

令和 6 年 6 月 17 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：21K05611

研究課題名(和文) チューリップモザイク病の分子機構と生物学的意義の解明

研究課題名(英文) Understanding of molecular mechanism and biological significance of Tulip breaking disease

研究代表者

八重樫 元 (Yaegashi, Hajime)

岩手大学・農学部・准教授

研究者番号：90582594

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、チューリップモザイクウイルス(TuIMV)による着色攪乱機構を明らかにするため、TuIMV感染したチューリップ品種「紫水晶」の花弁におけるアントシアニン合成関連遺伝子の発現変動を解析した。その結果、カルコンシンターゼ遺伝子(CHS)の発現がTuIMV感染により低下することを見出した。CHSの機能解析を行うため、リンゴ小球形潜在ウイルス(ALSV)ベクターの利用を検討したが、ALSVは本研究で供試したチューリップ品種には全身感染しなかった。以上より、本研究でチューリップの着色攪乱の原因候補遺伝子がCHSであることを明らかにしたが、その機能を明らかにするには、さらなる研究が必要である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

チューリップモザイク病は世界的に有名なウイルス病の一つであるが、その特徴的な病徴である花弁の色割れの分子機構は不明のままである。本研究ではチューリップモザイクウイルスが感染し、色割れを呈する花弁における遺伝子発現変動を網羅的に解析し、アントシアニン合成経路に関わるCHS遺伝子が原因であることを強く示唆した。今後のさらなる研究により、CHSの発現量低下メカニズムを解明できれば、色割れを人為的に再現することによりアブラムシの選好性操作や、新品種育成に関する研究に繋がり、植物保護のみならず園芸分野にも貢献すると期待される。

研究成果の概要(英文)：This study investigated the molecular mechanism of flower color-breaking by tulip mosaic virus (TuIMV) infection. RNA-seq and reverse-transcriptional quantitative PCR were conducted to reveal the expression pattern of candidate genes associated with anthocyanin biosynthesis. The results showed that the expression level of the chalcone synthase gene (CHS) is significantly reduced in petals showing color-breaking by TuIMV infection. To analyze the function of CHS, we attempted to use virus-induced gene silencing (VIGS) by apple latent spherical virus (ALSV) vector. Unfortunately, ALSV could not infect systemically several tulip cultivars by biolistic inoculation. This study strongly suggested that CHS is a key gene causing flower color-breaking of tulips. Further study will be required to uncover the function and down-regulation mechanism of CHS by TuIMV infection.

研究分野：植物保護科学

キーワード：植物ウイルス チューリップモザイク病 アントシアニン カルコンシンターゼ ウイルスベクター

様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

1. 研究開始当初の背景

チューリップはユリ科の球根植物であり、春を彩る代表的な花として世界中で親しまれている。海外ではオランダ、国内では富山県の球根生産量が最も高い。チューリップは、球根形成により栄養繁殖するため、ウイルス病が大きな問題となり、罹病球根から無毒化するのは困難である。国内外で最も被害が大きいのは、チューリップモザイクウイルス(tulip mosaic virus; TuIMV)によるモザイク病である。TuIMV は一本鎖プラス鎖 RNA をゲノムとするひも状粒子のウイルスであり、ポティウイルス科に属する。

チューリップモザイク病の特徴的な病徴は花卉の着色攪乱である。例えば赤色系の品種「ハルクロ」では、花卉が赤と淡黄色に色割れする。このような TuIMV 感染により花色の色割れを呈すチューリップは、まだウイルス病の認識がなかった 17 世紀のオランダで珍重された。また、TuIMV 感染株の葉や茎では、萌芽期に紫色に着色する場合がある。これらの各組織での着色攪乱は、植物の代表的な色素の一つであるアントシアニンの合成が TuIMV 感染により攪乱された結果であると推測されている。

