

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：82401

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2013～2014

課題番号：25871119

研究課題名(和文) RNAサイレンシング経験植物に影響を及ぼす化合物の作用解析

研究課題名(英文) Identification and analysis of chemicals that affect RNA silencing in plants.

研究代表者

栗原 志夫 (Kurihara, Yukio)

独立行政法人理化学研究所・環境資源科学研究センター・研究員

研究者番号：60455342

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)：本研究の目的は、植物においてRNAサイレンシングによって抑制された遺伝子の発現を復帰させることができる新規化合物を同定することである。化合物スクリーニングおよび分子生物学的手法による検定の結果、ひとつの特定のケミカルが最終候補として見つかった。植物へのこのケミカルの処理によって、指標タンパク質と mRNA の蓄積の増加だけでなく RNA サイレンシングの指標である siRNA の蓄積も増加することがわかった。

研究成果の概要(英文)：Aim of this research is to identify novel chemicals that inhibit RNA silencing in plants. I performed chemical screening and then some experiments using molecular biological approaches. I found one special chemical as a final candidate of interest. Arabidopsis plants treated with this chemical showed increased accumulation of not only proteins and mRNAs of a target gene but also siRNAs which indicate occurrence of RNA silencing.

研究分野：植物分子生物学

キーワード：RNAサイレンシング ケミカル 阻害 植物

1. 研究開始当初の背景

RNAサイレンシング (RNA 干渉: RNAi) とは、内在性 RNA の配列と相同な配列または相補的な配列をもつ外来性 RNA を導入すると両 RNA が分解を受けるといった現象である。また、トランスジーン RNA サイレncing による発現抑制は相同な配列をもつトランスジーンを複数導入することでも起こり得ることが報告されている。したがって、このトランスジーンを複数導入することで起こってしまう RNA サイレncing が、形質転換植物におけるトランスジーンの高発現を妨げ、その機能を低下させてしまう問題がしばしば起こる。また、遺伝子サイレンシングとは、遺伝子の転写自体が抑制されてしまう現象のことであり、RNA サイレncing と密接な関係にある。この遺伝子サイレンシングもまたトランスジーン発現を抑制してしまうことがわかっている。そのため、組換え技術を利用して外来遺伝子を導入し植物を物質生産工場として用いるために、RNAi による発現抑制の問題を解決できる技術開発が急務である。

RNA サイレncing を抑制しトランスジーンの高発現を実現する方法として、多くの植物ウイルスがコードする RNA サイレncing 抑制因子を植物で共発現させておくことがしばしば用いられてきた。しかしながら、RNA サイレncing 抑制因子は形態形成に重要な役割を果たす miRNA 経路などにも影響を及ぼすため、RNAi 抑制因子を恒常的に発現する植物は著しい形態異常を示してしまう。そのため、ウイルス RNA サイレncing 抑制因子の応用利用には限界があり新たな方法を開発することが必要である。

2. 研究の目的

これまでに植物において、遺伝子組換えによって特定遺伝子を高発現させる試みがなされてきたが、RNA サイレncing による発現抑制機構が負に働いてしまい、しばしば目的が達成できないことが起こり得ていた。ウイルスがもつ RNA サイレncing 抑制因子は、植物形態などへの影響が大きいため利用が難しい。本研究では、RNA サイレncing によって抑制された遺伝子の発現を復帰させることができる低分子化合物を同定し、それらの化合物の RNA サイレncing 経路内での作用点を明らかにすることを目的とする。将来的に得られた結果の応用利用を目指していく。

3. 研究の方法

(1) オレオシンに GFP を融合したタンパク質 (OLE-GFP) を恒常的に発現する形質転換植物 (シロイヌナズナ) に *xrn4* の変異が導入され、OLE-GFP 遺伝子がサイレンシングした植物 (OLE-GFP (*xrn4-8*)) を化合物のスクリーニングに用いた。96 穴プレートの各ウェルに、50 μ l の MS 生育液に入った 5-8 つの種子を

播種し、生育 3 日後に高濃度 (最終濃度 2.5 μ M) の化合物を添加し、さらに 1 日後に GFP 蛍光を観察した。さらに、播種と同時に化合物を添加し 4 日後に観察するスクリーニングも行った。観察には、本研究室が開発した 96 穴プレートの各ウェルを自動で撮影することができる蛍光顕微鏡を用いた。用いた化合物ライブラリーは、植物において使用実績がある LATCA 化合物ライブラリー (4,038 種類の化合物) である。また、東京大学薬学部より提供された約 1500 種類の化合物も用いた。

