

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25年 5月31日現在

機関番号：63904

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22770047

研究課題名（和文） 高等植物のノンコーディングRNAの代謝と遺伝子発現の制御

研究課題名（英文） Non-coding RNA metabolism and gene regulation in higher plants

研究代表者

星野 敦 (HOSHINO ATSUSHI)

基礎生物学研究所・多様性生物学研究室・助教

研究者番号：80312205

研究成果の概要（和文）：ノンコーディング RNA はタンパク質に翻訳されないで機能する RNA である。その代謝と遺伝子発現の調節機構を明らかにするために、ノンコーディング RNA が花色を決める遺伝子を調節して作り出されるアサガオの模様を解析した。これまで mRNA の分解に係わるとされてきた植物のノンコーディング RNA が、タンパク質の翻訳を阻害する機能がある可能性を示すことができた。

研究成果の概要（英文）：Non-coding RNA is a functional RNA that is not translated into a protein. To reveal metabolisms of non-coding RNA and their impact on gene expression in higher plants, we characterized the flower pigmentation patterns of the Japanese morning glory that are regulated by small RNA. While small RNA regulate gene expressions through mRNA cleavage in plants, our results suggested that small RNA also cause translational inhibition.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2011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、ノンコーディングRNA、遺伝子発現、花

1. 研究開始当初の背景

真核生物は膨大な数のノンコーディング RNA を転写し、遺伝子発現の制御を介してあらゆる生体機能の調節に関与している。なかでも、micro RNA などの低分子 RNA は mRNA の転写抑制、分解などに働いて遺伝子発現を制御することが知られ、基礎生物学におけるフロンティアの一つである。植物においても、発生や環境応答などの広範な植物機能の制

御や、植物ウイルスの防御機構でも中心的な役割を果たすことが知られている。しかし、低分子 RNA について、代謝や機能の全貌の理解には到っていない。

2. 研究の目的

植物におけるノンコーディング RNA 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目標として、低分子 RNA が関与して

生じるアサガオの模様形成機構を分子レベルで解明する。

3. 研究の方法

アサガオの「吹雪」、「車紋」、「覆輪」、「曜白」は、優性の突然変異により生じる模様である(図1)。これまでの研究から、いずれも花の色素であるアントシアニンの生合成に関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* 遺伝子の優性突然変異が、模様形成の主要因となることが明らかになっている。野生型では完全な構造をした *DFR-B* 遺伝子が1つ存在するが、「吹雪」と「車紋」では、完全な *DFR-B* 遺伝子に加えて不完全な *DFR-B* 遺伝子による繰り返し構造が存在する。「覆輪」と「曜白」では *DFR-B* 遺伝子が順向きに並んだ繰り返し構造を取っている。また、花の白い部分(非着色細胞)では、*DFR-B* 遺伝子の低分子 RNA の蓄積量が増加している。これらの非着色細胞では *DFR-B* mRNA の蓄積量が低下しているが、完全には消失しておらず着色が期待されるような mRNA の蓄積が認められることから、*DFR-B* mRNA の翻訳阻害が生じていることが示唆されている。そこで、この可能性を検証するために色素、*DFR-B* mRNA、タンパク質の蓄積量を定量などを行った。さらに、非着色細胞に蓄積する低分子 RNA の構造を網羅的な塩基配列の解析や、ノンコーディング RNA の代謝に関わる RNA 分解酵素の解析を行うことで、非着色細胞と着色細胞の違い、それぞれの模様の出方の違いに関わる因子を探求した。



図1 吹雪は、有色の花弁に白い縞が現れる模様である。縞の現れ方はランダムであり、花毎に模様が異なる。縞の形状は細胞分裂の系譜を反映する傾向が見られる。車紋は曜の

部分から放射状に着色が薄くなる模様である。覆輪と曜白は、有色花弁に白い縁取りが現れる模様で、覆輪は縁の部分だけが白いが、曜白は曜の部分も白い。車紋、覆輪、曜白の模様は、細胞系譜ではなく花弁中の位置を反映している。いずれの模様でも、優性の突然変異により *DFR-B* 遺伝子の発現が非着色細胞で抑制されている。この抑制には、ノンコーディング RNA の一種である低分子 RNA が関与している。

4. 研究成果

(1) 翻訳抑制の解析

吹雪と車紋の着色細胞と非着色細胞を切り分けて、アントシアニン色素、RNA、タンパク質、それぞれを抽出して解析した。

①アントシアニンは抽出液の吸光度を測定することで濃度の比較を行った。その結果、着色細胞に比べて非着色細胞ではアントシアニンの蓄積が低下していた。

② *DFR-B* mRNA の蓄積量を qPCR 法により定量した。その結果、着色細胞に比較すると非着色細胞では *DFR-B* mRNA の蓄積量は低下していたが、相当量の mRNA が蓄積していることからアントシアニン蓄積量の低下を説明できないことが明らかになった。

③ *DFR-B* mRNA の構造を塩基配列を解析することで調べた。その結果、非着色細胞で蓄積している *DFR-B* mRNA も完全な構造をしていることを明らかにした。

