

学 位 論 文 題 名

ジャガイモ原原種増殖体系における

ウイルス病の診断法に関する研究

学位論文内容の要旨

1980年代はじめ、全国の葉タバコ生産地でジャガイモYウイルスえそ系統（PVY-T）によるタバコ黄斑えそ病が多発した。タバコにおける発病状況からウイルスの伝染源としてジャガイモが指摘され、全国の種ジャガイモ生産の92.6%を占める北海道では大きな問題に発展した。本論文では、北海道のジャガイモにおけるウイルス病の発生実態の把握、PVY-Tの性状、血清診断法の開発・改良とPCRを利用した主要なウイルスの高感度診断法について一連の試験成績をとりまとめた。

I. 北海道のジャガイモにおけるウイルス病の発生実態

1. 北海道のジャガイモに発生するウイルスについて、1988年に採種圃、1989年に一般圃場の調査を行った結果、PVYの発生が多く、特に発生割合の高いえそ系統（PVY-T）は全道に広く発生していることが明らかになった。PVY-Tによるジャガイモの病徴は大変不明瞭であり、無病徴の株からも本ウイルスが検出された。

2. ジャガイモウイルスの発生状況調査を行った際、1987年にトマト輪点ウイルス（ToRSV）、1990年にキュウリモザイクウイルス（CMV、血清型Y型）を分離・同定した。ToRSVのジャガイモからの分離は初めての報告である。また、CMVのジャガイモでの発生は北海道で初めてであり、本ウイルスの塊茎伝染は本邦で初めての報告である。

II. ジャガイモYウイルスえそ系統（PVY-T）の性状と血清学的診断

前章では、北海道の種ジャガイモにPVY-Tが広範囲に発生していることが明らかになった。本章では、以下のようにPVY-Tの性状を解明し、抗血清を用いた迅速な診断法を開発した。

1. PVY-Tの物理的耐性はPVY普通系統（PVY-O）に比べ強く、特に耐希釈性、耐保存性が高かった。また、両系統の判別植物として、タバコ、*C. amaranticolor*、ピーマンが有効であることが明らかとなった。

2. PVY-T に対するジャガイモ31品種、3系統の反応を調べたところ、明瞭な病徴を示す「メークイン」を除き、多くの品種の病徴は軽微か、不明瞭であった。一方、PVY-Oでは、現れる病徴からえそ型とれん葉型の品種に大別された。「キタアカリ」は両者の中間型の病徴を示し、「コナフブキ」は両系統に対して抵抗性であった。

3. ジャガイモから分離したPVY-Tには、タバコとジャガイモに対して病原性の異なる分離株が認められた。

4. PVY-T、PVY-Oに対する抗血清を用いたELISA法では、各系統の単独感染株に限り、その吸光値の差から系統判別が可能であった。各系統の抗血清を混合した混合ELISA法は各系統の検出感度を相互に高め、PVYの検定に有効であることが明らかとなった。既報の各系統特異的モノクローナル抗体を用いたELISA法は各系統を明確に判別できたが、モノクローナル抗体では

全く反応しないPVYの存在が認められた。

5. PVY-Tに対する抗血清を用いたゼラチン粒子凝集法（PA法）と、さらに検出感度を向上させたプロテインA-PA法（PrA-PA法）を開発した。両法は、ともにELISA法に比べ検出感度は劣るものの、ジャガイモ葉から迅速、かつ簡便にウイルスが検出された。また、PA法はPVSの診断にも適用可能であった。

6. この他、本研究ではジャガイモ葉巻ウイルス（PLRV）とジャガイモSウイルス（PVS）に対して抗血清を作製し、いずれもELISA法に使用可能であった。

Ⅲ. ジャガイモウイルスの遺伝子診断

種ジャガイモの増殖ではウイルスフリーの塊茎を用いることが基本である。本章では、近年開発された逆転写-ポリメラーゼ連鎖反応（RT-PCR）を利用し、わが国のジャガイモで主要な4種ウイルス、PVY、PLRV、ジャガイモXウイルス（PVX）、PVSについて遺伝子診断法を開発して以下のような成果を得た。

