

研究報告書

「小分子 RNA による植物のゲノム動態制御」

研究期間：平成20年10月～平成24年3月

研究者：佐藤 豊

1. 研究のねらい

動く遺伝子としても知られるトランスポズンは、真核生物ゲノムの主要な構成因子である。トランスポズンは転移の過程でしばしば宿主ゲノムに有害な変異を誘発する一方、ゲノムに多様性をもたらし、宿主の環境適応や進化に一定の役割を果たしている。本研究はトランスポズンが宿主の遺伝子サイレンシングを利用し自身を活性化する経路の解析を通してトランスポズンによるゲノムの環境適応・進化機構の解明を目指す。また、これまでに得られた小分子 RNA と RNA サイレncing に関する研究成果を、農学分野で応用展開していくことも試みる。具体的には、2 重鎖 RNA をベースとして有害昆虫などの抑制に有効な小分子 RNA 農薬の開発を試行する。また、2 重鎖 RNA をベースとして有害昆虫などの抑制に有効な小分子 RNA 農薬の作用機序を明らかにするために、昆虫体内への 2 重鎖 RNA の取り込み機構や、2 重鎖 RNA の昆虫体内での増幅機構の解明などに取り組む。

2. 研究成果

(1) 小分子 RNA を介した宿主ゲノムとゲノム寄生因子の攻防に関する解析

トランスポズンなどの反復配列はゲノム寄生因子とも呼ばれ、多くの真核生物においてゲノムの主要な構成因子になっている。トランスポズンは転移の過程でしばしば宿主ゲノムに変異を誘発する。そこで、宿主ゲノムの安定化にはトランスポズンを不活性化し、その状態を維持する宿主側の機構が必要となる。遺伝子サイレンシングはトランスポズンなどのゲノム寄生因子に対し宿主が獲得した防御機構の一つである。実際、転写後遺伝子サイレンシング (PTGS) に関わる遺伝子の変異により、不活性なトランスポズンの再活性化がしばしば観察されている。言い換えると、トランスポズンは常に宿主から負の選択にさらされているといえる。一方で、トランスポズンの転移は宿主の表現型にほとんどの場合影響しないで、宿主ゲノムの複製以上の早さで自己複製が可能な究極の利己的 DNA とも解釈できる。このように真核生物のゲノムはゲノム寄生因子と宿主の防御機構との軍拡競争 (arms race) の場といえる。最近では、トランスポズンが多重遺伝子族の形成、ある種の転写因子の進化、また遺伝子発現制御における新規なシス制御配列の導入など、多様性の創出を通して宿主の環境適応や進化に一定の役割を果たしてきたと考えられている。すなわち、ゲノム寄生因子の不活化と活性化はゲノムの安定化と多様性の創出のバランスの元に絶妙な調節を受けていると考えられる。しかしながら、これまでの研究は宿主側のゲノム寄生因子に対する防御機構の解明に焦点が絞られてきたため、利己的な DNA としてのトランスポズンの活性化戦略については未解決な問題が多い。

そこで、本研究ではイネで発見したゲノム寄生因子が宿主の遺伝子サイレンシング機構を利用し自身を活性化する経路の解析を行った。具体的には図1にある破線の経路に関する解析を本研究で行った。この経路は、ゲノム寄生因子にとっての宿主の防御機構を回避する対宿主戦略としての意義と、宿主にとってはゲノムに多様性をもたらす意義の両面を持つまさに諸刃の剣で

ある。

miR820 はトランスポゾン遺伝子座から作られる miRNA で、ホストの外来遺伝子に対する防御機構において主要な働きをしている DNA メチル基転移酵素遺伝子 *OsDRM1a* を標的とすることが予測されていた。そこで、まず実際に *miR820* が *OsDRM1a* の発現を制御しうるかを検証した。具体的には *OsDRM1a* の *miR820* による切断産物の検出を試みた。その結果、予想される切断点を末端とする転写物の検出に成功した。さらに、

mRNA の切断ではなく DNA のメチル化のトリガーとなる 24nt の *miR820* 分子種の存在も他グループから報告されていたことから、*OsDRM1a* 遺伝子座のメチル化を解析した。その結果、*miR820* は mRNA の切断と DNA のメチル化の両方に寄与することが明らかになった。次に、*miR820* を過剰に発現する遺伝子組換え植物の作成や *miR820* を生産できない変異体を作出し、標的である DNA メチル基転移酵素の発現量や切断量を調べたところ、両者に負の相関が見られた。さらに、*miR820* とその標的配列の多様性をイネ族で解析したところ、両者に共進化の痕跡が見られる系統が見つかった。また、この系統において、*miR820* を持つトランスポゾンのコピー数が増大していたことから、トランスポゾンから作られる小分子 RNA の一種である *miR820* が宿主のサイレンシングを抑制しトランスポゾンの増大に寄与していると結論づけた。一方で、配列の共進化は *miR820* による宿主因子の制御が宿主側にとっても何か有利に働いている可能性も示唆された。

