

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 段階の切断を共に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 Exptin-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)。

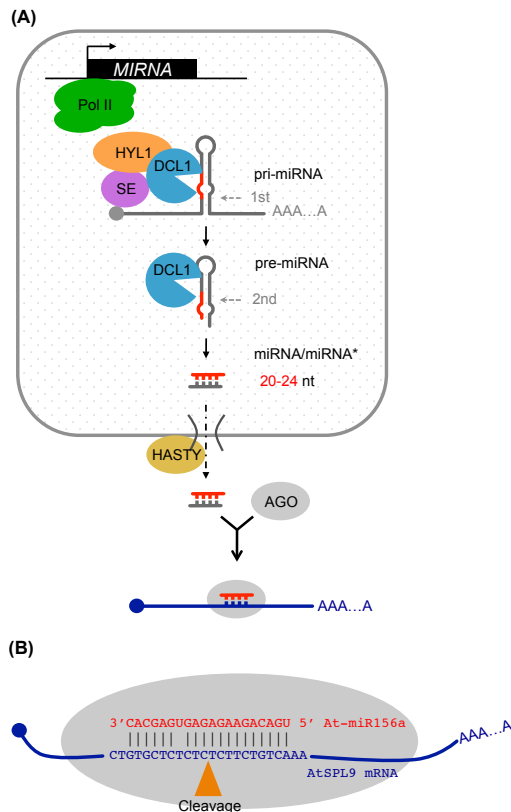


図1 (A)植物MicroRNAの合成経路 (B)RISCの作用機序

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)の鋳型となり、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 処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、花成遅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、花成遅滞など *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

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によって初めて機能を持つ (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) の産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.

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反応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 プロモーター下で 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、抽臺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的に減少していき、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* の発現量は経時的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 *HOMEODOMAIN-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きがかかることがわかっており、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することがわかっ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、単子葉植物、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され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で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 *IPAI* 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増加す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 の変異体を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 micro-RNAs 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., Saetern, 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. Aca. 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 suspensor 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.