1. 既報の塩基配列を基にして4種の各ウイルスに特異的なプライマーを設計し、RT-PCR法により塊茎からの検出を行ったところ、各ウイルスともELISA法に比べ高精度・高感度に検出された。PCR-マイクロプレート・ハイブリダイゼーション法（PCR-MPH法）の検出感度はさらに高かった。また、塊茎から簡便に、かつ短時間で核酸抽出できる簡易法を開発した。

2. 当代感染株から収穫した塊茎（1次感染塊茎）では、塊茎内のウイルス分布が不均一な場合があることを明らかにし、PVY、PLRV、PVXでは目によるウイルスの偏在が確認された。目の位置とウイルス検出には一定の傾向はなかった。また、4種ウイルスとも兄弟塊茎間でも感染塊茎と健全塊茎が混在する場合があることが明らかになった。一方、2次感染株から収穫した塊茎（2次感染塊茎）ではウイルスの分布は一様であった（PVY、PLRV）。

3. 1次感染塊茎を確実に診断するためには、ウイルス検出率が高い「基部の組織」と「頂部の組織」を併せて供試した場合に検出精度が向上するものと推察され、PCR-MPH法によるPVYとPLRVの検出実験で実証された。

4. 遺伝子診断法による塊茎検定では、電気ドリルを用いた「ドリル法」とポリ袋内の塊茎組織をハンマーで叩き搾汁する「ハンマー法」のいずれの試料調製法も有効であった。個々の塊茎診断の4種ウイルス診断精度は、PCR-MPH法およびRT-PCR法のいずれの方法でも99.0%以上であった。一方、20試料を1検体とした集団検定にはPCR-MPH法が有効であった。

5. ウイルスフリー母本作出を目的とした培養シュートのウイルス検定にはRT-PCR法、マイクロチューバー（MT）とMT生産シュートのウイルス検定にはELISA法により高精度にPVXとPVSが診断可能であった。ジャガイモ葉からの核酸抽出法はPVSの検出感度が向上する「グアニジン法」が有効であった。

6. PCR-MPH法により獲得吸汁5分のモモアカアブラムシからPLRVが検出され、8時間以上の吸汁で約90%の個体が陽性を示した。本法によって、圃場に設置した黄色水盤で捕捉されるPLRV保毒虫からもウイルスが検出された。

Ⅳ. 総合考察

本研究で明らかになった結果を基に、北海道内の種ジャガイモ採種体系におけるPVY-Tの発生拡大要因、原原種増殖体系におけるPVY-Tの発生から終息までの経緯について総合的に考察した。また、本研究で開発した遺伝子診断法を現行の原原種増殖体系に組み込み、新たなウイルス検定体系を提案した。本研究で作製した抗血清は種苗管理センターにおけるウイルス検定（ELISA法）に広く活用され、また、遺伝子診断法は1999年度から種苗管理センターの各農場に逐次導入されている。今後、本法と従来の検定法、感染予防法を融合させた新たな体系により一層健全な原原種生産が期待される。

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 内 藤 繁 男

学 位 論 文 題 名

ジャガイモ原原種増殖体系における ウイルス病の診断法に関する研究

本論文は、5章で構成され、図12、表29、図版5、引用文献124、総頁数105の和論文で、他に参考論文4編が添えられている。1980年代より新興病害として問題となったジャガイモYウイルスえそ系統（PVY-T）を中心として、北海道のジャガイモにおけるウイルス病の発生実態の把握し、新しい診断法をウイルス検定体系に導入したものである。この研究によって、ジャガイモ原原種増殖体系におけるウイルスフリー化は高精度になり、検定効率を飛躍的に高めることになった。

