

平成 23 年 6 月 3 日現在

機関番号：63904

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2008～2009

課題番号：20770038

研究課題名(和文) 高等植物の低分子 RNA と DNA メチル化による遺伝子発現の制御機構

研究課題名(英文) Gene expression regulated by small RNA and DNA methylation in higher plants

研究代表者

星野 敦 (HOSHINO ATSUSHI)

基礎生物学研究所・分子遺伝学研究部門・助教

研究者番号：80312205

研究成果の概要(和文)：

低分子 RNA と DNA のメチル化は生物の遺伝子発現を制御する基本的な要素である。本研究では、植物における低分子 RNA と DNA メチル化の動態と、遺伝子発現の制御機構を明らかにすることを目的に、これらの要素が働いて生じると思われるアサガオの模様を解析した。その結果、低分子 RNA の増幅が模様形成の鍵であることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：

Small RNA and DNA methylation are involved in fundamental systems to control gene expression. To reveal their dynamics and roles on gene regulation in higher plants, we studied the flower pigmentation patterns which are thought to be controlled by small RNA and DNA methylation in the Japanese morning glory. The results suggested that small RNA amplification is a key mechanism to produce the pigmentation patterns.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009 年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,300,000	990,000	4,290,000

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：高等植物、低分子 RNA、DNA メチル化、RNAi、花

1. 研究開始当初の背景

近年の基礎生物学において、低分子 RNA と DNA のメチル化は生物の基本的な遺伝子発現の制御機構に係わるとして注目されている。低分子 RNA は、RNA 干渉 (RNAi)

に代表されるように遺伝子の転写産物に作用して発現抑制に働く。DNA メチル化も、一般には遺伝子発現を転写レベルで抑制し、低分子 RNA との相互作用も知られている。このような低分子 RNA や DNA メチル化についての研究は急速に発展しているが、遺伝

子への作用機構の詳細については未解明な点が多く、動物と植物で異なる点があるなど多様性が知られている。

2. 研究の目的

本研究は、植物における低分子 RNA と DNA メチル化の動態と、遺伝子発現の制御機構を明らかにすることを最終的な目標として、低分子 RNA と DNA メチル化の関与が示唆されている「吹雪」と「車紋」と呼ばれるアサガオの模様形成機構を分子レベルで明らかにする。

3. 研究の方法

アサガオの「吹雪」と「車紋」は優性の突然変異である(図1)。従来の研究から、突然変異した原因遺伝子は花色素(アントシアニン)の生合成に係わるジヒドロフラボノール4還元酵素(DFR)をコードする *DFR-B* 遺伝子であり、2本鎖 RNA を発現する構造に変化した一対の不完全な *DFR-B* 遺伝子と完全な構造の *DFR-B* 遺伝子から構成されることを明らかにしている。また、花の非着色細胞では *DFR-B* 遺伝子の mRNA の蓄積量低下と siRNA と思われる低分子 RNA の蓄積が観察され、「車紋」では *DFR-B* 遺伝子の配列がメチル化されていることを見いだしている。以上のことから想定できる模様形成に係る分子機構のモデル(図2)を検証するために、

(1)吹雪と車紋の花弁で発現する RNA を分子生物学的な手法により解析し、(2)人為的な DNA メチル化の改変法を開発して車紋と DNA メチル化の関連を解析した。



吹雪 (Blizzard) 車紋 (Rayed)

図1 本研究で研究対象にしたアサガオの模様。吹雪は、花毎に模様異なる。また、矢の先にあるように有色細胞群の中に非着色細胞が現れるが、このような着色パターンは、従来知られているトランスポゾンによる体細胞突然変異が原因である模様(キメラ斑)では見られない。低分子 RNA の作用がランダムに発現していることが示唆される。車紋では、花毎の模様は同じで曜に沿った着

色が観察され、それ以外の部位特異的に低分子 RNA が働いていることが示唆される。

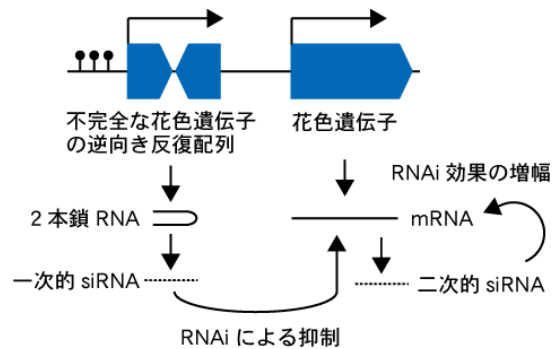


図2 吹雪と車紋に係る変異遺伝子座の構造と、模様形成機構のモデル。花色遺伝子が非着色細胞で抑制されるには、①2本鎖 RNA が反復配列から転写され、②一次的な siRNA に代謝され、③完全な花色遺伝子の転写産物に作用して二次的な siRNA が増幅される、3つの過程が必要である。吹雪ではいずれかの過程がランダムに抑制されて有色細胞が生じる。また、車紋では DNA メチル化が①の過程を抑制して曜に沿った着色が生じる。

