

ALSV ベクターによる高速開花技術を用いたリンゴの新たな
品種育成について

(概要版)

岩手大学農学部
岩手大学次世代アグリイノベーション研究センター

1. 要約

果樹などの木本植物は、種子を播種してから開花するまでの期間（幼若期間）が非常に長く、リンゴ実生では開花までに5年から12年を要する。リンゴの長い幼若期間は、優良遺伝子の栽培リンゴへの導入や、交配による優良品種の選抜に長期間を必要とする原因で、新品種の育成にとっては大きな障壁となっている。例えば、1994年に発表された黒星病抵抗性リンゴ品種‘Goldrush’の例では、1924年に黒星病抵抗性遺伝子（*Vf*）を持つカイドウズミ（*Malus floribunda*）と栽培リンゴ（*M. domestica* ‘Rome Beauty’）を掛け合わせた後、そのF1雑種に栽培リンゴを5回交配し選抜を繰り返したことにより、約70年間をかけて‘Goldrush’という品種が作出された。また、現在、栽培数が世界一の品種‘ふじ’は、1939年に‘国光’と‘デリシャス’の交雑実生から選抜された品種で、初結実は播種から12年後の1951年であり、品種登録されたのは23年後の1962年である。

これまでリンゴ実生苗の開花促進のために矮性台木への接ぎ木などの農業技術的手法が開発されてきた。しかしながら、これら技術を用いても、リンゴ実生苗の開花には3年以上の年月を要する。2007年に植物生理学上大きな謎であった植物の開花に関与する開花ホルモン「フロリゲン」をコードする遺伝子 *FLOWERING LOCUS T* (*FT*) の存在が明らかとなった。また、リンゴにおいて花成を抑制する *TERMINAL FLOWER 1-1* (*MdTFL1-1*) 遺伝子の発現を抑制すると、リンゴの開花が促進されることが明らかにされた。

岩手大学では無害な（潜在性）ウイルスであるリンゴ小球形潜在ウイルス（*ALSV*）をウイルスベクターに改変し、外来遺伝子の発現や植物の内在性遺伝子の抑制に利用する研究を約20年間にわたって行ってきた。これらの研究の中で、*ALSV* ベクターにシロイヌナズナの *FT* 遺伝子 (*AtFT*) の完全長配列と *MdTFL1-1* 遺伝子の一部を導入した *ALSV* ベクター (*ALSV-AtFT/MdTFL1*) をリンゴ実生に感染させることで、（1）感染細胞で *AtFT* 遺伝子の発現と *MdTFL1-1* 遺伝子の発現抑制を同時に誘導でき、感染実生の約8-9割が接種後2ヵ月半以内に開花を開始すること、（2）早期開花した感染リンゴに種子の入った果実を形成させることができること、（3）感染リンゴ実生苗を高温処理（37℃、1ヶ月間）することで、*ALSV* が除かれた新梢を容易に作出することができること、（4）*ALSV* ベクター感染により1年以内にリンゴ実生の果実の形や色、糖度、酸度などの果実評価が可能なことを明らかにした。現在、*ALSV* ベクターを利用した高速開花技術（リンゴの1世代を1年以内に短縮）を利用して、リンゴの新品種育成に取り組んでいる。

リンゴ実生は遺伝的にヘテロで、交雑育種による優良品種の育成では、交配種子を播

種し、開花結実した果実を評価して選抜する。2017 年 4 月から 2018 年 3 月にかけて、
‘ふじ’の自然交雑実生に ALSV-AtFT/MdTFL1 を接種し、果実糖度を指標にして優良系
統の選抜を行った。早期開花した感染実生 (23 個体) の中に、果実糖度が 16.2 度 (Brix)
を示す実生個体 (以後 F16.2) が認められた。その他の実生個体の果実の糖度は 7.8～
12.8 度で、F16.2 の果実糖度は他と比べて高く、かつ果実に割れが生じないことや香り
も良好であること、また遺伝子マーカーで日持ち性を調べたところ、‘ふじ’と同様に
日持ち性が高いことが推定され、「食味が良く日持ち性のあるリンゴ」の品種候補とし
て有望であると考えられた。

そこで、25℃の恒温室で育成していた F16.2 樹を 37℃のインキュベータで 1 ヶ月間
栽培した。その後 25℃の恒温室に戻して育成し、約 5 週間後に新たに成長した枝から
葉を採取し RT-PCR で検定したところ、ALSV は検出されなかった。ALSV が検出されない
枝を市販のリンゴ (‘アルプス乙女’) に緑枝接ぎした。その後新梢の成長を待って、
新梢の葉から RNA を抽出し qRT-PCR でウイルス検定したところ、ALSV の感染は認めら
れなかった。高温処理した F16.2 および ‘アルプス乙女’に緑枝接ぎした F16.2/ ‘ア
ルプス乙女’は隔離温室 (特定網室) 内で加温せずに越冬させた。

2019 年 4 月 3 日に越冬後の F16.2 と F16.2/ ‘アルプス乙女’の休眠枝をウイルスフ
リー台木 (JM2 と JM7) に接ぎ木した。活着して生長した接ぎ穂の葉を 2019 年 5 月と 10
月に再度 qRT-PCR 法で検定したところ、いずれの個体試料からも ALSV は検出されず、
全ての接ぎ木個体が ALSV に感染していないことが確認された。以上から、ALSV ベクタ
ーで早期開花／結実させ、高温処理後の穂木を接ぎ木した F16.2 選抜個体は全て ALSV
フリーと判断された。

感染リンゴ苗の高温処理 (37℃、1 ヶ月) で ALSV を除去 (ウイルスフリー化) でき
る機構としては次のように想定している。

これまでのリンゴ実生苗への ALSV の接種試験結果から、次の知見が得られている。

(1) ALSV (ウイルス粒子またはウイルス RNA) をリンゴ実生苗に接種する場合に、展
開した子葉および本葉に接種しても全身感染はほとんど成立しない (接種葉の一次感染
細胞で増殖していることは確認している)。(2) ALSV の全身感染が成立するのは、発根
直後の未展開子葉 (種皮を剥がした白色の子葉) にウイルス RNA をパーティクルガン法
で接種した場合のみと言って良い。(3) 他のリンゴウイルス (ACLSV、ASGV、ASPV) は
容易に接木伝染するが、ALSV は接木伝染が非常に難しく、感染穂木 (あるいは台木) か
ら健全台木 (あるいは健全穂木) に ALSV は移行しない。以上から、リンゴの成熟葉や
維管束組織では、ALSV の細胞間移行 (プラズモデスマータ (PD) を経由) および長距離移
行 (師管を經由) は著しく阻害されると推定される。

