

平成 30 年 9 月 10 日現在

機関番号：81101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07317

研究課題名(和文) ヤマノイモえそモザイクウイルス感染性クローンによるえそ病徴発現遺伝子の解明

研究課題名(英文) Analysis of virulence-related genetic region using Chinese yam necrotic mosaic virus infectious cDNA clone

研究代表者

近藤 亨 (Kondo, Toru)

地方独立行政法人青森県産業技術センター・農林部門・研究管理員

研究者番号：70543908

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：ヤマノイモえそモザイクウイルス(CYNMV)は、世界中のナガイモに発生して大きな減収の要因となっている。我々は、弱毒株を選抜しナガイモに保有させることにより、圃場に発生する強毒株の再感染を効果的に防ぎ、減収を抑えることを明らかにしてきた。本研究では、CYNMV強毒株と弱毒株のゲノム領域を部分的に組み替えたキメラウイルスクローンを作製し、パーティクルガンによりナガイモに接種して感染性を調査した。その結果、CYNMVゲノムのBamHI-SpeI領域が、ウイルスの病原性および/または感染性に関与する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Chinese yam necrotic mosaic virus (CYNMV) occurs in Nagaimo plants in the world and causes severe yield losses. We had selected an attenuated CYNMV strain and demonstrated that Nagaimo plants infected with the attenuated CYNMV strain were effectively protected from subsequent CYNMV infections that occurred in the field, thus preventing a substantial yield loss. In this study, different genomic regions of the severe CYNMV strain were replaced with the corresponding fragments of the attenuated strain to create a series of recombinants throughout the viral genome. The infectivity of chimeric cDNA clone was analyzed by biolistic inoculation of Nagaimo plants. Our results suggested that mutations in BamHI-SpeI region of CYNMV genome might influence the pathogenicity and/or infectivity of CYNMV on Nagaimo plants.

研究分野：植物病理学

キーワード：ヤマノイモえそモザイクウイルス

1. 研究開始当初の背景

ヤマノイモ類(ヤマイモ、*Dioscorea* 属作物の総称)は、世界のイモ類の中ではジャガイモに次ぐ重要な食料であるが、その栄養繁殖性のためにウイルス病による被害が大きい。我が国のヤマノイモ類の中で最も生産量が多い「ナガイモ」は輸出農産物の重要品目でもあるが、特にヤマノイモえそモザイクウイルス(CYNMV)の発生が多く、ほとんどの生産地域で被害を及ぼしている。CYNMVは、ナガイモの葉にえそモザイク症状を現し、30-45%もの減収を引き起こすことから、被害は全国で数十億円に上ると推定される。この対策として、これまでウイルスフリー種苗の生産、配布により対応されてきたが、生産圃場では、アブラムシにより付近の感染株から容易にウイルスが伝搬するため、被害が抑えられない状況である。このように重要病害でありながら、ナガイモ植物に含まれる粘性物質のためにウイルス精製実験が難しく、CYNMVに関する詳細な研究は為されていなかった。そこで我々は、効果的な防除対策を確立するため、以下の研究を行ってきた。

まず、困難であったウイルスの精製方法を改良し、ウイルス遺伝子の塩基配列を解析した。その結果、CYNMVはポティウイルス科マクルウイルス属に分類されることを明らかにした。また、これにより遺伝子診断法を確立した。更に、CYNMV遺伝子の多様性を調査した。次に、ウイルス病防除に最も効果的と考えられる、弱毒ウイルスを利用した防除に取り組んだ。その結果、弱毒ウイルス株を選抜してその識別法を確立し、弱毒株を保有するナガイモが、5年間の栽培を経ても圃場に発生する強毒株の再感染を完全に防ぎ、減収を防ぐうえ、形状の優れた良品の収量が増加することを明らかにした。この弱毒株による良品増収効果により、強毒株が感染してしまった場合に比べ、販売価格で1ヘクタール当たり186万円もの収入増になることも明らかとなった。更に我々は、実用化可能な安定した弱毒性を解析するには、まずえそ病徴の発現に関わるウイルス遺伝子を明らかにする必要があると考え、遺伝子機能解析の強力なツールであるウイルス感染性クロンの構築に取り組み、これに成功した。

