

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

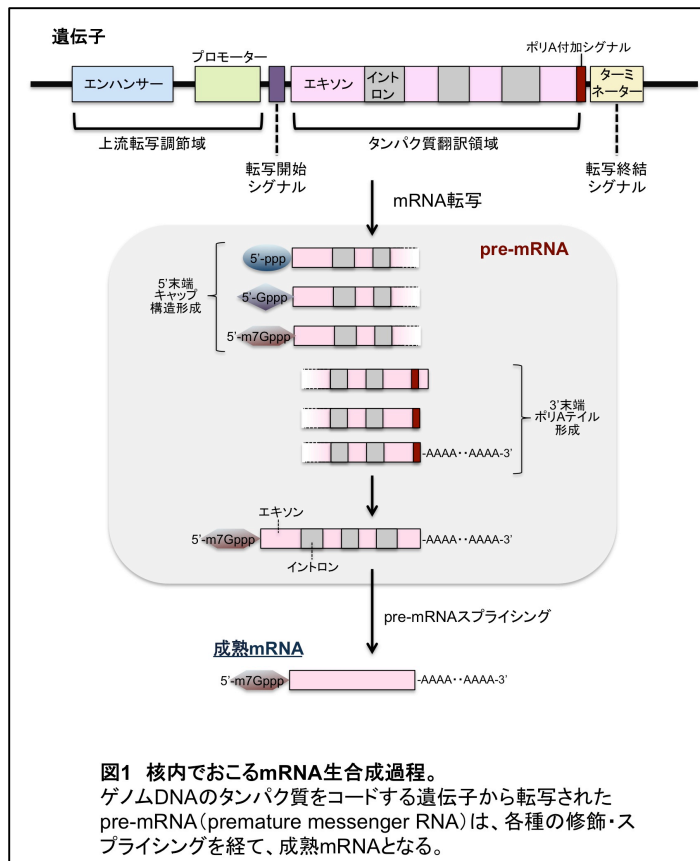
²RIKEN Center for Sustainable Resource Science,
Yokohama, Kanagawa, 230-0045 Japan

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、それが植物のこ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りうる成熟 mRNA の生合成のためには、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 種ほどのタンパク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 の間には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 が出そろった状態になる。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ソーム (いわゆるメジャースプライソソーム) 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ソーム (マイナースプライソソームと呼ばれる) が使われる (Will and Lührmann 2011)。

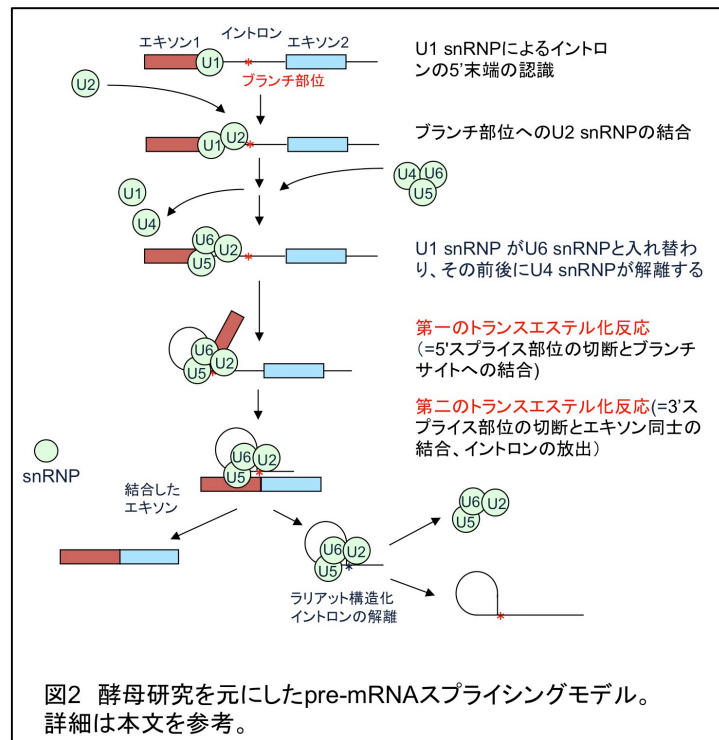
以上のスプライシングに関与する重要因子に相当するほぼ全ての遺伝子は、モデル植物であるシロイヌナズナのゲノム上にも見つかった (Wang and Brendel 2004)。このことから、基本的にこうした機構は植物でも保存されていると考えられているが、残念ながら植物では *in vitro* スプライシング実験系が欠如していることもあり、植物スプライシングの分子機構、とくにスプライソソームの詳細研究は遅れているのが現状である。

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「タンパク質の鋳型である成熟 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ーション生成機構

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ーション生成である (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



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

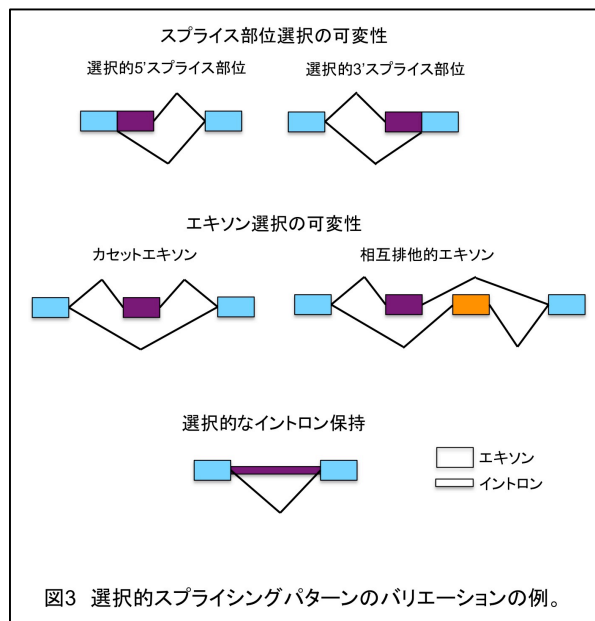


図3 選択的スプライシングパターンの変異の例。

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おり、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）がエクソン・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エーション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エーションは、リン酸化ターゲットを含む8アミノ酸のみが異なるタンパク質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*変異体が生ずる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*が生ずる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にともなって、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）のバリエーション生成率が高いこと（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エーションの一定数はコドンの読み枠が変化しないバリエーションであり、これによって活性ドメインの追加・削除がなされることが示された。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）としてはエクソンに近

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こ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

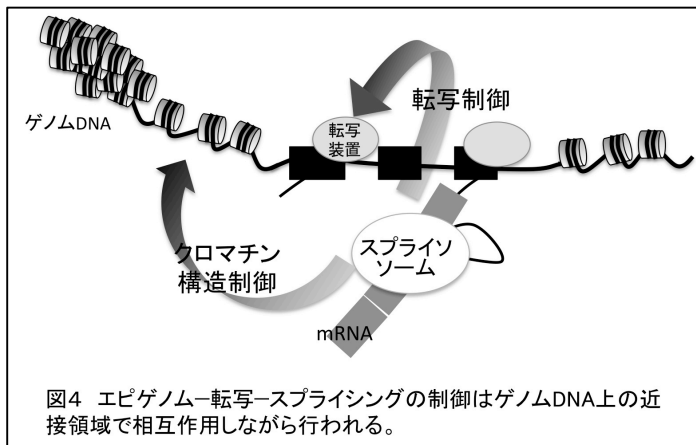


図4 エピゲノム-転写-スプライシングの制御はゲノムDNA上の近接領域で相互作用しながら行われる。

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 のスペクト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ーション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ゾ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のプロセスではなく, 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のような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, 核分裂後の胚嚢の 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

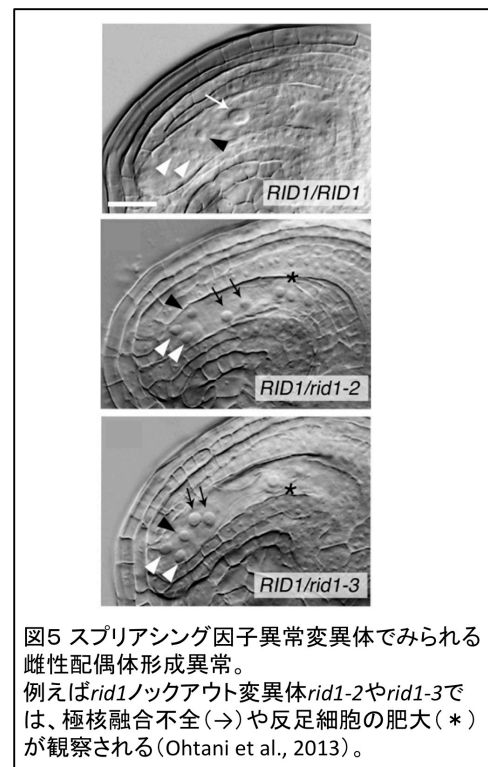


図5 スプライシング因子異常変異体でみられる雌性配偶体形成異常。
例えば *rid1* ノックアウト変異体 *rid1-2* や *rid1-3* では、極核融合不全(→)や反足細胞の肥大(*)が観察される (Ohtani et al., 2013)。

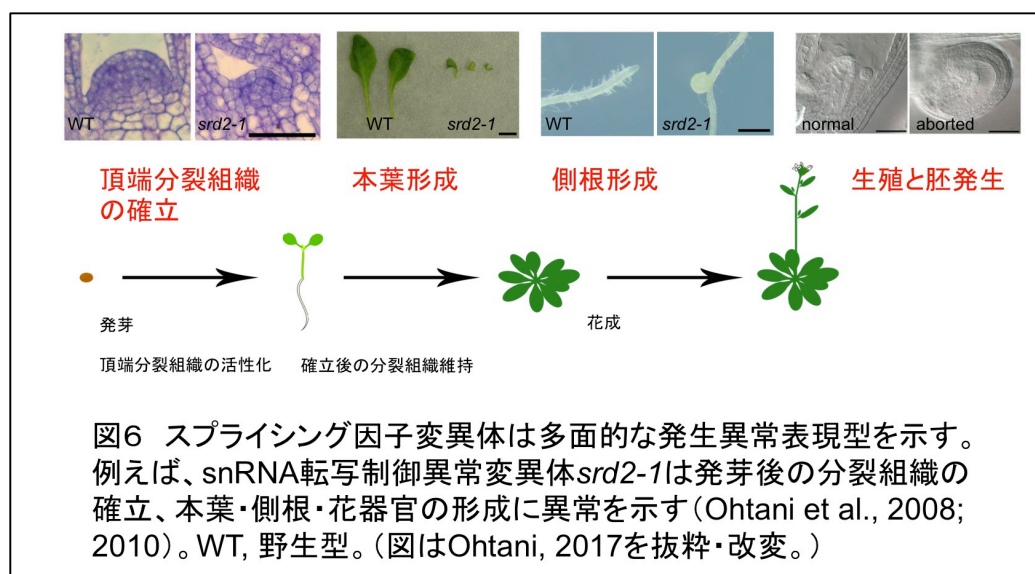
(SRD2) (Ohtani and Sugiyama, 2005) と U snRNP 生合成に重要と考えられている DEAH 型 RNA ヘリカーゼ ROOT INITIATION DEFECTIVE1 (RID1) (Ohtani et al. 2013) (これらの変異体の詳細は 3-3. で後述する) のノックアウト変異体においても, 同様に雌性配偶体致死の表現型を示すことが分かっている (図 5)。また, GFA1/CLO は LIS を含む複数のスプライシング因子の発現制御に機能していること (Moll et al. 2008), RID1 は前述の GFA1 と直接相互作用して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

