

平成 30 年 6 月 19 日現在

機関番号：11101

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04455

研究課題名(和文) 環状RNA病原体ウイロイドの病原性 - miRNA/遺伝子発現ネットワーク攪乱作用

研究課題名(英文) Pathogenicity of viroid - circular RNA pathogen; Analysis of destructive effects of viroid infection on a host miRNA/gene expression network

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) 13,000,000円

研究成果の概要(和文)：ウイロイドの病原性と宿主遺伝子発現ネットワーク攪乱作用を分析し、ウイロイド由来small RNAによるカロース合成酵素遺伝子の発現阻害機構とウイロイドの弱毒化に関与する塩基を特定し、RNA干渉を利用した新規ウイロイド耐性植物を作出した。DCL2とDCL4をRNAiで抑制したトマトは、ウイロイド感受性になり、全身に壞疽を生じて枯死に至る新奇な現象を見出し、CCS1、SOD1、miR398の発現量が異常に上昇することを突き止めた。植物は基礎的自然免疫で活性酸素種を発生させてウイロイドの感染に対抗するが、RNAサイレンシングに異常をきたすと防御機構に乱れを生じ、病徴が激化することを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：We analyzed adverse effects of viroid infection upon the network of host gene expression and found that accumulation of a viroid-specific small RNA derived from the position 39-59 of PSTVd genome caused down-regulation of callose synthase gene (CalS11-like) expression through RNA silencing pathway. We also developed novel viroid-resistant tobacco plants expressing viroid-specific small RNAs and identified a key nucleotide which attenuates PSTVd pathogenicity. RNAi-mediated down-regulation of DCL2 and DCL4 made tomato plants susceptible to viroid infection. The plants infected with PSTVd produced severe systemic necrosis and died 3 to 4 months after infection, in which the expression level of CCS1, SOD1, and miR398 was abnormally elevated. Although plants generate reactive oxygen species by fundamental innate immunity to counteract viroid infection, it became clear that abnormality in RNA silencing mechanism disturbs the defense mechanism and intensifies disease symptoms.

研究分野：植物病理学

キーワード：ウイロイド RNAサイレンシング DCL2 DCL4 miR398a-3p SOD1 CCS1

1. 研究開始当初の背景

ウイルス(viroid)は自己複製する環状 1本鎖 RNA というユニークな分子で、感染植物に矮化、葉巻、果実障害などを引き起こすことで知られるが、潜在的に感染するケースも多い。近年、ジャガイモやせいもウイルスなどポスピウイルス属のウイルスが、野菜の種子や花卉類などに潜在して流通し、世界中で流行が続き、欧米をはじめ日本国内でも国際植物検疫上の重大な懸念材料となっている。

RNA サイレncingの観点からウイルスの病原性を説明するものとして、まず、図1モデルAに示すように、ウイルス感染で生じたウイルス特異的 small RNA (vd-sRNA)が宿主 mRNA 中に偶然に存在する相同配列(21 塩基程度)を標的として分解(或は翻訳阻害)することで正常機能が損なわれ病状が発生するという仮説が提案された(Wang et al., PNAS 2004)。実際にこの説を支持するケースとして、Peach latent mosaic viroid の特殊な変異体に存在する挿入配列に由来する vd-sRNA が宿主の相同配列を切断することで Peach Calico (モモ伝染性白斑) 症状が発生する可能性が示された(Navarro et al., Plant J. 2012)。

しかし一方で、これはむしろ特殊なケースと考えられ、ウイルス病に特徴的な矮化、葉巻、着色障害などの発生機構はより複雑で、感染細胞中に多量に蓄積する vd-sRNA が宿主の RNA サイレncing機構を攪乱し、植物の形態形成に重要な役割を果たすマイクロ RNA (miRNA) の発現レベル、さらに転写因子群の発現制御に影響を与え、結果として植物ホルモン合成、光合成、防御関連遺伝子群など複数の遺伝子ネットワークが攪乱されることに起因するのではないかと考えられるようになってきた(図1、モデルB)。

報告者らは数年来、ウイルスの病原性と RNA サイレncingの関連性に関する研究を続けており、ウイルス感染植物に蓄積する vd-sRNA のホットスポットパターンがウイルスの病原性の強弱と相関して変動することを見出した。