花き類において花色は重要形質であり、アントシアニン合成経路をはじめとする着色制御機構が遺伝子レベルで解明されている。アントシアニンは、母核にアントシアニジンを持ち配糖化された化合物であり、そのアントシアニジンは構造的な違いから、シアニジン(赤色~深紅)、ペラルゴニジン(橙色~赤色)、デルフィニジン(赤紫色~青色)の3つに大別される。アントシアニンの合成は、フェニルアラニンがフェニルアラニンアンモニリアーゼ(PAL)によりトランス桂皮酸に変換されることから始まる。トランス桂皮酸は桂皮酸 4-水酸化酵素(C4H)の作用で4-クマル酸となり、さらに4-クマル酸 CoA リガーゼ(4CL)によって4-クロマイル CoA となる。4-クロマイル CoA は、カルコン合成酵素(CHS)のはたらきで3分子のマロニル CoA と反応してカルコンを生成する。開環型のカルコンは自発的に、あるいはカルコンイソメラーゼ(CHI)により開環し、フラバノンとなる。ここまでの過程は、各種フラボノイドの生合成に共通の過程であるが、その後の合成経路ではそれぞれフラボノイド 3'-ヒドロキシラーゼ(F3'H)、フラバノン 3-ヒドロキシラーゼ(F3H)、フラボノイド 3',5'-ヒドロキシラーゼ(F3'5'H)の働きによってジヒドロフラボノールになる。さらに、ジヒドロフラボノール還元酵素(DFR)とアントシアニン合成酵素(ANS)がどのジヒドロフラボノールに対して高い基質特異性を示すかによって、最終的に上記3つの中からどのアントシアニジンが合成されるか変化する。

上述のアントシアニン合成経路はチューリップでも機能するものと考えられているが、TuIMV 感染によりアントシアニン合成経路が攪乱されるメカニズムは不明のままである。

2. 研究の目的

本研究では、植物ウイルス病の分子機構を理解するための一環として、歴史上有名なチューリップモザイク病の着色攪乱機構の解明を目的とした。TuIMV 感染によりアントシアニン合成関連遺伝子が発現変動していると推定されるが、どの遺伝子がどのように発現変動しているかは未だ不明である。そこで、本研究では、TuIMV 感染チューリップの花弁から抽出した RNA から次世代シーケンサーを用いた RNA-seq を行い、特に着色攪乱に関わると推定されるアントシアニン合成関連遺伝子の発現変動を網羅的に解析した。また、遺伝子組換えが困難なチューリップにおいて、原因候補遺伝子の発現抑制により着色攪乱機構の遺伝子レベルでの解析を行うことを目的に、リンゴ小球形潜在ウイルス(ALSV)ベクターによるウイルス誘導ジーンサイレンシング(VIGS)がチューリップ遺伝子の発現・抑制に利用可能であることを検証した。

3. 研究の方法

1) TuIMV 感染チューリップの遺伝子発現変動解析

TuIMV 感染チューリップを作出するため、チューリップ品種「紫水晶」を培養土に植え、地上萌芽期まで育成した。-80℃で保存しておいた TuIMV 感染チューリップ葉・花弁を接種源として 0.1M リン酸バッファー(pH7.0)を3倍容加えた磨砕液を、それぞれのチューリップの第1-3葉に汁液接種した。接種後は16℃、長日条件下で育成した。

TuIMV 感染により色割れが認められる花弁サンプルと(図1) TuIMV を接種せずに育成した健全チューリップからの花弁サンプルから RNeasy Plant Mini Kit(キアゲン)を用いて全 RNA を抽出し、株式会社レリクサに委託して次世代シーケンサーによる RNA-seq を行った。

RNA-seq で得られたデータからアントシアニン合成経路に関わる遺伝子を選別し、RT-qPCR により遺伝子発現変動を解析した。

2) ALSV ベクターのチューリップへの感染性

ALSV がチューリップに感染できるかを調べるため、ALSV 感染葉を接種源としたチューリップ品種「紫水晶」、「ありさ」、「クリスタルスター」、「サネ」、「プリティーラブ」、「バレリーナ」、「ファンアイク」、「ピンクインプレッション」の球根を15℃で2週間、4℃で1か月間低温処理して発芽させた。発芽した球根に ALSV 感染葉から得られた RNA を GDS-80 ジーンガン・システム(ネッパジーン)を用いてパーティクルガン法により接種した。接種後の球根は培養土に植え、

16、長日条件下で育成した。その後、接種した葉および非接種葉から RNA を抽出し、ALSV 特異的プライマーを用いた RT-PCR により、ALSV 感染の有無を検定した。

3) TuIMV のゲノム解析

チューリップ品種「紫水晶」から分離された TuIMV-T8 株のウイルスゲノム全長配列を決定するため、ジーンバンクに登録されている TuIMV の部分配列 (9081 塩基; アクセション番号 MH886517) を基にプライマーを設計し、5' RACE 法と 3' RACE 法により 5' 末端配列と 3' 末端配列を決定した。決定した 5' と 3' 末端に特異なプライマーを設計し、TuIMV-T8 の全長 cDNA 断片を RT-PCR により増幅した。増幅した断片はバイナリーベクター (pCambia1300) のカリフラワーモザイクウイルス 35S プロモーターとノパリンシターゼターミネーターの間に In-Fusion クローニング法 (TAKARA 社) によりクローニングした。得られたクローン 3 つについて、プライマーウォーキング法により全塩基配列を決定した。また得られた cDNA クローンはアグロバクテリウム (GV3101, C58C1, EHA105) に導入し、*Nicotiana benthamiana* やチューリップにアグロイノキュレーションして感染性の有無を調べた。



図 1 . TuIMV 感染花卉 (左) と健全花卉 (右)

4. 研究成果

1) TuIMV 感染チューリップの遺伝子発現変動解析

TuIMV 感染 3 個体で退色が確認された花卉 3 サンプルと健全 3 個体からの花卉 3 サンプルからそれぞれ RNA を抽出し、RNA-seq 解析を行った。得られた配列データから、blastx 検索を行い、チューリップのアントシアニン合成に関わると推定される候補遺伝子を選抜し、さらに選抜した遺伝子が偽遺伝子ではなく発現が確認できる遺伝子について解析を行った。

9 種のアントシアニン合成に関わると推測される遺伝子を選抜し (表 1) それらの発現量を TuIMV 感染花卉と健全花卉で比較すると、PAL、DFR、ANS において健全個体より感染個体の方が遺伝子発現量が高いことが示された。一方、PAL2、CHS においては、健全個体に比べ感染個体の遺伝子発現量が低いことが示された。C4H、4CL1、CHI、F3' H では、個体間で遺伝子発現量にばらつきがあり、健全個体と感染個体で遺伝子の発現量に差は認められなかった。以上より、TuIMV 感染により退色が認められる花卉では、アントシアニン合成経路前半で働く PAL2 や CHS の遺伝子発現量が低く、アントシアニン合成経路後半で働く DFR や ANS の遺伝子の発現量が高い傾向が認められた。

RNA-seq 解析による遺伝子発現解析結果を検証するため、選抜した遺伝子について RT-qPCR を行った。その結果、PAL2、CHS、ANS については RNA-seq 解析と同様の遺伝子発現変動パターンが認められた (表 1)。C4H や CHI についても、健全個体と TuIMV 感染個体で遺伝子の発現量に差が認められず、RNA-seq と同様の結果が得られた。しかし、RNA-seq と RT-qPCR による結果を比較すると、4CL1 では RNA-seq 解析で遺伝子の発現量に差が認められなかったが、RT-qPCR では、健全個体より TuIMV 感染個体での発現量が高かった。また、PAL では、RNA-seq では TuIMV 感染個体での発現量が高かったが、RT-qPCR では健全個体に比べ TuIMV 感染個体での発現量が低い結果となった。このように、いくつかの遺伝子については RNA-seq 解析と RT-qPCR で異なる結果を示したが、RNA-seq 解析と RT-qPCR 解析の両手法において顕著に発現量が低下した遺伝子は CHS であった。よって、TuIMV 感染による花卉の着色攪乱において、花卉の退色型の病徴には、TuIMV 感染による CHS の発現量低下が関与することが示唆された。しかしながら、本研究では、退色型の色割れを示す花卉を解析したにもかかわらず発現量が増加する遺伝子も認められていることから、TuIMV 感染による着色攪乱の原因は、アントシアニン合成経路の特定の遺伝子の発現変動によるものではないと推測された。

アントシアニン合成に関与する他の要因として転写因子が関与する可能性が考えられたため、アントシアニンの合成に関わるとされる転写因子の選抜を行い、発現変動解析を行った。本研究で調査した転写因子は、アントシアニンの生合成系遺伝子の転写制御に関わると推測されている代表的な相同性遺伝子群 R2R3-MYB (Zhen et al., 2015, *Frontiers in Plant Science*) に属する転写因子の 1 つである MYB5 と SPL2 である。RNA-seq 解析の結果では、MYB5 は TuIMV 感染個体において発現量がやや増加していたが、SPL2 では健全個体と TuIMV 感染個体での発現量の差は認められなかった。一方、RT-qPCR では、MYB5 と SPL2 の発現量の差は認められず、転写因子と TuIMV 感染による花卉の着色攪乱の関係を明らかにするまでは至らなかった。

