

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2008～2010

課題番号：20370019

研究課題名(和文) RNA レベルでの遺伝子発現制御からみた植物の体制維持の理解

研究課題名(英文) Analysis of plant body maintenance through gene regulation mediated by intracellular small RNAs

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

研究成果の概要(和文)：

植物の発生、環境応答に大きな寄与が示されている小分子 RNA の機能発現を、関与するタンパク質性因子に注目した形で発現部位、局在、相互作用、動きについての解析をおこなった。miRNA, siRNA さらに植物固有に見られる tasiRNA の生合成、機能発現部位についての基本情報を得ること、さらに今後につながる研究材料の構築をすることができた。細胞質に小分子 RNA による機能発現の場として、Processing Body と SGS3/RDR6 body を見いだした。

研究成果の概要(英文)：

It is now widely accepted that small RNAs play important roles in regulation of plant development and various responses to environmental changes. We have analyzed protein factors that are involved in small RNA biogenesis and/or action focusing on their expression pattern, intracellular localization, intermolecular interaction and movement. The information obtained in this research project provided us wider understanding of basic knowledge leading to future research and useful molecular tools, for instance, transgenic plant lines, antibody against important factors. We discovered and observed the intracellular behaviors of processing bodies and newly coined SGS3/RDR6 bodies.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	7,400,000	2,220,000	9,620,000
2009年度	3,700,000	1,110,000	4,810,000
2010年度	3,000,000	900,000	3,900,000
年度			
年度			
総計	14,100,000	4,230,000	18,330,000

研究分野：環境応答学

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、発現制御、small RNA、RNAサイレンシング、植物ウイルス、Pボディー、細胞質顆粒、AGOタンパク質

1. 研究開始当初の背景

われわれは、世界に先駆けて植物におけるマイクロRNA(miRNA)の生成過程とそこに関与する遺伝子産物の同定に成功した(Kurihara & Watanabe, 2004)。またウイルス研究の中で植物が抵抗性状態を形成す

る際にそれと相補的な配列をもつ21塩基長ほどのsiRNAが合成されることを明らかにした。実際、ウイルスに感染した植物では、ウイルスゲノムの情報をになったsiRNAが合成されており、組織間を移行してほかの組織にウイルス耐性の状態を賦活化すること

が数多く観察されている。このように短い RNA が通常の発生、あるいは種々のストレス時に発現することが示唆されていた。本研究で RNA レベルでの遺伝子発現制御が、どのように植物の体制維持に関与しているかに注目したいと考えた。農業の場面でも利用できる意味で重要な課題であると考えた。

2. 研究の目的

こうした siRNA や miRNA(以後小分子 RNA と総称する。)が実際に細胞内で作用する場、小分子 RNA の細胞内移行・組織間移行の現象、さらにそれを可能にする補助因子の存在を基礎科学の上でも明らかにすることは非常に興味ぶかい。

miRNA を介して一度切断をうけた中間体がさらにプロセスを経て生まれる tasiRNA の存在は植物固有のものである。また tasiRNA の標的としてオーキシン応答因子 (ARF)があり、植物の発生過程への寄与も大きいと考えられる。tasiRNA の生成経路と miRNA の生成経路の比較も行う。

世界の研究動向を見極め、RNA をめぐる制御機構が植物の発生あるいはストレス応答、環境適応に関わる様子を、多面的に明らかにするのが本研究課題であった。ある状態をハイブリダイゼーションや免疫沈降法で“平均的”にみる解析するだけでなく、発生やストレス応答のなかでの確かな制御が行われる植物細胞内でのミクロの出来事や、時間軸にそった変化の様子を解析する。

われわれは、さらに終始コドンが通常的位置より前にはいった mRNA (premature termination codon; PTC)が翻訳の鋳型とならないように、こうした PTC を認識する Nonsense mediated mRNA decay (NMD)という機構が植物に存在することを世界に先駆けて報告していた (Hori and Watanabe, Plant J.2005))。研究開始当初はまったく低分子 RNA を介したサイレンシング機構と独立な RNA 制御システムと思われていた NMD 機構であるが、最近細胞質の P-body という共通の場で機能する可能性が出てきた。P-body には RISC とよばれる構造、AGO タンパク質も局在する。この場が植物の環境応答反応において果たす重要な寄与についても明らかとすることは基礎科学的に重要である。

3. 研究の方法

リアルタイムの遺伝子発現解析： 低分子 RNA が対合して負の制御をかける標的 mRNA がシロイヌナズナで数十種類、明らかとされている。これらについて、ハイブリダイゼーション、リアルタイム PCR などを持ちいて、その増減を、種々の突然変異体バックグラウンド、あるいは時間軸にそって解析をおこなう。この解析結果と、注目する環境応答の反応とを並行して記述する。

リアルタイムの生細胞内での観察： 低分子 RNA の生成や機能にかかわるいくつかの重要なタンパク質因子について、イメージング技術を駆使し、蛍光タンパク質を利用した生細胞内での細胞学的観察、複数因子同士の相互作用の有無、その動態解析を行う。特定の RNA の細胞内挙動の追跡も試み、RNA と関連因子であるタンパク質とのダイナミックな関係を、時間軸にそって詳細に解析する。P-body の環境応答における存在意義： 最近われわれが存在を明らかとした、細胞質の Processing Body (P-body)は種々の RNA を介した遺伝子発現制御の場として重要なものである。本研究では P-body に局在する DCP1, DCP2, UPF1-3, XRN4 などに注目し、細胞レベル、分子レベルでの遺伝子発現制御を介した新たな環境応答機構を明らかにする。

AGO タンパク質がもつ環境応答における意義： RNA を介した細胞質内での翻訳制御に大きく関与すると思われるのは、PIWI, PAZ という二つのドメインをもつ Argonaute とよばれるタンパク質分子である。シロイヌナズナのゲノムには AGO1-10 と名付けられた 10 個の遺伝子があり、それぞれに何らかの役割分担があると考えられる。そのなかで AGO1 はいわゆる RISC (RNA-induced silencing complex)の slicer 活性を担う。しかし、それ以外現時点において機能、生物学的役割の明らかとなったものは AGO4,7,10 にかざられていた。

4. 研究成果

tasiRNA 合成経路に関連して

植物特有の遺伝子である suppressor of gene silencing3 (SGS3)に焦点を当てた。植物ゲノム内に存在する RNA サイレncingに 関与する遺伝子産物の多くが動物のものと同じ起源をもつなかで、SGS3 は植物固有にみられる産物である。シロイヌナズナ SGS3 の変異体は葉の形態が細くなるなどの異常を示し、さらに一部のウイルスに対し抵抗性が低下する。先行研究により、SGS3 はウイルス由来の RNA や、内在性の TAS 遺伝子を前駆体とする tasiRNA の生合成に関わり、その tasiRNA を介したサイレンシング機能によって形態形成やウイルス防御に関与することが明らかとなっていた。SGS3 は RNA dependent RNA polymerase6 (RDR6)と協働して small RNA を合成する。この 2 つの遺伝子産物 (SGS3 と RDR6) の関与はこれまで遺伝的に示されている。今回 SGS3 を mCherry と融合した形、RDR6 は GFP と融合した形でクローニングし、*Nicotiana benthamiana* タバコに Agroinfiltration によって導入し、発現をさせた。その結果双方の発現に成功し、両タンパク質が細胞質中でドット状に共局在した。

さらに BiFC (bimolecular fluorescent complementation) 法をもちいて、この 2 つの分子の相互作用を検出することもできた。また SGS3 と RDR6 の局在はこれまで報告のあった mRNA の分解や貯蓄を担う RNA サイレンシングの場である Processing-body (P-body) や、ミトコンドリア、色素体などのオルガネラとも異なる新規な構造体であることから SGS3/RDR6-body と名付けた。現在、この構造体の一般性、TAS RNA の存在を示す解析を行っている。

一過的発現による SGS3/RDR6 ボディーの解析を継続した。さらに、自然に近い状態での SGS3, RDR6 の局在、挙動を明らかとするために、蛍光タンパク質と融合した遺伝子構築をおこない、それぞれの変異体 *sgs3*, *rdr6* に相補した植物を作成した。植物体をラインとして確立しつつある。

RISC-AGO1 に関して

AGO1-Flag を発現する形質転換体を用いて、免疫沈降法により AGO1 と結合するタンパク質の探索を行った。免疫沈降によって得られたタンパク質群を電気泳動にかけ、特異的なタンパク質バンドを質量分析にかけた結果、候補タンパク質を検出している。そこで得られた部分配列から、シロイヌナズナのタンパク質 10 種類ほどを同定した。これらから 3 つの遺伝子に絞り、解析をおこなった。それぞれの遺伝子を蛍光タンパク質と融合させた形でクローニングを行った。アグロインフィルトレーション法を用いて *Nicotiana benthamiana* タバコに発現させ、細胞内局在を蛍光顕微鏡で観察した。いずれのタンパク質ともに細胞質に存在する顆粒に局在がみとめられた。P-body マーカーである DCP1 との共発現について詳細に観察すると、完全に重なる局在を示すもの 2 種、一部重なるものが 1 種であった。小分子 RNA の生成、機能発現に関わる因子についての解析のために、種々の因子タンパク質に対する抗体を作成した。組織染色でも使える AGO1 に対する抗体を得ることができた。野生型の植物組織を固定して、AGO1 の局在を網羅的に調べることが可能となった。

P-body の実体解析: 一過的な発現ではなく、ナチュラルに近い状態での発現をさせた形での P-body 可視化をめざし、*DCP2* 遺伝子のプロモーターに、GFP を融合した *DCP2* 遺伝子を連結し、*dcp2* 変異体を相補した植物を作成した。その結果、P-body が通常の状態で見ることができた植物を確立することができた。現在、この植物を用いて、種々の生物学的あるいは非生物学的ストレスを与えた際の植物内の P-body の挙動を解析する系を立ち上げた。

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 8 件)

- 1) Sato, M., Tsuda, K., Wang, L., Collier, J., Watanabe, Y., Glazebrook, J. and Katagiri, F. (2010). Network modeling reveals prevalent negative regulatory relationships between signaling sectors in Arabidopsis immune signaling. *PLoS Pathogen* 6, e1001011.
- 2) Aoki, K., Yano, K., Suzuki, A., Kawamura, S., Sakurai, N., Suda, K., Kurabayashi, A., Suzuki, T., Tsugane, T., Watanabe, M., Ooga, K., Torii, M., Takahashi, H., Watanabe, Y., Kodama, M., Ichinose, Y., Kikuchi, M., Fukushima, S., Okabe, A., Arie, T., Sato, Y., Yazawa, K., Satoh, S., Ezura, H. and Shibata, D. (2010) Large-scale analysis of full-length cDNA of tomato (*Solanum lycopersicum*) cultivar Micro-Tom, a reference system for Solanaceae genomics. *BMC Genomics* 11, 210.
- 3) Kobayashi, M., Onodera, K., Watanabe, Y. and Yamashita, I. (2010) Fabrication of 3-nm platinum wires using a tobacco mosaic virus template. *Chemistry Letters*, 39, 616-618.
- 4) Kobayashi, M., Seki, M., Tabata, H., Watanabe, Y. and Yamashita, I. (2010) Fabrication of aligned magnetic nanoparticles using tobamoviruses. *Nano Letters* 10, 773-776
- 5) Tagami, Y., Motose, H. and Watanabe, Y. (2009). A dominant mutation in DCL1 suppresses the *hyl1* mutant phenotype by promoting the processing of miRNA. *RNA* 15,450-458.
- 6) Kumakura, N., Takeda, A., Fujioka, Y., Motose, H., Takano, R. and Watanabe, Y.

- (2009). SGS3 and RDR6 interact and colocalize in cytoplasmic SGS3/RDR6-bodies. *FEBS Lett.* 583, 1261-1266.
- 7) Meyers, B.C., Axtell, M. J., Bartel, B., Bartel, D.P., Baulcombe, D., Bowman, J.L., Cao, X., Carrington, J.C., Chen, X., Green, P.J., Griffiths-Jones, S., Jacobsen, S.E., Mallory, A.C., Martienssen, R.A., Poethig, R.S., Qi, Y., Vaucheret, H., Vazquez, F., Voinnet, O., Watanabe, Y., Weigel, D. and Zhu, J.K. (2008). Criteria For Annotation of Plant microRNAs. *Plant Cell* 20, 3186-3190.
- 8) Takeda, A., Iwasaki, S., Watanabe, T., Utsumi, M., and Watanabe, Y. (2008). The mechanism selecting the guide strand from small RNA duplexes is different among Argonaute proteins. *Plant and Cell Physiology* 49, 493-500.

[学会発表] (計 10 件)

- 1) 渡邊雄一郎 小分子 RNA の細胞内・細胞間移動 (2010.9.10) 日本植物学会 名古屋
- 2) 渡邊雄一郎 植物の小分子 RNA 法海とその応用の可能性 (2010.8.27) 日本 RNAi 研究会 広島
- 3) 渡邊雄一郎 植物は RNA を介してどれだけの状況判断ができるのか (2010.8.26) RNA から植物を考える シンポジウム 札幌
- 4) 渡邊雄一郎 The mechanism selecting the guide strand from small RNA duplexes is different from Argonaute proteins. (2010.3.19). PCP 論文賞講演 日本植物生理学会 熊本
- 5) Kumakura, N., Watanabe, Y. Analysis of SGS3/RDR6-body related to biogenesis of tasiRNAs and vsiRNAs. (February 22,2010). Keystone Symposium, RNA silencing mechanisms in plants. (Santa Fe, USA)
- 6) 熊倉直祐, 竹田篤史、渡邊雄一郎 Analysis of localization of SGS3 and RDR6 in RNA silencing. 日本分子生物学会 (2009.12.11) 横浜
- 7) 熊倉直祐、竹田篤史、渡邊雄一郎 植物の tasiRNA 及び vsiRNA 合成に関わる SGS3/RDR6-body の解析 日本 RNA 学会 (2009.7.27) 新潟
- 8) 田上優子、深谷雄志、本瀬宏康、渡邊雄一郎 小分子 RNA の発現制御に関わる核内因子と細胞質因子(2009.3.24) 日本植物生理学会 名古屋
- 9) 熊倉直祐、竹田篤史、高野遼、藤岡容一郎、渡邊雄一郎. Localization on SGS3 and RDR6 protein in RNA silencing. 日本分子生物学会・生化学会合同年会 (2008.12.10) 神戸
- 10) Tagami, Y., Motose, H., Watanabe, Y. Studies on factors involved in RNA silencing in *Arabidopsis thaliana* (July 24 2008) 19th International Conference on Arabidopsis Research (Montreal, Canada).

[図書](計 7 件)

- 1) Tagami, Y., Inaba, N., Watanabe, Y. Cloning new small RNA sequences. *In Plant Epigenetics*. Humana Press. 2010.
- 2) 本瀬宏康、渡邊雄一郎 改訂第三版 分子生物学イラストレイテッド 植物バイオテクノロジーと遺伝子組換え食品 2009.
- 3) 堀孝一、渡邊雄一郎 植物のナンセンス変異依存 RNA 分解(NMD)。蛋白質核酸酵素 2009.
- 4) Kurihara, Y., Watanabe, Y. Processing of miRNA precursors. *In Plant microRNA*

protocol book. Humana Press. 2009.

- 5) Hori, K., Watanabe, Y. In vivo analysis of plant nonsense-mediated mRNA decay. *In Methods in Enzymology Vol 449, RNA turnover in eukaryotes.* Elsevier. (2008)
- 6) 渡辺雄一郎 RNA 実験ノート〜 RNAi の原理とその実際 第一章 3 節 植物の microRNA 2008.
- 7) 渡辺雄一郎 RNA 実験ノート〜 RNAi の原理とその実際 第三章 5 節 RNAi の植物への応用 2008.

[その他]

ホームページ等

<http://bio.c.u-tokyo.ac.jp/labs/watanabe/index.htm>

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