

# いちごの遺伝子解析用ウイルスベクターの構築と利用技術の開発

## 1. 成果の要約

SMYEV ベクターは挿入する遺伝子が 150bp 以下であれば、6 か月間安定していちご植物体内から検出された。また、SMYEV ベクターを転写するプロモーターを CaMV35S から SVBV35S に変更することで、2 倍体野生種 (UC-5) におけるベクターの検出率が向上した。SMoV ベクターは、接種 2 週後のいちご植物体内からは検出されるが、1 か月後はほとんど検出されなかった。

## 2. キーワード

SMYEV ベクター、SMoV ベクター、SVBV35S プロモーター

## 3. 試験のねらい

いちごゲノム研究の進展に伴い、今後多くの有用遺伝子候補が単離されると予想されるが、それらを育種に利用するためには、候補遺伝子の機能を明らかにして目的遺伝子かどうか確認する必要がある。ウイルスベクターは、接種した植物の内在遺伝子を発現抑制したり、外来遺伝子を植物体内で発現させたりすることが可能である。それらの技術が確立できれば、迅速な遺伝子機能解析が可能となり、多数の遺伝子について簡便に機能を明らかにする技術が開発できる。そこで、いちごにおけるウイルスベクターの構築と利用技術について、宇都宮大学と共同で開発を目指す。

## 4. 試験方法

いちごの主要な 3 種のウイルス (SMYEV : イチゴマイルドイエローエッジウイルス、SMoV : イチゴ斑紋ウイルス、SVBV : イチゴベインバンディングウイルス) の全塩基配列決定、SMYEV と SMoV の感染性クローン (図-1、-2) およびベクターの構築は、宇都宮大学が担当した。構築されたウイルスの感染性クローンおよびベクターは金粒子にコーティングし、パーティクルガンでいちご葉身に接種した。接種した感染性クローンおよびベクターは、展開した最上位葉から RNA を抽出し、RT-PCR (Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction) により検出した。

## 5. 試験結果および考察

- (1) 何も挿入しない SMYEV ベクター (空ベクター) は、安定していちご植物体内から検出された。また、ベクターに挿入する遺伝子が 150bp 以下であれば、定着率は下がるものの、比較的安定していちご植物体内から検出されることを明らかにした (表-1)。
- (2) SMYEV ベクターを転写するプロモーターを CaMV35S から SVBV35S に変更することで、2 倍体野生種 (UC-5) におけるベクターの検出率が向上した (表-2)。
- (3) SMoV ベクターは、改良を重ねることで接種 2 週後のいちご植物体内からのベクター検出率は向上したが、1 か月後はほとんどの個体でベクターが検出されなかった (データ省略)。

※なお、本研究は宇都宮大学との共同で、農林水産業・食品産業科学技術研究推進事業の支援を受けて行われた。

(担当者 研究開発部 生物工学研究室 生井潔<sup>\*</sup>、鈴木恵美子<sup>\*\*</sup>)

<sup>\*</sup>現農業大学校、<sup>\*\*</sup>現経済流通課

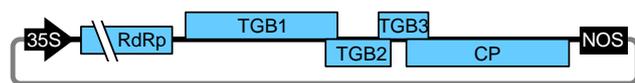


図-1 SMYEV 感染性クローンの構造

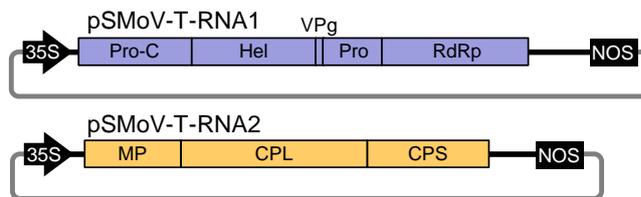


図-2 SMoV 感染性クローンの構造

表-1 RT-PCRによるいちご葉身からのSMYEVベクター検出結果

試験	供試ベクター	予想増幅産物(bp)	供試材料	経時的なベクター検出個体数 (接種後)				
				2週	1か月	2か月	4か月	6か月
1	空ベクター	189	農2号	2/4	4/4	3/3	4/4	4/4
	PDS2(+)	535		0/4	0/4	1/4	2+(1)/4	1+(2)/4
2	空ベクター	189	農2号	1/5	5/5	5/5	5/5	5/5
	PDS3(+)	489		0/5	0/5	1/5	0+(3)/5	3/5
	PDS3(-)	489		0/5	0/5	1/5	1/5	2/5
3	空ベクター	189	農2号	2/5	5/5	5/5	5/5	5/5
	PDS3(+)	489		0/5	3/5	1+(3)/5	1+(2)/4	0+(2)/3
	PDS3(-)	489		0/5	3/5	1/5	0/5	0/5
4	空ベクター	189	UC5	1/5	4/5	4/5	4/5	5/5
	PDS4(+)	339		1/5	3/5	3/5	3/5	3/5
5	空ベクター	189	UC5	1/3	1/3	1/3	1/3	1/3
	PDS5(-)	382	農2号	0/2	2/2	1/1	1/1	1/1
			UC5	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3
			農2号	0/2	0/2	0/2	0/2	0/2
	PDS6(-)	639	UC5	0/3	0/3	0/3	0/3	0/3
			農2号	0/2	0/2	0/2	0/2	0+(1)/2
6	PDS6(-)	639	UC5	0/8	1/8	0/8	0/8	—
7	PDS4(+)	339	農2号	2+(5)/10	3+(2)/10	5+(2)/10	—	—

注) 供試ベクターのPDS2～6は、PDS遺伝子を挿入したSMYEVベクターを示す。  
 SMYEVベクターに挿入したイチゴPDS遺伝子 (全長2043bp, CDS: 101～1807bp) の配列  
 PDS2: 1383～1727bp (345bp)、PDS3: 560～859bp (300bp)、PDS4: 560～709bp (150bp)、  
 PDS5: 1726～1918bp (193bp)、PDS6: 1019～1468bp (450bp)  
 (+): 正方向でベクターへ挿入、(-): 逆方向でベクターへ挿入  
 ベクター検出個体数は、「ベクター検出個体数/供試個体数」を示す。—は未実施。  
 検出個体数の ( ) 内の数字は、予想サイズ以外の増幅産物のみが認められた個体数を示す。

表-2 プロモーターの違いによるいちご葉身からのベクター検出結果への影響

供試材料	供試プロモーター	経時的なベクター検出個体数 (接種後)			
		1週	2週	3週	5週
UC5	CaMV35S	1+(5)/10	2/10	6/10	6/10
	SVBV35S	5+(4)/10	7+(1)/10	10/10	10/10
農2号	CaMV35S	4+(3)/10	3+(2)/10	6+(1)/10	10/10
	SVBV35S	5+(5)/10	3+(3)/10	7+(1)/10	9+(1)/10

注) CaMV35S: SMYEVベクターを転写するプロモーターがCaMV35S  
 SVBV35S: SMYEVベクターを転写するプロモーターがSVBV35S  
 ベクター検出個体数は「ベクター検出個体数/供試個体数」を示す。  
 ベクター検出個体数の ( ) 内の数字は、増幅量が少なかった個体数を示す。