

## 核酸を利用したニンニク茎頂組織からのウイルスフリー化

生物資源科学専攻 植物育種科学講座 細胞工学 長谷部 葉子

### 1. はじめに

ニンニクは、ユリ科に属する单子葉類の栄養繁殖性の植物である。通常の栄養繁殖では感染したウイルスが次世代に継代するが、成長点を0.3 mm程度に切り出して培養する茎頂培養法を用いるとウイルスフリー化植物を作出することができる。本研究では、ニンニクにおいてよく感染がみられる *Potyvirus* 属の *Leek yellow stripe virus* (LYSV)、*Onion yellow dwarf virus* (OYDV)、*Allexivirus* 属のウイルスの中でも、茎頂組織付近での局在を免疫組織化学法で調べた結果、頂端分裂組織まで侵入しやすいことがわかった *Allexivirus* 属ウイルスを対象として、核酸を使った新しいウイルス除去方法を考案した。また、そのウイルス除去方法を用いて、組織内でのウイルスフリー化のメカニズムについて追究した。

### 2. 方法

ニンニクから茎盤を取り除き1 mmの大きさで茎頂組織を切り出し、siRNAを含む溶液に浸漬し、卓上遠心機でスピンドウン後、MS培地に移植し培養した。siRNAは、ウイルスもしくはノックダウンさせたい遺伝子の配列を用いた。培養から14日~20日後にサンプリングを行い、RT-PCRによってウイルスフリー化率を調べた。

### 3. 結果と考察

*Allexivirus* 属ウイルスが頂端分裂組織に侵入しているニンニクを用いて、*Allexivirus* 属ウイルス配列を基にしたsiRNAを処理したところ、*Allexivirus* 属ウイルスについてのウイルスフリー化率が40~60%程度向上した。茎頂へ浸漬によって直接siRNAを導入することによって、ウイルスに対するRNAサイレンシングが強く誘導された結果であると考えられる。また、同様に、RNAサイレンシングに関連する遺伝子であるRNA-dependent RNA polymerase 6 (RDR6)配列から作出したsiRNAを茎頂組織に処理する実験も行った。その結果、OYDVのウイルス感染率が30%程度増加し、茎頂培養によるウイルスフリー化にはRDR6を介したRNAサイレンシングが関わっていることが判明した。さらに、RDR6のsiRNAを処理した個体について、処理3日目にサンプリングを行いRDR6の発現量についてReal time-RT-PCRで調べた。その結果、水処理に比べて1%水準で有意にmRNA蓄積レベルの低下が見られ、茎頂をsiRNA処理することによってノックダウンが起きることが判明した。

### 4. まとめ

本研究によって、茎頂培養時に任意の遺伝子のノックダウンを行う方法を考案した。この方法を用いることで、現在茎頂組織から除去することが困難なウイルスについても除去できることが明らかになった。さらに、この方法でRDR6のノックダウンを行った結果から、茎頂培養によるウイルスフリー化のメカニズムにはRDR6を介したRNAサイレンシング機構が関わっていることが示唆された。今後、DNAメチル化を誘導するsiRNAを処理することによって、組換え植物を使用しないで、エピジェネティクスによる遺伝子発現制御が後代に遺伝する植物を作出することができるかもしれない。