

令和 5 年 6 月 5 日現在

機関番号：12605

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2019～2022

課題番号：19K22304

研究課題名（和文）2本鎖RNA直接導入による病害虫抵抗性苗の開発

研究課題名（英文）Development of pathogen-resistant seedlings by direct introduction of double-stranded RNAs

研究代表者

福原 敏行（Fukuhara, Toshiyuki）

東京農工大学・（連合）農学研究科（研究院）・教授

研究者番号：90228924

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,900,000円

研究成果の概要（和文）：本研究は、2本鎖RNAを作物の苗に直接導入し病原体に対してRNA干渉を誘導する手法で、土壌病害に対して抵抗性のある安心・安全なワクチン苗を開発することを目的とする。2本鎖RNAの植物体への直接導入法については、蛍光(Cy3)標識2本鎖RNAの挙動を蛍光顕微鏡でモニターする実験系を確立し、トマト幼苗の根から吸収した2本鎖RNAが全身に移行することを確認した。トマト道管内で増殖するトマト萎凋病菌に対するワクチン苗作出を目的に、トマト萎凋病菌の増殖や病原性に関与する2種類の遺伝子の2本鎖RNAを処理することによりトマト萎凋病菌の孢子形成が阻害されることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、トマトを研究対象として2本鎖RNAの有効性を検討するが、トマトで有効性が確認できれば、ナス、サツマイモ、メロンなど多くの食用植物に対して応用が可能である。また、トマト萎凋病菌は、バナナの新パナマ病の病原菌と同様、フザリウム菌(*Fusarium oxysporum*)により引き起こされる土壌病害である。今回の2本鎖RNA直接導入法の有効性が証明されれば新パナマ病の防除法としての応用・利用につながる。遺伝子組換えDNA技術に頼らない本研究提案は、研究成果が得られれば社会に受け入れられる可能性が高い革新的技術となることが期待される。

研究成果の概要（英文）：The objective of this study is to develop safe and secure vaccine seedlings resistant to soil-borne diseases by introducing dsRNAs directly into crop seedlings and inducing RNA interference against pathogens. We have established an experimental system to monitor the behavior of fluorescent (Cy3)-labeled dsRNA using a fluorescence microscope, and confirmed that dsRNA absorbed from the roots of young tomato seedlings is transferred throughout the body. For the purpose of producing vaccine seedlings against tomato wilt fungus (*Fusarium oxysporum* f. sp. *lycopersici*, Fol) that grows in tomato xylem, we found that treatment with dsRNA of two genes involved in the growth and pathogenicity of Fol inhibited spore formation of Fol.

研究分野：植物細胞分子生物学

キーワード：トマト RNA干渉 2本鎖RNA トマト萎凋病菌 蛍光色素標識

1．研究開始当初の背景

RNA 干渉は、長鎖 2 本鎖 RNA(dsRNA)から生成された小分子 RNA の塩基配列特異的に mRNA が切断されることで遺伝子発現を特異的に抑制する現象(技術)である。RNA 干渉は、20 塩基程度の小分子 RNA の塩基配列特異的に遺伝子発現を抑制することができるため、ヒトの病気の治療薬として応用研究が進んでいる。植物は遺伝子組換え体の作成が容易であることから、長鎖 dsRNA を発現するように工夫された DNA をゲノム DNA に組み込み、目的遺伝子の発現を抑制した遺伝子組換え植物を作成し、遺伝子の機能解析や、植物の機能改変(有用農業形質付与)技術として RNA 干渉が利用されてきた。「果実が赤くなくても腐りにくいトマト」や「ウイルス抵抗性パパイア」は、遺伝子組換え技術により RNA 干渉を誘導させて有用農業形質を付与した食用植物の例であり、米国で実用化されている。しかしながら日本では、遺伝子組換え DNA 技術を用いて RNA 干渉を誘導し有用形質を付与した食用植物を作出しても、遺伝子組換え植物に対する一般市民の理解が得られない状況から社会実装が難しい。そこで遺伝子組換え技術に頼らず、2 本鎖 RNA を直接植物に導入することで、植物に有用農業形質を付与する技術開発研究の構想に至った。RNA 干渉苗は、安心安全で高付加価値(病害抵抗性)のワクチン苗として実用化が期待できる。

