

博士論文要約 (Summary)

平成 27 年 10 月入学

連合農学研究科 生物生産科学専攻

氏 名 柳澤 広宣

タイトル	ポスピウイルス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)
<p>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の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ルスは、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ルス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ポスピウイルス全 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ルスゲノムの左末端領域の影響について検討した。</p> <p>① TPMVd 及び PCFVd の宿主範囲・種子伝染性</p> <p>TPMVd と PCFVd は宿主範囲や種子伝染能の不明なウイルス種である。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、両ウイルス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、両ウイルス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 及び 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。またいずれのウイルス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 種ウイルス間に大差が生じた。</p> <p>② ポスピウイルス全 8 種の遺伝子診断による包括的検出法の開発</p> <p>各国の植物検疫機関はポスピウイルス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 種ウイルス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 種ウイルスの種の識別ができた。さらに、</p>	

種子伝染するウイロイド 5 種について、399 粒の健全トマト種子に 1 粒の各ウイロイドの感染トマト種子を混合したサンプルから各ウイロイドを検出・識別できた。以上より、種子からのウイ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、花粉内のウイ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 種ウイ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検出され、その後胎座等においても検出された。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イ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イ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イロイドゲノムの遺伝子領域を特定するため、TPMVd-PSTVd 間で TL 及び 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 領域を有するウイ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 領域を有するウイ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 領域はウイ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、開発したポスピウイ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、ポスピウイ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。