

令和 6 年 6 月 11 日現在

機関番号：11201

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K05590

研究課題名(和文)植物ウイルスの種子伝染に対する植物の防御機構の解明

研究課題名(英文)Analysis of plant defense mechanisms against seed transmission of plant viruses

研究代表者

磯貝 雅道 (Isogai, Masamichi)

岩手大学・農学部・教授

研究者番号：30312515

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：ラズベリー黄化ウイルス(RBDV)感染Nicotiana benthamiana (Nb)に、健全Nb由来の花粉を授粉しても、胚へのウイルス感染は検出されず、種子伝染しなかった。そこで、RNAサイレンシングにより、ウイルスが胚へ感染できず、種子伝染しないと仮説を立て、ダイサー様タンパク質2と4、RNA依存RNAポリメラーゼ6の機能を喪失させたNb変異体を用いて、RBDVの種子伝染を解析した。その結果、これらのNb変異体においても、胚にウイルス感染は検出されず、種子伝染しなかった。このことから、RNAサイレンシングはRBDVの種子伝染阻害に不可欠ではないと示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

植物ウイルスの中でも種子伝染性ウイルスは、国際的な種子流通量の増加から、世界中に拡散される危険性が極めて高い。種子伝染性ウイルスの多くは、発芽前の植物体である種子中の胚に感染することで次世代の植物へと伝染するため、乾熱処理による消毒効果は期待できない。しかも、種子伝染性ウイルスに対する植物の防御機構や抵抗性遺伝子は分かっておらず、その防除は困難を極める。申請者の解析から、胚におけるウイルス感染阻害作用にRNAサイレンシングが不可欠ではないことが示された。今後、未知の胚へのウイルス感染抑制メカニズムの解明が期待される。

研究成果の概要(英文)：I showed that RBDV is not transmitted through seeds in infected Nicotiana benthamiana (Nb) plants after pollination with virus-free Nb pollen grains, since RBDV was absent in the embryos. Subsequently, we analyzed seed transmission of RBDV in Nb mutants with mutations in dicer-like enzyme 2 and 4 (NbDCL2&4) or RNA-dependent RNA polymerase 6 (NbRDR6). As a result, seed transmission of RBDV was prevented by evasion of infection by the embryo. These results suggest that RNA silencing is not essential for preventing RBDV-seed transmission in Nb plants.

研究分野：植物病理学

キーワード：植物ウイルスの種子伝染 RNAサイレンシング ラズベリー黄化ウイルス ダイサー様タンパク質2 ダイサー様タンパク質4 RNA依存RNAポリメラーゼ6 ベンサミアナタバコ

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

種子はグローバル商品として国際的に流通量が増加しており、種子伝染により、海外から病原ウイルスが直接、圃場に持ち込まれる例が報告されている。この実情を危惧した国連食糧農業機関は各国が協力して種子伝染性病原体の侵入・まん延を防ぐため、国際植物防疫条約を公布し、各国が植物検疫措置を強化している。わが国では、侵入した場合に甚大な被害が予想されるとして、124種の植物ウイルスに対し植物防疫法施行規則により輸入検査が行われているが、その内、3割ものウイルスが種子伝染する。しかしながら、種子伝染性ウイルスの多くは、発芽前の植物体である種子中の胚に感染して伝染するため、乾熱処理による消毒効果は期待できない。しかも、種子伝染性ウイルスに対する植物の防御機構や抵抗性遺伝子は分かっておらず、種子伝染性ウイルスを防除することは困難である。そこで、本研究では、植物ウイルスの種子伝染を阻害する植物の防御機構について、植物ウイルスの防御機構である RNA サイレンシングの関与を解析した。

2. 研究目的

ラズベリー黄化ウイルス(RBDV)は、感染ラズベリーに、健全ラズベリーの花粉を人工授粉すると、RBDV が高率に種子伝染するが、もう一つの宿主植物である *Nicotiana benthamiana* (Nb) では、種子伝染しないことを見出した。種子伝染性ウイルスの特徴として、感染する植物種によって種子伝染率が大きく異なることは、以前から知られている現象であるが、その理由については分かっていない。また、海外では、RBDV とは別種の3種のウイルスを用いて、種子伝染率の上昇に關与するウイルス遺伝子を解析した研究があり、それぞれ異なるウイルス遺伝子が同定された。現在、それら異なるウイルス遺伝子は、共通に RNA サイレンシングを抑制する活性(RSS 活性)を持っていることが分かってきた。このことから、植物ウイルスは、その RSS 活性により、植物が持つ RNA サイレンシングを抑制して、種子伝染率を上昇させることが考えられる。つまり、RNA サイレンシングにより、植物はウイルスの種子伝染を抑制している可能性がある。そこで、本研究は、植物のウイルス防御機構である RNA サイレンシングにより、胚へのウイルス感染が抑制され、ウイルスの種子伝染が阻害されているのではないか」という「問い」を解決することを目的とした。