また、ジャガイモやせいもウイルス(PSTVd)の vd-sRNA (PSTVd-sRNA)の

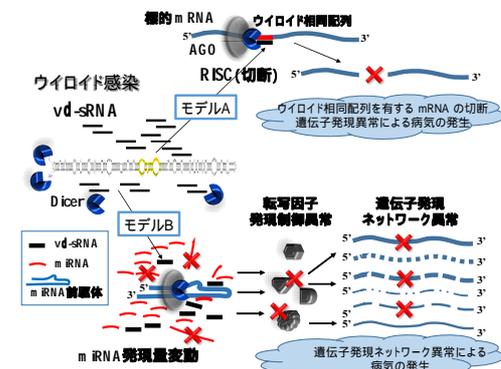


図1. ウィロイド病原性発現機構モデル

次世代シーケンス(NGS)解析とマイクロアレイ解析から、PSTVd 感染トマトでは、葉緑体関連遺伝子群、植物ホルモン合成とシグナル経路関連遺伝子群の両方が変化し、特にジベレリン合成経路のジベレリン β-水酸化酵素遺伝子の発現量が PSTVd-sRNA の標的となって低下する可能性があること、そして、ジベレリンシグナル経路の恒常性に関わる miRNA (miR159) や他の miRNA (miR319) 発現量に変化が認められることなどを観察してきた。

さらに報告者らは、先行研究で RNA 干渉(RNAi)により、6 種類の PSTVd-sRNA (21 塩基) を発現する形質転換トマト、擬態 RNA 分子を発現させて miR159 と miR319 の発現レベルを低下させた形質転換トマト、RNA サイレncingのキー因子 AGO2、DCL2、DCL4、RDR6 遺伝子発現を抑制した形質転換トマト、ジベレリン β-水酸化酵素遺伝子発現を抑制した形質転換トマトなどを作成・選抜して本研究の準備を進めてきた。

そこでまず本研究では、PSTVd をこれらの形質転換体トマトに感染させて、宿主細胞・組織中の PSTVd-sRNA、miRNA、転写因子、ジベレリン/その他植物ホルモン合成関連、光合成関連、及び防御関連遺伝子群の蓄積・発現レベルを定量 RT-PCR、ハイブリダイゼーション或は NGS 解析で比較分析することにした(図2、検討項目A)。

次に、PSTVd-sRNA の標的候補遺伝子をバイオインフォマティクスで予測し、PSTVd-sRNA がその標的候補遺伝子を RNAi 機能で切断する能力の有無を人工マイクロ RNA (amiRNA) 法で分析し、予想される位置で実際に切断が起こっているか否か 3'-RLM-RACE 法で実験的に検証することにした。

さらに、PSTVd の部分配列由来のヘアピン RNA を発現するウイルス抵抗性植物に PSTVd を感染させ、抵抗性を打破して増殖した後代 PSTVd の塩基配列を分析して、RNA サイレncing標的配列とそれ以外の領域の塩基変異発生率の比較から、RNA サイレncingを回避する変異が生じる可能性の有無、つまり、ウイルスの RNA サイレncing耐性機構を考察することに

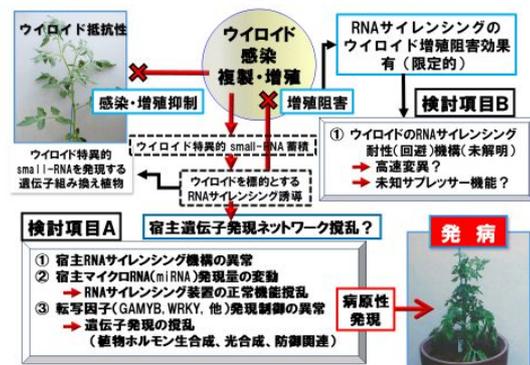


図2. 作業仮説-ウィロイド誘導RNAサイレンシングと病原性発現機構

した(図2、検討項目B)。

また、PSTVd 以外に、ホップ矮化ウイルス(HSVd)とリンゴゆず果ウイルス(AFCVd)に関しても分析を行った。

HSVd はホップ、キュウリ、ブドウ、カンキツ、スモモ、モモなど多様な宿主に感染するウイルスである。病原性の異なる2種類のHSVd 変異体に感染したキュウリのRNAseq 解析により矮化や葉巻などの病徴発現に関わる遺伝子ネットワークの網羅的解析を行った(図2、検討項目A)。

