

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 5 日現在

機関番号：11101

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2010～2013

課題番号：22380003

研究課題名(和文) エピジェネティック変異発動システムによるリンゴ枝変わり品種の作出

研究課題名(英文) Production of apple sport by epigenetic variation system

研究代表者

原田 竹雄 (Harada, Takeo)

弘前大学・農学生命科学部・教授

研究者番号：10228645

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,000,000円、(間接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：特定のsiRNAを産生するコンストラクトを導入した個体を穂木とし、これに接ぎ木した台木へ篩管輸送によりsiRNAを供与して、台木の篩管周辺組織に特定遺伝子の転写型遺伝子サイレンシングを発動させることができる。このサイレンシングはDNA複製を通して維持されることから、サイレンシング発動組織より再分化体を獲得すれば、サイレンシング個体を作成することができる。本研究はこの系を栄養繁殖性果樹であるリンゴ樹に適用すべく各工程に関する実験を行い、その成果を得たものである。

研究成果の概要(英文)：Using the scion in which the construct producing an artificial siRNA sequence was integrated, its siRNA molecule transported through phloem functions to induce the silencing (TGS: transcriptional gene silencing) of the gene possessing complementary sequence with the siRNA. In case of TGS, as the invoked silencing maintains through DNA replication, the TGS plant can be obtained by the regeneration from the TGS tissue. This study was carried out the each step experiment in order to apply the above system to a vegetative crop, apple (*Malus domestica*).

研究分野：農学

科研費の分科・細目：育種学

キーワード：ジーンサイレンシング siRNA リンゴ 日持ち性

1. 研究開始当初の背景

(1) リンゴ (*Malus × domestica*) は永年生の栄養繁殖性作物であり、その長い成長期間においては突然変異(枝変わり:芽条変異体)が起こる場合がある。この突然変異は内在性トランスポゾン転移が主な原因であると考えられてきたが、近年エピジェネティックな変化が関与している可能性も指摘されてきた。これまでの研究から、特定 DNA 領域のメチル化から始まる一連の反応を経てエピジェネティックの変化が誘導されること、その領域を決定するのは 24 塩基の small RNA であることが判っている。そこで、特定の遺伝子プロモーター領域に相同な siRNA を人為的に産生することで、そのターゲット遺伝子をサイレンシングさせることが可能である。事実、この機構を導入した遺伝子サイレンシング (TGS: Transcriptional Gene Silencing) を発動させたジャガイモが作出されている。

(2) 接ぎ木は紀元前から中国のカンキツ栽培で行われていたとの記録があるほど古くからの栽培技術であり、現在では多くの果樹・花木、キュウリやトマトなどの野菜においても用いられる園芸作物特有の栽培法となっている。また、花成ホルモン(フロリゲン)や RNA サイレンシングの全身伝搬性などの篩管長距離輸送性を検証するための実験技法としても用いられている。そこで、任意の RNA をよりの確に輸送できるシステムを構築した個体を作成して、その個体の接ぎ木相手にある目的の siRNA を輸送させることで、RNA サイレンシングを通して形質を改変する新規な品種改良技術を創出できる可能性がある。

2. 研究の目的

(1) 著者らは siRNA の篩管を介した長距離輸送性を利用し、siRNA を産生する形質転換体を siRNA ドナー、栽培品種などを siRNA レシピエントとして接ぎ木することによりレシピエントのターゲット遺伝子にジーンサイレンシングを誘導し、そのサイレンシング発動組織から再分化個体を得ることでエピゲノム編集された個体を獲得する GrIGS (Graft-induced Gene Silencing) システムを開発した。この場合には、接ぎ木相手には siRNA のみが運ばれて、DNA が接ぎ木相手に転移することはないことから、エピジェネティック変異体は従来の組換え体には相当しないことになる。さらに、エピジェネティックな変

化は安定して娘細胞に遺伝することが判明している。

(2) そこで、リンゴ樹でこのシステムを活用すれば、枝変わりを作出できることになる。本研究は以上の観点から「エピジェネティック変異発動システムによるリンゴ枝変わり品種の作出」に挑戦した。リンゴにおけるジーンサイレンシングのターゲット遺伝子としてポリガルクツロナーゼ (*MdPG1*) を選んだ。この遺伝子産物は果実の後熟過程で特異的に発現し細胞壁分解に関わり、結果的に果肉を軟化させる酵素である。この *MdPG1* をサイレンシングさせることにより、日持ち性を高めた「王林」を作出することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) スターターコンストラクトの作製

