

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 16 日現在

機関番号：34315

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2015～2016

課題番号：15K14665

研究課題名(和文)植物Small RNAの特異性とウイルスの病原性に関する研究

研究課題名(英文)Studies of the small RNA specificity and the viral pathogenicity in plants

研究代表者

竹田 篤史(Takeda, Atsushi)

立命館大学・生命科学部・准教授

研究者番号：60560779

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)：ウイルスが植物に感染すると、RNAサイレンシング機構による抵抗性反応が引き起こされる。この際、大量に生じるウイルス由来小分子RNA(vsiRNA)が主にAGO1に取り込まれた後に、配列特異的なRNAの分解が起こる。本研究では、AGO1-vsiRNA複合体の配列特異性を明らかにし、ウイルス感染時にウイルスRNA以外のどのmRNAが副次的に分解されているのかを予測できるようにすることを目指した。本研究の結果から、これまで詳細に解析されていなかった植物AGO1の特異性決定機構の一部が明らかとなり、植物ウイルス感染時の遺伝子発現抑制におけるvsiRNAの役割を評価することが可能となった。

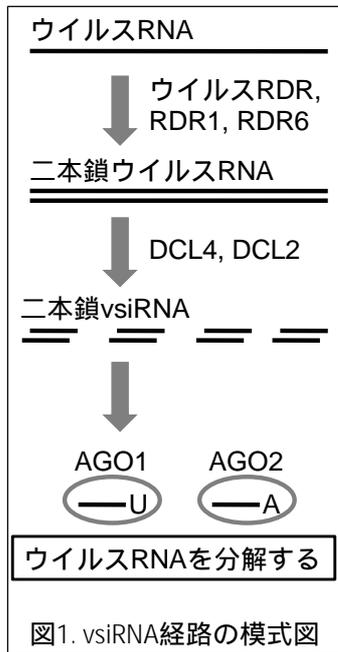
研究成果の概要(英文)：In plants, viral infection induces RNA silencing, which is a basal immune response against viruses. In the anti-viral pathways of plant RNA silencing, abundant viral-derived small-interfering RNAs (vsiRNAs) are generated through functions of Dicer-like enzymes (DCLs). A class of 21 nt vsiRNAs cleaved by DCL4 is incorporated into Argonaute 1 (AGO1). The AGO1-vsiRNA complex has a potential to cleave not only viral RNAs but also endogenous mRNAs dependent on the complementarity between target RNAs and vsiRNAs in AGO1. However, determinants of target specificity of AGO1-vsiRNA complex are unknown and thus we cannot predict the target mRNAs downregulated upon viral infection. In this study, we examined the AGO1 specificity in plants experimentally by using a massive transient luciferase assay. We identified several determinants of the plant AGO1 specificity, which can help predict the target mRNAs of vsiRNAs in viral-infected plants in future.

研究分野：植物ウイルス学

キーワード：ウイルス由来siRNA RNAサイレンシング AGO1 Nicotiana benthamiana miRNA

## 1. 研究開始当初の背景

モデル植物のシロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) に RNA ウイルスが感染すると、図 1 に示した RNA サイレンシング経路を通じてウイルス抵抗性反応が起こる。この際、ウイルスゲノム全域から、大量のウイルス由来小分子 RNA (virus-derived small-interfering RNA: vsiRNA) が生じる。vsiRNA のうち、5' 末端が U のものは Argonaute 1 (AGO1) タンパク質に、そして 5' 末端が A のものは AGO2 タンパク質に取り込まれて、ウイルス RNA の分解に働くと考えられている。これらの AGO-vsiRNA 複合体は、



感染時に、AGO-vsiRNA 複合体によって、どの植物 mRNA が分解されているのかは不明であり、それを予測する方法も確立されていなかった。

## 2. 研究の目的

本研究の目的は、植物ウイルス感染時に生じる vsiRNA が、ウイルス感染時に果たしている役割を明らかにすることである。RNA ウイルスが植物に感染すると、RNA サイレンシング機構によるウイルス抵抗性反応 (図 1) が引き起こされる。この際、21 塩基長の vsiRNA が大量に生じ、vsiRNA が主に AGO1 と AGO2 に取り込まれた後に、配列特異的なウイルス RNA の分解が起こる。vsiRNA は、相補性に従って植物の mRNA も分解に導いているはずである。しかし、vsiRNA による植物 mRNA 分解のウイルス感染時における役割はよく分かっていない。本研究では、AGO1-small RNA 複合体の配列特異性を明らかにし、ウイルス感染時に個別の vsiRNA がどの mRNA を分解しているのかを予測できるようにすることを目指した。

