

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成24年 5月31日現在

機関番号：82401

研究種目：基盤研究(C)

研究期間：2009～2011

課題番号：21570056

研究課題名（和文） センス鎖遺伝子と共発現するストレス応答性の非翻訳型アンチセンスRNAの解析

研究課題名（英文） Analysis of stress-responsive non-coding antisense RNAs that are co-expressed with sense RNAs

研究代表者

関 原明 (SEKI MOTOAKI)

独立行政法人理化学研究所・植物ゲノム発現研究チーム・チームリーダー

研究者番号：80281624

研究成果の概要（和文）：

シロイヌナズナゲノムに存在する、センス鎖遺伝子と共発現する非翻訳性アンチセンス RNA の生成メカニズムを、代表的なストレス誘導性遺伝子である RD29A 遺伝子を用いて解析した。RNA-dependent RNA polymerase (RDR)により RD29A 遺伝子の mRNA を鋳型として環境ストレス誘導性のアンチセンスが生成する事を明らかにした。内生 mRNA の分解産物から 2 本鎖 RNA が形成される新規な RNA 制御機構が植物の環境ストレス応答において機能することが示唆された。

研究成果の概要（英文）：

Our previous study identified about 7,000 stress-inducible antisense RNAs in Arabidopsis and showed that RD29A locus that has typical drought-inducible gene, has a type of stress-inducible antisense RNA which is complementary to sequence of the sense mRNA. Real time RT-PCR analysis showed that accumulation of RD29A antisense RNA was decreased in rdr1/2/6 triple mutants. Our data indicates a novel RNA regulation mechanism that RDR-mediated synthesis of antisense RNAs functions in the turnover of sense mRNAs under the stress conditions in plants.

交付決定額

(金額単位：円)

| | 直接経費 | 間接経費 | 合計 |
|--------|-----------|-----------|-----------|
| 2009年度 | 1,400,000 | 420,000 | 1,820,000 |
| 2010年度 | 1,100,000 | 330,000 | 1,430,000 |
| 2011年度 | 1,100,000 | 330,000 | 1,430,000 |
| | | | |
| | | | |
| 総計 | 3,600,000 | 1,080,000 | 4,680,000 |

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：植物、ゲノム、ストレス、発現制御、非翻訳型 RNA、アンチセンス RNA

1. 研究開始当初の背景

本申請代表者らは、シロイヌナズナタイリングアレイを用いた解析により、アンチセンス鎖に存在しセンス鎖の遺伝子と共発現する、ストレス応答性の非翻訳性 RNA を多数同定し

た。(Matsui et al., 2008, Plant Cell Physiol.)。これまでの動植物のトランスクリプトーム研究では、一般にアンチセンス RNA はセンス RNA の発現を抑制すると考えられているが、本申請代表者らの最近の実験結果からアンチセンス RNA に新たな機能が存在

することが示唆された。アンチセンス RNA の存在が確認できた乾燥ストレス応答性の CYP707A1 遺伝子 (チトクロム P450 遺伝子の 1 つで ABA 8'-水酸化酵素をコードする; Kushiro et al., 2004) について、アンチセンス RNA の生成メカニズムの解析を行ったところ、アンチセンス RNA の発現にセンス RNA の発現が必要であることが明らかになった (Matsui et al., 2008, Plant Cell Physiol)。

2. 研究の目的

本申請課題では、研究期間内に以下の内容を明らかにすることを目指す。シロイヌナズナゲノムに存在する、センス鎖遺伝子と共発現する (ストレスや ABA に対する応答性に関して) 非翻訳性アンチセンス RNA の生成メカニズムを明らかにする。RNA 代謝やクロマチン関連因子の遺伝子破壊株などを用いて解析し、センス鎖遺伝子と共発現する非翻訳性アンチセンス RNA の生成に関与する因子を同定する。

3. 研究の方法

本研究では、シロイヌナズナにおける代表的な乾燥ストレス誘導性遺伝子であり、かつ、アンチセンス鎖に乾燥ストレス誘導性の非翻訳型 RNA が存在する RD29A 遺伝子領域に焦点を絞って解析を進めた。

