

令和 3 年 6 月 26 日現在

機関番号：81202

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K05661

研究課題名(和文) 難防除植物RNAウイルスの伝搬機構の解明と感染系の確立

研究課題名(英文) Analysis of transmission mechanism of an unusual plant RNA virus and establishment of its infection system

研究代表者

藤崎 恒喜 (Fujisaki, Koki)

公益財団法人岩手生物工学研究センター・園芸資源研究部・主任研究員

研究者番号：30626510

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：リンドウこぶ症は新種のリンドウこぶ症関連ウイルス(GKaV)による病害と考えられるが、感染実験系がなくGKaVの伝搬機構も不明である。土壌細菌からGKaVのシグナルが検出されたため、その細菌をリンドウに接種したが、GKaVを感染させることには成功しておらず、GKaV感染への関与は明らかではない。一方、本課題で弱症状リンドウ株等が得られ、今後の解析で有用な材料となると考えられる。この他、本課題を介して偶然見出されたシクテウオーターボーンウイルス(SWBV)の低温依存的増殖特性を利用して高精度にウイルス感染を制御可能な新規の植物ウイルス間相互作用実験系を確立することができた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

GKaVは近縁のウイルスが知られていない新種のウイルスで、感染機構の情報はなく、ユニークな特徴を持つことも期待される。GKaV感染への関与を証明するには至っていないが、土壌細菌からGKaVが検出され、これまでにない細菌を介した植物ウイルスの伝搬機構の存在も示唆される。GKaVは農業上も大きな問題となっているリンドウこぶ症の病原体と考えられ、本研究で得られた弱症状リンドウ株等はこぶ症防除のための耐病性研究においても有用な材料である。また、本研究の過程で偶然得られたSWBVを用いて、新規の植物ウイルス間相互作用の解析実験系が確立されるなど植物ウイルス学に寄与する新たな展開も見せている。

研究成果の概要(英文)：Gentian Kobu-sho-associated virus (GKaV), which is regarded as the pathogen of Kobu-sho disease in gentians, is a novel plant RNA virus. The transmission mechanism of GKaV in fields remains unknown, and mechanical inoculation of GKaV to gentians has not been succeeded. In this study, we detected GKaV in bacteria in soil and gentian root. However, inoculation of the GKaV-positive bacteria to gentians has not led to GKaV infection. Therefore, the involvement of the bacteria in GKaV infection is not clear. On the other hand, we obtained GKaV-infecting Nicotiana plants and gentians showing attenuated symptoms of GKaV, which will be useful materials for future analysis of GKaV. In addition, we identified Sike waterborne virus (SWBV) from gentians showing unknown disease symptoms, which shows low-temperature preferred multiplication in gentians and arabidopsis. This finding led to the establishment of novel forward genetics system of arabidopsis to analyze plant-virus interactions.

研究分野：植物病理学

キーワード：RNAウイルス リンドウこぶ症 土壌伝搬 GKaV

1. 研究開始当初の背景

植物ウイルスには多様な種類が存在し、特異な性質を持つにも関わらず解析が困難なウイルスも多い。本研究は、新属に属するウイルスである *Gentian Kobu-sho-associated virus* (GKaV) に焦点を当てる。GKaV はその感染が農業上大きな問題となっているリンドウこぶ症の発症と密接に関連しているが(引用文献1)、自然界での伝搬経路は未知で、実験室レベルでの植物体への機械接種にも成功していない。これらの問題は、GKaV 研究の大きな障害となっている。GKaV は圃場の端の株から主に発症し、隣接する株に複数年かけて(リンドウは多年性作物)伝搬する傾向から土壌伝染の可能性が考えられている(引用文献2)。そこで申請者らはこぶ症発症株が出現したコンテナの土壌から、細菌、糸状菌を分離し、*Burkholderia* 属などのいくつかの細菌種において GKaV を検出した。以上の結果は、土壌細菌を介した GKaV 伝搬の可能性を示唆している。

2. 研究の目的

本研究は、遺伝子操作系がなく機械接種もできない植物 RNA ウイルス、GKaV を研究対象とし、そのウイルス学的研究を促進するために、GKaV 伝搬機構の解明と人工接種系の確立を目的としている。土壌中の細菌から GKaV が検出されることに基づき、極めて異例な土壌細菌を介したウイルス伝搬の可能性が示唆された。この GKaV 伝搬経路の解明により、これまでよく知られていない土壌細菌によるウイルス伝搬機構に切り込むとともに、それを活用した新規ウイルス接種系の構築を行う。これにより、GKaV のウイルス学的解析を可能とし、弱毒ウイルスやこぶ症耐性リンドウの選抜を行うことを目的とする。

3. 研究の方法

(1) こぶ症発症能をもつ土壌の解析

こぶ症発症圃場の土壌および健全圃場土壌の生物相をメタゲノム解析により網羅的に比較解析する。さらに、以前土壌細菌から GKaV が検出されたため特に着目し、GKaV 保持細菌の特異性、季節変動、健全/発病圃場での菌数を調べる。また、GKaV 保持細菌を無菌培土と混合、もしくは実験室内でのリンドウ培養組織と接触させることにより、こぶ症発症能を検証する。

