

機関番号：11201
 研究種目：基盤研究 (B)
 研究期間：2008～2010
 課題番号：20380025
 研究課題名 (和文) 潜在性ウイルスを利用した新規 RNA サイレンシング誘導ベクターの開発とその応用
 研究課題名 (英文) Development of a new virus-induced gene silencing vector using *Apple latent spherical virus*
 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

研究成果の概要 (和文)：リンゴ小球形潜在ウイルス (ALSV) ベクターを利用したマメ科、ウリ科、ナス科植物およびバラ科果樹で効率的にウイルス誘導ジーンサイレンシング (VIGS) を誘導できる実験系を確立した。本法を用いてタバコおよびシロイヌナズナのウイルス抵抗性遺伝子 (*N* および *RCY1*) の VIGS、またダイズでは ALSV の種子伝染を利用した種子の内在性遺伝子 (イソフラボン遺伝子) の VIGS の誘導に成功した。

研究成果の概要 (英文)：A virus-induced gene silencing (VIGS) system using *Apple latent spherical virus* (ALSV) vectors was established in legume, cucurbit, *Solanaceae* species, and *Rosaceae* fruit trees. ALSV vectors could be successfully used to silence disease resistant *N* gene in tobacco and *RCY1* gene in *Arabidopsis thaliana*. Infection with an ALSV vector having a fragment of soybean *isoflavone synthase 2* gene also led to a reduction of the levels of an isoflavone content in the cotyledons of infected seeds.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	7,700,000	2,310,000	10,010,000
2009 年度	3,100,000	930,000	4,030,000
2010 年度	2,800,000	840,000	3,640,000
年度			
年度			
総計	13,600,000	4,080,000	17,680,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農学・植物病理学

キーワード：ウイルスベクター、リンゴ小球形潜在ウイルス (ALSV)、ウイルス誘導ジーンサイレンシング (VIGS)、遺伝子機能解析、ダイズ、バラ科果樹

1. 研究開始当初の背景

RNA サイレンシングは現在、非常に優れた逆遺伝学的手法として各種植物の遺伝子の機能解析に幅広く利用されている。植物では、目的とする遺伝子の RNA サイレンシングを誘導するために、(1) アグロバクテリウム法などでその遺伝子配列の 2 本鎖 RNA を発現する形質転換植物を作製する方法と (2) 植物ウイルスベクターを利用する方法 (ウイルス誘導ジーンサイレンシング; VIGS) が

主に利用されている。植物ウイルスベクターを利用する方法は、ウイルスゲノムに目的遺伝子の一部を挿入し、植物体に感染させることで、植物体全体でその遺伝子の VIGS を誘導する方法である。本法は、アグロバクテリウムによる形質転換法に必要な組織培養やシュート形成、個体再生など長期間を要するステップを必要とせず、遺伝子を連結したウイルスを植物に接種するだけで、目的遺伝子の発現を容易に抑えることができる。すなわち多数の個体を短期間で解析でき、さらに形

質転換法では致死となる遺伝子の解析にも利用できる優れた特徴を持っている。特に、組織培養による再生が困難な植物（例えば、果樹類やマメ科およびウリ科植物など）では VIGS 用ウイルスベクターの開発は急務な課題である。これまでに、海外で構築されたジャガイモ X ウイルス (PVX) ベクターやタバコ茎えそウイルス (TRV) ベクターがサイレンシング誘導ベクターとして各種遺伝子の機能解析に広く利用されている。その他の植物ウイルスベクターの主な利用例としては、オオムギとオオムギ斑葉モザイクウイルス (BSMV)、マメ科植物と Pea early browning virus (PEBV) および Bean pod mottle virus (BPMV)、タバコとサテライトタバコモザイクウイルス (STMV)、African cassava mosaic virus (ACMV) とキャッサバ、イネとブロムモザイクウイルス (BMV) などの組み合わせが報告されている。一方、ウイルスベクター利用の問題点としては、VIGS が安定的に誘導される植物が *Nicotiana benthamiana* やトマトなどのナス科植物、またシロイヌナズナなど一部の植物に限定されていること、ウイルス感染によって病徴が現れるために VIGS による表現型の解析が困難になること、有用なウイルスベクターがない植物では、この方法は利用できないことなどが挙げられる。理想的な VIGS 誘導ウイルスベクターとしては、植物に効率的かつ安定的にサイレンシングを誘導し、感染植物に病徴を引き起こさない性質（潜在感染性）を持つことが挙げられる。

