

平成 30 年 6 月 8 日現在

機関番号：34315

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2014～2017

課題番号：26712006

研究課題名(和文) Small RNAを利用した次世代順遺伝学スクリーニング系の開発とその応用

研究課題名(英文) Development of a novel forward genetic screening system by using small RNA 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) 18,000,000円

研究成果の概要(和文)：植物での既存の順遺伝学スクリーニングでは、発生に必須な遺伝子や機能重複遺伝子を同定できない。本研究では、植物の内在性small RNA経路の一つであるtasiRNA経路を改変し、これらの弱点を克服した新奇順遺伝学スクリーニング法を確立した。このスクリーニング系を用いて植物ウイルスの新奇宿主因子の同定を試みた。まず、既存の宿主因子を用いたモデル実験を行い、人工tasiRNAの発現によって、植物ウイルスの宿主因子の同定が可能であることを明らかにした。その後、液胞膜局在タンパク質群とリン脂質代謝関連遺伝子群を標的として、キュウリモザイクウイルスの複製に必要な新奇宿主因子を探索するための基盤を確立した。

研究成果の概要(英文)：In plants, it is difficult to identify genes essential for development and genes having redundant functions and so on through current forward genetic screenings, for example EMS and T-DNA mutagenesis. In this study, to overcome these limitations, I established a novel forward genetic screening system in plants, in which I utilized an endogenous small RNA pathway called TAS1 tasiRNA. Then, by using the established system, I tried to identify novel host factors of a plant virus, Cucumber mosaic virus (CMV). Repression of TOM1 and TOM3 genes by synthetic artificial tasiRNAs in Arabidopsis reproduced the Tobacco mosaic virus-resistant phenotype of tom1/tom3 double mutant, strongly suggesting that we can identify host factors of plant viruses by using the established forward genetic screening system. I then set up the screening to identify host factors, which localize on vacuole membrane or are involved in phospholipid metabolism, required for CMV replication.

研究分野：植物病理学

キーワード：植物-病原体相互作用 RNAiスクリーニング バイオテクノロジー 遺伝学 植物ウイルス

1. 研究開始当初の背景

(1) ある表現型の原因遺伝子を同定することは、ある生命現象を分子生物学的に理解するための第一歩である。表現型を指標にした順遺伝学的な遺伝子同定の強みは、遺伝子同定と同時にその遺伝子の生物学的意義が保証される点である。植物では、EMS 等でランダムな変異を誘発した後、注目した表現型の変化を指標にスクリーニングを行うのが一般的である。しかし、一般的な順遺伝学スクリーニング法では、「欠損すると発生過程で致死になる生存に必須な遺伝子」と、「他のホモログ遺伝子または別の経路が機能して壊れても表現型が出ない遺伝子」を同定することが出来ない。実際にモデル植物シロイヌナズナでは多くの遺伝子が重複しており (Nature 2001, 408, 796)、これまでの順遺伝学スクリーニングでは遺伝子の取りこぼしが多数あるはずである。

(2) 多くの植物 RNA ウイルスがもつ 4~6 という遺伝子数から、ウイルス感染には多くの植物遺伝子 (以下宿主因子と呼ぶ) が関与すると想定されている。宿主因子の同定は、ウイルス感染機構の理解に重要であり、Cas9 などのゲノム編集技術を利用した農作物の劣勢ウイルス抵抗性育種に繋がると期待されている。モデル植物で多く試みられたにも関わらず、順遺伝学スクリーニングで同定された宿主因子は非常に少ない。タバコモザイクウイルス (TMV) の宿主因子 TOM1/TOM3 とキュウリモザイクウイルス (CMV) の宿主因子 eIF4E/eIF4G、カブモザイクウイルス (TuMV) の宿主因子 eIF(iso)4E などが、宿主因子として同定されている (Adv. Virus Res. 2009, 75, 119)。この少なさの原因は、宿主因子が生存に必須で致死になること、および遺伝子機能の重複によって単一遺伝子の破壊では表現型がでないためと予想される。

2. 研究の目的

(1) 本研究の一つ目の目的は、「植物において small RNA を利用した新奇順遺伝学スクリーニング系を構築すること」とである。本研究で開発する新奇スクリーニング系に

