

令和元年6月13日現在

機関番号：14603

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2018

課題番号：16K18569

研究課題名(和文)植物細胞増殖を制御する転写RNA代謝カップリング機構の解明

研究課題名(英文)Elucidation of coupled regulation of transcription-RNA metabolism for plant cell potency

研究代表者

大谷 美沙都(Ohtani, Misato)

奈良先端科学技術大学院大学・先端科学技術研究科・助教

研究者番号：60435633

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、植物の器官再生を制御する新たな分子機構の解明を目指し、遺伝子発現制御の要であるRNA(リボ核酸)の生合成と代謝に着目した研究を行った。その結果、植物の器官再生に関わる新たな転写因子(RNAの生合成を担うタンパク質)としてCPNDを見出すことに成功し、これまで報告されてきたRNA代謝異常による器官再生阻害が、このCPNDを介して起こっていることを明らかにした。これは、特定の転写因子を介した転写-RNA代謝のカップリング制御が植物の器官再生に重要であることを初めて示す重要な成果であった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、植物の器官再生の分子機構において、これまで想定されてこなかった転写RNA代謝のカップリング制御という全く新しい視座をもたらすという点で、学術的に非常に意義高いものとなった。さらに、クローン増殖技術向上につながる分子育種ターゲットを多く見出すことに成功しており、産業技術開発への高い貢献が見込まれることから、社会的にも一定以上の意義をもつ研究成果となったと考えている。

研究成果の概要(英文)：The high organ regeneration ability of plants is an industrially important trait that has long been used for clonal propagation of useful plants (cuttings, grafts, etc.). To elucidate new molecular mechanisms that control organ regeneration in plants, in this study, we focused on the biosynthesis and metabolism of RNA (ribonucleic acid), which is the key molecule for gene expression regulation. As a result, we successfully identified a new transcription factor (responsible for RNA biosynthesis), named CPND. Our data suggested that the inhibitory effects of abnormal RNA metabolism on organ regeneration would be occurred via an overexpression of CPND. Together, this work provided the big achievement to show that the coupling control of transcription-RNA metabolism through a specific transcription factor is crucial for organ regeneration in plants.

研究分野：植物分子遺伝学

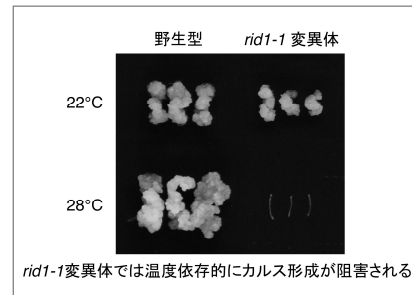
キーワード：RNA代謝 転写制御 植物 細胞増殖 器官再生

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

植物の高い器官再生能力は、有用植物のクローン増殖等に利用される産業的にも重要な形質である。研究開始当初の知見として、器官再生は通常発生プログラムの柔軟な運用によって達成されていることが分かり始めていたが、しかしながら、なぜ植物がこうしたプログラムを状況に合わせて部分的に開始・停止しうるのか、その基盤となっている分子機構の実体については、理解が十分とはいえなかった。

一方で、研究代表者は、脱分化(カルス形成)や器官再生に温度感受的異常を示すシロイヌナズナ変異体(*srd2-1*や*rid1-1*; 右図)を用いた研究を行っていた。研究成果として、既にSRD2はsnRNA(small nuclear RNA)と呼ばれる低分子RNAの転写因子を、RID1はRNAヘリカーゼをコードしていることを突き止め、snRNAとRID1の共通分子機能であるpre-mRNAスプライシング制御こそが、植物細胞の脱分化や器官再生が正常に起こるために重要な素過程であることを明らかにしていた(Ohtani and Sugiyama, 2005; Ohtani et al., 2013)。さらにこうした活性の要求度は植物発生過程によって異なっており、とくに側根形成や葉の形態形成、生殖などで必要とされること(Ohtani et al., 2008, 2011)、脱分化で必要とされる活性は芽生えの発生で必要とされる活性よりも高いこと(Ohtani et al., 2015)も明らかにし、植物におけるRNA代謝制御の重要性を示すことに成功していた。



