

平成 22 年 6 月 1 日現在

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2007～2009

課題番号：19380002

研究課題名（和文） 篩管長距離輸送 RNA による新規品種改良システムの開発

研究課題名（英文） Novel crop improvement by RNA transported through phloem

研究代表者

原田 竹雄（HARADA TAKEO）

弘前大学・農学生命科学部・教授

研究者番号：10228645

研究成果の概要（和文）：篩管内 RNA の効率的輸送を実行するための伴細胞特異的 CoYMV プロモーターの機能性を確認した。このプロモーターに篩管長距離輸送する PFP-T6 転写物の cDNA を連結し、このタバコ形質転換体を台木、野生型を穂木とした接ぎ木個体において、穂木に PFP-T6 転写物が輸送されること、また穂木葉の形状が変化することを確認した。さらに、リンゴ篩部の *in situ* hybridization の実験法、リンゴへの遺伝子導入法も確立し、これらの成果が他の委託研究において活用された。

研究成果の概要（英文）：To perform an effective RNA transport through phloem, the validity of the CoYMV promoter, reported as a companion specific function, was analyzed. We prepared the transgenic tobacco harboring a homeobox fusion gene PFP-T6. Then, wild type as scion was grafted onto the transgenic plants as stock. The grafts showed the transport of the PFP-T6 transcript through the graft union and the shape of scion leaves was changed. Furthermore, we developed the techniques *in situ* hybridization for phloem tissue cells and *Agrobacterium* transformation of *Malus*. These fruits were leveraged in the study of an another research project.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	4,300,000	1,290,000	5,590,000
2008年度	3,400,000	1,020,000	4,420,000
2009年度	3,400,000	1,020,000	4,420,000
年度			
年度			
総計	11,100,000	3,330,000	14,430,000

研究分野：植物分子育種学

科研費の分科・細目：農学 / 育種学

キーワード：伴細胞プロモーター、Me トマト、PFP-T6、接ぎ木

1. 研究開始当初の背景

(1) 接ぎ木はリンゴなどの果樹では古くから活用されている農業技術であり、その長い歴史を通して優れた台木品種が選抜されてきた。特に矮性台木は、穂木に矮化をもたらすことができ

るため、密植栽培様式を実現してきた。また、台木が有する特性によって、穂木の形質が変わる。例えば、リンゴ穂木の病害抵抗性が台木によってもたらされる事例も明らかにされ、この場合には、台木の違いにより、同一穂木品種で

も遺伝子発現様式が異なることが報告されている。

(2) 台木が穂木の遺伝子発現に対してどのようなメカニズムで影響をもたらしているかは不明であるが、篩管を通して転写制御因子遺伝子の RNA が長距離輸送され、輸送先で機能することが明らかにされてきた。

2. 研究の目的

(1) 篩管長距離輸送 RNA を効率的に実行するためには、その起点細胞である伴細胞特異的のプロモーターを起動させることが必要とされる。この目的で CoYMV(Commelia Yellow Mottle Virus)のプロモーター配列の有効性を検証する。

(2) 篩管長距離輸送 mRNA とされている PFP-T6 の cDNA を CoYMV プロモーターに連結した CoYMV:PFP-T6 を導入した個体を獲得し、それを台木とした場合に、その転写物 mRNA が台木から穂木へ輸送されるかを検証する。

(3) 伴細胞や篩管などの篩部組織における細胞レベルでの分子生物学的解析手法としての *in situ* hybridization 法を確立する。

3. 研究の方法

(1) Minnesota Univ. Olszewski 博士より分譲された CoYMV のプロモーター配列にレポーター遺伝子の GUS や GFP を連結して、タバコ (*Nicotiana benthamiana*) とリンゴ台木品種 (マルバカイドウ; *Malus prunifolia*) に導入した。

(2) トマト変異体 *Me* より PFP T6 (pyrophosphate-dependent phosphofructokinase)-LeT6 (KNOTTED-1-like homeobox) の cDNA を獲得し、CoYMV:PFP-T6 を構築して、*N. benthamiana* に導入し、これを台木とした野生型タバコ穂木に PFP-T mRNA が確認されるか、RT-PCR にて解析した。

(3) *M. prunifolia* の培養シュートの篩部細胞に特異的に存在することが報告されている *thioredoxin h* genes (Ishiwatari et al. 2000) を *in situ* hybridization にて検出した。

(4) リンゴ台木品種マルバカイドウへのアグロバクテリウム法による形質転換技術の確立を目指した。

4. 研究成果

(1) CoYMV : GFP 導入の *N. benthamiana* 個体では篩部細胞に GFP が観察された。図 1 は葉柄の断面切片を観察したものだが、木部の導管

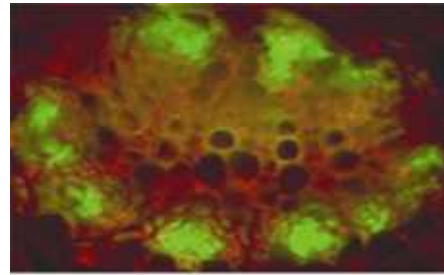


図 1 CoYMV:GFP 導入 *N. benthamiana* の葉柄断面切片

細胞を中心とする環状の篩部組織に相当する部位でシグナルが観察された。これらは葉身や茎、根においてもほぼ同様のシグナルが観察されたことから、CoYMV プロモーターは全ての器官の伴細胞で機能することが判明した。さらに、*M. prunifolia* に CoYMV:GUS を導入した個体においても同様の部位でのシグナルを得た。

(2) PFP-LeT6 を導入した *N. benthamiana* を作出した。それらは葉の形態が波打ち状となり、トマト変異体 *Me* で観察される同様の特徴を示した(図 2)。これらの T2 個体を獲得して、台木として発芽後 1 週間後の幼苗の胚軸間で接ぎ木を行った。接ぎ木面の接合状況を確認するた



図 2 CoYMV:PFP-T6 導入 *N. benthamiana* の葉の形態。A: WT, B: CoYMV:PFP-T6

め、穂木には 35S:GFP 導入個体である 16C を用いた。GFP 観察で接ぎ木面を確認したのち、ロックウール上での栽培体を台木にした。育成 2 週間後の穂木より RNA を抽出して、リアルタイム RT-PCR にて PFP-T6 転写物の検出を試みた結果、コントロール区での WT を台木にした場合には検出できなかったが、PFP-T6 導入個体を台木にした場合の穂木に PFP-T6 の転写物が確認された(図 3)。それらの量は接ぎ木個体によって大きく異なったが、解析した全ての個体で検出された。また、それらの穂木の葉の形態を観察したところ、葉身が二つに分かれたもの、大きな鋸歯が存在するもの、さらに丸み状の形態をとるものなどが得られた。これらは、トマト *Me* 変異体での葉に見られる特徴であった(図 3A)。

(3) 細胞レベルでの mRNA の存在を確認するためには *in situ* ハイブリダイゼーションの手法が必要である。そこで、篩部組織における *in*

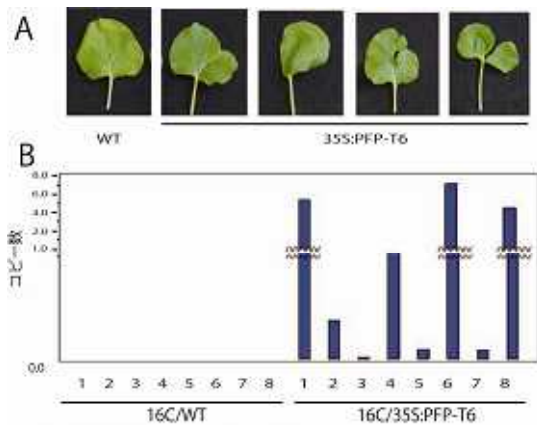


図3 35S:PPF-T6 導入タバコ個体。A: 導入個体に見られた葉の形態。B: 接ぎ木個体の穂木における PFP-T6 転写物のコピー数。Real-Time RT-PCR により定量した。

in situ ハイブリダイゼーションの技術を確立するため、他の植物で篩管、特に伴細胞に存在することが判っている *Thioredoxin h* の転写物の検出をリンゴ台木品種 *M. prunifolia* の培養シュートの横断切片で試みた。図4に示すように、維管束の外部にスポット状にシグナルが現れ、それらは図1に現れたように全体として環状に並んでいた。センスプローブではこれらのシグナルは現れず、検出されたのは *Thioredoxin h* 転写物であるものと考えられ、リンゴの茎組織での *in situ* ハイブリダイゼーション技術が確立された。

