

機関番号 : 14301
 研究種目 : 基盤研究 (B)
 研究期間 : 2008~2010
 課題番号 : 20380020
 研究課題名 (和文) ウイロイドに隠された園芸学的に重要な高度機能性 RNA 配列の探索
 研究課題名 (英文) Determination of functional sequences available for horticulture in viroid nucleotide
 研究代表者 細川宗孝 (HOSOKAWA MUNETAKA)
 京都大学・農学研究科・准教授
 研究者番号 : 40301246

研究成果の概要 (和文) : CSVd の全長あるいは部分配列を付加配列につなぎ、付加配列の長距離移行性を調べた。CSVd の一部の配列を付けた付加配列が長距離移行性を持ったことから、CSVd の配列には RNA を長距離移行させる能力があるものと推定された。本事実を確認するため、同様の配列を過剰発現するタバコの組み換え体を CSVd の部分配列シリーズについて作成した。全長配列の CSVd を持つタバコ組み換え体 (*Nicotiana tabacum*) に *Nicotiana benthamiana* の穂木を接ぎ木し付加配列の長距離移行性を調べたが、長距離移行は認められなかった。他の配列については現在も実験を継続中である。

また、CSVd 配列には 35S プロモーターの活性を増強させる機能があることが示唆された。さらには CSVd が持つと予想される RNA を鋳型にした RNA の転写する能力がタバコの組み換え体で確認されたことから、mRNA の植物体内での増殖が可能である可能性が考えられた。

研究成果の概要 (英文) : The full length of CSVd or its partial sequence was connected in additional sequences, the long-distance transmissibility of additional sequences were examined. Since the additional sequences which were added with the sequence of a partial CSVd had a long-distance transferability, it was presumed that there is a capability in the sequence of CSVd for transferring the RNA for a long distance.

In order to confirm this fact, a tobacco recombinant which excessively develops similar sequences was created regarding the partial sequence series of CSVd. Although a section of *Nicotiana benthamiana* was grafted in the tobacco recombinant (*Nicotiana tabacum*) with CSVd of full-length sequences and the long-distance transferability of addition sequences was examined, a long-distance transferability was not found. The examinations of other sequences are still ongoing.

Moreover, it was indicated that CSVd sequences have a function for reinforcing 35S promoter's activity. Furthermore, since the ability for transcribing RNA using the template of mRNA which CSVd is expected to have was confirmed in the recombinant tobacco, it is thought that the mRNA multiplication in a plant is possible.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	11,400,000	3,420,000	14,820,000
2009 年度	2,000,000	600,000	2,600,000
2010 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
総計	15,000,000	4,500,000	19,500,000

研究分野 : 農学

科研費の分科・細目 : 園芸・造園学

キーワード : ウイロイド・キク・機能性 RNA・プロモーター・長距離移行性

1. 研究開始当初の背景

超微小茎頂分裂組織培養法を用いて様々なキク品種からウイロイドの除去が可能となり、両ウイロイドともに3%程度の割合でキク植物体から除去することができた。これらのウイロイド除去個体を栽培したところ、品種の中に CSVd の除去によって開花のための日長反応性が大きく異なるものを見いだした。つまり、本品種では CSVd がキクの開花のための日長反応性を攪乱し四季咲き性としていたのである。われわれは「コッホの三原則」を満たすべくさらなる研究を行い、本品種における CSVd の感染と開花のための日長反応性の攪乱との関連を実証した。つまり、われわれがこれまでに見ていた品種特性は CSVd との共存体によって現れるものであったのだ。以上の研究結果から申請者は単なる病原体としてではなく、ウイロイドを機能性 RNA の集合体としてとらえ、園芸学上意味のある機能性 RNA をウイロイド配列の中から探すことの重要性を確信した。

2. 研究の目的

ウイロイドには重要な園芸植物で深刻な病気を引き起こすものが多いため、園芸学の分野では主に除去や防除に関する研究が行われている (Barba ら, 2003)。しかし、ウイロイドの持つ機能性を直接園芸的に利用することができないかと考えた。そこで、ウイロイドの長距離移行能に着目し、任意の非移行性の mRNA にウイロイド配列を付加すれば、それらに長距離移行能をもたせることができるという仮説をたてた。

