

令和元年5月30日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K18651

研究課題名(和文) ウイルスベクターを用いたサクラ属果樹の遺伝子機能評価系の開発およびその園芸的利用

研究課題名(英文) Development of a gene evaluation system using virus vectors in Prunus and its potential application to Prunus breeding

研究代表者

河井 崇 (KAWAI, Takashi)

岡山大学・環境生命科学研究所・助教

研究者番号：90721134

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、実用性の高い花成関連遺伝子に着目し、様々なサクラ属果樹を対象にリンゴ小球形潜性ウイルス(ALSV)ベクターを用いた遺伝子機能評価および早期開花誘導の有効性を調査した。花成との関連が示唆されるFT遺伝子の全長配列あるいはTFL1遺伝子の部分配列を組み込んだALSVベクターを遺伝子銃で接種したところ、アンズ、カンカオウトウ、アーモンドの数品種において感染が確認された。しかしながら、早期開花などの形質変化は観察されず、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するためには、接種手順や生育条件のさらなる検討が必要であると考えられた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

主要果樹種を多く含むサクラ属果樹では、早くから重要な園芸形質に関する遺伝子研究が進められてきたが、有効な遺伝子機能評価の手法が確立されていないため、得られた成果を果樹栽培・育種に十分に活用できていないのが現状である。本研究では、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法を確立するとともに、開発された系を応用して、育種の効率化につながる早期開花誘導技術の開発に取り組んだ。早期開花誘導には至らなかったものの、本研究で検討した効率的なウイルス接種法や、種・品種ごとの感染性に関する情報は、今後、基礎・応用の両面においてウイルスベクターを有効活用する際の重要な知見となり得る。

研究成果の概要(英文)：In this study, we attempted to use Apple latent spherical virus (ALSV) vectors for functional analysis of genes associated with floral induction and thus to induce precocious flowering in Prunus fruit tree species. ALSV vectors carrying the full-length sequence of FT gene or a partial sequence of TFL1 gene could be successfully inoculated into several cultivars of apricot, sweet cherry, and almond by particle bombardment, although early floral induction could not be observed in infected plants. 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 開花促進

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

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、ゲノムサイズが小さく、幼若期間も比較的短いことから、木本性果樹のモデルとして早くから遺伝子研究が進められてきた。近年、モモにおいて全ゲノム配列が解読されたことにより、有用形質との関連が示唆される候補遺伝子の単離・評価がよりいっそう加速化している。一方で、蓄積されたゲノム関連情報の果樹栽培・育種への利用は必ずしも成功していない。その理由の一つとして、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、ゲノム関連情報を園芸利用する上で必要不可欠な「遺伝子機能の実証」が困難であることが挙げられる。これまでシロイヌナズナやポプラを用いた代替的な形質転換実験により機能評価が行われてきたものの、果樹特有の形質を異種モデル植物で正確に評価するのは限界があるため、該当する果樹種自身に適用可能な遺伝子機能評価系の開発が強く求められている。

ウイルスベクターは、目的遺伝子を導入した組み換えウイルスを直接植物体に感染させることで「内生遺伝子の発現抑制 (virus-induced gene silencing ; VIGS)」および「外来遺伝子の過剰発現」の両方向の発現制御を可能とする技術である。ウイルスベクター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ことから、形質転換が困難な果樹類における有効な遺伝子機能評価法として近年利用が増加している。中でも、リンゴから単離された潜在ウイルス (ALSV) はリンゴやナシを含む幅広い植物種の遺伝子機能評価に安定的に利用できることが報告されている。また、花成関連遺伝子の発現制御による早期開花誘導、DNA のメチル化による花色改変、病害ウイルスに対するウイルスワクチンの開発など、基礎的な遺伝子機能評価にとどまらないユニークな応用研究も報告されており、宿主のゲノム配列を改変することなく形質改変が可能な新しい育種技術として国内外で注目されている。

