

令和 3 年 6 月 29 日現在

機関番号：11201

研究種目：基盤研究(B)（一般）

研究期間：2018～2020

課題番号：18H02202

研究課題名（和文）ウイルスベクターの機能を活用したリンゴ黒星病新規制御技術に関する基盤研究

研究課題名（英文）Basic research on a new control method for apple scab disease utilizing the function of a plant virus vector

研究代表者

吉川 信幸（Yoshikawa, Nobuyuki）

岩手大学・農学部・教授

研究者番号：40191556

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 11,700,000円

研究成果の概要（和文）：リンゴ栽培で大きな脅威となっているリンゴ黒星病の新たな防除法開発の基礎を築くため、（1）ALSVベクターの高速開花技術を利用してリンゴ黒星病抵抗性品種母本を作出した。作出個体については生物多様性影響評価検討会に届け出を終了し、令和3年5月から岩手大学の野外圃場で栽培試験を開始した。（2）ALSVベクターのサイレンシング誘導能を利用したhost-induced gene silencing（HIGS）によるリンゴ黒星病および斑点落葉病の感染阻害効果を解析した。その結果、黒星病菌では阻害効果は確認されなかったが、斑点落葉病では病斑面積が減少し、感染阻害を示唆する結果が得られた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、申請者らが開発したALSVベクターを利用した高速開花技術を、リンゴ黒星病抵抗性品種の育成に利用し、黒星病抵抗性遺伝子を有する品種候補を短期間に選抜した。選抜した品種候補については、農水省/環境省の生物多様性影響評価総合検討会に届け出を終了し、2021年5月から岩手大学の果樹園で栽培試験を開始した。このように短期間で優良系統を選抜できる可能性を示した点で社会的意義は大きい。ALSVベクターのサイレンシング誘導能を利用したHIGSについてはリンゴ斑点落葉病で感染阻害効果を示唆する結果が得られ、薬剤防除に代わる新たな防除技術の可能性を示した点で学術的な意義がある。

研究成果の概要（英文）：In order to establish a new control method for apple scab, which is a major threat in apple production, (1) apple scab-resistant varieties were bred using the early flowering technology of the ALSV vector. The selected scab-resistant candidates have been notified to the biological diversity risk assessment commission, and cultivation tests of the selected apple seedlings had been started in the field of Iwate University in May, 2021. (2) As a result of analyzing the infection-inhibiting effect of host-induced gene silencing (HIGS) on apple scab and Alternaria blotch disease using the ALSV vector, no effect was confirmed in apple scab disease. On the other hand, in Alternaria blotch disease, the results suggested that HIGS by ALSV vector inhibits infection with A. alternate apple pathotype.

研究分野：植物保護科学

キーワード：ALSVベクター リンゴ黒星病 リンゴ斑点落葉病 HIGS 抵抗性品種母本 高速開花技術

## 1. 研究開始当初の背景

リンゴ黒星病(apple scab)は世界中のリンゴに発生している糸状菌性病害である。病原のリンゴ黒星病菌 (*Venturia inaequalis*)は、胞子により葉や果実へ感染し、黒色病斑などを形成する。本病が果実に発生すると果実肥大に伴って裂果や奇形果となり、商品価値が完全に損なわれるため、リンゴ栽培における最重要病害である。本病の防除対策としてはDMI剤(ステロール生合成阻害剤)などの化学農薬の利用が有効であるが、アメリカではDMI剤に対する感受性が低下した薬剤耐性菌の発生が報告されている(Villani *et al.* 2015, Plant Dis.)。わが国でも2015年から2016年度にかけて、国内最大のリンゴ生産地である青森県で薬剤耐性菌が発生し、本病が激発した(平山ら、平成29年度日本植物病理学会大会)。発病果率が100%に至る園地もあり、リンゴ生産農家に存続の危機を抱かせるほどの脅威であった。このように、これまで本病の防除は化学農薬に依存してきたが、化学的防除は常に耐性菌発生リスクを抱えており、短期的には作用点の異なる化学農薬で代替することも可能であるが、長期的な観点から見ると、化学農薬だけに依存しない、新たなリンゴ黒星病防除法を取り入れた総合的な防除対策を考える必要がある。

## 2. 研究の目的

(1) リンゴ黒星病には抵抗性遺伝子(Vf遺伝子)が知られており、DNAマーカーも報告されている。もともと野生リンゴ *Malus floribunda* 821系統に由来するVf遺伝子を米国で約60年かけて栽培リンゴに導入し、品種‘プリマ’や‘ゴールドラッシュ’を作出した経緯がある。一方、日本の主要リンゴ品種はVf遺伝子を保有していない。リンゴは幼若期間が長く、開花・結実までに播種後5~10年を要する。このため、仮にDNAマーカーを利用してVf遺伝子を導入しようとしても、リンゴ黒星病抵抗性系統を育成するには十数年から数十年を要することになる。申請者らは、リンゴ小球形潜在ウイルス(ALSV)の一過的感染系を利用したリンゴの早期開花・早期結実技術を開発した(Yamagishi *et al.* 2013, Plant Biotech. J.)。この技術によりリンゴ実生個体を発芽後わずか1~2ヶ月で開花させ、1年以内に後代種子を得ることを世界で初めて可能とした(図1)。ALSVベクター技術を利用すれば、リンゴ黒星病抵抗性品種の開発期間を大幅に短縮できる。

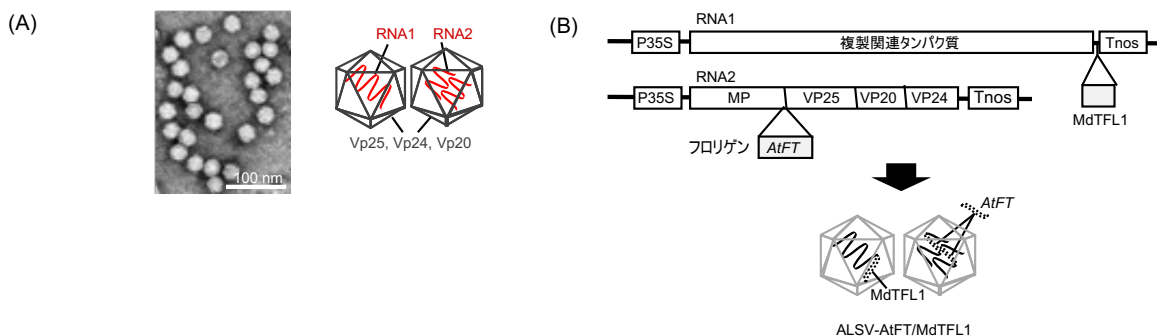


図1 (A) ALSV粒子の電子顕微鏡写真(左)とALSV粒子の模式図(右) ALSVはRNA1とRNA2の2本のゲノムを3種類の外殻タンパク質(Vp25、Vp24、Vp20)が包み込んで、粒子ができています。

(B) ALSVベクターの遺伝子地図(上)とリンゴ高速開花用ベクター (ALSV-AtFT/MdTFL1)の模式図(下)

(2) もう一つのチャレンジングな新規リンゴ黒星病防除法として、真核生物に広く保存された塩基配列特異的RNA分解機構(RNAサイレンシング)を利用し、リンゴ黒星病菌の感染を阻害する方法が考えられる。近年、様々な植物病原糸状菌が宿主植物に感染した際に、宿主植物で誘導されていたRNAサイレンシング効果が植物から糸状菌へ移行することが報告されている。このような植物-糸状菌間でのサイレンシング誘導は Host-induced gene silencing (HIGS)と呼ばれ、糸状菌の生存・感染に関わる遺伝子を標的にすることで糸状菌の感染阻害に成功している例がある(Nowara *et al.*, 2010, Plant Cell)。すなわち、HIGSを応用すれば、標的とする糸状菌遺伝子の二本鎖RNAあるいはsmall-interfering (si) RNAを“RNA農薬”として利用できる可能性がある。RNA農薬は化学農薬とは似て非なるもので、糸状菌の標的遺伝子を分子レベルで標的にするため、薬剤耐性菌の出現に対して柔軟かつ迅速な対応が可能であり、次世代型農薬として期待される。しかしながら、リンゴなどの果樹類において、病原糸状菌に対してHIGSを誘導できるかは未だ不明である。ALSVベクターはリンゴなどバラ科果樹で効率よくサイレンシング(Virus-induced gene silencing; VIGS)を誘導する(Sasaki *et al.*,