(1) ストレス誘導性の非翻訳型アンチセンス RNA の生成に関与する因子の同定

① これまでの研究から、アンチセンス RNA はセンス RNA を鋳型として、RNA-dependent RNA polymerase (RDR) により生成する可能性が示唆されていたので、シロイヌナズナゲノムに存在する 6 つの RDR 遺伝子の単一破壊株 (rdr1, rdr2, rdr3, rdr4, rdr5, rdr6) および二重変異株 (rdr1/rdr2, rdr1/rdr6, rdr2/rdr6) および三重変異株 (rdr1/rdr2/rdr6) を用いて、野生株との間で、無処理または乾燥ストレス処理 2 時間で、RD29A アンチセンス RNA の蓄積量に関して差がないか Real-time RT-PCR 法を用いて解析した (21-22 年度)。

② アンチセンス RNA の生成に、センス mRNA の分解産物のような不安定な RNA が基質となっている可能性が考えられたので、mRNA 分解に関与する因子に関しても、遺伝子破壊株を用いて RD29A アンチセンス RNA の蓄積量に関して差がないか Real-time RT-PCR 法を用いて解析した (23 年度)。

(2) ストレス誘導性の非翻訳型アンチセンス

RNA の性質の解析

① 22 年度までの解析で、rdr1/rdr2/rdr6 の 3 重変異体で RD29A アンチセンス RNA の蓄積が減少している事が確認されたので、アンチセンス RNA がセンス RNA と 2 本鎖 RNA を生成している事を、RNaseV1 (二本鎖 RNA に特異的な RNase) および RNaseI/RNaseA (一本鎖 RNA に特異的な RNase) を用いた RNase Protection Assay により解析した。

4. 研究成果

(1) ストレス誘導性の非翻訳型アンチセンス RNA の生成に関与する因子の同定

① RDR 遺伝子の単一変異体および多重変異体の内利用可能なもの (rdr1/2, rdr1/6, rdr2/6, rdr1/2/6) を用いて乾燥ストレス処理 (2 時間) 後の RD29A 遺伝子のアンチセンス RNA の蓄積を調べた。単一変異体および二重変異体 (rdr1/2, rdr1/6, rdr2/6) ではアンチセンス RNA の蓄積に関して野生株との間に差は見られなかったが、rdr1/2/6 の三重変異体では野生株と比べてアンチセンス RNA の蓄積が半分程度に減少していた。rdr1/2/6 の三重変異体の無処理および乾燥処理 (2 時間) 条件での発現プロファイルをタイリングアレイを用いて解析したところ、ストレス応答関連の遺伝子約 30 個においてアンチセンス RNA の蓄積が減少している事がわかった。

② キャップ構造のない mRNA を分解する 5' → 3' exoribonuclease (XRN4) の変異体では、導入遺伝子に対する small RNA 介在性のジーンサイレンシングが起こる事、ターゲット遺伝子領域でアンチセンス RNA の蓄積増加が報告されている。これらの結果から、XRN4 が RD29A アンチセンス RNA の蓄積に関与する事、mRNA の分解産物の一部がアンチセンス RNA の生成機構とリンクする可能性が考えられた。そこで、XRN4 および mRNA からキャップを除く機能を持つ DCP5 の変異体における RD29A アンチセンス RNA の蓄積量を調べた。XRN4 変異体では RD29A アンチセンス RNA の蓄積は増加し、DCP5 変異体では RD29A アンチセンス RNA の蓄積は減少してい

た。以上の結果から、内生 mRNA の分解産物から 2 本鎖 RNA が形成される新規な RNA 制御機構が存在することが示唆された。

(2) ストレス誘導性の非翻訳型アンチセンス RNA の性質の解析

- ① rdr1/2/6 三重変異体と野生型植物から RNA を抽出して RNaseV1(二本鎖 RNA に特異的な RNase)および RNaseI/RNaseA(一本鎖 RNA に特異的な RNase)を用いた RNase Protection Assay により解析した。その結果、RD29A のアンチセンス RNA は二本鎖 RNA に特異的な RNase で分解されるのに対して、一本鎖 RNA に特異的な RNase では分解されなかった。この結果は、RD29A 遺伝子領域ではアンチセンス RNA がセンス RNA と 2 本鎖 RNA を形成している事を示唆する。