この仮説が実証されれば、新たな園芸技術の開発が可能となる。目的の mRNA にウイロイド配列を付加した RNA を発現する形質転換体を台木として、野生型の穂木を接ぎ木すれば、ウイロイド配列によって mRNA は穂木へ長距離移行し、穂木の形質転換をすることなく望む形質を発現させることができると考えられる。

このようにウイロイドを長距離移行ベクターとして用いる方法は、ウイロイドの宿主範囲内で汎用性が高いこと、ウイルスベクターと比べてはるかに単純な構造のため扱いやすいことがメリットとして考えられる。更に、従来の形質転換技術と比較すると、穂木に組み換え遺伝子が含まれないため、花粉や種子の飛散による遺伝子汚染のリスクを激減させることができる。

ウイロイドベクターを実用化するためには、多くのステップが必要であると考えられる。まず、mRNA を付加するためには本来環状 RNA であるウイロイドを直鎖状にする必要がある。ウイロイドの長距離移行に関しては数多くの研究がなされているが (Ding・

Itaya, 2007)、直鎖状のウイロイド配列の長距離移行性に焦点を当てた研究はまだ報告されていない。さらに、ウイロイド配列によって病徴が出ないかどうか、移行した mRNA によって形質が十分に発現するかどうか、等を確認する必要がある。

そこで本研究では、ウイロイドベクター実用化のための第一歩として、ウイロイドの全長あるいは部分配列を直鎖状にした RNA が長距離移行能を持つかどうかを調査した。二量体以上の直鎖状ウイロイドは、仮に非宿主体内であっても環状の単量体 (つまりウイロイドそのもの) になる可能性があるため (Daròs・Flores, 2004 ; Gómez・Pallás, 2006)、単量体あるいは部分配列を直鎖状にしたものを扱った。今回はウイロイドのモデルとして、Pospiviroid 科に属するキクわい化ウイロイド (*Chrysanthemum Stunt Viroid*, CSVd) を用いた。CSVd は宿主範囲が広く、園芸的に重要なキク科、ナス科、ウリ科植物等を宿主とするので (Bouwen, 2004)、将来的な応用が期待できる。

また、核増殖型ウイロイドには植物の DNA 依存 RNA ポリメラーゼを利用して自己を増殖させるためのポロメラーゼ結合配列があると予想される。この機能を想定すると、核増殖型のウイロイドにはプロモーター活性があることが予測される。さらに、RNA を鋳型にして RNA を増殖させる機能を外來 RNA に付与することも出来るかも知れない。

本科学研究費では以上の2点に注目し、その可能性を追求した。

3. 研究の方法

(1) アグロインフィルトレーション法による CSVd 断片の長距離移行

CSVd に感染したキク (*Dendranthema grandiflorum*) ‘ピアト’の total RNA から、RT 反応および2段階の PCR により CSVd の全長あるいは部分配列の cDNA に attB1 および attB2 が付加された配列を増幅した。1%アガロース電気泳動を行いシングルバンドを確認した後、未泳動の PCR 産物をフェノール抽出およびエタノール沈殿によって精製し、BP Clonase II (Invitrogen) を用いて pDONR221 ベクターにクローニングした。全てのインサートでシングルバンドがみられたためゲル抽出は行わず、PCR 産物を直接用いた。精製した pDONR221 と pGWB ベクターを LR Clonase II で反応させ、DONR221 のインサートを pGWB ベクターに転移させた。抽出プラスミドをエレクトロポレーション法によってアグロバクテリウム (*Agrobacterium tumefaciens*) EHA105 系統に組み込んだ。

なお、pGWB2 でのコントロールとして

pGWB2: GUS を, pGWB5 でのコントロールとして pEC: GFP を作成した.

