

| | |
|-----------|---|
| 氏 名 | 柳澤 広宣 |
| 本籍（国籍） | 栃木県 |
| 学 位 の 種 類 | 博士（農学） |
| 学 位 記 番 号 | 連研第 720 号 |
| 学位授与年月日 | 平成 30 年 9 月 25 日 |
| 学位授与の要件 | 学位規則第 5 条第 1 項該当課程博士 |
| 研究科及び専攻 | 連合農学研究科 生物生産科学 |
| 学位論文題目 | ポスピウイロイドの包括的検出法の開発と花粉を介した垂直・水平伝染メカニズムの解明（Development of comprehensive detection method of pospiviroid and elucidation of vertical and horizontal transmission mechanism through pospiviroid-infected pollen） |
| 学位審査委員 | 主査 長谷 修(山形 教授) 副査 小林 隆(山形 准教授),佐野 輝男(弘前 教授),磯貝 雅道(岩手 准教授),松下 陽介(農業・食品産業技術総合研究機構 主任研究員) |

論 文 の 内 容 の 要 旨

農業生産に用いる多くの種苗は海外で生産され国内に輸入されている。それらの海外産種苗に国内未発生病原体が紛れて侵入することが危惧される。トマト等ナス科作物に甚大な被害を引き起こすポスピウイロイドは、種子伝染、無病徴感染、花粉伝染等により発生地域が拡大し世界的な問題となっている。そこで本研究はポスピウイロイドの包括的検出法の開発と、花粉を介した垂直・水平伝染機構の解明を目的とし、①tomato planta macho viroid (TPMVd) 及び pepper chat fruit viroid (PCFVd) の宿主範囲・種子伝染、②ポスピウイロイド全 8 種の遺伝子診断による包括的検出法の開発、③TPMVd 及び potato spindle tuber viroid (PSTVd) の感染花粉授粉後の水平伝染における変遷の相違、④花粉を介した水平・垂直伝染に及ぼすウイロイドゲノムの左末端領域の影響について検討した。

① TPMVd 及び PCFVd の宿主範囲・種子伝染性

TPMVd と PCFVd は宿主範囲や種子伝染能の不明なウイロイド種である。そこで植物検疫の検査対象となる植物種の特定を行うため、両ウイロイドの宿主範囲及び種子伝染の有無を調査した。国内へ種子として輸入量の多い 10 属 32 種の植物種に接種した結果、TPMVd と PCFVd はそれぞれ 16, 15 種に感染した。これらの感染植物の内、両ウイロイド共にトマトやジャガイモでは明瞭な病徴が生じ、ピーマン果実は小型化・奇形したが、その他の植物では全て無病徴感染であった。次に TPMVd と PCFVd のトマトにおける種子伝染率はそれぞれ 4.4, 1.4%であった。さらにペチュニアを用いて感染植物と健全植物間の交配試験を行い、花粉親及び種子親の種子伝染への影響を調査した。両親感染の場合、TPMVd, PCFVd, PSTVd の種子伝染率はいずれも高率(>90%)であった。種子親のみ感染の場合、100, 65.3, 97.7%であり、花粉親のみ感染の場合、91.8, 69.2, 20.8%であった。以上から TPMVd と PCFVd の新たな宿主植物及び種子伝染する植物が明らかになった。またいずれの

ウィロイドでも種子親が感染していた場合種子伝染率は高率である一方、花粉を介した種子伝染率は3種ウィロイド間に大差が生じた。

② ポスピウィロイド全8種の遺伝子診断による包括的検出法の開発

各国の植物検疫機関はポスピウィロイド全種を検査対象とする検査法を必要としている。そこでリアルタイム RT-PCR を用いた全8種の網羅的検出法、並びに種の識別法を開発した。本法はSYBR Green法による1次スクリーニングとTaqMan法による2次スクリーニングの2段階で構成した。1次スクリーニングは、3つの反応系（6種ウィロイドに対応したユニバーサルプライマー、並びにCLVd及びPCFVd特異的プライマー）でPCRを行い、CLVd及びPCFVdの識別と、残る6種を検出できた。次に2次スクリーニングは、ユニバーサルプライマーで検出した6種ウィロイドの種の識別ができた。さらに、種子伝染するウィロイド5種について、399粒の健全トマト種子に1粒の各ウィロイドの感染トマト種子を混合したサンプルから各ウィロイドを検出・識別できた。以上より、種子からのウィロイド検出が可能な、高感度で高精度の検出法を開発できた。

③ TPMVd及びPSTVdの感染花粉授粉後の水平伝染における変遷の相違

花粉伝染には感染花粉から後代種子への伝染（垂直伝染）と授粉した母体への伝染（水平伝染）があるが、花粉内のウィロイドが受粉した母体へどのように感染するのか未解明である。

①の結果からTPMVdは高率に垂直伝染したが、PSTVdは低率であったため、受粉後の2種ウィロイド間には動態に差があると考えた。そこで感染花粉受粉後の伝染メカニズムを解明するため、授粉後のTPMVdとPSTVdの分布を比較した結果、TPMVdは花粉管伸長に伴い花柱や子房で感染し、次に胎座等へ感染拡大した。PSTVdは花粉管が花柱を伸長した際、子房から検出されず水平伝染しなかった。それゆえ感染花粉の花粉管から漏れ出したウィロイドが花柱や子房に感染するか否かが重要であると推察した。

