

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年5月7日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究（B）

研究期間：2009～2011

課題番号：21380203

研究課題名（和文）ウイルスベクターを利用したエピジェネティック制御による革新的植物形質転換法の創造

研究課題名（英文）Nobel method to transform plants through epigenetic modifications by the cucumber mosaic virus-based vector

研究代表者

増田 税（MASUTA CHIKARA）

北海道大学・大学院農学研究院・教授

研究者番号：60281854

研究成果の概要（和文）：遺伝子のプロモーター領域をターゲットにした dsRNA よって転写型 RNA サイレンシング（TGS）を誘導できる。我々は、ペチュニアとトマトの内在性遺伝子に対する TGS をキュウリモザイクウイルス（CMV）ベクターにより誘導することに成功した。この TGS は後代植物でも確認された。CMV ベクターで人為的に DNA メチル化を植物ゲノムに誘導する技術は、エピジェネティクス制御のメカニズム解明に有益である。

研究成果の概要（英文）：Gene silencing through transcriptional repression can be induced by targeting double-stranded RNA (dsRNA) to a gene promoter. We show that heritable gene silencing can be induced by targeting dsRNA to the endogenous gene promoters in petunia and tomato plants, using the *Cucumber mosaic virus* (CMV)-based vector. This CMV-based gene silencing system provides a useful tool to artificially modify DNA methylation in plant genomes and elucidate the mechanism for epigenetic controls.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	6,200,000	1,860,000	8,060,000
2010年度	4,200,000	1,260,000	5,460,000
2011年度	4,200,000	1,260,000	5,460,000
2012年度	0	0	0
2013年度	0	0	0
総計	14,600,000	4,380,000	18,980,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：境界農業・応用分子細胞生物学

キーワード：遺伝子・染色体工学

1. 研究開始当初の背景

ジーンサイレンシング（GS）は、塩基配列特異的に遺伝子発現を抑制する現象で、細胞の分化などを制御している重要な機構である。GS は転写された RNA が分解される

PTGS と転写そのものが起きない TGS とに分類される。PTGS はウイルスなど外来遺伝子の侵入に対抗するために生物が獲得した機構であると考えられている。一方 TGS は主にゲノム中に存在するトランスポゾンな

どの転移を制御していると考えられている。TGS の詳細な機構は完全に理解されていないものの、ゲノム DNA のメチル化とそれに引き続くヒストンタンパク質の修飾が重要であることが判明している。エピジェネティック制御は、TGS を介して形質変化を誘導する現象であり、多くの生命現象に重要な役割を果たしている。エピジェネティックな現象を人工的に制御することは困難であると考えられているが、RNA によってゲノム DNA にメチル化を特異的に誘導する RNA-directed DNA methylation (RdDM) が発見され、エピジェネティック制御を解析するための手がかりが得られつつある。

我々は数年ほど前から TGS を誘導するキュウリモザイクウイルス (CMV) ベクターを開発し、RdDM を介したエピジェネティック制御によって植物の形質変化を誘導する研究を行ってきた。これまでにも他のウイルスベクター (PVX ベクターや TRV ベクター) によって外来遺伝子をターゲットにした TGS が報告されていたが、CMV ベクターの誘導効率が格段によいことが明らかになった。我々はその理由について CMV ベクターにのっている 2b 遺伝子 (2b) の力であると考えている。2b は CMV の RNA サイレンシングサプレッサー (RSS) であり、感染植物での全身移行を促進させる。我々は 2b タンパク質の生化学的性質を解析し、2b がサイレンシングの媒体である siRNA に結合することを以前に明らかにしている。さらに、2b は核に局在するタンパク質であることから 2b に siRNA を核に運ぶ役割があることも十分考えられ、本研究プロジェクトではこの可能性も含め 2b の RdDM に果たす役割について解析する計画であった。

