

学位論文題名

Analysis of the factors that affect efficient induction of
heritable transcriptional gene silencing through
Cucumber mosaic virus infection

(キュウリモザイクウイルスを介して誘導される
転写型ジーンサイレンシングの効率と
遺伝的安定性を決定する因子に関する研究)

学位論文内容の要旨

従来の交雑育種法によって不快味やアレルゲンの原因となるタンパク質などの不良形質の緩和もしくは除去を行うには、該当成分の生合成経路に関する遺伝子の変異体の探索や交雑後代の選抜および固定など、多大な労力を要する。そのため、迅速かつ簡便に標的遺伝子の発現のみを抑制可能で、かつその発現抑制が安定して次世代に伝わる育種法を開発することは非常に重要である。本論文では、遺伝子導入以外の方法で遺伝子の発現を特異的に改変可能な新規の手法として、ウイルスベクターを介した標的遺伝子特異的な転写抑制型ジーンサイレンシング(Transcriptional Gene Silencing; TGS)の誘導系に着目した。

TGS は、プロモーター領域と相同な配列を持つ二本鎖 RNA の存在下で核内 DNA のプロモーター領域中のシトシンが RNA を介した DNA のメチル化(RNA-directed DNA methylation; RdDM)経路によってメチル化されることにより誘導されることが明らかとなっている。また、植物ウイルスは、ゲノムの高次構造によって、あるいは複製中間体において二本鎖 RNA を形成することから、植物細胞への二本鎖 RNA の供給源として利用可能である。さらに、一度ゲノム DNA 中に生じた DNA メチル化は自殖後代個体でも維持されるため、種子伝染しないウイルスをベクターとして用いることで、組換えウイルスが存在しない後代個体でも TGS による発現抑制が維持される。これらのことを背景に、本論文ではキュウリモザイクウイルスベクターを介した配列特異的な DNA メチル化および TGS 誘導系の開発と効率化、および開発した TGS 誘導系を利用した TGS の機構解析を行った。

1. 植物ウイルスベクターを介した配列特異的なメチル化および TGS 誘導系の開発と効率化

キュウリモザイクウイルス(*Cucumber mosaic virus*; CMV)は単子葉植物と双子葉植物の両者に感染するなど宿主範囲が広く、育種への応用に適したウイルスベクターである。そこで、まず CMV に由来する新規のウイルスベクターである CMV2-A1 ベクターの TGS 誘導能力を検証した。カリフラワーモザイクウイルス(*Cauliflower mosaic virus*; CaMV)35S プロモーター配列の一部をベクターに組み込んだ CMV2-A1 ベクターをゲノムの構成要素として持つ CMV を CaMV 35S プロモーターの制御下

で GFP 遺伝子を発現している形質転換体 *Nicotiana benthamiana* 16c 系統 (16c 系統) に接種した結果、RdDM により GFP 遺伝子の TGS が高効率で誘導されることが示された。一方、CMV2-A1 ベクターに存在する 2b ORF を完全に欠失させた CMV2-H1 ベクターに上記と同一の CaMV 35S プロモーター配列を挿入した場合には、16c 系統に接種しても効率的な TGS を誘導することは出来なかった。この 2b ORF の有無はウイルスの蓄積量には影響を与えていなかったものの、CMV2-A1 ベクターを用いた場合の方が、CMV2-H1 ベクターを用いた場合よりも CaMV 35S プロモーター配列と相同な配列を持つ small interfering RNA (35S:siRNA) が核内に多く蓄積していた。さらに、2b タンパク質を発現する *N. tabacum* BY2 プロトプラストに対して FAM 標識した siRNA をトランスフェクションすることにより、2b タンパク質存在下では siRNA の核への移行が促進されることが明らかとなった。以上の結果から、CMV2-A1 ベクターは、植物細胞への二本鎖 RNA の供給源としての働きの他に、2b タンパク質による TGS 促進作用も有する、TGS を高効率で誘導可能なウイルスベクターであることが示された。