それではなぜ、発根直後の未展開子葉に接種した場合に、ALSV は容易に全身感染が成立するのかは次のように推定される。発根直後の未展開子葉組織の PD は、構造／機能上、ALSV が自由に細胞間移行できる状態であり、ALSV は一次感染細胞から PD を通過して周辺細胞に移行し、やがて茎頂分裂組織に速やかに侵入する。茎頂分裂組織や葉原基の細胞で ALSV が増殖していることは、*in situ* ハイブリダイゼーション分析で確認している。ALSV は常に新しい茎頂分裂組織や葉原基に移行しながら感染を続け、その結果、展開してきたリンゴの本葉すべてにウイルスは感染（蓄積）している。

全身感染したリンゴ苗を高温処理（37℃、1 ヶ月）すると、その間 ALSV の増殖は停止する（ALSV の増殖宿主であるキノアにおいて、ALSV は 20～25℃でよく増殖するが、30℃以上になると増殖量が低下することがわかっている）。高温処理（1 ヶ月）の間、リンゴの生育も抑制されるが、成長は続いており 4～5 枚は新葉が展開してくる。高温処理後に感染リンゴ苗を 25℃に移した場合、ALSV が増殖を開始したとしても、成熟（展開）葉の PD は構造／機能的に ALSV が細胞間移行および長距離移行できない状態になっており、その結果、茎頂分裂組織や葉原基には侵入できなくなっていると推定される。

本育種計画では 2020 年春に F16.2 接ぎ木個体を岩手大学農学部附属寒冷フィールド研究センター（FSC）の圃場に移植し、2020 年から生育、開花・結実特性などの各種形質を調査して行く予定である。

2. リンゴ小球形潜在ウイルス（ALSV）の基本的性状

リンゴ小球形潜在ウイルス（ALSV）（学名：*Apple latent spherical virus*）はピコルナウイルス目セコウイルス科チェラウイルス属に所属する植物ウイルスで、1985 年に岩手県盛岡市農水省果樹試験場（当時）のリンゴ園で輪状さび果病罹病樹から偶然発見された。その後リンゴ輪状さび果病とは関係ない（病原ではない）ことが証明され、リンゴに潜在感染するウイルスであることが明らかになった。

ALSV は 2 粒子性の小球形ウイルス（径 25nm）で、2 分節の一本鎖 RNA（RNA1：6815nt と RNA2：3384nt）と 3 種類の外被タンパク質（CP）（25kDa, 24kDa, 20kDa）から構成されている。ゲノムの 5' 端にゲノム結合タンパク質（VPg）、3' 端にはポリ(A)配列（poly(A））を持つ。

RNA1 と RNA2 はそれぞれ一つのポリプロテインをコードしている。RNA1 がコードする 235kDa タンパク質は N 末端側からプロテアーゼコファクター（Co-Pro）/ヘリカー

ゼ(He1)/VPg/システインプロテアーゼ(C-Pro)/RNA 複製酵素(RdRP)の保存配列を含む。RNA2 がコードする 108 kDa タンパク質は N 末端側から細胞間移行タンパク質(MP)/CP (Vp25) /CP (Vp20) /CP (Vp24) をコードする。

自然宿主はリンゴのみで、無病徴(潜在)感染する。人工接種では較的広い宿主域をもち、バラ科(リンゴ、ナシ、モモ、オウトウ、ビワなど)、ナス科、アブラナ科(シロイヌナズナのみ)、アカザ科、ウリ科、マメ科、リンドウ科、ブドウ科、ミカン科植物などに感染する。イネ科植物には感染しない。増殖および検定植物としてはアカザ科の *Chenopodium quinoa* が用いられる。

汁液接種が可能で、接ぎ木および種子により伝染する。ただし、1985 年に見つかられてから 25 年以上経過しても、感染樹周辺のリンゴ樹から ALSV は検出されていないため、花粉の飛散などによる圃場での水平伝染は生じないと考えられている。一方、実験的に調査した種子伝染率は植物種によって異なっており、シロイヌナズナでは 1~3%、ベンサミアナタバコでは約 2%、ダイズでは 20~30%、リンゴでは 1~3% (感染樹の花粉を健全樹に受粉した場合は約 0.2%) である。

ALSV をウイルスベクターに改変した ALSV ベクターは、茎頂分裂組織に侵入して増殖し、葉原基に速やかに侵入するため、感染植物でウイルス誘導ジーンサイレンシング(VIGS)を効率よく誘導する。宿主植物の多くが無病徴感染で、ウイルスは茎長分裂組織に侵入して植物体全体に均一に分布する性質を持つため、効果的な VIGS ベクターとして利用される。これまでに一本鎖 RNA をゲノムとして持つ植物ウイルスのゲノムが植物ゲノムに組み込まれた報告はない。

3. リンゴの宿主情報

リンゴはバラ科リンゴ属の落葉高木または低木である。原生地はコーカサス地方西部アジアから南東部ヨーロッパで、セイヨウリンゴ (*Malus pumila* Mill.) を基本とするが、多数の種が改良に関わった。温帯に広く栽培されているが、亜寒帯もしくは亜熱帯で栽培可能である。セイヨウリンゴは日本に原生するズミとエゾノコリンゴと交配可能である。

セイヨウリンゴの日本への本格的な導入は明治初期で、アメリカから‘国光’など 75 品種の苗木が渡島国亀田郡七重村(現・北海道七飯町)の七重官園に植栽された。その後、国および県などでの日本独自の品種の育種が進んだ。現在日本国内のリンゴの生産量は約 810000 トンとなっており、青森と長野県の上位 2 件が全国生産量のおよそ

75%を占めている。

リンゴは冷涼な気候で育つ果樹の代表格であり日本ではミカン類に次いで生産される果物である。繁殖は接木による。台木は、栽培管理が行いやすいように小さく育つ矮性台木が多い。ある特定の品種を除いては自家不和合性により自殖できず、主として他殖のみであるため、ミツバチを用いて交配させるか人工授粉を行う。商品価値の高い果実を収穫するためには花摘みや摘果作業が必要である。有袋栽培と無袋栽培があり、無袋栽培されたリンゴは名称の頭に「サン」がつき、見栄えは悪いが甘くおいしいリンゴとなる。リンゴは品種によっては貯蔵力が強く、特に呼吸作用を抑えると、新鮮状態が長期に保たれ、長期貯蔵ではあるが、新鮮なリンゴとして消費者に渡っている。1果実に最大10粒の種子がある。果肉を鳥などがついばむことなどにより地面に落下する。種子休眠があり、休眠は種子が湿った状態で一定期間低温にあわせることにより打破される。種子の寿命は乾燥状態で25℃では1年程度までは発芽能力を維持している。リンゴの花粉を採取し、乾燥させると、冷凍庫（-80℃）では数年間花粉の発芽能力が維持される。自然条件下では虫媒花であり、主にハチによって飛散されると思われる。したがって飛散距離はハチの移動距離に依存していると推察される。

