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_review.pdf, 審査の要旨

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　　李　　莘

審査担当者　主　査　教　授　増　田　　税
副　査　教　授　貴　島　祐　治
副　査　講　師　畑　谷　達　児

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，世界中に広く分布し，*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る．PVS は約 8.5 kb のプラス一本鎖 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．これまで世界各国の 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．本研究ではその構築に成功し，また全ゲノム配列に基づいて日本における PVS 株を世界各国の PVS 株と比較解析した．以下に主要な研究成果を要約する．

１．PVS の感染性 cDNA クローンの構築

先行研究で構築された PVS 普通系統 H95 株の全長 cDNA クローンから転写されたキャップ付加 RNA には感染性が認めらず，3 アミノ酸置換を導入することで，1 回目 25%，2 回目 37.5% の感染性を示す RNA を転写できるクローンが作製できた（李，平成 25 年度修士論文）．しかしその後感染性が再現しなくなり，本研究ではその再構築を行った．再構築では，PVS-H95 より *C. quinoa* 葉において単病斑分離を 3 回繰り返して得た H00 株のゲノムを鋳型とした．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 ELISA 法で外被タンパク質が，またノーザンブロット法でゲノム 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．これは最初の PVS 感染性 cDNA クローンであり，今後の PVS 研究に有用な分子基盤が

確立できたことになり，大変意義があり高く評価できる．

構築した感染性クローン pPVS-H-FL-β の全塩基配列を解析し，H00 株のゲノム配列とした．PVS-H00 ゲノムの塩基数はポリ A 鎖を除いて 8485 塩基と PVS-H95 ゲノムと同じものの，両者には 370 塩基の塩基相違があり，その内 102 塩基の相違が 91 アミノ酸の変異をもたらす．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．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 として存在することを示したものとして高く評価できる．

また先に構築した 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が，pPVS-H-FL-β との組換え体を構築して試験した結果，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解明された．

２．PVS 全ゲノム配列に基づく分子性状比較

先行研究では H95 株に加え，日本のアンデス系統 Na1 株の全ゲノム配列，日本の 12 株ゲノム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）とされた K-1 株について未解析配列を解析し，全ゲノム配列を決定した．

全ゲノム配列が決定された日本の 5 株に世界各国の 24 株を加えた計 29 分離株で比較解析した結果，PVS-M は PVS-H00 と 98.8%の最も高い同一性を示す普通系統で，SoPLV は PVS-Na1 と 99.1%の最も高い同一性を示すアンデス系統であると考えられた．これは，日本でのみ発生していると解釈される PVS 系統および SoPLV を世界標準に照らし合わせて整理したものとして評価できる．

よって、審査員一同は、李莘氏が博士（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。