

平成21年 5月12日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2007～2008

課題番号：19770043

研究課題名（和文）シロイヌナズナ胚乳特異的 small RNA の同定と解析

研究課題名（英文）Identification and characterization of small RNA specifically acting in Arabidopsis endosperm

研究代表者

立松 圭（TATEMATSU KIYOSHI）

基礎生物学研究所・植物器官形成学研究室・助教

研究者番号：00373324

研究成果の概要：

シロイヌナズナ種子吸水時に胚乳で遺伝子発現制御に関与する小分子 RNA の同定を行った。胚乳で特異的に発現する小分子 RNA を次世代シーケンス技術により塩基配列決定を行った。その結果、胚乳特異的に発現する AP2 転写因子群を認識する既知の miR172 や、アブシジン酸の生合成酵素 AtABA2 や細胞壁成分の加水分解に関わるエクспанシン遺伝子をターゲットとする新奇小分子 RNA 候補が得られた。こうした遺伝子群が胚乳で機能することで種子発芽が制御されていると予想された。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,400,000	0	1,400,000
2008年度	1,400,000	420,000	1,820,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,800,000	420,000	3,220,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学、植物生理・分子

キーワード：種子発芽、小分子 RNA、胚乳特異的、次世代シーケンス技術、AP2 転写因子、miR172、AtABA2、エクспанシン遺伝子

1. 研究開始当初の背景

双子葉植物の種子は、吸水により胚の生長ポテンシャルが上昇して根の伸長が起これ、それを物理的に押さえ込む種皮や胚乳が打ち破られることで発芽する。我々は、これまでに、種子吸水による AtTCP14 転写因子を介したタンパク質合成と細胞分裂の促進が幼根の伸長を引き起こすことを明らかにした

（Tatematsu et al., 2008）。この AtTCP14 に依存した根の伸長促進は、胚の生長ポテンシャルの上昇によって引き起こされると考えられる。双子葉植物の胚乳は胚を取り囲む単一種の生きた細胞から形成される細胞層で、種子発芽時にそれが軟化することが必要であり、トマトではアブシジン酸 (ABA) やジベレリン (GA) がその軟化に関与することが

知られている。近年シロイヌナズナでも、種子吸水時に GA 生合成酵素や ABA 代謝酵素をコードする遺伝子が胚軸の維管束のみでなく胚乳でも発現してその量を調節していること、また ABA 依存的な種子休眠関連遺伝子である *ABI3* や *ABI5* の発現が胚乳で起きていることが報告された (Yamauchi et al., 2004; Okamoto et al., 2006; Penfield et al., 2006)。さらに、胚乳で発現している種子発芽に関連した遺伝子が単離されている (Liu et al., 2005)。このようにいくつかの制御因子が得られているが、依然として胚乳の軟化メカニズムには不明な点が多く、新奇因子の単離が必要であった。

2. 研究の目的

シロイヌナズナ胚乳で約 10,000 個の遺伝子が発現していることが報告されていた (Penfield et al., 2006)。細胞内では内在性シグナル物質によって生長制御因子の作用点が時間的・空間的に調節されている。それら因子のタンパク質量は転写調節による遺伝子発現のみで規定されているわけではなく、mRNA の安定性の変化や mRNA からタンパク質への翻訳抑制—転写後調節—によっても決定づけられており、その“転写調節”と“転写後調節”の両者を考慮する必要がある。遺伝子発現の転写後調節に 21 から 24 塩基の長さからなる micro RNA (miRNA) や small-interfering RNA (siRNA) などの機能性小分子 RNA (small RNA) が植物でも関与していることが近年明らかになってきた。種子発芽時でも既知の miRNA が発現していることがすでに報告されている (Martin et al., 2005)。また我々はこれまでの種子吸水の遺伝子発現プロファイル解析から、small RNAs の生合成に関わる *Dicer-like* (*DCL*) 遺伝子族が種子吸水によって活性化することを見いだした (Preston ら、未発表)。こうした結果は種子でも small RNAs が機能していることを示唆している。また、吸水後の種子を“胚”と“胚乳 (及び種皮)”に分割し、その両者から 20 から 30 塩基の長さの RNA を含む画分を得ている。この RNA を電気泳動すると既報の small RNA の大きさとほぼ一致するバンドが見られることから、この中に種子休眠や発芽に関わる small RNAs が含まれていると予想される。Small RNAs を同定すればその制御のターゲット遺伝子も明らかにすることができ、新奇因子の効率的な単離に繋がっていく。そこで本研究では、シロイヌナズナ種子発芽時の胚乳の軟化メカニズムを明らかにするために、種子吸水時に胚乳で特異的に発現している small RNAs を同定するのが目的である。

3. 研究の方法

(1) 種子発芽時のシロイヌナズナ *DCL*、*AGO* 遺伝子群の機能解析

我々がこれまでに行ってきた、シロイヌナズナマイクロアレイを用いた遺伝子発現プロファイリング解析から、small RNA の生合成・機能に関与する *DCL* や *ARGONAUTE* (*AGO*) 遺伝子群の発現が種子吸水で誘導されることを見出していた。そこで、それら遺伝子群の中から、種子休眠・発芽時に深く関わるものを同定するために以下の研究を行う。

① *DCL*、*AGO* 遺伝子群の発現解析

種子吸水後のこれら遺伝子群の発現様式を調べるために、定量的、及び、半定量的 RT-PCR を用いた遺伝子発現解析を行う。水を含ませたる紙上に種を蒔いて吸水させたあと、経時的に種子を回収し、total RNA の抽出・逆転写反応を行う。また、乾燥種子を吸水 0 時間目のサンプルとして用いる。

② T-DNA 挿入株を用いた遺伝学的解析

これら遺伝子の機能を遺伝学的に解析するためにストックセンターから T-DNA 挿入変異株を取り寄せる。得られた欠損変異株について、i) 種子休眠性と種子吸水時の外来の ABA の効果、ii) 種子吸水前後での内生 ABA 量の定量、を行う。前者は、寒地培地に種を蒔き、発芽率を経時的に観察する。後者は、水を含ませたる紙上に種を蒔き、吸水後、回収した種子から ABA を抽出、LC-MS/MS を使って定量を行う。

(2) シロイヌナズナ胚乳特異的な small RNA の同定

シロイヌナズナの胚乳は単一種の細胞から形成されているが、種子全体に対して占める割合が小さいために、種子全体から RNA を抽出すると胚乳特異的に発現している遺伝子の発現量が相対的に小さくなるという問題点があった。この点が遺伝子発現プロファイル解析を行う際に、特定の組織に限定された新奇因子の単離を困難なものにしていた。この問題点を回避するために、我々は種子を“胚”と“胚乳”に分割した後に RNA 抽出を行った。この方法ならば、種子全体から RNA を抽出する場合と異なり、胚乳特異的に発現している RNA が得られるために、新奇因子を単離することができる。既に得られている胚乳から抽出した 20 から 30 塩基の長さの RNA (small RNA candidates) をクローニングし、454Life Science 社の次世代シーケンス技術により塩基配列情報を獲得する。次に、得られた塩基配列情報を基にデータベースを利用して mRNA や rRNA 等の分解産物を排除し、small RNAs の候補を絞り込む。絞り込まれた候補の塩基配列から、既に公開されてい

る複数の small RNAs のデータベースを利用して、既知の small RNA と新奇な物を選別する。新奇 small RNA の候補となった配列については、ゲノム DNA 上へのマッピングを行い、その前駆体となる RNA の構造予想などからさらに絞り込みをしていく。また、このようにして新奇 small RNA として同定された配列について、データベースを利用してその制御のターゲット遺伝子の同定も行う。

4. 研究成果

(1) シロイヌナズナ種子発芽に関わる *DCL*、*AGO* 遺伝子群

① *DCL*、*AGO* 遺伝子群の発現様式

定量的 RT-PCR 法を用いて、種子吸水後の *DCL* 遺伝子族の発現を経時的に調べた。その結果、4 つある *DCL* 遺伝子族のうち、種子では *DCL1* と *DCL2* の発現量が残り 2 つに比べ非常に高く、吸水後 3 時間目からその発現は誘導される。特に *DCL1* は吸水後 6 時間目に、*DCL2* は 1 2 時間目に誘導のピークを迎える。その後は両遺伝子共に発現量が減少し、その誘導性が一過的なものであることが明らかになった。

他方、*AGO* 遺伝子群については半定量的 RT-PCR 法を用いた解析を行った。10 個からなる *AGO* 遺伝子族の中で、*AGO1*、*AGO2*、*AGO4* および *AGO10* の発現量が他のものよりも高かった。これら 4 つの遺伝子については *DCL1* と同様に、吸水による一過的な発現上昇を示す。残りの 6 つは発現量が弱いながらも、*AGO3* 以外が同様に一過的な発現上昇を示した。一方 *AGO3* は唯一、吸水による一過的な発現低下を示すものである。

