



Title	ジャガイモやせいもウイルスの病原性と宿主トマトにおける病徴発現に関する研究 [論文内容及び審査の要旨]
Author(s)	直井, 崇
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(農学)
Dissertation Number	甲第14807号
Issue Date	2022-03-24
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/85447
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Naoi_Takashi_abstract.pdf, 論文内容の要旨



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 直井 崇

学位論文題名

ジャガイモやせいもウイルスの病原性と
宿主トマトにおける病徴発現に関する研究

ウイルスは環状1本鎖RNAをゲノムとする最小の植物病原体であり、自身の配列中にタンパク質をコードしていないため宿主の酵素を利用し自律的に複製する。ウイルスが感染した宿主植物で病原性を発揮するか、またウイルスに感染した宿主植物が発病するかはウイルスと宿主の組み合わせによって異なる。そのためウイルス側に存在する病原性決定要因と宿主植物側に存在する発病要因及びそれらの間の相互作用によって感染宿主が発病するか否か、または病徴の程度が決定されると考えられる。本研究ではトマト (*Solanum lycopersicum*) におけるジャガイモやせいもウイルス (PSTVd) の発病メカニズムを包括的に理解することを目的とし、トマト側と PSTVd 側の双方から病徴の程度を決定しうる要因に関して解析を行った。

1. PSTVd の1量体RNAによる感染系の確立

PSTVd の病原性解析を容易にするために、従来の2量体RNA転写産物による感染系に代わり、cDNAクローンから転写した非ウイルス配列を含まない正確な1量体RNAによる感染系を構築した。正確な1量体PSTVd転写産物は少なくとも2量体PSTVd転写産物と同程度の感染性を示し、感染初期におけるPSTVdの蓄積量はむしろ2量体転写産物よりも高かった。この1量体感染系を用いてPSTVdの接種試験及び病原性解析を行った。

2. トマト側に存在する病徴発現に影響を及ぼす要因の解析

病原性の異なる中間系統のPSTVd-Intermediate (-Int) と致死系統のPSTVd-AS1を様々なトマト品種及び野生種に接種し、感染時の反応を調べた。その結果、近縁野生種の大部分の種（または系統）はPSTVd感染時に発病し一部は特徴的な病徴を示したが、*S. pimpinellifolium* LA0373 と LA0411 及び *S. chmielewskii* LA1028 は致死系統のPSTVd-AS1感染時であっても病徴が認められない強い耐病性を示した。そしてPSTVd感受性の近縁野生種ではPSTVd系統間の病原性差異が顕著に認められたのに対し、PSTVd耐病性を示す種ではほとんど病原性差異が認められなかった。

次にトマト近縁野生種 *S. pimpinellifolium* LA0373 及び *S. chmielewskii* LA1028 で見つかった強いPSTVd耐病性の遺伝様式及び発病機構を明らかにするため、感受性の野生トマト *S. l. var. cerasiforme* LA1286 との交配後代を作出した。それぞれのF1雑種はPSTVd-AS1感染に対して耐病性を示し、これらの近縁野生種におけるPSTVd耐病性はいずれも顕性形質であった。またPSTVd耐病性の近縁野生種におけるPSTVdの蓄積は、感受性野生トマトと比較して著しく低かった。さらにF1雑種における感染初期のPSTVdの蓄積も感受性野生トマトと比較して低く、病徴の程度とPSTVd蓄積量が正の相関を示した。F1雑種のうち *S. l. var. cerasiforme* LA1286 × *S. pimpinellifolium* LA0373 F1を自殖して得たF2集団にPSTVd-AS1を接種し、PSTVd耐病性形質の分

