

ウイロイドフリー植物作出のための新手法・ 超微小茎頂分裂組織培養法

京都大学大学院農学研究科 ^{ほそ}細 ^{かわ}川 ^{むね}宗 ^{たか}孝

はじめに

DIENER (1971) によって発見されたウイロイドは植物感染性の病原体であり、現在までに2科30種類以上が発見されている。環状一本鎖RNAであるウイロイドは、核に局在する Pospiviroidae と葉緑体に局在する Avsunviroidae の二つの科に分類される。ウイルスとは異なり外被タンパク質やエンベロープに包まれておらず、いかなるタンパク質もコードしていないため、自己を複製する酵素も持たない。すなわち、ウイロイドはその複製のほとんどすべてのステップを植物の酵素にゆだねる機能性RNAである。ヒトに感染する Hepatitis D virus もウイロイドと同様の構造や機能を持ち、ウイロイドとの進化的同一性が指摘されているが、二つのタンパク質をコードしている点などがウイロイドとは異なる。我が国においてウイロイドによる病気は大きな脅威となっており、キクやカンキツをはじめ多くの作物に被害を与えている。2007年にはダリアから *Chrysanthemum stunt viroid* (CSVd) の自然感染が見つかり (NAKASHIMA et al., 2007), 2010年には同植物で *Potato spindle tuber viroid* (PSTVd) の感染も見つかっている。ウイロイドは他の病原体と異なり、病徴が現れるまでに長い潜伏期間を持つものが多い。栄養繁殖性の作物においては、見目で健全な植物が増殖され、定植後の栽培期間中にウイロイド濃度が上昇し発病株が激発することになる。さらには、種子でも感染植物が広がっているのが現状である (WAN CHOW WAH and SYMONS, 1999; 大石ら, 2001)。このような問題は我が国にとどまらず、ヨーロッパにおける重要な炭水化物であるジャガイモの生産あるいは地中海地域での重要な果樹、特にモモ、ブドウあるいはオレンジの生産に脅威を与えている。

ウイロイドは非常に除去が難しいとされてきた。ウイロイドのフリー化技術の開発は重要な園芸的課題であり、これまでも数多くの挑戦的な試みがなされてきた。ウイロイドは高照度 (SÄNGER and RAMM, 1975) や高

温 (MORRIS and SMITH, 1977) 下で植物体内での濃度が上昇する。よって、3か月以上の低温処理 (5℃) や低照度処理 (500 lx) と茎頂培養を組合せる方法がフリー化には有効であるとされる。また、PADUCH-CICHAL and KRZYCZYNSKI (1987) は暗黒下で6か月間の6~7℃処理後に茎頂培養を行うことで、PSTVd フリーのジャガイモ植物体を得ることに成功している。いずれの処理に関しても、非常に長い期間の前処理が必要であること、報告当時における検出感度が現在ほど高くないため、RT-PCR や RT-LAMP 等を用いた場合にはウイロイドが検出される可能性が高い。以上のことから、より現実的な方法を開発する必要があった。筆者らは茎頂分裂組織の微細手術を行う中で、ウイロイドの除去技術を開発することに成功し、超微小茎頂分裂組織培養法と名付けた。キクに感染する Pospiviroidae に属する CSVd と Avsunviroidae に属する *Chrysanthemum chlorotic mottle viroid* (CChMVd) の除去に本法が有効であることを明らかにした。ここでは、超微小茎頂分裂組織培養を用いたウイロイドフリー化技術およびウイロイドフリー化のメカニズムを概説する。

