

令和 4 年 6 月 9 日現在

機関番号：21301

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2019～2021

課題番号：19K22315

研究課題名（和文）園芸作物に付加価値を与えるウイルスの探索

研究課題名（英文）Search for viruses capable of increasing the value of horticultural crops

研究代表者

中村 茂雄（Nakamura, Shigeo）

宮城大学・食産学群・教授

研究者番号：20500937

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,800,000円

研究成果の概要（和文）：作物の付加価値を向上させる資材としての植物ウイルス利用技術の開発を目的として、野外に自生する植物などからキュウリモザイクウイルス（CMV）を新規に分離し、ナス科植物等に対して弱毒性の株を選抜した。弱毒CMV株を接種したペチュニアにおいては花卉の色調変化と関連する遺伝子発現量の減少を、感染ミニトマトの果実品質においては総アスコルビン酸含量の増加を確認した。これらのことから、新規に分離したCMV弱毒株の接種により、作物の生育を著しく抑制することなく、花色の変化や果実品質の向上を実現する可能性が示された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

農薬への依存を低減する環境にやさしい植物ウイルス病の防除のためには、強毒ウイルスの感染を予防する弱毒ウイルス（植物ワクチン）利用が有効な手段であり、本研究で新規に弱毒ウイルスを得たことは、身近な植物に有用な植物ウイルス資源があることを示している。また、弱毒ウイルス接種により、トマト果実の栄養成分の増加やペチュニア花卉の色調変化など、作物としての付加価値向上に資する形質変化も確認したことは、植物ワクチン利用促進に貢献する成果である。

研究成果の概要（英文）：Cucumber mosaic virus (CMV) isolates, which showed attenuated virulence to Solanaceae plants, were obtained from naturally infected plants. Due to the viral inoculation, a change in petal color and significantly suppressed gene expression in a part of flavonoid synthetic pathway were observed in petunia. In addition, an increase in total ascorbic acid content was observed in cherry tomato fruits infected with an attenuated CMV isolate. These results suggest that infection with an attenuated CMV isolate may result in changes in flower color and improved fruit quality without significantly preventing plant growth.

研究分野：植物病理学

キーワード：植物ウイルス 花色 栄養成分 植物ワクチン

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

農作物には数多くのウイルスが感染し、ときに壊滅的な被害をもたらすことがある。しかし、ウイルス感染によって引き起こされる植物の病徴は、葉、花弁、種子の斑紋など部分的な病徴と茎葉全体の黄化や萎縮などの全身病徴があり、またそれぞれの病徴の強弱も多様である。農作物に収量や品質の低下を引き起こすウイルス病は防除が必要であるが、菌類病に対するような効果的な薬剤がないウイルス病に対しては、病原性がほとんどないか非常に低い弱毒ウイルス(植物ワクチン)を用いた防除法が有効である。弱毒ウイルスの中には、感染の結果として収穫物の加工特性を高めるものや、栄養成分含量を高める例もあり、ウイルス感染の結果として栄養成分含量の増加や観賞価値の向上がもたらされるのであれば、農産物の高付加価値化を目的としたウイルスの積極的利用の可能性がある。

2. 研究の目的

本研究では、植物ウイルスを収穫物の付加価値向上をもたらす資材としてとらえ、自然界に存在する植物ウイルスの中から、作物に対して病原性が弱く、かつ野菜の栄養・機能性成分を高めるものや、花きの観賞価値を高めるものなどを選抜する。さらに、その変化の要因を遺伝子レベルで解明して、植物ウイルスを利用した農作物の付加価値向上技術の開発を目的とする。

3. 研究の方法

(1) 新規ウイルスの獲得とその病原性

多くの野菜・花きに感染することが知られているキュウリモザイクウイルス(CMV)を主たる対象とした。2019年8月から2021年1月にかけて、宮城県内2地域(A及びB地区)の農地周辺の野草や樹木から、ウイルス症状の有無にかかわらず無作為に937検体(73科150種以上)の葉を採取し、血清学的手法(DIBA)または遺伝子増幅(micro tissue direct RT-PCR)によりCMV感染個体をスクリーニングした。陽性個体は*Chenopodium quinoa*または*C. amaranticolor*に汁液接種し、単病斑分離を繰り返して分離株を得た。これら新規分離株は数種植物に接種して病徴を観察した。ただし、A地区についてはウイルス感染が疑われる栽培植物も採取対象とし、またA、B地区とは別の宮城県内C地区のウイルス感染栽培植物からもCMVを分離して検討に加えた。