4. ALSV を利用した高速開花による育種

（1）植物ウイルスベクター技術

申請者らが利用するウイルスベクターは、リンゴから分離された無害なウイルス (ALSV) を外来遺伝子の発現およびウイルス誘導ジーンサイレンシング (VIGS) による植物遺伝子の機能解析に利用できるように改変したものである (図1)。本ベクターは、ALSV の RNA1 と RNA2 それぞれの完全長 DNA を pUC18 または Ti プラスミド内のカリフラワーモザイクウイルス (CaMV) 35S プロモーターと nos ターミネーター間に正確に連結したものである。外来遺伝子の導入サイトとしては、RNA2 の MP と VP25 間と RNA1 および RNA2 の 3 ‘末端非翻訳領域の計3カ所に制限酵素サイトが設計されている (図1)。

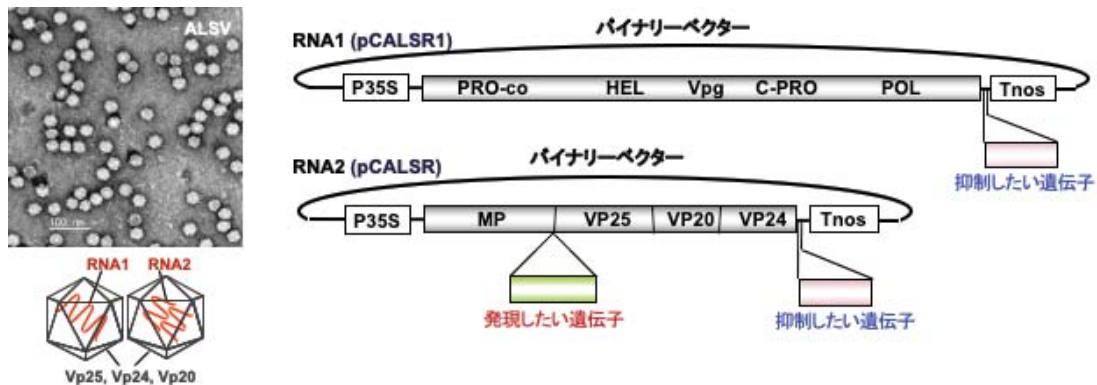


図1 リンゴ小球形潜在ウイルス(ALSIV)の粒子形態(左)とALSIVベクター(右)

(2) フロリゲン (FT) を発現する ALSIV ベクター

植物の多くは1日の中で光のあたる時間(日長)が一定時間より長い時期に花成が誘導される長日植物と、逆に日長が短くなると花成誘導される短日植物に分類される。シロイヌナズナでは長日条件下で葉の光受容体からのシグナルが概日時計経路に伝わり、その下流の因子 *GIGANTEA(GI)* が転写因子 *CONSTANS(CO)* の発現を誘導する。活性化した CO は花成ホルモンであるフロリゲンをコードする *FLOWERING LOCUS T (FT)* の発現を誘導する。葉で合成された FT タンパク質は篩管を通過して茎頂分裂組織に輸送され、茎頂で特異的に発現する核局在性の転写因子 *FLOWERING LOCUS D (FD)* と結合する。FT タンパク質が結合することで活性化された FD タンパク質は、茎頂分裂組織の花芽形成決定遺伝子を活性化し、開花が誘導される(図2)。

申請者らは、シロイヌナズナの *FT* 遺伝子(*AtFT*)を ALSIV-RNA2 ベクターに挿入した。このベクター(ALSIV-*AtFT*)が宿主細胞に感染すると、ALSIV-RNA2 がコードするポリタンパク質が翻訳される時に *AtFT* タンパク質も同時に翻訳され、その後プロセッシングを受けて機能的な *AtFT* タンパク質が生成されることになる。細胞で増殖したウイルスが隣接細胞に移行し、やがて篩管を通過して茎頂分裂組織に移行すると、ALSIV から翻訳された *AtFT* タンパク質が花芽形成決定遺伝子を活性化し、開花が誘導されることになる(図2)。実際に、シロイヌナズナやタバコ、ペチュニア、ダイズ、トルコギキョウなどで、感染個体全てが早期開花性を示した。また、通常、発芽後5~12年かかるリンゴ実生苗は ALSIV-*AtFT* 感染により約2ヵ月で開花することが示された。



図2 光周期による開花制御（左）と ALSV-AtFT による開花促進機構（右）

（3）リンゴの高速開花技術

リンゴは播種から開花までに5年から12年の年月を必要とする。そこで上述の ALSV-AtFT を発芽直後のリンゴ実生に接種後、4℃、遮光条件下で2日静置した後25℃の恒温室に移して育成した。すると、感染個体の約30%が接種後2ヵ月以内に開花し、その花の雄蕊と雌蕊には稔性があることが明らかとなった。しかしながら、ほとんどの個体において開花は1度きりであり、植物体も小さいため、果実の成熟までに至らなかった。一方、リンゴにおいては花芽形成を抑制する *MdTFL1-1* 遺伝子が存在し、その発現を抑制することでリンゴの早期開花を誘導できることが、遺伝子組換え実験において明らかとなっている。そこで *MdTFL1-1* 遺伝子の一部（201もしくは150塩基）を ALSV-RNA2 ベクターに挿入した VIGS ベクター（ALSV-MdTFL1）を構築し、発芽直後のリンゴ実生に接種したところ、感染個体の約10%が接種後2ヵ月以内に開花し、その花の雄蕊と雌蕊には稔性があることが明らかとなった。また、感染個体のうち、1個体は栄養生長と生殖生長を並行して行い複数の花を咲かせるとともに、授粉により形成された果実は肥大し成熟するに至った。そこで申請者らは、シロイヌナズナの *AtFT* を ALSV-RNA2 ベクターに、リンゴの花芽形成を抑制する *MdTFL1-1* 遺伝子を ALSV-RNA1 ベクターに挿入したベクター（ALSV-AtFT/MdTFL1）を上記のように構築し、発芽直後のリンゴ実生に接種した。ALSV-AtFT/MdTFL1 が宿主植物に感染すると、細胞で増殖したウイルスが隣接細胞に移行し、やがて篩管を通過して茎頂分裂組織に移行する。ALSV-AtFT/MdTFL1 から翻訳された AtFT タンパク質が茎頂分裂組織の未分化細胞において花芽形成決定遺伝子の発現を活性化する。また通常リンゴの茎頂分裂組織で発現する花芽形成抑制遺伝子の *MdTFL1-1* 遺伝子は ALSV-AtFT/MdTFL1 が誘導する VIGS により発現が抑制される。このふたつの現象の相乗効果により、感染リンゴの8-9割近くが開花に至り、リンゴの開