このような背景から、これまで申請者は ALSV ベクターを用いたサクラ属果樹の遺伝子機能評価系の開発に取り組み、サクラ属果樹ではじめて ALSV の接種および内生遺伝子の VIGS に成功している。また、サクラ属の中でも種や品種によって感染効率、病徴の有無、VIGS の持続性が異なることも明らかにした。一方、これらの先行研究は葉色に関するマーカー遺伝子 *PDS* を対象としたもので、実用的遺伝子の機能評価およびその園芸の利用についてはまだ検討が進んでいない。

2. 研究の目的

本研究は、ウイルスベクターを用いた遺伝子機能評価をサクラ属果樹で汎用化し、基礎・応用の両側面から蓄積されたゲノム関連情報を果樹栽培・育種に有効活用することを目的とする。本研究では特に花成関連遺伝子に着目し、「遺伝子機能評価系の基礎開発」および「実用的遺伝子を用いた系の園芸的利用」の2つの観点からサクラ属果樹におけるウイルスベクターの汎用化に取り組む。

まず、「遺伝子機能評価系の基礎開発」に取り組み、サクラ属果樹で VIGS の実績がある ALSV ベクターを用いて花成関連遺伝子の機能評価を行う。先行研究で ALSV の接種に成功しているサクラ属果樹種を対象に、花成関連遺伝子のサイレンシングまたは発現誘導を行う。幼若期間における形質変化 (早期開花) の有無、ALSV の感染効率、持続性、花成関連遺伝子の発現変化を調査することで、遺伝子機能評価系の有効性を評価する。その成果に基づいて「サクラ属果樹における早期開花誘導および世代促進技術の開発」に取り組み、実用的遺伝子を用いた系の園芸的利用について検討する。早期開花が観察された個体において花粉採取および人工授粉を行い、後代獲得を試みる。同時に、花粉稔性、受粉効率、種子稔性、ウイルス伝播の有無を調査する。さらに「対象遺伝子・果樹種の拡大による系の汎用化」において、複数遺伝子の発現抑制・発現誘導が同時に可能なベクターを構築し、より効果的に早期開花を誘導できる遺伝子の組み合わせを検討する。また、対象とするサクラ属の種や品種を拡大し、汎用性の高い世代促進技術を確立する。

上記により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制御メカニズムに関する基礎研究を進展させるだけでなく、それら形質の人為的な制御法や、有用形質との関連が逆遺伝学的に証明された精密な DNA マーカーの開発に繋がると期待される。また、花成関連遺伝子の発現制御による早期開花誘導が実用化されれば、通常長い年月が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。特に、ウイルスベクターは宿主のゲノム配列を改変しないため、遺伝子組み換えを用いない新たな育種技術として実用的な利用が期待される。以上のように、本研究の実施により、基礎・応用の両側面から果樹園芸学全般の進展に貢献できると期待される。また、本研究により得られる成果は今後対象遺伝子・果樹種を拡大する際のモデルケースにもなり得るため、国内外で蓄積された膨大なゲノム関連情報の有効活用に繋がる可能性がある。

3. 研究の方法

(1) ALSV ベクターを用いた遺伝子機能評価系の有効性調査

本研究では、宿主範囲が広くサクラ果樹で VIGS の実績がある ALSV ベクターを用いた。果実生産・育種において実用性の高い花成関連遺伝子を対象に、本研究を遂行する上で基礎となる遺伝子機能評価系の開発に取り組んだ。シロイヌナズナおよびウメ *FT* の全長配列 (*AtFT*、*PmFT*; 発現誘導) あるいはアンズおよびウメ *TFL1* の部分配列 (*ParTFL1*、*PmTFL1*; VIGS

による発現抑制)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。ベンサミアー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、先行研究で ALSV の感染および内生 *PDS* の VIGS に成功しているアンズ、カンカオウトウ、アーモンド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、形質変化を観察するとともに、各器官における内生の花成関連遺伝子 (*API*、*FT*、*SOC1*、*LFY*、*TFL1*) の発現量を調査した。