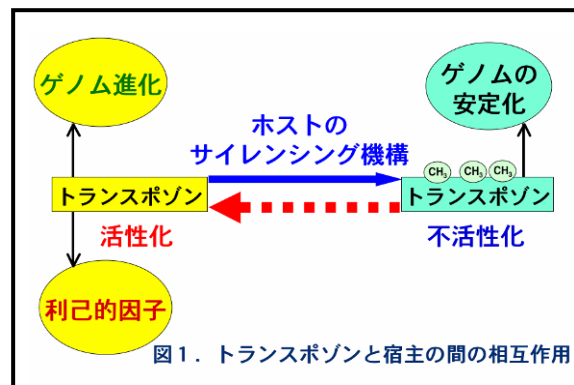


図1. トランスポゾンと宿主の間の相互作用

(2) トランスポゾン由来の miRNA 生産機構に関する解析

これまでに *miR820* を過剰に発現する遺伝子組換え植物の作成を試みてきた。ところが、*miR820* 前駆体を過剰発現する形質転換植物は得られなかったが、その理由はおそらく、トランスポゾン由来の配列を遺伝子導入したために遺伝子サイレンシングの標的となったと考えられた。このことは、トランスポゾン由来の *miR820* がそもそもどのようなメカニズムで転写されているのかという根本的な疑問をなげかけた。そこで、*miR820* の生成機構の解析を行った。まず、イネのリファレンスゲノム上に5コピー存在する *miR820* が座乗するトランスポゾンのヒストンの修飾状態を5コピーに共通の PCR プライマーを用いて ChIP 法により解析した。その結果、セントロメア領域並みに高度な転写抑制型ヒストン修飾領域に相当することが明らかになった。次に、5 コピー存在する *miR820* のうち、どのコピーが優先的に転写されているかを解析したところ、ほぼ7 番染色体上のコピーからのみ転写されることが明らかになった。そこで、7 番染色体上の *miR820* だけに特徴的なクロマチンの状態の有無を、*miR820* を持つ5 コピーのトランスポゾンを区別できる PCR プライマーを用いて ChIP 法により確認したところ、7 番染色体上のコピーにおいて、*miR820* の転写開始点上流に、転写抑制型のヒストン修飾の程度が下がっている領域が見つかった。さらに、*miR820* の近傍における DNA のシトシン残基のメチル化状態を解析したところ、CG、CHG サイトともに5コピーとも高度にメチル化を受けていた。一方、CHH サイトに関して、7 番染色体以外はそれほどメチル化を受けておらず、7 番染色体のコピーでのみ特異的に増加していた。また、CHH のメチル化上昇は *miR820* の認識部位が特に顕著であった。以上の結果から、高度に転写抑制型修飾を持つヒストンの存在する領域においても、転写を許容するメカニズムの存在が示

唆された。また、*miR820* がトランスではなくシスに存在する CHH サイトのメチル化のトリガーとしても機能することが示唆された(図 2)。一般に、ユークロマチンにおける小分子 RNA の標的領域は高度に CHH のメチル化が誘導され、転写に抑制的に働くと考えられている。本研究は転写抑制型クロマチン領域においては CHH のメチル化が通常とは逆に転写に許容的に働いている可能性を示唆している。

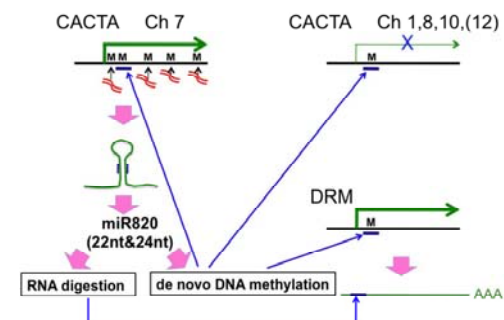


図 2 *miR820* のトランス及びシスの制御

(3) RNA サイレncing を農学分野で利用するための応用・基礎研究

爆発的な人口増加に伴い世界規模での食糧不足が緊迫するなか、驚くべきことに農作物の約 3 分の 1 が病害虫等により消失していることが国連食糧農業機関によって報告されている。すなわち、適切な害虫管理により害虫食害を減少させることができれば、それだけで膨大な食糧増産が見込まれる。従って、世界規模での食糧増産を果たす上で、いかに害虫を管理するかは非常に重要な問題である。現在、世界の農薬市場は年間約 3 兆円に達しており、世界的な食糧増産の必要性からその需要は今後さらに伸びることが予測されている。農薬には化学農薬を用いる殺虫剤、殺菌剤、植物成長調節剤や生物農薬など様々なものがある。化学農薬の多くは毒劇物であり害虫に対する特異性が低く、人畜に対する安全上の問題および環境に対する負荷が大きい。これに対し、現在では資源の循環に基づいた持続的な社会の形成が求められており、環境に配慮した害虫防除法の確立は今後ますます重要な位置を占めると考えられている。また、化学農薬に依存する従来の害虫防除法では、新奇薬剤を開発しても、昆虫はその薬剤に対する抵抗性を短期間のうちに発達させてしまうことが大きな問題となっている。これらの問題点を解決するため、本研究では、RNAi(RNA 干渉)の原理を利用し、遺伝子組換えに依存しない、新奇害虫防除法の開発に向けた基盤形成のための研究を行った。RNAi に基づき有害昆虫の生存に必須の遺伝子の機能阻害をもたらす RNA を“RNA 農薬”と命名し、RNA 農薬の利用システムの構築とその作用機序の解明が本研究の主題である。

まず、昆虫の生存に必須であるアポトーシス阻害因子(inhibitor of apoptosis; IAP)をコードする遺伝子をジャガイモ害虫であるニジュウヤホシテントウからクローニングした。この DNA もとに合成した二本鎖 RNA(dsRNA)を塗布したジャガイモ葉をニジュウヤホシテントウの幼虫に経口投与したところ、摂食が短時間に停止し、致死に至ることが明らかとなった(図 3)。また、IAP 二本鎖 RNA を他の昆虫に摂取したところ同様の効果が認められた。

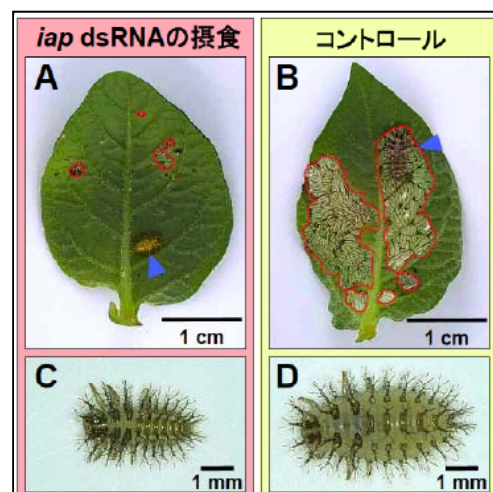


図 3 *iap* dsRNA の摂食による新規害虫防除法。
(A) *iap* dsRNA 摂食によりジャガイモ葉の食害停止。
(B) コントロール個体による食害の拡大。
赤線内：食害領域、青三角：幼虫。
(C) *iap* dsRNA 摂食による発育停止、致死に至る。
(D) コントロール個体は正常に発育。

3. 今後の展開

(1) 小分子 RNA を介したによる宿主ゲノムとゲノム寄生因子の攻防に関する解析

本研究はイネのトランスポゾンから産出される小分子 RNA である *miR820* が、宿主ゲノムとトランスポゾンの相互作用に関与することを明らかにした。従来、宿主ゲノムがトランスポゾンをコントロールする一方通行の仕組みに関する研究を中心にこの分野が発展して来たことを考えると、本研究成果は両者の相互作用を示唆する物であり、その新奇性は高い。一方で、*miR820* はイネに特有の小分子 RNA であり、今回の発見はイネにのみ当てはまる一つの例でしかない。今後は、宿主ゲノムとトランスポゾンの双方向の制御をになう良く似たシステムの存在を他の生物種で見つけ出すことにより、今回の発見の普遍性を確かめたい。

(2) トランスポゾン由来の miRNA 生産機構に関する解析

本研究はトランスポゾンから *miR820* が転写・生産される機構を明らかにすることを目的に行った。現状の解析は、*miR820* が高度に転写抑制型ヒストン修飾部位に位置する領域からも転写されうることを示し、この領域が DNA のシトシン残基のメチル化に特有のパターンが見られる現象のみを明らかにした。今後は、この DNA のメチル化パターンが転写抑制型ヒストン修飾領域からの転写にどのように関わるのかその分子機序を明らかにする必要がある。

(3) RNA サイレンシングを農学分野で利用するための応用・基礎研究

本研究では dsRNA の摂食投与により昆虫の遺伝子発現を改変するという新奇で応用価値の高い現象を見つけ出すことができた。しかし、その作用機序については皆目明らかにされていない。今後はこの点を重点的に解析する必要がある。また、この現象は植物と昆虫とが植物に内在する dsRNA を介して情報のやり取りをしている可能性を示唆している。今後は、この点も明らかにしてみたい。さらに、RNA 農薬を実際に利用するのに必要な各種試験データなども取得していきたい。また、IAP 以外の dsRNA の標的をスクリーニングし、更なる応用範囲の拡大を目指したい。

