

サテライト RNA
遺伝子の導入によるキュウリモザイクウイルス抵抗
性トマトに関する研究：第3報 サテライト RNA
の転写および伝搬による変異性の解明

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 公開日: 2019-03-22 キーワード (Ja): キーワード (En): 作成者: 眞岡, 哲夫, 早野, 由里子, 河辺, 邦正, 福本, 文良, 柏崎, 哲, 岩崎, 真人 メールアドレス: 所属:
URL	https://doi.org/10.24514/00001346

サテライトRNA遺伝子の導入による
キュウリモザイクウイルス抵抗性トマトに関する研究
第3報 サテライトRNAの転写および伝搬による変異性の解明
眞岡 哲夫¹⁾・早野由里子²⁾・河辺 邦正³⁾・福本文良⁴⁾・
柏崎 哲・岩崎 真人

目次

- [I. 緒言](#)
- [II. 材料および方法](#)
 - [1. 植物およびウイルス](#)
 - [2. ウイルスの純化および検出](#)
 - [3. 「No.4-7」のゲノム内における導入遺伝子のコピー数の推定](#)
 - [4. 継代接種によるsat55-1の変異性](#)
 - [5. 塩基配列の決定](#)
 - [6. 変異率の算出](#)
 - [7. 暴露栽培試験](#)
 - [8. 長期モニタリング試験 \(第2図J¹, J², W¹, W²\)](#)
- [III. 結果](#)
 - [1. 「No.4-7」のゲノム内における導入遺伝子のコピー数の推定](#)
 - [2. sat55-1の継代接種による変異性の解明](#)
 - [3. 組換え体からのsat55-1^{*}の分離と変異性の解明](#)
 - [4. 自然条件下でのsat55-1^{*}の伝搬と変異](#)
 - [5. 同一感染個体内におけるsat55-1^{*}の変異の長期モニタリング](#)
 - [6. sat55-1^{*}がヘルパーウイルスに与える影響](#)
 - [7. sat55-1および「No.4-7」の安全性](#)
- [IV. 考察](#)
- [V. 謝辞](#)
- [VI. 摘要](#)
- [VII. 引用文献](#)
- [SUMMARY](#)

平成20年1月8日原稿受理

旧生産環境部ウイルス病研究室

- 1) 現 バレイショ栽培技術研究チーム
- 2) 現 病害抵抗性研究チーム 特命チーム員
- 3) 現 国際農林水産業研究センター
- 4) 現 中央農業総合研究センター

[次へ進む](#)

サテライトRNA遺伝子の導入による
キュウリモザイクウイルス抵抗性トマトに関する研究
第3報 サテライトRNAの転写および伝搬による変異性の解明
眞岡 哲夫¹⁾・早野由里子²⁾・河辺 邦正³⁾・福本文良⁴⁾・
柏崎 哲・岩崎 真人

I. 緒言

植物ウイルスの粒子中には、サテライトRNAと呼ばれる低分子のRNAが付随している場合がある。サテライトRNAはウイルス本体の増殖には不可欠なものではなく、その機能は未だ解明されていないが、あるものはウイルスが寄生した植物の病徴の強弱に関与することが知られている (Roossinck et al., 1992)。

野菜・花き類を中心に広く発生し、特にトマトの難防除ウイルスの一つであるキュウリモザイクウイルス (CMV) については、CMVによるトマトの病徴発現にサテライトRNAが大きく関与することが報告され、病徴を弱める性質を持つ弱毒性のサテライトRNAを用いてCMV弱毒株が作出された (吉田, 1986)。しかし、この弱毒ウイルスは、定植前のトマト幼苗一つ一つにあらかじめ接種しておく作業が必要であり、さらに簡便な防除法の開発が求められた。そこで、弱毒ウイルスに利用したサテライトRNA, sat55-1のcDNAを遺伝子導入し、トマト体内でsat55-1を常時発現させることにより、感染したCMVを直ちに弱毒化できる、ウイルス抵抗性トマト「No.4-7系統」(以下「No.4-7」と略記)を作出した (河辺ら, 2002)。

ある弱毒サテライトRNAについては、実験的に増殖を繰り返すことで強毒化することが報告されている (Palukaitis and Roossinck, 1996)。また、弱毒サテライトRNAを利用した組換え植物では、他の組換え植物と異なり、組換え体由来のサテライトRNAが、感染したCMVのウイルス粒子内に取り込まれ、媒介生物により容易に組換え体外に水平伝搬し、ウイルスの増殖・伝搬により周辺環境に無制限に拡散する可能性がある。

これまで著者らは、「サテライトRNA遺伝子の導入によるキュウリモザイクウイルス抵抗性トマトに関する研究」として、ウイルス抵抗性トマト「No.4-7」の作出および遺伝様式 (河辺ら, 2002, 以下第1報とする)、形態・生育特性と環境に対する安全性評価 (岩崎ら, 2005, 以下第2報とする) について報告してきた。本報告は、上記研究の最終報となるもので、「No.4-7」の実用化を想定し、「No.4-7」にCMVが感染した際に、ウイルス粒子内に取り込まれて増殖するsat55-1が強毒性に変異する可能性について検討した。また、上記のように組換え体由来の遺伝子が容易に環境中に水平伝搬するようなタイプの組換え植物の安全性については、これまで確立された評価手法がなかったため、同植物の評価手法についても考察することとし、これらにより組換え体の産業的利用のための安全性を確保することを目的とした。

本研究は、農林水産省のプロジェクト研究「組換え体の産業的利用における安全性確保に関する総合研究 (平11-13)」「遺伝子組換え体の産業利用における安全性確保総合研究 (平14-17)」の予算を受託し行ったものである。

平成20年1月8日原稿受理

旧生産環境部ウイルス病研究室

- 1) 現 バレイショ栽培技術研究チーム
- 2) 現 病害抵抗性研究チーム 特命チーム員
- 3) 現 国際農林水産業研究センター
- 4) 現 中央農業総合研究センター

[次へ進む](#) [前に戻る](#) [目次に戻る](#)

サテライトRNA遺伝子の導入による
キュウリモザイクウイルス抵抗性トマトに関する研究
第3報 サテライトRNAの転写および伝搬による変異性の解明

II. 材料および方法

1. 植物およびウイルス

継代接種によるsat55-1の変異性試験には、タバコ*N. tabacum* cv. Xanthi ncおよびトマト品種「桃太郎」を、自然条件下でのsat55-1の伝搬試験には、同遺伝子を導入した組換えトマト「No.4-7」（自殖後代ホモ系統、原品種「秋玉」、岩崎ら、2005）およびトマト品種「桃太郎」を、また、同一個体内における長期モニタリング試験には、トマト品種「秋玉」を用いた。ヘルパーウイルスとして本試験に供試したCMVは、P7（病原性弱）、95-17（病原性中）および42CM（病原性強）の各分離株である。これら3分離株はいずれもサテライトRNAを保有していない株である。なお、以降「No.4-7」に由来するsat55-1を、他と区別するためにsat55-1*と表記する。

2. ウイルスの純化および検出

CMVの純化は、TOCHIHARA（1970）の方法に準じ、第1報（河辺ら、2002）に記した方法で行った。ウイルスの検出は、特に記さない限りELISA法を用いて行った（CLARK and ADAMS, 1977）。

3. 「No.4-7」のゲノム内における導入遺伝子のコピー数の推定

sat55-1遺伝子組換えホモ個体である「No.4-7」（98年採種、4-7/98）とその自殖後代（99年採種、4-7/99）から、CTAB法（MUURRAY and THOMPSON, 1980）によりゲノムを抽出し、制限酵素（*Xba*I, *Eco*RI, *Hind*III, *Pst*I, 各10 units/ μ g DNA）で消化後、0.8%（w/v）アガロースゲルにより電気泳動し、ナイロンメンブレンHybond N+（GEヘルスケア）に転写し、これをサザンハイブリダイゼーション用フィルターとした。プローブの標識、ハイブリダイゼーションおよび検出は、DIG DNA Labeling and Detection Kit（Roche, Germany）により行った。プローブには、導入遺伝子検出用として、遺伝子導入に用いたバイナリベクターpBI121（TOYOBO, Japan）の35Sターミネーター部分からsat55-1の3'-末端部までの断片（河辺ら、2002）、PBI55-1（875 bp, 増幅プライマー35S3F:5'-CTTACGACTCAATGACAAGAAGAA-3', BK2: 5'-GGGTCCTGTAGAGGAATGTC-3'）を用いた。トマトmRNAのRT-PCRより得られた、光合成の炭酸固定反応を担うリブローズビスリン酸カルボキシラーゼスモールサブユニット3A遺伝子（DDBJ/EMBL/GenBank, accession number X66070, 全長567 bp）の部分断片、LeRBCs3A（506 bp, 増幅プライマーF:5'-GAAAATCTGAATGTGTCTGCCC-3', R:5'-TGAGGACATTACTGAAGAACC-3'）を対照として用いた。

4. 継代接種によるsat55-1の変異性

PALUKAITIS and ROOSSINCK（1996）の継代接種試験に準じて行った。sat55-1のcDNAから合成したRNAと3種の純化ヘルパーウイルス（P7, 95-17, 42CM）をそれぞれ混合後、トマトに汁液接種し、これを継代前株とした。継代前株より純化したCMV（濃度50 μ g/mL）を新たなタバコおよびトマト苗に接種した。これを10回繰り返すことにより10代継代とした。継代前株および10代継代株を継代変異性試料とした。また、P7, 42CMの5代継代株および10代継代株より純化した

