

平成 26 年 7 月 31 日現在

機関番号：80122

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2011～2013

課題番号：23780007

研究課題名(和文)ダイズわい化病高度抵抗性遺伝子の同定

研究課題名(英文)Identification of the major gene for resistance to Soybean dwarf virus

研究代表者

山下 陽子 (Yamashita, Yoko)

地方独立行政法人北海道立総合研究機構・農業研究本部中央農業試験場・研究員

研究者番号：30462386

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円、(間接経費) 630,000円

研究成果の概要(和文)：ウイルスベクター誘導によるジーンサイレンシング(VIGS)を利用して、ダイズ品種「Wilis」由来のダイズわい化病高度抵抗性遺伝子Rsdv1候補領域の発現が抑制された系統を作出した。従来の病徴観察で抵抗性を判別する手法から、ELISAを用いたウイルス人工接種法を開発した。この手法によりVIGS処理した系統など、病徴観察が困難な品種系統においても確実な抵抗性評価が可能となった。Rsdv1候補遺伝子の発現抑制はダイズわい化病発病率を有意に変化させなかったことから、VIGS法は本遺伝子の同定法には不適であった、あるいは、近傍の他遺伝子が抵抗性に関与する可能性が考えられた。

研究成果の概要(英文)：The expression of the candidate Rsdv1 gene, the major Soybean dwarf virus (SbDV) resistance gene derived from the soybean cultivar 'Wilis', was suppressed by virus-induced gene silencing (VIGS). An evaluation method for SbDV resistance was developed, in which SbDV was detected by ELISA instead of symptom observation. This method enabled resistance evaluation of gene-silenced soybean lines whose symptoms of SbDV are not detectable due to the symptoms caused by VIGS. VIGS of the candidate Rsdv1 gene did not significantly change the percentage of SbDV-infected plants, suggesting that VIGS was not suitable for identification of Rsdv1, or that additional neighboring genes were necessary for resistance.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農学・育種学

キーワード：育種学 遺伝子 ジーンサイレンシング

科学研究費助成事業 研究成果報告書

1. 研究開始当初の背景

(1) ダイズわい化病は、ダイズわい化ウイルス (*Soybean dwarf virus*: SbdV) を病原とし、ジャガイモヒゲナガアブラムシ *Aulacorthum solani* (Kaltenbach) により媒介されるウイルス病である。ダイズわい化病に罹病した株は草姿がわい化、あるいは黄化し、着莢・子実が充実せず、収量が著しく低下する。SbdV はオーストラリア、ニュージーランド、アメリカ合衆国等で確認されているが、日本においても発生が多く、特に北海道は、被害が甚大な地域であるため、本病害に対する抵抗性品種の研究が世界に先んじて進められている。

(2) 田澤ら (2002) は、ダイズわい化病激発圃場を用いて、国内外から収集した遺伝資源 700 点のスクリーニングを実施し、ダイズわい化病激発条件下でもほとんど病徴が認められず、高度な抵抗性を示すインドネシア原産ダイズ「Wilis」を見出した。「Wilis」およびダイズわい化病感受性品種「トヨコマチ」の RILs (Recombinant inbred lines) を用いて、抵抗性の QTL (Quantitative trait loci) 解析を行った結果、連鎖群 A1 上に作用力の高い QTL (LOD 値 23.8、寄与率 79%) が検出された。抵抗性 QTL 近傍のマーカー Sat_271 における遺伝子型は、激発圃場での発病率と非常に高い相関を示した。

(3) 3 交配組合せ、計 2000 個体以上の集団を用いたマッピングにより、ダイズわい化病高度抵抗性遺伝子 (Resistance to SbdV 1: *Rsdv1*) 候補領域を 44kb に絞り込んだ。植物ゲノムデータベース Phytozome (<http://www.phytozome.net>) によると、候補領域内には 6 つの ORF (Open reading frame) の存在が予測されている。「Wilis」と感受性品種の cDNA を抽出し、塩基配列を比較したところ、そのうちの 1 つの ORF 内の塩基配列が両品種間で異なっていたが、両品種の塩基配列の違いが実際にダイズわい化病抵抗性に影響するかは検討されていない。

2. 研究の目的

ダイズわい化ウイルスによる病徴発現が著しく抑えられるインドネシア原産ダイズ「Wilis」に由来する高度抵抗性遺伝子 *Rsdv1* について、ファインマッピングによって特定した候補領域内 ORF の発現抑制が病原ウイルスの病徴発現に与える影響を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 日本ダイズ品種「トヨコマチ」(ダイズわい化病罹病性) および同品種に *Rsdv1* 候補領域を連続戻し交配によって導入したダイズわい化病抵抗性系統「トヨコマチ *Rsdv1* NIL」を使用した。

(2) 候補遺伝子の発現抑制はキュウリモザイクウイルス (*Cucumber mosaic virus*: CMV)

