HOKKAIDO UNIVERSITY

Title	ジャガイモウイルスの検出技術とジャガイモYウイルスの発生実態に関する研究
Author(s)	小野塚, 信哉
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(農学)
Dissertation Number	甲第14648号
Issue Date	2021-09-24
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k14648
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/96825
Type	doctoral thesis
File Information	onozuka_nobuya.pdf

Hokkaido University Collection of Scholarly and Academic Papers : HUSCAP

博士論文

ジャガイモウイルスの検出技術と
ジャガイモ Y ウイルスの発生実態に関する研究

北海道大学　大学院農学院

共生基盤学専攻　博士後期課程

小野塚　信哉

謝辞

ジャガイモ Y ウイルスの塊茎伝搬率の解析にあたって，ご支援賜った公益社団法人北海道農産基金協会に心より感謝申し上げます．

本研究を進めるにあたって，ご指導ご鞭撻いただいた北海道大学大学院農学院植物病原学研究室　教授　増田税博士，講師　中原健二博士に感謝申し上げます．学位論文のご校閲賜った植物病理学研究室　教授　近藤則夫博士に感謝申し上げます．

農研機構　植物防疫研究部門 所長　眞岡哲夫博士，中日本農業研究センター　岡紀邦博士，北海道農業研究センター　大木健広博士および佐野正和博士，種苗管理センター　北海道中央農場　青野佳之様には，本研究の遂行からとりまとめまで多大なるご助力いただきましたことに心よりお礼申し上げます．

目次

緒言 1
第1部　ジャガイモウイルス検定法の開発 7
　第1章　簡易 RNA 調製法とコンベンショナル mRT-PCR 法の開発 8
　　第 1 節　材料と方法 10
　　第 2 節　結果 20
　　第 3 節　考察 35
　第2章　リアルタイム mRT-PCR 法の開発 39
　　第 1 節　材料と方法 41
　　第 2 節　結果 44
　　第 3 節　考察 55
第 2 部　ジャガイモ Y ウイルスのほ場調査ならびに塊茎伝搬率の解析 59
　第 1 章　ジャガイモ Y ウイルスのほ場調査 61
　　第 1 節　材料と方法 63
　　第 2 節　結果 69
　　第 3 節　考察 76
　第 2 章　塊茎伝搬率の解析 79
　　第 1 節　材料と方法 81
　　第 2 節　結果 84
　　第 3 節　考察 88
総合考察 91
参考文献 96
摘要 105

緒言

ジャガイモ（*Solanum tuberosum* L.）は，世界で 4 番目に重要な食用作物であり（FAOSTAT 2018），日本国内においても年間 200 万トン以上が生産されている（MAFF 2020）．ジャガイモは，アメリカ大陸を起源とし，少なくとも 7000 年前から栽培されていたとされている．ジャガイモ栽培は，16 世紀に新大陸発見とともに欧州へと伝搬し，その後欧州から世界中へと伝搬していった．ジャガイモは，塊茎を用いた栄養繁殖により増殖が行われており，ほ場では遺伝的に均一な集団となりやすく，かつ，塊茎に病原が付着もしくは侵入しやすいため，非常に病気に弱い特徴がある．19 世紀半ば，北アイルランドでは，人口の 3 分の 1 が主食をジャガイモのみに依存し，ランパーという単一の品種を大規模に生産していたため，ジャガイモ疫病（*Phytophthora infestans* による）が大発生し，およそ 100 万人が餓死するほどの大飢饉をもたらした．この大飢饉を契機とし，欧米諸国では本格的なジャガイモの育種が始まった．ちょうど育種が本格化した時期に potato virus S（PVS）および potato virus Y（PVY）の遺伝的な多様性も高くなっており（Santillan et al. 2018； Fuentes et al. 2019），遺伝資源とともにそれに感染していた多様なウイルスも欧米諸国へと持ち込まれたと考えられる．

現在，ジャガイモに感染するウイルス（ジャガイモウイルス）は，30 種以上が報告されており（Campos and Ortiz 2020），日本では第 1-1 表に示した 12 種のジャガイモウイルスの発生が報告されている（Maoka et al. 2010）．これら 12 種のうち，国内では，

potato leafroll virus（PLRV），PVS，potato virus X（PVX）および PVY の 4 種が重要なジャガイモウイルスとされている（佐藤ら 2000）．

PLRV は，*Polerovirus* 属のタイプ種であり，プラス鎖の一本鎖 RNA（ssRNA）をゲノムとしている（International Committee on Taxonomy of Viruses： ICTV 2021）．2021 年 3 月に，*Luteoviridae* 科から *Solemoviridae* 科に再分類された．ジャガイモの植物内では師部に局在し，アブラムシおよび塊茎を通じて伝搬し，汁液や接触では感染しない．ジャガイモでの病徴は葉が上向きに巻くためほ場での診断は比較的に容易である．

PVX は，*Potexvirus* 属のタイプ種であり，プラス鎖の ssRNA をゲノムとしている（ICTV 2021）．ベクターは見つかっておらず，接触や汁液による感染力が強く，塊茎を通じて次世代へと伝搬する．ジャガイモに対する病原性は，単独感染では，弱いモザイク症状あるいは無症状であることからほ場での診断には熟練を要するが，他のジャガイモウイルスとの混合感染により重症化して収量が著しく減少する．

PVS は，*Carlavirus* 属であり，プラス鎖の ssRNA をゲノムとしている（ICTV 2021）．主にアブラムシおよび塊茎を通じて伝搬する．普通系統（Ordinary lineage），アンデス系統（Andean lineage）およびフレーヤ系統（Phureja lineage）の 3 系統が報告されており（Vallejo et al. 2016），このうち普通系統とアンデス系統は国内で分離されている．ゲノム配列は，比較的多様性が高く，アンデス系統は南部潜在ウイルスとして別のウイルスとして扱われていたこともあった（土崎ら 1993）．ジャガイモに対する病原性はモ

ザイク症状などで比較的弱い.

PVY は，*Potyvirus* 属のタイプ種であり，プラス鎖の ssRNA をゲノムとしている（ICTV 2021）．主にアブラムシと塊茎を通じて伝搬する．組換え体を含めた多数の系統が存在しており（Karasev and Gray 2013; Green et al. 2017），ジャガイモに対する病原性は，PVY の系統およびジャガイモ品種の組合せにより異なり，モザイク，れん葉，えそ斑点や葉脈えそなど様々な症状を引き起こす．アブラムシによるプロービング（探り吸汁）と呼ばれる数秒の吸汁でも感染株からのウイルスの獲得あるいはウイルスの伝搬が可能となることから，殺虫剤の施用による PVY の防除効果は限定的である（MacKenzie et al. 2014）.

これら 4 種のジャガイモウイルスは，いずれも塊茎を通じて次世代へと伝搬し，ジャガイモ生産の質および量を低下させるため，ジャガイモの安定生産にはウイルスに感染していない種ばれいしょを使用することが不可欠である．そのため，多くの先進諸国と同様，国内では種ばれいしょの生産管理が行われている（USDA 2004； UNECE 2018； AuSPICA 2019； SASA 2020）．国内の種ばれいしょ生産では，まず頂芽分裂組織を 0.2~0.3 mm 程度で切り出して組織培養することで，ウイルスフリーの培養苗を作出する（Kawakami et al. 2015）．ウイルスフリーの培養苗は，適宜，節毎に切り分けて組織培養して増殖を行い，その後，各種病原体が侵入しないよう管理された温室内において養液栽培により培養苗から 10 g前後の塊茎（ミニチューバー： MnT）を生

産する．その後，基本種，原原種，原種および採種の順にほ場栽培で増殖を行い，一般栽培農家に配布されている．種ばれいしょ検疫では，ウイルス病を管理するために夏季と冬季の 2 回に分けてウイルス病の検査が行われている．夏季検定では，ジャガイモの栽培期間中にほ場で目視による診断を行い，ウイルス感染が疑われる株をほ場から除去するとともに，定期的にウイルスに感染した株数が許容限界以下であることが検査される．冬季検定では，収穫した塊茎から一定割合の塊茎を抽出してウイルス病の検定に供試し，ウイルス検出率が許容限界以下であることが確認されている．ウイルスは，貯蔵期間中に検出感度が低下することが報告されていることから，塊茎を植え付けて栽培した植物の葉を試料として用いられている．冬季検定において，ウイルスの検出には ELISA 法が用いられてきたが，検出に時間と労力を要することが課題である．本研究では，冬季検定の省力化と精度の高度化を目的とし，ジャガイモウイルス検出技術を開発した（第 1 部）．

国内では，ジャガイモウイルスのなかで PVY による被害が最も多く，PLRV と PVS の発生は稀であり，PVX は近年では検出されていない．PVY の発生が多い要因の 1 つとして病原性の異なる多数の系統が存在していることが挙げられる．そこで，夏季検定を効果的に行えるよう，PVY の各系統の発生状況の調査を行った（第 2 部の第 1 章）．ジャガイモほ場調査の結果，2007 年から 2009 年に実施されたほ場調査と同様に（Chikh Ali et al. 2013），近年でもジャガイモほ場で NTN 系統（和名：塊茎えそ系

統あるいは欧州型塊茎えそ系統）が優占していた. NTN 系統は，他の系統に比べアブラムシ伝搬効率が高いことが示されているが（Carroll et al. 2016； Mondal et al. 2017），塊茎伝搬率に関しては系統間で比較した試験の報告がない. そこで，国内分離株を用いて塊茎伝搬率を解析した（第 2 部の第 2 章）. 以上により，ジャガイモの安定生産に貢献する技術の開発，ならび，Potyvirus 属のタイプ種である PVY の基礎的な解析を行った.

第 1-1 表　日本国内で既発生のジャガイモウイルス

略称	学名	属	科
AMV	alfalfa mosaic virus	Alfamovirus	Bromoviridae
CMV	cucumber mosaic virus	Cucumovirus	Bromoviridae
PAMV	potato aucuba mosaic virus	Potexvirus	Alphaflexiviridae
PLRV	potato leafroll virus	Polerovirus	Solemoviridae
PMTV	potato mop-top virus	Pomovirus	Virgaviridae
PVA	potato virus A	Potyvirus	Potyviridae
PVM	potato virus M	Carlavirus	Betaflexiviridae
PVS	potato virus S	Carlavirus	Betaflexiviridae
PVX	potato virus X	Potexvirus	Alphaflexiviridae
PVY	potato virus Y	Potyvirus	Potyviridae
ToRSV	tomato ringspot virus	Nepovirus	Secoviridae
TSWV	tomato spotted wilt orthotovirus	Tospovirus	Bunyaviridae

（Maoka et al. 2010; ICTV 2021）

第1部　ジャガイモウイルス検定法の開発

ジャガイモウイルスは RNA ウイルスであり，その検出には電子顕微鏡観察，病理学的な手法，免疫学的な手法および分子生物学的な手法など各種手法が用いられている．その中でも，免疫学的な手法である Enzyme-linked immunosorbent assay（ELISA）法は，他の手法に比べて操作が簡便であることから，主要な 4 種のジャガイモウイルス（PLRV, PVS, PVX および PVY）の検出に用いられてきた．しかし，ELISA 法では，1 ウェルあたり 1 ウイルスしか検出できず，粗汁液から検出までに多くの時間と労力を要する．一方，分子生物学的な手法は，佐藤ら（2000）により簡易的な RNA 精製法と reverse transcription polymerase chain reaction（RT-PCR）法による主要な 4 種のジャガイモウイルスの検出法が開発されたが，ELISA 法と比べ，RNA 精製の操作が煩雑であることに加えて試薬及び酵素類が高価であることが課題であった．近年，簡易的な RNA 調製法やマルチプレックス RT-PCR（mRT-PCR）法が報告されており，これらの技術を導入することで RT-PCR 法のデメリットの軽減が期待できる．そこで，現行法である ELISA 法に代わる検出技術として簡易 RNA 調製法と mRT-PCR 法による検定法を開発した．

第1章　簡易 RNA 調製法とコンベンショナル mRT-PCR 法の開発

簡易的な RNA 調製法は，用途によってさまざまな手法が報告されており，熱処理した粗汁液を直接鋳型として用いる方法（Nakaune and Nakano 2006）と核酸を吸着する担体を用いて簡易精製する方法（Singh et al. 2004； Zou et al. 2017）の 2 種類に分かれる．前者では粗汁液から植物残渣を除くために遠心分離を必要とするが，後者はピペッティング操作のみで植物残渣を除去できることからより多検体からの RNA 調製に適していると思われた．Zou et al.（2017）のろ紙を用いた手法は，担体を用いる手法のなかでも，簡便な操作で短時間に RNA 溶液を調製できる利点があった．しかし，彼らの手法では，RNA を吸着させたろ紙を PCR の反応液に浸漬して使用するため，検定に供試した RNA を保存できない欠点があった．そこで，第1章において，Zou et al.（2017）の手法を参考とし，保存性を改良するために手順を変更した．

コンベンショナル mRT-PCR 法は，ジャガイモウイルスを対象とした複数の手法が報告されているが（Nie and Singh 2000； Kumar et al. 2017； Zhang et al. 2017），このうちの 2 手法のみが主要な 4 種のジャガイモウイルスを標的としていた（Du et al. 2006； Bostan and Peker 2009）．Du et al.（2006）の手法は 4 つの増幅断片が 145 bp から 342 bp の狭い範囲に設計されていたのに対し，Bostan and Peker（2009）の手法は増幅産物のサイズが互いに 100 bp 以上離れているため，電気泳動解析でのウイルス種の診断が容易だと思われた．そこで，Bostan and Pekaer（2009）の手法を参考とし，

コンベンショナル mRT-PCR 法による主要な4種のジャガイモウイルスの検出技術を開発した.

第 1 節　材料と方法

第1項　ジャガイモウイルス

ジャガイモウイルスは，ジャガイモから分離された株を使用した（第 2-1 表）．ウイルス株は，汁液接種もしくは接ぎ木接種により増殖植物に接種したのち，病徴観察，ELISA 法または RT-PCR 法によりウイルス感染を確認した．ウイルス感染葉は，使用するまで−80°C で保存した．

第 2-1 表　使用したジャガイモウイルスの一覧

ウイルス	分離株	系統	増殖植物	GenBank accession
PLRV	ChLR_2	未分類	*S. tuberosum*	LC501445
PVS	M	Ordinary（PVS^{O}）	*S. tuberosum*	AB451180
	ChS_3	Andean（PVS^{A}）	*N. occidentalis*	LC492754
PVX	O-IC249	未分類	*S. tuberosum*	AB451181
PVY	Y28	O（PVY^{O}）	*N. tabacum* cv. Xanthi	AB451182
	NTND6	NA-N（PVY^{NA-N}）	*N. tabacum* cv. Xanthi	AB331515
	Eu-12Jp	NTN（PVY^{NTN}）	*S. tuberosum*	AB702945

第 2 項　プライマーの設計

Bostan and Peker（2009）の mRT-PCR 法で用いられているプライマーを参考とし，国内分離株の検出結果及びアライメント解析の結果から特異性が低いと判断したプライマーは新たに設計した．ウイルスおよび植物のゲノム配列は，National Center for Biotechnology Information（https://www.ncbi.nlm.nih.gov/）から取得し，MEGA-X

（https://www.megasoftwa re.net/）を用いてアライメント解析により保存配列を確認した．ウイルス特異的プライマーは，外被タンパク質遺伝子（CP）を標的とし，各ウイルスの配列の多様性を考慮して，無作為にデータベース上から抽出した 8 つ以上の分離株で保存されていた配列から設計した．PVS は Vallejo et al. (2016)の分類に基づき，普通系統（PVS^{O}），アンデス系統（PVS^{A}）およびフレーヤ系統（PVS^{P}）を含む配列を使用し，PVY は Green et al. (2017)の分類に基づき，O 系統（PVY^{O}）（和名：普通系統），O5 系統（PVY^{O5}），Eu-N 系統（$PVY^{Eu\text{-}N}$），NA-N 系統（$PVY^{NA\text{-}N}$）（和名：T 系統あるいは北米型塊茎えそ系統），E 系統（PVY^{E}）を含む配列を使用した．なお，PLRV と PVX は CP の多様性が低かったため，系統は考慮せず無作為に抽出した配列を用いた．増幅反応の成否を確認するための内部標準として，植物の Elongation factor 1 alpha gene (*EF1α*)を標的とするプライマーも同様に設計を行った．ジャガイモウイルスの増幅宿主としてタバコ（*Nicotiana tabacum*）が用いられることが多いことから，タバコ由来の 2 配列を含む計 8 配列を用いてアライメント解析を行い，保存配列からプライマーを設計した．プライマーの融点（Tm 値）は，Oligo Calculator（Nihon Gene Research Laboratories, Inc., https://www.ngrl.co.jp/tools/0217oligocalc.htm）を用いて確認し，65°C から 68°C となるように設計した．

第 3 項 ワンステップ コンベンショナル mRT-PCR 法の開発

Total RNA 溶液は凍結葉 25 mg から Pure Link RNA Mini Kit（Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA）を用いて抽出した. Total RNA 溶液の濃度は, NaroDrop 1000（Thermo Fisher Scientific）を用いて測定した吸光度から算出し, 100 ng/µl となるように RNase-free 水を用いて希釈したのちに使用した.

プライマーの特異性はツーステップ mRT-PCR 法により確認した. PVS, PVX 及び PVY はゲノム配列に poly-A tail を持つが, PLRV は poly-A tail を持たないため, 逆転写反応には, oligo（dT）$_{15}$ プライマーと PLRV 特異的なリバースプライマー（5′-GCA ATG GGG GTC CAA CTC AT -3′）を併用した. Total RNA 溶液（100 ng/µl）1 µl をプライマーと混合し, 65°C で 5 分間の変性処理したのち, ただちに 1 分間以上氷冷した. 逆転写反応は, 10 µl の反応液中で行い, 反応液の組成は 2.5 µM oligo（dT）$_{15}$ プライマー, 0.2 µM PLRV 特異的リバースプライマー, 0.5 mM dNTPs, 5 mM ジチオトレイトール（DTT）及び 10 U SuperScriptIII reverse transcriptase（Thermo Fisher Scientific）である. 反応液は, 50°C で 60 分間処理して cDNA 合成を行い, その後 70°C で 15 分間の熱処理によって逆転写酵素を失活させた. PCR は, cDNA 溶液 1 µl を鋳型として用い, 10 µl の反応液中で実施した. 反応液の組成は, 0.2 µM 各ウイルス特異的プライマー（8 種）, 0.4 µM *EF1α* 特異的プライマー（2 種）, 1 × PrimeSTAR max DNA polymerase（Takara Bio Inc., Kusatsu, Japan）である. 反応

条件は，98°C で 10 秒間と 64°C で 30 秒間を 30 サイクルとし，サイクル終了後は 4°C まで急冷し，電気泳動解析に用いるまで 4°C で保存した．次に，ツーステップ mRT-PCR 法およびアライメント解析から選出したプライマーと PrimeScript one-step RT-PCR kit ver. 2 (Dye plus)（Takara Bio）を用い，ワンステップ mRT-PCR 法を検証した．反応液は 10 µl とし，反応液の組成は 1 × reaction buffer，0.4 µl enzyme mixture，0.2 µM 各ウイルス特異的プライマーおよび 0.4 µM *EF1α* 特異的プライマーである．反応条件は，50°C で 60 分間と 94°C で 2 分間の逆転写反応に続き，98°C で 10 秒間と 64°C で 1 分間を 35 サイクル繰り返すシャトル PCR を行った．PCR サイクルにおけるアニーリングと伸長を行う温度を最適化するため，62°C，64°C，66°C および 68°C の 4 条件でそれぞれ反応を行い，電気泳動解析で特異的および非特異な増幅産物のバンドの濃さを比較した．以上の反応には，Veriti thermal cycler（Thermo Fisher Scientific）を使用した．

電気泳動解析は，RT-PCR の反応液 5 µl を供試して 1.5 - 2.0%アガロースゲルで増幅産物を分離し，その後 Midori Green Extra（Nippon Genetics Co. Ltd.， Tokyo，Japan）で染色した．染色後，WSE-5200 Printgraph 2M（ATTO Corp.， Tokyo， Japan）を用いて励起光（波長 510 nm）を照射して増幅産物を可視化した．

サーマルサイクラーは機種によって温度の変化速度（ramp rate）が異なっており，ramp rate の反応への影響を調べるため，GeneAmp PCR system 9700（Thermo Fisher

Scientific)（ramp rate: 1.5°C/s）と Veriti thermal cycler（Thermo Fisher Scientific）（ramp rate: 3.35°C/s）を用い，それぞれ反応を行って泳動像を比較した.