(2) 新規ベクターの開発および接種源の調整法の検討

安定したウイルスベクターの接種ならびに早期開花誘導を実現するため、新規ベクターの開発および接種源の調整法を検討した。*AtFT*、*PmFT* の全長配列あるいは *ParTFL1*、*PmTFL1* の部分配列を単独で有する ALSV ベクターに加えて、pBICAL1 にクローニングサイトを新規に設計し、複数遺伝子の発現を同時に制御することが可能なベクターを開発した。これらのベクターをベンサミアーナタバコおよびキヌアに接種し、ベントナイトと PEG を用いてウイルス RNA を精製・濃縮した。リアルタイム RT-PCR により ALSV RNA1 の絶対定量を行い、ウイルス RNA の濃縮の成否を確認した。濃縮した接種源を用いて、アンズ、カンカオウトウ、アーモンドの発根種子へ遺伝子銃で接種した。

(3) in vitro 転写を用いた ALSV 接種法の検討

ベンサミアーナタバコやキヌアでの ALSV 増幅を介した方法とは別の接種源の調整法として、in vitro 転写により人工的に合成した ALSV RNA を接種源として用いることを検討した。pBICAL1 および pBICAL2-NbPDS (ベンサミアーナタバコ *PDS* の部分配列を含む) から in vitro 転写により ALSV RNA を合成し、cap 構造および poly A を付加した。RT-PCR により ALSV RNA の合成の成否を確認した後、ALSV RNA1 および RNA2 を等量混合し、遺伝子銃でベンサミアーナタバコの葉に接種した。RT-PCR および葉の白化を指標として接種系の有効性を確認した。

(4) モモにおける ALSV の感染性の品種間差

PDS を VIGS の標的遺伝子とした先行研究により、モモは高い ALSV 感染率を示すものの、激しい病徴が出て形質変化が見られないことが明らかになっている。*AtFT* の全長配列、*PmTFL1* の部分配列、アンズ *PDS* (*ParPDS*) の部分配列を有する ALSV ベクターを (1) と同様の手順でモモ '川中島白桃'、'おかやま夢白桃'、'白皇'、'桃水' の発根種子に接種し、モモにおける ALSV 感染率、病徴の有無、形質変化の有無の品種間差を確認した。

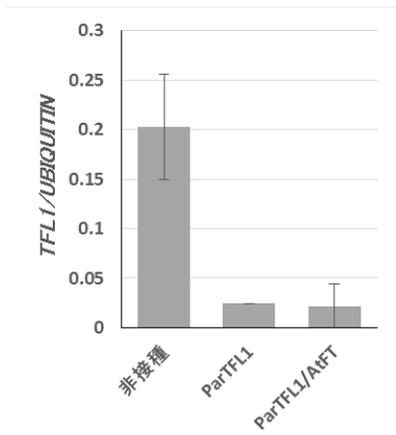
4. 研究成果

(1) ALSV ベクターを用いた遺伝子機能評価系の有効性調査

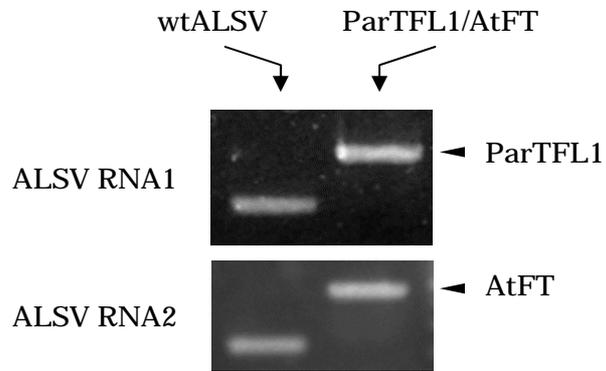
ALSV ベクターを用いて外来 *FT* の発現誘導および内生 *TFL1* のサイレンシングを行い、通常花芽が形成されない幼若段階での早期開花誘導を試みた。RT-PCR により組換え ALSV の感染を確認したところ、数個体の茎頂、葉、茎、根において感染が確認された。しかしながら、いずれの ALSV ベクター感染個体においても花芽形成などの形態的变化は確認されなかった。各器官における内生の花成関連遺伝子 (*API*、*FT*、*SOC1*、*LFY*) の発現量を調査したが、コントロールと差がみられるものはなかった。一方、*ParTFL1*-ALSV あるいは *PmTFL1*-ALSV 感染個体では、茎頂および根における内生 *TFL1* の発現量が減少する傾向がみられた(第1図)。これらの結果から、ALSV RNA2 単独での外来 *FT* の発現誘導あるいは内生 *TFL1* の発現抑制だけでは、花成誘導に不十分である可能性が考えられた。また、全体的に感染率が低く、正確な評価ができていない可能性もあるため、早期開花誘導・感染率改善の両観点から接種源の調整法を見直す必要があると考えられた。