② 遺伝子破壊株の遺伝学的解析

DCL、*AGO* 遺伝子それぞれに T-DNA が挿入された欠損突然変異体群を用いて、はじめに、種子休眠性を調べた。収穫直後の種子を用いて発芽率を調べたところ、*dc11*、*dc12* および *ago7* 変異体でその休眠が浅くなっていた。次に、ABA を含む培地での種子発芽を調べた結果、この 3 つの変異体は弱い ABA 耐性を示す。また、これら変異体の ABA 内生量を調べると、種子吸水後の内生量が野生型よりも若干少なくなっていた。そこで、ABA 生合成 (*AtNCED*)・代謝 (*CYP707A*) に関わる遺伝子群の発現を調べたところ、*AtNCED9*、*CYP707A2* の発現量が野生型と比べ変化していた。

以上、①及び②の結果から、*DCL1*、*DCL2*、*AGO4*、*AGO7* および *AGO10* が種子発芽に深く関与している可能性が考えられたが、それ以外の遺伝子群も冗長的に機能していることが予想され、多重変異体を用いた遺伝学解析をさらに行う必要があると考えられる。

(2) シロイヌナズナ胚乳特異的な新奇 small RNAs

シロイヌナズナ乾燥種子および吸水種子、また、種子吸水後の胚と胚乳それぞれから 20~30 塩基の小分子 RNA を抽出し、次世代シーケンス技術を用いて網羅的解析を行った。その結果、30~40 万クローンの塩基配列が得られ、バイオインフォマティクス解析から約 800 個の miRNA 候補配列が得られた。

得られた結果から、既知の miRNA 配列を検索したところ、miR160、miR165、miR166、miR167 及び miR390 が吸水後の種子全体、あるいは、胚から見つかった。これらのターゲット遺伝子は茎頂分裂組織や根端分裂組織で機能する発生・分化に関わるものであり、種子発芽以前の段階から葉の発生・分化、根の伸長生長の制御機構が作用していることが示唆された。また、AP2 転写因子群を認識する miR172 が胚乳サンプルからのみ得られ、その AP2 遺伝子族もまた胚乳で強く発現している事がマイクロレイ解析で示されており、これら遺伝子が胚乳軟弱化に関与している可能性が予想された。

次に、新奇 miRNA 候補について、その予想されるターゲット遺伝子を含めて検索を行った。その結果、胚乳由来のサンプルから、ABA 生合成に関与する *AtABA2* をターゲットとする新奇 miRNA 候補が得られた。また、種子発芽時に胚乳の軟弱化時に細胞壁成分の加水分解に関わるエクспанシン (*EXP*) 遺伝子をターゲットとする新奇 miRNA 候補も胚乳由来のサンプルから見つかった。ゲノムアレイを用いた解析から *AtABA2* や *EXP* 遺伝子は胚乳でも発現が確認されている。以上のことから、胚乳軟弱化のメカニズムにこれら新奇 miRNA が関与し、*AtABA2* や *EXP* 遺伝子の発現を空間的・時間的に精密に制御している可能性が示唆された。

他方で、新奇 miRNA 探索のために、候補配列のゲノム上にマップされた位置を調べた。その結果、10 コピー以上得られた配列のほとんどは、(1) セントロメア付近にあるリピート配列、(2) t-RNA に由来するものであった。また、4 コピー以上得られたものには既にアノテーションされている遺伝子のコード領域にマップされるものもあった。こうした配列は mRNA の分解産物である可能性も考えられる。さらに新奇 miRNA 候補配列は、既知ものに比べて、シーケンスによって配列決定されたクローン数が少なく、その大半が 1 コピーしか得られてない。以上の結果から、本研究で行った 20~30 塩基の RNA をクローニングして行った発現プロファイリングではこのような不要な配列を多く含んでし

まう事が推測され、限定された領域で機能する新奇 miRNA を同定するためには新たなアプローチ方法が必要であると考えられた。

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 6 件)

