HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	ジャガイモウイルスの検出技術とジャガイモYウイルスの発生実態に関する研究 [論文内容及び審査の要旨]
Author(s)	小野塚, 信哉
Citation	北海道大学. 博士(農学) 甲第14648号
Issue Date	2021-09-24
Doc URL	http://hdl.handle.net/2115/83091
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	theses (doctoral - abstract and summary of review)
Additional Information	There are other files related to this item in HUSCAP. Check the above URL.
File Information	onozuka_nobuya_review.pdf (審査の要旨)

Instructions for use

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学　位　論　文　審　査　の　要　旨

博士の専攻分野の名称　　博　士（農学）　　氏名　　小野塚　信哉

審査担当者	主　査	客員准教授	大　木　健　広
	副　査	教　授	増　田　税
	副　査	教　授	近　藤　則　夫

学　位　論　文　題　名

ジャガイモウイルスの検出技術と
ジャガイモＹウイルスの発生実態に関する研究

ジャガイモ（*Solanum tuberosum* L.）に感染するウイルス（以下，ジャガイモウイルス）のうち，potato leafroll virus（PLRV），potato virus S（PVS），potato virus X（PVX） potato virus Y（PVY）の 4 種は，世界中でジャガイモ生産に多くの被害を与えている．ジャガイモウイルスは塊茎を通じて次世代へと伝搬するため，被害を抑制するには，健全な種ばれいしょを植え付けることが重要である．本論文では，国内種ばれいしょのウイルス検疫の省力化および効率化を目的とし，以下の研究を行った．

第 1 部では，省力的なウイルス検出技術の開発を目指し，ろ紙を用いた簡易的な RNA 調製法および 4 種のジャガイモウイルスを対象とする multiplex RT-PCR（mRT-PCR）法によるウイルス検出法の開発を行った．まず，簡易 RNA 調製法として，PCR チューブにろ紙と葉の磨砕液を入れ，磨砕液の除去ならびに 2 種のアルコールで洗浄したのち，熱処理でろ紙に吸着した RNA を溶液中に溶出する簡便な方法を開発した．本法は，ピペット操作のみで行い，多検体からの RNA 調製にも対応できる．次に，コンベンショナル mRT-PCR 法とリアルタイム mRT-PCR 法の 2 種類の検出法を開発した．いずれの方法も，一つのチューブで逆転写反応と PCR を連続的に行うワンステップ反応系で行い, 省力的かつクロスコンタミネーションのリスクを軽減できる．コンベンショナル mRT-PCR 法では，ウイルス系統の多様性を考慮して PVS および PVY 特異的プライマーを新たに設計し，内部標準として Elongation factor 1 alpha 遺伝子（*EF1α*）特異的プライマーも設計した．これらのプライマーと既報の PVX と PLRV のプライマーを組み合わせ，反応条件を最適化することで，4 種のジャガイモウイルスを同時に検出できた．簡易 RNA 調製法と組み合せた場合，現行法である ELISA 法と比較し，PVS は同等，それ以外のウイルスはより高感度に検出できた．リアルタイム mRT-PCR 法では，各増幅産物を融点（Tm 値）で識別するインターカレーター法を用いて，４種ウイルスの同時検出を行った．ウイルス系統の多様性に対応し，かつ増幅産物の Tm 値が重複しないように，４種のウイルスと *EF1α*の特異的プライマーを新たに設計した．その結果，各ウイルスの国内分離株を Tm 値により識別でき，4 種のジャガイモウイルスを同時に検出できた．また，データーベース上の配列を用いて，各ウイルスの海外分離株の増幅産物の Tm 値を計算したところ重複しなかったことから，本法は海外分離株も検出できると考えられた．さらに，モデル試験の結果から，簡易 RNA 調製法との組み合わせで，葉 100 枚中に含まれる感染葉 1 枚を検出するのに十分な感度があり，多検体をまとめて検定するバルク検定に対応できると考えられた．以上の結果から，種ばれいしょ検定において，リアルタイム mRT-PCR 法によるバルク検定でスクリーニングをしたのち，コンベンショナル mRT-PCR 法で個別検定する診断フローを提示した．

第 2 部では，病原性の異なる多数の系統が存在する PVY をほ場で効率的に診断するため，国内のジャガイモほ場で発生している系統の構成を解析した．その結果，NTN 系統が優占して発生し，NA-N 系統と O 系統は少数であることを明らかにした．また，未報告の組換え体（JPH1806）を単離し，NTN 系統を主な親系統とする NA-N 系統と O 系統の 3 系統の組換え体と推定されること，JPH1806 の部分配列は国内分離株のゲノム配列に類似性が高く，国内で組換えが起きた可能性が高いことを明らかにした．JPH1806 の病原性は NTN 系統と大きな違いは認められず，検疫上の対応は従来と同様で良いと考えられたが，今後も国内での新規組換え体の発生に注意する必要がある．NTN 系統がほ場で優占している要因を解明するため，３系統を用いて塊茎伝搬率を比較した．その結果，NTN 系統は，NA-N 系統や O 系統に比べ，品種に関わらず高い塊茎伝搬率を有していること，ジャガイモの生育後期に感染しても塊茎まで移行できることを明らかにした．よって，これらの性質が，NTN 系統が国内で優先している要因の一つであると考えられた．

以上のように，本論文では，国内種ばれいしょのウイルス検定の省力化に繋がる新たなウイルス検出法の開発と国内における PVY の発生実態に関する新知見が得られており，これらの技術や知見はジャガイモの安定生産への貢献が期待できる．よって，審査員一同は，小野塚信哉が博士（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．