



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
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
DOI	<a href="https://doi.org/10.14943/doctoral.k15141">https://doi.org/10.14943/doctoral.k15141</a>
Doc URL	<a href="https://hdl.handle.net/2115/90375">https://hdl.handle.net/2115/90375</a>
Type	doctoral thesis
File Information	Atarashi_Hiroki.pdf



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

北海道大学 大学院農学院

農学専攻／生産フロンティア 博士後期課程

新子 泰規

## 目次

### 第 I 章 緒言

### 第 II 章 研究史

### 第 III 章 新たに作出したトマト *eIF4E1* 変異アレルが与える PVY と CMV への抵抗性

#### 1- 目的

#### 2- 材料と方法

#### 3- 結果

III-3-1 市販のトマト品種の *eIF4E1* 遺伝子変異アレルのホモ接合体

III-3-2 *eIF4E1* 変異アレルのホモ接合トマトにおける PVY<sup>N</sup> および PVY<sup>O</sup> への異なる感受性

III-3-3 *eIF4E1* の変異アレルのホモ接合トマトの CMV に対する感受性の低下

III-3-4 CMV 機械的接種に対する 9DEL トマトの抵抗性評価

III-3-5 9DEL トマトの CMV 虫媒接種に対する抵抗性評価

#### 4- 考察

### 第 IV 章 TYLCV 抵抗性を付与するトマト宿主因子の変異遺伝資源の開発

#### 1- 目的

#### 2- 材料と方法

#### 3- 結果

IV-3-1 市販大玉トマトの宿主因子の変異導入

IV-3-2 TYLCV 感染性クローン接種による TYLCV 抵抗性検定

IV-3-3 *BAM* 遺伝子と TYLCV の相互作用

#### 4- 考察

### 第V章 TSWV 抵抗性を付与するトマト宿主因子の変異遺伝資源の開発

#### 1- 目的

#### 2- 材料と方法

#### 3- 結果

##### V-3-1 機械的接種による TSWV 抵抗性評価

#### 4- 考察

### 第VI章 新たに作出したウイルス抵抗性トマトの栽培特性試験

#### 1- 目的

#### 2- 材料と方法

#### 3- 結果

##### VI-3-1 スルセグリガントの選抜

##### VI-3-2 栽培形質調査

#### 4- 考察

### 第VII章 総合考察

#### 摘要

#### 引用文献

#### 謝辞

## 第 I 章 緒言

ラテンアメリカ原産のトマト (*Solanum lycopersicum* L.) はナス科に属する園芸作物である。ナス科は他にジャガイモ (*Solanum tuberosum*)、トウガラシ (*Capsicum*)、タバコ (*Nicotiana tabacum*) など農業上重要な作物を含む約 100 属 2500 種で構成される (Olmstead et al., 2008)。豊富な栄養素をもつトマトは世界の主要作物の 1 つとして世界での年間生産量はジャガイモに次いで 2 番目で 1 億 6000 万トンを超え、野菜生産量全体の 15% 程度を占めている。トマトは、真菌・ウイルス・細菌・線虫などの多種多様な病原体によって引き起こされる 200 以上もの病気に罹患しやすい (Lukyanenko, 1991)。一般に、ウイルス病防除にはウイルス媒介者に対する農薬の使用が有効ではあるが、植物ウイルスに直接効果がある薬剤はなく、栽培者にとっては費用や負担がかかることが多いため、抵抗性育種が持続可能な作物生産にとって重要となる。トマトでは現在までに様々な抵抗性遺伝子が発見され、そのいくつかは育種に利用されているが (Hanson et al., 2016)、抵抗性が不十分な場合や、実用化されていない抵抗性も数多い。日本デルモンテ (株) 及びキッコーマン (株) グループはこれまで、トマトジュースやケチャップ、その他トマト加工品の原材料になる加工用トマトの契約栽培を国内外で進めてきた。そのなかで 1980 年代、キュウリモザイクウイルス (cucumber mosaic virus ; CMV) が国内外で大発生したこと、当時はナス科には CMV 抵抗性が見つかっていなかったこともあり、我々は弱毒 CMV ワクチンを開発した (Sayama, 1993)。現在でも加工トマト及び自社ブランドの家庭菜園用販売苗に利用している。一方近年、トマトのウイルス病害として様々なエマージングウイルスが出現している (Hanssen et al., 2010)。国内では、トマト黄化葉巻ウイルス (tomato yellow leaf curl virus, TYLCV)、世界的には、TYLCV を含むベゴモウイルス属のウイルス、tomato brown rugose fruit virus (ToBRFV) などの新規のトバモウイルス属のウイルスやトマト黄化えそウイルス (tomato spotted wilt virus ; TSWV) が挙げられる (Luria et al., 2017; Ueda et al., 2004)。中でも TYLCV を含むベゴモウイルス属のウイルスの発生地域は地球規模の温

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(EFSA, 2013)。現在、TYLCV の抵抗性遺伝子として利用されている *Ty-3* 等は発症を抑えるもののウイルスの感染自体は許容する(Torre et al., 2018)。このため、新たな付加価値をもつ抵抗性遺伝資源を開発するため、トマトのゲノム編集による新たな潜性（劣性）変異体の作出を試みた。本稿では、開発過程において予想外に認められた *eIF4E* 変異による CMV 抵抗性や、全身感染を阻害する TYLCV 抵抗性を示す変異遺伝子の開発について報告する。

## 第Ⅱ章 研究史

### Ⅱ-1 植物ウイルス病害

植物に病害を引き起こす病原体は真菌、細菌およびウイルス、ウイロイドに大別される。このうち植物ウイルスは遺伝情報を持つが生物の基本構造である細胞を構成しない最も小さな感染性因子である。太古の昔より植物ウイルスは様々な植物に感染しており、例えば万葉集の孝謙天皇の短歌の中にも黄化したヒヨドリバナが表現されており、これがジェミニウイルスに感染した葉の症状であることが推察され、私達の生活の直ぐそばに植物ウイルスが存在しつづけていることが分かる (井上, 1983)。植物ウイルスに感染すると、宿主によってその反応は様々ではあるものの、一般的には植物体の枝葉や茎に症状を表し、草姿を変えたり、植物が作物であった場合は果実や塊茎の収量や品質に著しい悪影響を及ぼしたりする。また、植物ウイルスは媒介生物によって感染植物から他の植物へ伝染していくため、ウイルス病害は農業上、重大な生産阻害要因となっている (Scholthof et al., 2011)。20 世紀の後半より、地球の温暖化に伴って、ベゴモウイルス属、オルソトスポウイルス属、トバモウイルス属を始めとする新興の植物ウイルスが発生頻度、発生地域を拡大しており、世界中の農産物の安定供給に対する脅威となっているが、植物ウイルスに対する有効な対策は限られる (Ertunc, 2020; Trebicki, 2020)。

一般にウイルスは究極の寄生体であり、最小限の遺伝情報のみで構成されている。植物ウイルスの遺伝子本体は RNA もしくは DNA の一方のみであり、その大きさは数千塩基から 1 万塩基程度、遺伝情報にコードされるタンパク質も 4~8 程度と最小限で構成されているが、最近ではその機能はやや複雑に多彩な用途に使用されていることが判明しはじめている (Sanfaçon, 2017)。このように最小限の遺伝情報しか持たない植物ウイルスは植物宿主に寄生することでその存在を維持しており、宿主のシステム

を利用することで、植物体内で複製、増殖、移動を可能にしている。これに対し、植物も対抗するための RNA サイレンシングや過敏感反応等様々な防御機構を備えている。植物ウイルスもサイレンシングサプレッサーを装備することで対抗するなど、植物とウイルスは多階層的に複雑な相互作用をしており、ウイルスとそれに対する植物の反応が、感染植物の様々な症状として現れることになりウイルス病害が発生する。

## II-2 トマトの育種と抵抗性

トマト (*Solanum lycopersicum* L.) は屋外及び屋内でも栽培できる作物として世界中で栽培されている最も重要なナス科の野菜である。ナス科はトマトの他にジャガイモ、トウガラシ、タバコなど農業上重要な植物を含む 2500 以上の種で構成されている。トマトはラテンアメリカ原産で、はじめはメキシコで栽培化され、その後スペイン人によって 16 世紀にはヨーロッパの各地へ広まり、17 世紀には東南アジアへと伝えられた。世界中での消費量はジャガイモに次いで世界で 2 番目の人気の高い園芸作物である。日本国内では野菜として産出額第 1 位の 2000 億円以上で、経済的に重要な作物である (2019 年農林水産統計)。このように高い人気の背景にはトマトの持つ有用な栄養成分が挙げられ、豊富なビタミン (A、B 及び C)、リコピン、 $\beta$ カロチン、フラボノイドなどが含まれるため、血液の浄化や抗酸化作用、抗ガン作用等が注目されている (Zushi & Matsuzoe, 2012)。トマトは生でも熱を通して食べることができ、スープ、調味料、ジュース、粉末パウダーなど加工食品としても広く利用されている。特にトマトのもつアミノ酸であるグルタミン酸及びアスパラギン酸は旨味成分として知られており、日本人に馴染みの昆布などに代わって欧米では味の奥行きを引き出すための「ダシ」としての役割にも重要な野菜である。

トマトには栽培種である *Solanum lycopersicum* L. 以外にこれまで、野生種とよばれるものが 12 系統見つかっている。比較的栽培種に近い *S. pimpinellifolium* や *S.*

*cheesmaniae*、やや遠い関係にある *S. habrochaites* や *S. pennellii* などがある(Bauchet & Causse, 2012)。栽培種である *Solanum lycopersicum* L. は現在では多様な色や形の品種が存在するが、食用化や栽培化に伴い、選抜の過程で遺伝的に非常に狭い集団を形成するようになった。一方、野生種には様々な有用な遺伝子が保存されており、育種への利用が試みられている。

トマト育種の一般的な目標は、他の園芸作物と同様に収量と果実品質の向上にある。この収量向上には主に、果実サイズ若しくは果実数の増加と、病虫害による収量減を防ぐための抵抗性が重要になる。これらに関係する遺伝子もしくは遺伝子座を特定するために、野生種と栽培種を計画的に交配させたイントログレッションシステムの整備がされ、量的関連形質遺伝子座 (QTL) 解析や病虫害抵抗性やストレス耐性の開発に利用されている。トマトは最も育種がさかんに進められている園芸作物の一つであり、はじめは表現型の選抜と伝統的な育種方法によって商業品種が開発されてきた。しかし、分子マーカーとマーカーアシスト選抜およびクローニング技術の進歩により、様々な抵抗性遺伝子もしくは領域が特定され、育種に利用されてきた。現在では、多くの商業品種に、トマトモザイク病抵抗性 (*Tm-2<sup>2</sup>*; 別名 *Tm-2a*)、萎凋病抵抗性 (*I2*, *I3*)、根腐れ萎凋病抵抗性 (*Frl*)、半身萎凋病抵抗性 (*Ve-1*, *Ve-2*)、ネコブセンチュウ抵抗性 (*Mi*)、疫病抵抗性 (*Ph-3*)、葉かび病抵抗性 (*Cf-4*, *Cf-9*)、トマト黄化葉巻病耐性 (*Ty-2*, *Ty-3*)、トマト黄化えそ病抵抗性 (*Sw-5*) などのうち、5 ないし 6 の抵抗性が導入されている(Acciarri et al., 2007; Balint-Kurti et al., 1994; Foolad, 2007; Hanson et al., 2006; Ji et al., 2007; Jones, 1993; Klein-Lankhorst et al., 1991; Ori et al., 1997; Robinson et al., 1970; Scott & Jones, 1989; Stevens et al., 1995; Vakalounakis et al., 1997)。しかし、抵抗性が見つからない、または不十分である病害も多く、現状では育種だけでは対応しきれず、化学農薬や耕種的防除に頼っている。

トマトはナス科の中ではゲノムサイズが小さいと推定され、世界的にゲノム解析共同プロジェクトが生まれ、2012年に加工用中大玉品種 Heinz1760 の全ゲノム配列の解

析に成功した。プロジェクトでは約 9 億塩基対のゲノムのうち、86%に当たる 7.8 億塩基対について塩基配列情報が解読され、12 本の染色体上に位置づけされた。加えて、これら塩基配列から 34000 のタンパク質が予測されている (The Tomato Genome Consortium 2012 年)。今後はこれらのデータベースを活用した新たな有用遺伝子の開発が望まれる。

### II-3 植物ウイルスに対する抵抗性

ヒトに感染するインフルエンザウイルスなどでは近年になって抗ウイルス剤が開発されているが、植物のウイルスではそのような有効且つ経済的に使用できるような抗ウイルス剤は開発されておらず、また糸状菌を抑えるような化学農薬による直接的な防除法も確立されていない。そのため、植物ウイルスの防除には、古くより行われてきた抵抗性を交配によって付与する抵抗性育種、弱毒ウイルスを用いた交叉防除、遺伝子組換えによる防除、若しくはウイルスの媒介生物を間接的に農薬等で抑制する方法などが試みられてきた。そのなかでも抵抗性育種は開発にこそ時間は要するものの、抵抗性品種を作り上げれば栽培時の付加的な作業は少なくなり、利用の利便性がある。

植物ウイルスに対する抵抗性に関わる植物側の因子 (遺伝子) の存在は抵抗性育種の側面から見出されてきた。そのなかで、トウモロコシの *Ac* 遺伝子を用いたトランスポゾンタギング法で、抵抗性遺伝子としてはじめて単離されたのはタバコモザイクウイルス (tobacco mosaic virus ; TMV) 抵抗性に関与するタバコ (ニコチアナ属) の *N* 遺伝子であった (Whitham et al., 1994) 。さらに 1999 年にはジャガイモウイルス X (potato virus X ; PVX) 抵抗性遺伝子 *R<sub>x</sub>* が、2003 年にはトマトモザイクウイルス (tomato mosaic virus ; ToMV) 抵抗性遺伝子 *Tm-2<sup>2</sup>* (別名 *Tm-2a*) が単離された (Bendahmane et al., 1997; Lanfermeijer et al., 2005)。これらの抵抗性遺伝子は R 遺伝子と呼ばれ、顕性 (優性) 抵抗性であり、過敏感反応 (hypersensitive response ; HR) によって壞疽斑を形成することでウイルスを組織に閉じ込めるタイプの抵抗性である。

また R 遺伝子がコードするタンパク質は構造的な特徴として、NB-ARC (nucleotide-binding adaptor shared by APAF-1, R proteins, and CED-4) ドメインおよび LRR (leucine-rich repeat) ドメインを持つため NB-LRR タンパク質と呼ばれており、ウイルス以外の病原体に対する抵抗性タンパク質とも共通した構造を示している(Dangl & Jones, 2001)。

一方、顕性抵抗性に対し、潜性(劣性)の抵抗性も見つかってきた。植物ウイルスに限らずウイルスは完全な寄生体であり、その複製、増殖は宿主因子に依存している。すなわち潜性抵抗性遺伝子はウイルスの感染に必要な宿主因子の潜性変異アレルであり、ウイルス側の遺伝子と相互作用が成立しない、若しくは成立しにくくなることに基づいている。翻訳開始因子(eukaryotic translation initiation factor 4E、*eIF4E*)ファミリーの変異アレルが代表的な潜性抵抗性遺伝子(座)である。まず2002年にシロイヌナズナの変異体がポテウイルス属のメンバーである tobacco etch virus (TEV) に抵抗性を示すことから、*eIF(iso)4E* 遺伝子が同定された(Lellis et al., 2002)。その後、*eIF4E* ファミリーの潜性アレルも様々なポテウイルス属のウイルスに抵抗性を示すことが明らかになった(Léonard et al., 2004; Ruffel et al., 2005)。*eIF4E* ファミリーの変異の抵抗性はウイルス RNA のキャップとの相互作用が翻訳効率に影響し、ひいては感染を抑えることへ繋がっていると考えられているが、単に翻訳効率への影響だけではない事例も見られ(Ashby et al., 2011)、広く感染経路の他のステップにも影響することが示唆されている。最近、NB-LRR をコードしない顕性抵抗性遺伝子(Ishibashi et al., 2007)や、*eIF4E* をコードしない潜性抵抗性遺伝子が次々に見つかって来ており(Hashimoto et al., 2016)、植物が備えるウイルス抵抗性の全容解明には至っていない。

## II-4 遺伝子編集

植物の育種では長い間、変異体を得るには放射線や EMS(エチルメタンサルホン酸)などの化学物質による突然変異誘発育種法が用いられてきた。これはゲノム上に無作

為に無数の変異を導入できるが、その後、目的の変異のみを持つ個体を選抜するのに多大な時間と労力を要することが最大の問題であった。1990年代に入るとアグロバクテリウムによる遺伝子組換え法が確立され、除草剤耐性セイヨウナタネなど、本来その作物種が持ち合わせない遺伝子特性を持った作物が開発され、栽培されはじめた (Brookes & Barfoot, 2020; Cerdeira & Duke, 2006)。遺伝子組換え作物は厳しい特性調査、環境影響などを審査した上で承認され、使用可能となり、その農業上のメリットも大きい。自然界では起こりにくい遺伝子構成をもつ独特な作物であることであることから忌避感も根強く、日本では青いバラなど、ごく一部の植物に限ってしか商用化されていない。

ゲノム DNA の特定の位置を切断する遺伝子編集 (ゲノム編集) の最初のツールは 1996 年に発表されたジンクフィンガーヌクレアーゼ (ZFN) であった (Kim et al., 1996)。これはその後、第 2 代ツールとして開発された TAL エフェクターヌクレアーゼ (TALEN) とともにタンパク質が特定配列を認識するタイプで、編集のためのツールの作製が煩雑であった (Christian et al., 2010)。これに対し、2012 年に Charpentier と Doudna によって提唱された DNA 切断システムは真正細菌や古細菌が有する獲得免疫の 1 つである CRISPR (Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats) / Cas (CRISPR-associated protein) システムを編集変異に応用したもので、RNA 誘導型ヌクレアーゼによって比較的単純な仕組みで標的 DNA を切断できる画期的なツールであった (Jinek et al., 2012)。CRISPR/Cas システムには標的配列に crRNA と tracrRNA と呼ばれる決まった配列をハイブリッドさせたキメラ RNA (まとめてガイド RNA と呼ばれる) と Cas タンパク質が揃えば十分で、Cas タンパク質は標的 DNA の配列如何に関わらず常に同じ 1 種類で適応できた。ガイド RNA が認識する標的 DNA の配列は約 20 塩基で、例えば化膿レンサ球菌の Cas9 を用いる CRISPR/Cas9 システムの場合、標的配列の 3' 側に PAM (protospacer adjacent motif) と呼ばれる 5'-NGG-3' (N は任意の塩基) の配列があれば切断できるため、高い自由度で目的の遺伝子の特定の

塩基配列に変異を入れることが可能となった (Cong et al., 2013)。CRISPR/Cas システムは広く微生物、動物、植物にまで応用でき、植物育種においてはパラダイムシフトとも言える変革であり、変異育種の可能性、汎用性および簡便性が格段に向上した。

植物の遺伝子編集では CRISPR/Cas システムを機能させるには遺伝子組換えで Cas9 遺伝子等の外来遺伝子を植物ゲノムに導入するケースが多いが、導入された外来遺伝子が単コピーである場合、自家受粉した（場合によっては非組換え個体を交配した）後代で「編集はされているが組換えではない」ヌルセグリガント個体を得ることが可能となる。

日本においては、官学研究機関を中心に遺伝子編集の事例が増え、高 GABA 生産トマト（筑波大）、ソラニンを低減したジャガイモ（大阪大）、肉厚なマダイ（京都大）等が開発されている (Kishimoto et al., 2018; Nonaka et al., 2017; Yasumoto et al., 2019)。2019 年に日本における遺伝子編集作物及び商品の取り扱いについて、政府の指針が定められ、単純な塩基欠損、置換、挿入のような変異（SDN-1 型）で、組換え遺伝子が除去されていることが証明できれば、「非遺伝子組換え作物である」と決定された。但し、義務ではないものの編集した作物、商品については関連省庁（農水省、厚労省）に届け出をすることが推奨されている。2022 年時点、前述の高 GABA 生産トマト、肉厚な真鯛、高成長なトラフグの 3 例について届け出が行われ、実用化へ向かっている。

### 第三章 新たに作出したトマト *eIF4E* 変異アレルが与える PVY と CMV への抵抗性

#### 1- 目的

新しい変異導入技術であるゲノム編集の編集効率及び変異体の効果の有効性を検証するために、ウイルス感受性因子であるトマトの *eIF4E1* の変異体を作成し、当該変異体について、ポテトウイルス属であるジャガイモウイルス Y (potato virus Y、PVY) に対する抵抗性を確認する。また、*eIF4E* の変異体についてはポテトウイルス属以外のウイルスへの感受性について報告は数少ないため、遺伝子編集を用いて変異遺伝子をより早く作製すること、*eIF4E* が翻訳効率以外の機能を担っている可能性から、トマトに影響を与えるその他のウイルスに対する抵抗性を検証することで、育種に役立つ実用抵抗性品種の作出を目指した。

#### 2- 材料と方法

##### バイナリープラスミドの構築

本研究では2つのプラスミドベクター pUC19-AtU6oligo と pZK\_gYSA\_FFCas9 を用いた (Kanazashi et al., 2018; Mikami et al., 2015) 。トマトのガイド RNA 認識領域の設計には Web サイト CRISPRdirect (<http://crispr.dbcls.jp/>) を使用した。トマトの3番染色体上の *eIF4E1* 遺伝子の標的部位の2本鎖オリゴヌクレオチド配列 (それぞれ 5'-attgagggtaaatctgataccagc-3' および 5'-aaacgctggtatcagattaccct-3') を人工的に合成し、2  $\mu$ M ずつを 95°C で5分間アニーリングした。アニーリングされたオリゴヌクレオチドを pUC19\_AtU6oligo の BbsI サイトにクローニングした。次に、クローン化したプラスミドを制限酵素 I-SceI で消化し、gRNA 発現カセット部位をバイナリーベクター pZK\_AtU6gRNA\_FFCas9\_NPTII にリクローニングした。最後に、アグロバクテリウム・ツメファシエンズ LBA4404 株 (タカラバイオ、日本) をバイナリーベクターで形質転換し、アグロ接種用の接種源として -80°C に保存した。

### トマトの形質転換と形質転換再生芽の増殖

遺伝子編集にはキッコーマン（株）の近交系大玉トマト親品種 S8 を用いた。アグロバクテリウムを用いた形質転換は Sun らの方法に従って行った (Sun et al., 2006)。0.5~0.8cm 程度に賽の目に切ったトマトの子葉若しくは本葉の葉片をバイナリープラスミドで形質転換されたアグロバクテリウム懸濁液に浸漬させ、形質転換させた。葉片から形成してきたカルス及びカルスから再生してきた再分化シュートをムラシゲ & スクーグ (MS) 基本培地に 1,5mg/L のゼアチン、50mg/L のカナマイシン及び 200mg/L のカルベニシリンを含んだ選択的シュート培地上で、蛍光灯による日長 16 時間の環境下においてグロスチャンバー内で無菌培養した。その後大きくなってきたシュートを MS 基本培地に 50mg/L のカナマイシン、100mg/L カルベニシリン、0.1mg/L ナフタレン酢酸 (NAA) を含んだ発根培地に移植した。さらに大きくなった形質転換個体はポットに鉢上げし、隔離実験室内で蛍光灯による日長 14 時間の環境下で生育させた。また、形質転換系統トランスジェニック第 1 世代 (T1 世代)、T2 及び T3 世代を各親世代から自家受粉によって作製した (T1 以下の世代では交配のなかで外来遺伝子が抜けたものが得られてくるが、便宜上すべて T をつけた世代で示す)。

### 導入遺伝子と変異のジェノタイピング

トマトのゲノム DNA は形質転換再生個体若しくは非形質転換個体より MonoFas Plant DNA Extraction Kit (ANIMOS、日本) を用いて抽出した。gRNA 認識領域や Cas9 遺伝子等を含む外来遺伝子の存在は、プライマーセット (フォワード (FW): 5'-tggaatc tgaagaagagaagca-3' / リバース (RV): 5' - aaacgctggtatcagattaccct-3'), KOD FX Neo 酵素 (東洋紡、日本) を用いて PCR で確認した。PCR の反応条件は 95°C 2 分後、「98°C 10 秒、60°C 25 秒、68°C 15 秒」を 30 サイクルで行った。

続いて形質転換が確認された個体について *eIF4E1* の変異の状態を CAPS (Cleaved Amplified Polymorphic Sequence) アッセイを用いてジェノタイピングを行った。PCR はプライマーセット (FW: 5'-atccatcacccaagcaagttaatt-3' / RV: 5'-gtccacaaagctatttttctccc-3') を用いて上記と同じサイクル条件で行った。PCR 産物は制限酵素 Pvu II で消化し、1.8%アガロースゲル電気泳動で分離を確認した。さらに T1 世代及びその後代におけるインデル変異の状態は標的変異領域の PCR 産物を Target clone キット (東洋紡、日本) によってクローニングし、塩基配列を確認した。

