

博士論文

植物の RNA 分解複合体 exosome を構成する RRP44/DIS3 の解析

**Analysis of Plant RRP44/DIS3, a component of the RNA Exosome**

熊倉直祐

**Naoyoshi Kumakura**

## 目次

略語 .....	1
第 1 章 序論 .....	4
1-1 背景 .....	4
1-1-1 RNA 分解経路の重要性 .....	4
1-1-2 RNA exosome の発見 .....	5
1-1-3 RNA exosome の構成因子 .....	5
1-1-4 RNA exosome グループ 1: exosome core .....	5
1-1-5 RNA exosome グループ 2: Rrp6 と Rrp44/Dis3 .....	6
1-1-6 <i>Arabidopsis thaliana</i> ( <i>A. thaliana</i> ) の exosome core .....	6
1-1-7 <i>A. thaliana</i> の RRP6 .....	7
1-1-8 <i>A. thaliana</i> の RRP44/DIS3 は未同定である .....	8
1-2 研究の目的と結果の概要 .....	8
第 2 章 結果 .....	10
2-1 植物の RNA exosome の候補因子 AtRRP44A と AtRRP44B/SOV の解析 .....	10
2-1-1 本節 (2-1) の目的 .....	10
2-1-2 <i>A. thaliana</i> の Rrp44/Dis3 候補遺伝子としての AtRRP44A と AtRRP44B/SOV .....	10
2-1-3 表現型観察のための AtRRP44A ノックダウン変異体の確立 .....	11
2-1-4 AtRRP44A は 5.8S rRNA のプロセッシングに関与する .....	14
2-1-5 AtRRP44A は 5' ETS の分解に関与する .....	15
2-1-6 AtRRP44A と AtRRP44B/SOV は <i>in vivo</i> で異なる RNA を制御する .....	16
2-1-7 AtRRP44A、AtRRP44B/SOV、exosome 因子はいずれも植物ウイルス (TCV と CMV) のゲノム RNA の蓄積に影響しない .....	18
2-1-8 AtRRP44A と exosome core はいずれも核に局在する .....	20
2-1-9 本節 (2-1) の結論: AtRRP44A は exosome 複合体の因子であり、AtRRP44B/SOV とは独立に RNA を制御する .....	20
2-2 AtRRP44A の <i>in vitro</i> 活性の確認および標的 RNA のトランスクリプトーム解析 .....	21
2-2-1 本節 (2-2) の目的 .....	21
2-2-2 AtRRP44A は exoribonuclease 活性を持つ .....	21

2-2-3 AtRRP44A はゲノムワイドに mRNA の蓄積量を制御する .....	23
第 3 章 考察.....	26
3-1 結果の概要 .....	26
3-2 AtRRP44A と AtRRP44B/SOV の解析 .....	26
3-3 AtRRP44A の <i>in vitro</i> 酵素活性解析 .....	30
3-4 トランスクリプトーム解析 .....	31
第 4 章 材料と方法 .....	33
4-1 タンパク質アミノ酸配列のアラインメントと系統樹解析 .....	33
4-2 プラスミドの作成 .....	34
4-2-1 pWAT208 .....	34
4-2-2 pWAT208-MASS-GUS .....	35
4-2-3 pWAT208-MIR390B .....	35
4-2-4 pNK009-pNK015 .....	35
4-2-5 pNK025 [pWAT3_P::RRP4-RRP4::Venus-Ter::RRP4] .....	36
4-2-6 pOH005.1 [pETM-11_AtRRP44A] .....	37
4-2-7 pOH008 [pETM-11_AtRRP44A (D132N,D158N)] .....	37
4-2-8 pOH009 [pETM-11_AtRRP44A (D489N)] .....	37
4-2-9 pOH007 [pETM-11_AtRRP44A (D132N,D158N,D489N)] .....	38
4-2-10 PCR4_CMVQ QR1 .....	38
4-3 植物ライン .....	38
4-4 植物の育成 .....	39
4-5 <i>A. thaliana</i> の形質転換 .....	39
4-6 プロモーターGUS アッセイ .....	40
4-7 RNA 抽出.....	40
4-8 ノーザンブロッティング .....	40
4-9 定量的リアルタイム PCR (qRT-PCR).....	42
4-9-1 カブクリンクルウイルス (TCV) の精製と接種.....	42
4-9-2 キュウリモザイクウイルス (CMV) の精製と接種 .....	43
4-10 RNA 分解活性アッセイ .....	45
1) リコンビナントタンパク質 .....	45
2) 基質 RNA.....	46
3) リコンビナントタンパク質による基質 RNA の分解シグナルの検出 .....	47
4-11 ウェスタンブロッティング .....	47

4-12 蛍光顕微鏡観察.....	48
4-13 RNA-seq .....	48
4-14 Gene Ontology (GO) 解析 .....	48
図 (25).....	50
表 (4).....	76
参考文献.....	87
謝辞 .....	95

## 略語

AGI	<u>A</u> rabidopsis <u>G</u> enome <u>I</u> nitiative
amiRNA	<u>a</u> rtificial <u>m</u> icro <u>R</u> NA
<i>A. thaliana</i>	<u>A</u> rabidopsis <u>t</u> haliana
ATP	<u>a</u> denosine <u>t</u> riphosphate
CAB	<u>c</u> hlorophyll <u>a</u> /b- <u>b</u> inding protein
cDNA	<u>c</u> omplementary <u>D</u> NA
CDS	<u>c</u> oding <u>s</u> equence
CMV	<u>C</u> ucumber <u>m</u> osaic <u>v</u> irus
Col-0	<u>C</u> olumbia- <u>0</u>
CP	<u>c</u> oat protein
DNA	<u>d</u> eoxyribo <u>n</u> ucleic <u>a</u> cid
DIS	<u>d</u> efective <u>i</u> n <u>s</u> ister chromatid disjoining
EDTA	<u>e</u> thylenediaminetetraacetic <u>a</u> cid
ETS	<u>e</u> xternal <u>t</u> ranscribed <u>s</u> pacer
FPKM	<u>F</u> ragments <u>P</u> er <u>K</u> ilobase of exon model per <u>M</u> illion mapped fragments
FDR	<u>f</u> alse <u>d</u> iscovery <u>r</u> ate
GABI-Kat	<u>G</u> enom <u>a</u> nalyse im <u>b</u> iologischen System Pflanze- <u>K</u> ölner <u>A</u> rabidopsis <u>T</u> -DNA lines
GK	<u>G</u> ABI- <u>K</u> at
GO	gene <u>o</u> ntology

GSEA	<u>gene</u> <u>set</u> <u>en</u> <u>richment</u> <u>a</u> <u>n</u> <u>a</u> <u>l</u> <u>y</u> <u>s</u> <u>i</u> <u>s</u>
GUS	$\beta$ - <u>glu</u> <u>c</u> <u>u</u> <u>r</u> <u>o</u> <u>n</u> <u>i</u> <u>d</u> <u>a</u> <u>s</u> <u>e</u>
<i>H. sapiens</i>	<i><u>H</u><u>o</u><u>m</u><u>o</u> <u>s</u><u>a</u><u>p</u><u>i</u><u>e</u><u>n</u><u>s</u></i>
HRP	<u>h</u> <u>o</u> <u>r</u> <u>s</u> <u>e</u> <u>r</u> <u>a</u> <u>d</u> <u>i</u> <u>s</u> <u>h</u> <u>p</u> <u>e</u> <u>r</u> <u>o</u> <u>x</u> <u>i</u> <u>d</u> <u>a</u> <u>s</u> <u>e</u>
IP	<u>i</u> <u>m</u> <u>m</u> <u>u</u> <u>n</u> <u>o</u> <u>p</u> <u>r</u> <u>e</u> <u>c</u> <u>i</u> <u>p</u> <u>i</u> <u>t</u> <u>a</u> <u>t</u> <u>i</u> <u>o</u> <u>n</u>
ITS	<u>i</u> <u>n</u> <u>t</u> <u>e</u> <u>r</u> <u>n</u> <u>a</u> <u>l</u> <u>t</u> <u>r</u> <u>a</u> <u>n</u> <u>s</u> <u>c</u> <u>r</u> <u>i</u> <u>b</u> <u>e</u> <u>d</u> <u>s</u> <u>p</u> <u>a</u> <u>c</u> <u>e</u> <u>r</u>
KD	<u>k</u> <u>n</u> <u>o</u> <u>c</u> <u>k</u> <u>d</u> <u>o</u> <u>w</u> <u>n</u>
mRNA	<u>m</u> <u>e</u> <u>s</u> <u>s</u> <u>e</u> <u>n</u> <u>g</u> <u>e</u> <u>r</u> <u>R</u> <u>N</u> <u>A</u>
MRP	<u>m</u> <u>i</u> <u>t</u> <u>o</u> <u>c</u> <u>h</u> <u>o</u> <u>n</u> <u>d</u> <u>r</u> <u>i</u> <u>a</u> <u>l</u> <u>R</u> <u>N</u> <u>A</u> - <u>p</u> <u>r</u> <u>o</u> <u>c</u> <u>e</u> <u>s</u> <u>s</u> <u>i</u> <u>n</u> <u>g</u>
MS	<u>M</u> <u>u</u> <u>r</u> <u>a</u> <u>s</u> <u>h</u> <u>i</u> <u>g</u> <u>e</u> <u>a</u> <u>n</u> <u>d</u> <u>S</u> <u>k</u> <u>o</u> <u>o</u> <u>g</u>
MTR	<u>m</u> <u>R</u> <u>N</u> <u>A</u> <u>t</u> <u>r</u> <u>a</u> <u>n</u> <u>s</u> <u>p</u> <u>o</u> <u>r</u> <u>t</u> <u>r</u> <u>e</u> <u>g</u> <u>u</u> <u>l</u> <u>a</u> <u>t</u> <u>o</u> <u>r</u>
PCR	<u>p</u> <u>o</u> <u>l</u> <u>y</u> <u>m</u> <u>e</u> <u>r</u> <u>a</u> <u>s</u> <u>e</u> <u>c</u> <u>h</u> <u>a</u> <u>i</u> <u>n</u> <u>r</u> <u>e</u> <u>a</u> <u>c</u> <u>t</u> <u>i</u> <u>o</u> <u>n</u>
pH	<u>p</u> <u>o</u> <u>w</u> <u>e</u> <u>r</u> <u>o</u> <u>f</u> <u>H</u> <u>y</u> <u>d</u> <u>r</u> <u>o</u> <u>g</u> <u>e</u> <u>n</u> <u>i</u> <u>o</u> <u>n</u> <u>c</u> <u>o</u> <u>n</u> <u>c</u> <u>e</u> <u>n</u> <u>t</u> <u>r</u> <u>a</u> <u>t</u> <u>i</u> <u>o</u> <u>n</u>
PIN	<u>P</u> <u>i</u> <u>l</u> <u>t</u> <u>N</u> <u>t</u> <u>e</u> <u>r</u> <u>m</u> <u>i</u> <u>n</u> <u>u</u> <u>s</u>
qRT-PCR	<u>q</u> <u>u</u> <u>a</u> <u>n</u> <u>t</u> <u>i</u> <u>t</u> <u>a</u> <u>t</u> <u>i</u> <u>v</u> <u>e</u> <u>r</u> <u>e</u> <u>a</u> <u>l</u> - <u>t</u> <u>i</u> <u>m</u> <u>e</u> <u>P</u> <u>C</u> <u>R</u>
RdRp	<u>R</u> <u>N</u> <u>A</u> <u>d</u> <u>e</u> <u>p</u> <u>e</u> <u>n</u> <u>d</u> <u>e</u> <u>n</u> <u>t</u> <u>R</u> <u>N</u> <u>A</u> <u>p</u> <u>o</u> <u>l</u> <u>y</u> <u>m</u> <u>e</u> <u>r</u> <u>a</u> <u>s</u> <u>e</u>
RI	<u>r</u> <u>a</u> <u>d</u> <u>i</u> <u>o</u> <u>i</u> <u>s</u> <u>o</u> <u>t</u> <u>o</u> <u>p</u> <u>e</u>
RNA	<u>r</u> <u>i</u> <u>b</u> <u>o</u> <u>n</u> <u>u</u> <u>c</u> <u>l</u> <u>e</u> <u>i</u> <u>c</u> <u>a</u> <u>c</u> <u>i</u> <u>d</u>
RNA-seq	<u>R</u> <u>N</u> <u>A</u> - <u>s</u> <u>e</u> <u>q</u> <u>u</u> <u>e</u> <u>n</u> <u>c</u> <u>i</u> <u>n</u> <u>g</u>
RRP	<u>r</u> <u>i</u> <u>b</u> <u>o</u> <u>s</u> <u>o</u> <u>m</u> <u>a</u> <u>l</u> <u>R</u> <u>N</u> <u>A</u> <u>p</u> <u>r</u> <u>o</u> <u>c</u> <u>e</u> <u>s</u> <u>s</u> <u>i</u> <u>n</u> <u>g</u>
RNB	<u>R</u> <u>N</u> <u>A</u> <u>b</u> <u>i</u> <u>n</u> <u>d</u> <u>i</u> <u>n</u> <u>g</u>
rpm	<u>r</u> <u>o</u> <u>t</u> <u>a</u> <u>t</u> <u>i</u> <u>o</u> <u>n</u> <u>p</u> <u>e</u> <u>r</u> <u>m</u> <u>i</u> <u>n</u> <u>u</u> <u>t</u> <u>e</u>

SAIL	<u>S</u> yngenta <u>A</u> rabidopsis <u>I</u> nsertion <u>L</u> ibrary
<i>S. cerevisiae</i>	<u>S</u> accharomyces <u>c</u> erevisiae
SDS	<u>s</u> odium <u>d</u> odecyl <u>s</u> ulphate
snRNA	<u>s</u> mall <u>n</u> uclear <u>R</u> NA
snoRNA	<u>s</u> mall <u>n</u> ucleolar <u>R</u> NA
SOV	<u>s</u> uppressor of <u>V</u> ARICOSE
SSC	<u>s</u> aline <u>s</u> odium <u>c</u> itrate
T-DNA	<u>t</u> ransfer <u>D</u> NA
TBE	<u>t</u> ris <u>b</u> orate <u>E</u> DTA
TCV	<u>T</u> urnip <u>c</u> rinkle <u>v</u> irus
TRAMP	<u>T</u> rf4- <u>A</u> ir1/2- <u>M</u> tr4p polyadenylation complex

# 第 1 章 序論

## 1-1 背景

### 1-1-1 RNA 分解経路の重要性

遺伝情報は DNA から DNA に複製され、DNA の持つ情報は RNA に転写され、この RNA の情報を用いてタンパク質が翻訳される。「セントラルドグマ」と呼ばれるこの概念は修正を経ながらも今なお分子生物学で広く受けられている (Crick, 1958)。発生過程や外界の環境などダイナミックに変化する状況に応じて細胞が生存するためには、タンパク質の発現が正確に制御されている必要がある。そのために細胞は遺伝子発現のための複雑で精密な機構を発達させてきており、それらは RNA の転写、スプライシング、ポリアデニル化、核外輸送、翻訳、そして分解をも含む。

細胞内の mRNA 代謝の制御において、分解は重要な要素の一つである。遺伝子ごとに mRNA の寿命は大きく異なっており、細胞周期の百分の一しかないものもあれば、いくつもの細胞周期をまたぐ長さのものもある。また mRNA によって、その寿命が環境変化に応じて大きく変化するものもあれば、ハウスキーピング遺伝子のように変化しないものもある。このように mRNA の分解を適切に制御することにより、細胞は転写物の量を素早く変化させる柔軟性を得ている。

真核生物にはこの RNA 分解を担う機構が数多くあり、RNA を端から分解する機構は 5'→3' RNA 分解経路と 3'→5' RNA 分解経路に大別される。5'→3' RNA 分解経路と 3'→5' RNA 分解経路を担う代表的なものとして、XRN ファミリーと RNA exosome が挙げられる。XRN ファミリーと RNA exosome はいずれも生存に重要な役割をもっており、これらの機能が欠損すると、動物、植物、真菌いずれにおいても重篤な表現型を示す。



### 1-1-2 RNA exosome の発見

細胞内の 3'→5' RNA 分解経路を担う RNA exosome は mRNA の分解のみならず、small nuclear RNA (snRNA)、small nucleolar RNA (snoRNA)、ribosomal RNA (rRNA) のプロセッシングも担う。RNA exosome は出芽酵母 (*S. cerevisiae*) で ribosomal RNA プロセッシングに関わる複合体として初めて同定された (Mitchell et al., 1997)。その2年後、RNA exosome がヒトの細胞において、自己免疫疾患の抗原として特定された PM/ScI 複合体と相同であることが明らかになった (Allmang et al., 1999b)。この PM/ScI 複合体の精製を通じて、RNA exosome 因子が全て同定された (Brouwer et al., 2000)。

### 1-1-3 RNA exosome の構成因子

RNA exosome (以下 exosome と記述) は真核生物において進化的に広く保存されたタンパク質複合体である。exosome は広範にわたる RNA を標的とし、機能性 RNA の成熟化や、RNA の品質管理、さらには mRNA の分解にも関与する。真核生物の exosome は 11 成分から構成され、これらの成分は機能と構造上の特徴から「基質の選択を担う exosome core グループ」と、「RNA 分解活性を担うグループ」の 2 つの主要なグループに分類される (Belostotsky, 2009; Chlebowsky et al., 2013; Houseley et al., 2006)。

### 1-1-4 RNA exosome グループ 1: exosome core

1 つ目のグループ「exosome core」は 9 個のタンパク質からなるリング状の構造を持つ (図 1)。Rrp41、Rrp42、Rrp43、Rrp45、Rrp46、Mtr3 (それぞれが RNase PH ドメインを

持つ) の 6 個の因子が 6 量体を形成し、その片側を Csl4、Rrp4、Rrp40 が三量体を形成して覆っている (図 1)。酵母では、exosome core の因子を一種類でも欠損させると rRNA のプロセッシングに異常がおこり、致死の表現型を示す (Allmang et al., 1999a; 1999b)。さらに X 線結晶解析によって、*H. sapiens* の exosome core の 9 種類の因子全てが、リング状構造の形成に必要であることが明らかとなっている (Liu et al., 2006)。

#### 1-1-5 RNA exosome グループ 2: Rrp6 と Rrp44/Dis3

*H. sapiens* と *S. cerevisiae* において、exosome core そのものは RNA 分解活性を持たず (Bonneau et al., 2009; Liu et al., 2006)、RNA 分解活性は Rrp6 と Rrp44/Dis3 となる第二のグループが担っている。Rrp6 と Rrp44/Dis3 はいずれも exoribonuclease 活性を持つ。Rrp6 は出芽酵母 (以降 *S. cerevisiae* と記述) においては核内に局在するが、ヒト (以降 *H. sapiens* と記述) の細胞内では核と細胞質の両方に見られる (Lykke-Andersen et al., 2011)。Rrp44/Dis3 は exoribonuclease 活性と endoribonuclease 活性の両方を持ち、*S. cerevisiae* と *H. sapiens* では exosome の活性に必須である。*S. cerevisiae* は Rrp44/Dis3 を失うと、その他の exosome core サブユニットの欠損時と同様に、致死となる。

#### 1-1-6 *Arabidopsis thaliana* (*A. thaliana*) の exosome core

*A. thaliana* においては、Chekanova らがエピトープタグを付加した AtRRP4 と AtRRP41 (いずれも *S. cerevisiae* exosome core 因子のホモログ) を用い、exosome core の保存された 9 種類のサブユニットを同定した。さらにこれらの因子は植物の生存に必須であり (CSL4 を除く)、一部の mRNA、miRNA の合成中間体、non-coding

RNA を含む広範囲の RNA を標的とすることが報告された (Chekanova et al., 2007; 2000)。Exosome core 因子は植物の生存の様々な側面で必要とされることが知られている。遺伝学的手法によって、クチクラロウの合成に異常が生じる変異の原因遺伝子として exosome core を構成する AtRRP45B が報告されたことから、exosome core がクチクラロウの合成を制御する遺伝子の転写物の蓄積を制御するというモデルが提唱されている (Hooker et al., 2007; Lam et al., 2012)。一方、植物の exosome core を構成する別の因子、AtRRP41L (AtMTR3) の変異体は種子の成熟や芽生えの発生で重要な役割を持つ (Yang et al., 2013)。さらに、AtRRP4 と AtRRP41 の解析によって、植物の exosome がヘテロクロマチン部位の siRNA 非依存的なサイレンシングに関与することも知られている (Shin et al., 2013)。

#### 1-1-7 *A. thaliana* の RRP6

*A. thaliana* は、exosome の第二のグループに属する Rrp6 も持っている。Lange らによって、*A. thaliana* は AtRRP6L1、AtRRP6L2、AtRRP6L3 の 3 種類の Rrp6 ホモログを持つことが明らかにされた (Lange et al., 2008)。AtRRP6L1 と AtRRP6L2 はいずれも核内に局在し、AtRRP6L3 は細胞質に局在する。AtRRP6L1 は *H. sapiens* と *S. cerevisiae* の Rrp6 がもつ PMC2NT ドメインを持ち、*S. cerevisiae* の *rrp6* 欠損変異株の成長が遅くなる表現型を相補することができる。AtRRP6L2 は rRNA 成熟過程で生じる副産物の分解に関与する。この副産物の蓄積は exosome 欠損時の典型的な表現型である (Lange et al., 2008)。

### 1-1-8 *A. thaliana* の RRP44/DIS3 は未同定である

以上のように *A. thaliana* においても exosome を構成する exosome core と、Rrp6 ホモログの機能が同定されている。しかしながら、exosome の活性中心を担うとされる Rrp44/Dis3 の *A. thaliana* におけるホモログは未だに同定されていない。ゲノム情報の解析によって、*A. thaliana* には AtRRP44A と AtRRP44B/SOV (Suppressor of VARICOSE) の 2 種類の Rrp44/Dis3 ホモログ候補が予想されている (Chekanova et al., 2007; Zhang et al., 2010)。先行研究によって、AtRRP44B/SOV は細胞質内の顆粒状構造に局在し、mRNA 分解に関わることが示唆されている。さらに AtRRP44A の T-DNA 挿入変異体は致死の表現型を示す (Zhang et al., 2010)。しかしながら、AtRRP44A と AtRRP44B/SOV のいずれが *A. thaliana* における exosome 因子なのかは未解明である。

### 1-2 研究の目的と結果の概要

本研究では、植物の Rrp44/Dis3 遺伝子を決定するため、AtRRP44A と AtRRP44B/SOV の解析を行った。AtRRP44A と exosome core 因子の AtRRP4 と AtRRP41 の変異体解析をおこない、AtRRP44A と exosome core が同じ標的 RNA を分解、またはプロセッシングすることが新たに判明した。また AtRRP44A と exosome core の細胞内局在を観察したところ、いずれも核への同じ局在パターンを示した。一方、AtRRP44B/SOV は AtRRP44A や exosome core とは異なる RNA を標的とし、変異体の表現型も異なっていた。これらの結果は、AtRRP44B/SOV は exosome とは独立に RNA 分解に関与すること、AtRRP44A が *A. thaliana* における exosome 因子であることを強く示唆する。以上の結果を 2-1 で報告する。

