



農研機構

国立研究開発法人 農業・食品産業技術総合研究機構

遺伝子組換えによるダイズわい化病抵抗性ダイズの作出

メタデータ	言語: Japanese 出版者: 独立行政法人 農業・食品産業技術総合研究機構 東北農業研究センター 公開日: 2019-03-22 キーワード: ダイズ, ダイズわい化病, RNAサイレンシング, 遺伝子組換え, 抵抗性 作成者: 藤郷, 誠 メールアドレス: 所属:
URL	https://doi.org/10.24514/00001233

遺伝子組換えによるダイズわい化病抵抗性ダイズの作出

藤 郷 誠*¹⁾

抄 録：本研究では、北日本において甚大な被害を起こしているダイズわい化病の病原ウイルスである *Soybean dwarf virus* (SbDV) に抵抗性を持つ遺伝子組換えダイズの作出を行った。SbDVの外被タンパク質 (CP) 遺伝子の逆位反復配列とセンスSbDV CP遺伝子を導入したダイズをそれぞれ1と6系統作出した。SbDV CP遺伝子の逆位反復配列を導入して作出した後代系統はSbDV抵抗性を示し、その抵抗性は逆位反復配列由来の short interfering RNA (siRNA) によるRNAサイレンシング機構によるものと考えられた。センスSbDV CP遺伝子を導入したダイズ6系統のうち、SbDV抵抗性が高いと考えられた系統番号6の個体群について、詳細にSbDV抵抗性機構を解析した。系統番号6のT₁個体群で、導入遺伝子の分離が確認され、3つの分離系統を獲得した。これら3系統のT₂個体群はSbDV抵抗性を示したが、そのうちの1系統は閾値モデルによるRNAサイレンシング機構によってSbDV抵抗性が付与されたと考えられた。以上のように、2種類の異なる構造の遺伝子の導入を行い、RNAサイレンシング機構によるSbDV抵抗性ダイズを作出した。

キーワード：ダイズ、ダイズわい化病、RNAサイレンシング、遺伝子組換え、抵抗性

Production of *Soybean dwarf virus*-resistant transgenic soybeans : Makoto TOUGOU*¹⁾

Abstract : In an attempt to generate soybean plants resistant to *Soybean dwarf virus* (SbDV), which causes serious damage to soybean production in northern Japan, we transformed a construct containing inverted repeat-SbDV coat protein (CP) genes spaced by β -glucuronidase (*GUS*) sequences or sense CP gene into soybean somatic embryos via microprojectile bombardment. One and 6 independent T₀ plants were obtained, respectively. Former progenies exhibited SbDV resistance two months after inoculation by aphid. It was considered that these plants acquired the resistance to SbDV by an RNA-silencing-mediated process. Among the latter 6 transgenic lines, progenies of one line were subjected to further extensive analysis of SbDV-resistant response. In T₁ plants, the segregation of transgenes was confirmed, and three different lines were obtained. After inoculation of SbDV by the aphids, most T₂ plants of these lines remained symptomless. One transgenic line among the three lines acquired, presumably, resistance to SbDV by the RNA-silencing-mediated process from the threshold model. We transformed two different constructs into soybeans and produced SbDV-resistant transgenic soybeans mediated by RNA silencing.

Key Words : soybean, RNA silencing, SbDV, transgenic, resistance

* 1) 東北農業研究センター (National Agricultural Research Center For Tohoku Region, Morioka, Iwate, 020-0198, Japan)
2008年5月23日受付、2008年12月16日受理

目 次

I 緒論	201	1) センスSbDV CP遺伝子強発現プラスミドの構築	212
II SbDV CP遺伝子逆位反復配列を導入したSbDV抵抗性ダイズの解析	204	2) ダイズ遺伝子導入法	213
1 緒言	204	3) PCRによる導入遺伝子の確認	213
2 材料および方法	204	4) サザンブロット解析	213
1) SbDV CP遺伝子逆位反復配列発現プラスミドの構築	204	5) ノーザンブロットによる導入遺伝子の発現解析	213
2) ダイズ遺伝子導入法	205	6) ノーザンブロットによるSbDV特異的RNAの検出	213
3) PCRによる導入遺伝子の確認	206	7) 低分子RNA解析	213
4) サザンブロット解析	206	8) アブラムシによる接種試験	214
5) ノーザンブロットによる導入遺伝子の発現解析	207	9) RNAドットブロットによるSbDV特異的RNAの検出	214
6) ノーザンブロットによるSbDV特異的RNAの検出	207	3 結果	214
7) 低分子RNA解析	207	1) 組換えダイズの作出	214
8) アブラムシによる接種試験	207	2) T ₁ 、T ₂ ダイズにおけるSbDV接種試験	214
3 結果	208	3) サザンブロットによる系統番号6の組換えダイズの解析	215
1) 組換えダイズの作出	208	4) ノーザンブロットによる系統番号6のT ₂ ダイズの解析	215
2) サザンブロットとノーザンブロットによるT ₁ 組換えダイズの解析	208	5) 系統番号6のT ₂ ダイズにおけるSbDV抵抗性と特異的RNAの検出	217
3) T ₁ 、T ₂ 個体におけるSbDV接種試験	208	4 考察	218
4) T ₃ 個体におけるSbDV接種試験	209	1) 系統番号6の遺伝解析	218
4 考察	211	2) 系統番号6の個体において想定されるSbDV抵抗性機構	218
1) SbDV CP遺伝子逆位反復配列導入ダイズの遺伝解析	211	3) 系統番号6の個体間におけるSbDV抵抗性の程度の違い	219
2) SbDV CP遺伝子逆位反復配列導入ダイズのSbDV抵抗性におけるsiRNAの関与	211	4) 安定したSbDV抵抗性組換えダイズを獲得するために	219
3) SbDV CP遺伝子逆位反復配列導入ダイズのSbDV抵抗性の個体間差	212	IV 総合考察	220
III センスSbDV CP遺伝子を導入したSbDV抵抗性ダイズの解析	212	V 引用文献	220
1 緒言	212		
2 材料および方法	212		

I 緒 論

ダイズわい化病は北日本において発生が確認され、特に北海道、青森県および岩手県で甚大な被害を及ぼしている（玉田 1975）。病原ウイルスは

Soybean dwarf virus (SbDV) であり、感染したダイズは株全体のわい化、もしくは縮葉や葉の脈間黄化などの症状を示すとともに子実形成が著しく阻害されて大幅な収量減となり、また、収穫期になっても枯れ上がらない青立ち株となる (Fig. 1)。

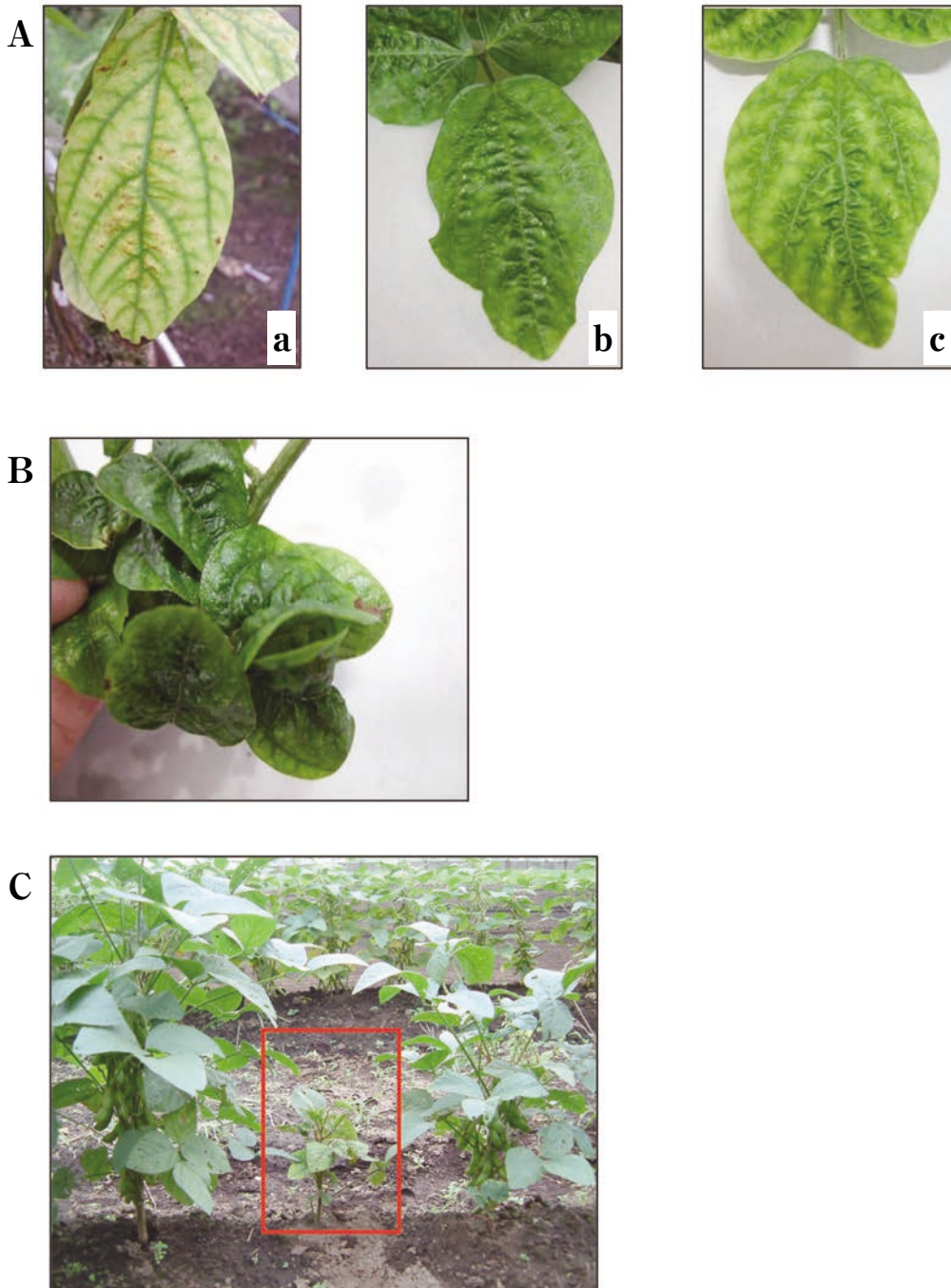


Fig. 1 Symptoms of SbDV infected soybean plants. Soybean plants 'A' were infected with SbDV Y strain. Symptoms of 'a', 'b' and 'c' were yellowing, shrinking and combination of yellowing and shrinking, respectively. Soybean plants 'B' was infected with SbDV D strain and exhibited symptoms of dwarfing. 'C' is appearance of SbDV infected soybean in the field.

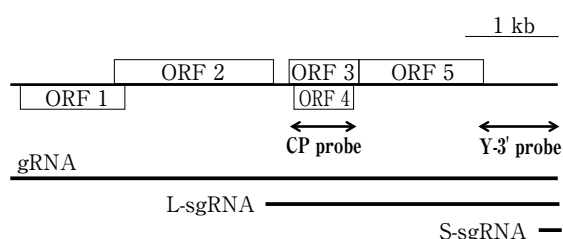


Fig. 2 Genome organization of SbDV

Open reading frames (ORFs) 1 and 2 encode replication-related proteins, ORFs 3, 4, and 5 encode the coat protein, a putative movement protein, and a readthrough domain (RTD), respectively. gRNA, genomic RNA; L-sgRNA, large subgenomic RNA; S-sgRNA, small subgenomic RNA. CP probe and Y-3' probe (Yamagishi *et al.* 2003) specific for CP region and 3' region of SbDV were used for Southern and northern hybridization analysis.

SbDVはルテオウイルス科 (*Luteoviridae*) ルテオウイルス属 (*Luteovirus*) に属し、5.7~5.9 kbのプラス鎖一本鎖RNAゲノムを持つ直径約25 nmの球状ウイルスである (土居ら 1968; 玉田 1975; Damsteegt *et al.* 1990; Rathjen *et al.* 1994) (Fig. 2)。SbDVは感染したダイズの病徴と宿主範囲の特異性からYP、YS、DPとDS系統に分類される (Terauchi *et al.* 2001) (Table 1)。YPとYS系統は、ダイズに縮葉や脈間黄化などの病徴を引き起こし、シロクロバ (*Trifolium repens* L.) に感染するがアカクロバ (*T. pratense* L.) には感染しない (玉田 1973; 玉田 1975; Damsteegt 1990; 御子柴ら 1991)。DPとDS系統はダイズにわい化や葉の小型彎曲化などの病徴を引き起こし、アカクロバに感染するがシロクロバには感染しない (玉田 1973; 玉田 1975; 高橋ら 1980; Damsteegt *et al.* 1990; 御子柴ら 1991; 本多ら 1999)。YSとDS系統はジャガイモヒゲナガアブラムシ (*Aulacorthum solani*) によって、YPとDP系統はエンドウヒゲナガアブラムシ (*Acyrtosiphon pisum*) とツメクサベニマルアブラムシ (*Nearctaphis bakeri*) によって永続的に伝搬される (玉田 1973; 玉田 1975; 御子柴ら 1991; 本多ら 1999)。Sb

DVは種子伝染せず、また、特定のアブラムシ種以外のアブラムシ種もしくは他の昆虫類では媒介されない。この媒介アブラムシ種が厳密に限定されるという性質は、SbDVが含まれるルテオウイルス科ウイルスの際だった特徴のひとつである (Herrbach 1999)。また、SbDVは、アブラムシによって永続的に媒介されるが虫体内では増殖せず、媒介様式は循環型である (Damsteegt *et al.* 1990)。国内に分布するSbDVの4系統それぞれに属する分離株のゲノム解析の結果により、YS (分離株M93-1, DDBJ. accession no. 038147) は5853塩基、YP (同M94-1, 038148) は5841塩基、DS (同HS97-8, no.038147 およびHS99-5, 076038) とDP (同M96-1, 038150) は5708塩基のゲノムRNAをそれぞれ持つことが明らかとなった (Terauchi *et al.* 2001)。SbDVはゲノムRNAが5つの翻訳読み取り枠 (ORF) をコードしている (Rathjen *et al.* 1994) (Fig. 2)。SbDVは感染細胞においてゲノムRNA (gRNA) に加えて大小2種類のサブゲノムRNA (L-sgRNA, S-sgRNA) を合成する (Yamagishi *et al.* 2003)。L-sgRNAはORF 3、4および3-5の翻訳を行い、S-sgRNAはSbDV感染葉において大量に安定して蓄積する。

SbDVが引き起こすダイズわい化病は北日本における大豆生産に深刻な被害を及ぼしているため、早急な抵抗性品種の育成が求められている。これまでに、北海道では「ツルコガネ」、「ツルムスメ」や「いわいくろ」といった抵抗性品種が育成・登録されてきたが、抵抗性強度は必ずしも充分ではないため、栽培には媒介アブラムシを減らすために殺虫剤の土壌施用と葉面散布が必要である。また、耕種的防除としてアブラムシの飛来時期をずらすための遅播があるが、北海道北部では利用できない技術であるため防除法としては不十分である。さらに、東北地方では有効なダイズわい化病抵抗性品種が未だ登録されていない。そこで、ダイズわい化病に対して、高度な抵抗性を持つ遺伝資源が見いだされていなか

Table 1 Classification of SbDV strains distributed in Japan.