2．研究の目的

コロナウイルスやインフルエンザなどのウイルスを原因とする病気は、抗生物質などの特效薬が無いために大流行(パンデミック)が起きることがあり、予防薬としてワクチンの開発が進められている。農業においても、ウメ輪紋ウイルスが感染し輪紋病に罹病したウメには特效薬がないため、地域の梅の木を全て伐採する以外に防除法がない。また、土壌病原菌のフザリウム菌(*Fusarium oxysporum*)によるバナナの新バナナ病に対しても今のところ有効な防除法がなく、世界的なバナナの被害が懸念されている。

これまで植物の機能改変技術として遺伝子組換え技術による RNA 干渉により有用農業形質を付与した「ウイルス抵抗性パパイア」などが米国で実用化されているが、日本では流通していない。本研究では、有効な防除法がないウイルス病や土壌病害の制御を目的とし、植物の幼苗を茎(胚軸)で切断し 2 本鎖 RNA を含む水溶液に浸すことで、遺伝子組換え技術を用いないで 2 本鎖 RNA を直接植物体に導入して RNA 干渉を誘導すると同時に発根を促し、病害虫に強い安心・安全なワクチン苗を開発することを目的とする。本研究では、社会実装を見据えて、挿し木苗が容易に作成でき商品価値も高いトマトを対象に、病害虫抵抗性を付与することを目的とした。

3．研究の方法

(1)dsRNA の調製

実験に供試した dsRNA は、市販の *in vitro* RNA 転写キット(Promega, T7 RibomAX Express Large Scale RNA Production System)を用い、キット添付のプロトコールに従って調製した。緑色蛍光タンパク質(GFP)遺伝子の配列を有する dsRNA (GFP-dsRNA)およびトマト萎凋病菌(*Fusarium oxysporum f. sp. lycopersici*, FoI)の 3 種類の遺伝子(Thioredoxin reductase (TrxR)、X 遺伝子、Y 遺伝子)の配列を有する dsRNA を合成した。これらを作成後、アガロースゲル電気泳動により期待されるサイズの dsRNA が合成できていることを確認した。蛍光色素 Cy3 で標識した dsRNA は、Cy3-UTP(Cytiva)を *in vitro* RNA 転写キットの 1 反応(20 μ L) 当たり 1 μ L 加え合成した。Cy3 が dsRNA に取り込まれたことはアガロース電気泳動で確認した。

(2)トマト萎凋病菌(FoI)への dsRNA 投与

ポテトデキストロース寒天培地(PDA)にて、25℃、5日間培養した FoI の菌糸の先端を 5mm 角で切り出し、100mL のポテトデキストロース液体培地(PDB)に懸濁し、25℃、3日間振とう培養した。滅菌した 4 重のガーゼで FoI の培養液をろ過することで、菌糸体を除去し孢子(分生子)を精製し、トーマ血球計算盤を用いて孢子濃度を計算した。終濃度 5×10^3 spores/ml の FoI 孢子に 5 μ g dsRNA を含む 100 μ L PDB 液体培地を、130rpm、25℃で3日間振とう培養し、緑色蛍光観察、菌体重量測定、孢子数測定に供し、dsRNA 投与による FoI の増殖や孢子形成に対する影響を評価した。

(3) 蛍光顕微鏡観察

蛍光顕微鏡(KEYENCE, BZ-X700)により緑色蛍光の観察・定量した。

(4) 菌体重量測定

振とう培養した FoI の菌糸体をミラクロス(Merck)でろ過して培地を除き、1時間ドラフト下で乾燥させた後、菌体重量を測定した。

(5) 孢子(分生子)数測定

振とう培養した FoI 培養液を二重にしたガーゼでろ過することで分生子を精製し、トーマ血球計算盤で孢子(分生子)数を測定した。

4. 研究成果

(1) GFP 遺伝子のノックダウン

本実験では dsRNA 添加による RNA 干渉の誘導を視覚的に評価することができる GFP 遺伝子をターゲットとして、GFP 遺伝子導入 FoI (GFP31 株) の培養液に GFP-dsRNA を 5 μ g 添加することで GFP 遺伝子発現のノックダウンを緑色蛍光で評価した。GFP-dsRNA を導入したもので蛍光の減少が見られ、FoI において dsRNA を培地に添加することで遺伝子ノックダウンを誘導できることが示唆された。

