

科学研究費助成事業 研究成果報告書

令和 5 年 6 月 13 日現在

機関番号：13901
研究種目：基盤研究(B) (一般)
研究期間：2020～2022
課題番号：20H03273
研究課題名(和文)植物の移行性mRNAの輸送機構および機能に関する研究

研究課題名(英文)Study on transport mechanism of mobile mRNA in plants

研究代表者

野田口 理孝 (Notaguchi, Michitaka)

名古屋大学・生物機能開発利用研究センター・准教授

研究者番号：00647927

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,500,000円

研究成果の概要(和文)：全身移行性mRNA輸送の分子機構を調べるため、シロイヌナズナと近縁種の接木を行い、シロイヌナズナ由来の移動性mRNAを同定した。得られた移動性mRNAの配列情報から移動性mRNAに存在するモチーフを独自のプログラムを用いて抽出し、全体の94%に認められる配列の抽出に成功した。トマトについても同様の方法で解析し、同様の配列がトマト移動性mRNAに認められることが分かった。同定されたモチーフ配列をGUSレポーター遺伝子に融合して、植物での移動性を調べたところ、GUS mRNAの移動性が示唆される結果を得た。以上より、植物に保存されたmRNAの移動に関与するシス配列を同定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

多細胞生物は、個々に機能分化した異なる器官、異なる組織が協調して働くことで、個体レベルの機能をより適切に発揮させていると考えられる。植物の全身性シグナル伝達は、篩管や道管を介した植物ホルモン、small RNA、mRNA、ペプチド、タンパク質等の分子送達で果たされていることが知られ、花成や栄養飢餓応答、乾燥ストレス応答等が全身的に制御されていることが明らかとなってきた。本研究では、それらの全身移行性分子のなかでも、生物学的な意義が未だに不明であるmRNAについて、その輸送の分子機構の一端を明らかとすることができ、今後の植物科学研究に意義深い成果を得ることができた。

研究成果の概要(英文)：To investigate the molecular mechanism of systemic mRNA transport, we grafted *Arabidopsis thaliana* and related species, and identified *Arabidopsis* mobile mRNAs. Using a unique program, we extracted motifs present in mobile mRNAs from the sequence information of mobile mRNAs obtained, and succeeded in extracting sequences found in 94% of the total. Tomatoes were also analyzed by the same method, and similar sequences were found in tomato mobile mRNAs. When the identified motif sequence was fused to the GUS reporter gene and its migratory behavior in plants was examined, results suggesting the mobility of GUS mRNA were obtained. From the above, we identified a cis-sequence involved in the transfer of mRNA conserved in plants.

研究分野：植物科学

キーワード：全身性シグナル伝達 移動性mRNA 移動性シス配列 RNA結合蛋白質

1. 研究開始当初の背景

(1) 生物は RNA 分子を多様に活用して細胞プロセスの基盤を形成する。DNA 複製を開始するプライマー、遺伝情報が発現する際のメッセンジャー、リボソームの触媒中心などは、RNA 分子が必要不可欠な機能を果たす例である。植物においては、RNA 分子が全身の器官をつなぐ篩管を介して長距離移行することが知られ、植物体内の情報伝達機構への寄与が予想されている。篩管を介して全身移行する RNA のうち、small RNA については遺伝子サイレンシングを引き起こし、遺伝子の発現調節に働くことが明らかにされている。しかし、蛋白質をコードする mRNA の全身移行についてはその機能は未だ明らかにされていない。

(2) これまでの当該分野の研究から、篩管中を運ばれる mRNA には生物学的意義が潜んでいることは、いくつかの視点で推察することができる。第一に、複数の植物で長距離移行性 mRNA を調べると、特定の遺伝子ファミリーの mRNA が共通して見つかることが分かり、mRNA の長距離移行は進化的に保存された現象であることが推察されている。第二に、篩管中には RNA 結合蛋白質が見つかることと、それら RNA 結合蛋白質は標的 mRNA 上の特定の配列に対して選択的に結合し、長距離移行のための RNA-蛋白質複合体を形成することから、何らかの移行制御機構が介在する現象であることが推察されている。第三に、篩管中には RNA 分解酵素の活性が検出されないことや、間接的ではあるが、植物に感染するウィルスの多くは RNA ウィルスであり、その感染は宿主植物が本来持つ RNA 輸送システムを利用しているという事実も、篩管中の RNA が機能していることを示唆する。

2. 研究の目的

本研究では、植物における移動性 mRNA の輸送機構とその生物学的意義を明らかにすることを目的とする。移動性 mRNA は複数の植物種で検出され、タンパク質をコードすることからも、現象自体に高い関心が寄せられているが、その輸送機構や機能は全くの未知であった。本研究で成果が得られれば、植物の全身的な発生統御様式の一部が新たに明らかとなる可能性がある。先行研究では、移動性 mRNA の機能に迫るべく、移動性 mRNA の網羅同定が試みられた。しかし、偽陽性の多い同定法で、移動性 mRNA の候補群から機能に関する明瞭な考察はされなかった。これに対し我々は、独自の同定手法を確立して、信頼性の高い移動性 mRNA の網羅情報を得る。バラ類のシロイヌナズナとキク類のトマトを対象に移動性 mRNA 分子群を同定し、進化的に保存された移動性 mRNA 分子を絞り込む。これらの信頼性の高い情報に基づき、移動性 mRNA の輸送の分子機構を探り、移動性 mRNA の機能理解を目指す。生物において RNA は実に多面的な機能を有し、植物に見られる移動性 mRNA 分子については「翻訳機構と輸送機構の拮抗のもと翻訳機構による認識から逃れ・組織間を長距離移行し・移行先で働く」ことが想定されるため、その制御様式の詳細を明らかにすることは RNA 研究としても意義深い。

3. 研究の方法

(1) 輸送メカニズムの探求

2 種類の植物の接木により、片側の植物に由来する mRNA がもう片側の植物の組織から検出できるかを調べることで、長距離移行する mRNA を同定することができる。シロイヌナズナに由来する移動性 mRNA の検出には、シロイヌナズナとルベラナズナの接木を適用し、トマトに由来する移動性 mRNA の検出には、トマトとベンサミアナタバコの接木を適用する。それぞれの接木試験で同定される移動性 mRNA の情報に基づいて、mRNA に移動性を付与するシス配列を同定する。

(2) 生物学的意義の探求

移動性シス配列を高度に保存した遺伝子に着目し、遺伝子機能がどのような場面で発揮されるかを、機能変異体および移動性を喪失した変異体を用いて検討する。また、移動性シス配列の情報をもとにして、植物ゲノムがどれだけの移動性 mRNA を保有するかを調べ、植物の全身移行性 mRNA について進化的側面を考察する。

4. 研究成果

(1) シロイヌナズナ穂木と近縁種ルベラナズナ台木の接木を行い、独自に用意した偽陽性の低い検出法でシロイヌナズナ穂木由来の移動性 mRNA を網羅同定した。同様にトマトでも検討し、シロイヌナズナで約 500 種、トマトで約 300 種の移動性 mRNA を同定した。

(2) 得られた移動性 mRNA の配列情報から独自に開発したスキャニングプログラムを用いて mRNA の移動性に関わるモチーフの抽出を試みた。ゲノム上の全遺伝子に由来する mRNA 配列を対象とした解析結果と、移動性 mRNA の配列を解析した際の結果を比較することで、移動性 mRNA にエンリッチする配列を同定することができた。次に、トマトで同様の抽出を行っ

たところ、やはりトマトの移動性 mRNA にエンリッチする配列を同定することができた。驚くべきことに、それらの移動性 mRNA にエンリッチする配列は、シロイヌナズナとトマトでまったく同様の配列であった。この配列は、シロイヌナズナおよびトマトにおいて、移動性 mRNA として同定された mRNA の 90% 以上に認められる配列であった。

(3) 同定された配列を GUS レポーター遺伝子の前後に付加したコンストラクトを用意し、細胞間移行するかを葉表皮へのボンバードメント法により評価した。その結果、通常の GUS レポータータンパク質は細胞自律的に働くため、ボンバードメントで導入された細胞のみで GUS 染色が起きたのに対し、GUS レポーター遺伝子に移動性 mRNA の持つ配列を付与したコンストラクトの場合は、細胞間移行して GUS 染色が複数の連続する細胞にわたって検出されることが明らかとなった (図 1)。

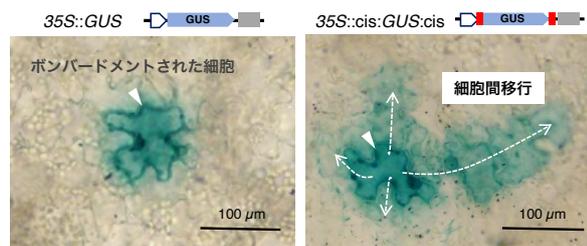


図 1

(4) さらに、移動性 mRNA として同定された遺伝子の保存配列を含む領域を、GUS レポーター遺伝子に付加したコンストラクトを用意して、ボンバードメント実験を行った。その結果、対照区として用意した GUS レポーター遺伝子単独のコンストラクトでは細胞間移行する様子は観察されないものの、移動性 mRNA として同定された遺伝子の部分配列を融合した GUS レポーター遺伝子の場合は細胞間移行する様子が観察された。そこで、移動性 mRNA の部分配列から保存配列に変異を入れたコンストラクトを用意して同様にボンバードメント実験を行ったところ、細胞間移行する様子が著しく低下することも明らかとなった。以上の結果より、同定した配列が mRNA の細胞間移行のためのシス配列として働くことが明らかとなった。

(5) 次に、葉において細胞間移行を検出した GUS レポーター遺伝子にシス配列を繋いだコンストラクトについて、そのコンストラクトを全身で過剰発現するシロイヌナズナ形質転換体を作成し、シロイヌナズナの芽生え接木であるマイクログラフティング試験に供した。レポーター遺伝子を過剰発現する形質転換体の地上部を穂木として、野生型台木の根に接木し、野生型台木の根をサンプリングして、GUS レポーター mRNA の接木部位を越えた長距離移行を調べた。その結果、GUS mRNA が野生型台木の根で検出され、穂木から台木まで長距離移行したことが示唆された。対照実験として、GUS レポーター遺伝子単独を過剰発現するシロイヌナズナ形質転換体を作成し、同様に接木試験を実施したが、そちらでは顕著な GUS mRNA の長距離移行は検出されなかった (図 2)。

A マイクログラフティング

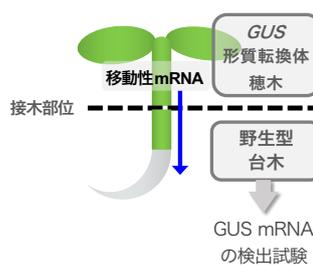
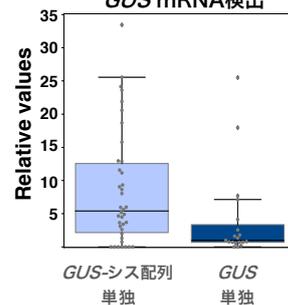


図 2

B 野生型台木における GUS mRNA 検出



(6) そこでさらに、移動性 mRNA として同定された遺伝子について、細胞間移行のためのシス配列を含む部分配列を融合した GUS レポーター遺伝子と、シス配列に変異を導入した部分配列を融合した GUS レポーター遺伝子を用意し、それぞれを発現するシロイヌナズナ形質転換体を作成して、マイクログラフティング試験に供した。野生型台木の根にそれぞれの形質転換体を接木し、野生型台木の根をサンプリングして、GUS mRNA が長距離移行したかを調べたところ、シス配列を正常に持つ部分配列を融合した場合は長距離移行し、変異を導入した場合は、その長距離移行が顕著に抑制されることが示された。以上の結果より、同定したシス配列は、mRNA の細胞間移行のみならず、全身の長距離移行にも働くことが明らかとなった。

(7) 移動性 mRNA の生物学的意義を問うため、移動性シス配列を高度に保存した 100 遺伝子をリストアップし、それらの機能変異体をリソースセンターから取り寄せて系統確立した。遺伝子機能がどのような場面で発揮されるかを推定するため、それらの変異体の表現型解析を実施した結果、成長量に影響する変異体が多く見つかり、移動性 mRNA が植物の生長生理に寄与していることが示唆された。今後、さらなる詳細な解析に取り組む。

(8) 植物の進化において、本研究で同定された mRNA の移動性シス配列の獲得がいつ頃起こったかを、各種の植物のゲノム解析によって推定した。その結果、維管束植物であるシダ植物以降にゲノム中に蓄積することが分かった。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 8件/うち国際共著 4件/うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Tsutsui, H., Kawakatsu, Y., Notaguchi M	4. 巻 11
2. 論文標題 Micrografting in Arabidopsis Using a Silicone Chip	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Bio-protocol	6. 最初と最後の頁 e4053
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kurotani Ken-ichi, Notaguchi Michitaka	4. 巻 62
2. 論文標題 Cell-to-Cell Connection in Plant Grafting Molecular Insights into Symplasmic Reconstruction	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Plant and Cell Physiology	6. 最初と最後の頁 1362 ~ 1371
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/pcp/pcab109	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -
1. 著者名 Kurotani Ken-ichi, Huang Chaokun, Okayasu Koji, Suzuki Takamasa, Ichihashi Yasunori, Shirasu Ken, Higashiyama Tetsuya, Niwa Masaki, Notaguchi Michitaka	4. 巻 9
2. 論文標題 Discovery of the interfamilial grafting capacity of Petunia, a floricultural species	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Horticulture Research	6. 最初と最後の頁 uhab056
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/hr/uhab056	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する
1. 著者名 Shimizu Kazunori, Kawakatsu Yaichi, Kurotani Ken-ichi, Kikkawa Masahiro, Tabata Ryo, Kurihara Daisuke, Honda Hiroyuki, Notaguchi Michitaka	4. 巻 17
2. 論文標題 Development of microfluidic chip for entrapping tobacco BY-2 cells	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 PLOS ONE	6. 最初と最後の頁 0266982 ~ 0266982
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pone.0266982	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

1. 著者名 Kurotani Ken-ichi, Kawakatsu Yaichi, Kikkawa Masahiro, Tabata Ryo, Kurihara Daisuke, Honda Hiroyuki, Shimizu Kazunori, Notaguchi Michitaka	4. 巻 135
2. 論文標題 Analysis of plasmodesmata permeability using cultured tobacco BY-2 cells entrapped in microfluidic chips	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Journal of Plant Research	6. 最初と最後の頁 693 ~ 701
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s10265-022-01406-8	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Adhikari Prakash Babu, Xu Qiang, Notaguchi Michitaka	4. 巻 12
2. 論文標題 Compatible Graft Establishment in Fruit Trees and Its Potential Markers	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Agronomy	6. 最初と最後の頁 1981 ~ 1981
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/agronomy12081981	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Jantean Lalita, Okada Kentaro, Kawakatsu Yaichi, Kurotani Ken-ichi, Notaguchi Michitaka	4. 巻 39
2. 論文標題 Measurement of reactive oxygen species production by luminol-based assay in <i>Nicotiana benthamiana</i> , <i>Arabidopsis thaliana</i> and <i>Brassica rapa</i> ssp. <i>rapa</i>	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Plant Biotechnology	6. 最初と最後の頁 415 ~ 420
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.5511/plantbiotechnology.22.0823a	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 該当する

1. 著者名 Kurotani Ken-ichi, Hirakawa Hideki, Shirasawa Kenta, Tanizawa Yasuhiro, Nakamura Yasukazu, Isobe Sachiko, Notaguchi Michitaka	4. 巻 64
2. 論文標題 Genome Sequence and Analysis of <i>Nicotiana benthamiana</i> , the Model Plant for Interactions between Organisms	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Plant and Cell Physiology	6. 最初と最後の頁 248 ~ 257
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/pcp/pcac168	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Huang Chaokun, Kurotani Ken-ichi, Tabata Ryo, Mitsuda Nobutaka, Sugita Ryohei, Tanoi Keitaro, Notaguchi Michitaka	4. 巻 -
2. 論文標題 Nicotiana benthamiana XYLEM CYSTEINE PROTEASE genes facilitate tracheary element formation in interfamily grafting	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Horticulture Research	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/hr/uhad072	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている(また、その予定である)	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計11件(うち招待講演 4件/うち国際学会 0件)

1. 発表者名 黒谷賢一、野田口理孝
2. 発表標題 植物体内を長距離移動するmRNAの研究
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会年会(招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 野田口理孝
2. 発表標題 個体内を移動するmRNA 研究のその後
3. 学会等名 さきかけ「情報協働栽培」成果報告会(招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 野田口理孝
2. 発表標題 接ぎ木の科学による展望
3. 学会等名 Science Cafe(招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 野田口理孝
2. 発表標題 接木の基礎研究と応用
3. 学会等名 第10回超異分野学会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 川勝弥一, 野田口理孝
2. 発表標題 マイクロ流路デバイスを用いたmiRNAの検出による 植物の栄養ストレス診断法の開発
3. 学会等名 第39回日本植物バイオテクノロジー学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Jantean L, Okada K, Kawakatsu Y, Kurotani K, Notaguchi M
2. 発表標題 Measurement of ROS production by luminol-based assay in <i>Nicotiana benthamiana</i> , <i>Arabidopsis thaliana</i> and <i>Brassica rapa</i> subsp. <i>rapa</i>
3. 学会等名 第39回日本植物バイオテクノロジー学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 川勝 弥一, 野田口 理孝
2. 発表標題 マイクロ流路デバイスを用いたmiRNAの検出による栄養ストレス診断法の 開発
3. 学会等名 日本植物学会第86回大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 川勝弥一, 野田口理孝
2. 発表標題 マイクロ流路デバイスを用いた miRNA の検出による植物栄養ストレス診断法 の開発
3. 学会等名 日本植物学会第86回大会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 野田口理孝
2. 発表標題 篩管を介した長距離シグナル伝達とリソース配分
3. 学会等名 第64回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 黒谷賢一, 平川秀樹, 白澤健太, 谷澤靖洋, 中村保一, 磯部祥子, 野田口理孝
2. 発表標題 生物間相互作用のモデル植物 <i>Nicotiana benthamiana</i> の詳細ゲノム解析
3. 学会等名 第64回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 岡田健太郎, Lalita Jantean, 黒谷賢一, 野田口理孝
2. 発表標題 活性酸素種による接木への影響
3. 学会等名 第64回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2023年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	黒谷 賢一 (Kurotani Ken-ichi) (10402778)	名古屋大学・生物機能開発利用研究センター・特任講師 (13901)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------