### 3次元構造解析

トマト *eIF4E1* の三次元構造は、Discovery Studio 2017 ソフトウェア (Biovia) を使用して、*Pisum sativum eIF4E* (タンパク質データベース ID: 2WMC) の結晶構造に基づくホモロジーモデリングによって作製した。

### ウイルスの機械的接種と検出

CMV 黄斑系統 (CMV-Y) と PVY 株 N 系統および O 系統 (PVY<sup>N</sup> 及び PVY) (Kwon et al., 2020) を *N. benthamiana* (ベンサミアナタバコ) で増殖させた後、この感染上葉を機械的接種の接種源として使用した。トマトの第3本葉が展開した段階の苗に、0.1 M リン酸緩衝液 (pH 7.0) で磨砕したウイルス感染葉粗汁液を機械的接種した。症状発現の経時的観察に続いて、接種後 25 日または 35 日での非接種上葉におけるウイルスコートタンパク質 (CP) 蓄積を、抗 CP ポリクローナル抗体 (日本植物防疫協会、日本) を用いた DAS-ELISA 法で調査した。CMV-Y ゲノム RNA を検出するための逆転写 PCR (RT-PCR) 分析は、プライマーセット (FW: 5'-gtacagagttcagggttgagcg-3' / RV: 5'-agcaatactgccaa ctcagctcc-3') を用いて以前の研究 (Kwon et al., 2020) に従って実施した。

### ティッシュブロットイング

抗 CMV の CP ポリクローナル抗体を使用したティッシュブロットイングを実施した (Kaneko et al., 2004; Murakami et al., 2016)。ImageJ (Wayne Rasband、National Institutes of Health) を使用して、感染点のサイズと感染領域を測定した。焦点サイズはその領域  $0.1\sim 30\text{mm}^2$  の範囲にあった病斑点を測定し、焦点の数はそのサイズが  $0.001\sim 30\text{mm}^2$  にある病斑点について計測した。

### CMV-O のアブラムシ虫媒接種と伝搬率検定

モモアカアブラムシ (*Myzus persicae*) は健全なカブ (*Brassica rapa*) 上で生育させた。CMV-Y はアブラムシを介した伝染に欠陥があることが知られているため、CMV 普通系統 (CMV-O) をアブラムシ伝搬試験に使用した。モモアカアブラムシによる伝搬率評価をするために、3 時間飢餓状態にしたアブラムシを接種後 10~30 日の CMV-O に感染した *N.tabacum* もしくはトマトに放飼し、2~5 分の獲得吸汁を行った。その後 10 匹のアブラムシを回収し、ゲノム編集で変異したアレルをもつトマト若しくは野生型 (WT) の S8 の実生苗にそれぞれに放飼した。接種 1 日後、農薬によってアブラムシを殺虫した。CMV 感染は、以下に説明する PCR 分析と、黄変、モザイクおよび葉の輪紋など病斑調査の評価によって確認した。接種位置より上位にある葉 (上位葉) よりウイルス RNA を TRIzol 試薬 (Thermo Fisher Scientific、米国) で抽出し、AMV 逆転写酵素 (Promega、米国) を使用してファーストストランド cDNA を合成した。PCR は前述 cDNA、 $0.5\ \mu\text{M}$  の各プライマーセット (FW: 5'-gtacagagttcagggtgagcg-3' / RV: 5'-agcaataactgccaactcagctcc-3') および Ex Taq ポリメラーゼ (タカラバイオ) を用いて実施した。PCR サイクルは  $95^\circ\text{C}$  で 2 分、「 $95^\circ\text{C}$  で 20 秒、 $55^\circ\text{C}$  で 30 秒、 $72^\circ\text{C}$  で 30 秒」の 35 サイクルの条件で実行した。PCR 産物は 1.8% アガロースゲル電気泳動によって確認した。

### 3- 結果

#### III-3-1 市販のトマト品種における *eIF4E1* 遺伝子の変異アレルのホモ接合

トマトには、3 番染色体と 2 番染色体上にそれぞれ *eIF4E1* と *eIF4E2* の 2 つの *eIF4E* 遺伝子があり、9 番染色体上にはアイソフォームの *eIF(iso)4E* 遺伝子が存在する。本研究では、CRISPR システムを介した *eIF4E* 遺伝子の編集を行うためのバイナリーベクターを保有したアグロバクテリウム・ツメファシエンスを用いて、大玉タイプの近交系親品種 (S8) を形質転換した。gRNA の標的となる領域 (図 1 の太字塩基) および黄色で強調表示されたアミノ酸配列 (図 2) は図 3 の矢印で示された 3 次元構造の一部に相当する。標的領域は mRNA キャップ (7-メチルグアノシン) および *eIF4G* への結合に重要なアミノ酸残基の近くに配するようにして (図 2 それぞれ水色と赤で強調表示) (German-Retana et al., 2008; Miras et al., 2017)、標的領域の編集変異がこれらの実際の結合に影響を与える可能性を持たせた。標的部位の CAPS アッセイにより、編集された *eIF4E1* 遺伝子アレルを持つ 20 の形質転換体が同定され、この T0 再生植物のうち、3 個体 (系統) について自家受粉を行い、T1 種子を回収して、ゲノム内の標的 *eIF4E* 遺伝子に生成された突然変異を調査した。さらに標的部位を含む領域の PCR 断片を増幅し、クローニングを行った。これらのクローンの塩基配列決定の結果、T1 植物で 1 塩基挿入 (以下 1INS) と 3 および 9 塩基欠損 (以下それぞれ 3DEL および 9DEL) を含む 6 種類のパターンの *eIF4E1* 変異アレルを確認した (図 4)。1INS アレルは、*eIF4E1* の翻訳でトレオニンを割り当てる 144 番目のコドンの直後に -1 塩基のフレームシフトを引き起こし、フレームシフトを介した伸長ペプチドの早期切断をもたらすことが予想される。3DEL アレルはトレオニンの欠失、9DEL アレルはリシンからアスパラギンへのアミノ酸置換に続いて、142 番目からのコドンでセリン、アスパラギン酸およびスレオニンが欠失しているタンパク質をコードする (図 1)。クローン化された PCR 断片 (計 16 クローン) の塩基配列を調べたところ、変異していない WT アレル

は存在せず、上記の変異アレルのいずれかに対応していたことから、T0 世代では相同する *eIF4E1* アレルが Cas9 によって両方とも編集されていることが示唆された。さらに、T1 または T2 世代では、Cas9 等の外来導入遺伝子を持たない個体（ヌルセグリガント）が得られた。これらの変異アレル個体（系統）は、隔離温室での栽培において、WT トマトと差のない表現型と形質を示した（第VI章 図 31）

### III-3-2 *eIF4E1* の変異アレルのホモ接合トマトにおける PVY<sup>N</sup> および PVY<sup>o</sup> への異なる感受性

*eIF4E* タンパク質はポテウイルスの感染に極めて重要な役割を果たす宿主感受性因子であることから、その潜性抵抗性アレルは、感染を支える機能を欠いていると考えられる。このため、植物が自然抵抗性遺伝子 *pot1* アレルを含む *eIF4E1* のホモ接合体（以下ホモ）の場合にのみ、ウイルスに対して抵抗性になっていた(Bastet et al., 2017; Hashimoto et al., 2016)。上記3つの編集アレル（1INS アレル、3DEL アレル、9DEL アレル）のいずれかがホモであるトマト実生苗に、PVY<sup>N</sup> または PVY<sup>o</sup> を接種した。これらのウイルス系統はタバコではそれぞれ全身性の葉脈壊死と斑点を引き起こし、WT トマトには全身的に無症状で感染する。抗 PVY- CP 抗体を用いた ELISA の結果、編集された *eIF4E* の変異アレルをホモに持つトマトでは、上葉における PVY<sup>N</sup> の CP の蓄積量が WT トマトよりも低いことが確認された。この差は、1INS および 3DEL アレルを持つトマト（以下 1INS トマト、3DEL トマト）では統計的に有意であったが、9DEL アレルを持つトマト（9DEL トマト）では有意ではなく、特に 1INS トマトで顕著であった（図5）。1INS アレルは、翻訳中にフレームシフトやそれに伴う早発の停止コドンが導入されることで機能喪失をもたらすと考えられる（図1）。一方、PVY<sup>o</sup> の CP は編集アレルのトマトと元の親である WT トマトで同等に蓄積されたことから、PVY<sup>N</sup> の感染には機能的な *eIF4E1* タンパク質が必須だが、PVY<sup>o</sup> の感染には必須ではないことが示唆された。

### III-3-3 *eIF4E1* の変異アレルのホモ接合トマトの CMV に対する感受性の低下

シロイヌナズナの *eIF4E* の機能喪失変異体である *cum1* は、WT シロイヌナズナに比べて CMV に対する感受性が低いことが知られている (Yoshii et al., 2004)。そこで次に、

編集された *eIF4E1* アレルをホモにしたトマトの CMV 感染に対する感受性が低下する  
のか調べた。3 つの編集されたアレルをそれぞれホモにした、1INS アレル、3DEL ア  
レル、9DEL アレル系統について、T2 トマト実生苗に CMV-Y 系統を機械的接種した。  
接種されたトマトのほとんどは、編集 *eIF4E1* アレルの有無にかかわらず、30dpi で感  
染を示した。しかし、抗 CMV-CP 抗体を用いた ELISA 法により、接種していない上  
葉における CMV-CP の蓄積量を調べたところ、9DEL トマトの CP 蓄積量の平均値は  
親である WT トマトのそれよりも低かった (図 5)。このことから、トマトの *eIF4E1*  
変異体では、シロイヌナズナとは違いノックアウト変異体である 1INS では感受性の  
低下は観察されなかったが、インフレーム塩基欠損型、すなわちアミノ酸欠損と置換  
を含むものの *eIF4E* 全長のタンパク質が発現していると思われる 9DEL トマトは CMV  
感染に負の影響を与える可能性が示唆された。

### III-3-4 CMV 機械的接種に対する 9DEL トマトの抵抗性評価

次に、CMV の感染サイクルのうち、9DEL トマトが影響を与えるステップを調査し  
た。抗 CMV-CP 抗体を用いて接種葉のティッシュブロッキングを行ったところ、  
9DEL トマトでは、接種した本葉 1 枚あたりの感染面積が WT トマトに比べて有意に  
小さいことがわかった (図 6)。この差は主に、9DEL トマトでは葉 1 枚あたりの感染  
病斑点が有意に減少したことによるもので、病斑点サイズには有意な差はなかった。  
接種した WT トマトはすべて接種 11 日後で上葉が激しく黄化するなどの症状が見ら  
れたが、接種した 9DEL トマトはこの時点で上葉に症状がほとんど見られず (図 7)、  
接種 35 日後では、3 分の 1 (7/20 個体) の 9DEL トマトは症状が見られなかった (図  
8)。また、CMV-CP を検出するために ELISA を行ったところ、接種はされたものの無  
症状の 9DEL トマトは接種 35 日後の時点で、上葉に検出されないレベルで CMV- CP  
を含んでおり、それは対照の Mock 接種トマトと同等かそれ以下であった (図 9)。ま

た、無症状の 9DEL トマトの上位葉を RT-PCR で解析したところ、7分の 6 の株で CMV ゲノム RNA が検出され、CMV の全身感染の可能性が示唆された (図 10)。これらの結果から、9DEL アレルは機械的接種した葉への CMV の感染成立を阻害し、増殖やウイルス移行に影響を与えるものの、CMV の全身感染は可能であることがわかった。

### III-3-5 9DEL トマトの CMV 虫媒接種に対する抵抗性評価

9DEL アレルが実際の CMV 防除に有用であるかどうかを判断するために、感染した *N. tabacum* から 9DEL トマトへのアブラムシによる CMV の感染効率を調べた (図 11)。モザイクや異常な葉を持つ植物の数を経時的にモニターしたところ、2 つの別々の実験で同様の結果が得られた (データ割愛)。この実験では CMV のアブラムシによる伝搬は WT トマトで観察されたレベルの半分程度にまで減少していた (図 11)。さらに、RT-PCR の結果から、症状のない植物は実際には CMV に感染していないことが明らかになった。これらの結果から、9DEL アレルは耐性ではなく免疫性をもたらすことがわかった (図 12)。次に、9DEL アレルに感染した CMV と WT に感染した CMV が別の WT トマトへのアブラムシによって伝染するかを比較した。感染した 9DEL トマトと WT トマトのうち、症状が現れたものをアブラムシの接種源とした。感染した 9DEL トマトおよび WT トマトからのアブラムシの伝搬は、互いに似たような感染率 (伝染率) を示した (図 13)。以上のことから、9DEL は、感染トマトの CMV のアブラムシによる他の植物への伝搬に影響するのではなく、アブラムシにより伝搬された CMV の感染成立を阻害することでアブラムシによる伝搬を抑制していると結論した。

```

WT  acgtgaaaaatgagtttttcgaagggtaaatctgataccagctggctgtatacgtctgctggcaatgattggacatcaattcgatcatggagatgaatt
   T W K M S F S K G K S D T S W L Y T L L A M I G H Q F D H G D E I
1INS acgtgaaaaatgagtttttcgaagggtaaatctgatacc+cagctggctgtatacgtctgctggcaatgattggacatcaattcgatcatggagatgaatt
   Q L A V Y A A G N D W T S I R S W R *
3DEL acgtgaaaaatgagtttttcgaagggtaaatctgat---agctggctgtatacgtctgctggcaatgattggacatcaattcgatcatggagatgaatt
9DEL acgtgaaaaatgagtttttcgaagggtaa-----agctggctgtatacgtctgctggcaatgattggacatcaattcgatcatggagatgaatt

```

図 1 1INS、3DEL、9DEL アレルの変異とアミノ酸

PAM : PAM 配列、太字塩基 : gRNA 認識部位

緑ハイライト : 置換 (塩基 a→c、アミノ酸 K→N)

紫ハイライト : フレームシフトによりロックアウトになる

```

MAAAEMERTM SFDAAEKLKA ADGGGGEVDD ELEEGEIVVE SNTASYLGK EITVKHPLEH
SWTFWFDNPT TKSRQTAWGS SLRNVYTFST VEDFWGAYNN IHHPSKLIMG ADFHCFKHKI
EPKWEDPVCA NGGTWKMSFS KGKSDTSWLY TLLAMIGHQF DHGDEICGAV VSVRAKGEKI
ALWTKNAANE TAQVSIGKQW KQFLDYSDSV GFIFHDDAKR LDRNAKNRYT V

```

図 2 eIF4E1 のアミノ酸配列

gRNA の塩基配列に対応するアミノ酸は黄色でハイライト、mRNA の 5'キャップ構造と eIF4G タンパク質への結合に重要なアミノ酸 (それぞれ青と赤でハイライト) と近接している

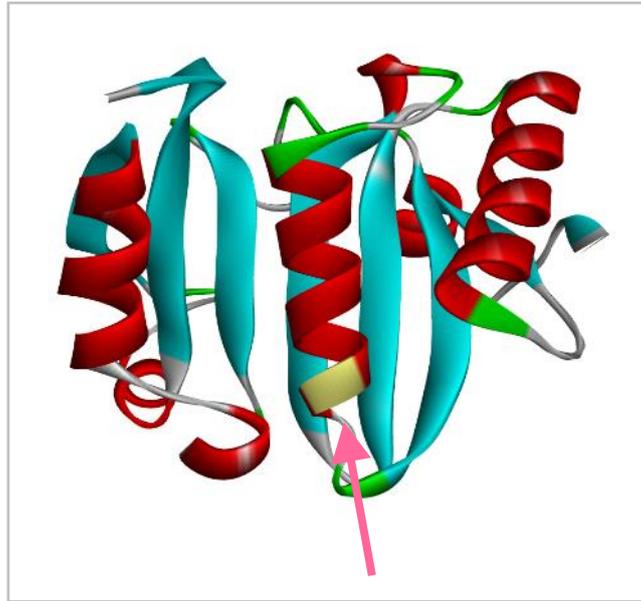


図 3 トマトの eIF4E1 タンパク質の 3 次元構造

矢印で示した領域が gRNA 配列の標的となった領域に相当

Transgenic Tomato lines	WT	taaatctgataccagctggctgt
A127	1INS 3DEL	taaatctgatacc <sup>+c</sup> agctggctgt taaatctgat---agctggctgt
A132	3DEL 9DEL	taaatctgat---agctggctgt taac-----agctggctgt
A142	1DEL 3DEL	taaatctgatac-agctggctgt taaatctgatac---ctggctgt
A143	4DEL 12DEL	taaatctga----agctggctgt taa-----ctggctgt

図 4 *eIF4E1* の編集変異パターン

+c: V の位置に c を挿入

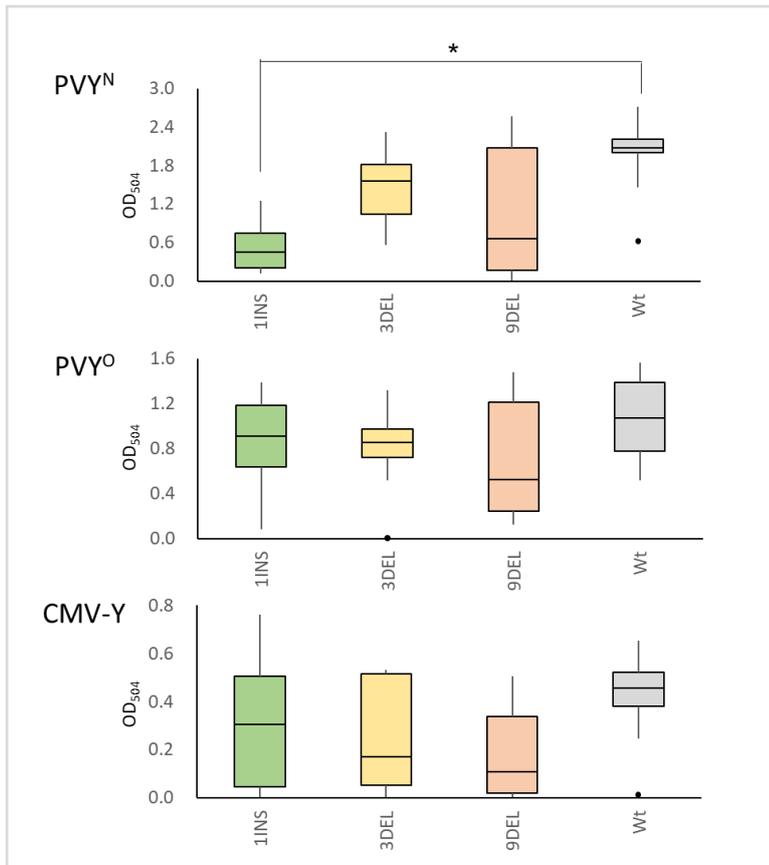


図 5 *eIF4E1* 対立遺伝子を持つトマトの非接種上葉における PVY と CMV のコートタンパク質 (CP) の蓄積量。

*eIF4E1* アレルトマトまたは対照 S8 トマトに PVY<sup>N</sup>、PVY<sup>O</sup>または CMV-Y を接種した (PVY<sup>N</sup> 実験 : 1INS、n = 8; 3DEL、n = 12; 9DEL、n = 7; WT、n = 14。PVY<sup>O</sup> 実験 : 1INS、n = 10; 3DEL、n = 10; 9DEL、n = 7; WT、n = 8。CMV-Y 実験 : 各アレル、n = 10, WT、n = 10) PVY および CMV CP の蓄積は、接種後 (dpi) 25 日および 35 日にそれぞれ抗 PVY または抗 CMV CP ポリクローナル抗体を用いた ELISA を用いて調査。データは箱ひげ図として表示。

\*p < 0.05; (Tukey-Kramer test)

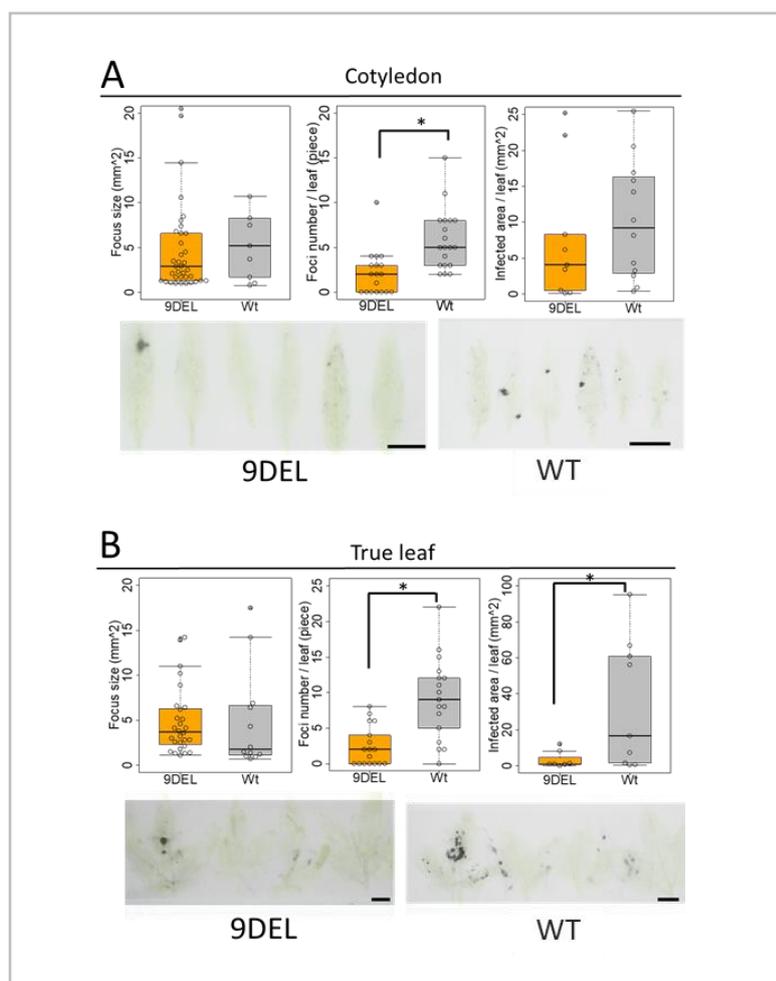


図 6 抗 CMV CP 抗体を用いたティッシュブロットイング

子葉 (A) 本葉 (B) における感染点をブロットイングにより検出した。(A) 9DEL 株の子葉と WT 株の子葉の間で、感染点サイズ (9DEL、n=9; WT、n=37)、葉当たりのフォーカス数 (9DEL、n=18; WT、n=19)、葉当たりの感染面積 (9DEL、n=9; WT、n=12) を比較検討した。(B) 9DEL 株と WT 株の本葉間で、感染点サイズ (9DEL、n=12; WT、n=28)、葉当たりの感染点数 (9DEL、n=17; WT、n=17) および葉当たりの感染面積 (9DEL、n=7; WT、n=9) を比較した。データは箱ひげ図および個々のデータ点として示した。

\* $p < 0.05$  (Student の t-検定)。



図 7 接種 11 日後の 9DEL トマト、WT トマトの症状

Mock はバッファのみ接種、WT トマトのほうが 黄化症状が明らかに強い

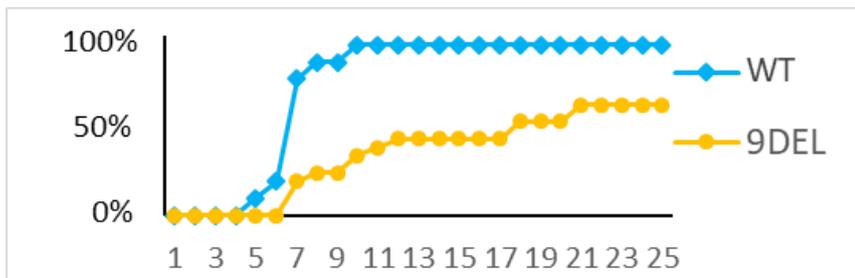


図 8 時間経過による接種した植物が症状を示す割合 (各 n=20)。

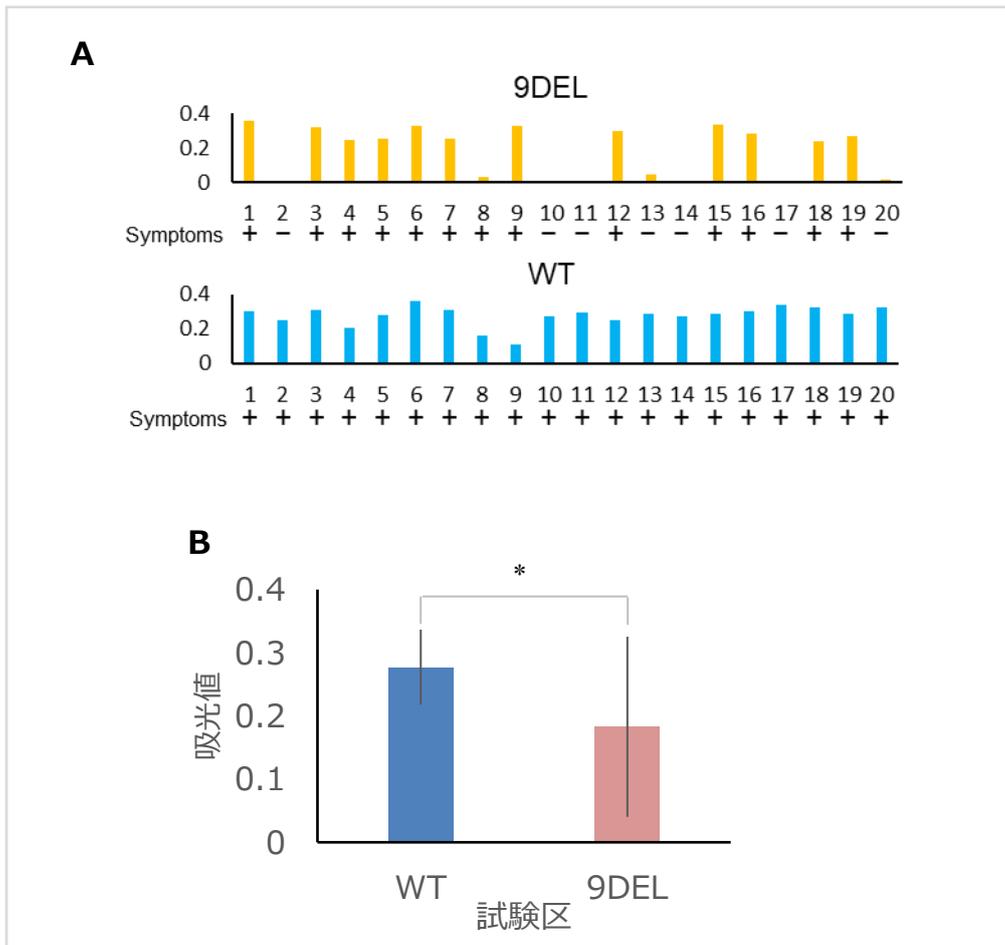


図 9 接種後 34 日目における上葉の CMV CP の蓄積の ELISA 結果

A：データは、生データから対応する健康な植物におけるレベルを差し引くことによって補正（9DEL、WT について各 20 株の結果）、縦軸は A405nm 吸光値。

B：A のデータを総合して、有意差を検定。\* $p < 0.05$  (Student の t-検定)。

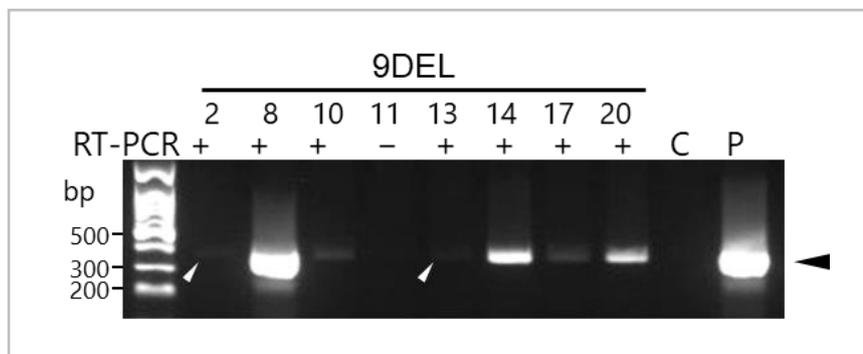


図 10 上葉における CMV ゲノム RNA の逆転写 PCR 分析

対照試料は健全 (C) および感染 (P) トマト葉から調製。黒矢印は、RT-PCR で予想されるバンドの位置を示す。白矢印は若干感染が薄く確認できることを示す。

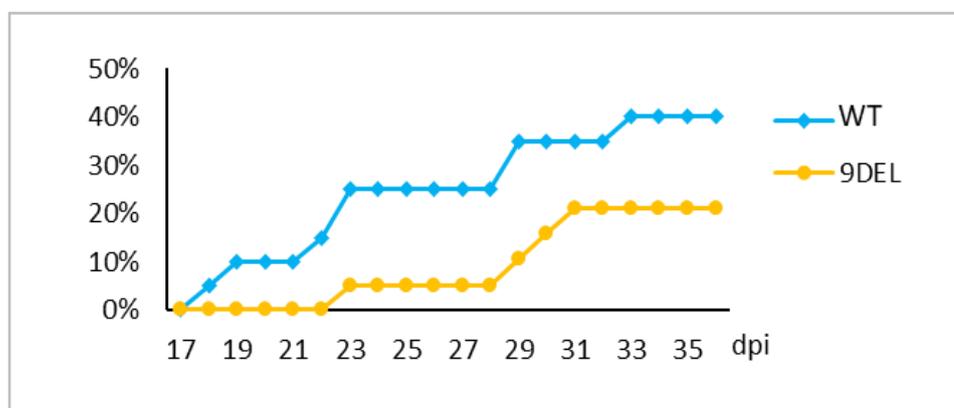


図 11 アブラムシ伝播による CMV の感染率の比較

CMV-O の感染したタバコから 9DEL トマトまたは WT トマト (各 =19) へ感染させた。dpi : 接種後日数

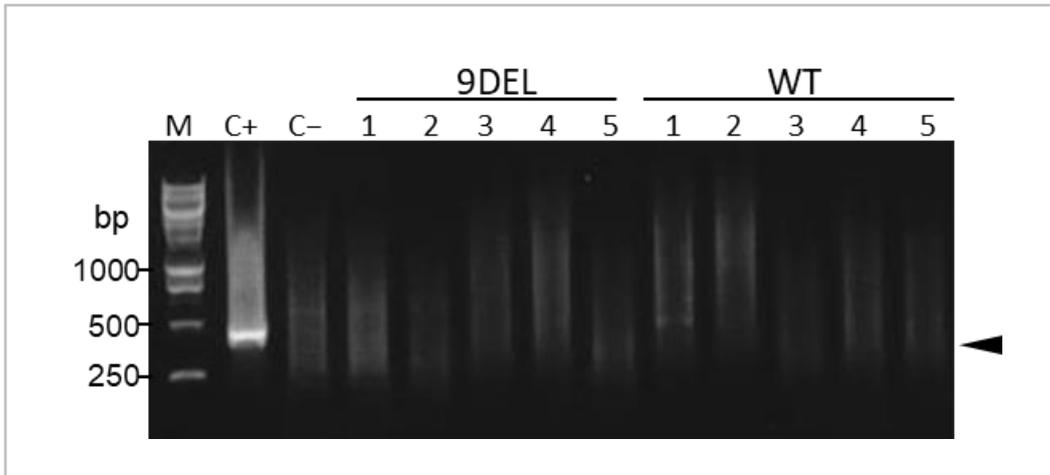


図 12 症状を示さなかった 9DEL および WT トマトの RT-PCR

ゲノム RNA を検出するために RT-PCR を実施し、アガロースゲル電気泳動で確認した。C+、症状を示す対照植物；C-、健全なトマト植物；M、DNA サイズマーカー、矢印は予想されるバンドの位置

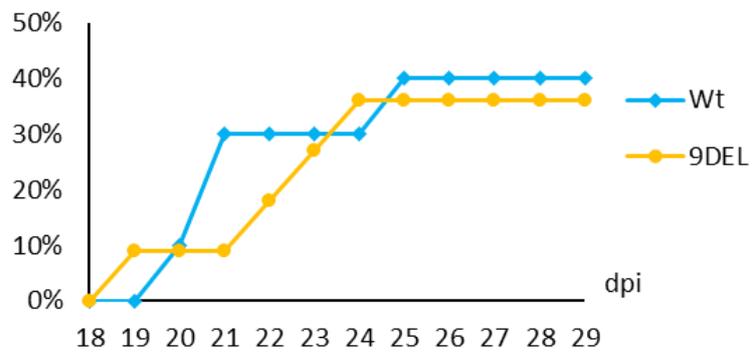


図 13 感染した 9DEL または WT トマトから健全なトマトへの CMV-O の伝搬感染率 (各 n = 10)

モザイク病と異常葉を持つ植物の経時的な割合を示す

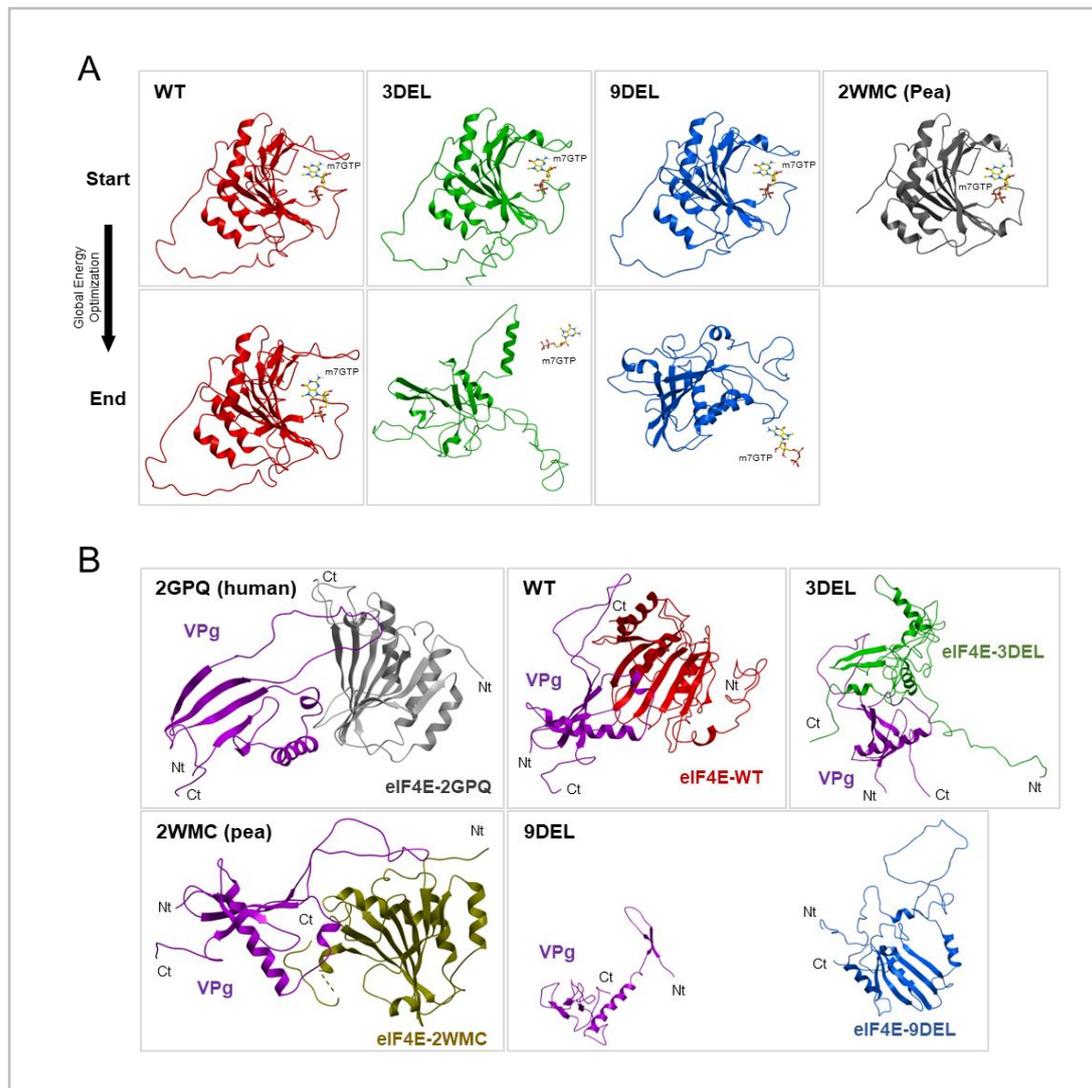


図 14 eIF4E と 7-メチルグアノシン-5'-三リン酸 (m7GTP) または VPg との分子間相互作用に対する変異の影響

(A) *eIF4E*-m7G 複合体のインシリコモデリング。*eIF4E* と *eIF4E* 変異体の 3 次構造は、I-TASSER プログラム (<https://zhanglab.cmb.med.umich.edu/I-TASSER/>) を用いて作成した。エンドウマメの *eIF4E*-m7GTP の X 線結晶構造 (Protein Data Bank (PDB) ID: 2WMC) を主要なテンプレートとして使用した。低エネルギーコンフォメーションモデルは、ICM-Pro ソフトウェア (Molsoft, San Diego, CA, USA) を用いて、バイアス確率モンテカルロに基づく 1000 のグローバル移動と 200 のローカルミと 200 回

ニコール (Abagyan and Totrov, 1994; Khan et al, 2017) を用いたグローバルエネルギー最適化によって作成された。

(B) *eIF4E*--Vpg 複合体のインシリコモデリング。ドッキングシステムをテストするために、ポティウイルス VPg (PDB ID : 6NFW)、ヒト *eIF4E* (PDB ID : 2GPQ)、およびエンドウマメ *eIF4E* (PDB ID : 2WMC) の X 線結晶学は既報のモデル (de Oliveira ら、2019) に対して ICM-Pro で使用した。ドッキングシミュレーションは、ICM-Pro の FFT (Fast Fourier Transform) ドッキング法によって実施され、その後、*eIF4E* 変異体 (3DEL および 9DEL) は、VPg と *eIF4E*-WT 間のドッキングモデルに重畳された。*eIF4E* の低エネルギーコンフォメーションモデルは、1,000 回のグローバルムーブと 200 回のローカルミニニコールによるグローバルエネルギー最適化によって作成された。

#### 4- 考察

病害による収量低下は農家にとって重要な問題である。トマトでは、ウイルスに対する抵抗性の育種が精力的に行われているが、抗 CMV については遺伝資源が少ないため、実用化には至っていない。2012 年に開発された遺伝子編集 CRISPR/Cas システムは効率よく変異体を作製できる画期的な方法である。本研究でポテivirus 属に対する抵抗性が確認されている *eIF4E* 遺伝子について、人工的に変異させて作製した変異体が同様の抵抗性を発揮するのかを検証するとともに、PVY および CMV に対する抵抗性を市販トマト品種に導入することができた。

多くの場合、トマトやその他の作物における *eIF4E* の天然変異体や RNA サイレncing によるノックダウン誘導体は、PVY などのポテivirus 属のメンバーに対する抵抗性を付与する(Ashby et al., 2011; Léonard et al., 2004; Ruffel et al., 2005) (「研究史」章参照)。一般に、植物は *eIF4E* およびそのアイソフォームの複数の遺伝子を保有しており、ポテivirus のメンバーはその感染のために単一の *eIF4E* を使用するとは限らず(Bastet et al., 2017)、ウイルスへの感染に必要な特定の *eIF4E* ファミリーは宿主植物種間で異なる。本研究でも、編集した *eIF4E1* アレルのトマトにおける PVY (PVY<sup>N</sup>、および PVY<sup>O</sup>) の 2 つの株に対する感受性への影響を検証したところ、1INS アレルと 3DEL アレルは、PVY<sup>N</sup> に対する感受性を有意に低下させたが、PVY<sup>O</sup> に対する感受性は低下させなかった (図 5)。これらの結果は、*eIF4E1* および *eIF4E2* をトマトで個別にまたは二重にノックアウトまたはノックダウンさせた先行研究に基づいて解釈することができる(Bastet et al., 2017; Gauffier et al., 2016; Mazier et al., 2011; Moury et al., 2020)。これまでの研究では、PVY は主に *eIF4E1* を使用することが示されていたが、ほとんどの PVY 系統は、*eIF4E1* がノックアウトまたはノックダウンされた場合に、*eIF4E2* を代替的に使用して感染を補完することができると思われる。今回の結果から、PVY<sup>O</sup> は *eIF4E2* を代替的に使用できる主要な PVY 系統の一つであるのに対し、PVY<sup>N</sup>

は *eIF4E1* のみを使用して感染を促進する系統であることが示唆された。従ってフレームシフト変異である 1INS アレルは、PVY の感染に対して *eIF4E1* を機能させないようである。ポテウイルス科のウイルスは、真核生物やウイルスの mRNA の 5'末端に見られる 7-メチルグアノシンのキャップ構造の代わりに、RNA ゲノムの 5'末端にウイルスタンパク質のゲノムリンク (VPg) が共有結合している。VPg は宿主の *eIF4E* やそのアイソフォームに親和性を持ち、ウイルスタンパク質の翻訳だけでなく、ウイルス RNA の安定化や抗ウイルス RNA サイレncing の回避にも関与しており (Saha & Mäkinen, 2020)、その親和性の程度はウイルスの感染力と相関している (Léonard et al., 2000)。したがって、3DEL アレルを持つトマトで PVY<sup>N</sup> に対する感受性が著しく低下することは、3DEL アレルの欠失変異が PVY<sup>N</sup> の VPg への結合性に影響を与えている可能性を示唆している。編集された変異アレルから翻訳された Cap 構造を持つ *eIF4E1* と VPg (図 14) の間のドッキングモデルは、3DEL と 9DEL の両方の欠失と置換が *eIF4E1* の Cap と VPg の両方への結合を破壊しうる可能性を示している。これらの結果は、宿主因子とウイルスタンパク質との相互作用を *in silico* で推定することにより、遺伝子編集技術を用いて、宿主因子をウイルス抵抗性遺伝子に改変できることを示唆している。

これまでに、*eIF4E1* と *eIF4E2* の両方を RNA でサイレンシングすることにより、ポテウイルス属のメンバーに対しては幅広い抵抗性が付与されるが、トマト斑点病ウイルス、アルファルファモザイクウイルス、タバコモザイクウイルス、CMV などの他のウイルスに対しては抵抗性が付与されないことがわかっていた (Mazier et al., 2011)。しかし、今回の研究では、単一の *eIF4E* 遺伝子である *eIF4E1* を編集して 9DEL アレルを作り出すと、CMV の増殖やアブラムシの伝搬による感染効率に悪影響を及ぼすことがわかった。この明らかな矛盾は、この対立遺伝子が発現する変異 *eIF4E1* タンパク質の優性効果による可能性もひとつに考えられる。*eIF4E1* 遺伝子の天然変異アレルである *pot1* は、トマトの野生種の近縁種から同定された (Ruffel et al., 2005)。一方、キャッ

プロ結合活性を欠く切断タンパク質を発現する *eIF4E1* ノックアウトは、メチルスルホン酸エチル変異導入法によって得られた(Piron et al., 2010)。*pot1* 及びノックアウトアレルをホモにした植物は、ポテウイルス属のメンバーに対して抵抗性を示す。最近の研究では、*pot1*、*eIF4E1* ノックアウトアレル、または *eIF4E1* と *eIF4E2* の両方のダブルノックアウトアレルを持つ植物の間で抵抗性スペクトルを比較したところ、*pot1* ホモアレルは、*pot1* 産物が 4 つのアミノ酸置換のみで *eIF4E* の必須機能を保持していると思われるにもかかわらず、*eIF4E1* ノックアウトアレルの植物と比較してより多くのポテウイルス属のメンバーに対して抵抗性を示し、抵抗性スペクトラムは、*eIF4E1* と *eIF4E2* のダブルノックアウトに匹敵した (Bastet et al., 2017; Gauffier et al., 2016)。これは、*pot1* 産物はポテウイルスの感染に機能しないだけでなく、*eIF4E2* の発現をドミナントネガティブに抑制することによることが示唆された。しかし我々の実験では、*pot1* ホモアレルのトマトに CMV-Y を接種したところ高確率で感染することがわかった (川久保, 2022)。この結果、9DEL アレルの CMV 抵抗性は、9DEL から発現する変異 *eIF4E1* タンパク質によると思われるが、その作用機序は *pot-1* アレルとは異なると考えられた。

また、シロイヌナズナの *eIF4E* ノックアウト変異体 *cum1* に CMV を接種したところ、CMV の移行タンパク質の発現が抑制されたが、他のウイルスタンパク質や RNA は WT と同程度に蓄積され、不完全な抵抗性が以前に報告されている (Yoshii et al., 2004)。しかしながら、本研究の *eIF4E1* ノックアウト変異体 1INS は CMV 抵抗性を示さず、インフレーム欠失型の 9DEL が CMV 抵抗性を示したことから、この 9DEL による CMV 抵抗性は、*cum1* による抵抗性とも作用機序が異なることが示唆された。編集変異させた *eIF4E1* アレルを持つトマトに CMV を機械的接種したところ、ほとんどの植物が CMV に感染したものの 9DEL トマトは WT トマトに比べて CMV CP の上葉への蓄積量が少なかった (図 9)。無症状の植物の多くは CMV の全身感染を許容していたが (図 10)、9DEL トマトの接種葉には WT トマトに比べて感染点が有意に少なく (図

6)、9DEL アレルが CMV の感染の初期感染に負の影響を与えていることも示唆される。これらのことからさらに一つの可能性として、9DEL アレルが直接 CMV のタンパクと相互作用するかどうかを確認された。

酵母ツーハイブリッドを用いた検証では、野生型 *eIF4E1* タンパクは CMV の 2b タンパクと相互作用が確認され、9DEL 変異タンパクは野生型 *eIF4E1* よりも強く 2b タンパクとの結合が確認された。さらに *N. benthamiana* への一過性発現の実験では単独で CMV 2b タンパクを発現させた時より、野生型 *eIF4E1* タンパクと 2b タンパクを共発現させた時のほうが、ウェスタンブロットによる 2b タンパクの検出量が少なく観察された。また、9DEL タンパクと 2b タンパクを共発現させた場合は、野生型 *eIF4E1* と 2b の共発現よりも 2b タンパクは少なく、9DEL タンパクも野生型 *eIF4E1* タンパクより少なかった (川久保, 2022) 。 CMV 2b は RNA サイレンシングサプレッサーとして報告されており (Brigneti, 1998; Lucy, 2000)、また *eIF4E* は細胞内でユビキチン化をうけることも知られている (Murata & Shimotohno, 2006)。このため、9DEL アレルによる抵抗性は *eIF4E1* の変異である 9DEL アレルタンパクが野生型の *eIF4E* よりも積極的に分解へ導かれることにより、9DEL タンパクに結合する CMV 2b タンパクも随伴して分解され、結果的にサプレッサー機能が低下することで抵抗性が增强されると推定される。

機械的接種した植物の無症状のほとんどの株サンプル RNA からは RT-PCR で CMV が依然として検出されたが (図 10)、アブラムシの伝搬試験で症状を示さなかった 9DEL トマトには CMV の RNA が検出されなかった (図 12)。これらの結果から、9DEL アレルが提供する抵抗性の有効性は、最初に接種された細胞内に侵入した CMV ウイルスの量に依存し、侵入した CMV の量が少ない場合、9DEL アレルは CMV の全身感染を完全に抑制すると推測される。

本研究は、遺伝子編集による CMV への耐性導入の可能性を示した初めての報告である。*eIF4E* や *eIF4G* などの宿主感受性因子の潜性 (劣性) 抵抗性や自然変異体は、顕

性（優性）抵抗性変異体に比べて育種に利用されている事例は少ないが、*eIF4E* をはじめとする感受性因子の中には、ほとんどのウイルスの感染に必要なものがあると考えられており、1 つの潜性抵抗性遺伝子が複数の異なるウイルスに対する抵抗性を同時に付与している可能性が示唆されている。抵抗性を破る病原体の系統やレースの出現を考慮すると (Enya et al., 2009; Tsuda et al., 1998) 、遺伝子編集アプローチを含む最近の遺伝子工学技術を活用して、抵抗性遺伝子を継続的に探索・開発する必要がある。不完全な抵抗性遺伝子も積み重ねることで、持続的な抵抗性も得られる可能性がある。今回の実験室試験では、9DEL 植物でもアブラムシによる CMV 感染を完全には抑制できなかったが、圃場での CMV の曝露は、ウイルスを保毒するアブラムシの割合や、環境の影響を受け水平伝搬が効率良く進まない等の理由から、一般に実験室試験よりも低いことを考えると (Hord et al., 2001; Jalender, 2017; Kayode et al., 2014)、9DEL アレルは CMV に抵抗性を持つ品種の育種に実用的であると考えられる。

## 第IV章 TYLCV 抵抗性を付与するトマト宿主因子の変異遺伝資源の開発

### 1- 目的

トマト黄化葉巻ウイルス (tomato yellow leaf curl virus; TYLCV) は現在、日本を含む世界の多くのトマト生産地域で最も問題になっているウイルス病の1つである。耐性遺伝子 *Ty-1*、*Ty-3* もしくは *Ty-3a* などが育種で導入されているが、ウイルス症状を抑えることはできるものの、ウイルスの感染自体は許容してしまうため (図 15)、保毒虫の伝染環を絶ち、ウイルス防除するには不十分である。本研究では、ベゴモウイルス属と宿主因子の関連の先行研究より (Lozano-Durán et al., 2011; Yong Chung et al., 2014)、遺伝子編集を用いて TYLCV に対する潜性の抵抗性に関与する宿主因子を編集し、これまでとは異なった性質の抵抗性をもった実用品種を作製する。

### 2- 材料と方法

#### バイナリープラスミドの構築

本研究では2つのプラスミドベクター pUC19-AtU6oligo と pZK\_gYSA\_FFCas9 を用いた (Mikami ら 2015、Kanazashi ら 2018 年)。トマトのガイド RNA 認識領域の設計は CRISPRdirect を使用した。標的トマトの宿主因子には、翻訳開始因子遺伝子 *eIF4E1* (Solyc03g005870) 及び *eIF4E2* (Solyc02g021550) の他、トマトの宿主因子のうちベゴモウイルス属との相互作用や感染に関係する報告を元に、カルモジュリン様タンパク *rgs-CAM* 遺伝子 *CLP06* (Solyc06g073830) 及び *CLP11-60* (Solyc11g071760)、受容体様キナーゼ遺伝子 *BAM1* (Solyc02g091840)、*BAM2* (Solyc03g043770)、Coatomer subunit delta 遺伝子 *deltaCOP10* (Solyc10g038120)、核関連アセチルトランスフェラーゼ遺伝子 *NAT* (Solyc10g074910)、4-クマル酸 CoA リガーゼ遺伝子 *4CL07* (Solyc07g008360)、*Dicer-like protein* 遺伝子 *DCL3* (Solyc08g067210) を選んだ (表 1)。これらの遺伝子の表中にあるエクソン内の標的部位のヌクレオチド配列 (表中に下線

が引かれている)を含むセンスおよびアンチセンスオリゴヌクレオチド配列(表1)を人工的に合成し、2  $\mu$ M ずつを 95°C で 5 分間アニーリングした。アニーリングされたオリゴヌクレオチドを pUC19\_AtU6oligo の BbsI サイトにクローニングした。次に、クローン化したプラスミドを制限酵素 I-SceI で消化し、gRNA 発現カセット部位をバイナリーベクター pZK\_AtU6gRNA\_FFCas9\_NPTII にリクローニングした。最後に、アグロバクテリウム・ツメファシエンズ LBA4404 株(タカラバイオ、日本)をバイナリーベクターで形質転換した。

### トマトの形質転換と形質転換再生芽の増殖

ゲノム編集には大玉系固定種マニーメーカー(以下 MM)もしくはキッコーマン(株)の近交系大玉トマト親系統品種 S8 を用いた。アグロバクテリウムを用いた形質転換は Sun らの方法に従って行った(Sun et al., 2006)。0.5~0.8cm 程度に賽の目に切ったトマトの子葉若しくは本葉の葉片をバイナリープラスミドで形質転換されたアグロバクテリウム懸濁液に浸漬させ、形質転換させた。葉片から形成してきたカルス及びカルスから再生してきた最分化シュートは MS 基本培地に 1,5mg/L のゼアチン、50mg/L のカナマイシン及び 200mg/L のカルベニシリンを含んだ選択的シュート培地上で、日長 16 時間の環境下においてグロスチャンバー内で無菌培養された。その後大きくなってきた再生シュートは MS 基本培地に 50mg/L のカナマイシン、100mg/L カルベニシリン、0.1mg/L ナフトレン酢酸(NAA)を含む発根培地に移植した。さらに大きくなった形質転換個体はポットに鉢上げし、日長 14 時間の環境下で生育させた。また形質転換系統 T1、T2 及び T3 世代は各親世代の自家受粉によって作製した。

### 導入遺伝子と変異のジェノタイピング

トマトのゲノム DNA は形質転換再生個体若しくは非形質転換個体より MonoFas Plant DNA Extraction Kit (ANIMOS、日本)を用いて抽出した。gRNA 認識領域や

Cas9 遺伝子を含む外来遺伝子の存在はプライマーセット (FW: 5'-gcacaagatgaggcactacttg3' / RV: 5'-aaccaaagagaggtgaaagactg -3'), KOD One 酵素 (東洋紡、日本) を用いて PCR で確認した。PCR の反応条件は 95°C 1 分後、「98°C 10 秒、60°C 5 秒、68°C 12 秒」を 30 サイクルで行った。

続いて形質転換が確認された個体についてそれぞれの標的遺伝子変異の状態を CAPS (Cleaved Amplified Polymorphic Sequence) アッセイを用いたジェノタイプングを行った。PCR は表 2 のプライマーセットを用いて上記と同じサイクル条件で行った。PCR 産物は同じく表 内の任意の制限酵素で消化し、1.8%アガロースゲル電気泳動で分離を確認することで変異の有無を選別した (CAPS アッセイ)。具体的な編集の状態、また適当な制限酵素サイトが設定されていないものや CAPS アッセイで判断できないものは標的領域のインデル変異の塩基配列を確認した。CAPS アッセイで制限酵素処理する前の PCR 産物を Target clone キット (東洋紡、日本) を用いてクローニングし、いくつかのクローン配列をシーケンスすることで、編集変異の in-del パターンを確認した。

#### TYLCV 感染性クローン接種と感染の検出

TYLCV は自然界ではタバココナジラミにより虫媒伝搬されるが、感染葉汁液による機械的接種では感染せず、接ぎ木接種のみが有効である。このため多検体に効率よく TYLCV を感染させる実験には、アグロバクテリウムによるウイルス感染性クローン接種法が広く利用されている。

まず、TYLCV イスラエル系統 (我々が保有する 6G 株; 熊本由来) のゲノム DNA を TYLCV 感染葉より前述の MonoFas Plant DNA Extraction Kit で抽出し、これを鋳型に illustra TempliPhi DNA Amplification Kit (Cytiva Tokyo, 日本) を用いて TYLCV ゲノム DNA が長く連なった増幅産物を得た。この増幅産物を TYLCV ゲノム内に 1 箇所しか切断サイトを持たない制限酵素 Sph I で 2 分間処理したのち、65°C で制限酵素

を失活させた。すぐに制限酵素処理した DNA を 1.5%アガロースゲル電気泳動に供すると、短時間で制限酵素処理されたためにラダー状に DNA 断片が確認でき、そのなかで 5.5Kb サイズの断片 (TYLCV イスラエル系統全長の 2 コピー分の長さ) を含むゲルを切り出し Monofas DNA 精製キット (ANIMOS、日本) を用いて DNA を抽出した。抽出された DNA 断片と同じく制限酵素 Sph I で切断したバイナリーベクター pRI909 (共にタカラバイオ、日本) 及び T4 DNA リガーゼを用いてライゲーションを行い、クローニングした。形質転換された大腸菌 (DH5  $\alpha$ ; ニッポンジーン、日本) を増殖させ、QIAprep Spin Miniprep Kit (QIAGEN、ドイツ) を用いてプラスミドを抽出した。抽出された TYLCV ゲノム配列を含むプラスミド DNA 1 $\mu$ g を用いて、アグロバクテリウム・ツメファシエンス LBA4404 株 (タカラバイオ、日本) を形質転換し、これを TYLCV 感染性クローンとした。接種は 28°C で 20-22 時間振盪培養した感染性クローン (形質転換されたアグロバクテリウム) 培養液を 5 倍のインフィルトレーションバッファ (10mM MES pH5.7、10mM MgCl<sub>2</sub>、150  $\mu$ M アセトシリンゴン) で希釈置換後、第 3~4 本葉が展開した大きさの編集トマト及び WT トマトの実生苗の茎葉の 3 箇所ずつにテルモシリンジ 25G 注射器 (テルモ、日本) を用いて注入した。接種されたトマト実生苗は隔離実験室内、25°C、16 時間日長の蛍光灯の環境下で生育させた。

接種から 2 週から 6 週の間、経時的に接種苗の葉の黄化、葉巻、矮化などの病徴観察をするとともに、接種後 21 日目または 28 日目の非接種上葉を 100mg 程度切り取り、MonoFas Plant DNA Extraction Kit で DNA を抽出し、プライマーセット (FW: 5'-ccctctggaatgaaggaaca-3' / RV: 5'-ttgaaaaattggrctctcaa-3' (注) r は a または g の混合塩基) 及び KOD One (東洋紡、日本) を用いて、95°C1 分、「98°C10 秒、56°C5 秒、68°C12 秒」の 26 サイクルの条件で PCR を行い、1.2%アガロースゲル電気泳動にてウイルス DNA の増幅を確認した。

### BAM cDNA の単離

WT トマト MM の葉 100mg から Plant Total RNA Purification Kit (GeneMark、台湾) を用いて全 RNA を抽出した。このうち 1/10 量と PrimeScript II 1st strand cDNA Synthesis Kit (タカラバイオ、日本) を用い、プロトコル通りに逆転写反応を行った。逆転写のプライマーにはオリゴ dT プライマーを使用した。BAM1 のオープンリーディングフレーム (ORF) 部位の cDNA を増幅するため、逆転写産物 1/20 量を用いてプライマーセット (FW; 5'-ggagcatatgccgtctcttttttcttctcttc-3' / RV; 5'-cattatcgattagatactgagtaggtcaggtggag-3') および KOD One 酵素を用いて PCR を行った。PCR の反応条件は、96°C 1 分、〈98°C10 秒、58°C12 秒、68°C45 秒〉 26 サイクルで行ない、cDNA を得た。

さらに BAM2 の ORF 部位の cDNA を作製するため、全長用に FW プライマー① (5'-agacatatgcgttttctctctcttcttcttacttacttaatac -3')、RV プライマー② (5'-ccacatggatccttatatgctgagaaggtcagg -3')、2 分割して増幅するために FW プライマー③ (5'-caaagggactttgttatctccatc-3')、RV プライマー④ (5'-ttacatcacgatggaggatcagag-3') を設計した。また確認用に FW プライマー⑤ (5'-gtattccaccggagtatggtagat-3')、RV プライマー⑥ (5'-aatgcaagtgacctcctgaag-3') 及び⑦ (5'-gagtgtg tatgcatattctggtgc-3') を設計した (図 16)。このうちプライマー⑥と⑦は BAM2 の第 1 エクソンと第 2 エクソン及び第 2 エクソンと第 3 エクソンに跨るように設計した。PCR には KOD-One (東洋紡社、日本) を用いて 95°C30 秒、「98°C10 秒/59°C5 秒/68°C25 秒」を 30 サイクルの反応で行った。

### 酵母ツーハイブリッド法

BAM タンパク質と TYLCV がコードするタンパク質が直接結合して相互作用している可能性を酵母ツーハイブリッド (Y2H) 法により調べた。Y2H はタカラバイオ社の

Matchmaker™ Gold Y2H システム (タカラバイオ、日本) を用い、方法は基本的にプロトコルに従った。BAM1 および BAM2 タンパク質をコードする ORF は、プレイベクター pGADT7 に組込んだ。TYLCV がコードする遺伝子、Rep、C2、C3、C4、V1 そして V2 をベイトベクター pGBKT7 に組込んだ。酵母 Y2H Gold 系統のコンピテントセルを以下のように準備して、構築したベクターの内、プレイベクターとベイトベクターを組み合わせた 2 種のプラスミドで形質転換した。Y2H Gold 系等を YPAD 液体培地 10 mL 中にて 28°C で 1 晩振盪した。新しい YPAD 培地 40 mL を加え、28°C で 3 時間程度、OD546 を 0.6~1.0 に達するまで振盪培養した。スウィングローターで 3000rpm、5 分間遠心分離して沈殿として培養酵母を分画して、25 mL の滅菌蒸留水でペレットを穏やかに懸濁し洗浄した。スウィングローターで再度 3000rpm、5 分間遠心処理して上清を除去後、1~3 mL の 100 mM 塩化リチウム溶液に懸濁して、30°C で 10 分間静置してコンピテントセルとして用いた。プレイ及びベイトベクターで酵母を形質転換して、懸濁液を最小培地 DDO(SD/-Trp/-Leu) 上に塗り広げ、プレイ及びベイトベクターを含む形質転換酵母を選抜した。これら形質転換酵母を X- $\alpha$ -gal を含む TDO(SD/-Trp/-Leu/-His) および QDO(SD/-Trp/-Leu/-His/-Ade) 最小培地に塗布して、プレイベクターとベイトベクターから発現するタンパク質同士が結合するのかどうか検証した。

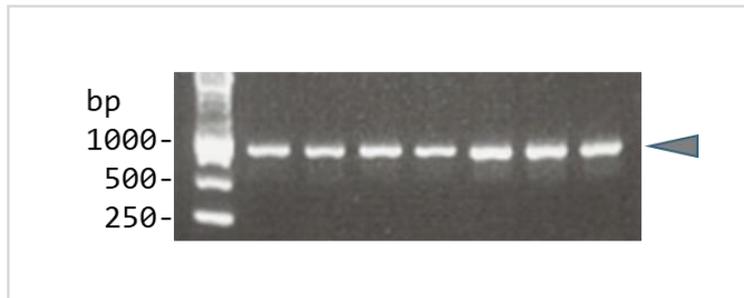


図 15 *Ty-3a* を持つ品種での TYLCV 感染を示す泳動図

*Ty-3a* を持つ抵抗性品種 (*Ty-3a/+*) に TYLCV 感染性クローンを接種 ( $n=7$ )。

接種後 29 日目に DNA を抽出して、PCR により TYLCV ゲノムを検出、

1.2%アガロースゲル電気泳動、矢印が予想される断片の位置

1 表 1 宿主因子標的遺伝子と各 gRNA 認識部位オリゴ 2 本鎖の配列

宿主因子	遺伝子略名	遺伝子座番号	標的エクソン	センス鎖 (5'→3') *	アンチセンス鎖 (5'→3') *
<b>Translation initiation factor 4E</b>	<i>eIF4E1</i>	Solyc03g005870	第 2exon	<u>attgagggtaaatctgataccagc</u>	<u>aaacgctggtatcagatttacct</u>
	<i>eIF4E2</i>	Solyc02g021550	第 2exon	<u>attggcttgtttcgatttcctga</u>	<u>aaactcagggaaatcgaacaagc</u>
<b>Calmodulin-like protein (rgs-CAM)</b>	<i>CLP06</i>	Solyc06g073830	第 1 exon	<u>attgtagcgaagtagcgatcaat</u>	<u>aaacattgatcgctactttcgcta</u>
	<i>CLP11-60</i>	Solyc11g071760	第 1 exon	<u>attggaaggctaatactcctaaga</u>	<u>aaactcttaggagtattagccttc</u>
<b>Receptor like kinase</b>	<i>BAM1</i>	Solyc02g091840	第 1exon	<u>attgactgcaaggtagcttagaga</u>	<u>aaactctctagagtaccttgagc</u>
	<i>BAM2</i>	Solyc03g043770	第 1exon	<u>attggagaagtcacgtgacgatac</u>	<u>aaacgtatcggtcacgtgacttctc</u>
<b>Coatomer subunit delta</b>	<i>deltaCOP10</i>	Solyc10g038120	第 2exon	<u>atgttcatgtctctgcaatccatt</u>	<u>aaacatggattgcagagacatgaa</u>
<b>Nuclear acetyltransferase</b>	<i>NAT</i>	Solyc10g074910	第 4exon	<u>attgtcaactagaacaaattcctc</u>	<u>aaacgaggaatttgttctagttga</u>
<b>4-coumarate:CoA ligase</b>	<i>4CL07</i>	Solyc07g008360	第 1exon	<u>attgcgctcggaaacgatgccccg</u>	<u>aaaccggggcatcgttccgaggcg</u>
<b>Dicer-like 3</b>	<i>DCL3</i>	Solyc08g067210	第 8exon	<u>attgccgaggtggctctgatgtgc</u>	<u>aaacgcacatcagagccacctcgg</u>

2 \* オリゴ配列中の下線が gRNA 認識

表 2 編集領域増幅のための PCR プライマー及び CAPS 用の制限酵素

遺伝子略名	フォワードプライマー(5'→3')	リバースプライマー(5'→3')	制限酵素*
<b><i>eIF4E1</i></b>	atccatcacccaagcaagttaatt	gtccacaaagctatTTTTTctccc	Pvu II
<b><i>eIF4E2</i></b>	atccaccacccaagcaagttggcc	gtccacagagctatTTTTTcttgt	—
<b><i>CLP06</i></b>	gatcgacgctagtactactagtcg	tccgtccgaatccgatagcctctac	Mun I
<b><i>CLP11-60</i></b>	ggtgtagttactgtttccatggc	gccttgatgcatctccttagctcc	Dde I
<b><i>BAM1</i></b>	ttaacacgtctgcgtaacctc	ccggtgaaggtattgtagtatcc	Xba I
<b><i>BAM2</i></b>	ctccacttcaccaccgcaaa	taccggagatgggtaagctg	Pml I
<b><i>deltaCOP10</i></b>	atgaagcgcaaagccagtgag	atccacatcagtgcttggtc	Nco I
<b><i>NAT</i></b>	caggttatagatacaccatcca	ctaatcaccggaaagaaag	Bsa36 I
<b><i>4CL07</i></b>	ctcggtatcgaacaaagagat	ataactccgcgaaactaagac	Ava I
<b><i>DCL3</i></b>	ctcaactatcaaggcagcttg	gataaaagctccttgccgagt	—

\* —は適当な制限酵素サイトなし

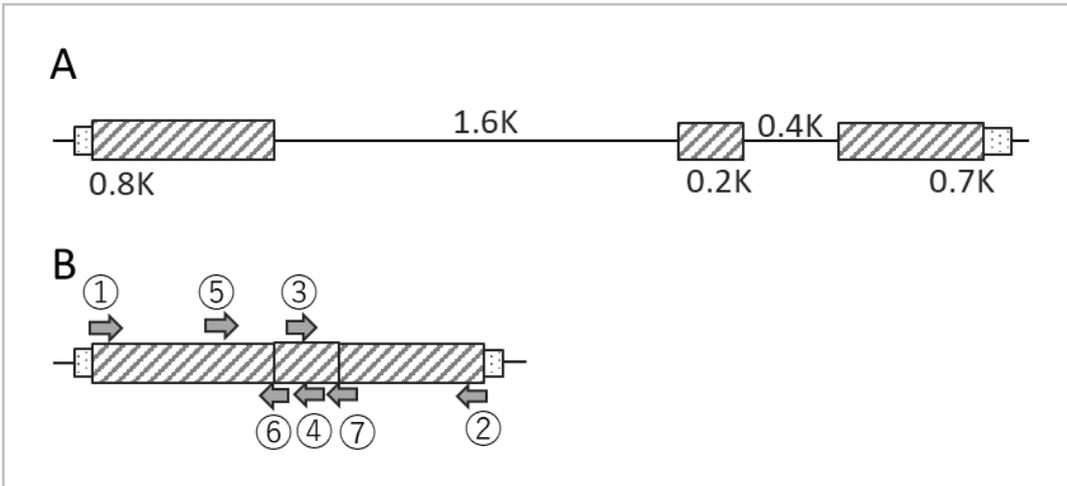


図 16 *BAM2* 遺伝子の遺伝子構成と設計プライマー位置

A：データベース上のゲノム及び mRNA 情報を元にした *BAM2* 遺伝子の構成  
 斜線ボックスは予想エクソン

B：イントロンを除いた予想 cDNA と設計したプライマー (①～⑦) の位置

### 3- 結果

#### IV-3-1 市販大玉系トマトの宿主因子の編集

トマトには約 35000 の遺伝子が確認されているが、それらのなかで、3 つの翻訳開始因子 *eIF4E* 遺伝子、受容体様キナーゼ *BAM* 遺伝子、コートマーサブユニット *deltaCOP* 遺伝子、核関連アセチルトランスフェラーゼ *NAT* 遺伝子、4-クマル酸 CoA リガーゼ *4CL* 遺伝子、カルモジュリン様タンパク *rgs-CAM (CLP)* 遺伝子及びダイサー関連タンパク *DCL3* 遺伝子のエクソン部位 (表 1) をそれぞれ標的にして、CRISPR システムを介した遺伝子編集を行った。それぞれの遺伝子標的に対して、第 3 章の *eIF4E1* の編集の時と同様に、形質転換再生個体を得られ、編集部位のシーケンスを解読することで、編集された変異が確認された。各標的遺伝子で編集による変異のパターンは異なるともに、同じ標的遺伝子内でも 1 もしくは複数の変異のバリエーションも見られた (図 17) が、以後の試験の目的に合わせて、各標的について 1~3 種類の変異パターンを選択し、それら変異の入った形質転換再生個体を生育させたのち、自家受粉を行って編集変異アレルがホモになるような後代の種子を回収した。

#### IV-3-2 TYLCV 感染性クローン接種による TYLCV 抵抗性評価

編集により変異を起こした変異体のいくつかは対になるアレルで同じ編集パターンのも (編集ホモ) もあれば、異なったパターンで編集されているもの (編集ヘテロ)、編集パターンについても、フレームシフトを起こすノックアウト (KO) 型変異、フレームシフトが起きないインフレーム欠損変異など様々な状態のものが得られた。自家受粉で得られた各標的遺伝子の編集変異体の T1 若しくは T2 の種子及び対照となる編集元 (編集する前の元品種) の WT の種子を播種し、実生苗 5~15 本ずつに TYLCV イスラエル系統感染性クローンを接種した。接種から 21 日後及び 28 日後に上位葉での

症状調査を行い、PCR による TYLCV ゲノムの検出率を感染率とした（表 3）。1 回目の試験で抵抗性効果の有りそうな変異系統に関しては反復で接種試験を繰り返した。

その結果、*BAM1* の KO 型変異トマトは編集していない対照 WT トマトと比べて TYLCV の感受性が下がっていた（表 3、図 18）。確認したこれら変異では発病の早さにやや差は認められるものの、接種から 3 週間～5 週間程度で TYLCV を検出した株は上位葉にて黄化葉巻症状を呈した。一方で、接種 35 日後（5 週間後）以降でも無症状を維持している株は免疫性を示し、PCR 分析でもウイルス DNA は検出されなかった（図 19）。

*BAM2* の変異ではさらに興味深い結果が得られた。*BAM2* の編集変異個体（系統）を複数分析したところ、1 塩基欠損（1DEL）、5 塩基欠損（5DEL）などの KO 型変異に加え、3 塩基欠損（3DEL）、6 塩基欠損（6DEL）、12 塩基欠損（12DEL）、141 塩基欠損（141DEL）など多くのインフレーム欠損型の変異もあり、豊富なバリエーションが確認された（図 20）。それぞれの変異がホモになるような個体を作製し、TYLCV を接種した結果、6DEL アレル、12DEL アレルには *BAM1*-KO アレルよりも高い抵抗性が見られた。3DEL アレルも若干高かった。一方、141DEL アレルは抵抗性が小さく、*BAM2*-KO アレルは感受性が下がらず、あまり抵抗性はみられなかった（表 3、図 18、図 21）。

次に *DCL3* の変異体について、TYLCV 抵抗性を評価した。*DCL3* の編集変異体はいくつか変異パターンが得られた（図 17）が、そのうちインフレーム欠損と思われる 6 塩基欠損（6DEL）及び KO 型変異と思われる 2 塩基欠損（2DEL）について、それぞれホモアレルにしたトマトを TYLCV 接種試験に供試した。その結果、*DCL3* ではインフレーム欠損変異の 6DEL トマトでは僅かしか感受性の低下が見られなかったが、KO 型変異の 2DEL トマトは WT に比較して大幅に感受性が低下し、抵抗性が確認された（表 3、図 18）。

その他、CLP の KO 変異体は対照 WT への感染に比べ、感受性が増しているような結果となった。また、*deltaCOP10*、*NAT*、*4CL07* 等についても、若干、対照 WT に比べて KO 変異アレルをもつトマトは感受性を低下させていて、抵抗性が確認できるものの *BAM1* 変異アレルの抵抗性よりは弱いものであった (表 3)。

#### IV-3-3 *BAM* 遺伝子と TYLCV の相互作用

*BAM* 遺伝子の相互作用を確認するため、*BAM1* 及び *BAM2* 遺伝子の ORF 部位の cDNA を作製した。*BAM1* の mRNA はナス科データベース Tomato Genome version SL4.0 (<https://solgenomics.net/>) によると全長 3.5kb 強のサイズになり、ORF 部位は 3kb 強のサイズになる。*BAM1* の mRNA はあまり多く存在しないようで、1 回の PCR では非常に微量の cDNA 増幅しか確認できなかったが、電気泳動では非特異断片は見られなかったため、この PCR 反応液の希釈を元に再度同じプライマーセットで PCR を行った (図 22)。増幅された 3.1kb 程度の断片を推定配列から制限酵素 Pst I で切断したところ、予想通り 2kb と 1kb 強の断片が確認できたため (データなし)、*BAM1* の ORF 部位の cDNA 断片が単離されたとした。

*BAM2* の mRNA は Tomato Genome version SL4.0 によると全長 1.8kb で ORF 部位は 1.5kb 程度とされているが、実際 トマトから全 RNA を抽出し、プライマー①及び②を用いて RT-PCR を行くと 3 kb 強の断片が得られた (図 23A)。さらに mRNA 全長を 2 分割してプライマー①と④、プライマー③と②を用いて分割して PCR をしたところ、プライマー③と②を用いて RT-PCR して得られた分割の後半部位の増幅は 0.8kb で予想通りであったが、プライマー①と④を用いて増幅した分割の前半部位の増幅は予想の 1kb 弱ではなく 2.5kb ほどの大きさであった (図 23A)。RT-PCR の鋳型に誤ってゲノム DNA が混入している可能性を排除するために、プライマー⑤と⑥もしくはプライマー⑤と⑦を用いて RT-PCR を行った。プライマー⑤はゲノム DNA でも mRNA でも共通する配列 (T と U は同じとする) であるが、プライマー⑥と⑦はエク