リンゴ品種「王林」の種子親である「ゴールドデンドリシャス」の *MdPG1* のプロモーター配列 (-634~-1) を逆位反復配列とし、これを CaMV35S プロモーター下でドライブするコンストラクトを作製した。また、この逆位反復配列を RNA 篩管輸送ターミナルである伴細胞で発現させるべく、伴細胞特異的 Cammelina Yellow Mottole Virus のプロモーター (CoYMV) を使用し、CoYMV:*MdPG1*proIR を作製した (図1)。

(2) 形質転換体の作出

作製コンストラクトをアグロバクテリウム法により *Malus* 属野生種の *M. sieversii*, *M. floribunda*, *M. sargentii*, *M. hupehensis*, クラブアップルの David crab の種子から摘出した子葉の培養組織へ導入し、形質転換体の作出を試みた。

(3) *M. sieversii* と「王林」の接ぎ木

M. sieversii を穂木、「王林」を台木としてそれらの培養シュート間で割り接ぎをした。接ぎ木点はシリコンチューブ(直径 2.0 mm×内径 1.5 mm) で支持した。

(4) 「王林」培養シュートからの発根

フェノール化合物 Phloroglucinol 126 mg/l、IBA 0.3 mg/l、GA₃ 0.45 mg/l を含む MS 基本培地で「王林」培養シュート基部からの発根実験を行った。

(5) 側根からの再分化体獲得

TDZ 3.29 mg/l、 IBA 0.1 mg/l、 GA₃ 0.1 mg/l を加えた MS 基本培地で根からの再分化体 (根生不定芽) 獲得試験を行った。

4. 研究成果

(1) 作製したコンストラクト (図 1) をタバコ (*Nicotiana benthamiana*) 葉にアグロインフイルトレーションする一過的発現系により siRNA 産生 (21~24 塩基) が確認された (図 2)。また、CoYMV:GUS の伴細胞での発現特異性は導入マルバカイドウを作出したところ、葉、茎、根のすべてにおいて篩管のみに強い発現が観察された。

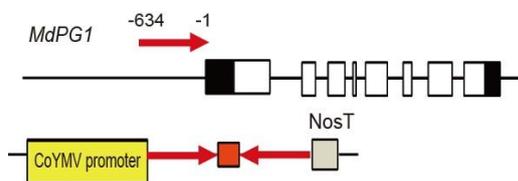


図 1 MdPG1 遺伝子とそのプロモーター領域の siRNA 産生コンストラクト

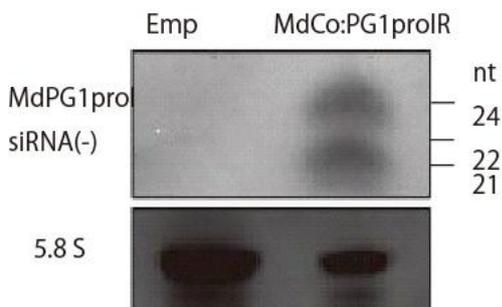


図 2 作製コンストラクトからの siRNA 検出

(2) 上記コンストラクトをアグロバクテリウム法によりリンゴに導入することを試みた。栽培リンゴの形質転換効率はかなり低いことが知られている。GrIGS における siRNA 産生体は接ぎ木する栽培品種へ siRNA を篩管輸送により供与することであるため、栽培品種と接ぎ木が成立できれば条件を満たすことになる。そこで *Malus* 属野生種の子葉を材料とした。その結果、*M. sieversii* と David crab から多数の再分化シュートが獲得できた。一方、他の 3 種の野生種からは再分化シュートが獲得できなかった。*M. sieversii* では GUS 一過的発現能についても良好な結果が得られたことから、この野生種が実験材料に最適と考察された。