AFCVd はリンゴやホップに感染するウイルスであるが、実験的にトマトに感染させることが出来る。もともとの自然宿主であるホップからトマトに感染させると多様な宿主適応変異が生じる。宿主適応変異が病原性に及ぼす影響、AFCVd 感染で生成・蓄積するAFCVd-sRNA の生成パターンのNGS 解析を行い、バイオインフォマティクス解析によりAFCVd-sRNA の標的となる可能性のある宿主遺伝子を探索・特定した(図2、検討項目A)。

2. 研究の目的

ウイルスは約250 - 430ヌクレオチドの環状1本鎖RNAからなる植物の病原体で、タンパク質情報をコードしない非コードRNAであるが、宿主細胞内に侵入すると転写系に依存して自己増殖し、様々な作物に矮化・葉巻・果実異常・着色障害を特徴とする病気を引き起こす。

本研究では、ウイルス感染で宿主細胞中に大量に生成・蓄積するvd-sRNA が宿主のmiRNA と転写因子群の発現制御に及ぼす影響を分析し、その影響を受けると予想される特定の遺伝子(群)の発現レベルを実験的に検証する。得られる結果を基に、vd-sRNA が植物ホルモン合成関連遺伝子群・光合成関連遺伝子群・防御関連遺伝子群など宿主遺伝子発現ネットワークに直接的・間接的に与える影響を評価し、非コードRNA が植物に病気を引き起こす病原性分子機構の解明をめざす。

3. 研究の方法

検討事項 A-1: vd-sRNA、RNA サイレncing キー遺伝子(AGO2, DCL2, DCL4, RDR6)、マイクロRNA(miR159, miR319)及びジベレリンβ水酸化酵素遺伝子とウイルスの病原性

検討事項 A-2: PSTVd-sRNA の標的候補遺伝子の探索と実験的検証

PSTVd-sRNA の標的候補遺伝子の探索と発現解析

amiRNA 法によるPSTVd-sRNA と標的候補遺伝子の相互作用の評価

3'-RLM-RACE 法による標的候補遺伝子切断部位の検証

検討事項 A-3: AFCVd-sRNA の標的候補遺伝子の探索

検討事項 B: ウィロイド抵抗性植物を用いたウイルスのRNA サイレncing 耐性機構の分析—PSTVd 抵抗性タバコ(*N. benthamiana*)で増殖する抵抗性打破PSTVdの変異率解析

4. 研究成果

検討事項 A-1: vd-sRNA、RNA サイレncing キー遺伝子(AGO2, DCL2, DCL4, RDR6)、マイクロRNA(miR159, miR319)及びジベレリンβ水酸化酵素遺伝子とウイルスの病原性

PSTVd 感染組織中に多量に蓄積するPSTVd-sRNA を発現する形質転換体トマトの生育とウイルス感受性

PSTVd 感染組織中に最も多量に蓄積する6種類のPSTVd-sRNA (21ヌクレオチド)の配列を逆向きに2つ連結(逆向き反復配列 Inverted Repeat; IR)したものを35Sプロモーターに連結し、アグロバクテリウム法でトマト(品種 Money maker)に遺伝子導入し、hpPSTVd-75M (1系統)、hpPSTVd-113P (3系統)、hpPSTVd-256P (4系統) 併せて3種8系統のT3ホモ世代を選抜した。これら8系統にPSTVdをチャレンジ接種した結果、全ての系統が感染し、接種3~4週目に上葉に糸葉や奇形がみられたものがあつた。特にhpPSTVd-113P系統はPSTVdに高感受性となり、野生型には見られない激しい矮化、葉巻症状を発現した。本来この実験はRNAiによるPSTVd耐性付与を目指すものであつたが、hpPSTVd-113P系統では当初の予想とは全く逆の想定外の現象が観察された。今後、この系統で観察される現象を分析することで、ウイルスの病原性に関する新たな機構の発見につながる事が期待される。

擬態RNA分子を発現させてmiR159、miR319の機能を低下させた形質転換体トマトの生育とウイルス感受性

miR159 と miR319 の標的配列の切断部位に変異を導入した擬態RNAを発現させ、それぞれ3系統の形質転換体を選抜した。全系統で遺伝子の導入が確認されたが、トランスジーン由来の転写物の発現量は検出レベル以下であつた。

