

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 5 月 7 日現在

機関番号：82401

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2012～2013

課題番号：24657041

研究課題名(和文)植物の環境ストレス応答に関与する新規な siRNA パスウェイの同定

研究課題名(英文) Identification of novel siRNA pathways involved in plant environmental stress responses

研究代表者

関 原明 (Seki, Motoaki)

独立行政法人理化学研究所・環境資源科学研究センター・チームリーダー

研究者番号：80281624

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000 円、(間接経費) 930,000 円

研究成果の概要(和文)：本研究代表者らは、ストレスにより誘導されセンス鎖RNAと共発現するアンチセンスRNAは、タンパク質コード領域からRNA依存性RNAポリメラーゼ(RDR)により生成することを見出している。rdr1/2/6の3重変異体と野生型からsmall RNA画分を抽出し、次世代シーケンサーを用いて解析したところ、RDR1/2/6依存性のアンチセンスRNA生成領域とRDR1/2/6依存性のsmall RNA生成領域はほとんど一致しなかった。以上から、RDR1/2/6は既知のsmall RNA生成とは別の新規経路で、センス鎖RNAを鋳型にしてストレス誘導性のアンチセンスRNAを生成している事が明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Arabidopsis transcriptome analysis under drought, cold, high-salinity stress and ABA treatment conditions, using tiling array, showed that approximately 6,000 novel transcripts existed in the antisense strand of the AGI code genes and they were induced under abiotic stress. To study the biogenesis mechanism of the antisense RNAs, accumulation of RD29A antisense RNA was analyzed, using RNA-dependent RNA polymerase (RDR) mutant series. Finally, we found that rdr1/2/6 mutation decreased accumulation of RD29A antisense RNA. RNase protection and RNA decay analyses showed that RD29A antisense RNA formed double stranded RNA and promoted degradation of RD29A mRNA. However, RNA-seq analysis did not detect siRNA accumulation in this locus. These results show that antisense RNAs are produced by RNA-dependent RNA polymerase (RDR) 1/2/6 without involving siRNA generation.

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：植物分子機能 small RNA

1. 研究開始当初の背景:

アンチセンス RNA を介したストレス応答性遺伝子の制御に関しては、Jian-Kang Zhu らにより nat-siRNA パスウェイが報告されているが、センス鎖とアンチセンス鎖の RNA の発現プロファイル(ストレスに対する応答性)は異なっている(Borsani et al.2005)。一方、本申請代表者らが最近見出したアンチセンス RNA とセンス RNA のストレスに応答した発現プロファイルは似ており、数千個以上のストレス誘導性遺伝子のアンチセンス鎖に非翻訳型の RNA が存在する事を見出している(Matsui et al.2008)。

21~25 塩基程度の small RNA を介した RNA サイレncing 経路の基本的な仕組みは真核生物に広く保存されている。現在知られている small RNA は、生合成過程の違いから microRNA (miRNA) と small interfering RNA (siRNA) に分けられる。miRNA は RNA polymerase II によって転写され、部分的に 2 本鎖 RNA 構造をとるステムループ領域の前駆体から切り出される。一方、siRNA は完全な相補性をもつ二本鎖 RNA から生じる。植物では、繰り返し配列由来の siRNA、trans-acting siRNA (ta-siRNA)、内在性のセンスアンチセンス鎖由来の siRNA (nat-siRNA) などの新規の siRNA の存在が報告されている。

そこで、本研究で、本申請代表者が見出した、環境ストレスにより誘導されてセンス RNA と共発現するアンチセンス RNA (上記参照、Matsui et al.2008) を介する遺伝子発現制御に新規な siRNA 生成パスウェイかどうか解析した。また、新規なパスウェイが存在する場合経路の因子の同定を目指して研究を進めた。

2. 研究の目的:

研究期間内に以下の 2 つを明らかにすることを旨とした。

1. 環境ストレスによりセンス鎖およびアンチセンス鎖で共に発現誘導される遺伝子領域(センス/アンチセンス遺伝子領域)から新規な siRNA が生成する事を確認する。

2. 新規な siRNA の生成が確認された場合、環境ストレス応答に参与する新規な siRNA 経路の因子を同定する。

3. 研究の方法:

環境ストレスにより発現誘導され、かつ、センス鎖 RNA と共発現するアンチセンス RNA の解析を続けた結果、上記アンチセンス RNA は、タンパク質をコードする領域から RNA 依存性 RNA ポリメ

ラーゼ(RDR)により生成し、細胞内でセンス鎖 RNA と 2 本鎖 RNA を生成する事を見出した。そこで、本研究で、上記アンチセンス RNA の生成経路が small RNA の生成経路と直接リンクしているかどうか解析した。具体的には、rdr1/2/6 の 3 重変異体と野生株から 17-30 塩基の small RNA 画分を抽出し、次世代シーケンサーを用いて解析した。

4. 研究成果:

rdr1/2/6 の 3 重変異体と野生株からの small RNA を次世代シーケンサーを用いて解析した。Small RNA をゲノム上にマッピングしたところ、タンパク質をコードする発現遺伝子領域にも mRNA の分解産物と考えられる低分子 RNA が存在していた。そこで、野生株と rdr1/2/6 の 3 重変異株を比較して変異体で small RNA の蓄積量が減少する領域を RDR1/2/6 依存性の small RNA 生成領域とみなした。その結果、意外にも RDR1/2/6 に依存してアンチセンス RNA が生成する領域と RDR1/2/6 依存性の small RNA 生成領域はほとんど一致しなかった。アンチセンス RNA は主にタンパク質をコードする遺伝子領域から生成しているのに対して、small RNA は主にトランスポゾン領域から生成していた。以上の結果から、RDR1/2/6 はこれまで報告済みの small RNA 生成経路とは異なる新規な経路で、センス鎖 RNA を鋳型にして環境ストレス誘導性のアンチセンス RNA を生成していることが明らかとなった。

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 3 件)

1. Matsui, A., Nguyen, A.H., Nakaminami, K. and Seki, M. (2013) Arabidopsis Non-coding RNA Regulation in Abiotic Stress Responses. In Special Issue "Regulation by non-coding RNAs". International Journal of Molecular Sciences. 14: 22642-22654. doi: 10.3390/ijms141122642. (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. doi: 10.1093/bioinformatics/bts065. (査読有)

3. 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. doi: 10.1534/g3.111.001362 (査読有)

[学会発表](計 14 件)

1. Seki, M. Novel Epigenetic and RNA Regulation in Plant Abiotic Stress Responses, Invited Seminar at Rockefeller Univ. (Host: Prof. Nam-Hai Chua), Jan. 10, 2014, New York, USA.
2. Matsui, A., Iida, K., Tanaka, M., Ishida, J., Morosawa, T., Takahashi, S., Toyoda, T. and Seki, M. Novel Antisense RNA Regulation Functions in Plant Abiotic Stress Responses. ASPB Satellite Meeting "Post-transcriptional Gene Regulation in Plants", July 25-26, 2013, Providence, USA.
3. Seki, M. Novel non-coding antisense RNA regulation in plant abiotic stress responses. International Symposium "Non-coding RNA in plants", July 10-12, 2013 Wittenberg, Germany.
4. Matsui, A., Kim, J.M., To, T.K., Iida, K., Tanaka, M., Ishida, J., Morosawa, T., Toyoda, T. and Seki, M. Novel RNA and Epigenetic Regulations in Plant Abiotic Stress Responses. 2013 International Symposium on Agricultural Biotechnology: Emerging Topics on Plant Stress Biology, May 24-25, 2013, Taipei, Taiwan.
5. 松井章浩, 飯田慶, 山口勝司, 田中真帆, 石田順子, 諸澤妙子, 重信秀治, 篠崎一雄, 豊田哲郎, 関原明. 環境ストレス条件下での新規アンチセンス RNA の生成は RNA-dependent RNA polymerase によって行われる. 第 54 回日本植物生理学会年会, 2013 年 3 月 21 日, 岡山.
6. Matsui, A., Kim, J.M., Kim To, T., Iida, K., Tanaka, M., Ishida, J., Morosawa, T., Toyoda, T. and Seki, M. Novel antisense RNA and epigenetic regulation in plant abiotic stress responses. Abiotic Stress Workshop, Plant & Animal Genome ASIA 2013, Mar. 18, 2013, Singapore.
7. Seki, M. Novel RNA and Epigenetic Regulation in Plant Abiotic Stress Responses. Seminar at University of Cambridge, Dec. 13, 2012, Cambridge, UK.
8. Seki, M. Novel antisense RNA and epigenetic regulations in plant abiotic stress responses, School of Biological Sciences Seminar, Royal Holloway, University of London, Dec. 12, 2012, Egham, UK.
9. Matsui, A., Iida, K., Tanaka, M., Ishida, J., Morosawa, T., Toyoda, T. and Seki, M.: Novel non-coding antisense RNA regulation in plant abiotic stress responses, Cold Spring Harbor Conferences Asia, Plany Epigenetics, Stress and Evolution, Suzhou, China, Oct. 29-Nov. 2 (2012).
10. Seki, M. Novel posttranscriptional and epigenetic regulation in plant abiotic stress responses, Workshops on Biotechnology Research and Application in Agriculture2, Sep 5, 2012, AGI, Ha Noi, Viet Nam.
11. Matsui, A., Iida, K., Yamaguchi, K., Tanaka, M., Ishida, J., Morosawa, T., Kim, J.-M., Shigenobu, S., Shinozaki, K., Toyoda, T. and Seki, M. Stress-inducible non-coding antisense RNAs are generated by RDR-mediated RNA dopying mechanism and function in the turnover of the sense mRNAs under abiotic stress, International Plant RNA Workshop 2012, July 8-9, 2012, Vienna, Austria.
12. Seki, M. Novel RNA and epigenetic regulation in plant abiotic stress responses, and Establishment of cassava functional genomics platform and its application to molecular breeding, Seminar at Hanoi University of Agriculture, June 9, 2012, Hanoi University of Agriculture, Ha Noi, Vietnam.
13. Seki, M. (2012) Novel RNA and epigenetic regulation in plant abiotic stress responses, GNU Plant Science Symposium 2012, May 10-12, 2012, Jinju, Korea.
14. Seki, M., Iida, K., Yamaguchi, K., Tanaka, M., Ishida, J., Morosawa, T.,

Shigenobu, S., Shinozaki, K., Toyoda, T. and Matsui, A. (2012) Biogenesis mechanism and function of stress-inducible non-protein-coding antisense RNAs in Arabidopsis, BIT's 3rd Annual World on DNA and Genome day, Apr 25-28, 2012, Xi'an, China.

〔その他〕

理化学研究所環境資源科学研究センター植物ゲノム発現研究チームホームページ
(<http://www.csrs.riken.jp/jp/labs/pgnr/t/index.html>)

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・環境資源科学研究センター・チームリーダー 研究者番号 80281624

(2) 研究分担者

該当なし

(3) 連携研究者

松井 章浩 (Matsui Akihiro) 独立行政法人理化学研究所・環境資源科学研究センター・研究員・研究者番号 90443027