

令和 2 年 6 月 25 日現在

機関番号：33910
 研究種目：基盤研究(C) (一般)
 研究期間：2017～2019
 課題番号：17K07454
 研究課題名(和文) 次世代型シーケンサーを用いた種子油脂貯蔵プログラムの発芽後抑制メカニズムの解析

研究課題名(英文) Analysis of the genetic mechanism repressing seed maturation program after germination using high-throughput sequencer

研究代表者
 鈴木 孝征 (SUZUKI, Takamasa)
 中部大学・応用生物学部・准教授

研究者番号：50535797

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dro11変異株は種子発芽後のオレオシンの遺伝子の発現抑制ができない変異株として単離された。その原因遺伝子はスプライシング因子をコードしていたことから網羅的なトランスクリプトームの解析を行った。その結果末端の塩基配列がAT-ACであるイントロンのスプライシングが特異的に抑制されていることがわかった。このことからAT-AC型イントロンを特異的にスプライシングするスプライソソームの存在が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

研究の結果シロイヌナズナのDROL1遺伝子は末端の塩基配列がAT-ACである極一部のイントロンのスプライシングに必要なものであることがわかった。イントロンのスプライシングはスプライソソームによって行われており、そのスプライソソームには2種類あることが知られている。しかし私たちの研究の結果、スプライソソームにはさらに細かい差を持つものがあることが示唆された。従来イントロンはその内部配列によって分けられ、それに応じたスプライソソームがあるとされていたが、この研究の結果からは末端の塩基配列もスプライソソームの選択性に影響を与えることが示唆された。

研究成果の概要(英文)：An Arabidopsis mutant named defective repression of OLE3::LUC 1 (dro11) was originally isolated as a mutant with defects in the repression of OLEOSIN gene after seed germination. Since the DROL1 gene was speculated to encode a splicing factor, the transcriptome of dro11 mutant was compared to that of the wild type. The analysis revealed that the introns with AT-AC terminal sequences were specifically retained in the transcriptome of dro11, indicating that DROL1 was required for the splicing of AT-AC-type introns. This result suggested the existence of new subclasses spliceosome specifically excising introns with AT-AC terminal dinucleotides.

研究分野：植物分子遺伝学

キーワード：植物 種子 遺伝子発現 オレオシン スプライシング イントロン

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

種子植物は次世代の栄養として種子に様々な物質を蓄積しており、我々はそれらを様々な用途に利用している。種子に蓄積される成分のうち、油脂(トリアシルグリセロール)は食料としてだけでなく化成品原料、燃料などにも使われ、近年バイオディーゼルの原料としても重要性を増している。

モデル植物のシロイヌナズナは種子油脂の生産に広く用いられているセイヨウアブラナ(*Brassica napus*)と同じ科に属し、同様に種子に油脂を蓄積することから、種子油脂生産の制御機構を解析する格好の材料である。種子の成熟過程での油脂の合成に必要な遺伝子群は、*LEC1*、*LEC2*、*FUS3* の *LEC* マスター転写因子群の制御下にあることが明らかとなっている。これらの遺伝子の活性は種子成熟過程においては重要な役割を担うが、種子が休眠に入るとともに活性が低下する。しかし、発芽直後には細胞の代謝が休眠前の状態に戻るため、その発現を不活性化・抑制することが種子成熟から発芽への生長プログラムの転換に重要である。しかし、油脂貯蔵など種子成熟プログラムを発芽後に抑制・サイレンシングして、初期生長への転換を起こす分子機構の詳細はまだ明らかになっていない。

研究代表者らは油脂の合成と蓄積を制御する因子を遺伝学的に探索するために、*LUC* レポーター遺伝子を用いた網羅的変異株スクリーニングを行った。油脂は子葉細胞内においてオイルボディに蓄積されており、オイルボディの膜にはオレオシン(oleosin)タンパク質が蓄積している。シロイヌナズナの *OLE3* 遺伝子は種子特異的に発現し、その発現は油脂の蓄積と相関している。この *OLE3* 遺伝子のプロモーターの下流に、ホタルのルシフェラーゼ遺伝子(*LUC*)をつないだ組換え遺伝子(*Ole3::LUC*)をシロイヌナズナに導入し、その *LUC* 活性を好感度 CCD カメラで可視化した。その結果、*OLE3* 遺伝子は種子成熟過程で強く発現していることが確認されるとともに、播種後数日の芽生えにおいて一過的に発現し、そして速やかに発現が消失することを見出した。この系を利用し、芽生えでの *Ole3::LUC* の発現を指標に変異株をスクリーニングし、*defective repression of Ole3p::LUC1-1 (drol1-1)* 変異株を単離した。

drol1-1 変異株では発芽後の *LUC* 発現が野生型株よりも持続しており、*OLE3* 遺伝子の発芽後の抑制・サイレンシングが低下している。*drol1-1* 変異株の原因となっている遺伝子上の変異を同定したところ、mRNA のスプライシングに関わる因子をコードすると推定される遺伝子に変異があることがわかった。この遺伝子を *DROL1* と名付けた。

2. 研究の目的

油脂貯蔵などの種子成熟プログラムを発芽後に抑制できない変異株として *drol1-1* 変異株を単離したが、その原因遺伝子 *DROL1* がどのようにして遺伝子発現に関わるのかはわからなかった。そこで本研究では *DROL1* の欠損から遺伝子発現パターンの変化に至る道筋を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