以上の結果から、RD29A のアンチセンス RNA は、内生 mRNA の分解産物から RDR を介して 2 本鎖 RNA を形成するという新規な RNA 生成機構によって作られる事が明らかになった。以前から環境ストレス下では mRNA の安定性が大きく変化し、遺伝子発現制御への関与の可能性が指摘されていた。今回の我々の研究成果は、環境ストレス下での RNA の代謝に関与する新しい RNA 制御機構の発見であり、私たちの遺伝子発現制御に対する理解を深めるものである。

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 6 件)

- ① Kurihara, Y., Schmitz, R. J., Nery, J. R., Schultz, M. D., Okubo-Kurihara, E., Morosawa, T., Tanaka, M., Toyoda, T., Seki, M. and Ecker, J. R. (2012) Surveillance of 3' non-coding transcripts requires FIERY1 and XRN3 in Arabidopsis. *G3* 2:487-498、査読有。
- ② Kawaguchi, S., Iida, K., Harada, E., Hanada, K., Matsui, A., Okamoto, M., Shinozaki, K., Seki, M. and Toyoda, T. (2012) Positional correlation analysis improves reconstruction of full-length transcript and alternative isoform from noisy array signals or short reads. *Bioinformatics* 28:929-937、査読有。
- ③ Nakaminami, K., Matsui, A., Shinozaki,

K. and Seki, M. (2011) RNA regulation in plant abiotic stress responses. *BBA - Gene Regulatory Mechanisms*. 19:149-153、査読有。

- ④ Okamoto, M. and Seki, M. (2011) Expression profile and 5'-terminal structure of Arabidopsis antisense transcripts expressed in seeds. *Plant Signaling Behavior* 6:691-693、査読有。
- ⑤ Iida, K., Kawaguchi, S., Kobayashi, N., Yoshida, Y., Ishii, M., Harada, E., Hanada, K., Matsui, A., Okamoto, M., Seki, M. and Toyoda, T. (2011) ARTADE2DB: Improved Statistical Inferences for Arabidopsis Gene Functions and Structure Predictions by Dynamic-Structure-Based Dynamic Expression (DSDE) Analyses. *Plant Cell Physiol.* 52:254-264、査読有。
- ⑥ Urano, K., Kurihara, Y., Seki, M. and Shinozaki, K. (2010) 'Omics' analyses of regulatory networks in plant abiotic stress responses. *Current Opin. Plant Biol.* 13:132-138、査読有。

[学会発表] (計 10 件)

- ① Matsui, A., Ishida, J., Morosawa, T., Tanaka, M., Endo, T. A., Iida, K., Toyoda, T., Shinozaki, K. and Seki, M. (2011). Biogenesis mechanism and function of stress-inducible non-coding antisense RNAs. International Plant RNA Workshop 2011; June 20; Yokohama.
- ② Nakaminami, K., Minami, A., Nakagami, H., Nomura, Y., Tanaka, M., Morosawa, T., Ishida, J., Shirasu, K., Uemura, M. and Seki, M. (2011). RNA masking system during cold deacclimation of Arabidopsis plants. International Plant RNA Workshop 2011; June 21; Yokohama
- ③ Iida, K., Kawaguchi, S., Harada, E., Matsui, A., Seki, M. and Toyoda, T. (2011). A survey and analysis of regulated alternative splicing events in Arabidopsis thaliana using genome tiling array and mRNA-seq. International Plant RNA Workshop 2011; June 20; Yokohama.
- ④ Matsui, A., Kim, J. M., To, K. T.,