I ウイロイドの持つ茎頂分裂組織への侵入能力と植物側の防御機構

これまで、ウイルスと同様にウイロイドも維管束が未分化である茎頂部には侵入しにくいと考えられてきた。MOMMA and TAKAHASHI (1983) は異なる大きさのホップの茎頂から植物体を再生させ、Pospiviroidae の *Hop stunt viroid* (HSVd) の除去率を調査した。その結果、小さく摘出したものほどウイロイドの除去効率が高かったことから HSVd が求動的に濃度減少すると推察した。SUAREZ et al. (2005) は Avsunviroidae の *Avocado sunblotch viroid* (ASBVd) に感染したアボカドからフリー植物を得る目的で、茎頂培養 (2~3枚の葉原基を持つ茎頂培養) を行ったがフリー植物を得ることはできなかった。彼らは維管束を持たない培養茎頂からも ASBVd フリー植物が得られなかったことから、ASBVd が茎頂分裂組織にまで侵入しているのではないかと推察した。また、顕微鏡下で注射針によってキクの微小部位を刺し、付着した液をテンプレートにして Real time RT-

A Novel Method for Viroid Elimination from Infected Plants: Leaf Primordial Free Shoot Apical Meristem Culture. By Munetaka HOSOKAWA

(キーワード: ウイロイド, 茎頂分裂組織, フリー植物)

PCRを行うことで、CChMVd および CSVd は茎頂部で急激に濃度が減少することを明らかにした (NABESHIMA et al., 未発表)。

Pospiviroidae の PSTVd が感染したトマトにおいては、茎頂分裂組織への PSTVd の侵入が見られない (ZHU et al., 2001)。また、*Nicotiana benthaminana* においても PSTVd は茎頂に侵入できない (DI SERIO, et al., 2010)。また、CSVd が感染したキク ‘ピアト’ において、CSVd は茎頂基部にまでは侵入するが、茎頂分裂組織の先端部には侵入しない (OMORI et al., 2009)。一方で、Avsunviroidae に属する Peach latent mosaic viroid (PLMVd) はモモの茎頂分裂組織のごく先端部を除く全域に侵入できることが報告されている (RODIO et al., 2007)。このとき、茎頂分裂組織では PLMVd の +鎖のみならず -鎖も検出されることから、PLMVd は茎頂分裂組織に侵入するだけでなく、複製も行っていることが示唆されている。また、CChMVd もキクの茎頂分裂組織の先端部でわずかに検出されており、これまで報告されている多くの研究においては Avsunviroidae に属するウイルスは茎頂分裂組織に侵入していることになる。Avsunviroidae には茎頂分裂組織に侵入する特殊な能力があるとすると、機能性 RNA の視点から興味深いですが、まずは確実な事例を慎重に集める必要がある。なお、すべての実験においてウイルスが検出されない部位においてもわずかのウイルスが存在する可能性は否定されていない。

ウイルスとは全く異なる病原体であるが、ウイルスの研究成果に学ぶところは大きい。これまで、茎頂分裂組織へのウイルスの侵入には、RNA サイレンシングにおける重要な酵素である RNA 依存 RNA ポリメラーゼ 6 (RDR6) が大きな役割を果たしていることから、RNA サイレンシングが関与していることが示唆されてきた (QU et al., 2005 ; SCHWACH et al., 2005)。HIRAI et al. (2008) はトバモウイルスが感染した葉において見られる病斑について興味深い実験を行っている。トバモウイルスが感染したタバコ (*N. tabacum*) では緑斑部や淡緑部からなるモザイクが見られるが、健全部との境界においては RNA サイレンシングが確立し siRNA を蓄積させることで、内部へのウイルスの侵入を防御している可能性を示した。さらに、タバコの組み換え体を用いた実験から、この防御反応に RDR が関与することを明らかにした。DI SERIO ら (2010) は RDR6 をサイレンシングした *N. benthamiana* に感染した PSTVd は茎頂分裂組織に侵入することを示し、ウイルスでも RDR6 が重要な役割をしていることを示した。また、植物の

RNA サイレンシングの発動を阻止するウイルスのサプレッサーが茎頂分裂組織への侵入に必要であることも報告されている。ウイルスはタンパク質をコードしていないためサプレッサーは存在しない。茎頂分裂組織の防御機構を突破できるウイルスはどのように茎頂分裂組織の RNA サイレンシング機構を抑えているのであろう。ウイルスにも植物側の RNA サイレンシングを阻止する何らかの戦略がある可能性もあり、ウイルスの持つ RNA の機能性に植物体のサイレンシング機構を抑制する可能性を求める視点は興味深い (ITAYA et al., 2007)。次に説明する超微小茎頂分裂組織培養は CSVd フリー化のみならず、CSVd を直接茎頂分裂組織に感染させる手段に使うことができる。筆者らは、茎頂分裂組織への侵入程度が異なる品種を用いて、植物側の持つウイルス侵入防止機構 (あるいは分解機構) を追究している。

II 超微小茎頂分裂組織培養

1 超微小茎頂分裂組織培養法の確立

茎頂分裂組織を微細に手術し、その断片から植物を育成するという形態学的実験がある。BALL (1952) はルピナスの茎頂分裂組織をカミソリで分割して、その断片から植物体を育成することに成功している。また、彼らは 8 分割したジャガイモの茎頂分裂組織の断片からの植物体の再生に成功しているが、この場合各断片は茎頂組織からは切り離さず、切り離した場合には植物は再生しなかったとしている。このような茎頂分裂組織の微細手術法は園芸学的に利用範囲が極めて広い。例えば、微細分割によるクローン増殖、異種の茎頂分裂組織の合体による人工キメラ植物の作出あるいはここで説明する難除去性病原体フリー植物の作出等がある。

MURASHIGE (1972) は葉原基を持たない茎頂分裂組織を植物生長調節物質を含む培地で単独で再生させることに成功している。茎頂分裂組織においてウイルスが存在しない領域の細胞塊を摘出し、植物体を育成することができればウイルスフリー化が可能である。しかし、この技術を産業的に病原体フリー植物の作出に利用するためには、変異原性を持つとされる植物生長調節物質を添加せずに植物体を再生させる方法を開発せねばならない。そこで、筆者らは茎頂分裂組織とともにウイルスが侵入しにくいとされる根端を小さく切り取り、茎頂分裂組織を切り口を併せて合体させ、“人工胚”を合成した (図-1)。外植体は植物生長調節物質を含まない培地でも、高い確率で植物体を再生した。しかし、キクでは多くの品種あるいは植物体が CSVd に感染しており(大石、

私信), また, 大石ら (2001) は CSVd に感染したキクから採種した種子は高い確率で CSVd を保毒していることを報告している。これらのことは, フリー化を目的とした超微小茎頂分裂組織培養にキクの根端を用いることが難しいことを示している。そこで, キク科とは遠縁な植物の根端が使えないかと考え, 実験を行った。根端を得る植物の候補は, 切断したときにポリフェノールによる褐変化が認められない, 植物体から切り離した根端が培地上で伸長を続けることができるものを選んだ。キャベツの根端が非常に高い確率でキクの超微小茎頂分裂組織からの植物体の再生を促すことが明らかになった (Hosokawa et al., 2004 a)。その後, キャベツ以外のアブラナ科 (ただし, ダイコンは除く) にも同様にキクの超微小茎頂分裂組織からの植物体の再生に効果があることがわかった。興味深いことに, キクとキャベツは一時的ではあるが両組織の細胞同士の接着が確認できた。アブラナ科植物は広い宿主を持つ PSTVd の非宿主として知られており, CSVd についても自然感染の報告はない。なお, キャベツの根端はキク科だけでなく, これまで試したほとんどの植物で超微小茎頂分裂組織からの植物体の再生に有効であることを見だしている。

2 超微小茎頂分裂組織培養によるウイロイドフリー化とフリー植物の生育

超微小茎頂分裂組織培養法によって CSVd と CChMVd に罹病したキク品種から両ウイロイドを除去することができた。CSVd と CChMVd フリー株の獲得率はいずれも 3% 程度であり (Hosokawa et al., 2004 b ; 2005), ウイロイドフリー植物の作出法としては効率のよい方法であると考えられる。さらに高い効率でウイロイドフリー株を得るためには, 一つの植物体について連続的に超微小茎頂分裂組織培養を行えばよい。ここで得られたフリー株はこれまでのところ感度が最も高い方法の一つとして考えられている nested PCR による検定で感染が認められないものである。残りの培養株のほとんどは RT-PCR では CSVd が検出されないが, nested PCR を行うと CSVd が検出される低濃度感染株であった。低濃度感染株を用いてもすぐには病徴が現れるわけではないため, これらの低濃度株を栽培に用いてもよいのではないかという考えも存在する。しかし, ウイロイドの病徴発現は急激な濃度上昇によって起こることから, 高感度の方法でもウイロイドが検出されないフリー植物体を栽培に用いるべきであると考え。なお, ここで得られた CSVd フリー株からは作出から 7 年を経過した現在も CSVd は検出されない。CSVd フリー株は旺盛に生育することを確認している。

‘ピアト’ は一定の日長を下回ると開花する短日性品種である。CSVd に感染した植物体は花芽分化のための日長反応性を示さず, 暗期中断による長日条件下においても連続的に開花した (Hosokawa et al., 2004 c)。一方で, CSVd フリー化した植物体では明らかな日長反応性を示し, 暗期中断中の開花は認められなかった。また, フリー株を感染株に接ぎ木し CSVd を再接種したところ, 長日条件下でも開花した。これらの実験より CSVd がキクの短日反応性を喪失させることが明らかとなった。CSVd の感染による日長反応性のかく乱は, ウイロイドを機能性 RNA として考えた場合, 興味深い現象である。ウイロイドが持つ機能性 RNA に関しては園芸学・病理学の両面からアプローチする必要があると考える。

III 超微小茎頂分裂組織培養の機械化

超微小茎頂分裂組織を行うには技術的に克服すべき二つのステップがある。すなわち, すべての葉原基を一つずつ顕微鏡下で外してゆく工程と, 超微小茎頂分裂組織を摘出し根端に移植する工程である。前述したとおり, 超微小茎頂分裂組織培養法を用いてウイロイドフリー株を獲得できる確率は 3% 程度であり, 数多くの超微小茎頂分裂組織の培養を行う必要がある。また, 品種によってはウイロイドが茎頂分裂組織に侵入するエリアが広い場合も考えられ, より多くの個体数を確保する必要がある。そこで, 超微小茎頂分裂組織培養法を流れ作業化するために, 上記の二つの工程の機械化に取り組んだ。まず, コンプレッサーに無菌フィルターやドライヤーを装着し, エアーガンから無菌圧縮空気を噴出させ, 短時間ですべての葉原基を吹き飛ばすための装置を開発した (Suzue et al., 2009) (図-1)。これによって, 今まで熟練者でも数十秒かかっていた茎頂分裂組織の露出作業を数秒でできるようにした。また, 本機器を用いれば, 非顕微鏡下で無傷で茎頂分裂組織を露出させることができる。品種によっては, 茎が細く折れやすかったり, 穂を採取する季節によっては葉原基が吹き飛びにくかったりするため, ある程度のコツは必要であるが, 本装置は超微小茎頂分裂組織培養法には必要不可欠なものである。摘出に関しては, 堂坂イーエム社と共同で小型のマイクロスライサーを開発し (図-1), 初心者でも超微小茎頂分裂組織の摘出を可能とした。

IV 茎頂分裂組織への CSVd 接種による抵抗性品種の探索

Pospiviroidae のウイロイドは茎頂分裂組織には侵入しにくい, キクにおいては茎頂分裂組織への CSVd の

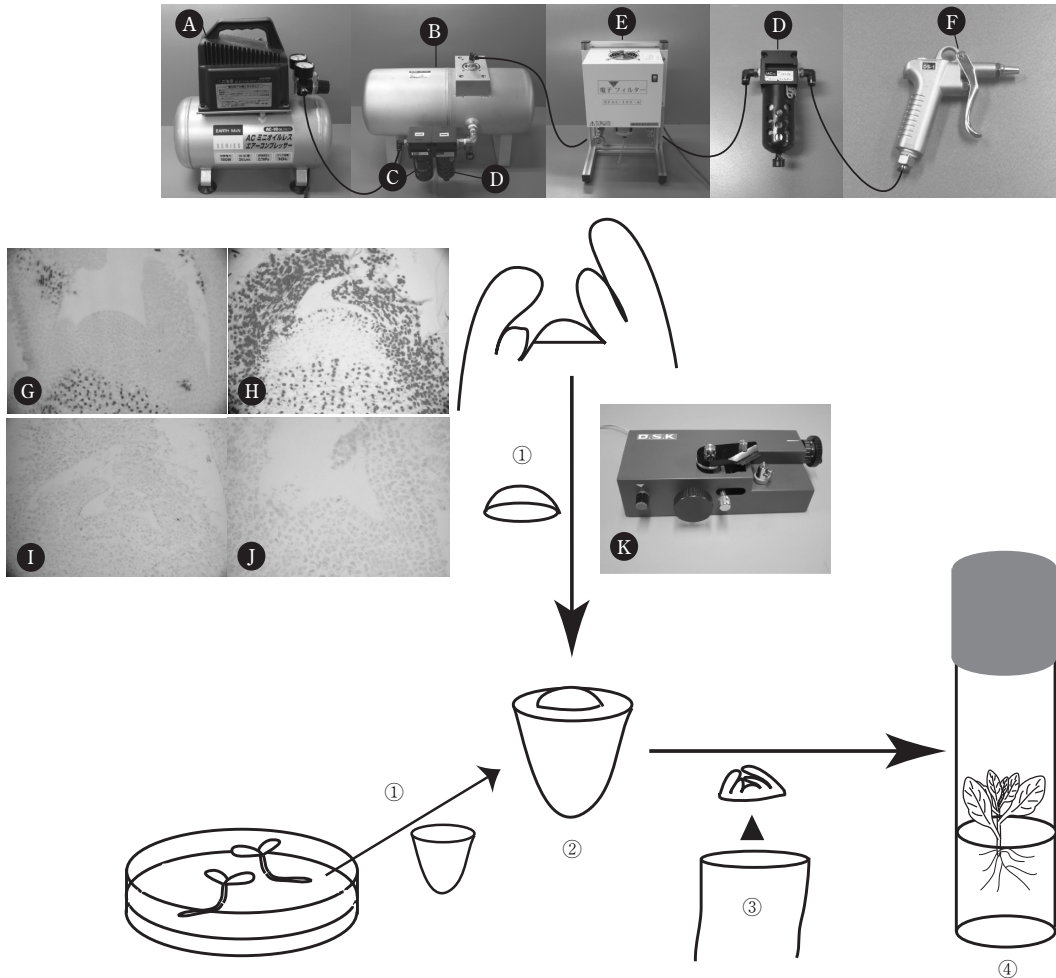


図-1 超微小茎頂分裂組織培養法の流れ

- ①：茎頂分裂組織の露出と摘出，根端部の摘出。
- ②：茎頂分裂組織と根端部の接着。
- ③：異种植物の根端部を用いた場合には葉原基数枚形成した後に茎頂部がはずれる。
- ④：2～3か月で植物体になる。

写真A～F：茎頂の露出装置，A：コンプレッサー，B：圧力を安定化させるための予備タンク，C：プレフィルター，D：無菌フィルター，E：ドライヤー，F：エアガン。

写真G～J：茎頂部でのCSVdの分布（in situ hybridization），GH：罹病性品種，IJ：抵抗性品種。

写真K：茎頂分裂組織の摘出装置（顕微鏡下に設置する）。

侵入程度には品種間差異が認められる。CSVdに感染した‘ピアド’の根端にキクの超微小茎頂分裂組織を移植し，茎頂分裂組織に直接CSVdを接種すると，ほぼすべての品種で茎頂分裂組織にCSVdが侵入する。しかし，なかにはCSVdが侵入しにくい品種や侵入後消失する品種が存在することが明らかとなった。これらの茎頂分裂組織からCSVdが消失する品種群はCSVd抵抗性品種であり，圃場での接ぎ木接種によっても一端感染した