DROL1遺伝子がスプライシング因子をコードしていることが予想されたため、その遺伝子の欠損は最初にスプライシングパターンの変化に現れることが予想された。そこで、次世代型シーケンサーを用いて転写物(mRNA)を網羅的に解析することを計画した。

シロイヌナズナの野生型株と*drol1*変異株の芽生えからRNAを抽出し、cDNAライブラリを作成した。これを次世代シーケンサーで解析し、3万種近いmRNAの量とスプライシングをコンピュータで解析した。

研究を始めた時点で得ていた予備的に行った実験から、*drol1-1* 変異株ではいくつかのヒストン脱アセチル化酵素遺伝子の特定イントロンのスプライシングが野生型株に比べて低下していることがわかってきた。そこで特にこれらの遺伝子の役割に注目して研究を行った。

4. 研究成果

drol1 変異株のmRNAを調べたところ、非常に多くの遺伝子のmRNAが変化していることがわかった。その中にはオレオシンの遺伝子が含まれており、また 2Sアルブミンや 18Sグロブリンといった種子貯蔵タンパク質も含まれていた。これらの結果から*drol1* 変異株はオレオシンの発現制御に特異的な因子ではなく、種子から芽生えへの生長変換に広く影響を与えていることがわかった。

スプライシングに注目してmRNAの解析を行ったところ、*drol1* 変異株中では 200 個ほどのイントロンがスプライシングされにくくなっていることがわかった。シロイヌナズナには約 12.5 万個のイントロンがあるがそのうちの98%以上は末端の塩基配列がGT-AGである。そしてごく一部(0.6%)がAT-ACである。ところが*drol1* 変異株でスプライシングされにくくなったイントロン約 200 個のうち、40 個ほどがAT-AC型であることがわかった。全体ではたった 0.6%のAT-AC型イントロンがスプライシングされないものの 20%以上を占めていることから、DROL1 はAT-AC型イントロンに特化したスプライシング因子であることがわかった。

イントロンのスプライシングはスプライソソームと呼ばれるRNAとタンパク質がたくさん集まった複合体によって行われることが明らかとなっている。これまでの研究で、このスプライソソームにはU2型とU12型の二つがあることがわかっている。U2型は全イントロンの99%以上をスプライシングしていると考えられており、U12 残りのわずかな部分のスプライシングを行っている。このU12型スプライソソームによってスプライシングされるイントロンのうち約3分の1がAT-AC型である。U2型スプライソソームはAT-AC型をほとんどスプライシングしない。

私たちの研究以前にはU12型スプライソソームは一種類だけであるとされていた。しかし、DROL1がスプライソソームの構成因子であることを明かにし、またその変異株でAT-AC型イントロンだけがスプライシングされないことが明らかとなったので、U12型スプライソソームにはイントロンの末端配列を区別する二つのサブクラスが存在する可能性が考えられた。

drol1 変異株でスプライシングが起きにくくなるイントロンを持つ遺伝子にヒストン脱アセチル化酵素(HDAC)をコードするものがあった。HDACには分類があり、そのうち植物固有のもの(HD2)がある。シロイヌナズナにはHD2が4つあり、そのうちの3つがAT-AC型イントロンを持っていた。HDACは一般に遺伝子の発現を抑制する機能があることから、*drol1* 変異株でオレオシン遺伝子が脱発現抑制しているのはHD2のスプライシング異常が原因であると考えた。しかし、*hd2* 変異株でオレオシン遺伝子の脱発

現抑制が起きないことがわかり、この可能性は小さいと考えられた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 0件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Suzuki Takamasa, Kawai Tsutae, Takemura Shunsuke, Nishiwaki Marie, Suzuki Toshiya, Nakamura Kenzo, Ishiguro Sumie, Higashiyama Tetsuya	4. 巻 31
2. 論文標題 Development of the Mitsucal computer system to identify causal mutation with a high-throughput sequencer	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Plant Reproduction	6. 最初と最後の頁 117 ~ 128
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s00497-018-0331-8	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 鈴木孝征
2. 発表標題 AT-AC 型イントロンの進化的な保存性に関する研究
3. 学会等名 第61回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 鈴木 孝征, 上野 友熙, 木全 祐資, 田中 彬貴, 緋田 響, 加藤 徹, 杉田 由季, 河合 都妙, 東山 哲也, 中村 研三
2. 発表標題 シロイヌナズナ DROL1遺伝子に依存するスプライシングの解析
3. 学会等名 第60回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Takamasa Suzuki, Yuki Ueno, Yusuke Kimata, Hideki Tanaka, Hibiki Akeda, Toru Kato, Yuki Sugita, Tsutae Kawai, Tetsuya Higashiyama, Kenzo Nakamura
2. 発表標題 Analysis of Arabidopsis DROL1 gene dependent splicing
3. 学会等名 Post-transcriptional Gene Regulation in Plants 2019 (国際学会)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 鈴木 孝征、河合 都妙、上田 実、関 原明、東山 哲也、中村 研三
2. 発表標題 シロイヌナズナ による特異的なスプライシングが発芽後の種子油脂貯蔵プログラムの抑制に必要である
3. 学会等名 第59回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
--	---------------------------	-----------------------	----