よって、致死性遺伝子および機能重複遺伝子を同定可能にし、分子レベルでの植物研究の解像度を一段階高めることを目指す。

(2) 本研究の二つ目の目的は、「新奇順遺伝学スクリーニング系を用いて植物ウイルスの新奇宿主因子を同定すること」である。植物ウイルスの新奇宿主因子を同定することで、植物ウイルスの感染機構をより詳細に理解するとともに、Cas9 などによるゲノム編集を利用して農作物のウイルス抵抗性育種へと繋げて行くことを目指す。

3. 研究の方法

(1) 本研究では、small RNA を利用した植物の新奇順遺伝学スクリーニング系を開発し、植物ウイルスの一つである CMV の新奇宿主因子を同定する事を試みた。新奇スクリーニング系を利用して「生存に必須な遺伝子」と「機能重複遺伝子」も含めて CMV の宿主因子を同定することを試みた。

(2) はじめに、TMV の増殖に必要な既知の宿主因子である TOM1/TOM3 遺伝子を人工 tasiRNA によって発現抑制する。TOM1/TOM3 発現抑制植物に TMV-Cg を接種し、tasiRNA を利用して宿主因子の同定が可能かどうかを確認する。

(3) TAS 前駆体から tasiRNA が切り出される領域を ccdB 遺伝子に置換したコンストラクトを作成する。Golden gate cloning 法によって、ランダムな人工 tasiRNA 配列を ccdB 遺伝子と置換したプラスミドライブラリーを構築する。致死性を回避するために、葉の細胞で特異的に発現するプロモーターを利用する。

(4) (3) で作成したプラスミドライブラリーを用いてアグロバクテリウムを形質転換する。このアグロバクテリウムライブラリーを用いて、シロイヌナズナを形質転換し、個体ごとに異なる人工 tasiRNA を発現する植物ライブラリーを構築する。

(5) GFP を発現する組換え CMV コンスト

ラクトを作出し、CMV の感染拡大を可視化する。この組換え CMV を、(4) で作出した植物ライブラリーに接種し、CMV の感染性を指標として、CMV の新奇宿主因子候補を単離・同定する。

(6)(5) で宿主因子候補を予測する際、候補植物に形質転換されていた人工 tasiRNA の配列を元に、宿主因子を予測する必要がある。ここでは、AGO1-siRNA の標的配列特異性に関する情報が必要になる。そこで、ルシフェラーゼセンサーを利用して、AGO1-small RNA 複合体の特異性を検証し、目的の人工 tasiRNA の標的とする宿主因子をより正確に予測できるようにする。

(7)(5) で同定した CMV の宿主因子候補の遺伝子破壊株を入手し、CMV の感染性を確認する。T-DNA 変異体を入手できない場合や候補遺伝子がファミリーを形成している場合、ゲノム編集を用いて宿主因子の確認を行う。

4 . 研究成果

(1) 人工 tasiRNA を用いて植物ウイルスの宿主因子が探索可能かどうかを検証するために、TMV の増殖に必要な既知の宿主因子である TOM1/TOM3 遺伝子を標的にする人工 tasiRNA を設計した。これらの人工 tasiRNA を葉の細胞で特異的に発現するプロモーターの制御下に組込んだプラスミドを構築した後、シロイヌナズナを形質転換した。RT-qPCR によって、作出した人工 tasiRNA 発現植物において、TOM1 および TOM3 遺伝子の発現抑制を確認した。この植物に TMV-Cg を接種したが、CP の蓄積は確認されなかった。これらの結果は、人工 tasiRNA の発現によって宿主因子の発現を抑制することで、植物ウイルスが宿主植物に感染できなくなることを示している。このポジティブコントロール実験から、人工 tasiRNA プールを用いて順遺伝学的な解析を行うことで、植物ウイルスの宿主因子を探索できることが明らかとなった。

(2) TAS1 前駆体中の tasiRNA コード領域

をランダムな small RNA 配列に置換するためのベクターを構築した。tasiRNA コード領域を ccdB 遺伝子に置換したコンストラクトを利用することで、ランダムな人工 tasiRNA を組み込んだライブラリーを作出する際に、ベクターが混入することを防いだ。二連結または三連結の人工 tasiRNA をベクターに挿入する手法を確立した。

