

平成21年 4月30日現在

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2007～2008

課題番号：19570035

研究課題名（和文） 植物オルターナティブプロモーターの網羅的検索

研究課題名（英文） Comprehensive search for plant alternative promoters

研究代表者

山本 義治 (Yoshiharu Yamamoto)

名古屋大学・遺伝子実験施設・研究員

研究者番号：50301784

研究成果の概要：代表者が開発した高速シーケンサーを用いた転写開始点の大量同定法をシロイヌナズナに適用し、16万もの転写開始点タグを同定した。この解析結果を統計解析することで、植物コアプロモーターの多様性を初めて解明できた。16万の転写開始点タグは24,453の転写開始点クラスター、すなわちプロモーターとして認識されその過半数はこれまで知られていなかったものである。そのうち、10,285のプロモーターが9,627の遺伝子(CDS)に関連づけられ、差分の658がプロモーターを複数持つ遺伝子として同定することができた。この結果は代表者らが作成した植物プロモーターデータベース ppdb により検索可能である。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,800,000	540,000	2,340,000
2008年度	1,700,000	510,000	2,210,000
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学 植物分子生物・生理学

キーワード：環境応答

1. 研究開始当初の背景

研究開始当初ゲノムに含まれるプロモーターのマッピングとしてはシロイヌナズナが最も進んでいたが、それでも、正確な転写開始点の位置を同定する、という研究は行われていなかった。当時可能であったのは、完全長 cDNA の 5' 末端部位を同定し、それが遺伝子あたり複数ある場合はランダムに、もしくは中央にくる点をとる、というものであった。問題点としては、1) 完全長 cDNA の数が少ないこと (9万クローン程度)、

2)、複数の cDNA ライブラリから少数ずつのクローンがマッピングされまたライブラリにはサブトラクションが行われてしまっているようなものが用いられているために転写開始点ごとの頻度解析を行える状況には無かったこと、3) 完全長 cDNA クローンの中にも完全長でないものが相当数 (1/3程度) 混入していること、が挙げられる。

以上のような状況であったために、同一遺伝子の上流に複数の転写開始点が観察されたとしてもそれらがオルターナティブプロ

モーターかどうかははっきりしない。すなわち、両者が共にも真の転写開始点であるかどうか判らないし、また、両者が共にオルターナティブプロモーター由来のものではなく単一プロモーターから生じている可能性もある。

2. 研究の目的

本研究の目的としては、単一の cDNA ライブラリから転写開始点タグ調製することで転写開始点ごとの発現解析を行えるような系をセットアップすること、タグクロンの配列を吟味し確実に転写開始点タグのみを含むようなタグコレクションを確立すること、転写開始点タグを大量収集することで一つの遺伝子あたり数十のタグを同定し、転写開始点クラスターの分布をはっきりさせ、複数の転写開始点クラスターを持つ遺伝子群をオルターナティブプロモーターとして浮き彫りにすること、が挙げられる。

もし時間的に可能であるなら、上記のストラテジーにより同定されたオルターナティブプロモーターの発現特性を解析し、また、生じる転写産物の多様性がどのような生物学的な効果を生むのかを部分的にでも、望ましくはゲノムワイドに解明する。

3. 研究の方法

Cap-Trapper 法と Massively Parallel Sequence Signature (MPSS) 法を組み合わせた CT-MPSS 法を既に確立しており、この方法をシロイヌナズナに適用し転写開始点タグをこれまでに無い規模で大量同定する。タグ情報を整理し、転写開始点クラスターに仕分けし、遺伝子にアサインしていく。一つの遺伝子に複数の転写開始点クラスターが認められた場合にはオルターナティブプロモーターとして同定する。

オルターナティブプロモーターとして同定されたものについては、発現解析や転写産物の形状などを個別に解析していく。

さらに、光応答など外部環境変化に応答するオルターナティブプロモーターをゲノムワイドに同定するために、いくつかの環境変化に曝された植物体より RNA を調製し、CT-MPSS 解析を行う。

4. 研究成果

CT-MPSS 法による大量転写開始点の決定

すでに確立した CT-MPSS 法を用いて白いナズナの葉、根、もやし、莖、花芽、花から調製した RNA から転写開始点タグライブラリを作成した。各組織より調製した RNA を混合しひとつのバッチの RNA 標品を作成した。これを材料として CT-MPSS 法により超並列シーケンシングを行い、37 万クロンの配列を

決定した。得られた配列をゲノム配列上にマッピングし、正しくマッピングされたもののうち “Cap Signature” を持つクロン (約 16 万) のみをさらに選び出し、以後の解析に用いることにした。これによりこれまでで最大規模でありかつ最もノイズの少ない転写開始点情報を確立することが出来た。

シロイヌナズナプロモーターの同定とオルターナティブプロモーターの特定

16 万の転写開始点タグをクラスターごとにまとめ 24,453 のクラスター (=プロモーター) を同定した。そのうち遺伝子性のプロモーターは 10,285 であったが (残りはアンチセンス鎖や遺伝子間領域に存在するものなどである)、対応する遺伝子数は 9,627 であり、差分の 658 がオルターナティブプロモーターであろう、ということが判明した。以上の成果は現在投稿中である (Yamamoto et al, “Heterogeneity of Arabidopsis core promoters revealed by high-density TSS analysis”, provisionally accepted by Plant J)。

データベースによる表示

上記の成果は山本らが運営している植物プロモーターデータベース ppdb (<http://ppdb.gene.nagoya-u.ac.jp>) にて公開している。

生理解析など

環境に応答して同一遺伝子のプロモーターが切り替わる、という現象についての解析を行うことを予定しており、サンプル調製などは済ませていた。研究実施期間中にいわゆる次世代型超高速シーケンサーが台頭し、当研究にとってもそれを利用するメリットが非常に大きいことが期待されたため次世代型シーケンサーを利用して解析を進めるべく実験計画を変更した。しかしながら、次世代型シーケンサーを取り巻くめまぐるしい状況の変化になかなか対応しきれず、結果的に環境応答によるプロモーターの選択というテーマについてはまとまった成果を出すには至っていない。この解析は当基盤研究終了後も続行する予定である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文] (計 5 件)

1. Brodersen P, Sakvarelidze-Achard L, Bruun-Rasmussen M, Dunoyer P, Yamamoto YY, Sieburth L, Voinnet O. Widespread translational inhibition by plant miRNAs and siRNAs. *Science*

320, 1185-1190 (2008) 査読有

2. Kazama Y, Saito H, Yamamoto YY, Hayashi Y, Ichida H, Ryuto H, Fukunishi N, Abe T. LET-dependent effects of heavy-ion beam irradiation in *Arabidopsis thaliana*. Plant Biotech 25, 113-117 (2008) 査読有

3. Yamamoto YY, Obokata J. ppdb, a plant promoter database. Nucleic Acids Res 36, D977-D981. (2008) 査読有

4. Yamamoto YY, Ichida H, Abe T, Suzuki Y, Sugano S, Obokata J. Differentiation of core promoter architecture between plants and mammals revealed by LDSS analysis. Nucleic Acids Res 35, 6219-6226 (2007) 査読有

5. Yamamoto YY, Ichida H, Matsui M, Obokata J, Sakurai T, Satou M, Seki M, Shinozaki K, Abe T. Identification of plant promoter constituents by analysis of local distribution of short sequences. BMC Genomics 8:67 (2007) 査読有

[学会発表] (計 17 件)

1. 山本義治, 小保方潤一 「コアプロモーターのタイプと遺伝子構造との相関関係」第 50 回日本植物生理学会年会 名古屋 (2009 年 3 月 21 日)

2. 山本義治 「植物プロモーターの構造」第四回「光計測技術と生物発光リアルタイム測定システムの応用」名古屋 (2009 年 3 月 6 日)

3. 山本義治, 佐藤直樹, 西山智明, 長谷部光泰, ダニエル・ラング, ステファン・レンシング, 小保方潤一 「ppdb 2.0: 植物プロモーターデータベース」日本分子生物学会第 31 回大会 神戸 (2008 年 12 月 9-12 日)

4. 工藤久幸, 山本義治, 中邨真之, 大谷将人, 長谷川桂子, 小保方潤一 「コード領域の上流近傍における転写開始位置の決定機構」日本分子生物学会第 31 回大会 神戸 (2008 年 12 月 9-12 日)

5. 山本義治, 小保方潤一 「高等植物におけるコアプロモーターと遺伝子機能・構造の関係」日本遺伝学会第 80 回大会 名古屋 (2008 年 9 月 3-5 日)

6. 工藤久幸, 山本義治, 中邨真之, 大谷将人, 長谷川桂子, 小保方潤一 「プロモーター下流の転写領域による転写開始位置制御機構」日本遺伝学会第 80 回大会 名古屋

(2008 年 9 月 3-5 日)

7. 風間裕介, 斉藤宏之, 山本義治, 林依子, 阿部知子 「シロイヌナズナへの重イオンビーム変異誘発における LET 効果と DNA 変異」日本育種学会第 113 回講演会 川崎 (2008 年 3 月 28-29 日)