RNAiでRNAサイレncingのキー因子AGO2遺伝子発現をノックダウンした形質転換トマトの生育とウイルス感受性

RNAiでAGO2遺伝子発現をノックダウンし、5系統の形質転換体を選抜した。これらの系統にPSTVdをチャレンジ接種し、ウイルスの蓄積量と病原性の変化を分析した。その結果、AGO2-siRNAの蓄積量に関わらず、AGO2をノックダウンしたトマト系統はウイルスの感染に耐性を示し、感染は認められたがほとんど病徴は現れなかつた。つまりAGO2のウイルスに対する防御は極めて限定的なものと考えられた。

RNAiでRNAサイレncingのキー因

子 DCL2 と DCL4 遺伝子発現をノックダウンした形質転換トマトの生育とウイルス感受性

RNAi で DCL2 と DCL4 の発現を同時にノックダウンし、3 系統の形質転換体 (hpDCL2/4i-21-6、hpDCL2/4i-72E、hpDCL2/4i-82A) を選抜した。これらの系統に PSTVd をチャレンジ接種した結果、hpDCL2/4i-72E 系統は PSTVd に高感受性となり、PSTVd の初期感染濃度が高まり、激しい矮化・葉巻・全身壊疽が現れた。Small RNA の NGS 解析の結果、hpDCL2/4i-72E 系統では野生型に比べ PSTVd-sRNA のサイズ分布が激変し、21-nt 種は約 30%、22-nt 種は 95% 以上減少し、24-nt 種は 10 倍以上増加した。MiRNA 発現量も変動し、特に miR398a-3p と miR398 は 6~7 倍に増加した。

以上、DCL2 と DCL4 はウイルスの感染を完全に防ぐことはできないが、感染初期の増殖/蓄積量を低下させる効果をも、もし、DCL2 と DCL4 に異常が起こると防御機構に異常を来し、本来病原体から身を守るために機能している活性酸素種の発生を制御することが出来なくなり、結果として激しい全身性の壊疽症状を発症するのではないかと結論付けた。

RNAi で RNA サイレncing のキー因子 RDR6 遺伝子発現をノックダウンした形質転換トマトの生育とウイルス抵抗性

RNAi で RDR6 の発現をノックダウンし、3 系統の形質転換体を選抜した。これらの系統に PSTVd をチャレンジ接種した結果、hpRDR6-91B 系統では PSTVd の感染初期の蓄積レベルが上昇したが、病徴の強さは野生型と同じで、ほぼ無病徴であった。茎頂部分を *in situ* ハイブリダイゼーションで分析した結果、野生型に比べて茎頂部分への侵入が進行することが確認された。

RNAi でジベレリン β 水酸化酵素遺伝子発現をノックダウンした形質転換トマトの生育とウイルス感受性

RNAi でジベレリン β 水酸化酵素遺伝子発現をノックダウンし、5 系統の形質転換体を選抜した。hpGibHi-1-1 系統に PSTVd を接種した結果、野生型に比べ感染が約 1 週間遅れたが、病徴は激化し、激しい葉巻、黄化、脈壊疽症状が観察された。すなわち、予想通り、ジベレリン β 水酸化酵素遺伝子の発現量低下と PSTVd 病徴の激しさが関連することが確認された。

検討事項 A-2

PSTVd-sRNA の標的候補遺伝子のバイオインフォマティクス探索と実験的検証

vd-sRNA が起因となり様々な遺伝子・転写因子を標的としてその発現制御に影響を与えて病原性が発揮される可能性が明らかにされつつある。バイオインフォマティクス解析等で PSTVd-sRNA との標的候補となりうる遺伝子 (群) を予測した結果、以

下の 3 種類の PSTVd-sRNA がトマト遺伝子中に標的候補配列を有することが示唆され、以下の実験的検証を行った。

PSTVd-sRNA-119P

PSTVd のプラス鎖の 119 - 139 番に由来する 21 塩基の PSTVd-sRNA (PSTVd-sRNA-119P) はジベレリン β 水酸化酵素遺伝子中に標的候補配列を有する。PSTVd-sRNA-119P がジベレリン β 水酸化酵素遺伝子中の標的候補配列を標的として切断するかどうか amiRNA 法で分析した。その結果、GFP 発光量の変化は見られず、PSTVd-sRNA-119P がジベレリン β 水酸化酵素遺伝子の発現を転写後 RNA サイレncing で分解して発現量を抑制する可能性を示すことはできなかった。