共通の植物材料として, *Nicotiana benthamiana* を供試した. 植物はすべて, 昼白色および昼光色蛍光灯の混合照明による約 $35 \mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, 16 時間日長下で栽培した. 温度は pGWB2 を接種したものの一部のみ 25°C , その他は 22.5°C とした. 発芽後 5~7 週目の本葉 7, 8 枚程度が展開した植物体にインフィルトレーションを行った. 上で作出したベクターが導入されたアグロバクテリウムを, カナマイシン, ハイグロマイシンおよびリファンピシンを各 50 ppm 含む液体 LB 培地 3 mL に接種し, 28°C で約 24 時間振とう培養した. 培養液を 1.5 mL エッペンドルフチューブに移し, 室温, 13,000 rpm で 2 分間遠心した. デカントで上清を除去し, インフィルトレーションバッファー (10mM MES および 10mM MgCl_2 を含む Milli Q 水を pH5.5 に調製し, オートクレーブしたもの) を加えてボルテックスし, 菌を再懸濁した. 再び室温, 13,000 rpm で 2 分間遠心した. 上清を除去し, 再びバッファーを加えてボルテックスして再懸濁した. 分光光度計で濃度を測定し, OD_{600} が 0.3 になるよう調整した. これにアセトシリンゴンを終濃度 0.2 mM となるよう加え, 室温で 3~5 時間インキュベートした. 針を装着していないツベルクリン用 1 mL プラスチックシリンジ (TERUMO) にアグロ懸濁液を適量吸入し, 植物体の葉の裏面にシリンジの先を軽く当てて表側から指で支えた状態で, 押子を押してアグロ懸濁液を葉の内部に注入した. 接種葉 1 枚につき 3-8 カ所場所を変えて注入を行い, 葉全体に懸濁液が浸潤するようにした. 接種葉はソース葉としたいので, なるべく低い位置にあつて萎れていない本葉とし, サンプルング部位とは少なくとも 5 節間以上離れた.

(2) 接ぎ木による CSVd 断片の長距離移行

タバコ (*Nicotiana tabacum*) 'Samsun' に上で作成した pGWB2 ベクターを組み込んだ形質転換体を作成した. 形質転換はアグロバクテリウム法で行い, タバコのリーフディスクをアグロバクテリウムと共存培養して遺伝子導入を行った. カルベニシリンによってアグロバクテリウムを除去した後, 植物体を再生させて形質転換個体を得た. 再生植物体から簡易 CTAB 法により DNA を抽出し, NPTII 遺伝子をターゲットとした PCR で挿入遺伝子の有無を確認した. ここまでを愛知県総合農業試験場で行い, 遺伝子挿入が確認された個体を譲り受けて以降の実験に供試した. 接ぎ木を行う前に, 形質転換体が直鎖状ウィロイド配列を発現していることを確認した. 形質転換体から 100 mg 程度の葉片を採取し, total RNA を抽出した. RT 反応

のテンプレートとする RNA 量を 500 ng に揃えて RT-PCR を行い, 1%アガロースゲル電気泳動によってバンドの有無および長さを確認した. 直鎖状ウィロイド配列の発現が確認された形質転換体を台木として, 本葉を 5,6 枚展開した 3 週齢の *N.benthamiana* を割り接ぎにより接ぎ木した. 台木には展開葉を 4,5 枚もつ個体を選び, 展開第 2 葉より上部を切除して接ぎ木に用いた. *N.benthamiana* は展開第 3 葉より上部を穂木として用いた. 穂木が再び成長を始めたものを活着と判断し, 接ぎ木から 4 週間後に穂木の展開葉 2, 3 枚を含む頂芽をサンプリングし, total RNA を抽出した. RT-PCR を行い, 1%アガロースゲル電気泳動によってバンドの有無および長さを確認した. なお, RT のプライマーには Oligo dT を, PCR のプライマーには inner-F · pGWB2-R を用いた.

(3) CSVd のプロモーター活性

CSVd に感染したキクからの全 RNA の抽出は, RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) を用い, 添付のプロトコールに従って抽出した. CSVd の RNA を含むキクの全 RNA を用い, CSVd の全配列および半分の配列を増幅した. cDNA の作出は, ReverTra Ace- α (Toyobo) を使用し, 全配列には 5'側末端に制限酵素 *Xba*I 認識配列を含むプライマー SF1848 (5'-TCTAGAGGGAACAAAACCTAAGGTTCC-3') を, 半分の配列には *Xba*I 認識配列を含むプライマー SF1849 (5'-TCTAGAACCCTGTTTATTAGGATTACTCC-3') を用いた. 得られたそれぞれの cDNA を鋳型とし, KOD-Plus (Toyobo) により DNA を増幅した. プライマーとして, それぞれの cDNA 合成に用いたプライマーに加え, *Xba*I 認識配列を含むプライマー SF1847 (5'-TCTAGATCGGGACTTACTTGTGTGTTCC-3') を加えた. PCR は, 94°C 2 分後に, 94°C 30 秒, 55°C 20 秒, 68°C 30 秒を 35 回繰り返すことにより行った. 得られた増幅断片を, Zero Blunt® PCR Cloning Kit (Invitrogen) を用いてクローニングした. 増幅断片を含むプラスミドおよびバイナリーベクター pBI121 を *Xba*I で消化した後, Ligation high (Toyobo) を用いてライゲーションを行った. 本研究では, 35S プロモーターの 3'側に, CSVd 配列の全長がセンスの向きで挿入されているベクター pCSa とアンチセンスの向きで挿入されているベクター pCSa_{rev}, および半長がセンスの向きで挿入されているベクター pCSh とアンチセンスの向きで挿入されているベクター pCSh_{rev} を作出した. 得られたバイナリーベクターおよび対照として用いる pBI121 を *Rhizobium radiobacter* (系統 EHA105) に形質転換した. アグロバクテリウム法を用いてタバコ (品種 'Samsun') に遺伝子導入を行った. 無菌播種

したタバコ本葉を 5 mm 角に切断した後、一晚培養し遠心洗浄した *R. radiobacter* 液に浸した。共存培地 (MS 培地, 3% sucrose, 0.1 mg/L IAA, 1.0 mg/L BA) で 2 日間共存培養した後、選抜培地 (共存培地, 100 mg/L kanamycin) で 2 週間おきに培地を換えながら培養を継続した。抗生物質を含む培地で得られたシュートを発根培地 (1/2MS, 100 mg/L kanamycin) に移した。発根個体の葉から簡易 CTAB 法により抽出した DNA を用い 35S プロモーター配列を増幅する PCR により遺伝子の導入を確認した。20 mg の組換えタバコの葉片を 380 μ L Extraction buffer (50 mM リン酸二水素ナトリウム pH8.0, 10 mM EDTA, 0.1% トリトン X-100, 0.1% ラウロイルサルコシナトリウム, 10 mM β -メルカプトエタノール) で磨砕した。80 μ L Extraction buffer に 10 μ L の磨砕液, 10 μ L の 10 mM 4-メチルウンベリフェリルグルクロニド(4-MUG)を加え 37°C で 1 時間インキュベートした。Gus 活性により, 4-MUG が蛍光を有する 4-メチルウンベリフェロン(4-MU)となる。4-MU 量は DyNA Quant 200 (Amersham)により測定した。

(4) ウイロイド配列を持つ mRNA の自己増殖の可能性

CSVd に感染したキクからの全 RNA の抽出は, RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen)を用い, 添付のプロトコールに従って抽出した。CSVd の RNA を含むキクの全 RNA を用い, CSVd の配列を増幅した。cDNA の作出は, ReverTra Ace α - α (Toyobo)を使用し, *SacI* 認識配列を含むプライマー SF1883 (5'-GTGGAGCTC

GGAACAAAACATAAGGTTCCA-3')を用いた。得られた cDNA を鋳型とし, DNA を増幅した。プライマーとして SF1883 に加え, *XbaI* と *NheI* 認識配列を含んだプライマー SF1882 (5'-GTGTCTAGA

GCTAGCTCGGACTTACTTGTGGTTC-3')を用いた。また, GFP 遺伝子は p35S-GFP Plant vector (Clontech)を鋳型とし, *NheI* 認識配列を含んだプライマー SF1884 (5'-GTGGCTAGC

ATGAGTAAAGGAGAAGAACTT-3') と SF1885

(5'-GTGGCTAGCTTATTTGTATAGTTCATCCAT-3')で増幅した。BMV polyA はプラスミド pB3G/deltaC (京都大学 海道博士から分譲)を鋳型とし, *NheI* 認識配列を含むプライマー SF1886 (5'-GTGGCTAGCGTAAATCCGGTCTAAC

AAGCT-3')及び *XbaI* 認識部位を含むプライマー SF1887

(5'-GTGTCTAGATTTTTTTTTTTTTTTTTTTT-3')で増幅した。すべての PCR 反応には KOD Plus (Toyobo)を用い, 94°C 2 分後に,

94°C 30 秒, 55°C 20 秒, 68°C 30 秒を 35 回繰り返すことにより DNA を増幅した。得られた PCR 産物は Zero Blunt pCR vector (Invitrogen)にクローニングし, CSVd 配列が挿入された pCR-CSVd, GFP 配列を挿入した pCR-GFP, polyA 配列を挿入した pCR-BpolaA を作出した。35S プロモーターの 3'側下流に, BMV polyA 配列をアンチセンスの向きで, GFP 配列をアンチセンスの向きで, CSVd 配列をセンスの向きで挿入したベクター-pCSGFP を作出した。先ず, pCR-BpolaA を *XbaI* と *NheI* で消化し, pCR-CSVd の *XbaI*, *NheI* 部位に挿入した。続いて, pCR-GFP を *NheI* 消化し, CSVd と BMV polyA の間の *NheI* 部位にアンチセンスの向きになるように挿入した。連結した断片を *XbaI* と *SacI* で切り出し, pBI121 の *XbaI*, *SacI* 部位に挿入した。

得られたバイナリーベクター-pCSGFP を *Rhizobium radiobacter* (系統 EHA105)に形質転換した。アグロバクテリウム法によりタバコ (品種 'Samsun') に以下の方法で遺伝子導入を行った。無菌播種したタバコ本葉を 5 mm 角に切断した後、一晚培養し遠心洗浄した *R. radiobacter* 液に浸した。共存培地 (MS 培地, 3% sucrose, 0.1 mg/L IAA, 1.0 mg/L BA) で 2 日間共存培養した後、選抜培地 (共存培地, 100 mg/L kanamycin) で 2 週間おきに培地を換えながら培養を継続した。抗生物質を含む培地で得られたシュートを発根培地 (1/2MS, 100 mg/L kanamycin) に移した。発根個体の葉から簡易 CTAB 法により抽出した DNA を用い 35S プロモーター配列を増幅する PCR により遺伝子の導入を確認した。遺伝子の導入が確認されたタバコ葉 100 mg から, RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen)を用いて RNA を抽出した。抽出した RNA を ReverTra Ace α - α (Toyobo)を用いて逆転写し, cDNA 作出した。逆転写反応にはプライマーとして, SF1883 又は SF1885 を用いた。cDNA を鋳型とし KOD-Dash (Toyobo)を用いて PCR 反応をおこなった。PCR 反応には, GFP 遺伝子の約 670bp を増幅する SF2476 (5'-TTCAGTGGAGTTGTCCCAATT-3') と SF2477

(5'-GCCATGTGTAATCCCAGCAGC-3')を用いた。また, 抽出した RNA を鋳型として同様に PCR 反応を行った。PCR 反応の温度条件は, 94°C 30 秒, 55°C 20 秒, 74°C 30 秒を 35 回とした。

4. 研究成果

(1) CSVd に感染したキク 'ピート' の total RNA をテンプレートにした RT 反応および 2 段階の PCR によって, 全てのインサートで明確なシングルバンドが確認された。PCR 産