④ 花粉を介した水平・垂直伝染に及ぼすウィロイドゲノムの左末端領域の影響

花粉伝染に関与するウィロイドゲノムの遺伝子領域を特定するため、TPMVd-PSTVd間で左末端（TL）及び病原性（P）領域を置換したキメラを作製し、授粉後の水平及び垂直伝染を調査した。その結果、TPMVdのTL領域を有するウィロイドキメラは授粉後に花柱から子房に高率に到達し水平伝染を引き起こし、高率に垂直伝染した。またPSTVdのTL領域を有するウィロイドキメラは花粉管が花柱を伸長する際に消失した。そのため、TL領域はウィロイドの垂直及び水平伝染に対し重要な因子を有している可能性がある。

以上から、開発したポスピウィロイドの包括的検出法により感染植物を排除すると共に、感染花粉を介した垂直及び水平伝染の感染機構を解明したことで、感染拡大の防止に繋げることができる。本研究は、ポスピウィロイドの国内への侵入、並びに感染植物の拡散の阻止に向けた植物検疫制度の向上に資する基礎的情報を示した。

論文審査の結果の要旨

トマト等ナス科作物に被害を与えるポスピウィロイドは種子伝染、無病徴感染、花粉伝染による発生地域拡大が植物防疫の重大な問題となっている。本論文ではポスピウィロイド全種の包括的検出法の開発と、花粉を介した垂直・水平伝染機構の解明を目的とした。

第1章では、tomato planta macho viroid (TPMVd) 及び pepper chat fruit viroid

(PCFVd) について、不明であった宿主範囲・種子伝染能を調査した。輸入量の多い植物種を供試した結果、TPMVd と PCFVd はそれぞれ 16 と 15 種の植物に感染し、トマトとジャガイモを除いて無病徴感染であった。また、トマトとペチュニアでの種子伝染を初確認し、花粉による垂直伝染率はウイロイド種間で大差があることが明らかとなった。

第 2 章では、ポスピウイロイドの包括的検出法の開発を目的に、RT-qPCR による全 8 種の網羅的検出法と種識別法を検討した。本法は 1 次検定 (SYBR Green) と 2 次検定 (TaqMan) で構成した。本法により 399 粒の健全トマト種子に 1 粒の各種ウイロイドの感染トマト種子を混合した試料からウイロイドを検出・識別することに成功した。

第 3 章では、高垂直伝染性の TPMVd 及び低垂直伝染性の potato spindle tuber viroid (PSTVd) の感染花粉授粉後の水平伝染における変遷の相違を比較した。その結果、TPMVd は花粉管伸長に伴い花柱や子房で感染後に胎座等へ感染拡大したが PSTVd は子房から検出されず水平伝染しなかった。それゆえ花粉管から漏れ出したウイロイドは花柱や子房に感染することが重要であると推察した。

第 4 章では、TPMVd と PSTVd 間でゲノムの左末端領域 (TL) と病原性領域 (P) を置換したキメラを作製し、花粉を介した水平・垂直伝染に及ぼすウイロイドゲノムの領域を解析した。その結果、TPMVd の TL を有するキメラは高率に水平伝染を引き起こし高い垂直伝染率だった。一方 PSTVd の TL を有するキメラは水平伝染せず垂直伝染率は低かった。よって、垂直及び水平伝染に重要な因子は左末端領域にあると特定した。

本研究により、開発した包括的検出法で感染植物を排除すると共に、花粉による垂直・水平伝染の感染機構を解明したことで感染拡大防止に繋げられ、植物防疫上の基礎的情報を示した。これらの知見は植物病理学の基礎的知見を深め、世界の植物防疫に貢献すると期待される。よって、本審査委員会は、「岩手大学大学院連合農学研究科博士学位論文審査基準」に則り審査した結果、本論文を博士 (農学) の学位論文として十分価値のあるものと認めた。

学位論文の基礎となる学術論文

1. Yanagisawa, H., Matsushita, Y., 2017. Host ranges and seed transmission of *Tomato planta macho viroid* and *Pepper chat fruit viroid*. *European Journal of Plant Pathology*, 149, 211–217.
2. Yanagisawa, H., Shiki, Y., Matsushita, Y., Ooishi, M., Takaue, N., Tsuda, S., 2017. Development of a comprehensive detection and identification molecular based system for eight pospiviroids. *European Journal of Plant Pathology*, 149, 11–23.
3. Yanagisawa, H., Matsushita, Y., 2018. Differences in dynamics of horizontal transmission of *Tomato planta macho viroid* and *Potato spindle tuber viroid* after pollination with viroid-infected pollen. *Virology*, 516, 258–264.

参考論文

1. Matsushita, Y., Yanagisawa H., 2018. Distribution of *Tomato planta macho viroid* in germinating pollen and transmitting tract. *Virus Genes* 54, 124–129.