〔ウイルス　第60巻　第2号，pp.155-162，2010〕

総　説

2. 植物ウイルスベクターを用いた遺伝子機能解析ツールとしてのウイルス誘導ジーンサイレンシング

山岸　紀子・吉川　信幸
岩手大学農学部

植物ウイルスベクターを利用したウイルス誘導ジーンサイレンシング（VIGS）は，ウイルス感染によって誘導されるRNAサイレンシング機構を利用した植物の逆遺伝学的解析ツールである．標的遺伝子配列の一部をVIGS用ウイルスベクターに連結し，植物に感染させることで簡便かつ迅速に標的遺伝子の発現をノックダウンすることができる．ベンサミアーナタバコなどの実験植物で主に利用されてきたが，最近では主要農作物を含む各種植物種の遺伝子機能解析に利用できるVIGS用ウイルスベクターが報告されている．本稿ではVIGSウイルスベクターの種類とその利用について解説する．

はじめに

植物ウイルスベクターは，ウイルスの感染・増殖能を利用して外来遺伝子を植物体で簡便に発現できる系として，遺伝子の機能解析などの基礎研究から医薬品の生産など応用分野で広く利用されている[16, 50, 57]．植物は，ウイルスやウイロイド，トランスポゾンなどの分子寄生体に対する防御メカニズムであるRNAサイレンシング機構を生来持ち，ウイルスの増殖や移行を阻止しようとする．ウイルス感染によって誘導されるRNAサイレンシング機構を植物遺伝子の発現抑制ツールとして利用しようとするのが植物ウイルスベクターを用いたウイルス誘導ジーンサイレンシング（VIGS）である．VIGSは植物の逆遺伝学的解析ツールとして利用されるようになり，各種植物のゲノム解析が進むなか，ポストゲノムの有力な解析技術としてその有用性はますます高まっている．本稿では，植物の遺伝子機能解析に利用されるVIGS用ベクターの種類とその利用について解説する．

連絡先
〒202-8550 岩手県盛岡市上田3-18-8
岩手大学農学部
TEL: 019-621-6150
FAX: 019-621-6150
E-mail: yoshikawa@iwate-u.ac.jp

1. RNAサイレンシング機構とVIGS

免疫機構をもたない植物においてRNAサイレンシング機構はウイルス感染に対する防御機構として重要な役割を担っている．植物にRNAウイルスが感染すると，ゲノムRNAの複製型2本鎖RNAあるいはゲノムRNA内で部分的に形成された2次構造がRNase III-type dsRNA endonuclease活性を持つDicer-like enzyme (DCL)により20数塩基のsiRNAに切断される[35]．これらウイルスゲノム配列由来のsiRNAはRNA-induced silencing complexes (RISC)に取り込まれ，siRNAと相補的な配列を持つ標的RNA（ウイルスゲノムRNA）をRISCが分解する[45]．VIGS用に構築されたウイルスベクター（VIGSウイルスベクター）に植物遺伝子の一部を連結し，これを植物に感染させると，上で述べたようにRNAサイレンシング機構が誘導されてウイルスRNAがRISCの標的になると同時に，ベクター内に連結されていた植物遺伝子配列に相同な植物mRNAが分解されるため，その発現は特異的にノックダウンされることになる[45]．

従来，逆遺伝学的手法として行なわれてきた変異体の作出や形質転換法が多大な労力や時間を要するのに対し，VIGSは，標的遺伝子配列を含むウイルスベクターを植物に接種すれば容易に誘導されることから，植物の環境やストレス応答，生育や代謝等に関与する遺伝子の解析を短期間に効率よく行うことができる[2]．農作物や果樹類に適用できれば病害抵抗性や品質，生育特性など農業上重要な形質に関与する遺伝子の同定にも利用できる．実験植物やモデル植物とは異なり，作物種によっては形質転換系が確立

していないものや形質転換効率が非常に低い場合も多く，また品種ごとに特有の性質を有し組織培養さえ困難な例もある．そのため主要農作物や果樹類で利用できる遺伝子機能解析ツールとしてのVIGSウイルスベクターに大きな期待が寄せられている[48, 58]．

2. VIGSウイルスベクターの種類

1995年にタバコモザイクウイルス（TMV）ベクターを用いたベンサミアーナタバコのphytoene desaturase（PDS）遺伝子の発現抑制が報告された[27]．これが 植物における VIGSウイルスベクターの最初の報告である．VIGSウイルスベクター開発初期の報告はその対象植物が植物病理学分野の実験植物であるベンサミアーナタバコに集中していた．これはベンサミアーナタバコがウイルス感染に対して感受性が高く，VIGSによるノックダウンの表現型が現れやすいという特性によるものであった．しかし，ベンサミアーナタバコで得られた情報を他の植物種に直接当てはめることには限界があり，実際に研究対象となる植物種に適したVIGSウイルスベクターが報告されはじめた．**表1**にこれまで報告されたVIGS用ウイルスベクターとその宿主をまとめた．多くのベクターはベンサミアーナタバコで利用されるものであるが，それらのベクターに加えて，現在ではトマトやジャガイモなどのナス科植物，ダイズなどのマメ科植物，各種ウリ科植物やバラ科果樹類で安定的にVIGSを誘導できるベクターが開発されている．

VIGSウイルスベクターに必要とされる条件としては，1）植物に対する病原性が弱いこと（標的遺伝子のノックダウンによる表現型が明確に識別できるようにウイルス感染の影響が無いこと）や2）感染植物に均一に全身感染すること，3）安定した（効率的な）接種法が確立していること，4）農作物においては栄養生長期の茎葉だけではなく収穫物となる果実や種子の解析も重要であるため，長期間にわたって遺伝的に安定なことなどが挙げられる．病原性の強いウイルスは強力なサイレンシングサプレッサーを持つことが多く，サプレッサー活性を低下させないかぎりVIGSウイルスベクターには適さない．また感染植物体内での分布が不均一なウイルス種ではVIGSによる表現型も均一に現れない．

VIGSウイルスベクターの開発では先ず，ファージのT7やT3プロモーターまたはカリフラワーモザイクウイルス35Sプロモーターを用いたウイルスゲノムの感染性cDNAクローンを構築する．対象ウイルスの感染性クローンができれば，そのゲノム上に標的遺伝子配列を導入するための制限酵素サイトを付加しウイルスベクター化する．カロテノイド合成に関わるPDS遺伝子やクロロフィル合成に必要なSU遺伝子は，その発現がノックダウンされると組織が白色化しVIGS効果を視覚的に確認できるため，VIGSベクターの有効性の判断に用いられてきた（**表1，図1**）．

使用するプロモーターやクローニング用ベクターの種類により，その後の操作が異なる．例えば，T7やT3プロモーターを用いた感染性cDNAクローンの場合は，標的遺伝子配列を連結した後試験管内転写によりウイルスRNAを

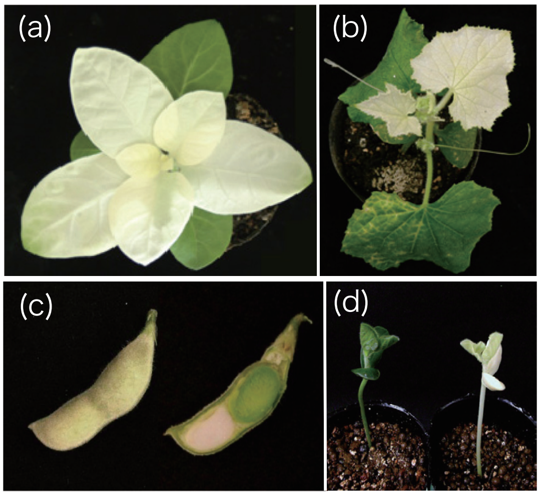

図1　リンゴ小球形潜在ウイルス（ALSV）ベクターを用いたタバコ，キュウリ，ダイズでのVIGS：
（a）と（b）クロロフィル合成に必要なSU遺伝子の一部を導入したALSVベクターを接種したタバコ（a）とキュウリ（b）での葉のクロロシス．（c）と（d）ダイズPDS遺伝子の一部を導入したALSVベクター（soyPDS-ALSV）による種子と次世代個体のPDS遺伝子のVIGS．（c）soyPDS-ALSV感染ダイズに形成された莢（左）とその縦断面（右）．下側の種子胚はVIGSが誘導され白色化している．上側の緑色の種子胚はウイルスに感染していない．（d）右はsoyPDS-ALSV感染種子由来の個体で全身でクロロシスが誘導されている．左は非感染個体．

表 1. 植物の VIGS 用ウイルスベクター

ウイルスベクター／サテライト	属	VIGS が誘導された植物	標的遺伝子	文献
African cassava mosaic virus	ベゴモウイルス	ベンサミアーナタバコ，キャッサバ	*pds, su, cyp79d*	13
リンゴ小球形潜在ウイルス	チェラウイルス	ベンサミアーナタバコ，タバコ，*N. glutinosa, N. occidentalis,* トマト，シロイヌナズナ，ウリ科植物，マメ科植物，リンゴ，ナシ	*pds, su, pcna, N, CH42, RCY1, rbcS, ifs2*	24, 61
オオムギ斑葉モザイクウイルス	ホルデイウイルス	オオムギ，コムギ	*pds, Lr21, Rar1, Sgt1, Hsp90*	21, 51
Bean pod mottle virus	コモウイルス	ダイズ	*pds*	65-67
Beet curly top virus	クルトウイルス	ホウレンソウ，トマト	*rbcS, transketolase, ChlI*	17
Brome mosaic virus	ブロモウイルス	オオムギ，イネ，トウモロコシ	*pds, actin, rubiscoactivase*	10
Cabbage leaf curl virus	ベゴモウイルス	シロイヌナズナ	*CH42, pds,*	55
Cotton leaf crumple virus	ベゴモウイルス	ワタ	*ChlI, pds*	56
キュウリモザイクウイルス	ククモウイルス	ベンサミアーナタバコ，ダイズ	*gfp, chs, sf3'h1*	38, 40
シンビジュームモザイクウイルス	ポテックスウイルス	コチョウラン	*MADS-box family gene*	33
ブドウ A ウイルス	ビティウイルス	ベンサミアーナタバコ，ブドウ	*pds*	37
Pea early browning virus	トブラウイルス	エンドウ，タルウマゴヤシ，スイートピー	*pds, lfy, kor*	9, 19
Poplar mosaic virus	カルラウイルス	ベンサミアーナタバコ	*gfp*	39
ジャガイモ X ウイルス	ポテックスウイルス	ベンサミアーナタバコ，タバコ，ペチュニア，ジャガイモ	*pds,various endogenous genes*	12, 49
Rice tungro bacilliform virus	ワイカウイルス	イネ	*pds,*	46
サテライトタバコモザイクウイルス	RNA satellite virus	タバコ	*pds, various endogenous genes*	18
Tobacco curly shoot virus DNA1 component	satellite-like ssDNA	ベンサミアーナタバコ，タバコ，*N. glutinosa*，トマト，ペチュニア	*pds, su, pcna, chs, tom*	23
タバコモザイクウイルス	タバモウイルス	ベンサミアーナタバコ	*pds*	27
タバコ茎えそウイルス	トブラウイルス	ベンサミアーナタバコ，トマト，トウガラシ，ジャガイモ，ペチュニア，ポピー，シロイヌナズナ，キンポウゲ，ハナビシソウ，アキカラマツ	*pds, ctr1, rbcS, Rar1, EDS1, NPR1/NIM1, chs, PI, various endogenous genes*	3, 5, 7, 8, 11, 15, 20, 26,47, 59, 60
タバコ黄萎ウイルス	マストレウイルス	ペチュニア	*chs*	1
Tomato golden mosaic virus	ベゴモウイルス	ベンサミアーナタバコ	*su, pcna*	25, 42
Tomato leaf curl virus viral amplicon (VA)	ベゴモウイルス	トマト	*pcna*	41
Tomato leaf curl virus satellite DNA	ベゴモウイルス	タバコ，ペチュニア	*chs*	30
トマトモザイクウイルス	タバモウイルス	ベンサミアーナタバコ	*pds, PMT*	22, 52
トマト黄化葉巻ウイルス	ベゴモウイルス	ベンサミアーナタバコ，ペチュニア，トマト	*pds*	43
Tomato yellow leaf curl China virus -associated βDNA satellite	ベゴモウイルス	ベンサミアーナタバコ，タバコ，*N. occidentalis*，トマト	*pds, pcna, su*	53
Turnip yellow mosaic virus	ティモウイルス	シロイヌナズナ	*pds,lfy*	44

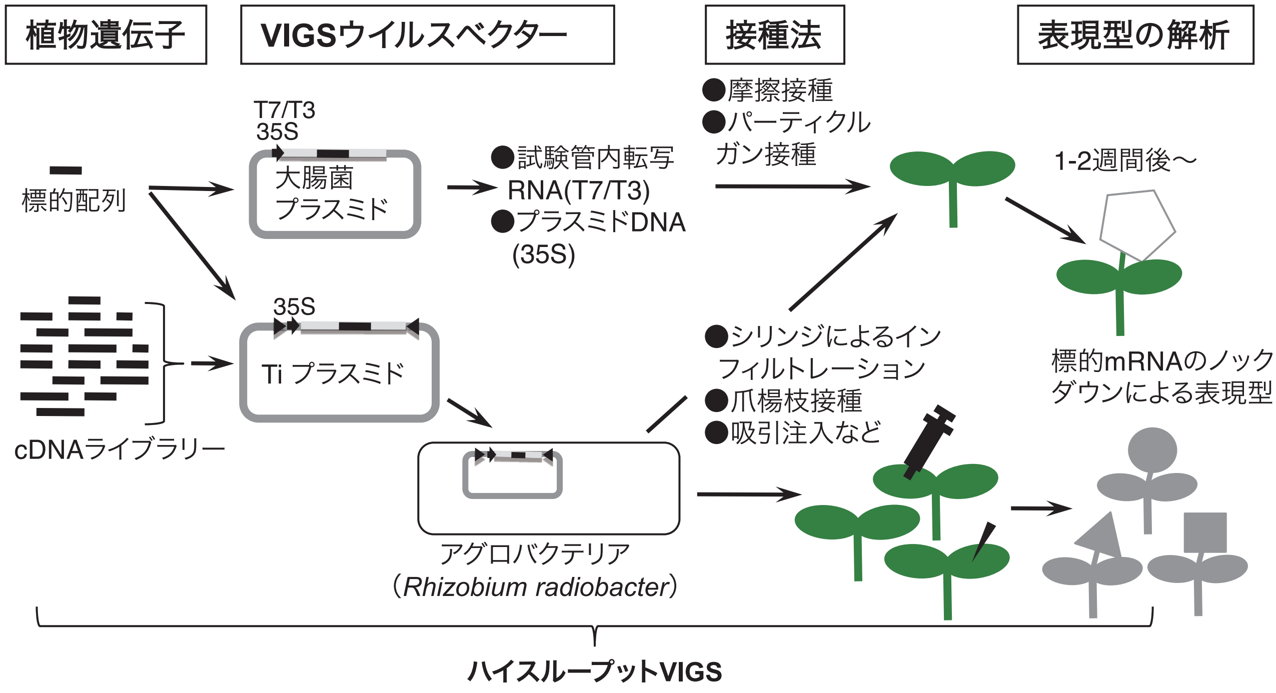

図2　VIGSによる植物遺伝子の機能解析：
標的遺伝子配列の一部をウイルスベクターに組み込み，T7/T3プロモーターを利用した場合には試験管内転写RNAを，35Sプロモーターに連結したクローンではプラスミドDNAを直接植物に接種する．ハイスループットVIGSではcDNAライブラリーに含まれるcDNAをウイルスベクター（Tiプラスミドベクター）に連結し，アグロバクテリアに導入する．続いて細菌培養液を植物（ベンタミアーナタバコ）の葉にシリンジを用いてインフィルトレーションする（爪楊枝で細菌のコロニーをそのまま葉に接種する方法もある）．接種した植物に現れる表現型を解析し，標的遺伝子の機能を明らかにする．

合成し，植物に機械的に接種する．これに対して35Sプロモーターと Ti プラスミドを用いた場合には，プラスミドを含む *Rhizobium radiobacter* 培養液をインフィルトレーション法などで直接植物の葉や根に導入し，ウイルスを感染させることができる（**図2**）．

VIGSベクターに導入する標的遺伝子配列は，理論的にはパーフェクトマッチする23塩基でよいが[28, 54]，異なるサイズの標的遺伝子を連結したウイルスベクターのサイレンシング効果（表現型）を比較した結果，筆者らは200塩基程度（以上）を連結している．また，標的遺伝子上のどの領域を導入するかも表現型に影響する場合がある[24]．

3. VIGSウイルスベクターの利用

タバコ茎えそウイルス(TRV)ベクターはベンサミアーナタバコやシロイヌナズナ，トマトなどで各種遺伝子の機能解析に現在最も広くされている．VIGS用ベクターとしても改良が重ねられ，強力なプロモーターとターミネーターを持つ Ti プラスミドベクターに導入された TRV ベクターは，植物の葉や果実にアグロイノキュレーション法で簡便に直接接種することが可能となっている[15, 31, 32, 47]．また，TRV ベクターの外来遺伝子導入サイトはウイルスのタンパク質読み枠（ORF）の外側に配置しているため，挿入する配列は翻訳領域でも非翻訳領域でもかまわない．さらに，Ligation independent cloning (LIC)法により標的配列を挿入できる GATEWAY システムをベースとした TRV ベクターも構築されており，ハイスループット解析に対応した VIGS システムが構築されている[11]．

植物には，ウイルスの茎頂分裂組織への侵入を監視もしくは阻止するシステムが存在し，多くのウイルスは茎頂分裂組織に侵入できない[14, 36]．しかし，TRV はこの監視システムをくぐり抜け茎頂分裂組織に侵入することができるため，分裂組織における遺伝子解析ツールとしても利用できる[47]．

VIGS は，適切な VIGS 用ベクターを選択することで，栄養生長期の茎葉だけではなく，果実や根における遺伝子機能解析にも利用可能である．Yang ら（2010）は果実の成熟過程の研究モデル植物のトマトにおいて，標的遺伝子を導入した TRV ベクターをトマト果実に直接接種することで，F-box 遺伝子（*SI-EBF1* と *SI-EBF2*）が成熟や老化に関わることを明らかにした[64]．また，Valentine ら（2004）は TRV の線虫伝搬に必要な 2b 遺伝子を含む TRV-2b ベクターがシロイヌナズナやトマトの根に効率よく侵入するこ

とを見出し，RML1 遺伝子などの根の発育を制御する遺伝子の VIGS 誘導に成功している[59]．

マメ科の中の最重要作物であるダイズの有力な VIGS 用ウイルスベクターとしては *Bean pod mottle virus*（BPMV）ベクターが開発されている[65-67]（**表 1**）．最初はウイルスの接種に試験管内転写産物を用いていたが，その後 35S プロモーターを利用したコンストラクトが構築され，cDNA クローンを直接植物に接種することが可能となった[66, 67]．BPMV はポリタンパク質による遺伝子発現様式をとるが，ゲノム RNA2 の細胞間移行タンパク質（MP）と外被タンパク質（L-CP）との間に発現を目的とした遺伝子を導入し，さらにウイルスゲノム非翻訳領域に VIGS による抑制を目的とした遺伝子を導入できるように改良され，2 種類の遺伝子の発現と抑制を同時にできる BPMV ベクターも開発された[65]．

筆者らの研究室で構築した *Apple latent spherical virus*（ALSV）ベクターは，リンゴから単離された潜在性ウイルスをベクター化したものである[29]（**表 1**）．自然宿主はリンゴのみであるが，実験的には各種植物（シロイヌナズナ，ナス科，ウリ科，およびマメ科植物など）にも無病徴（潜在）感染するという特徴を持つ．ALSV は茎頂分裂組織や葉原基に速やかに侵入し[62, 63]，その後展開した葉全体に均一に分布するため，植物体の全身で均一なサイレンシングを長期間安定して誘導し続けることができる[24]（**図 1**）．ALSV ベクターは，これまで VIGS ベクターが利用できなかったウリ科植物やリンゴ，ナシなどの果樹類でも安定したサイレンシングを誘導できるベクターとして今後の利用が期待される．また，筆者らが行なったダイズ PDS 遺伝子の VIGS 誘導では，ダイズの栄養成長期の茎葉だけではなく，感染植物に形成された種子の胚や，その種子由来の発芽期幼植物でも PDS 遺伝子をノックダウンすることが可能であった[61]（**図 1**）．このように ALSV ベクターの種子伝染性を利用することで，種子で発現する遺伝子の抑制や，発芽直後に発現する遺伝子の機能解析にも利用できる．

DNA ウイルスであるベゴモウイルス属の *Tobacco curly shoot virus* や *Tomato yellow leaf curl China virus* も VIGS ベクターとして利用されている[23, 53]（**表 1**）．これらのウイルスではサテライト様 DNA に標的遺伝子配列を連結し，ヘルパーウイルスと一緒に接種することで，ナス科植物での VIGS の誘導に成功している．サテライト分子を利用した VIGS ベクターとしては，サテライトタバコモザイクウイルスを用いた satellite virus-induced silencing system（SVISS）がタバコ内在性遺伝子のサイレンシングに有効であることが報告されている[18]．

VIGS ベクターの能力を遺憾なく発揮させるためには環境条件にも配慮する必要があるようである．Fu ら（2006）は，比較的低温と低湿度（15 ℃，30 % RH）で育成することによりトマトにおける TRV ベクターによる PDS 遺伝子の VIGS 効果が通常の育成条件（21 ℃，30-60 % RH）より安定して持続することを報告している[15]．また，Tuttle ら（2008）は *Cotton leaf crumple virus*（ClCrV）ベクターによる magnesium cheletase subunit I 遺伝子のワタでのサイレンシングは昼温 22 ℃，夜温 18 ℃の条件のときに生育期間を通じて持続したことを報告している[56]．

4. VIGS ベクターのハイスループット解析への利用

VIGS ウイルスベクターを大規模な遺伝子スクリーニングに利用した例がいくつか報告されている[4, 11, 34]（**図 2**）．Lu ら（2003）は植物病原細菌 *Pseudomonas syringae* に対する *Pto*-mediated resistance に関与する遺伝子をスクリーニングする目的で，ベンタミアーナタバコから調製した cDNA をジャガイモ X ウイルス（PVX）ベクターに組み込み，得られた 4992 クローンをそれぞれベンサミアーナタバコにアグロインフィルトレーション法で接種した．続いて，抵抗性遺伝子 *Pto* と非病原性遺伝子 *AvrPto* を PXV ベクター感染葉でトランジエントに発現させ，過敏感反応が抑制されたクローンを解析することにより，HSP90 が抵抗性に強く関与していることを明らかにした[34]．また Dong ら（2007）はトマトの 400 種類の EST 配列を TRV ベクターに組み込み，各 TRV ベクタークローンをそれぞれベンサミアーナタバコに感染させて各 EST 配列の抑制による表現型を解析することで，トマトの SlMADS1 遺伝子が花器官の形成に重要な役割を持つことを明らかにした[11]．

5. VIGS の限界と今後の課題

VIGS でよく指摘される点は，標的遺伝子の発現を完全に抑制することができないことである．VIGS による表現型は，標的遺伝子の種類（機能）や抑制の程度，さらに VIGS が誘導される範囲などに影響を受けることになる．例えば，**表 1** に示した VIGS ウイルスベクターがすべて植物全体に均一なサイレンシングを誘導するわけではなく，ベクターと植物種によっては部分的なサイレンシングしか誘導ができない場合もある．また，ウイルスベクターによっては挿入遺伝子が不安定で短期間のうちに脱落してしまうことがある[6]．TRV ベクターをはじめとして，ベンサミアーナタバコやシロイヌナズナなどの実験植物では有効な VIGS ベクターが利用できるが，その他の植物，特に重要な作物になるとベクターの種類は限定され，必ずしも実験系がシステム化されていないものも多い．今後は，各種植物で安定に VIGS を誘導する VIGS ベクターを開発すると共に，TRV ベクターで確立されているような効率的かつ簡便な接種法を各ベクターでも確立する必要がある．特にハイスループット解析のような大規模な遺伝子スクリーニングが VIGS システムで利用できるようになれば，各種植物の遺伝子機能解析が一段と進むであろう．

おわりに

モデル植物のゲノム解読が終了した現在，各種農作物でゲノム解読，EST データおよびマイクロアレイデータの収集が積極的に進められており，農作物の遺伝子機能解析ツールとしての VIGS ベクターの有用性はますます高まるといってよい．ウイルスに感染しない植物は存在しないので，どんな植物にも VIGS ベクター適用の可能性はあり，今後，より多くの植物種で利用できる VIGS ベクターの開発やそのハイスループット解析への対応などの問題が克服できれば，モデル植物と比べて非常に遅れていた，あるいは困難であった各種作物の遺伝子機能解析が一層容易になるであろう．

文　献

1）Atkinson RG, Bieleski LRF, Gleave AP, Janssen BJ, Morris BAM.：Post-transcriptional silencing of chalcone synthase in petunia using a geminivirus-based episomal vector. Plant J. 15: 593-604, 1998.

2）Becker A, Lange M.：VIGS-genomics goes functional. Trends Plant Sci. 15: 1-4, 2009.

3）Brigneti G, Martin-Hernandez AM, Jin H, Chen J, Baulcomb DC, Baker B, Jones JDG.：Virus-induced gene silencing in *Solanum* species. Plant J. 39: 264-272, 2004.

4）Burch-Smith TM, Anderson JC, Martin GB, Dinesh-Kumar SP.：Applications and advantages of virus-induced gene silencing for gene function studies in plants. Plant J. 39: 734-746, 2004.

5）Burch-Smith TM, Schiff M, Liu Y, Dinesh-Kumar SP.：Efficient Virus-Induced Gene Silencing in Arabidopsis. Plant Physiol. 142: 21-27, 2006.

6）Bruun-Rasmussen M, Madson CT, Jessing S, Albrechtsen M.：Stability of Barley stripe mosaic virus-induced gene silencing in barley. Mol. Plant Microbe. Interact. 20: 1323-1331, 2007.

7）Chen J-C, Jiang C-Z, Gookin TE, Hunter DA, Clark DG, Reid MS.：Chalcone synthase as a reporter in virus-induced gene silencing studies of flower senescence. Plant Mol. Biol. 55: 521-530, 2004.

8）Chung E , Seong E, Kim Y-C, Chung EJ, Oh S-K, Lee S, Park JM, Joung YH, Choi D.：A method of high frequency virus-induced gene silencing in chili pepper (*Capsicum annuum* L. cv. Bukang). Mol. Cells. 17: 377-380, 2004.

9）Constantin GD, Krath BN, MacFarlane SA, Nicolaisen M, Johansen IE, Lund OS.：Virus-induced gene silencing as a tool for functional genomics in a legume species. Plant J. 40: 622-631, 2004.

10）Ding XS, Schneider WL, Chaluvadi SR, Mian MAR, Nelson RS.：Characterization of a *Brome mosaic virus* strain and its use as a vector for gene silencing in monocotyledonous hosts. Mol. Plant Microbe. Interact. 19: 1229-1239, 2006.

11）Dong Y, Burch-Smith TM, Liu Y, Mamillapalli P, Dinesh-Kumar SP. A ligation-independent cloning tobacco rattle virus vector for high-throughput virus-induced gene silencing identifies roles for NbMADS4-1 and -2 in floral development. Plant Physiol. 145: 1161-1170, 2007.

12）Faivre-Rampant O, Gilroy EM, Hrubikova K, Hein I, Millam S, Loake GJ, Birch P, Taylor M, Lacomme C.：Potato virus X-induced gene silencing in leaves and tubers of potato. Plant Physiol. 134: 1308-1316, 2004.

13）Fofana IBF, Sangare A, Collier R, Taylor C, Fauquet CM.：A geminivirus-induced gene silencing system for gene function validation in cassava. Plant Mol. Biol. 56: 613-624, 2004.

14）Foster TM, Lough TJ, Emerson SJ, Lee RH, Bowman JL, Forster RLS, Lucus WJ.：A surveillance system regulates selective entry of RNA into the shoot apex. Plant Cell 14: 1497-1508, 2002.

15）Fu DQ, Zhu B-Z, Zhu H-L, Zhang H-X, Xie Y-H, Jiang W-B, Zhao XD, Luo YB.：Enhancement of virus-induced gene silencing in tomato by low temperature and low humidity. Mol. Cells 21: 153-160, 2006.

16）Gleba Y, Klimyuk V, Marillonne S.：Viral vectors for the expression of proteins in plants. Curr. Opin. Biotechnol. 18: 134-141, 2007.

17）Golenberg EM, Sather DN, Hancock LC, Buckley KJ, Villafranco NM, Bisaro DM.：Development of a gene silencing DNA vector derived from a broad host range geminivirus. Plant Methods 5: 9, 2009.

18）Gossele V, Fache I, Meulewaeter F, Cornelissen M, Metzlaff M.：SVISS-a novel transient gene silencing system for gene function discovery and validation in tobacco plants. Plant J. 32: 859-866, 2002.

19）Gronlund M, Constantin G, Piednoir E, Kovacev J, Johansen IE, Lund OS.：Virus-induced gene silencing in *Medicago truncatula* and *Lathyrus odorata*. Virus Res. 135: 345-349, 2008.

20）Hileman LC, Drea S, de Martino G, Litt A, Irish VF.：Virus-induced gene silencing is an effective tool for assaying gene function in the basal eudicot species *Papaver somniferum* (opium poppy). Plant J. 44: 334-341, 2005.

21）Holzberg S, Brosio P, Gross C, Pogue GP.：*Barley stripe mosaic virus*-induced gene silencing in a monocot plant. Plant J. 30: 315-327, 2002.

22）Hori K, Takizawa M, Watanabe Y.：Use of an attenuated strain of tobamovirus for early detection of virus-induced gene silencing. Plant Biotechnol. 21: 135- 142, 2004.

23）Huang C, Xie Y, Zhou X.：Efficient virus-induced gene silencing in plants using a modified geminivirus DNA1 component. Plant Biotechnol. J. 7: 254-265, 2009.

24）Igarashi A, Yamagata K, Sugai T, Takahashi Y, Sugawara E, Tamura A, Yaegashi H, Yamagishi N, Takahashi T, Isogai M, Takahashi H, Yoshikawa N.：*Apple latent spherical virus* vectors for reliable and effective virus-induced gene silencing among a broad range of plants including tobacco, tomato, *Arabidopsis thaliana*, cucurbits, and legumes. Virology 386: 407-416, 2009.