(3) Co:MdPG1proIR コンストラクトを *M. sieversii* へ導入した。2 回の導入実験から 10 個体ほどのカナマイシン選抜 (50 µg/l) においても緑色で成長を示す個体が獲得された。現在、それらの系統を増殖中である。今後、導入遺伝子を PCR やサザンブロット実験で確認したうえで、それらの個体における siRNA 産生能を調査する。

(4) 植物における siRNA 篩管輸送は基本的にシンクからソースへ輸送されることが知られており、根はシンク力が強いため siRNA は茎葉から根部に輸送される量が多い。そこで、本研究では siRNA ドナーとなる *M. sieversii* を穂木として、siRNA レシピエントを栽培品種「王林」とすることより、これらの培養シュート間での接ぎ木実験を試みた。2.5~3.0 cm の培養シュート間で割り接ぎを行い、接ぎ木の成立を 1 週間後に確認したところ、接ぎ木点の完全癒合が認められた。また、これらの接ぎ木体はその後の成長においてはコントロールと大差はなかった。

(5) 「王林」培養シュートにおける発根を試みたところ、培養開始の約 10 日後より基部に褐色の膨潤がみられ、その部位より根が出現した。その根は比較的太くマルバ



カイドウなどの野生種において形成される、成長が速く細い根ではなかった。しかし、発根率は少なくとも 50% を示したことから、本研究目的には十分な発根結果が得られた。また、図 3 に示すように主根から出現する側根の形成も観察された。

(5) 側根は主根の根鞘細胞の 2 細胞を起源とするとされている。また、根鞘細胞は篩部に隣接する一層の細胞からなる。これまでの著者らの研究から篩管輸送された siRNA によるジーンサイレンシングは篩部周辺部で強く発動することが判明している。そこで、ジーンサイレンシングを受けた根鞘細胞から

形成される側根の全領域がジーンサイレンシング細胞となることから、培養により側根からの再分化体を獲得する手法を試みた。その結果、根生不定芽形成専用の培地上に「王林」の根を置床したところ3週間で根全域において緑色の粉状化が起り、その後、多数の根生不定芽が出現した(図4)。得られた根生不定芽は継代培地に置床することで、正常な成長を示した。

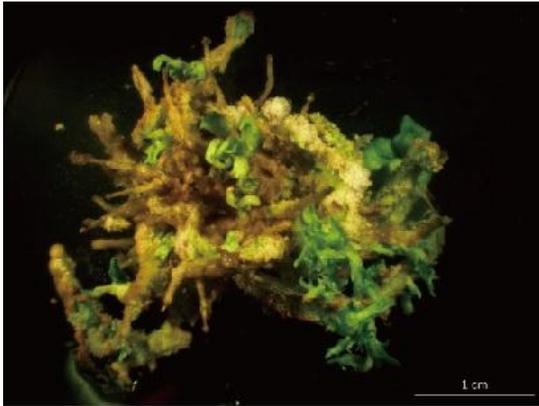


図4 「王林」培養体側根からの再分化体

5. 考察

リンゴは接ぎ木で増殖することから種子を経ない。エピジェネティックの変化は減数分裂時に初期化が起るとする報告もあるが、生殖細胞を経ない増殖法のリンゴではエピジェネティックの変化が安定に維持されることが期待される。同じ栄養繁殖性作物であるジャガイモでのエピ変異の安定維持を調査しているが、これまで少なくとも外生遺伝子のエピ変異は安定して次代に伝わることを観察している。しかしながら、エピ変異の安定維持は作物種に違いがある可能性があることから、慎重な検証実験を進める必要がある。

本システムでは siRNA 長距離輸送のターミナル部位である伴細胞で強力に機能する特異的プロモーターを使用している。このことにより効率的な siRNA の篩管輸送が実現し、TGS 発動を高めることができる。また、側根形成は篩部に隣接する内鞘細胞(根の幹細胞)の分裂によることから、根端分裂組織を含め側根の全細胞はエピゲノム編集される。そこで TGS 化された側根より再分化体を獲得すれば、それらは TGS 個体となることがタ