ウイルスをタバコおよびトマトに接種し、病徴を調べた。

5. 塩基配列の決定

RNAの抽出は、各試料より TRIZOL (Invitrogen, USA) またはSepaGene (三光純薬) を用いて行った。これを鋳型としsat55-1両端配列をプライマー (AK1, BK2, [第1表](#)) としてRT-PCR (RNA PCR kit ver.1.0, TaKaRa, Japan) を行った。増幅断片をTA-cloning法によりクローニングし、各試料につき3クローンの塩基配列をダイターミナルシーケンス反応により、Genteic Analyzer ABI 310 (ABI, USA) を用いて調べた。

また、CMV感染タバコ葉から精製したRNAを鋳型に、CMV subgroup IのRNA 1 および2の全長を増幅するプライマーセット (QI5', m2-2-33, [第1表](#)) および同RNA 3の全長を増幅するプライマーセット (CMV3I5', CMV3I3', [第1表](#)) を用い、RNA LA PCR Kit (AMV) Ver.1.1 (TaKaRa) を使用し添付説明書に従って各全長cDNAを増幅した。プライマーのうちQI5', m2-2-33は、北海道大学大学院農学研究院、増田税教授より提供いただいた。増幅産物をSizeSep 400 Spun Columns (Amersham Pharmacia Biotech Inc, UK) で精製し、pT7BlueT-Vector (Novagen, USA) またはTOPO TA Clonig Kit (Invitrogen) を用いてクローニングした。シーケンスは、全長cDNAが挿入された精製プラスミドを鋳型に、[第1表](#)のプライマーによるPrimer Walking法で行った ([第1図](#))。5'および3'末端配列の決定は、純化ウイルスから抽出したRNAを鋳型に、PolyA Tailing Kit (Ambion, USA) とSMART RACE cDNA Amplification Kit (Clontech, USA) を用い、それぞれ添付説明書の方法に従って行った。他については第1報 (河辺ら, 2002) と同様の方法で行った。

6. 変異率の算出

遺伝子の変異を数値化して比較するため、組換え体の導入遺伝子として用いたsat55-1 ([第2図A](#)) の塩基配列を基準として、各試料より得られたsat55-1の塩基配列における置換・欠損塩基数の割合を「変異率」として定義した。すなわちここでいう変異率とは、塩基配列を解読した3クローンの塩基配列総数に占める置換・欠損が起きた塩基数の割合である。同様な計算方法を用いて、ヘルパーウイルスの変異の割合を求めた。

7. 暴露栽培試験

自然条件下でCMVおよびアブラムシにより水平伝搬されるsat55-1*の変異を調べるために、以下の暴露栽培試験を行った。

1) 試験1 ([第2図G](#))

北海道農業研究センター隔離圃場において、健全トマト「桃太郎」苗120株 (株間50cm, 30株/畝, 畝間80cm) と、42CM感染「No.4-7」を、交互に配置して栽培した (2001年7月~9月)。栽培終了後、ELISA法によりCMV感染が認められたトマト株について、sat55-1*の有無とその塩基配列を解析し、変異性の検討に供した。CMV感染が認められなかったトマト株は、汁液をタバコへ戻し接種し、ELISAおよび電顕観察によりCMV感染の有無を再検討した。

2) 試験2 ([第2図I](#))

アブラムシを誘引する黄色板 (90×180cm) 上に、42CM感染「No.4-7」23株と、トラップ用の健全トマト「桃太郎」苗22株を交互に配置し、同隔離圃場で15日間暴露栽培した。本試験は2002年の6月15日から9月15日にかけて6回実施した。栽培終了後ELISA法によってCMVの感染が認められたトマト株は、sat55-1*の有無とその塩基配列を解析し、変異性の検討に供した。

8. 長期モニタリング試験 ([第2図J1](#), [J2](#), [W1](#), [W2](#))

「No.4-7」に42CMを接種し、sat55-1*を保有する42CM (sat55-1*) 株を作出し、健全トマト「秋玉」に汁液接種した。このCMV接種トマトを温室内で維持・栽培した。CMV接種より1年後および2年後にトマト植物体の一部を採集し、変異率の算出試料とした。対照として、「No.4-7」由来ではない、野生型sat55-1を保有する42CM (sat55-1) を用いて、同様に接種・栽培した。

[次へ進む](#) [前に戻る](#) [目次に戻る](#)

サテライトRNA遺伝子の導入による
キュウリモザイクウイルス抵抗性トマトに関する研究
第3報 サテライトRNAの転写および伝搬による変異性の解明

III. 結果

1. 「No.4-7」のゲノム内における導入遺伝子のコピー数の推定

sat55-1 (DDBJ/EMBL/GenBank, accession number AB072502) および「No.4-7」が産生するsat55-1*の変異性を解明するにあたり、「No.4-7」に導入された遺伝子のコピー数が1コピーで、単一の導入遺伝子から転写が起きているのか、あるいは数コピーの導入遺伝子からそれぞれ転写が起きているのかを明らかにする必要がある。そこで、非組換え原品種「秋玉」および「No.4-7」の採種年次の異なる種子より育成した植物体4-7/98および4-7/99のゲノミックサザンハイブリダイゼーションを行った。PBI55-1プローブは、非組換え原品種「秋玉」ゲノムには反応しなかったが、導入遺伝子ホモ系統「No.4-7」の採種年次の異なる種子より育成した植物体4-7/98および4-7/99のゲノムに特異的にシグナルを呈し、組換え体においてsat55-1遺伝子が特異的に存在する事を示した(第3図)。また、4-7/98および4-7/99においては、トマトゲノムに1コピー存在するリブ्रोスビスリン酸カルボキシラーゼスモールサブユニット3A遺伝子と同様に、いずれの制限酵素によっても単一バンドを示し、sat55-1遺伝子は、「No.4-7」ゲノム上に1コピー導入されていると推測された。

2. sat55-1の継代接種による変異性の解明

sat55-1を取り込んだCMVによる病徴は軽減することが知られている。継代接種を繰り返すことにより人工的にsat55-1の増殖速度を高め、その病徴を調べた。病徴の軽減は継代接種によっても大きくは変わらず、継代による病徴の強毒化はみられなかった。病原性の強い42CM接種トマトでは、継代接種10回目に病徴がやや顕在化したものの、対照株(sat55-1非混合接種)に比べ、病徴は大きく軽減していた。一方本来病原性の弱いP7接種トマト株では、継代接種前後で病徴の変化は認められなかった。特に、sat55-1の有無にかかわらずトマトではタバコよりも病原性が軽く、いずれも無病徴であった(第2表)。

sat55-1の塩基配列を継代前後で比較したところ、5'から44番目と287番目では、どのヘルパーCMVを用いてもそれぞれG→A, C→Aへの置換が起きていた。これらの塩基置換は、sat55-1がヘルパーウイルス粒子に取り込まれる際に起きた場合と、材料に用いたsat55-1を増殖、精製する際、鋳型となったRNAが変異していた可能性が考えられるが、そのどちらであったかは断定できない。これ以外の部分における塩基配列のクローン間の不一致は、継代前よりも継代後で多く見られ、接種の繰り返しにより変異した分子種が増えていることが示唆された(第4図)。ヘルパーCMVの種類と継代によるsat55-1の変異率を比較したところ、P7継代前、95-10継代前および95-10継代後の組み合わせで0.77%と最小となり、42CM継代後の組み合わせで最大の1.11%となった(第3表)。この結果から、sat55-1の変異率は、ヘルパーウイルスの種類によって異なることが示された。トマトのえそ症状に関与するといわれている領域(MASUTA et al., 1990, TALIANSKY et al., 1998) (336-346番目)は、継代接種を繰り返しても全く変異は起きなかった(第4図)。

以上のように、継代により、sat55-1の塩基配列には変異が認められたが、いずれも病徴の強毒化に関わる領域外であった。また病徴観察においても、継代による強毒性への変異はなかった。

3. 組換え体からのsat55-1*の分離と変異性の解明

第2図に掲げた遺伝子導入各段階B～Dにおけるsat55-1*の塩基配列を解析し、導入前のsat55-1の配列(A)と比較し、変異の有無を調べた。B～Dまでの各段階より得られたsat55-1*配列は、導入前の塩基配列と完全に一致し、変異は見られなかった(第2図 A-D)。しかし、「No.4-7」のゲノムDNAから転写されたmRNAでは、シークエンスした3クローン中1クローンで、1個所置換が認められ、変異率は0.09%となった(同E)。また、組換え体中でCMVに取り込まれ組換え体外に水平伝搬したsat55-1*の変異率(ヘルパーウイルス42CM, 接種1回)は、0.85%であった(同F)。

4. 自然条件下でのsat55-1*の伝搬と変異

方法に記述した2種の暴露栽培試験を実施し、「No.4-7」から自然環境下に水平伝搬したsat55-1*の変異性を検討した。

1) 試験1

ELISAの結果、トラップ用トマト供試株120株中1株でCMV感染が認められ、同株からsat55-1*が検出された。その塩基配列は、sat55-1とほぼ一致したが、2個所で変異が認められ、5'から275番目ではシークエンスした3クローン中1クローンでA→Cへの置換が、2クローンでは欠損が認められた。5'から287番目では、3クローン中1クローンでC→Aへの置換が認められ、変異率は0.46%となった(第5図, 第2図 G)。この変異率は、汁液接種による変異率(第2図 F)より小さかった。強毒化に関与しているといわれている領域に変異は認められず、sat55-1*の病原性に変化は見られなかった。

