

平成 21 年 5 月 29 日現在

研究種目：若手研究（スタートアップ）

研究期間：2007～2008

課題番号：19870032

研究課題名（和文）植物におけるスモール RNA を介したストレス応答遺伝子の制御機構の探索

研究課題名（英文）Search for small RNA-mediated regulation mechanism of gene expression under stress conditions.

研究代表者

栗原 志夫（KURIHARA YUKIO）

独立行政法人理化学研究所・植物ゲノム発現研究チーム・特別研究員

研究者番号：60455342

研究成果の概要：植物において、casiRNA はゲノム DNA のメチル化を誘導し、遺伝子の発現を抑制する。この機構を RdDM と呼ぶ。未処理および乾燥ストレス下において RdDM による制御を受ける遺伝子を同定するために、野生型植物、casiRNA 生合成の必須因子の変異体および DNA メチル化酵素の変異体において、タイリングアレイ解析を行った。その結果、いくつかの遺伝子が RdDM によって直接制御されている候補として同定できた。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	1,370,000	0	1,370,000
2008 年度	1,350,000	405,000	1,755,000
年度			
年度			
年度			
総計			

研究分野：植物分子生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学・植物生理・分子

キーワード：シロイヌマズナ、トランスクリプトーム、タイリングアレイ、スモール RNA、DNA メチル化、遺伝子発現制御

1. 研究開始当初の背景

植物は移動の自由がないため、環境変化に対して適応するさまざまな能力を有している。現在までに、乾燥、高塩や低温などの環境ストレス応答に關与する機能性タンパク質や制御タンパク質が同定され、それらの機能が明らかになってきた。一方、タンパク質をコードしていない機能性 RNA である 21-24 nt ほどの small RNA (sRNA) が、植

物のストレス耐性において重要な役割を果たしていることがわかってきた。現在、sRNA の役割の解明が待たれている。

近年、24 nt 長ほどの sRNA (chromatin-associated siRNA: casiRNA) が、エピジェネティックなゲノム制御機構であるゲノム DNA のメチル化を誘導する現象が明らかとなった。この機構を RNA-directed DNA methylation (RdDM) と呼ぶ。

casiRNA は主にゲノム上のリピート配列やトランスポゾン由来の配列から発生している。RdDM 機構は、それらの casiRNA が発生する配列を不活性化することでゲノムを安定化・保護していると考えられる。また、多くの casiRNA と相補する配列が、遺伝子のプロモーター、遺伝子内部などにも存在する。つまり casiRNA は、該当遺伝子の転写の抑制制御にも関与していると考えられる。

高速シーケンス技術を用いて、多くの sRNA が同定され、その約 7 割が casiRNA であることがわかってきた。したがって、casiRNA や RdDM 機構は植物にとって非常に重要であると考えられている。

しかしながら、casiRNA が誘導する DNA メチル化機構である RdDM の遺伝子制御機構は、ほんの一部が解明されたに過ぎない。また、RdDM によって制御されている遺伝子群のゲノムワイドの同定もなされていない。そのため、大多数の casiRNA がストレス応答時に果たす役割は、これからの解明が待たれているところである。

2. 研究の目的

本研究では、DNA メチル化を誘導する 24 nt 長の casiRNA に注目し、RdDM の標的となる遺伝子群のゲノムワイドな同定を目指す。さらに植物の環境ストレス応答に関与する casiRNA とそれらによって制御を受ける遺伝子を同定し、その役割やメカニズムの解明を目的とする。

3. 研究の方法

本研究では、シロイヌナズナを用いる。シロイヌナズナにおいて、casiRNA の生合成に必須の因子として、前駆体である二本鎖 RNA を合成する RNA-dependent RNA polymerase 2 (RDR2) が知られている。また、

casiRNA によって誘導され、ゲノム DNA にメチル基を付加する酵素として、Domains rearranged methylase 2 (DRM2) が報告されている。さらに、間接的に働くメチル化酵素として、Chromomethylase 3 (CMT3) がある。*rdr2* 変異体では、casiRNA の蓄積が消失することがわかっている。また、*drm1drm2cmt3 (ddc)* 変異体では、ゲノム DNA のメチル化程度が減少することが報告されている。

本研究では、casiRNA によって制御される遺伝子群を同定するために、通常育成時と乾燥ストレス下において、*rdr2* 変異体と *ddc* 変異体における全ゲノムトランスクリプトームを調べた。方法として、Affymetrix 社製のタイリングアレイ解析を用いた (図 1)。



b) 遺伝子とプローブの模式図

赤線部は遺伝子がないゲノム領域をしめす。各プローブは、下部に等間隔で描いた。

図 1 タイリングアレイ

図 1 に示すように、タイリングアレイを用いることで、遺伝子が存在しないと考えられているゲノム領域 (赤線部) を含む全ゲノムの発現領域を網羅的に検出することができる。さらに、ゲノムのプラス鎖とマイナス鎖の両方に対するプローブが載っているため、転写の向きを知ることができる。

本研究では、MS 塩を含むプレート培地に播種後、15 日目の植物を用いた。乾燥ストレス処理は、培地から植物を抜いて、空のプレー

トに放置することで処理した。未処理時、乾燥 2 時間目に野生型植物、*rdr2* 変異体、*ddc* 変異体から、トータル RNA を抽出した。それらを用いてラベリング反応を行い、ラベルしたものをアレイチップにハイブリダイゼーションを行った。各条件につき 3 回のハイブリダイゼーションを行った。

タイリングアレイデータの解析には、独立行政法人理化学研究所、生命情報基盤研究部門の豊田哲郎らによって開発された ARTADE プログラムを用いた。ARTADE 法を用いることで、各プローブをつなぎあわせ、各遺伝子の発現を調べられる。さらに、遺伝子がない領域の転写物やその構造を予測することができる。

4. 研究成果

(1) 未処理植物を用いたタイリングアレイの結果、野生型植物と比較して、*rdr2* 変異体で 70 個、*ddc* 変異体で 226 個の既知転写物の蓄積が増加することがわかった (図 2、Fold 2.0, FDR=0.05)。それらのうち、50 個の既知転写物が両変異体で共通であった (図 2、右側のベン図)。さらに、蓄積が増加した転写物の中から、遺伝子の 500 塩基長上流から 500 塩基長下流の範囲に、23-24 nt の *cas*iRNA の発生部位が存在するものをスクリーニングした。その結果、*rdr2* 変異体で 26 個、*ddc* 変異体で 61 個の既知転写物が該当し、そのうち 18 個が両変異体で共通であることがわかった (図 2、左側のベン図)。

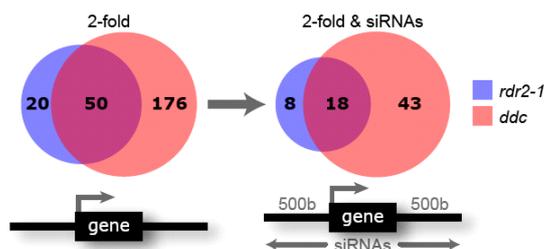


図 2 蓄積が増加した既知転写物のベン図
右側は、増加した転写物の両変異体間でのベン図.左側は *cas*iRNA 発生部位を遺伝子内またはその周辺にもつ転写物のベン図.

例えば、両変異体で蓄積が増加する遺伝子 At4g04293 は、遺伝子内部およびその周辺領域に多くの *cas*iRNA 発生部位をもつ (図 3)。

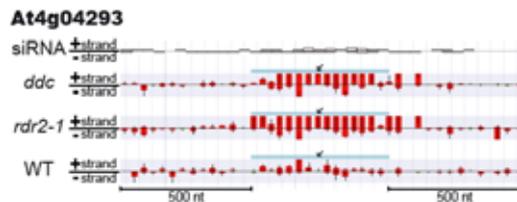


図 3 At4g04293 のタイリングアレイによる検出. 縦の赤いカラムが各プローブのシグナル強度を示す.横の水色のカラムは遺伝子の構造を示す. *si*RNA は、*cas*iRNA の発生箇所を示す.

このように、両変異体で蓄積が増加した 18 個の既知転写物を RdDM によって抑制されている遺伝子の候補として同定した。

(2) ARTADE 法による解析によって、既知遺伝子以外の新規転写単位を予測・同定することを試みた。その結果、野生型植物と比較して、*rdr2* 変異体で 30 個、*ddc* 変異体で 24 個の新規転写物の蓄積が増加することがわかった (図 4、Fold 2.0, FDR=0.05)。それらのうち、21 個の既知転写物が両変異体で共通であった (図 4、右側のベン図)。さらに、蓄積が増加した転写物の中から、遺伝子の 500 塩基長上流から 500 塩基長下流の範囲に、23-24 nt の *cas*iRNA の発生部位が存在するものをスクリーニングした。その結果、*rdr2* 変異体で 24 個、*ddc* 変異体で 22 個の既知転写物が該当し、そのうち 19 個が両変異体で共通であることがわかった (図 4、左側のベン図)。

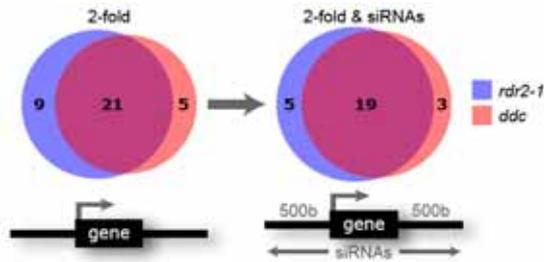


図4 蓄積が増加した新規転写物のベン図
右側は、増加した転写物の両変異体間でのベン図.左側は casRNA 発生部位を遺伝子内またはその周辺にもつ転写物のベン図.

例えば、新規転写単位 G1938 は、*rdr2* と *ddc* 両変異体において、その存在が予測され、明らかに蓄積が増加していた(図5、矢印)。さらに転写単位内部およびその周辺領域に多くの casRNA 発生部位をもつ(図5)。

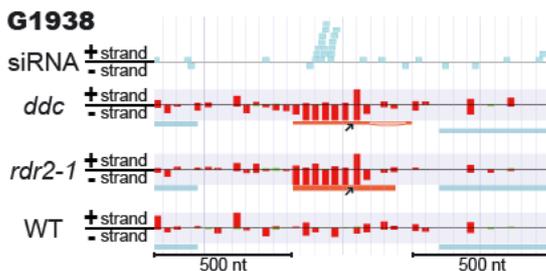


図5 予測・同定された新規転写単位 G1938 の検出. 縦の赤いカラムが各プロープのシグナル強度を示す.横の橙色のカラムは新規転写単位の予測構造を示す. siRNA は、casRNA の発生箇所を示す.

このように、両変異体で蓄積が増加した 19 個の新規転写物を RdDM によって抑制されている新規遺伝子の候補として同定した。

(3) 乾燥処理 2 時間目のタイリングアレイの結果、乾燥ストレス下において野生型植物では発現応答しないが、両変異体においては発現応答が認められる既知遺伝子および新規転写単位が数個みつかった。この発見は

casRNA によるゲノム DNA メチル化が遺伝子のストレス応答を隠していることを意味する。

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 1 件)

Yukio Kurihara et al. (11 人中 1 番目), Identification of the candidate genes by RNA-directed DNA methylation in *Arabidopsis*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 376, 553-557, 2008, 査読有.

〔学会発表〕(計 1 件)

栗原志夫、シロイヌナズナにおける全ゲノムタイリングアレイを用いたRdDM標的遺伝子の同定、日本RNA学会、2008年7月23日~25日、札幌。

6 . 研究組織

(1)研究代表者

栗原 志夫 (KURIHARA YUKIO)

独立行政法人理化学研究所・植物ゲノム発現研究チーム・特別研究員