

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 20 日現在

機関番号：82112

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2015

課題番号：24780009

研究課題名(和文) サプレッション配列による新規遺伝子発現抑制技術の開発とメカニズムの解明

研究課題名(英文) Development and analysis of the novel gene silencing induced by RNA silencing inducible sequence

研究代表者

小郷 裕子(Ogo, Yuko)

国立研究開発法人農業生物資源研究所・植物生産生理機能研究ユニット・主任研究員

研究者番号：90572214

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、新規遺伝子発現抑制システムRNA silencing inducible sequence (RSIS) について解析した。RSISは約100 bp程度のDNA配列であり、その5'側と3'側に抑制したい遺伝子の一部の配列を融合して発現させると、イネにおいて転写後発現抑制を誘導できる。しかし、シロイヌナズナではその抑制の効果はみられなかった。そこで、本研究ではシロイヌナズナにおいてもサプレッション効果がある新規サプレッション配列をスクリーニングした。新規サプレッション配列はsiRNAの蓄積がほとんど確認されず、RSISとは異なるメカニズムであると考えられた。

研究成果の概要(英文)：An artificial RNA silencing inducible sequence (RSIS) causes posttranscriptional gene silencing (PTGS) of 5' or 3' flanking-sequence-containing genes in rice. Small interfering RNAs (siRNA) are produced from RSIS-expressing cassettes, and transitive siRNAs are produced from endogenous target genes. However, RSIS did not cause PTGS in Arabidopsis. In the present study, we screened sequences which can cause gene silencing in Arabidopsis. The novel suppression sequences identified by the present screening did not produce siRNA, suggesting that the molecular mechanism of the silencing of the novel suppression sequences is different from that of RSIS.

研究分野：植物分子生物学、植物生理学

キーワード：転写後サイレンシング 遺伝子発現制御 種子貯蔵タンパク質

1. 研究開始当初の背景

申請者の所属する研究室では、健康機能性成分や医薬品成分を蓄積する作物を作出するため、多種多様な生物の遺伝子をイネ種子で高発現させてきた。その中で、ヒトグルカゴンペプチドをイネ胚乳に発現させるため、[イネグルテリンプロモーター] [イネグルテリン 5' UTR] [ヒトグルカゴンペプチド] [イネグルテリン 3' UTR]-[イネグルテリンターミネーター]というコンストラクトをイネに導入した。その結果、ヒトグルカゴンペプチドが発現しないだけでなく、グルテリンの発現が抑制されるという現象を見出した (Yasuda ら、2005、Transgenic Research, vol. 14, pp. 677-684; 図 1.1)。このヒトグルカゴンペプチドを RNA silencing inducing sequence (RSIS) と名付けた。

これまでに、RSIS にいくつかの種子貯蔵タンパク質遺伝子などの一部を融合した配列をイネに発現させると、その遺伝子の発現が抑制されることがわかっている。イネゲノム中に RSIS に相同性の高い配列は存在しない。small interfering RNA (siRNA) の蓄積を調べたところ、RSIS および RSIS でサプレッションしたターゲット遺伝子由来の 21-24 nt の siRNA が蓄積していた。これらのことから、RSIS を含む mRNA がトリガーとなって、RNAi の経路で siRNA が生成し、サイレンシングが起こったと考えられる。siRNA が生成するためには、まず二本鎖 RNA が形成されることが考えられるが、RSIS の mRNA はヘアピンループ構造をとらない。また、RSIS をターゲットとするような micro RNA (miRNA) も存在しない。これらのことから、RSIS を含む mRNA はこれら既知のルート以外の何らかの方法で RNAi の経路に入ると考えられる。核ランオンアッセイにより核内の mRNA を調べたところ、RSIS を含む mRNA やターゲット遺伝子が転写されていることがわかり、RSIS によるサプレッションは転写後サイレンシングであることが確認された。RNA サイレncing は、ウイルスやトランスポゾンなど外来遺伝子の侵入からの防御機構の一つとして機能していると考えられている。また miRNA による遺伝子発現制御は、発生・発達において重要な役割を果たす。ウイルス RNA や miRNA によるサプレッション機構は、詳細な分子機構が明らかになりつつある。しかしながら、コサプレッションのような、非ウイルス由来の遺伝子を導入した時のサプレッション機構については、最終的には何らかの方法で RNAi の経路に入ると考えられているものの、その分子機構についてはほとんどわかっていない。これまでの研究で、RSIS によるサプレッションは、RSIS を含む mRNA が何らかの方法で RNAi の経路に入り、RSIS に融合した遺伝子由来の siRNA が作られサプレッションが起こるものと考えられる。何らかの原因で RSIS 配列を含む mRNA は RNAi の経路に入りやすくなったため、高いサプレッション効果が得ら

れると推測される。

RSIS はシロイヌナズナやトマトでは高いサプレッション効果は無かった。一方、イネにおいては RSIS の他にヒノキ花粉エピソード Chao1、ヒト TGF- β 、ニワトリアレルゲンタンパク質等にも RSIS と同様なサプレッション効果があった。これら以外にも、外来遺伝子を植物に導入したものの発現しないような現象はしばしば起こることである。このようなことから、外来遺伝子の発現を抑制するシステムとして、RSIS のようなサプレッション配列は他にもある程度の頻度で存在することが示唆される。



2. 研究の目的

本研究では、シロイヌナズナを用い、RSIS 様サプレッション配列をスクリーニングし、そのメカニズムを解明することを目的とする。分子メカニズムの解明に有利なシロイヌナズナにおいてもサプレッション効果のある配列を特定することにより、RSIS の分子機構の解析をより詳細に行うことができる。

3. 研究の方法

(1) ランダム配列 DNA 導入形質転換シロイヌナズナライブラリーを用いたサプレッション配列のスクリーニング

シロイヌナズナでもサプレッション効果のある配列をスクリーニングするため、GFP を発現するシロイヌナズナに、ランダム DNA 配列と GFP の DNA 配列の一部を融合したライブラリーを導入する。形質転換体を得たら、GFP が光らなくなる (= サプレッションが起こる) ことを指標として、新規サプレッション配列をスクリーニングする(図 3.1)。

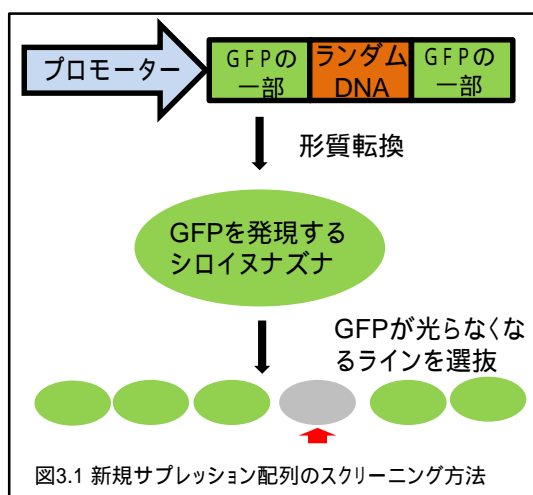
(2) スクリーニングされたサプレッション配列の解析

新規サプレッション配列が導入された形質転換シロイヌナズナで、サプレッションしたターゲット遺伝子由来の siRNA が蓄積しているかどうか、サプレッションが mRNA レベルの発現抑制であるかどうか、GFP 以外の遺伝子(内在性の遺伝子など)の発現も抑制できるかどうか等の解析を行う。

