

機関番号：16301

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20580046

研究課題名(和文) RNAサイレンシングの接ぎ木移行の解析とその利用

研究課題名(英文) Analysis on transmission of RNA silencing through grafting and its application

研究代表者

西口 正通(NISHIGUCHI MASAMICHI)

愛媛大学・農学部・教授

研究者番号：40343313

研究成果の概要(和文)：ウイルスの外被タンパク質遺伝子(CP)を導入した *Nicotiana benthamiana* のサイレンシング系統中、5'または3'末端側をRNA分解の標的領域にした系統を台木に、非サイレンシング(過剰発現)系統を穂木に接ぎ木を行ったところ、前者ではCP全領域を標的領域とする、後者では台木と同じ標的領域をもつサイレンシングが穂木に誘導された。これは交配によっても同じ結果であった。また、導入遺伝子のメチル化は交配では誘導されたが、接ぎ木では誘導されなかった。タバコ内在遺伝子のサイレンシング系統を非形質転換系統の穂木に接ぎ木すると、穂木にサイレンシングが誘導された。

研究成果の概要(英文)：

The spreading of RNA silencing occurred from 5' to 3' direction along the transgene, but not vice versa in grafted scions of transgenic *Nicotiana benthamiana* carrying the entire of coat protein gene (CP) of *Sweet potato feathery mottle virus* (SPFMV) onto the silenced rootstocks with target specificity in 3' or 5' region of SPFMC CP. The same result was obtained by crossing. The transgene methylation was induced by crossing but not by grafting. RNA silencing through grafting was also induced in non transgenic scions grafted on endogenous gene silenced rootstocks of *N. tabacum*.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	700,000	210,000	910,000
年度			
年度			
総計	3,700,000	1,110,000	4,810,000

研究分野：植物病理学・分子生物資源学

科研費の分科・細目：農学・植物病理学

キーワード：RNAサイレンシング、遺伝子サイレンシング、ウイルス、接ぎ木、バイオテクノロジー

## 1. 研究開始当初の背景

我々はすでにサツマイモ斑紋モザイクウイルス(SPFMV)の外被タンパク質(CP)遺伝子を導入した *N. benthamiana* のサイレンシング系統と非サイレンシング系統を作出している。またSPFMV-CP導入系統については、サ

イレンシング系統におけるRNA分解の標的領域について、CP遺伝子の5'末端側200/400塩基がRNA分解の標的領域である系統、3'末端側約400塩基が標的領域である系統およびCP遺伝子の全体が標的領域である系統に区分した。さらにそれらについて接ぎ木を行い、サイレ

ンシングシグナルが台木から穂木へ効率よく、穂木から台木へは低い率で移行し、サイレンシングを誘導すること等を明らかにしてきた。

一方、このようなサイレンシングの応用として、ウイルス抵抗性等の付与があるが、ウイルス感染に必需な宿主植物の遺伝子をサイレンシングすると高度のウイルス耐性が付与できることを報告している。これらは形質転換植物を用いた研究であり、実用という観点からすると形質転換植物自体の栽培についてはまだまだ一般には受け入れにくい状況が続いている。そこで、サイレンシングの接ぎ木移行という現象を考えれば、台木のみサイレンシングを起こした形質転換植物を、穂木には非形質転換植物を用いることが考えられる。非形質転換植物に接ぎ木により有用形質を付与することの可能性を秘めている。

以上のように、これまでに我々の蓄積したサイレンシング系統を用いた接ぎ木によるサイレンシング移行や標的領域の解析研究をさらに進め、サイレンシング誘導あるいはシグナル移行の実態を解明することは、基礎的な知見をもたらすばかりでなく、実用的に新たな病害耐性植物の開発へとつながるものと考えられる。