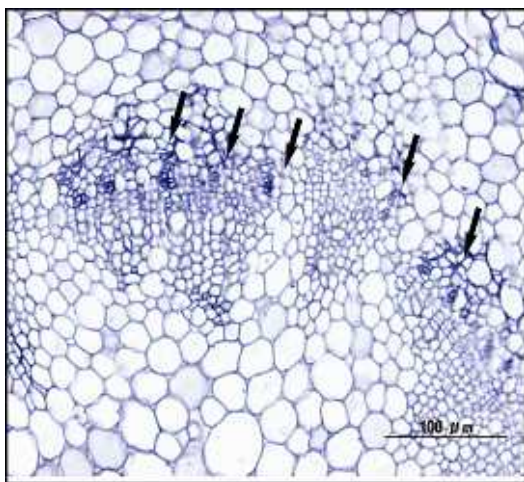


図4 *Malus prunifolia* の培養シュートにおける *Thioredoxin h* の *in situ* hybridization. 矢印がポジティブシグナル。

以上のように篩管伴細胞で特異的に強く発現する CoYMV プロモーターの機能性を確認した。篩管特異的発現プロモーターとしては、SUC2 が知られているが、このプロモーターは若い葉で働き、根においてはほとんど活性がないことも判っており、当研究の目的には適用できなかった。この CoYMV の高機能性は PFP-T6 での伴細胞での発現に使用され、その転写物の台木から穂木へ

の輸送を実現した。さらに、それらの接ぎ木実験から、輸送転写物が輸送先で機能していることを示唆する結果も得られた。これに関しては、より多くの接ぎ木個体を準備して、研究を進める必要がある。

細胞レベルでの RNA 局在性を検討するためには *in situ* ハイブリ実験は必須である。リンゴ組織での検出は世界的にもほとんど例がなかった。最適の組織切片の固定法、ハイブリの条件などを検討するために時間を費やしたが、安定して結果が得られるまでに至った。このことから、リンゴを実験材料とした特定遺伝子転写物の篩管長距離輸送についての実証が行うことができるようになった。

(4)リンゴ台木品種マルバカイドウへのアグロバクテリウム法による形質転換技術の確立を目指した。これまでの選抜マーカー遺伝子はカナマイシン耐性遺伝子であったが、本研究では図5に示す通りの除草剤ピアラフォス耐性遺伝子を使用した。

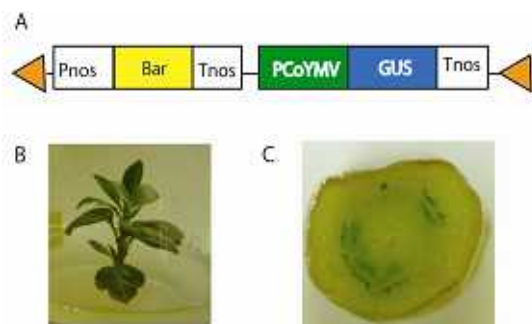


図5 リンゴ台木マルバカイドウへの形質転換。A: 用いたベクター。選抜マーカー遺伝子にピアラフォス耐性遺伝子 Bar、レポーター GUS のプロモーターに CoYMV を使用している。B: 再生分化個体。C: 再生分化個体のシュート切断面の GUS 染色。

リンゴの形質転換効率は極めて低いことが知られており、1%以下である報告も多い。その原因は品種間差なども大きいことから一概には言えないが、選抜マーカーにカナマイシン耐性遺伝子を使用していることが一因と考えられた。そこで、除草剤ピアラフォス耐性遺伝子 Bar を用いて形質転換を進めた結果、ピアラフォス 3 mg/L においても旺盛な成長を表す個体が獲得され、これらにおいては葉や茎、根における伴細胞で GUS 活性が認められた(図5)。これまでのところ、その獲得効率は約2 - 3%にも達しており、形質転換の技術はほぼ確立した。

以上の研究成果は、当研究室で同時に進められた生研センター委託研究において活用された。そのため、本研究と委託研究の具体的な線引きによる区別はほぼ不可能であるため、以下の項目、発表論文、学会発表、産業財産権においては、本研究で得た成果が含まれたものについて

記載した。

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3件)

Xu H, Zhang W, Li M, Harada T, Han Z, Li T. *GIBBERELLIC ACID INSENSITIVE* mRNA transport in both directions between stock and scion in *Malus*. 査読有、Tree Genetics and Genomes (in press)

Kanehira A, Yamada K, Iwaya T, Tsuwamoto R, Kasai A, Nakazono M, Harada T. 2010. Apple phloem cells contain some mRNAs transported over long distances. 査読有、Tree Genetics and Genomes (in press)

Kasai A, Kanehira A, Harada T. miR172 can move long distances in *Nicotiana benthamiana*. 査読有、Open Plant Sci. J. 4; 1-6 (2010)

[学会発表](計10件)

白松 齡・葛西厚史・原田竹雄
Transcriptional gene silencing by siRNA transported long-distantly through sieve tube 日本育種学会 2010年3月27日 (京都大学)

兼平杏美・山田かおり・葛西厚史・原田竹雄
篩管長距離輸送siRNA シグナルによる遺伝子サイレンシング発動様式 日本育種学会 2010年3月26日 (京都大学)

葛西厚史・兼平杏美・原田竹雄
篩管長距離輸送 siRNA シグナルによる内生遺伝子のサイレンシング 日本育種学会 2010年3月27日 (京都大学)

葛西厚史・白松 齡・原田竹雄
Small RNAによる内生遺伝子 GSA の gene silencing について 日本育種学会 2009年9月26日 (北海道大学)

兼平杏美・山田かおり・原田竹雄
*Malus*における *Aux/IAA14* 転写物の篩管長距離輸送 日本育種学会 2009年9月25日 (北海道大学)

葛西厚史・兼平杏美・原田竹雄
Analysis on the phloem long-distance transport of microRNA by grafting experiment Plant Biology 2009 2009年7月21日 (Honolulu)

岩谷朋美・徐海燕・原田竹雄
リンゴにおける接ぎ木伝搬性mRNAの解析 日本育種学会 2009年3月27日 (筑波大学)

葛西厚史・兼平杏美・大関さおり・原田竹雄
MicroRNAの接ぎ木実験による篩管長距離輸送性について 日本分子生物学会

2008年12月11日 (神戸ポートアイランド)

葛西厚史・兼平杏美・木田祥子・原田竹雄
MicroR393の篩管長距離輸送性とその機能について 日本育種学会 2008年10月11日 (滋賀県立大学)

岩谷朋美・中園幹生・原田竹雄
リンゴにおけるPTR (Phloem Transport RNA) 解析 東北育種研究集会 2008年8月18日 (弘前大学)

[産業財産権]

出願状況(計1件)

名称: 植物の篩管長距離輸送 siRNA の産生ベクター

発明者: 原田竹雄・葛西厚史

権利者: 弘前大学

種類: 特許出願

番号: 特願 2009-168897

出願年月日: 2009年7月31日

国内外の別: 日本

[その他]

ホームページ等

<http://nature.cc.hirosaki-u.ac.jp/lab/1/tharada/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

原田 竹雄 (HARADA TAKEO)

弘前大学・農学生命科学部・教授

研究者番号: 10228645

(2) 研究分担者

杉山 修一 (SUGIYAMA SYUICHI)

弘前大学・農学生命科学部・教授

研究者番号: 00154500

(3) 連携研究者

なし