の改変ベクター (CMV 改変ベクター) を用いた Virus-induced gene silencing (VIGS) 法により行った。CMV 改変ベクターは RNA1、RNA2、RNA3 のウイルスゲノムを含む 3 つのプラスミドから成る。標的遺伝子の部分配列 (200 塩基程度) を PCR により増幅し、RNA2 プラスミドにクローニングした。

(3) CMV 改変ベクターのプラスミドをそれぞれ制限酵素処理 (NotI、EcoRI) により直鎖化し、これを鋳型として *in vitro* 転写 (Superscript III、Life Technologies) を行った。RNA1~3 の *in vitro* 転写産物を等量混合し、*Nicotiana benthamiana* に汁液接種した。感染が確認された *N. benthamiana* 個体を用いてダイズ系統に汁液接種した。CMV 改変ベクターの感染の成否は、接種 2 週間後にポリクローナル抗体 (日本植物防疫協会) を用いた ELISA (Enzyme-linked immunosorbent assay) により行った。

(4) *Rsdv1* 候補遺伝子の発現量は定量 PCR (SYBR 法) により測定した。Taq 酵素は UltraFast QPCR (アジレントテクノロジー) を使用し、添付のマニュアルに従って Mx3005P (ストラタジーン) による PCR 反応を行った。発現量の補正には β -チューブリン遺伝子を用いた。

(5) ダイズわい化病抵抗性は人工ウイルス接種法により検定した。ウイルスは SbdV 黄化系統を用い、ジャガイモヒゲナガアブラムシは北海道芽室町で採取したクローンを用いた。ダイズ 1 系統あたり 8~10 個体に SbdV を接種し、黄化症状の観察およびモノクローナル抗体 (Agdia) を用いた ELISA により感染を確認した。

4. 研究成果

(1) ダイズわい化病抵抗性系統「トヨコマチ *Rsdv1* NIL」の *Rsdv1* 候補遺伝子の発現が抑制された系統を作出した。CMV 改変ベクターの RNA3 はウイルス株ごとに異なる植物種に対する感染能をもつため、ダイズへの感染が報告されているウイルス株を *Rsdv1* 導入ダイズ系統に接種した。その結果、感染効率が良く、病徴観察が容易であった SSV-D 株を選定し、このウイルス株由来の RNA3 配列を以降の試験に用いることとした。

(2) CMV 改変ベクターを用いた VIGS による発現抑制の程度は、RNA2 に導入する部分配列により異なる場合がある。そこで、*Rsdv1* 候補遺伝子の異なる部分配列をクローニングした 3 種類の VIGS ベクターを作製し、標的遺伝子の発現量を定量 PCR により測定した。その結果、いずれのベクターを接種した場合でも、*Rsdv1* 候補遺伝子発現量は非接種時の 20~40% 程度と低く抑えられていた (表 1)。以降の試験では、最も発現抑制程度の高い配列 #3 を用いた。

表1 CMV 改変ベクター導入による標的遺伝子の相対的発現量

導入ベクター	<i>Rsdv1</i> 候補遺伝子の発現量
配列# 1	0.41±0.34
配列# 2	0.43±0.46
配列# 3	0.22±0.11
非接種	1.00±0.66

注) 2 個体×3 反復の平均値±標準偏差。
ベクター非接種時を 1 とした。

(3) ダイズわい化病抵抗性検定法開発のため、既往の人工ウイルス接種検定法を改良した。従来法の病徴観察と ELISA による SbDV 感染個体率を比較したところ、感受性品種「トヨコマチ」では SbDV 接種 3 週間後に 90% 以上の個体で病徴が認められ、4 週間で 100% に達した。一方、ELISA では接種 2 週間後の時点で SbDV 検出個体率が 100% であった。抵抗性品種「トヨコマチ *Rsdv1* NIL」では、接種 6 週間後から病徴がみられ、ELISA では接種 3 週間後から 60% の個体で SbDV が検出された(図 1)。以上の結果から、「トヨコマチ *Rsdv1* NIL」では「トヨコマチ」と比較して SbDV 感染が 1~2 週間程度遅延するために、病徴の出現が 3 週間程度遅れることが明らかになった。ま

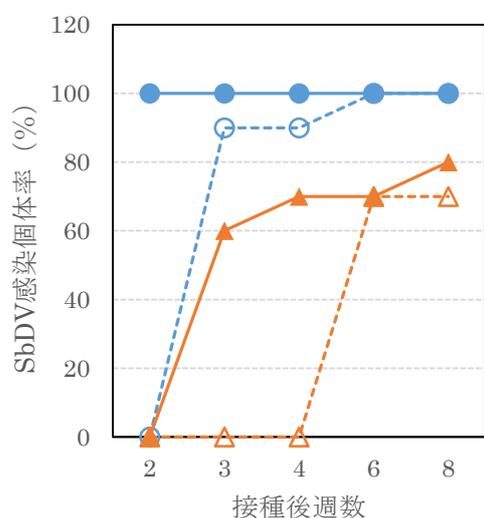


図1 ELISA および病徴観察による SbDV 感染個体率の推移

た、ELISA は従来法の病徴観察と比較して迅速かつ客観的な抵抗性判定が可能であった。さらに、VIGS 処理したダイズはしばしばモザイク症状を呈し、SbDV の病徴観察が困難となることから、以降の試験では ELISA により SbDV 感染の有無を判定した。

(4) SbDV 感染効率はダイズの生育ステージが若いほど高く、従来法ではダイズ播種 5 日後に SbDV を接種している。本研究では標的遺伝子の発現を VIGS ベクターで抑制してから抵抗性検定を行う必要があるため、VIGS ベクター接種適期である播種 8 日後に SbDV を接種した場合の感染個体率を調査した。その結果、SbDV 接種 2 週間後では、「トヨコマチ」の感染個体率は播種 5 日後に接種した場合より低かったものの、接種 4 週間後では 100% の感染個体率を示した。一方、「トヨコマチ *Rsdv1* NIL」の感染個体率は接種 2 週間後では 0% だったが、接種 4 週間後では 57% に増加した。以上のことから、播種 8 日後接種では、播種 5 日後接種より感染個体率が低い傾向があるものの、SbDV 接種 2~4 週間後に抵抗性の判定が可能と考えられた(図 2)。

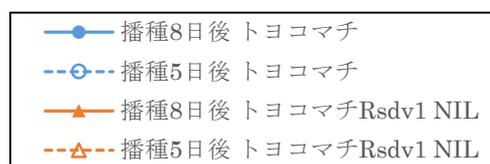
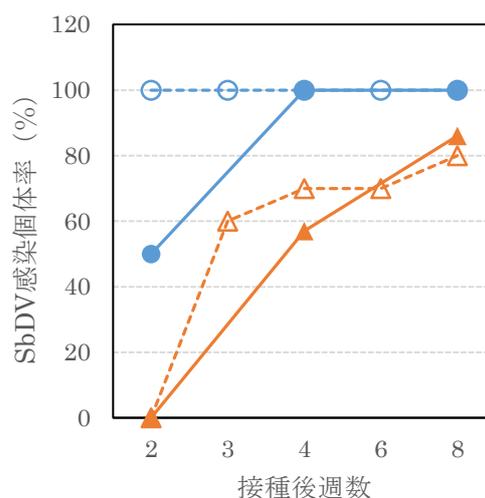


図2 異なる時期に接種した場合の SbDV 感染個体率の推移

(5) ダイズ播種 8 日後に抵抗性品種「トヨコマチ *Rsdv1* NIL」に作製した VIGS ベクターと SbDV を同時接種した結果、単独接種した場合と比較して VIGS ベクターの感染率が低下した。VIGS ベクターの感染率を高めるため、VIGS ベクターと SbDV を同時接種し、さらに

その1週間後および2週間後に VIGS ベクターを接種した。その結果、VIGS ベクターの感染率は30%程度まで上昇した。VIGS ベクターの感染が確認された「トヨコマチ *Rsdv1* NIL」個体における SbDV 感染率には有意な上昇は認められなかったことから(表2)、*Rsdv1* 遺伝子の同定には至らなかった。VIGS 法では遺伝子発現抑制が20~40%程度と不完全であるため、遺伝子の同定に適さなかった可能性がある。また、本試験で検討した候補遺伝子以外の5遺伝子がダイズわい化病抵抗性に関与することも考えられるため、今後の検討が必要である。

山下 陽子 (YAMASHITA, Yoko)
北海道立総合研究機構・農業研究本部・中央農業試験場・作物開発部・研究職員
研究者番号：30462386

(2) 研究分担者
なし

(3) 連携研究者
なし

表2 SbDV 接種4週間後の感染個体率

品種名	導入ベクター	SbDV (%)	CMV (%)
トヨコマチ <i>Rsdv1</i> NIL	配列#3	16.2	25.4
	Mock	8.8	33.3
トヨコマチ	-	56.7	-

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1件)

- ① 山下 陽子、竹内 徹、大西 志全、佐々木 純、田澤 暁子、Fine mapping of the major *Soybean dwarf virus* resistance gene *Rsdv1* of the soybean cultivar 'Wilis', *Breeding Science*、査読有、Vol. 63、Issue 4、2013、pp. 417—422
DOI:10.1270/jsbbs.63.417

[学会発表] (計1件)

- ① 山下 陽子、大西 志全、竹内 徹、「WILIS」由来のダイズわい化病高度抵抗性遺伝子 *Rsdv1* のファインマッピング、日本育種学会第120回講演会、2011年9月24日、福井県立大学

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

[その他]

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者