

令和元年6月11日現在

機関番号：10101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K07241

研究課題名(和文)統合的網羅解析によるポリA分解酵素の機能解明

研究課題名(英文)Integrated global analyses of Arabidopsis deadenylase

研究代表者

千葉 由佳子 (Chiba, Yukako)

北海道大学・理学研究院・准教授

研究者番号：70509546

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：シロイヌナズナのポリA分解酵素の機能と役割を理解するためには、その標的遺伝子の単離が不可欠である。本研究ではポリA鎖長、翻訳効率およびRNA蓄積量の網羅解析をポリA分解酵素の変異株を用いて行うことで、ポリA分解酵素の標的遺伝子のみならず、さらにmRNA量と翻訳効率のどちらにも影響を与えているのか明らかにすることを目指した。実験系の確立を進め、翻訳効率およびRNA蓄積量の網羅解析に関しては良好なデータを得ている。ポリA鎖長の網羅解析については予備実験の段階であるが、すべてのデータが揃うことによって植物のポリA鎖長制御の生理学的意義の理解が進むことが期待できる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ポリA鎖長の網羅解析、翻訳効率の網羅解析およびRNA蓄積量の網羅解析の統合は、現在、困難を極めているポリA分解酵素の標的遺伝子の同定を容易にし、同時にポリA鎖長を介した転写後制御に関する知見を飛躍的に増加させる。本研究は植物におけるその最初の挑戦であった。ポリA分解酵素は複数種類見つかることが多く、各酵素の機能がどのようにコーディネートされているのか、あるいは、その機能の生理学上の重要性は何であるのかは、これから解明されるべき重要な課題である。シロイヌナズナの他のポリA分解酵素においても、それぞれの変異株で同様の解析をおこなうことで、各酵素の役割分担を明らかにすることができる。

研究成果の概要(英文)：To understand the function and physiological role of poly(A)-degrading enzyme in *Arabidopsis thaliana*, isolation of its target gene is essential. In this study, we aimed to identify the target gene and to clarify which of the mRNA amount and the translation efficiency was affected by the poly(A) length using global analyses of poly(A)-tail length, of translation efficiency, and of RNA accumulation using the mutant strain of poly(A)-degrading enzyme. We have established experimental systems and obtained reliable data on comprehensive analysis of translation efficiency and RNA accumulation. Although comprehensive analysis of poly(A)-tail length is at the preliminary stage, we will be able to understand the physiological significance of plant poly(A)-tail length control by gathering all data.

研究分野：植物分子生物学

キーワード：ポリA分解酵素 シロイヌナズナ 統合的網羅解析

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

ポリA分解酵素の機能と役割を理解するためには、酵素が標的としている遺伝子の単離と解析は不可欠である。これまでは、酵素の変異株が示す表現型から標的遺伝子を推測し、個別にその遺伝子のポリA鎖長を野生型株と変異株で比較することによって標的遺伝子を同定するのが一般的であった。しかしながら、この方法には多くの時間と労力が必要であり、なかなか標的遺伝子にたどり着くことができない。そのため、様々な生物種で多くのポリA分解酵素が見つかってきているにもかかわらず、その役割がまだ明らかとなっておらず、ポリA鎖長を介した mRNA 分解制御や翻訳制御などの転写後制御の重要性は未だ過小評価されていると言わざるを得ない。シロイヌナズナにおけるポリA分解酵素のひとつである AtCCR4 の研究においても標的遺伝子の同定に苦慮している。たとえば、*atccr4* 変異株ではショ糖の蓄積量が減少し、一方でデンプン特にアミロースの蓄積が増加している。この表現型に関連する標的遺伝子はアミロースの合成酵素遺伝子である *GRANULE-BOUND STARCH SYNTHASE 1 (GBSSI)* であることを個別解析によりどうにか突き止めたが、他の表現型に関わる標的遺伝子の単離には至っていない。

### 2. 研究の目的

本研究はポリAプロファイリング、リボソームプロファイリングおよび RNA-seq という3つの網羅解析をポリA分解酵素の逆遺伝学的解析とともに統合的に進めることで、ポリA鎖長の制御を介した転写後制御の重要性を理解するための研究を躍進させることを目指している。

### 3. 研究の方法

本研究では、シロイヌナズナのポリA分解酵素のひとつである AtCCR4 に焦点をあて、ポリAプロファイリングによって野生型株と *atccr4* 変異株で mRNA のポリA鎖長を網羅的に比較し、AtCCR4 標的遺伝子を同定する。あわせて翻訳されている mRNA 量を測定するリボソームプロファイリングおよび mRNA 蓄積量を測定するための RNA-seq を行い、その遺伝子のポリA鎖長の制御が翻訳効率あるいは mRNA 蓄積量のどちらに影響を与えているかを明らかにする。

