

植物科学の新展開を創り出す RNA 研究

オーガナイザー

栗原 志夫

理化学研究所 環境科学研究センター

〒230-0045 神奈川県横浜市鶴見区末広町 1-7-22

濱田 隆宏

東京大学大学院総合文化研究科

〒153-8902 東京都目黒区駒場 3-8-1

Yukio Kurihara and Takahiro Hamada

RIKEN Center for Sustainable Resource Science, 1-7-22 Suehiro-cho, Tsurumi, Yokohama,
Kanagawa, 230-0045 Japan

Graduate School of Arts and Sciences, The University of Tokyo, 3-8-1 Komaba, Meguro,
Tokyo, 153-8902 Japan

DOI: 10.24480/bsj-review.8b1.00111

RNA (ribonucleotide) は、ゲノムの構成要素である DNA (deoxyribonucleotide) とともに生体内核酸の一つであり、遺伝子情報の発現において必須の分子である。核内において、ゲノム上の遺伝子情報は、まず messenger RNA (mRNA) 前駆体に転写される。転写の過程において、5'末端へのキャップ構造の付加、イントロン部分が取り除かれるスプライシング、3'末端へのポリ A鎖の付加を経て、成熟した mRNA が合成される。mRNA は細胞質に運ばれたのち、リボソームによって翻訳され、遺伝子産物であるタンパク質が合成される。合成されたタンパク質はさまざまな修飾を受けたのち、それぞれの役割（発現）を果たす。以上が一般的な遺伝子発現の流れであり、セントラルドグマと呼ばれている。その中で、スプライシングに代表される mRNA の成熟過程やその分解に関する研究、リボソームの構成因子である ribosomal RNA (rRNA) やアミノ酸を呼び込む transfer RNA (tRNA) などの機能性 RNA に関する研究等が生物種を問わずなされてきた。

近年、機能性 RNA 以外の非コード RNA と総称される概念が登場し、RNA 研究は更なる広がりを見せている。その流れの中で、最も注目を浴びた研究成果が、RNA 干渉の発見およびそのメカニズムの解明である。Andrew Fire 博士と Craig Mello 博士らが、線虫に二本鎖 RNA を導入することにより、それに相補的な遺伝子の発現が mRNA レベルで抑えられることをいち早く報告し(Fire et al. 1998), 2006 年にノーベル生理・医学賞を受賞したことは良く知られている。この RNA 干渉の存在は古くから知られており、例えば、植物ではペチュニ

アの花弁の斑入りに関する報告や RNA を介した植物ウイルスへの抵抗性を示唆する報告がなされていた（熊倉らの章を参照）。また、RNA 干渉を引き起こす中心的な役割を担う small interfering RNA (siRNA) の発見は、植物へのウイルスの感染過程からなされた(Hamilton and Baulcombe 1999)。植物における RNA 干渉を RNA サイレンシングと呼ぶ (Baulcombe 2004)。siRNA 以外にも RNA サイレンシングを引き起こす小分子 RNA として、主に植物の適切な発生に必要となる microRNA が知られている。それらの分子メカニズムには動物のそれと異なる部分が多様に存在することから、およそ 2000 年代に RNA サイレンシングに関する研究が盛んに行われるに至った。さらに、RNA サイレンシングに関わらず、植物において独自に発展してきた RNA 分子機構が数多く報告されている。

現在では、RNA にまつわる研究は次世代シークエンサーの登場によって、さまざまな研究対象・分野を巻き込みながら広がりを見せ始めている。その中には、RNA サイレンシングに加えて長鎖非コード RNA の役割を探る研究、RNA 分子の細胞間・組織間移行の研究、さらに植物が示す表現型をトランスクリプトーム (RNA プロファイルの総体) として理解しようとする試みなど多岐にわたる。

本総説集では、植物における小分子 RNA の役割、RNA 分子の成熟メカニズムから輸送メカニズムに至るまで、13名の研究者による8つの総説で RNA 研究を紹介する。都筑は microRNA の機能や進化について、熊倉・栗原は RNA サイレンシングとウイルスについて、岩川は RNA サイレンシングが自身の mRNA を攻撃しない仕組みについて小分子 RNA という視点から紹介する。また RNA の転写や転写後制御、輸送という視点から、鳥井・遠藤は組織特異的な転写制御機構、大谷は RNA スプライシング、濱田・渡邊は細胞質での転写後制御の場となる RNA 顆粒、鈴木・荒江・千葉はポリ A 鎖を介した転写後制御、野田口は RNA の長距離移行について紹介する。

引用文献

- Baulcombe D. 2004. RNA silencing in plants. *Nature* 431: 356-363.
- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M. K., Kostas, S. A. Driver, S. E., & Mello, C. C. 1998. Potent and specific interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391: 806-811.
- Hamilton, A. J., & Baulcombe, D. C. 1999. A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants. *Science* 286: 950-952.

植物 microRNA の発生における機能と進化的な側面から見た特徴

都筑正行

Department of Molecular, Cellular and Developmental Biology, University of Michigan
4075 Nat. Sci., 830 N. University Ave., Ann Arbor, MI 48109, USA

The feature of microRNAs in plant development and evolution

Keywords: development, evolution, microRNA, small RNA

Masayuki Tsuzuki

Department of Molecular, Cellular and Developmental Biology, University of Michigan
4075 Nat. Sci., 830 N. University Ave., Ann Arbor, MI 48109
DOI: 10.24480/bsj-review.8b2.00112

1. はじめに

真核生物の遺伝子発現は、DNA→RNA→タンパク質というセントラルドグマを中心としながら、最終的な発現が決定するまでには様々な因子が影響している。タンパク質をコードしないノンコーディング RNA である microRNA (miRNA) は遺伝子発現を制御する分子の 1 つであり、mRNA の切断や翻訳を抑制することで標的遺伝子の発現を負に制御している。miRNA の研究が本格的に始まってから 15 年程度経つが、その間に miRNA による遺伝子発現制御が植物の発生・形態形成過程の様々な場面で重要な役割を果たすことが明らかになってきた。シロイヌナズナを用いた遺伝学的解析を中心として始まった植物 miRNA の研究であるが、次世代シーケンサーの登場など、新たな技術の登場・発展と共に、様々な植物種における解析がなされている。本節では、シロイヌナズナの研究からわかった miRNA の植物における基本的なはたらきを始めとして、近年の研究によって明らかになってきた進化的な視点からの miRNA の知見や、今後の展望についても議論したい。

2. microRNA の生合成と機能メカニズム

miRNA は 20 から 25 塩基の一本鎖 RNA であり、機能性の小分子 RNA に分類される。miRNA の特徴の 1 つは、タンパク質コード遺伝子のようにゲノム DNA 上に塩基配列が存在し、RNA ポリメラーゼ II (Pol II) によって転写されることで生合成が開始される点である。まず *MIRNA* 遺伝子と呼ばれる DNA 領域から Pol II によって pri-miRNA と呼ばれる一本鎖 RNA が転写される (図 1)。pri-miRNA は自身の中にヘアピン様のステムループ二次構造を持つのが特徴である。このステムループ二次構造は Dicer や Drosha と呼ばれる RNase III 様タンパク質によって特異的に認識され、より短い前駆体 miRNA (pre-miRNA), miRNA/miRNA* (3'端 2 塩基突出で数塩基のミスマッチを持つ二本鎖 RNA) へと切断される (図 1)。植物では DICER-LIKE 1 (DCL1) タンパク質が 2 段階の切断を行なうことがわかっており、正常な切断に必要な HYPONASTIC LEAVES1 (HYL1) や SERRATE (SE) などの共役因子も同定されている (Kurihara and Watanabe 2004, Kurihara et al. 2006, Yang et al. 2006)。DCL1 の切断活性によって合成された

miRNA/miRNA*は HASTY と名付けられた Expotin-5 ホモログタンパク質により最終的に核外に運ばれる (Bollman et al. 2003)。

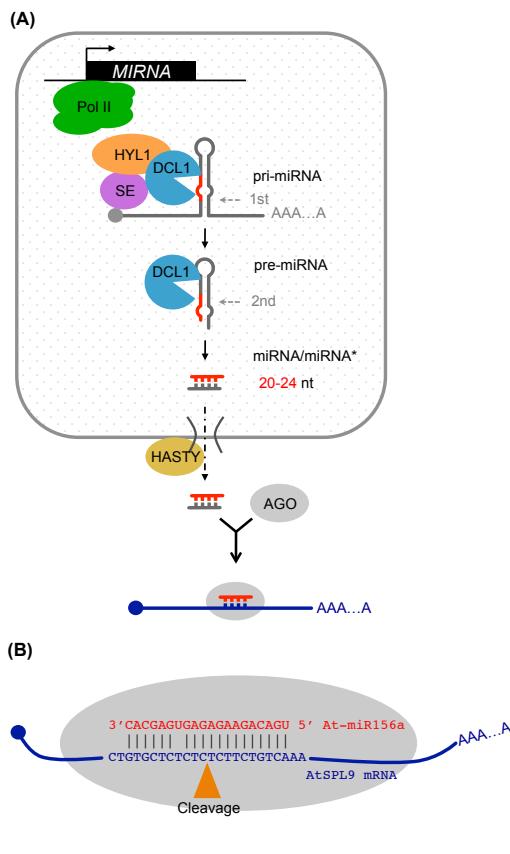


図1 (A) 植物MicroRNAの生合成経路 (B) RISCの作用機序

機能性小分子 RNA に共通するのは、自身と相補的な配列を持つ遺伝子の発現を抑制する点である。miRNA は、相補的な配列を持つ mRNA に結合することで標的遺伝子の発現を転写後レベルで抑制する。miRNA は単独でははたらくことができず、ARGONAUTE (AGO) ファミリーというエフェクタータンパク質と共に、RNA-induced silencing complex (RISC) と名付けられた複合体を作ることで初めて機能を持つ (Kawamata and Tomari 2010)。RISC は miRNA の配列依存的に mRNA に結合し、AGO の活性依存的に mRNA を切断したりリボソームによる翻訳を妨げて翻訳抑制を行なうことで、最終的に標的遺伝子の発現が減少する (Llave et al. 2002, Iwakawa and Tomari 2013)。

植物 miRNA の間接的な機能として、二次的な short-interfering RNA (siRNA) の产生を誘導する点が挙げられる。miR173, miR390 などいくつかの miRNA は、タンパク質をコードする mRNA ではなく TAS 遺伝子座から転写される長鎖ノンコーディング RNA を標的として切断する (Coruh et al. 2014)。

miRNA によって切断を受けた TAS RNA は、RNA 依存性 RNA ポリメラーゼ 6 (RDR6) の鉄型となり、相補鎖が合成されることで二本鎖 RNA が生まれ、さらに siRNA の合成へと導かれる。この siRNA は、特定の標的遺伝子を持ち *in trans* にはたらくことから、trans-acting siRNA (tasiRNA) と呼ばれる（この経路に関しては本節では詳細を省く）。

3. シロイヌナズナの研究から明らかになった microRNA の発生における機能

植物の発生に miRNA が大きな影響を持つことは、順遺伝学的な蓄積から徐々に明らかになっていった。シロイヌナズナの T-DNA挿入変異体である *suspensor 1* (*sus1*) 変異体は、元々胚性致死の表現型から *embryo defective 76* (*emb76*) と名付けられており、胚発生の段階で心臓型胚への発生が上手くいかない表現型を持つラインとして知られていた (Schwartz et al. 1994)。EMS 处理によって得られた *short integument 1* (*sin1*) 変異体は、胚珠の発生段階で外皮に異常をきたすため不稔の表現型を持つ他に、花成遲滞や葉の形態異常などの様々な表現型を持っていた (Ray et al. 1996)。T-DNA挿入変異体である *carpel factory* (*caf*) 変異体は、心皮の発生異常に由来する不稔性の表現型を示す他、花成遲滞など *sin1* と似た複数の表現型を示すラインであった (Jacobsen et al. 1999)。1996 年ごろから解読が始まったシロイヌナズナのゲノム配列の開示と共に、これらの変異体の原因遺伝子が全て *DCL1* であることが明らかになり (Golden et al. 2002, Schauer et al. 2002)，ショウジョウバエ Dicer タンパク質の研究報告を発端に、相同性の高い DCL1 タンパク質が miRNA の合成にはたらくことが示唆され、miRNA が

植物の発生に重要な役割を持つことが強く推測されることとなった。

これらと並行して、個々の miRNA ファミリーの発生への影響に関する研究も数多くなされた。エンハンサートラップ法によって得られた *jaw-D* 優性変異体はロゼット葉の形状がノコギリ状になる表現型を示した。*jaw-D* 変異体のエンハンサー領域の挿入位置はタンパク質コード領域ではなく *MIRNA* 遺伝子座付近に起こっていたことから、この *MIRNA* 遺伝子のコードする miRNA は miR-JAW と名付けられ、表現型の原因遺伝子として同定された (Palatnik et al. 2003)。miR-JAW は *TCP* 転写因子遺伝子内の塩基配列と高い相補性を示し、*TCP* mRNA 内の miR-JAW 結合配列へのナンセンス変異導入によって *jaw-D* 変異体と同様の表現型を示した。この研究は、個別の miRNA が特定の標的遺伝子の発現を負に抑制することで発生に大きな影響を持つことを明らかにした最初の報告である。miR-JAW はその後 miR319 と名前を改められ、陸上植物に広く保存される miRNA ファミリーであることがわかっている。

miR-JAW の研究と並列して、様々な miRNA ファミリーの機能解析が行なわれた。発生における個別の miRNA の機能としてよく知られるのが、miR156/157 と miR172 による環境非依存的な花成時期の調節機構である。植物の花成時期は、日長や温度などの環境刺激に応答して変化することが明らかになっているが、これらとは独立して年齢依存的に花成時期が調節されており、この経路に関与するのが miR156/157 と miR172 の 2 つの miRNA ファミリーである。miR156/157 は SQUAMOSA PROMOTER-BINDING LIKE (SPL) 転写因子群を、miR172 は APETALA2 (AP2) 転写因子群をそれぞれ標的遺伝子としている。35S プロモータ一下で miR156 を過剰発現させた植物は、発芽後ロゼット葉を作り続け、抽薹するまでに非常に時間がかかる表現型を示す (Huijser and Schmid 2011)。一方で miR172 を過剰発現させた植物体は通常よりも早い時期での花成を示すことから、2 つの miRNA は花成時期に対して相反する機能を持つことがわかる。野生型のシロイヌナズナにおいて miR156 の発現量は発芽後から経時に減少していく、反対に miR172 は上昇していく (Wu et al. 2009)。同時に標的遺伝子である SPL9 の発現量は経時に増加していく一方で、AP2 転写因子である TOE1/2 の発現量は減少する。この 2 種類の miRNA の発現量をスイッチすることによって、花成時期を上手く調節していると考えられる。

miRNA は植物の発生において、細胞運命や形態パターンの決定にも大きく関与する (Hisanaga et al. 2014)。植物の形態形成に大きなはたらきをする HOMEOODOMEIN-LEUCINE ZIPPER III (HD-ZIPIII) 転写因子群を標的とする miR166/165 ファミリーは、様々な細胞運命決定を担う因子である。HD-ZIPIII ファミリーの *PHABULOSA* (*PHB*) 遺伝子中にある miR166/165 の標的部位に変異が入ったドミナント変異体 *phb-1d* は、葉の背腹性を失い棒状の葉を形成することから、miR166/165 による発現抑制が背軸形成に重要なはたらきをもつことが明らかになっている (McConnell et al. 2001)。反対に tasiRNA の 1 つである *TAS3* にコードされた tasiR-ARF は、*AUXIN RESPONSE FACTOR* (ARF) 2-4 遺伝子の発現を抑制することで向軸形成に正にはたらくことがわかつており、2 種類の発現制御経路によって葉の向背軸パターンが形成されることがわかる (Chitwood et al. 2009)。他にも miR166/165 は根の細胞配列パターン形成にも関与していることなどから、一部の miRNA は植物の形態のパターンを作る上で様々な器官において重要なはたらきを持つことがわかる。

上に挙げた miRNA に共通する特徴として、植物の発生に大きな影響を持つ転写因子を標的としている点である。植物の正常な発生に必須な miRNA-転写因子ペアは、種を越えて保存されている場合が多い。続いて miRNA と標的遺伝子の進化的な側面に関して、次章で説明した

い。

4. 植物 microRNA の進化的な側面から見た特徴

前章では、植物の発生に大きな影響を与える miRNA のはたらきについて説明した。注目すべきは、発生に大きな役割を持つ miRNA の多くは、特定の転写因子ファミリーを標的としており、陸上植物種間での保存度が非常に高いという点である。次世代シーケンサーの発達により、ゲノム解読や小分子 RNA の網羅的シーケンス解析を比較的容易に行なうことができるようになった。その結果、現在までにシロイヌナズナを始めとした双子葉植物以外にも、单子葉植物、裸子植物、小葉類、コケ植物などの陸上植物や、クラミドモナスなどの藻類においても、その種で発現している miRNA が網羅的に同定されている。種間での比較解析によって、どの miRNA ファミリーがどの程度陸上植物の中で保存されているのかが明らかになってきている。最も保存度が高いファミリーは miR156/157, miR319/159, miR160, miR166/165, miR171/170, miR408 の 6 種類であり、陸上化後最も早くに分岐したとされるコケ植物から、双子葉植物までほとんど全ての陸上植物間で保存されている (Cuperus et al. 2011)。その他にも、前述した miR172 や、花序の正常な発生に必須な miR167 などは被子植物内で広く保存されているなど、発生に重要な miRNA ファミリーは保存度が高い傾向にあることが示唆される。

保存度の高い miRNA は、標的遺伝子との関係も保存されている場合が多いという点は興味深い。まずモデル植物であるシロイヌナズナとイネとの間で miRNA およびその標的遺伝子ファミリーが保存されていることが、コンピューター上の解析によって推測された (Reinhart et al. 2002, Sunkar et al. 2005)。さらに Floyd と Bowman (2004) では、miR166 の *HD-ZIPIII* 遺伝子内の標的配列が、ヒメツリガネゴケやゼニゴケといったコケ植物においても保存され、miR166 によって切断されていることを RACE 解析等によって明らかにした。その後の複数の研究によって、miR166 以外の保存度の高い miRNA に関しても、被子植物からコケ植物まで同じ遺伝子ファミリーを標的としていることが明らかにされてきた (Arazi et al. 2005, Axtell and Bartel 2005, Lin et al. 2016, Tsuzuki et al. 2016 : 表 1)。ではなぜこれらの miRNA-標的遺伝子間の関係が保存されているのだろうか。その理由として、植物における miRNA と標的遺伝子の間の塩基配列の相補性の高さが考えられる。植物 miRNA がはたらくためには、標的 RNA との間で 18 塩基程度相補性を持つことが必要とされている (Liu et al. 2014)。動物 miRNA がはたらくためにはシード領域と呼ばれる 2 から 8 塩基目までは標的 RNA と結合することが必要であるが、それ以外の領域の相補性は必須でない場合が多い (Bartel 2009)。この違いは、植物 miRNA が AGO タンパク質の活性に依存した標的 mRNA の切断を中心に発現抑制している一方で、動物 miRNA は他の因子との共役による翻訳抑制を中心としていることが原因と考えられている (Bartel 2004)。

miRNA の標的となっている遺伝子群は、前述の通り発生に大きな影響を持つ遺伝子、特に転写因子群が多いことから、miRNA の配列および標的遺伝子中の miRNA 結合配列に変異が入ると、発生に深刻な異常をきたす場合が多く、結果的に miRNA 側、標的遺伝子側の塩基配列が安定的に保存してきたと考えられる。

また、保存度合いの高い miRNA は、その遺伝子座数が多くゲノム上で重複していることが

	シロイヌナズナ		ヒメツリガネゴケ		ゼニゴケ	
	MiRNA	標的遺伝子座(ファミリー名)	MiRNA	標的遺伝子座(ファミリー名)	MiRNA	標的遺伝子座(ファミリー名)
miR156/157	12	10(SPL)	3	3(SPL)	0?	0(SPL)
miR319/159	6	8(MYB)、5(TCP)	5	2(MYB)	2	1(MYB)
miR160	3	3(ARF)	9	1(ARF)	1	1(ARF)
miR166/165	9	5(HD-ZIPIII)	13	5(HD-ZIPIII)	1	1(HD-ZIPIII)
miR171/170	4	3(GRAS)	2	2(GRAS)	1	0?(GRAS)

表1 陸上植物3種間でのMiRNA遺伝子座および標的遺伝子座数の比較

わかっている (Axtell 2008)。被子植物であるシロイヌナズナやイネだけでなく、陸上植物内で早期に分岐したコケ植物セン類ヒメツリガネゴケにおいても、MiRNA 遺伝子座数は重複している (表 1)。ゲノム解析により、ヒメツリガネゴケのゲノムは進化の過程で倍加を経たことが推測されていることから (Rensing et al. 2008)、ゲノム倍加が 1 つの要因であることが予想される。MiRNA 遺伝子座と同様に、多くの場合標的遺伝子ファミリーの重複も見られるため、1 つの miRNA ファミリーによる 1 種類の標的遺伝子ファミリーを取ってみても、発現制御ネットワークは複雑化していることがわかる。例えば、シロイヌナズナでは 8 遺伝子座の miR156 および 4 遺伝子座の miR157 が 10 遺伝子座の SPL 遺伝子を制御しているため、単純な組み合わせは 120 に及ぶ。標的遺伝子の重複は、多くの場合アミノ酸コード領域中の miRNA と相補的な塩基配列が保存されたまま起こる場合が多いが、稀に同じファミリー間で miRNA の結合する mRNA 上の位置が保存されていない場合が存在する。シロイヌナズナに 16 遺伝子座存在する SPL 転写因子のうち、miR156/157 の標的となるのは 10 種類ある。そのうち SPL2, 6, 9, 10, 11, 13, 15 の 7 種類はアミノ酸コーディング領域に miRNA 結合配列を持っているのだが、SPL3, 4, 5 は 3'UTR に存在している (Wu and Poethig 2006)。これはほとんどの miRNA 標的配列がアミノ酸コーディング領域に存在しているシロイヌナズナでは珍しく、遺伝子重複の後 SPL3, 4, 5 の元となる遺伝子内でナンセンス変異の導入などによりコーディング領域が 3'UTR に置き換わった結果であると推測される。このようにシーケンシング技術やバイオインフォマティクスの発展により、発生等に大きな影響を持つようになった miRNA は標的遺伝子との関係を維持しながら、遺伝子重複等を繰り返すことで発現制御を複雑化しているという miRNA の特徴が進化的な側面から見えてくるようになった。筆者ら (2016) および Lin ら (2016) は、近年新規モデル植物として用いられているコケ植物タイ類ゼニゴケにおいて発現している miRNA を、次世代シーケンサーを用いて網羅的に同定した。ゼニゴケは保存度が高いとされる miRNA ファミリーのうち miR156/157 を欠いた 6 種類の miRNA を持っていた。またこれらの miRNA に対する標的遺伝子も他の陸上植物との間で共通であることを明らかにした。ゼニゴケが他の陸上植物と異なるのは、保存度の高い miRNA ファミリーのゲノム上の遺伝子重複が非常に少なく、遺伝子座が 1 つや 2 つに限定されているという点である (表 1)。MiRNA 遺伝子だけでなく、標的遺伝子の遺伝子座数も少なく miRNA-標的遺伝子の関係がシンプルであり、陸上植物の miRNA-標的遺伝子の制御システムとその機能を解析するモデルとしての活用が期待される。

5. シロイヌナズナ以外の植物種を用いた発生における microRNA の機能解析

上述したように、植物の miRNA の発生における機能解析は主にシロイヌナズナを用いること

で発展してきた。これはシロイヌナズナの変異体リソースの豊富さや、ゲノム情報が最も早く明らかになったこと、次世代シーケンサーの発展時期とちょうどタイミングが重なったことなど様々な理由が挙げられる。しかしながら、シロイヌナズナの発生における知見を全ての植物に当てはめることができないのも事実であり、数は多くないものの他の植物種を用いて行なわれた植物発生における miRNA の機能解析の例をいくつか紹介する。

変異体を用いた順遺伝学的な蓄積が豊富なトウモロコシ (*Zea Maize*) を用いた研究では、幼生の葉を作り続けたり、花序に幼生の特徴を残したままのネオテニー変異体である *Congrass1* (*Cg1*) の原因が、T-DNA 挿入による zma-miR156b および c の過剰発現によるものであることを明らかにした (Chuck et al. 2007)。また、シロイヌナズナと同様に早期からモデル植物として用いられてきたのはイネ (*Oryza sativa*) である。単子葉植物であるという特徴以外にも、主要な穀物の 1 つであるという応用的な観点からも研究に用いられてきた植物種である。イネにおいては早くから EST やドラフトゲノム配列が明らかになっていたこともあり、前述したようにシロイヌナズナと並行する形で miRNA および標的遺伝子の同定が行なわれた (Reinhart et al. 2002, Sunkar et al. 2005)。イネにおいてはシロイヌナズナとの間で保存された miRNA や、イネ独自の miRNA の存在が明らかになり、初めて植物 miRNA の進化的な側面からの知見が得られた。発生における機能も変異体解析などにより明らかになっている。Jiao ら (2010) は野生種の交配から同定した *IPA1* 遺伝子がシロイヌナズナの SPL 転写因子と相同性の高い *OsSPL14* であり、miR156 標的部位への変異がイネ種子の産生量を上げることを明らかにした。その他の研究では、独立した 3 つの遺伝学的な解析により GRF 転写因子を標的とする miR396 を抑制することでイネ種子の産生量が増大することも明らかになっており (Che et al. 2015, Gao et al. 2015, Duan et al. 2015)、miRNA の応用面に着目した研究もイネを用いて行なわれている。他にも農作物特有の特徴を用いた研究として、リンゴにおいて miR172 の発現によって果実の大きさが抑制されることを明らかにした報告など (Yao et al. 2015)、シロイヌナズナでは行なうことのできない応用的な研究も徐々に行なわれるようになってきた。シロイヌナズナと同じくアブラナ科のミチタネツケバナ (*Caldamine hirsuta*) は、シロイヌナズナで得た知見を活かすことのできる近縁種として注目されている。ミチタネツケバナは、シロイヌナズナとのいくつかの形態的な違いを持つため、シロイヌナズナにおいて作られたモデルや理論などを拡張できる可能性がある。幼生葉から成熟葉に成長段階が移るに連れてミチタネツケバナは複葉を形成するようになるというシロイヌナズナにはない特徴に着目し、Rubio-Samoza ら (2014) は、miR164-CUC, miR319-TCP, miR156-SPL の 3 種類の miRNA 標的遺伝子ペアが協調して葉の成熟を制御していることを明らかにした。ミチタネツケバナとは反対に陸上植物内で上記の被子植物と離れた位置に属するコケ植物を用いた研究も、数はまだ少ないながら行われている。セン類ヒメツリガネゴケを用いた研究では、miR156 が原糸体から茎葉体への成長の転換を SPL 転写因子の発現を抑制することで促進している一方で、miR390 によって発現が誘導された tasiRNA が AP2 転写因子を抑制し、これに拮抗的にはたらくことを明らかにしている (Cho et al. 2012)。コケ植物は配偶体 (核相 n) で生活環の多くを過ごすなど上記の種子植物とは生活環が大きく異なり、比較進化発生学的な知見はまだ少ない。今後の研究によって陸上植物における miRNA の機能の多様性・普遍性に関する理解が深まることを期待したい。

6. おわりに

ここまで説明したように、植物 miRNA の研究はその発見以来、シロイヌナズナを中心として

様々な植物種を用いることで様々な角度から発展を続けてきた。では最後に今後の植物 miRNA に関する研究はどのように進んでいくだろうか。

基礎科学的な面では、個々の miRNA の機能に留まらず、複数の miRNA-標的遺伝子が関わる遺伝子発現ネットワークなど植物の発生を成り立たせている複雑な遺伝子発現制御システムの解明がなされる可能性があるだろう。現在複数の miRNA が関わる発生現象としては、miR156 および miR172 による花成時期の制御や (Wu et al. 2009) , miR159, miR319, miR167 が協調して花の形成に関わることなどが明らかになっているが (Rubio-Samoza and Weigel 2013) ,多くの miRNA が発生に大きな影響を持つ転写因子群を制御しており、未だ明らかになっていないネットワークが可視化されるかもしれない。またこれからは CRISPR/Cas9 を用いた研究が数多く登場することが予想される。CRISPR/Cas9 はゲノム DNA 上の目的の配列に切断を起こし、変異を誘導することができる (Doudna and Charpentier 2014)。miRNA 研究において、miRNA 変異体がなかなか得られないのが困難な点の 1つであった。シロイヌナズナの場合、多くの変異体は EMS や X 線照射による塩基置換か、アグロバクテリウムを用いた T-DNA 挿入によって得られている。どちらにも共通する点として変異誘導がランダムであることが挙げられ、20 塩基程度と配列が短い miRNA の変異体が得られることは非常に稀である。CRISPR/Cas9 は、この難点を乗り越えられる可能性を持っている。またモデル植物以外の植物種においても応用する系の開発が数多く為されていることから、miRNA の機能解析もより容易にできる可能性がある。

次世代シーケンサーやバイオインフォマティクスを用いた解析が比較的容易に扱えるようになったことで、近年農作物を含む様々な植物種での miRNA の網羅的な同定が盛んに行なわれている一方で、個々の miRNA の持つ機能解析、特に特定の有用な形質を増加させるような miRNA の同定やメカニズムの解析に関しては、遅れている印象がある。個々の miRNA の機能解析にはやはり形質転換系や培養細胞系の開発などの基本的な技術や、miRNA やそれに代替する物質、阻害剤などの農作物への大量導入を行なう系などが必要であり、このような研究開発も継続的に行なわれる必要があるだろう。

謝辞

本研究は、文部科学省科学研究費助成事業および日本学術振興会特別研究員奨励費の助成を受けて遂行された。京都大学河内孝之博士、荒木崇博士、オーストラリアモナシュ大学 John Bowman 博士、広島大学嶋村正樹博士に材料の提供、研究内容の助言等多大なる支援を頂いたことに感謝したい。

引用文献

- Arazi, T., Talmor-Neiman, M., Stav, R., Riese, M., Huijser, P., & Baulcombe, D.C. 2005. Cloning and characterization of microRNAs from moss. *Plant J.* 43: 837–848.
- Axtell, M.J., & Bartel, D.P. 2005. Antiquity of microRNAs and their targets in land plants. *Plant Cell* 17: 1658–1673.
- Axtell, M. J. 2008. Evolution of microRNAs and their targets: are all microRNAs biologically relevant? *Biochimica et Biophysica Acta* 1779: 725–34.
- Bartel, D. P. 2004. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 116: 281–297.
- Bartel, D. P. 2009. Review MicroRNAs: Target Recognition and Regulatory Functions. *Cell*: 215–233.

- Bollman, K. M., Aukerman, M. J., Park, M., Y., Hunter, C., Berardini, T., Z., & Poethig, R. S. 2003. HASTY, the *Arabidopsis* ortholog of exportin 5/MSN5, regulates phase change and morphogenesis. *Development* 130:1493-504.
- Che, R., Tong, H., Shi, B., Liu, Y., Fang, S., Liu, D., Xiao, Y., Hu, B., Liu, L., Wang, H., Zhao, M., & Chu, C. 2015. Control of grain size and rice yield by GL2-mediated brassinosteroid responses. *Nature Plants* 2: 1–7.
- Chitwood, D. H., Nogueira, F. T. S., Howell, M. D., Montgomery, T. A., Carrington, J. C., & Timmermans, M. C. P. 2009. Pattern formation via small RNA mobility. *Genes and Dev.* 549–554.
- Cho, S. H., Coruh, C., & Axtell, M. J. 2012. miR156 and miR390 Regulate tasiRNA Accumulation and Developmental Timing in *Physcomitrella patens*. *Plant Cell* 24: 4837-4849.
- Chuck, G., Cigan, A M., Saeteurn, K., & Hake, S. 2007. The heterochronic maize mutant Corngrass1 results from overexpression of a tandem microRNA. *Nature Genetics* 39: 544–549.
- Coruh, C., Shahid, S., & Axtell, M. J. 2014. Seeing the forest for the trees: annotating small RNA producing genes in plants. *Current Opinion in Plant Biology* 18: 87–95.
- Cuperus, J. T., Fahlgren, N., & Carrington, J. C. 2011. Evolution and Functional Diversification of MIRNA Genes. *Plant Cell* 23: 431-442.
- Doudna, J. A., & Charpentier, E. 2014. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science* 346: 1258096–1258096.
- Duan, P., Ni, S., Wang, J., Zhang, B., Xu, R., Wang, Y., & Chen, H. 2016. Regulation of OsGRF4 by OsmiR396 controls grain size and yield in rice. *Nature Plants* 2: 15203.
- Floyd, S. K., & Bowman, J. L. 2004. Gene regulation: ancient microRNA target sequences in plants. *Nature* 428: 485–486.
- Gao, F., Wang, K., Liu, Y., Chen, Y., Chen, P., Shi, Z., Luo, J., Jiang, D., Fan, F., Zhu, Y., & Li, S. 2015. Blocking miR396 increases rice yield by shaping inflorescence architecture. *Nature Plants* 2: 15196.
- Golden, T. A., Schauer, S. E., Lang, J. D., Mushegian, A. R., Grossniklaus, U., Meinke, D. W., & Ray, A. 2002. SHORT INTEGUMENTS1/SUSPENSOR1/CARPEL FACTORY , a Dicer Homolog , Is a Maternal Effect Gene Required for Embryo Development in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 130: 808–822.
- Hisanaga, T., Miyashima, S., & Nakajima, K. 2014. Small RNAs as positional signal for pattern formation. *Current Opinion in Plant Biology* 21: 37–42.
- Huijser, P., & Schmid, M. 2011. The control of developmental phase transitions in plants. *Development* 138(19), 4117–29.
- Iwakawa, H., & Tomari, Y. 2013. Molecular Insights into microRNA-Mediated Translational Repression in Plants. *Molecular Cell* 52: 591–601.
- Jiao, Y., Wang, Y., Xue, D., Wang, J., Yan, M., Liu, G., Dong, G., Zeng, D., Lu, Z., Zhu, X., Qian, Q., & Li, J. 2010. Regulation of OsSPL14 by OsmiR156 defines ideal plant architecture in rice. *Nature Genetics* 42: 541–545.
- Jacobsen, S. E., Running, M. P., & Meyerowitz, E. M. 1999. Disruption of an RNA helicase/RNase III gene in *Arabidopsis* causes unregulated cell division in floral meristems. *Development* 126: 5231–5243.

- Kawamata, T., & Tomari, Y. 2010. Making RISC. *Trends Biochem. Sci.* 35: 368–76.
- Kurihara, Y., & Watanabe, Y. 2004. Arabidopsis micro-RNA biogenesis through Dicer-like 1 protein functions. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 101: 12753–12758.
- Kurihara, Y., Takashi, Y., & Watanabe, Y. 2006. The interaction between DCL1 and HYL1 is important for efficient and precise processing of pri-miRNA in plant microRNA biogenesis. *RNA* 12: 206–12.
- Liu, Q., Wang, F., & Axtell, M. J. 2014. Analysis of Complementarity Requirements for Plant MicroRNA Targeting Using a Nicotiana benthamiana Quantitative Transient Assay. *Plant Cell* 26: 741–753.
- Lin, P.-C., Lu, C.-W., Shen, B.-N., Lee, G.-Z., Bowman, J. L., Arteaga-Vazquez, M. A., Liu, L.-Y. D., Hong, S.-F., Lo, C.-F., Su, G.-M., Kohchi, T., Ishizaki, K., Zachgo, S., Althoff, F., Takenaka, M., Yamato, K. T., & Lin, S.-S. 2016. Identification of miRNAs and their targets in the liverwort Marchantia polymorpha by integrating RNA-Seq and degradome analyses. *Plant and Cell Physiol.* 57: 339–358.
- Llave, C., Xie, Z., Kasschau, K. D., & Carrington, J. C. 2002. Cleavage of Scarecrow-like mRNA targets directed by a class of Arabidopsis miRNA. *Science* 297: 2053–2056.
- McConnell, J.R., Emery, J., Eshed, Y., Bao, N., Bowman, J., & Barton, M.K. 2001. Role of PHABULOSA and PHAVOLUTA in determining radial patterning. *Nature* 411: 709–713.
- Palatnik, J. F., Allen, E., Wu, X., Schommer, C., Schwab, R., Carrington, J. C., & Weigel, D. 2003. Control of leaf morphogenesis by microRNAs. *Nature* 425: 257–263.
- Ray, A., Lang, J. D., Golden, T., & Ray, S. 1996. SHORT INTEGUMENT (SIN1), a gene required for ovule development in Arabidopsis, also controls flowering time. *Development* 122: 2631–2638.
- Reinhart, B. J., Weinstein, E. G., Rhoades, M. W., Bartel, B., & Bartel, D. P. 2002. MicroRNAs in plants. *Genes & Development* 16: 1616–1626.
- Rensing, S. A., Lang, D., Zimmer, A. D. et al. 2008. The *Physcomitrella* genome reveals evolutionary insights into the conquest of land by plants. *Science* 319: 64–69.
- Rubio-Somoza, I., & Weigel, D. 2013. Coordination of Flower Maturation by a Regulatory Circuit of Three MicroRNAs. *PLoS Genetics* 9: e1003374.
- Rubio-Somoza, I., Zhou, C.-M., Confraria, A., Martinho, C., von Born, P., Baena-Gonzalez, E., Wang, J. W., & Weigel, D. 2014. Temporal Control of Leaf Complexity by miRNA-Regulated Licensing of Protein Complexes. *Current Biology* 24: 2714–2719.
- Schauer, S. E., Jacobsen, S. E., Meinke, D. W., & Ray, A. 2002. DICER-LIKE1: blind men and elephants in Arabidopsis development. *Trends in Plant Science* 7: 487–491.
- Schwartz, B. W., Yeung, E. C., & Meinke, D. W. 1994. Disruption of morphogenesis and transformation of the suspensor in abnormal sus pensor mutants of Arabidopsis. *Development* 125: 3235–3245.
- Sunkar, R., Girke, T., Jain, P. K., & Zhu, J.-K. 2005. Cloning and characterization of microRNAs from rice. *Plant Cell* 17: 1397–1411.
- Tsuzuki, M., Nishihama, R., Ishizaki, K., Kurihara, Y., Matsui, M., Bowman, J. L., Kohchi, T., Hamada, T., & Watanabe, Y. 2016. Profiling and characterization of small RNAs in the liverwort, Marchantia polymorpha, belonging to the first diverged land plants. *Plant and Cell Physiol.* 57: 359–372.
- Wu, G., & Poethig, R. S. 2006. Temporal regulation of shoot development in Arabidopsis thaliana by

- miR156 and its target SPL3. *Development* 133: 3539–3547.
- Wu, G., Park, M. Y., Conway, S. R., Wang, J., Weigel, D., & Poethig, R. S. 2009. The Sequential Action of miR156 and miR172 Regulates Developmental Timing in *Arabidopsis*. *Cell* 138: 750–759.
- Yang, L., Liu, Z., Lu, F., Dong, A., & Huang, H. 2006. SERRATE is a novel nuclear regulator in primary microRNA processing in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* 47: 841–850.
- Yao, J., Xu, J., Cornille, A., Tomes, S., Karunairetnam, S., Luo, Z., et al. 2015. A microRNA allele that emerged prior to apple domestication may underlie fruit size evolution. *Plant J.* 84: 417–427.

