

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 28 年 6 月 11 日現在

機関番号：12605

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26850014

研究課題名(和文) ウイルスベクターを利用した逆遺伝学的手法による植物の性決定メカニズム解明

研究課題名(英文) A reverse genetic approach to analyze sex determination systems in plants using a virus vector

研究代表者

藤田 尚子 (FUJITA, NAOKO)

東京農工大学・(連合)農学研究科(研究院)・研究員

研究者番号：50646966

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 1,800,000円

研究成果の概要(和文)：植物の性決定メカニズム解明を目指し、ウイルスベクターを利用した逆遺伝学的手法の確立を目的とし、雌雄異株植物ヒロハノマンテマ(ナデシコ科)におけるVIGS法(Virus Induced Gene Silencing)の開発に取り組んだ。その結果、花形成関連遺伝子の機能解析に有用なALSVベクターの接種法を最適化し、花器官を含む全身感染を確認できた。今後、本研究で開発した手法により性決定候補遺伝子の機能解析を進めていく。

研究成果の概要(英文)：White campion (*Silene latifolia*) is a dioecious flowering plant in the family Caryophyllaceae, also known as a model system for the study of plant sex determination. In this study, for the purpose of the identification of a plant sex-determination gene, we have developed an infection method for VIGS (Virus Induced Gene Silencing) system in *S. latifolia*. VIGS is an efficient method for gene functional analysis without transformation. To develop the VIGS system using a virus vector localizing in floral meristem tissues, named ALSV, we have optimized the ALSV infection method in *S. latifolia*. Our developed method resulted in a systemic infection with ALSV, indicating that the VIGS can be applied for the identification of sex-determination gene in *S. latifolia*.

研究分野：植物病理

キーワード：ウイルスベクター 植物の性 機能解析 ALSV ヒロハノマンテマ

### 1. 研究開始当初の背景

(1) オスとメスに分かれる雌雄異株植物は、ハウレンソウ、アスパラ、キウイ、パパイヤ等の重要な園芸作物を含み、農業生産上重要な形質である。ナデシコ科ヒロハノマンテマは、雌雄異株のモデル植物であり、雌雄異株性の研究が最も進んでいる。ヒロハノマンテマはヒトと同じXY型の性染色体をもち、Y染色体上にはヒトのSRY遺伝子にあたる性決定因子の存在が推定されている。しかし、これまでのところ原因遺伝子は特定されていない。これには、ヒロハノマンテマの形質転換系が確立されておらず、逆遺伝学的手法が利用できないことが大きな障壁となっている。

(2) VIGS法(Virus Induced Gene Silencing)は、時間や手間を要する形質転換を必要とせずに、特定の植物遺伝子を機能抑制することができる有効な逆遺伝学的解析ツールである。

### 2. 研究の目的

(1) VIGS法を用いた逆遺伝学的手法を、ナデシコ科雌雄異株植物に初めて応用することで、性決定因子の特定を目指す。

(2) そのためにまずヒロハノマンテマにVIGS法を確立する。ウイルスベクターを利用するには、種々の条件検討が必要である。本研究では、雌雄異株植物の性決定因子特定に適したVIGS法の最適化を行うことにより、性決定因子の候補遺伝子を迅速かつ効率的に機能できる解析法の開発を目的とする。

### 3. 研究の方法

(1) ヒロハノマンテマに最適なアグロバクテリウム系統を選抜する。これは、候補遺伝子を挿入したウイルスベクターの導入効率を上げるため、アグロバクテリウムを介して植物に接種するためである。アグロバクテリウムの系統はいくつかあり、それぞれ宿主植物によって導入効率が異なることが知られている。そこで4系統のアグロバクテリウム(EHA105、C58C1、GV3101、LBA4404)を利用し、導入効率を調べる。アグロバクテリウムにGFP遺伝子発現ベクターを形質転換し、これらをヒロハノマンテマに接種し、GFP発現強度によりアグロバクテリウムの導入効率を調べる。