(2) FoI の増殖に対する TrxR 遺伝子 dsRNA の効果

チオレドキシン還元酵素(Thioredoxin Reductase, TrxR)は、酸化型チオレドキシンの還元を触媒する酵素である。この遺伝子と相同な配列を有する dsRNA を植物の葉にスプレーした実験において、菌核病菌(*Sclerotinia sclerotiorum*)の病斑サイズを抑えられることが先行研究で報告されている(McLoughlin et al., 2018)。そこで、TrxR-dsRNA を液体培地に添加することで FoI の増殖阻害を期待した。TrxR-dsRNA 添加し3日間培養後に、菌体重量を GFP-dsRNA を添加したものを対照として、測定したが、FoI の菌体重量の減少は観察されなかった。

(3) FoI の増殖に対する X 遺伝子および Y 遺伝子 dsRNA の効果(特許出願の可能性があるので X および Y 遺伝子と記載する)

X 遺伝子がコードする X タンパク質は菌類の細胞壁の生合成と形態形成において重要な役割をすることが知られており、X 遺伝子の発現を RNA 干渉により抑制したところ *Fusarium oxysporum* の病原性が低下することが先行研究により報告されている。Y タンパク質はペルオキシソームの生合成に重要な役割を担っており、Y 遺伝子を欠損させた FoI は、孢子形成や病原性等に異常が見られ、感染効率が減少することが報告されている。FoI の増殖に対して X 遺伝

子配列およびY遺伝子配列を有する dsRNA の添加による抑制効果を寒天培地で評価した。dsRNA 5 μg と 5×10^3 spores/ml の FoI 10 μl を混合し、寒天培地の中央に滴下した。25 $^{\circ}\text{C}$ で3日間培養させた後に、dsRNA を加えない対照と比較してコロニーサイズを測定した。

X-dsRNA および Y-dsRNA

を添加した場合は、GFP-dsRNA 添加および dsRNA 未添加と比較して僅かにコロニーサイズの減少が見られたが統計的に有意な差が認められなかった (図1)。

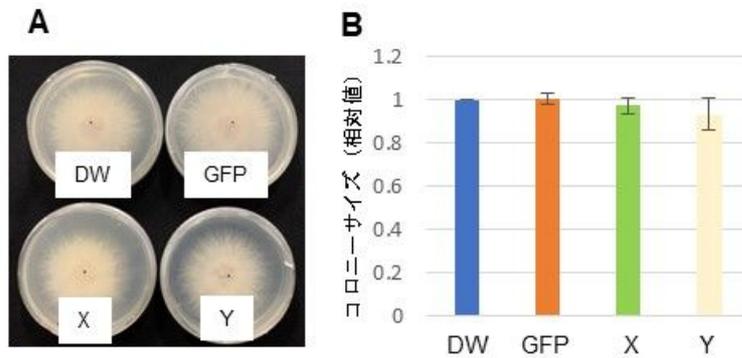


図1 FoIの増殖に対するdsRNAの効果
dsRNA 5 μg と 5×10^3 spores/ml の FoI 10 μl を混合し、寒天培地の中央に滴下、3日間培養後にコロニーサイズを測定した。DW, dsRNA無添加; GFP, GFP-dsRNA; X, X-dsRNA; Y, Y-dsRNA。

(4) FoI の孢子形成に対する X 遺伝子および Y 遺伝子 dsRNA の効果

本実験では、FoI の分生子形成に対する X 遺伝子 dsRNA および Y 遺伝子 dsRNA の効果を検証するために、100 μL PDB 液体培地に終濃度 5×10^3 spores/ml の FoI の胞子を調製し 5 μg の dsRNA を添加、3日間培養後の胞子数を測定した。GFP-dsRNA, X-dsRNA, Y-dsRNA の添加で、dsRNA 無添加の場合と比較して胞子数が、それぞれ 37%、77%、72%減少した (図2)。この dsRNA の添加による孢子形成阻害の dsRNA 濃度依存性を確認する実験を行った結果、1 μg 以下の X-dsRNA および Y-dsRNA 添加でも胞子数の減少が見られ、その阻害効果は概ね dsRNA 濃度に依存していた。また、1 μg 以下の GFP-dsRNA 添加では孢子形成阻害は生じなかったことから、5 μg GFP-dsRNA 添加では高濃度の dsRNA 添加によるオフターゲット効果が生じたことが示唆された。