## 2. 研究の目的

RNA サイレンシングを誘導させた形質転換植物を用いた接ぎ木実験により、サイレンシングシグナルの植物内での移行の実態を標的領域を中心に明らかにすること、それらの変化と DNA のメチル化状態の変化を解析すること、あわせて、接ぎ木による RNA サイレンシングの移行現象を応用する研究として植物に内在するウイルス増殖に必要なタバコ遺伝子を用いた接ぎ木を行い、サイレンシングが穂木の非形質転換植物に誘導され、その結果、穂木では内在遺伝子のサイレンシングが誘導され、ウイルスが増殖できないという機能が付与されるか検討を行う。

## 3. 研究の方法

(1) 既述したように SPFMV の CP 遺伝子領域を導入した *N. benthamiana* を用い、RNA サイレンシング系統を選抜し、それぞれの系統について RNA 分解の標的領域を、導入に用いた CP 遺伝子配列の断片をもつ組換えジャガイモ X ウイルス (PVX) を接種することにより導入遺伝子の全領域を標的とするサイレンシング系統あるいは 3'末端側約を標的領域とする系統が得られている。また、同じ SPFMV-CP 遺伝子の 5'末端側 200 あるいは 400

塩基を *N. benthamiana* に導入した系統を作成し、サイレンシング系統と非サイレンシング系統に分類してきたが、このうちのサイレンシング系統を台木として供試した。穂木には CP 全領域を導入した非サイレンシング(過剰発現) 系統を用いた接ぎ木を行った。接ぎ木植物の台木および穂木からそれぞれ全量 RNA を抽出し、ノーザンブロット解析に利用するとともに、さらに全量 RNA から小分子 RNA 画分を調製し、ノーザンブロット解析に供試した。プローブは、SPFMV CP の全領域を 3 等分し、5'末端側 3 分の 1、中央 3 分の 1 および 3'末端側 3 分の 1 をそれぞれ用いた。これらの接ぎ木植物について、異なる RNA 分解の標的領域をもつ台木を用いた場合に、どのような標的領域をもつサイレンシングが穂木に誘導されるかを検討した。

さらに上記で供試した台木および穂木の各系統ならびに接ぎ木後の穂木からそれぞれ DNA を抽出し、メチル化感受性酵素を利用した PCR 解析ならびにサザンブロット解析を行い、接ぎ木前後で SPFMV CP 遺伝子の DNA レベルでシトシン塩基のメチル化の程度が変化したか否かについて検討を加えた。また、ビスルフィド反応を利用した、導入遺伝子 DNA 上のシトシン塩基の網羅的メチル化解析も合わせて行った。

さらに、接ぎ木という手法と比較するため、接ぎ木に用いた系統を交配させ、得られた雑種第一代の個体についてもノーザンブロット解析ならびにメチル化解析を行い、接ぎ木および交配という 2 つのシステムの違いが RNA サイレンシング誘導ならびにメチル化に異なる影響を及ぼすかについて検討を行った。

(2) 内在遺伝子のサイレンシングを利用する接ぎ木実験については、タバコモザイクウイルスに代表されるタバコウイルスグループのウイルスの増殖に必要な *N. tabacum* の遺伝子 NtTOM1 および NtTOM3 の両遺伝子のサイレンシングが誘導された株を、各遺伝子のサイレンシング系統を交配させた後代植物の種子を播種し、得られた植物個体から全量 RNA を抽出後、RT-PCR により、両遺伝子のサイレンシングが誘導されたことを確認することにより選抜した。ここで得られた両遺伝子のサイレンシング系統を台木に、穂木には非形質転換体を用いた接ぎ木を行い、解析に利用した。その後、上述した SPFMV CP 遺伝子導入植物と同様に、穂木ならびに台木から全量 RNA を抽出し、ノーザンブロット解析に用いた。一方、全量 RNA からさらに小分子 RNA

画分を抽出し、RNAサイレンシングの目印となる siRNA 検出のためのノーザンブロット解析に用いた。プローブには NtTOM 1、NtTOM3 あるいは導入遺伝子にスペーサーとして含まれる  $\beta$ -glucuronidase (GUS) 遺伝子断片を供試した。

