

令和 2 年 6 月 17 日現在

機関番号：13801

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K19263

研究課題名(和文)異種病原体の重複感染により劇症化する植物病の分子解剖

研究課題名(英文)Enhanced virulence induced by coinfection with plant virus and bacteria

研究代表者

平田 久笑(Hirata, Hisae)

静岡大学・農学部・准教授

研究者番号：00432196

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,700,000円

研究成果の概要(和文)：植物病における異種病原体の重複感染の影響を調べることを目的として、リングステムグロウイングウイルス(ASGV)に感染したカンキツの葉にカンキツかいよう病菌(*X.citri*)を接種する実験系を試した。その結果、*X.citri*の増殖量および病斑サイズはASGV非感染葉に単独接種した場合と比べ促進され、*X.citri*の感受性に関わる遺伝子は発現上昇し、また一方で抵抗性関連遺伝子の発現は抑制されることがわかった。この結果は、圃場でも再現され、カンキツ品種間で応答に差があること、ASGV-*X.citri*の特異的な反応であることなどを確認した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

従来の重複感染の研究は、病原性が弱い系統や、非病原性系等を用いた近縁種を用いた交叉反応による生物的防除法を目的とした例が多く、異種病原体の重複感染に関する知見は限られていた。本研究では、研究材料としては例が少ない果樹のカンキツをモデルに、病原細菌と病原ウイルスの重複感染の実験系を立ち上げ、ウイルス感染が細菌病の発病を促進することを示した。永年生の果樹では潜在感染するウイルスも多く報告されており、植物病の診断では病原性の変化により特定が難しい事例もある。重複感染が病徴発現に影響を及ぼすことが具体的に示されたことで、ターゲットを広げた病害管理の重要性を示すことができた。

研究成果の概要(英文)：To understand the influence of coinfection with a plant virus and a plant pathogenic bacterium, *Xanthomonas citri* pv. *citri* (Xcc) was inoculated to leaves of citrus plants infected with Apple stem grooving virus and to leaves of uninfected plants. After inoculation with Xcc, the population of Xcc and the size of citrus canker lesions on ASGV-infected leaves were larger than those on ASGV-uninfected leaves. Expression of genes related to canker formation was highly upregulated and that of genes related to plant defense responses was repressed after coinoculation with ASGV and Xcc, relative to Xcc alone, suggesting that the defense response against Xcc was suppressed by ASGV infection.

研究分野：植物病理学

キーワード：カンキツ ウイルス 細菌

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

植物病の病害研究、診断や同定では、1種類の病原体とその感染植物の関係を調べることであり、微生物—宿主の相互作用について分子レベルに至るまで多くの知見が蓄積されてきた。一方で、自然界では2種類以上の病原体が1つの植物個体に感染する重複感染の例が知られているが、これに伴う微生物間の相互作用や植物の応答変化、また病徴発現への影響については研究例が少ない。重複感染の研究が、ウイルス同士あるいは細菌同士など、分類上の種が近い関係を利用した生物的防除を目的とした成果が多い背景もあり、特に異種病原体の重複感染については知見が乏しい。近年は、実際の栽培現場で異種病原体の重複感染が発病を促進させることが見出され、微生物種の垣根を超えた植物病研究のニーズが高まっていると考えられた。

2. 研究の目的

本研究では、細菌とウイルスという異なる感染様式をもつ2種類の病原体の重複感染による病態変化を調べることであり、微生物—微生物—宿主（あるいは、微生物—宿主—微生物）の相互作用について知見を得ることを目的とした。先進的なゲノム解読技術の普及に伴い、微生物と宿主の相互作用研究は、その対象を単一の微生物種に限定せず、微生物叢の複合的な影響を含めて議論することが可能となり、またそれが植物病の診断や防除研究の有効な新知見と基盤になると期待できる。ウイルス病と細菌病という組み合わせによる病徴発現への影響について、植物品種や病原体の種を変えた場合も含めて比較解析を試みた。

