

光るムギ類萎縮ウイルスをムギに感染させる技術を開発 ～ 少しの工夫がブレークスルーにつながった ～

【発表のポイント】

- ・感染したウイルスを光らせることは、ウイルスの増殖や広がりを調べるだけでなく、植物の抵抗性遺伝子の解析などにも利用できます。ムギ類萎縮ウイルスおよび同属のウイルスにおいて、蛍光タンパク質などの外来遺伝子をもつウイルス（ウイルスベクター）をムギ類に接種し、全身感染させることは世界中で誰も成功していませんでした。
- ・そこで著者らは、ウイルスベクターをいったんジョンソングラスに接種して感染させたのち、その感染葉を接種源に用いることで、オオムギに全身感染させることに成功しました。
- ・なぜジョンソングラスを使わないとオオムギに感染しないのか理由は未だ不明ですが、この手法により同属の他のウイルスもウイルスベクターをムギ類に感染させられることが期待され、研究のブレークスルーとなる接種技術となりました。

■研究概要

宇都宮大学農学部の西川尚志准教授、煉谷裕太朗助教、夏秋知英特命教授を中心とする植物病理学研究室は、ムギ類萎縮ウイルス（Japanese soil-borne wheat mosaic virus: JSBWMV）の感染性クローン（注1）をもとに、緑色蛍光タンパク質を発現するウイルスベクターをいくつか構築しましたが、これまでの報告と同様に、すべてオオムギに感染しませんでした。そこで、蛍光タンパク質の種類、ウイルスゲノムへの挿入部位、感染効率の良い接種法を検討した結果、蛍光タンパク質としてサンゴ由来のアザミグリーンが安定して維持され、また、ウイルスベクターをイネ科牧草（雑草）のジョンソングラスに接種し、その感染葉の汁液を用いるとオオムギに全身感染し、蛍光タンパク質を発現することが分かりました（図1）。ウイルスベクターをオオムギに直接接種したり、先行研究に倣ってベトナムタバコ経由で接種しても感染しない理由は未だ不明ですが、オオムギと同じ単子葉類のジョンソングラスに感染することでオオムギに感染可能な状態になると考えられます。これまで同属ウイルスの発現ベクターもオオムギやコムギへの全身感染に成功した例は世界中で全くありませんでしたが、本手法によりウイルスやムギ類の遺伝子解析が飛躍的に進むと期待できます。

本研究成果は、9月10日、国際学術誌「Journal of General Plant Pathology」のオンライン版に掲載されました。また、図1は、冊子のカバー写真として掲載される予定です。



(図 1) オオムギに感染し、アザミグリーンを発現したウイルスベクター。モザイク症状が見られる葉 (左) に紫外線を当てると緑色蛍光が見られる (右)。

■研究の背景

JSBWMV は *Furovirus* 属のウイルスで、オオムギやコムギに感染し萎縮や黄化を引き起こすため、減収や品質低下の原因となっています (図 2)。JSBWMV は土壌中のポリミキサ菌によって媒介され、またその休眠胞子は土壌中に 10 年以上安定して存在するため、化学農薬での防除は効果の持続性や環境への影響を鑑みると適切な防除法とは言えず、唯一有効な対策は抵抗性品種の育成のみとなっています。しかし、抵抗性遺伝子は明らかになっておらず、抵抗性品種を迅速に選抜する手法も確立されていません。そこで、蛍光タンパク質を発現するウイルスベクターを用いてウイルスの増殖を可視化することができれば、抵抗性品種の迅速な選抜が可能になると考えられますが、これまでウイルスベクターをオオムギの接種細胞に限り感染、発現させた例はあるものの、全身に感染させた例はなく、この分野の研究はあまり進んでいませんでした。



(図 2) 圃場におけるオオムギの様子。罹病性品種 ‘とちのいぶき’ (左) と抵抗性品種 ‘アスカゴールデン’ (右)

■研究方法

まず、蛍光タンパク質としてよく使われている緑色蛍光タンパク質 (GFP) 遺伝子を用いて、ウイルスゲノムのいくつかの部位に挿入した GFP 発現ベクターをいくつか作製しました。また、オオムギへの接種法として、オオムギの葉に直接接種する方法と、いったんベンサミアナタバコに接種してウイルスを増殖させた後、その汁液をオオムギに接種する方法 (汁液接種) (注 2) を行いました。また、試行錯誤の末 (詳細は研究成果参照)、蛍光タンパク質としてアザミグリーンを使用し、アザミグリーン発現ベクターをジョンソングラスに接種する手法も導入することにより、オオムギへの接種法を確立しました。

■研究成果

・オオムギへの接種試験

JSBWMV の感染性クローンをオオムギに接種すると感染するものの、各種 GFP 発現ベクターをオオムギに接種してもこれまでの報告通り、全く感染しませんでした。そこで、より効率の良い接種法として、ベンサミアナタバコに接種してウイルスを増殖させた後、オオムギに接種する方法を試しましたが、それでも感染しませんでした。

・GFP 遺伝子の安定性

ベンサミアナタバコに感染したウイルスは GFP 遺伝子の一部が抜け落ちることが分かりました。そこで、GFP と同じオワンクラゲ由来ではなく、サンゴ由来の蛍光タンパク質であるアザミグリーンという緑色蛍光タンパク質を用いたところ、抜け落ちることなく 3 か月以上

安定して維持することが確認できました。

・接種法の検討

オオムギに感染しない理由は蛍光タンパク質の種類によるものではなく、その理由は未だ不明ですが、単子葉植物体内における何らかの働きが重要であると考え、単子葉類の雑草であるジョンソングラスに接種しました。その結果、ウイルスは植物体全身には移行せず接種葉に留まりましたが、そこで緑色蛍光が観察されました。その蛍光が見られた葉を用いてオオムギに汁液接種したところ、オオムギの全身にウイルスが感染し、緑色蛍光が観察されました（図1）。さらに蛍光が見られる葉を用いてコムギにも感染させることが出来ました。

■今後の展望（研究のインパクトや波及効果など）

JSBWMV および同属ウイルスの先行研究では、双子葉植物であるベンサミアナタバコに感染する GFP 発現ベクターの報告はあるものの、本来の宿主であるムギ類の全身に感染するベクターの報告はありませんでした。そのため、本研究は、ムギ類に全身感染する外来遺伝子発現ベクターおよび接種法の世界初の報告となります。今後は、作製したウイルスベクターとその接種法を用いてムギ類の抵抗性遺伝子選抜や各種遺伝子の機能解析を行っていきたいと考えています。

■論文情報

論文名：First report of a furovirus vector systemically expressing fluorescent protein in barley and wheat

雑誌名：Journal of General Plant Pathology

著者：Chika Fukushima, Wei-Qin Wang, Yutaro Neriya, Tomohide Natsuaki, Hisashi Nishigawa

URL：<https://doi.org/10.1007/s10327-022-01095-0>

■用語説明

注1 感染性クローンとは、植物に接種すると元のウイルスが生成するように作製した DNA です。この感染性クローンに蛍光タンパク質の遺伝子を挿入することで、蛍光タンパク質を発現するウイルスベクターを作ることができます。

注2 汁液接種とは、ウイルスが感染した植物の葉をすりつぶした液を使って、別の植物の葉にこすりつけてウイルスを感染させる接種法です。

■英文概要

Japanese soil-borne wheat mosaic virus is a furovirus that causes severe stunting and mosaic in susceptible barley and wheat. For resistance screening, systemic virus infections can be visualized using virus that expresses a fluorescent protein (FP). In constructing a furovirus vector that expresses a FP when systemically infecting a monocot, we showed that Azami-Green gene was more stable than green fluorescent protein gene in the vector genome in *Nicotiana benthamiana* and that sap from vector-infected Johnsongrass is suitable inoculum for barley. This is the first report of a furovirus vector that stably and systemically expresses a FP gene in monocotyledons.

本件に関する問い合わせ

(研究内容について)

国立大学法人 宇都宮大学 学術院 准教授 西川 尚志

TEL : 028-649-5449 FAX : 028-649-5449 E-mail : nishigawa@cc.utsunomiya-u.ac.jp

(報道対応)

国立大学法人 宇都宮大学 広報室 (広報係)

TEL : 028-649-5201 FAX : 028-649-5026 E-mail : kkouhou@miya.jm.utsunomiya-u.ac.jp