

未来開拓学術研究推進事業

— Research for the Future Program —

(平成12年度開始分)

研究プロジェクト成果概要

独立行政法人日本学術振興会

植物における RNA 機能の不活化と遺伝子機能解析

RNA Silencing in Higher Plants and Functional Genomics

プロジェクトリーダー

佐藤 文彦 京都大学大学院生命科学研究科・教授



1 研究目的

RNA 機能の不活化に基づいた新規な実用的遺伝子発現抑制技術 RNAi (RNA interference) 法を開発することにより、ゲノムプロジェクト等によって獲得した遺伝子情報から、植物遺伝子機能を迅速に同定する。さらに、RNAi 法により作製した遺伝子発現抑制植物個体を用いて高次の生命現象を解析する。また、RNA 機能の不活化の機構の解明により、次世代の遺伝子組換え技術の基盤を確立する。本研究で開発した RNAi 法とは、転写ならびに転写後の遺伝子発現抑制を引き起こすことにより遺伝子発現を特異的に阻害する手法である。

2 研究成果概要

2-1 植物における簡便 RNAi 法の確立と、遺伝子発現抑制体を用いた高次の生命現象の解析:
有用アルカロイド ベルベリン高生産オウレン細胞において、2 本鎖(ds)RNA を用いた一過的 RNAi 系を開発した。(佐藤文彦、福崎英一郎)

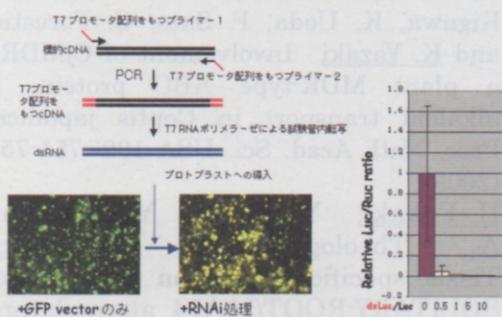


図 1 オウレンプロトプラストを用いた一過的 RNAi 法の開発

同手法を用いて、イソキノリンアルカロイド合成系に関する転写因子遺伝子を新たに同定するとともに、転写ネットワークの解析を可能とした。(佐藤文彦)

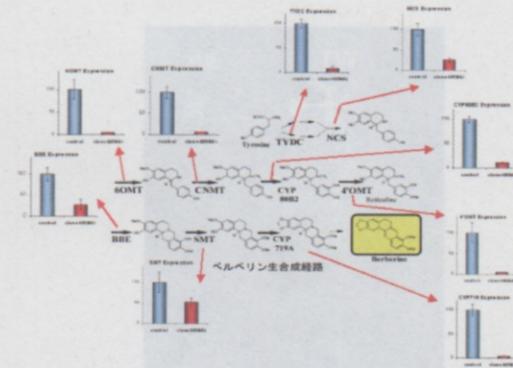


図 2 転写因子遺伝子の一過的 RNAi による発現抑制と転写ネットワークの解析

2-2. ファミリー遺伝子に対する differential RNAi (dRNAi) ならびに包括的 RNAi の開発:

高等植物 緑藻に特異的な光化学系 II 酸素発生系 PsbP タンパク質遺伝子ファミリーやアントシアニン合成系カルコン合成酵素ファミリーに対して遺伝子特異的 3' UTR を標的とした dRNAi 法を適用することによりグループ遺伝子特異的発現抑制ができる。また、共通する保存配列に対する RNAi によってファミリー遺伝子全体の包括的発現抑制ができる。 (佐藤文彦、福崎英一郎)

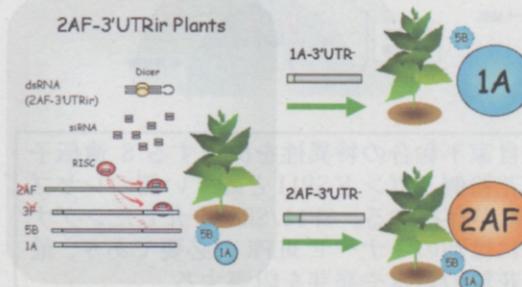


図 3 dRNAi の利用による分子置換体の作製

さらに、RNAi の配列特異性を利用し、標的配列を持たない発現ベクターの導入により遺伝子の実質的置換が可能であることを実証し、ファミリー遺伝子機能解析の新たな手法（RNAi 分子置換法）を確立した。（佐藤文彦）

2-3 イネにおける簡便な RNAi ベクター系の開発：

Gateway system を用い、簡便に RNAi ベクターを構築する方法 pPANDA を開発するとともに、RNAi 法がイネの耐病性、開花制御遺伝子の機能解析に有効であることを示した。（一色正之、島本功）

2-4. スプライス変異を利用した RNAi の量的制御：

スプライス変異を利用した RNAi ベクターを新たに開発し、植物特有の胚乳組織におけるアミロース合成遺伝子 Wx の発現を量的に調節できることを明らかにし、これを利用した汎用性の高いベクターの構築を行った。その結果、良食味米開発のターゲットである胚乳成分アミロースの量（もち性）を自在に制御できる事が可能になった。（伊藤紀美子）

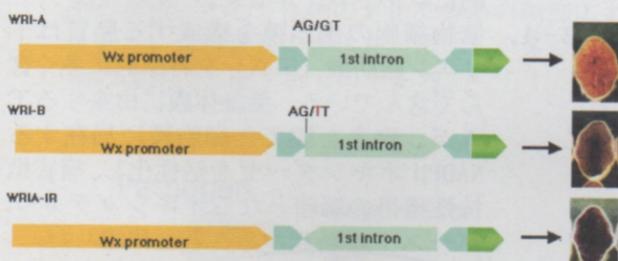


図4 スプライシング変異を利用した抑制効率の異なる胚乳特異的RNAi ベクターの構築とコメもち性の制御

2-5. RNAi を用いた代謝の遮断と代謝中間体を蓄積する細胞系の確立：

RNAi により代謝の遮断を引き起こすことができるとともに、代謝中間体を蓄積する新奇有用細胞系を確立できることをイソキノリンアルカロイド生合成酵素のひとつ berberine bridge 酵素をモデルに実証した。（佐藤文彦）

2-6 RNAi と DNA のメチル化の分子機構の解析：

シロイヌナズナの DNA 低メチル化突然変異 *ddm1* で誘発される発生異常を遺伝解析することにより DNA メチル化の低下に伴って内在トランスポゾンや宿主遺伝子が抑制解除されることを明らかにした。さらに、シロイヌナズナよりもゲノム中の反復配列の割合が多いイネを用いて 低メチル化に伴い転写産物が顕著に増加するイネのレトロトランスポゾン様配列を同定した。（角谷徹仁）

2-7 RNA サイレンシング機能の抑制の分子機構：

農業上最重要ウイルスのひとつであるトマト黄化えそウイルスの機能未知タンパク質 NSs の RNAi 抑制活性を解析し、RNAi 抑制活性を支配する様々なアミノ酸残基を特定するとともに、NSs は RNA サイレンシングの複数のステップに関与していることを示唆した。また、*Red clover necrotic mosaic virus* にはウイルス複製と強くリンクした RNA サイレンシング抑制活性があることを示した。（三瀬和之、奥野哲郎）

3 結論

植物細胞における実用的な RNAi 法（dRNAi、包括的 RNAi、一過的 RNAi 等）を確立し、その利用によってゲノム情報の活用に必要な遺伝子機能の迅速同定を可能とともに、それぞれの遺伝子の機能ネットワークの解析を可能とした。さらに、RNAi 分子置換法などの開発により、合理的な分子育種による植物機能開発の基盤を確立した。また、RNA 機能の不活性化機構に関する多くの知見をえ、次世代遺伝子組換え技術を活用した植物生産性拡大の基盤を固めた。

4 主な発表論文

- (1) Joseph G. Dubouzet, Takashi Morishige, Nanae Fujii, Chuang-Il An, Ei-ichiro Fukusaki, Kentaro Ifuku and Fumihiko Sato: "Transient RNA Silencing of Scoulerine 9-O-methyltransferase Expression by Double Stranded RNA in *Coptis japonica* Protoplasts" *Biosci. Biotech. Biochem.*, 69, 63-70, (2005).
- (2) Kentaro Ifuku, Yumiko Yamamoto, Taka-aki Ono, Seiko Ishihara, and Fumihiko Sato: "PsbP Protein, but not PsbQ Protein, is Essential for the Regulation and Stabilization of Photosystem II in Higher Plants" *Plant Physiol.* 139, 1175-1184, (2005).
- (3) Ryosuke Hayama, Shuji Yokoi, Shojiro Tamaki, Masahiro Yano and Ko Shimamoto: "Adaptation of Photoperiodic Control Pathways Produces Short-day Flowering in Rice" *Nature* 422, 719-722 (2003).
- (4) Tetsu Kinoshita, Asuka Miura, Yeonhee Choi, Yuki Kinoshita, Xiaofeng Cao, Steven E. Jacobsen, Robert L. Fischer and Tetsuji Kakutani: "One-way Control of *FWA* Imprinting in *Arabidopsis* Endosperm by DNA Methylation" *Science*, 303, 521-523, (2004).
- (5) Masahiro Tatsuta, Hiroyuki Mizumoto, Masanori Kaido, Kazuyuki Mise and Tetsuro Okuno: "The *Red clover necrotic mosaic virus* RNA2 trans-activator is also a *cis*-acting RNA2 Replication Element" *J. Virol.* 79, 978-986, (2005).