3. 研究方法

(1) RNA サイレンシングに關与する遺伝子発現を抑制および停止させた Nb での RBDV の種子伝染率の変化の解析

Nb での植物ウイルスに対する RNA サイレンシングでは、植物の DCL2 および DCL4 の切断活性により、ウイルス RNA の複製などで生じた 2 本鎖 RNA が、約 20 塩基対の 2 本鎖 RNA (siRNA) へと切断される。その siRNA は、植物の RDR6 により増幅され、siRNA のウイルス RNA と相補結合する鎖が RISC 複合体に取り込まれる。これにより、RISC 複合体は、塩基配列特異的にウイルス RNA に結合し、ウイルス RNA を切断することで、ウイルス感染を阻害する。そ

ここで、DCL2 と DCL4 の発現を 2 重にノックアウトした Nb ($\Delta D2\Delta D4$ 植物) および RDR6 の発現をノックアウトした Nb ($\Delta RDR6$ 植物)を用い、野生型 Nb での種子伝染率と比較した。

(2) RBDV 感染した野生型 Nb の頂分裂組織(SAM)、花芽、未授精の子房、胚珠、胚のうのウイルス局在解析

SAM は多分化能幹細胞であるため、RBDV が SAM に感染している場合、そこから分化してくる花芽、子房、胚珠、胚のうにウイルスが感染していると考えられる。Nb の頂分裂組織(SAM)、花芽、未授精の子房、胚珠、胚のうのウイルス局在を発色 in situ hybridization (CISH) により解析し、RBDV の種子伝染とそれら器官・組織でのウイルス局在との関連を解析した。

(3) 野生型 Nb、 $\Delta D2\Delta D4$ 植物、 $\Delta RDR6$ 植物における RBDV の胚感染解析

RBDV に感染した Nb に健全 Nb の花粉を授粉して形成される種子を CISH により解析し、種子中の胚のウイルス感染と種子伝染との関連を解析した。さらに同様の実験を $\Delta D2\Delta D4$ 植物で行い、CISH により胚のウイルス感染と種子伝染との関連を解析した。

4. 研究成果

(1) 野生型 Nb、 $\Delta D2\Delta D4$ 植物、 $\Delta RDR6$ 植物での RBDV の種子伝染率の解析

RBDV に感染した Nb に健全 Nb の花粉を授粉して形成される種子を発芽させ、RT-PCR により検定したところ、115 個体中で RBDV に感染している個体は検出されなかった(Table 1)。そこで、同様の実験を $\Delta D2\Delta D4$ 植物、 $\Delta RDR6$ 植物で行ったところ、両変異体ともに、形成された種子由来の実生にウイルスは検出されなかった(Table 1)。これらのことから、野生型 Nb と同様に、 $\Delta D2\Delta D4$ 植物、 $\Delta RDR6$ 植物においても、RBDV は種子伝染しないことが明らかになった。

Table 1. 野生型Nb、 $\Delta D2\Delta D4$ 植物、 $\Delta RDR6$ 植物におけるRBDVの種子伝染

RBDV感染 柱頭親植物	非感染 花粉親植物	RBDVの種子伝染	
		感染個体数	試験個体数
野生型Nb	野生型Nb	0	115
$\Delta D2\Delta D4$ 植物	$\Delta D2\Delta D4$ 植物	0	103
$\Delta RDR6$ 植物	$\Delta RDR6$ 植物	0	124

(2) RBDV 感染した野生型 Nb の SAM、花芽、未授精の子房、胚珠、胚のうのウイルス局在解析

RBDV 感染 Nb の SAM でのウイルス局在を CISH により解析した。その結果、RBDV が SAM に検出された。このことから、RBDV は Nb の SAM に侵入できることが明らかとなった(Fig. 1)。SAM は多分化能幹細胞であることから、RBDV に感染している SAM から分化してくる組織や器官はすべて RBDV に感染していると考えられる。そこで、RBDV 感染 Nb の花芽、子房、胚珠、胚のうでのウイルスを CISH により解析した。予想通りに、花芽、子房、胚珠、胚のうのす

