



ISSN 0919-2956
No.14
March 2022

植物ウイルス病研究会レポート第14号

(第14回植物ウイルス病研究会 講演要旨)

PSJ Plant Virus Disease Workshop Report No.14

日本植物病理学会 植物ウイルス病研究会

PSJ Plant Virus Disease Workshop
The Phytopathological Society of Japan

植物ウイルス病研究会レポート 第14号

～ウイルス病耐性植物の作出に向けた新たな知見～

目次

寒地畑作物におけるウイルス抵抗性	大木健広 ----- 1
トマト野生種におけるジャガイモやせいもウイロイドに対する耐性	直井 崇・畑谷達児 ----- 10
特別講演 リンゴ小球形潜在ウイルス：構造、生物学的性状、および ウイルスベクターとしての利用	吉川信幸 ----- 20
特別講演 ウイロイド研究－最近の話題	佐野輝男 ----- 33
RNAサイレンシングのプライミング機構とそのウイルス抵抗性への関与	安藤杉尋・宮下脩平・高橋英樹 ----- 54
植物ウイルスに対する新たな劣性抵抗性遺伝子の発見とその作用メカニズム	橋本将典・煉谷裕太郎・桂馬拓也・薦田（萩原）優香 ・難波成任・山次康幸 ----- 63
トマトの新たなウイルス抵抗性アレル	新子泰規・川久保彩花・Wikum Harshana Jayasinghe・Joon Kwon ・Hangil Kim・小西千秋・山田哲也・増田税・中原健二 ----- 71
二本鎖RNA分解酵素による植物のウイルス抵抗性機構	石橋和大 ----- 82
イネの縞葉枯病抵抗性と生育安定性	早野由里子 ----- 90
本会記事	----- 99



大木 健広(おおき たけひろ)
農研機構北海道農業研究センター
寒地畑作研究領域 上級研究員

経歴

2001	東北大学農学部環境修復生物学専攻博士課程修了
2001-2011	農研機構中央農業研究センター
2011-現在	農研機構北海道農業研究センター
2012	農研機構長期在外研究員(ドイツ・アーヘン工科大学)
2019-現在	(兼)北海道大学農学院連携大学院北海道農業生産基盤学

研究分野

- 寒地畑作物におけるウイルス抵抗性の解明
- 植物ウイルスの検出法の開発
- 菌媒介性ウイルスの伝搬機構の解明

寒地畑作物におけるウイルス抵抗性

大木 健広*

T. Ohki

Resistance to plant viruses in upland crops of cold region

Abstract

In the cultivation of field crops, if the same crop is continuously planted, some nutrients are lost and the incidence of soil-borne diseases increases, thereby resulting in decreased productivity. To avoid this replant failure, it is common practice in the upland farming area of Hokkaido to conduct crop rotation with four (sugar beet, beans, potatoes, and wheat) or three upland crops (excluding beans). Diseases in these crops in Hokkaido are primarily controlled by crop rotation and chemicals, but some viral diseases cannot be controlled. The use of resistant varieties is effective to control these viral diseases. This article outlines the viral diseases that are problematic on potato and wheat, which are the main field crops in Hokkaido, and their virus resistance, while introducing research conducted by Hokkaido Agricultural Research Center, NARO.

*農研機構北海道農業研究センター Hokkaido Agricultural Research Center, NARO, Sapporo 062-8555, Japan

1. はじめに

畑作物の栽培では、同じ作物を植え続けると特定の栄養分が失われ、土壌病害などの発生率が高まり、生産性の減少をもたらす。北海道の畑作地域では、この連作障害を回避するためにテンサイ・豆類・ジャガイモ・コムギの4作物、もしくは豆類を除く3作物で輪作体系を組むことが行われている。北海道の畑作物における病害防除は、輪作と薬剤による防除が基本となるが、それでは抑えられない各種ウイルス病が発生して問題となっている。これらのウイルス病を抑制するには、抵抗性品種の利用が有効である。本稿では、北海道の主要な畑作物であるジャガイモとコムギで問題となるウイルス病(図1)とそのウイルス抵抗性について、農研機構北海道農業研究センターで行っている研究事例を紹介しながら概説する。



図1 ジャガイモとコムギのウイルス病

2. ジャガイモにおける PVY 抵抗性の解析

1) PVY に対する過敏反応と高度抵抗性

ジャガイモは栄養繁殖性であり、種いもを通じてウイルスが蔓延しやすい。日本のジャガイモでは、12種のウイルスが報告されているが(Maoka *et al.*, 2010)、現在圃場で発生が見られるウイルスはポチウイルス属のタイプ種であるジャガイモ Y ウイルス(potato virus Y, PVY)がほとんどである。日本では PVY 普通系統(PVY⁰)、PVY えそ系統(PVY^N)、PVY 塊茎えそ系統(PVY^{N^{TN}})の3つの系統が発生しており、PVY^{N^{TN}} が優先している(小野塚ら, 2019)。PVY は 60 種類以上のアブラムシによって媒介され、短時間の吸汁でウイルスの獲得と感染が成立するため(Lacomme *et al.*, 2017)、圃場において感染を防ぐことは困難である。

ジャガイモにおける PVY に対する抵抗性は、*Ny* 遺伝子による過敏反応(Hypersensitive response, HR)と *Ry* 遺伝子による高度抵抗性(Extreme resistance, ER)が知られている(Valkonen *et al.*, 1996)。PVY に対する HR 反応は、従来は系統特異的な反応とされ、*Ny*、*Nc*、*Nz* の3つの遺伝子が報告されていた(Singh *et al.*, 2008)。しかし、近年、これら以外の *Ny* 遺伝子も複数報告され、系統にかかわらず HR 反応を起こす *Ny-1/Ny-2* (Szajko *et al.*, 2008, 2014)なども報告されている。*Ny* 遺伝子は、系統特異的で PVY が接種葉で留まらず全身感染してしまう場合があるため抵抗性育種には活用されておらず、日本のジャガイモ品種における *Ny* 遺伝子の保有状況も調べられていない。一方、ジャガイモにおける *Ry* 遺伝子による ER 反応は、ウイルスを接種した場所で検出されないか、もしくは高感度の検出法でのみ検出される抵抗性とされる(Valkonen *et al.*, 1996)。*Ry* 遺伝子は、PVY 系統に関わらず抵抗性を発揮する(Ross, 1952)ため、抵抗性育種の素材として有効である。*Ry* 遺伝子としては、*Solanum tuberosum* subsp. *andigena* 由来の *Ry^{adg}* (Hämäläinen *et al.*, 1997)、*S. stoloniferum* 由来の *Ry^{sto}* (Song *et al.*, 2005)と *Ry^{f_{sto}}* (Flis *et al.*, 2005)、*S. chacoense* 由来の *Ry^{chc}* (Sato *et al.*, 2006)、*S. tuberosum*

subsp. *Phureja* 由来の $Ry(o)_{phu}$ (Torrance *et al.*, 2020) が報告されている。これらの Ry 遺伝子のうち、 Ry_{adg} や Ry_{chc} は抵抗性遺伝子クラスター領域に位置していることが分かっている (Gebhardt and Valkonen, 2001)。 Ny/Ry 遺伝子の中では唯一 Ry_{sto} が同定され、N 末端に TIR ドメインを持つ NB-LRR タンパク質であることが明らかとなっている (Grech-Baran *et al.*, 2019)。一方、 Ry 遺伝子に抵抗性を誘導する非病原性タンパク質は、 Ry_{ade} では Nla プロテアーゼ (Mestre *et al.*, 2000)、 Ry_{sto} では外被タンパク質 (Grech-Baran *et al.*, 2019) と報告されている。

2) Ry_{chc} の機能解析と単離に向けた取り組み

日本では、でん粉原料用の品種である「コナフブキ」「サクラフブキ」「パールスターチ」「コナユタカ」などが Ry_{chc} を有している。これらの品種のうち、コナフブキは 1980 年代から北海道の主力品種として主に道東地域で栽培されてきたが、現在までのところ抵抗性打破系統の報告はない。一方、温室でコナフブキやサクラフブキに PVY を接種すると、接種葉に明瞭なえそ斑点を生じる場合があった。温室は夏期には 30°C 以上の高温になることから、 Ry_{chc} による PVY 抵抗性に温度条件が与える影響を調べた (Ohki *et al.*, 2018)。

PVY の 3 系統をそれぞれコナフブキに接種し、22°C と 28°C の温度条件で栽培したところ、PVY の系統に関わらず、22°C では接種葉にまれに極小えそ斑が確認されたのみであったが、28°C では明瞭なえそ斑が確認された (図 2)。サクラフブキでも同様の反応が確認された。また、接種 4 週間後に上葉のウイルス感染を ELISA で調べたところ、22°C では検出されなかったが、28°C では接種株の一部でウイルスが検出され、高温ではウイルスが上位葉へ移行する場合があることが分かった。次に、PVY⁰ と PVY^{NTN} を接種し、接種葉にえそ斑の形成を確認したコナフブキとサクラフブキを温室で栽培し、塊茎を収穫した。その塊茎を翌年の春に温室で栽培し、植付け 1 ヶ月後に地上部を検定したが、PVY の塊茎伝搬は確認されなかった。よって、 Ry_{chc} は、高温条件では PVY の増殖や上葉への移行を許すものの、次世代塊茎での発病は認められず、通常の栽培条件下では安定した抵抗性を示すと考えられた。

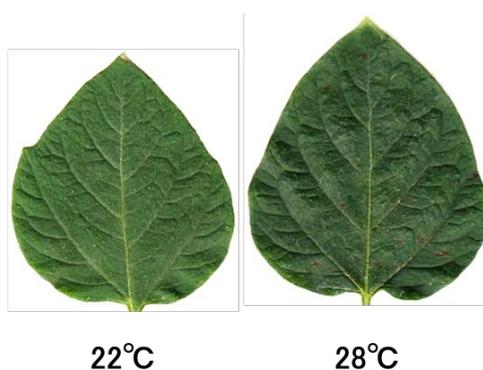


図 2 PVY^{NTN} を接種したコナフブキの接種葉 (5DPI)

Ry_{chc} 遺伝子は 9 番染色体長腕の 59.3Mbp 付近にある NB-LRR クラスターに座している (Sato *et al.*, 2006) が、単離はされていない。ジャガイモは同質 4 倍体であり、直接ゲノム解析を行う事は難しい。また、この NB-LRR クラスター領域は反復配列が多く、パレイショリファレンスゲノム中でも N が多く残された解析困難な領域である。そこで、まず Ry_{chc} をヘテロで持つながさき黄金とコナフブキの後代から Ry_{chc} をホモに持つ系統を選抜し、半数体化した。その半数体のゲノム配列を MinION (ONT) により得られたロングリード (平均 5kbp) と Illumina により得られた 150bp の高精度リードを組み合わせてアセンブリし、対象領域の配列を解析した。さらに、RNAseq で得られたリードを対象領域に貼り付け、遺伝子予測を行った。その結果、約 200kb の対象領域の範囲に 8 つの候補遺伝子が見つかった。 Ry_{chc} を特定するために、候補遺伝子の中で一番可能性が高いと思われた STRG1648 について、スプレー誘導遺伝子サイレンシング (SIGS) を使用して発現を抑制し、PVY 感染に対する抵抗性応答を調べた (中駄ら, 2021)。STRG1648 の 2 つの部位の配列から、二本鎖 RNA (dsRNA) を *in vitro* で合成し、ジャガイモの葉に噴霧した。次に、噴霧した葉に PVY⁰ を接種したところ、接種の 10 日後にえそ斑が観察された。一方、dsRNA を噴霧せずに PVY⁰ を接種した葉では、えそ斑は認められなかった。

PVY は、RT-PCR によってえそ斑部分の組織から 25 サイクルで検出され、PVY が病斑部で増殖していること

を確認した。dsRNA を噴霧してから3日後に STRG1648 の発現レベルを qRT-PCR により定量したところ、5割程度に低下していた。よって、ジャガイモの葉に PVY によって誘発されたえそ斑は、STRG1648 の発現の低下に伴うものと考えられる。現在、アグロインフィルトレーションによる一過性発現系の実験などにより、さらに STRG1648 の解析を進めている。

3. コムギにおける土壤伝染性ウイルスに対する抵抗性

土壤中に存在するネオブカビ類 *Polymyxa graminis* によってコムギに媒介される土壤伝染性ウイルスとして、ポチウイルス科バイモウイルス属とビルガウイルス科フロウイルス属のウイルスが知られている。日本では、バイモウイルス属ウイルスとしてムギ縞萎縮ウイルス (wheat yellow mosaic virus, WYMV) が発生している。WYMV は、7.6 kb の RNA1、3.6 kb の RNA2 の 2 分節ゲノムを持つひも状ウイルスで、RNA1 と RNA2 はそれぞれポリプロテインをコードしている。WYMV は宿主がコムギに限られ、日本全国のコムギ産地で発生が認められる。一方、フロウイルス属ウイルスは 6-7 kb の RNA1 と 3.5-3.6 kb の RNA2 を 2 分節ゲノムを持つ棒状ウイルスであり、日本ではムギ類萎縮ウイルス (Japanese soil-borne wheat mosaic virus, JSBWMV)、コムギ萎縮ウイルス (soil-borne wheat mosaic virus, SBWMV)、コムギモザイクウイルス (Chinese wheat mosaic virus, CWMV) の 3 種が発生している。フロウイルスは複数のイネ科植物に感染するが、日本では JSBWMV はコムギとオオムギ、CWMV はコムギとオオムギの一部品種 (Kondo *et al.*, 2022)、SBWMV はコムギで発生が報告されている。また、現在のところ、種毎に発生地域が限られており、SBWMV は北海道 (Horita and Sasaki, 2011)、JSBWMV は関東、CWMV は岩手や長野 (前島ら, 2010) など発生が報告されている。これらの土壤伝染性ウイルスは、*P. graminis* の休眠胞子中で長期間感染性を維持し、一度発生すると防除が難しいことから、抵抗性品種の利用が有効な防除手段となる。

1) コムギ萎縮ウイルス (WYMV) に対する抵抗性遺伝子とその機能

オオムギでは、WYMV と同じバイモウイルス属のウイルスとしてオオムギ萎縮ウイルス (barley yellow mosaic virus, BaYMV) やオオムギマイルドモザイクウイルス (barley mild mosaic virus, BaMMV) が知られ、現在までに 15 個の劣性抵抗性遺伝子 *rym* と 3 個の優性抵抗性遺伝子 *Rym* が報告されている (Tamada and Kondo, 2013)。そのうち、*rym4/5* は翻訳開始因子 eIF4E (Kanyuka *et al.*, 2004; Kühne *et al.*, 2003)、*rym1/11* は Protein disulfide isomerase 様タンパク質 (Yang *et al.*, 2014a, b) と報告されている。一方、コムギは異質 6 倍体のゲノムを持ち、2 倍体のオオムギと比較して抵抗性遺伝子の解析が遅れていたが、最近複数の WYMV 抵抗性遺伝子が報告されている (Nishio *et al.*, 2010; Suzuki *et al.*, 2015; Yamashita *et al.*, 2020; Zhu *et al.*, 2012)。WYMV は判別品種への感染性の違いから 3 つの病原型に分かれるが (Ohto 2006; Ohki *et al.*, 2015)、小島らは圃場試験の結果から 2DL、3BS、5AL 抵抗性遺伝子を有する品種に対する WYMV 各病原型の反応を整理した (表1) (Kojima *et al.*, 2019)。WYMV 抵抗性遺伝子は現在までに単離されておらず、詳細な抵抗性のメカニズムは明らかとなっていないが、2DL と 3BS の抵抗性遺伝子を持つ Madsen においては、抵抗性が根部でのみ発揮されていることが示されている (Liu *et al.*, 2016)。

表1 ほ場試験結果にもとづくWYMV病原型I-IIIの各抵抗性遺伝子に対する反応

病原型	2DL抵抗性遺伝子	3BS抵抗性遺伝子	5AL抵抗性遺伝子
I	抵抗性	感受性	部分的な抵抗性
II	単独では感受性 3BS遺伝子との組み合わせで抵抗性	単独では部分的な抵抗性 2DL遺伝子との組み合わせで抵抗性	感受性
III	抵抗性	感受性	感受性

Kojima *et al.* (2019)を一部改変

2) WYMVの病原型に関わるゲノム領域の特定

日本各地から収集した WYMV 分離株のゲノム配列を解析したところ、アミノ酸配列に基づいて RNA1 は3つ、RNA2 は2つの遺伝子型に分けられ、病原型・遺伝子型で整理した WYMV の分布には地域性が認められた

(図3) (Ohki *et al.*, 2014)。遺伝子型と病原型の関係を調べたところ、Aa 型、Ab 型ともに病原型 I、Ba 型は病原型 II、A'a 型は病原型 III を示した。RNA1 の遺伝子型が各株の病原型と対応することから、病原型を決定する因子は RNA1 に存在する可能性が高いと考えられた。そこで、cDNA 感染性クローンを用いて、病原型 I と II の違いに関わるウイルスゲノム領域を探索した (Ohki *et al.*, 2019)。各 ORF を入れ替えた WYMV やアミノ酸変異を導入した

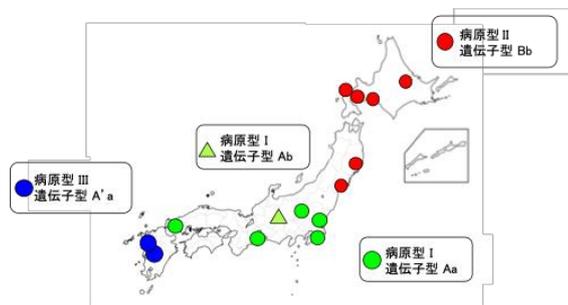


図3 WYMV各分離株の病原型と遺伝子型

WYMV の判別品種への感染性を調べ、最終的に筒状封入体(CI)タンパク質の3アミノ酸が病原型 I と II の違いに関わっている事を明らかにした(図4)。プロトプラスによる解析で、病原型 I と II の WYMV は細胞レベルでの増殖量に違いが見られなかったことから、細胞間もしくは全身移行が阻害されていると推察された。CI タンパク質は様々な機能を有するが、プラスモデスマータに局在し、ウイルスの細胞間移行に関わるとの報告がある (Sorel *et al.*, 2014)。

WYMV 病原型 I と III を示す RNA1 の遺伝子型 A と A' は配列の相同性が高く、病原型 III は病原型 I から派生した系統と推測される。現在、病原型 I と III の違いに関わるゲノム領域の解析を進めている。

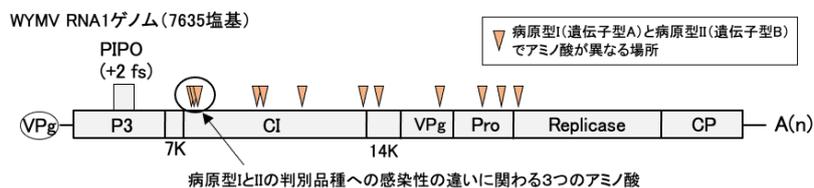


図4 病原型IとIIのRNA1ゲノムにおけるアミノ酸配列の差異

4. おわりに

抵抗性品種の育成には、長い時間と労力がかかる。それにも関わらず、一般栽培を始めて間もないうちに抵抗性が打破される場合がある。それを防ぐためには、ウイルスの系統とそれに対する抵抗性遺伝子の反応の整理、そして圃場における抵抗性の安定性を明らかにすることが重要である。Ry^{chc}の場合、圃場において長

期間安定した抵抗性を維持しているが、その理由は不明である。抵抗性育種において Ry_{chc} のさらなる利用促進を図るには、抵抗性が打破されない理由を明らかにし、 Ry_{chc} の有用性を示す事が有効であろう。一方、コムギの土壤伝染性ウイルスの解析では、圃場での根部感染による反応と実験室での地上部への接種試験の結果が必ずしも一致せず、圃場で起きている現象の全てを説明できてはいない。しかし、育種分野から圃場で発生しているウイルスの病原性を知りたいという要望は強く、例えば病原型に関わるゲノム領域の情報は RT-LAMP 法による WYMV 病原型の迅速識別法の開発などに活用されている。自然宿主であるジャガイモやコムギを使った実験は思うように進まない部分もあるが、今後とも育種研究者と情報交換をしながら研究を進めていきたい。

謝辞

Ry_{chc} 候補遺伝子の解析は、北海道大学増田税教授との共同研究による。コムギの土壤伝染性ウイルスの解析は、東京大学白子幸男名誉教授にご指導・ご助言をいただいた。PVY の抵抗性遺伝子の解析に係る研究の一部は、次世代ゲノム基盤プロ (SFC3002) により行った。コムギの土壤伝染性ウイルスに関する研究の一部は、JSPS 科研費 (20K06062)、全国米麦改良協会・国産麦開発支援事業「北海道小麦 (R2-6)」の助成により行った。本研究で用いたウイルス分離株は、都道府県公設試ならびに農研機構の様々な方々に分譲頂いた。この場をお借りして深く感謝申し上げます。

引用文献

- Flis, B., Hennig, J., Strzelczyk-Zyta, D., Gebhardt, C. and Marczewski, W. (2005) The Ry_{fsto} gene from *Solanum stoloniferum* for extreme resistance to *Potato virus Y* maps to potato chromosome XII and is diagnosed by PCR marker GP122₇₁₈ in PVY resistant potato cultivars. *Mol. Breed.* 15:95–101.
- Gebhardt, C. and Valkonen, J.P.T. (2001) Organization of genes controlling disease resistance in the potato genome. *Ann. Rev. Phytopathol.* 39:79–102.
- Grech-Baran, M., Witek, K., Szajko, K., Witek, A.I., Morgiewicz, K., Wasilewicz-Flis, I., Jakuczun, H., Marczewski, W., Jones, J.D.G. and Hennig, J. (2020) Extreme resistance to *Potato virus Y* in potato carrying the Ry_{sto} gene is mediated by a TIR-NLR immune receptor. *Plant Biotechnol. J.* 18:655–667.
- Hämäläinen, J.H., Watanabe, K.N., Valkonen, J.P.T., Arihara, A., Plaisted, R.L., Pehu, E., Miller, L. and Slack, S.A. (1997) Mapping and marker-assisted selection for a gene for extreme resistance to potato virus Y. *Theor. Appl. Genet.* 94:192–197.
- Horita, H. and Sasaki, J. (2011) First report of *Soil-borne wheat mosaic virus* on wheat in Hokkaido. *Ann. Rept. Plant Prot. North Japan* 62:43–46.
- Kanyuka, K., McGrann, G., Alhudaib, K., Hariri, D. and Adams, M.J. (2004) Biological and sequence analysis of a novel European isolate of *Barley mild mosaic virus* that overcomes the barley *rym5* resistance gene. *Arch. Virol.* 149:1469–1480.
- Kühne, T., Shi, N.G., Proeseler, G., Adams, M.J. and Kanyuka, K. (2003) The ability of a bymovirus to overcome the *rym4*-mediated resistance in barley correlates with a codon change in the VPg coding region on RNA1. *J. Gen. Virol.* 84:2853–2859.

- Kojima, H., Sasaya, T., Hatta, K., Seki, M., Oda, S., Kiribuchi-Otobe, C., Takayama, T., Fujita, Y., Chono, M., Matsunaka, H. and Nishio, Z. (2019) Response of Japanese wheat varieties to three pathotypes of wheat yellow mosaic virus. *Euphytica* 215:67.
- Kondo, H., Maejima, H., Maruyama, K., Fujita, M. and Ohki, T. (2022) First report of Chinese wheat mosaic virus infecting barley in Japan. *Plant Dis.* <https://doi.org/10.1094/PDIS-12-21-2803-PDN>.
- Lacomme, C., Pickup, J., Fox, A., Glais, L., Dupuis, B., Steinger, T., Rolot, J.-L., Valkonen, J.P.T., Kruger, K., Nie, X., Modic, S., Mehle, N., Ravnikar, M. and Hullé, M. (2017) Transmission and epidemiology of Potato virus Y, pp. 141–176. In Lacomme, C., Glais, L., Bellstedt, D.U., Dupuis, B., Karasev, A.V. and Jacquot, E. (eds.), *Potato virus Y: biodiversity, pathogenicity, epidemiology and management*. Springer, Cham, Switzerland.
- Liu, C., Suzuki, T., Mishina, K., Habekuss, A., Ziegler, A., Li, C., Sakuma, S., Chen, G., Pourkheirandish, M. and Komatsuda, T. (2016) *Wheat yellow mosaic virus* resistance in wheat cultivar Madsen acts in roots but not in leaves. *J. Gen. Plant Pathol.* 82:261–267.
- 前島秀和・白子幸男・上原泰・細 哲・牛山智彦 (2010) 長野県における Chinese Wheat Mosaic Virus (CWMV) の発生. *育種学研究* 12(suppl 2):221.
- Maoka, T., Sugiyama, S., Maruta, Y. and Hataya, T. (2010) Application of cDNA macroarray for simultaneous detection of 12 potato viruses. *Plant Dis.* 94:1248-1254.
- Mestre, P., Brigneti, G. and Baulcombe, D.C. (2000) An *Ry*-mediated resistance response in potato requires the intact active site of the N1a proteinase from potato virus Y. *Plant J.* 23:653–661.
- 中駄佑介・赤井浩太郎・大木健広・増田税 (2021) Spray-induced gene silencing を用いたジャガイモ Y ウイルス抵抗性の評価. 令和3年度(第55回)植物感染生理談話会講演要旨集.
- Nishio, Z., Kojima, H., Hayata, A., Iriki, N., Tabiki, T., Ito, M., Yamauchi, H. and Murray T.D. 2010. Mapping a gene conferring resistance to *Wheat yellow mosaic virus* in European winter wheat cultivar 'Ibis' (*Triticum aestivum* L.). *Euphytica* 176:223–229.
- 小野塚信哉・大木健広・岡 紀邦・眞岡哲夫 (2019) 国内ばれいしょ生産圃場で発生したジャガイモYウイルスの系統解析. *日本植物病理学会報* 85, 279-280.
- Ohki, T., Netsu, O., Kojima, H., Sakai, J., Onuki, M., Maoka, T., Shirako, Y. and Sasaya, T. (2014) Biological and genetic diversity of *Wheat yellow mosaic virus* (genus *Bymovirus*). *Phytopathology* 104:313-319.
- Ohki, T., Sano, M., Asano, K., Nakayama, T. and Maoka, T. (2018) Effect of temperature on resistance to *Potato virus Y* in potato cultivars carrying the resistance gene *Ry_{chc}*. *Plant Pathol.* 67:1629–1635.
- Ohki, T., Sasaya, T. and Maoka, T. (2019) Cylindrical inclusion protein of wheat yellow mosaic virus is involved in differential infection of wheat cultivars. *Phytopathology* 109:1475-1480.
- Ohto, Y. (2006) Studies on the pathotypes of Japanese isolates of *Wheat yellow mosaic virus* and their distribution in Japan (in Japanese with English summary). *Bull. Natl. Agric. Res. Cent. Tohoku Reg.* 105:73–96.
- Ross, H. (1952) Studies on mosaic resistance in the potato. In: Beemster, A.B.R., Streutgers, E., Walrave, J., Van der Want, J.P.H., eds. *Proceedings of the conference on potato virus diseases*, Wageningen-Lisse, Netherlands, 13–17 August 1951. Wageningen, Netherlands:Wageningen Uitgeverijbedrijf, 40–47.
- Sato, M., Nishikawa, K., Komura, K. and Hosaka, K. (2006) *Potato virus Y* resistance gene, *Ry_{chc}*, mapped to the distal end of potato chromosome 9. *Euphytica* 149:367–372.

- Singh, R.P., Valkonen, J.P.T., Gray, S.M., Boonham, N., Jones, R.A.C., Kerlan, C. and Schubert, J. (2008) Discussion paper: The naming of *Potato virus Y* strains infecting potato. *Arch. Virol.* 153:1–13.
- Song, Y.S., Hepting, L., Schweizer, G., Hartl, L., Wenzel, G. and Schwarzfischer, A. (2005) Mapping of extreme resistance to PVY (*R_{Ysto}*) on chromosome XII using anther-culture-derived primary dihaploid potato lines. *Theor. Appl. Genet.* 111:879–887.
- Sorel, M., Garcia, J.A. and German-Retana, S. (2014) The *Potyviridae* cylindrical inclusion helicase: a key multipartner and multifunctional protein. *MPMI* 27:215–226.
- Suzuki, T., Murai, M.N., Hayashi, T., Nasuda, S., Yoshimura, Y. and Komatsuda, T. (2015) Resistance to wheat yellow mosaic virus in Madsen wheat is controlled by two major complementary QTLs. *Theor. Appl. Genet.* 128:1569–1578.
- Szajko, K., Chrzanowska, M., Witek, K., Strzelczyk-Zyta, D., Zagórska, H., Gebhardt, C., Hennig, J. and Marczewski, W. (2008) The novel gene *Ny-1* on potato chromosome IX confers hypersensitive resistance to *Potato virus Y* and is an alternative to *Ry* genes in potato breeding for PVY resistance. *Theor. Appl. Genet.* 116:297–303.
- Szajko, K., Strzelczyk-Zyta, D. and Marczewski, W. (2014) *Ny-1* and *Ny-2* genes conferring hypersensitive response to potato virus Y (PVY) in cultivated potatoes: mapping and marker-assisted selection validation for PVY resistance in potato breeding. *Mol. Breed.* 34:267–271.
- Tamada, T. and Kondo, H. (2013) Biological and genetic diversity of plasmodiophorid-transmitted viruses and their vectors. *J. Gen. Plant Pathol.* 79:307–320.
- Torrance, L., Cowan, G.H., McLean, K., MacFarlane, S., Al-Abedy, A.N., Armstrong, M., Lim, T.-Y., Hein, I. and Bryan, G.J. (2020) Natural resistance to Potato virus Y in *Solanum tuberosum* Group Phureja. *Theor. Appl. Genet.* 133:967–980.
- Valkonen, J.P.T., Jones, R.A.C., Slack, S.A. and Watanabe, K.N. (1996) Resistance specificities to viruses in potato: standardization of nomenclature. *Plant Breed.* 115:433–438.
- Yamashita, Y., Souma, C., Ogura, R. and Suzuki, T. (2020) A single QTL on chromosome 6DS derived from a winter wheat cultivar ‘OW104’ confers resistance to *Wheat yellow mosaic virus*. *Breed. Sci.* 70:373–378.
- Yang, P., Habeku, A., Ordon, F. and Stein, N. (2014a) Analysis of bymovirus resistance genes on proximal barley chromosome 4HL provides the basis for precision breeding for BaMMV/BaYMV resistance. *Theor. Appl. Genet.* 127:1625–1634.
- Yang, P., Lüpken, T., Habekuss, A., Hensel, G., Steuernagel, B., Kilian, B., Ariyadasa, R., Himmelbach, A., Kumlehn, J., Scholz, U., Ordon, F. and Stein, N. (2014b) Protein disulfide isomerase like 5-1 is a susceptibility factor to plant viruses. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 111:2104–2109.
- Zhu, X., Wang, H., Guo, J., Wu, Z., Cao, A., Bie, T., Nie, M., You F. M., Cheng, Z., Xiao, J., Liu, Y., Cheng, S., Chen, P. and Wang X. (2012) Mapping and validation of quantitative trait loci associated with wheat yellow mosaic bymovirus resistance in bread wheat. *Theor. Appl. Genet.* 124:177–188.



直井 崇 (Naoi Takashi)

北海道大学 大学院農学院 植物病原学研究室 博士課程 3年
(兼) 筑波大学 生命環境系 非常勤研究員

経歴

2017年 3月 弘前大学農学生命科学部 卒業

2019年 3月 北海道大学 大学院農学院 修士課程 修了

2022年 3月 北海道大学 大学院農学院 博士後期課程 修了 (見込)

2022年 2月-現在 筑波大学 生命環境学群 生命地球科学研究群 生命環境系 非常勤研究員

興味のある研究内容

- ウイルス・ウイロイドの病原性・病徴発現機構
- ウイルス・ウイロイド感染に対する宿主の防御応答
- ウイルス・ウイロイド感染に対する抵抗性・耐病性

トマト野生種におけるジャガイモやせいもウイロイドに対する耐性

直井 崇*・畑谷達児**,**

Takashi Naoi* and Tatsuji Hataya**,**

Tolerance to potato spindle tuber viroid in wild tomato species

Abstract

To date, it has not been reported that natural resistance or tolerance to potato spindle tuber viroid (PSTVd) infection which can be introduced into susceptible or sensitive crops, such as cultivated tomatoes (*Solanum lycopersicum* var. *lycopersicum*), by general crossing. In addition, wild tomato species include many species that can be crossed with cultivated tomatoes; however, the responses including resistance and tolerance to PSTVd infection in most of them have not been ascertained. Therefore, this study was conducted to evaluate the responses of several cultivated and wild tomato species to the infection of PSTVd using two virulent strains (*i.e.*, intermediate and lethal strains). Although all inoculated plants were infected with PSTVd and did not exhibit sufficient resistance to PSTVd to render systemic infection impossible, these host plants displayed various responses including tolerance. Analyses revealed that the systemic accumulation of PSTVd in two wild tomato relatives (*S. pimpinellifolium* LA0373 and *S. chmielewskii* LA1028), exhibiting high tolerance even to the lethal PSTVd strain, was clearly lower than in a highly PSTVd-sensitive wild tomato (*Solanum lycopersicum* var. *cerasiforme* LA1286). Additionally, tolerance to the lethal PSTVd strain was also observed in filial first (F1) hybrids generated by crossing the PSTVd-sensitive wild tomato with these wild tomato relatives, which is accompanied by low accumulation of PSTVd during the early infection stage. These results indicate that the tolerance to PSTVd found in wild tomato relatives is a dominant trait and can be utilized for tomato breeding by general crossing.

*北海道大学大学院農学院 Graduate School of Agriculture, Hokkaido University, Kita 9, Nishi 9, Kita-ku, Sapporo 060-8589, Japan

** 北海道大学大学院農学研究院 Research Faculty of Agriculture, Hokkaido University, Kita 9, Nishi 9, Kita-ku, Sapporo 060-8589, Japan

1. はじめに

Pospiviroid 属のタイプ種であるジャガイモやせいもウイルス (potato spindle tuber viroid, PSTVd) は、世界中のジャガイモ生産において脅威となっている病原体である (Owens and Verhoeven, 2017; Tsuda and Sano, 2014). 宿主範囲が広くトマト (*Solanum lycopersicum*) を含むその他ナス科・キク科主要作物に対しても潜在的危険性を有することから、最も研究されているウイルスの1つである. PSTVdの分離株は感受性トマト品種 Rutgers における病原性により、弱毒、中間、強毒、及び致死の4系統に分類される (Sanger, 1982).

トマトはPSTVdをはじめとするポスピウイルスの研究において重要な宿主植物である. 1971年にTheodor Otto Dienerによりジャガイモやせいも病の病原体としてPSTVdが同定される以前から、トマト品種RutgersはPSTVd感染に対して高い感受性を示すことが報告されていた (O'Brien and Raymer, 1962). 元来ジャガイモてんぐ巣病の検定植物として用いられていたトマト品種Rutgers (Wright, 1954) は、それ以降PSTVdの指標植物として幅広い研究に用いられてきた. PSTVd感染に対するトマトの感受性及び感染時に認められる病徴は品種によって大きく異なり (Mahfouze *et al.*, 2009; Naoi and Hataya, 2021), 近年ではPSTVdに感染しても弱い病徴のみを示す耐病性品種MoneyMakerと感受性品種Rutgersにおける反応を比較・解析することで、ウイルスの病徴発現機構や対ウイルス防御応答が研究されている (Fujibayashi *et al.*, 2021; Owens *et al.*, 2012; Wang *et al.*, 2011).

アンデス地域では野生トマト *S. lycopersicum* var. *cerasiforme* (いわゆるチェリートマト) と12種の固有の近縁野生種 (*S. pimpinellifolium*, *S. cheesmaniae*, *S. galapagense*, *S. chmielewskii*, *S. arcanum*, *S. neorickii*, *S. huaylasense*, *S. peruvianum*, *S. corneliomulleri*, *S. chilense*, *S. habrochaites*, 及び *S. pennellii*) が進化してきた (Peralta *et al.*, 2008). これらのトマト野生種のうち、野生トマト *S. lycopersicum* var. *cerasiforme* と近縁野生種 *S. pimpinellifolium* は現在の栽培トマト (*S. lycopersicum* var. *lycopersicum*) の直接的な祖先であると考えられている (Blanca *et al.*, 2012; Menda *et al.*, 2013; Ranc *et al.*, 2008; Tomato Genome Consortium, 2012). トマト野生種には栽培トマトと交配が可能な種が多く存在し、それらの種が持つストレス耐性や病原体感染に対する抵抗性といった有用形質をトマト育種に利用することが可能である. PSTVd感染に対するトマト野生種の感受性に関しては、PSTVdの実験的宿主範囲を調査した研究において *S. lycopersicum* var. *cerasiforme* と *S. pimpinellifolium* がPSTVd感染時に発病せず、*S. peruvianum*, *S. habrochaites*, 及び *S. corneliomulleri* が発病することが報告されている (Singh, 1973; Singh and O'Brien, 1970). このように栽培トマト品種と同様にトマト野生種もまたPSTVd感染時に様々な反応を示すことが予想され、トマト育種に利用可能なPSTVd感染に対する抵抗性もしくは耐病性の形質を有するものが存在する可能性が十分に考えられた. しかしながら、大部分のトマト野生種ではPSTVd感染時の反応は明らかとなっていなかった.

一方、これまでにジャガイモ野生種 (*S. berthaultii*) やその他のジャガイモ近縁野生種ではPSTVdに対する抵抗性及び耐病性が報告されている (Singh, 1985; Palukaitis, 2012; Sofy *et*

al., 2013). しかしながら、これらの抵抗性は栽培ジャガイモ (*S. tuberosum*) に導入することはできなかった (Palukaitis, 2012; Palukaitis, 2014). また、耐病性トマト品種と感受性品種との交配により作出した F1 雑種が致死系統の PSTVd 感染時に感受性品種よりは若干弱いものの激しい病徴を示したことが報告されている (Matoušek et al., 2007). このように、交配により感受性作物品種に導入可能な PSTVd 感染に対する抵抗性もしくは耐病性はこれまでに報告されていなかった.

本稿では、トマト育種に利用可能な PSTVd 感染に対する抵抗性及び耐病性形質を見出すことを目的として栽培・野生トマト及び近縁野生種に対して PSTVd 中間系統と致死系統の 2 系統を接種した結果、近縁野生種 2 種で見つかった強い耐病性について紹介する. 本稿に掲載された研究成果は、Naoi and Hataya (2021) にて公表済みのものであり、直井 (2022) 学位論文の一部である.

2. PSTVd 感染に対する感受性及び耐病性の評価基準

接種試験に当たってはトマト品種、野生種、及び近縁野生種の PSTVd 感染に対する感受性及び耐病性を評価する際の基準とするため、まず主要な感受性品種 Rutgers と耐病性品種 Moneymaker における PSTVd 2 系統の病徴を確認した. その結果、感受性品種 Rutgers では中間系統の PSTVd 感染時に矮化、葉巻、及び軽度の葉脈壊疽が認められ、致死系統感染時にはさらに葉の黄化を伴う重度の葉脈・茎壊疽が認められた (図 1). 一方で耐病性品種 Moneymaker では感受性品種 Rutgers と比較して軽度の病徴が認められ、中間系統の PSTVd 感染時には矮化のみを示した. しかしながら致死系統感染時には重度の矮化、葉巻、葉の小型化に加え軽度の茎壊疽が認められた (図 1). このように、耐病性トマト品種であっても致死系統の PSTVd に感染した場合には重度の病徴が認められることが明らかとなった.



