

学位論文題名

形質転換によるジャガイモ葉巻ウイルス

抵抗性ジャガイモに関する研究

学位論文内容の要旨

ジャガイモ葉巻ウイルス（PLRV）はジャガイモの品質と収量の低下をもたらす世界的にもっとも重要なジャガイモのウイルス病原である。その防除は現在ウイルスフリー種いもの作成と媒介昆虫アブラムシの防除にたよっている。一方、病害抵抗性品種の育成は最も経済的で、効果ある防除法であるが、ジャガイモは野生種の抵抗性遺伝子を栽培種に導入する育種法が成果を上げていない。そこで、本研究では、PLRV抵抗性ジャガイモの作出を目的とし、種々の外来遺伝子、即ちPLRVの外被タンパク質（CP）遺伝子、PLRVゲノム上の open reading frame（ORF）2（ウイルス複製酵素成分）および分裂酵母（*Schizosaccharomyces pombe*）由来二本鎖RNA分解酵素の遺伝子*pac1*を栽培品種に導入した形質転換体の抵抗性を検定・解析した。その結果、完全なウイルス免疫を獲得した形質転換体は得られなかったが、遺伝子導入によってウイルス増殖抑制効果があることを明らかにした。

1. PLRVのCP遺伝子を導入した形質転換ジャガイモのPLRV抵抗性検定と解析

PLRVのCP遺伝子を2種類の異なる発現ベクターで導入した形質転換ジャガイモについて、導入遺伝子の発現確認とウイルス抵抗性検定を行った。PLRV-CP遺伝子のみを導入した形質転換ジャガイモ15系統、PLRV-CP遺伝子の上流に翻訳効率を上げるためにジャガイモXウイルスの $\alpha\beta$ -leader配列を付加して導入した形質転換ジャガイモ17系統それぞれに、モモアカアブラムシでPLRVを接種した。感染の有無とウイルス蓄積量をELISAで調べたところ、接種当代では非形質転換系統に比べ低いELISA値を示す形質転換系統が得られた。特に、CP遺伝子のみを導入した形質転換ジャガイモ1系統（MQ35）、および $\alpha\beta$ -leader配列を付加したCP遺伝子を導入した形質転換ジャガイモ1系統（AB32）では、顕著

な差が確認され、ウイルス増殖が抑制されていると考えられた。次代検定では、MQ35は非形質転換系統との間に有為な差がみられず、AB32では非形質転換系統との間に有為な差がみられたが、顕著ではなかった。MQ35を含む形質転換ジャガイモ5系統をサザンハイブリダイゼーションにより、また、MQ35とAB32を含む形質転換ジャガイモ8系統をゲノミックPCRにより導入遺伝子の存在を確認した。またMQ35とAB32を含む形質転換ジャガイモ11系統について、ノーザンハイブリダイゼーションにより導入遺伝子が予想通りに転写されていることを確認した。また形質転換ジャガイモのPLRV抵抗性と発現RNA集積量の間に関連はみられなかった。

ウイルス増殖抑制効果を持つ形質転換ジャガイモにウイルス伝播抑制効果があるか否か調べるために、PLRVに感染したMQ35およびAB32を獲得源とし、アブラムシ伝搬試験を行った。感染非形質転換ジャガイモを獲得源にした場合に比べて、これら感染形質転換体の伝搬効率は低く、ウイルス防除効果が期待できた。

2. PLRVのORF2を導入した形質転換ジャガイモの作出およびPLRV抵抗性の検定と解析

北海道大学で継代保存しているPLRVのゲノムを鋳型としてRT-PCR法により、ウイルスゲノム複製酵素をコードするORF2をcDNAクローニングし、塩基配列を決定した。更に得られたORF2のcDNAを植物発現ベクターのカリフラワーモザイクウイルス35Sプロモーターとノバリン合成酵素遺伝子ターミネーターの間に挿入し、構築したプラスミドを

*Agrobacterium tumefaciens*に取り込ませ、これをチューバーディスク法によって感染させジャガイモに導入した。カナマイシン耐性で選抜したジャガイモ32系統にPLRVを接種しELISAを行ったところ、接種当代では非形質転換系統に比べ低いELISA値を示す系統が得られた。特に、40M7では顕著な差が確認され、ウイルス増殖が抑制されていると考えられた。

40M7を含む8系統について、ゲノミックPCRとノーザンハイブリダイゼーションにより導入遺伝子の存在と転写を確認した。その結果、形質転換ジャガイモの抵抗性と発現RNA集積量の間に関連はみられなかった。

3. *S. pombe* の *pac1* を発現する形質転換ジャガイモのPLRV抵抗性検定

S. pombe の *pac1* を発現する形質転換ジャガイモ3系統にPLRVを接種し、ELISAを行ったところ、接種当代では3系統いずれも非形質転換系統に比べ低いELISA値を示し、ウイルス増殖が抑制されていると考えられた。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 上 田 一 郎
副 査 教 授 生 越 明
副 査 教 授 喜久田 嘉 郎

学 位 論 文 題 名

形質転換によるジャガイモ葉巻ウイルス

抵抗性ジャガイモに関する研究

本論文は、7章で構成され、図51、表23、引用文献121、総頁数169頁の和論文で、他に参考論文1編が添えられている。

本研究では、ジャガイモ葉巻ウイルス（PLRV）抵抗性ジャガイモの作出を目的とし、種々の外来遺伝子、即ちPLRVの外被タンパク質（CP）遺伝子、PLRVゲノム上の open reading frame（ORF）2（ウイルス複製酵素成分）および分裂酵母（*Schizosaccharomyces pombe*）由来二本鎖RNA分解酵素の遺伝子 *pac1* を栽培品種に導入した形質転換体の抵抗性を検定・解析した。その結果、完全なウイルス免疫を獲得した形質転換体は得られなかったが、遺伝子導入によってウイルス増殖抑制効果があることを明らかにした。主な研究成果は以下のようにまとめられる。

1. PLRVのCP遺伝子を導入した形質転換ジャガイモのPLRV抵抗性検定と解析

PLRVのCP遺伝子を導入した形質転換ジャガイモについて、その発現確認とウイルス抵抗性検定を行った。PLRV-CP遺伝子のみを導入した形質転換ジャガイモ15系統、翻訳効率を上げるためにPLRV-CP遺伝子の上流にジャガイモXウイルスの $\alpha\beta$ -leader配列を付加して導入した形質転換ジャガイモ17系統それぞれに、モモアカアブラムシでPLRVを接種した。感染の有無とウイルス蓄積量をELISAで調べたところ、接種当代では非形質転換系統に比べ低いELISA値を示す形質転換系統が得られた。特に、CP遺伝子のみを導入した形質転換ジャガイモ1系統（MQ35）、および $\alpha\beta$ -leader配列を付加したCP遺伝子を導入した形質転換ジャガイモ1系統（AB32）では特に低く、ウイルス増殖が抑制されていると考えられた。次代検定では、MQ35は非

形質転換系統との間にELISA値の有為な差がみられず、またAB32では非形質転換系統との間に有為差がみられたが、顕著ではなかった。これら形質転換体の導入遺伝子の存在と転写の確認はサザンハイブリダイゼーション、ゲノミックPCRおよびノーザンハイブリダイゼーションで行った。また形質転換ジャガイモのPLRV抵抗性と発現RNA集積量の間に関連はみられなかった。

ウイルス増殖抑制効果を持つ形質転換ジャガイモにウイルス伝播抑制効果があるか否か調べるために、PLRVに感染したMQ35およびAB32を獲得源とし、アブラムシ伝播試験を行った。感染非形質転換ジャガイモを獲得源にした場合に比べて、これら感染形質転換体の伝播効率は低く、ウイルス防除効果が期待できた。

2. PLRVのORF2を導入した形質転換ジャガイモの作出およびPLRV抵抗性の検定と解析

PLRVのゲノム複製酵素をコードするORF2をcDNAクローニングし、これをジャガイモに導入した。選抜したジャガイモ32系統にPLRVを接種し、ELISAで感染の有無とウイルス蓄積量を調べたところ、接種当代では非形質転換系統に比べ低いELISA値を示す系統が得られた。40M7では特に値が低く、ウイルス増殖が抑制されていると考えられた。40M7を含む8系統について、ゲノミックPCRとノーザンハイブリダイゼーションにより導入遺伝子の存在と転写を確認した。その結果、形質転換ジャガイモの抵抗性と発現RNA集積量の間に関連はみられなかった。

3. *S. pombe* の *pac1* を発現する形質転換ジャガイモのPLRV抵抗性検定

S. pombe の *pac1* を発現する形質転換ジャガイモ3系統にPLRVを接種し、ELISAを行ったところ、接種当代では3系統いずれも非形質転換系統に比べ低いELISA値を示し、ウイルス増殖が抑制されていると考えられた。

以上のように本研究は、種々の外来遺伝子を導入したジャガイモのPLRV抵抗性を解析して、ウイルス増殖抑制効果があることを明らかにしたもので、学術上の貢献が大きく、学会においても高く評価されるものである。よって審査員一同は、最終試験の結果と合わせて、本論文の提出者近藤亨は博士（農学）の学位を受けるに十分な資格があるものと認定した。