ダウン変異体では、雌性配偶体、花粉形成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* の点変異アレル *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 の点変異アレルである *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一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である。*vaj-1*, *srd2-1* および *rid1-1* 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レ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 (*GEAL/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。一つには生物的・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。

生物学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、例えば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

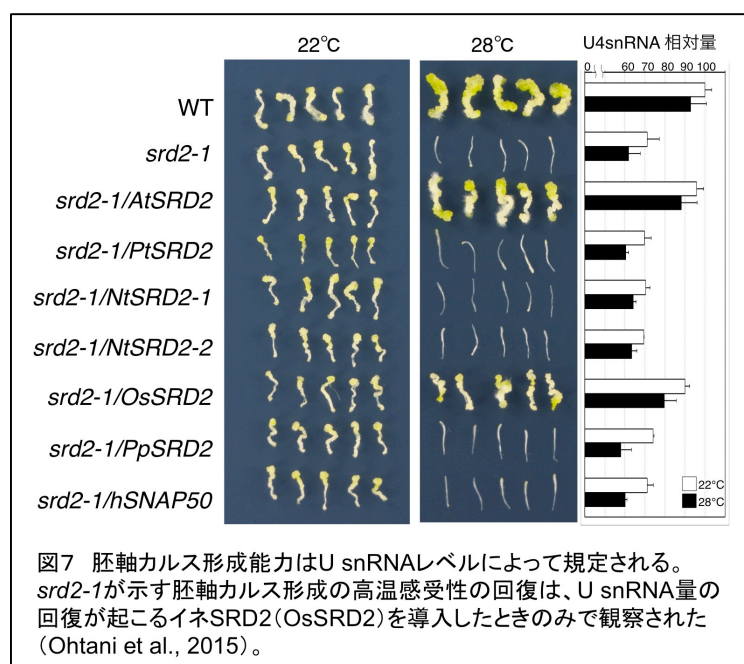
全に相補的な配列をもっており、2つのクラスのスプライシングバリエントが知られているが、どちらが優勢になるかによって、*FLC* の発現量が決定されうる (Swiezewski et al. 2009, Marquardt et al. 2014, Wang et al. 2014)。さらに別の MADS 転写因子である *SHORT VEGETATIVE PHASE (SVP)* や *FLOWERING LOCUS M (FLM)* などの遺伝子も温度依存的な選択的スプライシング制御を受けることが知られており、温度情報とスプライシング制御の分子的关系性は未解明な点も多いものの、花成制御におけ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 *rid1-1* 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 *rid1-1* 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* は根断片からのシュート再生が、*rid1-1* は胚軸断片からの不定根形成が、それぞれ高温 (27~28°C) で異常になる (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、シュート再生に関する詳細解析の結果、*srd2-1* と *rid1-1* 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・側根形成およびシュ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 (正確に言えば細胞分裂の再開) と根・シュ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、特異的な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 *rid1-1* 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 *rid1-1* 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ニ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)。

ヒトの SRD2 ホモログは hSNAP50 とよばれ, snRNA activating protein complex (SNAPc) タンパク質複合体のサブユニットの1つである (Mittal et al. 1999, Hernandez 2003, Ohtani 2017)。SNAPc は動植物に共通して保存されている snRNA 転写装置であり, 比較解析から SNAP190, SNAP50, SNAP43 の3つのタンパク質がコアとなって, snRNA 遺伝子のプロモーター領域に存在する特異的なシス配列を認識し, snRNA 転写を

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* 遺伝子プロモーター下で発現させ, *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 (AlShareef 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 *rid1-1* 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る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っ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, Gueroussov 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, Jarmołowski 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, Komblitt 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 exons 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

- 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, Hiroshima 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, Kornblihtt 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

- 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 pleiotropic 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, Lüthmann 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) VAI/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.