

ビートえそ性葉脈黄化ウイルス (BNYVV) RNA の 構造解析および遺伝子を利用した診断と防除に関する研究

学位論文内容の要旨

テンサイは北海道の畑作農業における輪作体系の基幹作物である。テンサイそう根病はテンサイの重要病害の一つで、ビートえそ性葉脈黄化ウイルス (*Beet necrotic yellow vein virus*; BNYVV) によっておこり、土壤菌 *Polymyxa betae* に媒介される。汚染圃場の対策として、pH 低下処理や土壤消毒が有効とされ、また、抵抗性品種が開発されているが、適用範囲は限られている。本研究は、日本産 BNYVV についてウイルスの病原性や伝搬性の遺伝子レベルでの解析と遺伝子診断への応用を目的として行い、以下の結果を得た。

1. BNYVV の分離株は4~5種類の分節したRNAでゲノムが構成されている。BNYVV の日本産分離株 (BNYVV-S) の RNA-1~RNA-4 および BNYVV-D-5、-R83、-S44、-K79 の分離株に含まれていた RNA-5 の全塩基配列を決定した。その結果、RNA-1 は 6746 塩基で、237kDa のタンパク質 (P237) をコードする一つの ORF を有していた。P237 は N 末端側からメチルトランスフェラーゼ・ドメイン、dNTP バインディング・ドメイン、ポリメラーゼ・ドメインをもち、ウイルス複製に関与する。RNA-2 は 4609 塩基で、6 個の ORF がある。ORF1 は 21kDa の外被タンパク質 (CP) が、また ORF2 には CP のシストロンのアンバー終止コドンからその読み過ぎしたタンパク質として 54kDa がコードされている。これは CP との融合タンパク質 75kDa (P75) として翻訳される。ORF3、4、5 には、それぞれ 42kDa (P42)、13kDa (P13)、15kDa (P15) の、トリプル・ジーン・ブロック (TGB) と呼ばれるタンパク質がコードされていた。ORF6 には、システインリッチな 14kDa のタンパク質 (P14) がコードされていた。RNA-3 は 1774 塩基で、25kDa のタンパク質 (P25)、RNA-4 は 1465 塩基で、31kDa のタンパク質 (P331)、RNA-5 は 1347~1342 塩基で、26kDa のタンパク質 (P26) をそれぞれコードしていた。以上の RNA-1~4 の遺伝子構造は、フランス産分離株 F2 のそれと同じであった。

2. BNYVV-S と F2 の塩基配列を比較すると、RNA-1 で 1.4%、RNA-2 で 4.1%、RNA-3 で 2.9%、RNA-4 で 3.6% の違いがみられた。各 ORF のアミノ酸の違いは、P237 で 1.4%、CP で 2.1%、P42 で 0.5%、P13 で 1.7%、P15 で 3.0%、P14 で 7.0%、P25 で 6.4%、P31 で 3.5% あった。それに対して S 株とユーゴスラビア株 (Yu2) の CP と TGB の塩基レ

ベルの違いはそれぞれ 0.7%、1.0%であった。このように S 株は F2 株より Yu2 株に近縁であることがわかった。Koenig et al. (1995) の類別に従うと F2 は B 型に属するのに対して、S 分離株は Yu2 株と同様、A 型に属すると考えられた。日本から分離された 4 種の RNA-5 には、わずかの差 (0.3~0.9%) がみられたが、フランスから分離された RNA-5 とは、塩基レベルで 3.5~3.6%、アミノ酸レベルで 3.9~4.8%の違いがみられた。

3. 汁液による継代接種で生じた BNYVV の欠失変異株について解析した。2 種の RNA-2 変異株 (480~579 塩基欠失) の欠失領域について解析した結果、いずれも CP 読み過ぎタンパク質の C 末端領域に欠失が生じていることがわかった。40 の野生分離株から継代接種によって生じた 13 種の RNA-3 変異株、13 種の RNA-4 変異株、3 種の RNA-5 変異株について解析したところ、すべてで ORF 内に欠失が生じていた。欠失塩基数は、RNA-3 では 69~607 塩基、RNA-4 では 303~549 塩基、RNA-5 では 303~366 塩基であった。欠失領域のジャンクション近傍の塩基配列をみると、いくつかの分離株に 4~16 塩基の一部不完全な反復配列が認められ、また、欠失のジャンクションの集中している領域があったが、他の変異には顕著な特徴が認められなかった。変異の生じる分子機構として、コピーチョイスが考えられる。

4. 形質転換によりウイルス抵抗性植物を得るため、BNYVV の RNA-2 にコードされている 3 つの TGB 遺伝子 (P42、P13、P15) をそれぞれ単独、または組み合わせて、アグロバクテリウムにより *Nicotiana benthamiana* に導入した。その結果、P13 と P15 の遺伝子、あるいは P13 の変異遺伝子と P15 遺伝子とをつないだ DNA を導入した *N. benthamiana* の一部の系統で、接種葉から上位葉へのウイルスの移行が遅れる傾向が認められ、抵抗性が獲得された。しかし、P42、P13 および P15 をそれぞれ単独で導入した植物は抵抗性を示さなかった。

5. BNYVV の 5 種類の分節 RNA に対する cDNA クローンをジゴキシゲニン標識したものをプローブとして用い、ノーザン・ブロット・ハイブリダイゼーションにより各ウイルス RNA を特異的に検出することができた。ドット・ブロット・ハイブリダイゼーションでは 10pg の RNA の検出が可能であった。テンサイ根から直接核酸を抽出した場合には非特異反応がみられ、検出が不十分であったが、サンプルを濃縮することにより検出が可能となった。

