



Title	ウイルス関連トマト遺伝子の変異による抵抗性遺伝資源開発に関する研究 [論文内容及び審査の要旨]
Author(s)	新子, 泰規
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(農学)
Dissertation Number	甲第15141号
Issue Date	2022-09-26
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/87142
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Atarashi_Hiroki_abstract.pdf, 論文内容の要旨



学位論文内容の要旨

博士の専攻分野名称：博士（農学）

氏名：新子 泰規

学位論文題名

ウイルス関連トマト遺伝子の変異による抵抗性遺伝資源開発に関する研究

トマト (*Solanum lycopersicum* L.) はナス科に属する園芸作物で、主要作物の1つとして世界での年間生産量は1億6000万トンを超え、野菜生産量の15%以上を占めている。トマトはウイルス・細菌・真菌・線虫などの多種多様な病原体に罹患しやすいため、抵抗性トマトの育種が持続可能なトマト生産にとって重要である。近年、トマト黄化葉巻ウイルス (TYLCV) を含むベゴモウイルス属ウイルスの発生は地球規模の温暖化に伴い、媒介虫の生息地拡大とともに世界中に広がっている。現在、利用されている TYLCV 抵抗性トマトは発症を抑えるもののウイルス感染自体は許容する。また、従来は膨大なイントログレッションラインや化学薬剤処理等で作製した膨大な変異母集団の中からウイルス抵抗性など有用形質を選抜するため、大変な労力と時間がかかることが課題であり試練であった。しかし、最近開発された細菌の免疫システム CRISPR を利用した遺伝子編集は栽培品種に直接、標的変異だけを導入できる画期的な手法で、時間と労力を削減でき、育種のパラダイムシフトになった。本研究は、植物ウイルスが感染・増殖に利用しているトマトの感受性因子を遺伝子編集により変異させることで、ウイルス感染を許さない新たな強抵抗性遺伝資源を開発することを目標に行った。

1. 新規 *eIF4E1* 変異アレルによる PVY 抵抗性と CMV 抵抗性

はじめに、本研究戦略、すなわちウイルス感受性因子の編集でウイルス抵抗性が付与できるかを検証するために翻訳開始因子 *eIF4E1* 遺伝子を編集標的として選択した。自社のトマト固定品種又は市販固定種マニーメーカーを用いて、トマト第3染色体上の *eIF4E1* のエクソン内に CRISPR による変異導入を試みた。その結果、標的の *eIF4E1* 内に1塩基が挿入 (1INS) もしくは1塩基が欠損したノックアウト型変異や3塩基または9塩基が欠損 (3DEL、9DEL) したインフレーム欠損型の変異など、新たな *eIF4E1* 変異アレルが得られた。自殖種子の後代から、変異アレルのホモ接合体かつ、Cas9 など移入された組換え遺伝子が除かれたヌルセグリガント個体を選抜して種子を回収した。

eIF4E ファミリーの遺伝子は、ポテウイルス科のウイルスの感受性因子で、その変異植物が抵抗性を示すことが報告されていることから、前述の新たな *eIF4E1* 変異ホモ接合体、9DEL、3DEL、1INS のトマト実生にジャガイモ Y ウイルスの N 系統 (PVY^N) を機械的接種し、Double antibody sandwich-enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) 法により、上位葉のウイルス外被タンパク質 (CP) の蓄積を評価したところ、編集していない野生型品種 (WT) に比べて 1INS トマトでは CP 蓄積が顕著に低かった。この結果、*eIF4E1* の loss-of-function による PVY 抵抗性が確認され、予想通り感受性因子を遺伝子編集で変異させることで抵抗性を付与することができ、本研究戦略が正しいことが証明できた。さらに、キュウリモザイクウイルス (CMV) を、前述の変異体に接種したところ、WT や 1INS トマトでは接種実生のほとんどが発病したにも関わらず、予想外に 9DEL トマトの 1/3 は発病せず、発病株についても発病は他の接種実生苗に比べ遅延した。ELISA による非接種上位葉のウイルス CP 蓄積の解析でも、9DEL トマトが WT に比べて CP レベルが有意に低かった。この機械的接種テストでは 9DEL トマトは一定の CMV 感染を抑制していたが、全身感染も許容していることが示された。一方、CMV-O 系統のアブラムシ

