

ALSV ベクターの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)

2020 年 10 月

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（Fischer 1994; Hanke et al., 2007）。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（Crosby et al., 1994）。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（定盛ら, 1963）。

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（Fischer 1994; Flachowsky et al., 2009）。2007年に植物生理学上大きな謎であった植物の開花に關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（Corbesier et al., 2007）。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（Kotoda et al., 2006）。

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ヵ月半以内に開花すること（Yamagishi et al., 2014）、（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（Yamagishi et al., 2014）、（3）感染リンゴ実生苗を高温処理（37°C, 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（Yamagishi et al., 2016）、（4）ALSVベクタ

一感染により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る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。2019年4月から2020年3月にかけて、以下の系統にALSV-AtFT/MdTFL1を接種し、‘Gold Rush’が持つ黒星病抵抗性遺伝子である vf 遺伝子を有すること、結実した果実の日持ち性が良いこと、および果実糖度が高いことを指標にして優良系統の選抜を行った。

- ① ‘ふじ’ x ‘Gold Rush’ の交配実生
- ② ‘はるか’ x ‘Gold Rush’ の交配実生
- ③ ‘玉林’ x ‘Gold Rush’ の交配実生
- ④ ‘はるか’ 自然交雑実生

早期開花した感染実生（115個体）の中に、 vf 遺伝子を有し、日持ち性があり、果実糖度(Brix)が高い果実が結実した‘ふじ’ x ‘Gold Rush’ 実生3個体(以下「ふ39」, 「ふ126」, および「ふ187」)と‘はるか’ x ‘Gold Rush’ 実生1個体(以下「は222」)が認められた。また、 vf 遺伝子は持たないものの、果実の日持ち性があり、果実糖度(Brix)が高い果実が結実した‘はるか’ x ‘Gold Rush’ 実生1個体(以下「は76」)と、‘はるか’ 自然交雑実生1個体(以下「は0」)を選抜した。これらの実生個体は、果実に割れが生じないこと、香りも良好であることから、新品種候補として有望であると考えられた。そこで、25°Cの恒温室で育成していた新品種候補樹を37°Cのインキュベータで1ヵ月間栽培した。その後25°Cの恒温室に戻して育成し、約5週間後に新たに成長した新梢の枝から葉を採取しqRT-PCRで検定したところ、ALSVは検出されなかった。ALSVが検出されなかった枝を矮性台木(M26とJM7)に緑枝接ぎした。活着して生長した接ぎ穂の新梢の葉を再度qRT-PCR法とqPCR法で検定し、ALSVフリーの緑枝接ぎ個体19個体(「ふ39」を接いだ3個体(ふ39⑤/M26, ふ39⑥/JM7, および ふ39⑦/JM7), 「ふ126」を接いだ3個体(ふ126⑧/M26, ふ126⑨/JM7, および ふ126⑩/JM7), 「ふ187」を接いだ3個体(ふ187⑭/M26, ふ187⑮/M26, ふ187⑯/JM7), 「は222」を接いだ3個体(は222⑪/JM7, は222⑫/M26, は222⑬/M26), 「は76」を接いだ3個体(は76⑰/JM7, は76⑱/M26, は76⑲/M26), および「は0」を接いだ4個体(は0①/M26, は0②/M26, は0③/M26, は0④/M26))を選抜した。

本育種計画では2021年春に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、2021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(Hel)/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108kDa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年に見つかったから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)。

