特集：植物ウイルス病防除技術開発最前線―イネ萎縮ウイルス―

RNA 干渉法によるイネ萎縮病抵抗性イネの開発

中央農業総合研究センター　清水（しみず）　巧（たくみ）・笹谷（ささや）　孝英（たかひで）・大村（おおむら）　敏博（としひろ）

は　じ　め　に

ウイルス病抵抗性遺伝子組換え植物の開発は，最初の報告から既に 20 年が経ち，様々なウイルス―植物の組み合わせで行われてきた。その多くは，ウイルス由来の遺伝子を導入することによって植物に抵抗性を付与するというもので，この抵抗性は pathogen－derived resistance（PDR）と呼ばれている。また，PDR による抵抗性機構として，導入遺伝子から翻訳されたタンパク質が関与する抵抗性と，導入遺伝子から転写された RNA が関与する抵抗性とに大別されている。今日では，後者の抵抗性機構として，転写後型遺伝子発現抑制（post－transcriptional gene silencing, PTGS）が関与していると考えられている（Baulcombe, 1996 ; Prins et al., 2008）。

PTGS の現象は，最初にペチュニアで報告された。その後，転写後に起こる遺伝子発現抑制の例が次々と報告されるようになり，PTGS と呼ばれるようになった。PTGS と同様の RNA の特異的切断を伴う遺伝子の発現抑制機構として，菌類の quelling，線虫の RNA 干渉（RNA interference, RNAi）が別々に発見されたが，その後の研究からこれらの現象は真核生物に広く保存された遺伝子発現抑制機構として認識されるようになり，この総称として RNA サイレンシングと呼ばれるようになった。しかし，線虫では RNAi という用語が使われ続け，ショウジョウバエやヒトなどでも RNAi という用語のまま研究が進展したことから，今日では，RNAi が一般的に定着している。線虫で RNAi を発見した Fire と Mello（Fire et al., 1998）両博士が 2006 年にノーベル賞を受賞したのは記憶に新しい。現在，RNAi という用語は，生体内で二本鎖（ds）RNA から切断された 22 塩基前後の short interfering RNA（siRNA）が引き金となって，これと相補的な配列をもつ標的 RNA が分解されるという配列特異的な遺伝子の発現抑制現象に用いられている。本稿ではこれ以降，植物における RNA サイレンシングの現象（Brodersen and Vionnet, 2006）についても RNAi と表現する。

植物において RNAi を誘起するには，ヘアピン型 dsRNA を発現する遺伝子を細胞に導入するのが一般的である。この現象は，イネやシロイヌナズナをはじめとする多くの植物種において遺伝子機能の解析ツールとして用いられている。近年のウイルス病抵抗性植物の開発においては，ウイルスの侵入以前に当該ウイルス配列に対して RNAi を誘起させることにより，後から進入してきた標的となるウイルス遺伝子を効果的に分解するという方法が主流となってきている。しかし，それらの効果は，免疫性，発病遅延型抵抗性や罹病性と多様である（Mansoor et al., 2006）。

イネ萎縮ウイルス（*Rice dwarf virus* : RDV）は，イネ萎縮病の病原ウイルスである。イネ萎縮病の防除において，抵抗性品種の利用が最も有効な手段の一つであるが，RDV に対する抵抗性遺伝資源はいまだ報告されておらず，現在もなお，伝染源の除去や媒介昆虫を殺虫剤で駆除する方法等に依存している。

RDV がコードする 12 種タンパク質の諸性質については，その複製におけるおおよその機能と役割が明らかとなった。この詳細については，本ミニ特集の他稿を参照されたい。

本稿では，RDV 複製機構の分子基盤情報から考案した RDV 抵抗性導入戦略の構築について紹介したい（Shimizu et al., 2009）。

I　RNAi 標的配列の選抜とイネへの導入

イネにおいて効率的に RNAi を誘導するためのバイナリーベクターとして pANDA が開発されている（Miki and Shimamoto, 2004）。このベクターは，Gateway® system を用いて RNAi ベクターの構築が簡便化されるように工夫が施されている。

そこで，上記ベクターを用いて RDV 抵抗性イネの作出を試みた。まず，RDV の複製機構の分子情報を基にして標的ウイルス遺伝子について検討した。その結果，ウイルス合成工場であるバイロプラズマの基本マトリックスを構築し，ウイルス複製の足場として重要な役割を担っている Pns12 をコードする遺伝子（Wei et al.,

---

Development of RNAi－Mediated Resistance to *Rice dwarf virus* in Genetically Engineered Rice Plants.　By Takumi Shimizu, Takahide Sasaya and Toshihiro Omura

（キーワード：イネ萎縮ウイルス，イネ，RNAi，遺伝子組換え，抵抗性）

2006 a）を候補遺伝子として選抜した。また，抵抗性の程度を比較する目的で，RDV の感染後期に機能すると想定される Pns4 をコードする遺伝子（WEI et al., 2006 b）についても RNAi の標的遺伝子として選抜した。これら2種遺伝子について，ORF 開始コドンから 500 塩基を RNAi の引き金として働くように構築した DNA ベクターを用いて，それぞれイネ‘日本晴’を形質転換した。

