

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 24 日現在

機関番号：82111

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2015

課題番号：25850031

研究課題名(和文)ポスピウイルスの種子伝染機構の解明

研究課題名(英文)Elucidating the mechanism of seed transmission of Pospiviroid

研究代表者

松下 陽介(Yosuke, Matsushita)

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合研究機構・野菜花き研究部門花き生産流通領域・主任研究員

研究者番号：00414665

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：ウイルスは246から401塩基の一本鎖環状RNAからなる最小の病原体である。ウイルスの種子伝染パターンを解明するためにin situ hybridization法を用いてペチュニアの花芽形成から種子形成に至るまでにおけるジャガイモやせいもウイルス(PSTVd)の感染分布を明らかにした。その結果、PSTVdは胚のうまたは花粉を通じて胚に間接的に侵入することによって次世代組織に感染することが判明した。これらの成果から、PSTVdは胚発生中に直接的に胚へ侵入するのではなく、細胞胚発生前に胚のうまたは花粉に侵入する間接侵入することが示された。

研究成果の概要(英文)：Viroids are the smallest and simplest of the plant pathogens, consisting of a single-stranded circular, naked RNA genome from 246 to 401 nucleotides (nt) in length, which lacks any protein-coding sequences. To identify the major pattern of seed transmission of viroids, we used in situ hybridization to histochemically analyze the distribution of Potato spindle tuber viroid (PSTVd) in each developmental stage of petunia (flowering to mature seed stages). Our observation that PSTVd infected reproductive tissues such as the ovule before embryogenesis reveals that PSTVd can invade the embryo through pollen (i.e., seed transmission of PSTVd occurs by indirect embryo invasion through the infected embryo sac or pollen). These findings indicate that PSTVd is indirectly delivered to the embryo through ovule or pollen during the development of reproductive tissues before embryogenesis but not directly through maternal tissues as cell-to-cell movement during embryogenesis.

研究分野：植物保護

キーワード：ウイルス 種子伝染

1. 研究開始当初の背景

ウイルスは塩基数が 250 ~ 400 程度と短い環状の一本鎖 RNA のみで構成され、タンパク質をコードしていない最小の植物病原体である(佐野 2010)。ウイルス感染は細胞間、組織間への移行を通して進行し、全身感染に至る。ウイルスはタンパク質をもたない裸の RNA で存在しているため、RNA の配列やそれに伴う立体構造が複製や移行に重要な役割を果たしていることが示されている。近年、ジャガイモやせいもウイルス (PSTVd; *Potato spindle tuber viroid*) を用いた最近の実験により、複製や細胞間および全身移行に関する配列や立体構造が徐々に明らかになってきている(Ding et al. 2009)。

ウイルス・ウイルスが種子伝染するためには胚珠や胚への移行・感染が必要である。しかし、種子伝染するウイルスやウイルスであっても、完全に胚珠や胚へ侵入することは困難である。実際にトマトの胚珠における両ウイルスの分布を *in situ* hybridization によって明らかにしており(Matsushita et al. 2011) 開花時において、PSTVd は胚珠内部での感染と複製が認められたが、TCDVd は全く感染していなかった。したがって、胚や胚乳など次世代組織への侵入または感染を防ぐ何らかの機構が存在すると考えられる。しかしながら、それらの知見は皆無である。そこで、種子伝染する PSTVd と、種子伝染しない TCDVd (*Tomato chlorotic dwarf viroid*; PSTVd と 85%以上の塩基配列の相同性をもつ近縁種)を利用して、上記の機構解明に取り組んだ。

2. 研究の目的

PSTVd と TCDVd の両ウイルスの塩基配列の違いはわずか 37 塩基であり、それに伴う立体構造の相違が胚珠へのウイルスの移行・感染に影響を及ぼしていると考えられる。PSTVd と TCDVd の異なる配列は主に病原性領域(P)と可変領域(V)に集中しており、その部分に着目することで、胚珠への移行・感染に関する配列を特定できると考えられた。

そこで、PSTVd と TCDVd の塩基配列の違いに着目して、塩基配列を改変した PSTVd を作成した。ペチュニア (*Petunia x hybrida*) に接種試験を行ない、感染確認後、開花中の花を採取して固定し、*in situ* hybridization と種子伝染の確認を行った。これらの結果からウイルスがもつ種子伝染に必要な塩基配列の特定を行うことを目的とした。

3. 研究の方法

(1) PSTVd と TCDVd の組換えウイルスを用いた種子伝染の解明
PSTVd と TCDVd の配列の違い(37 塩基)に着目し、ウイルスがもつ種子伝染に必要な配列部分を特定することを目的として実験を

行った。PSTVd を基本にして、TCDVd との配列の異なる部位を入れ替えた。両ウイルスで異なる部位は主に病原性領域(P)と可変領域(V)である。はじめに、その2領域をそれぞれ入れ替えた PSTVd を作製して、ペチュニアに接種して感染成立後に *in situ* hybridization を行ない、胚珠への感染の有無を観察した。

接種源として次の組換えウイルスを準備した。P-TCV (P 領域のみ PSTVd の配列をもつウイルス)、V-TCV (V 領域のみ PSTVd の配列をもつウイルス)、T-TCV (T 領域のみ PSTVd の配列をもつウイルス)、V-T-TCV (V および T 領域のみ PSTVd の配列をもつウイルス)

ウイルスは5つのドメインに分かれており、P 領域 = 病原性領域、V 領域 = 可変領域、T 領域 = 右末端領域を指す。

次に、感染部位に影響を与えている領域を特定した後、その領域の RNA 立体構造を RNA 予測ソフト(Zuker 2003; <http://unafold.rna.albany.edu/?q=mfold>)を用いて、予測される構造パターンに応じて、改変した PSTVd を作製した。上記と同様に接種試験と *in situ* hybridization を順次行った。組換え体の作製は Matsushita et al. (2010) の方法に従って行った。

改変した PSTVd の接種試験の後、それぞれの接種植物体における種子伝染の有無を確認した。

最終的にこれらの配列データを元にウイルスがもつ種子伝染に必要な塩基配列の特定を行なった。

(2) PSTVd および TCDVd に感染した花芽形成から種子形成に至るまでにウイルス分布

当初の目的では上記(1)のように、種子伝染に関する配列の特定を目指していたが、接種した組換えウイルス感染個体から得られた後代においても種子伝染が確認されたため、試験計画を見直した。

これまでは胚珠への感染が止められていることから種子伝染を引き起こさないと考えてきたが、実際の種子形成時におけるウイルスの分布については全く未解明であったため、開花時におけるウイルスの分布だけでなく花芽分化から種子形成に至るまでの過程における感染分布について検証することにした。

PSTVd および TCDVd にそれぞれ感染したペチュニアを準備し、感染 2 か月後に RT-PCR によって感染を確認した。ペチュニアにおける花芽発達から種子形成における PSTVd および TCDVd の組織局在性の調査を行った。PSTVd および TCDVd 感染ペチュニアの花芽から種子までのサンプリングを行い、FAA (Formalin/Acetic acid/Alcohol) によって固定してパラフィン切片を作製した。PSTVd 特異的プローブを用いた *in situ*

hybridization により、その切片におけるウィロイドの感染分布を光学顕微鏡で観察した。

(3) 他の宿主植物におけるウィロイド種子伝染の実態解明

PSTVd はトマト・ペチュニア以外にも感染する植物種があり、それらにおいても種子伝染するものやしないものが知られている。そこで、トマト・ペチュニアと同様に胚珠における PSTVd の分布と種子伝染の有無について検証した。

材料としてナス (*Solanum melongena*) およびトウガラシ (*Capsicum annuum*) に PSTVd を接種した。なお、この2つの植物種においては PSTVd は種子伝染しないことが報告されている。感染確認後に開花時の花芽をの方法と同様にサンプリングし、感染分布を観察した。

4. 研究成果

(1) PSTVd と TCDVd の組換えウィロイドを用いた種子伝染の解明

組換えウィロイドをペチュニアに接種したところ、V-T-TCV および P-TCV は感染し、そのウィロイドの塩基配列を確認したところ、接種源と同じ配列を維持していた。T-TCV は感染していたが、組換え配列部分が変異していた。一方で V-TCV は全く感染が確認できなかった。

それぞれの組換えウィロイドに感染したペチュニア (感染しなかった T-TCV は除く) の開花時における胚珠におけるウィロイドの感染分布を確認したところ、胎座まではウィロイドの感染が確認できたが、胚珠内への感染は確認できなかった。しかしながら、得られた種子における感染率を確認すると、感染率は高く、組換え実験による種子伝染への影響は判別できなかった。

(2) PSTVd および TCDVd に感染した花芽形成から種子形成に至るまでにウィロイド分布

ペチュニアにおいて、PSTVd は茎頂組織の葉原基には感染が認められたが、茎頂分裂組織では感染は認められなかった。一方で、PSTVd は花芽形成時においてすでに分裂組織以外の組織に感染していた。発達中の花芽では未分化の胚のう組織を除くすべての組織で PSTVd の感染が認められた。開花期においては胎座および胚珠といった生殖組織での感染が認められた。また、種子形成期に発生した胚や胚乳においても PSTVd が感染しており、種子では胚と一部の胚乳組織で PSTVd の感染が観察された。

PSTVd 汚染花粉を受けた個体の受粉前の胚珠および受粉直後の胚珠においては PSTVd の感染は見られなかったが、胚のうが発達を開始し、胚原基が観察されるステージにおいては PSTVd のシグナルが胚原基で観察された。

さらに胚と胚乳発達に伴い、胚と胚乳において PSTVd の感染が見られた。したがって、ペチュニアにおける PSTVd の花粉伝染は、花粉由来の PSTVd が胚に感染して起こる伝染であることが示された。

次世代の組織である胚および胚乳においては PSTVd の感染が種子発達後期においても見られたが、雌由来の組織である柔細胞や種皮においては PSTVd に感染は確認されなかった。したがって、花粉由来の PSTVd は次世代組織には感染するが、雌由来の組織には侵入しないと考えられた。

汚染受粉を受けた個体からは PSTVd は検出されなかったことから、ペチュニアにおいては PSTVd の花粉を介した垂直伝染は起こるが、水平伝染は起こらないと考えられた。

TCDVd に感染した個体の花芽分裂組織や心皮、雄ずい、雌ずい、花弁において TCDVd の感染が確認された。

発生過程にある胚珠組織や胚珠内の胚のう細胞には TCDVd の感染は見られなかった。一方で、珠皮およびは TCDVd が感染していた。

受粉後の胚珠では、珠皮から生じた柔組織の一部から TCDVd の消失が確認され、胚のうからはシグナルは確認されなかった。

さらに発達した胚珠では胚原基が見られたが、TCDVd の感染は見られず、その後、生じた胚乳においても感染は見られなかった。また、柔細胞からのシグナル消失が引き続き確認された。

最終的に成熟した種子内の胚や胚乳においては TCDVd の感染は見られなかった。

PSTVd の種子伝染過程では胚のうが既に感染しており、それが種子伝染の要因であると推察されたが、一方で TCDVd では胚のうへの感染が一貫して見られなかったことから、胚のうへの早期感染がウィロイドの種子伝染に必要な過程であると推察された。

(3) 他の宿主植物におけるウィロイド種子伝染の実態解明

ナスおよびトウガラシに感染した PSTVd の胚珠における分布は、ナスでは完全に胎座で感染が停止しており、胚珠組織には全く PSTVd のシグナルは観察されなかった。一方でトウガラシにおいては胚珠と胎座をつなぐ組織までは感染が見られたが、胚珠内への感染は全く見られなかった。したがって、種子形成に至るまでこの状態が継続し、胚および胚乳に感染しないことから、種子伝染が起きないのであろうと推察された。おそらく、ウィロイドの種子伝染については宿主にかかわらず、少なくともナス科においては、で明らかになったペチュニアにおける伝染メカニズムと同様なのであろうと思われる。

< 引用文献 >

Ding B. (2009) The biology of viroid-host interactions. *Annu Rev Phytopathol.* 47: 105-131.

Matsushita Y. Usugi T. Tsuda S.(2011)
Distribution of tomato chlorotic dwarf
viroid in floral organs of tomato. Eur J
Plant Pathol. 130: 441-447.

Matsushita Y. Usugi T. Tsuda S. (2010)
Development of a multiplex RT-PCR
detection and identification system for
Potato spindle tuber viroid and *Tomato
chlorotic dwarf viroid*. Eur J Plant
Pathol.128:165-170.

佐野輝男 (2011)ウイルス 60: 177-186.

Zuker (2003) Mfold web server for nucleic
acid folding and hybridization prediction.
Nucleic Acids Res.31:3406-3415.

5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計2件)

Yosuke Matsushita, Shinya Tsuda. Seed
transmission of *Potato spindle tuber
viroid*, *Tomato chlorotic dwarf viroid*,
Tomato apical stunt viroid, and *Columnea
latent viroid* in horticultural plant.
European Journal of Plant Pathology.
査読有. 2016. in press
DOI: 10.1007/s10658-016-0868-z

Yosuke Matsushita, Shinya Tsuda.
Distribution of *Potato spindle tuber
viroid* in reproductive organs of petunia
during its developmental stages.
Phytopathology. 査読有. 104(9) 2014.
964-969. DOI: 10.1094/PHYTO-10-13-0294-R

〔学会発表〕(計1件)

松下陽介、侵入警戒を要するポスピウイロイ
ドの種子伝染、日本植物病理学会、2014年6
月2日、札幌コンベンションセンター(札幌
市)

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

取得状況(計0件)

〔その他〕

ホームページ等

6 . 研究組織

(1)研究代表者

松下 陽介 (MATSUSHITA, Yosuke)

国立研究開発法人農業・食品産業技術総合
研究機構野菜花き研究部門花き生産流通
研究領域 主任研究員

研究者番号：00414665