

令和 5 年 6 月 6 日現在

機関番号：16401

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K15814

研究課題名（和文）陸上植物に共通したmiR156/529-SPLモジュールの分子メカニズムの解明

研究課題名（英文）The study for understanding the molecular mechanism of miR156/529-SPL module conserved among land plants

研究代表者

都筑 正行 (Tsuzuki, Masayuki)

高知大学・教育研究部総合科学系生命環境医学部門・講師

研究者番号：40845616

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 3,200,000円

研究成果の概要（和文）：陸上植物の成長期移行を制御するmiR156/529-SPL転写因子モジュールの上流および下流の両方に着目し、陸上植物の成長期移行を制御する普遍的なメカニズムを同定することを目的として研究を行った。まず *in vitro* で MpSPL2 に結合したDNAを次世代シーケンシング法によって検出することができたが、シス配列の濃縮には至らなかった。一方で、対照として用いたシロイヌナズナにおけるホモログタンパク質を用いて同様の解析を行った結果、シス配列の濃縮ができた。ゼニゴケSPL2を植物体において過剰発現させることで *in vivo* で解析を試みたが、最終的には検出の成功までは至らなかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は、植物にとって共通する発生メカニズムである成長期の移行の制御に関して解明しようとするものであり、将来的な作物エンジニアリングなどの場面において、重要な分子メカニズムの一端の解明を目指したものである。結果としては *in vitro* でゼニゴケSPL2タンパク質に結合したDNAの検出を試み、タンパク質の合成および結合DNAの次世代シーケンシングによる検出を行うことができたが、下流遺伝子群の同定までは至らず、引き続き実験の条件検討が必要である。一方シロイヌナズナのホモログタンパク質を用いて下流遺伝子群を同定できたため、将来的な成長期移行メカニズム解明のための解析の基盤の整備は進んだと考える。

研究成果の概要（英文）：In this study, we focused the miR156/529-SPL transcription factor regulatory module, which controls the transition of growth phase in land plants, and aimed to understand the molecular mechanism. We performed *in vitro* protein synthesis and deep sequencing to identify the DNAs binding to the MpSPL2 in *Marchantia polymorpha*. Although the DNA sequences were identified, not clear cis regulatory motif was not obtained. On the other hand, *Arabidopsis AtSPL3* and *AtSPL9* were also tested and the DNA binding to those SPL homologs were successfully identified. The cis-regulatory motif was also detected by informatics analysis. We also tried to detect DNA by *in vivo* ChIP-seq of MpSPL2 with transformants overexpressing MpSPL2 but could not succeed in the detection. For identification of evolutionarily conserved mechanism, further studies are needed.

研究分野：植物遺伝子発現制御

キーワード：マイクロRNA 転写因子 ゼニゴケ シロイヌナズナ 遺伝子発現制御

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

陸上植物において、栄養成長期から生殖成長期の移行は普遍的に存在する発生ステップである。これまでの分子遺伝学的な解析により、外来刺激にตอบสนองした分子経路や、植物年齢依存的に移行する分子経路など様々な経路による調節を受けている。陸上植物に保存された microRNA である miR156/529 ファミリーと、その標的である SPL 転写因子ファミリーによる成長期移行の制御モジュールは、その1つである。申請者らの先行研究により、陸上植物の基部にあたるコケ植物ゼニゴケにおいて、miR156 と近い配列を持つ miR529c が SPL ファミリーに

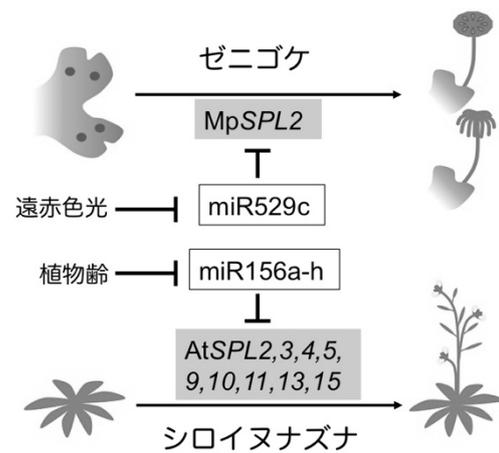


図1 陸上植物に共通したmiR156/529-SPLモジュールの成長期の移行における役割

属する MpSPL2 遺伝子の発現抑制を通じて成長期移行を制御していることが明らかになった (Tsuzuki et al. (2019) Curr. Biol. 29:3307.). 被子植物シロイヌナズナにおいては植物年齢依存的に miR156 の発現が減少し、それに対応する形で SPL 転写因子ファミリーの発現が上昇することがすでに知られていた (Poethig (2009) Curr. Opin. Gen. Dev 19:374-378.). これらの結果を比較すると、コケ植物から種子植物まで陸上植物内で miR156/529 の減少により SPL 転写因子の発現上昇が誘導され、これにより成長期が移行する仕組みが共通していることが示唆される (図1)。

この陸上植物に共通する成長期移行の仕組みに関して、miR156/529-SPL モジュールの上流と下流分子メカニズムがどうなっているかという問いが生まれた。具体的には、上流に関して、SPL 転写因子の発現を相反的に誘導する際に起こる miR156/529 の発現が減少する分子メカニズムは共通しているのか (Q1)、下流に関して、SPL 転写因子は陸上植物間で保存された特定の遺伝子を標的にしているのか (Q2)、SPL 転写因子はどのようなタンパク質をパートナーとしてはたらくのか (Q3)、という問いである。

2. 研究の目的

以上の知見を踏まえ、本研究では陸上植物の成長期移行を制御する miR156/529-SPL 転写因子モジュールの上流および下流の両方に着目し、植物年齢や外部刺激依存的に miR156/529 の発現が抑制される上流メカニズム、および SPL 転写因子が遺伝子発現を制御する共通下流分子メカニズムを明らかにすることで、陸上植物の成長期移行を制御する普遍的なメカニズムを同定する。材料としては、系統的に離れた種と考えられるシロイヌナズナとゼニゴケの両方を比較して用いることで、陸上植物に共通したメカニズムを探索する。

3. 研究の方法

本研究では、特に SPL 転写因子がはたらく分子メカニズムに着目して、それを明らかにすることを目指した。これまでに SPL 転写因子がどのような下流遺伝子を持つかは、遺伝学的に特定の遺伝子座について解析がされた報告が存在するが、ゲノムワイドな同定は未だなされていない。そこでこの疑問点を明らかにするため、クロマチン免疫沈降シーケンシング (ChIP-seq) を行い、SPL 転写因子が結合する DNA 領域を網羅的な同定を目指した。シロイヌナズナの 3 クレイド SPL からそれぞれ AtSPL3、9、10、ゼニゴケから MpSPL2 を選び、変異体背景で GFP タグ付き形質転

換体を作成し、ChIP-seq 解析から得られた DNA 領域からメタ解析を行う。まずこれまで生化学的な解析から SPL 転写因子の結合モチーフとして得られている GTAC モチーフが濃縮されているかどうかを検討した。最終的には、SPL の下流遺伝子の同定をすることで、SPL 転写因子のはたらきについてゲノムワイドな特徴を同定することを目指した。

4. 研究成果

(1) in vitro での SPL2 タンパク質の発現および結合 DNA の検出系の確立

当初予定していた in vivo ChIP 解析での SPL2 標的領域の同定の条件検討を行っていたが、ゼニゴケ SPL2 の発現量の少なさから検出が困難であった。そのため、代替となる方策として、in vitro での SPL2 タンパク質の発現および標的 DNA 候補領域の同定を行う方法に切り替えた。小麦胚芽抽出液を使用したタンパク質の in vitro 発現系による発現と、結合している DNA の検出ができる系を確立した。