25）Kjemtrup S, Sampson KS, Peele CG, Nguyen LV, Con-

kling MA, Thompson WF, Robertson MA. : Gene silencing from plant DNA carried by a Geminivirus. Plant J. 14: 91-100, 1998.
26) Kramer EM, Holappa L, Gould B, Jaramillo MA, Setnikov D, Santiago PM. : Elaboration of B gene function to include the identity of novel floral organs in the lower eudicot *Aquilegia*. Plant Cell 19: 750-766, 2007.
27) Kumagai MH, Donsn J, Della-Cioppa G, Harvey D, Hanley K, Grill LK. : Cytoplasmic inhibition of carotenoid biosynthesis with virus-derived RNA. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 92: 1679-1683, 1995.
28) Lacomme C, Hrubikova K, Hein I. : Enhancement of virusinduced gene silencing through viral-based production of inverted-repeats. Plant J. 34: 543-553, 2003.
29) Li C, Sasaki N, Isogai M, Yoshikawa N. : Stable expression of foreign proteins in herbaceous and apple plants using Apple latent spherical virus RNA2 vectors. Arch. Virol. 149: 1541-1558, 2004.
30) Li D, Behjatnia SAA, Drya IB, Walkera AR, Randlesb JW, Rezaianb MA. : Tomato leaf curl virus satellite DNA as a gene silencing vector activated by helper virus infection. Virus Res. 136: 30-34, 2008.
31) Liu Y, Schiff M, Dinesh-Kumar SP. : Virus-induced gene silencing in tomato. Plant J. 31: 777-786, 2002.
32) Liu Y, Schiff M, Marathe R, Dinesh-Kumar, SP. : Tobacco *Rar1*, *EDS1* and *NPR1/NIM1* like genes are required for *N*-mediated resistance to tobacco mosaic virus. Plant J. 30: 415-429, 2002.
33) Lu H-C, Chen H-H, Tsai W-C, Chen W-H, Su H-J, Chang DC-N, Yeh H-H. : Strategies for functional validation of genes involved in reproductive stages of orchids. 143: 558-569, 2007.
34) Lu R, Malcuit I, Moffett P, Ruiz MT, Peart J, Wu A-J, Rathjen JP, Bendahmane A, Day L, Baulcombe DC. : High throughput virus-induced gene silencing implicates heat shock protein 90 in plant disease resistance. EMBO J. 22: 5690-5699, 2003.
35) Lu R, Martin-Hernandez AM, Peart JR, Malcuit I, Baulcombe DC. : Virus-induced gene silencing in plants. Methods 30: 296-303, 2003.
36) Matthews REF. : Plant Virology, Ed 3. Academic Press, San Diego, 1991.
37) Muruganantham M, Moskovitz Y, Haviv S, Horesh T, Fenigstein A, du Preez J, Stephan D, Burger JT, Mawassi M. : *Grapevine virus A*-mediated gene silencing in Nicotiana benthamiana and *Vitis vinifera*. J Virol. Methods 155: 167-174, 2009.
38) Nagamatsu A, Masuta C, Senda M, Matsuura H, Kasai A, Hong JS, Kitamura K, Abe J, Kanazawa A. : Functional analysis of soybean genes involved in flavonoid biosynthesis by virus-induced gene silencing. Plant Biotechnol. J. 5: 778-790, 2007.
39) Naylor M, Reeves J, Cooper JI, Edwards ML, Wang H. : Construction and properties of a gene-silencing vector based on Poplar mosaic virus (genus *Carlavirus*). J. Virol. Methods 124: 27-36, 2005.
40) Otagaki S, Arai M, Takahashi A, Goto K, Hong JS, Masuta C, Kanazawa A. : Rapid induction of transcriptional and post-transcriptional gene silencing using a novel *Cucumber mosaic virus* vector. Plant Biotechnol. 23: 259-265, 2006.
41) Pandey P, Choudhury NR, Mukherjee SK. : A geminiviral amplicon (VA) derived from *Tomato leaf curl virus* (ToLCV) can replicate in a wide variety of plant species and also acts as a VIGS vector. Virol. J. 6: 152, 2009.
42) Peele C, Jordan CV, Muangsan N, Turnage M, Egelkrout E, Eagle P, Hanley-Bowdoin L, Robertson D. : Silencing of a meristematic gene using geminivirus-derived vectors. Plant J. 27: 357-366, 2001.
43) Peretz Y, Mozes-Koch R, Akad F, Tanne E, Czosnek H, Sela I. : A universal expression/silencing vector in plants. Plant Physiol. 145: 1251-1263, 2007.
44) Pflieger S, Blanchet S, Camborde L, Drugeon G, Rousseau A, Noizet M, Planchais S, Jupin I. : Efficient virus-induced gene silencing in Arabidopsis using a 'one-step' TYMV-derived vector. Plant J. 56: 678-690, 2008.
45) Purkayastha A, Dasgupta I. : Virus-induced gene silencing: A versatile tool for discovery of gene functions in plants. Plant Physiol. Biochem. 47: 967-976, 2009.
46) Purkayastha A, Mathur S, Verma V, Sharma S, Dasgupta I. : Virus-induced gene silencing in rice using a vector derived from a DNA virus. Planta DOI: 10. 1007/S00425-010-1273-z, 2010.
47) Ratcliff F, Martin-Hernandez AM, Baulcombe DC. : Tobacco rattle virus as a vector for analysis of gene function by silencing. Plant J. 25: 237-245, 2001.
48) Robertson D. : VIGS vectors for gene silencing: many targets, many tools. Annu. Rev. Plant Biol. 55: 495-519, 2004.
49) Ruiz MT, Voinnet O, Baulcombe DC. : Initiation and maintenance of virus-induced gene silencing. Plant Cell 10: 937-946, 1998.
50) Rybicki EP. : Plant-made vaccines for humans and animals. Plant Biotechnol. J. 8: 620-637, 2010.
51) Scofield SR, Huang L, Brandt AS, Gill BS. : Development of a virus-induced gene-silencing system for hexaploid wheat and its use in functional analysis of the *Lr21*-mediated leaf rust resistance pathway. Plant Physiol. 138: 2165-2173, 2005.
52) Takizawa M, Hori K, Inai K, Takase H, Hashimoto T, Watanabe Y. : A virus-induced gene silencing approach for the suppression of nicotine content in *Nicotiana benthamiana*. Plant Biotechnol. 24: 295-300, 2007.
53) Tao X, Zhou X. : A modified viral satellite DNA that suppresses gene expression in plants. Plant J. 38: 850-860, 2004.
54) Thomas CL, Jones LDC, Maule AJ. : Size constraints for targeting post-transcriptional gene silencing and for using RNA directed methylation in *N. benthamiana* using a potato virus X vector. PlantJ. 25: 417-425, 2001.
55) Turnage MA, Muangsan N, Peele CG, Robertson D. : Geminivirus- based vectors for gene silencing in Arabidopsis. Plant J. 30: 107-114, 2002.

56) Tuttle JR. , Idris AM, Brown JK, Haigler CH, Robertson D. : Geminivirus-mediated gene silencing from *Cotton leaf crumple virus* is enhanced by low temperature in cotton. Plant Physiol. 148: 41-50, 2008.
57) 上田一郎: 植物プラス1本鎖RNAウイルス発現ベクター．ウイルス 50: 251-257.
58) Unver T, Budak H. : Virus-induced gene silencing, a post transcriptional gene silencing method. Int. J. Plant Genomics 198680, 2009.
59) Valentine T, Shaw J, Blok VC, Phillips MS, Oparka KJ, Lacomme C. : Efficient virus-induced gene silencing in roots using a modified tobacco rattle virus vector. Plant Physiol. 136: 3999-4009, 2004.
60) Wege S, Scholz A, Gleissberg S, Becker A. : Highly efficient virus-induced gene silencing (VIGS) in California Poppy (*Eschscholzia californica*): an evaluation of VIGS as a strategy to obtain functional data from non-model Plants. Annal. Bot. 100: 641-649, 2007
61) Yamagishi N, Yoshikawa N. : Virus-induced gene silencing in soybean seeds and the emergence stage of soybean plants with *Apple latent spherical virus* vectors. Plant Mol. Biol. 71: 15-24, 2009.
62) Yamagishi N, Sasaki S, Yamagata K, Komori S, Nagase M, Wada M, Yamamoto T, Yoshikawa N. : Promotion of flowering and reduction of a generation time in apple seedlings by *Apple latent spherical virus* vector expressing a *FT* gene. Plant Mol. Biol. (印刷中)
63) Yamagishi N, Yoshikawa N. : Expression of *FLOWERING LOCUS T* from *Arabidopsis thaliana* induces precocious flowering in soybean irrespective of maturity group and stem growth habit. Planta (印刷中)
64) Yang Y, Wu Y, Pirrello J, Regad F, Bouzayen M, Deng W, Li Z. : Silencing *SI-EBF1* and *SI-EBF2* expression causes constitutive ethylene response phenotype, accelerated plant senescence, and fruit ripening in tomato. J. Exp. Bot. 61: 697-708, 2010.
65) Zhang C, Bradshaw JD, Whitham SA, Hill JH. : The development of an efficient multipurpose bean pod mottle virus viral vector set for foreign gene expression and RNA silencing. Plant Physiol. 153: 52-65, 2010.
66) Zhang C, Ghabrial SA. : Development of *Bean pod mottle virus* based vectors for stable protein expression and sequence-specific virus-induced gene silencing in soybean. Virology 344: 401-411, 2006.
67) Zhang C, Yang C, Whitham SA, Hill JH. : Development and use of an efficient DNA-based viral gene silencing vector for soybean. Mol. Plant Microbe. Interact. 22: 123-131, 2009.

Virus-induced gene silencing as a tool for analysis of gene functions in plants

Noriko YAMAGISHI and Nobuyuki YOSHIKAWA

Faculty of Agriculture, Iwate University
Morioka 020-8550, Japan
E-mail: yoshikawa@iwate-u.ac.jp

Virus-induced gene silencing (VIGS) is a technology that exploits an RNA-mediated antivirus defense mechanism in plants and has been shown to have great potential in plant reverse genetics. When the virus vector carries sequences of plant genes, virus infection triggers VIGS that results in the degradation of endogenous mRNAs homologous to the plant genes. The system is well established in *Nicotiana benthamiana* and several reliable VIGS vectors have been developed for other plant species including important agricultural crops. Here, we describe the use of VIGS technology to determine gene function and plant virus vectors for induction of VIGS in plants.