2. 研究の目的

ウイルス感染性クローンとは、物体としては単なるDNAであるが、接種によりひとたび宿主細胞内に取り込まれるとウイルス遺伝子が発現し、自然界と同様にウイルスの感染・増殖を引き起こすことができる。この感染性クローンを利用すると、ウイルス遺伝子に導入した様々な変異が、ウイルスの増殖、移行、病徴発現等にどのように影響するかを直接的に証明することが可能である。ゆえに、我々の持つCYNMV感染性

クローンにより、これまで全く分かっていなかったマクルウイルス属の病原性関連遺伝子を、世界に先駆けて解明することができる可能性がある。本研究課題では、我々が開発したCYNMV感染性クローンを利用して、えそ病徴の発現に関わるウイルス遺伝子を特定し、弱毒ウイルスの実用化に向けた基礎的知見を得ることが目的である。

3. 研究の方法

CYNMVには、ナガイモ葉に激しいえそ病徴を生じさせ減収をもたらす「強毒株」と、ほとんどえそ病徴を生じず収量への影響がごく少ない「弱毒株」がある。我々が持つCYNMV感染性クロンのCYNMVゲノムcDNA領域は強毒株に由来しており、ナガイモに感染させた場合激しいえそモザイク症状を引き起こす。そこで、感染性クロンのCYNMVゲノムcDNA領域について、弱毒株由来cDNAによって一部入れ替えて得られるウイルス「キメラウイルス」を作製し、パーティクルガンを用いたナガイモへの接種により病徴の変化を観察することにより、えそ病徴発現に関与する遺伝子領域を探索した。この試験に先立ち、ウイルス感染細胞を可視化し接種による感染成立個体の効率的な選抜を可能にするために、緑色蛍光タンパク質(GFP)遺伝子を導入した感染性クロンの構築を試みた。また、キメラウイルスクローンを作製することと並行して、DNAの修復系に欠損を有する大腸菌宿主を利用したCYNMV感染性クローンへのランダム変異導入を行い、えそ病徴発現遺伝子の探索を試みた。更に試験期間を通じて、CYNMV感染性クローンをパーティクルガンによりナガイモへ接種した際の感染率を向上させる条件の検討を行った。

4. 研究成果

(1) CYNMV感染性クローンへのGFP遺伝子導入

本研究では、3種のGFP遺伝子導入クローンを作出した。最初に構築したGFP遺伝子の挿入位置は、感染性クロンの研究が比較的進んでいるポティウイルス属において幾つかの成功例が知られている、N1b遺伝子とCP遺伝子の間とした。目的のクローンを構築し、これまで220個体のナガイモへパーティクルガンによる接種を行ったが、感染個体は得られなかった。クローンの塩基配列解析により、予想外の変異は無かったことから、感染性喪失はN1aプロテアーゼによるGFP前後の切断に問題があることが予想された。次に、もう一つのウイルスプロテアーゼであるHC-ProのN末端側にGFPを融合させたクローンを作製した。これについてもこれまで51個体のナガイモへ接種を行ったが、感染個体は得られなかった。そこで更に、融合タンパク質と

野生型 HC-Pro を同時発現可能なクローンを構築した。これまで 72 個体のナガイモへ接種を行ったが、感染個体は得られなかった。以上のように、構築した 3 種の GFP 遺伝子導入クローンは、研究期間内に感染性を確認することが出来なかった。

