

機関番号：63904

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2009～2010

課題番号：21770056

研究課題名（和文） シロイヌナズナDCL1を用いた種子特異的pre-miRNA発現プロファイリング

研究課題名（英文） Expression profiling of seed-specific pre-miRNA binding to Arabidopsis DCL1 protein

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（和文）：miRNAの生合成因子であるDCL1タンパク質と結合するmiRNAの前駆体pre-miRNAを植物体から精製するために、抗体反応に必要なタグ配列をつないだDCL1遺伝子を過剰発現する形質転換体シロイヌナズナを作成した。形質転換体シロイヌナズナにおいてmRNA量やタンパク質量を測定し、導入したDCL1が発現していることを確認した。タグ配列を認識する抗体を用いた免疫沈降法を利用して、目的のpre-miRNAを精製する実験系を確立した。

研究成果の概要（英文）：To isolate pre-miRNAs binding to DCL1 from Arabidopsis, we made transgenic Arabidopsis plants, which express the DCL1 fused with a tag sequence driven by the inducible promoter. We confirmed the expression level of the fusion DCL1 gene using RT-PCR and western blot analyses. Finally, we are preparing the pre-miRNAs binding to the fused DCL1 protein from the transgenic plants by immunoprecipitation methods

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2010年度	2,300,000	690,000	2,990,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

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：シロイヌナズナ、機能性小分子RNA、pre-miRNA、AtDCL1タンパク質、種子休眠・発芽

1. 研究開始当初の背景

生体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いる。植物

の様々な成長反応において遺伝子発現の転写後調節に“機能性小分子RNA (small RNA; miRNA, siRNA)”の関与が次々と報告されている。申請者らは、これまで行ったシロイヌナズナ種子吸水後の遺伝子発現プロファイリング (Nakabayashi et al., 2005; Tatematsu et al., 2008; Preston and Tatematsu et al., 2009) を基にした研究か

ら、miRNA の生合成・機能に関わる“*Dicer-like (DCL1)* 遺伝子”や“*ARGONAUTE (AGO)* 遺伝子群”の発現が吸水後3時間目から上昇することを見出した(立松ら、未発表)。また種子発芽に既知のmiRNAを介した発現制御が関与していることがすでに報告されており(Reyes & Chua, 2007; Liu et al., 2007)、さらに申請者も種子発芽時の胚の成長ポテンシャル上昇を制御するAtTCP14の局在に転写後調節が関与することを示唆する結果を得ている(立松と南原、未発表)。

そこで申請者らは、種子休眠・発芽制御因子の局在化のメカニズムを明らかにするために、それに関わる新奇 small RNAs の同定を目指して、“次世代シーケンス技術”を用いて、種子で発現している small RNAs の網羅的解析—small RNAs の発現プロファイリング—を行ってきた(立松ら、未発表)。種子から20から30塩基のRNAをクローニングして次世代シーケンスを行い、30万クローンからなるシーケンス結果が得られた。バイオインフォマティクスを用いたデータ解析から、16個の既知のmiRNAsと約800個の新奇miRNAs候補が得られた。しかし、次世代シーケンスで得られたクローンの大半はトランスポゾンやmRNAs、他のnon-coding RNAsの分解産物であった。20から30塩基のRNAをクローニングする方法では、こうしたRNAの分解産物をも含んでしまうため、相対的に発現の弱い、局所的に発現する新奇miRNAsの同定を困難にしていることが考えられた。

2. 研究の目的

申請者は葉の形態形成に関わるmiR165/166の発現解析を行い、RT-PCR法を用いて、miR165/166の9つある遺伝子座から生じる“pre-miR165/166の発現の器官・組織特異性”を解析している。その結果、“葉の表裏決定機構ではいくつかの遺伝子座が特異的に関与している”ことを示唆する結果が得られた(立松と岡田、未発表)。既知のmiRNAsには複数の遺伝子座を持つものが多く、また、種子でのsmall RNAsの発現プロファイリングで得られた新奇miRNA候補にも複数の遺伝子座が予想されるものが得られていた。こうしたことから、“特定の器官や成長反応では複数の遺伝子座の中の特定のpre-miRNAsが発現しており、それらがDCL1を介して切断されて成熟したmiRNAsとして機能する”ことが予想された。つまり、DCL1と結合するpre-miRNAsを同定すれば、特異的に発現している*MIRNA* 遺伝子座を決定し、なおかつ、新奇のmiRNAが得られることが期待された。そこで本研究では、1) RNA分解産物混入の問題を回避した新奇miRNAsの同定、2) 種子発芽に関わるmiRNA遺伝子座の

