

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6月6日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2010～2011

課題番号：22780035

研究課題名（和文）

植物 RNA ウイルスの RNA サイレンシング抑制機構及びその制御機構

研究課題名（英文）

Analysis of the mechanisms of plant viral RNA silencing suppressors

研究代表者

竹田 篤史 (TAKEDA ATSUSHI)

東京大学・大学院総合文化研究科・助教

研究者番号：60560779

研究成果の概要（和文）：RNA サイレンシングは、植物によるウイルス抵抗性機構のひとつである。一方、植物ウイルスは RNA サイレンシングによる抵抗性を回避するために、RNA サイレンシングサプレッサー(RSS)と呼ばれる遺伝子を持つ。本研究で明らかにした主な点は以下の通りである。(1)植物の DCL2, DCL4, RDR1, RDR6 が RNA サイレンシングによるウイルス抵抗性に重要なことを明らかにした。(2)siRNA 分子が細胞間移行することと、ウイルスの RSS がその移行を妨げることを明らかにした。(3) *Red clover necrotic mosaic virus* による RNA サイレンシング抑制機構について調べ、複製酵素成分の P27 と P88 が相互作用することと、その相互作用が RSS 活性に重要なことを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：RNA silencing is an anti-virus defense mechanism in plants. On the other hands, many plant viruses have RNA silencing suppressor (RSS) gene(s) to counteract RNA silencing-mediated anti-viral defense. In this study, I showed that (1) *Arabidopsis* DCL2, DCL4, RDR1, and RDR6 were important for the anti-viral defense through, (2) siRNA molecules moved from cell to cell and a viral RSS interfered the siRNA movement, and (3) *Red clover necrotic mosaic virus* (RCNMV) P27 interacted with P88 and this interaction was important for the RCNMV RSS activity.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2011年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農学・植物病理学

キーワード：植物・病原体相互作用

1. 研究開始当初の背景

RNA サイレンシングは、植物によるウイルス抵抗性機構のひとつである。しかし、その分子機構については不明な点が多かった。

一方、植物ウイルスは RNA サイレンシングによる抵抗性を回避するために、RNA サイレンシングサプレッサー(RSS)と呼ばれる遺

伝子を持つ。私は、*Red clover necrotic mosaic virus* (RCNMV)の複製酵素に RSS 活性があることを発見し、この複製酵素複合体が miRNA および siRNA の生合成を阻害することを発見した。しかし、この RSS の作用機序およびこの RSS の活性制御に関する知見は乏しかった。

真核生物には RNA サイレンシング以外にも RNA 分解機構が複数存在する。しかし、それらの機構がウイルス RNA の分解に働いているかどうかは不明であった。

2. 研究の目的

本研究の目的は、RSS の機能解析とモデル植物の遺伝子解析を通じて、RNA を標的とした植物のウイルス抵抗性機構の解明を目指すことである。

3. 研究の方法

(1) RNA サイレンシングによるウイルス抵抗性における Dicer like (DCL) 遺伝子の役割を遺伝学的に解析した。

(2) RNA サイレンシングによるウイルス抵抗性における RNA-dependent RNA polymerase (RDR) 遺伝子の役割を遺伝学的に解析した。

(3) RNA サイレンシングのシグナルは細胞間および組織間を移行することが知られていたが、その実体は不明であった。Tomato bushy stunt virus P19 RSS を利用して、RSS が RNA サイレンシングシグナルの移行に及ぼす影響を調べるとともに、シグナル分子の同定を試みた。

(4) RCNMV の複製複合体形成と RSS 活性の関連性を調べる目的で RCNMV の複製複合体を解析した。

(5) ウイルス感染時には 21, 22, 24 塩基長のウイルス RNA 由来 siRNA が生じる。このうちの 22 塩基長の siRNA の機能を予測するために、内源性 22 塩基長 miRNA の miR173 の機能解析を行った。

(6) 真核生物の主要な mRNA 分解機構である 5'-3'および 3'-5' RNA 分解経路のウイルス抵抗性における機能解析を行った。

(7) RCNMV の RSS 活性制御機構を明らかにするために、ルシフェラーゼを用いた RSS 活性測定系の構築を試みた。

4. 研究成果

(1) RSS 活性を失った TuMV クローン(AS9)を作製し、*dcl2*, *dcl3*, *dcl4* の一重、二重、三重変異体に接種実験を行った。その結果、DCL2 と DCL4 が TuMV 抵抗性に重要なことが明らかとなった (発表論文⑦)。今後、DCL2 と DCL4 の性質を詳細に調べることで、ウイルス抵抗性の増強につなげることが可能になるかもしれない。

(2) RSS 活性を失った TuMV-AS9 を、*rdr1*, *rdr2*,

rdr6 の一重、二重、三重変異体に接種した。その結果、RDR1 と RDR6 が TuMV 抵抗性に重要なことが明らかとなった (発表論文⑦)。今後、RDR1 と RDR6 の性質を詳細に調べることで、ウイルス抵抗性の増強につなげることが可能になるかもしれない。

(3) 師部特異的発現プロモーターの SUC2p 制御下で CH42 遺伝子に対する dsRNA を発現させると、サイレンシングのシグナルは周囲の葉肉細胞に広がって行く。SUC2p 制御下および葉肉細胞特異的プロモーター制御下で二本鎖の siRNA に結合する P19 RSS を発現させたところ、サイレンシングシグナルの移行が抑えられた。siRNA の打ち込み実験も合わせて、siRNA が細胞間を移行していることを明らかとした。siRNA に結合する RSS が多いことから、siRNA の移行がウイルス抵抗性に重要なことが示唆された (発表論文⑥)。今後、siRNA の移行とウイルス抵抗性の関係をより詳細に解析することで、ウイルス抵抗性の増強につなげることが可能になるかもしれない。

(4) RCNMV の複製複合体による RNA サイレンシング抑制機構について調べるために、RCNMV の複製機構について解析を行った。RCNMV の複製には複製酵素成分の P27, P88 とウイルス RNA が必要である。今回、P27 と P88 が相互作用すること (発表論文⑤)、P27 と P88 を含む複製酵素複合体が約 480 kDa の分子量を持つこと (発表論文⑤)、その中には HSP70 と HSP90 が含まれること (発表論文⑤) を明らかにした。さらに P27 と P88 の相互作用が RSS 活性に重要なことを示した (発表論文③)。最近 HSP が RNA サイレンシングに重要なことが明らかとなったことと合わせて考えると、RCNMV の複製複合体が HSP を奪うことで RNA サイレンシングを抑制していることが予想される。今後、この点について検証して行く予定である。

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 7 件)

① Makoto Hayashi, Chieko Nanba, Miyuki Saito, Maki Kondo, Atsushi Takeda, Yuichiro Watanabe and Mikio Nishimura. Loss of XRN4 Function can trigger cosuppression in a sequence-dependent manner. *Plant and Cell Physiology* 査読有 (2012), doi:10.1093/pcp/pcs078.

- ② Kazuki Motomura, Quy TN. Le, Naoyoshi Kumakura, Takashi Fukaya, Atsushi Takeda and Yuichiro Watanabe. The role of decapping proteins in the miRNA accumulation in *Arabidopsis thaliana*. **RNA Biology** 査読有 9, (2012), 1-9.
- ③ Akira Mine, Kiwamu Hyodo, Atsushi Takeda, Masanori Kaido, Kazuyuki Mise and Tetsuro Okuno. Interactions between p27 and p88 replicase proteins of *Red clover necrotic mosaic virus* play an essential role in viral RNA replication and suppression of RNA silencing via the 480-kDa viral replicase complex assembly. **Virology** 査読有 407, (2010), 213-224.
- ④ Josh T. Cuperus, Alberto Carbonell, Noah Fahlgren, Hernan Garcia-Ruiz, Russel T. Burke, Atsushi Takeda, Christopher M. Sullivan, Sunny D. Gilbert, Taiowa A. Montgomery and James C. Carrington. Unique functionality of 22-nt miRNAs in triggering RDR6-dependent siRNA biogenesis from target transcripts in *Arabidopsis*. **Nature Structural and Molecular Biology** 査読有 17, (2010), 997-1004.
- ⑤ Akira Mine, Atsushi Takeda, Takako Taniguchi, Hisaaki Taniguchi, Masanori Kaido, Kazuyuki Mise and Tetsuro Okuno. Identification and characterization of the 480 kilodalton template-specific RNA-dependent RNA polymerase complex of *Red clover necrotic mosaic virus*. **Journal of Virology** 査読有 84, (2010), 6070-6081.
- ⑥ Patrice Dunoyer, Gregory Schott, Christophe Himber, Denise Meyer, Atsushi Takeda, James C. Carrington and Olivier Voinnet. Small RNA duplexes function as mobile silencing signals between plant cells. **Science** 査読有 328, (2010), 912-916.
- ⑦ Hernan Garcia-Ruiz, Atsushi Takeda,