(2) 新規分離株の遺伝子解析

ウイルス感染葉からRNAを抽出し、既報(眞岡ら、2008)のプライマー及びそれを一部改変したプライマーを用い、RT-PCRによりCMV RNA1、RNA2及びRNA3のほぼ全長を増幅して、得られた増幅産物をクローニングした後、シーケンス解析を行った。決定した塩基配列のうち、ウイルスの遺伝子領域(1a、2a、3a及び外被タンパク質(CP))の配列について系統樹を作成した。また、推定されるアミノ酸配列についても同様に解析した。

(3) 虫媒伝染性評価

新規に分離したCMVを健全ツククサに接種してCMV感染植物を作出した。これらを接種源として、モモアカアブラムシとワタアブラムシによる獲得吸汁、ホウレンソウへの接種吸汁を行い、ウイルス伝搬の有無をホウレンソウの病徴とDIBAにより確認した。

(4) ウイルス感染野菜の品質評価と遺伝子解析

ミニトマト(品種:アイコ)の苗に弱毒性CMVの1株を接種し、2021年6月にポットに定植して屋外で栽培した。同年9月に収穫した果実は-60℃で冷凍し、凍結乾燥前後の重量差を水分とした。凍結乾燥粉末について総アスコルビン酸、リコペン、β-カロテン、総ポリフェノール、及び元の水分含量となるよう蒸留水を加えてBrix糖度及び酸度を測定した。

遺伝子発現解析は、9月10日に収穫した弱毒接種区及び未接種区の果実からそれぞれRNAを抽出し、0.5 µg相当のRNAからcDNAを合成した。得られた鋳型について、アクチン遺伝子をリファレンスとし、既報(Badejoら、2012)のプライマーを用い各遺伝子の発現量をリアルタイムPCRにより相対定量した。

(5) ウイルス感染花きの品質評価と遺伝子解析

新規に分離したCMV 9株について、ペチュニア「バカラ」シリーズ単色系10品種に接種し、開花後の花色を調査した。

遺伝子解析は、比較的病徴が弱い3株を接種した「サーモン」、「マジェンタ」及び「チェリーローズ」の開花1日以内の花冠裂片の有色部を採取してRNAを抽出した。RNA 1 µg相当からcDNAを合成し、得られた鋳型を用いアクチン遺伝子をリファレンスとし、各遺伝子の発現量をリアルタイムPCRにより相対定量した。対象遺伝子は、カルコンイソメラーゼ(CHI)遺伝子、フラバノン3-水酸化酵素(F3H)遺伝子、ジヒドロフラボノール還元酵素(DFR)遺伝子、アントシア

ニジン合成酵素 (ANS) 遺伝子, フラボノイド生産促進 (EFP) 遺伝子とした。また、前述の 3 株を接種した「チェリーローズ」花卉について、塩酸性メタノールで色素を粗抽出して分光光度計で測定し、おおまかな色素組成の変化の有無と量について調査した。

4. 研究成果

(1) 新規ウイルスの獲得とその病原性

宮城県内 2 地域の野外に自生する植物からの新規ウイルスの分離を行い、新規に 5 株の CMV を分離した。このうち 3 株がツユクサから、ほかにヤブジラミとシロツメクサから各 1 株が得られた。さらに栽培作物からも新規に 4 株の CMV (A 地区のズッキーニから 1 株、C 地区のトルコギキョウから 3 株) を分離した。これらを用いて、ウイルス遺伝子の解析、作物への病原性調査、アブラムシによる伝搬性調査、感染作物の品質評価を行った。作物への病原性については、2 株がタバコ、ピーマン、トマト、ペチュニアなどナス科植物に対して比較的病徴が弱かった。

(2) 新規分離株の遺伝子解析

供試した 9 株はいずれも CMV サブグループ 1 に属した。A 地区由来の 3 株間はいずれの遺伝子 (1a、2a、3a 及び CP) のアミノ酸配列相同性が非常に高かったのに対し、B 地区由来の 3 株間においては、3a と CP 遺伝子アミノ酸配列に多様性が見られた。C 地区の栽培植物由来の 3 株のうち、2 株はいずれの遺伝子のアミノ酸配列が非常に類似したが 1 株は大きく異なり、同一圃場にもかかわらず多様性が見られた。このように分離地域間の遺伝的多様性と地域内における多様性の程度の違いが確認され、同一県内 3 地域での採取であるにもかかわらず多様な CMV 分離株を得ることができた。

(3) 虫媒伝染性評価

供試した 4 株の CMV すべてでアブラムシによる伝搬性が確認された。農作物に寄生する代表的な 2 種のアブラムシを用いたが、モモアカアブラムシではいずれの株も伝搬は低率であったのに対し、ワタアブラムシではいずれの株も高率で伝搬され、アブラムシ伝搬性は分離株の違いよりもアブラムシ種による影響が大きかった。

(4) ウイルス感染野菜の品質評価と遺伝子解析

弱毒株を接種したトマトの葉には軽微な斑紋がみられたが、果実には症状はなかった。しかし、接種区では無接種区に比べて草丈、果実総数、果実重量が若干減少した。果実の総アスコルビン酸含量は、接種区で第 2 果房の収穫が始まった 9 月 10 日以降に高く、9 月 15 日に無接種区と最大の差が見られた (図 1)。カロテノイド、総ポリフェノール含量には有意差は見られず、また水分、Brix 糖度、酸度にも差は見られなかった。アスコルビン酸を前述の濃度差に調整したモデルのトマトジュースでの味には差は見られなかったことから、弱毒ウイルスを接種したミニトマトにおいて、アスコルビン酸は増加するが、他の成分や味への影響は小さいことが示唆された。

アスコルビン酸合成経路関連遺伝子の発現量は、6 種遺伝子いずれも CMV 感染による変化が見られなかった。このことから、果実におけるアスコルビン酸含量の増加は、葉からの転流の影響が示唆された。

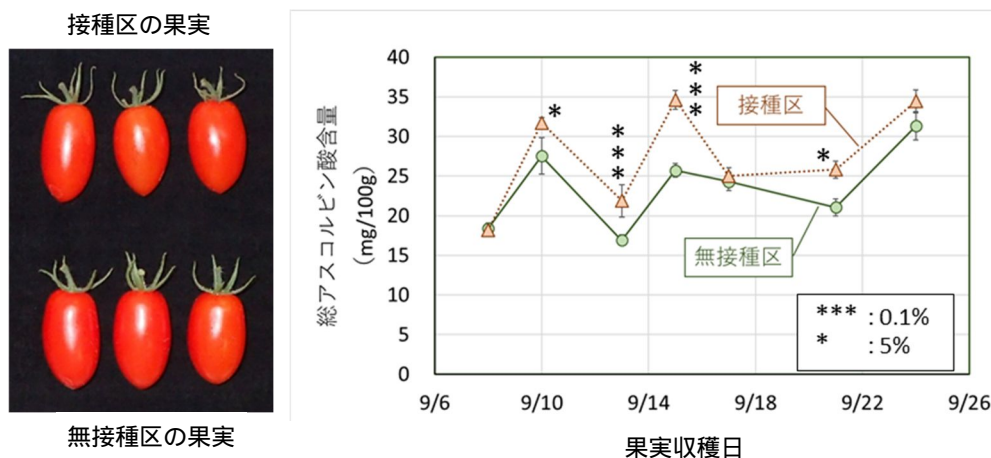


図 1 ウイルス接種の有無によるトマト果実の総アスコルビン酸含量の推移

(5) ウイルス感染花きの品質評価と遺伝子解析

ペチュニアの花において、モザイク症状の他に萎縮、奇形等の症状が観察された。その中でも、3 株は比較的軽微な症状が軽く、モザイク症状は見られたが花の形状への影響は少なかった。花卉の色調については「ホワイト」で一部時期によりピンクの絞りが出ることがあった他、有色系の品種ではモザイク様に色調の変化が見られた (図 2)。また、その 3 株を接種した「チェリーローズ」

花卉の色素粗抽出液の分析では、無接種区と各接種区とで最大吸光波長は同一であったが、ウイルス接種区でいずれも量的に低い値を示したことから、色調の変化は質的ではなく量的な変化であると考えられた。

花卉の色素合成関連遺伝子の発現を解析し、無接種区との相対発現量を調査したところ、「サーモン」では全体的に無接種区と同等かやや発現量が減少する傾向が、「マゼンタ」では同等か上昇する傾向がそれぞれあり、品種間差が見られた。「チェリーローズ」では、ANS で無接種区と比較して有意に発現量が減少する区も見られた（図2）。

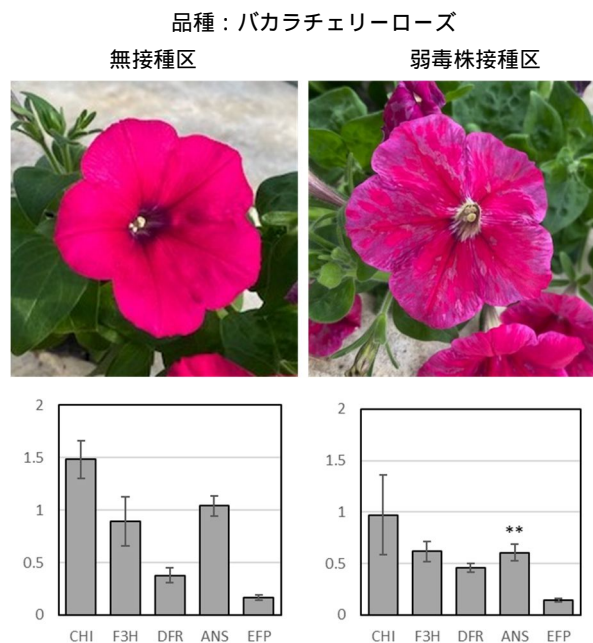


図2 ウイルス接種の有無による花色の色調変化（上）と花色関連遺伝子の発現量（下）

発現量の比較はactinをキャリブレーターとした Ct値

図中の**は無接種区と比較し Δ Ct値のt検定において1%水準で有意差あり

<引用文献>

眞岡哲夫, et al. サテライト RNA 遺伝子の導入によるキュウリモザイクウイルス抵抗性トマトに関する研究 第 3 報 サテライト RNA の転写および伝搬による変異性の解明. 北海道農業研究センター研究報告= *Research Bulletin of the NARO Hokkaido Agricultural Research Center*, 2008, 188: 1-28.

BADEJO, Adebajo Ayobamidele, et al. Translocation and the alternative D-galacturonate pathway contribute to increasing the ascorbate level in ripening tomato fruits together with the D-mannose/L-galactose pathway. *Journal of experimental botany*, 2012, 63.1: 229-239.

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 2件）

1. 著者名 板橋 建・大坂正明・千葉直樹・中村茂雄	4. 巻 71
2. 論文標題 野草及び雑草からのキュウリモザイクウイルスの獲得	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 北日本病害虫研究会報（講演要旨）	6. 最初と最後の頁 197
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.11455/kitanihon.2020.71_192	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 -

1. 著者名 板橋 建・進藤友恵・大坂正明・千葉直樹・鶴岡莉子・櫻村結友・中村茂雄	4. 巻 72
2. 論文標題 宮城県内の雑草等から分離されたキュウリモザイクウイルスの性状	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 北日本病害虫研究会報	6. 最初と最後の頁 30～34
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.11455/kitanihon.2021.72_30	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 0件）

1. 発表者名 板橋 建・大坂正明・千葉直樹・中村茂雄
2. 発表標題 野草及び雑草からのキュウリモザイクウイルスの獲得
3. 学会等名 第73回北日本病害虫研究発表会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 毛利 哲・中村茂雄・進藤友恵・板橋 建
2. 発表標題 キュウリモザイクウイルスの感染がミニトマトの果実含有成分に与える影響
3. 学会等名 日本農芸化学会2022年度大会
4. 発表年 2022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	板橋 建 (Itabashi Takeru) (10537848)	宮城県農業・園芸総合研究所・園芸環境部・研究員 (81306)	
研究分担者	大坂 正明 (Osaka Masaaki) (20739685)	宮城県農業・園芸総合研究所・園芸環境部・技師 (81306)	
研究分担者	進藤 友恵 (Shindo Tomoe) (90881590)	宮城県農業・園芸総合研究所・園芸環境部・技師 (81306)	
研究分担者	毛利 哲 (Mohri Satoshi) (90503615)	宮城大学・食産業学群(部)・教授 (21301)	

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