

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 7 日現在

機関番号：63904

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2012～2015

課題番号：24570062

研究課題名(和文) 高等植物の多様なRNAサイレンシング経路の制御機構

研究課題名(英文) Regulatory mechanisms of various RNA silencing pathways in plants

研究代表者

星野 敦 (HOSHINO, Atsushi)

基礎生物学研究所・多様性生物学研究室・助教

研究者番号：80312205

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,300,000円

研究成果の概要(和文)：植物におけるRNAサイレンシングと遺伝子発現の制御機構の解明を目的として、低分子RNAによる花色遺伝子の発現制御が関与するアサガオの模様形成機構を解析した。低分子RNAとmRNAの網羅的な解析などから、特定のRNAサイレンシング経路が特有な模様形成に関与することが示唆された。また、アサガオのゲノム配列を解読に成功した。ゲノム配列を利用した解析から、模様形成に関わる可能性がある複数の遺伝子を同定した。

研究成果の概要(英文)：To understand regulatory mechanisms of RNA silencing and gene expression in plants, we characterized the pigmentation patterns that are regulated by small RNA in flowers of the Japanese morning glory. The results of small RNA and mRNA sequence analysis suggested that a specific RNA silencing pathway is activated in a particular pigmentation pattern. In addition, we sequenced whole genome of the Japanese morning glory. By the analyses using the whole genome sequence, several candidate genes controlling pigmentation patterns were identified.

研究分野：植物分子遺伝学

キーワード：RNAサイレンシング 遺伝子発現調節 small RNA 植物 花 アサガオ

## 1. 研究開始当初の背景

真核生物は膨大な数のノンコーディング RNA を転写し、遺伝子発現の制御ネットワークを構築している。とくに、20~30 塩基からなる低分子 RNA は、発生、環境応答、耐病性、ゲノムの恒常性など広範な生命現象を制御している。高等植物では、複数の機能分化した RNA サイレンシング (RNAi) 経路が多様な低分子 RNA を産生している。それぞれの低分子 RNA は、mRNA の分解や翻訳阻害による転写後抑制と、エピジェネティックな機構による転写抑制により遺伝子発現を制御している。これまで、RNAi 経路を構成する因子が特定されて解析が進んでいる。しかし、RNAi 経路の制御機構や、経路間の相互作用、多様性などは未解明な点が多い。

一方、アサガオには多彩な花色と多様な模様をもつ自然突然変異体が存在する。研究代表者らは、これらの突然変異体を利用した研究から、花色や模様形成の分子機構を明らかにした。そのうち、有色の花に白い模様ができる吹雪や覆輪などの模様 (図 1) には、低分子 RNA が関わることを見いだしている。これらの模様をもつ突然変異体は、花の色素合成系遺伝子の一つである *DFR-B* 遺伝子が大きな DNA 再編成をおこなっている。その結果、*DFR-B* 遺伝子由来の低分子 RNA が産生され、*DFR-B* 遺伝子自体の発現を非着色細胞において抑制している。また、古典遺伝学的な解析から、*DFR-B* 遺伝子とは別に模様を制御する突然変異座が報告されている。これらの突然変異座は、*DFR-B* 遺伝子やその転写産物に作用して模様を制御していると予測される。



吹雪 (Blizzard) 車紋 (Rayed)  
同一の *DFR-B* 遺伝子座をもつ



覆輪 (Margined) 曜白 (Ray-white)  
吹雪や車紋とは異なる同一の *DFR-B* 遺伝子座をもつ

図 1 *DFR-B* 遺伝子の低分子 RNA が制御するアサガオの模様。

アサガオは実験生物として優れた特性をもつ。その学術研究は 100 年以上の歴史があり、おもに国内で行われてきた。本研究の遂行には、その全ゲノム解読が必要であった。全ゲノム配列は、アサガオの研究者だけでなく、多くの研究者にとって有用な情報になることが期待された。

## 2. 研究の目的

(1) 高等植物における RNA サイレンシングと遺伝子発現の制御機構を解明するために、アサガオの模様 (図 1) の形成機構を分子レベルで明らかにする。

(2) RNAi 経路の構成因子の同定や、模様を制御する突然変異遺伝子の同定のために、アサガオ標準系統の全ゲノムを解読する。

## 3. 研究の方法

### (1) 模様形成機構の解析

模様の形成機構について、非着色細胞で特定の RNAi 経路が活性化しているとする「RNAi 活性化モデル」と、RNAi を誘導する変異型の *DFR-B* 遺伝子の転写量が多いために RNAi が活性化するという「閾値モデル」を立てた。以下の方法で、これら 2 つのモデルの検証を試みた。

着色細胞と非着色細胞を切り分けてサンプリングし、次世代シーケンサー (NGS) で網羅的に低分子 RNA を解読して、比較検討する。

非着色細胞で活性化している RNAi 経路を特定するために、と同様に転写産物の解読 (RNA-seq) を行い、着色細胞と非着色細胞における遺伝子の発現量を検討する。参照配列として、アサガオの全ゲノム配列を利用する。有意差の認められた遺伝子の発現量は、定量 PCR で再確認する。

模様を制御する突然変異座を、遺伝学的手法やゲノム配列を利用して同定する。

### (2) アサガオゲノムの解読

アサガオの標準系統である、東京古型標準型 (TKS) の全ゲノムを、新学術領域「ゲノム支援」の支援をうけて解読する。アサガオのゲノムは染色体数が  $2n=2x=30$  で、約 750 Mb のサイズがある。

3 種類の NGS (GS FLX、Illumina、PacBio) を使って、ショットガンシーケンスを行う。

花、葉、茎、根、胚、種皮の 6 組織について RNA-seq を行い、アノテーションに用いる。

TKS とアフリカ系統を交配して得た F2 で

RAD-seq を行い、連鎖地図を作成する。

BAC クローンの末端配列を決定して、アセンブリの検証に利用する。

*de novo* アセンブリ、連鎖図の作成、遺伝子のアノテーション、全ゲノム重複など、塩基配列を計算機で解析する。

#### 4. 研究成果

##### (1) 模様形成機構の解析

「RNAi 活性化モデル」を支持する結果が得られた。その一方で、閾値モデルを支持する結果は得られなかった。また、模様形成に関わる遺伝子の有力候補として、RNA の代謝に関わる可能性がある、*InRNT1* 遺伝子と2つの RNA ヘリカーゼ遺伝子を同定した。

吹雪と車絞の着色細胞と非着色細胞で蓄積する低分子 RNA を網羅的に解読した。その結果、吹雪の非着色細胞に 22 塩基の低分子 RNA が特異的に蓄積していることを見いだした。ほかの長さの低分子 RNA は、着色細胞と非着色細胞の間で特異的蓄積がみられなかったことから、この 22 塩基の低分子 RNA を構成因子とした RNAi 経路が活性化していることが示唆された。

RNA-seq の結果、吹雪の着色細胞と非着色細胞では予想以上に多くの遺伝子で転写産物の蓄積量に差が見られた。着色細胞と非着色細胞を比較したときに、非着色細胞で転写産物が 5 倍以上多く蓄積している遺伝子は 356、逆に着色細胞で 5 倍以上多く蓄積している遺伝子は 420 あった。非着色細胞で多く蓄積し、着色細胞との蓄積量の差が 2 番目に大きな遺伝子 (*InRNT1*) の推定アミノ酸配列は、正常なアミノ酸配列をコードしないノンコーディング RNA の制御に関わるタンパク質と部分的に類似性が見られた。そこで、定量 PCR により発現量の差を再確認したところ、非着色細胞でより多くの転写産物が蓄積していることがわかった(図2)。*InRNT1* が RNAi 経路の制御に関わっているとすれば、RNAi 活性化モデルを支持する結果である。

さらに非着色細胞で 10 倍以上多く転写産物が蓄積している遺伝子のうち、3 つについて定量 PCR を行った。その結果、いずれの遺伝子も非着色細胞で多く転写産物が蓄積することを確認した(図2)。このうち1つは、シロイヌナズナの *TT12* 遺伝子のホモログである。*TT12* は液胞膜上のフラボノイド輸送体である MATE (membrane-localized multidrug and toxic compound extrusion) 輸送体をコードしている。非着色細胞ではアントシアニンが合成されない代わりに、無色のフラボノイドが多く蓄積すると予測される。*TT12* ホモログは、フラボノイドが蓄積したことで、二次的に活性化されている可能性がある。

一方で、着色細胞でより多くの転写産物が蓄積している遺伝子中に、花の色素合成系遺伝子は含まれていなかった。*DFR-B* 遺伝子を含む色素合成系遺伝子は、同調して転写が活性化されている。従って、*DFR-B* 遺伝子の転写量が多いとする閾値モデルが正しければ、色素合成系遺伝子の転写も活性化されているはずである。しかし、実際にはそのような活性化は認められなかった。