④ *DFR-B* タンパク質の蓄積量を、ウェスタンブロット法により解析した。非着色細胞では着色細胞に比べて蓄積量が極端に低下していた。

以上の結果より、吹雪と車紋の非着色細胞では mRNA の分解と同時に、翻訳抑制が生じることで *DFR-B* 遺伝子の発現が抑制されていることが強く示唆された。

(2) 低分子 RNA の解析

吹雪、車紋、覆輪の着色細胞と非着色細胞を切り分けて、それぞれから RNA を抽出し、次世代型シーケンサーにより低分子 RNA の配列を網羅的に解析した。

①いずれの模様でも、着色細胞に比べて非着色細胞でより多くの *DFR-B* 遺伝子由来の低分子 RNA が蓄積していた。

②「吹雪」と「車紋」では、非着色細胞で完全な *DFR-B* mRNA が代謝されて低分子 RNA が生じていた。

③「吹雪」と「車紋」では蓄積する低分子 RNA の量とサイズ分布に違いが見られた。さらに「吹雪」では、着色細胞と非着色細胞で蓄積する低分子 RNA のサイズ分布も異なっていた。

以上の結果より、低分子 RNA が *DFR-B* 遺伝子を抑制することで模様が生じ、低分子 RNA の代謝の違いにより、着色細胞と非着色細胞の違い、あるいは模様の違いが制御されていることが示唆された。

(3) RNA 分解酵素の解析

花卉で発現し、低分子 RNA の代謝に関わることが予測された 3 種類の RNA 分解酵素の遺伝子 cDNA クローンを得た。また、そのうち 2 つについて、ゲノム上の遺伝子を保持する BAC クローンを単離し、全長配列を新学術領域「ゲノム支援」のサポートを受けることで解読した。その結果、RNA 分解酵素の構造や、ゲノム上の遺伝子構造を明らかにできた。これらの発現解析も行ったが、現在までに模様との関連を示す結果は得られていない。

(4) 国内外における位置づけ、インパクト

これまで植物の低分子 RNA は mRNA の分解を介して遺伝子発現の制御を行うと考えられてきた。本研究では、自然突然変異により形成された繰り返し構造を持つ遺伝子に由来する低分子 RNA が翻訳抑制に関わることを初めて明らかにすることができた。最近になって、miRNA や tasiRNA と呼ばれる低分子 RNA が mRNA の分解だけでなく翻訳抑制にも関わることが報告されたが、これらの報告と共に、普遍的に植物に存在すると思われるノンコーディング RNA による翻訳抑制という、遺伝子発現制御の新しいモデルを提供できた。

(5) 今後の展望

本研究では模様を構成する着色細胞と非着色細胞の違いや、それぞれの模様の違いが、低分子 RNA の代謝制御により生じていることが示唆された。これらの代謝制御に関わる因子は、古典遺伝学的な解析から見いだされた模様の違いに関わる優性遺伝子座がコードされている可能性がある。これらの遺伝子座を解析することで、低分子 RNA の代謝制御に関する独創的な知見が得られ、生物の複雑さの源としても注目されているノンコーディング RNA 研究の発展に貢献できると思われる。

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 4 件)

- ① L. Tong, H. Fukuoka, A. Otaka, A. Hoshino, S. Iida, E. Nitasaka, N. Watanabe and T. Kuboyama: Development of EST-SRR markers of *Ipomoea nil*. *Breed. Sci.* **62**, 99-104 (2012) 査読有
- ② K. I. Park and A. Hoshino: A WD40-repeat protein controls proanthocyanidin and phytomelanin pigmentation in the seed coats of the Japanese morning glory. *J. Plant Physiol.* **169**, 523-528 (2012) 査読有
- ③ S. Ohno, M. Hosokawa, M. Kojima, Y. Kitamura, A. Hoshino, F. Tatsuzawa, M. Doi and S. Yazawa: Simultaneous post-transcriptional gene silencing of two different chalcone synthase genes resulting in pure white flowers in the octoploid dahlia. *Planta* **234**, 945-958 (2011) 査読有
- ④ S. Ohno, M. Hosokawa, A. Hoshino, Y. Kitamura, Y. Morita, K. I. Park, A. Nakashima, A. Deguchi, F. Tatsuzawa, M. Doi, S. Iida, S. Yazawa: A bHLH transcription factor, *DvIVS*, is involved in regulation of anthocyanin synthesis in dahlia (*Dahlia variabilis*). *J. Exp. Bot.* **62**, 5105-5116 (2011) 査読有

[学会発表] (計 15 件)

- ① A. Hoshino, E. Nitasaka: NBRP-Morning glory: Genetic Resources of *Ipomoea nil* and related species: Wide variety of mutants induced by transposons. The 4th NIBB-MPIPZ-TLL symposium "Arabidopsis and Emerging Model Systems" Okazaki, Japan, December 19-21, 2012
- ② 星野敦、アサガオの模様を生み出すエピジェネティクス (シンポジウム 2 「エコロジカル・エピジェネティクスー可塑性メカニズムの適応・進化的意義を探るー」)、第 44 回種生物学シンポジウム (高島)、2012 年 12 月 9 日
- ③ 仁田坂英二、星野敦、ゲノム配列情報を

- 利用したアサガオバイオリソースの高度化 (NBRP ワークショップ:九州ブランドのバイオリソース)、日本遺伝学会第84回大会(福岡)、2012年9月26日
- ④ 山田瑞樹、和田楓、古塩綾、金古堅太郎、白矢武士、星野敦、酒井達也、三ツ井敏明、加藤朗、竹能清俊、アサガオの貧栄養ストレス応答花成におけるサリチル酸の動態と *PnFT2* の発現調節、植物学会第76回大会(姫路)、2012年9月15日
- ⑤ 星野敦、朴慶一、飯田滋、アサガオの模様みるエピジェネティックな遺伝子発現制御の獲得機構(ワークショップ:植物のエピジェネティクス:環境と表現型の動態をつなぐ)、日本進化学会第14回大会(八王子)、2012年8月21日
- ⑥ 山田瑞樹、和田楓、古塩綾、金古堅太郎、白矢武士、星野敦、酒井達也、三ツ井敏明、加藤朗、竹能清俊、アサガオの貧栄養ストレス応答花成におけるサリチル酸と *PnFT2* の役割、北陸植物学会大会(富山)、2012年6月24日
- ⑦ A. Hoshino, K.I. Park, S. Iida: Epigenetic regulation of flower variegation in *Ipomoea tricolor*. The Eighth Okazaki Biology Conference: "Speciation and Adaptation II-Environment and Epigenetics", Okazaki, Japan, March 18-23, 2012
- ⑧ 森田裕将、星野敦、飯田滋、アサガオの模様を生み出す small RNA の機能と制御、第53回日本植物生理学会年会(京都)、2012年3月17日
- ⑨ 猫橋茉莉、森本玲奈、廣瀬真名、松本省吾、星野敦、森田裕将、飯田滋、白武勝裕、花弁特異的プロモーターの開発 -アサガオ由来 *InMYB1* プロモーターの解析-、園芸学会平成23年度秋季大会(岡山)、2011年9月25日
- ⑩ 森田裕将、星野敦、飯田滋、アサガオの模様から RNA サイレンシングの制御と機能を探る(ワークショップ、植物の機能性 RNA:花成から受粉まで)、日本遺伝学会・第83回大会(京都)、2011年9月22日
- ⑪ 白武勝裕、森本玲奈、猫橋茉莉、廣瀬真名、星野敦、森田裕将、飯田滋、花弁特異的プロモーターの開発 -アサガオ由来 *InMYB1* プロモーターの解析-、第29回日本植物細胞分子生物学会(福岡)大会(福岡)、2011年9月7日
- ⑫ 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20-22日
- ⑬ 猫橋茉莉、森本玲奈、廣瀬真名、松本省吾、星野敦、森田裕将、飯田滋、白武勝裕、花弁特異的プロモーターの開発(第1報)アサガオ由来 *InMYB1* プロモーターのシロイヌナズナにおける検証、園芸学会平成23年度春季大会(宇都宮)、2011年3月20-21日
- ⑭ 白武勝裕、森本玲奈、廣瀬真名、猫橋茉莉、松本省吾、星野敦、森田裕将、飯田滋、花弁特異的プロモーターの開発(第2報)アサガオ由来 *InMYB1* プロモーターの多様な花きにおける検証、園芸学会平成23年度春季大会(宇都宮)、2011年3月20-21日
- ⑮ 星野敦、伝統園芸植物・アサガオの多彩な花色の発現機構、第5回アントシアニン研究会(名古屋)、2011年3月8日
- ⑯ A. Hoshino: "Epigenetic Regulation of Flower Variegation in the Morning Glory", The 2nd NIBB-MPIPZ Joint Symposium, Plant Science Communications 2010, Okazaki, Japan, November 16-18, 2010
- ⑰ 星野敦、アサガオの動かないトランスポゾンと花の模様、アサガオ研究集会(岡崎)、2010年11月14日
- [図書](計1件)
- ① 星野敦、玉田洋介:植物のエピジェネティクスと形質発現。**植物の分子育種学**(鈴木正彦編)、講談社、191-201(2011)
- [その他]
- ホームページ等
- ① <http://www.nibb.ac.jp/hoshino/>
- ② 日本経済新聞「アサガオ 千変万化に迫る」2012年7月22日、取材協力
- ③ 雑誌ニュートン「シリーズ フラワーサイエンス前編、花が色とりどりなのはなぜ」2012年6月号、協力
- ④ 日本植物生理学会・市民講座・植物科学

をもっと楽しもう 2011-花と生殖-, 講演会「花の色や模様はどのようにしてできる?」、実験「花色素の分離、花色素の吸収曲線の実験」(大阪、) 2011年11月6日、講師

6. 研究組織

(1) 研究代表者

星野 敦 (HOSHINO ATSUSHI)
基礎生物学研究所・多様性生物学研究室・助教
研究者番号：80312205

(2) 研究分担者

()

研究者番号：

(3) 連携研究者

()

研究者番号：