*rid1-1*変異体では温度依存的にカルス形成が阻害される

こうした研究の中で、スプライシング異常変異体を用いた脱分化過程におけるゲノムワイドトランスクリプトーム解析の結果から、変異体中で発現レベルが異常亢進する興味深い転写因子を見出していた。この発現異常はRNA代謝制御異常からは直ちに説明できない現象であり、植物の柔軟な細胞増殖・分化制御に関わる転写とRNA代謝の新たなカップリング制御機構の存在を示唆するデータであった。

2. 研究の目的

上記の背景をもとに、本研究では、「植物の柔軟な細胞増殖制御を可能にしている転写-RNA代謝のカップリング機構の解明」を目的として研究を行った。具体的には、

- 植物細胞はmRNA代謝異常をどのように情報化しているのか
- 転写-RNA代謝カップリングは細胞増殖制御とどのようにリンクしているのか

について、シロイヌナズナ突然変異体とRNA代謝阻害剤を材料としたRNA代謝および転写制御解析を軸とし、転写-RNA代謝制御のカップリング機構について、分子レベルの新規知見の獲得を目指した。

3. 研究の方法

研究目的達成のため、RNA代謝に関わるシロイヌナズナ変異体やスプライシング阻害剤を用いて、以下の解析を行った。

- (1) RNA代謝異常のセンシングと分子情報化の実態解明: RNA代謝異常誘導剤によるmRNAプロセッシング異常の解析、および、RNA代謝異常シグナリングに関わると推定される転写因子CPND(CELL POTENCY-RELATED NAC DOMAIN)の機能解析
- (2) 転写-RNA代謝カップリング制御と細胞増殖制御のリンクの解析: CPND下流ターゲット遺伝子の同定とその機能解析

4. 研究成果

(1) RNA代謝異常のセンシングと分子情報化の実態解明

pre-mRNAスプライシング阻害剤添加実験によって、スプライシング阻害がシロイヌナズナ胚軸の脱分化を濃度依存的に阻害することを明らかにした。さらに、スプライシング異常応答性転写因子CPNDの機能欠損変異体*cpnd*を用いた実験から、こうしたスプライシング阻害剤による脱分化阻害効果がCPNDを介して起こっていることを遺伝学的に突き止めた。

pre-mRNAスプライシング阻害剤を含む各種細胞ストレス誘導剤をシロイヌナズナ芽生えに添加し、スプライシング動態を調べた結果、NO代謝やATP代謝、また葉緑体の機能をかく乱する薬剤がスプライシングパターンに強い影響をもたらすことが明らかになった。さらに、こうした異常の一部は、重要なスプライシング制御分子である小分子ノンコーディングRNA、snRNAの蓄積量の変化と連動していることも分かり、細胞ストレスがsnRNA(あるいはsnRNP)レベルを介してmRNA代謝に影響する可能性を示すことに成功した。

(2) 転写-RNA代謝カップリング制御と細胞増殖制御のリンクの解明

スプライシング異常応答性転写因子CPNDの誘導的過剰発現体を用いたRNA-seq解析を行い、CPND下流因子候補を多数単離した。さらに*srd2-1 cpnd*および*rid1-1 cpnd*二重変異体を作製し、これらを用いたqRT-PCR解析から、これら下流因子遺伝子の発現異常を実験的に確かめた。これによって、*srd2-1*および*rid1-1*における細胞増殖再開異常が、CPNDを介して起こっているという仮説が改めて支持された。さらにCPNDホモログ転写因子であるCPNL(CPND-like)もスプライシン

グ阻害によって発現誘導されることを明らかにし、スプライシング異常の下流ではCPNDやCPNLといった複数の転写因子による転写調節が起こった結果、細胞増殖が阻害される可能性を見出した。

以上の結果から、本研究成果によって、植物の細胞増殖・分化能を制御する新たな分子メカニズムとして、転写-RNA代謝制御フィードバック機構が存在していることを示すことに成功した。これは植物生理学的に重要な新規知見であるだけでなく、植物クローン増殖技術向上につながる新たな分子育種ターゲットとしても非常に有用な成果であった。すなわち、本研究成果は将来的なクローン増殖をベースとした各種産業の活性化に繋がるシーズとなることが期待され、社会的にも一定以上の貢献を果たしたと考えている。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計7件、全て査読あり)

Ohtani M (2018) Plant snRNP biogenesis: a perspective from the nucleolus and cajal bodies. *Frontiers in Plant Science*, 8: 2184. 10.3389/fpls.2017.02184

Tabara M, Ohtani M, Kanekatsu M, Moriyama H, Fukuhara T. (2018) Size distribution of small interfering RNAs in Various organs at different developmental stages is primarily determined by the dicing activity of Dicer-like proteins in plants. *Plant and Cell Physiology*, 59: 2228-2238. doi: 10.1093/pcp/pcy144

Nakano T, Tanaka S, Ohtani M, Yamagami A, Takeno S, Hara N, Mori A, Nakano A, Hirose S, Himuro Y, Kobayashi M, Kushiro T, Demura T, Asami T, Osada H, Shinozaki K. (2018) FPX is a novel chemical inducer that promotes callus formation and shoot regeneration in plants. *Plant and Cell Physiology*, 59: 1555-1567. doi:10.1093/pcp/pcy139

Ohtani M (2017) Transcriptional regulation of snRNAs and its significance for plant development. *Journal of Plant Research*, 130: 57-66. doi:10.1007/s10265-016-0883-3

Sawano H, Matsuzaki T, Usui T, Tabara M, Fukudome A, Kanaya A, Tanoue D, Hiraguri A, Horiguchi G, Ohtani M, Demura T, Kozaki T, Ishii K, Moriyama H, Fukuhara T (2017) Double-stranded RNA-binding protein DRB3 negatively regulates anthocyanin biosynthesis by modulating *PAP1* expression in *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Plant Research*, 130: 45-55. doi: 10.1007/s10265-016-0886-0

大谷美沙都 (2017) 植物の器官再生における RNA 代謝制御の役割. *生物科学*, 68: 240-249. http://www.ruralnet.or.jp/seibutsu/068_04.htm

大谷美沙都 (2017) pre-mRNA スプライシングが制御する植物の発生・環境応答・器官再生. *BSJ-Review*, 8B: 80-98. doi: 10.24480/bsj-review.8b6.00116

〔学会発表〕(計28件)

Ohtani M. Possible “RNA processing checkpoint” for cell potency regulation in plants. *Post-transcriptional Gene Regulation in Plants 2019 Nara*(招待講演). 2019年

Ohtani M. Crosstalk between pre-mRNA splicing and transcription for the cell potency regulation in plants. *JTPB2019*(招待講演). 2019年

Ohtani M. Possible “RNA processing checkpoint” for cell potency regulation in plants. *Japan-Australia RNA 2018*(招待講演). 2018年

畑中 優佳、高橋 洋和、大谷美沙都. 植物の細胞ストレス応答を制御するRNA代謝制御. 第41回日本分子生物学会年会. 2018年

大谷美沙都. 植物細胞の増殖・分化能を制御するRNA代謝制御系. 富山RNA倶楽部(招待講演). 2018年

大谷美沙都. “RNAの海”で舵をとれ:細胞分化能を支えるRNA代謝制御. 第82回日本植物学会年会. 2018年

花本修一, 出村拓, 大谷美沙都. シロイヌナズナRNAヘリカーゼ遺伝子ESP3/RSW12の胚軸脱分化時における分子機能解析. 第82回日本植物学会年会. 2018年

畑中優佳、廣山涼子、出村拓、大谷美沙都. 植物の環境ストレス応答におけるsnRNAキャプトリメチル化の役割. 第82回日本植物学会年会. 2018年

石澤未来, 橋本佳世, 大谷美沙都, 松井南, 奈良久美. シロイヌナズナの光によるRNAスプライシングの調節と根毛形成促進との関連性の検討. 第82回日本植物学会年会. 2018年

向井麻衣, 畑中優佳, 花本修一, 出村拓, 大谷美沙都. 植物細胞の分化能制御におけるRNAプロセッシングチェックポイントの可能性. 第20回RNA学会年会. 2018年

畑中優佳, 廣山涼子, 出村拓, 大谷美沙都. 植物の環境ストレス応答におけるsnRNAキャプトリメチル化の役割. 第20回RNA学会年会. 2018年

花本修一, 出村拓, 大谷美沙都. シロイヌナズナPrp2様DEAH-ボックス型RNAヘリカーゼESP3/RSW12の機能解析. 第20回RNA学会年会. 2018年

Hiroshima R, Hatanaka Y, Demura T, Ohtani M. snRNA cap hypermethylation: a new key regulatory step of gene expression for plant development and environmental response.

第 59 回日本植物生理学会年会（招待講演）. 2018 年

大谷美沙都. 植物の高い器官再生能力を支える分子機構～あらたなクローン増殖技術の展開を探る～. 岡山大学資源植物科学研究所 作物イノベーション研究ワークショップ. 2018 年

大谷美沙都. 植物の分化全能性研究から見えてきた RNA 代謝と転写のクロストーク. ConBio2017 シンポジウム「富澤純一先生メモリアル 分子生物学の原点から未来は見えるか」(招待講演). 2017 年

向井麻衣, 出村拓, 大谷美沙都. pre-mRNA スプライシング制御と脱分化制御をつなぐ新規転写因子 CELL POTENCY-RELATED NAC-DOMAIN PROTEIN の機能解析. 第 7 回植物 RNA 研究ネットワークシンポジウム. 2017 年

花本修一, 出村拓, 大谷美沙都. シロイヌナズナ Prp2 様 DEAH-ボックス型 RNA ヘリカーゼ遺伝子群の機能解析. 第 7 回植物 RNA 研究ネットワークシンポジウム. 2017 年

畑中優佳, 廣山涼子, 出村拓, 大谷美沙都. 植物の環境ストレス応答における snRNA キャップトリメチル化の役割の解明. 第 7 回植物 RNA 研究ネットワークシンポジウム. 2017 年

大谷美沙都. 植物細胞が分裂をためらう理由～脱分化を制御する RNA 代謝と転写のカップリング制御～. 日本植物学会第 81 回大会(招待講演). 2017 年.

向井麻衣, 佐野亮輔, 出村拓, 大谷美沙都. 植物細胞の脱分化制御に関わる新規転写因子の解明. 日本植物学会第 81 回大会. 2017 年

21 大谷美沙都, 向井麻衣, 佐野亮輔, 出村拓. 植物細胞の増殖・分化能制御における RNA プロセシングと転写のクロストーク. 第 58 回日本植物生理学会. 2017 年.

22 高瀬めぐみ, 鈴木孝征, 大谷美沙都, 伊藤正樹. RNA 代謝異常と細胞周期抑制を結ぶ新規チェックポイント機構の存在の可能性. 第 58 回日本植物生理学会. 2017 年.

23 田原緑, 大谷美沙都, 森山裕充, 福原敏行. 器官特異的な DCL3, DCL4 による siRNA 生成活性の解析. 第 58 回日本植物生理学会. 2017 年.

24 Ohtani M, Inoue M, Demura T. Feedback regulation between pre-mRNA splicing quality and transcription is critical for plant cell totipotency. Post-transcriptional Gene Expression Regulation in Plants 2016. 2016 年.

25 大谷美沙都. 植物細胞の増殖・分化を制御する多層的遺伝子情報発現制御に関する研究. 日本植物学会第 80 回大会. 2016 年.

26 大谷美沙都. mRNA 品質管理機構のシュート再生における役割の解明. 第 6 回植物 RNA 研究者ネットワークシンポジウム. 2016 年.

27 井上雅, 春山誠, 杉山宗隆, 出村拓, 大谷美沙都. snRNA 転写活性化因子 SRD2 の発現制御機構の解明. 第 6 回植物 RNA 研究者ネットワークシンポジウム. 2016 年.

28 向井麻衣, 出村拓, 大谷美沙都. 植物細胞の脱分化制御に関わる新規転写因子の解析. 第 6 回植物 RNA 研究者ネットワークシンポジウム. 2016 年.

〔その他〕

国際会議「Post-transcriptional Gene Regulation in Plants 2019 Nara」2019 年 3 月 18-20 日（奈良市）開催主宰者（Chair）

6. 研究組織

(1) 研究分担者

なし

(2) 研究協力者

研究協力者氏名：出村 拓（奈良先端科学技術大学院大学）

ローマ字氏名：Taku Demura (Nara Institute of Science and Technology)

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。