図 1. 栽培トマトにおける PSTVd 2 系統の病徴

これらの病徴を基準として、栽培・野生トマト及び近縁野生種の PSTVd 感染に対する感受性及び耐病性の程度及び感染時の反応を評価した。PSTVd の全身感染を阻害するような抵抗性を示す植物は見つからなかったものの、供試植物は PSTVd 感染時に無病徴から致死性の病徴まで様々な反応を示した (Naoi and Hataya, 2021; 表 1)。本稿ではそのうち野生トマト及び近縁野生種において認められた反応を紹介する。

表 1. 野生トマト及びトマト近縁野生種における PSTVd 中間系統 (-Int) と致死系統 (-AS1) の病徴

種	品種 / 系統	病徴の程度と種類	
		PSTVd-Int (中間系統)	PSTVd-AS1 (致死系統)
<i>Solanum lycopersicum</i> var. <i>cerasiforme</i>	LA1286	+++ (S, Lc, Lm, Ru, Vn)	++++ (S, Lc, Lm, Ru, Vn, Sn)
<i>Solanum lycopersicum</i> var. <i>cerasiforme</i>	LA1310	-	+ (Lm)
<i>Solanum lycopersicum</i> var. <i>cerasiforme</i>	LA1324	++ (S, Lc, Lm)	++++ (S, Lc, Lm, Ru, Vn, Sn, W)
<i>Solanum lycopersicum</i> var. <i>cerasiforme</i>	LA1328	+ (S, Lm)	+++ (S, Lc, Lm, Vn)
<i>Solanum lycopersicum</i> var. <i>cerasiforme</i>	Tomallilo	+ (S, Lm)	++ (S, Lc, Lm)
<i>Solanum pimpinellifolium</i>	LA0373	-	-
<i>Solanum pimpinellifolium</i>	LA0411	-	-
<i>Solanum cheesmaniae</i>	LA0421	+++ (S, Lm, Ln)	++++ (S, Lr, Lm, Ln, Ro)
<i>Solanum galapagense</i>	LA0317	-	-
<i>Solanum chmielewskii</i>	LA1028	-	-
<i>Solanum chmielewskii</i>	LA2695	++ (S, Lr, Lm, Ln)	++++ (S, Lr, Lm, Ln, Sn, Y)
<i>Solanum arcanum</i>	LA1031	+ (S)	++ (S)
<i>Solanum neorickii</i>	LA0247	++ (S, Lm)	+++ (S, Lm)
<i>Solanum huaylasense</i>	LA1358	+ (S)	+ (S)
<i>Solanum pervianum</i>	LA0111	++ (S, Lm, Ro)	+++ (S, Lm, Ro)
<i>Solanum corneliumulleri</i>	LA0103	+ (S)	++ (S, Ro)
<i>Solanum chilense</i>	LA1938	-	+ (S, Ro)
<i>Solanum habrochaites</i>	LA0361	+ (S)	++ (S, Ro)
<i>Solanum pennellii</i>	LA0716	++ (S, Lc, Ru)	+++ (S, Lc, Lm, Ru)

プラス (+) またはマイナス (-) の記号はそれぞれ PSTVd 感染時に "発病する" または "発病しない" ことを示す。プラス (+) の数が多いほど、PSTVd 感染時の病徴が激しいことを示している。PSTVd 接種植物は少なくとも接種後 42 日まで観察を行った。括弧内の文字はそれぞれ以下の病徴を示している: S, 矮化 (stunting); Lc, 葉巻 (leaf curling, downward); Lr, 巻葉 (leaf rolling, upward); Lm, 葉の小型化 (leaf miniaturization); Ln, 葉肉組織における壊疽 (leaf necrosis); Ru, 縮葉 (rugose); Sn, 茎壊疽 (stem necrosis); Vn, 葉脈壊疽 (vein necrosis); Y, 黄化 (yellowing); Ro, ロゼット (rosette); W, 枯死 (withering)。

3. 野生トマト・トマト近縁野生種における PSTVd 2 系統の病徴

病原性の異なる PSTVd 2 系統を 1 種の野生トマト (4 系統+1 品種) 及び 12 種のトマト近縁野生種 (14 系統) に接種した。その結果、PSTVd を接種した野生トマト *S. lycopersicum* var. *cerasiforme* のうち 3 系統が PSTVd 感染に対して感受性を示し、2 系統がある程度の耐病性を示した。感受性を示した系統 (LA1286, LA1324, 及び LA1328) では、PSTVd 感染に対して感受性の高い栽培トマト品種 Rutgers で認められたものと質的に類似した矮化や葉巻、葉脈・茎壊疽といった病徴が認められ、それらの病徴は致死系統感染時に特に重度であった (図 2)。耐病性を示した系統 (LA1310 及び品種 Tomallilo) では、致死系統の PSTVd 感染時に節間長の短縮や軽度の矮化及び葉巻のみが認められた。このように野生トマト *S. lycopersicum* var. *cerasiforme* は過去の報告 (Singh, 1973) にあったような PSTVd 感染に対して耐病性を示すものに加え、感受性の非常に高い系統が含まれることが明らかとなった。PSTVd 感染に対して感受性の高い現在の栽培トマト品種は、これらの感受性の高い野生トマトに由来しているのかもしれない。

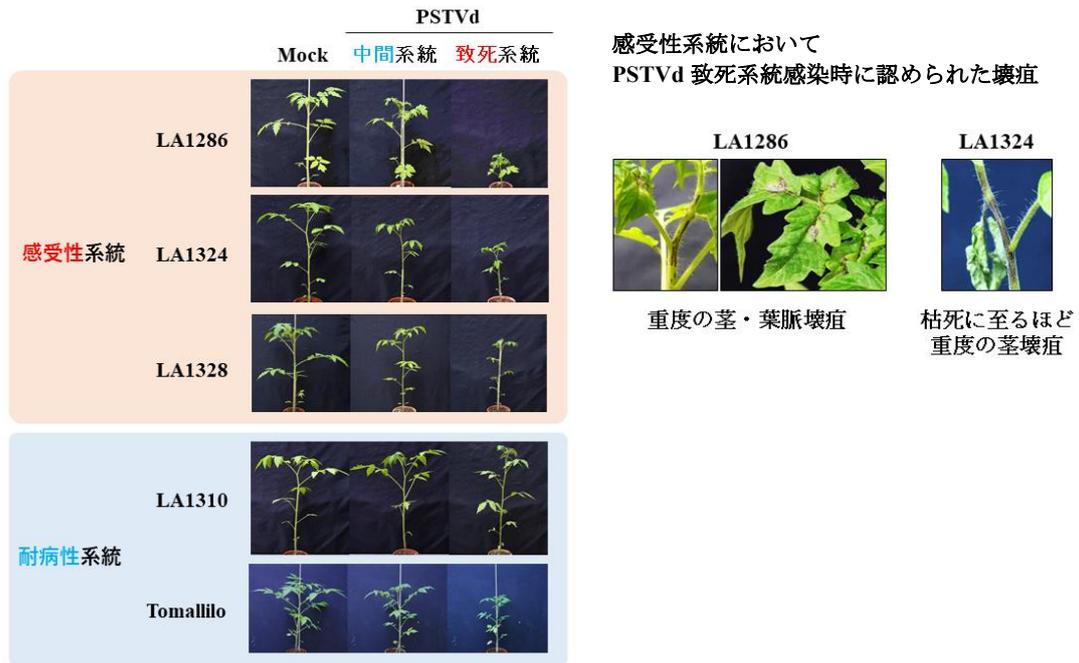


図 2. PSTVd 感染時に野生トマト (*Solanum lycopersicum* var. *cerasiforme*) において認められた病徴.

PSTVd を接種したトマト近縁野生種のうち、10 種 (10 系統) において PSTVd 感染時に何らかの病徴が観察された (表 1). 矮化は発病したすべての近縁野生種で認められ (表 1), いくつかの近縁野生種は葉脈, 茎, 及び葉肉部の壊疽や下向きに巻く葉巻, 上向きに巻く巻葉といった特徴的な病徴を示した (図 3). 対照的に 3 種 (4 系統) の近縁野生種は PSTVd 感染

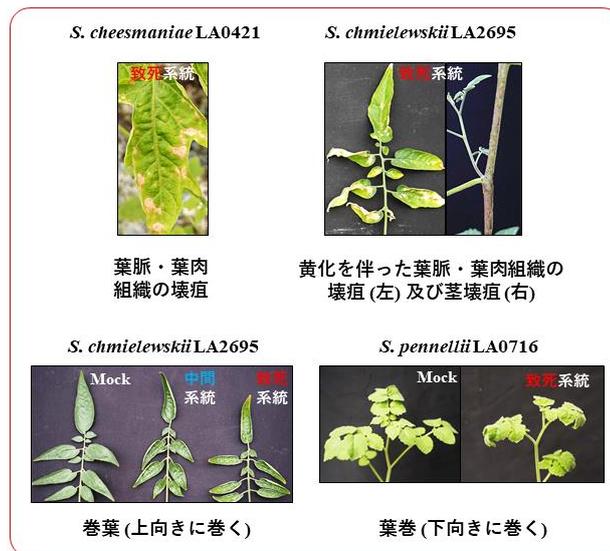


図 3. PSTVd 感染時にトマト近縁野生種で認められた特徴的な病徴.

時に顕著な病徴を示さなかった。特に *S. pimpinellifolium* LA0373 と LA0411 及び *S. chmielewskii* LA1028 は致死系統の PSTVd 感染時であっても病徴は認められず、強い耐病性を示した (図 4)。このようにトマト近縁野生種は PSTVd 感染時に様々な反応を示した。

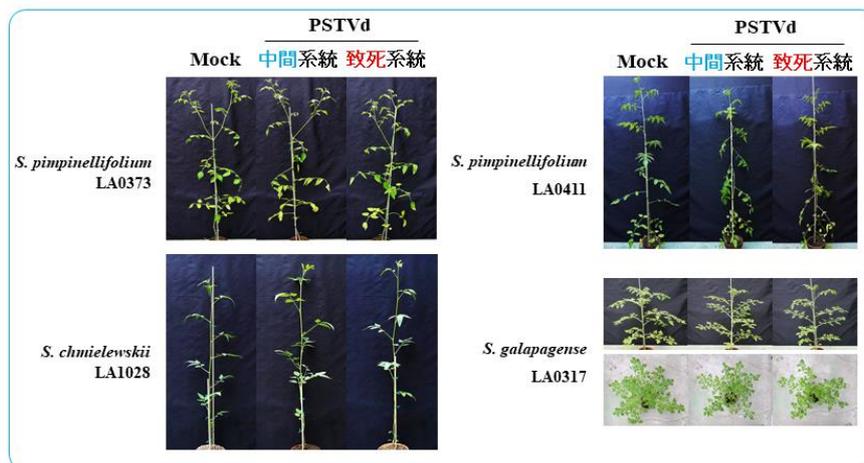


図 4. PSTVd 感染に対して耐病性を示したトマト近縁野生種。

4. トマト近縁野生種 2 種で見つかった PSTVd 感染に対する耐病性の交配後代への遺伝

トマト近縁野生種 *S. pimpinellifolium* 及び *S. chmielewskii* LA1028 で見つかった PSTVd 感染に対する強い耐病性 (図 4) の遺伝様式を明らかにするため、PSTVd 感染に対して感受性が高かった野生トマト *S. lycopersicum* var. *cerasiforme* LA1286 (図 2) とこれらの近縁野生種を交配して F1 雑種を作出し PSTVd 致死系統の接種試験を行った。その結果、*S. l. cerasiforme* LA1286 × *S. pimpinellifolium* LA0373 F1 では接種後 14 日に頂部でごく軽度の葉巻が認められたが、接種後 21 日には回復し顕著な病徴は認められなくなった (図 5)。また *S. l. cerasiforme* LA1286 × *S. chmielewskii* LA1028 F1 では接種後 21 日までに病徴は全く認められなかった (図 5)。このように *S. l. cerasiforme* LA1286 × *S. pimpinellifolium* LA0373 F1 または *S. l. cerasiforme* LA1286 × *S. chmielewskii* LA1028 F1 は致死系統の PSTVd に感染してもほとんどまたは全く発病せず、トマト近縁野生種 2 種における PSTVd 感染に対する耐病性は顕性の形質であると考えられた。

5. PSTVd 感染に対する耐病性と PSTVd の蓄積量の関係

PSTVd 感染に対して耐病性を示したトマト近縁野生種 2 種及び F1 雑種における PSTVd の蓄積を明らかにするため、ドットプロットハイブリダイゼーションにより PSTVd 致死系統の蓄積量を解析した。まず交配に用いた両親において解析を行ったところ、PSTVd 感染に対して耐病性を示した *S. pimpinellifolium* LA0373 及び *S. chmielewskii* LA1028 における PSTVd の蓄積は感受性を示した *S. l. cerasiforme* LA1286 と比較して明らかに低かった (図 6)。

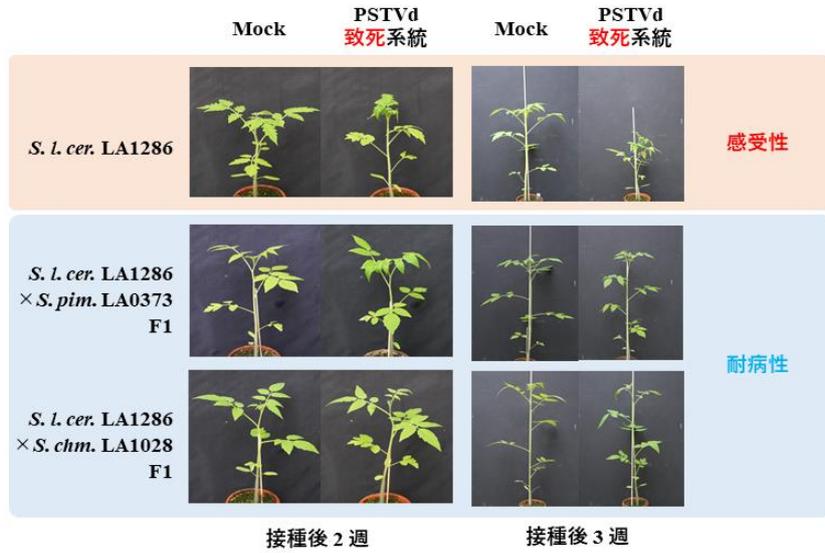


図 5. PSTVd 感染に対して耐病性を示した感受性野生トマトと耐病性近縁野生種との F1 雑種.

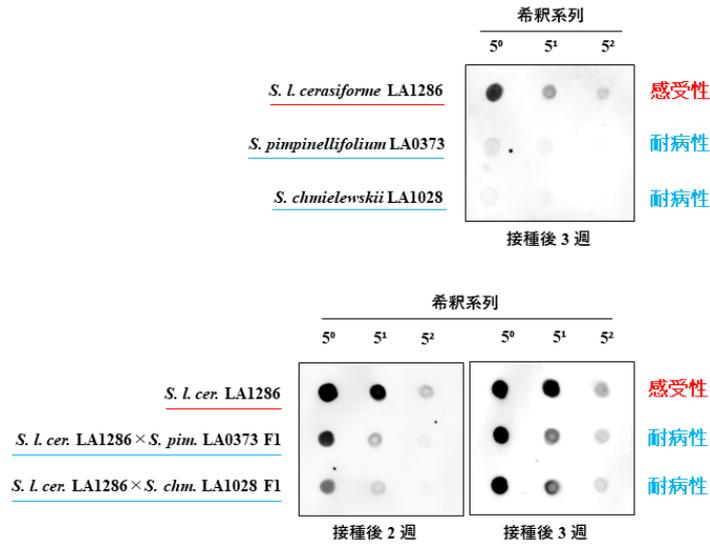


図 6. PSTVd 感染に対する耐病性と PSTVd の蓄積量の相関

F1 雑種においては、特に感染初期 (接種後 14 日) における PSTVd の蓄積量が感受性親の *S. l. cerasiforme* LA1286 と比較して顕著に低かった (図 6)。また *S. l. cerasiforme* LA1286 及び F1 雑種での感染初期 (接種後 14 日) における PSTVd の蓄積量は、病徴の程度と正の相関を示した (図 5, 6)。以上の結果より、トマト近縁野生種の PSTVd 感染に対する耐病性は感染初期において全身での PSTVd の蓄積が低く抑えられることに起因していると考えられた。

6. おわりに

これまで PSTVd 感染に対する反応が不明であったトマト近縁野生種 7 種 (*S. cheesmaniae*, *S. galapagense*, *S. chmielewskii*, *S. arcanum*, *S. neorickii*, *S. huaylasense*, 及び *S. pennellii*) が PSTVd 感染時に様々な反応を示すこと, そしてそれらの大部分と野生トマト *S. l. cerasiforme* が PSTVd の発病宿主であることを明らかにした. さらに PSTVd の全身感染を阻害するような抵抗性を示す植物は見つからなかったが, トマト近縁野生種 *S. pimpinellifolium* LA0373 と LA0411 及び *S. chmielewskii* LA1028 が PSTVd の中間系統及び致死系統に感染してもほとんど病徴を示さない強い耐病性を示すことを明らかにした. これらの耐病性は感染初期における PSTVd の蓄積が低く抑えられることに起因すると考えられ, 感受性の高い野生トマトへ交配により導入が可能であった. 上記のトマト近縁野生種 2 種はいずれもトマト栽培種との交配が可能であり, これらの耐病性形質は PSTVd による病気の防除につながる耐病性トマト品種の育種への利用が期待できる. また本研究で見出したトマト近縁野生種の PSTVd 感染に対する耐病性は一部のトマト栽培品種で認められるものよりも強力である. そのためこの発現機構を解明することで新たなウイロイドの防除法の開発につながる可能性が考えられ, 今後さらに解析を進めていく必要がある.

引用文献

- Blanca J., Cañizares J., Cordero L., Pascual L., Diez M.J., Nuez F. (2012) Variation revealed by SNP genotyping and morphology provides insight into the origin of the tomato. *PLoS ONE* 7: e48198.
- Fujibayashi M., Suzuki T., Sano T. (2021) Mechanism underlying potato spindle tuber viroid affecting tomato (*Solanum lycopersicum*): loss of control over reactive oxygen species production. *J. Gen. Plant Pathol.* 87: 226–235.
- Mahfouze S.A., El-Shamy M., El-DougDoug K. (2009) Molecular variability of tomato cultivars to *Potato spindle tuber viroid* infection. *Aust. J. Basic Appl. Sci.* 3: 3321–3329.
- Matoušek J., Kozlová P., Orctová L., Schmitz A., Pešina K., Bannach O., Diermann N., Steger G., Riesner D. (2007) Accumulation of viroid-specific small RNAs and increase in nucleolytic activities linked to viroid-caused pathogenesis. *Biol. Chem.* 388: 1–13.
- Menda N., Strickler S.R., Mueller L.A. (2013) Advances in tomato research in the post-genome era. *Plant Biotech.* 30: 243–256.
- Naoi T., Hataya T. (2021) Tolerance even to lethal strain of potato spindle tuber viroid found in wild tomato species can be introduced by crossing. *Plants* 10: 575.
- O'Brien J., Raymer W.D. (1962) Transmission of potato spindle tuber virus in tomato. *Am. Potato J.* 39: 401–408.
- Owens R.A., Tech K.B., Shao J.Y., Sano T., Baker C.J. (2012) Global analysis of tomato gene expression during potato spindle tuber viroid infection reveals a complex array of changes affecting hormone signaling. *Mol. Plant Microbe Int.* 25: 582–598.

- Owens R.A., Verhoeven J.Th.J. (2017) Potato spindle tuber viroid. In *Viroids and Satellites*; Hadidi, A., Flores, R., Randles, J.W., Palukaitis, P., Eds.; Elsevier: London, UK, pp. 149–158.
- Palukaitis P. (2012) Resistance to viruses of potato and their vectors. *Plant Pathol. J.* 28: 248–258.
- Palukaitis P. (2014) What has been happening with viroids? *Virus Genes* 49: 175–184.
- Peralta I.E., Spooner D.M., Knapp S. (2008) Taxonomy of wild tomatoes and their relatives (*Solanum* sect. *Lycopersicoides*, sect. *Juglandifolia*, sect. *Lycopersicon*; Solanaceae). *Sys. Bot. Monogr.* 84: 1–186.
- Ranc N., Muños S., Santoni S., Causse M. (2008) A clarified position for *solanum lycopersicum* var. *cerasiforme* in the evolutionary history of tomatoes (solanaceae). *BMC Plant Biol.* 8: 130.
- Sänger H.L. (1982) Biology, structure, functions and possible origin of viroids. In *Nucleic Acids and Proteins in Plants II*; Parthier, B., Boulter, D., Eds.; Springer: Berlin/Heidelberg, Germany, pp. 368–454.
- Singh R.P. (1973) Experimental host range of the potato spindle tuber 'virus'. *Am. Potato J.* 50: 111–123.
- Singh R.P. (1985) Clones of *Solanum berthaultii* resistant to potato spindle tuber viroid. *Phytopathology* 75: 1432–1434.
- Singh R.P., O'Brien M.J. (1970) Additional indicator plants for potato spindle tuber virus. *Am. Potato J.* 47: 367–371.
- Sofy A.R., Mahfouze S.A., El-Enany M.A.M. (2013) Isozyme markers for response of wild potato species to *Potato spindle tuber viroid* egyptian isolate. *World Appl. Sci. J.* 27: 1010–1022.
- Tomato Genome Consortium. (2012) The tomato genome sequence provides insights into fleshy fruit evolution. *Nature* 485: 635.
- Tsuda S., Sano T. (2014) Threats to Japanese agriculture from newly emerged plant viruses and viroids. *J. Gen. Plant Pathol.* 80: 2–14.
- Wang Y., Shibuya M., Taneda A., Kurauchi T., Senda M., Owens R.A., 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.
- Wright N.S. (1954) The witches' broom virus disease of potatoes. *Am. Potato J.* 31: 159–164.
- 直井 崇. (2022) ジャガイモやせいもウイロイドの病原性と宿主トマトにおける病徴発現に関する研究. 北海道大学 大学院農学院 博士後期課程 学位論文.



岩手大学名誉教授 吉川信幸

経歴

- 1979. 3. 岩手大学農学部農学科卒業
- 1981. 3. 岩手大学大学院農学研究科修士課程修了
- 1986. 3. 大阪府立大学大学院農学研究科博士後期課程（園芸農学専攻）修了
農学博士（大阪府立大学）
- 1986. 4. 岩手大学農学部講師
- 1988. 9.～1989. 8. アメリカ農務省(USDA-ARS)／オレゴン州立大学客員研究員
- 1990. 4. 岩手大学農学部助教授
- 2000. 4. 岩手大学農学部教授
- 2014. 4.～2015. 3. 岩手大学農学部附属寒冷バイオ研究センター長
- 2015. 4.～2019. 3. 岩手大学副学長（研究担当）
- 2018. 4.～2021.3 岩手大学次世代アグリイノベーション研究センター（AIC）長
- 2018.10～2021.9 内閣府/食品安全委員会/遺伝子組換え食品等専門調査会委員
- 2021.3 岩手大学退職
- 2021.4 岩手大学名誉教授、岩手大学 AIC 特任教授（2022.3 まで）

受賞

- 日本植物病理学会 学術奨励賞（1989）
- 日本植物病理学会 学会賞（2012）
- 文部科学大臣表彰 科学技術賞（研究部門）（2016）

リンゴ小球形潜在ウイルス：構造、生物学的性状、および ウイルスベクターとしての利用

吉川信幸 *

N. Yoshikawa

Apple latent spherical virus : structure, biological properties, and usefulness as a plant
virus vector

Abstract

Apple latent spherical virus (ALSV) is a small spherical virus with a diameter of 30 nm isolated from an apple tree. ALSV belongs to the genus *Cheravirus*, the subfamily *Comovirinae* of the family *Secoviridae* and is composed of a two-segment positive-strand RNA genome (RNA1 and RNA2) and three coat proteins (Vp25, Vp20, and Vp24). ALSV has a relatively broad spectrum of host plants including species from *Solanaceae*, *Fabaceae*, *Cucurbitaceae*, *Gentianaceae*, *Rosaceae*, *Vitaceae*, *Rutaceae* etc. and does not cause any obvious symptoms in most hosts. ALSV also invades to shoot meristems and induce uniform gene silencing throughout the plants. These properties make ALSV suitable as a viral vector for the expression and silencing of target genes. In this lecture, I will first talk about the particle structure and genome organization of ALSV, its biological properties, and then usefulness of ALSV as viral vectors for (1) functional analysis of plant genes by virus-induced gene silencing (VIGS), (2) virus vaccines for controlling plant virus diseases, and (3) use of virus-induced flowering (VIF) using a ALSV vector expressing plant florigen gene for breeding of fruit trees.

* 岩手大学次世代アグリイノベーション研究センター 020-8550 盛岡市上田3-18-8
Agri-Innovation Center, Iwate University, Morioka, Iwate, 020-8550, Japan

はじめに

リンゴ小球形潜在ウイルス (apple latent spherical virus, ALSV) はリンゴ樹から分離された径 30nm の小球形ウイルスである。分離された当初はリンゴ輪状さび果病の病原ウイルスではないかと考えられたが、その後の研究で輪状さび果病とは関係なく、リンゴに潜在感染しているウイルスであることが証明された (小金沢ら 1985, 伊藤・吉田, 1997)。ALSV はセコウイルス科コモウイルス亜科チェラウイルス属に所属し (Sanfaçon et al., 2020)、2分節1本鎖RNAゲノム(RNA1およびRNA2)と3種類の外被タンパク質(Vp25、Vp20、およびVp24)から構成される (Li et al., 2000 ; Thompson et al., 2017)。ALSVは自然界ではリンゴ樹からのみ報告されているが、実験的には比較的広い宿主域を持ち、ナス科植物、ウリ科植物、マメ科、リンドウ科などの各種植物、バラ科やブドウ属の落葉果樹類、カンキツ類、またスギやマツなどの樹木類にも感染し、ほとんどの植物で症状を示すことなく無病徴感染する (Igarashi et al., 2009 ; Kasajima et al., 2017)。

ALSVは病原性の無い(弱い)ウイルスであること、また上記のように比較的宿主域が広く、果樹類を含む各種植物に無病徴感染し、全身的なウイルス誘導ジーンサイレンシング(virus induced gene silencing, VIGS)を効率よく誘導する性質を持つことから (Li et al., 2004; Igarashi et al., 2009; Sasaki et al., 2011; Yamagishi, and Yoshikawa 2009, 2011; 山岸・吉川, 2010), VIGSによる植物遺伝子機能解析用のウイルスベクターとして、また果樹、野菜および花卉類の開花促進誘導ベクターとして利用されている。本稿では筆者らの研究室で約20年間行ってきたALSVの構造、生物学的性状、およびウイルスベクターとしての利用研究について紹介する。

1. ALSVの構造

(1) 粒子構造

ALSVの宿主植物の中でキノア (*Chenopodium quinoa*) は唯一比較的明瞭な病徴を示す植物で、ウイルス増殖量も他の宿主種に比べて高い。ウイルス粒子の精製は感染キノア葉を用いて行われた。精製ウイルス粒子はショ糖密度勾配遠心分離では単一のバンドを形成したが、塩化セシウム平衡密度勾配遠心分離では近接した二つのバンド(粒子密度1.41と1.43 g/cm³)に分離し、2粒子性ウイルスと考えられた。感染キノア葉100gから0.4~0.6 mg(ウイルスの吸光係数を6として計算)のALSVが精製された(図1) (Li et al., 2000)。

ALSV粒子は、2分節のssRNA (RNA1とRNA2) と3種類の外被タンパク質から構成され、RNA1を1分子含む粒子とRNA2を2本含む粒子の2粒子性である(図1) (Li et al., 2000)。一昨年、ALSV粒子の原子構造がクライオ電子顕微鏡を用いた単粒子解析法により、2.87 オングストローム分解能で決定された (Naitow et al., 2020)。ALSVの3種類の外被タンパク質 (Vp20、Vp24、Vp25) の中でVp25の長く伸びたN末端延長部分が、キャプシド内表面を経て隣接するVp20とVp25、およびウイルスRNAと相互作用することで、一つの骨格構造を形成している(図1)。そしてこのキャプシド構造の開口部をVp24の5量体が蓋をするように配置され、粒子の突起部分となっている(図1)。Vp20とVp24のC末端には外来ペプチドを付加することが可能であった (Li et al., 2004)。クライオ電子顕微鏡像の画像処理の結果、Vp245量体の突起部分からウイルスRNAが粒子の外に流出していることが判明した。この突起部分は揺らぎが大きいことが構造解析の結果から明らかになり、ある

一定の割合で常にウイルスRNAの放出が起こっていると考えられた。

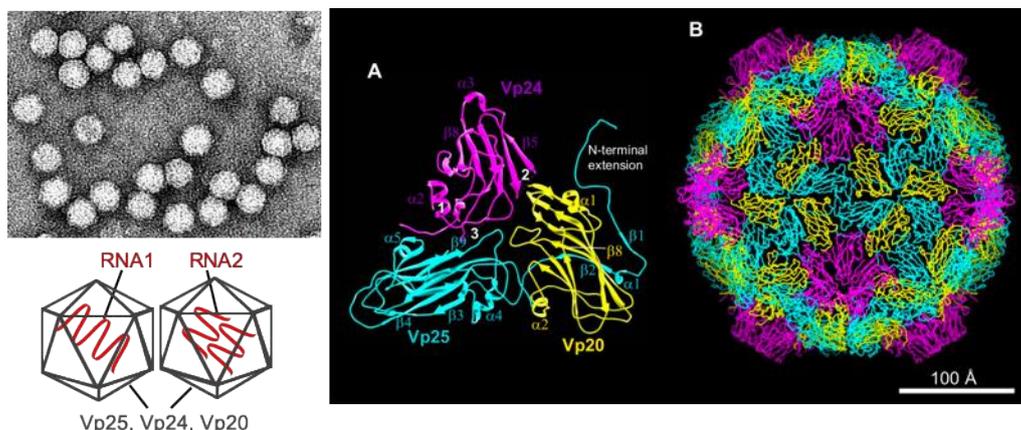


図1. ALSV粒子の電子顕微鏡像(左上)、模式図(左下)と分子構造(右)

(2) ゲノム構造

ALSV-RNA1 (AB030940) は3'末端のポリA配列を除いて6812塩基から、またALSV-RNA2 (AB030941) はポリA配列を除いて3384塩基からなる。RNA1は234キロダルトン (kDa) の複製関連ポリタンパク質を、またRNA2は108kDaのポリタンパク質をコードしている(図2) (Li *et al.*, 2000)。234kDaタンパク質にはN末端側からプロテアーゼコファクター (PRO-co), ヘリカーゼ (HEL), ゲノム結合タンパク質 (Vpg), プロテアーゼ (C-PRO), そしてポリメラーゼ (POL) の保存配列が認められる。RNA2の108kDaタンパク質には、N末端側から42kDaの細胞間移行タンパク質 (MP) と3種類の外被タンパク質 (Vp25, Vp20, Vp24) が含まれる(図2) (Li *et al.*, 2000, 2004)。234kDaタンパク質内のC-PROにより108kDaポリタンパク質が切断され、MP, Vp25, Vp20, およびVp24が生成する。MPとVp25間, Vp25とVp20間, およびVp20とVp24間の切断部位アミノ酸はそれぞれQ/G, Q/G, およびE/Gと同定された (Li *et al.*, 2000)。

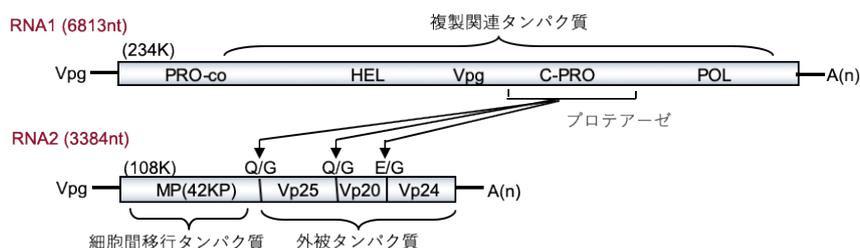


図2. ALSVのゲノム構造

2. 生物的性状

(1) 宿主域

ALSVは盛岡市の農研機構果樹茶業研究部門(盛岡)の果樹ウイルス保存樹から分離されたが(小金沢ら, 1985), 現在栽培されているリンゴ樹にどの程度自然発生しているかは不明である。一方, 実験的には比較的広い宿主域を持ち, 草本植物としてはアカザ科, ウリ科, ナス科, マメ科, リンドウ科等の植物種に感染する (Kasajima *et al.*, 2017)。アブ

ラナ科植物ではシロイヌナズナを除いて感染は認められない。またイネには感染しない。後述するウイルスベクターとしての利用に関連するが、ALSVの接種試験において、植物の生育ステージが感染の成立に大きく影響する。例えば、ウリ科植物の多くでは、展開子葉への汁液接種で容易に全身感染するが、カボチャでは発根直後の未展開子葉にパーティクルガン接種しないと全身感染はほとんど起こらない(図3)(Yamagishi and Yoshikawa, 2022)。この現象はバラ科の果樹類(リンゴ, ナシ, アプリコット, オウトウなど)やイチゴ, ブドウ, カンキツ類でも認められ、植物の生育ステージや接種法が感染成立に大きく影響する。また樹木(スギとマツ)にも全身感染し、サイレンシングを誘導することが報告された(小長谷ら, 2019)。

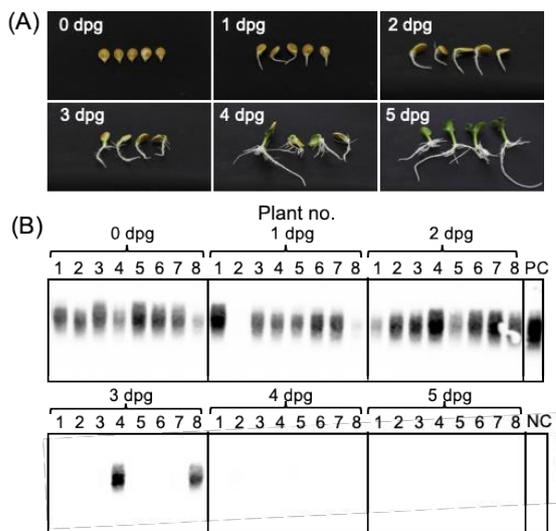


図3. ALSVを接種したカボチャ種子の発芽後のステージ(A)とノーザン・ハイブリダイゼーションによる全身感染の検定(B)

(2) 増殖・移行

ALSVのウイルス学的特徴の一つは、ほとんどの宿主で症状を示さず潜在感染することである。上述したようにALSVの収量(0.4~0.6 mg/100g感染葉)は一般的な多くのウイルスと比べて低い。これは植物細胞内でのウイルスの増殖・蓄積が限定されているためと考えられるが、宿主の抵抗反応(サイレンシング)と関係しているようである。GFPを発現するALSV(ALSV-GFP)をキノア葉に接種しウイルスの増殖・移行の様子を観察すると、GFP蛍光は最初スポットとして現れるが、接種後5日頃からリング状で感染拡大する(図4)(Li et al., 2004; Yaegashi et al., 2007)。リングの幅(GFP蛍光の幅)は日数が経過してもほぼ一定であることから、リング内部ではGFP蛍光が消失しながら外側に感染を拡大していったことがわかる。おそらく侵入した細胞内でのウイルスの増殖は、サイレンシングの誘導により1~2日で終了し、GFP蛍光の消失(GFPタンパク質の分解)が起こるのであろう。この時にウイルスはサイレンシングがまだ誘導されていない外側の細胞に感染を広げていくと考えられた。蛍光消失した組織ではALSVは粒子形態で蓄積し、感染性は保持されていた。GFP遺伝子を形質転換したタバコを用いた感染実験では、タバコ細胞で発現していたGFP蛍光が、ALSV-GFPの感染により消失していくが、蛍光が消失した領域よりも広い範囲でALSVの蓄積が観察される(図4)。ALSVは強力なサイレンシングサプレッサーを持たないことから、ALSVは感染細部でサイレンシングが誘導されると複

製を停止し、まだ誘導が起きていない周辺細胞に逃げていくよにして感染を広げているのであろう (Yaegashi *et al.*, 2007)。

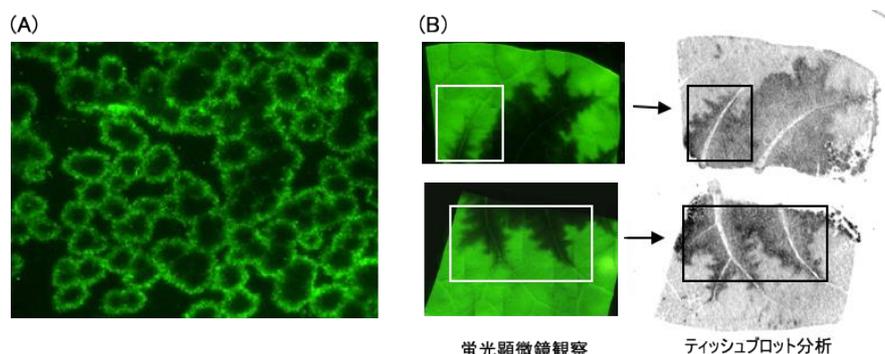


図4. (A) ALSV-GFPのリング状の感染拡大(接種後4日)
 (B) ALSV-GFPを接種したGFP発現*N. tabacum*上葉におけるGFP蛍光の消失領域とウイルス蓄積領域の比較

ALSVが粒子形態で細胞間移行している像が電子顕微鏡で観察されている (Yoshikawa *et al.*, 2006)。ALSVのMP, Vp25, Vp20, およびVP24のそれぞれに欠失変異を導入した変異株を用いた解析では, MPと3種類のVpタンパク質の全てがウイルスの細胞間移行に必須であった (Yoshikawa *et al.*, 2006)。またMPはALSV粒子との結合能を有し, 特にVp25とMPが特異的に結合した (Isogai *et al.*, 2006)。MPのアミノ酸配列内には独立した2カ所にVp25との結合部位が存在し, またMPは1本鎖核酸との結合能も有していた (Isogai *et al.*, 2006)。

(3) 伝搬

ALSVが発見された感染リンゴ樹周辺のリンゴの樹を対象に ALSV の感染状況を調べたところ, ALSVが発見されてから既に20年以上経過しているにも関わらず, 周辺のリンゴ樹から ALSV は検出されなかった (Nakamura *et al.*, 2011)。このことはリンゴ園では, 昆虫・ダニ類や花粉, 剪定作業等による水平伝染は起こっていないことを示している。発芽直後のリンゴ子葉に ALSV-RNA をパーティクルガン接種すると ALSV は実生苗全体に全身感染し, その後苗が成長しても ALSV は樹全体に分布している。一方, 本葉が展開したリンゴ実生苗に同様の方法で接種すると全身感染率は非常に低いか、感染しない

(Yamagishi *et al.*, 2010)。また, 感染リンゴ枝(穂木)を非感染リンゴ苗(台木)に接木接種すると, 感染穂木からは ALSV が検出されるが, 台木から伸びた枝には ALSV は移行せず, 接木伝染は起こらない。

ALSVの種子伝染(垂直伝染)については, 高率(数十%)に種子伝染する植物(ダイズ)から低率(0.5~数%)の種子伝染率の植物(シロイヌナズナ, ベンサミアナタバコ, リンゴなど), 種子伝染が認められない植物(リンドウ, トルコギキョウ, トマトなど)まで植物種で異なっている (Nakamura *et al.*, 2011; Yamagishi and Yoshikawa, 2009; Fekih *et al.*, 2016)。

3. ウイルスベクターとしての利用

(1) ウイルスベクターの構築

筆者らはRNA1とRNA2の全長cDNAをpUCプラスミドの35Sプロモーターの下流に連結した感染性cDNAクローン(pEALSR1とpEALSR2)を構築すると共に、pEALSR2上の42KPとVp25間のプロテアーゼ切断認識配列を反復し、その間にクローニングサイト(*Xho* I、*Sma* I、*Bam* HI切断配列)を挿入することで、遺伝子発現用RNA2ベクター(pEALSR2L5R5)を構築した(Li *et al.*, 2004)。GFP遺伝子を導入したALSV-GFPを用いた感染実験では、導入GFP遺伝子は比較的安定で、キノアで7回以上継代接種を繰り返しても、GFP遺伝子の脱落は認められなかった(Li *et al.*, 2004)。その後構築したバイナリーベクターを利用したALSVベクターには遺伝子導入部位が3カ所付加されており、1～3種類の遺伝子の発現と抑制を同時に行うことができる(Kon and Yoshikawa, 2014; Yamagishi *et al.*, 2016) (図5)。

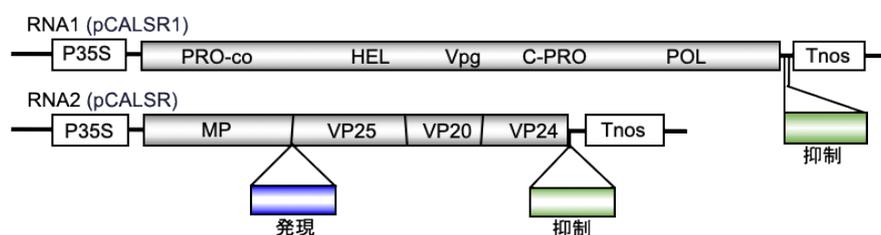


図5. 1～3種類の遺伝子の発現と抑制を同時に行うことができるALSVベクター

(2) ウイルス誘導遺伝サイレンシング (VIGS)

ALSVは各種果樹類、野菜や作物、および花卉類に無病徴で感染し、ウイルスは植物の全身に均一に分布する。そのため、特定の標的遺伝子の一部を連結したALSVベクターを感染させると、全身に均一なVIGSを誘導する(Igarashi *et al.*, 2009)。タバコの*N*遺伝子の一部を連結したALSVベクターを*N*因子タバコに感染させ、その後タバコモザイクウイルス(TMV)を接種すると、対象区と比較してえ死病斑数が減少し、かつTMVが全身感染した(Igarashi *et al.*, 2009)。最近筆者らはリンゴ斑点落葉病に対する感受性遺伝子の候補遺伝子(A8)の一部をALSVベクターに連結し、感受性リンゴ実生に感染させた。その後斑点落葉病菌を接種したところ、対象区(非感染および野生型ALSV感染植物)と比較して有意に感受性が低下する個体が認められた。これらの結果から、A8遺伝子がリンゴ斑点落葉病の感受性遺伝子であると考えられた(中嶋ら, 2020)。これまでバラ科の果樹類を含む12科35種以上の植物で内在性遺伝子のVIGSが誘導された(Fujita *et al.*, 2019; Gedling *et al.*, 2018; Hikage *et al.*, 2016; Izuishi *et al.*, 2020; Kawai *et al.*, 2014, 2016; Kitazawa *et al.*, 2017; Li *et al.*, 2019; Maeda *et al.*, 2020; Nakatsuka *et al.*, 2015; Navarro *et al.*, 2017; Ogata *et al.*, 2017, 2021; Oikawa *et al.*, 2018; Sasaki *et al.*, 2011; Takahashi *et al.*, 2013; Takeshima *et al.*, 2019; Toyoda *et al.*, 2013; Xu *et al.*, 2015; 吉川・山岸, 2018; Yamagishi and Yoshikawa, 2022)。植物種にもよるが、草本植物であれば通常接種後1～2週間から標的遺伝子の抑制による表現型の変化が観察される。

(3) ウイルスワクチン

ALSVの全身的VIGS誘導能を利用して、ALSVをウイルス病防除のためのワクチンウイルスとして利用できないかとか考えた。すなわち病原ウイルスゲノムの一部を連結したALSVベクターを前もって植物に感染させることで、その病原ウイルスに対するワクチンウイルス (ALSVワクチン) として利用するものである。著者らは、ズッキーニ黄斑モザイクウイルス (ZYMV) およびキュウリモザイクウイルス (CMV) に対するALSVワクチンを構築し、キュウリでワクチンとしての効果を調べたところ、強いワクチン効果が認められた (Tamura *et al.*, 2013)。同様に3種トスポウイルス (インパチェンスえそ斑点ウイルス: INSV, アイリス黄斑ウイルス: IYSV, トマト黄化えそウイルス: TSWV), およびインゲンマ黄斑モモザイクウイルスのゲノムの一部をそれぞれ連結したALSVワクチンを一次接種した植物は、それぞれの病原ウイルスの二次接種に対して強いワクチン効果を示した (Sato *et al.*, 2014; Taki *et al.*, 2013)。ALSVワクチンは挿入するウイルスゲノム断片を変えるだけで、異なるウイルスに対するALSVワクチン株を短期間に作製することも可能となる。カルタヘナ法による規制の問題があるが、将来的には難防除ウイルス病の有効な防除法として利用できるかもしれない。

(4) ウイルス誘導開花促進 (VIF)

ALSVベクターは果樹や花卉類の開花促進 (virus-induced flowering, VIF) に利用できる (吉川・山岸, 2012, 2018)。ALSVベクターにシロイヌナズナのフロリゲン遺伝子 (*AtFT*) を挿入したALSV-*AtFT*を植物に接種すると、感染細胞で増殖したウイルスは師管を通過して茎頂分裂組織に到達する。ALSV-*AtFT*が増殖する時には、ウイルスゲノム上にコードされたウイルスタンパク質と共にFTタンパク質が翻訳される。その結果、日長やその他の要因に関係なく開花が誘導されることになる。例えば、多年生植物であるリンドウは、播種後開花までに通常1年以上を必要とするが、リンドウのFT遺伝子である*GtFT*を発現するALSV-*GtFT*の感染により、発芽後数ヶ月で開花し、1世代の経過を6ヶ月程度に短縮することができる (Fekih *et al.*, 2016)。木本植物であるリンゴには非常に長い幼若期間があり、種を播いてから開花・結実するまで通常は6~12年を要するが、シロイヌナズナの*AtFT*を発現すると同時にリンゴ *TFL1* (*MdTFL1-1*) の発現を抑制するALSVベクター (ALSV-*AtFT*/*MdTFL*) をリンゴ実生に感染させると、接種後1.5~3ヶ月で開花を始め、その後は連続して開花・結実を続けた (Yamagishi *et al.*, 2014)。*AtFT*単独発現では開花が誘導されても7~8本葉期に一度しか開花しなかったのに対して (Yamagishi *et al.*, 2011)、*AtFT*発現と*MdTFL1-1*抑制を同時に行うことで、リンゴ実生苗の早期開花誘導率が高まり、同時に数ヶ月に渡って連続して開花する。このように、ALSVベクター技術を用いることで、通常5~12年を要するリンゴの1世代 (当代種子から次世代種子ができるまで) の期間を1年以内に短縮できるようになった。

感染リンゴ樹からALSVを簡便に除去することも可能であった (Yamagishi *et al.*, 2016)。すなわち、ALSV感染リンゴ苗を1ヶ月程度高温処理 (37°C) するだけでALSVの樹体内での移行がストップし、苗を25°Cに戻した後に伸びた枝にはALSVは移行しない。この技術を用いれば、品種間の交配で得られた実生が優良系統と判定された場合に、その感染株からALSVを除去し、そのまま品種の選抜に利用できる。

*FT*遺伝子を発現するALSVベクター技術 (VIF) はリンゴ以外に、果樹類ではセイヨ

ウナシ (Yamagishi *et al.*, 2016) , ブドウ (Maeda *et al.*, 2020) , オウトウ (未発表) , ビワ (未発表) , レモン (未発表) など, 作物ではダイズ (Yamagishi, N. and Yoshikawa, N., 2011), 野菜類ではイチゴ (Li *et al.*, 2019) , 花卉類ではトルコギキョウ (Fekih *et al.*, 2016) , リンドウ (Fekih *et al.*, 2016) , カーネーション (未発表) , ヒマワリ (未発表) , アサガオ (未発表) など誘導されることが確認されている。おそらく, 接種条件や育成条件を検討することで, 各種園芸植物や農作物の開花・世代促進に利用できることが期待される。

おわりに

ALSVは病気を起こさない無害なウイルスのため, 病害防除の対象ではなく, また植物病理学の研究材料としても大きな特徴も認められないが, 逆にその性質を利用したウイルスベクター としては有用性が高いと考えられる。現在VIGSへの利用目的では25カ国、約90の大学や研究所, 国内では56研究室に配布されている。感染力がやや弱いため, 実験植物以外では接種法に工夫が必要であるが, 他のウイルスベクターが利用できなかった果樹類などの木本植物では有効なウイルスベクターである。またALSVベクターを利用したリンゴやブドウなどの高速開花技術は, 品種育成の効率化や省力化に利用されることが期待される。

謝辞

ALSV ベクターに関する一連の研究は、ベクター開発から研究に参加した 李 春江 博士, リンゴの高速開花技術を確立した 山岸紀子 博士, また卒論, 修論のテーマとして研究に参加した学生の皆さんの貢献が非常に大きい。心からお礼申し上げます。

引用文献

- Fekih, R., Yamagishi, N., and Yoshikawa, N. (2016). Apple latent spherical virus vector-induced flowering for shortening the juvenile phase in Japanese gentian and lisianthus plants. *Planta* 244: 203-214.
- Fujita, N., Kazama, Y., Yamagishi, N., Watanabe, K., Ando, S., Tsuji, H., Kawano, S., Yoshikawa, N., and Komatsu, K. (2019). Development of the vigs system in the dioecious plant *Silene latifolia*. *Int. J. Mol. Sci.* 20: art. no. 1031.
- Gedling, C.R., Ali, E.M., Gunadi, A., Finer, J.J., Xie, K., Liu, Y., Yoshikawa, N., Qu, F., and Dorrance, A.E. (2018). Improved apple latent spherical virus-induced gene silencing in multiple soybean genotypes through direct inoculation of agro-infiltrated *Nicotiana benthamiana* extract. *Plant Meth.* 14: art. no. 19.
- Hikage, T., Yamagishi, N., Takahashi, Y., Saitoh, Y., Yoshikawa, N., and Tsutsumi, K.-I. (2016). Allelic variants of the esterase gene W14/15 differentially regulate overwinter survival in perennial gentian (*Gentiana* L.). *Mol. Genet. Genomics* 291: 989-997.
- Igarashi, A., Yamagata, K., Sugai, T., Takahashi, Y., Sugawara, E., Tamura, A., Yaegashi, H., Yamagishi, N., Takahashi, T., Isogai, M., Takahashi, H. and Yoshikawa, N. (2009). Apple latent spherical virus vectors for reliable and effective virus-induced gene silencing among a broad range of plants including tobacco, tomato, *Arabidopsis thaliana*, cucurbits, and legumes. *Virology* 386: 407-416.