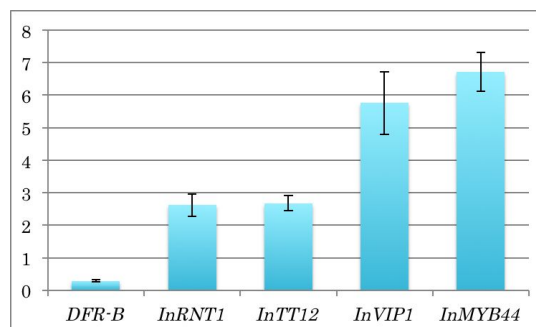


図2 吹雪模様の非着色細胞で転写産物が多く蓄積する遺伝子。着色細胞における蓄積量を1としたときの比。非着色細胞では、*DFR-B* 遺伝子の蓄積量が低下している。

吹雪模様の系統と模様をもたないTKSを交配し、そのF2を栽培して表現型を観察した。その結果、メンデル遺伝する1遺伝子領域により、吹雪、車絞り(覆輪)、無地の3種の表現型が支配されていることを示唆する結果が得られた。

一方、覆輪や車絞の形成に関わる突然変異座のうち、*Mr-2* と *Ry-3* は *ac* (南天遺伝子座) の近くに座乗することが知られている。そこで、アサガオのゲノム配列を利用して、すでにクローニングされている南天遺伝子の近くに座乗する遺伝子の配列を解析した。その結果、RNA の代謝に働く RNA ヘリカーゼ (DEAD-box ATP-dependent RNA helicase) をコードする2つの遺伝子を見いだした。いずれの遺伝子も RNA-seq の結果から、着色細胞に比べて非着色細胞で 2~2.5 倍程度多く転写産物が蓄積することがわかった。

##### (2) アサガオゲノムの解読

アサガオの全ゲノム解読に成功した。

GS FLX と Illumina のリードをハイブリッドアセンブリする計画であったが、最終的に PacBio のリードを *de novo* アセンブリした。

RNA-seq のリードを遺伝子配列の推定に利用し、アサガオのゲノム配列中に 41,000 の遺伝子を見いだした。

アサガオの染色体数に一致する 15 の連鎖群に、1,045 のマーカーが座乗する連鎖地図を作成することができた。

27,648 の BAC クローンについて、末端配列を得ることができた。

*de novo* アセンブリの結果、コンティグとスキファールドの N50 が、3.2 Mb と 3.5 Mb の良好なゲノム配列を得ることができた。これらの N50 は、近年に解読されたゲノムの中では極めて長い値である。CEGMA 解析や、連鎖地図、BAC-end 配列、BAC の全長配列、EST 配列、RNA-seq のリードとの比較解析によりアセンブリの高い正確性を検証できた。さらに、連鎖地図にスキファールドをマップすることで、全ゲノムの 85 % をカバーする pseudo molecule が得られた。小数のスキファールドで連鎖地図との不一致がみられたが、アセンブリを見直すことで完全に一致させることができた。また、アサガオとおなじナス目に属するトマトとジャガイモのゲノムと比較することで、ナス科とヒルガオ科が分岐したあとに、それぞれで全ゲノム重複がおきたことが明らかになった。

ドラフトゲノムを解析することで、アサガオの主要な変異原である *Tpn1* ファミリーのトランスポゾンを経網的に同定することができた。転移に必要な転移酵素をコードする自律性トランスポゾンの有力候補を含む、322 の *Tpn1* ファミリーのトランスポゾンを見いだした。

### (3) 国内外における位置づけ、インパクト

真核生物の RNAi 経路は、現在も国内外で盛んに解析されて発展している研究分野である。small RNA の解析結果から得られた、おなじ *DFR-B* 遺伝子の RNA サイレンシングでも、模様によって異なる RNAi 経路が活性化されているという知見は、模様の制御だけでなく、RNAi 経路の制御機構を明らかにしていく上で、ユニークな知見であろう。

アサガオは、植物科学のさまざまな分野において膨大な知見が集積している我が国独自のバイオリソースである。また国内だけでなく、国外でも花成の研究などに利用されている。そのゲノム解読は、アサガオの研究環境を飛躍的に改善する。実際に、RNAi 経路以外の研究に利用して結果が得られているほか、多くの研究者がゲノム配列を利用した研究を開始している。

アサガオのゲノム解読では、PacBio を利用することで、非常に長いコンティグが得られることを示すことができた。本研究でのゲノム解読のストラテジーは、当面のあいだゲノム解読の主流になるとと思われる。

### (4) 今後の展望

*InRNT1* 遺伝子と 2 つの RNA ヘリカーゼ遺伝子の解析を進めて、低分子 RNA が関わる模様形成の分子機構の理解を深化させたい。

ゲノムを解読したことで、アサガオを用いたさまざまな研究が発展すると期待される。たとえば、古典連鎖地図上にマップされた遺伝子を同定することも容易になった。実際に渦遺伝子を同定し、ブラシノステロイドホルモンの合成酵素をコードすることも明らかにできた。今後、植物ホルモンや形態形成の研究も進むと思われる。アサガオには多くの突然変異が知られ、つる性などほかのモデル植物にない特性がある。これらの突然変異や特性を活用することで、独自性のある研究成果を発信できるであろう。

### 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 2 件)

A. Hoshino, Y. Yoneda, T. Kuboyama, A Stowaway transposon disrupts the *InWDR1* gene controlling flower and seed coloration in a medicinal cultivar of the Japanese morning glory. *Genes & Genetic Systems*, 査読あり、2016、in press  
DOI: 10.1266/ggs.15-00062

Y. Morita, K. Ishiguro, Y. Tanaka, S. Iida, A. Hoshino, Spontaneous mutations of the UDP-glucose:flavonoid 3-O-glucosyltransferase gene confers pale and dull colored flowers in the Japanese and common morning glories. *Planta*, 査読あり、242 巻、2015、575-587  
DOI: 10.1007/s00425-015-2321-5

#### [学会発表](計 5 件)

宮本香、奥野堇、勝山弘章、星野敦、仁田坂英二、飯田滋、渡部信義、久保山勉、アサガオ花色の濃さ QTL 間相互作用と *ADM2* 候補遺伝子 *InMYB1* における系統間塩基配列多型、日本育種学会平成 27 年度春季大会(2016 年 3 月 21-22 日) 横浜市立大学(神奈川県、横浜市)

勝山弘章、奥野堇、白澤健太、仁田坂英二、星野敦、小野道之、渡部信義、久保山勉、RAD-seq を用いたアサガオ開花早晚性 QTL の検出、日本育種学会平成 27 年度春季大会(2016 年 3 月 21-22 日) 横浜市立大学(神奈川県、横浜市)

星野敦、仁田坂英二、アサガオのゲノム情報整備における RAD-seq の活用(シンポジウム: RAD-Seq が切り拓く植物研究栽培種から野生種まで)(招待講演) 植物学会第 77 回大会(2013 年 9 月 13-15 日) 北海道大学(北海道、札幌市)

星野敦、アサガオの模様を生み出すエピジェネティクス(シンポジウム2「エコロジカル・エピジェネティクス - 可塑性メカニズムの適応・進化的意義を探る -」)(招待講演) 第44回種生物学シンポジウム(2012年12月7-9日) 奥琵琶湖マキノパークホテル&セミナーハウス(滋賀県、高島市)

星野敦、朴慶一、飯田滋、アサガオの模様にもみるエピジェネティックな遺伝子発現制御の獲得機構(ワークショップ:植物のエピジェネティクス:環境と表現型の動態をつなぐ)(招待講演) 日本進化学会第14回大会(2012年8月21-24日) 首都大学東京(東京都、八王子市)

〔図書〕(計 3件)

山内卓樹、星野敦、遺伝子のノックアウトとノックダウン、丸善出版、植物の百科事典、2016(印刷中)

星野敦、飯田滋、植物の花の色、化学同人、エピジェネティクス-その分子機構から高次生命機能まで - DOJIN BIOSCIENCE SERIES 12(田嶋正二編) 2013、217-232

星野敦、森田裕将、トランスポゾン、文一総合出版、植物色素フラボノイド(武田幸作、齋藤規夫、岩科司編) 2013、434-447

〔その他〕

ホームページ等

<http://www.nibb.ac.jp/hoshino/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

星野 敦 (HOSHINO, Atsushi)

基礎生物学研究所・多様性生物学研究室・助教

研究者番号：80312205