

## 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30日現在

機関番号：12605

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2009～2011

課題番号：21580411

研究課題名（和文） ダイサーおよび2本鎖RNA結合タンパク質を利用したウイルス抵抗性植物の作出

研究課題名（英文） Making virus tolerant plants by using Dicer and dsRNA-binding protein genes

研究代表者 福原 敏行 (FUKUHARA TOSHIYUKI)

東京農工大学・大学院農学研究院・教授

研究者番号：90228924

研究成果の概要（和文）： シロイヌナズナのダイサー遺伝子(DCL1-4)および2本鎖RNA結合タンパク質遺伝子(DRB1-5)を過剰発現した系統について、カブモザイクウイルスを用いてウイルス接種実験を行った。その結果、DRB2、DRB3、DRB4遺伝子を過剰発現した系統では、病徴がマイルドになるといった傾向が見られた。さらに、シロイヌナズナの芽生え由来の粗抽出液を用いてダイサー活性（2本鎖RNA切断活性）を簡便に評価する実験系を確立した。

研究成果の概要（英文）： Inoculation experiments with *Turnip mosaic virus* on *Arabidopsis* plants with over-expressing Dicer-like protein (DCL1-4) or dsRNA-binding protein (DRB1-5) genes were carried out. Infected plants with over-expressing DRB2, DRB3 or DRB4 tended to exhibit mild symptom. Furthermore, a biochemical procedure for evaluating the dicer activity (dsRNA-cleaving activity) is established by using crude extracts from *Arabidopsis* seedlings.

## 交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011年度	1,300,000	390,000	1,690,000
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：境界農学・応用分子細胞生物学

キーワード：細胞機能・ウイルス・RNA干渉・2本鎖RNA・ダイサー

## 1. 研究開始当初の背景

(1) プラスミド様2本鎖RNAレプリコンについて

申請者は、1990年から20年近く一貫してイネ2本鎖RNAを中心に、宿主に病徴を及ぼさずプラスミド様の性質を示す2本鎖RNAレプリコンについて研究してきた。このようなプラスミド様2本鎖RNAは、広く生物界に分布するように思われるが、宿主に病

気を引き起こさないために農学的な重要性が低く研究されてこなかった (Fukuhara & Moriyama 2008)。このような背景から、宿主植物が、1本鎖RNAウイルスを制御できるようになった結果、2本鎖RNAレプリコンとして病気を引き起こさない共生関係ができたと考えた。

(2) ダイサーおよび2本鎖RNA結合タン

## パク質とRNAサイレンシング

そこで、2本鎖RNAに結合するタンパク質が、RNAウイルスに対する制御機構に関与すると考え、シロイヌナズナから16種の2本鎖RNA結合モチーフ(dsRBM)を含むタンパク質を検索し、12種について生化学的な解析を中心に行い、2本鎖RNA特異的結合活性、タンパク質間相互作用活性を検出した(Hiraguri et al. 2005)。この中で、4種のダイサー(DCL1-4)、2種の2本鎖RNA結合タンパク質(DRB1, DRB4), HEN1の少なくとも7種の2本鎖RNA結合タンパク質が、RNAサイレンシング機構に関与することが実験的に証明された(Vaucheret 2006)。

### (3) ダイサー(DCL)および2本鎖RNA結合タンパク質(DRB)とウイルス抵抗性(図1)

RNAウイルスは、1本鎖RNAウイルスでも、ウイルス自身がコードする複製酵素(RdRp)により複製時には必ず2本鎖RNA状態(複製中間体)をへる。通常の細胞には存在しない2本鎖RNA(ウイルス複製中間体RNA)をDCLやDRBといった2本鎖RNA切断酵素および2本鎖RNA結合タンパク質を中心としたRNAサイレンシング機構が認識し、切断されることにより、ウイルス防御機構がはたらくと考えられている(Ding & Voinnet 2007)。実際、シロイヌナズナの4種のダイサー(DCL1-4)は全て、RNAおよびDNAウイルスの感染に対する防御機構に関与し(Ding & Voinnet 2007)、特にDCL4とDCL2がウイルス感染防御機構に中心的是はたらくことが明らかにされた(Deleris et al. 2006)。さらに、我々はシロイヌナズナのカリフラワーモザイクウイルスに対する感染防御機構に、DRB4がDCL4と共にはたらくことも示した(Haas et al. 2008)。