申請者らはこれまで、果樹類には病気を引き起こすことなく潜在感染している植物ウイルスが多数存在していることを明らかにし、これら潜在性ウイルスをウイルスベクターとして利用できないか検討してきた。これら一連の研究の中で、潜在性ウイルスの一種であるリンゴ小球形潜在ウイルス (ALSV) に関して、平成 15～18 年度科学研究費（基盤研究 B：「果樹潜在性ウイルスベクターを利用した果樹への新機能付与技術の開発」）の補助を受け、ALSV ゲノムの感染性 cDNA クローンを植物での遺伝子発現用ウイルスベクター (ALSV ベクター) に改変することに成功し（図 1）、これを用いて草宿主植物およびリンゴで外来遺伝子を発現できることを明らかにした（図 2A）

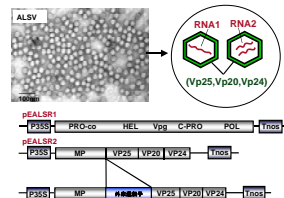


図1.リンゴ小球形潜在ウイルス (ALSV)のウイルスベクター化

(Li *et al.*, 2004, Arch. Virol. 149, 1541-1558; Yoshikawa *et al.*, 2006; Arch. Virol. 151, 837-848)。申請者らはまた、ALSV ベクターが実験植物（タバコ）でのトランス

ジーン (GFP 遺伝子) や内在性遺伝子 (Magnesium chelatase (SU) 遺伝子など) の

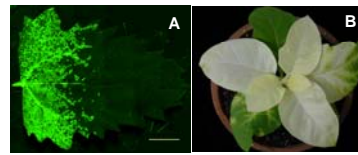


図2. ALSVベクターを用いた植物での外来遺伝子の発現と内在性遺伝子のサイレンシングの発現と内在性遺伝子のサイレンシング
A. ALSVベクターによる GFPの発現(C. quinoa)
B. ALSVベクターによるタバコ SU遺伝子のサイレンシング
サイレンシングを効率良く、かつ安定的に誘導し、RNAサイレンシング誘導ベクターとしても有望であることを報告した (Yaegashi *et al.*, 2007) (図 2B)。

2. 研究の目的

本申請では、次の4課題を実施することで、本邦産植物ウイルスベクターを利用した効率的・安定的 VIGS 誘導系を確立し、今後の関連研究の進展に資することとする。

(1) ALSV ベクターを利用した各種植物での VIGS 誘導系の確立

実験植物 (*Nicotiana* 属植物やシロイヌナズナ) に加えて、マメ科植物、ウリ科植物を供試して、これら植物において ALSV ベクターが効率的かつ安定的な VIGS 誘導ベクターとなることを明らかにする。また安定した VIGS の誘導に必要な導入遺伝子のサイズを明らかにする。

(2) 植物の病害抵抗性関連遺伝子の機能解析への利用 ALSV による VIGS 誘導系が病害抵抗性関連遺伝子の解析に利用できるかどうかを明らかにするために、タバコモザイクウイルス (TMV) 抵抗性遺伝子 (N) を持つタバコおよびキュウリモザイクウイルス (CMV) -Y 抵抗性遺伝子 (RCY1) を持つシロイヌナズナを供試して、ウイルス抵抗性関連遺伝子のサイレンシングとその抵抗性反応に及ぼす影響を解析する。

(3) ALSV ベクターによる VIGS の植物成分改変への利用

ALSV がダイズ、エンドウ、ササゲ等のマメ科植物にも全身感染することを利用して、ここではダイズ種子成分の VIGS による制御を目的に、ダイズのイソフラボン遺伝子の VIGS を試みる。

(4) バラ科果樹類での VIGS 誘導系の確立 遺伝子機能解析技術が確立していないリンゴ、ナシ、モモなどバラ科果樹類での ALSV ベクターによる VIGS 誘導系の確立を行う。

3. 研究の方法

研究項目 (1) : ALSV ベクターを利用した各種植物での VIGS 誘導系の確立

実験植物 (*Nicotiana* 属植物やシロイヌナズナ)、マメ科植物 (ダイズ、アズキ、エンドウ、ササゲ)、ウリ科植物 (キュウリ、カボチャ、メロン)、およびバラ科果樹 (リンゴ、ナシ) を供試して ALSV ベクターを利用した VIGS 誘導系を確立する。

(a) マメ科植物 (ダイズ) およびウリ科植物 (キュウリ) の葉から、色素合成あるいはクロロフィル合成に関与する *Phytoene desaturase* (PDS) 遺伝子および *SU* 遺伝子を RT-PCR 法により増幅後クローニングする。クローン DNA の塩基配列を決定後、これら遺伝子の一部 (200~300 塩基) を ALSV ベクターに連結する。タバコおよびシロイヌナズナの PDS および *SU* 遺伝子については、既に ALSV に導入済みである。PDS あるいは *SU* 遺伝子を導入した ALSV ベクターを各植物の実生苗に感染させ、葉の白色化、すなわちこれら遺伝子のサイレンシングが起こるかどうかを観察するとともに、両遺伝子の mRNA の定量的 PCR 解析、クロロフィル含量の測定により、サイレンシングの効率と安定性を確かめる。

(b) PVX ベクターなどは成長点付近に侵入できないため、成長点近傍で発現する遺伝子のサイレンシングには利用できないことが報告されている。ALSV ベクターが成長点で発現する遺伝子のサイレンシングに有効かどうかを明らかにする目的で、*proliferating cell nuclear antigen* (PCNA) 遺伝子の一部を ALSV ベクターに連結後、上と同様にタバコに接種し、葉の奇形などの影響を解析する。

(c) ALSV ベクターに導入する遺伝子のサイズと VIGS の安定性との関係を調べる目的で、一連の長さのタバコ PDS 遺伝子 (100bp、150bp、200bp、300bp) を導入した ALSV ベクターを作製する。各 ALSV ベクターをタバコに接種後、葉の白色化出現時期、mRNA 量、クロロフィル含量を解析し、安定した VIGS の誘導に必要な導入遺伝子のサイズを明らかにする。

研究項目(2) : VIGS 誘導系のための ALSV ベクター接種条件の検討

目的遺伝子を連結した ALSV ベクターの植物体への接種法としては、草本植物においてはウイルス粒子 (感染葉磨砕液) の機械的接種 (カーボランダム法) で十分に高い感染効率を得ることができるが、バラ科の果樹類の場合には感染効率が低いことが明らかになっている。果樹類で VIGS 誘導実験を行うためには接種法を改良して、高い感染効率を得る必要がある。そこで、次の3つの方法による ALSV ベクターの果樹類への接種法を検討

し、最適な VIGS 誘導条件を確立する。本申請課題で要求している Helios Gene Gun システムはパーティクルガン接種に必要な備品である。

(a) クローン化したプラスミド DNA のパーティクルガンによる最適な接種条件を検討する。

(b) 精製ウイルス粒子のパーティクルガンによる最適な接種条件を検討する。

(c) 感染葉から抽出した RNA のパーティクルガンによる最適な接種条件を検討する。

(d) リンゴ *SU* 遺伝子 RT-PCR で増幅後、ALSV ベクターに連結し、上で得られた最適な接種法でリンゴ、ナシ、モモ実生苗に接種し、VIGS の誘導を確認する。

研究項目(3) : ALSV ベクターの抵抗性関連遺伝子の機能解析への利用

ALSV ベクターによる VIGS 誘導系が病害抵抗性関連遺伝子の解析に利用できるかどうかを明らかにする。

(a) TMV 抵抗性遺伝子である *N* 遺伝子の一部を ALSV ベクターに連結後、*N* 遺伝子を持つタバコ (品種キサンチ *nc*) に接種し、*N* 遺伝子の VIGS を誘導する。このタバコ植物に TMV を接種し、HR 反応による TMV の封じ込めが解除されるかどうかを解析し、抵抗性遺伝子の解析に利用できるかどうかを明らかにする。

(b) *N* 遺伝子の実験と同様に、抵抗性関連遺伝子である *EDS1*、*NPR1*、*AOX* の各遺伝子の VIGS を誘導し、TMV 感染に対する影響を解析する。

(c) シロイヌナズナ (C24) が持つ *RCY1* 遺伝子の一部を ALSV ベクターに連結し、このウイルスをシロイヌナズナ (C24) に接種し、VIGS を誘導する。続いて、これら植物に *CMV-Y* を接種し、HR 感染に対する反応を解析する。

研究項目(4) : ALSV ベクターによる VIGS の植物成分改変への利用

ALSV がダイズに全身感染することを利用して、ここではダイズ種子に含まれるイソフラボン遺伝子の ALSV ベクターによる VIGS を実施する。

(a) ダイズ種子に含まれるイソフラボン遺伝子をダイズから増幅し、クローニングする。

(b) これら遺伝子の一部を ALSV ベクターに連結後、ダイズに接種する。

(c) 接種植物から得られたダイズ種子中のイソフラボン含量を定量し、ALSV ベクターによる種子タンパク質の改変が可能かどうか検討する。

研究項目(5)：バラ科果樹類での VIGS 誘導系の確立

バラ科果樹類（リンゴ、ナシ）の VIGS 誘導系の確立を行う目的で、塩基配列データが登録されているリンゴ遺伝子の中でルビスコ小サブユニット遺伝子 (rbcS) のサイレンシング誘導を行う。

(a) リンゴから rbcS 遺伝子を PCR で増幅後、ALSV ベクターに連結する。これを平成 20 年度の研究項目で確立した接種条件に基づいて、リンゴ、ナシに接種し、VIGS が誘導されるかどうかを解析する。

4. 研究成果

(1) リンゴ小球形潜在ウイルス(ALSV)ベクターがマメ科植物（ダイズ、エンドウ、アズキ、ササゲ）、ウリ科植物（キュウリ、メロン、スイカ、ズッキーニ、トウガンなど）、およびナス科植物（トマト、ジャガイモ）などの栽培植物で効率良く、安定的に内在性遺伝子のサイレンシングを誘導するベクターであることが明らかにした（雑誌論文②、⑤）。

ALSV ベクターに導入する遺伝子のサイズと VIGS の安定性との関係を調べる目的で、一連の長さのタバコ PDS 遺伝子（100bp、150bp、200bp、300bp）を導入した ALSV ベクターを作製し、各 ALSV ベクターをタバコに接種後、葉の白色化出現時期、mRNA 量、クロロフィル含量を解析した。その結果、導入遺伝子サイズが 200bp 以下で、VIGS が長期間持続することが明らかになった（雑誌論文②）。

(2) TMV 抵抗性遺伝子である N 遺伝子の一部を ALSV ベクターに連結後、N 遺伝子を持つタバコ（品種キサンチ nc）に接種し、N 遺伝子の VIGS を誘導した。このタバコ植物に TMV を接種したところ、本来誘導されるべき HR 反応が不完全となり TMV の封じ込めが解除され、TMV が全身感染した。すなわち、ALSV ベクターにより TMV 抵抗性遺伝子のサイレンシングが誘導された。タバコでの N 遺伝子の VIGS は世界初である。また、シロイヌナズナ(C24)が持つ RCY1 遺伝子の一部を ALSV ベクターに連結し、このウイルスをシロイヌナズナ(C24)に接種した。これら植物に CMV-Y を接種したところ、本来は HR 誘導により CMV-Y は全身感染できない

RCY1 遺伝子をもつシロイヌナズナにおいて、CMV-Y の全身感染が確認された。これらの結果から、シロイヌナズナの抵抗性遺伝子の機能解析に ALSV ベクターが利用できることが明らかになった（雑誌論文②）。

(3) ダイズでは ALSV の種子伝染を利用した種子（胚）や発芽直後の植物体での内在性遺伝子の VIGS の誘導に成功した（雑誌論文③、⑤）。ALSV 感染ダイズ種子のイソフラボン遺伝子 (soyIFS2) の mRNA 量を RT-PCR で解析したところ、感染種子において減少していた。同時に種子内のイソフラボン含量を測定したところ、対象区と比べて有意に減少していた（雑誌論文③）。

(4) ALSV ベクターを用いたバラ科果樹での VIGS 実験系を確立する目的で、リンゴ実生苗へのウイルス接種法を検討し、続いて ALSV ベクターによるリンゴおよびナシの内在性遺伝子の VIGS 誘導を行った。感染葉から抽出した ALSV-RNA をパーティクルガン法でリンゴ実生苗に接種した結果、ほぼ 100% の感染率を得ることができた（雑誌論文④）。次に、リンゴのルビスコ小サブユニット (rbcS) 遺伝子の一部を ALSV ベクターに組み込み、ウイルス化した後、パーティクルガン法でリンゴおよびニホンナシ実生苗に接種した。その結果、接種後約 2 週間から rbcS-ALSV 接種個体では葉の退緑と矮化、actin-ALSV 接種個体では葉の奇形が観察された。rbcS-ALSV 接種リンゴ葉の RNA 分析では、rbcS-mRNA の著しい減少と rbcS-siRNA の生成が認められた。以上から、ALSV ベクターはリンゴおよびニホンナシの VIGS 誘導ベクターとして利用できることが明らかになった（雑誌論文①）。なお、バラ科果樹類での効率的に VIGS を誘導できるウイルスベクターは ALSV が初めてで、今後、リンゴなどの遺伝子機能解析のための強力なツールとして利用できると考えられた。

5. 主な発表論文等

（研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線）

〔雑誌論文〕（計 6 件）

- ① Sasaki, S., Yamagishi, N., and Yoshikawa, N. Efficient virus-induced gene silencing in apple, pear and Japanese pear using Apple latent spherical virus vectors. *Plant Methods* 2011 (印刷中) (査読有り)
- ② Nakamura, K., Yamagishi, N., Isogai, M., Komori, S., Ito, T., and Yoshikawa, N. Seed and pollen transmission of

Apple latent spherical virus in apple. Journal of General Plant Pathology 77, 48-53, 2011 (査読有り).

- ③ 山岸紀子・吉川信幸. 植物ウイルスベクターを用いた遺伝子機能解析ツールとしてのウイルス誘導ジーンサイレンシング. ウイルス 60, 155-162, 2010 (査読無し).
- ④ Yamagishi, N., Sasaki, S., and Yoshikawa, N. Highly efficient method for inoculation of apple viruses to apple seedlings. Julius-Kuhn-Archiv. 427: 226-229, 2010 (査読有り).
- ⑤ Igarashi, A., Yamagata, K., Sugai, T., Takahashi, Y., Sugawara, E., Tamura, A., Yaegashi, H., Yamagishi, N., Takahashi, T., Isogai, M., Takahashi, H., and Yoshikawa, N. Apple latent spherical virus vectors for reliable and effective virus-induced gene silencing among a broad range of plants including tobacco, tomato, Arabidopsis thaliana, cucurbits, and legumes. Virology 386, 407-416, 2009 (査読有り)
- ⑥ Yamagishi, N. and Yoshikawa, N. Virus-induced gene silencing in soybean seeds and the emergence stage of soybean plants with Apple latent spherical virus vectors. Plant Molecular Biology 71, 15-24, 2009 (査読有り)

[学会発表] (計 5 件)

- ① 山岸紀子・佐々木慎太郎・吉川信幸. パラ科果樹での効率的なウイルス誘導ジーンサイレンシング(VIGS). 平成 23 年日本植物病理学会. 2011 年 3 月 27~29 日. 東京農工大学
- ② 山岸紀子・吉川信幸. リンゴ小球形潜在ウイルスベクターのダイズへの接種部位と全身感染率. 平成 21 年度日本植物病理学会東北部会. 2009 年 9 月 29~30 日. 宮城大学
- ③ 佐々木慎太郎, 山岸紀子, 小森貞男, 磯貝雅道, 吉川信幸. ニホンナシ実生苗でのウイルス誘導ジーンサイレンシング(VIGS). 平成 21 年度日本植物病理学会東北部会. 2009 年 9 月 29~30 日. 宮城大学

- ④ 山岸紀子・石原亜耶・高橋由佳里・田村顕裕・須貝友和・五十嵐亜紀・山形広輔・磯貝雅道・吉川信幸. リンゴ小球形潜在ウイルスベクターを利用した各種草本植物でのウイルス誘導ジーンサイレンシング(VIGS). 平成 21 年度日本植物病理学会大会. 2009 年 3 月 26~28 日. 山形大学

- ⑤ 佐々木慎太郎, 山岸紀子, 山形広輔, 小森貞男, 磯貝雅道, 吉川信幸. リンゴ実生苗でのウイルス誘導ジーンサイレンシング(VIGS). 平成 21 年度日本植物病理学会大会. 2009 年 3 月 26~28 日. 山形大学

[図書] (計 1 件)

- ① Yamagishi, N. and Yoshikawa, N. Virus-induced gene silencing of endogenous genes and promotion of flowering in soybean by apple latent spherical virus-based vectors. pp.43-56 In Soybean-Molecular Aspects of Breeding. A. Sudaric ed. InTech press, 2011.

[産業財産権]

○出願状況 (計 2 件)

名称: リンゴ小球形潜在ウイルスベクターを用いたウリ科植物の内在性遺伝子発現抑制法遺伝子の発現抑制

発明者: 吉川信幸

権利者: 吉川信幸/岩手大学

種類: 特願

番号: 2009-013535

出願年月日: 2009 年 1 月 23 日

国内外の別: 国内

名称: 組換え ALSV によるダイズ内在性遺伝子の発現抑制

発明者: 吉川信幸/山岸紀子

権利者: 吉川信幸/山岸紀子/岩手大学

種類: 特願

番号: 2008-264274

出願年月日: 2008 年 10 月 10 日

国内外の別: 国内

○取得状況 (計 0 件)

6. 研究組織

(1) 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

(2) 研究分担者

無し

(3) 連携研究者

無し