

「イネ科植物いもち病菌が産生する小分子 RNA の機能と進化」

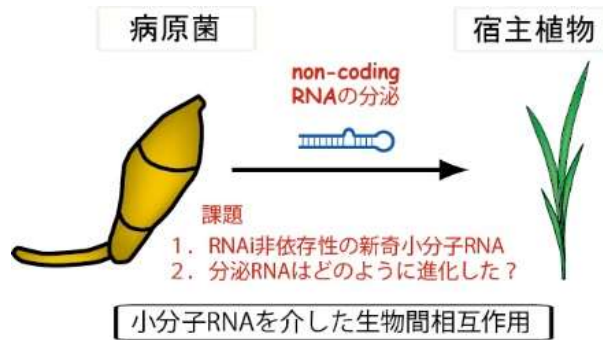
神戸大学農学研究科

中屋敷 均

1 研究の背景と目的

イネ科植物いもち病菌は、我が国の主食であるイネの重要病原菌であり、本県の特産である山田錦などの酒米に対しても深刻な脅威を与えている。本菌の防除には、全国で年間約 6 千トン、約 100 億円（平成 26 年度）の殺菌剤が使用されており、より効果的で低環境負荷型の防除法の確立が待たれている。

本研究課題は、いもち病菌が産生する小分子 RNA (sRNA) に焦点を当て、細胞内にどのような sRNA が存在するのか、それらの菌の病原性への関与はあるのか、また sRNA を介した病原菌と植物の相互作用の進化過程はどのようなものであったか、解き明かそうとするものである。



2 研究方法・研究内容

当研究室ではイネ科植物いもち病菌の sRNA の解析を、種々の変異体を用いて、長年行ってきた。その中で新しいクラスと考えられる興味深い sRNA 群を見出した(図1)。このクラスに属すると考えられる 50 種ほどの sRNA を同定しているが、共通して以下の特徴を持つ; ①サイズが 16-18bp と通常の siRNA や miRNA よりも短い、②その生成が Dicer, Ago, RdRP といった RNAi のコンポーネントのいずれにも依存しない、③Ago 複合体にロードされない、④コード領域、イントロン領域、遺伝子間領域のいずれでも検出され、ごく狭い領域 (30-50bp) にマッピングされる。

以上の結果は、このクラスの sRNA がこれまで知られているどんな sRNA とも異なっており、RNAi 経路に依存していないことを示唆している。そこで本研究では、これら新奇 sRNA の生物学的機能の解明を目指した。

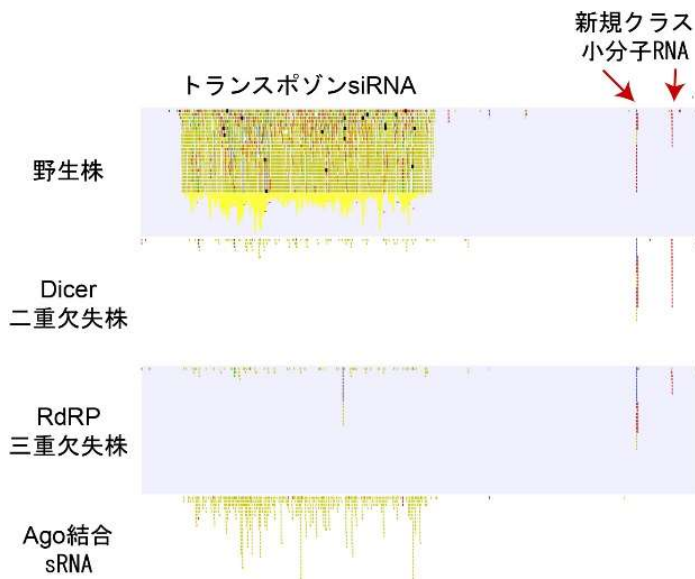


図1. 小分子 RNA のマッピングデータ

野生株、Dicer の二重欠失株 (いもちゲノムのすべての Dicer を欠失)、および RdRP の三重変異株 (ゲノムのすべての RdRP を欠失) から sRNA を抽出し、NGS で解析後、マッピングを行った。また、野生株における Ago 結合 sRNA も同様に解析した。図は、転移因子と新奇クラスの sRNA 配列が隣接するゲノム領域における sRNA のマッピングを示している。

3 研究成果

1) 新奇 sRNA のノーザン解析による検出

イネ科いもち病菌の新奇 sRNA は次世代シーケンサー (NGS) を用いた網羅的な sRNA の解析からその存在が示唆されているものの、実際にどのような分子種が細胞内に存在しているのか知見がない。そこで新奇 sRNA に相補的な配列を FITC ラベルシプローブとしたノーザンブロットにより解析を試みた。

当研究室で使用しているコムギいもち病菌系統である Br48 株、およびその Dicer 二重欠失変異体と RdRP の三重欠失変異体のそれぞれを富栄養培地で 4 日間培養し、得られた菌糸から全 RNA を抽出した。全 RNA はセパゾール (ナカライテスク社) を用いて粗抽出を行い、NucleoSpin RNA Clean-up (MACHEREY-NAGEL 社) により精製した。得られた全 RNA をアクリルアミドゲルで泳動し、タンク法により Hybond-N⁺メンブレンに転写し、FITC ラベルした sRNA#7 と命名された新奇 sRNA の相補鎖配列を持ったオリゴプローブと 50°C でハイブリダイゼーションを行った。ハイブリバッファーには ULTRAhyb 溶液 (Thermo Fisher Scientific 社) を用いた。シグナルはメンブレンを洗浄後、Chem-Doc (Bio-Rad 社) により検出した。

その結果、NGS による解析結果と同様に、対象の sRNA は Dicer や RdRP といった RNAi 経路を担うタンパク質に依存せずに生成されていることが明らかとなった (図 2)。興味深いことに、対象の sRNA 以外に、より高分子領域に 3 本の強いシグナルが検出された。最大のものは約 150nt ほどの分子と推定された。これらの分子は、新奇 sRNA の前駆体と想定することが最も単純な仮説であるが、これら高分子の RNA が機能分子である可能性もあり、現在、クローニングを試みている。

また、ここに示した sRNA#7 以外の分子種においてもノーザン解析を行っており、いずれも Dicer や RdRP といった RNAi 経路を担うタンパク質に依存せずに生成していることを確認している。それらの中には、同様に高分子領域にシグナルを持つものもあり、これら新奇 sRNA を生成機構には共通の経路があるのかどうかも含め、今後の検討課題としたい。

2) 新奇 sRNA の機能解析

今回ノーザン解析において存在が確認された sRNA 種について、その生物学的機能を調査する目的で、レポーターアッセイにより遺伝子サイレンシングへの関与の有無を検討した。新奇 sRNA は RNAi 経路とは無関係に生成されており、遺伝子サイレンシングには関与しないことが想定される。eGFP 遺伝子を *Aspergillus nidulans* の TrpC 遺伝子プロモーター制御下で発現させる pEGFP75 を用いて、その終止コドン直下の 3' UTR 領域に sRNA#7 の相補配列を挿入し、sRNA#7 が結合可能なコンストラクト、pEGF75-sRNA#7 を構築した。3' UTR に RNAi 経路で働く sRNA のターゲット配列がある mRNA は、そこで RNA の切断や翻訳の阻害が起これ、発現が阻害されることが知られている。

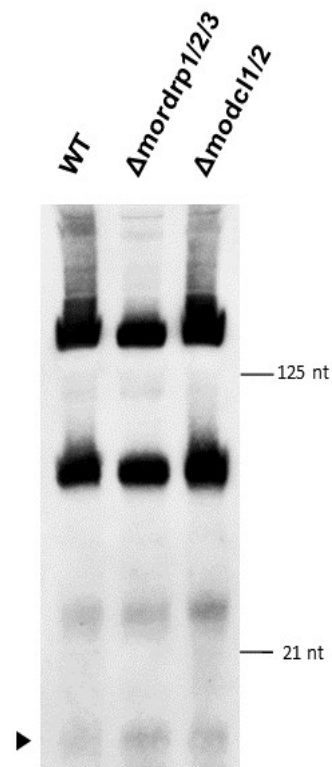


図 2. 新奇 sRNA のノーザン解析

野生株、Dicer の二重欠失株、および RdRP の三重変異株から全 RNA を抽出し、10%ポリアクリルアミドゲルにより分離して、FITC ラベルしたプローブとハイブリダイゼーションを行った。

pEGF75-sRNA#7 とコントロールの pEGFP75 を PEG 法によりいもち病菌に導入し、約 50～100 株の形質転換体を得た。これら形質転換体における GFP 蛍光を計測することで、内在性の sRNA#7 により導入コンストラクト上の eGFP 遺伝子のサイレンシングが起こるかどうか調査した。その結果、pEGF75-sRNA#7 導入形質転換体の平均的な GFP 蛍光値は、コントロールの pEGFP75 を導入した際の蛍光値と有意差がなく、sRNA#7 は RNAi 経路では機能しないことが明らかとなった (図 3A)。一方、RNAi 経路で機能することが知られている siRNA を産生する eGFP ヘアピン RNA 発現プラスミドを導入した場合には、形質転換体における蛍光値の平均が有意に低下していた (図 3B)。

