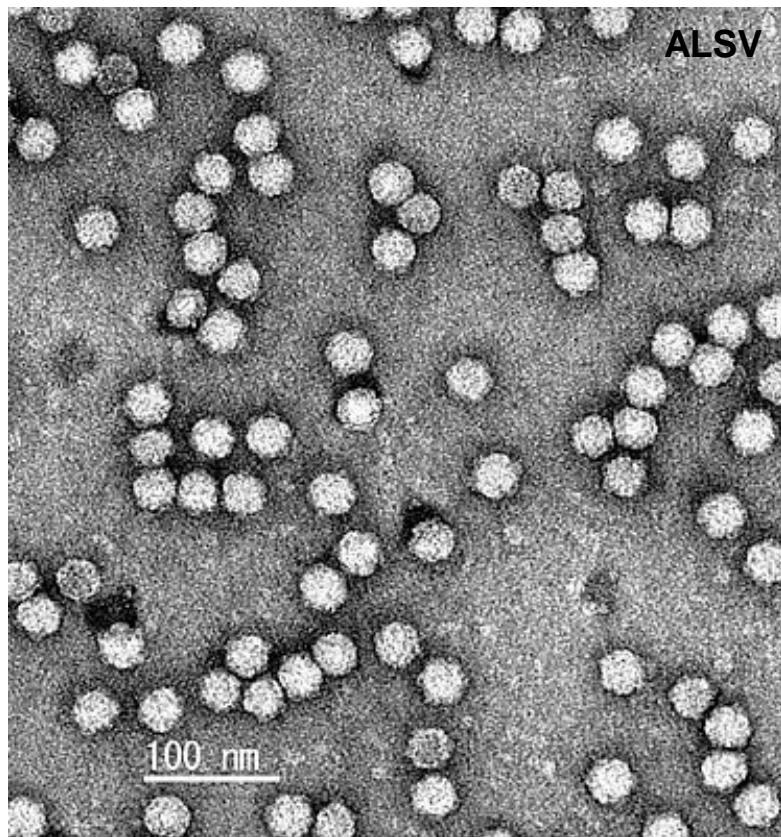


# ウイルスベクターを活用した果樹・花卉類の 開花促進技術



吉川信幸 (岩手大学農学部)

## 本日の話題

1. 農作物の品種改良
2. ウイルスベクターとは
3. 果樹の早期開花技術
4. 果樹・花卉育種への応用

# 1. 農作物の品種改良

## 米の品種改良とブランド化

### 米の品種 一食味ランキング「特A」

- ゆめぴりか（北海道）
- ななつぼし（北海道）
- 青天の霹靂（青森）（2015）**
- あきたこまち（秋田）
- 銀河のしずく（岩手）（2016）**
- 金色の風（岩手）（2017）**
- ひとめぼれ（宮城）
- つや姫（山形）
- コシヒカリ（新潟）（新品種：新之介）
- 元気つくし（福岡）
- 森のくま（岩手）

日本穀物検定協会



銀河のしずく

Ginga no Shizuku

岩手県が本気で開発した  
オリジナル水稻品種（岩  
手107号）

外観 香り 味 粘り 硬さ



# イチゴ品種のブランド化

品種 (育種県)

- とちおとめ (栃木県)
- スカイベリー (栃木県)
- アイベリー (愛知県)
- 紅ほっぺ (静岡県)
- あまおう (福岡県)
- さがほのか (佐賀県)



# なぜ品種改良が必要か

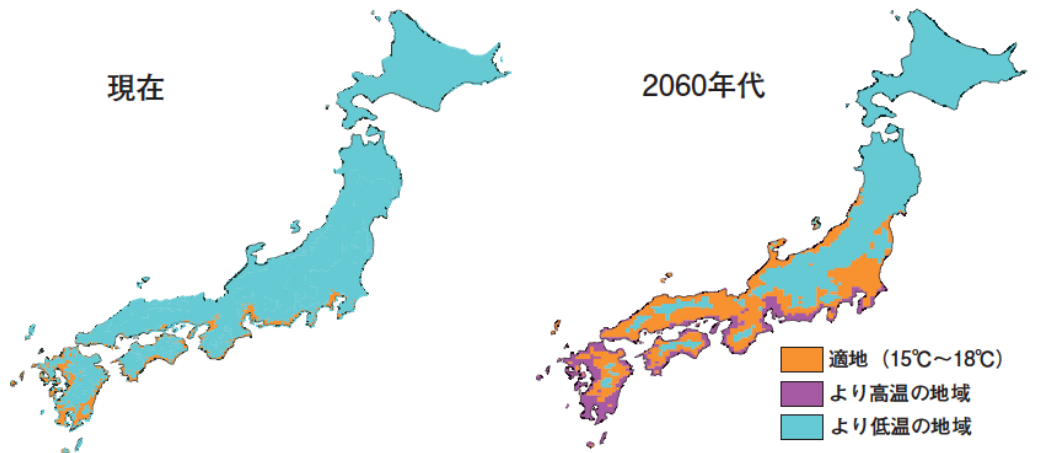
- 【背景】
- 消費者の需要を満たす高品質の品種
  - 温暖化による障害・栽培適地の変化
  - 環境保全型栽培の推進（減農薬・無農薬）

## ●育種目標

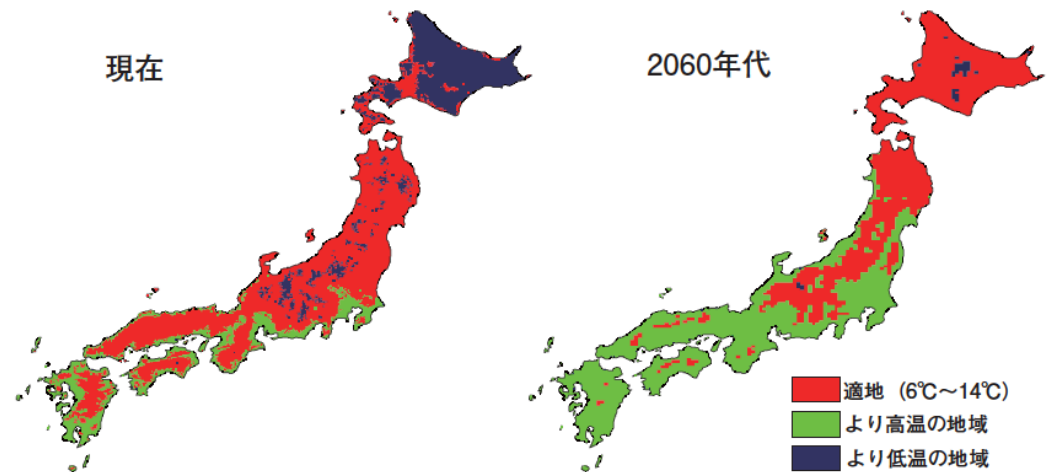
- ・ 成分(食味・栄養価)
- ・ 花色・花型
- ・ 日持ち性
- ・ 環境適応性(温暖化、耐寒性、耐塩性、早晩生)
- ・ 耐病性・耐虫性
- ・ 収量性・耐倒伏性・作業性  
など

農作物の品種育成には一般に10年から数十年の期間が必要

# 温暖化が果樹栽培に及ぼす影響



温暖化によるウンシュウミカン栽培適地の変化



温暖化によるリンゴ栽培適地の変化

杉浦ほか (2009) から引用

## 気温による色づきの違い



杉浦 (2014)

# 農作物の品種改良の歴史

古代

近代

数十年前

現在

自然界からの変異体の選抜

交雑育種

突然変異育種（放射線、化学物質など）

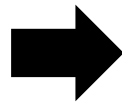
ゲノム情報の解明（ゲノム育種）

遺伝子組換え技術（GM作物）

NBT（ゲノム編集など）



ツルマメ

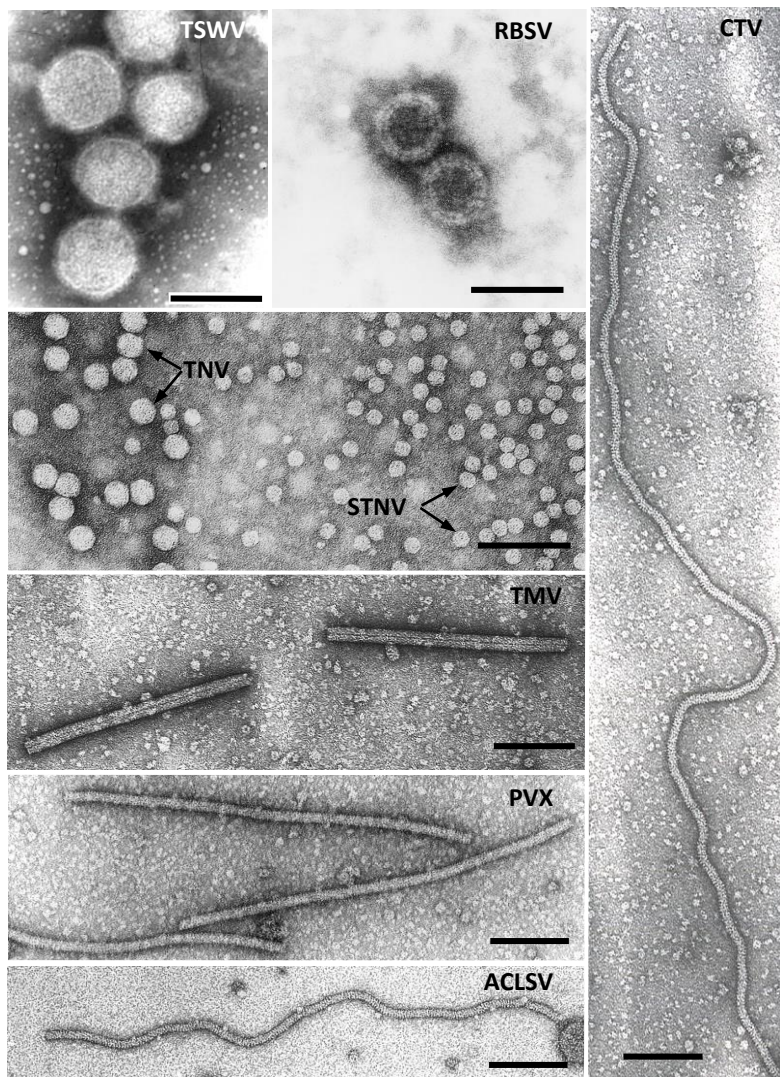


ダイズ



## 2. 植物ウイルスベクターとは

### 植物ウイルスの種類 (世界で約1000種、国内で約350種)

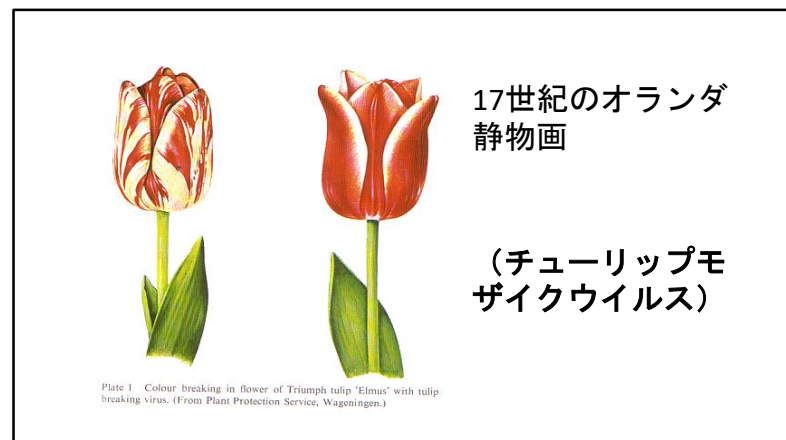


植物ウイルスの形態とサイズ  
(スケールは100nm)



ヒヨドリバナの黄葉  
(ヒヨドリバナ葉脈黄化ウイルス)

この里は継ぎて霜や置く  
夏の野にわが見し草はもみちたり  
けり  
藤原仲麻呂  
752年





# ウイルスベクターとは

○遺伝子の発現あるいは発現抑制のツール

●ウイルスの感染・増殖能を利用

○植物体で目的遺伝子を**発現**

○RNAサイレンシング誘導を利用した標的遺伝子の**抑制**

●利点

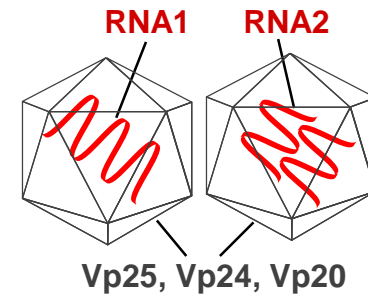
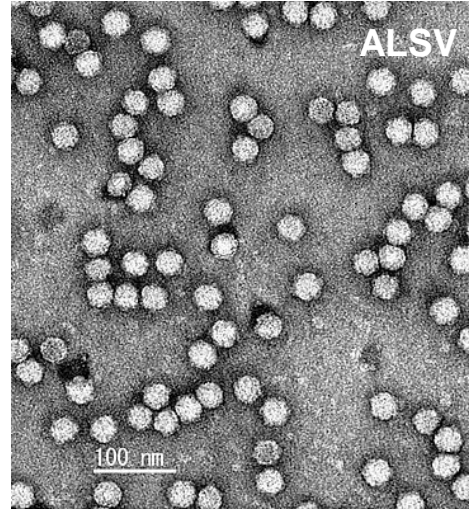
●短期間で遺伝子発現／抑制が可能