2) 試験2

トラップ用トマト供試株合計132株中4株からsat55-1*が検出された(第6図, 第2図 T)。これらの株はほとんど病徴を示さなかった。その塩基配列は、sat55-1の配列とほぼ一致したが、3個所で変異が認められ、株番号2-3の5'から272番目ではシークエンスした3クローン中1クローンで欠損が認められた。株番号5-10では、5'から267番目と353番目で、それぞれ3クローン中1クローンでT→Cへの置換が認められた(第7図)。自然条件下のトラップ試験におけるアブラムシ伝搬によるsat55-1*の変異率は0%～0.17%で、同暴露栽培でのアブラムシ伝搬による変異率(第2図 G)および汁液接種による変異率(同F)より小さかった。強毒化に関与しているといわれている領域に変異は認められず、sat55-1*の病原性に変化は見られなかった。

以上の2つの暴露栽培試験の結果、自然環境下において、組換え体からアブラムシによりCMVが伝搬され、それに伴ってsat55-1*も自然環境下に水平伝搬することが実験的に示された。また、解析した5株のCMVに含まれていたsat55-1*では、強毒化は認められなかった。

5. 同一感染個体内におけるsat55-1*の変異の長期モニタリング

「No.4-7」から組換え体外に水平伝搬したsat55-1*が長期間同一植物体内で維持された場合、病原性が強毒化する可能性を明らかにするためモニタリングを行った。sat55-1*を粒子内に保有するCMV, 42CM (sat55-1*)に感染したトマトは、接種1年後および2年後においても、その病徴

は軽く、植物体内で維持されているsat55-1*の病原性には変異はないと推測された。これらsat55-1* (第2図 J¹, J²) の塩基配列は、接種1, 2年後にそれぞれ5, 14個所で変異が認められた。その変異率は、0.43%, 1.19%となり、野生型サテライトRNAの変異率(1年後0.85%, 2年後1.96%, 第2図 W¹, W²) より小さかった。

6. sat55-1*がヘルパーウイルスに与える影響

sat55-1*がヘルパーウイルスに与える影響を調べる目的で、CMV (42CM) (第2図 HV) のRNA 1~3の全塩基配列(8,613塩基)を決定した(DDBJ/EMBL/GenBank accession number AB368496, AB368497, AB368498)。前項のモニタリング用感染植物体から接種2年後にRNAを抽出し、ヘルパーウイルスの全塩基配列を調べた結果、変異率は0.32%となった(第2図 HV²)。サテライトRNAのヘルパーウイルスへのパッケージングに関与する遺伝子領域(RNA1の1a領域, ROOSSINCK et al., 1997, YAMAGUCHI et al., 2005)に顕著な変異は認められなかった。

7. sat55-1および「No.4-7」の安全性

sat55-1のタバコによる継代接種の病徴(第2表)と変異率(第3表)から明らかのように、PALUKAITIS and ROOSSINCK (1996)が指摘したような強毒化は一例も認められず、sat55-1の弱毒性は安定しており、安全性は高いものと判断された。

また、諸条件下における「No.4-7」由来のサテライトRNA, sat55-1*の変異率(第4表)をみると、ヘルパーウイルス(42CM)に比べ変異率は高いものの、様々な条件下においても導入遺伝子の強毒化は認められなかった。以上から、遺伝子導入に用いたsat55-1およびsat55-1*を産生する組換えトマト「No.4-7」の高い安全性が確認された。

[次へ進む](#) [前に戻る](#) [目次に戻る](#)

サテライトRNA遺伝子の導入による
キュウリモザイクウイルス抵抗性トマトに関する研究
第3報 サテライトRNAの転写および伝搬による変異性の解明

IV. 考察

組換え体由来のサテライトRNAの安全性評価

PALUKAITIS and ROOSSINCK (1996) は、弱毒サテライトRNAを含むCMVの継代接種を繰り返すと病原性が強毒化することを報告し、弱毒サテライトRNAの安全性を確認する重要性を示した。本試験に供試されたサテライトRNA, sat55-1は、PALUKAITIS and ROOSSINCK (1996) と同様な条件で継代接種を繰り返しても、えそ症状などの強毒性を示すものではなく、その弱毒性がきわめて安定性の高いものであることが示された。次に、さまざまな条件下における組換え体由来のsat55-1*の塩基配列の変化を変異率で見ると、遺伝子導入の各段階では全く変異は認められず、同一個体内での1年維持 (0.43%) , アブラムシによる自然感染 (最大0.46%) , 継代接種10回 (1.11%) , 同一個体内での2年維持 (1.19%) と、条件により変異率に相違が生じることが判明した。次にこれらの変異がどこで起きているかについてみると、その多くが267-287番目に集中していた。これらは病原性に関連なく、立体構造にも影響しない、いわゆる「揺らぎ」的な塩基配列と考えられた。しかしながら、どのような条件下、塩基配列の変異においても病原性には変化は見られなかった。

以上の結果から、sat55-1および「No.4-7」由来のsat55-1*の弱毒性に変化は認められないと結論した。この結果は、sat55-1を利用したCMV弱毒株およびCMV抵抗性組換えトマト「No.4-7」の安全性を支持する有力な知見と考えられる。

弱毒サテライトRNAをウイルスの防除に用いようとする試みは、sat55-1の他にも多数の報告例がある (HARRISON *et al.*, 1987, JACQUEMOND *et al.*, 1988, MASUTA *et al.*, 1994, MCGARVEY *et al.*, 1994, PENA *et al.*, 1994, SAITO *et al.*, 1992, SAYAMA *et al.*, 1993, TIEN *et al.*, 1991, YIE and TIEN, 1993, YIE *et al.*, 1995, YIE *et al.*, 1992) 。これらのサテライトRNAについてはsat55-1で試みたような諸条件下における弱毒性の安定性は検証されていない。今後サテライトRNAの利用にあたっては、その安定性について事前に検討する必要があると思われる。

組換え弱毒ウイルスの安全性評価手法

2003年の食品衛生法の改正により、2006年よりポジティブリスト制が施行されたことも影響し、農薬を使わずにウイルスを防除できる弱毒ウイルスが再び注目され、農業現場への導入が計られている (小坂, 1997, KOSAKA *et al.*, 2006) 。

本来弱毒ウイルスは、自然株の選抜や、薬剤、紫外線、温度処理等による変異株の作出により行われていた。しかしながら、より安定的な弱毒ウイルスを得るために、遺伝子組換え技術を使った弱毒ウイルスの作出が行われ (HAGIWARA *et al.*, 2002) , 将来的には実用的な組換え弱毒ウイルスが農業現場へ導入される可能性がある。これらの組換え弱毒ウイルスや本課題で扱った弱毒CMVは、ウイルス遺伝子の全部または一部が組換え体由来のものであるが、植物体に感染後は、ウイルスの増殖伝搬能により自律的に増殖し、アブラムシ等特定のベクターにより環境中に遺伝子が水平伝搬し拡散される。このようなタイプの組換え遺伝子に対する安全性評価は、花

粉による交雑を想定した高等植物や、接合等による遺伝子拡散を想定した微生物に対する安全性評価手法とは、自ずと異なる評価手法が必要と考えられる。本課題では、組換え弱毒ウイルスの環境影響のための安全性評価項目として少なくとも、以下の3項目を評価項目として確認した：

①自然条件下におけるウイルスの増殖・伝搬を想定し、植物から植物への機械的伝搬およびベクターによる伝搬を一定回数行い、遺伝子組換えの目的形質であるウイルスの弱毒性が安定的に維持されること、②組換え遺伝子の弱毒性に関与する塩基配列の全配列、または弱毒性に大きく関与する特定配列が、導入前の配列と同一か、または塩基置換・欠損を起こす確率が導入前の配列と同程度であること、③導入遺伝子がウイルス粒子中にパラサイト状に存在するサテライトRNAの場合は、導入したサテライトRNA遺伝子の安定性だけでなく、ヘルパーウイルス（サテライトRNAを粒子に取り込んだウイルス）の遺伝子のうち少なくともサテライトRNAに関連する遺伝子領域に、組換えサテライトRNAの粒子化によると思われる著しい変異がないこと。

この事例は、今後、組換えサテライトRNAや組換え弱毒ウイルスの安全性評価項目として参考になるとと思われる。

[次へ進む](#) [前に戻る](#) [目次に戻る](#)

サテライトRNA遺伝子の導入による
キュウリモザイクウイルス抵抗性トマトに関する研究
第3報 サテライトRNAの転写および伝搬による変異性の解明

V. 謝辞

北海道大学大学院農学研究院教授，増田税博士には，CMVゲノムRNAの全長を増幅するプライマーを提供頂き懇切なご指導を頂いた。記して感謝申し上げます。

VI. 摘要

ウイルス抵抗性トマト「No.4-7」の作出に用いた弱毒サテライトRNA，sat55-1が，強毒性に変異する可能性を検討した。増殖を繰り返した場合の変異性，組換え体内での変異性，ウイルスと共に組換え体外へ水平伝搬された場合の変異性，および同一感染個体内での変異性を調査した結果，いずれも強毒性への変異は認められず，ウイルス抵抗性組換えトマトおよび弱毒サテライトRNAの安全性が確認された。これらの知見をもとに，組換え弱毒ウイルスに対する安全性評価手法を提示した。

[次へ進む](#) [前に戻る](#) [目次に戻る](#)