2-2 では植物の RNA exosome 因子として、AtRRP44A の詳細な解析を行った。まず AtRRP44A の RNA 分解活性を検証した。その結果、AtRRP44A リコンビナントタンパク質は *in vitro* で RNA 分解活性を持つことが明らかとなった。また AtRRP44A のアミノ酸置換変異型タンパク質を用いた実験によって、AtRRP44A の RNA 分解活性中心は 489 番目のアミノ酸 (D489) が担うことを明らかとした。次に RNA 分解活性を持つ AtRRP44A が、*in vivo* で標的とする RNA 探索するため、AtRRP44A ノックダウン植物を用いてトランスクリプトーム解析を行った。その結果 *A. thaliana* がもつ全遺伝子の約 0.7% に相当する 181 遺伝子の蓄積に統計学的に有意な変化が見られた。興味深いことに、蓄積が変化した 181 遺伝子群の性質を Gene ontology (GO) 解析によって調べたところ、概日リズムと光合成に関わる遺伝子群が顕著に多く含まれていた。

以上の結果は、AtRRP44A が RNA 分解を介して、植物の概日リズムや光合成を制御することを示唆する。

## 第 2 章 結果

### 2-1 植物の RNA exosome の候補因子 AtRRP44A と AtRRP44B/SOV の解析

#### 2-1-1 本節 (2-1) の目的

*H. sapiens* や *S. cerevisiae* において Rrp44/Dis3 は exosome の RNA 分解活性中心を担う (Dziembowski et al., 2007; Liu et al., 2006)。しかしながら、植物における Rrp44/Dis3 ホモログは未だ同定されていない。本節では植物の Rrp44/Dis3 ホモログの同定を目的とし、候補遺伝子である AtRRP44A と AtRRP44B/SOV の変異体表現型解析、分子生物学的手法を用いた標的 mRNA の解析、細胞内局在解析を行った。

#### 2-1-2 *A. thaliana* の Rrp44/Dis3 候補遺伝子としての AtRRP44A と AtRRP44B/SOV

*A. thaliana* は AtRRP44A (AT2G17510) と AtRRP44B/SOV (AT1G77680) の 2 つの Rrp44/Dis3 候補を持つ (Chekanova et al., 2007; Lubas et al., 2013; Zhang et al., 2010)。本研究においても系統樹解析 (図 2) とアミノ酸配列の相同性解析を行い (図 3)、前述の 2 つの遺伝子が Rrp44/Dis3 の候補遺伝子であることを確認した。

動物 (ヒト、マウス、ハエ、線虫)、植物 (シロイヌナズナ、イネ、トウモロコシ)、真菌 (出芽酵母、分裂酵母) の Rrp44/Dis3 の系統樹解析を行ったところ、これらは大きく二つのクラスターを形成した。中に含まれる遺伝子の構成から ScRrp44 と AtRRP44A が属すクラスターを AtRRP44A/DIS3 クラスター、AtRRP44B/SOV が属すもう一つのクラスターを AtRRP44B/DIS3L2 クラスターとした (図 2)。

exosome の RNA 分解活性中心を担うとされる出芽酵母 (*S. cerevisiae*) の Rrp44 (以

降 ScRrp44 と記す) は pilt N-terminus (PIN) ドメインと RNA binding (RNB) ドメインの 2 つのドメインを持つ。*H. sapiens* と *S. cerevisiae* において、PIN ドメインは exosome core との結合に重要であることが知られている (Schaeffer et al., 2009; Schneider et al., 2009; Wang et al., 2007)。RNB ドメインは *H. sapiens*、*S. cerevisiae*、*Schizosaccharomyces pombe* (*S. pombe*) において exoribonuclease 活性を持つことが報告されている (Dziembowski et al., 2007; Liu et al., 2006; Murakami et al., 2007)。*A. thaliana* の AtRRP44A は PIN ドメインと RNB ドメインの両方を持ち、ScRrp44 との配列の相同性は 57.3% と *A. thaliana* のゲノム中では最も高かった。それに対して、AtRRP44B/SOV は PIN ドメインを持たないが、RNB ドメインを持ち、ScRrp44 との配列相同性も *A. thaliana* のゲノム中では AtRRP44A の次ぐ高さの 32.4% であった (図 3A)。これらの高度に保存されたドメインとアミノ酸配列より、AtRRP44A と AtRRP44B/SOV を植物における Rrp44/Dis3 の機能的ホモログと考え、以降の解析を進めた。

### 2-1-3 表現型観察のための AtRRP44A ノックダウン変異体の確立

AtRRP44A または AtRRP44B/SOV が実際に RNA 代謝に関わっているか否かを知るために変異体解析を行った。それぞれの遺伝子について、ストックセンターより T-DNA 挿入変異体 (Alonso et al., 2003) を取り寄せた。T-DNA とはアグロバクテリウムが植物のゲノム上に導入する約 10 kbp の巨大な DNA 断片のことで、T-DNA がタンパク質をコードする遺伝子領域に入ると遺伝子発現が異常になる。

AtRRP44A については独立した 3 ラインの T-DNA 挿入変異体 *rrp44a-1*、*rrp44a-2*、*rrp44a-3* (図 3B) をストックセンターより取り寄せた。これら T-DNA 挿入変異体のヘテロ接合体は得ることができたが、ホモ接合体は手に入らなかった。またヘテロ接合体の

個体から得られた種子 100 個前後の種子からも、ホモ接合体は得られなかった。この事実より、AtRRP44A が植物の生存に必須であり、AtRRP44A を失うと植物は成長できないことが示された。

一方で、AtRRP44B/SOV の T-DNA 挿入変異体 (図 3B) は入手した独立した 3 ライン *rrp44b-1*、*rrp44b-2*、*rrp44b-3* の全てでホモ接合体がえられ、目立った表現型は見られなかった (Kumakura et al., 2013)。このことより、AtRRP44B/SOV は植物の生存に必須ではないことが示唆された。

上に述べた通り、AtRRP44A の T-DNA 挿入変異体のホモ接合体を得ることはできなかった。そのため、AtRRP44A の変異体の解析のためには、AtRRP44A の発現を致死に至らない程度に低下させる必要がある。これを実現するために、AtRRP44A を「組織特異的」に「ノックダウン」する方法を試みた。

まず、AtRRP44A の発現のノックダウンには artificial microRNA (amiR) を発現させる方法を用いることにした (Ossowski et al., 2008; Schwab et al., 2006)。amiR の発現によって標的となる相補的な配列を持つ mRNA の発現レベルを効果的に抑制できることを期待した。また amiR は標的遺伝子の抑制に用いる配列が、RNAi (RNA interference) 法でよく使われる small interfering RNA (siRNA) と比較して短く (siRNA の数十～数百塩基に対して amiR は 21 塩基) 目的以外の遺伝子を抑制する「off-target」効果の可能性を下げるができる。amiR デザインを行うオンラインプログラムの WMD3 (Ossowski et al., 2008) を用い、AtRRP44A mRNA の異なる配列と相補的な配列を持つ amiR 配列 (amiR\_RRP44A-1 と amiR\_RRP44A-2) を設計した (図 4A、B)。またネガティブコントロールとして *A. thaliana* のゲノム上にターゲット配列を持たない amiR\_GUS-2 (大腸菌の  $\beta$ -glucuronidase と相補的な配列) を同時に設計した。



これらの設計した amiR 配列を、*A. thaliana* が持つ microRNA 390 (miR390) を発現させる pri-MIR390A (AT2G38325) 内の miR390 配列部分と置換し (図 4C)、amiR として発現させた (Cuperus et al., 2010)。

また組織特異的なノックダウンのために、光に応答して葉肉細胞特異的に活性を持つ *A. thaliana* の chlorophyll a/b-binding protein 3 (CAB3) プロモーターを amiR の発現に用いた。葉でのみ amiR を発現させることにより、AtRRP44A 欠損の致死性の表現型を回避することができ次世代の種子も得ることができると予想された。CAB3 プロモーターの活性はプロモーターGUS アッセイによって、葉肉細胞特異的であることが観察された (図 4D)。

野生型の Col-0 植物に、amiR 発現ベクター (amiR\_RRP44A-1、amiR\_RRP44A-2、amiR\_GUS-2) をそれぞれ floral-dip 法によって導入した。その後、自家受粉を繰り返して、導入した遺伝子をゲノム上に一カ所のみ持ち、さらにホモ接合体となったと統計学的に推定される形質転換体を選抜した (*rrp44aKD-1*#7-3-1、*rrp44aKD-2*#6-2-1、*gusKD-2*#2-10-3)。ノーザンブロッティングによって、amiR\_RRP44A-1 と amiR\_RRP44A-2 の発現はそれぞれ葉から検出された (図 5A)。

次に実際に amiR の標的となる AtRRP44A mRNA が葉において発現レベルが下がっているかを定量的リアルタイム PCR (qRT-PCR) によって計測した。WT に相当する *gusKD-2*#2-10-1 植物と比較して、AtRRP44A mRNA の発現レベルは *rrp44aKD-1*#7-3-1 植物で約 5%、*rrp44aKD-2*#6-2-1 植物で約 16%にまで低下していた (図 5B)。これらの変異体は野生型と比較して成長や発生に異常は観察されず、正常に発育した。このように独立した二つの AtRRP44A ノックダウン植物、*rrp44aKD-1*#7-3-1、*rrp44aKD-2*#6-2-1 とベクターコントロールライン (VC) の

*gusKD-2#2-10-1* の作出に成功した。以降これらの植物ラインをそれぞれ *rrp44aKD-1*、*rrp44aKD-2*、*gusKD-2* と表記する。

AtRRP44A と exosome 複合体の機能を比較するために、*A. thaliana* の exosome core 因子の AtRRP4 (AT1G03360) と AtRRP41 (AT3G61620) (Chekanova et al., 2007) についても、AtRRP44A と同様の amiR を発現させる方法でノックダウンした。図 5C に示された通り、AtRRP4 と AtRRP41 のノックダウンにも成功した。これらの amiR 遺伝子をゲノム上に一カ所にのみ持つホモ接合体となった植物ライン *rrp4KD-2*、*rrp4KD-3*、*rrp41KD-1#3-3*、*rrp41KD-1#9-2* を選抜した。以降 *rrp41KD-1#3-3* を *rrp41KD-1* と表記する。

#### 2-1-4 AtRRP44A は 5.8S rRNA のプロセッシングに関与する

*S. cerevisiae* では exosome core 因子や、Rrp44/Dis3 の欠失によって、5.8S rRNA の合成中間体が蓄積する (Allmang et al., 1999a)。酵母の場合と同様に、*A. thaliana* の AtRRP44A と AtRRP44/SOV がこの 5.8 S rRNA 合成中間体のプロセッシングに関わるかどうかを知るため、それぞれの変異体から、RNA を抽出した。そして図 6A に赤線で示したプローブを用い、ノーザンブロッティングを行った。その結果、*rrp44aKD-1* と *rrp44aKD-2* 変異体では 3'側が伸長した 5.8S rRNA の合成中間体の増加が見られた (図 6B、黒い矢尻の部分)。それに対して *rrp44b-1* と *rrp44b-2* 変異体では 5.8S rRNA の合成中間体は野生型と差が見られなかった (図 6B)。

*rrp44aKD-1*、*-2* で蓄積が上昇したバンドを AtMTR4 の欠損変異体、*mtr4-1* と比較した。*A. thaliana* の AtMTR4 は植物における推定 TRAMP 複合体因子である。*H. sapiens* と *S. cerevisiae* において TRAMP 複合体は exosome の基質 RNA に poly(A) を

付加し、exosome による RNA 分解を促進することが知られている。植物において AtMTR4 は 5.8S rRNA 合成中間体のプロセッシングに関わることが既に知られ、蓄積が上昇するバンドの配列も同定されている (Lange et al., 2011)。図 6B で示した通り、*rrp44aKD-1* と *rrp44aKD-2* で蓄積が上昇したバンドは、*mtr4-1* で蓄積が上昇するバンドと一致していた (5.8S + 120 nt、Δ、5.8S + 10 nt のバンド)。以上の結果より、AtRRP44B/SOV ではなく、AtRRP44A が、5.8S rRNA 合成中間体の 3'末端側のプロセッシングに関与することが示唆された。

*S. cerevisiae* と *H. sapiens* において、Rrp44/Dis3 は exosome core と PIN ドメインを介して結合し (Schaeffer et al., 2009; Schneider et al., 2009; Wang et al., 2007)、exosome 複合体における RNA 分解活性をになう。*A. thaliana* において、AtRRP4 と AtRRP41 はすでに exosome core の因子として同定されている (Chekanova et al., 2000; 2007)。AtRRP44A と exosome core (代表として AtRRP4 と AtRRP41) の rRNA プロセッシングにおける役割を分子レベルで比較するために、5.8S rRNA の合成中間体をノーザンブロットイングで検出した (図 6C)。その結果、*rrp4KD-3*、*rrp41KD-1*、*rrp44aKD-1* 全てにおいて、5.8S rRNA の 3'末端が伸長した合成中間体 5.8S + 120 nt、Δ、5.8S + 10 nt のバンドが観察された。この結果は AtRRP44A が既に解析が進められている exosome core 因子 (AtRRP4 と AtRRP41) と同じ経路で rRNA プロセッシングに寄与することを示唆する。

#### 2-1-5 AtRRP44A は 5' ETS の分解に関与する

植物と *S. cerevisiae* では rRNA 成熟過程で生じる 5' external transcribed spacer (ETS) が exosome によって分解される (Briggs et al., 1998; Lange et al., 2008)。そこで、

exosome の候補因子である AtRRP44A あるいは AtRRP44B/SOV が 5' ETS の分解に関わっているか否かを確かめた。

よく知られた rRNA 合成副産物として、P-P'断片が知られ、植物において AtMTR4 の標的と報告されている (Lange et al., 2011)。Probe 2 (図 7A) を用い、ノーザンブロッティング法によって P-P'断片を検出したところ、*rrp44aKD-1*、*rrp44aKD-2*、*mtr4-1* で強いシグナルが検出された (図 7B)。一方で、*rrp44b-1* と *rrp44b-2* 変異体でのバンドのシグナルは野生型植物との差が見られなかった。これらの結果は AtRRP44A のみが、P-P'断片の分解に必要であることを示唆する。

*rrp4KD-3* と *rrp41KD-1* でも P-P'断片のノーザンブロッティングによる検出を行った。図 7C のとおり、P-P'断片は野生型と比較して *rrp44aKD-1*、*rrp4KD-3*、*rrp41KD-1* でそれぞれ 2 倍、14 倍、7 倍に増加していた。この結果は AtRRP44A が既に解析が進められている exosome core 因子 (AtRRP4 と AtRRP41) と同じ経路で rRNA 合成副産物の P-P'断片分解に寄与するという考えを支持する。

#### 2-1-6 AtRRP44A と AtRRP44B/SOV は *in vivo* で異なる RNA を制御する

これまでの結果で、AtRRP44A、AtRRP4、AtRRP41 は rRNA のプロセッシングと分解に関与することが示された。一方、AtRRP44B/SOV は関与しなかった (図 6B、7B)。Chekanova らは AtRRP4 と AtRRP41 の薬剤誘導型ノックダウン植物ライン (*rrp4<sup>iRNAi</sup>*、*rrp41<sup>iRNAi</sup>*) を用いた Tiling array 解析によって、一部の RNA の蓄積が上昇することを報告している (Chekanova et al., 2007)。これらの exosome の標的 RNA が、AtRRP44A のノックダウン、あるいは AtRRP44B/SOV のノックアウトによって影響を受けるか否かを検証することにした。標的 RNA 候補として *rrp4<sup>iRNAi</sup>* と *rrp41<sup>iRNAi</sup>* 両方で発現が上昇し

ていると Chekanova らによって報告された機能性 non-coding RNA である MRP RNA と snoRNA31 に着目した。MRP RNA と snoRNA31 はいずれも rRNA のプロセッシングに必要である。これらの RNA を *rrp4KD-3*、*rrp41KD-1*、*rrp44aKD-1*、*rrp44b-2* 変異体で検出したところ、いずれの RNA も *rrp4KD-3*、*rrp41KD-1*、*rrp44aKD-1* 変異体でコントロール植物 (*gusKD-2*) と比較して発現が上昇し、有意差が見られた。しかしながら、*rrp44b-2* では野生型と差が見られなかった (図 8)。これらの結果から、AtRRP44A は AtRRP4、AtRRP41 と同様に、MRP RNA と snoRNA31 の適切な制御に必要とされていることが示された。

Chekanova らは *rrp4<sup>iRNAi</sup>*、*rrp41<sup>iRNAi</sup>* 植物ラインにおいて、多くの mRNA の 3'末端の伸長を報告している (Chekanova et al., 2007)。これは異常に長く転写された mRNA を exosome が分解するものと考えられる。もし AtRRP44A と AtRRP44B/SOV が exosome の活性に必要であれば、それぞれの変異体において、3'末端が伸長した RNA が検出されると予想できる。そこで、*rrp44aKD-1*、*rrp44b-2* と *rrp4KD-3*、*rrp41KD-1* でそれらの RNA の検出を試みた。図 9B にみられるように AT5G11090 mRNA 3' extension の増加は特に見られなかった (*rrp4KD-3* を除く)。しかし図 9C に示された通り、AT5G11090 mRNA は AtRRP44B/SOV でのみ上昇が見られた。この結果は、AtRRP44B/SOV が AT5G11090 mRNA を標的とするが、AtRRP44A と exosome core は AT5G11090 mRNA を標的としないことを示唆する。

*rrp4<sup>iRNAi</sup>* においては、いくつかのイントロン (またはスプライシングを受けていない mRNA) の発現の上昇が報告されている (Chekanova et al., 2007)。それらの RNA のうち、発現の上昇が顕著だった AT5G27720 の第 5 番目のイントロンを代表として、*rrp44aKD-1*、*rrp44b-2* 変異体で解析した。その結果、野生型と比較してイントロンと成

熟型 mRNA の発現レベルの上昇は見られなかった (図 10)。

最後に NCED5 mRNA の発現を確認した (図 11)。NCED5 は Yang らによって、*A. thaliana* の exosome core 因子の一つである AtRRP41L (AT4G27490) の変異体で mRNA 蓄積上昇が報告された遺伝子である (Yang et al., 2013)。NCED5 mRNA 発現量は、野生型と変異体において有意差が見られなかった。

これらの結果は二つの可能性を示唆する。一つは AtRRP44A と AtRRP44B/SOV、AtRRP41L が少なくとも一部は独立した機能を持つ可能性である。もう一つは、exosome の標的が植物の組織によって異なる可能性である。今回の実験では葉を用いたが、Yang 等の報告で用いられたのは芽生えであり、このサンプルの違いが標的の検出の違いを生んだ可能性が残されている。

#### 2-1-7 AtRRP44A、AtRRP44B/SOV、exosome 因子はいずれも植物ウイルス (TCV と CMV) のゲノム RNA の蓄積に影響しない

これまでの結果で AtRRP44A、AtRRP44B/SOV、exosome が植物の内在性 RNA の制御に関わることが示された。植物は内在性の RNA の他に、ウイルスやカビ由来の RNA を細胞内に持つことが知られている (Weiberg et al., 2013)。ほ乳類の細胞では、zinc finger antiviral protein (ZAP) が Molony murine leukemia virus (MLV) 由来の mRNA に特異的に結合し、これを RNA exosome にリクルートして分解することが知られている (Guo et al., 2007)。これらの結果から、植物においてもウイルス由来の RNA の蓄積に exosome に関連のある因子 (AtRRP44A、AtRRP44B/SOV、AtRRP41) が影響を与えるのではないかと予想された。そこで、RNA ウイルスを変異体へ接種し、ゲノム RNA の定量を行うことにした。接種に用いたのはゲノム RNA の 3' 末端構造が異なるカブクリン

クルウイルス (TCV) とキュウリモザイクウイルス (CMV) である。ゲノムRNAの3'末端は、TCVが単純なステムループ構造、CMVが複雑なtRNA様構造をとる。

TCV: 一本鎖のRNAゲノムをもつカブクリンクルウイルス (TCV) (Carrington et al., 1989) を*rrp44aKD*、*rrp44b*、*rrp41KD*変異体に接種した。TCV精製粒子を播種後16日目の第4と第5ロゼッタ葉に接種し、3日間育成の後、接種葉のみを回収し、RNAを抽出してTCVゲノムRNA量をqRT-PCRによって定量した。まず全長4,000塩基程度のTCVゲノムRNAの5'末端側を検出するプライマーセット TCV-5'を用いた (図12A、表4)。その結果、いずれの変異体においてもTCVのゲノムRNA蓄積量は野生型と有意な差が見られなかった (図12B、C、D)。次にTCVゲノムRNAの中央部分を検出するTCV-20プライマーセット、またTCVゲノムRNA複製時に細胞内に蓄積するマイナス鎖RNAを検出するTCV-3'(-)のプライマーセット (図13A、表4) を用い、*rrp44aKD*におけるTCVゲノムRNAを定量した (図13B、C、D)。その結果いずれのプライマーセットにおいても*rrp44aKD*変異体とコントロール植物でのシグナルの間に有意差は見られなかった。以上の結果より、本実験条件において、TCVはAtRRP44A、AtRRP44B/SOV、AtRRP41によるゲノムRNAの分解を免れていることが示唆された。

CMV: CMVのゲノムRNAは3分節のRNA1、RNA2、RNA3からなる。CMV精製粒子を播種後20日後の第4、5ロゼッタ用に接種し、3日間育成した後接種葉のみを回収し、RNAを抽出して3本のゲノムRNAをそれぞれqRT-PCRで定量した。その結果、図14、15に示した通り、RNA1、RNA2、RNA3の蓄積量は*rrp41KD*と*rrp44aKD*において、野生型と有意な差が見られなかった。またウイルスを接種したサンプルにおいてもAtRRP41 mRNAとAtRRP44A mRNAのノックダウンは成立していた (図15B)。以上の結果より、AtRRP41とAtRRP44AはCMVのゲノムRNAの蓄積に影響を与え

ないことが示唆された。

#### 2-1-8 AtRRP44A と exosome core はいずれも核に局在する

AtRRP44A、AtRRP44B/SOV、exosome core の互いの関係を調べるため、細胞内局在を観察した。AtRRP44A と AtRRP4 (exosome core 因子) の C 末端側にそれぞれ CFP、Venus を発現させた融合タンパク質を *A. thaliana* の植物体内で発現させ、蛍光顕微鏡で観察した (図 16)。その結果、AtRRP44A と AtRRP4 はいずれも核に強く局在し、細胞質に拡散した局在を見せた。また Zhang らによって、AtRRP44B/SOV-CFP は細胞質に顆粒状の局在を示し、核内には局在しないことが報告された (Zhang et al., 2010)。これらより、核への局在を示した AtRRP44A と exosome core と、AtRRP44B/SOV は異なる局在を示すことが明らかになった。

#### 2-1-9 本節 (2-1) の結論: AtRRP44A は exosome 複合体の因子であり、

#### AtRRP44B/SOV とは独立に RNA を制御する

本節 (2-1) では AtRRP44A と AtRRP44B/SOV の標的 RNA と細胞内局在を比較した。その結果と先行研究の知見 (Chekanova et al., 2007; Moreno et al., 2013; Zhang et al., 2010) を図 17 にまとめた。AtRRP44A と AtRRP44B/SOV は確認した標的 RNA が全て異なっていた (図 6-9)。一方 AtRRP44A と exosome core は標的 RNA がほぼ一致していた (図 6-9)。また AtRRP44A の胚性致死の表現型は exosome core 因子の AtRRP4 の表現型と一致し、目立った表現型が見られない AtRRP44B/SOV と大きく異なっていた。細胞内局在は AtRRP44A と exosome core が核への共通の局在を示したが、AtRRP44B/SOV は細胞質の顆粒状構造に局在する (Zhang et al., 2010)。以上よ



り、

1) AtRRP44A は植物の exosome 因子だが、AtRRP44B/SOV は exosome 因子ではない。

2) AtRRP44B/SOV と exosome は独立に異なる RNA を制御している。

という二つの結論が導かれる。また 1) の結果は筆者らが発表した (Kumakura et al., 2013) の Figure 1B の AtRRP44A タンパク質が酵母 ScRrp44 変異体の致死性の表現型を相補した結果からも強く支持される。

## 2-2 AtRRP44A の *in vitro* 活性の確認および標的 RNA のトランスクリプトーム解析

### 2-2-1 本節 (2-2) の目的

これまでの結果から、AtRRP44A が植物における exosome 因子であることが明らかになった。これにより AtRRP44A は exosome core がリクルートする基質 RNA を分解することが予想される。しかしながら、AtRRP44A が実際に RNA 分解活性を持つのか否か、持っていたとして *in vivo* でどのような RNA を標的とするのか、またどのようにしてそれらの RNA を認識するのかは不明である。これらを明らかにするため、本節では AtRRP44A の *in vitro* における RNA 分解活性の検証 (2-2-2) と、*in vivo* における標的 RNA のゲノムワイドな探索 (2-2-3) を行った。

### 2-2-2 AtRRP44A は exoribonuclease 活性を持つ

*H. sapiens* と *S. cerevisiae* における exosome の RNA 分解活性は、リング状の exosome core ではなく、Rrp44/Dis3 が担う (図 1) (Dziembowski et al., 2007; Liu et

al., 2006; Murakami et al., 2007)。酵母の ScRrp44 は PIN ドメインと RNB ドメインをもち、RNA に対してそれぞれ endoribonuclease 活性と exoribonuclease 活性 (Dziembowski et al., 2007; Lorentzen et al., 2008) を持つ (図 18A)。ScRrp44 の endoribonuclease 活性中心は PIN ドメイン内の 171 番目のと 198 番目のアスパラギン酸残基 (D171、D198) (図 18B) であり、これら 2 つのアミノ酸をアスパラギン残基 (N) に置換すると活性を失う (Lebreton et al., 2008; Schaeffer et al., 2009)。ScRrp44 の exoribonuclease 活性中心は RNB ドメイン内の 551 番目のアスパラギン酸残基 (D551) (図 18C) であり、この 1 つのアミノ酸残基を N に置換すると exoribonuclease 活性を失う (Dziembowski et al., 2007)。

HsRRP44、ScRrp44、AtRRP44A のアミノ酸配列を比較したところ、AtRRP44A においても PIN ドメインと RNB ドメインの活性中心は全てアスパラギン酸残基で保存されていた (PIN ドメイン; D132 と D158、RNB ドメイン; D489) (図 18B、C)。

AtRRP44A タンパク質では D132、D158、D489 が保存され、RNA 分解活性を持つことが強く予想される。これを確かめるために、*in vitro* で AtRRP44A タンパク質の RNA 分解活性を確認した。まず小麦胚芽抽出液を用いた無細胞翻訳系でリコンビナントタンパク質を作成した。野生型 AtRRP44A に加え、PIN ドメイン、RNB ドメインの活性中心 (D) を不活性型 (N) に置換した失活型タンパク質も作成した (図 19A)。全てのリコンビナントタンパク質には C 末端側に FLAG タグを付加し、翻訳後に抗 FLAG 抗体を用いて免疫沈降法で濃縮した。濃縮した全てのタンパク質の発現はウェスタンブロッティングによって確認した (図 19B)。RNA 分解活性反応のネガティブコントロールとして NPR1:FLAG (non-expresser of PR1:*A. thaliana* がコードする転写因子) を用いた。RNA 分解活性の基質 RNA として、*in vitro* 転写した約

150 塩基の RNA に Radioisotope (RI) 標識した 5' Cap 構造を付加したものをを用いた。

これらのリコンビナントタンパク質と基質 RNA を *in vitro* で混合し、90 分間室温でインキュベートしたのち、反応液をポリアクリルアミドゲルで分離し、オートラジオグラフィーでシグナルを検出した (図 20)。その結果、AtRRP44A:FLAG と AtRRP44A(D132N,D158N):FLAG でのみ基質 RNA の分解が見られた。一方で、AtRRP44A(D489N):FLAG と AtRRP44A(D132N,D158N,D489N) では RNA の分解が見られなかった。以上の結果より、AtRRP44A は *in vitro* で RNA 分解活性を持ち、その活性中心は RNB ドメインの D489 が担うことが示された。一方で、本実験においては AtRRP44A の PIN ドメインの RNA 分解活性は見られなかった。

### 2-2-3 AtRRP44A はゲノムワイドに mRNA の蓄積量を制御する

これまでの結果から、*in vitro* で AtRRP44A が RNA 分解活性を持つことが示された。AtRRP44A が植物における exosome の活性中心として RNA の分解を担っていることが強く予想される。そこで植物の AtRRP44A が *in vivo* でどのような mRNA を標的としているかを知るために、トランスクリプトーム解析を行った。サンプルとして AtRRP44A ノックダウン植物 (*rrp44aKD-1*、以下 *rrrp44aKD* と表記) と野生型植物に相当するコントロール植物 (*gusKD-2*、以下 *gusKD* と表記) を用いた。*rrp44aKD* と *gusKD* の植物をそれぞれ 100 個体程度、時期を分けて 3 回独立に育成した。生育した植物体の葉から RNA を抽出し (n=3)、ポリ (A) RNA 選択後にライブラリーを作成し、HiSeq2000 (イルミナ社) でシーケンスを行った。1 サンプルにつき 1000 万リード以上のシーケンスを得た。得られたデータの解析にはオープンソースの TopHat と

Cufflinks を用いた (Trapnell et al., 2012)。まず TopHat で *A. thaliana* のゲノムにリードをマップし、Cufflinks を用いて *rrp44aKD* と *gusKD* での、全ての遺伝子の発現量を統計学的に比較した。その中から、有意差があると判断される false discovery rate (FDR) が 0.05 未満であり、かつ発現量の比が 2 倍以上の遺伝子を選出した (表 1、2)。

その結果、*rrp44aKD* では、128 遺伝子の転写物が増加し (FDR<0.05、*rrp44aKD/gusKD* > 2) (表 1)、53 遺伝子の転写物が減少していた (FDR<0.05、*rrp44aKD/gusKD*<0.5) (表 2)。これらを合計した 181 遺伝子は *A. thaliana* 全ゲノム上の約 26,000 遺伝子中の約 0.7%に相当する。

次に蓄積量に変化した遺伝子群がどのような性質を有しているのかを、これまでの知見に基づいて遺伝子を機能ごとに分類した Gene ontology (GO) を用いて解析した。まず発現が変化した 181 遺伝子 (図 21)、発現が増加した 128 遺伝子 (図 22A)、減少した 53 遺伝子 (図 22B) を対象にし、The PlantGSEA オンラインソフトウェアでそれぞれ解析した。これらの図には、GO term が無作為に選出される場合と比較して、有意に高い割合で含まれた上位 10 個 (FDR が小さい方から上位 10 個) の GO term を Enrichment score と共に示した。Enrichment score は「 $-\log_{10}(\text{P-value})$ 」で示され、GO term に含まれる遺伝子クラスターが無作為に選択された場合と比較して、多く含まれるほど、大きな値をとる (Subramanian et al., 2005)。*rrp44aKD* で蓄積が変化した遺伝子は概日リズム (Circadian rhythm)、次いで光合成 (Photosynthesis) の GO term をもつものが顕著に多く含まれていた (図 21)。このうち、蓄積が上昇した遺伝子群は概日リズムや光合成の GO term を持つ遺伝子が多く含まれた (図 22A)。蓄積が減少した遺伝子群にはイノシトール代謝の GO term がとりわけ多く含まれていた (図

22B)。

*rrp44aKD* で蓄積が変化した遺伝子 (表 1、2) のうち、概日リズムと光合成の GO term を持つ遺伝子をそれぞれ図 23、24 に示した。概日リズムに関わり、蓄積が増加したものは 18 遺伝子 (図 23A)、減少したものは 3 遺伝子だった (図 23B)。また光合成に関わり、蓄積が増加したものは 15 遺伝子 (図 24A)、減少したものは 4 遺伝子だった (図 24B)。光合成の GO term を持つ遺伝子の多くは葉緑体ゲノムにコードされていた。葉緑体ゲノムにコードされる mRNA は短いポリ A 鎖しか持たないと考えられており、本研究で用いた分析方法で正確に定量できているかは、qRT-PCR 等を用いた検証も必要と考えられる。

以上の結果より、AtRRP44A は *in vivo* において約 0.7% の遺伝子の蓄積を制御し、制御される遺伝子は概日リズムと光合成に関わるものが顕著に多いことが示された。

## 第 3 章 考察

### 3-1 結果の概要

本研究は植物における Rrp44/Dis3 候補遺伝子である AtRRP44A と AtRRP44B/SOV の同定を目的とし、遺伝学的、分子生物学的解析を行った。その結果、AtRRP44A が植物の exosome 因子であることを明らかにした。Rrp44/Dis3 は exosome の RNA 分解の活性中心を担う重要な因子であり、本発見は植物の exosome の役割を知る上で重要なものである。さらにもう一つの Rrp44/Dis3 候補遺伝子である AtRRP44B/SOV は、exosome とは異なる RNA を制御することが明らかとなった (2-1)。次に、exosome 因子である AtRRP44A に焦点を絞って生化学的解析を行ったところ、AtRRP44A が *in vitro* で RNA 分解活性を持つことが示された。さらに AtRRP44A ノックダウン植物を用いてトランスクリプトーム解析を行ったところ、AtRRP44A が *A. thaliana* のタンパク質をコードする全遺伝子のうち約 0.7% を制御し、その中に概日リズムに関わる遺伝子と光合成に関わる遺伝子が顕著に多く含まれることを見いだした (2-2)。これらの結果は、AtRRP44A が RNA の分解を介して植物の概日リズムを制御することを示唆し、非常に新規性の高い発見といえる。以下では以上の結果について、考察する。

### 3-2 AtRRP44A と AtRRP44B/SOV の解析

植物における exosome 因子の Rrp44/Dis3 ホモログを同定するため、AtRRP44A と AtRRP44B/SOV の解析を行った。表現型の解析によって AtRRP44A と exosome は共通の RNA の分解やプロセッシングを行っていることが明らかになった。5.8S rRNA 合成中間体 (図 6)、rRNA のプロセッシングの副産物 (図 7)、MRP RNA (図 8A)、

snoRNA31 (図 8B) は全て AtRRP44A と exosome (AtRRP4 と AtRRP41) 両方に制御されていた。反対に、AtRRP44B/SOV はこれらの RNA の制御には関与していなかった (図 6、7、8)。また筆者らは酵母の *scrrp44* 変異体の致死性の表現型を AtRRP44A が相補する一方、AtRRP44B/SOV は相補できないことを (Kumakura et al., 2013) の Figure 1B で示した。以上の事実は全て *A. thaliana* の AtRRP44A が酵母の Rrp44/Dis3 のホモログであり、AtRRP44B/SOV は Rrp44/Dis3 のホモログではないという結論を支持する。

この結論は細胞内局在解析によっても裏付けられる。exosome core 因子 (AtRRP4、AtRRP41、AtRRP45B) と AtRRP44A はいずれも同じ核への局在パターンを示す (Hooker et al., 2007; Moreno et al., 2013; Zhang et al., 2010)。一方で、AtRRP44B/SOV は細胞質の顆粒状構造に局在する (Zhang et al., 2010)。これらのデータは AtRRP44B/SOV が exosome からは独立して働くことを示唆する。

AtRRP44B/SOV と表記してきた AT1G77680 遺伝子は、Chekanova らによって、その配列上の ScRrp44 への相同性の高さから AtRRP44B と名付けられた (Chekanova et al., 2007)。一方で Zhang らはデキャッピング複合体を形成するタンパク質 VARICOSE の変異体の表現型を抑制する原因遺伝子 SOV (Suppressor of VARICOSE) として、AT1G77680 を名付けた (Zhang et al., 2010)。本研究によって AtRRP44B/SOV は exosome とは局在・機能の両面で独立して働くことが示されたことから、今後は AT1G77680 遺伝子を SOV と名付けるのが適切だと考えられる。

*S. cerevisiae* と *H. sapiens* の細胞において、Rrp44/Dis3 は PIN ドメインを介して exosome core と結合する (Schaeffer et al., 2009; Schneider et al., 2009; Wang et al., 2007)。植物では AtRRP4 あるいは AtRRP41 の免疫沈降実験で AtRRP44A は検出さ

れていないが (Chekanova et al., 2007)、AtRRP44A は PIN ドメインを持つ (図 3A)。Chekanova らと異なる免疫沈降実験の条件下では AtRRP44A が exosome core と結合している可能性は高い。実際に本研究の結果は AtRRP44A と exosome core の RNA 分解とプロセッシングが、同じ経路上で働くことを示している。

rRNA プロセッシングの異常は *S. cerevisiae* の exosome core や Rrp6、Rrp44/Dis3 の欠損変異体で共通してみられる表現型である。*A. thaliana* においては、exosome のコファクターと推定される *rrp6l2* (Lange et al., 2008) や *mtr4* (Lange et al., 2011) (exosome に基質 RNA をリクルートする TRAMP 複合体の構成因子と予想される遺伝子) で同様の rRNA プロセッシング異常が報告されている。さらに AtRRP6 と AtMTR4 は核に局在することから、exosome core や AtRRP44 と共に核内 exosome を形成していることが予想される。

*rrp44b* 変異体ではチェックした 3 種の mRNA のうち、AT5G11090 mRNA の蓄積が上昇した (図 9-11)。このことは AtRRP44/SOV が *in vivo* で一部の mRNA を分解するという報告と矛盾しない (Zhang et al., 2010)。*S. pombe* と *H. sapiens* においては、AtRRP44B/SOV と最も相同性の高い DIS3L2 (図 2) が 3'末端をウリジル化された RNA をよく分解することが報告されている (Chang et al., 2013; Malecki et al., 2013)。また近年、植物において RNA の 3'末端にウラシルを付加する urydylyl transferase 1 (URT1) が存在することが報告された (Sement et al., 2013)。将来的には AtRRP44B/SOV がウリジルされた RNA を特異的に分解するか否かを知ることは非常に興味深い。

Zhang らは AtRRP44B/SOV が細胞質の顆粒状構造に局在することを示した。*S. pombe* において、DIS3L2 (AtRRP44B/SOV のホモログ) も細胞質に顆粒状に局在し、



一部が processing body (P-body) と共局在することが報告されている。P-body とは mRNA の分解と蓄積を担う細胞質の顆粒状構造である (Iwasaki et al., 2007; Xu et al., 2006)。植物は P-body の他にも small interfering RNA (siRNA) の生合成に関わるとされる siR-body (Jouannet et al., 2012; Kumakura et al., 2009) や、翻訳が阻害された mRNA が蓄積するとされる stress granule の存在が知られている (Buchan and Parker, 2009; Weber et al., 2008)。AtRRP44B/SOV がこれらの細胞質顆粒と共局在するか否かを確認することは今後の課題である。

さらに、AtRRP44A 変異体はいずれも胚性致死と雌性配偶子致死の表現型を示す (2-1-3) (Chekanova et al., 2007; Kumakura et al., 2013)。さらに AtRRP44A の変異は雄性配偶体への影響を示さなかった。この表現型は exosome core 因子の AtRRP41 変異体でも同様である (Chekanova et al., 2007)。これらのデータは AtRRP44A と AtRRP41 が雌性配偶子内で同一の標的 RNA を制御していることを予想させる。一方、AtRRP44B/SOV の欠損は通常の条件下での植物の生存に影響を与えない ((Kumakura et al., 2013) の (Figure 6B))。

*S. pombe* において、AtRRP44B/SOV と最も相同性の高い DIS3L2 は 5'→3' exoribonuclease の XRN1 や、mRNA の脱キャップ化を促す LSM1-7 複合体の LSM1 と協調的に機能することが示唆されている (Nissan et al., 2010)。dis3l2 単独の変異体は細胞の成長に影響を与えないが、dis3l2 xrn1Δ の二重変異体は致死性の表現型を示す (Malecki et al., 2013)。また dis3l2 lsm1Δ 二重変異体は、成長が遅くなる表現型を示すことから、DIS3L2 は LSM1 と XRN1 の少なくとも 2 つの異なる RNA 分解経路と協調的に機能することが示唆される。これら二つの遺伝子はいずれも *A. thaliana* で AtLSM1 (Golisz et al., 2013; Perea-Resa et al., 2012)、AtXRN4 (Souret et al., 2004;

Weber et al., 2008) として保存されており、いずれも P-body への局在が観察されている。AtRRP44B/SOV と AtLSM1、あるいは AtXRN4 の T-DNA 挿入変異体を交配し、その表現型を観察することでこれらの遺伝子が協働するか否かを知ることは非常に興味深い。

本研究の結果とこれまでの報告に基づき、植物の RNA 分解とプロセッシングにおける AtRRP44A と AtRRP44B/SOV の役割をモデルとして描いた (図 25)。核内では AtRRP44A と exosome core が協調して rRNA、snoRNA、MRP RNA 等の機能性 non-coding RNA をプロセッシングする。細胞質では、AtRRP44B/SOV は細胞質の顆粒状構造に局在し、exosome core とは独立に AT5G11090 mRNA などの mRNA を選択的に分解する。

### 3-3 AtRRP44A の *in vitro* 酵素活性解析

本研究では *in vitro* で AtRRP44A が RNA 分解活性を持つことを示した。*H. sapiens* や *S. cerevisiae* においては exosome core 自体には RNA 分解活性はなく、exosome core によってリクルートされた RNA 基質を Rps44/Dis3 が分解する (Dziembowski et al., 2007)。植物の exosome core は先行研究によって多岐にわたる RNA を制御することが知られている。例えば AtRRP4 と AtRRP41 は rRNA、snoRNA、一部の mRNA を制御する (Chekanova et al., 2007)。また別の exosome core 因子の AtRRP45A および AtRRP45B は RNA の制御を通じて、植物細胞の表層を覆うクチクラロウの合成を制御する (Hooker et al., 2007)。さらに別の exosome core 因子である AtRRP41L は種子成熟に参与する遺伝子を制御し、この遺伝子が欠損すると発育に異常が見られる (Yang et al., 2013)。このように exosome core が RNA 代謝を制御するとの報告があるも

の、植物 exosome の RNA 分解活性をになう遺伝子については不明確であった。本研究の結果によって、これら exosome core に制御される RNA の分解を AtRRP44A が担うことが強く示唆された。

### 3-4 トランスクリプトーム解析

AtRRP44A の *in vivo* での標的 RNA を探索するため、AtRRP44A ノックダウン植物 (*rrp44aKD*) のトランスクリプトーム解析を行った。その結果、AtRRP44A は全遺伝子の約 0.7% のゲノム RNA の蓄積を制御することを明らかにした。このことから AtRRP44A が全ての RNA ではなく、一部の RNA のみを選択的に制御していることが示唆された。蓄積が変動した遺伝子群がどのような性質を持つか知るために GO 解析を行ったところ、遺伝子発現が変化した遺伝子群には、概日リズムや光合成に関わる遺伝子が顕著に多く含まれていた (図 21)。

興味深いことに *rrp44aKD* で発現が上昇していた遺伝子の中に概日リズムの GO term を持つものは 18 遺伝子あったが、その中で夜間に発現が上昇することが知られる概日リズム遺伝子 ELF4、ELF3、LUX (図 23A)、TOC1 (AT1G32100, FDR=0.0052, *rrp44aKD/gusKD*=1.52) の蓄積が上昇していた (Nakamichi, 2011)。一方、昼間に発現が上昇することが知られている遺伝子 CCA1 は発現が低下した (図 23B)。また夜間は ELF4、ELF3、LUX が形成する複合体 (evening complex) によって蓄積が抑制され昼間に蓄積のピークを迎えることが知られる遺伝子 PIF4 (Nusinow et al., 2011) の蓄積は *rrp44aKD* において減少していた (図 23B)。以上をまとめると *rrp44aKD* 植物において、概日リズムに関わる夜間に蓄積のピークを迎える遺伝子が増加し (ELF3、ELF4、LUX、TOC1)、昼間に蓄積のピークを迎える遺伝子が減少した (CCA1、PIF4)。

これらのデータ取得に際し、植物サンプルは連続白色光下で育成したのにも関わらず、概日リズム関連の遺伝子は、*rrp44aKD* 植物において夜間に特徴的な発現パターンを示した。この結果は AtRRP44A が夜間に発現が上昇する遺伝子の RNA 転写物の分解を通じて、植物の概日リズムを制御することを示唆する。従って本研究の今後の主要な課題は、AtRRP44A ノックダウン植物における概日リズムの乱れの検出と、AtRRP44A による RNA 分解の直接の標的となる概日リズム遺伝子の同定である。

## 第 4 章 材料と方法

### 4-1 タンパク質アミノ酸配列のアラインメントと系統樹解析

アラインメントに用いたタンパク質のアミノ酸配列は以下の遺伝子の DNA 配列を元に得た (ScRrp44; YOL021c、HsRRP44/hDIS3; AB001743.1、AtRRP44A; AT2G17510.1、AtRRP44B/SOV; AT1G77680.1)。各タンパク質の配列相同性 (Sequence similarity) (図 3)、ドメイン情報 (図 3)、アラインメント (図 18B、C) はそれぞれ以下のオンラインソフトウェアを用いて得た。