(3) サプレッション機構の解析

イネの RSIS と同様に、RNAi の経路によってサプレッションが起こっているようであれば、RNAi 経路の遺伝子のノックアウトシロ

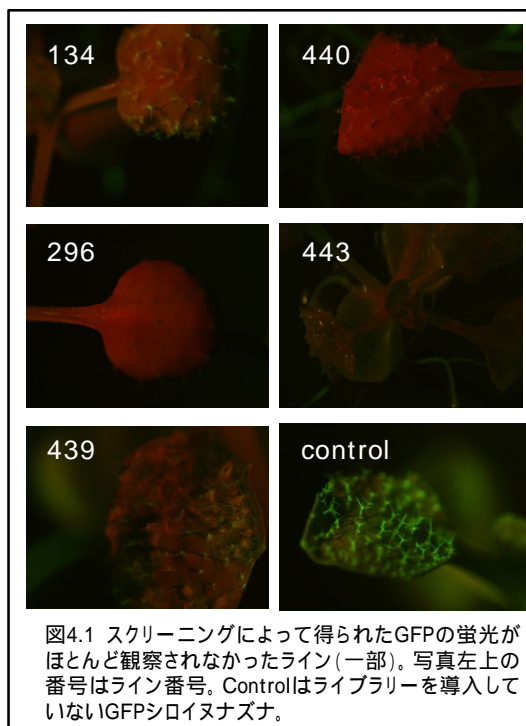
イヌナズナとの交配により、どの RNAi 経路の遺伝子がサプレッション配列の機構に関わっているか調べる予定であった。さらに、新規サプレッション配列とルシフェラーゼ遺伝子の一部を融合した T-DNA を、ルシフェラーゼを発現するシロイヌナズナに導入し、サプレッション配列によりルシフェラーゼが光らなくなる形質転換体を得た後、EMS により突然変異を導入し、ルシフェラーゼが光らなくなるラインを選抜し原因遺伝子を特定する予定であった。



4. 研究成果

(1) シロイヌナズナでもサプレッション効率の高い DNA 配列のスクリーニング

GFP を発現するシロイヌナズナに、ランダム DNA 配列と GFP の DNA 配列の一部が融合したライブラリーを導入し、500 程度の形質転換シロイヌナズナを得た。これらの幼植物の葉を蛍光顕微鏡で観察したところ、強い GFP の蛍光が確認されたラインは 65% 程度、弱い GFP の蛍光が確認されたラインは 28% 程度、GFP の蛍光がほとんど確認されなかったラインは 7% 程度 (35 ライン程度) であった (図 4.1)。一方、根での GFP の蛍光を観察したところ、葉においてほとんど GFP の蛍光が観察されなかったラインにおいても、根では蛍光が観察された。次に、GFP の蛍光がほとんど確認されなかったラインのランダム DNA 配列を同定し、各 DNA 配列に GFP の一部を融合し、再度 GFP を発現するシロイヌナズナに導入した。その結果、6 つの DNA 配列が再度 GFP の発現を高い頻度で抑制することができた。この 6 つの配列を新規サプレッション配列とした。その他の DNA 配列は、再形質転換時に GFP の発現を抑制する頻度が少なかったことから、スクリーニング時に起こった GFP の発現抑制は、形質転換時の突然変異等によるものと考えられる。



(2) 新規サプレッション配列の解析

6 つのサプレッション配列が導入された GFP 発現シロイヌナズナにおいて、GFP の mRNA の発現を real time PCR により調べた。その結果、葉においては GFP の発現が mRNA レベルで強く抑制されていた。GFP の蛍光が観察された根においても、完全ではないが GFP の発現が抑制されていた (図 4.2)。

次に、siRNA の蓄積をノーザンハイブリダイゼーションにより調べた。GFP のセンス鎖およびアンチセンス鎖をプローブとして用いた。その結果、全ての新規サプレッション配列において、siRNA のシグナルは非常に弱かった (図 4.3)。イネにおいては、RSIS で siRNA が検出されるため、今回シロイヌナズナで見つかった新規サプレッション配列は、RSIS とは異なるメカニズムのものと考えられる。

次に、新規サプレッション配列の共通モチーフを Multiple Em for Motif Elicitation (MEME, <http://meme-suite.org/tools/meme>) により検索した。6 つの新規サプレッション配列は全体の相同性は低いが、図 4.4 に示す一つのモチーフが、新規サプレッション配列に共通のモチーフであることがわかった。このモチーフがシロイヌナズナにおける GFP のサプレッションに関わっているかもしれない。