(2) キメラウイルスおよびランダム変異導入によるえそ病徴遺伝子の探索

病徴変異ウイルスの作出を目指した、KM3 株(弱毒株) cDNA を用いたキメラウイルスクローンの作製、およびランダム変異導入クローンの作製を進めた。KM3 株 cDNA は、ゲノムを大きく 3 つの部分に分けキメラウイルスクローンを作製した。そのうち KM3 ゲノムの上流部分を入れ替えたクローン、および中流部分を入れ替えたクローンは、ナガイモへの接種により複数の感染個体が得られたが、いずれの個体も元クローンによる感染個体と比べ病徴に変化は認められなかった。一方、下流部分を入れ替えたクローンはこれまで 32 個体のナガイモに接種を行ったが、感染個体は得られなかった。そこで、組み替えた領域(BamHI ~ SpeI 領域)の塩基配列を解析した。その結果、アミノ酸の変化を伴う塩基置換が 5 箇所見出された。そこで、元の感染性クローンにこれら塩基置換をそれぞれ 1 箇所のみ導入したクローン(5 種の点変異導入クローン)を新たに作出した。これらのクローンを用いてこれまで 122 個体のナガイモへ接種したが、研究期間内に感染が確認できた個体は得られなかった。ランダム変異導入クローンについては 68 クローンが得られ、順次ナガイモへの接種を行ったところ、7 クローンで感染が確認されたが、いずれのクローンも病徴に変化が認められなかった。

以上の結果から、CYNMV ゲノムの下流部分である BamHI ~ SpeI 領域が感染性・病原性に関与する可能性が示唆されたものの、病原性に直接結びつく変異箇所を特定するには至らなかった。

(3) CYNMV 感染性クローンのナガイモへの感染率に影響する条件

CYNMV 感染性クローンをナガイモに接種した場合の感染率は、研究の進んでいるポテウイルス属ウイルスに比べかなり低い。更に研究開始一年目には、クローンが感染性を失う事象が認められた。そこで、研究期間内に見出された、CYNMV 感染性クローンをナガイモに接種し感染させるために考慮すべき 2 点を以下に示す。

一つ目は、CYNMV 感染性クローンを大腸菌で増幅する場合、用いる大腸菌株に注意が必要な点である。大腸菌によるプラスミド DNA の増幅は、通常ほとんど変異が入ることのない安定的な増幅方法であり、多くの研究室で日常的に行われている実験方法である。一方、本研究において、CYNMV 感染性クローンを大腸菌で増幅する際に、ウイルスゲノム領

域に短い DNA 断片が挿入される、或いは塩基の点変異が入る、等の事象が頻繁に起こり、新たなウイルスクローンの構築と全塩基配列の確認にかなりの時間と労力が割かれた。そこで、本研究のような比較的大きなプラスミド(10kb 以上)の増幅に向いているとされる幾つかの大腸菌株を形質転換に用いて比較したところ、DH10B と呼ばれる大腸菌株が比較的安定した増幅が可能であることが明らかとなった。今後は、この大腸菌株を使用することでより効率的な試験が可能と考えられる。

二つ目は、接種に用いたムカゴ(ナガイモ植物の地上部葉腋にできる栄養繁殖体)の大きさの違いにより感染率が大きく異なる可能性がある点である。本研究では、ムカゴをポットに播き、第 1 本葉の葉幅が 1~2cm 程度になったものをパーティクルガン接種に用いていた。使用している材料は、県内 J A 等への配布を目的に当センター内で生産しているウイルスフリームカゴであり、年次によりムカゴの大きさがかなり異なっていた。本研究期間においては、平成 27 年度(平成 25 年産)、平成 29 年度(平成 27 年産)は 1 個 1g 以下の小粒のムカゴが多く、平成 28 年度(平成 26 年産)は、1.5g 以上の比較的大粒のムカゴが多かった。一方、CYNMV 感染性クローンによる感染効率(感染個体/接種個体)は、平成 27 年度、平成 29 年度は 1%以下とかなり低く、平成 28 年度は 10%程度と安定していた。また、ムカゴの大きさにより、葉の質(堅さ、皺の深さ等)に違いがみられた。これらのことから、ムカゴの大きさが感染率に大きく影響している可能性が高く、今後更に確認することで、試験効率の向上が図られると思われる。

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 0 件)

[学会発表](計 0 件)

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

近藤 亨 (KONDO, Toru)
青森県産業技術センター・農林部門・研究
管理員
研究者番号：7 0 5 4 3 9 0 8

(2) 研究分担者

佐野 輝男 (SANO, Teruo)
弘前大学・農学生命科学部・教授
研究者番号：3 0 1 4 2 6 9 9

(3) 連携研究者

()

研究者番号：

(4) 研究協力者

()