べてに RBDV が感染していることが明らかとなった。さらに、胚のう内部の卵細胞がウイルスに感染していることを示唆した(Fig. 2, 矢印)。

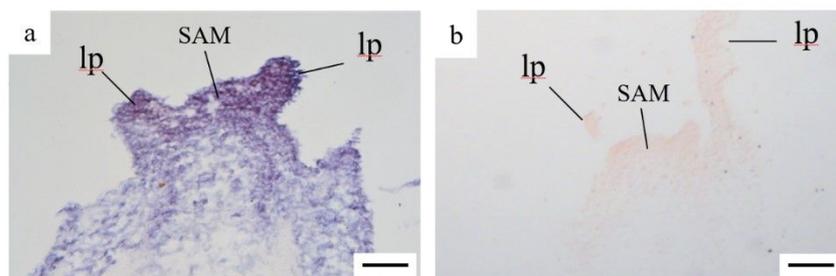


Fig. 1. RBDV感染Nb植物のSAMでのウイルス局在
a, RBDV感染Nb由来の茎頂. b, 健全Nb由来の茎頂. SAM, 茎頂分裂組織. lp, 葉原基. RBDVの存在は青色で示される. スケールバーは100 μm

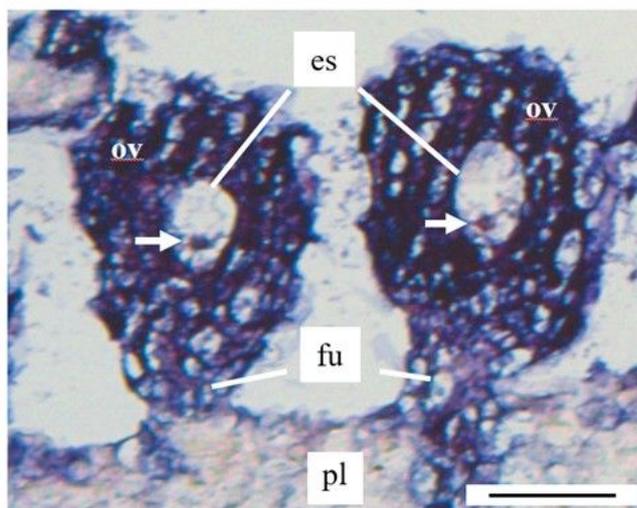


Fig 2. RBDV感染Nb由来の胚珠に内包された胚のうのCISHによるウイルス局在解析.
ov, 胚珠. es, 胚のう. fu, 珠柄. pl, 胎座. 矢印, 卵細胞. RBDVの存在は青色で示される. スケールバーは100 μm .

(3) RBDV 感染した野生型 Nb に健全な野生型 Nb の花粉を授粉して形成される種子内部のウイルス局在解析

RBDV に感染した野生型 Nb に健全野生型 Nb の花粉を授粉して形成される種子内部のウイルス局在を CISH により解析した。その結果、授粉 10 日後には球状胚と胚乳が形成されたが、ウイルスは胚乳に検出されるにも関わらず、胚には検出されなかった(Fig. 3, b and c)。その後、胚は、心臓型胚、魚雷型胚と発達したが、胚乳にウイルスが検出されるにも関わらず、胚にウイルスは検出されなかった(Fig. 3, d-g)。さらに、RBDV 感染 $\Delta D2\Delta D4$ 植物に健全 $\Delta D2\Delta D4$ 植物の花粉を授粉して形成される種子を用いて、同様にウイルス局在を解析した。その結果、野生型 Nb と同様に、胚乳にウイルスが検出されるにも関わらず、胚にウイルスは検出されなかった。