PSTVd-sRNA-39P

PSTVd の病原性の異なる変異体の病原性領域に由来する 2 種類の 21 塩基の PSTVd-sRNA (PSTVd-sRNA-39P と PSTVd-sRNA-40P) はカロース合成酵素遺伝子 (*CalS11-like* mRNA) 中に標的候補配列を有する。amiRNA 法で分析した結果、PSTVd-sRNA-39P が *CalS11-like* mRNA を RNA サイレncing 機構を介して切断する可能性が示唆され、さらに 3'-RLM-RACE 法で分析した結果、切断部位は予想切断部位と一致した。このことから、PSTVd 感染によりプラズモデスマータ内壁のカロース集積量が減少し、細胞間移行が促進される可能性を明らかにした (Adkar-Purushothama et al., 2015a)。

PSTVd-sRNA-44M

PSTVd の強毒型と弱毒型には 9 カ所の塩基変異が観察されたので、各変異を 1 つずつ相互に入れ替えた変異体を作成し、その増殖/蓄積量と病原性を分析した結果、強毒型の第 42 番塩基 C を弱毒型 U に変えると弱毒化することが明らかになった。PSTVd の強毒型と弱毒型に感染した感受性トマトの small RNA の NGS 解析データ中には 42 番塩基を含む PSTVd-sRNA は 8 種類検出され、特に PSTVd マイナス鎖の第 44 番~22 番から生成する PSTVd-sRNA-44M は発現量も多く、トマトの予想 E3 コピキチンプロテインリガーゼ (UBR7) mRNA 中に標的候補配列を有していた。

検討事項 A-3

(1) 病原性の異なる HSVd 変異体 - 感染キュウリの病徴発現に伴う遺伝子発現変動 (トランスクリプトーム) の網羅的解析

HSVd-ホップ (基準株 ; HSVd-g54A) とそのホップ適応変異体 HSVd-KFKi は 4 塩基で異なり、HSVd-g54 がキュウリに強い矮化症状を示すのに対して HSVd-hKFKi は軽い矮化症状を示す。それぞれに感染したキュウリから経時的に全 RNA を抽出し、NGS による RNAseq 解析を行った結果、HSVd 感染キュウリでは光合成関連遺伝子

群の発現量が低下していた。一方、RNA 依存 RNA 合成酵素(特に CsRDR1 と CsRDR2) と防御関連遺伝子群の発現量が上昇していた。また、植物ホルモンシグナリング経路に関連した遺伝子群が変化しており、これらの変化は強毒型の HSVd-g54A でより早期に強く観察された (Xia et al., 2017)。

(2) AFCVd の宿主適応変異で生じる宿主適応変異体の分子構造の特徴及び AFCVd-sRNA の標的候補遺伝子の探索

PSTVd 以外のウイルスに関して同様の分析を行った。AFCVd はリンゴやホップから分離されたウイルスであるが、トマトにも感染し、果実に特徴的な奇形や着色障害を出す。AFCVd がトマトに感染する際に生じる塩基変異の多様性と AFCVd-sRNA の生成パターンを分析するために感染トマトの葉と果実中の AFCVd-sRNA の NGS 解析を行った (Suzuki et al., 2017)。

得られた AFCVd-sRNA の情報に基づき、AFCVd-sRNA の標的となりうる配列を有する多数のトマト遺伝子を特定したジベレリンやフラボノイド生合成系にかかわる遺伝子やそれらの転写調節に関わる複数の遺伝子が含まれていた。

検討事項 B: ウィロイド抵抗性植物を用いたウィロイドの RNA サイレンシング耐性機構の分析—PSTVd 抵抗性タバコ (*N. benthamiana*) で増殖する抵抗性打破 PSTVd の変異率解析

PSTVd のほぼ全長、中央保存領域上部、中央保存領域下部など、PSTVd の様々な配列に由来するヘアピン-RNA を発現する形質転換 *N. benthamiana* (T3 ホモ世代) を作出・選抜し、PSTVd 抵抗性検定を繰り返して PSTVd の感染増殖を抑制する複数の系統を選抜した (Adkar-Purushothama et al., 2015b)。

得られた抵抗性系統 (No.24 と No.25) に PSTVd (感染性 cDNA クローンから *in vitro* で調製した均一の塩基配列を有する集団) を接種し、5 週間後に感染・増殖した後代 PSTVd を回収し、NGS 解析を行ない各区約 10000 リードの全長配列を取得した。感染前と感染後の塩基配列を比較し、それぞれの形質転換系統が発現するヘアピン PSTVd 配列、すなわち、RNA サイレンシングの標的部位内に生じる変異率とそれ以外の部位の変異率の違いを分析した。

その結果、標的部位の変異率はそれ以外の部位と同じで、ウィロイドは標的部位に変異を生じることで RNA サイレンシングを回避している可能性は支持されなかった。

まとめと考察

本研究において、RNA サイレンシングのキー因子 DCL2 と DCL4 を RNAi でノックダウンすると PSTVd 耐性トマト品種が罹

病性に変化し、全身壊疽症状を呈して枯死に至る新奇な現象を見出した。この感染植物では CCS1 や SOD1 発現が増加し、それを負に制御するマイクロ RNA miR398 と miR398a-3p の発現レベルが異常に上昇していることを突き止めた。CCS1 は活性酸素種 (ROS) のスカベンジャーであるスーパーオキシドジスムターゼ (SOD) に銅を運搬して活性化させる酵素で、この結果から「ウィロイド感染植物では防御反応として ROS が発生していること、しかし DCL2 と DCL4 がノックダウンされたトマトでは ROS の発生を制御することが出来なくなり全身壊疽症状が発生しているのではないか」という新たな着想を得た。ROS の発生は様々な病原体の侵入に対して宿主が示す基礎的自然免疫による抵抗性反応のひとつである。すなわち、ウィロイド感染で誘導される自然免疫とその結果発動される防御反応の制御がウィロイドに対する防御機構として重要であり、且つ、その攪乱が病徴の発現にも関与している可能性が明らかになってきた。

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 20 件)

- 1) Tsushima T, Sano T. (2018) A point-mutation of *Coleus blumei* viroid 1 switches the potential to transmit through seed. *J Gen Virol.* 99: 393-401, doi: 10.1099/jgv.0.001013 査読有
- 2) Xia CJ, Li SF, Hou WY, Fan ZF, Xiao H, Lu MG, Sano T, Zhang ZX. (2017) Global transcriptomic changes induced by infection of cucumber (*Cucumis sativus* L.) with mild and severe variants of hop stunt viroid. *Front Microbiol.* 8:2427. doi: 10.3389/fmicb.2017.02427. 査読有
- 3) Kasai H, Ito T, Sano T. (2017) Symptoms and molecular characterization of apple dimple fruit viroid isolates from apples in Japan. *J Gen Pl Pathol* 83: 268-272. 査読有
- 4) Matoušek J, Siglová K, Jakše J, Radišek S, Brass Joseph RJ, Tsushima T, Guček T, Duraisamy GS, Sano T, Steger G. (2017) Propagation and some physiological effects of Citrus bark cracking viroid and Apple fruit crinkle viroid in multiple infected hop (*Humulus lupulus* L.). *J Plant Physiol.* 213: 166-177. 査読有
- 5) Suzuki T, Fujibayashi M, Hataya T, Taneda A, He Y-H, Tsushima T, Duraisamy GS, Siglová K, Matoušek J, Sano T. (2017) Characterization of host-dependent mutations of Apple fruit crinkle viroid replicating in newly identified experimental hosts suggests maintenance of stem-loop structures in the left-hand half of the molecule is important for replication. *J Gen*