第 4 項　ろ紙を用いた簡易 RNA 調整法の最適化

ろ紙を用いた簡易 RNA 調整法は，Zou et al. (2017)の手法を参考とし，（1）1 チューブ内で全ての操作を行うこと，（2）ろ紙を洗浄する溶媒の変更，（3）RNA を溶出する過程の追加，以上の 3 点の変更を加え，第 2-1 図に従って実施した. ジャガイモの葉 25 mg を Extraction buffer #2 を 1ml 加えて磨砕した. Extraction buffer #2 の組成は，800 mM グアニジンイソチオシアネート，50 mM Tris-HCl（pH 8.0），0.5%（v/v）Triton X-100 および 1%（v/v）Tween 20 である（Zou et al. 2017）. 直径 3 mm のろ紙のディスクは，Whatman Grade 1 のろ紙（GE Healthcare UK Ltd.， Amersham， UK）を 3.0 mm のハリス ユニコア ポンチ（GE Healthcare）でくり抜いて作製し，0.2 ml 容の PCR チューブに入れた. 葉の磨砕液 100 µl をディスクが入ったチューブに加え，数回のピペッティング後に除去した. その後，ディスクを 200 µl のアルコール（50%イソプロパノールおよび 75%エタノール）または Wash buffer（10 mM Tris-HCl, 0.1% Tween 20）で洗浄した. ディスクから RNA を溶出するため，RNase-free 水 50 µl を加えて 94°C で 5 分間の熱処理したのち，上清 1 µl を RT-PCR の鋳型として使用した. ディスクの洗浄溶媒としてアルコールと Wash buffer を比較するため，ジャガイモの健全葉の磨砕液を用い，ウイルス感染葉の磨砕液の 10 倍の希釈系列を作製して上記の調整方法に

より鋳型を調製し，ワンステップ mRT-PCR 法による検出感度を比較した．担体の素材を検証するため，ニトロセルロース膜（HybondC Super 0.45-micron, GE Healthcare）をろ紙の代替とし，上記の手法を用いて RNA 溶液を調製した．また，検出感度を比較するため，熱抽出法（Nakaune and Nakano 2006）を一部改変して用いた．改変した熱抽出法では，4%（w/v）ポリビニルピロリドン K40，10 mM DTT および 0.1%（v/v）Triton X-100 を添加した TE buffer pH 8.0 を抽出バッファーとして用いた．ジャガイモの葉 25 mg に抽出バッファーを 1 ml を加えて磨砕し，遠心分離（2,500×g，5 分間）したのち，上清を熱処理（75°C，5 分間）した．熱処理後の上清を RT-PCR の鋳型として使用した．

ろ紙またはニトロセルロース膜を使用した方法および熱抽出法の 3 手法の比較を行うため，PVY 感染葉及び健全葉をそれぞれ 50 mg に対して氷冷した蒸留水 1 ml（各手法の半量）を加え，氷上で磨砕した．磨砕液は，遠心分離（2,500 × g，5 分間）により残渣を除去したのち，10 倍の段階希釈を行った．段階希釈液は，それぞれ 4 本のチューブに分注し，上記の 3 手法および Pure Link RNA Mini Kit（Thermo Fisher Scientific）で RNA を調製し，ワンステップ mRT-PCR 法の鋳型とした．RNA を調製する際，磨砕液に対して等量の各手法の 2 × 抽出バッファーを加えてから先述した方法に従って抽出した．ただし，Pure Link RNA Mini Kit は添付の 1 × 抽出バッファーを使用した．それぞれの方法で抽出した RNA 溶液 1 µl を供試し，ワンステップ mRT-

PCR 法でPVYと*EF1α*の検出感度を比較した．以上の比較試験は，3 反復実施した．

1. 試料（磨砕液）の調製

ジャガイモの葉を試料とする．

↓　Extraction buffer #2 を（葉25 mg に対して1 ml）加える．

磨砕する．（磨砕液）

2. 磨砕液からのRNA抽出

直径3 mmのろ紙を0.2 ml容のチューブに入れる．

↓　磨砕液 を100 µlを加える．

ピペッティングにより混和後，磨砕液は除去する．

↓　50%イソプロパノールを200 µl加える．

ピペッティングにより混和後，イソプロパノールは除去する．

↓　75%エタノールを200 µl加える．

ピペッティングにより混和後，エタノールは除去する．

↓　RNase-free水を50 µl加える．

熱処理（94°C, 5分間）により溶出する．

↓

上清（1 µl）をRT-PCRの鋳型として使用する．

↓

残りは－80°Cで保存する．

第 2-1 図　改変した簡易 RNA 調製法のフローチャート

Zou et al.（2017）の手法からの変更点は，下線で示した．

第 5 項　簡易 RNA 調製法における混入する DNA の影響の検証

ろ紙を用いた核酸の調製法では，ゲノム DNA と RNA の両方が抽出される（Zou et al. 2017）．今回設計した *EF1α* 検出プライマーによる増幅領域はイントロンを含んでいないため，開発した mRT-PCR 法ではゲノム DNA からも同様の増幅断片として検出される可能性がある．そこで，本簡易 RNA 調製法による RNA 溶液を鋳型とした場合の，ゲノム DNA 由来および RNA 由来の *EF1α* の増幅量を検証した．簡易 RNA 調製法で健全葉および各ウイルスの単独感染葉の磨砕液から RNA 溶液を調製した．調製した RNA 溶液はそれぞれ 2 つのチューブに分け，一方は DNase 処理に用い，もう一方は DNase 処理の比較として DNase/RNase-free 水で 10 倍希釈した．DNase 処理は，RQ1 RNase-free DNase I（Promega, Madison, WI, USA）を用いて行い，RNA 溶液 1 µl を加えた 10 µl の反応液中で行った．DNase 反応液は，37°C で 30 分間インキュベートしたのちに 65°C 10 分間熱処理することで DNase を不活化させ，その後ただちに 4°C まで急冷した．RNA 溶液の 10 希釈液も同様の温度処理をした．反応液は，それぞれ PCR および RT-PCR の鋳型として 1 µl ずつ供試した．PCR は，*TAKARA EX-Taq* DNA polymerase（Takara Bio）を用いて行い，反応液は製品マニュアルに従って調製した．PCR における各プライマーの濃度および反応条件は，ワンステップ mRT-PCR と同様とした．すなわち，各ウイルス特異的プライマーは 0.2 µM，*EF1α* 特異的プライマーは 0.4 µM となるように添加し，PCR 条件は，98°C で 10 秒および

64°C で 1 分を 35 サイクルとした. RT-PCR は第 3 項で記載した条件で行った.

第 6 項　開発した検定法と ELISA 法の検出感度の比較

開発した簡易 RNA 調製法とワンステップ mRT-PCR 法による検定法の検出感度を確認するため，現行法の ELISA 法と比較した. 葉の磨砕液の調製は ELISA 法に合わせて行い，ジャガイモの各ウイルス感染葉および健全葉を供試し，葉 50 mg に対して 0.05% Tween 20 を含むリン酸バッファー（pH 7.4）（PBST）を 1 ml 加えて磨砕したのち，健全葉の磨砕液を用いてウイルスを含む磨砕液の 10 倍の段階希釈液をそれぞれ作製した. 各希釈液は，2 本のチューブに分け，一方には 2 × Extraction buffer #2 を等量加えたのち RT-PCR 法による検出に用い，もう一方には General extraction buffer（GEB）（PBST に 0.13%（w/v）硫酸ナトリウム，2%（w/v） ポリビニルピロリドン K40，0.02% （w/v） アジ化ナトリウム，0.2%（w/v） 卵アルブミンおよび 2%（v/v） Tween 20 を加えた緩衝液）を等量加えたのち ELISA 法による検出に用いた. RT-PCR 法では，先述した簡易 RNA 調製法およびワンステップ mRT-PCR 法を用い，各ウイルスを検出した. ELISA 法は，各ウイルスの ELISA キット（Agdia Inc.， Elkhart， IN， USA）を用い，製品マニュアルに従って反応を行い，Infinite M200 Pro Multimode Microplate Reader (TECAN Group Ltd.， Männedorf， Switzerland)を用いて基質添加 30 分後および 60 分後に波長 405 nm の吸光度（A_{405}）を測定した. 磨砕液の作製か

ら検出までの一連の試験は，3 反復実施した.

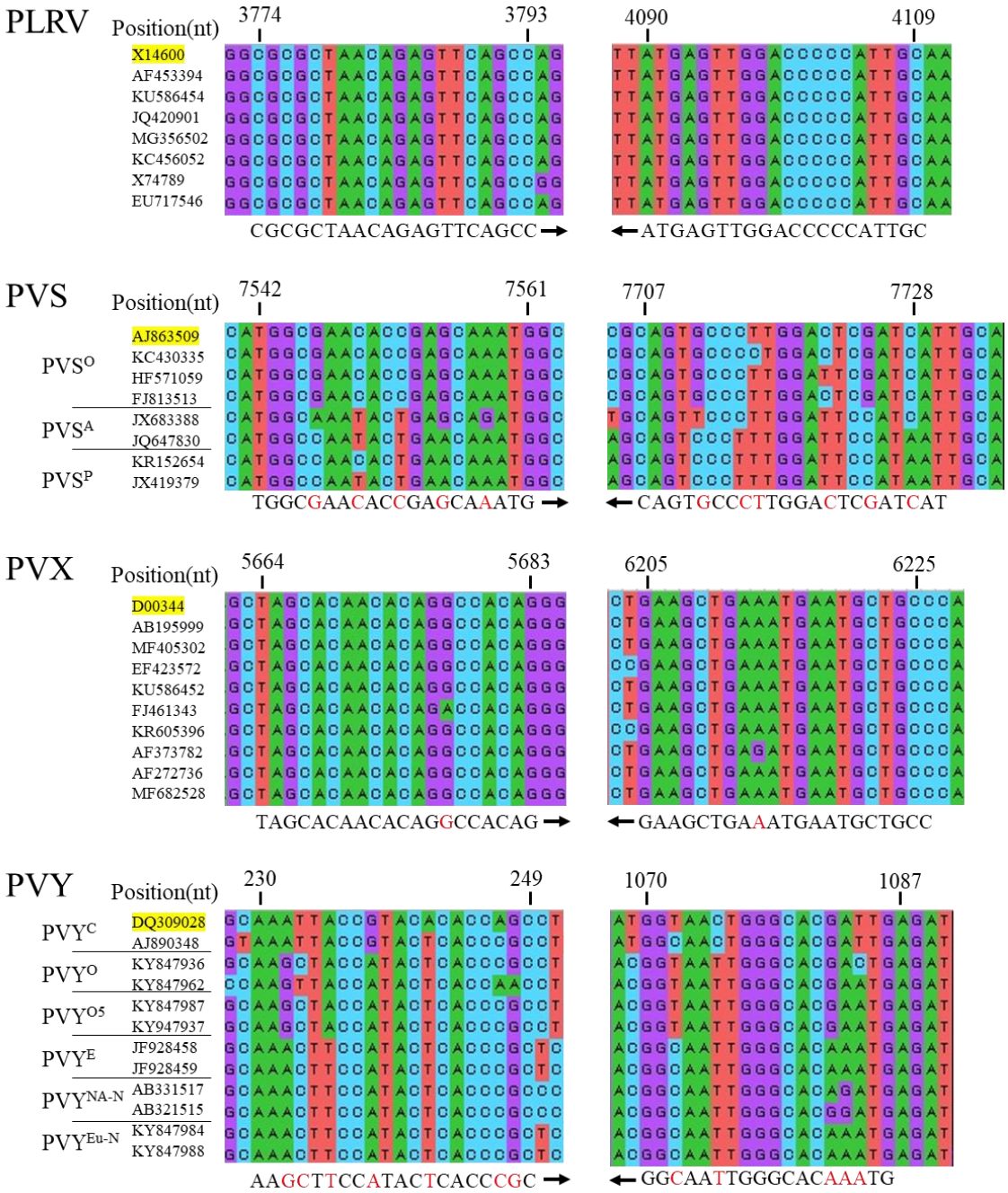
第 7 項　開発した検定法によるジャガイモ感染葉からの同時検出の確認

mRT-PCR 法では複数のプライマーが反応液中の成分を競合して増幅反応を行うことで同時検出が不安定になることから，ジャガイモウイルスの同時検出の可否を確認した．日本国内の種ばれいしょ検疫では，複数の葉をまとめて磨砕して1つの試料として供試している．そこで，葉 10 枚のうちウイルス感染葉1枚を含むことを想定したモデル試験を実施した．各ウイルス感染葉または健全葉 25 mg に対して Extraction buffer #2 を 1 ml 加えて磨砕したのち，任意のウイルスの組合せで各ウイルスの磨砕液が最終液量の 1/10 量となるように混和した．すなわち，PVS + PVY の試料であれば，PVS および PVY のそれぞれの磨砕液 20µl に対し，健全葉の磨砕液 160 µl を加えることで 2 種のウイルスを含む磨砕液 200µl を作製した．作製した各磨砕液から先述したろ紙を用いた簡易 RNA 調製法及びワンステップ mRT-PCR 法によりウイルスを検出した.

第 2 節　結果

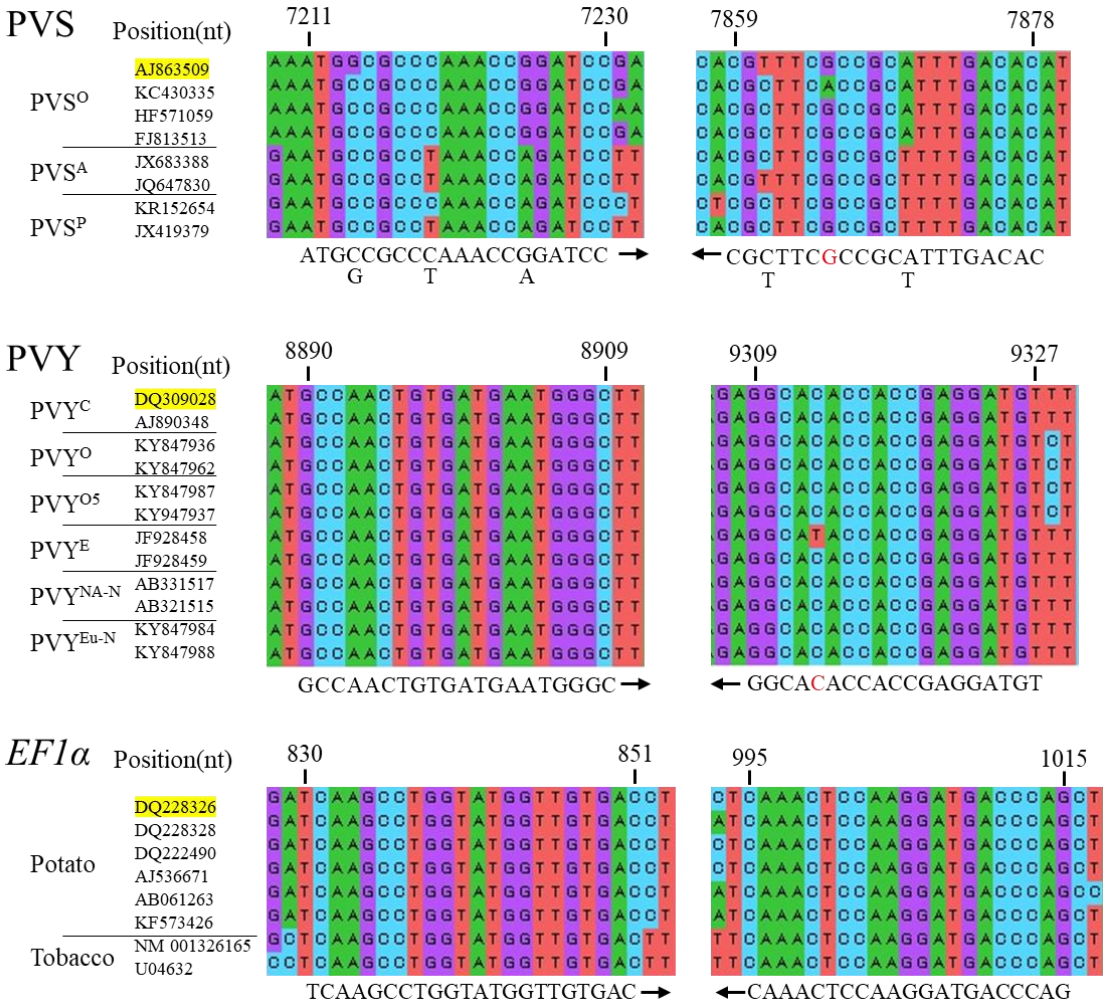
第 1 項　ワンステップ コンベンショナル mRT-PCR 法の開発

Bostan and Peker (2009)のプライマーを用いてツーステップ mRT-PCR により国内分離株の検出を試みたところ，PVS^{A} と PVY^{O} を検出できなかった（data not shown）．それぞれのウイルスについてアライメント解析したところ，ゲノム配列とプライマー配列にミスマッチが複数あることが明らかとなった（第 2-2 図）．一方で，PLRV と PVX の特異的プライマーは，いずれも比較したゲノム配列と一致しており，特異性に問題がないと考えられた．そのため，PVS と PVY の特異的プライマーは，外被タンパク質遺伝子（CP）の保存配列から新たに設計をした（第 2-3 図）．加えて，増幅反応の成否を確認するための内部標準とし，Elongation factor 1 alpha gene（*EF1α*）を検出するプライマーも設計した．以上より，第 2-2 表に示したプライマーを使用した．



第 2-2 図　既報プライマー（Bostan and Peker 2009）の結合位置とゲノム配列とのミスマッチの確認

アライメントの上部には，黄色でハイライトした配列におけるプライマーの結合領域の位置を示した．アライメントの下部には，プライマーの配列（リバースプライマーはその相補配列）とその方向（矢印）を示した．プライマー配列とゲノム配列の間にミスマッチのある塩基は赤字で示した．



第 2-3 図　新たに設計したプライマーの結合位置とゲノム配列とのミスマッチの確認

アライメントの上部には，黄色でハイライトした配列におけるプライマーの結合領域の位置を示した．アライメントの下部には，プライマーの配列（リバースプライマーはその相補配列）とその方向（矢印）を示した．プライマー配列とゲノム配列の間にミスマッチのある塩基は赤字で示した．

第 2-2 表　mRT-PCR 法に用いたプライマー

対象	方向	配列（5' - 3'）[a]	断片長（bp）	文献
PLRV	フォワード	CGC GCT AAC AGA GTT CAG CC	336	Singh et al.（1995）
	リバース	GCA ATG GGG GTC CAA CTC AT		
PVS	フォワード	ATGSCGC CYA AAC CRG ATCC	668	Vallejo et al.（2016）
	リバース [b]	GTG TCA AAW GCG GCG AAR CG		Onozuka et al.（2020）
PVX	フォワード	TAG CAC AAC ACA GGC CAC AG	562	Nie and Singh（2000）
	リバース	GGC AGC ATT CAT TTC AGC TTC		
PVY	フォワード	GCC AAC TGT GAT GAA TGG GC	438	Onozuka et al.（2020）
	リバース	ACA TCC TCG GTG GTG TGC C		
Potato	フォワード	TCA AGC CTG GTA TGG TTG TGAC	187	Onozuka et al.（2020）
	リバース	CTG GGT CAT CCT TGG AGT TTG		

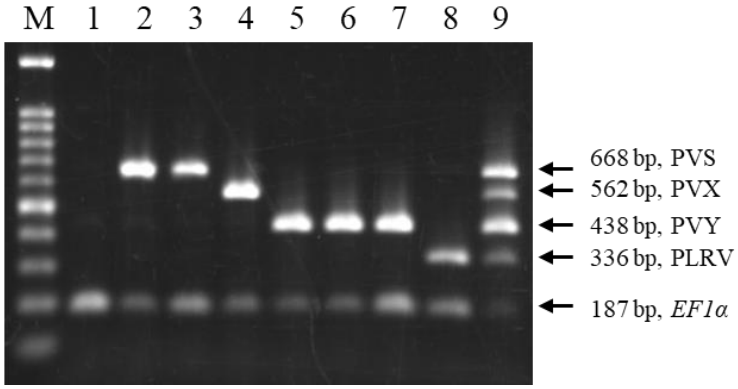
[a] 表中の塩基は，The International Union of Pure and Applied Chemistry（IUPAC）に従って記載した．ハイライトは，本研究で新たに設計したプライマーであることを示す．

[b] PVS のリバースプライマーは，Vallejo et al.（2016）のリバースプライマーから 2 塩基を置換させて設計した．

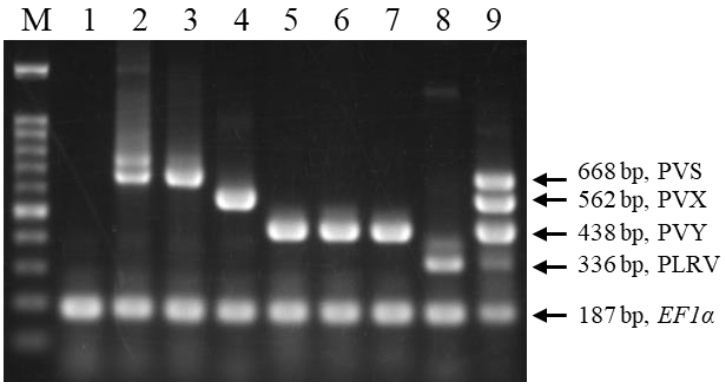
次に，ツーステップ mRT-PCR 法を用いて PCR の反応条件を検討した．予備試験において，通常の PCR 法と比較し，アニーリングと伸長を同時に行うシャトル PCR 法は電気泳動解析における増幅産物の量が多かったことから，シャトル PCR 法を採用した．アニーリングー伸長を行う温度を 62°C から 68°C まで 2°C 毎に特異的および非特異的な増幅を比較したところ，64°C で最も良い結果が得られた．それよりも高い温度では，PVS の増幅産物の量が減少し，それよりも低い温度では非特異的な増幅産物が多くなった．最適化した PCR 条件により，国内で発生が確認されている PVS の 2 系統，PVS^{O} および PVS^{A}，PVY の 3 系統，PVY^{O}，$PVY^{NA\text{-}N}$ および PVY^{NTN} を含む各ウイルスの分離株を検出することができ，かつ，4 ウイルスを同時に検出できた（第 2-4 図 A）．ウイルス由来の増幅量が多い場合，*EF1α* の増幅量が減少する傾向が見られ，4 種のウイルスを同時検出時が最も顕著であったが，内部標準を添加した目的から，ウイルスよりも増幅効率が低い点は問題ないと判断した．さらなる省力化を図るため，ワンステップ mRT-PCR 法を採用可能であるか検証した．なお，使用したワンステップ RT-PCR キットの酵素に合わせてアニーリングー伸長時間を 30 秒から 60 秒へと変更した．この結果，同様の条件で各ウイルス分離株の単独検出および4ウイルスの代表株の同時検出ができた（第 2-4 図 B）．ワンステップ mRT-PCR 法では，ツーステップ mRT-PCR 法と異なり，ウイルス検出時においても，*EF1α* の増幅量の減少は見られなかった．ツーステップ mRT-PCR 法と比べ、若干の非特異産物の増幅が確認さ

れたが，増幅産物の断片長が異なっており、ウイルスの検出に支障がないと考えられた．PVS と PVY は系統にかかわらず検出できたことから，以降の試験にはそれぞれ PVS^{O}（分離株 M）と PVY^{NTN}（Eu-12Jp）を代表株として使用した．

A）ツーステップ コンベンショナル mRT-PCR 法



B）ワンステップ コンベンショナル mRT-PCR 法



第 2-4 図 mRT-PCR 法による主要なジャガイモウイルス 4 種の検出

PureLink RNA mini kit で抽出した Total RNA100 ng を鋳型とし，A) ツーステップステップ コンベンショナル mRT-PCR 法および B) ワンステップ コンベンショナル mRT-PCR 法でジャガイモウイルスを検出した. レーン：M，100 bp DNA ラダーマーカー； 1， ジャガイモの健全葉（品種：男爵薯）； 2， PVS（分離株：M）； 3， PVS（ChS_3）； 4， PVX（O-IC249）； 5，PVY（Y28） ； 6， PVY（NTND6）； 7， PVY（Eu-12Jp）； 8， PLRV（ChLR_2）； 9， PVS（分離株：M），PVX（O-IC249），PVY（Eu-12Jp）および PLRV（ChLR_2）の Total RNA の混合液.

