

## 科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年3月31日現在

機関番号：11101

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21380029

研究課題名（和文）ウイロイド特異的RNAサイレンシングとウイロイドの病原性及び分子進化に関する研究

研究課題名（英文）Studies on viroid-specific RNA silencing in relation to viroid pathogenicity and molecular evolution

研究代表者

佐野 輝男（SANO TERUO）

弘前大学・農学生命科学部・教授

研究者番号：30142699

研究成果の概要（和文）：ウイロイドは低分子の環状1本鎖RNAであるが、ひとたび宿主植物細胞に侵入すると宿主の転写系に依存して自己複製し、様々な程度の病気を引き起こす。植物をウイロイドの感染から保護する新しい戦略を模索するために、ウイロイド感染で誘導されるウイロイド標的RNAサイレンシングとウイロイドの病原性及び分子進化の関連性を分析した。まず、ジャガイモやせいもウイロイド（PSTVd）感染トマトに蓄積するPSTVd特異的small RNA（srPSTVd）の大規模塩基配列解析の結果、PSTVd高感受性トマト“Rutgers”ではプラス鎖由来のsrPSTVdが圧倒的に優占し（90%以上）、PSTVd耐性“MoneyMaker”ではほぼ同程度であった。srPSTVdはPSTVd分子のプラス鎖とマイナス鎖の全領域から生成していたが、複数の特定の領域（ホットスポット）から特に多量に生成していた。両品種ともプラス鎖のホットスポット部位は共通し、病原性領域と上部中央保存領域から多数のsrPSTVdが生じていた。一方、マイナス鎖由来のsmall RNAには品種間差があり、MoneyMakerのホットスポット部位はより多様であった。すなわち、ウイロイド特異的small RNAの生成パターンには、品種特異性が認められた。また、病原性の異なるPSTVd-Intermediate（強毒型）とPSTVd-dahlia（弱毒性）を比較した結果、茎と葉で生成パターンとホットスポット部位に共通性があったが、部位により生成量に違いが認められた。

次に、ウイロイドの病原性発現に関与する宿主遺伝子を特定するため、PSTVd感染トマトのマイクロアレイ発現解析を行った結果、ジベレリン・他、複数の植物ホルモン生合成遺伝子の発現量が変化していた。PSTVd感染で発現量が低下した遺伝子の中でPSTVdと21塩基程度の相同配列を有するものを検索した結果、gibberellin  $\beta$ -hydroxylaseが見出された。RNAゲルブロットアッセイの結果、本遺伝子は葉より茎でより明瞭に発現量が低下していた。すなわち、本遺伝子はウイロイド感染で誘導されるウイロイド標的RNAサイレンシングの宿主側標的遺伝子となる可能性が示唆された。また複数のmicroRNA発現量にも有意な変動が認められた。

RNAサイレンシングに関連する宿主遺伝子（DCL2、RDR6など）或はPSTVdに由来する様々な“ヘアピンRNA”を発現する形質転換トマトと*N. benthamiana*系統を選抜・育成し、PSTVdのほぼ全長のヘアピンRNAを発現するPSTVd- $\Delta$ TLとマイナス鎖由来の主要srPSTVdであるsrPSTVd-257aのヘアピンRNAを発現する*N. benthamiana*系統のT2ホモ接合系統を得た。両系統共にPSTVdの感染・増殖を阻害し、RNAサイレンシングを利用した新規ウイロイド抵抗性戦略の可能性が示唆された。

ホップ、ブドウ、カンキツ、スモモから分離したHpSVd変異体をホップに15年間持続感染させ、それぞれの宿主適応過程を分析した結果、HpSVd-grapeは5ヶ所の適応変異を生じ、新たな変異体（HpSVd-hKFKi）に収斂進化した。HpSVd-hKFKiがホップ感染中に獲得した5箇所の適応変異は、原宿主、適応宿主、第3宿主のいずれにおいても、複製能上のメリットは認められなかったが、srHpSVd蓄積量が少なかったことからRNAサイレンシング誘導能が低下していると判断された。特に5箇所の変異を含むsrHpSVdリード数の全srHpSVdリード数に占める比率がHpSVd-KFKiではHpSVd-grapeより低下していたことから、5箇所の適応変異によりHpSVdはRNAサイレンシングを回避した可能性が示唆された。

研究成果の概要（英文）：Viroids are small circular, single-stranded, non-coding RNAs, but, once infected into host plant cells, replicate autonomously depending on the host transcription machinery and caused severe to mild diseases on varieties of crop plants. To investigate the novel strategy to prevent plants from viroid infection, we have analyzed viroid-induced RNA silencing in relation to viroid pathogenicity and molecular evolution. First, by large-scale sequencing analysis using next generation sequencer on the biogenesis of PSTVd-specific small RNAs (srPSTVd), it was found that those derived from genomic strand was superior than those from anti-genomic strand, i.e., 9:1, in case of “Rutgers” tomato – a highly sensitive cultivar, but the ratio was almost 1:1 in “MoneyMaker” tomato – a tolerant cultivar. In both cultivars, srPSTVds were derived in general from whole the molecule of both strands, but some specific regions – hotspots – produced more abundant srPSTVd. In the genomic strand, both cultivars showed the similar hotspot pattern, however, the cultivar-specific pattern was observed in the anti-genomic strand, i.e., MoneyMaker showed more variable hotspots. The results indicated that the srPSTVd biogenesis is host/cultivar-dependent. We have also compared the hotspot patterns among PSTVd variants with different pathogenicity, i.e., the Intermediate (severe) and the Dahlia (mild) strains, and found that both of the strains showed the similar hotspot pattern in Rutgers tomato in leaves and stem with distinct abundance depending on the individual hotspots.

