



Title	北海道産ニンニクのウイルス感染に関する疫学的・分子生物学的解析 [論文内容及び審査の要旨]
Author(s)	佐々木, 純
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(農学)
Dissertation Number	甲第15225号
Issue Date	2022-12-26
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/87773
Rights(URL)	https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/
Type	doctoral thesis
File Information	Sasaki_Jun_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 佐々木 純

学位論文題名

北海道産ニンニクのウイルス感染に関する疫学的・分子生物学的解析

北海道では 2010 年頃からニンニクの栽培面積が増加しているが、多くの地域ではウイルスフリー種球の入手が難しいため、栽培に用いる種球はすでにウイルスに感染していると考えられる。このため、道内のニンニク収量はウイルスフリー種苗の生産体制をとっている国内生産量第一位の青森県に比べて 6 割程度と低くなっている。ニンニクに感染する主要なウイルスとしては、leek yellow stripe virus (LYSV), onion yellow dwarf virus (OYDV), allexivirus が知られている。これまで、市場のりん球からの検出により、これらのウイルスは確認されていたが、栽培中のニンニクに対しての全道的な発生分布調査は行われていなかった。

本研究では、北海道産ニンニクのウイルスに関する現地調査により疫学的解析を実施した。さらに、LYSV について分子系統学的解析を行った他、タマネギへの感染や野生ネギ属植物への寄主性、P1 タンパク質の RNA silencing suppressor (RSS) 活性に関する分子生物学的解析を実施した。

2019～2020 年に道内 7 振興局（空知，石狩，後志，檜山，上川，オホーツクおよび十勝）の 17 市町村合計 54 圃場より合計 65 検体のニンニクの葉または個体全体を採取した。ほとんどの圃場でモザイク症状，黄色条斑，葉の奇形が確認された。各サンプルから RT-PCR 法によるウイルス検出を行ったところ，検出されたウイルスは LYSV が最も多く，ほとんどの場合 P1 遺伝子が N 型のタイプのみが検出された。しかし，2 検体のみ N 型と P1 遺伝子に欠失がみられる S 型の増幅が同時に認められ，これは LYSV-N と LYSV-S の混合感染と推測された。OYDV は 2 番目に多かったが，ほとんどの分離株で HC-Pro の N-末端領域が欠失していた。りん球からの検出ではすでに明らかとなっていたが，栽培圃場のサンプルからも同様に確認でき，しかも北海道ではすでに優先種となっていることが示唆された。allexivirus は，CP-3'UTR 領域の塩基配列相同性の比較から garlic virus A, garlic virus B, garlic virus C, garlic virus D の 4 種が，既に北海道に広く分布していることが示唆された。また，地域により allexivirus の種に偏りがみられた。allexivirus に感染した種球の由来での発生状況が大きく影響しているのではないかと推測された。

次に，ニンニクから N 型と混合感染した形で検出され，北海道では優占種ではない LYSV S 型 P1 遺伝子について，分子系統学的解析を実施した。まず，オホーツク産ニンニクの混合感染に由来する LYSV の N 型（オホーツク N）と S 型（オホーツク S）P1 遺伝子と，沖縄産ニンニクおよび輸入ニンニク（アメリカ産，中国産）から分離した LYSV-N および LYSV-S の P1 遺伝子の塩基配列を決定し，これらの配列と GenBank データベース上に登録されている P1 遺伝子の配列を用い，系統樹を作成した。この系統樹では，N 型 P1（オホーツク N）と S 型 P1（オホーツク S）は明らかに異なるグループに配置されており，S 型 P1 は LYSV-N と LYSV-S の混合感染の N 型 P1 には由来していないことが分かった。また，N 型 P1 は，S 型 P1 に見られる共通の欠失はなく，様々な長さの短いストレッチの配列を有していたが，進化的に独立し S 型 P1 と姉妹群を形成していた。このことから，LYSV の N 型と S 型の P1 配列は異なる進化系統群に属していることがわかった。

さらに、N 型 P1 を持つ LYSV-N 感染ニンニクに、S 型 P1 を持つ LYSV-S を持ち込んだ感染源について検討した。LYSV-S 感染タマネギ（品種：フレッシュレッド）を接種源とした LYSV-N 感染ニンニクに対するアブラムシ伝染試験の結果、LYSV-N と LYSV-S の両方に低率ながら感染し、アブラムシにより LYSV-S はタマネギに感染する可能性が示された。そこで、市販のタマネギ苗（品種：札幌黄）から LYSV を検出したところ、Nested-PCR でようやく LYSV-S を検出したが、極微量の存在を示唆するこの結果からアブラムシの感染によってタマネギからニンニクに LYSV-S が持ち込まれたとは考えにくい。さらに、北海道の野生ネギ属植物（アサツキ、ギョウジャニンニク）の LYSV 感染について調査した。しかし、アサツキ 1 株から Nested-PCR で LYSV-S が検出されたのみでほとんど検出されず、北海道の野生ネギ属植物は、これらがニンニクの LYSV の保毒源にはなっていないと考えられた。一方で、本州で採取した野生ネギ属植物（ノビル、アサツキ、ラッキョウ、ワケギ、ギョウジャニンニク）などからは高頻度に LYSV-S が検出された。本州では、ニンニクへのアブラムシ感染の保毒源となっている可能性が考えられた。以上の結果から、LYSV-S の感染源として、それに感染したニンニクなどが本州または海外から持ち込まれて北海道で栽培されていたことに由来する可能性が考えられた。また、LYSV-S は LYSV-N と比較してより広い範囲のネギ属植物に感染しうることも示唆された。

最後に、LYSV-S は LYSV-N と比較してより広い範囲の宿主に感染していたことから、potyvirus の P1 タンパク質が HC-Pro タンパク質の RSS 活性を促進するとの既報と同様に、LYSV-S の欠失した P1 タンパク質も HC-Pro タンパク質の RSS 活性を促進することで広い宿主範囲を獲得したのではないかという仮説を立て、この検証をおこなった。まず、*N. benthamiana* のアグロインフィルトレーションを用いた RSS 活性アッセイでは、N 型 P1 も S 型 P1 も RSS 活性がほとんどなく、P1 と HC-Pro を共発現させた場合、S 型 P1 は N 型 P1 よりも強く HC-Pro の RSS 活性を促進していると考えられた。次に、よりニンニクに近いネギ属植物のモデル植物としてタマネギを用いて同様のアグロインフィルトレーションアッセイを行った。HC-Pro は *N. benthamiana* の結果と同様に強い RSS 活性を示した。その一方で、P1 タンパク質自体が RSS 活性を有していた。さらに、S 型 P1 の RSS 活性は N の P1 タンパク質よりもかなり強かった。P1 と HC-Pro を共発現させた場合、相加的あるいは相乗的な RSS 活性はほとんど観察されず、タマネギにおける P1 単独の活性と同程度であった。このことから、LYSV の P1 は N 末端半分を欠失させると RSS 活性を高めることができ、S 型の P1 を獲得することで LYSV の RSS 活性が向上した可能性があると考えられた。この機能により、LYSV-S は他のネギ属植物にも感染することが可能になったのではないかと考えられた。

本研究は、全道のニンニクにおけるウイルス発生状況に関わる初めての調査例であるとともに、LYSV についての分子系統学的解析の他、タマネギや野生ネギ属植物への感染、LYSV の P1 タンパク質の RSS 活性について解析した初めての報告である。本研究の結果は、ニンニクのウイルス感染に関する多くの新しい情報を含み、今後、ニンニクのウイルス病防除に役立つ知見となりうるものである。