EMBOSS Needle ([http://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss\\_needle/](http://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_needle/))

InterProScan 4 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/pfa/iprscan/>)

Tcoffee ([http://www.igs.cnrs-mrs.fr/Tcoffee/tcoffee\\_cgi/index.cgi](http://www.igs.cnrs-mrs.fr/Tcoffee/tcoffee_cgi/index.cgi))

系統樹解析に際して以下のアクセッション番号を持つ (カッコ内) タンパク質のアミノ酸配列を National Center for Biotechnology Information (NCBI) で得た。SpRRP44A/DIS3 (NP\_596653)、SpRRP44B/DIS3L2 (NP\_594510)、AtRRP44A (NP\_177891)、AtRRP44B/SOV (NP\_565418)、OsRRP44A (NP\_001048846)、OsRRP44B (NP\_001048152)、MzRRP44A (DAA43126)、MzRRP44B (AFW64437)、CeRRP44B (NP\_498160)、CeRRP44A (NP\_501835)、DmRRP44B-1 (NP\_612012)、DmRRP44B-2 (NP\_728490)、DmRRP44A (NP\_651246)、MmRRP44A (NP\_082591)、MmRRP44B (NP\_705758)、MmDIS3L (NP\_766107)。これらのもつ RNB ドメインのアミノ酸配列を用い、CLUSTALW (GenomeNet) で系統樹を作成した。

CLUSTALW (<http://www.genome.jp>)

## 4-2 プラスミドの作成

本研究で用いたプラスミド作成方法の詳細を以下に記す。プライマーの配列情報は表 4 に記載した。なお、PCR を経てプラスミドへ導入した DNA 配列部位の全てに関して、設計した配列と相違がないことをシーケンスによって確認したものを用いた。

### 4-2-1 pWAT208

pWAT208 は pWAT2 (Kumakura et al., 2013) からの派生物であり、CAB3 プロモーターと *Agrobacterium* 6b ターミネーターを持つ。CAB3 プロモーターから制限酵素部位を除去するため、CAB3Pro-F と CAB3Pro-R のプライマーセットから PCR-1 を増幅した。次に PCR-1 を鋳型とし、Kpn-CAB3Pro-F と CAB3-24R、CAB3P-26F と CAB3P-55R、CAB3P-57F と CAB3P-58R、CAB3P-60F と CAB3P-129R、CAB3P-131F と Xho-CAB3ProR のプライマーセットを用いて PCR 反応を行い、それぞれ PCR-2、PCR-3、PCR-4、PCR-5、PCR-6 を得た。さらに、PCR-2 と PCR-3 の混合物と Kpn-CAB3Pro-F と CAB3P-55R のプライマーセットで PCR を行い、PCR-7 を得た。また、PCR-4 と PCR-5 の混合物と CAB3P-57F と CAB3P-129R のプライマーセットを用いて PCR を行い、PCR-8 を得た。次に PCR-8 と PCR-6 の混合物と CAB3P-57F と Xho-CAB3-Pro-R のプライマーセットを用いて PCR を行い、PCR-9 を得た。次に、PCR-7 と PCR-9 の混合物と、Kpn-CAB3Pro-F と Xho-CAB3Pro-R のプライマーセットで PCR を行い、PCR-10 を得た。PCR-10 の *KpnI*-*XhoI* 断片と、pWAT2 の *KpnI*-*XhoI* 断片を入れ替え、pWAT208-PS を得た。

6b-Ter-F1 と 6b-Ter-R1 のプライマーセットで PCR を行い、PCR-11 を得た。PCR-11

と Xba-6b-Ter-F2 と Sac-6b-Ter-R2 のプライマーセットで PCR を行い、PCR-12 を得た。

PCR-12 の *XbaI-SacI* 断片と pWAT208-PS の *XbaI-SacI* 断片を入れ替え、pWAT208 を得た。

#### 4-2-2 pWAT208-MASS-GUS

pWAT208-MASS-GUS は CAB3 プロモーター下に  $\beta$ -glucuronidase (GUS) をコードする配列を持つベクターである。pETNR-gus (invitrogen) を鋳型とし、Xho\_MASS-GUS-F と Xba\_GUS-R のプライマーセットで PCR-13 を得た。PCR-13 の *XbaI-SacI* 断片と pWAT208 の *XbaI-SacI* 断片を入れ替え、pWAT208-MASS-GUS を得た。

#### 4-2-3 pWAT208-MIR390B

*A. thaliana* のゲノム DNA を鋳型とし、Sal-MIR390a-F と Spe-MIR390-R を用いて PCR を行い、PCR-14 を得た。PCR14 を鋳型とし、Sal-MIR390-F と Bsa-390R、Bsa390F と Spe-MIR390a-R のプライマーセットでそれぞれ増幅し、PCR-15 と PCR-16 の二つの断片を得た。次に、PCR-15 と PCR-16 の混合物と、Sal-MIR390a-F と Spe-MIR390-R のプライマーセットで PCR を行い、PCR-17 を得た。PCR-17 の *SalI-SpeI* 断片と pWAT208 の *SalI-SpeI* 断片を入れ替え、pWAT208-MIR390Bsa を得た。

#### 4-2-4 pNK009-pNK015

以下のプライマーセットで PCR を行い、PCR それぞれの PCR 断片を得た。  
(PCR-18: 390amiR\_RRP4\_2-F and 390amiR\_RRP4\_2-R, PCR-19:  
390amiR\_RRP4\_3-F and 390amiR\_RRP4\_3-R, PCR-20: 390amiR\_RRP41\_1-F and

390amiR\_RRP41\_1-R, PCR-21: 390amiR\_RRP41\_3-F and 390amiR\_RRP41-3-R, PCR-22: 390amiR\_RRP44A\_1-F and 390amiR\_RRP44A\_1-R, PCR-23: 390amiR\_RRP44A\_2-F and 390amiR\_RRP44A\_2-R and PCR-24: 390amiRgus-2-F and 390amiRgus-2-R)。次に、PCR18-24 の *BsaI* 断片を pWAT208-MIR390B の *BsaI* 断片の小さい方と入れ替え、pNK009、pNK010、pNK011、pNK012、pNK013、pNK014、pNK015 を得た。ベクター作成時に用いた amiR 配列 (amiR\_RRP44A-1、-2、amiR\_RRP4-2、-3、amiRRRP41-1、-3) は Web MicroRNA Designer (<http://wmd3.weigelworld.org/cgi-bin/webapp.cgi>) (Ossowski et al., 2008) で設計した。

#### 4-2-5 pNK025 [pWAT3\_P::RRP4-RRP4:Venus-Ter::RRP4]

pNK025はRRP4のC末端側に蛍光タンパク質Venusを付加した融合タンパク質 RRP4:Venusを*A. thaliana*で発現させるバイナリーベクターである。プロモーターとターミネーターには*A. thaliana*ゲノム上のRRP4 ORFの上流約1.5 kb、下流0.5 kbをそれぞれ用いた。Sali+RRP4(np+ORF)\_F、EcoRV+RRP4\_Rのプライマーセットを用い、*A. thaliana*のゲノムDNAを鋳型にPCRを行いPCR-24を得た。バイナリーベクターである pWAT3 (植物体内でHygromycin耐性、菌体内でKm耐性遺伝子を発現) の *Sali-EcoRV*断片と、PCR-1の*Sali-EcoRV*断片を入れ替え、pNK025-P1を得た。次に EcoRV+RRP4\_RとBamHI+Venus\_Rプライマーを用い、Venus-pTA7002<sup>GW</sup>(N) (Fujioka et al., 2007) を鋳型にPCRを行い、PCR-25を得た。pNK025-P1の *EcoRV-BamHI*断片と、PCR-25の*EcoRV-BamHI*断片を入れ替え、pNK025-P2を得た。次に*A. thaliana*のゲノムDNAを鋳型とし、BamHI+RRP4(native Terminator)\_F、



SpeI+RRP4(native Terminator)\_RのプライマーセットでPCRを行い、PCR-26を得た。

pNK025-P2の*Bam*HI-*Spe*I断片と PCR-26のも*Bam*HI-*Spe*I断片を入れ替え、pNK025を得た。

#### 4-2-6 pOH005.1 [pETM-11\_AtRRP44A]

AtRRP44AHA リコンビナントタンパク質発現用の鑄型作成の鑄型として AtRRP44A (AT2G17510.1) の coding sequence (CDS) を持つ pOH005.1 を用いた。まず *A. thaliana* の cDNA を鑄型に、F\_IF\_RRP44A\_pOH005.1、R\_IF\_RRP44A\_pOH005.1 のプライマーセットで PCR を行い、2802 bp の PCR-27 を得た。pETM-11 の *Nco*I-*Xho*I 断片とPCR-27を In-Fusion HD Cloning Kit (Takara) を用いて反応させ、pOH005.1を得た。なお、pETM-11 は European Molecular Biology Laboratory より分与していただいた。

#### 4-2-7 pOH008 [pETM-11\_AtRRP44A (D132N,D158N)]

pOH005.1 を鑄型に、F\_D177N\_pOH005、R\_D177N\_pOH005 のプライマーセットで PCR を行い、約 200 bp の PCR-28 を得た。pOH005.1 の *Nco*I-*Mfe*I 断片と PCR-28 の *Nco*I-*Mfe*I 断片を入れ替え、pOH009を得た。

#### 4-2-8 pOH009 [pETM-11\_AtRRP44A (D489N)]

pOH005.1 を鑄型に F\_D556N\_pOH005、R\_D556N\_pOH005 のプライマーセットで PCR を行い、約 246 bp の PCR-29 を得た。pOH005.1 の *Bsi*WI-*Bsr*GI 断片と、PCR-29 の *Bsi*WI-*Bsr*GI 断片を入れ替え、pOH008を得た。

#### 4-2-9 pOH007 [pETM-11\_AtRRP44A (D132N,D158N,D489N)]

pOH009 の *NcoI-MfeI* 断片と、PCR-28 の *NcoI-MfeI* 断片を入れ替え、pOH007 を得た。

#### 4-2-10 PCR4\_CMVQ QR1

RNA 分解活性アッセイの基質 RNA の転写用ベクターとして用いた。まず、ショウウェイ・ディン博士から分与していただいたプラスミドの pBIN CMV-Q を鋳型に QR1-300F、QR1-540R のプライマーセットで増幅を行った。得られた約 240 bp の DNA 断片を ZERO Blunt TOPO PCR Cloning Kit (Invitrogen) を用い、マニュアルの指示に従って PCR4 ベクターに導入し、PCR4-CMVQ QR1 を得た。

#### 4-3 植物ライン

*A. thaliana* のエコタイプの一つである Col-0 を野生型 (wild type; WT) として用いた。また変異体ラインとしては T-DNA 挿入ライン (Alonso et al., 2003) の *rrp44b-1* (SAIL\_804\_F05, Col-0 background)、*rrp44b-2* (SALK\_017934, Col-0 background)、*mtr4-1* (GK\_774H07, Col-0 background) を用いた。*rrp44b-1* および *rrp44b-2* の種子はリソースセンター (The Nottingham Arabidopsis Stock Centre) から取り寄せた。*mtr4-1* の種子は、ドミニク・ガグリアルディ博士 (フランス、ストラスブルグ大学) より分与していただいた。これらの植物ラインは表 4 のプライマーを用いてジェノタイピングを行った。

#### 4-4 植物の育成

無菌培養に用いた種子は滅菌溶液 (50% エタノール、0.25% 次亜塩素酸) を加えて 1 分間静置した後、滅菌水で 4 回洗浄した。滅菌処理した種子は 4°C、遮光下で 2 日間静置した。その後、植物プレート (2.3 mg/ml ムラシゲスカーグ培地用混合塩類 (Wako)、1% スクロース、3  $\mu$  g/mL thiamine HCl、5  $\mu$  mg/mL pyridoxine HCl、0.5  $\mu$ g/mL nicotinic acid、100 mg/mL *myo*-Inositol、0.5 g/L MES、0.8% (W/V) アガー (ナカライテスク)、KOH で pH5.8 に調整した) に播種し、23°C、連続白色光下で育成した。土に播種した種子は 0.1% アガーに浸して 4 °C、遮光下で 2 日間静置し、土 (JIFFY mix (サカタのタネ) とバーミキュライト (白元) を 1:2 で混合) に播種し、23°C、連続白色光下で育成した。

#### 4-5 *A. thaliana* の形質転換

植物に導入するバイナリーベクターでアグロバクテリウム (GV3101 株、Rifampicin と Gentamycin 耐性) を形質転換した。その際、pWAT を Backbone に持つベクターはヘルパープラスミドである pSoup-Spec と共にアグロバクテリウムに形質転換した。その後、シングルコロニーを選んで適切な抗生物質入りの LB 培地に入れ、吸光度が 0.5 (600 nm で計測) に達するまで 28°C で震盪培養した。その後、5,000 rpm、5 分間、25°C の条件で遠心分離し、上清を取り除き、infiltration medium (5% sucrose、0.02% Silwet L-77) で菌体を懸濁した。この懸濁液に土で育成した *A. thaliana* の Col-0 (播種後約 40 日、開花、結実している花を取り除いた地上部) を 1 分間浸し、暗所に一晚置いた。翌日植物を暗所から取り出し、引き続き育成し、約 1 ヶ月後に T1 種子を回収した。この T1 種子を滅菌処理した後、適切な抗生物質による選抜を行った。

#### 4-6 プロモーターGUS アッセイ

植物サンプルを 90%アセトンに浸し 4°C、15 分間インキュベートし、100 mM リン酸ナトリウムバッファー pH7.0 で洗浄した後、GUS 染色液 (100 mM  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  pH7、5 mM  $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ 、5 mM  $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6$ 、0.1% Triton X-10、0.5 mg/mL X-Gluc ) に浸し、30 分間吸引した。その後、室温で一晩インキュベートし、GUS 染色液を除き、固定液 (90% エタノール、10%酢酸) に浸して室温で 30 分間インキュベートし、実体顕微鏡で観察した。

#### 4-7 RNA 抽出

ノーザンブロットイング (図 5-7) と cDNA 合成 (図 5、8-15) で用いた total RNA は、それぞれの植物サンプルを液体窒素で凍結破碎したのち RNAiso Plus (TaKaRa) を使い、マニュアルの指示通りに抽出した。その際、植物サンプル重量の 3 倍量の RNAiso Plus を用いた。RNA-seq (図 21-24、表 1、2) のライブラリー作成に用いた total RNA は、RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) を使い、マニュアルの指示通りに抽出した。total RNA を抽出した植物サンプルの詳細は RNA-seq の項目に記した。

#### 4-8 ノーザンブロットイング

図 6、7 では、5  $\mu\text{g}$  分の total RNA と 1.5xLMW RNA sample buffer (67.5 mM トリス、67.5 mM ホウ酸、1.5 mM EDTA (pH8.0)、10 M 尿素、10%スクロース、0.03%ブロモフェノールブルー、0.03%キシレンシアノール) を 1:2 の割合で混合し、65°C で 5 分間インキュベートし、RNA サンプルとした。この RNA サンプルを 7 M 尿素・6%ポリアクリル

アミドゲルと 1xTBE バッファー (45 mM トリス、45 mM ホウ酸、1 mM EDTA (pH8.0)) を用いて分離した。図 5A では、5 µg 分の total RNA、4x Loading buffer (50% グリセロール、0.03% ブロモフェノールブルー、50 mM Tris-HCl (pH7.7)、5 mM EDTA)、ホルムアミドを 1:1:2 の割合で混合し、65°C で 5 分間インキュベートし、small RNA サンプルとした。

small RNA サンプルは 17%ポリアクリルアミド・7 M 尿素のゲルと 0.5xTBE バッファー (1xTBE バッファーの半分の濃度)で分離した。

分離された RNA サンプル、または small RNA サンプルは Hybond N+ (GE ヘルスケア) に 1xTBE バッファー中で、80 V、1 時間トランスファーした。RNA がトランスファーされたメンブレンは 20xSSC (3 M NaCl、0.3 M クエン酸三ナトリウム二水和物) に 5 分間浸し、StrataLinker 1800 (Stratagene) を用いて UV cross link (120,000 µJ/cm<sup>2</sup>) を行った。その後、メンブレンを 2×SSC に浸して乾燥させた。メンブレンはハイブリダイゼーションボトルにいれ、PerfectHyb Plus (Sigma-Aldrich) を加え、42°C で 1 時間震盪した。検出に用いたプローブは T4 polynucleotide kinase (Toyobo) を用い、γ-32P-ATP を small RNA (図 5A) または rRNA (図 6、7) と相補的な配列のオリゴヌクレオチドにラベルして作成した。これらのプローブを PerfectHyb Plus バッファー中で震盪し、メンブレンと 42°C、一晩ハイブリダイゼーションを行った。その後、42°C の条件で、メンブレンを Wash buffer (2×SSC、0.1% SDS) を用いて洗浄し、イメージングプレートに露光させた。イメージングプレートのシグナルはバイオ・イメージングアナライザーBAS-2500 (GE ヘルスケア) で検出した。

#### 4-9 定量的リアルタイム PCR (qRT-PCR)

まず、図 8-11 に用いたサンプルにはプレート上に播種後 7 日目の *A. thaliana* の葉を、図 12、13 は土上に播種後 16 日目の *A. thaliana* の第 4、5 ロゼッタ葉に TCV 精製粒子を接種し、3 日後に回収した接種葉を、図 14、15 は土上に播種後 20 日目の *A. thaliana* の第 4、5 ロゼッタ葉に CMV 精製粒子を接種し、3 日後に回収した接種葉を、それぞれ植物サンプルとして用いた。植物サンプルから「RNA 抽出」の方法に従って total RNA を抽出した。この total RNA と PrimeScript RT reagent Kit with gDNA Eraser (TaKaRa) を用い、マニュアルの指示に従って cDNA を作成した。total RNA に含まれるゲノム DNA は gDNA Eraser によって取り除かれる。なお、逆転写にはキット付属のランダムヘキサマープライマーとオリゴ dT のプライマーミックスを用いた。

完成した cDNA を用いて qRT-PCR を行った。反応条件は (Motomura et al., 2012) に記載されている方法を用いた。全ての qRT-PCR に KAPA SYBR Fast qPCR kit (KAPA BIOSYSTEMS) と StepOnePlus Real-Time PCR System (Life Technologies) を用い、Minimal Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments (MIQE) ガイドラインに従って、電気泳動と cDNA を用いた Integrity check を行い、サンプルとして用いた RNA が定量的な評価が可能な品質であることを確認した (Bustin et al., 2009)。また反応に用いたプライマーは表 4 に記した。

##### 4-9-1 カブクリンクルウイルス (TCV) の精製と接種

TCV 粒子の増殖: ジャック・モリス博士 (アメリカ合衆国、ネブラスカ-リンカーン大学) から TCV ゲノム RNA を *in vitro* 転写させるためのベクター pTCV-t1d1 を分与していただいた。pTCV-t1d1 は制限酵素 *Xba*I (Fermentas) で処理し、T7 RNA

polymerase によって RNA 転写物を得た。これを用い、(Heaton et al., 1989) に掲載されている方法で寄居カブ (*Brassica rapa* L. cv. Yorii) に TCV RNA を接種した。その後 3 週間、23°C、連続白色光下で育成した。

TCV 粒子の精製： TCV 感染葉から (Dougherty, 1980) に記されている方法に従って TCV 粒子を精製した。TCV 精製粒子 (10 mg/mL、10 mM HEPES pH7.5、50%グリセロール) は-20°C で保管した。吸光度が 1 (波長 260 nm で計測) のとき、TCV 粒子の濃度を 50 µg/mL とし、精製粒子濃度を算出した。

TCV 粒子の接種： TCV 精製粒子は 0.05 M リン酸ナトリウムバッファー pH7.0 で 50 µg/mL に希釈し、葉一枚につき 2 µL を接種した。各植物ラインを播種し、16 日後に第 4、第 5 ロゼッタ葉にカーボンランダムをかけ、TCV 精製粒子をのせ、ラテックス手袋をはめた指で塗布し、その後蒸留水で洗浄した。図 12、13 の実験では各植物ラインにつき 20 から 30 の植物個体 (1 個体あたり 2 枚 [第 4、第 5] のロゼッタ葉) に TMV を接種し、3 日間育成した。その後、接種葉を切り取り、6 分割して RNA 抽出に供した。

#### 4-9-2 キュウリモザイクウイルス (CMV) の精製と接種

CMV 粒子の増殖： ショウウェイ・ディン博士 (アメリカ合衆国、カリフォルニア大学リバーサイド校) から CMV-Q 株 を植物体内で発現させるインフュクシャスクローン pBIN CMV-Q (Ding et al., 1995) を分与していただいた。pBIN CMV-Q をアグロバクテリウム GV3101 株に導入した。アグロバクテリウムのシングルコロニーを Rifampicin、Gentamycin、Kanamycin (各 50 ng/mL) を含む LB 培地 5 mL にいれ、28°C で一晩培養した。翌日 800 G、25°C、10 分間、の条件で遠心分離して上清を除き、Vir Induction Medium (338 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、176 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、68mM NaCl、150 mM NH<sub>4</sub>Cl、

0.2% glucose、10 mM MES、0.1 mM acetosyringone、0.1 mM CaCl<sub>2</sub>、2 mM MgSO<sub>4</sub>、pH5.2) に懸濁し、5 時間から一晩の間 28°C で静置した。そして 3000 rpm、10 分間、25°C で遠心分離して上清を除いた後、Infiltration Solution (10 mM MgCl<sub>2</sub>、10 mM MES、150 μM acetosyringone) に懸濁し、吸光度を 0.8 (600 nm で計測) に合わせた。そして、播種後 1-2ヶ月の *Nicotiana glutinosa* の葉にインフィルトレーションし、さらに育成した。約 1 ヶ月後に CMV 感染葉を回収した。

CMV 粒子の精製：CMV 感染葉をブレンダーを用いて 4°C で破碎し、つぶした葉の重量の 2 倍量の破碎液 (0.5 M クエン酸三ナトリウム二水和物、10 mM EDTA、0.5% メルカプト酢酸、KOH で pH6.5 に調整) を加えて混合した。破碎液と等量のクロロホルムを加えて混合したのち、8,400 G、4°C で 15 分間遠心分離し、水層を回収した。水層に終濃度 10%になるよう 50% polyethylene glycol (分子量:8000) 溶液を加え、緩やかに 45 分間、4°C で混合した。その後、溶液を、4°C、7,000 G、20 分間遠心分離し、上清を捨てた。ペレットに Virion wash buffer (5 mM 四ホウ酸ナトリウム、1 mM EDTA、2% Triton X-100、KOH で pH9.0 に調整) を加え、4°C で 30 分間攪拌し、4°C、10,000 G、15 分間で遠心分離し、上清を回収した。上清を 4°C、100,000 G、120 分間遠心分離し、上清を捨てた。ペレットに Virion resuspension buffer (5 mM ホウ酸ナトリウム、1 mM EDTA、KOH で pH9 に調整) を入れ、4°C で一晩懸濁した。懸濁液を 4°C、10,000 rpm、10,000 G で遠心分離し、上清を回収した。この上清の吸光度を計測し、濃度を決定し、CMV 粒子を 1mg/mL に合わせたのち分注し、CMV 粒子とした (260 nm での吸光度 5 で CMV 粒子 1 mg/mL)。

