

論文の内容の要旨

植物ウイルスベクターによる RNAi 誘導系の構築と 逆遺伝学的機能解析への利用

堀 孝一

植物体に外来遺伝子を導入することは遺伝子の機能解析のための重要な手法である。その手法としてアグロバクテリウムを利用して導入する方法や、パーティクルガンによる直接導入法が広く用いられている。しかし、これらの方法で得られる組換え植物の作製は多くの時間と労力が必要である。新たな植物体に外来遺伝子を導入する別の手法として、植物ウイルスベクターを利用する手法がある。植物ウイルスを利用すると短時間にベクターを構築でき、導入が容易である。

私は修士課程においてトマトモザイクウイルス(ToMV)を母体とするウイルスベクターTocJを作成した。TocJはタバコをはじめとしたナス科において外来遺伝子を発現し、植物体全身に移行することができた。

遺伝子導入は外来タンパク質の発現のほか、機能破壊にも利用することが可能である。遺伝子の機能破壊は機能の解析に有効な手法のひとつであるが、植物では相同組換えを利用した遺伝子ノックアウトの系は確立されていない。その中で最近、植物においても RNA interference(RNAi)により遺伝子の機能破壊を試みることがおこなわれつつある。RNAiとは内在性遺伝子と外来性遺伝子同士の相同性に依存して双方の発現が抑制される現象である。植物ウイルスベクターのメリットは短期間に遺伝子を導入しその効果を検討できることであり、植物ウイルスベクターによる RNAi の誘導により、内在性遺伝子の発現を抑制することができれば、遺伝子の機能解析のツール

として非常に有効なものになると思われる。しかしながら現在まだ応用例は少なく一般的なツールとしては用いられるにいたっていない。

本研究では TocJ で蓄積した情報をもとに、まずはタバコにおいて、植物ウイルスベクターを用いた RNAi の誘導系を確立した。その系を用いて チュープリンの機能解析を行った。次にシロイヌナズナにおける RNAi 誘導の技術開発を行い、RNA 依存性 RNA ポリメラーゼ(RDR)とウイルス抵抗性の関連の解析、Nonsense mediated mRNA decay(NMD)の機能解析に応用した。

1 . 植物ウイルスベクターTocJ による RNAi の誘導と改良

植物ウイルスベクターによる RNAi 誘導系を構築するために、TocJ を用いたタバコでの RNAi の誘導をフィトエンデサチュラーゼ (PDS) mRNA を標的として検討を行った。しかしながら、RNAi の誘導は確認されたが、同時に強い病徴も引き起こし、形態などの表現型を観察するツールとしては適していないことが明らかとなった。そこで弱毒ウイルス L11A をベクターの母体とすることによって病徴の軽減を試みた。作成した弱毒ウイルスベクターLcJ に PDS mRNA の一部を組み込み、RNAi の誘導を試みた結果、LcJ/PDS は顕著な病徴をしめさず RNAi を誘導することができた。

LcJ ベクターを用いた RNAi 誘導の応用として -チュープリンの解析を試みた。-チューブリンは生命活動に必須であり、従来手法では機能破壊株を得ることが難しい。一方ウイルスベクターによる RNAi 誘導は成長後に mRNA 発現抑制を行うため -チューブリンにおいても発現抑制による表現型を観察できることが期待された。その結果 -チューブリン mRNA の RNAi を誘導した植物体は萎縮 (図 1) やトライコームの形態異常、孔辺細胞の分裂異常などの表現型を示し、 -チューブリンが細胞伸張に関わる可能性を示唆した。以上によりウイルスベクターは生命活動に必須な遺伝子においても機能解析に利用できることが示された。

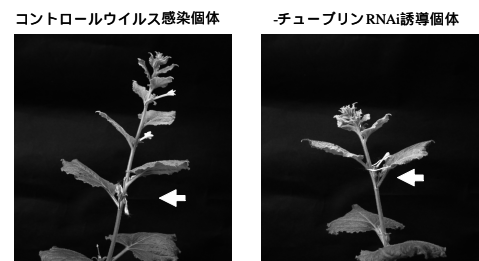


図1 -チュープリンの RNAi の誘導による茎の伸長異常 (右) 矢印は感染葉から 5、6 枚上葉の位置を示す

2 . シロイヌナズナに感染するウイルスベクターの構築と利用

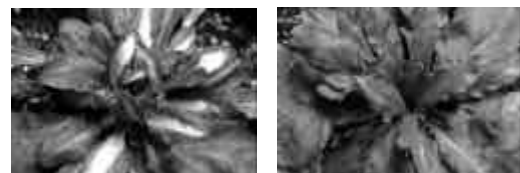
ナス科の植物はタバコ、トマトを初めとして農業上重要な作物であり、モデル植物として歴史が古く、多くの重要な研究がなされている。しかしゲノムサイズが大きいことなどから大規模な遺伝子情報解析は現在のはじまったばかりである。

一方シロイヌナズナは全ゲノム配列が決定され、豊富な EST 情報を有し、イネとならび高等植物の重要なモデルとなっている。またシロイヌナズナは多くの変異体も単

離されており、ウイルスベクターによる発現や RNAi と組み合わせることでより有効に遺伝子機能解析を進めることができると考えられる。2 章では LcJ による RNAi 誘導系によって得られた情報の蓄積を元に、シロイヌナズナにおける RNAi 誘導系の構築、検討を行った。その結果、YogW と名づけた TMV-Cg と TMV ワサビ系統を組み合わせたウイルスベクターがシロイヌナズナにおいて有効に RNAi を誘導できることが示された。