花が効率的に誘導されることが明らかとなった。このリンゴ高速開花技術を利用すると、1世代(当代種子から次世代種子まで)を1年以内に短縮することが可能である(図3)。

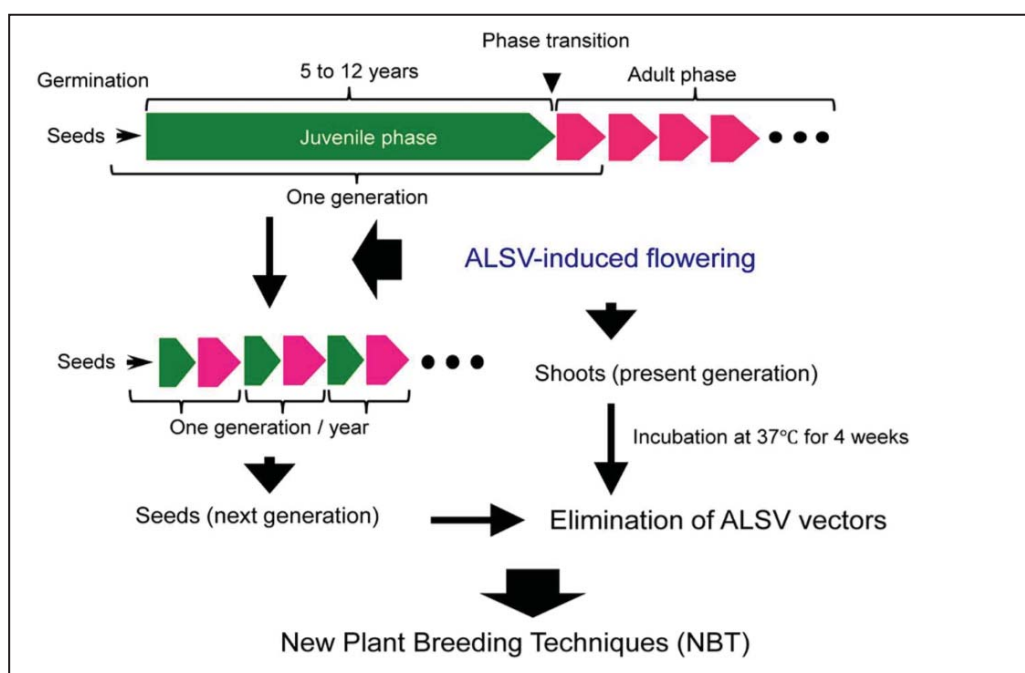


図3. ALSV ベクターによる早期開花技術を用いたリンゴの世代促進法

5. 開発プロセス

(1) 「食味が良く日持ち性のあるリンゴ」品種の開発

1) リンゴ実生の高速開花と果実評価

リンゴ実生は遺伝的にヘテロで、交雑育種による優良品種の育成では、交配種子を播種後、開花結実を待ち、果実を評価して選抜する。2017年4月から2018年3月にかけて‘ふじ’の自然交雑実生に ALSV-AtFT/MdTFL1 を接種した。感染個体は岩手大学隔離温室で育成し、果実を形成させた(図4)。開花した感染実生(23個体)の中に果実糖度が16.2度(Brix)を示す実生個体(以後F16.2)が認められた。その他の実生個体の果実の糖度は7.8~12.8度程度で、F16.2の果実糖度は他と比べて高く、かつ果実に割れが生じないことや香りも良好であること、また遺伝子マーカーで日持ち性を調べたところ、‘ふじ’と同様に日持ち性が高いことが推定され(図4)、「食味が良く日持ち性のあるリンゴ」の品種候補として有望であると考えられた。

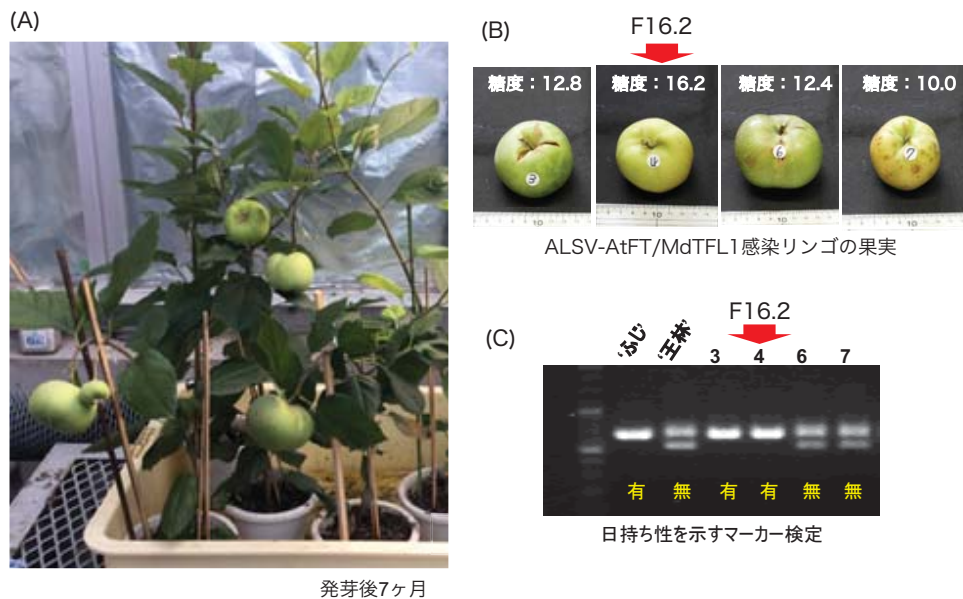


図4. (A) 隔離温室で育成中のALSV-AtFT/MdTFL1感染リンゴ実生、(B) ALSV-AtFT/MdTFL1感染リンゴ実生に形成された果実と糖度（接種後約7ヶ月）、(B) 日持ち性マーカー(ACS1遺伝子)の検定

2) 候補樹 (F16.2) からの ALSV ベクターの除去

申請者らは、感染リンゴ実生を高温処理（37℃、1ヶ月）することで ALSV が感染していない新梢が容易に得られることを報告した。これは、高温処理により ALSV の増殖を一旦止めることで、その後に伸長する新梢への ALSV の移行が阻害されることが原因である。

そこで 25℃の恒温室で育成していた F16.2 樹を 37℃のインキュベータで1ヵ月間処理した。その後 25℃の恒温室に戻して育成し、5週間後に新たに成長した枝から葉を採取し RT-PCR で検定したところ、ALSV は検出されなかった（図5）。次に ALSV が

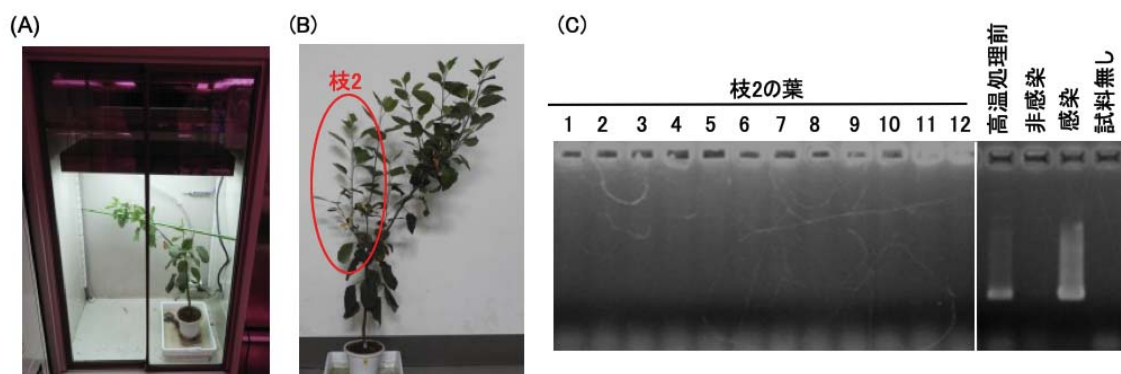


図5. (A) 高温 (37℃) 処理中のF16.2樹
(B) 高温処理後25℃の恒温室で5週間育成したF16.2樹
(C) (B)の枝2の葉のRT-PCR検定.

検出されなかった新梢（図 5B の枝 2）を市販のリンゴ苗（‘アルプス乙女’）に緑枝接ぎ（生長中の枝を、生長中の台木の枝に接ぐ方法）した。2.5 ヶ月後に生長した枝の葉をリアルタイム RT-PCR（qRT-PCR）で検定したところ、ALSV は全く検出されなかった（図 6）。高温処理した F16.2 樹および ‘アルプス乙女’ に緑枝接ぎした F16.2/ ‘アルプス乙女’ を岩手大学隔離温室（特定網室）内で加温せずに越冬させた。

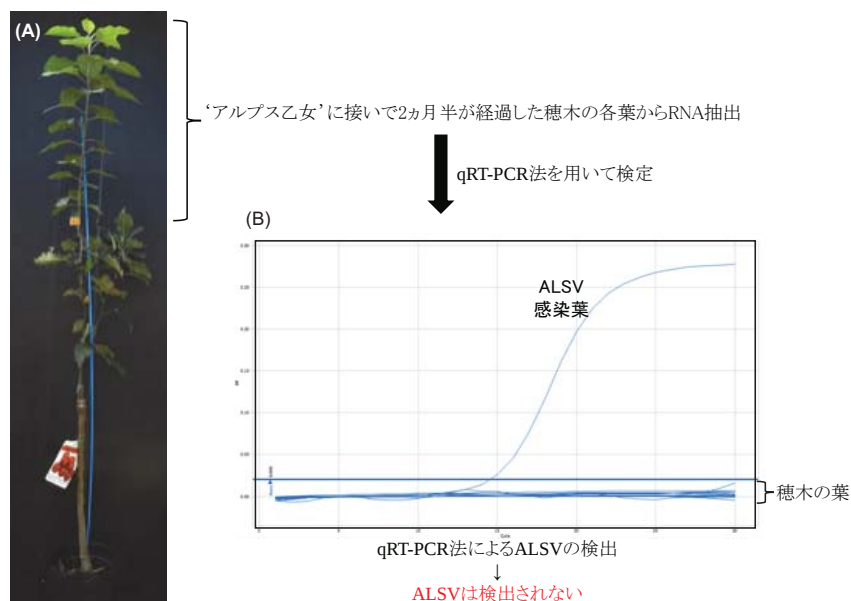


図6. (A) F16.2穂木を接ぎ木した‘アルプス乙女’(接ぎ木後2.5ヶ月)
(B) 穂木に形成された新葉のqRT-PCRによるALSV検定.

3) 候補樹 (F16.2 および F16.2/ ‘アルプス乙女’) の休眠枝の矮性台木への接ぎ木
2019 年 2 月に F16.2 および F16.2/ ‘アルプス乙女’ 樹の休眠枝を採取し、接ぎ木まで 4℃で保存した。2019 年 4 月にこれらの休眠枝をウイルスフリー台木 (JM2 と JM7) に休眠枝接ぎ（落葉期（休眠期）に採取して 4℃で保存していた休眠状態の枝を、春に萌芽してきた台木の主幹に接ぐ方法。接ぐ際に台木の休眠が破れて萌芽していることと、穂木が休眠は破れているものの、低温（4℃）によりまだ萌芽していないことが必要である）を行った。活着したリンゴ樹は F16.2/JM2-①、F16.2/JM2-②、F16.2/JM2-③、F16.2/JM2-④、F16.2/JM2-⑤、F16.2/JM7-①、F16.2/JM7-②と命名し、以下のウイルス検定に用いた。

(2) 高温処理後のリンゴ樹に ALSV ベクターが残存しないことの証明

植物体からの ALSV の検出・診断技術については、感染リンゴ試料を用いて酵素結合抗体法 (ELISA)、ハイブリダイゼーション法、RT-PCR 法、リアルタイム RT-PCR (qRT-

PCR) 法、および次世代シーケンス (siRNA) 法を実施し、いずれの方法でも正確に感染の有無を判定できることが明らかになった。

1) qRT-PCR による ALSV-RNA の検出

qRT-PCR 法は、ALSV 感染植物体から抽出した RNA を鋳型に、逆転写反応と特異的プライマーを用いた RT-PCR により、ALSV 特異的断片を増幅し、増幅された配列にインターカレートする SYBR Green が発する蛍光を検出することによって ALSV を検出する方法で、ウイルス RNA の検出技術の中で最高の検出感度を有する技術である。本研究で使用した Bio-Rad 社の CFX Connect™ RealTime System の検出感度を、ALSV-RNA2 試料を用いて調べたところ、図 7 に示したように、50 ag/試料までの RNA が検出可能であった。

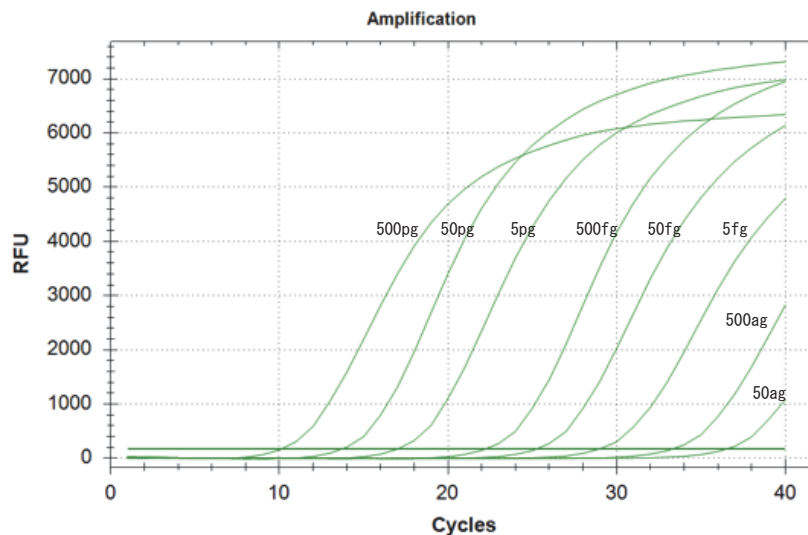


図7. qRT-PCRによるALSV-RNA2標準試料の増幅曲線

2019 年 5 月に、F16. 2/ ‘アルプス乙女’ および矮性台接ぎ木樹 (F16. 2/JM2-①、F16. 2/JM2-②、 F16. 2/JM2-③、 F16. 2/JM2-④、 F16. 2/JM2-⑤、 F16. 2/JM7-①、 F16. 2/JM7-②) の新梢の葉を採取し、以下のように qRT-PCR 検定した。

約 30mg のリンゴ葉 (1 樹あたり植物体の上位、中位、および下位の 3 枚の葉) *それぞれ*から Agencourt ChloroPure (ベックマンコールター) により全核酸を抽出した後、TOYOBO ReverTraAce を用いて 42℃、60 分間逆転写反応した。続いて PCR 反応を行った。プライマーには、ALSV RNA2 をターゲットとした RNA2-Primer 778(+) [5' -ccccattacttgctatgtgt-3'] (RNA1 の塩基番号 778-797 に相当) と RNA2-Primer 900(-) [5' -ttagcggttaaggagatgaga-3'] (RNA2 の塩基番号 900-881 に相当) の組み合わせを用いた。

図 8 および表 1 に示したように、感染試料の Cq は 15.55、非感染試料は N/A (増幅

なし) の条件で被験試料は全て N/A であった。以上から、高温処理後の F16.2 樹を接ぎ木した F16.2/ ‘アルプス乙女’ および矮性台接ぎ木樹 (F16.2/JM2-①、F16.2/JM2-②、 F16.2/JM2-③、 F16.2/JM2-④、 F16.2/JM2-⑤、 F16.2/JM7-①、 F16.2/JM7-②) は全て ALSV に感染していないと結論された。

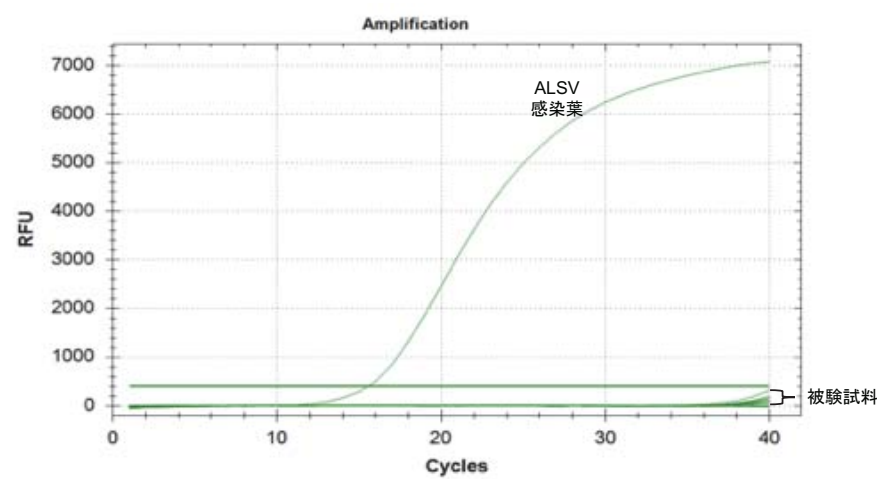


図8. qRT-PCRによるF16.2/‘アルプス乙女’、F16.2/JM2、F16.2/JM7の葉組織からのALSVの検出

表1. qRT-PCRによるF16.2/‘アルプス乙女’、F16.2/JM2、F16.2/JM7の葉組織からのALSVの検出

樹 No.	葉No.	増幅サイクル数(Cq)
F16.2/JM2①	1	N/A
	2	N/A
	3	N/A
F16.2/JM2②	1	N/A
	2	N/A
	3	N/A
F16.2/JM2③	1	N/A
	2	N/A
	3	N/A
F16.2/JM2④	1	N/A
	2	N/A
	3	N/A
F16.2/JM2⑤	1	N/A
	2	N/A
	3	N/A
F16.2/JM7①	1	N/A
	2	N/A
	3	N/A
F16.2/JM7②	1	N/A
	2	N/A
	3	N/A
F16.2/‘アルプス乙女’	1	N/A
	2	N/A
	3	N/A
非感染	1	N/A
ALSV感染	1	15.55
鋳型無		N/A

Cqは増殖曲線が閾値と交わる値を示し、N/Aは増幅がないことを示す。

さらに、2019 年 10 月に、F16. 2/ ‘アルプス乙女’ (接ぎ木後約 1 年 3 ヶ月) および矮性台接ぎ木樹 (F16. 2/JM2-① (接ぎ木後約 6 ヶ月)、F16. 2/JM2-② (接ぎ木後約 6 ヶ月)、F16. 2/JM2-③ (接ぎ木後約 6 ヶ月)、F16. 2/JM2-④ (接ぎ木後約 6 ヶ月)、F16. 2/JM2-⑤ (接ぎ木後約 6 ヶ月)、F16. 2/JM7-① (接ぎ木後約 6 ヶ月)、F16. 2/JM7-② (接ぎ木後約 6 ヶ月)) の新梢の葉 (上位葉, 中位葉, および下位葉の 3 枚/個体) を採取し qRT-PCR 検定 (RNA 試料) 並びに qPCR 検定 (DNA 試料) した。

図 9 に示すように、試料のうち、ALSV 感染リンゴの cDNA を鋳型とした試料のみにおいて増幅が観察され、その C_q 値は 15.75 であった (表 2)。非感染試料は N/A (増幅なし) であり、また被験試料 (cDNA と DNA) は全て N/A であった (表 2)。以上から、高温処理後の F16. 2 樹を接ぎ木した F16. 2/ ‘アルプス乙女’ および矮性台接ぎ木樹 (F16. 2/JM2-①、F16. 2/JM2-②、F16. 2/JM2-③、F16. 2/JM2-④、F16. 2/JM2-⑤、F16. 2/JM7-①、F16. 2/JM7-②) は全て ALSV に感染していないと結論された。

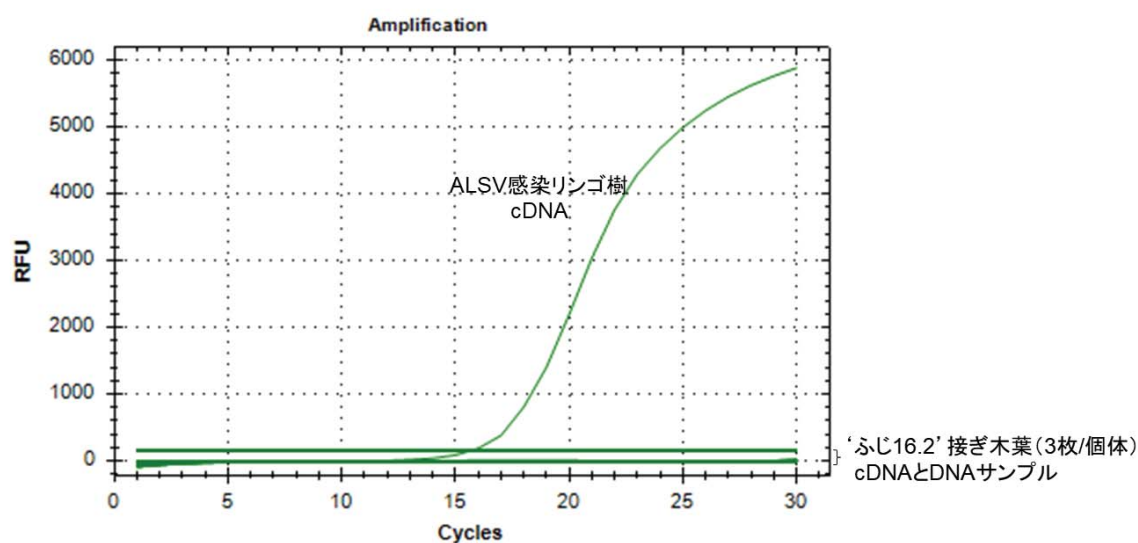


図9.リアルタイムPCRにより検出されたALSVの増殖曲線

表2. リアルタイムPCRによるALSVの検出(上位葉(1), 中位葉(2), および下位葉(3)/個体)

樹 No.	葉No.	標的	増幅サイクル数 (Cq)	樹 No.	葉No.	標的	増幅サイクル数 (Cq)
F16.2/JM2?	1	cDNA	N/A	F16.2/JM2?	1	DNA	N/A
	2	cDNA	N/A		2	DNA	N/A
	3	cDNA	N/A		3	DNA	N/A
F16.2/JM2?	1	cDNA	N/A	F16.2/JM2?	1	DNA	N/A
	2	cDNA	N/A		2	DNA	N/A
	3	cDNA	N/A		3	DNA	N/A
F16.2/JM2?	1	cDNA	N/A	F16.2/JM2?	1	DNA	N/A
	2	cDNA	N/A		2	DNA	N/A
	3	cDNA	N/A		3	DNA	N/A
F16.2/JM2?	1	cDNA	N/A	F16.2/JM2?	1	DNA	N/A
	2	cDNA	N/A		2	DNA	N/A
	3	cDNA	N/A		3	DNA	N/A
F16.2/JM2?	1	cDNA	N/A	F16.2/JM2?	1	DNA	N/A
	2	cDNA	N/A		2	DNA	N/A
	3	cDNA	N/A		3	DNA	N/A
F16.2/JM7?	1	cDNA	N/A	F16.2/JM7?	1	DNA	N/A
	2	cDNA	N/A		2	DNA	N/A
	3	cDNA	N/A		3	DNA	N/A
F16.2/JM7?	1	cDNA	N/A	F16.2/JM7?	1	DNA	N/A
	2	cDNA	N/A		2	DNA	N/A
	3	cDNA	N/A		3	DNA	N/A
F16.2/'アルプス乙女'	1	cDNA	N/A	F16.2/'アルプス乙女'	1	DNA	N/A
	2	cDNA	N/A		2	DNA	N/A
	3	cDNA	N/A		3	DNA	N/A
非感染	1	cDNA	N/A	非感染	1	DNA	N/A
ALSV感染	1	cDNA	15.75	ALSV感染	1	DNA	N/A
鋳型無			N/A	鋳型無			N/A

本育種計画では、ALSV フリーと確認された個体(図 10) は 2020 年春まで岩手大学隔離温室で育成し、その後岩手大学農学部附属寒冷フィールドサイエンス教育研究センター (FSC) のリンゴ圃場に移し、2020 年から生育、開花、結実など各種特性を調査していく予定であり、それら果実品質等の評価結果に基づいて品種登録を検討する。



図10. 隔離温室で育成中のF16.2/JM2（左）、F16.2/JM7（中央）、およびF16.2/ ‘アルプス乙女’（右）（2019.5.30）。

植物ウイルスの各種検出法は、病原ウイルスの同定、診断、防除、また植物検疫の場面で広く利用されている。現在最もよく利用される検出・診断法は、抗体を用いた ELISA や遺伝子診断法（RT-PCR や RT-LAMP など）である。最近の例では、わが国の特定重要病害に指定されているウメ輪紋ウイルス（PPV）の発生調査と植物防疫法に基づく根絶事業の公式検査方法として、イムクロマト法と RT-LAMP が利用されている。イムクロマト法は抗体反応を利用した簡便な方法で、ELISA と同等の検出感度である。RT-LAMP は簡便な遺伝子診断法で、検出感度は RT-PCR とほぼ同程度である。われわれがこれまでに実施した診断法の検出感度を比較すると、ELISA が約 1 ng ALSV 粒子、ハイブリダイゼーション法が数 pg RNA、RT-PCR が 100～10 pg RNA、そして qRT-PCR は 10 fg～50 ag RNA である。このように qRT-PCR は、植物防疫法に基づく根絶事業の公式検査方法として利用されている RT-LAMP と比べて 1000-100000 倍感度が高い方法と言える。

ALSV ベクターによる高速開花技術を利用して選抜したリンゴ樹は、高温処理することにより、その後発生する新梢は ALSV フリーとなる。この機構については、成熟した葉組織や維管束系では ALSV の細胞間移行と長距離移行が阻害されるためであると推定される。

本研究においては、熱処理後の F16.2 樹、緑枝接ぎ後に成長した F16.2/ ‘アルプス乙女’、そして F16.2/矮台（JM2 あるいは JM7）について、休眠期（冬）を挟んで 1 樹あたり計 4 回（F16.2/JM2-①は 3 回）のウイルス検定を実施した。また 1 樹あたり植物体の上位、中位、および下位の 3 枚の葉を検定した（表 1 および 2）。その結果、高温処理後のリンゴ樹およびその枝を接ぎ木した個体の全てが ALSV フリーであることが確認

された（図 6, 8, 9, 表 1 および 2）。このように高速開花技術を利用して選抜したリングゴ樹について複数回のウイルス検定を実施し、ALSV が残存していないことを確実に検証できたものと考えられる。

6. ほ場における管理方法

（１）圃場の場所

岩手大学農学部附属寒冷フィールドサイエンス教育研究センター（FSC）（岩手県滝沢市巣子 1552）のリングゴ圃場（図 11）に植栽する。

（２）圃場における栽培方法

2020 年 4 月に上記圃場に移植して慣行栽培体系で管理し、生育と果実特性など各種特性検定などを行う。早ければ、2021 年に F16. 2/ ‘アルプス乙女’

が、2022 年に矮性台接ぎ木樹（F16. 2/JM2-①、F16. 2/JM2-②、F16. 2/JM2-③、F16. 2/JM2-④、F16. 2/JM2-⑤、F16. 2/JM7-①、F16. 2/JM7-②）が開花・結実する予定である。

（３）圃場での栽培時の緊急措置体制

圃場で管理するリングゴ樹は、「5. 開発プロセスの（2）高温処理後のリングゴ樹に ALSV ベクターが残存しないことの証明」に記載した通り、複数回のウイルス検定を経て ALSV に感染していないことを確認したリングゴ樹である。そのため、圃場で育成中に ALSV が増殖を開始することは考えられないが、ALSV はリングゴに病徴を引き起こさないため、外観からは ALSV の感染は確認できないので、圃場で越冬した 2020 年の春（5～6 月）に全個体について再度岩手大学でウイルス検定を実施することとする。ウイルス検定の結果、万が一 ALSV が検出された場合には、滝沢農場において高圧滅菌処理後廃棄するとともに、生物多様性影響を生ずる恐れがあると認められる場合には、リスクの程度に応じて適切な措置をとる。同時に農林水産省 消費・安全局農産安全管理課および環境省自然環境局野生生物課に速やかに報告する。



図 11 岩手大学農学部附属寒冷フィールドサイエンス教育研究センター（FSC）滝沢農場

(4) 圃場の管理体制

ALSV ベクターの作出、リンゴへの接種と早期開花による世代促進は、図 12 に示したように、岩手大学における遺伝子組換え生物等の安全管理体制（文部科学省／遺伝子組換え生物等の使用等の規制による生物の多様性の確保に関する法律／第二種使用等拡散防止措置）に基づいて実施し、ALSV フリーであることを証明したリンゴ樹を FSC の実験圃場において圃場試験に供する。リンゴ樹の管理は FSC の職員に依頼する。

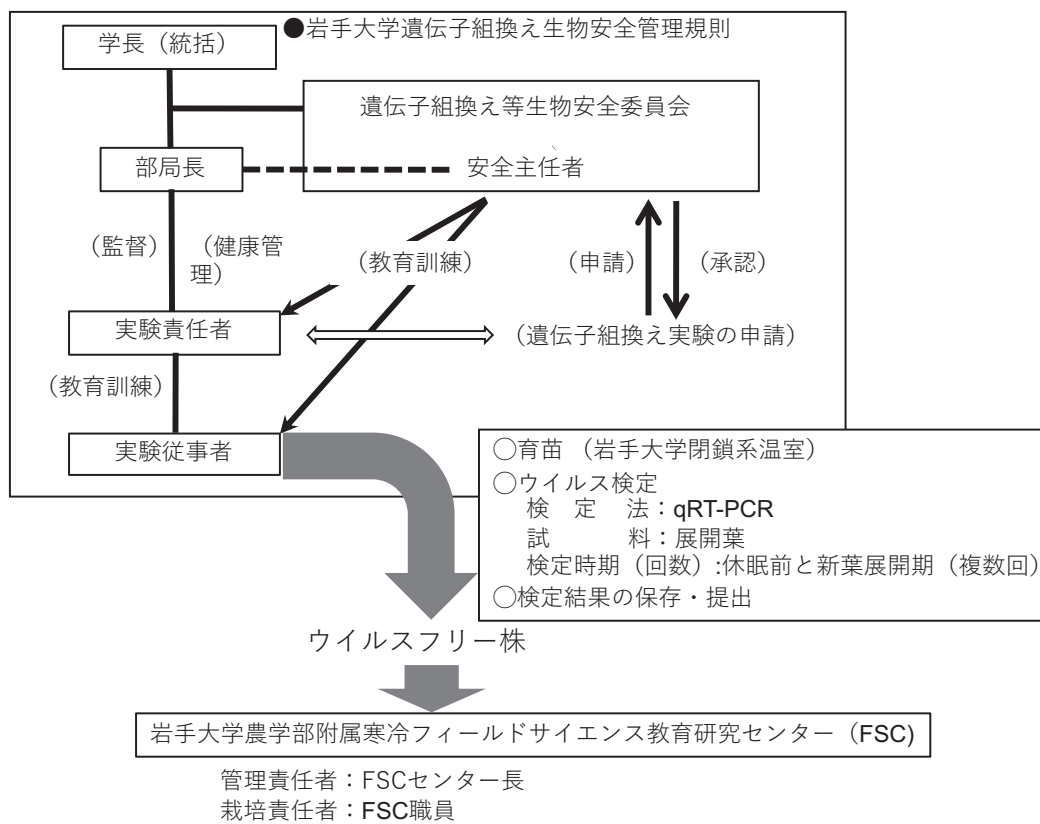


図 12 岩手大学における遺伝子組換え生物等の安全管理体制