

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和元年6月6日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2018

課題番号：16K14848

研究課題名(和文) 遺伝子情報を利用した次世代有用園芸作物開発スキームの確立

研究課題名(英文) Establishment of a scheme to create next-generation beneficial horticultural crops using the genetic information

研究代表者

山次 康幸 (Yamaji, Yasuyuki)

東京大学・大学院農学生命科学研究科(農学部)・教授

研究者番号：40345187

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,800,000円

研究成果の概要(和文)：次世代育種技術を利用し、有用園芸作物を開発するためには、膨大な植物遺伝子機能情報をもとに、作物やその近縁種から有用遺伝子を同定する技術が求められるが、その効率的特定スキームは確立されていない。本研究ではモデル植物で得られた植物ウイルス抵抗性遺伝子の機能情報をもとに、作物種から植物ウイルスに対する抵抗性遺伝子を同定し、次世代育種技術を利用したウイルス抵抗性作物開発に向けた基盤知見を得た。この一連の研究を通じて、モデル植物における遺伝子機能情報から園芸作物種の有用遺伝子を特定するスキームを確立し、遺伝子組換え技術の産業利用に新たな道を拓いた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究ではモデル植物における研究で同定した抵抗性遺伝子情報を活かし、作物に応用するスキームを確立した。ゲノム編集技術を用いてウイルス抵抗性品種開発に大きく寄与する成果である。同様のアプローチで幅広い病原に対する作物の抵抗性品種作出が可能になると予想され、耐病性分子育種のモデルケースとなり得る。また、本研究で対象としたpepino mosaic virusはトマトに果実の奇形、葉のモザイクなどの病徴を引き起こし、世界中でトマト生産に甚大な被害を与えている。本ウイルスに対する抵抗性品種は皆無であることから、本研究の成果を利用した抵抗性品種開発とその普及が期待される。

研究成果の概要(英文)：To develop beneficial horticultural crops using new plant breeding techniques (NBT), it is important to identify beneficial genes from crops based on the enormous information of plant gene functions obtained in researches using model plants. However, it is not clear how to do it efficiently. In this study, we identified a novel plant virus resistance gene from a model plant *Arabidopsis thaliana* and, based on its genetic information, identified a resistance gene from a crop, contributing to future development of virus resistant crops via NBT-mediated molecular breeding. Through the sequence of these researches, we created a model scheme to identify beneficial genes from horticultural crops based on the genetic functional information in model plants, paving the way to industrial use of plant recombinant DNA technologies.

研究分野：植物病理学

キーワード：植物ウイルス 抵抗性 園芸作物 トマト

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

1. 研究開始当初の背景

遺伝子組換え技術は植物自身や他の生物が持つ耐病性、ストレス耐性などの有用形質を植物に導入できる無限の可能性を秘めた手法であり、食料危機克服の切り札として期待されてきた。しかし、組換え作物の栽培・生産には安全性や環境に与える影響等の観点から高いハードルが存在する。その中で「遺伝子組換えの痕跡を残さない」遺伝子組換え技術が New plant Breeding Technology (NBT) と呼ばれ、次世代育種技術として注目されている。次世代育種技術を用いれば、これまでに解明された膨大な植物遺伝子機能情報を利用し、通常育種では偶然に頼っていた有用形質の発見や有用遺伝子の導入をオーダーメイドで行うことが原理的には可能になると予想される。しかし、その過程でキーとなるのはモデル植物における遺伝子機能情報から対象作物やその近縁種の有用遺伝子を特定する技術であると考えられるが、現在までにその効率的開発スキームは確立されていない。

2. 研究の目的

本研究では、植物遺伝子機能情報をもとに作物種から有用遺伝子を同定する効率的特定スキームの確立を目的とし、モデル植物で新たなウイルス抵抗性遺伝子を同定し、その機能を解明した上で、当該遺伝子の植物間における保存性解析をもとに作物から相同遺伝子を同定し、機能解明までを目指す。これら一連のモデル植物における遺伝子同定から作物種における機能解析までの流れを達成することにより、植物ウイルス抵抗性遺伝子に関する基礎研究を作物に応用するモデルスキームの確立を目指す。