- Isogai, M., Watanabe, K., Uchidate, Y., and Yoshikawa, N. (2006). Protein-protein- and protein-RNA-binding properties of the movement protein and VP25 coat protein of apple latent spherical virus. *Virology* 352: 178-187.
- 伊藤 伝・吉田幸二 (1997). リンゴ輪状さび果病の病原ウイルスについて. 日植病報 63: 487.
- Izuishi, Y., Isaka, N., Li, H., Nakanishi, K., Kageyama, J., Ishikawa, K., Shimada, T., Masuta, C., Yoshikawa, N., Kusano, H., and Yazaki, K. (2020). Apple latent spherical virus (ALSV)-induced gene silencing in a medicinal plant, *Lithospermum erythrorhizon*. *Scientific Rep.* 10: art. no. 13555.
- Kasajima, I., Ito, M., Yamagishi, N., and Yoshikawa, N. (2017). Apple Latent Spherical Virus (ALSV) Vector as a Tool for Reverse Genetic Studies and Non-transgenic Breeding of a Variety of Crops. *RNA technologies* pp. 513-536.
- Kawai, T., Gono, A., Nitta, M., Yamagishi, N., Yoshikawa, N., and Tao, R. (2016). Virus-induced gene silencing in various Prunus species with the apple latent spherical virus vector. *Scientia Hort.* 199: 103-113.
- Kawai, T., Gono, A., Nitta, M., Kaido, M., Yamagishi, N., Yoshikawa, N., and Tao, R. (2014). Virus-induced gene silencing in apricot (*Prunus armeniaca* L.) and Japanese apricot (*P. mume* Siebold & Zucc.) with the apple latent spherical virus vector system. *J. Jap. Soc. Hort. Sci.* 83: 23-31.
- Kitazawa, Y., Iwabuchi, N., Himeno, M., Sasano, M., Koinuma, H., Nijo, T., Tomomitsu, T., Yoshida, T., Okano, Y., Yoshikawa, N., Maejima, K., Oshima, K., and Namba, S. (2017). Phytoplasma-conserved phyllogen proteins induce phyllody across the Plantae by degrading floral MADS domain proteins. *J. Expt. Bot.* 68: 2799-2811.
- 小金沢碩城・柳瀬春夫・落合正文・佐久間勉 (1985). リンゴ輪状さび果罹病樹から分離された球形ウイルスについて. 日植病報 51: 363.
- Kon, T. and Yoshikawa, N. (2014). Induction and maintenance of DNA methylation in plant promoter sequences by apple latent spherical virus-induced transcriptional gene silencing. *Front. Microbiol.* 5: art. no. 595.
- 小長谷 賢一・吉川 信幸・谷口 亨 (2019) . ウイルスベクターを用いたスギにおける花粉形成関連遺伝子のノックダウン解析. 第 37 回日本植物細胞分子生物学会(京都)大会.
- Li, C., Yoshikawa, N., Takahashi, T., Ito, T., Yoshida, K. and Koganezawa, H. (2000). Nucleotide sequence and genome organization of Apple latent spherical virus: a new virus classified into the family *Comoviridae*. *J. Gen. Virol.* 81: 541-547.
- Li, C., Sasaki, N., Isogai, M. and Yoshikawa, N. (2004). Stable expression of foreign proteins in herbaceous and apple plants using Apple latent spherical virus RNA2 vectors. *Arch. Virol.* 149: 1541-1558.
- Li, C., Yamagishi, N., Kasajima, I., and Yoshikawa, N. (2019). Virus-induced gene silencing and virus-induced flowering in strawberry (*Fragaria × ananassa*) using apple latent spherical virus vectors. *Hort. Res.* 6: art. no. 18.
- Li, C., Hirano, H., Kasajima, I., Yamagishi, N., and Yoshikawa, N. (2019). Virus-induced gene silencing in chili pepper by apple latent spherical virus vector. *J. Virol. Meth.* 273: art. no. 113711.

- Maeda, K., Kikuchi, T., Kasajima, I., Li, C., Yamagishi, N., Yamashita, H., and Yoshikawa, N. (2020). Virus-induced flowering by apple latent spherical virus vector: Effective use to accelerate breeding of grapevine. *Viruses* 12: art. no. 70.
- Naitow, H., Hamaguchi, T., Maki-Yonekura, S., Isogai, M., Yoshikawa, N., and Yonekura, K. (2020). Apple latent spherical virus structure with stable capsid frame supports quasi-stable protrusions expediting genome release. *Commu. Biol.* 3: art. no. 488.
- 中嶋 瞳・八重樫 元・山岸紀子・磯貝雅道・森谷茂樹・吉川信幸 (2020) . リンゴ斑点落葉病に対する感受性の原因となる候補遺伝子(A8)の解析. 令和2年度日本植物病理学会東北部会
- Nakamura, K., Yamagishi, N., Isogai, M., Komori, S., Ito, T., and Yoshikawa, N. (2011). Seed and pollen transmission of apple latent spherical virus in apple. *J. Gen. Plant Pathol.* 77: 48-53.
- Nakatsuka, T., Saito, M., Yamada, E., Fujita, K., Yamagishi, N., Yoshikawa, N., and Nishihara, M. (2015). Isolation and characterization of the C-class MADS-box gene involved in the formation of double flowers in Japanese gentian. *BMC Plant Biol.* 15: art. no. 182.
- Navarro Gallón, S.M., Elejalde-Palmett, C., Daudu, D., Liesecke, F., Jullien, F., Papon, N., Dugé de Bernonville, T., Courdavault, V., Lanoue, A., Oudin, A., Glévarec, G., Pichon, O., Clastre, M., St-Pierre, B., Atehortúa, L., Yoshikawa, N., Giglioli-Guivarc'h, N., and Besseau, S. (2017). Virus-induced gene silencing of the two squalene synthase isoforms of apple tree (*Malus × domestica* L.) negatively impacts phytosterol biosynthesis, plastid pigmentation and leaf growth. *Planta* 246: 45-60.
- Ogata, T., Nagatoshi, Y., Yamagishi, N., Yoshikawa, N., and Fujita, Y. (2017). Virus-induced down-regulation of GmERA1A and GmERA1B genes enhances the stomatal response to abscisic acid and drought resistance in soybean. *PLoS ONE* 12: art. no. e0175650.
- Ogata, T., Toyoshima, M., Yamamizo-Oda, C., Kobayashi, Y., Fujii, K., Tanaka, K., Tanaka, T., Mizukoshi, H., Yasui, Y., Nagatoshi, Y., Yoshikawa, N., and Fujita, Y. (2021). Virus-mediated transient expression techniques enable functional genomics studies and modulations of betalain biosynthesis and plant height in quinoa. *Front. Plant Sci.* 12: article 643499.
- Oikawa, T., Ishimaru, Y., Munemasa, S., Takeuchi, Y., Washiyama, K., Hamamoto, S., Yoshikawa, N., Mutara, Y., Uozumi, N., and Ueda, M. (2018). Ion Channels Regulate Nyctinastic Leaf Opening in *Samanea saman*. *Curr. Biol.* 28: 2230-2238.
- Sanfaçon, H., Dasgupta, I., Fuchs, M., Karasev, A.V., Petrzik, K., Thompson, J.R., Tzanetakis, I., van der Vlugt, R., Wetzl, T., and Yoshikawa, N. (2020). Proposed revision of the family *Secoviridae* taxonomy to create three subgenera, “Satsumavirus”, “Stramovirus” and “Cholivirus”, in the genus *Sadwavirus*. *Arch. Virol.* 165: 527-533.
- Sasaki, S., Yamagishi, N. and Yoshikawa, N. (2011). Efficient virus-induced gene silencing in apple, pear and Japanese pear using Apple latent spherical virus vectors. *Plant Meth.* 7:15-25.

- Satoh, N., Kon, T., Yamagishi, N., Takahashi, T., Natsuaki, T., and Yoshikawa, N. (2014). Apple latent spherical virus vector as vaccine for the prevention and treatment of mosaic diseases in pea, broad bean, and eustoma plants by bean yellow mosaic virus. *Viruses* 6: 4242-4257.
- Takahashi, R., Yamagishi, N., and Yoshikawa, N. (2013). A MYB transcription factor controls flower color in soybean. *J. Heredity* 104: 149-153.
- Takeshima, R., Nan, H., Harigai, K., Dong, L., Zhu, J., Lu, S., Xu, M., Yamagishi, N., Yoshikawa, N., Liu, B., Yamada, T., Kong, F., and Abe, J. (2019). Functional divergence between soybean FLOWERING LOCUS T orthologues FT2a and FT5a in post-flowering stem growth. *J. Expt. Bot.* 70: 3941-3953.
- Taki, A., Yamagishi, N., and Yoshikawa, N. (2013). Development of apple latent spherical virus-based vaccines against three tospoviruses. *Virus Res.* 176: 251-258.
- Tamura, A., Kato, T., Taki, A., Sone, M., Satoh, N., Yamagishi, N., Takahashi, T., Ryo, B.-S., Natsuaki, T., and Yoshikawa, N. (2013). Preventive and curative effects of apple latent spherical virus vectors harboring part of the target virus genome against potyvirus and cucumovirus infections. *Virology*, 446: 314-324.
- Thompson, J.R., Dasgupta, I., Fuchs, M., Iwanami, T., Karasev, A.V., Petrzik, K., Sanfaçon, H., Tzanetakis, I., van Der Vlugt, R., Wetzell, T., Yoshikawa, N. (2017). ICTV Report Consortium, ICTV virus taxonomy profile: Secoviridae. *J. Gen. Virol.* 98: 529-531.
- Toyoda, K., Kawanishi, Y., Kawamoto, Y., Kurihara, C., Yamagishi, N., Tamura, A., Yoshikawa, N., Inagaki, Y., Ichinose, Y., and Shiraishi, T. (2013). Suppression of mRNAs for lipoxygenase (LOX), allene oxide synthase (AOS), allene oxide cyclase (AOC) and 12-oxo-phytodienoic acid reductase (OPR) in pea reduces sensitivity to the phytotoxin coronatine and disease development by *Mycosphaerella pinodes*. *J. Gen. Plant Pathol.* 79: 321-334.
- Xu, M., Yamagishi, N., Zhao, C., Takeshima, R., Kasai, M., Watanabe, S., Kanazawa, A., Yoshikawa, N., Liu, B., Yamada, T., and Abe, J. (2015). The soybean-specific maturity gene E1 family of floral repressors controls night-break responses through down-regulation of FLOWERING LOCUS T orthologs. *Plant Physiol.* 168: 1735-1746.
- Yaegashi, H., Yamatsuta, T., Takahashi, T., Li, C., Isogai, M., Kobori, T., Ohki, S. and Yoshikawa, N. (2007). Characterization of virus-induced gene silencing in tobacco plants infected with apple latent spherical virus. *Arch. Virol.* 152:1839-1849.
- Yamagishi, N. and Yoshikawa, N. (2009). Virus-induced gene silencing in soybean seeds and the emergence stage of soybean plants with Apple latent spherical virus vectors. *Plant Mol. Biol.* 71: 15-24.
- Yamagishi, N. and Yoshikawa, N. (2011). Expression of FLOWERING LOCUS T from *Arabidopsis thaliana* induces precocious flowering in soybean irrespective of maturity group and stem growth habit. *Planta* 233: 561-568.
- Yamagishi, N. and Yoshikawa, N. (2022). Efficient virus-induced gene silencing system in pumpkin (*Cucurbita maxima*) using apple latent spherical virus vector. *J. Virol. Meth.* 301: 114456.

- 山岸紀子・吉川信幸 (2010) 植物ウイルスベクターを用いた遺伝子機能解析ツールとしてのウイルス誘導ジーンサイレンシング. ウイルス 60: 155-162.
- Yamagishi, N., Kishigami, R., and Yoshikawa, N. (2014). Reduced generation time of apple seedlings to within a year by means of a plant virus vector: a new plant-breeding technique with no transmission of genetic modification to the next generation. *Plant Biotech. J.* 12: 60-68.
- Yamagishi, N., Li, C., Yoshikawa, N. (2016). Promotion of flowering by apple latent spherical virus vector and virus elimination at high temperature allow accelerated breeding of apple and pear. *Front. Plant Sci.* 7: art. no. 171.
- Yamagishi, N., Sasaki, S. and Yoshikawa, N. (2010). Highly efficient method for inoculation of apple viruses to apple seedlings. *Julius-Kuhn-Archiv.* 427: 226-229.
- Yamagishi, N, Sasaki, S, Yamagata, K, Komori, S, Nagase, M, Wada, M, Yamamoto, T and Yoshikawa, N (2011). Promotion of flowering and reduction of a generation time in apple seedlings by ectopical expression of the Arabidopsis thaliana FT gene using the Apple latent spherical virus vector. *Plant Mol. Biol.* 75: 193-204.
- 吉川信幸・山岸紀子 (2012). 植物潜在性ウイルスベクターを利用した植物の開花促進. 植物の生長調節47:45-51.
- 吉川信幸・山岸紀子 (2018). パワー・オブ・ウイルスベクター：農作物と園芸作物の遺伝子サイレンシング (VIGS) と開花促進 (VIF) . JATAFFジャーナル6: 14-18.
- Yoshikawa, N., Okada, K., Asamura, K., Watanabe, K., Igarashi, A., Li, C., and Isogai, M. (2006). A movement protein and three capsid proteins are all necessary for the cell-to-cell movement of apple latent spherical chervirus. *Arch. Virol.* 151: 837-848.



佐野輝男

略歴

- 1979年 北海道大学農学部 卒業
- 1981年 北海道大学大学院農学研究科修士課程 修了
- 1981年 北海道大学農学部 助手
- 1990年 米国農務省ベルツビル農業研究所 在外研究員
- 1992年 弘前大学農学部 助教授
- 2005年 弘前大学農学生命科学部 教授
- 2021年 弘前大学名誉教授

受賞歴

- 1982年 「ウイロイドの比較病原学的研究」昭和62年度日本植物病理学会学術奨励賞
- 2008年 「本邦に発生するウイロイドの研究」平成20年度日本植物病理学会賞
- 2020年 「ウイロイドに関する研究」令和2年度日本学士院賞を受賞

ウィロイド研究—最近の話題

佐野輝男

T. Sano

Viroid research – recent topics

Abstract

Viroids are single-stranded circular RNAs consist of 246–434 nucleotides, which do not encode proteins. Despite their non-protein-coding RNA nature, after infecting host plant cells, viroids are imported to the nucleus or chloroplast to replicate, exported to cytoplasm, move locally from cell to cell via plasmodesmata, then spread systemically through phloem. Viroids accumulate nucleotide variations in the process of replication in various host plant species. Namely, viroids have a property to adapt to host environments according to the Darwinian selection, which is one of the attributes of life, therefore they are likely to be living fossils that have survived from the pre-cellular RNA world. To date, over 25 viroid diseases have been reported in more than 15 species of crops, including vegetables, fruit trees and ornamentals. Some cause serious disease problems, and others infect subclinically without inducing disease symptoms. It is believed that structural motifs present in viroid RNA molecules interact with host factors to exert various levels of pathogenicity, from mild to severe, however, a large part still await for further investigation. Though they are small, i.e., smaller than one-tenth the size of the viral genome, molecular mechanism of viroid pathogenicity has turned out to be much more complex than initially thought. Extensive researches into the better understanding of viroid for controlling viroid diseases, including their molecular structures, replication mechanism, pathogenicity, diagnostic technology, and search for new species, are still in progress.

1. はじめに

ウイロイドは、自律的に複製する能力を有する小さな一本鎖の環状 RNA で、タンパク質をコードしないノンコーディング RNA である。1971 年、Theodor Diener により、ジャガイモ (*Solanum tuberosum*) の “spindle tuber (やせいも)” 病の病原として発見された新しいクラスの病原因子の呼称として提案され (Diener, 1971)、7 年後、ゲノム配列が解読され、potato spindle tuber viroid (PSTVd) は全ゲノム配列が解読された最初の真核生物の病原となった (Gross et al., 1978)。現在まで、30 種以上、最小で 246 ヌクレオチド (nt)、最大で 436-nt のウイロイドが報告されている。自然宿主は被子植物に限られており、宿主との組合せにより病原性を顕わし重大な被害を及ぼす場合と病気を起こさず無症状で感染している場合がある。細胞内局在性 (核または葉緑体)、複製様式 (対称または非対称ローリングサークル)、中央保存領域の塩基配列、保存配列またはモチーフ (末端保存配列、末端保存ヘアピン、リボザイムなど) の有無、塩基配列の全体的な同一性、そして宿主特異性などの生物学的特徴に基づき科、属、種に分類される (Di Serio et al., 2014)。ポスピウイロイド科とアブサンウイロイド科の 2 科が設立され、前者は 5 属 28 種 (Di Serio et al., 2021)、後者は 3 属 4 種 (Di Serio et al., 2018) で構成されている。ポスピウイロイド科のメンバーは核内において非対称ローリングサークルで複製し、その分子は 5 つの構造ドメインからなり、各属のメンバーは属に特徴的な中央保存領域を共有する。一方、アブサンウイロイド科のメンバーは葉緑体において対称ローリングサークルで複製し、ドメイン構造を持たないが、ハンマーヘッド型リボザイムの保存配列を共有するのが特徴である。

これまでに、ジャガイモやせいも病、トマト退緑萎縮病、カンキツエクソコーティス病、ホップ矮化病、ココヤシ Cadang-cadang 病、リンゴさび果病、アボカド sunblotch 病、キク矮化病など、15 以上に及ぶ作物の 25 以上の病気が報告されている。ウイロイド病の症状は、全身の矮化や葉の奇形、果実の肥大異常や果皮のコルク化や着色異常、二次代謝産物の生合成異常など様々で、一般に発症は緩慢で慢性的である。フィリピンのココヤシカダンカダン病はこれまでに 4,000 万本ものココヤシ樹を枯死させた (Vadamarai et al., 2017)。日本のホップに発生した矮化病は国内のホップ産業に大きな経済的損失をもたらした (Sano, 2013)。さらに、PSTVd や類似のポスピウイロイドは依然として世界中のジャガイモやトマト生産に対する脅威でありつづけている (Tsuda and Sano, 2014)。

ウイロイドは “最小の病原” として発見され、農作物に被害を及ぼす重要病原因子として植物病理学者の研究対象となってきたが、一方で、感染・複製する過程で宿主環境に適応して変異する姿が明らかになり、すなわち、ダーウィンの自然選択説に従って適応変異する生命の基本的な属性の 1 つを備えていることから、原始地球に初期の生命が誕生した時に存在したと考えられている RNA ワールドの “生きて化石” ではないかともいわれている (Diener, 1989 ; Moelling and Broecker, 2021)。

ウイロイドが発見されて半世紀余りが経過し、数多くの新知見が蓄積されてきた (Sano, 2021)。本稿では、主にウイロイドの分子構造と生物的機能、特に病原学的な側面を中心に、最近のウイロイド研究の進展を紹介する。

2. 分子構造

ウイロイドの最初のゲノム配列は、当時の最先端技術であった RNA フィンガープリント分析によって解読された。PSTVd RNA は 359 ヌクレオチドの RNA で構成されており、同時に塩基特異的リボヌクレ

アーゼを用いたマッピングデータとコンピューター予測に基づいて提案された 2 次構造モデルは、それが高い分子内塩基相補性により高度に構造化された棒状のステムループ構造を持つ分子として存在している可能性を示していた (Gross et al., 1978)。また、PSTVd ゲノムはタンパク質をコードしていないことが示唆され、ウイルスとは異なる新しいクラスの病原であることが明確になった。以来、30 種を超えるウイロイド種が発見されたが、その全塩基配列が決定されると、専らコンピューターによる RNA 2 次構造予測アルゴリズム (Mfold) に基づいて 2 次構造が予測されてきた (Adkar-Purushothama and Perreault, 2020)。

近年、SHAPE (Selective 2'-Hydroxyl Acylation analyzed by Primer Extension) 法或はハイスループト SHAPE (hSHAPE) 法と呼ばれる RNA 選択的 2'-ヒドロキシルアシル化 (2'-hydroxyl acylation) 反応をプライマー伸長法で分析する手法で既知のほとんどのウイロイドの 2 次構造が実験的に明らかにされた (Dubé et al, 2011 ; Giguère et al, 2014a)。SHAPE は、RNA ヌクレオチドであるリボースが有する 2'-ヒドロキシル基 (2'-OH) と選択的に反応する化学物質 N-methylisatoic anhydride や benzoyl cyanide などで RNA を処理することによって、個々の塩基が塩基対を形成しているか否かを識別し、RNA の詳細な分子構造を決定する方法である (Merino et al, 2005 ; Vasa et al, 2008)。hSHAPE は、逆転写酵素によって生成された cDNA を放射性標識オリゴヌクレオチドではなく蛍光オリゴヌクレオチドで標識し、キャピラリー電気泳動で分離する SHAPE の進化形である。

2-1. アブサンウイロイド科

アブサンウイロイド科は 3 属 4 種が知られているが、まず、peach latent mosaic viroid (PLMVd) で SHAPE による詳細な解析が行われた。PLMVd 変異体の 2 次構造には、14 個の比較的よく保存されたステム領域が含まれており、その分子は大きく 2 つのドメインに分けることができる (Giguère et al, 2014a)。左側ドメインは熱力学的観点から右側ドメインより安定しており、カナダで分離された塩基配列変異体では、左ドメインは P11 と名付けられた 1 つの長いステムに沿って配置された 2 つのステムループによって形成される十字形のモチーフからなり、右ドメインは内部ループを含む複雑に分岐した 2 次構造に折りたたまれる (図 1)。

左側ドメインには、ハンマーヘッド型リボザイムの自己切断モチーフが存在し、それは複製中の新生鎖の合成中に折りたたまれ、アブサンウイロイド科のメンバーに特有の両極性鎖の単位長ウイロイド分子が生成される。PLMVd では、左側ドメインの下部鎖が (+) 鎖のハンマーヘッドモチーフを、一方上部鎖が (-) 鎖のハンマーヘッドモチーフを形成し、マグネシウムイオン存在下で、ハンマーヘッド構造に折りたたまれた RNA 鎖は特定の部位で自己切断され (図 1 B、枠内)、両端に 2'-, 3'-環状リン酸と 5'-ヒドロキシル末端を生じる。当初、リボザイム自体が切断だけでなく環状化ももたらすと考えられたが、アブサンウイロイドの場合、ハンマーヘッドモチーフが宿主の tRNA リガーゼを引き寄せて環状化が起こるのではないかと考えられている。左側ドメインには PLMVd の複製に必要なすべての機能が含まれ、主要な複製開始部位は (+) 鎖では塩基 A50 と C51、(-) 鎖では塩基 U284 に位置している (Delgado et al, 2005 ; Motard et al, 2008)。

一方、右側ドメインに関する知識はまだ少なく、このドメインに起因する生物学的貢献は報告されていない。ただ、このドメイン内に存在することが予測された各ステムループが実際に存在するらしいこ

とは、いくつかの変異体の塩基配列の分析において、ステムを構成する塩基対の一方の塩基に変異が起こると相手方もそれに対応して塩基対を形成するように変異する“塩基対の共変異”が起こるといふ観察結果から支持されている (Dubé et al, 2011)。このドメイン独特の構造的特徴の1つは、全てのPLMVd変異体で保存されている3次構造“P8 シュードノット”である。このシュードノットは常に、P6とP7と名付けられた二つのステムのそれぞれをキャップする二つのループからの少なくとも4つのGC塩基対によって形成される。このシュードノットはPLMVdの増殖・蓄積に重要と考えられているが、そのライフサイクルへの正確な寄与は不明である (Dubé et al, 2010)。

その他、アブサンウィロイド科の全てのメンバーの(+)および(-)鎖の両方の2次構造がhSHAPE法で解析されている (Giguère et al, 2014a)。chrysanthemum chlorotic mottle viroid (CChMVd)はシュードノットの存在を含めてPLMVdとほぼ同じくらい複雑で、eggplant latent viroid (ELVd)は左端の近くに1つの突出したステムループがあり右側の末端にY字型構造を形成するが非常に直線的である。一方、avocado sunblotch viroid (ASBVd)はシンプルな棒状の構造を形成する。ASBVdはハンマーヘッド型リボザイムの自己切断配列を含んでいるが、その構造はむしろポスピウロイド科の構造を彷彿とさせる。

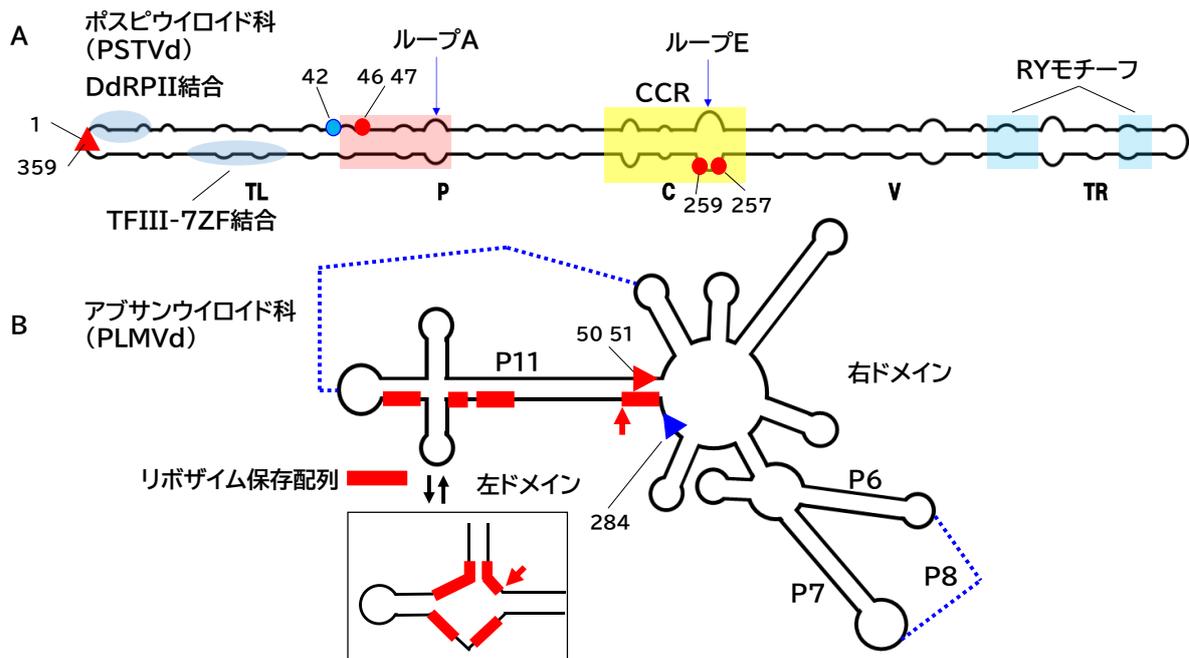


図1. ポスピウロイド科とアブサンウィロイド科の分子構造と主なモチーフ。▲は(+)鎖の複製(転写)開始点、▲は(-)鎖の複製開始点を示す。●は強毒性、●は弱毒性をもたらす塩基、また■はハンマーヘッドリボザイム保存配列、赤矢印は切断箇所を示す。枠の中はハンマーヘッド型リボザイムの構造を示している。赤い網掛けはVM領域、黄色い網掛けはCCR、青い網掛けはRYモチーフを示す。

2-2. ポスピウイロイド科

1980年代半ばから始まったウイロイドの病原性の強さを決定する構造的特徴（モチーフ）を特定しようとする研究により、PSTVdをタイプ種とするポスピウイロイド科のウイロイドの分子は棒状の構造に折りたたまれ、5つの構造ドメイン（TL、P、C、V、およびTR）から構成されているとする構造ドメインモデルが提案され（Keese and Symons, 1985）、現在、ポスピウイロイド科を特徴づける概念として受け入れられている。

近年、PSTVd 変異体の hSHAPE による 2 次構造が再検討された結果、かつて予測された 2 次構造と同様、棒状に折りたたまれており、わずかな局所的な違いが観察されただけであった。さらに、PSTVd 以外のポスピウイロイド科の 5 属のメンバーの少なくとも 1 つの変異体の 2 次構造が hSHAPE で解明され（Giguère and Perreault, 2017 ; Giguère et al, 2014b）、その結果を基にポスピウイロイド科各属の分子構造的な特徴、すなわち各属の中央保存領域（CCR）の特性、2 次構造（棒状または枝分かれ棒状）、ループ A および E の存在、そしてその他の構造的な特徴が提案された。

まず **PSTVd** に関して、分子の左側から右側へ、各ドメインにみられる重要な構造的な特徴は次のようである（図 1 A）。PSTVd の **TL ドメイン** には、棒状または Y 字型の構造を形成する可能性がある不完全な繰り返しが含まれている（Dingley et al, 2003）。**P ドメイン** には、PSTVd だけでなくほとんどのポスピウイロイド科ウイロイドの上部鎖に位置するオリゴプリン配列と下部鎖に位置するオリゴピリミジン配列が含まれている（Steger et al, 1984）。さらに、アデノシン残基が豊富な一本鎖領域「ループ A」が存在する。ループ A を含む領域は比較的熱力学的安定性が低い構造をもたらすため「pre-melting (PM)」領域と名付けられ、この領域内には病原性の強弱に関係する「Virulence modulating (VM)」領域が含まれる。**C ドメイン**（または中央保存領域；CCR）は、最も高度に保存された領域である。PSTVd の 2 次構造では棒状の領域に折りたたまれるが、両方の鎖が熱力学的に安定したヘアピンを形成することもある（Baumstark et al, 1997 ; Gas et al, 2007 ; Steger and Perreault, 2016）。CCR の上部鎖の 94 と 95 番塩基は PSTVd の (+) 鎖複製中間体から単位長の分子が切り取られ環状化される部位と考えられる重要部位である（Diener, 1986）。また PSTVd の CCR の中心には真核生物の 5S RNA の「ループ E」と相性を示す特殊な内部ループがある（Wimberly et al, 1993）。このループ E 内の塩基は、UV 照射時に架橋をもたらす非標準的な相互作用（非ワトソン・クリック塩基対）を形成し、その構造が複製に重要であることが明らかにされている（Zhong et al, 2006）。**V ドメイン** は塩基配列が最も可変的なドメインである（Keese and Symons, 1985）。最後に、**TR ドメイン** は比較的大きな内部ループを含み、いくつかの連続したウリジンが下の鎖に位置している。このドメイン内には RY モチーフがあり、VirP1 と名付けられたウイロイドと特異的に結合するタンパク質の結合部位で、ウイロイドの全身輸送に関与している可能性が示唆されている（Maniataki et al., 2003）。

PSTVd 以外のポスピウイロイド属の多くのメンバーも PSTVd と同様の棒状構造に折りたたまれる。唯一の例外は、分岐した TL 領域を持つ columnea latent viroid (CLVd) である。全てが P ドメインにあるループ A と C ドメインにあるループ E を持っている。さらに、全てが TR ドメインにある比較的大きなループを共有している。これはこの属に固有の特徴である。**ホスタウイロイド (Hostuviroid) 属**の 2 つのメンバーも棒状の構造に折りたたまれる。**コカドウイロイド (Cocadviroid) 属**も棒状構造を形成し、

全てが同様の CCR を共有することに加えて、P ドメインにある特に大きなループ A と、C ドメインにあるループ E を持っている。アプスカウイロイド (Apscaviroid) 属は、CBLVd、citrus dwarfing viroid (CDVd)、CVd-V、GYSVd-1 および GYSVd-2 の 5 つのメンバーが棒状構造に折りたたまれ、一方、apple scar skin viroid (ASSVd) と apple dimple fruit viroid (ADFVd) は TL ドメインに分岐したステムループが存在する棒状の構造、すなわち Y 字型を形成する。pear blister canker viroid (PBCVd) は棒状の構造に折りたたまれるが、その TR ドメインの末端には異常に大きいループがみられる。CVd-VI は、TL ドメインと TR ドメインの両方に分岐構造が存在する独特の棒状の構造を形成する。最後に、コレウイロイド (Coleviroid) 属は全て棒状構造に折りたたまれ、共通の CCR を共有している。しかし、他の属で見られたそれ以外の構造的特徴は存在しない。

3. 病原性に関与する構造モチーフ

3-1. 複製能

ポスピウイロイド科ウイロイドで提唱された構造ドメインは特定の機能的役割を持つことが提案されていた。例えば、P ドメインは病原性に関連する領域と考えられた。一方で、PSTVd の病原性の強弱は P ドメイン以外でも変化することが明らかになってきた。トマトで継代した PSTVd 変異体 KF440-2 をタバコ (*Nicotiana tabacum*) に接種したところ、新規なタバコ変異体 (PSTVd-NT) が出現した。この変異体は PSTVd の中央保存領域下鎖にある複製に重要な役割を有するループ E モチーフ内に位置する 259 番に変異 (C→U) を有し、トマトだけでなくタバコでも安定に複製することができるようになった (Wassenegger et al., 1996)。従って 259 番塩基の変異は、ループ E の立体構造変化を通じて宿主特異性に影響を与える可能性が示唆された。また、トマトに強毒型の病原性を有する PSTVd-I 変異体を用いて、C ドメイン内の 259 番塩基のすぐ近傍の 257 番塩基を U から A に変化させると、病原性が致死型に変化し、トマトに重度の発育阻害を引き起こすことが報告された (Qi and Ding, 2003)。すなわち、C ドメインは、(+) 鎖複製中間体の切断-結合部位としてウイロイド複製における重要な役割を果たしているが、宿主特異性や病原性など幅広い機能に関与する構造モチーフも含んでいることが明らかになった。

ウイロイドの病原性は必ずしも複製能と平行ではないが複製能と密接に結びついている。PSTVd の (+) 鎖の複製 (転写) 開始点は予測 2 次構造上の TL ドメイン左末端ループ内の 359 番塩基 (U) 或は 1 番塩基 (C) と推定されており (Kolonko et al., 2006)、宿主のトマトから抽出したウイロイドの複製を司る DdRPII 複合体が PSTVd の TL ドメインの棒状構造部分と相互作用したという証拠によっても裏付けられている (Bojić et al., 2012)。さらに PSTVd (+) 鎖の合成に宿主の転写因子 IIIA (TFIIIA) 及びリボソームタンパク質 L5 (RPL5) が関与することが示唆された (Eiras et al., 2011)。TFIIIA には、9 つの zinc-finger (ZF) モチーフを有する標準型の TFIIIA-9ZF とそのスプライシングバリエーションで 7 つの ZF モチーフを有する TFIIIA-7ZF が存在し、TFIIIA のスプライシングレギュレーターである RPL5 により、TFIIIA-9ZF から TFIIIA-7ZF へのスプライシングが制御されている。両者ともに PSTVd の (+) 鎖と相互作用するが、TFIIIA-7ZF だけが (-) 鎖と相互作用し、RNase Protection assay により TL ドメイン内

に結合部位があることが示された。TFIIIA-7ZF の発現を抑制すると PSTVd の複製は低下し、過剰発現させると増加した。これは TFIIIA-7ZF が DdRPII による PSTVd の複製に不可欠であることを示している (Wang et al., 2016)。興味深いことに、PSTVd は TFIIIA のスプライシングレギュレーターである RPL5 と結合することにより、TFIIIA-9ZF から TFIIIA-7ZF へのスプライシングを促進し、TFIIIA-7ZF の発現を最適化することで自己の複製に有利な状況を作り出していると考えられている (Jiang et al., 2018 ; Dissanayaka Mudiynanselage et al., 2018)。

以上、**TL ドメイン**と C ドメインの中央に位置する**ループ E**は、それぞれ、①複製開始と② (+) 鎖複製中間体の単位長への切断-結合-環状化という、複製上の二つの重要ステップに関与する構造モチーフとしてウイロイドの病原性に関与している。

3-2. 細胞間-組織間-全身移行能

ウイロイドの病原性に関与するもう一つの要素は、侵入細胞から隣接細胞に移行し、さらに全身に拡散する機能である。傷口などから細胞内に侵入した後、ウイロイドは細胞核または葉緑体に輸送され、そこで複製・増殖する。その後再び細胞質に出て、プラズモデスマータを通過して隣接細胞に拡がり、やがて維管束鞘から師部細胞に侵入し、師部組織を通じて長距離を移動して上葉さらに全身に拡がる。プラズモデスマータを介した感染細胞から隣接細胞への移動及び師部組織を通じた長距離輸送は PSTVd の特定の配列または構造モチーフと関連することが示された (Ding et al., 1997 ; Zhu et al., 2001)。In vitro 突然変異導入法で PSTVd の予測 2 次構造にみられるループ (インターナルループとバルジループ) を 1 つずつ潰した変異体を作り出して *N. benthamiana* に接種し、in situ ハイブリダイゼーション法で複製能と細胞間或は組織間移行能を分析した結果、27 か所のループのうち 6 か所が複製に、11 か所が移行や全身輸送に、それぞれ重要な機能を持つことが明らかになった (Zhong et al., 2006)。例えば、ループ 6 と 19 は葉肉の柵状組織から海綿状組織への輸送に必須の RNA モチーフで (Takeda et al., 2011 ; Jiang et al., 2017 ; Takeda et al., 2018)、ループ 7 は維管束鞘から師部への全身輸送に重要なモチーフであった (Zhong et al., 2007)。一方、ループだけでなく、ほぼ全ての G/U ペアも複製と全身への拡がりに重要であることが示された (Wu et al., 2020)。特に 7 番塩基と 353 番塩基ペアは複製に、27 と 335、44 と 317、61 と 299、156 と 205 の 4 ペアは全身移行に、そして 64 と 296 及び 76 と 283 の 2 ペアは維管束系への侵入にそれぞれ必須なモチーフであった。

