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［全文の要約］
Author(s)	小野塚, 信哉
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(農学)
Dissertation Number	甲第14648号
Issue Date	2021-09-24
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/83094
Type	doctoral thesis
File Information	onozuka_nobuya_summary.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

博 士 論 文 の 要 約

博士の専攻分野の名称: 博　士（農学）　　氏名　小野塚　信哉

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

1. 背景

ジャガイモ（*Solanum tuberosum* L.）は、世界で 4 番目に生産量の多い主食作物であり（FAOSTAT 2018）、日本国内においても年間 200 万トン以上が生産されている重要な作物である（MAFF 2020）。ジャガイモに感染するウイルス（ジャガイモウイルス）は 30 種以上が報告されており、そのうち 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（Campos and Ortiz 2020）。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、日本国内では植付け予定の種ばれいしょのウイルス感染率の検定（冬季検定）と栽培期間中の植物体のウイルス感染率の検定（夏季検定）によって種ばれいしょ生産が管理されている（Kawakami et al. 2015）。

冬季検定におけるジャガイモウイルスの検出には、Enzyme-linked immunosorbent assay（ELISA）法が用いられてきたが、1ウェルあたり1ウイルスしか検出できないことから時間と労力がかかることが課題である。そこで、第1部では冬季検定の省力化と高度化を目的として4種ウイルスの同時検出技術を開発した。

国内のジャガイモほ場では、ジャガイモウイルスのなかでも PVY による被害が多く、PLRV と PVS の発生は稀であり、PVX は近年検出されていない。PVY の発生が多い要因

の１つとして病原性の異なる多数の系統が存在していることが挙げられる（Green et al. 2017）。そこで、第 2 部では、効率的な夏季検定に資する知見を得るため、PVY の各系統の発生状況を調査した。本調査では、NTN 系統（和名：塊茎えそ系統あるいは欧州型塊茎えそ系統）が優占しており、NTN 系統は他の系統に比べて伝搬率が高いことが考えられた。NTN 系統は他の系統に比べてアブラムシ伝搬効率が高いことが示されているが（Carroll et al. 2016; Mondal et al. 2017）、塊茎伝搬率に関しては系統間で比較した試験の報告はない。そこで、国内分離株を用いて各系統の塊茎伝搬率を解析した。以上により、ジャガイモの安定生産に貢献する技術の開発、ならび、Potyvirus 属のタイプ種である PVY の基礎的な解析を行った。

第１部　ジャガイモウイルス検定法の開発

現行法である ELISA 法の代替技術として、省力的な遺伝子診断技術を検討した。遺伝診断技術は、ELISA 法に比べ、RNA 調製が煩雑であることおよび酵素が比較的高価であることが課題であった。そこで、簡便な操作のみで実施可能な RNA 調製法および 4 種のジャガイモウイルスを 1 反応で検出可能な multiplex reverse transcription-polymerase chain reaction（mRT-PCR）法を開発することで課題解決を目指した。簡易 RNA 調製法は、Zou et al.（2017）のろ紙を用いる手法を基に、PCR チューブ内でピペット操作のみで実施できるように手順を変更し、調製した RNA 溶液を保存できるように熱処理で RNA を溶液中に溶出する工程を追加した。本手法では、葉の粗汁液からろ紙への RNA の吸着、ろ紙の洗浄および熱処理によるろ紙からの RNA の溶出という単純な作業で RNA 溶液の調整が可能である。また、ろ紙の洗浄については、Zou et al（2017）の手法で用いられている界面活性剤を含む緩衝液を使用して2回洗浄したところ、反復間で検出結果が安定しなかった。その不