この YogW を用いて植物内在性の RDR がウイルス抵抗性や RNAi に関与しているかどうか、それぞれの RDR のノックダウン変異体を用いて解析を試みた。GFP を発現する YogW/GFP を用いてウイルスの感染率、細胞間移行能力、全身移行その結果、単一の RDR のみではウイルス増殖に大きな影響は及ぼしていないことが明らかとなった。しかしながら、各 RDR 変異株で YogW により PDS mRNA の RNAi を誘導し比較した結果、*rdr6* 変異株では PDS mRNA の蓄積量の減少は観察されたにもかかわらず退色の表現型は極めてごくわずかしが観察されなかった(図 2)。このことにより、RDR6 は成長点近辺においてウイルスを防いでいる可能性を示唆した。

このようにウイルスベクターはシロイヌナズナの既存の変異体と組み合わせることで有効に機能解析に利用できることが示された。



野生型 *rdr6*
図 2 野生型と *rdr6* 変異体での RNAi の誘導性の比較
発達初期に RNAi が誘導されると退色(白い部分)が現れる。

3 . 植物ウイルスベクターを利用した Nonsense mediated mRNA decay(NMD)の解析

NMD はナンセンス変異 (premature termination codon :PTC)が存在する mRNA が生体内で分解される現象で、mRNA 上の変異や異常なスプライシング産物を監視していると考えられている。植物においても NMD 様の現象は報告されているが、植物における NMD の存在、機構や役割はまだ未解明であった。しかしサーベイランス複合体を形成し、NMD の中で重要な因子である UPF1,UPF2,UPF3 に非常に高い相同性を持つタンパク質の存在がシロイヌナズナのゲノム情報上推定されている。またナンセンス変異が存在する mRNA が急速に分解される現象が報告されている事から、植物においても NMD 機構が存在し機能していると思われる。

本研究は、ここまでに構築したウイルスベクターを利用して、植物の NMD 現象とそれと関連が予測される因子の存在を実証し、その機能を解析することを試みた。

NMD の一因子と考えられる AtUPF3 の GFP 融合タンパク質をウイルスベクター TogJ を利用して BY-2 プロトプラストに発現させ局在を解析した。その結果、細胞質

および核に存在し、特に核内に球状の構造物を形成することを確認した。このことから AtUPF3 も他の真核生物と同様、核内で mRNA の複合体に結合することが期待される

さらに NMD を解析するにあたって、NMD の標的遺伝子をデータベースより予測した。この NMD 標的遺伝子候補が NMD 様の分解をうけるかどうか *atupf3-1* 変異株を入手し検討した。その結果、実験を行った 6 つの NMD 標的遺伝子候補のうち 5 つはオルタナティブスプライシングによりナンセンス変異を持つ mRNA (PTC+ mRNA) を生じ、ナンセンス変異を持たないバリエーション (PTC- mRNA) と比較してすみやかに分解されていることが明らかとなった。

NMD の標的 mRNA が明らかとなったので、ウイルスベクターによる *AtUPF1*, *AtUPF2*, *AtUPF3* の RNAi の誘導による NMD 機構の抑制を試みた。その結果、転写阻害剤 cordycepin 添加後の PTC+/PTC- mRNA 比の減少が有意に抑制され(図 3)、*AtUPF1*, *AtUPF2* も *AtUPF3* と同様に NMD に関与していることを示唆することができた。

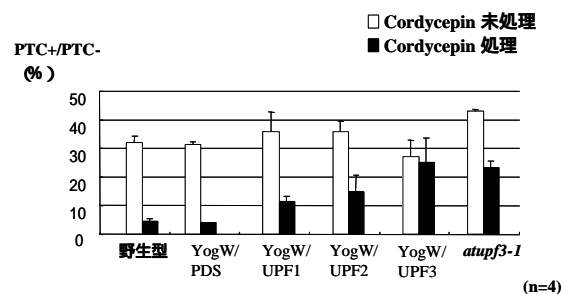


図 3 *AtUPF1,2,3* の RNAi の誘導による NMD 標的遺伝子の分解の抑制

・考察

各種ウイルスベクターを構築し、タバコにおいて チュープリン、シロイヌナズナにおいて RDR および NMD の逆遺伝学的解析に利用することを試みた。その結果、それぞれ新規な知見を得ることができた。ウイルスベクターによる RNAi は一過的であり、完全には標的遺伝子を抑制しないという特徴を持つ。よって生命維持に重要な遺伝子においても発現抑制による表現型を解析することができた。また既存の変異体と組み合わせた解析も可能であり、遺伝子導入が容易であるため、ハイスループットに多数の候補遺伝子をスクリーニングできる可能性も示された。よって従来手法に並び、逆遺伝学的な機能解析に利用できる事が示された。今後は本研究で行ったような標的となる遺伝子があらかじめ決まっている逆遺伝学的な解析のみならず、外来遺伝子の組み込みから遺伝子導入、その解析までが短期間であることを利用して、ウイルスベクターを用いて作製したライブラリーの中から目標の表現型を探索することで、未知の標的遺伝子を明らかにする利用法も考えられる。今後ウイルスベクターがより多くの遺伝子機能解析に利用されることが期待される。