

令和 6 年 5 月 31 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2020～2023

課題番号：20K21415

研究課題名（和文）RNA高次構造ダイナミクスを介した植物環境応答システムの解明

研究課題名（英文）Plant environmental response systems via RNA structural dynamics

研究代表者

大谷 美沙都（Ohtani, Misato）

東京大学・大学院新領域創成科学研究科・教授

研究者番号：60435633

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、植物のロバストな細胞形質発現を可能にする「RNA高次構造ダイナミクス」に着目し、RNAを介した環境応答システムの分子機序の解明を行った。解析の結果、温度変化や細胞ストレスによって起こるpre-mRNAスプライシング変化は、pre-mRNA高次構造の変化やスプライシング装置の量的変化によって制御されることがわかった。これは植物環境応答におけるRNA構造ダイナミクスの重要性を示す成果であった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

植物の環境応答におけるRNA高次構造の重要性が明らかとなったことで、動かない植物がどのように環境に適した発生や成長を達成しているのか、その多層的な環境調和型生存戦略の理解が大きく前進した。さらにこのメカニズムの応用により、植物の環境耐性向上の技術開発が可能になると考えられ、持続可能社会に向けた作物増産・カーボンニュートラル促進が期待される。

研究成果の概要（英文）：In this study, the molecular mechanisms of an RNA-mediated environmental response were elucidated, focusing on 'RNA secondary structure dynamics' as a specific system for robust expression of cellular traits in plants. Our analysis revealed that temperature shift- and cellular stress-induced changes in pre-mRNA splicing would be mediated by changes in pre-mRNA secondary structure and quantitative changes in the splicing machinery. These results demonstrate the importance of RNA secondary structural dynamics in plant environmental responses.

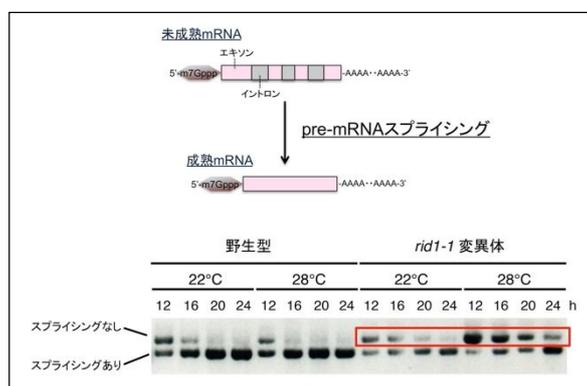
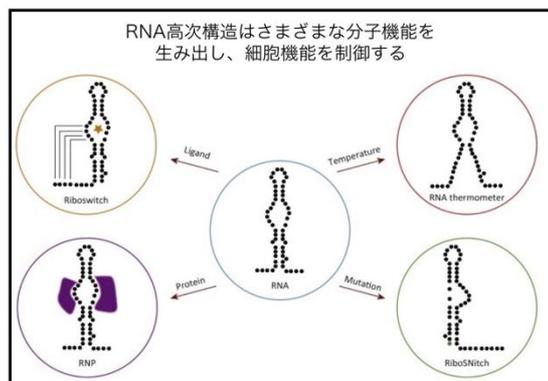
研究分野：RNA生物学

キーワード：RNA高次構造 植物環境応答 pre-mRNAスプライシング 選択的スプライシング UsnRNA

## 様式 C - 19、F - 19 - 1 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

近年、次世代シーケンサーなどのポストゲノム技術の進展に伴い、RNA が介在する多様な多層的な遺伝子発現制御機構が明らかになってきた。こうした多様な RNA の分子機能をもたらす一因は、RNA が相補的配列を通して、分子間あるいは分子内高次構造を取り得るという特徴である。これによって、RNA は、それ自身がさまざまな細胞環境要因（温度、pH、酸化還元状態、低分子代謝物、タンパク質）によって立体構造を変化させるセンサーとして機能し、またそれに伴う RNA のプロセッシング、安定化や分解、翻訳、などさまざまな代謝を促進する遺伝子発現制御リアクターとして働きうる (Vazquez-Anderson and Contreras, 2013, RNA Biol, 右上図)。これは、既存の RNA 分子を利用して遺伝子発現を状況に最適化する経済的なシステムであると考えられており、実際の生物生存環境では環境因子が微細に、かつ連続的に変動していることを考えれば、RNA 分子作用による遺伝子発現制御システムは生存環境下のロバストな細胞機能発現を実現している重要な要素のひとつと考えられる。