安定性の原因は洗浄中に RNA が分解、もしくは、洗浄溶媒中に溶出していることであると考え、洗浄方法を 50%イソプロパノールで洗浄したのちに 75%エタノールで洗浄するように変更した。その結果、反復間の RT-PCR 法による検出結果が安定し、検出感度が 10 倍向上した。開発した RNA 調製法の妥当性を検証するため、ろ紙の代わりにニトロセルロース膜を担体として用いた手法、熱処理した粗汁液を直接鋳型として使用する熱抽出法および市販のスピンカラムのキット（PureLink RNA Mini Kit）の 3 手法と RT-PCR 法による検出感度を指標として比較した。比較には、ジャガイモの健全葉の粗汁液を用いて PVY 感染ジャガイモ葉の粗汁液を段階希釈し、その希釈液からそれぞれの手法を用いて RNA 溶液を調製して RT-PCR 法に供試した。その結果、開発した手法は、ニトロセルロース膜を用いた手法および熱抽出法に比べて 10 倍検出感度が高く、PureLink RNA Mini Kit と同程度の検出感度であり、RT-PCR 法の鋳型を調製するのに十分な収量および精製度があると判断した。

検出法は、コンベンショナル mRT-PCR 法とリアルタイム mRT-PCR 法の 2 種類を開発した。いずれの手法も、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うため、検出にかかる労力や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 法について、Bostan and Peker（2009）の手法は増幅産物の断片長が互いに 100 bp 以上離れており、電気泳動解析による診断が容易であると思われたため、各ウイルスの国内分離株の検出を試みたところ、PVS と PVY のうち一部の分離株を検出できなかった。Bostan and Peker（2009）の手法で用いられているプライマーの特異性を確認するためアライメント解析したところ、PLRV および PVX 特異的プライマーは供試したゲノム配列との間にミスマッチがほとんどなかったが、PVS および PVY 特異的プライマーは一部の系統のゲノム配列との間にミスマッチが多く存在していることが明らかとなった。そ

のため、PVS は Vallejo et al.（2016）の分類に基づき普通系統、アンデス系統およびフレーヤ系統の 3 系統、PVY は Green et al.（2017）の外被タンパク質遺伝子（CP）の分類に基づき O 系統、O5 系統、Eu-N 系統、NA-N 系統および E 系の 5 系統を検出できるようにプライマーを新たに設計した。加えて、検出反応の成否を判定する内部標準として植物の Elongation factor 1 alpha gene（*EF1α*）特異的プライマーを設計した。新たに設計したプライマーと既報の PLRV および PVX 特異的プライマーを用いて反応条件を検討したところ、50°C で 60 分間と 94°C で 2 分間の逆転写反応をに続き、98°C で 10 秒間と 64°C で 1 分間を 35 サイクル繰り返すシャトル PCR を行うことで主要な 4 種のジャガイモウイルスを同時検出できた。開発した簡易 RNA 調製法とコンベンショナル mRT-PCR 法による新たな検定法の妥当性を確認するため、ジャガイモの健全葉の粗汁液を用いて作製した各ウイルスのジャガイモ感染葉の粗汁液の希釈系列を用い、現行法である ELISA 法と検出感度を比較した。その結果、開発した検定法は、ELISA 法に比べ、PLRV と PVY では 10 倍、PVX では 1,000 倍、PVS は同等であり、種ばれいしょ検疫において ELISA 法の代替技術として用いるのに十分であった。

リアルタイム mRT-PCR 法は、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開発した。インターカレーター法によるジャガイモウイルスの同時診断法は、1 手法のみ報告があった（Cheng et al. 2013）。Cheng et al.（2013）のプライマーの特異性を確認するためにアライメント解析したところ、PVS 特異的プライマーはゲノム配列とのミスマッチが多く、PVS のアンデス系統とフレーヤ系統を検出できない懸念があった。そこで、コンベンショナル RT-PCR 法と同様に、PVS の系統間で保存されている領域に新たに設計した PVS 特異的プライマーを設計した。設計した PVS 特異的プライマーによる増副産物の融点は、Cheng et al.（2013）の他のプライマーによる増幅産物の融点が重複することが想定さ

れたため、ウイルス特異的プライマーと *EF1α* 特異的プライマーは、増幅産物の Tm 値が 2°C 以上離れるように新たに設計した。設計したプライマーを用いてプライマー濃度および反応温度を最適化したところ、4 種のジャガイモウイルスを同時検出することができた。次に、各ウイルスの融点の変動幅を検証するため、国内分離株の増幅産物の Tm 値の計算値と測定値を比較したところ、強い直線的な相関（R^2 = 0.9875）があり、計算値は十分な信頼性があった。そこで、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、昇順に、PVY は 77.7 – 79.5、PVS は 81.0 – 82.5、PVX は 84.5 – 85.5 および PLRV は 87.0 – 87.5 となり重複していないことから、本法は海外分離株もウイルス種を識別できると考えられた。健全葉の粗汁液でウイルス感染葉の粗汁液の希釈系列を用いたモデル試験の結果、簡易 RNA 調製法とリアルタイム mRT-PCR による検定法は、葉 100 枚のうち１枚のウイルス感染葉を検出するのに十分な検出感度があった。

第 2 部 ジャガイモ Y ウイルスの発生系統の解析ならびに塊茎伝搬率の解析

PVY は、病原性の異なる多数の系統が存在するため、国内ジャガイモほ場における各系統の発生状況を把握するためほ場調査を行った。2016 年から 2018 年にジャガイモほ場から収集したウイルス様症状株から採取した複葉 158 試料を ELISA 法および第 1 部で開発した RT-PCR 法で主要な 4 種のジャガイモウイルスの感染を確認したところ、PVY は 107 試料から検出され、PLRV、PVS および PVX は検出されなかった。PVY 陽性となった 107 試料は、Chikh Ali et al.（2010）の mRT-PCR 法による系統分類を行ったところ、NTN 系統が 86.0%、NA-N 系統が 7.5%、O 系統が 5.6%であり、複数の系統が混合感染している試料はなかった。また、未報告のバンドパターンを示す試料が検出されたため、単病斑分離後に分離株 JPH1806 と命名して詳細な解析を行った。まず、Green et al.（2017）のシークエン

スプライマー及び解読した配列由来する新規プライマーを用い、RT-PCR 法によって増幅した DNA を鋳型としてサンガー法によるシークエンス解析（ダイレクトシークエンス解析）により 5′ 末端からおよそ 50 塩基と polyA tail を除いた 9649 nt の配列を解読した。解読した配列は、リコンビナント解析ソフトウェア recombination detection program version 4（RDP4）によって組換え位置を推定し、その位置に基づいて部分配列による系統樹解析を行った。その結果、JPH1806 は約 50 – 7000 nt の領域は NTN 系統、約 7001 – 8750 nt は NA-N 系統および約 8750 – 9649 nt は O 系統に最も類似していた。このことから、JPH1806 は、NTN 系統を主な親系統とし、NA-N 系統および O 系統の 3 系統の組換え体であることが推定された。JPH1806 の病原性を確認するため、PVY の系統判定に用いられるタバコ（*Nicotiana tabacum* cv. Xanti）およびアカザ（*Chenopodium amaranticolor*）、ならびに、系統に応じて特徴的な反応を示すジャガイモの品種トヨシロに汁液接種をして病徴観察を行ったところ、いずれの植物に対する病徴も NTN 系統と一致していていた。このことから、JPH1806 の病原性は NTN 系統と類似しており、ジャガイモ生産に与える影響も NTN 系統と同等であることが考えられた。次に、NTN 系統がほ場で優占している要因を解明するため、系統間の塊茎伝搬率を比較した。植付け 4 週間後に汁液接種し、病徴あるいは上位葉の遺伝子診断により PVY の感染を確認し、植付け 12 週後に感染株から収穫した塊茎を解析に用いた。収穫した塊茎を催芽処理したのち、新芽を試料として開発した検定法を用いて PVY を検出した。その結果、各試験区の塊茎伝搬率は、NTN 系統は 3 品種全てで 100.0%、NA-N 系統は男爵薯で 88.3%、トヨシロで 63.2%およびコナヒメで 97.9%、O 系統は男爵薯で 14.3%、トヨシロで 0.0%およびコナヒメで 100.0%であった。以上より、NTN 系統の塊茎伝搬率が 3 品種全てで高かったが、NA-N 系統も比較的高い塊茎伝搬率を示した。

総合考察

種ばれいしょ検疫では、塊茎の貯蔵期間中にウイルスの検出率が低下することから、収穫した塊茎を植付けて栽培した植物体の葉を試料としている。また、多数の塊茎を検定する必要があるため、数十枚の葉を 1 試料としてスクリーニングをし、陽性となった試料は 1 枚ずつ個別に検査してウイルス感染率を確認している。開発したコンベンショナル mRT-PCR 法とリアルタイム mRT-PCR 法は、それぞれ増幅産物の断片長と融点で識別するため、両方の手法を用いることで高精度にウイルスを検出できる。そのため、より多検体の検出に適したリアルタイム mRT-PCR 法でスクリーニングを行い、コンベンショナル mRT-PCR 法で個別に検査することで、省力的かつ高精度にウイルスを検出できる。

PVY のほ場調査では、NTN 系統が優先していた。国内で分離された系統の塊茎伝搬率を比較した結果、NTN 系統は、他の系統に比べ、品種に依存せずに塊茎伝搬率が高いことがほ場で優先している要因であることが示唆された。また、本調査では、NTN 系統、NA-N 系統および O 系統の 3 系統を親とする新たな組換え体が発見された。各領域を用いた Blastn 検索の結果いずれも国内分離株の配列が最も高いスコアを示したことから国内で組換えが起きた可能性が高いと考えられる。今回の調査では、複数の系統の混合感染は発見されなかったが、今後も新規組換え体の発生には警戒が必要である。

以上、本研究で得られた技術や知見は、ジャガイモの安定生産への貢献が期待される。

引用文献

Bostan H, Peker PK（2009）The feasibility of tetraplex RT-PCR in the determination of PVS, PLRV, PVX and PVY from dormant potato tubers. Afr J Biotechnol 8：4043–4047.

Campos and Ortiz（2020）The potato crop its agricultural, nutritional and social contribution

to humankind. New York: Springer; 2020. https:// doi. org/ 10.1007/ 978-3-030-28683-5.

Caroll JE, Smith DM, Gray SM（2016）Preferential acquisition and inoculation of PVY^{NTN} over PVY^{O} in potato by the green peach aphid *Myzus persicae*. J Gen Virol 97：797-802.

Cheng J, Jiang Y, Rao P, Wu H, Dong Q, Wu Z, Ding X, Guo J（2013）Development of a single-tube multiplex real-time PCR for detection and identification of five pathogenic targets by using melting-curve analysis with EvaGreen. Arch Virol 158：379-386.

FAOSTAT（2018）The database on production of crops; 2018 (online database). Available from: http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC.

Green KJ, Brown CJ, Gray SM, Karasev AV（2017）Phylogenetic study of recombinant strains of *potato virus Y*. Virology 507：40-52.

Kawakami T, Oohori H, Tajima K（2015）Seed potato production system in Japan, staring from foundation seed of potato. Breed Sci 65：17-25.

MAFF（2020）令和元年度 食料・農業・農村白書 第 2 章. 農林水産省. Available from： https://www.maff.go.jp/j/wpaper/w_maff/r1/zenbun.html.

Mondal S, Lin YH, Caroll JE, Wenninger EJ, Bosque-Pérez NA, Whitworth JL, Hutchinson P, Eigenbrode S, Gray SM（2017）*Potato virus Y* transmission efficiency from potato infected with single or multiple virus strain. Phytopathology 107：491-498.

Vallejo D, Gutiérrez P, Marín M（2016）Genome characterization of a potato virus S (PVS) variant from tuber sprouts of *Solanum phureja* Juz. et Buk. Agron Colomb 34：51–60.

Zou Y, Mason MG, Wang Y, Wee E, Turni C, Blackall PJ, Trau M, Botella JR（2017）Nucleic acid purification from plants, animals and microbes in under 30 seconds. PLoS Biol 16(5):e1002630.