

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 29 年 5 月 15 日現在

機関番号：11301

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2012～2016

課題番号：24248006

研究課題名(和文) ウイルス誘導性ジーンサイレンシングによるファンクショナルゲノミクスの加速化

研究課題名(英文) Acceleration of functional genomics by virus-induced gene silencing

研究代表者

金山 喜則 (Kanayama, Yoshinori)

東北大学・農学研究科・教授

研究者番号：10233868

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 28,100,000円

研究成果の概要(和文)：園芸作物においてゲノム関連情報の集積が進んでいるが、生産への貢献度は必ずしも高くない。その主な理由の1つに、ファンクショナルゲノミクスの手法が、多様な種を含む園芸の分野において確立していないことが上げられる。そこで、園芸作物へのウイルス誘導性ジーンサイレンシングの適用によって、有用遺伝子の機能の同定を加速化することを本研究の目的とした。本研究では、制御対象となる遺伝子の生理学的役割と園芸学上の有用性の解析を行った。また、多様な園芸作物に適用可能なウイルスベクターの開発を行うとともに、宿主範囲が広く、高い汎用性が期待できるキュウリモザイクウイルスの感染機構の検討も行った。

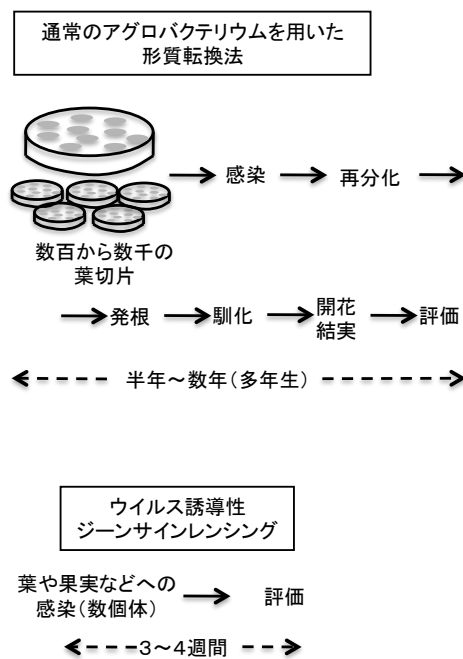
研究成果の概要(英文)：Accumulation of genome-related information is advanced in horticultural crops; however, its contribution to horticultural production is not necessarily high. One of the main reasons is that the functional genomics method to prove the function of a gene has not been established in the field of horticulture including various species. Therefore, the purpose of this study was to accelerate the identification of the function of useful genes by applying virus-induced gene silencing to horticultural crops. In this study, we analyzed the physiological role and horticultural importance of genes to be controlled in fruit trees, vegetables, and flowers. In addition, we tried to develop viral vectors applicable to various horticultural crops, and to examine the mechanism of infection related to the use of cucumber mosaic virus with potentially general versatility because of wide host range.

研究分野：園芸学

キーワード：サイレンシング 園芸作物 果樹 野菜 花き

1. 研究開始当初の背景

ウイルス誘導性ジーンサイレンシング (VIGS) に関する論文の多くが、本研究開始当初から過去5~6年の間に発表されていることから、VIGSは比較的新しい研究分野であったと言える。VIGSが主に植物病理学の分野で研究されてきた経緯から、これらの過去の知見の多くはタバコを用いた病害抵抗性に関する研究に関するものであった。タバコ以外の園芸作物を用いた論文もいくつかみられたが、いずれも植物病理関係の研究例が多く、園芸学上の主題である品質等に関わる成果は少ないのが研究開始当初の現状であった。



第1図 通常の形質転換に対するウイルス誘導性ジーンサイレンシングの利点

- ★短期間で成果が得られる!
- ★多数の培養個体の作成不要→数個体への接種でOK!
- ★幅広い種、品種・系統に適用可能!
- ★熟練が必要な培養技術が不要!
- ★任意の時期と部位に適用可能!

