

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 22 日現在

機関番号：16301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24580065

研究課題名(和文) イネにおけるRNAサイレンシング関与遺伝子とウイルス応答の解析

研究課題名(英文) Analysis of rice genes involved in RNA silencing and response to virus

研究代表者

西口 正通 (Nishiguchi, Masamichi)

愛媛大学・農学部・研究員

研究者番号：40343313

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：OsRDR1変異株についてイネマイクロアレイ解析の結果リボキシゲナーゼ等の防御遺伝子の発現が低下していた。本遺伝子,OsRDR6, OsSGS3の各変異株及びOsRDR1,OsSGS3の各過剰発現株において、ウイルス、細菌および菌類に対する感染応答を解析した。その結果各変異株においては感受性が高まり、過剰発現株においては抵抗性を示す結果が得られた。OsRecQ1およびOsRDR1の各変異株について、紫外線照射やEMS処理によるDNA損傷ストレスに対してDNA損傷特異的小分子RNAの蓄積が見られず、これらの遺伝子が関係することを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Defense genes including lipoxigenase were proven to be down-regulated in an OsRDR1 mutant by rice 44K microarray. Using rice mutants and overexpressed lines, response to infection with virus, bacterial and fungal pathogens were analyzed. All mutants of OsRDR1, OsRDR6 and OsSGS3 were found to be more sensitive to pathogen infection, respectively, than wild type while the overexpressed lines of OsRDR1 or OsSGS3 showed resistance. DNA damaging stress induced rice to produce DNA damage specific small RNAs. Both OsRDR1 and OsRecQ1 were elucidated to be involved in this small RNA biogenesis.

研究分野：分子生物資源学

キーワード：RNAサイレンシング イネ 防御 イネえそモザイクウイルス キュウリモザイクウイルス DNA損傷
小分子RNA 感染応答

1. 研究開始当初の背景

RNAサイレンシングにおけるキーとなるものは2本鎖RNAである。このことは最初線虫で明らかにされた (Fire et al., 1998) が、それ以来ショウジョウバエ等の動物、植物、菌類で証明されている。転写されたRNAが2本鎖をつくることができればRNAサイレンシングは誘導される。例えば、DNAの転写で、センス鎖とアンチセンス鎖の転写物から2本鎖が、またメチル化DNAから異常なRNAが転写され、それを認識するRNA合成酵素により、アンチセンスのRNAができる、また、1本鎖RNAウイルスでは複製時に2本鎖RNAができる、1本鎖のウイルスRNA単独でも部分的に相補性があれば2本鎖をとることができる。2本鎖RNAができると、ダイサーと呼ばれるRNA分解酵素により、21-15ヌクレオチドの短い2本鎖RNAに切断される。この短い2本鎖RNAはsiRNAと呼ばれ、RNAサイレンシングに特徴的な構造物である。これは1999年初めて植物を材料に単離された (Hamilton and Baulcombe, 1999)。ダイサーはショウジョウバエで初めて見つけれられた (Bernstein et al., 2001)。さらにsiRNAのアンチセンス鎖がRISCと呼ばれるいくつかのタンパク質からなる複合体に取り込まれ、このアンチセンスRNAはセンスRNA (mRNA) があれば結合し、mRNAが分解される。このようなサイクルが次々と起こり、効率的にRNAの分解が起こる現象がRNAサイレンシングとされる。また、siRNAは核内のDNAとも相互作用し、DNAのシトシン塩基のメチル化さらにはヒストンたんぱく質のメチル化をもたらし、染色体構造に影響し、転写阻害に導く (Gruwal and Jia, 2007)。

2. 研究の目的

本研究課題においては、イネにおけるRNAサイレンシング関与遺伝子 (RNA依存RNAポリメラーゼ1, *RDR1*, 等) の突然変異株や過剰発現株を用い、イネに感染するウイルスの感染に対する応答反応 (ウイルスの増殖・病徴) を解析する。ウイルスとして、キュウリモザイクウイルス (CMV) や菌類により伝搬されるイネえそモザイクウイルス (RNMV) を供試する。またサイレンシングの目印となる小分子RNA (siRNA等) の蓄積への影響、さらにマイクロアレイを用いたRNAサイレンシング関与遺伝子のイネ発現遺伝子への影響を検討する。またウイルスのみならず、他の病原体感染に対する影響についても明らかにする。

