

令和 3 年 6 月 5 日現在

機関番号：11501

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K14457

研究課題名(和文)キクとウイルスの温室生態学

研究課題名(英文)Analysis on seasonal dynamics of CSVd population in Chrysanthemum

研究代表者

鍋島 朋之(Nabeshima, Tomoyuki)

山形大学・農学部・助教

研究者番号：10801920

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): ウィロイドは一本鎖RNAから成る植物に感染する病原体であり、現在30種以上が報告されている。同一種内にも多様な変異があり、これらの変異が植物の病徴発達に影響することが知られている。本研究ではキクにおける重大病原体であるキク矮化ウイルス(CSVd)について、季節に応じた環境の変動がキク個体中のCSVd集団の構成に与える影響について調査した。4品種・3時点でCSVd集団構造とCSVd濃度を調査した結果、多数のCSVd系統を検出できたが、濃度や時点に関してCSVd集団構成との明瞭な関係性は見出せなかった。従って、これらの変異は環境要因とは無関係に、ランダムに生じたものだと考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ウィロイドは非常に速い変異速度を持つことが知られる。次世代シーケンサーを使った変異系統の網羅的解析は過去にも試みられてきたが、本研究で実施したような、変動環境下における多時点解析は例が無かった。今後更なる検証が必要ではあるが、ウィロイドの進化と環境要因との関係性を理解するために、重要な手がかりとなるデータを得ることができた。

研究成果の概要(英文): Viroids are small, circular, highly structured RNA without protein coding region. They are the smallest infectious agents in plants and cause various symptoms, which sometimes result in significant economic loss in agriculture. Of these, Chrysanthemum stunt viroid (CSVd) is a member of Pospiviroidae family and has been identified as a causal agent of chrysanthemum stunt disease. We studied the effect of environment on establishment of CSVd population in chrysanthemums. Using high-through-put sequencing technology, CSVd-infected materials harvested at three different time point (summer, winter and spring) were analyzed. We found no obvious correlation between seasons and detected CSVd sequences. Thus, it was considered that seasonal dynamics of CSVd population was due to randomly occurring mutations.

研究分野：園芸学

キーワード：ウィロイド キク RNA

1. 研究開始当初の背景

ウイロイドはタンパク質をコードしない 250-400 nt の環状一本鎖 RNA から成る病原体である。多様な農作物において世界中でウイロイドによる被害が報告されているが、防除法は確立されていない。ウイロイドによる病徴の発現には、温度や光などの環境要因、感染配列の違いの関与が報告され、ウイロイドの生体内濃度や植物体の生育状態なども影響力を持つことが予想されるものの、これらがどのように統合されて病気という結果に至るのかは明らかでない。これまでの病徴発現に関する研究は、接種配列の比較や、単一配列を用いた育成条件の比較検討など、試験中の配列変異を想定しないものに限られてきた。しかし、ウイロイドは他の RNA 性病原体と比較しても非常に速い変異速度を持ち、一塩基の変異は病徴のみならず、複製効率や生体内移行効率にも大きな影響を及ぼし得ることから、生体内におけるウイロイドの変異は濃度変動や、最終的な病徴発現に大きなインパクトを持つはずである。また、気温などの外的要因がウイロイドの変異や濃度変動に直接的な影響力を持つ可能性も無視できない。実際の生産現場でどのようにウイロイド病害が生じているのかを理解するために、環境と、宿主/寄生者の双方の状態変化を考慮に入れた研究が必要であった。

2. 研究の目的

CSVd はキクに矮化などを引き起こす最重要病害のひとつであり、100 種以上の配列 (354-356 nt) がデータベース上に登録されている。筆者はこれまでに、32 のキク品種について圃場における長期間の接種試験を実施し、感受性品種においても CSVd 濃度の変動が見られることや、単一植物体において複数配列の重複感染が頻繁に起こっていることを見出している。本研究では、このような CSVd 濃度変動と多様性について経時的に調査し、周期性や方向性の有無を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

【植物材料・CSVd の接種】

2018 年度の試験では、CSVd 感受性品種であるキク‘ピアト’の CSVd フリー株を用いた。植物体は挿し木により維持し、発根した挿し穂をプラスチックポットに定植して実験に使用した。栽培は京都大学農学研究科附属農場内のガラス温室において実施した。In vitro で転写した CSVd のセンス鎖二量体 RNA を蒸留水で 50 ng/μl に調整し、20 μl をペンチの刃に塗布した。これで、展開葉を 5 枚持つ植物体の第 3 葉の中肋を一度挟むことで接種を行った。接種から 2 か月後に展開最上位葉から RNA を抽出し、RT-PCR 法により CSVd の感染を確認した。

2020 年度の試験は、山形大学農学部実験圃場において実施した。実験に使用した‘B5-61’、‘B6-62’、‘B13-69’および‘B23-79-AP22’はいずれもプラスチックポットに定植され、露地の成り行き条件で管理されていた。2020 年の 8 および 12 月、2021 年の 3 月にこれらの品種の展開上位葉を採取して RNA を抽出した。RT-PCR 法により CSVd の感染を確認し、real-time RT-PCR 法により CSVd 濃度を調査した。

【CSVd 配列の解析手法】

PCR-DGGE 法

ウイロイドの変異を PCR-DGGE (濃度勾配ゲル電気泳動) 法および Hetero-duplex 法によって検出した。変異が殆ど生じない中央保存領域にプライマーを設計し、RT-PCR 産物をクローニングした。各クローンの PCR 増幅産物と基準配列に形成されるヘテロ二本鎖のバンドパターンを分析し、新たなバンドパターンが得られるたびにサンガーシーケンスによって全長を決定した。

amplicon-seq 法

植物体から抽出した RNA を用いて、RT-PCR 法により CSVd 配列を増幅した。各サンプルに含まれる CSVd 配列は、MiSeq システムおよび MiSeq Reagent Kit v3 (Illumina) を用い、2×300 bp の条件で取得した。得られた配列から、CLC Genomics Workbench (Filgen) を用いて変異の抽出を行った。

4. 研究成果

本研究では、CSVd 感受性品種であるキク‘ピアト’に CSVd を接種し、その後の感染配列の変化を調査していく計画であった。単系統の CSVd を接種する接種源として in vitro 転写し

た RNA を用いるため、まずはこの RNA を用いた効率的な接種系を 2018 年度に確認した。濃度調整したウイロイド RNA を、ペンチあるいはカーボランダムと綿棒を用いた機械的接種に用いたところ、ペンチを用いた時に良好な感染率 (92%) を得た。次に、感染配列から変異系統を抽出する手法を検討した。接種 1 か月後に感染株の上位葉から RNA を抽出し、サンプル中の CSVd 配列を RT-PCR によって増幅・クローニングした。クローニングした配列を、PCR によって増幅し、DGGE およびヘテロデュプレックス解析により調査した。この結果、調査した 32 クローンの中から、接種に用いた配列とは異なるバンドパターンを示す増幅産物を 4 種得た。これらの配列をサンガーシーケンスにより確認すると、それぞれ接種に用いた配列とは 1 あるいは 2 塩基の相違を持つ CSVd 配列であることがわかり、本手法により CSVd の変異系統を 1 塩基レベルでスクリーニングできることを確認した。本実験で接種源として使用した CSVd 系統は、筆者が以前に‘ピアト’の CSVd 高保毒系統から単離したメジャーな系統である。今回調査した 32 クローンの中では依然として接種系統が優先的であり (27 クローン)、接種系統と‘ピアト’が高い親和性を持つことが確認された。一方で、本試験によって回収された変異系統における変異箇所は、‘ピアト’-CSVd の親和性に大きな影響を与えないと考えられたものの、これらが安定的に生体内で維持されるか、今後集団構造に変化が起こるか否かについては、更なる調査が必要である。

