

平成 30 年 6 月 7 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2014～2017

課題番号：26660001

研究課題名(和文)植物成分の量的変化を可能にするRNAサイレンシングの制御系の開発

研究課題名(英文) Toward the development of an RNA silencing control system allowing quantitative modification of plant metabolites

研究代表者

金澤 章 (KANAZAWA, Akira)

北海道大学・農学研究院・准教授

研究者番号：30281794

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円

研究成果の概要(和文)：RNAサイレンシングを利用した遺伝子発現の制御により植物の代謝産物量を改変する観点から、植物の生活環におけるRNAサイレンシングの時間的・空間的な動態を解析した。レポーター遺伝子を導入したダイズ植物体を用いた解析により、RNAサイレンシングの植物体の生長過程における誘導と拡大、および、生殖の過程におけるリセットが各世代で起きること、ならびに、これらの現象の多様性に、植物間で保存された機構に加え、その植物に特有の構造的要因が関与することを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：Spatial and temporal dynamics of RNA silencing in the life cycle of plants were analyzed in terms of exploiting quantitative modification of plant metabolites through gene expression control mediated by RNA silencing. Using transgenic soybean plants that carry a reporter gene, the following points were revealed: the induction and spread of RNA silencing during plant growth and its reset during reproduction occur in each generation; specific features of the architecture of the plant, in addition to the mechanisms conserved in plants, are involved in the diversity of these phenomena.

研究分野：農学

キーワード：遺伝子発現 発現制御 植物 発生 RNA

1. 研究開始当初の背景

RNAサイレンシングは、RNAを介した塩基配列特異的な相互作用によって誘導される、遺伝子の発現が抑制される現象である。この現象の理解は、1990年に報告された、遺伝子を導入した植物におけるコサプレッションの発見に端を発する。1998年の線虫におけるRNA干渉の発見、ならびに、その後の遺伝学的な解析および生化学的な解析による反応に関与する因子の同定等を経て、多様なRNAサイレンシングの反応経路の存在が明らかになった。RNAサイレンシングの誘導には、二本鎖RNA、および、そのプロセッシングにより生じる21-24ヌクレオチド長の低分子RNAが関与する。これらの分子を含む反応により、相同な塩基配列を含むmRNAの分解、あるいは、相同な塩基配列を含むDNAに対するエピジェネティックな修飾を介した転写抑制が起きることで、遺伝子の発現が抑制される (Brodersen and Voinnet 2006)。

遺伝子の転写される領域の配列を逆向きの反復配列として含むRNAを産生するように設計したDNA構築物を植物に導入すると、二本鎖RNAが形成され、程度の強いRNAサイレンシングが高頻度で誘導される (Smith et al. 2000)。これに対し、タンパク質の産生を目的とした場合のように、遺伝子のセンス鎖のRNAを産生するDNA構築物を導入した場合、低頻度でRNAサイレンシング(コサプレッション)が誘導され、組織レベルで見ると、さまざまな程度で遺伝子の発現抑制が起きる。これらの場合、遺伝子機能が完全に不活性化される突然変異の誘発とは異なり、発現抑制に伴う量的な遺伝子機能の変化が誘導可能である。RNAサイレンシングを利用することにより、さらには、その効率を制御することにより、遺伝子の発現量をさまざまな段階に制御することができれば、植物の代謝経路の量的制御が可能になり、代謝産物の含量を制御することが可能になるものと考えられた。

植物においては、さまざまな遺伝子の導入に伴ってRNAサイレンシングが誘導された事例、ならびに、遺伝子導入を行っていない植物における自然発生型のRNAサイレンシングの事例が報告されている (Kanazawa 2008)。しかしながら、形質変化が外観に現れる組織特異的な遺伝子のRNAサイレンシングに関するものを除いては、RNAサイレンシングが植物体の発生の過程でどのように誘導され、RNAサイレンシングを起こす部位がどのように植物体内で生じるのか、体系的に解析した研究は少数であった。とりわけ外来遺伝子のRNAサイレンシングに関しては、特定の組織において誘導が阻害されることを見出した事例 (Voinnet et al. 1998; Mitsuhashi et al. 2002; Liang et al. 2012) や、世代間での異同を解析した事例 (Mitsuhashi et al. 2002) が存在したものの、RNAサイレンシングの動態が生活環にわたってどのように変化する

のか、さらには、これらの事象が植物種間と同じであるのか否かといった基礎的な知見は、集積していなかった。

2. 研究の目的

植物におけるRNAサイレンシングによる遺伝子発現の量的制御を念頭に、RNAサイレンシングの強度に影響を及ぼす要因として、その誘導や拡大、世代間における伝達を含む、時間的・空間的な動態を明らかにすることを第一の目的とした。RNAサイレンシングの誘導を植物体の全身にわたり視覚的に観察することを可能にすることから、緑色蛍光タンパク質 (green fluorescent protein: GFP) の遺伝子を恒常的な転写活性を持つプロモーターに連結して導入したダイズを研究材料として用いた。他の植物を対象とした研究において得られた知見と比較することで、この植物を用いて検出された事象が、植物種によらず普遍的なものであるか、あるいは、この植物に特有のものであるか検証し、その機構を明らかにすること、ならびに、その機構を制御することを目指した。

3. 研究の方法

(1) 研究材料

カリフラワーモザイクウイルス35Sプロモーターに連結したGFP遺伝子を導入したダイズ形質転換体の集団が作出され (Sato et al. 2007)、その初期世代においてGFP蛍光が消失した個体が見出されていた。この個体の自殖後代の植物集団を本研究の解析に用いた。GFP遺伝子のサイレンシングを解析するため、植物体のさまざまな発生段階の組織をGFP蛍光の観察、ならびに、RNAの抽出に用いた。

(2) GFP遺伝子の発現状態の解析

GFP遺伝子の発現状態を、蛍光顕微鏡により観察した。また、組織からRNAを抽出し、Kasai et al. (2012) の方法に基づき、定量RT-PCR法により解析した。

(3) 低分子RNA (short interfering RNA: siRNA) の解析

Goto et al. (2003) に基づく方法により、組織から低分子RNAを含む画分を単離し、GFP遺伝子のsiRNAの産生状態をノーザン法により解析した。

(4) トレーサーを用いた解析

カルボキシフルオレセインジアセテート (CFDA) 溶液を葉に注射し、蛍光を発する領域の時間の経過に伴う変化を解析した。

(5) 組織学的解析

植物体より組織を切り出し、寒天に包埋した後、振動刃ミクロームにより組織切片を作成した。組織切片を蛍光顕微鏡により観察した。

4. 研究成果

(1) 植物体の生長過程における RNA サイレンシングの誘導と拡大の様式

GFP 蛍光および GFP 遺伝子の mRNA 量に関する解析から、GFP 遺伝子の発現量は、個体間で異なること、ならびに、一つの個体内においても発生段階の異なる組織の間では異なることが明らかになった。GFP 蛍光強度の減少および GFP 遺伝子の mRNA 量の減少は、GFP 遺伝子の siRNA の産生と関係しており、GFP 遺伝子の転写後の RNA 分解によるサイレンシングが起きているものと推察された。

ダイズ的生活環のさまざまな段階における GFP 蛍光の解析から、GFP 遺伝子のサイレンシングの誘導と拡大の様式について以下のことが明らかになった。GFP 遺伝子のサイレンシングは、植物体の生長過程を通して同じ程度で起きているわけではなく、発芽後のある段階において局所的に誘導され、その後の植物体の生長過程において他の組織へ、やがては全身的に、誘導範囲を拡大した。植物体の生長過程で GFP 遺伝子のサイレンシングが最初に誘導される組織は、初生葉である場合が最も多かった。

(2) 生殖過程における RNA サイレンシング

ダイズの莢における GFP 遺伝子のサイレンシングの有無に関わらず、その内部に形成される胚においては GFP 遺伝子のサイレンシングは検出されなかった。このことから、自律的な GFP 遺伝子のサイレンシングの誘導と GFP 遺伝子のサイレンシングを誘導するシグナルの拡散の両者が、胚発生の過程では制限されているものと考えられた。組織学的な解析から、GFP 遺伝子のサイレンシングは種皮においては起きうるものの、その内部ではそれが起きないようにする仕組みがあることが示唆された。これらのことから、GFP 遺伝子のサイレンシングは、配偶子形成から胚発生の過程においてリセットされ、発芽後のシユートにおいて細胞自律的に誘導されるものと推察された。また、こうした事象が各世代の生活環において繰り返されるものと考えられた。

(3) RNA サイレンシングの組織間での拡大に影響する要因

前述のとおり、GFP 遺伝子のサイレンシングが、植物体の生長の過程で、組織内、および組織間で広がる現象が観察された。一般に RNA サイレンシングの誘導には、細胞自律的に起きるものに加え、他の細胞や組織から移動してきたシグナルによって起きるものがあると考えられている。後者に関しては、原形質連絡を介して細胞間でシグナルが移動する機構と維管束を通して全身的にシグナルが移動する機構が想定されている (Melnyk et al. 2011)。本研究において検出された GFP 蛍光の消失は、これらの機構と矛盾しない様式で拡大していた。シグナルの移

動が関与する可能性を検証するため、トレーサーとして用いられる CFDA の溶液を葉脈に注入して、蛍光を発する領域を経時的に観察した。その結果、GFP 蛍光の消失が広がる過程で見られたものに類似した形状での蛍光の広がりが観察され、維管束を介したシグナルの移動が支持された。

こうした観察結果に加え、特定の組織における GFP 遺伝子のサイレンシングの誘導の抑制が観察された。その一つとして、GFP 蛍光が互いに接続している組織間で異なる現象、例えば、GFP 蛍光が消失している茎に接続している葉柄において GFP 蛍光が消失していないといった現象が観察された。このことから、GFP 遺伝子のサイレンシングの有無に両組織が接続する節の構造が関わっていることが示唆された。節に関する組織学的な観察から、茎から一つの葉柄に入る葉跡数が少数であること等を確認した。このように組織間が限られた数の維管束によって連絡していることが、GFP 遺伝子のサイレンシングが植物体内で広がることを制限する要因となりうるものと示唆された。

以上のことから、植物体内での RNA サイレンシングの誘導とその後の生長過程における誘導範囲の拡大は、基本的に植物種間で保存された機構によって起きるものの、それに加えて、植物種間で異なる構造的な要因によって影響を受けると考えられた。また、これらのことが複合的に作用することにより、植物体内における RNA サイレンシングの動態の多様性が生じているものと推察された。

(4) 考察

現在までに RNA サイレンシングの反応効率を細胞レベルで自在に制御する方法は確立していない。この目的では RNA サイレンシングの反応経路に含まれる因子を改変することが有効である可能性がある。一方、本研究で得られた知見は、個体レベルおよび組織レベルでの RNA サイレンシングの効果を理解する上で有用であると考えられる。上記の現象に加え、本研究では、GFP 遺伝子のサイレンシングが起きている個体の後代の集団が、強いサイレンシングを各世代で起こす個体群と、サイレンシングを起こさない、あるいはその程度が低い個体群に分化する傾向が見られた。このような変化を利用すること、ならびに、本研究で明らかにした RNA サイレンシングの動態を勘案することにより、少なくとも個体レベルおよび組織レベルにおいて、代謝産物を量的に制御することが可能になるものと考えられた。

<引用文献>

Brodersen, P. and Voinnet, O. (2006) The diversity of RNA silencing pathways in plants. *Trends Genet.* 22, 268-280.

Goto, K., Kanazawa, A., Kusaba, M. and Masuta, C. (2003) A simple and rapid method to detect plant siRNAs using nonradioactive probes. *Plant Mol. Biol. Rep.* 21, 51-58.

Kanazawa, A. (2008) RNA silencing manifested as visibly altered phenotypes in plants. *Plant Biotechnol.* 25, 423-435.

Kasai, M., Koseki, M., Goto, K., Masuta, C., Ishii, S., Hellens, R.P., Taneda, A. and Kanazawa, A. (2012) Coincident sequence-specific RNA degradation of linked transgenes in the plant genome. *Plant Mol. Biol.* 78, 259-273.

Liang, D., White, R.G. and Waterhouse, P.M. (2012) Gene silencing in Arabidopsis spreads from the root to the shoot, through a gating barrier, by template-dependent, nonvascular, cell-to-cell movement. *Plant Physiol.* 159, 984-1000.

Melnyk, C.W., Molnar, A. and Baulcombe, D.C. (2011) Intercellular and systemic movement of RNA silencing signals. *EMBO J.* 30, 3553-3563.

Mitsuhara, I., Shirasawa-Seo, N., Iwai, T., Nakamura, S., Honkura, R. and Ohashi, Y. (2002) Release from post-transcriptional gene silencing by cell proliferation in transgenic tobacco plants: possible mechanism for noninheritance of the silencing. *Genetics* 160, 343-352.

Sato, H., Yamada, T., Kita, Y., Ishimoto, M. and Kitamura, K. (2007) Production of transgenic plants and their early seed set in Japanese soybean variety, Kariyutaka. *Plant Biotechnol.* 24, 533-536.

Smith, N.A., Singh, S.P., Wang, M.B., Stoutjesdijk, P.A., Green, A.G. and Waterhouse, P.M. (2000) Total silencing by intron-spliced hairpin RNAs. *Nature* 407, 319-320.

Voinnet, O., Vain, P., Angell, S. and Baulcombe, D.C. (1998) Systemic spread of sequence-specific transgene RNA degradation in plants is initiated by localized introduction of ectopic promoterless DNA. *Cell* 95, 177-187.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計1件)

Mori, A., Sato, H., Kasai, M., Yamada, T. and Kanazawa, A. (2017) RNA silencing in the life cycle of soybean: multiple restriction systems and spatiotemporal variation associated with plant architecture. *Transgenic Res.* 26, 349-362. 査読号 doi: 10.1007/s11248-017-0011-8

〔学会発表〕(計6件)

森あゆみ・佐藤 洋・河西めぐみ・山田哲也・金澤 章 植物におけるRNAサイレンシングの動態には植物体の構造上の特性が影響する 日本遺伝学会第88回大会 日本大学 (静岡県・三島市) 2016年9月7日

金澤 章 レトロトランスポゾンの挿入を介した植物の環境適応とエピメュータジェネシス: 重複遺伝子を持つダイズにおける事例 2016年度国立遺伝学研究所 研究集会「転移因子と宿主の相互作用による生命機能と進化」国立遺伝学研究所 (静岡県・三島市) 2016年9月6日

福本沙弥・河西めぐみ・金澤 章 ペチュニアのカルコン合成酵素遺伝子のコサプレッションとエピジェネティックな表現型の復帰過程におけるシトシンメチル化の動態 日本育種学会第128回講演会 新潟大学(新潟県・新潟市)2015年9月12日

金澤 章 ダイズにおけるRNAサイレンシングによる遺伝子発現制御とその利用 第8回ダイズ研究会 岩手大学(岩手県・盛岡市) 2015年3月6日

6. 研究組織

(1)研究代表者

金澤 章 (KANAZAWA, Akira)

北海道大学・大学院農学研究院・准教授

研究者番号: 30281794