3. 研究の方法

モデル植物における新規植物ウイルス抵抗性遺伝子の同定から作物における当該遺伝子ホモログの機能解析までを行った。まず、モデル植物シロイヌナズナを用いた新規抵抗性遺伝子の同定を行った。シロイヌナズナの変異体集団に GFP を発現するポテックスウイルスベクターを接種し、非感染変異体を選抜した。変異体と野生型植物との掛け合わせを通じたファインマッピングにより原因遺伝子を同定することにより、ウイルス劣性遺伝子 EXA1 を同定した。抵抗性遺伝子の配列情報解析を行うとともに、変異体植物を用いた遺伝子機能解析を行うことにより、EXA1 を介した劣性抵抗性の作用点を解明した。次いで、実験植物 *Nicotiana benthamiana* における EXA1 の一過的遺伝子機能解析を行うため、*N. benthamiana* の EXA1 ホモログ NbEXA1 を同定し、*N. benthamiana* において植物ウイルスベクターを用いた NbEXA1 の一過的ノックダウンを行った後に、各種植物ウイルスを接種して増殖能を解析することにより、EXA1 を介した劣性抵抗性のウイルス効果範囲を解析した。さらに、この系でイネとトマトの EXA1 ホモログを発現させることにより、EXA1 の機能を相補することができるかを解析した。最後に、トマトにおいてトマト EXA1 ホモログを植物ウイルスベクターを用いて一過的にノックダウンし、トマトの重要ウイルス pepino mosaic virus を接種してウイルス抵抗性を示すかを解析した。

4. 研究成果

(1) 植物ウイルスに対する劣性抵抗性遺伝子 EXA1 の同定

変異原処理により生じた多数のシロイヌナズナ変異体集団に対して、シロイヌナズナに感染するポテックスウイルス PIAMV を接種し、ウイルス感染の有無を調査した。その結果、ウイルスが全く感染できない変異体 E10773 を見出した。E10773 の戻し交配体を用いた遺伝解析により、本抵抗性は単一劣性遺伝子座によることが明らかになった。次世代シーケンサー解析ならびにファインマッピングによりこの変異体の劣性抵抗性の原因遺伝子の特定に成功し、この遺伝子を Essential for poteXvirus Accumulation 1 (EXA1) と名付けた。EXA1 はこれまで機能が明らかに

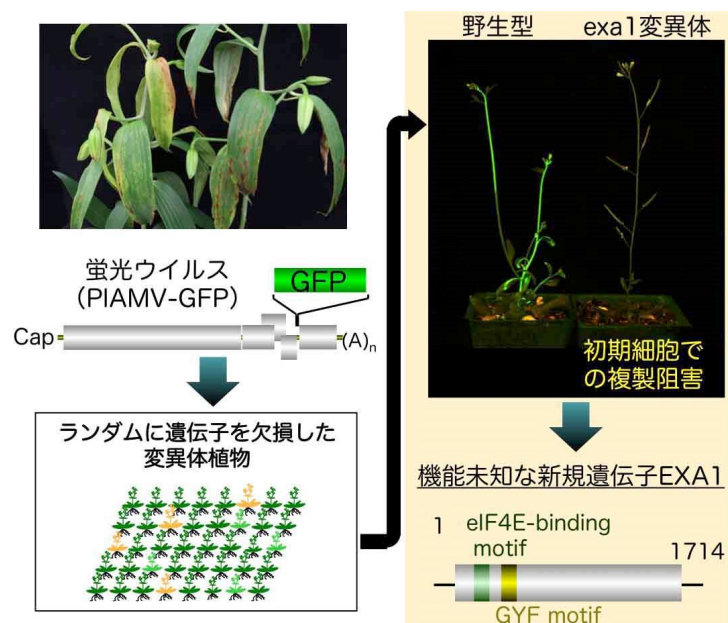


図. 新規劣性抵抗性遺伝子 EXA1 の同定

されていない遺伝子であり、イネ、トマトを含む広範な植物種にも存在することを見出し、さらに構造を詳細に調べたところヒトやマウスで翻訳に関わるタンパク質と類似した構造をもつことが分かった。