2. 研究の目的

本研究は、内在性遺伝子のプロモーターに対して、植物ウイルスベクターを利用して転

写型ジーンサイレンシング (TGS) を誘導することを目的とする。さらには人工的に誘導したエピジェネティック制御を介してターゲット遺伝子の発現を抑制し、最終的に植物の形質変化へとつなげる革新的な植物形質転換法を開発することを目的とする。

3. 研究方法

CMV ベクター A1 と H1 に 35SPro の塩基配列を挿入し、GFP を発現する 16C タバコに接種して GFP の蛍光消失までの期間を観察する。GFP 蛍光の消失を確認した後、バイサルファイト法と ChIP 法によって DNA のメチル化とヒストンの修飾を解析する。GFP の転写量はリアルタイム PCR によって測定する。次にペチュニアのカルコンシンターゼ (CHS) 遺伝子のプロモーターをクローニングし、この配列を CMV ベクターに導入して RdDM を誘導する。バイサルファイトシーケンス法によって DNA のメチル化を確認し、ChIP 法によってヒストンの修飾を解析する。また、PVX ベクターによって同様の実験を行い、CMV ベクターと比較して RdDM 誘導効率に 2 つのウイルス間で明瞭な差があるのか確認する。さらに、後代植物の DNA についてバイサルファイトシーケンス法によりメチル化頻度を解析し、当代個体に比較してメチル化程度にどのような変化が生じているのか確認する。また、ChIP 法によってヒストンの修飾状況を解析し、DNA のメチル化とヒストン修飾が後代で維持されるのか、そしてそれらは連動するのか明らかにする。標的遺伝子の転写量はリアルタイム PCR によって測定する。必要に応じてノーザンブロット解析を行い、CMV 感染自体が DNA のメチル化やヒストン修飾に及ぼす影響について結論を得る。

4. 研究の成果

CMV ベクターに 35S promoter (35Spro) 配列を様々な長さで挿入し、GFP を発現するベンタミアーナ (16C) に感染させて転写型ジーンサイレンシング (TGS) の誘導の有無や程度を調査した。その結果、挿入断片の長さが 90 塩基以上の場合 GFP の TGS が効率的に誘導され、その TGS は自殖種子から生じた次世代植物に遺伝することを観察した。この TGS 誘導には、CMV ベクターにコードされている 2b 遺伝子の機能が重要な役割を果たすことも明らかになった。したがって、CMV ベクターはターゲット遺伝子に対する TGS 誘導に役立つものと期待される。

次に、CMV ベクターを接種した当代の 16C 植物及びその後代の植物で 35Spro のメチル化状態をバイサルファイトシーケンス法によって解析したところ、挿入配列に相当する部分のシチジン (C) に高頻度のメチル化を確認した。さらに、頻度は低いものの挿入配列の外側の部分にもメチル化が拡大していることも判明した。また、この TGS 状態の 35Spro に結合・集合しているヒストンタンパク質の修飾状態を ChIP 法によって解析したところ、ヒストン H3 の脱アセチル化および 9 番目のリジン残基 (K9) のメチル化を確認した。

これらの結果を総合して、CMV ベクターにより 35Spro 等の外来遺伝子のプロモーターをターゲットに挿入遺伝子の発現をエピジェネティック制御可能であることを立証した。また、その TGS は後代に遺伝することも明らかになった。このベクターを利用して内在性遺伝子の発現制御が可能となれば、植物の形質を改変する新規の形質転換法の開発につながるものと考えられる。

CMV ベクター (A1) にペチュニアの chalcone synthase (CHS) 遺伝子の promoter 領域を挿入した A1-CHSpro を用いて CHS 遺伝子を標的とした転写型ジーンサイレン

シング (TGS) の誘導を試みた。A1-CHSpro 接種当代では、花卉に細かな白い斑点が多数出現した。A1-CHSpro 接種当代の花弁での CHS 遺伝子の mRNA 蓄積量は A1 接種個体に比べ、大きく減少していた。この時、A1-CHSpro 接種当代では TGS の引き金となる siRNA も検出された。またバイサルファイトシーケンシング法と ChIP 法によって、A1-CHSpro 接種当代の花弁の CHS promoter 領域に、それぞれ DNA methylation と histone modification の明瞭な変化を確認した。