3. 研究の方法

(1) 重複感染の接種試験

リンゴステムグルーピングウイルス (ASGV) [同種別系統にカンキツタターリーフウイルス (*Citrus tatter leaf virus*; CTLV) を含む] は、接木により伝搬されることが知られている。重複感染に用いる ASGV 感染樹は、① ASGV ゲノムの感染性 cDNA 配列を保持する *Agrobacterium tumefaciens* 系統を接種したカンキツ (品種 ナツダイダイ) と、② ASGV 感染樹を穂木とした接木株 (穂木品種は、黄金柑と太田ポンカン) の育成を行い、カンキツ複数品種のウイルス感染樹を作出した。また、温州萎縮ウイルス [*Satsuma dwarf virus*; SDV] については、本研究では感染性クローンの確立には至らなかったが、上述の②の方法により、SDV 感染樹を穂木とした接木 (穂木品種は、青島温州と太田ポンカン) により感染樹を作出した。また圃場で栽培されるカンキツの感染樹 (偶発的にそれぞれのウイルス感染が認められたカンキツ樹) も用いて、実験室環境と同様な現象が屋外の自然環境で再現されるか確認した。

植物病原細菌であるカンキツかいよう病菌 (*Xanthomonas citri* subsp. *citri*; X.citri) の接種は、カンキツ葉表面へのシリンジを用いた注入接種および、自然感染と同様な病斑を形成できるような虫ピンを用いた針接種により行なった。対照区としては、1) ASGV ゲノムの cDNA 配列非挿入のプラスミドを保持する *Agrobacterium tumefaciens* 系統を接種した株、2) ASGV および SDV の非感染樹を穂木とした接木により作出した株を用いて接種を行なった。接種後は、継時的な病徴観察を行い、また葉の接種領域を採取して全 RNA を抽出することにより遺伝子発現解析に用いた。

カンキツの病原体の重複感染による病原性の変化について、普遍的または特異的な現象を調べるため、草本植物であるマメ科植物を宿主として、モザイク症状を呈するウイルスと、X.citri と同じく *Xanthomonas* 属グループに分類される病原細菌の組み合わせによる重複感染の実験系を確立した。両者の宿主となるマメ科植物に重複接種して、それぞれの単独感染の場合と病原性を比較した。

(2) 遺伝子発現解析

接種部位より抽出した全 RNA を用いて、定量 PCR により植物遺伝子の発現量を解析した。病原体感染に対する植物の防御応答関連遺伝子、またカンキツでは X.citri の感受性遺伝子の発現について、ウイルス感染植物に病原細菌を接種した後に葉を採取して遺伝子発現量の変動を調べた。

4. 研究成果

カンキツのウイルス病には、ASGV (CTLV) による接木部異常病や、温州萎縮ウイルス (*Satsuma dwarf virus*; SDV) による葉の黄化や奇形を伴う病害が知られる。ASGV は、宿主内のウイルス蓄積量が季節により変動するため確実なウイルス検定が困難であり、感染穂木の接ぎ木により伝搬されると、後に接ぎ木部に離層を形成し、徐々に樹勢を衰えさせ枯死させる。また伝搬様式が未だ不明の SDV は、感染樹を圃場から取り抜いて蔓延を防ぐが、実質的な発生子防が難しい。ウイルスは宿主細胞の中で自己増殖を繰り返し、細胞間移行を経て植物全体に広がるため、植物は一度の感染により枯死するまでウイルス感染状態が続く。特に永年性の果樹類のウイルス病は発病に至るまで時間を要するため、病原性因子の動態解析に関する知見が乏しく、潜在感染の状態が長く続く場合や、複数の病原体に感染する機会が多いと予想される。