(2) 新規ベクターの開発および接種源の調整法の検討

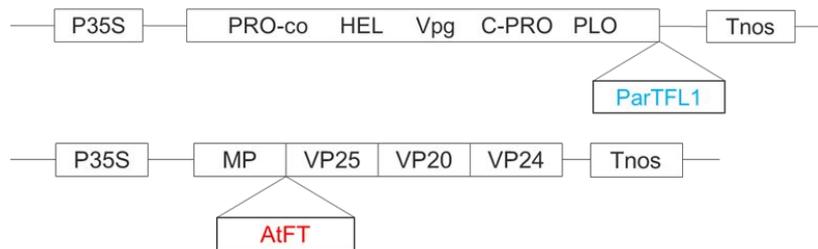
pBICAL1 にクローニングサイトを新規に設計し、外来 *FT* の発現誘導および内生 *TFL1* のサイレンシングを同時に行うことが可能なベクターを開発した(第1図、第2図)。ベンサミアーナタバコおよびキヌアで組換え ALSV を増幅し、ベントナイトと PEG を用いてウイルス RNA を精製・濃縮したところ、従前の方法と比較して 7.5~40 倍にウイルス RNA を濃縮することに成功した。濃縮 RNA をアーモンド、カンカオウトウ、アンズに接種したところ、数個体で感染が確認されたものの(第3図)、明確な感染率の改善は確認できなかった。また、感染個体における早期開花誘導もみられなかった。これらの結果から、ウイルス RNA の濃縮が不十分か、濃縮 RNA を用いてもサクラ属果樹における感染率の改善が困難であることが示唆され、異なる接種法の開発が必要であると考えられた。



第 1 図 ALSV 感染カンカオウトウの根における内生 *TFL1* の発現量の低下



第 3 図 カンカオウトウにおける ParTFL1/AtFT-ALSV の感染



第 2 図 外来 *FT* の発現誘導および内生 *TFL1* のサイレンシングを同時に行うことが可能なベクター（上：pBICAL1、下：pBICAL2）

(3) *in vitro* 転写を用いた ALSV 接種法の検討

pBICAL1 および pBICAL2-NbPDS から *in vitro* 転写により ALSV RNA を合成し、cap 構造および poly A を付加した後、RT-PCR により ALSV RNA の合成を確認した。遺伝子銃で ALSV RNA1 および RNA2 をベンサミアーナタバコの葉に接種し、RT-PCR および葉の白化を指標として接種系の有効性を確認したが、cap 構造や poly A の有無によらず、ALSV の感染は確認されなかった。この結果から、*in vitro* 転写を用いた ALSV の接種は困難であると考えられた。

(4) モモにおける ALSV の感染性の品種間差

組換え ALSV ベクターをモモ‘川中島白桃’、‘おかやま夢白桃’、‘白皇’、‘桃水’の4品種の発根種子に接種したところ、いずれも高い感染率を示した。しかしながら、上位葉で激しい病徴が発生し、形質変化は観察されなかった。この結果および先行研究の結果から、品種によらず、モモにおいては ALSV ベクターの利用が困難であると考えられた。現在、モモにおけるウイルスベクターの利用に向けて、TRV ベクターなど別のウイルスベクターの構築・接種を進めている。

以上より、早期開花誘導には至らなかったものの、本研究で検討した効率的なウイルス接種法や、種・品種ごとの感染性に関する情報は、今後、基礎・応用の両面においてウイルスベクターをサクラ属果樹で有効活用する際の重要な知見となり得る。今後は引き続き、安定したウイルスベクターの接種法を検討するとともに、他のウイルスベクターの有効性を調査することで、サクラ属果樹における早期開花誘導の実現を目指す。

5. 主な発表論文等
なし

6. 研究組織

(1) 研究分担者

なし

(2)研究協力者

なし

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。