(2) GKaV人工接種系の確立

上記解析で同定/単離された土壌微生物のうち、GKaV が検出された生物種を中心に、GKaV 非存在株へのウイルス再導入試験を行う。ウイルスの保持が確認された微生物をリンドウ組織に処理し、GKaV の感染/伝搬能を検討する。

(3) GKaV変異株の作出と病原性評価

こぶ症発症圃場や実験室内での培養組織では、GKaV が感染しているにも拘らず無・弱病徴のリンドウ株が稀に見出される。これらの株を解析し、GKaV 弱毒株もしくはこぶ症耐性リンドウ作出の端緒とする。

4. 研究成果

こぶ症発症圃場の土壌および健全圃場土壌やこぶ症発症株および健全株根圏のメタゲノム比較

解析により、こぶ症株で存在比が上がっている細菌種として *Pseudomonas* 属菌、*Burkholderia* 属菌や *Luteibacter* 属菌等を同定した。PDA 培地上での細菌単離ではこぶ症発症株根圏から多くの *Burkholderia* 属菌が単離され、メタゲノム解析の結果と一致する結果を得た。PDA 培地上で単離された *Burkholderia* 属菌を始めとする各種菌株における GKaV を RT-PCR で調べ、GKaV 陽性株をリンドウ苗および培養リンドウ組織に接種し、温度（10、18、23）接種組織（根、茎、葉、越冬芽）の条件についても検討を行ったが、複数年にわたる経過観察においてもこぶ症発症と GKaV 感染の再現を確認することができず、当該細菌を介した GKaV 感染を証明することはできていない。

また、本研究において、こぶ症発症リンドウの培養組織を培地上で継代していく過程で、症状が緩和した組織を選抜・継代することにより、GKaV 弱毒系統もしくはこぶ症耐性リンドウ候補株となるこぶ症緩和リンドウ組織の選抜を行った。得られたこぶ症緩和リンドウ組織 (AS24) は根の発達阻害とこぶ形成は観察されるが地上部の生育阻害は緩和していた (図 1)。より症状が緩和した系統の獲得を目指し、本系統を元にした選抜と継代を継続するほか、リバピリン処理による GKaV もしくはリンドウ組織への人為的変異導入を行っているが、こぶ症状が認められなくなるほどの系統は選抜されていない。

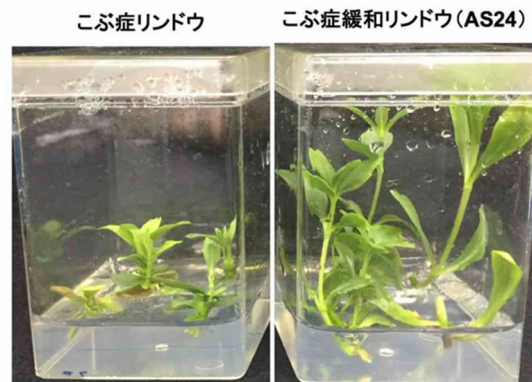


図1 培養リンドウの選抜・継代で得られたこぶ症緩和候補株 (AS24)

一方、こぶ症緩和リンドウ組織獲得の一環として、野外圃場のこぶ症発病域内で健全に生育しているリンドウ株をこれまでに、20 株収集し、GKaV 感染とこぶ症発症に関する経年的な観察を行い、現在 10 株をこぶ症耐性リンドウ候補株として維持している。これらを GKaV 弱毒系統もしくはこぶ症耐性リンドウ候補株として解析を進めている。

また昨年度、こぶ症発病圃場にセンニチコウ、花タバコなどのリンドウ以外の園芸植物を定植したところ、花タバコにおいて GKaV 感染と激しい生育阻害が認められた。花タバコなどのニコチアナ植物は実験室レベルでの有用なモデル実験系となりうるため、現在、罹病組織の培養・維持を行なっている。

並行して、典型的なこぶ症状以外のリンドウの原因不明症状における GKaV の関与、および GKaV 感染こぶ症株における他のウイルスの共感染の影響を調べた。その過程で岩手県内のリンドウにおける新奇病害からリンドウウイルス A (GeVA) 及びシクテウオーターボーンウイルス (SWBV) という 2 種のトムプスウイルスを同定した。ユニークな特性として両ウイルスは低温 (18) ではリンドウおよびシロイヌナズナで効率よく増殖・発病するが、より高温 (GeVA では 23 以上、SWBV では 28 以上) ではウイルス感染が認められなくなることがわかった。少なくとも 1 細胞レベルでのウイルス増殖が影響を受けており、タバコなどではこの現象は観察されないほか、RNA silencing 等の既知の植物免疫システムの関与も認められなかった。GeVA は新種のトムプスウイルスであると考えられた (引用文献 3)。一方、SWBV はスターチス等での感染報告があり、シロイヌナズナへの病原性は GeVA よりも強く、遺伝子操作系の確立にも成功した。その後の解析で、SWBV の多くの系統はシロイヌナズナへの感染能力がないこと、リンドウから単離された C1 系統のみがゲノム RNA の 3' 非翻訳領域への変異により、低温依存的にシロイヌナズナに感染することを見出した。