Symptoms	Strain	Host plants		Aphid vector species	
		White clover (<i>Trifolium repens</i>)	Red clover (<i>T. pratense</i>)	<i>Aulacorthum solani</i>	<i>Acyrtosiphon pisum</i> <i>Nearctaphis bakeri</i>
Yellowing	YS	●		●	
	YP	●			●
Dwarfing	DS		●	●	
	DP		●		●

った背景より、本研究では遺伝子組換え技術を利用して、ダイズへわい化病抵抗性付与の可能性を調査することを目的とした。

植物ウイルスの遺伝子の一部を植物に導入することによってウイルス抵抗性植物の作出がこれまでに進んでいる。このような抵抗性付与技術は Pathogen-derived resistance (PDR) と呼ばれており (Sanford *et al.* 1985)、Powell-Abel *et al.* (1986) がタバコモザイクウイルス (*Tobacco mosaic virus*, TMV) の外被タンパク質 (Coat protein, CP) 遺伝子を導入した組換えタバコのTMVに対する病徴発現の遅延を報告して以来、数多くのウイルス抵抗性組換え植物が作出されてきた。Fitch *et al.* (1992) のパパイヤ輪紋ウイルス (*Papaya ring spot virus*, PRSV) 抵抗性組換えパパイヤ、Tricoli *et al.* (1995) のキュウリモザイクウイルス (*Cucumber mosaic virus*, CMV) 抵抗性組換えスクアッシュ、Wang *et al.* (2000) のオオムギ黄化萎縮ウイルス (*Barley yellow dwarf virus*, BYDV) 抵抗性組換えオオムギやMissiou *et al.* (2004) のジャガイモYウイルス (*Potato virus Y*, PVY) 抵抗性組換えジャガイモなどが実用作物の例として挙げられる。その中でも PRSV抵抗性組換えパパイヤとCMV抵抗性スクアッシュは一般圃場にて商業栽培されおり、防除が困難なウイルス病にPDRによって抵抗性を付与することは有効であることが認められている。

PDRにより、植物はタンパク質を仲介とした (protein-mediated) 機構 (Beachy 1999) あるいは、RNAを仲介とした (RNA-mediated) 機構、特にRNAサイレンシング (Wang and Metzloff 2005) と呼ばれる機構によりウイルス抵抗性を獲得することができると考えられている。タンパク質を仲介としたウイルス抵抗性の詳しいメカニズムは解明されていない (Bazzini *et al.* 2006) が、ウイルスの外被タンパク質遺伝子を蓄積した組換え植物は、CP遺伝子の由来となったウイルスに抵抗性を持つことが知られており、TMV抵抗性、CMV抵抗性 (Cuozzo *et al.* 1988)、PVY抵抗性 (Hemenway *et al.* 1988) 等の組換えタバコを挙げることができる。一方、RNAを仲介としたウイルス抵抗性の組換え植物では、ウイルスのゲノムRNAを塩基配列特異的に分解するため、ウイルスの増殖が抑制される。これらの植物体が獲得した抵抗性は、転写後型ジーンサイレンシング (post-transcriptional gene silencing, PTGS) によ

る現象と類似した機構によるものであること明らかになっている (Dougherty and Parks 1995; Baulcombe 1996; Wang and Metzloff 2005)。PTGSを含む、相同性のあるRNAの分解機構はRNAサイレンシングと総称されている。このようなウイルス抵抗性は相同性依存型抵抗性 (homology-dependent resistance) (Mueller *et al.* 1995) としても知られている。RNAサイレンシングと、その結果として起こるウイルス抵抗性を説明するために、二本鎖RNAによるモデルが提唱されており (Metzloff *et al.* 1997; Waterhouse *et al.* 1998; Bass 2000)、それは次のように説明される。すなわち、二本鎖RNAはRNAサイレンシング機構において重要な役割を担っており、Dicer-like enzyme (DCL) (Carmell and Hannon 2004) と呼ばれる二本鎖特異的リボヌクレアーゼによって短い21から25塩基の二本鎖RNAに分解される。この短い二本鎖RNAはshort interfering RNA (siRNA) と呼ばれ、RNAサイレンシングが生じている指標とされている (Hamilton and Baulcombe 1999; Zamore *et al.* 2000; Elbashir *et al.* 2001)。siRNAはRNA-induced silencing complex (RISC) (Hammond *et al.* 2000) というエンドリボヌクレアーゼ活性を持つタンパク質の複合体に取り込まれ、相同性のある一本鎖RNAを切断する。ウイルス由来のsiRNAがRISCにプログラムされている植物は、RNAウイルスが侵入すると、RISCが速やかにウイルスRNAの分解を行うため、抵抗性を示すと考えられている。

また、二本鎖RNAは不安定な分子として、相同性のあるRNA分解を引き起こす要因となっている (Voinnet *et al.* 1999; Bass 2000; Vaucheret and Fagard 2001)。RNAウイルスは感染細胞において二本鎖RNAを複製中間体として形成するため、この複製中間体がRNAサイレンシングの分解ターゲットともなりえる。ウイルスのゲノム領域と相同性のあるRNAが転写後に二本鎖RNAになるような構造を植物に導入すれば、積極的にRNAサイレンシングを起こすことで、相同性のあるウイルスRNAを特異的に分解し、抵抗性を付与することが可能であると考えられている (Waterhouse *et al.* 1998)。二本鎖RNAを生成する構造は逆位反復 (inverted repeat, IR) 配列と呼ばれる。Wang *et al.* (2000) はBYDVのポリメラーゼ領域のIR構造をオオムギに導入し、RNAサイレンシング機構によるBYDV

抵抗性オオムギを作出した。これまでに数多くの植物において、この方法により抵抗性組換え植物が得られている (Smith *et al.* 2000; Kalantidis *et al.* 2002; Chen *et al.* 2004; Missiou *et al.* 2004)。

しかし、RNAサイレンシング機構によるウイルス抵抗性メカニズムが明らかになるまでは、センス鎖のウイルスCP遺伝子のみが主に導入されてきた。すなわち、CP遺伝子が逆位に導入されるか、過剰発現することによって異常なRNAが転写され、偶発的にウイルス抵抗性が獲得できる。スクアッシュモザイクウイルス (*Squash mosaic comovirus*, SqMV) の22 kDaと42 kDaの2種類のCP遺伝子を導入した組換えスクアッシュは、RNAサイレンシング機構によりSqMV抵抗性となった (Jan *et al.* 2000; Pang *et al.* 2000)。この組換えスクアッシュ個体では、CP遺伝子のmRNAの蓄積はわずかであったが、核でのmRNAの転写は高レベルに行われていることが示された。

SbDVに対して抵抗性を持つ組換えダイズの報告はこれまでにないことから、本研究ではSbDVのゲノムRNA情報をもとにして、遺伝子領域をダイズに導入することによってSbDV抵抗性組換えダイズの作出を試みた。なお、SbDV CP遺伝子のIR構造とセンス鎖SbDV CP遺伝子の2種類の異なる導入用ベクターを準備し、SbDV抵抗性組換えダイズの作出を行ったことから、本研究はⅡ章とⅢ章に分けて説明する。

本研究の取りまとめに際し、岩手大学農学部・高畑義人教授、横井修司准教授、弘前大学農学生命科学部・原田竹雄教授、山形大学農学部・阿部利徳教授には、始終ご指導と本研究の審査、並びに校閲を賜った。また、東北農業研究センター 日高 操博士には研究推進全般にわたりご支援とご助言を頂いた。同センター (現所属 岩手大学) 山岸紀子博士には導入遺伝子の解析手法のご指導とSbDV抵抗性検定法の確立に尽力を頂いた。同センター兼松誠司博士、酒井淳一博士、寺内英貴博士にはSbDVに関する基礎研究に尽力を頂いた。同センター 非常勤職員小林元子氏には実験支援にご協力頂いた。さらに、業務1科齋藤文隆氏には実験試料となる大豆生産に関して圃場の維持管理に協力を頂いた。また、京都府農業資源研究センター応用研究部 古谷規行博士にはパーティクルボンバードメントによるダイズ遺伝子導入法に関して、東北農業研究センターで

のダイズ遺伝子導入実験系の確立にご指導とご教示を頂いた。さらに、同センター 静川幸明氏には農林水産省交付金プロジェクト研究「遺伝子組換え技術を応用した次世代型植物の開発に関する研究」における分担協力を頂いた。野菜茶業研究所 石田正彦博士には先輩職員として様々な助言を頂いた。これらの方々に感謝の意を表する。

Ⅱ SbDV CP遺伝子逆位反復配列を導入したSbDV抵抗性ダイズの解析

1 緒 言

緒論で述べた通り、ウイルスのゲノム領域をIR構造に導入すれば、IR構造由来のウイルスの塩基配列と相同な二本鎖RNAがDCLによって分解され、siRNAになった後に、RISCに取り込まれ、相同性のあるウイルスRNAを切断すると予想される。こうして、難防除ウイルスに対し、植物に効果的に抵抗性を付与することが可能であると考えられる。

本研究ではSbDV CP遺伝子領域をIRに配置した構造をダイズに導入し、作出した遺伝子組換えダイズのSbDV抵抗性を調査した。

本研究の研究結果の一部は既に投稿論文にて発表されており (Tougou *et al.* 2006)、本研究では改変並びに補充されたデータを追加して記した。

2 材料および方法

1) SbDV CP遺伝子逆位反復配列発現プラスミドの構築

SbDV CP遺伝子のセンス鎖断片とアンチセンス鎖断片を逆位反復に配列するため、SbDVのYP系統のcDNAクローン (DDBJ accession No. AB038148) (Terauchi *et al.* 2001) よりPCR反応にてそれぞれの断片を増幅した。CP遺伝子をコードする領域は塩基配列位置3035番目から3637番目である。SbDV CP遺伝子センス鎖とアンチセンス鎖断片の作製には制限酵素 Sac I 認識サイトを含むフォワードプライマー (5'-TTGAGTCATGGTCGCGGTTAGCAATGT-3') と制限酵素 Kpn I 認識サイトを含むリバースプライマー (5'-TTGGTACCCTATTTAGCATTCTGCGTTA-3') を用いた。SbDV CP遺伝子センス鎖断片とアンチセンス鎖断片のスペーサー配列であるGUS遺伝子の断片 (670 bp) の作製には制限酵素 Bam HI 認識サイトを含むフォワードプライマー (5'-GGATCCGCAACGTCTGGATTCAGCGC-3') と制限酵素 Kpn I 認識サイトを含むリバー

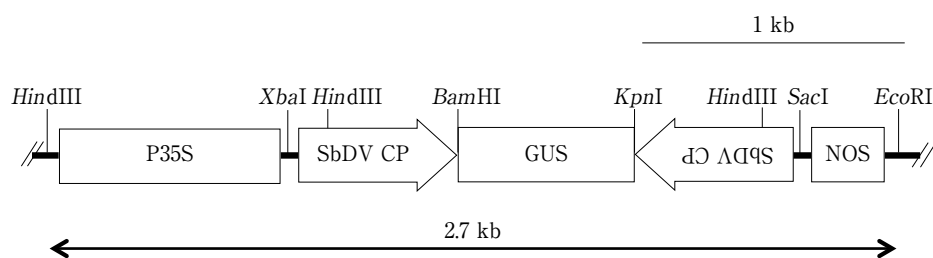


Fig. 3 Structure of plasmid used for transformation of inverted repeat-SbDV coat protein gene.

Plasmid pCP/IR/G contains inverted repeat-SbDV-CP genes, which are spaced by a *GUS* sequence, and driven by the 35S CaMV promoter.

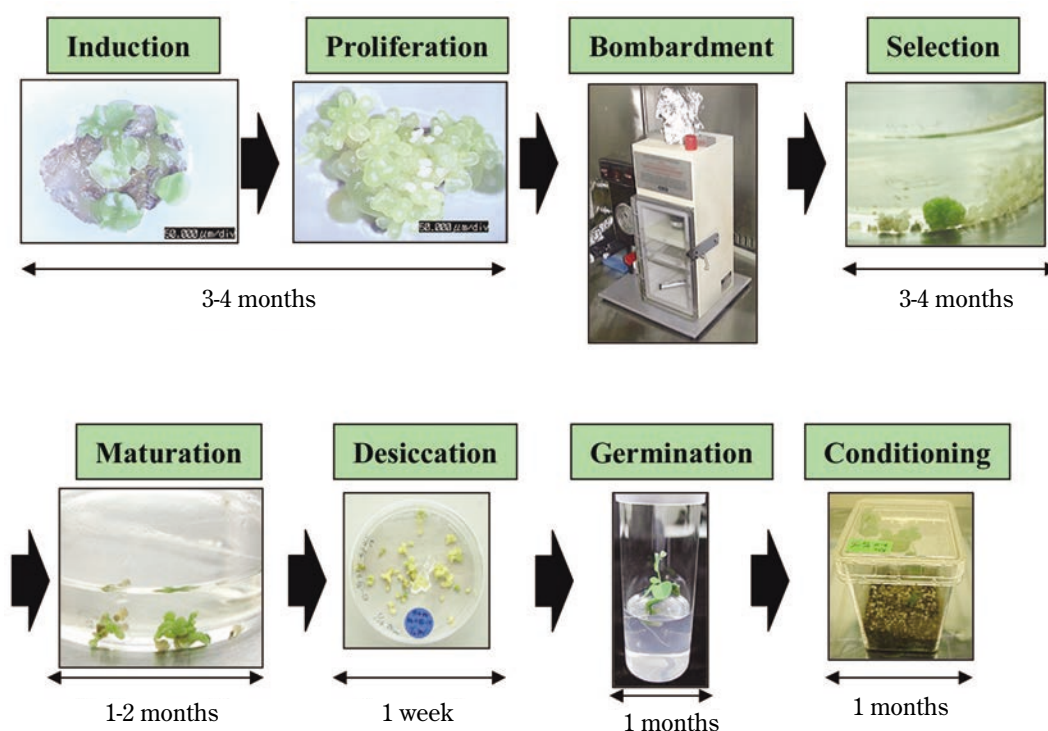


Fig. 4 Process of production of transgenic soybeans.

プライマー（5'-GGTACCACGGTTTGTGGTTT AATCAGG-3'）を用いた。作製したPCR断片を、SbDV CPセンス鎖、*GUS*遺伝子配列とSbDV CPアンチセンス鎖断片の順に *Cauliflower mosaic virus* (CMV) の35SプロモーターとNOSターミネーターを持つプラスミドpBR322に挿入した。SbDV CPセンス鎖断片の挿入の際には、5'末端のSacI認識サイトと3'末端のKpnI認識サイトを除去した平滑末端断片を35Sプロモーターの3'末端のXbaI認識サイトと*GUS*遺伝子の断片の5'末端のBamHI認識サイトの間に挿入した。作製したプラスミドはpCP/IR/Gと名付けた (Fig. 3)。以上のように作製

されたプラスミドは東北農業研究センター 日高操博士により分譲して頂いた。

2) ダイズ遺伝子導入法

ダイズへの遺伝子導入はパーティクルガンによるダイズ不定胚への導入法 (Furutani and Hidaka 2004) を採用した (Fig. 4)。不定胚形成能が高い品種 'Jack' をガラス温室にて春期から夏期にかけて栽培した。開花後約10日の莢を採取し、表面を70%エタノールで消毒殺菌し、クリーンベンチ内で無菌操作により未熟種子を取り出した。滅菌シャーレ上で未熟種子の種皮を除去し、胚軸部位を切除した子葉部分の向軸側を下にして不定胚誘導用

MSD40固形培地 (MS 無機塩、B5 ビタミン、サッカロース 30 g/l、2,4-D 40 mg/l、ゲルライト 2 g/l) に置床した。培養3週間後に、置床した子葉片の表面に不定胚が形成されるため、新鮮なMSD40培地に移植した。さらに、3週間後に増殖した不定胚塊をMSD20固形培地 (MS 無機塩、B5 ビタミン、サッカロース 30 g/l、2,4-D 20 mg/l、ゲルライト 2 g/l) に移植して増殖させた。同様の操作を3週間毎に行い、遺伝子導入用不定胚を増殖し、不定胚への遺伝子導入にはパーティクルガン (PDS 1000/He particle gun (Bio-Rad)) を用いた。遺伝子導入条件はFurutani and Hidaka (2004) の条件に従った。すなわち、100 μ lの金粒子 (直径 1.0 μ m) 懸濁液 (60 mg/ml (50%グリセロール)) に0.5 μ gの導入用ベクターpCP/IR/Gと選抜マーカー遺伝子としてハイグロマイシン耐性遺伝子 (hygromycin phosphotransferase, *hpt*) のベクターpE2113-HPT 0.5 μ gをコーティングした。MSD20培地を入れたシャーレの中心部分 (直径約 5 cm以内) に約20個の不定胚塊を置床し、ヘリウム圧1100 psi、ターゲット距離 9 cmで不定胚塊に2回ずつの遺伝子打ち込みを行った。打ち込み7日後に、遺伝子打ち込み操作をしたシャーレから半数の不定胚塊を、FNL液体培地 (FN マクロ、MSマイナー、Fe-EDTA、B5ビタミン、サッカロース 10 g/l、2,4-D 5 mg/l、アスパラギン 1 g/l) を入れたカルチャーボトルに投入して、80 rpmで振とうして培養した。ハイグロマイシンによる遺伝子導入不定胚の選抜は、不定胚塊の液体培地投下7日後より開始した。7日ごとに液体培地を交換しハイグロマイシン濃度を徐々に上げていった。継代2回目までは20 mg/l、次の継代4回は30 mg/l、以降は40 mg/lで、ほとんどの不定胚塊が白化する中で、緑色を呈したハイグロマイシン耐性不定胚塊が生じるまで選抜培養を行った。ハイグロマイシン耐性と思われる不定胚塊を1個ずつ0S3SGM液体培地 (FN マクロ、MSマイナー、Fe-EDTA、B5 ビタミン、サッカロース 30 g/l、ソルビトール 30 g/l、アスパラギン 1 g/l) に投入し80 rpmで振とう培養した。液体培地は2週間後に1度交換した。子葉型成熟胚を、培地等を含まない空の滅菌シャーレに置床し、発根を促すために乾燥処理を7日間行った。乾燥させた成熟胚をMS0固形培地に置床して発根・発芽させた。発根・発芽し、生育旺盛な再分化個体は順化処理を行い、最終的に閉

鎖温室にて育成した。

3) PCRによる導入遺伝子の確認

組換えダイズと非組換えダイズ (品種 Jack) の新葉 (約50 mg) より、川崎 (1997) の方法を改変した簡易ゲノム抽出法を用いてゲノムDNAを抽出した。すなわち、ダイズ組織に800 μ lの抽出溶液 (200 mM Tris-HCl (pH 7.5)、250 mM NaCl、25 mM EDTA、0.5% SDS) を加えてMicro Smash MS-100 (TOMY) を用いて液状になるまで完全に破碎した。遠心分離 (15,000 rpm、30分間、室温) を行い、磨砕液より植物残渣を取り除いた。上清液に中性TE飽和フェノールとクロロホルムをそれぞれ250 μ lずつ添加し、完全に混和した。遠心分離 (15,000 rpm、30分間、室温) を行い、水層を分離し、さらにクロロホルムを500 μ l添加し、完全に混和した。遠心分離 (15,000 rpm、5分間、室温) した後に水層において、アルコール沈殿を行い、最終的に200 μ lのTEに溶解した。SbDV CP遺伝子の導入を検出するため、得られた抽出ゲノム溶液 1 μ lを鋳型としてフォワードプライマー (5'-GGTTCGCGGTTAGCAATGTGCGCA-3') とリバースプライマー (5'-ATTCTGCGTTAGGACATTGATCGA-3') によるPCR反応を行った。反応条件は94 $^{\circ}$ C、5 minの後、94 $^{\circ}$ C、1 min; 58 $^{\circ}$ C、1 min; 72 $^{\circ}$ C、2 minを30サイクルプラス72 $^{\circ}$ C、7 minで行った。増幅産物 (592 bp) は1.5%アガロースゲル電気泳動により分画し、エチジウムブロマイド染色により確認した。

4) サザンブロット解析

組換えダイズと非組換えダイズの新葉 (約50 mg) をMicro Smash MS-100を用いて粉碎し、DNeasy kit (Qiagen) を用いて付属マニュアルに従ってゲノムDNAを抽出した。5 μ gのゲノムDNAを100 Unitの制限酵素 *Eco*RIで16時間切断した後、0.8%のアガロースゲル電気泳動を行った。分画したDNAをナイロンメンブラン (Hybond-N⁺; GE Healthcare Bio Sciences) にブロットした。SbDV CP遺伝子検出用のプローブには、PCRにより増幅したSbDV CP遺伝子のPCR産物 (592 bp、CPプローブ (Fig. 2)) を用いた。CPプローブのラベリング、ハイブリダイゼーションはAlkPhos Direct labeling module (GE Healthcare Bio Sciences) にて行った。ハイブリダイゼーション条件は58 $^{\circ}$ Cで18時間とした。メンブランに付着した過剰なプローブを、60 $^{\circ}$ Cプライマ

リーウオッシュバッファーを用いて30分間で3回、室温セカンドウオッシュバッファーを用いて5分間で2回洗浄した。標識の検出にはCDP Star Chemiluminescent Substrate (New England Biolabs) により付属マニュアルに従って行った。洗浄したメンブランをラップで包んでオートラジオグラフィ用カセットに入れ、Hyperfilm ECL (GE Healthcare Bio Sciences) をメンブランに密着させ、室温で2時間から12時間感光させることにより、導入遺伝子を確認した。

5) ノーザンプロットによる導入遺伝子の発現解析

組換えダイズと非組換えダイズの新葉 (約50 mg) をMicro Smash MS-100を用いて粉碎し、Trizol Reagent (Invitrogen) を用いてtotal RNAを付属マニュアルに従って抽出した。SbDV CP遺伝子の転写を確認するため、total RNA 5 µgを、22%ホルムアルデヒドと1×MOPS (0.02 M 3-(N-モルホリノ)プロパンスルホン酸、5 mM酢酸ナトリウム、1 mM EDTA・2 Na, pH 7.0) を含む1.5%アガロースゲルで電気泳動を行い、ナイロンメンブランにプロットした。SbDV CP mRNA 検出用のプローブのラベリング、ハイブリダイゼーションと標識の検出はサザンプロット解析と同様の手法と条件を用いた。

6) ノーザンプロットによるSbDV特異的RNAの検出

後述するアブラムシによる媒介試験において、SbDV感染の有無をウイルスゲノムRNAレベルで検出するため、ノーザンプロットによるSbDV特異的RNAの検出を行った。Trizol Reagentを用いて抽出したSbDV YP系統接種および非接種の組換えダイズと非組換えダイズの新葉 (約50 mg) のtotal RNAを、ノーザンプロットによる導入遺伝子の発現解析と同様の方法を用いて電気泳動、プロットングおよびハイブリダイゼーションを行った。SbDV YP系統特異的検出用プローブにはYamagishi *et al.* (2003) によるY-3' プローブを用いた (Fig. 2)。

7) 低分子RNA解析

前述と同様に抽出したtotal RNA 15 µgを15%変性ポリアクリルアミドゲルで電気泳動分画し、ナイロンメンブランにエレクトロプロットした。SbDV CP遺伝子由来 siRNA 検出のためジゴキシゲニン

(DIG) 標識RNAプローブを以下のように調整した。pBluescript SK (-) (Stratagene) のHincIIサイトにアンチセンスSbDV CP遺伝子が導入されたプラスミド (pSV-CP4) をEcoRV処理し、in vitro転写用の鋳型を作製した。続いて、Megascript T7 kit (Ambion) とDIG RNA Labeling Mix (Roche Diagnostics) を用いた転写反応により、DIG標識SbDV CPアンチセンスRNAを合成した後、アルカリ加水分解により平均70から100塩基にしたものをプローブとした。メンブランをハイブリダイゼーション液 (50% formamide, 2.5×SSC, 2% blocking reagent [Roche Diagnostics], 0.1% sarcosyl, 0.02% SDS) 中で40°C、2時間プレハイブリダイゼーションした後、上記プローブを加えた新しいハイブリダイゼーション液に交換し、40°Cで20時間ハイブリダイゼーションを行った。ハイブリダイゼーション終了後、洗浄液1 (2×SSC, 0.1% SDS) で5分間 (室温) を2回、洗浄液2 (0.1×SSC, 0.1% SDS) で15分間 (40°C) を2回洗浄し、メンブランに付着した過剰なプローブを除去した。次に、メンブランをバッファー1 (0.1 M マレイン酸, 0.15 M NaCl, pH 7.5) で5分間室温処理した後、ブロッキングバッファー (Blocking reagent: バッファー1=1:9) で45分室温処理しブロッキングを行った。ブロッキング終了後、メンブランはAnti-Digoxigenin. AP. Fab fragments (Roche Diagnostics) をブロッキングバッファーで1/20000に希釈した抗体液中で30分間 (室温) 反応させた。抗体反応終了後、メンブランを洗浄液3 (0.45% Tween-20を含むバッファー1) で20分間 (室温) 3回洗浄し、さらにバッファー4 (0.1 M Tris-HCl, 0.1 M NaCl, 50 mM MgCl₂, pH 9.5) 中で3分間 (室温) 振盪した。続いて1/150に希釈したCDP-Star Chemiluminescent Substrateをメンブラン上で5分間反応させ、メンブランをラップに包み、Hyper film ECLに30分間感光させた。

8) アブラムシによる接種試験

ウイルスを保持していない (ウイルスフリー) エンドウヒゲナガアブラムシ (北海道・芽室系統) をSbDV YP系統を維持したシロクローバ葉上に置き、15°Cで5日間獲得吸汁させた後に健全ソラマメに移して15°C、7日間吸汁させ、SbDV YP系統感染ソラマメを作出した。このSbDV YP系統感染ソラマメにウイルスフリーのエンドウヒゲナガアブラムシを移し、15°Cで7日間以上吸汁させて保毒させた。

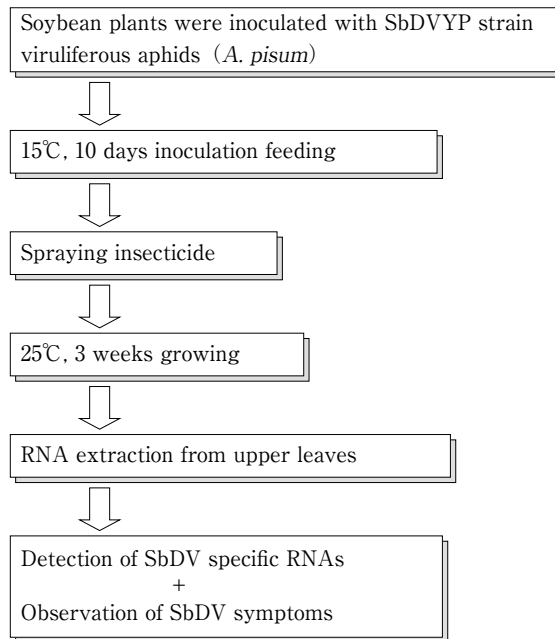


Fig. 5 Flow chart of testing soybean plants for SbDV resistance.

次に、SbDV YP系統保毒エンドウヒゲナガアブラムシ10頭を、播種後約1週間の組換えダイズと非組換えダイズの芽生えに移して15°Cで10日間吸汁させた。接種期間終了後の各ダイズ芽生えに殺虫剤を噴霧した後、植物体を25°C、10,000 lux、16時間明期/8時間暗期に設定したグロースチャンバーにおいて生育させた。ウイルス感染の判定は、上葉における病徴の発現とノーザンブロットによるSbDV由来RNAの検出により行った。アブラムシによる媒介試験のフローチャートをFig. 5に示した。

3 結 果

1) 組換えダイズの作出

ベクター pCP/IR/G のダイズ不定胚への導入操作を70回（1回の導入操作は約20個の不定胚塊への2回のボンバードメントに相当）行い、3個体の再分化個体 (T₀) を得た。CP遺伝子の導入は、PCRでCP遺伝子配列を増幅させることにより確認した（データ非掲載）。得られた3個体の再分化個体を閉鎖温室にて育成したが、2個体は枯死し、1個体のみからT₁種子が得られた。育成したT₁ダイズの閉鎖系温室における生育状況をFig. 6に示した。

2) サザンブロットとノーザンブロットによるT₁組換えダイズの解析

ベクター pCP/IR/G を導入して得られたT₁種子を播き、育成したT₁ダイズを供試した。56個体のT₁



Fig. 6 Growing appearance of a transgenic soybean with the inverted repeat-coat protein genes of SbDV in glasshouse.

ダイズのうち38個体でPCR解析にてCP遺伝子の導入が確認された。38個体のPCRポジティブであった個体のうち3個体でCPプローブを用いたサザンブロットによる導入遺伝子の確認を行った。9本のEcoRI断片（3.2、3.5、4、4.4、4.9、5.2、5.5、6、7 kb）が検出され、調査した3個体のT₁ダイズ全てで同様なバンドパターンを示した（Fig. 7）。

サザンブロットを行ったT₁ダイズと同じ個体においてCPプローブを用いたノーザンブロットによるCP遺伝子の発現確認を行った（Fig. 8）。その結果、CP遺伝子の配列に相同なRNAの蓄積は認められなかった。一方、ポジティブコントロールであるSbDV YP系統感染個体のレーンでは、6 kb付近にゲノムRNAと3 kb付近に高分子サブゲノムRNAが検出された。

3) T₁、T₂個体におけるSbDV接種試験

PCR解析によりSbDV CP遺伝子が確認された38個体のT₁ダイズのうち、26個体にSbDV YP保毒アブラムシを接種した。8個体はSbDVの病徴を示さなかったためT₂種子を採取した。一方、ポジティブコントロールとして35個体の非組換え体のダイズにSbDV YP保毒アブラムシを接種したところ、30個体がSbDVに特異的な病徴を示した。サザンブロットとノーザンブロット解析を行ったT₁ダイズではSbDV YP保毒アブラムシ接種は行わず育成し、T₂

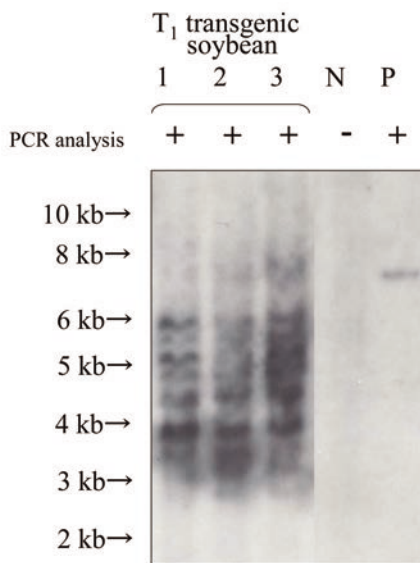


Fig. 7 Southern blot hybridization analysis of T₁ soybean plants.

Genomic DNA (5 µg) was digested with *Eco*RI, separated in 0.8% agarose gel, blotted onto membrane, and hybridized with *CP* gene probe. 'N', non-transformed soybean (cv. Jack); 'P', positive control (pCP/IR/G digested with *Eco*RI). 'PCR analysis' shows the presence or absence of amplified, 592-bp, SbDV-*CP* transgene PCR product.

種子を採取した。Fig. 8の個体番号1のT₁ダイズから採取したT₂種子より育成した9個体について、PCRでSbDV *CP*遺伝子の有無を調査したところ、7個体についてSbDV *CP*遺伝子の保持が確認された。これら7個体のT₂ダイズとポジティブコントロールとして7個体の非組換え体のダイズにSbDV YP保毒アブラムシを接種した。接種1ヶ月後にSbDV特異的RNAの蓄積をノーザンプロットにて解析した。7個体のT₂ダイズ中3個体においてSbDV特異的RNAは検出されなかった (Fig. 9 A)。これらの個体は接種2ヶ月後においてもSbDV特異的病徴を示さず、ELISA検定によりウイルスタンパク質の蓄積も確認できなかった (データ非掲載)。一方、非組換えダイズでは、7個体中6個体において、SbDV特異的病徴が観察され、着莢しなかった。

一本鎖CP RNAプローブを用いてノーザンプロットによるSbDV *CP*遺伝子特異的siRNAの検出を行

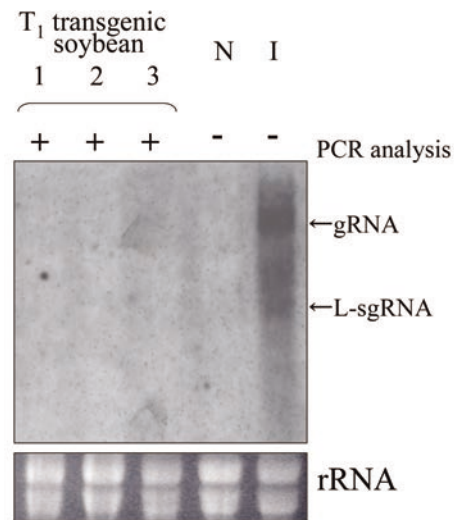


Fig. 8 Northern blot hybridization analysis of T₁ soybean plants.

Total RNA (5 µg) was used for northern blots, separated in denaturing 1.5% agarose gels with formaldehyde, blotted onto membrane, and hybridized with *CP* gene probe. 'N', non-transformed soybean (cv. Jack); 'I', infected soybean plant. gRNA, genomic RNA; L-sgRNA, large subgenomic RNA. 'PCR analysis' shows the presence or absence of amplified, 592-bp, SbDV-*CP* transgene PCR products. 'rRNA' shows equal loading from corresponding plant samples.

った (Fig. 9 B)。SbDVに感染したダイズにはSbDV特異的RNAとSbDV *CP*遺伝子特異的siRNAの両方が蓄積していた。一方、SbDVに感染しなかった3個体のT₂ダイズではSbDV特異的RNAは検出されなかったが、SbDV *CP*遺伝子特異的siRNAは蓄積していた。

4) T₃個体におけるSbDV接種試験

SbDV YP保毒アブラムシ接種後、SbDV抵抗性を示した13個体のT₃ダイズを選抜して、さらに解析を行った (Fig. 10)。これらのT₃ダイズはT₁世代でサザンプロット解析とノーザンプロット解析、T₂世代でSbDV接種試験を行った個体群とは異なり、別に閉鎖温室にて世代を促進させるために得られたものである。13個体のSbDV抵抗性T₃ダイズの葉よりtotal RNAをSbDV接種前と接種後1ヶ月目に抽出した。これらのT₃ダイズにおいて接種後1ヶ月目ではSbDV特異的RNAは検出されなかったが (Fig.

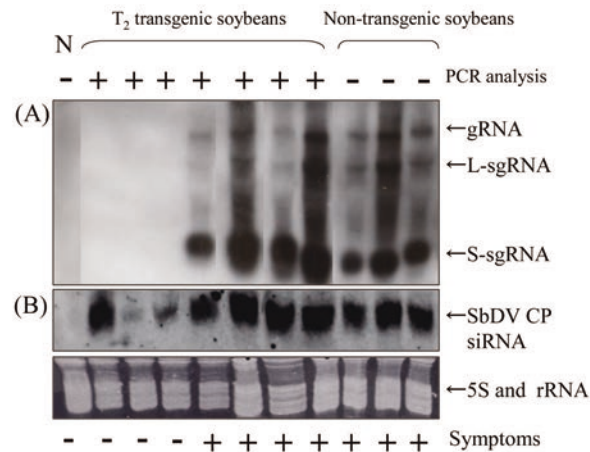


Fig. 9 Detection of SbDV virion by northern blot hybridization analysis with Y-3' probe and accumulation of SbDV-CP homologous siRNA.

(A) Detection of SbDV specific RNAs. Total RNA (10 μ g) inoculated with SbDV was used for northern blot hybridization using Y-3' probe to detect the SbDV virion.

(B) Detection of SbDV-CP homologous siRNA. Total RNA (15 μ g) inoculated with SbDV was used to detect the accumulation of siRNA. Hybridization was performed with single-stranded CP RNA probe, which was hydrolyzed to lengths averaging 100 nt.

'N', non-inoculated soybean (cv. Jack). gRNA, genomic RNA; L-sgRNA, large subgenomic RNA; S-sgRNA, small subgenomic RNA. '5S and rRNA' shows equal loading across the lanes. 'PCR analysis' and 'Symptoms' show the presence or absence of amplified, 592-bp, SbDV-CP transgene PCR products and severity of viral symptoms in mature plants from corresponding plant samples.

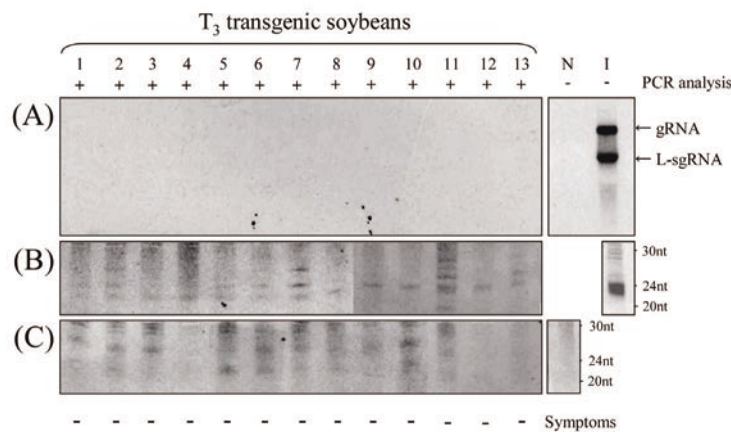


Fig.10 Detection of SbDV virion in T₃ soybean plants by northern blot hybridization analysis with the CP probe and accumulation of SbDV-CP homologous siRNA before and after inoculation with SbDV.

(A) Detection of SbDV specific RNAs. Total RNA (10 μ g) inoculated with SbDV was used for northern blot hybridization using the CP probe to detect the SbDV virion.

(B) Detection of SbDV-CP homologous siRNA after inoculation.

(C) Detection of SbDV-CP homologous siRNA before inoculation.

Total RNA (15 μ g) inoculated with SbDV was used to detect the accumulation of siRNA. Hybridization was performed with single-stranded CP RNA probe, which was hydrolyzed to lengths averaging 100 nt.

'N', non-inoculated soybean (cv. Jack). 'I', infected soybean plant. gRNA, genomic RNA; L-sgRNA, large subgenomic RNA. 'PCR analysis' and 'Symptoms' show the presence or absence of amplified, 592-bp, SbDV-CP transgene PCR products and severity of viral symptoms in mature plants from corresponding plant samples.

10 A)、SbDV CP遺伝子特異的siRNAは蓄積していた (Fig. 10 B)。一方、接種前に抽出しておいた total RNAを用いて、SbDV CP遺伝子特異的siRNAの検出を試みたところ、蓄積が確認された (Fig. 10 C)。

4 考 察

1) SbDV CP遺伝子逆位反復配列導入ダイズの遺伝解析

T₁ダイズ56個体について、PCRによりSbDV CP遺伝子を増幅したところ、遺伝子特異的バンドが検出された個体と検出されなかった個体の比率が、38:18であった。この分離比についてカイ2乗検定を行ったところ、 $\chi^2=1.52$ ($0.3 > p > 0.1$) となり、3:1の分離比に近似していた。このことより、サザンブロット解析により示された導入断片は同一染色体上に存在し、連鎖していると考えられた。

導入したSbDV CP遺伝子の全長を含む、35Sプロモーター5'末端のHindIIIサイトからNOSターミネーター3'末端のEcoRIサイトまでの領域の距離は約2.7 kbである。一方、得られたSbDV CP遺伝子IR配列導入ダイズの9本のEcoRI断片はいずれも2.7 kb以上であるため、導入遺伝子の分断も考えられるものの、いずれかの断片は35SプロモーターからNOSターミネーターまでの全長の導入単位が含まれていると考えられる。

サザンブロット解析でSbDV CP遺伝子の導入が確認された3個体のT₁ダイズにおいて、ノーザンブロットによる同遺伝子のmRNAの発現解析を行ったところ、3個体全てmRNAの蓄積が認められなかった。この発現抑制は、SbDV CP遺伝子をIR配列として導入することにより、目的通りRNAサイレンシングが生じた結果であるか、あるいは、導入遺伝子のメチル化によって転写が阻害された結果である可能性がある。しかし、導入遺伝子の断片化やリアレンジメントの可能性も否定できない。パーティクルボンバードメントによる遺伝子導入にはプラスミド全体が利用され、目的遺伝子とともに余分なベクターバックボーンの配列も宿主生物のゲノムDNAに導入される (Fu *et al.* 2000; Reddy *et al.* 2003)。ベクターバックボーン配列は導入遺伝子のリアレンジメントを引き起こす。また、パーティクルボンバードメントによる遺伝子導入では、一般的に、導入遺伝子がゲノム上に多コピー導入される。同じプロモーター領域が多コピー導入されると、プロモーター領域のメチル化、転写因子の結合阻害、

クロマチン構造の変化などにより、しばしば転写型ジーンサイレンシング (transcriptional gene silencing, TGS) が起こり、導入遺伝子のmRNAが転写されなくなる (Ng and Bird 1999; Matzke *et al.* 2000; Vaucheret and Fagard 2001)。本研究でサザンブロットとノーザンブロット解析を行ったT₁ダイズでは、SbDV保毒アブラムシ接種前のSbDV CP遺伝子特異的siRNAの検出を実行していないが、これらの解析をしたT₁ダイズとは別に育成したT₁とT₂ダイズから得られたT₃ダイズにおいてSbDV保毒アブラムシ接種前に抽出したtotal RNAを用いて、SbDV CP遺伝子特異的siRNAの検出を試みたところ、蓄積が確認された。このことにより、本研究で得られたSbDV CP遺伝子IR配列導入ダイズは、導入遺伝子由来のRNAが自己相補的にヘアピン構造を取り、二本鎖RNAとなり、RNAサイレンシングを誘導している可能性が示された。

2) SbDV CP遺伝子逆位反復配列導入ダイズのSbDV抵抗性におけるsiRNAの関与

サイレンシングされた遺伝子の塩基配列に特異的な21から23塩基のsiRNAの生産は、RNAサイレンシングの指標である。SbDVに感染した4個体のT₂ダイズでは、SbDV特異的RNAとSbDV CP遺伝子特異的siRNAが蓄積していた。一方、SbDV特異的病徴を示さなかった3個体のT₂ダイズでは、SbDV特異的RNAは検出されず、SbDV CP遺伝子特異的siRNAのみが蓄積していた。ウイルス由来の遺伝子を導入した植物のウイルス抵抗性は、RNAサイレンシング機構が重要な役割を果たしており、これらの抵抗性植物において蓄積したsiRNAを検出している (Vazquez Rovere *et al.* 2001; Kalantidis *et al.* 2002)。pCP/IR/Gを導入したT₂ダイズはRNAサイレンシングによるSbDV抵抗性を獲得したと考えられた。しかし、サザンブロットとノーザンブロット解析を行ったT₁ダイズでは、SbDV保毒アブラムシ接種前のSbDV CP遺伝子特異的siRNAの検出を実行していなかった。従って、その抵抗性がRNAサイレンシングによるものである確証を得るために、SbDV YP保毒アブラムシ接種後、SbDV抵抗性を示した13個体のT₃ダイズを選抜して、さらに解析を行った。これらのT₃ダイズは、接種前後でSbDV CP遺伝子特異的siRNAは蓄積しており、接種後1ヶ月目ではSbDV特異的RNAは検出されなかった。このことより、本研究で得られたSbDV CP遺伝子

IR 配列導入ダイズは、RNA サイレンシング機構による SbDV 抵抗性を示したと考えられる。

3) SbDV CP 遺伝子逆位反復配列導入ダイズの SbDV 抵抗性の個体間差

ルテオウイルス属のウイルスは遺伝子組換えによる抵抗性付与が困難であるといわれている (Barker and Waterhouse 1999)。Wang *et al.* (2000) はアグロバクテリウム法により、ルテオウイルス属である BYDV のポリメラーゼ領域の二本鎖 RNA を転写する構造を導入した組換えオオムギを作出し、その子孫の解析で、1 コピーの導入遺伝子が BYDV 抵抗性に関与することを明らかにしている。一方、パーティクルボンバードメントで作出した遺伝子組換え植物は遺伝子が複雑に導入されることが知られており、本研究においても、導入遺伝子が含まれていると考えられる 9 本の *EcoRI* 断片が検出された。PCR 解析にて SbDV CP 遺伝子の導入が確認された 7 個体の T₂ ダイズのうち 4 個体は、導入遺伝子を保持しているにもかかわらず SbDV 保毒アブラムシ接種試験において SbDV 特異的病徴を示した。すなわち、T₂ 世代では抵抗性個体と感受性個体が混在していた。パーティクルボンバードメント法により多コピーの *GUS* 遺伝子が導入された組換えダイズの T₂ 個体間において、*GUS* 遺伝子の発現に顕著な差があり、その差はプロモーター、あるいはコード領域のメチル化の程度によって異なることが報告されている (Reddy *et al.* 2003)。本研究においても、導入した SbDV CP 遺伝子 IR 配列のメチル化の程度が個体ごとに異なり、生産される siRNA の量に影響を及ぼしていることが考えられる。今後は 35S プロモーター領域や SbDV CP 遺伝子 IR 配列のメチル化の程度を調べ、SbDV 抵抗性の有無との関連を調査する必要がある。

さらに、本研究で SbDV 保毒アブラムシを接種した SbDV CP 遺伝子 IR 配列導入個体群は、導入遺伝子がホモとヘミの状態が混在した個体群である。導入遺伝子がホモ化されると、ゲノム中の目的遺伝子量が 2 倍になるため、ヘミ個体と mRNA の転写量に差が生じることが考えられる。Aida and Shibata (1998) は、*GUS* 遺伝子を導入したトレニアを作出し、*GUS* 遺伝子がヘミ状態のトレニアは *GUS* が発現しているが、ホモ状態になると、転写される mRNA 蓄積量がある一定値以上を超えると、mRNA 分解の方向に働き出す、閾値モデル (Smith *et al.* 1994) に

よる RNA サイレンシングが起り、*GUS* が発現しなくなると報告している。従って、導入遺伝子がホモあるいはヘミ状態のいずれであるのかが、RNA サイレンシングによる SbDV 抵抗性に影響を及ぼしていると考えられる。

本研究で得られた SbDV CP 遺伝子 IR 配列導入ダイズの T₄ 世代以降の個体で、SbDV 保毒アブラムシ接種による抵抗性検定を継続するとともに、それらの個体において導入遺伝子の分離とメチル化の 2 点について詳細に解析することによって、SbDV CP 遺伝子 IR 配列から安定した siRNA の生産が行われ、RNA サイレンシング機構による SbDV 抵抗性を持つ遺伝子組換えダイズ固定系統を得ることができると考えられる。

III センス SbDV CP 遺伝子を導入した SbDV 抵抗性ダイズの解析

1 緒 言

II 章において SbDV 抵抗性の SbDV CP 遺伝子 IR 構造導入組換えダイズを作出した。しかし、緒論で述べた通り、組換え植物で RNA サイレンシング誘導によるウイルス抵抗性メカニズムが明らかになるまでは、センス鎖のウイルス CP 遺伝子のみが主に導入されてきた経緯がある。すなわち、CP 遺伝子が過剰発現することによって異常な RNA 転写と認識され、偶発的に RNA サイレンシングが誘導され、ウイルス抵抗性が獲得できる。もしくは、導入した CP 遺伝子より mRNA が転写され、CP へと翻訳され、タンパク質を仲介とした機構によりウイルス抵抗性を獲得することも考えられる。

III 章ではセンス鎖の SbDV の CP 遺伝子領域を導入した遺伝子組換えダイズを作出し、その SbDV 抵抗性を調査した。

本研究の結果の一部は既に投稿論文にて発表されており (Tougou *et al.* 2007)、本研究では改変並びに補充されたデータを追加して記した。

2 材料および方法

1) センス SbDV CP 遺伝子強発現プラスミドの構築

II 章の SbDV CP 遺伝子 IR 配列発現プラスミドの構築時と同様に、SbDV の YP 系統の cDNA クローンより制限酵素 *XbaI* 認識サイトを含むフォワードプライマー (5'-TTTCTAGAAATGGTTCGCGGT-TAGCAATGT-3') と制限酵素 *SacI* 認識サイトを

含むリバースプライマー（5'-TTTTTGAGCTC-TATTTAGCATCTCGCTTA-3'）を用いたPCR反応にて、SbDV CP遺伝子をコードする領域を増幅し、得られたPCR産物をXbaIとSacIで処理し、pE2113 (Mitsuhara *et al.* 1996) の同制限酵素サイトに導入した。pE2113は35Sプロモーターの上流部にエンハンサーが二つ並んだE12を持ち、下流部にΩ配列をもつ高発現タイプのベクターである。作製したプラスミドをpE12Ω-SbDVCPと名付けた (Fig. 11)。以上のように作製されたプラスミドは東北農業研究センター 日高 操博士により分譲して頂いた。

2) ダイズ遺伝子導入法

ダイズへの遺伝子導入は、II章と同様のパーティクルガンによるダイズ不定胚への導入法を用い、pE12Ω-SbDVCPとpE2113-HPTをCo-transformationにより遺伝子導入を行った。

3) PCRによる導入遺伝子の確認

II章と同様の方法を用い、作出した遺伝子組換えダイズのPCRによるSbDV CP遺伝子の導入確認を行った。

4) サザンブロット解析

作出した遺伝子組換えダイズ葉のゲノムDNAを制限酵素 SacIで切断する以外は、II章と同様の方法を用いて、ハイブリダイゼーションによる導入遺伝子の検出を行った。

5) RNA抽出

RNA抽出はacid-guanidium-phenol-chloroform method (AGPC法) (van den Heuvel *et al.* 1999) を用いた。すなわち、組換えダイズと非組換えダイズの新葉 (約50 mg) に750 μlのGTC溶液 (4 M グアニジンチオシアン酸塩、25 mM クエン酸二ナトリウム水和物、0.5%ザルコシル、100 mM 2-メル

カプトエタノール) を加えてMicro Smash MS-100を用いて液状になるまで完全に磨砕した。磨砕液に75 μlの2 M 酢酸ナトリウム溶液 (pH 4.0) を加えて激しく攪拌し、続いて水飽和フェノールを750 μl加えて激しく攪拌した後、150 μlのクロロホルムを加えて激しく攪拌して完全に混合した。氷水中に静置した後遠心分離 (15,000 rpm、15分間、4℃) を行い、RNAを含む水層を回収した。回収した水層に等量の2-プロパノールを加えて攪拌し、氷水中に1時間静置した。静置後遠心分離 (15,000 rpm、10分間、4℃) により得たRNAの沈殿を100 μlの滅菌蒸留水に溶解した (RNA粗抽出液)。RNA粗抽出液より、導入遺伝子の転写産物やSbDVゲノムRNAを含む高分子量RNA (high-molecular-weight RNA, HMW-RNA) とsiRNAを含む低分子量RNA (low-molecular-weight RNA, LMW-RNA) を分画するために、50 μlの24%ポリエチレングリコール6000・2.2 M NaCl溶液を添加し、氷水中に1時間静置した。HMW-RNAを含む沈殿は20 μlの滅菌蒸留水に溶解し、ノーザンブロットに利用した。LMW-RNAを含む上清はエタノール沈殿を行った後、12 μlの滅菌蒸留水に溶解し、siRNAの解析に用いた。

6) ノーザンブロットによる導入遺伝子の発現解析

上記により得られたHMW-RNA溶液の半量である10 μlを用いて、SbDV CP遺伝子の転写を確認した。プローブには加水分解処理を行わない全長一本鎖DIG標識SbDV CPアンチセンスRNAを用い、ハイブリダイゼーションと洗浄を35℃で行った以外は、II章と同様の方法を用い、ハイブリダイゼーションとシグナルの検出を行った。

7) 低分子RNA解析

上記により得られた12 μlのLMW-RNA溶液を用

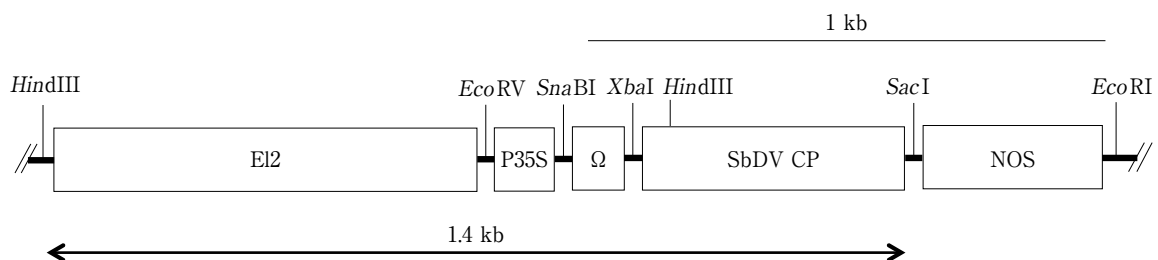


Fig. 11 Structure of plasmid used for transformation of sense SbDV-CP gene.

Plasmid pE12Ω-SbDVCP contains the sense SbDV-CP gene. 'E12', 5' upstream sequence of the CaMV 35S promoter ×2; 'P35S', CaMV 35S promoter; 'Ω', 5' untranslated sequence of TMV.

いてSbDV CP遺伝子と相同性のあるsiRNAの検出を行った。ハイブリダイゼーションと洗浄を35℃で行った以外はII章と同様の方法を用い、ハイブリダイゼーション、シグナルの検出を行った。

8) アブラムシによる接種試験

SbDV YP保毒アブラムシの増殖とダイズへの接種は、媒介アブラムシにツメクサベニマルアブラムシを用いること以外はII章と同様の方法を用いた。ウイルス感染の判定は、接種3週間後のRNAドットプロット分析によるSbDV由来RNAの検出と、接種2ヶ月後の上葉における病徴の発現観察により行った。

9) RNAドットプロットによるSbDV特異的RNAの検出

アブラムシによる接種試験において、SbDV感染の有無を簡便にウイルスゲノムRNAレベルで検出するため、Yamagishi *et al.* (2006) によるRNAドットプロットによるSbDV特異的RNAの検出を行った。すなわち、前述の方法により得たSbDV YP接種・非接種の組換えダイズと非組換えダイズの新葉(約50 mg)のtotal RNAを含む40 µlのRNA粗抽出のうち、10 µlを30 µlの変性溶液(10×SSC、18.6%ホルムアルデヒド液)を加えて混和し、65℃で20分間処理したあと、氷水中にて急冷し、ドットプロットに供するサンプルとした。RNAドットプロットは次の通り行った。20×SSCで全処理したHybond-N⁺をImmunodot AE-6190 dot blotting apparatus(ATTO)にセットし、ウェルを10×SSCで洗浄し、RNAをウェルにアプライした。続いて、ウェルを10×SSCで洗浄し、洗浄後のメンブランを20×SSCで処理した後、ベーキングを行い、RNAをメンブランに固定した。メンブランのハイブリダイゼーションおよびシグナルの検出はII章と同様の方法を用いた。

3 結 果

1) 組換えダイズの作出

ベクター-pE12Ω-SbDVCPのダイズ不定胚への導入操作を294回行い、10個体の再分化個体(T₀)を得た。SbDV CP遺伝子の導入は、PCRでCP遺伝子配列を増幅させることにより確認した(データ非掲載)。得られた10個体の再分化個体を閉鎖温室にて育成したが、4個体は枯死し、6個体からT₁種子が採取された。それぞれの再分化個体は、異なるハ

イグロマイシン選抜カルチャーボトルより生じたことから独立の遺伝子導入個体である。T₀再分化個体から得られたT₁種子群に、収穫した順に1から6番の系統番号を付した。

2) T₁、T₂ダイズにおけるSbDV接種試験

SbDV CP遺伝子導入個体群のSbDV接種試験の結果をTable 2に示した。導入遺伝子の確認はSbDV保毒アブラムシを接種する前にPCR解析にて行った(データ非掲載)。SbDV保毒アブラムシ接種2ヶ月後に特異的病徴を示したものをSbDV感染ダイズと判定した。系統番号1のT₂ダイズは11個体中8個体がSbDVに感染しなかったが、T₁とT₂ダイズの合計では34個体中20個体がSbDV特異的病徴を示したので、SbDV抵抗性は低いと考えられた。系統番号2のT₁とT₂個体群は検体数が少ないが、合計で11個体中8個体がSbDV特異的病徴を示したので、SbDV抵抗性は低いと考えられた。系統番号3のT₁個体群は調査した9個体全てがSbDVに感染しなかったが、T₂個体群において26個体中18個体がSbDV特異的病徴を示したので、SbDV抵抗性は低いと考えられた。系統番号4と5では、採取できた種子が少なかったため、T₁ダイズではSbDV接種を実行せず、T₂ダイズでも接種検体数が少ないため、SbDV抵抗性を判別するには不十分であった。系統番号6のT₁ダイズは3個体全てSbDVに感染せず、T₂ダイズは39個体中10個体でSbDV特異的病徴を示した。しかしながら、T₂ダイズの残りの29個体はSbDV特異的病徴を示さず、正常の発育を示し、多数の種子を付けて非組換え体との生育に差異を示さなかったことから系統番号6の個体群をSbDV抵抗性の詳細な解

Table 2 Infection rates of transgenic soybean lines with SbDV-CP transgene inoculated with SbDV by aphid.

Line	T ₁	T ₂	Total
1	17/23 ^a (14/15) ^b	3/11(7/8)	20/34(21/23)
2	0/1(16/20)	8/10(11/13)	8/11(27/33)
3	0/9(29/34)	18/26(14/16)	18/35(43/50)
4	n.t. ^c	4/7(10/10)	4/7(10/10)
5	n.t.	1/11(12/12)	1/11(12/12)
6	0/3(5/6)	10/39(16/16)	10/42(21/22)

^a Number of infected transgenic soybeans/total number of inoculated transgenic soybeans

^b Number of infected non-transgenic soybeans (cv. Jack)/total number of inoculated non-transgenic soybeans (cv. Jack)

^c Infection rate was not tested

析に供試した。

3) サザンプロットによる系統番号6の組換えダイズの解析

系統番号6について、PCR解析にてSbDV CP遺伝子の導入が確認された11個体のT₁ダイズでCPプローブを用いたサザンプロットによる導入遺伝子の確認を行った。これら11個体のT₁ダイズは導入遺伝子のバンドパターンにより3種類に分類された (Fig. 12 T₁)。1個体は2.7 kbの1本のSacI断片を、2個体は0.6、1.9、2.2、3、4、4.6 kbの6本のSacI断片を、そして8個体は0.6、1.9、2.2、3、4、4.6 kbの7本のSacI断片を所持していた。本研究では便宜上、2.7 kbの1本のSacI断片を「A」インサート、0.6、1.9、2.2、3、4、4.6 kbの6本のSacI断片を「B」インサートと分類した。そして、0.6、1.9、2.2、2.7、3、4、4.6 kbの7本のSacI断片を持つT₁ダイズは、「A」と「B」インサート両方をもつ (A+B) ことが泳動像のバンドパターンより推測された。A、BとA+Bインサートを持つT₁ダイズ個体から採種し育成したT₂世代で、それぞれ4個体を無作為に選

び出し、同様にCPプローブを用いたサザンプロットによる導入遺伝子の確認を行った。検定したそれぞれ4個体のT₂ダイズは全て、親であるT₁ダイズ個体と同じバンドパターンを示した (Fig. 12 T₂)。さらに、サザンプロット解析を行わなかった残りのT₂ダイズもPCR解析にてSbDV CP遺伝子の導入が確認された (データ非掲載)。従って、解析に選んだT₁とT₂ダイズ個体はそれぞれのインサートがホモ化した固定系統であることが分かった。これらのA、BとA+Bインサートがホモ化した系統番号6の組換えダイズには、それぞれ系統番号6 A、6 Bと6 ABとした新系統名を与えた。育成した系統番号6のT₁ダイズの閉鎖系温室における生育状況をFig. 13に示した。

4) ノーザンプロットによる系統番号6のT₂ダイズの解析

系統番号6 A、6 Bと6 ABのT₂ダイズにおいてCPプローブを用いたノーザンプロットによるSbDV CP遺伝子の発現確認を、SbDV 保毒アブラムシを接種する前に行った (Fig. 14 A)。系統番号6 Aの

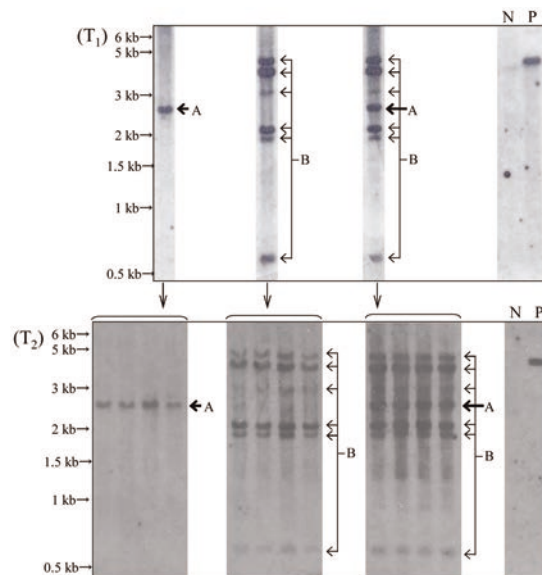


Fig.12 Southern blot hybridization analysis of T₁ and T₂ soybean plants in line 6.

Genomic DNA (5 μg) was digested with SacI, separated in 1% agarose gel, blotted onto membrane and hybridized with a CP probe. 'N', non-transgenic soybean (cv. Jack); 'P', positive control (pE12Ω-SbDVCP digested with SacI). The transgene insertions in this line were grouped into two fragments, 'A' and 'B'.

The upper panel (T₁) shows the insertion patterns of three representative T₁ plants which contain different fragments.

The bottom panel (T₂) shows the insertion patterns of the T₂ progenies of each T₁ plant. The arrows connecting (T₁) to (T₂) show that all four T₂ plants were progenies of the original T₁ plant.

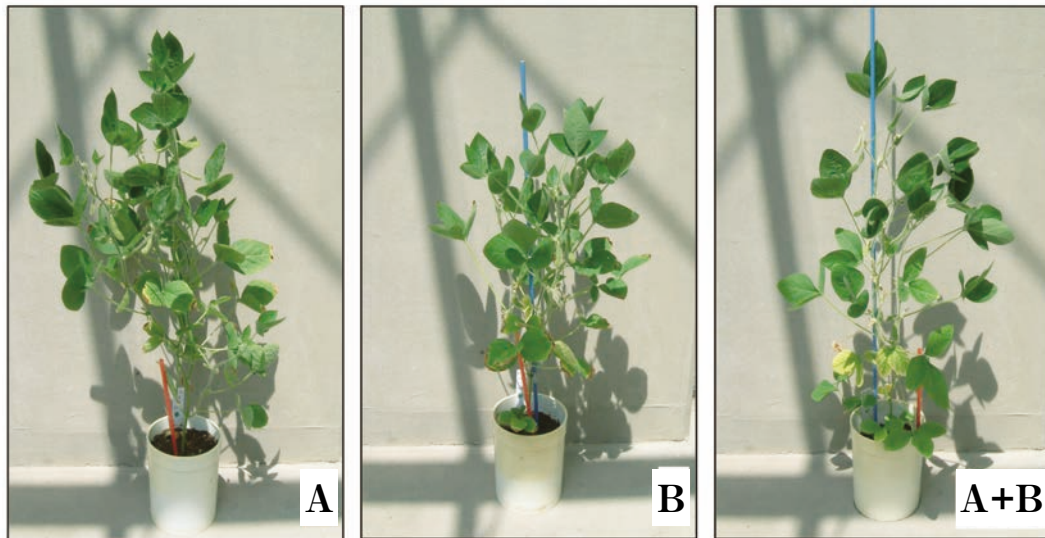


Fig.13 Growing appearance of transgenic soybeans with the SbDV-CP gene in glasshouse. Left panel, 'A', middle panel, 'B', and right, 'A+B', show T₂ soybean plants (line 6) that had the A, B and A+B transgene insertion patterns, respectively,

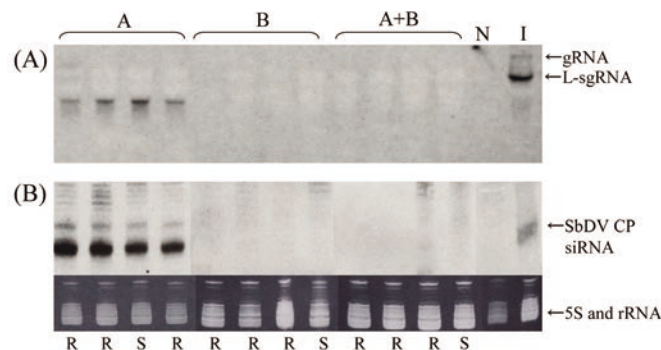


Fig.14 Detection of mRNA derived from the SbDV-CP transgene and the SbDV-CP homologous siRNA in T₂ soybean plants (line 6) prior to inoculation with SbDV.

(A) Northern blot hybridization analysis of SbDV-CP mRNA in T₂ plants.

HMW-RNA was used for northern blots, separated in denaturing 1.5% agarose gels with formaldehyde, blotted onto membrane and hybridized with a CP probe. 'A', 'B' and 'A+B', T₂ plants that had the A, B and A+B transgene insertion patterns, respectively. 'N', non-transgenic soybean (cv. Jack); 'I', infected soybean plant, gRNA, genomic RNA; L-sgRNA, large subgenomic RNA.

(B) Detection of SbDV-CP homologous siRNA in T₂ plants.

HMW-RNA was used to detect the accumulation of siRNA. Hybridization was performed with a single-stranded CP RNA probe, which was hydrolyzed to lengths averaging 100 nt.

The bottom panel of '5S and rRNA' shows loading control across the lanes. 'R' and 'S' indicate resistant and sensitive response to SbDV two months after inoculation, respectively.

T₂ダイズにおいてSbDV CP遺伝子のmRNA (約600 bp) の蓄積が確認されたが、系統番号6 Bと6 ABのT₂ダイズでは蓄積は認められない、もしくは検出限界以下であった。(Fig. 14 A)。これらのT₂ダイズにおいて、SbDV保毒アブラムシを接種する前にSbDV CP遺伝子特異的siRNAの検出を試みた(Fig. 14 B)。系統番号6 AのT₂ダイズにおいてSbDV CP遺伝子特異的siRNAの蓄積が確認された。一方、系統番号6 Bと6 ABのT₂ダイズではsiRNAの蓄積は認められない、もしくは検出限界以下であった(Fig. 14 B)。

5) 系統番号6のT₂ダイズにおけるSbDV抵抗性と特異的RNAの検出

系統番号6 AのT₂ダイズに関しては、14個体中12個体がSbDV抵抗性であった(Fig. 15 A)。これら12個体では、SbDV特異的RNAは検出されない、もしくはわずかにしか検出されなかった。しかしその一方、系統番号6 AのT₂ダイズ全個体からSbDV CP遺伝子特異的siRNAは検出された。この結果は、これら12個体のT₂ダイズはRNAサイレンシングによるSbDV抵抗性を獲得したことを示している。SbDVのRNAドットプロット解析により、4個体のT₂ダイズ(個体番号5、9、10、14)においてわずかにSbDV特異的RNAの蓄積が認められた(Fig. 15 A)。これらの4個体のうち2個体(同5、10)が最終的にSbDV特異的病徴を接種2ヶ月後に示した。残り

A	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	infection rate
RNA dot blot															2 / 14
phenotype	R	R	R	R	S	R	R	R	R	S	R	R	R	R	
siRNA after inoculation	+	+	+	+	++	+	±	+	+	+	+	+	+	+	
B	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	infection rate				
RNA dot blot											3 / 10				
phenotype	R	R	S	R	R	R	S	S	R	R					
siRNA after inoculation	±	±	+	+	n.t	n.t	++	++	-	-					
A+B	1	2	3	4	5	6	7	8	9	infection rate					
RNA dot blot										2 / 9					
phenotype	R	R	R	R	R	R	R	S	S						
siRNA after inoculation	±	±	±	±	±	++	±	++	++						
Control soybeans inoculated with SbDV										Control soybeans total infection rate	10/10				
RNA dot blot															
phenotype	S	S	S	S	S	S	S	S	S			S			

Fig.15 Testing for SbDV resistance in T₂ plants (line 6) by RNA dot-blot analysis.

The upper panel, 'A', second panel, 'B', and third panel, 'A+B', show the results of T₂ plants (line 6) that had the A, B and A+B transgene insertion patterns, respectively, as confirmed by Southern hybridization analysis when digested with *Sac*I. Image films of 'RNA dot-blot' show the results of detection of SbDV-YP strain RNAs by RNA dot-blot hybridization analysis with a Y-3' probe. One-fourth volume of total RNA extracted from a soybean plant leaf (80 mg) three weeks after inoculation with SbDV-YP strain was dot-blotted onto membrane and hybridized with a Y-3' probe. 'R' and 'S' indicate resistant and sensitive response to SbDV two months after inoculation, respectively, judged visually based on the appearance or lack of appearance of SbDV-specific symptoms. The accumulation levels of SbDV-CP homologous siRNA in soybean plants one month after inoculation are discriminated with '+' high, '++' very high, '±' weak, '-' not detectable and 'n.t.', not tested in this plant. The bottom panel shows a sample image figure of RNA dot-blot analysis in the control SbDV-YP strain-infected non-transgenic soybean (cv. Jack). 'N', non-inoculated soybean.

の2個体(同9、14)は生育後期においてもSbDV特異的病徴は示さなかった。

系統番号6BのT₂ダイズに関しては、10個体中7個体がSbDV抵抗性であった(Fig. 15 B)。SbDV抵抗性7個体のうち、3個体のT₂ダイズ(個体番号1、2、4)でSbDV CP遺伝子特異的siRNAが検出され、2個体(同9、10)では検出されなかった。残りの2個体(同5、6)については、siRNAの検出実験を行わなかった。接種2ヶ月後にSbDV特異的な病徴を示していた3個体のT₂ダイズ(同3、7、8)では、SbDV RNAドットプロット解析により接種3週間目で、非常に高レベルでSbDV特異的RNAが蓄積していた(Fig. 15 B)。

系統番号6ABのT₂ダイズに関しては、9個体中7個体がSbDV抵抗性であった(Fig. 15 A+B)。これら7個体のT₂ダイズではSbDV特異的RNAは検出されず、SbDV CP遺伝子特異的siRNAが検出された。接種2ヶ月後にSbDV特異的な病徴を示した残りの2個体のT₂ダイズ(個体番号8、9)では、SbDV RNAドットプロット解析により接種3週間目で、非常に高レベルでSbDV特異的RNAが蓄積していた。

SbDV接種から3週間後のRNAドットプロット解析によりSbDV特異的RNAが高レベルに検出された組換えダイズは、接種2ヶ月後においてもSbDV特異的病徴を示した。一方、接種3週間後にSbDV特異的RNAがわずかに検出された組換えダイズでは、接種2ヶ月後にSbDVの病徴を示した個体と病徴を示さない個体に分かれた。一方、ポジティブコントロールとして非組換え体のダイズにSbDV保毒アブラムシを接種し、SbDVのRNAドットプロット解析と病徴発現の確認を行い、接種効率を調査した。その結果、調査した10個体全てがSbDVに特異的な病徴を示し、接種効率は100%であった(Fig. 15)。

4 考 察

1) 系統番号6の遺伝解析

本研究において、センスSbDV CP遺伝子を導入し、SbDV抵抗性を獲得した組換えダイズを作成した。系統番号6のT₁ダイズにおいて、サザンプロットによるSbDV CP遺伝子の導入確認を行い、3種類の導入パターンを確認した。T₁ダイズのサザンプロットのパターンから、T₀ダイズではパーティクルボンバードメントによって1コピーのSbDV CP遺伝子がある染色体上に(Aインサート)、6コピーのSbDV CP遺伝子が別の染色体上(Bインサ

ート)に導入されたと推測された。T₀ダイズより得られた系統番号6Aと6BのT₁ダイズは、これら2つのインサートのうちどちらかが遺伝し、系統番号6ABのT₁ダイズは両方のインサートが遺伝したと考えられる。導入遺伝子の目的領域のうち、35Sプロモーター5'末端のHindIIIサイトからSbDV CP遺伝子の3'末端のSacIサイトまでの距離は約1.4 kbであることから、導入遺伝子の分断も考えられるが、本研究で得られた系統番号6AのT₂個体の2.7 kbのSacI断片には、SbDV CP遺伝子のmRNAを転写させる全長領域が含まれると考えられる。系統番号6BのT₂ダイズは0.6、1.9、2.2、3、4、4.6 kbの6本のSacI断片を持ち、1.4 kb以上の断片を含んでいるため、系統番号6Aと同様にSbDV CP遺伝子転写領域を持つと考えられる。しかし、SbDV CP遺伝子のmRNAの蓄積は認められなかった。また、系統番号6ABのT₂ダイズでも、系統番号6Aの個体と同様にSbDV CP遺伝子のmRNA発現に関わると考えられるAインサートを持つにもかかわらず、mRNAの蓄積は認められなかった。

これらのT₂ダイズにおいて、SbDV保毒アブラムシを接種する前にSbDV CP遺伝子特異的siRNAの検出を試みた。系統番号6AのT₂ダイズにおいてSbDV CP遺伝子特異的siRNAの蓄積が確認された。この結果は、検出したsiRNAは導入したSbDV CP遺伝子由来であって、この個体においてRNAサイレンシングが起こっていることを示している。検出したsiRNAは過剰発現したSbDV CP遺伝子のmRNAが分解した産物であると考えられる。一方、系統番号6Bと6ABのT₂ダイズではsiRNAの蓄積は認められなかったため、SbDV CP遺伝子のmRNAの転写後分解は行われていない、もしくは検出限界以下と考えられる。これらの結果から、Bインサートを持つ個体はSbDV CP遺伝子のmRNA発現と導入遺伝子由来のsiRNAの蓄積が何らかの要因により阻害されたと考えられる。

2) 系統番号6の個体において想定される

SbDV抵抗性機構

本系統のT₂ダイズにおいて、高度なSbDV抵抗性が観察された。特に、SbDV接種前にSbDV CP遺伝子由来のsiRNAが蓄積している系統番号6AのT₂ダイズは個体群の中で高頻度に抵抗性個体が存在した。SbDVを接種する前と後でSbDV CP遺伝子特異的siRNAが検出されたことから、系統番号6Aでは

導入遺伝子が過剰発現し、mRNAが分解される閾値モデルによるRNAサイレンシングが誘導されていると考えられ、SbDVが分解されて、系統番号6AのT₂ダイズにSbDV抵抗性が付与されたと考えられた。

一方で、系統番号6Bと6ABのT₂ダイズのほとんどがSbDV抵抗性であったが、RNAサイレンシングによる抵抗性であることの十分な証拠を得ることができなかった。さらに、これらの個体ではSbDV CP遺伝子のmRNAが発現していないことから、タンパク質を仲介とした (protein-mediated) 機構による抵抗性の可能性はないと考えられる。従って、この系統でのSbDV抵抗性の機構は現在のところ不明であるが、本研究で用いた実験手法での検出限界以下のわずかな量のSbDV CP遺伝子由来のsiRNAが、RNAサイレンシングによるSbDV抵抗性を誘導している可能性もある。

系統番号6ABの個体はAインサートを持っているにもかかわらず、SbDV CP遺伝子のmRNAもsiRNAも蓄積しておらず、系統番号6Bと同様の傾向を示していた。系統番号6Bと6ABの個体では、TGSが誘導されている可能性がある。TGS化した外来遺伝子のローカスが同じプロモーターを持つ他の遺伝子を同様にTGS化することが報告されており (Park *et al.* 1996; Mourrain *et al.* 2007)、本研究でも同様に系統番号6ABの個体において、TGS化したBインサートがAインサートをTGS化してSbDV CP遺伝子のmRNA転写を阻害しているかもしれない。これまでに、TGSがウイルス抵抗性を誘導しているという報告はないことから、系統番号6Bと6ABで確認されたSbDV抵抗性はこれまでに知られていない機構で誘導された抵抗性であるかもしれない。この仮説を検証するためにも、今後メチル化解析など詳細な研究を継続する必要がある。

3) 系統番号6の個体間におけるSbDV抵抗性の程度の違い

系統番号6において、SbDV抵抗性のあったT₂個体と同じ導入遺伝子を持つにもかかわらず、SbDV感受性の個体が存在した。系統番号6A、6Bと6ABでは導入遺伝子は固定している。従って、T₂個体間における導入遺伝子のホモとヘミによる転写量の差の可能性は排除できる。

本研究と同様に、ウイルスの塩基配列の一部を植物に導入したところ、ウイルス抵抗性の個体を得た

が、同時に感受性の個体も存在し、個体間において導入遺伝子のプロモーターやコード領域のDNAメチル化に違いが観察された報告がある (Sijen *et al.* 1996; Ingelbrecht *et al.* 1999)。導入遺伝子のメチル化とウイルス抵抗性の明確な関係は証明されていないが、PTGSは導入遺伝子の些細な変化に非常に影響を受け (English and Baulcombe 1997) ることから、組換え植物の導入遺伝子のメチル化による些細な変化は、RNAサイレンシング機構によるウイルス抵抗性に影響を及ぼすかもしれない。さらに、遺伝子導入に用いた植物の遺伝的背景、環境要因や発育ステージがRNAサイレンシングによるウイルス抵抗性に影響を及ぼすことも示唆されている (Pang *et al.* 1996; Kalantidis *et al.* 2002)。本研究における系統番号6のセンスSbDV CP遺伝子導入ダイズにおいても、導入遺伝子の些細な変化や環境要因が個体間で異なり、導入遺伝子の転写量やSbDV抵抗性に差異が生じているのかもしれない。

4) 安定したSbDV抵抗性組換えダイズを獲得するために

数多くの研究グループがダイズ組換え体を作成するためにパーティクルボンバードメントによる導入法を採用している。これは、組換えダイズを獲得するために比較的効率が良く、ルーチン化されているからである。一方、アグロバクテリウム法は断片化されていない遺伝子が少数導入される点が優れているものの、パーティクルボンバードメントを用いる方法よりも遺伝子導入効率が劣る。しかしながら、近年効率的なアグロバクテリウム法によるダイズ組換え体の作出が報告されている (Olhoft *et al.* 2003; Zeng *et al.* 2004; Paz *et al.* 2006)。本研究では、多数の系統を得るために、パーティクルボンバードメントによってSbDV CP遺伝子をダイズに導入した。導入した遺伝子のうち、いくつかはプロモーター領域が失われ、断片化し、その結果、導入遺伝子が発現していない可能性もある。また、多数の遺伝子が導入されると、導入遺伝子のリアレンジメントやメチル化、さらにはTGSを引き起こすといわれていることから導入遺伝子の発現予測は容易ではない。しかし、ウイルス抵抗性を付与する目的で組換え体を作成する上では、必ずしもプロモーター領域からターミネーター領域を含んだ全長領域を導入し、目的通りのmRNAを転写させる必要はないと考えられる。偶発的にIRとして導入されて、転写された二本鎖

RNAや過剰発現による異常なRNAがRNAサイレンシングを誘導してウイルス抵抗性を結果として付与する可能性もある。しかし、ウイルス抵抗性に関与する導入遺伝子がメチル化され、TGSが誘導されるとウイルス抵抗性に影響を及ぼすかもしれない。今後は導入遺伝子のメチル化や環境要因の影響を受けにくいSbDV抵抗性組換えダイズを選抜していく必要がある。

IV 総合考察

本研究では、北日本におけるダイズ生産に深刻な被害を及ぼしているダイズわい化病に抵抗性を持つ遺伝子組換えダイズの作出を試みた。この研究において、SbDVのCP遺伝子を逆位反復配列に導入したダイズとセンス方向に導入したダイズを作出して、それぞれの系統よりRNAサイレンシング機構によるSbDV抵抗性個体を得た。RNAサイレンシング機構による植物へのウイルス抵抗性付与は、実験植物であるシロイヌナズナやタバコで確立した技術であり、主要農作物であるダイズで、その感染ウイルスであるSbDVに対する抵抗性を付与した組換え植物を作出した報告は本研究が初めてである。この研究を開始した2001年の時点では、ダイズわい化病に抵抗性を持つダイズ遺伝資源は存在しないといわれていた。従って、遺伝子組換え技術によるSbDV抵抗性付与は有効な手段であると考えられていた。しかしその後、北海道立中央農業試験場の研究グループが、インドネシア原産のダイズ品種「WILIS」を新たなダイズわい化病抵抗性遺伝資源として、人工交配により高度抵抗性育種素材「植系32号」を育成した(田澤ら 2005)。今後、「WILIS」を利用して実用品種の育成が行われると考えられる。日本国内の遺伝子組換え作物利用の状況から、SbDV抵抗性組換えダイズよりも抵抗性遺伝資源の利用によるダイズわい化病抵抗性ダイズの品種育成が有力であると考えられる。しかし、抵抗性育種は常に、品種への抵抗性の付与と、それを打破する病原体系統の出現との戦いである。病原体がウイルスである場合には、感染した植物体内で爆発的に増殖することにより塩基配列の変化が生じやすい。この塩基配列の変化により、既存の抵抗性品種を打破するウイルス系統が出現する可能性もある。例えば、トマトモザイクウイルス(*Tomato mosaic virus*, ToMV)に抵抗性を示す*Tm-2*遺伝子を持つ抵抗性品種のトマトは、細胞間移行

タンパク質にアミノ酸変異が認められたToMV変異株Ltb1に全身感染することが報告されている(Meshi *et al.* 1989)。従って、遺伝資源の利用のみならず、本研究のように遺伝子組換え技術を利用した抵抗性付与の研究の継続も抵抗性の無力化に対する、危険分散の上でも重要である。また、ウイルス抵抗性組換え体の作出には、必然的にウイルス自体の基礎的知見も必要とされるため、ウイルスの研究分野の発展にも貢献できると考えられる。

引用文献

- 1) Aida, R.; Shibata, M. 1998. Developmentally regulated transgene silencing in *Torenia*. *Breed. Sci.* 48 : 63-69.
- 2) Barker, H.; Waterhouse, P. M. 1999. The development of resistance to luteoviruses mediated by host genes and pathogen-derived transgenes. (Smith, H. G.; Barker, H. eds., *The Luteoviridae*). CABI Publishing, Wallingford, Oxon, UK, p 169-210.
- 3) Bass, B. L. 2000. Double-stranded RNA as a template for gene silencing. *Cell* 101 : 235-238.
- 4) Baulcombe, D. C. 1996. Mechanisms of pathogen-derived resistance to viruses in transgenic plants. *Plant Cell* 8 : 1833-1844.
- 5) Bazzini, A. A.; Hopp, H. E.; Beachy, R. N.; Asurmendi, S. 2006. Posttranscriptional gene silencing does not play a significant role in potato virus X coat protein-mediated resistance. *Virology* 96 : 1175-1178.
- 6) Beachy, R. N. 1999. Coat-protein-mediated resistance to Tobacco mosaic virus: discovery mechanisms and exploitation. *Phil. Trans. R. Soc. Lond. B.* 354 : 659-664.
- 7) Carmell, M. A.; Hannon, G.J. 2004. RNaseIII enzymes and the initiation of gene silencing. *Nat. Struct. Mol. Biol.* 11 : 214-218.
- 8) Chen, Y. K.; Lohuis, D.; Goldbach, R.; Prins, M. 2004. High frequency induction of RNA-mediated resistance against Cucumber mosaic virus using inverted repeat constructs. *Mol. Breed.* 14 : 215-226.

- 9) Cuozzo, M.; O'Connell, K. M.; Kaniewski, W.; Fang, R. X.; Chua, N. H.; Tumer, N. E. 1988. Viral protection in transgenic plants expressing the Cucumber mosaic virus coat protein or its antisense RNA. *Bio/Technology* 6 : 549-557.
- 10) Damsteegt, V. D.; Voegtlin, D. J. 1990. Morphological and biological variation among population of *Aulacorthum solani* (Homoptera: Aphididae), the vector of Soybean dwarf virus. *Ann. Entomol. Soc. Am.* 83 : 949-955.
- 11) 土居養二, 木村 登, 与良 清, 明日山秀文. 1968. 北海道の大豆矮化病(異常生育)の茎葉から見出されたウイルス粒子について. *日植病報* 34 : 37.
- 12) Dougherty, W. G.; Parks, T. D. 1995. Transgenes and gene suppression : telling us something new? *Curr. Opin. Biotechnol.* 7 : 399-405.
- 13) Elbashir, S. M.; Lendeckel, W.; Tuschl, T. 2001. RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. *Genes Dev.* 15 : 188-200.
- 14) English, J. J.; Baulcombe, D. C. 1997. The influence of small changes in transgene transcription on homology-dependent virus resistance and gene silencing. *Plant J.* 12 : 1311-1318.
- 15) Fitch, M. M. M.; Manshardt, R. M.; Gonsalves, D.; Slightom, J. L.; Sanford, C. 1992. Virus resistant papaya derived from tissues bombarded with the coat protein gene of papaya. *Bio/Technology* 10 : 1466-1472.
- 16) Fu, X.; Duc, L. T.; Fontana, S.; Bong, B. B.; Tinjuangjun, P.; Sudhakar, D.; Twyman, R. M.; Christou, P.; Kohli, A. 2000. Linear transgene constructs lacking vector backbone sequences generate low-copy-number transgenic plants with simple integration patterns. *Transgenic Res.* 9 : 11-19.
- 17) Furutani, N.; Hidaka, S. 2004. Efficient production of transgenic soybean using a co-transformation method. *Breed. Sci.* 54 : 91-98.
- 18) Hamilton, A. J.; Baulcombe, D. C. 1999. A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants. *Science* 286 : 950-952.
- 19) Hammond, S. M.; Bernstein, E.; Beach, D.; Hannon, G. J. 2000. An RNA-directed nuclease mediated post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. *Nature* 404 : 293-296.
- 20) Hemenway, C.; Fang, R. X.; Kaniewski, W. K.; Chua, N. H.; Tumer, N. E. 1988. Analysis of the mechanism of protection in transgenic plants expressing the potato virus X coat protein or its antisense RNA. *EMBO J.* 7 : 1273-1280.
- 21) Herrbach, E. 1999. Introduction, (Smith, H. G.; Barker, H. eds., *The Luteoviridae*). CAB International, Oxon, United Kingdom. p. 85-88.
- 22) 本多健一郎, 兼松誠司, 御子柴義郎. 1999. ツメクサベニマルアブラムシとエンドウヒゲナガアブラムシによって媒介されるダイズわい化ウイルス(SbDV)のわい化系統. *日植病報* 65 : 387-388.
- 23) Ingelbrecht, I. L.; Irvine, J. E.; Mirkov, T. E. 1999. Posttranscriptional gene silencing in transgenic sugarcane. Dissection of homology-dependent virus resistance in a monocot that has a complex polyploid genome. *Plant Physiol.* 199 : 1187-1197.
- 24) Jan, F. J.; Pang, S. Z.; Tricoli, D. M.; Gonsalves, D. 2000. Evidence that resistance in squash mosaic comovirus coat protein-transgenic plants is affected by plant developmental stage and enhanced by combination of transgenes from different lines. *J. Gen. Virol.* 81 : 2299-2306.
- 25) Kalantidis, K.; Psaradakis, S.; Tabler, M.; Tsagris, M. 2002. The occurrence of CMV-specific short RNAs in transgenic tobacco expressing virus-derived double-stranded RNA is indicative of resistance to the virus. *Mol. Plant. Microbe. Interact.* 15 : 826-833.
- 26) 川崎 努. 1997. PCR解析用の簡便なイネゲノムDNAの単離法. (島本 巧, 佐々木卓治 監修, 新版 植物のPCR実験プロトコール 核酸の単離法とゲノム・遺伝子発現の最新解析法PCR解析用の簡便なイネゲノムDNAの単離法). 秀潤社 東京 pp.67-68.
- 27) Meshi, T.; Motoyoshi, F.; Maeda, T.; Yoshioka.

- S.; Watanabe, H.; Okada, Y. 1989. Mutations in the Tobacco mosaic virus 30-kD protein gene overcome Tm-2 resistance in tomato. *Plant Cell* 1 : 515-522.
- 28) Matzke, M. A.; Mette, M. F.; Matzke, A. J. 2000. Transgenic silencing by the host genome defence: implications for the evolution of epigenetic control mechanisms in plants and vertebrates. *Plant Mol. Biol.* 43 : 401-415.
- 29) Metzloff, M.; O' Dell, M.; Cluster, P. D.; Flavell, R. B. 1997. RNA-mediated RNA degradation and chalcone synthase A silencing in petunia. *Cell* 88 : 845-854.
- 30) 御子柴義郎, 藤澤一郎, 本多健一郎. 1991. ダイズわい化ウイルス (SbDV) のエンドウヒゲナガアブラムシ伝搬系統. *日植病報* 57 : 448.
- 34) Missiou, A.; Kalantidis, K.; Boutla, A.; Tzortzakaki, S.; Tabler, M.; Tsagris, M. 2004. Generation of transgenic potato plants highly resistant to potato virus Y (PVY) through RNA silencing. *Mol. Breed.* 14 : 185-197.
- 35) Mitsuhara, I.; Ugaki, M.; Hirochika, H.; Ohshima, M.; Murakami, T.; Gotoh, Y.; Katayose, Y.; Nakamura, S.; Honkura, R.; Nishimiya, S.; Ueno, K.; Mochizuki, A.; Tanimoto, H.; Tsugawa, H.; Otsuki, Y.; Ohashi, Y. 1996. Efficient promoter cassettes for enhanced expression of foreign genes in dicotyledonous and monocotyledonous plants. *Plant Cell Physiol.* 37 : 49-59.
- 36) Mourrain, P.; van Blokland, R.; Kooter, J. M.; Vaucheret, H. 2007. A single transgene locus triggers both transcriptional and post-transcriptional silencing through double-stranded RNA production. *Planta* 225 : 365-379.
- 37) Mueller, E.; Gilbert, J.; Davenport, G.; Brigneti, G.; Baulcombe, D. C. 1995. Homology-dependent resistance: transgenic virus resistance in plants related to homology-dependent gene silencing. *Plant J.* 7 : 1001-1013.
- 38) Ng, H. H.; Bird, A. 1999. DNA methylation and chromatin modification. *Curr. Opin. Genet. Dev.* 9 : 158-163.
- 39) Olhoft, P. M.; Flagel, L. E.; Donovan, C. M.; Somers, D. A. 2003. Efficient soybean transformation using hygromycin B selection in the cotyledonary-node method. *Planta* 216 : 723-735.
- 40) Pang, S. Z.; Jan, F. J.; Carney, K.; Stout, J.; Tricoli, D. M.; Quemada, H. D.; Gonsalves, D. 1996. Post-transcriptional transgene silencing and consequent tospovirus resistance in transgenic lettuce are affected by transgene dosage and plant development. *Plant J.* 9 : 899-909.
- 41) Pang, S. Z.; Jan, F. J.; Tricoli, D. M.; Russell, P. F.; Carney, K. J.; Hu, J. S.; Fuchs, M.; Quemada, H. D.; Gonsalves, D. 2000. Resistance to squash mosaic comovirus in transgenic squash plants expressing its coat protein genes. *Mol. Breed.* 6 : 87-93.
- 42) Park, Y. D.; Papp, I.; Moscone, E. A.; Iglesias, V. A.; Vaucheret, H.; Matzke, A. J. M.; Matzke, M. A. 1996. Gene silencing mediated by promoter homology occurs at the level of transcription and results in meiotically heritable alterations in methylation and gene activity. *Plant J.* 9 : 183-194.
- 43) Paz, M. M.; Martinez, J. C.; Kalvig, A. B.; Fonger, T. M.; Wang, K. 2006. Improved cotyledonary node method using an alternative explant derived from mature seed for efficient *Agrobacterium*-mediated soybean transformation. *Plant Cell Rep.* 25 : 206-213.
- 44) Powell-Abel, P.; Nelson, R. S.; De, B.; Hoffman, N.; Rogers, S. G.; Fraley, R. T.; Beachy, R. 1986. Delay of disease development in transgenic plants that express the Tobacco mosaic virus coat protein gene. *Science* 232 : 738-743.
- 45) Rathjen, J. P.; Karageorgos, L. E.; Habili, N.; Waterhouse, P. M.; Symons, R. H. 1994. *Soybean dwarf luteovirus* contains the 3rd variant genome type in the luteovirus group. *Virology* 198 : 671-679.
- 46) Reddy, M. S. S.; Dinkins, R. D.; Collins, G. B. 2003. Gene silencing in transgenic soybean plants transformed via particle bombardment. *Plant Cell Rep.* 21 : 676-683.

- 47) Sanford, J. C.; Johnston, S. A. 1985. The concept of parasite-derived resistance: Deriving resistance genes from the parasites own genome. *J. Theor. Biol.* 115 : 395-405.
- 48) Sijen, T.; Wellink, J.; Hiriart, J-B.; van Kammen, A. 1996. RNA mediated virus resistance: role of repeated transgene and delimitation of targeted regions. *Plant Cell* 8 : 2277-2294.
- 49) Smith, H. A.; Swaney, S. L.; Parks, T. D.; Wernsman, E. A.; Dougherty, W. G. 1994. Transgenic plant virus resistance mediated by untranslatable sense RNAs: expression, regulation, and fate of nonessential RNAs. *Plant Cell* 9 : 1441-1453.
- 50) Smith, N. A.; Singh, S. P.; Wang, M. B.; Stoutjesdijk, P. A.; Green, A. G.; Waterhouse, P. M. 2000. Total silencing by intron-spliced hairpin RNAs. *Nature* 407 : 319-320.
- 51) 高橋孝吉, 田中敏夫, 飯田 格, 津田保昭. 1980 日本におけるダイズのウイルス病と病原ウイルスに関する研究. *東北農試研報* 62 : 1-130.
- 52) 玉田哲男. 1973. ダイズわい化ウイルスの系統. *日植病報* 39 : 27-34.
- 53) 玉田哲男. 1975. ダイズわい化病に関する研究. *北海道立農試報告* 25 : 1-144.
- 54) 田澤暁子, 神野裕信, 手塚光明, 三好智明, 鴻坂扶美子, 田中義則. 2005. 「WILIS」を用いたダイズわい化病高度抵抗性育種素材 平成16年度「新しい研究成果－北海道地域－」北海道農業試験研究推進会議 (独)北海道農業研究センター.
- 55) Terauchi, H.; Kanematsu, S.; Honda, K.; Mikoshiba, Y.; Ishiguro, K.; Hidaka, S. 2001. Comparison of complete nucleotide sequences of genomic RNAs of four *Soybean dwarf virus* strains that differ in their vector specificity and symptom production. *Arch. Virol.* 146 : 1885-1898.
- 56) Tougou, M.; Furutani, N.; Yamagishi, N.; Shizukawa, Y.; Takahata, Y.; Hidaka, S. 2006. Development of resistant transgenic soybeans with inverted repeat-coat protein genes of *soybean dwarf virus*. *Plant Cell Rep.* 25 : 1213-1218.
- 57) Tougou, M.; Yamagishi, N.; Furutani, N.; Shizukawa, Y.; Takahata, Y.; Hidaka, S. 2007. *Soybean dwarf virus*-resistant transgenic soybeans with the sense coat protein gene. *Plant Cell Rep.* 26 : 1967-1975.
- 58) Tricoli, D. M.; Carney, K. J.; Russell, P. F.; McMaster, J. R.; Groff, D. W.; Hadden, K. C.; Himmel, P. T.; Hubbard, J. P.; Boeshore, M. L.; Quemada, H. D.; 1995. Field evaluation of transgenic squash containing single or multiple virus coat protein gene constructs for resistance to Cucumber mosaic virus. *Bio/Technology* 13 : 1458-1465.
- 59) van den Heuvel, J. F. J. M.; Hougenvout, S. A.; van den Wilk, F. 1999. Recognition and receptors in virus transmission by arthropods. *Trends Microbiol.* 7 : 71-76.
- 60) Vaucheret, H.; Fagard, M. 2001. Transcriptional gene silencing in plants: targets, inducers and regulators. *Trends Genet.* 17 : 29-35.
- 61) Vazquez Rovere, C.; Asurmendi, S.; Hopp, H. E. 2001. Transgenic resistance in potato plants expressing potato leaf roll virus(PLRV) replicase gene sequences is RNA-mediated and suggests the involvement of post-transcriptional gene silencing. *Arch. Virol.* 146 : 1337-1353.
- 62) Voinnet, O.; Pinto, Y. M.; Baulcombe, D. C. 1999. Suppression of gene silencing: a general strategy used by diverse DNA and RNA viruses of plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96 : 14147-14152.
- 63) Wang, M. B.; Abbott, D. C.; Waterhouse, P.M. 2000. A single copy of a virus-derived transgene encoding hairpin RNA gives immunity to barley yellow dwarf virus. *Mol. Plant Pathol.* 1 : 347-356.
- 64) Wang, M.B.; Metzloff, M. 2005. RNA silencing and antiviral defense in plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* 8 : 216-222.
- 65) Waterhouse, P. M.; Graham, M.W.; Wang, M. B. 1998. Virus resistance and gene silencing in

- plants can be induced by simultaneous expression of sense and antisense RNA. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95 : 13959-13964.
- 66) Yamagishi, N.; Terauchi, H.; Kanematsu, S.; Hidaka, S. 2003. Characterization of the small subgenomic RNA of Soybean dwarf virus. Arch. Virol. 148 : 1827-1834.
- 67) Yamagishi, N.; Terauchi, H.; Honda, K.; Kanematsu, S.; Hidaka, S. 2006. Discrimination of four Soybean dwarf virus strains by dot-blot hybridization with specific probes. J. Virol. Methods. 133 : 219-222.
- 68) Zamore, P. D.; Tuschl, T.; Sharp, P. A.; Bartel, D. P. 2000. RNAi: Double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals. Cell 101 : 25-33.
- 69) Zeng, P.; Vagnais, D. V.; Zhang, Z.; Polacco, J. C. 2004. Refined glufosinate selection in *Agrobacterium*-mediated transformation of soybean [*Glycine max* (L.) Merrill]. Plant Cell Rep. 22 : 478-482.