

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 4 年 6 月 6 日現在

機関番号：12605

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K06048

研究課題名(和文) パンデミックウイルスのゆりかご：多年生野草から農作物へのホストジャンプ機構の解明

研究課題名(英文) A cradle of pandemic plant viruses: mechanisms underlying host jump from perennial weeds to agricultural crops.

研究代表者

小松 健 (Komatsu, Ken)

東京農工大学・(連合)農学研究科(研究院)・准教授

研究者番号：60451837

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：オオバコモザイクウイルス(PIAMV)は機械的伝搬性のポテックスウイルスで、ユリに壊疽を生じるほか多様な野草から分離される。新分離株を含む全34分離株の系統解析の結果、PIAMVは分離宿主や地域に対応した5クレード(Lily clade, Clade I-IV)に分かれた。分離株の植物への感染性や病徴はクレードごとに異なり、特にオオバコには、オオバコの分離株を多数含むクレード IIIの分離株のみ全身感染が認められた。また、野草分離株はいずれも鑑賞ユリに接種当代での感染が認められなかった。適応進化解析では、複製酵素と外被タンパク質コード領域を中心に各クレードに特有の適応進化座位が複数検出された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究はオオバコという誰にとっても身近な多年生野草に感染しているPIAMVというウイルスが、日本国内だけでも大きく2つの集団に分かれていることを示すとともに、これらのユリへの感染が難しいことを示した。このことは、鑑賞ユリに被害を及ぼしている本ウイルスの一群は一度だけ進化し、ユリに特殊に適応したものであることを示しており、検疫上問題となっている本ウイルスの性状把握に重要な知見を提供するものである。

研究成果の概要(英文)：Plantago asiatica mosaic virus (PIAMV), a member of the genus Potexvirus, infects ornamental lilies and causes severe necrotic symptoms. Phylogenetic analysis using the full-length genome sequences of all available 36 isolates, including 14 new isolates in Japan, revealed that PIAMV isolates were divided into five clades, one Lily Clade and four clades (Clade I to Clade IV) that included isolates from weeds, which are differentiated depending on host and geographical location. PIAMV isolates in different phylogenetic clades infected a subset of plant species differently. Especially, only isolates from Clade III, which includes several isolates from *P. asiatica*, can infect this host. All PIAMV isolates from weed plants cannot infect ornamental lilies. Analysis of a site-specific positive selection has identified a total of 20 sites under episodic diversifying selection, which are concentrated in replicase- and coat protein-encoding regions.

研究分野：植物ウイルス学

キーワード：植物ウイルス ポテックスウイルス オオバコ ユリ 多年生野草 系統解析 集団遺伝学的解析 適応進化

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

植物ウイルスは高いゲノム変異率により新規な宿主植物に適応(ホストジャンプ)し、しばしば世界的な感染拡大を引き起こす。近年の新規ウイルス病害の増加は、世界的な貿易自由化・種苗の輸出入増加の傾向と関連することが示唆されている(Tsuda and Sano, 2014)。すなわち、無病徴のウイルス感染植物の移動が頻繁になると、農作物へのホストジャンプの機会が増加しうる。この問題は植物検疫の厳格化を促し、世界の食糧問題への影響は多大である。これに対処するには、自然生態系中に無数に存在するウイルスが(Wren et al., 2006) どのような植物からいかにしてホストジャンプしうるのかに関する知見が必要である。

鑑賞ユリの壊そ病は 2010 年にオランダで発生し球根の輸出入を介し世界的に発生が拡大しているウイルス病で、病原はオオバコモザイクウイルス(Plantago asiatica mosaic virus; PIAMV) である。PIAMV は機械的伝搬性で、球根の貯蔵・洗浄の過程で感染が拡大したと考えられる。複数の国で被害が報告されている「壊そ系統」は 2010 年に発生した株と 98%以上の同一性を示し、鑑賞ユリへの PIAMV の侵入は一度であることが示唆されている(Hammond et al., 2018)。しかし、壊そ系統は最も近縁な PIAMV 分離株とも全ゲノム配列で 15%の変異があり、その出現の経緯は不明である。

研究開始当初までに応募者は、青森県の野草から遺伝的に多様な PIAMV 分離株を見出し、系統解析の結果、(1)PIAMV 感染野草の種類は多様であるが全てが多年生であり、(2)同地域の分離株は 2 つの系統学的に異なる集団：壊そ系統に比較的近縁な「Li1 クレード」、系統学的に異なる「Vi クレード」に明確に分かれることを明らかにしていた(Komatsu et al., 2017)。この PIAMV の宿主植物種に加え、同じ地域から分離されたウイルスゲノムの高い多様性は、野草が遺伝的に多様な PIAMV を生み出す「ゆりかご」になっていることを示唆する。さらに接種試験により、壊そ系統に比較的近縁な Li1 クレードの分離株は、鑑賞ユリへの感染性が低いことが示されていた(Tanaka et al., 2018)。以上より、壊そ系統の PIAMV ゲノムには、野草分離株にはない鑑賞ユリへの適応に関わる変異が生じている可能性がある。

これらの背景から応募者は、PIAMV の野草株と鑑賞ユリの壊そ系統との関係をモデルとして、植物ウイルスのホストジャンプ機構に迫るため本研究を開始した。

2. 研究の目的

本研究は、ホストジャンプの前提となる高い遺伝的多様性はどのようにして生まれるのか?、多年生野草からのホストジャンプと鑑賞ユリへの適応には、どのようなウイルスゲノム変異が必要なのか?この変異は全ての野草分離株に見出されるのか?という二つの問いに答え、多様な遺伝的背景の PIAMV 分離株から鑑賞ユリへの適応に関するゲノム領域を見出し、最終的に壊そ系統の分離株と野草分離株とのゲノム置換によりホストジャンプを実証することを目的とする。

3. 研究の方法

日本各地の多年生野草から PIAMV を分離し、検定植物での単病斑分離を経てウイルス感染植物の total RNA を抽出する。逆転写と PCR により全長塩基配列(約 6000 塩基)を取得、その配列を決定し、系統解析と集団遺伝学的解析により本ウイルスの種内分化の様相について解析する。得られた分離株から代表的なものを選抜してユリやオオバコなどの PIAMV の分離宿主、およびモデル植物への接種試験を行い、分化した種内クレード間の生物学的な差異を示す。次に、多数の PIAMV 分離株を、全ゲノム中からクレード特異的・適応進化している座位を見出す手法で解析し、種内分化とユリへの感染に必要と考えられるアミノ酸座位の候補を見出す。見出された鑑賞ユリへのホストジャンプに関与しうるゲノム領域について、野草分離株と壊そ系統間でゲノムを置換した感染性クローンを作成し、実際にユリに接種することでゲノム置換がユリへの感染性を生み出せるかを検証する。

4. 研究成果

本研究で新たに分離した株を含め全 34 分離株の約 6000 塩基の全長配列について、RDP4 ソフトウェアを用いた組換え解析では、全ての分離株の組み合わせで有意な組換えは検出されなかった。そこで全ての分離株を用いて系統解析を行なった結果、本ウイルスは分離宿主や地域に対応した、高い bootstrap 値によって支持される 5 つのクレード(Lily clade, Clade I-IV)に分かれることがわかった。この結果は ML 法、Bayes 法、NJ 法で同様であった。Lily clade には世界各地で鑑賞ユリに壊そ病を引き起こす分離株のみが含まれた。Clade I, III には、青森県で近隣地域から見出されている分離株が属しており、両クレードで地域が共通していた。他のクレードの分離株の宿主と地域から総合すると、野草株はある程度宿主や地域に対応して分化していることが示唆された。さらに、遺伝的多様性を算出すると、Clade I-IV それぞれのは 0.085-0.129 であった一方、Lily clade においては =0.006 という低い値であった。以上は、鑑賞ユリ株集団は遺伝的多様性が低く、これと比較するとその他の野草株集団は遺伝的多様性が高いという、系

統解析に準ずる結果を示していた。

日本で未発見の Clade IV を除く各クレードの代表的な株の感染性 cDNA クローンから試験管内転写したゲノム RNA は検定植物であるアカザに効率よく感染し、それぞれのウイルスが感染性を持つ配列であることが確認できた。そこでこの感染葉を用いて、モデル植物であるシロイヌナズナおよびベンサミアタバコ、および分離宿主であるオオバコ・ユリへの接種試験を行った。モデル植物では、クレードごとに全身感染性や病徴に違いがみられた。さらに、この接種試験により初めて、PIAMV が初めて報告された宿主であるオオバコへ本ウイルスを感染させることに成功し、オオバコの分離株を含むクレード III に属する分離株のみ全身感染が認められることを明らかにした。また、野草分離株はいずれも鑑賞ユリに接種当代での感染が認められなかった。さらに、主たる野草宿主であるオオバコでの各分離株の宿主適応を調べるためその蓄積量を定量 PCR(RT-qPCR)で調べたところ、クレード III に属する分離株のみ蓄積量が高く、他のクレードの分離株の蓄積量は低かった。これらのことから、PIAMV の種内分化は各宿主への適応と関連している可能性が示唆された。