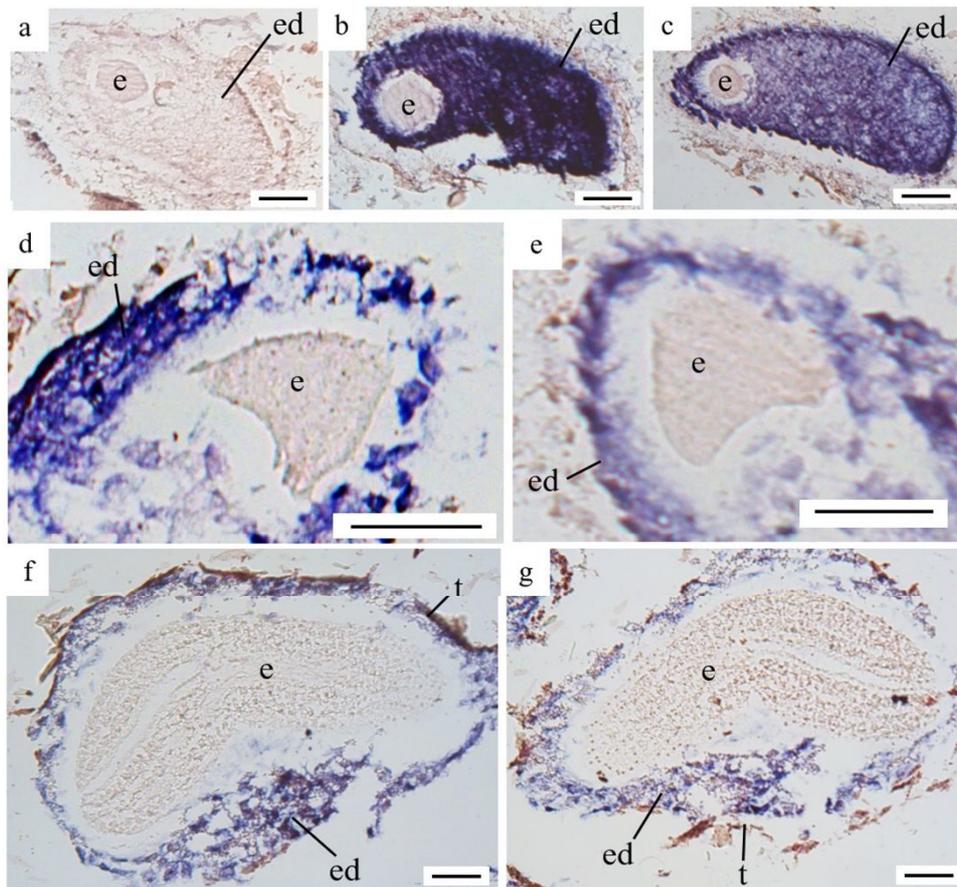


Fig. 3. RBDV感染Nb植物に形成された未熟種子内部のCISHによるウイルス局在解析.

a,健全Nb由来の未熟種子(球状胚). b-g, RBDV感染Nb由来の未熟種子(a, b: 球状胚, d, e: 心臓型胚, f, g: 魚雷型胚). e, 胚. ed, 胚乳, t, 種皮. RBDVの存在は青色で示される. スケールバーは100 μm .