●多数の植物種で利用可能（ウイルスの種類に依存）

●植物RNAウイルスは核ゲノムに挿入されない  
（接種個体での一過的な発現）

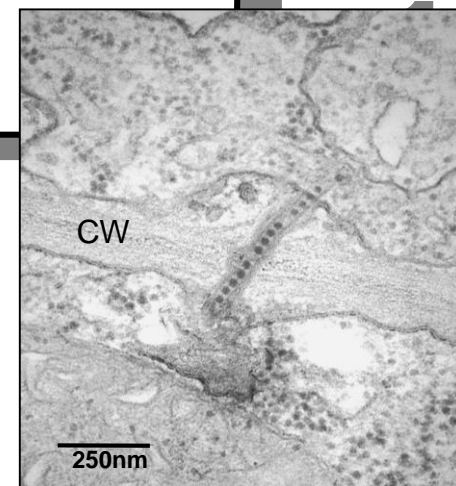
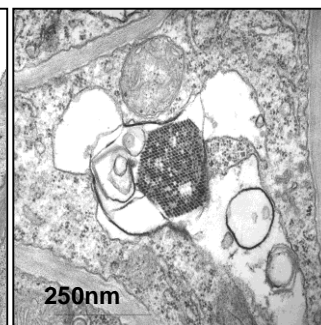
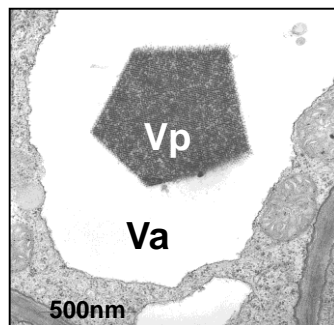
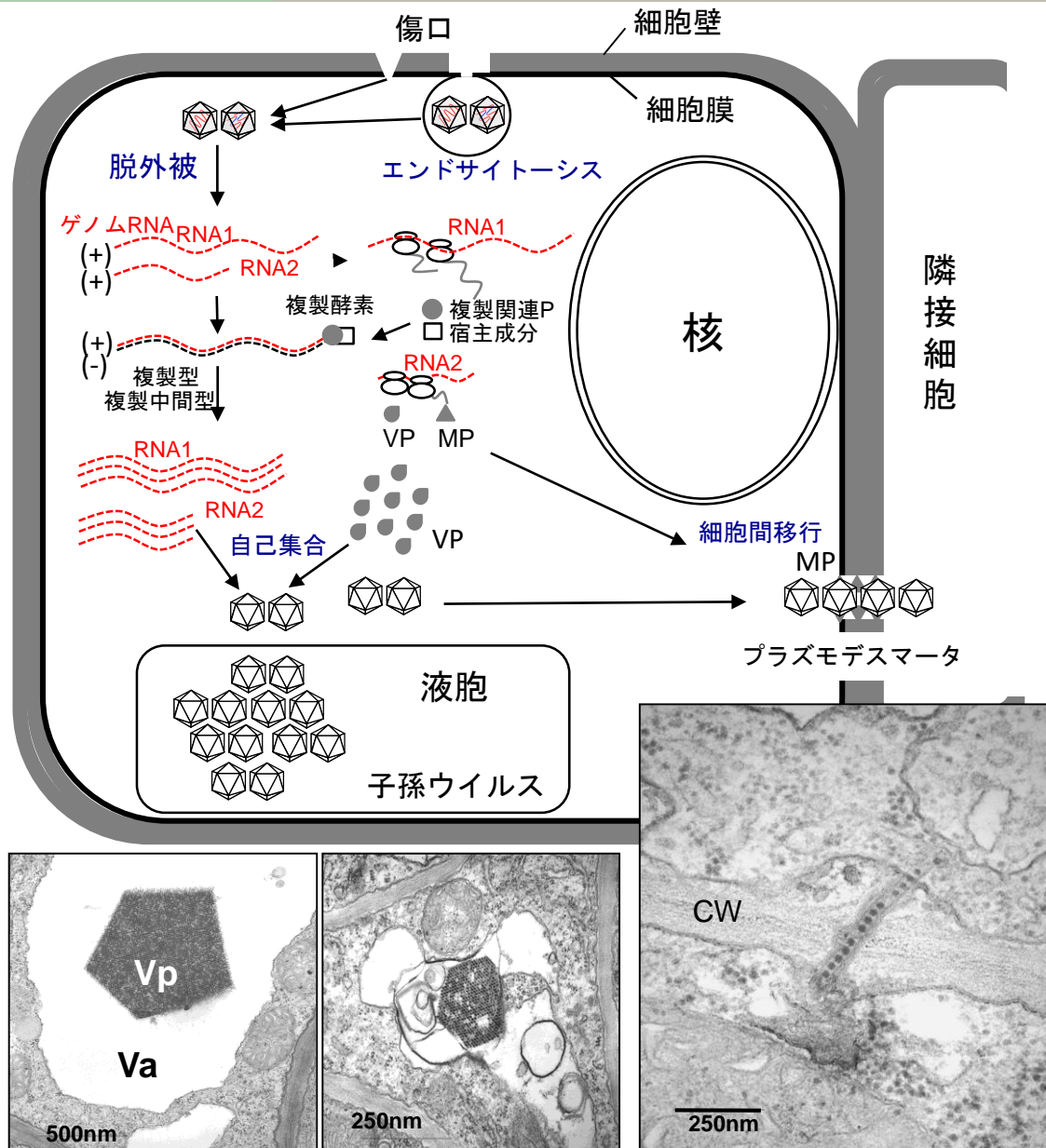
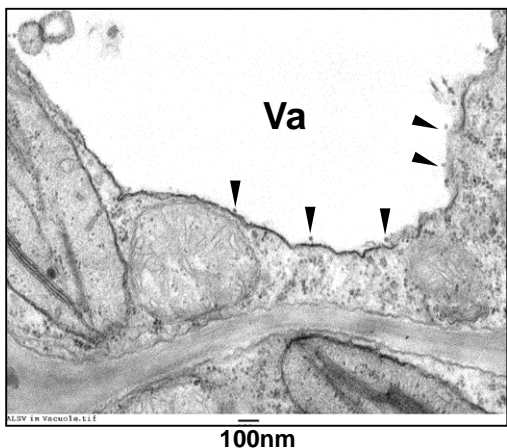
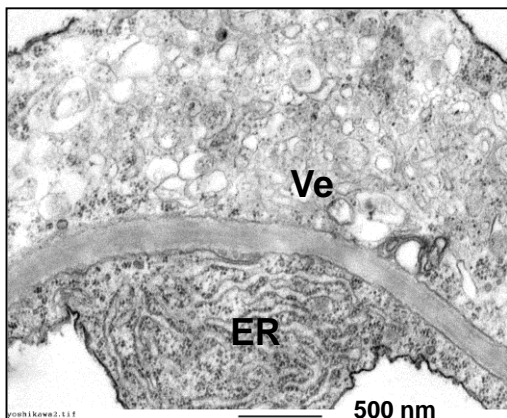
→ 後代個体の大部分にはウイルス（導入遺伝子）は存在しない。

# リンゴ小球形潜在ウイルス (ALSV)

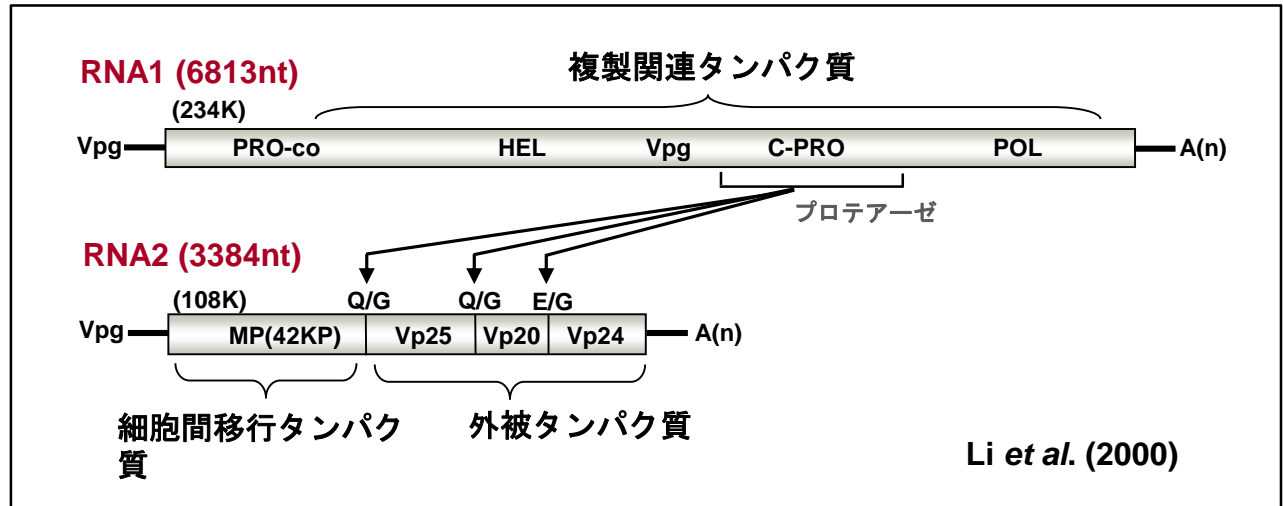
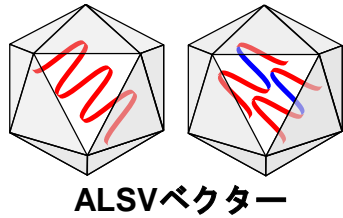


- 一本鎖RNAウイルス
- 潜在感染(無害なウイルス)
- 宿主範囲が広い (自然感染はリンゴ)
  - マメ科、ナス科、ウリ科植物、果樹類 (リンゴ、ナシ、オウトウ、ブドウ、カンキツ類)、花卉類 (リンドウ、カーネーションなど)、樹木 (マツ、スギ) など
- 茎頂分裂組織・葉原基に侵入する
- 果樹 (リンゴ) 園で広がらない (伝染力弱い)
- 日本原産

# ALSVの増殖と移行



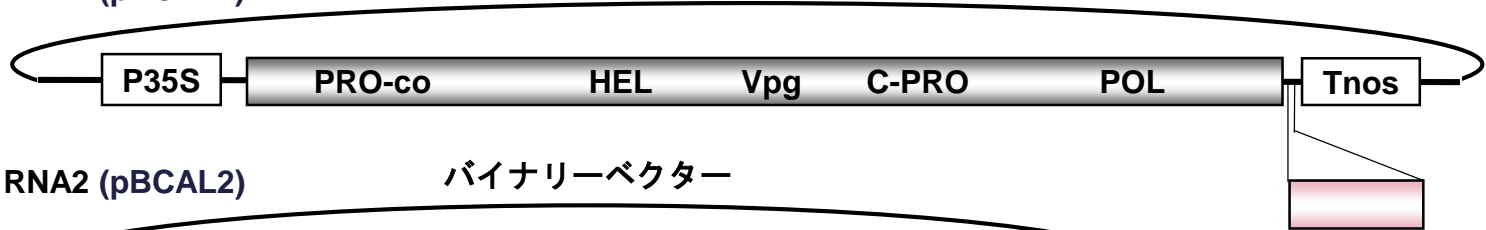
# ALSVベクターの開発



DNAに変換

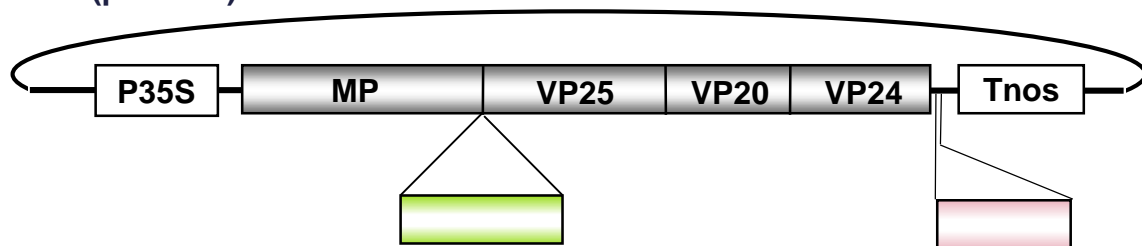
バイナリーベクター

RNA1 (pBCAL1)



RNA2 (pBCAL2)

バイナリーベクター

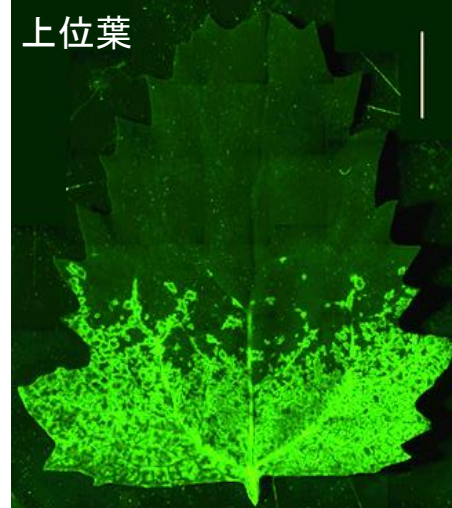
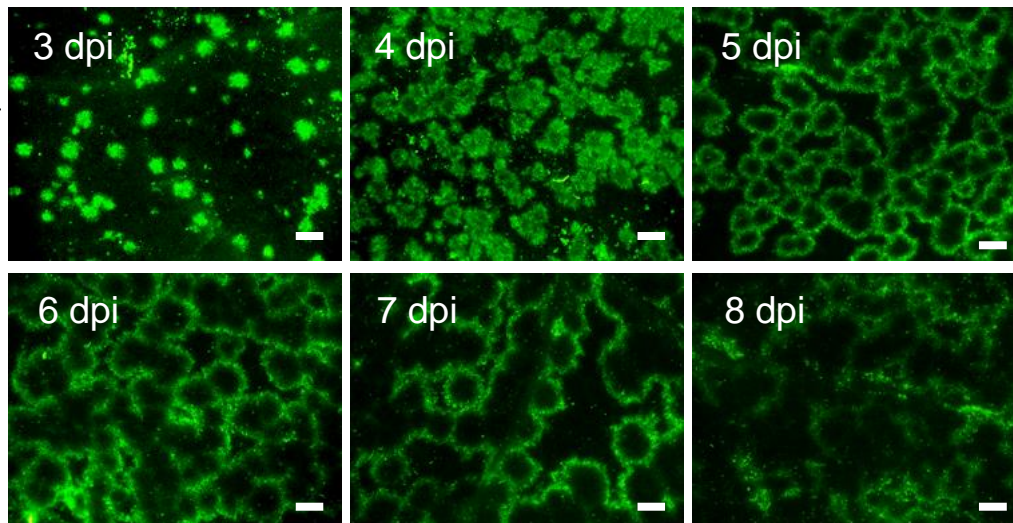