2011, Plant Methods)。そこで、申請者らは、ALSV ベクターの VIGS 技術を利用し、リンゴにおいて黒星病菌の生存・感染に必須な標的遺伝子の HIGS による黒星病菌の感染阻害効果を解析することで、RNA 農薬の実現可能性を検証できると着想した。

### 3. 研究の方法

(1) 黒星病抵抗性遺伝子(Vf)を保有するリンゴ品種‘ゴールドラッシュ’の花粉を、日持ち性が良く食味も優れているわが国の代表的品種‘ふじ’等に平成 30 年春に交配し、11 月までに F1 種子を得る。これら F1 種子を低温処理し、平成 31 年 3 月までに発芽させる。発芽 F1 種子に早期開花用 ALSV ベクターを接種して育成するとともに、Vf 遺伝子、日持ち性を決める MdACS1 遺伝子、およびリンゴ自家不和合性を決定する S 遺伝子型を DNA(PCR)マーカーで解析した。これら選抜個体(約100個体)の中で、果実の糖度が高い個体を選抜した。次に高温処理により選抜個体からウイルスベクターを除去しウイルスフリーとなった枝をリンゴの台木に緑枝接ぎした。これら Vf 遺伝子、日持ち性を決める MdACS1 遺伝子等を有する個体を選抜系統として、農水省/環境省の生物多様性影響評価総合検討会に届け出て、野外栽培試験を開始した。

(2) リンゴ黒星病菌の生存・感染に必須なステロール合成酵素遺伝子(CYP51A1)およびリンゴ斑点落葉病菌の AM 毒素合成遺伝子(AMT1)の一部を ALSV ベクターに導入し、ALSV-CYP51 および ALSV-AMT1 ベクターを構築した。これらをリンの実生苗に接種し、ALSV-CYP51 感染リンゴ実生苗および ALSV-AMT1 感染リンゴ実生苗を育成した。続いて、黒星病菌の場合には感染植物全体に、斑点落葉病菌では切除した葉にそれぞれの菌の孢子懸濁液(1 x10<sup>6</sup>/ml)を噴霧接種した。湿室条件で黒星病菌の場合に1週間、斑点落葉病菌では2日間インキュベートし、発病条件を調べた。

### 4. 研究成果

(1) 黒星病抵抗性遺伝子(Vf)と日持ち性関連遺伝子(MdACS1)をホモに持つリンゴ品種母本の育成

①黒星病抵抗性遺伝子(Vf)を保有する‘ゴールドラッシュ’の花粉を、日持ち性が良く食味も優れているわが国の代表的品種‘ふじ’、‘王林’、および‘はるか’に平成 30 年春に交配した。その結果、‘ふじ’については 270 粒、‘王林’については 165 粒、‘はるか’については 334 粒の F1 種子を得た。これら F1 種子を低温処理し、平成 31 年 3 月から発芽させ、早期開花用の ALSV ベクターを接種した。同時に、これらの発芽実生については Vf 遺伝子、日持ち性 MdACS1 遺伝子を DNA(PCR)マーカーで解析を行った(図2)。その結果、ALSV ベクター感染実生は、‘ふじ’由来で 85 個体、‘はるか’由来で 95 個体、‘王林’由来で 24 個体得られた。Vf 保有個体と非保有個体数は、‘ふじ’由来で 46:39、‘はるか’由来で 46:49、‘王林’由来で 7:6 となり、予想通り Vf 保有個体と非保有個体は 1:1 に分離した。一方、変異型 MdACS1 は、‘ふじ’由来が 85 個体、‘はるか’由来が 95 個体の全てで変異型 MdACS1 であった。‘王林’由来(24 個体)では日持ち性有りと判断されたのは 13 個体であった。以上のように、ALSV ベクター感染実生の中で、黒星病抵抗性と日持ち性を有する F1 実生が 3 品種合わせて 99 個体得られた。

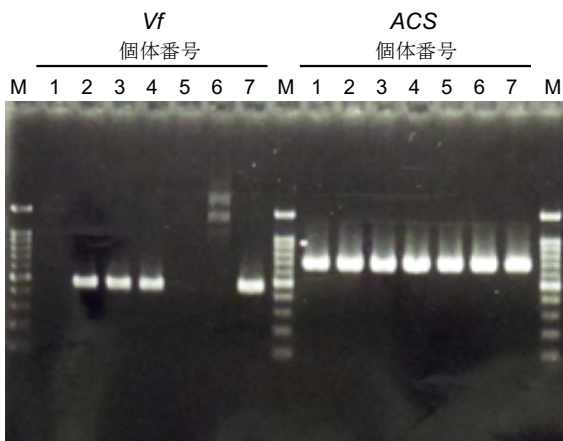


図2 リンゴ実生のリンゴ黒星病抵抗性遺伝子(Vf)および日持ち性を決めるMdACS1遺伝子(ACS)のDNAマーカー検定。個体番号2、3、4、7はVf遺伝子を保有しており、1~7の全てが日持ち性を有していることがわかる。MはDNAサイズマーカーである。



②ALSV ベクター感染により早期開花し、果実が成熟段階まで達した個体の中で、食味良好で品種として有望な個体が‘ふじ’由来 3 個体、‘はるか’由来で 1 個体得られた。

③これらの個体については、ALSV の除去処理(37C で 1 ヶ月)を行った。ALSV ベクターが除去された個体については、枝を矮性台木(JM 台木)に接ぎ木して育成後、ウイルス検定した結果、全て ALSV フリーであることを確認した。これらの個体は、生物多様性影響評価総合検討会に届け出を終了し、令和3年5月から岩手大学 FSC の野外圃場で栽培試験を開始した。

## (2) HIGS によるリンゴ黒星病およびリンゴ斑点落葉病の感染阻害の検証

①青森県で分離されたリンゴ黒星病菌 3 菌株(TA14、TO22、NO30)について、含菌寒天片をホモジナイズしたものを接種源とし、支持体(セロファン膜あるいはガーゼ)を敷いた PDA 培地上で培養(20℃、暗黒条件下)し、分生子の形成を調べた。その結果、いずれの支持体を用いた場合でも TA14 と TO22 では培養 1 週間で分生子の形成が認められ、NO30 では分生子の形成は認められなかった。TA14 と TO22 の分生子を寒天培地に接種したところ、ほとんどの分生子の発芽を確認した。

②リンゴ黒星病菌の生存・感染に必須なステロール合成酵素遺伝子(CYP51A1)の一部を ALSV ベクターに導入し、ALSV-CYP51 を構築した。ALSV-CYP51 をリンゴ実生苗に接種し、感染リンゴ個体を作成した。ALSV-CYP51 に感染したリンゴ実生(8~10 葉期)に、黒星病胞子( $5 \times 10^5$  個/ml)を接種したが、接種後 2 週間には全個体で上位葉がえそを起し、野生型 ALSV を同様に枯死した。このようにリンゴ黒星病の試験では ALSV ベクター感染個体において、HIGS による明確な感染阻害は観察されなかった。

③斑点落葉病菌の単分生子分離株(AKI-3)を V8 固形培地で約 1 週間培養後、分生子を回収した。接種に適した分生子濃度、判定する接種後日数、葉位を調べるため、非接種個体の葉を用いて噴霧接種試験を行ったところ、濃度は  $1 \times 10^5$  分生子/ml、接種 4 日後での判定するのが適していた。

④ALSV-AMT1 を *C. quinoa* で増殖後 RNA を抽出し、パーティクルガン法で‘王林’実生に接種した。接種個体を RT-PCR で検定したところ、ALSV-AMT1 に感染していることが明らかになった(図3)。次に、ALSV-AMT1 感染リンゴ苗に対し、リンゴ斑点落葉病菌(分生子: $1 \times 10^5$  個/ml)の接種を行った。その結果、ALSV 非接種個体および野生型 ALSV 感染個体葉では大部分の領域で壊死斑形成が観察されたのに対して(感染スコア: 無処理平均3.6、wtALSV 感染葉平均3.9)、ALSV-AMT1 を接種したリンゴ実生では感染スコアが平均2.1となり、リンゴ斑点落葉病菌の感染阻害を示唆する結果が得られた(図4)。また AMT1 に対する RNA プローブを用いて siRNA を解析したところ、ALSV-AMT1 感染リンゴ苗の中で病徴の抑制された個体では siRNA が検出されたが、病徴が現れた個体では siRNA が確認されなかった(図5)。以上から、ALSV ベクターによる HIGS により、ある程度の抵抗性が付与されたと考えられた。

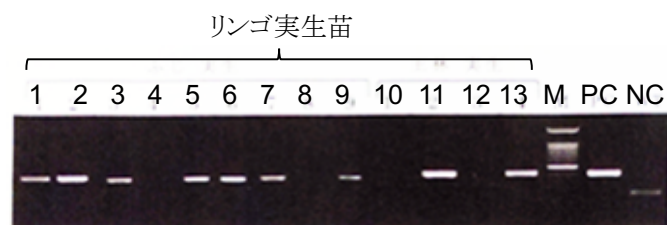


図3. ALSV-AMTを接種したリンゴ実生苗のRT-PCRによる感染確認  
個体番号1,2,3,5,6,7,9,11,13はALSV-AMTに感染していると判定した。  
Mはサイズマーカー、PCはポジティブ、NCはネガティブ(野生型 ALSV)コントロールである。

以上のように本研究では、申請者らが開発した ALSV ベクターを利用した高速開花技術を、リンゴ黒星病抵抗性品種の育成に利用し、黒星病抵抗性遺伝子を有する品種候補を短期間に選抜することができた点で社会的意義は大きい。ALSV ベクターのサイレンシング誘導能を利用した HIGS についてはリンゴ斑点落葉病で感染阻害効果を示唆する結果が得られ、薬剤防除に代わる新たな防除技術の可能性を示した点で学術的な意義がある。

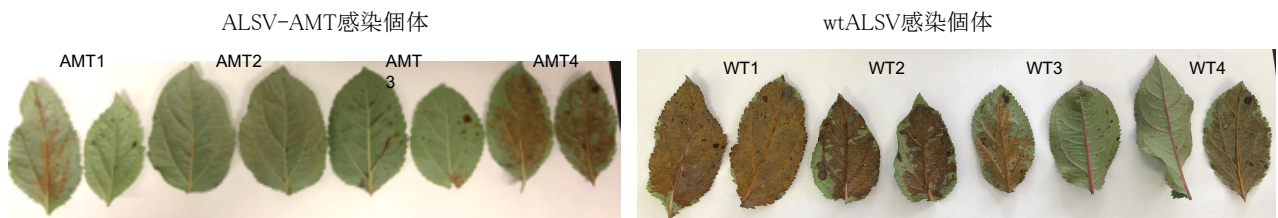


図4. ALSV感染リンゴ実生のリンゴ斑点落葉病菌接種に対する反応. ALSV-AMT感染個体 (AMT1, AMT2, AMT3) は右側のwtALSV感染個体と比較して、斑点落葉病菌に対して比較的抵抗性を示した。

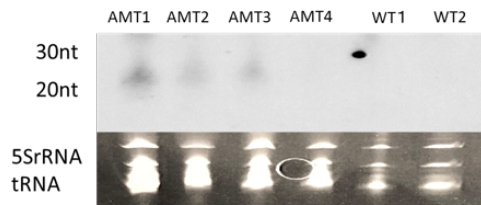


図5. ALSV-AMT感染個体のsiRNAのノーザンハイブリダイゼーション分析.斑点落葉病菌に対して抵抗性を示したAMT1,AMT2,およびAMT3からは、AMTのsiRNAが検出された。

<引用文献>

- Nowara *et al.*, 2010, *Plant Cell* 22:3130–2141. 1  
 Sasaki *et al.*, 2011, *Plant Methods* 7: 15.  
 Villani *et al.* 2015, *Plant Dis.* 99:1526–1536.  
 Yamagishi *et al.* 2013, *Plant Biotech. J.* 12: 60–68.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 0件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 吉川信幸	4. 巻 76
2. 論文標題 ウイルスベクターを利用した高速開花技術のリンゴ育種への利用	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 果実日本	6. 最初と最後の頁 60-63
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 中嶋 瞳・八重樫 元・山岸紀子・磯貝雅道・森谷茂樹・吉川信幸
2. 発表標題 リンゴ斑点落葉病に対する感受性の原因となる候補遺伝子(A8)の解析
3. 学会等名 日本植物病理学会東北部会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究分担者	八重樫 元 (Yaegashi Hajime) (90582594)	富山県農林水産総合技術センター・富山県農林水産総合技術センター園芸研究所・主幹研究員  (83207)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------