

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年5月13日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21380018

研究課題名（和文） 園芸作物におけるウイルス誘導性ジーンサイレンシングの汎用化

研究課題名（英文） Application of virus-induced gene silencing to horticultural crops

研究代表者

金山 喜則（KANAYAMA YOSHINORI）

東北大学・大学院農学研究科・准教授

研究者番号：10233868

研究成果の概要（和文）：進展するゲノム関連研究の園芸生産への貢献度が必ずしも高くない理由の1つとして、遺伝子の機能を証明するファンクショナルゲノミクスの手法が、多様な種を含む園芸学において確立していないことが上げられる。そこで本研究では、多様な種を含む園芸作物における遺伝子の機能解析に適用可能なウイルス誘導性ジーンサイレンシングの汎用化を目的として計画を遂行し、その技術開発と適用遺伝子に関する有益な情報を得た。

研究成果の概要（英文）：Contribution of genome-related research to horticultural production is not high in spite of its remarkable progress in recent because method of functional genomics has not been established in horticultural crops including so many species. This study was carried out for application of virus-induced gene silencing, which can be useful for a wide range of species, to horticultural crops and useful information was obtained on technology development and genes for functional analysis using the technique.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	5,100,000	1,530,000	6,630,000
2010年度	3,900,000	1,170,000	5,070,000
2011年度	3,600,000	1,080,000	4,680,000
年度			
年度			
総計	12,600,000	3,780,000	16,380,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農学，園芸学・造園学

キーワード：園芸作物・ウイルス・ジーンサイレンシング

1. 研究開始当初の背景

近年、モデル実験植物であるシロイヌナズナとともにイネやトマトなどの主要作物の全ゲノムが解読され、その他の植物種においても膨大なゲノム情報が蓄積しつつある。また、分子生物学的手法の発展により、種々の

園芸作物がもつ有用形質の分子レベルでの解析も進んでいる。しかし、現状ではこれらの成果は具体的な園芸生産の向上には必ずしも結びついていない。その理由として、多様な園芸作物において、有用形質に関する遺伝子の機能を証明するためのファンクシ

ナルゲノミクスの手法が確立されていないことが上げられる。

これまでは、ファンクショナルゲノミクスの手法として、主にアグロバクテリウムを用いた形質転換法が用いられてきた。しかし、アグロバクテリウムによる形質転換効率の低い作物が多いため、トマト以外の園芸作物において遺伝子の機能が証明された事例は少ない。また、このアグロバクテリウム法には、非常に多くの外植体から培養個体を選抜する必要があることから多大な労力と時間を必要とすること、個体ごとの表現型のばらつきが大きいことなどいくつかの問題があった。

2. 研究の目的

新たなファンクショナルゲノミクスの手法として、植物ウイルスをベクターとして用いたウイルス誘導性ジーンサイレンシング (VIGS) 法が開発されている。植物は感染ウイルス由来の RNA を配列特異的に分解することにより、ウイルスの増殖を抑制する防御機構を備えている。この防御機構において、相同的な配列をもつ mRNA が分解される転写後ジーンサイレンシング (PTGS) と呼ばれる反応が存在する。内在遺伝子の断片配列を組み込んだウイルスベクターにより PTGS を誘導することで、内在遺伝子をノックアウトする手法が VIGS である。VIGS は培養を経ずに迅速に任意の時期と部位において遺伝子発現を制御できることから、アグロバクテリウム法を補うファンクショナルゲノミクスの手法として注目されている。

VIGS は植物病理学の分野で開発された背景があることから、主にタバコやシロイヌナズナにおける耐病性関連遺伝子についての研究に利用されてきたが、多様な器官を利用する園芸作物の有用遺伝子への応用も可能であると考えられる。そこで本研究では、園芸作物における VIGS の汎用化を目的とした技術開発と、発現制御対象遺伝子に関する情報を得ようとした。

3. 研究の方法

VIGS の技術開発に関しては、多様な園芸作物への VIGS の利用を考える場合、宿主範囲の広いウイルスベクターを開発する必要があり、85 科 365 属 775 種の植物への感染が報告されているキュウリモザイクウイルス

