

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 1 日現在

機関番号：11101

研究種目：研究活動スタート支援

研究期間：2012～2013

課題番号：24880007

研究課題名(和文)接ぎ木と篩管長距離輸送RNAによる品種改良システムの再構築

研究課題名(英文)Update of breed improvement system using grafting and phloem transportable RNA.

研究代表者

葛西 厚史(Kasai, Atsushi)

弘前大学・農学生命科学部・研究員

研究者番号：80633982

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,300,000円、(間接経費) 690,000円

研究成果の概要(和文)：申請者らのグループが開発した篩管長距離輸送性RNAを利用した接ぎ木相手へのエピゲノム編集誘導法であるGrIGS(Graft induced gene silencing)システムのアップデートならびに応用性の検証を行った。本システムを利用することで外来遺伝子を含まないエピゲノム編集体の獲得ができるため新規品種改良技術(NBT)の一つとなる。サイレンシングシグナルの一過的発現系の利用と輸送先でシグナルを増幅するシステムを導入することでより効率的にエピゲノム編集を誘導することができた。また、トマトやジャガイモといった作物の内生遺伝子をターゲットとしてエピゲノム編集を誘導することが可能であった。

研究成果の概要(英文)：GrIGS(Graft induced gene silencing) system is the epigenome editing induction method to a graft partner via long-distance transportable promoter-targeting siRNA through the phloem. The application of this system is one of the new plant breeding techniques(NBT) to improve the cultivars of various horticultural crops. Since the produced plants do not contain any transgenes, these do not correspond to GM plants. In this study, I examined the improvement of this system and its application. As a result, epigenome editing was induced efficiently by including transient expression assay of the transportable signals and signal amplification system, furthermore also in the endogenous gene promoter of tomato.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：生産環境農学・遺伝育種科学

キーワード：植物育種学 NBT 接ぎ木 RNAサイレンシング RdDM エピゲノム編集

1. 研究開始当初の背景

接ぎ木は古くから行われてきた栽培技法であり、栄養体増殖に加え病虫害の回避・収量性の向上さらに矮化栽培を目的として園芸作物では広く活用されている。一方で、高等植物は多様な環境変動への応答や器官・組織間の協調的な成長・分化の実行にあたり細胞間での情報交換を必要し、原形質連絡系を通した短距離情報伝達に加え、篩管輸送系による長距離シグナル伝達も行っている。近年、特定のタンパク質や RNA 分子が運ばれ、その運搬先で機能していることが報告されている。また、一般的に small RNAs と称される21~24 ntの RNAs は、非常に短いサイズにもかかわらずその塩基配列特異的に遺伝子を抑制 (Gene Silencing) することが可能であり、このGene Silencing 現象は、接ぎ木によっても台木から穂木へと伝搬することが報告されており、篩管長距離輸送性について精力的に研究が行われてきている。small RNAs による抑制様式は、転写後型遺伝子抑制 (PTGS) と転写型遺伝子抑制 (TGS) に分類でき、それぞれの接ぎ木を介した応用性について調査を行ってきた。特に TGS タイプについては、申請者らのグループによって初めて表現型としても確認された。これまでの研究から GrIGS (Graft-induced Gene Silencing) システムと命名した品種改良技術を提唱するに至った [国際特許出願中 第 PCT/JP2011/078150 号]。すなわち、ある遺伝子のプロモーター領域などをターゲットとして、そのサイレンシングシグナルを産生している形質転換体 (ドナー) と接ぎ木を行うことで接ぎ木相手 (レシピエント) のターゲット配列にエピジェネティックな変異 (DNA のメチル化; RdDM と呼ばれる現象) を誘導し、ある遺伝子の TGS (エピゲノム編集) を発動させることができる。さらにこのエピゲノム編集された DNA (ヒストン) を有する組織 (側根

など) から再分化個体 (エピゲノム編集体) を得ることで、品種改良を行うものである。

従来の突然変異育種 (放射線照射や EMS 処理など) では、その変異がゲノムのどこにおこったかが不明であり、数多くの突然変異誘導した個体の中から偶発的に見出される優良個体を選抜する必要がある。一方の GrIGS システムは、ある特定遺伝子を狙い撃ちにすることができるためその効率性は高い。さらに近年は、技術革新により種々の作物におけるゲノム配列解読がなされ、そのデータの公開が進められている。そのため、品種改良につながるターゲット遺伝子情報の探索も容易となってきた。そのため、数多くの作物に応用でき汎用性の高い新規品種改良技術となりうる可能性を秘めている。また、ゲノムへ組換え核酸を移入しているわけではなく、small RNAs によりエピジェネティックな修飾を発動させたことによる変異であるため、従来の外来遺伝子の挿入などによる遺伝子組換え体 (GM 作物) に相当しないと考えられることも大きなメリットである。

2. 研究の目的

当該システムによる新規品種改良技術には、まだまだ検証・改善の余地が残されているため、本応募課題では、GrIGS システムのアップグレードおよびその応用性を検証するものである。具体的には、ネックとなるサイレンシングシグナルのドナーとなる形質転換体の作出という技術的にも時間的にも負担の大きいポイントを一過的発現系の導入により改善しつつ、さらに効率化を図るためにサイレンシングシグナルの増幅システムの導入を試みる。タバコ (*Nicotiana benthamiana*) を用いたアグロインフィльтраクションによる一過的発現系によるサイレンシングシグナルの産生と篩管長距離輸送 RNA の輸送ドメインとのキメラ遺

伝子の転写による輸送先でのシグナル (siRNAs) 増幅の有用性を 35S:GFP 導入タバコを用いたモデル実験で明らかにする。

実用化に向けてまずは、タバコと同じナス科植物のトマト (*Solanum lycopersicum*) の内生遺伝子をターゲットにして、タバコ/トマトの異種間接ぎ木個体に対し改良版 GrIGS システムによりエピゲノム編集誘導を行い、その有用性を評価する。さらに、実際の育種現場での利用を想定すると、エピジェネティックな変化の安定的維持などから栄養繁殖性作物への利用が期待されるため、世界的な作物であるナス科ジャガイモ (*Solanum tuberosum*) に対し GrIGS システムの適用を試みた。

3. 研究の方法

(1) 外生遺伝子をターゲットとするモデル実験系を利用した改良版 GrIGS システムの評価

一過的発現系としてアグロインフィルトレーションを適用した。この手法は、Gene Silencing の全身伝搬性を調査する際によく用いられ申請者らも GrIGS システムを構築するまでの基礎研究において活用し、その有用性を認識した。また、もう一つの改良点としてシグナル増幅システムの適用を試みた。これは、サイレンシングシグナルである siRNAs がターゲットとなる配列を認識し 2 次的に siRNAs を産生する現象を付加しようとするもので、ターゲットとするプロモーター領域からは通常十分な mRNA が転写されていないことから、篩管長距離輸送性 RNA として人工的に産生してやることでサイレンシングシグナル同様輸送され、輸送先でシグナル増幅を誘引することによりエピゲノム編集の効率性向上を期待するものである。篩管長距離輸送 RNA として報告のあったシロイヌナズナの *AtGAI* (*GIBBERELLIC ACID INSENSITIVE*) 遺伝子の特定配列であり研究協力

者(原田竹雄教授)らが特許出願しており[出願番号 2008-248887]、きわめて独自性の高い輸送モチーフを保持している。また近年、Hung らの報告からもキメラ転写物の輸送性ならびに輸送モチーフとしての機能性について期待がもたれた。実際、予備実験において輸送モチーフとのキメラ遺伝子の転写産物が接ぎ木パートナーで検出されることは確認された。さらに、シグナル (siRNAs) の増幅についても、これまでの報告から外生遺伝子に対する siRNAs の増幅反応は確実に起こっており、キメラ転写産物も外生遺伝子であるため増幅反応が期待された。

本研究では、上記の仮説を確認するうえで、35S:GFP 導入タバコを利用して 35S プロモーターをターゲットとするモデル実験を行った (図 1A)。接ぎ木パートナーでの TGS 状態の確認は、UV 照射による GFP 蛍光のモニタリングならび顕微鏡下での時空的制御様式を詳細に調査した。さらに、増幅コンストラクトのあり・なしによる接ぎ木パートナーでの TGS 状態を定量的に調査することで、4つの技術を組み合わせた改良版 GrIGS システムの評価とした (図 1B, 1C)。

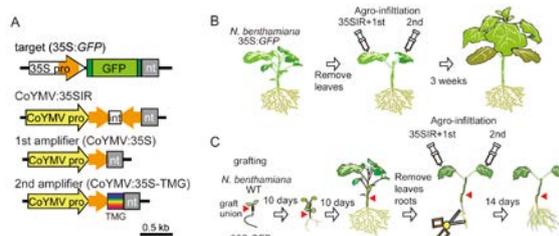


図1 GrIGS システムのアップグレード。(A) ターゲットとなるコンストラクトとそのプロモーター領域の siRNAs を産生するコンストラクトおよびシグナル増幅用のコンストラクトの模式図。(B) 新展葉へのエピゲノム編集誘導実験スキーム。(C) 接ぎ木個体の根へのエピゲノム編集誘導実験スキーム。

(2) タバコとトマトの異種間接ぎ木個体への改良版 GrIGS システムの応用

最も効率的にアグロインフィルトレーション可能なタバコ同士だけの技術では、応用範囲に乏しく実用性に向いていない。そこで、タバコと同じナス科の作物との異種間接ぎ木個体を用いて改