バコを用いたモデル実験で確認された。

本研究を通して栽培リンゴの培養シュートでの接ぎ木、発根、側根形成、そして、根生不定芽形成技術を確認した。このことからリンゴのエピ変異体作出のプロセスに目途が立った。今後は目的の siRNA 産生穂木を獲得して、接ぎ木を介して栽培リンゴ「王林」の *MdPG1* エピ変異体作出を進めたい。また、穂木となる siRNA ドナーは「王林」のみでなく他の栽培リンゴにもエピ変異を発動できると予想されることから、他の主要品種である栽培品種「つがる」などの品種改良に使用できる可能性がある。さらに、高品質化につながる遺伝子は他にも多く存在することから、それらのサイレンシング誘導にも、本技法が活用できると考えられる。本研究技法によるエピ変異体がこれまでの遺伝子組換え体とは全く異なることから、新しい植物育種技法として全世界で展開し、本邦においても GMO (組換え体) 扱いとはならず、広く普及することを期待する。

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計9件)

- ① Xu H, Iwashiro R, Li T, Harada T. GIBBERELLIC ACID INSENSITIVE transcript transported from stock is translated and attenuates GA response in the scion. *BMC Plant Biology*. 2013, 査読有 13: 165. (2013) DOI:10.1186/10.1186/1471-2229-13-165
- ② Kasai A, Sano T, Harada T. Scion on a stock producing siRNAs of potato spindle tuber viroid (PSTVd) attenuates accumulation of the viroid. *PLOS ONE*, 査読有 8(2): e57736. DOI:10.1371/journal.pone.0057736 (2013)
- ③ Zhang WN, Duan XW, Ma C, Harada T, Li TZ. Transport of mRNA molecules coding NAC domain protein in grafted pear and transgenic tobacco. *Biologia Plantarum* 査読有 57; 224-230 (2012) DOI:10.1007/s11105-011-7
- ④ Bai S, Wang A, Igarashi M, Kon T, Fukasawa-Akada T, Li T, Harada T, Hatsuyama Y. Distribution of *MdACS3* null alleles in apple (*Malus domestica* Borkh.) and its relevance to the fruit ripening characters. *Breeding Science* 査読有 62:46-52(2012) DOI: 10.1270/jsbbs.62.46
- ⑤ Zhang WN, Gong L, Ma C, Xu HY, Hu JF, Harada T, Li TZ. Gibberellic acid-insensitive

- mRNA transport in *Pyrus*. *Plant Molecular Biology Reporter* 査読有 doi:10.1007/s11105-011-7 (2011)
- ⑥ Wang A, Li T, Harada T. The regulatory role of 1-aminocyclopropan-1-carboxylate synthase genes in apple fruit shelf life. *Europ. J. Horticult. Sci.* 査読有 76; S.77-83, ISSN 1611-4426 (2011)
- ⑦ Bai S, Kasai A, Yamada K, Li T, Harada T. Mobile signal transported over a long distance induces systemic transcriptional gene silencing in a grafted partner. *J. Exp. Bot.* 査読有 62; 4561-4570 (2011) doi: 10.1093/jxb/err163
- ⑧ Tsuwamoto R, Harada T. The Arabidopsis COR13 promoter contains two cis-acting regulatory regions required for transcriptional activity in companion cells. *Plant Cell Reports* 査読有 30: 1723-1733 (2011) doi: 10.1007/s00299-011-1080-4.
- ⑨ Kasai A, Bai S, Li T, Harada T. Graft-transmitted siRNA signal from root induces visual manifestation of endogenous post transcriptional gene silencing in the scion *PLoS ONE* 査読有 6 ;e16895 (2011) DOI: 10.1371/journal.pone.0016895

[学会発表] (計 12 件)