第 2 項　ろ紙を用いた簡易 RNA 調製法の最適化

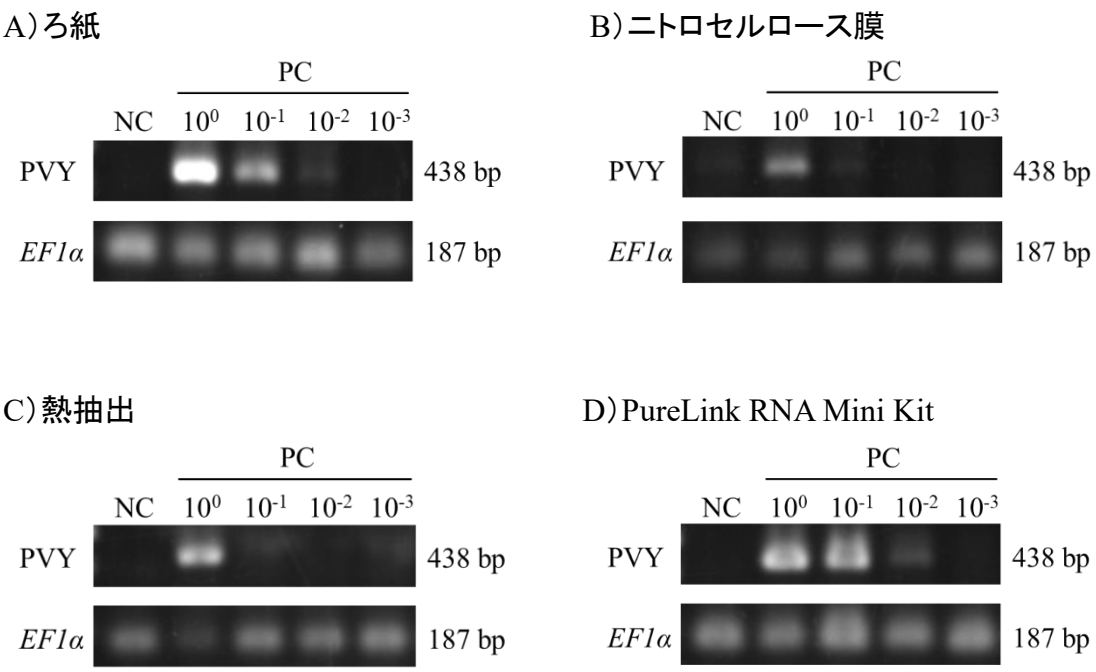
Zou et al.（2017）の手法を参考とし，RNA 溶液が保存できるように全ての手順を1つの PCR チューブ内で行うように変更し，洗浄後にろ紙から RNA を溶出するための熱処理の手順を追加した（第 2-1 図）．改変プロトコルでは，磨砕液をチューブから除去したのちにろ紙のディスクを Zou ら（2017）の Wash buffer で洗浄したところ，ワンステップ mRT-PCR による検出感度が反復間で安定しなかった．安定しなかった原因は，阻害物質の除去が不十分であること，および，洗浄中に RNA が Wash buffer 中に溶出していることが考えられたため，より適した洗浄溶媒を検討した．Shi and Panthee（2017）は，ろ紙を用いた DNA 調製法において，70%（v/v）エタノールによる洗浄でも十分にタンパク質や夾雑物を除去できると報告している．また，Extraction buffer #2 に含まれるタンパク質変性剤であるグアニジンイソチオシアネートはアルコールに可溶であるため，アルコールは洗浄溶媒として適していると思われた．ただし，Shi and Panthee（2017）の手法は DNA を対象としており，RNA は DNA に比べるとより親水性が高いため，RNA のアルコール沈殿を参考として 50%（v/v）イソプロパノールと 75%（v/v）エタノールで洗浄するように変更した．この結果，Wash buffer と比較し，安定して各ウイルスを検出でき，検出感度が 10 倍向上した（第 2-3 表）．ウイルス種の違いによる RNA 抽出効率の差は少ないと思われたため，以降の調製法の検証では PVY のみを供試した．

第 2-3 表　洗浄溶媒による各ウイルスの検出感度の比較

ウイルス	洗浄 [a]	陽性数 / 反復回数					検出感度 [b]
		10^{0}	10^{-1}	10^{-2}	10^{-3}	10^{-4}	
PLRV	W	4/4	2/4	0/4	nt[c]	nt	10^{0}
	A	4/4	4/4	1/4	nt	nt	10^{-1}
PVS	W	4/4	4/4	2/4	0/4	nt	10^{-1}
	A	4/4	4/4	4/4	0/4	nt	10^{-2}
PVX	W	4/4	4/4	4/4	3/4	0/4	10^{-2}
	A	4/4	4/4	4/4	4/4	0/4	10^{-3}
PVY	W	6/6	6/6	1/6	0/6	nt	10^{-1}
	A	6/6	6/6	6/6	0/6	nt	10^{-2}

[a] “W”は Wash buffer（Zou et al. 2017），“A”は2種のアルコールで洗浄したことを示す.
[b] 検出感度は，全反復でウイルスが検出された最も濃度の低い希釈段階を示した.
[c] 試験を行っていない（not tested）.

最適化した簡易 RNA 調製法について，用いた担体（ろ紙）の妥当性を検証するため，ニトロセルロース膜と検出感度を比較した．また，熱処理した粗汁液を直接鋳型として使用する熱抽出法や，市販のスピンカラムのキット（PureLink RNA Mini Kit）と検出感度を比較した．その結果，ろ紙を用いた手法は，ニトロセルロース膜を用いた手法および熱抽出法に比べて 10 倍検出感度が高く，PureLink RNA Mini Kit と同程度の検出感度であった（第 2-5 図）．したがって，開発した RNA 調製法は，mRT-PCR 法による検定に使用するのに十分な RNA の収量があることが明らかとなった.

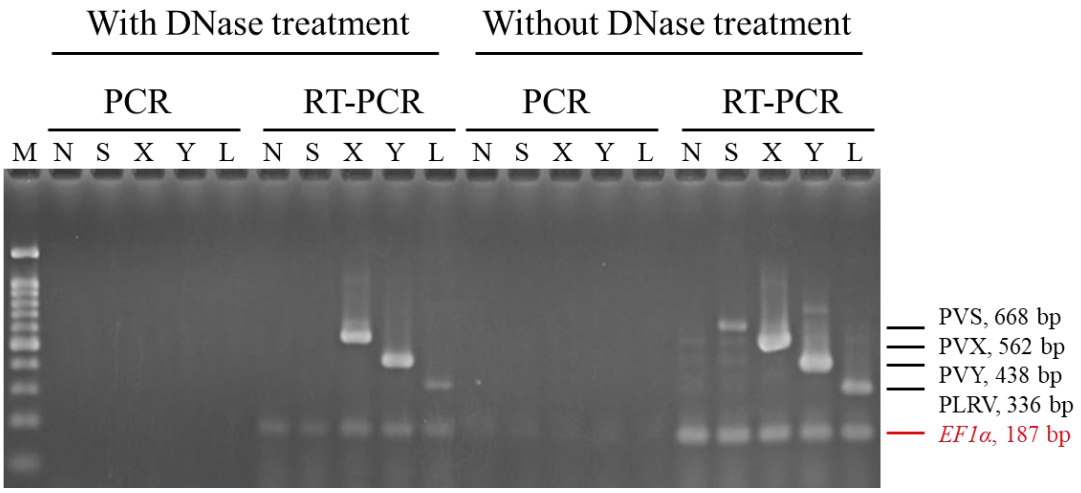


第 2-5 図　開発した簡易 RNA 調製法の妥当性の検証

PVY を含む磨砕液の希釈系列から，A）最適化したろ紙を用いた手法，B）ろ紙の代わりにニトロセルロース膜を使用した手法，C）熱抽出法および D）PureLink RNA Mini Kit でそれぞれ抽出した RNA 溶液 1 µl を鋳型とし，ワンステップ コンベンショナル mRT-PCR 法で PVY と *EF1α* を検出した．NC はジャガイモの健全葉，PC は PVY を含む磨砕液の希釈系列（10^{0}～10^{-3}）を示した．

第 3 項　簡易 RNA 調製法における混入 DNA の影響の検証

内部標準として設計した *EF1α* 特異的プライマーは，標的遺伝子のゲノム配列においてイントロンを挟んでいないため，ゲノム DNA 由来の標的遺伝子も同様に 187 bp の断片長で検出される．また，ろ紙には RNA だけでなく DNA も吸着されるため，簡易 RNA 調製法では DNA も抽出される．そのため，簡易 RNA 調製法とワンステップコンベンショナル mRT-PCR 法を組み合わせた検定法では，内部標準遺伝子に関してゲノム DNA 由来と mRNA 由来の増幅産物を区別することはできない．そこで，ゲノム DNA 混入による *EF1α* の mRNA の検出への影響を調べるため，DNase 処理の有無および逆転写反応の有無による増幅を比較した（第 2-6 図）．その結果，DNase 処理した場合，PCR による *EF1α* 増幅は認められず，RT-PCR により *EF1α* が検出された．一方，DNase 処理をしなかった場合，すなわち DNase/RNase-free 水で希釈したのちに加温処理のみ行った場合，PCR ではわずかに *EF1α* が検出されたのに対し，RT-PCR では明瞭な増幅が確認できた．以上の結果より，簡易 RNA 調製法の RNA 溶液を鋳型に用いた場合，ゲノム DNA 由来の増幅はわずかで，主として mRNA 由来の増幅産物が検出されていると考えられる．ただし，DNase 処理の有無による mRT-PCR 法による増幅量を比較すると，DNase 処理区では *EF1α* だけでなくウイルス特異的な断片の増幅量が減少していた．

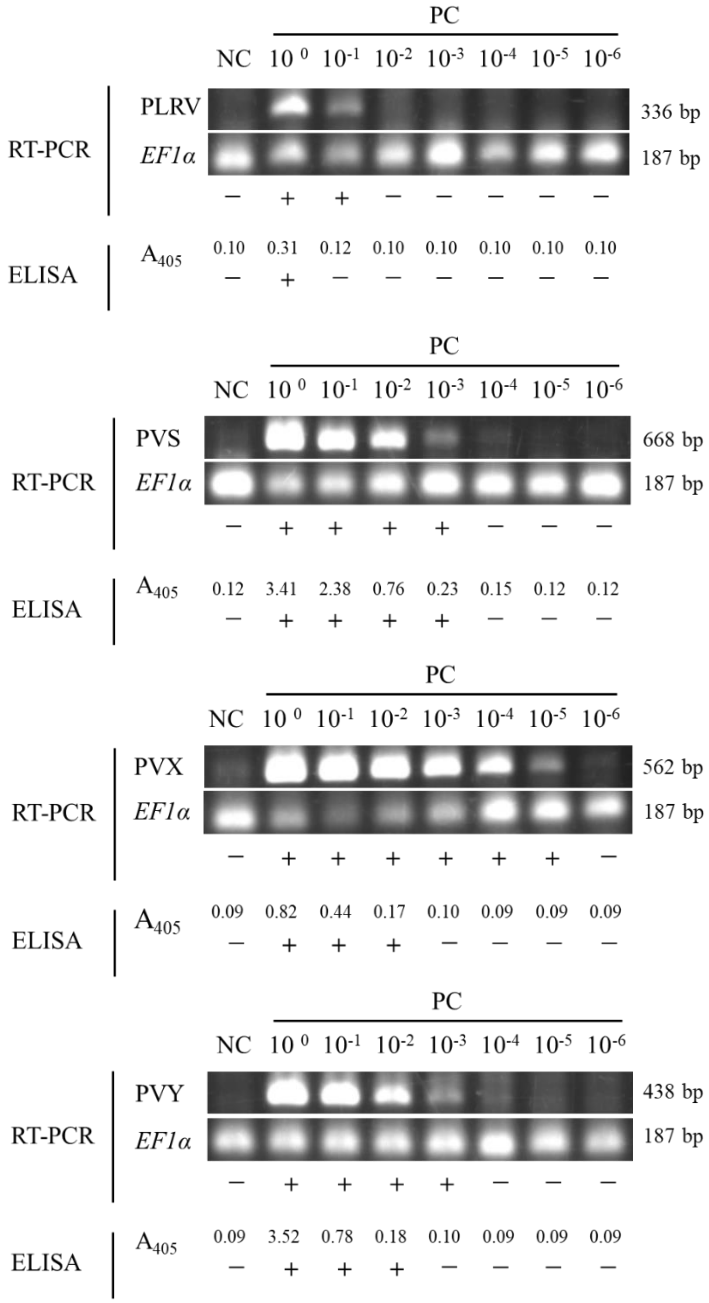


第 2-6 図 DNA コンタミネーションによる mRT-PCR 法での検出への影響

ジャガイモの健全葉および各ウイルス感染葉の磨砕液から簡易調製法を用いて RNA 溶液を調製した. 調製した RNA 溶液 1µl を(**With DNase treatment**)RQ1 RNase-free DNase I(Promega)の反応液 9 µl または(**Without DNase treatment**) DNase/RNase-free 水 9 µl に添加し, マニュアルに従って DNase 処理を行った. 各反応液は 1 µl を PCR および RT-PCR の鋳型として用いた. PCR は, ワンステップ RT-PCR キットに含まれている酵素と同じ *TAKARA Ex-Taq* DNA polymerase(TAKARA Bio)を用い, 98°C で 10 秒および 64°C で 1 分間の 35 サイクルで行い, RT-PCR 法は最適化したワンステップ mRT-PCR 法で行った. レーン; N, 健全葉; S, PVS 感染葉; X, PVX 感染葉; Y, PVY 感染葉; L, PLRV 感染葉.

第 4 項　開発した検定法と ELISA 法の検出感度の比較

簡易 RNA 調製法とワンステップ mRT-PCR 法を用いた新たな検定法の各ウイルスに対する検出感度を確認するため，現行法である ELISA 法と比較した（第 2-7 図）．その結果，ELISA 法は，PLRV，PVS，PVX および PVY をそれぞれ 10^{-0}，10^{-3}，10^{-2} および 10^{-2} まで検出可能であったのに対し，新たな検定法は，それぞれ 10^{-1}，10^{-3}，10^{-5} および 10^{-3} まで検出可能だった．したがって，新たな検定法は，ELISA 法に比べ，PVX で 1,000 倍，PLRV と PVY で 10 倍検出感度が高く，PVS で同等の検出感度であった．

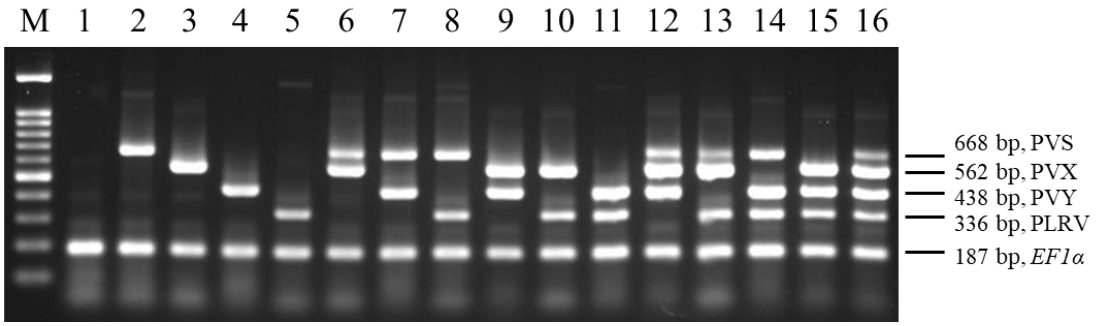


第 2-7 図　開発した検定法と ELISA 法の検出感度の比較

RT-PCR 法では，明瞭なバンドが得られた試料を陽性とし，ELISA 法では健全試料の 1.5 倍以上の吸光値（A_{405}）を示した試料を陽性とした．判定結果は，陽性（+）および陰性（－）で示した．

第 5 項　開発した検定法によるジャガイモ感染葉からの同時検出の確認

新たに開発した検定法による 4 種のジャガイモウイルスの同時検出の可否を確認した. 国内の種ばれいしょ検疫では, ジャガイモの葉 10～20 枚程度をまとめて1試料として検定に供試している. このことから, ジャガイモの葉 10 枚のうち各ウイルス感染葉 1 枚が含まれていることを想定したモデル試験を行った（第 2-8 図）. その結果, 開発した検定法は, 任意の組合せで4種のウイルスを同時検出可能である.



第 2-8 図　開発した検定法を用いたモデル試験における4種のウイルスの同時検出
レーン; M, 100 bp ラダーマーカー; 1, 健全葉; 2, PVS; 3, PVX; 4, PVY; 5, PLRV; 6, PVS + PVX; 7, PVS + PVY; 8, PVS + PLRV; 9, PVX + PVY; 10, PVX + PLRV; 11, PVY + PLRV; 12, PVS + PVX + PVY; 13, PVS + PVX + PLRV; 14, PVS + PVY + PLRV; 15, PVX + PVY + PLRV; 16, PVS + PVX + PVY + PLRV.

第 3 節　考察

今回，種ばれいしょ検疫での利用を想定し，簡易 RNA 調製法とワンステップ mRT-PCR 法による省力的な検定法を開発した．

Bostan and Peker (2009)の PVS 特異的プライマーと PVY 特異的プライマーは，分離株によってミスマッチが存在しており，一部の分離株を検出できなかった．PVS はゲノム配列の多様性が比較的高く，CP の pairwise distance は平均 0.20 であったため，縮合塩基（degenerated nucleotide）を用いることでミスマッチを 8 配列中１配列に対して 1 つのみとすることができた．PVY は，PVS と同様にゲノム配列により複数の系統に分類されるが，系統間で CP 内に保存された塩基配列も存在していたため，縮合塩基を使うことなく設計することが可能であった．PLRV と PVX については，CP の塩基配列の多様性は低く，検証したプライマーは PVX 特異的プライマー2 種で1つずつミスマッチがあったのみでゲノム配列と一致していた．以上より，主要な4種のジャガイモウイルスのプライマー設計については，特に PVS と PVY のゲノム配列の多様性に考慮する必要がある．国内の原原種ばれいしょ生産において，年間におよそ 10 万塊茎がウイルス病検定に供試されているが，そのほとんどは陰性である．現行法の ELISA 法に比べ，RT-PCR 法では扱う容量が小さく，鋳型や酵素の入れ忘れといった人為的なミスが起きやすい．そのため，増幅反応の成否を判定できる内部標準が重要となる．定量 PCR の内部標準を探索する研究において，ジャガイモのハウスキー

ピング遺伝子 7 種のうち，*EF1α* は生物的および非生物的なストレス条件下において最も安定して発現していることが報告されている（Nicot et al. 2005）．組織別の発現量を比較しても，塊茎の細胞内ではわずかに発現量が低いことを除いてジャガイモ植物内において安定して発現していることも報告されている（Kumar et al. 2017）．上記の2つの報告により，*EF1α* はジャガイモ内で安定して一定量の発現量があると考え，検出の内部標準遺伝子として選出した．

ツーステップ mRT-PCR 法では，ウイルス検出時に内部標準の増幅量が減少する傾向があった．ウイルスゲノムに比べて *EF1α* の mRNA のコピー数が少ない可能性が考えられ，ウイルスの検出を阻害することなく，このことからも内部標準として妥当と考えられた．ワンステップ mRT-PCR 法は，ツーステップ mRT-PCR 法と異なり，逆転写で合成された cDNA を全て PCR に持ち越すことができるため，各標的の増幅量が増加し，ツーステップ mRT-PCR 法で見られたウイルス検出時における *EF1α* の増幅量の減少は見られなかった．一方で，非特異的な断片が増加したが，非特異的な断片は，1.5%から 2.0%のアガロースゲルを用いた際，50V で 30 分間の電気泳動解析で十分に分離可能なサイズであった．

ELISA 法では粗汁液をそのまま試料として使用できるのに対し，RT-PCR 法では粗汁液から RNA を抽出する必要となるため，簡便な RNA 調製法は必要不可欠であった．本研究では，Zou et al.（2017）のろ紙を用いた手法を RNA 溶液が保存できるよ

うに改良した．本法は，ELISA 法と同様にピペッティング操作のみで実施可能できるため，遠心操作を必要とする市販の抽出キットに比べ，省力的に多検体から鋳型を調製できる．そのため，大量の塊茎を検定している種ばれいしょ検疫で用いる RNA 調製技術として適していると考えられる．ろ紙から RNA を溶出する条件を検討した際，熱処理を 15 分行うと mRTR-PCR 法によるジャガイモウイルスの検出感度が低下した．同様に，凍結保存後に再度熱処理に溶出すると，熱処理せずに氷上で融解した時に比べ，検出感度が低下した．このことから，調製した RNA 溶液は，RNA の分解を防ぐために氷上で扱う必要がある．

簡易 RNA 調製法とワンステップコンベンショナル mRT-PCR による検定法の各ウイルスに対する検出感度は，現行法の ELISA 法と同等あるいはそれ以上であることが示された．このことから，開発した検定法は十分な検出感度を示す現行法に代わる新たな検出技術であると考えられる．今回の検出感度の比較試験では，各ウイルスを単独に検出した場合の比較であり，混合感染株における各ウイルスの濃度差によってはいずれかのウイルスが検出できなくなる可能性がある．しかしながら，少なくとも，今回行ったモデル試験の結果，葉 10 枚のうちウイルス感染葉1枚が含まれていても同時に検出できた．内部標準の検出に関して，設計した *EF1α* 特異的プライマーはゲノム DNA 由来と mRNA 由来の増幅産物を識別できないが，簡易 RNA 調製法により混入する DNA による mRNA 検出への影響は少なかった．ただし，DNA を除去す

るために DNase 処理を行うと，RT-PCR におけるウイルス由来の断片の増幅量が減少し，PVS は検出されなくなった．原因の究明はできていないが，調製した RNA 溶液は DNase 処理をせずに用いるのが妥当であると考えられる．

ジャガイモウイルスを標的としたマルチプレックス RT-PCR は多数あるが（Nie and Singh 2000; Du et al. 2006; Bostan and Peker 2009; Kumar et al. 2017; Zhang et al. 2017），主要な 4 種のジャガイモウイルスを対象として含む手法は 2 つのみであった（Du et al. 2006; Bostan and Peker 2009）．本研究では検証を行っていないが，Du et al.（2006）の手法は主要な 4 種のジャガイモウイルスに加え，potato virus A と内部標準として 18S rRNA を標的としており，6 つの標的の増幅産物は 116 bp から 342 bp とサイズに差が少なく，非特異的な増幅産物があった場合に識別が困難になることが懸念された．また，ジャガイモウイルスを対象とした 5 手法ともに，逆転写反応と PCR を別のチューブ内で行っているため，ピペッティング操作が増えることによる労力やクロスコンタミネーションの懸念があった．本研究で開発した手法は，増幅産物は概ね 100 bp 離れるように設計されており，ワンステップ mRT-PCR 法を採用しているためより省力的にウイルスを検出できる．そのため，多数の試料を検定する種ばれいしょ検疫やほ場調査などに有効である．

第2章　リアルタイム mRT-PCR 法の開発

第 1 章で開発した簡易 RNA 調製法とワンステップ コンベンショナル mRT-PCR 法は，サーマルサイクラーのみで実施できるため汎用性が高い反面，試料数が多い場合に電気泳動解析に多くの労力を要することが課題であった．そこで，より省力化を図るため，リアルタイム PCR システムを用いた検出技術を開発した．リアルタイム PCR を用いた検出法は，配列非特異的に二本鎖 DNA（dsDNA）結合する蛍光色素を用いる手法（インターカレーター法）と蛍光標識された配列特異に結合するプローブを用いる手法（TaqMan 法）の２種類に分類される．インターカレーター法に用いられる DNA 染色蛍光色素は，配列非特異的に dsDNA 取り込まれることで励起光を照射することにより蛍光を発するようになり，dsDNA が一本鎖 DNA（ssDNA）に解離する際に放出されて励起光を照射しても蛍光を発しなくなる．この性質を利用し，PCR 中に蛍光量の増幅量（増幅曲線）と PCR 後に dsDNA を解離させた時の蛍光量の減少量（融解曲線）を解析することで，目的遺伝子の検出と増幅産物の特異性の解析を行うことができる．また，増幅産物の融解温度を変えることで，複数の増幅産物を同時に検出することも可能である．そのため，同時検出を目的とする場合，TaqMan 法では複数の蛍光標識プローブが必要であるのに対し，インターカレーター法は，必要な蛍光色素は１種で十分であり，安価な試薬を用いて下位モデルのリアルタイム PCR システムでも実施できる利点がある．そこで，本研究では融解曲線解析を利用したイン

ターカレーター法による主要な 4 種のジャガイモウイルスの同時検出法の開発を目標とした．インターカレーター法による植物ウイルスの同時検出技術は報告が少なく（Cheng et al. 2013; Huo et al 2015; Alosio et al. 2018），ジャガイモウイルスを対象とする手法は 1 例のみ報告されている（Cheng et al. 2013）．Cheng et al. (2013)の手法は，主要な 4 種のジャガイモウイルスを対象として各ウイルスの増幅産物の融点がおよそ 2°C 異なるように設計されているが，プライマー設計では各ウイルスから 1 分離株のみしか参照されておらず，ウイルスのゲノム配列の多様性が十分に検証されていない．Aloisio et al. (2018)の報告によると，ブドウの病原ウイルスでは，分離株によって 1°C 程度増幅産物の融点が変化している．そのため，プライマーの特異性や増幅産物の融点の重複を検証する必要があった．加えて，植物ウイルスの同時検出技術では，いずれも逆転写と PCR を独立した反応で行っているが，この 2 つの反応を 1 つのチューブ内で行うワンステップ RT-PCR を採用することでより省力化が期待できる．そのため，全ての分離株が検出できるようにプライマー配列の特異性及び PCR 産物の融点を検証し，インターカレーター法によるワンステップリアルタイム mRT-PCR 法を開発した．

第 1 節　材料と方法

第1項　ジャガイモウイルス

第 2-1 表に示したウイルス分離株を供試した. ウイルス増殖法, 感染の確認および保管方法も第 1 章で示したとおりである.

第 2 項　プライマーの設計

第 1 章と同様, ゲノム配列の取得, 保存配列の決定およびプライマーの Tm 値の確認を行った. 増幅産物の Tm 値は, uMelt batch software（DNA-UTAH.ORG, https://dna-utah.org/index.html）用いて計算し, 各オプションは次のとおり設定した, 30 mM mono cation, 1.2 mM free Mg^{2+}, 10% DMSO（dimethyl sulfoxide）, “Huguet et al.（2010）”thermodynamic library および“Medium （0.5°C）”resolution. これらのオプションは, オプションを最適化する前に設計したプライマーによる増幅産物の塩基配列とその Tm 値を用いて調整した.

第 3 項　ワンステップ リアルタイム mRT-PCR 法の開発

ウイルス分離株は PLRV（分離株: ChLR_2）, PVS（M）, PVX（O-IC249）および PVY（Eu-12Jp）を使用し, 各ウイルス感染葉および健全葉から第 1 章で開発した簡易 RNA 調製法を用いて RNA 溶液を調製した. PrimeScript One step RT-PCR kit ver. 2

（Takara Bio）を用い，ワンステップ リアルタイム mRT-PCR 法は反応液量 10 µl で行った．反応液の組成は，RNA 溶液 1 µl（全核酸 5ng 程度），1 × EvaGreen（Biotium Inc., CA, USA），0.1 × ROX Reference Dye（Thermo Fisher Scientific），1 × 1 Step buffer および 1 × Prime Script 1 Step Enzyme Mix である．各プライマーの濃度は 0.2 µM を基準とし，各ウイルスの単独検出時および同時検出時の融解曲線における特異的なピークの高さをもとに，増減させて調整した．同時検出に用いた RNA 溶液は，各ウイルスの感染葉の磨砕液を等量ずつ混和し，簡易 RNA 調製法を用いて調製した．リアルタイム PCR システムは，QuantStudio 3（Thermo Fisher Scientific）を使用し，反応条件は使用機種のソフトフェア“Design and Analysis New（DA2）”を用いて第 1-4 表のとおりに設定した．検出結果である増幅曲線および融解曲線は，“DA2”を用いて解析した．

計算した増幅産物の Tm 値の妥当性は，第 2-1 表に示したウイルス分離株の計算値と測定値を用いて検証した．測定値は 3 反復の平均値を用いた．両者の相関は，Microsoft Excel 365 を用いて演算した回帰直線の相関係数（R^2）によって確認した．ウイルス診断の可否を検証するため，PVS と PVY の系統を考慮してランダムに NCBI のデータベースから取得した配列の Tm 値を計算し，各ウイルスの Tm 値の変動幅を推定した．

第 2-4 表　QuantStudio3 による反応プログラム

反応	逆転写		PCR（40 サイクル）		融解曲線解析			
	合成	変性	変性	結合-伸長	変性	結合	融解 [b]	保持
温度	50°C	95°C	95°C	58°C	95°C	60°C	0.03°C /sec	95°C
時間	5 min	10 sec	5 sec	31 sec	15 sec	15 sec		1 sec
計測 [a]				✓			✓	

[a] 蛍光強度の計測の設定を行った反応段階（✓）を示した.

[b] 融点を測定するため，60°C から 95°C まで 0.03°C/sec で温度を上昇させた.

第 4 項　各ウイルスの検出感度の確認

ウイルス分離株は，PLRV（分離株：ChLR_2），PVS（M），PVX（O-IC249）および PVY（Eu-12Jp）を使用した. 各ウイルス感染葉の磨砕液は，健全葉の磨砕液を用いて 10 倍の段階希釈を行い，各希釈液から簡易 RNA 調製法を用いて鋳型を調製した. 検出および結果の解析は先述した方法で行った.

第 2 節　結果

第 1 項　プライマーの設計

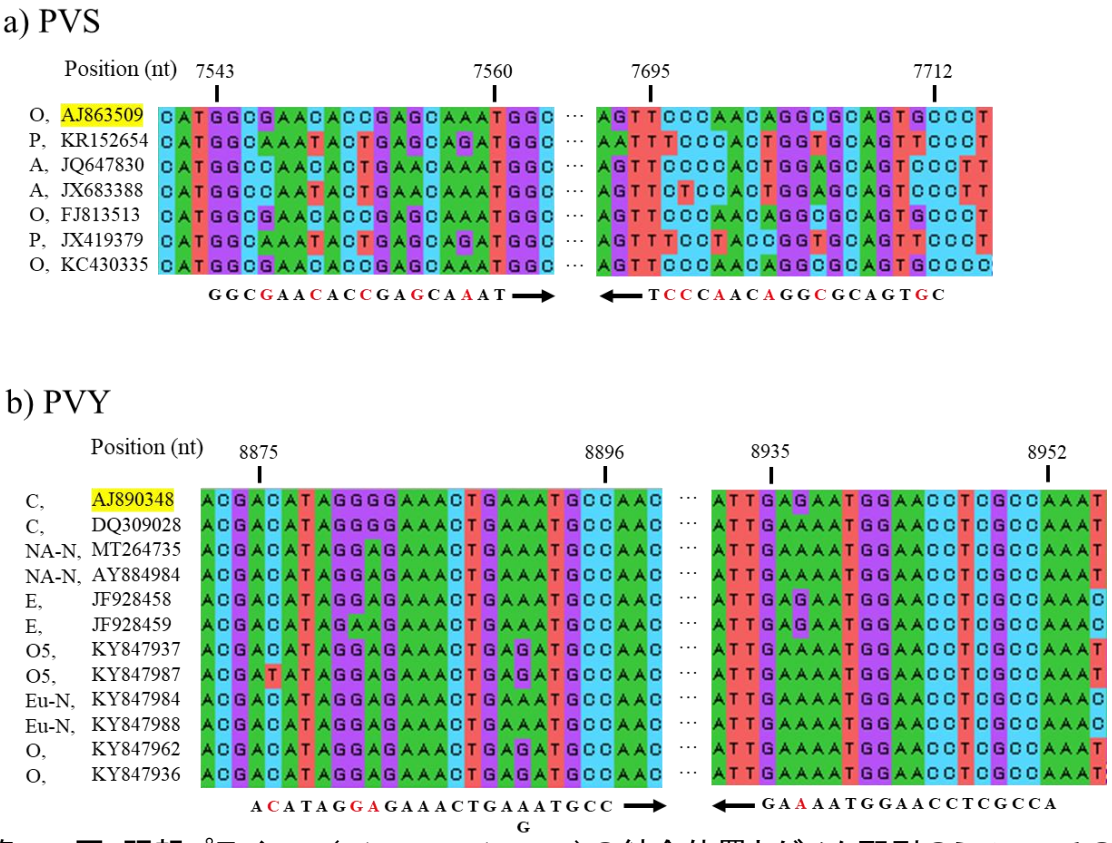
第 1 章での結果から PVS と PVY のゲノム配列の多様性を考慮し，既報の主要な 4 種のジャガイモウイルスを標的としたプライマー（Cheng et al. 2013）の特異性を検証するためにアライメント解析を行った．その結果，PVY 特異的プライマーは各系統のゲノム配列と一致していたが，PVS 特異的プライマーは PVS^A と PVS^P のゲノムとのミスマッチが多く，検出できない可能性が考えられた（第 2-9 図）．そこで，報告されている全 3 系統に対応するため，PVS 特異的プライマーを縮重塩基（degenerate nucleotide）を用いてミスマッチを1つとなるよう新たに設計した（第 2-10 図）．設計した PVS 特異的プライマーによる増幅産物は，Cheng et al.（2017）の他のウイルス特異的プライマーによる増幅産物と Tm 値が重複することが想定されたため，各増幅産物の Tm 値が 2°C 以上離れるように他のウイルスプライマーも全て新たに設計した（第 2-5 表）．

第 2-5 表　ワンステップ リアルタイム mRT-PCR 法に用いたプライマー

対象	方向	配列 (5' - 3') [a]	濃度 (μM) [b]	断片長 (bp)	計算した増幅産物の Tm 値 (°C)
PLRV	フォワード	AAGAAGGCAATCCCTTCG	0.25	155	87.5
	リバース	ATGTCTCGCTTGAGCCTC			
PVS	フォワード	TCGTBTGGAATTACATGCTMG	0.50	102	81.0–82.5
	リバース	ATCAAATGTGTCAAAWGCGG			
PVX	フォワード	TTCGACTTCTTCAATGGAGTC	0.11	189	84.5
	リバース	TCCAGTGATACGACCTCG			
PVY	フォワード	TGAAAATGGAACCTCGCC	0.14	129	78.0–79.0
	リバース	AATGTGCCATGATTTGCC			
Potato (*EF1α*)	フォワード	TACTCCAAGGCTAGGTATGATG	0.22	74	74.0–75.0
	リバース	TCAGGGTTGTAACCGACC			

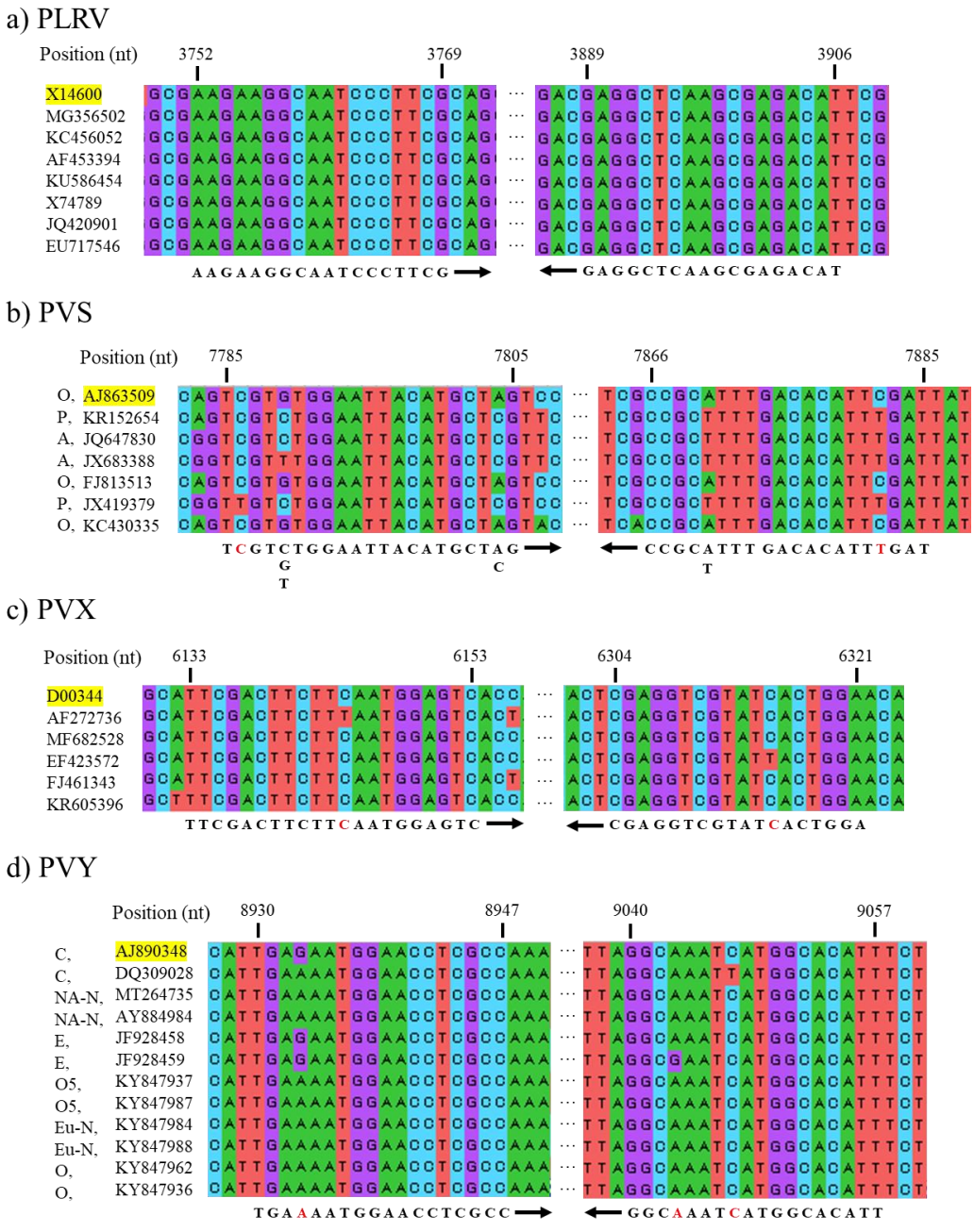
[a] 表中の塩基は，The International Union of Pure and Applied Chemistry（IUPAC）に従って記載した.

[b] 反応液中の濃度を示す.



第 2-9 図 既報プライマー（Cheng et al. 2013）の結合位置とゲノム配列のミスマッチの確認

アライメントの上部には，黄色でハイライトした配列におけるプライマーの結合領域の位置を示した．アライメントの下部には，プライマーの配列（リバースプライマーはその相補配列）とその方向（矢印）を示した．プライマー配列とゲノム配列の間にミスマッチがある塩基は赤字で示した．各ウイルスの系統について，PVS は O（PVS^{O}），P（PVS^{P}）および A（PVS^{A}），PVY は C（PVY^{C}），NA-N（$PVY^{NA\text{-}N}$），E（PVY^{E}），O5（PVY^{O5}）Eu-N（$PVY^{Eu\text{-}N}$）および O（PVY^{O}）と略称で示した．

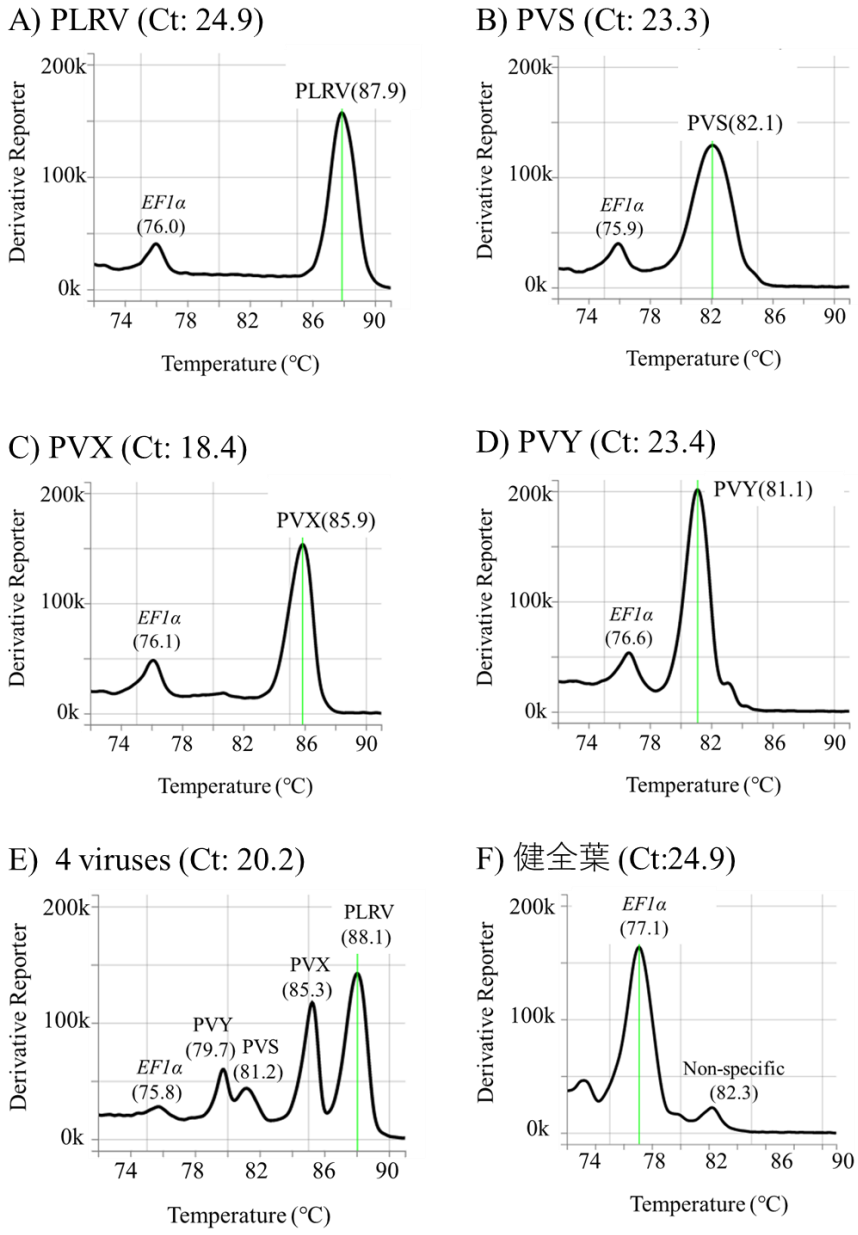


第 2-10 図　新たに設計したプライマーの結合位置とゲノム配列のミスマッチの確認
アライメントの上部には，黄色でハイライトした配列におけるプライマーの結合領域の位置を示した．アライメントの下部には，プライマーの配列（リバースプライマーはその相補配列）とその方向（矢印）を示した．プライマー配列とゲノム配列の間にミスマッチがある塩基は赤字で示した．各ウイルスの系統について，PVS は O（PVS^{O}），P（PVS^{P}）および A（PVS^{A}），PVY は C（PVY^{C}），NA-N（PVY^{NA-N}），E（PVY^{E}），O5（PVY^{O5}）Eu-N（PVY^{Eu-N}）および O（PVY^{O}）と略称で示した．

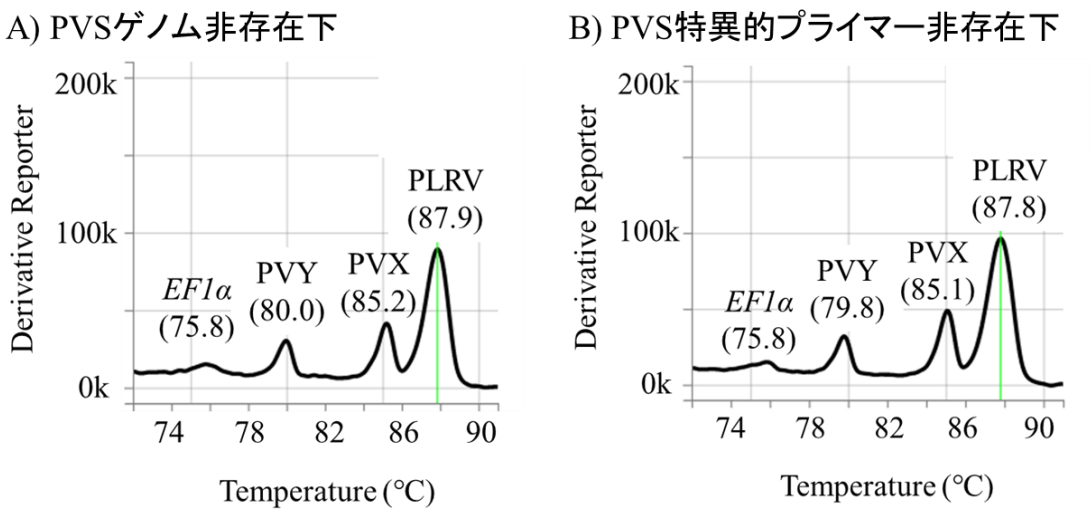
第 2 項　ワンステップ リアルタイム mRT-PCR 法の開発

プライマー濃度を全て 0.2μM で用いた際，融解曲線解析でピークが重なり合い主要な 4 種のジャガイモウイルスを同時に検出ができなかった．そこで，ジャガイモの感染葉を用いて同時検出が可能となるようプライマーの濃度を調製した（第 2-5 表）．その結果，ワンステップ リアルタイム mRT-PCR 法により，各ウイルスを同程度の Threshold Cycle（Ct）値（閾値以上の蛍光量が得られるサイクル数）で検出することができた（第 2-11 図 A, B, C, D）．また，各ウイルスが単独に感染した葉の磨砕液を等量ずつ混和した主要な4種のジャガイモウイルスを含む磨砕液から調製した RNA 溶液から 4 種全てのウイルスを同時検出することができた（第 2-11 図 E）．PVX 単独検出時における Ct 値は他のウイルス単独検出時よりも低く，ジャガイモの植物内のウイルス濃度が高いあるいは増幅効率が高いことが想定された．同時検出時において，PVX 特異的なピークは最も近い PLRV 特異的なピークよりも低くかったことから，PVX プライマー濃度をさらに下げることで増幅効率を下げる必要性はないと思われた．一方，PVS 特異的ピークは他のウイルス特異的ピークに比べて低くなったが，反応液中に PVS 特異的プライマーを 0.5 μM 以上加えても改善されなかった．健全葉の試料を供試した際，Tm 値 82.0°C 付近に非特異的なピーク出ることがあったが，プライマー濃度の調整では改善することができなかった（第 2-11 図 F）．この非特異的なピークは PVS 特異的な Tm 値に近く，特にウイルスを同時検出した際，PVS 疑陽性となる

恐れがあった. そこで, PVS ゲノムもしくは PVS 特異的プライマーを除いて検出を試みたところ, 81.0°C から 82.0°C 付近にピークは見られなかった（第 2-12 図）. このことから, 第 2-11 図 E の Tm 値 81.2°C のピークは PVS に由来することが示された.



第 2-11 図　融解曲線解析による 4 種のジャガイモウイルスの単独または同時検出
　各試料検出時の Ct 値は, 検出対象の後にカッコ内に示した. また, ピークの上部には, 検出された対象とその Tm 値を示した.



第 2-12 図　PVS ゲノムまたは PVS 特異的プライマー非存在下における 4 種のジャガイモウイルスの同時検出
ピークの上部には，検出された対象とその Tm 値を示した．

ブドウの病原ウイルスの同時診断技術では，分離株によって Tm 値がおよそ 1°C 異なることが報告されている（Aloisio et al. 2018）．プライマーは，計算した増幅産物の Tm 値が 2°C 以上離れるように設計したが，分離株によっては Tm 値が重複することが懸念された．そこで，Tm 値の計算結果の妥当性を検証するため，国内分離株の計算値を実測値と比較した（第 2-6 表）．この結果，計算値と実測値は強い直線的な相関（R^2 = 0.9875）があったことから，計算値は実測値を推定するのに十分な精度があることが示唆された．PVS と PVY の系統を考慮し，データベースからランダムに選出した分離株の Tm 値を計算したところ，昇順に，PVY は 77.5 – 79.5，PVS は 81.0 – 82.5，PVX は 84.5 – 85.5 および PLRV は 87.0 – 87.5 となり，ウイルス種間で重複せず，最も近い分離株間でも 1.5°C の差があった（第 2-7 表）．

第 2-6 表　国内分離株の増幅産物の計算した Tm 値と実測した Tm 値の比較

ウイルス	分離株	系統	計算した Tm 値 (°C)	実測した Tm 値 [a] (°C)
PLRV	ChLR_2	Unclassified	87.5	87.6±0.3
PVS	M	Ordinary	81.0	82.2±0.1
	ChS_3	Andean	82.5	83.1±0.3
PVX	O-IC249	Unclassified	84.5	85.9±0.2
PVY	Y28	O	79.0	80.5±0.4
	NTND6	NA-N	78.0	79.4±0.2
	Eu-12Jp	NTN	79.0	80.5±0.3

[a] (Tm 値の平均値) ± 2 × (標準誤差)

第 2-7 表　国外分離株の増幅産物の計算した Tm 値

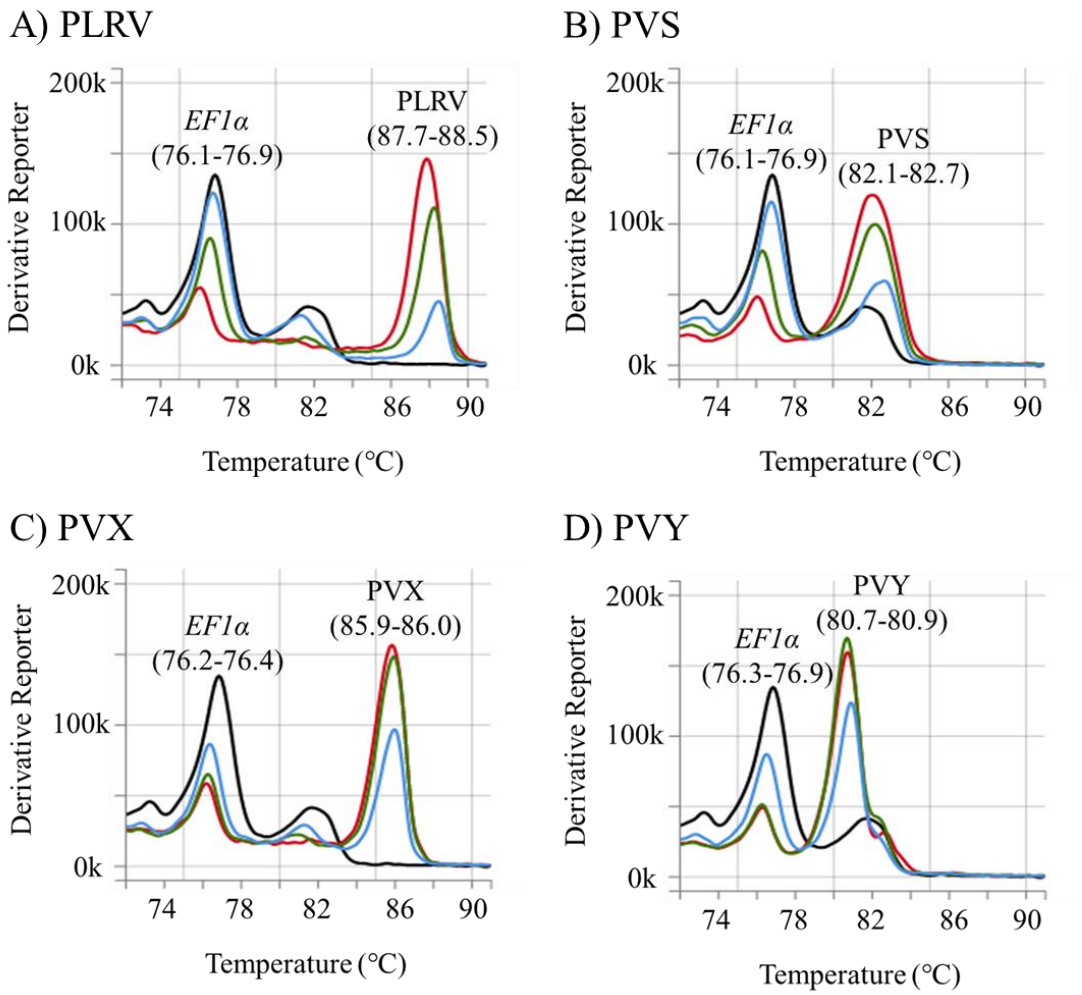
ウイルス	分離株	Accessions[a]	系統	Tm 値 [b]
PLRV	PLRV165	MG356502	-	87.0
	PLRV-IM	KC456052	-	87.0
	14.2	AF453394	-	87.5
	D00530	D00530	-	87.5
	GAF318-4.2	KU586454	-	87.5
	Polish isolate	X74789	-	87.5
PVS	Leona	AJ863509	PVS^{O}	81.0
	Dic2	KR152654	PVS^{P}	81.0
	BB-AND	JQ647830	PVS^{A}	81.5
	RL5	JX683388	PVS^{A}	81.5
	Id4106-US	FJ813513	PVS^{O}	82.0
	RVC	JX419379	PVS^{P}	82.0
	Yunnan YN	KC430335	PVS^{O}	82.5
PVX	Taiwan	AF272736	-	84.5
	PVX_Tn148	MF682528	-	84.5
	FX21	EF423572	-	85.0
	Iran	FJ461343	-	85.0
	JAL-2	KR605396	-	85.5
PVY	NC57	DQ309028	PVY^{C}	77.5
	Adgen	AJ890348	PVY^{C}	78.0
	P141	MT264735	$PVY^{NA\text{-}N}$	78.0
	RRA-1	AY884984	$PVY^{NA\text{-}N}$	78.0
	PVY-MON	JF928458	PVY^{E}	78.5
	PVY-AGA	JF928459	PVY^{E}	79.0
	CO11	KY847937	PVY^{O5}	79.0
	MT100010	KY847987	PVY^{O5}	79.0
	MSU_45_384a	KY847984	$PVY^{Eu\text{-}N}$	79.0
	MT100017	KY847988	$PVY^{Eu\text{-}N}$	79.0
	ME_236_120	KY847962	PVY^{O}	79.0
	CA14	KY847936	PVY^{O}	79.5

[a] GenBank accession

[b] uMelt batch を用いて計算した Tm 値

第 4 項　各ウイルスに対する検出感度の確認

ウイルス感染葉の磨砕液の段階希釈液を用い，簡易 RNA 調製法とワンステップリアルタイム mRT-PCR 法による検定法の各ウイルスに対する検出感度を確認した．その結果，供試した全ての試料は，増幅曲線解析では Ct 値が 30.0 以下であり，融解曲線解析ではいずれも 1,000 倍希釈液まで特異的な Tm 値にピークが確認できた（第 2-13 図）．ただし，PVS の 1,000 倍希釈では特異的な 82.0°C 付近のピークが低く，健全試料の非特異的なピークと識別が難しかった．



第 2-13 図　開発した検定法の各ウイルスに対する検出感度

各ウイルス感染葉の磨砕液と健全葉の磨砕液を用い，ウイルスの 10 倍段階希釈液を作製した．段階希釈から簡易 RNA 調製法を用いて RNA 溶液を調製し，ワンステップ リアルタイム mRT-PCR 法の鋳型として用いた．融解曲線は，健全試料（黒），10 倍希釈液（赤），100 倍希釈液（緑）および 1,000 倍希釈液（青）を示している．ピークの上部には，検出された対象とその融点を示した．

第 3 節　考察

第 1 章で開発した検定法をより省力化・高度化するため，本章ではリアルタイム mRT-PCR 法の開発した．リアルタイム PCR を用いた同時診断技術では複数の蛍光色素を同時に利用できることから一般的には TaqMan 法が用いられているが，PVS は CP の塩基配列の多様性が高く，リアルタイム PCR で最適とされている 80 bp から 150 bp の断片長の間にプローブを設計するのは困難であることが想定された．また，TaqMan 法では最大で同時に利用できる蛍光波長は 4 種であるため，内部標準を加えることができない．そのため，本研究ではインターカレーター法を用いて開発した．

プライマーの設計において，第 1 章と同様に既報のプライマーの特異性を検証した．プライマーの特異性について，AT リッチな非相補的な配列を相補的な配列の上流側に付与することでリアルタイム PCR の蛍光シグナルが増加し，GC リッチな非相補的な配列では同様な効果が得られなかったことが報告されている（Afonina et al. 2007）．このことから，プライマーの特異性には，プライマーの 3′側が特に重要であり，AT リッチな配列は特異性への寄与は低いと考えられる．Cheng et al.（2013）の PVS プライマーは，3′側にもミスマッチが多く，フォワードプライマーは 3′末端に AT が続いていたため，検出漏れだけでなく非特異的な増幅も懸念された．そのため，特に 3′側のミスマッチおよび AT 含量に注意して新たに設計した．PVY のリバースプライマーは PVY^{E} の 2 つのうち 1 つのゲノム配列と 3′側のミスマッチがあるが，プライマーの塩基は T

であるため，比較的に特異性や結合温度への影響は少ないと考えられる．また，ミスマッチのあったゲノム配列を除く 11 配列とは一致していたため，縮合塩基は使用しなかった．

ワンステップ リアルタイム mRT-PCR 法により，主要な 4 種のジャガイモウイルスを同時に検出することができた．インターカレーター法を用いた植物ウイルスの mRT-PCR 法の報告は複数があるが（Varga and James 2005； Cheng et al. 2013； Aloisio et al. 2018），逆転写反応とリアルタイム PCR を1つのチューブ内で連続的に行うワンステップ mRT-PCR 法での同時検出は初である．ワンステップ mRT-PCR の利点は，ピペッティング操作を減らすことができ，クロスコンタミネーションや人為的なミスを減らすことができる．一方で，鋳型溶液中の夾雑物や逆転写産物がより多く PCR に持ち越されるため，非特異的な増幅が多くなることが欠点となる．本法では，融解曲線解析時に非特異的なピークが PVS 特異的なピークの近傍に検出され，プライマー濃度や反応条件を変更してもなくすことができなかった．この非特異的なピークは，*EF1α* 特異的なピークよりも低かったことから，結果を判定するための基準を設定した．加えて， DNase/Rnase-free 水を鋳型として用いた場合でもサイクル数が 30.0 を超えると非特異的な増幅が見られたことから，偽陽性を除くために増幅に関する基準を設定した．

1）増幅反応の判定： Ct 値≦30.0 を特異的な増幅とする．

2）ウイルス検出の判定： *EF1α* 特異的なピーク≦ウイルス特異的なピークをウイルス陽性とする.

各ウイルスを含む磨砕液の 1,000 倍希釈までウイルス特異的なピークを検出することができたが，上記の基準に従うと，PLRV と PVS の特異的なピークは，*EF1α* 特異的なピークよりも低く，陰性と判定される. したがって，判定基準に基づき 4 種のウイルスを検出する場合は，検出感度は 100 倍希釈となる.

主要な 4 種のジャガイモウイルスのうち，少なくとも PVY は，貯蔵期間中に ELISA 法およびリアルタイム RT-PCR による検出率が徐々に低下することが報告されている（Fox et al. 2005）. 検出精度を維持するためには塊茎から育てた植物の葉を試料として用いる必要があり，葉から効率的にウイルスを検出することが重要である. 検査塊茎数は先に述べたとおり，年間 10 万塊茎と多いが，海外と同様（USDA 2004；UNECE 2018； AuSPICA 2019； SASA 2020），種ばれいしょ生産の上流の塊茎のウイルス感染率は1.0%未満である. また，塊茎のウイルス感染率は，種ばれいしょのロットを評価するために重要である. そこで，複数の葉をまとめて1つの試料（集団）としてスクリーニングし，陽性集団に含まれる葉を個別に効率的に検査することで感染葉を特定することができる. 感染葉を特定することを前提とした場合，10 枚から 100 枚を1試料として扱うことで労力が最小限となる. 上述したとおり，開発したワンステップリアルタイム mRT-PCR 法は 100 倍希釈まで 4 種のジャガイモウイルスうち任意のウ

イルスを検出できることから，このスクリーニングに用いるのに十分な検出感度がある．また，リアルタイム mRT-PCR 法は，第 1 章で開発したコンベンショナル mRT-PCR に比べ，蛍光色素を使用するために 1 試料あたりの費用が約 10 円多くなる，電気泳動解析にかかる労力を削減できるのに加えて，増幅反応に要する時間もコンベンショナル mRT-PCR 法では 2 時間程度であるのに対して 1 時間半程度である．したがって，リアルタイム mRT-PCR 法は，コンベンショナル mRT-PCR 法に比べ，検査試料が多いスクリーニングをより迅速かつ省力的に実施できる利点がある．

第 2 部　ジャガイモ Y ウイルスのほ場調査ならびに塊茎伝搬率の解析

はじめに，第 2 部では PVS の系統と区別するため，PVY の系統は PVY^{O} のようにウイルスの略称の右肩に表記したが，本部では PVY のみを対象とするためウイルス名を省略して O 系統と表記する．PVY は，potyvirus 属のタイプ種であり，約 9700 nt のプラス鎖の一本鎖 RNA をゲノムとしている（ICTV 2021）．PVY は主にアブラムシ伝搬と塊茎伝搬により感染が拡大し，茎葉にモザイクやえそ症状，場合によっては塊茎にもえそ症状（PTNRD: potato tuber necrotic ringspot disease）を引き起こすことから，ジャガイモの生産量だけでなく生産物の質を低下させることが問題となっている（Stevenson et al. 2001; Wale et al. 2008）．PVY による被害を抑えるためにはウイルスフリーの種ばれいしょを利用することが重要であり，先進諸国では種ばれいしょ生産管理が行われている（USDA 2004; Kawakami et al. 2015; UNECE 2018; AuSPICA 2019；SASA 2020）．種ばれいしょ生産管理の具体的な流れは国と地域によって差異はあるが，種ばれいしょのウイルス感染率を低減させるため，栽培期間中にウイルス感染株の除去（抜取り）を行っている．PVY は組換え体を含めた病原性の異なる多数の系統が存在していることから（Karasev and Gray 2013; Green et al. 2017），効果的に抜取りを実施するには発生している系統を把握する必要がある．国内のジャガイモほ場において 2007 年から 2009 年に実施された調査では，NTN 系統が優占し，NA-N 系統と O 系統が少数発生していることが明らかとなったが（Chikh Ali et al. 2013），

それ以降は調査が行われていない．そこで，第 1 章では，現在の発生状況を把握するため，2016 年から 2018 年に北海道内および本州の 11 ヶ所のジャガイモほ場から収集した PVY 感染葉についてその系統を解析した．次に，各系統の塊茎伝搬の効率の差について，N 系統と O 系統の比較はあるが，NTN 系統も含めた比較は報告されていないため（Beemster 1976; Gibson 1991），第 2 章では，国内分離株を用いて塊茎伝搬率を比較した．

第 1 章　ジャガイモ Y ウイルスのほ場調査

PVY の系統分類の方法は，病理学的な手法，血清学的な手法および分子生物学的な手法がある（Singh et al. 2008； Karasev and Gray 2013）．病理学的な手法では，ジャガイモ，タバコ（*Nicotiana tabacum*），アカザ（*Chenopodium amaranticolor*）に汁液接種をし，その反応の組み合わせで分類する方法である．宿主に対する病原性を直接確認できる利点はあるが，温度条件の影響を受けやすく，組換え体と非組換え体の識別はできないなどの欠点がある．血清学的な手法は，系統特異的なモノクローナル抗体に対する反応で分類する方法であり，ELISA 法により簡便に O 系統（および C 系統）と N 系統の 2 つに分類することができる．しかし，外被タンパク質のうち，抗原決定基のある N 末端側のおよそ 3 分の 1 のアミノ酸配列によって判定されるため，組換え体を考慮した解析には向いていない．分子生物学的な手法は，組換え体を考慮して全長ゲノム解析によって分類を行うが（Green et al. 2017），組換えを起こしやすい位置（Recombinant Junction）を挟むように設計されたプライマーを用いた mRT-PCR 法によりゲノム構造を簡易的に判定する手法も報告されている（Chikh Ali et al. 2010）．本研究では，ほ場調査で得られた多数の試料を解析するため，まずは ELISA 法および Chikh Ali et al.（2010）の mRT-PCR 法を用いて簡易的に分類を行った．そのうち，分類できなかった試料を単病斑分離したのち，分離株 JHP1806 と命名し，解読したゲノム配列をもとにリコンビナント解析および系統樹解析によって，その

ゲノム構造と由来を推定した．最後に，JPH1806 の病原性を NTN 系統および O 系統と比較するため，ジャガイモ，タバコ及びアカザを用いて接種試験を実施した．

第 1 節　材料と方法

第 1 項　ジャガイモウイルス

ジャガイモウイルスは，ジャガイモから分離された Y28（O 系統），NTND6（NA-N 系統）および Eu-12Jp（NTN 系統）を検出のコントロールとして用いた．ウイルス分離株は，タバコ（*Nicotiana tabacum* cv. Xanthi nc）に汁液接種し，病徴観察および第 1 部で開発したコンベンショナル RT-PCR 法で感染を確認し，感染葉は−80°C で保存した．

第 2 項　ほ場調査

ほ場調査は，北海道内および本州の種ばれいしょ生産ほ場およびジャガイモの一般ほ場で実施した．

2016 年と 2017 年は，道内の 1 ほ場で調査を実施した．ジャガイモの栽培期間中にウイルス病の症状を示す株から葉を収集し，−80°C で保存した．

2018 年は，道内の 9 ほ場および本州の 2 ほ場で調査を実施し，同様に，ジャガイモの栽培期間中にジャガイモの葉を収集した．道央の 2 ほ場および道南の 1 ほ場で収集した葉については，冷蔵で研究室まで輸送したのち，ただちに−80°C で保存した．それ以外の 8 ほ場で収集した葉は，個別にペーパータオルで包み，シリカゲル中で 4°C で乾燥させ，常温で輸送した．収集した葉は，ポリクローナル抗体を用いた DAS-ELISA 法または第 1 部で開発したコンベンショナル mRT-PCR 法で PVY の感染を確

認し，PVY の系統解析に用いた．PVY 感染が確認された凍結葉または乾燥葉 1cm 角（生葉 25 mg 相当）から市販の RNA 抽出キット，PureLink RNA Mini Kit（Thermo Fisher Scientific）を用い，製品マニュアルに従って Total RNA を抽出した．RNA の収量および精製度は，NanoDrop1000（Thermo Fisher Scientific）を用い，吸光値によって確認して，以降の試験に用いた．Total RNA 溶液 1µl を供試し，mRT-PCR 法による系統識別法（Chikh Ali et al. 2010）により PVY の系統を分類した．本識別法では，PVY のゲノムのうち，組換えを起こしやすい位置（Recombinant Junction）を挟むように設計されたプライマーを用い，バンドパターンにより系統を識別可能である．例えば，O 系統では 532bp と 853 bp，Eu-N 系統では 398 bp，633 bp および 1307 bp，それらの組換え体である NTN 系統では 411 bp，633 bp および 1307 bp であり，混合感染と組換え体を識別することも可能である．

第 3 項　シークエンス解析

mRT-PCR 法による系統識別法で系統が分類できなかった 1 試料は，単病斑分離後に分離株 JPH1806 と命名し，以降の解析に用いた．単病斑分離には，PVY 抵抗性遺伝子 *Rychc* を持つジャガイモ品種に汁液接種したのち，高温条件で栽培すると接種葉にえそ斑点を生じる性質を利用した（Ohki et al. 2018）．ジャガイモの PVY 抵抗性品種サクラフブキに汁液接種をし，25°C の恒温条件で数日栽培した．接種葉に生じ

たえそ斑点を接種源とし，再度単病斑分離したのち，タバコに汁液接種して分離株を増殖させ，感染葉は−80°C で保存した．JPH1806 の Total RNA 溶液は，タバコの感染葉から RNA 抽出キットを用いて抽出し，吸光値により収量と精製度を確認したのち，mRT-PCR 法による系統識別法によってバンドパターンが分離前と一致していることを確認した．塩基配列は，RT-PCR 法の増幅産物を鋳型としてサンガー法によって解読した（ダイレクトシークエンス）．シークエンス解析に供試した鋳型の増幅には，既報のプライマー（Yamamoto and Fuji 2008； Green et al. 2017）に加え，解読した配列に由来する新たに設計したプライマーを用いた（第 3-1 表）．cDNA の合成は，Total RNA 1 µl を供試し SuperScript III Reverse Transcriptase（Thermo Fisher Scientific）とオリゴ$(dT)_{15}$プライマーもしくは PVY 配列相補的プライマーを用いて行った．反応後の cDNA 溶液 1 µl を供試し，PrimeSTAR Max DNA polymerase（TAKARA Bio）で製品マニュアルに従って増幅し，電気泳動解析によって非特異的な増幅がないことを確認したのち，スピンカラムの精製キット，FastGene Gel/PCR Extraction Kit （Nippon Genetics Co. Ltd., Tokyo, Japan）を用いて増幅産物を精製した．

