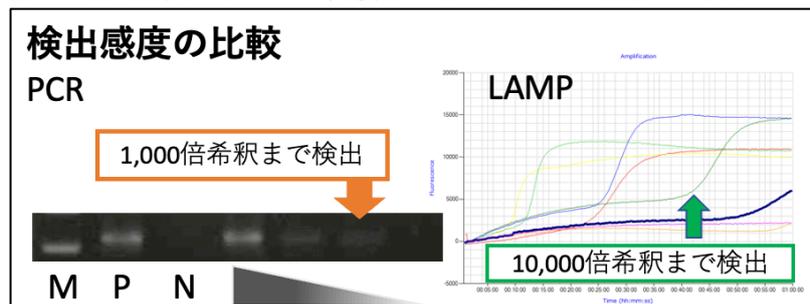


図4 PCR と LAMP の検出感度比較

(4) カーネーションの内在性ウイルス様配列の解析

カリモウウイルスのカーネーションエッチドリリングウイルス (CERV) はナデシコ科植物のみを宿主とする。種子から栽培したアメリカナデシコ (*Dianthus barbatus*) において、カリモウウイルスに対するユニバーサルプライマーを用いて検出したところ、CERV 様配列の増幅が認められた。より詳細な解析を行うため、この植物から抽出した全 DNA を用いて次世代シーケンス解析、*de novo assembly* を行った。その結果、CERV に相同な配列が 3 種類得られ、末端が植物ゲノムの配列と相同な CERV のほぼ全長の領域、CERV の ORF1 から ORF5 の前半までの領域、CERV の ORF5 の後半から ORF6 までの領域をもつ配列であった (図 5)。これらの配列の ORF5 のアミノ酸配列の相同性を既報 2 分離株の CERV 配列と比較したところ、すべて 80% 以上であった。以上より、本研究で用いたナデシコには少なくとも 2 種類以上の CERV 様配列が存在し、これらが内在配列としてゲノム中に組み込まれている可能性が示唆された。

さらに、PCR により増幅した DNA 断片同士を繋ぎ合わせて DNA クローンを構築し、構築した DNA クローンをナデシコおよび近縁植物に接種した。しかし、一部の個体を除いて感染性が認められず、植物の生育も非接種個体と顕著な違いは無かった。そのため、構築した DNA クローンの配列の修正や接種法の改善を行うことで、感染性を向上させ、感染時の応答性について継続して調べる予定である。

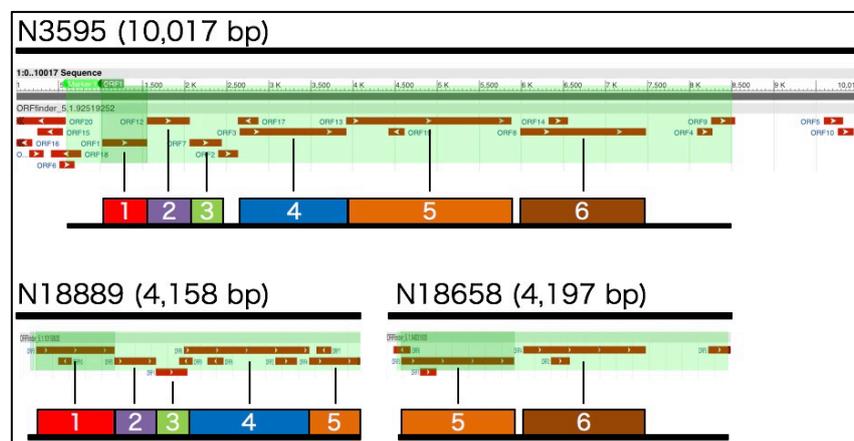


図 5 CERV に相同な 3 配列の ORF 解析

(5) カーネーション斑紋ウイルスの感染性クローン構築

栃木県内で市販されていた無病徴のカーネーションから、RNA ウイルスのカーネーション斑紋ウイルス (CarMV, アルファカルモウイルス属) を検出した。CarMV の全長配列を決定し、既報の CarMV と高い同一性を示した。さらに、感染性クローンを構築した。構築した感染性クローンから RNA を転写し、*Nicotiana benthamiana*、キノア、ナデシコに接種したところ、軽微な病徴を示し、PCR により感染が確認された (図 6)。

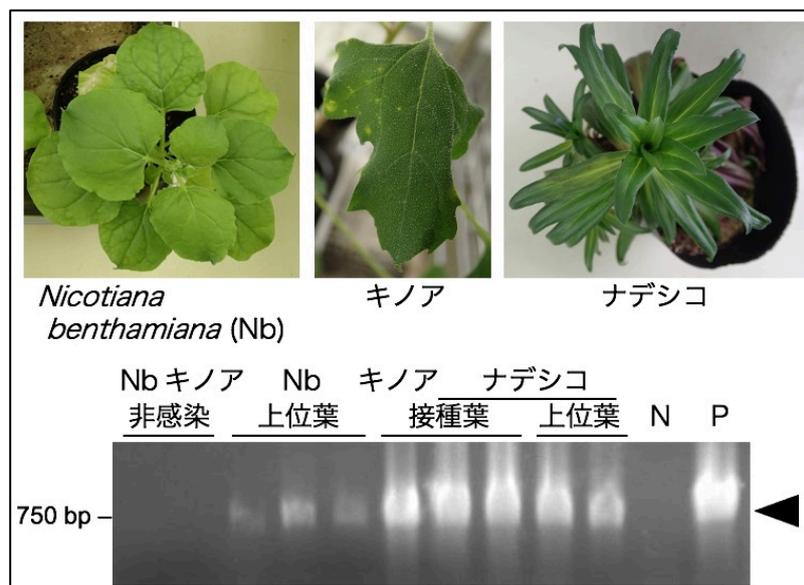


図 6 CarMV 感染性クローンを接種した植物の病徴と PCR による検出結果

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1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 Yamamoto Daiki, Neriya Yutaro, Suzuki Tomohiro, Nishigawa Hisashi, Natsuaki Tomohide	4. 巻 166
2. 論文標題 Construction of an infectious dahlia common mosaic virus clone	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Archives of Virology	6. 最初と最後の頁 3179 ~ 3182
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00705-021-05225-5	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1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 山本大稀・西川尚志・夏秋知英・煉谷裕太郎
2. 発表標題 ダリアから分離されたDNAウイルスの感染性クローン構築と感染率の品種間差異
3. 学会等名 令和4年度日本植物病理学会大会
4. 発表年 2022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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------