

令和 3 年 4 月 21 日現在

機関番号：11101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18H02201

研究課題名(和文) ウイロイド感染に対する基礎的自然免疫・防御反応と矮化・壊疽病徴発現機構の解析

研究課題名(英文) Analysis of defense responses based on innate immunity against viroid infection and mechanism to develop dwarfing and necrosis

研究代表者

佐野 輝男 (Sano, Teruo)

弘前大学・農学生命科学部・教授

研究者番号：30142699

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,300,000円

研究成果の概要(和文)：ジャガイモやせいもウイロイド強毒株感染トマトでは、ストレス応答性マイクロRNA (miR398とmiR398a-3p) が過剰に誘導され、活性酸素種(ROS)消去酵素をコードするSOD遺伝子の発現が低下し、その結果、ROS消去機能の不全によるROSの過剰蓄積のため壊死を伴う重度の病的症状が発症していた。弱毒株の42と64番塩基は弱毒性のキー塩基であり、43・310・311/312番塩基と協調し、低く安定な増殖に貢献していた。弱毒株は、病原性関連タンパク質1b1など、過剰な防御応答を誘発しなかった。ウイロイド病に特徴的な矮化・葉巻に関連する新規2-オキソグルタル酸オキシゲナーゼ遺伝子を同定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ウイロイドは小環状一本鎖RNA病原体で、侵入した宿主細胞中で自己増殖し、矮化・葉巻・壊疽・塊茎/果実の肥大異常や着色障害を起こす。ジャガイモ、トマト、キク、ココヤシ、ホップ、リンゴなど様々な農作物に経済的被害を与えている。治療薬はなく、診断により早期に発見して除去する以外に有効な防除方法がない。本研究では、ウイロイド感染に対する宿主の基礎的自然免疫で生じる抵抗性反応、特に活性酸素種の発生機構とそれがウイロイド特有の病徴発現に至る分子機構の一端を明らかにした。これらの研究成果は、植物本来の自然免疫を活用した実用的ウイロイド防御戦略の開発に貢献するものである。

研究成果の概要(英文)：In tomato plants infected with the virulent strain of potato spindle tuber viroid (PSTVd), stress-responsive microRNAs (miR398 and miR398a-3p) were excessively induced, and the expression of SOD genes encoding reactive oxygen species (ROS) scavenging enzymes were down-regulated, which caused loss of normal ROS scavenging function resulted in excessive accumulation of ROS, leading to severe pathological symptoms accompanied by necrosis. The nucleotides at position 42 and 64 of the attenuated strain of PSTVd were key nucleotides for the attenuation, and in cooperation with the nucleotides 43, 310, and 311/312, contributed to its low and stable accumulation. The attenuated strain did not elicit an excessive defense responses, such as pathogenesis-related protein 1b1. A novel 2-oxoglutarate Fe (II)-dependent oxygenase gene associated with dwarfing and leaf malformation characteristic of viroid disease was identified in tomato plant (*Solanum lycopersicum*).

研究分野：植物保護科学関連

キーワード：ウイロイド 自然免疫 矮化 壊疽 活性酸素種(ROS) miR398 miR398a-3p 2-オキソグルタル酸ジ
オキシゲナーゼ

1. 研究開始当初の背景

ウイルスは最小の感染因子で、生物学史上最初に発見された小環状 1 本鎖 RNA である。宿主特異性があり、侵入した宿主細胞中で自己増殖し、様々な農作物に矮化・葉巻・壊疽・塊茎/果実の肥大異常や着色障害を起こす。タンパク質情報を持たない 246~401 ヌクレオチドの非コード RNA が自律複製能、宿主特異性、病原性など多様な生物学的活性を示すのは、ウイルス RNA 中の塩基配列や構造モチーフが様々な宿主因子(転写因子や複製酵素など)と相互作用するためと考えられている。近年ヒトを含む様々な生物から小環状 1 本鎖 RNA が検出されアルツハイマーなどの病気との関連性に興味を持たれているが、独自の遺伝子を有して自律複製し病原性を発揮する点でウイルスは特異な存在である。

すなわち、なぜタンパク質を持たない RNA が宿主の基本的自然免疫を活性化させ RNA サイレンシングを始めとする宿主の防御反応を誘導するのか? そしてその結果としてどのようにウイルス感染に特有の矮化・葉巻・壊疽病徴を発現するのかという根本的な命題を解明し、植物の持つ自然免疫を活用した実用的なウイルス防御戦略の開発につなげることが本研究の有する科学的な意義である。

さらに、ウイルスは野菜、花卉、観葉植物、果樹など様々な植物から 2 科 8 属 39 種が分離されている。元々病原体として発見されたが、無病徴感染するケースも多く、保毒植物が伝染源となり感受性の高い作物に種の壁を越えて伝染し、新病害の発生・流行につながる危険性が指摘されている(Kawaguchi-Ito et al, 2009; Sano 2013, Tsushima et al, 2011)。とりわけ、1990 年代末以降、野菜・花卉・観葉植物類の汚染種を介したポスビウイルスの世界的な流行が国際・国内植物検疫上の懸案事項となっており、喫緊の対応が求められている。本研究は、このような栽培現場の重要課題を最先端の研究に基づいて解決する点に学術上及び実用上の意義と特色がある。

2. 研究の目的

本研究では、まずウイルス感染に対する宿主の基礎的自然免疫で生じる抵抗性反応、特に活性酸素種の発生機構とそれが病徴発現 - 特に壊疽病徴 - に及ぼす影響を明らかにする。また、ウイルス防御の最前線に位置する RNA サイレンシングで大量に蓄積するウイルス特異的 small RNA の病原性作用を分析し、特に矮化・葉巻病徴発現に関与する標的宿主遺伝子を明らかにする。得られる結果を基に、ウイルス感染に対抗する宿主の自然免疫と防御反応が防御関連遺伝子群など宿主遺伝子発現ネットワークを介して植物ホルモン生成関連遺伝子群に及ぼす直接的・間接的影響を総合的に評価し、非コード RNA が植物に矮化・葉巻・壊疽などの病徴を引き起こす病原性分子機構を解明し、植物本来の自然免疫を活用した実用的なウイルス防御戦略の開発につなげることを目的とする。

3. 研究の方法

課題 I. ウイルス感染に対する宿主の基礎的自然免疫機構 - ウイルス感染で誘導される活性酸素種 (ROS) 発生機構と壊疽病徴発現機構の解析

【概略と目的】これまでの報告者の研究から、RNA サイレンシングのキー因子 DCL2 と DCL4 をノックダウンしたトマト (MoneyMaker; 以下 DCL2&4i-MoneyMaker) は、PSTVd 罹病性に变化し、激しい矮化・葉巻と致死性の全身壊疽を生じることが明らかになった(研究開始時未発表データ)。DCL2&4i-MoneyMaker では ROS のスカベンジャー・SOD のシャペロン CCS1 が誘導され、SOD や CCS1 発現を負に制御する miR398 と miR398a-3p が異常に活性化されていたことから、ROS の発生を制御出来ないと全身壊疽が発生するという可能性が示唆される。ROS 発生は自然免疫の指標となる防御反応である。ウイルス感染で誘導される宿主自然免疫とその結果発動される防御反応がウイルス感染に特徴的な壊疽病徴発現を引き起こす分子機構を分析する。

課題 II. ウイルス感染に特徴的な矮化・葉巻病徴発現に関わる宿主側遺伝子の解析 - ウイルス由来 small RNA (PSTVd-sRNA) とその標的候補遺伝子の特定並びに発現解析

II - 1. PSTVd-sRNA-44M とその標的候補遺伝子 - ユビキチンリガーゼ遺伝子の解析

【概略と目的】PSTVd-強毒株と-弱毒株間キメラの病原性解析から、第 42 番塩基が弱毒性を制御することがわかってきた。この第 42 番塩基を含む領域からは PSTVd-sRNA-44M (21-nt) が多数生成しており、これと相補性の高い配列がユビキチンリガーゼ遺伝子(生体内でタンパク質の分解・品質管理に重要な役割を果たすユビキチン - プロテアソーム系の遺伝子)中に存在することが判明した。PSTVd-sRNA-44M が RNA サイレンシングを介してユビキチンリガーゼの転写量を抑制し、ウイルス特有の葉巻・矮化など全身性生育抑制が起こる可能性を検証する。ウイルスの small RNA が RNA サイレンシング経路に取り込まれて相補配列を有する宿主遺伝子発現を抑制する可能性はこれまで数例報告されているが、ユビキチン - プロテアソーム系に関連するものは例がない。

II - 2. PSTVd-sRNA-118P とその標的候補遺伝子 - ジベレリン β 水酸化酵素遺伝子の解析

【概略と目的】申請者は、PSTVd 感染トマトのマイクロアレイ解析から、ジベレリン β 水酸化酵素遺伝子(仮称: 以下 GibβH と略)の発現量が PSTVd 感染で低下し、その遺伝子配列中に PSTVd-sRNA-118P (21 nt)と高い相補性を示す配列が存在することを報告した。申請者らはこの結果を踏まえ、科研費・基盤 B (佐野、平成 27~29 年)で、PSTVd-sRNA-118P が RNA サイレンシング経路に取り込まれ GibβH 遺伝子発現を抑制する可能性を分析するため、RNA 干渉で GibβH 遺伝子発現をノックダウンした形質転換トマト(品

種; Moneymaker、以下 GibβHiMoneymaker) T3 ホモ世代を作出した。栽培試験の結果、GibβHi-Moneymaker は野生型より徒長し、着果量が少なく、果実の成熟が遅れた。また、PSTVd を感染させると激しい矮化と葉巻症状が現れ、ほとんど病徴が出ない野生型と対照的な反応を示した。すなわち、GibβH 遺伝子のノックダウンにより、GibβHi-Moneymaker はジベレリン生合成系に変化が生じ、ウイルス感染に対して罹病性(矮化・葉巻)に変化したことが示されたのである(佐野、研究開始時未発表データ)。以上の知見を踏まえて、PSTVds-RNA-118P が GibβH 遺伝子発現を抑制しウイルス感染に特徴的な矮化・葉巻症状が発現する可能性を検討する。

4. 研究成果

課題 I. ウィロイド感染に対する宿主の基礎的自然免疫機構 - ウィロイド感染で誘導される活性酸素種(ROS)発生機構と壞疽病徴発現機構の解析

RNAサイレンシングのキー因子ダイサー様リボヌクレアーゼDCL2と4をRNA干渉でノックダウンしたトマト(品種; Moneymaker) DCL2&4i-72E(以下72E系統)にPSTVdを感染させると激しい矮化・葉巻と全身の壞疽症状が生じた。