第 3-1 表　ゲノム解読に用いたプライマー

プライマー名	配列（5′-3′）
473n-R	TTCGACACAACACTTGACGC
707n-F	GATCACATCGCGCAGTTG
2808o-R	TTGCAACACCATCAACGCAG
3841o-R	CACTTGGACAGCAGTTGCTC
4482o-F	TGAAGCACGGTTGCCTAGA
5320o-F	TCAGAAGTCTCATCGACGAAG
5871-R	AACCTCCTGCTTGACTTGCC
6922n-R	GGTACTCTCCTTGAGCTTCA
7371n-R	AGCAGCTTTCATATTGAGAGC
7282n-F	CATTTATCTGCAAGTGCATGG
7640n-F	TGCTGGACTGTTGGAATGAC
8415n-R	ATGCTCGCTATGTATGGAGCAT
8681n-R	TCGTGGCACAGTGTGAGTTC

精製した増幅産物を鋳型として，BigDye Teminator v3.1 Cycle Sequencing Kit（Thermo Fisher Scientific）を用いてマニュアルに従って蛍光標識した断片を合成し，FastGene Dye Terminator Removal Kit（Nippon Genetics）を用いて精製した．配列の解読は，ABI PRISM 3130xl Genetic Analyzer（Thermo Fisher Scientific）を用いて標準プロトコルで実施し，結果は MEGA-X を用いて明瞭な波形が得られた領域を切り出した．コンセンサス配列は，Genetyx ver. 9.（Genetyx, Tokyo, Japan）を用いて確認し，3 リード以上で一致する塩基配列とした．決定したゲノム配列は，組換えの有無を推定するため，第 3-2 表に示した非組換え体のゲノム配列とともに MEGA-X でアライメントを作成し，リコンビナント解析ソフトフェア RDP4（Martin et al. 2015）のうちデフォルト設

定のプログラム”RDP”で解析した．RDP4 で検出された組換えイベントを検証するため，MEGA-Xを用いて組換え体を含めたアライメントを作成し，系統樹解析を行った．系統樹解析は，最尤法で行い，適したモデルはアライメントデータを用いて MEGA-X で推定し，ブートストラップは 1000 反復行った．

第 3-2 表　RDP4 によるリコンビナント解析に用いたゲノム配列

GenBank accession	Strain	Origin
AB331515	NA-N	Japan
AB331516	NA-N	Japan
AB331517	NA-N	Japan
AB331518	NA-N	Japan
AB331519	NA-N	Japan
AB711147	O	Japan
AB711148	O	Japan
AB711149	O	Japan
AB711150	O	Japan
AB711151	O	Japan
AM268435	Eu-N	New Zealand
AY884983	Eu-N	USA
X97895	Eu-N	Switzerland

第 4 項　病原性の確認

新たなゲノム構造を持つ JPH1806 の病原性を確認するため，タバコの感染葉をおよそ 10 倍量のリン酸緩衝液（pH 7.0）で調製した磨砕液を接種源とし，ジャガイモ（品種：トヨシロ），タバコおよびアカザにカーボランダムを振りかけたのち，接種源を染みこませた綿棒を擦りつけて汁液接種した．栽培は，ガラス温室中で行い，室温は日中 20°C および夜間 15°C で設定してボイラーにより加温し，光条件は自然光下で行い，明暗周期が 12h/12h となるよう蛍光灯で照射して補った．

第 2 節　結果

第 1 項　ほ場調査

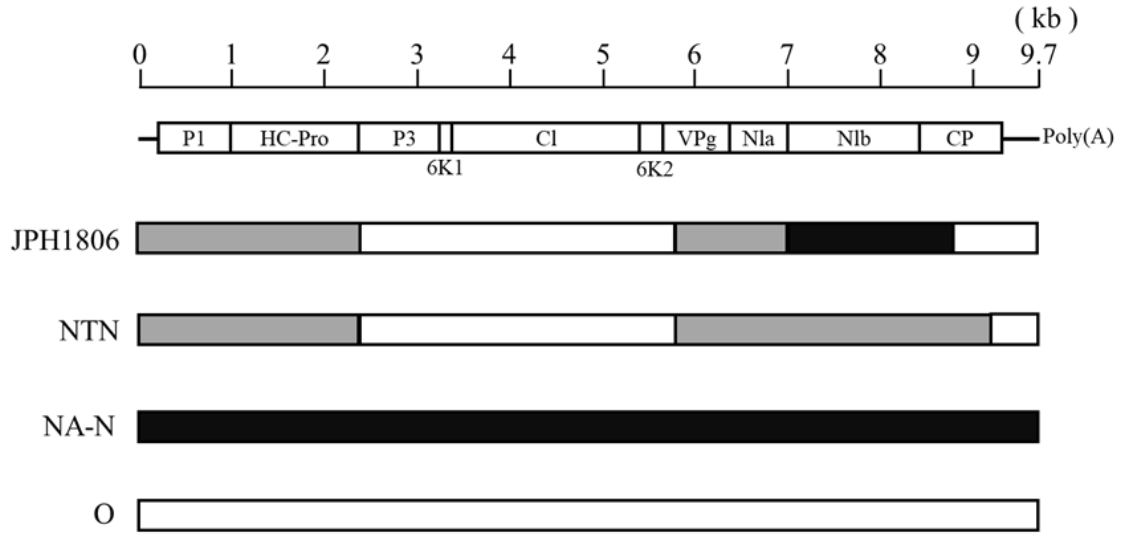
2016 年から 2018 年に収集したウイルス感染が疑われる試料から ELISA 法および第 1 部で開発したコンベンショナル mRT-PCR 法で主要な 4 種ジャガイモウイルスの検出を行ったところ，全 158 試料中 107 試料から PVY が検出され，PLRV, PVS および PVX は検出されなかった. PVY 陽性試料は，mRT-PCR 法（Chikh Ali et al. 2010）による系統識別法による簡易的な分類により，NTN 系統が 92 試料，NA-N 系統が 8 試料および O 系統が 6 試料となった（第 3-3 表）. いずれのほ場でも NTN 系統が多い傾向にあったが，10 試料にも満たないほ場もあったため地域差は確認できなかった. また，未報告のバンドパターンを示す試料が 1 つ検出された. この試料を詳細に解析するため，単病斑分離したのち，JPH1806 と命名して以降の解析に用いた.

第 3-3 表 2016 年から 2018 年に収集された PVY の系統解析

系統	NTN	NA-N	O	未分類	Total
PCR 産物（bp）	441, 663, 1307	1307	532, 853	441, 663	
試料数	92	8	6	1	107
割合（%）	86.0	7.5	5.6	0.9	100

第 2 項　シークエンス解析

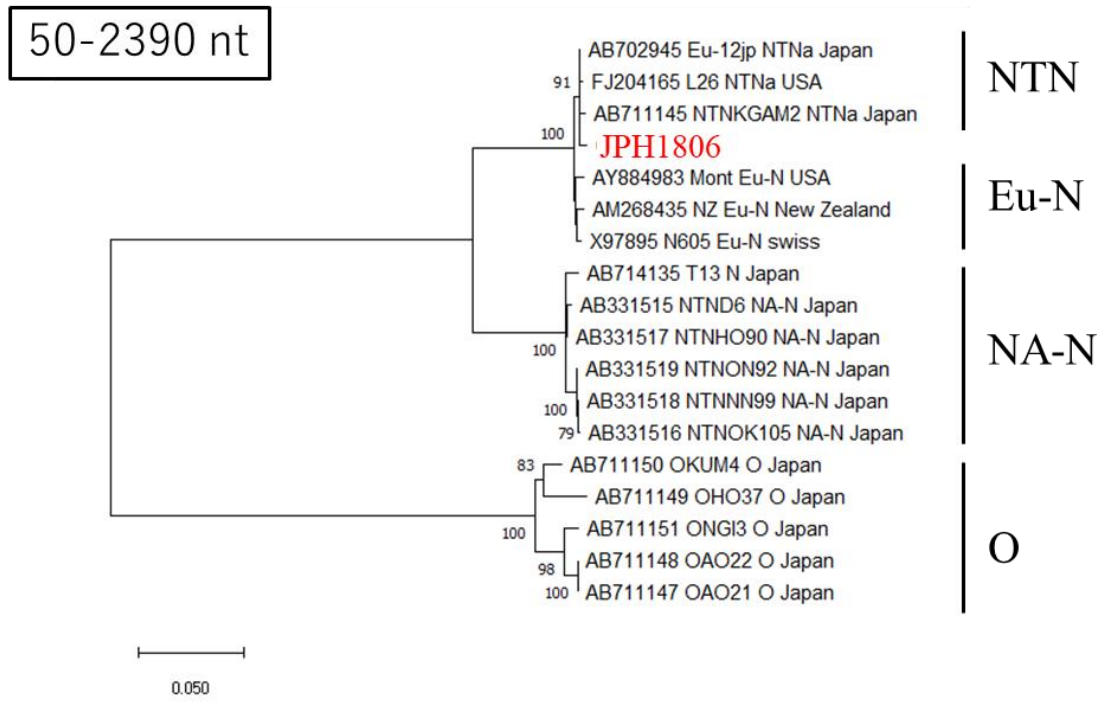
JPH1806 の 5′末端のおよそ 50 塩基と polyA tail を除いた 9649 nt の配列をダイレクトシークエンスで解読し，RDP4 により組換え位置を推定した．その結果，組換え位置は，ソフトフェアでは 4 ヵ所が示唆されたが，ゲノム構造を比較すると NTN 系統に類似しており，NTN 系統を親系統としてさらに 2 回の組換えを起こしていることが考えられた（第 3-1 図）．JPH1806 と同様のゲノム構造を持つ分離株は報告がなく，解読した配列を用いて Blastn 検索した結果，最もスコアの高い配列は NTN 系統の国内分離株である Eu-12Jp（GenBank accession： AB702945）であった．以上の結果から，JPH1806 は，国内で組換えが起きていると仮定し，国内分離株を用いて系統解析を実施した．



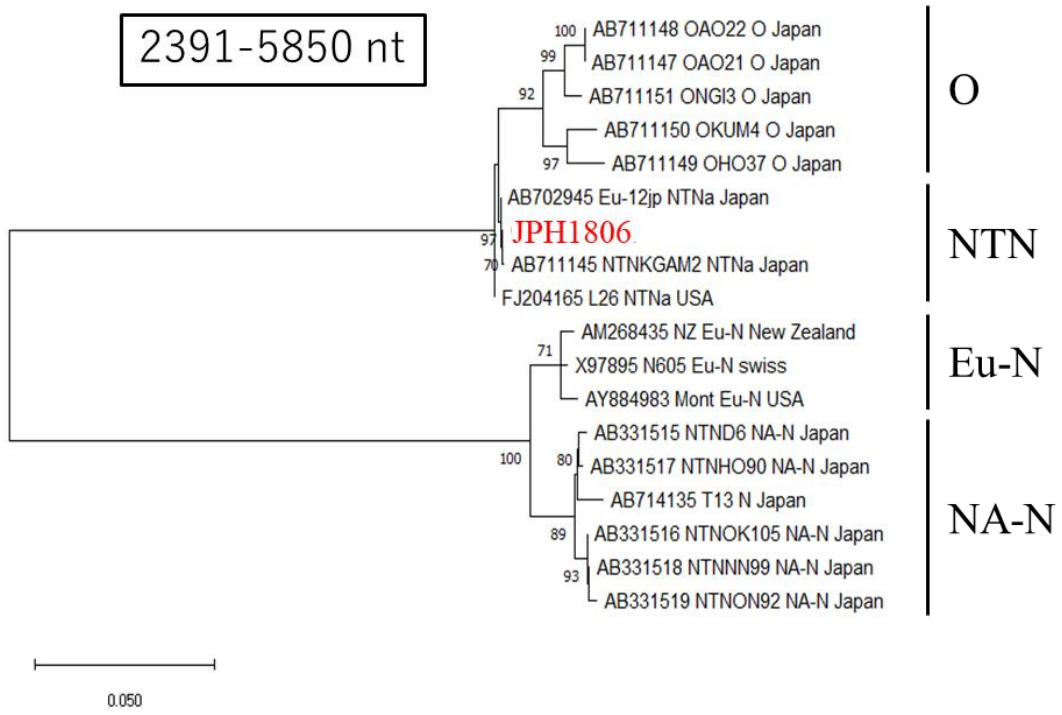
第 3-1 図　JPH1806 および国内で発生が確認されている 3 系統のゲノム構造
JPH1806 のゲノム構造は，RDP4 を用いて推定し，各領域の推定される親系統である Eu-N 系統由来（グレー），O 系統（白）および NA-N 系統（黒）を色分けして示した．なお，RDP4 で示唆された確率は，2390 - 5850 nt は 3.1×10^{-138}，7000 – 8750nt は 1.0×10^{-12}，8750 – 9649nt は 7.0×10^{-58} であった．

まずは，NTN 系統由来と仮定した領域（約 50 – 2390 nt，約 2391 – 5850 nt および約 5850 – 7000 nt）の由来を検証するため，国内分離株のゲノム配列を用いて系統解析を行った（第 3-2, 3, 4 図）．ただし，非組換え体の Eu-N 系統は国内で発生報告がないため，海外分離株の配列を用いた．また，NTN 系統の海外分離株の代表としてアメリカの分離株 L26（GenBank accession： FJ204165）を用いた．NTN 系統とその親系統との分岐について，約 50 – 2390 nt の領域における NTN 系統と Eu-N 系統との分岐はブートストラップ値が 100%と信頼性が高かったが，約 2391 – 5850 nt における NTN 系統と O 系統または約 5850 – 7000 nt における NTN 系統と Eu-N 系統との分

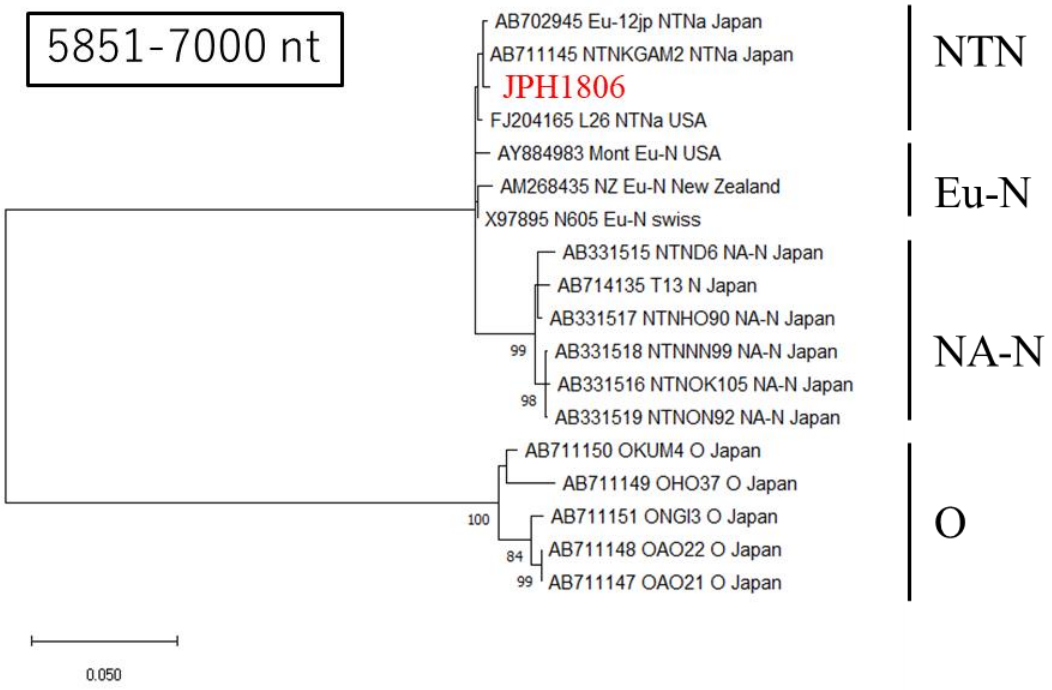
岐は，信頼性が低いまたは同一のクレードとなった．JPH1806 の約 50 – 2390 nt の領域は NTN 系統のクレードに含まれ，他の 2 つの領域は NTN 系統に近い位置に分類されたため，JPH1806 の約 50 – 7000 nt の領域は NTN 系統に由来する可能性が高いことが示唆された．したがって，JPH1806 は NTN 系統を主たる親系統とし，NA-N 系統および O 系統との 3 系統の組換え体であると考えられる．



第 3-2 図　部分配列（約 50-2390nt）を用いた最尤法による系統樹解析
ブートストラップを 1000 反復行い，70%以上の値を各節に記載した．



第 3-3 図　部分配列（約 2391-5850nt）を用いた最尤法による系統樹解析
ブートストラップを 1000 反復行い，70%以上の値を各節に記載した.



第 3-4 図　部分配列（約 5851-7000nt）を用いた最尤法による系統樹解析
ブートストラップを 1000 反復行い，70%以上の値を各節に記載した.

第 3 項　病原性の確認

JPH1806 の病原性を確認するため，PVY の系統の判定植物であるタバコとアカザ，および系統毎に特徴的な反応を示すジャガイモ品種のトヨシロを用いて接種試験を実施した（第 3-4 表）．この結果，JPH1806 は，タバコに葉脈えそ症状を引き起こし，アカザに対して感染しないことから，NTN 系統と同様に N 系統グループの特徴を示した．また，ジャガイモ品種のトヨシロに対する病徴も NTN 系統と同様に葉脈えそ症状を示した．以上から，JPH1806 の病原性は，判定植物であるタバコ及びアカザに対しては NTN 系統と一致しており，ジャガイモにも対しても類似していることが示唆された．

第 3-4 表　JPH1806 の PVY の系統判定植物およびトヨシロに対する病原性

分離株	系統	病徴（接種葉 / 上位葉）[a]		
		タバコ	アカザ	トヨシロ [b]
JPH1806	unclassified	Vn / Vn	− / −	Vn / Vn
Eu-12Jp	NTN	Vn / Vn	− / −	Vn / Vn
Y28	O	− / −	Ns / −	Ns / Ns

[a] “Vn”は葉脈えそ症状，“Ns”はえそ斑および“–”は無症状として略称で示した．
[b] ジャガイモの品種名

第 3 節　考察

PVY は，組換え体を含めて病原性の異なる系統が多数存在するため，効果的にほ場で感染株を診断するには，どの系統が発生しているか把握することが重要である．そこで，本研究では 2016 年から 2018 年に道内および本州の 11 ヵ所のジャガイモ生産ほ場で調査した．

収集した 107 試料を解析した結果，NTN 系統が優占しており，NA-N 系統および O 系統が少数発生していることが明らかとなった．この結果は，およそ 10 年前に実施された 2007 年から 2009 年にかけての調査結果と一致しており（Chikh Ali et al. 2013），PVY の系統の構成に大きな変化は見られなかった．ジャガイモの栽培品種は少しずつ遷移しているが（田宮 2016），PVY に感受性の男爵薯，メークインおよびトヨシロなど生食用あるいは加工用として最初期に導入された品種は現在でも栽培面積が広く，一方，でん粉原料品種の多くは全ての系統に抵抗性を示す *Rychc* 遺伝子が導入されている．そのため，ジャガイモ品種の構成に大きな変化がなかったことが PVY の系統の構成に変化がなかった要因として考えられる．一方で，本調査では国内外未報告のゲノム構造を持つ組換え体，JPH1806 が検出された．リコンビナント解析と系統解析の結果から，JPH1806 は，NTN 系統を主な親系統とし，NA-N 系統と O 系統との組換え体であることが示唆された．部分配列を個別に Blastn 検索すると最もスコアの高い配列はそれぞれ，NTN 系統由来の配列は Eu-12Jp（GenBank accession :

AB702945），NA-N 系統由来の配列は NTND6（AB331515）および O 系統は OH（AB714134）であり，いずれも国内分離株であった．また，2009 年までの調査結果では，NTN 系統と O 系統の混合感染も確認されている（Chikh Ali et al. 2013）．以上のことから，JPH1806 は国内で発生した可能性が高いと考えられる．

JPH1806 のジャガイモに対する病原性の確認には，トヨシロを用いて実施した．国内栽培品種の PVY に対する反応は，男爵薯やメークインのようにほとんど病徴を示さないグループ，トヨシロやホッカイコガネのように明瞭な病徴を示すグループおよびコナフブキやサクラフブキなどの PVY 抵抗性遺伝子 *Rychc* を持つグループの 3 つに分けられる（土崎ら 1993； Chikh Ali et al. 2013）．このうち，トヨシロは O 系統に対して過敏感反応様のえそ斑症状を示して全身感染しないことがあり，N 系統のグループ（NA-N 系統や NTN 系統）には全身に葉脈えそ症状を示す．このことから，トヨシロは JPH1806 のジャガイモに対する病原性が O 系統と NTN 系統のいずれにより近いかを確認するのに適している品種であると思われた．その結果，JPH1806 と NTN 系統は葉脈えそ症状，O 系統ではえそ斑症状を引き起こし，タバコとアカザを用いた系統判定の結果と一致していたことから，トヨシロもタバコやアカザと同様に PVY の O 系統または N 系統の簡易識別に用いることができると考えられる．

本調査結果から，国内ジャガイモほ上では NTN 系統が依然として優占しており，NA-N 系統および O 系統も存在していることが再確認された．また，新規に見つかっ

た組換え体 JPH1806 は，NTN 系統にゲノム構造も病原性も類似していた．このことから，検疫上は，これまでと同様の対応で良いと考えられる．

第 2 章　塊茎伝搬率の解析

第 1 章で実施したほ場調査の結果，NTN 系統が優占していることが明らかとなった．NTN 系統が他の系統に対して優占する要因として，伝搬効率が他の系統よりも優れていることが考えられる．PVY の主な伝搬経路は，アブラムシ伝搬と塊茎伝搬の 2 つである．アブラムシ伝搬については，NTN 系統が他の系統よりも伝搬効率が高いことが報告されている（Carroll et al. 2016； Mondal et al. 2017）．一方，塊茎伝搬効率については，O 系統と N 系統の比較（Beemster 1976; 福家ら 1990； Gibson 1991），あるいは，NTN 系統の単独の試験は行われているが（Chikh Ali et al. 2019），NTN 系統と他の系統を直接比較した試験は行われていない．そこで，NTN 系統が優占している要因の理解を深めるため，本研究では系統間の塊茎伝搬率を比較した．PVY は，植付け 4 週後以降は塊茎伝搬率が徐々に減少する Age-related resistance（ARR）または Mature plant resistance（MPR）と呼ばれる現象が報告されている（Beemster 1976; Sigvald 1985; Gibson 1991; Chikh Ali et al. 2019）．そこで，まずはこの ARR の影響を避けるため，植付け 4 週後に汁液接種を行い，塊茎伝搬率の解析を行った．この解析には，ウイルス分離株は国内分離株のうち NTN 系統，NA-N 系統および O 系統から各 1 株を用いた．ジャガイモ品種は，種ばいれしょの生産量の多い品種のうち，使途の異なる男爵薯，トヨシロおよびコナヒメを用いた．