CMV 粒子の接種：CMV 粒子を Virion resuspension buffer (5 mM 四ホウ酸ナトリウム、1 mM EDTA) を用いて 50 ng/mL に懸濁し、カーボンランダム (600 mesh、ナカ



ライテスク) を振りかけたロゼッタ葉に 2  $\mu$ L ずつのせ、ラテックスグローブをはめた指で塗布し、その後蒸留水で洗浄した。図 14、15 の実験では各植物ラインにつき 20 から 30 の植物個体 (1 個体あたり 2 枚 [第 4、第 5] のロゼッタ葉) に CMV を接種し、3 日間育成した。その後、接種葉を切り取り、6 分割して RNA 抽出に供した。

#### 4-10 RNA 分解活性アッセイ

図 20 の RNA 分解活性アッセイはまず 1) リコンビナントタンパク質と 2) 基質 RNA をそれぞれ独立に準備した。次に 3) リコンビナントタンパク質と基質 RNA の反応とシグナルの検出を行った。以下に 1)、2)、3) の詳細を記す。

##### 1) リコンビナントタンパク質

リコンビナントタンパク質はテンプレート RNA と小麦胚芽抽出物を用い、*in vitro* で翻訳した。翻訳したタンパク質は免疫沈降によって精製してから RNA 分解活性アッセイに用いた。

テンプレート RNA はテンプレート DNA から T7 polymerase を用いて転写した。テンプレート DNA は図 19A の AtRRP44A タンパク質の CDS 配列を含むプラスミド (pOH005.1、pOH007、pOH008、pOH009) を鋳型に WG-Ctag\_AtRRP44A-F と WG-Ctag\_AtRRP44A-R のプライマーセットで 1st PCR 産物を得た。次に、T7Eu-F2、HRV3C-FLAG、RAFL09\_R のプライマーセットで 2nd PCR 産物を得た。この 2nd PCR 産物をテンプレート DNA として T7 RNA polymerase で転写し、得られた RNA をエタノール沈澱し、テンプレート RNA とした。また図 19B で発現を確認した NRP1:FLAG のテンプレート DNA は多田安臣博士、野元美佳氏 (香川大学農学部) より分譲をうけ、RNA 転写に用いた。

得られたテンプレート RNA は多田安臣博士、野元美佳氏 (同上) らが開発した小麦胚芽無細胞翻訳系のプロトコールに従って用い、リコンビナントタンパク質 (NPR1:FLAG 、 AtRRP44A:FLAG 、 AtRRP44A(D132N,158N):FLAG 、 AtRRP44A(D489N):FLAG、 AtRRP44A(D132N,D158N,D489N):FLAG) の翻訳を行った。

得られたリコンビナントタンパク質は免疫沈降法によって精製した。免疫沈降には anti-FLAG M2 Monoclonal antibody (Sigma-Aldrich) と Protein G sepharose 4 Fast Flow (Amersham) を用いた。リコンビナントタンパク質が結合した Sepharose ビーズの一部はウェスタンブロッティングのサンプルに用いた (図19B)。精製リコンビナントタンパク質が結合したビーズは 2×Reaction buffer (20 mM Tris-HCl pH8、150 mM NaCl、400 nM MgCl<sub>2</sub>、2 mM 2-メルカプトエタノール) で置換し、RNA 分解活性アッセイに用いた。

## 2) 基質 RNA

基質 RNA は 150 塩基程度の *in vitro* 転写 RNA の 5' Cap を radioisotope (RI) 標識を行ったのち、ポリアクリルアミドゲルで目的の長さのバンドのみ精製して作成した。まず、PCR4\_CMVQ QR1 を制限酵素 *Xba*I (Fermentas) で処理したものをテンプレート DNA とし、T7 RNA polymerase で *in vitro* RNA 転写を行い、約 150 b の RNA を得た。この転写 RNA、 $\alpha$ -[<sup>32</sup>P]-GTP (111 TBq/mmol, 400 MBq/mL)、Vaccinia ウイルス由来の Capping enzyme (Vaccinia Capping System M2080S (NEB) に含まれる) をマニュアルに従って反応させ、5' Cap 構造を RI 標識した RNA を得た。この 5' Cap RI 標識 RNA を 7 M 尿素・6%ポリアクリルアミドゲルで分離し、150 塩基程度の部分のゲルを切り出した。同重量の 2×PK バッファー (200 mM Tris-HCl pH7.5、25 mM EDTA、300

mM NaCl、2% SDS) に浸してローテーションしながら室温で一晩インキュベートした。その後、上清のみを回収してエタノール沈澱させ、DEPC 処理水で溶解させて基質 RNA とした。

### 3) リコンビナントタンパク質による基質 RNA の分解シグナルの検出

精製リコンビナントタンパク質 1) と、基質 RNA 2) を 1.5 mL チューブ内で混合し、ローテーションしながら室温で 90 分間反応させた。その後、反応液を等量の 2×Loading Buffer (95% ホルムアミド、10 mM EDTA pH8、0.1% ブロモフェノールブルー、0.1% キシレンシアノール) と混合し、65°C、5 分間インキュベートし、7M 尿素・15%ポリアクリルアミドゲルで泳動した。泳動後、ゲルをイメージングプレートに 3 日間露光させ、バイオ・イメージングアナライザーBAS-2500 (GE ヘルスケア) で検出した (図 20)。

#### 4-11 ウェスタンブロッティング

8% polyacrylamide ゲル (濃縮ゲル; 4.75% polyacrylamide bis (29:1)、125 mM Tris-HCl、0.1% SDS、pH6.8、分離ゲル; 8% polyacrylamide bis (29:1)、375 mM Tris-HCl、0.1% SDS、pH8.8) を用い、サンプルをそれぞれ 10 $\mu$ L 泳動した。泳動後、Immobilion-P Transfer Membrane (MILLIPORE) に 40 V で 2 時間転写し、Blocking buffer (2.5% スkimミルク (雪印)、1×PBST (80 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>、20 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>、100 mM NaCl、0.1% Tween 20、pH7.5) 中で、1 時間震盪した。その後、ペルオキシダーゼが結合した抗 FLAG 抗体 (Monoclonal anti-FLAG M2-Peroxidase (HRP) antibody (Sigma-Aldrich)) を Blocking buffer で 1000 倍に希釈し、メンブレンを浸した。1 時間室温で震盪培養してから、Blocking buffer での洗浄 (5 分間震盪) を 4 回繰り返した。その後、メンブレンに Luminata Forte Western HRP Substrate (MILLIPORE) をかけ、

ImageQuant LAS 4000 mini (GE ヘルスケア) でシグナルを検出した。

#### 4-12 蛍光顕微鏡観察

本研究における細胞内局在は OLYMPUS (IX71) 蛍光顕微鏡を用いた。観察に用いたサンプルは植物プレートに播種後 5 日の *A. thaliana* の根を用いた。観察手法の詳細は藤岡ら (Fujioka et al., 2007) の手法に従って行った。

#### 4-13 RNA-seq


RNA-seq には植物ライン、*rrp44aKD-1*#7-3-1 および *gusKD-1*#2-2-1 (コントロール植物) を用いた。各植物ラインを 100 個体ずつ植物プレートに播種し、7 日後に葉のみを切り取って植物サンプルとした。この操作を 1 週間おきに 3 回繰り返し、各ラインにつきそれぞれ 3 反復の植物サンプルを得た。この植物サンプルから「RNA 抽出」の方法に従って total RNA を抽出した。total RNA の品質チェック、ライブラリー作成、RNA シーケンスを UMGC (University of Minnesota Genomics Center) に依頼した。Library 作成は TruSeq. RNA. Stranded のキットで依頼し、RNA シーケンスは Illumina 社の HiSeq2000 を用い、Paired end、50 サイクル、1000 万リード/サンプルの条件で実施された。得られたデータは共同研究者の佐藤昌直博士の協力を得て TopHat と Cufflinks を用いて *A. thaliana* のゲノムへアセンブリし、mRNA の定量解析を行った。これらのデータを用いて GO 解析を行った。

#### 4-14 Gene Ontology (GO) 解析

RNA-seq 解析で *rrp44aKD-1* において蓄積量 (FPKM; Fragments Per Kilobase of

exon model per Million mapped fragments) が変化した遺伝子グループ (false discovery rate (FDR)<0.05、 $rrp44aKD/WT(gusKD)>2$  または  $rrp44aKD/WT(gusKD)<0.05$  の 181 遺伝子)、上昇した遺伝子グループ (false discovery rate (FDR)<0.05、 $rrp44aKD/WT(gusKD)>2$  の 128 遺伝子) および発現が減少した遺伝子グループ (FDR<0.05、 $rrp44aKD/WT(gusKD) < 0.5$  の 53 遺伝子) をそれぞれ GO 解析した。該当する遺伝子の AGI code リストを The Plant Geneset Enrichment Analysis Toolkit\* (Du et al., 2010) に入力し、GO 解析の結果を得た。このうち FDR の値が小さい方から 10 個のクラスターを Enrichment score とともに図 19、20 に示した。Enrichment score は「 $-\log_{10}(P\text{-value})$ 」で示され、GO term に含まれる遺伝子クラスターが無作為に選択された場合と比較して、どれほど大きな比率を占めているのかを反映する (Subramanian et al., 2005)。

\*(<http://structuralbiology.cau.edu.cn/PlantGSEA/index.php>)

 (25)

## RNA exosome

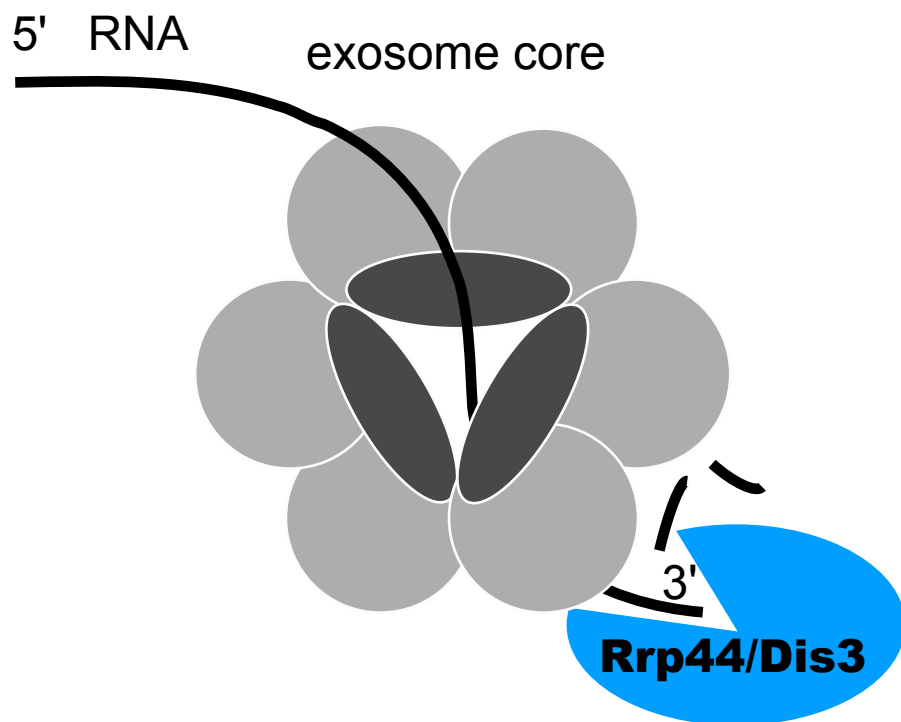


図 1. RNA exosome の概略図。

真核生物に保存された exosome 複合体。9 つのタンパク質によるリング状の exosome core と Rrp44/Dis3 からなる。exosome core の中心を通過した RNA を Rrp44/Dis3 が分解する。薄い灰色: Rrp41、Rrp42、Rrp43、Rrp45、Rrp46、Mtr3。濃い灰色: Csl4、Rrp4、Rrp40。

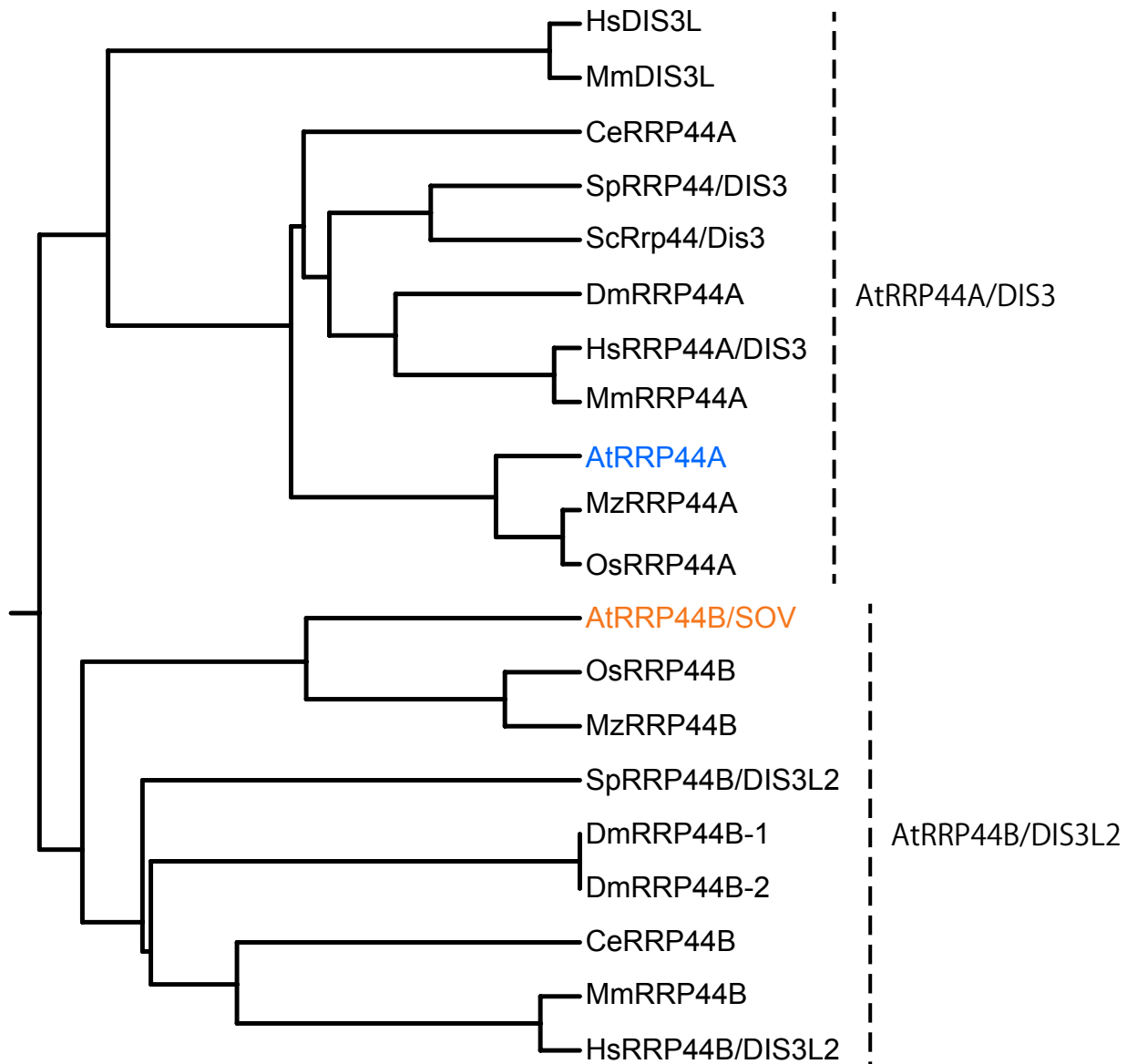
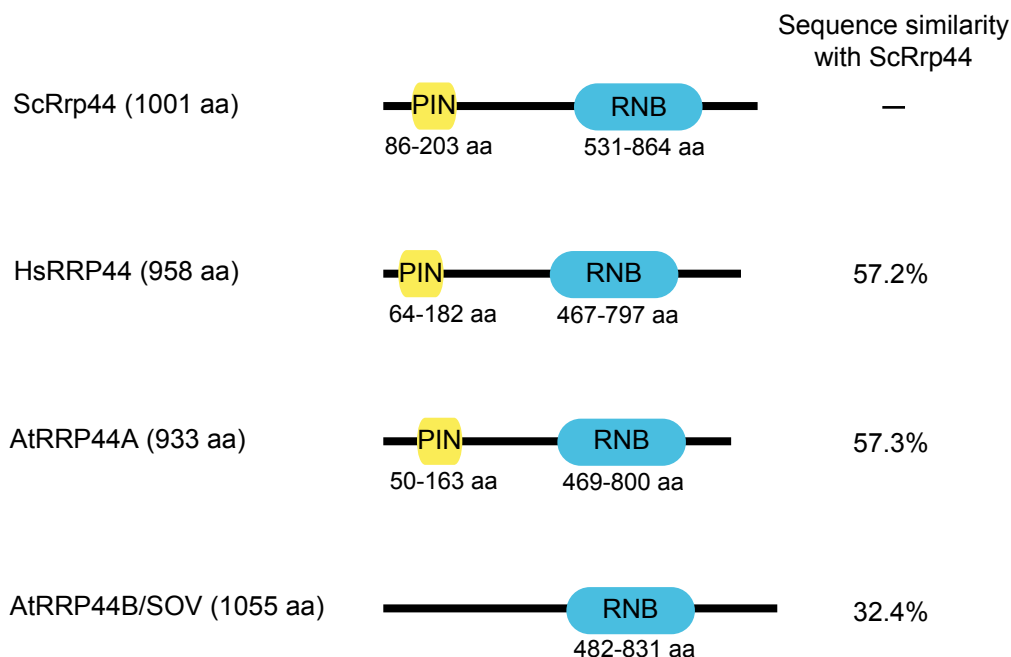


図 2. *A. thaliana* は 2 つの Rrp44/Dis3 ホモログ (AtRRP44A と AtRRP44B/SOV) を持つ。植物 (シロイヌナズナ、イネ、トウモロコシ)、動物 (ヒト、マウス、ハエ、線虫)、真菌 (出芽酵母、分裂酵母) の Rrp44/Dis3 タンパク質の系統樹解析。それぞれのタンパク質の RNB ドメイン配列を用い、Clustal W (GenomNet) で作成した。異なる生物種由来の Rrp44/Dis3 は AtRRP44A/DIS3 と AtRRP44B/SOV の 2 つのクラスターを形成した。Hs: ヒト、Mm: マウス、Ce: 線虫、Sp: 出芽酵母、Sc: 分裂酵母、Dm: ショウジョウバエ、At: シロイヌナズナ、Os: イネ、Mz: トウモロコシ。図



**A**



**B**

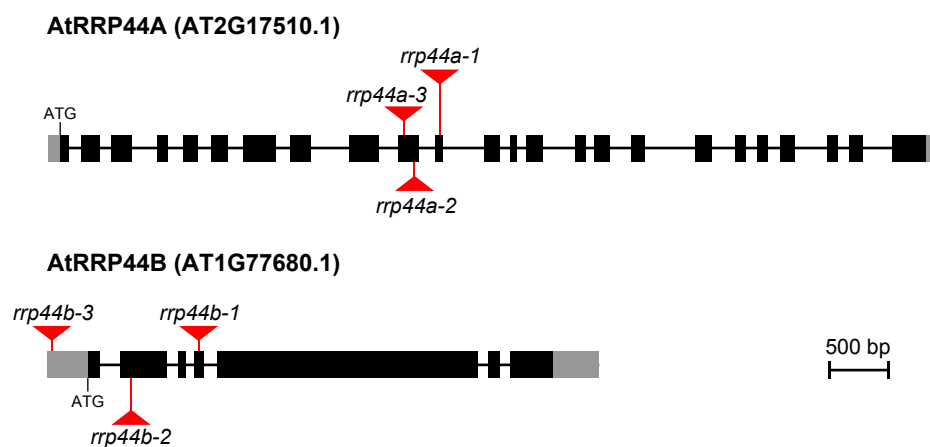


図 3. RRP44/Dis3 のホモログの概略図。

(A) 出芽酵母 (ScRrp44)、ヒト (HsDIS3)、シロイヌナズナ (AtRRP44A [AGI code: AT2G17510.1]、AtRRP44B/SOV [AGI code: AT1G77680.1]) のアミノ酸配列相同性を右上に示した (EMBOSS Needle オンラインソフトウェアで算出)。PIN (Pilt N terminal) ドメインと RNB (RNA binding domain) のアミノ酸領域は InterProScan 4 オンラインソフトウェアで推定した。「aa」はアミノ酸を示す。(B) AtRRP44A (AT2G17510.1) と AtRRP44B (AT1G77680.1) の exon-intron 構造の概略図。灰色の四角は UTR、黒の四角は exon、実線は intron を示す。赤い線の位置に各変異体の T-DNA が挿入されている。

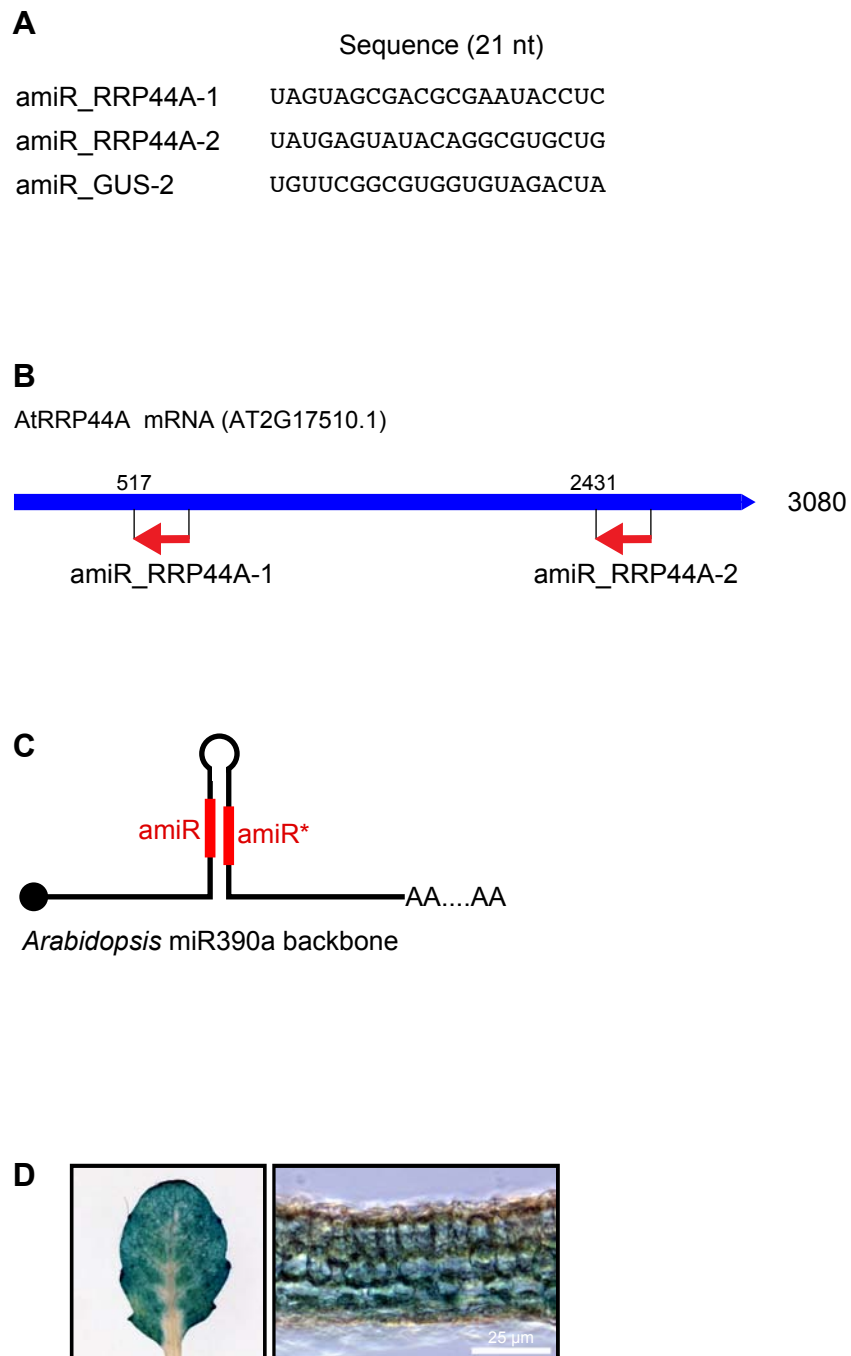


図 4. artificial microRNA (amiR) による AtRRP44A の組織特異的なノックダウン植物の確立。  
 (A) amiR の配列 (amiR\_RRP44A-1 and amiR\_RRP44A-2)。(B) AtRRP44A mRNA (AGI code: AT2G17510.1、青線) 上の amiR ターゲットサイト (赤線)。(C) amiR の前駆体の概略図。赤線は成熟した amiR になる領域を示す。(D) amiR をドライブする CAB3 promoter の活性を  $\beta$ -glucuronidase (GUS) の発現でチェックした。CAB3 promoter が活性を持つ葉肉細胞で GUS の発現 (青の染色部分) が確認された。

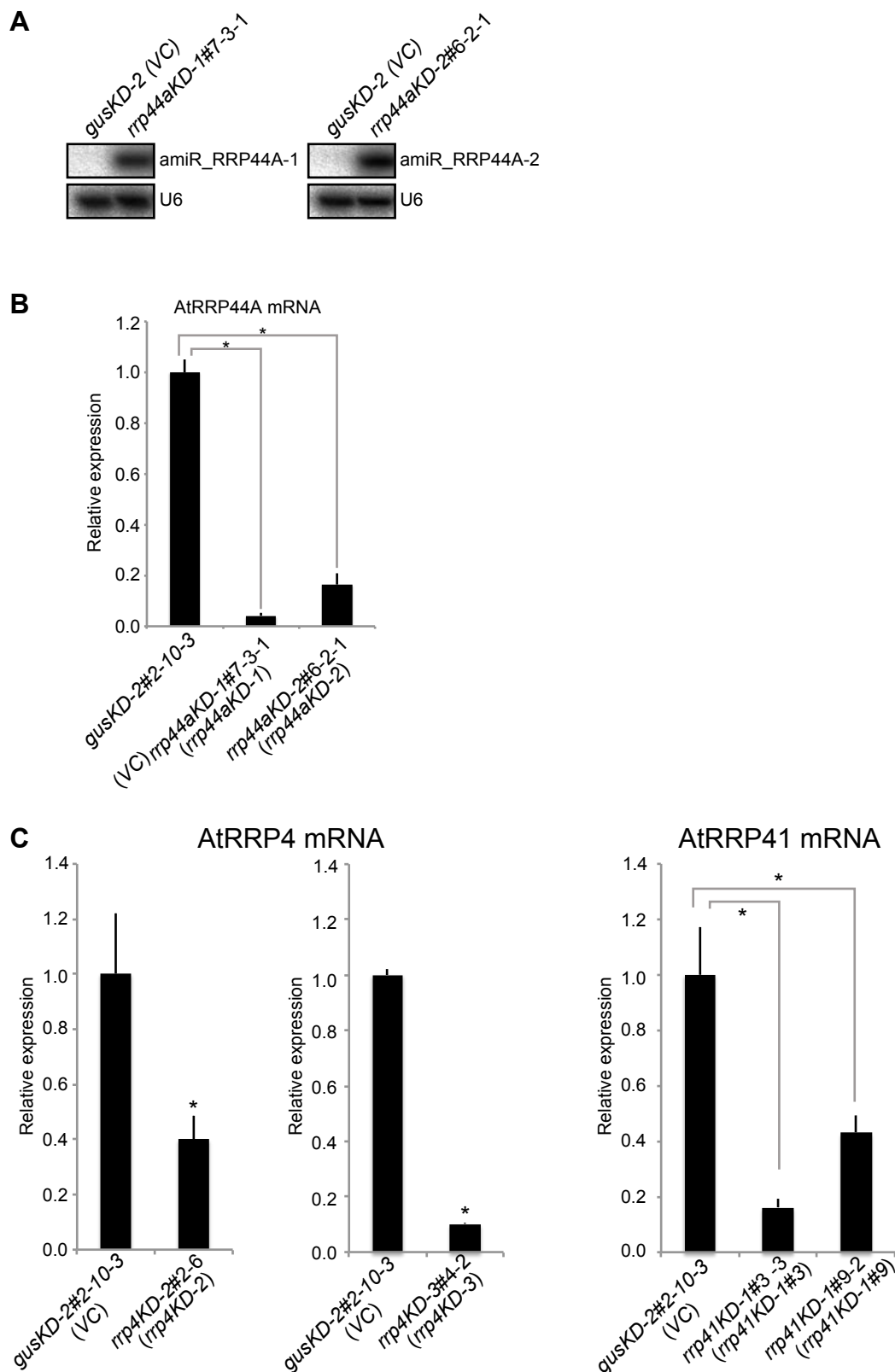


図 5. artificial microRNA (amiR) による AtRRP44A の組織特異的なノックダウン植物の確立。  
 (A) amiR\_RRP44A-1 と amiR\_RRP44A-2 のノーザンブロットングによる発現確認。ローディングコントロールとして、U6 RNA を検出した。(B) *rrp44aKD-1#7-3-1* と *rrp44aKD-1#6-2-1* における AtRRP44A mRNA のノックダウンの確認。qRT-PCR を用いて計測した。(C) は *rrp4KD* と *rrp41KD* (B,C) 共に播種後 25 日後のロゼッタ葉から抽出した total RNA を使用した 6 回の生物学的反復および、2 回の技術的反復を行った。\* は有意差を示す ( $p < 0.01$ , Tukey's test)。エラーバーは標準誤差。

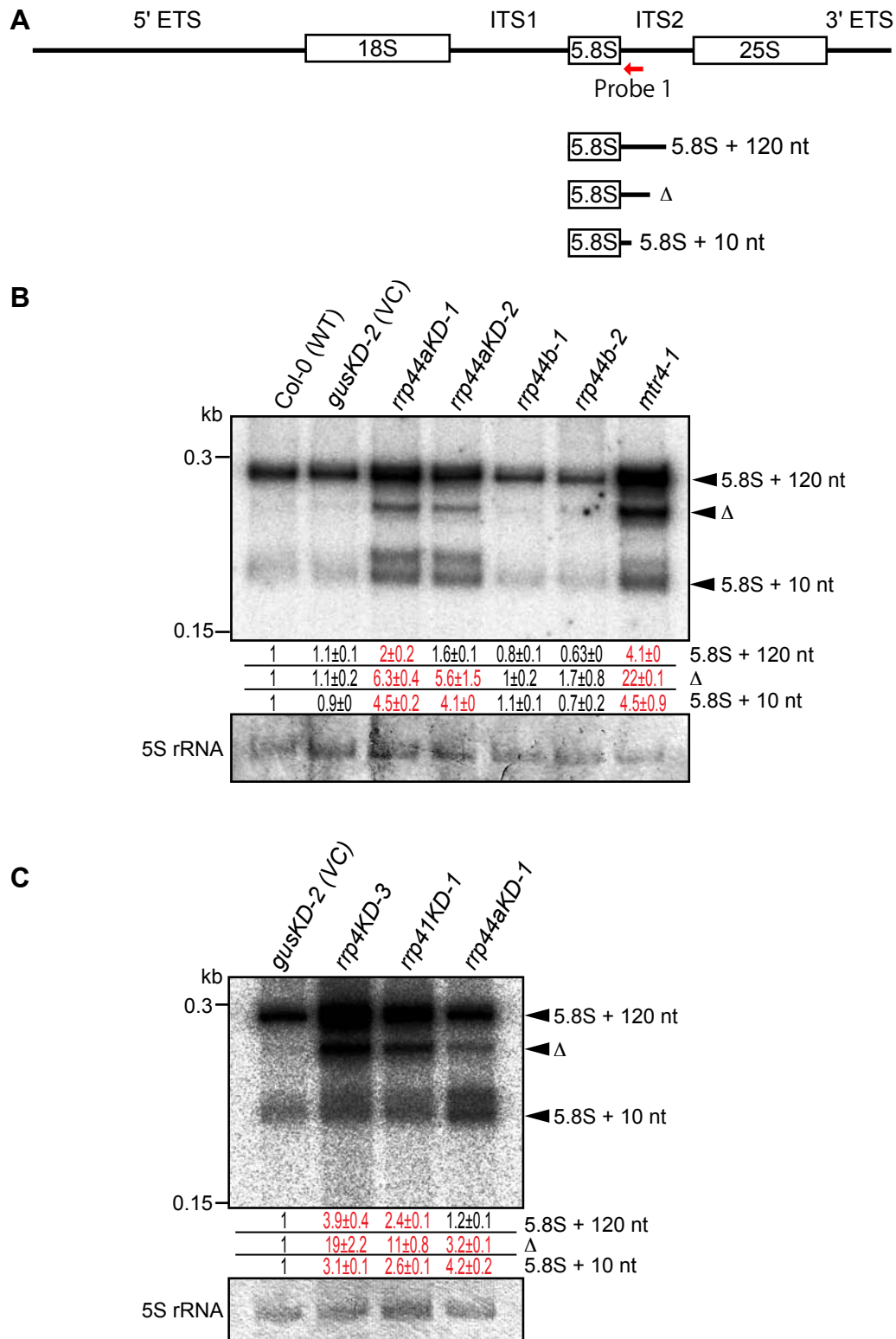


図 6. rRNA プロセッシングの解析。

(A) rRNA 前駆体である 35S precursor と 5.8S rRNA 合成中間体の概略図。赤い矢印は用いた Oligonucleotide プローブの位置を示す。(B) AtRRP44A は 5.8S rRNA のプロセッシングに関与するが、AtRRP44B/SOV は関与しない。(C) AtRRP44A と exosome 因子 (AtRRP4 と AtRRP41) は 5.8S rRNA のプロセッシングに同様に関与する。実験の諸条件は次ページに記載。WT: Wild Type。VC: Vector Control。

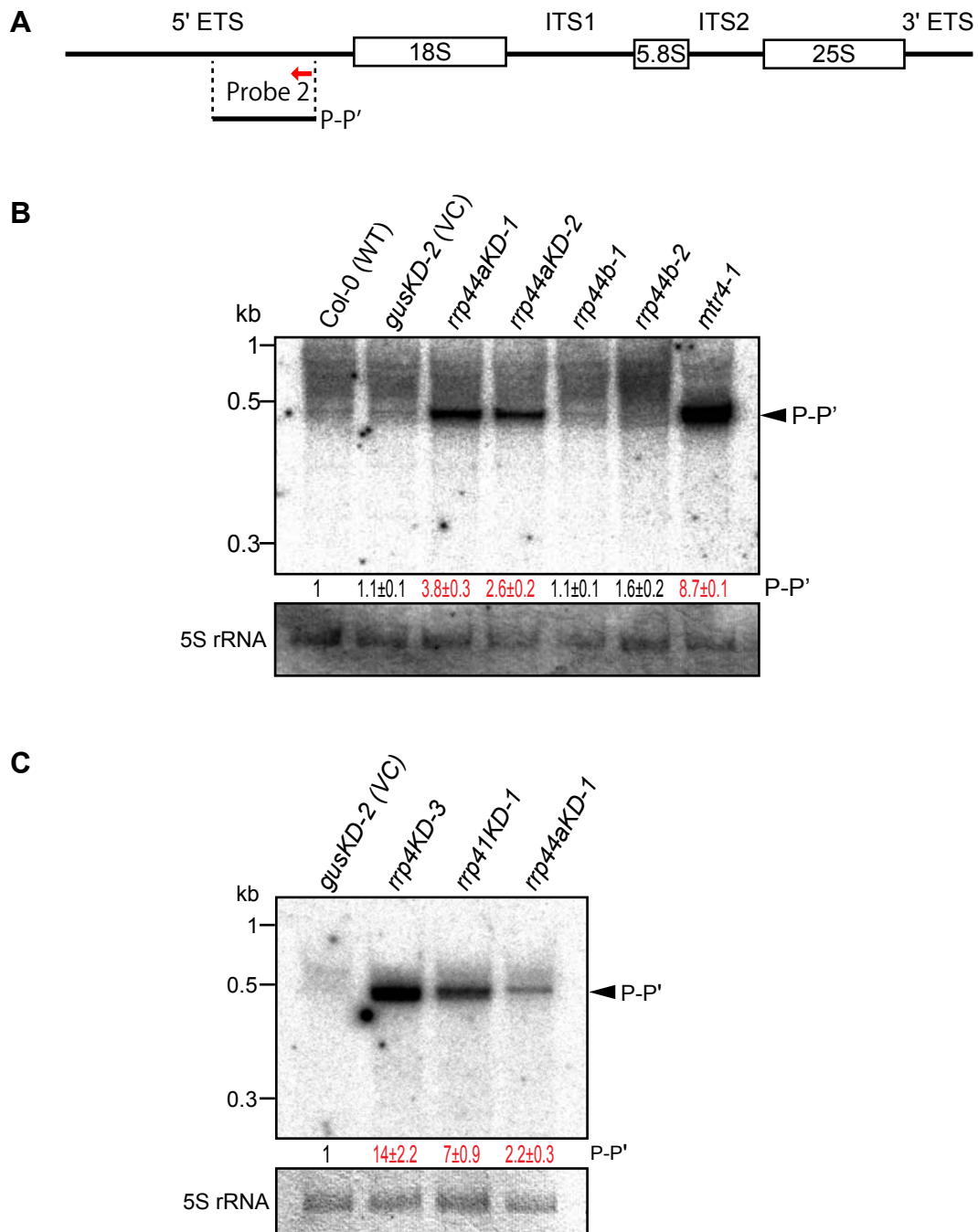
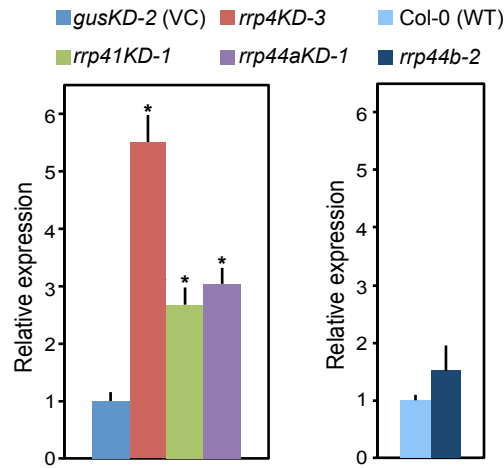


図 7. rRNA 分解の解析。

(A) rRNA 前駆体である 35S precursor と 5.8S rRNA 合成中間体の概略図。赤い矢印は用いた Oligonucleotide プローブの位置を示す。(B) AtRRP44A は 5' ETS の分解に関与するが、AtRRP44B/SOV は関与しない。(C) AtRRP44A と exosome 因子 (AtRRP4 と AtRRP41) は 5' ETS の分解に関与する。total RNA は播種後 10 日の Col-0 (wild type: WT)、*gusKD-2* (vector control: VC)、*rrp44aKD-1*, *rrp44aKD-2* *rrp44b-1* *rrp44b-2* と *mtr4-1*、または *gusKD-2*, *rrp4KD-3*, *rrp41KD-1*, *rrp44aKD-1* 植物から抽出した。*mtr4-1* は 5.8S rRNA 合成中間体のコントロールとして用いた。5S rRNA をメチレンブルーで染色し、ローディングコントロールとして用いた。バンドのシグナルから推定される相対的な RNA 量は ± 標準誤差と共に Col-0 の値を 1 として、各レーンの下に記した。多重比較 (Tukey' s Test) の結果、Col-0 (WT) (B) または *gusKD-2* (C) との間で、有意な差がみられたもの ( $p < 0.05$ ) は赤字で記した。(B)、(C) の値はそれぞれ 2 回、3 回の生物学的反復のデータから算出した。

### A MRP RNA



### B snoRNA31

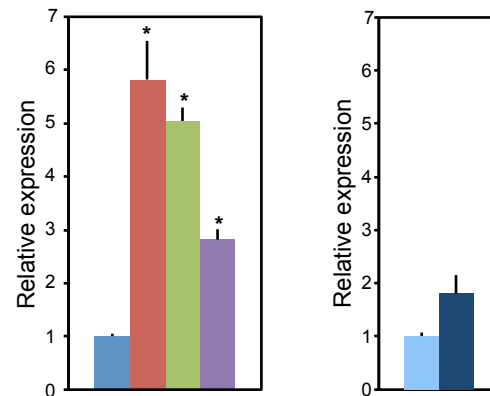


図 8. *rrp44aKD-1*, *rrp44b-1* と exosome core 変異体における機能性 non-coding RNA 蓄積レベル。

(A) Exosome core 因子である AtRRP4 と AtRRP41 の基質 RNA (MRP RNA) を qRT-PCR で測定した。(B) snoRNA31を測定した。トータルRNAは播種後7日目の葉から抽出した。エラーバーは標準誤差。3回の生物学的反復と、各2回の技術的反復を行った。EF1a mRNAを内在性遺伝子のコントロールとして用いた。\*は変異体と野生型 (*gusKD-2* (VC) または Col-0 (WT)) との有意な差を示す (Tukey's Test,  $p < 0.05$ )。

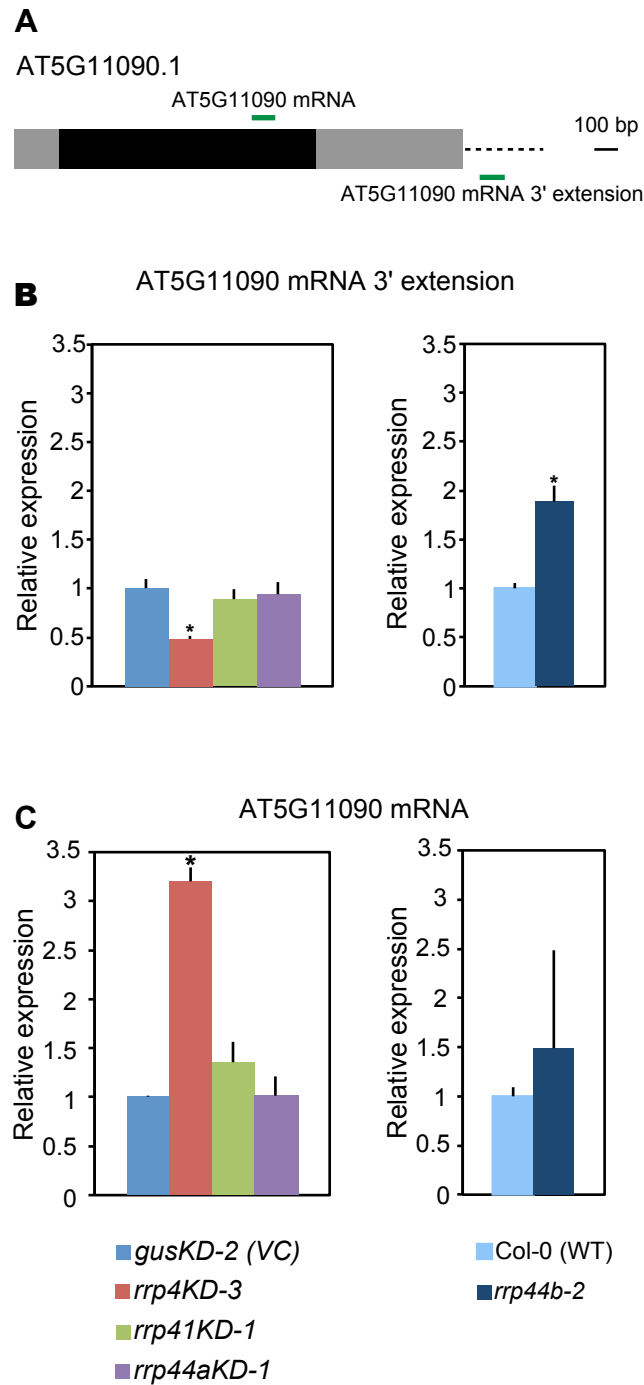


図 9. *rrp44aKD-1*, *rrp44b-1* と exosome core 変異体における mRNA 蓄積レベル (1)。  
 (A) qRT-PCR による検出部位の概略図。Untranslated region (UTR) は灰色、exon は黒、intron は実線、3' extension 領域は破線でそれぞれ示した。緑の線は qRT-PCR に用いた Amplicon の領域を示す。(B, C) Exosome core 因子である AtRRP4 と AtRRP41 の基質 RNA (AT5G11090 mRNA 3' extension, AT5G11090 mRNA) をそれぞれ qRT-PCR で測定した。total RNA は播種後 7 日目の葉から抽出した。エラーバーは標準誤差。3 回の生物学的反復と、各 2 回の技術的反復を行った。EF1a mRNA を内在性遺伝子のコントロールとして用いた。\* は変異体と野生型 (*gusKD-2* (VC) または Col-0 (WT)) との有意差を示す (Tukey's Test,  $p < 0.05$ )。

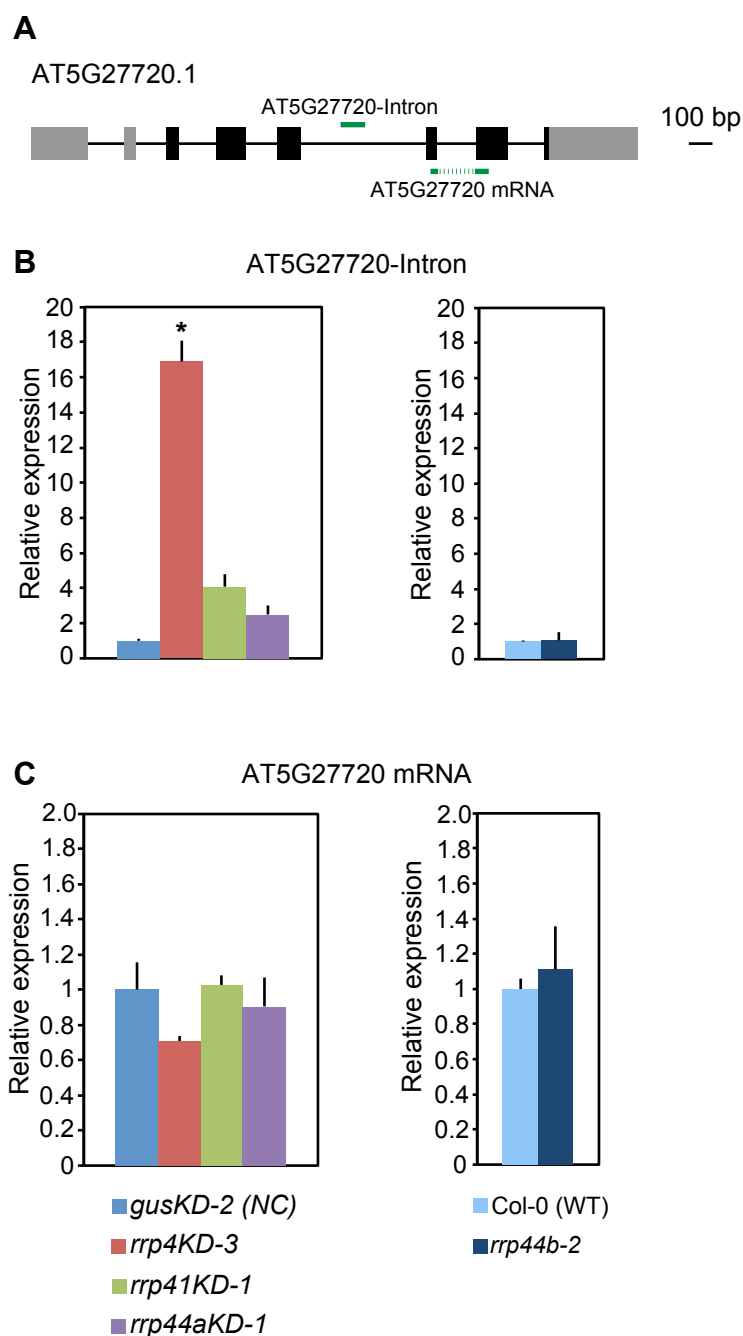


図 10. *rrp44aKD-1*, *rrp44b-1* と exosome core 変異体における mRNA 蓄積レベル (2))。

(A) qRT-PCR による検出部位の概略図。Untranslated region (UTR) は灰色、exon は黒、intron は実線でそれぞれ示した。緑の線は qRT-PCR に用いた Amplicon の領域を、緑の破線は amplicon には含まれない領域 (intron spanning region) を示す。(B, C) Exosome core 因子である AtRRP4 と AtRRP41 の基質 RNA (AT5G27720 intron, AT5G11090 mRNA) をそれぞれ qRT-PCR で測定した。total RNA は播種後 7 日目の葉から抽出した。エラーバーは標準誤差。3 回の生物学的反復と、各 2 回の技術的反復を行った。EF1a mRNA を内在性遺伝子のコントロールとして用いた。\* は変異体と野生型 (*gusKD-2* (VC) または *Col-0* (WT)) との有意差を示す (Tukey's Test,  $p < 0.05$ )。



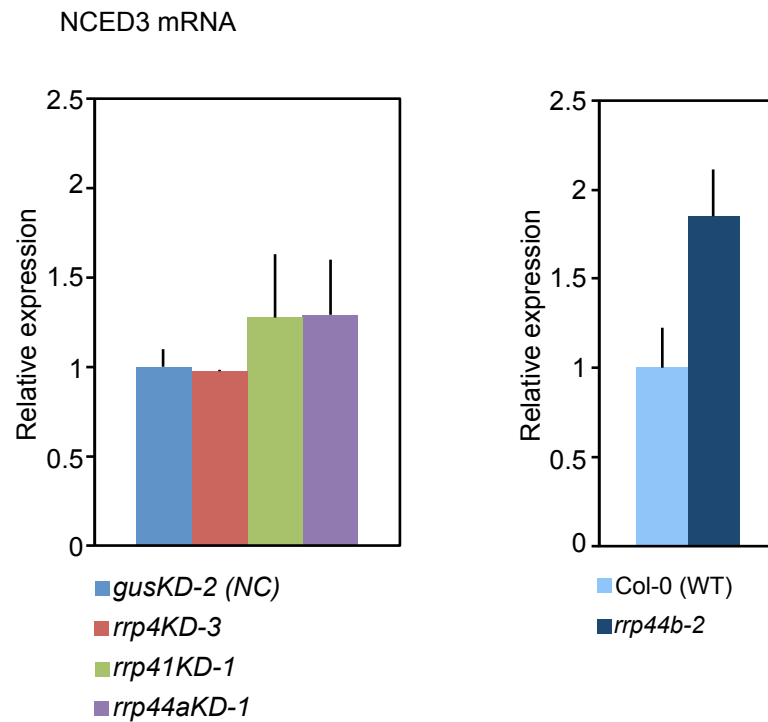


図 11. *rrp44aKD-1*, *rrp44b-1* と exosome core 変異体 mRNA 蓄積レベル (3)。  
Exosome core 因子 RRP41L の標的 mRNA NCED5 を qRT-PCR で測定した。エラーバーは標準誤差。3 回の生物学的反復と、各 2 回の技術的反復を行った。EF1a mRNA を内在性遺伝子のコントロールとして用いた。

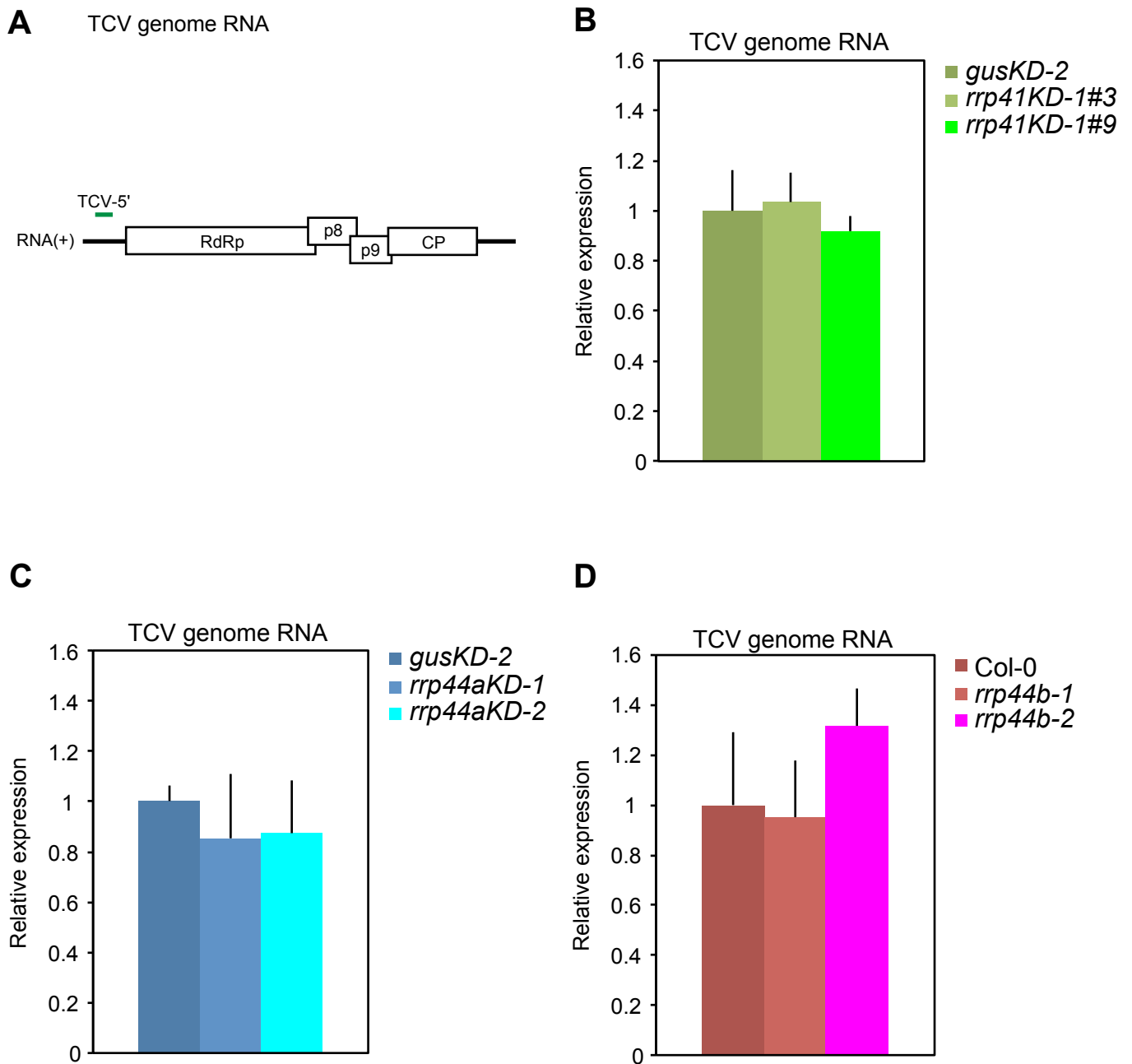


図 12. AtRRP44A、AtRRP44B/SOV、exosome は RNA ウィルスである TCV の増殖に影響を与えない。(A) TCV のゲノム RNA (約 4000 塩基) の構造。(B) TCV ゲノム RNA の *rrp41KD-1#3* と #9 における蓄積。(C) TCV ゲノム RNA の *rrp44aKD-1* と *rrp44aKD-2* における蓄積。(D) TCV ゲノム RNA の *rrp44b-1* と *rrp44b-2* における蓄積。TCV のウイルス粒子は 16 day post germination (dpg) に 4、5 番目のロゼッタ用に接種した。接種から 3 日後に接種葉を回収し、total RNA を抽出し cDNA を作成した。全てのデータは qRT-PCR で取得した。エラーバーは標準誤差。生物学的反復を 6 回、qRT-PCR の技術的反復を 2 回ずつ行った。EF1a mRNA を内在性のコントロールとして用いた。使用したプライマーセットは表 4 を参照。

## A TCV genome RNA

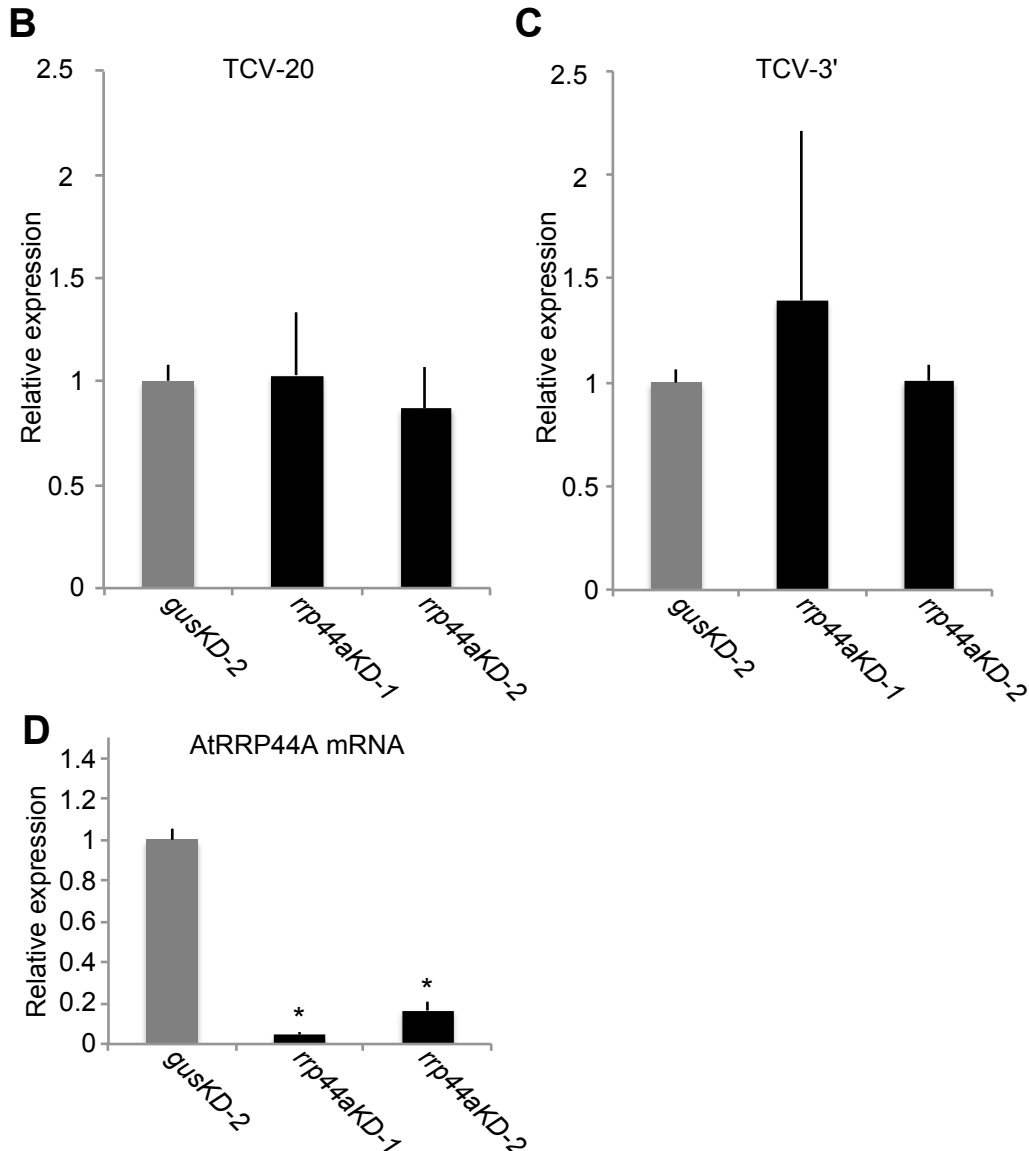
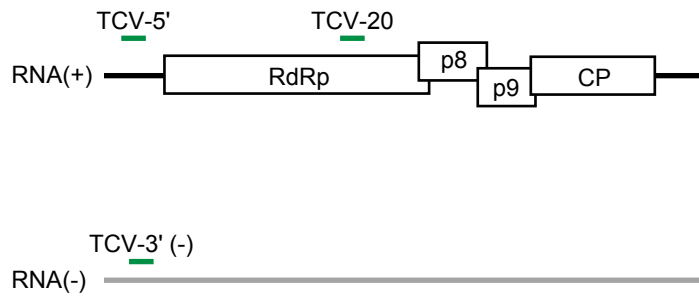
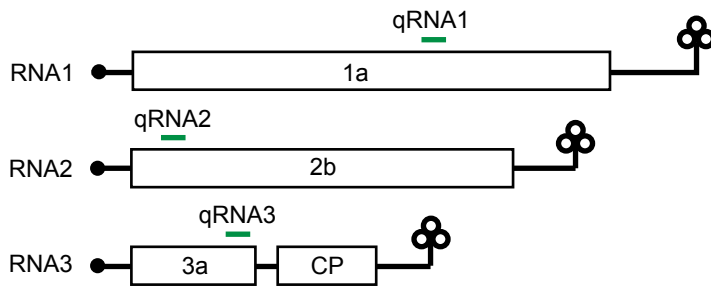


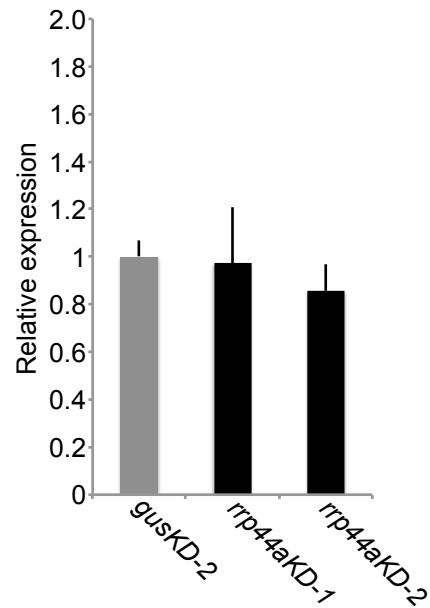
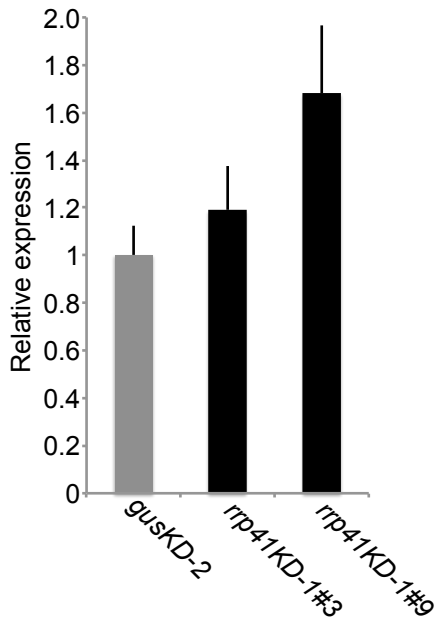
図 13. AtRRP44A は TCV のゲノム RNA の蓄積に影響を与えない。

(A) TCV のゲノム RNA (約 4000 塩基) の構造。四角はたんぱく質をコードする領域。緑色の線は qRT-PCR の Amplicon 領域を示す。(B) Amplicon “TCV-20” による、*rrp44aKD-1* と *rrp44aKD-2* における TCV ゲノム RNA の蓄積の検出。(C) Amplicon “TCV-3 (-)” による、*rrp44aKD-1* と *rrp44aKD-2* における TCV ゲノム RNA (マイナス鎖) の蓄積の検出。(D) TCV 接種植物における AtRRP44A の mRNA の検出。全てのデータは qRT-PCR で取得した。エラーバーは標準誤差。生物学的反復を 6 回、qRT-PCR の技術的反復を 2 回ずつ行った。EF1a mRNA を内在性のコントロールとして用いた。使用したプライマーセットは表 4 を参照。

## A CMV genome RNA



## B RNA1



## C RNA2

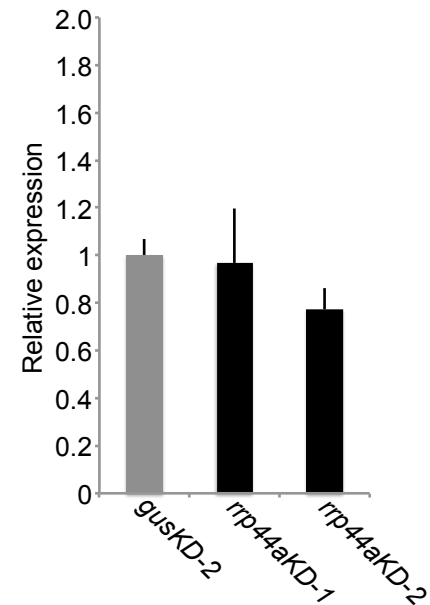
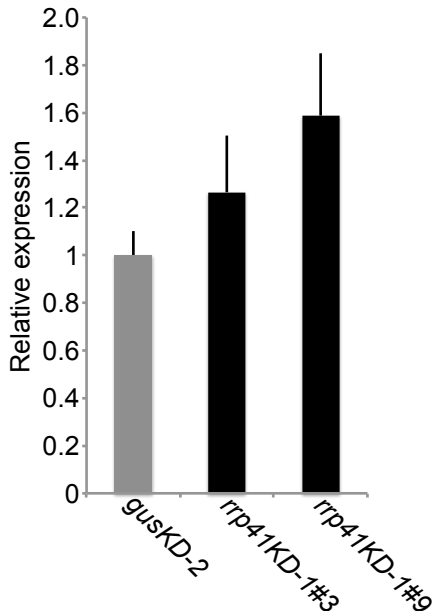


図 14. AtRRP44A と AtRRP41 は RNA ウィルスである CMV の蓄積に影響を与えない。  
(A)CMV のゲノム RNA (3 分節のゲノム RNA; RNA1, RNA2, RNA3) の構造。白の箱はタンパク質をコードする領域を示す。各ゲノム RNA は 5' 末端にキャップ構造、3' 末端に tRNA 様構造を持つ。(B) CMV の RNA1 の *rrp41KD-1#3* と #9 と *rrp44aKD-1*, *rrp44aKD-2* における蓄積。(C) CMV の RNA2 の *rrp41KD-1#3* と #9 と *rrp44aKD-1*, *rrp44aKD-2* における蓄積。実験条件の詳細は次頁。

