

# 論文の内容の要旨

## 論文題目

### Characterization of small RNAs in the liverwort, *Marchantia polymorpha*

(苔類ゼニゴケ (*Marchantia polymorpha*) における small RNA の機能解析)

Masayuki Tsuzuki

都 筑 正 行

#### 【背景と目的】

植物において 20-24 塩基長の small RNA が発生や環境応答に重要な役割を持つことが広く知られるようになった。中でも内在性の small RNA である microRNA (miRNA) は、相補的な塩基配列を持つ遺伝子 mRNA を標的として、その発現を負に抑制することで、植物の発生制御に大きく関与している。近年の次世代シーケンサーの発展により、様々な植物種のゲノム塩基配列の解読、および small RNA の網羅的な同定が進み、一部の miRNA がコケ植物から双子葉植物まで広く保存されていること、およびその種を超えた重要性が示唆されてきた。そこで、本研究では陸上植物における small RNA の機能を探索するべく、陸上植物の進化上の基部に位置するとされるコケ植物タイ類ゼニゴケ (*Marchantia polymorpha*) を用いて、small RNA の網羅的同定、および遺伝学的な機能解析を行なった。

ゼニゴケは、近年ドラフトゲノムの解読が完了しつつあり、また形質転換法などの遺伝子操作技術も急速に進展しつつあるモデル植物である。比較ゲノム解析などから、ゼニゴケの分子遺伝学的な特徴として、陸上植物に特徴的な遺伝子を備えつつ、転写因子等の遺伝子座数が顕著に少ないことがわかっている。miRNA 遺伝子座数も少ないことが予想され、miRNA の多くが重複している最も用いられるモデル陸上植物シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) 等の研究では明らかにならなかった miRNA の役割が明かされることが期待される。

#### 【結果 I】ゼニゴケにおいて発現している small RNA の網羅的な同定

(結果 I-1) ゼニゴケは 3 つの *DICER-LIKE* (*DCL*) 遺伝子と 3 つの *ARGONAUTE* (*AGO*) 遺伝子をゲ

ノム上に持っている

本研究ではまずゼニゴケドラフトゲノムおよび EST 情報を用いた相同性検索を行い、small RNA の生合成を担う DCL タンパク質、small RNA と RNA-induced silencing complex (RISC)複合体を形成し、実際に作用するエフェクターである AGO タンパク質をコードする遺伝子を探索した。その結果、シロイヌナズナのものとの相同性の高い遺伝子が、それぞれ *DCL* 遺伝子が 3 種類、*AGO* 遺伝子が 3 種類同定され、これらを *MpDCL1*、*MpDCL3*、*MpDCL4*、および *MpAGO1*、*MpAGO4a*、*MpAGO4b* と名付けた。この結果は、陸上植物に主に存在している 3 種類の経路である、miRNA、posttranscriptional gene silencing-siRNA (PTGS-siRNA)、heterochromatic-siRNA (hc-siRNA)の経路に必要なタンパク質群が揃っていること、ゼニゴケにおいても small RNA が機能を持つことが示唆された。

〈結果 I-2〉 small RNA シーケンシングによる網羅的同定-ゼニゴケは 9 種類の保存された miRNA を持っており、多くの遺伝子座数は 1、2 つである

次に、ゼニゴケにおいて発現している small RNA を網羅的に同定するため、次世代シーケンサーによって、ゼニゴケ葉状体、雄器床、雌器床のそれぞれの器官から small RNA を精製し、small RNA シーケンスを行なった。得られたシーケンスデータと、京都大学河内孝之研究室より提供を受けたゼニゴケドラフトゲノム、および EST データを用いて、small RNA 解析用プログラム「ShortStack」による解析を行なった。その結果、ゼニゴケゲノム上の small RNA クラスター、および推定 miRNA、siRNA 遺伝子座が得られた。双子葉類シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*)、コケ植物セン類ヒメツリガネゴケ (*Physcomitrella patens*) との間で保存された、9 つの miRNA (miR160、166、171、319、390、408、529、536、1030) がゼニゴケにおいて発現していることがわかった (図 1A)。驚いたことに、ほぼ全ての陸上植物に保存されていると考えられていた miR156 は、ゲノム上に miR156 の配列はあるにも関わらず、発現が検出できなかった。EST データ上に miR156 の存在するゲノム領域を含むものが見られないことから、miR156 がゼニゴケにおいて発現していない可能性が高い。また、これらの保存された miRNA 遺伝子座は、1 つか 2 つである場合が多かった。これは、他の陸上植物において、miRNA 遺伝子座が重複しやすいという傾向に反しており、ゼニゴケゲノムの遺伝子冗長性の低さが miRNA においてもみられることを示すものである。加えて、シーケンス解析により、ゼニゴケには多くの保存されていない新規 miRNA が発現していることもわかった。本研究では新規 miRNA を 213 ファミリー同定した。

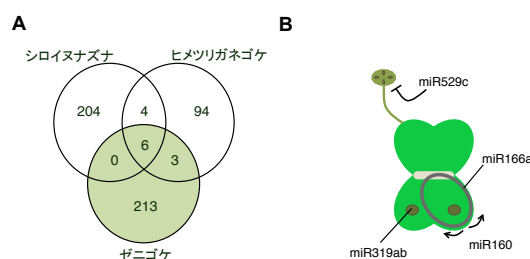


図1 (A) small RNAシーケンシングによって見つかったゼニゴケmicroRNAと、シロイヌナズナ、ヒメツリガネゴケとの保存度の比較を表したベン図。(B) miRNAによるゼニゴケ発生制御のモデル図。

〈結果 I-3〉ゼニゴケにおいて保存された miRNA は、標的となる遺伝子も保存されている

続いて、ゼニゴケにおいて miRNA が標的としている遺伝子を推定した。その結果 miR160/MpARF3、miR166/MpHD-ZIPIII、miR319/MpMYB33-like、miR529c/MpSPL2 の 4 種類の miRNA/標的遺伝子の関係を同定した。これらは RACE 解析により実際に mRNA が切断されていることも確認できたことから、陸上植物において保存度の高い miRNA は、標的遺伝子側の結合部位の塩基配列も保存されていることがわかった。

〈結果 I-4〉ゼニゴケ SPL 遺伝子群は、miR529c と新規に同定された miRNA (Mpo-MR-13) とによって、2 種類の抑制を受けている

シーケンス解析によって同定された新規 miRNA のうち、4 種類の miRNA は転写因子を標的としていることが予測された。このうち、Mpo-MR-13 と名付けられた新規 miRNA は、ゼニゴケ MpSPL1 遺伝子を標的にしていることが RACE 解析により確認された。MpSPL2 が miR529c によって標的にされていることと合わせて、ゼニゴケの 2 つの SPL 遺伝子、MpSPL1 と MpSPL2 は、それぞれ独立に Mpo-MR-13 と miR529c による抑制を受けていることが示唆された。

## 【結果 II】ゼニゴケ miRNA の遺伝学的な解析

〈結果 II〉保存された miRNA (miR160、miR166、miR319、miR529c) は、葉状体の正常な展開、杯状体の発生、生殖成長期への転換の抑制に重要な役割を持つ

small RNA シーケンス解析によって、ゼニゴケにおいて発現している miRNA が網羅的に同定された。次に、これらの miRNA の中で、他の陸上植物との間で保存された miRNA が実際にゼニゴケにおいてどのような機能を持つのかを解析した。アグロバクテリウムを介した形質転換によって、4 種類の miRNA (miR160、166、319、529c) に関して、miRNA 過剰発現体の作出、およびゲノム編集技術である CRISPR/Cas9 による miRNA 変異体の作出を行なった。その結果、これらの miRNA の発現が上昇、あるいは減少した個体が、顕著な形態異常の表現型を示した (図 1B)。miR160 自身に挿入が入った変異体は、葉状体の湾曲を示した。CRISPR/Cas9 により miR166a が欠失した変異体は、MpHD-ZIPIII 遺伝子 mRNA の発現上昇、および葉状体の異常な矮小化、棒状化などの表現型を見せた。miR319a および b 遺伝子に変異が見られた個体は、MpMYB33-like 遺伝子 mRNA の発現上昇は見られなかった一方で、杯状体の欠失などの表現型を示した。また、miR529c 遺伝子に欠損が入った個体が葉状体の雄器床様の形状への変化という表現型を示したことから、miR529c が通常遠赤外線照射等の環境変化に応答して起こる生殖成長期への移行を抑制していることが示唆された。これは、シロイヌナズナなどの種子植物において、miR156 が SPL 遺伝子の発現抑制を通じて、生殖成長期への移行を抑制していることと相似しており、miRNA による SPL 遺伝子の抑制が陸上植物に普遍的な役割をもつことを示唆するものである。

## 【結論と展望】

本研究により、陸上植物の基部に属するゼニゴケには9つの保存された miRNA が存在していること、またこれらの遺伝子座が非常に少ないことが明らかになった。また、miRNA 過剰発現体の作出、および冗長性の低さを利用したゲノム編集技術による変異体作出を行い、ゼニゴケの発生において miRNA が非常に重要な役割を持つことを示した。ゼニゴケはまだ分子遺伝学的な研究の蓄積は少ないものの、その遺伝子冗長性の低さ、遺伝子操作の容易さを活かして、植物分子遺伝学の推進に進化的な側面から大きく寄与する可能性を持つモデル植物である。miRNA による遺伝子発現制御機構は、陸上植物の発生に普遍的に重要な役割を持つことも他の陸上植物と同様あるいは互いの差異も明らかになった。今後、種子植物とコケ植物間の生活環の違いなどの観点から、miRNA の役割が明らかになる可能性があるだろう。今後とも本研究で明らかになった標的転写因子の遺伝子座数と miRNA の遺伝子重複の少なさを利用して、陸上植物に普遍的な miRNA-遺伝子ネットワークについてさらなる解明を行いたい。