(3) ランダムな人工 tasiRNA が三連結されたプラスミドライブラリーを用いてシロイヌナズナを形質転換し、植物ライブラリーを構築した。約 100 ラインから、挿入された人工 tasiRNA 配列を PCR で増幅し、シーケンス解析を行った。このシーケンス解析によって決定した人工 tasiRNA 配列を元に、WMD3 を用いて標的遺伝子の予測を行なった結果、各ラインあたり平均して約 4 遺伝子の発現が抑制されていることが予測された。発現抑制されていると予測された遺伝子群を詳細に解析した結果、実際に CMV の感染を解析する葉で発現している遺伝子は、約 1/4 しかなかった。この結果は、ランダムな人工 tasiRNA を 3 つ発現させても一植物あたり一つの遺伝子しか発現抑制できないことを示している。重複遺伝子も含めてスクリーニングするという当初の目的の達成が困難であると判断し、人工 tasiRNA の設計方法を変更することにした。

(4) CMV は、液胞膜上で複製することが知られている。また、ウイルスの複製に生体膜の構成成分のうちのリン脂質が重要な役割を示すことが示されてきた。そこで、プロテオーム解析によって明らかにされている液胞膜上に局在するタンパク質群とリン脂質代謝関連遺伝子群に標的を絞った。これらの遺伝子群に対する人工 tasiRNA を設計した後、ファミリーを形成する遺伝子の発現を同時に抑制できるように、設計した人工 tasiRNA を三連結させた。in silico で設計した人工 tasiRNA を Oligo pools によって合成した。この Oligo pool を利用して、液胞膜局在タンパク質とリン脂質代謝関連遺伝子群を標的とする人工 tasiRNA を発現させるためのプラスミドライブラリーを構築した。この新しいプラスミドライブラリーを用いてシロイヌナズナを形質転換し、植物ライブラリーを構

築した。現時点では、CMV の宿主因子の同定には至っていないが、今後もスクリーニングを継続し、新奇宿主因子の同定を達成する計画である。

(5) 人工 tasiRNA が標的とする遺伝子を正確に予測するために、ルシフェラーゼを用いたレポーターアッセイによって AGO1-small RNA の特異性を調べた。その結果、これまで考えられていたモデルより、AGO1-small RNA の特異性が高いことが示された。我々の結果を用いることで、人工 tasiRNA の標的遺伝子および off target 効果をより正確に予測できるようになった。

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 8 件)

1. Mine A., Berens M. L., Nobori T., Anver S., Fukumoto K., Winkelmuller T. A., Takeda A., Becker D. and Tsuda K. Pathogen exploitation of an abscisic acid- and jasmonate-inducible MAPK phosphatase and its interception by *Arabidopsis* immunity. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, (査読有) 114, (2017) 7456–7461. DOI: 10.1073/pnas.1702613114
2. 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
3. Garcia-Ruiz H., Carbonell A., Hoyer S. J., Fahlgren N., Gilbert K. B., Takeda A., Giampetruzzi A., Garcia-Ruiz M. T., McGinn M. G., Lowery N., Baladejo M. T. M. and Carrington J. C. Roles and programming of *Arabidopsis* ARGONAUTE proteins during *Turnip mosaic virus* infection. *PLoS Pathogens* (査読有) 11, (2015) e1004755. DOI: 10.1371/journal.ppat.1004755
4. 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.
5. Kishi-Kaboshi M., Muto H., Takeda A. and Watanabe Y. Localization of tobacco germin-like protein 1 in leaf intercellular space. *Plant Physiology and Biochemistry* (査読有) 85, (2014) 1–8. DOI: 10.1016/j.plaphy.2014.10.005
6. Tsuzuki M., Takeda A. and Watanabe Y. Recovery of *dicer-like 1*-late flowering phenotype by miR172 expressed by the non-canonical DCL4-dependent biogenesis pathway. *RNA* (査読有) 20, (2014) 1320–1327. DOI: 10.1261/rna.044966.114
7. Takeda A. Studies on molecular mechanisms of RNA silencing-mediated anti-virus defense in plants and RNA silencing suppression by plant viruses. *Journal of General Plant Pathology* (査読無) 80, (2014) 527–528. DOI: 10.1007/s10327-014-0548-9
8. 竹田篤史「RNA サイレンシングによるウイルス抵抗性機構及びウイルスによる RNA サイレンシング抑制機構に関する研究」、日本植物病理学会報 (査読無) 80, (2014) 22.

[学会発表](計 24 件)

1. 堀裕和、山下航平、白谷公孝、岩橋美穂、奥野真弥、江口弘真、寺嶋清成、峯彰、竹田篤史「AGO1-RISC の機能における G-U wobble 塩基対の影響」、第 59 回日本植物生理学会年会、2018 年
2. 末森彩洋子、峯彰、奥野哲郎、竹田篤史「AGO2 発現誘導に必要な RCNMV 因子」、平成 30 年度日本植物病理学会大会、2018 年

3. 後藤尚隆、竹内信弘、峯彰、竹田篤史「ウイルス RNA サイレンシングサプレッサーの機能解析に向けた新規 RNA サイレンシング活性定量系の確立」、第 7 回植物 RNA 研究ネットワークシンポジウム、2017 年
4. 末森彩洋子、奥野哲郎、峯彰、竹田篤史「ウイルス感染時に認められる AGO2 mRNA の発現誘導に関する研究」、第 7 回植物 RNA 研究ネットワークシンポジウム、2017 年
5. 末森彩洋子、中村光希、奥野哲郎、竹田篤史「Red clover necrotic mosaic virus 感染時の AGO2 遺伝子の発現誘導に関する研究」、ConBio2017 (第 40 回日本分子生物学会年会)、2017 年
6. 後藤尚隆、竹内信弘、竹田篤史「ウイルス RNA サイレンシングサプレッサーの機能解析に向けた RNA サイレンシング活性定量系の確立」、ConBio2017 (第 40 回日本分子生物学会年会)、2017 年
7. 竹内信弘、竹田篤史「35S プロモーターを含んだ T-DNA 挿入変異体における外来遺伝子の過剰発現系の構築」、ConBio2017 (第 40 回日本分子生物学会年会)、2017 年
8. 澤野光、井木太一郎、竹田篤史、森山裕充、福原敏行「植物ウイルスの RNA サイレンシングサプレッサーがベンサムアナタバコのダイサー-DCL3 および DCL4 に与える影響」、ConBio2017 (第 40 回日本分子生物学会年会)、2017 年
9. 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
10. 竹内信弘、前田健吾、渡邊雄一郎、中屋敷均、竹田篤史「植物における複数遺伝子の同時過剰発現に関する研究」、第 39 回日本分子生物学会年会、2016 年
11. 後藤尚隆、竹内信弘、竹田篤史「ウイルスによる RNA サイレンシング抑制能の定量系の確立」、平成 28 年度日本植物病理学会関西支部会、2016 年
12. 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
13. 富田麻理絵、菊池貴光、渡邊雄一郎、竹田篤史「ランダムな人工 tasiRNA を発現する植物体ライブラリーの構築」、第 80 回日本植物学会、2016 年
14. 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
15. 末森彩洋子、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
16. 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
17. 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
18. 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支部会、2015 年
19. 末森彩洋子、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支部会、2015 年
20. 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
21. 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
22. 唐戸俊介、白谷公孝、都筑正行、渡邊雄一郎、竹田篤史「AGO1-ウイルス由来 siRNA の標的遺伝子予測を目指して」、第 100 回日本植物病理学会、2015 年
23. 都筑正行、竹田篤史、渡邊雄一郎「miR172 強制発現によるシロイヌナズナ Dicer-like 1 変異体の部分相補」、第 78 回日本植物学会、2014 年
24. 唐戸俊介、都筑正行、白谷公孝、渡邊雄一郎、竹田篤史「植物 microRNA の特異性に関する研究」、第 78 回日本植物学会、2014 年

〔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.ritsumei.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

なし

(4) 研究協力者

なし