このようにして得た Pns12 および Pns4 の遺伝子配列を導入した形質転換イネの複数系統から，導入遺伝子由来の 21 ～ 24 塩基からなる siRNA が検出された（図−1）。このことから，作出した形質転換イネにおいてデザインしたとおりにRNAiが誘起されていることが明らかとなった。

II　Pns4 RNAi イネの発病遅延型抵抗性

前章で siRNA の蓄積が認められた Pns4−RNAi イネの自殖後代 T_1 において，RDV に対する抵抗性が付与されたか否かについて解析した。

各系統 2 ～ 3 葉期のイネに対して，1株当たり 10 頭の RDV 保毒ツマグロヨコバイを 1 日間放飼することで虫媒接種（RDV は機械的接種では植物に感染しないため）した後，病徴の出現状況を観察した。その結果，導入遺伝子が形質転換当代から受け継がれた Pns4−RNAi 後代イネは，いずれの系統においても接種後 8 週間目でも病徴が認められない RDV 抵抗性を示す株（図−2 左）と原品種‘日本晴’と比較して 2 ～ 4 週間程度遅れて発病するという発病遅延型抵抗性を示す株が見いだされた（図−2 中央）。一方，導入遺伝子の後代への遺伝が認められなかった株は，空ベクター（pANDA）で形質転換したイネおよび原品種‘日本晴’と同様に，接種後 2 週間以内に典型的な RDV の病徴が認められた（図−2，表−1）。

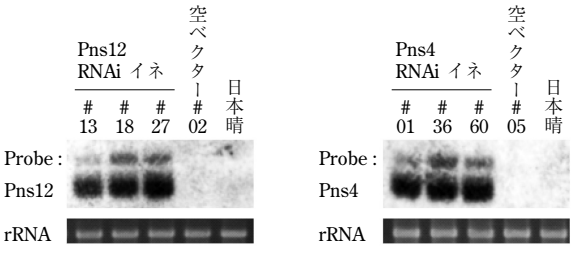
Pns4 を標的としたイネが示した遅延型抵抗性の機構として，次のことが考えられる。ウイルス感染の初期段階では，Pns4 の発現抑制効果による細胞内ウイルス増殖が阻害されたことで見かけ上は抵抗性を示したが，バイロプラズマで増殖した子孫ウイルスが一定量を超えると，Pns4 の発現抑制が間に合わなくなり，ウイルスが全身に蔓延して発病に至ったのではないかと推察される。

III　Pns12−RNAi イネの強度抵抗性

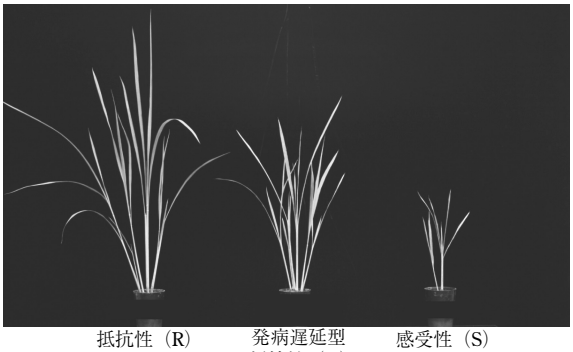
前章の Pns4−RNAi イネと同様に，Pns12−RNAi イネの自殖後代 T_1 について RDV 接種検定を行った。

その結果，導入遺伝子が形質転換当代から受け継がれた Pns12−RNAi 後代イネは，極めて強い抵抗性を示し，その収穫に至るまで発病する株は認められなかった（口絵①，図−3，表−1）。一方，導入遺伝子の後代への遺伝が認められなかった株は，前項と同様に罹病した（表−1）。

RDV と同科に属する乳児嘔吐下痢症を引き起こすロタウイルスでは，NSP2 遺伝子がコードするタンパク質はバイロプラズマを構成し，RDV の Pns12 に相当する。



図−1　RNAi 形質転換イネ当代における siRNA の蓄積



図−2　Pns4−RNAi イネ自殖後代が示す発病遅延型抵抗性
引用文献 9）より転載.

表−1　遺伝子組換えイネ自殖後代 T_1 における RDV 抵抗性

標的遺伝子	系統	n	S −	S ＋	D	R
Pns12	#13	32	5	0	0	27
	#18	32	4	0	0	28
	#27	32	5	0	0	27
Pns4	#01	32	9	0	6	17
	#36	32	3	0	4	25
	#60	32	8	0	9	15
空ベクター	#02	32	30		0	2
	#05	32	32		0	0
	#14	32	30		0	2
日本晴		64	61		0	3

n：接種株数，S：接種後 2 週以内に発病した株数，D：接種後 2 ～ 8 週で発病した株数，R：接種後 8 週においても無病徴の株数，−：導入遺伝子が遺伝しなかった株，＋：遺伝した株.

