

令和元年6月19日現在

機関番号：12102

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2015～2018

課題番号：15K18550

研究課題名(和文) 長鎖非コードRNAは如何に転写因子を制御するか：実生時ストレス応答機構をモデルに

研究課題名(英文) Noncoding RNA regulation of transcription factor: early seedling stress response as an example

研究代表者

木下 奈都子 (Kinoshita, Natsuko)

筑波大学・生命環境系・助教

研究者番号：80716879

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：温暖化や水不足によって経済的に重要なアブラナ科作物の栽培適地の減少が予測される。このため分子育種による生産安定化に期待が寄せられる。一方で、近年の転写物解析の進歩に伴い、長鎖非コードRNAが転写を制御していることが分かった。既にヒト疾患との関与が示されていることから、植物の形質発現への重要性が予想されるが、植物における長鎖非コードRNAの機能は殆ど未知である。本研究では、シロイヌナズナでNPC60という長鎖非コードRNAが環境ストレスに応答していることを示す結果を得た。長鎖非コードRNAの核局在性を生きている細胞で簡単に解析できる技術を開発し、NPC60 RNAが核に局在することを示した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

大部分の長鎖非コードRNAが核内でトランスに機能していることが推測されているにも関わらず、ハイスループットでRNAの核局在性を生きた植物細胞で解析する技術が今まで存在しなかった。本研究では、形質転換植物を経由することなく一過性の発現システムで解析することができる手法を開発した。形質転換された細胞はビジュアルマーカーで判別する。さらに、一過的発現系では結果までに要する時間が短いことからハイスループットに適していると考えられる。長鎖非コードRNAの詳細な分子メカニズムを明らかにすることで、新しい分子育種の基盤的知見が得られる。

研究成果の概要(英文)：Global warming and lack of water are expected to reduce the cultivation area of economically important cruciferous crops. For this reason, the production stabilization by molecular breeding is expected. On the other hand, with the recent progress in transcript analysis, it was found that long non-coding RNAs regulate transcription. Although the involvement in human diseases has already been shown, the importance for plant trait expression is expected, but the function of long non-coding RNA in plants is almost unknown. In this study, in *Arabidopsis thaliana*, we obtained results indicating that NPC60, a long non-coding RNA, responds to environmental stress. Furthermore, we developed a technique for analyzing the nuclear localization of long noncoding RNAs in living cells easily, and showed that NPC60 RNA is localized in the nucleus.

研究分野：植物生理

キーワード：長鎖非コードRNA

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19、CK - 19 (共通)

## 1. 研究開始当初の背景

地球環境の変化による栽培適地の減少に伴い、アブラナ科作物などの環境ストレス耐性改善が重要になる。通常の育種では時間がかかるので分子育種が期待されている。そのため基盤を整備する必要がある。最近の研究で、長鎖非コード RNA (lncRNA: long non-coding RNA) が、「遺伝子」の機能はコードされるタンパク質が担っているということがわかってきた。そこで本研究では、lncRNA を介した環境ストレスの機能メカニズムの解明によって、環境ストレス耐性のための基盤的知見が得られると期待できる。

哺乳類のゲノム解析によると、ゲノム中でタンパク質をコードしている部分はわずか 1.5% にしか過ぎないのに関わらず、ゲノム上の 70% が転写されている (Lee, 2012)。この事実は転写産物の大部分が長鎖非コード RNA (lncRNA: long non-coding RNA) によって占められていることを示しているが、ほとんどの lncRNA に関してはその機能が未知である。

植物における長鎖非コード RNA (lncRNA) に関しては、代表的なものとして花成抑制遺伝子 *FLC* にシスに作用する 2 種類の非コード RNA (*FLC* アンチセンス RNA の *COOLAIR* と *FLC* イントロン由来の RNA、*COLDAIR*) が知られている (Swiezewski et al, 2009; Heo et al, 2011)。しかし、トランスに作用する例は申請者が知る限り未だ報告されていない。

lncRNA とは通常、(1) 200 塩基以上、(2) 100 アミノ酸以上をコードする ORF を含まない、(3) 既知の遺伝子から少なくとも 500 塩基以上離れていると定義される (Liu et al, 2012)。(前述の *COOLAIR* と *COLDAIR* は *FLC* 遺伝子と重複するため、lncRNA ではない。) 申請者は研究室内外のデータベースを探索し、塩ストレスで誘導される *NPC60* に着目した (Ben Amor et al., 2009)。

