

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 8 日現在

機関番号：14301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2015

課題番号：26850016

研究課題名(和文) ウイルスベクターを用いたバラ科サクラ属果樹の遺伝子機能評価系の開発

研究課題名(英文) Development of a gene evaluation system using virus vectors in Prunus

研究代表者

河井 崇 (KAWAI, Takashi)

京都大学・(連合)農学研究科(研究院)・助教

研究者番号：90721134

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：ウイルス誘導性ジーンサイレンシング(VIGS)は迅速かつ効果的な遺伝子機能評価法として様々な植物で利用されている。本研究では、多様なサクラ属果樹の種や品種を対象に、リンゴ小球形潜在ウイルス(ALSV)ベクターを用いたVIGSの有効性を調査した。その結果、アンズ、カンカオウトウ、アーモンドの数品種において内生フィトエン不飽和化酵素(PDS)遺伝子のVIGSに成功した。一方、ALSVの感染率やVIGS効率はサクラ属果樹の種や品種によって異なることが示唆された。ウイルス接種手順や感染個体の生育条件を改善することで、サクラ属果樹の遺伝子機能評価や応用研究にALSVベクターを有効活用できる可能性がある。

研究成果の概要(英文)：Virus-induced gene silencing (VIGS) has been used as a rapid and effective tool for functional analysis of genes in various plants. In this study, we assessed the VIGS efficiency of Apple latent spherical virus (ALSV) vectors in a wide range of Prunus species and cultivars. We found that ALSV vectors could successfully induce VIGS of endogenous PHYTOENE DESATURASE (PDS) genes in several cultivars of apricot, sweet cherry, and almond, although ALSV infectivity and VIGS efficiency seemed to vary depending on species and/or cultivar in Prunus. Further optimization of viral inoculation procedures and growth conditions for infected plants will lead to the full use of ALSV vectors for evaluation of gene functions or various practical studies in Prunus.

研究分野：果樹園芸学

キーワード：果樹 サクラ属 ウイルスベクター ジーンサイレンシング 遺伝子機能評価

1. 研究開始当初の背景

モモ、ウメ、アンズ、アーモンド等を含むバラ科サクラ属果樹は、基本染色体数の少なさ・ゲノムサイズの小ささから果樹類の中でも早くから遺伝子研究が進められ、有用形質との関連が推測される遺伝子が数多く単離されてきた。これらの候補遺伝子の機能解析には遺伝子組み換え実験が必要不可欠であるが、サクラ属果樹では従来のアグロバクテリウム法を用いた形質転換系が確立されておらず、形質転換体の作出や評価を行うには多大な時間・労力が必要となる。そのため、候補遺伝子の機能解析はシロイヌナズナやポプラ等のモデル植物への遺伝子導入により行われることが多かった。しかしながら、果実品質や生産性など園芸作物としての形質を異種モデル植物で評価するのは限界があり、遺伝子を単離した果樹種そのものにおける機能解析が強く求められている。

ウイルスベクターを用いた virus-induced gene silencing (VIGS) は、組み換えウイルスを直接植物体に感染させ内生遺伝子の発現を抑制する技術である。VIGS は組織培養を必要とせず、対象植物種自身における形質評価が可能であるため、従来の形質転換法の問題点を解決し得る遺伝子機能評価法として注目されている。また、ウイルスベクターは内生遺伝子の発現抑制だけでなく外来遺伝子の発現誘導にも有効であることが示されている。近年、リンゴで単離されたリンゴ小球形潜在ウイルス (*Apple latent spherical virus*; ALSV) がリンゴやナシにおいて安定的に VIGS および外来遺伝子の発現を誘導できることが報告され、果樹類においてもウイルスベクターの利用の動きがみられはじめた。また、リンゴにおいて花成関連遺伝子の発現制御により早期開花誘導に成功した例も報告されており、基礎的な遺伝子機能評価にとどまらない応用面での利用も期待される。これらの技術はサクラ属果樹を含む他の果樹種にも応用できる可能性があるが、果樹類におけるウイルスベクターの利用は一部の種や品種に限られており、幅広い種や品種を対象とした研究はほとんど行われていない。

2. 研究の目的

本研究では、従来の形質転換法に対して多くの優位性をもつウイルスベクターをサクラ属果樹で汎用化し、先行研究で蓄積されたゲノム情報を広く果樹栽培・育種に有効活用することを目的としている。まず多様なサクラ属の種や品種を対象に、ウイルスベクターを用いた VIGS による遺伝子機能評価系を確立する。安定的に利用可能な遺伝子機能評価系が確立できれば、果実品質、花成、貯蔵性などの重要形質の解析が可能になり、有用形質との関連が逆遺伝学的に裏打ちされた精密な DNA マーカーの構築や、遺伝子機能に基づいた有効な育種・栽培法の開発に繋がる