発現したい遺伝子

抑制したい遺伝子

# ALSVベクターによる遺伝子の発現と発現抑制

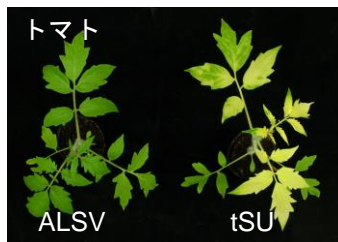
GFPの発現



Bar = 1mm

接種葉

植物内在遺伝子の  
VIGS

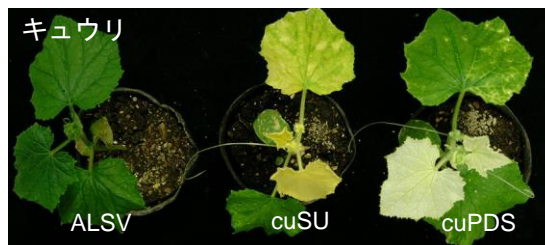


非感染      ALSV-soyPDS



ダイズ種子でのVIGS

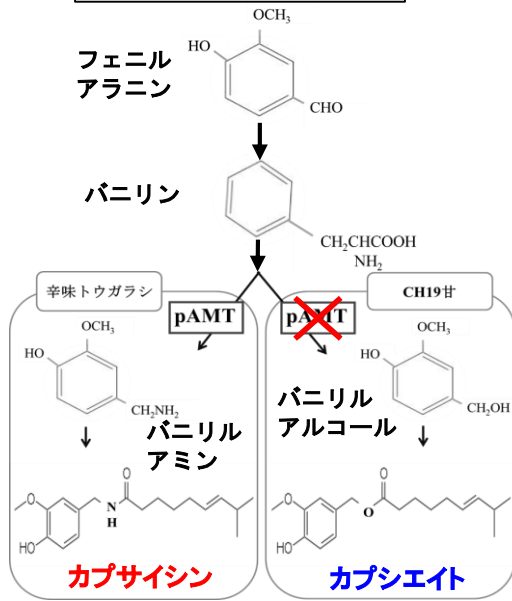
標的遺伝子の発現を  
ノックダウン  
↓  
表現型の変化  
(遺伝子の機能を推定)



# カプサイシン合成遺伝子のウイルス誘導ジーンサイレンシング (VIGS)

## カプサイシン (トウガラシの辛味成分)

- 代謝促進効果
- 脂肪燃焼効果
- 免疫力賦活作用



カプサイシン高含量植物  
(ブートジョロキア、ハバネロ)



ALSVベクター  
(pAMTのVIGS)

辛さ (スコヴィル値)

- ブート・ジョロキア (100万)
- ハバネロ (10-35万)
- 鷹の爪 (4-5万)

カプサイシン合成阻害

カプシエイト (辛さは約1/1000)

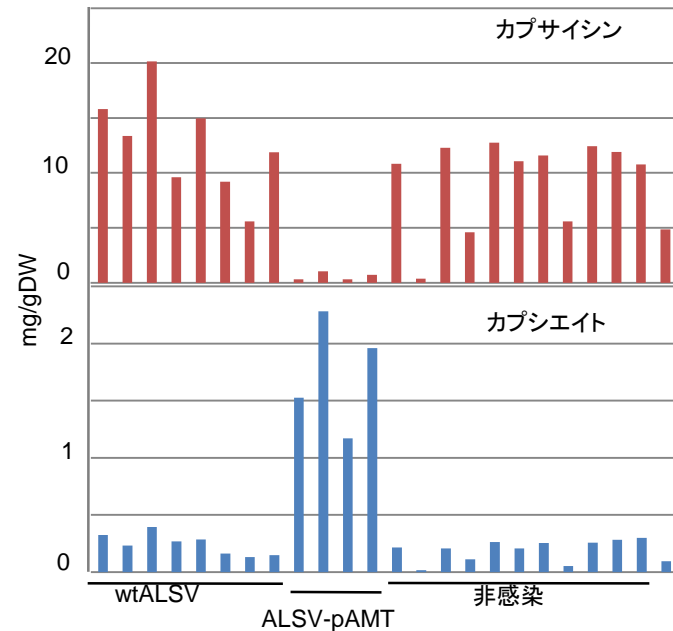


「カプシエイト ナチュラ®」

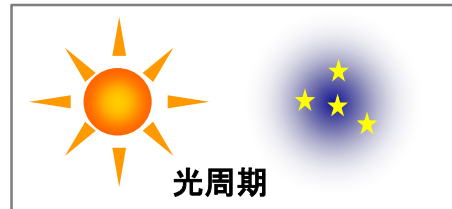


「アミノバイタル® カプシ®」

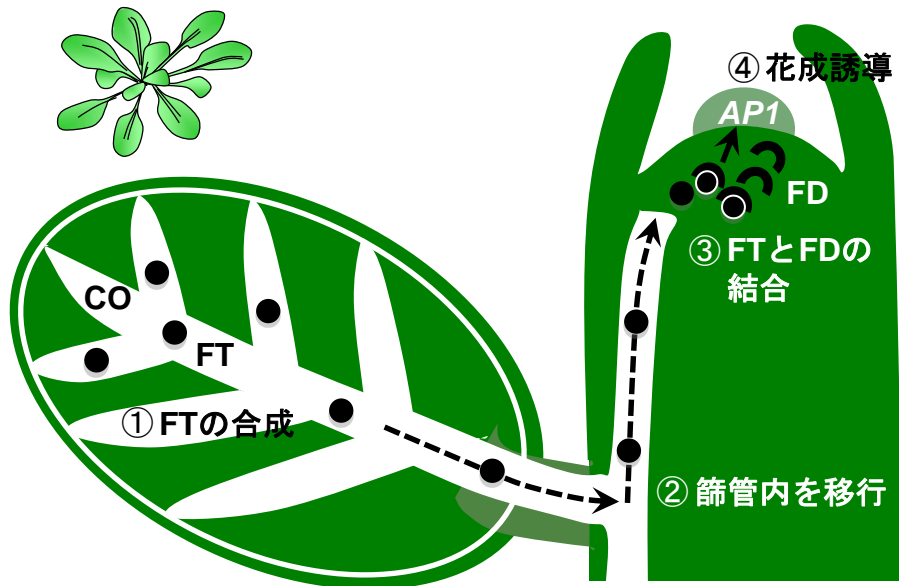
ハバネロでの予備実験



# 植物の開花を誘導するタンパク質



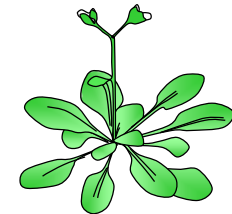
長日条件



‘フロリゲン’  
*Flowering locus T (FT)*

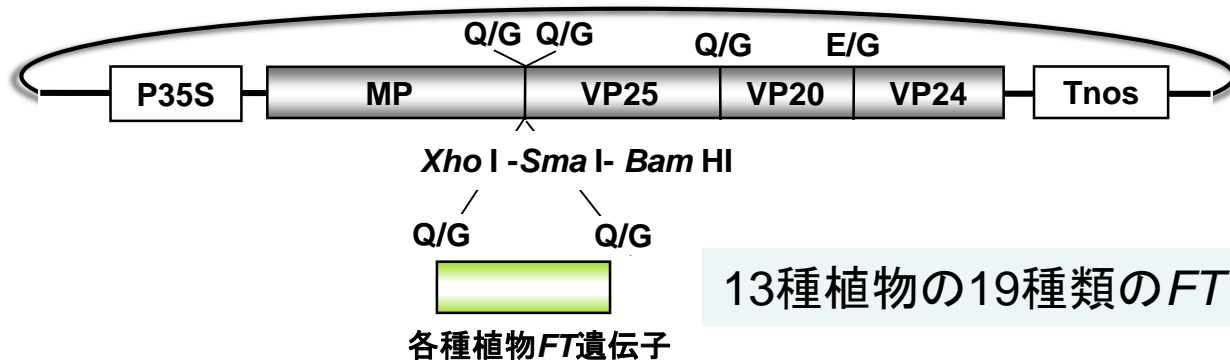
⇔ TFL

開花



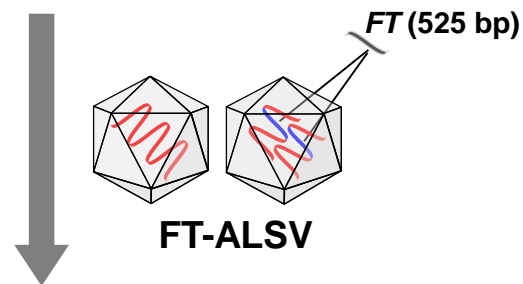
# FT遺伝子を発現するALSV感染による植物の開花促進

## RNA2 (pEALSR2L5R5)



## + RNA1 (pEALSR1)

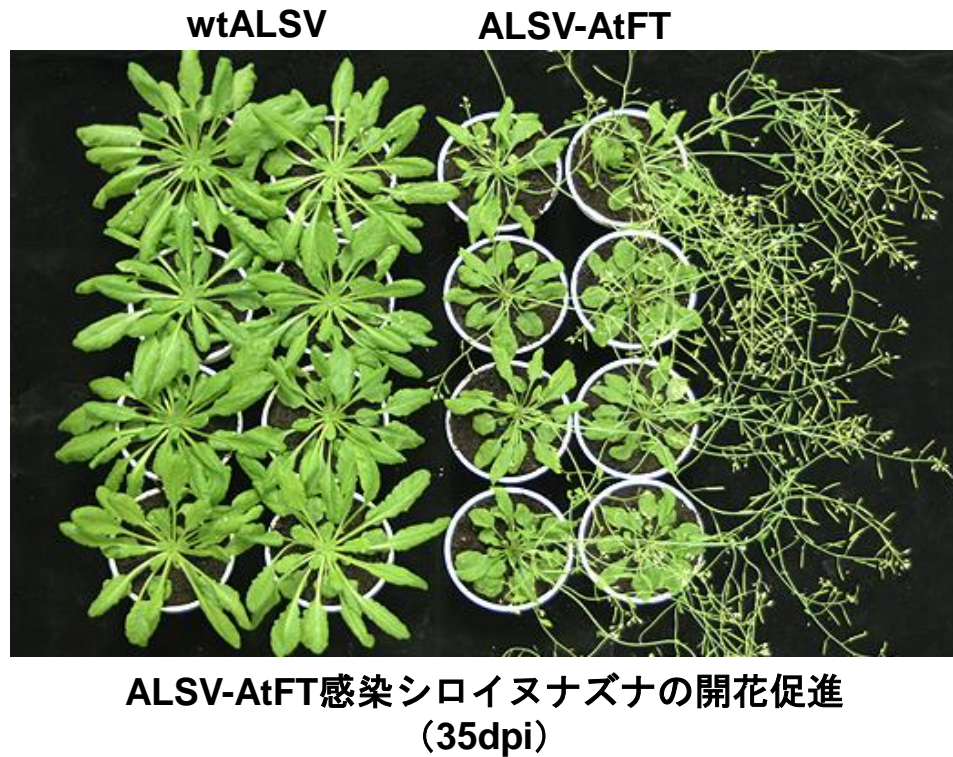
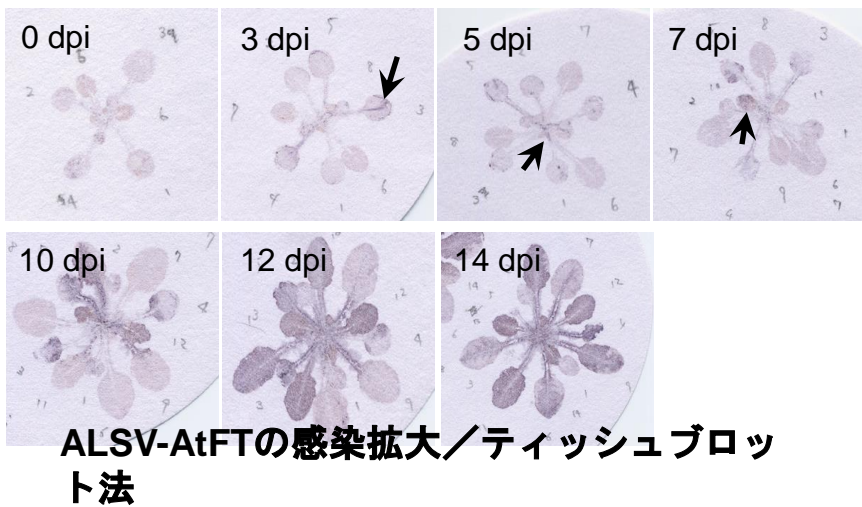
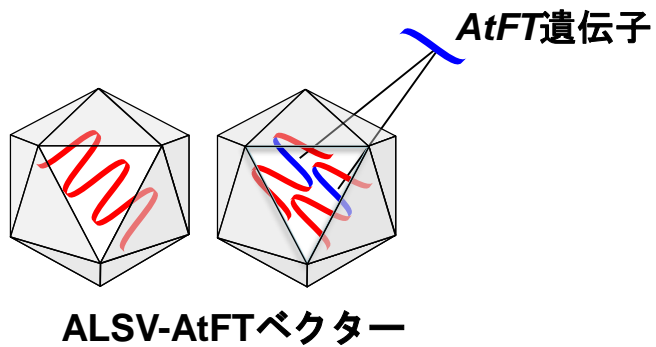
接種