研究代表者・分担者はこれまで、園芸生産に関わる生理学的研究、遺伝学的研究に分子生物学的手法を取り入れることによって一定の成果を上げてきた。また、日本の園芸学全体としても、ゲノム関連情報と生理学的情報の蓄積において国際的に高いレベルにあった。しかし、多様な園芸作物における遺伝子機能の証明の手段が脆弱であるため、精度の高い情報を提供できず、蓄積された研究成果が十分に活かされていないと考えられた。研究代表者らが単離したバラ科果樹の転流糖合成酵素遺伝子については、リンゴ自身の形質転換によってその機能が証明された数少ない研究例である。しかし、そのアグロバ

クテリウムによる形質転換体の作出と解析には多大な労力と年月が費やされており、多様な園芸作物において迅速な成果を上げる手法としては限界がある(第1図)。VIGSは、多様な種を含む園芸作物、あるいは種内でも品種・系統などの遺伝的多様性が重要な園芸作物における研究の発展のために不可欠な技術であると考え、本研究をおこなった。

2. 研究の目的

本研究の特色は、これまでのゲノム関連研究や生理学的研究の成果として予想される遺伝子の機能を、VIGSを活用して該当する作物種自身において証明しようとする点と、それによってファンクショナルゲノミクスを加速化しようとする点である。本研究の進展により、園芸学の分野における従来の研究では有用形質との関連性については推測にとどまっていた遺伝子の機能を、迅速に証明することが可能となり、さらには、遺伝子から表現型に到達する逆遺伝学的な手法の発展を促すことから、精密なDNAマーカーの開発にもつながることが期待できる。従来の園芸学の分野における遺伝子機能の証明の多くは、異なる種であるモデル実験植物への導入において表現型が現れる場合にのみ成立してきた。しかもこの手法では、異種植物での証明であることから結果の解釈が限定されてしまう。実際、果実や花などの生産に関わる形質を検討するためには、モデル実験植物であるシロイヌナズナやタバコは材料としては脆弱であり、研究の対象となっている作物種自身において機能を証明することが求められている。

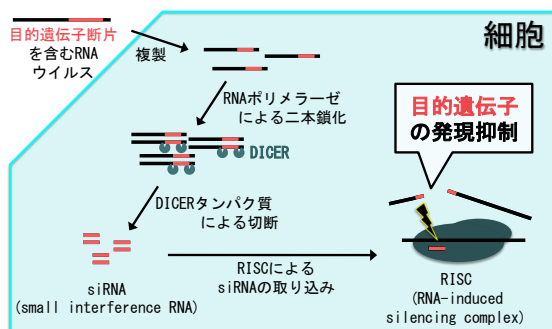
本研究の遂行によって、モデル実験植物を利用することなく、園芸作物自身において、直接、生産にかかわる諸形質と遺伝子との関連性を明らかにすることが可能となる。さらに園芸作物では、種内の品種・系統における遺伝的多様性が重要であるが、煩雑で多大な労力と時間を要するアグロバクテリウムによる形質転換法では、それらの比較検討は難しい。本研究が実施されれば、迅速性と簡便性をもつVIGSによって品種・系統を網羅した遺伝子機能の証明が可能となる。したがって、本研究遂行による波及効果は広く園芸学全体に及び、一定の評価を得ている日本の園芸学のさらなる発展に貢献することが可能である。

このような学術的特色にもとづいて、本研究では、園芸作物へのVIGSの適用によって、有用遺伝子の機能同定を加速化し、蓄積するゲノム関連情報や分子レベルでの情報の有効活用を広く園芸分野において図ることを目的とした。

3. 研究の方法

材料としては、VIGSにおいてよく使用される *Nicotiana benthamiana* を VIGS (第2図) の基本的な評価に使用するとともに、実際の

感染とサイレンシングの前段階としてのウイルスの増殖にも用いた。その他、核果類をはじめとする園芸作物の他に、基礎的な知見を得るためにシロイヌナズナやタバコ (*Nicotiana tabacum*) も用いた。ウイルスとしては *Cucumber mosaic virus (CMV)*、*Apple Latent Spherical Virus (ALSV)* 等を使用した。栽培は基本的には、人工気象器やファイトトロンを用いた制御環境下でおこなった。発現解析には Reverse transcription-PCR 法、タンパク質の解析にはウェスタンブロット法を用いた。



第2図 VIGSの概要

#### 4. 研究成果

園芸作物には果樹、野菜、花きの3つのカテゴリーがあり多様な種を含んでいる。幅広い種を含む園芸作物において、VIGSの対照となり得る生産や品質に関わる遺伝子について解析した。

野菜においては、トマト果実の発育に関わる遺伝子として液胞膜に局在するプロトンピロホスファターゼ遺伝子について解析した。本遺伝子は開花2日後から4日後において発現が高く、果実の初期成長に関与していることが推察された。局在性を調べたところ、種子およびその周辺で mRNA が検出され、果実の初期成長を促進するオーキシンの輸送に関わる重要な遺伝子であることが考えられた。また、トマトには野生種の染色体断片を導入した系統が作成されており、第8染色体に関して、糖度やアミノ酸などの有用成分が増加する導入系統を見出した。糖度の上昇には細胞壁インペルターゼやスクロース合成酵素が関与しており、発現解析や成分分析等の結果から、これらの遺伝子の発現が促進され、果実の発育中期におけるデンプンが増加した結果、成熟期の糖度が増加するというメカニズムが考えられた。また、アミノ酸代謝が糖によって促進されることも確認された。以上のように、果実の初期成長の促進および糖の蓄積において重要な役割をはたすことが考えられ、果実の生産と品質の決定要因としての制御対象遺伝子を示すことができた。

花きにおいては、切り花類の周年栽培による生産をおこなうため、花成制御が最も重要

な課題の1つであると考えられる。主要切り花類の中でキクは短日植物であり、赤色光による暗期中断や明期延長によって花成を遅らせて物日需要に対応している。一方キク以外の切り花類においては、四季咲きまたは長日性の品目が多い。長日性切り花類を秋冬季に開花させる場合、夜間の電照による長日処理が必要となる。長日処理の光源としては従来白熱電球が使用されてきたが、地球温暖化防止の観点から、省電力で長寿命な発光ダイオード (LED) の使用が求められている。しかし、LED は単色光を放射し、幅広い波長の光を放射する白熱電球とは異なることから、電照栽培への活用に当たっては光の色すなわち光質が花成に及ぼす影響を十分に理解する必要がある。長日性であるモデル実験植物のシロイヌナズナの花成は、遠赤色光と青色光によって促進されるが、短日植物において長日効果を示す赤色光では促進されないことが知られている。そこで、このモデル実験植物の性質が多様な切り花類に当てはまるかどうかについての知見を得るとともに、関連する分子機構を明らかにすることによって花成をコントロールしやすい品種開発に資する知見を得るために、数種の長日性切り花類を用いて LED による長日処理の影響を調べた。その結果、モデル実験植物と同様に遠赤色光と青色光によって花成が促進される種他に、主に遠赤色光のみによって花成が促進される種や、青色光、赤色光、遠赤色光のすべてで花成が促進される種も存在することが明らかとなった。その中で、種内で光質と花成の関係に変異がみられた種において、花成関連遺伝子の解析をおこなったところ、主要遺伝子のプロモーター領域に大きな変異がみられたことから、その遺伝子の発現が光質の花成応答の違いを生じる原因であり、光質と花成の関係において制御対象遺伝子であることが示唆された。

果樹においては、環境変動に対応して安定した生産をおこなう必要がある。モデル実験植物で種々の環境ストレス耐性遺伝子が明らかになっているが、果樹では研究が遅れている。低温耐性には適合溶質となり得る可溶性炭水化物の蓄積や、低温耐性関連タンパク質の蓄積が必要である。そこで、数種果樹においてこれらの物質の蓄積や関連遺伝子の発現と低温との関係を調べたところ、オリゴ糖の蓄積や、種々の環境ストレス耐性に関わるとされている LEA タンパク質の1つの発現が、制御対象遺伝子として有力であることが明らかとなった。

果樹における実際の VIGS の検証については、ALSV の例を上げる。アンズおよびウメにおいて、フィトエン不飽和化酵素遺伝子の部分配列をアンズから単離して ALSV ベクターに挿入し、アグロバクテリウムを介して *N. benthamiana* で増殖させた。増殖させたウイルスをアンズおよびウメに感染させたところ、アンズにおいて VIGS に由来する表現型

が認められた。さらに数種の核果類に範囲を広げて検討したところ、甘果オウトウおよびアーモンドにおいても VIGS に由来する表現型が認められた。以上に実験結果から、VIGS の汎用性を高めることができた。一方では、同じ核果類でも種あるいは品種によってもその効果違いがあることが明らかとなり、VIGS の汎用性の向上にはさらに検討が必要であると考えられた。

幅広い宿主をもつことからベクターとして有望な CMV については、感染機構と関連して抵抗性タンパク質との関係においても新たな知見を得ることができた。また、RNase を過剰発現させたタバコにおいて CMV の増殖が抑制されることも示された。これらの成果については、必ずしもサイレンシングとの関係は明確ではないが、関連する成果としてウイルス耐性作物の作出に寄与するため、園芸学的な意義を有すると考えられる。さらに、他の園芸作物においても VIGS を検討するとともに、既に述べてきたベクターの他にも、汎用性の向上を期待して *Tobacco rattle virus (TRV)* を用いた遺伝子発現の制御についても検討した。

#### 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 28 件)

- ① T. Shibuya, Y. Murakawa, K. Nishidate, M. Nishiyama and Y. Kanayama (2017) Characterization of flowering-related genes and flowering response in relation to blue light in *Gypsophila paniculata*. Horticulture Journal 86: 94-104. doi: 10.2503/hortj.MI-126. 査読有り.
- ② Kawai, T., A. Gono, M. Nitta, N. Yamagishi, N. Yoshikawa and R. Tao (2016) Virus-induced gene silencing in various *Prunus* species with the *Apple latent spherical virus* vector. Scientia Horticulturae 199: 103-113. doi: 10.1016/j.scienta.2015.12.031. 査読有り.
- ③ H. Ikeda, T. Shibuya, S. Imanishi, H. Aso, M. Nishiyama and Y. Kanayama (2016) Dynamic Metabolic Regulation by a Chromosome Segment from a Wild Relative During Fruit Development in a Tomato Introgression Line, IL8-3. Plant and Cell Physiology 57: 1257-1270. doi:10.1093/pcp/pcw075. 査読有り.
- ④ T. Sugawara, E. A. Trifonova, A. V. Kochetov and Y. Kanayama (2016) Expression of an extracellular ribonuclease gene increases resistance to *Cucumber mosaic virus* in tobacco. BMC Plant Biology 16: 928. doi: 10.1186/s12870-016-0928-8. 査読有り.
- ⑤ Kawai, T., A. Gono, M. Nitta, M. Kaido, N. Yamagishi, N. Yoshikawa and R. Tao (2014) Virus-induced gene silencing in apricot (*Prunus armeniaca* L.) and Japanese apricot (*P. mume* Siebold & Zucc.) with the *Apple Latent Spherical Virus* vector system. Journal of the Japanese Society for Horticultural Science 83: 23-31. doi: 10.2503/jjshs1.CH-091. 査読有り.
- ⑥ Y. Kanayama, R. Mizutani, S. Yaguchi, A. Hojo, H. Ikeda, M. Nishiyama and K. Kanahama (2014) Characterization of an uncharacterized aldo-keto reductase gene from peach and its role in abiotic stress tolerance. Phytochemistry 104: 30-36. doi: 10.1016/j.phytochem.2014.04.008. 査読有り.
- ⑦ Y. Sato, S. Ando and H. Takahashi (2014) Role of intron-mediated enhancement on accumulation of an Arabidopsis NB-LRR class R-protein that confers resistance to *Cucumber mosaic virus*. PLoS ONE 9: e99041. doi: 10.1371/journal.pone.0099041. 査読有り.
- ⑧ Takahashi, H., Nakaho, K., Ishihara, T., Ando, S., Wada, T., Kanayama, Y., Asano, S., Yoshida, S., Tsushima, S. and Hyakumachi, M. (2014) Transcriptional profile of tomato roots exhibiting *Bacillus thuringiensis*-induced resistance to *Ralstonia solanacearum*. Plant Cell Reports 33: 99-110. doi: 10.1007/s00299-013-1515-1. 査読有り.

[学会発表] (計 123 件)

- ① 高橋拓馬・渋谷知暉・西山学・金山喜則 (2016) トルコギキョウの花成および花成関連遺伝子の発現に及ぼす光質の影響. 園芸学会平成 28 年度春季大会. 東京農大(神奈川県・厚木市). 3月26—27日.
- ② Y. Kanayama (2016) Dynamic Metabolic Regulation by a Chromosome Segment from a Wild Species During Fruit Development in a Tomato Introgression Line. The 10<sup>th</sup> International Conference on Bioinformatics of Genome Regulation and Structure/System Biology. Novosibirsk (Russia). August 29–September 2.
- ③ 渋谷知暉・池田裕樹・西山学・金山喜

則 (2015) トマトの染色体断片置換系統におけるアミノ酸代謝に関する研究. 園芸学会平成 27 年度秋季大会. 徳島大学 (徳島県・徳島市) 9 月 26—27 日.

- ④ Kawai, T., M. Nitta, A. Gonoï and R. Tao (2014) Development of *ALSV*-mediated VIGS in *Prunus* fruit trees 7th Rosaceae Genomics Conference. Seattle (USA). June 24-26.
- ⑤ H. Takahashi, M. Hyakumachi, M. Shimizu, Y. Iwamoto, M. Aino, K. Matsuura, S. Goto, K. Nakano, S. Ando, T. Arie, S. Tsushima and S. Yoshida (2014) Molecular basis for bioinsecticide-activated plant defense system suppressing bacterial wilt diseases caused by *Ralstonia solanacearum*. 13th IUPAC International Congress of Pesticide Chemistry. August 10-14, San Francisco (USA).
- ⑥ 勝又淳司・菅原哲平・E. A. Trifonova・A. V. Kochetov・金山喜則 (2013) 細胞外リボヌクレアーゼを導入したタバコのキュウリモザイクウイルス耐性. 園芸学会平成 25 年度秋季大会. 岩手大学 (岩手県・盛岡市). 9 月 20—22 日.
- ⑦ 河井崇・五ノ井彩子・山岸紀子・吉川信幸・海道真典・田尾龍太郎 (2013) リンゴ小球形潜在. ウイルスベクターを用いたアングスの遺伝子機能評価系の開発. 園芸学会平成 25 年度春季大会. 東京農工大学 (東京都・府中市). 3 月 23 日-24 日.

[図書] (計 2 件)

- ① Y. Kanayama and A. V. Kochetov (2015) Abiotic stress biology in horticultural plants. Springer. 220 ページ.
- ② Ishihara, T, Sato, Y. and Takahashi, H. (2015) Microarray Analysis of R-Gene-Mediated Resistance to Viruses. Plant Virology Protocols Methods in Molecular Biology. Springer. Vol. 1236, pp. 197-218.

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

金山 喜則 (KANAYAMA, Yoshinori)  
東北大学・大学院農学研究科・教授  
研究者番号：10233868

### (2) 研究分担者

高橋 英樹 (TAKAHASHI, Hideki)  
東北大学・大学院農学研究科・教授  
研究者番号：20197164

### (3) 連携研究者

田尾 龍太郎 (TAO, Ryutaro)  
京都大学・大学院農学研究科・教授  
研究者番号：10211997