続いて、CMV2-A1 ベクターを介した TGS 誘導系のさらなる効率化を目的とし、DNA 脱メチル化酵素遺伝子の発現抑制下における、CMV2-A1 ベクターを介した外来性プロモーターへのメチル化誘導効率の増強作用について解析した。まず、*N. tabacum* における DNA 脱メチル化酵素遺伝子 *NtROS1* の配列を基に *N. benthamiana* より *NbROS1* 遺伝子を単離した。次に、迅速かつ簡便に遺伝子発現を抑制可能な Virus-induced gene silencing の手法を用い、*NbROS1* 遺伝子の発現抑制下および通常発現下の 16c 系統における、CMV2-A1 ベクターを介した CaMV 35S プロモーターへのメチル化の誘導効率を比較した結果、*NbROS1* 遺伝子の発現抑制下では、外来性 CaMV 35S プロモーターに対する DNA メチル化がより高頻度で誘導されることが明らかとなった。以上の結果より、DNA 脱メチル化を行う酵素遺伝子の発現量と CMV2-A1 ベクターを介した外来性プロモーターへのメチル化誘導との間には負の相関があり、この酵素遺伝子の発現抑制により、外来性遺伝子に対する TGS がより強く誘導される可能性が示された。

2. CMV ベクターを用いた TGS の誘導および維持機構の解析

現在までに、RdDM 経路に関与する遺伝子は多数同定されているものの、RdDM を引き起こす RNA 配列の長さなどが DNA メチル化および TGS の誘導に影響を与えるのか否かについてはほとんど明らかとなっていない。そこで、長さあるいは部位の異なる種々の CaMV 35S プロモーター配列を CMV2-A1 ベクターに組み込み、RNA 配列の構成と DNA メチル化および TGS の誘導との関係性を解析した。その結果、35S:siRNA の蓄積量は挿入配列の違いによる影響を受けないものの、ゲノム中に挿入された CaMV 35S プロモーター領域に対する DNA メチル化、および TGS の誘導効率は挿入配列の長さの制約を受けることが明らかとなった。最後に、TGS 誘導個体から得た CMV 非伝搬の自殖第 1 世代 (S1 植物体) を用い、TGS の誘導源として用いた RNA の違いが TGS 維持にもたらす影響について解析した。その結果、接種当代時に -116 +1 の領域を標的とした場合のみ、S1 植物体でのゲノム中に挿入された CaMV 35S プロモーター領域のメチル化の解除、およびそれに伴う GFP 遺伝子の TGS からの復帰が検出された。このことから、一度誘導されたメチル化が自殖を経て安定に維持されるか否かは、RdDM の誘導源として用いる CaMV 35S プロモーター配列の部位が影響することが明らかとなった。

遺伝子導入法は特定遺伝子の発現を恒常的に改変可能な技術であるものの、日本では遺伝子組換え作物が未だに一般社会に受け入れられておらず、現状では育種手法として用いることは難しい。本研究では、キュウリモザイクウイルスに由来する CMV2-A1 ベクターが TGS 誘導に適したウイルスベクターであることや、一過的な二本鎖 RNA の供給の際に TGS が遺伝的に安定に維持されるのに必要な因子などを明らかにした。これらの知見は、ウイルスベクターを介して内在性遺伝子へ TGS を誘導することにより、遺伝子組換えによらずに作物の形質を改善する技術の実現に大きく寄与すると期待される。

学位論文審査の要旨

主 査 准教授 金 澤 章
副 査 教 授 増 田 税
副 査 教 授 喜多村 啓 介

学 位 論 文 題 名

Analysis of the factors that affect efficient induction of heritable transcriptional gene silencing through *Cucumber mosaic virus* infection

(キュウリモザイクウイルスを介して誘導される
転写型ジーンサイレンシングの効率と
遺伝的安定性を決定する因子に関する研究)

本論文は 99 頁からなる英文論文であり、図 32 と表 2 を含む。別に、参考論文 2 編が添えられている。

従来の交雑育種法によって不良形質の緩和もしくは除去を行うには多大な労力を要するため、迅速かつ簡便に標的遺伝子の発現のみを抑制可能で、かつその発現抑制が安定して次世代に伝わる育種法を開発することは非常に重要である。本研究では、交雑育種法に代わる手法として、ウイルスベクターを介した標的遺伝子特異的な転写型ジーンサイレンシング(TGS)の誘導系に着目した。TGS は、プロモーター領域と相同な配列を持つ二本鎖 RNA の存在下で核内 DNA のプロモーター領域中のシトシンが RNA を介した DNA のメチル化(RdDM)経路によってメチル化されることにより誘導される。また、ある種の植物ウイルスは、ゲノムの高次構造によって、あるいは複製中間体において二本鎖 RNA を形成し、かつ種子伝搬しないことから、植物細胞への一過的な二本鎖 RNA の供給源として利用可能である。これらのことを背景に、本研究ではキュウリモザイクウイルス(CMV)ベクターを介した配列特異的な DNA メチル化および TGS 誘導系の開発と効率化、および開発した TGS 誘導系を利用した TGS の機構解析を行った。得られた結果は、以下のように要約される。