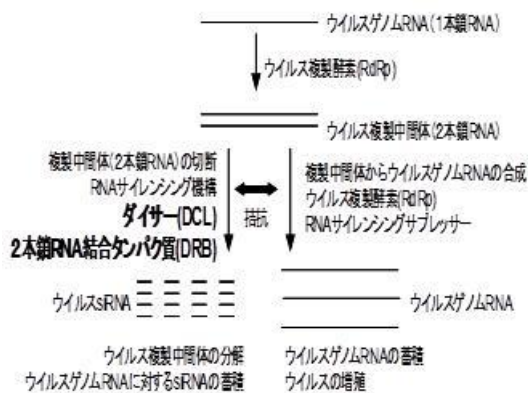


図1 RNAウイルスの増殖とウイルス感染防御機構としてのRNAサイレンシング

## 2. 研究の目的

農作物に対するウイルス感染被害に対しては、1) ウイルス抵抗性遺伝子を育種的に商業品種に導入することによりウイルス抵抗性品種を作出する、もしくは2) 弱毒ウイルスをワクチンとして用いるといった手法がとられてきた。しかしながら、これらの方法は、対象とする作物(宿主植物)とウイルスの関係が特異的で、特異的な作物とウイルスの間で非常に有効な手段であるが、広い範囲の作物種とウイルス種一般に適用できないといった短所がある。

一方、RNAサイレンシングは、植物のみならず真核生物全般に保存された生体防御機構で、ウイルス感染に対する宿主植物の防御機構と考えられている。RNAウイルスが感染すると1本鎖RNAウイルスでも必ず複製時に2本鎖RNAの状態とることから、この2本鎖RNAが引き金となって引き起こされるRNAサイレンシングは、全てのRNAウイルスに対して有効な植物が本来持つ抵抗性機構である。本研究では、植物が本来持つRNAサイレンシング機構の中心となる2本鎖RNA切断酵素ダイサー(DCL1-4)やRNaseIII(RTL2)、2本鎖RNA結合タンパク質(DRB1-5)を用いて、植物のRNAサイレンシング機構を強化することでウイルス抵抗性を強化することを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) 植物材料

モデル植物シロイヌナズナ(*Arabidopsis thaliana*)の野生型Col系統、シロイヌナズナにシロイヌナズナ由来の4種のダイサー遺伝子(DCL1-4)のC末端触媒領域、5種の2本鎖RNA結合タンパク質遺伝子(DRB1-5)およびRNaseIII様タンパク質遺伝子(RTL2)を過剰発現するよう遺伝子導入したシロイヌナズナ(本研究室で作製)10系統、およびそれらの遺伝子のT-DNAによる挿入変異系統(米国、Arabidopsis Biological Resource Centerより分譲)を使用した。

### (2) 植物ウイルス

連携研究者・夏秋知英教授により作製されたオワンクラゲ由来の緑色蛍光タンパク質(GFP)を付加したカブモザイクウイルス(TuMV-GFP、ポティウイルス属)、キュウリモザイクウイルスY系統(CMV、ククモウイルス属、東北大学・高橋英樹博士より分譲)、およびトマトモザイクウイルス(ToMV、トバモウイルス属、東京農工大学・佐々木信光博士より分譲)を使用した。

### (3) ウイルス接種実験

タバコ (*Nicotiana benthamiana*) にウイルスを接種し、病徴を発現した上位葉から得られた樹液を接種源として、播種後約 1 ヶ月のシロイヌナズナのロゼット葉 2~3 枚に、カーボランダムを用い機械接種した。ウイルス感染の成立 (病徴) および感染の広がりについては、TuMV-GFP 接種の場合、GFP 蛍光をイメージングアナライザー (LAS3000) で観察・評価した。ToMV のウイルス蓄積量は、ウエスタン法にて評価した。