(CMV) はその候補となり得る。しかし、これまで CMV ベクターを用いた VIGS の園芸作物への利用は少なく、既存の Tobacco rattle virus (TRV) ベクターと比較するとその知見は少ない。そこで、VIGS の代表的なマーカーであるフィトエン不飽和化酵素 (PDS) 遺伝

子断片を導入した CMV ベクターを用い、種々の園芸作物への VIGS の適用の可能性を探った。

具体的には VIGS のモデル実験やウイルスの増殖に用いられる *Nicotiana benthamiana* と数種園芸作物の種子をシャーレで発芽させた後、バーミキュライトとパーライトを混合して詰めた育苗プラグに移植して得られた植物体を接種に用いた。栽培は室内において、16 時間日長、8 時間暗期、25°C の条件で行った。

CMV ベクターには PDS 遺伝子の cDNA 断片を挿入したのを用いた。感染用ウイルス RNA の転写に用いるプラスミドベクターを制限酵素で切断し、エタノール沈殿の後滅菌水で溶かし、その後プロテアーゼ K 処理を行った。フェノール・クロロホルム抽出とエタノール沈殿を行い、滅菌水で溶解後、-20°C で保存した。このプラスミド DNA を鋳型として、T7 RNA ポリメラーゼによる転写を行い、接種用の RNA を作成した。接種葉にはカーボランダムを振りかけ、その上から RNA を含む接種液をまんべんなく滴下した後、プラスチックペッセルで接種葉をくまなく摩擦し、1 mL 程度の滅菌水で洗い流した。その後植物体を透明なビニール袋で被覆し、1 日経過してから取り除いた。

ウイルスの接種から 7 日後に *N. benthamiana* の接種葉を採取し、その磨砕液を遠心分離した上清を継代用の接種液とした。各種植物体の完全展開した子葉へカーボランダムを振りかけ、接種液をまんべんなく滴下し、プラスチックペッセルで子葉を数回摩擦した後、1 mL 程度の滅菌水で洗い流した。最後に植物体をラップで被覆し、1 日経過してから取り除いた。

接種葉と上位葉からコルクボーラーを用いてリーフディスクを 3 枚ずつ抜き出し、氷上のチューブへ入れ、10% (v/v) グリセリン、25 mM Tris-HCl pH 7.5, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA と共に氷上でプラスチックペッセルを用いて磨砕した。その後等量の 2×サンプルバッファーを加えて攪拌し、100°C で 5 分間煮沸した後、遠心分離し、上清を SDS-PAGE の試料とした。SDS-PAGE 後、PVDF メンブレンにセミドライ式ブロッティング装置を用いてタンパク質を転写した。次にタッパーへタンパク質の付着面が上になるようにメンブレンを入れ、浸るくらいまで TTBS (1 M Tris-HCl pH 7.6, 5 M NaCl, 0.5% (v/v) Tween 20) を注いで 15 分間振とうした。その後 TTBS を捨て、*N. benthamiana* の健全葉磨砕液を注ぎ、1 次抗体 (抗 CMV 外被タンパク質抗体) を加えて 30 分間振とうした。その後 TTBS による洗浄を行った後、新しい TTBS を注ぎ、2 次抗体を加えて 30 分間振とうし、抗体液を捨て、TTBS による洗浄を 3 回行った後、バッ

ファーを置換するために AP9.5 (1 M Tris-HCl pH9.6, 5 M NaCl, 1 M MgCl₂) による洗浄を 3 回行った。最後に AP9.5 を注ぎ, NBT/BCIP 液を加えて発色させた。

制御対象遺伝子については, 園芸学的に重要な幼若性, 花成, および果実形成に関わる遺伝子を解析した。cDNA の単離はデータベースより得られた EST 等の配列に基づくか, データベースに情報がない場合はディジェネレートプライマーを用いた RT-PCR による。発現に関してはリアルタイム PCR や単離したプロモーターに GUS をつないだレポーター遺伝子を利用して解析し, 花成や着果などの園芸学的に重要な現象との関係を明らかにした。