RNA サイレンシングと植物ウイルス

熊倉直祐, 栗原志夫

理化学研究所 環境資源科学研究センター

〒230-0045 神奈川県横浜市鶴見区末広町 1-7-22

Naoyoshi Kumakura, Yukio Kurihara

Link between plant virus and RNA silencing

Key words: *plant RNA virus, resistance, RNA silencing, symptom*

RIKEN Center for Sustainable Science, 1-7-22 Suehiro-cho, Tsurumi, Yokohama,

Kanagawa, 230-0045 Japan

DOI: 10.24480/bsj-review.8b3.00113

1. RNA サイレンシングの概要

侵入してくるウイルスへの抵抗性は、動植物で大きく異なっている。動物は、抗体・抗原反応に代表される免疫機構を中心にウイルスの増殖を防ぎ、RNA 干渉・サイレンシング機構（植物での RNA 干渉を RNA サイレンシングと呼ため、本稿では RNA 干渉を含めて RNA サイレンシングと呼称する）を使うことは稀である。一方で、植物は RNA サイレンシングがウイルス抵抗性において重要な役割を占めている。

RNA サイレンシングは内在性の遺伝子配列と相同的な配列を外から導入すると、その遺伝子の発現が抑えられてしまうという現象である。1998 年に線虫で、二本鎖 RNA が RNA 干渉の引き金となるという分子メカニズムの一端が初めて報告された（Fire et al. 1998）。植物での現象の発見は 1990 年に遡る。ペチュニアで内在性遺伝子と相同的な遺伝子を形質転換で導入すると、その遺伝子の発現が抑制されることが明らかになり、これが現象としての RNA サイレンシングの初めての報告であると考えられている（Napoli et al. 1990）。この例のように、しばしば形質転換植物で導入遺伝子の RNA サイレンシングによる抑制がみられてきた。現在では、RNA サイレンシングとは、細胞内に存在する長さ 21-24 塩基程度の小分子 RNA が相補的な配列を持つ RNA に結合し、RISC (RNA-induced silencing complex) と呼ばれるエフェクター複合体をリクルートすることで RNA の分解・または翻訳抑制を行うメカニズムであることが明らかとなっている（Chapman and Carrington 2007, Iwakawa and Tomari 2015）。真核生物において RNA サイレンシングの発生・環境応答における役割は非常に重要であり、RNA サイレンシ

グのいくつかの主要な遺伝子を欠損した生物個体は、動植物問わず致死に至る重篤な表現型を示す。特に植物においては、発生過程・ストレス応答時の遺伝子発現の制御・ウイルス抵抗性において重要であることが明らかになっている。本稿ではこれまで明らかになってきた植物の RNA サイレンシングを、植物ウイルス抵抗制機構としての側面から概説する。

RNA サイレンシングは大きく二つのステップに分けられる。小分子 RNA の生合成と、小分子 RNA による標的 RNA への作用である。小分子 RNA は長さ 21-24 塩基程度の RNA であり、生合成過程から microRNA (miRNA) と small interfering RNA (siRNA) に分類される。miRNA の前駆体はゲノムにコードされ、mRNA と同様に RNA ポリメラーゼ II によって転写され、5' 末端にキャップ構造と 3' ポリ A 末端を持つ（図 1, 右）。miRNA 前駆体は自身の配列の持つ相補性からステムループ構造を形成し、二本鎖 RNA 切断酵素である Dicer-like 1 (DCL1) によってその構造が認識され、正確に miRNA となる配列が切り出される (Kurihara and Watanabe 2004, Kurihara et al. 2006)。成熟した miRNA は核内から核外へと移動し、相補的な標的 RNA を抑制すると考えられている。miRNA の持つ特徴としては、ゲノムにコードされていること、miRNA の標的となる mRNA の種類が決まっていることである。

一方、21 塩基長の siRNA は miRNA と異なり、ゲノム上の配列に限らず外来遺伝子など多様な配列をもとに合成される。21-22 nt 長の siRNA の前駆体となる RNA は細胞質で SGS3 とよばれるタンパク質に結合し、二本鎖 RNA 合成酵素である RDR6 によって二本鎖化される (Dalmay et al. 2000, Mourrain et al. 2000, Peragine et al. 2004, Yoshikawa et al. 2005)。SGS3 と RDR6 は細胞質で SGS3/RDR6-body (siRNA-body) とよばれる顆粒状構造を形成することから、この構造体内で siRNA の前駆体が二本鎖 RNA 化されると考えられる (Jouannet et al. 2012, Kumakura et al. 2009)。この二本鎖 RNA は二本鎖 RNA 切断酵素である Dicer-like タンパク質によって端から 21-22 nt 長ずつ順に切断され、成熟した siRNA となる。このような siRNA の原料は、ウイルス由来の RNA、細胞質内で分解されなかつた mRNA、ta-siRNA (trans-acting siRNA) の前駆体など多岐にわたるのが特徴である (Allen et al. 2005, Hamilton and Baulcombe 1999, Gazzani et al. 2004)。

生合成経路とは異なり siRNA や miRNA の作用機構は共通している。モデル植物であるシロイヌナズナは RISC の活性中心である Argonaute (AGO) とよばれる endonuclease 活性を持つタンパク質を 11 種コードする。AGO は siRNA・miRNA と結合するポケットを備えており、取り込んだ siRNA・miRNA と相補的な配列を持つ標的 RNA を切断あるいは、その翻訳を抑制する。miRNA が結合するのは主に AGO1 である。siRNA は AGO1-11 のいずれからも検出される。AGO1-11 は発現・局在のパターンが異なっており、どの AGO と結合するかは miRNA・siRNA の作用を知るうえで非常に重要である。植物では小分子 RNA の 5' 末端の塩基がどの AGO に取り込まれるかを決める重要な因子であることが明らかになっている。たとえば、

AGO2 は主に 5'末端にアデニンを持つ小分子 RNA と、AGO5 は主に 5'末端にシトシンを持つ小分子 RNA は AGO5 と結合する。このように小分子 RNA はそれぞれ親和性を持つ AGO と結合し、標的 RNA に作用する (Mi et al. 2008, Takeda et al. 2008)。

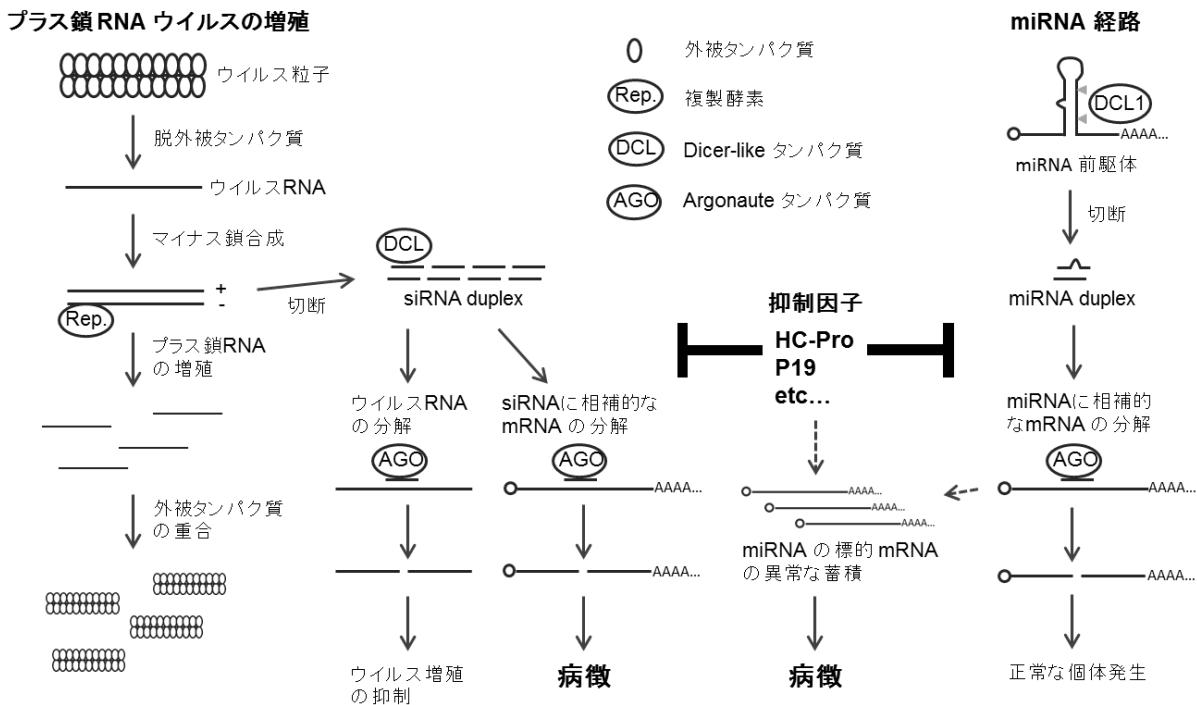


図 1 植物ウイルスと RNA サイレンシングとの関係性

プラス鎖 RNA ウィルスを例とした。RNA サイレンシングは植物ウィルスの増殖を抑制する抵抗性機構として働く。一方で、植物ウィルスはカウンターディフェンスとして RNA サイレンシングを阻害する抑制因子を自ら備えている。ウィルス由来の siRNA はウィルス RNA を分解するだけではなく、宿主側の相補的な mRNA も分解してしまい、病徴が現れると考えられる。さらに、ウィルスの抑制因子は、miRNA 経路も阻害してしまい、miRNA とその標的 mRNA のバランスを崩してしまい、病徴を引き起こす。

2. 植物ウイルスと RNA サイレンシング抑制因子

知られている植物ウイルスの約八割はゲノムが RNA からなる RNA ウィルスであり、そのゲノム RNA は外被タンパク質に覆われている。ウィルスの外被タンパク質を発現する組換え植物は、ウィルスの感染・増殖に対して抵抗性を示すことが知られていた (Abel et al. 1986)。また、植物ウイルスの感染を予防するために、予め植物に病原性の弱い弱毒ウィルスを感染させておき、後から侵入してくる強毒ウィルスの感染を防ぐ手法も広く使われてきた (Kurihara and Watanabe, 2003)。1990 年代の後半に、上記のようなウイルス抵抗性と RNA サイレンシングの類似性が指摘され始めた (Ratcliff et al. 1997)。そして、1999 年のウィルス由来の

siRNA の発見によって, RNA サイレンシングがウイルスに対する抵抗性機構であることが真に証明されたのである (Hamilton and Baulcombe 1999)。

植物ウイルスと RNA サイレンシングによる抵抗性の分子機構について, ここではタバコモザイクウイルス (TMV) に代表されるプラス鎖 RNA ウィルスを例に解説する (図 1, 左)。TMV ゲノムはプラス鎖の一本鎖 RNA であり, それが外被タンパク質に包まれることでウイルス粒子を形成している。このウイルスは細胞内に侵入すると外被タンパク質が外れ, ゲノム RNA から植物の持つ翻訳装置を用いて複製酵素の翻訳を開始する。複製酵素は, プラス鎖であるゲノム RNA からマイナス鎖 RNA (二本鎖化) を合成し, さらにマイナス鎖 RNA を鋳型にゲノム RNA を複製する。このように一本鎖プラス鎖 RNA 二本鎖化とマイナス鎖 RNA を鋳型にしたプラス鎖 RNA の合成の一連のサイクルを繰り返すことでウイルスは爆発的に増殖する。一方で植物は, ウイルスの増殖を抑えるために, ウィルス複製時の二本鎖 RNA の Dicer による切断を通して, RNA サイレンシングをひき起こすウイルス由来の siRNA の生成する (Hamilton and Baulcombe 1999)。siRNA 生成は RDR1/6 の作用によって, さらに促進される (Wang et al. 2010)。生成された siRNA は, さらにウイルス RNA を標的として分解することで, 増殖を抑えると考えられている。

しかし, ウイルスも植物にやられてばかりではない。ウイルスは自身のゲノム上に RNA サイレンシング機構を抑制するタンパク質をコードする遺伝子を持つのである (図 1, 中央)。最初に同定されたウイルスの抑制因子はポティウイルスにコードされた HC-Pro (helper component protease) である (Anandalakshmi et al. 1998, Kasschau and Carrington, 1998)。もともと HC-Pro は, 長期にわたるウイルスのゲノム複製や, 維管束依存的なウイルスの長距離移行に必要な因子として知られていた。これらの現象は HC-Pro が RNA サイレンシングを阻害することで引き起こされる。また, 広く知られている抑制因子としては P19 がある。P19 はトネバスウイルスがコードする 19 kDa タンパク質で, ウィルスにとって病徴を引き起こすのに必要な因子として同定され, 後に細胞内の siRNA と結合し, その siRNA の RISC への取り込みを阻害することで, RNA サイレンシングを抑制することが明らかになった (Silhavy et al. 2002, Qiu et al. 2002, Qu and Morris 2002)。比較的良好に解析されている P19 による RNA サイレンシング抑制の一例を図 2 に示す。結晶構造解析によって, P19 は一組の siRNA duplex (図 1) に対して配列には依存せずにダイマーとして結合することが報告されている (Vargason et al. 2003)。このような性質から, P19 は siRNA duplex と同じ構造を持つ miRNA duplex にも結合する。HC-Pro や P19 のみならず, 様々なウイルスが抑制因子を持つことが明らかになり, それらの多くが小分子 RNA と結合することが示された (Lakatos et al. 2006, Merai et al. 2006, Voinnet et al. 1999)。例に挙げた TMV の場合, 複製酵素が, ウィルスの複製を担うだけではなく,

小分子 RNA に結合することで RNA サイレンシング抑制因子としても働く (Csorba et al. 2007, Kubota et al. 2003, Kurihara et al. 2007)。一つのタンパク質が全く異なる二つの機能をもつことは、ウイルスが極めて少ない遺伝子情報のみで最大限の機能を発揮し、生存するための効率の良い策かもしれない。このように植物ウイルスは抑制因子を発現することで小分子 RNA を RISC から隔離し、自身のゲノム RNA を RNA サイレンシング機構から守っている。RNA サイレンシングを抑制することが、植物ウイルスにとっては一般的な感染戦略であると考えられるようになった。

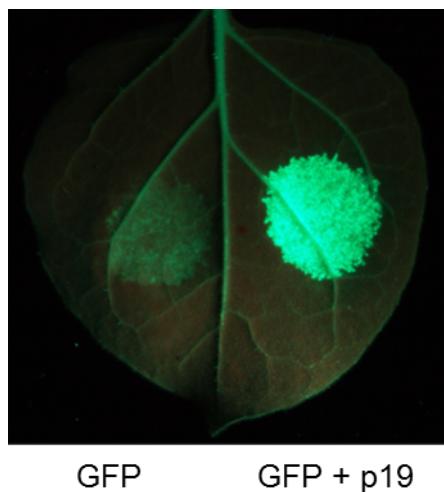


図 2 トンバスウイルス P19 による RNA サイレンシングの抑制の例

恒常的に GFP を発現する *Nicotiana benthamiana* の葉に外部からさらに GFP 遺伝子を導入すると GFP 蛍光が見られるものの、RNA サイレンシングが誘発されるため弱い蛍光となる (左側)。一方で、GFP 遺伝子とともに p19 遺伝子を導入すると RNA サイレンシングは抑制され、強い GFP 蛍光が見られる (右側)。アグロインフィルトレーション法を用いて遺伝子導入を行った。写真は UV 照射下で撮影。

3. RNA サイレンシング機構と病徵との関係性

ウイルスは植物に感染し、全身に広がって病徵を引き起こす。植物細胞に感染したウイルスは、細胞内で複製され、原形質連絡を通過して細胞から細胞へと移動し、師管を介して、感染した細胞から離れた組織へと広がっていく。ウイルス感染が引き起こす病徵はモザイク様斑紋に代表される組織の色の変化など比較的穏やかなものから、発生過程への大きな影響や細胞死などの激しいものまで多岐にわたる。これらの病徵がどのようなメカニズムによって引き起こされているかは未解明の部分が多い。しかしながら、少なくとも一部の病徵は、ウイルスの RNA サイレンシング抑制因子が、miRNA 経路を阻害することで引き起こされることが明らかになっている。

ポティウイルスであるカブモザイクウイルス (TuMV) がシロイスナズナに感染すると生長阻害や激しい発生異常という病徵が現れる。TuMV は抑制因子である HC-Pro をコードしており、HC-Pro を発現させたシロイスナズナは、TuMV 感染植物と類似した成長の阻害を受けた。HC-Pro 発現植物と TuMV 感染植物では共通して、複数個の miRNA の標的とされる mRNA の蓄積が上昇していた。つまり、HC-Pro が siRNA 経路を抑制するだけではなく、miRNA 経路も

阻害することがわかった。さらに, miRNA の標的 mRNA の多くは発生を制御する因子（転写因子など）をコードすることから, miRNA 経路が阻害され, 標的 mRNA の量的な均衡が崩れることにより, TuMV の病徵の一部として発生異常が引き起こされると考えられた (Kasschau et al., 2003)。miRNA 経路の阻害によって引き起こされる発生異常（病徵）は, 複数の抑制因子を個別に発現するシロイスナズナでみられたことから, ウィルス病に共通した病徵発生メカニズムなのかもしれない (Chapman et al. 2004)。

図 1 に示すように, ウィルス由来 siRNA は, 偶然にも siRNA の配列に相補的な宿主（植物）側の mRNA を分解の標的とすることが考えられる。植物ウィルスに付随して存在するサテライト RNA と呼ばれるタンパク質をコードしない病原性 RNA がある。キュウリモサイクウイルス (CMV) に付随して存在するサテライト RNA (Y-sat) は, タバコにおいて黄化の病徵引き起こす。この病徵の原因が, Y-sat 由來の siRNA がクロロフィルの生成に必須の内在性遺伝子である CHL1 の mRNA を分解・抑制しているためであることが示された (Shimura et al. 2011, Smith et al. 2011)。

同様の現象が, ウィルスに類似したウイロイドとその宿主において報告されている。ウイロイドは, 一本鎖環状 RNA のゲノムを持ち, タンパク質をコードしないが植物細胞内で自律的に増殖し, ウィルス同様に病徵を引き起こす。このウイロイドの病徵がどのように引き起こされているかは長年の謎であった。ウイロイドもウィルス同様に植物の RNA サイレンシングによって siRNA が生成され抑制される (Hammann and Steger 2012, Wang et al. 2004)。モモ潜在モザイクウイロイド (PLMVd) がモモに感染すると, 葉に白化の症状が現れる。この病徵も, ウイロイド由來の二つの siRNA が葉緑体の生合成に関わる cHSP90 の mRNA を分解・抑制しているためであることが示された (Navarro et al. 2012)。以上の報告以外にも, ウィルスまたはウイロイド由來の siRNA が宿主側の mRNA を標的としていることが推測される報告がなされている (Hammann and Steger 2012, Miozzi et al. 2012)。しかしながら, まだ検証された例は少なかっため, 今後の報告を待ちたい。

4. まとめ

長期にわたる植物ウィルスと宿主側の抵抗性に関する研究の中で, RNA サイレンシングが外来性核酸に対する抑制機構であることが明らかとなった。植物ウィルスは宿主側の RNA サイレンシング機構によって増殖が抑制される一方で, ウィルス側はその抵抗を抑えるための抑制因子を自ら備えている。さらに, それらの RNA サイレンシング抑制因子は宿主側遺伝子の発現制御機構に干渉し, 病徵を引き起こす。ウィルス病は時に, 宿主が子孫を残すことを妨げることもある。ウィルスにとっては, 宿主に過度な病徵が現れ, 自らが存在する場が脅かさ

れてしまうことは本来好ましくない。RNA サイレンシングとウイルスがもつ抑制因子による抵抗の関係は、うまくバランスをとりながら共進化してきたのかもしれない。

5. 謝辞

植物の RNA 研究、特に RNA サイレンシングに関する研究に従事する機会を与えてくださった東京大学大学院総合文化研究科の渡邊雄一郎教授にこの場を借りて御礼申し上げます。

6. 引用文献

- Abel, P. P., Nelson, R. S., De, B., Hoffmann, N., Rogers, S. G., Fraley, R. T., and Beachy, R. N. 1986. Delay of disease development in transgenic plants that express the tobacco mosaic virus coat protein gene. *Science* 232: 738-743.
- Allen, E., Xie, Z., Gustafson, A. M., and Carrington, J. C. 2005. microRNA-directed phasing during trans-acting siRNA biogenesis in plants. *Cell* 121: 207-221.
- Anandalakshmi, R., Pruss, G.J., Ge, X., Marathe, R., Mallory, A. C., Smith, T. H., and Vance, V. B. 1998. A viral suppressor of gene silencing in plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 95: 13079–13084.
- Chapman, E. J., and Carrington, J. C. 2007. Specialization and evolution of endogenous small RNA pathways. *Nat. Rev. Genet.* 8: 884-894.
- Chapman, E. J., Prokhnevsky, A. I., Gopinath, K., Dolja, V. V., and Carrington, J. C. 2004. Viral RNA silencing suppressors inhibit the microRNA pathway at an intermediate step. *Genes Dev.* 18: 1179-1186.
- Csorba, T., Bovi, A., Dalmay, T., and Burgyan, J. 2007. The p122 subunit of tobacco mosaic virus replicase is a potent silencing suppressor and compromises both small interfering RNA- and microRNA-mediated pathways. *J. Virol.* 81: 11768-11780.
- Dalmay, T., Hamilton, A., Rubb, S., Angell, S., and Baulcombe, D. C. 2000. An RNA-dependent RNA polymerase gene in *Arabidopsis* is required for posttranscriptional gene silencing mediated by a transgene but not by a virus. *Cell* 101: 543-553.
- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M. K., Kostas, S. A. Driver, S. E., and Mello, C. C. 1998. Potent and specific interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* 391: 806-811.
- Gazzani, S., Lawrenson, T., Woodward, C., Headon, D., and Sablowski, R. 2004. A link between mRNA turnover and RNA interference in *Arabidopsis*. *Science* 306: 1046-1048.
- Hamilton, A. J., and Baulcombe, D. C. 1999. A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants. *Science* 286: 950-952.
- Hammann, C., and Steger, G. 2012. Viroid-specific small RNA in plant disease. *RNA Biol.* 9: 809-819.

- Iwakawa, H. O., and Tomari, Y. 2015. The functions of microRNAs: mRNA decay and translational repression. *Trends Cell Biol.* 25: 651-665.
- Jouannet, V., Moreno, A. B., Elmayan, T., Vaucheret, H., Crespi, M. D., and Maizel, A. 2012. Cytoplasmic Arabidopsis AGO7 accumulates in membrane associated siRNA bodies and is required for ta siRNA biogenesis. *EMBO J.* 31: 1704-1713.
- Kasschau, K. D., and Carrington, J. C. 1998. A Counterdefensive strategy of plant viruses: suppression of posttranscriptional gene silencing. *Cell* 95: 461-470.
- Kasschau, K. D., Xie, Z., Allen, E., Llave, C., Chapman, E. J., Krizan, K. A., and Carrington, J. C. 2003. P1/HC-Pro, a Viral suppressor of RNA silencing, interferes with Arabidopsis development and miRNA function. *Dev. Cell* 4: 205-217.
- Kubota, K., Tsuda, S., Tamai, A., and Meshi, T. 2003. Tomato mosaic virus replication protein suppresses virus-targeted posttranscriptional gene silencing. *J. Virol.* 77: 11016-11026.
- Kumakura, N., Takeda, A., Fujioka, Y., Motose, H., Takano, R., and Watanabe, Y. 2009. SGS3 and RDR6 interact and colocalize in cytoplasmic SGS3/RDR6-bodies. *FEBS Lett.* 583: 1261-1266.
- Kurihara, Y., Inaba, N., Kutsuna, N., Takeda, A., Tagami, Y., and Watanabe, Y. 2007. The binding of tobamovirus replication protein with small RNA duplexes. *J. Gen. Virol.* 88: 2347-2352.
- Kurihara, Y., Takashi, Y., and Watanabe, Y. 2006. The interaction between DCL1 and HYL1 is important for efficient and precise processing of pri-miRNA in plant microRNA biogenesis. *RNA* 12: 206-212.
- Kurihara, Y., and Watanabe, Y. 2003. Cross-protection in Arabidopsis against crucifer tobamovirus Cg by an attenuated strain of the virus. *Mol. Plant Pathol.* 4: 259-269.
- Kurihara, Y., and Watanabe, Y. 2004. Arabidopsis micro-RNA biogenesis through Dicer-like 1 protein functions. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101: 12753-12758.
- Lakatos, L., Csorba, T., Pantaleo, V., Chapman, E. J., Carrington, J. C., Liu, Y. P., Dolja, V. V., Calvino, L. F., Lopez-Moya, J. J., and Burgyan, J. 2006. Small RNA binding is a common strategy to suppress RNA silencing by several viral suppressors. *EMBO J.* 25: 2768-2780.
- Merai, Z., Kerenyi, Z., Kertesz, S., Magna, M., Lakatos, L., and Silhavy, D. 2006. Double-stranded RNA binding may be a general plant RNA viral strategy to suppress RNA silencing. *J. Virol.* 80: 5747-5756.
- Mi, S., Cai, T., Hu, Y., Chen, Y., Hodges, E., Ni, F., Wu, L., Li, S., Zhou, H., Long, C., et al. 2008. Sorting of small RNAs into Arabidopsis argonaute complexes Is directed by the 5 terminal nucleotide. *Cell* 133: 116-127.
- Miozzi, L., Gambino, G., Burgyan, J., Pantaleo, V. 2013. Genome-wide identification of viral and host transcripts targeted by viral siRNAs in *Vitis vinifera*. *Mol. Plant Pathol.* 14: 30-43.
- Mourrain, P., Beclin, C., Elmayan, T., Feuerbach, F., Godon, C., Morel, J. B., Jouette, A. M., Nikic, S., Picault, N., Remoue, K., et al. 2000. Arabidopsis SGS2 and SGS3 genes are required for

- posttranscriptional gene silencing and natural virus resistance. *Cell* 101: 533-542.
- Napoli, C., Lemieux, C., and Jorgensen, R. 1990. Introduction of a chimeric Chalcone Synthase Gene into Petunia results in reversible co-suppression of homologous genes in trans. *Plant Cell* 2: 279–289.
- Peragine, A., Yoshikawa, M., Wu, G., Albrecht, H. L., and Poethig, R. S. 2004. SGS3 and SGS2/SDE1/RDR6 are required for juvenile development and the production of trans-acting siRNAs in *Arabidopsis*. *Genes Dev.* 18: 2368–2379.
- Qiu, W., Park, J. W., and Scholthof, H. B. 2002. Tombusvirus P19-Mediated Suppression of Virus-Induced Gene Silencing Is Controlled by Genetic and Dosage Features That Influence Pathogenicity. *Mol. Plant. Microbe Interact.* 15: 269–280.
- Qu, F., and Morris, T. J. 2002. Efficient infection of *Nicotiana benthamiana* by tomato bushy stunt virus is facilitated by the coat protein and maintained by p19 through suppression of gene silencing. *Mol. Plant. Microbe Interact.* 15: 193–202.
- Ratcliff, F., Harrison, B. D., and Baulcombe, D. C. 1997. A similarity between viral defense and gene silencing in plants. *Science* 276: 1558-1560.
- Shimura, H., Pantaleo, V., Ishihara, T., Myojo, N., Inaba, J., Sueda, K., Burgyan, J., and Masuta, C. 2011. A viral satellite RNA induces yellow symptoms on tobacco by targeting a gene involved in chlorophyll biosynthesis using the RNA silencing machinery. *PLoS Pathog.* 7: e1002021.
- Silhavy, D., Molnár, A., Lucioli, A., Szittya, G., Hornyik, C., Tavazza, M., and Burgýán, J. 2002. A viral protein suppresses RNA silencing and binds silencing - generated, 21- to 25-nucleotide double-stranded RNAs. *EMBO J.* 21: 3070–3080.
- Smith, N. A., Eamens, A. L., and Wang, M. B. 2011. Viral small interfering RNAs target host genes to mediate disease symptoms in plants. *PLoS Pathog.* 7: e1002022.
- Takeda, A., Iwasaki, S., Watanabe, T., Utsumi, M., and Watanabe, Y. 2008. The mechanism selecting the guide strand from small RNA duplexes is different among argonaute proteins. *Plant Cell Physiol.* 49: 493–500.
- Vargason, J. M., Szittya, G., Burgýán, J., and Hall, T. M. T. 2003. Size Selective Recognition of siRNA by an RNA Silencing Suppressor. *Cell* 115: 799–811.
- Voinnet, O., Pinto, Y. M., and Baulcombe, D. C. 1999. Suppression of gene silencing: A general strategy used by diverse DNA and RNA viruses of plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 14147–14152.
- Wang, M.-B., Bian, X.-Y., Wu, L.-M., Liu, L.-X., Smith, N. A., Isenegger, D., Wu, R.-M., Masuta, C., Vance, V. B., Watson, J. M., Rezaian, A., Dennis, E. S., and Waterhouse, P. M. 2004. On the role of RNA silencing in the pathogenicity and evolution of viroids and viral satellites. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101: 3275-3280.
- Wang, X.B., Wu, Q., Ito, T., Cillo, F., Li, W.X., Chen, X., Yu, J.L.&Ding, S.W. 2010.

RNAi-mediated viral immunity requires amplification of virus-derived siRNAs in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci USA* 107: 484–489.

Yoshikawa, M., Peragine, A., Park, M. Y., and Poethig, R. S. 2005. A pathway for the biogenesis of trans-acting siRNAs in *Arabidopsis*. *Genes Dev.* 19: 2164–2175.

植物の RNA サイレンシング機構が自己の mRNA を攻撃しないメカニズム

岩川 弘宙^{1,2}

東京大学分子細胞生物学研究所¹

〒113-0032 東京都文京区弥生 1-1-1

東京大学大学院新領域創成科学研究科メディカル情報生命専攻²

〒113-0032 東京都文京区弥生 1-1-1

Hiro-oki Iwakawa^{1,2}

How do plants avoid self-attack by unwanted RNA silencing?

Key words: Antiviral defense, PTGS, RNA silencing, siRNA

¹Institute of Molecular and Cellular Biosciences, The University of Tokyo, Bunkyo-ku, Tokyo

113-0032, Japan.

²Department of Computational Biology and Medical Sciences, Graduate School of Frontier

Sciences, The University of Tokyo, Bunkyo-ku, Tokyo 113-0032, Japan.

DOI: 10.24480/bsj-review.8b4.00114

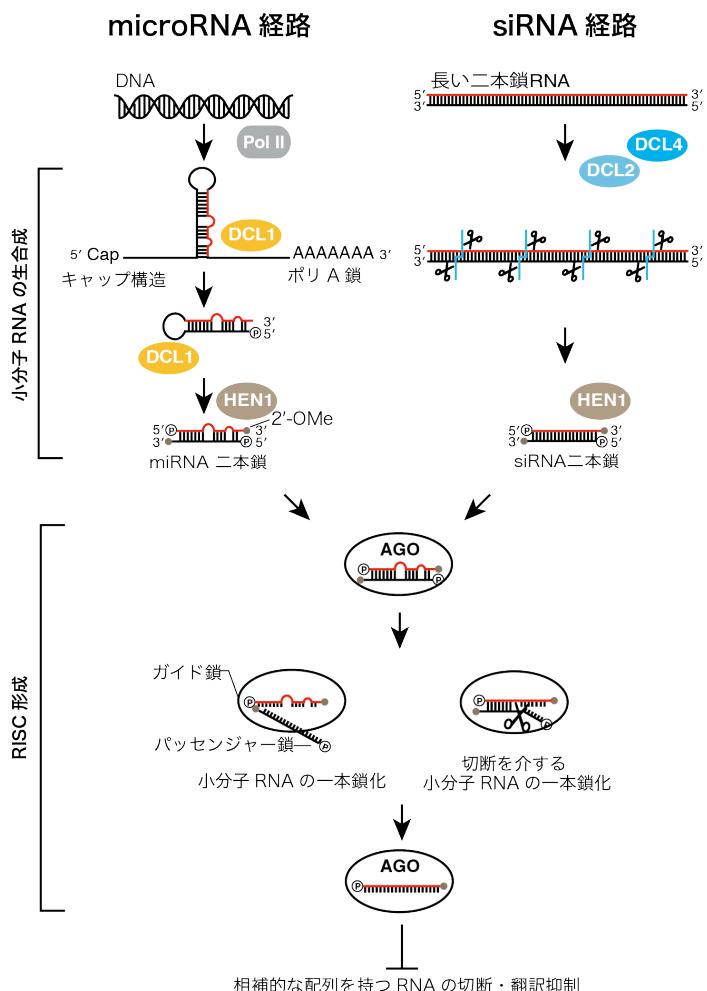
1. はじめに

RNA サイレンシング機構は 20–30 塩基程度の小さな RNA を介して相補的な配列をもつ遺伝子を転写レベル、また転写後レベルで抑制する遺伝子発現制御機構である。この機構は分化や発生など様々な生体反応を制御するのみならず、外来核酸を排除する生体防御機構としての役割も持ち合わせている(Ghildiyal and Zamore, 2009; Bologna and Voinnet, 2014; Castel and Martienssen, 2013; Kobayashi and Tomari, 2015)。特に植物や昆虫などでは主要な抗ウイルス防御機構としてはたらくことが知られている。植物には小分子 RNA の標的 RNA からさらに小分子 RNA を作り出す「小分子 RNA 増幅機構」が存在するため、RNA サイレンシングの標的となるウイルス RNA などは非

常に強い負の制御を受けることとなる (Ding, 2010)。この小分子 RNA 増幅機構の最重要反応は一本鎖の標的 RNA を小分子 RNA の前駆体である長い二本鎖 RNA に変換する過程であるが、自身の mRNA をむやみに二本鎖に変換してしまっては無秩序な RNA サイレンシングが引き起こされ、植物の遺伝子全体が抑制される事態に陥ってしまう。そのため、植物は正常な RNA と異常な RNA を見分け、異常な RNA のみを RNA サイレンシングに引き込む何らかのメカニズムを持っていると考えられる。RNA サイレンシング機構が発見されてから四半世紀が経ち、ようやく正常な RNA と異常な RNA を区別するしくみが分かりつつある。本稿では植物の RNA サイレンシング機構、および小分子 RNA 増幅機構を介して外来の異常な RNA を排除するメカニズムを概説するとともに、自己の mRNA を攻撃しないメカニズムを最新の知見を踏まえて考察したいと思う。

2. 小分子 RNA の生合成と RISC 形成

植物の RNA サイレンシング機構は 20 塩基から 24 塩基程度の小分子 RNA を介して引き起こされる配列特異的な遺伝子発現制御機構である。機能的な面からは小分子 RNA と相補的な mRNA の切断、翻訳抑制を行う転写後ジーンサイレンシング (PTGS: post-transcriptional gene silencing) と相補的な遺伝子を DNA のメチル化を介して抑制する転写制御 (TGS: transcriptional gene silencing) の 2 つの経路に分かれる。24 塩基の小分子 RNA は TGS で働くことが知られている。一方で 20–22 塩基の小分子 RNA は PTGS に関わ



H. Iwakawa et al. 図1.2 小分子 RNA の生合成と RISC 形成
BSJ-review 8:59 (2017)

るが、それらは生合成過程の違いにより microRNA (miRNA) と short-interfering RNA (siRNA) に大別される (Bologna and Voinnet, 2014)。

2-1. miRNA の生合成と RISC 形成

内在の遺伝子を制御する働きをもつ miRNA はゲノムにコードされた小分子 RNA で、RNA ポリメラーゼ II によりヘアピン構造を持った長い前駆体 RNA として転写される。ヘアピン構造は DICER-LIKE1 (DCL1) と呼ばれる RNase III 型酵素によって 20–22 塩基の miRNA 二本鎖にプロセシングされ、メチル基転移酵素である HEN1 により 3'末端がメチル化される (Reinhart et al., 2002; Park et al., 2002; Kurihara and Watanabe, 2004; Yu et al., 2006; Li et al., 2005)。miRNA 二本鎖は RNase H 様ドメインを持つ Argonaute (AGO) と呼ばれるタンパク質に取り込まれた後、一方の鎖 (ガイド鎖) は AGO に残り、もう一方の鎖 (パッセンジャー鎖) は RISC から排除される (Vaucheret et al., 2004; Iki et al., 2010; Bologna and Voinnet, 2014)。こうして出来た RNA タンパク質複合体は RNA-induced silencing complex (RISC) と呼ばれ、miRNA のガイド鎖と相補的な配列をもつ mRNA を切断・翻訳抑制する (図 1) (Bologna and Voinnet, 2014; Iwakawa and Tomari, 2015)。シロイヌナズナは 10 種類の AGO をコードしており、主に AGO1 が miRNA と RISC を形成し標的遺伝子の発現を制御する。