表1 . RNA-seq と RT-qPCR によるアントシアニン合成関連遺伝子の発現解析

gene	RNA-seq		RT-qPCR	
	Fold change (log2)	P-Value	Fold change (log2)	SD
PAL	1.243	0.049528	-0.062	0.052
PAL2	-1.193	0.397182	-1.537	0.387
C4H	-0.449	0.55569	0.633	0.189
4CL1	0.182	0.834166	2.244	0.948
CHS	-1.816	0.038998	-3.904	0.767
CHI	-0.512	0.513644	-0.777	0.502
F3'H	0.500	2.343106	-	-
DFR	6.967	1.28E-05	-	-
ANS	1.104	0.098832	0.711	0.371

2) ALSV ベクターのチューリップへの感染性

RNA-seq 解析と RT-qPCR の結果をから、CHS の発現量低下が花弁の退色に関わることが示唆された。しかしながら、チューリップでは効率的な形質転換系や遺伝子発現系が整備されておらず、候補遺伝子の機能解析を行うことが困難である。これらの課題を克服するため、ALSV ベクターによるウイルス誘導ジーンサイレンシング (VIGS) を利用した遺伝子発現抑制が可能であるか検証した。ALSV はリンゴなどのバラ科果樹をはじめとし、ナス科、マメ科、ウリ科など幅広い宿主植物に感染するため、チューリップでも利用できる可能性がある。

まず ALSV がチューリップに感染するか調べるため、チューリップ品種「紫水晶」, 「ありさ」, 「クリスタルスター」, 「サネ」, 「プリティラブ」, 「バレリーナ」, 「ファンアイク」, 「ピンクインプレッション」の発芽した球根に ALSV をパーティクルガン法により接種した。接種後に展開してきた葉に ALSV が感染しているかを RT-PCR で調べた結果、いずれの品種でも ALSV 感染は認められなかった。そこで品種「紫水晶」を用い、発芽期、展葉期と生育ステージを変えて ALSV をパーティクルガン接種したところ、接種葉では ALSV が検出されたが、非接種葉では ALSV は検出されなかった。以上より、ALSV はチューリップには全身感染しないと考えられ、ALSV の利用は困難であると考えられた。ALSV ベクターを利用するには、ALSV が全身感染できるチューリップ品種の探索や接種方法の検討が必要である。また、ALSV 以外の植物ウイルスベクターとして、チューリップ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が利用できる可能性がある (Katarina et al., 2014, Plant Disease)。チューリップでの効率的な遺伝子解析系の確立が今後の課題である。

3) TuIMV のゲノム解析

上述したようにウイルスベクターを利用した遺伝子機能解析は困難であることが示された。そこで、TuIMV の全ゲノム配列を決定し、感染性 cDNA クローンの作出により TuIMV の逆遺伝学的解析系を確立し、ウイルス側から花弁の退色に関わる遺伝子の解析を行うことを試みた。

品種「紫水晶」より分離された TuIMV-T8 分離株の全長は 9577 塩基であり、既報の TuIMV の部分配列と高い配列同一性を示した。35S プロモーター制御下で TuIMV-T8 ゲノム RNA が発現するようにバイナリーベクターにクローニングした pCTuIMV-T8 を各種アグロバクテリウム (GV3101, C58C1, EHA105) に導入し、まずは *N. benthamiana* にアグロイノキュレーションしたが、TuIMV の感染は認められなかった。チューリップ品種「紫水晶」や「ありさ」の葉にアグロイノキュレーション接種した場合でも感染は認められず、根や発芽直後の芽に接種した場合でも感染は認められなかった。以上より、本研究で TuIMV の感染性 cDNA クローンの作出には至らなかった。チューリップでは、アグロバクテリウムを介した形質転換効率が極めて低いことが原因かもしれない。今後、試験管内転写した RNA の接種など別の接種法を検討する必要がある。

本課題では、歴史上有名なチューリップモザイク病の着色攪乱機構の解明を目的に、TuIMV 感染により発現変動するアントシアニン合成関連遺伝子を網羅的に解析し、CHS の発現量低下が花弁の退色に関わることを明らかにした。しかしながら、候補遺伝子の機能解析、発現量低下の分子メカニズム、着色攪乱の生物学的意義の解明には至らなかった。これらの課題を克服するには、チューリップにおける効率的な遺伝子機能解析系の確立が必要となるだろう。また、本研究で対象とした TuIMV はウイルス感受性が高い植物ウイルスの代表的な草本宿主である *N. benthamiana* にも感染しないため、チューリップにおけるウイルス解析系の確立も必要となる。以上のように、チューリップでの実験系の確立が今後の研究推進に貢献すると期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計0件

〔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
---------	---------