4. 研究成果

(1) 花卉で発現する RNA の解析

吹雪と車紋の花弁を着色細胞と非着色細胞に切り分け RNA を抽出し、それぞれに発現する RNA を解析した。完全な mRNA は定量 PCR により、その蓄積量を検討した。その結果、非着色細胞では有意に着色細胞に比べて蓄積量が低下していた。

さらに2本鎖 RNA の蓄積量を、RNA 分解酵素を用いた2本鎖 RNA 特異的な RT-PCR により検討したところ、吹雪と車紋いずれも着色細胞と非着色細胞では同程度の蓄積が確認された。この結果から、2本鎖 RNA の転写量は、着色にかかわらず花卉細胞で一様であることが示唆された。

さらに、低分子 RNA を RPA 法により解析した。その結果、siRNA に特徴的な 21nt 前後の長さを持つ低分子 RNA が、着色細胞と非着色細胞の両方に蓄積していることを見出した。着色細胞に比べると非着色細胞では低分子 RNA が多く蓄積するだけでなく、2本鎖 RNA に相同な配列を持たない完全な花色遺伝子の代謝産物である低分子 RNA も蓄積していることが明らかになった。

以上の結果より、吹雪と車紋の着色細胞では、図2のモデルで示した③の過程、すなわ

二次的 siRNA の増幅の過程が抑制されていることが強く示唆された。

(2) 車紋と DNA メチル化の関連

これまでに、ソライロアサガオのフライングソーサーは、DNA メチル化により花色遺伝子の転写が制御されて模様が生じることを明らかにしている。そこでまず、フライングソーサーの花弁を薬剤処理することで DNA メチル化を人為的に変化させる方法の開発を試みた。薬剤の種類、投与方法を検討することで、DNA メチル化を改変して模様を人為的に制御することに成功した。そこで、この手法を車紋に適用したが、DNA メチル化と模様の関連を示す結果は得られなかった。(1)の実験結果から、車紋も DNA メチル化による 2 本鎖 RNA の転写制御ではなく (図 2 の①の過程)、二次的 RNA の増幅の制御により花色遺伝子が制御されていることが示されており、その結果とも一致する。

吹雪や車紋のように、自然突然変異により生じた siRNA を発現する遺伝子が係る模様はペチュニアで解析され、RNAi 発見の先駆けになる研究として広く知られている。また、他大学との共同研究から、ダリアで見られる車紋にも類似した模様にも siRNA が関与することを明らかにしている。しかし、ペチュニアやダリアの模様では、詳細な遺伝子の構造が明らかにされておらず、2 本鎖 RNA などの解析も行われていない。また、人工的な RNAi でも一つの組織内で遺伝子の抑制が斑状に発現する現象が知られているが、その詳細も明らかにされていない。これらの模様や現象も、吹雪や車紋と同じように二次的 RNA の増幅の過程で支配されている可能性がある。

一方、古典遺伝学的な解析から、本研究で解析した花色遺伝子とは別に存在する優性の遺伝子座が、吹雪と車紋の模様形成に係ることが示されている。これらの遺伝子座は二次的 RNA の増幅に係る新規因子をコードする可能性があり、その解析から植物の低分子 RNA の代謝に関する独創的な知見が得られると期待される。

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) N. Saito, F. Tatsuzawa, A. Hoshino, Y. Abe, M. Ichimura, M. Yokoi, K. Toki, Y. Morita, S. Iida and T. Honda: The anthocyanin pigmentation controlled by the *speckled* and *c-1* mutations of the Japanese morning glory. *J. Japan. Soc. Hort. Sci.* (in press) 査読あり
- (2) Y. Higuchi, K. Sage-Ono, R. Sasaki, N. Ohtsuki, A. Hoshino, S. Iida, H. Kamada and M. Ono: Constitutive expression of the *GIGANTEA* ortholog affects circadian rhythms and suppresses one-shot induction of flowering in *Pharbitis nil*, a typical short-day plant. *Plant Cell Physiol.* **52**, 638-650 (2011) 査読あり
- (3) A. Hoshino, K.I. Park and S. Iida: Identification of *r* mutations conferring white flowers in the Japanese morning glory, *Ipomoea nil*. *J. Plant Research* **122**, 215-222 (2009) 査読あり
- (4) Z. Shimatani, K. Takagi, C.H. Eun, M. Maekawa, H. Takahara, A. Hoshino, Q. Qian, R. Terada, Y. Johzuka-Hisatomi, S. Iida and K. Tsugane: Characterization of autonomous *Dart1* transposons belonging to the *hAT* superfamily in rice. *Mol. Gen. Genomics* **281**, 329-344 (2009) 査読あり
- (5) D. Kitazawa, Y. Miyazawa, N. Fujii, A. Hoshino, S. Iida, E. Nitasaka and H. Takahashi: The gravity-regulated growth of axillary buds is mediated by a mechanism different from decapitation-induced release. *Plant Cell Physiol.* **49**, 891-900 (2008) 査読あり

[学会発表] (計 14 件)

- (1) 星野敦、伝統園芸植物・アサガオの多彩な花色の発現機構、5 回アントシアニン研究会 (名古屋)、2011 年 3 月
- (2) 星野敦、朴慶一、崔丁斗、飯田滋、ソラ

イロアサガオの模様に係わるエピジェネティクス、第 52 回日本植物生理学会年会（仙台）、2011 年 3 月

- (3) 細川宗孝、大野翔、星野敦、立澤文見、土井元章、ダリア 花卉の純白化に関わる 2 種類の *CHS* の同時的転写後分解、園芸学会平成 23 年度春季大会（宇都宮）2011 年 3 月
- (4) Atsushi Hoshino: Epigenetic Regulation of Flower Variegation in the Morning Glory. The 2nd NIBB-MPIPZ Joint Symposium, Plant Science Communications 2010, Okazaki, Japan, November 2010
- (5) 星野敦、アサガオの動かないトランスポゾンと花の模様、第 6 回アサガオ研究集会（岡崎）、2010 年 11 月
- (6) 仁田坂英二、星野敦、ナショナルバイオリソースプロジェクト・アサガオ、第 6 回アサガオ研究集会（岡崎）、2010 年 11 月
- (7) 白武勝裕、中川喜夫、牧野治子、水野祐輔、森本玲奈、星野敦、田中幸子、森田裕将、飯田滋、アサガオにおけるアクアポリンの発現と花卉特異的アクアポリン発現抑制形質転換体の作出、第 6 回アサガオ研究集会（岡崎）、2010 年 11 月
- (8) リートン、福岡浩之、星野敦、飯田滋、仁田坂英二、久保山勉、*mRNA* の網羅的塩基配列解読によるアサガオ SNP マーカーの作出、日本育種学会 2010 年秋季大会（秋田）、2010 年 9 月
- (9) 小林奈通子、田野井慶太郎、星野敦、飯田滋、中西友子、アサガオにおける *WUSCHEL*、*SHOOTMERISTEMLESS*、*FRUITFUL* オートソログの単離と解析、日本植物生理学会・2009 年度年会（名古屋）、2009 年 3 月
- (10) 仁田坂英二、星野敦、飯田滋、トランスポゾンが生み出した多様なアサガオの変異体、日本植物生理学会・2009 年度年会（名古屋）、2009 年 3 月
- (11) 星野敦、朴慶一、崔丁斗、飯田滋、花の模様のエピジェネティクス、日本遺伝学会第 80 回大会（名古屋）、2008 年 9 月

(12) 森田裕将、星野敦、飯田滋、RNA サイレンシングによるアサガオ花卉の模様形成、日本遺伝学会第 80 回大会（名古屋）、2008 年 9 月

(13) Atsushi Hoshino, Jeong-Doo Choi, Kyeung-Il Park, and Shigeru Iida: Epigenetic regulation of flower pigmentation in the morning glory. The 55th NIBB Conference and Arabidopsis Workshop 2008, Frontiers of Plant Science in the 21st Century, Okazaki, Japan, September 2008

(14) 星野敦、朝顔は江戸からのタイムカプセル：遺伝資源を活かして生き物を知る、未来エネルギー研究会・第 8 回マースクール（亀岡）2008 年 8 月

〔図書〕（計 1 件）

(1) 定塚（久富）恵世、星野敦、森田裕将、山内卓樹、朴慶一、寺田理恵、森藤暁、飯田滋：アサガオとイネの DNA メチル化と遺伝子発現。植物のエピジェネティクス、*細胞工学別冊、植物細胞工学シリーズ 24*、36-43（2008）

〔その他〕

ホームページ等

(1) <http://www.nibb.ac.jp/hoshino>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

星野 敦 (HOSHINO ATSUSHI)

基礎生物学研究所・分子遺伝学研究部門・助教

研究者番号：80312205