ソンとエクソンを跨ぐように設計したため、ゲノム DNA にあるイントロン配列にアニーリングしないことでゲノム DNA を鋳型にはせず mRNA のみを鋳型にする。RT-PCR の結果、プライマー⑤と⑥を用いた場合、増幅産物が得られず、プライマー⑤と⑦を用いた場合、推定よりも 1.6kb ほど大きい 2kb の断片が得られた (図 2B)。またプライマー①と⑦でも推定より 1.6Kb 大きい断片が得られ、プライマー①と⑥では断片が得られなかった (図 23B)。2 分割にした後半増幅断片のサイズが合っていること、プライマー⑦を用いると断片が得られることから、ゲノム DNA は混入しておらず、mRNA が鋳型になっていると推測された。一方、プライマー①と②、①と⑦、⑤と⑦を用いる RT-PCR は予想より 1.6kb 大きく、RV プライマー⑥を用いると増幅が見えないことから、第 1 エクソンと第 2 エクソンの間にイントロン配列が挿入されて大きなエクソンを構成していると推測した。実際、データベース上の第 1 イントロンは 1599 塩基のため挿入されても ORF はフレームシフトしないと予想され、また BAM2 のホモログである BAM1 の ORF 部位の cDNA が 3kb 強のサイズであることから、BAM2 の ORF も第 1 イントロン配列を含んだ 3.1kb であると推定した (図 23C)

得られたトマトの BAM1 および BAM2 遺伝子と TYLCV 遺伝子を酵母の Y2H 用発現ベクターに組み込み、Y2H により、BAM1 と BAM2 が TYLCV のコードするタンパク質と直接結合して相互作用している可能性を検証した (図 24)。その結果、BAM1 と BAM2 共に、TYLCV の C3 および C4 と結合している可能性が示された。

<b>A</b>					
		WT		<u>ggaagatt</u> <span style="border: 1px solid black;">ccc</span> <u>gtctctagagtaccttgcagtttcagg</u>	
transgenic	C6-18-3	5DEL		<u>ggaagattccc</u> gtct-----gtaccttgcagtttcagg	
lines	C6-18-5	7DEL		<u>ggaagattccc</u> gtc-----taccttgcagtttcagg	
	C72-4	7DEL		<u>ggaagattccc</u> gtc-----taccttgcagtttcagg	
	C22-1	2INS		<u>ggaagattccc</u> gtctcttagagtaccttgcagtttcagg	
				^ ct	
<b>B</b>					
		WT		<u>aaaaacctccccgaggtggctctgatgtgc</u> <span style="border: 1px solid black;">agg</span> acaga	
transgenic	DC3-2D	2DEL		<u>aaaaacctccccgaggtggctctgatg</u> -caggacaga	
lines	DC3-1D	1DEL		<u>aaaaacctccccgaggtggctctgatgt</u> -caggacaga	
	DC3-3D	3DEL		<u>aaaaacctccccgaggtggctctgat</u> ---caggacaga	
	DC3-6D	6DEL		<u>aaaaacctccccgaggtggctct</u> -----caggacaga	

図 17 変異のパターン例 A : *BAM1* の変異、 B : *DCL3* の変異

ボックス ; PAM 配列、下線 ; gRNA 認識部位

-- : 欠損、^ ; 挿入、WT ; 野生型 (元親) の配列

表 3 抵抗性候補宿主因子の変異遺伝型別の TYLCV 接種試験の感染率

遺伝子	変異タイプ*	平均 感染率	感染率 % (感染株/供試株) 28dpi		
			反復 1	反復 2	反復 3
<i>eIF4E1</i>	in-frame 9DEL	76%	67% (8/12)	60% (3/5)	100% (8/8)
WT		95%	100 (9/9)	86% (6/7)	100% (8/8)
<i>eIF4E1</i>	in-frame 3DEL	71%	71% (10/14)	90% (9/10)	–
WT		93%	93% (14/15)	100% (8/8)	–
<i>eIF4E1</i>	KO	83%	83% (5/6)	–	–
WT		100%	100% (8/8)	–	–
<i>eIF4E2</i>	KO	74%	58% (7/12)	90% (9/10)	–
WT		88%	75% (6/8)	100% (10/10)	–
<i>CLP06</i>	KO	91%	83% (15/18)	100% (18/18)	90% (19/21)
WT		72%	67% (4/6)	50% (3/6)	100% (7/7)
<i>CLP11-60</i>	KO	90%	100% (8/8)	71% (5/7)	100% (9/9)
WT		81%	78% (7/9)	70% (7/10)	94% (17/18)
<i>delta10</i>	KO	71%	82% (9/11)	60% (6/10)	70% (7/10)
WT		97%	100% (9/9)	92% (11/12)	100% (14/14)
<i>NAT</i>	KO	72%	72% (8/11)	–	–
WT		94%	94% (15/16)	–	–
<i>BAM1</i>	KO	56%	64% (7/11)	60% (6/10)	45% (5/11)
WT		98%	100% (14/14)	100% (13/13)	93% (14/15)
<i>BAM2</i>	KO	73%	88% (7/8)	80% (4/5)	50% (4/8)
WT		98%	100% (7/7)	94% (14/15)	100% (18/18)

表3 続き

<i>BAM2</i>	in-frame141DEL	72%	80% (4/5)	71% (5/7)	65% (11/17)
WT		89%	86% (12/14)	94% (17/18)	86% (12/14)
<i>BAM2</i>	in-frame12DEL	26%	38% (3/8)	14% (1/7)	–
WT		94%	94% (15/16)	100% (17/18)	–
<i>BAM2</i>	in-frame 6DEL	40%	40% (2/5)	–	–
WT		94%	94% (17/18)	–	–
<i>BAM2</i>	in-frame 3DEL	47%	50% (4/8)	43% (3/7)	–
WT		90%	86% (12/14)	94% (17/18)	–
<i>4CL07</i>	KO	76%	80% (4/5)	75% (9/12)	72% (8/11)
WT		97%	100% (8/8)	100% (8/8)	91% (10/11)
<i>DCL3</i>	In-frame 6DEL	78%	92% (11/12)	63% (5/8)	–
WT		97%	94% (17/18)	100% (8/8)	–
<i>DCL3</i>	KO	25%	25% (2/8)	–	–
WT		94%	94% (17/18)	–	–

\* DEL;塩基欠損 (例、9DEL;9塩基欠損) KO;ノックアウト –;未実施

接種4週間後(28dpi)の上位葉でのウイルス検出率の結果を示す

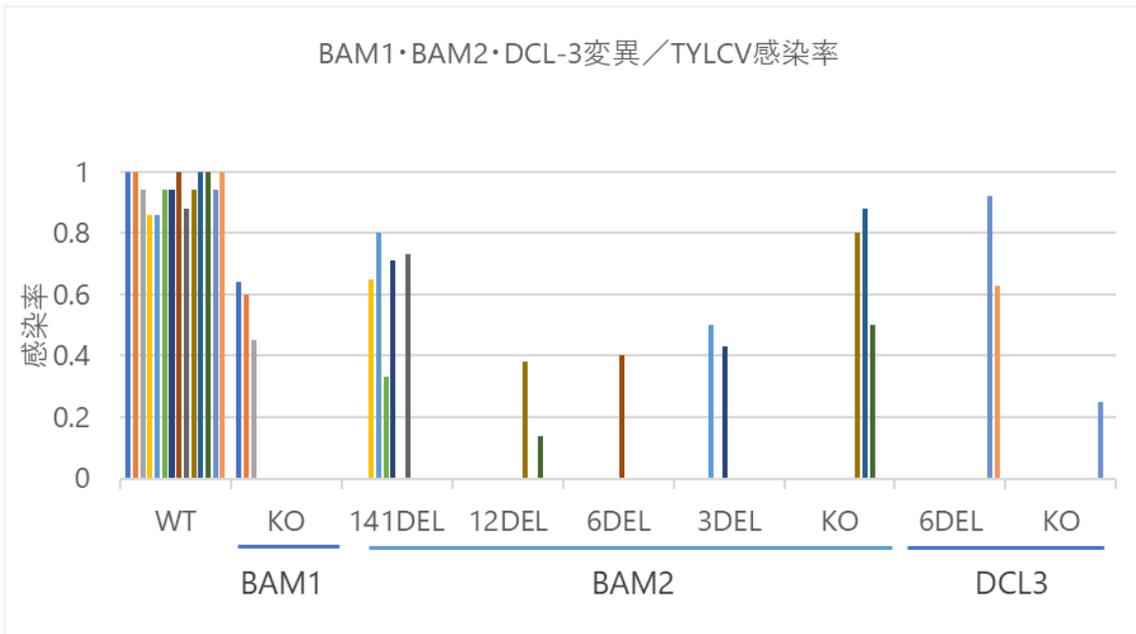


図 18 *BAM 1*、*BAM2*、*DCL3* の各遺伝型別の感染率比較

接種 28 日後の PCR によるウイルス検出率で示す。各バーの色は同じ接種回を示す。

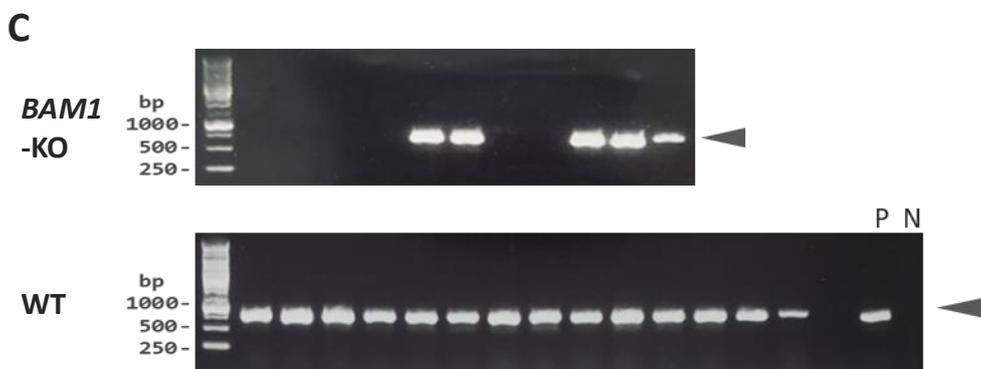


図 19 *BAM1*-KO の TYLCV 接種試験の供試トマト (A,B) と感染確認 PCR 分析 (C)

A : 接種 28 日後の *BAM1*-KO (C6 ライン) の無症状株 (左) と WT の発症株 (右)

B : 接種 35 日後の *BAM1*-KO (C72 ライン) の無症状株 (左) と WT の発症株 (右)

C : *BAM1*-KO (C72) (上段) と WT (下段) の TYLCV 感染 PCR 分析の 1.2% アガロース電気泳動図 (表 3 の *BAM1*-KO の反復 3 テストに相当)、

*BAM1*-KO は n=11、WT は n=15、P は陽性対照、N は陰性対照、

矢印は予想検出位置

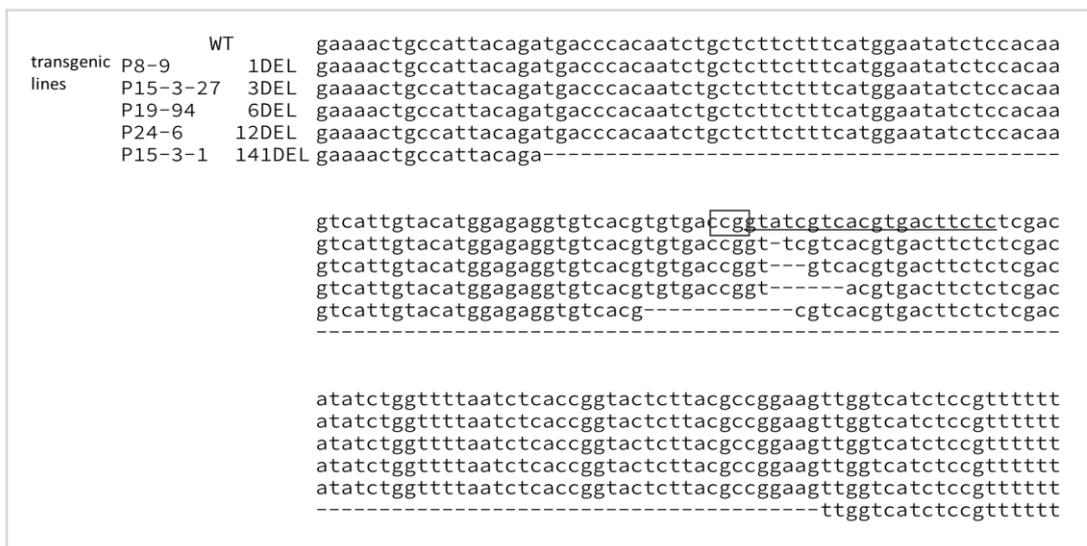


図 20 *BAM2* 変異のパターン

ボックス ; PAM 配列、下線 ; gRNA 認識部位

-- : 欠損、WT ; 野生型 (元親) の配列

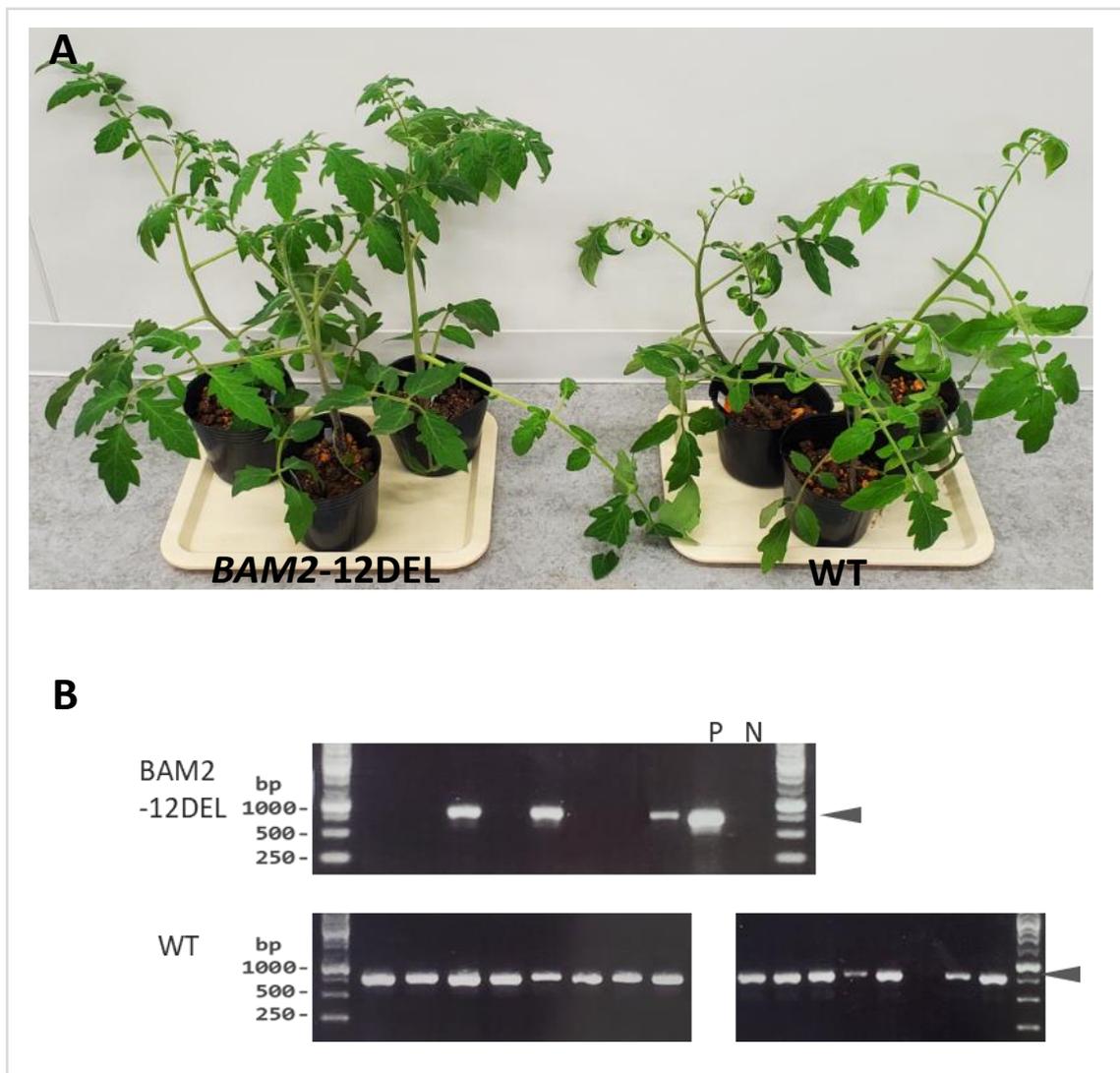


図 21 *BAM2-12DEL* の TYLCV 接種試験の供試トマト (A) と感染確認 PCR 分析 (B)

A : 接種 28 日後の *BAM2-12DEL* (P24 ライン) の無症状株 (左) と WT の発症株 (右)

B : *BAM2-12DEL* (P24 ライン) (上段) と WT (下段) の TYLCV 感染 PCR 分析の

1.2% アガロース電気泳動図 (表 3 の *BAM2-12DEL* の反復 1 テストに相当)、

*BAM2-12DEL* は  $n=8$ 、WT は  $n=16$ 、P は陽性対照、N は陰性対照、

矢印は予想検出位置

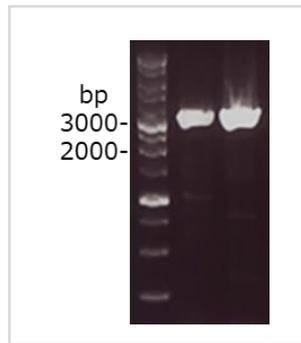


図 22 *BAM1* 遺伝子 ORF 部分の cDNA 全長 PCR 産物

1.2%アガロースゲル電気泳動図。2つのレーンは同じ WT トマトから抽出したもの（抽出ロットが異なるのみ）

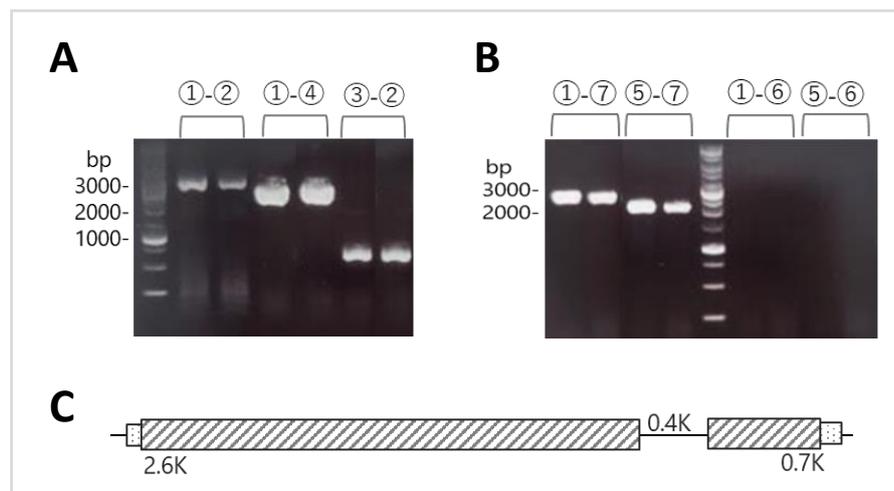


図 23 *BAM2* 内に設置したプライマーによる PCR 産物 (A,B) と新たに予想された *BAM2* 遺伝子の構成

A,B は 1.2%アガロースゲル電気泳動図。A：全長 (①-②) 及び 2 分割した前半部 (①-④)、後半部 (③-②)。B：エクソン間に挿入があるかどうかを検証するための PCR の産物、リバースプライマー⑦を用いるとアニーリングするため産物が得られるが、サイズが予想より 1.6kb 程大きい。リバースプライマー⑥を用いると産物が得られない（アニーリングしない）。C：得られた cDNA から新たに予想された *BAM2* 遺伝子の構成

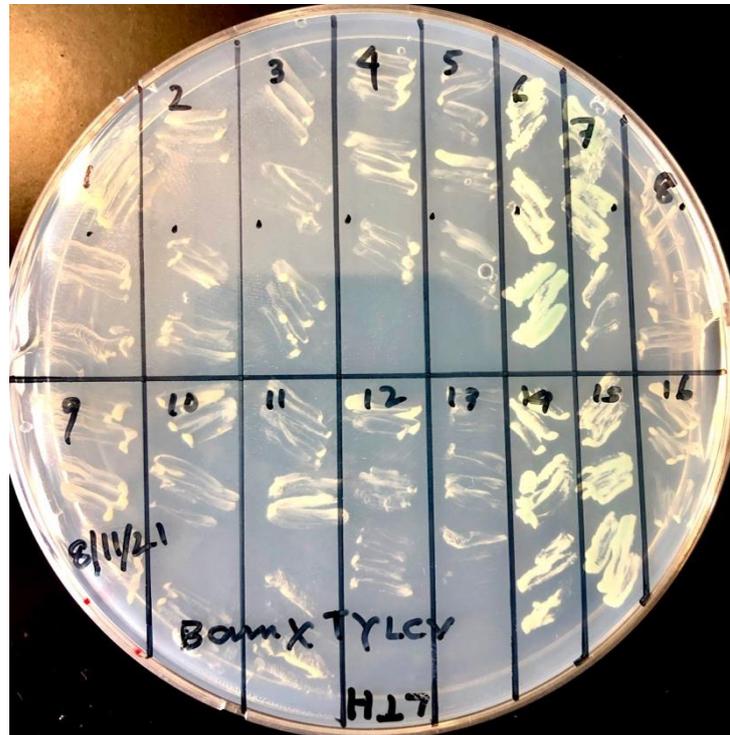


図 24 *BAM1* および *BAM2* と TYLCV がコードするウイルスタンパク質との親和性の Y2H 法による検証

*BAM1* ORF を組込んだプレイベクター-pGADT7 と TYLCV 遺伝子、Rep (1,2)、V1 (3)、V2 (4)、C2 (5)、C3 (6)、C4 (7)、空 (8) を組込んだベイトベクター-pGBKT7 の組み合わせで酵母を形質転換して、X- $\alpha$ -gal を含む最小培地 SD-LTH で結合を検証した。同様に *BAM2* ORF を組込んだプレイベクター-pGADT7 と TYLCV 遺伝子、Rep (9,10)、V1 (11)、V2 (12)、C2 (13)、C3 (14)、C4 (15)、空 (16) の組み合わせで酵母を形質転換して検証した。その結果、6,7,14, 15 で生育が他の区画より促進され、青色の発色が確認された。

### 3- 考察

病害による収量低下やその防止にかかる薬剤散布などの労力は生産者にとって、コストと労力負担が重要な課題である。特にタバココナジラミが媒介するトマト黄化葉巻ウイルスを含むベゴモウイルス属のグループのウイルスはエマージングウイルスとして近年急激に世界中で発生地域を拡大しており、流行り廃れがあまりなく発生し続けている(Ertunc, 2020; Moriones & Navas-Castillo, 2000)。TYLCV はジェミニウイルス科ベゴモウイルス属に属する代表的なウイルスで、環状 1 本鎖 DNA 分子で構成されている。ベゴモウイルス属には 2 分子性のものも見られるが、TYLCV は 1 分子性であり、ゲノム塩基数は約 2.8kb でビリオンセンス方向に 2 つの ORF (V1,V2)、相補鎖方向に 4 つの ORF (C1、C2、C3、C4) を持つ(Glick et al., 2009)。TYLCV はタバココナジラミによって持続的循環性をもって伝搬される。トマトでの主な症状は黄化、葉のカール (葉巻)、縮葉、矮化、果実不良を引き起こす。現在までに植物ウイルスに直接効く有効な化学農薬は開発されておらず、TYLCV を防除するには媒介する虫を殺虫するか、ハウス栽培の場合はハウスの通気口を防虫網で防ぐような耕種的防除、もしくは抵抗性育種か弱毒ウイルスによる防除に限られている。タバココナジラミは体長 0.8mm の微小昆虫で、防虫網をすり抜けたり、トマトの葉裏に隠れて殺虫剤から逃れたりすることもしばしばある。また昨今では一部の化学農薬に耐性をもつコナジラミ個体群 (バイオタイプ) も増えている(Horowitz et al., 2020)。ベゴモウイルス属のウイルスは機械的接種が不可能なため、弱毒ウイルスを予防的に接種しておくことも非常に手間がかかり、開発も難しいことが推測される。このため、抵抗性育種がもっとも有効な防除手段と思われてきたが、現在までに TYLCV に有効な抵抗性遺伝子は見つかっておらず、黄化葉巻症状を抑えることのみができる *Ty-1*、*Ty-3*、*Ty-3a* のような耐性遺伝子が利用されている。しかしこれらの耐性遺伝子はウイルス感染を高率で許容するため、ウイルス伝搬の伝染環を断ち切れず、完全な防除にはなっていない(Honda, 2006; Torre et al., 2018)。

トマトは、ナス科のなかでもカビ病、細菌病とともにウイルス病に対する抵抗性の育種が最も盛んに行われており、様々な抵抗性遺伝子が利用されているが、多くは顕性の抵抗性であり、潜性の抵抗性はあまり利用されていない。しかし、植物の種属を限らなければ *eIF4E* ホモログをはじめとする潜性抵抗性も発見されていて、宿主因子の変異に起因する潜性抵抗性にも可能性が高いことが分かる。

そこで、本研究では、トマトの宿主因子のうちベゴモウイルス属との相互作用や感染に関係する報告を元に遺伝子を選んで標的にして、TYLCV 抵抗性遺伝子の選抜を行った。

*eIF4E* とそのホモログはポティウイルス属のウイルスに対して抵抗性を示しており (Léonard ら 2004、Ruffel ら 2005 年)、潜性抵抗性の代表的存在として知見も多いが、ベゴモウイルス属との関連の報告は乏しい。本研究では、トマトの 3 番染色体上の *eIF4E1* 及び 2 番染色体上の *eIF4E2* を標的に遺伝子編集を実施した。得られた変異体のうち、*eIF4E1* の KO 型変異への TYLCV 接種試験の結果は、わずかに感受性の低下が見られた。CMV に抵抗性を示した 9DEL 変異アレル、3DEL 変異アレルをそれぞれホモにもつトマトも同様にわずかに感受性の低下が見られたが、抵抗性といえる程度ではなかった。一方、*eIF4E2* の KO 型変異アレルをもつトマトでも TYLCV の抵抗性評価を行ったが、あまり抵抗性は見られなかった。

カルモジュリン様タンパク *rgs-CAM* は、TEV の helper-component プロテアーゼ (HC-Pro) と相互作用するタバコの宿主因子としてはじめに特定され、ジャガイモウイルス X (PVX) ベクターによるウイルス誘導遺伝子サイレンシング (VIGS) を抑制する RNA サイレンシングサプレッサー (RSS) であることも示された (Anandalakshmi et al., 2000)。また、ベゴモウイルス属との関連において、*rgs-CaM* が RNA 結合タンパク質である SGS3 に結合することでオートファジーへの分解へ導くことから RSS 活性を有することでベゴモウイルス属のウイルスによる感染を促進することが確認されている (Li ら 2014)。そこで本研究ではタバコの *rgs-CAM* に相同するト

マトの *rgs-CAM* であるトマト 11 番染色体 *CLP11-60* 及びそのホモログである 6 番染色体上の *CLP06* の変異体を作製し、TYLCV への抵抗性を検証したが、抵抗性は確認できなかった。これは、*rgs-CaM* にウイルス感染細胞における対ウイルス RNA サイレンシングを補強する抗ウイルス機能があるとした報告 (Nakahara et al., 2012) を支持する結果であった。

その他、*deltaCOP10*、*NAT*、*4CL07* の KO 変異体について、これらはいくつかのベゴウイルスのウイルスタンパクと相互作用するシロイヌナズナの宿主因子として先行研究で示されていたため、そのトマトのホモログを選定した (Lozano-Durán et al., 2011)。先行研究では、例えば *deltaCOP* をノックダウンすると TYLCSV (トマト黄化葉巻サルジニアウイルス) に対し抵抗性のような反応を示していたが、我々の実験では 10 番染色体上の *deltaCOP* をノックアウトした変異体では TYLCV に大きく抵抗性を示さなかった。これは、夫々の候補遺伝子にはホモログが 1 もしくは複数存在することから、その中の 1 遺伝子を抑制するだけでは不十分であった可能性があるが、本研究では全ての候補遺伝子ホモログの変異については確認できなかった。

*DCL3* はダイサー様タンパク質の 1 つであり、シロイヌナズナではこれらは *DCL1* ~ *4* が存在する。*DCL1* は miRNA 前駆体から miRNA (21 塩基) の生成にいたるすべての過程に関わる。*DCL2* はストレス関連 mRNA の制御に関わる 24 塩基の natural antisense siRNA (nat-siRNA) を生成するとともに、ウイルス感染に関わる 22 塩基の siRNA の生成にも携わる。*DCL4* もウイルスの制御に関連し 21 塩基の siRNA を、*DCL3* はヘテロクロマチン修飾を介した転写型ジーンサイレンシングに関わる 24 塩基の siRNA を生成する ((Blevins et al., 2006; Borsani et al., 2005; KURIHARA et al., 2006; Xie et al., 2004))。動物や虫類では 1 もしくは 2 つしかないダイサーが植物では 4 つある DCL が複雑で巧妙な small RNA ネットワークとバランスをもっている (Andika et al., 2015; Vaucheret, 2006)。一般に RNA ウイルスは *DCL2* と *DCL4* の標的になり、DNA ウイルスは *DCL3* によるメチル化の影響を受ける (Wang et al., 2012)。*DCL4*

および *DCL2* が機能不全になるとウイルスへの感受性が上がる報告はあるが(Andika et al., 2015; Garcia-Ruiz et al., 2010)、*DCL3* の機能不全に対するウイルスへの影響はあまり調べられていない。本研究で、本来防御遺伝子であるはずの *DCL3* のノックアウト型変異に TYLCV 抵抗性が見られたことは注目すべき結果となった。ダイサー同士の複雑な関係はいまだ未知ではあるが、*DCL3* をサイレンシングさせると、*DCL2b* や *DCL4* が活性化し、small RNA が増大する現象も確認されており(Kravchik et al., 2014)、このような補助的な機能が抵抗性を支援する可能性がある。

*BAM1*、*BAM2* は受容体様キナーゼタンパクであり、シロイヌナズナでは分裂組織上での器官形成、例えば葯の発達などに関わり、さらに広い形質形成へも関与が示唆されているタンパクである (DeYoung ら 2006 年)。シロイヌナズナでは *BAM1* から *BAM3* (*BAM1* ; At5g65700、*BAM2* ; At3g49670 及び *BAM3* ; AT4g20270) まで確認されているが、トマトでは *BAM1*、*BAM2* しか確認できず、*BAM3* に近いとみられる遺伝子も存在はするが、現在のところ確証はない。シロイヌナズナの *BAM1* 及び *BAM2* は高いアミノ酸相同性をもっている(DeYoung et al., 2006)が、これらに関してトマトのゲノム配列を対照とした BLAST 検索 (<https://solgenomics.net/tools/blast/>) を行うと、いずれもトマトの *BAM1* (Solyc02g091840) に最も相同性を示し、*BAM2* (Solyc03g043770) を検出しなかった。これは本研究の cDNA 作製で、*BAM2* のデータベース上での mRNA 予想との相違があったためと推定された。本研究で推定されたトマトの *BAM1* と *BAM2* は高い相同性を持ち、*BAM1* の KO 型変異トマトは生育に影響を与えないこと (第VI章参照) から、*BAM1* 及び *BAM2* 遺伝子には冗長な機能が示唆される。

本研究ではまず *BAM1* の KO 型変異アレルに TYLCV への感受性が大きく低下する結果が得られた。その結果を受け、*BAM2* の第 1 エクソン配列を標的に遺伝子編集を行い、組換え体の選抜を行ったところ、1DEL、5DEL、3DEL、6DEL、12DEL、141DEL と予想以上に様々な塩基欠損の変異アレルのパターンが得られた。しかし、TYLCV を

接種したところ、*BAM2* の 1DEL や 5DEL のような KO 型変異トマトでは TYLCV の感受性はほとんど低下しなかった。一方で、6DEL や 12DEL をホモアレルに持つトマトは TYLCV への感受性が大きく低下し、抵抗性が見られた。3DEL トマトや 141DEL トマトでも TYLCV への感受性の低下が見られたが、6DEL や 12DEL トマトほどではなかった。

*BAM1* の KO 型変異アレルが一定の TYLCV 抵抗性を示すこと、*BAM1* タンパクと TYLCV の C4 タンパクが相互作用を認めることから、*BAM1* はウイルス感染、特にウイルス移行に関連する感受性因子であることが示唆される。しかし完全な抵抗性が得られていないことから、*BAM1* の感受性因子としての役割をホモログが担っている可能性がある。最近、TMV に抵抗性がある潜性遺伝子 *tom1* は単独だと同じトバモウイルス属の ToBRFV に対し若干の抵抗性しか与えないものの、*tom1* の複数のホモログをノックアウトすると ToBRFV に高い抵抗性を持つことが報告された(Ishikawa et al., 2022)。このことから *BAM1* も単独の変異ではなく、ホモログの変異と合わせると抵抗性が高くなる可能性が予想される。一方、*BAM2* の KO 型変異にはあまり抵抗性は見られなかったが、インフレーム欠損変異には抵抗性が確認された。本研究では *BAM2* タンパクも TYLCV の C4 タンパクと相互作用していたが、これ自体は先行研究でも確認されており(Rosas-Diaz et al., 2018)、TYLCV が *BAM2* を主たる感受性因子として利用していないものの、なんらかの機能を利用していると考えられる。また *BAM2* のインフレーム欠損変異が抵抗性を与える結果については、推測でしかないが、*eIF4E1* の 9DEL アレルのようにウイルスに直接作用して増殖を阻害するか、*BAM* 遺伝子のホモログに対しドミナントネガティブ効果を与えている可能性がある。

今後、*BAM1* と *BAM2* の変異は異なる染色体上にあることから交雑等で二重に組み合わせることは容易である。このような二重変異体は現在作製中であるが、完成すればより高い抵抗性が期待され、実用化の際に訴求できる付加価値となりうる。

## 第V章 TSWV 抵抗性を付与するトマト宿主因子の変異遺伝資源の開発

### 1- 目的

一つの遺伝子変異アレルが他のウイルス病にも効果をもつ複合抵抗性について検証する。世界的にトマトにおいて被害の上位にあるトマト黄化えそ病 (TSWV) に対する抵抗性について確認した。

### 2- 材料と方法

#### 編集変異体の取得

接種検定に用いた変異体は第IV章で選抜した編集変異体と同じものを利用した (第IV章-2 参照)

#### TSWV の接種と感染検出

トマト黄化えそウイルス (TSWV) の接種は CMV と同様に機械的接種で行った。キクより分離した TSWV 分離株を *N. benthamiana* に接種し、得られた単病斑を再度 *N. benthamiana* もしくは *N. rusutica* にて増殖させたのち、感染葉を -80°C で凍結保存して接種源とした。この感染葉を 10mM の亜硫酸ナトリウムを含む 0.05M リン酸バッファー (pH7.0) で 10 倍希釈 (重量比) した磨碎粗汁液を第 3-5 本葉期のトマトに機械的接種した。接種後、7 日から 21 日の間で症状調査を行い、接種後 14 日目の感染上位葉をサンプリングし、Plant Total RNA Purification Kit (BioElegen、台湾) を用いて、全 RNA を抽出した。全 RNA の 1/20 量と Primescript 1st strand cDNA Synthesis Kit (タカラバイオ、日本) を用いてプロトコルに従って逆転写反応を行った (プライマーには付属のオリゴ dT を使用)。逆転写産物 1/10 量、プライマーセット「FW; 5'-ctgtartgktccatwgcarca-3' / RV; 5'-gayatgacyttcmgaagrcttgat-3' (r は a と g、k は g と t、w は a と t、y は c と t、m は a と c の混合塩基)」及び KOD One を用いて、反応

条件 95° C 1分、「98° C 10秒、55°C 30秒、68°C 30秒」を 30 サイクルで PCR を行い、1.2%アガロース電気泳動で TSWV の S-RNA ゲノムを検出した。

### 3- 結果

#### V-3-1 機械的接種による TSWV 抵抗性評価

接種試験には *eIF4E1* のインフレーム型変異 (9DEL アレル及び 3DEL アレル) トマトと *BAM1* の KO 型変異トマトを用いた。自家受粉で得られた各標的遺伝子の編集変異の T1 若しくは T2 の世代のホモ接合アレルトマト及び対照となる編集元の WT トマトの種子を播種し、実生苗に TSWV を機械的接種した。1 回目の試験で効果の有りそうな系統に関しては反復で接種試験を繰り返した (表 4)。接種後 2 週間から 3 週間程度の間で各接種個体の上位葉での症状調査及びウイルス RNA の RT-PCR 分析を行った結果、*BAM1* の KO 変異トマトでは対照 WT に比べて発症率、感染率共に低くなった (図 25)。発病率と感染率は同じで、無症状感染は見られず、症状のない株は RT-PCR でもウイルスは検出されなかった (図 26、図 27)。一方、*eIF4E1* の変異では 9DEL アレルも 3DEL アレルも対照 WT との感染率との差は少なく、*deltaCOP10* の KO 型は若干の感受性の低下を観察したが、高い抵抗性ではないと判断した。

表 4 抵抗性候補宿主因子の変異遺伝型別の TSWV 接種試験の感染率

遺伝子・変異	平均感染率	感染株数／供試株数 *		
		反復 1	反復 2	反復 3
<i>BAM1</i> -KO	19%	1/8	6/16	1/6
WT	71%	5/9	12/15	5/7
<i>eIF4E1</i> -9DEL	60%	5/8	4/7	—
WT	66%	12/16	5/9	—
<i>eIF4E1</i> -3DEL	100%	4/4	—	—
WT	75%	12/16	—	—
<i>deltaCOP10</i> -KO	50%	3/6	—	—
WT	78%	7/9	—	—

\* — ; 実施せず

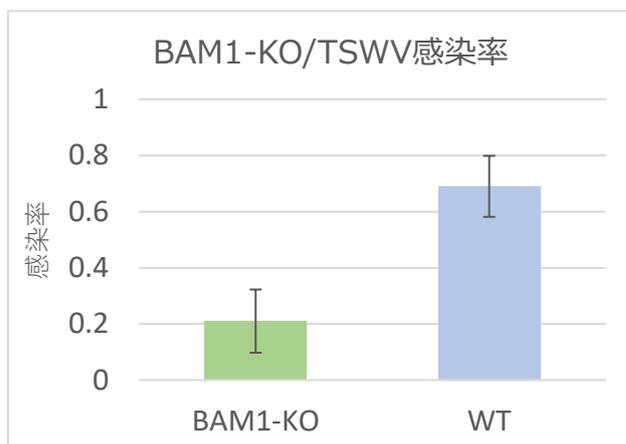


図 25 *BAM1*-KO の TSWV 接種検定 (計 3 反復)

接種 22-24 日後の RT-PCR によるウイルス検出率

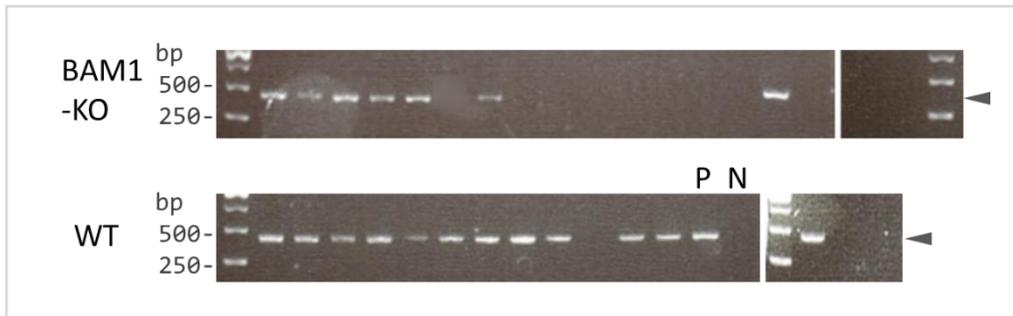


図 26 *BAM1*-KO の TSWV 接種試験の感染確認 RT-PCR 分析

表 4 の *BAM1*-KO の反復 2 のテスト (*BAM1*-KO、n=16；WT、n=15)

P；陽性対照、N；陰性対照、矢印は予想バンドの位置

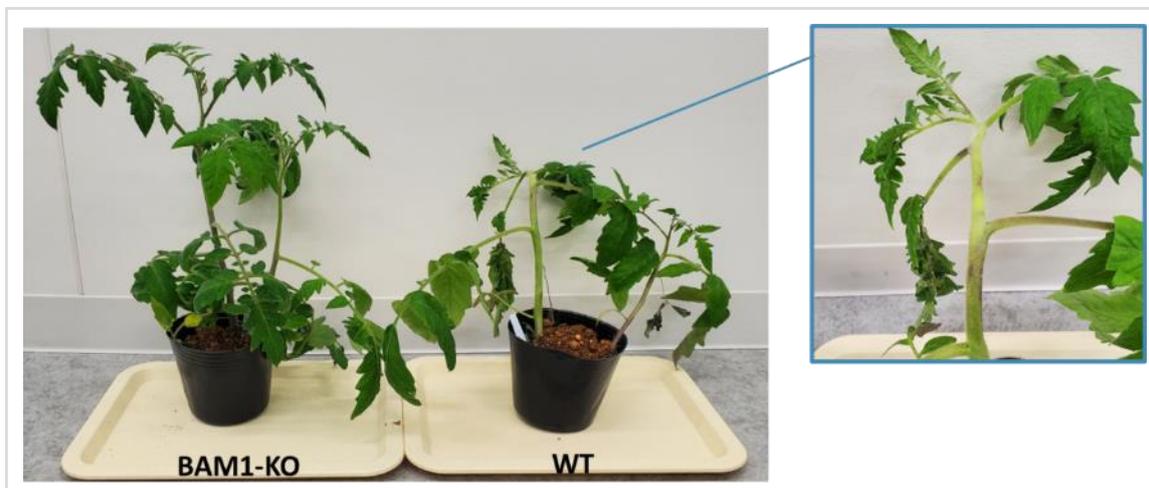


図 27 *BAM1*-KO の TSWV 接種試験

接種 25 日後の *BAM1*-KO 無症状株と WT の発症株。

右上図は WT トマトの TSWV の典型的なえそ症状

#### 4- 考察

トマト黄化えそウイルス (TSWV) は 1915 年に発見された比較的歴史の古い植物ウイルスの一種であったが、完全なウイルス粒子の精製が困難であったことから、他のウイルスに比べその研究が遅れていた。現在は国際ウイルス分類委員会でトスポウイルス科のオルトスポウイルス属に属するウイルスと分類され、世界中の様々な花卉、野菜に感染する最も破壊的な植物ウイルスの 1 つである (Abudurexiti et al., 2019; Oliver & Whitfield, 2016; Roselló et al., 1996)。トマトでの主な症状は黄化、モザイク、壊疽、茎折れを引き起こし、他の植物でも黄化や壊疽は共通にみられる。10 種類以上の微細昆虫アザミウマ類によって媒介されるが、最も一般的な媒介種はミカンキイロアザミウマである。TSWV は前述の CMV や TYLCV とは全く異なる科に属し、1 本鎖マイナス鎖 RNA ウイルスで、3 分節ゲノム (L、M、S) から成り、5 つの ORF をコードする (Oliver & Whitfield, 2016)。TSWV を媒介するアザミウマは花粉を好むため、園芸花卉での被害は大きく、花卉と並んで野菜を栽培していると野菜での被害も大きくなる (Latham & Jones, 1997; Mertelík & Mokra, 1998)。

経済的に大きな被害をもたらす TSWV に対してトマトでは抵抗性育種が試みられ、1990 年代には顕性抵抗性遺伝子 *Sw-5* が単離された (Brommonschenkel et al., 2000; Brommonschenkel & Tanksley, 1997)。その後、積極的にトマト品種へ導入が進められようとした矢先に、当該遺伝子の抵抗性を打破する TSWV 分離株が現れた (Aramburu & Marti, 2003)。同様のことはトウガラシ属の TSWV 抵抗性遺伝子 *Tsw* でも起こっており (Sharman & Persley, 2006)、顕性抵抗性を育種することの難しさを示唆している。

本研究では、得られた各変異遺伝子アレルを持つトマトを使用して、TYLCV、CMV の他にトマトに感染する重要なウイルス病として TSWV に対する抵抗性の選抜を行った。CMV に抵抗性を示した *eIF4E1-9DEL*、TYLCV に抵抗性を示した *BAM1-KO* 型、その他 *deltaCOP10-KO* 型などを TSWV 接種試験に供したところ、*BAM1-KO* 変異トマトで TSWV への感受性が大幅に低下した。

1 遺伝子の変異がウイルスの科を超えた抵抗性を示す例としては potato virus X を含むアルファフレキシウイルス科の potato virus X やベータフレキシウイルス科の potato virus M に抵抗性を示す *nCBP* 遺伝子のみが報告されている(Fujimoto et al., 2020)。これらも科の上位の目では同じ目に属しているが、今回、*BAM1* の変異が与える抵抗性に関して、ジェミニウイルス科の TYLCV とトスポウイルス科の TSWV は上位の目も全く異なり、ウイルスの形状や遺伝子構成も大きく異なるウイルスであり、このような科を超えたウイルスへの抵抗性が確認された事例は初めてと思われる。*BAM1* はこれらの異なるウイルスで感受性遺伝子として機能している可能性がある。最近、*BAM1* はトバモウイルス属のウイルスの感受性因子である可能性が報告された(Tran & Citovsky, 2021)。この報告の中で *BAM1* は TMV の movement protein (MP) である ORF 3 タンパクと相互作用し、原形質連絡を通じた MP の移動に関与することが確認されており、TMV 粒子の移行に影響を与えている。我々の研究では *BAM1* と TYLCV の C4 タンパクの相互作用も確認しており、C4 タンパクは TYLCV の細胞間移行に関与している(Hak et al., 2015; Rojas et al., 2001) 、*BAM1* は広範囲のウイルスの移行に関与する重要な感受性因子である可能性が推測される。

## 第VI章 新たに作出したウイルス抵抗性トマトの栽培特性試験

### 1- 目的

宿主遺伝子の変異は時に宿主の生育に影響を与えることが考えられる。変異による影響が許容できるものか確認するため、また、遺伝子編集した作物を実用化するにはその変異体の栽培形質をデータ提示する必要があるため、遺伝子編集によって作製された変異体が元の編集していない親品種と栽培上どの程度違いがあるか、栽培形質調査試験を実施して検証する。

### 2- 材料と方法

#### ヌルセグリガントの選抜

それぞれの標的遺伝子について、編集のために組換えを行い再分化してきた個体を T0 世代とし、その T0 世代を自家受粉させ、T1 世代種子を回収した。T1 世代を播種し、実生苗から第III章の「2-材料と方法」内の「導入遺伝子と変異のジェノタイピング」項に示した方法と同様に Cas9 等の外来導入遺伝子の確認を行った。通常は Cas9 遺伝子の一部の 1 箇所のみ領域を PCR 検定することで判別するが、今回は外来遺伝子が意図せず分断されて導入されるような場合も考慮して、外来遺伝子の T-DNA 挿入部位内に 4 箇所のプライマーセットを作製し（図 28、表 5）、PCR で確認した。外来遺伝子が検出されなかった苗株をヌルセグリガント（外来遺伝子を持たない非組換え個体）として選抜した。

#### 栽培形質調査

隔離閉鎖温室において、それぞれの標的遺伝子の変異がホモになったトマトと、その編集元である野生型 WT を対照トマトとして栽培試験を行った（図 29）。それぞれの編集変異アレルトマト、WT トマトの種子を播種し、草丈 20cm 程度の大きさになっ

た実生を 20L の培養土の入ったプランターに各区 5 本ずつ定植した。その後、生育したトマトを 4 段果房の上で芯止めし、果実を収穫するまで約 5 ヶ月間栽培し、草丈、果実収量、平均糖度等を測定した。

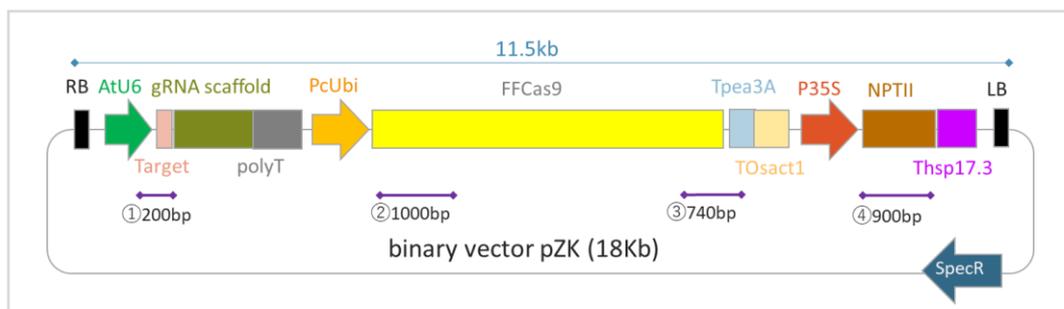


図 28 編集のための用いたバイナリーベクターの T-DNA 部分の遺伝子構成と  
外来遺伝子検出のためのプライマーセットの位置

①～④；プライマーセットの位置とおおよその増幅産物長

表 5 外来遺伝子検出のためのプライマーセット

	フォワードプライマー (5'→3')	リバースプライマー (5'→3')
セット①( <i>eIF4E</i> の場合)	tgggaatctgaaagaagagaagca	aaacgctggtatcagatttacct
セット①( <i>BAM1</i> の場合)	tgggaatctgaaagaagagaagca	aaactctcagagtaccttgcagt
セット②	cggactcgatatcggaactaac	agaagtgtgagatcctggtggt
セット③	gcacaagcactacttggatgag	aaccaagagaggtgaaagactg
セット④	agaatggggattgaacaagatg	gagcacaccaaaaacaccagta

表内①～④は図 27 内の①～④に相当



図 29 栽培試験の様子

栽培は 25L の培土の入った袋型プランターで行った。各区 5 株ずつ栽培。

定植 5 月上旬～栽培終了 9 月末

### 3- 結果

#### VI-3-1 ヌルセグリガントの選抜

各標的遺伝子に変異した個体の当代 (T0 世代) は確実に Cas9 等の外来遺伝子が存在するが、多くは 1 コピーがトマトゲノム上のどこかに挿入されていることが多く、それら T0 世代から次世代 T1 種子を回収し、いくつかの種子から DNA を抽出して PCR 分析すると外来遺伝子を含まない個体が一定数得られる。このようにして各編集変異個体から DNA を抽出して Cas9 遺伝子等の外来導入遺伝子の存在を検査し、外来遺伝子が検出されなかったものを選抜してヌルセグリガントとした。以下に、*eIF4E*-9DEL 系統 (A132-2)、*BAM1*-KO 系統 (C6-18、C74-1) について外来遺伝子検出 PCR の電気泳動泳動結果を示す (図 30)。

栽培試験にはこれら外来遺伝子の影響を考慮しないヌルセグリガントで変異だけが WT と異なるトマトを用いた。

#### VI-3-2 栽培形質調査

隔離温室内で 5 ヶ月間、*eIF4E1*-9DEL トマトと *BAM1*-KO 型トマトを WT トマトと共に栽培し、形質を調査した。草丈、一果重、糖度 (Brix) においては、*eIF4E1*-9DEL トマト (A132) も *BAM1*-KO 型トマト (C6) も WT とほぼ同じで、差はなかった。着花数及び着果数は *BAM1*-KO 型トマトと WT に差はなかったものの、*eIF4E1*-9DEL トマトと WT には若干の差は見られたが、有意差はなかった (図 31)。

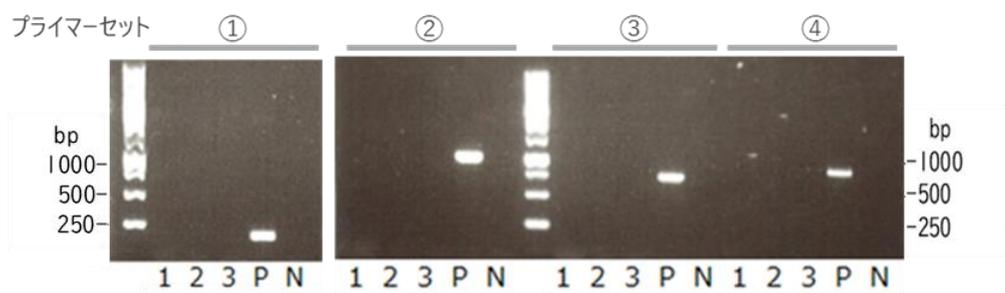


図 30 外来遺伝子の確認 PCR

①～④；プライマーセット①～④

1：A132-2 (*eIF4E1-9DEL*)、2；C6-18 (*BAM1-KO*)、3；C74-1 (*BAM1-KO*)、P；陽性対照、N；陰性対照 (WT)

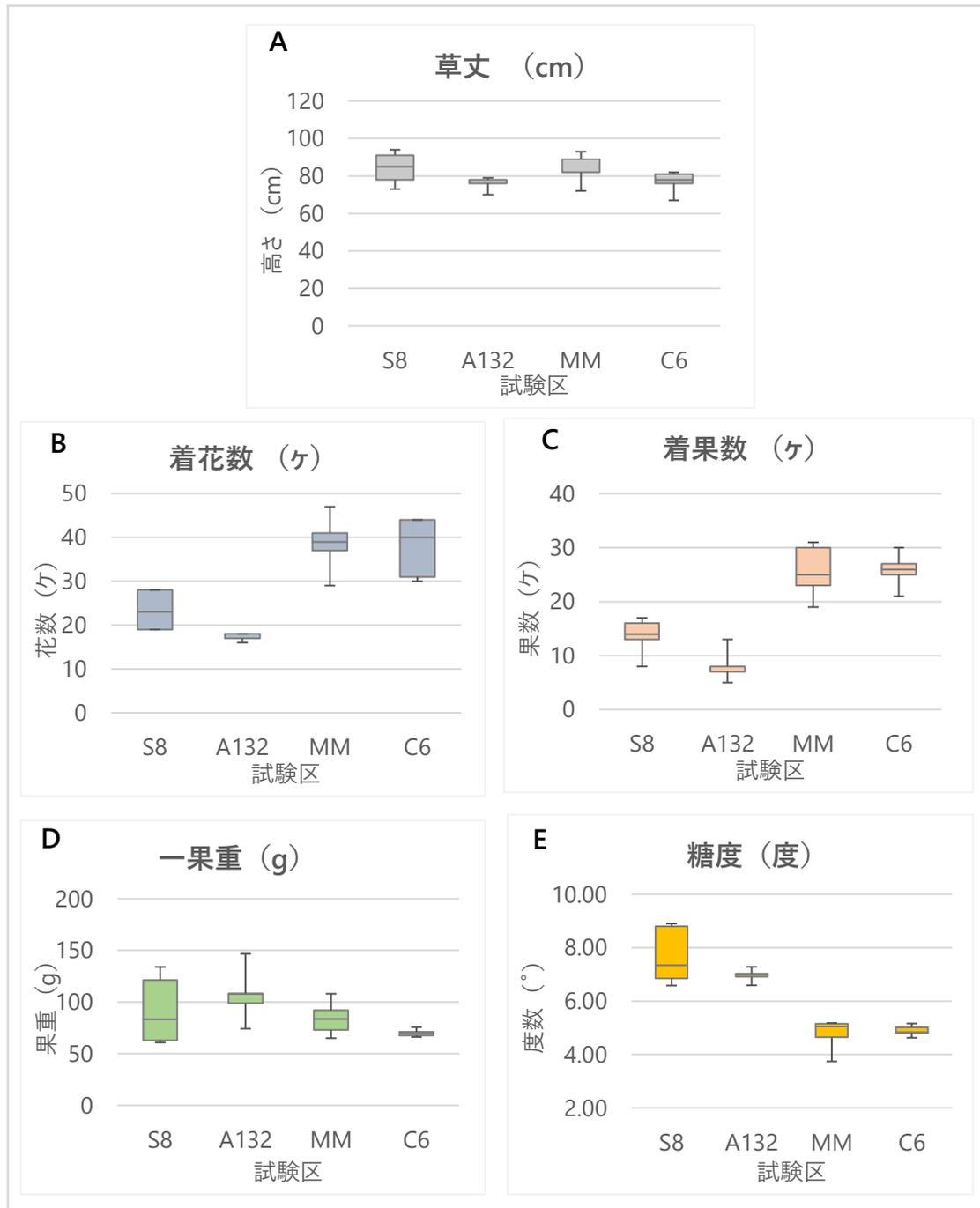


図 29 編集変異株の栽培特性調査

A、草丈 (株あたり)； B、着花数 (株あたり)； C、着果数 (株あたり)； D、一果重 (果実あたり)； E、糖度 (株あたり)。 A132、*eIF4E1-9DEL* 変異； C6、*BAM1-KO* 変異； S8、A132 の元親 WT； MM、C6 の元親 WT

#### 4- 考察

外来遺伝子を除いたヌルセグリガントである編集変異トマトと WT トマトの比較栽培調査を行った。変異体の栽培調査のデータは報告に乏しく、草丈の調査程度であることも多い。本研究では実用化を視野に入れ、変異させたトマトが WT と差がないことを確認する目的で行った。*eIF4E* はノックダウンの研究で、*eIF4E1* をノックダウンすると草丈や生体重量に影響していることが報告されている(Mazier et al., 2011)。我々が今回調査した *eIF4E1-9DEL* トマトはノックアウト型ではなくインフレーム欠損型であり、不完全な *eIF4E1* タンパクは存在する可能性があるため、草丈調査、一果重、糖度の調査では WT とほとんど差はなかった。一方で、不完全な *eIF4E1-9DEL* タンパクは全てではないにしても一定の分解を受けている可能性(第IV章 考察)があり、その結果、着果数などに僅かな影響を与えている可能性も否定できない。しかし、着花率、一果重、糖度は栽培の環境条件によって左右されることも多く、大きな差がなければ実用化について問題ではないと思われた。

*BAM1* の変異についても同様に知見は乏しいが、シロイヌナズナでは *BAM1* の KO 型変異体は WT と比べ表現型に差はないと報告されている(DeYoung et al., 2006)。*BAM2* の変異体も同じく WT と差がなく、*BAM* 因子がホモログで互いに冗長な機能を果たしている可能性がある。本研究でも、*BAM1-KO* 型トマトと WT トマトでは調査した形質全てにおいて、ほぼ差はなかった。トマトにおいても *BAM1* が機能不全であっても特に生育に影響がないと思われる。

今後、育種においてさらなる高いウイルス抵抗性を得るためには *BAM1* と *BAM2* の変異を交雑で同時にもたせることが目標となる。シロイヌナズナでは *BAM1*、*BAM2*、両方の遺伝子のノックアウトは生育に影響を与えることが報告されており、トマトでもその可能性が考えられる。このような懸念から *BAM1-KO* 型変異アレルと二重に組み合わせる *BAM2* 変異にはインフレーム欠損変異アレルが望ましいのかもしれない。

またホモログではない別個の変異遺伝子を交雑でピラミッディングすることも抵抗性を強め、実用化に有効な手段となりうると思われる。

## 第VII章 総合考察

トマトは世界中で栽培され、ジャガイモに次いで 2 番目に生産量の多い園芸作物である。トマトベルトと呼ばれる北緯 35 度／南緯 40 度のトマト栽培好適地は気候に恵まれ、様々な病害の発生も多い。近年では、交通手段の発達と経済活動のグローバル化により世界中の園芸作物や花卉が国境を超えて移動することになり、また徐々に地球温暖化が進む傾向にあって、ウイルスを媒介する虫類がそれまで存在しなかった地域に出現するようになった。これらの人間の経済活動に伴って、虫や植物の移動とともに新たな若しくは局地的にいた植物ウイルスが世界中で発生し、エマージングウイルスとなっている。作物の種類によってウイルス種に傾向はあるものの、一般的にエマージングウイルスにはポティウイルス科、ブニヤウイルス科、ジェミニウイルス科、クロステロウイルス科、ベータフレキシウイルス科のウイルスが多く、トマトではジェミニウイルス科の TYLCV やその近縁種、ブニヤウイルス科の TSWV がこれにあたる。特に TYLCV を含むベゴモウイルス属ウイルスの発生は近年世界中で見られるようになり、流行り廃りがなく、この四半世紀の間、恒常的に生産者を悩ませており、トマトでの被害額は年間数億ドルに及んでいる。これまで TYLCV の抵抗性遺伝子としては *Ty-1* や *Ty-3* (若しくは *Ty-3a*) が普及し始めているが、ウイルス症状は抑えるもののウイルスの感染自体は高い確率で許容してしまうため、ウイルスの伝染環を断ち切ることが難しかった。そこで、ウイルス感染率を落とすような抵抗性を選抜することにした。但し、顕性抵抗性においては、膨大なイントログレッションラインからまだ報告のない遺伝子を選抜することの難しさ、潜性抵抗性においてもかなり膨大な数の EMS 処理等の変異集団から選抜することについて期間と人数がかけられないことの困難さがあった。そこで、ウイルスの感受性因子に焦点を絞り、候補遺伝子を遺伝子編集で変異させることで、潜性抵抗性の遺伝資源を選抜することにした。

本研究では潜性抵抗性の代表格である翻訳開始因子 *eIF4E1* の編集を実験のモデルケースにして、いくつかの変異パターンのアレルを持つ変異体を得た。モデル実験とし

て *eIF4E1* の 1INS (1 塩基挿入) 変異トマトはノックアウト型の変異で、先行研究の通り、PVY に対する抵抗性が確認された。当初は感受性因子のノックアウトが機能性喪失による抵抗性のモデルと考えていたが、*eIF4E1* の様々な変異アレルパターンに CMV を接種したところ、予想外に 9DEL (9 塩基欠損) のインフレーム欠損型変異体に抵抗性が確認された。このインフレーム欠損型変異アレルは直接ウイルスタンパクに影響することで抵抗性をもたらしていることが推測できているが、ホモログ因子への影響は未知である。

インフレーム欠損変異が抵抗性をもたらす現象は *eIF4E1* の 9DEL 以外にも、受容体様キナーゼ *BAM2* の変異でも見られた。*BAM2* のホモログである *BAM1* はノックアウト変異体で TYLCV への感受性が低下したが、*BAM2* はノックアウト変異ではなく、3DEL や 12DEL といったインフレーム欠損型変異体で抵抗性を確認した。*BAM1* 及び *BAM2* は TYLCV の C4 タンパクと反応することは確認したが、本研究内ではメカニズムの解明には至っていない。しかし、*eIF4E1*-9DEL 変異のように、*BAM1* のノックアウト変異と *BAM2* のインフレーム欠損変異の抵抗性への作用は異なる可能性が高い。

本研究では、ダイサー *DCL3* のノックアウト変異でも抵抗性が見られた。このメカニズムについても、追求には至っていないが、本来、植物の防御因子として報告の多いダイサー関連遺伝子の機能欠失が抵抗性に寄与することは、同じく同様に防御因子との報告にあった *BAM* 遺伝子でも、変異体に抵抗性が確認され、ウイルス感染に対応する宿主因子が感染防御と感染促進の二面性を担い、冗長性があることが本研究で明らかになった。

さらに、受容体様キナーゼ *BAM1* のノックアウト変異体には、TYLCV の感受性を低下させる他に、TSWV への抵抗性も確認された。このように 1 つの遺伝子変異が TYLCV と TSWV といった遠くかけ離れたウイルス種間で抵抗性が確認されたことは世界ではじめてであり、異なった種のウイルスが同じ感受性因子を使用していることが推測され、潜在抵抗性開発の可能性を広げるものである。

遺伝子編集（ゲノム編集）は従来の変異誘発育種に比べ開発のための時間および労力が短縮されることが利点とされてきたが、本研究のようにノックアウト変異だけでなく、インフレーション欠損型変異に抵抗性が確認されたことは、従来の変異導入技術では得にくい変異体が遺伝子編集によって得られる新たな利点であり、さらに今後、遺伝子編集による潜性抵抗性資源の開発のターゲットとして、当初想像していたより広い範囲の宿主因子及び植物ウイルスが対象となりえることを示唆している。

遺伝子編集は実用化されつつあるものの、作製された「物」としては外来遺伝子を含まず、従来の変異技術で得られた変異体と同等の変異体であるにも関わらず、先正過程において一時的に組換え技術を用いていることから誤解されていることも多い。世界の人口は2050年には100億人に到達すると言われ、一方で耕地面積は年々下がっている。日本においても農業従事者の高齢化、低い自給率、新しい病害に対する使用農薬の制限など問題は多い。いかに効率的且つ持続的に農産物を生産できるかが日本のみならず世界においても植物育種の急務な課題である。新しい育種技術が世の中に受け入れられ、育種が活発になり、病虫害の防除、収量性の向上、環境に適した農業に貢献することを期待している。

## 摘要

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. *eIF4E1* 変異体の 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<sup>N</sup>) 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において、WT トマトに比べ、9DEL トマトでは 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 がウイルス感染圧つり感染時に植物組織に入るウイルス量によって、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。

2. TYLCV 抵抗性を付与するトマト宿主因子の変異遺伝資源の開発及び複合抵抗性の確認

*eIF4E1* 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 Agroinfiltration 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ム欠損変異、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 of 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。このことから、*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ること、並びに *BAM* 遺伝子は多様なウイルスの移行タンパク質と相互作用して細胞間移行に関わる感受性因子の可能性が示された。

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、インフレーム欠損型変異にも抵抗性が見られた。このインフレーム欠損型変異は、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、遺伝子編集による潜在抵抗性の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。

## 引用文献

- Abudurexiti, A., Adkins, S., Alioto, D., Alkhovsky, S. v., Avšič-Županc, T., Ballinger, M. J., Bente, D. A., Beer, M., Bergeron, É., Blair, C. D., Briese, T., Buchmeier, M. J., Burt, F. J., Calisher, C. H., Cháng, C., Charrel, R. N., Choi, I. R., Clegg, J. C. S., de la Torre, J. C., ... Kuhn, J. H. (2019). Taxonomy of the order Bunyavirales: update 2019. *Archives of Virology*, 164(7), 1949–1965. <https://doi.org/10.1007/s00705-019-04253-6>
- Acciarri, N., Rotino, G. L., Tamietti, G., Valentino, D., Voltattorni, S., & Sabatini, E. (2007). Molecular markers for Ve1 and Ve2 Verticillium resistance genes from Italian tomato germplasm. *Plant Breeding*, 126(6), 617–621. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0523.2007.01398.x>
- Anandalakshmi, R., Marathe, R., Ge, X., Herr, J., Mau, C., Mallory, A., Pruss, G., Bowman, L., & Vance, V. B. (2000). A calmodulin-related protein that suppresses posttranscriptional gene silencing in plants. *Science*, 290(5489), 142–144. <https://doi.org/10.1126/science.290.5489.142>
- Andika, I. B., Maruyama, K., Sun, L., Kondo, H., Tamada, T., & Suzuki, N. (2015). Differential contributions of plant Dicer-like proteins to antiviral defences against potato virus X in leaves and roots. *Plant Journal*, 81(5), 781–793. <https://doi.org/10.1111/TPJ.12770>
- Aramburu, J., & Marti, M. (2003). The occurrence in north-east Spain of a variant of *Tomato spotted wilt virus* (TSWV) that breaks resistance in tomato (*Lycopersicon esculentum*) containing the *Sw-5* gene. *Plant Pathology*, 52(3), 407–407. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3059.2003.00829.x>
- Ashby, J. A., Stevenson, C. E. M., Jarvis, G. E., Lawson, D. M., & Maule, A. J. (2011). Structure-based mutational analysis of *eIF4E* in relation to *sbm1* resistance to pea

- seed-borne mosaic virus in pea. *PLoS ONE*, 6(1), e15873.  
<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0015873>
- Balint-Kurti, P. J., Dixon, M. S., Jones, D. A., Norcott, K. A., & Jones, J. D. G. (1994). RFLP linkage analysis of the *Cf-4* and *Cf-9* genes for resistance to *Cladosporium fulvum* in tomato. *Theoretical and Applied Genetics*, 88(6–7), 691–700.  
<https://doi.org/10.1007/BF01253972>
- Bastet, A., Robaglia, C., & Gallois, J.-L. (2017). *eIF4E* Resistance: Natural variation should guide gene editing. *Trends in Plant Science*, 22(5), 411–419.  
<https://doi.org/10.1016/j.tplants.2017.01.008>
- Bauchet, G., & Causse, M. (2012). Genetic diversity in tomato (*Solanum lycopersicum*) and Its wild relatives. In Mahmut Caliskan (Ed.), *Genetic Diversity in Plants* (pp. 133–162). InTech. <https://doi.org/10.5772/33073>
- Bendahmane, A., Kanyuka, K., & Baulcombe, D. C. (1997). High-resolution genetical and physical mapping of the Rx gene for extreme resistance to potato virus X in tetraploid potato. *Theoretical and Applied Genetics*, 95(1–2), 153–162.  
<https://doi.org/10.1007/s001220050543>
- Blevins, T., Rajeswaran, R., Shivaprasad, P. v., Beknazariants, D., Si-Ammour, A., Park, H. S., Vazquez, F., Robertson, D., Meins, F., Hohn, T., & Pooggin, M. M. (2006). Four plant Dicers mediate viral small RNA biogenesis and DNA virus induced silencing. *Nucleic Acids Research*, 34(21), 6233–6246. <https://doi.org/10.1093/nar/gkl886>
- Borsani, O., Zhu, J., Verslues, P. E., Sunkar, R., & Zhu, J.-K. (2005). Endogenous siRNAs derived from a pair of natural cis-antisense transcripts regulate salt tolerance in *Arabidopsis*. *Cell*, 123(7), 1279–1291. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2005.11.035>

- Brigneti, G. (1998). Viral pathogenicity determinants are suppressors of transgene silencing in *Nicotiana benthamianai*. *The EMBO Journal*, 17(22), 6739–6746. <https://doi.org/10.1093/emboj/17.22.6739>
- Brommonschenkel, S. H., Frary, A., Frary, A., & Tanksley, S. D. (2000). The broad-spectrum Tospovirus resistance gene *Sw-5* of tomato is a homolog of the root-knot Nematode resistance gene *Mi*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*®, 13(10), 1130–1138. <https://doi.org/10.1094/MPMI.2000.13.10.1130>
- Brommonschenkel, S. H., & Tanksley, S. D. (1997). Map-based cloning of the tomato genomic region that spans the *Sw-5* tospovirus resistance gene in tomato. *Molecular and General Genetics MGG*, 256(2), 121–126. <https://doi.org/10.1007/s004380050553>
- Brookes, G., & Barfoot, P. (2020). Environmental impacts of genetically modified (GM) crop use 1996–2018: impacts on pesticide use and carbon emissions. *GM Crops & Food*, 11(4), 215–241. <https://doi.org/10.1080/21645698.2020.1773198>
- Cerdeira, A. L., & Duke, S. O. (2006). The current status and environmental impacts of glyphosate-resistant crops. *Journal of Environmental Quality*, 35(5), 1633–1658. <https://doi.org/10.2134/jeq2005.0378>
- Christian, M., Cermak, T., Doyle, E. L., Schmidt, C., Zhang, F., Hummel, A., Bogdanove, A. J., & Voytas, D. F. (2010). Targeting DNA double-strand breaks with TAL effector nucleases. *Genetics*, 186(2), 756–761. <https://doi.org/10.1534/GENETICS.110.120717>
- Cong, L., Ran, F. A., Cox, D., Lin, S., Barretto, R., Habib, N., Hsu, P. D., Wu, X., Jiang, W., Marraffini, L. A., & Zhang, F. (2013). Multiplex genome engineering using CRISPR/Cas systems. *Science*, 339(6121), 819–823. <https://doi.org/10.1126/science.1231143>
- Dangl, J. L., & Jones, J. D. G. (2001). Plant pathogens and integrated defence responses to infection. *Nature*, 411(6839), 826–833. <https://doi.org/10.1038/35081161>

- DeYoung, B. J., Bickle, K. L., Schrage, K. J., Muskett, P., Patel, K., & Clark, S. E. (2006). The CLAVATA1-related *BAM1*, *BAM2* and *BAM3* receptor kinase-like proteins are required for meristem function in *Arabidopsis*. *Plant Journal*, *45*(1), 1–16. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2005.02592.x>
- EFSA. (2013). Scientific Opinion on the risks to plant health posed by *Bemisia tabaci* species complex and viruses it transmits for the EU territory. *EFSA Journal*, *11*(4). <https://doi.org/10.2903/j.efsa.2013.3162>
- Enya, J., Ikeda, K., Takeuchi, T., Horikoshi, N., Higashi, T., Sakai, T., Iida, Y., Nishi, K., & Kubota, M. (2009). The first occurrence of leaf mold of tomato caused by races 4.9 and 4.9.11 of *Passalora fulva* (syn. *Fulvia fulva*) in Japan. *Journal of General Plant Pathology*, *75*(1), 76–79. <https://doi.org/10.1007/s10327-008-0134-0>
- Ertunc, F. (2020). Emerging plant viruses. In M. M. Ennaji (Ed.), *Emerging and Reemerging Viral Pathogens* (Vol. 1, pp. 1041–1062). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-819400-3.00046-6>
- Foolad, M. R. (2007). Genome mapping and molecular breeding of tomato. *International Journal of Plant Genomics*, *2007*. <https://doi.org/10.1155/2007/64358>
- Fujimoto, Y., Hashimoto, M., & Yamaji, Y. (2020). Recessive resistance to plant viruses by the deficiency of eukaryotic translation initiation factor genes. *Uirusu*, *70*(1), 61–68. <https://doi.org/10.2222/jsv.70.61>
- Garcia-Ruiz, H., Takeda, A., Chapman, E. J., Sullivan, C. M., Fahlgren, N., Brempelis, K. J., & Carrington, J. C. (2010). *Arabidopsis* RNA-dependent RNA polymerases and Dicer-Like proteins in antiviral defense and small interfering RNA biogenesis during Turnip Mosaic Virus Infection. *The Plant Cell*, *22*(2), 481–496. <https://doi.org/10.1105/tpc.109.073056>

- Gauffier, C., Lebaron, C., Moretti, A., Constant, C., Moquet, F., Bonnet, G., Caranta, C., & Gallois, J.-L. (2016). A TILLING approach to generate broad-spectrum resistance to potyviruses in tomato is hampered by *eIF4E* gene redundancy. *The Plant Journal*, *85*(6), 717–729. <https://doi.org/10.1111/tpj.13136>
- German-Retana, S., Walter, J., Doublet, B., Roudet-Tavert, G., Nicaise, V., Lecampion, C., Houvenaghel, M.-C., Robaglia, C., Michon, T., & le Gall, O. (2008). Mutational analysis of plant cap-binding protein *eIF4E* reveals key amino acids involved in biochemical functions and Potyvirus infection. *Journal of Virology*, *82*(15), 7601–7612. <https://doi.org/10.1128/JVI.00209-08>
- Glick, E., Levy, Y., & Gafni, Y. (2009). The viral etiology of tomato yellow leaf curl disease – a review. *Plant Protection Science*, *45*(No. 3), 81–97. <https://doi.org/10.17221/26/2009-PPS>
- Hak, H., Levy, Y., Chandran, S. A., Belausov, E., Loyter, A., Lapidot, M., & Gafni, Y. (2015). TYLCV-Is movement in planta does not require V2 protein. *Virology*, *477*, 56–60. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2015.01.007>
- Hanson, P., Green, S. K., & Kuo, G. (2006). Ty-2, a gene on chromosome 11 conditioning geminivirus resistance in tomato. *Report of the Tomato Genetics Cooperative*, *56*, 17–18.
- Hanson, P., Lu, S. F., Wang, J. F., Chen, W., Kenyon, L., Tan, C. W., Tee, K. L., Wang, Y. Y., Hsu, Y. C., Schafleitner, R., Ledesma, D., & Yang, R. Y. (2016). Conventional and molecular marker-assisted selection and pyramiding of genes for multiple disease resistance in tomato. *Scientia Horticulturae*, *201*, 346–354. <https://doi.org/10.1016/j.scienta.2016.02.020>
- Hanssen, I. M., Lapidot, M., & Thomma, B. P. H. J. (2010). Emerging Viral Diseases of Tomato Crops. / *539 MPMI*, *23*(5), 539–548. <https://doi.org/10.1094/MPMI>

- Hashimoto, M., Neriya, Y., Yamaji, Y., & Namba, S. (2016). Recessive Resistance to Plant Viruses: Potential Resistance Genes Beyond Translation Initiation Factors. *Frontiers in Microbiology*, 7(OCT). <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.01695>
- Honda, K. (2006). Recent progress on tomato yellow leaf curl and its vector whitefly researches. *Proceedings of Vegetable and Tea Science*, 3, 115–122. <https://agriknowledge.affrc.go.jp/RN/2010724280>
- Hord, M. J., García, A., Villalobos, H., Rivera, C., Macaya, G., & Roossinck, M. J. (2001). Field survey of *Cucumber mosaic virus* subgroups I and II in crop plants in Costa Rica. *Plant Disease*, 85(9), 952–954. <https://doi.org/10.1094/PDIS.2001.85.9.952>
- Horowitz, A. R., Ghanim, M., Roditakis, E., Nauen, R., & Ishaaya, I. (2020). Insecticide resistance and its management in *Bemisia tabaci* species. *Journal of Pest Science*, 93(3), 893–910. <https://doi.org/10.1007/s10340-020-01210-0>
- Ishibashi, K., Masuda, K., Naito, S., Meshi, T., & Ishikawa, M. (2007). An inhibitor of viral RNA replication is encoded by a plant resistance gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 104(34), 13833–13838. <https://doi.org/10.1073/pnas.0703203104>
- Ishikawa, M., Yoshida, T., Matsuyama, M., Kouzai, Y., Kano, A., & Ishibashi, K. (2022). Tomato brown rugose fruit virus resistance generated by quadruple knockout of homologs of *TOBAMOVIRUS MULTIPLICATION1* in tomato. *Plant Physiology*, 189(2), 679–686. <https://doi.org/10.1093/plphys/kiac103>
- Jalender, P. (2017). Survey for the incidence of cucumber mosaic virus in tomato growing areas of Telangana and Andhra Pradesh. *International Journal of Pure & Applied Bioscience*, 5(4), 2058–2063. <https://doi.org/10.18782/2320-7051.5763>
- Jinek, M., Chylinski, K., Fonfara, I., Hauer, M., Doudna, J. A., & Charpentier, E. (2012). A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity. *Science*, 337(6096), 816–821. <https://doi.org/10.1126/science.1225829>

- Ji, Y., Schuster, D. J., & Scott, J. W. (2007). *Ty-3*, a begomovirus resistance locus near the *Tomato yellow leaf curl virus* resistance locus *Ty-1* on chromosome 6 of tomato. *Molecular Breeding*, 20(3), 271–284. <https://doi.org/10.1007/s11032-007-9089-7>
- Jones, D. A. (1993). Two complex resistance loci revealed in tomato by classical and RFLP mapping of the *Cf-2*, *Cf-4*, *Cf-5*, and *Cf-9* genes for resistance to *Cladosporium fulvum*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 6(3), 348. <https://doi.org/10.1094/MPMI-6-348>
- Kanazashi, Y., Hirose, A., Takahashi, I., Mikami, M., Endo, M., Hirose, S., Toki, S., Kaga, A., Naito, K., Ishimoto, M., Abe, J., & Yamada, T. (2018). Simultaneous site-directed mutagenesis of duplicated loci in soybean using a single guide RNA. *Plant Cell Reports*, 37(3), 553–563. <https://doi.org/10.1007/s00299-018-2251-3>
- Kaneko, Y., Inukai, T., Suehiro, N., Natsuaki, T., & Masuta, C. (2004). Fine genetic mapping of the *TuNI* locus causing systemic veinal necrosis by turnip mosaic virus infection in *Arabidopsis thaliana*. *Theoretical and Applied Genetics*, 110(1), 33–40. <https://doi.org/10.1007/s00122-004-1824-4>
- Kayode, A. B., Odu, B. O., Ako-Nai, K. A., & Alabi, O. J. (2014). Occurrence of *Cucumber mosaic virus* subgroups IA and IB isolates in tomatoes in Nigeria. *Plant Disease*, 98(12), 1750–1750. <https://doi.org/10.1094/PDIS-08-14-0844-PDN>
- Kim, Y. G., Cha, J., & Chandrasegaran, S. (1996). Hybrid restriction enzymes: zinc finger fusions to *Fok I* cleavage domain. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 93(3), 1156–1160. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.3.1156>
- Kishimoto, K., Washio, Y., Yoshiura, Y., Toyoda, A., Ueno, T., Fukuyama, H., Kato, K., & Kinoshita, M. (2018). Production of a breed of red sea bream *Pagrus major* with an increase of skeletal muscle mass and reduced body length by genome editing with CRISPR/Cas9. *Aquaculture*, 495, 415–427. <https://doi.org/10.1016/j.aquaculture.2018.05.055>

- Klein-Lankhorst, R., Rietveld, P., Machiels, B., Verkerk, R., Weide, R., Gebhardt, C., Koornneef, M., & Zabel, P. (1991). RFLP markers linked to the root knot nematode resistance gene *Mi* in tomato. *Theoretical and Applied Genetics*, 81(5), 661–667. <https://doi.org/10.1007/BF00226734>
- Kravchik, M., Damodharan, S., Stav, R., & Arazi, T. (2014). Generation and characterization of a tomato DCL3-silencing mutant. *Plant Science*, 221–222, 81–89. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2014.02.007>
- KURIHARA, Y., TAKASHI, Y., & WATANABE, Y. (2006). The interaction between DCL1 and HYL1 is important for efficient and precise processing of pri-miRNA in plant microRNA biogenesis. *RNA*, 12(2), 206–212. <https://doi.org/10.1261/rna.2146906>
- Kwon, J., Kasai, A., Maoka, T., Masuta, C., Sano, T., & Nakahara, K. S. (2020). RNA silencing-related genes contribute to tolerance of infection with potato virus X and Y in a susceptible tomato plant. *Virology Journal*, 17(1), 149. <https://doi.org/10.1186/s12985-020-01414-x>
- Lanfermeijer, F. C., Warmink, J., & Hille, J. (2005). The products of the broken Tm-2 and the durable Tm-22 resistance genes from tomato differ in four amino acids. *Journal of Experimental Botany*, 56(421), 2925–2933. <https://doi.org/10.1093/jxb/eri288>
- Latham, L. J., & Jones, R. A. C. (1997). Occurrence of tomato spotted wilt tospovirus in native flora, weeds, and horticultural crops. *Australian Journal of Agricultural Research*, 48(3), 359. <https://doi.org/10.1071/A96084>
- Lellis, A. D., Kasschau, K. D., Whitham, S. A., & Carrington, J. C. (2002). Loss-of-susceptibility mutants of *Arabidopsis thaliana* reveal an essential role for eIF(iso)4E during Potyvirus Infection. *Current Biology*, 12(12), 1046–1051. [https://doi.org/10.1016/S0960-9822\(02\)00898-9](https://doi.org/10.1016/S0960-9822(02)00898-9)

- Léonard, S., Plante, D., Wittmann, S., Daigneault, N., Fortin, M. G., & Laliberté, J.-F. (2000). Complex formation between Potyvirus VPg and translation eukaryotic initiation factor 4E correlates with virus infectivity. *Journal of Virology*, *74*(17), 7730–7737. <https://doi.org/10.1128/JVI.74.17.7730-7737.2000>
- Léonard, S., Viel, C., Beauchemin, C., Daigneault, N., Fortin, M. G., & Laliberté, J.-F. (2004). Interaction of VPg-Pro of Turnip mosaic virus with the translation initiation factor 4E and the poly(A)-binding protein in planta. *Journal of General Virology*, *85*(4), 1055–1063. <https://doi.org/10.1099/vir.0.19706-0>
- Lozano-Durán, R., Rosas-Díaz, T., Luna, A. P., & Bejarano, E. R. (2011). Identification of host genes involved in geminivirus infection using a reverse genetics approach. *PLoS ONE*, *6*(7). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0022383>
- Lucy, A. P. (2000). Suppression of post-transcriptional gene silencing by a plant viral protein localized in the nucleus. *The EMBO Journal*, *19*(7), 1672–1680. <https://doi.org/10.1093/emboj/19.7.1672>
- Lukyanenko, A. N. (1991). Disease Resistance in Tomato. In G. Kalloo (Ed.), *Genetic Improvement of Tomato* (pp. 99–119). [https://doi.org/10.1007/978-3-642-84275-7\\_9](https://doi.org/10.1007/978-3-642-84275-7_9)
- Luria, N., Smith, E., Reingold, V., Bekelman, I., Lapidot, M., Levin, I., Elad, N., Tam, Y., Sela, N., Abu-Ras, A., Ezra, N., Haberman, A., Yitzhak, L., Lachman, O., & Dombrovsky, A. (2017). A new israeli *Tobamovirus* isolate infects tomato plants harboring *Tm-22* resistance genes. *PLoS ONE*, *12*(1). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0170429>
- Mazier, M., Flamain, F., Nicolai, M., Sarnette, V., & Caranta, C. (2011). Knock-down of both *eIF4E1* and *eIF4E2* genes confers broad-spectrum resistance against Potyviruses in tomato. *PLoS ONE*, *6*(12), e29595. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0029595>

- Mertelík, J., & Mokra, V. (1998). Tomato spotted wilt virus in ornamental plants, vegetables and weeds in the Czech Republic. *Acta Virologica*, 42(5), 347–351. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10358737>
- Mikami, M., Toki, S., & Endo, M. (2015). Comparison of CRISPR/Cas9 expression constructs for efficient targeted mutagenesis in rice. *Plant Molecular Biology*, 88(6), 561–572. <https://doi.org/10.1007/s11103-015-0342-x>
- Miras, M., Truniger, V., Silva, C., Verdaguer, N., Aranda, M. A., & Querol-Audı, J. (2017). Structure of *eIF4E* in complex with an eiF4G peptide supports a universal bipartite binding mode for protein translation. *Plant Physiology*, 174(3), 1476–1491. <https://doi.org/10.1104/pp.17.00193>
- Moriones, E., & Navas-Castillo, J. (2000). Tomato yellow leaf curl virus, an emerging virus complex causing epidemics worldwide. *Virus Research*, 71(1–2), 123–134. [https://doi.org/10.1016/S0168-1702\(00\)00193-3](https://doi.org/10.1016/S0168-1702(00)00193-3)
- Moury, B., Lebaron, C., Szadkowski, M., ben Khalifa, M., Girardot, G., Bolou Bi, B. A., Kone, D., Nitiema, L. W., Fakhfakh, H., & Gallois, J. L. (2020). Knock-out mutation of eukaryotic initiation factor 4E2 (*eIF4E2*) confers resistance to pepper veinal mottle virus in tomato. *Virology*, 539, 11–17. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2019.09.015>
- Murakami, T., Tayama, R., & Nakahara, K. S. (2016). Microperforated leaf blotting on polyvinylidene difluoride and nylon membranes to analyze spatial distribution of endogenous and viral gene expression in plant leaves. *Journal of General Plant Pathology*, 82(5), 254–260. <https://doi.org/10.1007/s10327-016-0671-x>
- Murata, T., & Shimotohno, K. (2006). Ubiquitination and proteasome-dependent degradation of human eukaryotic translation initiation factor 4E. *Journal of Biological Chemistry*, 281(30), 20788–20800. <https://doi.org/10.1074/jbc.M600563200>

- Nakahara, K. S., Masuta, C., Yamada, S., Shimura, H., Kashihara, Y., Wada, T. S., Meguro, A., Goto, K., Tadamura, K., Sueda, K., Sekiguchi, T., Shao, J., Itchoda, N., Matsumura, T., Igarashi, M., Ito, K., Carthew, R. W., & Uyeda, I. (2012). Tobacco calmodulin-like protein provides secondary defense by binding to and directing degradation of virus RNA silencing suppressors. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *109*(25), 10113–10118. <https://doi.org/10.1073/pnas.1201628109>
- Nonaka, S., Arai, C., Takayama, M., Matsukura, C., & Ezura, H. (2017). Efficient increase of  $\gamma$ -aminobutyric acid (GABA) content in tomato fruits by targeted mutagenesis. *Scientific Reports*, *7*(1), 7057. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-06400-y>
- Oliver, J. E., & Whitfield, A. E. (2016). The genus *Tospovirus* : emerging Bunyaviruses that threaten food security. *Annual Review of Virology*, *3*(1), 101–124. <https://doi.org/10.1146/annurev-virology-100114-055036>
- Olmstead, R. G., Bohs, L., Migid, H. A., Santiago-Valentin, E., Garcia, V. F., & Collier, S. M. (2008). A molecular phylogeny of the Solanaceae. *TAXON*, *57*(4), 1159–1181. <https://doi.org/10.1002/tax.574010>
- Ori, N., Eshed, Y., Paran, I., Presting, G., Aviv, D., Tanksley, S., Zamir, D., & Fluhr, R. (1997). The *I2C* family from the wilt disease resistance locus *I2* belongs to the nucleotide binding, leucine-rich repeat superfamily of plant resistance genes. *The Plant Cell*, *9*(4), 521–532. <https://doi.org/10.1105/tpc.9.4.521>
- Piron, F., Nicolăi, M., Minoia, S., Piednoir, E., Moretti, A., Salgues, A., Zamir, D., Caranta, C., & Bendahmane, A. (2010). An induced mutation in tomato *eIF4E* leads to immunity to two Potyviruses. *PLoS ONE*, *5*(6), e11313. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0011313>
- Robinson, R., Provvidenti, R., & Schroeder, W. T. (1970). A marker gene for tobacco mosaic resistance. *Rep Tomato Genet Coop*, *20*, 55–56.

- Rojas, M. R., Jiang, H., Salati, R., Xoconostle-Cázares, B., Sudarshana, M. R., Lucas, W. J., & Gilbertson, R. L. (2001). Functional analysis of proteins involved in movement of the monopartite begomovirus, Tomato yellow leaf curl virus. *Virology*, *291*(1), 110–125. <https://doi.org/10.1006/viro.2001.1194>
- Rosas-Diaz, T., Zhang, D., Fan, P., Wang, L., Ding, X., Jiang, Y., Jimenez-Gongora, T., Medina-Puche, L., Zhao, X., Feng, Z., Zhang, G., Liu, X., Bejarano, E. R., Tan, L., Zhang, H., Zhu, J. K., Xing, W., Faulkner, C., Nagawa, S., & Lozano-Duran, R. (2018). A virus-targeted plant receptor-like kinase promotes cell-to-cell spread of RNAi. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, *115*(6), 1388–1393. <https://doi.org/10.1073/pnas.1715556115>
- Roselló, S., Díez, M. J., & Nuez, F. (1996). Viral diseases causing the greatest economic losses to the tomato crop. I. The tomato spotted wilt virus — a review. *Scientia Horticulturae*, *67*(3–4), 117–150. [https://doi.org/10.1016/S0304-4238\(96\)00946-6](https://doi.org/10.1016/S0304-4238(96)00946-6)
- Ruffel, S., Gallois, J. L., Lesage, M. L., & Caranta, C. (2005). The recessive potyvirus resistance gene *pot-1* is the tomato orthologue of the pepper *pvr2-eIF4E* gene. *Molecular Genetics and Genomics*, *274*(4), 346–353. <https://doi.org/10.1007/s00438-005-0003-x>
- Saha, S., & Mäkinen, K. (2020). Insights into the functions of *eIF4E*-binding motif of VPg in potato virus A infection. *Viruses*, *12*(2), 197. <https://doi.org/10.3390/v12020197>
- Sanfaçon, H. (2017). Grand challenge in plant virology: Understanding the impact of plant viruses in model plants, in agricultural crops, and in complex ecosystems. *Frontiers in Microbiology*, *8*, 860. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00860>
- Sayama, H. (1993). Field testing of a satellite-containing attenuated strain of cucumber mosaic virus for tomato protection in Japan. *Phytopathology*, *83*(4), 405. <https://doi.org/10.1094/Phyto-83-405>

- Scholthof, K.-B. G., Adkins, S., Czosnek, H., Palukaitis, P., Jacquot, E., Hohn, T., Hohn, B., Saunders, K., Candresse, T., Ahlquist, P., Hemenway, C., & Foster, G. D. (2011). Top 10 plant viruses in molecular plant pathology. *Molecular Plant Pathology*, 12(9), 938–954. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2011.00752.x>
- Scott, J. W., & Jones, J. P. (1989). Monogenic resistance in tomato to *Fusarium oxysporum* f. sp. lycopersici race 3. *Euphytica*, 40(1–2), 49–53. <https://doi.org/10.1007/BF00023296>
- Sharman, M., & Persley, D. M. (2006). Field isolates of Tomato spotted wilt virus overcoming resistance in capsicum in Australia. *Australasian Plant Pathology*, 35(2), 123–128. <https://doi.org/10.1071/AP06014>
- Stevens, M. R., Lamb, E. M., & Rhoads, D. D. (1995). Mapping the Sw-5 locus for tomato spotted wilt virus resistance in tomatoes using RAPD and RFLP analyses. *Theoretical and Applied Genetics*, 90(3–4), 451–456. <https://doi.org/10.1007/BF00221989>
- Sun, H. J., Uchii, S., Watanabe, S., & Ezura, H. (2006). A highly efficient transformation protocol for Micro-Tom, a model cultivar for tomato functional genomics. *Plant and Cell Physiology*, 47(3), 426–431. <https://doi.org/10.1093/pcp/pci251>
- Torre, C., Donaire, L., Gómez-Aix, C., Juárez, M., Peterschmitt, M., Urbino, C., Hernando, Y., Agüero, J., & Aranda, M. A. (2018). Characterization of begomoviruses sampled during severe epidemics in tomato cultivars carrying the Ty-1 gene. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(9). <https://doi.org/10.3390/ijms19092614>
- Tran, P. T., & Citovsky, V. (2021). Receptor-like kinase *BAM1* facilitates early movement of the Tobacco mosaic virus. *Communications Biology*, 4(1). <https://doi.org/10.1038/s42003-021-02041-0>
- Trebicki, P. (2020). Climate change and plant virus epidemiology. *Virus Research*, 286, 198059. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2020.198059>

- Tsuda, S., Kirita, M., & Watanabe, Y. (1998). Characterization of a Pepper mild mottle Tobamovirus strain capable of overcoming the *L<sup>3</sup>* gene-mediated resistance, distinct from the resistance-breaking Italian isolate. *Molecular Plant-Microbe Interactions*®, 11(4), 327–331. <https://doi.org/10.1094/MPMI.1998.11.4.327>
- Ueda, S., Kimura, T., Onuki, M., Hanada, K., & Iwanami, T. (2004). Three distinct groups of isolates of Tomato yellow leaf curl virus in Japan and construction of an infectious clone. *Journal of General Plant Pathology*, 70(4), 232–238. <https://doi.org/10.1007/s10327-003-0112-5>
- Vakalounakis, D. J., Laterrot, H., Moretti, A., Ligoixigakis E K, & Smardas, K. (1997). Linkage between *Frl* (*Fusarium oxysporum f.sp. radicis-lycopersici* resistance) and *Tm-2* (tobacco mosaic virus resistance-2) loci in tomato (*Lycopersicon esculentum*). *Annals of Applied Biology*, 130(2), 319–323. <https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.1997.tb06835.x>
- Vaucheret, H. (2006). Post-transcriptional small RNA pathways in plants: mechanisms and regulations. *Genes & Development*, 20(7), 759–771. <https://doi.org/10.1101/gad.1410506>
- Wang, M.-B., Masuta, C., Smith, N. A., & Shimura, H. (2012). RNA silencing and plant viral diseases. *Molecular Plant-Microbe Interactions*®, 25(10), 1275–1285. <https://doi.org/10.1094/MPMI-04-12-0093-CR>
- Whitham, S., Dinesh-Kumar, S. P., Choi, D., Hehl, R., Corr, C., & Baker, B. (1994). The product of the tobacco mosaic virus resistance gene N: Similarity to toll and the interleukin-1 receptor. *Cell*, 78(6), 1101–1115. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(94\)90283-6](https://doi.org/10.1016/0092-8674(94)90283-6)
- Xie, Z., Johansen, L. K., Gustafson, A. M., Kasschau, K. D., Lellis, A. D., Zilberman, D., Jacobsen, S. E., & Carrington, J. C. (2004). Genetic and functional diversification of small RNA pathways in plants. *PLoS Biology*, 2(5). <https://doi.org/10.1371/journal.pbio.0020104>

- Yasumoto, S., Umemoto, N., Lee, H. J., Nakayasu, M., Sawai, S., Sakuma, T., Yamamoto, T., Mizutani, M., Saito, K., & Muranaka, T. (2019). Efficient genome engineering using Platinum TALEN in potato. *Plant Biotechnology*, 36(3), 167–173. <https://doi.org/10.5511/plantbiotechnology.19.0805a>
- Yong Chung, H., Lacatus, G., & Sunter, G. (2014). Geminivirus AL2 protein induces expression of, and interacts with, a calmodulin-like gene, an endogenous regulator of gene silencing. *Virology*, 460–461(1), 108–118. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2014.04.034>
- Yoshii, M., Nishikiori, M., Tomita, K., Yoshioka, N., Kozuka, R., Naito, S., & Ishikawa, M. (2004). The *Arabidopsis* Cucumovirus Multiplication 1 and 2 Loci Encode Translation Initiation Factors 4E and 4G. *Journal of Virology*, 78(12), 6102–6111. <https://doi.org/10.1128/JVI.78.12.6102-6111.2004>
- Zushi, K., & Matsuzoe, N. (2012). Comparative analysis of oxidative parameters, antioxidant content, and antioxidant enzyme activity during fruit ripening in tomato pericarp and pulp. *Journal of the Japanese Society for Horticultural Science*, 81(1), 109–116. <https://doi.org/10.2503/jjshs1.81.109>
- 井上 忠男. (1983). 最も古くて最も新しいウイルス. 化学と生物, 114–115.
- 川久保 彩花 (2022) . キュウリモザイクウイルスの小型蛍光タンパク質 iLOV を用いた全身モニタリングと変異 *eIF4E* タンパク質による感染阻害. 北海道大学大学院農学院農学専攻生産フロンティアコース 修士論文.

## 謝辞

本論文の作成にあたり、多くの方々にご指導ご鞭撻を賜りました。

指導教官の北海道大学農学院増田教授並びに中原講師には終始適切なお指導を賜りました。ここに深謝の意を表します。

また日本デルモンテ株式会社、キッコーマン株式会社には多大なお支援を賜りました。厚く御礼申し上げます。

本研究の遂行にあたり、北海道大学農学部植物病原学研究室の皆様、キッコーマン株式会社研究開発本部および日本デルモンテ株式会社の皆様、Jean-Luc Gallois (INRA、フランス)、眞岡哲夫氏および遠藤真咲氏（農研機構）に解析・試料の提供のほか、数多くのご協力とご助言を頂きました。この場を借りて感謝申し上げます。

最後に、これまで私をあたたく応援してくれた家族に感謝致します。