このような種内分化、鑑賞ユリへの適応に関わるアミノ酸座位を同定するため、mixed-effects model of evolution (MEME)を用いた適応進化解析を行った。これにより各クレードに特有の適応進化座位の検出を試みたところ、複製酵素と外被タンパク質コード領域を中心に合計 20 の有意なアミノ酸座位が見出され、そのうち複数、複製酵素領域のメチルトランスフェラーゼドメインとヘリカーゼドメインの間の比較的アミノ酸配列が多様な領域に存在していた。また、複製酵素の 4 つのアミノ酸座位はクレードごとに特徴的なアミノ酸を示していた。

これらのアミノ酸の鑑賞ユリへの適応への寄与を調べるため、Lily clade から分離された単一配列の分離株の鑑賞ユリへの接種試験を行ったが、全身感染が認められなかった。これは接種源である感染葉をユリではなく検定植物で用意したためである可能性や、鑑賞ユリへの単一配列株の感染はメリステムクローンなどの植物がごく小さい時期の接種が必要である可能性が残されており、現在検証を行っている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 10件／うち国際共著 3件／うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 Saito Hiroki, Sasaki Mai, Nonaka Yoko, Tanaka Jun, Tokunaga Tomomi, Kato Akihiro, Thuy Tran Thi Thu, Vang Le Van, Tuong Le Minh, Kanematsu Seiji, Suzuki Tomotaka, Kurauchi Kenichi, Fujita Naoko, Teraoka Tohru, Komatsu Ken, Arie Tsutomu	4. 巻 87
2. 論文標題 Spray Application of Nonpathogenic Fusaria onto Rice Flowers Controls Bakanae Disease (Caused by Fusarium fujikuroi) in the Next Plant Generation	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Applied and Environmental Microbiology	6. 最初と最後の頁 e01959-20
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/AEM.01959-20	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 Owashi Yuta, Aihara Mitsuhiro, Moriyama Hiromitsu, Arie Tsutomu, Teraoka Tohru, Komatsu Ken	4. 巻 11
2. 論文標題 Population Structure of Double-Stranded RNA Mycoviruses That Infect the Rice Blast Fungus Magnaporthe oryzae in Japan	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Frontiers in Microbiology	6. 最初と最後の頁 e01959-20
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fmicb.2020.593784	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 Uchida Keiko, Sakuta Kohei, Ito Aori, Takahashi Yumi, Katayama Yukie, Omatsu Tsutomu, Mizutani Tetsuya, Arie Tsutomu, Komatsu Ken, Fukuhara Toshiyuki, Uematsu Seiji, Okada Ryo, Moriyama Hiromitsu	4. 巻 12
2. 論文標題 Two Novel Endornaviruses Co-infecting a Phytophthora Pathogen of Asparagus officinalis Modulate the Developmental Stages and Fungicide Sensitivities of the Host Oomycete	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Frontiers in Microbiology	6. 最初と最後の頁 633502
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fmicb.2021.633502	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 Kato Yuto, Yanagisawa Takahiro, Nakai Madoka, Komatsu Ken, Inoue Maki N.	4. 巻 10
2. 論文標題 Direct and sensitive detection of a microsporidian parasite of bumblebees using loop-mediated isothermal amplification (LAMP)	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 1118
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-57909-8	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 Matsuo Yuki, Novianti Fawzia, Takehara Miki, Fukuhara Toshiyuki, Arie Tsutomu, Komatsu Ken	4. 巻 32
2. 論文標題 Acibenzolar-S-Methyl Restricts Infection of Nicotiana benthamiana by Plantago Asiatica Mosaic Virus at Two Distinct Stages	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Molecular Plant-Microbe Interactions	6. 最初と最後の頁 1475 ~ 1486
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1094/MPMI-03-19-0087-R	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 Higashiura Tomoya, Katoh Yu, Urayama Syun-ichi, Hayashi Osamu, Aihara Mitsuhiro, Fukuhara Toshiyuki, Fuji Shin-ichi, Kobayashi Takashi, Hase Shu, Arie Tsutomu, Teraoka Tohru, Komatsu Ken, Moriyama Hiromitsu	4. 巻 535
2. 論文標題 Magnaporthe oryzae chrysovirus 1 strain D confers growth inhibition to the host fungus and exhibits multifunctional viral structural proteins	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Virology	6. 最初と最後の頁 241 ~ 254