良版 GrIGS システムの応用性について調査した。トマト・ジャガイモなどナス科植物では全ゲノム解析が済み公開されているため、容易に任意遺伝子の上流配列を手にすることができる。また、シロイヌナズナにおいて接ぎ木によるゲノム内生配列の TGS 発動が報告されている。このことから、トマトにおいては実用化に向けた試みとして内生遺伝子のプロモーター領域をターゲットとすることにした。一つのターゲットとして病原性 RNA ウィロイドの核移行に関わると示唆される *SVirp1* (viroid RNA-binding protein 1) 遺伝子を用いた。タバコ/トマトの異種間接ぎ木個体に対し改良版 GrIGS システムによりエピゲノム編集を誘導し、側根での *SVirp1* プロモーターのメチル化程度を解析し、その有効性を調査した(図2A)。メチル化程度の解析には、メチル化依存性制限酵素 MspBC でゲノム DNA を処理した後、定量的 PCR により増幅量を他の内生遺伝子で補正した相対値で示した。すなわち、PCR 増幅量が低い方がよりメチル化されていることを示す(図4)。

また、ジャガイモにおいては 35S: *GFP* 導入個体を作出したので、タバコでの実験同様 35S プロモーターをターゲットとするモデル実験を行った。35S プロモーター siRNAs を産生する形質転換タバコと 35S: *GFP* 導入ジャガイモとの異種間接ぎ木個体での側根へのエピゲノム編集誘導の状態を GFP 蛍光のモニタリングとプロモーターのメチル化程度・*GFP* mRNA 量の比較により分子生物学的にも解析した(図2B)。

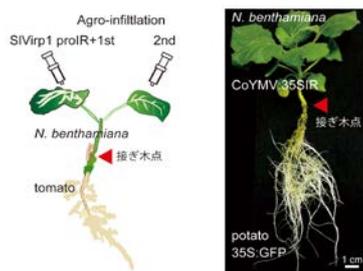


図2 トマトおよびジャガイモにおける GrIGS システムによるエピゲノム編集誘導。(A) タバコとトマトとの異種間接ぎ木個体を用いた GrIGS システム模式図。(B) タバコとジャガイモとの異種間接ぎ木個体。

4. 研究成果

(1) 外生遺伝子をターゲットとするモデル実験系を利用した改良版 GrIGS システムの評価

篩管長距離輸送性サイレンシングシグナルの一過的産生ならびにシグナル増幅システムの導入による GrIGS システムのアップデートを目的として行った。まずシグナル増幅システム導入の検証として、siRNAs 産生タバコに対して増幅コンストラクトをアグロインフィルトレーションしたところ二次 siRNAs の産生により siRNAs 量の増加が確認された。輸送性については、アグロインフィルトレーションによりサイレンシングシグナルを産生し、輸送先と推定される組織(新しく形成されてきた腋芽)から低分子 RNA を抽出し、次世代シーケンサーにより全塩基配列を決定し増幅コンストラクトにマッピングしたところターゲット配列に由来する siRNAs が特異的にマッピングされ、さらに増幅コンストラクトを用いた場合のみ輸送モチーフへもマッピングされた。このことは、輸送先で増幅コンストラクトがサイレンシングシグナルにより分断され二次 siRNAs 産生システムが働いたことを示唆するものと考えられ、シグナル増幅システムの有用性も示唆された。次に 35S: *GFP* 導入タバコに対して、上方への輸送とエピゲノム編集の効率化を確認するため先ほどと同様の実験方法でエピゲノム編集を誘導し、その TGS の状態・程度を表現型で観察した(図 1B)。その結果、シグナル増幅コンストラクトを利用することでより効率的に TGS 発動させられることが示唆された(図3A)。次に、穂木を野生型、台木を 35S: *GFP* 導入タバコとする接ぎ木個体を用いて改良版 GrIGS システムを試みた。UV 照射による GFP 蛍光のモニタリングを行ったところ、(図3A)。接ぎ木個体においてもアグロインフィルトレーションによる一過低発現系で TGS を発動させることが可能であり、シグナル増幅コンストラクトの利用でその効率

性が向上することが示された(図3B)。

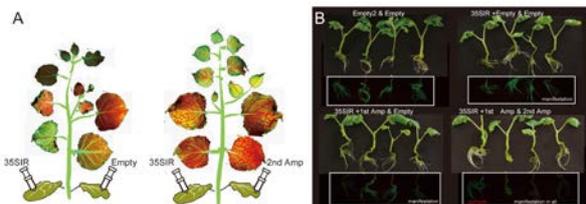


図3 GrIGS システム改良版によるエピゲノム編集誘導の有効性。新展葉 (A) および根 (B) へのエピゲノム編集。

(2) タバコとの異種間接ぎ木個体への改良版 GrIGS システムの応用

予備的に行ったタバコとトマトの異種間接ぎ木個体において顕著な生長不良は観察されず、アグロインフィルトレーションによる siRNAs 産生も観察されたため、改良版 GrIGS システムの適用に問題ないものと思われた。そこで *SVirp1* 遺伝子プロモーターをターゲットとするサイレンサーおよびシグナル増幅コンストラクトを作製し、タバコ/トマト接ぎ木個体にアグロインフィルトレーションを行った。その結果、シンクソースの単純化並びにエピゲノム編集された側根形成促進のため2度根を切断し、形成された側根における *SVirp1* 遺伝子のプロモーター領域のメチル化程度を比較したところ、有意に減少しておりメチル化されたことが示唆された。このことから、改良版 GrIGS システムによってもトマトの内生プロモーターにメチル化を誘導することが可能であった(図4)。

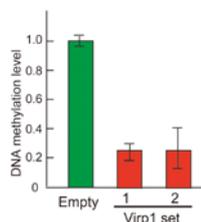


図4 タバコとトマトの異種間接ぎ木個体での GrIGS システム改良版の適用。トマト内生遺伝子のプロモーター領域のメチル化解析。

ジャガイモについては、より詳細な研究を行うためモデル実験として 35S: *GFP* 導入ジャガイモを作出し、形質転換が容易なタバコとの異種間接ぎ木によるエピゲノム編集誘導の有効性を検証

した。これまでの研究で用いた 35S プロモーター siRNAs 産生タバコと 35S: *GFP* 導入ジャガイモとの異種間接ぎ木を行い、接ぎ木 2 カ月後ジャガイモの側根における GFP 蛍光を観察したところ、野生型タバコを接いだコントロールと比べ siRNA ドナーを接いだ個体では、顕著に GFP 蛍光が減少していた(図5A)。さらに、その側根における 35S プロモーター領域のメチル化程度ならびに *GFP* mRNA を調査したところ、メチル程度は上昇し *GFP* mRNA は減少していた(図5B, C)。このことからドナーとなるタバコとの接ぎ木によりジャガイモにエピゲノム編集誘導することが可能であると判明した。

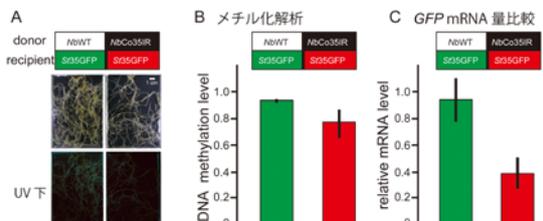


図5 タバコとジャガイモの異種間接ぎ木によるエピゲノム編集。 (A) 異種間接ぎ木 1 ヶ月後の表現型。 (B) ターゲットである 35S プロモーターのメチル化解析。 (C) 35S プロモーターにより制御されている GFP 遺伝子の mRNA 量比較。

本研究課題により、改良版 GrIGS システムを利用したエピゲノム編集誘導の開発およびその有用性が示唆された。さらに、ジャガイモにおいては側根からの再分化系も獲得しており、今後内生遺伝子をターゲットすることでエピゲノム編集の獲得による新たな品種改良技術の確立が期待される(図6)。

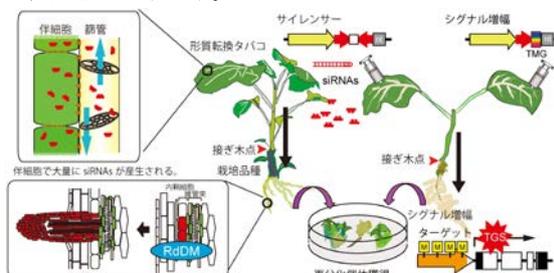


図6 GrIGS システムモデル図

5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計 5 件)

- ① 葛西厚史、原田竹雄、植物におけるエピゲノム編集ーその原理と接ぎ木による誘導、生物の科学 遺伝、査読無、68(2)、2014、pp. 140-144
- ② Kasai A、Sano T、Harada T、Scion on a stock producing siRNAs of potato spindle tuber viroid (PSTVd) attenuates accumulation of the viroid、PLoS ONE、査読有、8(2)、e57736、DOI: 10.1371/journal.pone.0057736

[学会発表] (計 9 件)

- ① Kasai A、Iwashiro R、Harada T、An effective TGS induction in grafting partner by phloem transport of siRNA and mRNA、Plant Biology 2013、July 20-24 2013
- ② 葛西厚史、北條初音、川又奨、原田竹雄、接ぎ木を利用したエピ変異体獲得について、第 35 回日本分子生物学会年会、2012 年 11 月 13 日

6. 研究組織

(1) 研究代表者

葛西 厚史 (KASAI, Atsushi)

弘前大学・農学生命科学部・研究員

研究者番号:80633982