

令和 4 年 6 月 3 日現在

機関番号：34315

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2019～2021

課題番号：19K23674

研究課題名(和文)ダイズにおける自然発生RNA干渉の器官特異性決定メカニズムの解明

研究課題名(英文)The determination mechanism of organ-specificity of natural occurring RNA interference in soybean

研究代表者

田原 緑 (Tabara, Midori)

立命館大学・立命館グローバル・イノベーション研究機構・助教

研究者番号：20849525

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,200,000円

研究成果の概要(和文)：ダイズの黄色い品種の種皮ではアントシアニンが蓄積していない。これはフラボノイド合成の鍵酵素Chalcone synthase遺伝子が、自然発生したRNA干渉によって抑制されているからである。しかしこのRNA干渉は植物体全体で起きているのではなく種皮特異的に起きている。この特異性について、RNA干渉においてsiRNA生成に関与するダイサータンパク質DCL4に着目して解析したところ、RNA干渉が起きているダイズの種皮ではDCL4の活性が検出される一方、葉では検出されないことが明らかになった。フラボノイド自身がin vitroにおいてダイサータンパク質を阻害する活性を持っていることが明らかになった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は古くから現象としては報告のあるフラボノイドに対する自然発生型RNA干渉に対して、RNA干渉の生化学的解析から切り込んだ初めての研究である。この現象はダイズだけでなく花の色といった重要形質を決定づけるものであり、重要形質の安定化に資する情報を提供する。フラボノイドとRNA干渉は草食生物に対する抵抗性やウイルス抵抗性に関与することから本研究はさまざまな生物間相互作用にも影響することが示唆される。

研究成果の概要(英文)：Anthocyanin is not accumulated in seed coat of yellow soybean cultivar. It was resulted from natural-occurring RNAi against chalcone synthase gene, the key enzyme of flavonoid synthesis. However, RNAi occurs systematically, only occurs in seed coat. Focusing on DCL4 which produces siRNA, this organ-specific manner was investigated. DCL4 enzymatic activity could be detected from seed coats, not from leaves. in vitro assay system showed that flavonoid has an inhibit activity against DCL4.

研究分野：植物RNA生物学

キーワード：ダイズ RNA干渉 アントシアニン フラボノイド 生化学

1. 研究開始当初の背景

世界的な重要作物であるダイズは黄色い種皮を持つ品種が多く生産消費されている。この品種は、黒い種皮を持つ野生型品種が、栽培化の過程で色素アントシアニン合成の鍵酵素であるカルコン合成酵素(CHS)遺伝子の重複による**自然発生型 RNA 干渉**が原因である。これによりダイズの豆では種皮全体あるいは一部が黄色

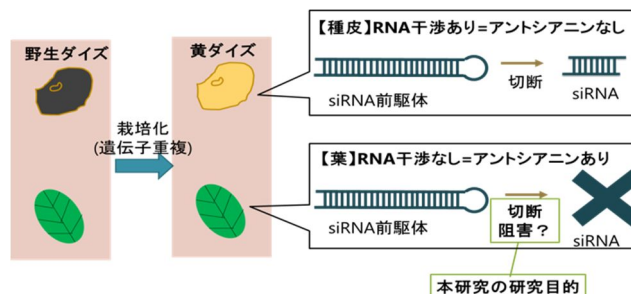


図1 黄ダイズにおける組織特異的なRNA干渉

になる『色抜け』が起こっている(図1)。このためダイズの種皮ではCHSのmRNAは検出されず、RNA干渉を誘導する小分子RNA(siRNA)が検出される。このように種皮の『色抜け』がCHS遺伝子のRNA干渉によることは明らかになっているが、『色抜け』品種でも植物体全身でRNA干渉が起こるわけではなく、葉等の他の器官ではCHS遺伝子が発現し、アントシアニンやイソフラボンが合成・蓄積される。このように同じゲノムを持つ葉ではRNA干渉が誘導されないが『なぜ種皮のみで(器官特異的に)RNA干渉が起こるのか』という「問い」の答えは得られていない。

2. 研究の目的

【目的】ダイズの器官特異的なRNA干渉が**ダイサータンパク質DCL3, DCL4の生化学的制御**に起因するとの仮説を立てた(図1)。**自然発生型RNA干渉の器官特異性決定メカニズム**を明らかにする。

3. 研究の方法

申請者独自の手法であるDCL3, DCL4活性(小分子RNA生成活性)検定法を用いる。ダイズの葉、種皮を磨砕しタンパク質粗抽出液を調製する。これに基質となる放射性ラベルしたdsRNAを添加し反応させ、活性を定量する(図2)。

シロイヌナズナの幼苗およびダイズ種皮からそれぞれ活性型DCL3, DCL4を抽出し、ダイズ葉の抽出物を添加することによって阻害物同定実験を行う。ダイズの葉の抽出物を(a)分子量に基づいたカラム精製(b)熱処理(c)化学処理を行うことによって抽出物を変化させ、阻害物の性質を解析する。

4. 研究成果

RNA干渉が起きている黄色い種皮をもつ品種「エンレイ」、RNA干渉が起きている黒い種皮を持つ品種「丹波黒」を用いて解析を行ったところ、エンレイの種皮ではDCL4の活性が検出されるにも関わらず、葉や丹波黒の種皮では活性が検出されなかった。CHSに対するRNA干渉が起きている器官とDCL4によるsiRNAの生成活性の検出に相関があった。

さらにダイズ葉の抽出液について解析を行ったところ、葉にはDCL3, DCL4両方を阻害するタンパク質と、DCL4のみを阻害する熱安定性の低分子化合物が存在していることが示唆された。

特に低分子化合物について、今回のRNA干渉によって制御されているフラボノイドの関与しているのではないかと仮説を立てた。シロイヌナズナから抽出した活性型DCL3, DCL4 にフラボノイドを添加したところ、いくつかのフラボノイドがDCL3, DCL4の活性を阻害することが示唆された。特に7,4'-dihydroxyflavoneはDCL4を特異的に阻害した(図2)。

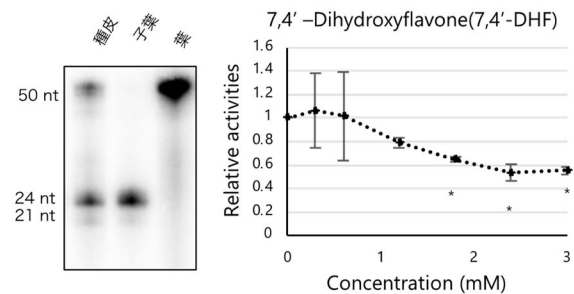


図2 フラボノイドは小分子RNA生成活性に影響を及ぼす(論文改訂中)(左)ダイズの葉ではsmall RNA生成活性は検出されない(右)フラボノイドはin vitroで小分子生成は阻害される

このことからダイズのRNA干渉の器官特異性にはDCL4の活性が関与していることが示唆され、RNA干渉によって制御されるフラボノイドがRNA干渉活性に影響し、新たな遺伝子調節機構の存在を示唆した。

【本研究の位置付け・インパクト】

自然発生型RNA干渉についての研究はRNAの定量を主とした分子生物学的解析のみにとどまっていた。本課題はこの現象に生化学的に切り込む初めての研究であり、この謎に対してフラボノイドとDCL4の生化学的相互作用を示唆するこれまでの先行研究とは一線を画した新しい知見を提供した。

種皮特異的な自然発生型RNA干渉はダイズのみのものであるが、ペチュニアやダリアの2色咲きも同様の器官(花弁)特異的RNA干渉が花弁の一部領域特異的に誘導された例であり園芸品種として重要な形質を決定づけている。本研究の研究成果は、有用な農業形質を生み出すRNA干渉の器官・組織特異的発生機構の解明結果としてダイズのみならず花弁の育種に資する情報を提供する。

これまでの自然発生型RNA干渉の報告は全てアントシアニン合成に関与する遺伝子のみだが、これは単に表現型として見だしやすいことが一因と予想される。しかしゲノムサイズが増大した植物では表現型として我々が認識できずともRNA干渉によって制御されている遺伝子が潜在的に多く存在している可能性がある。一方で本研究成果はフラボノイド自身の性質からRNA干渉の標的となりやすい可能性を示唆する結果でもある。本研究がゲノム増大の中で発生したRNA干渉解析のモデルとなり、栽培化や進化の過程での遺伝子重複とその発現調節機構の全貌の解明へと展開することが期待される。

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 4件）

1. 著者名 Tabara Midori, Nagashima Yukihiro, He Kai, Qian Xiaoning, Crosby Kevin M., Jifon John, Jayaprakasha G.K., Patil Bhimanagouda, Koiwa Hisashi, Takahashi Hideki, Fukuhara Toshiyuki	4. 巻 293
2. 論文標題 Frequent asymptomatic infection with tobacco ringspot virus on melon fruit	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Virus Research	6. 最初と最後の頁 198266 ~ 198266
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.virusres.2020.198266	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 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） 10.1101/2020.05.10.087429	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 Aulia Annisa, Tabara Midori, Telengech Paul, Fukuhara Toshiyuki, Suzuki Nobuhiro	4. 巻 1
2. 論文標題 Dicer monitoring in a model filamentous fungus host, Cryphonectria parasitica	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Current Research in Virological Science	6. 最初と最後の頁 100001 ~ 100001
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1016/j.crviro.2020.100001	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 -
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, Kanazawa Akira, Koiwa Hisashi, Takahashi Hideki, Fukuhara Toshiyuki	4. 巻 -
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 -
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

[学会発表] 計7件(うち招待講演 0件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 田原 緑、小岩 尚志、高橋英樹、福原敏行
2. 発表標題 米国におけるメロン果実へのTobacco ringspot virusの不顕性感染
3. 学会等名 第9回植物RNA研究ネットワークシンポジウム
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 田原緑
2. 発表標題 Tobacco ringspot virusのメロン果実への不顕性感染とその解析
3. 学会等名 ウイルス学若手研究集会2020
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 田原緑、福原敏行
2. 発表標題 植物のダイサータンパク質の生化学的特徴および他の真核生物との比較
3. 学会等名 第62回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 田原緑、浦口晋平、高橋英樹、福原敏行
2. 発表標題 ハクサンハタザオにおけるキュウリモザイクウイルス不顕性感染と環境ストレス耐性の関係
3. 学会等名 第61回植物生理学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 田原緑、福原敏行
2. 発表標題 ダイズにおける小分子 RNA 生成活性の解析
3. 学会等名 2021年度植物RNA研究ネットワークシンポジウム
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 山梨里歩、栗山和典、田原緑、福原敏行
2. 発表標題 ダイズで起こるRNA干渉とダイサー活性の組織特異性の関係
3. 学会等名 RNAフロンティアミーティング2021
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山梨里歩、栗山和典、田原緑、森山裕充、福原敏行
2. 発表標題 ダイズ黄色種皮特異的なRNA干渉とダイサー活性の関係
3. 学会等名 第63回日本植物生理学会
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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			