(4) まとめ

Nbでは、RBDVは種子伝染することができないことが示された。驚くことに、RBDVが卵細胞に感染しているにもかかわらず、受精により形成された胚では、ウイルス感染が検出できないことが判明した。さらに、ウイルス感染した胚乳から、隣接する胚へ、ウイルスが侵入できないことが判明した。これらのことから、野生型Nbは、胚へのRBDV感染を阻止することで、RBDVの種子伝染することを防いでいることが明らかとなった。そして、ウイルスに感染している卵細胞から、受精時あるいは受精後に、ウイルスが排除され、ウイルスに感染していない胚が形成されると考えられた。さらに、RNAサイレンシングを抑制した $\Delta D2\Delta D4$ 植物、 $\Delta RDR6$ 植物を用いたRBDVの種子伝染解析で、RBDVの種子伝染が観察されないこと、RBDVに感染した $\Delta D2\Delta D4$ 植物由来の種子をCISH解析した際、野生型Nbと同様に胚乳にウイルスが検出されるにも関わらず、胚にウイルスは検出されないことから、Nb植物におけるRBDVの胚への感染の阻害の要因として、RNAサイレンシングは本質的要因とは考えにくかった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計6件（うち査読付論文 5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 Isogai Masamichi, Yoshikoshi Mizuna, Seki Kentaro, Masuko-Suzuki Hiromi, Watanabe Masao, Matsuoka Kouki, Yaegashi Hajime	4. 巻 168
2. 論文標題 Seed transmission of raspberry bushy dwarf virus is blocked in <i>Nicotiana benthamiana</i> plants by preventing virus entry into the embryo from the infected embryo sac and endosperm	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Archives of Virology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00705-023-05767-w	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 Fuji Shin-ichi, Mochizuki Tomofumi, Okuda Mitsuru, Tsuda Shinya, Kagiwada Satoshi, Sekine Kentaro, Ugaki Masashi, Natsuaki Keiko T., Isogai Masamichi, et al.	4. 巻 88
2. 論文標題 Plant viruses and viroids in Japan	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of General Plant Pathology	6. 最初と最後の頁 105 ~ 127
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s10327-022-01051-y	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 Isogai Masamichi, Shimoda Ren, Nishimura Honoka, Yaegashi Hajime	4. 巻 88
2. 論文標題 Pollen grains infected with apple stem grooving virus serve as a vector for horizontal transmission of the virus	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of General Plant Pathology	6. 最初と最後の頁 81 ~ 87
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s10327-021-01039-0	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 磯貝雅道	4. 巻 76
2. 論文標題 花粉に乗り新たな植物に感染する植物ウイルスの伝染メカニズム	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 植物防疫	6. 最初と最後の頁 19 ~ 23
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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 八重樫元・山岸紀子・吉川信幸・磯貝雅道	4. 巻 56
2. 論文標題 果樹ウイルスの病原性に関する研究	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 植物感染整理談話会論文集	6. 最初と最後の頁 87～96
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 Masamichi Isogai, Misaki Yamamura, Hijiri Sakamoto, Hajime Yaegashi, Manabu Watanabe	4. 巻 90
2. 論文標題 Occurrence of blueberry virus L in Japan and its aphid transmission and pathogenicity in highbush blueberry	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Journal of General Plant Pathology	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10327-024-01184-2	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 -

〔学会発表〕 計9件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 磯貝雅道・福土裕梧・猫塚修一・八重樫元
2. 発表標題 こぶ症を呈したリンドウからの低分子RNA解析 によるウイルス検出
3. 学会等名 日本植物病理学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 中嶋瞳・山岸紀子・磯貝雅道・八重樫元
2. 発表標題 リングクロロティックリーフスポットウイルス輪状さび果分離株の病原性決定領域の解析
3. 学会等名 日本植物病理学会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 磯貝雅道・菅野明日美・山村美紗紀・渡邊学・八重樫元
2. 発表標題 栽培ブルーベリー樹の低分子RNA解析 によるウイルス検出
3. 学会等名 日本植物病理学会東北部会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 中嶋瞳・磯貝雅道・八重樫元
2. 発表標題 リンゴクロロティックリーフスポットウイルスリング輪状さび果病分離株の感染性cDNAクローンの構築
3. 学会等名 日本植物病理学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 八重樫元・伊藤伝・山岸紀子・吉川信幸・磯貝雅道
2. 発表標題 リンゴ奇形果病罹病樹由来リンゴステムピッチングウイルス変異株の感染性cDNAクローンの作出
3. 学会等名 日本植物病理学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 磯貝雅道・山村美紗紀・坂本聖・渡辺学・八重樫元
2. 発表標題 blueberry virus Lの日本における発生
3. 学会等名 日本植物病理学会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 加賀惇・山岸紀子・磯貝雅道・八重樫元
2. 発表標題 リンゴ奇形果病由来リンゴステムピッチングウイルス分離株の特性解析
3. 学会等名 日本植物病理学会
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 中川沙樹・中嶋瞳・山岸紀子・磯貝雅道・八重樫元
2. 発表標題 リンゴクロロティックリーフスポットウイルス輪状さび果分離株の病原性に関わるアミノ酸変異の解析
3. 学会等名 日本植物病理学
4. 発表年 2024年

1. 発表者名 磯貝雅道・関賢太郎・松尾幸毅・八重樫元
2. 発表標題 RNAサイレンシングは <i>Nicotiana benthamiana</i> におけるラズベリー黄化ウイルスの種子伝染の抑止に不可欠ではない
3. 学会等名 日本植物病理学会東北部会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

植物病理学分野 植物病理学研究室 紹介
<http://www.agr.iwate-u.ac.jp/lab/%e6%a4%8d%e7%89%a9%e7%97%85%e7%90%86%e5%ad%a6%e7%a0%94%e7%a9%b6%e5%ae%a4/>

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