Elisabeth J. Chapman, Christopher M. Sullivan, Noah Fahlgren, Katherine J. Brempele and James C. Carrington. *Arabidopsis* RNA-dependent RNA polymerases and Dicer-like proteins in antiviral defense and siRNA biogenesis during *Turnip Mosaic Virus* infection. **Plant Cell** 査読有 22, (2010), 481-496.

[学会発表] (計 9 件)

- ① 熊倉直祐、竹田篤史、渡邊雄一郎、ウイルス抵抗性機構としての RNA exosome の機能解析、日本植物病理学会、2012 年 3 月、福岡
- ② Naoyoshi Kumakura, Risa Ohishi, Atsushi Takeda and Yuichiro Watanabe、The analysis of RNA exosome subunits of *Arabidopsis thaliana*、日本植物生理学会、2012 年 3 月、京都
- ③ Kazuki Motomura, Quy TN. Le, Naoyoshi Kumakura, Atsushi Takeda and Yuichiro Watanabe、Decapping proteins are involved in the accumulation of miRNA in *Arabidopsis thaliana*、日本植物生理学会、2012年3月、京都
- ④ Kazuki Motomura, Quy TN. Le, Naoyoshi Kumakura, Takashi Fukaya, Atsushi Takeda and Yuichiro Watanabe、Decapping proteins are involved in the accumulation of miRNA in *Arabidopsis thaliana*、KEYSTONE SYMPOSIA "Gene Silencing by Small RNAs"、February 2012、Vancouver, Canada
- ⑤ Naoyoshi Kumakura, Atsushi Takeda and Yuichiro Watanabe、The analysis of the substrate recognition mechanisms of RNA exosome、日本分子生物学会、2011 年 12 月、横浜
- ⑥ Kazuki Motomura, Quy TN. Le, Naoyoshi Kumakura, Atsushi Takeda and Yuichiro Watanabe、Decapping proteins are involved in miRNA accumulation and miRNA-mediated gene silencing in *Arabidopsis thaliana*. 日本分

子生物学会、2011年12月、横浜

⑦ 橋場彩有里、奥村直史、藤岡容一郎、竹田篤史、渡邊雄一郎、シロイヌナズナの RISC 構成因子の解析、日本植物学会、2011年9月、東京

⑧ 元村一基、熊倉直祐、レイティニャットクイ、深谷雄志、竹田篤史、渡邊雄一郎、シロイヌナズナのデキャッピングタンパク質は miRNA の正常な蓄積に必要である、日本植物学会、2011年9月、東京

⑨ Kazuki Motomura, Naoyoshi Kumakura, Atsushi Takeda and Yuichiro Watanabe. Decapping proteins are involved in miRNA pathway in *Arabidopsis thaliana*. International Conference on Arabidopsis Research, June 2011, Madison, USA

[図書] (計 1 件)

① 竹田 篤史、羊土社、植物の miRNA と siRNA 経路、実験医学増刊、Vol. 28、No. 10、2010、101-106

6. 研究組織

(1) 研究代表者

竹田 篤史 (TAKEDA ATSUSHI)

東京大学・大学院総合文化研究科・助教
研究者番号：60560779