8. Yamamoto YY, Obokata J. Promoter Prediction from Genome Sequence, The 55th NIBBConference, "Frontier of Plant Science in the 21st Century", Okazaki (2008 年 9 月 13-15 日)

9. 山本義治, 種村尚典, 遊佐陽一, 平野弥生, 平野義明, 本村泰三, 小保方潤一 『『盗葉緑体』によって光合成を行う囊舌目ウミウシの探索』光合成研究会 名古屋 (2008 年 5 月 30-31 日)

10. 山本義治, 吉次友昭, 櫻井哲也, 関原明, 篠崎一雄, 小保方潤一. 「高密度転写開始点解析から明らかになったシロイヌナズナのコアプロモーター構造の多様性」第 49 回日本植物生理学会年会 札幌 (2008 年 3 月 20-22 日)

11. 工藤久幸, 山本義治, 中邨真之, 大谷将人, 長谷川桂子, 小保方潤一 「光合成核遺伝子群にみられる TATA-less 型プロモーターの転写開始位置決定機構」第 49 回日本植物生理学会年会 札幌 (2008 年 3 月 20-22 日)

12. 山本義治, 小保方潤一 「ppdb: 植物プロモーターデータベース」第 49 回日本植物生理学会年会 札幌 (2008 年 3 月 20-22 日)

13. 山本義治. 「シロイヌナズナコアプロモーター因子間の相関関係」シロイヌナズナワークショップ 2007 横浜 (2007 年 12 月 10 日)

14. 山本義治, 吉次友昭, 櫻井哲也, 関原明, 篠崎一雄, 小保方潤一. 「高密度転写開始点解析から明らかになったシロイヌナズナのコアプロモーター構造の多様性」, 日本遺伝学会第 79 回大会 岡山 (2007 年 9 月 19-21 日)

15. Kazama Y, Saito H, Hayashi Y, Ichida H, Ohbu S, Ryuto H, Fukunishi N, Abe T, Yamamoto YY. Effects of ion beam irradiation on mutation induction in *Arabidopsis thaliana*. CYCLOTRONS 2007, Giardini Naxos, Italy (2007 年 10 月 1-5 日)

16. Yamamoto YY, Obokata J. ppdb: a plant

promoter database for rice and *Arabidopsis*, 5th International Symposium on Rice Functional Genomics (ISRF2007), Tsukuba, (2007年10月15-17日)

17. Yamamoto YY. Identification and characterization of promoters scattered in the *Arabidopsis* genome. 10th International Colloquium on Endocytobiology and Symbiosis, Gmunden, Austria (2007年9月10-13日)

[図書] (計6件)

1. Yamamoto YY, Obokata J. Extraction of position-sensitive promoter constituents. In "Computational biology: new research", Russe AS (ed), Hauppauge, NY, Nova Science Publishers. (2009) 印刷中

2. 山本義治、小保方潤一 「植物・藻類・細菌の材料の入手と栽培・培養：タバコ」 低温科学 vol 67 「光合成研究法」 39-43, (2008)

3. 長尾一生、山本義治、小保方潤一 「タバコ形質転換法：核ゲノム」 低温科学 vol 67 「光合成研究法」 617-622 (2008)

4. 山本義治、種村尚典、遊佐陽一、平野弥生、平野義明、本村泰三、小保方潤一 「光合成をするウミウシ」 うみうし通信 (財団法人 水産無脊椎動物研究所) 60: 10-11 (2008)

5. 山本義治 「盗葉緑体により光合成する囊舌目ウミウシ」 光合成研究 18, 42-45 (2008)

6. Kazama Y, Saito H, Hayashi Y, Ichida H, Ohbu, S., Ryuto, H., Fukunishi N, Abe T, Yamamoto YY. Effects of ion beam irradiation on mutation induction in *Arabidopsis thaliana*. In: CYCLOTRONS 2007 pp. 240-242, (2007)

[その他]

ホームページ等

研究成果データベース

ppdb: plant promoter database

<http://ppdb.gene.nagoya-u.ac.jp>

作成者：山本義治、小保方潤一

6. 研究組織

(1) 研究代表者

山本 義治 (Yoshiharu Y. Yamamoto)

名古屋大学・遺伝子実験施設・研究員

研究者番号：50301784

(2) 研究分担者

小保方 潤一 (Junichi Obokata)

京都府立大学 大学院生命環境科学研究科・教授

研究者番号：50185667