

## 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：若手研究(B)

研究期間：2009～2011

課題番号：21780315

研究課題名（和文） 光誘導性の small open reading frame の単離と解析

研究課題名（英文） Functional analysis of small open reading frame in plants

研究代表者

樋口 美栄子 (HIGUCHI MIEKO)

独立行政法人理化学研究所・植物ゲノム機能研究グループ・特別研究員

研究者番号：40443014

研究成果の概要（和文）：

本研究では、高等植物において遺伝子間隙に存在する short open reading frames (sORFs) を同定し、発現解析を行った。その結果、全ての組織において sORF が発現していることが確認でき、光で転写が制御される sORF を同定した。RACE 法により sORF の転写を、さらに GUS 遺伝子を融合させ sORF 領域の翻訳を確認した。また sORF の過剰発現体を作製し、葉の形態や芽生えの胚軸、根の伸長に変化が生じた変異体を単離した。これらの結果から sORF は植物においてペプチドとして機能し、新規の遺伝子群となることが期待される。

研究成果の概要（英文）：

To investigate function of sORFs in plants, I developed custom microarrays including sORFs and annotated genes in Arabidopsis to analyze gene expression profile. Microarray analysis was carried out in various tissue types. The expression of sORFs could be detected in various plant tissues. Full length cDNA of sORF was verified by RACE experiment. Next, promoter region and sORF without stop codon was fused to GUS gene and then expressed it in Arabidopsis. GUS signal was detected in transgenic plants, indicating that sORF was actually translated in plants. I selected sORFs based on expression, conservation, peptide hormone-like sequence to generate sORF overexpression Arabidopsis plants. Some overexpression plants showed visible phenotypes. Thus, I conclude that sORFs have roles in growth and developmental processes.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2010年度	900,000	270,000	1,170,000
2011年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：境界農学・応用分子細胞生物学

キーワード：short open reading frames、マイクロアレイ、シロイヌナズナ、光誘導性遺伝子

## 1. 研究開始当初の背景

多くの生物において成長や代謝などの過程で、ペプチドホルモンが重要な役割を果たすことが知られている。このペプチドホルモンは、短いアミノ酸で構成されていることが特徴の一つである。植物においても、システミンやファイトスルフォカインといったペプチドホルモンが存在し、導管形成や孔辺細胞形成といった植物の生育過程に関与することが近年、報告されている。これらのペプチドホルモンの受容体として LRR 受容体型キナーゼが報告されており、シロイヌナズナのゲノム中には LRR 受容体型キナーゼが 200 以上存在するが、多くの受容体型キナーゼは何を認識しているのかは不明なままである。CLE ペプチド群を含むペプチドホルモンは数十種しかないことから、リガンドとなる未同定のペプチドホルモンは他にも多数存在することが予測される。

近年、数多くの生物において全塩基配列の解読が終了しており、これらの遺伝子配列情報を利用して、機能未知遺伝子の機能予測が急速に進められている。従来の遺伝子構造予測では、100 アミノ酸以上をコードする領域を遺伝子として予測してきたが、酵母や線虫において、より短いアミノ酸をコードする領域が発現し機能していることが報告された。このような短いコード領域を持つ遺伝子は **small open reading frame (sORF)** と呼ばれ、新しいカテゴリーの遺伝子として注目され始めている。

シロイヌナズナにおいても、花田らによって既知の遺伝子の間に 30-100 アミノ酸をコードする sORF が約 7,000 存在することが報告された。しかし、これらの sORF は塩基配列の存在が予測されているのみであり、植物体内において実際に機能しているかどうかはまだ確認されていない。したがって、これらの sORF が新規のペプチドホルモンをコードしている可能性があり、この中から多数の重要な遺伝子群が発見できると思われる。

## 2. 研究の目的

本研究では、シロイヌナズナで予測された 7,000 の sORF の発現制御に注目し、大量解析が可能なマイクロアレイを用いて発現解析を行う。これらの sORF は、新規の遺伝子群として、植物の様々な生育段階や環境変化への応答時に機能することが期待される。特に、光応答性の遺伝子には転写因子が多く含まれており、光誘導初期の茎頂分裂組織において多くの LRR 受容体型キナーゼの発現が

誘導されることが報告されていることから、光誘導性の sORF は植物の形態形成に重要な役割を持つことが期待できる。そこで本研究においては、光に応答して転写が誘導される sORF をカスタムマイクロアレイで同定し、それらの機能について解析することを目的とした。

## 3. 研究の方法

まず、sORF が植物において発現しているかどうかを確認するため、アジレント社の earray というシステムを用いて、シロイヌナズナの sORF と既知の遺伝子を搭載したマイクロアレイを作成した。まずシロイヌナズナにおいてどのような組織で sORF が発現しているか確認するため、様々な組織から RNA を抽出し、カスタムマイクロアレイを用いた発現解析を行った。次に光により特異的に発現が変動する sORF を同定するため、3 日間暗所で生育させたシロイヌナズナの芽生えに連続白色光を照射し、経時的に芽生えから抽出した RNA をマイクロアレイに供し、発現解析を行った。

また、同定した sORF がどの光質で発現制御されているかを調べるため、暗所生育させた芽生えに単色光（青・赤・遠赤色）を照射し、光質による sORF の発現変動も調べた。その際同時に、cry1・cry2・phyA・phyB などの光受容の変異体の発現変化も解析し、光誘導性 sORF の発現制御がどの光受容体のシグナル伝達経路に依存して行われるかを解析した。

研究目的で記述したように、同定した sORF にコードされるペプチドは拡散性である可能性も考えられる。その場合、植物ホルモンのように外部からの添加により植物体に影響を及ぼすことが期待される。実際、化学的に合成された CLE ペプチド群は、培地に添加することにより植物の形態形成に影響を与えることが報告されている。このペプチド添加による表現型は過剰発現体において同様な効果を観察できることが報告されていることから、本研究においては、同定した sORF が分泌性ペプチドである可能性を探るため、sORF の過剰発現体を作成し、表現型観察を行った。

## 4. 研究成果

まずシロイヌナズナにおいてどのような組織で sORF が発現しているか確認するため、機知遺伝子と sORF を搭載したカスタムマイクロアレイを作成した。様々な組織から RNA を抽出し、カスタムマイクロアレイを用いた

発現解析を行った。その結果、全ての組織において短い遺伝子が発現していることが確認された。マイクロアレイの結果を確認するため、sORFの全長を増幅するプライマーを用いて RT-PCR を行ったところ、様々な組織（花・さや・根）において発現が検出され、一部の sORF は組織特異的な発現パターンを示していた。このことから植物において短い遺伝子は既知の長い遺伝子と同様、転写され機能していると考えられる。

短い遺伝子の機能解析方法のひとつとして、過剰発現体を作製し、表現型解析を行った。作成する遺伝子を選抜する指標としては、マイクロアレイのデータによりいずれかの組織において発現が確認されているもの、公開されているプロテオーム解析により短い遺伝子にコードされているタンパク質が同定されているもの、他の植物において配列が保存されているもの、ペプチドホルモン様の配列を有しているものという4つの観点から選抜した。

これらの過剰発現体の1つである ATRIKEN16307 は、老化葉、若いさや、カルスにおいて発現が検出されているが、その過剰発現体は、明所で生育させたときに野生型と比較して胚軸と根が長くなるという表現型を示した。ATRIKEN16307 に関しては、ORFの全長をカバーする完全長 cDNA のデータが得られている。また、ATRIKEN16307 は相同な遺伝子がシロイヌナズナのゲノム上に3つ存在しているが、これら4つの発現パターンを比較すると、ATRIKEN16307 ともうひとつの短い遺伝子はよく似た発現パターンを示すが、残り2つはほとんど発現していないことを明らかにした。この結果は、少なくとも2つの短い遺伝子にも、類似した機能があると考えられる。この過剰発現体以外にも植物体のサイズや草丈、稔性、葉の形態など表現型が多岐に渡る過剰発現体を単離することができた。このように sORF を過剰発現することにより形態や生育に様々な影響が見られたことから、植物において短い遺伝子は発生段階や生育に重要な役割を持つことは明らかである。

過剰発現体が表現型を示したものについては、ORF 領域が実際に転写されているかどうか確認するため、5' -RACE と 3' -RACE により完全長 cDNA を同定した。RACE 用のサンプルとしては、作製された発現データベースを参照することにより、遺伝子発現が最も高い組織を選定し、選んだ組織から抽出した RNA を RACE 実験に供した。RACE 産物をシーケンズすることにより、短い遺伝子の ORF 領域がカバーされるような完全長 cDNA が道程された。このことから sORF 領域が実際に植物体内において転写されていることを確認できた。

次に短い遺伝子が翻訳されているかどうか確認するために、GUS と GFP のレポーター遺伝子を用いた解析を行った。プロモーター領域として機能すると考えられる短い遺伝子上流約 1 kb と終止コドン欠いた ORF 領域に GUS 遺伝子を融合させたコンストラクトを作製し、植物内で発現させ、GUS 発現の様子を観察した。GUS 染色の結果、さややロゼット葉において GUS のシグナルが検出された。このことから、sORF 領域が翻訳され、ペプチドとして存在することが示唆された。

さらに短い遺伝子がコードするタンパク質の細胞内局在を観察するため、GUS の代わりにレポーターとして GFP を融合させたコンストラクトを作製し、シロイヌナズナに形質転換した植物において GFP の細胞内局在を観察した。その結果、GFP のシグナルが細胞間隙に検出された。今後いくつかの方法で追試等を行う必要があるが、これらの結果は、翻訳された短い遺伝子は翻訳された後、細胞外に分泌されている可能性を強く示唆している。

これまでに報告されているほとんど全ての植物のホルモン様の機能を示すペプチドは、細胞外に分泌され細胞間のシグナル伝達に関与することがわかっている。しかし報告されている遺伝子数は未だ少なく、多くのホルモン様ペプチドが未知のまま残されていると考えられる。今回の研究結果から、単離した短い遺伝子は新規のホルモン様ペプチドとしての機能を持つものである可能性が高いと考えている。同時に本研究の解析対象である短い遺伝子の中に他にも機能性ペプチドの有力な候補遺伝子が多く存在することを強く示唆しており、今後の解析において新たな機能性ペプチドの発見につながることを期待される。

## 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 2 件)

- ① Higuchi-Takeuchi M, Ichikawa T, Kondou Y, Matsui K, Hasegawa Y, Kawashima M, Sonoike K, Mori M, Hirochika H, Matsui M. Functional analysis of two isoforms of leaf-type ferredoxin-NADP<sup>+</sup>-oxidoreductase in rice using heterologous expression system of Arabidopsis thaliana. *Plant Physiol* (2011) 157:96-108 (査読有り)
- ② Kondou Y\*, Higuchi M\* (\*Co-first author), Matsui M. High-throughput characterization of plant gene functions by using gain-of-function

technology. Annual Review of Plant Biology (2010) 61:373-393 (査読有り)

[学会発表] (計 8 件)

- ① 樋口美栄子、吉積毅、花田耕介、児玉豊、清水みなみ、堀井陽子、川島美香、松井敬子、松井南遺伝子間隙に存在する short open reading frame の機能解析 第52回植物生理学会 2011.03.20 仙台
- ② 樋口美栄子、花田耕介、吉積毅、堀井陽子、川島美香、松井敬子、清水みなみ、松井南 Functional analysis of short open reading frames (sORFs) in plants 第33回日本分子生物学会 2010.12.07 横浜
- ③ Rebecca Lyons, Kousuke Hanada, Mieko Higuchi, Minami Matsui and Ken Shirasu. "Novel small open reading frames which regulate plant immunity" Plant Science Communications 2010.11.16 Okazaki Japan
- ④ Mieko Higuchi, Yoko Horii, Mika Kawashima, Keiko Matsui, Kousuke Hanada, Minami Matsui Functional analysis of short open reading frames (sORFs) in plants. 21st International Congress on Arabidopsis Research 2010.06.06 Yokohama
- ⑤ Kobayashi M, Kondou Y, Higuchi M, Ichikawa T, Matsui M, Japanese resource project on Arabidopsis - outlines and introduction of FOX lines. 21st International Congress on Arabidopsis Research 2010.06.06 Yokohama
- ⑥ Rebecca Lyons, Kousuke Hanada, Mieko Higuchi, Minami Matsui and Ken Shirasu "Flagellin-triggered induction of novel small open reading frames" 21st International Conference on Arabidopsis Research 2010.06.06 Yokohama
- ⑦ 堀井陽子、樋口美栄子、近藤陽一、松井敬子、川島美香、加藤茉紗美、眞鍋勝司、花田耕介、松井南既知遺伝子間隙に存在する short open reading frames (sORFs) の機能解析 第51回植物生理学会 2010.03.18 熊本
- ⑧ Higuchi M, Hanada K, Kondou Y, Sakai T, Horii Y, Kawashima M, Matsui M. Expression analysis of short open reading frames (sORFs) in Arabidopsis by custom microarray 20th International Conference on Arabidopsis Research 2009.06.30 Edinburgh

[図書] (計 4 件)

- ① Higuchi M, Matsui M. (2013) Screening for gene function using the FOX (Full-length cDNA Overexpressor gene) hunting system. Methods in Molecular Biology. The Humana Press Inc (in press)
- ② Higuchi M, Kondou Y, Mori M, Ichikawa T, Matsui M. (2012) Characterization of rice genes using heterologous full-length cDNA expression system. Methods in Molecular Biology. The Humana Press Inc 847: 75-90
- ③ Kondou Y, Higuchi M, Ichikawa T, Matsui M. (2011) Application of full-length cDNA resources to gain-of-function technology for characterization of plant gene function. cDNA libraries, Methods in Molecular Biology, The Humana Press Inc. 729: 183-197
- ④ Higuchi M, Kondou Y, Ichikawa T, Matsui M. (2010) Full-length cDNA overexpressor gene hunting system (FOX hunting system), Plant Reverse Genetics, Methods in Molecular Biology. The Humana Press Inc. 678: 77-89

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

名称 :  
発明者 :  
権利者 :  
種類 :  
番号 :  
出願年月日 :  
国内外の別 :

○取得状況 (計 0 件)

名称 :  
発明者 :  
権利者 :  
種類 :  
番号 :  
取得年月日 :  
国内外の別 :

[その他]

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

樋口 美栄子 (HIGUCHI MIEKO)

独立行政法人理化学研究所・植物ゲノム機能  
研究グループ・特別研究員

研究者番号：40443014