3-3. 病原性ドメイン

病原性の異なる 4 種類の PSTVd 自然変異体、軽症型 (KF6)、強毒型 (DI)、激症型 (HS)、致死型 (KF-440) の塩基配列、熱力学的安定性、そしてトマトに対する病原性の分析により、病原性 (P) ドメイン内の VM 領域にある PM ループ 1 の熱力学的不安定性が病原性と相関していることが示され (Schnölzer et al., 1985)、熱力学的に不安定な PM ループ 1 の構造変化が宿主因子 (未知) の結合を促進し、PSTVd の病原性の強弱に影響を与えられたと考えられた。しかし、VM 領域の熱力学的不安定性と病原性の相関は必ずしも全ての場合に成り立つものではないこと、むしろ VM 領域の分子構造の曲がり角度が病原性と完全な相関性があることが示され (Hammond et al., 1992)、VM 領域の立体構造の熱力学的安定性は PSTVd

の複製と病原性を調節するいくつかの要因の1つにすぎないと考えられた (Owens et al., 1995)。

日本のダリアから分離された PSTVd 変異体 (D) は、ダリアでは無症状で、トマトにも軽症型の病原性を示す (Tsushima et al., 2011)。強毒型 (I) と比べ 9 か所 (塩基番号 42, 43, 64, 119, 126, 201, 310, 311, 312) で異なり、これらの変異は C ドメイン以外の全ての領域に散在していた。各塩基を 1 つずつ交換した変異体の複製能と病原性の解析から、42 番塩基 (TL ドメイン; C→U) と 64 番塩基 (P ドメイン; U 挿入) の変異により PSTVd の蓄積量が減少し、病原性が弱くなることが明らかになった (Tsushima et al., 2015; Adkar-Purushothama et al., 2015; Tsushima et al., 2016; Kitabayashi et al., 2020)。特に 42 番塩基の C→U 変異は PSTVd の蓄積量を著しく低下させ、それに伴ってウイロイド感染で発現が誘導される病原性関連タンパク質 PR1b1 の誘導も遅延した。つまり、過剰な宿主防御反応を誘発しないことが症状の重症度の軽減に大きく寄与していることが示された。また、VM 領域の下鎖に位置する 310~312 番塩基の変異は病原性に直接影響しなかったが、特に軽症型の PSTVd-D の 310~312 番塩基を強毒型に変化させた場合、変異は安定に維持されず、上鎖の 64 番塩基との共変異が見られた。すなわち、これらの塩基は協働的に作用して VM 領域の局所構造を維持することにより PSTVd-D の低い安定した複製に寄与しているものと考えられた。

以上、病原性が異なる PSTVd 変異体の解析から、TL 或は P ドメイン内に病原性の強弱に関与する最も重要な領域が存在することが多数の研究結果から明確になってきた。特に VM 領域の熱力学的不安定性や分子の曲がり角度などの指標で示される P ドメイン内の局所的な立体構造 (モチーフ) は、複製や細胞間移動或は長距離輸送などに関与する未だ同定されていない宿主因子と相互作用する領域と考えられ、今後の分析が俟たれる。

PSTVd や CEVd 以外のウイロイドでも、断片的ではあるが、病原性、種子或は花粉伝染性などに関連する構造ドメインとモチーフが特定されてきた。

カンキツウイロイド II (CVd-II) は、HSVd のシノニムで HSVd-citrus と呼ばれ、295~302 ヌクレオチドの多様な変異体で構成されている。CVd-IIa などほとんどの変異体は柑橘類では潜在性であるが、CVd-IIb など一部の変異体が検疫病害に指定されていた“cachexia”病の原因であることが明らかになった。cachexia 誘導変異体は、‘Parsons’ Special’ mandarin, ‘Orlando’ tangelo, ‘Palestine’ sweet lime などの感受性品種に gumming (粘質液溢出) や茎のピットングなどの症状を起し、V ドメイン内の「cachexia 発現モチーフ」と名付けられた領域内に位置する 6 か所の塩基 (塩基番号 107, 109, 115, 189, 194, 197) に特有の変異を有する (Reanwarakorn and Semancik, 1998; 1999)。cachexia 非誘導変異体 CVd-IIa の V ドメインに cachexia 誘導変異体にみられる 6 か所変異を導入すると cachexia の病原性が獲得された。また、このうちの 1 塩基を変異させると cachexia 症状が軽減することから、このモチーフは cachexia 症状を誘発する上で主要な役割を果たし、このモチーフ内の微妙な構造変化が症状の重症度に影響を及ぼすと考えられた (Serra et al., 2008)。一方、興味深いことに、cachexia 発現モチーフはヘチマ (*Luffa aegyptiaca*) には逆の結果をもたらす。すなわち、cachexia 非誘導変異体 CVd-IIa 型の V ドメインを有する変異体はヘチマに強い病原性を示し、cachexia 誘導変異体 CVd-IIb 型の V ドメインを有する変異体は弱い病原性を示すのである (Reanwarakorn and Semancik, 1998; 1999)。これは、同じ構造モチーフが宿主により逆の作用をもたらすことがあることを示しており、この構造モチーフと相互作用する宿主

因子の作用がどのように病原性の発現に至るのか、今後の解析が興味深い。また、HSVd のブドウ変異体 (HSVd-g) とそのホップ適応変異体 (HSVd-h) に関する比較分析の結果、HSVd-g は HSVd-h よりキュウリ (*Cucumis sativus*) により激しい矮化症状を引き起こした。両変異体は塩基番号 25、26、54、193、281 の 5 か所の塩基が異なる。HSVd-g をベースにこの 5 か所の塩基を 1 つずつ変化させた変異体を作成しキュウリ感染させると、第 54 番塩基を HSVd-h 型に変異させた変異体は HSVd-g よりさらに病原性が強くなり、それ以外は HSVd-h と同程度に低下した (Zhang et al., 2020)。特に V ドメイン内の 193 番塩基に U を持つ HSVd-g は C を有する HSVd-h よりもキュウリに強い症状を引き起こしたことは興味深い。なぜなら、HSVd-g の 193 番塩基は「cachexia 発現モチーフ」のキー塩基の 1 つである 197 番塩基に対応しているからである。V ドメインの 197 (又は 193) 番塩基を含む「cachexia 発現モチーフ」は、少なくともウリ科では HSVd の重要な病原性決定構造と考えられる。

CEVd と TASVd の間、或は CEVd と HSVd の間で構造ドメインを交換したキメラ変異体の分析から、ウイロイドの病原性は P ドメインだけで決定されるのではなく、複数のドメインが関与していることが明らかにされているが (Sano et al., 1992 ; Sano and Ishiguro, 1998)、HSVd の場合、病原性は主に V ドメイン内の構造モチーフで決定されていた。さらに、同じ構造モチーフでも宿主が異なると病原性に及ぼす影響が逆転することもあり、ウイロイドの病原性を制御する構造モチーフは相互作用する宿主側の因子により一様ではないと考えられた。

3-4. ウイロイド特異的 small RNA の生合成と機能

生合成: 2001 年 PSTVd 感染トマトから PSTVd 配列と相同或は相補な約 22-25-nt の small RNA が検出され、PSTVd に感染したトマトに RNA サイレncing が誘導されることが明らかになった (Itaya et al., 2001 ; Papaefthimiou et al., 2001)。PSTVd 由来の small RNAs (以下 PSTVd small RNA) はウイロイド分子の様々な領域の (+) 鎖と (-) 鎖の両極性鎖に由来していた。さらに核局在型のポスピウイロイド科だけでなく、葉緑体局在型のアブサンウイロイド科ウイロイドの感染も RNA サイレncing を誘導することが明らかになった (Martínez de Alba et al., 2002)。

2000 年代の後半からは PSTVd や CEVd に感染したトマトの small RNA の塩基配列の解析が始まり、次世代シーケンサーの普及により、様々なウイロイド種と宿主の組合せ或は病原性の異なるウイロイド変異体間での比較解析が加速し、ウイロイド small RNA にみられる以下の特徴が明らかにされた。① 核内で複製するポスピウイロイドでは 21-nt と 22-nt のウイロイド small RNA が最も多く、次いで 24-nt である。一方、葉緑体で複製するアブサンウイロイドでは 21-nt が最も多く 22-nt がその次で、24-nt は極めて少ない。すなわち、ウイロイド small RNA の生成には複数のダイサー様リボヌクレアーゼ (DCL) が関与している。② ゲノム鎖 (+鎖) とアンチゲノム鎖 (-鎖) それぞれの特定領域 (ホットスポット) から特に多量に生成される。ただし、ホットスポットパターンはウイロイドと宿主の組合せで異なり、感受性品種と耐性品種でも異なることが報告された (Wang et al., 2011)。③ (+) 鎖由来と (-) 鎖由来の比率は様々で、ウイロイドと宿主の組合せや病原性の強弱などで異なった。ウイロイド small RNA が 2 本鎖 RNA から生成すると仮定すると (+) 鎖と (-) 鎖の比率は等しくなるはずであるが、実験結果は (+) 鎖に偏っていることが多い。ウイロイドはヘアピン RNA 構造を有し、感染細胞中には (+) 鎖が (-) 鎖より多量に存在することを考えると、ウイロイド small RNA は transacting small interfering

RNA (ta-siRNA) のような経路でウイロイドゲノム RNA から直接生成してくる可能性も考えられている (Gómez et al., 2009)。

ウイロイド small RNA の生合成には複数の DCL が関与することが示唆されていたが、RNA 干渉法 (RNAi) で 4 種類の DCL を単独で或は複合してノックダウンした *N. benthamiana* に PSTVd を感染させると、DCL2、3、4 単独ノックダウン系統では順に 22-nt、24-nt、21-nt の PSTVd small RNA の蓄積量が減少した (Katsarou et al., 2016)。同様に、トマトでも RNAi で DCL2 と 4 をノックダウンして PSTVd を感染させると 21-nt と 22-nt の PSTVd small RNA の蓄積量が減少し、対照的に 24-nt が大幅に増加した (Suzuki et al., 2019)。つまり、ウイロイド感染で生成する 3 種類 (21-nt、22-nt、24-nt) の主要なウイロイド small RNA は順に DCL4、2、3 により生成することが明らかになった。また、DCL4 単独及び DCL2 と 4 のダブルノックダウンで 24-nt が増加したことから、DCL の階層性により DCL2 と 4 の機能が低下すると DCL3 が活性化されることが示された。トマトでは 4 種類の DCL2 (SIDCL2a, 2b, 2c, 2d) が存在することが知られているが、PSTVd 感染トマトでは SIDCL2d の発現量が最も強く誘導された (Fujibayashi et al., 2021)。

病原性機能：ウイロイドは、タンパク質をコードしない感染性 RNA 分子であるが、宿主の防御機構である RNA サイレncing によって生じるウイロイド small RNA がウイロイドの病原性や進化に関与しているのではないかという仮説が提唱された (Wang et al., 2004)。PSTVd のゲノム配列由来のヘアピン RNA を構成的に発現するトマトが PSTVd 感染と同様の症状を示し、PSTVd が生理的に重要な宿主遺伝子を標的とした RNA サイレncing を誘導することで病気の症状を引き起こす可能性が示唆されたのである。実際に、致死型の PSTVd-AS1 変異体に感染したトマトでは、P ドメインに由来する PSTVd small RNA が最も多かった (Diermann et al., 2010)。また、強毒型の PSTVd-I 感染トマトでは、軽症型の PSTVd-D より、より多量の P ドメイン由来の PSTVd small RNA が検出された (Tsushima et al., 2016)。

この仮説はモモの葉が部分的に白化して斑入りになるモモ“キャリコ”症 (Peach Calico ; PC) で実証された (Navarro et al., 2012)。PC は PLMVd の特殊な変異体の感染で起こり、PC 誘導変異体には PC 非誘導変異体にはない 12–14-nt の挿入配列がみられる (Malfitano 2003)。興味深いことに、この挿入配列は PLMVd の左ドメイン (図 1 B) の先端に新たなヘアピンを形成する。この PC 関連挿入配列から生じる PLMVd small RNA は、モモの葉緑体熱ショックタンパク質 90 (cHSP90) をコードする mRNA の一部と高い相補性を有し、その配列を標的にして RNAi 作用で cHSP90 mRNA 切断し、cHSP90 の発現を阻害する。シロイヌナズナの cHSP90 は葉緑体生合成と色素体から核へのシグナル伝達に関与することが知られており、cHSP90 の発現阻害は葉緑体の形成を阻害し、その結果 PC 症状の誘発につながると考えられる。

この他にも、特定の宿主遺伝子の発現を阻害する可能性のあるウイロイド由来の small RNA が、ポスピウイロイド科の主に PSTVd とナス科の宿主植物の組み合わせで報告されている (Diermann et al., 2010 ; Adkar-Purushothama, et al., 2015 ; Eamens et al., 2014 ; Avina-Padilla et al., 2015 ; Adkar-Purushothama et al., 2017 ; Adkar-Purushothama and Perreault, 2018a ; Adkar-Purushothama et al., 2018b ; Bao et al., 2019)。注目すべきことに、これらの PSTVd-sRNA の多くは病原性の強弱と最も関連性が高い P ドメインにマッピングされている。例えば、PSTVd-I の P ドメイン内のプラス鎖 39~59 番

塩基から多量に生成する PSTVd small RNA はトマトのカロース合成酵素遺伝子 (CalS11-like) の 3768 ~3788 番目と高い相補性を有し、RNAi 作用で CalS11-like mRNA を切断することが実験的に示された (Adkar-Purushothama, et al., 2015)。カロースは高等植物の細胞壁で細胞が外傷や病原体の侵入を受けた時に作られる直鎖状 β -1,3-グルカンで、細胞壁やプラズモデスマータに沈着して病原体の侵入拡大を防ぐ重要な生体防御物質である。カロース合成酵素遺伝子の発現を阻害することでプラズモデスマータへのカロース沈着を阻害し、細胞間移行と全身への拡散が容易となり、結果として強い病原性を発揮するのではないかと考えられている。また、致死型の PSTVd-RG1 変異体の P ドメイン内の病原性調節 (VM) 領域に存在する 21-nt の配列がジャガイモの StTCP23 遺伝子の 3'非翻訳領域 (UTR) と高い相補性を有することが見出され、RNAi 作用で StTCP23 mRNA の相補領域を切断し発現を抑制することが示された (Bao et al., 2019)。StTCP23 は TCP (teosinte branched1/Cycloidea/Proliferating cell factor) 転写因子ファミリー遺伝子のメンバーで、特にジベレリン酸 (GA) への応答において、植物の成長と発達及びホルモン調節に重要な役割を果たしている。PSTVd 感染で生じる病徴が VM 領域由来の siRNA による StTCP23 のサイレンシングに起因する可能性が示された。

以上、ノンコーディングなウイルスのゲノム RNA から生成されるウイルス small RNA が、低分子干渉 RNA (siRNA) のように、標的 (相補的) 配列を含む宿主 mRNA に直接作用して発現を阻害し、結果として病気の症状を引き起こす可能性が示された。しかし、ウイルス small RNA の病原性作用は直接的なものだけにとどまらないであろう。ウイルスに感染した細胞中には大量のウイルス small RNA が生産され蓄積されることを考えると、宿主の siRNA やマイクロ RNA (miRNA) 経路への間接的な影響も計り知れない (Gómez et al., 2009 ; Diermann et al, 2010)。すなわち 正常な RNA サイレンシング機構 や miRNA 発現制御機構 などの阻害と攪乱を通じて、宿主の発達や形態形成に悪影響を与える可能性も考えられる (Mishra et al., 2016)。今後さらに検討する価値のある興味深い課題である。

分子進化、宿主適応への関与：ホップ矮化ウイルス (HSVd) は日本で発生した“ホップ矮化病”から分離されたウイルスである。その後、ブドウ、カンキツ、スモモなど世界 37 개국 18 種の植物から分離され、現在、全てのウイルス種の中で最も広い宿主域を持つことが知られている (Hataya et al., 2017)。HSVd には分離される宿主により特徴ある変異が見られ、ブドウ、カンキツ、スモモから分離した変異体の宿主適応変異の解析から、ブドウに不顕性感染している変異体がホップに伝染して「矮化病」が発生したことが報告されている (Sano et al., 2001; Kawaguchi-Ito et al., 2009)。HSVd のブドウ変異体 (HSV-g) とそのホップ適応変異体 (HSVd-h) で、RNA サイレンシングが宿主適応変異に及ぼす影響が分析された (Zhang et al., 2020)。ブドウから分離した HSVd-g をホップに感染させると感染中に 25、26、54、193、281 番塩基が変化した HSVd-h 変異体が優占してくる。この変異は HSVd-g がホップ感染中に生じる宿主適応変異と考えられる。それぞれの変異体を感染させたホップの網羅的 small RNA 解析の結果、HSVd small RNA (21~24-nt) 全体の分布 (ホットスポット) パターンは良く似ていたが、25、26、54、193 及び 281 番に位置する 5 つのホップ適応変異を含む領域から生成する HSVd small RNA の出現頻度に違いがみられ、HSVd-g 感染ホップでは HSVd-h 感染ホップより生成・蓄積量が多かった。同様の傾向は HSVd-g と HSVd-h をキュウリに感染させた時にもみられ、一方で、HSVd-g の 54 番塩基を HSVd-h 型に変化させた変異体 (HSVd-g54) では、54 番塩基を含む HSVd small RNA の生成・蓄積量は HSVd-h

とほぼ同じ程度であった。HSVd small RNA の生成・蓄積量が RNA サイレンシング圧の強さと相関すると解釈すると、HSVd-h に生じた 5 か所の宿主適応変異は RNA サイレンシングの圧力を回避する効果をもたらしたことになる。前述のように、ウイロイド small RNA の生成パターンは宿主や品種の違いでも変化することを考えると、RNA サイレンシングはウイロイドが感染植物中で生じる宿主適応変異に様々な程度の影響を与えているかもしれない。

3-5. 宿主植物の防御機構及び遺伝子発現制御の攪乱

ウイロイドゲノム RNA の機能モチーフや分子構造に関する研究にくわえて、2000 年代の半ば過ぎからウイロイド感染植物の網羅的遺伝子発現変動の解析が開始された。マクロアレイ、マイクロアレイ、最近では RNA シーケンシング (RNAseq) による包括的なトランスクリプトーム解析も加わり、様々なウイロイドと宿主の組合せでウイロイド感染による宿主の遺伝子発現変化が解析されている (Sano, 2021)。

ウイロイド感染植物の網羅的遺伝子発現解析から、ウイロイドの感染で発現量変動する宿主植物の遺伝子はウイロイドの種や宿主によらずいくつかの重要な共通性が見られた。複数のウイロイド-宿主の組合せで変動することが報告された遺伝子には、① 防御反応/ストレス応答/植物免疫応答、② ジベレリンなどの植物ホルモンの生合成とシグナル伝達、③ 葉緑体と光合成、④ 細胞壁の強化、⑤ 色素、タンパク質或は糖の代謝、⑥ RNA サイレンシング、そして⑦ RNA スプライシングなどに関連するものが含まれていた。

防御反応/ストレス応答/植物免疫応答に関連するものには、カルシウム依存性プロテインキナーゼ、MAP キナーゼ、過敏反応、PR タンパク質などをコード或は制御する遺伝子が含まれ、ウイロイド感染で発現量が上昇した。同様に、RNA 依存性 RNA ポリメラーゼ 1 (RdRP1)、dicer like-2 (DCL2)、argonaute 2 (AGO2)、AGO7、silencing defective 3 など、RNA サイレンシング経路の遺伝子も発現量が上昇した。一方、光合成、細胞壁、ジベレリン応答性などの植物ホルモンのシグナル伝達に関連する遺伝子は発現量が正常時と比べて低下或は大きく変動した。例えば、PSTVd 感染トマトではゲノム全体にわたる選択的スプライシングや phased secondary siRNA (phashi-RNA) の誘導に変化が認められ (Zheng et al., 2017)、PSTVd 感染ジャガイモの塊茎では DWARF1/DIMINUTO、ジベレリン 7-オキシダーゼ及び塊茎形成を調節する転写因子 BEL5 などの転写量が変化しており、PSTVd 感染によるジャガイモ塊茎の発達障害にジベレリンとブラシノステロイド経路の異常が関与している可能性が示唆された (Katsarou et al., 2016)。また、ジベレリン酸 (GA) 応答性の低下と細胞壁の拡大の阻害が CSVd 感染キクの成長阻害の主な原因であることが示唆されている (Takino et al., 2019)。これらの遺伝子発現変動は、軽症型より強毒型の変異体に感染した植物でより大きく (Więsyk et al., 2018 ; Hadjieva, 2021)、より早く誘導された (Xia et al., 2017)。さらに、HSVd に感染したキュウリのトランスクリプトーム、スモール RNA オーム及びメチロームの包括的な経時的解析は、まず感染初期に、選択的スプライシングによる宿主トランスクリプトームの再構成が顕著にみられ、続いて宿主遺伝子のメチル化の増加によるエピジェネティックな変化が観察されるようになり、やがて転写活性の低下が顕著になることが報告された (Márquez-Molins, 2022)。すなわち、HSVd の感染が進行するにつれ影響を受ける宿主側の調節経路 (regulatory pathways) が変化してゆくことが示唆された。

ウイルス感染による miRNA の発現変動も報告されている。miRNA は約 18–25-nt の小さな non-coding RNA で、遺伝子にコードされた前駆体から生成する。転写後遺伝子発現調節機能を有する最小の情報担体で、健康な細胞機能の調節や動植物の病気の発症に関わる重要な伝達物質として機能する。網羅的なトランスクリプトームと small RNA の解析から、miR159、miR171e、miR4376 などの発現が、ウイルス感染で変動していることが報告された (Owens et al., 2012 ; Tsushima et al., 2017 ; Zheng et al., 2017)。CBCVd に感染したホップのハイスループットシーケンシング分析により 67 の保存された miRNA と 49 の新規 miRNA が同定され、そのうちの 36 の保存された miRNA と 37 の新規 miRNA が CBCVd 感染に応答して発現量が変化した。ホップのトランスクリプトームの中にはこれら miRNA の潜在的な標的になりうる配列が 311 か所もあると予測され、その大部分はホップの葉、根、及び蔓の成長と発達を調節する可能性のある転写因子であった。さらに、同定された miRNA は、シグナル伝達、ストレス応答、プレニルフラボノイド生合成経路、細胞および代謝など様々な経路で重要な役割を果たす可能性が示唆された (Mishra et al., 2017)。しかし一方で、PSTVd 感染トマトや HSVd 感染キュウリでは、miRNA の変化は限定的であったと報告されている (Zheng et al., 2017 ; Márquez-Molins, 2022)。

ウイルス感染によって誘導される miRNA の中で、miR398 と miR398a-3p は特に興味深い。PSTVd に耐性 (感染するがほとんど無病徴) のトマト品種 ‘MoneyMaker’ は、RNAi で RNA サイレncing の重要な要素である DCL2 及び DCL4 遺伝子をノックダウンすると、PSTVd 高感受性に変化し、重症の全身性壊死を引き起こすことが報告され (Suzuki et al., 2019)、その時感染植物では、活性酸素種 (ROS) の発生量が高まり、ストレス応答性 miR398 及び miR398a-3p の発現が健全の約 8 倍に増加し、一方で、細胞質及び葉緑体局在性 Cu/Zn-スーパーオキシドジスムターゼ (SOD) である SISOD1、2、3 及び SOD の銅シャペロンである SISOD4 (copper chaperon for SOD; CCS1) の発現レベルが低下していた。miR398 は SISOD1、2、4 を、398a-3p は SISOD3 をそれぞれ負に調節する miRNA で、SOD は ROS の消去酵素である。また、元来 PSTVd 高感受性のトマト品種 ‘Rutgers’ も強毒型 PSTVd の感染で葉脈や茎に壊疽を生じる。強毒型に感染して壊疽を生じた ‘Rutgers’ の葉では健全に比べて miR398 と miR398a-3p の発現量が有意に上昇し、SOD の発現量が低下した (Fujibayashi et al., 2021)。特に miR398a-3p の上昇とそれに対応する SISOD3 の低下が顕著であった。これらの結果は、ウイルス感染によって誘導される miR398 及び miR398a-3p の高レベルの発現が SOD 遺伝子の発現を妨害し、その結果、正常な ROS 産生制御が損なわれ、過剰な ROS が蓄積することによって壊死の発症につながることを示唆している (図 2)。

以上、ウイルスの感染により、はじめにストレスや防御応答に関与する遺伝子群の発現が誘導されて上昇し、一方、その結果として宿主遺伝子発現の大規模な改変が起こり、植物ホルモンなど形態形成にかかわる遺伝子群の正常な発現が阻害或は攪乱され、最終的に、全身の矮化や葉巻・壊疽症状などウイルス特有の病徴の発達に至るものと考えられる (図 3)。ウイルス病発症の分子機構の概要がウイルス感染で発現量が変動する宿主遺伝子の解析から裏付けられてきた。今後は変動することが明らかにされた個々の遺伝子間の相互作用とそれを取り巻く遺伝子発現ネットワークから病徴発症機構を解析し理解してゆくことが必要になるだろう。

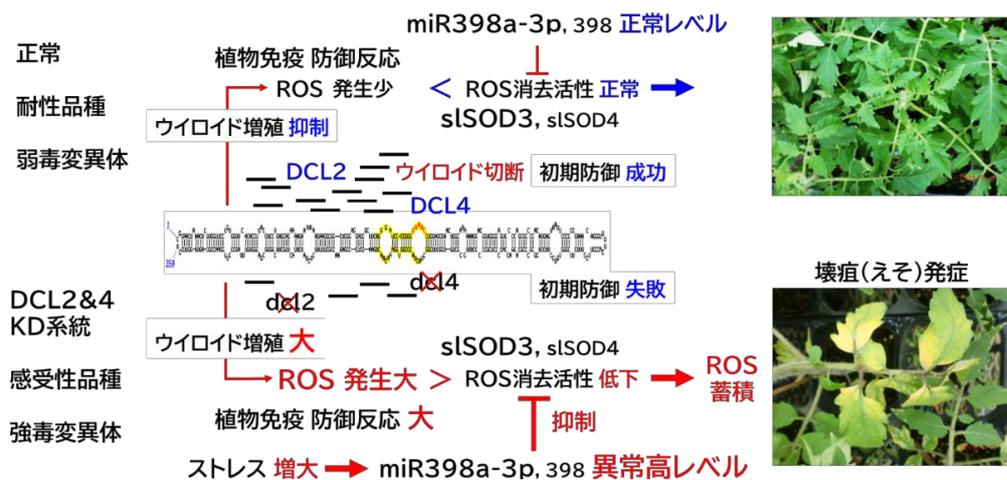


図2. ウイロイド感染による“壞疽 (えそ)”病徴 発症機構。図の上部はウイロイド耐性品種、下部は感受性品種の反応を示している。このモデルはウイロイドの弱毒変異体と強毒変異体に感染した感受性品種にも適用できる。

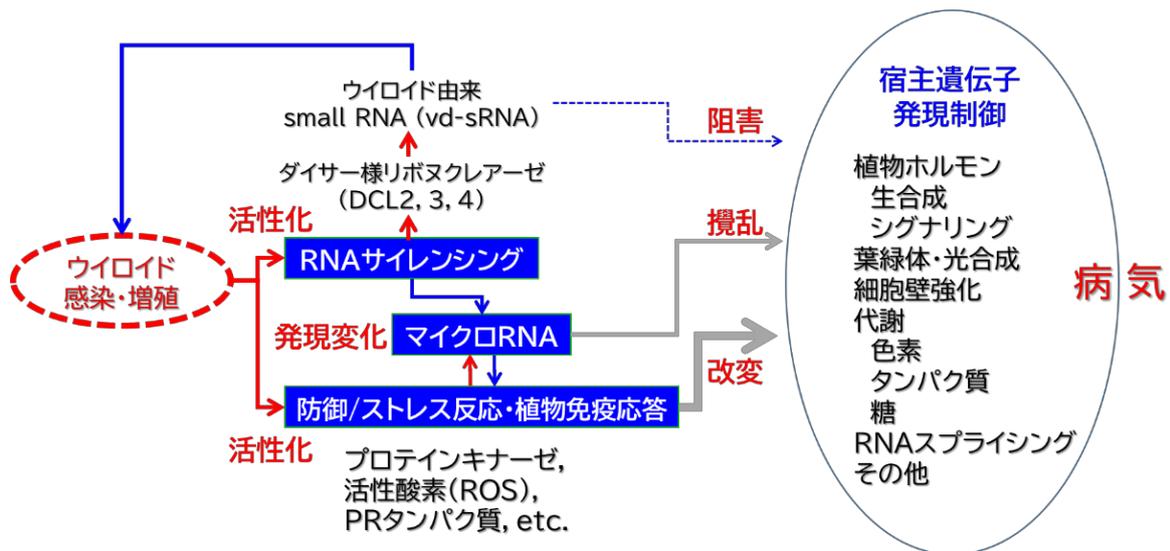


図3. ウイロイド感染に対する宿主防御反応と病原性メカニズムの概要

4. 今後の展望

発見当時、ウイロイドのイメージは“外殻を失ったウイルスのようなもの”であった。その後50年の間に、コンパクトに折りたたまれた一本鎖環状 RNA というユニークな分子構造が明らかにされ、複製能や病原性など機能性に関連する分子内のヌクレオチド配列や構造モチーフも特定され、自己複製するノンコーディング RNA 病原という基本的概念が確立された。さらに、ウイロイド感染により影響を受ける宿主側の多数の遺伝子も明らかになってきた。しかし、ウイロイドが病気を引き起こすメカニズムの詳

細はまだほとんどわかっていない。ウイロイド病を克服する新技術を開発するためには、自律複製、病原性、宿主適応など、ウイロイドの機能性発現の根底にある RNA の構造ドメインまたはモチーフと相互作用する様々な宿主因子とその作用を解明しなければならない。

500-nt にも満たない極小のゲノムサイズにもかかわらず、ウイロイドの病原性メカニズムは、当初想像されていたよりもはるかに複雑であることがわかってきた。ウイロイドの感染から発病に至る過程で見られる様々な現象は複雑で且つ巧妙に制御されている宿主遺伝子発現ネットワークの中で理解する必要がある。ウイロイド以外の生物学の研究分野においても、機能性ノンコーディング RNA という概念はすでに広く認識されており、ウイロイドとヒト miRNA の構造的類似性やヒトの病気にウイロイドと構造的に類似した一本鎖環状 RNA が関与する可能性があることなども示唆されている (Pogue et al., 2014 ; Cong et al., 2018 ; Bengone-Abogourin et al., 2019)。ウイロイドは RNA の構造モチーフがどのように生体内で機能を発揮し、細胞内の正常な生物学的プロセスに影響を与えるかを研究するための優れたモデルである。診断以外に有効な制御手段がないウイロイド病の発症機構の根底にある基本的メカニズムを解明することは、ウイロイド病の制御戦略を開発するための喫緊の課題であるだけでなく、人間の健康を含む幅広い科学分野の進歩にも関連している。

Diener による最初のウイロイドの発見は分画遠心分離と感染性実験に基づいていた。その後、新規ウイロイドの発見は、ウイロイドの一本鎖環状 RNA という特殊な形態的特性を検出するゲル電気泳動技術と自律複製能を確認するための生物検定を組み合わせることによって達成されてきた。しかし、近年、次世代シーケンサーによる網羅的遺伝子解析技術の開発と既知の塩基配列情報に依存しないで一本鎖環状 RNA の存在を予測・検出するアルゴリズムの開発のおかげで、新規又は既知のウイロイドを従来の技術では到達できなかった極低レベルで検出することが可能になった (Wu et al., 2012 ; Ito et al., 2013 ; Zhang et al., 2014 ; Olmedo-Velarde et al., 2020 ; Chiaki and Ito, 2020)。今後、従来の概念を超えて、より広い範囲の生物種で、未知のウイロイドが発見されてくるかもしれない。ウイロイドは細胞生物が誕生する以前に存在したと考えられている RNA ワールドの生きた化石ではないかと考えられている。生命の起源に関する知的好奇心を刺激するような情報が出てくると面白い。

謝辞

本稿の研究成果の一部は日本学術振興会 (JSPS) 科学研究費補助金 (課題番号 : 18380028、21380029、24380026、15H04455、18H0221) の助成を受けて実施した。

引用文献

Adkar-Purushothama, C.R., Brosseau, C., Giguère, T., Sano, T., Moffett, P., and Perreault, J.-P. (2015) Small RNA derived from the virulence modulating region of the potato spindle tuber viroid silences callose synthase genes of tomato plants. *The Plant Cell* 27, 2178–2194.

- Adkar-Purushothama, C.R., and Perreault, J.-P. (2018a) Alterations of the viroid regions that interact with the host defense genes attenuate viroid infection in host plant. *RNA Biol.* 15, 955–966.
- Adkar-Purushothama, C.R., and Perreault, J.P. (2020) Impact of nucleic acid sequencing on viroid biology, *Int. J. Mol. Sci.* 21, 5532.
- Adkar-Purushothama, C.R., Iyer, P.S., and Perreault, J.-P. (2017) Potato spindle tuber viroid infection triggers degradation of chloride channel protein CLC-b-like and ribosomal protein S3a-like mRNAs in tomato plants. *Sci. Rep.* 7, 8341.
- Adkar-Purushothama, C.R., Sano, T., and Perreault, J.-P. (2018b) Viroid-derived small RNA induces early flowering in tomato plants by RNA silencing. *Mol. Plant Pathol.* 19, 2446–2458.
- Avina-Padilla, K., Martínez de la Vega, O., Rivera-Bustamante, R., Martínez-Soriano, J.P., Owens, R.A., Hammond, R.W., and Vielle-Calzada, J.-P. (2015) In silico prediction and validation of potential gene targets for pospiviroid-derived small RNAs during tomato infection. *Gene* 564, 197–205.
- Bao, S., Owens, R.A., Sun, Q., Song, H., Liu, Y., Eamens, A.L., Feng, H., Tian, H., Wang, M.-B., and Zhang, R. (2019) Silencing of transcription factor encoding gene StTCP23 by small RNAs derived from the virulence modulating region of potato spindle tuber viroid is associated with symptom development in potato. *PLoS Pathogen* 15, e1008110.
- Baumstark, T., Schröder, A.R., and Riesner, D. (1997) Viroid processing: switch from cleavage to ligation is driven by a change from a tetraloop to a loop E conformation. *EMBO J* 16, 599–610.
- Bengone-Abogourin, J.G., Chelkha, N., Verdin, E., and Colson, P. (2019) Sequence similarities between viroids and human microRNAs. *Intervirology* 62, 227–234.
- Bojić, T., Beeharry, Y., Zhang, D.-J., and Martin Pelchat, M. (2012) Tomato RNA polymerase II interacts with the rod-like conformation of the left terminal domain of the potato spindle tuber viroid positive RNA genome. *J. Gen. Virol.* 93, 1591–1600.
- Chiaki, Y., and Ito, T. (2020) Characterization of a distinct variant of hop stunt viroid and a new apscaviroid detected in grapevines. *Virus Genes* 56, 260–265.
- Cong, L., Zhao, Y., Pogue, A.I., and Lukiw, W.J. (2018) Role of microRNA (miRNA) and viroids in lethal diseases of plants and animals. potential contribution to human neurodegenerative disorders. *Biochemistry (Mosc)* 83, 1018–1029.
- Delgado, S., Martínez de Alba, A.E., Hernández, C., and Flores, R. (2005) A short double-stranded RNA motif of Peach latent mosaic viroid contains the ini-tiation and the self-cleavage sites of both polarity strands. *J. Virol.* 79, 12934–12943.
- Di Serio, F., Flores, R., Verhoeven, J.T.J., Li, S.-F., Pallás, V., Randles, J.W., Sano, T., Vidalakis, G., and Owens, R.A. (2014) Current status of viroid taxonomy. *Arch. Virol.* 159, 3467–3478.
- Di Serio, F., Owens, R.A., Li, S-F., Matoušek, J., Pallás, V., Randles, J.W., Sano, T., Verhoeven, J.Th.J., Vidalakis, J., and Flores, R., ICTV Report Consortium. (2021) ICTV Virus Taxonomy Profile: Pospiviroidae. *J. Gen. Virol.* 102:001543.
- Di Serio, F., Owens, R.A., Li, S-F., Matoušek, J., Pallás, V., Randles, J.W., Sano, T., Verhoeven, J.Th.J., Vidalakis, J., Flores, R., and ICTV Report Consortium. (2018) ICTV Virus Taxonomy Profile: Avsunviroidae. *J. Gen. Virol.* 99: 611–612, DOI 10.1099/jgv.0.001045
- Diener, T.O. (1971) Potato spindle tuber “virus”. *Virology* 45, 411–428.
- Diener, T.O. (1986) Viroid processing: A model involving the central conserved region and hairpin I. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 83, 58–62.
- Diener, T.O. (1989) Circular RNAs: Relics of precellular evolution? *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 86, 9370–9374.
- Diermann, N., Matoušek, J., Junge, M., Riesner, D., and Steger, D. (2010) Characterization of plant miRNAs and small RNAs derived from potato spindle tuber viroid (PSTVd) in infected tomato. *Biol. Chem.* 391, 1379–1390.
- Ding, B., Kwon, M.O., Hammond, R., and Owens, R.A. (1997) Cell-to-cell movement of potato spindle tuber viroid. *Plant J.* 12, 931–936.
- Dingley, A.J., Steger, G., Esters, B., Riesner, D., and Grzesiek, S. (2003) Structural characterization of the 69 nucleotide potato spindle tuber viroid left-terminal domain by NMR and thermodynamic analysis. *J. Mol. Biol.* 334, 751–767.
- Dissanayaka Mudiynanselage, S.D., Qu, J., Tian, N., Jiang, J., and Wang, Y. (2018) Potato spindle tuber Vviroid RNA-templated transcription: factors and regulation. *Viruses* 10, 503.
- Dubé, A., Baumstark, T., Bisailon, M., and Perreault, J.-P. (2010) The RNA strands of the plus and minus

- polarities of peach latent mosaic viroid fold into different structures. *RNA* 16, 463–473.
- Dubé, A., Bolduc, F., Bisailon, M., and Perreault, J.-P. (2011) Mapping studies of the Peach latent mosaic viroid reveal novel structural features. *Mol. Plant Pathol.* 12, 688–701.
- Eamens, A.L., Smith, N.A., Dennis, E.S., Wassenegger, M., and Wang, M.-B. (2014) In *Nicotiana* species, an artificial microRNA corresponding to the virulence modulating region of Potato spindle tuber viroid directs RNA silencing of a soluble inorganic pyrophosphatase gene and the development of abnormal phenotypes. *Virology* 450–451, 266–277.
- Eiras, M., Nohales, M.A., Kitajima, E.W., Flores, R., and Daròs, J.A. (2011) Ribosomal protein L5 and transcription factor IIIA from *Arabidopsis thaliana* bind in vitro specifically potato spindle tuber viroid RNA. *Arch. Virol.* 156, 529–533.
- Fujibayashi, M., Suzuki, T., and Sano, T. (2021) Mechanism underlying potato spindle tuber viroid affecting tomato (*Solanum lycopersicum*): loss of control over reactive oxygen species production. *J. Gen. Pl. Pathol.* 87, 226–235.
- Gas, M.-E., Hernández, C., Flores, R., and Daròs, J.-A. (2007) Processing of nuclear viroids in vivo: an interplay between RNA conformations. *PLoS Pathogen* 3, e182.
- Giguère, T., Adkar-Purushothama, C.R., Bolduc, F., and Perreault, J.-P. (2014a) Elucidation of the structures of all members of the Avsunviroidae family. *Mol. Plant Pathol.* 15, 767–779.
- Giguère, T., Adkar-Purushothama, C.R., and Perreault, J.-P. (2014b) Comprehensive secondary structure elucidation of four genera of the family Pospiviroidae. *PLoS One* 9, e98655.
- Giguère, T., and Perreault, J.-P. (2017) Classification of the Pospiviroidae based on their structural hallmarks. *PLoS One* 12, e0182536.
- Gómez, G., Martínez, G., and Pallás, V. (2009) Interplay between viroid-induced pathogenesis and RNA silencing pathways. *Trends Plant Sci.* 14, 264–269.
- Gross, H.J., Domdey, H., Lossow, C., Jank, P., Raba, M., Alberty, H., and Sängner, H.L. (1978) Nucleotide sequence and secondary structure of potato spindle tuber viroid. *Nature* 273, 203–208.
- Hadjieva, N., Apostolova, E., Baev, V., Yahubyan, G., and Gozmanova, M. (2021) Transcriptome analysis reveals dynamic cultivar-dependent patterns of gene expression in potato spindle tuber viroid-infected pepper. *Plants* 7, 10(12):2687.
- Hammond, R.W. (1992) Analysis of the virulence modulating region of potato spindle tuber viroid (PSTVd) by site-directed mutagenesis. *Virology* 187, 654–662.
- Hataya, T., Tsushima, T., and Sano, T. (2017) Hop stunt viroid, Chapter 19, pp. 199–210. in *Viroids and Satellites* (Eds. Hadidi, A. et al.) Academic Press. ISBN 978-0 12-801498-1.
- Itaya, A., Folimonov, A., Matsuda, Y., Nelson, R.S., and Ding, B. (2001) Potato spindle tuber viroid as inducer of RNA silencing in infected tomato. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 14, 1332–1334.
- Ito, T., Suzuki, K., Nakano, M., and Sato, A. (2013) Characterization of a new apscaviroid from American persimmon. *Arch. Virol.* 158, 2629–2631.
- Jiang, D., Wang, M., and Li, S. (2017) Functional analysis of a viroid RNA motif mediating cell-to-cell movement in *Nicotiana benthamiana*. *J. Gen. Virol.* 98, 121–125.
- Jiang, J., Smith, H.N., Ren, D., Dissanayaka Mudiyansele, S.D., Dawe, A.L., Wang, L., and Wang, Y. (2018) Potato spindle tuber viroid modulates its replication through a direct interaction with a splicing regulator. *J. Virol.* 92, e01004–18.
- Katsarou, K., Mavrothalassiti, E., Dermauw, W., Leeuwen, T.V., and Kalantidis, K. (2016) Combined activity of DCL2 and DCL3 is crucial in the defense against potato spindle tuber viroid. *PLoS Pathogen* 12, e1005936.
- 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., and 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, e8386.
- Keese, P., and Symons, R.H. (1985) Domains in viroids: evidence of intermolecular RNA rearrangements and their contribution to viroid evolution. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 82, 4582–4586.
- Kitabayashi, S., Tsushima, D., Adkar-Purushothama, C.R., and Sano, T. (2020) Identification and molecular mechanisms of key nucleotides causing attenuation in pathogenicity of dahlia isolate of potato spindle tuber viroid. *Int. J. Mol. Sci.* 21, 7352.
- Kolonko, N., Bannach, O., Aschermann, K., Hu, K.-H., Moors, M., Schmitz, M., Steger, G., and Riesner, D. (2006) Transcription of potato spindle tuber viroid by RNA polymerase II starts in the left terminal loop. *Virology* 347, 392–404.

- Malfitano, M., Di Serio, F., Covelli, L., Ragozzino, A., Hernández, C., Flores, R. (2003) Peach latent mosaic viroid variants inducing peach calico (extreme chlorosis) contain a characteristic insertion that is responsible for this symptomatology. *Virology* 313, 492–501."
- Maniataki, E., Martínez de Alba, A.E., Sägesser, R., Tabler, M. and Tsagris, M. (2003) Viroid RNA systemic spread may depend on the interaction of a 71-nucleotide bulged hairpin with the host protein VirP1. *RNA* 9, 346–354."
- Márquez-Molins, J., Villalba-Bermell, P., Corell-Sierra, J., Pallás, V., and Gómez, G. (2022) Integrative time-scale and multi-omic analysis of host- responses to Hop stunt viroid infection. *bioRxiv*, preprint doi: <https://doi.org/10.1101/2022.01.06.475203>
- Martínez de Alba, A.E., Flores, R., and Hernández, C. (2002) Two chloroplastic viroids induce the accumulation of small RNAs associated with posttranscriptional gene silencing. *J. Virol.* 76, 13094–13096.
- Merino, E.J., Wilkinson, K.A., Coughlan, J.L., and Weeks, K.M. (2005) RNA structure analysis at single nucleotide resolution by selective 2'-hydroxyl acylation and primer extension (SHAPE). *J. Am. Chem. Soc.* 127, 4223–4231.
- Mishra, A.K., Duraisamy, G.S., Matoušek, J., Radisek, S., Javornik, B., and Jakse, J. (2016) Identification and characterization of microRNAs in *Humulus lupulus* using highthroughput sequencing and their response to Citrus bark cracking viroid (CBCVd) infection. *BMC Genomics* 17, 919.
- Moelling, K., and Broecker, F. (2021) Viroids and origin of life. *Int. J. Mol. Sci.* 22(7), 3476; <https://doi.org/10.3390/ijms22073476>
- Motard, J., Bolduc, F., Thompson, D., and Perreault, J.-P. (2008) The peach latent mosaic viroid replication initiation site is located at a universal position that appears to be defined by a conserved sequence. *Virology* 373, 362–375.
- Navarro, B., Gisel, A., Rodio, M.E., Delgado, S., Flores, R., and Di Serio, F. (2012) Small RNAs containing the pathogenic determinant of a chloroplast-replicating viroid guide the degradation of a host mRNA as predicted by RNA silencing. *Plant J.* 70, 991–1003.
- Olmedo-Velarde, A., Navarro, B., Hu, J.S., Melzer, M.J., and Di Serio, F. (2020) Novel fig-associated viroid-like RNAs containing hammerhead ribozymes in both polarity strands identified by high-throughput sequencing. *Front. Microbiol.* 18, 11:1903.
- Owens, R.A., Chen, W., Hu, Y., and Hsu, Y.H. (1995) Suppression of potato spindle tuber viroid replication and symptom expression by mutations which stabilize the pathogenicity domain. *Virology* 208, 554–564.
- Owens, R.A., Tech, K.B., Shao, J.Y., Sano, T., and Baker, C.J. (2012) Global analysis of tomato gene expression during Potato spindle tuber viroid infection reveals a complex array of changes affecting hormone signaling. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 25, 582–598.
- Papaefthimiou, I., Hamilton, A.J., Denti, M.A., Baulcombe, D.C., Tsagris, M., and Tabler, M. (2001) Replicating potato spindle tuber viroid RNA is accompanied by short RNA fragments that are characteristic of posttranscriptional gene silencing. *Nucl. Acids Res.* 29, 2395–2400.
- Pogue, A.I., Hill, J.M., and Lukiw, W.J. (2014) MicroRNA (miRNA): sequence and stability, viroid-like properties, and disease association in the CNS. *Brain Res.* 10, 1584;73–79.
- Qi, Y., and Ding, B. (2003) Inhibition of cell growth and shoot development by a specific nucleotide sequence in a noncoding viroid RNA. *The Plant Cell* 15, 1360–1374.
- Reanwarakorn, K., and Semancik, J.S. (1998) Regulation of pathogenicity in hop stunt viroid-related group II citrus viroids. *J. Gen. Virol.* 79, 3163–3171.
- Reanwarakorn, K., and Semancik, J.S. (1999) Correlation of hop stunt viroid variants to cachexia and xyloporosis diseases of citrus. *Phytopathology* 89, 568–574.
- Sano, T. (2013) History, origin, and diversity of hop stunt disease and hop stunt viroid, *Acta Horticulturae* 1010, 87–96.
- Sano, T. (2021) Progress in 50 years of viroid research—Molecular structure, pathogenicity, and host adaptation. *Proc. Jpn. Acad., Ser. B* 97, 371-401.
- Sano, T., and Ishiguro, A. (1998) Viability and pathogenicity of intersubgroup viroid chimeras suggest possible involvement of the terminal right region in replication. *Virology* 240, 238–244.
- Sano, T., Candresse, T., Hammond, R.W., Diener, T.O., and Owens, R.A. (1992) Identification of multiple structural domains regulating viroid pathogenicity. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 89, 10104–10108.
- Sano, T., Mimura, R., and Ohshima, K. (2001) Phylogenetic analysis of hop and grapevine isolates of hop stunt viroid supports a grapevine origin for hop stunt disease. *Virus Genes* 22, 53–59.

- Schnölzer, M., Haas, B., Ramm, K., Hofmann H., and Sanger, H.L. (1985) Correlation between structure and pathogenicity of potato spindle tuber viroid (PSTV). *The EMBO J.* 4, 2181–2190.
- Serra, P., Gago, S., and Duran-Vila, N. (2008) A single nucleotide change in Hop stunt viroid modulates citrus cachexia symptoms. *Virus Res.* 138, 130–134.
- Steger, G., and Perreault, J.-P. (2016) Structure and Associated Biological Functions of Viroids. *Adv Virus Res* 94, 141–172.
- Steger, G., Hofmann, H., Fortsch, J., Gross, H.J., Randles, J.W., Sanger, H.L., and Riesner, D. (1984) Conformational transitions in viroids and virusoids: comparison of results from energy minimization algorithm and from experimental data. *J. Biomol. Struct. Dyn.* 2, 543–571.
- Suzuki, T., Ikeda, S., Kasai, A., Taneda, A., Fujibayashi, M., Sugawara, K., Okuta, M., Maeda, H., and Sano, T. (2019) RNAi-mediated down-regulation of dicer-like 2 and 4 changes the response of ‘Moneymaker’ tomato to potato spindle tuber viroid infection from tolerance to lethal systemic necrosis, accompanied by up-regulation of miR398, 398a-3p and production of excessive amount of reactive oxygen species. *Viruses* 11, 344.
- Takeda, R., Petrov, A.I., Leontis, N.B., and Ding, B. (2011) A three-dimensional RNA motif in Potato spindle tuber viroid mediates trafficking from palisade mesophyll to spongy mesophyll in *Nicotiana benthamiana*. *The Plant Cell* 23, 258–272.
- Takeda, R., Zirbel, C.L., Leontis, N.B., Wang, Y., and Ding, B. (2018) Allelic RNA motifs in regulating systemic trafficking of potato spindle tuber viroid. *Viruses* 10, 160.
- Takino, H., Kitajima, S., Hirano, S., Oka, M., Matsuura, T., Ikeda, Y., Kojima, M., Takebayashi, Y., Sakakibara, H., and Mino, M. (2019) Global transcriptome analyses reveal that infection with chrysanthemum stunt viroid (CSVd) affects gene expression profile of chrysanthemum plants, but the genes involved in plant hormone metabolism and signaling may not be silencing target of CSVd-siRNAs. *Plant Gene* 18, 100181.
- Tsuda, S., and Sano, T. (2014) Threats to Japanese agriculture from newly emerged plant viruses and viroids. *J. Gen. Pl. Pathol.* 80, 2–14.
- Tsushima, D., Adkar-Purushothama, C.R., Taneda, A., and Sano, T. (2015) Changes in relative expression levels of viroid-specific small RNAs and microRNAs in tomato plants infected with severe and mild symptom-inducing isolates of Potato spindle tuber viroid. *J. Gen. Pl. Pathol.* 81, 49–62.
- Tsushima, D., Tsushima, T., and Sano, T. (2016) Molecular dissection of a dahlia isolate of potato spindle tuber viroid inciting a mild symptoms in tomato. *Virus Res.* 214, 11–18.
- Tsushima, T., Murakami, S., Ito, H., He, Y.-H., Adkar-Purushothama, C.R., and Sano, T. (2011) Molecular characterization of Potato spindle tuber viroid in dahlia. *J. Gen. Pl. Pathol.* 77, 253–256.
- Vadamarai, G., Thanarajoo, S.S., Joseph, H., Kong, L.L., and Randles, J.W. (2017) Coconut Cadang-Cadang viroid and coconut Tiagaja viroid, Part III, 25, pp. 263–273, in *Viroids and Satellites* (Eds. Hadidi, A. et al.) Academic Press, ISBN 978-0 12-801498-1.
- Vasa, S.M., Guex, N., Wilkinson, K.A., Weeks, K.M., and Giddings, M.C. (2008) ShapeFinder: a software system for high-throughput quantitative analysis of nucleic acid reactivity information resolved by capillary electrophoresis. *RNA* 14, 1979–1990.
- Wang, M.-B., Bian, X.-Y., Wu, L.-M., Liu, L.-X., Smith, N.A., Isenegger, D., Wu, R.-M., Masuta, C., Vance, V.B., Watson, J.M., Rezaian, A., Dennis, E.S., and Waterhouse, P.M. (2004) On the role of RNA silencing in the pathogenicity and evolution of viroids and viral satellites. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101, 3275–3280.
- Wang, Y., Qu, J., Ji, S., Wallace, A. J., Wu, J., Li, Y., Gopalan, V., and Ding, B. (2016) A land plant-specific transcription factor directly enhances transcription of a pathogenic noncoding RNA template by DNA-dependent RNA polymerase II. *The Plant Cell* 28, 1094–1107.
- Wang, Y., Shibuya, M., Taneda, A., Kurauchi, T., Senda, M., Owens, R.A., and 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.
- Wassenegger, M., Spieker, R.L., Thalmeir, S., Gast, F.U., Riedel, L., and Sanger, H.L. (1996) A single nucleotide substitution converts potato spindle tuber viroid (PSTVd) from a noninfectious to an infectious RNA for *nicotiana tabacum*. *Virology* 226, 191–197.
- Więsyk, A., Iwanicka-Nowicka, R., Fogtman, A., Zagórski-Ostojka, W., and Góra-Sochacka, A. (2018) Time-course microarray analysis reveals differences between transcriptional changes in tomato leaves triggered by mild and severe variants of potato spindle tuber viroid. *Viruses* 10, 257.

- Wimberly, B., Varani, G., and Tinoco, I. (1993) The conformation of loop E of eukaryotic 5S ribosomal RNA. *Biochemistry* 32, 1078–1087.
- Wu, J., Zhou, C., Li, J., Li, C., Tao, X., Leontis, N.B., Zirbel, C.L., Bisaro, D.M., and Ding, B. (2020) Functional analysis reveals G/U pairs critical for replication and trafficking of an infectious non-coding viroid RNA. *Nucl. Acids Res.* 48, 3134–3155.
- Wu, Q., Wang, Y., Cao, M., Pantaleo, V., Burgyan, J., Li W.X., and Ding, S.W. (2012) Homology-independent discovery of replicating pathogenic circular RNAs by deep sequencing. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 109, 3938–3943.
- Xia, C., Li, S., Hou, W., Fan, Z., Xiao, H., Lu, M., Sano, T., and Zhang, Z. (2017) Global transcriptomic changes induced by infection of cucumber (*Cucumis sativus* L.) with mild and severe variants of hop stunt viroid. *Front. Microbiol.* 8, 2427.
- Zhang, Z., Qi, S., Tang, N., Zhang, X., Chen, S., Zhu, P., Ma, L., Cheng, J., Xu, Y., Lu, M., Wang, H., Ding, S.-W., Li, S., and Wu, Q. (2014) Discovery of replicating circular RNAs by RNA-seq and computational algorithms. *PLoS Pathogen* 10, e1004553.
- Zhang, Z., Xia, C., Matsuda, T., Taneda, A., Murosaki, F., Hou, W., Owens, R.A., Li, S., and Sano, T. (2020) Effects of host-adaptive mutations on hop stunt viroid pathogenicity and small RNA biogenesis. *Int. J. Mol. Sci.* 21, 7383
- Zheng, Y., Wang, Y., Ding, B., and Fei, Z. (2017) Comprehensive transcriptome analyses reveal that potato spindle tuber viroid triggers genome-wide changes in alternative splicing, inducible trans-acting activity of phased secondary small interfering RNAs, and immune responses. *J. Virol.* 91, e00247-17.
- Zhong, X., Archual, A.J., Amin, A.A., and Ding, B. (2008) A genomic map of viroid RNA motifs critical for replication and systemic trafficking. *The Plant Cell* 20, 35–47.
- Zhong, X., Leontis, N., Qian, S., Itaya, A., Qi, Y., Boris-Lawrie, K., and Ding, B. (2006) Tertiary structural and functional analyses of a viroid RNA motif by isostericity matrix and mutagenesis reveal its essential role in replication. *J. Virol.* 80, 8566–8581.
- Zhong, X., Tao, X., Stombaugh, J., Leontis, N., and Ding, B. (2007) Tertiary structure and function of an RNA motif required for plant vascular entry to initiate systemic trafficking. *The EMBO J.* 26, 3836–3846.
- Zhu, Y., Green, L., Woo, Y.M., Owens, R., and Ding, B. (2001) Cellular basis of potato spindle tuber viroid systemic movement. *Virology* 279, 69–77.



東北大学農学研究科
植物病理学分野
准教授・安藤 杉尋

経歴

2002年 筑波大学大学院博士課程生命科学研究科修了・博士（理学）
2003年 日本学術振興会特別研究員（農業生物資源研究所）
2006年 農業生物資源研究所 特別研究員
2009年 東北大学大学院農学研究科 助教
2013年～現在 東北大学大学院農学研究科 准教授
（2014年9月-2015年3月 ドイツ・アーヘン工科大学）

研究内容

- ・植物免疫のプライミングとCMV抵抗性の解析
- ・微生物集団を用いた病害防除技術の開発
- ・大気圧プラズマを用いた植物免疫の活性化に関する研究

RNAサイレンシングのプライミング機構と そのウイルス抵抗性への関与

安藤杉尋*・宮下脩平*・高橋英樹*

S. Ando, S. Miyashita, H. Takahashi

Priming of RNA silencing and its involvement in virus resistance

Abstract

Defense priming is a mechanism that allows plants to memorize infection stimuli of pathogens and efficiently activate defense responses against secondary invasion of pathogens. In this study, we investigated the possibility that RNA silencing, a resistance mechanism against viruses, is activated by defense priming in *Arabidopsis thaliana*. Therefore, the gene expressions of RNA silencing components, Argonaute (AGO), Dicer-like protein (DCL), and RNA-dependent RNA polymerase (RDR), were analyzed after treatment with the priming inducer acibenzolar-*S*-methyl (BTH). The expression levels of *AGO2* and *AGO3* were revealed to be shown a typical pattern for primed activation. Furthermore, regions with changes in chromatin modifications, such as histone methylation (H3K4me3) and acetylation (H3K9Ac), were detected in the promoter of the *AGO2* gene. The primed activation of *AGO2* was found to be compromised in histone methyltransferase mutants (*atx4* and *atx5*). These results suggest that epigenetic regulation is involved in the priming of *AGO2*. In addition, yeast one-hybrid analysis identified WRKY25 and AtHMGB9 as transcription factors that bind to regions with changes in histone modifications, suggesting that these transcription factors might be involved in the regulation of primed *AGO2* expression. We discuss possible strategies for virus resistance in plants by *AGO2* priming.

*東北大学大学院 農学研究科 植物病理学分野 Graduate School of Agricultural Science, Tohoku University, Sendai, Miyagi 980-8572, Japan

1. はじめに

植物は病原体の攻撃から効率的に身を守るため、その攻撃を記憶し、さらなる攻撃に対して迅速に強く応答するシステムを持っている(図1)。これは植物免疫のプライミング(Defense priming)とよばれ、その記憶にはエピジェネティックな遺伝子発現の制御や MAP kinase のリン酸化カスケードの関与が示唆されている(Beckers et al. 2009; Reimer-Michalski and Conrath 2016)。一般に防御応答は植物にとってコストが高いため、防御応答を起こさず迅速な応答が可能である状態を形成する Defense priming は植物にとって効率のよい戦略といえる。Defense priming は病原体の局所的な感染刺激によって誘導される全身獲得抵抗性(SAR)の確立にも関与すると考えられている。また Defense priming はアスピベンゾラル S メチル(BTH)などのプラントアクティベーター処理によっても誘導されることが分かっている。

RNAサイレンシングは植物ウイルスに対する抵抗性機構として重要な役割をもつことが知られている。ウイルスが感染すると、ウイルスの複製過程で形成される2本鎖RNAやウイルスRNAのヘアピンループのステム部分の2本鎖RNAがDicer-like protein(DCL)によって切断され、small interfering RNA(siRNA)が形成される。siRNAはArgonaute protein(AGO)に取り込まれ、RNA induced silencing complex(RISC)を形成し、siRNAの相補性を利用してウイルス由来のRNAを特異的に分解する。さらに、RNA dependent RNA polymerase(RDR)はウイルス由来のRNAを鋳型に相補鎖を合成することで、2本鎖RNAを合成し、この2本鎖RNAがDCLによって切断され、siRNAの産生が増幅される。このようにRNAサイレンシング機構は、外来のウイルスRNAをsiRNAによる相補性を利用して特異的に分解することで、ウイルスの増殖を抑制する(Wang et al. 2012; Ando et al. 2019)。

ウイルス抵抗性におけるRNAサイレンシングの重要性は良く知られているが、その制御機構については明らかになっていない部分が多いのが現状である。また Defense priming におけるRNAサイレンシングの役割についても全く解析されていなかった。そこで本研究では、RNAサイレンシング機構が Priming されることで、ウイルス抵抗性が増強される可能性について検討を行った。

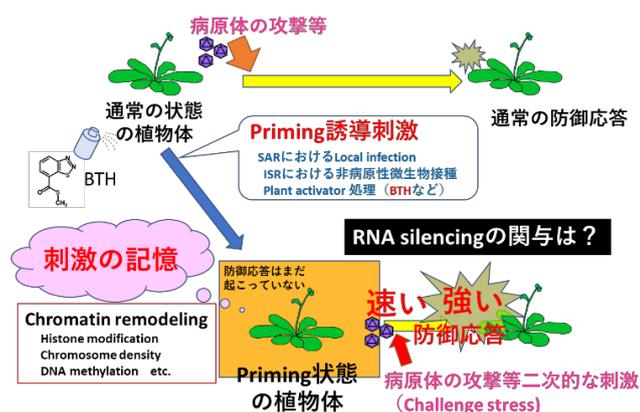


図1 Defense priming の概要

2. RNAサイレンシング関連遺伝子の Priming の解析

Defense priming 誘導時にRNAサイレンシング機構がどのように制御されているかを解析するため、*Arabidopsis thaliana* に Priming 誘導剤として 100 μ M BTH をスプレー処理し3日

間培養することで Priming 状態とした。この状態の植物にキュウリモザイクウイルス黄斑系統[CMV(Y)]を接種すると、無処理区に比べて CMV の初期感染が抑制されることから、ウイルスに対する抵抗性が增強されていることも確認した(Ando et al. 2021)。Priming 状態の植物は、外部からのストレスに対して敏感となり、細胞間隙に水を浸潤させる「水ストレス」を与えることによって、*WRKY* 遺伝子 (*WRKY53* など) が通常よりも強く速く発現誘導されることが知られている(Jaskiewicz et al. 2011)。この実験系を利用し、RNA サイレンシング関連因子である *AGO1*~*10*, *DCL1*~*4*, *RDR1*~*6* について Defense priming による遺伝子発現の活性化が認められるかどうかを解析した。その結果、*AGO2* と *AGO3* が典型的な Priming 誘導された遺伝子発現のパターンを示した(図 2; Ando et al. 2021)。すなわち、BTH 処理のみではコントロールと同程度の発現量であるが BTH 処理した植物に水ストレスを与えると、コントロールの場合よりも強い発現誘導が認められた。その他の RNA サイレンシング関連因子ではそのような発現パターンは認められなかった。さらに、*AGO2* の Priming は BTH 処理以外にも *Pseudomonas syringae* pv. *maculicola* の局部感染や CMV 抵抗性遺伝子 *RCY1* による CMV(Y)感染葉の抵抗性応答によって非接種上位葉において確認された(Ando et al. 2021)。また、*AGO2* の Priming は *npr1-1* 変異体では認められないことから、NPR1 を介したサリチル酸シグナルの関与が示唆された。*AGO2* は CMV を含む植物ウイルスに対する抵抗性に重要な役割をもつことが示唆されていることから(Harvey et al. 2011)、BTH 処理により *AGO2* が Priming したことによって CMV 抵抗性が增強された可能性が考えられる。そこで、以降は *AGO2* の Priming 誘導機構について解析を行った。

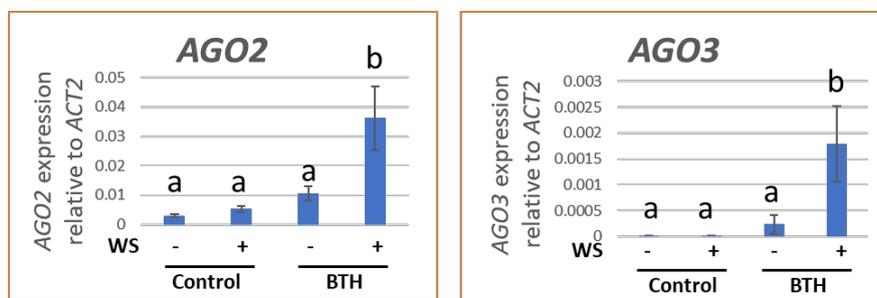


図 2 BTH 処理による *AGO2*, *AGO3* 遺伝子の Priming

A. thaliana に BTH (100 μ M) をスプレー処理し、3 日後に完全展開葉の細胞間隙に水を浸潤させることで水ストレス (WS) を与え、さらに 3 時間後の遺伝子発現を解析した。対照区(Control)は展着剤 (Wettable powder) 溶液処理を用いた。異なるアルファベットは有意差を示す (Tukey-Kramer test, $n=3$, $p<0.05$)。

3. miR403 が *AGO2* の Priming に影響する可能性について

AGO2 や *AGO3* 遺伝子の 3'UTR 部分には miRNA である miR403 のターゲット配列が存在することから、*AGO2* と *AGO3* は miR403 を介して *AGO1* の制御下にあることが示唆されて

いる(Harvey et al. 2011)。Defense priming 誘導時に両者が類似の発現パターンを示したことから、この発現パターンへの miR403 の関与を検証した。まず、*ago2-1* 変異体に *AGO2* 遺伝子を native promoter (約 2.2 kb) の制御下で miR403 のターゲットサイトを欠損させて導入した形質転換体を作成した。この形質転換体における *AGO2* の Priming を同様に解析した結果、Priming による発現パターンは維持されていたが、発現量が miR403 のターゲットサイトを欠損することで大きく増加した。すなわち、miR403 は Priming 誘導ではなく Basal な *AGO2* の発現制御に関与していると考えられた。また、BTH 処理によって miR403 の蓄積量が増加することも確認された。*AGO2* の発現は BTH 処理後 2 日目まで上昇し、3 日目に対照区と同レベルに減少することが分かっている(Ando et al. 2021)。miR403 の増加はこの *AGO2* の発現量の減少に寄与している可能性も考えられる。

4. *AGO2* の転写開始点付近のクロマチン構造の解析

BTH 処理による *WRKY* 遺伝子の Priming にはプロモーター領域のヒストン修飾が関与していることが示唆されている(Jaskiewicz et al. 2011)。そこで、同様に *AGO2* のプロモーター領域のヒストン修飾の変化をクロマチン免疫沈降法 (ChIP) によって解析した。その結果、転写開始点付近において、遺伝子発現の活性化の指標とされるヒストンのアセチル化[ヒストン H3 の第 9 リジンのアセチル化(H3K9Ac)]やヒストン H3 の第 4 リジンとトリメチル化(H3K4me3)が BTH 処理によって増加することが示された(図 3; Li et al. 2007; Ando et al. 2021)。また、クロマチン密度は低いほど、転写因子や RNA polymerase などの accessibility が高くな

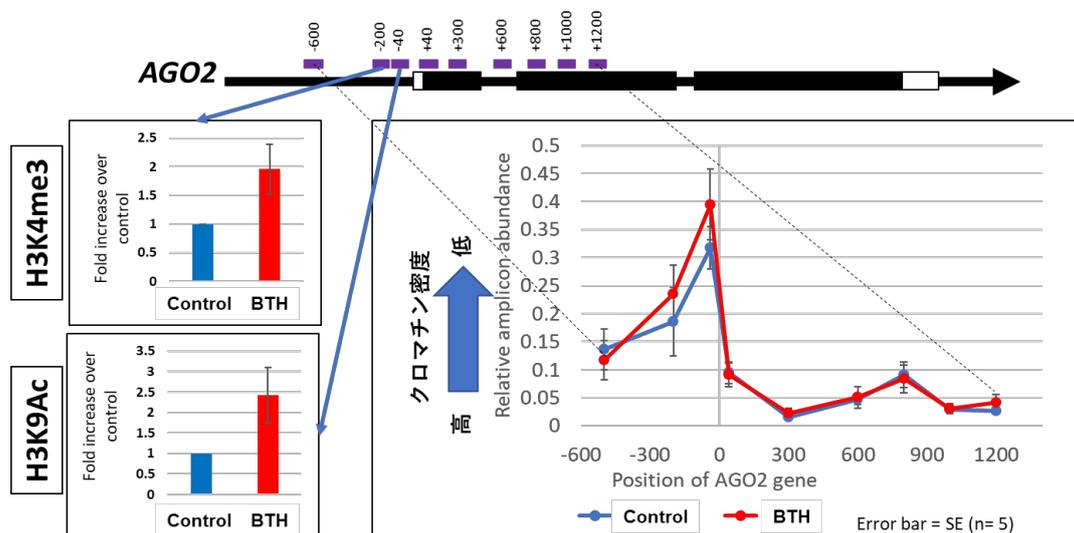


図 3 BTH 処理による *AGO2* 遺伝子のクロマチン構造の変化

A. thaliana に BTH (100 μ M) をスプレー処理し、3 日後に完全展開葉を用い、ChIP によるヒストン修飾の変化 (H3K4me3, H3K9Ac) と FAIRE によるクロマチン密度の解析を行った。*AGO2* ゲノム模式図の上の紫色のバーは解析に用いた Primer で増幅される配列の位置を示している。

るため、遺伝子発現の活性化の指標とされる(Pfluger and Wagner 2007)。そこで、クロマチン密度を FAIRE (Formaldehyde-Assisted Isolation of Regulatory Elements; Baum et al. 2020)によって解析した結果、BTH 処理区と対照区の間で有意差は認められないものの、転写開始点付近のクロマチン密度が周辺領域に比べて低く、その傾向は BTH 処理区でより強かった(図 3; Ando et al. 2021)。これらの結果から、BTH 処理による Defense priming 誘導時にはヒストン修飾やクロマチン密度の変化によって通常よりも速く遺伝子発現が活性化できる状態にスタンバイされていることが示唆された。

ヒストンのメチル化修飾には Trithorax-group proteins が関与することが知られており、特に H3K4 のメチル化は *Arabidopsis Trithorax* (ATX1~5)が重要な働きをもつことが示唆されている(図 4; Pien et al. 2008; Liu et al. 2018)。そこで、*atx1*, *atx2*, *atx4*, *atx5* 変異体における BTH による *AGO2* の Priming と CMV 抵抗性誘導を解析したところ、*atx1* では BTH による *AGO2* の Priming および CMV 抵抗性誘導が確認されたが(CMV 抵抗性誘導は *atx2* でも確認)、*atx4* および *atx5* では両方とも BTH の効果が弱くなることが確認された。すなわち、*AGO2* の Priming を制御するヒストン修飾には ATX4 および ATX5 が関与する可能性が高いと考えられた。

Defense priming の状態では刺激に対して迅速に強く応答できるが、防御応答は活性化されていないことから、転写開始を抑制する機構の存在が推察される。ヒストン修飾とクロマチン密度の解析から、BTH 処理による *AGO2* の Priming 時にはプロモーター領域のクロマチン構造は既に活性化されている状態と考えることができる。しかし、実際には mRNA レベルは対照区と同レベルであることから、やはり発現を抑制するなんらかの仕組みがあるものと考えられる。そこで、RNA polymerase II (RNAPII)の転写開始点付近への結合活性を ChIPによって解析した。RNAPII の C-terminal domain (CTD)はリン酸化による修飾を受け、その機能が制御されているため(Hajheidari et al. 2013)、解析にはリン酸化部位特異的な抗体を用いた。その結果、*AGO2* の転写開始点付近の RNAPII の結合性はリン酸化修飾の有無に関わらず、BTH 処理によって低下することが明らかになった。一方で、同様に BTH 処理によって Priming される *WRKY53* のプロモーター領域では RNAPII の結合性は BTH 処理によって上昇していた。通常、クロマチン密度が低い状態では RNAPII の結合性は上がると考えられるが、*AGO2* の Priming 時には RNAPII の accessibility を抑制する何らかの仕組みによって、転写量が抑えられている可能性がある。遺伝子によって Priming 誘導のメカニズムには違いがあるものと思われるが、詳細については今後の解析が必要である。

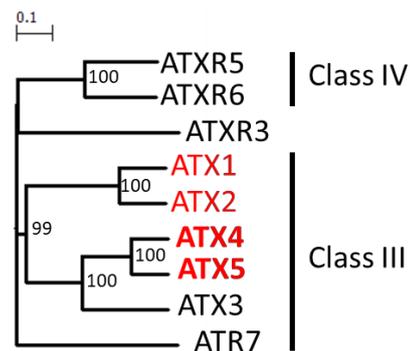


図 4 *Arabidopsis trithorax* 遺伝子の分子系統樹
解析に用いた遺伝子を赤字で示した。

5. AGO2 のプロモーター領域に結合する転写因子の探索

AGO2 の転写開始点付近のクロマチン構造が BTH 処理による Priming 誘導時に変化することで、RNAPII や基本転写因子などの結合性が変化する可能性は示唆されたが、その発現制御には上流のプロモーター領域の cis 配列やそこに結合する転写因子が関わると考えられる。そこで、AGO2 プロモーター上流域のヒストン修飾が変化する領域の特定とそこに結合する転写因子の探索を行った。まず、BTH による Priming 誘導時に H3K4me3 が変化する領域を探索した結果、上流 2.1-2.2 kb の領域で H3K4me3 が増加することが明らかになった。この領域の cis 配列を探索したところ、WRKY 転写因子の結合サイトである W-box が複数見出されたことから、この領域が免疫応答に関与する可能性があるかと判断した。そこで、この領域の DNA 配列を Yeast one-hybrid 法の Bait 配列として用い、ここに結合する転写因子の探索を行った。その結果、DNA 結合タンパク質として WRKY25 と AtHMGB9 (High Mobility Group Box 9) が単離された。WRKY25 については、*wrky25* 変異体において BTH による AGO2 の priming が増強され、CMV 抵抗性が亢進されたことから AGO2 priming の negative regulator として機能している可能性が考えられる。AtHMGB9 の機能については現在解析中である。

6. おわりに

本研究では、AGO2 の遺伝子発現が BTH 処理によって Priming され、ストレス刺激に対して通常よりも強く応答することを見出した。AGO2 がウイルス抵抗性に重要な役割をもつことが示唆されていること、AGO2 の Priming の強度と CMV 抵抗性の間にある程度の相関

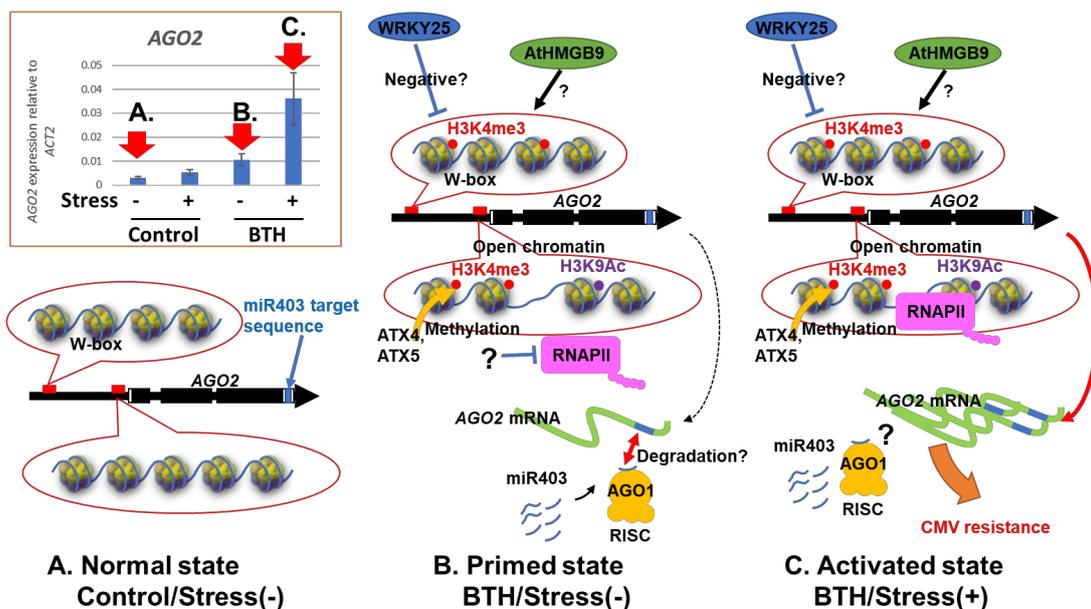


図5 BTHによるAGO2 priming機構のモデル

性が認められることなどから、AGO2を中心としたサイレンシング機構がウイルスに対する Defense priming の一翼を担っている可能性が考えられる。まだまだ不明な部分が多いのが現状であるが、本研究で得られた結果をもとに考えられる AGO2 priming のモデルを図5に示した。また今回は、AGO2に焦点を絞って解析したため、同様に Priming の認められた AGO3 や他の AGO との関係については未検討である。BTH 処理によって AGO7 の発現が誘導されることも確認されており(Ando et al. 2021)、Defense priming やウイルス抵抗性への寄与を解析する必要がある。また、miRNA を介した AGO1 による制御の影響についても更に解析が必要と考えている。

7. 謝辞

本研究は科研費・基盤研究 C (15K07307, 20K06045) の助成によって行われた。また本研究の一部は、ドイツ・アーヘン工科大学の Uwe Conrath 教授の技術協力のもとで行った。

8. 引用文献

- Ando S, Jaskiewicz M, Mochizuki S, Koseki S, Miyashita S, Takahashi H, Conrath U (2021) Priming for enhanced *ARGONAUTE2* activation accompanies induced resistance to cucumber mosaic virus in *Arabidopsis thaliana*. *Mol Plant Pathol* 22:19–30 .
<https://doi.org/10.1111/mpp.13005>
- Ando S, Miyashita S, Takahashi H (2019) Plant defense systems against cucumber mosaic virus: lessons learned from CMV–*Arabidopsis* interactions. *J Gen Plant Pathol* 85:174–181 .
<https://doi.org/10.1007/s10327-019-00845-x>
- Baum S, Reimer-Michalski EM, Jaskiewicz MR, Conrath U (2020) Formaldehyde-assisted isolation of regulatory DNA elements from *Arabidopsis* leaves. *Nat Protoc* 15:713–733 .
<https://doi.org/10.1038/s41596-019-0277-9>
- Beckers GJM, Jaskiewicz M, Liu Y, Underwood WR, He SY, Zhang S, Conrath U (2009) Mitogen-activated protein kinases 3 and 6 are required for full priming of stress responses in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* 21:944–953 . <https://doi.org/10.1105/tpc.108.062158>
- Hajheidari M, Koncz C, Eick D (2013) Emerging roles for RNA polymerase II CTD in *Arabidopsis*. *Trends Plant Sci* 18:633–643 . <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2013.07.001>
- Harvey JJW, Lewsey MG, Patel K, Westwood J, Heimstädt S, Carr JP, Baulcombe DC (2011) An antiviral defense role of AGO2 in plants. *PLoS One* 6:e14639 .
<https://doi.org/doi:10.1371/journal.pone.0014639>
- Jaskiewicz M, Conrath U, Peterhänsel C (2011) Chromatin modification acts as a memory for systemic acquired resistance in the plant stress response. *EMBO Rep* 12:50–55 .
<https://doi.org/10.1038/embor.2010.186>

- Li B, Carey M, Workman JL (2007) The role of chromatin during transcription. *Cell* 128:707–719 .
<https://doi.org/10.1016/j.cell.2007.01.015>
- Liu Y, Zhang A, Yin H, Meng Q, Yu X, Huang S, Wang J, Ahmad R, Liu B, Xu ZY (2018) Trithorax-group proteins ARABIDOPSIS TRITHORAX4 (ATX4) and ATX5 function in abscisic acid and dehydration stress responses. *New Phytol* 217:1582–1597 .
<https://doi.org/10.1111/nph.14933>
- Pfluger J, Wagner D (2007) Histone modifications and dynamic regulation of genome accessibility in plants. *Curr Opin Plant Biol* 10:645–652 . <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2007.07.013>
- Pien S, Fleury D, Mylne JS, Crevillen P, Inzé D, Avramova Z, Dean C, Grossniklaus U (2008) Arabidopsis Trithorax1 dynamically regulates Flowering Locus C activation via histone 3 lysine 4 trimethylation. *Plant Cell* 20:580–588 . <https://doi.org/10.1105/tpc.108.058172>
- Reimer-Michalski EM, Conrath U (2016) Innate immune memory in plants. *Semin Immunol* 28:319–327 . <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.smim.2016.05.006>
- Wang M-B, Masuta C, Smith NA, Shimura H (2012) RNA silencing and plant viral diseases. *Mol Plant-Microbe Interact* 25:1275–1285 . <https://doi.org/http://dx.doi.org/10.1094 /MPMI-04-12-0093-CR>



橋本 将典(はしもと まさよし)

東京大学大学院農学生命科学研究科 生産・環境生物学専攻 栽培学研究室 助教
静岡大学農学部 生物資源科学科 准教授 (2022年4月~)

Twitter: @masayoshihs

経歴

2006年	東京大学農学部卒業
2011年	東京大学大学院農学生命科学研究科博士課程修了
2011~2015年	東京大学大学院農学生命科学研究科 植物医科学研究室 特任助教
2015~2018年	日本学術振興会特別研究員 PD
2016~2017年	マックスプランク植物育種学研究所 客員研究員
2018~2022年	東京大学大学院農学生命科学研究科 栽培学研究室 助教
2022年4月~	静岡大学農学部 生物資源科学科 准教授 (テニュアトラック)

研究テーマ

- ・植物とウイルスの相互作用
- ・植物圏微生物叢の機能と多様性

植物ウイルスに対する新たな劣性抵抗性遺伝子の発見と その作用メカニズム

橋本将典¹・煉谷裕太郎^{1,2}・桂馬拓也¹・薦田（萩原）優香^{1,3}・難波成任¹・山次康幸¹

Masayoshi Hashimoto, Yutaro Neriya, Takuya Keima, Yuka Hagiwara-Komoda,
Shigetou Namba and Yasuyuki Yamaji

Molecular Identification and Dissection of Novel Recessive Resistance Genes against Plant Viruses

Abstract

Plant viruses heavily rely on host cellular machineries such as translational regulation to propagate their genomes in host plant cells. An effective way for controlling viral diseases in plants is taking advantage of the host resistance machinery. Recessive resistance is attributed to a recessive gene mutation that encodes a host factor essential for viral infection. *Eukaryotic translation initiation factor (eIF) 4E* and *eIF4G* and their isoforms are the most common recessive resistance genes in several crop species, and they are effective against only a subset of viral species including potyviruses. In the last decade, we have identified recessive resistance genes *EXA1* and *nCBP* against potexviruses to obtain genetic resources other than eIF4Es for anti-viral breeding. Firstly, we found that *EXA1* is responsible for loss-of-susceptibility phenotype of an Arabidopsis mutant against a potexvirus, plantago asiatica mosaic virus (PIAMV). *EXA1* encodes a functionally unknown gene containing a GYF domain, which binds to proline-rich sequences, and eIF4E-binding motif. The eIF4E-binding motif in *EXA1* implied the involvement of eIF4E family proteins in potexvirus infection. Candidate gene approach suggested that among the plant eIF4E family genes tested, *nCBP* genes is required for PIAMV infection. *EXA1*- and *nCBP*-mediated recessive resistance impaired viral multiplication in the initially infected cells and spread into the adjacent uninfected cells, respectively, suggesting that both types of recessive resistance have distinct mechanism. Although further studies are still needed, our studies provide some insights into recessive resistance-based anti-viral breeding and plant-virus interactions.

¹ 東京大学大学院農学生命科学研究科 Graduate School of Agricultural and Life Sciences,
The University of Tokyo

² 宇都宮大学農学部 School of Agriculture, Utsunomiya University

³ 酪農学園大学農食環境学群 College of Agriculture, Food and Environment Sciences,
Rakuno Gakuen University

1. はじめに

植物ウイルスは、農作物の収量減や品質の低下を招き、農業生産に深刻な被害を引き起こしている。また、ヒトやモノの移動のグローバル化や地球温暖化を背景として、国内で未発生の植物病原体が海外から侵入するリスクがある (Tsuda and Sano, 2014)。特に植物ウイルスでは、ウメに発生したウメ輪紋ウイルス (plum pox virus) が記憶に新しい (Maejima et al, 2010)。植物ウイルスの防除は、ウイルスの感染を効果的に抑える薬剤が未だ存在しないため、媒介昆虫の防除や被害株の速やかな除去のほか、弱毒ウイルスや抵抗性品種の利用が有効な防除手段となっている。海外からの病害虫の侵入や未知の病原体による植物病の発生リスクに備えて、診断・防除技術の開発や抵抗性品種の開発に役立つ基礎的な知見を得ることが重要である。

ポテックスウイルスは、48の種が分類される植物ウイルスの一群である (Verchot, 2022)。ポテックスウイルスでは、ジャガイモ X ウイルス (potato virus X; PVX) がタイプ種とされているが、なかでも海外のトマト生産に大きな被害を起こしている pepino mosaic virus (PepMV) や、国内外の花弁生産で問題となっている plantago asiatica mosaic virus (PIAMV)、cymbidium mosaic virus (CymMV) などが農業生産上重要なウイルスとして知られている (Hanssen and Thomma, 2010; Koh et al, 2014; Komatsu et al, 2017)。ポテックスウイルスのゲノムは、およそ 6,000 塩基前後からなる単一の一本鎖 RNA から構成され、mRNA と同じ極性を持ち、単一の複製酵素 (RdRp)、3つの移行タンパク質 (TGBp1, TGBp2, TGBp3)、外被タンパク質 (CP) の 5つのタンパク質がコードされている。ポテックスウイルスは、5つのウイルスタンパク質を駆使して、他の植物ウイルスと同様に、多くの宿主タンパク質を利用して感染を成立させると考えられている (Hyodo and Okuno, 2014)。ポテックスウイルスに対する植物の抵抗性には、ジャガイモから単離された *Rx* 遺伝子とシロイヌナズナから単離された *JAX1* 遺伝子が知られている (Bendahmane et al, 1999; Yamaji et al, 2012)。*Rx* 遺伝子は PVX に対する CC-NBS-LRR 型の抵抗性遺伝子であり、PVX の増殖を強力に抑制することが知られている (Bendahmane et al, 1999)。*JAX1* は PIAMV に抵抗性を示すシロイヌナズナエコタイプから単離された、ジャカリン様レクチン型の抵抗性遺伝子である。*JAX1* はポテックスウイルスの複製酵素に結合し、複製を抑制することが明らかにされている (Sugawara et al, 2013; Yoshida et al, 2019)。*Rx* と *JAX1* はいずれも遺伝学的には優性 (顕性) の遺伝子であり、これらの遺伝子を介した抵抗性は「優性抵抗性」と呼ばれる。

優性遺伝子により規定される優性抵抗性に対して、「劣性抵抗性」は遺伝学的に劣性 (潜性) の遺伝子により獲得される。ウイルス抵抗性品種の約半数が劣性抵抗性であると言われている (Kang et al, 2005)。これまでに明らかになっている劣性抵抗性の原因遺伝子の多くは、翻訳開始因子をコードする *eukaryotic translation initiation factor 4E* (*eIF4E*) と *eIF4G*、およびそれらのアイソフォーム *eIFiso4E*、*eIFiso4G* である (Hashimoto et al, 2021)。しかし、翻訳開始因子を介した劣性抵抗性の多くは、ポティウイルスとその類縁のウイルスに限定されている。劣性抵抗性の大部分は、宿主因子を利用して増殖するという植物ウイルスの特性を利用したものであり、ウイルス感染に重要な宿主因子を人為的に改変することにより獲得される loss-of-susceptibility (感受性の喪失) と呼ばれる表現型と遺伝学的に同等である

(Hashimoto et al, 2016b). 従って、劣性抵抗性が見つかっていないウイルスに対して loss-of-susceptibility を示す変異体とその原因遺伝子を明らかにすれば、劣性抵抗性を利用したウイルス抵抗性育種やウイルス感染メカニズムの理解に役立つ可能性がある。本研究では、劣性抵抗性品種が発見されていないポテックスウイルスに対して、モデル植物であるシロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) を用いて新規の劣性抵抗性遺伝子を発見するとともに、それらの作用メカニズムの解明を試みた。

2. 新規劣性抵抗性遺伝子 *EXA1* の発見

ポテックスウイルスである PIAMV は、オオバコ (*Plantago asiatica*) から初めて発見されたことから命名されたが、ユリなどの花卉に感染して被害を起こすウイルスとして知られている (Komatsu et al, 2008)。PIAMV はシロイヌナズナに感染する性質を持ち、*GFP* 遺伝子を組み込んだ PIAMV-GFP を用いることによりシロイヌナズナで簡便にウイルスの感染を観察することができる (Minato et al, 2014)。

はじめに PIAMV-GFP とシロイヌナズナの組み合わせをモデルシステムとして、劣性抵抗性を示す変異体のスクリーニングを行った。シロイヌナズナ変異体は、野生型の Col-0 系統の種子をエチルメタンサルホン酸 (EMS) により変異源処理を行なうことにより作製した。約 10,000 個体に PIAMV-GFP を接種し、ウイルス感染が抑制される系統のスクリーニングを行った。その結果、劣性抵抗性を示す変異体 1 系統を特定した。マップベースクローニング法と次世代シーケンサーを用いた SNP の絞り込みにより原因遺伝子を特定し、機能未知遺伝子であったため *Essential for poteXvirus Accumulation 1 (EXA1)* と命名した (Hashimoto et al, 2016a)。*exal* 変異体では接種葉におけるウイルス感染が顕著に抑制された。*exal* 変異体から抽出した葉肉細胞プロトプラストを用いた解析などから、EXA1 抵抗性はウイルス感染のごく初期段階である翻訳あるいは複製の過程を阻害することが示唆された。また、*exal* 変異体では PIAMV だけでなく、同じポテックスウイルスである PVX と alternanthera mosaic virus (AltMV) の接種葉における感染が顕著に抑制された。

興味深いことに、EXA1 には GYF ドメインと呼ばれるプロリンリッチ配列に結合することが知られている機能ドメインに加えて、翻訳開始因子である eIF4E 結合モチーフが推定された。また、EXA1 オルソログは単子葉植物であるイネを含む幅広い植物種にコードされており、さらにタンパク質の一次構造では類似しないが、哺乳類の GIGYF2 と同様の機能ドメイン構造を持つことが分かった。以上のことから、ウイルス感染における EXA1 の機能が広範な植物種において幅広く保存されることや、EXA1 と既知の劣性抵抗性遺伝子である *eIF4E* との関係が予想された。なお、機能的な保存性については、シロイヌナズナだけでなく、*Nicotiana benthaminana* およびトマト (*Solanum lycopersicum*) においても EXA1 が劣性抵抗性遺伝子として機能することが明らかにされている (Yusa and Neriya et al, 2019)。

3. 翻訳開始因子遺伝子 *nCBP1* による劣性抵抗性の発見

上述の通り、シロイヌナズナで劣性抵抗性変異体から原因遺伝子として EXA1 の構造が明らかになると、ウイルス感染における EXA1 の機能解明を目指す上で、eIF4E 結合モチー

フの存在や GIGYF2 との類似性が特に目を引いた。GIGYF2 はマウスの受容体型チロシンキナーゼに結合するアダプタータンパク質 GRB10 に結合する因子として単離され (Giovannone et al, 2003), 翻訳開始因子の一つである 4EHP と結合し翻訳の制御に関わることが報告されていた (Morita et al, 2012)。さらに調べて見ると, 哺乳類の 4EHP は, 植物が持つ翻訳開始因子のなかでも劣性抵抗性遺伝子としては当時知られていなかった *nCBP* と類似することが分かった (Joshi et al, 2005)。

そこで, ポテックスウイルスに対しても翻訳開始因子が劣性抵抗性に関与する可能性があるのではないかと考え, 植物の eIF4E ファミリー遺伝子 (*eIF4E*, *eIFiso4E*, *nCBP*) を欠損したシロイヌナズナ変異体に PIAMV の接種を行った。その結果, *ncbp* 変異体のみで PIAMV の感染が低下することを見出した (Keima et al, 2017)。*ncbp* 変異体では, 葉肉細胞プロトプラストにおける PIAMV の増殖は野生型 Col-0 と同等であり, PIAMV-GFP の接種葉における GFP 蛍光の拡がりや抑制されたことから, 細胞間移行が遅れることが示唆された。さらに *ncbp* 変異体では接種葉において移行タンパク質である TGBp2 と TGBp3 の蓄積が低下していた。さらに *nCBP* 抵抗性は, ポテックスウイルスである AltMV および CymMV, 近縁なロライウイルス (*lolium latent virus*), カルラウイルス (*potato virus M*) の感染を低下させた。以上のことから, *nCBP* 抵抗性は PIAMV の移行タンパク質の蓄積を低下させることにより PIAMV の感染拡大を遅延させることが示唆された。

これまでに PIAMV 抵抗性のシロイヌナズナ変異体の単離をきっかけにして, 複数のポテックスウイルスの感染を阻害する新規の劣性抵抗性遺伝子として *EXA1* および *nCBP* を見出すとともに, それらのウイルス感染阻害の作用点を絞り込んできた。研究開始当初は, *EXA1* と *nCBP* はウイルス感染において機能的な関係を持つことが想像されたが, 研究を進めるなかで予想に反して *EXA1* と *nCBP* の両者はいずれも PIAMV の感染に必要な宿主因子ではあるが, 作用点は異なることが示唆された。

4. おわりに

ポテックスウイルスに対する劣性抵抗性遺伝子として特定された *EXA1* および *nCBP* は, いずれもシロイヌナズナだけでなく様々な植物種においてオルソログを見出すことができる。このことから, ゲノム編集技術を利用してこれらの遺伝子を改変することにより, 様々な作物において劣性抵抗性による非遺伝子組換えのポテックスウイルス抵抗性品種の開発が可能になると期待している。実際に, キャッサバ (*Manihot esculenta*) において *nCBP* 遺伝子をゲノム編集技術 CRISPR-Cas9 で破壊することにより, ポティウイルスに近縁なイボモウイルスである cassava brown streak virus に対して抵抗性になることが報告された (Gomez et al, 2019)。このように植物ウイルスの宿主因子に関する基礎的な研究は, ゲノム編集技術の発展により, ウイルス抵抗性育種への応用の可能性がさらに広がったと言える。しかし一方で, 宿主因子に関する基礎的な研究の大部分は, 環境が制御された実験室内での現象の観察にとどまっているため, 抵抗性育種への応用は一筋縄ではいかない可能性がある。

また今後, ポテックスウイルスの感染メカニズムを理解するため, ウイルス感染における *EXA1* および *nCBP* の機能をさらに詳細に調べる必要がある。また, ウイルス感染だけで

なく、EXA1 および nCBP が持つ本来の機能を明らかにすることも重要である。EXA1 が劣性抵抗性遺伝子として報告されたのと同時期に、EXA1 が細菌や糸状菌に対する植物の免疫応答や mRNA の安定性に関わるという報告が相次いでなされた(Matsui et al, 2017; Wu et al, 2017; Scheer et al, 2021)。これまでの結果からは、ポテックスウイルスに対する EXA1 抵抗性に植物の免疫応答は関与しないと考えているが(Hashimoto et al, 2016a), さらなる検証が必要である。さらに、EXA1 の改変は植物の免疫応答などに副次的な影響を起し、抵抗性育種の妨げとなる可能性がある。このようなことから、EXA1 および nCBP に限らず植物ウイルスの宿主因子は様々な角度からその機能を明らかにすることが重要である。

謝辞

本研究の実施にあたり、翻訳開始因子のシロイヌナズナ変異体は Karen S. Browning 教授 (テキサス大学オースティン校) より分譲いただいた。小松健准教授 (東京農工大学), 前島健作准教授 (東京大学), 東京大学植物病理学研究室および植物医科学研究室諸氏には、多大な御助言・御支援をいただいたことを深く御礼申し上げます。

引用文献

- Bendahmane A, Kanyuka K, Baulcombe DC. 1999. The Rx gene from potato controls separate virus resistance and cell death responses Plant Cell 11: 781-792.
- Giovannone B, Lee E, Laviola L, Giorgino F, Cleveland KA, Smith RJ. 2003. Two novel proteins that are linked to insulin-like growth factor (IGF-I) receptors by the Grb10 adapter and modulate IGF-I signaling. J Biol Chem 278: 31564-31573.
- Gomez MA, Lin ZD, Moll T, Chauhan RD, Hayden L, Renninger K, Beyene G, Taylor NJ, Carrington JC, Staskawicz BJ, Bart RS. 2019. Simultaneous CRISPR/Cas9-mediated editing of cassava eIF4E isoforms nCBP-1 and nCBP-2 reduces cassava brown streak disease symptom severity and incidence. Plant Biotechnol J 17: 421-434.
- Hanssen IM, Thomma BP. 2010. Pepino mosaic virus: a successful pathogen that rapidly evolved from emerging to endemic in tomato crops. Mol Plant Pathol 11: 179-189.
- Hyodo K, Tetsuro Okuno T. 2014. Host factors used by positive-strand RNA plant viruses for genome replication. J Gen Plant Pathol 80: 123-135.
- Joshi B, Lee K, Maeder DL, Jagus R. 2005. Phylogenetic analysis of eIF4E-family members. BMC Evol Biol 5: 48.
- Kang BC, Yeam I., Jahn MM. 2005. Genetics of Plant Virus Resistance. Annu Rev Phytopathol 43: 581-621.
- Keima T, Hagiwara-Komoda Y, Hashimoto M, Neriya Y, Koinuma H, Iwabuchi N, Nishida S, Yamaji Y, Namba S. 2017. Deficiency of the eIF4E isoform nCBP limits the cell-to-cell movement of a plant virus encoding triple-gene-block proteins in Arabidopsis thaliana. Sci Rep 7:39678.
- Koh KW, Lu HC, Chan MT. 2014. Virus resistance in orchids. Plant Sci 228:26-38.

- Komatsu K, Yamaji Y, Ozeki J, Hashimoto M, Kagiwada S, Takahashi S, Namba S. 2008. Nucleotide sequence analysis of seven Japanese isolates of *Plantago asiatica* mosaic virus (PIAMV): a unique potexvirus with significantly high genomic and biological variability within the species. *Arch Virol* 153: 193-198.
- Komatsu K, Yamashita K, Sugawara K, Verbeek M, Fujita N, Hanada K, Uehara-Ichiki T, Fuji SI. 2017. Complete genome sequences of two highly divergent Japanese isolates of *Plantago asiatica* mosaic virus. *Arch Virol* 162: 581-584.
- Hashimoto M, Neriya Y, Keima T, Iwabuchi N, Koinuma H, Hagiwara-Komoda Y, Ishikawa K, Himeno M, Maejima K, Yamaji Y, Namba S. 2016a. EXA1, a GYF domain protein, is responsible for loss-of-susceptibility to *plantago asiatica* mosaic virus in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* 88: 120-131.
- Hashimoto M., Neriya Y., Yamaji Y., Namba S. 2016b. Recessive Resistance to Plant Viruses: Potential Resistance Genes Beyond Translation Initiation Factors. *Front Microbiol* 7: 1695.
- Hashimoto M, Maejima K, Yamaji Y, Namba S. 2021. Plant resistance to viruses: natural resistance associated with recessive genes. In: Bamford D, Zuckerman M (ed) *Encyclopedia of Virology* 4th Edition, pp 69-80, Elsevier.
- Maejima K, Hoshi H, Hashimoto M, Himeno M, Kawanishi T, Komatsu K, Yamaji Y., Hamamoto H, Namba S. 2010. First report of plum pox virus infecting Japanese apricot (*Prunus mume* Sieb. et Zucc.) in Japan. *J Gen Plant Pathol* 76:229-231.
- Matsui H, Nomura Y, Egusa M, Hamada T, Hyon GS, Kaminaka H, Watanabe Y., Ueda T., Trujillo M, Shirasu K, Nakagami H. 2017. The GYF domain protein PSIG1 dampens the induction of cell death during plant-pathogen interactions. *PLoS Genet* 13:e1007037.
- Minato N., Komatsu K., Okano Y., Maejima K., Ozeki J., Senshu H., Takahashi S., Yamaji Y., Namba S. 2014. Efficient foreign gene expression in planta using a *plantago asiatica* mosaic virus-based vector achieved by the strong RNA-silencing suppressor activity of TGBp1. *Arch Virol* 159: 885-896.
- Morita M, Ler LW, Fabian MR, Siddiqui N, Mullin M, Henderson VC, Alain T, Fonseca BD, Karashchuk G, Bennett CF, Kabuta T, Higashi S, Larsson O, Topisirovic I, Smith RJ, Gingras AC, Sonenberg N. 2012. A novel 4EHP-GIGYF2 translational repressor complex is essential for mammalian development. *Mol Cell Biol* 32: 3585-3593.
- Scheer H, de Almeida C, Ferrier E, Simonnot Q, Poirier L, Pflieger D, Sement FM, Koechler S, Piermaria C, Krawczyk P, Mroczek S, Chicher J, Kuhn L, Dziembowski A, Hammann P, Zuber H, Gagliardi D. 2021. The TUTase URT1 connects decapping activators and prevents the accumulation of excessively deadenylated mRNAs to avoid siRNA biogenesis. *Nat Commun* 12 :1298.
- Sugawara K., Shiraiishi T., Yoshida T., Fujita N., Netsu O., Yamaji Y., Namba S. 2013. A replicase of Potato virus X acts as the resistance-breaking determinant for JAX1-mediated resistance. *Mol Plant Microbe Interact* 26: 1106-1112.

- Tsuda S., Sano T. 2014. Threats to Japanese agriculture from newly emerged plant viruses and viroids. *J Gen Plant Pathol* 80: 2-14.
- Verchot J. 2022. Potato virus X: A global potato-infecting virus and type member of the Potexvirus genus. *Mol Plant Pathol* 23: 315-320.
- Wu Z, Huang S, Zhang X, Wu D, Xia S, Li X. 2017. Regulation of plant immune receptor accumulation through translational repression by a glycine-tyrosine-phenylalanine (GYF) domain protein. *Elife* 6: e23684.
- Yamaji Y, Maejima K, Ozeki J, Komatsu K, Shiraishi T, Okano Y, Himeno M, Sugawara K, Neriya Y, Minato N, Miura C, Hashimoto M, Namba S. 2012. Lectin-mediated resistance impairs plant virus infection at the cellular level. *Plant Cell* 24:778-93.
- Yoshida T, Shiraishi T, Hagiwara-Komoda Y, Komatsu K, Maejima K, Okano Y, Fujimoto Y, Yusa A, Yamaji Y, Namba S. 2019. The Plant Noncanonical Antiviral Resistance Protein JAX1 Inhibits Potexviral Replication by Targeting the Viral RNA-Dependent RNA Polymerase. *J Virol* 93:e01506-18.
- Yusa A, Neriya Y, Hashimoto M, Yoshida T, Fujimoto Y, Hosoe N, Keima T, Tokumaru K, Maejima K, Netsu O, Yamaji Y, Namba S. 2019. Functional conservation of EXA1 among diverse plant species for the infection by a family of plant viruses. *Sci Rep* 2019 9: 5958.



キッコーマン（株）研究開発本部
新子 泰規

経歴

1995年 弘前大学農学部卒業
1997年 北海道大学大学院農学研究科修士課程修了
1997年 日本デルモンテ（株）研究開発部
2010年 キッコーマン（株）研究開発本部（出向；現在に至る）

研究分野の内容

- ・弱毒ウイルスワクチンの開発・製造
- ・非虫媒性ウイルスワクチンの開発
- ・潜性（劣性）変異とウイルス抵抗性の研究

トマトの新たなウイルス抵抗性アレル

新子泰規*・川久保彩花**・Wikum Harshana Jayasinghe**・Joon Kwon**・Hangil Kim**・
小西千秋*・山田哲也**・増田税**・中原健二**

Hiroki Atarashi, Ayaka Kawakubo, Wikum Harshana Jayasinghe, Joon Kwon, Hangil Kim, Chiaki
Konishi, Tetsuya Yamada, Chikara Masuta and Kenji Nakahara

Renewed virus-resistance alleles in tomato

Abstract

Tomato is one of the major globally grown crops; annual global production exceeds 160 million tons, accounting for more than 10% of global vegetable production. The breeding of resistant crops is important for sustainable tomato production. Eukaryotic translation initiation factors, including eIF4E, are susceptibility factors for viral infection in host plants. Here, we artificially mutated the eIF4E1 gene on chromosome 3 of a commercial cultivar of tomato by using CRISPR/Cas9. We obtained three alleles, comprising two deletions of three and nine nucleotides (3DEL and 9DEL) and a single nucleotide insertion (1INS). Inoculation tests with potato virus Y (PVY) showed a significant reduction in susceptibility to the N strain (PVY^N), but not to the ordinary strain (PVY⁰), in 1INS plants. 9DEL among three artificial alleles had a deleterious effect on infection by cucumber mosaic virus (CMV). When CMV was mechanically inoculated into tomato plants and viral coat protein accumulation was measured in the non-inoculated upper leaves, the level of viral coat protein was significantly lower in the 9DEL plants than in the parental cultivar. Viral aphid transmission test showed that 9DEL plants were reduced transmissibility compared with the parental control in laboratory tests. Our findings suggest that artificial gene editing can introduce additional virus resistances into commercial cultivars of various crops, and that edited eIF4E alleles confer an alternative way to manage CMV in tomato fields.

* キッコーマン (株) 研究開発本部 Kikkoman Corporation, Research & Development Div,
Chiba 278-0037, Japan

** 北海道大学大学院農学研究院 Research Faculty of Agriculture, Hokkaido University,
Sapporo 060-8589, Japan

1. はじめに

ラテンアメリカ原産のトマト (*Solanum lycopersicum* L.) はナス科に属する園芸作物である。ナス科は他にジャガイモ (*Solanum tuberosum* L.)、トウガラシ (*Capsicum*)、タバコ (*Nicotiana tabacum* L.) など農業上重要な作物を含む約 100 属 2500 種で構成される (Olmstead et al., 2008)。豊富な栄養素をもつトマトは世界の主要作物の 1 つとして世界での年間生産量は 1 億 6000 万トンを超え、野菜生産量の 10%以上を占めている。トマトはウイルス・細菌・真菌・線虫などの多種多様な病原体によって引き起こされる 200 以上もの病気に罹患しやすい (Lukyanenko, 1991)。病害防除には農薬の使用も有効ではあるが、植物ウイルスに効果がある薬剤はなく、栽培者にとっては費用や負担がかかることが多いため、抵抗性作物の育種は持続可能な作物生産にとって重要となる。トマトでは様々な抵抗性遺伝子が発見され、そのいくつかは育種に利用されているが (Hanson et al., 2016)、抵抗性が不十分な場合や、実用化されていない抵抗性も数多い。日本デルモンテ (株) 及びキッコーマングループはこれまで、国内外で加工用トマトの契約栽培を進めてきた。そのなかで 1980 年代、キュウリモザイクウイルス (cucumber mosaic virus, CMV) が国内外で大発生したこと、当時はナス科には CMV 抵抗性が見つかっていなかったこともあり、我々は弱毒 CMV ワクチンを開発した (Sayama et al., 1993)。現在でも加工トマト及び自社ブランドの家庭菜園用販売苗に利用している。一方近年、トマトのウイルス病害として様々なエマージングウイルスが出現している (Hanssen et al., 2010)。国内では、トマト黄化葉巻ウイルス (tomato yellow leaf curl virus, TYLCV)、世界的には、TYLCV を含むベゴモウイルス属のウイルス、tomato brown rugose fruit virus (ToBRFV) などの新規のトバモウイルス属のウイルスが挙げられる (Ueda et al., 2004 ; Luria et al., 2017)。中でも TYLCV を含むベゴモウイルス属のウイルスの発生地域は地球規模の温暖化に伴い、媒介虫の生息地拡大とともに世界中に広がっている (EFSA Journal 2013)。現在 TYLCV の抵抗性遺伝子として利用されている Ty-3 等は発症を抑えるもののウイルス感染自体は許容する (Torre et al., 2018)。このため、新たな付加価値をもつ抵抗性を開発するため、トマトの潜性 (劣性) 変異体の作製を試みた。本稿では、開発過程において予想外に認められた eIF4E 変異と CMV 抵抗性を中心にその他の抵抗性についても紹介する。

2. eIF4E1 変異体の作出

顕性 (優性) 抵抗性と呼ばれる抵抗性遺伝子は対象作物の野生種より導入することが一般的であり、半世紀ほどの研究で野生種と栽培種の交雑系統遺伝資源は多数作出されているが、実際に抵抗性を導入した実用栽培種を作出するのは容易ではない。一方で、潜性の抵抗性も見つかってきている (Gallois et al., 2018)。少数の遺伝子しかコードしない植物ウイルスは、感染・増殖・全身移行等の過程を宿主の植物の遺伝子や生命システムに依存している。これらウイルスが依存する宿主植物の遺伝子は感受性因子と呼ばれ、その変異は時として潜性の抵抗性をもたらすことになる。そこで、放射線や EMS (エチルメタンサルホン酸) 処理で感受性因子に変異を導入することで栽培種に直接、抵抗性を付与することが試みられている。しかしながら、このような無作為の変異導入法では目的の変異を特定し選抜するために膨大な人手・労力及び時間がかかることが最大の試練であった。2012 年に開発された細菌の免疫システム CRISPR を利用した遺伝子編集は植物で標的変異導入を

可能にする画期的なシステムであり、育種のパラダイムシフトに貢献することになった (Jinek et al., 2012)。本研究では、遺伝子編集により新たな抵抗性アレルを開発することを目標とし、はじめに編集でウイルス抵抗性が付与できるかのテスト用として *eIF4E1* 遺伝子を選択した。

キャップ結合タンパク質で翻訳に関わる因子群の律速となる翻訳開始因子 eIF4E は翻訳だけでなくウイルスのゲノム複製や移行にも関与しており、加えて複数の植物種でウイルス抵抗性の *eIF4E* 自然変異体が発見されていることから、植物の抵抗性戦略のひとつではないかと推察される。そこで、我々は自社の大玉トマト品種 S8 又は固定種マニーメーカーを用いて、トマト第 3 染色体上の *eIF4E1* (Soly03g005870) のエクソン内に遺伝子編集ツール CRISPR/Cas による変異導入を試みた。CRISPR と標的となるガイド RNA 認識配列 20 塩基を CRISPR システム用のバイナリーベクターに組み込み、当該バイナリーベクターを用いてアグロバクテリウムを形質転換した。

さらに、形質転換アグロバクテリウム菌をトマトの外植片に接種し、形質転換トマト組織の培養及び形質転換体の再分化を行った。得られた形質転換/再生個体から DNA を抽出し、シーケンス等の解析の結果、標的 *eIF4E1* 内で 1 塩基が挿入もしくは 1 塩基が欠損したノックアウト (KO) 型変異や 3 塩基または 9 塩基が欠損したインフレーム型の変異など、*eIF4E1* アレルにいくつかの変異バリエーションが認められた (図 1)。

これらの変異体を大きく生育させ、自家受粉によって種子を回収し、次世代 (T1) もしくはさらに次々世代 (T2) において、両アレルが 1 塩基挿入 (1 INS) あるいは 3 塩基欠損 (3 DEL) あるいは 9 塩基欠損

(9 DEL) でホモ接合体になった系統を得た。また、自家受粉で変異をホモに固定する過程で、Cas9 などバイナリーベクターから移入された T-DNA 部分を含まない (つまり組換え遺伝子が除かれた) Null segregant 後代種子を選抜した。

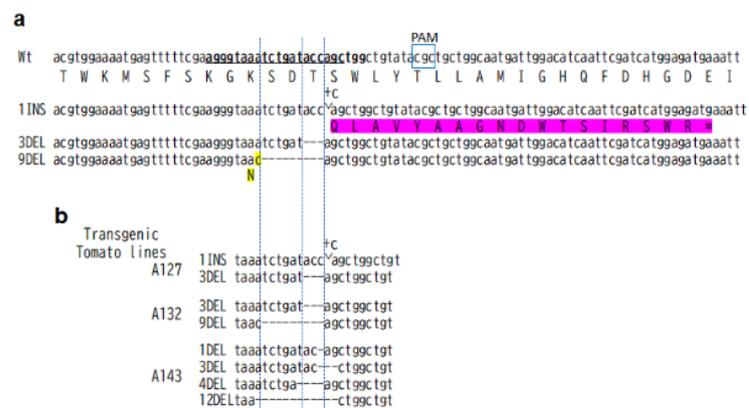
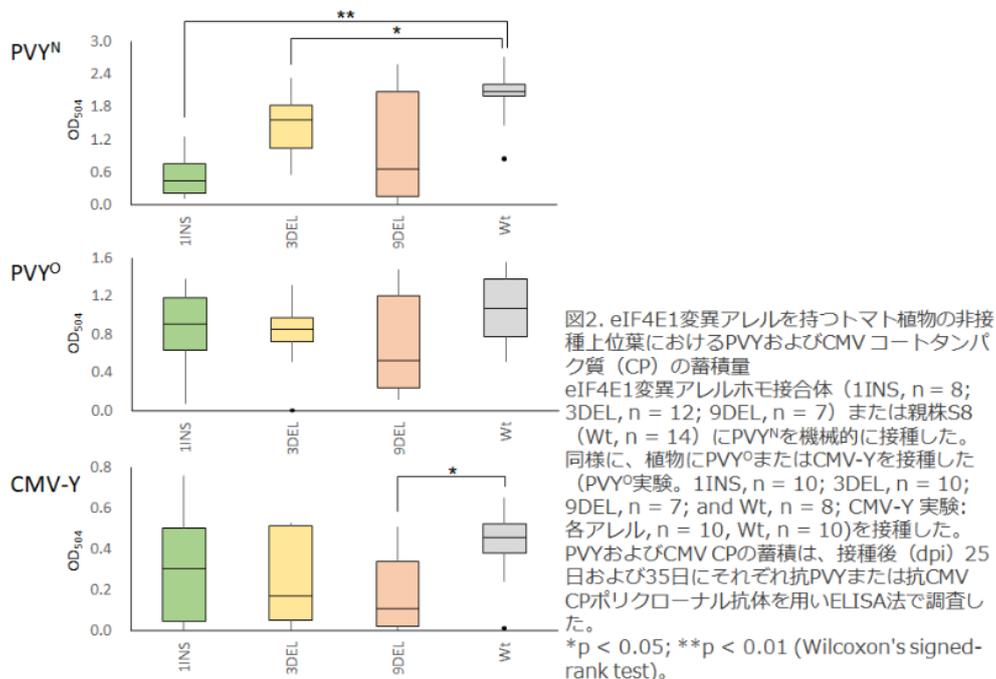


図1. CRISPR/Cas9で人工的に作成したeIF4E1アレル
(a) 野生型 (Wt) 配列と新規アレルの配列。太字の下線はガイドRNA (gRNA) の標的配列を示す。囲み枠内はプロトスペーサー隣接モチーフ (PAM) 配列。1塩基挿入型 (1INS)、3塩基欠損型 (3DEL)、9塩基欠損型 (9DEL) の3つのアレルが得られている。1INS (矢印と+Cでマーク) は144番目のコドンの直後に-1フレームシフトを引き起こし、eIF4E1の翻訳にスレオニンを割り当てる。この結果、フレームシフトによって伸長したペプチド (紫でハイライト) が早期に切断される。3DELアレルから翻訳されたタンパク質は144番目のコドンにコードされるスレオニンが欠失し、9DELアレルから翻訳されたタンパク質は1つのアミノ酸置換 (Xコドンにおけるリジンからアスパラギン; 黄色でハイライト) および3つのアミノ酸残基 (セリン、アスパラギン酸、スレオニン) の欠失を持つ。
(b) CRISPR/Cas9コンストラクトを保有する3つのトランスジェニックトマト植物におけるeIF4E1遺伝子の変異をアンプリコンシーケンスにより調査した。上記3つのアレルに加え、1、4、12ヌクレオチド欠失を有するアレル (1DEL、4DEL、12DEL) が検出された。

3. 機械的接種による PVY 抵抗性の評価

eIF4E ファミリーの変異体はポテウイルス科のウイルスに対する抵抗性が報告されていることから (Sato et al., 2005)、前述3つの eIF4E1 変異ホモライン 9DEL、3DEL、1INS のトマト実生苗 (3-5 本葉期) にジャガイモ Y ウイルス (potato virus Y, PVY) の N 系統及び O 系統 (PVY^N、PVY^O) をそれぞれ機械的接種した。対照試験区には、eIF4E1 を編集していない野生型 (Wild type, Wt) 元親品種 S8 の実生苗を用いた。接種後、発症を観察しながら、25 日後から 35 日後の間で非接種上位葉をサンプリングし、ウイルスコートタンパク (CP) 蓄積について、抗抗体を使用した Double antibody sandwich-enzyme linked immunosorbent assay (DAS-ELISA) 法によって評価した。その結果、PVY^N の接種試験では、Wt に比べて eIF4E1 変異トマトのほうが上位葉のウイルス CP の蓄積量は低かった (図 2)。なかでも 1INS トマトが顕著に低くなっており、3DEL トマトも



有意に低かったが、9DEL トマトでは有意ではなかった。1INS トマトはフレームシフトを起こしていると推測され、eIF4E1 の loss-of-function が抵抗性に寄与していると考えられる。一方で、PVY^O の接種試験ではウイルス CP の蓄積は Wt と各変異体との差はあまりなかった。つまり、PVY^N は感染に eIF4E1 を必要としているが、PVY^O は必ずしも必要としないということが言える。このような現象は以前にも報告されており、一般に植物は eIF4E とそのアイソフォームのホモログ遺伝子を持っており、ポテウイルスのメンバーは必ずしも単一の eIF4E を使用するわけではない。先行研究では PVY は感染に主に eIF4E1 を使用するが、多くの PVY は eIF4E1 がノックアウトやノックダウンされた場合、eIF4E2 を代わりに使用することが分かっている。本研究でも PVY^O は代わりに eIF4E2 を使うことができ、PVY^N は eIF4E1 を特異的に使用して感染を促進していると推察された。

4. 機械的接種と虫媒伝染による CMV 抵抗性の評価

さらに eIF4E の変異体について、CMV に対する抵抗性も検証した。先行研究でシロイヌナズナ eIF4E の loss-of-function 変異体である *cum1* は Wt よりも CMV の感受性が低下していることが報告されていたからである (Yoshii et al., 2004)。一方で、キュウリの eIF4E 変異体の研究では CMV への感受性が Wt と同等であるとの報告もある (Chandrasekaran et al., 2016)。PVY の時と同様に、編集で作られた 3 つの eIF4E 変異ホモアレルトマトと対照 Wt トマトの実生苗に CMV-Y 系統を機械的接種した。その結果、Wt と 1INS および 3DEL トマトでは接種実生苗のほとんどが発病した。9DEL トマトの 1/3 は発病せず、発病株についても発病は他の接種実生苗に比べ遅延した。抗 CMV CP 抗体を用いた ELISA による非接種上葉におけるウイルス CP 蓄積の解析でも、9DEL トマトが Wt や他のアレルを持つトマトに比べて CP レベルが有意に低いことが確認された (図 2)。さらに、9DEL トマトの CMV 抵抗性の性状について解析を進めた。9DEL トマトと Wt トマトに CMV-Y を機械的接種し、抗 CMV CP 抗体を用いてトマト接種葉におけるウイルス感染のティッシュブロットニングを行った。その結果、明らかに 9DEL トマトのほうが Wt トマトに比べ、接種葉あたりの感染エリアが低かった (図 3a, 3b)。感染点サイズは 9DEL トマトと Wt 両者に差がなか

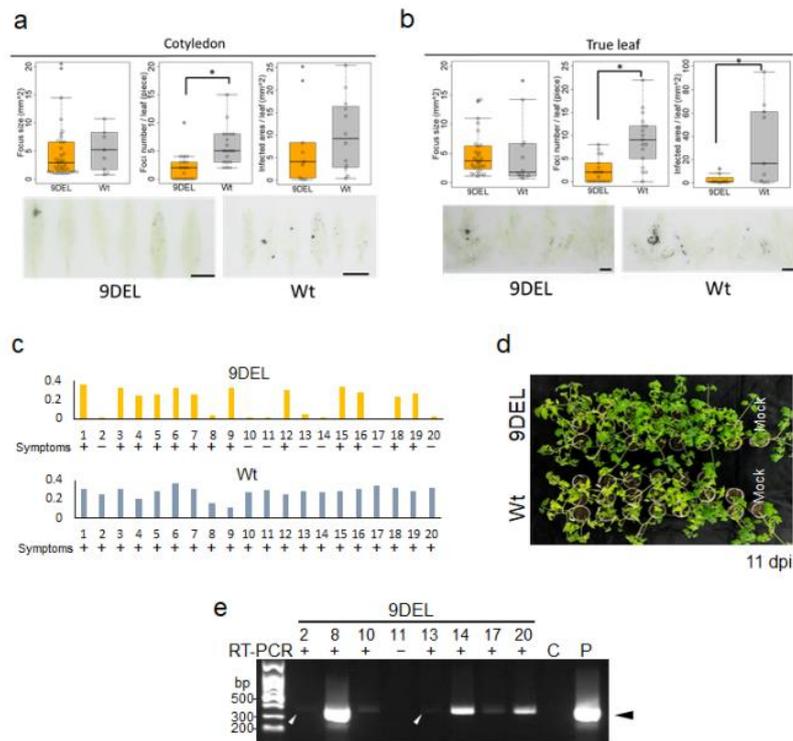


図3. 9DELトマトにおけるCMV-Yに対する抵抗性の詳細な検討
 接種した子葉 (A) および本葉 (B) における感染焦点を抗CMV CP抗体を用いたmicroperforated leaf blottingにより検出した。(a) 9DELトマトの子葉とWt株の子葉の間で、焦点サイズ (9DEL, n = 9; 親品種 [Wt], n = 37, 葉当たりの焦点数 (9DEL, n = 18; Wt, n = 19), 葉当たりの感染面積 (9DEL, n = 9; Wt, n = 12)を比較した。(b) 9DELトマトの本葉とWtの本葉の間で、焦点サイズ (9DEL, n = 12; Wt, n = 28)、葉当たりの焦点数 (9DEL, n = 17; Wt, n = 17)、葉当たりの感染面積 (9DEL, n = 7; Wt, n = 9)を比較した。データは箱ひげ図および個々のデータ点として示した。* $p < 0.05$ (スチューデントのt-検定)。(c) 34dpiにおける上位葉のCMV CP蓄積のELISAの結果。データは生データから対応する健康な植物におけるレベルを差し引くことによって補正。各遺伝子型について20個の植物についてのデータを表示する。(d) 11dpiの9DELトマト及びWtトマトの状態。症状は上部の葉の黄化である。(e) 無症状9DELトマト8本の上位葉におけるCMVゲノムRNAのRT(逆転写)-PCR分析。対照試料は健全[C]及び感染[P]トマトの葉から調製した。矢印はRT-PCRで予想されるバンドの位置を示す。

ったことから、これは9DEL 変異の感染点の数が大きく減少したことによるものと考えられる。全身感染についても上記のように1/3の9DEL トマトは無症状であった(図3c、3d)。これらの無症状の9DEL アレルではELISA 分析でも上位葉にウイルスの蓄積は殆ど見られなかったが、RT-PCR 分析ではCMV ゲノムが検出された(6/7 個体で検出、図3e)。これらの結果、機械的接種では9DEL トマトは接種葉において一定のCMV 感染を抑制するものの、全身感染は低レベルながら許容していることが示された。さらに、9DEL トマトとWt トマト実生苗を用いてCMV のアブラムシ伝染に対する抵抗性の評価を行った。CMV-O 系統を感染させた *N. tabacum* からウイルスを獲得させたモモアカアブラムシを用いて反復試験を行った結果、CMV のアブラムシ伝染率はWt トマトに比べて、9DEL トマトでは伝染率が半分のレベルに低下した(図4)。またRT-PCR 分析の結果では、無症状の9DEL トマトではウイルスゲノムが検出されず、9DEL アレルが部分的に耐性ではなく免疫性を付与していることを確認した。

5. 9DEL 変異アレルによるCMV 抵抗性メカニズム

9DEL アレルによるCMV 抵抗性は、これまで知られているeIF4E ノックアウト変異によるウイルス抵抗性メカニズム、すなわちウイルス感染に必要な感受性因子eIF4E が変異で失われることで付与される抵抗性とは考えづらい。ノックアウト変異である1INS トマトがCMV 抵抗性を示さなかったため、先行研究もこれを支持している。トマトは二つのeIF4E 遺伝子、eIF4E1 とeIF4E2 を持ち、両方をRNA

サイレンシングで同時にノックダウンすると、eIF4E1 だけをサイレンシングした場合に比べてより広範囲のポテウイルス属メンバーに対して抵抗性を付与したが、CMV、トマト黄化えそウイルス、タバコモザイクウイル

スなどの他のウイルスに対しては抵抗性を付与しなかった(Mazier et al.,2011)。一方でトマトのeIF4E1 遺伝子の自然変異アレルである *pot1* がトマトの野生種から同定されている(Ruffel et al., 2005)。*pot1* アレルは4 アミノ酸置換を伴うものの機能的なeIF4E タンパク質を発現すると推測され、eIF4E1 とeIF4E2 のダブルノックアウトトマトと同様、eIF4E1 ノックアウトトマトよりも広範囲のポテウイルス属のメンバーに抵抗性を示していた。(Gauffier et al., 2016 ; Bastet et al., 2017)。これは *pot1* タンパクがポテウイルス感染に機能しないだけでなく、ドミナントネガティブにeIF4E2 の発現も抑制することで高い抵抗性スペクトラムを獲得していると示唆された。そのため、我々も9DEL から発現する変異eIF4E1 タンパク質がCMV 感染を阻害する優性効果の可能

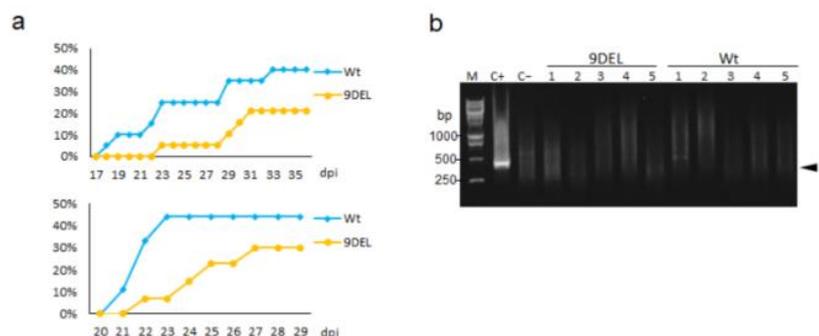


図4. 非変異株(Wt)と比較した9DELトマトにおけるCMVのアブラムシ感染
(a) CMV-Oは感染したタバコ植物から9DELトマト (n = 19) またはWtトマトへ感染させた。2つの独立した実験について、経時的に症状のある葉を持つ植物の割合を示している。(b) 症状を示さなかった9DELおよびWtトマトの各5個体において、CMVゲノムRNAを検出するRT-PCRを実施した。C+, 症状を示す对照植物; C-, 健常なトマト植物。M, DNAサイズマーカー。

性を推察したが、実際には *pot1* アレルをもつトマトが CMV 抵抗性を示さないことを確認した。9DEL トマトは前述のように PVY 抵抗性を示さないことから、9DEL から発現する変異 eIF4E1 タンパク質の効果は *pot1* の優性効果とは異なることが考えられた。

そこで我々は、9DEL から発現する変異 eIF4E1 タンパク質が直接 CMV タンパク質に結合して、その機能を阻害することで CMV 抵抗性を付与している可能性について検討することにした。CMV は PVY と異なり、eIF4E と結合することが知られる VPg を持たないため、もし 9DEL タンパクが CMV タンパク質に直接結合するとすれば、その CMV タンパク質を探索する必要がある。CMV 接種試験では CMV の全身移行後のウイルス CP 量が減少していたことから、酵母ツーハイブリッドシステム (Y2H) を用いて、全身移行に関わる CP、移行タンパク (MP) 及び 2b タンパクとの結合を検証した。その結果、9DEL および野生型 eIF4E1 は CMV の CP 及び MP とは結合せず、2b タンパクと結合することがわかった。また、スプリットルシフェラーゼ相補結合法により 9DEL および野生型 eIF4E1 と 2b が植物細胞内でも結合することを確認した。CMV の 2b は他のウイルスタンパク質と同様に多機能タンパク質であるが、ウイルス感染増殖のために最も重要な働きは RNA サイレンシングの主要な因子 AGO1、RDR1 や siRNA と結合して不活化することで RNA サイレンシングを抑制 (RSS) することである。そこで、9DEL が 2b に結合して、2b の RSS 活性を阻害するのかどうか検証した。2b の RSS 活性は、*N. benthamiana* 葉へのアグロインフィルトレーションによる一過発現解析で確認できる。9DEL 及びトマト野生型の eIF4E1 を含む各タンパク質のコード領域を 35S プロモーター下に組込んだバイナリーベクターを準備し、2b タンパク質と 9DEL もしくは野生型 eIF4E1 タンパク質を共発現して RSS 活性を比較したところ、9DEL がコードする変異タンパクを共発現すると 2b の RSS 活性が弱くなったが、野生型 eIF4E1 タンパクは 2b の RSS 活性に影響しなかった。この結果から 9DEL による CMV 抵抗性は 9DEL アレルから発現する変異 eIF4E1 タンパク質が CMV の 2b タンパクに結合し RSS 活性を阻害することで RNA サイレンシング防御が増強され、抵抗性が付与されていることが示唆された。

6. 9DEL 変異アレルのフェノタイプ調査

9DEL アレルのトマトと Wt の品種 S8 を隔離温室内で夏季に 6 ヶ月間栽培し、特性調査を行った。9DEL トマト苗は Null segregant を用いた。その結果、一果重、着果数、草丈、糖度について、9DEL トマトと Wt トマトには有意な差は認められず、eIF4E の変異は表現型に影響を与えないことが確認された。

7. 新たな潜性アレルと TYLCV 抵抗性

TYLCV を含むジェミニウイルス科ベゴモウイルス属のメンバーは世界中でエマージングウイルスとして急拡大し、様々な作物の被害を大きくしている。トマトでは TYLCV や近縁の tomato yellow leaf curl Sardinia virus (TYLCSV) に対する抵抗性素材として、Ty-1 遺伝子等が導入されているが、これらは黄化葉巻症状を抑えるものの、ウイルス感染自体を許容してしまう。そこで、我々は TYLCV 感染率を下げるような抵抗性について開発を進めている。まだ抵抗性機序などは不明であるが、抵抗性を示す変異アレルを幾つか選抜した。

eIF4E の編集と同様にいくつかの宿主因子について、遺伝子編集による変異体を作製した。組換え当代 (T0) から自家受粉により世代を進め、変異アレルがホモ接合体になったものを選抜した。TYLCV の接種は TYLCV イスラエル系統を感染性クローン化したものを Agro-infiltration 法 (注射接種) を用いて、変異アレルのトマト及び Wt トマトの本葉 4-5 葉期の実生苗に行った。接種後 3-4 週間の間で上位葉での症状調査及び上位葉でのウイルスゲノムの PCR 分析により、TYLCV 感染率を検証した。その結果、受容体様キナーゼ BAM1 とそのホモログの変異アレル (潜性アレル) で TYLCV 感染率が大きく低下したことを確認した。

8. おわりに

病害による作物収量の減少、葉散等のコスト及び労働負荷は生産者にとって重大な問題であり、作物の病害虫被害は食品へ流通する前段階 (生産時) のフードロスとして環境及び食料問題としても看過できない。抵抗性作物を育種することは、収量が維持または改善され、農業への依存が減少し持続可能な農業に貢献する。トマトはウイルス抵抗性のために育種され続けているが、遺伝資源は膨大な一方、いずれを利用するかを選抜は非常に難しいため、CMV 抵抗性はこれまで実用化されず TYLCV 抵抗性も十分ではなかった。今回、*eIF4E* の遺伝子編集を使用して、市販の大玉トマト品種において PVY および CMV に対する抵抗性を確認し、トマト収量に影響を与えないことを確認した。また TYLCV 抵抗性に関与する潜性変異アレルの選抜についても紹介した。

eIF4E 編集による CMV 抵抗性の結果はトマトの遺伝子編集で CMV への抵抗性を付与できる可能性を示した初めての実証である。また、TYLCV 抵抗性選抜の中で、感染率を下げ、免疫性を示すような TYLCV 抵抗性のタイプも初めてであると思われる。

近年開発された遺伝子編集技術は、従来のランダムな変異誘発とは異なり、特定の標的遺伝子を効率的に変異誘発することが可能である。商業作物品種に直接遺伝子編集を施すことで、その形質変更に要する時間を短縮することができる。*eIF4E* や *eIF4G* などの宿主感受性因子の自然変異体による潜性抵抗性は、顕性抵抗性に比べて育種に利用されにくい傾向にあるが、感受性因子の中には広範囲のウイルス種の感染に必要と考えられるものがあり、1つの感受性因子の編集による潜性抵抗性遺伝子が同時に複数の異なるウイルスに対する抵抗性を付与できる可能性がある。感受性因子や相互作用因子の遺伝子編集は今後有望な抵抗性育種の一戦略である。

謝辞:

本研究では、北海道大学農学部植物病原学研究室の皆様、眞岡哲夫氏および遠藤真咲氏 (農研機構)、Jean-Luc Gallois (INRA、フランス) に解析・試料の提供のほか、数多くのご助言と支援を頂きました。この場を借りて厚くお礼申し上げます。

引用文献

Bastet, A., Robaglia, C., and Gallois, J. L., 2017. *eIF4E* resistance: natural variation should guide gene editing. *Trends Plant Sci.* 22. 411–419. doi: 10.1016/j.tplants. 2017.01.008

- Chandrasekaran, J., Brumin, M., Wolf, D., Leibman, D., Klap, C., Pearlsman, M., Pearlsman, M., Sherman, A., Arazi, T., Gal-On, A., 2016. Development of broad virus resistance in non-transgenic cucumber using CRISPR/Cas9 technology. *Mol. Plant Pathol.* 17, 1140–1153. doi: 10.1111/mpp.12375
- EFSA Panel on Plant Health. 2013. Scientific opinion on the risks to plant health posed by *Bemisia tabaci* species complex and viruses it transmits for the EU territory. *EFSA Journal* ;11(4) :3162
- Gallois, J. L., Moury, B., and German-Retana, S. 2018. Role of the genetic background in resistance to plant viruses. *Int. J. Mol. Sci.* 19: 2856. doi:10.3390/ijms19102856
- Gauffer, C., Lebaron, C., Moretti, A., Constant, C., Moquet, F., Bonnet, G., Caranta, C., Gallois, J. L., 2016. A TILLING approach to generate broad-spectrum resistance to potyviruses in tomato is hampered by eIF4E gene redundancy. *Plant J.* 85. 717–729. doi: 10.1111/tpj.13136
- Hanson, P., Lu, S., Wang, J., Chen, W., Kenyon, L., Tan, C., Tee, K.L., Wang, Y., Hsu, Y., Schafleitner, R., Ledesma D., Yang R., 2016. Conventional and molecular marker-assisted selection and pyramiding of genes for multiple disease resistance in tomato. *Scientia Horticulturae* 201. 346–354. doi.org: 10.1016/j.scienta.2016.02.020
- Hanssen, I. M., Lapidot, M., Thomma, B. P. H. J., 2010. Emerging Viral Diseases of Tomato Crops. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 23, 539–548. doi:10.1094/MPMI -23-5-0539
- Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Daudona, J. A., Charpentier, E., A programmable Dual-RNA-Guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. 2012. *Science* 337.816. doi: 10.1126/science.1225829
- Lukyanenko, A. N. 1991. "Disease resistance in tomato" in Genetic improvement of tomato. Monographs on theoretical and applied genetics. Vol. 14. ed. G. Kalloo (Berlin, Heidelberg: Springer).
- Luria, N., Smith, E., Reingold, V., Bekelman, I., Lapidot, M., Levin, I., Elad, N., Tam, Y., Sela, N., Abu-Ras, A., Ezra, N., Haberman, A., Yitzhak, L., Lachman, O., Dombrovsky, A., 2017. A New Israeli Tobamovirus isolate infects tomato plants harboring Tm-2² resistance genes. *PLoS One* 12. 1-19. doi: 10.1371/journal.pone.0170429
- Mazier, M., Flamain, F., Nicolai, M., Sarnette, V., Caranta, C. 2011. Knock-down of both eIF4E1 and eIF4E2 genes confers broad-spectrum resistance against potyviruses in tomato. *PLoS One* 6:e29595. doi: 10.1371/journal.pone.0029595
- Olmstead, R. G., Bohs, L., Migid, H. A., Santiago-Valentin, E., Garcia, V. F., Collier, S. M. 2008. A molecular phylogeny of the Solanaceae. *Taxon* 57, 1159–1181. doi: 10.1002/ tax.574010
- Ruffel, S., Gallois, J. L., Lesage, M. L., Caranta, C. 2005. The recessive potyvirus resistance gene pot-1 is the tomato orthologue of the pepper pvr2-eIF4E gene. *Mol. Gen. Genom.* 274, 346–353. doi: 10.1007/s00438-005-0003-x
- Sato, M., Nakahara, K., Yoshii, M., Ishikawa, M., and Uyeda, I. 2005. Selective involvement of members of the eukaryotic initiation factor 4E family in the infection of *Arabidopsis thaliana* by potyviruses. *FEBS Lett.* 579, 1167–1171. doi: 10.1016/j.febslet. 2004.12.086
- Sayama, H., Sato, T., Kominato, M., Natsuaki, T., Kaper, J. M. 1993. Field testing of a satellite-containing attenuated strain of cucumber mosaic virus for tomato protection in Japan. *Phytopathology* 83, 405–410. doi: 10.1094/Phyto-83-405

- Torre, C., Donaire, L., Gomez-Aix, C., Juarez, M., Peterschmitt, M., Urbino, C., Hernando, Y., Agüero, J., Aranda, M. A., 2018. Characterization of Begomoviruses sampled during severe epidemics in tomato cultivars carrying the Ty-1 Gene. *Int. J. Mol. Sci.* 19. 2614. doi:10.3390/ijms19092614
- Ueda, S., Kimura, T., Onuki, M., Hanada, K., Iwanami, T., 2004. Three distinct groups of isolates of Tomato yellow leaf curl virus in Japan and construction of an infectious clone. *J. Gen. Plant. Pathol.* 70.232–238. doi: 10.1007/s10327-003-0112-5
- Yoshii, M., Nishikiori, M., Tomita, K., Yoshioka, N., Kozuka, R., Naito, S., Ishikawa, M., 2004. The Arabidopsis Cucumovirus multiplication 1 and 2 loci encode translation initiation factors 4E and 4G. *J. Virol.* 78, 6102–6111. doi: 10.1128/JVI.78.12.6102-6111.2004



石橋 和大

農研機構生物機能利用研究部門 作物生長機構研究領域 作物病害制御機構グループ
上級研究員

経歴

平成 20 年 北海道大学大学院農学研究科博士課程修了
平成 20 年 日本学術振興会 特別研究員
平成 21 年 農業生物資源研究所 特別研究員
平成 23 年 農業生物資源研究所 任期付研究員
平成 28 年 農研機構生物機能利用研究部門 主任研究員

研究テーマ

- ・植物のウイルス抵抗性機構
- ・植物ウイルスの複製機構
- ・ウイルスベクターを用いた植物のゲノム編集

二本鎖 RNA 分解酵素による植物のウイルス抵抗性機構

石橋和大

Kazuhiro Ishibashi

Plant antiviral immunity mediated by double-stranded ribonucleases

Abstract

RNA viruses replicate their genomes via complementary RNA, presenting double-stranded (ds) RNA as a target of host defense systems. Eukaryotic positive-strand RNA viruses replicate their genomes in membranous compartments formed in a host cell, which sequesters the dsRNA replication intermediate from immune surveillance. Accordingly, host dsRNA-degrading enzymes *per se* do not have potent antiviral activity. Here we found that a plant has developed a way to overcome this sequestration. We report the positional cloning of the broad-spectrum soybean mosaic virus resistance gene *Rsv4*, which encodes an RNase H family protein with dsRNA-degrading activity. An active-site mutant of *Rsv4* was incapable of inhibiting virus multiplication and was co-purified with a viral RNA polymerase complex from detergent-solubilized membranes of infected cells. These results suggest that *Rsv4* enters the replication compartments and degrades viral dsRNA. Inspired by this model, we designed three plant-gene-derived dsRNases, each consisting of a dsRNase fused with a host protein involved in RNA replication of a positive-strand RNA virus. Each fusion protein successfully inhibited the multiplication of the respective target virus. These findings suggest a method for designing crops resistant to any target positive-strand RNA virus by fusion of endogenous genes.

1. はじめに

RNA ウイルスは相補鎖 RNA を介して複製するため、複製時には二本鎖 RNA が生じる。長い二本鎖 RNA は真核生物の細胞内には通常存在しないため、異物として RNA サイレンシングや自然免疫の標的となる。そこで、ウイルスは二本鎖 RNA を宿主に見つからないようにする必要がある。プラス鎖 RNA ウイルスは宿主の生体膜を変形させて、細胞質から隔離された複製の場を形成することにより、複製時に生じる二本鎖 RNA を隠していると考えられている (den Boon and Ahlquist, 2010)。我々は、二本鎖 RNA を分解することによりウイルス増殖を抑制する、植物の新たなウイルス防御機構を明らかにしたので紹介する (Ishibashi et al., 2019)。

ウイルス病の防除は農業における重要な課題の一つであるが、植物ウイルス病に有効な農薬は開発されておらず、抵抗性品種の育成が最も効果的な防除法となっている。抵抗性品種は、農作物の近縁野生種等にウイルス抵抗性個体が見つかった場合に、交配によってウイルス抵抗性を付与する遺伝子 (抵抗性遺伝子) を作物に導入することによって作られる。これまでに様々な植物からウイルス抵抗性遺伝子が同定されているが、その多くは顕性 (優性) で、ヌクレオチド結合領域とロイシンリッチ反復配列をもつタンパク質をコードし、ウイルスの感染を認識して植物の防御機構を活性化する役割を担っている (De Ronde et al., 2014)。

ダイズ (*Glycine max* (L.) Merr.) は、国内では主に食用にされるが、世界的に搾油の原料として広く栽培される重要作物である。ダイズモザイクウイルス (soybean mosaic virus; SMV) は、ポティウイルス科ポティウイルス属のプラス鎖 RNA ウイルスで、ダイズに感染すると収量や品質の低下を引き起こす (Hajimorad et al., 2018)。SMV に対する抵抗性遺伝子として、*Rsv1*、*Rsv3*、*Rsv4*、*Rsv5* が知られており、*Rsv1* および *Rsv3* は他の多くのウイルス抵抗性遺伝子同様、ヌクレオチド結合領域とロイシンリッチ反復配列をもつタンパク質をコードする (Hajimorad and Hill, 2001; Tran et al., 2018)。*Rsv5* は *Rsv1* の対立遺伝子 (*Rsv1-y*) と考えられていたものが、異なる遺伝子として最近報告されたものである (Klepadlo et al., 2017)。*Rsv1* あるいは *Rsv3* は多くのダイズ品種に導入されているが、いずれも SMV の系統特異的に抵抗性を付与することから、抵抗性が効かないウイルスによる被害が報告されている。一方、*Rsv4* はほぼ全ての SMV 系統に有効であるため、近年栽培品種への導入が進められている。*Rsv4* は植物の防御機構の活性化を介さずにウイルスの増殖を遅延させることが報告されていたが、遺伝子産物は未同定であった (Gunduz et al., 2004)。

2. *Rsv4* のポジショナルクローニング

農研機構作物研の加賀秋人博士らとの共同研究による我々のチームでは、*Rsv4* のポジショナルクローニングを行った。*Rsv4* をもつダイズ品種である Peking と日本産の SMV 感受性品種であるエンレイの交配後代 9,320 個体の解析により、*Rsv4* の座乗領域を約 9.8 kbp ま

で絞り込むことに成功した。この領域には、膜貫通領域と RNase H ドメインをもつと予測されたタンパク質をコードする ORF が存在した。当該遺伝子を SMV 感受性ダイズに発現させると、SMV 抵抗性になったこと、Peking において変異原処理により当該遺伝子に変異を導入すると SMV 感受性になったことなどから、当該遺伝子が *Rsv4* であると結論付けた。

3. *Rsv4* の機能解析

ベンサミアナタバコ (*Nicotiana benthamiana* Domin) は SMV の増殖を許容するが、*Rsv4* を一過的に発現させると SMV の増殖が阻害されたことから、この系を用いて *Rsv4* の機能解析を行った。まず、*Rsv4* の RNase H ドメインに存在する活性部位モチーフ (DEDN) に変異 (D99N) を導入したところ、SMV 増殖抑制能が喪失したことから、RNase H ドメインの活性がウイルス増殖抑制に重要と考えられた。RNase H は一般に DNA-RNA 二本鎖の RNA 鎖を切断するが、プラス鎖 RNA ウイルスの複製サイクルにおいて、DNA-RNA のハイブリッドは生じない。そこで *Rsv4* の基質特異性を調べるために、ベンサミアナタバコで発現させた *Rsv4* を界面活性剤で可溶化、精製した標品に、放射性標識した様々な核酸を加えて分解の可否を調べたところ、*Rsv4* は二本鎖 RNA を分解することが分かった。D99N 変異体は二本鎖 RNA 分解活性を喪失していたことから、この活性が SMV の増殖抑制に重要であると考えられた。

前述の通り、プラス鎖 RNA ウイルスは二本鎖 RNA を宿主から隠して複製していると考えられている。この仕組みにより、おそらく全ての生物は二本鎖 RNA 分解酵素 (RNase III など) をもっているにもかかわらず、ウイルスは宿主細胞内でゲノムを分解されることなく感染を成立させる。したがって、*Rsv4* が SMV の二本鎖 RNA を分解して増殖を抑制するためには、SMV の複製の場に入り込む必要があると考えられた。この可能性を検証するため、*Rsv4* の活性中心変異体 (D99N) を利用した。*Rsv4* を発現する細胞では SMV が増殖できないため、SMV 由来の核酸やタンパク質を検出することができず、作用機構の解析は困難である。一方 D99N 変異体は、SMV の複製の場に入り込む能力は維持しつつ二本鎖 RNA 分解活性を喪失していると仮定すれば、D99N を発現する SMV 感染細胞では D99N を含む SMV の複製酵素複合体が大量に蓄積している可能性がある (図 1)。そこで、FLAG タグを付加した D99N 変異体を発現するベンサミアナタバコに SMV を感染させて、膜画分を可溶化後に抗 FLAG 抗体を用いて精製したところ、D99N とともに SMV の P3 タンパク質および N1b ポリメラーゼが共精製された。さらにこの精製標品に鋳型となる SMV のゲノム RNA を加えたところ、RNA ポリメラーゼ活性が検出されたことから、D99N は活性を有する複製酵素複合体と相互作用していることが示唆された。したがって *Rsv4* は、SMV の複製の場に入り込むことが可能であり、合成された二本鎖 RNA を分解することにより、SMV の増殖を阻害していると考えられた。

Rsv4 による増殖阻害を受けにくい (増殖遅延の程度が小さい) SMV の変異株が分離され、*Rsv4* から逃れるには P3 タンパク質コード領域内のアミノ酸置換を伴う変異が重要であるこ

とが報告されている (Ahangaran et al., 2013; Chowda-Reddy et al., 2011; Wang and Hajimorad, 2016)。ポティウウイルスの P3 タンパク質は、機能はほとんど分かっていないが膜タンパク質と予想され、複製に必須であることなどから、複製酵素複合体の構成因子である可能性が指摘されている (Cui et al., 2017)。ベンサミアナタバコにおいて Rsv4 と SMV の P3 を共発現させ、可溶化、精製すると P3 は Rsv4 と共精製されたことから、Rsv4 は P3 との相互作用を介して複製の場に入り込んでいること、一方 SMV は P3 に生じた変異によって Rsv4 との相互作用を弱め、Rsv4 をもつダイズに適応していることが示唆された。

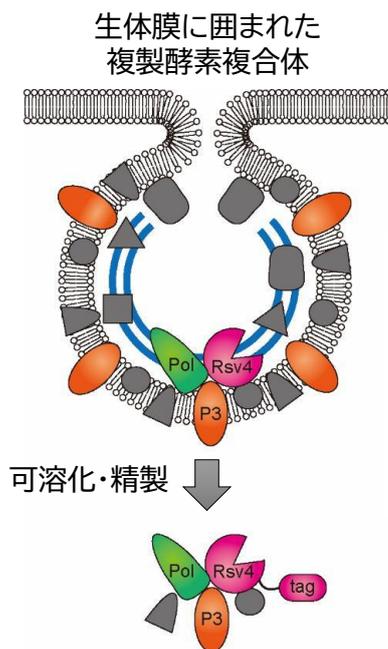


図1 Rsv4 と SMV 複製複合体の相互作用

SMV 感染 Rsv4 (D99N) 発現細胞より調製した膜面分を可溶化し、D99N に付加されたタグを用いて精製すると、RNA 合成活性を有する SMV の複製酵素複合体が精製された。P3: SMV P3 タンパク質。Pol: SMV Nib ポリメラーゼ。

4. 二本鎖 RNA 分解酵素を利用した人工ウイルス増殖抑制タンパク質の設計

明らかになった Rsv4 の作用機構から着想を得て、二本鎖 RNA 分解酵素を複製の場へ送り込むことさえできれば、任意のプラス鎖 RNA ウイルスの増殖を阻害することが出来るのではないかと考えた。複製複合体の形成は、ウイルスの因子だけではなく多くの宿主因子との協働で行われると考えられており、いくつかのウイルスではその過程で働く宿主因子が同定されている。そこで、既に複製複合体の一部として、あるいはその近傍に存在することが報告されている宿主因子に二本鎖 RNA 分解酵素を融合させることにより、標的ウイルスの増殖抑制が可能か調べた。トマトモザイクウイルス (ToMV, トバモウイルス属) に対する TOM1 (Yamanaka et al., 2000)、キュウリモザイクウイルス (CMV, ククモウイルス属) に対する TIP1 (Kim et al., 2006)、カブモザイクウイルス (TuMV, ポティウウイルス属) に対する eIF(iso)4E (Beauchemin et al., 2007) をそれぞれ複製の場へ送り届けるための宿主因子として選定し、シロイヌナズナの内在性二本鎖 RNA 分解酵素である RTL2 (Kiyota et al., 2011) を融合した融合タンパク質をベンサミアナタバコで一過的に発現させたところ、それ

それぞれの宿主因子と RTL2 の融合タンパク質を発現させた場合に標的ウイルスの増殖が抑制された。コントロールとして RTL2 のみ、あるいは RTL2 の活性中心変異体 (D100A) と各宿主因子の融合タンパク質を発現させた場合にはウイルス増殖は阻害されなかったことから、「複製の場に入り込む」「二本鎖 RNA を分解する」という二つの機能を揃えたタンパク質の働きにより、標的ウイルスの増殖が阻害されたと考えられた (図 2)。

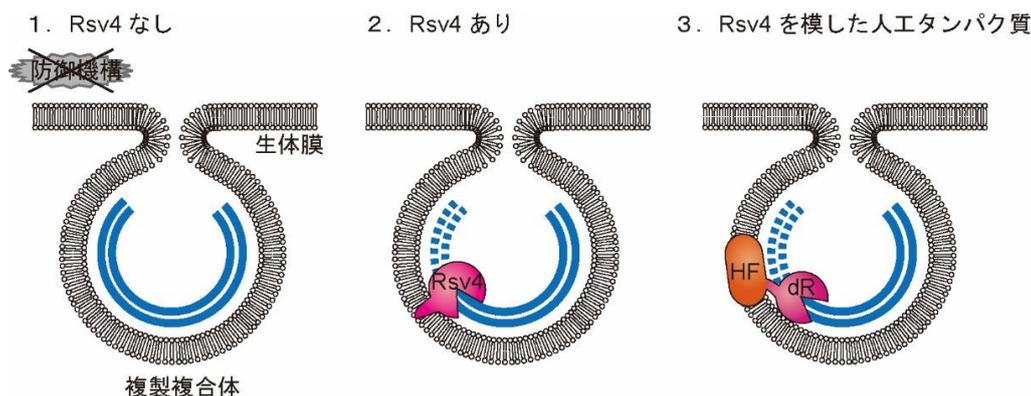


図 2 標的ウイルスの増殖を阻害する人工タンパク質の設計

1. プラス鎖 RNA ウイルスは宿主の生体膜を変形させて複製の場を形成し、複製時に生じる二本鎖 RNA を細胞質から隔離する。2. Rsv4 は SMV の複製の場に入り込むことにより、二本鎖 RNA を分解する。3. ウイルス複製の場に局在することが分かっている宿主因子 (HF) と二本鎖 RNA 分解酵素 (dR) を融合することにより、Rsv4 のように複製の場で二本鎖 RNA を分解する人工タンパク質を設計することができる。

5. おわりに

ゲノム編集技術や育種技術等の進展により、近い将来作物の品種育成は地域の需要等に合わせてオーダーメイドで形質を付与できるようになるだろう。一方、どのように遺伝子改変すればどのような形質が得られるかの情報は十分に揃っていない。今回我々が開発したウイルス抵抗性付与法は、理論的には任意のプラス鎖 RNA ウイルスに対して有効と考えられ、ウイルス種によって二本鎖 RNA 分解酵素を融合する相手となる宿主因子を決めておけば、必要に応じてオーダーメイドでウイルス抵抗性植物が作出できる可能性がある。また内在性の遺伝子どうしを融合させればよいことから、従来の遺伝子組換え植物とは異なり、外来遺伝子をもたないウイルス抵抗性植物が作出可能である。植物では相同組換えを利用したノックインが難しいなど、技術的に解決すべき課題は残されているものの、今後ますます重要性が高まる持続可能な農業の実現に向けて、低投入で高生産なウイルス抵抗性作物の開発に貢献できるよう、引き続き植物ウイルスの研究を続けていきたい。

謝辞

本研究の遂行にあたり、農研機構の加賀秋人博士、石川雅之博士をはじめ、多くの共同研究者にご協力いただいた。本研究の一部は、農林水産省委託プロジェクト「ゲノム情報を活用した農作物の次世代生産基盤技術の開発（SFC）」により実施された。

参考文献

- Ahangaran, A., Habibi, M.K., Mohammadi, G.-H.M., Winter, S., and García-Arenal, F. (2013). Analysis of *Soybean mosaic virus* genetic diversity in Iran allows the characterization of a new mutation resulting in overcoming *Rsv4*-resistance. *J Gen Virol* *94*, 2557-2568.
- Beauchemin, C., Boutet, N., and Laliberté, J.-F. (2007). Visualization of the interaction between the precursors of VPg, the viral protein linked to the genome of *Turnip mosaic virus*, and the translation eukaryotic initiation factor iso 4E in planta. *J Virol* *81*, 775-782.
- Chowda-Reddy, R.V., Sun, H., Chen, H., Poysa, V., Ling, H., Gijzen, M., and Wang, A. (2011). Mutations in the P3 protein of *Soybean mosaic virus* G2 isolates determine virulence on *Rsv4*-genotype soybean. *Mol Plant-Microbe Interact* *24*, 37-43.
- Cui, X., Yaghmaiean, H., Wu, G., Wu, X., Chen, X., Thorn, G., and Wang, A. (2017). The C-terminal region of the *Turnip mosaic virus* P3 protein is essential for viral infection via targeting P3 to the viral replication complex. *Virology* *510*, 147-155.
- De Ronde, D., Butterbach, P., and Kormelink, R. (2014). Dominant resistance against plant viruses. *Frontiers in Plant Science* *5*.
- den Boon, J.A., and Ahlquist, P. (2010). Organelle-like membrane compartmentalization of positive-strand RNA virus replication factories. *Annu Rev Microbiol* *64*, 241-256.
- Gunduz, I., Buss, G.R., Chen, P., and Tolin, S.A. (2004). Genetic and phenotypic analysis of *Soybean mosaic virus* resistance in PI 88788 soybean. *Phytopathology* *94*, 687-692.
- Hajimorad, M.R., Domier, L.L., Tolin, S.A., Whitham, S.A., and Saghai Maroof, M.A. (2018). *Soybean mosaic virus*: a successful potyvirus with a wide distribution but restricted natural host range. *Mol Plant Pathol* *19*, 1563-1579.
- Hajimorad, M.R., and Hill, J.H. (2001). *Rsv1*-mediated resistance against *Soybean mosaic virus*-N is hypersensitive response-independent at inoculation site, but has the potential to initiate a hypersensitive response-like mechanism. *Mol Plant-Microbe Interact* *14*, 587-598.

- Ishibashi, K., Saruta, M., Shimizu, T., Shu, M., Anai, T., Komatsu, K., Yamada, N., Katayose, Y., Ishikawa, M., Ishimoto, M., *et al.* (2019). Soybean antiviral immunity conferred by dsRNase targets the viral replication complex. *Nature Communications* *10*, 4033.
- Kim, M.J., Kim, H.R., and Paek, K.-H. (2006). Arabidopsis tonoplast proteins TIP1 and TIP2 interact with the cucumber mosaic virus 1a replication protein. *J Gen Virol* *87*, 3425-3431.
- Kiyota, E., Okada, R., Kondo, N., Hiraguri, A., Moriyama, H., and Fukuhara, T. (2011). An Arabidopsis RNase III-like protein, AtRTL2, cleaves double-stranded RNA in vitro. *J Plant Res* *124*, 405-414.
- Klepadlo, M., Chen, P., Shi, A., Mason, R.E., Korth, K.L., Srivastava, V., and Wu, C. (2017). Two tightly linked genes for soybean mosaic virus resistance in soybean. *Crop Sci* *57*, 1844-1853.
- Tran, P.-T., Widyasari, K., Seo, J.-K., and Kim, K.-H. (2018). Isolation and validation of a candidate *Rsv3* gene from a soybean genotype that confers strain-specific resistance to soybean mosaic virus. *Virology* *513*, 153-159.
- Wang, Y., and Hajimorad, M.R. (2016). Gain of virulence by *Soybean mosaic virus* on *Rsv4*-genotype soybeans is associated with a relative fitness loss in a susceptible host. *Mol Plant Pathol* *17*, 1154-1159.
- Yamanaka, T., Ohta, T., Takahashi, M., Meshi, T., Schmidt, R., Dean, C., Naito, S., and Ishikawa, M. (2000). *TOM1*, an *Arabidopsis* gene required for efficient multiplication of a tobamovirus, encodes a putative transmembrane protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences* *97*, 10107-10112.



早野由里子

農研機構 生物機能利用研究部門 作物ゲノム編集研究領域
上級研究員

経歴

1988年 埼玉大学大学院理学研究科修士課程修了

1988年 農林水産省入省(農業生物資源研究所)

1993年 北海道農業研究試験場(現北海道農業研究センター)

2000年 北海道大学大学院農学研究科博士課程修了(社会人)

2001年(法人化)

2008年 日本育種学会賞(グループ受賞)

「イネ縞葉枯病・穂いもち抵抗性に関するDNA マーカー選抜育種の体系化」

2010年 農研機構 中央農業研究センター

2021年 農研機構 生物機能利用研究部門(現在)

研究内容

- ・水稻ストレス耐性の遺伝解析と遺伝子単離
- ・イネ縞葉枯病およびいもち病抵抗性に関する研究
- ・イネ縞葉枯病ウイルスのゲノム構造の解析
- ・薬剤耐性いもち病菌の検出マーカーの開発
- ・CMV 弱毒株の利用に関する研究

イネの縞葉枯病抵抗性と生育安定性

早野由里子

Yuriko Hayano-Saito

A rice stripe resistance gene, *Svb-i*, supports rice plant growth

Abstract

Rice stripe, a viral disease, causes serious damage to rice production mainly in East Asian countries. The use of resistant cultivars is one of the control measures for rice stripe in Japan. In general, the stability and sustainability of plant resistance are major issues in the agricultural use. A rice stripe resistance gene, *Svb-i*, has shown stable resistance for over 50 years and has been introduced into new rice varieties in Japan. To understand the rice stripe resistance by *Svb-i*, we isolated the *Svb-i* gene, and revealed that the gene expresses specifically in meristematic tissues and supports rice plant growth. The role of *Svb-i* and the sustainability of its resistance to rice stripe are discussed here.

はじめに

イネ縞葉枯病の初発(栗林 1931)から 100 年以上が経過した。この間、本病は発生期と鎮静期を繰り返し、我が国の稲作に甚大な被害をもたらしてきた。関東圏などの大発生の度に、その対策に関わる研究が推進され、防除対策は確立されていると言える。しかしながら、その周期的な発生に関わる要因は依然として不明であり、依然として発生動向に注意が必要な病害である。

本病の病原である縞葉枯ウイルス rice stripe virus (RSV)は、イネ科植物を宿主とし、媒介昆虫であるヒメビウンカの体内での増殖が可能で、永続的に伝搬される。ウイルスに直接作用する薬剤はないことから、本病の防除対策(https://ml-wiki.sys.affrc.go.jp/rsv_web/manual/start)においても、圃場環境におけるウイルス濃度の抑制を目的とする間接的な策を組み合わせた予防的な措置が提示されている。媒介昆虫の絶対数を減らし、感染機会を減じるために、殺虫剤の施用、刈取後の圃場の速やかな耕起、畦畔雑草の管理などが行われる。また、抵抗性品種の作付けは、感染による生産性の低下を防ぐだけでなく、ヒメビウンカの RSV 保毒率の低下も期待できる(早野 201)。特に、抵抗性品種の継続的な作付けは、防除目安とされる保毒率の上昇抑制に対し高い効果があるとされる。一方で、一般的に、抵抗性品種の利用においては病原側の変異による抵抗性の崩壊、つまり、抵抗性の持続性について懸念がされる。

イネ縞葉枯病抵抗性品種の開発は 1960 年代に本格的に開始された。それに伴い、抵抗性に関する研究も進み、まず、日本陸稲に由来する二遺伝子(*Sva*, *Svb*)が明らかとなった(鷲尾ら 1968)。それぞれイネの第2、

第11染色体に座乗する(前田2008)。主働遺伝子である *Svb* には、複数の対立遺伝子の存在が示唆された(鷲尾ら1968)。その後解析された抵抗性遺伝子(*Svb-i*, *STVII^{IR24}*, *STVII^{TQ}*, *STVII^{KAS}* および *STVII^{SG}*)は、いずれもイネ第11染色体長腕の *Svb* 座に位置づけられた(Hayano-Saito *et al.* 2000; Wang *et al.* 2011; Wu *et al.* 2011; Zhang *et al.* 2011; Kwon *et al.* 2012)。野生イネ *Oryza officinalis* に由来する抵抗性も *Svb* 座に導入された(前田2008)。異なる座に座乗する抵抗性遺伝子があることは、抵抗性崩壊に対する備えとなる。しかし、縞葉枯病抵抗性については、*Svb* 座以外に単独で効果的に作用する遺伝子座の存在は見出せていない。現状では、イネ縞葉枯病抵抗性の付与は、*Svb* 座の抵抗性遺伝子をいずれか一つ導入するしかない。国内で最も多く利用されている縞葉枯病抵抗性遺伝子はインド型イネ「Modan」に由来する *Svb-i* である。本遺伝子は50年以上に渡り抵抗性の崩壊の報告はなく、現在も多くのイネ新品種に導入されている。*Svb-i* 遺伝子による縞葉枯病抵抗性の持続性に関する知見は、抵抗性品種の利用、つまり縞葉枯病防除対策において非常に重要な情報である。*Svb-i* を単離し、縞葉枯病抵抗性および持続性について検証し、その抵抗性について考察を試みた(Hayano-Saito and Hayashi 2020)。その報告を基にイネ縞葉枯病抵抗性とイネの成長との関係について考える。

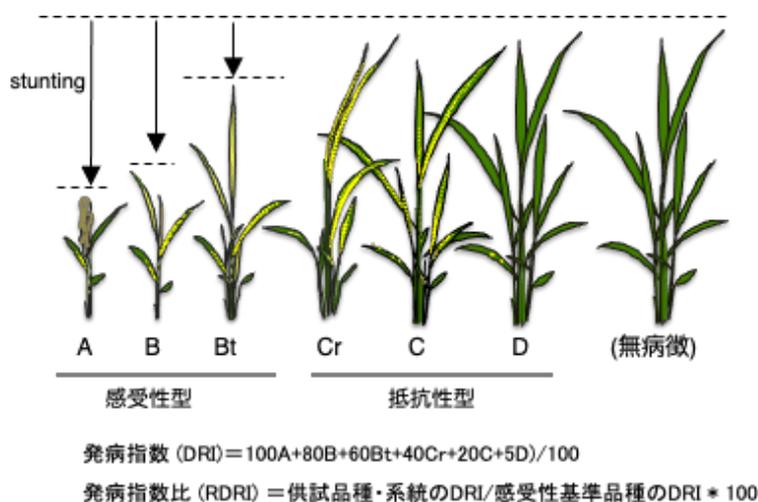


図1 幼苗検定法における病徴型の分類と発病指数比の算出式(鷲尾ら(1968)を基に作図)

1. *Svb-i* によるイネ縞葉枯病抵抗性の安定性

イネ縞葉枯病抵抗性は、RSV 保毒ヒメトビウンカを用いた幼苗検定法(鷲尾ら1968)によって行われる。供試イネ30個体を1検体集団とし、接種約30日後の供試個体の病徴型を調べ、集団内の各病徴型数より発病指数を算出し、感受性基準品種のそれと比較し、検体の抵抗性評価とする(図1)。病徴型は、葉に見られる病徴(退緑斑点、抽出葉の枯死、捲葉など)に加え、植物体の全身症状(萎縮、分けつ数の減少など)を含めてA-Dの六つに分類される(図1)。発病は、接種強度(保毒虫率×虫密度×時間)、感染時のイネの生育ステージや栄養状態、接種後の気温、日照等の影響を受けるため、感受性品種においても、抵抗性型病徴を呈する個体が見られることもある。逆に、抵抗性品種でも感受性型病徴Btを呈する個体が見られることもある。しかし、もっとも激しい病徴型Aが抵抗性品種で観察されることは稀である。退緑斑点部には、抵抗性/感受性によらずRSVが高濃度で局在することが確認されている(野田ら1991;早野,2014)。退緑斑点は、抵抗性イネでは感受性イネに比べて明らかに少なく、その出現率は低い。*Svb-i*の抵抗性は感染株率を低下させると推測されている

(早野2015)。そこで、これまでに実施した計92回の接種試験(1992-2009年)において、*Stvb-i*保有品種の退緑斑点を生じた個体を罹病個体とした罹病率を算出した。感受性基準品種日本晴の罹病率を1とした罹病率比で0.4を超える事はなく、安定した抵抗性を維持していることを示した(図2)。当該接種試験には、継代飼育・選抜を繰り返しながら維持し、虫とイネの双方を循環させた保毒虫率60%以上かつ幼齢の揃った集団を用いた。試験環境下においても *Stvb-i* の抵抗性は RSV に対し選択圧を生じにくいと考えられた。

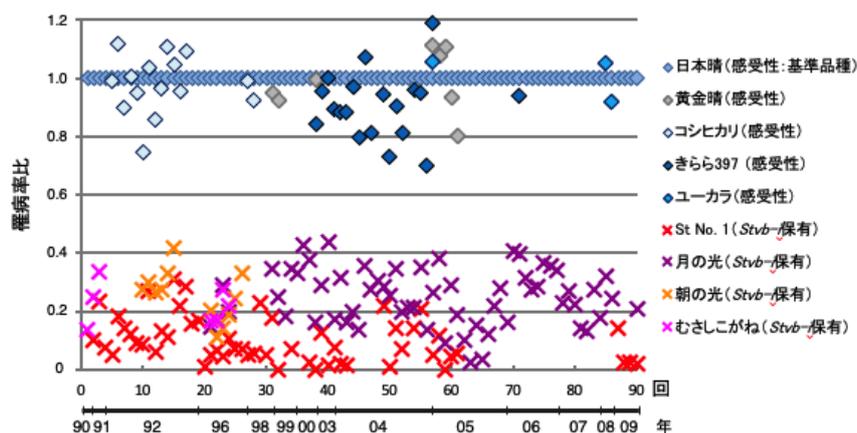
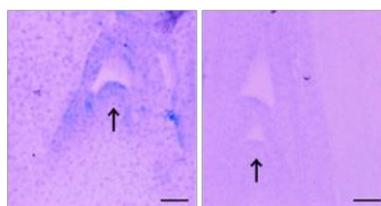


図2 *Stvb-i*保有イネの縮葉枯病抵抗性の接種試験の結果
退緑斑を生じた個体を罹病個体とした罹病率(罹病個体数/供試個体数)を算出し、感受性基準品種の日本晴を1とした罹病率比で表した。

2. *Stvb-i* の縮葉枯病抵抗性

虫の吸汁行動により唾液腺よりイネ維管束に吐出された RSV は、感受性イネ体基部の分裂組織で増殖し、成長に伴って植物体全体に拡散する(孫工 1973)。接種3日後のイネ幼苗基部における ELISA による RSV 検出頻度は、抵抗性/感受性で大きな差はない(早野 2014)。しかしながら、抵抗性イネにおける RSV のゲノム RNA コードされる遺伝子の複製は、いずれも感受性イネよりも1-2日遅れが生じる。組織免疫染色観察を行ったところ、接種7-8日を経過したイネ体基部では、茎頂分裂組織に RSV の局在が認められるが、抵抗性イネでは染色程度が低く、感受性イネに比べて RSV 濃度が低いことが示された(図3)。*Stvb-i* 保有イネでは、茎頂分裂組織におけるウイルス濃度が抑制されていると考えられる。