- Virol. 98: 506-516. 査読有
- 6) Tsushima D, Tsushima T, Sano T. (2016) Molecular dissection of a dahlia isolate of potato spindle tuber viroid inciting a mild symptoms in tomato. *Virus Res.* 214: 11-18. 査読有
 - 7) Adkar-Purushothama CR, Kasai A., Sugawara K, Yamamoto H, Yamazaki Y, He Y-H, Takada N, Goto H, Shindo S, Harada T, Sano T. (2015) RNAi mediated inhibition of viroid infection in transgenic plants expressing viroid-specific small RNAs derived from various functional domains. *Scientific Reports* 5:17949 | DOI: 10.1038/srep17949. 査読有
 - 8) Nekoduka S, Kobayashi K, Fuji S, Okuda M, Sano T. (2015) Molecular epidemiology of Impatiens necrotic spot virus on greenhouse ornamental plants in a local area of Japan. *J Gen Pl Pathol.* 81: 429-438. (DOI 10.1007/s10327-015-0615-x) 査読有
 - 9) Adkar-Purushothama CR, Chennappa G, Poornachandra Rao K, Sreenivasa MY, Nagendra Prasad MN, Maheshwar PK, Sano T. (2015) First report of Chrysanthemum chlorotic mottle viroid Infecting Chrysanthemum in India. *Plant Disease, Disease Note* 99(12) : 1868. Doi. org/10.1094/PDIS-04-15-0428-PDN. 査読有
 - 10) Adkar-Purushothama CR, Brosseau C, Giguère T, Sano T., Moffett P, Perreault JP. (2015) Small RNA derived from the virulence modulating region of the Potato spindle tuber viroid silences callose synthase genes of tomato plants. *The Plant Cell* 27: 2178-2194. (August 2015 tpc.15.00523), doi: <http://dx.doi.org/10.1105/tpc.15.00523>. 査読有
 - 11) Adkar-Purushothama CR, Perreault JP, Sano T. (2015) Analysis of small RNA production patterns among the two potato spindle tuber viroid variants in tomato plants. *Genomics Data* 6: 65-66, S2213-5960(15) 30002-7. doi: 10.1016/j.gdata.2015.08.008 査読有
 - 12) Tsushima T, Sano T. (2015) First report of *Coleus blumei* viroid 5 infection in vegetatively propagated clonal *Coleus* cv. 'Aurora black cherry' in Japan. *New Disease Reports*, 32, 7. [<http://dx.doi.org/10.5197/j.2044-0588.2015.032.007>] 査読有
 - 13) Tsushima T, Matsushita Y, Fuji S, Sano T. (2015) First report of Dahlia latent viroid and Potato spindle tuber viroid mixed-infection in commercial ornamental dahlia in Japan. *New Disease Reports* 31: 11. 査読有
 - 14) 他 7 件

〔学会発表〕(計 26 件)

- 1) 直井崇、畑谷達児、葛西厚史、佐野輝男：トマトの RDR6 はジャガイモやせいもウイルス(PSTVd)の初期増殖と茎頂分裂組織内部への侵入を抑制する平成 30 年度日本植物病理学会大会 3 月 26 日、神戸市(神戸国際会議場), 2018.
- 2) 鈴木貴大、林勇作、菅原康平、藤林美里、葛西厚史、佐野輝男：ウイルス感染植物の矮化・葉巻症状に関連する宿主遺伝子の解析 平成 30 年度日本植物病理学会大会 3 月 26 日、神戸市(神戸国際会議場), 2018.
- 3) 池田翔、葛西厚史、種田晃人、奥田真生、鈴木貴大、佐野輝男：トマトの DCL2 と DCL4 はジャガイモやせいもウイルス(PSTVd)の初期増殖と病徴発現を抑制する 平成 29 年度日本植物病理学会大会 4 月 28 日、盛岡市(アイーナ), 2017.
- 4) 他 23 件

〔図書〕(計 1 件)

- 1) Hataya T, Tsushima T, Sano T. (2017) Hop stunt viroid, Chapter 19, pp. 199-210. in *Viroids and Satellites* (Eds. Hadidi, A. et al.) Academic Press, ISBN 978-0 12-801498-1. (他 4 章分担執筆)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://nature.cc.hirosaki-u.ac.jp/lab/3/plapath/>

6 . 研究組織

(1) 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

(2-1) 研究分担者

葛西 厚史 (KASAI, Atsushi)

弘前大学・農学生命科学部・研究員

研究者番号：80633982

(2-2) 研究分担者

種田 晃人 (TANEDA, Akito)

弘前大学・理工学研究科・准教授

研究者番号：70332492

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

海外研究協力者

Matoušek Jaroslav

Biology Centre ASCR v.v.i, Institute of

Plant Molecular Biology,

Czech Republic

Adkar Purushothama CR

RNA Group/Groupe ARN,

Université de Sherbrooke, Canada