

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 22 日現在

機関番号：11201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26450051

研究課題名(和文) ラズベリー黄化ウイルスの花粉による水平伝染のメカニズム解明

研究課題名(英文) Elucidation of the mechanism leading to horizontal pollen transmission of raspberry bushy dwarf virus

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) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：植物ウイルスの花粉の水平伝染は1918年に初めて報告されたが、そのメカニズムについては不明であった。本研究はラズベリー黄化ウイルスを供試ウイルスとして研究を行い、植物科が異なっている植物間でも花粉による水平伝染が生じることを明らかにした。そして、感染植物由来の花粉から発芽した花粉管が柱頭に侵入することで、授粉された植物へとウイルスが伝搬されることを示した。さらに、受精の際、ウイルスを蓄積した花粉管が、胚のうにウイルスを持ち込むことで、ウイルスに感染した種子が形成されることを証明した。

研究成果の概要(英文)：Mechanisms by which pollination with virus-contaminated pollen grains cause systemic viral infection to healthy plants have been unknown since 1918, when the possibility that viruses might be spread by pollen from plant to plant was first raised. This study has revealed that horizontal pollen transmission of raspberry bushy dwarf virus (RBDV) can result in infection of plants in families different from those of the pollen donor. In particular, RBDV can be horizontally transmitted to healthy plants by penetration of their stigmas by germinating pollen tubes originating from RBDV-infected plants. In addition, the study has also shown that RBDV-infected pollen tubes can introduce RBDV directly into embryo sacs during fertilization, and that this results in virus infection of seeds from the fertilized flowers.

研究分野：植物病理学

キーワード：花粉伝染、花粉による水平伝染、花粉による垂直伝染、ラズベリー黄化ウイルス、花粉管、胚のう、柱頭、リンドウ子房輪紋ウイルス

1. 研究開始当初の背景

わが国のラズベリー輸入量は、洋菓子店やレストランでの需要の増加から、2010年には冷凍および生鮮果実を合わせて2,500トンに達している(財務省、貿易統計)。それに伴って、国産ラズベリーのニーズがあり、農林水産省の実用技術開発事業により、東北地方でラズベリー産地が新たに形成された。そのような中、申請者は、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、感染ラズベリー樹から作られた花粉が、健全ラズベリー樹に受粉されると、受粉された樹がウイルスに全身感染する。ラズベリーは、受粉なしに果実発達しないこと、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は圃場内を急速に感染拡大する。アメリカでは、5~6年で圃場内の900個体のラズベリー樹ほぼすべてにRBDVが水平伝染した例が報告されている。しかしながらこれまで花粉伝染のメカニズムは解明されていない。

2. 研究の目的

RBDVは、感染植物からの花粉が受粉することで健全植物に伝染する(花粉による水平伝染)。また、RBDVは、感染植物からの花粉が受粉されてきた種子に感染し、その子孫へとウイルスが伝染する(花粉による垂直伝染)。RBDVの花粉伝染の解析にラズベリー樹を用いた場合、播種から開花までの期間が長く、開花時期に限られる。そこで、花粉伝染のメカニズム解明のため、草本植物を用いてRBDVの花粉伝染を再現する。さらに、花粉による水平伝染を、花粉による垂直伝染と独立して解析できる新規実験系を確立し、RBDVの花粉による水平伝染および垂直伝染のメカニズムおよび両者の関係を解明する。また、RBDVと別種のウイルスを供試ウイルスとして花粉伝染メカニズムを解析し、異種ウイルス間の花粉伝染メカニズムを比較する。

3. 研究の方法

(1) RBDVの花粉による水平伝染メカニズムの研究手法

RBDVに感染したレッドラズベリー(*Rubus idaeus*)とトレニア(*Torenia foenifera*)から花粉を採取した。採取した花粉を、健全トレニアに人工授粉し、授粉1か月後に授粉したトレニアからRNAを抽出した。そのRNAを用いて、逆転写PCR

(RT-PCR)によりウイルス検定を行い、植物へのRBDVの花粉による水平伝染を解析した。トレニア柱頭に人工授粉したレッドラズベリー花粉の動態は、アニリンブルー染色による蛍光顕微鏡観察で解析した。また、RBDV感染レッドラズベリーとトレニア由来の花粉から発芽した花粉管におけるウイルス蓄積は、whole mount in situ hybridizationにより解析した。さらに、感染花粉管のトレニア柱頭への侵入により生じる柱頭でのウイルス感染は、Tissue blot hybridizationにより解析した。

(2) RBDVの花粉による垂直伝染メカニズムの研究手法

RBDV感染花粉管の胚のうへの侵入に伴って生じる受精で形られた種子のウイルス検定は、Tissue blot hybridizationにより行った。RBDV感染トレニア花粉の人工授粉により形成された種子および胎座のウイルス検定もTissue blot hybridizationにより行った。

(3) リンドウ子房輪紋ウイルス(Gentian ovary ring-spot virus, GORV)の花粉による水平伝染メカニズムの研究手法

GORVに感染したリンドウ(*Gentiana triflora*)と*Nicotiana benthamiana*から花粉を採取した。採取した花粉を、健全リンドウと*N. benthamiana*に人工授粉し、授粉1か月後にそれら植物からRNAを抽出した。そのRNAを用いて、RT-PCRによりウイルス検定を行い、植物へのGORVの花粉による水平伝染を解析した。リンドウ柱頭と*N. benthamiana*柱頭での*N. benthamiana*花粉とリンドウ花粉の動態は、アニリンブルー染色による蛍光顕微鏡観察で解析した。GORV感染リンドウと*N. benthamiana*由来の花粉から発芽した花粉管のウイルス蓄積は、whole mount in situ hybridizationにより解析した。さらに、ウイルスを蓄積した花粉管の柱頭への侵入により生じる柱頭および花柱でのウイルス感染は、Tissue blot hybridizationにより解析した。

4. 研究成果

(1) RBDVの花粉による水平伝染メカニズムの研究成果

トレニア柱頭に、感染ラズベリー花粉を人工授粉すると、RBDVがトレニアに全身感染することを見出した。アニリンブルー染色によりトレニア柱頭上での感染ラズベリー花粉の動態を解析すると、感染ラズベリー花粉がトレニア柱頭上で発芽

し、その花粉管が柱頭内へ侵入している様子が観察された。さらに、感染ラズベリー花粉の花粉管は、トレニア花柱1 cm未満で伸長を停止していることがわかった。一方、発芽能を喪失させた感染ラズベリー花粉を健全トレニアに人工授粉した場合、母体への水平伝染は確認できなかった。これらのことから、感染ラズベリーの花粉管により、トレニア柱頭から花柱1 cm未満でRBDV感染が成立し、母体へと感染が拡大すると考えられた。そこで、Tissue blot hybridizationにより解析すると、柱頭にウイルスが感染し、花柱へウイルス感染を拡大している様子が確認できた。さらに、感染ラズベリーの花粉管の先端にウイルスが蓄積していることが分かった。これらの結果から、感染ラズベリー花粉は、トレニア柱頭上で発芽し、ウイルスを蓄積した花粉管がトレニア柱頭へ侵入することで、その柱頭にウイルスが感染し、その後ウイルスは花柱を経て母体本体へと感染を進行させることを世界で初めて示した。

(2) RBDV の花粉による垂直伝染メカニズムの研究結果

花粉による水平伝染の起点である柱頭からのRBDVの移行をブロックしつつ、花粉管を胚のうへと侵入させ、それによる受精で種子を形成させることに成功した。この実験系を用い、RBDV感染花粉由来の花粉管を胚のうへと侵入させ、受精により形成された種子を、ウイルス検定した。その結果、これらの種子からウイルスが検出された。このことから、感染花粉から発芽した花粉管が受精のために胚のうへと侵入する際、ウイルスが胚のうへと持ち込まれ、種子にウイルスが感染したことを世界で初めて示した。さらに、感染花粉の授粉により形成された未熟種子にウイルスが検出されるが、その未熟種子と胚柄を介してつながっている胎座には、ウイルスが検出されなかった。このことから、ウイルスは、感染している未熟種子から胎座へと移行しないことが示唆された。つまり、花粉による垂直伝染から花粉による水平伝染へといった連続性はなく、両者は独立した感染経路を持っていると示唆された。以上のことより、RBDVの花粉による水平伝染および花粉による垂直伝染は、両者ともに感染花粉がその開始点であるが、それぞれ固有のメカニズムにより、当代(水平)および次世代(垂直)の植物へと花粉を介してウイルス伝染することが示唆された。

(3) GORV の花粉による水平伝染メカニズムの研

究成果

GORVに感染したリンドウおよび*N. benthamiana*の花粉を、それぞれ健全なリンドウおよび*N. benthamiana*の柱頭に人工授粉すると、GORVが授粉された植物に全身感染することを明らかにした。次に、ヘテロな植物種の組み合わせによる人工授粉で水平伝搬試験を行った。その結果、感染リンドウ花粉を健全*N. benthamiana*の柱頭に授粉すると、*N. benthamiana*へのウイルス感染が検出されたが、感染*N. benthamiana*花粉を健全リンドウの柱頭に授粉してもリンドウへのウイルス感染は検出されなかった。花粉の柱頭・花柱での動態を解析すると、感染リンドウ花粉は*N. benthamiana*柱頭上で発芽し、その花粉管が柱頭・花柱に侵入している様子が観察された。さらに、感染リンドウ花粉の花粉管が*N. benthamiana*の柱頭・花柱に侵入する部位でウイルス感染していることが示唆された。一方、感染*N. benthamiana*花粉は、リンドウ柱頭上でほとんど発芽することはなく、リンドウの柱頭・花柱でのウイルス感染も検出されなかった。このことから、GORVの花粉による水平伝染は、感染花粉から発芽した花粉管が柱頭・花柱に侵入することで、ウイルス感染が柱頭・花柱で成立することが分かった。GORVはビルガウイルス科ゴラウイルス属に所属する棒状ウイルスであり、RBDVはイダエオウイルスに所属する球形ウイルスであるが、両ウイルスは共通のメカニズムで花粉による水平伝染を成立させていることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計6件)

Masamichi Isogai, Yukie Kamata, Syunpei Ando, Misaki Kamata, Asuka Shirakawa, Ken-Taro Sekine, Nobuyuki Yoshikawa. Horizontal pollen transmission of Gentian ovary ring-spot virus is initiated during penetration of the stigma and style by infected pollen tubes. *Virology*, 査読有, 503, 2017, 6-11.

DOI: 10.1016/j.virol.2017.01.002

Masamichi Isogai, Yurie Matsuhashi, Kenshu Suzuki, Satoru Yashima, Manabu Watanabe, Nobuyuki Yoshikawa. Occurrence of blueberry mosaic associated virus involved in blueberry mosaic disease in Japan. *Journal of General Plant Pathology*, 査読有, 82, 2016, 177-179. DOI: 10.1007/s10327-016-0653-z

Takuya Shimura, Tetu Yoshida, Nobuyuki Yoshikawa, Masamichi Isogai. Development of a Raspberry bushy dwarf virus-based plant virus vector

for virus-induced gene silencing. PSJ Plant Virus Disease Workshop Report, 査読有, 12, 2016, 54-60.

Masamichi Isogai, Kenshu Suzuki, Satoru Yashima, Manabu Watanabe, Nobuyuki Yoshikawa. Blueberry mosaic associated virus detected in a highbush blueberry tree with mosaic symptoms in Japan. PSJ Plant Virus Disease Workshop Report, 査読有, 12, 2016, 61-65.

Masamichi Isogai, Tetu Yoshida, Takuya Shimura, Nobuyuki Yoshikawa. Pollen tubes introduce Raspberry bushy dwarf virus into embryo sacs during fertilization processes. Virology, 査読有, 484, 2015, 341-345. DOI: 10.1016/j.virol.2015.06.028

Masamichi Isogai, Tetu Yoshida, Chiaki Nakanowatari, Nobuyuki Yoshikawa. Penetration of pollen tubes with accumulated Raspberry bushy dwarf virus into stigmas is involved in initial infection of maternal tissue and horizontal transmission. Virology, 査読有, 452-453, 2014, 247-253. DOI: 10.1016/j.virol.2014.02.001

〔学会発表〕(計 26 件)

鎌田和樹, 山岸紀子, 磯貝雅道, 吉川信幸. リンゴ小球形潜在ウイルス(ALSV)ベクターで世代促進したリンゴ由来の広大実生からは ALSV は検出されない. 日本植物病理学会大会, 20170426-20170428, アイーナ(岩手県・盛岡市)

松平昂士, 志村拓哉, 吉川信幸, 磯貝雅道. 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. 日本植物病理学会大会, 20170426-20170428, アイーナ(岩手県・盛岡市)

野田浩気, 笠島一郎, 磯貝雅道, 遠藤真咲, 土岐精一, 夏秋知英, 吉川信幸. メガヌクレアーゼ □-Sce□ を発現する植物ウイルスベクターを用いた標的遺伝子への変異誘導. 日本植物病理学会東北部会, 20160929-20160930, コラッセふくしま(福島県・福島市)

前田清明, 磯貝雅道, 山下裕之, 吉川信幸. 高温処理による感染ブドウ樹でのリンゴ小球形潜在ウイルスの増殖と全身移行の阻害. 日本植物病理学会東北部会, 20160929-20160930, コラッセふくしま(福島県・福島市)

菊池哲平, 笠島一郎, 山岸紀子, 磯貝雅道, 吉川信幸. DNA マーカーを利用したリンゴ品種の病害抵抗性及び果実形質の評価. 日本植物病理学会東北部会, 20160929-20160930, コラッセふくしま(福島県・福島市)

磯貝雅道, 鎌田由希恵, 安藤俊平, 関根健太郎, 吉川信幸. リンドウ子房輪紋ウイルスの花粉によ

る垂直伝染の解析. 日本植物病理学会東北部会, 20160929-20160930, コラッセふくしま(福島県・福島市)

磯貝雅道, 鎌田由希恵, 安藤俊平, 白川明日佳, 関根健太郎, 吉川信幸. 花粉管の柱頭への侵入は リンドウ子房輪紋ウイルスの花粉による水平伝染に 関与している. 日本植物病理学会大会, 20160321-20160323, 岡山コンベンションセンター (岡山県・岡山市)

磯貝雅道, 吉田哲, 志村拓哉, 吉川信幸. 花粉管によるラズベリー黄化ウイルスの胚のうへの導入. 日本植物病理学会東北部会, 20150928-20150929, 東北大学(宮城県・仙台市)

野田浩気, 山岸紀子, 八重樫元, 磯貝雅道, 伊藤伝, 吉川信幸. リンゴモザイク病罹病樹での葉のモザイク症状とリンゴえそモザイクウイルス (ApNMV) 分布の相関. 日本植物病理学会東北部会, 20150928-20150929, 東北大学(宮城県・仙台市)

前田清明, 川崎未央子, 佐藤誉子, 門馬孝之, 李春江, 磯貝雅道, 中島育子, 山下裕之, 吉川信幸. リンゴ小球形潜在ウイルス(ALSV)ベクター技術を利用したブドウの開花促進. 日本植物病理学会東北部会, 20150928-20150929, 東北大学(宮城県・仙台市)

Masamichi Isogai, Kenshu Suzuki, Satoru Yashima, Manabu Watanabe, Nobuyuki Yoshikawa. Blueberry mosaic associated virus detected in a highbush blueberry tree with mosaic symptoms in Japan. 23rd International Conference on Viruses and Other Graft Transmissible Diseases of Fruit Crops, 20150608-20150612, Aiina, Morioka (Japan)

Takuya Shimura, Tetu Yoshida, Nobuyuki Yoshikawa, Masamichi Isogai. Development of a Raspberry bushy dwarf virus-based plant virus vector for virus-induced gene silencing. 23rd International Conference on Viruses and Other Graft Transmissible Diseases of Fruit Crops, 20150608-20150612, Morioka (Japan)

Nobuyuki Yoshikawa, Saki Oyamada, Hajime Yaegashi, Shiniti Goto, Noriko Yamagishi, Masamichi Isogai, Tutae Ito. Multiple virus infection in cherry trees affected by a bud blight disease. 23rd International Conference on Viruses and Other Graft Transmissible Diseases of Fruit Crops, 20150608-20150612, Morioka (Japan)

Saki Oyamada, Hajime Yaegashi, Shiniti Goto, Noriko Yamagishi, Masamichi Isogai, Tutae Ito, Nobuyuki Yoshikawa. Cherry virus B, a new virus classified into genus Foveavirus found in a sweet cherry

tree. 23rd International Conference on Viruses and Other Graft Transmissible Diseases of Fruit Crops, 20150608-20150612, Morioka (Japan)

渡邊 学, 磯貝雅道, 村上政伸, 佐川 了. Blueberry latent spherical virus および blueberry virus A に感染したブルーベリー樹の生育. 園芸学会平成 27 年度春季大会, 20150328- 20150329, 千葉大学(千葉県・千葉市)

八島理, 渡邊学, 吉川信幸, 磯貝雅道. ブルーベリー随伴ウイルスの日本分離株の全塩基配列. 日本植物病理学会大会, 20150328- 20150331, 明治大学駿河台キャンパス(東京都・千代田区)

前田清明, 山岸紀子, 李春江, 磯貝雅道, 五十鈴川寛司, 山下裕之, 田尾龍太郎, 吉川信幸. リンゴ小球形潜在ウイルス(ALSV)ベクターによるオウトウおよびブドウでの外来遺伝子の発現. 日本植物病理学会大会, 20150328- 20150331, 明治大学駿河台キャンパス(東京都・千代田区)

Masamichi Isogai. Horizontal transmission of Raspberry bushy dwarf virus by pollen. 23th Annual Meeting & International Symposium on Plant Virus Diseases. 2014.10.22, Busan (Korea)

磯貝雅道, 鈴木乾修, 八島理, 渡邊学, 吉川信幸. 日本での Blueberry mosaic associated virus の検出. 日本植物病理学会東北部会, 2014.9.25-2014.9.26, アイーナ(岩手県・盛岡市)

志村拓哉, 吉田哲, 山岸紀子, 吉川信幸, 磯貝雅道. ラズベリー黄化ウイルスの ORF1b にコードされる 12kDa タンパク質の機能解析. 日本植物病理学会東北部会, 2014.9.25- 2014.9.26, アイーナ(岩手県・盛岡市)

21 前田清明, 八木皓平, 山岸紀子, 李春江, 磯貝雅道, 五十鈴川寛司, 山下裕之, 田尾龍太郎, 吉川信幸. リンゴ小球形潜在ウイルス(ALSV)のオウトウ, モモおよびブドウ実生への感染と VIGS の誘導. 日本植物病理学会東北部会, 2014.9.25-2014.9.26, アイーナ(岩手県・盛岡市)

22 野田浩気, 山岸紀子, 八重樫元, 磯貝雅道, 伊藤伝, 吉川信幸. 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)(仮称)について. 日本植物病理学会東北部会, 2014.9.25-2014.9.26, アイーナ(岩手県・盛岡市)

23 Masamichi Isogai, Tetu Yoshida, Nobuyuki Yoshikawa, Chiaki Nakanowatari. Penetration of pollen tubes with accumulated RBDV into stigma is essential in causing the first viral infection in the stigma to lead to systemic infection. International Union of

Microbiological Societies Congresses, 2014.7.27-2014.8.1, Montreal (Canada)

24 吉田哲, 吉川信幸, 磯貝雅道. ラズベリー黄化ウイルスの花粉による水平伝染の初期感染部位の解析. 日本植物病理学会大会, 2014.6.2-2014.6.4, 札幌コンベンションセンター(北海道・札幌市)

25 志村拓哉, 藤原早希, 山岸紀子, 吉川信幸, 磯貝雅道. ラズベリー黄化ウイルスを基にした VIGS 誘導能を持つウイルスベクターの作製. 日本植物病理学会大会, 2014.6.2-2014.6.4, 札幌コンベンションセンター(北海道・札幌市)

26 吉川信幸, 小山田早希, 八重樫元, 山岸紀子, 後藤新一, 磯貝雅道, 伊藤伝. パイローム解析で明らかとなった芽枯病罹病オウトウ樹の多重ウイルス感染. 日本植物病理学会大会, 2014.6.2-2014.6.4, 札幌コンベンションセンター(北海道・札幌市)

〔図書〕(計4件)

磯貝雅道, 一般社団法人 日本植物防疫協会, ひと目でわかる果樹の病害虫-第三巻(改訂第二版)坂本泰輔・工藤晟 編, 2015, 277(243, 245, 254, 255)

磯貝雅道, 朝倉書店, 植物ウイルス大辞典 日比忠明・大木理 監修, 2015, 944(303, 304, 305, 336, 338, 339, 439, 440, 519)

磯貝雅道, 全国農村教育協会, CDROM 版病害最新情報 日本植物病害大辞典, 2015, 863(1)

磯貝雅道, 日本植物病理学会東北部会創立 50 周年記念誌刊行会, 写真で見る東北の病害 診断ハンドブック: ブルーベリー赤色輪点病, ラズベリー黄化病, 2014, 64(52, 54)

〔その他〕

ホームページ等

How viruses hitch a ride on pollen to infect plants. <http://www.virologyhighlights.com/how-viruses-hitch-a-ride-on-pollen-to-infect-plants/>

植物的性病?!

<http://pansci.asia/archives/58284>

6. 研究組織

(1)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