- ① 原田 竹雄・北條 初音・葛西 厚史: 接ぎ木と siRNA 篩管輸送による品種改良。日本農芸化学会シンポジウム アプライド RNA サイエンスー産業利用を目指した微生物・植物・動物の RNA 研究 — (明治大学) 平成 26 年 3 月 30 日
- ② 葛西 厚史・北條 初音・原田 竹雄: ジャガイモの新奇エピゲノム編集法。日本育種学会 (東北大学) 平成 26 年 3 月 22 日
- ③ Kasai A, Hojo H, Harada T. Epimutant induction by long- distance transport siRNA. 8th Joint Korea-Japan Plant Biotech Workshop -New Biotechnology-based Plant Breeding Techniques-Hokkaido University 2013.Sep.9th
- ④ Hojo H, Kasai A, Harada T. Transcriptional gene silencing of endogenous gene *Virp1* in tomato. *Plant Biology* 2013. USA (Boston) 2013 July 23th
- ⑤ Kasai A, Iwashiro R, Harada T. An effective TGS induction in grafting partner by phloem transport of siRNA and mRNA. *Plant Biology* 2013. USA (Boston) 2013 July 23th
- ⑥ 葛西 厚史・北條 初音・佐野 輝男・原田 竹雄 トマト *SIVirp1* エピ変異体の獲得とその特性法 日本育種学会 (東京農業大学) 平成 25 年 3 月 24 日
- ⑦ Harada T. Epimutant induction of endogenous gene by grafting. 29th IPSR International Symposium and Symposium on Plant Stress Sciences. (岡山大学資源植物
- 科学研究所) 平成 25 年 3 月 7 日、8 日)
- ⑧ Kasai A, Hojo H, Kawamata T, Harada T.: Generation of Epimutants by Grafting. 第 35 回日本分子生物学会 (福岡国際会議場) 12 月 11 日—14 日
- ⑨ 原田 竹雄 篩管輸送 RNA と根系機能活用による新規形質転換体作出法 園芸学会平成 24 年度秋季大会シンポジウム 2012 年 9 月 22 日 (福井県立大学)
- ⑩ 原田 竹雄・岩城麗香・岩本啓志・葛西厚史 エピ変異体獲得における RNA 篩管輸送モチーフの活用 日本育種学会 (京都産業大学) 平成 24 年 9 月 15 日
- ⑪ 北條 初音・葛西 厚史・原田 竹雄 接ぎ木を利用した内生遺伝子のエピ変異体獲得について 日本育種学会 (京都産業大学) 平成 24 年 9 月 15 日
- ⑫ 原田 竹雄 植物の接ぎ木を利用した接ぎ木相手の形質転換 日本学術会議公開シンポジウム「新しい遺伝子組換え技術の開発と植物研究・植物育種への利用」5 月 14 日 (2012)

[図書] (計 5 件)

- ① 葛西 厚史・原田 竹雄 接ぎ木によって接ぎ木相手を改良する B&I バイオサイエンスとインダストリー 72; 237-239 (2014)
- ② 葛西 厚史・原田 竹雄 植物におけるエピゲノム編集: その原理と接ぎ木による誘導 生物の科学 遺伝 3; 140-144 (2014)
- ③ 原田 竹雄・葛西 厚史 エピ変異誘導による品種改良; 遺伝子の環境記憶システムの活用。ゲノム手法・情報を利用した果樹研究の展開 No.9 果実日本 69: 2 (2014)
- ④ 葛西 厚史・原田 竹雄 植物の接ぎ木を利用した接ぎ木相手の形質転換: 植物の成長調節; *Regulation of Plant Growth & Development* 48; 126-134 (2013)
- ⑤ 葛西 厚史・原田 竹雄 植物育種技術としてのエピ変異体作出法; シリーズ: NBT⑤ バイオサイエンスとインダストリー 71: 462-465 (2013)

[産業財産権]

○出願状況 (計 2 件)

名称: 植物の篩管を通して遺伝子の転写物を輸送する方法

発明者: 原田 竹雄、工藤 久幸

権利者: 弘前大学

種類: ライフサイエンス

番号: 特許第 5360702 号

出願年月日: 平成 20 年 9 月 26 日

国内外の別: 国内および国外

名称: 台木と穂木の接ぎ木を介して植物の

形質転換を行う方法

発明者：原田 竹雄、葛西 厚史、白 松齡、
山田 かおり
権利者：弘前大学
種類：ライフサイエンス
番号：特開 2013-201911
出願年月日：平成 22 年 12 月 20 日
国内外の別：国内および国外

〔その他〕

ホームページ等

<http://nature.cc.hirosaki-u.ac.jp/lab/1/tharada/index.html>

6. 研究組織

(1)研究代表者

原田 竹雄 (HARADA, Takeo)

研究者番号：10228645

(2)研究分担者

千田 峰生 (SENDA, Mineo)

研究者番号：30261457