

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 14 日現在

機関番号：11201

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24380027

研究課題名(和文) 果樹バイローム解析に基づく病原未確認重要病害の病原ウイルス解析システムの確立

研究課題名(英文) Establishment of the system for identification of causal viruses in fruit tree virus diseases based on virome analyses

研究代表者

吉川 信幸 (Yoshikawa, Nobuyuki)

岩手大学・農学部・教授

研究者番号：40191556

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 15,100,000円

研究成果の概要(和文)：従来病原が未定であったオウトウ芽枯病、リンゴ輪状さび果病、リンゴ奇形果病、およびリンゴえそモザイク病の病原ウイルスの解析に、次世代シーケンサーによるバイローム解析を応用し、オウトウ芽枯病からはオウトウBウイルス(ChVB)、リンゴえそモザイク病からはリンゴえそモザイクウイルス(ApNMV)の2種の新ウイルスを発見するとともに、リンゴ輪状さび果病の病原は、リンゴクロロティックリーフスポットウイルスの一系統であることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：We conducted virome analyses by the next-generation sequencer of cherry trees affected by a bud blight disease, apple trees by a russet ring disease, apple trees by a green crinkle disease, and apple trees by a mosaic-disease. The results indicated that two new viruses, Cherry virus B and Apple necrotic mosaic virus (ApMV) were detected from a cherry tree affected by a bud blight disease and mosaic-diseased apple trees, respectively. Furthermore, we found an Apple chlorotic leaf spot virus variant from a russet ring-diseased apple trees and this variant induced a russet-like symptom on fruits of inoculated apple seedlings.

研究分野：果樹類に感染するウイルスの構造と機能に関する研究

キーワード：植物ウイルス学 植物病理学 果樹ウイルス病 病原ウイルスの同定 バイローム解析

1. 研究開始当初の背景

従来、果樹ウイルス病の病原の解析・同定では、先ず罹病果樹からウイルスを草本(検定)植物に分離・精製後、ウイルスの性状(粒子形態やゲノム配列、タンパク質の性状など)を調べると共に、精製ウイルスを原宿主(果樹)に戻し接種することで病原性を確認し、病原ウイルスを同定する必要があった。しかしながら、果樹類の接ぎ木伝染性(ウイルス性)病害の中には、病原ウイルスを草本植物に分離できないために、病原の解析・同定が一向に進まない病気が多く残されている。その中には、リンゴの奇形果病や輪状さび果病、ニホンナシえそ斑点病、セイヨウナシ粗皮病、オウトウ芽枯病など大きな被害を出している重要病害が含まれている。例えば、リンゴ奇形果病は1929年に青森県で発見され、1934年にわが国で接ぎ木伝染性が確認された世界におけるリンゴウイルス病の初めての記載となった病気であるにもかかわらず、未だに病原は不明のままである。また、オウトウ芽枯病は授粉用品種を高接ぎした「佐藤錦」の芽が枯れるウイルス性の病気で、平成5年に山形県で発生して以降甚大な被害を出している新興病害であるが、病原は未同定である。これらウイルス性病害の病原解析が進まない大きな理由としては、木本植物にはウイルス感染阻害物質が多く含まれており、通常、果樹体内のウイルス濃度は極めて低いため、病原ウイルスを適当な草本植物に分離ができないためである。

近年、高速・大量シーケンス(ディープシーケンス)技術の実用化により、ウイルスの草本植物への分離・増殖の過程を経ずに、罹病樹の組織から直接ウイルス関連のsiRNAまたは二本鎖RNAを調製し、それらの塩基配列を網羅的に調べることで、従来では不可能であった罹病樹に含まれる全てのウイルスゲノム(virome、パイローム)の情報を得ることが可能になった。パイローム解析(以下、パイロミクスと呼ぶ)で得られたゲノム情報を利用することで、罹病組織からの全核酸を鋳型にウイルスゲノムを増幅し、増幅DNAからウイルスRNAを試験管内転写し、そのまま病原性検定に利用できる可能性が考えられた。研究代表者らはこれまでに、リンゴ高接病の病原ウイルスであるリンゴクロロティックリーフスポットウイルス(ACLSV)およびリンゴステムピッチングウイルス(ASPV)の感染葉から抽出した全RNAを鋳型として、long RT-PCRによりこれらウイルスゲノムの全長cDNAを合成後、感染性のあるウイルスRNAの試験管内転写に成功している。また、従来、接種が非常に難しかったリンゴやナシでの効率的なウイルス接種法を開発し、リンゴでは発根直後の種子(子葉)にウイルスRNAをパーティクルガン接種することで、ほぼ100%の感染率を得ることに成功している。

2. 研究の目的

本研究では、これまで病原未確認のウイルス性病害、すなわちオウトウ芽枯病、リンゴ奇形果病、リンゴ輪状さび果病、リンゴえそモザイク病を対象に、

(1) これらの病気に感染した果樹のパイロミクスにより、感染樹に含まれる全ウイルス種を明らかにする。

(2) 各病害の病原候補となる既知および未知ウイルスの全ゲノム配列を解析する。(3) 病原候補ウイルスゲノムのPCRによる増幅と増幅DNAを鋳型にしたウイルスRNAの試験管内転写により感染性ウイルスRNAを作製する。

(4) ウイルスRNAの各果樹種子へのパーティクルガン接種、および原宿主(果樹品種)での病原性検定を実施し、従来の技術では病原の解析・同定ができなかった病原未確認ウイルス性病害の病原ウイルスを同定すると同時に、果樹パイロミクスに基づく病原未確認病害の病原ウイルス解析システムを確立する目的で開始した。

3. 研究の方法

オウトウ芽枯病、リンゴ奇形果病、リンゴ輪状さび果病、リンゴえそモザイク病の各罹病樹を供試し、先ず各罹病組織から20~30ヌクレオチド程度のsiRNAを調製後、ディープシーケンス解析およびパイオインフォマティクス(既知ウイルスゲノム配列へのマッピングなど)を行い、各罹病樹に含まれる全ウイルスをリストアップする。その中で病原と推定される既知および未知ウイルスについてRT-PCRによるゲノム増幅とシーケンス解析により、全ゲノム配列を決定する。続いて各病害の病原候補ウイルスの完全長ゲノムをT7(またはT3)プロモーターを含むプライマーを用いてPCR増幅後、感染性のあるウイルスRNAを試験管内転写する。転写したウイルスRNAをパーティクルガン法で各樹種の発芽直後の種子(子葉)に接種し、感染実生苗を作出する。これらの感染苗を各樹種(品種)に接ぎ木接種し、各病害に特徴的な症状を再現する。

4. 研究成果

(1) オウトウ芽枯病 1990年代に山形県で発生したオウトウ芽枯病は、品種「佐藤錦」などに発芽障害が現れる接木伝染性病害であるが、病原ウイルスについては特定されていない。本研究では、4本の芽枯罹病オウトウ樹(S1~S4)の次世代シーケンスによるパイローム解析を行った。各樹から2本鎖RNAを抽出し、これを鋳型にしてライブラリーを作製後、イルミナ社HiSeq2000シーケンサーを用いてシーケンス解析した。各樹の試

料から得られたリード(約 6000 万 / 試料)から de novo アセンブル(Velvet)によりコンティグを作成し, Blast によりウイルス配列に対する相同性検索を行った。その結果, 罹病樹 S1, S2, S4 にはリトルチェリーウイルス 1(LChV-1), リトルチェリーウイルス 2(LChV-2), チェリーえそさび斑ウイルス(CNRMV), チェリー緑色輪紋ウイルス(CGRMV), チェリー A ウイルス(CVA), プルーン萎縮ウイルス(PDV), およびリンゴクロティックリーフスポットウイルス(ACLSV)の 7 種類のウイルスが, S3 にはこれら 7 種のウイルスに加えて新規なホペア属のオウトウ B ウイルス(CVB)が感染していることを明らかにした。さらに, 各ウイルスの sequence variants も考慮すると, オウトウ芽枯病感染樹は複雑な多重ウイルス感染の様相を示している。

(2) リンゴ奇形果病

リンゴ奇形果病は, 1929 年青森県で発見され, 1934 年に接木伝染が確認されたリンゴウイルス病である。本病罹病樹からはこれまで各種ウイルスが検出されているが, 病原ウイルスの特定には至っていない。本研究では, 果樹研究所リンゴ研究拠点に保存されている罹病リンゴ樹の次世代シークエンスによるパイローム解析を試みた。感染樹の葉から抽出した 2 本鎖 RNA を鋳型にしてライブラリーを作製後, イルミナ社 HiSeq2000 シークエンサーを用いて 100bp, paired end でシークエンス解析した。得られたリード(約 7000 万)から de novo アセンブル解析(Velvet)によりコンティグ(長さ 10248~189nt, 総数 853, 平均長 771nt)を作成した。これらのコンティグを, Genbank のウイルス配列に対する相同性検索(Blastn)で解析した結果, 供試した罹病樹にはリンゴステムピッチングウイルス(ASPV), Apple green crinkle-associated virus, Apricot latent virus (ApLV), リンゴステムグルーピングウイルス(ASGV), リンゴクロティックリーフスポットウイルス(ACLSV)が感染していることが明らかになった。続いて, リンゴ奇形果病罹病リンゴ樹から各ウイルスの単離を試みた。すなわち, 罹病樹の花弁から抽出した全 RNA を鋳型に, T3 プロモーター配列を含むプライマーを用いて RT-PCR によりウイルスゲノムの全長 cDNA を増幅した。続いて T3 ポリメラーゼでウイルス RNA を転写し, *Nicotiana occidentalis* および *C. quinoa* に接種した。その結果, 奇形果病罹病樹からは ASPV の 3 変異株が *N. occidentalis* に単離された。今後各変異株の奇形果病との関連を検討する。

(3) リンゴ輪状さび果病

リンゴ輪状さび果病は古くから知られる接ぎ木伝染性病害であるが, 現在までに病原ウイルスの同定されていない。次世代シークエンスによるパイローム解析で, 罹病樹にはリンゴステムピッチングウイルス(ASPV), リ

ンゴクロティックリーフスポットウイルス(ACLSV), リンゴステムグルーピングウイルス(ASGV)が感染していることを明らかにした。そこで先ず, 輪状さび果病と ASPV および ACLSV の関連性を調べる目的で, 罹病リンゴ樹から各ウイルスの単離を試みた。すなわち, 罹病樹の花弁から抽出した全 RNA を鋳型に, T3 プロモーター配列を含むプライマーを用いて RT-PCR によりウイルスゲノムの全長 cDNA を増幅した。続いて T3 ポリメラーゼでウイルス RNA を転写し, *Nicotiana occidentalis* および *C. quinoa* に接種した。その結果, 輪状さび果病罹病樹から ACLSV の 4 変異株が単離された。

続いて, T3 ポリメラーゼで転写したウイルス RNA をパーティクルガン法で発根直後のリンゴ実生に接種したところ, 輪状さび果病罹病リンゴ由来の ACLSV-RNA は高率にリンゴ実生に感染した(感染率 85.7%)以上から, 感染リンゴ樹からウイルスを草本植物に単離する過程を経ることなく, RT-PCR により全長 cDNA を増幅後 *in vitro* 転写系で合成したウイルス RNA を直接リンゴ実生に戻し接種できることが明らかになった。さらに, ACLSV の一変異株を接種したリンゴ樹に形成された果実に輪状さびに類似した症状が認められ, 輪状さび果病の病原が ACLSV の一系統であることが示唆された。

(4) リンゴえそモザイク病

リンゴモザイク病の病原としてはリンゴモザイクウイルス(ApMV)が知られているが, 果樹研究所リンゴ研究拠点保存のモザイク病様症状を示すリンゴ樹の中には, ApMV 抗体を用いた ELISA で陰性の樹(P129: 葉に顕著なえそを伴う)が存在する。P129 葉試料(dsRNA)を次世代シークエンス解析したところ, リンゴの潜在感染ウイルス(ACLSV, ASPV, および ASGV)以外に, イラルウイルス属に近縁な未知ウイルスが検出された。3'-および 5'-RACE 法で解析した末端配列を加えると, P129 ウイルスは RNA1: 3341 nt, RNA2: 2723 nt, RNA3: 1957 nt からなり, それぞれ 119.6kDa(HEL), 97.4kDa(POL), および 31.4kDa(MP)と 24.5kDa(CP)のタンパク質をコードしていた。CP のアミノ酸配列はプルヌスえそ輪点ウイルス(PNRSV)と 53%, ApMV と 43%の相同性を示し, PNRSV と ApMV と共にイラルウイルス属のサブグループ 3 に分類された。以上から, P129 ウイルスはイラルウイルス属の新規ウイルスで, リンゴえそモザイクウイルス(Apple necrotic mosaic virus, ANMV)と仮称した。

続いて, モザイク症状と ApNMV の分布の相関を調べる目的で, 罹病リンゴ樹(PK28)の病徴の程度が異なる 6 本の枝から葉(5 葉/枝)を採取し, RT-PCR 検定をしたところ, 病徴を呈した葉からは全て ApNMV が検出されたが, 無病徴の葉では ApNMV が検出されないか, あるいは濃度が非常に低く, 葉のモ

ザイクと ApNMV の分布が一致した ApNMV の発生については、中国から導入した P129, PK28, PK45 の 3 樹から ApNMV が検出されたが、その他の罹病樹 (6 樹) はすべて ApMV が検出された。

さらに、P129 葉試料からの全 RNA を鋳型に T3 プロモーターを付加した 5' 末端プライマーを用いて ApNMV ゲノムの全長 cDNA を増幅した。T3 ポリメラーゼで ApNMV-RNAs を転写後、リンゴ実生に接種したところ、接種葉で ApNMV-RNAs が複製することが明らかになった。今後、ApNMV のリンゴに対する病原性を調べたい。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 0 件)

[学会発表](計 12 件)

1. R. Kishigami, H. Yaegashi, N. Yamagishi, T. Ito and N. Yoshikawa (2015). Isolation of Apple chlorotic leaf spot virus variants from a russet ring-diseased apple trees by in vitro transcription system and evaluation of their pathogenesis on fruits of apple. 23rd ICVF, June 8-12, Morioka, Japan.

2. H. Noda, N. Yamagishi, H. Yaegashi, M. Isogai, T. Ito and N. Yoshikawa (2015). Apple necrotic mosaic virus (ApNMV), a new virus classified into genus Ilarvirus, found in apple trees affected by a mosaic disease. 23rd ICVF, June 8-12, Morioka, Japan.

3. N. Yoshikawa, S. Oyamada, H. Yaegashi, S. Goto, N. Yamagishi, M. Isogai and T. Ito (2015). Multiple virus infection in cherry trees affected by a bud blight disease. 23rd ICVF, June 8-12, Morioka, Japan.

4. S. Oyamada, H. Yaegashi, S. Goto, N. Yamagishi, M. Isogai, T. Ito, and N. Yoshikawa (2015). Cherry virus B, a new virus classified into genus Foveavirus found in a sweet cherry tree. 23rd ICVF, June 8-12, Morioka, Japan.

5. 野田浩気・山岸紀子・八重樫 元・磯貝雅道・伊藤 伝・吉川信幸(2015). リンゴモザイク病に見出された新規イラルウイルス [リンゴえそモザイクウイルス, Apple necrotic mosaic virus (ApNMV)] (仮称) について. 平成 27 年度日本植物病理学会大会. 3 月 28 日~31 日. 明治大学.

6. 岸上隆介・山岸紀子・八重樫 元・伊藤 伝・吉川信幸(2015). 感染リンゴ樹試料から RT-PCR と In Vitro 転写で合成したリンゴウイルス RNA のリンゴ実生への感染. 日本植物病理学会報 81, 61-62.

7. 野田浩気・山岸紀子・八重樫 元・磯貝雅

道・伊藤 伝・吉川信幸(2015). モザイク症状を示すリンゴから分離された新規イラルウイルス [リンゴえそモザイクウイルス, Apple necrotic mosaic virus (NMV)] (仮称) について. 日本植物病理学会報 81, 61.

8. 吉川信幸・小山田早紀・八重樫 元・山岸紀子・後藤新一・磯貝雅道・伊藤 伝(2014). バイローム解析で明らかになった芽枯病罹病オウトウ樹の多重ウイルス感染. 日本植物病理学会報 80, 333-334.

9. 岸上隆介・山岸紀子・八重樫 元・伊藤 伝・吉川信幸(2014). ウイルス RNA の In Vitro 転写系を利用したリンゴ奇形果病と輪状さび果病からのウイルスの分離. 日本植物病理学会報 80, 300.

10. 小山田早希・齊藤邦亮・山岸紀子・後藤新一・八重樫元・伊藤 伝・磯貝雅道・吉川信幸(2014). 芽枯病罹病オウトウ樹に見いだされた新規 Foveavirus 属ウイルス [チェリー-B ウイルス (仮称)] について. 日本植物病理学会報 80, 60.

11. 齊藤邦亮・山岸紀子・後藤新一・八重樫元・伊藤 伝・磯貝雅道・吉川信幸(2013) オウトウ芽枯病罹病樹の次世代シークエンスによるバイローム解析. 日本植物病理学会報 79: 243-244.

12. 吉川信幸・齊藤邦亮・山岸紀子・八重樫元・伊藤 伝(2013) リンゴ奇形果病罹病樹の次世代シークエンスによるバイローム解析. 日本植物病理学会報 79: 243.

[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:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

[その他]
ホームページ等

6. 研究組織
(1) 研究代表者

吉川信幸 (Yoshikawa Nobuyuki)

岩手大学・農学部・教授

研究者番号：40191556

(2)研究分担者

伊藤 伝 (Ito Tsutae)

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・果樹茶業研究部門・上席研究員

研究者番号：20355415

八重樫 元 (Yaegashi Hajime)

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・果樹茶業研究部門・主任研究員

研究者番号：90582594