(2) シロイヌナズナ SPL3 および SPL9 に関する結合 DNA 検出系の確立

シロイヌナズナ SPL の中から成長期移行に必要な SPL3 および SPL9 に着目し、(1) と同様の検出系を確立した。

(3) in vitro ChIP-seq 法による SPL 結合 DNA の網羅的検出およびインフォマティクス解析

(1) および (2) で確立した結合 DNA の検出法を用いて、in vitro ChIP-seq を行い、次世代シーケンサーを用いて網羅的に DNA 配列を解読した。その後、インフォマティクス解析により検出された配列をそれぞれのゲノム配列にマッピングし、標的領域を得た。標的領域として検出されたのは、MpSPL2 が 1456 箇所、AtSPL3 が 4807 箇所、AtSPL9 が 7367 箇所であった。

次に結合領域の配列から結合モチーフの推定を行った。その結果、AtSPL3、AtSPL9 に関しては、GTAC の SBP-box が濃縮されていたが (図 2)、MpSPL2 に関しては見られなかった。また、MpSPL2 はエキソン領域にも多く結合していたことから、非特異的な領域なのか、実際の機能部位なのかについては不明であった。



図 2 AtSPL3 の結合領域から推定されたモチーフ

以上の結果から、in vitro ChIP-seq 法によってシロイヌナズナの SPL に関しては結合領域の同定を行うことができた一方で、ゼニゴケ SPL2 に関しては、さらなる実験系の条件検討が必要である結果であった。改善点としては、SPL2 単独で発現させる in vitro 系では SPL2 本来のコンプォメーションを取れていないことなどが考えられたことから、発現量を増やした in vivo 系における検討が必要であることが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 Rothi M Hafiz, Tsuzuki Masayuki, Sethuraman Shriya, Wierzbicki Andrzej T	4. 巻 49
2. 論文標題 Reinforcement of transcriptional silencing by a positive feedback between DNA methylation and non-coding transcription	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nucleic Acids Research	6. 最初と最後の頁 9799 ~ 9808
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/nar/gkab746	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

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 3件/うち国際学会 1件）

1. 発表者名 二神和敬, 都筑正行, 渡邊雄一郎
2. 発表標題 microRNA319 標的遺伝子の進化的解析
3. 学会等名 第63回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 橋本梨乃, 都筑正行, 東山哲也, 渡邊雄一郎
2. 発表標題 シロイヌナズナの miRNA 生産におけるDICER-LIKE 1 C末端領域の重要性の再検証
3. 学会等名 第63回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 都筑正行
2. 発表標題 植物における非コード転写の機能とメカニズム
3. 学会等名 第63回日本植物生理学会年会（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Masayuki TSUZUKI
2. 発表標題 Pervasive non-coding transcription by Pol V suggesting a genome surveillance mechanism.
3. 学会等名 第44回分子生物学会大会（招待講演）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 池田ひかり，渡邊雄一郎，都筑正行
2. 発表標題 苔類ゼニゴケにおけるPol IV、Pol Vの機能解析
3. 学会等名 日本植物学会第85回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Masayuki Tsuzuki
2. 発表標題 Pervasive non-coding transcription by Pol V suggesting a genome surveillance mechanism.
3. 学会等名 2nd webinar of the IRN France-Japan Frontiers in Plant Biology : Genome dynamics and epigenetics (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 池田ひかり，都筑正行，渡邊雄一郎
2. 発表標題 ゼニゴケにおけるRNA ポリメラーゼIV、Vの機能解析
3. 学会等名 第62回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 都筑正行	4. 発行年 2020年
2. 出版社 羊土社	5. 総ページ数 147
3. 書名 実験医学2020年6月号 News & Hot Paper Digest 離れた調節因子は植物に広く保存されている	

〔産業財産権〕

〔その他〕

Researchmap https://researchmap.jp/m_tsuzuki Researchmap https://researchmap.jp/m_tsuzuki 渡邊雄一郎研究室ホームページ個人ページ http://park.itc.u-tokyo.ac.jp/RNAwatanabe/profile_3.html
--

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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------