ことが期待される。

ALSV ベクターを用いた遺伝子機能評価の有効性が確認された果樹種については、開発した系を応用して、花成関連遺伝子の発現制御による開花促進技術の開発に取り組む。この技術が実用化されれば、通常数年~十数年かかるサクラ属果樹の育種年限を大幅に短縮できる可能性がある。

これらにより得られる成果は、サクラ属果樹のみならず、今後対象とする果樹種や遺伝子を拡大していく際のモデルケースにもなり得ると考えられる。

3. 研究の方法

(1) 様々なサクラ属果樹における遺伝子機能評価系の開発・評価

本研究では宿主範囲が広くバラ科果樹で VIGS の実績がある ALSV ベクターを用いた。商業的に重要なサクラ属果樹 7 種 (アンズ、ウメ、モモ、ニホンスモモ、ヨーロッパスモモ、カンカオウトウ、アーモンド) 計 16 品種を供試し、ALSV の感染効率、病徴の有無、サイレンシング効率を調査した。VIGS の標的遺伝子にはカロテノイド生合成経路に關与する *PDS* 遺伝子を用いた。アンズから単離した *PDS* の部分配列 (*ParPDS*) を ALSV RNA2 をコードするバイナリーベクター pBICAL2 に挿入し、ALSV RNA1 をコードするバイナリーベクター pBICAL1 と共にアグロバクテリウムに導入した。ベンサミアナタバコへのアグロインフィルトレーションにより ALSV をウイルス化し (*ParPDS*-ALSV) 上記のサクラ属果樹の発根種子へ遺伝子銃で接種した。数週間後に接種個体の上位葉を採取し、RT-PCR により ALSV の感染を確認した。感染が確認された個体については、リアルタイム RT-PCR により内生 *PDS* mRNA 量を調査した。また small RNA-Seq 解析を行い、VIGS により生じる small RNA の分布を調査した。

(2) 花成関連遺伝子の発現制御による開花促進技術の開発

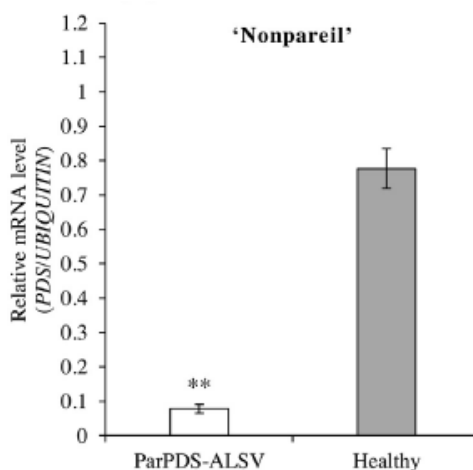
FT および *TFL1* は先行研究からそれぞれ花成誘導および花成抑制への関与が示唆されている遺伝子であり、果樹類においてもリンゴ、セイヨウナシ、カンキツ等を用いた形質転換実験によりその機能が実証されている。本研究では ALSV ベクターを用いて外来 *FT* の発現誘導および内生 *TFL1* のサイレンシングを行い、通常花芽が形成されない幼若段階での早期開花誘導を試みた。シロイヌナズナ *FT* の全長配列 (*AtFT*) およびアンズ *TFL1* の部分配列 (*ParTFL1*) をクローニングし、pBICAL2 に挿入した。実験 (1) と同様の手順で ALSV をウイルス化し (*AtFT*-ALSV および *ParTFL1*-ALSV) 比較的高い感染率を示したアーモンドおよびカンカオウトウに遺伝子銃で接種した。感染個体の形質変化を観察するとともに、花成開

連遺伝子の発現を調査した。

4. 研究成果

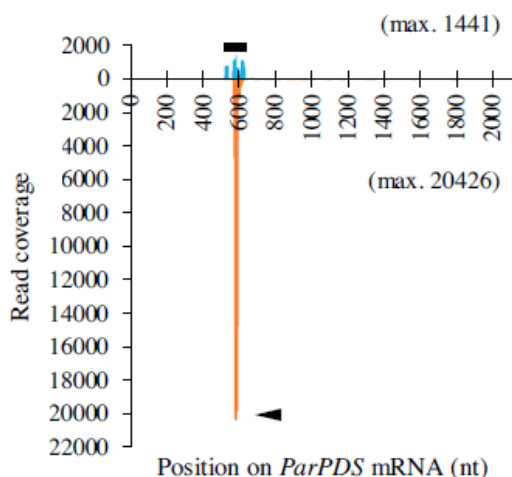
(1) 様々なサクラ属果樹における遺伝子機能評価系の開発・評価

ParPDS-ALSV の感染率は種間および品種間で差がみられた。感染が確認されたアンズ 3 品種（感染率約 10%）、カンカオウトウ 1 品種（感染率約 20%）、アーモンド 2 品種（感染率約 30%）の全個体において、PDS のサイレンシングによる上位葉の白化および内生 PDS mRNA 量の減少が確認され（第 1 図）、ParPDS-ALSV の感染により VIGS が誘導されたと考えられた。一方、ウメ 4 品種、二ホンモモ 1 品種、ヨーロッパモモ 1 品種、および上記と品種が異なるアンズ 2 品種、アーモンド 1 品種では感染は確認されなかった。モモ 1 品種は 85% 以上の高い感染率を示したが、生育初期にウイルス感染による激しい病徴がみられ、主枝の生長が停止した。感染葉における内生 PDS mRNA 量の有意な減少は確認されなかった。その後正常な葉をもつ側枝が形成されたが、展葉した上位葉ではウイルスは検出されなかった。



第 1 図 ParPDS-ALSV 接種アーモンド 'Nonpareil' における葉の白化（上図）および内生 PDS mRNA 量の減少（下図）

アンズ、カンカオウトウ、アーモンドの白化葉およびモモの病徴葉から精製した small RNA を次世代シーケンサーで解析し、得られたリードを ParPDS mRNA 全長配列にマッピングした。その結果、全ての種でインサート PDS 配列内のアンチセンス側に 21nt の coverage のピークがみられ（第 2 図）、この領域が mRNA の分解に関わる siRNA として機能したと考えられた。一方、インサート外の PDS 配列にマッピングされた small RNA はほとんどなかったことから、内生 PDS mRNA を介した siRNA の二次的な増幅は生じていないと考えられた。白化が生じないモモにおける siRNA 量は他の種より少なかったことから、siRNA 量が VIGS 効率に影響を及ぼす可能性が考えられた。



第 2 図 ParPDS-ALSV 接種アンズ '信陽' における small RNA のマッピング。得られたリードを ParPDS mRNA 全長配列にマッピングした。黒色バーはインサートとして用いた ParPDS の部分配列をあらわす。矢印は 21nt の coverage のピークを示す。

以上より、アンズ、カンカオウトウ、アーモンドにおいて ALSV ベクターを用いた VIGS による遺伝子機能評価系が有効であることが示された。この手法を用いることで、上記の種におけるファンクショナルゲノミクスが加速化することが期待される。また、アンチセンス鎖 siRNA が VIGS 誘導において重要な働きをすること、その産生がインサート配列内の限られた領域で行われることが示唆された。この結果は、標的遺伝子の配列によって siRNA 産生の程度や VIGS 効率が異なる可能性を示している。

一方、サクラ属果樹の中でも種や品種によって ALSV の感染率や VIGS 効率が異なることが示唆された。今後、サクラ属果樹において ALSV ベクターを用いた遺伝子機能評価系を有効活用していくためには、このような種・品種ごとの違いを考慮する必要があると考えられる。また、感染率の改善も重要な課

題の一つである。ウイルスの増幅・抽出・精製・接種の一連の手順や、接種個体の生育条件を検討することで、こうした問題の改善を目指す。

(3)連携研究者
なし

(2) 花成関連遺伝子の発現制御による開花促進技術の開発

アーモンドおよびカンカオウトウにおいて AtFT-ALSV および ParTFL1-ALSV の感染が確認されたが、花芽形成およびその他の形態的变化は確認されなかった。この結果から、サクラ属果樹では外来 FT の発現誘導または内生 TFL1 の発現抑制だけでは、花成誘導には不十分である可能性が考えられた。一方、インサートが脱離した野生型 ALSV が検出された個体も多く、このことが花成誘導を阻害する一因になった可能性も考えられた。ParTFL1-ALSV 感染個体の茎頂および根において TFL1 の発現が低下する傾向がみられたが、インサートを保持した感染個体が少なく、正確な評価ができていない可能性もある。今後は、接種法を改善することでインサートを保持した ALSV 感染個体を十分数確保して、サクラ属果樹における開花促進の有効性をより正確に評価していく必要がある。また、リンゴでは外来 FT の発現誘導と内生 TFL1 の発現抑制を同時に行うことで 90%以上の高い開花率が得られている。サクラ属果樹の開花促進においても同様の手法が有効であるか、今後検討する価値がある。

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1件)

Kawai, T.、Gonoi, A.、Nitta, M.、Yamagishi, N.、Yoshikawa, N.、Tao, R.、Virus-induced gene silencing in various *Prunus* species with the *Apple latent spherical virus* vector、*Scientia Horticulturae*、査読有、Vol. 199、2014、pp. 103-113、DOI:10.1016/j.scienta.2015.12.031

[学会発表](計1件)

Kawai, T.、Nitta, M.、Gonoi, A.、Tao, R.、Development of ALSV-mediated VIGS in *Prunus* fruit trees、7th International Rosaceae Genomics Conference、2014年6月24日~26日、Seattle(アメリカ)

6. 研究組織

(1)研究代表者

河井 崇 (KAWAI, Takashi)
京都大学・大学院農学研究科・助教
研究者番号：90721134

(2)研究分担者

なし