(2) EXA1 を介した劣性抵抗性の作用点の解析

EXA1 の機能を解析するため、プロトプラストを用いて細胞レベルでウイルスの増殖をモニターしたところ、EXA1 が欠損した変異体のプロトプラストにおいても、ウイルスがほとんど増殖することができないことを見出した。このことから、EXA1 の変異による劣性抵抗性により、ウイルスの感染初期段階が抑制されることが明らかになった。

(3) EXA1 を介した劣性抵抗性のウイルス効果範囲

EXA1 を介した劣性抵抗性のウイルス効果範囲を明らかにするため、まず EXA1 を欠失したシロイヌナズナ変異体に、複数種のウイルスを接種し、抵抗性の有無について調べた。その結果、PIAMV に加えて PVX など他の 2 種類の異なるポテックスウイルスも感染できないことが分かった。次いでさらに広範囲の植物ウイルスについて解析するため、多数の植物ウイルスが感染可能な実験植物である *N. benthamiana* を用いた。まず、*N. benthamiana* の EXA1 ホモログ NbEXA1 を同定し、植物ウイルスベクターを用いた VIGS を利用することにより、一過的に NbEXA1 の発現をノックダウンできることを明らかにした。NbEXA1 をノックダウンした個体に様々な植物ウイルスを接種したところ、ポテックスウイルス属ウイルスは広く感染が抑制され、ポテックスウイルス属に近縁なロラウイルス属ウイルスの感染も阻害されたが、その他のウイルスの感染には影響がなかったことから、EXA1 による劣性抵抗性はポテックスウイルス属ならびに近縁の植物ウイルスに対して効果があることが明らかになった。

(4) トマトへの劣性抵抗性付与

トマトの EXA1 ホモログ SlEXA1 に関する解析を行った。NbEXA1 をノックダウンした *N. benthamiana* 個体にポテックスウイルス属ウイルスを接種するとその感染が阻害されたが、SlEXA1 を発現させるとウイルス感染が回復したことから、SlEXA1 も EXA1 と同様の機能を持つことが分かった。そこで、トマトにおいて植物ウイルスベクターを用いて SlEXA1 のノックダウンを行い、そこにポテックスウイルス属ウイルスの pepino mosaic virus (PepMV) を接種したところ、PepMV の感染が有意に抑制されたことから、EXA1 を介した劣性抵抗性によりトマトにおける PepMV の感染を抑制できることを明らかにした。

5 . 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 6 件)

1. Yusa A., Neriya Y., Hashimoto M., Yoshida T., Fujimoto Y., Hosoe N., Keima T., Tokumaru K., Maejima K., Netsu O., Yamaji Y., Namba S. Functional conservation of EXA1 among diverse plant species for the infection by a family of plant viruses. **Scientific Reports** 9:5958, 2019.
2. Yoshida T., Shiraiishi T., Hagiwara-Komoda Y., Komatsu K., Maejima K., Okano Y., Fujimoto Y., Yusa A., Yamaji Y., Namba S. The plant noncanonical antiviral resistance protein JAX1 inhibits potexviral replication by targeting the viral RNA-dependent RNA polymerase. **Journal of Virology** 93:e01506-18, 2019.
3. Fujimoto Y., Nijo T., Hosoe N., Watanabe K., Maejima K., Yamaji Y., Namba S. Complete genome sequence of lychnis mottle virus isolated in Japan. **Genome Announcements** 6:e00535-18, 2018.
4. Keima T., Hagiwara-Komoda Y., Hashimoto M., Neriya Y., Koinuma H., Iwabuchi N., Nishida S., Yamaji Y., Namba S. Deficiency of the eIF4E isoform nCBP limits the cell-to-cell movement of a plant virus encoding triple-gene-block proteins in *Arabidopsis thaliana*. **Scientific Reports** 7: 39678, 2017.
5. Hashimoto M., Neriya Y., Keima T., Iwabuchi N., Koinuma H., Hagiwara-Komoda Y., Ishikawa K., Himeno M., Maejima K., Yamaji Y., Namba S. EXA1, a GYF domain protein, is responsible for loss-of-susceptibility to plantago asiatica mosaic virus in *Arabidopsis thaliana*. **The Plant Journal** 88: 120-131, 2016.
6. Koinuma H., Nijo T., Iwabuchi N., Yoshida T., Keima T., Okano Y., Maejima K., Yamaji Y., Namba S. First complete genome sequence of Cherry virus A. **Genome Announcements** 4(3):e00498-16, 2016.

[学会発表] (計 1 2 件)

1. 徳田遼佑・西川雅展・細江尚唯・二條貴通・岩渕望・吉田哲也・渡邊清斗・前島健作・山次康幸・難波成任, 国内のアシタバから検出された carrot torradovirus 1 の全ゲノム配列, 平成 31 年度日本植物病理学会大会, 2019
2. 西川雅展・徳田遼佑・吉田哲也・二條貴通・丸山紀子・勝浩介・前島健作・山次康幸・難波成任, 国内で検出された iris severe mosaic virus のゲノム配列の解析, 平成 31 年度日本植物病理学会大会, 2019

3. 勝浩介・遊佐礼・吉田哲也・白石拓也・小松健・橋本将典・前島健作・山次康幸・難波成任, JAX1 抵抗性の標的となるポテックスウイルス因子の解析, 平成 31 年度日本植物病理学会大会, 2019
4. 藤本祐司・吉田哲也・白石拓也・薦田優香・小松健・岡野夕香里・前島健作・山次康幸・難波成任, JAX1 によるポテックスウイルス増殖阻害の in vitro 再構成, 平成 31 年度日本植物病理学会大会, 2019
5. 吉田哲也・薦田優香・藤本祐司・徳田遼佑・西川雅展・岡野夕香里・前島健作・山次康幸・難波成任, ポテックスウイルス複製複合体前駆体への JAX1 のターゲティング, 平成 31 年度日本植物病理学会大会, 2019
6. 吉田哲也・北沢優悟・細江尚唯・藤本祐司・岡野夕香里・橋本将典・前島健作・山次康幸・難波成任, hibiscus latent Singapore virus 日本分離株の全ゲノム解読, 平成 30 年度日本植物病理学会大会, 2018
7. 遊佐 礼・桂馬拓也・薦田(萩原)優香・橋本将典・細江尚唯・渡邊聖斗・根津 修・山次康幸・難波成任, 翻訳開始因子 eIF4E アイソフォーム nCBP を欠損したシロイヌナズナでは plantago asiatica mosaic virus の感染が遅延する, 平成 29 年度日本植物病理学会大会, 2017
8. 細江尚唯・遊佐 礼・桂馬拓也・薦田(萩原)優香・橋本将典・藤本祐司・関村紘代・山次康幸・難波成任, nCBP はポテックスウイルスの移行タンパク質 TGBp2 および TGBp3 の蓄積を介してウイルスの細胞間移行に寄与する, 平成 29 年度日本植物病理学会大会, 2017
9. 渡邊聖斗・遊佐 礼・橋本将典・煉谷裕太郎・藤本祐司・吉田哲也・前島健作・山次康幸・難波成任, plantago asiatica mosaic virus に対するシロイヌナズナ劣性抵抗性遺伝子のファイニングマッピング, 平成 29 年度日本植物病理学会大会, 2017
10. 藤本祐司・橋本将典・遊佐 礼・煉谷裕太郎・吉田哲也・岡野夕香里・前島健作・山次康幸・難波成任, plantago asiatica mosaic virus に対するシロイヌナズナ劣性抵抗性遺伝子 EXA1 の遺伝子構造解析, 平成 29 年度日本植物病理学会大会, 2017
11. 吉田哲也・橋本将典・遊佐 礼・煉谷裕太郎・岩渕 望・根津 修・前島健作・山次康幸・難波成任, シロイヌナズナの EXA1 欠損により plantago asiatica mosaic virus の感染は細胞レベルで阻害される, 平成 29 年度日本植物病理学会大会, 2017
12. 橋本将典・桂馬拓也・煉谷裕太郎・遊佐 礼・細江尚唯・鯉沼宏章・根津 修・山次康幸・難波成任, plantago asiatica mosaic virus の宿主因子 EXA1 および nCBP の欠損によるウイルス抵抗性スペクトラム, 平成 29 年度日本植物病理学会大会, 2017

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。