



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	<a href="https://hdl.handle.net/2115/87142">https://hdl.handle.net/2115/87142</a>
Rights(URL)	<a href="https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/">https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/</a>
Type	doctoral thesis
File Information	Atarashi_Hiroki_review.pdf, 審査の要旨



# 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 新子 泰規

審査担当者 主査 教授 増田 税  
副査 教授 金澤 章  
副査 講師 中原 健二

## 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

本論文は和文 102 頁, 図 31, 表 5, 6 章からなり, 参考論文 1 編が付されている.

一般に, 植物ウイルス病の防除には, ウイルス抵抗性品種を育種して栽培することが最も有効な手段の一つである. しかしながら, 抵抗性品種の利用は, 抵抗性を打破する病原ウイルスがいずれ出現する危険性をはらんでいる. そこで, 継続的な抵抗性品種の開発が望まれるが, 育種に用いることの出来る抵抗性遺伝資源には限りがあり, また, 抵抗性が近縁野生種に由来する場合, 栽培品種への導入は容易ではない. 近年, 主要作物の一つであるトマト栽培では, 感染を阻害する有効な抵抗性遺伝子が見つかっていないトマト黄化葉巻ウイルス (TYLCV) やその近縁ウイルス感染による世界的な被害が問題となっており, 宿主植物の持つ遺伝子を改変することで抵抗性遺伝資源を作出することが求められている. 遺伝子を改変する手段として, 最近, CRISPR を代表とするゲノム編集技術が開発され, 広範囲の生物種に適応されている. 作物育種でも, 栽培品種の標的遺伝子を直接編集することで時間と労力を軽減することができるため, 非常に有望な技術革新と考えられている. 本研究は, CRISPR によるトマト遺伝子の編集で, ウイルス抵抗性, 特に TYLCV 抵抗性を付与することを試みた結果をまとめたものである.

### 1. トマトの翻訳開始因子 *eIF4E1* 編集によるウイルス抵抗性

本研究の開始当初は, 作物のゲノム編集によるウイルス抵抗性付与の実証例がほとんどなかったため, まず初めに, この研究戦略の有効性の検証が行われた. 編集する標的遺伝子として, 自然変異および人為的な機能欠損変異でジャガイモ Y ウイルス (PVY) に対する抵抗性が付与されることが報告されている翻訳開始因子 *eIF4E1* が選定された. CRISPR によりトマトの 3 番染色体に座乗する *eIF4E1* のエクソン内の塩基配列が編集され, 1 塩基挿入で翻訳時にフレームシフトにより機能を失うノックアウト型変異 (1INS) トマトと, 3 塩基または 9 塩基が欠損したインフレーム型塩基配列欠損 (3DEL, 9DEL) トマトが得られた. これらのホモ接合体への PVY の N 系統, PVY<sup>N</sup> の接種試験で, 期待通りノックアウト型 1INS が抵抗性を示す結果が得られ, 本研究戦略が有効であることが示されている. 一方, キュウリモザイクウイルス (CMV) をこれらの編集トマトに接種する

と IINS は野生型トマトと同様の感受性であったが、9DEL トマトで発病率やウイルス外被タンパク質蓄積量が有意に低下する結果が示された。9DEL トマトでは3アミノ酸欠失を伴う変異 *eIF4E1* タンパク質が発現していると考えられ、その後の解析で CMV の 2b タンパク質との結合が見出されている。従って、9DEL トマトの部分的な CMV 抵抗性は、この変異 *eIF4E1* タンパク質が 2b に結合して、CMV の感染を阻害するよう働いたためではないかと考察されている。以前の研究で *eIF4E1* 変異トマトは CMV 抵抗性を示さなかったことが報告されており、本成果はゲノム編集が、予想外の新たなウイルス抵抗性を付与できることを示した点でも評価される。

## 2. トマト遺伝子編集による TYLCV 抵抗性および複合抵抗性

本研究では、過去の研究で TYLCV と同じベゴモウイルス属のウイルスと相互作用することが報告されている 10 余りのタンパク質の遺伝子が編集標的として選定され、それら遺伝子の編集トマトが作出された。それらの変異ホモ接合体への TYLCV のアグロインジェクション法による接種試験で、*Dicer* 様タンパク質遺伝子 3 (*DCL3*) と受容体様リン酸化酵素 1 (*BAM1*) のフレームシフトを伴うノックアウト型変異トマトの発病率の低下が見出されている。また、*BAM2* のノックアウト型変異トマトは TYLCV 抵抗性を示さないものの、6塩基や 12塩基欠損などのインフレーム型塩基配列欠損トマトで発病率の低下が示されている。さらにそれぞれの接種試験で、PCR により TYLCV 感染率を調べたところ、発病率とほぼ一致したことが示されている。すなわち、未発症の個体は PCR でも TYLCV が検出されなかったことになり、変異により全身感染が阻止されたことになる。これらのことから、従来の感染を許す TYLCV 抵抗性トマトより TYLCV 防除を行う上でより効果的であると考察されている。また *BAM1* のノックアウト変異は TYLCV とは異なる科のウイルスであるトマト黄化えそウイルスにも抵抗性であったことが見出された。このことは、*BAM1* タンパク質が多様なウイルスの感染に必要な共通の感受性因子であることを示唆し、*BAM1* 遺伝子の編集により広範囲のウイルス種に抵抗性を付与できる可能性を示している。

以上、本研究で、CRISPR を用いたトマト遺伝子の編集によりウイルス抵抗性を付与できることが実証された。特に、インフレーム型塩基配列欠損変異によりノックアウト変異で付与されない抵抗性が付与されたこと；一つの宿主遺伝子の変異で複数の異なる科のウイルスに対して抵抗性が付与されたこと；ウイルス防御遺伝子と思われる *DCL3* のノックアウト変異で TYLCV 抵抗性が付与されたことは、従来の知見からは予想することができない、画期的な成果と評価できる。以上の成果は、ウイルスと宿主植物の相互作用の理解ならびにウイルス抵抗性作物の育種研究に大きく寄与するものである。

よって、審査員一同は、新子 泰規が博士（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。