固着生活を営む植物は、変動する環境に柔軟にตอบสนองするための様々な分子メカニズムを持っていると考えられている。実際、登熟種子では、乾燥種子という極度の乾燥状態でも胚が生存するための乾燥耐性機構が存在する。乾燥種子では、親水性タンパク質の高蓄積などのメカニズムによって、水分含量が 9 割程度低下した状況下でも胚珠が生存し、水分と光条件が適した状態では発芽できる状態を保っている。一方、発芽後は植物の生活環の中で最も乾燥に弱い時期の一つである。そこでは、まわりの水分環境が発芽に適しているかどうかを判断するチェックポイントが存在する。仮にこのチェックポイントで乾燥ストレスが感知された場合、植物は ABA 依存的に種子登熟時の乾燥耐性機構を作動し、生長を停止する。**生長停止状態の芽生えは、高い塩・乾燥ストレス耐性を保持している。** 申請者らは、bZIP 型転写因子である ABI5 が 環境ストレスにตอบสนองして発現し、チェックポイントで正の因子として機能し、核内斑点 (Nuclear Body) に局在することを明らかにしている (Lopez-Molina, Kinoshita et al, Genes & Dev 2003; Perruc, Kinoshita et al, Plant J. 2007; Piskurewicz, Kinoshita et al, Plant Cell 2008; Kinoshita et al, Plant and Cell Physiol 2010)。

## 2. 研究の目的

本研究では、塩・乾燥等の環境ストレス応答において新規なストレス応答メカニズムを見出す事を目的とし、非コード RNA に着目した。非コード RNA には、大きく分けて低分子 RNA と長鎖非コード RNA が存在する。長鎖非コード RNA には、タンパク質をコードする mRNA

に対してアンチセンス型、センス型がある。さらに、タンパク質をコードする従来の遺伝子と重複しない長鎖非コード RNA が存在する。本課題では、環境ストレス誘導型長鎖非コード RNA に着目し、その発現パターンと下流候補遺伝子の発現パターンの解析を行った。機能解析においては、実生時におけるストレス依存性生長抑制機構をモデルとして用いた。この時期は、植物が従属栄養から独立栄養へと移行する時期であり、植物のライフサイクルの中で最も環境ストレスに弱い時期の一つである。実生がこの時期に環境ストレスに遭遇すると生長を抑制し、ストレス耐性を獲得する。この過程で長鎖非コード RNA が機能しているのか、このプロセスにおける鍵転写因子 ABI5 とはどのように関係しているのか、についても解析を行った。

### 3. 研究の方法

環境ストレスに応答した転写産物の解析では、野生型とノックダウン、ノックアウト系統を用いて、RNA の蓄積量を定量 PCR 法によって解析した。さらに、RNA の全長を確認するためには、葉と花に由来する組織から RNA を抽出し、ノザンプロットングを行った。塩・乾燥ストレスなどの環境ストレスとして、高浸透圧ストレス(マニトール)、高塩濃度ストレス(0-250 mM NaCl)、環境ストレス応答で中心的な役割を担う植物ホルモンであるアブシジン酸(0-5  $\mu$ M)を用いて、濃度依存的な発現解析を行った。

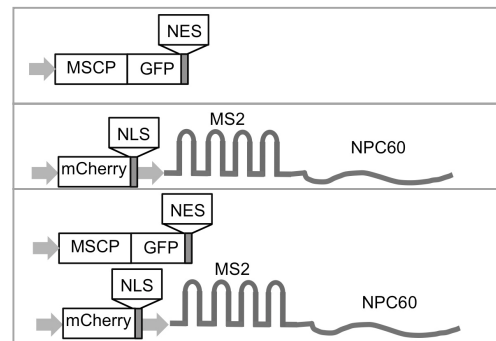


図1 上、NPC60 に結合している MS2 RNA 配列に親和性を持つ MSCP は NES(nuclear exporting signal)を付与した GFP に結合しているので MS2 配列が存在しない場合は核外に局在し、GFP で検出できる。中、MS2-NPC60 を発現している細胞は mCherry で識別できるとともに mCherry は NLS(Nuclear Localizing Signal)を付与しているので核のマーカーでもある。下、MSCP-GFP と MS2-NPC60 を共発現し、GFP シグナルが核で検出されると NPC60 は核に局在すると考えられる。

NPC60 の細胞内局在性を明らかにするために、細胞質 RNA 用のステムループ RNA (MS2) と MS2 結合タンパク質(MSCP:MS2 coupling protein)による *in vivo* RNA 可視化法(Schonberger et al., 2012)を改変し、核内 RNA を *in vivo* で可視化した。改変システムでは、核内での非特異的ノイズを減らすために MSCP には Nuclear Exit Signal (NES) を付与した GFP を結合した。したがって MS2 が存在しない場合、GFP は核外で検出される。一過性発現システムは、ホストとして *Nicotiana benthamiana* を用い、DNA の導入はアグロバクテリウムを利用した。蛍光タンパク質の解析は、共焦点レーザー顕微鏡を用いて行った。

### 4. 研究成果

まず、ノザン解析で期待される長さの RNA が検出されることを確認した。塩ストレスは、高浸透圧ストレスや水ストレスに応答するホルモンであるアブシジン酸(ABA)の経路と重なっていることから、ABA や高浸透圧ストレスにおける NPC60 RNA レベルの変化を解析した。その結果、NPC60 の RNA レベルは塩・高浸透圧ストレス及び ABA に応答して急上昇することを確認した。よって NPC60 は塩・高浸透圧ストレスおよび ABA に共通して応答する lincRNA だと考えられた。特に発芽時では、環境ストレス耐性を司る bZIP 型鍵転写因子である ABI5 と類似した ABA や高濃度ストレスに応答した発現レベルの上昇を示す。より注意深くそのタイミングを解析すると、NPC60 の RNA は ABI5 のそれに先行して蓄積し、NPC60

の蓄積量が減少するにつれて、ABI5 mRNA の蓄積量が上昇した。

次に NPC60 がどの組織で発現しているのかを調べるために葉と花の組織から抽出した RNA を用いて器官特異的な発現レベルを解析した。NPC60 は花組織に高発現していた。芽生え時の環境ストレス応答機構は、胚発生の過程を再起動させていることを考えると、NPC60 が芽生え時の環境ストレス応答機構で発現していることとも合致していた。

bZIP 型の転写因子である ABI5 は核に局在することが知られている。そこで、NPC60 RNA が果たして核に局在するのかどうか、解析を行った。その際、生きた細胞で核に局在する RNA を簡便な方法で可視化する技術がなかったことから、その開発を行った。まず、既存の細胞質局在性の RNA を可視化するプローブである核局在性シグナル(Nuclear localizing signal)を付加された緑色蛍光タンパク質と RNA 結合タンパク質である MSCP のキメラタンパク質に関して、核局在シグナルを核外排出シグナルに変更した。これにより、プローブのタンパク質が常時細胞質へ排出され、核内でのバックグラウンドシグナルを軽減することができた。さらに、RNA 側である MSCP と親和性のある MS2 と目的 RNA を融合したキメラ RNA を発現する DNA カセットに、植物系統を選抜する除草剤耐性遺伝子の代わりに、(RNA とは異なる転写フレームで)核局在シグナルである NLS と mCherry の融合タンパク質のユニットを導入した。mCherry は、一過性発現システムで技術的な問題となる、形質転換済みの細胞のマーカーとなるほか、NLS が付加されているため、核のマーカーとしても機能する。このシステムを用いて NPC60 の核局在性を解析したところ、核へ局在することが確認できた。本システムは、形質転換体を作成せずに一過性で RNA の核局在性を解析することができるため、lncRNA のハイスループットな解析へ貢献できる技術だと考えられる。

## 5 . 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計 2 件)

Kinoshita, N.<sup>#</sup>, Arenas, C., Chua, N-H<sup>#</sup>. Visualizing nuclear-localized RNA using transient expression system in plants. *Genes to Cells* 23:101-105 (2017) <sup>#</sup>Co-corresponding author

Kinoshita, N.\*, Sugita, A., Lustig, B., Betsuyaku, S., Fujikawa, T., Morishita, T. **Automating measurements of fluorescent signals in freely moving plant leaf specimens** *Plant Biotechnology* 36, 7–11 (2019) \* corresponding author

〔学会発表〕(計 1 件)

Kinoshita, N., Arenas, C., Chua, N-H. NON PROTEIN CODING (NPC) 60 is a Nuclear Localized Negative Regulator for ABA dependent growth inhibition acting through ABI5 第39回日本分子生物学会 (2015年12月)

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 2 件)

名称：画像処理装置、画像処理システム及び画像処理プログラム

発明者：木下奈都子

権利者：木下奈都子

種類：特願  
番号：2017-205564  
出願年：2017  
国内外の別： 国内

名称：植物のストレスの検出方法及び植物における発光タンパク質の検出方法

発明者：木下奈都子  
権利者：木下奈都子  
種類：PCT

番号：PCT/JP2018/039554  
出願年：2018  
国内外の別： 国外

取得状況（計 0 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年：  
国内外の別：

〔その他〕  
ホームページ等

## 6 . 研究組織

### (1)研究分担者

研究分担者氏名：

ローマ字氏名：

所属研究機関名：

部局名：

職名：

研究者番号（8桁）：

### (2)研究協力者

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

研究協力者氏名：

ローマ字氏名：

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。