

平成 21 年 4 月 28 日現在

研究種目：基盤研究 (B)

研究期間：2006-2009

課題番号：18380002

研究課題名 (和文) エピジェネティック変異を利用した植物有用成分の量的改変

研究課題名 (英文) Quantitative modification of useful components in plants via induction of epigenetic changes

研究代表者

金澤 章 (KANAZAWA AKIRA)

北海道大学・大学院農学研究院・准教授

研究者番号：30281794

研究分野：植物分子遺伝学

科研費の分科・細目：農学・育種学

キーワード：植物、遺伝子発現、エピジェネティクス、メチル化、転写

## 1. 研究計画の概要

植物細胞においては、転写段階ならびに転写後段階におけるジーンサイレンシングが起きることが知られている。前者においては、ゲノム DNA の特に遺伝子のプロモーター領域のメチル化により、直接的あるいはクロマチン構造の変化を介して、遺伝子の転写が阻害される。本研究を計画した時点において、細胞内に二本鎖 RNA 分子が存在する場合、その塩基配列に相同な核内のゲノム DNA に対して配列特異的なメチル化ならびに転写抑制が誘導されることが示されていた。また、本研究の代表者は、この機構を利用し、新規な RNA ウイルスベクターを用いて植物細胞で転写抑制を誘導することに成功していた。本研究の目的は、この実験系を用いて、以下に集約される研究を推進することである。

(1) レポーター遺伝子を用いたエピジェネティックな遺伝子発現の制御機構の解析を詳細にわたり行うことで、遺伝子特異的な転写抑制の誘導と維持に必須の条件を明らかにする。

(2) それにより最適化された方法を植物ゲノムに存在する遺伝子の発現抑制に適用し、植物の産生する有用成分の量的制御に応用する。

## 2. 研究の進捗状況

(1) 植物ゲノムに導入されている GFP レポーター遺伝子を制御するプロモーターの部分配列を持つウイルスベクターを作成し、このウイルスを植物体に接種することにより、レポーター遺伝子の転写抑制を行った。転写抑制の程度の評価を、GFP 蛍光の消失の程度、ならびに定量 RT-PCR による GFP mRNA の減少

程度を解析することによって行った。その結果、ベクターに挿入するプロモーター配列の領域とその長さが、転写抑制の効率に影響を与える要因であることが明らかになった。さらに、この方法による転写抑制の最適化に必要な条件を見出すため、10 bp おきの異なる長さのプロモーター部分配列を挿入したベクターを用いて、転写抑制の程度を評価した。その結果、特にウイルス接種後の早期では、挿入配列の長さ 100 bp 前後に、転写抑制を効率よく誘導するための閾値が存在することが示唆された。

(2) ウイルスベクターを用いた配列特異的 RNA 分解によるサイレンシングをダイズのフラボノイド合成系の内在性遺伝子に対して行い、フラボノイド成分量の改変が可能であるか否かを検討した。フラボノイド 3' 水酸化酵素遺伝子を標的としてサイレンシングの誘導を試みたところ、mRNA 量の減少、siRNA の産生、フラボノイド量の変化が検出され、この方法がダイズにおける成分組成の改変に利用可能であることが証明された。

(3) エピジェネティック変異を利用した植物の遺伝子の発現抑制を行うため、ダイズ種子貯蔵タンパク質の  $\beta$  コングリシニン  $\alpha$  サブユニット遺伝子のプロモーターを標的として実験を行った。第一に、そのプロモーター活性の解析を、遺伝子上流域を連結した GUS レポーター遺伝子を導入した形質転換シロイヌナズナを用いて行った。その結果、転写開始点の 245 bp 上流までに転写の時間的・空間的パターンを制御するのに十分な配列が存在し、そのさらに上流には転写の程度

に影響する配列が存在することが明らかになった。このプロモーター配列を挿入したウイルスを感染させることで転写抑制の誘導を試みた。その結果、低頻度ながらGUS活性が見られない植物体が得られ、転写抑制がおきているものと推察された。

### 3. 現在までの達成度

②おおむね順調に進展している。

(理由)