カンキツかいよう病（病原細菌 *X. citri*）は、カンキツ栽培地域で広く発生が認められ、欧米諸国では輸入規制や厳しい検疫の対象とされる重要病害のひとつである。感染初期は葉や果実の感染部位において退緑した水浸状病斑を形成し、その後に宿主の細胞分裂を盛んにして感染組織を隆起させて、最終的に中心部が細胞死により褐変してコルク化した斑点病斑「かいよう」を形成する。経時的な変化を遂げるユニークな病徴発現には、*Xanthomonas* 属細菌に広く保存されるエフェクターである Bs3/PthA タンパク質が、*X. citri* の菌体内で生産された後、タイプ III 型分泌装置を介して植物の細胞内に送り込まれ、次いで宿主細胞の核へ移行し、特異的なプロモーター配列に結合して植物遺伝子の転写を活性化することで病徴発現に至ると推測される。この転写活性の機能から、TAL (transcriptional activator-like) エフェクターと称され、感染と発病に関わる遺伝子の特異的な制御に寄与すると考えられるが、細胞内挙動の実像や詳細な機能解明が課題となっている。TAL エフェクターそのものの発現制御については、病原性細菌に特有な *hrp* 遺伝子群を介した転写時、また翻訳後の制御が予想されるが未解明な部分が多い。ウイルスとの重複感染による細菌病の発病への影響を調べるには、ウイルス感染した細胞内環境で *X. citri* の病原性因子の発現がどのように制御されるか調べる必要があると考え、重複感染後の遺伝子の発現量について解析して病原性との相関を確認した。

(1) カンキツにおける重複感染

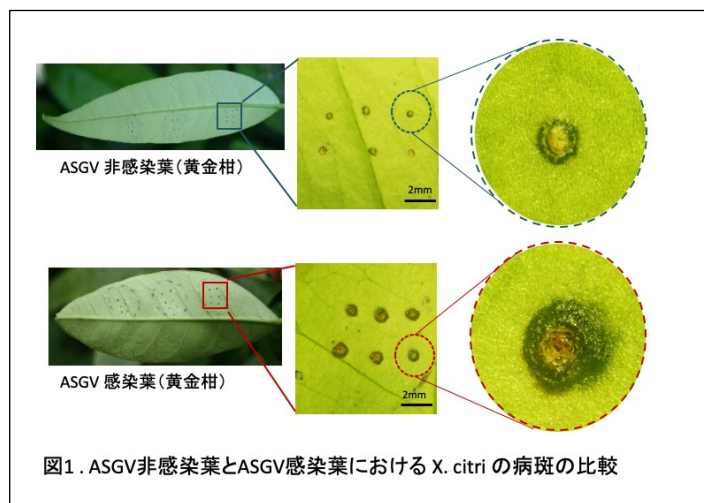
ASGV(CTLV)に感染したカンキツに、*X. citri* を接種した結果、双方の病原体ともに単独感染の場合より葉内での増殖量が増すことが見出された。特に、*X. citri* によるかいよう病の病斑形成のタイミングは早まり、結果的に病斑サイズも大きくなった。この現象は、実験室でポット栽培するカンキツの他、圃場栽培のカンキツでも再現された（図 1）。また複数のカンキツ品種間での違いを調べたところ同様な傾向が認められたが、病原性の程度には差があり、ナツダイダイや黄金柑では重複感染の影響が顕著である一方で、太田ポンカンでは病原性変化の再現性は乏しかった。SDV 感染樹を用いた同様の検定では、重複感染による病原性の顕著な変化は観察できず、*X. citri* の病原性の激化は ASGV 感染樹での特異的な反応である可能性が考えられた。

遺伝子発現解析の結果、ASGV 感染樹では *X. citri* の接種後速やかに *X. citri* の感受性とかいよう形成に関わる遺伝子の発現量が ASGV 非感染樹よりも上昇し、また防御応答関連の遺伝子発現量は ASGV 非感染樹の方が高かった（図 2、図 3）。これら遺伝子発現の変動は、病原性の程度と相関しており、ASGV 感染樹では病害抵抗性が抑制されて *X. citri* の病原性が強まることが示された。