CSVdを消失させる。CSVdを直接茎頂分裂組織に感染させ，注射針を用いたMicro tissue-direct real-time RT-PCR法（Hosokawa et al., 2006）でCSVd濃度の推移を定量する方法は簡易であり時間も場所も節約できることから，キクの抵抗性品種のスクリーニング法として有用である。この方法を用いて，筆者らは多数の営利品種の中から抵抗性キク品種を得ることに成功している（Nabeshima et al., 未発表）。

抵抗性品種ではそもそも CSVd が感染しにくく、感染しても CSVd の供給源から切り離すと消失する (OMORI et al., 2009)。いったん感染した葉では CSVd が消失することはないが、茎頂分裂組織に感染した CSVd は徐々に消失し、CSVd が消失した茎頂分裂組織から形成された葉では CSVd が見られない。最終的に新しく形成されたすべての葉で CSVd が存在しないため、植物体全体がフリーとなる。しかし、CSVd が消失した植物体でも再感染は観察されることから、感染経験によって抵抗性を獲得するわけではない (NABESHIMA et al., 未発表)。前述したように、茎頂分裂組織には RNA サイレncing が関与したウイロイドの侵入防御機構が存在するものと考えられるが、CSVd の茎頂分裂組織からの消失は侵入バリアーの形成だけでは説明しにくく、別の機構も存在している可能性が高い。

我が国には複数の異なる塩基配列を持つ CSVd が存在していることが明らかにされており (MATSUSHITA et al., 2007)、一つの品種の中にも複数の変異系統が共存していることを認めている (NABESHIMA et al., 未発表)。Hop latent viroid (HLVd) や PSTVd が感染した植物に 40°C 程度の高温処理を行うと、ウイロイドの塩基配列が多様化し、宿主の拡大に寄与していることが示唆されており、この現象は Posipiviroidae に共通したものである可能性がある (MATOUSEK et al., 2004)。このような“ウイロイド進化”が宿主の抵抗性機構を突破する可能性は十分に考えられるため、抵抗性品種においては多様な変異系統について抵抗性を調査する必要がある。

おわりに

ウイロイドのフリー化技術として超微小茎頂分裂組織培養法は極めて有効である。また、茎頂分裂組織のウイロイドの消去能力に着目すると、我が国の遺伝資源の中から抵抗性品種を見つけることができる。抵抗性品種は複数の異なるメカニズムによって成立している可能性が高く、きちんと分類していくことが遺伝資源として利用するうえで重要であろう。キクの生産を一つのモデル系と考え、ウイロイドフリー化植物と抵抗性品種を利用することで、安全な生産体系を開発することができる。

超微小茎頂分裂組織培養は、機械化などの省力・省コスト化が可能な一方で、なお熟練した技術が必要でありすべての機関で可能な技術ではない。世界で汎用的に使える技術開発は重要であるが、職人的技術の我が国での独占的利用も重要であると考え。すなわち、様々な病原体をフリー化した完全フリー苗の作出およびその戦略品目としての利用は我が国の生産園芸にとって重要な位

置づけになるのではないだろうか。*In vitro* で管理した完全フリー苗を大量増殖し販売する総合的なシステムを構築する必要がある。これまでのキクの苗生産体系にこだわらない新しいシステムの構築が我が国の戦略的園芸のモデルケースになりうるのではないだろうか。これまでに我が国で開発してきた多くの検定技術やフリー化技術を結集し、我が国の種苗が世界で一番安全であると世界に認めさせるのが戦略的園芸なのではないだろうか。優れた研究成果や技術を持ちながら、海外の企業の戦略に取り込まれてしまうのは寂しいことである。

我が国の夏はウイロイドにとって増殖に適した高温となる。低保毒感染株を栽培に用いるのは危険が伴う、また、低濃度の検定を常に行うのはコストもかかる。すなわち、ヨーロッパで開発された技術や輸出における安全基準は我が国の環境下では通用しない。一方でヨーロッパ、特にオランダでは輸入に伴うウイロイドの広がりを阻止するために、感染源の徹底的な検定や検疫を強化する動きも見られる。完全フリー苗への厳しい検定技術の運用、完全フリー苗への保証書の配布制度、完全フリー培養苗の保存センターの運用等、栄養繁殖性種苗生産の世界基準を確立する必要があるように思う。

引用文献

- 1) BALL, E. (1952): *Growth* **16**: 151 ~ 174.
- 2) DIENER, T. O. (1971): *Virology* **45**: 411 ~ 428.
- 3) DI SERIO, F. et al. (2010): *J. Virol.* **84**: 2477 ~ 2489.
- 4) HIRAI, K. et al. (2008): *ibid.* **82**: 3250 ~ 3260.
- 5) HOSOKAWA, M. et al. (2004 a): *Plant Cell Rep.* **22**: 859 ~ 863.
- 6) ——— et al. (2004 b): *ibid.* **22**: 859 ~ 863.
- 7) ——— et al. (2004 c): *Planta* **220**: 64 ~ 70.
- 8) ——— et al. (2005): *J. Japan. Soc. Hort. Sci.* **74**: 386 ~ 391.
- 9) ——— et al. (2006): *J. Virol. Meth.* **131**: 28 ~ 33.
- 10) ITAYA, A. et al. (2007): *J. Virol.* **81**: 2980 ~ 2994.
- 11) MATOUSEK, J. et al. (2004): *Virology* **323**: 9 ~ 23.
- 12) MATSUSHITA, Y. et al. (2007): *J. Japan. Soc. Hort. Sci.* **76**: 333 ~ 337.
- 13) MOMMA, T. and T. TAKAHASHI (1983): *Phytopath.* **106**: 272 ~ 289.
- 14) MORRIS, T. J. and E. M. SMITH (1977): *ibid.* **67**: 145 ~ 150.
- 15) MURASHIGE, T. (1972): *HortSci.* **7**: 118 ~ 119.
- 16) NAKASHIMA, A. et al. (2007): *J. Gen. Plant Pathol.* **73**: 225 ~ 227.
- 17) 大石一史ら (2001): *園学雑* **70** (別2): 192.
- 18) OMORI, H. et al. (2009): *J. Japan. Soc. Hort. Sci.* **78**: 350 ~ 355.
- 19) PADUCH-CICHAL, E. and S. KRZYCZYNSKI (1987): *J. Phytopath.* **118**: 341 ~ 346.
- 20) QU, F. et al. (2005): *J. Virol.* **79**: 15209 ~ 15217.
- 21) RODIO, M. et al. (2007): *Plant Cell* **19**: 3610 ~ 3626.
- 22) SANGER, H. L. and K. RAMM (1975): *Proc. 2nd John Innes Symposium. Norwich, England*, p. 230 ~ 253.
- 23) SCHWACH, F. et al. (2005): *Plant Physiol.* **138**: 1842 ~ 1852.
- 24) SUAREZ, I. E. et al. (2005): *Plant Cell Tiss. Org. Cult.* **80**: 179 ~ 185.
- 25) SUZUE, H. et al. (2009): *HortSci.* **44**: 1501 ~ 1503.
- 26) WAN CHOW WAH, Y. F. and R. H. SYMONS (1999): *J. Phytopath.* **147**: 285 ~ 291.
- 27) ZHU, Y. et al. (2001): *Virology* **279**: 69 ~ 77.