(2) 同定した化合物を処理した植物における OLE-GFP 遺伝子の発現の詳細を調べるためにウエスタンブロット法による OLE-GFP タンパク質の検出 (抗 GFP 抗体を用いた。) とノーザンブロット法による OLE-GFP の mRNA および RNA サイレncing の指標である GFP 配列由来の siRNA の検出を行った。RNA の検出には、放射線同位元素でランダムラベル法によって作製した GFP プローブを用いた。また、化合物の植物の形態や生育への影響も観察した。各化合物を 1.0 μ M の濃度で含む生育培地上で 2 週間育てた植物を観察および RNA、タンパク質の検出に用いた。

4. 研究成果

(1) 化合物スクリーニング

OLE-GFP (*xrn4-8*) 植物は OLE-GFP 遺伝子が RNA サイレncing を受けているため、GFP 蛍光が野生型植物に比べてかなり低い (図 1)。化合物ライブラリーを OLE-GFP (*xrn4-8*) 植物に添加し、GFP 蛍光を強くする化合物を選抜したところ、図 1 に赤枠で囲った ChemicalA の例のように強い GFP 蛍光を示すもの 5 2 種類を一次候補化合物として選んだ。

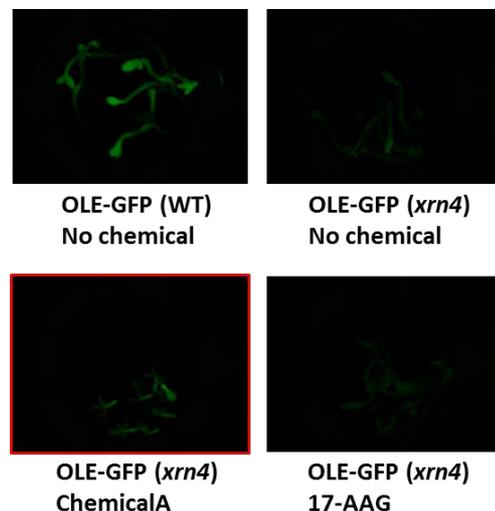


図1 OLE-GFPサイレンシング植物を用いた化合物スクリーニングの結果の例

さらに作用点が既知の化合物を加えて二次スクリーニングを行い、入手の簡便さを考慮し、ChemicalAを含む4つの新規化合物および3つの既知化合物を以下の実験に用いることとした。ここでは、それらの新規化合物を ChemicalA、ChemicalB、ChemicalC、ChemicalD とする。選んだ既知化合物は、RNAサイレンシングを抑制することがすでに知られている HSP90 の阻害剤 17-AAG、mRNA のポリA鎖を合成する酵素の阻害剤 Cordycepin、遺伝子サイレンシングを起こすまたは維持するために必要な DNA へのメチル化付加酵素の阻害剤 Zebularine である。しかしながら、本研究のアッセイにおいては図1に示すように RNA サイレンシングを阻害するはずの 17-AAG は GFP 蛍光を復帰させることはできなかった。

(2) 候補化合物の植物への影響の検証

候補化合物が植物の生育に与える影響を検証するために、化合物を含む生育培地で2週間、植物を育てた。その結果、図2に示すようにいくつかの化合物によってさまざまな形態異常を示すことがわかった。ChemicalA 処理は、厳しい生育阻害をおこす。ChemicalC 処理によって、形態異常を引き起こす以外に、約4割の植物が致死してしまうという結果を得た。また、Zebularine 処理によって、不確率にさまざまな形態異常を引き起こす現象がみられた。この結果は、ランダムに DNA メチル化が阻害されたことを示唆するかもしれない。それ以外の候補化合物も白化、生育阻害、致死性や根が伸びないなどの形態異常を誘発することがわかった。RNA サイレンシング経路は植物の発生に深く関与する microRNA の経路と分子機構を一部共にしている。したがって microRNA 経路も阻害されると考えると形態異常を示す結果は合理的なものであると考えられる。

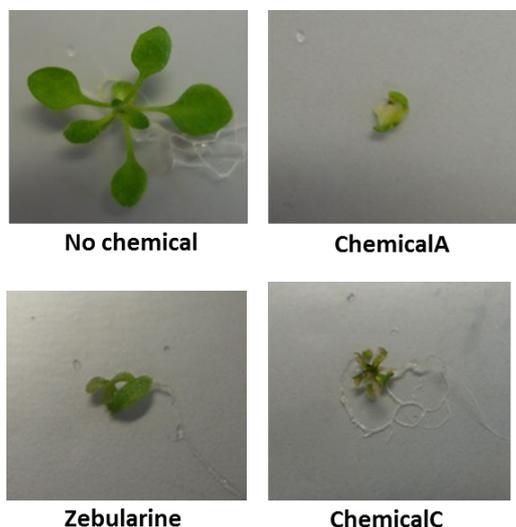


図2 化合物を含む培地で生育した植物

(3) 化合物処理した植物における OLE-GFP タンパク質の検出

候補化合物を含む生育培地上で二週間育てた植物からタンパク質を抽出し、ウエスタンブロット法によって OLE-GFP タンパク質を検出した(図3)。その結果、未処理植物に比べて、新規化合物の4つ ChemicalA、ChemicalB、ChemicalC、ChemicalD を処理した植物において、OLE-GFP の蓄積量が多くなることがわかった。この結果は、植物の GFP 蛍光が強くなる結果を支持するものである。RNA サイレンシングを阻害することが知られている 17-AAG 処理では、やはりタンパク質の蓄積が低い結果となった。

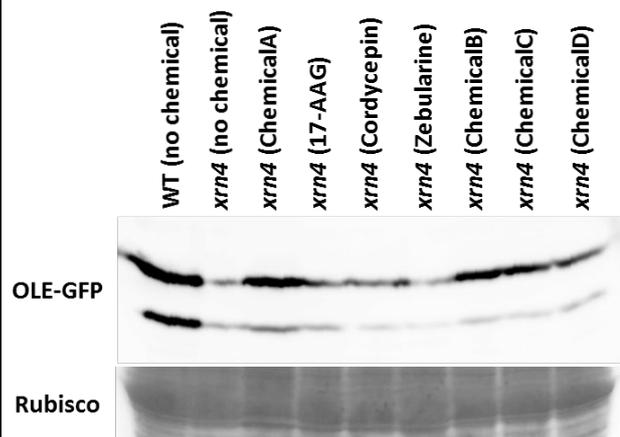


図3 OLE-GFPタンパク質のウエスタンブロットによる検出

括弧内に化合物名を記す。

(4) 化合物処理した植物における OLE-GFP の mRNA および GFP 由来 siRNA の検出

候補化合物を含む生育培地上で二週間育てた植物から total RNA を抽出し、ノーザンブロット法によって OLE-GFP の mRNA および GFP 配列由来の siRNA を検出した(図4)。その結果、ChemicalA 処理によって若干ではあるが、mRNA の蓄積が増加することがわかった。一方で、ChemicalA 処理によって、RNA サイレンシングの指標である siRNA の蓄積も増加する結果を得た。ChemicalA 以外の候補化合物の処理では、mRNA の蓄積に変化がみられなかった。図3に示すように ChemicalB、ChemicalC、ChemicalD 処理によって、タンパク質が増加する一方で、mRNA の蓄積が変わらないことを考慮すると、それらの化合物は mRNA の翻訳かそれ以降の機構に作用することが考えられる。

植物ウイルスがもつ RNA サイレンシング抑制因子の多くは、siRNA に結合し安定化させる (siRNA の蓄積を増加させる) 一方で、RNA サイレンシングを抑制することがわかっている。ケミカル A による現象はその RNA サイレンシング抑制因子の作用に似ている。したがって、siRNA に結合する因子がケミカル A

の標的となっている可能性が考えられる。今後の研究として、ChemicalA の作用をさらに詳しく調べていくつもりである。

実験全般にわたって、RNA サイレンシングを阻害するとされている 17-AAG が作用している結果は得られなかった。その理由として、本研究で用いた実験系が特定の化合物に対してうまく動いていない可能性が考えられる。今後、本研究で得られた候補化合物が別の実験系でどのように作用するかを調べる必要がある。

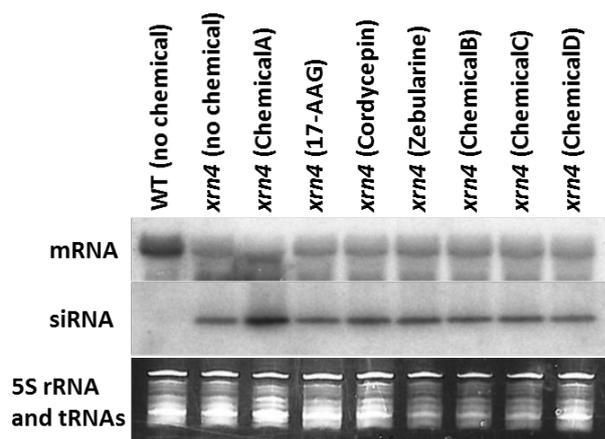


図4 OLE-GFPのmRNAおよびGFP由来のsiRNAのノーザンプロットによる検出
括弧内に化合物名を記す。

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 0 件)

[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 無し

6. 研究組織

(1) 研究代表者

栗原 志夫 (KURIHARA, Yukio)

理化学研究所・環境資源科学研究センタ

ー・研究員

研究者番号: 60455342

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号: