

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 24 日現在

機関番号：13201

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25660002

研究課題名(和文) 遺伝子組換えによらない、幅広い植物種に適用できる新奇的な形質転換系の開発

研究課題名(英文) An attempt to develop a novel system for transforming a wide variety of plant species without using the genetic recombination technique.

研究代表者

山田 恭司 (Yamada, Kyoji)

富山大学・大学院理工学研究部(理学)・教授

研究者番号：70200714

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：遺伝子サイレンシング・シグナル(siRNA)を産生する宿主植物に対して、宿主特異性の低い寄生植物ネナシカズラを寄生させ、宿主から異種植物へのsiRNA輸送実験系を構築した。siRNAの長距離輸送と輸送されたsiRNAによる異種間遺伝子サイレンシングが、宿主とネナシカズラの間で、あるいは、ネナシカズラ寄生を介した別々の宿主個体間で、起こるかどうかが調べた。その結果、宿主からネナシカズラへのsiRNA輸送系、ネナシカズラを介した宿主個体間におけるsiRNA輸送系のいずれにおいても、移動したsiRNAのレベルは検出限界以下であり、移動したsiRNAによる遺伝子サイレンシングは観察されなかった。

研究成果の概要(英文)：In order to develop a novel transformation method by transfer of siRNAs between two different host plants via a stem-parasite *Cuscuta japonica*, we tried to establish a bridge system. A *Cuscuta* seedling was attached to the flower stalk of *Arabidopsis* producing siRNAs (donor plant). Subsequently, the *Cuscuta* stem parasitic on the first donor host was connected to the second host (acceptor plant), namely *Arabidopsis* expressing one of various target genes. We investigated on the transfer of siRNAs between such two *Arabidopsis* connected through a *Cuscuta* stem. Downregulation of expression of the target gene in the acceptor plant by trans-specific RNA interference was also investigated. The results suggested that the translocation of siRNAs from the donor to the acceptor plant occurred at undetectable level, and did not result in gene silencing in the acceptor plant, indicating that improvement of our system in the level of production and transference of gene silencing signals is needed.

研究分野：植物分子生物学

 キーワード：遺伝子サイレンシング 低分子RNA 異種間遺伝子サイレンシング 師部長距離輸送システム 寄生植物  
 維管束連結 宿主植物の形質転換 ネナシカズラ

## 1. 研究開始当初の背景

高等植物では、種々の RNA・タンパク質が、篩部組織を通して長距離輸送され機能発現することによって植物体の調和的成長を支えていることが知られている(総説)。近年、このような遺伝子産物の長距離輸送が寄生植物とその宿主の間でも、種の壁を超えて起こりうるという事実が明らかになっている(文献)。また、寄生植物ネナシカズラを介して二つの植物を連結した場合、一方の植物のタンパク質が、ネナシカズラを介して、もう一方の植物に移動することも報告されている(文献)。最近、根に寄生する寄生植物(*Triphysaria versicolor*)において遺伝子サイレンシング・シグナルが宿主から寄生植物へ移動することも報告され、篩管を通した遺伝子サイレンシング・シグナルの輸送により異種間遺伝子サイレンシングが可能なが示された(文献)。しかし、根に寄生する寄生植物は宿主域が狭いため、任意の植物に対して異種間遺伝子サイレンシングを引き起こすことは困難であった。

以上のような、研究状況を背景に、我々は、遺伝子サイレンシング・シグナルを産生する植物と標的となる植物を、宿主特異性が低いネナシカズラを介して連結し、ネナシカズラを介した遺伝子サイレンシング・シグナルの輸送により、形質転換技術を用いることなく標的植物の遺伝子発現を抑制することを企図した。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、宿主特異性が低い地上部寄生性のネナシカズラを寄生させることにより、宿主となりうる広範な植物種に低分子 RNA を導入して、遺伝子の組換えも改変も伴わずに形質転換を引き起こす系を開発することにある。具体的には、(1)シロイヌナズナ(第1宿主)に寄生中のネナシカズラを、さらに別種の第2宿主に寄生させることにより、2種の宿主植物間にネナシカズラを仲立ちとした維管束連絡を形成させ、(2)特殊な低分子 RNA を産生するべく改変したシロイヌナズナを第1宿主に用いたとき、第2宿主の形質転換が実現される条件について検討する。

## 3. 研究の方法

### (1) 遺伝子サイレンシング・シグナルを産生するシロイヌナズナの作出

篩管特異的に遺伝子サイレンシング・シグナルを産生する遺伝子を、篩管伴細胞特異的プロモーター AtSUC2 の下流に標的遺伝子(CjFT, GFP など)のヘアピン遺伝子を連結することによって作成した。これらの遺伝子を、ベクター pFGC5941 に導入したのち、アグロバクテリウムを用いたフラワー・ディップ法によりシロイヌナズナに導入した。除草剤(グリフォセート)含有培地で遺伝子が導入された植物を選抜し、実験に用いた。

### (2) ネナシカズラの寄生

シロイヌナズナに対するネナシカズラの寄生の誘導は、常法に従った。すなわち、シロイヌナズナの花茎に播種後8日目のネナシカズラ芽生えをサージカルテープで固定し、20分間の遠赤色光照射により、寄生を誘導した。第2宿主に寄生させる場合は、第1宿主に寄生した後に伸長したネナシカズラ先端部分を第2宿主のシロイヌナズナ花茎に固定し、第1宿主の場合と同様の方法で寄生を誘導した。

### (3) siRNA の検出

遺伝子サイレンシング・シグナルの低分子 RNA (siRNA) を検出するため、宿主(シロイヌナズナ)およびネナシカズラの各組織から、低分子 RNA を抽出した。抽出した低分子 RNA をポリアクリルアミドゲル電気泳動により分画した。そして、分画した RNA をエレクトロ・プロットングによりナイロン膜に写し取った。その後、放射性標識した標的遺伝子の DNA をプローブとしたノーザン・ハイブリダイゼーションにより、標的遺伝子の siRNA レベルを解析した。

### (4) 標的遺伝子の発現解析

標的遺伝子の発現レベルを解析するために、宿主(シロイヌナズナ)およびネナシカズラの各組織から、RNA を抽出し、それを鋳型に合成した cDNA に対して PCR (RT-PCR) を行なった。標的遺伝子の cDNA を増幅させ、標的遺伝子の mRNA 量の変化を調べた。

## 4. 研究成果

### (1) 宿主からネナシカズラへのタンパク質および mRNA の輸送と機能

シロイヌナズナを宿主としてネナシカズラを寄生させたとき、宿主のタンパク質がネナシカズラへ移動するかどうか、また、その移動タンパク質がネナシカズラで機能するかどうかを調べるため、ネナシカズラ花成誘導因子遺伝子 CjFT にタグ配列コード配列を連結してタグ標識した CjFT 遺伝子を作製した。それら標識遺伝子を篩管伴細胞特異的 AtSUC2 プロモーターあるいは 35S プロモーターに連結し、それぞれシロイヌナズナに導入し、形質転換シロイヌナズナを得た。しかし、目的遺伝子の発現量が低く、その機能を確認するには至っていない。

シロイヌナズナにネナシカズラを寄生させた時、宿主の mRNA がネナシカズラに輸送されるかを、長距離移動が知られている GAI 遺伝子(ジベレリン・インセンティブ遺伝子)について検定した。その結果、シロイヌナズナからネナシカズラへの GAI 遺伝子の mRNA の輸送は確認できなかった。この結果から、シロイヌナズナからネナシカズラへの篩管を経由した mRNA の輸送は、他の植物(トマトなど)と比べて少ない可能性が示唆された。

### (2) 遺伝子サイレンシング・シグナルを産生するシロイヌナズナの作出

カルコン合成酵素遺伝子 CHS やネナシカズ

ラの寄生根形成に関わる各種遺伝子のヘアピン遺伝子を師管伴細胞特異的プロモーターに連結し、それぞれシロイヌナズナに導入し、形質転換シロイヌナズナを作製した。しかし、これらはいずれも、siRNA の発現量が低く、実験には用いることができなかった。そこで、師管伴細胞特異的にネナシカズラ花成誘導遺伝子 *CjFT* の siRNA を発現するシロイヌナズナを作製して実験を行うこととした。また、緑色蛍光タンパク質遺伝子 (*GFP*) の siRNA を全身で発現するシロイヌナズナが *GFP* 遺伝子の過剰発現変異体を作製する過程で作出されていたので、これも用いることとした。

### (3) 宿主からネナシカズラへの siRNA 輸送と異種間遺伝子サイレンシングの調査

師管伴細胞特異的にネナシカズラ花成誘導遺伝子 *CjFT* の siRNA を発現するシロイヌナズナに対してネナシカズラを寄生させ、*CjFT* siRNA が宿主からネナシカズラへ移動するか、ネナシカズラの *CjFT* 遺伝子の発現が抑制されるかどうかを調べた。

まず、*CjFT* siRNA の輸送をノーザン・ハイブリダイゼーションによって調べたところ、宿主組織では *CjFT* siRNA が検出されたが、ネナシカズラの組織からは *CjFT* siRNA は検出されなかった。このことから、宿主植物から寄生植物ネナシカズラへは *CjFT* siRNA は輸送されていないか、検出限界以下の量しか移動していないと考えられた。

次に、*CjFT* siRNA によって、ネナシカズラの *CjFT* 遺伝子の発現が抑制されるかを調べた。その結果、ネナシカズラの *CjFT* の mRNA 量は、*CjFT* siRNA 発現植物に寄生したものと野生型植物に寄生したものの間で顕著な差はなかった。*CjFT* 遺伝子の発現が抑制されると、花成誘導が阻害されることから、*CjFT* siRNA 発現植物に寄生したものと野生型植物に寄生したものの間で花成誘導に差があるかについても調べた。その結果、両者の間で、開花誘導から花芽をつけるまでの期間の長さに有意な差は見出せなかった。

以上のことから、宿主からネナシカズラへは、ノーザン・ハイブリダイゼーションによって検出できる量の siRNA 輸送は起きておらず、宿主から輸送された siRNA による異種間遺伝子サイレンシングは観察できなかった。

### (4) ネナシカズラを介した宿主個体間における siRNA 輸送と異種間遺伝子サイレンシングの調査

*GFP* 遺伝子の siRNA を発現するシロイヌナズナを第 1 宿主に用い、第 2 宿主には、*GFP* 遺伝子が発現するシロイヌナズナを用いた。第 1 宿主と第 2 宿主をネナシカズラによる寄生を介して連結し、第 1 宿主から第 2 宿主へと *GFP* siRNA が移動するか、*GFP* siRNA によって第 2 宿主で *GFP* 遺伝子の発現が抑制されるかを検証した。

まず、第 1 宿主からの *GFP* siRNA の輸送をノーザン・ハイブリダイゼーションによって

調べたところ、ネナシカズラや第 2 宿主のどの組織からも、第 1 宿主から移動した *GFP* siRNA のシグナルは検出されなかった。このことから、第 1 宿主からネナシカズラおよび第 2 宿主へは *GFP* siRNA は輸送されていないか、検出限界以下の量しか移動していないと考えられた。

次に、*GFP* siRNA によって第 2 宿主の *GFP* 遺伝子の発現が抑制されるかどうか調べた。その結果、第 2 宿主の *GFP* の緑色蛍光の強度、および *GFP* mRNA の量は、*GFP* siRNA 発現植物と連結したものと野生型と連結したものの間で顕著な差は認められなかった。

以上のことは、本実験系では、第 1 宿主からネナシカズラおよび第 2 宿主まで siRNA が移動しないか、あるいは検出限界以下の量しか移動しないこと、また、その結果として第 2 宿主における標的遺伝子の発現抑制は起こらなかったことを示している。

### (5) 考察

本研究では、遺伝子サイレンシング・シグナル (siRNA) を産生するシロイヌナズナを宿主として、ネナシカズラを寄生させ、ネナシカズラを介した遺伝子サイレンシング・シグナル (siRNA) 輸送系を構築し、他の植物体における遺伝子発現抑制を引き起こすことを試みた。その結果、シロイヌナズナにネナシカズラを連結させる実験系では、siRNA の輸送レベルが非常に少なかったため、ネナシカズラや第 2 宿主に対して顕著な遺伝子サイレンシングを引き起こすことはできないことが示唆された。この原因としては、シロイヌナズナとネナシカズラの間で連結された師管を通した RNA 輸送の量が少ないことや、シロイヌナズナ内で産生された siRNA 量も少ないことなどが考えられる。

明らかになった実験系の問題点を解決するために、宿主をシロイヌナズナから、ネナシカズラへの物質輸送量が多いと期待されるタバコに切り替え、タバコの葉においてアグロ・インフィルトレーションにより一過的に遺伝子サイレンシング・シグナルを産生させる方法をすでに試みている。さらに、ウイルスベクターにより移動性のサイレンシング・シグナルを大量に作らせる実験系を構築しつつある。これらの実験系の改良により、ネナシカズラを介した遺伝子サイレンシング・シグナルの移動と異種間遺伝子サイレンシングが可能になるものと期待される。

### <引用文献>

- Suarez-Lopez. , Int J Dev Biol, 49, 2005, 761-771
- Haupt et al., J Exp Bot, 52, 2001, 173-177 (2001)
- Roney et al., Plant Physiol., 433, 2007, 1037-1043
- Birschwilks et al., Planta, 226, 2007, 1231-1241
- David-Schwartz et al., New Phytol, 179,

2008, 1133-1141  
Birschwilks et al., Planta,  
226-1231-1241 (2007)  
Tomilov et al., Plant J 56-389-397  
(2008)

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 0 件)

〔学会発表〕(計 1 件)

若杉達也・山田恭司・古橋勝久  
「ネナシカズラ研究を始めるために 採種、  
発芽、寄生実験、遺伝子解析」  
植物生理学会関連集会ワークショップ  
2014年3月17日、富山

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ等 なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

山田 恭司(YAMADA, Kyoji)  
富山大学・大学院理工学研究部・教授  
研究者番号: 70200714

(2)研究分担者

山本 将之(YAMAMOTO, Masayuki)  
富山大学・大学院理工学研究部・講師  
研究者番号: 10456402