次に，PVY はジャガイモに対して全身で病徴を発現するまでに 4 週間程度かかるこ

とがあることから，生育後期の感染により病徴が発現する前に PVY が塊茎まで移行することで，種ばいれしょ検疫下でも塊茎伝搬していると考えられている．そこで，植付け 8 週後から 11 週後における塊茎伝搬率の解析を行った．この解析では，同様のウイルス分離株を用いたが，ジャガイモ品種は各系統に対して明瞭な病徴を示すトヨシロのみを用いた．

第 1 節　材料と方法

第 1 項　植物の準備

ジャガイモの塊茎は，農研機構種苗管理センターから入手した調査用種苗を用いた．初期生育を揃えるため，40g 前後の塊茎を使用し，10 ppm のジベレリン溶液に 30 秒間浸漬したのちにガラス温室内で催芽した．催芽処理から収穫までの期間中，室温は，日中は 20°C 以上，夜間は 15°C 以上となるように加温し，室温が 25°C 以上となる場合は天窓および側窓を開けて調整した．自然光条件で栽培し，明暗周期は 12h/12h となるように蛍光灯で補った．塊茎は，萌芽を確認したのち，粒状培土（Hokusan Co. Ltd., Hokkaido, Japan）を充填した 18 cm のポリポットに 1 塊茎ずつ植え付けた．PVY の母塊茎を通じた茎から茎への移行による塊茎伝搬率への影響を除外するため，植付け 3 週後に余分な茎を根元から引き抜き，1 鉢あたり 1 茎とした．

第 2 項　早期感染における塊茎伝搬効率の解析

原原種の出荷袋が多い品種のうち，生食用の男爵薯，加工用のトヨシロおよびでん粉原料用のコナヒメの 3 品種を用いた．ウイルス分離株は，第 1 章と同様，Y28（O 系統），NTND6（NA-N 系統）および Eu-12Jp（NTN 系統）を使用し，タバコの感染葉に対しておよそ 10 倍量のリン酸緩衝液（pH 7.0）を加えて磨砕することで接種源を調製した．植付け 4 週間後に，1 株あたり上位葉 3 枚にカーボランダムを振りかけたのち，

接種源を染みこませた綿棒を葉に擦りつけて汁液接種を行った．また，汁液接種のネガティブコントロールとして，接種源の調製に使用したリン酸緩衝液も同様の操作を行った．各ウイルス分離株および品種の組合せに対し，ジャガイモの植物 11 株を供試し，接種したのちは毎週観察を行って病徴を記録した．ジャガイモは植付け 90 日後から自然枯凋し始め，それにより生細胞を移行する PVY の地上部から塊茎への移行も止まるものと考えられた．そのため，植付け 12 週後（接種 8 週後）に，上位葉を回収したのち，地上部から地下部へのウイルスの移行を止めるため株毎に食器用洗剤で洗浄した剪定ばさみを用いての地際部から切断した．採取した葉は，第 1 部で記載した簡易 RNA 調製法およびコンベンショナル RT-PCR 法によってウイルスの感染を確認した．なお，リアルタイム RT-PCR には，PVY 特異的プライマーのみを用いた．病徴観察および RT-PCR 法により PVY の感染が確認できた株から約 10 g 以上の塊茎を株毎に分けて収穫し，以降の解析に用いた．収穫した塊茎は 4°C の暗所で 1 ヶ月間貯蔵したのち，植付け時と同様にジベレリン処理および浴光により催芽処理をした．各塊茎から 3-5 mm 程度に伸びた芽を消毒済みの外科用メスで切り出し，簡易 RNA 調製法の試料とした．外科用メスは，株毎に 0.5%次亜塩素酸ナトリウム，70%エタノールの順で洗浄したのちに蒸留水でリンスして用いた．切り出した芽は，ポリ袋に入れて氷冷した TE バッファー（pH 8.0）を 100 µl 加えて磨砕し，磨砕液 50 µl を 2 × 抽出バッファー50 µl と直径 3 mm のろ紙のディスクが入った 0.2 ml 容の PCR チュー

ブに加えてピペッティングにより，よく混和した．これ以降の RNA 調製の操作は，第 1 部の簡易 RNA 調製法の手順に従った．PVY の検出は，先述した PVY 特異的プライマーのみを用いたリアルタイム RT-PCR 法で行った．Ct 値が 30 前後の試料については，第 1 部で設計した PVY 特異的プライマーのみを用いたコンベンショナル RT-PCR 法によって再度確認した．株毎に PVY の検出に供試した塊茎に対する PVY 陽性の塊茎数の割合（%）を算出し，その株の塊茎伝搬率とした．試験区間の塊茎伝搬率を比較するため，Tukey-Kramer 法による多重比較を行ない，演算には Microsoft Excel 365 を用いた．

第 3 項　後期感染における塊茎伝搬効率の解析

成育後期における感染の塊茎伝搬率を調べるため，植付け 8 週後から 11 週後まで 1 週間おきに汁液接種をし，植付け 12 週後までの塊茎へのウイルスの移行を確認した．ジャガイモは病徴が明瞭であるトヨシロのみを供試し，ウイルス分離株は先の試験と同様に 3 分離株を用いた．各ウイルス分離株および接種時期の組合せに対し，ジャガイモの植物 4 株を供試し，接種したのちは毎週観察を行って病徴を記録した．接種方法および収穫方法は先述したとおりであるが，上位葉を用いたウイルス感染の確認は行わず，供試した 4 株全てを解析に用いた．上記の試験は，1 回目は 2020 年 6 月から 9 月，2 回目は同年 7 月から 10 月に実施した．

第 2 節　結果

第 1 項　早期感染における塊茎伝搬効率の解析

生育後期での感染では，Mature plant resistance（MPR）によって系統にかかわらずウイルスの塊茎への移行が見られない懸念があったため，まずは生育初期における感染での各系統の塊茎伝搬率を比較した．PVY はジャガイモに対して汁液接種しても感染しないことがあるため，病徴観察および上位葉の遺伝子診断により PVY の感染を確認した（第 3-5 表）．病徴観察では，NTN 系統と NA-N 系統は，トヨシロに対して葉脈えそ症状を引き起こし，男爵薯とコナヒメではほとんど症状が見られなかった．O 系統ではいずれの品種に対してもえそ斑症状を引き起こしたが，コナヒメでは男爵薯とトヨシロに比べて葉の縁に症状が集中しており，症状の発現が異なっていた（第 3-5 図）．RT-PCR 法による上位葉の検定では，NTN 系統と NA-N 系統を接種した男爵薯とコナヒメの病徴を示さなかった株から PVY が検出され，無病徴感染していた．O 系統では，男爵薯とトヨシロにおいて，病徴を示した株の一部またはほとんどが RT-PCR 法による検定で陰性となった．以降の塊茎伝搬率の解析には，病徴が観察された株または RT-PCR 法で上位葉から PVY が検出された株から収穫した塊茎を供試した．塊茎伝搬率は，PVY 検出に供試した塊茎に対する PVY 陽性塊茎の割合とし，株毎に算出した．その結果，NTN 系統，NA-N 系統および O 系統の順に塊茎系伝搬率が高い傾向にあった．男爵薯では，NTN 系統と NA-N 系統の間に有意差がなく，O

系統は明らかに低い塊茎伝搬率を示した. トヨシロでは, NTN 系統は NA-N 系統よりも塊茎伝搬率が有意に高く, O 系統では塊茎伝搬を確認できなかった. コナヒメでは, 系統にかかわらず塊茎伝搬率が高かった.

第 3-5 表　植物体の病徴とその娘塊茎における塊茎伝搬率

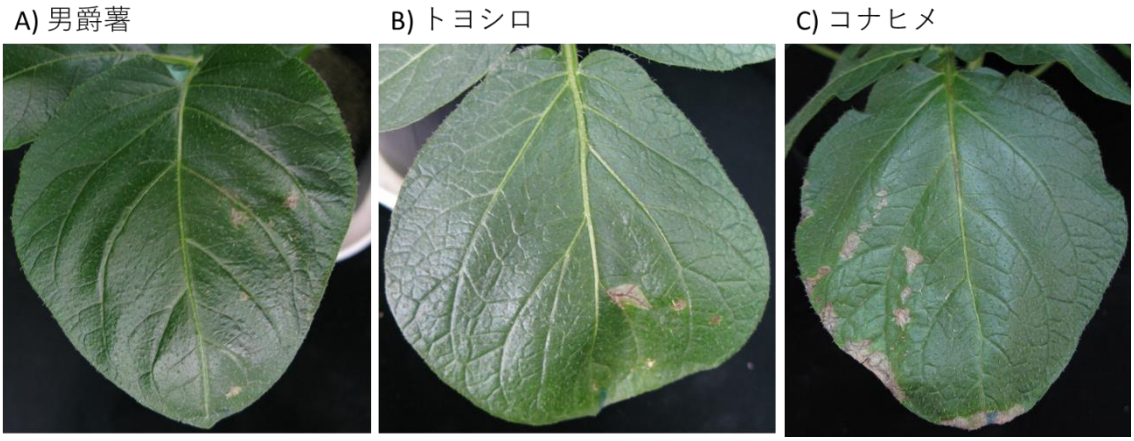
系統	品種	主な病徴[a]			親株の判定[b]		塊茎伝搬率の解析[c]		
		接種葉	/	上位葉.	病徴	RT-PCR	株数	伝搬率(%)	
NTN	男爵薯	−	/	−	0	8	8	100.0	a
	トヨシロ	Vn	/	Vn	11	11	11	100.0	a
	コナヒメ	(Ns)	/	−	2	9	9	100.0	a
NA-N	男爵薯	−	/	−	0	10	10	88.3	a
	トヨシロ	−	/	Vn	9	9	9	63.2	b
	コナヒメ	−	/	−	0	8	8	97.9	a
O	男爵薯	Ns	/	(Ns)	7	2	7	14.3	c
	トヨシロ	Ns	/	(Ns)	11	1	11	0.0	d
	コナヒメ	Ns	/	Ns	11	11	11	100.0	a
NC[d]	男爵薯	−	/	−	0	0	11	0.0	d
	トヨシロ	−	/	−	0	0	11	0.0	d
	コナヒメ	−	/	−	0	0	11	0.0	d

[a] 略号; Vn, 葉脈えそ症状; Ns, えそ斑症状; (Ns), 数株でえそ斑症状が見られたことを示した.

[b] 病徴は病徴を示した株数を示し, RT-PCR はリアルタイム RT-PCR で陽性となった株数を示した.

[c] 株数は, 植付け 4 週間後に汁液接種をし, 栽培期間中の病徴観察または収穫直前に上位葉を用いた RT-PCR 法で PVY が感染を確認し, 塊茎伝搬率の解析に供試した株数を示した. ただし, 陰性コントロール(NC)は植え付けた全ての株を塊茎伝搬率の解析に供試した. 伝搬率は, PVY 検出に供試した塊茎に対する PVY 陽性塊茎の割合を株毎に算出し, 試験区の平均値を示した.

[d] NC は, 接種源の調製に使用したリン酸緩衝液を用いて汁液接種と同様の操作を行い, 陰性コントロール区とした



第 3-5 図　O 系統によるえそ斑症状

植付け 4 週後に O 系統を汁液接種し，A）接種 4 週後の男爵薯，B）接種 3 週後のトヨシロおよび C）接種 4 週後のコナヒメにおけるえそ斑症状を示した.

第 2 項　後期感染における塊茎伝搬効率の解析

トヨシロの生育後期における感染の塊茎伝搬率を比較するため，植付け 8 週後（8W）から植付け 11 週後（11W）まで 1 週間おきに汁液接種を行い，塊茎伝搬率を比較した（第 3-6 表）. 病徴観察の結果では，8W の NTN 系統を接種した試験区で接種葉に葉脈えそ症状が見られ，それ以外の試験区ではほとんどの株で症状を示さなかった. 1 回目の試験では，早期感染の試験と同様に上位葉を用いた RT-PCR 法による PVY の検出を試みたが，8W の NTN を接種した試験区のうち上位葉で症状の見られた 1 株のみ陽性となった. そのため，病徴および RT-PCR 法いずれでも PVY の感染を確認できない株が多数となったため，供試した全ての株を解析に用いた. その結果，8W の NTN 系統を接種した試験区でのみ塊茎伝搬しており，それ以外の試験区では，全ての塊茎が陰性となった.

第 3-6 表　PVY の接種時期と塊茎伝搬率の関係

接種時期[a]	系統	病徴[b]			塊茎伝搬率[c] (%)		
		接種葉	/	上位葉	1 回目	2 回目	平均
8W	NTN	Vn	/	(Vn)	8.3	25.0	16.7
	NA-N	−	/	−	0.0	0.0	0.0
	O	(Ns)	/	−	0.0	0.0	0.0
9W	NTN	(Vn)	/	−	0.0	0.0	0.0
	NA-N	(Vn)	/	−	0.0	0.0	0.0
	O	−	/	−	0.0	0.0	0.0
10W	NTN	(Ns)	/	−	0.0	0.0	0.0
	NA-N	−	/	−	0.0	0.0	0.0
	O	−	/	−	0.0	0.0	0.0
11W	NTN	−	/	−	0.0	0.0	0.0
	NA-N	−	/	−	0.0	0.0	0.0
	O	−	/	−	0.0	0.0	0.0

[a] 植付け 8 週後（8W）から植付け 11 週後（11W）まで 1 週間毎に汁液接種をし，植付け 12 週後に 10 g 以上の塊茎を全て収穫して試験に供試した.

[b] 略号； Vn，葉脈えそ症状； Mo，モザイク症状； Ns，えそ斑症状； （Ns）および（Vn），（）内の病徴が2回の試験のうち数株で観察されたことを示した.

[c] PVY 検出に供試した塊茎に対する PVY 陽性塊茎の割合を株毎に算出し，試験区の平均値を示した.

第 3 節　考察

国内のジャガイモほ場では，ジャガイモウイルスの中では PVY の発生が多く，特に NTN 系統が優占していることが，第 1 章の調査によって再確認された．NTN 系統が優占している要因としてアブラムシ伝搬効率の高いことが報告されているが（Carroll et al. 2016； Mondal et al. 2017），塊茎伝搬に関して NTN 系統と他の系統を比較した報告はなかった．そこで本研究では，NTN 系統が優先している要因に塊茎伝搬率が関与しているか明らかにするために試験を行った．

生育初期における試験では，NTN 系統は，品種にかかわらず高い塊茎伝搬率を示したのに対し，NA-N 系統と O 系統は間で塊茎伝搬率に差が見られた．このことから，NTN 系統は，より多くの品種で効率的に塊茎伝搬できる可能性がある．今回は，2019 年度の原原種出荷袋数の多い 3 品種を試験に供試したが，農研機構種苗管理センターの原原種配布実績によると，これら 3 品種が原原種出荷袋数に占める割合は合計で 4 割弱である．供試した 3 品種における塊茎伝搬率の差は PVY の系統構成に与える影響が大きいと思われるが，種ばれいしょ検疫下で栽培されている品種だけでも 70 品種以上存在する．NTN 系統が日本の品種に適応していることを示すためには，今後，より多くの品種を供試して塊茎伝搬率の品種間差を確認する必要がある．

生育後期における塊茎伝搬について，Chikh Ali et al.（2019）の植え付け 8 週後以

降はほとんど塊茎伝搬しないとする報告と福家ら（1990）の収穫直前においても塊茎伝搬するという 2 つ報告がある. MPR の報告を考慮すると生育後期における塊茎伝搬は稀であると推測されたが（Beemster 1976; Sigvald 1985; Gibson 1991），収穫直前まで塊茎まで移行可能であった場合は種ばれいしょ生産に与える影響が大きい. そのため，本研究では，収穫直前までの感染を考慮して試験を設計した. その結果，NTN 系統のみ植付け 8 週後に一部の株でのみ塊茎伝搬を確認することができ，それ以降は塊茎伝搬を確認できなかった. この結果は，供試したジャガイモ品種は異なるが，Chikh Ali et al.（2019）の結果と一致していた. また，供試株数は 2 回の試験を合計しても 8 株と少数ではあるものの，NA-N 系統は塊茎伝搬を確認できなかった. NTN 系統を含めた系統間の塊茎伝搬率を比較した報告はなく，NTN 系統は，他の系統に比べ，生育後期でも塊茎まで移行できることを示した報告は本研究が初めてである.

一連の塊茎伝搬に関する試験結果から，NTN 系統は NA-N 系統よりも優占している要因として，ジャガイモ植物内での移行速度が速く，より生育後期の感染においても塊茎にまで到達できることが考えられる. 種ばれいしょ生産では，アブラムシの飛来を防ぐため，早期栽培が基本であることから，ジャガイモ植物内での移行速度の差が PVY の系統の選択圧となっている可能性がある. この仮説を検証するため，組織レベルでのウイルス移行速度を解析する必要がある. O 系統については，早期感染の

試験の結果では男爵薯およびトヨシロにおいて著しく低い塊茎伝搬率を示したのに対し，コナヒメでは高い塊茎伝搬率を示した．この要因として，系統特異的に過敏感反応を示す *N* 遺伝子の存在が考えられる．国内栽培品種の *N* 遺伝子については詳細な解析が行われていないが，男爵薯とトヨシロの反応は *N* 遺伝子による過敏感反応と推定される．トヨシロは，男爵薯に比べ，O 系統に対してより早く病徴が発現しており，接種 3 週後には明瞭な病徴を示し，株によっては接種 4 週後には接種葉は落葉していた．この反応速度の差により，トヨシロでは塊茎伝搬せず，男爵薯ではわずかに塊茎伝搬した要因となっていると考えられる．一方で，コナヒメの O 系統に対する反応は，男爵薯やトヨシロと異なり，葉の縁にえそ斑症状を示し，徐々に葉の内部へと拡大していたことから，典型的なえそ斑症状とは異なっていた．そのため，コナヒメの症状は過敏感反応による積極的な細胞死というよりはウイルス感染による生理的な障害による受動的な細胞死が引き起こされたと考えられる．また，O 系統に対する *Ny* 遺伝子は知られているが（Moury et al. 2011），NTN 系統の全身移行を阻害できる *N* 遺伝子は見つかっていない．このことが，NTN 系統が O 系統よりも発生が多い要因であると考えられる．

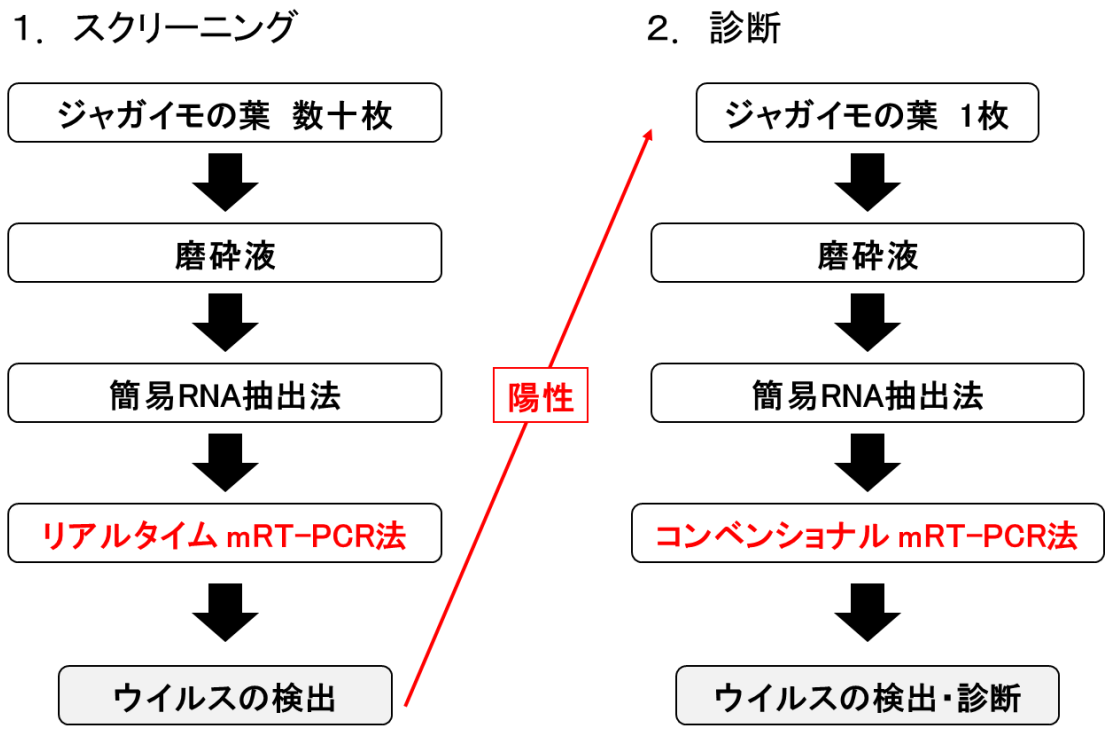
以上より，NTN 系統の 3 系統が最も塊茎伝搬率が高く，かつ，ジャガイモの生育が進んだ後でも塊茎にまで移行できることがほ場で優占している一因であると考えられる．

総合考察

本研究では，種ばれいしょ検疫におけるウイルス検出の省力化を目的とし，第 1 部で，ELISA 法に代わる省力的な検出技術として簡易 RNA 調製法と 2 種の mRT-PCR 法を開発した．第 2 部では，ほ場での目視によるウイルス感染株の診断を効率的に行うため，病原性の異なる系統が多数存在する PVY について，ジャガイモほ場における系統の構成を調査した．調査では NTN 系統が優占していることが明らかとなり，その要因を解明するために各系統の塊茎伝搬率を比較した．

開発した簡易 RNA 調製法は，ELISA 法と同様にピペッティング操作のみ実施でき，ろ紙への RNA の吸着，ろ紙の洗浄，ろ紙からの RNA の溶出と単純な工程であることが利点である．種ばれいしょ検疫では，大量の塊茎を検査しなければならず，ウイルス病の検出率が許容限界値以下であることが検査の合格基準となっており，ほとんどの塊茎は陰性となっている．そのため，数十試料をまとめてスクリーニングを行うことで効率的に検査を行うことができる．開発したリアルタイム mRT-PCR 法は，省力的かつ迅速に大量の試料を検査することができるが，健全葉からも PVS に類似したピークが検出されることから偽陽性の試料が出る可能性を排除できない．コンベンショナル mRT-PCR 法とリアルタイム mRT-PCR 法は，それぞれ別の領域に結合するプライマーを使用しており，増幅産物の識別方法もそれぞれ断片長と Tm 値で異なっている．そのため，リアルタイム mRT-PCR 法でスクリーニングを行い，コンベンショナル

mRT-PCR 法で個別に診断することで，省力的かつ高精度にウイルス感染株を診断できる（第 4-1 図）．検疫の現場において，本検定法の導入するためには新たにリアルタイム PCR システムが必要となるが，2 波長を同時検出可能な比較的安価な下位モデルでも適応できる．また，4 種のジャガイモウイルスを検出する場合，コンベンショナル mRT-PCR 法は，市販の ELISA キットと比較し，1 試料あたりの費用は同程度（320 円）であり，リアルタイム mRT-PCR 法は約 10 円多くかかる．そのため，本検定法は，現行法の ELISA 法の代替として用いることで，種ばれいしょ検疫の省力化および高度化が期待できる．



第 4-1 図 本研究で開発した検出技術を用いた大量試料の診断フロー

本研究で実施した PVY の系統構成に関する調査結果は，2010 年以前の調査結果と一致しており，国内のジャガイモほ場では NTN 系統が優占し，NA-N 系統と O 系統が少数発生していた．塊茎伝搬率を解析した結果，NTN 系統は，国内で生産量が多い 3 品集全てで高い塊茎伝搬率を示し，トヨシロにおいては他の 2 系統に比べて生育後期の感染でも塊茎まで移行した．以上より，NTN 系統は，他の系統に比べ，ジャガイモの植物内での移行速度が早く，それにより早期栽培を行っている種ばれいしょ検疫下においても発生数が多いと考えられる．これまでは PVY の感染性クローンは大腸菌では作ることができなかったが，ウイルス由来の配列の途中にイントロンを挿入するあるいは宿主を酵母菌（*Saccharomyces cerevisiae*）に変更することで全長の感染性クローンの作出に成功した報告がある（Sun et al. 2017； Cheng et al. 2020）．PVY の系統間におけるジャガイモ植物内での移行の差異については解析が行われていないが，今後、感染性クローンを用いた解析によって解明されることが期待できる．

本研究のほ場調査では，国内外未報告の組換え体（JPH1806）が検出された．PVY は，主に N 系統，C 系統および O 系統に分けられ，さらに N 系統は Eu-N 系統と NA-N 系統の 2 つクレード，O 系統は O 系統と O5 系統の 2 つのクレードに分かれる（Ogawa et al. 2012； Gibbs et al. 2017； Fuentes et al. 2019； Mao et al. 2019； Bartola et al. 2020； Gao et al. 2020）．これらの系統のうち，20 世紀半ば頃，すなわち

アイルランドの大飢饉以降に，非組換え体の O 系統と Eu-N 系統を親株として N:O 系統が発生し，さらにその後に N:O 系統と Eu-N 系統を親株として NTN 系統が発生したと推定されている（Karasev et al. 2011； Fuentes et al. 2019）．ゲノム解析の結果から，JPH1806 は，国内のジャガイモほ場において，NTN 系統を親株として，NA-N 系統と O 系統の組換え体と 1 回もしくは NA-N 系統および O 系統と計 2 回の組換えを起こしていることが推定された．そのため，JPH1806 は，150 年前後の間に 3 回もしくは 4 回の組換えが起きていること，および，国内で組換えが起きていることを示唆しており，PVY の系統間の組換えによる進化を考える上で貴重なサンプルであると考えられる．一方で，JPH1806 の病原性は，NTN 系統に類似していたことから，現段階では組換えによる種ばれいしょ検疫への影響は低いと考えられる．国内では，種ばれいしょ検疫が始まって以来，PVY を含めたジャガイモウイルスの発生数は減少しており，2009 年では PVY の複数系統の混合感染が発見されたが（Chikh Ali et al. 2013），2015 年から 2018 年の調査では混合感染は発見できなかった．本研究では種ばれいしょ生産ほ場およびその近隣一般ほ場を調査しており，ジャガイモほ場の中でも比較的 PVY の発生が少ないほ場で調査したことが混合感染株を見つけることができなかった要因であると考えられる．種ばれいしょ検疫により PVY の発生数が低減されたことで新たな組換え系統の発生リスクも減少していると思われるが，今後も組換え体および変異体への警戒は必要である．

最後に，本研究は種ばれいしょ検疫の省力的および効率的を目的とし，4 種のジャガイモウイルスの検出技術の開発と PVY の実態解明を行った．本研究で得られた技術や知見は，ジャガイモの安定生産への貢献が期待される．

参考文献

Afonina I，Ankoudinova I，Mills A，Lokhov S，Huynh P，Mahoney W（2007）Primers with 5′ flaps improve real-time PCR. Biotechiques 43：770-774.

Aloisio M，Morelli M，Elicio V，Saldarelli P，Ura B，Bortot B，Severini GM，Minafra A（2018）Detection of four regulated grapevine viruses in a qualitative, single tube real-time PCR with melting curve analysis. J Virol Methods 257：42-47.

AuSPICA（2019）Conditions for the AuSPICA seed potato certification scheme. Available from： https://www.auspica.org.au/wp-content/uploads/2020/02/

Bartola MD，Byrne S，Mullins E（2020）Characterization of potato virus Y isolates and assessment of Nanopore sequencing to detect and genotype potato viruses. Viruses 12：478.

Beemster ABR（1976）Translocation of the potato viruses Y^N and Y^O in some potato varieties. Potato Res 19：169-172.

Bostan H，Peker PK（2009）The feasibility of tetraplex RT-PCR in the determination of PVS, PLRV, PVX and PVY from dormant potato tubers. Afr J Biotechnol 8：4043–4047.

Campos and Ortiz （2020） The potato crop its agricultural, nutritional and social contribution to humankind. New York: Springer; 2020. https:// doi. org/ 10.1007/

978-3-030-28683-5.

Caroll JE，Smith DM，Gray SM（2016）Preferential acquisition and inoculation of PVY^{NTN} over PVY^{O} in potato by the green peach aphid *Myzus persicae*. J Gen Virol 97：797-802.

Cheng DJ，Tian YP，Geng C，Guo Y，Jia MA，Li XD（2020）Development and application of a full-length infectious clone of potato virus Y isolate belonging to SYR-I strain. Virus Res 276：197827.

Cheng J，Jiang Y，Rao P，Wu H，Dong Q，Wu Z，Ding X，Guo J（2013）Development of a single-tube multiplex real-time PCR for detection and identification of five pathogenic targets by using melting-curve analysis with EvaGreen. Arch Virol 158：379-386.

Chikh Ali M，Karasev AV，Furutani N，Taniguchi M，Kano Y，Sato M，Natsuaki T，Maoka T（2013）Occurrence of *Potato virus Y* strain PVY^{NTN} in foundation seed potatoes in Japan，and screening for symptoms in Japanese potato cultivars. Plant Pathol 62：1157-1165.

Chikh Ali M，Maoka T，Natsuaki KT，Natsuaki T（2010）The simultaneous differentiation of *Potato virus Y* strains including the newly described strain PVY^{NTN-NW} by multiplex PCR assay. J Virol Methods 165：15-20.

Chikh Ali M, Tran LT, Price WJ, Karasev AV（2019）Effect of the age-related resistance to Potato virus Y in potato on the systemic spread of the virus, incidence of the potato tuber necrotic ringspot disease, tuber yield, and translocation rates into progeny tubers. Plant Dis 104：269-275.

Du Z, Chen J, Hiruki C（2006）Optimization and application of a multiplex RT-PCR system for simultaneous detection of five potato viruses using 18S rRNA as an internal control. Plant Dis 90：185–189.

FAOSTAT（2018）The database on production of crops; 2018 (online database). Available from: http://www.fao.org/faostat/en/#data/QC.

Fuents S, Jones RAC, Matsuoka H, Ohshima K, Kreuze J, Bibbs AJ（2019）Potato virus Y; the Andean connection. Virus Evol 5(2):vez037.

Gibbs AJ, Ohshima K, Yasaka R, Mohammadi M, Gibbs M, Jones RAC（2017）The phylogenetics of the global population of potato virus Y and its necrogenic recombinants. Virus Evol 3(1):vex002.

Gibson RW（1991）The development of mature plant resistance in four potato cultivars against aphid-inoculates potato virus Y^O and Y^N in four potato cultivars. Potato Res 34：205-210.

Green KJ, Brown CJ, Gray SM, Karasev AV（2017）Phylogenetic study of recombinant

strains of *potato virus Y*. Virology 507：40-52.

Huo P，Shen WT，Yan P，Tuo DC，Li XY，Zhou P（2015）Simultaneous detection of papaya ringspot virus, papaya leaf distortion mosaic virus, and mosaic virus by multiplex real-time reverse transcription PCR. Acta Virol 59：380-388.

ICTV（2021）Taxonomy. Available from： https://talk.ictvonline.org/

Karasev AV，Gray SM（2013）Continuous and emerging challenges of *Potato virus Y* in potato. Annu Rev Phytopathol 51：571-586.

Kawakami T，Oohori H，Tajima K（2015）Seed potato production system in Japan, staring from foundation seed of potato. Breed Sci 65：17-25.

Kumar R，Jeevalatha A，Baswaraj R，Sharma S，Nagesh M（2017）A multiplex RT-PCR assay for simultaneous detection of five viruses in potato. J Plant Pathol 99：37–45.

MAFF（2020）令和元年度 食料・農業・農村白書 第 2 章. 農林水産省. Available from： https://www.maff.go.jp/j/wpaper/w_maff/r1/zenbun.html.

MacKenzie TDB，Fageria MS，Nie X，Singh M（2014）Effects of crop management practices on current-season spread of *Potato virus Y*. Plant Dis 98：213-222.

Mao Y，Sun X，Shen J，Gao F，Qiu G，Wang T，Nie X，Zhang W，Gao Y，Bai Y（2019）Molecular evolutionary analysis of potato virus Y infecting potato based on the VPg gene. Front Microbiol 10:1708.

Maoka T，Sugiyama S，Maruta Y，Hataya T（2010）Application of cDNA macroarray for simultaneous detection of 12 potato viruses. Plant Dis 94：1248–1254.

Mondal S，Lin YH，Caroll JE，Wenninger EJ，Bosque-Pérez NA，Whitworth JL，Hutchinson P，Eigenbrode S，Gray SM（2017）*Potato virus Y* transmission efficiency from potato infected with single or multiple virus strain. Phytopathology 107：491-498.

Moury B，Carimel B，Johansen E，Simon V，Chauvin L，Jacquot E，Kerlan C，Lefebvre V（2011）The helper component proteinase cistron of *Potato virus Y* induces hypersensitivity and resistance in potato genotypes carrying dominant resistance genes on chromosome IV. Mol Plant-Microbe Interact 24：787-797.

Nakaune R，Nakano M（2006）Efficient methods for sample processing and cDNA synthesis by RT-PCR for the detection of grapevine viruses and viroids. J Virol Methods 134：244-249.

Nicot N，Hausman J，Hoffmann L，Evers D（2005）Housekeeping gene selection for real-time RT-PCR normalization in potato during biotic and abiotic stress. J Exp Bot 56：2907–2914.

Nie X，Singh R（2000）Detection of multiple potato viruses using an oligo(dT) as a common cDNA primer in multiplex RT-PCR. J Gen Methods 86：179-185.

Ogawa T，Nakagawa A，Hataya T，Ohshima K（2012）The genetic structure of populations in Potato virus Y in Japan: Based on the analysis of 20 full genomic sequences. J Phytopathol 160：661-673.

Ohki T，Sano M，Asano K，Nakayama T，Maoka T（2018）Effect of temperature on resistance to *Potato virus Y* in potato cultivars carrying the resistance gene *Rychc*. Plant Pathol 67：1629-1635.

Santillan FW，Fribourg CE，Adams IP，Gibbs AJ，Boonham N，Kehoe MA，Maina S，Jones RAC（2018）The biology and phylogenetics of *Potato virus S* isolates from Andean Region of South America. Plant Dis 102：869-885.

SASA（2020）Scottish seed potato classification scheme. Explanatory leaflet. Available from: https://www.sasa.gov.uk/document-library/growing-crop-leaflet.

Shi R，Panthee DR（2017）A novel plant DNA extraction method using filter paper-based 96-well spin plate. Planta 246：579–584.

Sigvald R（1985）Mature-plant resistance of potato plants against potato virus Y^O(PVY^O). Potato Res 28：135-143.

Singh RP，Dilworth AD，Singh M，McLaren DL（2004）Evaluation of a simple membrane-based nucleic acid preparation protocol for RT–PCR detection of potato viruses from aphid and plant tissues. J Virol Methods 121:163–170.

Singh RP，Kurz J，Boiteau G，Bernard G（1995）Detection of potatoleafroll virus in single aphids by the reverse transcription polymerase chain reaction and its potential epidemiological application. J Virol Methods 55：133–143.

Singh RP，Valkonen JPT，Gray SM，Boonham N，Jones RAC，Kerlan C，Schubert J（2008）Discussion paper: The naming of *Potato virus Y* strains infecting potato. Arch Virol 153：1-13.

Stevenson WR，Loria R，Franc GD，Weingartner DP（2001）Compendium of potato diseases second edition. The American phytopathological society，Minnesota，USA.

Sun K，Zhao D，Liu Y，Huang C，Zhang W，Li Z（2017）Rapid construction of complex plant RNA virus infectious cDNA clones for agroinfection using a Yeast-*E. coli*-Agrobacterium shuttle vector. Viruses 9：332.

UNECE（2018）UNECE standard S-1 seed potatoes 2018 ed. Available from: https://www.unece.org/fileadmin/DAM/trade/agr/standard/potatoes/S-1_SeedPotatoes_2018_E.pdf.

USDA（2004）Canada/US-Management Plan for potato viruses that cause tuber necrosis. Available from：https://www.aphis.usda.gov/plant_health/plant_pest_info/potato/downloads/pvy/NecroticVirusManagementPlan.pdf.

Vallejo D, Gutiérrez P, Marín M（2016）Genome characterization of a potato virus S (PVS) variant from tuber sprouts of *Solanum phureja* Juz. et Buk. Agron Colomb 34：51–60.

Varga A, James D（2005）Detection and differentiation of plum pox virus using real-time multiplex PCR with SYBR Green and melting curve analysis: a rapid method for strain typing. J Virol Methods 123：213-220.

Wale S, Platt HW, Cattlin N（2008）Diseases, pests and disorders of potatoes a colour handbook. Manson publishing, London, UK.

Zhang W, Zhang Z, Fan G, Gao Y, Wen J, Bai Y, Qiu C, Zhang S, Shen Y, Meng X（2017）Development and application of a universal and simplified multiplex RT-PCR assay to detect five potato viruses. J Gen Plant Pathol 83：33–45.

Zheng Y, Gao S, Padmanabhan C, Li R, Galvez M, Gutierrez D, Fuents S, Ling KS, Kreuze J, Fei Z（2017）VirusDetect: An automated pipeline for efficient virus discovery using deep sequencing of small RNAs. Virology 500：130-138.

Zou Y, Mason MG, Wang Y, Wee E, Turni C, Blackall PJ, Trau M, Botella JR（2017）Nucleic acid purification from plants, animals and microbes in under 30 seconds. PLoS Biol 16(5):e1002630.

佐藤仁敏，畑谷健二，岩崎真人（2000）RT-PCR によるジャガイモ休眠塊茎からの４種

ウイルス検出. 北日本病虫研報 51:87-92.

田宮 誠司(2016)ばれいしょの需要変化と品種の動向. 砂糖類・でん粉情報 10:62-69.

土崎常男, 栃原比呂志, 亀谷満朗, 柳瀬春夫(1993)原色作物ウイルス病辞典. 全国農村教育協会, 東京, 日本.

福家 宏, 佐郷勝也, 田中智(1991)ジャガイモにおけるジャガイモ Y ウイルス(PVY)の塊茎への移行について. Ann Phytopath Soc Japan 57:121.(講演要旨)

摘要

ジャガイモ（*Solanum tuberosum* L.）に感染するウイルス（ジャガイモウイルス）は 30 種以上が報告されており，そのうち potato leafroll virus（PLRV），potato virus S（PVS），potato virus X（PVX），potato virus Y（PVY）の 4 種は，世界中でジャガイモ生産に多くの被害を与えている．ジャガイモウイルスは，塊茎を通じて次世代へと伝搬するため，先進諸国では，植付け予定の種ばれいしょのウイルス感染率の検定（冬季検定）と栽培期間中の植物体のウイルス感染率の検定（夏季検定）によって種ばれいしょ生産が管理されている．本研究では，冬季検定の省力化と精度の高度化を目的としてウイルス検出技術を開発した．また，効率的な夏季検定に資する知見を得るため，病原性の異なる多数の系統が存在する PVY について，ほ場で収集した感染葉を解析した．

第1部 ジャガイモウイルス検定法の開発

現在は Enzyme-linked immunosorbent assay（ELISA）法がウイルスの検出に用いられているが，粗汁液から検出までに多くの時間と労力を要する．そこで，ろ紙を用いた簡易的な RNA 調製法および 4 種のジャガイモウイルスを対象とする multiplex reverse transcription-polymerase chain reaction（mRT-PCR）法によるウイルス検定法を開発した．簡易 RNA 調製法は，PCR チューブ内でピペット操作のみで実施でき，葉の粗汁液から RNA をろ紙に吸着させ，ろ紙を 2 種のアルコールで洗浄したのちに熱

処理で RNA を溶液中に溶出することで，RT-PCR 法の鋳型として十分な濃度の RNA 溶液を調整できた．検出法は，コンベンショナル mRT-PCR 法とリアルタイム mRT-PCR 法の 2 種類を開発した．いずれの手法も，一つのチューブで逆転写反応と PCR を連続的に行うワンステップ反応であり，クロスコンタミネーションのリスクと人為的なミスを軽減できる．コンベンショナル mRT-PCR 法では，ウイルスの多様性を考慮し，PVS は普通系統，アンデス系統およびフレーヤ系統の 3 系統，PVY は C 系統，O 系統，O5 系統，Eu-N 系統，NA-N 系統および E 系の 6 系統を検出できるようにプライマーを新たに設計し，加えて内部標準として Elongation factor 1 alpha gene（*EF1α*）特異的プライマーを設計した．これらのプライマーと既報の PLRV および PVX 特異的プライマーを用い，主要な 4 種のジャガイモウイルスを同時に検出できた．簡易 RNA 調製法と組合せ時の検出感度は，ELISA 法に比べ，PLRV と PVY では 10 倍，PVX では 1,000 倍，PVS は同等であり，種ばれいしょ検疫で用いるのに十分であった．

リアルタイム mRT-PCR 法は，各増幅産物を融点（Tm 値）で識別するインターカレーター法を用いて開発した．ウイルス特異的プライマーと *EF1α* 特異的プライマーは，増幅産物の Tm 値が重複しないように新たに設計した．その結果，4 種のジャガイモウイルスを同時検出でき，各ウイルスの国内分離株は Tm 値により識別できた．国内分離株の増幅産物の Tm 値の計算値と測定値と比較したところ，強い直線的な相関（$R^2 = 0.9875$）があり，計算値は十分な信頼性があった．各ウイルスの国外分離株の

増幅産物の Tm 値を計算したところ，昇順に，PVY は 77.7 – 79.5，PVS は 81.0 – 82.5，PVX は 84.5 – 85.5 および PLRV は 87.0 – 87.5 となり重複していないことから，本法は海外分離株も診断できると考えられた．また，健全葉の粗汁液を用いて作製したウイルス感染葉の粗汁液の希釈系列を用いたモデル試験の結果，簡易 RNA 調製法とリアルタイム mRT-PCR による検定法は，葉 100 枚をまとめて検定するのに十分な検出感度があった．

第 2 部 ジャガイモ Y ウイルスの発生系統の解析ならびに塊茎伝搬率の解析

2016 年から 2018 年にジャガイモほ場から収集した PVY 感染葉 107 試料を解析したところ，NTN 系統が 86.0%，NA-N 系統が 7.5%、O 系統が 5.6%であった．また，未報告の組換え体（JPH1806）が検出され，ゲノム解析の結果，JPH1806 は NTN 系統を主な親系統とし，NA-N 系統と O 系統の 3 系統の組換え体であることが推定された．NTN 系統がほ場で優占している要因を解明するため，系統間の塊茎伝搬率を比較した．植付け 4 週間後に汁液接種し，病徴あるいは上位葉の遺伝子診断により PVY の感染を確認し，植付け 12 週後に感染株から収穫した塊茎を調査した．その結果，NTN 系統は 3 品種全てで 100%，NA-N 系統は男爵薯で 88.3%，トヨシロで 63.2%およびコナヒメで 97.9%，O 系統は男爵薯で 14.3%，トヨシロで 0%およびコナヒメで 100%の塊茎から PVY が検出された．以上より，NTN 系統の塊茎伝搬率が 3 品種全てで高かった．

生育後期における塊茎伝搬率を比較するため，トヨシロを供試し，植付け 8 週後から 11 週後にかけて汁液接種して植付け 12 週後の塊茎を調査したところ，植付け 8 週後に NTN 系統を接種した試験区でのみ 16.7%の塊茎から PVY が検出され，それ以外の試験区の塊茎は検出されなかった．以上より，NTN 系統は，品種に関わらず高い塊茎伝搬率を有し，かつ，生育後期の感染でも塊茎まで移行できることが優占している要因の一つであると考えられた．

総合考察

種ばれいしょ検疫は，多数の試料を検査するため，数十枚の葉を 1 試料としてスクリーニングをし，陽性となった試料は 1 枚ずつ個別に検査してウイルス感染率を確認している．開発したコンベンショナル mRT-PCR 法とリアルタイム mRT-PCR 法は，それぞれ増幅産物の断片長と融点で識別するため，両方の手法を用いることで高精度にウイルスを検出できる．そのため，リアルタイム mRT-PCR 法でスクリーニングを行い，コンベンショナル mRT-PCR 法で個別に検査することで，省力的かつ高精度にウイルスを検出できる．

塊茎伝搬率の解析から，NTN 系統が優占している要因とし，他の系統に比べ，ジャガイモの植物内での移行速度が早いことが示唆された．これまでは大腸菌を用いて PVY の感染性クローンを作ることができなかったが，近年，感染性クローンの作出に成功した報告がある．今後，感染性クローンを用いた解析により，ジャガイモ植物

内での移行速度の系統間での差が解明されることが期待できる.

JPH1806 は, ゲノム解析の結果から NTN 系統を親株とし, 国内で 2 回の組換えが起きていることが示唆された. また, NTN 系統は, 20 世紀半ば以降に, O 系統と Eu-N 系統を親株として 2 回の組換えにより発生したと推測されている. そのため, わずか 150 年前後の間に 4 回の組換えが起きている可能性があり, JPH1806 は PVY の組換えによる進化を考察する上で重要なサンプルであると考えられる.

最後に, 本研究では国内の種ばれいしょ検疫の省力化および効率化を目的とし, 4 種のジャガイモウイルスの検出技術の開発ならびに PVY の系統の構成および塊茎伝搬率を解析した. 得られた技術や知見は, ジャガイモの安定生産への貢献が期待される.