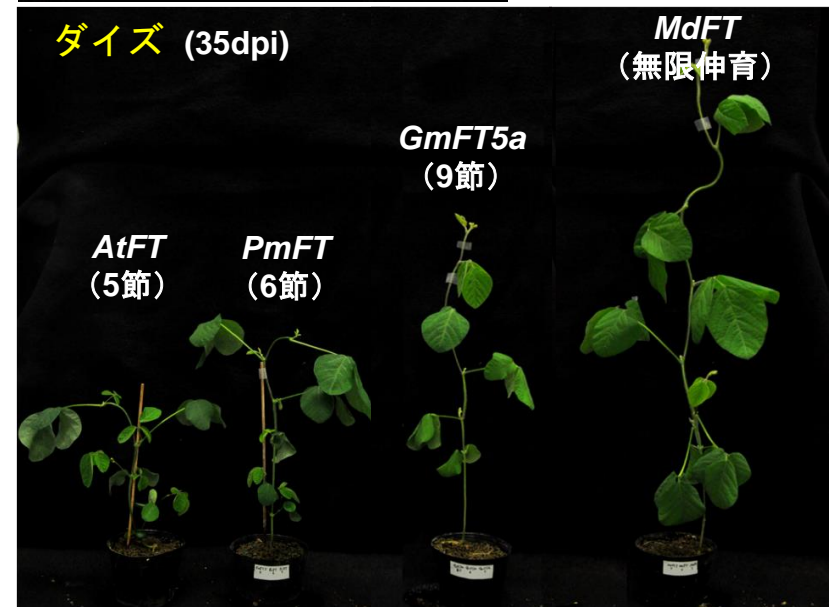
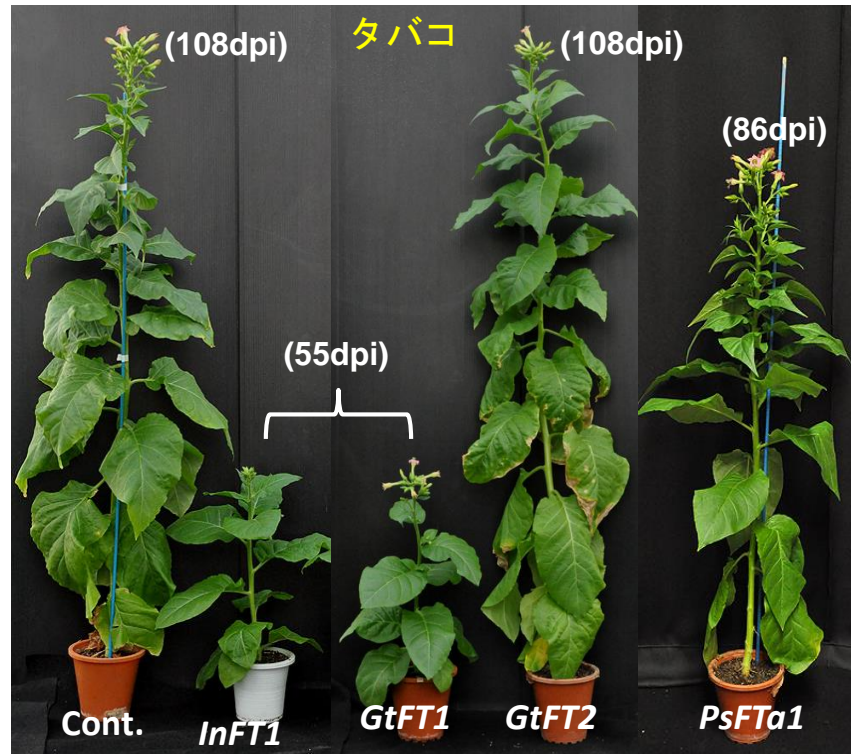
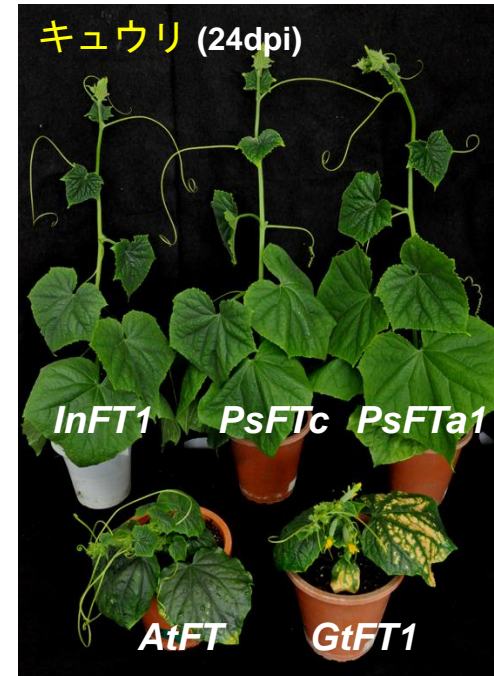
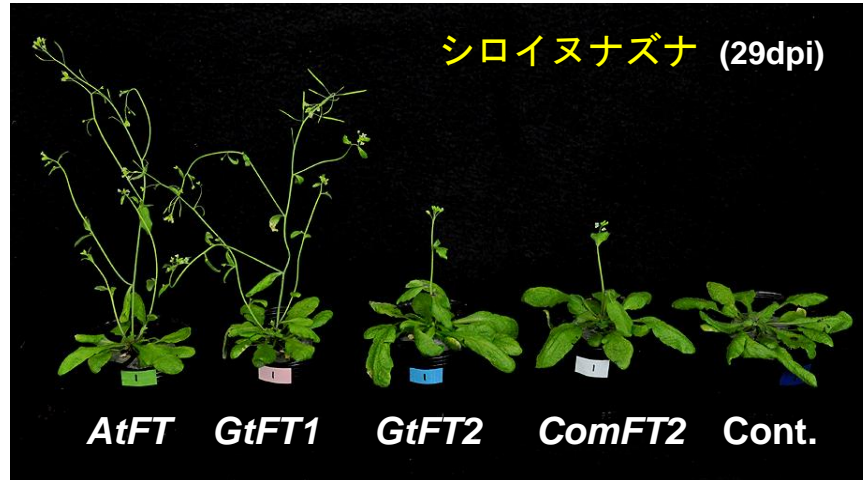
シロイヌナズナ  
タバコ  
キュウリ  
ダイズ

開花促進効果？





# 各種FT遺伝子を発現するALSVベクター感染の開花促進効果



# 各種植物のFT遺伝子を発現するALSVベクター感染による開花促進効果

FT 遺伝子 (植物名)	供試植物			
	シロイヌナズナCol.	タバコ'Xanthi nc'	キュウリ'青大'	ダイズ'デウムスメ'
<b>AtFT</b> (シロイヌナズナ)	<b>H (11-12)</b>	<b>H (9-11)</b>	<b>H</b>	<b>H (5-6)</b>
<i>AtTSF</i> (シロイヌナズナ)	H (10-12)	H (11-13)	-	M (11-13)
<i>CiFT</i> (カンキツ)	M (13-17)	L (20-23)	-	M (7-12)
<i>CsFT</i> (キュウリ)	H (12-14)	H (11-13)	-	M (9-10)
<i>ComFT2</i> (カボチャ)	M (16-17)	- (34-38)	-	M (12-15)
<i>GmFT2a</i> (ダイズ)	M (14-15)	M (14-17)	-	H (6-8)
<i>GmFT5a</i> (ダイズ)	M (16-17)	L (21-25)	-	M (9-11)
<b>GtFT1</b> (リンドウ)	<b>H (11-13)</b>	<b>H (10-15)</b>	<b>H</b>	<b>H (5-6)</b>
<b>GtFT2</b> (リンドウ)	<b>M (15-17)</b>	<b>- (35-37)</b>	<b>-</b>	<b>- (無限伸育)</b>
<i>InFT1</i> (アサガオ)	M (16-18)	H (12-14)	-	M (12-14)
<i>InFT2</i> (アサガオ)	H (11-13)	H (10-12)	-	M (9-10)
<i>LeFT</i> (トマト)	M (16-19)	M (14-16)	H	M (7-11)
<b>MdFT1</b> (リンゴ)	<b>M (19-20)</b>	<b>- (31-35)</b>	<b>-</b>	<b>- (無限伸育)</b>
<i>MdFT2</i> (リンゴ)	M (17-18)	M (16-19)	-	- (無限伸育)
<i>PmFT</i> (ウメ)	M (15-18)	M (12-16)	-	H (5-7)
<i>PsFTa1</i> (エンドウ)	H (12-13)	L (27-30)	-	H (6-6)
<i>PsFTc</i> (エンドウ)	M (15-17)	- (33-36)	-	M (10-11)
<i>PtFT1</i> (ポプラ)	M (17-19)	- (33-35)	-	M (13-14)
<i>VvFT</i> (ブドウ)	H (10-14)	H (8-10)	-	M (7-9)
対象区 (FT無し)	- (26-32)	- (33-38)	-	- (無限伸育)

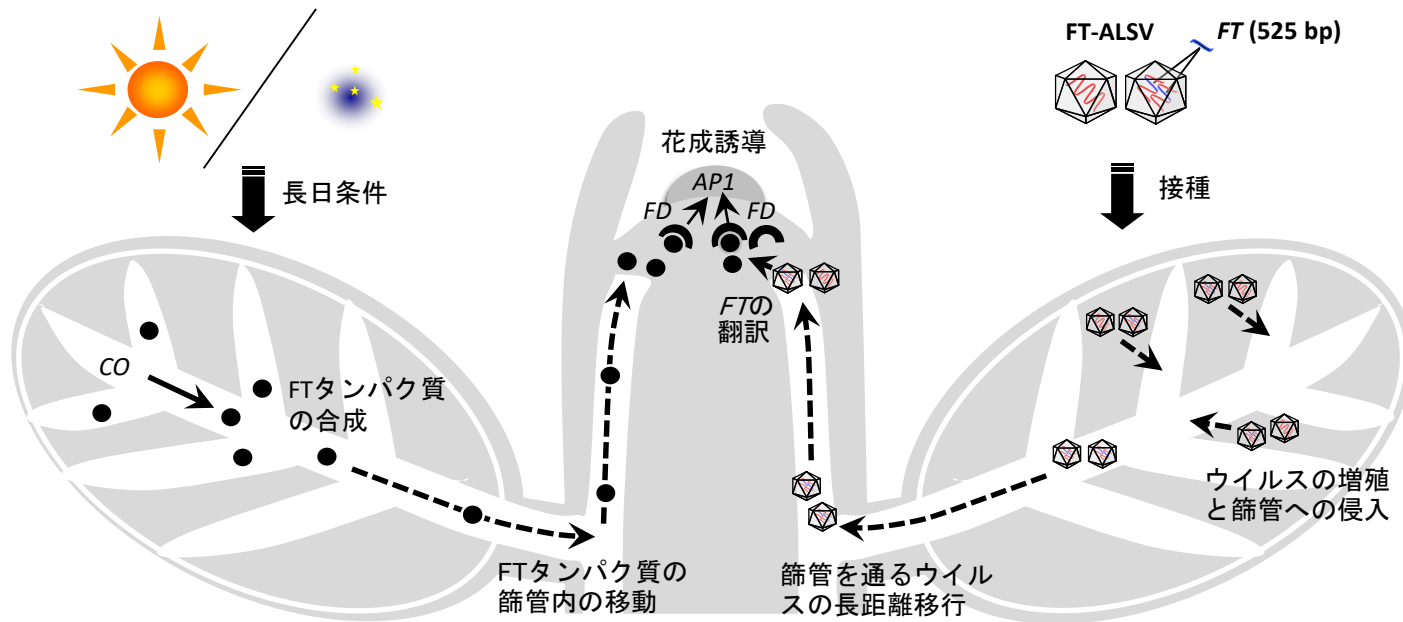
1) H, 強い; M, やや強い; L, 弱い; -, 効果なし。

2) 括弧内の数字は、タバコおよびシロイヌナズナでは花芽形成時の本葉の数、ダイズでは節数である。各植物の1試験区当たり個体数は5~15である。

# ALSVベクターによる開花促進

## 光周期による開花制御

## ALSV-FTベクターによる開花促進



## 光周期による開花制御とALSV-FT-による開花促進機構

(左)葉で日長が受容されると、葉脈の維管束篩部組織で発現したCO遺伝子によりFT遺伝子の発現が誘導される。合成されたFTタンパク質(●)が篩管を通り茎頂分裂組織へ輸送されると転写因子FDタンパク質(◐)と結合し、FDタンパク質を活性化させる。活性化FDタンパク質が花芽形成遺伝子のAP1遺伝子の転写を促進し、花芽形成が開始される。