### 4. 研究成果

本研究で行うポリAプロファイリング、リボソームプロファイリングおよび RNA-seq のうち、まずは Ribo-seq の実験系の確立に取り組んだ。2016年に発表された論文 (Hsu et al., PNAS, 2016) をもとに、我々が用いる植物サンプルに適した実験プロトコルへと改変し確立した。その手法を用いてシロイヌナズナのテストサンプルで Ribo-seq と RNA-seq の良好なデータを得ることができた(投稿準備中)。しかし、この段階で使用していた試薬キットが販売停止となり、プロトコルの全面見直しが必要となった。いくつかの予備実験を行いマニュアルプロトコルを立ち上げた。その手法を用いて、野生型株と *atccr4* 変異株を用いた Ribo-seq と RNA-seq を行い良好なデータを得ることができた。途中で胆振東部地震のため、植物体サンプルの調整に時間を要したため進行が遅れ、現在データ解析を進めている段階にある。同じサンプルを使って、TAIL-seq を行う予定であったが、TAIL-seq 法を植物サンプルに適応させるための改良を行っている途中で、新規の改良された方法が報告された (Lim et al., Gene Dev., 2016)。新規の方法では、従来の方法では大きな問題であった rRNA の混入を大きく抑えることができ、ゆえに検出の感度を上げることが出来る。また、実験にかかるコストを大幅に削減することができるという多くのメリットがある。現在、新規の方法による予備実験を進めている。

### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文](計7件)

1. Arae T., Morita K., Imahori R., Suzuki Y., Yasuda S., Sato T., Yamaguchi J., and \*Chiba Y.: Identification of Arabidopsis CCR4-NOT complexes with Pumilio RNA binding proteins, APUM5 and APUM2. *Plant Cell Physiol.* in press (2019) (査読あり)
2. Luo, Y., Aoyama, S., Fukao, Y., Chiba, Y., Sato, T., and \*Yamaguchi, J.: Involvement of the membrane-localized ubiquitin ligase ATL8 in sugar starvation response in Arabidopsis. *Plant Biotech.*, in press (2019) (査読あり)
3. \*Satake, A., Kawata, K., Chiba, Y., Kitamura, K., and Qingmin, H.: Synchronized expression of FLOWERING LOCUS T between branches underlies mass flowering in *Fagus crenata*. *Population Ecology.* 61:5-13 (2018) (査読あり)
4. Arae T. †, Isai S. †, (†co-first authors) Sakai A., Mineta K., Hirai Y. M., Suzuki Y., Kanaya S., Yamaguchi J., Naito S., \*Chiba Y.: Co-ordinated regulations of mRNA synthesis and decay during cold acclimation in Arabidopsis cells. *Plant Cell. Physiol.* 58 : 1090-1102 (2017) (査読あり) DOI: 10.1093/pcp/pcx059
5. 鈴木悠也, 南雲亜希子, 荒江星拓, 千葉由佳子. (2017) mRNA 分解制御から植物の環境ストレス応答を考える. *生物科学*, 68: 215-222. [査読あり]

6. Aoyama S., Terada S., Sanagi M., Hasegawa Y., Lu Y., Morita Y., Chiba Y., Sato T. \*Yamaguchi J.: Membrane-localized ubiquitin ligase ATL15 functions in sugar-responsive growth regulation in Arabidopsis. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 491 : 33-39 (2017) (査読あり) DOI: 10.1016/j.bbrc.2017.07.028
7. Tanaka M., Sotta N., Yamazumi Y., Yamashita Y., Miwa K., Murota K., Chiba Y., Hirai Y. M., Akiyama T., Onouchi H., Naito S., and \*Fujiwara T.: The Minimum Open Reading Frame, AUG-Stop, Induces Boron-Dependent Ribosome Stalling and mRNA Degradation. *Plant Cell*, 28: 2830-2849 (2016) (査読あり) DOI: 10.1105/tpc.16.00481

〔学会発表〕(計 23 件)