2-2. siRNA の生合成と RISC 形成

長い二本鎖 RNA より作られる小分子 RNA を siRNA と呼ぶ。長い二本鎖 RNA は様々な経路で生合成されるが、ウイルス RNA の高次構造や複製中間体、双方向の転写によって出来た二本鎖 RNA、そして後述する RNA 依存性 RNA ポリメラーゼ (RDR: RNA-dependent RNA polymerase) によって出来た二本鎖 RNA などが挙げられる (Ding, 2010)。これらの二本鎖 RNA は DCL2/3/4 によってそれぞれ 22, 24, 21 塩基の siRNA にプロセシングされる。24 塩基の siRNA は AGO3, 4, 6, 9 に結合し、主に TGS に関わる (Havecker et al., 2010; Zhang et al., 2016; Mi et al., 2008)。一方、21 塩

基、22 塩基の短い siRNA は AGO1,AGO2,AGO5 と RISC を形成し PTGS に関わることが知られている(Mi et al., 2008; Takeda et al., 2008; Montgomery et al., 2008)。RISC 形成過程はパッセンジャー鎖の排除に AGO の切断活性を必要とする以外は miRNA と同様であると考えられている(Iki et al., 2010) (図 1)。

2-3. 小分子 RNA の振り分け機構

シロイヌナズナには 10 種類の AGO がコードされており、一部冗長性も認められるが、それぞれ固有の機能を持っている(Bologna and Voinnet, 2014)。組織による発現量の差や、発現誘導の有無などにより、細胞内で発現している AGO のバランスこそ異なるが、複数の AGO は一細胞内同時に発現している(Bologna and Voinnet, 2014)。そのような状況において小分子 RNA がどの AGO と結合するのかは極めて重要な問題である。ショウジョウバエでは小分子 RNA 二本鎖の形の違いにより（中央のミスマッチの有無）2つある AGO のどちらに入るかを決めているが(Tomari et al., 2007; Kawamata and Tomari, 2010; Montgomery et al., 2008), 植物においては主に小分子 RNA の 5'末端の塩基がどの AGO と結合するかを決めている。植物の miRNA の多くは 5'末端が U であり、5'末端が U の小分子 RNA と強く結合する性質を持つ AGO1 と結合し機能を果たす(Mi et al., 2008; Takeda et al., 2008)。また AGO2 は 5'末端が A, AGO5 は 5'末端が C の小分子 RNA とそれぞれ結合することが知られている(Montgomery et al., 2008; Mi et al., 2008; Takeda et al., 2008)。AGO7 は小分子 RNA の 5'末端の塩基のみならず miRNA 二本鎖の配列や構造をチェックすることで miR390 という miRNA と特異的に結合することが知られている(Endo et al., 2013; Montgomery et al., 2008)。

3. 植物が持つ小分子 RNA 増幅機構

3-1. ウィルスの感染と小分子 RNA 増幅機構

上述したようにウィルスが感染すると、DCL2/4 の働きにより複製中間体などの長い二本鎖

RNA からウイルス由来の siRNA が作り出され、RISC を介してウイルス RNA は切斷される (Bouchéet al., 2006; Deleris et al., 2006; Diaz-Pendon et al., 2007; Fusaro et al., 2006)。植物は小分子 RNA を增幅する機構を持つことでより強力にウイルスの複製を阻害することができる。その中心的役割を担うのが一本鎖 RNA を二本鎖 RNA に変換する RDR である。シロイヌナズナには 6 種類存在するがウイルスの小分子 RNA 増幅において重要な RDR は RDR1 と RDR6 である (Wang et al., 2010; Garcia-Ruiz et al., 2010; Diaz-Pendon et al., 2007; Donaire et al., 2008)。RDR1/6 は RNA 結合タンパク質である SGS3 やその他のタンパク質の助けを借りて RISC が切斷したウイルス RNA を二本鎖 RNA に変換し、その二本鎖 RNA を DCL2/4 が再度切斷することで小分子 RNA は増幅される (図 2) (Ding, 2010)。

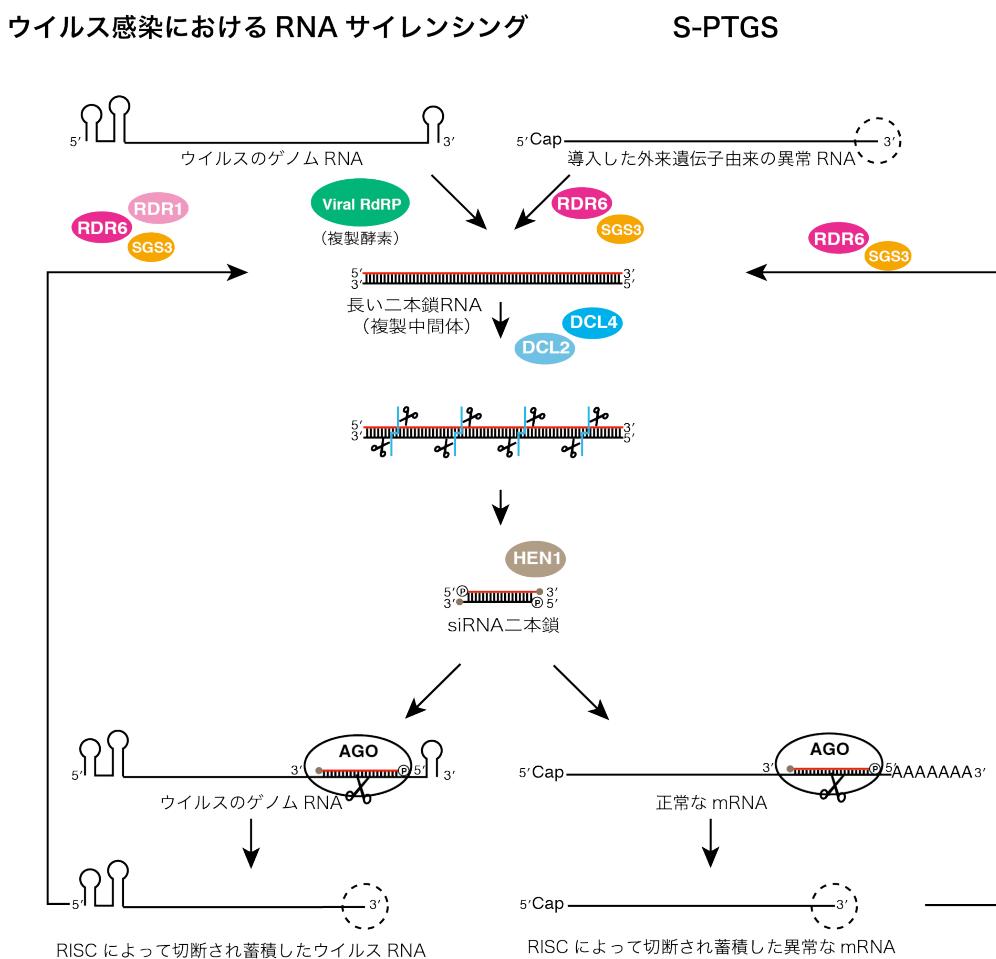


図2. ウィルス感染における RNA サイレンシングと S-PTGS

3-2. 外来遺伝子導入とコサプレッション・S-PTGS

1990 年 Napoli らが紫色のペチュニアに色素合成遺伝子であるカルコン合成遺伝子を導入し過剰発現した際、予想に反しアントシアニン合成は阻害され白色の花を咲かせる事を発見した (Napoli et al., 1990)。カルコン合成遺伝子 mRNA の蓄積量を調べてみると過剰発現されていないばかりか、野生型の 50 分の 1 程度まで減少していた(Napoli et al., 1990)。導入した外来遺伝子のみならず相同配列をもつ内在遺伝子の発現まで抑制する「コサプレッション」と名付けられたこの現象は、ウイルス RNA を排除する場合と同様に小分子 RNA の增幅を介した RNA サイレンシングによって引き起こされることが分かっている (Brodersen and Voinnet, 2006)。ウイルス RNA の場合と異なる部分は過剰発現した外来遺伝子は内在 mRNA と同様の一本鎖 RNA という点であるが、後述するように植物は外来遺伝子由来の「異常な」 mRNA を見分け RDR6 によって二本鎖化することで RNA サイレンシングを引き起こす (図 2,3)。一本鎖 RNA により RNA サイレンシングを引き起こす機構のことを S-PTGS (Sense transgene-induced post-transcriptional gene silencing) と呼ぶ。

3-3. tasRNA 経路：小分子 RNA 増幅系を介した内在小分子 RNA の生合成

一部の内在 RNA は RDR6 によって二本鎖 RNA に変換され trans-acting siRNA (tasiRNA) と呼ばれる内在小分子 RNA を作り出すことで、相補性をもつ他の内在遺伝子の発現を制御することが知られている(Bologna and Voinnet, 2014)。最近になって、明確な標的は持たないが RDR6 依存的に生成される内在小分子 RNA も数多く発見されてきた(Fei et al., 2013)。これらの小分子 RNA は phasiRNA (phased, secondary, small interfering RNAs) と呼ばれる。tasiRNA の生成には RDR6, SGS3, その他のコファクターの他に、特殊な RISC (22 塩基の miRNA と結合した AGO1 や miR390 と結合した AGO7) が内在の TAS RNA (*TRANS-ACTING siRNA (TAS) precursor*) に結合することが必須であることが報告されている (Fei et al., 2013; Arribas-Hernández et al., 2016; de Felippes et al., 2017)。tasiRNA/PhasiRNA 経路は S-PTGS 機構と似ている点が多いが、S-PTGS 経路に特殊な RISC の結合

が必須か否かは未だ明らかでない (Branscheid et al., 2015)。

4. RNA サイレンシングが自己の mRNA を攻撃しないメカニズム

小分子 RNA の増幅を介した RNA サイレンシング機構は実に強力な生体防御システムではあるが、制御なく内在の mRNA に作用すると遺伝子発現が乱され、植物の生育は阻害されてしまう。なぜ内在の mRNA は小分子 RNA の増幅を介した RNA サイレンシング機構の標的にならないのであろうか？最近その謎を解決するかもしれない複数の論文が発表された。

4-1. 3'末端ポリ A 鎖の役割

前述したように、外来遺伝子を導入すると、植物は RNA サイレンシングを引き起こし、外来遺伝子の発現を抑制する。複製中間体などの長い二本鎖 RNA を作り出すウイルス RNA と異なり、過剰発現した外来遺伝子由来の mRNA は内在 mRNA と同様の一本鎖 RNA であるため、植物はどうにかして外来遺伝子由来の mRNA を内在 mRNA から区別して RNA サイレンシングを引き起こさなくてはならない。真核生物の mRNA は 5'末端にキャップ構造、3'末端にポリ A 鎖を持ち、それらは翻訳の促進および mRNA の安定化に寄与している (Gallie, 1991)。これまでの報告で、キャップ構造やポリ A 鎖を欠いた異常な RNA が S-PTGS を引き起こす原因になることが示唆されていた (Luo and Chen, 2007; Gazzani et al., 2004; Parent et al., 2015)。長い間植物がどのような分子機構でポリ A 鎖を欠いた mRNA を特異的に RNA サイレンシング機構に導くかは謎であったが、最近、RDR6 にはポリ A 配列を欠いた RNA のみを二本鎖 RNA に変換し、3'末端にポリ A 鎖をもつ正常な mRNA は二本鎖 RNA に変換しないという興味深い基質特異性があることが明らかになった (Baeg et al., 2017)。すなわち正常な mRNA がもつ 3'末端のポリ A 鎖はこれまで知られていた RNA の安定化や翻訳促進だけでなく、RDR6 依存的な RNA サイレンシング機構の標的にならないようにする、いわば “自己 mRNA の ID” としての役割を兼ね備えていることが明らかになった。興味深いことに TAS RNA に関しては、ポリ A 鎖から二本鎖 RNA 合成を開始できるようである。

(Rajeswaran et al., 2012)。おそらく特殊な RISC は TAS RNA に積極的に RDR6 を呼び込むはたらきをしているのだと考えられる (Arribas-Hernández et al., 2016; de Felippe et al., 2017)。

4-2. RNA の品質管理システムおよび RNA 代謝システムの役割

生体内では常に RNA の品質管理システムが作動しており異常な RNA を迅速に分解することでそれらの蓄積を防いでいる (Inada, 2013)。また正常な mRNA も常に転写と分解のサイクルを繰り返すことで、動的な平衡状態を保っている。分解を促進する様々なタンパク質因子やシス因子は数多く見つかっているが、正常な RNA も異常な RNA も最終的にはエキソリボヌクレアーゼによる 5'-3' 方向または 3'-5' 方向への分解を受ける (Garneau et al., 2007)。mRNA は通常キャップ構造とポリ A 鎮によってエキソリボヌクレアーゼによる分解から身を守っているが、エンドリボヌクレアーゼの切断を受け生じたポリ A 鎮を欠いた 5' 側の RNA 断片は 5'-3' エキソリボヌクレアーゼによって、キャップ構造を欠いた 3' 側の RNA 断片は 5'-3' エキソリボヌクレアーゼによってそれぞれ分解される (Garneau et al., 2007)。エンドヌクレアーゼによる切断を介さない分解においては、まずポリ A 鎮分解酵素によって mRNA のポリ A 鎮が短縮され、キャップ構造がデキャッピング酵素によって取り除かれた後、最終的に 5'-3' エキソリボヌクレアーゼによって分解される (Garneau et al., 2007)。

これまで複数の論文で RNA の品質管理に関わるタンパク質やエキソリボヌクレアーゼが働く植物体において、S-PTGS が増強されることが報告されている (Moreno et al., 2013; Gazzani et al., 2004; Branscheid et al., 2015)。これらの結果は RNA の品質管理システムや RNA の代謝経路が小分子 RNA 増幅を介した RNA サイレンシングと拮抗していることを示唆している (Tsuzuki et al., 2017)。最近になって mRNA の分解経路が強く阻害されると、植物の様々な内在遺伝子から小分子 RNA が作り出され内在の遺伝子を濫りに抑制するため、植物の生育に異常をきたすことが報告された (Martinez de Alba et al., 2015; Zhang et al., 2015)。この生育阻害は RDR6 や SGS3 などの RNA サイレンシング関連因子を欠損すると回復することから、エキソリボヌクレアーゼによる RNA

代謝は自身の mRNA が小分子 RNA 増幅を介した RNA サイレンシングの対象になることを防いでいると示唆される (Martinez de Alba et al., 2015; Zhang et al., 2015)。

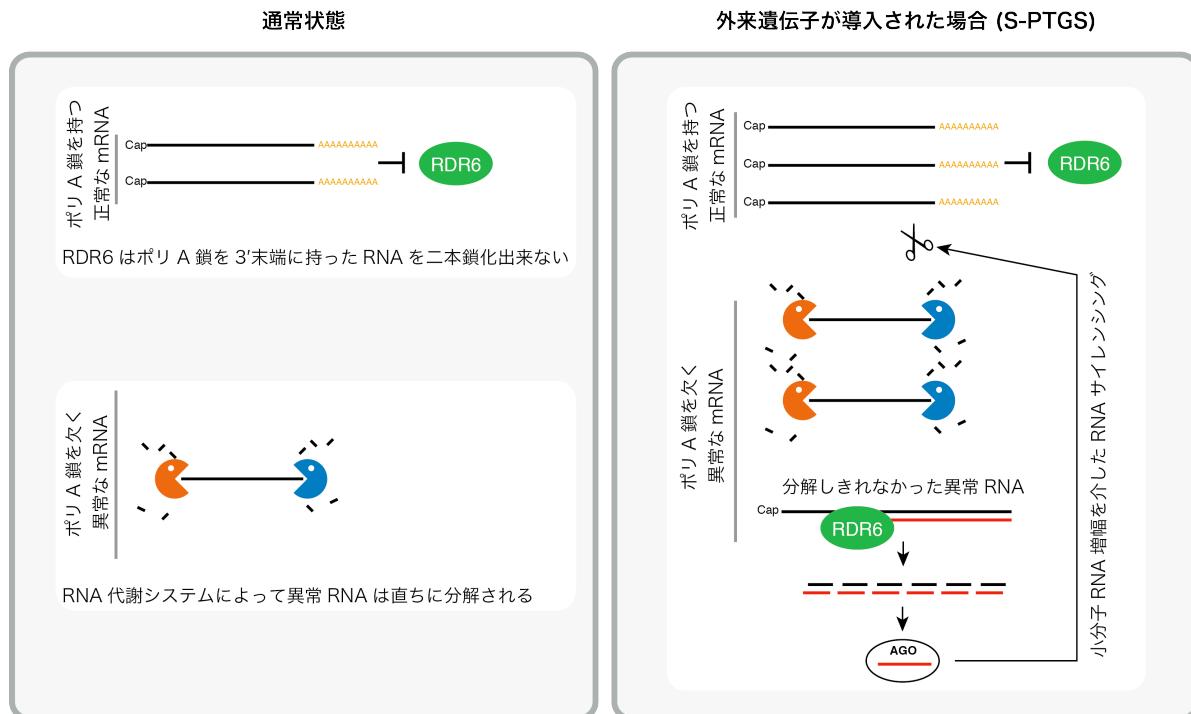


図 3. RNA サイレンシングが自己の mRNA を攻撃しないメカニズム

4-3. RNA サイレンシングが自己の mRNA を攻撃しないメカニズムのまとめ

これまで解説した結果をまとめると次のようなモデルが考えられる。安定に存在している内在 mRNA はポリ A 鎖をもっているため RDR6 によって二本鎖化されない (図 3 左上)。また, RDR6 の鉄型となり得るポリ A 鎖を欠いた異常な内在 mRNA は様々な原因により生じてはいるが, 通常は RNA 代謝系によって迅速に分解されており, RDR6 の認識を免れているのだと考えられる (図 3 左下)。外来遺伝子を過剰発現した場合等においては RNA 代謝系による分解が追いつかず RDR6 が好むポリ A 鎖を欠いた異常 RNA が蓄積するため, RNA サイレンシングが引き起こされるのであろうと考えられる (図 3 右)。

おわりに

RNA サイレンシングが自己の mRNA を攻撃しないメカニズムとして、今回 mRNA のポリ A 鎮と RNA 代謝経路の重要性を挙げたが、RDR6 や SGS3 の顆粒を形成することにより小分子 RNA 増幅を引き起こす「場」を限局することや (Kumakura et al., 2009)、RNA の 3' 末端に存在する強固な RNA 構造や RNA 結合タンパク質なども自己 RNA を RDR6 依存的な RNA サイレンシングをから守るはたらきをしている可能性もある (Baeg et al., 2017)。植物はそれらの多層的な制御機構をもつことによってはじめて諸刃の剣ともなり得る「小分子 RNA 増幅を介した RNA サイレンシング」という極めて強力な核酸防御機構を常時配備し、内在遺伝子制御にまで応用できているのかもしれない。

引用文献

- Arribas-Hernández, L., Marchais, A., Poulsen, C., Haase, B., Hauptmann, J., Benes, V., Meister, G. & Brodersen, P. 2016 The Slicer Activity of ARGONAUTE1 Is Required Specifically for the Phasing, Not Production, of Trans-Acting Short Interfering RNAs in Arabidopsis. *Plant Cell* 28, 1563–1580.
- Baeg, K., Iwakawa, H.O. & Tomari, Y. 2017 The poly(A) tail blocks RDR6 from converting self mRNAs into substrates for gene silencing. *Nat Plants* 3, 17036.
- Bologna, N.G. & Voinnet, O. 2014 The Diversity, Biogenesis, and Activities of Endogenous Silencing Small RNAs in Arabidopsis. *Annu Rev Plant Biol* 65, 473–503.
- Bouché, N., Lauressergues, D., Gascioli, V. & Vaucheret, H. 2006 An antagonistic function for Arabidopsis DCL2 in development and a new function for DCL4 in generating viral siRNAs. *EMBO J* 25, 3347–3356.
- Branscheid, A., Marchais, A., Schott, G., Lange, H., Gagliardi, D., Andersen, S.U., Voinnet, O. & Brodersen, P. 2015 SKI2 mediates degradation of RISC 5'-cleavage fragments and prevents secondary siRNA production from miRNA targets in Arabidopsis. *Nucleic Acids Res* 43, 10975–10988.
- Brodersen, P. & Voinnet, O. 2006 The diversity of RNA silencing pathways in plants. *Trends Genet* 22, 268–280.
- Castel, S.E. & Martienssen, R.A. 2013 RNA interference in the nucleus: roles for small RNAs in transcription, epigenetics and beyond. *Nat Rev Genet* 14, 100–112.

- de Felippes, F.F., Marchais, A., Sarazin, A., Oberlin, S. & Voinnet, O. 2017 A single miR390 targeting event is sufficient for triggering TAS3-tasiRNA biogenesis in Arabidopsis. *Nucleic Acids Res*
- Deleris, A., Gallego-Bartolome, J., Bao, J., Kasschau, K.D., Carrington, J.C. & Voinnet, O. 2006 Hierarchical action and inhibition of plant Dicer-like proteins in antiviral defense. *Science* 313, 68–71.
- Diaz-Pendon, J.A., Li, F., Li, W.X. & Ding, S.W. 2007 Suppression of antiviral silencing by cucumber mosaic virus 2b protein in Arabidopsis is associated with drastically reduced accumulation of three classes of viral small interfering RNAs. *Plant Cell* 19, 2053–2063.
- Ding, S.W. 2010 RNA-based antiviral immunity. *Nat Rev Immunol* 10, 632–644.
- Donaire, L., Barajas, D., Martínez-García, B., Martínez-Priego, L., Pagán, I. & Llave, C. 2008 Structural and genetic requirements for the biogenesis of tobacco rattle virus-derived small interfering RNAs. *J Virol* 82, 5167–5177.
- Endo, Y., Iwakawa, H.O. & Tomari, Y. 2013 Arabidopsis ARGONAUTE7 selects miR390 through multiple checkpoints during RISC assembly. *EMBO Rep* 14, 652–658.
- Fei, Q., Xia, R. & Meyers, B.C. 2013 Phased, secondary, small interfering RNAs in posttranscriptional regulatory networks. *Plant Cell* 25, 2400–2415.
- Fusaro, A.F., Matthew, L., Smith, N.A., Curtin, S.J., Dedic-Hagan, J., Ellacott, G.A., Watson, J.M., Wang, M.B., Brosnan, C., Carroll, B.J. & Waterhouse, P.M. 2006 RNA interference-inducing hairpin RNAs in plants act through the viral defence pathway. *EMBO Rep* 7, 1168–1175.
- Gallie, D.R. 1991 The cap and poly(A) tail function synergistically to regulate mRNA translational efficiency. *Genes Dev* 5, 2108–2116.
- Garcia-Ruiz, H., Takeda, A., Chapman, E.J., Sullivan, C.M., Fahlgren, N., Brempelis, K.J. & Carrington, J.C. 2010 Arabidopsis RNA-dependent RNA polymerases and dicer-like proteins in antiviral defense and small interfering RNA biogenesis during Turnip Mosaic Virus infection. *Plant Cell* 22, 481–496.
- Garneau, N.L., Wilusz, J. & Wilusz, C.J. 2007 The highways and byways of mRNA decay. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8, 113–126.
- Gazzani, S., Lawrenson, T., Woodward, C., Headon, D. & Sablowski, R. 2004 A link between mRNA turnover and RNA interference in Arabidopsis. *Science* 306, 1046–1048.
- Ghildiyal, M. & Zamore, P.D. 2009 Small silencing RNAs: an expanding universe. *Nat Rev Genet* 10, 94–108.
- Havecker, E.R., Wallbridge, L.M., Hardcastle, T.J., Bush, M.S., Kelly, K.A., Dunn, R.M., Schwach, F., Doonan, J.H. & Baulcombe, D.C. 2010 The Arabidopsis RNA-directed DNA methylation argonautes functionally diverge based on their expression and interaction with target loci. *Plant Cell* 22, 321–334.

- Iki, T., Yoshikawa, M., Nishikiori, M., Jaudal, M.C., Matsumoto-Yokoyama, E., Mitsuhara, I., Meshi, T. & Ishikawa, M. 2010 In vitro assembly of plant RNA-induced silencing complexes facilitated by molecular chaperone HSP90. *Mol Cell* 39, 282–291.
- Inada, T. 2013 Quality control systems for aberrant mRNAs induced by aberrant translation elongation and termination. *Biochim Biophys Acta* 1829, 634–642.
- Iwakawa, H.O. & Tomari, Y. 2015 The Functions of MicroRNAs: mRNA Decay and Translational Repression. *Trends Cell Biol* 25, 651–665.
- Kawamata, T. & Tomari, Y. 2010 Making RISC. *Trends Biochem Sci* 35, 368–376.
- Kobayashi, H. & Tomari, Y. 2015 RISC assembly: Coordination between small RNAs and Argonaute proteins. *Biochim Biophys Acta*
- Kumakura, N., Takeda, A., Fujioka, Y., Motose, H., Takano, R. & Watanabe, Y. 2009 SGS3 and RDR6 interact and colocalize in cytoplasmic SGS3/RDR6-bodies. *FEBS Lett* 583, 1261–1266.
- Kurihara, Y. & Watanabe, Y. 2004 Arabidopsis micro-RNA biogenesis through Dicer-like 1 protein functions. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 12753–12758.
- Li, J., Yang, Z., Yu, B., Liu, J. & Chen, X. 2005 Methylation protects miRNAs and siRNAs from a 3'-end uridylation activity in Arabidopsis. *Curr Biol* 15, 1501–1507.
- Luo, Z. & Chen, Z. 2007 Improperly terminated, unpolyadenylated mRNA of sense transgenes is targeted by RDR6-mediated RNA silencing in Arabidopsis. *Plant Cell* 19, 943–958.
- Martinez de Alba, A.E., Moreno, A.B., Gabriel, M., Mallory, A.C., Christ, A., Bounon, R., Balzergue, S., Aubourg, S., Gautheret, D., Crespi, M.D., Vaucheret, H. & Maizel, A. 2015 In plants, decapping prevents RDR6-dependent production of small interfering RNAs from endogenous mRNAs. *Nucleic Acids Res* 43, 2902–2913.
- Mi, S., Cai, T., Hu, Y., Chen, Y., Hodges, E., Ni, F., Wu, L., Li, S., Zhou, H., Long, C., Chen, S., Hannon, G.J. & Qi, Y. 2008 Sorting of small RNAs into Arabidopsis argonaute complexes is directed by the 5' terminal nucleotide. *Cell* 133, 116–127.
- Montgomery, T.A., Howell, M.D., Cuperus, J.T., Li, D., Hansen, J.E., Alexander, A.L., Chapman, E.J., Fahlgren, N., Allen, E. & Carrington, J.C. 2008 Specificity of ARGONAUTE7-miR390 interaction and dual functionality in TAS3 trans-acting siRNA formation. *Cell* 133, 128–141.
- Moreno, A.B., Martínez de Alba, A.E., Bardou, F., Crespi, M.D., Vaucheret, H., Maizel, A. & Mallory, A.C. 2013 Cytoplasmic and nuclear quality control and turnover of single-stranded RNA modulate post-transcriptional gene silencing in plants. *Nucleic Acids Res* 41, 4699–4708.
- Napoli, C., Lemieux, C. & Jorgensen, R. 1990 Introduction of a Chimeric Chalcone Synthase Gene into Petunia Results in Reversible Co-Suppression of Homologous Genes in trans. *Plant Cell* 2, 279–289.

- Parent, J.S., Jauvion, V., Bouché, N., Béclin, C., Hachet, M., Zytnicki, M. & Vaucheret, H. 2015 Post-transcriptional gene silencing triggered by sense transgenes involves uncapped antisense RNA and differs from silencing intentionally triggered by antisense transgenes. *Nucleic Acids Res* 43, 8464–8475.
- Park, W., Li, J., Song, R., Messing, J. & Chen, X. 2002 CARPEL FACTORY, a Dicer homolog, and HEN1, a novel protein, act in microRNA metabolism in *Arabidopsis thaliana*. *Curr Biol* 12, 1484–1495.
- Rajeswaran, R., Aregger, M., Zvereva, A.S., Borah, B.K., Gubaeva, E.G. & Pooggin, M.M. 2012 Sequencing of RDR6-dependent double-stranded RNAs reveals novel features of plant siRNA biogenesis. *Nucleic Acids Res* 40, 6241–6254.
- Reinhart, B.J., Weinstein, E.G., Rhoades, M.W., Bartel, B. & Bartel, D.P. 2002 MicroRNAs in plants. *Genes Dev* 16, 1616–1626.
- Takeda, A., Iwasaki, S., Watanabe, T., Utsumi, M. & Watanabe, Y. 2008 The mechanism selecting the guide strand from small RNA duplexes is different among Argonaute proteins. *Plant Cell Physiol* 49, 493–500.
- Tomari, Y., Du, T. & Zamore, P.D. 2007 Sorting of *Drosophila* small silencing RNAs. *Cell* 130, 299–308.
- Tsuzuki, M., Motomura, K., Kumakura, N. & Takeda, A. 2017 Interconnections between mRNA degradation and RDR-dependent siRNA production in mRNA turnover in plants. *J Plant Res* 130, 211–226.
- Vaucheret, H., Vazquez, F., Crete, P. & Bartel, D.P. 2004 The action of ARGONAUTE1 in the miRNA pathway and its regulation by the miRNA pathway are crucial for plant development. *Genes Dev* 18, 1187–1197.
- Wang, X.B., Wu, Q., Ito, T., Cillo, F., Li, W.X., Chen, X., Yu, J.L. & Ding, S.W. 2010 RNAi-mediated viral immunity requires amplification of virus-derived siRNAs in *Arabidopsis thaliana*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 484–489.
- Yu, B., Chapman, E.J., Yang, Z., Carrington, J.C. & Chen, X. 2006 Transgenically expressed viral RNA silencing suppressors interfere with microRNA methylation in *Arabidopsis*. *FEBS Lett* 580, 3117–3120.
- Zhang, X., Zhu, Y., Liu, X., Hong, X., Xu, Y., Zhu, P., Shen, Y., Wu, H., Ji, Y., Wen, X., Zhang, C., Zhao, Q., Wang, Y., Lu, J. & Guo, H. 2015. Suppression of endogenous gene silencing by bidirectional cytoplasmic RNA decay in *Arabidopsis*. *Science* 348, 120–123.
- Zhang, Z., Liu, X., Guo, X., Wang, X.J. & Zhang, X. 2016 *Arabidopsis* AGO3 predominantly recruits 24-nt small RNAs to regulate epigenetic silencing. *Nat Plants* 2, 16049.

植物における組織特異的な転写制御機構と 1細胞トランスクリプトームデータの時系列解析アルゴリズム

鳥井孝太郎、遠藤求

京都大学 生命科学研究科 分子代謝制御学分野
〒606-8502 京都市左京区北白川追分町

Tissue specific transcriptional regulation in plants
and time series analysis tool for single cell data

Keyword: transcriptional regulation, cis-element, circadian clock, tissue specificity, single cell transcriptome

Kotaro tori & Motomu Endo
Graduate School of Biostudies, Kyoto University
Kitashirakawa-oiwake-cho, Sakyo-ku, Kyoto 606-8502, Japan

DOI: 10.24480/bsj-review.8b5.00115

1 RNA の転写制御におけるシス配列の重要性

植物が遺伝子の機能を適切に発揮するためには、適切な遺伝子発現制御が必須である。遺伝子発現制御の過程には、転写因子による転写制御のほかに、RNaseA・miRNA・ナンセンス変異依存 mRNA 分解機構などによる RNA の分解、メチル化や塩基の再構成による RNA 修飾、DNA やヒストンの修飾に見られるエピジェネティックな制御などの多くの制御段階が存在している。こうした多様な制御段階の中でも、転写因子による転写制御は RNA の機能発現において最も基本的かつ重要な制御段階である。モデル植物シロイヌナズナでは、約 2,000 の転写因子が存在し、それらはシス配列と呼ばれる数塩基からなるモチーフ配列に結合することで、様々な転写制御を行っていると考えられている (Vandepoele et al. 2009)。

移動できない植物は、周囲の環境変化に鋭敏に応答する必要があるため、光・温度・水分・塩・過酸化物などの環境刺激に応答するための特異的なシス配列を発達させてきた。光応答性の遺伝子はプロモーター上に G-box (CACGTG) と呼ばれるシス配列を持つことが知られており、シロイヌナズナの約 3% の遺伝子がプロモーター領域に G-box を持っている (Michael and McClung 2003) (図 1)。また、低温刺激や乾燥刺激・塩ストレスの応答に関わるシス配列として C-repeat (CRT)/drought-responsive element (DRE) (A/GCCGAC) が、高温への応答にかかるシス配列として HS-1 (ATGGGCCCTA) や HS-2(GTT(A/C)TAGA)、過酸化物の応答にかかるシス配列として ROS-1 ((TA)4G(AT)4) や ROS-2 (TTCAATT) が報告されている (Rushton et al. 2002, Geisler et al. 2006)。こうした環境変化の応答に関わるシス配

列のうち、最も広範な遺伝子発現制御に関わっているものは概日リズム制御に関わるシス配列である。実際にシロイヌナズナの89%以上の遺伝子は明暗条件下で約24時間周期の発現振動を示している(Michael et al. 2008, Endo et al. 2014)。この発現振動には光刺激による発現制御も含まれているものの、光応答性の遺伝子は全遺伝子の約19%であることから、大部分の遺伝子の発現振動は概日時計によるものだと考えられている(Jiao et al. 2005)。

植物の概日時計を構成する時計遺伝子は転写因子をコードしており、朝方に発現ピークを持つ

*CIRCADIAN CLOCK ASSOCIATED 1 (CCA1)*と *LATE ELONGATED HYPOCOTYL (LHY)*は、evening

element (EE; AAAATATCT)と呼ばれるシス配列を認識する(図2)。他にもEEに類似したCCA1-binding site (CBS; AAAAATCT)も報告されており、これらはそれぞれ全遺伝子の25%および35%のプロモーター領域に存在している(Wang et al. 1997, Harmer et al. 2000, Michael and McClung 2003)。CCA1/LHYは昼頃に発現ピークを持つ *PSEUDO RESPONSE REGULATOR 9 (PRR 9)/PRR7/PRR5* 遺伝子群などの時計遺伝子の転写を促すと同時に、夕方に発現ピークを持つ *TIMING OF CAB EXPRESSION 1 (TOC1)*、*LUX ARRHYTHMO (LUX)*、*EARLY FLOWERING 4 (ELF4)*などの発現を抑制する。TOC1はTOC1 morning element (T1ME; TGTG)と呼ばれるシス配列を認識し、LUXはLUX binding site (LBS; GAT(A/T)CG)と呼ばれるシス配列を認識する(Chow et al. 2012, Gendron et al. 2012)。これらの概日時計タンパク質に認識されるシス配列を全て合わせると、先に述べたように全遺伝子のかなりの部分は概日時計制御であると予想される。

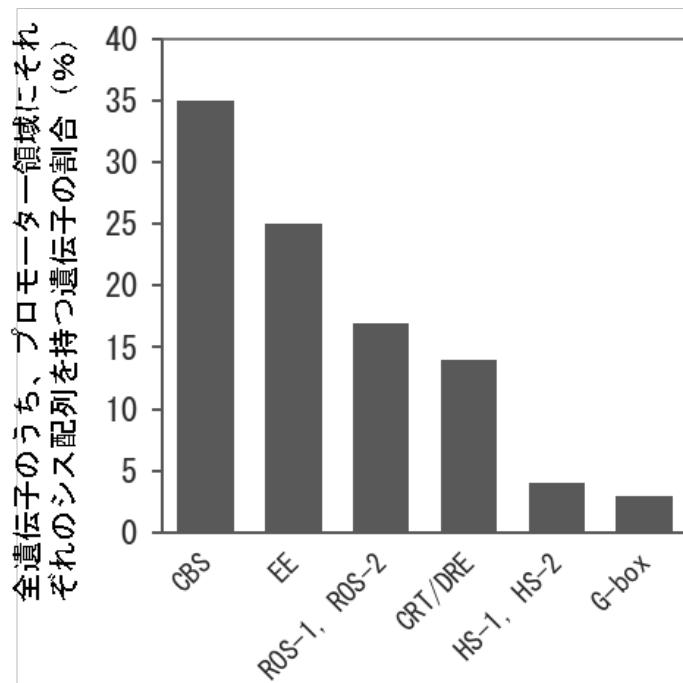


図1. シロイヌナズナにおいて、環境応答にかかるシス配列をプロモーターに含む遺伝子の割合

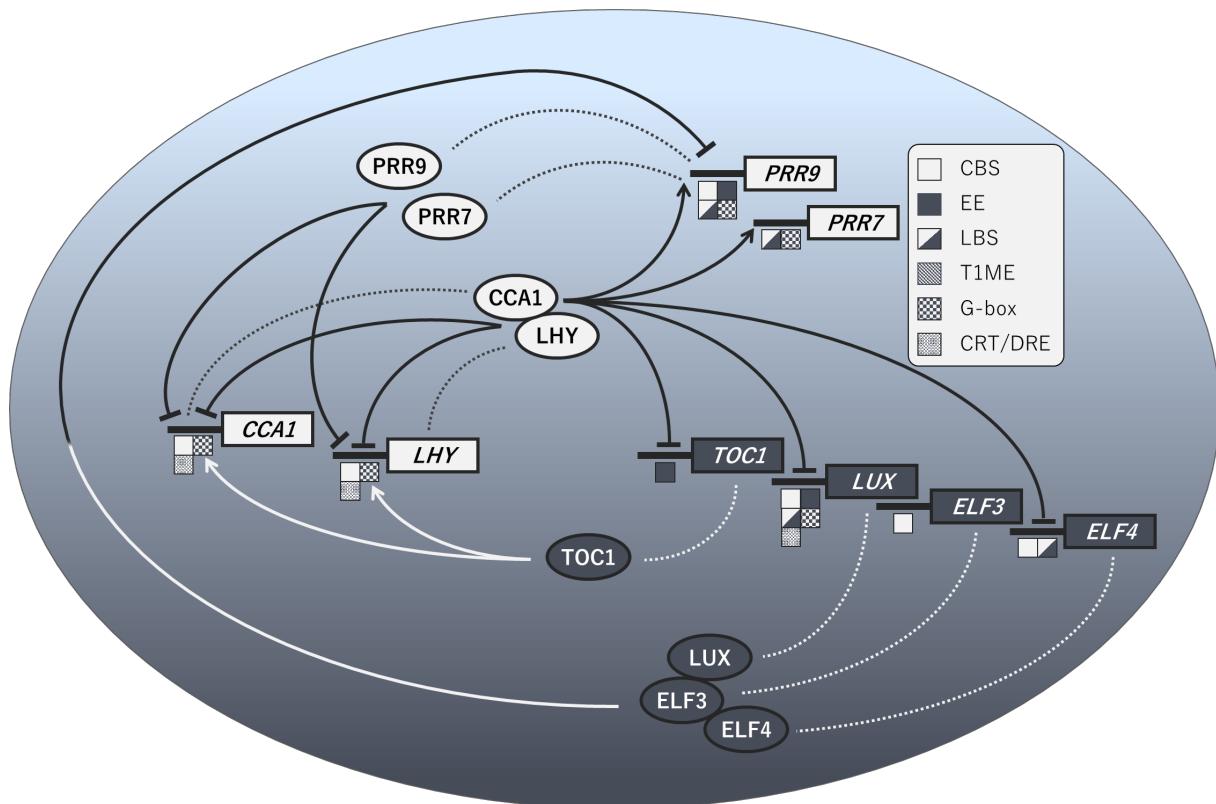


図2. 概日時計を構成する時計遺伝子間の転写フィードバック

丸はタンパク質、四角は遺伝子を示し、黒で表されているのは夕方から夜にかけて発現する時計遺伝子であり、白は明け方から昼にかけて発現する時計遺伝子を示している。遺伝子の左下にはそれぞれの時計遺伝子に含まれるシス配列を示している。点線は遺伝子の翻訳を意味し、実線は遺伝子の転写制御を表している。

2 転写制御機構の組織特異性

こうした概日リズム制御に関わるシス配列は主に植物個体全体の解析から明らかにされたものである。しかし、シス配列による転写制御には組織特異性が存在することが、近年の組織レベルのトランスクリプトーム解析から明らかにされつつある。維管束で概日リズムを示す遺伝子のプロモーター領域には、long-day vasculature element (LVE; ACACGG)や short-day vasculature element (SVE; GCAGGA)といった新しいシス配列が見出されており、これらを持つ遺伝子は葉肉など他の組織では概日リズムを示さない。さらに、telo-box (TBX) や starch box (SBX)、protein box (PBX) といったシス配列をもつ遺伝子は主に葉肉における概日リズムに関わっており、維管束での概日リズム形成には関わらないと考えられる (Michael et al. 2008, Endo et al. 2014)。このような組織ごとに特異的なシス配列の存在は、それを認識する転写因子または機能に組織特異性があるためだと考えられる。実際、時計遺伝子 *ELF4* は維管束で特に高い発現を持っていることが示されており、promoter::GUS レポーターの実験からは *PRR3* や *PRR9* もまた維管束で高い発現を持っていることが示唆されて

いる (Para et al. 2007, Endo et al. 2014)。このような組織特異的な時計遺伝子の発現および組織特異的なシス配列の存在は、組織ごとに異なる概日時計の機能を意味しており、これまでに、根・地上部・気孔・表皮・維管束での特異的な概日リズムが存在することが示されている (Thain et al. 2002, Yarik et al. 2011, Endo et al. 2014)。

こうした組織特異的なシス配列や組織特異的な時計遺伝子の発現はショウジョウバエやマウス、ヒトなどでもその存在が知られており、生物種を超えた普遍的な仕組みであると考えられる (Smith et al. 2007, Kalay and Wittkopp 2010)。また、概日時計の他にも植物の組織特異的な転写制御の例として、菌類の感染に対する転写制御が同一の遺伝子であっても組織ごとに全く異なり、転写制御のリプログラミングが組織特異的に行われることが知られている (Lyons et al. 2015)。さらに、紫外線・浸透圧・乾燥・低温・高温・傷などのストレスも組織ごとに異なる遺伝子発現を誘導することが知られており、多様なストレス応答においても組織特異的なシス配列の存在が考えられている (Swindell et al. 2007, Singh et al. 2015)。

3 1 細胞解析

このように大部分の遺伝子の転写制御に関わる概日リズムをはじめ、多く生理応答が組織ごとに異なる転写制御を行っていることは、転写制御の解析には組織や細胞の違いを区別して行わなければならないことを意味する。また、近年の解析から、同一と思われていた細胞が異なる機能をもっているケースや細胞には個性があることが相次いで示されていることから、生命の基本単位である細胞レベルの発現解析を行うことで、より多様で精緻な転写制御メカニズムが明らかになると期待されている。幸いにも近年の技術進歩により、植物でも1細胞レベルでトランスクリプトーム解析を行うことが可能になってきている (Efroni et al. 2016)。その技術的な詳細についてはすでに、BSJ-Review vol. 7 の中で久保稔博士により詳しく解説されているため (久保 2016)、本稿では割愛し、ここでは1細胞 RNA sequencing により得られた遺伝子発現データの時系列解析手法について説明する。

これまで見てきたように転写制御と概日リズムは不可分であるため、個々の細胞で遺伝子発現を測定する際には、ある時点の発現を見るだけでは不十分であり、時系列解析を行うことで遺伝子発現のリズムを計測する必要がある。しかし、現在の1細胞解析、特にトランスクリプトーム解析では細胞を破壊してRNAを抽出しているため、同一の細胞から時系列データを得ることは原理上不可能である。こうした問題を解決するため、複数の細胞から得た遺伝子発現データをつなぎ合わせ、疑似的な時系列データを再構成する手法が考案されている。その中で代表的なアルゴリズムである Monocle (Trapnell et al. 2014) は、独立成分分析により遺伝子発現データの次元圧縮を行い、2次元平面上に投影された各細胞に対し、最小全域木 (MST) を用いて各点をつなぐ辺の総和が最短となる経路を探し出す。次に、細胞をつなぐ MST の長さが最長となる経路を細胞分化の主な軌跡として時系列を構築するアルゴリズムである (図 3)。このように遺伝子発現データから、細胞間の距離 (発現プロファイルの類似度) をもとに、細胞変化の時系列を再構築することで擬似的な時間軸 (pseudo-time) を作成することができる。現在では、pseudo-timeを再構築する様々なアルゴリズムが報告されており、解析目的に応じて選択できる (表 1)。

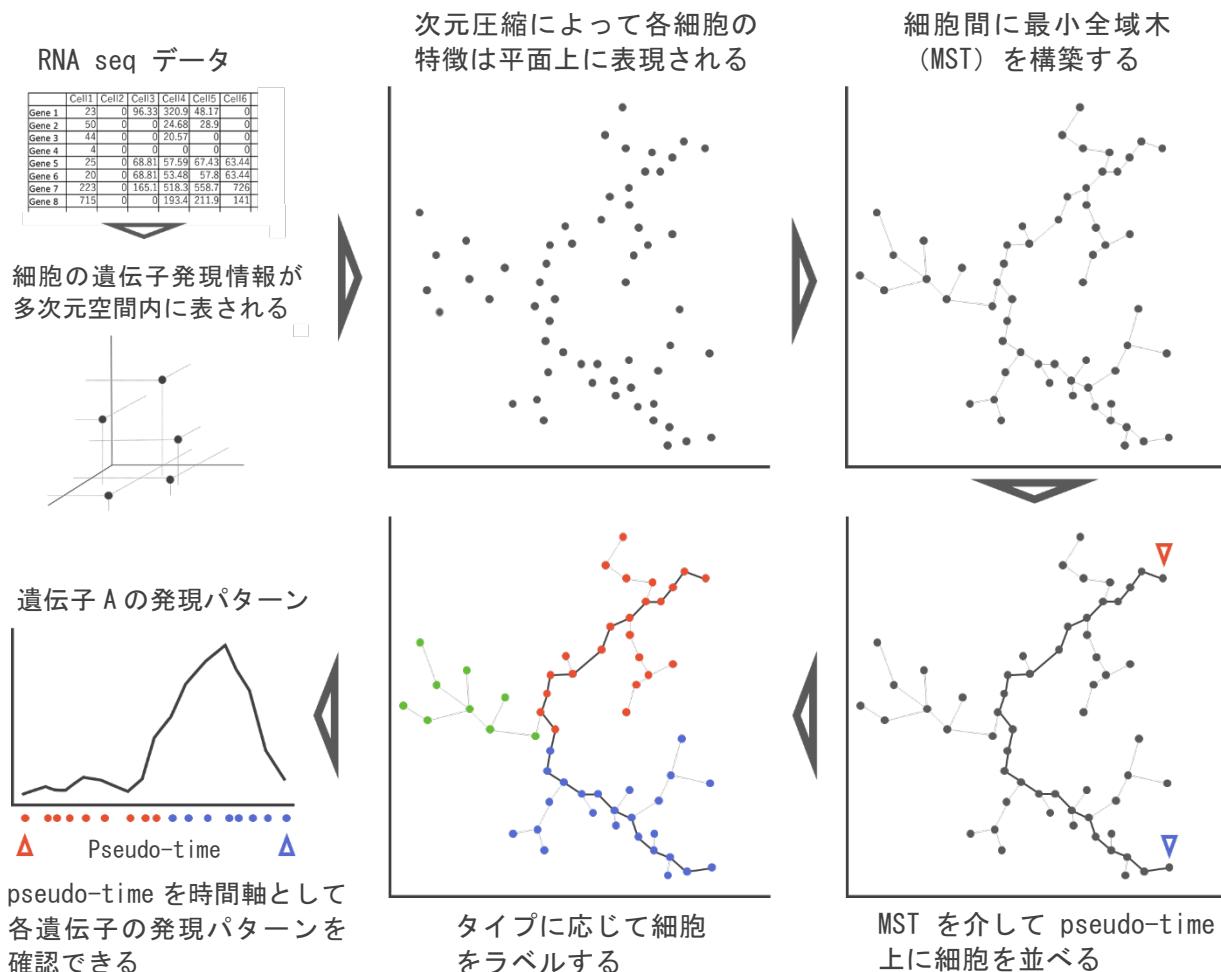


図 3. Monocle による時系列解析の概要

Monocle に用いる遺伝子発現データは 1 遺伝子を 1 次元とみなす高次元ユークリッド空間内で表されている。図では便宜的に三次元空間での各細胞の発現プロファイルを示している。Monocle はこのようなデータを用いて、独立成分分析による次元圧縮を行い、多次元上での遺伝子発現情報を可能な限り維持したまま、各細胞の発現プロファイルを 2 次元上に表す。次に、最小全域木 (MST) により、各点をつなぐ経路を構築し、その中で距離が最長となる経路を、細胞分化の軌跡として選択する。この軌跡を主軸として細胞分化の擬時刻を算出し、続いて、この主軸から離れた軌跡にある細胞の擬時刻を見積もり、主軸上につなげ擬時刻を完成させる。図では赤い矢印で細胞分化の最初期にある細胞、青い矢印で最も後期にある細胞を示している。その後、特徴的な遺伝子発現をもとに各細胞の標識を行い、得られたデータは細胞種に応じて特異的に発現する遺伝子の検出、pseudo-time 上での遺伝子発現パターンの解析、各クラスターを特徴づける遺伝子の同定に用いることができる。

表 1. Single cell RNA sequencing における主な時系列解析アルゴリズム

名称	原著論文	特徴
Monocle	Trapnell et al. 2014	次元圧縮に独立成分分析、細胞系列の作成に最小全域木を用いる
Wanderlust	Bendall et al. 2014	k近傍法を用いて細胞系列を作成する
Waterfall	Shin et al. 2015	隠れマルコフモデルを用いて、MSTで得られた経路に沿った遺伝子発現変化を予測し、細胞タイプ特異的に働く遺伝子を特定する
Sincell	Julia et al. 2015	細胞集団内の階層性を予測できる
Oscope	Leng et al. 2015	細胞状態が周期的に変化する集団から、発現振動を持つ遺伝子群を推定し、それらの発現パターンをもとに細胞の時間的位置づけを決定する
Slicer	Welch et al. 2016	時系列データにおいて、高い精度で非線形の遺伝子発現変化を捉える
TSCAN	Zhicheng Ji and Hongkai Ji 2016	最小全域木を用いる前に細胞のクラスタリングを行った後にpseudo-timeを作成する
Wishbone	Setty et al. 2016	2叉に分岐する細胞分化過程を検出し、それぞれの経路におけるpseudo-timeを作成する

表 1 に挙げたほとんどのアルゴリズムは、グラフ上で各点の距離を最短にすることで pseudo-time を作成するが、これらの手法とは異なる発想で、時間軸を作成するアルゴリズムも存在する。Oscope (Leng et al. 2015) は非同調的に細胞分裂を行う細胞集団から得た 1 細胞 RNA seq データから、細胞分裂のサイクルの中で発現が振動する遺伝子を探し出すことができる。さらに、細胞分裂のサイクルの中で個々のサンプルがどの時点に位置するのか、発現振動を行う遺伝子の発現量に注目することで特定し、細胞分裂周期を時間軸とする時系列データを構築する。今後は Oscope に続き、多様な原理で時系列を構築するアルゴリズムの開発が望まれており、特に、他の実験系との比較を行うにためには、実際の時間スケールと対応可能な時系列解析が必須である。これにより、1 細胞レベルでの時系列解析が可能となり、細胞タイプ特異的に機能する転写因子やシス配列を見出し、細胞レベルの転写制御機構を明らかにできると期待できる。

4 終わりに

概日時計による網羅的な転写制御は、大部分の遺伝子発現に日周変動を引き起こすため、転写制御を理解するうえで、時間という概念は非常に重要である。さらに、概日時計を含めいくつかの転写制御は組織ごとに異なっていることから、組織や細胞のような空間情報も転

写制御を理解するうえで欠かせない。こうしたことから、今後はより高い時空間解像度での転写解析が求められている。1細胞トランск립トーム解析やpseudo-timeベースの時系列解析は、こうしたニーズを満たす次世代の技術であり、今後ますます重要なツールとなるだろう。これらの技術はすでに植物でも導入され始めており、こうした解析を通じて時空間特異的な新たな転写制御メカニズムを発見・理解できると期待される。

5 引用文献

- Bendall, S.C., Davis, K.L., Amir, el-AD., Tadmor, M.D., Simonds, E.F., Chen, T.J., Shenfeld, D.K., Nolan, G.P., Pe'er, D. 2014. Single-cell trajectory detection uncovers progression and regulatory coordination in human B cell development. *Cell.* 157: 714–725.
- Chow, B.Y., Helfer, A., Nusinow, D.A., Kay, S.A. 2012. ELF3 recruitment to the PRR9 promoter requires other Evening Complex members in the *Arabidopsis* circadian clock. *Plant Signal. Behav.* 7: 170–173.
- Efroni, I., Mello, A., Nawy, T., Ip, P.L., Rahni, R., DelRose, N., Powers, A., Satija, R., Birnbaum, K.D., Birnbaum, K.D. 2016. Root regeneration triggers an embryo - like sequence guided by hormonal interactions. *Cell.* 165: 1721–1733.
- Endo, M., Shimizu, H., Nohales, M.A., Araki, T., Kay, S.A. 2014. Tissue-specific clocks in *Arabidopsis* show asymmetric coupling. *Nature.* 515: 419–422.
- Geisler, M., Kleczkowski, L.A., Karpinski, S. 2006. A universal algorithm for genome-wide in silicio identification of biologically significant gene promoter putative cis-regulatory-elements; identification of new elements for reactive oxygen species and sucrose signaling in *Arabidopsis*. *Plant J.* 45: 384–398.
- Gendron, J.M., Pruneda-Paz, J.L., Doherty, C.J., Gross, A.M., Kang, S.E., Kay, S.A. 2012. *Arabidopsis* circadian clock protein, TOC1, is a DNA-binding transcription factor. *Proc Natl Acad Sci USA.* 109: 3167–3172.
- Harmer, S. L., Hogenesch, J. B., Straume, M., Chang, H.S., Han, B., Zhu, T., Wang, X., Kreps, J.A., Kay, S.A. 2000. Orchestrated transcription of key pathways in *Arabidopsis* by the circadian clock. *Science.* 290: 2010–2013.
- Ji, Z., Ji, H. 2016. TSCAN: Pseudo Time Reconstruction and Evaluation in Single-cell RNA-seq Analysis. *Nucleic Acids Research.* 44: e117.
- Jiao, Y., Ma, L., Strickland, E., Deng, X.W. 2005. Conservation and divergence of light-regulated genome expression patterns during seedling development in rice and *Arabidopsis*. *Plant Cell.* 17: 3239–3256.
- Julia, M., Telenti, A., Rausell, A. 2015. Sincell: an R/Bioconductor package for statistical assessment of cell-state hierarchies from single-cell RNA-seq. *Bioinformatics.* 31: 3377–3379.
- Kalay, G., Wittkopp, P.J. 2010. Nomadic enhancers: tissue-specific cis-regulatory elements of yellow have divergent genomic positions among *Drosophila* species. *PLoS Genet.* 6: e1001222.
- 久保稔 2016. 次世代シーケンサーを用いた 1 細胞遺伝子発現解析の現状と展望～植物細胞のリプログラミング機構の解明に向けて～. 植物科学の最前線 (7): 189.

- Leng, N., Chu, L., Barry, C., Li, Y., Choi, J., Li, X., Jiang, P., Stewart, R.M., Thomson, J.A., Kendziora, C. 2015. Oscope identifies oscillatory genes in unsynchronized single-cell RNA-seq experiments. *Nature methods*. 12: 947–950.
- Lyons, R., Stiller, J., Powell, J., Rusu, A., Manners, J. M., Kazan, K. 2015. Fusarium oxysporum triggers tissue-specific transcriptional reprogramming in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS ONE*. 10: e0121902.
- Michael, T.P., Mockler, T.C., Breton, G., McEntee, C., Byer A., Trout, J.D., Hazen, S.P., Shen, R., Priest, H.D., Sullivan, C.M., Givan, S.A., Yanovsky, M., Hong, F., Kay, S.A., Chory, J. 2008. Network discovery pipeline elucidates conserved time-of-day-specific cis-regulatory modules. *PLoS Genet*. 4: e14.
- Michael, T.P., McClung, C.R. 2003. Enhancer trapping reveals widespread circadian clock transcriptional control in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*. 132: 629–639.
- Para, A., Farre, E.M., Imaizumi, T., Pruneda-Paz, J.L., Harmon, F.G., Kay, S.A. 2007. PRR3 is a vascular regulator of TOC1 stability in the *Arabidopsis* circadian clock. *Plant Cell*. 19: 3462–3473.
- Rushton, P.J., Reinstadler, A., Lipka, V., Lippok, B., Somssich, I.E. 2002. Synthetic plant promoters containing defined regulatory elements provide novel insights into pathogen- and woundinduced signaling. *Plant Cell*. 14: 749–762.
- Setty, M., Tadmor, M.D., Reich-Zeliger, S., Angel, O., Salame, T.M., Kathail, P., Choi, K., Bendall, S.C., Friedman, N., Pe'er, D. 2016. Wishbone identifies bifurcating developmental trajectories from single-cell data. *Nature Biotechnol*. 34: 637–645.
- Shin, J., Berg, D.A., Zhu, Y., Shin, J.Y., Song, J., Bonaguidi, M.A., Enikolopov, G., Nauen, D.W., Christian, K.M., Ming, G.L., Song, H. 2015. Single-cell RNA-Seq with waterfall reveals molecular cascades underlying adult neurogenesis. *Cell Stem Cell*. 17: 360 –372.
- Singh, A., Kushwaha, H.R., Soni, P., Gupta, H., Singla-Pareek, S.L., Pareek, A. 2015. Tissue specific and abiotic stress regulated transcription of histidine kinases in plants is also influenced by diurnal rhythm. *Front. Plant Sci*. 6: 711.
- Smith, A.D., Sumazin, P., Zhang, M. Q. 2007. Tissue-specific regulatory elements in mammalian promoters. *Mol syst Bio*. 3: 73.
- Swindell, W.R., Huebner, M., Weber, A.P. 2007. Transcriptional profiling of *Arabidopsis* heat shock proteins and transcription factors reveals extensive overlap between heat and non-heat stress response pathways. *BMC Genomics*. 8: 125.
- Thain, S.C., Murtas, G., Lynn, J.R., McGrath, R.B., Millar, A.J. 2002. The circadian clock that controls gene expression in *Arabidopsis* is tissue specific. *Plant Physiology*. 130: 102–110.
- Trapnell, C., Cacchiarelli, D., Grimsby, J., Pokharel, P., Li, S., Morse, M., Lennon, N.J., Livak, K.J., Mikkelsen, T.S., Rinn, J.L. 2014. The dynamics and regulators of cell fate decisions are revealed by pseudotemporal ordering of single cells. *Nat. Biotechnol*. 32: 381–386.
- Vandepoele, K., Quimbaya, M., Casneuf, T., De Veylder L., Van de Peer Y. 2009. Unraveling transcriptional control in *Arabidopsis* using cis-regulatory elements and coexpression networks. *Plant Physiol*. 150: 535–546

- Wang, Z.Y., Kenigsbuch, D., Sun, L., Harel, E., Ong, M.S., Tobin, E.M. 1997. A Myb-related transcription factor is involved in the phytochrome regulation of an Arabidopsis Lhcb gene. *Plant Cell*. 9: 491–507.
- Welch, J. D., Hartemink A. J., Prins J. F. 2016. SLICER: inferring branched, nonlinear cellular trajectories from single cell RNA-seq data. *Genome Biol.* 17: 106.
- Yakir, E., Hassidim, M., Melamed-Book, N., Hilman, D., Kron, I., Green, R.M. 2011. Cell autonomous and cell-type specific circadian rhythms in Arabidopsis. *Plant J.* 68: 520–31.

pre-mRNA スプライシングが制御する 植物の発生・環境応答・器官再生

大谷美沙都^{1,2}

¹ 奈良先端科学技術大学院大学 バイオサイエンス研究科

〒630-0192 奈良県生駒市高山町 8916-5

² 理研 環境資源科学研究センター

〒230-0045 神奈川県横浜市鶴見区末広町 1-7-22

Misato Ohtani^{1,2}

pre-mRNA splicing regulates development, environmental response, and organ regeneration in plants

Keywords: alternative splicing, environmental response,

organ regeneration, plant development, pre-mRNA splicing

¹Graduate School of Biological Sciences, Nara Institute of Science and Technology,

Ikoma, Nara, 630-0192 Japan

²RIKEN Center for Sustainable Resource Science,

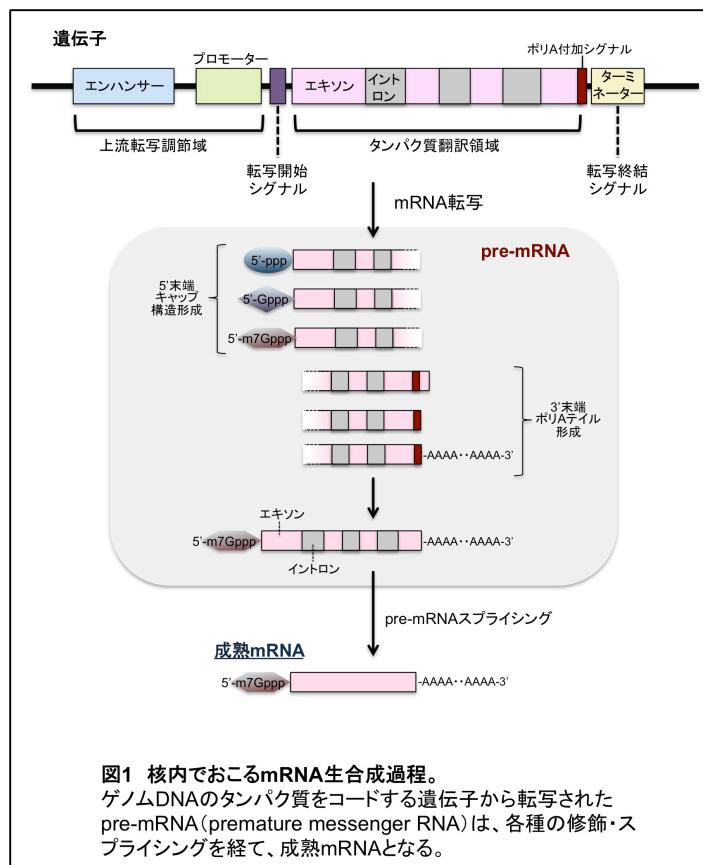
Yokohama, Kanagawa, 230-0045 Japan

DOI: 10.24480/bsj-review.8b6.00116

近年の研究発展によって、真核細胞内にはゲノム情報から予想されるよりも多種多様な pre-mRNA 分子が存在していること、さらには pre-mRNA スプライシングを中心とした複雑で精緻な遺伝子発現制御が行われていることが明らかになりつつある。本稿では、pre-mRNA スプライシングから見た遺伝子発現制御に関する最新の研究成果を紹介しながら、それが植物のどういった生理過程において重要なのか、シロイヌナズナ分子遺伝学から分かってきた知見を概説する。これによって、植物がどのように pre-mRNA スプライシング制御を鍵としながら、発生・環境応答・器官再生を行っているのか考察したい。

1. pre-mRNA スプライシングとは

真核細胞では、タンパク質に翻訳される遺伝情報の多くが、ゲノム DNA 上では分断されてコードされていることが知られている。タンパク質配列コード領域はエキソン、非コード領域はイントロンと呼ばれ、ゲノム DNA のアンチセンス鎖を鋳型として転写される mRNA (messenger RNA) は、最初はイントロンを含む前駆体 pre-mRNA として転写される (図 1)。タンパク質の鋳型となる成熟 mRNA の合成のためには、イントロンを除去し、エキソンをつなぎ合わせる必要があるが、これが pre-mRNA スプライシングと呼ばれるプロセスである (図 2, Jurica and Moore 2003, Will and Lührmann 2011)。



pre-mRNA スプライシングはスプライソームとよばれる巨大分子装置によって基本的に核内で行われる (Jurica and Moore 2003, Will and Lührmann 2011)。スプライソームは、100 nt ほどの長さの核内小分子ノンコーディング RNA である U snRNA (small nuclear RNA) 5 種類と、150 種ほどの中間質群からなる複合体 snRNP (small nuclear ribonucleic protein) をコアコンポーネントとしており、スプライシング反応の進行に従って snRNP が入れ替わりながら機能することが知られている (Jurica and Moore 2003, Will and Lührmann 2011)。スプライシングの過程では 2 回のエステル転移反応が起こるが、スプライシングの各段階は、snRNP に含まれる U snRNA 配列と、pre-mRNA のエキソン—イントロン境界やイントロン内の特異的配列の間の配列相補性、あるいは異なる U snRNA 種同士の配列相補性によって、snRNP と pre-mRNA、snRNP 同士が相互作用することによって進行していく (Jurica and Moore 2003, Will and Lührmann 2011)。

酵母研究から明らかにされているモデル (図 2) によれば、スプライシングの初段階である pre-mRNA と U1 snRNP の相互作用は、U1 snRNA によるイントロンの 5'末端の GU 配列の認識が鍵となって起こる。これによって U1 snRNP がエキソン—イントロン境界に結合し、続くイントロン内のブランチ部位の下流配列への U2AF タンパク質の呼び込みが促進される。U2AF の結合は U2 snRNA 配列とブランチ部位配列との相互作用 (塩基対形成) を促し、結果的に U2 snRNP がブランチ部位に結合する。さらに U5 snRNP および U4/U6 snRNP 複合体 (U4 snRNA と U6 snRNA の間に配列相補性があるため、U4-U6 間塩基対が形成され、U4/U6 snRNP 複合体となっている) からなる U4/U6/U5 tri-snRNP が呼び込まれ、全ての U snRNP が出そろう状態になる。このあと、U1 snRNP と U4 snRNP が放出され、U5 snRNP がイントロンの 5'末端の GU 配列に近接し、さらに U6 snRNP が U2 snRNP と snRNA 同士の塩基対を形成して結合する。これにより一気にスプライソーム—pre-mRNA 複合体の構造変化が進み、1 回目のエステル転移反応によって、イントロンの 5'末端の GU 配列がエキソン 3'末端と切り離され、ブランチ部位の A 塩基と結合する。この状態をラリアット構造と呼ぶ。切り離されたエキソン 3'末端には U5 snRNP が結合しているが、U5 snRNP はこのときイントロン 3'末端の AG 配列にも結合している。この両者の近接が 2 回目のエステル転移反応を引き起こし、エキソン同士がつなぎ合わされるとともに、イントロンが切り出され遊離する。以上が、スプライシング機構のあらましである (図 2, Jurica and Moore 2003, Will and Lührmann 2011)。

さらに、各段階の反応にはU snRNPに加えてRNAヘリカーゼなどの多様なタンパク質が関わっており、スプライシングはきわめて複雑で精緻な触媒反応の一つであると言える (Jurica and Moore 2003, Will and Lührmann 2011)。また、上記はエキソン—イントロン境界部にGT—AG配列をもつタイプの pre-mRNA に作用するスプライソーム（いわゆるメジャースプライソーム）の例であるが、AT—AC配列をもつタイプの pre-mRNA には、U1, U2, U4, U6 snRNP の代わりに U11, U12, U4atac, U6atac snRNP からなる別種のスプライソーム（マイナースプライソームと呼ばれる）が使われる (Will and Lührmann 2011)。

以上のスプライシングに関与する重要因子に相当するほぼ全ての遺伝子は、モデル植物であるシロイヌナズナのゲノム上にも見つかっている (Wang and Brendel 2004)。このことから、基本的にこうした機構は植物でも保存されていると考えられているが、残念ながら植物では *in vitro* スプライシング実験系が欠如していることもあり、植物スプライシングの分子機構、とくにスプライソームの詳細研究は遅れているのが現状である。

2. pre-mRNA スプライシングが生み出す遺伝子発現制御の多様性

pre-mRNA スプライシングは1. で紹介したように、イントロンを切り出しエキソンをつなぎ合わせ「タンパク質の錫型である成熟 mRNA を生み出す」機構である。しかしながらスプライシング因子は、成熟 mRNA を生み出すだけでなく、多様な分子機能を担っていることが示されつつある。ここでは、最新の知見をもとに、スプライシング制御がもたらす多様な遺伝子発現制御の一端について紹介したい。

2-1. 選択的スプライシングによるバリエント生成機構

スプライシング制御によってもたらされる多様な遺伝子発現制御の一つが、選択的スプライシングによるスプライシングバリエント生成である（図3）。すなわち、スプライシング反応の際にどのエキソン—イントロン境界が認識・使用されるのかによって、同じ pre-mRNA から複数の mRNA 種を生み出す仕組みである（図3, Wang and Burge 2008, Reddy et al. 2013）。これによって、活性ドメインや局在シグナルの付加・欠如によるタンパク質機能の変化や、mRNA 自体の安定性の変化による発現量調節などが可能になる。2001年のヒトの全ゲノム配列解読研究の中で、mRNA 種数から

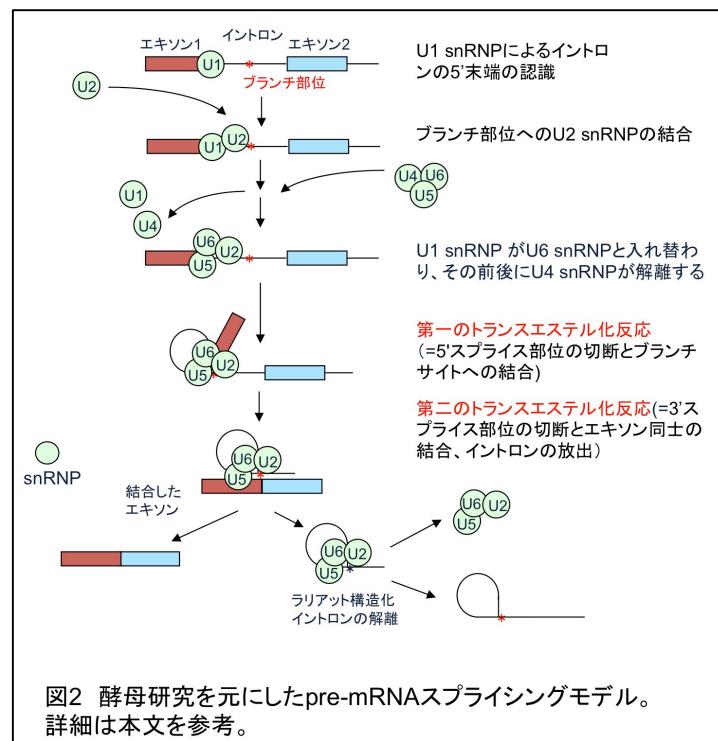


図2 酵母研究を元にしたpre-mRNAスプライシングモデル。
詳細は本文を参考。

予測されていた数（約10万種～）よりも、実際に見つかった遺伝子総数（2万5千個前後）が少なかった点に注目が集まったが（International Human Genome Mapping Consortium 2001, 2004），まさに

こうした状況を生み出しているのが選択的スプライシングであり、ヒトの場合は95%以上の遺伝子が選択的スプライシングによって複数のmRNA種を作り出しているとも言われている（Pan et al. 2008）。

前項で述べたように、スプライシング反応ではpre-mRNAに存在するイントロン5'末端やブランチ部位の配列が、スプライシング位置を決めるために重要な役割を果たしている（図2, Jurica and Moore 2003, Will and Lührmann 2011）。興味深いことに、酵母ではこれらの認識配列がほぼ100%保存されているのに対して、動物や植物では保存性が低くなっている、スプライシング部位の選択可能性に幅を持たせる結果となっている。さらにはこうした認識配列選択に影響を与えるような配列（エンハンサー配列やサイレンサー配列）がエキソン・イントロン内に存在し、発生段階や細胞系列、あるいは環境に合わせた積極的で巧妙な選択的スプライシング制御を行うことも知られている（Wang and Burge 2008, Reddy et al. 2013）。植物でもスプライシングバリアントがタンパク質機能の違いを生み出す例が多く知られている。例えば初期の研究例として、serine/arginine-rich splicing factorの1つであるSR45遺伝子から生成される2つのスプライシングバリアントは、リン酸化ターゲットを含む8アミノ酸のみが違うタンパク質SR45.1とSR45.2を生み出す（Palusa et al. 2007, Zhang and Mount 2009）。SR45.1とSR45.2を人工的に発現させた結果、SR45.1とSR45.2は、それぞれsr45-1変異体が示す花芽形成不全と根形成不全の表現型のうち片方ずつしか相補しないことが分かった（Zhang and Mount 2009）。その一方でsr45-1が示すグルコース高感受性は、SR45.1とSR45.2のどちらでも相補されうる（Carvalho et al. 2016）。これは、数アミノ酸の違いが結果として大きなタンパク質機能の違いを生み、細胞機能を制御している好例といえよう。

次世代シーケンサー技術の普及とともに、植物におけるゲノムワイドな選択的スプライシング情報についても、ここ10年ほどで急速に知見が蓄積しつつある。とくに現時点では17の植物種について、選択的スプライシングデータが報告されている（Zhang et al. 2015）。こうした結果からは、植物では～60%の遺伝子が選択的スプライシングを受けていることが示されており、動物と比べると相対的に選択的スプライシングの頻度が低いこと、選択的イントロン保持型（図3）のバリアント生成率が高いこと（Reddy et al. 2013, Zhang et al. 2015）が分かってきた。とくに植物の場合、イントロン保持型のスプライシングバリアントの一定数はコドンの読み枠が変化しないバリアントであり、これによって活性ドメインの追加・削除がなされうることが示された。さらにこうした読み枠が変化しない選択的イントロンは、塩基配列上の特徴（GC率など）としてはエキソンに近

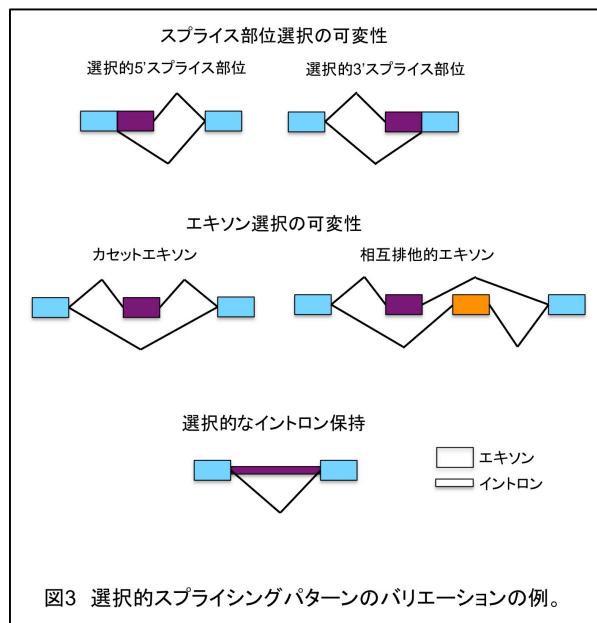
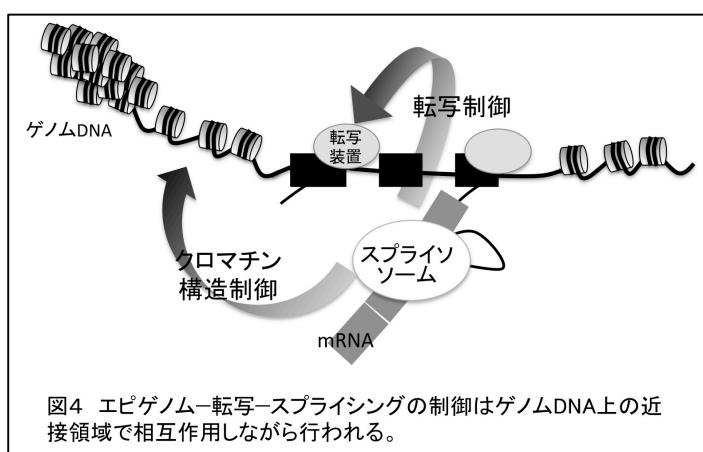


