HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	ジャガイモＳウイルスの感染性cDNAクローンの構築と分子性状比較［論文内容及び審査の要旨］
Author(s)	李, 莘
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(農学)
Dissertation Number	甲第13595号
Issue Date	2019-03-25
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/74368
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Li_Xin_abstract.pdf, 論文内容の要旨

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

学 位 論 文 内 容 の 要 旨

博士の専攻分野の名称： 博　士（農学）　　氏名　　李　　莘

学 位 論 文 題 名

ジャガイモＳウイルスの感染性 cDNA クローンの構築と分子性状比較

ジャガイモＳウイルス（PVS）はジャガイモの主要ウイルスの一つで，世界中のジャガイモ栽培地域に広く分布し，接触およびアブラムシで伝搬される．PVS 単独感染ジャガイモ品種の多くは無病徴または軽微な病徴を現すのみであるが，外観目視検査による抜き取り廃棄が困難な PVS は，種いも生産過程における感染の拡大が問題となる．種いもが PVS に感染していた場合の二次感染塊茎の収量は最大 20%減になり，また他種ウイルスとの混合感染により病徴が激化する. PVS は従来 *Chenopodium quinoa* での全身感染性から普通系統とアンデス系統に大きく分けられ，アンデス系統は普通系統よりジャガイモでの病原性が強く，アブラムシ伝搬性も高いことが報告されている．また，これら典型的な 2 系統とは生物学的性状の異なる PVS 株も報告されている. PVS はカルラウイルス属で，約 8.5 kb のプラス一本鎖の RNA をゲノムとし，その 5′末端にキャップ構造，3′末端にポリ A 配列を持ち，6 つのオープンリーディングフレーム（ORF）を有する．これまで世界中の多くの PVS 株の全ゲノム配列が解析されているが, PVS のゲノムの機能や複製・移行・病原性に関する知見は少ない．その理由のひとつは，RNA ウイルスの逆遺伝学的研究において非常に有用な感染性 cDNA クローンが PVS では構築されていないことにある．そこで本研究では，感染性クローンの構築を行うとともに，日本における PVS 株と世界各国の PVS 株を全ゲノム配列に基づいて分子性状を比較した.

１. PVS の感染性 cDNA クローンの構築

研究室の先行研究で，日本の普通系統 H95 株のゲノム全塩基配列（8485 塩基）が既に決定されて, 8 つのクローンを繋ぎ合わせた全長 cDNA クローンが大腸菌プラスミドに構築されていた．このクローンは T7 プロモーターの転写開始部位に合わせて PVS-H95 ゲノムの 5′末端 cDNA が挿入され, 3′末端は 42 個のポリ A 配列直下に *Mlu*I 切断部位が設計されており，転写されるキャップ付加 RNA は非ウイルス配列を含まない PVS ゲノムのコピーであると考えられたが，非感染性であった．そこで，この全長 cDNA クローンを改変した結果, 3 アミノ酸置換を導入したクローンからの転写 RNA で 1 回目 25%, 2 回目 37.5% の感染性が認められた（李，平成 25 年度修士論文）．しかしその後感染性が再現しなかった.

本研究では，*C. quinoa* 葉において PVS-H95 から単病斑分離を 3 回繰り返して得た H00 株のゲノムを鋳型とし，2 つの長い RT-PCR 増幅断片を繋いでほぼ全長の cDNA クローンを構築し，3′末端は 66 個のポリ A 配列を有するように改変した．その転写 RNA を *Nicotiana occidentalis* に接種した結果, 上葉で PVS-H00 接種と同様のえそ病徴などが観察され, 発病葉から抗体を用いた ELISA 法で PVS 外被タンパク質が，またノーザンブロット法でウイルスゲノム RNA とサブゲノム RNA が検出されたことから，接種した転写 RNA からウイルスが複製していることが確認された．転写 RNA の感染性は安定して高く，植物個体当たり 0.2 μg 以上の接種で 100% であった.

