

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 6月 5日現在

機関番号：13901

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011 ～ 2012

課題番号：23658006

研究課題名（和文）

イネのマイクロRNA 遺伝子転写機構の解明とその人工miRNA 発現への利用

研究課題名（英文） Analysis of microRNA transcription machinery and its application for artificial miRNA gene expression.

研究代表者

佐藤 豊（ SATO YUTAKA ）

名古屋大学・生命農学研究科・准教授

研究者番号：40345872

研究成果の概要（和文）：本研究では植物 miRNA 遺伝子転写機構を明らかにし、安定的な人工 miRNA の発現系を構築することを目的に実験を行った。本研究ではイネの植物特異的 DNA 依存的 RNA 合成酵素複合体遺伝子ノックダウン系統において miRNA 遺伝子の転写が減少している事およびマイクロアレー解析により細胞周期関連遺伝子など、多数の遺伝子発現が変化している事を見いだした。また、この中には遺伝子導入時の薬剤選抜マーカーも含まれていた。

研究成果の概要（英文）：The goal of this research is to understand the molecular mechanism of miRNA gene transcription in rice and to develop a system that ensure the high level of amiRNA gene expression. Using the knock down lines of genes encoding DNA dependent RNA polymerase subunit, I found that several miRNA gene expressions were decreased as well as the changes in the expression of some cell cycle regulation genes.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,000,000	900,000	3,900,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農学・育種学

キーワード：植物育種・遺伝、バイオテクノロジー

1. 研究開始当初の背景

microRNA (miRNA)をはじめとする小分子 RNA は特定の遺伝子発現を抑制する技術として医療や研究など様々な場面で利用されている。一方、植物育種など農学分野での積極的な利用はその効果が不安定なため基礎・応用の両面において立ち後れている。効果が不安定な理由は今のところ不明である。

従来 miRNA 遺伝子は RNA 合成酵素 pol II により転写されると信じられてきた。RNA 合成酵素 I ~ III (pol I ~ III)はそれぞれ主に rRNA, mRNA, tRNA 等の転写を担うことが知られている。一方、近年植物ゲノムにはこれら pol I ~ III と構造上の類似性は見られるが機能の異なる RNA 合成酵素遺伝子の存在が明らかになっている。これらの RNA 合成酵

素遺伝子は pol IV および pol V と呼ばれ、それぞれ siRNA のソースとなる RNA の転写と RNA 依存的 DNA メチル化によるエピジェネティックサイレンシングに必要である事が知られている。イネでは pol IV および pol V の largest subunit 遺伝子はそれぞれ 2 コピーで、pol IV と pol V で共有される 2nd largest subunit 遺伝子も 2 コピーである。このため、イネの pol IV と pol V には 8 通りもの subunit 構成が存在し、これらが機能分担していることも考えられる (図 1)。そこで、これらの DNA 依存的 RNA 合成酵素複合体遺伝子の miRNA 遺伝子の転写への影響を解析した。

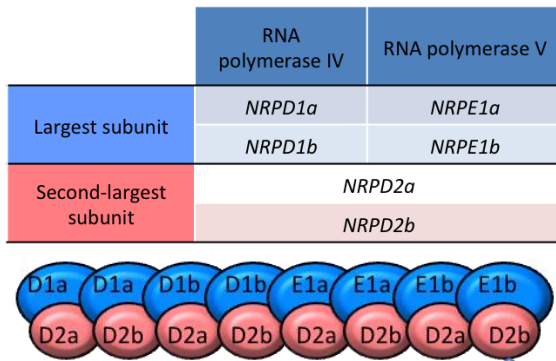


図1. イネゲノム上に6コピー存在する植物特異的DNA依存的RNA合成複合体ラージェストサブユニットおよびセカンドラージェストサブユニットをコードする遺伝子
 上段は6種の遺伝子の対応関係を表で示している。
 下段は6種の遺伝子産物がとりえる組み合わせをすべて示している。

2. 研究の目的

本研究は植物 miRNA 遺伝子転写機構を明らかにし、安定的な人工 miRNA の発現系を構築することを目的とした。

3. 研究の方法

本研究はイネゲノム上に6コピー存在する植物特異的DNA依存的RNA合成酵素複合体ラージェストサブユニットとセカンドラージェストサブユニットをコードする遺伝子のRNAi法によるノックダウンシステムを作成しその分子的ならびに形態的表現型を観察した。また、6コピー存在する植物特異的DNA依存的RNA合成酵素複合体ラージェストサブユニットとセカンドラージェストサブユニットをコードする遺伝子の一部については、挿入変異システムを入手する事ができたので、これらも材料にして実験を行った。

4. 研究成果

本研究ではイネの植物特異的DNA依存的RNA合成酵素複合体遺伝子ノックダウンシステムの一部においてmiRNA遺伝子の蓄積が減少している事を培養中のカルスにおいて発見した事を発端に研究が始まった。そこで、miRNA遺伝子の蓄積減少の再現性の確認を最初に行った。その結果、イネの植物特異的DNA依存的RNA合成酵素複合体遺伝子ノックダウンシステムのうち、特定の系統について、miRNA遺伝子の発現低下が再現された。しかも、この発現低下は特定のmiRNAだけでなく、調べた複数のmiRNAについて共通して観察された。次に、miRNAの蓄積減少の原因がmiRNA遺伝子の転写の減少に起因するのか、もしくは、miRNAのプロセッシングの低下に起因するのかを明らかにするために、miRNA遺伝子前駆体の蓄積量の確認をmiRNAの蓄積量が減少して

いるカルスと通常のカルスで比較した。その結果、miRNAの蓄積量が減少しているカルスでは前駆体の蓄積量も減少していた。このことから、イネの植物特異的DNA依存的RNA合成酵素複合体遺伝子ノックダウンシステムのうち、特定の系統の系統で観察されたmiRNA遺伝子の蓄積低下は前駆体の転写量の減少に起因すると結論づけた。

次に、イネの植物特異的DNA依存的RNA合成酵素複合体遺伝子ノックダウンシステムのうち、特定の系統の系統で観察されたmiRNA遺伝子の蓄積低下が、カルスでのみ観察される現象なのか、はたまた、個体レベルでも観察される現象なのかを明らかにするために、イネの植物特異的DNA依存的RNA合成酵素複合体遺伝子ノックダウンシステムのうち、miRNA遺伝子の蓄積低下が観察された系統の再分化個体ならびにベクターのみを遺伝子導入した再分化個体から全RNAを抽出し、miRNAの蓄積を比較したところ、両者に差は見られなかった。このことから、イネの植物特異的DNA依存的RNA合成酵素複合体遺伝子ノックダウンシステムのうち、特定の系統の系統で観察されたmiRNA遺伝子の蓄積低下は残念ながら、培養中のカルスという特異な状況でのみ顕在化する物と考えられた。

次に、培養中のカルスという特異な状況のどのような要因が、miRNAの蓄積に影響を及ぼしているのか、また、カルスにおいてmiRNAが欠損した状態で遺伝子発現にどのような影響を及ぼすかをマイクロアレイ解析により調べてみた。その結果、細胞周期関連遺伝子など、多数の遺伝子発現が変化している事を見いだした。また、miRNA遺伝子の転写量に影響がある系統とそうでない系統の間に、固形培地上でのカルスの細胞増殖速度に差があることも見いだした。そこで、ハイグロマイシン抵抗性カルスを液体培養し、6種ある植物特異的DNA依存的RNA合成酵素遺伝子のノックダウンシステムすべてについて増殖曲線を取得した。その結果、一部の系統について、実際に増殖が速くなっている傾向が得られた。この事は、ノックダウンシステムにおいて、細胞周期関連遺伝子の高発現を良く説明出来る。また、これらの系統ではハイグロマイシン抵抗性遺伝子も高発現している事から、高度のハイグロマイシン抵抗性により、選択培地における増殖促進につながったと結論づけた。

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6件)

(1) Hiroaki Tabuchi, Yu Zhang, Susumu Hattori, Minami Omae, Sae Shimizu-Sato, Tetsuo Oikawa,

Qian Qian, Minoru Nishimura, Hidemi Kitano, He Xie, Xiaohua Fang, Hitoshi Yoshida, Junko Kyojuka, Fan Chen, and Yutaka Sato: *LAX PANICLE2* of rice encodes a novel nuclear protein and regulates the formation of axillary meristems. **Plant Cell**, 23, 3276-3287, 2011. (査読有り)

(2) Misuzu Nosaka, Jun-ichi Itoh, Yasuo Nagato, Akemi Ono, Aiko Ishiwata Yutaka Sato: Role of transposon-derived small RNAs in the interplay between genomes and parasitic DNA in rice. **PLoS Genetics** 8(9), e1002953, 2012. 10.1371/journal.pgen.1002953 (査読有り)

(3) Aiko Ishiwata, Misa Ozawa, Hiroshi Nagasaki, Makio Kato, Yusaku Noda, Takahiro Yamaguchi, Misuzu Nosaka, Sae Shimizu-Sato, Akie Nagasaki, Masahiko Maekawa, Hiro-Yuki Hirano, Yutaka Sato: Two *WUSCHEL*-related *homeobox* Genes, *narrow leaf2* and *narrow leaf3*, Control Leaf Width in Rice. **Plant and Cell Physiology**, doi: 10.1093/pcp/pct032, 2013. (査読有り)

(4) Misuzu Nosaka, Akemi Ono, Aiko Ishiwata, Sae Shimizu-Sato, Kiyoe Ishimoto, Yusaku Noda and Yutaka Sato: Expression of the rice microRNA *miR820* is associated with epigenetic modifications at its own locus. **Genes Genet. Syst.**, in press, 2013. (査読有り)

(5) Misuzu Nosaka, Aiko Ishiwata, Sae-Shimizu Sato, Akemi Ono, Kiyoe Ishimoto, Yusaku Noda, Yutaka Sato: The copy number of rice CACTA DNA transposon carrying *MIR820* does not correlate with *MIR820* expression. **Plant Signal. Behav.**, in press, 2013. (査読有り)

(6) 佐藤 豊 : 小分子 RNA を介したゲノム寄生因子と宿主ゲノムの攻防「生命分子を統合する RNA-その秘められた役割と制御機構」**実験医学** 31(7), 91-97, 2013. (査読無し)

[学会発表] (計 7 件)

(1) Yutaka Sato: Battles between plant genome and its parasitic elements through the action of small RNAs. Tokyo RNA Club, Keio University, Sept 14th 2011

(2) Yutaka Sato: Battles between plant genome and its parasitic elements through the action of small RNAs. NTU-JST Joint Symposium on RNA and Biofunctions-Asia Studies, Taipei Taiwan, Nov10 2011

(3) 佐藤 豊 : RNAワールドの今、遺伝学研

究所研究会「イネ分子遺伝学の飛躍」、国立遺伝学研究所、2011年11月18日

(4) 佐藤 豊 : 植物の小分子RNAを介したゲノム間相互作用の解析とその応用、さきがけ「RNAと生体機能」第三回研究報告会、東大弥生講堂、2011年12月12日

(5) Yutaka Sato: An anti-host strategy of transposons through the action of small RNAs. MBSJ workshop, Pacifico Yokohama, Dec 14 2011

(6) 佐藤豊 : 小分子RNAによる植物のゲノム動態制御とその利用、さきがけ交流会、ウィル名古屋、2012年8月9日

(7) Yutaka Sato: Battles between plant genome and its parasitic elements through the action of small RNAs. Japan-China rice developmental biology meeting-Morphology to Yield, Beppu, Oita, Japan 2013/3/7-9

[図書] (計 0 件)

[産業財産権]

○出願状況 (計 3 件)

名称 : 害虫防除法
発明者 : 新美輝幸、吉岡博史、佐藤豊
権利者 : 名古屋大学
種類 : 国際特許
番号 : 201-518506(JP)
出願年月日 : 2011 年 9 月 28 日
国内外の別 : 国際出願

名称 : 害虫防除法
発明者 : 新美輝幸、吉岡博史、佐藤豊
権利者 : 名古屋大学
種類 : 国際特許
番号 : 13/375,842(US)
出願年月日 : 2011 年 12 月 2 日
国内外の別 : 国際出願

名称 : 害虫防除法
発明者 : 新美輝幸、吉岡博史、佐藤豊
権利者 : 名古屋大学
種類 : 国際特許
番号 : 10 783 457.4(EP)
出願年月日 : 2012 年 1 月 2 日
国内外の別 : 国際出願

○取得状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :

種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

〔その他〕
ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

佐藤 豊 (SATO YUTAKA)
名古屋大学・大学院生命農学研究科・准教授
研究者番号：40345872

(2) 研究分担者
該当なし

(3) 連携研究者
該当なし