伝搬試験では、WT トマトに比べ、9DEL トマトは CMV の伝染率が半分のレベルに低下した。RT-PCR 分析では、無症状の 9DEL トマトではウイルスゲノムが検出されず、9DEL が部分的に耐性ではなく免疫性を付与していることが確認された。

この 9DEL アレルから発現する変異 *eIF4E* タンパク質が CMV 2b タンパク質と結合することが見出された。一過性共発現実験より CMV 2b タンパク質と 9DEL タンパク質を共発現させると 2b の RNA サイレンシング抑制 (RSS) 活性が弱くなった。これらの結果から、インフレーション型変異アレルである 9DEL で CMV 抵抗性が付与された理由は、9DEL から発現する変異タンパク質が 2b タンパク質に結合しその機能を阻害することで CMV 感染を阻害しているからであることが示唆された。

2. トマト遺伝子編集による TYLCV 抵抗性遺伝資源の開発及び複合抵抗性の確認

eIF4E の編集と同様に、ベゴモウイルス属のウイルスとの相互作用等の研究報告がある宿主因子、カルモジュリン様タンパク *rgs-CAM* 遺伝子 *CLP06* 及び *CLP11-60*、受容体様キナーゼ遺伝子 *BAM1*、*BAM2*、Coatomer subunit delta 遺伝子 *deltaCOP10*、核関連アセチルトランスフェラーゼ遺伝子 *NAT*、4-クマル酸 CoA リガーゼ遺伝子 *4CL07* の他、*eIF4E2*、Dicer-like protein 遺伝子 *DCL3* について遺伝子編集によって変異体を作製した。*eIF4E1* 変異と同様に自家受粉により世代を進め、変異アレルがホモになったものを選抜した。接種テストは TYLCV イスラエル系統を感染性クローン化したものを Agrobacterium 法 (注射接種) で実生苗に実施した。接種後 3-5 週間の間で症状調査及び上位葉でのウイルスゲノムの PCR 分析により、TYLCV 感染率を検証した。その結果、*eIF4E1* 他、多くの宿主因子の変異はあまり抵抗性を示さなかったが、受容体様キナーゼ *BAM1* のノックアウト変異とそのホモログ *BAM2* の 6 塩基欠損、12 塩基欠損などのインフレーション欠損変異、及び *DCL3* のノックアウト変異において TYLCV の発病率が大きく低下し、抵抗性がみられた。そして、未発症の個体は PCR でも TYLCV が検出されなかったことから、感染を許さない免疫性を示し、従来の感染を許す TYLCV 耐性トマトより TYLCV 防除に効果的であると思われる。また *BAM1* のノックアウト変異は TYLCV とは全く異なる科である TSWV にも抵抗性が認められた。これは、*BAM1* ノックアウト変異が広範囲のウイルス種に抵抗性を付与できる可能性があり、*BAM* 遺伝子は多様なウイルスにとって重要な感受性因子である可能性が示された。

抵抗性作物を育種することは労働負荷の軽減、収量の改善、ひいては農薬への依存を減らした持続可能な農業、環境問題にも貢献する。本研究では、loss-of-function であるノックアウト変異だけではなく、インフレーション欠損型変異にも抵抗性が見られた。このインフレーション欠損型変異は、従来の変異導入技術では得にくい変異であり、遺伝子編集をウイルス抵抗性に用いる思わぬ利点である。これらの変異はいずれも完全に免疫性をもつものではなかったが、例えば、*BAM1* と *BAM2* の変異の多重化により、さらに強いウイルス抵抗性を付与できるのではないかと推測する。また、一つの宿主遺伝子の変異が複数の異なる科のウイルスに対して効果がある可能性も認められた。さらに、従来、感受性因子とは反対のウイルス防御遺伝子と考えられた *DCL3* の loss-of-function 変異で抵抗性が付与された。これらを考慮すると、今後、遺伝子編集による抵抗性育種資源開発のターゲットとして、当初想定していたより広い範囲の宿主因子及び植物ウイルス病が対象となりえることが示唆された。