

ニンニクのウイルスフリー化技術の改良及び アレキシウイルスのコートタンパク質遺伝子と CRP 遺伝子の機能解析

生物資源科学専攻 植物育種科学講座 植物病原学 高橋 春南

1. はじめに

ニンニクは栄養繁殖性の作物であり、感染したウイルスが次世代に持ち越されてしまうという問題がある。ウイルスは、圃場や貯蔵中での虫媒感染によって広がっていく。ニンニクのウイルスフリー化には茎頂培養が用いられるが、ウイルスフリー化苗をより早く、確実に作ることが望まれる。本研究では、ニンニクのウイルスフリー化の促進を目的として、ウイルスフリー化技術を改良した。また、ニンニクに感染するアレキシウイルスは、いまだに多くのことが解明されておらず、ニンニク栽培に大きな影響を与えるウイルスの一つである。コートタンパク質 (CP) 遺伝子およびシステインリッチタンパク質 (CRP) 遺伝子の配列に基づいて、アレキシウイルスは 2 つの主要なグループ (グループ I およびグループ II) に分類されることが報告されている。本研究ではグループ II に含まれる Garlic virus B (GarVB) と、グループ I に含まれる Garlic virus D (GarVD) に着目し、CP 遺伝子と CRP 遺伝子の機能解析を行った。

2. 方法

- 1) **茎頂組織への dsRNA, siRNA 処理** Leek yellow stripe virus (LYSV) から dsRNA, siRNA を作製し、0.5 mm の大きさに切りだした茎頂にそれら进行处理した。20 日間 MS 培地上で培養し、葉の先端から RNA 抽出し、One Step RT-PCR (40 サイクル) によってウイルス検定を行った。無処理区に対するウイルス除去率を比較した。
- 2) **CP 遺伝子と CRP 遺伝子の機能解析** CRP と、CP から CRP にかけてのコンストラクトを potato virus X (PVX) ベクターにクローニングし、*N. benthamiana* に接種したときの PVX の蓄積量を調査した。また、その病徴を観察した。CP と CRP をそれぞれ pBE2113 ベクターにクローニングし、アグロバクテリウムに入れた。次に *N. benthamiana* とタマネギにアグロインフィルトレーションによってそれらを発現させ、RNA サイレンシングサプレッサー (RSS) 能力を検定した。GarVB と GarVD の CRP の C 末端に GFP を付加し、*N. benthamiana* にアグロインフィルトレーションを行い、細胞内での局在を観察した。

3. 結果と考察

- 1) **siRNA, dsRNA 処理によるウイルスフリー化の促進** siRNA, dsRNA を処理することで、ニンニクの茎頂培養におけるウイルスフリー化率を増加させることができることが示された。
- 2) **GarVB と GarVD の CP と CRP の異なる性質を持つ** GarVB は CRP 単独の時よりも CP-CRP の時のほうが PVX の蓄積量は増加したが、GarVD にはそのような違いは見られなかった。GarVB の CRP は RSS 能力を持っていたが、GarVD は持っていなかった。GarVB と GarVD は細胞内で異なる場所に局在していた。

4. まとめ

- 1) dsRNA, siRNA をニンニク茎頂に処理すると、人為的に RNA サイレンシングを誘発させ、ウイルスフリー化を促進できる。
- 2) GarVB と GarVD の CRP は異なる細胞内局在を示し、RSS 活性は GarVB のみに認められた。