感染性クローン pPVS-H-FL-β の全塩基配列を解析したところ, 塩基数はポリ A 鎖を除いて 8485 塩基と PVS-H95 ゲノムと同じであったが，両者には 370 塩基（総塩基数の 4.4%）の塩基相違が見

られ，その内 102 塩基の相違が 91 アミノ酸（総アミノ酸数の 3.3%）の変異をもたらすものであった. その 91 アミノ酸の約 90%はゲノム長の約 70%を占める ORF1 にコードされる複製酵素に存在し，その内の 71.3%は N 端側のメチルトランスフェラーゼ（MTR）と卵巣腫瘍プロテアーゼ類似タンパク質（O-PRO）領域の間に集中して分布していた．また，両者の相違から求めたゲノム全体の Ka/Ks 値は 0.38 で強いネガティブ選択を受けていたが，MTR と O-PRO 間の領域では最大 2.37 と強いポジティブ選択を受けていることがわかった.

先に構築した pPVS-H-FL-H は決定した PVS-H95 ゲノムと全く同じ配列を有するものの感染性が認められなかったので, その原因を調べるため, pPVS-H-FL-β と ORF1 領域を交換した組換え体を構築した．pPVS-H-FL-H の ORF1 領域を pPVS-H-FL-β に組換えた pPVS-H-FL-βH から転写した RNA は *N. occidentalis* に感染性を示したのに対し， pPVS-H-FL-β の ORF1 領域を pPVS-H-FL-H に組換えた pPVS-H-FL-Hβ から転写した RNA には感染性が認められなかった．このことから，感染性に影響しているのは ORF2 より下流にコードされるタンパク質に存在する 11 アミノ酸相違ではなく, ORF1 の複製酵素に存在する 80 アミノ酸相違であることが明らかとなった.

２. PVS 全ゲノム配列に基づく分子性状比較

感染性クローン pPVS-H-FL-β の配列を普通系統 H00 株のゲノム配列とした. 研究室の先行研究では, H95 株に加え，日本のアンデス系統である Na1 株の全塩基配列および日本の 12 株の部分配列が解析されていた. その内, 1970 年代の研究でモザイク系統とされた分離株（PVS-M）と 1980 年代に別種のジャガイモ南部潜在ウイルス（SoPLV）として報告された K-1 株はそれぞれゲノムの 3′末端側 2991 塩基と 1661 塩基が既に解析されていた. 本研究では,この 2 株の未解析配列を解析し，全塩基配列を決定した. PVS-M と SoPLV のゲノムはポリ A 鎖を除き，ともに PVS-Na1 と同じ 8486 塩基で，PVS-H96 および PVS-H00 より 3′非翻訳領域が 1 塩基長かった.

日本の 5 株に世界各国の 24 株を加えた計 29 分離株を全ゲノム配列に基づいて解析した結果, PVS-M は普通系統に属し, PVS-H00 と 98.8%の最も高い同一性を示し, SoPLV はアンデス系統に属し, PVS-Na1 と 99.1%の最も高い同一性を示した. 2 株間の同一性では，普通系統 20 株の系統内で 91.8%以上，アンデス系統 6 株，新たに提唱された P（phureja）系統 2 株の系統内では 95.2%以上であった．一方，普通系統株，アンデス系統株，P 系統株の系統間の同一性はいずれも 77%以上 80%以下であったことから現在 PVS をこの 3 系統に分類することは妥当であると考えられた.

本研究では，高い感染性を持つ RNA を安定して転写できる PVS の cDNA クローンの構築に成功した．これは最初の PVS 感染性クローンであり，今後の PVS 研究に有用な分子基盤が確立できた．また, これまでひとつの宿主内における PVS ゲノム配列の多様性に関する報告はなかったが, 本研究では，PVS-H95 から分離した PVS-H00 の全ゲノム配列を比較することで，細胞内の PVS 集団が quasispecies として存在し，複製酵素の MTR と O-PRO 領域の間が最も多様性に富む領域であることを示した. 更に，日本の 5 分離株と世界各国の 24 分離株を全ゲノム配列に基づいて解析し，日本の 5 分離株の分類学的位置を明らかにした.