これらの結果は、生成経路から予想された通り、新奇 sRNA が RNAi 経路では機能しないことを示しており、新奇 sRNA がアルゴノートタンパク質と結合しないという知見にも符合するものである。こういった点で、新奇 sRNA がこれまでに知られていない小分子 RNA であるとする我々の仮説をサポートするものであるが、残念なことにこれらの sRNA の具体的な生物学的な機能に対して新たな知見を与えるものとはなっていない。本研究の期間内にこの点に迫るために新奇 sRNA を産生するゲノム領域の破壊株の作製を試みた。しかし、度重なる試みにも関わらず、破壊株は得られておらず、ターゲットとしているゲノム領域が生存に必須な配列を含む可能性も考えられている。破壊株作製のターゲットとしている新奇 sRNA 分子種の数も多くなく、今後、ターゲットを変えて、さらに遺伝子破壊株の作製を行っていく予定である。

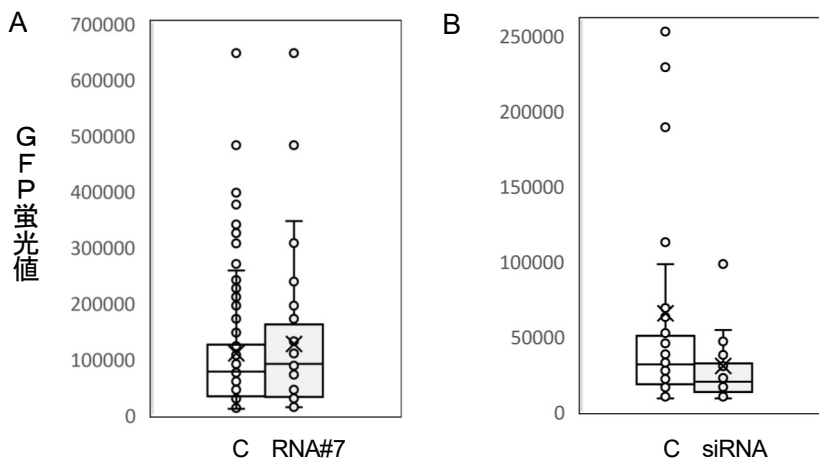


図 3. GFP レポーターアッセイによる新奇 sRNA の機能解析

A, *Aspergillus nidulans* の *TrpC* 遺伝子プロモーターの制御下で eGFP 遺伝子を発現させる pEGFP75 (C) とその 3'UTR に sRNA#7 の相補配列を挿入した pEGFP75-sRNA#7 (RNA#7)を導入したいもち病菌形質転換体の GFP 蛍光を測定した。B, pEGFP を発現するいもち病菌に GFP のヘアピン RNA を転写する pEGFP-SA (siRNA) および薬剤耐性遺伝子のみを発現するプラスミド(C)を導入したいもち病菌形質転換体の GFP 蛍光を測定した。

3) 新奇 sRNA の細胞外分泌の可能性

近年、植物病原性糸状菌が小分子 RNA を細胞外に分泌する例が多く報告されるようになった。本研究で見出した新奇 sRNA の生物学的機能を探る目的で、これらが細胞外へ分泌される可能性を検討した。貧栄養培地でイネ科いもち病菌を培養し、培地中に分泌された RNA を抽出し、小分子 RNA を精製して、次世代シーケンサーで分析した。その結果、約 100 種の sRNA が分泌されていることを示唆する結果を得たが、それらの中に新奇 sRNA は一種類も含まれていなかった。したがって、新奇 sRNA は細胞外に分泌され、宿主植物に影響を与

えるような機能を持つものではないと考えられた。

4 生活や産業への貢献および波及効果

本研究は、我が国の稲作において最重要病害と言えるいもち病菌における新奇 sRNA の機能解明を目指したものである。生成経路やサイズから既知の sRNA とは性質が異なることが予想されていたが、ここで行った研究により実際にこれまでに知られているような sRNA の機能には当てはまらないことが示された。では、これら新奇 sRNA がどんな新しい生物学的機能を持っているという点が次の重要な問いとなるが、どのようなアッセイ系を使えば、それが分かるのかという点から試行錯誤を行わなくてはならず、本研究の期間内に明快な答えを得られなかったのは残念に思っている。

本研究の結果を、直接具体的に生活や産業に役立てることは難しいと言わざるを得ないが、もし新奇 sRNA が本菌の病原性に何らかの寄与をしていることが判明すれば、本菌の防除戦略に新しいアプローチを提示できる可能性はあると考えている。一方、本研究の魅力は、むしろ生物学の基礎研究として、新しい小分子の機能を見出すことにあるのではないかと思う。生命現象の根幹をなす RNA が細胞の中でどんな新しい役割を果たしているのかを見出すことは、細胞に存在する新しい遺伝子制御機構を発見するということのみならず、どのように生命現象が進化してきたのかという点にも洞察を与える可能性がある。生活や産業への直接的な貢献につながるには時間がかかろうが、多くの人の知的興味を満たすものになることを願っている。