次に、これらのサプレッション配列が GFP 以外の遺伝子の発現を抑制できるかどうか調べた。外来遺伝子の GUS 遺伝子と、ETHYLENE INSENSITIVE 2 (EIN2) 遺伝子について、これらの遺伝子の一部を、新規サプレッション配列の 5' と 3' 側に融合して、35S プロモーターで誘導するコンストラクトを作製した。

これらをそれぞれ、GUS を発現するシロイヌナズナと非形質転換シロイヌナズナに導入した。その結果、GUS 染色が弱くなったラインは少なく、EIN2 をノックアウトした時に現れるフェノタイプが観察されたラインは無かった。GUS と EIN2 の mRNA の発現を調べたところ、有意に抑制されているラインは少なかった。このことから、新規サプレッション配列は、GUS と EIN2 の発現抑制には効果が低いことが分かった。イネにおける RSIS は、いくつかの種子貯蔵タンパク質の発現を高い確率で抑制することがわかっている。しかしながら、いくつかの発現が弱い遺伝子の発現は抑制する確率が非常に低かった。種子貯蔵タンパク質は種子において非常に発現が高いため、RSIS は発現が高い遺伝子において抑制効果が高いと考えられる。今回の新規サプレッション配列も発現が高い遺伝子において効果が高いかもしれない。

RSIS はシロイヌナズナにおいてサプレッション効果は今の所確認されていないが、RSIS 以外にも、イネにおいてサプレッション効果が確認されている、ヒノキ花粉エトープ Chao1 について、シロイヌナズナの発現量の高いいくつかの遺伝子の発現を抑制するかどうか調べた。しかし、抑制する確率は非常に低かった。このことから、イネとシロイヌナズナでは、サプレッションを引き起こす配列が異なる、または種子貯蔵タンパク質など、非常に発現量が高い遺伝子においてのみ効果が高いなどの可能性が考えられる。

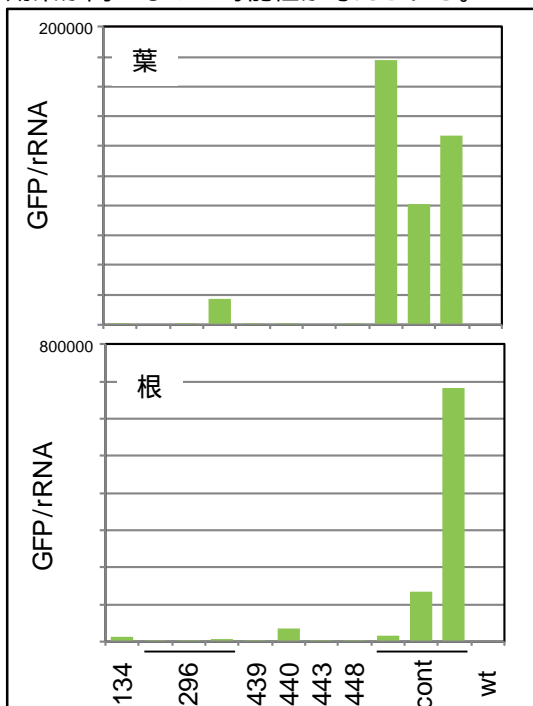


図4.2 サプレッションが起こっているラインのGFPの real time PCR
縦軸に相対RNA量を示す。ライン134~448はサプレッションが起こっているライン。ライン296についてはサブラインを3ライン解析した。Contはサプレッションが起こっていないラインをコントロールとして用いた。Wtは非形質転換シロイヌナズナ。