(2) 上記で得られたアグロバクテリウム系統を用いて3種類のウイルスベクターの感染効率を調べる。ウイルスベクター候補として、apple latent spherical virus (ALSV)、tobacco rattle virus (TRV)、potato virus X (PVX)の3つを検討する。播種2週間後(インフィルトレーションが可能な葉の大きさ)に上記3種類のウイルスベクターをアグロインフィルトレーションで接種し、接種後2週間で上位葉をサンプリングし、RT-PCRで感染

有無を確認する。感染が確認された植物個体の花芽器官をサンプリングし、*in situ hybridization* 解析により、ウイルスベクターの花芽器官の組織局在を観察する。30サンプル(10サンプル×3回)の接種で安定的な感染かつ花芽器官局在が認められたウイルスベクターを用いることとする。ヒロハノマンテマは多年草で数年間安定的に花が咲く。感染が確認できた個体については継続的に感染有無およびVIGS法による遺伝子発現抑制を確認し、ウイルスベクターの安定性も調べる。

(3) VIGS効果を評価するため、遺伝子サイレンシングの表現型マーカーとしてカロテノイド合成系遺伝子PDS(phytoene desaturase)を利用する。ウイルスベクターにPDS遺伝子配列を導入し、それを植物に接種することでサイレンシングを誘導する。サイレンシングされた組織はフォトブリーチングにより白くなる。接种植物の白化によりサイレンシング効果を評価する。

(4) 花形成関連遺伝子のノックダウンを検証するため、ヒロハノマンテマの花形成関連遺伝子SISUP遺伝子(Kazama *et al.* 2009)をウイルスベクターに導入し、VIGS法によりSISUPをノックダウンする。SISUPはシロイヌナズナで過剰発現すると雄蕊が抑制されることが報告されている。これはSISUPの上流遺伝子である性決定遺伝子の制御によって、メスではSISUP遺伝子が発現上昇されるため雄蕊形成が抑制されることを示唆している。これを検証するため、開発したVIGS法でSISUPをヒロハノマンテマでノックダウンし、雌花の形態変化を観察する。

### 4. 研究成果

(1) アグロインフィルトレーションによるウイルス接種

導入効率向上のためアグロバクテリウムを利用したGFP一過的発現を観察したが、いずれのアグロバクテリウム系統においても、安定したGFP蛍光は観察されなかった。その中でも微弱ながらGFP蛍光が観察できたアグロバクテリウム系統を使い、3種類のウイルスベクター(TMV, PVX, ALSV)にPDS遺伝子を導入し、これらをヒロハノマンテマにアグロインフィルトレーション法によって接種し、VIGS効果を観察した。しかし、いずれのウイルスベクターの場合もヒロハノマンテマは白色化せず、さらに上位葉のウイルス感染も確認できなかった。

タバコ植物では簡便かつ効率的な接種方法と知られるアグロインフィルトレーションだが、ヒロハノマンテマには有効な接種方法ではないことがわかった。

ウイルス感染が確認できない理由として宿主範囲または接種圧を考えた。TMV と PVX は非宿主には感染しにくいいため、ヒロハノマンテマに感染できないのも非宿主抵抗性によるものと推測できたが、一方で ALSV は広い宿主範囲を有し、ほぼ全ての植物に感染することが報告されている (Igarashi et al. 2009)。そのため、接種圧が高い接種方法で ALSV ベクターを接種すれば、ナデシコ科植物にも感染する可能性が高まる。そのため、以後 ALSV ベクターに絞った接種方法の検討を行った。

#### (2) パーティクルガンによるウイルス接種

ALSV ベクターの接種方法として、パーティクルガンの使用を検討した。パーティクルガンに使用する ALSV ベクターは接種前にタバコ植物を用いて予めウイルス濃縮を行なった。この方法で ALSV はパーティクルガンによる接種でほぼ全ての植物に感染するといわれている。ヒロハノマンテマにも有効かどうか検証するため、発芽初期の植物種子に直接ウイルス粒子をパーティクルガンで打ち込んだ。

パーティクルガンは1ショットまたは2ショット打ち込んだが、いずれの場合もヒロハノマンテマの成長に影響するようなダメージはみられなかった。接種後2週間で上位葉から RNA を抽出し、RT-PCR で感染を確認したところ、ほぼ全ての個体で感染が確認できた。

ヒロハノマンテマの性決定因子解析のために ALSV ベクターを利用する利点として、ALSV の組織局在性も重要な性質である。ほとんどのウイルスは花芽メリステムには侵入しないが、ALSV は花芽組織を含めて全身に感染する。さらに、無病徴感染するため表現型変化を観察しやすい。パーティクルガンで野生型 ALSV を接種した植物をそのまま成長させ、花形成時期に蕾をサンプリングし、RT-PCR および *in situ hybridization* により感染有無を調べた。ところが、接種初期に上位葉で感染が認められた植物個体であっても、花芽組織における ALSV 感染は確認できなかった。

#### (3) 植物系統間の ALSV 感染率の違い

上位葉で感染が確認できたにも関わらず、花組織の感染が認められなかった理由として、植物系統により感染率が異なる可能性を考えた。そこで複数のヒロハノマンテマ系統を用意し、野生型 ALSV の感染率を調べた。感染率は上位葉および花組織からトータル RNA を抽出し、RT-PCR により ALSV 感染有無を調べた。その結果、上位葉ではほぼ全てのヒロハノマンテマ系統に感染が確認されるものの、その後の成長過程で、花器官感染が確認できるものとできない系統があること

がわかった。この結果から、ヒロハノマンテマにおける ALSV 感染は植物系統によって異なることが明らかになった。

ウイルスが花器官まで全身感染するヒロハノマンテマ系統を選抜するため、継続的に花器官をサンプリングしながら ALSV 感染の安定性を調べた。その結果、調べたヒロハノマンテマから一系統を選抜した。

#### (4) ALSV ベクターを利用したヒロハノマンテマの VIGS 法

以上の実験から ALSV が花器官も含め全身感染するヒロハノマンテマ系統を特定することができた。さらに、*in situ hybridization* で花組織内のウイルス局在を観察したところ、花組織全体に ALSV 感染が認められた。見出されたヒロハノマンテマ系統と ALSV ベクターを利用することで、VIGS 法による遺伝子ノックダウンができる準備ができた。

VIGS 法による遺伝子ノックダウンを評価するため、ALSV-PDS と ALSV-S1SUP の接種試験を行っている。感染率は野生型 ALSV より下がるため、接種時期の再検討、導入配列の検討など、実験を進めている。ウイルスベクターを利用した逆遺伝学的解析法は、形質転換系のない植物に強力なツールとなり得るが、植物によって最適化する必要がある。

本研究により見出されたヒロハノマンテマの ALSV 感染系は、形質転換法のないヒロハノマンテマの性決定候補因子の機能解析を可能にする重要なステップとなった。今後、Y 染色体マッピングおよび次世代シーケンズ解析から得られた候補因子を ALSV ベクターで機能解析し、性決定因子を特定していく。

#### <引用文献>

① Kazama Y., Fujiwara, T.M, Koizumi A., Nishihara K., Nishiyama R., Kifune E., Abe T. and Kawano S. A SUPERMAN-like gene is exclusively expressed in female flowers of the dioecious plant *Silene latifolia*. *Plant Cell Physiol.* 2009, 50: 1127-1141

② Igarashi A., Yamagata K., Sugai T., Takahashi T., Sugawara E., Tamura A., Yaegashi H., Yamagishi N., Takahashi T., Isogai M., Takahashi H. and Yoshikawa N. Apple latent spherical virus for reliable and effective virus-induced gene silencing among a broad range of plants including tobacco, tomato, Arabidopsis thaliana, cucurbits, and legumes. *Virology* 2009, 386: 407-426

## 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0件)

[学会発表] (計0件)

[図書] (計0件)

[産業財産権]

○出願状況 (計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

出願年月日:

国内外の別:

○取得状況 (計0件)

名称:

発明者:

権利者:

種類:

番号:

取得年月日:

国内外の別:

[その他]

ホームページ等

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

藤田 尚子 (FUJITA, Naoko)

東京農工大学・農学研究院・研究員

研究者番号: 50646966