4. 研究成果

本研究では, VIGS の代表的なマーカーである PDS 遺伝子の cDNA を組み込んだ CMV ベクターを用いた。PDS はカロテノイド生合成系の鍵酵素であり, 発現が抑制されると葉の脱色が起こるため, VIGS を可視化することができる。CMV ベクターでは *in vitro* 転写によって得られたウイルス RNA を用いて種々の植物体へ接種し, VIGS の適用の可能性を探った。

CMV ベクターを用いた VIGS では, まず始めにウイルスに対する罹病性の高い *N. benthamiana* を被験植物として実験を行い, CMV ベクターから転写されたウイルスの全身移行性を検討した。ウイルスの接種日から 2 週間後に行ったウエスタンブロット解析により, 非接種上位葉においてウイルスが検出され, 全身移行性が確認された (下図)。ま



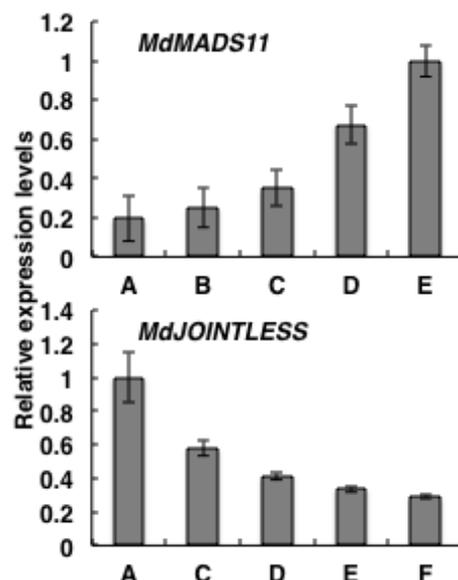
た, 脱色や遺伝子発現などから, ウイルスに組み込まれた PDS 遺伝子配列により *N. benthamiana* の内在性 PDS 遺伝子の VIGS が誘導されたと考えられた。さらに, 種々の園芸作物への接種を行うことによって, CMV ベクターを用いた VIGS の汎用化の可能性を探った。これらの植物体への接種源として, 罹病性の高い *N. benthamiana* においてウイルスを増殖させた葉の磨砕液を用いた。ウイルスの接種日から 2 週間後に行ったウエスタンブロット解析により, 用いた作物の非接種上位葉においてウイルスが検出され, 全身移行性が確認され, 非接種上位葉において葉の脱色等も確認された。

以上の実験では, ウイルスを一度 *N. benthamiana* へ接種し, その磨砕液を各作物

への接種に用いた。この磨砕液を -80°C で保存して接種へ用いたところ, 再度感染が可能であることがタバコ, トマト, キュウリにおいて確認されている。しかし, 凍結融解によって結果が安定しないことも考えられることから, 再現性を求める場合は, ショ糖密度勾配遠心分離や分画遠心分離によってウイルスを精製して保存しておくことが好ましい。今後はこれらのベクターの適用種や品種・系統をさらに広く明らかにすることによって, 多様な園芸作物における効率的なファンクショナルゲノミクスが可能となるであろう。

発現の制御対象遺伝子として, 果実形成などに関わる遺伝子の発現と, 園芸学的な重要性を示す現象との関連性を検討した。野菜においては, トマトの果実形成に関わるオーキシンの輸送を担う PIN について解析した。すなわち, 果実形成初期に発現する数種の PIN のプロモーターを単離して GUS 遺伝子につないでトマトに導入したところ, 2 種類の PIN が種子と果実全体で発現してオーキシンを種子から果皮, さらには果柄へと輸送し, 果皮の細胞分裂と果実脱離の抑制に寄与していることが示唆された。

花きにおいては, 光質がシュコンカスミソウの花成に及ぼす影響と対応する FT 遺伝子や SOC1 遺伝子の発現を解析したところ, 遠赤色光や混合光による花成の促進に寄与する遺伝子が示唆された。果樹においては, 幼若相から成熟相への転換に伴って発現の増加する MADS ボックス遺伝子として, MdMADS11 が幼若性関連遺伝子であることが提案された (下図; A から F にかけて幼若性が弱まる。Hatsuda et al. 2011)。



以上のような遺伝子は VIGS の対象として,

発現抑制によって園芸学的な意義を証明する必要がある。特に、シュコンカスミソウやリンゴは従来のアグロバクテリウム法による形質転換効率が低いか実験例がないことから、VIGSの汎用化によって機能解析が実現すると考えられる。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計10件)

- ① Yoshimi Hori, Koji Nishidate, Manabu Nishiyama, Koki Kanahama, Yoshinori Kanayama (2011) Flowering and expression of flowering-related genes under long-day conditions with light-emitting diodes. *Planta* 234 (2) 321-330. 査読有.
doi:10.1007/s00425-011-1397-9.
- ② Yoshihito Hatsuda, Sogo Nishio, Sadao Komori, Manabu Nishiyama, Koki Kanahama, Yoshinori Kanayama (2011) Relationship between MdMADS11 Gene Expression and Juvenility in Apple. *J. Japan. Soc. Hort. Sci.* 80 (4) 396-403. 査読有.
https://www.jstage.jst.go.jp/article/jjshsl/80/4/80_4_396/_pdf
- ③ Ryo Moriguchi, Kensuke Ohata, Koki Kanahama, Hideki Takahashi, Manabu Nishiyama, Yoshinori Kanayama (2011) Suppression of telomere-binding protein gene expression represses seed and fruit development in tomato. *Journal of Plant Physiology* 168 (16) 1927-1933. 査読有. doi: 10.1016/j.jplph.2011.05.009.
- ④ Sogo Nishio, Ryo Moriguchi, Hiroki Ikeda, Hideki Takahashi, Hideyuki Takahashi, Nobuharu Fujii, Thomas J. Guilfoyle, Koki Kanahama, Yoshinori Kanayama (2010) Expression analysis of the auxin efflux carrier family in tomato fruit development. *Planta* 232 (3) 755-764. DOI: 10.1007/s00425-010-1211-0, 査読有
- ⑤ H. Takahashi, S. Hase, Y. Kanayama, S. Takenaka (2010) Identification of a Protein that Interacts with LeATL6 Ubiquitin-protein Ligase E3 Up-regulated in Tomato Treated with Elicitor-like Cell Wall Proteins of *Pythium oligandrum*. *Journal of Phytopathology* 158 (2): 132-136. 査読有. DOI: 10.1111/j.1439-0434.2009.01589.x

〔学会発表〕(計18件)

- ① 菅原哲平ら (2012) ナス科およびウリ科作物におけるウイルス誘導性ジーンサイレンシングの利用. 園芸学会春季大会 (大阪府立大学) 3月28-29日
- ② 大島健介ら (2012) トマトのアルドース-6-リン酸還元酵素遺伝子導入シロイヌナズナの解析. 園芸学会春季大会 (大阪府立大学) 3月28-29日
- ③ 平賀正浩ら (2012) トマト野生種からの染色体断片導入系統 IL8-3 の解析. 園芸学会春季大会 (大阪府立大学) 3月28-29日
- ④ 村川雄紀ら (2011) シュコンカスミソウにおけるFKF1およびGIホモログの解析. 園芸学会秋季大会 (岡山大学) 9月24-26日
- ⑤ 菅原哲平ら (2010) 園芸作物におけるウイルス誘導性ジーンサイレンシングの汎用化に関する研究. 園芸学会秋季大会 (大分大学) 9月19-20日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

金山 喜則 (KANAYAMA YOSHINORI)
東北大学・大学院農学研究科・准教授
研究者番号: 10233868

(2) 研究分担者

高橋 英樹 (TAKAHASHI HIDEKI)
東北大学・大学院農学研究科・教授
研究者番号: 20197164