日本晴(感受性) 接種7日後 月の光(*Stvb-i*保有) 接種8日後

図3 RSV接種イネ幼苗基部
(組織免疫染色法による)
矢印は茎頂分裂組織、黒色バー: 100 μ m

3. *Stvb-i* 遺伝子

Map-based cloning 法により、*Stvb-i* の座乗領域を限定し、相補性試験による候補遺伝子の絞り込み、絞り込まれた候補遺伝子の RNAi 発現抑制試験を経て、*Stvb-i* 遺伝子を特定した。植物の病害抵抗性は NBS-LRR タンパク質によるものが多く、その持続性に不安があることが知られている。*Stvb-i* は ATP 結合ドメイン (histidine kinase/HSP90-like ATPase superfamily, IPR036890) を有する機能未知のタンパク質をコードしており、縞葉枯病抵抗性は既報の植物抵抗性遺伝子とは異なるメカニズムによることが示唆された。

Stvb-i は分裂が盛んな組織 (幼苗基部、分けつ基部、幼穂) やカルスで発現が高い。接種後 RSV が侵入・増殖するイネ幼苗基部での *Stvb-i* の発現を調べたところ、RSV 接種 3 日後 *Stvb-i* の発現上昇が見られた。前述の通り、接種 3 日後には ELISA によりウイルス検出が可能となる。*Stvb-i* の発現は、ウイルスの分裂組織への侵入ではなく、RSV の増殖の影響を受けると考えられる。

また、RNAi により *Stvb-i* の発現を抑制した組換え系統 (以下 *Stvbi*-RNAi 系統) では、RSV 接種後に *Stvb-i* の発現の回復が見られた。RSV の RNAi サプレッサーの働きによるものと推測される。この *Stvb-i* の発現回復による病徴の軽減は見られなかった。イネが縞葉枯病に対し抵抗性であるためには、RSV 感染時には植物体基部で *Stvb-i* が発現していることが必要であると考えられる。

4. 抵抗性遺伝子 *Stvb-i* と温度

初発病徴である退緑斑点は、RSV 接種から概ね 2 週間を経過した感受性イネの葉身上に認められる (孫工 1973)。ある接種試験において、僅か 7 日という短期間で明瞭な退緑斑点が感受性イネに出現した。当該期間の気象データを確認したところ、通常の接種後より好天が続き、平均気温が明らかに高かったことが判明した。RSV は細胞分裂に伴って植物体全体に拡散すると考えられることから、好天候によりイネの成長が促進され、同時にウイルスの増殖・拡散が早まり、病徴の出現時期を早めたものと推測された。*Stvb-i* 保有の抵抗性イネも感受性イネと同様な成長推移を示したが、病徴出現時期が通常より早まる、あるいは、抵抗性の弱体化は観察されなかった。*Stvb-i* は細胞分裂が早まる環境下においても RSV の増殖を抑制できると推測された。



St No.1 St507 St509 5株/ポット
(*Stvb*-保有) *Stvbi*-RNAi系統
原品種
図4 *Stvb-i* の発現抑制による生育への影響 (1)

5. *Stvb-i* とイネの生育

感受性イネが縞葉枯病に罹病すると生育不良が見られる (図1)。RSV は、イネ植物体基部の分裂組織に侵入し、増殖により、その個体の生育阻害を引き起こす。これに対し、*Stvb-i* を保有する抵抗性イネでは、生育不良の程度は小さいか、ほとんど見られない。*Stvbi*-RNAi 系統では、RSV 感染の有無によらず、生育が抑制される (図4、5a)。さらに、*Stvbi*-RNAi 系統の草丈は RSV の感染によりさらに著しく抑制される (図5b)。*Stvb-i* は、イネの分裂組織の生育安定性に関与し、植物の良好な生育の維持に貢献していると考えられる。

抵抗性イネの幼苗基部では、RSV の濃度と拡散が抑制される (図3)。*Stvb-i* による RSV 抵抗性のメカニズムは、茎頂培養によるウイルスフリー植物の生産技術の基盤メカニズム (Spangenberg *et al.* 1998; Razdan 2003) と類似していると考えられる。分裂組織では、新たに生成された細胞ではウイルス汚染を免れており

(Spangenberg *et al.* 1998)、それは、活発な代謝によって宿主細胞の増殖速度がウイルスの増殖速度よりも高いために生じる(Razdan 2003)。*Stvb-i* 保有イネでは、分裂組織において RSV が増殖を開始しても細胞増殖速度を維持し、細胞内の RSV 濃度の上昇を招かず、結果として、イネの成長は RSV の蔓延から急速に逃れることが可能となっていると推測される。RSV による生育阻害の軽減と RSV 増殖の抑制という抵抗性は、*Stvb-i* が関わる生育安定性のメカニズムによるものと考えられる。

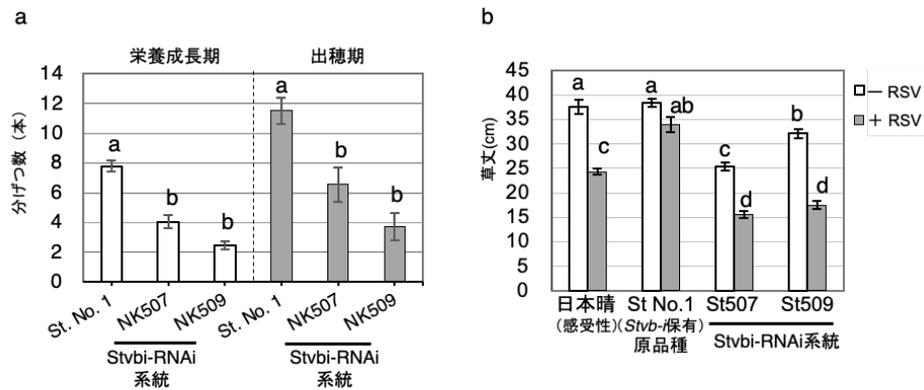


図5 *Stvb-i*発現抑制の生育への影響(2)
 栄養成長期および出穂期の分けつ数(a)およびRSV接種1ヶ月後のイネの草丈(b)。
 同じアルファベット間に有意差はない。(Tukey-Kramer test, $p < 0.01$, $n = 15$)

6. 熱ストレスにおける *Stvb-i* の役割

Stvb-i-RNAi 系統の生育は気温に左右されるようであった。そこで、生育障害を生じる 35 度以上の高温にイネ幼苗を数日間晒し、その後の生育への影響を観察した。高温処理をしていない場合、*Stvb-i*-RNAi 系統は原品種と同様に生育する。しかし、高温処理は *Stvb-i*-RNAi 系統の生育(草丈や分けつ)を徐々に悪化させ、イネ幼苗時に受けた熱によるダメージからの回復程度は、原品種に比べ小さかった。また、幼苗期の高温処理回数に応じて、*Stvb-i*-RNAi 系統-原品種間の生育差は大きくなった(図6)。

高温にさらされると、イネはさまざまな形態異常を呈す: 細くて短い冠根、クロロシス、しおれや発育不全(以上、幼苗期)、分けつ数の減少(栄養成長期)、穂形成不全(生殖期)など(Krishnan *et al.* 2011)。同様の異常は、*Stvb-i*-RNAi 系統の植物の常温栽培で観察され、高温に何日もさらされることにより悪化する。分裂組織において *Stvb-i* はイネの成長における熱耐性に大きな役割を持っていると考えられる。*Stvb-i* は、N 末端ドメイン構造、発現(通常の条件下で恒常的)、および機能(熱ストレスからの回復および植物の成長への影響)において、分子シャペロンとして細胞の恒常性に寄与している熱ショックタンパク質である Hsp90 に類似している。*Stvb-i* は、分裂組織の成長に密接に関連する熱に敏感なシグナル伝達カスケードを調節しているのかもしれない。

7. *Stvb-i* の役割と縞葉枯病抵抗性

熱ストレスを受けた植物の形態変化と RSV による病徴には類似点が多い(Washio *et al.* 1968; Ling 1972; Krishnan *et al.* 2011)。RSV 感染による生育阻害は、*Stvb-i* の発現抑制によってさらに悪化する(図5b)。RSV 増殖は分裂組織細胞に熱に類似するストレスを誘導し、*Stvb-i* が関与する反応系を刺激する可能性が示唆される。RSV 感染イネでの蓄積が認められた Hsp70 (Jiang *et al.* 2014) の熱応答的な発現制御への *Stvb-i* の関与を示すデータも得られている。いずれにせよ、*Stvb-i* が関与する分裂組織の成長のメカニズムは、高温によるストレスだけでなく、RSV によるストレスも軽減する。

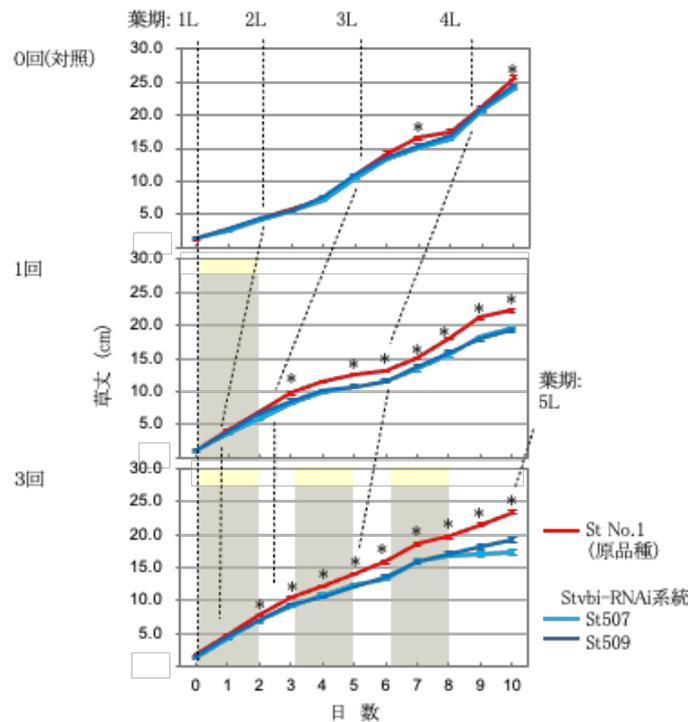


図6 高温処理したStvbi-RNAi系統の草丈
 1葉期のイネに高温処理（38℃、2日、グラフ中黄色部分）を行い、草丈を調査。*は
 原品種-Stvbi-RNAi系統間での有意差を示す（Tukey-Kramer test, $p < 0.01$, $n = 20$ ）

植物の主要な病害抵抗性遺伝子がコードする NBS-LRR タンパク質は、病原性因子との相互作用に Hsp90 を必要とし、温度感受性が見られる (Samuel 1931; Kobayashi *et al.* 2014; Park and Seo, 2015; Qian *et al.* 2018)。この 50 年間、イネの苗の成長に最適な温度を超え、RSV 増殖に理想的な条件とされる温度になった日数が増加した (気象庁データ) にもかかわらず、*Stvb-i* による抵抗性は安定していた。*Stvb-i* の恒常的な発現は、分裂組織細胞のストレス回復に寄与し、RSV の増殖の速やかな抑制を可能とすると考えられる。NBS-LRR タンパク質をコードする主要な抵抗性遺伝子の場合とは異なり、*Stvb-i* による抵抗性は、宿主の分裂組織細胞の熱ストレスに対する基本的な応答に起因している。*Stvb-i* は RSV 増殖を完全に抑制することはないが、熱に敏感でないことも含めて、耐久性と持続性のある抵抗性をイネに提供している。

おわりに

イネ縞葉枯病抵抗性を担う *Stvb* 座遺伝子の一つ、*Stvb-i* の主たる役割は、イネ植物体の成長を支えることであり、RSV の増殖を直接抑制する作用は持っていない。鷲尾ら (1968) が縞葉枯病抵抗性を測るために幼苗検定法を開発した当時は、圃場における自然感染下での発病株率により判定していた。しかし、幼苗検定法のように強制的な接種を行った場合、発病株率だけでは抵抗性の強弱の差がはっきりしなかったという。おそらく、強制接種により一度に多くの RSV が細胞に侵入し、その後引き起こされるストレスが生育の良否という形で顕在化したのであろう。RSV 増殖による直接的影響 (= 退緑病斑) と、RSV 増殖に起因する副次的影響 (= 植物体のストレス) とを抵抗性反応として総合的に取り扱う評価であったからこそ、生育を支える遺伝子が抵抗性遺伝

子として特定され、安定性と持続性のある抵抗性に至ったと考える。イネ縞葉枯病および抵抗性については多くの研究蓄積があり、*Svb-i* の単離およびその抵抗性を考察する基盤となった。先人達の業績に敬意を評したい。

Svb-i は、RSV と熱の双方によるストレスに対応する。*Svb-i* が関与する細胞内反応システムの詳細や、RSV の増殖システムとどのように交錯しているかについては今後の研究を要する。成長を支える働きによる抵抗性がどのように成り立ったのかも明らかでない。しかしながら、イネではウイルス感染により植物体の成長が妨げられることが多い(Ling 1972)。*Svb-i* は、他のイネのウイルスによる生育障害に対し効果があるのかも明らかでない。*Svb-i* と同様な働きを有する遺伝子を見出し、利用できるなら、病原ウイルスの感染環を断ち切ることは困難でも、ウイルス感染による生産被害の軽減は可能かもしれない。

これまでイネ縞葉枯病といもち病の抵抗性研究に関わってきた。今、植物の状態を意識して見ることの大事さを痛感している。生育場所を移動することができない植物には様々な環境変化に襲われる。その環境に耐え、より健全に育とうというシステムが構築されている。病気であるとはどんな状態であるのか？病徴とは何か？病徴は何を意味しているのか？ストレスとは何か？そして、抵抗性研究の目的である植物(作物)の強化と何か？頑健性とは何か？「健全な植物」はどのように成り立っていることなのかを意識しながら、抵抗性(=ストレス)を考えさせられることになった。今後の抵抗性研究の発展は、病害防除という問題を越えて、植物の環境適応力向上に繋がるだろう。

引用文献

早野由里子 (2014) *Svb-i* 遺伝子保有イネ縞葉枯病抵抗性品種におけるイネ縞葉枯ウイルスの感染. 関東東山病害虫研究会報 61, 9–12. doi: 10.11337/ktpps.2014.9

早野由里子(2015) イネ縞葉枯病と抵抗性品種の利用. 植物防疫, 69: 18-21

Hayano-Saito, Y. and Hayashi, K. (2020) *Svb-i*, a rice gene conferring durable resistance to Rice stripe virus, protects plant growth from heat stress. *Front. Plant Sci.* 11, 519. doi: 10.3389/fpls.2020.00519

Hayano-Saito, Y., Saito, K., Nakamura, N., Kawasaki, S., Iwasaki, M. (2000) Fine physical mapping of the rice stripe resistance gene locus, *Svb-i*. *Theor. Appl. Genet.* 101, 59–63. doi: 10.1007/s001220051449

Jiang, S., Lu, Y., Li, K., Lin, L., Zheng, H., Yan, F., Chen, J. (2014). Heat shock protein 70 is necessary for *Rice stripe virus* infection in plants. *Mol. Plant Pathol.* 15, 907–917. doi: 10.1111/mpp.12153

Kobayashi, K., Sekine, K., Nishiguchi, M. (2014) Breakdown of plant virus resistance: can we predict and extent the durability of virus resistance? *J. Gen. Plant Pathol.* 80, 327–336. doi: 10.1007/s10327-014-0527-1

栗林数衛 (1931) 稲縞葉枯病に関する研究. 長野県農事試験場報告. 2, 45-69

Krishnan, P., Ramakrishnan, B., Raja Reddy, K., Reddy, V. R. (2011) High temperature effects on rice growth, yield, and grain quality. *Adv. Agron.* 111, 87–206. doi: 10.1016/B978-0-12-387689-8.00004-7

Kwon, T., Lee, J.H., Park, S.K., Hwang, U.-H., Cho, Kwon, T., Lee, J.H., Park, S.K., Hwang, U.H., Cho, J.H., Kwak, D.Y., Youn, Y.N., Yeo, U.S., Song, Y.C., Nam, J., Kang, H.W., Nam, M.H., Park, D.S. (2012) Fine mapping and identification candidate rice genes associated with *qSTV11^{SG}*, a major QTL for rice stripe disease resistance. *Theor. Appl. Genet.* 125, 1033–1046. doi: 10.1007/s00122-012-1893-8

- Ling, K. C. (1972). *Rice Virus Diseases*. Los Baños: The International Rice Research Institute.
- 前田英郎 (2008) 日本陸稲およびイネ野生種の縞葉枯病抵抗性に関する遺伝的解析. *近中四農研報* 7, 71-107
- Nemoto, H., Ishikawa, K., Shimura, E. (1994) The resistance to Rice stripe virus and small brown planthopper in rice variety, IR50. *Breeding Science* 44, 13-18
- 野田聡・大村敏博・村上正雄・土崎常男(1991) イネ縞葉枯病抵抗性品種に対するイネウイルスの感染性. *日本植物病理学会報* 57, 259-262. doi: 10.3186/jjphytopath.57.259
- Park, C. J., Seo, Y. S. (2015) Heat shock proteins: a review of the molecular chaperones for plant immunity. *Plant Pathol. J.* 31, 323–333. doi: 10.5423/PPJ.RW.08.2015.0150
- Qian, L., Zhao, J., Du, Y., Zhao, X., Han, M., Liu, T. (2018) Hsp90 interacts with Tm-2² and is essential for Tm-2²-mediated resistance to Tobacco mosaic virus. *Front. Plant Sci.* 9, 411. doi: 10.3389/fpls.2018.00411
- Razdan, M. K. (2003) *Introduction to Plant Tissue Culture*, 2nd Edn, New Hampshire: Science Publisher.
- Samuel, G. (1931) Some experiments on inoculating methods with plant viruses, and on local lesions. *Ann. Appl. Biol.* 18, 494–507.
- 孫工弥寿雄(1973)イネ縞葉枯病に対するイネ品種抵抗性と病原ウイルスの感染ならびに増殖機構に関する研究. *中国農試研報* E8,1–86
- Spangenberg, G., Wang, Z. Y., Potrykus, I. (1998) “Meristem culture,” in *Biotechnology in Forage and Turf Grass Improvement. Monographs on Theoretical and Applied Genetics*, Vol. 23, eds. R. Frankel, M. Grossman, H. F. Linskens, P. Maliga, and R. Riley (Berlin: Springer), 7–17
- Wang, B., Jiang, L., Zhang, Y., Zhang, W., Wang, Q., Liu, S., Liu, Y., Cheng, X., Zhai, H., Wan, J. (2011) Genetic dissection of the resistance to *Rice stripe virus* present in the *indica* rice cultivar ‘IR24’. *Genome* 54, 611–619. doi: 10.1139/g11-022
- 鷺尾養・江塚昭典・鳥山国土・櫻井義郎 (1968) イネ縞葉枯病抵抗性の簡易検定法ならびに抵抗性品種の育成に関する研究. *中国農試研報* A16, 39–197
- Wu, X., Zuo, S., Chen, Z., Zhang, Y., Zhu, J., Ma, N., Tang, J., Chu, C., Pan, X. (2011) Fine mapping of *qSTV11^{TQ}*, a major gene conferring resistance to rice stripe disease. *Theor. Appl. Genet.* 122, 915–923. doi: 10.1007/s00122-010-1498-z
- Zhang, Y.X., Wang, Q., Jiang, L., Liu, L.L., Wang, B.X., Shen, Y.Y., Cheng, X.N., Wan, J. (2011) Fine mapping of *qSTV11^{KAS}*, a major QTL for rice stripe disease resistance. *Theor. Appl. Genet.* 122, 1591–1604. doi: 10.1007/s00122-011-1557-0

本 会 記 事

1. 第13回植物ウイルス病研究会の報告

第13回植物ウイルス病研究会は、平成30年度植物病理学会大会終了翌日の平成30年3月28日に、晴天と満開の桜に恵まれる中、神戸大学六甲台キャンパス内の滝川記念学術交流会館で約100名の参加を得て開催された。今回は、特に統一テーマを掲げず、果樹ウイルス、ウイルスの生態および基礎ウイルス学の各分野から合計10名の講師の方々に最新の研究動向を紹介して頂いた。

午前中、まず果樹ウイルスとして磯貝雅道博士（岩手大）から「ラズベリー黄化ウイルスの花伝粉伝染」という演題で花粉伝染性植物ウイルスの水平伝染と垂直伝染のメカニズム研究が紹介された。つぎに伊藤隆男博士（農研機構果茶研）から「ブドウとカキから新たに検出されたウイルス・ウイルス」という演題で次世代シーケンサー（NGS）を用いた多様なウイルス・ウイルスの混合感染の検出例が紹介された。さらに鍵和田聡博士（法政大）から「ウメ輪紋ウイルスの宿主範囲と伝染リスク」という演題で本ウイルス日本分離株2系統の木本・草本植物における宿主範囲の検定および種苗類による伝搬やアブラムシによる伝染のリスク管理が紹介された。続いてウイルスの生態について奥田充博士（農研機構中央農研）から「イネ縞葉枯ウイルスの多発要因の解明と新たな防除対策への取り組み」という演題で本ウイルスの生活環に関する最新の知見および本病による被害抑制のための媒介虫防除等の新たな取り組みが紹介された。つぎに久保田健嗣博士（農研機構中央農研）から「青しその生産地におけるシソモザイクウイルスと媒介虫シソサビダニの発生生態」という演題で病原のエンラウイルスと媒介虫のサビダニの生物学的知見や産地におけるそれらの発生実態の解明、診断技術や防除技術が紹介された。

午後には、基礎ウイルス学分野として中原健二博士（北海道大）から「ダイズ栽培化で選抜されたかもしれないクローバ葉脈黄化ウイルス抵抗性について」という演題で栽培ダイズが示す本ウイルスに対する種特異的な抵抗性の作動ステップの解明と遺伝子単離に向けた取り組みが紹介された。つぎに小林括平博士（愛媛大）から「トランスジェニックモデル植物を用いた植物ウイルス病発症機構の解析」という演題でウイルス病発現機構の代表例の紹介および誘導発現系を用いたモデル植物実験系が解説された。さらに兵頭究博士（岡山大）から「植物RNAウイルスの複製機構」という演題でダイアンソウイルスが宿主植物の活性酸素種産生機構をハイジャックし複製に利用していることが提唱された。続いて再びウイルスの生態について吉田直人氏（ホクレン農総研）から「テンサイ黄化病とニンジン黄化病に関与するウイルスの生物学的・遺伝的特性」という演題でテンサイやニンジンに黄化病を引き起こす多様なポレロウイルスの分子系統解析が報告された。最後に関根健太郎博士（琉球大）から「ポストゲノム時代の病原ウイルス探索の現状と課題」という演題でNGS法等によってウイルスを網羅的に検出することが容易になった反面、そのウイルスを病原体として証明することには様々な困難・課題があることが紹介された。

佐野輝男博士（弘前大）、眞岡哲夫博士（農研機構北農研）、大島一里博士（佐賀大）には座長を担当して頂いた。基礎ウイルス学分野の座長は三瀬和之（京都大）が担当した。講演者の皆様には大会の一般講演とは異なり、研究背景なども十分に説明して頂き、内容を理解しやすく感じられた。また、座長の皆様には、活発な質疑応答を先導して頂き、予定時間を超えるほどの盛り上がりも見られた。最後に、講演者、座長の皆様、神戸大学までお越し頂いた聴衆の皆様、本会の運営に携わった岡山大学資源生物学研究所・植物/微生物相互作用グループと京都大学植物病理学研究室の諸氏、および神戸大学の土佐幸雄博士、中屋敷均博士および池田健一博士に感謝申し上げる。

（三瀬和之・鈴木信弘）

（日本植物病理学会ニュース第82号より一部割愛後転載）

2. 植物ウイルス分類委員会からのお知らせ

植物ウイルス分類委員会の委員の変更についてお知らせします。令和3年度からの委員は次の通りです。

植物ウイルス分類委員会委員（◎委員長）

◎ 鈴木信弘 岩波 徹 宇垣正志 大島一里 鍵和田聡 近藤秀樹 笹谷孝英 津田新哉 畑谷達児
藤 晋一 望月知史 山次康幸 吉川信幸

3. 植物ウイルス病研究会からのお知らせ

植物ウイルス病研究会の委員の変更についてお知らせします。令和3年度からの委員は次の通りです。

植物ウイルス病研究会委員

代 表：鈴木信弘

会計幹事：近藤秀樹

地区委員 北日本： 磯貝雅道 佐野輝男 畑谷達児 藤 晋一

関 東： 奥田 充 久保田健嗣 夏秋啓子 山次康幸 眞岡哲夫

西日本： 大島一里 小林栞平 近藤秀樹 鈴木信弘 関根健太郎

三瀬和之 竹下 稔

4. 植物ウイルス病研究会の開催記録

第1回（平成3年4月5日、東京農業大学）

1. ウイルス分類の現状と問題点
 - 1) 植物ウイルス：都丸敬一
 - 2) 細菌・菌類ウイルス：山下修一
 - 3) 動物ウイルス：大谷 明
2. 植物ウイルス病研究における遺伝子構造解析とその意義
 - 1) 植物ウイルス遺伝子の構造と機能：上田一郎
 - 2) 弱毒ウイルスの特性と遺伝子構造：西口正通
 - 3) 植物ウイルス遺伝子形質転換植物の基礎と応用研究：奥野哲郎
 - 4) 遺伝子組み替え植物のウイルス病抵抗性：難波成任

第2回（平成5年4月6日、大阪府立大）

1. 東南アジアと日本の植物ウイルス病
 - 1) 東南アジアに発生するマメ類ウイルス病：亀谷満朗
 - 2) 東南アジアに発生するイネウイルス病とその防除：日比野啓行
 - 3) 東南アジアに発生する野菜類ウイルス病：藤沢一郎
2. 特別講演
 - 1) 動物ウイルスについて考える：畑中正一
3. 植物ウイルスの遺伝子解析の現状と問題点
 - 1) Cucumovirus の遺伝子解析と分類：高浪洋一
 - 2) ブロムモザイクウイルスの遺伝子解析：古沢 巖
 - 3) Cryptovirus の遺伝子解析：夏秋知英

第3回（平成8年4月5日、九州大学国際ホール）

1. 西南団地で問題にされている植物ウイルス病研究の現状と問題点
 - 1) サトウキビのウイルス病：花田 薫
 - 2) サツマイモのウイルス病：酒井淳一
 - 3) カンキツのウイルス病：岩波 徹
2. 特別講演 潜伏感染：森 良一
3. 植物ウイルス由来のタンパク質に関する研究の現状と今後の展望
 - 1) 外被タンパク質の機能：桑田 茂、高浪洋一
 - 2) 移行に関与するタンパク質の機能：渡辺雄一郎
 - 3) ポリメラーゼタンパク質：鳥山重光

第4回（平成10年5月23日、北海道農業試験場）

1. 北海道の植物ウイルス病
 - 1) テンサイそう根病：齋藤美奈子
 - 2) ジャガイモウイルス病の検定：佐藤仁敏
 - 3) 北海道における主要作物のウイルス病とその防除：萩田孝志
2. 特別講演
 - 1) 新興感染症としてのウイルス性ダニ脳炎の疫学：高島郁夫
3. ワークショップ

- 1) 植物ウイルス病の病原をどう呼ぶかー和名、英名、略号などの使い方：大木 理
4. 植物ウイルス抵抗性の分子生物学
 - 1) アラビドプシスにおける CMV 抵抗性：高橋英樹
 - 2) ササゲーCMV システムにおける遺伝子対遺伝子説：柄澤 明
 - 3) トマトの ToMV 抵抗性遺伝子の解析：本吉總男・大森 拓

第5回（平成12年4月5日、倉敷市立美術館）

1. ウイルスの変異と進化
 - 1) 植物レオウイルスの昆虫媒介に関与するタンパク質とその機能：大村敏博
 - 2) カピロウイルスゲノムの構造と分子変異：吉川信幸
2. 特別講演
 - 1) An evolutionary view of plant virus identification: Adrian Gibbs
3. 最近話題のウイルス・ウイロイド病
 - 1) 果樹のウイロイド病：伊藤 伝
 - 2) 日本に発生する begomovirus (*Geminiviridae*) の種とその分子的特徴：大貫正俊
 - 3) メロン黄化えそウイルスを中心としたトスポウイルスの日本での発生：加藤公彦
4. ウイルス・宿主相互作用
 - 1) ブロモウイルスの宿主適応：三瀬和之
 - 2) 植物ウイルスの増殖をサポートする宿主因子の検索：石川雅之・山中拓哉・吉井基泰・内藤 哲
5. 特別記事
 - 1) 植物ウイルス分類の最近の動き：大木 理

第6回（平成14年4月6日、大阪府立大学）

1. 最近話題の植物ウイルス病
 - 1) 近年問題になっているトスポウイルス病害：奥田 充
 - 2) レタスビックベイン病に関わるウイルス：笹谷孝英
 - 3) チューリップ微斑モザイク病と条斑病（仮称）：守川俊幸
2. バイオテクノロジー
 - 1) 基礎・応用研究への利用を目指したハイポウイルスの遺伝子改良
3. 特別講演
 - 1) 微生物の宿主・臓器特異性：サルモネラの一血清型 (*Salmonella Enteritidis*) とニワトリの関係：馬場栄一郎・笹井一美・谷 浩行・深田恒夫
 - 2) *Cis- and trans-acting regulatory elements required for Potato virus X replication* : Kim, K.-H.
4. 植物ウイルス抵抗性の分子機構
 - 1) *Cucumis figarei* のウイルス抵抗性：小堀 崇
 - 2) キュウリモザイクウイルス-シロイヌナズナ系におけるウイルス抵抗性反応：高橋英樹
 - 3) TMV 感染タバコにおける過敏感反応：大橋祐子

第7回（九州大学国際ホール、平成16年3月31日）

1. ウイルス・ウイロイドの遺伝的多様性と宿主適応
 - 1) ウイロイドの病原性と宿主適応：佐野輝男
 - 2) 国内のカンキツが保毒するウイロイドと温州萎縮ウイルスグループの多様性：伊藤隆男
 - 3) ヤマノイモに発生する potyvirus の多様性と起源：藤 晋一
2. 特別講演
 - 1) Analysis of Cucurbit-Infecting Tobamoviruses and Plant Virus Sequencing in Korea : Ryu, K. H.
 - 2) タンパク質構造の柔軟性、動きと機能発現機構：渡邊啓一
3. 植物ウイルス分類の動向
 - 1) 植物ウイルス分類についての最近の動き：大木 理
4. 植物とウイルスの相互作用
 - 1) ウイルス由来配列を利用した多重遺伝子発現系に関する研究：松尾直子・橋本千種・市橋 茜・平塚和之

- 2) RNAサイレンシングがウイルス間相互作用に及ぼす影響：園田昌司
5. 九州・沖縄のウイルス病
- 1) 南九州におけるパッションフルーツのウイルス病について：岩井 久・尾松直志
 - 2) 弱毒ウイルスを利用したサツマイモ帯状粗皮病の防除：山崎修一・酒井淳一・花田 薫
 - 3) トマト黄化葉巻ウイルス病 トマト黄化葉巻ウイルス病の現在及び新系統発生の可能性：上田重文
 - 4) 媒介虫の生態特性に基づいたトマト黄化葉巻病の防除技術：小川恭弘・内川敬介・嶽本弘之・石井貴明・行徳 裕・古家 忠・江口武志

第8回（北海道大学学術交流会館 平成18年6月6日）

1. 北海道のウイルス病
 - 1) マクロアレイによる全ジャガイモウイルスの同時検出法：眞岡哲夫
 - 2) ユリのウイルス病：佐々木 純
2. 植物耐病性強化に向けた研究
 - A. 抵抗性遺伝子の利用
 - 1) カブシクム属植物のウイルス抵抗性機構の解析：鈴木一実・村井 淳・富田麗子・浜田博幸・三浦由雄
 - B. 弱毒ウイルス
 - 1) 異なる蛍光色素でタグしたウイルス利用による混合感染と干渉作用の解析：高橋 翼・吉川信幸・夏秋知英
 - 2) ZYMV弱毒株製剤を利用したキュウリモザイク病の防除：小坂能尚・梁 宝成・安原壽雄
 - 3) 果樹類紋羽病菌の病原力を低下させるマイコウイルス：兼松聡子・吉田幸二・松本直幸
3. 特別講演
 - 1) Development of multivirus resistant plants by using catalytic antibody: Lee Sukchan
4. 転写後型ジーンサイレンシング機構からウイルス病防除へのアプローチ
 - 1) Cucumovirusのサブレッサー遺伝子と病徴発現：後藤一法・小堀 崇・増田 税
 - 2) ベゴモウイルスのサブレッサーと病徴発現：今 辰哉・池上正人
 - 3) RNAサイレンシングによるテンサイそう根病の抵抗性：I. B. Andika・玉掛秀人・近藤秀樹・玉田哲男
 - 4) Tobamovirusに起因するトマトとピーマンモザイク病の防除：津田新哉

第9回（倉敷市 平成20年4月29日）

植物ウイルスとマイコウイルスの接点

- 1) 植物におけるRNAサイレンシングの移行と拡大：西口 正通・A. K. M. Nazmul Haque
- 2) Fungal RNA silencing pathways and mycovirus-mediated alterations of fungal-plant pathogenic interactions : Donald L. Nuss
- 3) Mycovirus vs. fungal individualism : Naoyuki Matsumoto
- 4) 分節型ラプト様ウイルス、ランエソ斑紋ウイルスの分子生物学的および分子系統学的解析：近藤秀樹・前田孚憲・玉田哲男
- 5) イネと昆虫を宿主とするイネ萎縮ウイルス：清水 巧・大村敏博
- 6) Viruses, symbiosis and mutualism : Malrilyn J. Roossinck, Ping Xu, Luis Marquez, and James Susaimuthu.
- 7) ブロモウイルス感染シロイヌナズナにおける全身えそ病徴発現機構：三瀬和之・岩橋福松・猿渡洋介・林 瑞恵・樽林大樹・乾 裕江・藤崎恒喜・海道真典・奥野哲郎
- 8) Identification and characterization of fungal host factors interacting with RNA dependent RNA polymerase of Fusarium graminearum virus (FgV)-DK21 : Sun-Jung Kwon, Kyung-Mi Lee, Jisuk Yu and Kook-Hyung Kim.

第10回（京都テルサ 平成22年4月21日）

1. ウイルス感染により誘起される病徴の発現機構
 - 1) トバモウイルスの感染によるタバコのモザイクパターン形成機構：平井克之・久保田健嗣・望月知史・津田新哉・飯 哲夫
 - 2) トマトモザイクウイルスL11Y系統感染タバコ植物におけるクロロシス誘導：大西 純・平井克之・

神田絢美・宇杉富雄・飯 哲夫・津田新哉

特別講演

β Cl, the pathogenicity factor of TYLCCNV, interacts with AS1 to alter leaf development and suppress selective jasmonic acid responses. Yang, J.-Y., Iwasaki, M., Machida, C., Machida, Y., Zhou, X. and Chua, N.-H.

- 3) メロンえそ斑点ウイルスの複製酵素 p29 が誘起する「えそ」の発病機構：望月知史・平井克之・神田絢美・大西 純・大木健広・津田新哉
 - 4) CC-NBS-LRR 型抵抗性タンパク質によるトバモウイルス外被タンパク質認識と局部病斑形成：小林 括平・富田麗子・関根健太郎・坂本 勝
2. 海外侵入・新興・再興ウイルス・ウイロイド病
- 1) 本邦における plum pox virus の発生：前島健作・難波成任
 - 2) トマト退緑萎縮ウイロイドの発生とその特性：松下陽介・松浦昌平・宇杉富雄・小塚玲子・津田新哉
 - 3) ウリ類退緑黄化ウイルスの同定と遺伝的特徴について：奥田 充
 - 4) ジャガイモモップトップウイルス-25年ぶりの再発生と防除戦略の基本的な考え方：眞岡哲夫

第 11 回 (岐阜大学 平成 25 年 3 月 30 日)

1. 植物ウイルスの病徴の誘導

- 1) 2 種ウイルスのシナジズムと局部干渉：竹下 稔・小泉恵美子・野口眞季子・古屋成人・土屋健一
- 2) ポテックスウイルスによる全身壊死病徴の発現機構：小松 健・橋本将典・山次康幸・難波成任
- 3) CMV によるモザイク病徴の発現メカニズム：望月知史
- 4) CMV-Y サテライト RNA による黄化誘導メカニズム：志村華子・増田 悦

特別講演 1

Alternanthera mosaic virus TGB3 protein interactions with *Nicotiana benthamiana* PsbO enable chloroplast localization and veinal necrosis associated with TGB3-over-expression. Lim Hyoun-Sub and John Hammond.

特別講演 2

ICTV 第 9 次報告書での植物ウイルスの分類：大木 理

2. 植物ウイルス病に対する新技術

- 1) 数理モデルを利用した植物ウイルス生態の理解：宮下脩平
- 2) 人工 DNA 結合タンパク質を用いたウイルス耐病性植物の創出：世良貴史
- 3) レクチン抵抗性：新規な植物ウイルス耐性システム：山次康幸・前島健作・尾関丈二・小松 健・難波成任
- 4) 潜在性ウイルスを利用した難防除ウイルス病制御のためのワクチンウイルス開発：吉川信幸・滝 文希・加藤貴央・田村顕裕・山岸紀子・Li Chunjiang・夏秋知英
- 5) ウイルスタンパク質の機能解析に基づくイネへの強度抵抗性付与：大村敏博・清水 巧・一木珠樹・笹谷孝英・Wei Taiyun

第 12 回 (岡山大学 平成 28 年 3 月 24 日)

Interface between plant and fubgal viruses II ~植物ウイルスとマイコウイルスの接点 II~

- 1) Virus intracellular movement: Utilizing the host intracellular trafficking network. Richard S. Nelson, Amr Ibrahim, James E. Schoelz.
- 2) Molecular mechanisms of intra- and intercellular movement of a dianthovirus. Masanori Kaido
- 3) The P1 protease modulates potyviral replication and host defense responses. Fabio Pasin, Hongying Shan, Carlos D. Ordoñez, Mingmin Zhao, Sandra Martínez-Turiño, Bernardo Rodamilans, Carmen Simón-Mateo and Juan Antonio García.
- 4) Spatial and temporal evolution of potyviruses . Kazusato Ohshima
- 5) Yeast as a genetic platform to explore plant virus-host interactions: from 'omics' to functional studies. Peter D. Nagy.
- 6) Molecular mechanisms of RNA silencing suppression by flexiviruses. Yukari Okano.
- 7) Mycoviruses in fungal crop pathogen *Sclerotinia sclerotiorum*. Daohong Jiang.
- 8) Mycoviruses of the rice blast fungus, *Magnaporthe oryza*. Hiromitsu Moriyama.
- 9) How to engineer useful mild strains for cross protection, using potyvirus as an example. Shyi-Dong Yeh and Tzu-Tung Lin.

- 1 0) Highly activated RNA silencing via strong induction of dicer by one virus can interfere with the replication of an unrelated virus. Sotaro Chiba and Nobuhiro Suzuki.

第13回 (神戸大学 平成30年3月28日)

- 1) ラズベリー黄化ウイルスの花粉伝染：磯貝雅道
- 2) ブドウとカキから新たに検出されたウイルス・ウイロイド：伊藤隆男
- 3) ウメ輪紋ウイルスの宿主範囲と伝染リスク：鍵和田聡・延原 愛・川合 昭・西尾 健
- 4) イネ縞葉枯ウイルスの多発要因の解明と新たな防除対策への取り組み：奥田 充・柴 卓也・平江雅宏
- 5) 青しその生産地におけるシソモザイクウイルスと媒介虫シソサビダニの発生生態：久保田健嗣・多々良明夫
- 6) ダイズ栽培化で選抜されたかもしれないクローバ葉脈黄化ウイルス抵抗性について：中原健二・山田哲也
- 7) トランスジェニックモデル植物を用いた植物ウイルス病発症機構の解析：寺田 忍・Bhor Sachin Ashok・望月知史・館田知佳・関根健太郎・田谷萌香・Islam Shaikhu・中村瑞生・三好沙季・八丈野孝・小林括平
- 8) 植物 RNA ウイルスの複製機構：兵頭 究
- 9) テンサイ黄化病とニンジン黄化病に関与するウイルスの生物学的・遺伝的特性：吉田直人・玉田哲男
- 1 0) ポストゲノム時代の病原ウイルス探索の現状と課題：関根健太郎

植物ウイルス病研究会レポート (第 14 号)

発行 2022 年 3 月 24 日

発行者 一般社団法人 日本植物病理学会

会長 土佐 幸雄

〒114-0015 東京都北区中里 2 丁目 28 番 10 号

日本植物防疫協会内 電話 03 (5980) 0281

編集者 日本植物病理学会植物ウイルス病研究会

代 表 鈴木 信弘

編集幹事 畑谷 達児

無断複製・転載を禁ず

ISSN 0919-2956 No.14

Printed in Japan

PSJ Plant Virus Disease Workshop Report No. 14

New findings toward production of virus-tolerant plants

CONTENTS

Papers in the 14th PSJ Plant Virus Disease Workshop

Resistance to plant viruses in upland crops of cold region	Ohki, T. -----	1
Tolerance to potato spindle tuber viroid in wild tomato species	Naoi, T. and Hataya, T. -----	10
Apple latent spherical virus: structure, biological properties, and usefulness as a plant virus vector	Yoshikawa, N. -----	20
Viroid research – recent topics	Sano, T. -----	33
Priming of RNA silencing and its involvement in virus resistance	Ando, S., Miyashita, S. and Takahashi, H. -----	54
Molecular identification and dissection of novel recessive resistance genes against plant viruses	Hashimoto, M., Neriya, Y., Keima, T., Hagiwara-Komoda, Y., Namba, S. and Yamaji, Y. -----	63
Renewed virus-resistance alleles in tomato	Atarashi, H., Kawakubo, A., Jayasinghe, W. H., Kwon, J., Kim, H., Konishi, C., Yamada, T., Masuta, C. and Nakahara, K. -----	71
Plant antiviral immunity mediated by double-stranded ribonucleases	Ishibashi, K. -----	82
A rice stripe resistance gene, <i>Stvb-i</i> , supports rice plant growth	Hayano-Saito, Y. -----	90
Appendix	-----	99

PSJ Plant Virus Disease Workshop Report is biannually published by the Phytopathological Society of Japan

BUSSINESS CORRESPONDENCE should be made to:

The Phytopathological Society of Japan

C/o Japan Plant Protection Association., 2-28-10 Nakazato, Kita-ku, Tokyo 114-0015, Japan

Managing Editors (2022)

N. Suzuki (Okayama University)

T. Hataya (Hokkaido University)