1. Yamagishi, K. *, Tatematsu, K. *, Yano, R., Preston, J., Kitamura, S., Takahashi, H., McCourt, P., Kamiya, Y., and Nambara, E. (2009) CHOTTO1, a double AP2 domain protein of *Arabidopsis thaliana*, regulates germination and seedling growth under excess supply of glucose and nitrate. *Plant Cell Physiol.* 50, 330-340. (*: Equally contributed) (査読有り)
2. Matakias, T., Alboresi, A., Jikumaru, Y., Tatematsu, K., Pichon, O., Renou, J.-P., Kamiya, Y., Nambara, E., and Truong, H.-N. (2009) The Arabidopsis abscisic acid catabolic gene *CYP707A2* plays a key role in nitrate control of seed dormancy. *Plant Physiol.* 149, 949-960. (査読有り)
3. Sawada, Y., Aoki, M., Nakaminami, K., Mitsuhashi, W., Tatematsu, K., Kushiro, T., Koshiba, T., Kamiya, Y., Inoue, Y., Nambara, E., and Toyomasu, T. (2008) Phytochrome- and gibberellin-mediated regulation of abscisic acid metabolism during germination of photoblastic lettuce seeds. *Plant Physiol.* 146, 1386-1396. (査読有り)
4. Tatematsu, K., Kamiya, Y., and Nambara, E. (2008) Co-regulation of ribosomal protein genes as an indicator of growth status: Comparative transcriptome analysis on axillary shoots and seeds in *Arabidopsis*. *Plant Signal. Behav.* 3, 450-452. (査読なし)
5. Tatematsu, K., Nakabayashi, K., Kamiya, Y., and Nambara, E. (2008) Transcription factor AtTCP14 regulates embryonic growth potential during seed germination in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 53, 42-52. (査読有り)
6. 立松圭、南原英司 発芽過程のホルモン調

節-胚の生長ポテンシャルと胚乳の軟弱化の調節- 植物の生長調節 (2007) Vol. 42 No. 2, 139-145. (査読なし)

[学会発表] (計 6 件)

1. Tatematsu, K., Matsui, A., Morosawa, T., Kaminuma, E., Okamoto, M., Toyoda, T., Shinozaki, K., Kamiya, Y., Seki, M., and Nambara, E.: Small RNA expression profiling during seed germination in *Arabidopsis thaliana*. The 55th NIBB Conference Arabidopsis Workshop 2008, Okazaki, 13th - 15th September, 2008
2. Kimura, M., Preston, J., Tatematsu, K., Kanno, Y., Toh, S., Kawakami, N., Kamiya, Y., and Nambara, E.: Comparative studies on non-dormant Col and dormant Cvi seeds: Common and polymorphic regulations on molecular mechanism of seed imbibition in Arabidopsis. 19th Intl. Conf. Arabidopsis Res., Montreal, 23rd - 27th July, 2008
3. Nambara, E., Tatematsu, K., and Kamiya, Y.: Functional genomics on seed germination in Arabidopsis. 6th Canadian Plant Genomics Workshop, Toronto, 23rd - 26th June, 2008
4. 立松圭、Jeremy Preston、菅野裕理、藤茂雄、川上直人、神谷勇治、南原英司: シロイヌナズナ種子吸水時の遺伝子発現解析. 第49回日本植物生理学会年会、札幌、2008年3月20日-22日
5. Sawada, Y., Aoki, M., Nakaminami, K., Mitsuhashi, W., Tatematsu, K., Jikumaru, Y., Kushiro, T., Kamiya, Y., Inoue, Y., Nambara, E., and Toyomasu, T.: Regulation of endogenous levels of abscisic acid in photoblastic lettuce seeds. 19th Intl. Conf. Plant Growth Substances Association Meeting, Puerto Vallarta, 21st - 25th July, 2007
6. Preston, J., Tatematsu, K., Kamiya, Y., and Nambara, E.: Studies on early events in response to seed imbibition in Arabidopsis. 2nd ISSS Workshop on Molecular Aspects of Seed Dormancy and Germination, Salamanca, 1st - 4th July, 2007

〔図書〕（計 1 件）

1. 南原英司、立松圭、内藤哲 第15章 発芽関連遺伝子の解析 発芽生物学 種子発芽の生理・生体・分子機構, 種生物学会編, 文一総合出版 (2009) pp.375-385.

6. 研究組織

(1) 研究代表者

立松 圭 (TATEMATSU KIYOSHI)
基礎生物学研究所・植物器官形成学研究室・助教
研究者番号：00373324

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし