

令和元年6月10日現在

機関番号：82105

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07790

研究課題名(和文) ウイルスベクターを用いた遺伝子発現制御による無花粉スギの開発

研究課題名(英文) Development of pollen-free Sugi by gene expression control using viral vectors

研究代表者

小長谷 賢一 (Konagaya, Ken-ichi)

国立研究開発法人森林研究・整備機構・森林総合研究所 森林バイオ研究センター・主任研究員 等

研究者番号：30582762

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,700,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では遺伝子の運搬体(ベクター)としてリンゴ小球形潜在ウイルス(ALSV)を用い、スギへ接種することで遺伝子組換えすることなく形質を改変できる実験系の開発を目的とした。ALSVベクターを用いて効率的に遺伝子の発現を抑制することに成功した。また、雄花特異的に発現する遺伝子を単離し、本法を用いてこれら遺伝子の発現を抑制することで、スギを迅速に無花粉化させる技術確立し、花粉形成に関する遺伝子の同定に成功した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ウイルスベクターは農作物やモデル植物においては基本的な実験ツールとして利用されているが、本研究により針葉樹におけるウイルスベクターの利用が世界で初めて可能となったことから、遺伝子の機能解析等、針葉樹の基礎研究分野への波及効果が期待できる。また、本研究で得られた花粉形成に関する遺伝子情報は、今後ゲノム編集等の新たな育種技術における標的遺伝子として利用可能であり、育種素材作出へ向けた応用展開が期待できる。

研究成果の概要(英文)：In this study, we aimed to develop an experimental system to modify traits without genetic transformation by inoculating Sugi with apple latent spherical virus (ALSV) as a carrier (vector) of genes. We succeeded in efficiently suppressing gene expression using ALSV vector. In addition, we have established a technology for rapidly producing pollen-free Sugi by gene knockdown of genes with male flower-specific expression. As a result, genes involved in pollen formation were identified.

研究分野：樹木分子生物学

キーワード：雄性不稔 VIGS 花粉症

様式 C-19、F-19-1、Z-19、CK-19（共通）

1. 研究開始当初の背景

現在、スギ花粉症対策として花粉症対策品種の開発・普及が急務となっている。遺伝子組換え技術は目的となる遺伝子のみを導入するため、従来の交配を繰り返す方法と比較して余分な形質が混じることなく、確実に品種改良が可能であり、長寿命な樹木の品種開発法の一つとして利用価値は高い。しかしながら、スギの遺伝子組換えは組織培養が不可欠であり、この過程には大きな労力と1年以上の培養日数を必要とする。さらに、現状では特定の系統でのみしか効率よく遺伝子組換えを行うことができず、既に林業場面で実績のある品種や、これまで開発されてきた多くの優良品種を無花粉化していくためには、効率面での課題が残されている。これらの問題を打開するため、植物ウイルスの利用を考えた。植物に感染したウイルスは植物体内で増殖し、全身へ移行するため、植物ウイルスを遺伝子の運搬体（ベクター）として用いれば、組織培養を経ることなく、また、宿主植物のゲノムを遺伝子組換えすることなく形質を改変することが可能である。筆者らは、これまでスギおよびクロマツへリンゴ小球形潜在ウイルス（*Apple latent spherical virus*, 略称 ALSV）の接種を試み、いずれの樹種へも品種間の差異なく ALSV が潜在感染する（感染しても病気を発症しない）ことを確認しており、本ウイルスがベクターとして針葉樹へ利用可能であることが期待された。

2. 研究の目的

本研究では、ウイルスベクターを用いて花器官形成に関与する遺伝子を制御することで、スギを効率的かつ迅速に無花粉化させる技術の確立を目指す。ウイルスベクターは農作物やモデル植物においては遺伝子の機能解析や形質の改変等、基本的な実験ツールとして広く利用されているが、針葉樹での利用例は皆無であり、針葉樹へ感染するウイルス自体も知見に乏しいのが現状である。本研究において、スギである針葉樹へ ALSV ベクターを適用し、遺伝子の機能解析および形質改変を行うための実験系を確立する。また、花粉形成に関与する遺伝子を特定することで、ゲノム編集等の新しい育種技術へ活用するための基盤情報を整備することを目的とする。

3. 研究の方法

(1) ALSV ベクターによる遺伝子ノックダウン法の確立

スギへの ALSV ベクターの接種をリンゴで確立されている方法（Yamagishi and Yoshikawa 2013）に準じて行う。接種する植物体としては、完熟種子の胚または未熟種子胚の培養によって得られた不定胚を無菌的に培地上で発芽させた小植物体を用いる。また、ALSV ベクターによる遺伝子の発現抑制（ノックダウン）の効果を確認するため、色素合成に関与する遺伝子をスギより単離し、ALSV ベクターに挿入した組換え ALSV を作製し、スギへ接種する。

(2) 花粉形成関連遺伝子の単離と組換え ALSV の作製

スギ雄花のマイクロアレイ解析と雌花の RNA-seq 解析から雄花で特異的に発現し、花粉形成に関与すると推定される遺伝子を選抜し、これらの遺伝子断片を ALSV ベクター内へ挿入した構築物を作製する。

(3) 組換え ALSV の接種と表現型の解析

組換え ALSV を接種したスギについてジベレリン溶液の浸漬処理による着花誘導を行う。また、人工気象器で花粉を成熟させるための培養条件を明らかにする。得られた雄花について花粉形成を調査する。

4. 研究成果

(1) ALSV ベクターによる遺伝子ノックダウン法の確立

本研究で確立したスギへの ALSV ベクターの接種法の概要を図1に示す。まず、ALSV をクローニングしたプラスミドベクターを増殖用植物であるキノアへカーボランダムを用いて機械的接種し、ALSV を増殖させる。ALSV が感染したキノアから total RNA を抽出し、パーティクルガン装置を用いてスギ不定胚へ RNA を導入することにより ALSV を接種する。パーティクルガン装置使用時の接種効率を向上させる目的で、不定胚置床培地への 0.4M マルトース添加による浸透圧処理の効果を検証した結果、接種の4時間以上前に浸透圧処理することでほぼ100%の感染効率が得られ（図2）、スギにおける効率的な ALSV ベクター接種法の確立に成功した。

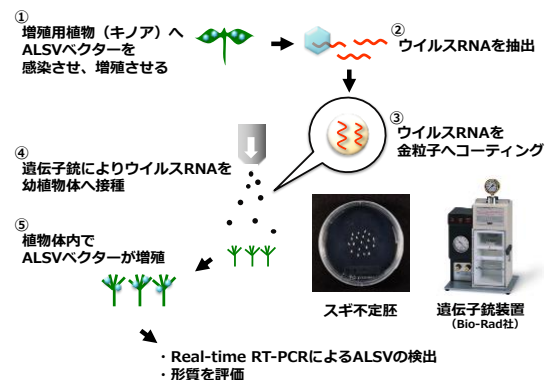
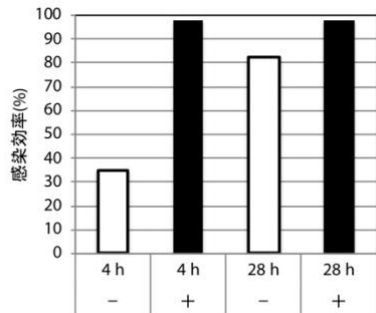


図1. スギにおける ALSV ベクターの接種法。



処理時間および0.4Mマルトース添加の有無

図2. 不定胚の浸透圧処理による感染効率の影響. 緑色蛍光タンパク質遺伝子を導入した組換え ALSV ベクターを接種し、蛍光が観察された不定胚を感染個体として計測した (n=46).

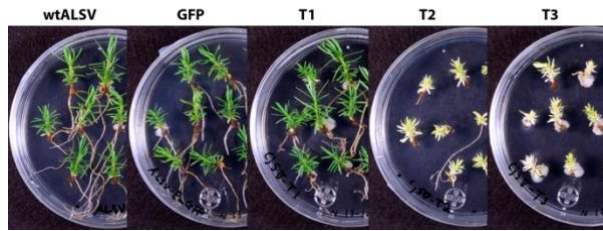


図3. ALSV ベクターによる *Ch11* 遺伝子のノックダウン. スギ不定胚へ接種 70 日後の幼植物体. アクセシビリティの高い領域 (T2 および T3) を標的領域とした場合は、*Ch11* 遺伝子の効率的なノックダウンにより白化が確認された. 対照として wtALSV は空ベクター、GFP は緑色蛍光タンパク質遺伝子を導入した ALSV ベクター.

これまでスギにおける遺伝子ノックダウンの効率が遺伝子配列の標的領域に大きく影響することが観察されていた。これは標的 RNA の二次構造による影響が一因であると推測された。そこで葉緑素合成に関与するマグネシウムキラーゼ (*Ch11*) 遺伝子を標的とし、二次構造アルゴリズム (Raccès; Kiryu et al. 2011) を用いてアクセシビリティの高い領域を標的領域とした結果、発芽個体を完全に白化させることに成功し (図3)、ノックダウン効率を大きく向上させることに成功した。

(2) 雄花形成関連遺伝子の単離と組換え ALSV の接種

スギ雄花の各発達ステージにおけるマイクロアレイ解析 (Tsubomura et al. 2016) および雌花の各発達ステージにおける RNA-seq 解析 (科研費 JP25292093) から、雄花で特異的に発現すると推定される遺伝子 17 種を選抜し、定量 RT-PCR による発現解析を行った。その結果、これらは主に雄花の発達ステージ 3 (花粉母細胞期) からステージ 7 (タペート層崩壊期) において発現し、栄養器官では発現しないことが明らかとなった (図4)。そこで、これらの遺伝子を標的とする組換え ALSV を作製し、スギ不定胚へ接種した。接種後 6 ヶ月においてウイルスの存在を RT-PCR により検出した結果、ほぼ全ての個体に ALSV が検出され、組換え ALSV の効率的な接種に成功した。

(3) 表現型の解析

培養ビン内で育成したスギの無菌個体について、ジベレリン溶液への浸漬処理を行い、人工気象器を用いて次の条件下で培養した。すなわち、長日条件として明期 25°C16 時間・暗期 25°C8 時間での培養を 6 ヶ月、次に短日条件として明期 20°C10 時間・暗期 10°C14 時間での培養を 2 ヶ月、明期 15°C10 時間・暗期 10°C14 時間での培養を 4 ヶ月行なった。その結果、人工気象器内で成熟した花粉を含む雄花の育成に成功し (図5)、季節によらず稔性調査可能な培養系を確立した。そこで、本培養系を利用し、前項の花粉形成関連遺伝子のノックダウンを目的とした組換え ALSV ベクターの感染スギについて花粉稔性を調査した。*Cj#9-Cj#17* の標的遺伝子については現在雄花の発達段階であり調査中であるが、*Cj#1-Cj#8* の標的遺伝子のうち *Cj#1* と *Cj#8* において正常な花粉粒が観察されず、異形な細胞が蓄積する傾向が確認された (図6)。しかしながら、着花の培養条件においては多くの系統で育成中にウイルスが脱落し、花粉形成までにノックダウンを維持させることが困難であった。今後はスギにおける ALSV ベクターの安定性を考慮した培養条件を検討する必要がある。

本研究により ALSV ベクターを用いた効率的な遺伝子ノックダウン法の確立に成功し、また、雄花形成関連遺伝子の単離と ALSV ベクターを用いたノックダウンによる花粉形成の阻害に成功した。現在、本知見で得られた花粉形成関連遺伝子についてゲノム編集技術を用いた遺伝子破壊による無花粉ス

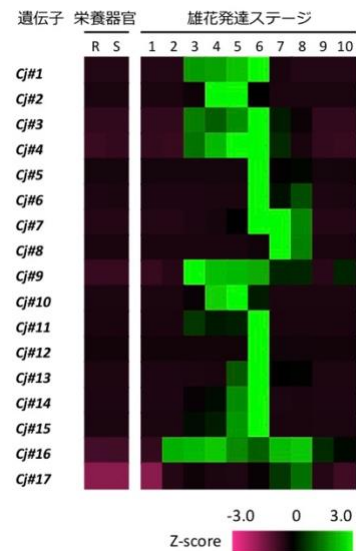


図4. 定量 RT-PCR による標的遺伝子の雄花における発現プロファイル. 各発達ステージ (Tsubomura et al., 2016) について 3 反復の平均値を Z スコアによりヒートマップ化した. R: 根, S: シュート.



図5. ジベレリンにより着花誘導した ALSV 感染スギの無菌培養.

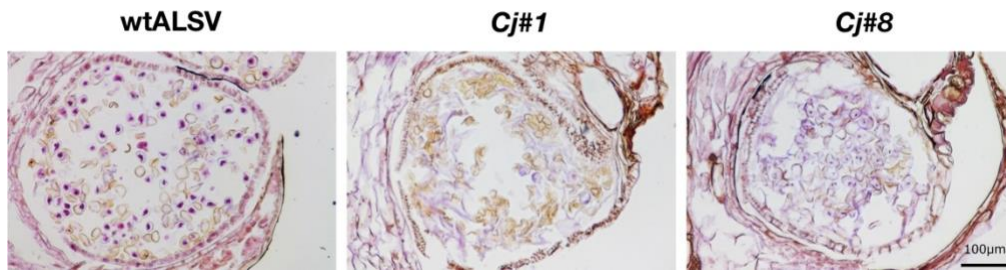


図6. 組換え ALSV 感染スギの雄花切片の顕微鏡像。
対照としての空ベクター (wtALSV) は花粉嚢内に成熟した花粉粒が観察されるが、*Cj#1* および *Cj#8* 遺伝子を標的とした場合は異形な細胞の蓄積が観察された。

ギの開発を進めており、育種素材作出に向けた応用が期待される。

<引用文献>

- ① Yamagishi and Yoshikawa (2013) Virus-Induced Gene Silencing, pp.167-181
- ② Kiryu et al. (2011) Bioinformatics 27:1788-1797
- ③ Tsubomura et al. (2016) Tree Physiol 36:653-666

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計3件)

- ① 小長谷賢一、遺伝子組換えスギの隔離ほ場栽培試験の成果、林木育種情報、査読無、28、2018
- ② 小長谷賢一、林木育種の新技術、林業いばらき、査読無、729、2018
- ③ 小長谷賢一、ウイルスを利用した林木育種研究の試み、林木育種情報、査読無、23、2017

[学会発表] (計4件)

- ① 小長谷賢一他、遺伝子組換え雄性不稔スギの隔離ほ場栽培における不稔性と成長評価、第36回日本植物細胞分子生物学会(金沢)大会、2018
- ② 小長谷賢一他、遺伝子組換え雄性不稔スギの隔離ほ場栽培における特性評価、森林遺伝育種学会大会、2017
- ③ 小長谷賢一他、スギ雌性配偶体からの半数体カルスの作出、第35回日本植物細胞分子生物学会(さいたま)大会、2017
- ④ 小長谷賢一他、RNA-seqによるスギ雌性生殖器官の遺伝子発現プロファイリング、第34回日本植物細胞分子生物学会(上田)大会、2016

[図書] (計1件)

- ① Ken-ichi Konagaya, Toru Taniguchi, Springer, Somatic Embryogenesis and Genetic Transformation in Cupressaceae Trees (In Somatic Embryogenesis in Ornamentals and Its Applications)、2016、203-216

[その他]

- ① 小長谷賢一、遺伝子組換え技術によるスギの効率的な形質改変、森林産業実用化カタログ、2019、www.ffpri.affrc.go.jp/sangakukan/catalog/index.html

6. 研究組織

(1)研究分担者

研究分担者氏名：谷口 亨

ローマ字氏名：(TANIGUCHI, toru)

所属研究機関名：国立研究開発法人森林研究・整備機構

部局名：森林総合研究所 林木育種センター

職名：主任研究員 等

研究者番号 (8桁)：00360470