6. RT-PCR によって BNYVV の RNA-3、RNA-4、RNA-5 を検出するためのプライマーを設計した。検出感度は 1pg であった。テンサイの根から効率よく検出するための核酸抽出法を検討し、土壌検診法を確立した。RT-PCR の検出感度は ELISA と同等またはそれ以上であった。この手法を用いて北海道内における RNA-5 の分布を明らかにした。

学位論文審査の要旨

主 査 教 授 上 田 一 郎

副 査 教 授 増 田 税

副 査 教 授 伴 戸 久 徳

副 査 教 授 玉 田 哲 男

(岡山大学資源生物科学研究所)

学 位 論 文 題 名

ビートえそ性葉脈黄化ウイルス (BNYVV) RNA の 構造解析および遺伝子を利用した診断と防除に関する研究

本論文は、6章で構成され、図18、表7、図版1、引用文献132、総頁数99の和論文で、他に参考論文14編が添えられている。テンサイそう根病はテンサイの重要病害の一つで、ビートえそ性葉脈黄化ウイルス (BNYVV) によっておこる。本研究では、日本産 BNYVV の全塩基配列を決定して、これを遺伝子診断に応用した。内容は以下のように要約される。

1. BNYVV の分離株は 4~5 種類の分節した RNA をゲノムとする。日本産分離株 (BNYVV-S) の RNA-1~RNA-4、および他の数分離株に含まれていた RNA-5 の全塩基配列を決定した。RNA-1 は 6746 塩基で、237kDa のタンパク質 (P237) をコードしていた。P237 は N 末端側からメチルトランスフェラーゼ・ドメイン、dNTP バインディング・ドメイン、ポリメラーゼ・ドメインをもち、ウイルス複製に関与すると推定した。RNA-2 は 4609 塩基で、6 個の ORF があった。ORF1 は 21kDa の外被タンパク質 (CP) が、また ORF2 には CP のシストロンのアンバー終止コドンからその読み過ぎタンパク質として 54kDa がコードされていた。これは CP との融合タンパク質 75kDa (P75) として翻訳される。ORF3、4、5 には、それぞれ 42kDa (P42)、13kDa (P13)、15kDa (P15) の、トリプル・ジーン・ブロック (TGB) と呼ばれるタンパク質がコードされていた。ORF6 には、システインリッチな 14kDa のタンパク質 (P14) がコードされていた。RNA-3 は 1774 塩基で、25kDa のタンパク質 (P25)、RNA-4 は 1465 塩基で、31kDa のタンパク質 (P31)、RNA-5 は 1347~1342 塩基で、26kDa のタンパク質 (P26) をそれぞれコードしていた。以上の RNA-1~4 の遺伝子構造は、フランス株 (F2) と同じであった。

2. BNYVV-S と-F2 の塩基配列を比較すると、RNA-1 で 1.4%、RNA-2 で 4.1%、RNA-3 で 2.9%、RNA-4 で 3.6%の違いがみられた。各 ORF のアミノ酸の違いは、P237 で 1.4%、CP で 2.1%、P42 で 0.5%、P13 で 1.7%、P15 で 3.0%、P14 で 7.0%、P25 で 6.4%、P31 で 3.5%であった。それに対して S 株とユーゴスラビア株 (Yu2) の CP と TGB の塩基レベルの違いはそれぞれ 0.7%、1.0%であった。このように S 株は F2 株より Yu2 株に近縁であることがわかった。日本から分離された 4 種の RNA-5 には、わずかの差 (0.3~0.9%) がみられたが、フランスから分離された RNA-5 とは、塩基レベルで 3.5~3.6%、アミノ酸レベルで 3.9~4.8%の違いがみられた。

3. 汁液による継代接種で生じた BNYVV の欠失変異株について、遺伝子構造を解析した。2 種の RNA-2 変異株は、CP 読み過ぎタンパク質の C 末端領域に欠失が生じていることがわかった。40 の野生分離株から継代接種によって生じた 13 種の RNA-3 変異株、13 種の RNA-4 変異株、3 種の RNA-5 変異株について解析したところ、すべてで ORF 内に欠失が生じていた。欠失領域のジャンクション近傍の塩基配列をみると、いくつかの分離株に 4~16 塩基の一部不完全な反復配列が認められるので、これらの変異はコピーチョイスモデルによって生じると結論した。

4. BNYVV の 5 種類の分節 RNA に対する cDNA クローンをジゴキシゲニン標識したものをプローブとして用い、ノーザン・ブロット・ハイブリダイゼーションにより各ウイルス RNA を特異的に検出することができた。本法で、10pg の RNA の検出が可能であった。またテンサイ根から直接核酸を抽出し、濃縮することによりウイルス RNA を検出できた。

5. 逆転写-ポリメラーゼ連鎖反応 (RT-PCR) によって BNYVV の RNA-3、RNA-4、RNA-5 を検出するためのプライマーを設計した。検出感度は 1pg であった。テンサイの根から効率よく検出するための核酸抽出法を検討し、土壌検診法を確立した。RT-PCR の検出感度は ELISA と同等またはそれ以上であった。この手法を用いて北海道内における RNA-5 の分布を明らかにした。

本研究は、BNYVV のゲノム構造を明らかにして、遺伝子診断法を確立したものであり、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、齊藤 美奈子氏が博士 (農学) の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認めた。