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.virol.2019.07.014	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 Asai Shuta, Ayukawa Yu, Gan Pamela, Masuda Sachiko, Komatsu Ken, Shirasu Ken, Arie Tsutomu	4. 巻 8
2. 論文標題 High-Quality Draft Genome Sequence of Fusarium oxysporum f. sp. cubense Strain 160527, a Causal Agent of Panama Disease	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Microbiology Resource Announcements	6. 最初と最後の頁 e00654-19
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/MRA.00654-19	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 Sasaki Nobumitsu, Murakami Tomoya, Yoshimoto Nanae, Komatsu Ken, Matsushita Yasuhiko, Nyunoya Hiroshi	4. 巻 87
2. 論文標題 Cell-death-independent antiviral response mediated by N resistance factor in Nicotiana benthamiana involves inhibited localization of tobamovirus movement protein to plasmodesmata	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of General Plant Pathology	6. 最初と最後の頁 170 ~ 177
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10327-021-00984-0	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 Komatsu Ken, Sasaki Nobumitsu, Yoshida Tetsuya, Suzuki Katsuhiko, Masujima Yuki, Hashimoto Masayoshi, Watanabe Satoru, Tochio Naoya, Kigawa Takanori, Yamaji Yasuyuki, Oshima Kenro, Namba Shigetou, Nelson Richard S., Arie Tsutomu	4. 巻 95
2. 論文標題 Identification of a Proline-Kinked Amphipathic α -Helix Downstream from the Methyltransferase Domain of a Potexvirus Replicase and Its Role in Virus Replication and Perinuclear Complex Formation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Virology	6. 最初と最後の頁 e01906-20
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1128/JVI.01906-20	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 Novianti Fawzia, Sasaki Nobumitsu, Arie Tsutomu, Komatsu Ken	4. 巻 306
2. 論文標題 Acibenzolar-S-methyl-mediated restriction of loading of plantago asiatica mosaic virus into vascular tissues of Nicotiana benthamiana	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Virus Research	6. 最初と最後の頁 198585 ~ 198585
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.virusres.2021.198585	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7件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 針山梓、有江力、小松健
2. 発表標題 オオバコモザイクウイルスのRNAサイレンシングサプレッサー活性を弱めるTGBp1の1アミノ酸変異はウイルスの細胞間移行に影響を与える
3. 学会等名 令和3年度 日本植物病理学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Furuya Minako, Yamashita Kazuo, Hanada Kaoru, Uehara-Ichiki Tamaki, Fuji Shin-ichi, Komatsu Ken
2. 発表標題 Mechanisms underlying intraspecies differentiation of Plantago asiatica mosaic virus isolated from a variety of host plants
3. 学会等名 14th International Plant Virus Epidemiology Symposium (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 針山梓、有江力、小松健
2. 発表標題 オオバコモザイクウイルスのRNAサイレンシングサプレッサー活性に関わるtriple gene block protein 1における1アミノ酸変異が感染性に及ぼす影響
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 阿部遥貴、対馬大希、小松健、古屋実那子、山下一夫、花田薫、一木(植原)珠樹、湊菜未、藤晋一
2. 発表標題 オオバコモザイクウイルスの遺伝的多様性への宿主植物の関与
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 棚井偲乃、古屋実那子、山下一夫、花田薫、一木(植原)珠樹、藤晋一、小松健
2. 発表標題 オオバコモザイクウイルスの網羅的検出が可能なユニバーサルプライマーの構築と未知分離株の系統解析への適用
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 大川あずさ、棚井偲乃、阿部遥貴、中村奈輔、山下一夫、一木(植原)珠樹、花田薫、湊菜未、藤晋一、小松健
2. 発表標題 オオバコモザイクウイルス各種分離株のオオバコおよびユリへの感染性
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

1. 発表者名 針山梓、根津修、有江力、小松健
2. 発表標題 オオバコモザイクウイルスのtriple gene block protein 1のRNAサイレンシングサプレッサー活性はウイルスの長距離移行に寄与する
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