#### 4. 研究成果

(1) 接ぎ木によるシグナルの移行実態の解析について述べる。まず、SPFMV CP の 3'末端側約 400 塩基の領域がサイレンシングした系統を台木に、SPFMV CP の非サイレンシング(過剰発現)系統を穂木にした接ぎ木植物について、穂木の全量 RNA のノーザン解析では、導入遺伝子の 5'末端側および中央の 3 分の 1 をプローブにした場合に、mRNA のシグナルが検出され、3'末端側 3 分の 1 をプローブにした場合では検出されなかった。このことは台木と同じ RNA 標的領域をもつサイレンシングが穂木に誘導され、mRNA の 3'末端側約 400 塩基部分が分解されたと考えられる短い RNA バンドが検出されたことを示す。一方、SPFMV CP の 5'末端側 200 または 400 塩基を導入し、サイレンシングした系統を台木に用い、非サイレンシング(過剰発現)系統を穂木にした接ぎ木植物について、穂木の全量 RNA のノーザン解析では、SPFMV CP の 3 つの異なる領域に対応するいずれのプローブを用いても、mRNA のシグナルは検出できなかった。このことは、台木の SPFMV CP の 5'末端側 200 または 400 塩基を RNA 分解の標的領域にしたサイレンシングが台木に誘導されたばかりでなく SPFMV CP の全領域を RNA 分解の標的領域とするサイレンシングが誘導されたことを示す。

このことをさらに確かめるため、RNAサイレンシングの目印となる siRNA の検出を目的に、上述した 2 タイプの接ぎ木植物から調製した小分子 RNA 画分のノーザンブロット解析を行った。前者の SPFMV CP の 3'末端側約 400 塩基が RNA 分解の標的領域であるサイレンシング系統の接ぎ植物の場合、穂木には台木と同様に SPFMV CP の 3'末端側 3 分の 1 をプローブした場合のみ、siRNA が検出され、他の領域に対応するプローブでは検出されなかった。後者の SPFMV CP の 5'末端側 200 または 400 塩基を導入したサイレンシング系統を台木にした接ぎ木植物の穂木では、3 つの異なる領域に対応する全てのプローブで siRNA が検出された。以上の siRNA の結果は、導入遺伝子 SPFMV CP の 3'末端側約 400 塩基が RNA 分解の標的領域とするサイレンシング系統からサイレンシングシグナルが穂木に移行し、穂木には台木と同じ RNA 分解の標的領域とするサイレンシングを引き起こすが、SPFMV CP の 5'末端側 200 または 400 塩基を RNA 分解の標的領域とするサイレンシング系統を台木にした場合、穂木には台木と同じ 5'

末端側を RNA 分解の標的領域とするサイレンシングが誘導されるばかりでなく、標的領域は 3'末端側に拡大したことを示す。

以上、接ぎ木により、サイレンシングが穂木に誘導されるが、RNA分解の標的領域により 2 つの異なる様式をとることが判明した。このような RNA 分解の標的領域の誘導あるいは拡大という現象が、接ぎ木に用いたサイレンシング系統と非サイレンシング系統間で交配するによっても起こりえるのか検討した。非サイレンシング系統(4.07)および SPFMV CP の 5'末端側 400 塩基を導入したサイレンシング系統(400.15)を交配した場合、後代植物における導入遺伝子 mRNA は検出できなかったが、対照系統との交配では検出できた(図1)。

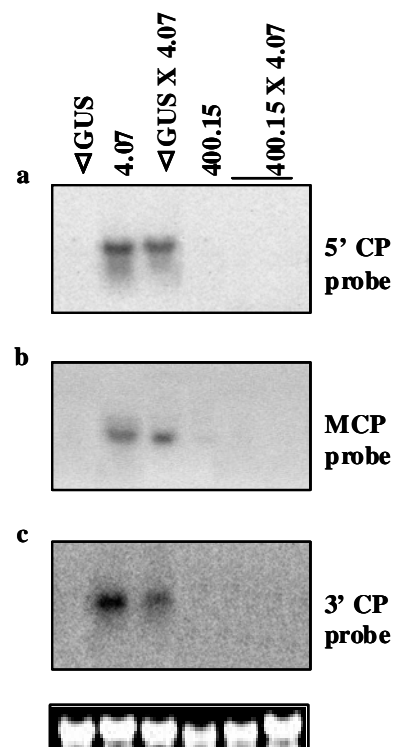


図1 交配によるサイレンシングの移行と拡大  
サイレンシング(400.15)及び非サイレンシング(4.07)系統の交配. ΔGUSは対照系統.