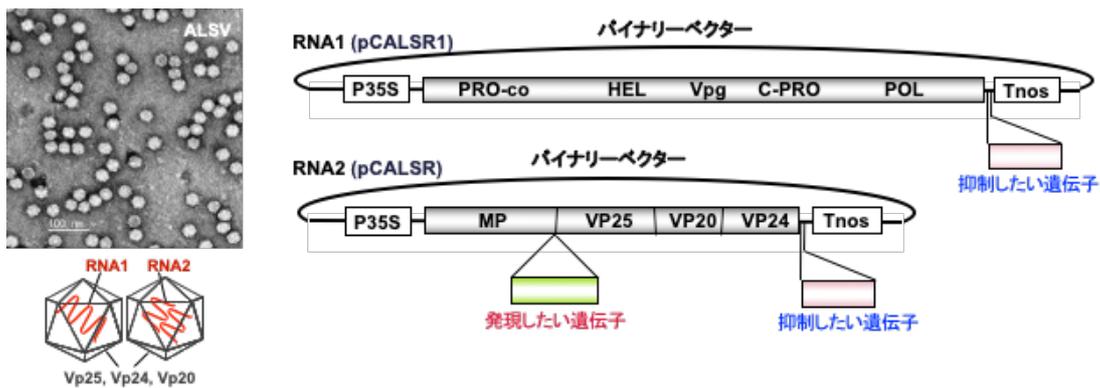


図1 リンゴ小球形潜在ウイルス(ALSV)の粒子形態(左)と ALSV ベクター(右)

(2) フロリゲン (FT) を発現する ALSV 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 ALSV-RNA2 ベクターに挿入した。このベクター (ALSV-*AtFT*) が宿主細胞に感染すると、ALSV-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、やがて篩管を通して茎頂分裂組織に移行すると、ALSV 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 ALSV-*AtFT* 感染により約 2 ヶ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°C、遮光条件下で2日静置した後25°C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 ヶ月以内に開花し、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)。

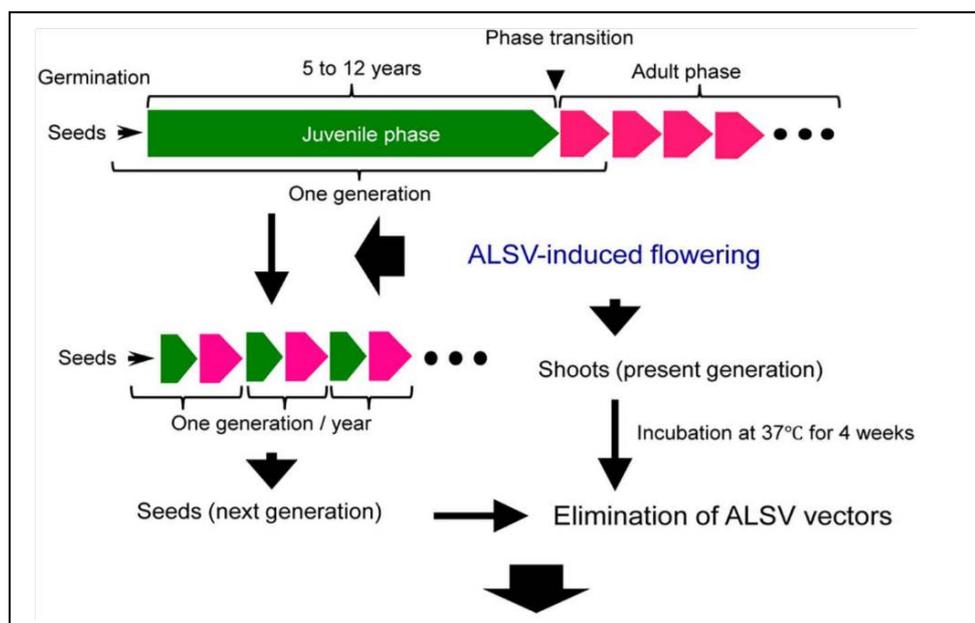


図 3. ALSV ベクターによる早期開花技術を用いたリンゴの世代促進法

5. 開発プロセス

(1) 「リンゴ黒星病抵抗性 (*vf*) 遺伝子を持ち、食味が良く、日持ち性のあるリンゴ」品種の開発

1) リンゴ実生的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。2019年4月から2020年3月にかけて、‘ふじ’ x ‘Gold Rush’、‘はるか’ x ‘Gold Rush’、および‘王林’ x ‘Gold Rush’、の交配実生と‘はるか’の自然交雑実生に ALSV-AtFT/MdTFL1 を接種し、‘Gold Rush’が持つ黒星病抵抗性遺伝子である *vf* 遺伝子を有し、日持ち性が良く、果実糖度が高いことを指標にして、優良系統の選抜を行った。早期開花／結実した感染実生(115個体)の中から最終的に、*vf* 遺伝子を有し、日持ち性があり、果実糖度(Brix)が高い実生系統が‘ふじ’ x ‘Gold Rush’で3個体(以下「ふ39」, 「ふ126」, および「ふ187」)、‘はるか’ x ‘Gold Rush’で1個体(以下「は222」)選抜した。また、*vf* 遺伝子は持たないものの、日持ち性があり、果実糖度(Brix)が高い‘はるか’ x ‘Gold Rush’の実生1個体(以下「は76」)と‘はるか’の自然交雑実生1個体(以下「は0」)を選抜した。これらの選抜個体は、果実に割れが生じないことや香りも良好であることから、新品種候補として有望であると考えられた(図4, 表1)。

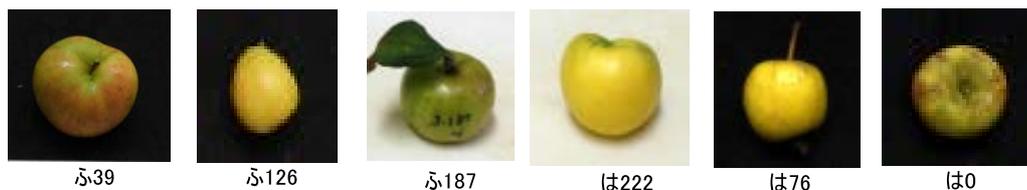


図4. ALSV-AtFT/MdTFL1 感染リンゴ実生に形成された果実

表1. ALSVベクターの高速開花技術により選抜したリンゴの新品種候補樹					
交配親	選抜系統	糖度	酸度	<i>Vf</i> (黒星病抵抗性遺伝子)	<i>MsACSI</i> (日持ち性マーカー)
'ふじ' x 'Gold Rush'	ふ39	16.1	0.68	+	+
	ふ126	17.4	3.48	+	+
	ふ187	11.6	0.69	+	+
'はるか' x 'Gold Rush'	は222	12	1.44	+	+
	は76	23	*	-	+
'はるか'自然交雑実生	は0	18.1	0.73	-	+

糖度と酸度の測定にはATAGO社のポケット糖酸度計PAL-BXIACID5を用いた。*は測定できなかったことを示す。

2) 品種候補樹からの 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（Yamagishi et al., 2016）. 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（Yamagishi et al., 2016）.

そこで、25℃の恒温室で育成していた選抜樹を 37℃のインキュベータで1ヵ月間栽培した. その後 25℃の恒温室に戻して育成し、約7週間後に新たに成長した新梢の枝から葉を採取し、脚注1) に示す方法で qRT-PCR で検定を行った. その結果、図5と表2に示すように、ALSV 感染リンゴの cDNA を鋳型とした試料のみ（ポジティブコントロール）において増幅が観察された（図5，表2）. 非感染試料は N/A（増幅なし）であり、また被験試料（cDNA）は全て N/A であった（表2）. 以上から、「ふ39」，「ふ126」，「ふ187」，「は222」，「は76」，および「は0」は全て ALSV に感染していないと結論された.

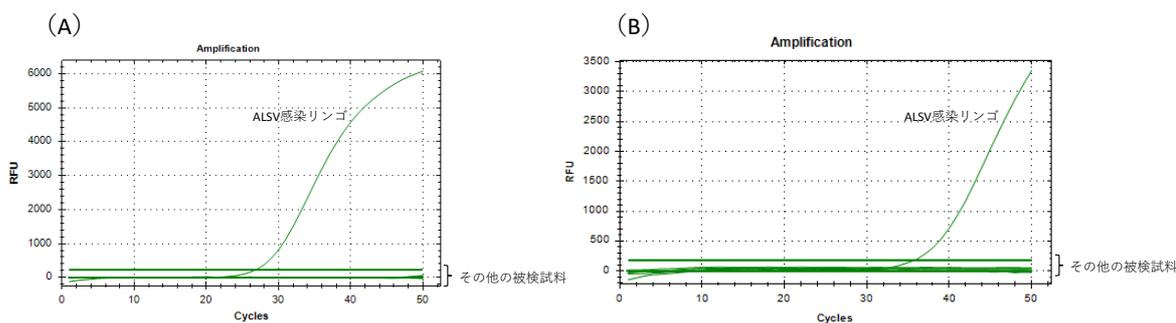


図5. 高温処理7週間後の新梢のqRT-PCRによるALSV検定

(A) 「ふ39」，「ふ126」，「は0」の増殖曲線；(B) 「ふ187」，「は76」，「は222」の増殖曲線.

表 2. リンゴ選抜系統のリアルタイムPCRによるALSV検定*

鋳型試料	選抜系統	葉No.	Ct	鋳型試料	選抜系統	葉No.	Ct
RNA (cDNA)	ふ39	1	N/A ^{*2}	RNA (cDNA)	ふ187	1	N/A
		2	N/A			2	N/A
		3	N/A			3	N/A
		4	N/A		は76	1	N/A
		5	N/A			2	N/A
		6	N/A			3	N/A
	ふ126	1	N/A		は222	4	N/A
		2	N/A			1	N/A
		3	N/A			2	N/A
		4	N/A			3	N/A
		5	N/A			4	N/A
	は0	1	N/A			5	N/A
		2	N/A		6	N/A	
		3	N/A		非感染リンゴ	N/A	
		4	N/A		ALSV感染リンゴ	35.57	
5		N/A	鋳型無	N/A			
非感染リンゴ		N/A					
ALSV感染リンゴ		26.66					
鋳型無		N/A					

*: 高温処理約7週間後の新梢の葉を供試した。

*2: N/Aは増殖が見られないことを意味している。

脚注 1) 検定試料 30 mg を 2.0 ml 凍結保存チューブ (ASSIST) に入れ, Micro smash MS-100R (TOMY) および液体窒素を用いて破砕した後, 300 μ l の Lysis buffer (ベックマンコールター) を加え, 再度 Micro smash MS-100R を用いて十分に磨砕した. 磨砕後 1,000rpm で 10 分間 (4°C) 遠心分離し, 上清 250 μ l を新しい 1.5 ml 容チューブに移し, 250 μ l の Bind buffer (ベックマンコールター) を加えて十分に攪拌した後, 磁気プレート (Thermo fisher scientific) 上で 2 分静置した後, 上清を除去した. チューブに Wash buffer (ベックマンコールター) 500 μ l を加えて攪拌し, 再び, 磁気プレート上で 2 分静置した後, 上清を除去した. 上清を除去し, 70%エタノール 600 μ l を加えて攪拌し, 再び, 磁気プレート上で 2 分静置した後, 上清を除去した. この操作をもう一度繰り返した後, 30 μ l の滅菌水に懸濁し, 磁気プレート上で 2 分静置した後, 全核酸を含む上清を新しい 1.5 ml 容チューブに移した. 分光光度計で得られた溶液を 500 ng/ μ l に調整し, これを全 RNA 溶液とした. これらの試料について qRT-PCR 法 (対象: RNA) による ALSV 検定を行った. 1 μ g の全 RNA を Rever Tra Ace (TOYOBO) を用いて逆転写して cDNA とし, TaKaRa SYBR[®] Premix Ex Taq[™] を用いて PCR 反応した. プライマーには, ALSV RNA2 をターゲットとした RNA2-Primer 778(+) [5' - cccattacttgctatgtgt-3'] (RNA1 の塩基番号 778-797 に相当) と RNA2-Primer 900(-) [5' - tttagcgtaaggagatgaga-3'] (RNA2 の塩基番号 900-881 に相当) の組み合わせを用いた. リアルタイム PCR は Bio-Rad 社の CFX Connect[™] RealTime System を用いて行った. 条件は初期変性: 95°C, 30 秒, 変性反応: 95°C, 5 秒, アニーリング・伸長反応: 65°C, 30 秒とした. この反応を 50 サイクル繰り返し, 蛍光値を検出した.

3) 候補樹の矮性台木への接ぎ木

ALSV が検出されなかった「ふ39」, 「ふ126」, 「ふ187」, 「は222」, 「は76」, および「は0」の新梢を2020年6月11日(「ふ39」, 「ふ126」, 「は0」)と6月25日(「ふ187」, 「は222」, 「は76」)に矮性台木(M26とJM7)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。接ぎ木した樹は次のように命名した。

「ふ39」 : ふ39⑤/M26, ふ39⑥/JM7, および ふ39⑦/JM7 (3樹)

「ふ126」 : ふ126⑧/M26, ふ126⑨/JM7, および ふ126⑩/JM7 (3樹)

「ふ187」 : ふ187⑭/M26, ふ187⑮/M26, および ふ187⑯/JM7 (3樹)

「は222」 : は222⑪/JM7, は222⑫/M26, および は222⑬/M26 (3樹)

「は76」 : は76⑱/JM7, は76⑲/M26, および は76⑳/M26 (3樹)

「は0」 : は0①/M26, は0②/M26, は0③/M26, および は0④/M26 (4樹)

(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

2020年8月, 緑枝接ぎから2-3ヵ月経過し, 活着して生長した各樹の葉を, 脚注2)に示した条件でqRT-PCR検定(RNA試料)並びにqPCR検定(DNA試料)した。図6に示すように, ALSV感染リンゴのcDNAを鋳型とした試料(ポジティブコントロール)のみにおいて増幅が観察され, そのCt値は17.47と18.12であった(図6, 表3)。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3)。以上から, ふ39⑤/M26, ふ39⑥/JM7, ふ39⑦/JM7, ふ126⑧/M26, ふ126⑨/JM7, ふ126⑩/JM7, ふ187⑭/M26, ふ187⑮/M26, ふ187⑯/JM7, は222⑪/JM7, は222⑫/M26, は222⑬/M26, は76⑱/JM7, は76⑲/M26, は76⑳/M26, は0①/M26, は0②/M26, は0③/M26, は0④/M26は全てALSVに感染していないと結論された(図6, 表3)。

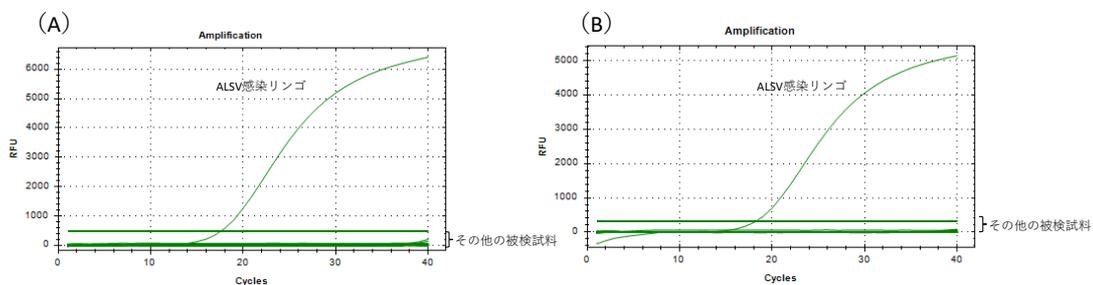


図6. 緑枝接ぎ2-3ヵ月後の新梢のqRT-PCRによるALSV検定
(A) 「ふ39」, 「ふ126」, 「は0」の増殖曲線; (B) 「ふ187」, 「は76」, 「は222」の増殖曲線。

表3. リンゴ選抜系統のリアルタイムPCRによるALSV検定*

鋳型試料	選抜系統	個体No.	葉No.	Ct	鋳型試料	選抜系統	個体No.	葉No.	Ct
DNA	ふ39	⑤/M26	1	N/A* ²	DNA	ふ187	⑭/M26	1	N/A
			2	N/A				2	N/A
		⑥/JM7	1	N/A			⑮/M26	1	N/A
	2		N/A	2				N/A	
	⑦/JM7	1	N/A	⑯/JM7			1	N/A	
		2	N/A				2	N/A	
	ふ126	⑧/M26	1	N/A		⑰/JM7	1	N/A	
			2	N/A			2	N/A	
		⑨/JM7	1	N/A		⑱/M26	1	N/A	
	2		N/A	2			N/A		
	は0	⑩/JM7	1	N/A		⑲/M26	1	N/A	
			2	N/A			2	N/A	
		①/M26	1	N/A		⑳/M26	1	N/A	
			2	N/A			2	N/A	
②/M26	1	N/A	㉑/M26	1	N/A				
	2	N/A		2	N/A				
③/M26	1	N/A	㉒/M26	1	N/A				
	2	N/A		2	N/A				
④/M26	1	N/A	⑪/JM7	1	N/A				
④/M26	2	N/A	⑪/JM7	2	N/A				
非感染リンゴ			⑫/M26	1	N/A				
ALSV感染リンゴ			⑫/M26	2	N/A				
鋳型無			⑫/M26	3	N/A				
			⑫/M26	2	N/A				
			非感染リンゴ		N/A				
			ALSV感染リンゴ		N/A				
			鋳型無		N/A				
RNA (cDNA)	ふ39	⑤/M26	1	N/A	RNA (cDNA)	ふ187	⑭/M26	1	N/A
			2	N/A				2	N/A
		⑥/JM7	1	N/A			⑮/M26	1	N/A
	2		N/A	2				N/A	
	⑦/JM7	1	N/A	⑯/JM7			1	N/A	
		2	N/A				2	N/A	
	ふ126	⑧/M26	1	N/A		⑰/JM7	1	N/A	
			2	N/A			2	N/A	
		⑨/JM7	1	N/A		⑱/M26	1	N/A	
	2		N/A	2			N/A		
	は0	⑩/JM7	1	N/A		⑲/M26	1	N/A	
			2	N/A			2	N/A	
		①/M26	1	N/A		⑳/M26	1	N/A	
			2	N/A			2	N/A	
②/M26	1	N/A	㉑/M26	1	N/A				
	2	N/A		2	N/A				
③/M26	1	N/A	㉒/M26	1	N/A				
	2	N/A		2	N/A				
④/M26	1	N/A	⑪/JM7	1	N/A				
④/M26	2	N/A	⑪/JM7	2	N/A				
ALSV感染リンゴ			⑫/M26	1	N/A				
非感染リンゴ			⑫/M26	2	N/A				
鋳型無			⑫/M26	3	N/A				
			⑫/M26	2	N/A				
			非感染リンゴ		18.12				
			ALSV感染リンゴ		N/A				
			非感染リンゴ		N/A				
			鋳型無		N/A				

* : 緑枝接ぎ2-3ヵ月後の新梢の葉を供試した.

*²: N/Aは増殖が見られないことを意味している.

脚注2) 検定試料 30 mg を 2.0 ml 凍結保存チューブ (ASSIST) に入れ, Micro smash MS-100R (TOMY) および液体窒素を用いて破碎した後, 300 μ l の Lysis buffer (ベックマンコールター) を加え, 再度 Micro smash MS-100R を用いて十分に磨砕した. 磨砕後 1,000rpm で 10 分間 (4°C) 遠心分離し, 上清 250 μ l を新しい 1.5 ml 容チューブに移し, 250 μ l の Bind buffer (ベックマンコールター) を加えて十分に攪拌した後, 磁気プレート (Thermo fisher scientific) 上で 2 分静置した後, 上清を除去した. チューブに Wash buffer (ベックマンコールター) 500 μ l を加えて攪拌し, 再び, 磁気プレート上で 2 分静置した後, 上清を除去した. 上清を除去し, 70% エタノール 600 μ l を加えて攪拌し, 再び, 磁気プレート上で 2 分静置した後, 上清を除去した. この操作をもう一度繰り返した後, 30 μ l の滅菌水に懸濁し, 磁気プレート上で 2 分静置した後, 全核酸を含む上清を新しい 1.5 ml 容チューブに移した. 分光光度計で得られた溶液を 100 ng/ μ l に調整し, これを全核酸溶液とした. これらの試料について qRT-PCR 法 (対象: RNA) による ALSV 検定を行った. 500ng の全核酸を Rever Tra Ace (TOYOBO) を用いて逆転写して cDNA とし, 1/20 量を THUNDERBIRD SYBR qPCR Mix (TOYOBO) を用いて PCR 反応した. 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. また, DNA サンプルとして逆転写反応前の試料 300ng について上記と同様に PCR 反応を行った. リアルタイム PCR は Bio-Rad 社の CFX ConnectTM RealTime System を用いて行った. 条件は初期変性: 95°C, 30 秒, 変性反応: 95°C, 5 秒, アニーリング・伸長反応: 65°C, 1 分間とした. この反応を 40 サイクル繰り返し, 蛍光値を検出した.

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) (岩手県滝沢市菓子 1552) のリンゴ圃場 (図 7) に植栽する。

(2) 圃場における栽培方法

2021 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、2023～2024 年に開花・結実する予定である。



図 7 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

(3) 圃場での栽培時の緊急措置体制

圃場で管理するリンゴ樹は、「5. 開発プロセスの(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」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 2022 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。

(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 8 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。

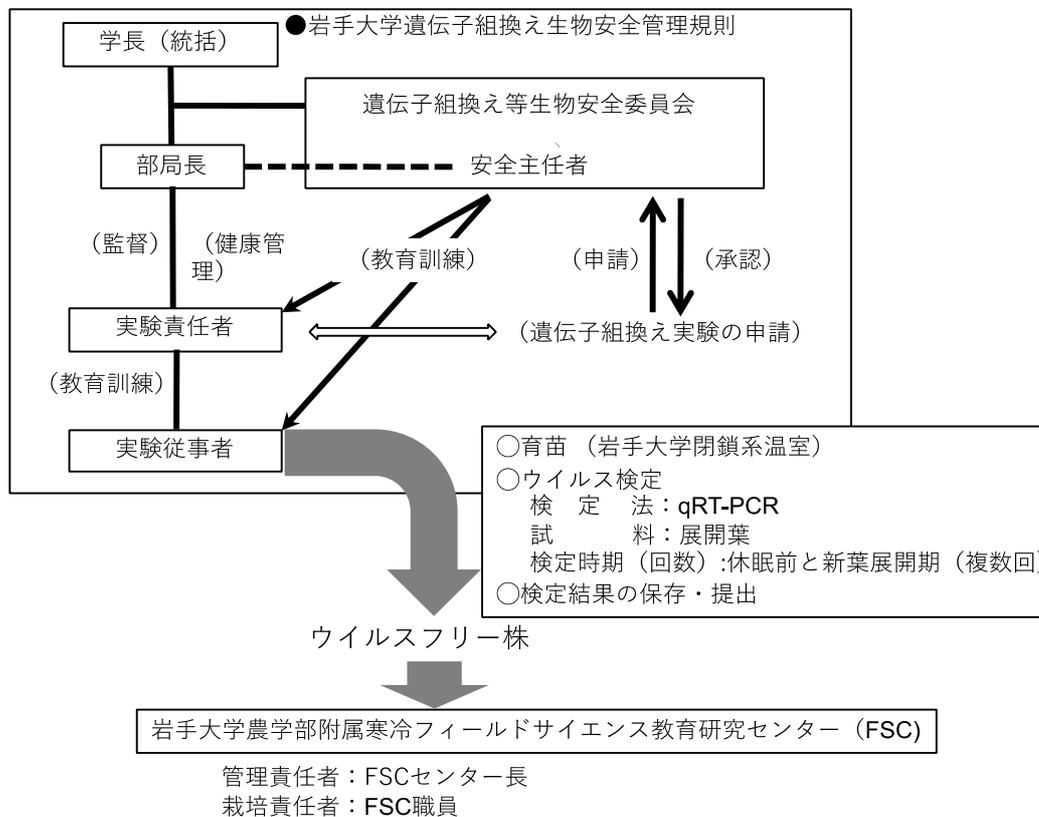


図8 岩手大学における遺伝子組換え生物等の安全管理体制

7. 作出したリンゴの取扱いに関する情報、流通

FSC の圃場に栽培を開始したリンゴ樹は開花・結実まで数年間育成し、生育特性および果実形質の評価を行う予定である。その結果に基づき新品種として有望であると判断された場合には、品種登録および商業栽培に向けて岩手大学を中心に JA など関連機関と協議をしながら検討する。

なお、ALSV/高速開花技術を利用して作出したリンゴ樹の野外圃場での栽培試験について厚生労働省の担当者に問い合わせたところ、本件は遺伝子組換え植物に当たらないため、栽培試験の申請や届出の必要はないと連絡を受けている。将来的に品種登録し販売を開始する段階では、商品への表示について相談が必要になる可能性があるとのことであった。