

令和 3 年 6 月 16 日現在

機関番号：34315

研究種目：挑戦的研究(萌芽)

研究期間：2018～2020

課題番号：18K19219

研究課題名(和文)植物ウイルスおよびウイロイドによる宿主遺伝子の発現抑制機構に関する研究

研究課題名(英文)Study of virus-mediated and viroid-mediated silencing of host plant genes

研究代表者

竹田 篤史(Takeda, Atsushi)

立命館大学・生命科学部・教授

研究者番号：60560779

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 4,900,000円

研究成果の概要(和文):本研究では、植物がウイルスやウイロイドを撃退する際に、これらの病原体のゲノムRNAから生じる小分子RNAが果たす役割を明らかにするための基盤の確立を目指した。今回、ウイルスおよびウイロイド由来の小分子RNAを取り込むことが知られているAGO1およびAGO2タンパク質に着目して研究を実施した。本研究の主な成果は、「(1)植物において、AGO1-小分子RNA複合体が標的mRNAを決定する際のG:U wobble結合の役割を明らかにしたこと」と、「(2)植物において、AGO2-小分子RNA複合体の標的mRNA決定機構を解析するためのアッセイ系を確立したこと」の二点である。

研究成果の学術的意義や社会的意義

これまでに、G:U wobbleに着目して植物のAGO1の標的mRNA特異性への影響を研究した例はほぼ無く、植物のAGO2の標的特異性を正確に検証可能な系も確立されていなかった。今回得られた成果によって、植物ウイルスやウイロイドの病原性を研究する際に、AGO1やAGO2を介して分解される宿主mRNAを予測可能にするための基盤が確立された。今回得られた成果は、学術的に植物病理学上意義深いだけでなく、将来の植物ウイルス病・ウイロイド病の防除や、ウイルス・ウイロイド抵抗性品種の開発に貢献する可能性を秘めている。

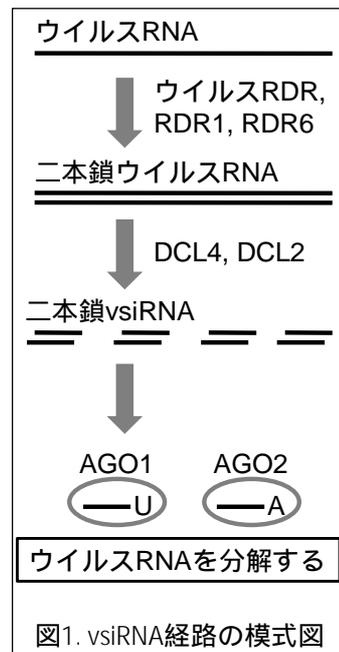
研究成果の概要(英文):To date, it is unclear how AGO1 and AGO2 determine the target mRNAs to be degraded in plants. To predict the target host mRNAs of AGO1-virus-derived siRNAs (vsiRNAs) and AGO2-vsiRNAs more precisely, I analyzed target specificities of AGO1-miRNA and AGO2-miRNA in plants. In case of AGO1-mediated silencing, I tested effects of G:U wobbles between miRNA and mRNAs. Results of a series of transient assay showed that G:U wobble has an intermediate effect between the base pairing and the mismatch in a position-dependent manner. In case of AGO2-mediated silencing, I established a transient system to test the requirement of complementarities between miRNA and mRNAs by using a newly generated ago triple mutant of *Nicotiana glauca*. This system allows us to analyze mechanisms of the AGO2 specificity in plants. These basic analyses will help establish algorithms to predict host mRNAs targeted by AGO1-vsiRNAs and AGO2-vsiRNAs in future.

研究分野：植物病理学

キーワード：植物ウイルス ウイロイド siRNA AGO 遺伝子発現抑制

1. 研究開始当初の背景

- (1) 植物に植物 RNA ウィルスが感染すると、図 1 に示した RNA サイレンシング機構による抵抗性反応が起こる。この際、ウィルスゲノム全体から、大量のウィルス由来小分子 RNA (virus-derived small-interfering RNA: vsiRNA)が生じる。また、植物にウィロイドが感染した際にも、おそらく同様の経路を介して、ウィロイド由来小分子 RNA (viroid-derived small-interfering RNA: vdsiRNA)が生じると考えられる。vsiRNA や vdsiRNA 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、ウィルス RNA やウィロイド RNA の分解に働くと予想されている。これらの AGO-vsiRNA や AGO-vdsiRNA 複合体は、ウィルスやウィロイドの RNA だけでなく、相補性に従って植物の内在性 mRNA も分解しているはずである。研究開始時点では、キュウリモザイクウィルスの Y サテライト由来の vsiRNA によるタバコ ChII mRNA の分解(PLoS Pathog. 2011, 7, e1002021)や、ジャガイモやセイモウイロイド由来の vdsiRNA によるトマト CalS-11 like mRNA の分解(Plant Cell 2015, 27, 2178-2194)など、少数の例が報告されていた。しかし、他の植物ウィルスやウィロイドの感染時に、AGO-vsiRNA や AGO-vdsiRNA 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、それを正確に予測する方法も確立されていなかった。



- (2) 我々は、先行研究において、一過的ルシフェラーゼアッセイによって AGO1-miRNA 複合体の標的特異性を検証する系を構築していた。この系を用いて、AGO1 中の miRNA と標的 mRNA 間に 1 つから 3 つのミスマッチが存在する場合に、mRNA が標的として分解され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を明らかにしていた。しかし、AGO1 中の miRNA と mRNA 間にミスマッチ以外の G:U wobble やバルジが生じる場合に、標的として mRNA が分解されるかどうかは検証されていなかった。
- (3) 植物の AGO2 はウィルス抵抗性に関与することが知られていた。しかし、AGO2-siRNA の標的 mRNA 特異性は不明であった。

2. 研究の目的

本研究の目的は、以下の 4 点である。

- (1) 植物ウィルスおよびウィロイドが植物に感染した際に生じる vsiRNA や vdsiRNA が、ウィルスやウィロイドの感染時に果たしている役割を明らかにすること
- (2) AGO1 に取り込まれた vsiRNA および vdsiRNA が切断する宿主 mRNA を正確に予測するために、AGO1 中の miRNA と mRNA 間に G:U wobble が存在する際の影響を個別に評価すること
- (3) AGO1 に取り込まれた vsiRNA および vdsiRNA が切断する宿主 mRNA をより正確に予測するために、AGO1 中の miRNA と mRNA 間に 10,000 種類以上の様々なミスマッチや G:U wobble の組合せを持つ標的 mRNA プールを確立し、次世代シーケンサーを利用した超並列レポーターアッセイ系を確立すること
- (4) AGO2 に取り込まれた vsiRNA および vdsiRNA が切断する宿主 mRNA を予測するために、AGO2 による遺伝子発現抑制を個別に評価するための一過的アッセイ系を構築すること

3. 研究の方法

- (1) AGO1 タンパク質は、ウィ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。本研究では、*Nicotiana benthamiana* 葉で発現していない miRNA を利用した一過的ルシフェラーゼアッセイ系によって、AGO1-vsiRNA および AGO1-vdsiRNA 複合体の特異性決定における G:U wobble の影響を検証した。
- (2) AGO1-miRNA 複合体の特異性を網羅的に解析するために、様々なミスマッチや G:U wobble を組み合わせた 10,000 種類以上の標的配列プールを構築した。このプールを用いて超並列レポーターアッセイを行い、AGO1-miRNA 複合体の特異性をより詳細に決定することを試みた。
- (3) AGO2-vsiRNA および AGO2-vdsiRNA 複合体の特異性を予測できるようにする目的で、AGO2 に取り込まれることが報告されている miRNA を利用して、AGO2 タンパク質の標的 mRNA 認識機構の解明を試みた。AGO2-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

#### 4. 研究成果

本研究では、植物ウイルスおよびウイロイド感染時に生じる vsiRNA と vdsiRNA の作用を予測するために、AGO1-miRNA と AGO2-miRNA 複合体の特異性の検証を試みた。本研究の成果は以下の(1)~(4)の通りである。

- (1) AGO1-miRNA 複合体の遺伝子発現抑制能を一過的・定量的に調べる系を用いて、miRNA と標的 mRNA 間に 1 つおよび 2 つの G:U wobble を持つ区で遺伝子発現抑制が起こるかどうかを検証した。また、miRNA と標的 mRNA 間に 1 つの G:U wobble と 1 つのミスマッチを持つ区でも遺伝子発現抑制が起こるかどうかを検証した。その結果、G:U wobble には、塩基対とミスマッチの中間的な影響があることが明らかとなった。また、G:U wobble の位置によって、塩基対のように振る舞う場合とミスマッチのように振る舞う場合があることが明らかとなった。
- (2) AGO1-miRNA 複合体の特異性を網羅的に解析するために、様々なミスマッチや G:U wobble を組み合わせた 10,000 種類以上の標的配列プールを構築した。このプールを用いて超並列レポーターアッセイを行った。次世代シーケンス解析の結果、個別のアッセイで遺伝子発現抑制が見られた区でも、遺伝子発現抑制が認められなかった。この結果は、AGO1 中の miRNA と標的 mRNA 間に 1~4 つのミスマッチを含むような mRNA が、想像以上に target mimicry (miRNA の機能を阻害する mRNA)として機能する可能性を示唆している。
- (3) AGO2 に取り込まれることが報告されている複数の miRNA を利用して、AGO2-miRNA 複合体の標的 RNA 認識特異性を定量的に調べるための *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。AGO2 の発現はウイルス感染時に誘導されるため、外来の AGO2 を一過的に発現させてウイルス感染時の状況を再現することを試みた。実験の結果、テストした複数の miRNA を単独で発現させただけで標的ルシフェラーゼの発現抑制が起こってしまった。この結果は、実験に用いた miRNA が内在性の AGO2 の他、他の AGO タンパク質に取り込まれて機能した可能性を示唆している。
- (4) (3)の結果から、AGO2-miRNA 複合体の標的 RNA 認識特異性を評価するためには、*N. benthamiana* の遺伝的改変が必要であることが考えられた。そこで、*N. benthamiana* の AGO2 遺伝子、および系統解析で同じクレードになる AGO7 遺伝子を破壊することを試みた。CRISPR-Cas9 を用いたゲノム編集の結果、ago2/ago7a/ago7b の三重変異体の作出に成功した（外来遺伝子の除去には至っていない）。この三重変異体を用いて AGO2-miRNA 複合体の標的 RNA 認識特異性を調べるための一過的ルシフェラーゼアッセイを行ったところ、外来で発現させた AGO2 に依存して標的遺伝子の発現抑制が起こった。この系を利用することで、今後 AGO2-miRNA 複合体の標的 RNA 認識特異性を検証することが可能になった。

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Motomura Kazuki, Arae Toshihiro, Araki-Uramoto Haruka, Suzuki Yuya, Takeuchi Hidenori, Suzuki Takamasa, Ichihashi Yasunori, Shibata Arisa, Shirasu Ken, Takeda Atsushi, Higashiyama Tetsuya, Chiba Yukako	4. 巻 61
2. 論文標題 AtNOT1 Is a Novel Regulator of Gene Expression during Pollen Development	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Plant and Cell Physiology	6. 最初と最後の頁 712 ~ 721
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/pcp/pcz235	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Iwakawa Hiro-oki, Lam Andy Y.W., Mine Akira, Fujita Tomoya, Kiyokawa Kaori, Yoshikawa Manabu, Takeda Atsushi, Iwasaki Shintaro, Tomari Yukihide	4. 巻 -
2. 論文標題 Ribosome stalling caused by the Argonaute-microRNA-SGS3 complex regulates the production of secondary siRNAs in plants	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 bioRxiv	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1101/2020.09.10.288902	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Matsumoto Ayumi, Schluter Titus, Melkonian Katharina, Takeda Atsushi, Nakagami Hirofumi, Mine Akira	4. 巻 -
2. 論文標題 A versatile Tn7 transposon-based bioluminescence tagging tool for quantitative and spatial detection of bacteria in plants	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 bioRxiv	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1101/2021.02.11.430857	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計11件（うち招待講演 0件/うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Yurina Naito, Hirokazu Hori, Akira Mine, Atsushi Takeda
2. 発表標題 Analysis of target mRNA specificity of AGO2-miR390 in plants
3. 学会等名 UIUC Plant Science Symposium (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 上四元晴香、峯彰、海道真典、竹田篤史
2. 発表標題 RCNMV複製とAG02発現誘導の関係についての研究
3. 学会等名 日本植物学会第83回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Akira Mine、Ayumi Matsumoto、Atsushi Takeda
2. 発表標題 Temporal transcriptome profiling reveals distinct gene expression signatures associated with suppression of plant immunity by high temperature and high humidity
3. 学会等名 IS-MPMI XVIII congress (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 下川心平、元村一基、津田賢一、竹田篤史、峯彰
2. 発表標題 免疫活性化に伴って発現誘導される花粉発生に必要な long noncoding RNA
3. 学会等名 令和元年度日本植物病理学会関西支部会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 峯彰、松本歩、下川心平、竹田篤史
2. 発表標題 生物発光によるグラム陰性細菌の増殖定量を可能にする汎用性プラスミドベクター
3. 学会等名 平成31年度日本植物病理学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 鈴木新、井手口真也、竹田篤史、丹生谷博、松下保彦、佐々木信光
2. 発表標題 ゲノム編集技術によるBBF2およびBBF3遺伝子ノックアウトタバコの作出
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 堀裕和、岩橋美穂、白谷公孝、佐藤昌直、峯彰、竹田篤史
2. 発表標題 ウイルス感染時におけるAGO1-vsRNAの標的となる植物mRNAの予測
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 宮崎光洋、竹内信弘、峯彰、竹田篤史
2. 発表標題 カリモウイルス科のウイルス由来Flitプロモーターを利用した同時過剰発現系の構築
3. 学会等名 第41回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 鈴木大河、鈴木新、佐野彩葉、竹田篤史、丹生谷博、松下保彦、佐々木信光
2. 発表標題 CRISPR/Cas9 ゲノム編集による BBF 遺伝子ノックアウトタバコの作製
3. 学会等名 令和二年度日本植物病理学会関東部会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 峯彰、松本歩、Titus Schluter、Katharina Melkonian、中神弘史、竹田篤史
2. 発表標題 Tn7トランスポゾンを介したluxCDABEオペロンのゲノム挿入によるPseudomonas syringaeの植物内増殖の定量と可視化
3. 学会等名 令和二年度日本植物病理学会関西支部会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 飯田笑美、澤野光、栗山和典、田原緑、竹田篤史、森山裕充、福原敏行
2. 発表標題 アグロバクテリウム感染による転写および転写後遺伝子サイレンシングの誘導
3. 学会等名 第62回日本植物生理学会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	佐藤 昌直  (Sato Masanao)  (20517693)	北海道大学・農学研究院・助教    (10101)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------