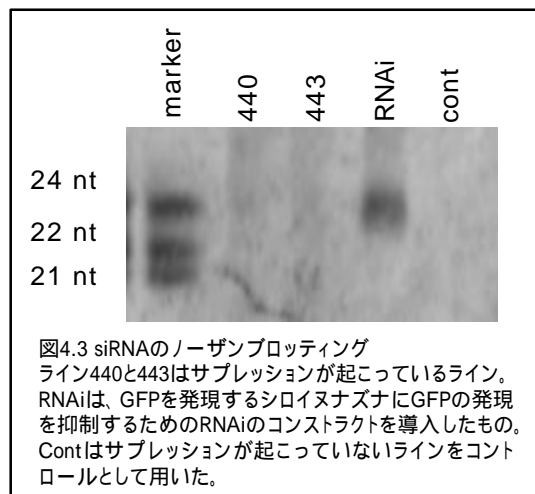


図4.3 siRNAのノーザンプロット
ライン440と443はサプレッションが起こっているライン。RNAiは、GFPを発現するシロイヌナズナにGFPの発現を抑制するためのRNAiのコンストラクトを導入したもの。Contはサプレッションが起こっていないラインをコントロールとして用いた。



図4.4 MEMEにより検索した新規サプレッション配列の共通モチーフ

(3) 考察および今後の展望

当研究室では、有用物質を蓄積するコメを開発するため様々な生物由来の、膨大な種類の遺伝子をイネに導入してきた。その中で、RSIS の他にもサプレッションを引き起こす遺伝子が多く見つかった。当研究室に限らず、高発現させる予定で導入した遺伝子が誘導されず、逆にサプレッションを引き起こしてしまうことは、古くはコサプレッションと呼ばれしばしば確認されてきた現象である。コサプレッションの分子メカニズムは、最終的には何らかの方法で RNAi の経路に入ると考えられているものの、その分子機構についてはほとんどわかっていない。当研究室の Yang ら (Plant Science, 2014, vol. 225, pp. 138-146) は、RSIS 以外でイネにおいてサプレッション効果のある配列、Chao1、human TNF- α 、mouse hIL-9、human TGF- β 、V3J1 (residues 274-292 of envelope surface glycoprotein gp120 of HIV) について、イネにおけるサプレッション効果を調べた。これらの配列は、いくつかの種子貯蔵タンパク質の発現を抑制した。また、Chao1 を導入したイネでは、発現抑制された遺伝子の siRNA が確認された。当研究室の Kawakatsu ら (Plant Physiology, 2012, vol. 160, pp. 601-612) により、RSIS の発現カセットの転写産物が高い頻度でリードスルーしており、polyA が付加していないことがわかった。このことから、RSIS 配列は正常な転写終了と polyA 付加を阻害し、このことが二本鎖 RNA、

そして siRNA の合成を促進したためサプレッションが起こったと考えられる。今後は、RSIS 配列がどのようにして正常な転写終了を阻害するのか、RNAi 経路においてどのようにサプレッションを引き起こすかを調べる必要がある。これらの解析に、RNAi に関わる遺伝子が詳細に解析されており、ノックアウトラインも豊富であるシロイヌナズナを用いることが有効であると考えられたが、本研究で見つかったサプレッション配列は、イネにおける RSIS のサプレッション機構とは異なるものであると考えられた。今後、さらなる解析によりシロイヌナズナにおいて RSIS と同様の機構によってサプレッションを起こす配列が見つければ、RSIS によるサプレッション機構、ひいてはコサプレッション等の分子機構の解明につながる。また、CRISPR/CAS9 によるゲノムエディティングによりイネにおいても簡単にノックアウトラインが作出できるようになった。この技術を用いて、イネにおいてもサプレッションに関わる遺伝子の特定、そして分子機構の解明が可能であると考えられる。

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 件)

〔学会発表〕(計 件)

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 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 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

6. 研究組織

(1)研究代表者

小郷 裕子(OGO, Yuko)

国立研究開発法人農業生物資源研究所

植物生産生理機能研究ユニット

主任研究員

研究者番号: 90572214

(2)研究分担者

()

研究者番号:

(3)連携研究者

()

研究者番号: