

平成30年6月18日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15H04628

研究課題名(和文) カウンターストレス装置としてのRNA顆粒による相反mRNA抑制の解析

研究課題名(英文) Analysis of mRNA fates with exclusive function mediated by RNA granules

研究代表者

渡邊 雄一郎 (Watanabe, Yuichiro)

東京大学・大学院総合文化研究科・教授

研究者番号：60183125

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 12,000,000円

研究成果の概要(和文)：植物が高温などのストレスを受けた際、細胞内に現れるRNA顆粒-Pボディーとストレス顆粒について、ストレス耐性を付与する機能との関連を解析した。ストレス高温処理直後から、分単位で見られる非常に早い変化であった。DCP1によるPボディーは平常時から存在し、DCP2がそこに集結、ストレス顆粒はそれとは独立に形成されるが、P-ボディーと離合集散する構造として観察された。ストレス耐性の際増加するmRNA、不安定化するmRNA種類はそれぞれ7-8,000種。Pボディーを構築するタンパク質や含まれるRNA種を解析した。mRNAプロファイルの変化に関連している顆粒としてP-ボディーを捉えることができた。

研究成果の概要(英文)： We have studied dynamic changes of P-bodies and stress granules (SG) in Arabidopsis before and after heat stress application. DCP2 (decapping enzyme 2; P-body marker) began to accumulate to cytoplasmic granules preformed by DCP1, while eIF4A2 (SG marker) started to form granules independently from DCP1/2. SG often came close to P-bodies over time, and some time later it detached the contact with P-bodies. We also analyzed the RNA species of which levels were elevated and those lessened after temperature rises. It turned out that almost 7000 RNA species increased and almost the same number of RNA species decreased by heat stress. It meant that 30% of total genes were transcriptionally activated while another 30% of mRNAs were specifically destabilized. When the temperature returned normal, about half member of each gene set showed reciprocal pattern in accumulation. The phosphorylation level of DCP1 reflects the rise of temperature and is likely to be involved in DCP2 accumulation.

研究分野：植物分子生物学・環境応答論

キーワード：植物 mRNA制御 環境応答 高温ストレス ストレス顆粒 P-ボディー RNA顆粒 シロイヌナズナ

1. 研究開始当初の背景

植物は移動することができない。その中で環境変化を受けても生き延びるすべをもっている。しかしどのように耐えているかなど、その実態がほとんど不明なままであり、従ってその能力を最大限引き出す方策も知られていないのが実情である。昨今地球環境の変動が指摘され、環境変化によって農業現場でのさまざまな生産性が低下する、品質が低下するなどの問題が指摘され、問題解決の方策の立案が待たれている。

環境変化が起こった際、変化に抵抗する上で新規な mRNA の転写、新たなタンパク質を発現することが、モデル植物シロイヌナズナやイネ、さらに農作物でも知られている。細胞内で起こることを想像してみると、環境変化が起こる前から多くの mRNA が存在しており、ストレス応答のためには相反する機能をもった mRNA も存在したままであると思われる。あとからストレスに抵抗する遺伝子 mRNA が発現しても、何らかの機構がないと“薄まって”ストレス耐性に機能する新たな遺伝子 mRNA が効率よく翻訳にまわらないことが予想される。環境変化応答遺伝子が機能発現する際の大きなパラドックスである。植物においても RNA 顆粒である P-ボディーが環境変化の際に細胞内に現れることから状況に対応する機構として関与することが示唆されてきており、その検証が待たれていた。

最後、野外での作物生産への指針と繋がるような知見を得ることを目的とした。

2. 研究の目的

動物や酵母では、迅速に効率よく植物がストレスに対応し機能する細胞内構造として、1 μm 前後の大きさを持つ RNA 顆粒である P-ボディー、あるいはストレス顆粒(SG) が関与することが示唆されていた。我々の事前の解析で植物でも P-ボディー、ストレス顆粒(SG) 双方が存在することがわかっていった。双方の構造の詳細、構造の異同も含めて、その機能を

解析することを目指した。本研究に入る前に、その可能性を検討するため、それぞれ報告されているマーカーを発現する植物体を最初の段階で作成した。次にそれらを利用して高温などのストレス応答と RNA 顆粒の挙動解析、そして発現する遺伝子、mRNA の制御への関与について解析することを目指した。

高温ストレスに注目し、耐性のために新たな mRNA が発現した際に、その機能と相反する mRNA が働かないようにする機構として RNA 顆粒が関与する可能性の検討を行う。総合的な解析を通じて、P-ボディーあるいはストレス顆粒とストレス応答能力との関連を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

植物が環境応答をする過程でしめす遺伝子発現のパターン変化の機構について、細胞内で見出された RNA 顆粒についてストレス耐性と関連した詳細な時間軸に沿った記述を行った。我々は環境変化が加わった際の P-ボディー、ストレス顆粒の動態観察から始めた。この P-ボディーあるいはストレス顆粒が高温ストレス応答のために関わる重要な構造体であることを示すために、温度設定を 1 ごとに細かく変えて、形成されたか否かを顕微鏡下で確認した。温度の与え方についても、過去の論文などで見られる異なる方法を 4 種試した。

P-ボディーについては構造体を生成する方法について検討し、その構成成分について MASS 解析を行った。

P-ボディーについては、構造を抗体で沈降させ、その沈殿物内にある RNA 種について解析を加えた。

ストレス耐性前後で動的に mRNA プロファイルの変化に関連している顆粒としてストレス顆粒と P-ボディーとを区別する必要があった。

動けない植物が高温などのストレスを受けた際細胞内に現れる RNA について、ストレス耐性になるための機能との関連から RNA-seq

解析を施した。ストレス環境にさらされる前後、解消後の遺伝子発現パターン変化を、RNA 顆粒の動態変化の時間軸に沿った解析を行う。

4. 研究成果

DCP1:GFP 植物あるいは *eIF4A2-GFP* 植物を用いた解析から高温処理 (22 → 40 °C) によって、P-ボディー、ストレス顆粒の数が平常時に比べて増加することを見いだした。植物に与える高温条件について、温度と処理時間を変えて、P-ボディー、ストレス顆粒ができる最低限の条件が明らかとなってきた。スライドグラスに挟む、あるいはチューブに入れたシロイヌナズナでは 34 °C を境にストレス顆粒が形成され始めることが明らかとなった。それ以下の温度では時間をかけて観察をしても確認されなかった。その温度は、植物を事前に低温処理をして温度差を大きくしても、同じ温度を境に顆粒形成の有無は決定されていた。ただ高温処理を、鉢で土に植え付けた植物で行うとストレス顆粒の形成は 41 °C まで起こらなかった。植物にとっての温度は、蒸散が起こることで“体感温度”が下がり、ストレス応答が引き起こされるのが緩和されていることが明らかとなった。言ってみれば、ストレス顆粒形成を細胞内の一種、温度センサーとすることで見出された知見である。

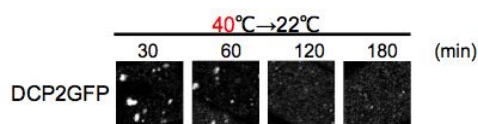
二つの顆粒はほぼ同じ温度で現れるが、それぞれを可視化した植物細胞を観察することで、別の局在を示す別の構造であること、ただし P-ボディーがストレス顆粒形成を促進し隣り合って存在していることが多いこと、さらに時間が経過すると両者が分かれていく可能性が示された。

P-ボディーは平温時にも DCP1 タンパク質によってある一定の数、構成されている。DCP1 は植物細胞内の MAP キナーゼによってリン酸化を受けることが知られ、高温ストレスではリン酸化された DCP1 の割合が増加する。それに呼応するかのように高温となると DCP2 が

集結し、P-ボディー数が増え、さらに個々の顆粒サイズが大きくなった。

さらにこの知見を受けて、DCP1 のリン酸化を受けるセリンをアラニンに置換した変異 DCP1 を発現する植物体を新たに構築した。その植物体は、高温ストレスに対して弱くなっていた。細胞内では P-ボディーを構成した際の数や大きさが野生型の DCP1 : GFP に比べて少なく小さくなった。DCP1 が高温ストレスを受けて、リン酸化を受けることが DCP2 などの構成因子を動員するレベルが変化し、P-ボディーの数、大きさを大きくすることが示唆された。

高温状態から通常温度へと戻し、“ストレスを解除”すると、P-ボディーの数はもとの平温時レベルへと戻ると同時に DCP2 も DCP1



で確認される P-ボディーから離れていく。

DCP2 が DCP1-P ボディーから離れる様子

その時 DCP1 のリン酸化レベルは前と同じ低レベルに下がっていた。ストレス顆粒を構成している *eIF4A2* も集合体を崩し、細胞質全体に拡散していく。ストレス顆粒はストレス時にのみ可逆的に現れる RNA 顆粒であることが確認された。

このように P-ボディー、ストレス顆粒が相反 mRNA に作用しカウンターストレス装置として機能している可能性を調べるために、環境変化として高温ストレスにさらされた時、取り除かれたときにどのような遺伝子発現変動があるかを調べた。

シヨ糖密度勾配遠心法により P-ボディーあるいはストレス顆粒が形成される高温ストレスを与えると、ハウスキーピング 遺伝子の mRNA が、翻訳されるポリソーム画分からこの

P-ボディー画分に移動することが明らかとなった。高温ストレスを与えて新たに転写された熱ショックタンパク質 mRNA などはポリソーム画分にあらわれた。これは環境ストレスを受けるまでに翻訳されていた mRNA (相反 mRNA) が環境変化の際に抑えられることを示唆した。

ストレスを与える前の植物、与えて 90 分後の植物体それぞれから mRNA について RNA-seq 解析を行った結果、高温ストレスの際増加する mRNA として 7535 種(a グループ RNA とする)、減少する mRNA 種は 7117 種(b グループ RNA) ほどあった。また高温を解除して 3 時間後に (高温時と比較して) 増加する mRNA として 8213 種(c グループ RNA)、減少する mRNA として 7117 種(d グループ RNA) 見出された。ゲノム中の遺伝子数を考えると、相当な割合の遺伝子の発現レベルがダイナミックに変動することが明らかとなった。この際 a グループ RNA と d グループ RNA の間で共通な RNA 種は 4411 種、 b グループ RNA と c グループ RNA の間で共通な RNA 種は 4469 種あり、温度の上下でレベル増減の位相が逆となる遺伝子が、予想通りかなり存在することが判明した。現在のところ、そうした mRNA グループ内で共通に見られるシス配列などは見出されていない。

c グループ RNA に属すものとして、全てではないがハウスキーピング遺伝子 mRNA が多い。またストレスからの回復のために必要と思われる新たな ontology に属す遺伝子 mRNA も多く見られた。ヒートショックタンパク質 mRNA のように高温ストレスをうけて発現した mRNA は d グループであり、どのようにして分解される側となるのか興味深い現象である。

実験室内の温度変化に関する応答を解析すると並行して、野外のように連続的に (1 日、季節を通じて) 温度変化する環境に置かれた植物について将来に向けて解析の必要がある。最終年度、調査を継続している圃場の

イネについて、気温日較差の大小の比較で解析をする系を検討した。

並行して行なっているゼニゴケを用いた遺伝子発現制御に関する解析が非常に多くの情報を与えてくれる実績を鑑み、ストレス応答に関係する相同遺伝子に注目した解析を開始する準備を始めた。

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 10 件)

- 1) Matsui, H., Nomura, Y., Egusa, M., Hamada, T., Hyon, G-S., Kaminaka, H., Watanabe, Y., Ueda, T., Trujillo, M., Shirasu, K., Nakagami, H. The GYF domain protein PSIG1 dampens the induction of cell death during plant-pathogen interactions. PLoS Genetics, 査読有 <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1007037> (2017).
- 2) Bowman, J.L., Kohchi, T., Yamato, K.T., (中略) Hamada, T., (中略) Watanabe, Y., Yazaki, K., Yokoyama, R., Yoshitake, Y., Yotsui, I., Zachgo, S. and Schmutz, J. (著者 113 名中 41 と 107 番目) Insights into land plant evolution garnered from the *Marchantia polymorpha* genome. Insights into land plant evolution garnered from the *Marchantia polymorpha* genome. Cell 査読有 171, 287-304. e15 (2017). DOI: [10.1016/j.cell.2017.09.030](https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.09.030)
- 3) 濱田隆宏, 渡邊雄一郎 植物における RNA 顆粒 植物科学最前線 査読有 8, 99-109 (2017). DOI: [10.24480/bsj-review.8b7.00117](https://doi.org/10.24480/bsj-review.8b7.00117)
- 4) 渡邊雄一郎 陸上植物を小分子 RNA と RNA サイレンシング機能からみたとき 生物科学 査読有 68, 196-205 (2017).

- 5) Sakaguchi, J and Watanabe, Y. Light perception in aerial tissues activates DWF4 expression in root tips and induces root growth. *Scientific Reports*. 査読有 7: 1808 (2017). DOI: 10.1038/s41598-017-01872-4
- 6) Tsuzuki, M. and Watanabe, Y. Profiling New Small RNA Sequences. In: *Plant Epigenetics: Methods and Protocols* (ed. Igor Kovalchuk, 2nd edition) 査読有 pp.177-188. (2016). Springer.
- 7) Kumakura, N., Otsuki, H., Ito, M., Nomoto, M., Tada, Y., Ohta, K., Watanabe Y. Arabidopsis AtRRP44 Has ribonuclease Activity that Is Required for Cell Viability. *Plant Biotechnology* 査読有 33, 77-85 (2016). DOI: 10.5511/plantbiotechnology.16.0316a
- 8) Bowman, J., Araki, T., Arteaga-Vazquez, M., Berger, F., Dolan, L., Haseloff, J., Ishizaki, K., Kyoizuka, J., Lin, S-S., Nagasaki, H., Nakagami, H., Nakajima, K., Nakamura, Y., Ohashi-Ito, K., Sawa, S., Shimamura, M., Solano, R., Tsukaya, H., Ueda, T., Watanabe, Y., Yamato, K., Zachgo, S., Kohchi, T. The naming of names: guidelines for gene nomenclature in *Marchantia* *Plant Cell Physiol*. 査読有 57: 257-261 (2016) doi:10.1093/pcp/pcv193
- 9) Tsuzuki, M., Nishihama, R., Ishizaki, K., Kurihara, Y., Matsui, M., Bowman, J.L., Kohchi, T., Hamada, T., Watanabe, Y. Profiling and characterization of small RNAs in the liverwort, *Marchantia polymorpha*, belonging to the first diverged land plants. *Plant Cell Physiol*. 査読有 57: 359-372 (2016) doi:10.1093/pcp/pcv182 .
- 10) Motomura, K., Le, Q.T-N., Hamada, T., Kutsuna, N., Mano, S., Nishimura, M., Watanabe, Y. (2015) Diffuse DCP2 Accumulates in DCP1 Granules under Heat Stress in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol*. 査読有 56, 107-115. doi:10.1093/pcp/pcu151
- 〔学会発表〕（計9件）
- 1) Relationships between components of cytoplasmic RNA granules and small RNA metabolism（口頭発表）. 日本植物学会第79回大会(新潟 朱鷺メッセ) Takahiro Hamada, 2015/9/16-18.
- 2) 植物におけるRNA顆粒ダイナミクス（口頭発表）. BMB2015(神戸ポートアイランド) 濱田隆宏, 2015/12/1-4.
- 3)シロイヌナズナにおけるストレス顆粒形成機構の解析.(ポスター発表).第5回植物RNAワークショップ(東京大学駒場キャンパス). 矢光真子、福澤麻里奈、佐藤繭子、亀井保博、柳川由紀、西村いくこ、豊岡公德、渡邊雄一郎、濱田隆宏. 2016/1/8-9
- 4) Communication between nucleus and cytoplasm through RNA-interacting proteins.（口頭発表）. 第57回日本植物生理学会年会(盛岡、岩手大学) Yuichiro Watanabe, Takahiro Hamada 2016/3/18-20
- 5) RNA granules network in Arabidopsis.（口頭発表）. 第一回RNA顆粒・RNAタンパク質複合体研究会.(岡崎コンファレンスセンター) 濱田隆宏, 2016.7.
- 6) シロイヌナズナの熱ストレス時におけるストレス顆粒の解析(ポスター発表). 第一回RNA顆粒・RNAタンパク質複合体研究会.(岡崎コンファレンスセンター). 矢光真子、福澤麻里奈、佐藤繭子、亀井保博、柳川由紀、西村いくこ、豊岡公德、渡邊雄一郎、濱田隆宏、2016.7.
- 7) 免疫電子顕微鏡を用いた植物ストレス顆粒の解析（ポスター発表）. 日本植物学会第80回大会(沖縄宜野湾市コンベンションセンター) 矢光真子、福澤麻里奈、佐

藤繭子、亀井保博、柳川由紀、西村いく
こ、豊岡公德、渡邊雄一郎、濱田隆宏
2016.9.16-19

- 8) 温度変化に应答した微小管ダイナミクス
(口頭発表)日本植物学会第81回大会(千
葉県野田市東京理科大学) 濱田隆宏
2017/9/8-10。

- 9) Lessons from biotic and abiotic stress studies
(口頭発表). シンポジウム 作物の持続的安
定生産を目指した病害虫管理技術開発の展望
(つくば市、農林水産技術会議事務局筑波産
学連携支援センター) Yuichiro Watanabe
2017/9/29

〔図書〕(計 2 件)
植物学の百科事典 日本植物学会編 (分担
執筆) 丸善出版 2016 年

理系総合のための生命科学 第4版 東京大
学生命科学教科書編集委員会編集 羊土社
2018 年

〔その他〕
ホームページ等
<http://park.itc.u-tokyo.ac.jp/RNAwatanabe/study.html>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

渡邊 雄一郎 (WATANABE YUICHIRO)
東京大学・大学院総合文化研究科・教授
研究者番号: 60183125

(2) 研究分担者

濱田 隆宏 (HAMADA TAKAHIRO)
東京大学・大学院総合文化研究科・助教
研究者番号: 20452534

(3) 連携研究者

佐藤 正直 (Sato Masanao)
北海道大学・大学院農学研究科・助教
研究者番号: 20517693

岡本 晃充 (Okamoto Akimitsu)
東京大学・先端科学技術研究センター・教
授
研究者番号: 60314233

(4) 研究協力者

()