(2) マメ科植物における重複感染

草本植物であるマメ科植物にモザイク症状を呈するウイルスと、*Xanthomonas* 属病原細菌の重複感染においても、細菌病への宿主応答の変化が認められた。ウイルス感染による明瞭なモザイク症状が発現する前に、病原細菌を接種すると細菌の葉内増殖は抑制され、これはウイルス接種により誘導された初期段階の防御応答が作用した結果と解釈できた。しかし一方で、ウイルス感染による明瞭なモザイク症状が発現して間もない葉に病原細菌を接種すると、ウイルス非感染の葉に接種した場合と比べて病徴が激化した。

これらの研究より、ウイルス感染が細菌病の病原性を強める複数の事例が示されたことから、病害防除の観点からは潜在感染性のウイルスについても影響を調べる重要性を示唆できた。またウイルス感染のプロセスに従い、細菌病の発現を抑制するタイミングと、促進するタイミングがあると考えられた。まだ知見の少ない植物病における微生物間のクロストークと重複感染による病原性のシナジズムという概念を確認できた。



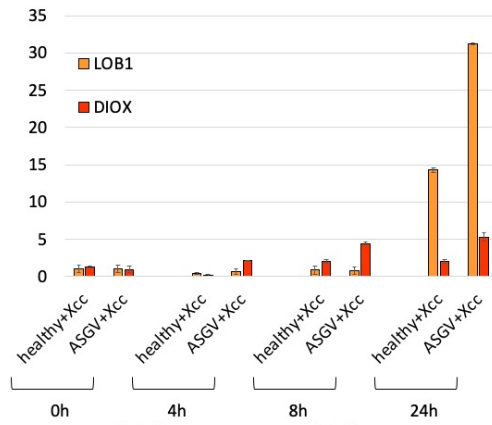


図2. ASGV非感染葉 (healthy+)とASGV感染葉(ASGV+)における X. citri (Xcc)接種後のかいよう形成に関わる遺伝子発現量の比較
Lateral Organ Boundaries (LOB) gene family, Citrus dioxygenase (DIOX)

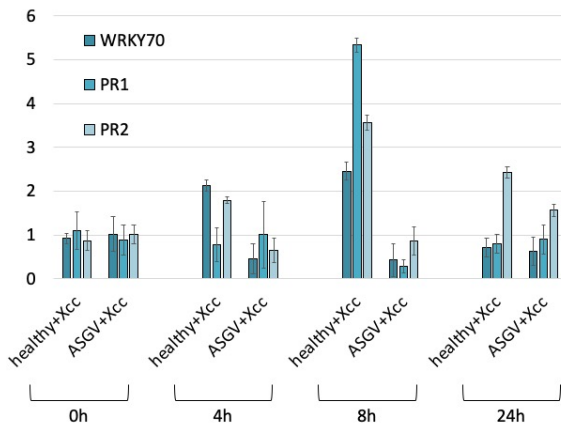


図3. ASGV非感染葉 (healthy+)とASGV感染葉(ASGV+)における X. citri (Xcc)接種後の防御応答関連遺伝子の発現量の比較

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 Ayaha Iwai, Misako Kashihara, Yukari Okano, Masaki Yahata and Hisae Hirata
2. 発表標題 Enhanced virulence of <i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>citri</i> after coinfection with Apple stem grooving virus in citrus trees
3. 学会等名 International Congress of Plant Pathology (ICPP) 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 岩井 彩葉, 柏原 美紗子, 岡野 夕香里, 平田 久笑
2. 発表標題 ASGVの感染によりカンキツの <i>Xanthomonas citri</i> subsp. <i>citri</i> に対する感受性は高まる
3. 学会等名 平成29年度日本植物病理学会大会
4. 発表年 2017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
連携研究者	八幡 昌紀 (Yahata Masaki) (60420353)	静岡大学・農学部・准教授 (13801)	