さらに、研究実施者自身の RNA 代謝制御関連シロイヌナズナ温度感受性変異体を用いた研究から、22 / 28 というミディアムスケールな温度変化によって RNA プロセッシングが劇的に影響を受けること (Ohtani et al., 2013, Plant Cell, 下図) が明らかとなり、RNA 高次構造および RNA 代謝制御のダイナミクスが、植物発生・生長において重要な役割を担っていることが見えてきた。また、2014 年にはゲノムワイドな RNA 高次構造ダイナミクス情報がヒト培養細胞、酵母、シロイヌナズナにおいて報告されたが (Ding et al., 2014, Nature; Rouskin et al., 2014, Nature),

興味深いことに、シロイヌナズナストレス応答性遺伝子の mRNA 高次構造は細胞内状態により感受的な性質をもっており、そのため細胞内ストレス状態に合わせた RNA 構造変化が引き起こされ、結果的に適切なストレス応答に貢献している可能性が示唆された (Ding et al., 2014, Nature)。このように、植物細胞の環境応答システムにおける RNA 高次構造の重要性を示す見解が多方面から蓄積しつつあった。

### 2. 研究の目的

以上から、本研究では、RNA 構造ダイナミクスが植物環境応答の鍵になっているという着想のもと、植物のロバストな細胞形質発現を可能にする、RNA を介した環境応答システムとして「RNA 高次構造ダイナミクス」に着目し、その分子機序の解明を行った。

### 3. 研究の方法

(1) ミディアムスケールの温度条件で育てたシロイヌナズナ芽生えを材料としたトランスクリプトーム解析

シロイヌナズナ野生型の芽生えを、16°C、22°C、28°C といったミディアムスケールの温度条件で育て、全 RNA を調製し、RNA-seq データを取得した。得られた RNA-seq データは発現レベル変動解析に加えて pre-mRNA スプライシングパターン解析に供し、発現レベルだけでなくスプライシング動態への温度の影響も調べた。また、シロイヌナズナ pre-mRNA スプライシング変異体であり、高温依存的に成長阻害を見せることが分かっている *srd2-1* および *rid1-1* 変異体についても同様に RNA-seq 解析を行い、温度に対する影響を野生型と比較した。

(2) 細胞ストレス依存的な選択的スプライシング解析

植物細胞に対して細胞ストレスを与えることが分かっている細胞ストレス誘導剤 31 種を用いて、シロイヌナズナ野生型の芽生えを 24 時間処理した後、選択的スプライシングバリエーションの存在が報告されている 4 つのモデル遺伝子 (*SERINE-ARGININE PROTEIN30*, *U1-70K*, *ASCORBATE PEROXIDASE3*, *FOLYL POLYGLUTAMATE SYNTHETASE3*) について RT-PCR を行い、その選択的スプライシングパターンを調べた。また UsnRNA レベルを RT-qPCR により定量化し、UsnRNA 量と選択的スプライシングとの関係性を明らかにするとともに、*srd2-1* 変異体についても同様の解析を行い、とくにストレス誘導剤への濃度依存性を調べた。

### ( 3 ) DMS (dimethyl sulfide)-qPCR 解析による RNA 構造解析

硫酸ジメチル ( DMS ) は対を形成していないアデニンおよびシトシン残基をメチル化修飾する化学物質であり、広く RNA 高次構造 ( ループ構造部位 ) の推定に利用されている。今回は、逆転写酵素が mRNA 分子上のメチル化アデニン/シトシン部位で反応停止することを利用し、DMS 処理した RNA サンプルを材料とした定量的 RT-PCR 解析 ( DMS-qPCR 解析 ) を行うことで、構造推定情報の取得を行った。

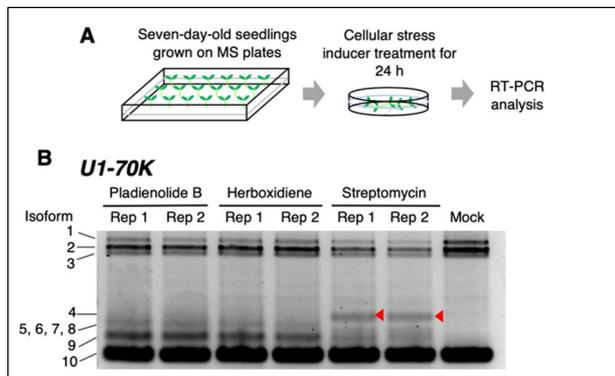
## 4 . 研究成果

### ( 1 ) ミディアムスケールの温度変化がもたらす RNA 代謝イベントの同定

シロイヌナズナ野生型芽生えを 16°C、22°C、28°C といったミディアムスケールの温度条件で育て、得られた全 RNA を用いて RNA-seq 解析を行った。解析の結果、温度条件依存的に発現量が大きく変動する遺伝子群を突き止めた。また、6°C の温度条件変化は、遺伝子発現量だけではなく、pre-mRNA スプライシングパターンを大きく変化させることも新たに見いだした。さらに pre-mRNA スプライシング変異体ではこうした温度変化依存的な遺伝子発現変化が大きく攪乱され、とくにオーキシン関連遺伝子が温度と pre-mRNA スプライシング異常の影響を強く受けることが見いだされた。これらは、植物において、ミディアムスケールの温度変化が積極的に RNA 代謝ダイナミクスに影響することで植物ホルモンスグナリングに影響し、結果として成長・発生を調整することを示唆する成果であった。

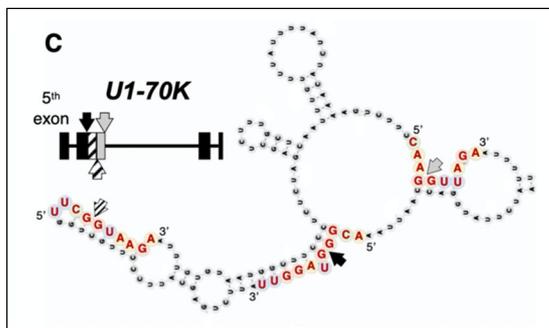
### ( 2 ) 細胞ストレス依存的な選択的スプライシング動態とそのメカニズムの解明

選択的スプライシングは、真核生物における RNA を介した遺伝子発現の重要な制御層の一つであり、とくに選択的スプライシングパターンはさまざまなストレスに応答して変化することから、ストレス条件依存的に細胞機能を調整するための仕組みの一つと考えられてきた。そこで、選択的スプライシングが起こることが分かっている 4 つのモデル遺伝子、*SP30p*、*U1-70K*、*APX3*、*FPGS3* の選択的スプライシングパターンに対する細胞ストレス誘導剤 31 種の影響を調べた。その結果、一酸化窒素代謝、ATPase 活性、プラスチド機能、ゲノムの安定性が、選択的スプライシングパターンに大きく影響する重要な細胞活動であることが示された。さらにストレス誘導剤によって異なるパターンが見出されたことから、細胞は異なる環境情報を異なる選択的スプライシングパターンとして認識し、遺伝子発現に反映させることが示唆された ( 右図; Liu et al., 2024 Plant Mol Biol; Takahashi et al. submitted )。



興味深いことに、選択的スプライシングパターンを変化させるストレス誘導剤処理は、スプライシング装置のコア因子 UsnRNP のサブユニットである UsnRNA ( U-rich small nuclear RNA ) の一種、U1 snRNA の量を大きく増加させた。また UsnRNA 転写因子変異体 *srd2-1* では、こうしたストレス誘導剤への感受性が高くなっていた。以上から、選択的スプライシングパターン変化の少なくとも一部は、U1 snRNA レベルの転写制御によって制御されていると考えられた。

### ( 3 ) RNA 構造依存的に起こるストレス応答性選択的スプライシング制御の同定



( 2 ) の結果を受け、さらに *U1-70K* pre-mRNA の AS 部位について DMS-qPCR 解析を行った。その結果、ストレス誘導剤処理に応答して *U1-70K* pre-mRNA の二次構造が変化している様子が観察され、興味深いことに、構造変化が起こる箇所はスプライスサイトと重複していることも示唆された ( 左図 )。これは、植物細胞は pre-mRNA 二次構造の変化による介してスプライシング部位の選択を変化させ、遺伝子発現へと反映していることが示唆している ( Takahashi et al. submitted )。

## < 引用文献 >

- Vazquez-Anderson and Contreras (2013) RNA Biol 10: 1778-1797
- Ohtani et al. (2013) Plant Cell 25: 2056-2069
- Ding et al. (2014) Nature 505: 696-700
- Rouskin et al. (2014) Nature 505: 701-705
- Liu et al. (2024) Plant Mol Biol 114: 45

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 1件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Takayanagi N, Mukai M, Sugiyama M, Ohtani M	4. 巻 39
2. 論文標題 Transcriptional regulation of cell proliferation competence-associated Arabidopsis genes, CDKA;1, RID1, and SRD2 by phytohormones in tissue culture.	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Plant Biotechnology	6. 最初と最後の頁 329-333
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.5511/plantbiotechnology.22.0513a	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 高柳なつ, 大谷美沙都	4. 巻 94
2. 論文標題 植物pre-mRNAスプライシングの特徴とその生理的役割	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 生化学	6. 最初と最後の頁 861-867
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.14952/SEIKAGAKU.2022.940861	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 -

1. 著者名 Liu Ming-Jung, Fang Jhen-Cheng, Ma Ya, Chong Geeng Loo, Huang Chun-Kai, Takeuchi Ami, Takayanagi Natsu, Ohtani Misato	4. 巻 114
2. 論文標題 Frontiers in plant RNA research in ICAR2023: from lab to innovative agriculture	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Plant Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 45
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s11103-024-01436-x	査読の有無 有
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 該当する

〔学会発表〕 計12件（うち招待講演 5件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 竹内亜美、永宮研二、池田拓之、大林祝、杉山宗隆、大谷美沙都
2. 発表標題 pre-mRNA スプライシング制御を介したサイトカニン依存的な細胞増殖・分化能制御の分子機構
3. 学会等名 第64回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 高柳なつ、荒江星拓、大谷美沙都
2. 発表標題 植物はpre-mRNAスプライシングを介して地上部環境情報を地下部形態形成へと反映させる
3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 大谷美沙都
2. 発表標題 植物の細胞分化を制御する転写後遺伝子発現調節の解明
3. 学会等名 第63回日本植物生理学会年会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 山崎逸平、畑中優佳、高橋洋和、大谷美沙都
2. 発表標題 遺伝子をどう転写しプロセスするか：植物における UsnRNP 機能の重要性
3. 学会等名 第63回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 石橋鴻大、荒江星拓、吉積毅、栗原志夫、黒森崇、松井南、大谷美沙都
2. 発表標題 栄養条件依存的な植物成長制御にはマイナータイプスプライシングが関与する
3. 学会等名 第63回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Ohtani M
2. 発表標題 How to transcribe and modify what kinds of snRNAs: Metabolic regulation of snRNAs is a key to environment-appropriate control of plant development
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 高柳なつ、荒江星拓、高橋洋和、清水隆之、堀口吾朗、相田光宏、深城英弘、増田建、大谷美沙都
2. 発表標題 植物プラスチックストレスはpre-mRNAスプライシング制御を介して側根形態に反映される
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 高橋洋和、高柳なつ、出村拓、大谷美沙都
2. 発表標題 シロイヌナズナでは細胞ストレスは選択的スプライシングを介して遺伝子発現に反映される
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Misato Ohtani, Hirokazu Takahashi, Natsu Takayanagi, Taku Demura
2. 発表標題 Cellular Stress Can Reflect to Gene Expression Via Alternative Splicing Regulation in Arabidopsis
3. 学会等名 第22回日本RNA学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Chiam Nyet-Cheng、藤村 朋世、佐野 亮輔、出村 拓、大谷 美沙都
2. 発表標題 Importance of Nonsense-mediated mRNA Decay in Auxin Signaling during in vitro Organogenesis and Development in Plants
3. 学会等名 第62回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 高柳 なつ、高橋 洋和、大谷 美沙都
2. 発表標題 プラスチドシグナルによる側根形態制御にはpre-mRNAスプライシング制御が関与する
3. 学会等名 第62回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Misato Ohtani
2. 発表標題 Roles for mRNA quality control in the organ regeneration of plants
3. 学会等名 第43回日本分子生物学会年会
4. 発表年 2020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
研究協力者	荒江 星拓  (Arae Toshihiro)	東京大学・新領域創成科学研究科・博士研究員  (12601)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8 . 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------