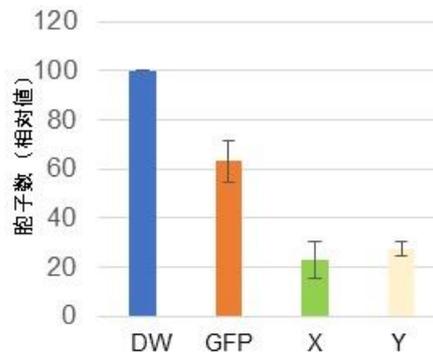


図2 FoIの孢子形成に対するdsRNAの効果
100 μL PDB液体培地に、 5×10^3 spores/ml 終濃度の FoI 胞子と 5 μg dsRNA を添加し、3日間培養後の胞子数を測定した。DW, dsRNA無添加; GFP, GFP-dsRNA; X, X-dsRNA; Y, Y-dsRNA。

(5) トマト植物体内への dsRNA の導入方法

上述のように、FoI の増殖や病原性に必須な遺伝子の配列を有する dsRNA を液体培地に添加することで、FoI 孢子形成に対する阻害効果があることが示された。次に、この dsRNA をトマトの道管に導入し、トマト萎凋病に対する予防効果があることを検証する実験を計画している。その前に、dsRNA をトマト道管内に効率よく導入するために、3つの手法を蛍光色素 Cy3 で標識した dsRNA を使用し検討した。1 番目の手法は、2 週齢のトマト幼苗の茎 (胚軸) を切断し、dsRNA 水溶液に胚軸を浸すことで、dsRNA を吸収すると同時に発根を促すという手法である。本手法は、本研究課題開始前から採用している手法であり、dsRNA が道管に取り込まれていることを Cy3 標識した dsRNA の蛍光顕微鏡観察にて確認している。ただ本手法では確実に

dsRNA を植物個体に導入することが可能である一方で、胚軸切断後に根が再生するまでに1週間程度要することや、dsRNA の導入が1回のみであるという欠点がある。そこで、本研究では、この欠点を解消すべく異なる手法を検討した。まず、1週齢のトマト幼苗の根を dsRNA 溶液に浸す手法を試みた。本手法でも Cy3 蛍光を茎（胚軸）の道管で観察することができた（図 3A）。すなわち、胚軸を切断することなく根から dsRNA を導入することが可能である。本手法では、胚軸を切断するよりも植物体にダメージが少なく、何度でも dsRNA を植物体に導入することが可能である。次に、トマト植物体から第1本葉を切り取り葉柄の切断面から dsRNA を吸収させる方法を試みた。dsRNA 吸収部位の上の第2本葉の葉柄および下部の茎の道管で dsRNA の存在を示す Cy3 のオレンジ蛍光を観察した（図 3B）。本手法も、植物体への損傷が少なく何度でも植物体へ dsRNA を導入することができる。また、幼苗の時点で根からの dsRNA を吸収させ、植物体が大きく成長してからは葉柄もしくは側枝から dsRNA を吸収させることも可能と考えられる。

