

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 10 日現在

機関番号：14603

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24770052

研究課題名(和文)植物分化全能性を支えるRNA代謝制御系の解明

研究課題名(英文)Elucidation of RNA metabolism regulation important for plant cell totipotency

研究代表者

大谷 美沙都(Ohtani, Misato)

奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科・助教

研究者番号：60435633

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：一つの細胞が個体を構成するあらゆる種類の細胞の起源となりうる時、その細胞は分化全能性をもつといい、植物では多くの体細胞が分化全能性を持ち続けていると考えられている。本研究では、植物細胞における分化全能性とRNA代謝制御機構の関わりを明らかにするため、シロイヌナズナ変異体を用いた分子遺伝学的解析を行った。その結果、分化全能性が顕在化するためには、プレmRNAスプライシング制御やRNA品質管理機構といった特定のRNA代謝制御系の役割がとくに大きいことが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：The cell potentiality to give rise to a whole body is called “totipotency”, and plant somatic cells are considered to retain this ability. In this project, molecular genetics works were performed with Arabidopsis thaliana mutants, to reveal molecular mechanisms underlying plant cell totipotency, especially from the viewpoint of RNA metabolism regulation. The obtained results suggested that specific RNA metabolism regulatory pathways, such as pre-mRNA splicing regulation and/or RNA quality control mechanism, have critical roles in plant cell totipotency.

研究分野：植物分子遺伝学

キーワード：分化全能性 RNA代謝 プレmRNAスプライシング RNA品質管理 snRNA シュート再生 脱分化

1. 研究開始当初の背景

一つの細胞が個体を構成するあらゆる種類の細胞の起源となりうる時、その細胞は分化全能性をもつという。植物の場合、様々な体細胞から不定胚あるいは器官再分化を経て、個体のほぼ全体を再生できることから、多くの細胞が分化全能性を保持していると見なされている。申請者は、こうした植物細胞の分化全能性発現を支える分子機構の解明を目指して、研究を行ってきた。研究開始当初には、分化全能性が顕在化する際の2つの鍵過程、細胞の脱分化と分裂組織の新形成に関して強い温度感受性を示す、シロイヌナズナ突然変異体 *srd2* および *rid1* の解析結果から、核内低分子 RNA である snRNA (small nuclear RNA) とそれによって規定されるプレ mRNA スプライシング活性が、分化全能性発現の重要な素過程となっていることを明らかとしていた。

同時に、植物生理学分野では、RNA を介した遺伝子転写後発現調節が植物形態形成やウイルス応答、環境ストレス応答など、幅広い生理過程で中心的かつ積極的な役割を担っていることを示す研究が蓄積されつつあった。こうした結果は、申請者自身の研究結果も合わせて考えると、自ら移動できない植物が環境刺激に適切に応答するためには、RNA 制御系による遺伝子発現制御が植物独自の重みをもって機能していることを示唆しており、非常に興味深いところであった。

2. 研究の目的

以上の背景を受けて、本研究では、RNA 制御機構全体に視野を広げ、植物分化全能性における RNA 代謝系が果たす役割の解明を目的とした。具体的には、分化全能性発現に影響を与える RNA 制御異常の解明、およびノンコーディング RNA を介した新規の分化全能性制御機構の解析、を個別目的として設定し、植物細胞の分化全能性を RNA 代謝制御機構の関係を明らかにすることを目指した。

3. 研究の方法

(1) 分化全能性発現に影響を与える RNA 制御異常の解明

すでに解析を進めていた *srd2* および *rid1* 変異体に加え、さまざまな RNA 制御系に関するシロイヌナズナ変異体を収集し、組織培養を利用して分化全能性発現への影響を調べることで、分化全能性に重要な RNA 制御系を突き止めた。さらに、実際にはどういった RNA 制御異常が起こっているのかをトランスクリプトーム解析によって明らかにし、RNA 制御破綻と表現型との接点を探った。

(2) ノンコーディング RNA を介した新規の分化全能性制御機構の解析

先行研究結果から、植物細胞の脱分化に重要であることが分かっていた核内低分子

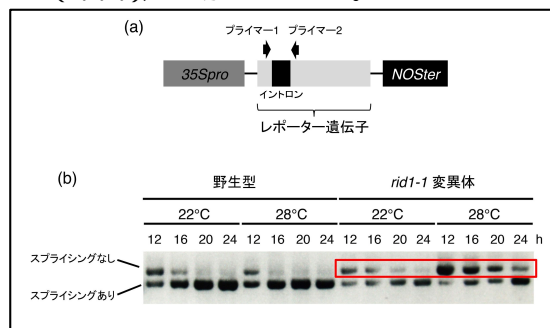
RNA (small nuclear RNA; snRNA) について、動物細胞の知見をもとにした逆遺伝学的解析を行い、生合成機構の解明に取り組んだ。さらにシロイヌナズナ胚軸脱分化過程におけるトランスクリプトーム解析を行い、脱分化に従って発現が変動する mRNA 型ノンコーディング RNA の同定を試みた。

4. 研究成果

(1) 分化全能性発現に影響を与える RNA 制御異常の解明

スプライシング因子 RID1 の機能解析

従来より解析対象としてきた、脱分化と分裂組織の新形成に強い温度感受性を示すシロイヌナズナ突然変異体 *rid1* の解析を進め、RID1 遺伝子が DEAH ボックス型 RNA ヘリカーゼをコードしていること、核小体に局在する新規のスプライシング関連因子であること(下図)を明らかにした。



さらに RID1 機能は植物発生時において分裂組織の確立や側根形成、本葉形態形成、生殖などでとくに重要であることを突き止め、植物発生におけるプレ mRNA スプライシング活性の要求度のダイナミズムを明らかにした(論文成果7)。

シュート再生過程における RNA 品質管理機構の重要性

RNA 代謝重要因子に関するシロイヌナズナ変異体を収集し、それらを材料とした組織培養実験から、RNA 品質管理に関わる因子の変異体が正常なシュート再生機構に必須であることを見出した。さらにこの変異体におけるシュート再生異常の原因の少なくとも一端が、オーキシン応答異常にあることを突き止め、シュート再生における RNA 品質管理機構の重要性を初めて明らかにした。

RNA 代謝制御系の分化全能性発現における要求性の解明

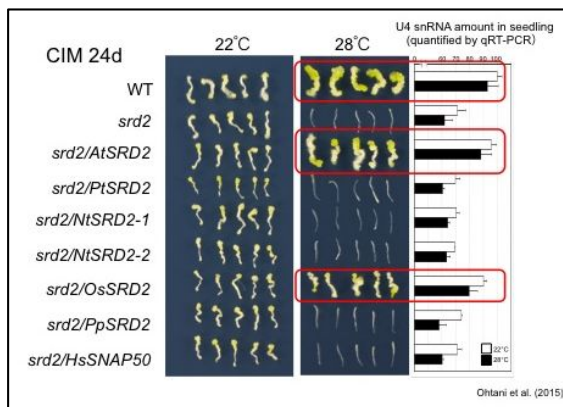
RNA 代謝重要因子の逆遺伝学的解析から、分化全能性発現には、特定の過程で特定の RNA 代謝系の要求度が高いこと、また全体を俯瞰した場合には、核内で起こる RNA 代謝イベントの重要度が高い傾向があることを明らかにした(論文成果2)。

(2) ノンコーディング RNA を介した新規の分化全能性制御機構の解析

分化全能性における snRNA 要求度の詳細

解析

snRNA 転写因子である SRD2 のホモログ遺伝子を幅広い実験植物種からクローニングし、これをシロイヌナズナ *srd2* 変異体に導入することで、snRNA 転写レベルが異なる一連の形質転換植物体群を作成することに成功した。この形質転換体群を材料とした組織培養解析によって、分化全能性発現時には通常発生よりも高い snRNA レベルを要求することを明らかにした(下図:論文成果1)。



植物 snRNA 生合成過程の解明

snRNA 特異的な修飾であるトリメチルグアノシンキャップ付加酵素遺伝子の逆遺伝学的解析を行った。これにより、適切な snRNA キャップ修飾制御が植物発生において重要な役割を担っている可能性を明らかにした。

脱分化に関連した mRNA 型ノンコーディング RNA の単離

シロイヌナズナ胚軸脱分化過程のトランスクリプトーム解析 (RNA-seq 解析) から、脱分化進行に伴って発現が変動する mRNA 型ノンコーディング RNA を新たに複数見出すことに成功した。

以上の研究結果から、植物の分化全能性発現においては、特定の分化全能性発現素過程ごとに特定の RNA 代謝系活性を選択的に要求する可能性を明らかにした。これまでに転写後遺伝子発現制御と分化全能性の関わりについて俯瞰的な解析に取り組んだ例はなく、本研究では植物分化全能性研究のみならず RNA 代謝の生理学としても、重要な基礎的情報となる成果をあげることができたと考えている。

さらに、本研究から、分化全能性発現素過程ごとに強化すべき RNA 制御活性が見えてきたことで、例えば有用植物のクローン増殖効率化や高効率増殖技術開発における新規分子育種ターゲットとして応用されることも期待される。

5. 主な発表論文等
〔雑誌論文〕(計 8 件)

1. *Ohtani M, Takebayashi A, Hiroyama R, Xu B, Kudo T, Sakakibara H, Sugiyama M, Demura T (2015) Cell dedifferentiation and organogenesis *in vitro* require more snRNA than does seedling development in *Arabidopsis thaliana*. J Plant Res 128: 371-380. 査読あり
doi: 10.1007/s10265-015-0704-0.
2. *Ohtani M (2015) Regulation of RNA metabolism is important for *in vitro* dedifferentiation of plant cells. J Plant Res 128: 361-369. 査読あり
doi: 10.1007/s10265-015-0700-4.
3. Nakano Y, Yamaguchi M, Endo H, Rejab NA, *Ohtani M (2015) NAC-MYB-based transcriptional regulation of secondary cell wall biosynthesis in land plants. Front Plant Sci 6: 288. 査読あり
doi: 10.3389/fpls.2015.00288.
4. *Yamaguchi M, Nagahage ISP, Ohtani M, Ishikawa T, Uchimiyama H, Kawai-Yamada M, Demura T (2015). Arabidopsis NAC domain proteins VND-INTERACTING1 and ANAC103 interact with multiple NAC domain proteins. Plant Biotechnol *in press* 査読あり
doi: 10.5511/plantbiotechnology.15.0208a.
5. Endo H, Yamaguchi M, Tamura T, Nakano Y, Nishikubo N, Yoneda A, Kato K, Kubo M, Kajita S, Katayama Y, Ohtani M, *Demura T (2015) □ Multiple classes of transcription factors regulate the expression of VASCULAR-RELATED NAC-DOMAIN7, a master switch of xylem vessel differentiation. Plant Cell Physiol 56: 242-254. 査読あり
doi: 10.1093/pcp/pcu134.
6. *Numata K, Ohtani M, Yoshizumi T, Demura T, Kodama Y (2014) Local gene silencing in plants via synthetic dsRNA and carrier peptide. Plant Biotechnol J 12:1027-1034. 査読あり
doi: 10.1111/pbi.12208.
7. *Ohtani M, Demura T, Sugiyama M (2013) Arabidopsis ROOT INITIATION DEFECTIVE 1, a DEAH-box RNA helicase involved in pre-mRNA splicing, is essential for plant development. Plant Cell 25:2056-2069. 査読あり
doi: 10.1105/tpc.113.111922.
8. *Hirayama T, Matsuura T, Ushiyama S, Narusaka M, Kurihara Y, Yasuda M, Ohtani M, Seki M, Demura T, Nakashita H, Narusaka Y, Hayashi S (2013) A poly(A)-specific ribonuclease directly regulates the poly(A) status of mitochondrial mRNA in Arabidopsis. Nat Commun 4:2247. 査読あり
doi: 10.1038/ncomms3247.

(*corresponding author)

〔学会発表〕(計 12 件)

1. 大谷美沙都「植物発生における snRNA キャップトリメチル化の役割」RNA から植物を考える~植物をささえる RNA 制御~(第4回植物研究者ネットワークシンポジウム)、2015年1月19-20日、京都大学(京都府京都市)
2. 大谷美沙都、出村拓、杉山宗隆 シンポジウム "植物の個体制御における RNA 機能"「植物細胞の分化全能性を支える pre-mRNA スプライシング制御」日本植物生理学会第 55 回年会、2014年3月18-20日、富山大学(富山県富山市)
3. 大谷美沙都「植物細胞の分化全能性を支える pre-mRNA スプライシング制御」RNA world への階段(東京理科大学 RNA 科学総合研究センター公開シンポジウム)、2013年7月17日、東京理科大学(東京都葛飾区)
4. Ohtani M, Demura T, Sugiyama M. Essential requirement for Arabidopsis RID1, a DEAH-box RNA helicase involved in pre-mRNA splicing, in plant development. *Frontiers in Plant RNA Research* 2012, October, 2012, Sapporo, Japan.
5. Ohtani M, Demura T, Sugiyama M. "Critical roles of RID1 DEAH-box RNA helicase functioning in pre-mRNA splicing for organogenesis *in vitro* and *in planta*." 23th International Conference on Arabidopsis Research, July, 2012, Vienna, Austria.
6. Hiroyama R, Demura T, Ohtani M. "Physiological roles of snRNA hypermethylation in plant: lessons from Arabidopsis TGS genes" Plant RNA Meeting, July, 2012, Vienna, Austria.

など、国内外学会(招待講演含む)合わせて、合計 12 件。

〔産業財産権〕

出願状況(計 2 件)

名称：植物細胞に核酸を導入する方法

発明者：沼田圭司、大谷美沙都、出村拓、吉積毅、児玉豊

権利者：同上

種類：特許

番号：PCT/JP2013/056062

出願年月日：2013/2/27

国内外の別：国際

名称：カルス誘導剤及びカルス誘導方法

発明者：中野雄司、浅見忠男、山上あゆみ、長田裕之、大谷美沙都、出村拓

権利者：同上

種類：特許

番号：特願 2014-117832

出願年月日：2014/6/6

国内外の別：国内

〔その他〕

ホームページ

植物 RNA 研究ネットワーク

<https://www.sci.hokudai.ac.jp/~yukako/RNA/>

6. 研究組織

(1)研究代表者

大谷 美沙都 (OHATNI, Misato)

奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科・助教

研究者番号：60435633