3. 研究の方法

(1) イネにおけるRNAサイレンシング関与遺伝子の突然変異株を選抜する。これはイネのレトロトランスポゾン *Tos17* の挿入変異株のコレクションから選抜した。供試したものはイネ

の *RDR1* (*OsRDR1*) 変異株およびイネの *SGS3* ホモログである *OsSGS3* の変異株を選抜し、それぞれのホモ接合体を用いた。また、両者を交配し、二重突然変異株を作出した。

さらに、*OsRDR1* および *OsSGS3* については、それぞれの完全長 cDNA をカリフラワーモザイクウイルスの 3'5S のプロモーターの下流に配置し、イネに形質転換した過剰発現系統を作出した。また、*OsRDR6* については *Tos17* 挿入による変異株は得られていないので、突然変異誘導剤処理により作出された、変異株 (*shl2-rol*) を供試した。一部の実験では、*OsReqQ1* の *Tos17* 挿入変異株を供試した。

(2) ウイルスの感染応答の解析のために、CMV および RNMV を用いたが、前者については、純化ウイルスを供試し、イネ葉身にカーボランダムをふりかけ、ガラスペラで直接こすりつけることにより接種した。後者については、RNMV を保持している菌を含む土壌に、イネを移植することにより、感染させた。また、他の病原体として、イネの白葉枯病細菌ならびにイネいもち菌を供試した。前者は、ペトリ皿上の培地上にコロニーから、一部を液体培養し、接種源とした。後者は、ペトリ皿上に植え付けた後、菌叢から胞子を集め、接種源とした。これらの細菌と菌は、イネの切離葉に接種し、感染反応をチェックした。また、一部の突然変異株については、DNA損傷処理による解析を行った。これには、イネ幼苗に紫外線やEMSによる処理を行い、エバンス青による染色によりイネの細胞死を観察するとともに、全量RNAならびに低分子画分RNAをさらに調製した。これらのRNAは、その後電気泳動した後、プロット解析に用いた。

4. 研究成果

(1) ウイルス感染に対する応答反応
CMV および RNMV を接種後、全量RNAを調製し、RT-PCRならびにRT-qPCRにより、ウイルスの蓄積量について検討した。*OsRDR6* の突然変異株 *shl2-rol* についての結果は、野生株に比べ、変異株の方が、それぞれのウイルス蓄積量が多くなり、ウイルスが増えやすくなっていることが明らかになった。図1にCMVのRNA蓄積量の比較データを示す。*OsRDR1* 突然変異株において *OsSGS3* 突然変異株においても同様に調査検討したが、同じような結果であった。さらに、両者の交配した2重突然変異株においては、単独の変異株に比べ、より一層ウイルス蓄積量の多いことが判明した。また、それぞれの過剰発現株についてもウイルス接種を行った。その結果、野生株よりもウイルス蓄積量が少なく、抵抗性を示した。病徴を呈する

RNMV の場合は、変異株において、病徴が強くなり、過剰発現株において、弱くなった。これらの結果は、*OsRDR1*、*OsRDR6* および *OsSGS3* の遺伝子は、イネのウイルス感染において、ポジティブに防御に関わっていることを示す。

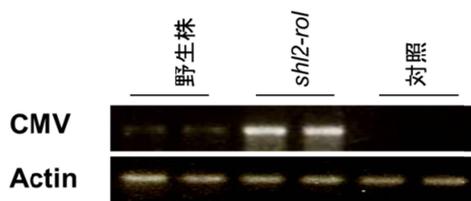


図1 CMV の RNA 蓄積量 (接種7日後)

(2)小分子 RNA 蓄積への影響

最近、アカパンカビにおいて、紫外線照射や変異誘導剤である EMS 処理などの DNA 損傷に伴い、リボソーム由来の小分子 RNA の生じることが明らかにされた。他の動物や植物については未報告である。イネにおいても同様の処理により小分子 RNA が生じるか否か、これらの合成に RNA サイレncing 関与遺伝子が関係しているか検討した。その結果、紫外線処理および EMS 処理により、小分子 RNA が生じることを明らかにするとともに、これらには *OsRecQ1* ならびに *OsRDR1* が関係していることを明らかにした。

(3)イネマイクロアレイによる解析

OsRDR1 変異株について、イネ 44K マイクロアレイによる解析を行った。その結果、野生株と比較して、変異株において、発現の低下した遺伝子には PR タンパク質、リポキシゲナーゼ等の防御に関与する遺伝子等が含まれていることが判明した。このことは、本遺伝子の過剰発現株においては、病原体に対する防御反応が増大し、変異株においては、防御反応が低下していることを示唆し、(1)で得られた結果と符合する。

(4)病原細菌・菌類に対する影響の解析

上記(3)の結果は、RNA サイレncing 関与遺伝子が、ウイルス以外の病原体の感染にも影響を及ぼすことを予想させるものである。また、最近では、卵菌において、ある種のエフェクターは RNA サイレncing 抑制作用をもつことが明らかにされている (Qiao et al. 2013)。このことから、イネに感染するウイルス以外の病原体に対する影響を検討することにした。

病原細菌にはイネ白葉枯病菌を、菌類病菌はイネいもち病菌をそれぞれ供試し、(1)で供試した変異株、二重突然変異株および過剰発現株に対して、病徴の程度を検討した。その結果、いずれの病原体に対しても、野生株における病徴と比較して、*OsRDR1*、*shl2-rol* および *OsSGS3* 変異株においては、

病斑のサイズが有意に大きくなり、二重突然変異株においては、単一遺伝子変異株より、一層病斑サイズが大きくなった。一方、*OsRDR1* あるいは *OsSGS3* の過剰発現株については病斑のサイズが野生株より小さく、抵抗性を示した。以上の結果は、これらの遺伝子はウイルスのみならず細菌や菌類に対しても積極的に防御に関与していることを示し、本遺伝子が関わる RNA サイレncing 機構はウイルスのみならず、細菌や菌類などに対する防御機構としても機能することを示すものである。

<引用文献>

- Fire et al. (1998) Nature 391 : 806-811.
Hamilton and Baulcombe (1999) Science 286: 950-952.
Bernstein et al. (2001) Nature 409:363-366.
Gruwal and Jia (2007) Nature Rev Genet 8:35-46.
Qiao et al.(2013) Nature Genet 45: 1-6.

5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計 11件)

S. G. Wagh, M. M. Alam, K. Kobayashi, T. Yaeno, N. Yamaoka, T. Toriba, H.-Y. Hirano and M. Nishiguchi. Analysis of rice *RNA-dependent RNA polymerase (OsRDR6)* gene in response to viral, bacterial and fungal pathogens. J Gen Plant Pathol 査読有 82:12-17 (2016)

S. Nakamura, K. Hondo, T. Kawara, Y. Okazaki, K. Saito, K. Kobayashi, T. Yaeno, N. Yamaoka and M. Nishiguchi. Conferring high-temperature tolerance to nontransgenic tomato scions using graft transmission of RNA silencing of the fatty acid desaturase gene. Plant Biotech J 査読有 14: 783-790 (2016)

S. G. Wagh, K. Kobayashi, T. Yaeno, N. Yamaoka and M. Nishiguchi. Rice necrosis mosaic virus, a fungal transmitted *Bymovirus*: complete nucleotide sequence of the genomic RNAs and subgrouping of bymoviruses. J Gen Plant Pathol 査読有 82:38-42. (2016)

M.A. Emran, S. Waliullah, K. Kobayashi, N. Yamaoka and M. Nishiguchi.

Transmission of RNA silencing through grafting: conferring virus resistance from transgenically silenced tobacco rootstocks to non-transgenic tomato scions. *J Plant Biochem Biotechnol* 査読有 DOI:10.1007/s13562-015-0334-6 (2015)

M. E. Ali, S. Waliullah and M. Nishiguchi. Molecular analysis of an attenuated strain of Cucumber green mottle mosaic virus using in vitro infectious cDNA clone: pathogenicity and suppression of RNA silencing. *J Plant Biochem Biotechnol* 査読有 DOI:10.1007/s13562-015-0312-z (2015)

M. M. Alam, T. Tanaka, H. Nakamura, H. Ichikawa, K. Kobayashi, T. Yaeno, N. Yamaoka, K. Takayama, H. Nishina and M. Nishiguchi. Overexpression of a rice heme activator protein gene (*OsHAP2E*) confers resistance to pathogens, salinity and drought, and increases photosynthesis and tiller number. *Plant Biotech J* 査読有 13: 85-96. (2015)

M. M. Alam, H. Nakamura, H. Ichikawa, K. Kobayashi, T. Yaeno, N. Yamaoka and M. Nishiguchi. Overexpression of *OsHAP2E* for a CCAAT-binding factor confers resistance to Cucumber mosaic virus and Rice necrosis mosaic virus. *J Gen Plant Pathol* 査読有 81: 32-41. (2015)

M. M. Alam, H. Nakamura, H. Ichikawa, A. Miyao, H. Hirochika, K. Kobayashi, N. Yamaoka and M. Nishiguchi. Response of an aspartic protease gene *OsAP77* to fungal, bacterial and viral infections in rice. *RICE* 査読有 DOI:10.1186/s12284-014-0009-2 (2014)

E. Md. Ali, K. Kobayashi, N. Yamaoka, M. Ishikawa and M. Nishiguchi. Graft transmission of RNA silencing to non-transgenic scions for conferring virus resistance in tobacco. *PLOS ONE* 査読有 8(5): e63257 (2013)

H. Chen, K. Kobayashi, A. Miyao, H. Hirochika, N. Yamaoka and M. Nishiguchi. Both *OsRecQ1* and *OsRDR1* are required for the production of small RNA in response to DNA-damage in rice. *PLOS ONE* 査読有 8(1): e55252 (2013)

A. M. Emran, Y. Tabei, K. Kobayashi, N. Yamaoka and M. Nishiguchi. Molecular analysis of transgenic melon plants showing virus resistance conferred by direct repeat of movement gene of *Cucumber green mottle mosaic virus*. *Plant Cell Rep.* 査読有 31(8) 1371-1377. (2012)

〔学会発表〕(計 23 件)

G. S. Wagh, K. Kobayashi, T. Yaeno, N. Yamaoka and M. Nishiguchi. Genome sequence analysis of *Rice necrosis mosaic virus*, a fungus transmitted *Bymovirus*. 第 30 回中国四国ウイルス研究会、くらしき山陽ハイツ東館(岡山県倉敷市)6月27日~28日 (2015)

S. G. Wagh, M. M. Alam, T. Tanaka, A. Miyao, H. Hirochika, T. Toriba, H.-Y. Hirano, K. Kobayashi, T. Yaeno, N. Yamaoka and M. Nishiguchi. Roles of rice *RNA dependent RNA polymerase (OsRDR1 and OsRDR6)* to viral, fungal and bacterial infections. 平成 27 年度日本植物病理学会大会、明治大学(東京都千代田区)3月28~31日 (2015)

田中 徹・S. G. Wagh・M. M. Alam・H. Chen・宮尾 安藝雄・廣近 洋彦・小林 括平・八丈野 孝・山岡 直人・西口 正通. イネ RNA サイレンシング関与遺伝子 *OsSGS3* の機能解析. 平成 27 年度日本植物病理学会大会、明治大学(東京都千代田区)3月28~31日 (2015)

田中 徹・吉田 崇彦・月原 周将・長田 龍太郎・柳間 義幸・小林 括平・八丈野 孝・山岡 直人・西口 正通. カラスウリから分離されたタバモウイルスの塩基配列: *Kyuri green mottle mosaic virus* の分離株群の 2 ウイルス種への分類の可能性. 平成 27 年度日本植物病理学会大会、明治大学(東京都千代田区)3月28~31日 (2015)

M. M. Alam, K. Kobayashi, T. Yaeno, N. Yamaoka and M. Nishiguchi. A rice heme activator protein gene (*OsHAP2E*), a CCAAT binding protein, plays multiple roles in rice: resistance to biotic and abiotic stress and increased photosynthesis and tiller number. 第37回日本分子生物学会年会、パシフィコ横浜(神奈川県横浜市)11月25~27日 (2014)

中村 真也・瓦 朋子・本藤 加奈・小林 括平・八丈野 孝・山岡 直人・西口 正

通. トマトの内在遺伝子のサイレンシングによる高温耐性の付与と接ぎ木による移行. 第37回日本分子生物学会年会、パシフィコ横浜 (神奈川県横浜市) 11月25~27日 (2014)

M.M. Alam, K. Kobayashi, T. Yaeno, N. Yamaoka and M. Nishiguchi. (2014) Role of rice heme activator protein gene (*OsHAP2E*), a CCAAT binding protein: resistance to fungi, bacterial and viral pathogens. 3rd Korea-Japan Joint Symposium、平成26年10月22~25日 (2014)

M.M. Alam, K. Kobayashi, T. Yaeno, N. Yamaoka and M. Nishiguchi. Virus resistance in transgenic rice over-expressing a heme activator protein gene (*OsHAP2E*): *Rice necrosis mosaic virus*. 平成26年度日本植物病理学会関西西部会、富山大学 (富山県富山市) 9月27~28日 (2014)

S.G. Wagh, M.M. Alam, T. Tanaka, K. Kobayashi, T. Yaeno, N. Yamaoka and M. Nishiguchi. Response of rice RNA dependent RNA polymerase1 (*OsRDR1*) and suppressor of gene silencing (*OsSGS3*) to Pathogen Infections. 平成26年度日本植物病理学会関西西部会、富山大学 (富山県富山市) 9月27~28日 (2014)

S.G. Wagh, Kobayashi, K. Yaeno, T., Yamaoka, N., Masuta, C. and Nishiguchi, M. Molecular cloning and nucleotide sequence of *Rice necrosis mosaic virus*, a fungal transmitted Bymovirus, genomic RNA. 平成26年度日本植物病理学会大会、札幌コンベンションセンター (北海道札幌市) 6月2~4日 (2014)

M.M. Alam, H. Nakamura, H. Ichikawa, K. Kobayashi, T. Yaeno, N. Yamaoka and M. Nishiguchi. Response of rice heme activator protein gene (*OsHAP2E*) to virus infection. 平成26年度日本植物病理学会大会、札幌コンベンションセンター (北海道札幌市) 6月2~4日 (2014)

M.E. Ali, Y. Ishii, J. Taniguchi, Y. Watanabe, M. Syounaka, M. Ishikawa, K. Kobayashi, T. Yaeno, N. Yamaoka and M. Nishiguchi. Analysis of transgenic tomato with the inverted repeat of tomato homologs of TOM1 in Arabidopsis. 平成26年度日本植物病理学会大会、札幌コンベンションセンター (北海道札幌市) 6月2~4日 (2014)

M. M. Alam, H. Nakamura, H. Ichikawa, M. Miyao, H. Hirochika, K. Kobayashi, Y. Yaeno, N. Yamaoka, M. Nishiguchi. Functional analysis of a rice aspartic protease gene (*OsAP77*): resistance to pathogens. 日本育種学会第125回講演会、東北大学 (宮城県仙台市) 3月21~22日 (2014)

M. M. Alam, M. Miyao, H. Hirochika, H. Nakamura, H. Ichikawa, K. Kobayashi, N. Yamaoka, M. Nishiguchi. Functional characterization of rice aspartic protease (*OsAP77*) gene in response to bacterial and fungal pathogens. Plant and Animal Genome Conference XXII, (San Diego, USA) 1月10~15日 (2014)

M. Nishiguchi, Ali M. E., Kobayashi K., Yaeno T. and Yamaoka N. Further investigation of graft-transmission of RNA silencing and virus resistance from transgenic silenced rootstocks to non-transgenic scions of tobacco and tomato. 第36回日本分子生物学会年会、神戸ポートアイランド (兵庫県神戸市)、12月3~7日 (2013)

M. M. Alam, N. Nakamura, H. Ichikawa, K. Kobayashi, T. Yaeno, N. Yamaoka and M. Nishiguchi. Characterization of rice heme activator protein gene (*OsHAP2E*) in response to fungal and bacterial infections. 平成25年度日本植物病理学会関西西部会、岡山大学 (岡山県岡山市) 9月26~27日 (2013)

M. M. Alam, H., K. Kobayashi, N. Yamaoka and M. Nishiguchi. The use of Cucumber mosaic virus in rice plants for analysis of stress inducible gene. 平成25年度日本植物病理学会大会、岐阜大学 (岐阜県岐阜市) 3月27~29日 (2013)

H. Chen, K. Kobayashi, A. Miyao, H. Hirochika, N. Yamaoka and M. Nishiguchi. *OsRecQ1* and *OsRDR1* is involved in the biogenesis of qiRNA and DNA damage response in rice. Keystone Symposia on RNA silencing, Whistler Conference Centre (Whistler, Canada) 3月19~24日 (2013)

M. E. Ali, K. Kobayashi, M. Ishikawa, N. Yamaoka and M. Nishiguchi. Conferring of virus resistance to non-transgenic scions by graft-transmission of RNA silencing from transgenic silenced

rootstocks in tobacco plants 第28回日本分子生物学会年会、福岡国際会議場(福岡県福岡市)12月11~14日(2012)

M. E. Ali, K. Kobayashi, T. Yaeno, N. Yamaoka and M. Nishiguchi. Further investigation on graft-transmission of RNA silencing and tobamovirus resistance to non-transgenic scions of tobacco and tomato. 日本植物病理学会関西支部会、とりぎん文化会館(鳥取県鳥取市)9月27~28日(2012)

21 M. E. Ali, K. Kobayashi, N. Yamaoka, M. Ishikawa and M. Nishiguchi. Induction of tobamovirus resistance in nontransgenic scions after grafting onto *NtTOM1* and *NtTOM3* silenced rootstocks. XV International Congress on Molecular Plant-Microbe Interactions、国立京都国際会館(京都府京都市)7月30日~8月2日(2012)

22 M. Nishiguchi, H. Chen, K. Kobayashi, and N. Yamaoka. Effect of rice RNA-dependent RNA polymerase 1 (*OsRDR1*) on RNA silencing and small RNA regulation. XV International Congress on Molecular Plant-Microbe Interactions、国立京都国際会館(京都府京都市)7月30日~8月2日(2012)

23 M. E. Ali, K. Kobayashi, N. Yamaoka and M. Nishiguchi. Further investigation on graft-transmission of RNA silencing from silenced rootstocks to non-transgenic scions of necrotic responding tobacco upon tobamovirus infection. 第28回中国四国ウイルス研究会、広島大学(広島県広島市)6月23日,(2013)

〔図書〕(計5件)

西口 正通, M.M. ALAM, 小林 括平, 市川 裕章. イネのスーパー遺伝子「*HAP2E*」~耐病性, 耐乾性, 耐塩性の付与と収量増に向けて~. 植物防疫 69(10): 64-67 (2015)

K. Kobayashi, K.-T. Sekine and M. Nishiguchi. Breakdown of plant virus resistance: Can we predict and extend the durability of virus resistance? J. Gen. Plant Pathol., 80: 327-336 (2014)

M. Hyakumachi, H. Takahashi, Y. Matsubara, N. Someya, M. Shimizu, K.

Kobayashi and M. Nishiguchi. Recent studies on biological control of plant diseases in Japan. J Gen Plant Pathol 80: 287-302. (2014)

百町 満朗・高橋 英樹・松原 陽一・染谷 信孝・清水 将文・小林 括平・西口 正通. 最近のわが国における植物病害の生物防除研究. 日本植物病理学会報 80特別号: 179-187 (2014)

小林 括平・関根 健太郎・西口 正通. 植物ウイルス抵抗性の打破: ウイルス抵抗性の永続性を予測したり延長させたりできるだろうか? 日本植物病理学会報 80特別号 165-171 (2014)

〔産業財産権〕

出願状況(計1件)

名称: 植物に耐病性・耐乾性・耐塩性・光合成効率向上・分げつ数増大を付与する遺伝子

発明者: 西口 正通他2名

権利者: 柳澤 康信

種類: 特許

番号: 特願2014-4769

出願年月日: 平成26年3月11日

国内外の別: 国内

取得状況(計1件)

名称: ジーンサイレンシング抑制技術

発明者: 西口 正通他2名

権利者: 柳澤 康信

種類: 特許

番号: 特許第5266489号

取得年月日: 平成25年5月17日

国内外の別: 国内

6. 研究組織

(1)研究代表者

西口 正通 (NISHIGUCHI, Masamichi)

愛媛大学・農学部・研究員・名誉教授

研究者番号: 40343313