(右)FTを発現するALSVベクター(FT-ALSV)を宿主植物に接種すると、細胞で増殖したウイルスは篩管に入り、やがて茎頂分裂組織を含む植物体全体に長距離移行し、全身感染する。茎頂分裂組織で増殖するときに翻訳されたFTタンパク質が花成を誘導する。

### 3. 果樹の早期開花技術

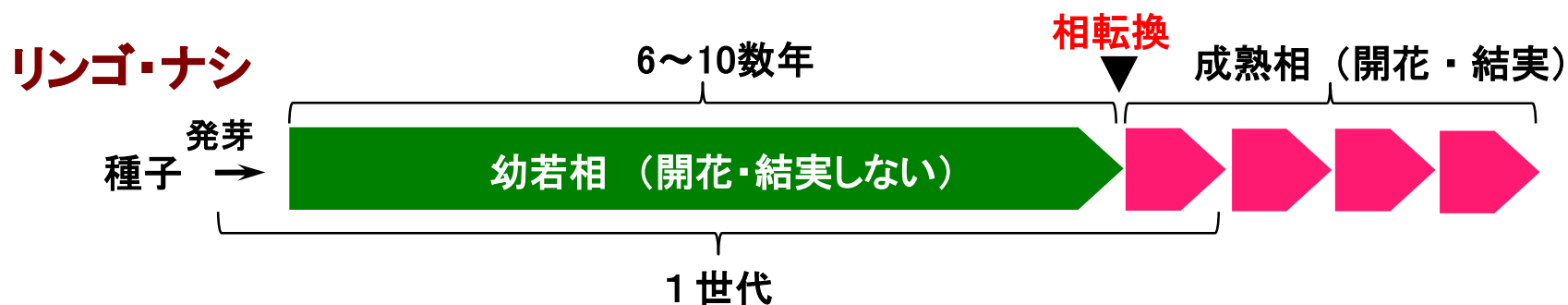
## 「桃栗三年、柿八年」

実生苗木が結実を開始するまでの期間

○モモ、クリ 3年

○ウメ、アンズ、スモモ、ブドウ 3～4年

○リンゴ、ナシ、カキ、ミカン 6～10数年



果樹の品種改良や遺伝解析の障壁

# 果樹の品種育成には一般に10数年から数十年かかる

## リンゴ品種 ‘ふじ’ (生産量 世界一)



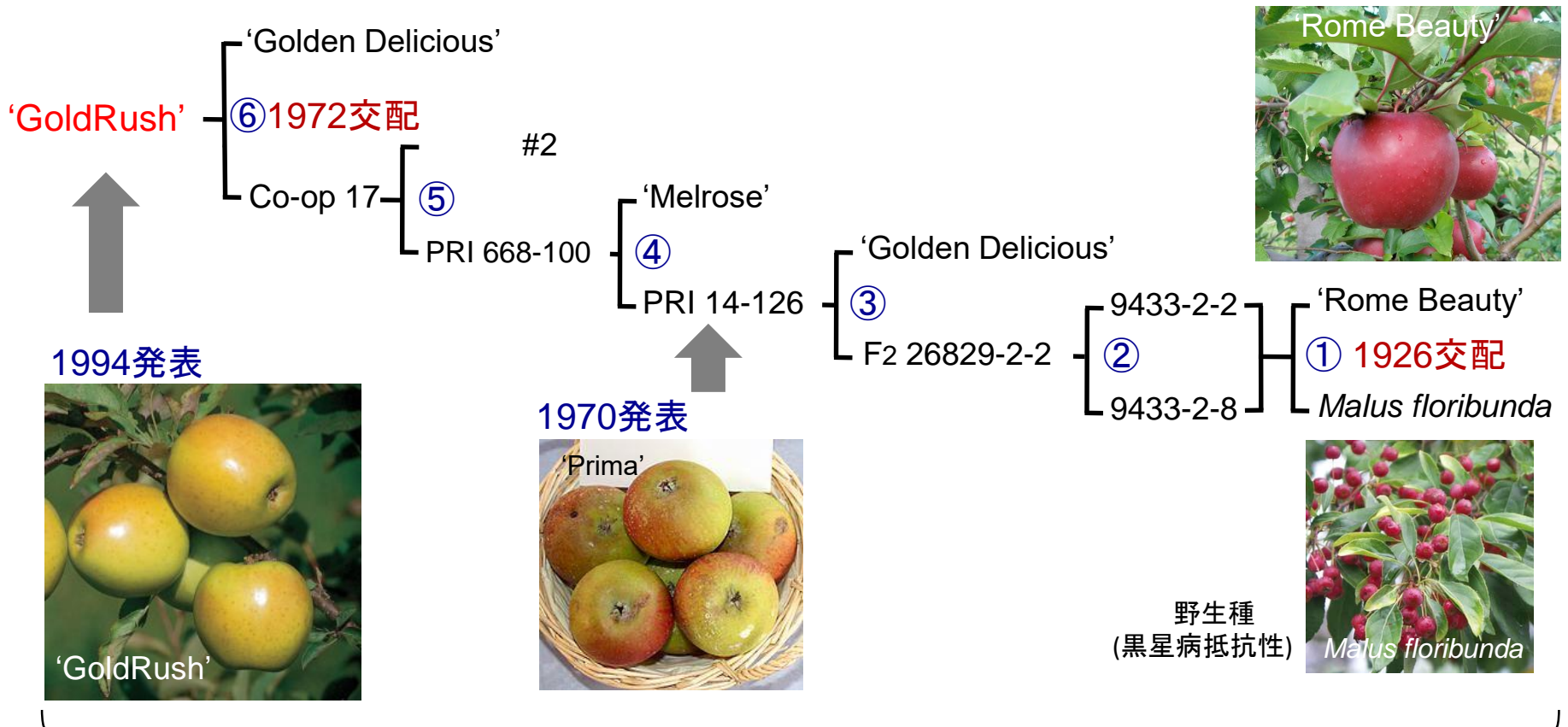
‘ふじ’ 原木

果樹研究所 (盛岡市)

- 1939年 交配  
( ‘国光’ × ‘デリシャス’ )
- ↓
- 1951年 初結実
- ↓
- 1962年 品種登録



# 黒星病抵抗性リンゴ品種の育成 (米国での実施例)



7世代 68年



○ 1 世代を 1 年以内の短縮できれば、育種が飛躍的に進展

# リンゴ実生苗での各種FTの開花促進効果

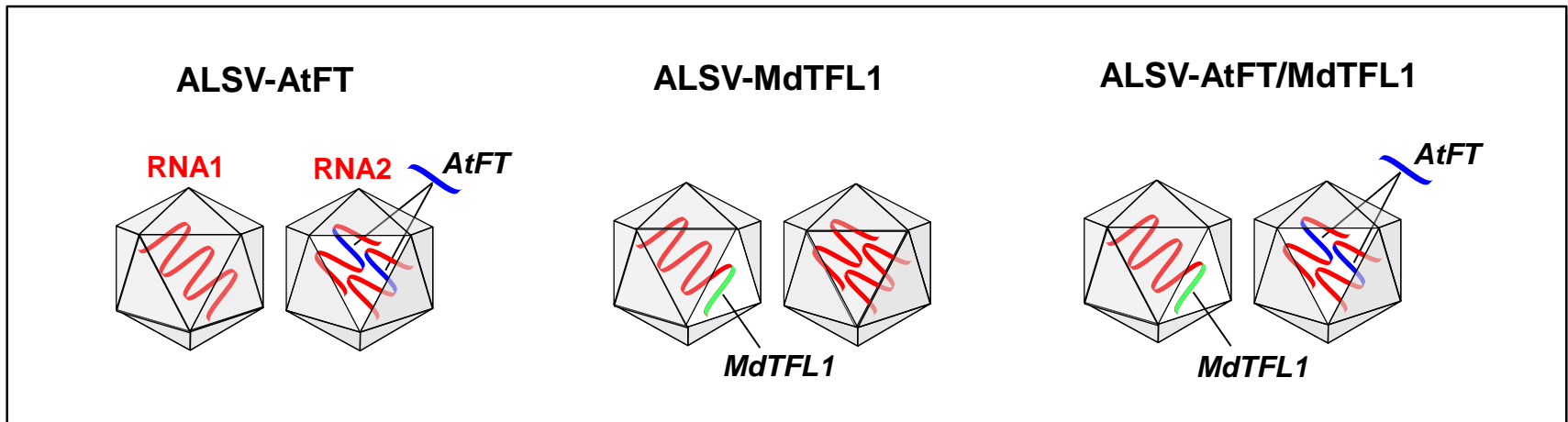
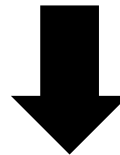
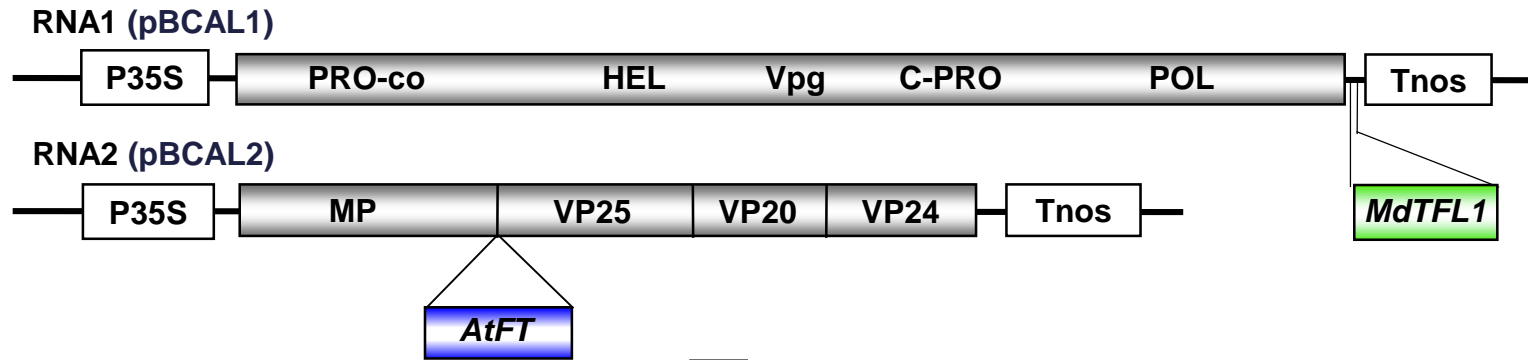
FT 遺伝子(植物名)	リンゴ実生開花率 (%)
<i>AtFT</i> (シロイヌナズナ)	31
<i>AtTSF</i> (シロイヌナズナ)	30
<i>CiFT</i> (カンキツ)	0
<i>CsFT</i> (キュウリ)	0
<i>ComFT2</i> (カボチャ)	0
<i>GmFT2a</i> (ダイズ)	33
<i>GmFT5a</i> (ダイズ)	0
<i>GtFT1</i> (リンドウ)	12.5
<i>GtFT2</i> (リンドウ)	0
<i>InFT1</i> (アサガオ)	0
<i>InFT2</i> (アサガオ)	0
<i>LeFT</i> (トマト)	0
<i>MdFT1</i> (リンゴ)	0
<i>MdFT2</i> (リンゴ)	0
<i>PmFT</i> (ウメ)	0
<i>PsFTa1</i> (エンドウ)	0
<i>PsFTc</i> (エンドウ)	0
<i>PtFT1</i> (ポプラ)	0
<i>VvFT</i> (ブドウ)	0
対象区 (FT無し)	0



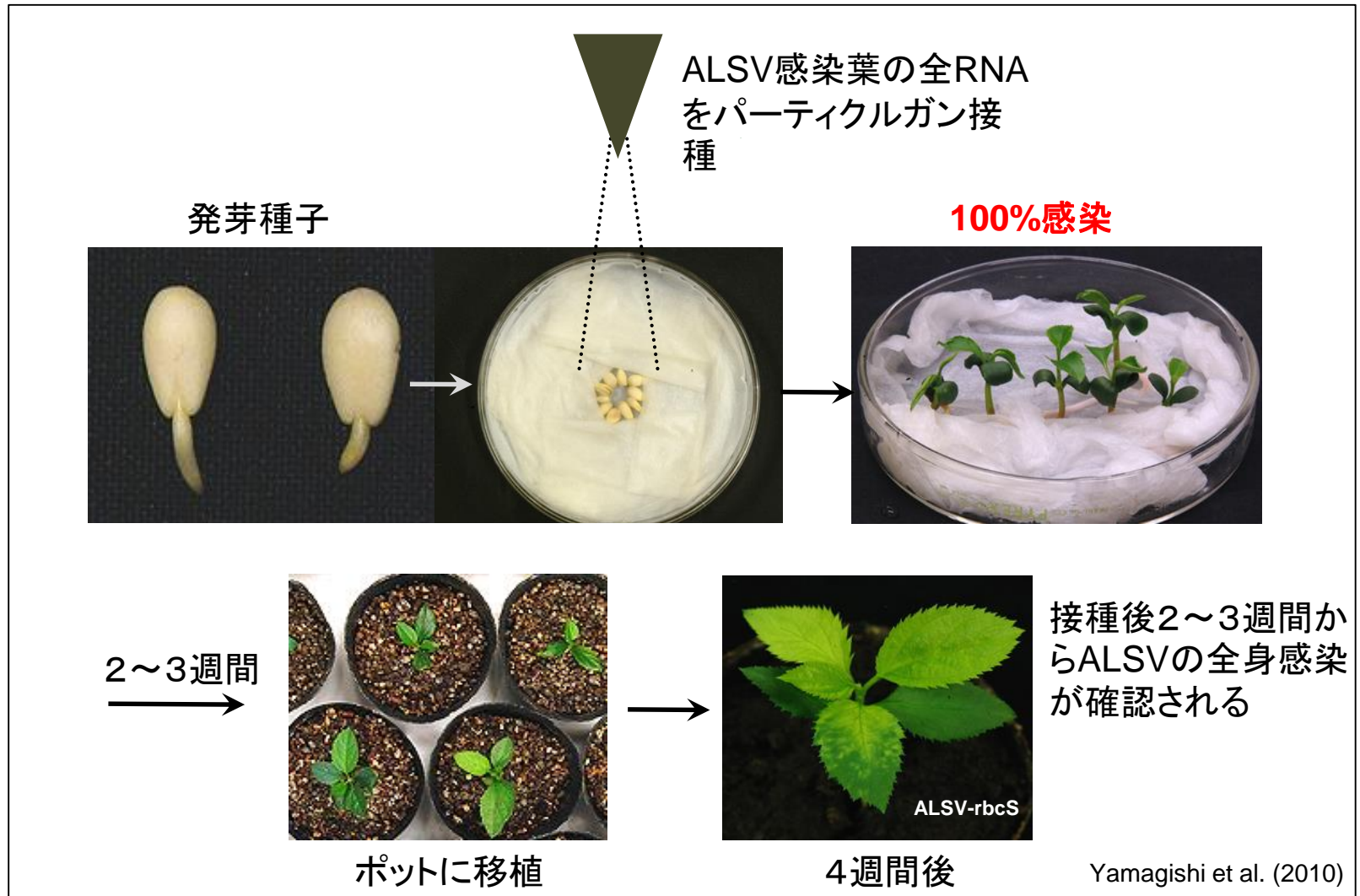
ALSV-*AtFT*接種後2ヶ月



# リンゴの早期開花を誘導するALSVベクターの作製

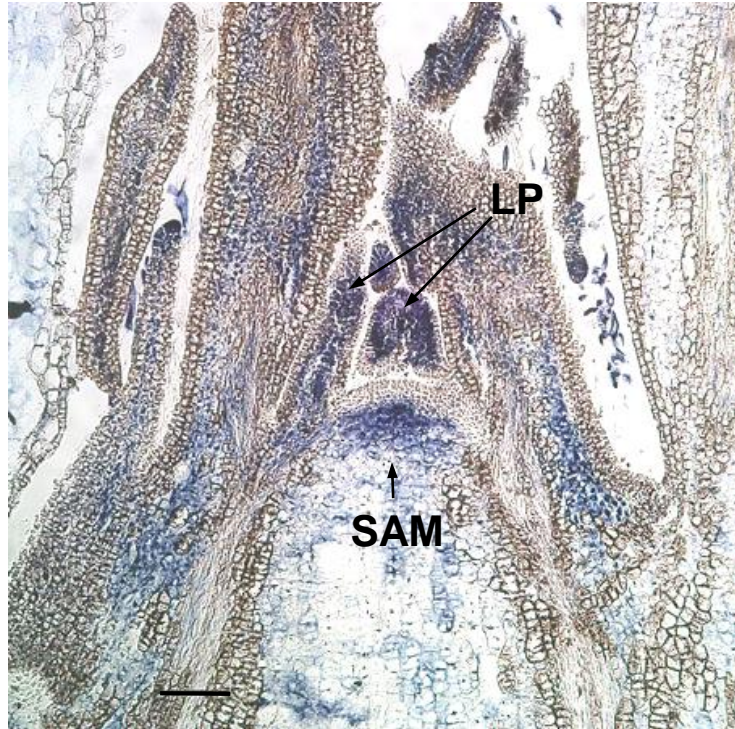


# ALSV ベクターのリンゴ実生苗への感染

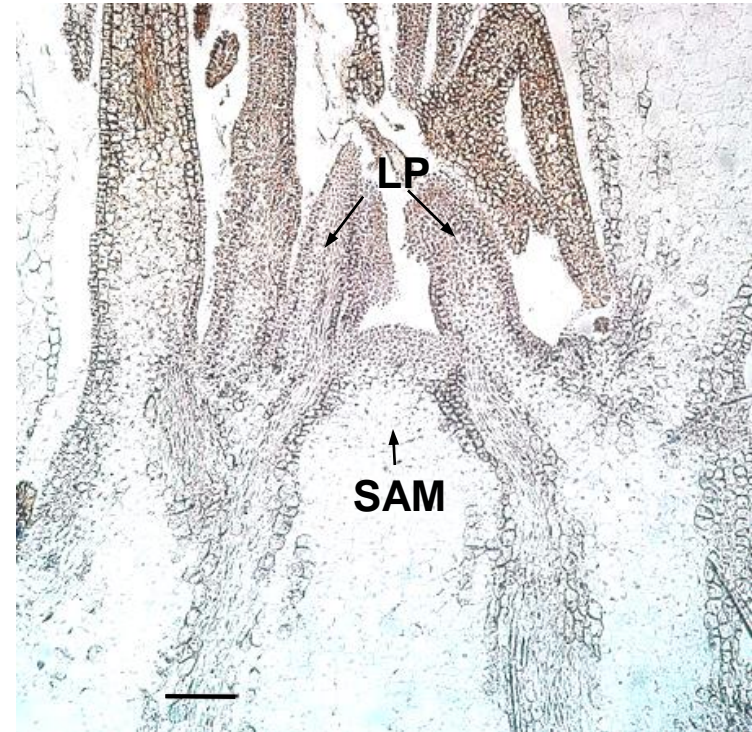


# リンゴ茎頂分裂組織でのALSVの分布

感染リンゴ実生



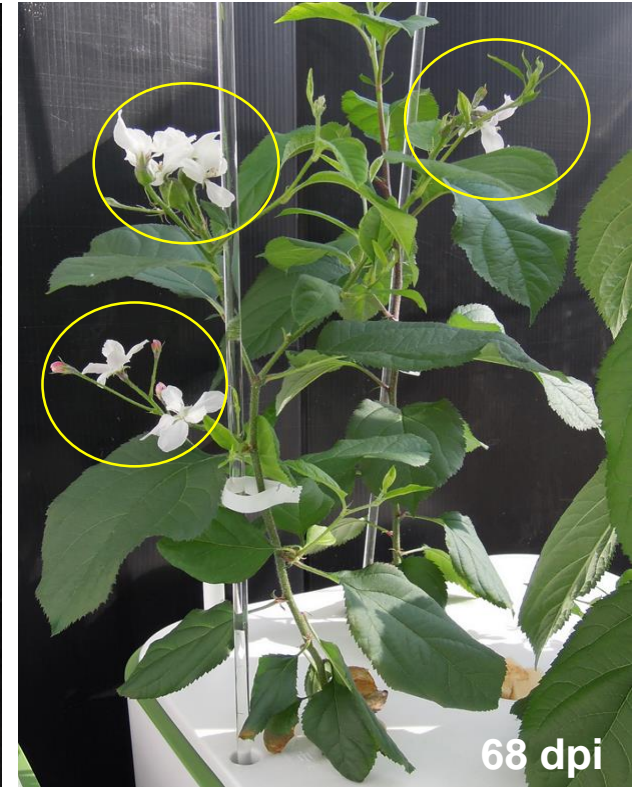
健全リンゴ実生



*In situ* ハイブリダイゼーション

Yamagishi et al. (2011)

# ALSV-AtFT/MdTFL1感染によるリンゴ実生の開花促進効果



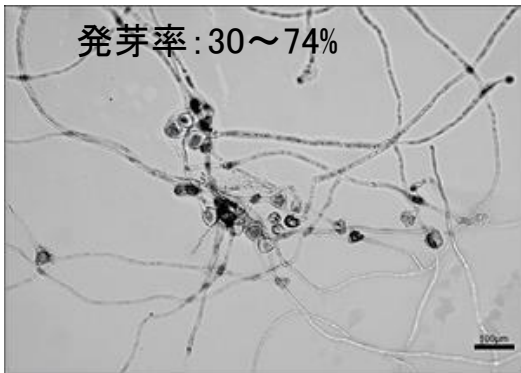
dpi: 接種後日数

# 3種ALSVベクター感染リンゴの花芽形成の特徴

ALSV ベクター	早期 開花率	開花時の 本葉数	花数/個体	特徴
ALSV-AtFT	約30%	7-9	1-2	開花は1度
ALSV-MdTFL1	約10%	8-14	1-9	開花は1度または 連続する
ALSV-AtFT/MdTFL1	>90%	7~	多数	連続して開花

Yamagishi et al. (2013)

# ALSV-AtFT感染により早期開花した花の解剖図

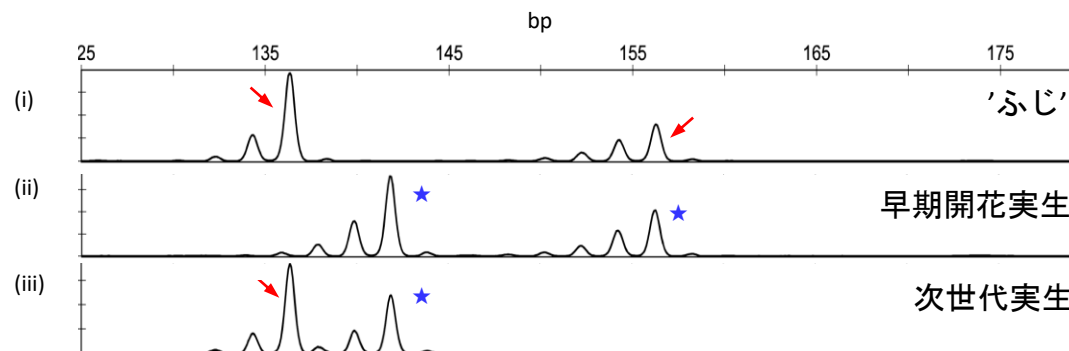


(17%シヨ糖, 1%寒天培地)

# 早期開花リンゴの花粉を利用した世代促進

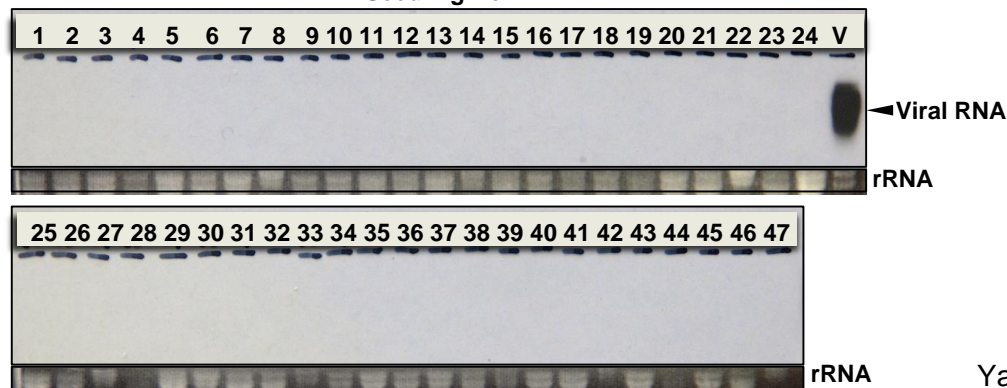


## 親子鑑定 (SSR分析)



## Seedling No.

## 次世代実生のウイルス検定



Yamagishi et al. (2011)

# ALSV-AtFT/MdTFL1によるリンゴの世代促進



9 mpi

Yamagishi et al. (2013)