### (4) シロイヌナズナのダイサー活性 (2 本鎖 RNA 切断活性) の解析

シロイヌナズナの播種後約 2 週間の芽生え由来の粗抽出液を酵素画分として用い、*in vitro* の転写反応で合成した <sup>32</sup>P-UTP により標識した 100~500 塩基対の 2 本鎖 RNA を基質に、反応をおこなった。反応物を変性ポリアクリルアミドゲル (PAGE) で展開し、21~24 塩基の小分子 RNA 生成活性を指標に、ダイサーの 2 本鎖 RNA 切断活性 RNA を評価した。

## 4. 研究成果

### (1) DRB 遺伝子過剰発現シロイヌナズナの カブモザイクウイルスに対する抵抗性

野生型のシロイヌナズナ (Co1 エコタイプ) を対照として、DCL1-4、DRB1-5 および RTL2 遺伝子の過剰発現系統、およびそれらの遺伝子の変異系統に対して、ポティウイルス属に分類されるカブモザイクウイルス (TuMV) に GFP 遺伝子を導入した組換えウイルス (TuMV-GFP) の接種を行った。実験に用いたシロイヌナズナ系統のウイルス抵抗性は、病徴とウイルスの蓄積および全身への感染の広がりをイメージングアナライザー (LAS3000) による GFP 蛍光観察により評価した。図 2 に示すように、2 本鎖 RNA 結合タンパク質 DRB2、DRB3 および DRB4 遺伝子の過剰発現系統において、病徴の軽減およびウイルス蓄積量の減少が観察された。しかし、病徴およびウイルス蓄積量共に統計的に有意と評価できるほどに顕著な差ではなく、今後の検討が必要である。

さらに、DRB1-5 遺伝子の過剰発現系統 (15 個体) について、感染の成立を基準にウイルス抵抗性を評価した。DRB2 および DRB4 過剰発現系統で感染が成立した個体の割合が低く、DRB2 および DRB4 過剰発現系統では、ウイルス耐性が付与されている可能性が示唆された (表 1)。

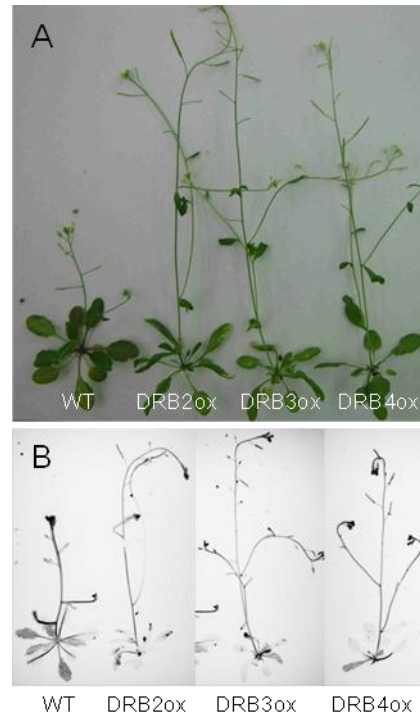


図 2. カブモザイクウイルス感染によるシロイヌナズナの病徴 (A) とウイルスの蓄積 (B)

ウイルスの蓄積は、ウイルスゲノムに組み込まれた GFP タンパク質の蛍光強度をイメージングアナライザー (LAS3000) 測定することにより解析した。B の写真で黒く見えるところは GFP の蛍光が強いこと、すなわちウイルスの蓄積が多いことを表す。DRBnox: DRB 遺伝子の過剰発現株

表 1 カブモザイクウイルス接種実験のまとめ

系統	接種個体数	感染個体数	感染率 (%)
WT	15	10	67
DRB1ox	15	8	53
DRB2ox	15	6	40
DRB3ox	15	11	73
DRB4ox	15	5	33
DRB5ox	15	11	73

DRBnox: DRB 遺伝子の過剰発現株

### (2) DRB 遺伝子過剰発現シロイヌナズナの キュウリモザイクウイルスに対する抵抗性

ポティウイルス属に分類される TuMV だけでなく、ククモウイルス属に分類されるキュウリモザイクウイルス (CMV) の Y 系統を用いてウイルス接種実験を行った。CMV の接種実験では、どのシロイヌナズナ系統も病徴が激しく、顕著なウイルス抵抗性の表現型は観察されなかった。

### (3) DRB 遺伝子過剰発現シロイヌナズナの

トマトモザイクウイルスに対する抵抗性

トマトモザイクウイルス (ToMV, トバモウイルス属) を用いて、同様なウイルス接種実験を行った。2本鎖RNA結合タンパク質 DRB2, DRB3 および DRB4 遺伝子の過剰発現系統において、病徴が軽減される傾向が見られた。特に、DRB2 および DRB3 の過剰発現系統において、ウイルス外被タンパク質を検出するウェスタン解析によりウイルス蓄積量の低下が観察された。

TuMV の接種実験の結果と合わせて考えると、DRB2, DRB3 および DRB4 遺伝子の過剰発現系統においては、複数のウイルスの感染に対して抵抗性が向上している可能性が示唆された。

#### (4) シロイヌナズナを用いたダイサー活性 (2本鎖RNA切断活性) の簡便な検出法の確立

ウイルス接種実験と並行して、シロイヌナズナの芽生え由来の粗抽出液を用いて、簡便にダイサー活性 (2本鎖RNA切断活性) を検出し、RNA干渉能を評価する実験系の確立を目指した。特にシロイヌナズナの4種類のダイサーの中でウイルス感染防御にはたらくことが知られている DCL4 の2本鎖RNA切断活性を検出することを試みた。2週齢のシロイヌナズナの芽生えから粗抽出液を作製し、500塩基対の2本鎖RNAを基質として切断反応を行った結果、野生型植物由来の粗抽出液は長鎖2本鎖RNAを切断し、21塩基と24塩基の小分子RNAを生じた (図3、レーン2)。

野生株に加えてダイサー (DCL) 遺伝子および2本鎖RNA結合タンパク質 (DRB) 遺伝子の変異体植物から同様に粗抽出液を作製し、2本鎖RNA切断活性を検証した。その結果、*dc12*, *drb1*, *drb2*, *drb3*, *drb5* 変異由来の粗抽出液は野生株と同様の2本鎖RNA切断活性を示し、21塩基および24塩基の小分子RNAを生じた (図3、レーン3, 6-8, 10)。しかし、*dc14-2* 変異体由来の粗抽出液は24塩基の小分子RNAしか生じなかったことから、21塩基の小分子RNA生成活性はDCL4によることを示唆している (図3、レーン5)。同様に、*dc13-1* 変異体由来の画分において24塩基の小分子RNAの生成活性が消失したことは、この活性がDCL3によるものである事を示唆している (図3、レーン4)。このDCL3とDCL4がそれぞれ24および21塩基の小分子RNAを生成する活性を有するという結果は、これまでの分子遺伝学的な解析から得られた結果と一致した (Vaucheret 2006)。このように、

シロイヌナズナの芽生え由来の粗抽出液を用いて、簡便にDCL3およびDCL4による2本鎖RNA切断活性を検出する実験系を確立した。

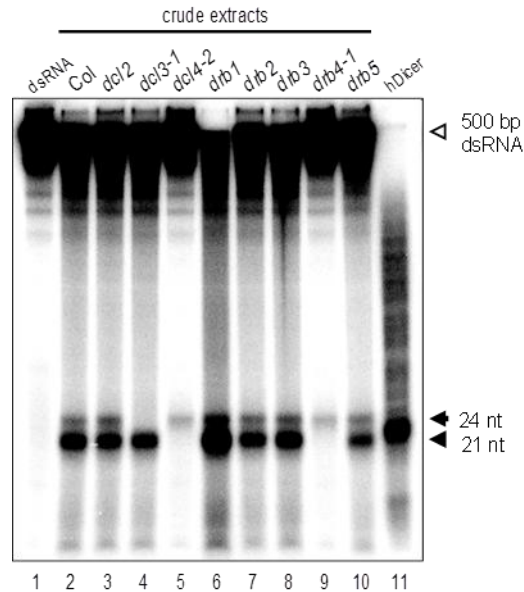


図3. シロイヌナズナ粗抽出液中の2本鎖RNA切断活性の検出

[ $\alpha$ -<sup>32</sup>P]-UTP でラベルした 500 bp (塩基対) の2本鎖RNAをシロイヌナズナの粗抽出液と27°Cで2時間反応させ、切断産物を変性PAGE (15%) で展開した。ヒトDicer (hDicer) を切断のコントロールおよび21-nt RNAのサイゼマーカーとして用いた。白矢頭; 500塩基対 2本鎖RNA、黒矢頭; 21 nt (塩基) RNA、黒矢印; 24 nt (塩基) RNA、Col, 野生型

さらに、DCL4の21塩基の小分子RNA生成活性は*drb4-1*変異体の画分で消失したことから (図3、レーン9)、DCL4の2本鎖RNA切断活性には2本鎖RNA結合タンパク質DRB4が必須であることが示唆された。この結果も、これまでの分子遺伝学的な結果を裏付ける結果となった。

本研究により、シロイヌナズナの芽生えの粗抽出液を用いて簡便にDCL3およびDCL4のダイサー (2本鎖RNA切断) 活性を検出する実験系を確立した。さらに、DCL3およびDCL4に特異的な抗体を用いた免疫沈降法により、粗抽出液からDCL3およびDCL4を部分精製し、DCL3およびDCL4の2本鎖RNA切断活性を検出することにも成功した。DCL3およびDCL4は、それぞれDNAのメチル化およびウイルス抵抗性にはたらく21塩基および24塩基の小分子RNAの生成を担うことが報告されており、今後の研究の発展が期待される。

#### (5) 参考文献

Fukuhara & Moriyama, *Encyclopedia of Virology*, pp109-116 (2008)  
Hiraguri et al., *Plant Mol Biol* 57: 173-188



(2005)  
Vaucheret, *Genes Dev* 20: 759-771 (2006)  
Ding & Voinnet, *Cell* 130: 413-426 (2007)  
Deleris *et al.*, *Science* 313: 68-71 (2006)  
Haas *et al.*, *EMBO J* 27: 2102-2112 (2008)

5. 主な発表論文等  
〔雑誌論文〕(計6件)

- ① Fukudome A., Kanaya A., Egami M., Nakazawa Y., Hiraguri A., Moriyama H. and Fukuhara T. Specific requirement of DRB4, a dsRNA-binding protein, for the in vitro dsRNA-cleaving activity of *Arabidopsis* Dicer-like 4. *RNA* 17(4): 750-760 (2011). 査読有 DOI: 10.1261/rna.2455411
- ② Kiyota E., Okada R., Kondo N., Hiraguri A., Moriyama H. and Fukuhara T. An *Arabidopsis* RNase III-like protein, AtRTL2, cleaves double-stranded RNA *in vitro*. *Journal of Plant Research* 124: 405-414 (2011). 査読有 DOI: 10.1007/s10265-010-0382-x
- ③ Okada R., Kiyota E., Sabanadzovic S., Moriyama H., Fukuhara T., Saha P., Roossinck M.J., Severin A. and Valverde R.A. Bell pepper endornavirus: molecular and biological properties and occurrence in the genus *Capsicum*. *Journal of General Virology* 92(11): 2664-2673 (2011). 査読有 DOI: 10.1099/vir.0.034686-0
- ④ Fuke K., Takeshita K., Aoki N., Fukuhara T., Egusa M., Kodama M. and Moriyama H. The presence of double-stranded RNAs in *Alternaria alternata* Japanese pear pathotype is associated with its morphological changes. *Journal of General Plant Pathology* 77: 248-252 (2011). 査読有 DOI: 10.1007/s10327-011-0315-0
- ⑤ Urayama S., Moriyama M., Aoki N., Nakazawa Y., Okada R., Kiyota E., Miki D., Shimamoto K. and Fukuhara T. Knockdown of *OsDCL2* in rice negatively affects maintenance of the endogenous dsRNA virus, *Oryza sativa endornavirus*. *Plant and Cell Physiology* 51(1): 58-67 (2010). 査読有 DOI: 10.1093/pcp/pcp167
- ⑥ Urayama S., Kato S., Suzuki Y., Aoki N., Le Minh T., Arie T., Teraoka T., Fukuhara T. and Moriyama H. Mycoviruses related to chrysovirus affect vegetative growth in the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*. *Journal of General Virology* 91(12):3085-3094 (2010). 査読有 DOI: 10.1099/vir.0.025411-0