- Nakaminami, K., Ishida, J., Morosawa, T., Tanaka, M., Kobayashi, S., Nishioka, T., Ushifusa, C., Shinozaki, K., Toyoda, T. and Seki, M. (2011): Novel RNA and chromatin regulation in plant abiotic stress responses, Abiotic Stress Workshop, Plant & Animal Genome XIX. The International Conference on the Status of Plant & Animal Genome Research, San Diego, USA, Jan 15-19 (2011).
- ⑤ Matsui A., Kim J-M., To K.T., Nakaminami K., Ishida J., Morosawa T., Tanaka M., Endo T., Kawaguchi S., Iida K., Shinozaki K., Toyoda T. and Seki, M.: Novel RNA- and chromatin remodeling-mediated regulatory mechanisms in plant abiotic stress responses The 2010 Cold Spring Harbor Asia Conference on From Plant Biology to Crop Biotechnology, Suzhou, China, Oct 25-29 (2010).
- ⑥ Seki, M., Matsui A., Ishida J., Morosawa T., Iida K., Endo T., Okamoto M., Tanaka M., Kawaguchi S., Shinozaki K. and Toyoda T.: Genome-wide analysis of RNA regulation in plant abiotic stress responses, Society for Experimental Biology Annual Main Meeting 2010, Prague Czech Republic, June 30-July 3 (2010).
- ⑦ Matsui A., Kim J-M., Ishida J., Morosawa T., Endo T., Okamoto M., Kurihara K., Nakaminami K., Tanaka M., To T., Nambara E., Hanada K., Mochizuki Y., Kawaguchi S., Toyoda T., Shinozaki K. and Seki M.: Novel RNA- and chromatin remodeling-mediated regulatory mechanisms in plant abiotic stress responses, 9th IPMB Congress, St. Louis, Missouri, USA, Oct 25-30 (2009).
- ⑧ Matsui A., Kim J-M., Ishida J., Morosawa T., Okamoto M., Kim T., Nambara E., Mochizuki Y., Kawaguchi S., Toyoda T., Shinozaki K. and Seki M.: Novel RNA- and chromatin remodeling-mediated regulatory mechanisms in plant abiotic stress responses, 20th International Conference on Arabidopsis Research, Edinburgh, Scotland UK, June 30- July 4 (2009).
- ⑨ Kawaguchi S., Hanada K., Iida K., Mochizuki Y., Matsui A., Okamoto M., Seki M., Shinozaki K. and Toyoda T.: ARTADE2.0: a mathematical integration of tiling array, CAGE and sequence data to elucidate the transcriptional systems dynamics of Arabidopsis thaliana, 20th International Conference on Arabidopsis Research, Edinburgh, Scotland UK, June 30- July 4 (2009).
- ⑩ Iida K., Kawaguchi S., Hanada K., Fukami-Kobayashi K., Toyoda A., Sakaki Y., Kobayashi M., Seki M., Shinozaki K. and Toyoda T.: Multiple alternative splicing events in individual transcripts; analyses using full-length cDNAs and tiling arrays, 20th International Conference on Arabidopsis Research, Edinburgh, Scotland UK, June 30- July 4 (2009).

[図書] (計2件)

- ① Kurihara, Y. and Seki, M. (2011) Genome-wide analysis of RNA degradation in Arabidopsis. In "RNA Technologies (Edited by Volker A. Erdmann and Jan Barciszewski)". Springer Publisher, Berlin Heidelberg, pp. 79-89、査読有.
- ② Matsui, A., Ishida, J., Morosawa, T., Okamoto, M., Kim, J.M., Kurihara, Y., Kawashima, M., Tanaka, M., To, T., Nakaminami, K., Kaminuma, E., Endo, T., Mochizuki, Y., Kawaguchi, S., Kobayashi, N., Toyoda, T., Shinozaki, K. and Seki, M. (2010) Arabidopsis tiling array analysis to identify the stress-responsive genes. In "Methods in Molecular Biology-Plant Stress Tolerance (Edited by Dr. Ramanjulu Sunkar)". Humana Press Inc., NJ. 639:141-155、査読有.

[その他]

ホームページ:

<http://labs.psc.riken.jp/pgnrt/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

関 原明 (SEKI MOTOAKI)
独立行政法人理化学研究所・植物ゲノム発現
研究チーム・チームリーダー
研究者番号：80281624

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

豊田 哲郎 (TOYODA TETSURO)
独立行政法人理化学研究所・生命情報基盤研
究部門・部門長
研究者番号：20342818

松井 章浩 (MATSUI AKIHIRO)
独立行政法人理化学研究所・植物ゲノム発現
研究チーム・研究員
研究者番号：90443027