サテライトRNA遺伝子の導入による
キュウリモザイクウイルス抵抗性トマトに関する研究
第3報 サテライトRNAの転写および伝搬による変異性の解明

VII. 引用文献

- 1) CLARK, M.F. and ADAMS, A.N. (1977) : Characteristic of the microplate method of enzyme-linked immunosorbent assay for detection of plant viruses. *J. Gen. Virol.*, 34, 475-483.
- 2) HAGIWARA, K., ICHIKI, T.U., OGAWA, Y., OMURA, T. and TSUDA, S. (2002) : A single amino acid substitution in 126-kDa protein of Pepper mild mottle virus associates with symptom attenuation in pepper; the complete nucleotide sequence of an attenuated strain, C-1421. *Arch. Virol.*, 147, 833-840.
- 3) HARRISON, B.D., MAYO, M.A. and BAULCOMBE, D.C. (1987) : Virus resistance in transgenic plants that express cucumber mosaic virus satellite RNA. *Nature*, 328, 799-802.
- 4) 岩崎真人・伊藤喜三男・河辺邦正・杉戸智子・新田恒雄・瀧川重信・伊藤清光・中田唯文・小川恭男・早野由里子・福本文良 (2005) : サテライトRNA遺伝子の導入によるキュウリモザイクウイルス抵抗性トマトに関する研究 第2報 組換えトマトの形態・生育特性と環境に対する安全性評価. *北海道農研研究報告*. 182, 51-63.
- 5) JACQUEMOND, M., ASMELEM, J. and TEPFER, M. (1988) : A gene coding for a mono-meric form of cucumber mosaic virus satellite RNA confers tolerance to CMV. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, 1, 311-316.
- 6) 河辺邦正・岩崎真人・早野由里子・本田要八郎・吉田幸二・眞岡哲夫 (2002) : サテライトRNA遺伝子の導入によるキュウリモザイクウイルス抵抗性トマトに関する研究 第1報 抵抗性トマト系統の作出. *北海道農研研究報告*. 177, 37-53.
- 7) 小坂能尚 (1997) : ダイズウイルス病の病原ウイルスと防除法に関する研究. *京都農研報*. 20,1-100.
- 8) KOSAKA, Y., RYANG, B-S., KOBORI, T., SHIOMI, H., YASUHARA, H. and KATAOKA, M. (2006) : Effectiveness of an attenuated zucchini yellow mosaic virus isolate for cross-protecting cucumber. *Plant Disease*, 90, 67-72.
- 9) MASUTA, C., HAYASHI, Y., SUZUKI, M., KUWATA, S., TAKANAMI, Y. and KOIWAI, A. (1994) : Protective effect of a satellite RNA expressed in transgenic plants on disease incidence after inoculation of cucumber mosaic virus. *Ann. Phytopath. Soc. Japan*, 60, 228-232.
- 10) MASUTA, C., HAYASHI, Y., WANG, W. Q. and TAKANAMI, Y. (1990) : Comparison of four satellite RNA isolates of cucumber mosaic virus. *Ann. Phytopath. Soc. Japan*, 56, 207-212.
- 11) MCGARVEY, P.B., MONTASSER, M.S. and KAPER, J.M. (1994) : Transgenic tomato plants expressing satellite RNA are tolerant to some strains of cucumber mosaic virus. *J. Amer. Soc. Hort. Sci.*, 119, 642-647.
- 12) MUURRAY, M.G. and THOMPSON, W. F. (1980) : Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Research*, 8, 4321-4325.
- 13) PALUKAITIS, P. and ROOSSINCK, M.J. (1996) : Spontaneous change of a benign satellite RNA of cucumber mosaic virus to a pathogenic variant. *Nature Biotechnology*, 14, 1264-1268.
- 14) PENA, L., TRAD, J., DIAZ-RUIZ, J.R., V MCGARVEY, P.B. and KAPER, J.M. (1994) : Cucumber

mosaic virus protection in transgenic tobacco plants expressing monomeric, dimeric or partial sequences of a benign satellite RNA. *Plant Sci.*, 100, 71-81.

15) ROOSSINCK, M.J., KAPLAN, I. and PALUKAITIS, P. (1997) : Support of a cucumber mosaic virus satellite RNA maps to a single amino acid proximal to the helicase domain of the helper virus. *J. Virol.*, 71, 608-612.

16) ROOSSINCK, M.J., SLEAT, D. and PALUKAITIS, P. (1992) : Satellite RNAs of plant viruses. *Microbiol. Rev.*, 56, 265-279.

17) SAITO, T.K., MASUTA, C., KUMASHIRO, T. and TAKANAMI, Y. (1992) : Cucumber mosaic virus-tolerant transgenic tomato plants expressing a satellite RNA. *Theor. Appl. Genet.*, 83, 679-683.

18) SAYAMA, H., SATO, T., KOMINATO, M., NATSUAKI, T. and KAPER J.M. (1993) : Field testing of a satellite-containing attenuated strain of cucumber mosaic virus for tomato protection in Japan. *Phytopathology*, 83, 405-410.

19) TALIANSKY, M.E., EUGENE, V.R., DAVID, J.R. and PALUKAITIS, P. (1998) : Tomato cell death mediated by complementary plant viral satellite RNA sequences. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, 11,1214-1222.

20) TIEN, P. and WU, G. (1991) : Satellite RNA for the biocontrol of plant disease. *Adv. in Virus Res.*, 39, 321-339.

21) TOCHIHARA, H. (1970) : Some properties of chrysanthemum mild mottle virus, and comparison of this virus with cucumber mosaic virus. *Ann. Phytopathol. Soc. Japan*, 36, 1-10.

22) YAMAGUCHI, N., SESHIMO, Y., YOSHIMOTO, E., AHN, H.I., RYU, K.H., CHOI, J.K. and MASUTA, C. (2005) : Genetic mapping of the compatibility between a lily isolate of cucumber mosaic virus and a satellite RNA. *J. Gen. Virol.*, 86, 2359-2369.

23) YIE, Y. and TIEN, P. (1993) : Plant virus satellite RNAs and their role in engineering resistance to virus diseases. *Seminars in Virology*, 4, 363-368.

24) YIE, Y., WU, Z.X., WANG, S.Y., ZHAO, S.Z., ZHANG, T.Q., YAO, G.Y and TIEN, P. (1995) : Rapid production and field testing of homozygous transgenic tobacco lines with virus resistance conferred by expression of satellite RNA and coat protein of cucumber mosaic virus. *Transgenic Research*, 4, 256-263.

25) YIE, Y., ZHAO, R., ZHAO, S.Z., LIU, Y.Z., LIU, Y.L. and TIEN, P. (1992) : High resistance to cucumber mosaic virus conferred by satellite RNA and coat protein in transgenic commercial tobacco cultivator G-140. *Mol. Plant-Microbe Interact.*, 5, 460-465.

26) 吉田幸二 (1986) : サテライトRNA置換による弱毒CMVの作出. *植物防疫*. 40, 510-515.

[次へ進む](#) [前に戻る](#) [目次に戻る](#)

Virus Resistance in Transgenic Tomato Expressing Satellite RNA of Cucumber mosaic virus

3: Mutation Analysis of Satellite RNA through Translation and Transmission

Tetsuo MAOKA¹⁾, Yuriko HAYANO²⁾, Kunimasa KAWABE³⁾, Fumiyoshi FUKUMOTO⁴⁾,
Satoshi KASHIWAZAKI and Mabito IWASAKI

Summary

A transgenic tomato line, “No.4-7”, expressing a satellite RNA 55-1 of *Cucumber mosaic virus* (CMV), which shows resistance to CMV, has been developed. We previously reported the genetics and virus resistance of “No.4-7” (KAWABE et al., 2002) and also results of evaluation of the biosafety of transgenic tomato “No. 4-7” in terms of influence on agricultural traits and the environment (IWASAKI et al., 2005). This is the third and last report on the transgenic tomato line “No. 4-7”. We passaged a satellite RNA 55-1 of CMV with its helper virus to determine whether a satellite RNA that attenuated CMV-induced disease on tobacco or tomato plants could mutate to a pathogenic form. No remarkable symptom was observed on the test plants after 10 passages. The sequence diversity of satellite RNA 55-1 of “No. 4-7” was checked in various cases: genomic DNA, its transcribed RNA, satellite RNA repackaged in a helper virus, satellite RNA with a helper virus transmitted into other plants by an aphid, and satellite RNA in a plant for a long period. The rate of mutation in the sequence of satellite RNA 55-1 was from 0 to 1.9%, and no change of pathogenicity from attenuate to severe was observed. These results prove the biosafety of the transgenic tomato line “No. 4-7”. Guidelines for assessment of the biosafety of a satellite RNA are also proposed.

1) Potato Production and Protection Research Team

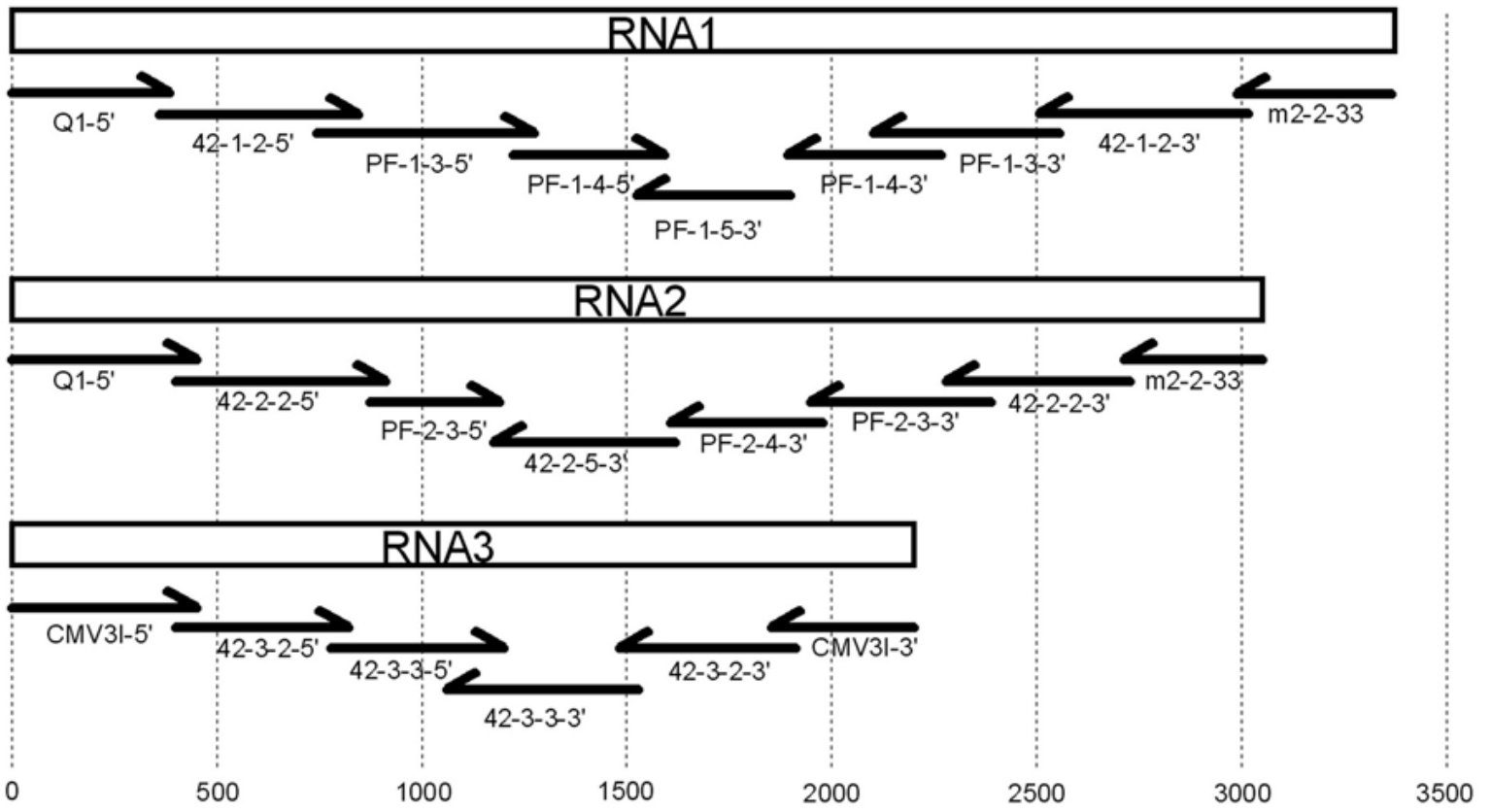
2) Independent Researcher (Rice Disease Resistance Research Team, Hokkaido Region)

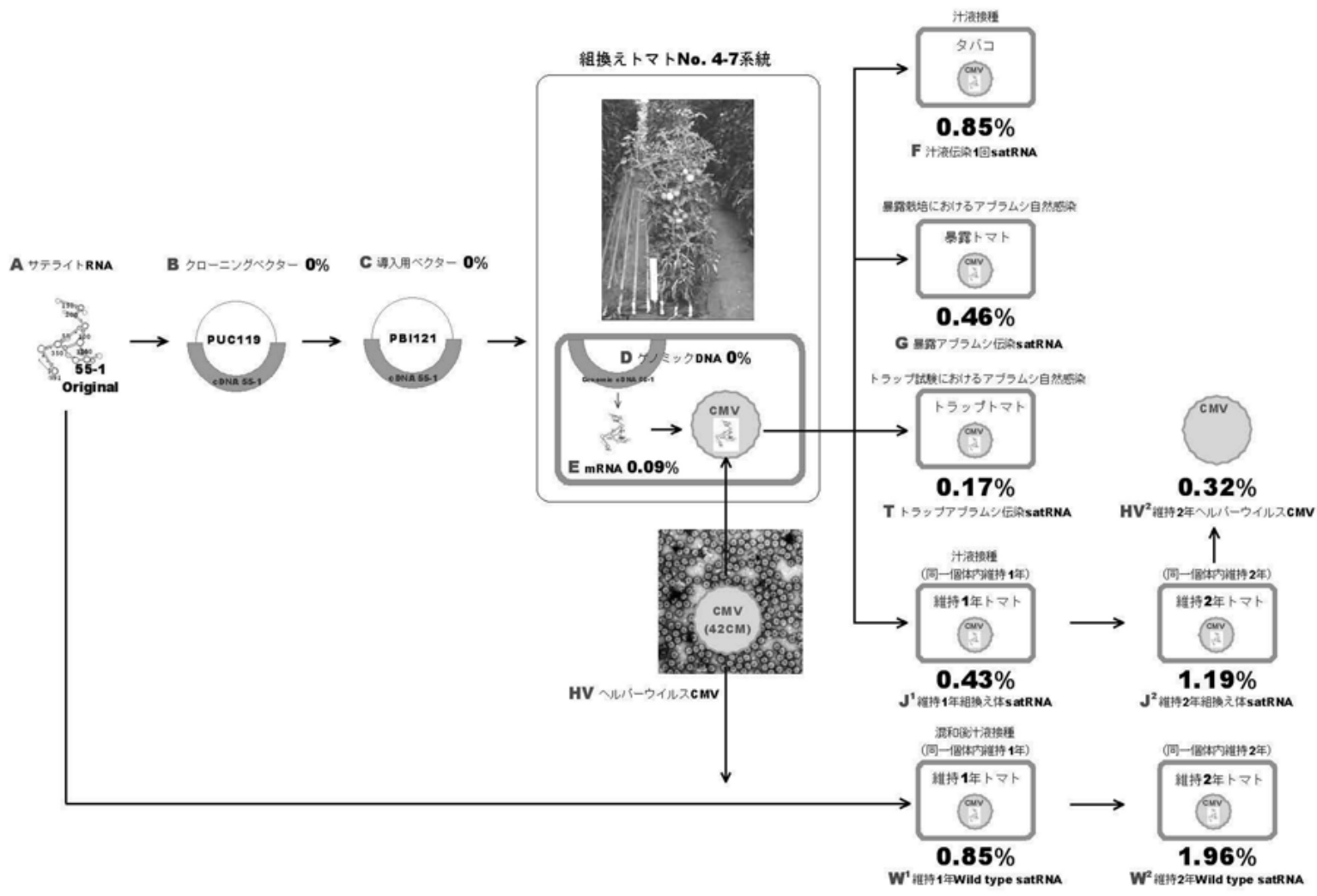
3) National Agricultural Research Center

4) Japan international Research Center for Agricultural Sciences

[前に戻る](#) [目次に戻る](#)