〔学会発表〕(計16件)

- ① 福原敏行、浦山俊一、岡田亮、森山裕充、イネ内在性2本鎖RNAレプリコン(*Oryza sativa endornavirus*)の遺伝様式と宿主R

NAサイレンシング機構との関係 日本遺伝学会第83回大会シンポジウム 京都大学 2011年9月

- ② Fukudome A., Kanaya A., Egami M., Nakazawa Y., Hiraguri A., Moriyama H. and Fukuhara T. The role of dsRNA-binding protein DRB4 in the Dicer activity of DCL4 complex in *Arabidopsis thaliana*. The 16<sup>th</sup> Annual Meeting of the RNA Society 京都国際会議場 2011年6月
- ③ Fukudome A., Kanaya A., Egami M., Nakazawa Y., Hiraguri A., Moriyama H. and Fukuhara T. *in vitro* dicing activity of *Arabidopsis* Dicer-like 4 requiring a dsRNA-binding protein DRB4. International Plant RNA Workshop 2011. 理研横浜研究所 2011年6月
- ④ Takahashi T., Usui T., Fukudome A., Moriyama H. and Fukuhara T. Involvement of DRB proteins in cell-to-cell spread of silencing signal. 第34回日本分子生物学会年会 パシフィコ横浜 2011年12月
- ⑤ 長野秀昭、福留章仁、中澤悠宏、平栗章弘、森山裕充、福原敏行 シロイヌナズナのダイサー-DCL3 および DCL4 の生化学的解析、第53回日本植物生理学会年会 京都産業大学 2012年3月

〔図書〕(計3件)

- ① Fukuhara T. Endornavirus, Unassigned Genus. In Christian Tidona and Gholamreza Darai (eds) “**The Springer Index of Viruses**” Springer, pp1989-1992 (2012).
- ② Fukuhara T., Urayama S., Okada R., Kiyota E. and Moriyama H. Detection of long and short double-stranded RNAs. In Hiroaki Kodama and Atsushi Komamine (eds) “**Methods in Molecular Biology 744: RNAi and Plant Gene Function Analysis**” Humana Press, pp129-144 (2011). DOI: 10.1007/978-1-61779-123-9\_9
- ③ Fukuhara T. and Gibbs M.J. Family *Endornaviridae* In “**Virus Taxonomy: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses**”. Andrew MQ King, ed. Elsevier, pp 519-521 (2012).

6. 研究組織

(1) 研究代表者

福原 敏行 (FUKUHARA TOSHIYUKI)  
東京農工大学・大学院農学研究院・教授  
研究者番号：90228924

(2) 連携研究者

夏秋 知英 (NATSUAKI TOMOHIDE)  
宇都宮大学・農学部・教授  
研究者番号：10134264

森山 裕充 (MORIYAMA HIROMITSU)  
東京農工大学・大学院農学研究院・准教授  
研究者番号：20392673