To identify the host genes responsible to exhibit viroid-specific disease symptoms such as dwarf and/or leaf curling, we have then performed microarray analysis of gene expression in tomato cultivars (Rutgers and MoneyMaker) with or without infecting PSTVd. Expression of the genes related to biosynthesis of most of the known plant hormones including gibberellin and auxin have more or less been altered by development of specific disease symptoms. Among them, we have surveyed genes containing a stretch of 21-nucleotide sequence homologous to PSTVd, and found that the gene encoding gibberellin  $\beta$ -hydroxylase contains a PSTVd-specific 21-nucleotide sequence and was down-regulated by PSTVd infection, suggesting that the gene could be a hypothetical target by PSTVd-induced RNA silencing. Several of the tomato microRNAs such as miR159 have also changed their expression levels.

We have created transgenic tomato and *Nicotiana benthamiana* lines constitutively expressing hairpin RNA derived from various regions of PSTVd or from host genes relating to RNA silencing, i.e., DCL2 and RDR6. At present, transgenic *N. benthamiana* T2 lines expressing near full-length hairpin PSTVd (PSTVd- $\Delta$ TL) and one of the srPSTVd hotspots (srPSTVd-257a) derived from lower central region of anti-genomic strand successfully exhibited resistance to PSTVd infection.

To investigate molecular evolution of viroid in relation to RNA silencing, we infected hops with natural *Hop stunt viroid* (HpSVd) isolates derived from four host species (hop, grapevine, plum and citrus). These plants were maintained for 15 years, then analyzed the HpSVd variants present. As the result, the variant originally found in cultivated grapevines gave rise to various combinations of mutations at positions 25, 26, 54, 193, and 281, and upon prolonged infection, these variants underwent convergent evolution resulting in a limited number of adapted mutants. Further analysis revealed that these five mutations did not give a merit upon the mutant to replicate either in the original host (grapevine), the adapted host (hops), and the third host (cucumber). However, the

mutant accumulated less abundant srHpSVd in infected hops and cucumber, and especially the relative ratio of srHpSVd reads containing the five mutations per total srHpSVd reads were significantly downed, suggesting that the adapted mutant successfully escaped from viroid-induced RNA silencing by giving rise to the five mutations.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	6,800,000	2,040,000	8,840,000
2010年度	3,900,000	1,170,000	5,070,000
2011年度	3,600,000	1,080,000	4,680,000
年度			
年度			
総計	14,300,000	4,290,000	18,590,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農学・植物病理学

キーワード：ウイロイド、ノンコーディングRNA、RNAサイレンシング、siRNA シークエンス

#### 1. 研究開始当初の背景

ウイロイドは現在知られている最小の病原体で、246-401ヌクレオチドの環状1本鎖RNAである。独自のタンパク質情報をコードしない“ノンコーディングRNA”で、感染した宿主の転写系に依存して複製・増殖する (Flores et al 2005, Gas et al 2007)。自然界及び農業現場には様々なウイロイド種とその多様な変異体が存在し、時に深刻な病害を引き起こす (Hadidi et al 2003)。ウイロイドは感染植物に効率よくウイロイドを標的とするRNAサイレンシングを誘導し、多量のウイロイド特異的 small RNA (分解産物、Vd-sRNA) が生成される (Itaya et al 2001, Papaefthimiou et al 2001)。しかし、ウイロイドはRNAサイレンシングの標的となりながらも、RNAサイレンシングに耐性を示し、感染植物体中で活発に複製・増殖を続ける (Itaya et al 2007, Martin et al 2007, Machida et al 2007)。

ウイロイド感染で誘導されるRNAサイレンシングとウイロイドによる病徴発現との関連性を示唆する実験結果が報告され (Wassenegger et al 2000, Markatrian et al 2004, Sano & Matsuura 2004, Gomez et al 2008)、ウイロイドを標的とするRNAサイレンシングが宿主ゲノム中に存在する相同配列を標的とすることで宿主の正常な遺伝子とRNA発現経路が攪乱され、病徴発現に至るといった仮説が提唱されている (Wang et al 2004)。

申請者らは、「ウイロイド感染で誘導されるRNAサイレンシングの生物学的及び農学的意義の解析」(科研費・基盤C、H15-17)

及び「ノンコーディングRNA病原体“ウイロイド”の自律複製能と病原性発現の分子機構」(科研費・基盤B、H18-20)で、ウイロイド感染で誘導されるRNAサイレンシングによって感染細胞内に生成するウイロイド特異的 small RNA (Vd-sRNA) の経時的蓄積パターンを解析し、ウイロイドは複製の様々な段階でRNAサイレンシングの標的となり、複数のDCLで切断される可能性を明らかにした (Sano & Matsuura 2004, Machida et al 2007)。

また、申請者を含めた独立の3研究グループによるVd-sRNAのクローニングと塩基配列解析から、Vd-sRNAはウイロイド分子全体からランダムに生じるのではなく、複数のホットスポットから生成されてくることが示され、ウイロイドの特定の部位がRNAサイレンシングの標的となることが明らかになった (Itaya et al 2007, Martin et al 2007, Machida et al 2007)。

さらに、2007年以来、欧米の研究グループにより、ウイロイドの病原性或いは病徴発現とRNAサイレンシングに関して、宿主植物中のVd-sRNAの蓄積量が病徴の強さと相関すること (Matousek et al 2007)、ウイロイドの病徴発現は宿主のウイロイド特異的RNAサイレンシング活性に依存し、特にRNA依存RNAポリメラーゼ6 (RDR6) 活性と関連していること (Gomez et al 2008)、などが報告されている。RDR6はRNAサイレンシングシグナルの増幅 (Primary siRNA から Secondary siRNA への変換と増幅に関わると

されるものである (Schwach et al 2005, Brodersen & Voinnet 2006)。

## 2. 研究の目的

研究代表者らの今までの研究成果と海外の関連分野の研究動向に基づき、本研究では以下の3課題を設定して、ウイルス感染で誘導・蓄積する Vd-sRNA の生成特性、ウイルスの病原性発現と RNA サイレncing の関係、自然界に存在する多様なウイルス変異体の適応・分子進化への影響を併せて総合的に考察する。

課題① ウィルス特異的 RNA サイレncing の初期標的部位の特定： ジャガイモやせいもウイルス (*Potato spindle tuber viroid*; PSTVd) 感染トマトに蓄積する PSTVd 特異的 small RNA (srPSTVd) の塩基配列解析から、PSTVd には少なくとも5箇所の srPSTVd 生成ホットスポット、すなわち RNA サイレncing 標的部位が存在することが明らかになった。srPSTVd の生成特性を分析し感染初期の主要標的部位を特定する。

課題② ウィルス感染が宿主 RNA サイレncing 機構及び microRNA 経路に及ぼす影響の解析： ウィルスは、複製の様々な段階で複数の DCL (1~4) で切断されながら、なおも活発に複製増殖を続ける。その結果、感染植物には異常な量の Vd-sRNA が蓄積してくる。本研究は「この異常な Vd-sRNA が、宿主の DCL、RDR6 或は RISC 複合体を構成する Argonaute (AGO) 蛋白質等を過剰にリクルートする (即ち RNA サイレncing 機構を独占する) ことが、宿主の正常な発生・分化・形態形成に関わる RNA サイレncing 機構と microRNA 発現経路を攪乱し、結果としてウイルスの病原性発現に至る」との作業仮説のもと、アグロバクテリウム植物形質転換法及び植物ウイルスベクター法により、RNA 干渉でウイルスの複製や宿主の RNA サイレncing 関連遺伝子群の発現をノックダウンする実験系を構築し、RNA サイレncing や microRNA 経路に関わる遺伝子機能を変化させた植物を作出して、ウイルス感染で誘導される RNA サイレncing と病徴発現の関連性を検証する。また、様々なウイルス配列に由来するヘアピン RNA を発現する形質転換植物を作出し、構成的にウイルスを標的とする RNA サイレncing を誘導することで、感染初期にウイルスの複製を効果的に阻害する手法を検討する。また、この植物自体の生育を分析することで、「ウイルス配列に対する RNA サイレncing が宿主の相同な遺伝子発現を乱し病原性発現に至る」と考える従来の作業仮説 (Wang et al, PNAS 2004) を検証し、新規なウイルス抵抗性戦略を考案し、その可能性を評価する。

課題③ ウィルスの宿主適応と分子進化に及ぼす影響の解析： ウィルスは様々な植物を宿主とし、各宿主に特異的な多様な変異体が知られている。すなわち、ウィルスは新たな宿主に遭遇した時、宿主適応変異を生じてゲノムの多様性を増大させている。宿主側の抵抗性機構である RNA サイレncing がウイルスの宿主適応に及ぼす影響を解析する。

## 3. 研究の方法

① ウィルス特異的 RNA サイレncing の初期標的部位の特定： ウィルス特異的 RNA サイレncing の初期主要標的部位を特定するため、PSTVd 感染トマト (品種：Rutgers、Money maker) の葉或は茎に蓄積する srPSTVd の蓄積パターンを RNA ゲルブロットアッセイで解析し、さらに small RNA 画分を調製して、次世代シーケンサー (イルミナ社、GAII) により srPSTVd の大規模塩基配列解析を行なった。

② ウィルス感染が宿主 RNA サイレncing 機構及び microRNA 経路に及ぼす影響の解析： RNA サイレncing とウイルスの病徴発現の関連性を解析するため、PSTVd 感染及び健全トマト (品種：Money maker、Rutgers) から RNA を抽出し、一部はマイクロアレイ法で、一部は次世代シーケンサー (イルミナ社、GAII) による small RNA の大規模塩基配列解析を行った。マイクロアレイ解析で得られたデータから PSTVd 感染で発現量が低下する遺伝子群を特定し、さらにその中で PSTVd 配列と相同な 21 塩基の配列を有する遺伝子を探索した。また、マイクロアレイ及び次世代シーケンスで得られたデータを分析して、PSTVd 感染トマト中の microRNA 遺伝子の発現量を定量的に解析して、ウイルス感染が特に植物ホルモン関連遺伝子群の発現に及ぼす影響を分析・評価した。また、RNA サイレncing 関連遺伝子をアグロバクテリウム或は植物ウイルスベクター (*Potato virus M*、*Potato aucuba mosaic virus*) に挿入し、RNA サイレncing 機能と microRNA 経路を RNA 干渉でノックダウンする新しい実験系の構築に取り組んだ。さらに、並行して、PSTVd 配列及び srPSTVd のホットスポット配列と相同のヘアピン RNA を発現する形質転換トマトを作出し、ウイルスを標的とする RNA サイレncing が宿主の遺伝子発現と形態形成に与える影響を分析し、且つ、その植物体のウイルス抵抗性を評価した。

③ ウィルスの宿主適応と分子進化に及ぼす影響の解析： 研究代表者は、ホップ、ブドウ、カンキツ、スモモから分離した主要なホップ矮化ウイルス (*Hop stunt viroid*; HpSVd) 変異体をホップに感染させ、持続感

染状態で15年間継代維持してきた。感染後5年、10年、15年目に採集した葉からHpSVdを分離し、RT-PCRでcDNAを増幅し、クローニングした。各サンプルからランダムに10個程度のcDNAクローンを選抜して子孫ウィロイドの変異とその時間的変化を分析した。

#### 4. 研究成果

##### ① ウィロイド特異的RNAサイレンシングの初期標的部位の同定

RNAサイレンシングによるウィロイドの標的部位と分解過程を解明するため、PSTVd感染トマトに蓄積するPSTVd特異的small RNA (srPSTVd)の次世代シーケンサーによる大規模塩基配列解析を行なった。

まず、PSTVd-Intermediate感染トマト(品種Rutgers)の葉と茎のsrPSTVd蓄積量をRNAゲルブロットアッセイで解析した結果、srPSTVdは葉より茎で高濃度に蓄積し、プラス鎖由来は20-24塩基と27-29塩基、マイナス鎖由来は21-24塩基の多様なサイズが観察された。そこで、茎と葉からsrPSTVdを含む15-30塩基のsmall RNA分画を調製し、次世代シーケンサーで解析した結果、茎では葉の約34倍の90,869個(リード数)のsrPSTVd配列(15-29塩基)が得られ、プラス鎖89,070個、マイナス鎖1,799個であった。従来のシーケンス法では得られにくかった23塩基より長いsrPSTVdが多数検出され、その多くは、PSTVd病原性領域(第50-80番付近)に由来し、複製の際の環状化/切断点とされる第88-89番塩基を5'末端とするものが多数検出された。また21-22塩基のsrPSTVdでは第30番を5'末端とするものが最多で、26,903個であった。次世代シーケンスとRNAゲルブロットアッセイの解析結果に基づき、第30-50番付近が最初の標的となること、第50-80番付近から生じるsrPSTVdは病原性発現に関与する可能性があること、RNAサイレンシングがウィロイドの複製に関与する可能性があることなどが今後の検討課題として明確になった(佐野2010、Wang et al 2011)。

そこで次に、PSTVdに対する感受性の異なるトマト2品種(RutgersとMoney maker)及びPSTVd由来の配列を遺伝子導入したトマト(Money maker)を用いて実験を行った。RutgersとMoney makerにPSTVd-Intermediateを感染させると、Rutgersには激しい矮化と葉巻、Money makerには軽い矮化が現われた。健全葉と各感染葉からsrPSTVdを含む15-30塩基のsmall RNA分画を調製し、次世代シーケンサーによる大規模塩基配列解析を行った。また、PSTVd配列由来のヘアピンRNAを発現する形質転換Money makerは恒常的にPSTVdが感染・増殖した時と同じように

srPSTVdを細胞内に蓄積していたので、同様にsrPSTVdを含むsmall RNA分画を調製し、次世代シーケンサーによる大規模塩基配列解析を実施した。その結果、PSTVd感染Rutgersではプラス鎖由来のsrPSTVdが圧倒的に優占し、Money makerではプラス鎖由来とマイナス鎖由来がほぼ同程度であった。両品種ともプラス鎖から生じるホットスポット部位は共通し、病原性領域と上部中央保存領域から多数のsmall RNAが生じていた。一方、マイナス鎖由来のsmall RNAには品種間差があり、Money makerのホットスポット部位はより多様であった(図1.赤矢印)。すなわち、ウィロイド感染で誘導・蓄積するウィロイド特異的small RNAは、そのホットスポットの位置、或はプラス鎖由来とマイナス鎖由来の比率、などの点において、品種特異性があり、病徴発現の強弱とも関連する可能性が示唆されてきた(Wang et al 2011)。

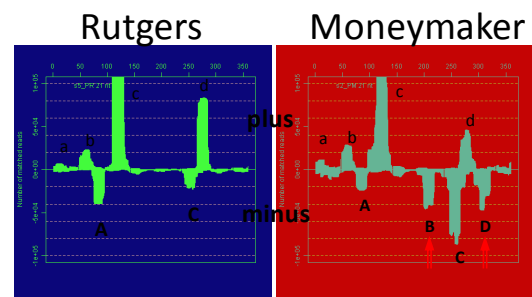


図1. srPSTVdホットスポット

本研究を実施中、研究代表者らは世界で初めてダリアからPSTVdを分離した(Tsushima et al 2011)。このPSTVd分離株(PSTVd-dahlia)はPSTVd-Intermediateと比較して9塩基の変異を有し、トマト(Rutgers)に感染させたところほとんど矮化症状が見られず、極めて弱毒性の病原性を有していることが判明した。そこで実験計画を一部変更して、この弱毒株を実験系に加え、病原性の異なるPSTVdに感染したトマトに蓄積するsrPSTVdのホットスポットとプラス鎖/マイナス鎖比の分析を開始した。すなわち、各PSTVd分離株感染トマト葉と茎から今までと同様にsrPSTVdを含む15-30塩基のsmall RNA分画を調製し、次世代シーケンサーによる大規模塩基配列解析を行った。その結果、強毒型のPSTVd-Intermediateと弱毒性のPSTVd-dahliaに感染したトマト(Rutgers)では、srPSTVdを生じるホットスポット部位には共通性があり、茎と葉でもそのパターンに大きな違いはなかったが、各ホットスポット部位により生成量に若干の違いが認められた。現在、さらに詳細なsrPSTVdの蓄積パターンを分析中である(佐野、千田、海外研究協力者:Owens RA)。

② ウイロイド感染が宿主 RNA サイレンシング機構及び microRNA 経路に及ぼす影響の解析

**PSTVd 感染で蓄積量に変化するトマト遺伝子発現のマイクロアレイ分析及び次世代シーケンスによるトマト microRNA の大規模塩基配列解析：** 次世代シーケンス解析の結果、PSTVd 感染トマト (Rutgers) に蓄積する srPSTVd は感染トマト中の全 small RNA の約 10% を占め、宿主の microRNA 経路に影響を与える可能性が強く示唆された。

そこで、前項 (1) に記載の PSTVd に対する感受性の異なるトマト 2 品種 (Rutgers と Moneymaker) 及び PSTVd 由来の配列を遺伝子導入したトマト (Moneymaker) の大規模シーケンス解析に用いたものと同じ試料を用いて PSTVd 感染トマト葉のマイクロアレイ発現解析を行った結果、ジベレリンを初めとする複数の植物ホルモン生合成系とその他複数の遺伝子群の発現量の変化が確認された。また、大規模シーケンスデータに含まれる主要な microRNA の出現頻度を分析した結果、miR159 など複数の microRNA の発現量に有意な変動が認められた (Owens et al 2011、表 1)。

表 1. PSTVd 感染トマト-マイクロアレイ分析結果

TAIR ID	Gene description	Fold expression change			
		PSTVd (Rutgers)	PSTVd (M' maker)	siRNA (M' maker)	Ca/GV (A. thal)
<b>Abietic acid</b>					
AT3G14440	9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase (S)	-1.80	-	-	-
AT2G27150	aldehyde oxidase (S)	-	-1.34	-	+1.14
AT4G19230	8'-hydroxylase (D)	-	-1.84	-	-
AT4G34131	UDP-glucosyl transferase family (D)	+9.99	-	-	-
<b>Amino</b>					
AT4G05530	short-chain dehydrogenase (S)	-	-1.25	-	+1.33
<b>Brassinosteroid</b>					
AT3G50660	22α hydroxylase (S)	-	-0.66	-0.90	-0.21
AT3G02580	sterol-C5(6)-desaturase homolog (S)	-1.31	-	-	-
AT3G19800	campesterol synthesis (S)	-2.73	-	-	-2.24
AT1G50430	sterol 6-7 reductase (S)	+2.13	+1.56	-	+1.25
<b>Cytokinin</b>					
AT2G15490	UDP-glucosyl transferase (zeatin) (D)	+1.79	-	-	-
AT3G11340	(zeatin?) (D)	+5.74	+3.81	+4.41	-
<b>Ethylene</b>					
AT4G11280	ACC synthase 11 (S)	-	-2.1	-	-
AT1G09010	ACC oxidase (S)	+4.59	+3.94	+2.64	-
<b>Gibberellin</b>					
AT2G44800	gibberellin β-hydroxylase (S)	-1.66	-1.67	-2.38	-
AT4G25420	gibberellin 20-oxidase-1 (S)	-2.58	-2.04	-	-
<b>Jasmonic acid</b>					
AT3G45140	lipoygenase (S)	-	-	-3.98	-
AT1G76690	12-oxophytodienoate reductase 1	+1.48	-	-	-
AT2G06050	12-oxophytodienoate reductase 3	+1.51	-	-	-1.25
AT2G46370	JAR1 (jasmonic acid-amino acid conjugating enzyme)	-	-	-1.77	-

さらに、PSTVd 感染で発現量が低下したトマト遺伝子の中で、PSTVd 配列と 21 塩基程度の相同性部分を有するものを検索した結果、gibberellin β-hydroxylase など複数の遺伝子が特定された。すなわち、これらの遺伝子は PSTVd と相同な 21 塩基の配列を有し、PSTVd 感染で発現量が低下することから、ウイロイド感染で誘導される RNA サイレンシングの副作用として生じる仮定の宿主側標的遺伝子の候補と考えるに至った (佐野及び R.A.Owens—海外共同研究者)。

**PSTVd の病徴発現に伴い発現量が低下するトマト遺伝子の RNA ゲルブロット解析：** 前項までの分析で、ウイロイド感染によりほとんど全ての植物ホルモン生合成系関連遺

伝子群とその発現調節に関与する microRNA 発現量に有意な低下が認められた。ウイロイド感染植物には実際に矮化・発根の遅れなどジベレリンを初めとする植物ホルモンの機能と密接に関連した症状が発現することから、矮化・葉巻きなどの病徴発現と関連する可能性のあるフラボノイド、オーキシン、ブラシノステロイド、ジベレリン生合成関連遺伝子を対象に RNA ゲルブロットアッセイによる分析を行った。すなわち、トマトのカルコン合成酵素遺伝子 (*tchs1*, *tchs2*)、マイクロトムの矮性因子 (DWARF) とされる p450d、細胞伸長に関与するエクспанシン合成遺伝子 (Le-exp1)、gibberellin β-hydroxylase、オーキシン生合成酵素遺伝子などの遺伝子の一部をクローニングしてプローブを作成し、PSTVd 感染による各遺伝子発現量の変化を解析した。その結果、既に研究代表者ら (科学研究費・基盤 (B) 2006—2008 年) 或は Qi & Ding (2003) で明らかにされている *tchs1*, *tchs2*、Le-exp1 に加えて、gibberellin β-hydroxylase も PSTVd 感染による矮化・葉巻の発症に伴って発現量が低下することが確認された。これはマイクロアレイ解析の結果を強く支持するものであり、特に葉より茎でより顕著に発現量が低下していたことから矮化症状との関連性に焦点を当ててさらに RNA ゲルブロット分析を継続している。また、PSTVd 感染トマトと健全トマトの次世代シーケンス解析データに含まれる gibberellin β-hydroxylase 遺伝子配列由来 small RNA 蓄積量の比較分析も現在継続中である (佐野、千田、海外研究協力者: Owens RA)。

**PSTVd 由来ヘアピン RNA を発現する形質転換植物の作出とその性状分析：** PSTVd のほぼ全長、部分長及び srPSTVd ホットスポット配列に由来する人工ヘアピン RNA を発現する形質転換トマト系統の作出に着手した。まず、PSTVd の左末端の一部を欠失するほぼ全長 RNA (PSTVd-△TL)、PSTVd の左半分 (PSTVd-left half)、PSTVd の病原性ドメインを欠失した配列 (PSTVd-△P)、PSTVd の中央保存領域下部マイナス鎖由来の srPSTVd ホットスポット配列 (srPSTVd-257a) に基づき、それぞれの人工ヘアピン遺伝子を構築し、CaMV-35S プロモーター (全身発現性) 或は CoYMV プロモーター (師部伴細胞特異的発現性) に連結して、アグロバクテリウムに導入した。トマト及び *Nicotiana benthamiana* の形質転換と平行して、アグロインフィルトレーションで人工ヘアピン RNA のサイレンシング誘導能を確認した。

現在まで、上記の PSTVd-ヘアピン RNA を発現する形質転換トマトと *N. benthamiana* の形質転換体系統を選抜・育成中であるが、PSTVd-△TL と srPSTVd-257a のヘアピン

RNA を発現する *N.benthamina* 系統の T2 ホモ接合系統が得られ、その PSTVd 感受性を分析した結果、両系統共に PSTVd の感染・増殖を阻害した。また、それぞれの形質転換体系統を選抜する過程で、ウイロイド感染に類似した矮化症状、莖長部分の水浸状化(ガラス化)、発芽(発根)障害などを示す系統がかなりの頻度で観察された。これらの障害を有する系統は十分な子孫植物が得られないことから、その性状を十分に評価できないのが現状であるが、導入した PSTVd 由来のヘアピン RNA により誘導される RNA サイレncing により、植物側の植物ホルモン生合成関連遺伝子発現或は microRNA 代謝経路に悪影響が生じた可能性が考えられ、さらに実験系の構築を検討中である(佐野、研究協力者:原田)。

ウイルスベクターによる RNA サイレncing 関連遺伝子ノックダウン系の構築: ウイロイド (PSTVd 及び HSVd) 或いはトマトの RNA サイレncing 関連遺伝子 (DCL、RDR6、AGO など) の一部と相同な 2 本鎖 RNA 或はヘアピン RNA を発現するよう構築したウイルスベクターをトマト (品種: Rutgers、Micro-Tom) に感染させ、RNA サイレncing 関連遺伝子発現をノックダウンする実験系の構築を目指し、PAMV をベースにして改変したウイルスベクターを作製し、2 本鎖 RNA を発現する実験系を構築した。更に効率の高いノックダウン系の構築に向けてヘアピン RNA を発現する構築を進めている。また PAMV 以外にも PVM をベースにして改変したウイルスベクターの作成を継続している(畑谷)。

### ③ ウイロイドの宿主適応と分子進化に及ぼす影響の解析

ホップ矮化ウイロイド (HpSVd) -ブドウ変異株 (HpSVd-grape) を栽培ホップに感染させ、持続感染状態で 15 年間維持した結果、HpSVd-grape は年数の経過と共に多様な適応変異体を生じ、5 箇所 (第 24,25,54,193,281 番塩基) の変異を有するホップ適応変異体 (HpSVd-hKFKi) に収斂した (Ito-Kawaguchi et al 2009)。HpSVd-grape と HpSVd-hKFKi の感染性 cDNA クローンを構築し、単独或は混合してブドウ、ホップ、キュウリに感染させ複製能・病原性を比較解析した結果、HpSVd-KFKi はブドウで安定に複製する能力を喪失し感染後すぐに HpSVd-grape に復帰変異した。ホップとキュウリでは安定に複製する能力を維持していたが、増殖量と病原性はホップでは HpSVd-grape とほぼ同等~若干低下、キュウリでは明らかに低下していた。すなわち、HpSVd がホップに長期間持続感染中に獲得した適応変異は、原宿主、適応宿主、第 3 宿主のいずれにおいても、複製能力の点では利点をもたらさなかったと判断された。

そこで次に両変異体に感染したキュウリとホップから srHpSVd を含む 15-30 ヌクレオチドの small RNA 分画を調製し、次世代シーケンサーによる大規模塩基配列解析を実施した。その結果、HpSVd-grape の方が HpSVd-KFKi よりホップとキュウリ共により多量の srPSTVd を蓄積しており、より強く RNA サイレncing を誘導していることが明らかになった。また、特に 5 箇所の変異を含む srHpSVd リード数の全 srHpSVd リード数に占める割合が HpSVd-KFKi 感染ホップ・キュウリでは HpSVd-grape より低下していたことから、5 箇所の適応変異により HpSVd は RNA サイレncing を結果として回避していることが示唆された (佐野)。

### 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 13 件)

- ① 竹本周平・佐野輝男 (2012) 小さな小さなウイルス発見物語 リカタン 2012 年 1 月号 63 頁
- ② 佐野輝男 (2011) ウイロイド・ウイルス性病害の検出と診断 病害虫情報 第 93 号 植物防疫所
- ③ Tsushima, T., Murakami, S., Ito, H., He, Y-H., Adkar-Purushothama CR., Sano, T\*. (2011) Molecular characterization of Potato spindle tuber viroid in Dahlia. J. Gen. Pl. Pathol. 77; 253-256.
- ④ Jiang, D., Wu, Z., Xie, L., Sano, T., Li, S-F. (2011) Sap-direct RT-PCR for the rapid detection of coleus blumei viroids of the genus Coleviroid from natural host plants. J. Virol. Method. 174(1-2):123-127
- ⑤ Ramachandral, S., C.R. Adkar- Purushothama, CR., Maheshwara, PK., Sano, T., Janardhana, GR\*. (2011) A sensitive and reliable RT-nested PCR for the detection of Citrus tristeza virus from naturally infected Citrus plants. Current Microbiology 62(5);1455-1459.
- ⑥ Wang, Y., Shibuya, M., Taneda, A., Kurauchi, T., Senda, M., Owens, RA., Sano, T\*. (2011) Accumulation of Potato spindle tuber viroid-specific small RNAs is accompanied by specific changes in gene expression in two tomato cultivars. Virology 413; 72-83.
- ⑦ 佐野輝男 (2010) ウイロイド研究の新展開 ウイルス 60 巻 177-186.
- ⑧ He, Y-H., Isono, S., Kawaguchi-Ito, Y., Taneda, A., Kondo, K., Iijima, A., Tanaka, K. and Sano, T\* (2010) Characterization of a new Apple dimple fruit viroid variant that causes yellow dimple fruit formation in 'Fuji'

apple trees. J. Gen. Pl. Pathol. 76; 324-330.

- ⑨ Sano, T., Barba, M., Li, S-F. and Hadidi, A. (2010) Viroids and RNA silencing; Mechanism, role in viroid pathogenicity and development of viroid-resistant plants. GM Crops 1:2, 1-7; March/April 2010 ©, Landes Bioscience
- ⑩ Kurauchi, T., Matsumoto, T., Taneda, A., Sano, T. and Senda, M. (2009) Endogenous short interfering RNAs of chalcone synthase genes associated with inhibition of seed coat pigmentation in soybean. Breeding Science 59:419-426.
- ⑪ Kawaguchi-Ito, Y., Li, S-F., Tagawa, M., Araki, H., Goshono, M., Yamamoto, S., Tanaka, M., Narita, M., Tanaka, K., Liu, S-X., Shikata, E., Sano, T. (2009) Cultivated grapevines represent a symptomless reservoir for the transmission of hop stunt viroid to hop crops: 15 years of evolutionary analysis. PLoS ONE 4(12): e8386. doi:10.1371/journal.pone.0008386.
- ⑫ Hou, W., Li, S., Wu, Z., Jiang, D. and Sano, T. (2009) Coleus blumei viroid 6: A new tentative member of the genus Coleviroid derived from natural genome shuffling. Arch Virol. 154:993-997.
- ⑬ Hou, W., Sano, T., Li, F., Wu, A., Li, L. and Li, S. (2009) Identification and characterization of a new Coleviroid (CbVd-5). Arch. Virol. 154:315-320.

[学会発表] (計 20 件)

- ① 佐川恭太・Lu Quan-You・Li Shi-Fang・Xie Lian-Hui・対馬太郎・佐野輝男：桑から分離されたウイロイド様小環状 RNA の分子構造とリボザイム活性，日本植物病理学会大会（福岡市，福岡国際会議場）2012 年 3 月 30 日
- ② 対馬太郎・宍戸愛・Adkar Purushothama Charith-Raj・佐野輝男：ダリアから検出されたジャガイモスピンドルチューバーウイロイド (PSTVd) 欠損分子について，日本植物病理学会大会（福岡市，福岡国際会議場）2012 年 3 月 30 日
- ③ 葛西厚史・鳥倉健太・佐野輝男・原田竹雄：ウイロイド (PSTVd) の siRNA 産生形質転換タバコにおける PSTVd 増殖抑制。平成 23 年度日本分子生物学会（パシフィコ横浜）2011 年 12 月 14 日。
- ④ 佐野輝男：ウイロイド病を見分ける。第 5 回植物病害診断研究会（日本植物病理学会）（青森市、青森市民ホール）2011 年 11 月 1 日。
- ⑤ 松田考広・Adkar-Purushothama Charith Raj・佐野輝男：ホップ矮化ウイロイド-ブドウ分離株とそのホップ適応変異体の病原性の比較 (2)。平成 23 年度日本植物病

理学会東北部会（青森市、青森市民ホール）2011 年 10 月 31 日

- ⑥ Owens, RA, Taneda A., Senda, M., Tech, K., Baker, T., Sano, T.: Accumulation of Potato spindle tuber viroid-specific small RNAs is accompanied by specific changes in gene expression in two tomato cultivars, IUMUS 2011 Sapporo, XVth International Congress of Virology, September 15, Sapporo Convention Center (Oral). 2011.
- ⑦ Sano, T., Matsuda, T., Charith Raj, AP., Zhang, Z., Li, S.: Pathogenicity of Hop stunt viroid-grapevine and its mutant adapted to hops. IUMUS 2011 Sapporo, XVth International Congress of Virology, September 15, Sapporo Convention Center (Oral). 2011.
- ⑧ Tsushima, T., Sano, T.: Detection of Coleus blumei Viroid 6 (CbVd-6) from Coleus in Japan and seed transmission of CbVd-1 and -6, IUMUS 2011 Sapporo, XVth International Congress of Virology, September 15, Sapporo Convention Center (Poster). 2011.
- ⑨ 対馬太郎・佐野輝男：コリウスブルメイウイロイド 1 及び 6 の種子伝染性について。平成 23 年度日本植物病理学会（府中市・東京農工大学）2011 年 3 月 27 日
- ⑩ 松田考広・Adkar-Purushothama Charith Raj・佐野輝男：ホップ矮化ウイロイド-ブドウ分離株とそのホップ適応変異体の病原性の比較。平成 23 年度日本植物病理学会（府中市・東京農工大学）2011 年 3 月 27 日
- ⑪ 佐野輝男・村上咲子・伊藤寛次・対馬太郎：ダリアから分離された Potato spindle tuber viroid について。平成 23 年度日本植物病理学会（府中市・東京農工大学）2011 年 3 月 27 日
- ⑫ Teruo Sano: Viroid – Pathogenicity, evolution (host-adaptation), and RNA silencing. Lecturer, School of Life Sciences (Yi Li's Lab.), Peking University, Sept.23, 2010.
- ⑬ Teruo Sano: Current Status of Viroid Diseases. Lecturer, Wuyi University, Wuyishan, China, Sept.21, 2010
- ⑭ Teruo Sano: Latest Progress in Viroid Research. Lecturer, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou, China, Sept.18-19, 2010
- ⑮ 対馬太郎・李世訪・佐野輝男：コリウスのウイロイドについて—Coleus blumei viroid 5 の検出。京都国際会議場（京都市）2010 年 4 月 19 日
- ⑯ 佐野輝男・川口（伊藤）陽子・松田考広・張志想・李世訪：ホップ矮化ウイロイド-ブドウ分離株とそのホップ適応変異体の病原性及び遺伝的安定性。平成 22 年度日本植物病理学会東北部会（コラッセふくしま、



福島市) 2010年10月5日

- ⑰ 佐野輝男: ホップ矮化ウイルスと果樹病害. 落葉果樹研究会 講演 (青山会館、東京都) 2010年2月2日
- ⑱ 佐野輝男・Wang Ying・渋谷允・種田晃人・千田峰生: ウィロイド感染植物に蓄積する多様な長さのウィロイド特異的 small RNAs の大規模塩基配列解析, 平成21年度日本植物病理学会東北部会 宮城県立大学 (仙台市) 2009年9月29日
- ⑲ 葛巻英祐・佐野輝男: Potato spindle tuber viroid 感染と病徴発現に伴って発現量が低下するトマト2遺伝子 (tchs2 と p450d) の発現量解析, 平成21年度日本植物病理学会東北部会 宮城県立大学 (仙台市) 2009年9月29日
- ⑳ 葛巻英祐・佐野輝男: ウィロイドの病徴発現に伴って発現量が低下する2つのトマト遺伝子の発現量解析, 平成21年度日本植物病理学会感染整理談話会, 大沼国際セミナーハウス (北海道亀田郡) 2009年8月6日

[図書] (計4件)

- ① DiSerio, F., Randles, J.W., Flores, R., Owens, R.A., Sano, T., Li, S-F., Vidalakis, G., and Pallas, V. (2011) Viroids. In Andrew M.Q. King, Michael J. Adams, Eric B. Carstens, and Elliot J. Lefkowitz, editors: Virus Taxonomy, Oxford: Elsevier, pp. 1221 - 1234.
- ② Sano, T. (2011) Chapter 42, Hop stunt viroid, In Virus and Virus-like Diseases of Pome and Stone Fruits, Edited by Hadidi A et al., APS Press, pp229-232, ISBN 978-0-89054-396-2
- ③ Eastwell, K. and Sano, T. (2009) Hop stunt disease (HSVd), In the Compendium of Hop Diseases, Arthropod Pests and Other Disorders, APS Press, pp 48-51, 93 page, ISBN 978-0-89054-376-4
- ④ Sano, T. (2009) Apple fruit crinkle viroid (AFCVd), In the Compendium of Hop Diseases, Arthropod Pests and Other Disorders, APS Press, pp 39, 93 page, ISBN 978-0-89054-376-4

[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

<http://nature.cc.hirosaki-u.ac.jp/lab/3/plapath/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

佐野 輝男 (SANO TERUO)  
弘前大学・農学生命科学部・教授  
研究者番号: 30142699

### (2) 研究分担者

千田 峰生 (SENDA MINEO)  
弘前大学・農学生命科学部・准教授  
研究者番号: 30261457

畑谷 達児 (HATAYA TATSUJI)  
北海道大学・農学研究科 (研究院)・講師  
研究者番号: 20241367

### (3) 連携研究者

原田 竹雄 (HARADA TAKEO)  
弘前大学・農学生命科学部・教授  
研究者番号: 10228645

海外研究協力者

R.A.Owens  
USDA・Agriculture Research Service  
Molecular Plant Pathology Laboratory