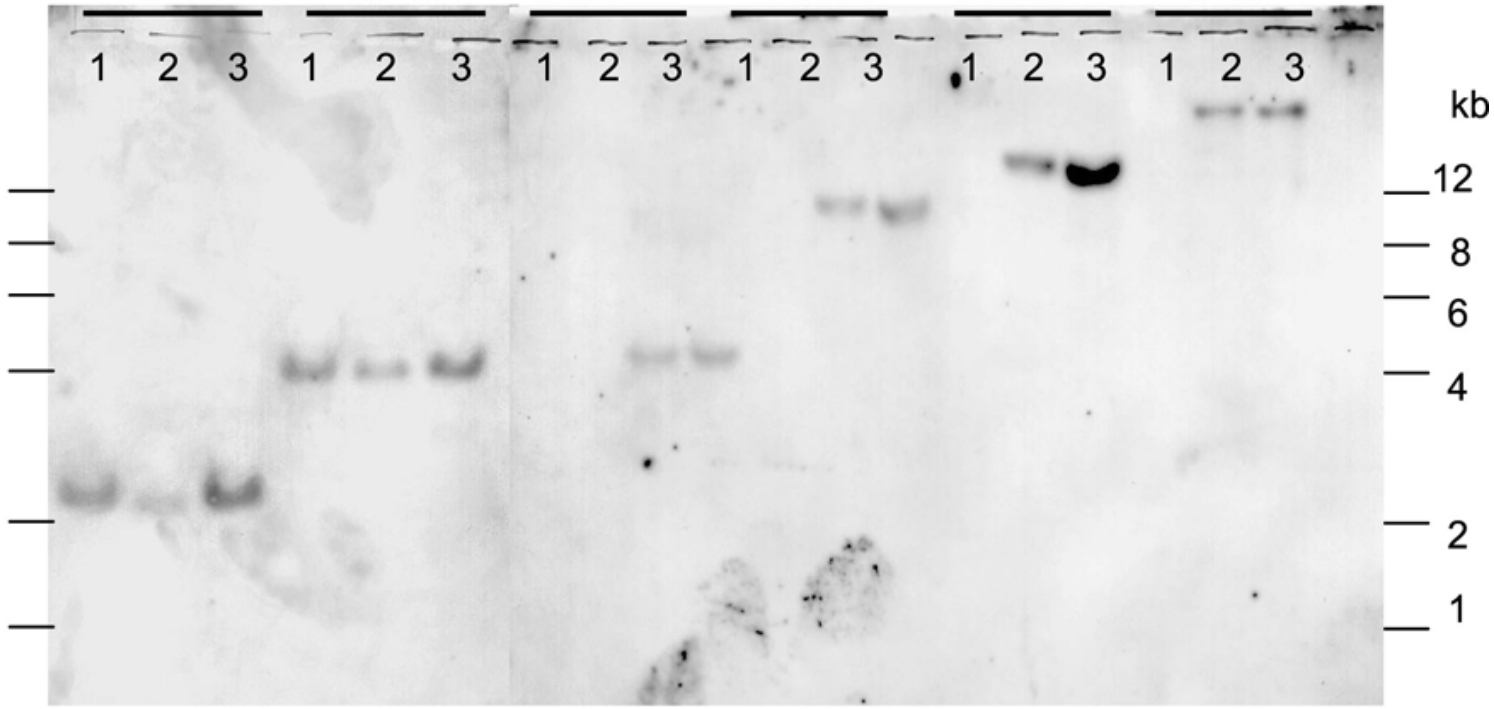
用途および名称	塩基配列 (5'-3')	ゲノムの位置
サテライト RNA 増幅		
AK1	GTTTTGTTTGGTGGAGAATTGCG	sat55-1 の 5'末端配列
BK2	GGGTCCTGTAGAGGAATGTC	sat55-1 の 3'末端配列
CMV RNA1-2 全長増幅		
Q15'	ATTAATACGACTCACTATAGTTTTATTTACAAGAGCGTACGG	T7promoter + CMV RNA1, 2 の 5'末端配列
m2-2-33	CCGAGCTCGCGGCCGCTGGTCTCCTTWTGGAG	CMV RNA1 および 2 の 3'末端配列
CMV RNA3 全長増幅		
CMV3I5'	GTAATCTTACCACTGTGTGTGT	CMV RNA3 の 5'末端配列
CMV3I3'	TGGTCTCCTTWKGRAGSCCCC	CMV RNA3 の 3'末端配列
Primer Walking		
42-1-2-5'	ATCTTACCCAGCAGGAGTTTGCTC	CMV RNA1 311-334
PF-1-3-5'	ATGATGTTTCGACGGTGCATGATGTT	CMV RNA1 727-752
PF-1-4-5'	CATTCGACATTGTATTTGGTTCCCTC	CMV RNA1 1083-1109
PF-1-5-3'	GAGTTTCTCTTGCCATCACCGCCC	CMV RNA1 1947-1970
PF-1-4-3'	AATGGATTTAATTGCCGTAGTTPTCCC	CMV RNA1 2251-2278
PF-1-3-3'	AATGTAGTGTCCGCATCACTAGTCTC	CMV RNA1 2596-2621
42-1-2-3'	CCGAAGGAGGGGAACCGCTAAGCA	CMV RNA1 3072-3095
42-2-2-5'	TCCCTCCGAACCTCTGACGGAGCT	CMV RNA2 271-294
PF-2-3-5'	CTTTAAAGAAATCGTGCCTGAGAGGA	CMV RNA2 728-754
42-2-5-3'	TGACATCAAATCCTGCCATCTCAA	CMV RNA2 1590-1613
PF-2-4-3'	TGTGAATTTACTCGGATCACCAACAG	CMV RNA2 1947-1972
PF-2-3-3'	TTAGCGGTATACTTCTTAAAGGCGCC	CMV RNA2 2276-2301
42-2-2-3'	ATTTACACGCTCAACCCTGAACTC	CMV RNA2 2375-2398
42-3-2-5'	TTCCCGAAGTAACCCACGGTCGTA	CMV RNA3 273-296
42-3-3-5'	ATCGCAGCTGGGAAGACTCTAGTA	CMV RNA3 680-703
42-3-3-3'	CGTGACTGAATCAGGTAATAACAA	CMV RNA3 1502-1525
42-3-2-3'	GCCACAGAAATCGGAGGGAGGGT	CMV RNA3 1908-1930
5'RACE		
PF1-5RA2	CTGTAATTGCTCCTCGAGCTGCTCATGA	CMV RNA1 186-213
PF2-5RA1	GGGAGCTCCGTCAGGAGTTCGGAGGGAA	CMV RNA2 270-297
42RNA2-5RA1	CATCATCAGATTTTTCAAGGTAATCTTCAGCACCATAAGTT	CMV RNA2 324-364
42RNA3-5RA1	GAACGAGGGGCCGACTGAAATAGCATT	CMV RNA3 248-275
3'RACE		
42RNA1-3RA1	GGCGGGATCTGAGTTGGCGGTAATCTA	CMV RNA1 3095-3121
PF2-3RA1	TGTGGCGGGAGCTGAGTTGGCAGTATTG	CMV RNA2 2785-2812
42RNA3-3RA1	GCTATAAACTGTCTGAAGTCACTAAACG	CMV RNA3 1952-1979





Probe: \leftarrow *LeRBCs3A* \rightarrow \leftarrow *pIB55-1* \rightarrow

EcoRI *HindIII* *XbaI* *EcoRI* *HindIII* *PstI*



継代接種の回数	P7+sat55-1		42CM+sat55-1	
	タバコ	トマト	タバコ	トマト
5回	-/m	-/-	-/m	-/m
10回	-/m	-/-	-/M	-/M
対照 (sat55-1 無し)	nrs/m	-/-	N,M/M,Y,St	N/M,Y,St

	AK1	10	primer	20	30	40	50
sat55-1	GTTTTGTTT	GTTTGGAGA	AATTGCGCG	GGAGGGGG	TTGTATTTC	CGCGTGAGG	GATC
42CM繼代前後	GTTTTGTTT	GTTTGGAGA	AATTGCGCG	GGAGGGGG	TTGTATTTC	CGCGTAAAG	GATC
42CM繼代前後	GTTTTGTTT	GTTTGGAGA	AATTGCGCG	GGAGGGGG	TTGTATTTC	CGCGTAAAK	GATC
P7繼代前後	GTTTTGTTT	GTTTGGAGA	AATTGCGCG	GGAGGGGG	TTGTATTTC	CGCGTAAAG	GATC
P7繼代前後	GTTTTGTTT	GTTTGGAGA	AATTGCGCG	GGAGGGGG	TTGTATTTC	CGCGTAAAG	GATC
95-10繼代前後	GTTTTGTTT	GTTTGGAGA	AATTGCGCG	GGAGGGGG	TTGTATTTC	CGCGTAAAG	GATC
95-10繼代前後	GTTTTGTTT	GTTTGGAGA	AATTGCGCG	GGAGGGGG	TTGTATTTC	CGCGTGAGG	GATC
Consensus	GTTTTGTTT	GTTTGGAGA	AATTGCGCG	GGAGGGGG	TTGTATTTC	CGCGT	RA KGATC
		60	70	80	90	100	
sat55-1	CTTCACTAGG	CGGTGTGGG	TAACTCCCT	GCTACGGC	GGGTTGGAG	ACTG	
42CM繼代前後	CTTCACTAGG	CGGTGTGGG	TAACTCCCT	GCTACGGC	GGGTTGGAG	ACTG	
42CM繼代前後	CTTCACTAGG	CGGTGTGGG	TAACTCCCT	GCTACGGC	GGGTTGGAG	ACTG	
P7繼代前後	CTTCACTAGG	CGGTGTGGG	TAACTCCCT	GCTACGGC	GGGTTGGAG	ACTG	
P7繼代前後	CTTCACTAGG	CGGTGTGGG	TAACTCCCT	GCTACGGC	GGGTTGGAG	ACTG	
95-10繼代前後	CTTCACTAGG	CGGTGTGGG	TAACTCCCT	GCTACGGC	GGGTTGGAG	ACTG	
95-10繼代前後	CTTCACTAGG	CGGTGTGGG	TAACTCCCT	GCTACGGC	GGGTTGGAG	ACTG	
Consensus	CTTCACTAGG	CGGTGTGGG	TAACTCCCT	GCTACGGC	GGGTTGGAG	ACTG	
		110	120	130	140	150	
sat55-1	CGCTTAGGACA	AGCCGGACCT	TGGGGGAGCC	CACGAGCCG	CGTGGGAGCG		
42CM繼代前後	CGCTTAGGACA	AGCCGGACCT	TGGGGGAGCC	CACGAGCCG	CGTGGGAGCG		
42CM繼代前後	CGCTTAGGACA	AGCCGGACCT	TGGGGGAGCC	CACGAGCCG	CGTGGGARCG		
P7繼代前後	CGCTTAGGACA	AGCCGGACCT	TGGGGGAGCC	CACGAGCCG	CGTGGGAGCG		
P7繼代前後	CGCTTAGGACA	AGCCGGACCT	TGGGGGAGCC	CACGAGCCG	CGTGGGAGCG		
95-10繼代前後	CGCTTAGGACA	AGCCGGACCT	TGGGGGAGCC	CACGAGCCG	CGTGGGAGCG		
95-10繼代前後	CGCTTAGGACA	AGCCGGACCT	TGGGGGAGCC	CACGAGCCG	CGTGGGAGCG		
Consensus	CGCTTAGGACA	AGCCGGACCT	TGGGGGAGCC	CACGAGCCG	CGTGGGA	R CG	
		160	170	180	190	200	
sat55-1	TAGCGGTTT	CGGTGGA	ACTGGCGCC	GGAGGCCCT	CAGCGGT	TGGAATTCC	
42CM繼代前後	TAGCGGTTT	CGGTGGA	ACTGGCGCC	GGAGGCCCT	CAGCGGT	TGGAATTCC	
42CM繼代前後	TAGCGGTTT	CGGTGGA	ACTGGCRCC	GGAGGCCCT	CAGCGGT	TGGAATTCC	
P7繼代前後	TAGCGGTTT	CGGTGGA	ACTGGCGCC	GGAGGCCCT	CAGCGGT	TGGAATTCC	
P7繼代前後	TAGCGGTTT	CGGTGGA	ACTGGCGCC	GGAGGCCCT	CAGCGGT	TGGAATTCC	
95-10繼代前後	TAGCGGTTT	CGGTGGA	ACTGGCGCC	GGAGGCCCT	CAGCGGT	TGGAATTCC	
95-10繼代前後	TAGCGGTTT	CGGTGGA	ACTGGCGCC	GGAGGCCCT	CAGCGGT	TGGAATTCC	
Consensus	TAGCGGTTT	CGGTGGA	ACTGGC R CC	GGAGGCCCT	CAGCGGT	TGGAATTCC	
		210	220	230	240	250	
sat55-1	ACGCTTTCCT	CCATTTGAG	CCCCCGCT	CAGTTTGCT	AGCAAAACCC	GGCA	
42CM繼代前後	ACGCTTTCCT	CCMTTTGAG	CCCCCGCT	CAGTTTGCT	AGCAAAACCC	GGCA	
42CM繼代前後	ACGCTTTCCT	CCATTTGAG	CCCCCGCT	CAGTTTGCT	AGCAAAACCC	GGCA	
P7繼代前後	ACGCTTTCCT	CCATTTGAG	CCCCCGCT	CAGTTTGCT	AGCAAAACCC	GGCA	
P7繼代前後	ACGCTTTCCT	CCATTTGAG	CCCCCGCT	CAGTTTGCT	AGCAAAACCC	GGCA	
95-10繼代前後	ACGCTTTCCT	CCATTTGAG	CCCCCGCT	CAGTTTGCT	AGCAAAACCC	GGCA	
95-10繼代前後	ACGCTTTCCT	CCATTTGAG	CCCCCGCT	CAGTTTGCT	AGCAAAACCC	GGCA	
Consensus	ACGCTTTCCT	CC M TTT	GAGCCCC	CGCTCAGTTTGCT	AGCAAAACCC	GGCA	
		260	270	280	290	300	
sat55-1	CATGGTTCG	CGTTACTAT	TGGAAAATCT	GAAAAGAA	AACTCTGTT	TAGGTG	
42CM繼代前後	CATGGTTCG	CGTTACTAT	TGGAAAATCT	GAAAAGAA	AACTCTGTT	TAGGTG	
42CM繼代前後	CATGGTTCG	CGTTACTAT	TGGAAAATCT	GAAAAGAA	AACTCTGTT	TAGGTG	
P7繼代前後	CATGGTTCG	CGTTACTAT	TGGAAAATCT	GAAAAGAA	AACTCTGTT	TAGGTG	
P7繼代前後	CATGGTTCG	CGTTACTAT	TGGAAAATCT	GAAAAGAA	AACTCTGTT	TAGGTG	
95-10繼代前後	CATGGTTCG	CGTTACTAT	TGGAAAATCT	GAAAAGAA	AACTCTGTT	TAGGTG	
95-10繼代前後	CATGGTTCG	CGTTACTAT	TGGAAAATCT	GAAAARGAAA	A ACTCTGTT	TAGGTG	
Consensus	CATGGTTCG	CGTTACTAT	TGGAAAATCT	GAAA R GAA M A	ACTCTGTT	TAGGTG	
		310	320	330	340	350	

```

sat55-1      GTATCAGTTGACGACGCACGCAGGGAGAGGGCTAAAACCTATAATGGTCAT
42CM繼代前  GTATCAGTTGACGACGCACGCAGGGAGAGGGCTAAAACCTATAATGGTCAT
42CM繼代後  GTATCAGTTGACGACGCACGCAGGGAGAGGGCTAAAACCTATAATGGTCAT
P7繼代前    GTATCAGTTGACGACGCACGCAGGGAGAGGGCTAAAACCTATAATGGTCAT
P7繼代後    GTATCAGTTGACGACGCACGCAGGGAGAGGGCTAAAACCTA?AATGGTCAT
95-10繼代前 GTATCAGTTGACGACGCACGCAGGGAGAGGGCTAAAACCTATAATGGTCAT
95-10繼代後 GTATCAGTTGACGACGCACGCAGGGAGAGGGCTAAAACCTATAATGGTCAT

```

```

-----
Consensus    GTATCAGTTGACGACGCACGCAGGGAGAGGGCTAAAACCTATAATGGTCAT
              360          370      BK2 380primer 390          400

```

```

sat55-1      GCTGATCTCCGCGAATGTCTAGACATTCCTCTACAGGACCC.....
42CM繼代前  GCTGATCTCCGCGAATGTCTAGACATTCCTCTACAGGACCC.....
42CM繼代後  GCTGATCTCCGYGAATGTCTAGACATTCCTCTACAGGACCC.....
P7繼代前    GCTGATCTCCGCGAATGTCTAGACATTCCTCTACAGGACCC.....
P7繼代後    GCTGATCTCCGCGAATGTCTAGACATTCCTCTACAGGACCC.....
95-10繼代前 GCTGATCTCCGCGAATGTCTAGACATTCCTCTACAGGACCC.....
95-10繼代後 GCTGAYCTCCGCGAATGTCTAGACATTCCTCTACAGGACCC.....

```

```

-----
Consensus    GCTGAYCTCCGYGAATGTCTAGACATTCCTCTACAGGACCC.....

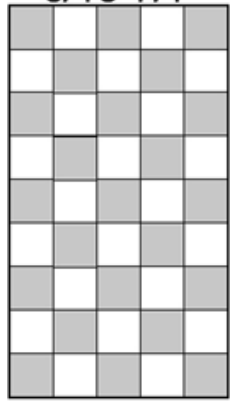
```

継代	ヘルパーCMV		
	42CM	P7	95-10
継代前	0.85	0.77	0.77
継代後 (10 回)	1.11	1.02	0.77

	AK1	10	primer	20	30	40	50
sat55-1	GTTTTGTTT	GTTGGAGA	AATTGCGCGG	GAGGGG	TTGTATT	CGCGTGAGG	ATC
bakuro. SEQ	GTTTTGTTT	GTTGGAGA	AATTGCGCGG	GAGGGG	TTGTATT	CGCGTGAGG	ATC
Consensus	GTTTTGTTT	GTTGGAGA	AATTGCGCGG	GAGGGG	TTGTATT	CGCGTGAGG	ATC
sat55-1		60	70	80	90	100	
sat55-1	CTTCACTAGG	CGGTGTGGG	TAACTCCCT	GCTACGGC	GGGTTGGAG	ACTG	
bakuro. SEQ	CTTCACTAGG	CGGTGTGGG	TAACTCCCT	GCTACGGC	GGGTTGGAG	ACTG	
Consensus	CTTCACTAGG	CGGTGTGGG	TAACTCCCT	GCTACGGC	GGGTTGGAG	ACTG	
sat55-1		110	120	130	140	150	
sat55-1	CGCTTAGG	ACAAGCCGG	ACCTTGGGG	GAGCCACG	AGCCGCGT	GGGAGCG	
bakuro. SEQ	CGCTTAGG	ACAAGCCGG	ACCTTGGGG	GAGCCACG	AGCCGCGT	GGGAGCG	
Consensus	CGCTTAGG	ACAAGCCGG	ACCTTGGGG	GAGCCACG	AGCCGCGT	GGGAGCG	
sat55-1		160	170	180	190	200	
sat55-1	TAGCGGTTT	C CGGTGGA	ACTGGCGC	CGGAGGCC	CCTCAGCGG	TGGAATTCC	
bakuro. SEQ	TAGCGGTTT	C CGGTGGA	ACTGGCGC	CGGAGGCC	CCTCAGCGG	TGGAATTCC	
Consensus	TAGCGGTTT	C CGGTGGA	ACTGGCGC	CGGAGGCC	CCTCAGCGG	TGGAATTCC	
sat55-1		210	220	230	240	250	
sat55-1	ACGCTTTC	CTCCATTT	GAGCCCC	CGCTCAGTTT	GCTAGCAAA	ACCCGGCA	
bakuro. SEQ	ACGCTTTC	CTCCATTT	GAGCCCC	CGCTCAGTTT	GCTAGCAAA	ACCCGGCA	
Consensus	ACGCTTTC	CTCCATTT	GAGCCCC	CGCTCAGTTT	GCTAGCAAA	ACCCGGCA	
sat55-1		260	270	280	290	300	
sat55-1	CATGGTT	CGCCGTT	ACTATGGAAA	A TCTGAAA	AAGAA CACTCT	GTTAGGTG	
bakuro. SEQ	CATGGTT	CGCCGTT	ACTATGGAAA	M TCTGAAA	AAGAA MACTCT	GTTAGGTG	
Consensus	CATGGTT	CGCCGTT	ACTATGGAAA	M TCTGAAA	AAGAA MACTCT	GTTAGGTG	
sat55-1		310	320	330	340	350	
sat55-1	GTATCAGTT	GACGACGC	ACGCAGGG	GAGAGGCT	AAAACCTATA	AATGGTCAT	
bakuro. SEQ	GTATCAGTT	GACGACGC	ACGCAGGG	GAGAGGCT	AAAACCTATA	AATGGTCAT	
Consensus	GTATCAGTT	GACGACGC	ACGCAGGG	GAGAGGCT	AAAACCTATA	AATGGTCAT	
sat55-1		360	370	BK2 380	primer	390	400
sat55-1	GCTGATCT	C CGCGAAT	GTCTAGAC	ATTCTCTAC	AGGACCC	
bakuro. SEQ	GCTGATCT	C CGCGAAT	GTCTAGAC	ATTCTCTAC	AGGACCC	
Consensus	GCTGATCT	C CGCGAAT	GTCTAGAC	ATTCTCTAC	AGGACCC	

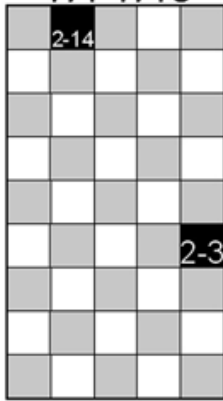
試験 1

6/15-7/1



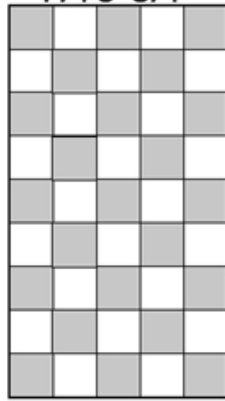
試験 2

7/1-7/15



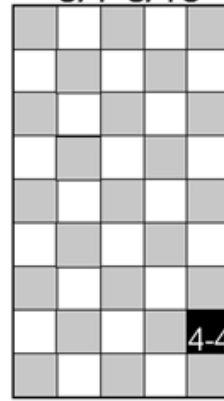
試験 3

7/15-8/1



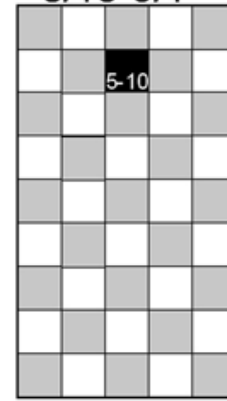
試験 4

8/1-8/15



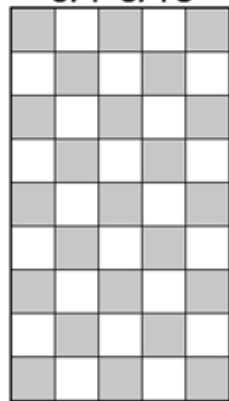
試験 5

8/15-9/1



試験 6

9/1-9/15



CMV感染組換えトマト

 サテライトRNAが検出されたトラップ用トマト

サテライトRNAが検出されなかったトラップ用トマト

	AK1	10primer	20	30	40	50
sat55-1	GTTTTGTTTGTGGAGAATTGCGCGGAGGGGGTTGTATTTCGCGGTGAGGATC					
2-3. SEQ	GTTTTGTTTGTGGAGAATTGCGCGGAGGGGGTTGTATTTCGCGGTGAGGATC					
2-14. SEQ	GTTTTGTTTGTGGAGAATTGCGCGGAGGGGGTTGTATTTCGCGGTGAGGATC					
4-4. SEQ	GTTTTGTTTGTGGAGAATTGCGCGGAGGGGGTTGTATTTCGCGGTGAGGATC					
5-10. SEQ	GTTTTGTTTGTGGAGAATTGCGCGGAGGGGGTTGTATTTCGCGGTGAGGATC					
Consensus	GTTTTGTTTGTGGAGAATTGCGCGGAGGGGGTTGTATTTCGCGGTGAGGATC					
		60	70	80	90	100
sat55-1	CTTCACTAGGCGGTGTGGGTTAACTCCCTGCTACGGCGGGTTGGAGACTG					
2-3. SEQ	CTTCACTAGGCGGTGTGGGTTAACTCCCTGCTACGGCGGGTTGGAGACTG					
2-14. SEQ	CTTCACTAGGCGGTGTGGGTTAACTCCCTGCTACGGCGGGTTGGAGACTG					
4-4. SEQ	CTTCACTAGGCGGTGTGGGTTAACTCCCTGCTACGGCGGGTTGGAGACTG					
5-10. SEQ	CTTCACTAGGCGGTGTGGGTTAACTCCCTGCTACGGCGGGTTGGAGACTG					
Consensus	CTTCACTAGGCGGTGTGGGTTAACTCCCTGCTACGGCGGGTTGGAGACTG					
		110	120	130	140	150
sat55-1	CGCTTAGGACAAGCCGGACCTTGGGGGAGCCACGAGCCGCGTGGGAGCG					
2-3. SEQ	CGCTTAGGACAAGCCGGACCTTGGGGGAGCCACGAGCCGCGTGGGAGCG					
2-14. SEQ	CGCTTAGGACAAGCCGGACCTTGGGGGAGCCACGAGCCGCGTGGGAGCG					
4-4. SEQ	CGCTTAGGACAAGCCGGACCTTGGGGGAGCCACGAGCCGCGTGGGAGCG					
5-10. SEQ	CGCTTAGGACAAGCCGGACCTTGGGGGAGCCACGAGCCGCGTGGGAGCG					
Consensus	CGCTTAGGACAAGCCGGACCTTGGGGGAGCCACGAGCCGCGTGGGAGCG					
		160	170	180	190	200
sat55-1	TAGCGGTTTCCGGTGGAACTGGCGCCGGAGGGCCCTCAGCGGTGGAATTCC					
2-3. SEQ	TAGCGGTTTCCGGTGGAACTGGCGCCGGAGGGCCCTCAGCGGTGGAATTCC					
2-14. SEQ	TAGCGGTTTCCGGTGGAACTGGCGCCGGAGGGCCCTCAGCGGTGGAATTCC					
4-4. SEQ	TAGCGGTTTCCGGTGGAACTGGCGCCGGAGGGCCCTCAGCGGTGGAATTCC					
5-10. SEQ	TAGCGGTTTCCGGTGGAACTGGCGCCGGAGGGCCCTCAGCGGTGGAATTCC					
Consensus	TAGCGGTTTCCGGTGGAACTGGCGCCGGAGGGCCCTCAGCGGTGGAATTCC					
		210	220	230	240	250
sat55-1	ACGCTTCCCTCCATTTGAGCCCCGCTCAGTTTGCTAGCAAAACCCGGCA					
2-3. SEQ	ACGCTTCCCTCCATTTGAGCCCCGCTCAGTTTGCTAGCAAAACCCGGCA					
2-14. SEQ	ACGCTTCCCTCCATTTGAGCCCCGCTCAGTTTGCTAGCAAAACCCGGCA					
4-4. SEQ	ACGCTTCCCTCCATTTGAGCCCCGCTCAGTTTGCTAGCAAAACCCGGCA					
5-10. SEQ	ACGCTTCCCTCCATTTGAGCCCCGCTCAGTTTGCTAGCAAAACCCGGCA					
Consensus	ACGCTTCCCTCCATTTGAGCCCCGCTCAGTTTGCTAGCAAAACCCGGCA					
		260	270	280	290	300
sat55-1	CATGGTTCGCCGTTACTATGGAAAATCTGAAAAGAACAACCTCTGTTAGGTG					
2-3. SEQ	CATGGTTCGCCGTTACTATGGAAAATCTGAAAAGAACAACCTCTGTTAGGTG					
2-14. SEQ	CATGGTTCGCCGTTACTATGGAAAATCTGAAAAGAACAACCTCTGTTAGGTG					
4-4. SEQ	CATGGTTCGCCGTTACTATGGAAAATCTGAAAAGAACAACCTCTGTTAGGTG					
5-10. SEQ	CATGGTTCGCCGTTACTATGGAAAATCTGAAAAGAACAACCTCTGTTAGGTG					
Consensus	CATGGTTCGCCGTTACTATGGAAAATCTGAAAAGAACAACCTCTGTTAGGTG					
		310	320	330	340	350
sat55-1	GTATCAGTTGACGACGCACGCAGGGAGAGGGCTAAAACCTATAATGGTCAT					
2-3. SEQ	GTATCAGTTGACGACGCACGCAGGGAGAGGGCTAAAACCTATAATGGTCAT					
2-14. SEQ	GTATCAGTTGACGACGCACGCAGGGAGAGGGCTAAAACCTATAATGGTCAT					
4-4. SEQ	GTATCAGTTGACGACGCACGCAGGGAGAGGGCTAAAACCTATAATGGTCAT					
5-10. SEQ	GTATCAGTTGACGACGCACGCAGGGAGAGGGCTAAAACCTATAATGGTCAT					
Consensus	GTATCAGTTGACGACGCACGCAGGGAGAGGGCTAAAACCTATAATGGTCAT					
		360	370	BK2 380primer	390	400
sat55-1	GCTGATCTCCGCGAATGTCTAGACATTCCTCTACAGGACCC.					
2-3. SEQ	GCTGATCTCCGCGAATGTCTAGACATTCCTCTACAGGACCC.					
2-14. SEQ	GCTGATCTCCGCGAATGTCTAGACATTCCTCTACAGGACCC.					
4-4. SEQ	GCTGATCTCCGCGAATGTCTAGACATTCCTCTACAGGACCC.					

5-10. SEQ GCY GATCTCCGCGAATGTCTAGACATTCCTCTACAGGACCC.....

Consensus GCY GATCTCCGCGAATGTCTAGACATTCCTCTACAGGACCC.....