1. Suzuki Y., Nagumo A., Arae T., Hirai M.Y., McClung C.R., Green P. J., Yamaguchi J., Chiba Y.: Physiological effects of Arabidopsis deadenylases, AtCCR4a/b, components of the AtCCR4-NOT complex. Post-transcriptional gene regulation in plants. March 18-20, 2019, Todaijii culture center, Nara (Invited speaker)
2. Kotone Morita, Toshihiro Arae, Yuya Suzuki, Yukako Chiba: Characterization of Arabidopsis mutants deficient in deadenylases or RNA binding protein, APUM5 under stress conditions. The 60<sup>th</sup> Annual Meeting of JSPP, Mar.13-15. 2019, Nagoya (Oral presentation)
3. Toshihiro Arae, Riko Imahori, Yuya Suzuki, Yukako Chiba: Identification of Arabidopsis CCR4-NOT complexes with variable combinations of deadenylase subunits. The 60<sup>th</sup> Annual Meeting of JSPP, Mar.13-15. 2019, Nagoya (Oral presentation)
4. 千葉 由佳子, 植物における翻訳レベルの代謝制御, 理研シンポジウム「植物の代謝制御と化学生物学の新展開」, 12月20日, 2018, 理研横浜キャンパス 交流棟ホール, 横浜(口頭発表)
5. Yuya Suzuki, Toshihiro Arae, Akiko Nagumo, Kotone Morita, Masami Y. Hirai, C. Robertson McClung, Pamela J. Green, Junji Yamaguchi, Yukako Chiba: Physiological events regulated by AtCCR4a/b deadenylases, components of the CCR4-NOT complex in Arabidopsis. 59<sup>th</sup> Annual Meeting of JSPP, March 28-30, 2018, Sapporo (Symposium presentation)
6. 森田 琴音, 荒江 星拓, 鈴木 悠也, 千葉 由佳子: 環境ストレス条件下における RNA 結合タンパク質 APUM5 およびポリ A 鎖除去酵素欠損変異株の表現型解析, 第 59 回日本植物生理学会年会, 3月28日-30日, 2018, 札幌コンベンションセンター, 札幌(ポスター発表)
7. 南雲 亜希子, 鈴木 悠也, 平井 優美, 高橋 明格, 山本 雅, 千葉 由佳子: シロイヌナズナのポリ A 分解酵素 AtCCR4a/4b は概日時計の維持に重要である, 第 59 回日本植物生理学会年会, 3月28日-30日, 2018, 札幌コンベンションセンター, 札幌(口頭発表)
8. 荒江 星拓, 森田 琴音, 鈴木 悠也, 千葉 由佳子: シロイヌナズナ CCR4-NOT 複合体を構成する脱アデニル化酵素およびその標的認識に関わる RNA 結合タンパク質の同定, 第 59 回日本植物生理学会年会, 3月28日-30日, 2018, 札幌コンベンションセンター, 札幌(口頭発表)
9. 南雲 亜希子, 鈴木 悠也, 平井 優美, C. Robertson McClung, Pamela J. Green, 高橋 明格, 山本 雅, 千葉 由佳子: シロイヌナズナ概日時計におけるポリ A 鎖長制御の重要性, 第 7 回植物 RNA 研究ネットワークシンポジウム, 平成 29 年 12 月 14 日- 15 日, 国立遺伝学研究所, 静岡(ポスター発表)
10. 荒江 星拓, 森田 琴音, 鈴木 悠也, 千葉 由佳子: シロイヌナズナ CCR4-NOT 複合体を構成する脱アデニル化酵素の同定と標的認識に関わる RNA 結合タンパク質の探索, 第 7 回植物 RNA 研究者ネットワークシンポジウム, 平成 29 年 12 月 14 日-15 日, 国立遺伝学研究所, 静岡(口頭発表)
11. 荒江 星拓, 森田 琴音, 鈴木 悠也, 千葉 由佳子: シロイヌナズナ CCR4-NOT 複合体を構成する脱アデニル化酵素の同定と標的認識に関わる RNA 結合タンパク質の機能解析, 第 40 回日本分子生物学会年会, 平成 29 年 12 月 6 日-9 日, 神戸ポートアイランド, 神戸(口頭発表)
12. Y. Suzuki, A. Nagumo, T. Arae, M. Y. Hirai, C. R. McClung, P. J. Green, J. Yamaguchi, Y. Chiba: Poly(A) status of clock genes were modulated by AtCCR4a/b deadenylases, components of the CCR4-NOT complex in Arabidopsis. Cutting edge developments in RNA biology for the control of gene expression, November 13-17, 2017, Okinawa (Invited speaker)
13. 荒江 星拓, 鈴木 悠也, 千葉 由佳子: シロイヌナズナ CCR4-NOT 複合体を構成する脱アデニル化酵素とその標的認識に関わる RNA 結合タンパク質の同定, 第 19 回日本 RNA 学会年会, 平成 29 年 7 月 19 日-21 日, 富山国際会議場, 富山(ポスター発表)