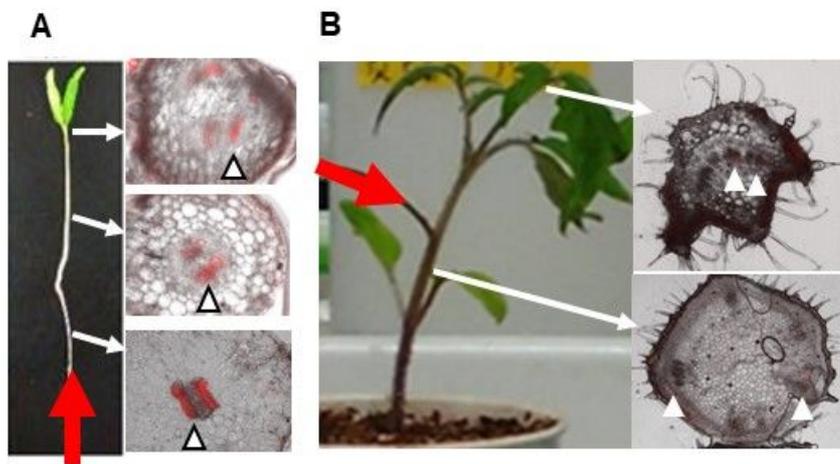


図3 トマト植物体内への蛍光標識dsRNAの導入
 蛍光標識したdsRNAの根(A)および葉柄(B)からの植物体への導入。(A)1週齢のトマト幼苗を10 ng/ μ L Cy3標識dsRNA溶液に浸し1日後に白矢印の地点で胚軸の切片を作成し、Cy3のオレンジ蛍光(矢頭)を観察した。(B)3週齢のトマトの第一本葉を切断、葉柄を約17 μ g/500 μ L Cy3標識dsRNA溶液に浸し、3日後に白矢印の部位から切片を作成しCy3蛍光(矢頭)を観察した。

引用文献

McLoughlin AG, Wytinck N, Walker PL, Girard IJ, Rashid KY, de Kievit T, Fernando WGD, Whyard S, Belmonte MF. (2018) Identification and application of exogenous dsRNA confers plant protection against *Sclerotinia sclerotiorum* and *Botrytis cinerea*. *Sci Rep* 8:7320.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 4件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Bensoussan Nicolas, Dixit Sameer, Tabara Midori, Letwin David, Milojevic Maja, Antonacci Michele, Jin Pengyu, Arai Yuka, Bruinsma Kristie, Suzuki Takeshi, Fukuhara Toshiyuki, Zhurov Vladimir, Geibel Sven, Nauen Ralf, Grbic Miodrag, Grbic Vojislava	4. 巻 10
2. 論文標題 Environmental RNA interference in two-spotted spider mite, Tetranychus urticae, reveals dsRNA processing requirements for efficient RNAi response	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 19126
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-75682-6	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Tabara Midori, Koiwa Hisashi, Suzuki Nobuhiro, Fukuhara Toshiyuki	4. 巻 146
2. 論文標題 Biochemical characterization of the dicing activity of Dicer-like 2 in the model filamentous fungus Neurospora crassa	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Fungal Genetics and Biology	6. 最初と最後の頁 103488 ~ 103488
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1016/j.fgb.2020.103488	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Kuriyama Kazunori, Tabara Midori, Moriyama Hiromitsu, Kanazawa Akira, Koiwa Hisashi, Takahashi Hideki, Fukuhara Toshiyuki	4. 巻 103
2. 論文標題 Disturbance of floral color pattern by activation of an endogenous pararetrovirus, petunia vein clearing virus, in aged petunia plants	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 The Plant Journal	6. 最初と最後の頁 497-511
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/tpj.14728	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する
1. 著者名 Kuriyama Kazunori, Tabara Midori, Moriyama Hiromitsu, Takahashi Hideki, Fukuhara Toshiyuki	4. 巻 39
2. 論文標題 The essential role of the quasi-long terminal repeat sequence for replication and gene expression of an endogenous pararetrovirus, petunia vein clearing virus	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Plant Biotechnology	6. 最初と最後の頁 405 ~ 414
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.5511/plantbiotechnology.22.1017a	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Tabara Midori, Yamanashi Riho, Kuriyama Kazunori, Koiwa Hisashi, Fukuhara Toshiyuki	4. 巻 111
2. 論文標題 The dicing activity of DCL3 and DCL4 is negatively affected by flavonoids	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Plant Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 107 ~ 116
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s11103-022-01314-4	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計1件 (うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件)

1. 発表者名 飯田航史、笠原博幸、森山裕充、福原敏行
2. 発表標題 二本鎖RNA直接導入法によるシロイヌナズナの遺伝子発現調節法の検討
3. 学会等名 日本植物学会第85回大会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

東京農工大学グローバルイノベーション研究院 福原チーム https://www.tuat-global.jp/food/2020/team-2020/3972/
--

6. 研究組織		
氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
米国	Texas A&M University			
カナダ	The University of Western Ontario			