



Title	ジャガイモ健全種苗育成に向けたウイルス除去技術の省力化・効率化に関する研究
Author(s)	鈴木, 智
Description	この博士論文の全文は利用可能日以降に公開されます。利用可能日以前の閲覧方法は https://www.lib.hokudai.ac.jp/dissertations/copy-guides/ をご参照ください。
Degree Grantor	北海道大学
Degree Name	博士(農学)
Dissertation Number	甲第16685号
Issue Date	2025-12-25
DOI	https://doi.org/10.14943/doctoral.k16685
Doc URL	https://hdl.handle.net/2115/98659
Type	doctoral thesis
File Information	SUZUKI_Tomo_abstract.pdf, 論文内容の要旨 https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/



学 位 論 文 内 容 の 要 旨

博士の専攻分野の名称： 博 士（農学）

氏名 鈴 木 智

学 位 論 文 題 名

ジャガイモ健全種苗育成に向けたウイルス除去技術の省力化・効率化に関する研究

ジャガイモは栄養繁殖性作物であり、栽培期間中にウイルスに感染すると、種イモを介して次世代へ感染が伝播する。また、増殖率は約 10 倍と穀類に比べて著しく低いため、国内では、市場に流通するまでに 5 年以上をかけて、段階的に増殖する体系が採用されている。新品種を導入する場合、農研機構種苗管理センターにおいて、ウイルス非感染（ウイルスフリー）が確認された培養苗から増殖が開始される。ウイルスフリー培養苗の作出には、ウイルス感染塊茎のスクリーニング検査、茎頂培養によるウイルスフリー化処理、再生培養苗のウイルスフリー確認検査といった工程を経る必要がある。しかし、これらの工程で用いられる RT-PCR によるウイルス検定は、RNA 抽出操作にかかる作業負担が大きいことに加え、国内で発生が報告されている全 12 種のウイルスに対応可能なプライマーセットが未整備という課題がある。また、ジャガイモの茎頂培養技術は、0.2～1.0 mm の茎頂組織を無菌培養で再生させ、ウイルスを除去する方法である。切除サイズが小さいほどウイルス除去率は高まるが、再生率が低下し再生期間も長期化する。よって、ウイルス除去効率の向上や植物体の再生期間の短縮など、作業の簡便化・効率化に繋がる技術的な改良が求められている。本研究では、これら課題の解決とジャガイモのウイルス除去技術の基盤強化を目的として、省力的なウイルス検定法の開発および RNA サイレncing 機能の活性化に着目した茎頂培養技術の改良に取り組んだ。

1. 熱処理鋳型調製法を用いた RT-PCR による省力的なウイルス検定法の開発

茎頂培養に使用する塊茎のスクリーニング検査は、従来、Trizol 法で精製した RNA を用いた RT-PCR により行われており、多検体の検査には大きな作業負担が伴っていた。そこで、これに代わる簡易手法として、ジャガイモ葉の粗汁液から、RNA 抽出操作を省略した RT-PCR により国内主要 4 種ウイルス（ジャガイモ葉巻ウイルス（PLRV）、ジャガイモ S ウイルス（PVS）、ジャガイモ X ウイルス（PVX）、ジャガイモ Y ウイルス（PVY））を迅速に検出する新規検定法を開発した。本法は、ジャガイモ葉の希釈粗汁液を主要 4 種ウイルスおよびジャガイモ遺伝子 *EF1 α* を同時検出するプライマーミックス A と混合し 70℃で熱処理する「熱処理鋳型調製法」により RT-PCR 鋳型を調製し、one-step multiplex RT-PCR によりウイルスを同時検出する。本検定法の特徴は粗汁液とプライマーを混ぜて熱処理する点にあり、粗汁液単独で熱処理するよりもウイルスを高感度に検出できる。検出感度は ELISA やろ紙による RNA 簡易抽出法（ろ紙法）を用いた RT-PCR と同等以上であり、鋳型調製に要する時間も大幅に短縮した。さらに、熱処理鋳型調製法は塊茎組織からの直接検出やリアルタイム RT-PCR にも適用できることを確認した。本法は、鋳型調製に劇物試薬を使用しないことから安全性にも優れており、スクリーニング検査の省力化および迅速化に資する新たな技術として有望である。

2. 国内既報告ウイルス8種を対象としたプライマーセットの整備と育種圃場周辺におけるウイルス発生調査

国内で発生が報告されている12種ウイルスのうち、主要4種以外の8種ウイルスから、それぞれ4種ずつ検出するプライマーミックスBおよびCを設計した。これらに熱処理鋳型調製法を用いたRT-PCRを適用したところ、ミックスBでは80℃、ミックスCでは98℃での熱処理によって、ろ紙法のRNA溶液を用いたRT-PCRと同等以上の検出感度が得られた。これにより、国内報告のある12種のジャガイモウイルスをRT-PCRで効率的に検出することが可能となった。これらのプライマーセットを用いて、北海道芽室町のジャガイモ遺伝資源保存圃でウイルス発生調査を実施したところ、PVSが最も多く検出され、次いでPVXおよびPVYが検出された。また、一部の品種ではPLRVやジャガイモMウイルスも検出された。これらの結果から、本プライマーミックスの実用性が示されるとともに、新品種導入の際に12種ウイルスを検定することの重要性が確認された。

3. ジャガイモの茎頂培養によるウイルスフリー化技術の改良

始めに、ジャガイモ培養苗の節分割培養の培地および光条件を検討し、茎頂材料の効率的な作出法を確立した。そのうえで、PVSに感染した‘男爵薯’培養苗を対象に、アスコルビン酸誘導体、ジャスモン酸系誘導材 YNU-001、PVS 特異的な低分子干渉 RNA (siRNA) の各処理がウイルスフリー化や生育へ与える影響を検討した。アスコルビン酸誘導体添加培地での茎頂培養では PVS 除去効果は限定的であったが、生育促進効果が認められた。特に 3-O-エチル-L-アスコルビン酸添加培地では、複数の品種において再生期間の短縮と再生率の向上が確認されたことから、効率的な培養苗の生産に有効であると考えられた。一方、生産現場では培養変異の発生が問題となることから、技術の実用化に向けてアスコルビン酸誘導体がジャガイモの生育に与える長期的な影響評価が必要である。YNU-001 を使用した茎頂培養では、10 μ M 添加培地において、0.5~0.7 mm サイズの茎頂における PVS 陽性率が有意に低下した。一方で、生育異常や再生期間の長期化が認められた。アスコルビン酸誘導体の同時添加による再生期間の短縮や、通常培地への植え継ぎによる生育の回復が確認されたものの、生育への影響を完全には防げないため、さらなる条件検討が必要である。また、ジャガイモに副作用の少ない YNU-001 の類縁体の探索も有望なアプローチだと考えられる。siRNA については、PVS 感染ジャガイモから得られた small RNA 配列を PVS ゲノムにマッピングすることで、PVS を標的とする siRNA を推測・設計した。PVS を接種したアカザやセンニチコウでは、siRNA 処理によるウイルス抑制効果が確認できたが、PVS 感染ジャガイモ由来の茎頂組織断片では確認できなかった。茎頂組織断片への siRNA 処理は、ニンニクで使用する針刺法を用いたが、組織ダメージが大きく再生率が大きく低下していた。今後、効率的な siRNA の導入方法の確立が必要である。

本研究では、熱処理鋳型調製法およびジャガイモの国内発生ウイルス12種に対応可能なプライマーセットを開発することで、ウイルスフリー化事業におけるウイルス検定作業の省力化と検査体制の強化を可能にした。特に、熱処理鋳型調製法は他作物や他ウイルス種への応用展開が期待できる汎用性の高い技術であり、種イモ生産にとどまらず、さまざまな作物に対する検定体制の強化にも貢献できる。また、茎頂培養技術の改良については、さらなる技術の最適化が必要であるものの、アスコルビン酸誘導体の生育促進効果、YNU-001 による PVS 除去効果、さらに抗 PVS 効果を示す siRNA の設計など、有用な知見が得られた。これらの成果は、ウイルスフリー苗の迅速な供給体制の構築に寄与し、ジャガイモ健全種苗生産の効率化と安定化に資する技術基盤の強化に大きく貢献する。