離を解析した。その結果、F2 集団は少なくとも 4 つの発病パターンを示し、全体の約 63%が PSTVd-AS1 に感染しても発病しなかった。発病パターンの分離比より、この耐病性は寄与の大きな主働遺伝子と寄与の小さなその他の微働遺伝子によって支配される量的形質である可能性が示唆された。さらに発病グループごとに PSTVd の蓄積を解析したところ、PSTVd の病徴が激しいグループほど PSTVd の蓄積量は多く、発病の程度と PSTVd の蓄積量が正の相関を示した。以上の結果より、*S. pimpinellifolium* LA0373 の PSTVd 耐病性に寄与する遺伝子は PSTVd の蓄積に影響を及ぼす因子をコードしていることが示唆された。

さらに、PSTVd 耐病性トマト品種 Moneymaker において RNA サイレンシングの重要な因子である RNA 依存 RNA ポリメラーゼ 6 (RDR6) の発現を抑制した形質転換植物に、病原性の異なる中間系統の PSTVd-Int と致死系統の PSTVd-RG1 を接種した。その結果、RDR6 の発現抑制により PSTVd 2 系統の病徴は変化せず、トマト品種 Moneymaker の PSTVd 耐病性は失われなかった。その一方で RDR6 の発現抑制により PSTVd 2 系統が同程度の侵入度・侵入率で茎頂分裂組織 (SAM) の基部へ侵入した。以上の結果より、RDR6 はトマトの PSTVd 耐病性には寄与していないが PSTVd の SAM 基部への侵入を抑制する上で重要であると考えられた。

3. PSTVd 側に存在する病原性決定要因の解析

致死系統の PSTVd-AS1 は中間系統の PSTVd-Int と比較して、二次構造上の病原性調節 (virulence-modulating, VM) 領域内の 4 塩基が異なることでその領域内に位置する第 7 ステム中の 315 番塩基 C がバルジループとなる。この二次構造変化が PSTVd-AS1 における強毒化の主要因であるかを明らかにするため、PSTVd の病原性と二次構造との関係を詳細に解析した。PSTVd-Int と PSTVd-AS1 の間の塩基置換変異体 6 種と第 7 ステムの二次構造を変化させる変異を導入した構造改変型変異体 14 種をトマト品種 Rutgers へ接種し、病原性の比較・解析を行った。その結果、第 7 ステムにおける 313 番塩基 A と 314 番塩基 C のバルジループが弱毒の病原性、315 番塩基 A または C のバルジループが致死の病原性と関連付けられた。全体をまとめると、PSTVd の VM 領域内の第 7 ステムにおけるバルジループの有無、位置、及び塩基または第 7 ステムの長さが病原性決定要因の 1 つであるが、その病原性の発揮には周辺構造との相互作用も重要であることが考えられた。また PSTVd 蓄積量の解析より、PSTVd の第 7 ステムの二次構造変化と感染初期における蓄積量の増加、及び病原性の強毒化が関連付けられた。

次にトマト品種 Rutgers における PSTVd の病原性と壊疽病徴の発症機構の観点から、PSTVd の病原性と宿主遺伝子の発現変動の関係を調べた。その結果、感染している PSTVd の病原性が強く葉における壊疽が激しいほど活性酸素種の蓄積量が多く、ストレス応答性の miR398 及び miR398a-3p の発現が高かった。そして miR398a-3p の発現は予測ターゲット遺伝子である活性酸素分解酵素をコードする *SOD3* mRNA の発現と負の相関を示した。

以上の結果より、VM 領域内の第 7 ステムの二次構造変化に伴う PSTVd 蓄積量の変化により宿主植物の活性酸素種の代謝及び関連遺伝子の発現が変動することで、病原性が変化することが示唆された。

以上、本研究より感染初期における PSTVd の蓄積に影響を及ぼしうる PSTVd 側とトマト側の要因、そしてそれらの間の相互作用がトマトにおける発病及び病徴の程度を決定する上で特に重要であると考えられた。本研究の成果は、PSTVd 耐病性トマトの作出や弱毒 PSTVd ワクチンの開発などウイロイド病防除への応用が期待される。