物を精製後、1-2 時間 BP 反応を行い、大腸菌に組み込んだところ、全てのインサートで 10 個以上のコロニーが得られた。コロニーを 4 つ程度選んでコロニーダイレクト PCR によってインサートを確認したところ、いずれの配列においても 1 つ以上はインサート長に対応したシングルバンドが確認された。また、LR 反応を行った pGWB ベクターを組み込んだ大腸菌をテンプレートに、pGWB2-F・pGWB2-R (pGWB2) あるいは pGWB2-F・pGWB5-R (pGWB5) のプライマーセットでコロニーダイレクト PCR を行ったところ、インサートの長さに対応する位置にバンドが確認された。ただし、大腸菌が全く生えない場合もあったので、その場合は LR 反応から再試行した。多くとも再試行 2 回以内で複数のコロニーを得られた。また、PCR 産物をテンプレートとしてシーケンスを解析したところ、目的とする配列が正しく組み込まれていることが分かった (データ略)。従って、RT-PCR および GATEWAY テクノロジーを用いて目的とするベクターを構築できたと考えられる。インフィルトレーション 1 週間後に、展開第 1 葉より上部の未展開葉を含む頂芽をサンプリングした。Sepasol RNA Super G (ナカライテスク) を用いて total RNA を抽出した。RT-PCR を行い、1%アガロースゲル電気泳動によってバンドの有無および長さを確認した。RT 反応のプライマーには Oligo dT を用い、サンプルに含まれる total mRNA の cDNA を得た。PCR のプライマーには inner-F と pGWB2-R あるいは NPTII-F と Nos-T-R を用いた。前者は直鎖状ウイロイド配列を含むベクターインサートを検出し、後者はカナマイシン耐性遺伝子を検出する。頂芽から抽出した total RNA をテンプレートとして、Oligo dT による RT および Inner-F・pGWB2-R のプライマーセットで PCR を行った結果、pGWB2: S を接種したもので 22 個体中 2 個体、pGWB2: UH で 24 個体中 2 個体、pGWB2: LR で 24 個体中 2 個体バンドが検出された (第 1 表)。バンドの長さはインサートの塩基長と対応していたので、直鎖状ウイロイド配列の RNA に由来すると考えられる。また、同じ RT 産物をテンプレートに NPTII-F と Nos-T-R のプライマーセットで PCR を行った場合はバンドがみられなかったため、検出されたバンドは、接種葉で転写された直鎖状ウイロイド配列が長距離移行したものに由来すると考えられる。すなわち、直鎖状の CSVd の全長、棒状構造の上半分および左半分は *N.benthamiana* において長距離移行能をもつと考えられる。従って、CSVd が *N.benthamiana* で長距離移行するためには、棒状構造の左上の配列が重要であると考えられる。

ウイロイドの機能性には、ウイロイド RNA の高次構造、特にループ・突出部が関与していると言われている。*Potato Spindle Tuber Viroid* (PSTVd) では、計 27 個存在するループ・突出部のそれぞれに関して *N.benthamiana* における移行性あるいは複製への関与が調査されており、長距離移行に関与するループ・突出部は棒状構造の上半分に位置する 11 個であることが示されている (Zhong ら, 2008)。同様に、CSVd が *N.benthamiana* で長距離移行するためには、棒状構造の左上に存在するループ・突出部が重要であると考えられる。

今回は移行がみられた個体の割合が少なかった。比較的高い齢の植物を用いたため、インフィルトレーションによる RNA の発現量が低かったためと考えられる。また、RT-PCR を検出法としたので、検出感度よりも低い濃度の転写産物が仮にサンプルに含まれていたとしても検出できなかった可能性がある。RT-PCR よりも感度の高い検出法として nested-PCR が挙げられるが、nested-PCR ではネガコンを含めて試した全てのサンプルでバンドが検出されたため、検定には用いることができなかった (データ略)。

(2) Oligo dT をプライマーとした RT 反応および inner-F と pGWB2-R をプライマーとした PCR 反応により、接ぎ木が成功した 13 個体の全てにおいてバンドが確認された。バンドの長さはインサート配列の長さに対応していた。これより、台木として用いた形質転換体では、直鎖状ウイロイド配列の RNA が発現していると考えられた。2011 年 2 月上旬時点で活着が確認された 13 個体について検定を行ったが、RT-PCR により明確なバンドがみられた個体は存在しなかった。従って、直鎖状の CSVd はタバコに *N.benthamiana* を接ぎ木した場合、接ぎ木面を越えて長距離移行しないことが示唆された。

移行がみられなかった原因を詳しく探るために、穂木にタバコ 'Samsun' の野生型を用いて改めて同様の実験を行うとともに、*in situ* ハイブリダイゼーションによってどこで移行阻害が起こっているのかを確認する必要があると考えられる。

(3) それぞれのベクターを *Rhizobium radiobacter* に形質転換し、タバコに遺伝子導入を行った。得られた発根個体から DNA を抽出し、CSVd 遺伝子の導入を確認したところ、pCSa では 3 個体、pCSreva では 3 個体、pCSH では 4 個体、pBI121 では 3 個体の組換え体を得ることができた。それぞれの個体について GUS 活性を調査した。その結果、センスの向きで全長を挿入した pCSa では平均で 1.195 nmol(4-MU)/mg、アンチセンスの向きで全長を挿入した pCSa_{rev} では

2.300 nmol(4-MU)/mg, センスの向きで半長を挿入した pCSH では 1.308 nmol(4-MU)/mg, 対照とした pBI121 では 1.264 nmol(4-MU)/mg であった. pCSA および pCSH の GUS 活性が対照の pBI121 の GUS 活性と同等であったのに対し, pCSArev の GUS 活性は pBI121 の GUS 活性の約 2 倍で有意差も確認された. 以上の結果から, CSVd の配列にはプロモーター活性を向上させる働きがある可能性が示唆された.

(4) それぞれのベクターをアグロバクテリウムに形質転換し, タバコに遺伝子導入を行った. 得られた発根個体から DNA を抽出し, 35S プロモーターの確認したところ, 7 個体の組換え体を得ることができた.

本研究は, CSVd のゲノム RNA が有しているプロモーター活性について調査することを目的としている. 作出したベクターから転写される RNA と CSVd 配列にプロモーター活性があった場合に転写される RNA を第 1 図に示した. バイナリーベクターから植物に導入された DNA(第 1 図 A)に含まれる 35S プロモーターの働きにより, 5'側から BMV polyA のアンチセンス配列, GFP のアンチセンス配列, CSVd のセンス配列が連結した mRNA ができる (第 1 図 B). CSVd はゲノム内に相同配列を持っているため, 2 本鎖様の構造をとると考えられる(第 1 図 C). 本研究で用いたベクターのウイロイド配列にプロモーター活性があれば, 第 1 図 D に示したように CSVd 配列にポリメラーゼが結合し, 鋳型 RNA に基づいて RNA が合成されるはずである (第 1 図 D, E). その結果, CSVd の 5'上流の GFP および BMV polyA のセンス鎖 RNA が合成されると予想される (第 1 図 F). この仮説が正しければプライマー SF1883 によって合成される cDNA に加え (第 1 図 B), SF1885 を用いた逆転写反応でも cDNA が合成されるはずである(第 1 図 F). RT-PCR の結果を第 14 図に示した. SF1883 を用いて逆転写した RT-PCR では, No.1, 2, 3, 6 の個体で 35S プロモーターによって転写された GFP のアンチセンス鎖由来の PCR 産物を得ることができた. 一方, SF1885 を用いて逆転写では, No.1, 2, 6 の個体でウイロイド配列のプロモーター活性で合成された可能性のある GFP センス鎖由来のバンドが検出された. また, 抽出した RNA を鋳型にした PCR では DNA は増幅されなかった (データ未掲載). 以上の結果, CSVd 配列による RNA 転写が行われている可能性が示唆された.

第 1 表 pGWb2 を下位葉で発現させた時の, 上位葉における直鎖状ウイロイド配列検出数

コントロール(GUS)	インサート					
	S	AS	UH	LH	LR	RR
0/8	2/22	0/26	2/24	0/24	2/24	0/25

分母は処理個体数を, 分子は直鎖状ウイロイド配列が検出された個体数を表



第 1 図 予想される転写の流れ

A : 植物に組み込まれる DNA のカセットの構造, B : A の CaMV 35S プロモーターにより転写される mRNA, C : CSVd のゲノム RNA の相補配列によって 2 本鎖 RNA 様の構造を形成する, D, E : CSVd の 2 本鎖様の配列のプロモーター活性により, 宿主の DNA 依存 RNA ポリメラーゼが結合し, RNA を鋳型として RNA が合成される, F : 合成された RNA, 5'側から GFP のセンス鎖と BMV polyA 配列が連結した構造を持つ. 実線はセンス鎖, 破線はアンチセンス鎖の RNA を示す.

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 1 件)

植物防疫 2011 年 8 月掲載確定
新しいウイロイドフリーの方法としての超微小茎頂分裂組織培養法 (仮題)

細川宗孝

6. 研究組織

(1) 研究代表者

細川宗孝 (HOSOKAWA MUNETAKA)
京都大学・農学研究科・准教授
研究者番号: 40301246

(2) 研究分担者

海道真典 (KAIDO MASANORI)
京都大学・農学研究科・助教
研究者番号: 20314247
松下陽介 (MATSUSHITA YOUSUKE)

花き研究所・研究員

研究者番号: 00414655

(3) 連携研究者

()
研究者番号