北海道のジャガイモにおけるウイルス病の発生実態を調査して、2種のウイルスを新たに分離し、さらPVY-Tが全道に広く発生していることを明らかにした。

新興ウイルスとしてのPVY-TをPVY普通系統（PVY-O）と比較して、系統判別法を開発した。PVY-Tと-Oは、タバコ、*C. amaranticolor*、ピーマンを判別植物として区別出来ることを明かにした。さらに、PVY-Tに対するジャガイモ31品種、3系統の反応を調べると、明瞭な病徴を示す「メイクイン」を除き、多くの品種の病徴は軽微か、不明瞭であった。一方、PVY-Oに対する反応では、病徴がえそ型とれん葉型の品種に大別された。「コナフブキ」は両系統に対して抵抗性であった。

ELISAによって、PVY-TとPVY-Oが識別出来るか調べたところ、各系統の単独感染株に限り、その吸光値の差から系統判別が可能であった。各系統の抗血清を混合した混合ELISA法は各系統の検出感度を相互に高め、PVYの検定に有効であることを明らかにした。既報の各系統特異的モノクローナル抗体を用いたELISA法は各系統を明確に判別

できたが、中には全く反応しないPVY分離株の存在も認められた。

PVY-Tを検出する方法としてゼラチン粒子凝集法（PA法）と、さらに検出感度を向上させたプロテインA-PA法（PrA-PA法）を開発した。両法は、ともにELISA法に比べ検出感度は劣るものの、ジャガイモ葉から迅速、かつ簡便にウイルスが検出されるので、圃場診断に適用できる有効な方法であった。

種ジャガイモの増殖ではウイルスフリーの塊茎を用いることが基本である。わが国のジャガイモで主要な4種ウイルス、PVY、ジャガイモ葉巻ウイルス（PLRV）、ジャガイモXウイルス（PVX）、ジャガイモSウイルス（PVS）について、逆転写-ポリメラーゼ連鎖反応（RT-PCR）を利用した遺伝子診断法を開発した。4種のウイルスをそれぞれ特異的に検出するPCR用プライマーをまず設計した。RT-PCR法により塊茎から、各ウイルスともELISA法に比べ高精度・高感度に検出された。PCR-マイクロプレート・ハイブリダイゼーション法（PCR-MPH法）の検出感度はさらに高かった。これらの方法によって、塊茎を直接検定することが可能となって、従来の芽出しした葉で行う検定に較べて、時間とコストを大幅に短縮・節減できた。当代感染株から収穫した塊茎（1次感染塊茎）では、塊茎内のウイルス分布が不均一な場合があり、PVY、PLRV、PVXでは目によるウイルスの偏在が認められた。一方、2次感染株から収穫した塊茎（2次感染塊茎）ではウイルスの分布は一様であった。1次感染塊茎を確実に診断するためには、ウイルス検出率が高い「基部の組織」と「頂部の組織」を併せて供試した場合に検出精度が向上するものと推察され、PCR-MPH法によるPVYとPLRVの検出実験でこれが実証された。実際の診断に遺伝子診断を応用したところ、個々の塊茎診断の4種ウイルス診断精度は、PCR-MPH法およびRT-PCR法のいずれの方法でも99.0%以上であった。一方、20試料を1検体とした集団検定にはPCR-MPH法が有効であった。ウイルスフリー母本作出を目的とした培養シュートのウイルス検定にはRT-PCR法、マイクロチューバー（MT）とMT生産シュートのウイルス検定にはELISA法により高精度にPVXとPVSが診断可能であった。PCR-MPH法によりモモアカアブラムシからも微量のPLRVが検出されることを示した。

本研究で明らかになった結果を基に、開発した遺伝子診断法を、現行の原原種増殖体系に組み込んだ。これによって、ウイルスフリー化は高精度になり、さらに検定効率を飛躍的に高めることができた。

よって審査員一同は、佐藤 仁敏が博士（農学）の学位を受けるに十分な資格を有するものと認めた。