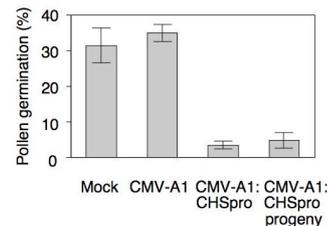


図 1. ウイルスベクターによるペチュニア CHS に対する TGS 誘導

さらに、ウイルス (A1-CHSpro) が存在しない、A1-CHSpro 接種の自殖後代の植物に生じた花卉でも白いストライプが観察され (図 1)、CHS 遺伝子の mRNA の低下、CHS promoter 領域での DNA methylation と histone modification の変化の維持が確認された。また、この花についての葯の矮小化と花粉稔性の著しい低下が観察された (図 1)。CHS の低下が花粉稔性の低下を誘発することは以前から報告されていることから、矛盾のない結果である。これらの結果から、A1 ベクターを用いることで、後代へと遺伝する TGS の誘導とこれに伴う形質変化の維持が可能であることが示された (図 1)。

前述の CHS 遺伝子の他にも CMV ベクタ

ーによってトマトの LeSPL-CNR 遺伝子に TGS を誘導することに成功した。いずれもターゲット配列に DNA methylation の増加が確認され、その配列に結合しているヒストンでは、H3K9me2 が増加し、H3Ac が減少した。さらに、ウイルス感染個体では、いずれもターゲット遺伝子の TGS の結果生じたと考えられる表現型の変化が観察できた。ウイルス感染個体から得られた後代の植物においても表現型の変化を確認することができた。しかし、親のウイルス感染植物より、その表現型変化の程度は低下しており、DNA methylation の頻度も減少していた (図 2)。したがって、このエピジェネティック制御は後代に遺伝するものの減衰していくものと思われる。いずれにしても、内在性植物遺伝子に人工的に誘導したエピジェネティック制御が後代に遺伝することを明らかにした。この新規ウイルスベクター技術は、遺伝子組換え植物を作出することなしに、ターゲットの表現型を誘導することができる新植物形質転換法の開発につながるものである。

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 24 件) ※全て査読有り

- (1) Uehara, T., Itou, K., Narabu, T. and Masuta, C. (2011). Decrease in *Globodera rostochiensis* (Woll.) (Nematode: Heteroderidae) population density on resistant tomato cultivars in greenhouse trials. *Nematological Research* 41, 41-44.
- (2) Masuta, C., Inaba, J. and Shimura, H. (2012). The 2b proteins of Cucumber mosaic virus generally have the potential to differentially induce necrosis on *Arabidopsis*. *Plant Signaling & Behavior* 7, 43-45.
- (3) Seto, Y., Hamada, S., Ito, H., Masuta, C., Matsui, H., Nabeta, K. and Matsuura, H.

(2011). Tobacco salicylic acid glucosyltransferase is active toward tuberonic acid (12-hydroxyjasmonic acid) and is induced by mechanical wounding stress. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 75, 2316-2320.

- (4) Yoshida, N., Shimura, H., Yamashita, K., Suzuki, M. and Masuta, C. (2011). Variability in the P1 gene helps to refine phylogenetic relations among Leek yellow stripe virus isolates from garlic. *Archives of Virology* 157, 147-153.
- (5) Takeshita, M., Koizumi, E., Noguchi, M., Sueda, K., Shimura, H., Ishikawa, N., Matsuura, H., Ohshima, K., Natsuaki, T., Kuwata, S., Furuya, N., Tsuchiya, K. and Masuta, C. (2011). Infection dynamics in viral spread and interference under the synergism between Cucumber mosaic virus and Turnip mosaic virus. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 25, 18-27.
- (6) Inaba, J., Kim, B.M., Shimura, H. and Masuta, C. (2011). Virus-induced necrosis Is a consequence of direct protein-protein interaction between a viral RNA-silencing suppressor and a host catalase. *Plant Physiology* 156, 2026-2036.
- (7) Otagaki, S., Kawai, M., Masuta, C. and Kanazawa, A. (2011). Size and positional effects of promoter RNA segments on virus-induced RNA-directed DNA methylation and transcriptional gene silencing. *Epigenetics* 6, 681-691.
- (8) Fujiwara, A., Inukai, T., Kim, B.M. and Masuta, C. (2011). Combinations of a host resistance gene and the CI gene of Turnip mosaic virus differentially regulate symptom expression in *Brassica rapa* cultivars. *Archives of Virology* 156, 1575-1581.

- (9) Kanazawa, A., Inaba, J., Kasai, M., Shimura, H. and Masuta, C. (2011). RNA-mediated epigenetic modifications of an endogenous gene targeted by a viral vector: a potent gene silencing system to produce a plant that does not carry a transgene but has altered traits. *Plant Signaling & Behavior* 6, 1090-1093.
- (10) Shimura, H., Pantaleo, V., Ishihara, T., Myojo, N., Inaba, J., Sueda, K., Burgyán, J. and Masuta, C. (2011). A viral satellite RNA induces yellow symptoms on tobacco by targeting a gene involved in chlorophyll biosynthesis using the RNA silencing machinery. *PLoS Pathogens* 7(5): e1002021.
- (11) Sato, C., Aikawa, K., Sugiyama, S., Nabeta, K., Masuta, C. and Matsuura, H. (2011). Distal transport of exogenously applied jasmonoyl-isoleucine with wounding stress. *Plant Cell Physiology* 52, 509-517.
- (12) Ohnishi, S., Echizenya, I., Yoshimoto, Kim, B.M., E., Inukai, T. and Masuta, C. (2011). Multigenic system controlling viral systemic infection determined by the interactions between Cucumber mosaic virus genes and QTLs of soybean cultivar. *Phytopathology* 101, 575-582.
- (13) Kim, B.M., Inaba, J. and Masuta, C. (2011). Virus induced gene silencing in *Antirrhinum majus* using the Cucumber mosaic virus vector: Functional analysis of the AINTEGUMENTA (Am-ANT) gene of *A. majus*. *Horticulture, Environment, and Biotechnology* 52, 176-182.
- (14) Kanazawa, A., Inaba, J., Shimura, H., Otagaki, S., Tsukahara, S., Matsuzawa, A., Kim, B., Goto, K., Masuta, C. (2010). Virus-mediated efficient induction of epigenetic modifications of endogenous genes with phenotypic changes in plants. *The Plant Journal* 65, 156-68.
- (15) Uehara, T., Sugiyama, S., Matsuura, H., Arie, T. and Masuta, C. (2010). Resistant and Susceptible Responses in Tomato to Cyst Nematode are Differentially Regulated by Salicylic Acid. *Plant Cell Physiology* 51, 1524-1536.
- (16) Fukuzawa, N., Ishihara, T., Itchoda, N., Tabayashi, N., Kataoka, C., Masuta, C. and Matsumura, T. (2010). Risk-managed production of bioactive recombinant proteins using a novel plant virus vector with a helper plant to complement viral systemic movement. *Plant Biotechnology Journal* 9, 38-49.
- (17) Liu, B., Watanabe, S., Uchimiya, T., Kong, F., Kanazawa, A., Xia, Z., Nagamatsu, A., Arai, M., Yamada, T., Kitamura, K., Masuta, C., Harada, K. and Abe, J. (2010). Soybean stem growth habit gene Dt1 is an orthologue of Arabidopsis TFL1. *Plant Physiology* 153, 198-210.
- (18) Fukuzawa, N., Itchoda, N., Ishihara, T., Goto, K., Masuta, C. and Matsumura, T. (2010). HC-Pro, a potyvirus RNA silencing suppressor, cancels cycling of Cucumber mosaic virus in *Nicotiana benthamiana* plants. *Virus Genes* 40, 440-446.
- (19) Sueda, K., Shimura, H., Meguro, A., Uchida T., Inaba J., and Masuta, C. (2010). The C-terminal residues of the 2b protein of Cucumber mosaic virus are important for efficient expression in *Escherichia coli* and DNA binding. *FEBS Letters* 584, 945-950.
- (20) Asaoka, R., Shimura, H., Arai, M. and Masuta, C. (2010). A progeny virus from a cucumovirus pseudorecombinant evolved to gain the ability to accumulate its RNA

silencing suppressor leading to systemic infection in tobacco. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 23, 32-339.

- (21) Maoka, T., Saito-Hayano, Y., Iwasaki, M., Yoshida, K. and Masuta, C. (2010). Mixed Infection in Tomato to Ensure Frequent Generation of A Natural Reassortant Between Two Subgroups of Cucumber mosaic virus. *Virus Genes* 40, 148-150.
- (22) Kim, B., Suehiro, N., Natsuaki, T., Inukai, T. and Masuta, C. (2010). The P3 Protein of turnip mosaic virus can alone induce HR-like cell death in *Arabidopsis thaliana* carrying TuNI. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 40, 144-152.
- (23) Seto, Y., Hamada, S., Matsuura, H., Matsushige, M., Satou, C., Takahashi, K., Masuta, C., Ito, H., Matsui, H. and Nabeta, K. (2009). Purification and cDNA cloning of a wound inducible glucosyltransferase active toward 12-hydroxy jasmonic acid. *Phytochemistry* 70, 370-379.
- (24) Matsuura, H., Aoi, A., Satou, C., Nakaya, M., Masuta, C. and Nabeta, K. (2009). Simultaneous UPLC MS/MS analysis of endogenous jasmonic acid, salicylic acid, and their related compounds. *Plant Growth Regulation* 57, 293-301.

[学会発表] (計 39 件)

- (1) Fujiwara, A. Ascorbic acid accumulation is specifically induced in incompatible interaction between *Brassica rapa* and Turnip mosaic virus. 第 2 回日韓合同シンポジウム, 2012 年 3 月 27 日, 福岡国際会議場 (福岡市)
- (2) 長嶋沙希, Rapid and convenient diagnosis of strawberry anthracnose using a method combining macroarray and microtube hybridization. 第 2 回日韓合同シンポジウム, 2012 年 3 月 27 日, 福岡国際会議場 (福岡市)

(3) 古田和義, Simultaneous detection of strawberry viruses using cDNA macroarray. 第 2 回日韓合同シンポジウム, 2012 年 3 月 27 日, 福岡国際会議場 (福岡市)

(4) Masuta, C. Virus-induced necrosis is a consequence of direct protein-protein interaction between a viral RNA silencing suppressor and a host catalase. 第 2 回日韓合同シンポジウム, 2012 年 3 月 27 日, 福岡国際会議場 (福岡市)

(5) Sueda, K. Analysis of DNA-binding ability and phosphorylation of the 2b protein of Cucumber mosaic virus. Gene silencing by small RNAs In Keystone Symposia on Molecular and Cellular Biology, 2012 年 2 月 7-12 日, Fairmont Hotel Vancouver (バンクーバー, カナダ)

(6) Kanazawa, A. RNA-mediated epigenetic modifications provide a tool to produce a plant that does not carry a transgene but has altered traits. Japan-Australia Symposium on Plant Science for Agriculture, 2012 年 1 月 19 日, 北海道大学 (札幌市)

これら 6 件の国際学会での発表の他、33 件の国内の学会発表は、報告書全体 6 ページの制限を超えるため省略する。

6. 研究組織

(1) 研究代表者

増田 税 (MASUTA CHIKARA)
北海道大学・大学院農学研究院・教授
研究者番号：60281854

(2) 研究分担者

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