4. 自己評価

3 年半、さがけのサポートを受けて、思う存分やりたいと思った実験をデザインし、取り組むことができた。特に、当初予想もしなかった方向へ進んだ研究もあり、自己の研究テーマに広がりがあったことは大きな収穫となった。一方で、当初の想定通り実験が進まなかった計画もある。特に、トランスポゾンと宿主ゲノムの相互作用に関する解析では“レトルスペクティブ”なアプローチだけでは限界があるとの、さがけの採用面接の時から指摘を受けていた点に関し、何も答えを見つけ出せなかったのは心残りとなった。

5. 研究総括の見解

本研究は、動く遺伝子としても知られるトランスポゾンが宿主の遺伝子サイレンシングを利用し、自身を活性化する経路の解析を通し、トランスポゾンによるゲノムの環境適応・進化機構の解明を目指した。また、小分子 RNA 農薬の開発も目指した。前者の研究においては、トランスポゾン遺伝子座から作られる miRNA である *miR820* が、ホストの外来遺伝子に対する防御機構において主要な働きをしている DNA メチル基転移酵素遺伝子 *OsDRM1a* を標的とし、そ

の発現を制御していることを証明した。すなわち、トランスポゾンから作られる小分子 RNA の一種である *miR820* が宿主のサイレンシングを抑制しトランスポゾンの増大に寄与していることを明らかにした。宿主ゲノムとトランスポゾンの双方向の制御を担うシステムの存在を示したもので、高く評価出来る。また、この *miR820* の生産機構に関する解析も行い、転写抑制型クロマチン領域においては、メチル化が通常とは逆に転写に許容的に働いている可能性を示唆した。後者においても、農作物の害虫防除のための効率の良い RNA 農薬を創製した。この RNA 農薬の作用機序を是非説明して欲しい。

6. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. Séverine Lacombe, Hiroshi Nagasaki, Carole Santi, David Duval, Benoît Piégu, Martine Bangratz, Jean-Christophe Breitler, Emmanuel Guiderdoni, Christophe Brugidou, Judith Hirsch, Xiaofeng Cao, Claire Brice, Olivier Panaud, Wojciech Karlowski, Yutaka Sato, Manuel Echeverria: Identification of precursor transcripts for 6 novel miRNAs expands the diversity of the genomic organization and expression of miRNA genes in rice. <i>BMC Plant Biol.</i> , 8 123, 2008
2. Masashi Abe, Takanori Yoshikawa, Misuzu Nosaka, Hitoshi Sakakibara, Yutaka Sato, Yasuo Nagato, Jun-ichi Itoh: WAVY LEAF 1, an Ortholog of Arabidopsis HEN1, Regulates Shoot Development by Maintaining microRNA and trans-acting siRNA Accumulation in Rice. <i>Plant Physiol.</i> , 2010 154, 1335-1346.
3. Hiroaki Tabuchi, Yu Zhang, Susumu Hattori, Minami Omae, Sae Shimizu-Sato, Tetsuo Oikawa, Qian Qian, Minoru Nishimura, Hidemi Kitano, He Xie, Xiaohua Fang, Hitoshi Yoshida, Junko Kozuka, Fan Chen, and Yutaka Sato: <i>LAX PANICLE2</i> of rice encodes a novel nuclear protein and regulates the formation of axillary meristems. <i>Plant Cell</i> , 23, 3276-3287, 2011.
4. Katsutoshi Tsuda, Yutaka Sato, Yukihiro Itoh, Nori Kurata: Positive autoregulation of a KNOX gene is essential for shoot meristem maintenance in rice. <i>Plant Cell</i> Published online before print December 2011, doi: http://dx.doi.org/10.1105/tpc.111.090050 .

(2) 特許出願

研究期間累積件数: 5 件

発 明 者: 新美輝幸、吉岡博文、佐藤豊

発明の名称: 害虫防除法

出 願 人: 名古屋大学

出 願 日: 2009/6/5 特願 2009-136701

発 明 者: 新美輝幸、吉岡博文、佐藤豊

発明の名称: 害虫防除法

出 願 人: 名古屋大学

出 願 日: 2010/6/5 PCT/JP2010/059499 (WO)

発 明 者: 新美輝幸、吉岡博文、佐藤豊

発明の名称: 害虫防除法
出願人: 名古屋大学
出願日: 2011/9/28 2011-518506 (JP)

発明者: 新美輝幸、吉岡博文、佐藤豊
発明の名称: 害虫防除法
出願人: 名古屋大学
出願日: 2011/12/2 13/375,842 (US)

発明者: 新美輝幸、吉岡博文、佐藤豊
発明の名称: 害虫防除法
出願人: 名古屋大学
出願日: 2012/1/2 10 783 457.4 (EP)

(3)その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物等)

- (1) 日本育種学会奨励賞 2010.3.25
- (2) GGS Prize 2010 (Genes & Genetic Systems 論文賞) 2010.9.25