一方、RNAサイレンシングの目印となる siRNA は 3 つの異なる領域に対するプローブのいずれにおいても検出することができた。このことは、交配により、SPFMV CP の全領域を RNA 分解の標的とするサイレンシングが誘導されたことを示している。

また、非サイレンシング(過剰発現)系統と SPFMV CP の 3'末端側 400 塩基を RNA 分解の標的領域としたサイレンシング系統を交配した場合においては、後代植物の全量 RNA のノ

ノーザンブロット解析により、mRNAの3'末端側が分解された短いmRNAのバンドが検出された。また、siRNAの検出のために小分子RNAのノーザンブロット解析を行うと、接ぎ木における同様に、SPFMV CPの3'末端側3分の1をプローブにした場合のみsiRNAが検出され、5'末端側3分の1や中央部分の3分の1プローブでsiRNAは検出されなかった。この場合、台木と同じRNA分解の標的領域をもつサイレンシングが誘導されたことを示す。

以上のことは、サイレンシングの誘導あるいは拡大は接ぎ木で得られた結果と同じことが交配という方法によっても起こることが明らかになった。

次に、穂木において誘導されたサイレンシングにより、穂木のSPFMV CP遺伝子DNAにおけるメチル化の程度も変化するかについて検討した。接ぎ木前および後の穂木からDNAを抽出し、メチル化感受性酵素を用いたPCRおよびサザンブロット解析、ならびにビスルフィド反応に供試した。その結果、穂木の導入遺伝子DNAにおけるメチル化の程度は接ぎ木の前および後で変化しないことが判明した。一方、交配した場合、交配する前の非サイレンシング系統においては、メチル化レベルは低いが、交配後の同じ系統に由来する導入遺伝子DNAのメチル化レベルは高くなっていることが判明した。

以上のことから、導入遺伝子DNAのシトシン塩基のメチル化状態は、接ぎ木の場合は変化しないが、交配の場合は変化し、サイレンシングの誘導にともない、メチル化も誘導されることが明らかになった。接ぎ木と交配のこのような違いは、接ぎ木では台木から移行したサイレンシングシグナル(穂木における細胞質での増幅)と核DNAの相互作用である(図2)のに対し、交配では同一細胞の核内の相互作用であることから、サイレンシングシグナルとDNAの相互作用は後者の方がはるかに容易に行われるためであると考えられる。

(2) 内在性遺伝子のサイレンシングを利用する接ぎ木実験について記述する。これはタバモウウイルスの増殖に必要なタバコ (*N. tabacum*) 遺伝子であるNtTOM1およびNtTOM3のサイレンシングを利用するものである。それぞれの遺伝子をサイレンシングさせた系統同士を交配し、得られたT1個体から、両遺伝子がサイレンシングした個体を選抜した。さらに、その個体から得られた種子 (T2) を利用し、台木として用いた。穂木には同じタバコの非形質転換植物を用い、接ぎ木を行った。接ぎ木植物の穂木および台木から全量RNAを抽出し、RT-PCRあるいはノーザンブロット解析により導入遺伝子の発現量を検討した。導入遺伝子に含まれるスペーサーとしての GUS遺伝子断片をプローブに用いた。そ

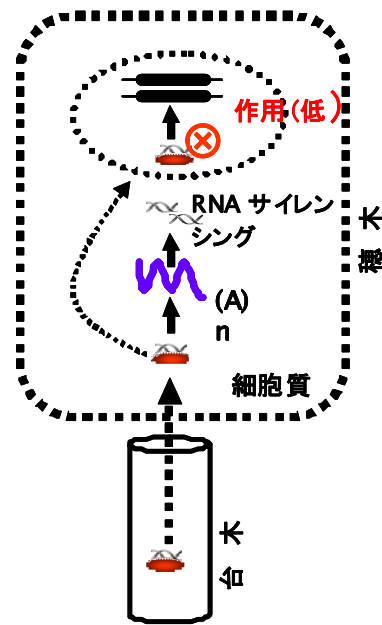


図2 接ぎ木によるDNAとsiRNAの相互作用

の結果、導入遺伝子の転写されたRNA (ヘアピン2本鎖) が検出された。さらに、RNAサイレンシングの目印となるsiRNAをNtTOM1およびNtTOM2遺伝子について行ったところ、台木及び穂木ともに検出された。siRNAの検出された穂木から葉を切り取り、タバモウウイルスに属するトマトモザイクウイルスを接種した。接種後一週間約26°Cに保った後に、ウイルス感染の有無をELISAにより行った。その結果、ウイルス感染は抑制されていることが明らかになった。

以上の結果は、ウイルス増殖に必要なタバコの2つの内在性遺伝子のサイレンシングが、台木から非形質転換体の穂木に誘導され、穂木においてウイルスの増殖が抑制されたことを示す。

##### 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 5 件)

- ① M. Nishiguchi and K. Kobayshi, Attenuated plant viruses: a protective means to prevent virus diseases and its molecular understanding, J. Gen. Plant Pathol., 査読有, (in press)
- ② N. Haque, N. Yamaoka, and M. Nishiguchi, Spreading of RNA silencing and DNA methylation in transgenic hybrid plants with the coat protein gene of *Sweet potato feathery mottle virus*, Breed. Sci., 査読有, 60, 2010, 361-370
- ③ H. Chen, A. Tamai, M. Mori, M. Ugaki, Y.

Tanaka, P. P. Samadder, A. Miyao, H. Hirochika, N. Yamaoka, and M. Nishiguchi, Analysis of rice *RNA-dependent RNA polymerase 1 (OsRDRI)* in virus mediated RNA silencing by particle bombardment. *J. Gen. Plant Pathol.* 査読有, 76, 2010, 152-160

- ④ 西口正通、遺伝子サイレンシングの解析とその応用、愛媛ジャーナル、査読無、11月号、2009、80-83
- ⑤ 西口正通・A. K. M. N. Haque、植物における RNA サイレンシングの移行と拡大、植物ウイルス病研究会レポート、査読無、2008、1-10

[学会発表] (計 5 件)

- ① 西口正通、植物における RNA サイレンシングとウイルス：イネイネ RNA 依存 RNA ポリメラーゼ遺伝子 (*OsRDRI*) の解析、第 26 回中国四国ウイルス研究会、2011
- ② 西口正通・A. K. M. N. Haque、植物における RNA サイレンシングの移行と拡大、植物ウイルス病研究会 2008
- ③ 玉木洋平・石川雅之・山岡直人・西口正通、接ぎ木による RNA サイレンシングの移行：トバモウイルス抵抗性の付与、植物感染生理談話会、2008
- ④ A. K. M. N. Haque, N. Yamaoka, and M. Nishiguchi, Spreading of RNA silencing and transgene methylation: analysis of transgenic *Nicotiana benthamiana* with the coat protein gene of Sweet potato feathery mottle virus、日本植物病理学会大会、2008

[図書] (計 2 件)

- ① N. Haque and M. Nishiguchi, Humana Press, Bisulfite sequencing for cytosine-methylation analysis in plants, In: RNAi and Plant Gene Function Analysis: Methods and Protocols, no. 744, Methods in Molecular Biology (eds. by H. Kodama and A. Komamine), 2011, pp. 187-197
- ② A. K. M. N. Haque and M. Nishiguchi, Nova Science Publisher, RNA silencing and DNA methylation in plants, *In RNA Interference Research Progress*, (eds. by R. T. Lyland and I. B. Browning), 2008, pp. 251- 257

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

西口正通 (NISHIGUCHI MASAMICHI)  
愛媛大学・農学部・教授  
研究者番号：40343313