図3 選択的スプライシングパターンのバリエーションの例。

い特徴をもっていることから、新しいカテゴリーExitronとして名付けられ、新規制御ユニットとして注目を集めている (Marquez et al. 2015)。比較解析の結果、Exitronは確かに植物で多く見つかるものの、動物や菌類にも存在することが分かり、真核細胞に共通した選択的スプライシング制御であるらしい (Marquez et al. 2015)。こうした例は、選択的スプライシング制御のどういった側面が各生物種の進化の過程で積極的に選択されてきたかを想像させ、遺伝子発現制御進化という意味でも興味深い問題である。

2-2. エピゲノム-転写-スプライシングのカップリング制御



分子生物学の教科書では、いまだに図1のようなステップワイズな mRNA 生合成モデルが示されていることが多い。しかしながら、近年の動物細胞研究成果からは、実際にはクロマチンリモデリングや DNA メチル化、転写、キャップ付加、スプライシング、polyA テイル付加、が時空間的に近接した形で進んでおり、相互に影響・制御し合いながら調節されていることが示されている

(Braunschweig et al. 2013, Reddy et al. 2013)。つまり、核内で起こっている実際の状況を考えると、図4のようなイメージで理解されるべきではないだろうか。

例えば、スプライシングと転写間のカップリング制御の端的な例として、前項で紹介したスプライソームのコア因子 U1 snRNP を挙げることができる。U1 snRNP は他の U snRNP と比べて存在量が格段に多く、スプライシング以外の機能があることが長らく想像されてきたが、ヒト培養細胞を用いた U1 snRNA 機能阻害による実験から、U1 snRNP が pre-mRNA を保護し、転写維持に働いていることが明らかになった (Kaida et al. 2010)。具体的には、U snRNA 機能阻害によって、RNA Pol II の mRNA 5'端での停滞が引き起こされ、さらに mRNA の PolyA 化の促進と mRNA のスペックル構造への蓄積などが起こり、結果として転写が抑制されること、とくに 10 kb を越えるような長い転写物が顕著に影響を受けることが示されている (Kaida et al. 2010, Koga et al. 2014, Kurogi et al. 2014)。Pol II の C 端領域に存在する活性部位のリン酸化はスプライシング因子を呼び込むシグナルであること (Hsin and Manley 2012)、イントロンをもたない Pol II 転写遺伝子領域にもスプライソームはリクルートされていること (Volanakis et al. 2013) も分かっており、スプライソームによる認識が Pol II 転写の活性維持を制御する重要な要素であると考えられる。さらに、スプライシング因子はヒストン修飾因子の呼び込みを促進し、結果として転写を促進することも知られている (Braunschweig et al. 2013, Reddy et al. 2013)。

また、転写速度による選択的スプライシング制御が、新たなスプライシングと転写間のカップリング制御として注目を集めている (Luco et al. 2011, Braunschweig et al. 2013, Reddy et al. 2013)。スプライシングは 1. で説明したように複雑な反応機構であり、スプライシングイベントの全てが完了

するためには、スプライソーム因子が pre-mRNA 上に結合し作用するのに十分な時間が確保される必要がある。このため、動物細胞では、速い転写速度で転写されるとエキソン認識効率が低下する（そのためエキソンが飛ばされ、エキソンスキッピングが起こる）一方で、遅い転写速度の場合には pre-mRNA 上でスプライソームが機能するのに十分な時間が担保されるため、結果として異なるスプライシングバリエントが作られることが知られている (Luco et al. 2011, Reddy et al. 2013)。植物細胞でもこうした制御が起こっていることが実験的に示されており、Dolata ら (2015) は、酵母ではスプライソームアセンブリに関わることが知られている NTR1 のシロイヌナズナホモログ AtNTR1 が、植物細胞では Pol II と相互作用して転写速度を調節することで、結果として選択的スプライシングパターンに変化をもたらしていることを明らかにしている。こうした知見は、これまでの図 1 のようなモデルでは想定できなかった転写-スプライシングのカップリング制御の在り方を示しており、興味深い (Luco et al. 2011, Braunschweig et al. 2013, Reddy et al. 2013)。

また、真核細胞では、ゲノム DNA のシトシンのメチル化は遺伝子サイレンシングやトランスポン因子との関わりが深いエピジェネティックマークであることが知られている。シロイヌナズナでは、この DNA メチル化は RNA-directed DNA methylation (RdDM) と呼ばれる植物特異的な RNA ポリメラーゼである Pol IV および V とその転写物である non-coding RNA に依存した機構によって確立される (Matzke and Mosher, 2014)。この RdDM にも、スプライシング因子である SR45 (前述; Ausin et al. 2012) や U4/U6 snRNP サブユニット PRP3/RDM16 (Huang et al. 2013), Zinc-finger and OCRE domain-containing Protein 1 (ZOP1) (Zhang et al. 2013)，酵母では U4/U6.U5 snRNP のアッセンブリーに機能することが分かっている PRP31 ホモログ (Du et al. 2015) などのスプライシング因子が重要な機能をもっていることが、順遺伝学的解析から示されている (Huang and Zhu 2014)。分裂酵母の遺伝子サイレンシング機構では、DNA メチル化ではなく、ヒストン H3K9 メチル化酵素のリクルートによるヘテロクロマチン化が起こるが、この酵母クロマチンサイレンシングに必要な siRNA 蓄積にも、スプライシング因子が重要な役割を担っていることが分かっている (Huang and Zhu 2014)。すなわち、スプライシング因子による遺伝子サイレンシング制御は、広く真核細胞に共通していると考えられよう。

さらに、スプライシングを受けたかどうかはその後の mRNA の輸送、翻訳、分解制御に大きく影響する重要な目印として働くこと、エキソンとイントロン領域ではヒストンのアセチル化状態が異なっていること (Luco et al. 2011, Braunschweig et al. 2013, Reddy et al. 2013) やスプライシング阻害は核内構造体形成を大きく攪乱すること (Kurogi et al. 2014)、なども分かっている。こうした知見は、スプライシング因子やスプライシング活性制御の役割が、単なる成熟 mRNA 生合成以上のものであることを示している。RdDM 研究の中で報告されたデータからは、SR45, ZOP1, PRP3, PRP31 などは確かにスプライシング因子としての機能している一方で、それとは独立した分子機能として RdDM に必要な short interfering RNA (siRNA) の蓄積 (SR45 や ZOP1) や Pol V による non-coding RNA 転写 (PRP3/RDM16) に関与していることが示唆されている (Ausin et al. 2012, Huang et al. 2013, Zhang et al. 2013)。こうした同一分子の多機能性は、同一分子内における機能間競合を生み出し、さらにその結果として、スプライシング活性の増減が、結果的に転写や遺伝子サイレンシングなど他の核酸代謝活性の調整弁となっている（あるいは逆に、転写や遺伝子サイレンシングの活性がスプライ

シング活性を制限する) ことも想像される。今後、こうした視点からの研究の進展を待ちたい。

3. 植物における pre-mRNA スプライシング制御の生理的役割

これまで述べてきたとおり、pre-mRNA スプライシング制御は成熟 mRNA を作り出すだけの橋渡し的なプロセスではなく、エピゲノム、転写、RNA の運命決定などにも影響しうる、真核細胞の遺伝子発現制御の中核機構であることが分かってきた。では、植物では pre-mRNA スプライシング制御はとくにどういった生理的側面で重要になってくるのであろうか。シロイヌナズナ分子遺伝学の発展によって、この点についても知見が蓄積しつつある (Staiger and Brown 2013, Tsukaya et al. 2013)。ここではシロイヌナズナのスプライシング制御関連因子の変異体研究を中心に、植物の発生や環境応答、器官再生における役割について概説する。

3-1. pre-mRNA スプライシング制御因子変異体の発生異常

3-1-1. 配偶体形成不全

pre-mRNA スプライシングは真核細胞の遺伝子発現制御において必須の機構であるため、その機能不全は第一に細胞致死性をもたらすと予想される。この予想を裏付けるように、シロイヌナズナ雌性配偶体異常変異体スクリーニング研究によって、複数のスプライシング因子変異体が報告されている。LACHESIS (LIS)、GAMETOPHYTIC FACTOR1(GFA1)/CLOTHO (CLO) および ATROPUS (ATO) は、雌性配偶体形成に重要な因子として単離されてきたシロイヌナズナ遺伝子であるが、いずれもスプライシング因子をコードしている遺伝子であった (Coury et al. 2007, Gross-Hardt et al. 2007, Moll et al. 2008)。これらの変異体では、核分裂後の胚囊の 8 細胞化の際に起こるべき細胞アイデンティティの獲得が異常となり、正常な雌性配偶体が形成されず、受精が起こらない。同様に、著者が解析対象としてきた、snRNA 特異的な転写因子 SHOOT REDIFFERENTIATION DEFECTIVE2

(SRD2) (Ohtani and Sugiyama, 2005) と U snRNP 生合成に重要と考えられている DEAH 型 RNA ヘリカーゼ ROOT INITIATION DEFECTIVE1 (RID1) (Ohtani et al. 2013) (これらの変異体の詳細は 3-3. で後述する) のノックアウト変異体においても、同様に雌性配偶体致死の表現型を示すことが分かっている (図 5)。また、GFA1/CLO は LIS を含む複数のスプライシング因子の発現制御に機能していること (Moll et al. 2008)、RID1 は前述の GFA1 と直接相互作用して機能する可能性などから (Zhu et al. 2016)，これらのスプライシング因子は複雑に相互作用しながら雌性配偶体細胞分化に関与していると考えられる。また、*lis*, *gfa1/clo*, *ato*, *srd2*, *rid1* 変異は花粉形成にはほとんど影響しない一方で、逆遺伝学的に解析された U2 snRNP 複合体サブユニットである SAP130 のノック

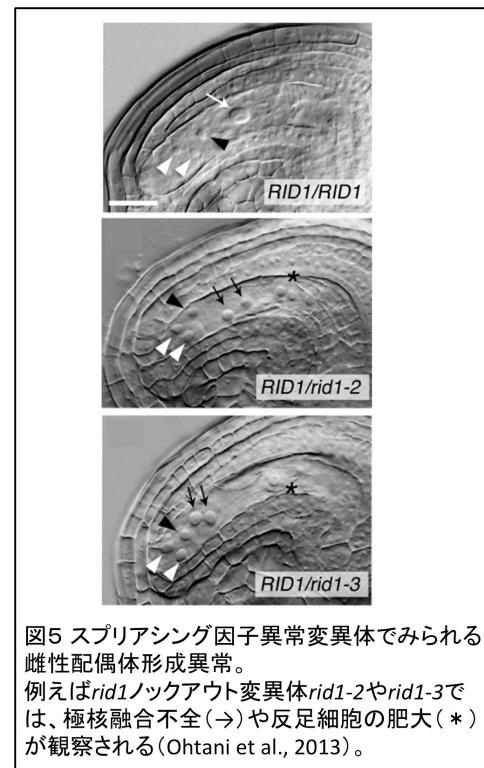


図5 スプライシング因子異常変異体でみられる雌性配偶体形成異常。

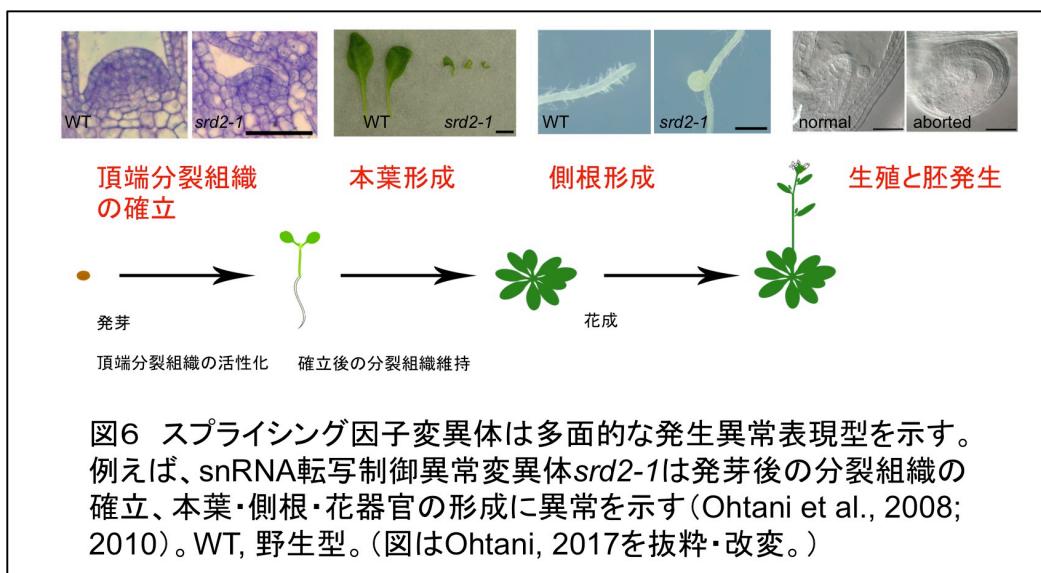
例えば *rid1* ノックアウト変異体 *rid1-2* や *rid1-3* では、極核融合不全(→)や反足細胞の肥大(*)が観察される(Ohtani et al., 2013)。

ダウン変異体では、雌性配偶体、花粉形成とともに影響が出ることが報告されている (Aki et al. 2011)。

3-1-2. 形態形成不全

形態形成に関する表現型としては、選択的スプライシング制御因子である SR タンパク質の 1 つ SR45 の変異体が根の形成不全、細い葉や花器官形成異常などを示すことが分かっている (Ali et al. 2007)。また、MERISTEM-DEFECTIVE (MDF) は、分裂組織の組織化に関わる因子の探索の中で胚発生遺伝子発現プロファイルから単離された U4/U6.U5 tri-snRNP 関連タンパク質の 1 つである (Casson et al. 2009)。MDF に関する T-DNA 挿入によるノックアウト変異体 *mdf* では、オーキシン極性輸送に必要なオーキシン輸送体 PIN-FORMED (PIN) タンパク質の発現異常に加えて、分裂組織形成に重要な転写因子群 PLETHORA, SCARECROW および SHORTROOT の発現低下が見られ、このために 3 枚に増加した子葉、根の形成不全を伴う顕著な矮化が観察される (Casson et al. 2009)。MDF と同じ遺伝子は葉脈パターン形成異常変異体 *defectively organized tributaries2* (*dot2*) 変異体の責任遺伝子としても同定されており、*mdf* 変異体と同様に矮性表現型と根の形成不全が報告されている (Petricka et al. 2008)。また、U snRNA と結合し U snRNP 生合成～スプライシングに重要な Sm タンパク質の 1 つである SmD3 ホモログについて、逆遺伝学的に解析された結果、シロイヌナズナゲノムに 2 コピー存在する *SmD3* 遺伝子のうち、*smd3-b* ノックアウト変異体が多面的表現型を示し、花成の遅れや根の発達不全、葉脈・トライコーム・花器官の発達異常を起こすことが分かっている (Swaraz et al. 2011)。

多面的表現型は先に挙げた U snRNP 生合成に機能する *SRD2* および *RID1* の点変異アリル *srd2-1* および *rid1-1* でも観察されており、*srd2-1* および *rid1-1* では発芽後の分裂組織の確立、本葉・側根・花器官の形成に異常が見られる (図 6, Ohtani et al. 2008, 2010, 2013, Ohtani 2017)。*srd2-1* の側根形成異常は、PIN 発現異常がもたらすオーキシン局在異常に依ることが示されており (Ohtani et al. 2010)、先の *mdf/dot2* 変異体との関連をうかがわせる。さらに花器官発達異常は先に挙げた GFA1/CLO の点変異アリルである *vajra-1* (*vaj-1*) でも観察されている (Yagi et al. 2009)。また、葉脈パターン異常変異体 *clumsy vein* (*cuv*) の責任遺伝子は RNA ヘリカーゼである PRP16 ホモログをコードしていた (Tsugeki et al. 2015)。*cuv* 変異体では、オーキシンの生合成、輸送、受容およびシグナリングに関わる遺伝子のスプライシング制御不全が示されており、結果としてオーキシンによる形態形成が全般的に異常になっていると考えられている (Tsugeki et al. 2015)。



3-1-3. スプライシング制御と植物発生について変異体解析から分かること

このように、スプライシング因子変異体研究を概観してみると、いくつかの重要な点が浮かび上がってくる。一つには、スプライシング制御異常の程度が強すぎる（必須遺伝子のノックアウト変異など）場合には、配偶体形成異常となり、結果としてノックアウトホモ変異体の取得は不可能であることがある。*vaj-1*, *srd2-1* および *ridl-1* といった点変異の解析例が示しているように、同じ遺伝子であっても弱いアリルの場合には特徴的な表現型があらわれ、各因子の活性要求度が発生過程によって異なっている可能性を想像させる(Ohtani 2015, 2017)。また、複数の変異体で重複して見られる表現型から、植物発生の中でも、一つにはオーキシンに依存した発生制御機構がスプライシング制御異常に感受性が高いと考えられる。さらに、独立変異体スクリーニング実験にも関わらず、遺伝学的に同じ遺伝子が何度も単離されている点(*GFA1/CLO/VAJ*, *MDF/DOT2*)も示唆的である。これは、発生に重要なスプライシング制御因子は、過程によっては限られていることを意味しているのかもしれない。

植物はゲノム倍加を起こしやすいことが知られており、このため、酵母や動物に比べて、スプライシング遺伝子のコピー数が多いことが容易に想像される(Wang and Brendel 2004)。単純に考えれば、このため、スプライソーム構成因子の組み合わせのバリエーション数も激増し、複合体としてのスプライソームも複雑な状況にあることが想像されてきた(Isshiki et al. 2006)。しかしながら実際には、2 コピー存在するシロイヌナズナ *SmD3* 遺伝子のうち、単独変異で表現型を示すのは *SmD3-b* 遺伝子だけだったように(Swaraz et al. 2011)，主要分子として機能しているコピーと、特定の役割をもつコピーとに、それぞれ機能分化している可能性も考えられる。果たしてこれは他の植物スプライシング因子についても同様なのか、今後の研究課題の一つであろう。

3-2. pre-mRNA スプライシング制御と環境応答

続いて、pre-mRNA スプライシング制御と環境応答との関わりについて紹介する。1つには生物的・非生物的ストレス耐性に関する変異体スクリーニング研究から明らかにされてきた、ストレス

応答におけるスプライシング制御の重要性である。さらに、近年の次世代シーケンサー技術の成熟により、トランスクリプトーム解析の時空間的解像度が飛躍的に向上しているが、これによってさまざまな環境条件に応答して、選択的スプライシング制御がダイナミックに変動している様子が見えつつある (Staiger and Brown 2013)。ここでは最新知見を概説しながら、「動かない」植物の環境応答戦略としてのスプライシング制御について考えてみたい。

3-2-1. ストレス応答と pre-mRNA スプライシング制御

植物に対する非生物学的ストレスとしては、塩、高温／低温、強光、栄養飢餓／過剰などが挙げられる。これらのストレスに曝されると、植物細胞はダイナミックな選択的スプライシングを起こし (Ding et al., 2014 など)，時には選択的スプライシングによる鍵遺伝子の発現調節が、直接的にストレス応答を制御しているケースも報告されている (Staiger and Brown 2013, Shang et al. 2017)。例えばイネでは、ストレス応答に重要な転写因子 *OsDREB2* のスプライシングバリエントのうち、高温および乾燥ストレスによって、完全長タンパク質をコードするバリエントフォームの形成が促進される。これによって転写制御とは独立して速やかに機能的 DREB2 転写因子生合成が進み、ストレス応答反応が引き起こされると考えられている (Matsukura et al. 2010)。

さらに、ストレス応答とスプライシング制御の密な関係性を示す成果として、生物学的・非生物学的ストレス耐性に関するシロイヌナズナ変異体スクリーニング研究を挙げることができる (Staiger and Brown 2013, Shang et al. 2017)。非生物学的ストレス高感受性変異体としては、U5 snRNP 複合体のサブユニットである酵母 Prp6 ホモログ STA1 (Lee et al. 2006) や U6 snRNP 複合体のコアサブユニット LSM4 (Zhang et al. 2011) および LSM5 (Xiong et al. 2001)，さらに mRNA のキャップ構造に結合するタンパク質であり選択的スプライシングへの関与が知られている CAP BINDING PROTEIN20 (CAP20) および CAP80 (Hugouvieux et al. 2001, Papp et al. 2004) などの機能欠損型変異体が得られている。これらの変異体ではアブシジン酸 (ABA) への高感受性に加えて、さまざまな非生物学的ストレスに高感受性になっている (*sta1* 変異体は塩および低温ストレス高感受性，*lsm4* は塩ストレス高感受性，*lsm5/Arabidopsis supersensitive to ABA and drought1 (sad1)* 変異体は乾燥ストレス高感受性になっている) (Xiong et al. 2001, Lee et al. 2006, Zhang et al. 2011)。こうした結果は、スプライシングを含む RNA 代謝制御と植物ストレスシグナルを仲介する重要植物ホルモンである ABA シグナリングの間に強い関係性があることを想像させ、研究者の興味を引いてきた。ごく最近、スプライシング阻害剤処理によってシロイヌナズナ芽生えのスプライシングをゲノムワイドに阻害すると、非生物学的ストレス応答とよく似た遺伝子発現変動が起こることが報告された (AlShareef et al. 2017, Ling et al. 2017)。すなわち、植物細胞は（選択的）スプライシング制御の変動自体を、非生物学ストレスシグナルとして利用していると考えられ、植物細胞がどのように環境状態をモニタリングしているのかを考える上で、非常に興味深い。

生物的ストレスとしては、病原菌感染、虫や動物による食害などが考えられ、植物はさまざまな対応策を進化させてきた。病原菌に対する免疫システムの1つが Resistance (R) タンパク質と呼ばれる一群のタンパク質であり、病原菌感染後の R 遺伝子の機能発揮に、R 遺伝子の選択的スプライシング制御が重要である例が知られている (Shang et al. 2017)。さらに恒常的に免疫応答を起こす変

異体の抑圧変異スクリーニングによって単離された *MODIFIER OF SNC1 (MOS)* 遺伝子シリーズのうち, *MOS4*, *MOS12*, *MOS14* がスプライシング因子であることが分かり, *MOS4* との相互作用因子 *MOS4-associated complex3 (MAC3)* および *MAC5* もスプライシングに関わるタンパク質であった (Palma et al. 2007, Monaghan et al. 2010, Xu et al. 2012)。これらのスプライシング因子は *R* 遺伝子の選択的スプライシングの制御に関わることで, 植物免疫に影響することが報告されている。

3-2-2. pre-mRNA スプライシング制御と概日時計・花成

生物は概日時計と呼ばれる内在性の分子時計システムをもっており, これによって約 24 時間のリズムを認識し, 発生や成長活動の日周性を獲得している。植物の概日時計リズムは CIRCADIAN CLOCK-ASSOCIATED1 (CCA1), LATE ELONGATED HYPOCOTYL (LHY), TIMING OF CAB EXPRESSION1 (TOC1), PSEUDO RESPONSE REGULATOR7 (PRR7) および PRR9 といった転写因子群 (時計遺伝子群) のフィードバック転写制御によって生み出される, 発現レベルの振動変動によって刻まれている (Dodd et al. 2015) が, これらの転写因子は選択的スプライシング制御を受けることが知られている。スプライシング関連因子の変異体, 例えはスプライシング関連タンパク質のメチル化を行うタンパク質メチル化酵素 PROTEIN ARGinine METHYLTRANSFERASE5 (PRMT5) (Deng et al. 2010, Hong et al. 2010, Sanchez et al. 2010) や U snRNP 形成促進因子である GEM NUCLEAR ORGANELLE ASSOCIATED PROTEIN2 (GEMIN2) (Schlaen et al. 2015), 酵母 Prp39 ホモログ ATPRP39-1 (Wang et al. 2007), 酵母 Prp19 複合体サブユニット Ski-INTERACTING PROTEIN (SKIP) ホモログ (Wang et al. 2012) など, では, これら時計遺伝子の選択的スプライシング制御が攪乱され, 概日時計異常が引き起こされていると考えられている (Staiger and Brown 2013, Shang et al. 2017)。

さらに上述の時計遺伝子の発現は, 実際には植物が受け取る外界の光や温度の情報によって調整されながら, 栄養成長相から生殖相への転換 (いわゆる花成) の制御につながっている (Dodd et al., 2015)。シロイヌナズナにおける赤色/遠赤色光レセプターであるフィトクローム A (PhyA) および PhyB を欠損した *phyA phyB* 二重変異体を用いた解析から, フィトクロームに依存した素早い赤色光応答性選択的スプライシング変化が起こること, さらにその制御ターゲットにはスプライシング因子が多く含まれていること, が明らかとなった (Shikata et al. 2014)。つまり, 光環境情報の一部はスプライシング因子のスプライシング状態, ひいてはスプライシング因子機能調節に変換され, 時計遺伝子などの重要因子のスプライシング制御につながっていると考えられる (Shikata et al. 2014)。また, スプライシング関連因子の変異体は, 花成タイミング制御の異常を示すことが多く (Staiger and Brown 2013, Tsukaya et al. 2013, Shang et al. 2017), 栄養期から生殖期への相転換制御におけるスプライシング制御の重要性が想定されてきた。その一端と考えられているのが, 花成制御遺伝子の温度依存的な選択的スプライシング制御である。花成を抑制する重要な MADS 転写因子をコードする *FLOWERING LOCUS C (FLC)* 遺伝子の発現は, 複数の経路によって制御されていることが知られているが, その 1つがいわゆる冬季に起こる低温誘導性のエピジェネティックな *FLC* 発現抑制制御である (Shang et al. 2017)。これには non-coding RNA である *COOLAIR* の選択的スプライシングが関与することが知られている (Swiezewski et al. 2009)。*COOLAIR* は *FLC* mRNA と完

全に相補的な配列をもっており、2つのクラスのスプライシングバリアントが知られているが、どちらが優勢になるかによって、*FLC* の発現量が決定されうる (Swiezewski et al. 2009, Marquardt et al. 2014, Wang et al. 2014)。さらに別のMADS転写因子である *SHORT VEGETATIVE PHASE (SVP)* や *FLOWERING LOCUS M (FLM)* などの遺伝子も温度依存的な選択的スプライシング制御を受けることが知られており、温度情報とスプライシング制御の分子的関係性は未解明な点も多いものの、花成制御における温度依存的な選択的スプライシング制御の重要性が解かれつつあると言える (Shang et al. 2017)。

3-3. 植物器官再生における pre-mRNA スプライシング制御の重要性

最後に、筆者が解析対象としてきたシロイヌナズナ突然変異体 *srd2-1* および *ridl-1* を紹介し、これらの変異体解析を通して明らかになってきた、植物の器官再生における pre-mRNA スプライシング制御の重要性について概説したい。植物は動物に比べて、一般的に高い器官再生能力をもっていることが知られている (Ohtani 2015, 大谷 2017)。例えば人工的には、植物ホルモン条件を最適化した培地上で植物組織片を培養することで、この器官再生能力を容易に顕在化させることができる。*srd2-1* および *ridl-1* は、こうした組織培養応答に関する温度感受性を指標に単離されてきた変異体であり、*srd2-1* は根断片からのショート再生が、*ridl-1* は胚軸断片からの不定根形成が、それぞれ高温 (27~28°C) で異なる (Yasutani et al. 1994, Ozawa et al. 1998, Konishi and Sugiyama 2003)。胚軸および根の断片を材料としたカルス形成、側根形成、不定根形成、ショート再生に関する詳細解析の結果、*srd2-1* と *ridl-1* は、非常によく似た組織培養異常を示すことが分かった。すなわち、両者とも胚軸断片からのカルス形成に強い温度感受性を示す一方、根断片からのカルス形成は正常である。また、不定根・側根形成およびショート再生も強い温度感受性を示す (Ohtani and Sugiyama 2005, Ohtani et al. 2013, Ohtani 2015, 2017)。こうした表現型から、SRD2 および RID1 は、胚軸脱分化（正確にいえば細胞分裂の再開）と根・ショート再生時に重要な分裂組織の新形成の両方において、必須機能を果たしていると考えられてきた。

3-1. で既に簡単に紹介したとおり、*SRD2* 遺伝子は snRNA 特異的な zinc-finger 型転写活性化因子を、*RID1* 遺伝子は DEAH-box 型 RNA ヘリカーゼをコードしていることが明らかとなっている (Ohtani and Sugiyama 2005, Ohtani et al. 2013)。U snRNA は U snRNP のコア因子であり、スプライシングに必須の因子である。また、RID1 は核小体に局在することが分かっているが (Ohtani et al. 2013)，核小体は細胞質で修飾を受け成熟型となって核内へ戻ってきた U snRNA が、特異的タンパク質と結合し U snRNP となる場である。このことから、RID1 は U snRNP 生合成に機能している RNA ヘリカーゼであると考えられた (Ohtani et al. 2013)。まとめると、SRD2 と RID1 のどちらも正常な U snRNP 生合成に必須の分子であり、*srd2-1* と *ridl-1* 変異体では、機能的 U snRNP 量低下によるスプライシング不全が起こっていることが想像される。解析の結果、実際に *srd2-1* と *ridl-1* 変異体におけるスプライシング制御異常が観察される (Ohtani et al. 2013, unpublished data)。興味深いことに、*SRD2* も *RID1* も、胚軸からのカルス形成誘導過程において、培地に含まれるオーキシンおよびサイトカインに応答して大きく発現が誘導される (Ohtani and Sugiyama 2005, Ohtani et al. 2013)。これは、胚軸脱分化時には新たに誘導される *SRD2* および *RID1* による積極的な U snRNP

生合成（とおそらくはそれによるスプライソソームの再編）が重要であることを示唆している

(Ohtani, 2015, 2017, 大谷 2017)。

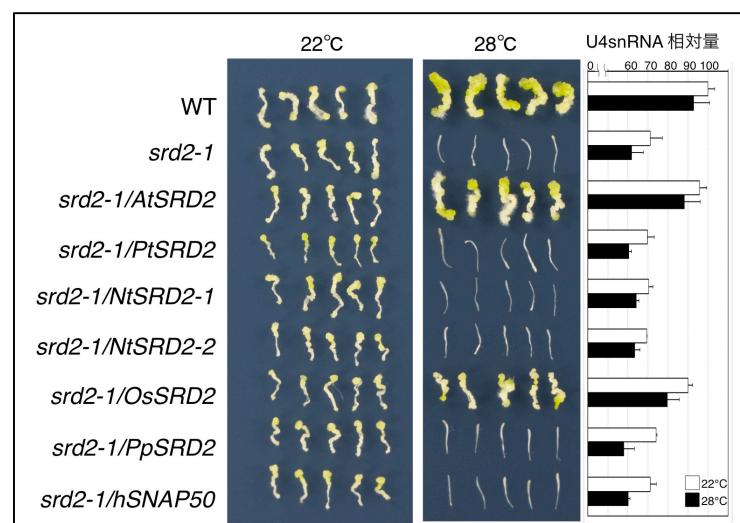


図7 胚軸カルス形成能力はU snRNAレベルによって規定される。
*srd2-1*が示す胚軸カルス形成の高温感受性の回復は、U snRNA量の回復が起こるイネSRD2(*OsSRD2*)を導入したときのみで観察された(Ohtani et al., 2015)。

正に制御している(Mittal et al. 1999, Hernandez 2001, Ohtani 2017)。hSNAP50とさまざまな植物種由来のSRD2ホモログをシロイヌナズナSRD2遺伝子プロモータ一下で発現させ、*srd2-1*に対する相補能を調べたところ、U snRNA量と器官再生、芽生えの発生の表現型の完全な回復はイネSRD2を導入したときのみで観察された(図7, Ohtani et al. 2015)。興味深いことに、タバコSRD2やポプラSRD2、hSNAP50を導入した場合には、U snRNA量の回復も十分ではなく器官再生の表現型は回復しない一方で、芽生えの発生(本葉形成)阻害は若干回復した(Ohtani et al. 2015)。これは、器官再生には、通常の芽生えの発生よりもより多いU snRNA量が必要とされることを示唆する重要な成果であった(Ohtani et al. 2015, Ohtani 2015, 2017, 大谷 2017)。

では、なぜ植物の器官再生には高いU snRNP活性が要求されるのであろうか。これまでのスプライシング関連因子変異体の例にあるように、器官再生の鍵遺伝子群の(選択的)スプライシング制御の異常のせいで器官再生阻害が起こっている可能性もあれば、スプライシング阻害剤処理によって非生物学ストレス応答が起こったように(AI Shareef et al. 2017, Ling et al. 2017)、スプライシング異常自体がシグナルとなってなんらかのストレス状態に陥った結果、器官再生阻害が起こっている可能性もある。今後、*srd2-1*や*ridl-1*などの器官再生不全を示すスプライシング関連因子変異体を材料とした解析を進めることによって、この点を明らかにしたいと考えている。

4. おわりに

分子生物学の教科書を開くと、最初に説かれるのは往々にしてセントラルドグマ「DNA→RNA→タンパク質」のモデルであり、DNA=遺伝暗号こそが生物の最重要設計図である、という強烈なイメージが植え付けられてしまう。しかしながら、ここまで述べてきたとおり、生物は実際には、遺伝子に書き込まれた情報をいつ・どう読み取るか、あるいは一時的に上書きして使うか、RNA分子を主体的制御因子として柔軟に制御しながら、生命活動を成立させていくことが分かってきた。

RNA 分子はそれ自体に配列情報（遺伝情報）をもちながら、分子内・分子間相互作用によって複雑な立体構造をとつて触媒活性を担うことができる、非常にユニークな生体高分子である。ゲノム DNA が遺伝暗号（code）だとすると、RNA はそれを読み解く（decode）ための鍵であり、さらには pre-mRNA スプライシングはどういった鍵を作り出すのか、それを調節する機構だと考えられよう。そして植物は本稿で紹介したように、この機構を巧妙に利用して、環境情報を取得して適切に応答し、発生プログラムを調整して生きている。植物では RNA 依存型 RNA ポリメラーゼによって二次的に RNA から RNA が作り出される（Willmann et al. 2011）ことを考えると、「動かない」植物の細胞の中では、常に活発な RNA の生合成と分解が起こっており、スプライシング阻害剤実験によって示唆されたように（AlShareef et al. 2017, Ling et al. 2017），この RNA 代謝自体が重要な分子シグナルとして機能していることも想像される。

植物がどのように外界を認識し、自己を組織化し、自己を code し、世界を decode しているのか。新しい pre-mRNA スプライシング制御像にもとづく植物 RNA 研究の進展が、この問い合わせを解き明かしてくれることを期待したい。

謝辞

本稿の執筆にあたっては、JSPS 科研費 JP16K18569、公益財団法人 内藤記念科学振興財団、住友財団 基礎科学研究助成、および日本分子生物学会 若手研究助成 富澤純一・桂子 基金の助成をいただきました。この場を借りて御礼申し上げます。

引用文献

- Aki S, Nakai H, Aoyama T, Oka A, Tsuge T (2011) AtSAP130/AtSF3b-3 function is required for reproduction in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.* 52: 1330–1339.
- Ali GS, Palusa SG, Golovkin M, Prasad J, Manley JL, Reddy AS (2007) Regulation of plant developmental processes by a novel splicing factor. *PLoS One* 2: e471.
- AlShareef S, Ling Y, Butt H, Mariappan KG, Benhamed M, Mahfouz MM (2017) Herboxidiene triggers splicing repression and abiotic stress responses in plants. *BMC Genomics* 18: 260.
- Ausin I, Greenberg MV, Li CF, Jacobsen SE (2012) The splicing factor SR45 affects the RNA-directed DNA methylation pathway in *Arabidopsis*. *Epigenetics* 7: 29–33.
- Braunschweig U, Guerousov S, Plocik AM, Graveley BR, Blencowe BJ (2013) Dynamic integration of splicing within gene regulatory pathways. *Cell* 152: 1252–1269.
- Carvalho RF, Szakonyi D, Simpson CG, Barbosa IC, Brown JW, Baena-González E, Duque P (2016) The *Arabidopsis* SR45 splicing factor, a negative regulator of sugar signaling, modulates SNF1-related protein kinase 1 stability. *Plant Cell* 28: 1910–1925.
- Casson SA, Topping JF, Lindsey K (2009) MERISTEM-DEFECTIVE, an RS domain protein, is required for the correct meristem patterning and function in *Arabidopsis*. *Plant J.* 57: 857–869.
- Coury DA, Zhang C, Ko A, Skaggs MI, Christensen CA, Drews GN, Feldmann KA, Yadegiri R (2007)

- Segregation distortion in *Arabidopsis gametophytic factor 1* (*gfa1*) mutants is caused by a deficiency of an essential RNA splicing factor. *Sex. Plant Reprod.* 20: 87–97.
- Deng X, Gu L, Liu C, Lu T, Lu F, Lu Z, Cui P, Pei Y, Wang B, Hu S, Cao X. (2010) Arginine methylation mediated by the *Arabidopsis* homolog of PRMT5 is essential for proper pre-mRNA splicing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 107: 19114–19119.
- Ding F, Cui P, Wang Z, Zhang S, Ali S, Xiong L (2014) Genome-wide analysis of alternative splicing of pre-mRNA under salt stress in *Arabidopsis*. *BMC Genomics* 15:431.
- Dodd AN, Belbin FE, Frank A, Webb AAR (2015) Interactions between circadian clocks and photosynthesis for the temporal and spatial coordination of metabolism. *Front. Plant Sci.* 6:245.
- Dolata J, Guo Y, Kołowerzo A, Smoliński D, Brzyżek G, Jarchołowski A, Świeżewski S (2015) NTR1 is required for transcription elongation checkpoints at alternative exons in *Arabidopsis*. *EMBO J.* 34: 544–558.
- Du JL, Zhang SW, Huang HW, Cai T, Li L, Chen S, He XJ (2015) The splicing factor PRP31 is involved in transcriptional gene silencing and stress response in *Arabidopsis*. *Mol. Plant* 8: 1053–1068.
- Groß-Hardt R, Kägi C, Baumann N, Moore JM, Baskar R, Gagliano WB, Jürgens G, Grossniklaus U (2007) *LACHESIS* restricts gametic cell fate in the female gametophyte of *Arabidopsis*. *PLoS Biol.* 5:e47.
- Hernandez N (2001) Small nuclear RNA genes: a model system to study fundamental mechanisms of transcription. *J. Biol. Chem.* 276: 26733–26736.
- Hong S, Song HR, Lutz K, Kerstetter RA, Michael TP, McClung CR (2010) Type II protein arginine methyltransferase 5 (PRMT5) is required for circadian period determination in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 107: 21211–21216.
- Hsin JP, Manley JL (2012) The RNA polymerase II CTD coordinates transcription and RNA processing. *Genes Dev.* 26: 2119–2137.
- Huang CF, Miki D, Tang K, Zhou HR, Zheng Z, Chen W, Ma ZY, Yang L, Zhang H, Liu R, He XJ, Zhu JK (2013) A Pre-mRNA-splicing factor is required for RNA-directed DNA methylation in *Arabidopsis*. *PLoS Genet.* 9: e1003779.
- Huang CF, Zhu JK (2014) RNA splicing factors and RNA-directed DNA methylation. *Biology (Basel)* 3: 243–254.
- Hugouvieux V, Kwak JM, Schroeder JI (2001) An mRNA cap binding protein, ABH1, modulates early abscisic acid signal transduction in *Arabidopsis*. *Cell* 106: 477–487.
- International Human Genome Mapping Consortium (2001) A physical map of the human genome. *Nature* 409: 934–941.
- International Human Genome Mapping Consortium (2004) Finishing the euchromatic sequence of the human genome. *Nature* 431: 931–945.
- Isshiki M, Tsumoto A, Shimamoto K (2006) The serine/arginine-rich protein family in rice plays important roles in constitutive and alternative splicing of pre-mRNA. *Plant Cell* 18: 146–158.
- Jurica MS, Moore MJ (2003) Pre-mRNA splicing: awash in a sea of proteins. *Mol. Cell* 12: 5–14.

- Kaida D, Berg MG, Younis I, Kasim M, Singh LN, Wan L, Dreyfuss G (2010) U1 snRNP protects pre-mRNAs from premature cleavage and polyadenylation. *Nature* 468: 664–668.
- Koga M, Satoh T, Takasaki I, Kawamura Y, Yoshida M, Kaida D (2014) U2 snRNP is required for expression of the 3' end of genes. *PLoS One* 9: e98015.
- Konishi M, Sugiyama M (2003) Genetic analysis of adventitious root formation with a novel series of temperature-sensitive mutants of *Arabidopsis thaliana*. *Development* 130: 5637–5647.
- Kurogi Y, Matsuo Y, Mihara Y, Yagi H, Shigaki-Miyamoto K, Toyota S, Azuma Y, Igarashi M, Tani T (2014) Identification of a chemical inhibitor for nuclear speckle formation: implications for the function of nuclear speckles in regulation of alternative pre-mRNA splicing. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 446: 119–124.
- Lee B, Kapoor A, Zhu J, Zhu JK (2006) STABILIZED1, a stress-upregulated nuclear protein, is required for pre-mRNA splicing, mRNA turnover, and stress tolerance in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 18: 1736–1749.
- Ling Y, Alshareef S, Butt H, Lozano-Juste J, Li L, Galal AA, Moustafa A, Momin AA, Tashkandi M, Richardson DN, Fujii H, Arold S, Rodriguez PL, Duque P, Mahfouz MM (2017) Pre-mRNA splicing repression triggers abiotic stress signaling in plants. *Plant J.* 89: 291–309.
- Luco RF, Allo M, Schor IE, Kornblith AR, Misteli T (2011) Epigenetics in alternative pre-mRNA splicing. *Cell* 144: 16–26.
- Marquardt S, Raitskin O, Wu Z, Liu F, Sun Q, Dean C (2014) Functional consequences of splicing of the antisense transcript COOLAIR on FLC transcription. *Mol. Cell* 54: 156–165.
- Marquez Y, Höpfler M, Ayatollahi Z, Barta A, Kalyna M (2015) Unmasking alternative splicing inside protein-coding exons defines exitrons and their role in proteome plasticity. *Genome Res.* 25: 995–1007.
- Matsukura S, Mizoi J, Yoshida T, Todaka D, Ito Y, Maruyama K, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2010) Comprehensive analysis of rice DREB2-type genes that encode transcription factors involved in the expression of abiotic stress-responsive genes. *Mol. Genet. Genomics* 283: 185–196.
- Matzke MA, Mosher RA (2014) RNA-directed DNA methylation: an epigenetic pathway of increasing complexity. *Nat. Rev. Genet.* 15: 394–408.
- Mittal V, Ma B, Hernandez N (1999) SNAPc: a core promoter factor with a built-in DNA-binding damper that is deactivated by the Oct-1 POU domain. *Gene Dev.* 13: 1807–1821.
- Moll C, von Lyncker L, Zimmermann S, Kägi C, Baumann N, Twell D, Grossniklaus U, Groß-Hardt R (2008) CLO/GFA1 and ATP are novel regulators of gametic cell fate in plants. *Plant J.* 56: 913–921.
- Monaghan J, Xu F, Xu S, Zhang Y, Li X (2010) Two putative RNA-binding proteins function with unequal genetic redundancy in the MOS4-associated complex. *Plant Physiol.* 154: 1783–1793.
- Ohtani M (2015) Regulation of RNA metabolism is important for in vitro dedifferentiation of plant cells. *J. Plant Res.* 128: 361–369.
- Ohtani M (2017) Transcriptional regulation of snRNAs and its significance for plant development. *J. Plant Res.* 130: 57–66.
- 大谷美沙都 (2017) 植物の器官再生における RNA 代謝制御の役割. 生物科学 68: 240–249.
- Ohtani M, Sugiyama M (2005) Involvement of SRD2-mediated activation of snRNA transcription in the M. Ohtani-16

- control of cell proliferation competence in *Arabidopsis*. *Plant J.* 43: 479–490.
- Ohtani M, Demura T, Sugiyama M (2008) Differential requirement for the function of SRD2, an snRNA transcription activator, in various stages of plant development. *Plant Mol. Biol.* 66: 303–314.
- Ohtani M, Demura T, Sugiyama M (2010) Particular significance of SRD2-dependent snRNA accumulation in polarized pattern generation during lateral root development of *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiol.* 51: 2002–2012.
- Ohtani M, Demura T, Sugiyama M (2013) *Arabidopsis* ROOT INITIATION DEFECTIVE1, a DEAH-box RNA helicase involved in pre-mRNA splicing, is essential for plant development. *Plant Cell* 25: 2056–2069.
- 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: 371–338.
- Ozawa S, Yasutani I, Fukuda H, Komamine A, Sugiyama M (1998) Organogenic responses in tissue culture of *srd* mutants of *Arabidopsis thaliana*. *Development* 125:135–142.
- Palma K, Zhao Q, Cheng YT, Bi D, Monaghan J, Cheng W, Zhang Y, Li X (2007) Regulation of plant innate immunity by three proteins in a complex conserved across the plant and animal kingdoms. *Genes Dev.* 21: 1484–1493.
- Palusa SG, Ali GS, Reddy AS (2007) Alternative splicing of pre-mRNAs of *Arabidopsis* serine/arginine-rich proteins: Regulation by hormones and stresses. *Plant J.* 49: 1091–1107.
- Pan Q, Shai O, Lee LJ, Frey BJ, Blencowe BJ (2008) Deep surveying of alternative splicing complexity in the human transcriptome by high-throughput sequencing. *Nat. Genet.* 40: 1413–1415.
- Papp I, Mur LA, Dalmadi A, Dulai S, Koncz C (2004). A mutation in the Cap Binding Protein 20 gene confers drought tolerance to *Arabidopsis*. *Plant Mol. Biol.* 55: 679–686.
- Petricka JJ, Clay NK, Nelson TM (2008) Vein patterning screens and the defectively organized tributaries mutants in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 56:251–263.
- Reddy AS, Marquez Y, Kalyna M, Barta A (2013) Complexity of the alternative splicing landscape in plants. *Plant Cell* 25: 3657–3683.
- Sanchez SE, Petrillo E, Beckwith EJ, Zhang X, Rugnone ML, Hernando CE, Cuevas JC, GodoyHerz MA, Depetris-Chauvin A, Simpson CG, Brown JW, Cerdán PD, Borevitz JO, Mas P, Ceriani MF, Kornblith AR, Yanovsky MJ (2010) A methyl transferase links the circadian clock to the regulation of alternative splicing. *Nature* 468: 112–116.
- Schlaen RG, Mancini E, Sanchez SE, Perezsantángelo S, Rugnone ML, Simpson CG, Brown JW, Zhang X, Chernomoretz A, Yanovsky MJ (2015) The spliceosome assembly factor GEMIN2 attenuates the effects of temperature on alternative splicing and circadian rhythms. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 112: 9382–9387.
- Shang X, Cao Y, Ma L (2017) Alternative splicing in plant genes: a means of regulating the environmental fitness of plants. *Int. J. Mol. Sci.* 18: 432.
- Shikata H, Hanada K, Ushijima T, Nakashima M, Suzuki Y, Matsushita T (2014) Phytochrome controls M. Ohtani-17

- alternative splicing to mediate light responses in Arabidopsis. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 111: 18781–18786.
- Staiger D, Brown JWS (2013) Alternative splicing at the intersection of biological timing, development, and stress responses. *Plant Cell* 25: 3640–3656.
- Swaraz AM, Park Y-D, Hur Y (2011) Knock-out mutations of Arabidopsis SmD3-b induce pleotropic phenotypes through altered transcript splicing. *Plant Sci.* 180: 661–671.
- Swiezewski S, Liu F, Magusin A, Dean C (2009) Cold-induced silencing mediated by long antisense RNA from a Polycomb target. *Nature* 462: 799–802.
- Tsugeki R, Tanaka-Sato N, Maruyama N, Terada S, Kojima M, Sakakibara H, Okada K. (2015) CLUMSY VEIN, the Arabidopsis DEAH-box Prp16 ortholog, is required for auxin-mediated development. *Plant J.* 81: 183–197.
- Tsukaya H, Byrne ME, Horiguchi G, Sugiyama M, Van Lijsebettens M, Lenhard M (2013) How do 'housekeeping' genes control organogenesis?—Unexpected new findings on the role of housekeeping genes in cell and organ differentiation. *J. Plant Res.* 126: 3–15.
- Volanakis A, Passoni M, Hector RD, Shah S, Kilchert C, Granneman S, Vasiljeva L (2013) Spliceosome-mediated decay (SMD) regulates expression of nonintronic genes in budding yeast. *Genes Dev.* 27: 2025–2038.
- Wang BB, Brendel V (2004) The ASRG database: identification and survey of Arabidopsis thaliana genes involved in pre-mRNA splicing. *Genome Biol.* 5: R102.
- Wang C, Tian Q, Hou Z, Mucha M, Aukerman M, Olsen OA (2007) The *Arabidopsis thaliana* AT PRP39-1 gene, encoding a tetratricopeptide repeat protein with similarity to the yeast pre-mRNA processing protein PRP39, affects flowering time. *Plant Cell Rep.* 26: 1357–1366.
- Wang X, Wu F, Xie Q, Wang H, Wang Y, Yue Y, Gahura O, Ma S, Liu L, Cao Y, Jiao Y, Puta F, McClung CR, Xu X, Ma L (2012) SKIP is a component of the spliceosome linking alternative splicing and the circadian clock in Arabidopsis. *Plant Cell* 24: 3278–3295.
- Wang Z, Burge CB (2008) Splicing regulation: from a parts list of regulatory elements to an integrated splicing code. *RNA* 14: 802–813.
- Wang ZW, Wu Z, Raitskin O, Sun Q, Dean C (2014) Antisense-mediated FLC transcriptional repression requires the P-TEFb transcription elongation factor. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 111: 7468–7473.
- Will CL, Lührmann R (2011) Spliceosome structure and function. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 3: 3.
- Willmann MR, Endres MW, Cook RT, Gregory BD (2011) The Functions of RNA-Dependent RNA Polymerases in Arabidopsis. *Arabidopsis Book* 9: e0146.
- Xiong L, Gong Z, Rock CD, Subramanian S, Guo Y, Xu W, Galbraith D, Zhu JK (2001) Modulation of abscisic acid signal transduction and biosynthesis by an Sm-like protein in Arabidopsis. *Dev. Cell* 1: 771–781.
- Xu F, Xu S, Wiermer M, Zhang Y, Li X (2012) The cyclin L homolog MOS12 and the MOS4-associated complex are required for the proper splicing of plant resistance genes. *Plant J.* 70: 916–928.

- Yagi N, Takeda S, Matsumoto N, Okada K. (2009) VAJ/GFA1/CLO is involved in the directional control of floral organ growth. *Plant Cell Physiol.* 50: 515–527.
- Yasutani I, Ozawa S, Nishida T, Sugiyama M, Komamine A (1994) Isolation of temperature-sensitive mutants of *Arabidopsis thaliana* that are defective in the redifferentiation of shoots. *Plant Physiol.* 105: 815–822.
- Zhang C, Yang H, Yang H (2015) Evolutionary Character of Alternative Splicing in Plants. *Bioinform. Biol. Insights* 9: 47–52.
- Zhang CJ, Zhou JX, Liu J, Ma ZY, Zhang SW, Dou K, Huang HW, Cai T, Liu R, Zhu JK, He XJ (2013) The splicing machinery promotes RNA-directed DNA methylation and transcriptional silencing in Arabidopsis. *EMBO J.* 32: 1128–1140.
- Zhang XN, Mount SM (2009) Two alternatively spliced isoforms of the Arabidopsis SR45 protein have distinct roles during normal plant development. *Plant Physiol.* 150: 1450–1458.
- Zhang Z, Zhang S, Zhang Y, Wang X, Li D, Li Q, Yue M, Li Q, Zhang Y, Xu Y, Xue Y, Chong K, Bao S (2011) Arabidopsis floral initiator SKB1 confers high salt tolerance by regulating transcription and pre-mRNA splicing through altering histone H4R3 and small nuclear ribonucleoprotein LSM4 methylation. *Plant Cell* 23:396–411.
- Zhu DZ, Zhao XF, Liu CZ, Ma FF, Wang F, Gao XQ, Zhang XS (2016) Interaction between RNA helicase ROOT INITIATION DEFECTIVE 1 and GAMETOPHYTIC FACTOR 1 is involved in female gametophyte development in Arabidopsis. *J. Exp. Bot.* 67: 5757–5768.

植物における RNA 顆粒

濱田 隆宏, 渡邊 雄一郎

東京大学大学院総合文化研究科 広域科学専攻 生命環境科学系
〒153-8902 東京都目黒区駒場 3-8-1

RNA granules in plants

Keywords: RNA granules,

Takahiro Hamada, Yuichiro Watanabe

Department of Life Sciences, Graduate School of Arts and Sciences, The
University of Tokyo
3-8-1 Komaba, Meguro-Ku, Tokyo 153-8902
DOI: 10.24480/bsj-review.8b7.00117

真核細胞には核やオルガネラなどの多くの膜で区切られた構造が存在する。それらの構造は細胞質とは明確に区別され、電子顕微鏡観察において明瞭な構造として認識できる。一方、細胞質には不明瞭な構造も多く存在する。RNA 顆粒 (RNA granules) は、そのような構造物の代表格であると言える。

RNA 顆粒について生物の教科書ではほとんど記述がなく、一般には馴染みのない構造である。厳密な定義は研究者によって異なるが、RNA 顆粒とは「RNA とタンパク質を含む生体膜で覆われていない細胞質顆粒」といえる。その大きさは小さな顆粒で直径 100 nm 程度、大きな顆粒だと直径数 μm まで巨大化することもあり、多くのオルガネラよりも大きな構造になり得る。この RNA 顆粒は、RNA 代謝の場として働き、mRNA の輸送や翻訳抑制、分解などに関わる構造であると言われている。例えば、近年、植物の発生において microRNA の重要性が示されているが、microRNA 依存的な mRNA 分解も AGO タンパク質を構成因子とした RNA 顆粒で起きていると考えられる。

本レビューでは、転写から分解までに至る mRNA の基本的な制御メカニズムを概説した後、RNA 顆粒に関するトピックを紹介する。

1. 概説 : mRNA 制御メカニズム

DNA には親から子へ引き継がれる遺伝情報が書き記されている。それらの遺伝情報

が発生段階や周辺環境の変化に応じて機能するためには、必要な DNA 領域から mRNA が転写され、機能を持ったタンパク質へと翻訳されることが必要である（セントラルドグマ、図 1）。

現在、セントラルドグマを支える遺伝子発現制御メカニズムは詳細に解析され、多くの知見が得られている。例えば、DNA からの mRNA 転写開始は、DNA 上に記された転写開始点に転写因子と呼ばれるタンパク質群が結合することで

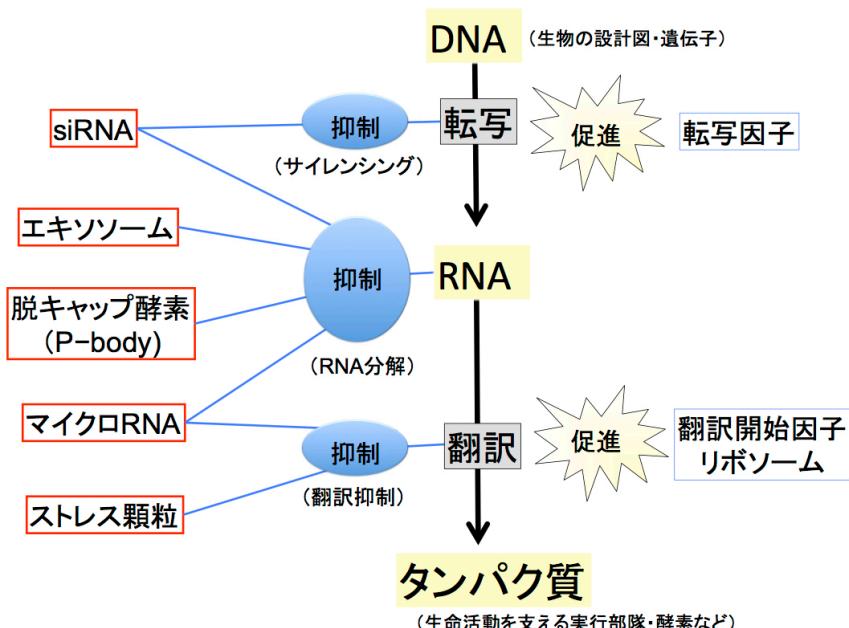


図1 生物には遺伝子発現のアクセル(促進)とブレーキ(抑制)の両方が必要である

促進されている（熊倉 & 栗原 2017）。さらに転写された mRNA はスプライシングされ、不要なイントロン領域が取り除かれ、同時に核外、すなわち細胞質へと輸送されていく（大谷 2017）。細胞質に辿り着いた mRNA はリボソームへと運ばれ、タンパク質に翻訳される。

一方、負の遺伝子発現制御（ネガティブレギュレーション）も存在し、転写抑制、mRNA の選択的分解、タンパク質の翻訳抑制などにより、遺伝子の発現の on-off が適切に調節されている（図 1）。転写レベルでは、DNA メチル化やヘテロクロマチンなども関わり、発生・分化状態や環境変化に応じた転写抑制が引き起こされることも知られてきた。

転写された mRNA の 5'末端にはキャップ構造が、3'末端にはポリアデニル鎖が (polyA 化) 付加される。これらの構造は翻訳開始に重要な構造であると共に、mRNA 自身の安定性にも寄与している。mRNA レベルのネガティブレギュレーションとしては、CCR4-NOT 複合体による 3'末端の脱アデニル化（鈴木ら 2017）や Decapping 複合体による 5'末端のキャップ構造分解が重要であることが知られている。一般的には 3'末端の脱アデニル化が引き起こされた後に、5'末端のキャップ構造分解が起こると考えられている。また新たなネガティブレギュレーションメカニズムとして、microRNA による

ターゲット RNA の分解や翻訳抑制制御も明らかとなっている。さらに翻訳レベル・タンパク質レベルでは、翻訳開始因子のリン酸化や結合タンパク質などを介した翻訳抑制、またユビキチンープロテアソーム系によるタンパク質分解経路なども明らかとなっている。

2. RNA 顆粒の分類と役割

真核生物における代表的な RNA 顆粒として P-body (processing body)、ストレス顆粒 (stress granules)、神経細胞顆粒 (neuronal granules)、生殖細胞顆粒 (germ cell granules) などが知られている (Anderson & Kedersha 2006)。植物においては、これまでに P-body やストレス顆粒に加え、microRNA や siRNA などの small RNA を含む顆粒などが存在することが知られている (図 2)。それぞれの RNA 顆粒には主要構成因子が存在するが、その一方、共通して存在する構成因子も多数あると考えられている。

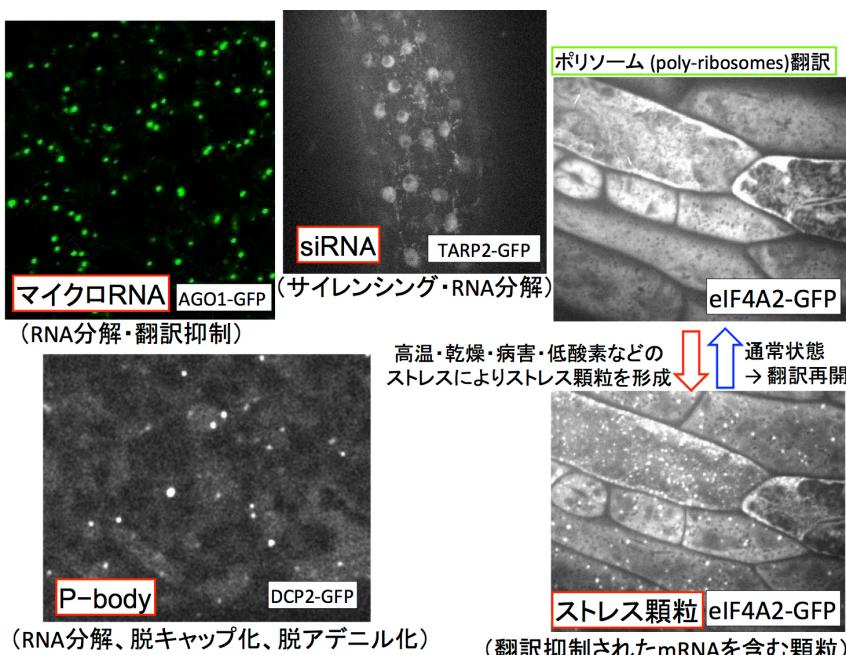


図2 遺伝子発現抑制に関わる植物RNA顆粒

P-body は RNA の分解 (5'末端のキャップ構造分解と 3'末端の脱アデニル化) に関する RNA 顆粒であり、その構成因子として脱キップ酵素である DCP2 とその相互作用因子である DCP1, 5'末端エキソヌクレアーゼ XRN1 に加え、脱アデニル化酵素である CCR4-NOT 複合体などが含まれている (Iwasaki et al. 2007, 鈴木ら 2017)。*dcp1* 変異体はホモ接合体では胚性致死の表現型を示すことから、初期の発生段階での役割が示唆される (Iwasaki et al. 2007; Motomura et al. 2012)。

ストレス顆粒は、細胞が生死に関わるような強いストレスを受けた際に形成される

RNA 顆粒である。これまでに、動物細胞や酵母では、高温、ヒ素、ウイルス感染、UV 照射、栄養飢餓などにより、ストレス顆粒が誘導されることが知られている (Kedersha et al. 2013)。植物では、高温、低酸素、高塩濃度、メチルジャスモン酸などの刺激によりストレス顆粒が誘導される (Weber et al. 2008, Pomeranz et al. 2010, Sorenson & Bailey-Serres 2014, Yan et al. 2014, Gutierrez-Beltran et al. 2015)。ストレス顆粒の主な構成因子としては、mRNA に加え、翻訳開始因子群 (eIFs)、ポリ A 結合タンパク質群、40S リボソーム小サブユニットなどが知られている。これらの構成因子は、非ストレス条件下では翻訳マシンナリーとして細胞質に分散するように観察されるが、ストレス条件下では顆粒を形成する (図 2)。

microRNA は Argonaute タンパク質 (AGO) と RISC (RNA-induced silencing complex) を形成し、相補的な配列を持つ RNA の分解を引き起こす。植物の発生・組織分化過程では個々の細胞が動けないため、細胞の位置情報に基づいて細胞の分化状態が決定されている。この細胞の位置情報、すなわち細胞分化の境界を明確に区別するのが、いくつかの植物 microRNA の代表的な役割と言える。microRNA とその分解ターゲットである転写因子 mRNA は異なる細胞で発現し、隣接する細胞へ移動する。microRNA と転写因子 mRNA と出会うと、その細胞では転写因子が発現できず、そこが組織分化の境界となる。例えば、miR165/miR166 は HD-ZIPIII 転写因子ファミリーを制御し、葉の表裏の境界決定や根の分化境界決定に関わっている (Mallory et al. 2004a, Kidner & Martienssen, 2004, Carlsbecker et al. 2010, Miyashima et al. 2011, Sakaguchi & Watanabe, 2012)。また miR164 は NAC 転写因子ファミリーを制御し、茎頂分裂組織境界の決定、側根形成、葉の鋸歯形成などに関わっている (Laufs et al. 2004, Mallory et al. 2004b, Guo et al. 2005, Nikovics et al. 2006)。先に紹介した *dcp1* 変異体では、いくつかの miRNA の蓄積が減少していることが見いだされているが (Motomura et al. 2012)、その減少する miRNA 種に miR165/166 および miR164 がふくまれている。DCP1/P-body がこうした境界決定の過程に関与し、初期発生の進行に寄与しているのかもしれない。

一方、siRNA も AGO タンパク質、RDR6、SGS3 と共に siRNA body を形成している (Kumakura et al. 2009, Jouannet et al. 2012)。siRNA はウイルス RNA などの外来 RNA を分解ターゲットとし、ウイルス感染を防御する役割を持っている (Ruiz-Ferrer & Voinnet 2009)。siRNA も細胞間を移動するため、ある葉でウイルス感染が起り siRNA が合成されると、その siRNA は植物体全体へ広がることが知られている。この siRNA の合成には、ターゲット RNA を鋳型として 2 本鎖 RNA を形成する RNA 依存的 RNA ポリメラーゼ (RDR) が働く。なおポリ A を欠いた植物自身の mRNA が異常に蓄積した場合、

それらの mRNA からも siRNA が生成され, siRNA の RNA 抑制メカニズムが諸刃の剣として植物の生育を阻害することが知られている (Cao et al. 2014; Martínez de Alba et al. 2015; Zhang et al. 2015, 岩川 2017)。また siRNA は RNA 指向性 DNA メチル化 (RNA directed DNA Methylation, RdDM) というメカニズムにより核内 DNA メチル化を誘導し, トランスポゾンの抑制や遺伝子の転写調節に働くことも知られている (Matzke et al. 2015)。

3. RNA 顆粒ダイナミクス

動物における多くの先行研究から様々な RNA 顆粒の形成メカニズムが明らかとなっている。ストレス顆粒の形成に関しては、翻訳開始因子である eIF2 α のリン酸化やストレス顆粒誘導タンパク質 TIA-1 の発現が重要であることが知られていた (Kedersha et al. 1999)。近年では多くの RNA 顆粒局在タンパク質が、特定の立体構造は持たないが、IDR (intrinsically disordered regions)配列や LC (low complexity) 配列と呼ばれる特定のアミノ酸残基による繰り返し配列を持ち、タンパク質—タンパク質間相互作用に働くことが明らかとされている。これらの配列を持つタンパク質は溶液中でアミロイド様纖維を形成してゲル状に凝集するため、RNA 顆粒の基礎となる可能性が示唆されている (Kato et al. 2012, Han et al. 2012)。この相転換現象 (LLPS : liquid- liquid phase separation) は細胞内でも起こるとされ、ストレス顆粒や P-body, 生殖細胞顆粒などの RNA 顆粒のみならず、核小体、カハールボディなど核内 RNA 構造体にも共通するメカニズムであると考えられている (Banani et al. 2017)。植物においては TIA-1 ホモログであるとされる UBP1 が同定され、ストレス顆粒への局在が確認されている (Sorenson & Bailey-Serres 2014)。しかしながら、その詳細な分子メカニズムやその他の RNA 顆粒誘導因子についてはほとんど知見がない。

植物においても、RNA 顆粒形成メカニズムの基本原理は共通する点が多いと考えられるが、その一方で植物独特な発生や環境応答メカニズムにおける RNA 顆粒の働きや、その構成因子は植物独特である可能性も高い。例えば、植物の mRNA や microRNA は細胞間を移動することで、細胞間コミュニケーションの基盤となり、発生・組織分化を支えている。また植物全体でも篩管を通じた microRNA, siRNA, mRNA などの輸送が確認されている (Molnar et al. 2010, 野田口 2017)。これら RNA の細胞間移行は、細胞間で細胞質を繋ぐ植物特有の構造であるプラズモデスマータを介して行われていると考えられている。しかしながら、そのメカニズムに関しては不明な点が多く残されている。一方、動物では microRNA がエキソサイトーシス/エンドサイトーシスによって分

泌小胞であるエキソソームに依存して輸送されることが知られており (Mittelbrunn & Sanchez-Madrid 2012) , 植物においても microRNA, siRNA, mRNA などがプラズモデスマータのみならず, エキソソーム依存的に輸送される可能性も考えられる。現在, 植物細胞内では, RNA 顆粒が長距離輸送される場合はアクチン纖維依存的に行われ, 細胞表層では微小管上に係留されることが知られている (Hamada et al. 2012, Steffens et al. 2014)。細胞間の RNA 輸送に関しては, 詳細な RNA 顆粒イメージングを基盤とした研究により, 更なる知見が得られることが期待される。

また環境応答においても, 独特な制御が存在する可能性がある。興味深いことに通常生育条件である 22°Cで生育させたシロイヌナズナでは, P-body の構成因子である decapping 酵素の活性中心である DCP2 の大半が細胞質に存在していた。細胞質に拡散していた DCP2 が, 高温条件におかれると DCP1 で標識した P-body に集積することが確認され, 高温条件特異的に P-body における decapping 活性が高まっている可能性が示唆されている (Motomura et al. 2015)。RNA 顆粒は, 生体膜で覆われておらず, 細胞質に存在する RNA-タンパク質の顆粒である。そのため異なる RNA 顆粒が隣接して接触するだけで, RNA の受け渡しができる可能性がある。例えば, 同じ高温条件で誘導されるストレス顆粒は, P-body に隣接して局在することが知られており, ストレス顆粒内で翻訳抑制された RNA は, 状況に応じて, RNA 分解に送られている可能性が考えられる。このような RNA 顆粒間での RNA のやり取りなどは動物でも不明な点が多く, 今後の課題である。

4. 今後の展開

植物において「RNA 顆粒研究」と銘打った研究はこれまで少なく, 黎明期であると言える。しかしながら RNA 顆粒研究の基礎となった古典的な実験の多くは, 実は植物で行われてきた。例えば, ストレス顆粒は「環境変化に対応するためにハウスキーピング遺伝子の翻訳を抑制し, 新たな環境に適応するためのタンパク質を発現させる」役割を担っているとされているが, この実験はトマト培養細胞で行われている (Nover et al. 1989)。彼らは 25°Cと 40°Cのトマト培養細胞の全タンパク質プロファイル及び, 生化学的に精製したストレス顆粒画分 (Heat shock granules) から抽出した mRNA を用いて *in vitro* 翻訳させたタンパク質プロファイルを比較解析し, 結論を得ている。

動物の神経細胞顆粒 (neuronal granules), 生殖細胞顆粒 (germ cell granules) などは翻訳抑制された状態で細胞内を運ばれ, そのあと適切な場所・タイミングで翻訳が開始されることが知られている。このような mRNA の輸送は 1930 年代に行われた巨大単細

胞藻類であるカサノリ（1細胞で最大 10 cm）を用いた実験で発見されており、基部にある核から傘が形成される上部まで情報伝達物質（mRNA）が送られることが示唆されていた(Haemmerling 1963)。現在、モデル植物として使われるシロイヌナズナを含む陸上植物では、発生制御に関わるような翻訳抑制顆粒の存在自体は見つかっていないが、類似したメカニズムが存在する可能性は高いと思われる。

RNA 顆粒は、植物の発生や組織分化、環境応答などを支える RNA 代謝の基盤であり、果たしている役割は大きい。今後、「RNA 顆粒」という構造に注目した研究が本格化することで、さらなる植物科学研究の発展と深化が期待される。

5. 謝辞

本研究は JSPS 科研費 JP16H01229, JP15H04628 の助成を受けたものです。

6. 引用文献

- Banani, S.F., Lee, H.O. & Hyman, A.A. 2017. Biomolecular condensates: organizers of cellular biochemistry. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 18, 285–298.
- Cao, M., Du, P., Wang, X., Yu, Y.-Q., Qiu, Y.-H., Li, W., Gal-On, A., Zhou, C., Li, Y. & Ding, S.W. 2014. Virus infection triggers widespread silencing of host genes by a distinct class of endogenous siRNAs in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 111, 14613–8.
- Carlsbecker, A., Lee, J. Y., Roberts, C.J., Dettmer, J., Lehesranta, S., Zhou, J., Lindgren, O., Moreno-Risueno, M. a, Vatén, A., Thitamadee, S., Campilho, A., Sebastian, J., Bowman, J.L., Helariutta, Y. & Benfey, P.N. 2010. Cell signalling by microRNA165/6 directs gene dose-dependent root cell fate. *Nature* 465, 316–321.
- Guo, H. S., Xie, Q., Fei, J.-F. & Chua, N.-H., 2005. MicroRNA Directs mRNA Cleavage of the Transcription Factor NAC1 to Downregulate Auxin Signals for *Arabidopsis* Lateral Root Development. *Plant Cell* 17, 1376–1386.

- Gutierrez-Beltran, E., Moschou, P.N., Smertenko, A.P. & Bozhkov, P. V, 2015. Tudor staphylococcal nuclease links formation of stress granules and processing bodies with mRNA catabolism in Arabidopsis. *Plant Cell* 27, 926–943.
- Hamada, T., Tominaga, M., Fukaya, T., Nakamura, M., Nakano, A., Watanabe, Y., Hashimoto, T. & Baskin, T.I. 2012. RNA processing bodies, peroxisomes, Golgi bodies, mitochondria, and endoplasmic reticulum tubule junctions frequently pause at cortical microtubules. *Plant Cell Physiol.* 53, 699–708.
- Han, T.W., Kato, M., Xie, S., Wu, L.C., Mirzaei, H., Pei, J., Chen, M., Xie, Y., Allen, J., Xiao, G. & McKnight, S.L. 2012. Cell-free formation of RNA granules: Bound RNAs identify features and components of cellular assemblies. *Cell* 149, 768–779.
- Iwasaki, S., Iwasaki, S., Takeda, A., Motose H., & Watanabe, Y. 2007. Characterization of Arabidopsis decapping proteins AtDCP1 and AtDCP2, which are essential for post-embryonic development. *FEBS Letters* 581, 2455-2459.
- Jouannet, V., Moreno, A.B., Elmayan, T., Vaucheret, H., Crespi, M.D. & Maizel, A. 2012. Cytoplasmic Arabidopsis AGO7 accumulates in membrane-associated siRNA bodies and is required for ta-siRNA biogenesis. *EMBO J.* 31, 1704–1713.
- Kato, M., Han, T.W., Xie, S., Shi, K., Du, X., Wu, L.C., Mirzaei, H., Goldsmith, E.J., Longgood, J., Pei, J., Grishin, N. V., Frantz, D.E., Schneider, J.W., Chen, S., Li, L., Sawaya, M.R., Eisenberg, D., Tycko, R. & McKnight, S.L. 2012. Cell-free formation of RNA granules: Low complexity sequence domains form dynamic fibers within hydrogels. *Cell* 149, 753–767.
- Kedersha, N., Ivanov, P. & Anderson, P. 2013. Stress granules and cell signaling: More than just a passing phase? *Trends Biochem. Sci.* doi:10.1016/j.tibs.2013.07.004
- Kedersha, N.L., Gupta, M., Li, W., Miller, I. & Anderson, P. 1999. RNA-binding proteins TIA-1 and TIAR link the phosphorylation of eIF-2 α to the assembly of mammalian stress granules. *J. Cell Biol.* 147, 1431–1441.

- Kidner, C. & Martienssen, R. 2004. Spatially restricted microRNA directs leaf polarity through ARGONAUTE1. *Nature* 428, 81–84.
- Kumakura, N., Takeda, A., Fujioka, Y., Motose, H., Takano, R. & Watanabe, Y. 2009. SGS3 and RDR6 interact and colocalize in cytoplasmic SGS3/RDR6-bodies. *FEBS Lett.* 583, 1261–1266.
- Laufs, P., Peaucelle, A., Morin, H. & Traas, J. 2004. MicroRNA regulation of the CUC genes is required for boundary size control in *Arabidopsis* meristems. *Development* 131, 4311–4322.
- Mallory, A.C., Dugas, D. V., Bartel, D.P. & Bartel, B. 2004. MicroRNA regulation of NAC-domain targets is required for proper formation and separation of adjacent embryonic, vegetative, and floral organs. *Curr. Biol.* 14, 1035–1046.
- Mallory, A.C., Reinhart, B.J., Jones-Rhoades, M.W., Tang, G., Zamore, P.D., Barton, M.K. & Bartel, D.P. 2004. MicroRNA control of *PHABULOSA* in leaf development: importance of pairing to the microRNA 5' region. *The EMBO journal* 23, 3356–3364.
- Martínez de Alba, A.E., Moreno, A.B., Gabriel, M., Mallory, A.C., Christ, A., Bounon, R., Balzergue, S., Aubourg, S., Gautheret, D., Crespi, M.D., Vaucheret, H. & Maizel, A. 2015. In plants, decapping prevents RDR6-dependent production of small interfering RNAs from endogenous mRNAs. *Nucleic Acids Res.* 43, 2902–2913.
- Matzke, M., Kanno, T. & Matzke, A. J. M. 2015. RNA-Directed DNA Methylation: The Evolution of a Complex Epigenetic Pathway in Flowering Plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* 66, 243–267.
- Mittelbrunn, M. & Sánchez-Madrid, F. 2012. Intercellular communication: diverse structures for exchange of genetic information. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 13, 328–335.

- Miyashima, S., Koi, S., Hashimoto, T. & Nakajima, K., 2011. Non-cell-autonomous microRNA165 acts in a dose-dependent manner to regulate multiple differentiation status in the *Arabidopsis* root. *Development* 138, 2303–2313.
- Molnar, A., Melnyk, C.W., Bassett, A., Hardcastle, T.J., Dunn, R. & Baulcombe, D.C. 2010. Small silencing RNAs in plants are mobile and direct epigenetic modification in recipient cells. *Science* 328, 872–875.
- Motomura, K., Le, Q.T.N., Kamakura, N., Fukaya, T., Takeda, A. & Watanabe, Y., 2012 . Decapping proteins are involved in the accumulation of miRNA in *Arabidopsis thaliana*. *RNA Biology* 9, 644-652.
- Motomura, K., Le, Q.T.N., Hamada, T., Kutsuna, N., Mano, S., Nishimura, M. & Watanabe, Y. 2015. Diffuse decapping enzyme DCP2 accumulates in DCP1 foci under heat stress in *arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.* 56, 107–115.
- Nikovics, K., Blein, T., Peaucelle, A., Ishida, T., Morin, H., Aida, M. & Laufs, P. 2006. The balance between the MIR164A and CUC2 genes controls leaf margin serration in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 18, 2929–2945.
- Nover, L., Scharf, K.D. & Neumann, D. 1989. Cytoplasmic heat shock granules are formed from precursor particles and are associated with a specific set of mRNAs. *Mol. Cell. Biol.* 9, 1298–308.
- Pomeranz, M.C., Hah, C., Lin, P.-C., Kang, S.G., Finer, J.J., Blackshear, P.J. & Jang, J. C. 2010. The *Arabidopsis* tandem zinc finger protein AtTZF1 traffics between the nucleus and cytoplasmic foci and binds both DNA and RNA. *Plant Physiol.* 152, 151–165.
- Ruiz-Ferrer, V. & Voinnet, O. 2009. Roles of plant small RNAs in biotic stress responses. *Annu. Rev. Plant Biol.* 60, 485–510.
- Sakaguchi, J. & Watanabe, Y. 2012. miR165/166 and the development of land plants. *Develop. Growth Differ.* 54, 93-99.

- Sorenson, R. & Bailey-Serres, J. 2014. Selective mRNA sequestration by OLIGOURIDYLATE-BINDING PROTEIN 1 contributes to translational control during hypoxia in Arabidopsis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 111, 2373–2378.
- Steffens, A., Jaegle, B., Tresch, A., Hülskamp, M. & Jakoby, M. 2014. Processing-body movement in Arabidopsis depends on an interaction between myosins and DECAPPING PROTEIN1. *Plant Physiol.* 164, 1879–92.
- Weber, C., Nover, L. & Fauth, M. 2008. Plant stress granules and mRNA processing bodies are distinct from heat stress granules. *Plant J.* 56, 517–530.
- Yan, C., Yan, Z., Wang, Y., Yan, X. & Han, Y. 2014. Tudor-SN, a component of stress granules, regulates growth under salt stress by modulating GA20ox3 mRNA levels in Arabidopsis. *J. Exp. Bot.* 65, 5933–5944.
- Zhang, X., Zhu, Y., Liu, X., Hong, X., Xu, Y., Zhu, P., Shen, Y., Wu, H., Ji, Y., Wen, X., Zhang, C., Zhao, Q., Wang, Y., Lu, J. & Guo, H. 2015. Suppression of endogenous gene silencing by bidirectional cytoplasmic RNA decay in Arabidopsis. *Science* 348, 120–123.
- 岩川弘宙 2017. 植物のRNAサイレンシング機構が自己のmRNAを攻撃しないメカニズム *BSJ-review* 8, 58-70.
- 大谷美沙都 2017. pre-mRNAスプライシングが制御する植物の発生・環境応答・器官再生 *BSJ-review* 8, 81-99.
- 熊倉直祐 & 栗原志夫 2017. RNAサイレンシングと植物ウイルス *BSJ-review* 8, 48-57.
- 鈴木悠也, 荒江星拓 & 千葉由佳子 2017. mRNAのポリA鎖を介した転写後制御 *BSJ-review* 8, 111-121.
- 野田口理孝 2017. 植物の全身を長距離移行する RNA *BSJ-review* 8, 122-130.

mRNA のポリ A 鎖を介した転写後制御

鈴木悠也, 荒江星拓, 千葉由佳子

北海道大学大学院 生命科学院

〒060-0810 北海道札幌市北区北 10 条西 8 丁目

北海道大学理学部 5 号館

Yuya Suzuki, Tomohiro Arae and Yukako Chiba

Poly(A)-dependent Post-transcriptional Regulations

Keywords: deadenylation, mRNA decay, Poly(A), Post-transcriptional Regulation

Graduate School of Life Science, Hokkaido University

Sapporo, Hokkaido, 060-0810 Japan

DOI: 10.24480/bsj-review.8b8.00118

1. はじめに

遺伝子発現の厳密な制御は、細胞のホメオスタシスの維持や、細胞内および細胞外の環境変化に適応するために重要である。セントラルドグマという分子生物学の基本原理に示されるように、遺伝情報は基本的に DNA, mRNA, タンパク質の順に伝達される。各段階における発現調節が最終的なタンパク質量を決定するのに重要である一方で、遺伝子発現制御に関する多くの研究は転写制御に焦点が当てられており、転写後調節とりわけ mRNA 分解による発現制御の研究例はあまり多くない。しかしながら近年、mRNA の安定化や翻訳効率の調節による遺伝子発現制御の重要性が次々と明らかとなっており、見落としてはならない重要な制御段階であると言える。本総説は mRNA の 3'末端に付加されるポリ A 鎖に焦点を当て、ポリ A 鎖を介した遺伝子発現制御を中心としたポリ A 鎖の役割について、ここ数年植物の分野で明らかになった事柄を紹介する。

2. ポリ A 鎖の役割

真核生物では、核内で転写により合成された pre-mRNA が 5'キャップ構造の付加、スプラ

イシング, 3'末端へのポリ A 鎖の付加というプロセシングを受け, 成熟 mRNA となり核外へ搬出される。主に個別の遺伝子における解析から, mRNA のポリ A 鎖長は遺伝子ごとに異なり, ポリ A 鎖は mRNA の安定性や翻訳効率に影響を与えるということが示された (Preiss et al., 1998; Tucker et al., 2001)。一方で, これまでゲノムワイドなポリ A 鎖長の同定が技術的に困難であったため, こうした mRNA の安定性や翻訳効率におけるポリ A 鎖長の重要性は個別の遺伝子での議論に留まっていた。しかし, ここ数年の間に polyadenylation state array (PASTA), TAIL-seq, poly(A)-tail length profiling by sequencing (PAL-seq) などの, ポリ A 鎖長を網羅的に推測・同定する手法が確立され, ポリ A 鎖長と遺伝子発現制御の関わりについてゲノムワイドなレベルでの議論がなされ始めている (Beilharz & Preiss, 2007; Subtelny et al., 2014; Chang et al., 2014)。さらに, これらのポリ A 鎖長のゲノムワイドな解析によって, mRNA 全体のポリ A 鎖長の分布は生物種によって大きく異なり, ポリ A 鎖の平均長は酵母で約 30 塩基, 哺乳類で約 82 塩基, そして植物で約 58 塩基であることが示された (Subtelny et al., 2014)。ここでは, 酵母, 哺乳類, 植物における知見を基に, ポリ A 鎖の役割について概説する。

2-1. ポリ A 鎖と翻訳

mRNA のポリ A 鎖の役割として翻訳効率の制御が挙げられる。mRNA は 5'末端のキャップ構造に結合する因子である eukaryotic initiation factor 4E (eIF4E) と, ポリ A 鎖に結合するタンパク質である Poly(A) binding protein (Pab1p) が eIF4G を介して相互作用することによって環状構造を取る (Tarun & Sachs, 1996)。この環状構造により, 翻訳終結後に一度 mRNA から解離したリボソームが再び mRNA の 5'末端にリクルートされやすくなり, 翻訳効率が上昇すると考えられる (Hong et al., 2017)。また, 同じ mRNA でも長いポリ A 鎖を持つものは高い翻訳効率を示すことから, 翻訳効率の制御におけるポリ A 鎖長の重要性が示された (Preiss et al., 1998)。しかしながらこれまで, 個々の遺伝子におけるポリ A 鎖長と翻訳効率に関する研究の多くは, 主にアフリカツメガエルなどの卵母細胞という極めて特殊な細胞を用いて行われており, さらにこれらのゲノムワイドな相関については長い間解明されていなかった。近年, 酵母を用いたポリ A 鎖長の網羅的な同定手法の確立により, ポリ A 鎖長と mRNA 上のリボソームの密度に正の相関が示された (Beilharz & Preiss, 2007; Lackner et al., 2007)。このことは酵母において, 長いポリ A 鎖を持つ mRNA は翻訳効率が高い傾向があることを示している。一方で PAL-seq とリボソームプロファイリングによる解析から, ゼブラフィッシュやアフリカツメガエルでは胚発生初期にあたる胞胚期までの細胞でポリ A 鎖長と翻訳効率に正の相関が見られるのに対し, その後の原腸胚の細胞ではこの相関が喪失することが示された (Subtelny et al., 2014)。これらのことから, ポリ A 鎖による翻訳効率の制御はある特定の時期や特定の細胞において機能すると考えられている。植物ではこのようなゲノムワイドなポリ A 鎖長と翻訳効率に関する解析が未だ行われておらず, 今後の解析が期待される。

2-2. ポリ A 鎖と mRNA の安定性

mRNA のポリ A 鎖のもうひとつの役割として多く議論されているのが、ポリ A 鎖と mRNA の安定性との関わりである。

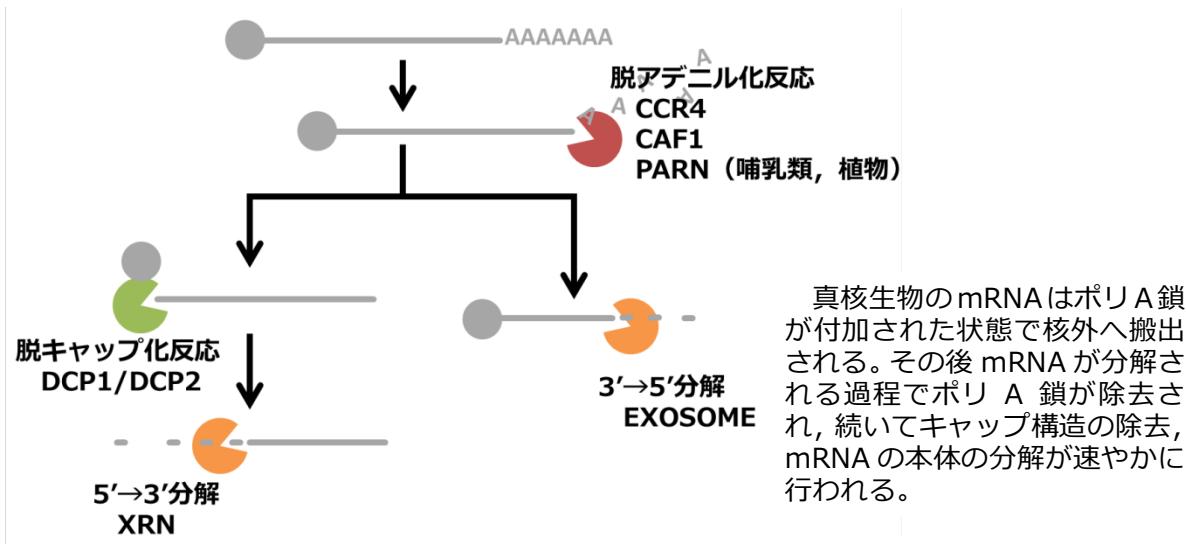


図 1 真核生物における mRNA 分解の概略

真核生物における mRNA 分解経路は広く保存されており、脱アデニル化酵素によるポリ A 鎖の除去が最初の段階であり、律速段階であると考えられている。ポリ A 鎖が取り除かれた mRNA は続いて脱キヤップ酵素である Decapping 1 (DCP1)/DCP2 複合体によりキヤップ構造が取り除かれる (Beelman et al., 1996; Xu et al., 2006)。その後、mRNA は 5'末端から Exoribonuclease (XRN) によって分解されるか、3'末端から EXOSOME による分解を受ける (図 1, Larimer & Stevens, 1990; Souret et al., 2004; Mitchell et al., 1997; Chekanova et al., 2007)。

脱アデニル化酵素は複数種類存在し、酵素活性ドメインの構造から大きく分けて Asp-Glu-Asp-Asp (DEDD) と Exonuclease-endonuclease-phosphatase (EEP) のふたつのファミリーに分類される。酵母における主要な脱アデニル化酵素は EEP ファミリーに含まれる Carbon catabolite repressor 4 (Ccr4p) であり、DEDD ファミリーに含まれる Ccr4 associate factor 1 (Caf1p) と相互作用することにより巨大なタンパク質複合体である Ccr4-Negative on TATA (Not) 複合体を形成している。哺乳類と植物は Ccr4p と Caf1p のホモログに加えて、Poly(A)-specific ribonuclease (PARN) とよばれる脱アデニル化酵素を持つ。酵母と哺乳類では Poly(A) nuclease 2 (Pan2p)/Pan3p 複合体も脱アデニル化酵素として働き、CCR4-NOT 複合体と協調してポリ A 鎖分解を行っている (Yamashita et al., 2005)。

酵母の *ccr4* 変異株では代表的な mRNA のポリ A 鎖が長くなっている、かつその半減期が長くなる (Tucker et al., 2001)。また、ポリ A 鎖に結合するタンパク質である Pab1p が CCR4-NOT 複合体による脱アデニル化反応を阻害する (Tucker et al., 2002)。これらのこととは、酵母においてポリ A 鎖が mRNA の安定化に重要であることを示している。ゲノムワイドな解析からは、ポリ A 鎖長と半減期の相関関係を見出すことができる。マウスの培養細胞である NIH 3T3 を用いた解析では、mRNA のポリ A 鎖長と半減期に正の相関が見られた (Chang et al., 2014)。一方で、酵母、哺乳類の培養細胞および植物を用いた解析では、ポリ A 鎖長と半減期

にはつきりとした相関は見られず、弱い負の相関が示された (Beilharz & Preiss, 2007; Subtelny et al., 2014; Kappel et al., 2015)。この違いが実験系の違いによるものである可能性もあるが、mRNA のポリ A 鎖長と半減期の関係については、今後さらなる解析が必要であると思われる。

3. 植物の脱アデニル化酵素

mRNA のポリ A 鎖は核内でポリ A ポリメラーゼによって付加される。その後細胞質内で脱アデニル化酵素によるポリ A 鎖の除去を介した mRNA 分解が促進されることで、適切な遺伝子発現の調節を可能にしていると考えられる。植物は代表的な脱アデニル化酵素として CCR4, CAF1, PARN の 3 種類の脱アデニル化酵素を持つ。植物の脱アデニル化酵素の研究例は酵母や哺乳類に比べるとはるかに少ないが、2004 年の AtPARN の解析を皮切りに、少しづつではあるが着実に研究が進んでいる。ここではポリ A 鎖長を制御する脱アデニル化酵素に焦点を当て、植物での脱アデニル化反応の生理的な意義について概説する。

3-1. CCR4

植物における CCR4 はシロイヌナズナとイネで見つかっている。シロイヌナズナの CCR4 (AtCCR4) は酵母 Ccr4p のホモログとして単離された (Dupressoir et al., 2001)。AtCCR4 はシロイヌナズナで 7 つの遺伝子からなるファミリーを形成し、中でも AtCCR4a および AtCCR4b が酵母 Ccr4p と最も高い相同意を示す。*atccr4a/4b* 二重変異株を用いた逆遺伝学的解析から、AtCCR4a/4b がデンプン代謝に関わっていることが明らかとなった。*atccr4a/4b* 二重変異株ではデンプンの構成要素のひとつであるアミロースの量が増加しており、さらに、アミロース合成酵素をコードする *Granule-bound starch synthase 1 (GBSS1)* mRNA のポリ A 鎖長が長くなっていた。このことから、AtCCR4a/4b によって決まる GBSS1 のポリ A 鎖長は、アミロースの量の制御に重要であることがわかった (Suzuki et al., 2015)。mRNA 分解に関わる多くの酵素は細胞質内で Processing body (P-body) と呼ばれる顆粒状の凝集体を形成している (Xu et al., 2006; Iwasaki et al., 2007; Zheng et al., 2008)。AtCCR4a/4b も同様に P-body に局在しており、蛍光蛋白質再構成法 (bimolecular fluorescence complementation) による解析から、AtCCR4a/4b は AtDCP1/2, AtXRN4 といった他の mRNA 分解酵素と P-body において相互作用することが示された (Suzuki et al., 2015)。OsCCR4a および OsCCR4b はイネにおける酵母 Ccr4p のホモログであり、これらもまた P-body に局在する。さらに、OsCCR4a/4b は *in vitro* でポリ A 鎖の分解活性を示した (Chou et al., 2017)。EEP ファミリーに含まれる脱アデニル化酵素は、CCR4, Nocturnin, PDE12, Angel の 4 つのサブグループに分類され、AtCCR4a/4b, OsCCR4a/4b はともに CCR4 グループに属する (Dupressoir et al., 2001; Chou et al., 2017)。AtHesperin (AtHESP) は哺乳類の Nocturnin のシロイヌナズナにおけるホモログであり、*in vitro* でポリ A 鎖特異的な分解活性が示された (Delis et al., 2016)。

3-2. CAF1

植物における CAF1 はシロイヌナズナ、イネ、トウガラシで見つかっている。トウガラシの *CAF1 (CaCAF1)* は病原菌の感染によって発現が誘導され、CaCAF1 を過剰発現させた形質転換トマトは強い病害抵抗性を示した (Lee et al., 2004; Sarowar et al., 2007)。また、その形

質転換トマトでは病害抵抗性遺伝子である *Pathogenesis-related gene 1 (PRI)* および *PR6* の発現が恒常に増加していた (Sarowar et al., 2007)。シロイヌナズナでは、AtCAF1は11個の遺伝子からなるファミリーを形成している。AtCAF1aとAtCAF1bもまた病原菌の感染によって発現誘導が起こり、さらにストレス応答関連の植物ホルモンの添加や傷害などによつても発現が誘導される (Liang et al., 2009)。AtCAF1aはCaCAF1と同様に、過剰発現させることで植物体に強い病害抵抗性をもたらし、その過剰発現株でも *PRI* および *PR2* の遺伝子発現が増加していた。また、AtCAF1a/bは *in vitro* でポリA鎖の分解活性を示し、AtCAF1a/b共通の標的 mRNAとしてジャスモン酸誘導性遺伝子である *Vegetative storage protein 1 (VSP1)* やストレス関連遺伝子である *Chitinase B (CHIB)*, *Lipoxygenase2 (LOX2)*, さらに AtCAF1bの特異的な標的 mRNAとして *Phosphatidyl-inositol 4-kinase (PI4Kg3)* が同定された (Liang et al., 2009; Walley et al., 2010)。これらのことから、CAF1は特定の mRNAのポリA鎖長の調節を介して、病原体感染などの生物的ストレス応答に関わっていると考えられる。イネにおける CAF1のホモログである OsCAF1bに関しては、その発現がアブシジン酸(ABA)や傷害応答で誘導されること、さらに AtXRN4との共局在解析から P-bodyに局在することが示された (Chou et al., 2014)。

3-3. PARN

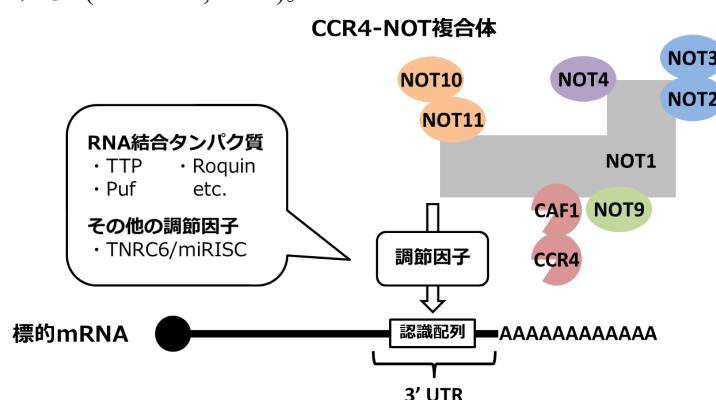
PARNは酵母、ショウジョウバエには存在しない脱アデニル化酵素であり、植物においてはシロイヌナズナでヒトPARNのホモログであるAtPARNが単離された。AtPARNはその機能欠損変異株が胚発生致死になることから、生育に必須の脱アデニル化酵素であると言える (Chiba et al., 2004; Reverdatto et al., 2004)。また、AtPARNの漏出突然変異株は、内生のABA量が増加するために外生のABAに対して高感受性となる表現型を示した (Nishimura et al., 2005)。興味深いことに、AtPARNがミトコンドリアに局在する脱アデニル化酵素であることが示され、ポリAポリメラーゼと協調したミトコンドリア mRNAのポリA鎖長の制御機構が明らかとなった (Hirayama et al., 2013)。このことから、核や細胞質だけでなく、ミトコンドリアなどの細胞小器官においても脱アデニル化反応が重要な役割をもつことが示された。

4. 複合体と複合体による mRNA の認識

真核生物に広く保存された主要な脱アデニル化酵素のうち、CCR4およびCAF1はCCR4-NOT複合体という巨大なタンパク質複合体を形成している。また、これらの脱アデニル化酵素は標的 mRNAを認識するために必要なRNA結合ドメインを持たない。そのため標的 mRNAの認識にはCCR4-NOT複合体と、mRNAの3'UTRに存在する塩基配列や二次構造を認識するRNA結合タンパク質などの調節因子との相互作用が必要であることが、酵母や哺乳類の研究で示された。ここではCCR4-NOT複合体と標的 mRNA認識機構の概要、そして植物における研究例を簡単に紹介する。

4-1. CCR4-NOT複合体

CCR4-NOT複合体は、NOT1を足場タンパク質としてCCR4/CAF1, NOT2/3/5, NOT4, NOT9, NOT10/11などが結合する巨大なタンパク質複合体である(図2)。酵母や哺乳類では、複合体の足場タンパク質であるNOT1を欠失させると致死の表現型を示すことから、CCR4-NOT複合体が生命活動の維持に必須であることが理解できる(Collart, 2003; Shirai et al., 2014)。酵母のCCR4-NOT複合体はCcr4p/Caf1pによる脱アデニル化反応の制御だけでなく、他のサブユニットによる転写やタンパク質分解の制御など、遺伝子発現の様々な段階の制御に関わっている。酵母CCR4-NOT複合体のサブユニットであるNot4pはE3ユビキチンリガーゼであり、翻訳中のリボソームがmRNA上で停止すること(翻訳アレスト)により誘導されるタンパク質分解への関与が示唆されている(Mulder et al., 2007; Dimitrova et al., 2009; Inada & Makino, 2014)。翻訳アレストはmRNAからのリボソームの解離を引き起こす。このことが引き金となり、Not4pによる翻訳が途中で終了した不完全なタンパク質の分解促進や、その錆型となっているmRNAの分解が起こる。また、Not2/3/5はRNAポリメラーゼIIのサブユニットであるMediator of RNA polymerase II transcription subunit 17(Med17p)と相互作用し、転写制御に関与する(Lee et al., 1998)。



真核生物に広く保存された脱アデニル化酵素複合体CCR4-NOTは、足場であるNOT1タンパク質にCCR4/CAF1や他のNOTタンパク質が結合したタンパク質複合体である。脱アデニル化酵素であるCCR4/CAF1は標的mRNAを認識するRNA結合ドメインを持たず、特異的な標的mRNAの認識はRNA結合タンパク質などの調節因子がCCR4-NOT複合体と相互作用することによって行われている。

図2 ヒトCCR4-NOT複合体による調節因子を介した標的mRNA認識の概略

植物においてもCCR4-NOT複合体のコアサブユニットは保存されており、イネでOsCCR4とOsNOT1がOsCAF1を介して相互作用し複合体を形成することが示された(Chou et al., 2017)。しかしながら、植物のCCR4-NOT複合体の全容は未解明で、各サブユニットのホモログに関する研究例もまだ少ない。酵母Not2pのシロイヌナズナにおけるホモログであるAtNOT2a/bは、Dicer-like 1(DCL1)やSERRATE(SE)など、miRNAの成熟に関わるタンパク質と核で相互作用する(Wang et al., 2013)。またAtNOT2a/bの機能欠損変異株は致死の表現型を示し、プロモーター領域へのT-DNAの挿入及びRNAiによってAtNOT2a/bの発現が低下している植物体でも葉の形態異常や花成の遅延を示し、miRNAを含む多くの遺伝子の転写が抑制される。ゆえにCCR4-NOT複合体は植物においても遺伝子発現制御の根幹にかかわる重要な複合体として機能していると考えられる。

4-2. 標的mRNA認識

酵母や動物では先に述べたCCR4-NOT複合体のコアサブユニットに加えて、標的mRNAの

認識に働く調節因子が複合体と相互作用し、標的 mRNA の分解や翻訳抑制を行う。このような標的 mRNA の認識に働く RNA 結合タンパク質として Tristetraprolin (TTP), Pumilio/FBF (Puf), Mmi1, Roquin, Bicaudal C, Smaug などがある。哺乳類で保存されている TTP は, AU-rich elements (AREs) と呼ばれる配列を認識することで CCR4-NOT 複合体を標的 mRNA にリクリートし, Tumor necrosis factor- α (TNF- α) などのサイトカインやがん原遺伝子の発現を抑制する (Lykke-Andersen & Wagner, 2005; Fabian et al., 2013)。酵母の Puf ファミリーに属する Puf4p と Mpt5p は, 接合型転換を制御する *HO endonuclease* mRNA の発現を負に制御する。Puf4p と Mpt5p はそれが *HO* mRNA の 3'UTR 上に存在する 9-10 塩基の配列を認識し, *HO* mRNA の分解や翻訳抑制を行う (Hook et al., 2007)。また, RNA 結合タンパク質の他にも標的 mRNA の認識に機能する調節因子として miRNA が報告されている。哺乳類の Trinucleotide repeat-containing gene 6 (TNRC6) は miRNA 誘導性サイレンシング複合体 (miRISC) と CCR4-NOT 複合体に相互作用することで, miRNA に相補的な配列を持つ標的 mRNA のポリ A 鎮分解を促進する (Fabian et al., 2012)。

このように酵母や動物では CCR4-NOT 複合体を介した標的 mRNA の制御機構の詳細が徐々に明らかとなってきている。しかしながら, TTP や TNRC6 などの他の真核生物で報告してきた調節因子の多くは植物では保存されていない。このことから植物は動物や酵母とは異なる独自の標的 mRNA 認識機構を持つ可能性がある。植物では AtCCR4 や AtCAF1 の標的 mRNA として, *GBSSI*, *VSP1*, *CHIB*, *LOX2*, *PI4K γ 3* が明らかとなっているが, これらの認識に関わる調節因子については未解明である (Suzuki et al., 2015; Liang et al., 2009; Walley et al., 2010)。今後これらの標的 mRNA の制御機構を明らかにするためには, 植物における CCR4-NOT 複合体の全貌を解明する必要がある。

5. おわりに

ポリ A 鎮長の網羅的な同定手法の確立や, 個々の脱アデニル化酵素の研究により, mRNA のポリ A 鎮の遺伝子発現制御における役割について, 少しずつではあるが確実に知見が蓄積されてきた。特に, 植物においては脱アデニル化酵素のホモログが数多く存在し, さらに個々の脱アデニル化酵素の変異株が異なる表現型を示すことから, 酵素ごとに特異的な標的 mRNA を持つと考えられる。一方で, 脱アデニル化酵素の標的 mRNA の認識機構については, この分野の研究が進んでいる酵母, 哺乳類においても例が少なく, 植物では未だ報告例がない。脱アデニル化酵素の変異株を用いてゲノムワイドにポリ A 鎮長を検出することができれば, 脱アデニル化酵素の標的 mRNA を網羅的に同定し, さらには認識に関わるシス配列の解明へつながり得る。また, 植物においてポリ A 鎮長を介した転写後制御を行うことの生理的な意義が明らかとなれば, この分野の研究を大きく進展させることになるであろう。

6. 謝辞

本特集を企画し, 執筆の機会を与えてくださった濱田 隆宏氏, 栗原 志夫氏に感謝します。

7. 引用文献

- Beelman, C.A., Stevens, A., Caponigro, G., LaGrandeur, T.E., Hatfield, L., Fortner, D.M. & Parker, R. 1996. An essential component of the decapping enzyme required for normal rates of mRNA turnover. *Nature*, 315: 642-646.
- Beilharz, T.H. & Preiss, T. 2007. Widespread use of poly(A) tail length control to accentuate expression of the yeast transcriptome. *RNA*, 13: 982-997.
- Chang, H., Lim, J., Ha, M. & Kim, V.N. 2014. TAIL-seq: genome-wide determination of poly(A) tail length and 3' end modifications. *Mol. Cell*, 53: 1044-1052.
- Chekanova, J.A., Gregory, B.D., Reverdatto, S.V., Chen, H., Kumar, R., Hooker, T., Yazaki, J., Li, P., Skiba, N., Peng, Q., Alonso, J., Brukhin, V., Grossniklaus, U., Ecker, J.R. & Belostotsky, D.A. 2007. Genome-wide high-resolution mapping of exosome substrates reveals hidden features in the *Arabidopsis* transcriptome. *Cell*, 131: 1340-1353.
- Chiba, Y., Johnson, M.A., Lidder, P., Vogel, J.T., van Erp, H. & Green, P.J. 2004. AtPARN is an essential poly(A) ribonuclease in *Arabidopsis*. *Gene*, 328: 95-102.
- Chou, W.L., Huang, L.F., Fang, J.C., Yeh, C.H., Hong, C.Y., Wu, S.J. & Lu, C.A. 2014. Divergence of the expression and subcellular localization of CCR4-associated factor 1 (CAF1) deadenylase proteins in *Oryza sativa*. *Plant Mol. Biol.*, 85: 443-458.
- Chou, W.L., Chung, Y.L., Fang, J.C., & Lu, C.A. 2017. Novel interaction between CCR4 and CAF1 in rice CCR4-NOT deadenylase complex. *Plant Mol. Biol.*, 93: 79–96.
- Collart, M. A. 2003. Global control of gene expression in yeast by the Ccr4-Not complex. *Gene*, 313: 1-16.
- Delis, C., Krokida, A., Tomatsidou, A., Tsikou, D., Beta, R.A., Tsioumpekou, M., Moustaka, J., Stravodimos, G., Leonidas, D.D., Balatsos, N.A. & Papadopoulou, K.K. 2016. AtHESPERIN: a novel regulator of circadian rhythms with poly(A)-degrading activity in plants. *RNA Biol.*, 13: 68-82.
- Dimitrova, L.N., Kuroha, K., Tatematsu, T. & Inada, T. 2009. Nascent peptide-dependent translation arrest leads to Not4p-mediated protein degradation by the proteasome. *J. Biol. Chem.*, 284: 10343–10352.
- Dupressoir, A., Morel, A.P., Barbot, W., Loireau, M.P., Corbo, L. & Heidmann, T. 2001. Identification of four families of yCCR4- and Mg²⁺-dependent endonuclease-related proteins in higher eukaryotes, and characterization of orthologs of yCCR4 with a conserved leucine-rich repeat essential for hCAF1/hPOP2 binding. *BMC Genomics*, 2: 9.
- Fabian, M.R., Cieplak, M.K., Frank, F., Morita, M., Green, J., Srikumar, T., Nagar, B., Yamamoto, T., Raught, B., Duchaine, T.F. & Sonenberg, N. 2012. miRNA-mediated deadenylation is orchestrated by GW182 through two conserved motifs that interact with CCR4-NOT. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 19: 1211-1217.

- Fabian, M.R., Frank, F., Rouya, C., Siddiqui, N., Lai, W.S., Karetnikov, A., Blackshear, P.J., Nagar, B. & Sonenberg, N. 2013. Structural basis for the recruitment of the human CCR4-NOT deadenylase complex by tristetraprolin. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 20: 735–739.
- 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.
- Hong, K.Y., Lee, S.H., Gu, S., Kim, E., An, S., Kwon, J., Lee, J.B. & Jang, S.K. 2017. The bent conformation of poly(A)-binding protein induced by RNA-binding is required for its translational activation function. *RNA Biol.*, doi: 10.1080/15476286.2017.1280224. [Epub ahead of print]
- Hook, B.A., Goldstrohm, A.C., Seay, D.J., & Wickens, M. 2007. Two yeast PUF proteins negatively regulate a single mRNA. *J. Biol. Chem.*, 282: 15430–15438.
- Inada, T. & Makino, S. 2014. Novel roles of the multi-functional CCR4-NOT complex in post-transcriptional regulation. *Front Genet.*, 5: 1–7.
- Iwasaki, S., Takeda, A., Motose, H. & Watanabe, Y. 2007. Characterization of Arabidopsis decapping proteins AtDCP1 and AtDCP2, which are essential for post-embryonic development. *FEBS Lett.*, 581: 2455-2459.
- Kappel, C., Trost, G., Czesnick, H., Ramming, A., Kolbe, B., Vi, S.L., Bispo, C., Becker, J.D., de Moor, C. & Lenhard, M. 2015. Genome-Wide Analysis of PAPS1-Dependent Polyadenylation Identifies Novel Roles for Functionally Specialized Poly(A) Polymerases in Arabidopsis thaliana. *PLoS Genet.*, 25; 11 :e1005474.
- Lackner, D.H., Beilharz, T.H., Marguerat, S., Mata, J., Watt, S., Schubert, F., Preiss, T. & Bahler, J. 2007. A network of multiple regulatory layers shapes gene expression in fission yeast. *Mol. Cell*, 26: 145-155.
- Larimer, F.W. & Stevens, A. 1990. Disruption of the gene XRN1, coding for a 5'----3' exoribonuclease, restricts yeast cell growth. *Gene*, 95: 85-90.
- Lee, S., Kim, S.Y., Chung, E., Joung, Y.H., Pai, H.S., Hur, C.G. & Choi, D. 2004. EST and microarray analyses of pathogen-responsive genes in hot pepper (*Capsicum annuum* L.) non-host resistance against soybean pustule pathogen (*Xanthomonas axonopodis* pv. *glycines*). *Funct. Integr. Genomics.*, 4: 196-205.
- Lee, T.I., Wyrick, J.J., Koh, S.S., Jennings, E G., Gadbois, E.L., & Young, R.A. 1998. Interplay of positive and negative regulators in transcription initiation by RNA polymerase II holoenzyme. *Mol. Cell. Biol.*, 18: 4455–4462
- Liang, W., Li, C., Liu, F., Jiang, H., Li, S., Sun, J., Wu, X. & Li, C. 2009. The Arabidopsis homologs of CCR4-associated factor 1 show mRNA deadenylation activity and play a role in plant defence responses. *Cell Res.* 19: 307-316

- Lykke-Andersen, J., & Wagner, E. 2005. Recruitment and activation of mRNA decay enzymes by two ARE-mediated decay activation domains in the proteins TTP and BRF-1. *Genes Dev.*, 19: 351–361.
- Mitchell, P., Petflaski, E., Chevchenko, A., Mann, M. & Tollervey, D. 1997. The exosome: A conserved eukaryotic RNA processing complex containing multiple 3' → 5' exoribonuclease activities. *Cell*, 91: 457-466.
- Mulder, K.M., Inagaki A., Cameroni E., Mousson F., Winkler G.S., De Virgilio C., Collart M.A. & Timmers H.T. 2007. Modulation of Ubc4p/Ubc5p-mediated stress responses by the RING-finger-dependent ubiquitin-protein ligase Not4p in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*, 1: 181-192.
- Nishimura, N., Kitahata, N., Seki, M., Narusaka, Y., Narusaka, M., Kuromori, T., Asami, T., Shinozaki, K. & Hirayama, T. 2005. Analysis of ABA hypersensitive germination2 revealed the pivotal functions of PARN in stress response in *Arabidopsis*. *Plant J.*, 44: 972-984.
- Preiss, T., Muckenthaler, M. & Hentze, M.W. 1998. Poly(A)-tail-promoted translation in yeast: implications for translational control. *RNA*, 4: 1321-1331.
- Reverdatto, S.V., Dutko, J.A., Chekanova, J.A., Hamilton, D.A. & Belostotsky, D.A. 2004. mRNA deadenylation by PARN is essential for embryogenesis in higher plants. *RNA*, 10: 1200-1214.
- Sarowar, S., Oh, H.W., Cho, H.S., Baek, K.H., Seong, E.S., Joung, Y.H., Choi, G.J., Lee, S. & Choi, D. 2007. Capsicum annuum CCR4-associated factor CaCAF1 is necessary for plant development and defence response. *Plant J.*, 51: 792-802.
- Shirai, Y.T., Suzuki, T., Morita, M., Takahashi, A., & Yamamoto, T. 2014. Multifunctional roles of the mammalian CCR4-NOT complex in physiological phenomena. *Front Genet*, 5: 1–11.
- Souret, F.F., Kastenmayer, J.P. & Green, P.J. 2004. AtXRN4 degrades mRNA in *Arabidopsis* and its substrates include selected miRNA targets. *Mol. Cell*, 15: 173-83.
- Subtelny, A.O., Eichhorn, S.W., Chen, G.R., Sive, H. & Bartel, D.P. 2014. Poly(A)-tail profiling reveals an embryonic switch in translational control. *Nature*, 508: 66-71.
- Suzuki, Y., Arae, T., Green, P.J., Yamaguchi, J., & Chiba, Y. 2015. AtCCR4a and AtCCR4b are involved in determining the poly(A) length of granule-bound starch synthase 1 transcript and modulating sucrose and starch metabolism in *arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.*, 56: 863–874.
- Tarun, S.Z. Jr & Sachs, A.B. 1996. Association of the yeast poly(A) tail binding protein with translation initiation factor eIF-4G. *EMBO J.*, 15: 7168-7177.
- Tucker, M., Valencia-Sanchez, M.A., Staples, R.R., Chen, J., Denis, C.L. & Parker, R. 2001. The transcription factor associated Ccr4 and Caf1 proteins are components of the major cytoplasmic mRNA deadenylase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell*, 104: 377-386.
- Tucker, M., Staples, R.R., Valencia-Sanchez, M.A., Muhlrad, D. & Parker, R. 2002. Ccr4p is the catalytic subunit of a Ccr4p/Pop2p/Notp mRNA deadenylase complex in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.*, 21: 1427-36.

- Walley, J.W., Kelley, D.R., Nestorova, G., Hirschberg, D.L., & Dehesh, K. 2010. Arabidopsis deadenylases AtCAF1a and AtCAF1b play overlapping and distinct roles in mediating environmental stress responses. *Plant Physiol.*, 152: 866–875.
- Wang, L., Song, X., Gu, L., Li, X., Cao, S., Chu, C., Cui, X., Chen, X. & Cao, X. 2013. NOT2 Proteins Promote Polymerase II-Dependent Transcription and Interact with Multiple MicroRNA Biogenesis Factors in Arabidopsis. *Plant Cell*. 25: 715–727.
- Xu, J., Yang, J.Y., Niu, Q.W. & Chua, N.H. 2006. Arabidopsis DCP2, DCP1, and VARICOSE form a decapping complex required for postembryonic development. *Plant Cell*. 18: 3386-3398.
- Yamashita, A., Chang, T.C., Yamashita, Y., Zhu, W., Zhong, Z., Chen, C.Y. & Shyu, A.B. 2005. Concerted action of poly(A) nucleases and decapping enzyme in mammalian mRNA turnover. *Nat. Struct. Mol. Biol.*, 12: 1054-1063.
- Zheng, D., Ezzeddine, N., Chen, C.Y., Zhu, W., He, X. & Shyu, A.B. 2008. Deadenylation is prerequisite for P-body formation and mRNA decay in mammalian cells. *J. Cell Biol.*, 182: 89-101.

植物の全身を長距離移行する RNA

野田口理孝

名古屋大学大学院生命農学研究科,

名古屋大学トランスフォーマティブ生命分子研究所(ITbM), JST さきがけ

〒464-8602 愛知県名古屋市千種区不老町

Michitaka Notaguchi

Systemic long-distance transport of RNAs in plants

Key words: Grafting, Mobile RNA, Phloem, RNA-Seq analysis, Systemic signaling

Graduate School of Bioagricultural Sciences, Nagoya University,

Institute of Transformative Bio-Molecules, Nagoya University, JST PRESTO

Furo-cho, Chikusa-ku, Nagoya 464-8602, JAPAN

DOI: 10.24480/bsj-review.8b9.00119

1. はじめに

かつて地球上の生物は、RNA を遺伝情報としていたと言われている (“RNA world 仮説”, Joyce 2002)。その後、DNA-タンパク質の世界へ移行した現在も、RNA 分子は生物の細胞プロセスの根幹をなし、DNA 複製を開始するプライマーとして、遺伝情報が発現する際のメッセンジャーとして、リボソームの触媒中心として働くなど、生物に必要不可欠な場面で様々に機能を果たしている（図 1A）。植物に視点を当てるとき、植物が進化の過程で獲得した RNA 現象の一つとして、篩管を介した RNA の長距離

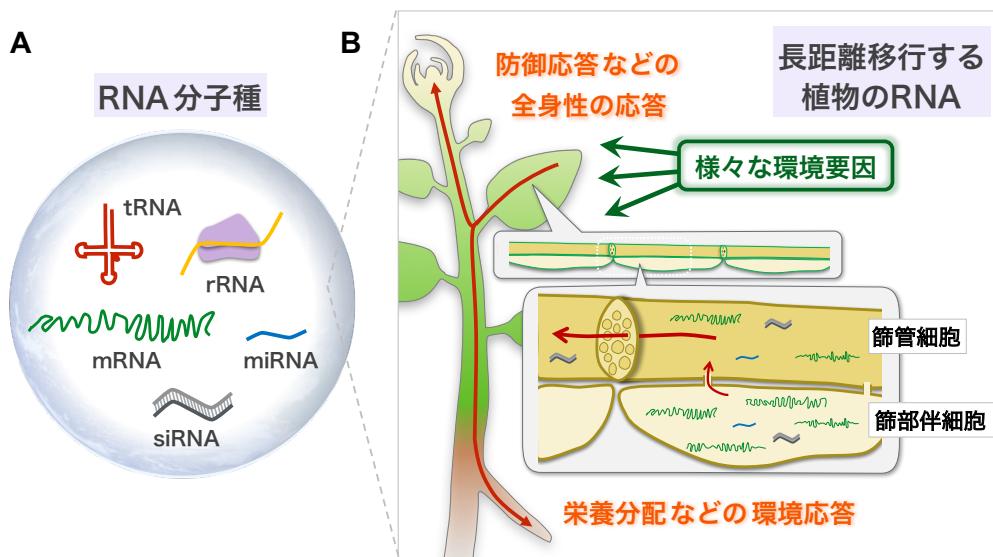


図 1. RNA 分子種と植物の全身移行性 RNA のモデル図

様々な RNA 分子種 (A) が、篩部細胞から原形質連絡を介して篩管細胞に積み込まれる。篩管のマスフロー (赤矢印) に乗って、地上部の成長点や地下部の根に向けて全身へと長距離移行する。移行先において RNA 分子が固有に持つ生理作用を發揮し、個体レベルで統制のとれた発生・成長を果たす。

移行が知られる（図 1B）。植物の筛管は、生きた細胞からなり、光合成産物、すなわち栄養分を全身に運ぶ働きを持つ。他方、筛管は全身の器官をつなぐ組織として、個体のある部位で感受した情報を別の部位に伝達するシグナル伝達経路として働くことも近年明らかになりつつある。筛管は通道組織へと細胞が分化する過程で核を失い、一部のオルガネラと細胞質によって構成された細胞となる。そのため、核に包有されるゲノム情報が転写・翻訳されることは分化した筛管細胞では起こりえない。それにも関わらず、筛管の中には栄養分、ホルモンなどの低分子化合物の他に、RNA、タンパク質といった生体高分子が存在することが、1990 年代以降の筛管液分析を通して急速に明らかとなった（Lough and Lucas 2006, Notaguchi and Okamoto 2015）。従って、RNA やタンパク質が周りの細胞から筛管細胞へと積み込まれるということである。筛管細胞の隣には筛部伴細胞が在り、タンパク質や RNA の積み込みは筛部伴細胞から原形質連絡を介して行われると考えられている。筛管中を運ばれる RNA 分子の種類は多様であり、miRNA, siRNA, tRNA, long noncoding RNA, mRNA など、通常の細胞で働く分子種の多くが、その構成は異なるものの、筛管中にも見つかる。次世代シーケンサーを用いたゲノムワイドな RNA 解析技術により、筛管中の RNA 分子について包括的な情報が得られる時代となり、今後益々の研究の飛躍が見込まれる。本稿では、筛管を介して植物の全身を長距離移行する RNA 分子のうち、焦点がおかれ研究が進められてきた small RNA と mRNA について概説する。

2. 全身を長距離移行する small RNA

近年のマイクロアレイや次世代シーケンサーを用いた解析によって、茎を切断して得られる筛管液の中には多様な small RNA が含まれることが明らかとなった（Molnar et al. 2010, Buhtz et al. 2010）。miRNA や siRNA といった small RNA は筛管を介して全身へ長距離輸送され、遺伝子サイレンシング、環境応答、栄養配分、そして発生を制御すると考えられている（Kehr and Buhtz 2007, Mlotshwa et al. 2002）。

siRNA については、全身移行する RNA の中で機能が最も説明されている。siRNA の全身移行性については siRNA 產生に関わる Dicer の変異体を用いた接ぎ木実験によって明確に示されており、siRNA の全身移行によって転写レベルの遺伝子サイレンシング（Transcriptional gene silencing, TGS）と転写後に mRNA を分解することで起こる転写後遺伝子サイレンシング（Post-transcriptional gene silencing, PTGS）の両方を引き起こすことが知られる。これらの遺伝子サイレンシング機構はウィルスなどの病害にさらされた際、全身的に抵抗性を発揮する上で非常に重要である（Molnar et al., 2010）。TGS について紹介すると、TGS は siRNA の働きによって、RNA-directed DNA methylation (RdDM) を介した DNA メチル化、あるいはクロマチンの不活性化が起き、結果として標的された遺伝子の転写が抑制される。Bai et al. (2011) の接ぎ木実験では、2 種類の植物、カリフラワーモザイクウィルスの 35S プロモーターに由来する siRNA を形成する植物と 35S プロモーターで GFP 遺伝子を発現する植物 (*CaMV 35Sp::GFP*) が用いられ、両者の間で接ぎ木を行うと、*CaMV 35Sp::GFP* 植物における GFP 遺伝子の発現抑制が起きることが示された。さらに、siRNA が産生できない Dicer の一つである DCL3 の変異体を用いた接ぎ木実験では、野生型で認められる TGS が *dcl3* 変異体背景では引き起こされないことから、siRNA が全身移行する実体であり、TGS は siRNA の輸送先で引き起こされることが示唆された

(Melnyk et al. 2011)。RdDM 経路についても理解が深まり、DCL3 が 24 塩基の siRNA を產生すること (Qi et al. 2005), RdDM は 24 塩基の siRNA により引き起こされることが明らかとなった (Law and Jacobsen 2010)。Lewsey et al. (2016) は全身移行性 siRNA による DNA メチル化についてゲノムワイドに解析し、siRNA による RdDM は DOMAINS REARRANGED METHYLTRANSFERASE 1 (DRM1) と DRM2 に依存して起こることを明らかにした。以上を合わせると、TGS はまず DCL3 による 24 塩基の siRNA の產生に始まり、次に產生された siRNA の全身移行、移行先での DRMs との複合体を形成および RdDM の発動と続き、最終的に標的遺伝子の遺伝子サイレンシングが確立されるというのが現状の理解である。なお、DNA メチル化状態の変化は、シロイヌナズナの異なるエコタイプ間で接ぎ木した場合や (Lewsey et al. 2016)，ウリ科やナス科の異なる種間で接ぎ木した場合にも検出されており (Avramidou et al. 2015, Kasai et al. 2016, Wu et al. 2013)，将来的には実用作物においても、接ぎ木を介してエピジェネティックな変化を誘導することで有用形質を付与するといった技術が生まれる可能性がある。

一方、miRNA の移行に関する発見は、主要栄養素の一つであるリン (P) への応答様式の研究にはじまる。リンは、ATP、核酸、リン脂質に含まれる必須元素であり、無機リン酸 (Pi) として根から取り込まれる (Schachtman et al. 1998)。Pi は、維管束を運ばれる際の主要な形態であり (Bielecki 1973)，Pi の欠乏時には、欠乏状態を補うため Pi の吸収力は高まる (Drew and Saker 1984)。Pi の欠乏状態におかれた植物は、miRNA の一種である miR399 を高発現し、miR399 の標的となる *PHO2* 遺伝子の発現を抑制する。*PHO2* 遺伝子はユビキチン結合酵素をコードし、miR399 による *PHO2* 遺伝子の発現抑制は、その下流において Pi トランスポーター遺伝子の発現上昇を引き起こし、その結果、葉における Pi の蓄積が促進される (Bari et al. 2006, Fujii et al. 2005)。このように、miR399/*PHO2* シグナル伝達経路によって、リンの全身的な配分が調整されている。その後の研究で、このメカニズムは様々な植物に広く保存されていることも現在では知られている (Branscheid et al. 2010, Zhang et al. 2016a)。リン以外の栄養素についても、全身的な配分の調整のために類似した機構が働く場合が見つかっており、硫酸塩の欠乏時にも miR395 という miRNA の発現上昇が認められ、結果として硫酸トランスポーター遺伝子の発現が上昇することが報告されている (Buhtz et al. 2010, Kawashima et al. 2011)。他にジャガイモでは miR172 と miR156 の移行性が報告されており、それらは花成や塊茎形成のタイミングを制御している可能性が示唆されている (Martin et al. 2009; Kasai et al. 2010; Bhogale et al. 2014)。以上、miRNA は細胞自律的に働く場合が一般的であるが (Schwab et al. 2006)，上記の例にあるように、一部の miRNA については個体レベルの全身性のシグナル伝達（長距離シグナル伝達と呼ばれる）に働くことが示唆されている。なお、30~90 塩基と si/miRNA よりは長い small noncoding RNA についても *in vitro* でどんな活性を持つか調べられたことがあり、タンパク質翻訳の阻害活性を示すことが報告されている (Zhang et al. 2009)。このように、植物の個体の中には様々な small RNA が長距離移行し、分子種ごとに異なる様式で、移行先の組織における標的分子の発現レベルを調節している。

3. 全身を長距離移行する mRNA

mRNA の筋管を介した長距離輸送は、これまでに複数の植物種を用いて研究されてきており、輸送

される mRNA の同定やその輸送機構に関する知見も集まっている。興味深いことに、複数の植物で長距離移行する mRNA を同定すると、特定の遺伝子ファミリーの mRNA が調べた複数の種で共通して見つかることが分かり、mRNA の長距離移行は保存された現象であることが推察されている (Notaguchi 2015 にて概説)。さらに、篩管中には RNA 結合タンパク質が見つかること (Balachandran et al. 1997, Xoconostle-Cázares et al. 1999, Aoki et al. 2002, Gómez et al. 2005)，それらのタンパク質は標的 mRNA 上の特定の配列に対して特異的に結合し、長距離移行のための RNA-タンパク質複合体を形成することが示唆されている (Ham et al. 2009, Cho et al. 2012)。また、篩管にはそもそも RNA 分解酵素の活性が検出されないことも知られ (Sasaki et al. 1998, Doering-Saad et al. 2002)，植物に感染する植物ウィルス（多くは RNA ウィルス）はおそらく宿主の植物が有する篩管輸送システムを利用しているという推察も一般的になされている (Nelson and Citovsky 2015)。以上は、植物は何かしらの mRNA を長距離輸送する機構を獲得・維持しており、輸送される mRNA には何らかの生物学的意義があることを推察させる。しかし、これまでに篩管中を移行する mRNA の研究は精力的に行われているものの、その役割については殆ど明らかにされていない。詳細については、本稿以外にも別の概説論文を参照されたい (Kehr and Buhtz 2007, Harada 2010, Spiegelman et al. 2013, Notaguchi 2015)。

最近になり次世代シーケンサーを用いたゲノムワイドな解析が行われ、接ぎ木や寄生といった二種類の植物が接合した場合では、それらの植物の間で数百から数千の mRNA が接合部位を越えて長距離輸送されることが報告されている (Kim et al. 2014, Notaguchi et al. 2015, Thieme et al. 2015, Yang et al. 2015, 図 2A, B)。一部の mRNA についてはさらなる機能解析が試みられ、mRNA が長距離輸送された結果、輸送された先の発生現象に影響を与えることが報告されている (Kim et al. 2001, Haywood et al. 2005, Banerjee et al. 2006, Notaguchi et al. 2012, 図 2C)。これまでの研究では、輸送先で mRNA がタンパク質

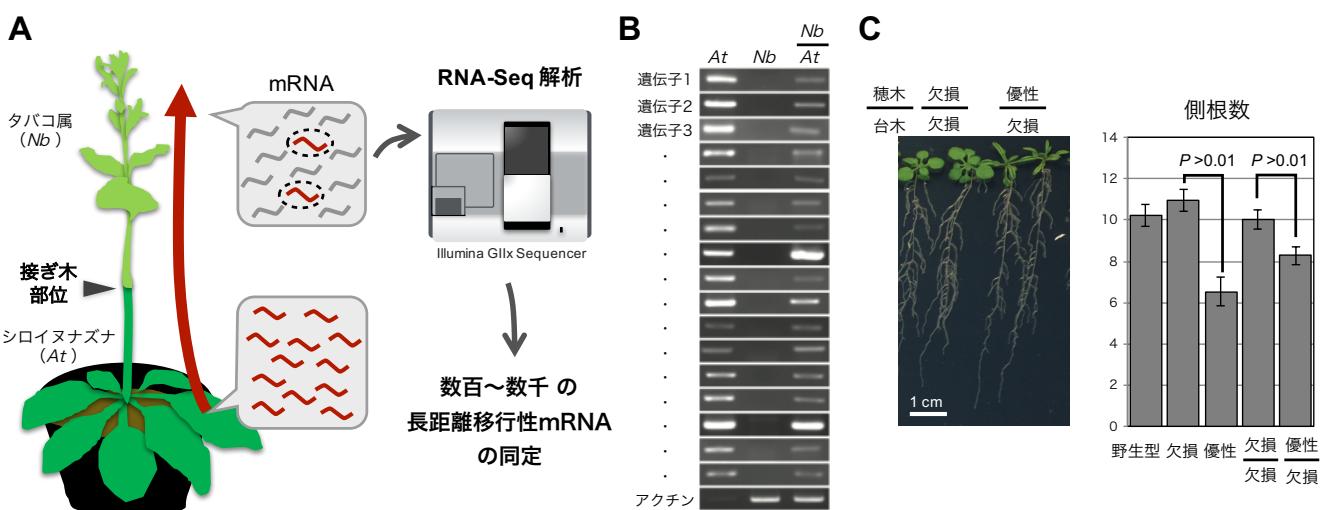


図2. 次世代シーケンサーを用いた植物の全身移行性 mRNA の同定

(A) 二種類の植物を接ぎ木すると、全身移行性の mRNA は接ぎ木部位を越えて相手の植物へ移行する。次世代シーケンサーを用いて相手の植物の mRNA を網羅解析することで、移行してきた mRNA の配列情報を取得でき、全身移行性の mRNA を同定することができる。(B) RT-PCR による結果の追証。(C) 全身移行性 mRNA として同定された Aux/IAA mRNA の生理作用について検討した接ぎ木実験。それぞれの実験の詳細は、原著論文を参照 (A, B: Notaguchi et al. 2015, C: Notaguchi et al. 2012)。

へ翻訳されていることを明示した例はないが、表現型の解析からタンパク質への翻訳は起こりえると推察されている。著者らの以前の検討では、長距離輸送される mRNA 群の特徴をゲノム上の全 mRNA の特徴と比較してみると、mRNA の長さにも、遺伝子プロモーター上の配列モチーフにも、mRNA そのものの配列にも、特筆すべき特徴は見つからなかった (Notaguchi et al. 2015)。興味深かったのは、移行性を示す mRNA の中には、はじめから全身で発現するハウスキーピング遺伝子も多く含まれていたことである。それらの mRNA があえて個体の中を移行する必要性は低いように考えられるため、移行性 mRNA の中にはシグナル伝達に関係するものと関係しないものの両方が含まれているのではないかというのが著者の推察である。なお、長距離輸送される mRNA の発現量と移行性の関係を調べると、単純な発現量が移行性を説明する訳ではなく、移行には何らかの制御機構が働くことが推察された (Notaguchi et al. 2015)。ただし、別の研究グループの解析結果では、多くの mRNA の場合について発現量と移行性の間に関係性が見出されることも示唆されており、篩部伴細胞から篩管細胞への mRNA の移行については、選択性を持った制御を受ける移行と、発現量に応じた一定レベルの漏洩、即ち選択性の低い、選択的制御を受けない移行の二パターンがありえると考察されている (Thieme et al. 2015, Calderwood et al. 2016)。類似した篩管細胞への生体高分子の漏洩は、タンパク質の場合でも認められるという報告が最近なされており (Paultre et al. 2016)，今後はこうした一定の漏洩状況を考慮して結果と向き合う必要がある。

また実験手法の観点でも注意は必要である。物質の長距離輸送の検証によく用いられる接ぎ木法について、興味深い報告がなされている。Yang et al. (2015) によると、接ぎ木して 11 年経過したブドウの成木苗と接ぎ木して 1 月の幼苗を用意し、それぞれの試料から移行性を示す mRNA を同定してみると、11 年苗では 1 月苗の場合に比べて移行性を示す mRNA 数（種類数）が少なくなるという。この結果の解釈として、成長ステージによって移行する mRNA の種類が変化したという単純な解釈の他に、接ぎ木という人為操作による影響が時間経過と共に落ち着いたためとする解釈も成立つ。そのため、mRNA の移行性について最終的な結論を得るには、接ぎ木以外の手法による試験も必要であると著者は考える。

mRNA の移行については非選択性の漏洩の可能性を挙げたが、一定の制御機構が働いていることもこれまでの研究で明らかにされている。移行性を示す mRNA の部分配列を、本来は移行性を示さない GFP や GUS などのレポーター遺伝子に融合すると、GFP や GUS mRNA に移行性が付与されることが実験的に示されている (Banerjee et al. 2009, Huang and Yu 2009, Thieme et al. 2015, Zhang et al. 2016b)。これまでに複数の mRNA を対象に実験が行われ、mRNA の UTR 部分など特定の配列・領域が移行に重要であることが示されている。先述のように RNA 結合タンパク質が篩管中に存在することや、他にも、移行性を示す mRNA の別の遺伝子ファミリーを調べると、必ずしも移行性を示す訳ではないことなど (Huang and Yu 2009, Notaguchi et al. 2012, 2015)，mRNA の移行は選択性を持つことも示唆されている。

今後、全身移行性の mRNA の生物学的機能を解明するためには、同定作業に続き、その後の研究で標的する対象を絞り込む作業が必要である。一つの提案は、Thieme et al. (2015) が行ったように、特定の環境下で特異的に移行性を示す mRNA に着目することである。原理的には、全身移行性シグナルは個体のある場所で受容した情報を別の場所へと伝達するためにある。そのため、環境要因の中でも特

に局所的にインプットされる要因に着目する（あるいは用意して調べる）のが好ましく、これまで確立してきた移行性 mRNA の同定技術を上手に適用することで、現象の理解が深まることが望まれる。実際の自然界では多くの環境要因は植物の個体を不均一に取り囲んでおり、こうした環境情報を伝達するシグナル分子の研究は、植物の環境応答メカニズムを紐解く上で鍵となるはずである。

4. 展望

植物の全身性シグナル伝達機構は、急速に拓けた分野になりつつある。RNA はその潜在的な機能性の高さから、シグナル分子として多様な現象に寄与する可能性が高い。siRNA については機能理解が進むものの、mRNA については機能未知な部分が大きく、以下に示す潜在的な問い合わせ残されている。
(1) どの mRNA が輸送されるのか、そこに選択性はあるのか？ (2) 転写されれば直ちに移行するのか、あるいは特異的な内外的環境条件に依存して移行が制御されているのか？ (3) どこに移行するのか？ (4) どのようなメカニズムで移行するのか？ 篩部位細胞から篩管細胞への積み込みの制御はあるのか、篩管を長距離移行する際の漏洩防止や漏洩物の再積み込みのシステムはあるのか、篩管の末端へ到達した後に最終目的地となる細胞/組織までの細胞間移行は制御されるのか？ (5) 輸送された mRNA の運命は？ 翻訳されるのか？ 翻訳されるのであれば、そのタンパク質の活性やタンパク質修飾の様式は輸送されない場合と何か違いはあるか？ シグナル分子として機能が永続しないよう、機能発現した後に代謝・分解を促進する機構は存在するか？ (6) 輸送される mRAN の成長・発生における機能は何か？ 今後の研究では、こうした一連の問い合わせにアプローチがなされたい。

small RNA については遺伝子サイレンシングを引き起こし、外界の環境に応じて植物の発生様式を制御したり、外来の生物的攻撃から防御したりする際に、シグナル分子として全身に移行して作用することが明らかとなり、今後も更なる分子同定が続くことが予想される。移行性 small RNA の働きによる現象の解明は、植物科学の理解を深めるのみならず、栽培作物への形質付与の技術という観点で期待が持たれる。実際に一部の野菜類では実証例も得られており、遺伝子組換え技術に変わる新たな技術として活用が期待されている (Kudo and Harada 2007)。何より、植物の RNA の長距離輸送によるシグナル伝達機構の知見は、地球上でこれだけ多様化して繁殖する植物がいかに頑強に生きて、繁栄を遂げているのか、その理解を助ける関心の深いテーマではないだろうか。本テーマを追求した先に、生命の深淵を覗いてみたい。

5. 謝辞

本稿で紹介した研究は、文部科学省 科学研究費補助金 新学術領域研究「環境記憶統合」(16H01465), 同省 卓越研究員事業 (16811669), 科学技術振興機構 さきがけ「情報協働栽培」(JPMJPR15O3), 同機関 START プロジェクト (15657559), 農林水産省 農林水産業・食品産業科学技術研究推進事業 (16770567) の支援を得て遂行した。

6. 引用文献

- Aoki, K., Kragler, F., Xoconostle-Cazares, B., & Lucas, W.J. 2002. A subclass of plant heat shock cognate 70 chaperones carries a motif that facilitates trafficking through plasmodesmata. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 99: 16342–16347.

- Avramidou, E., Kapazoglou, A., Aravanopoulos, F.A., Xanthopoulou, A., Ganopoulos, I., Tsaballa, A. et al. 2015. Global DNA methylation changes in *Cucurbitaceae* inter-species grafting. *Crop Breed. Appl. Biotechnol.* 15: 112–116.
- Bai, S., Kasai, A., Yamada, K., Li, T., & Harada, T. 2011. A mobile signal transported over a long distance induces systemic transcriptional gene silencing in a grafted partner. *J. Exp. Bot.* 62: 4561–4570.
- Balachandran, S., Xiang, Y., Schobert, C., Thompson, G.A., & Lucas, W.J. 1997. Phloem sap proteins from *Cucurbita maxima* and *Ricinus communis* have the capacity to traffic cell to cell through plasmodesmata. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 14150–14155.
- Banerjee, A.K., Chatterjee, M., Yu, Y., Suh, S.G., Miller, W.A., & Hannapel, D.J. 2006. Dynamics of a mobile RNA of potato involved in a long-distance signaling pathway. *Plant Cell* 18: 3443–3457.
- Banerjee, A.K., Lin, T., & Hannapel, D.J. 2009. Untranslated regions of a mobile transcript mediate RNA metabolism. *Plant Physiol.* 151: 1831–1843.
- Bari, R., Datt Pant, B., Stitt, M., & Scheible, W.R. 2006. PHO2, microRNA399, and PHR1 define a phosphate-signaling pathway in plants. *Plant Physiol.* 141: 988–999.
- Bhogale, S., Mahajan, A.S., Natarajan, B., Rajabhoj, M., Thulasiram, H.V., & Banerjee, A.K. 2014. MicroRNA156: a potential graft-transmissible microRNA that modulates plant architecture and tuberization in *Solanum tuberosum* ssp. *andigena*. *Plant Physiol.* 164: 1011–1027.
- Bieleski, R.L. 1973. Phosphate pools, phosphate transport, and phosphate availability. *Ann. Rev. Plant Physiol.* 24: 225–252.
- Branscheid, A., Sieh, D., Pant, B.D., & May, P. 2010. Expression pattern suggests a role of MiR399 in the regulation of the cellular response to local Pi increase during arbuscular mycorrhizal symbiosis. *Mol. Plant Microbe Interact.* 23: 915–926.
- Buhtz, A., Pieritz, J., Springer, F., & Kehr, J. (2010) Phloem small RNAs, nutrient stress responses, and systemic mobility. *BMC Plant Biol.* 10: 64.
- Calderwood, A., Kopriva, S., & Morris, R.J. 2016. Transcript abundance explains mRNA mobility data in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* 28: 610–615.
- Cho, S.K., Kang, I.H., Carr, T., & Hannapel, D.J. 2012. Using the Yeast Three-Hybrid System to Identify Proteins that Interact with a Phloem-Mobile mRNA. *Front. Plant Sci.* 3: 189.
- Doering-Saad, C., Newbury, H.J., Bale, J.S., & Pritchard, J. 2002. Use of aphid stylectomy and RT-PCR for the detection of transporter mRNAs in sieve elements. *J. Exp. Bot.* 53: 631–637.
- Drew, M.C., & Saker, L.R. 1984. Uptake and long-distance transport of phosphate, potassium and chloride in relation to internal ion concentrations in barley: evidence of non-allosteric regulation. *Planta* 160: 500–507.
- Fujii, H., Chiou, T.-J., Lin, S.-I., Aung, K., & Zhu, J.-K. 2005. A miRNA Involved in Phosphate-Starvation Response in *Arabidopsis*. *Curr. Biol.* 15: 2038–2043.
- Gómez, G., Torres, H., & Pallás, V. 2005. Identification of translocatable RNA-binding phloem proteins from melon, potential components of the long-distance RNA transport system. *Plant J.* 41: 107–116.
- Ham, B.K., Brandom, J.L., Xoconostle-Cázares, B., Ringgold, V., Lough, T.J., & Lucas, W.J. 2009. A

- polypyrimidine tract binding protein, pumpkin RBP50, forms the basis of a phloem-mobile ribonucleoprotein complex. *Plant Cell* 21: 197–215.
- Harada, T. 2010. Grafting and RNA transport via phloem tissue in horticultural plants. *Scientia Horticulturae* 125: 545–550.
- Haywood, V., Yu, T.S., Huang, N.C., & Lucas, W.J. 2005. Phloem long-distance trafficking of GIBBERELLIC ACID-INSENSITIVE RNA regulates leaf development. *Plant J.* 42: 49–68.
- Huang, N.C., & Yu, T.S. 2009. The sequences of Arabidopsis GA-INSENSITIVE RNA constitute the motifs that are necessary and sufficient for RNA long-distance trafficking. *Plant J.* 59: 921–929.
- Joyce, G.F. 2002. The antiquity of RNA-based evolution. *Nature* 418: 214–221.
- Kawashima, C.G., Matthewman, C.A., Huang, S., Lee, B.R., Yoshimoto, N., Koprivova, A. et al. 2011. Interplay of SLIM1 and miR395 in the regulation of sulfate assimilation in Arabidopsis. *Plant J.* 66: 863–876.
- Kasai, A., Bai, S., Hojo, H., & Harada, T. 2016. Epigenome editing of potato by grafting using transgenic tobacco as siRNA donor. *PLoS ONE* 11: e0161729.
- Kasai, A., Kanehira, A., & Harada, T. 2010. *miR172* Can Move Long Distances in *Nicotiana benthamiana*. *The Open Plant Science J.* 4: 1–6.
- Kehr, J., & Buhtz, A. 2007. Long distance transport and movement of RNA through the phloem. *J. Exp. Bot.* 59: 85–92.
- Kim, G., LeBlanc, M.L., Wafula, E.K., & Westwood, J.H. 2014. Genomic-scale exchange of mRNA between a parasitic plant and its hosts. *Science* 345: 808–811.
- Kim, M., Canio, W., Kessler, S., & Sinha, N. 2001. Developmental changes due to long-distance movement of a homeobox fusion transcript in tomato. *Science* 293: 287–289.
- Kudo, H., & Harada, T. 2007. A graft-transmissible RNA from tomato rootstock changes leaf morphology of potato scion. *Hort. Science* 42: 225–226.
- Law, J.A., & Jacobsen, S.E. 2010. Establishing, maintaining and modifying DNA methylation patterns in plants and animals. *Nat. Rev. Genet.* 11: 204–220.
- Lewsey, M.G., Hardcastle, T.J., Melnyk, C.W., Molnar, A., Valli, A., Urich, M.A., et al. 2016. Mobile small RNAs regulate genome-wide DNA methylation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 113: E801–810.
- Lough, T.J., & Lucas, W.J. 2006. Integrative plant biology: role of phloem long-distance macromolecular trafficking. *Annu. Rev. Plant Biol.* 57: 203–232.
- Martin, A., Adam, H., Díaz-Mendoza, M., Zurczak, M., González-Schain, N.D., & Suárez-López, P. 2009. Graft-transmissible induction of potato tuberization by the microRNA miR172. *Development* 136: 2873–2881.
- Melnyk, C.W., Molnar, A., Bassett, A., & Baulcombe, D.C. 2011. Mobile 24 nt small RNAs direct transcriptional gene silencing in the root meristems of *Arabidopsis thaliana*. *Curr. Biol.* 21: 1678–1683.
- Mlotshwa, S., Voinnet, O., Mette, M.F., Matzke, M., Vaucheret, H., Ding, S.W. et al. 2002. RNA silencing and the mobile silencing signal. *Plant Cell* 14: S289–301.
- Molnar, A., Melnyk, C.W., Bassett, A., Hardcastle, T.J., Dunn, R., & Baulcombe, D.C. 2010. Small silencing RNAs in plants are mobile and direct epigenetic modification in recipient cells. *Science* 328: 872–875.

- Nelson, R.S., & Citovsky, V. 2005. Invaders of Cells and Pirates of Cellular Pathways. *Plant Physiol.* 138: 1809–1814.
- Notaguchi, M. 2015. Identification of phloem-mobile mRNA. *J. Plant Res.* 128: 27–35.
- Notaguchi, M., Higashiyama, T., & Suzuki, T. 2015. Identification of mRNAs that move over long distances using an RNA-seq analysis of *Arabidopsis/Nicotiana benthamiana* heterografts. *Plant Cell Physiol.* 56: 311–321.
- Notaguchi, M., & Okamoto, S. 2015. Dynamics of long-distance signaling via plant vascular tissues. *Front. Plant Sci.* 6: 161.
- Notaguchi, M., Wolf, S., & Lucas, W.J. 2012. Phloem-mobile Aux/IAA transcripts target to the root tip and modify root architecture. *J. Integr. Plant Biol.* 54: 760–772.
- Paultre, D., Gustin, M.P., Molnar, A., & Oparka, K.J. 2016. Lost in transit: long-distance trafficking and phloem unloading of protein signals in *Arabidopsis* homografts. *Plant Cell* 28: 2016–2025.
- Qi, Y., Denli, A.M. & Hannon, G.J. 2005. Biochemical specialization within *Arabidopsis* RNA silencing pathways. *Mol. Cell* 19: 421–428.
- Sasaki, T., Chino, M., Hayashi, H., & Fujiwara, T. 1998. Detection of several mRNA species in rice phloem sap. *Plant Cell Physiol.* 39: 895–897.
- Schachtman, D., Reid, R., & Ayling, S. 1998. Phosphorus Uptake by Plants: From Soil to Cell. *Plant Physiol.* 116: 447–453.
- Spiegelman, Z., Golan, G., & Wolf, S. 2013. Don't kill the messenger: Long-distance trafficking of mRNA molecules. *Plant Sci.* 213: 1–8.
- Thieme, C.J., Rojas-Triana, M., Stecyk, E., Schudoma, C., Zhang, W., Yang, L. et al. Endogenous *Arabidopsis* messenger RNAs transported to distant tissues. *Nat. Plants* 1: 15025.
- Wu, R., Wang, X., Lin, Y., Ma, Y., Liu, G., Yu, X. et al. 2013. Inter-species grafting caused extensive and heritable alterations of DNA methylation in *Solanaceae* plants. *PLoS ONE* 8: e61995.
- Xoconostle-Cázares, B., Xiang, Y., Ruiz-Medrano, R., Wang, H.L., Monzer, J., Yoo, B.C., McFarland, K.C., Franceschi, V.R., & Lucas, W.J. 1999. Plant paralog to viral movement protein that potentiates transport of mRNA into the phloem. *Science* 283: 94–98.
- Yang, Y., Mao, L., Jittayasothorn, Y., Kang, Y., Jiao, C., Fei, Z. et al. 2015. Messenger RNA exchange between scions and rootstocks in grafted grapevines. *BMC Plant Biol.* 15: 251.
- Zhang, S., Sun, L., & Kragler, F. 2009. The phloem-delivered RNA pool contains small noncoding RNAs and interferes with translation. *Plant Physiol.* 150: 378–387.
- Zhang, W., Thieme, C.J., Kollwig, G., Apelt, F., Yang, L., Winter, N. et al. (2016b) tRNA-related sequences trigger systemic mRNA transport in plants. *Plant Cell* 28: 1237–1249.
- Zhang, Z., Zheng, Y., Ham, B.K., Chen, J., Yoshida, A., Kochian, L.V., et al. (2016a) Vascular-mediated signalling involved in early phosphate stress response in plants. *Nat. Plants* 2: 16033.