本研究ではこの SWBV の特性に着目し、ウイルス増殖を高度に制御可能なハイスループットの宿主 - ウィルス間相互作用解析実験系の確立を試みた。上記研究で独自に単離した SWBV-C1 系統の全長ゲノムをエストラジオール誘導プロモーターの制御下で発現させる形質転換シロイヌナズナを作出した。その形質転換体にエストラジオールを処理すると、18 で SWBV 様の病徴が観察されたが 28 では観察されず、ウイルス外被タンパク質 (CP) の蓄積も検出されなかった (図 2)。さらに、ウイルス増殖制御の精度を確認するため、形質転換体の組織破碎液を SWBV 高感受性のベンサミアナタバコに接種した。その結果、18 ではエストラジオールを処理しなくても全ての系統で破碎液が病原性を示し、わずかに発現した SWBV がある程度自立増殖していると考えられたのに対し、28 ではエストラジオールを処理しないとほとんどの形質転換体系統 (15 系統中 14 系統) で組織破碎液の病原性が確認されず、誘導プロモーターと温度シフトを組み合わせることで、より高精度のウイルス増殖制御が可能であることが確認された。また、発病個体を改めて 28 に移すと健全な生育を再開し、採種が可能となる利点があることもわかった。本実験系はウイルス-植物間相互作用の順遺伝学的解析に有用であると考えられ、本課題を通して得られた知見から新たな展開に結びつけることができた。

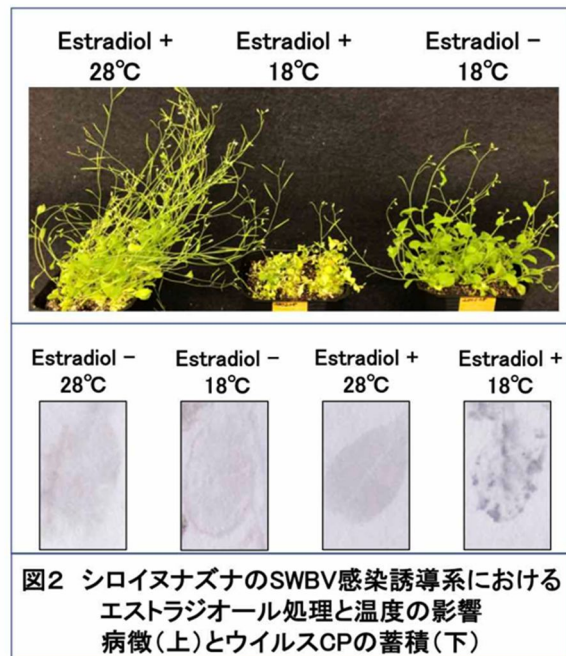


図2 シロイヌナズナのSWBV感染誘導系におけるエストラジオール処理と温度の影響
病徴(上)とウイルスCPの蓄積(下)

<引用文献>

- (1) 小林ら、2013、 J. Gen. Plant Pathol、 79 、 56-63.
- (2) 小山田ら、2016、 北日本病虫研報、 67、 119-121
- (3) 藤崎ら、2018、 Archives of Virology、 163、 2477-2483

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Fujisaki Koki, Tateda Chika, Abe Yoshiko, Dominguez John Jewish A., Iwai Mari, Obara Kazue, Nakamura Taiiki, Iwadata Yasuya, Kaido Masanori, Mise Kazuyuki	4. 巻 166
2. 論文標題 Infectious in vitro transcripts from a cDNA clone of a Japanese gentian isolate of Sikte waterborne virus, which shows host-specific low-temperature-dependent replication	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Archives of Virology	6. 最初と最後の頁 1991 ~ 1997
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00705-021-05074-2	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 Fujisaki Koki, Abe Yoshiko, Tateda Chika, Iwai Mari, Kaido Masanori, Mise Kazuyuki	4. 巻 286
2. 論文標題 Host specific preference for low temperature in the multiplication of a tombusvirus, gentian virus A	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Virus Research	6. 最初と最後の頁 198048 ~ 198048
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.virusres.2020.198048	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1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 藤崎恒喜・館田知佳・阿部善子・岩井摩莉・中村太紀・岩館康哉・海道真典・三瀬和之
2. 発表標題 岩手県内のリンドウから単離されたシクテウォーターポーンウイルスの遺伝子操作系の確立
3. 学会等名 日本植物病理学会 東北部会
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	清水 元樹 (Shimizu Motoki) (90734343)	公益財団法人岩手生物工学研究センター・ゲノム育種研究部・主任研究員 (81202)	

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
---------	---------