本研究の第一の目標として、レポーター遺伝子を用いて行うエピジェネティックな遺伝子発現の抑制の誘導効率を詳細に検討し、研究開始時点で想定した条件に関する最適化を完了することができた。植物の持つ遺伝子に関して本法を適用する実験では、対象としている遺伝子数が限定的ではあるものの、その適用が可能であることを示唆する結果が得られている。さらに、ウイルスベクターを用いてダイズにおける mRNA 分解によるジーンサイレンシングを世界に先がけて確立し、ダイズの成分を改変するという成果をあげることができた。

### 4. 今後の研究の推進方策

第一に、ウイルスベクターを用いた、植物に存在する遺伝子のサイレンシングの効率を高めることが望ましいと考えている。また、種子における成分を改変するために、種子発育の過程における直接的な遺伝子発現抑制と他組織から種子へ転流する物質の量的制御の有効性に関する比較解析が、最終目的である植物の有用成分の量的改変には重要であると認識している。さらに、植物体をエピジェネティックな発現変化に関わる薬剤によって処理することにより、種子等における成分の変化を誘導可能であるか否かを解析することを考えている。以上の研究を通して、エピジェネティックな遺伝子発現変化により有用成分が変化した植物系統を作出するための方策を体系化する予定である。

### 5. 代表的な研究成果

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 13 件)

- ① Nagamatsu, A., Masuta, C., Matsuura, H., Kitamura, K., Abe, J. and Kanazawa, A. (2009) Down-regulation of flavonoid 3'-hydroxylase gene expression by virus-induced gene silencing in soybean reveals the presence of a threshold mRNA level associated with pigmentation in pubescence. *J. Plant Physiol.* 166, 32-39. 査読有り
- ② Liu, B., Kanazawa, A., Matsumura, H.,

Takahashi, R., Harada, K. and Abe, J. (2008) Genetic redundancy in soybean photoresponses associated with duplication of the phytochrome A gene. *Genetics* 180, 995-1007. 査読有り

- ③ Hisano, H., Kanazawa, A., Yoshida, M., Humphreys, M. O., Iizuka, M., Kitamura, K. and Yamada, T. (2008) Coordinated expression of functionally diverse fructosyltransferase genes is associated with fructan accumulation in response to low temperature in perennial ryegrass. *New Phytol.* 178, 766-780. 査読有り
- ④ Kanazawa, A., O'Dell, M. and Hellens, R. P. (2007) Epigenetic inactivation of *chalcone synthase-A* transgene transcription in petunia leads to a reversion of the post-transcriptional gene silencing phenotype. *Plant Cell Physiol.* 48, 638-647. 査読有り
- ⑤ Nagamatsu, A., Masuta, C., Senda, M., Matsuura, H., Kasai, A., Hong, J.-S., Kitamura, K., Abe, J. and Kanazawa, A. (2007) Functional analysis of soybean genes involved in flavonoid biosynthesis by virus-induced gene silencing. *Plant Biotechnol. J.* 5, 778-790. 査読有り

[学会発表] (計 43 件)

- ① 永松 敦・増田 税・松浦英幸・喜多村啓介・阿部 純・金澤 章 RNAサイレンシングは植物組織の着色に必要なフラボノイド合成系遺伝子の mRNA 量の閾値を明らかにする 日本分子生物学会第 31 回年会 神戸市 神戸ポートアイランド 2008 年 12 月 12 日
- ② 太田垣駿吾・増田 税・金澤 章 DNA 脱メチル化酵素遺伝子の発現量は植物ウイルスベクターを介した外来性プロモーターへのメチル化誘導の程度に影響する 日本育種学会第 114 回講演会 彦根市 滋賀県立大学 2008 年 10 月 11 日

[図書] (計 1 件)

- ① Koide, Y., Onishi, K., Kanazawa, A. and Sano, Y. (2008) Genetics of speciation in rice. *In Rice Biology in the Genomics Era*, Ed. by H.-Y. Hirano, A. Hirai, Y. Sano and T. Sasaki, Springer-Verlag, pp. 247-259.

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

なし