## 3. 研究の方法

AGO1 タンパク質は、ウイルス非感染時には主にマイクロ RNA (miRNA) と呼ばれる内在性小分子 RNA を取り込んで AGO1-miRNA 複合体を形成する。この AGO1-miRNA 複合体は、植物の発生・分化やストレス応答における遺伝子発現調節を担っている。

本研究では、AGO1-vsiRNA 複合体の特異性を予測できるようにする目的で、はじめに miRNA を利用して AGO1 タンパク質の標的 mRNA 認識機構の解明を試みた。AGO1-miRNA 複合体の標的 RNA 認識特異性を定量的に調べるために、モデルタバコの *Nicotiana benthamiana* 葉での一過的ルシフェラーゼアッセイ系の構築を試みた。

次に、miRNA と一つのミスマッチをもつ 21 種類のルシフェラーゼコンストラクト群を構築し、遺伝子発現抑制が起こるかどうかを検証し、AGO1 による遺伝子発現抑制の際に重要となる塩基対の同定を試みた。

一つのミスマッチをもつ実験区の結果を元に、ルシフェラーゼ遺伝子と miRNA 間に二つのミスマッチをもつコンストラクト群を作成し、遺伝子発現抑制が起こるかどうかを検証した。さらに、二つのミスマッチをもつ実験区の結果を元に、ルシフェラーゼ遺伝子と miRNA 間に三つのミスマッチをもつコンストラクト群を作成し、遺伝子発現抑制が起こるかどうかを検証した。

上記の実験結果を元に、vsiRNA の標的 mRNA の予測を試みた。

## 4. 研究成果

本研究では、植物ウイルス感染時に生じる vsiRNA の作用を予測するために、AGO1-miRNA の特異性を検証した。本研究の成果は以下の (1)~(5) の通りである。

(1) 通常の栽培条件下で *Nicotiana benthamiana* の葉で発現していない miRNA を利用して、AGO1-miRNA 複合体の遺伝子発現抑制能を一過的・定量的に調べる系の構築に成功した。

(2) (1) で構築に成功した系を用いて、miRNA とルシフェラーゼ mRNA 間に一つのミスマッチをもつ 21 種類の区で遺伝子発現抑制が起こるかどうかを検証した。その結果、21 箇所中 6 箇所において、一塩基のミスマッチが生じただけで AGO1-miRNA 複合体による遺伝子発現抑制が起こらなくなることが明らかとなった。

(3) (1) で構築に成功した系を用いて、miRNA とルシフェラーゼ mRNA 間に二つのミスマッチをもつ区で遺伝子発現抑制が起こるかどうかを検証した。その結果、当初の予想に反して、これまでの動物の AGO タンパク質にお

ける実験などから重要だと思われていなかった位置の塩基対が植物 AGO1 による遺伝子発現抑制に重要であることが明らかとなった。

(4) (1)で構築に成功した系を用いて、miRNA とルシフェラーゼ mRNA 間に三つのミスマッチをもつ区で遺伝子発現抑制が起こるかどうかを検証した。その結果、miRNA と mRNA 間に 4 つ以上のミスマッチが生じる場合、ほぼ例外なく遺伝子発現抑制が起こらなくなることが示唆された。

(5) 上記(2)～(4)の実験結果を元に、AGO1-vsRNA の標的 mRNA を予測した。研究期間は終了したが、予測された標的 mRNA 候補が実際に発現抑制されるかどうかを検証した後、成果を発表したいと考えている。

今回の一連の実験から、これまで未知な部分が存在した AGO1-miRNA 複合体の特異性決定メカニズムの一端が明らかとなった。本研究の成果は、miRNA や tasiRNA などの既知の内因性小分子 RNA や、ウイルスやウイロイド由来の siRNA による遺伝子発現抑制に関する研究の進展に貢献するものになるであろう。

#### 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 2 件)

1. Tsuzuki M., Motomura K., Kumakura N. and Takeda A. Interconnections between mRNA Degradation and RDR-Dependent siRNA Production in mRNA Turnover in Plants. *Journal of Plant Research* (査読有) 130, (2017) 211-226. DOI: 10.1007/s10265-017-0906-8
2. 竹田篤史「植物ウイルス由来 siRNA の役割とは？」植物感染生理談話会論文集「感染と防御をめぐる新潮流」(査読無) 50, (2015) 103-112.

[学会発表](計 12 件)

1. 井手口 真也、竹田 篤史「植物 U6 プロモーターを用いた sgRNA の一過的発現に関する研究」、第 39 回日本分子生物学会年会、2016 年 12 月 1 日、パシフィコ横浜(横浜市・西区)
2. 白谷 公孝、舛田 さくら、長田 怜子、唐戸 俊介、都筑 正行、佐藤 昌直、渡邊 雄一郎、竹田 篤史「植物 micro-RNA の認識特異性に関する研究と

その応用」、第 80 回日本植物学会、2016 年 9 月 16 日、沖縄コンベンションセンター(沖縄県・宜野湾市)

3. 井手口 真也、竹田 篤史「CRISPR-Cas9 を利用した植物遺伝子の多重破壊系の開発」、第 80 回日本植物学会、2016 年 9 月 16 日、沖縄コンベンションセンター(沖縄県・宜野湾市)
4. 後藤 尚隆、竹内 信弘、竹田 篤史「*Nicotiana benthamina* における RNA サイレンシング活性定量系の確立」、第 80 回日本植物学会、2016 年 9 月 16 日、沖縄コンベンションセンター(沖縄県・宜野湾市)
5. 未森 彩洋子、中村 光希、奥野 哲郎、竹田 篤史「ウイルス感染時に認められる AGO2 遺伝子の発現誘導に関する研究」、第 80 回日本植物学会、2016 年 9 月 16 日、沖縄コンベンションセンター(沖縄県・宜野湾市)
6. 井手口 真也、竹田 篤史「シロイヌナズナ由来の U6 プロモーターによる sgRNA の発現に関する研究」、第 1 回日本ゲノム編集学会、2016 年 9 月 6 日、広島国際会議場(広島市・中区)
7. 富田 麻理絵、菊池 貴光、渡邊 雄一郎、竹田 篤史「人工ランダム tasiRNA ベクターの開発とその利用」、第 5 回植物 RNA 研究者ネットワークシンポジウム、2016 年 1 月 9 日、東京大学(東京都・目黒区)
8. 白谷 公孝、舛田 さくら、長田 怜子、唐戸 俊介、都筑 正行、佐藤 昌直、渡邊 雄一郎、竹田 篤史「植物の microRNA-標的 mRNA 間に 1~3 ヶ所のミスマッチがある場合の認識特異性に関する研究」、BMB2015(第 38 回日本分子生物学会年会第 88 回日本生化学会大会合同大会)、2015 年 12 月 2 日、神戸国際展示場(神戸市・中央区)
9. 未森 彩洋子、中村 光希、奥野 哲郎、竹田 篤史「*Red clover necrotic mosaic virus* 感染時に認められる AGO2 遺伝子の発現誘導に関する研究」、平成 27 年度日本植物病理学会関西西部会、2015 年 9 月 29 日、あわぎんホール(徳島県・徳島市)
10. 佐嶋 宏哉、菊池 貴光、渡邊 雄一郎、竹田 篤史「TALE ヌクレアーゼを利用したトバモウイルス抵抗性植物の作出に関する研究」、平成 27 年度日本植物病理学会関西西部会、2015 年 9 月 29 日、あわぎんホール(徳島県・徳島市)

研究者番号：20517693

11. 白谷 公孝、長田 怜子、都筑 正行、  
唐戸 俊介、舛田 さくら、渡邊 雄一  
郎、竹田 篤史「miRNAによる標的 mRNA  
認識特異性に関する研究」、第 79 回日本  
植物学会、2015 年 9 月 6 日～2015 年 9  
月 8 日、朱鷺メッセ（新潟市・中央区）

12. 竹田 篤史「植物ウイルス由来 siRNA の  
役割とは？」、平成 27 年度感染生理談話  
会、2015 年 8 月 25 日、道後温泉メルパ  
ルク松山（愛媛県・松山市）

〔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：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

<http://research-db.ritsumeai.ac.jp/Profiles/103/0010294/profile.html>

## 6. 研究組織

(1) 研究代表者

竹田 篤史（TAKEDA ATSUSHI）  
立命館大学・生命科学部  
・准教授  
研究者番号：60560779

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

佐藤 昌直（SATO MASANAO）  
北海道大学・農学研究院  
・助教

(4) 研究協力者

なし