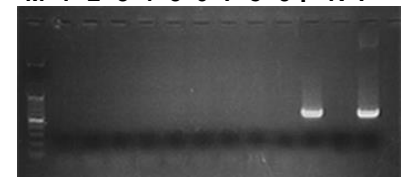
11 mpi



次世代種子の発芽



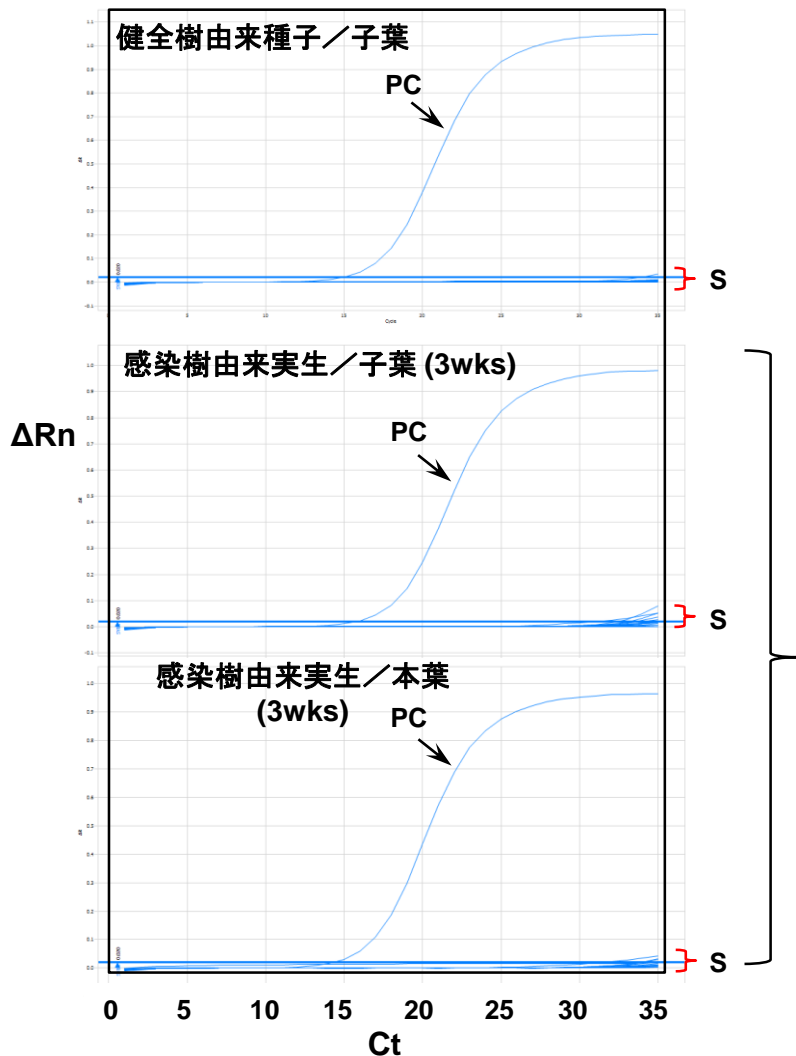
M 1 2 3 4 5 6 7 8 9 P N P



後代の実生苗からはALSVは検出されない



# ALSVベクターの除去



1) 後代種子由来の実生  
→ 99%はウイルスフリー

## 種子伝染

'Indo'	2/87
'G.D'	0/137
計	2/224 (0.89%)

qPCRによるリンゴ子葉・本葉からのALSVの検出

PC: ポジティブコントロール (感染リンゴ葉)  
S: 検定サンプル

## 2) 感染果樹苗からのALSVの除去



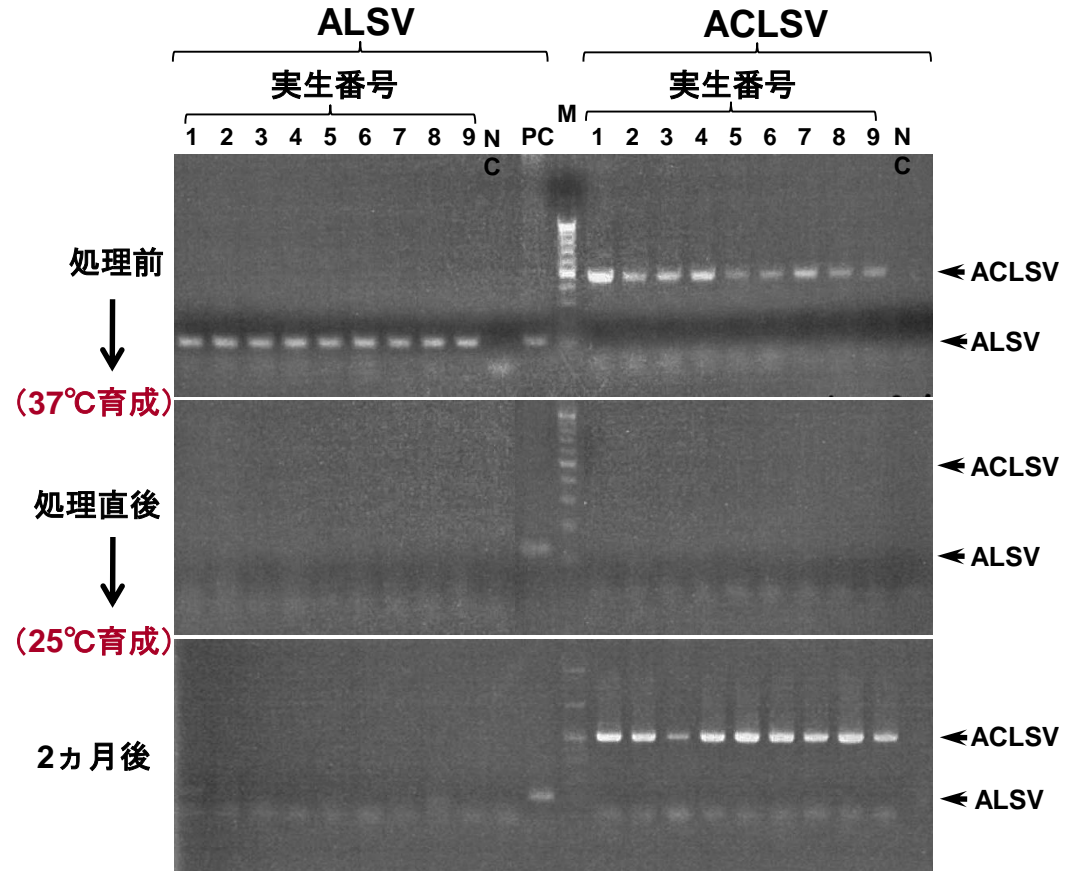
この中に優良品種候補がある場合



### ALSVベクター除去技術

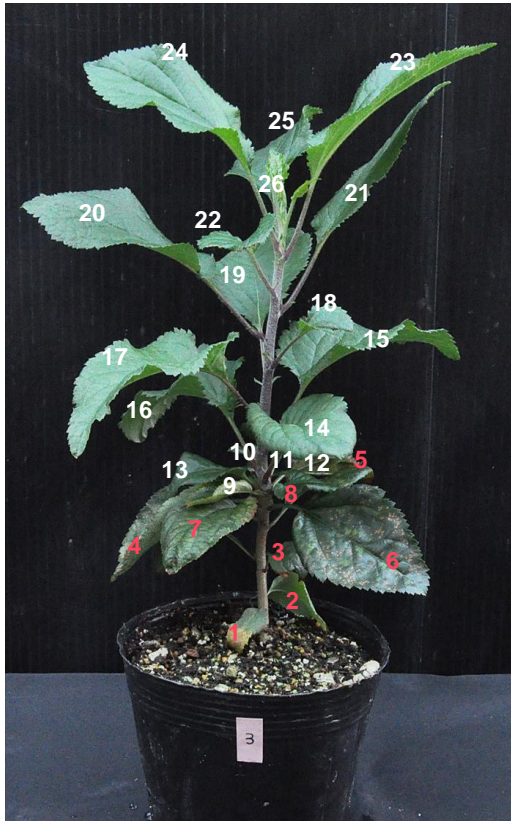
○高温 (37°C) 処理

### RT-PCR検定



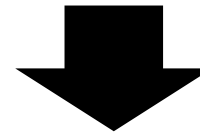
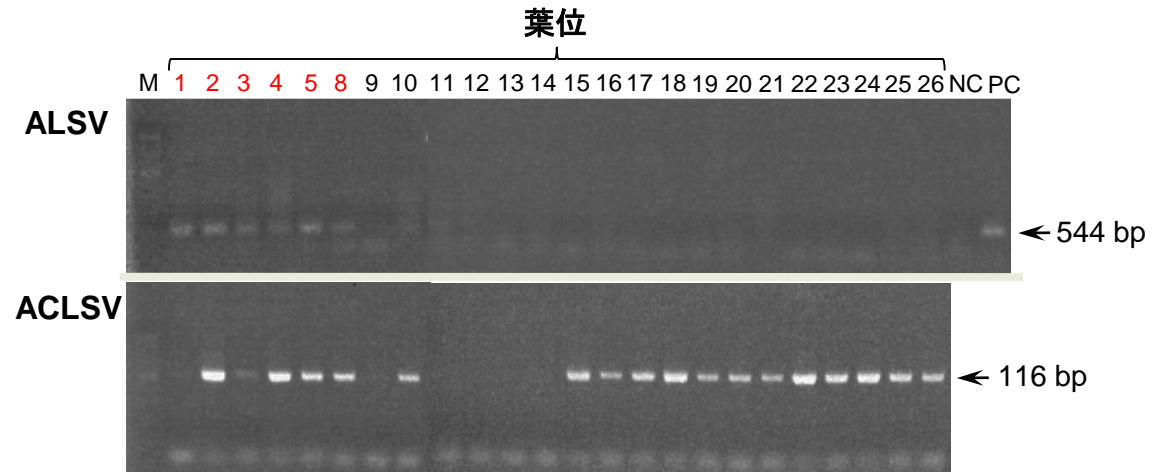
# 高温処理による感染果樹苗からのALSVの除去

(A) 感染リンゴ実生



高温処理後2ヵ月、25°Cで育成した個体

(B) RT-PCR検定



高温(37°C)でALSVの全身移行が停止

Yamagishi et al, 2016

# ALSVベクター技術によるリンゴの開花促進技術

- (1) 一般に5-10数年を要するリンゴ実生の開花時期を2ヶ月程度に短縮
- (2) リンゴ1世代(種子から次世代種子までに期間)を1年以内に短縮
- (3) ALSVは植物の核ゲノムには組み込まれない (遺伝しない)
- (4) 早期開花樹から簡便にALSVを除去できる
- (5) 次世代実生のほとんどはALSVフリーである

## ALSVベクター技術 (DNA組換え技術)

↓  
開花・世代促進 →

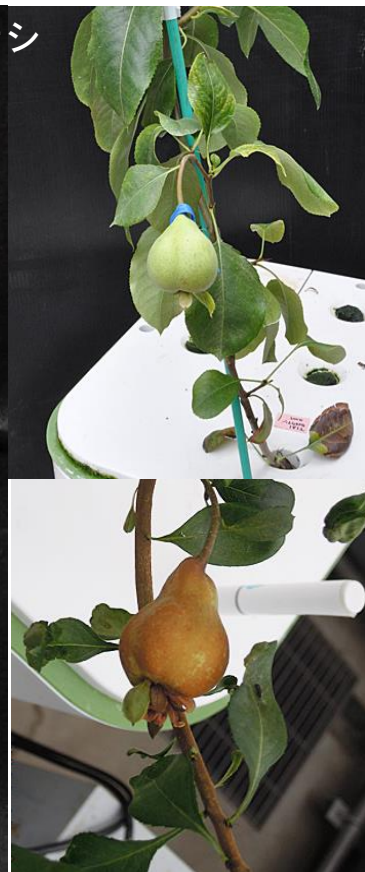
- 開花樹から簡便にウイルス除去
- 次世代実生はウイルスフリー

↓  
遺伝子組換え植物ではない

# 4 果樹・花卉育種への利用

## ウイルスベクター技術の応用展開

- 早期開花・世代促進による品種改良 (NPBT)
- 植物の形質改変 (NBT)
- 植物遺伝子の機能解析ツール (VIGS)



# リンゴの早期開花（一年中いつでもリンゴの花を咲かせることが可能）

岩手大学独自の技術開発

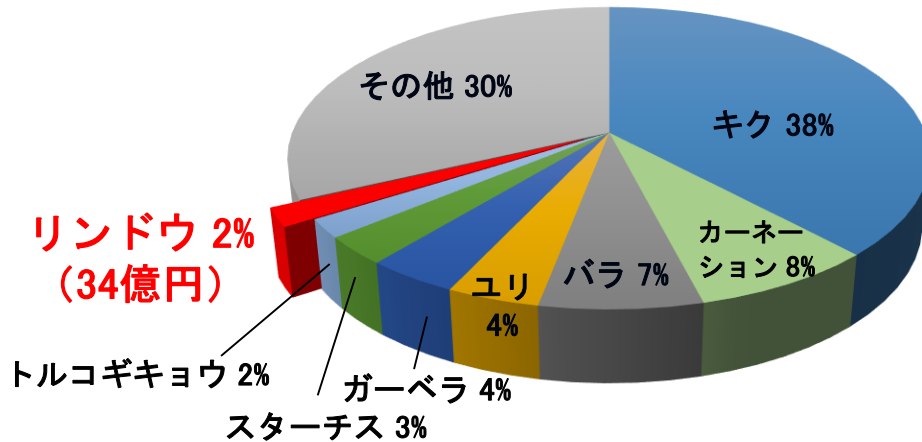


1年以内に果実の成分評価（糖度など）ができないか

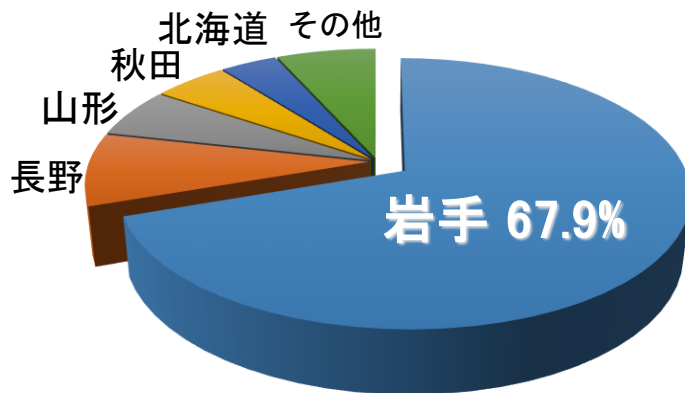
# 「花開くエゾリンドウ」育種プロジェクト

- ・八幡平市花き研究開発センター
- ・岩手大学

## 日本の切り花市場（出荷量 41.6億本）



## 県別リンドウ出荷量7,820万本／全国

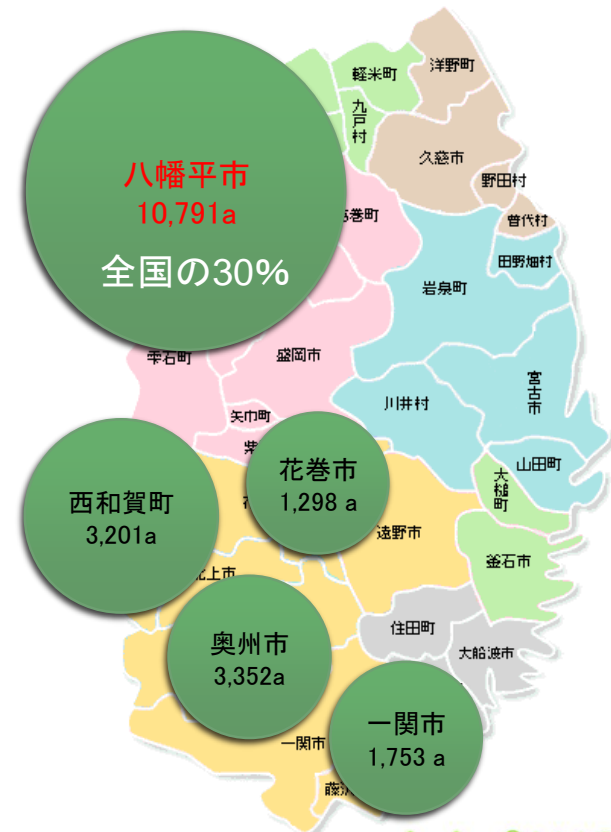


平成23年農林水産統計

## 八幡平市

独自の品種育成・ブランド化  
海外との共同開発・栽培  
海外への輸出

J A 新いわて花き生産部会が全国農林水産祭にて平成27年度に天皇杯受賞、EU等への輸出の取組が評価される。



平成23年度統計

# ALSVベクター技術による「花開くエゾリンドウ」品種の育種

## 背景：リンドウの品種の現状

- 日本原産のエゾリンドウ (*Gentiana triflora*) とササリンドウ (*G. scabra*) を利用。
  - エゾリンドウ：早生～中生(7～9月) / 花が開かない / 株が強く、5～6年栽培可能
  - ササリンドウ：晩生 (10月) / 花が開く / 株が弱く、集花は2年程度
- 切り花生産量：約 8000万本
  - エゾリンドウ 80% (60%が仏花、20%が装飾ほか),
  - ササリンドウ 10% (装飾+仏花)
  - エゾ×ササ 10% (装飾+仏花)
- 輸出 (八幡平市 切り花 10万鉢) ササリンドウ 85%
  - 輸出や装飾用での使用の拡大のためには、**花が開くエゾリンドウ(早生)が必須。**

エゾリンドウ *Gentiana triflora*



花が開かないタイ

X

ササリンドウ *Gentiana scabra*



花が開くタイ



新型リンドウ  
(花開くエゾリン)

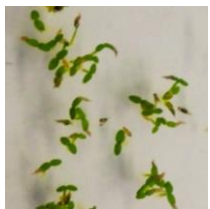
輸出が10倍(100万鉢)



# リンドウの高速開花技術

一世代：5～6ヵ月

エゾ×ササF1

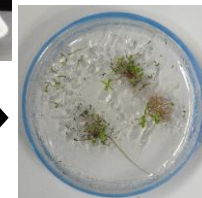


播種後約10日  
ALS-V-GtFT接種

ALS-V-GtFT接種F1実生個体



接種後3～4ヵ月



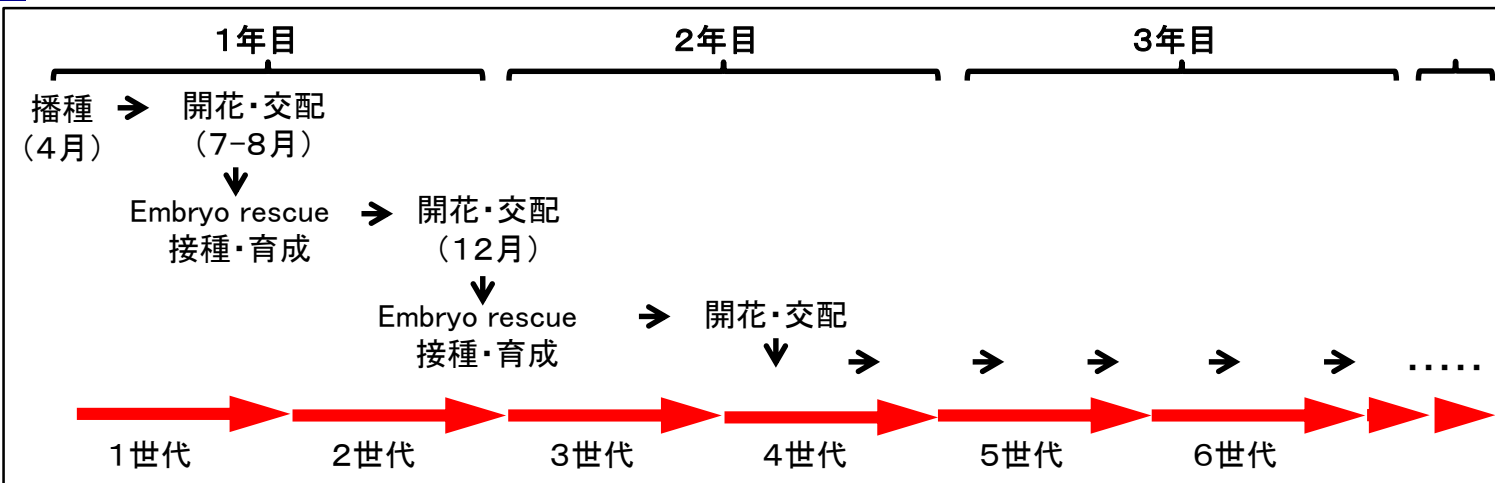
エンブリオレスキュー  
約2週間後・発芽

●[通常育種]  
(1世代:2年)

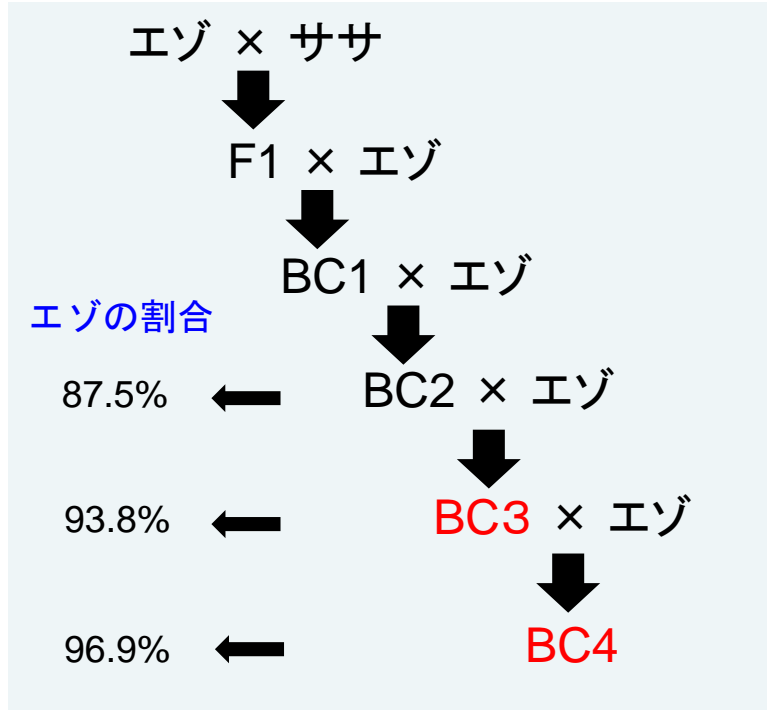


●[ALS-Vベクター技術](1世代:5～6ヶ月)

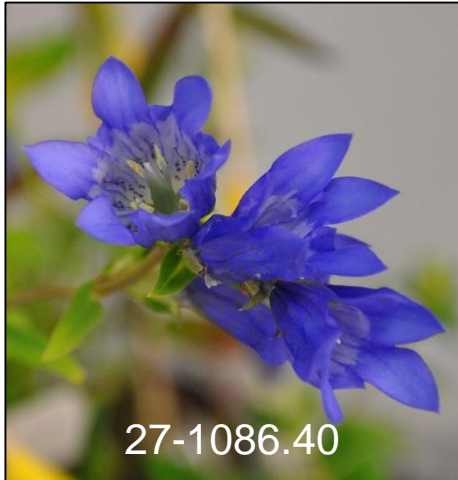
育種期間  
→ 12年を  
3年に短縮



# 「花開くエゾリンドウ」の育種計画 (2016. 12)



BC2の花開く系統



# ウイルス検定技術／ALSV種子伝染の調査（1）

## ● ティッシュ・ブロット・ハイブリダイゼーション法によるALSVの検出

播種後2週間の幼苗をプレスブロット



RNAプローブでハイブリダイズ



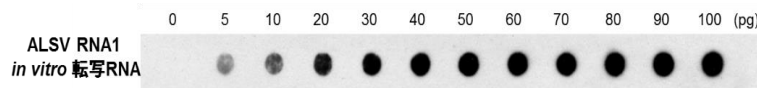
感染リンドウ由来の種子



感染個体数/検定個体数

0/506

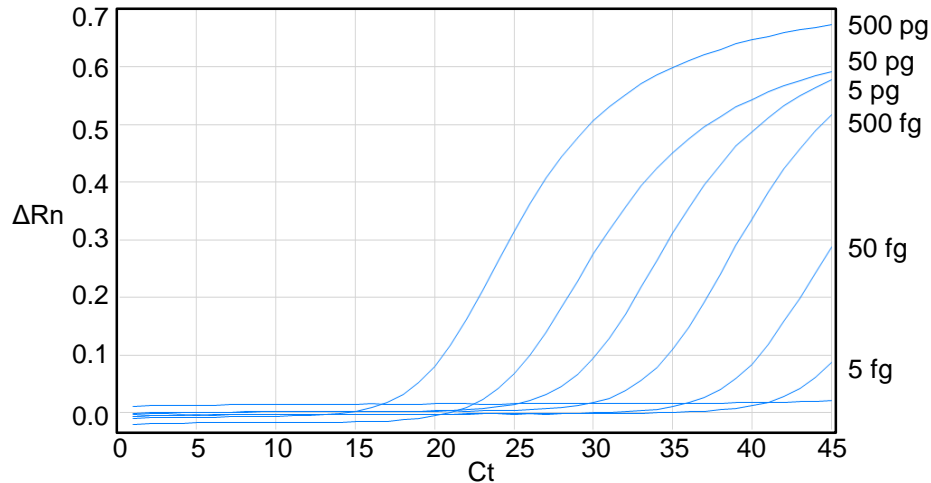
高速開花で得られた実生はすべてALSVフリーである。



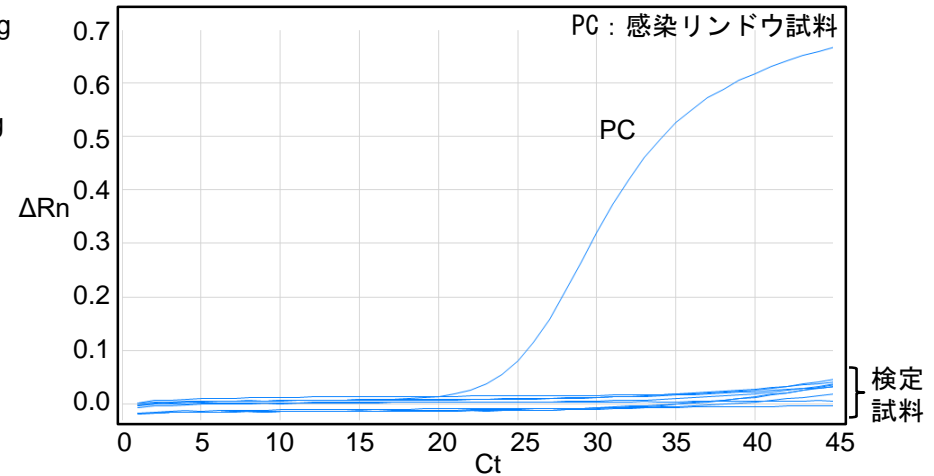
検出限界：ALSV-RNA1 約 5pg

# ウイルス検定技術／ALSV種子伝染の調査（2）

## ● リアルタイムPCRによるALSVの検出



qPCR法の検出限界  
(=ALSV RNA 約 5 fg - 50 at)



リアルタイムPCR法によるリンドウ実生苗からの  
ALSVの検出

### qRCRによるリンドウ実生からのALSVの検出

播種後月数(葉期)	感染個体数/検定個体数
2カ月(2~3対葉)	0/115
4カ月(6~7対葉)	0/108

リンドウでは種子伝染  
は認められない

# ウイルス診断・圃場試験へのプロセス

BC3とBC4の種子(1系統20個体、20系統 計400個体)

ポット(9 cm)苗 → 個体標識 No. 1~200

2017年4-5月

育苗(岩手大学閉鎖系温室)

ウイルス検定

検 定 法: リアルタイムPCR  
試 料: 個体毎の最上位展開葉  
検定時期(回数): 播種後2ヵ月、4ヵ月(2回)

10月

検定結果の記録・保存・提出?

(第3者による検定を実施するか)

ウイルスフリー株: 越冬のため圃場(八幡平市)へ

2018年4月

ポット(12 cm)に移植し、形質評価(花型、早晩生、稔性、10月まで)

本研究は

- 農水省「新たな農林水産政策を推進する実用技術開発事業」(H18～H22)
- 生研センター・イノベーション創出基礎的研究推進事業(H23～H27)
- 戦略的イノベーション創造プログラム（SIP）(H26～H30)
- 農水省・食品産業科学技術研究推進事業(H28～H30)

の支援で実施した／実施中のものである。

ご清聴ありがとうございました



岩手山と一本桜