図-3　Pns12－RNAi イネ自殖後代が示す強度抵抗性

このタンパク質の発現を RNAi で抑制すると，バイロプラズマの構築が阻害されるだけでなく，ウイルス RNA の合成阻害，ウイルス全タンパク質の合成阻害，ひいてはウイルス粒子の産生阻害といったウイルス複製サイクルの多くの局面に影響を及ぼすことが報告されている（Silvestri et al., 2004）。Pns12－RNAi イネが示す抵抗性もこれと同様の機構が働くことにより，ウイルス複製を効果的に抑制できたのであろうと推察される。

お　わ　り　に

これまでに，多くの宿主―ウイルス間の組み合わせでウイルス病抵抗性遺伝子組換え植物の開発が行われてきたが，実用化に至ったのは *Papaya ring spot virus* の外被タンパク質を導入した抵抗性パパイヤの品種‘レインボー’（Gonsalves, 2006）などごく少数である。

本稿で概説したように，RDV の Pns12 をコードする遺伝子を発現抑制させたイネは，本ウイルスに対して完全な抵抗性を示した。このイネは，ウイルスタンパク質を発現することなく植物自身に生来備わっている自己防御機構を利用するものである。また，本防御機構は，標的配列が最大で 24 塩基一致していれば発動するので，500 塩基長からなる標的配列はウイルスの進化過程における少々の RNA 変異や RNA 配列がわずかに異なる他の RDV 系統にも RNAi が機能するといった優位性を兼ね備えているものと思われる。このような実用レベルに達する抵抗性をイネに付与できた背景には，RDV 感染細胞内におけるウイルス複製様式についての分子基盤情報が蓄積していたことが挙げられよう。

一方，本稿の Pns4－RNAi イネのように闇雲にウイルス遺伝子を発現抑制させた場合，ある程度の抵抗性は得られるが実用レベルに達しない可能性が予想される。そういう意味で，いずれのウイルス遺伝子を標的とするかが強度抵抗性を付与するうえで重要なポイントとなるであろう。しかしながら，ウイルスタンパク質の機能解析が進展していないウイルスについては，RNAi の標的として全ウイルス遺伝子の各々に対して RNAi 植物を作出することが実用レベルに到達する近道の一つになるかもしれない。一方，単一の標的遺伝子では十分な抵抗性が得られなかった場合でも，複数の標的ウイルス遺伝子を連結して同時に発現抑制する RNAi ベクターの構築や，異なる標的遺伝子を発現する RNAi 植物間で交配することで，抵抗性強度が改良できる可能性が考えられる。さらには，強力なプロモーターで導入遺伝子をドライブさせるといった遺伝子工学的工夫を凝らすことも有効な手段となろう。

イネのウイルス病は，いったん大発生すると広大な面積で数年間続くという特徴がある。今後，農薬などの使用を最小限にした飼料用およびバイオマスエネルギー用作物を粗放栽培した圃場では，病害虫が発生しやすくなり，これが温床となって食用イネにも被害が拡大するという事態が懸念される。また，地球温暖化による気温の上昇は，ウイルス媒介昆虫の日本への飛来数の増加や生息域・越冬可能域の北上等の誘因となることから，これまで東南アジアで主に発生していたイネのウイルス病が我が国で猛威を振るう可能性も予測される。近年，媒介昆虫の飛来源である中国ではイネ縞葉枯病およびイネ黒すじ萎縮病が，ベトナムではイネグラッシースタント病およびイネラギッドスタント病が大発生して現地の稲作に甚大な被害を与えている。それぞれ後者の病原ウイルスは RDV と同科に分類されることから，筆者らが開発した RDV 抵抗性導入戦略を応用して，現地の栽培品種に展開されることを期待したい。

本研究の一部は，（独）生研センター「新技術・新分野創出のための基礎研究推進事業」の一環として行われたものです。

引　用　文　献

1）Baulcombe, D. C.（1996）: Plant Cell **8** : 1833 ～ 1844.
2）Brodersen, P. and O. Vionnet（2006）: Trends Genet. **22** : 268 ～ 280.
3）Fire, A. et al.（1998）: Nature **391** : 806 ～ 811.
4）Gonsalves, D.（2006）: Adv. Virus Res. **67** : 317 ～ 354.
5）Mansoor, M. et al.（2006）: Trends Plant Sci. **11** : 559 ～ 565.
6）Miki, D. and K. Shimamoto（2004）: Plant Cell Physiol. **45** : 490 ～ 495.
7）Prins, M. et al.（2008）: Mol. Plant Pathol. **9** : 73 ～ 83.
8）Shimizu, T. et al.（2009）: Plant Biotech. J. **7** : 24 ～ 32.
9）Silvestri, L. S. et al.（2004）: J. Virol. **78** : 7763 ～ 7774.
10）Wei, T. et al.（2006 a）: J. Gen. Virol. **87** : 429 ～ 438.
11）――― et al.（2006 b）: Arch. Virol. **151** : 1701 ～ 1712.