14. Yuya Suzuki, Akiko Nagumo, Masami Y. Hirai, C. Robertson McClung, Pamela J. Green, Yukako Chiba: Poly(A) status of clock genes is important for robust circadian rhythm in Arabidopsis. Strategies of plants and animals on environmental response/adaptation. March 9, 2017, Okayama Univ., Okayama (Invited speaker)
15. Toshihiro Arae, Shiori Isai, Akira Sakai, Katsuhiko Mineta, Masami Y. Hirai, Yuya Suzuki, Shigehiko Kanaya, Junji Yamaguchi, Satoshi Naito, and Yukako Chiba: Coordinated regulations of mRNA synthesis and degradation during cold acclimation in Arabidopsis. Environmental Stress Adaptation and Memory in Plants. February 27-28, 2017, RIKEN, Yokohama (Invited speaker).
16. 宮島 証記, 鈴木 悠也, 千葉由佳子: シロイヌナズナの脱アデニル化酵素 AtCCR4C の発芽における機能解析, 第 58 回日本植物生理学会年会, 3 月 16 日-18 日, 2017, 鹿児島大学, 鹿児島
17. 荒江星拓, 鈴木悠也, 千葉由佳子: シロイヌナズナ CCR4-NOT 複合体サブユニットと標的認識に働く RNA 結合タンパク質の探索と同定, 第 58 回日本植物生理学会年会, 3 月 16 日-18 日, 2017, 鹿児島大学, 鹿児島 (口頭発表)
18. Akiko Nagumo, Yuya Suzuki, Masami Y. Hirai, C. Robertson McClung, Pamela J. Green, Yukako Chiba: Cytoplasmic deadenylases AtCCR4a/4b are involved in the regulation of circadian clock gene expression in Arabidopsis. 39<sup>th</sup> Annual Meeting of the molecular biology society of Japan. November 30-December 2, 2016, Pacifico Yokohama, Yokohama (Poster presentation)
19. Toshihiro Arae, Yuya Suzuki, Yukako Chiba: Interactome analysis of Arabidopsis deadenylases, AtCCR4a/4b, determined a large CCR4-NOT complex. 39<sup>th</sup> Annual Meeting of the molecular biology society of Japan. November 30-December 2, 2016, Pacifico Yokohama, Yokohama (Poster presentation)
20. Yuya Suzuki, Akiko Nagumo, Toshihiro Arae, Masami Y. Hirai, Robertson McClung, Pamela J. Green, Junji Yamaguchi, Yukako Chiba: Physiological impacts of AtCCR4a/4b deadenylases, components of the CCR4-NOT complex in Arabidopsis. 89<sup>th</sup> Annual Meeting of the Japanese Biochemistry Society. September 25-27, 2016, Sendai International Center, Sendai (Symposium presentation)
21. Akiko Nagumo, Yuya Suzuki, Masami Y. Hirai, C. Robertson McClung, Pamela J. Green Yukako Chiba: Poly(A) length of clock genes modulated by Arabidopsis deadenylases, AtCCR4a/4b is critical for the robust oscillation. The 2016 joint annual meeting of the RNA Society and the RNA Society of Japan, June 28 - July 2, 2016, International Conference Center, Kyoto (Poster presentation)
22. Toshihiro Arae, Yuya Suzuki, Yukako Chiba: Multiple deadenylases form a large AtCCR4-NOT complex in Arabidopsis. The 2016 joint annual meeting of the RNA Society and the RNA Society of Japan, June 28 - July 2, 2016, International Conference Center, Kyoto (Poster presentation)
23. Yuya Suzuki, Pamela J. Green, Junji Yamaguchi, Yukako Chiba: Endocycle acceleration in the mutants of Arabidopsis deadenylases, AtCCR4a/4b. The 2016 joint annual meeting of the RNA Society and the RNA Society of Japan, June 28 - July 2, 2016, International Conference Center, Kyoto (Poster presentation)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称 :  
 発明者 :  
 権利者 :  
 種類 :  
 番号 :  
 出願年 :  
 国内外の別 :

取得状況 (計 0 件)

名称 :  
 発明者 :  
 権利者 :  
 種類 :

番号：  
取得年：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

<https://www.sci.hokudai.ac.jp/~yukako/index.html>

## 6 . 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

### (2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。