

令和 6 年 6 月 13 日現在

機関番号：11501

研究種目：若手研究

研究期間：2021～2023

課題番号：21K14846

研究課題名（和文）ウイロイドにおける干渉効果成立条件の解明

研究課題名（英文）Analysis on superinfection exclusion among viroids

研究代表者

鍋島 朋之（Nabeshima, Tomoyuki）

山形大学・農学部・准教授

研究者番号：10801920

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,600,000円

研究成果の概要（和文）：ウイロイドは環状一本鎖RNAから成る病原体であり、様々な作物に被害を与える。本課題では干渉効果を利用した防除法の開発に向け、ウイロイドにおける干渉効果についての基礎的知見を収集した。干渉効果の成立を決定する配列情報の特定には至らなかったものの、*coleus blumei* viroid-1のシソにおける移行性に関する配列について知見を得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

植物において、事前のウイルス接種が後の同種ウイルスの感染を抑制する現象を干渉効果と呼び、弱毒ウイルスの製剤化や事前接種苗の販売も行われている。本課題では、ウイロイドの移行性に関する配列について知見を得たが、このような知見を集積し、作物に対する感染のしやすさを考慮しながら配列設計することで、ウイロイドにおいても安定的な干渉効果の実現が近づくと考える。

研究成果の概要（英文）：In plants, the phenomenon where pre-inoculation with a virus suppresses subsequent infection by the same virus is called superinfection exclusion. In this study, we conduct basic experiments to develop a control method utilizing superinfection exclusion against viroids, plant pathogens consisting of circular single-stranded RNA, which cause damage to various crops.

研究分野：園芸学

キーワード：ウイロイド ウィルス シソ トマト

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

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約 250-400 nt の環状一本鎖 RNA から成る病原体であり、44 種が知られる。増殖や生体内移行などの感染ステップの全てを宿主のタンパク質の機能に依存する特徴的な病原体であり、トマト、ジャガイモ、ホップ、カンキツなど多様な農作物において世界中で被害が報告されている。ウイロイドはウイルスとは似て非なる病原体であるが、特に、有効な農薬が無いこと、栄養繁殖により伝搬すること、抵抗性品種も病原体の変異により打破され得ることなど、防除面での困難さにおいてウイルスとの共通点は多い。本課題では、「干渉効果」を利用した防除に注目した。干渉効果はあるウイルスの感染が同種のウイルスの二次的な感染を抑制する現象として古くから知られ、弱毒ウイルスの利用例も数多くある。ウイロイドは Pospiviroidae および Avsunviroidae の 2 科に分類される。同科に含まれるウイロイド種同士でも干渉効果が成立することが報告されているが (Niblett ら, 1978), 以後この現象に焦点を当てた研究は少なく、干渉効果が成立する詳細な条件や、防除における有用性については未検討のままである。

2. 研究の目的

- (1) ウイロイドにおいて干渉効果が成立した報告がある一方で、一つの植物体に複数種の同科ウイロイドが共感染する例も数多く報告されている。従って、あるウイロイド種の感染が他種の感染に対して排他的に働くためには何らかの条件が必要となるはずであり、このような条件をウイロイド配列から探る。
- (2) 干渉効果をウイロイド防除法として運用するためには、用いる事前接種系統には弱毒性であることと、迅速に全身感染を成立させられることが求められる。後者の条件について、シソ科に感染しやすい *coleus blumei viroid-1* (CbVd-1) と、キク科やナス科には感染しやすいが、シソ科には感染しにくい *chrysanthemum stunt viroid* (CSVd), およびこれら 2 種のキメラウイロイドを用い、CbVd がシソ科に感染しやすい原因と、これに関連する配列の特定を目指す。
- (3) ウイロイドを種子感染させることができれば、苗ごとに接種をしなくても弱毒ウイロイド感染済み苗を量産することができる。トマトにおいて弱毒性を示すウイロイドを探索するとともに、種子伝染性について調査した。

3. 研究の方法

- (1) CbVd-1 および CbVd-3 を用い、ベンサミアナタバコにおける接種試験を実施した。接種条件として、それぞれの単独接種、両種等量を同時に接種、CbVd-1 (CbVd-3) を接種した 1 週間後に CbVd-3 (CbVd-1) を接種、の組み合わせを設定し、上位葉におけるそれぞれのウイロイド種の感染動向を調査した。
- (2) CbVd-1 と CSVd の配列を左腕、中央、右腕の 3 部分に分割し、それぞれを組み合わせで 8 通り (うち 2 通りはオリジナル配列) のウイロイドを準備した。これらをベンサミアナタバコとアオジソに接種し、上位葉における感染を RT-PCR により調査した。
- (3) トマトの「フルティカ」と「マイクロトム」に 7 種 16 系統のウイロイドを機械接種し、上位葉における感染を RT-PCR により調査した。また、ウイロイドに感染した「フルティカ」は感染確認後も育成を継続して果実を収穫し、得た種子を播種した。発芽した実生について、RT-PCR による感染調査を行うことでウイロイドの種子伝染性を評価した。

4. 研究成果

- (1) 接種から 2 週間後に上位葉で RT-PCR を用いて感染調査をすると、同時接種、あるいは CbVd-1 CbVd3 (CbVd-3 CbVd1) のいずれにおいても多くの個体において両ウイロイド種が検出された。検出率、生体濃度共に CbVd-3 が高い傾向があったものの、明確な干渉効果は観察できなかった。CbVd-1 を単独接種した植物体では、病徴として黄斑および凹凸が特徴的であり、CbVd-3 の単独接種した植物体では、黄斑および葉巻が特徴的であった。CbVd-1 CbVd-3 CbVd-3 CbVd-1 および同時接種のいずれの植物体においても、CbVd-3 を単独接種した際に特徴的であった葉巻が多くの個体で観察された。RT-PCR の結果も踏まえ、本実験系では CbVd-3 の感染力が勝り、接種個体において優先的であったと推察された。しかし、少なくとも 1 週間のインターバルでは CbVd-3 の事前接種は CbVd-

1のその後の感染を完全には抑制しないと考えられた。

- (2) CbVd-1 および CSVd がベンサミアナタバコに全身感染できることをあらかじめ確認した。また、キメラウイルスをベンサミアナタバコに接種すると、2週間ですべてのキメラウイルスが全身感染し、これらの人工ウイルスが植物体内で複製・移行を行うことが確認できた。つぎに、これらのウイルスをアオジソに接種した。CbVd-1 は接種4週間で上位葉における感染が確認されたが、CSVd は上位葉における感染が確認されなかった。6種類のキメラウイルスのうち、CbVd-1 由来の右腕部をもつもののみで全身感染が確認され、この右腕部の配列中に、シソにおける全身感染性に強く寄与する配列が含まれると考えられた。CSVd を接種した葉では、RT-PCR ではウイルス配列の存在が確認され、接種葉での複製が行われていることが示唆されたが、残存した接種源に由来する擬陽性である可能性が否定できないため、複製中間産物の蓄積等を評価する必要がある。少なくとも、CSVd がアオジソに感染しにくいのは、接種葉からの移行が非常に起こりにくいからだと考えられた。
- (3) 調査した7種16系統のうち、apple fruits crinkle viroid (AFCVd) の2系統が‘フルティカ’に高い感染率を示した。AFCVd に感染した‘フルティカ’と非接種の個体をほ場において慣行法で育成したが、草丈、花数、葉数などに有意差はなく、明確な病徴はみられなかった。AFCVd に感染した個体では開花日が若干早まったほか、果実の可溶性固形物含量が非接種と比較して10%程度増加した。総じて、生育・果実生産にAFCVd 感染による悪影響は確認できず、これら2系統はトマトに対して弱毒性を示すと考えられた。しかし、これら2系統を‘マイクロトム’に接種しても感染率は低かった。‘マイクロトム’では他のウイルス種・系統の接種試験においても低い感染率しか得られなかったことから、‘マイクロトム’はウイルスに感染しにくい品種だと考えられ、今後このような品種間差も解決していく必要がある。AFCVd に感染した‘フルティカ’の果実から種子を回収し、発芽後にRT-PCR でAFCVd の感染を調査した。8果実に由来する96の実生を調査したが、全ての個体において感染が確認できなかったことから、供試した2系統は種子伝染しないと考えられた。

研究の(1)の結果から、まずは迅速で安定的な全身感染を達成するための配列条件を検討する必要があると考え、研究の(2)を軸とする方針に変更した。その結果、CbVd-1 の全身感染に必要な配列情報のある程度絞り込むことに成功した。今後は移行性に関与する配列をさらに絞り込むことを検討する。また、同様の手法によってCbVd-1 がナス科やキク科に感染しにくい要因を探ることで、ウイルスの宿主選択性の理解や、資材の利用に向けた配列設計に役立つ知見が得られると考えている(3)ではトマトにおいて弱毒性を示すウイルスの選抜ができたが、種子伝染は確認できなかった。ウイルスでは1塩基の変異が種子伝染性を決定する例も知られるため、突然変異誘導等により解析対象を増やすことを検討する。また、‘マイクロトム’に見出された多種のウイルスに感染しにくい形質は農業的に興味深い形質であり、(2)と同様のアプローチで解析をすすめることで、ウイルスの作物に対する感染のしやすさを決める配列要因に関して、新たな知見が得られると考える。

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 Nabeshima Tomoyuki、Abe Junya	4. 巻 13
2. 論文標題 High-Throughput Sequencing Indicates Novel Varicosavirus, Emaravirus, and Deltapartitivirus Infections in Vitis coignetiae	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Viruses	6. 最初と最後の頁 827 ~ 827
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/v13050827	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 Abe Junya、Nabeshima Tomoyuki	4. 巻 103
2. 論文標題 First report of grapevine Pinot gris virus in wild grapevines (Vitis coignetiae) in Japan	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Journal of Plant Pathology	6. 最初と最後の頁 725 ~ 725
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s42161-021-00800-w	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
---------	---------