

平成 23 年 3 月 31 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

研究成果の概要 (和文)：新規な RNA ウイルスベクターを用いて、植物において遺伝子サイレンシングを誘導する系を確立するとともに、その効率的な誘導のために必須な要素を明らかにした。この系を用いて植物の持つ成分の生合成系に含まれる酵素の遺伝子発現制御を行い、有用成分量を改変することが可能であることを実証した。本研究の成果より、この方法により迅速に誘導される遺伝子のサイレンシングが、植物成分の生合成系に含まれる遺伝子の機能解析やそれに関する分子育種を行う上で有用であることが示唆された。

研究成果の概要 (英文)：A system for the induction of gene silencing in plants was established using a novel RNA viral vector, and elements necessary for its efficient induction were identified. This system was used to control the expression of genes that were involved in the biosynthesis of plant components, which was found to be useful for modifying the contents of useful components. Results of this study suggested that gene silencing induced rapidly by this method was useful for functional analysis of genes involved in the biosynthesis of plant components and molecular breeding of the pathways.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	5,600,000	0	5,600,000
2007年度	4,500,000	1,350,000	5,850,000
2008年度	3,700,000	1,110,000	4,810,000
2009年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
総計	15,300,000	2,910,000	18,210,000

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. 研究開始当初の背景

本研究の研究代表者は、遺伝情報と遺伝子発現制御機構が相互に関連しながら生物進化がなされていると考え、この仮説を元にして生物の多様性を理解していくこと、ならびに、そこから得られる知見を有用生物資源の開発に資することをテーマとして研究を行ってきた。特に、植物における遺伝子のサイレンシングに焦点を当てて基礎と応用の両面から遺伝子発現制御機構に関する研究を行っていた。ジーンサイレンシングは、これまで言われてきたような、生物がウイルスから遺伝情報を守る防御機構であるという考え方に加えて、交配や倍数化といった植物の進化の過程で頻繁におきるゲノムの変化によって不都合が生じた際に、それを補う手段として進化した機構であると研究代表者は考え、主としてこのような観点からその機構に関する研究を行ってきた (Koseki et al., 2005)。

植物細胞においては、転写段階のジーンサイレンシング (transcriptional gene silencing; TGS) および転写後段階のジーンサイレンシング (post-transcriptional gene silencing; PTGS) が起きることが知られていた。TGS 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た間接的な機構により、転写因子のプロモーターへの結合が妨げられ、遺伝子の転写が阻害される。PTGS においては、配列特異的な RNA 分解がおきる。これらは、細胞内に二本鎖 RNA 分子が存在することにより誘導され、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不活性化が誘導されること、また、その配列が転写されている場合、その RNA を分解することが示されていた。

研究代表者らは、これらの機構を利用し、新規な RNA ウイルスベクターを用いて植物

細胞で転写不活性化を誘導することに成功した。遺伝子サイレンシングをウイルスベクターを用いて行うことには、アグロバクテリウムを介した遺伝子導入によって行う場合に比べ、その誘導が短期間で行うことが可能であるという利点がある。研究開始当初、PTGS の誘導に関する研究が進展していたのに対し、TGS の誘導に影響を与える要素は特定されていなかった。また、ウイルスベクターを用いた遺伝子サイレンシングには上記の優位性があったが、それを植物成分の含有量の改変に利用した研究は行われていなかった。

## 2. 研究の目的

(1) 研究代表者らが遺伝子のサイレンシングを誘導することに成功していた RNA ウイルスベクターを用いた系により、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、遺伝子特異的なサイレンシングの誘導と維持に必須の条件を明らかにし、その誘導を高効率で可能にする要因を突き止めることを第一の目的とした。

(2) 遺伝子サイレンシングの誘導のために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ことを目指した。

## 3. 研究の方法

(1) 本研究の研究代表者は新規なウイルスベクターを用いて、DNA 配列特異的にメチル化を誘導すること、ならびに、その配列をプロモーターとすることで、転写不活性化を誘導する系を開発していた。この系では、ベクターのクローニングサイトに CaMV 35S プロモーターの配列を挿入し、その核酸をもつウイルスを、CaMV 35S プロモーターの制御下で転写される GFP 遺伝子をゲノムに組み込んで

ある *Nicotiana benthamiana* 植物体に対して接種することで、*GFP* 遺伝子の発現を抑えることが可能である。本研究では、第一に、サイレンシングが誘導されやすい条件を明らかにする目的から、標的とするプロモーターのさまざまな部分を持つウイルスを作成し、その感染による転写不活性化誘導の有無、それに伴う DNA のメチル化の程度の変化、ウイルス RNA の安定性、short interfering RNA (siRNA) の産生等を解析した。

(2) 上記の方法による遺伝子のサイレンシングを植物の持つ遺伝子プロモーターに適用することを考えた。その目的、ならびに、重要な植物成分をコードする遺伝子として、研究代表者がそれまでに研究の対象としてきた遺伝子の一つである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を選定し、そのプロモーター機能の詳細な解析を行うとともに、プロモーター配列を標的とした遺伝子サイレンシングを行った。

(3) ウイルスベクターを用いた遺伝子サイレンシングにより、植物の持つ成分含有量を改変することを行った。その目的から、ダイズのフラボノイド合成系の遺伝子であるフラボノイド 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。サイレンシングの誘導ならびに、成分組成の変化に関する解析を行った。

(4) 遺伝子特異的な改変に加え、植物のゲノム中の DNA メチル化の状態をランダムに改変することで形質を変化させることを試みた。この目的から、植物体を DNA メチル化阻害剤で処理し、その影響を解析した。同様に、変異原処理によるダイズ成分の改変を行った。

#### 4. 研究成果

(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 (TGS) 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。また、一続きではない配列であっても、それらの長さを合わせたものが長い場合には高い効率で転写不活性化が起きることを見出した。

(2) 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) 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 (PTGS) 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。この研究の過程で、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 量の閾値が存在することを見出し、RNA サイレncing が mRNA 量の違いに起因する生命現象を理解するための手段として有効であることが示唆された。

(4) 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、顕著な植物体の形態変化を誘導することに成功し、この方法が新たな形質改変の手段として利用できることが示唆された。以上の研究を通して、エピジェネティックな特定の遺伝子を標的とした遺伝子発現変化を誘導すること、ならびに、ランダムに遺伝子発現変化を誘導することの双方が、有用成分が変化した植物を作出するための方策として有効であるものと考えられた。また、変異原処理によるダイズの成分変化を検出し、変化した形質の遺伝性を確認した。

## 5. 主な発表論文等

(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 16 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 Kanazawa, A., Liu, B., Kong, F., Arase, S. and Abe, J. (2009) Adaptive evolution involving gene duplication and insertion of a novel *Ty1/copia*-like retrotransposon in soybean. *J. Mol. Evol.* 69, 164-175. 査読有り
- ③ Imoto, Y., Yamada, T., Kitamura, K. and Kanazawa, A. (2008) Spatial and temporal control of transcription of the soybean  $\beta$ -conglycinin  $\alpha$  subunit gene is conferred by its proximal promoter region and accounts for the unequal distribution of the protein during embryogenesis. *Genes Genet. Syst.* 83, 469-476. 査読有り
- ④ 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
- ⑤ 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
- ⑥ 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
- ⑦ Kanazawa, A., O' Dell, M. and Hellens, R. P. (2007) The binding of nuclear factors to the *as-1* element in the CaMV 35S promoter is affected by cytosine methylation *in vitro*. *Plant Biol.* 9, 435-441. 査読有り
- ⑧ 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

- ⑨ Otagaki, S., Arai, M., Takahashi, A., Goto, K., Hong, J.-S., Masuta, C. and Kanazawa, A. (2006) Rapid induction of transcriptional and post-transcriptional gene silencing using a novel *Cucumber mosaic virus* vector. *Plant Biotechnol.* 23, 259-265. 査読有り
- ⑩ Shinozuka, H., Hisano, H., Yoneyama, S., Shimamoto, Y., Jones, E. S., Forster, J. W., Yamada, T. and Kanazawa, A. (2006) Gene expression and genetic mapping analyses of a perennial ryegrass glycine-rich RNA-binding protein gene suggest a role in cold adaptation. *Mol. Genet. Genomics* 275, 399-408. 査読有り

[学会発表] (計 53 件)

- ① Kanazawa, A. RNA silencing as a tool to uncover regulatory mechanisms underlying visible phenotypes in plants. Plant Science Seminar Series. The Samuel Roberts Noble Foundation, Ardmore, Oklahoma, USA. Jan. 15, 2010.
- ② 太田垣駿吾・河合文珠・増田 税・金澤 章 植物ウイルスベクターを介して誘導される外来性遺伝子のプロモーター領域のメチル化状態と転写型ジーンサイレンシングの安定性 日本育種学会第 116 回講演会 札幌市 北海道大学 2009年10月26日
- ③ 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

④ 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

⑤ Otagaki, S., Masuta, C. and Kanazawa, A. The dynamics of cytosine methylation induced by a plant virus vector on the CaMV 35S promoter and transcriptional repression. Japan-Australian International Symposium on: Biological Interactions with Plant Roots and Aerial Tissues, Hokkaido Univ., Sapporo, Japan, July 28, 2008.

[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.

## 6. 研究組織

### (1) 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

### (2) 研究分担者

喜多村 啓介 (KITAMURA KEISUKE)

北海道大学・大学院農学研究院・教授

研究者番号：50111240

### (3) 連携研究者

なし