この72E系統では、ストレス応答性のマイクロRNA(miR398とmiR398a-3p)が活性化されていた。これらのマイクロRNAは活性酸素種(ROS)の消去酵素スーパーオキシドジスムターゼ(SOD)とSODに銅を運搬するシャペロンタンパク質CCS1の発現を負に制御する機能がある。ROS発生は植物自然免疫の指標となる防御反応なので、植物自然免疫による防御反応によって、ウィロイド感染に特徴的な壞疽病徴の発現に至る分子機構をさらに分析した。すなわち、PSTVdを72E系統に感染させ、葉巻・壞疽症状の強さを観察し、ROS発生量、自然免疫関連宿主遺伝子とmiR398及びmiR398a-3p、及びSOD遺伝子(SISOD1, SISOD2, SISOD3, SISOD4)の発現レベルを分析した。

その結果、72E系統では対照区には見られない激しい黄化・壞疽が現れ(右図)壞疽発症葉では、異常に高いROS産生とmiR398及びmiR398a-3pの発現がみられた。一方、細胞質局在性のSOD1(SISOD1, 2)とCCS1(SISOD4)及び葉緑体局在性のSOD2(SISOD3)の発現レベルは低下していた。また、72E系統では対照区に比べPSTVdの初期蓄積量が増加していた。すなわち、PSTVd感染72E系統では、PSTVd感染に対する自然免疫による防御反応で多量の活性酸素種(ROS)が発生するが、その一方で、PSTVd感染によりストレス応答性マイクロRNAであるmiR398とmiR398a-3pの発現量が高いレベルに維持されていることが明らかになった。miR398とmiR398a-3pはROSの消去酵素SOD遺伝子の発現を負に制御していることから、72E植物はPSTVd感染で生じる有害なROSを消去することができなくなり、結果として激しい壞疽症状が生じると結論付けた。

対照区 / PSTVd



軽い葉巻

DCL2/4i-72E / PSTVd



黄化・莖壞疽

以上の結果は、ウィロイドに対する宿主の防御機構の最前線で機能しているRNAサイレンシングのキー因子であるDCL2とDCL4をノックダウンした形質転換トマト系統で観察された現象である。一方、トマトはPSTVdに最も感受性の高い農作物で、感受性品種は重度の矮化、葉巻、壞疽病徴を生じ、重大な経済的損失が発生する。今のところPSTVdが感染しない免疫性のトマト品種は知られていないが、品種によりPSTVd感受性は大きく異なり、例えば品種Rutgersには重度の矮化、葉巻、壞疽症状が発症するが、品種Moneymakerには軽い葉巻のみみられる程度で極めて軽症で推移する。この栽培品種に見られる病徴の重症度の違いにも、72E系統で観察されたものと同様の機構が関与しているのではないかと考え、感受性品種Rutgersと耐性品種Moneymakerに、病原性の異なる3種類のPSTVd系統、RG1S(致死)、I(強毒)、D(弱毒)を感染させ、病徴の重症度、ROS産生、miR398/miR398a-3p発現量、SODs発現量、及びDCLs発現量を比較分析した。

その結果、PSTVd感受性トマト品種Rutgersに致死株及び強毒株が感染すると、全身の発育不全、葉の奇形、葉脈壞死が顕れ、ROSの急速な増加と、ストレス応答性microRNAであるmiR398とmiR398a-3pの異常に高い発現がみられた。重症度、PSTVdの蓄積量、miR398とR398a-3pの発現レベル、高レベルのROS産生は、PSTVd株の病原性と正の相関があった。対照的に、ROS消去酵素SODをコードする遺伝子SISOD4(細胞質局在性)とSISOD3(葉緑体局在性)の発現は有意に低下していた。一方、PSTVd耐性(ほぼ無症候性)トマト品種Moneymakerでは、PSTVd強毒株に感染しても、ROS産生とmiR398/miR398a-3pの発現量は未接種と同程度或はそれより低く、ほぼ全てのSOD遺伝子の発現が上昇していた。

以上の結果は、PSTVd感受性トマト栽培品種Rutgersでは、PSTVdの致死株や強毒株の感染により、miR398とmiR398a-3pの過剰発現が誘導され、SOD遺伝子の発現抑制が起こることを示唆している。すなわち、正常なROS消去機能が損なわれ、過剰なROSの蓄積により、壞死を伴う重度の病理学的症状が引き起こされたものと考えられた。それに対して、PSTVd耐性トマト栽培品種Moneymakerでは、PSTVdの致死株や強毒株に感染しても、過剰なROSの産生やmiR398/miR398a-3pの発現上昇は見られず、一方、SODの発現は上昇していた。すなわち、正常なROS消去機能が維持されているものと考えられた。

RutgersとMoneymakerのこの違いは何によりもたらされているのか? ウィロイド感染防御の最前線で機能している7種類のトマトDCL遺伝子(SIDCL1, 2a, 2b, 2c, 2d, 3, 4)の発現レベルを分析した結果、各DCL遺伝子はPSTVd感染によって上昇或は下降制御されたが、パターンはRutgersとMoneymakerで異なっていた。特に、接種10日目の時点において、耐性品種MoneymakerではPSTVdの蓄積レベルがRutgersより有意に低かったにもかかわらず、SIDCL4が顕著に上昇していたことが注目された。一方、感受性品種Rutgersでは、PSTVdの蓄積が検出レベルに達し、初期症状が顕れはじめた時期に、漸くSIDCL4遺伝子がSIDCL1およびSIDCL2s遺伝子とともに上昇してきた。PSTVd感染に応答したDCL遺伝子発現の違いがPSTVdに対する耐性にどのように影響するかをさらに調査する必要がある。

宿主の防御機構に関しては、この他に、RNAポリメラーゼ6(RDR6)とDCL3がウィロイド防御に果た

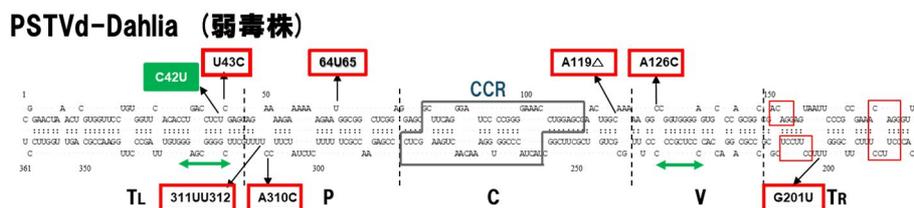
す役割の検討を行った。RNA 干渉で SIRDR6 発現を抑制した RDR6i-Moneymaker を作出し、PSTVd の強毒株と致死株を感染させて感受性の変化を分析した。その結果、SIRDR6 の抑制は PSTVd に対する感受性を変化させず、耐性のままで、RDR6i-Moneymaker は軽い葉巻症状を示すのみであった。また、*in situ* ハイブリダイゼーションでシュート頂分裂組織 (SAM) を観察した結果、SIRDR6 の発現を抑制すると PSTVd は SAM 基底部まで侵入できるようになるが、頂端部分までは侵入できないことが観察された。*N. benthamiana* では、RDR6 をノックダウンすると PSTVd が SAM の頂端まで侵入できるようになると報告されている (Di Serio et al, 2010)。トマトでは、RDR6 以外の RDR (例えば RDR1) も SAM へのウイルスの侵入阻止に関与していることが示唆された。

また、DCL2 と 4 以外の DCL の機能を明らかにするために、ゲノム編集による DCL ノックアウトトマトの作出を継続し、*dcl3* 変異体の作成に成功した。*dcl3* 変異体トマト (Moneymaker) に PSTVd-I (強毒) を感染させたが、感受性の変化は見られず、耐性のままであった。一方、*dcl2* 変異体も作出したが、現時点では稔性が悪く、引き続き採種を試みている。

課題 II . ウィロイド感染に特徴的な矮化・葉巻病発現に関わる宿主側遺伝子の解析 - ウィロイド由来 small RNA (PSTVd-sRNA) とその標的候補遺伝子の特定並びに発現解析

II - 1 . PSTVd-sRNA-44M とその標的候補遺伝子 - コピキチンリガーゼ遺伝子の解析

ダリアから分離した PSTVd-Dahlia (PSTVd-D) 株は、トマト品種 Rutgers に非常に軽度の症状を引き起こし、重度の症状を引き起こす強毒株 (PSTVd-I) に比べ、9 箇所の塩基が異なり、そのうち 6 つの変異は病原性 (P) ドメインと左端 (TL) ドメイン内に位置する (下図)。まず、これらの変異と弱毒性の関係を評価するために、両株間で各変異を交換して 10 種類の点変異体を作成し、病原性と蓄積量を分析した。その結果、PSTVd-I (強毒) の 42 番と 64 番塩基を PSTVd-D (弱毒) 型に変えると弱毒化することが明らかになり、特に、42 番塩基の変異 (下図緑白抜き) は、病原性と蓄積量を有意に減少させた。また、各点変異体の感染性と遺伝的安定性の分析から、42 番や 64 番の塩基の変異は、それ以外の 43 番、310 番、311/312 番の塩基の変異とも協調していることが示唆された。42 番と 64 番以外の 4 か所の変異は、単独では病原性に影響を与えなかったが、安定な複製・増殖を介して、弱毒株の存続に貢献しているものと考えられた。



上記の結果より、PSTVd の 42 番塩基は、弱毒性のキー塩基であり、強毒株 PSTVd-I の 42 番塩基 (C) を弱毒株型 (U) に変えると弱毒化することが明らかになった。そこで、この 42 番塩基を含み、PSTVd の病原性 (P) ドメインから大量に生成するウィロイド特異的 small RNA である PSTVd-sRNA-44M が、それと相補性の高い配列を含むコピキチンリガーゼ遺伝子 (*UBR7*) を転写後発現調節で抑制する可能性を検証した。因みに、42 番塩基の強毒株型 (C) から弱毒株型 (U) への変化は、PSTVd-sRNA-44M と *UBR7* 転写物ハイブリッドの安定性に影響を与え、弱毒株型では安定性が低下する。まず、amiRNA 法で PSTVd-sRNA-44M を発現するアグロバクテリウムとその仮定の標的配列であるコピキチンリガーゼ遺伝子配列を含むアグロバクテリウムを構築・作成し、アグロインフィルトレーション法により *N. benthamiana* に共接種し、コピキチンリガーゼ遺伝子転写物の発現抑制が起こるか否かを分析した。その結果、PSTVd-sRNA-44M とコピキチンリガーゼ遺伝子転写物との相互作用は観察されなかった。また、PSTVd-I を感受性トマト Rutgers に感染させ、接種後 1 週目から 1 週間おきに 4 週目まで、経時的に感染トマト葉中の *UBR7* の転写量をノーザンハイブリダイゼーションで分析したが、感染の有無そして接種後の時期に関わらず、PSTVd 感染区の *UBR7* の転写量は未接種区と比べて変化しなかった。すなわち、いずれの実験結果からも仮説を支持する証拠は得られなかった。

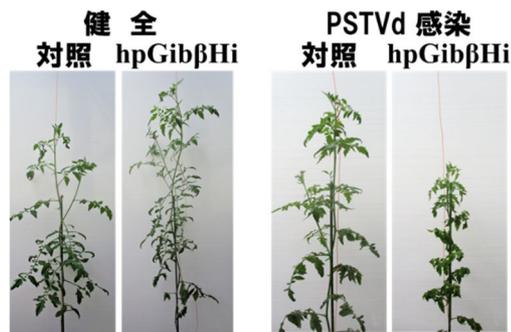
以上、42 番塩基を含む PSTVd 由来の small RNA である PSTVd-sRNA-44M が、コピキチンリガーゼ遺伝子転写物を転写後発現調節で抑制することにより PSTVd の病原性の違いが生じるという作業仮説は否定されたが、この実験系を利用してさらにその他の要因について分析を行った。すなわち、強毒株 (PSTVd-I) とその 42 番変異体 (PSTVd-I-C42U) を感染させたトマト品種 Rutgers から経時的 (接種後 1 週目から 1 週間おきに 4 週目まで) 全 RNA を抽出し、これまで、ウィロイド感染で発現量が変動することが報告されている遺伝子である CalS11-like (カロース合成酵素) CHS (カルコン合成酵素) PR1b1 (病原性関連タンパク質) 及び Exp (細胞伸長因子エクスパンシン) について、RT-qPCR で発現レベルを経時的に解析した。その結果、PSTVd-I と PSTVd-I-C42U 間で、PR1b1 と CHS 遺伝子の発現量に有意な違いが観察された。PR1b1 は発病前の接種後 2 週目頃から強毒性の PSTVd-I でより強く発現が誘導され、CHS は発病が認められた接種後 3 週目頃から強毒性の PSTVd-I で有意に発現量が低下した。宿主の自然免疫活性化の指標である PR1 の遺伝子発現が、病原性の弱い PSTVd-D では強毒性の PSTVd-I でより低いレベルでしか誘導されなかったことから、PSTVd-D (弱毒) に感染した植物では、上述の 42 番塩基を含む 6 か所の塩基変異により弱毒株の蓄積量が低く保たれ、その結果、過剰な宿主防御応答を誘発しないため、病気の症状が減衰するものと考えられた。

本研究で解析した GibβH 遺伝子 (ID SGN-U578331) は、PSTV に感染したトマト品種 Rutgers と Moneymaker 及び PSTVd-small RNA (以下 PSTVd-sRNA) を構成的に発現している形質転換トマト Moneymaker の大規模 small RNA シーケンスおよびマイクロアレイの分析によって、PSTVd 感染で病徴発現に関連する可能性がある遺伝子として見出されたものである。つまり、マイクロアレイ分析により、この遺伝子の発現レベルが上記の 3 つのトマト試料で共通して、PSTVd 感染および症状発現後に有意に減少したことが示された。また、パイオインフォマティクス分析により、この遺伝子には、PSTVd の可変領域の上部に由来する PSTVd-sRNA-118P と高い相補性を有する配列が含まれていることが明らかになった。PSTVd-sRNA-118P は PSTVd のプラス鎖の 118 番塩基から 138 番塩基から生成する 21-ヌクレオチドの small RNA (5'-AAAAAAGGACGGTGGGGAGTG-3') である。

まず、GibβH 遺伝子の塩基配列を特定するため、DNA データベースを検索した。その結果、GibβH はトマト第 8 染色体のマイナス鎖 (遺伝子名; Solyc08g006760.3) に座する 4 つのエクソンで構成される遺伝子で、1,238 ヌクレオチド (アクセッション番号; XM_004244474) の mRNA が転写され、353 個のアミノ酸で構成されるタンパク質をコードすることが予測された。この遺伝子は、2-オキシグルタル酸/Fe(II)依存オキシゲナーゼスーパーファミリーに属する *DOWNY MILDEW RESISTANCE 6* (DMR6; van Damme et al., 2008) と高い相同性があり、未解析の新規遺伝子と考えられた。類似の遺伝子として、トマトでは *SIDMR6-1* (Solc03g080190) と *SIDMR6-2* (Solc06g073080) という 2 つの *DMR6* 様遺伝子がトマトから報告されている (Thmazella et al., 2016) が、それらはそれぞれ染色体 3 と 6 に座し、本研究で解析した GibβH 遺伝子とは異なる塩基配列を持つ異なる遺伝子であった。

次に、PSTVd をトマト Rutgers に感染させ、接種後 1 週目から 1 週間間隔で 4 週目まで全 RNA を抽出して、ノーザンハイブリダイゼーションで GibβH 遺伝子の発現変動を分析した。その結果、PSTVd 感染区で、接種後 3 週目に GibβH 遺伝子の発現量の低下が認められたが、それ以外のポイントでは健全区とほぼ同じ程度の発現量であった。また、接種 3 週目においては、PSTVd 感染区では GibβH 遺伝子の発現量の低下に加えて、転写物が若干短くなっている様子が観察された。特に、GibβH 遺伝子の 5'末端側のプロンプトを使用し、低分数量域に明瞭なシグナルが検出されたので、転写物の 5'末端側が欠失して短くなったのではないかと推測された。そこで、5'-RACE 法で、転写物の 5'末端を解析した結果、健全 Rutgers で発現している GibβH 転写産物の 5'末端は DNA データベースに登録された EST 配列 (登録番号; XM_004244474) の 5'末端のさらに 31 ヌクレオチド上流にマッピングされた。一方、PSTVd 感染 Rutgers の転写産物の 5'末端は、健全区で観察された転写産物の 64 ヌクレオチド下流にマッピングされた。すなわち、5'末端から 64 ヌクレオチドが削除されていた。削除された領域には翻訳開始コドンは含まれていなかったが、5'-UTR の約 3 分の 1 が削除されており、翻訳効率が低下している可能性が示唆された。強調すべきもう 1 つの点は、欠失が発生した場所が、上述の PSTVd-sRNA (srPSTVd-21P118) の標的となる可能性が予測された部位から約 150 ヌクレオチド上流に位置していたことである。従って、現時点では、PSTVd 感染がこの位置で GibβH 遺伝子転写産物の欠失を引き起こす理由は不明である。PSTVd 感染は、ゲノム全体にわたり宿主タンパク質をコードする遺伝子の選択的スプライシングに変化を引き起こすことが報告されている (Zheng et al., 2017)。また、後述のように、本研究で実施した RNAseq による包括的なトランスクリプトーム分析データからも、PSTVd に感染したトマトにおいて、特に選択的転写の開始と終結に関わる大量の選択的スプライシングが生じていたことが示された。現時点で知り得る限り、これはウイロイド感染がタンパク質をコードする遺伝子転写物の欠失を引き起こし、それが病気の症状の発症につながる可能性があることを示す最初の例である。

さらに次に、PSTVd 耐病性の Moneymaker トマト品種を使用して、GibβH 遺伝子発現が RNA 干渉によってノックダウンされるトランスジェニックトマト植物を作成した。この hpGibβHi-762 Moneymaker 植物は、PSTVd に感染していない場合、ほぼ正常な栄養成長を示した。しかし、興味深いことに、PSTVd に感染すると、PSTVd 感受性トマト Rutgers に見られるのと同様の顕著な矮化と激しい葉巻病徴を示した (右図)。つまり、hpGibβHi-762 Moneymaker トマトは PSTVd 感受性に変化した。これらの結果から、PSTVd の複製/蓄積に加えて、GibβH 遺伝子の発現抑制が、PSTVd 感染に特徴的な矮化と葉巻症状を発症するために重要であることが示唆された。



最後に、GibβH 遺伝子発現を RNA 干渉でノックダウンした PSTVd 感受性 hpGibβHi-762 Moneymaker トマトを PSTVd に感染させ、感染初期 (5 dpi)、初期病徴発現期 (15dpi) 及び顕著な病徴発現期 (25dpi) の網羅的トランスクリプトーム解析 (RNAseq) を実施した。5 dpi では、傷痕、水分欠乏、熱、酸化ストレス、過酸化水素、色素体に関連する経路の遺伝子の発現が大幅に変動していた。すなわち、植物と病原体の相互作用 (防御反応)、フェニルプロパノイド生合成、フラボノイド生合成、及び光合成経路が影響を受けることがわかった。PSTVd の蓄積が検出レベルに達し、且つ、初期症状が現れ始めた 15 dpi では、防御反応とシグナル伝達に関わる植物自然免疫、タンパク質セリン/スレオニンキナーゼ活性、サリチル酸への応答などの防御関連経路に関連する遺伝子群の発現が大幅に変化していた。具体的には、植物と病原体の相互作用、酸化リン酸化、グルタチオン代謝、フラボノイド生合成、アミノ糖とヌクレオチド糖の代謝、及び光合成が影響を受けていた。症状が最も深刻な状態になる 25 dpi では、DNA テンプレート転写、転写因子活性、配列特異的 DNA 結合、転写調節、またはフラボノイドや植物ホルモンなどの二次代謝経路に関連する経路に関連する遺伝子の転写および転写調節が有意に変動していた。以上の結果は、PSTVd に感染した hpGibβHi-762Moneymaker では、感染の影響が植物-病原体相互作用及び植物ホルモンシグナル伝達からフェニルプロパノイド生合成やフラボノイド生合成から概日リズムにまで及ぶことを示唆している。

以上、トマトの第 8 染色体のマイナス鎖に座するジベレリン β 水酸化酵素遺伝子 (仮称; GibβH) は、2-オキシグルタル酸 Fe (II) 依存性オキシゲナーゼスーパーファミリーに属する新奇な遺伝子で、ウイロイドで生じる病徴発現に関連することから、ウイロイド感受性の 2-オキシグルタル酸 / Fe(II) 依存オキシゲナーゼと考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計11件（うち査読付論文 11件／うち国際共著 6件／うちオープンアクセス 8件）

| | |
|---|-----------------------|
| 1. 著者名 Suzuki T, Ikeda S, Kasai A, Taneda A, Fujibayashi M, Sugawara K, Okuta M, Maeda H, Sano T. | 4. 巻 11 |
| 2. 論文標題 RNAi-mediated down-regulation of dicer-like 2 and 4 changes the response of 'Moneymaker' tomato to potato spindle tuber viroid infection from tolerance to lethal systemic necrosis, accompanied by up-regulation of miR398, 398a-3p and production of excessive amount of reactive oxygen species | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Viruses | 6. 最初と最後の頁 344 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/v11040344 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス 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 - |
| 1. 著者名 Maddahian M, Massumi H, Heydarnejad J, Hosseinipour A, Khezri A, Sano T. | 4. 巻 167 |
| 2. 論文標題 Biological and molecular characterization of hop stunt viroid variants from pistachio trees in Iran | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 J Phytopathology | 6. 最初と最後の頁 163-173 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/jph.12783 | 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 該当する |
| 1. 著者名 Di Serio F, Ambros S, Sano T, Flores R, Navarro B. | 4. 巻 10 |
| 2. 論文標題 Viroid diseases in pome and stone fruit trees and Koch's postulates: a critical assessment | 5. 発行年 2018年 |
| 3. 雑誌名 Viruses | 6. 最初と最後の頁 612 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/v10110612 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス 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 該当する |
| 1. 著者名 Matsushita Y, Yanagisawa Y, Sano T. | 4. 巻 10 |
| 2. 論文標題 Vertical and Horizontal Transmission of Pospiviroids | 5. 発行年 2018年 |
| 3. 雑誌名 Viruses | 6. 最初と最後の頁 706 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/v10120706 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス 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 - |

| | |
|--|---------------------|
| 1. 著者名 Yanagisawa H, Sano T, Hase S, Matsushita Y. | 4. 巻 526 |
| 2. 論文標題 Influence of the terminal left domain on horizontal and vertical transmissions of tomato planta macho viroid and potato spindle tuber viroid through pollen | 5. 発行年 2018年 |
| 3. 雑誌名 Virology | 6. 最初と最後の頁 22-31 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし | 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 - |

| | |
|---|-------------------------|
| 1. 著者名 Adkar-Purushothama CR, Sano T, Perreault J-P | 4. 巻 19 |
| 2. 論文標題 Viroid-derived small RNA induces early flowering in tomato plants by RNA silencing | 5. 発行年 2018年 |
| 3. 雑誌名 Mol Plant Pathol. | 6. 最初と最後の頁 2446-2458 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/mpp.12721 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス 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 該当する |

| | |
|--|----------------------|
| 1. 著者名 Naoi T, Kitabayashi S, Kasai A, Sugawara K, Adkar-Purushothama CR, Senda M, Hataya T, Sano T. | 4. 巻 5(7) |
| 2. 論文標題 Suppression of RNA-dependent RNA polymerase 6 in tomatoes allows potato spindle tuber viroid to invade basal part but not apical part including pluripotent stem cells of shoot apical meristem | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 PLoS One | 6. 最初と最後の頁 236481 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1371/journal.pone.0236481 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス 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 該当する |

| | |
|--|-------------------|
| 1. 著者名 Kwon J, Kasai A, Maoka T, Masuta C, Sano T, Nakahara, K.S. | 4. 巻 17 |
| 2. 論文標題 RNA silencing-related genes contribute to tolerance of infection with potato virus X and Y in a susceptible tomato plant. Plant viruses | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Virology J | 6. 最初と最後の頁 149 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1186/s12985-020-01414-x | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス 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 - |

| | |
|---|--------------------|
| 1. 著者名 Kitabayashi S, Tsushima D, Adkar-Purushothama CR, Sano T. | 4. 巻 21 |
| 2. 論文標題 Identification and molecular mechanisms of key nucleotides causing attenuation in pathogenicity of dahlia isolate of potato spindle tuber viroid | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences | 6. 最初と最後の頁 7352 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms21197352 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス 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 該当する |

| | |
|--|--------------------|
| 1. 著者名 Zhang Z, Xia C, Matsuda T, Taneda A, Murosaki F, Hou W, Owens RA, Li S, Sano T. | 4. 巻 21 |
| 2. 論文標題 Effects of host-adaptive mutations on hop stunt viroid pathogenicity and small RNA biogenesis | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 International Journal of Molecular Sciences | 6. 最初と最後の頁 7383 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/ijms21197383 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス 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 該当する |

| | |
|---|--------------------|
| 1. 著者名 Fujibayashi M, Suzuki T, Sano T | 4. 巻 87 |
| 2. 論文標題 Mechanism underlying potato spindle tuber viroid affecting tomato (<i>Solanum lycopersicum</i>): loss of control over reactive oxygen species production | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Journal of General Plant Pathology | 6. 最初と最後の頁 1-10 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10327-021-01000-1 | 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18件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 4件)

| |
|--|
| 1. 発表者名 Kwon, J., C. Masuta, A. Kasai, T. Sano, K. Nakahara |
| 2. 発表標題 RNA silencing-related genes are involved in tomato tolerance toward virus infection |
| 3. 学会等名 38th Annual American Society for Virology Meeting |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 鈴木貴大・佐野輝男 |
| 2. 発表標題 果実障害の重症度を制御するリンゴゆず果ウイルス塩基配列の分析 |
| 3. 学会等名 平成 31年度（第 54回）植物感染生理談話会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 北林奨也・対馬大希・Adkar-Purushothama C.R.・佐野輝男 |
| 2. 発表標題 ジャガイモやせいもウイルス-42番塩基変異体の弱毒化機構 蓄積量と標的候補遺伝子の発現量解析 |
| 3. 学会等名 平成 31年度（第 54回）植物感染生理談話会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 鈴木貴大・藤林美里・葛西厚史・佐野輝男・Zhang, Z-X.・Li S-F. |
| 2. 発表標題 ジャガイモやせいもウイルス感染による矮化・葉巻病徴発現に関するトマト遺伝子の解析 |
| 3. 学会等名 令和元年度日本植物病理学会東北部会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 北林奨也・対馬大希・Adkar-Purushothama, C.R.・佐野輝男 |
| 2. 発表標題 ジャガイモやせいもウイルスの42番塩基と64番塩基の変異による弱毒化の解析 |
| 3. 学会等名 令和元年度日本植物病理学会東北部会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 鈴木貴大・藤林美里・佐野輝男 |
| 2. 発表標題 リンゴゆず果ウイルスのトマト果実への病原性を制御する塩基配列の分析 |
| 3. 学会等名 令和元年度日本植物病理学会東北部会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 北林奨也・佐野輝男 |
| 2. 発表標題 ジャガイモやせいもウイルスの病原性の違いに関与する宿主遺伝子の発現量解析 |
| 3. 学会等名 令和2年度日本植物病理学会大会 |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Kwon J, Maoka T, Sano T, Masuta C, Nakahara K. |
| 2. 発表標題 Analysis of increased virulence of potato virus X in AG02-knockdown tomato |
| 3. 学会等名 令和2年度日本植物病理学会大会 |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 鈴木貴大・藤林美里・佐野輝男 |
| 2. 発表標題 ウイルス感受性トマト品種におけるジャガイモやせいもウイルス感染による病徴発現関連遺伝子転写物の5'非翻訳領域の欠失 |
| 3. 学会等名 令和2年度日本植物病理学会大会 |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|---|
| 1 . 発表者名 Suzuki, T., M. Fujibayashi, T. Sano |
| 2 . 発表標題 Selection of AFCVd variants with severe and mild symptom on tomato fruits |
| 3 . 学会等名 International Conference on Viroids and Viroid-like RNAs (Valencia, Spain) (国際学会) |
| 4 . 発表年 2018年 |

| |
|---|
| 1 . 発表者名 Suzuki, T., A. Kasai, M. Fujibayashi, T. Sano |
| 2 . 発表標題 Susceptibility to viroid infection of tomato plant in which RNA silencing key factors - AGO2, RDR6, or DCL2 & 4 - is knocked down |
| 3 . 学会等名 International Conference on Viroids and Viroid-like RNAs (Valencia, Spain) (国際学会) |
| 4 . 発表年 2018年 |

| |
|---|
| 1 . 発表者名 Matousek, J., L. Steinbachova, UK. Killi, AK. Mishra, T. Sano, D. Honys, G. Steger |
| 2 . 発表標題 Elimination of apple fruit crinkle viroid (AFCVd) during anther development and its depressed propagation in pollen of <i>Nicotiana tabacum</i> |
| 3 . 学会等名 International Conference on Viroids and Viroid-like RNAs (Valencia, Spain) (国際学会) |
| 4 . 発表年 2018年 |

| |
|--|
| 1 . 発表者名 Zhang, ZX., CJ. Xia, WY. Hou, ZF. Fan, T. Sano, SF. Li |
| 2 . 発表標題 Identification and characterization of miRNAs in cucumber and their responses to hop stunt viroid (HSVd) infection |
| 3 . 学会等名 International Conference on Viroids and Viroid-like RNAs (Valencia, Spain) (国際学会) |
| 4 . 発表年 2018年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 北林奨也・対馬大希・Adkar-Purushothama CR・佐野輝男 |
| 2. 発表標題 ジャガイモやせいもウイルス (PSTVd) の42番塩基の変異がもたらす弱毒化機構の分析 |
| 3. 学会等名 平成30年度日本植物病理学会東北部会 (山形市・山形大学) |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 鈴木貴大・藤林美里・前多隼人・佐野輝男 |
| 2. 発表標題 黄化・壞疽症状を示すジャガイモやせいもウイルス感染トマト葉における活性酸素種の発生量解析 |
| 3. 学会等名 平成30年度日本植物病理学会東北部会 (山形市・山形大学) |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 鈴木貴大・藤林美里・前多隼人・佐野輝男 |
| 2. 発表標題 ジャガイモやせいもウイルス感染トマトにおける活性酸素種の発生と壞疽症状 |
| 3. 学会等名 平成31年度日本植物病理学会大会 (つくば市) |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 北林奨也・対馬大希・Adkar-Purushothama C.R・佐野輝男 |
| 2. 発表標題 ジャガイモやせいもウイルスの弱毒化に関与する宿主遺伝子-カルコン合成酵素遺伝子の発現量分析 |
| 3. 学会等名 平成31年度日本植物病理学会大会 (つくば市) |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 直井 崇・畑谷 達児・北林 奨也・葛西 厚史・佐野 輝男 |
| 2. 発表標題 トマトRDR6はジャガイモやせいもウイルス2系統の頂端分裂組織への侵入を同様の抑制するが、初期増殖に異なる影響を及ぼす |
| 3. 学会等名 平成31年度日本植物病理学会大会（つくば市） |
| 4. 発表年 2019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 |
|-----------|---|---|----|
| 研究 分担者 | 葛西 厚史 (Kasai Atsushi) (80633982) | 弘前大学・農学生命科学部・研究機関研究員 (11101) | |
| 研究 分担者 | 中原 健二 (Nakahara Kenji) (90315606) | 北海道大学・農学研究院・講師 (10101) | |

| | 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 |
|-----------|--|-----------------------|----|
| 研究 協力者 | アドカプルシヨッタマ チャリス ラジ (Adkar-Purushothama Carith Raj) | | |
| 研究 協力者 | 李 世訪 (Li Shifang) | | |

6. 研究組織（つづき）

| | 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 |
|-------|-----------------------------|-----------------------|----|
| 研究協力者 | 張 志想 (Zhang Zhixing) | | |

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 |
|---------|---------|
| | |