同定を目指して、miRNA生合成経路の鍵因子であるDCL1タンパク質に着目し、DCL1と結合しているpre-miRNAsをクローニングして、次世代シーケンスを用いた発現プロファイリングを行う。

3. 研究の方法

(1) シロイヌナズナDCL1と共沈降するRNA分子の精製

①DCL1過剰発現株の作成

シロイヌナズナDCL1と蛍光タンパク質の融合遺伝子をDCL1遺伝子自身のプロモーターで発現させる形質転換体シロイヌナズナを作成する。本研究の最終目標の一つは、“器官・組織特異的、成長反応特異的なpre-miRNAsを同定すること”であり、その為にnativeなプロモーターによる発現系を選択した。発現させるDCL1にはpre-miRNAsの回収効率を上げるために*dc11-7*変異を導入する。*dc11-7*変異体では成熟したmiRNAの量が減少しているが、そのタンパク質はHYL1と相互作用する(Kurihara & Watanabe, 2004; Kurihara et al., 2006)。この結果から、*dc11-7*タンパク質はpre-miRNA切断複合体を形成するが切断能を持たず、pre-miRNAsの蓄積が予想でき、本研究で用いるのに適していると考えられる。また、蛍光タンパク質と融合させることにより、作成した形質転換体の中での発現様式の確認が容易となる。その様式と、*in situ*ハイブリダイゼーション法で確認したDCL1遺伝子の野生型における発現様式と比較することで、実際にDCL1が機能する領域で発現しているかどうかを確認できる。さらに、免疫沈降法ではその蛍光タンパク質に対する抗体を用いることが出来るため、抗DCL1抗体を作成する時間と費用の削減にもなる。このように作成したコンストラクトをシロイヌナズナの野生型に導入した形質転換体を作成する。

②免疫沈降法を用いたDCL1と共沈降するRNA分子の精製

次に、得られた形質転換体での融合タンパク質の発現様式を確認した後、最も発現が強いものを用いて、免疫沈降法を行い、DCL1と共沈降してきたRNAのクローニングを行う。前述の通り、免疫沈降法では蛍光タンパク質に対する抗体を用いる。DCL1の発現解析の結果から種子吸水後3時間目でその発現が強く誘導されることが分かっている。そこで、免疫沈降法ではこの吸水後3時間目の種子をサンプルとして用いる。DCL1と共沈降してきたRNAをクローニングした後、サザンハイブリダイゼーション法や半定量的RT-PCR法を用いて、既知のpre-miRNAsが同定できるかどうか調べる。複数の遺伝子座を持つmiR159、miR160、miR165/166、miR167やmiR168

について、種子での発現プロファイルがこれまでの研究結果から得られているので、これらを中心に解析を行う。また、pre-miRNA は遺伝子座ごとに配列が異なる領域があるため、その配列特異を考慮した RT-PCR 解析を行えば、得られた pre-miRNA がどの遺伝子座由来かを明らかにすることが容易である。

(2) 種子特異的に発現する pre-miRNA の発現プロファイリング解析

上記で確立した実験系を用いて、次世代シーケンス技術を利用した pre-miRNAs の発現プロファイリング解析を行う。発現プロファイリングを行うサンプルには、前述の吸水後 3 時間目の種子だけではなく、種子発芽に向けた相転移状態にある吸水後 2 4 時間目の種子も用いる予定である。申請者の所属研究機関には次世代シーケンサーとしてアプライドバイオシステムズ社の SOLiD™ システムが共同利用機器として導入されており、利用申請を行えば自由に使用することが出来る。クローニングした DCL1 と共沈降してきた RNA はこの SOLiD™ システムを用いてシーケンスを行い、そこに含まれる新奇 pre-miRNAs を探索する。得られたシーケンス結果は 3,000 万から 4,000 万クローンになると予想されるため、そのデータ解析にはバイオインフォマティクス解析を、その解析に長けた研究室と共同研究により進める。さらに、得られた新奇 pre-miRNAs 候補の結果と、現在持っている miRNAs 発現プロファイルの結果を比較することにより、より確実に新奇 miRNAs とその pre-miRNAs 決定する。

4. 研究成果

(1) シロイヌナズナ DCL1 を用いた pre-miRNA の同定系の開発

免疫沈降法を用いて DCL1 と結合する pre-miRNA を共沈降させるため、DCL1 とタグ配列を融合させたタンパク質を発現させる形質転換体シロイヌナズナを作成した。DCL1 遺伝子は野生型由来と、HYL1 タンパクと結合して pre-miRNA 切断複合体を形成するがその切断が起こらないと予想される *dc11-7* 変異体由来の配列を用いた。当初の計画では DCL1 遺伝子自身のプロモーターを用いる予定であったが、最終的な DCL1 タンパク質の発現量が少ない場合には免疫沈降法によるタンパク回収が成功しないことが新たに懸念されたため、融合タンパクを過剰発現させることに計画を変更した。また、それに伴い、タグについても GFP タンパク質ではなく、Flag タグを用いることとした。これら Flag タグ融合 DCL1 タンパク質の生育に対する影響を少なくするために、その融合遺伝子をデキサメタゾン (DEX) 処理により発現が誘導される DEX 誘導性プロモーターの下流につないだ

コンストラクトを作成し、アグロバクテリウムを介した形質転換法を用いて、シロイヌナズナに導入した。

DCL1 と Flag タグを融合させたタンパク質を発現させる形質転換体シロイヌナズナを 20 ライン選抜した。始めに、これら形質転換体で融合遺伝子がデキサメタゾン (DEX) 誘導性プロモーターによる発現誘導を、10 μ M の DEX を形質転換体幼植物に処理し、半定量的 RT-PCR 法を用いて融合遺伝子の発現を確認した。次に、DEX 処理をした幼植物から total RNA 及び全タンパク質を抽出し、定量的 RT-PCR 法と Flag 抗体を用いたウエスタンブロットング法を利用して、融合タンパク質の発現量が高い形質転換体ラインを選抜した。予備実験として、幼植物体に DEX 処理を行った後に、Flag-DCL1 融合タンパク質と pre-miRNA を共沈降させるための Flag 抗体を用いた免疫沈降法を行ったが、Flag-DCL1 融合タンパク質が効率よく得られていない。そのため、DEX の濃度や処理時間、植物体の固定方法などのさらなる条件検討が必要であると考えられた。

(2) シロイヌナズナ HYL1 を用いた pre-miRNA の同定系の開発

DCL1 タンパク質と結合して pre-miRNA の切断に関わる HYL1 タンパク質について、*hyl1* 突然変異体では一部の pre-miRNA 分子種においてスプライズバリエーションが蓄積することが近年、報告された。このことから、HYL1 と結合しやすい、ある種の pre-miRNA が存在することが想定され、HYL1 を用いることで DCL1 の場合とは異なる pre-miRNA が得られることが期待された。さらに、HYL1 をターゲットにして免疫沈降を行えば、内在する DCL1 と結合する pre-miRNA が得られることができ、前述の Flag タグによる DCL1 と pre-miRNA の結合に対する影響をなくすことも期待される。以上のことから、HYL1 に HA タグをつないだ融合タンパク質を、CaMV35S プロモーターで恒常的に発現させる形質転換体を作成した。Flag-DCL1 形質転換体の場合と同様に、HYL1-HA タグ融合タンパク質の過剰発現する形質転換体について、その発現量を元にラインの選抜を行った。Flag-DCL1 形質転換体を用いた免疫沈降法の条件が定まれば、同様の条件で HYL1-HA の免疫沈降実験を今後行う予定である。

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 5 件)

1. Endo, A. *, Tatematsu, K. *, Hanada, K. *, Duermeyer, L., Okamoto, M.,

- Yonekura-Sakakibara, K., Saito, K., Toyoda, T., Kawakami, N., Kamiya, Y., Seki, M., and Nambara, E. (2012) Tissue-specific transcriptome analysis reveals cell wall metabolism, flavonol biosynthesis, and defense responses are activated in the endosperm of germinating *Arabidopsis thaliana* seeds. *Plant Cell Physiol.* 53, 16-27. (*: Equally contributed) (査読有り)
2. Nambara, E., Okamoto, M., Tatematsu, K., Yano, R., Seo, M., Kamiya, Y. (2010) Abscisic acid and the control of seed dormancy and germination. *Seed Sci. Res.* 20, 55-67. (査読有り)
3. Okamoto, M., Tatematsu, K., Matsui, A., Morosawa, T., Ishida, J., Tanaka, M., Endo, T., Mochizuki, Y., Toyoda, T., Kamiya, Y., Shinozaki, K., Nambara E., and Seki, M. (2010) Genome-wide analysis of endogenous abscisic acid-mediated transcription in *Arabidopsis* seeds using tiling arrays. *Plant J.* 62, 39-51. (査読有り)
4. Preston, J. *, Tatematsu, K. *, Kanno, Y., Hobo, T., Kimura, M., Jikumaru, Y., Yano, R., Kamiya, Y., and Nambara, E. (2009) Temporal expression patterns of hormone metabolism genes during imbibition of *Arabidopsis thaliana* Seeds: a comparative study on dormant and non-dormant accessions. *Plant Cell Physiol.* 50, 1786-1800. (*: Equally contributed) (査読有り)
5. Nambara, E., Yamagishi, K., Tatematsu, K., Nakabayashi, K., and Kamiya, Y. (2009) Nitrate responses of *Arabidopsis* chol mutants: obvious only when excess nitrate is supplied. *Plant Signal. Behav.* 4, 1164-1166. (査読なし)
- [学会発表] (計 5 件)
1. Nambara, E., Tatematsu K., Hanada, K., Okamoto, M., Endo, A., Seki, M., and Kamiya, Y.: Analysis of the genes that expressed in endosperms after imbibition of *Arabidopsis* seeds. Canadian Plant Genomic Workshop 2011, Niagara Falls, Canada, August 22-25, 2011
2. Tatematsu, K.: miR165/166 might regulate non-cell-autonomously the expression domains of HD-Zip III in *Arabidopsis* leaf primordia. The 2nd NIBB-MPIPZ Joint Symposium Plant Science Communications 2010, NIBB, Okazaki, Japan, November 16-18, 2010
3. Tatematsu, K., Nakabayashi, K., Osuna, D., Fernandez-Arbaizar, A., Albertos-Arranz, P., Kamiya, Y., Lorenzo, O., and Nambara, E.: Studies of ABA action on *Arabidopsis* seed germination. 3rd ISSS Workshop on Molecular Aspects of Seed Dormancy and Germination, York, UK, July 18-21, 2010
4. 南原英司、立松圭、菅野裕理、保浦徳昇、軸丸裕介、神谷勇治: シロイヌナズナ種子における吸水極初期の植物ホルモン代謝. 植物化学調節学会第44回大会、東北大学、仙台、2009年10月29日~30日
5. Tatematsu, K.: The role of miRNA in leaf development along the adaxial-abaxial axis in *Arabidopsis thaliana*. Japanese-German Symposium on Evolution and Development, Cologne, Germany, August 25-27, 2009
- [その他]
- アウトリーチ活動情報
1. 2010年 自然科学研究機構基礎生物学研究所 一般公開「体験! 生き物研究空間」. 体験実験「生き物をDNA鑑定してみよう-PCR法による遺伝子解析-」. 2010年10月2日
2. 自然科学研究機構基礎生物学研究所 高校生実験講座 2010 「葉と花の生まれるところを見てみよう」. 2010年8月21日 (共催: 日本学術振興会 H22年度ひらめき・ときめきサイエンス~ようこそ大学の研究室へ~KAKENHI)
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