本研究では、第一に、CMV に由来する新規のウイルスベクターである CMV2-A1 ベクターの TGS 誘導能力を検証した。カリフラワーモザイクウイルス (CaMV) 35S プロモーター配列の一部を組み込んだ CMV2-A1 ベクターをゲノムの構成要素として持つ

CMV を CaMV 35S プロモーターの制御下で *GFP* 遺伝子を発現している形質転換体 *Nicotiana benthamiana* 16c 系統 (16c 系統) に接種した結果、RdDM により *GFP* 遺伝子の TGS が高効率で誘導されることが示された。一方、CMV2-A1 ベクターに存在する 2b ORF を完全に欠失させた CMV2-H1 ベクターに上記と同一の CaMV 35S プロモーター配列を挿入した場合には、16c 系統に接種しても効率的な TGS を誘導することは出来なかった。加えて、CMV2-A1 ベクターを用いた場合、CMV2-H1 ベクターを用いた場合よりも CaMV 35S プロモーター配列と相同な配列を持つ siRNA (35S:siRNA) が核内に大量に蓄積していることが示された。この 2b タンパク質による siRNA の核移行の促進は、2b タンパク質を発現する *N. tabacum* BY2 プロトプラストに対する FAM 標識した siRNA のトランスフェクション試験によっても確かめられたことから、CMV2-A1 ベクターは、2b タンパク質による TGS 促進作用も有する、TGS を高効率で誘導可能なウイルスベクターであることが示された。

続いて、DNA 脱メチル化酵素遺伝子の発現抑制下における、CMV2-A1 ベクターを介した外来性プロモーターへのメチル化誘導効率の増強作用について解析した。その結果、DNA 脱メチル化酵素遺伝子である *NbROS1* 遺伝子の発現抑制下では、CMV2-A1 ベクターを介した外来性 CaMV 35S プロモーターに対する DNA メチル化がより高頻度で誘導されることが明らかとなった。このことから、DNA 脱メチル化酵素遺伝子の発現量と CMV2-A1 ベクターを介した外来性プロモーターへのメチル化誘導との間には負の相関があることが示された。

最後に、RdDM を引き起こす RNA 配列の長さ等の要素が DNA メチル化および TGS の誘導に影響を与えるのか否かについて解析するため、長さあるいは部位の異なる種々の CaMV 35S プロモーター配列を CMV2-A1 ベクターに組み込み、RNA 配列の構成と DNA メチル化および TGS の誘導との関係性を解析した。その結果、挿入配列の違いは 35S:siRNA の蓄積量に影響を与えないものの、ゲノム中に挿入された CaMV 35S プロモーター領域に対する DNA メチル化、および TGS の誘導効率は挿入配列の長さの制約を受けることが明らかとなった。さらに、TGS 誘導個体から得た CMV 非伝搬の自殖第 1 世代を用いて TGS 維持について解析した結果、TGS が安定して維持されるか否かは RdDM の誘導源として用いる配列の部位に依存することが示された。

遺伝子導入法は特定遺伝子の発現を恒常的に改変可能な技術であるものの、我が国では遺伝子組換え作物が未だに一般社会に受け入れられておらず、現状では育種手法として用いることは難しい。ウイルスベクターを介した内在性遺伝子に対する TGS 誘導系は、遺伝子組換えによらずに作物の形質を改善可能な技術として期待されるが、本研究で得られた知見は、この技術の実現に大きく寄与するものである。

以上のように、本研究の成果は、ジーンサイレンシングの機構解明に寄与するとともに、作物の形質改変を意図した新たな遺伝子の発現制御法としての知見をもたらす

ものであり、学術および応用の両面で高く評価できる。よって審査員一同は太田垣駿吾が博士（農学）の学位を受けるのに十分な資格を有するものと認めた。