

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 5 月 29 日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25660004

研究課題名(和文) 外来遺伝子防御機構の改変による高効率高発現植物遺伝子導入系の開発

研究課題名(英文) Development of high efficient and expression transformation system in plants

研究代表者

佐藤 豊 (SATO, Yutaka)

名古屋大学・生命農学研究科・准教授

研究者番号：40345872

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)：RNAサイレンシングとして知られる外来遺伝子防御機構は、トランスポゾンやRNAウィルスなどのゲノム寄生因子に由来する2重鎖RNAにより起動し、これらを不活性化・分解する。一方、植物に遺伝子導入する際にも、トランスジーンアレイや転写のリードスルーなどにより、予期せず2重鎖RNAが作られ、RNAサイレンシングの標的とされやすい。このため、導入遺伝子が高発現しないケースや形質転換体が得られにくい事がしばしばある。そこで、本研究は植物が持つ外来遺伝子防御機構を抑制する事により、高発現かつ高効率に遺伝子組換え植物を作出するシステムの開発を行った。

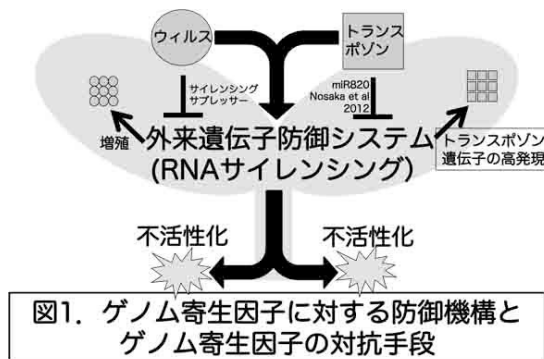
研究成果の概要(英文)：RNA silencing is known as a defense system against invading exogenous genes such as transposons or RNA viruses. RNA silencing is triggered by the production of double stranded RNA derived from invaders and this results in inactivation or degradation of invading exogenous genes. In case of plant transformation, the double stranded RNAs are often produced from transgenes by means of transcription read through or transgene array. These also can start host's RNA silencing and result in low efficient transformation or low expression of transgene. In this study, I aimed to develop a novel plant transformation system to obtain high expression and high efficient transformants.

研究分野：植物遺伝育種学

キーワード：イネ RNAサイレンシング

1. 研究開始当初の背景

研究代表者は、自身がこれまで行ってきたイネの RNA サイレンシング機構の解析を通して、「外来遺伝子防御機構」としての RNA サイレンシングが、ゲノム寄生者(トランスポゾンやウイルス)にとって、宿主ゲノムへの侵入の足がかりとなる事を明らかにした。つまり、ウイルスやトランスポゾンなどのゲノム寄生者は宿主側の防御機構をかいくぐるのに、宿主の生存を脅かさない範囲で RNA サイレンシングを抑制している(図1)。一方、植物の遺伝子組換えの際にも、ホスト植物の「外来遺伝子防御機構」がしばしば起動し、転写後ジーンサイレンシング(PTGS)を生じ、組換え技術による物質生産・形質改変の技術的障壁となっている。このような背景から、申請者はトランスポゾンやウイルスが宿主ゲノムに寄生する際の戦略を遺伝子組換えの際にも適用し、ホストの RNA サイレンシングを人為的に抑制する事による導入遺伝子の高発現や、薬剤耐性遺伝子の高発現による遺伝子導入の高効率化が可能との着想に至った。



2. 研究の目的

RNA サイレンシングとして知られる外来遺伝子防御機構は、トランスポゾンや RNA ウィルスなどのゲノム寄生因子に由来する 2 重鎖 RNA により起動し、これらを不活性化・分解する。一方、植物に遺伝子導入する際にも、トランスジーンアレイや転写のリードスルーなどにより、予期せず 2 重鎖 RNA が作られ、RNA サイレンシングの標的とされやすい。このため、導入遺伝子が高発現しないケースや形質転換体が得られにくい事がしばしばある。そこで、本研究は植物が持つ外来遺伝子防御機構を抑制する事により、高発現かつ高効率に遺伝子組換え植物を作出するシステムを開発し、この問題の解決を目指す。

3. 研究の方法

研究代表者は、RNA サイレンシングに関わる植物特異的 RNA 合成酵素遺伝子 pol IV/V のノックダウンイネ系統において、遺伝子導入効率が著しく上昇し、薬剤耐性遺伝子も高発現するケースがある事に気がついた。この現象の分子的基盤を解明し、遺伝子組換

えシステムに利用するために、主に以下の二つの実験を計画した。

- (1) イネの pol IV/V のノックダウン系統における遺伝子導入効率の上昇および導入遺伝子高発現の分子的基盤を解明する。
- (2) イネ及び、遺伝子導入の難しい種々の作物由来 pol IV/V のノックダウン用 RNAi カセットを載せた汎用性の高い高効率遺伝子導入ベクターの作成と実用性の検証

具体的には、以下の実験を計画した。

RNA 合成酵素 I ~ III (pol I ~ III) はそれぞれ主に rRNA, mRNA, tRNA 等の転写を担うことが知られている。一方、近年植物ゲノムにはこれら pol I ~ III と構造上の類似性は見られるが機能の異なる RNA 合成酵素遺伝子の存在が明らかになっている。これらの RNA 合成酵素遺伝子は pol IV および pol V と呼ばれ、それぞれ siRNA のソースとなる RNA の転写と RNA 依存的 DNA メチル化によるエピジェネティックサイレンシングに必要である事が知られている。イネでは pol IV および pol V の largest subunit 遺伝子はそれぞれ 2 コピー (pol IV: *NRPD1a*, *NRPD1b*; pol V: *NRPE1a*, *NRPE1b*) で、pol IV と pol V で共有される 2nd largest subunit 遺伝子も 2 コピー (*NRPD2a*, *NRPD2b*) である。研究代表者はイネを材料にこれら pol IV, pol V のサブユニットをコードするすべての遺伝子のノックダウン系統を作出し解析したところ、一部の subunit のノックダウン系統 (*NRPD1ab*, *NRPE1a*) では遺伝子導入効率が著しく上昇し、薬剤耐性遺伝子も高発現していた。本研究では、この現象の分子的基盤の理解およびこの現象を利用した高効率・高発現遺伝子導入系の開発を行うことを計画した。

4. 研究成果

上述の通り、これまでの研究において RNA ポリメラーゼ IV と RNA ポリメラーゼ V を構成するタンパク質をコードする遺伝子のノックダウンイネ系統において、形質転換カルスの選抜に使う薬剤耐性遺伝子や導入遺伝子そのものが高発現する事が明らかになっていた。そこで、初年度においては遺伝子導入効率上昇の分子的基盤の理解を重点目標に研究を行った。研究代表者は遺伝子導入効率の上昇が、遺伝子導入細胞すなわち耐性遺伝子をもつ細胞の増殖が、通常のベクターで遺伝子導入したカルスよりも早い事が、見かけ上の遺伝子導入効率が高くなっている理由であると考えた。つまり、実際に遺伝子導入される細胞の数は、コントロールベクターと差はないが、その後の分裂速度が早いからに見えるのだらうと考えた。これはこれで、多数の耐性カルスを取得するという点で、遺伝子導入効率の上昇と換言する事もできる。そこで、この仮説を検証するために、RNA ポリメラーゼのノックダウン系統とコントロ

ール系統における、薬剤耐性遺伝子の発現と、細胞周期関連遺伝子の発現を qRT-PCR 法により解析した。その結果、両者には高い相関がある事が判明した。次に、ノックダウン系統由来のカルスの増殖がコントロール系統由来のカルスよりも早い事を液体培養後の細胞ボリュームを計測する事により確認したところ、液体培養する限りカルスには明確な増殖速度の差は見られなかった。この事は、当初の仮説である、実際に遺伝子導入される細胞の数は、コントロールベクターと差はないが、その後の分裂速度が早いために、耐性カルスが多く出現しているように見えていると言う考えが正しくない事を示唆している。おそらく、実際にアグロバクテリア感染細胞の数が、RNA ポリメラーゼ IV/V のノックダウン系統においては増えている事が予想されるが、その検証まではいたらなかった。

次に、RNA ポリメラーゼ IV/V のノックダウンを利用した高効率・高発現遺伝子導入システムをより汎用的なイネの形質転換用ベクターに導入する事により、容易に任意の導入遺伝子を高発現させることのできるベクターの開発を行った。このベクターは ACTIN プロモーターにより RNA ポリメラーゼ IV/V を構成するタンパク質をコードする遺伝子の RNAi カセットを発現させ、導入遺伝子を UBI プロモーターで発現させている。また、UBI プロモーターの下流には MCS を導入し、任意の遺伝子がクローニングし易いように工夫した。実際に、UBI プロモーターの下流に GFP 遺伝子を挿入し、イネに形質転換したところ、通常のベクターよりも GFP を高発現する耐性カルスを多数取得出来た。この事から、本システムの有効性が実証された。

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 6 件)

Aiko Ishiwata, Misa Ozawa, Hiroshi Nagasaki, Makio Kato, Yusaku Noda, Takahiro Yamaguchi, Misuzu Nosaka, Sae Shimizu-Sato, Akie Nagasaki, Masahiko Maekawa, Hiro-Yuki Hirano, Yutaka Sato: Two *WUSCHEL*-related *homeobox* Genes, *narrow leaf2* and *narrow leaf3*, Control Leaf Width in Rice. **Plant and Cell Physiology** 54, 779-792, doi: 10.1093/pcp/pct032, 2013.

Kylee M Peterson, Christine Shyu, Christian A Burr, Robin J Horst, Masahiro M Kanaoka, Minami Omae, Yutaka Sato, and Keiko U Torii: Arabidopsis homeodomain-leucine zipper IV proteins promote stomatal development and their ectopic

expression induces stomata beyond the epidermis. **Development**, 140 1924-1943, doi: 10.1242/dev.090209, 2013.

Misuzu Nosaka, Akemi Ono, Aiko Ishiwata, Sae Shimizu-Sato, Kiyoe Ishimoto, Yusaku Noda and Yutaka Sato: Expression of the rice microRNA *miR820* is associated with epigenetic modifications at its own locus. **Genes Genet. Syst.** 88, 105-112, 2013.

Misuzu Nosaka, Aiko Ishiwata, Sae-Shimizu Sato, Akemi Ono, Kiyoe Ishimoto, Yusaku Noda, Yutaka Sato: The copy number of rice CACTA DNA transposon carrying *MIR820* does not correlate with *MIR820* expression. **Plant Signal. Behav.**, 8(8), e25169, **10.4161/psb.25169**, <http://dx.doi.org/10.4161/psb.25169>, 2013.

田淵宏明、大森伸之介、西村実、佐藤豊、吉田均: イネ閉花受粉性変異体 *spw1-cl5* および疎粒変異体 M645 (*lax2-3* アレル) 識別用 PCR-based DNA マーカーの開発、北陸作物学会報 48, 31-33, 2013.

Tomomi Hara, Hirokazu Katoh, Daisuke Ogawa, Yasuaki Kagawa, Yutaka Sato, Hidemi Kitano, Yasuo Nagato, Ryo Ishikawa, Akemi Ono, Tetsu Kinoshita, Shin Takeda, Tsukahoro Hattori: Rice SNF2 family helicase ENL1 is essential for syncytial endosperm development. **Plant J.**, 81, 1-12, 2015, doi: 10.1111/tpj.12705.

[学会発表](計 1 件)

小澤美沙、佐藤豊: NAL2/3 遺伝子によるイネ葉幅制御機構の解析、第124回 日本育種学会講演会、鹿児島、2014.3.21-22

小澤美沙、佐藤豊: 外来遺伝子防御システムを利用した導入遺伝子高発現組換えイネの作成、第126回 日本育種学会講演会、宮崎、2014.9.27

[図書](計 0 件)

[産業財産権]

出願状況(計 0 件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:

出願年月日：
国内外の別：

取得状況（計 0 件）

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐藤 豊 (SATO, Yutaka)
名古屋大学・大学院生命農学研究科・准教授
研究者番号：40345872

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：