2019 年度 4 月に筆者が所属機関を異動したため、栄養繁殖させた CSVd フリーの *in vitro* 苗を輸送し、再度苗を増殖・順化させてから試験を継続することとなった。2020 年 3 月に 2019 年度と同様の方法で 20 株の順化苗に CSVd を接種したものの、2 か月後にも上位葉から CSVd を検出することができなかった。接種が上手くいかなかった原因として、植物体の状態が前回の試験では数年にわたって温室栽培で維持してきた系統であったのに対し、2020 年では *in vitro* から順化して直ぐのものを使用したこと、あるいは環境要因、特に気温が前回試験として低かったことなどが考えられた。そこで、当初予定とは異なるものの、予め CSVd に感染したキクを確保し、この個体における CSVd 配列を調査するプランに変更をした。所属機関で保存されていた山形県在来キク品種を材料とし、CSVd に感染した個体をスクリーニングした結果、CSVd に高濃度で感染した 2 品種 (‘B5-61’ および ‘B6-62’) と、低濃度で感染した 2 品種 (‘B5-61’ および ‘B6-62’) を 1 個体ずつ見出した。これらの個体から 8 月、12 月および翌 3 月に展開上位葉を採取し、*real-time* RT-PCR および *amplicon-seq* 法により CSVd 濃度および感染配列を解析した。‘B5-61’ および ‘B6-62’ では、いずれの時点においても CSVd 濃度は高い濃度で維持されていたのに対し、‘B13-69’ および ‘B23-79-AP22’ ではいずれの時点でも CSVd 濃度は同時点の ‘B5-61’ および ‘B6-62’ における濃度の 1/10 程度の値を推移していた。*amplicon-seq* の結果を基に、各品種・各時点における CSVd 配列を比較したものの、品種あるいは時点において有為に特徴的な配列を見出すことはできなかった。従って、‘B13-69’ および ‘B23-79-AP22’ において CSVd 濃度が低かったのは、感染配列の違いよりも、品種と CSVd の親和性によるものだと考えられた。また、各サンプルから検出された CSVd 配列は非常に多様であった (>100)。現時点で、生体内の CSVd 集団構造について明確な傾向や周期性は見出せていない。本実験で確認した変異系統における変異箇所は生体内増殖・移行について大きな影響を持たず、これらの変異はランダムに生じ、さらに、結果として生じた集団構造も固定化されない流動的なものである可能性がある。しかし、傾向や周期性について結論するためには、今後も調査を継続し、サンプル数を増やす必要があると考えている。また、本試験で使用した 4 品種はいずれの時点においても典型的な CSVd の病徴である矮化や葉角の減少を示していたため、病徴と感染配列との関係を解析することはできなかった。

上述の実験に加え、トマトおよび Apple fruit crinkle viroid (AFCVd) の組み合わせでも同様の試験を実施した。この試験では、2020 年 8 月にトマト品種‘フルティカ’の幼苗に *in vitro* 合成した AFCVd を接種した後、温室内で栽培し、3 個体から定植前と定植 3 か月後の植物体の腋芽から RNA を抽出し、CSVd-キクと同様の比較調査を行った。本試験においても CSVd の実験と同様に各サンプルから多様な変異系統が検出され、時点間あるいは個体間において明確な傾向を見出すことができなかった。なお、これらの個体では AFCVd 感染による生育への影響は認められなかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 1件）

| | |
|---|-------------------|
| 1. 著者名 Nabeshima, T., Matsushita, Y. and Hosokawa, M. | 4. 巻 719 |
| 2. 論文標題 Chrysanthemum Stunt Viroid Resistance in Chrysanthemum | 5. 発行年 2018年 |
| 3. 雑誌名 Viruses | 6. 最初と最後の頁 719 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/v10120719 | 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 - |

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

| |
|---|
| 1. 発表者名 T.Nabeshima and M. Hosokawa |
| 2. 発表標題 Attempts toward breeding of Chrysanthemum plants resist to Chrysanthemum Stunt Viroid infection |
| 3. 学会等名 International Conference on Food and Applied Bioscience, 6-7 February 2020, Chaing Mai, Thailand（国際学会） |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Nabeshima, T., M. Doi and M. Hosokawa |
| 2. 発表標題 Agroinfection methods for evaluating Chrysanthemum stunt viroid accumulation and movement in Chrysanthemum plants |
| 3. 学会等名 Viroid 2018: International conference on viroids and viroid-like RNAs@Valencia(7/5-7)（国際学会） |
| 4. 発表年 2018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 |
|---------|---------|
|---------|---------|