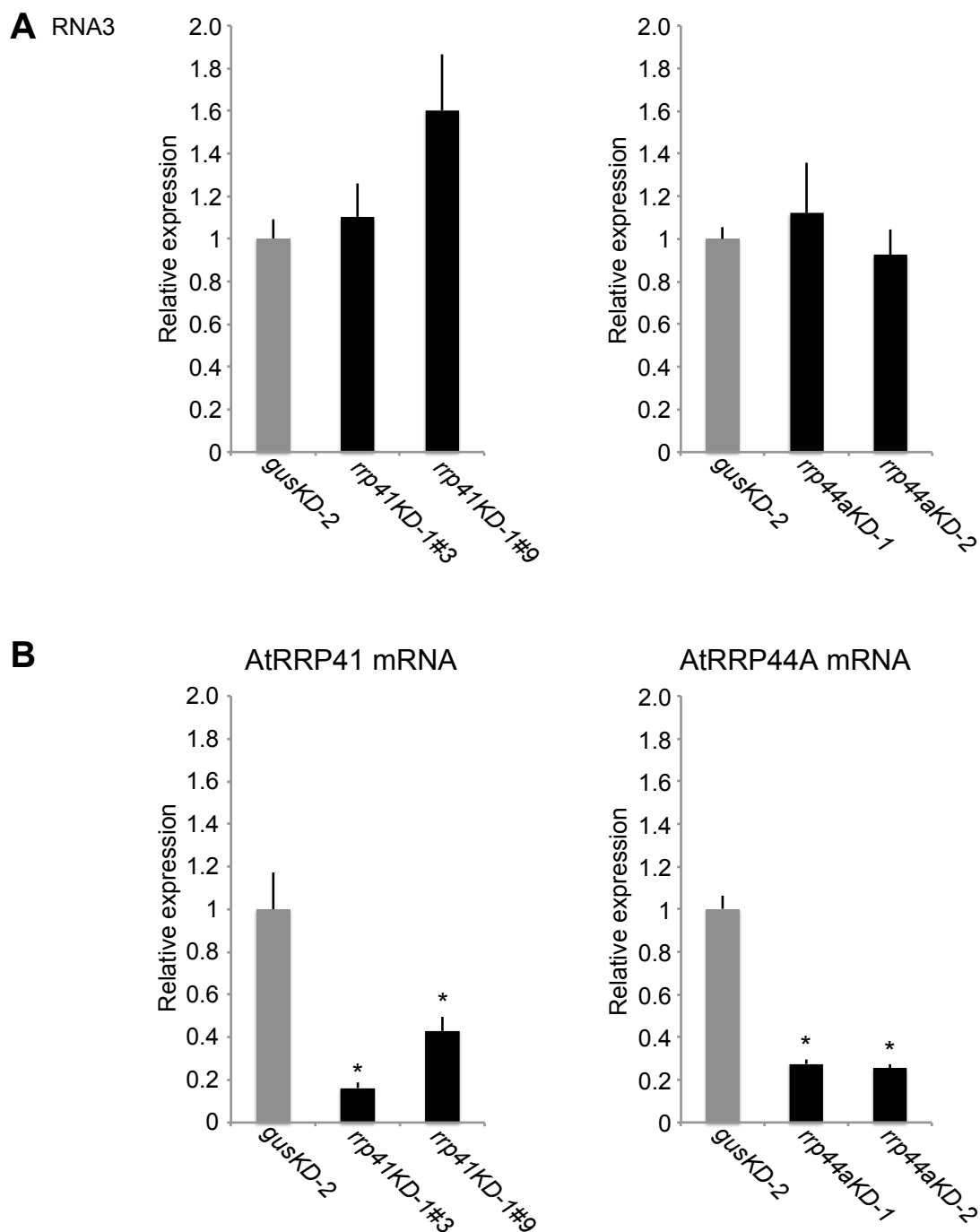


図 15. AtRRP44A と AtRRP41 は RNA ウィルスである CMV の蓄積に影響を与えない。  
 (A) CMV の RNA3 の *rrp41KD-1#3* と #9 と *rrp44aKD-1*, *rrp44aKD-2* における蓄積。(B)  
 CMV 感染植物における AtRRP41 または AtRRP44A mRNA のノックダウンの確認。TCV の  
 ウィルス粒子は 20 day post germination (dpg) に 4、5 番目のロゼッタ用に接種した。接種  
 から 3 日後に接種葉を回収し、total RNA を抽出し cDNA を作成した。全てのデータは  
 qRT-PCR で取得した。エラーバーは標準誤差。生物学的反復を 6 回、qRT-PCR の技術  
 的反復を 2 回ずつ行った。EF1a mRNA を内在性のコントロールとして用いた。使用したプ  
 ライマーセットは表 4 を参照。

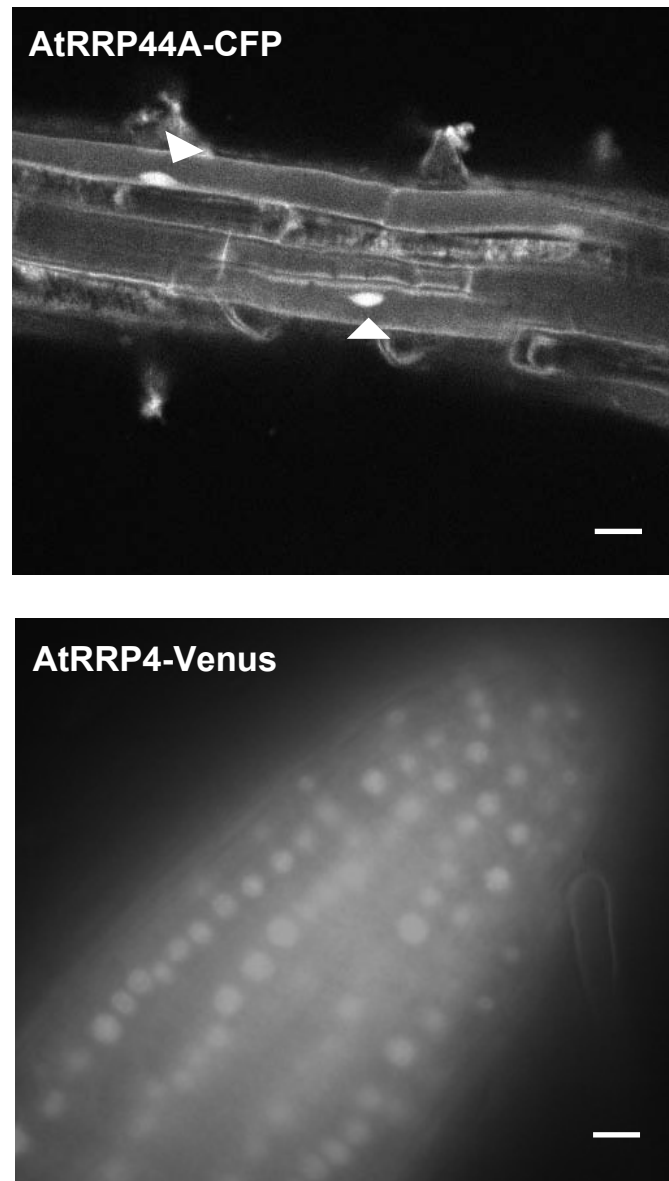
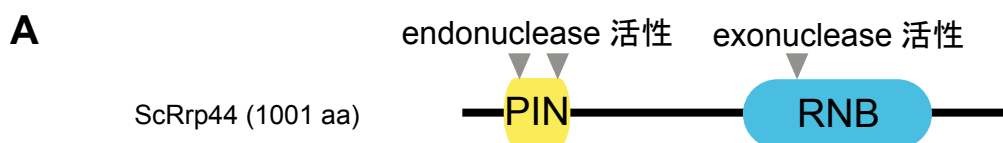


図 16. AtRRP44A と exosome core (AtRRP4) の局在  
AtRRP44A と AtRRP4 の C 末端側にそれぞれ CFP、Venus を融合させたタンパク質を、シロイヌナズナで発現させ、根において細胞内局在を観察した。白い矢尻は核を示す。スケールバー：50  $\mu\text{m}$ 。



比較項目		exosome core	AtRRP44A	AtRRP44B/SOV
変異体の表現型		胚性致死	胚性致死	特になし
標的RNA	rRNA	○	○	×
	MRP RNA	○	○	×
	snoRNA	○	○	×
	AT5G11090 mRNA	×	×	○
	ウイルスRNA	×	×	×
細胞内局在		核・細胞質	核・細胞質	細胞質顆粒

図 17. AtRRP44A は植物の exosome 因子である。(2-1) のまとめ。



**B** ヒト、酵母、シロイヌナズナで保存された PIN ドメインの活性中心のアスパラギン酸残基

	aa			
ScRr44	168	<b>DRNDRAIRKTCQWYSEHLKPY</b> ----- <b>DINVVLVTNDRLNREAA</b>	205	
HsRRP44	143	<b>DRNDRAIRVAAKWYNEHLKKMSADNQLQVIFTTNDRRNKEKA</b>	184	
AtRRP44A	129	<b>DHNDRAIRVATLWYQKHLGDT</b> ----- <b>SQVLLVTNDRENKRKA</b>	165	
		▲	▲	

**C** ヒト、酵母、シロイヌナズナで保存された RNB ドメインの活性中心のアスパラギン酸残基

	aa			
ScRr44	531	<b>RKDLRDKLICSIDPPGCVD</b> <b>I</b> DDALHAKKLPNGNWEVGVHIAD	572	
HsRRP44	467	<b>REDLRHLCICSVDP</b> <b>P</b> GC <b>T</b> <b>D</b> IDDALHCRELENGNLEVGVHIAD	508	
AtRRP44A	469	<b>RQDLRHLLVFSVD</b> <b>P</b> PG <b>C</b> <b>K</b> <b>D</b> IDDALHCTSLPNGNFELGVHIAD	510	
		▲		

図 18. Rrp44/Dis3 に保存された exoribonuclease と endoribonuclease 活性中心 D  
 (A) ScRRP44 のドメイン図。(B) PIN ドメインの活性中心。(C) RNB ドメインの活性中心。  
 RRP44/Dis3 の RNA 分解活性中心 (endoribonuclease 活性と exriboonuclease 活性。青い矢  
 尻部分) はヒト、出芽酵母、シロイヌナズナで保存されている。ScRRP44 (出芽酵母)、  
 HsRRP44 (ヒト)、AtRRP44A (シロイヌナズナ) のアミノ酸配列の一部。上段は PIN ドメイン、  
 下段は RNB ドメイン。



**A**

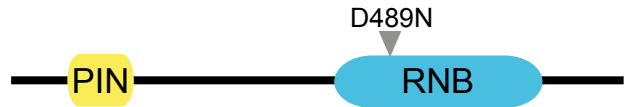
AtRRP44A



AtRRP44A(D132N,D158N)



AtRRP44A(D489N)



AtRRP44A(D132N,D158N,D489N)

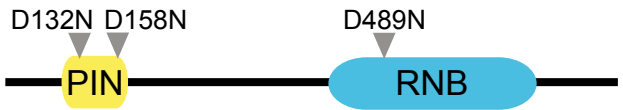
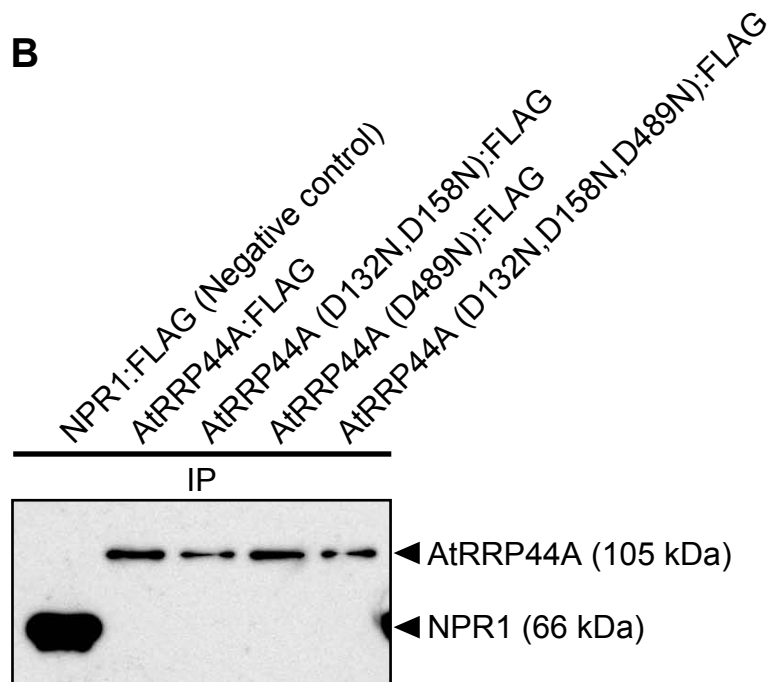
**B**

図 19. AtRRP44A リコンビナントタンパク質の構造と発現

(A) *In vitro* RNA 分解活性実験に用いる AtRRP44A のアミノ酸置換変異体。上から AtRRP44A; 野生型、AtRRP44A(D132N,D158N); PIN ドメインの推定 endonuclease 活性中心のアミノ酸置換変異体、AtRRP44A(D489N); RNB ドメインの推定 exonuclease 活性中心のアミノ酸変異置換体、AtRRP44A(D132N,D158N,D489N); PIN ドメインの endonuclease 活性中心と、RNB ドメインの exonuclease 活性中心のアミノ酸変異置換体。(B) リコンビナントタンパク質の発現確認。Exonuclease 活性実験に用いたタンパク質の発現をウェスタンブロットングによって確認した。

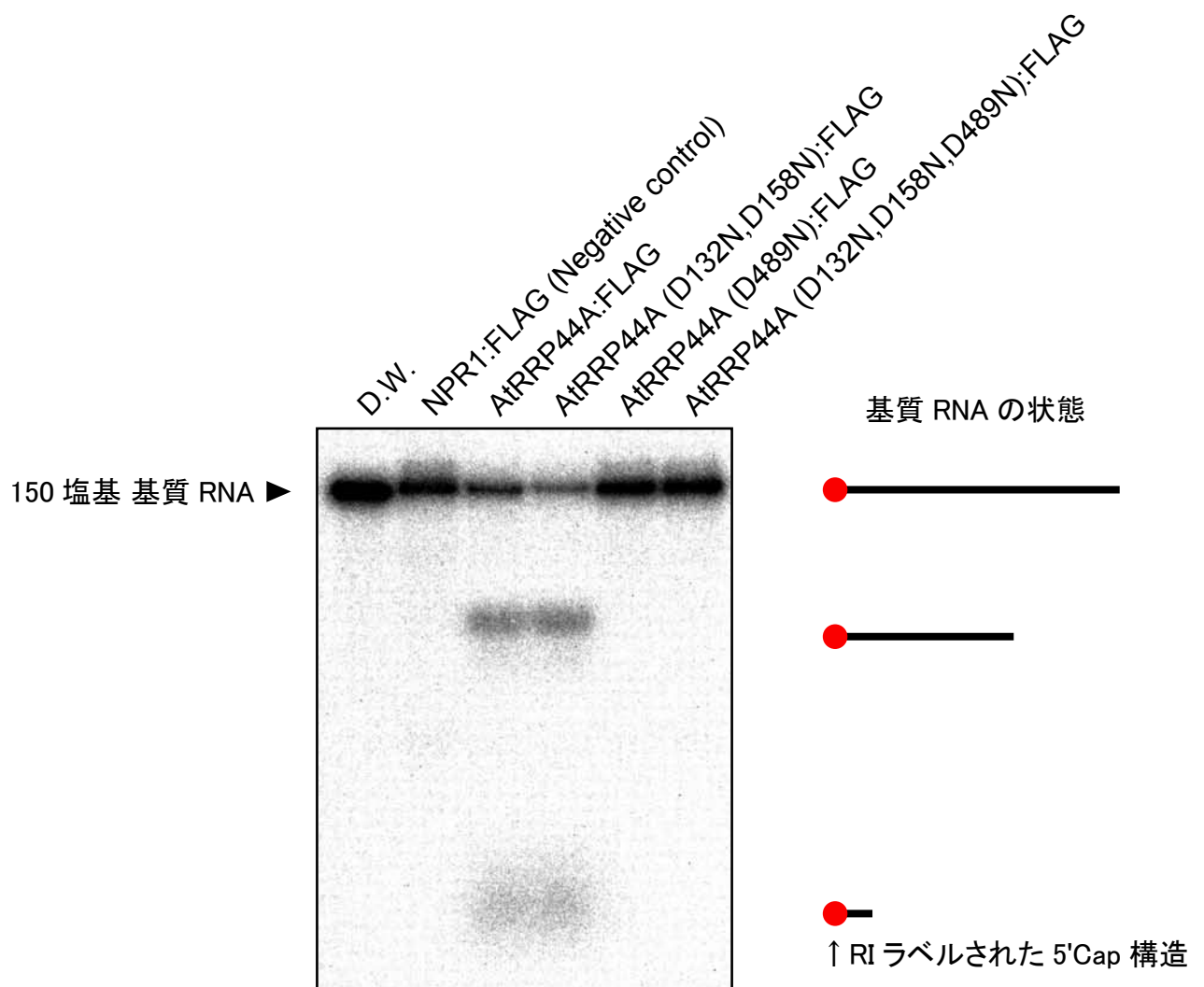


図 20. AtRRP44A の RNB ドメインが示す RNA 分解活性 (exoribonuclease 活性) の検出  
5' Cap RI 標識された RNA 基質への RRP44A:FLAG, RRP44A(D132N,D158N):FLAG, RRP44A (D489N):FLAG, RRP44A(D132N,D158N,D489N):FLAG の exonuclease 活性。リコンビナント蛋白質を RNA 基質と室温で 90 分間インキュベートした。反応液を 7M 尿素・15% ポリアクリルアミドゲルで電気泳動し、オートラジオグラフィーによって検出した。ネガティブコントロールとして水 (D.W.) と RNA 分解活性を持たないシロイヌナズナの NPR1 タンパク質の C 末端に FLAG タグを付加したものをを用いた。

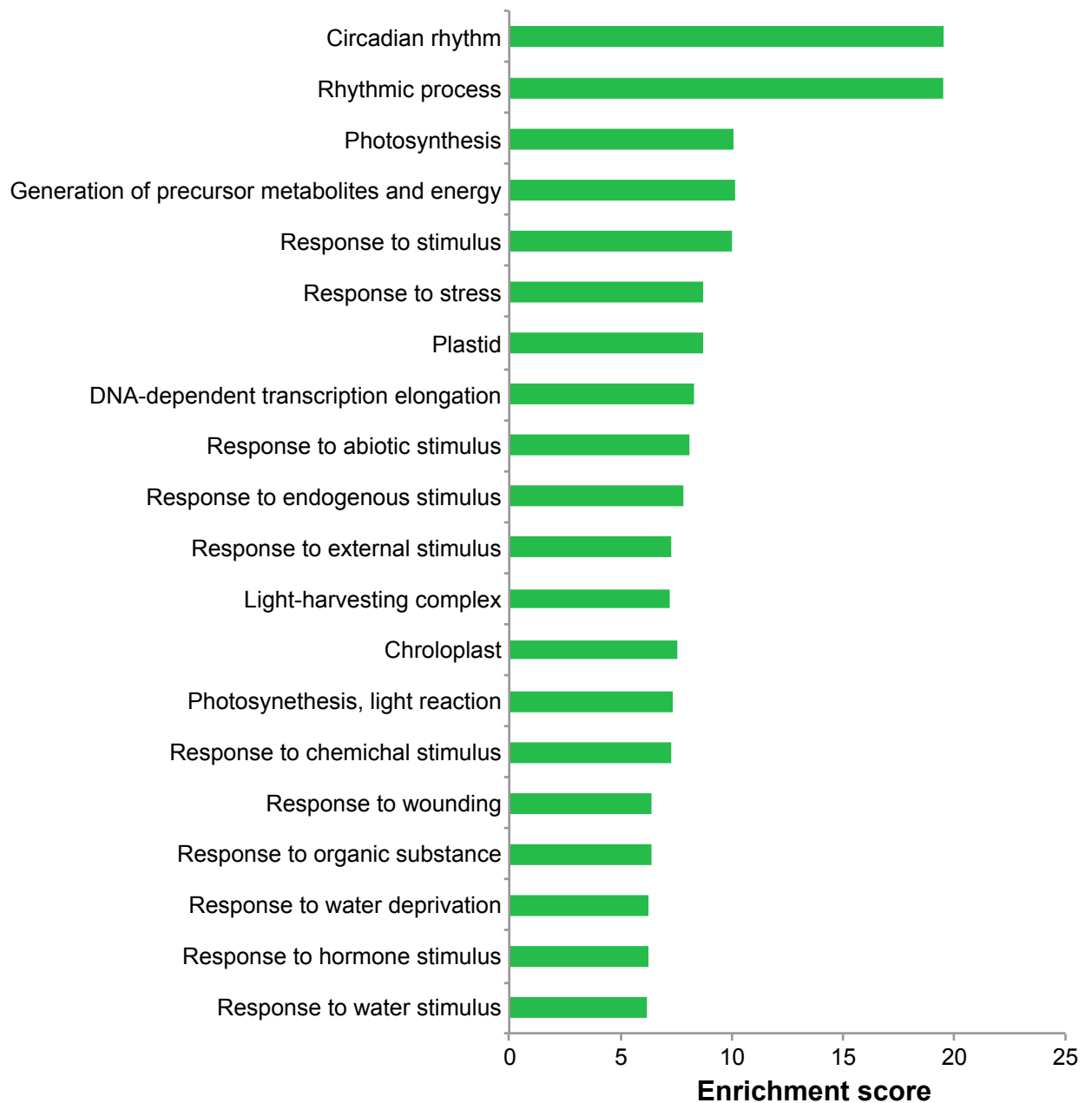
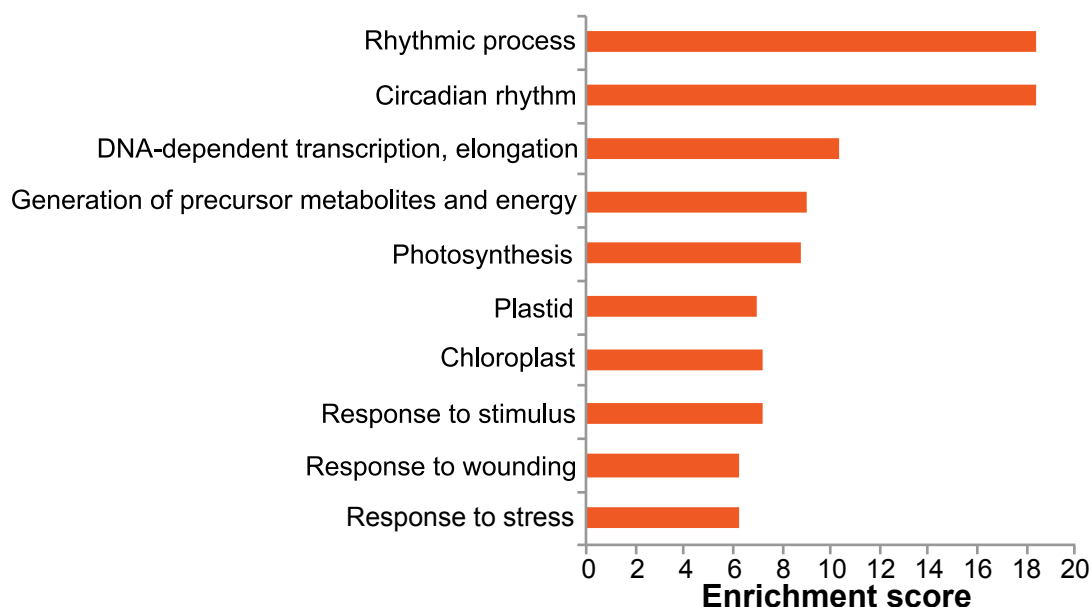


図 21. AtRRP44A ノックダウン植物において蓄積が変化した 181 遺伝子の Gene ontology (GO) 解析。

この 181 遺伝子は WT と *rrp44aKD* での蓄積量 (FPKM) の間に有意差 ( $FDR < 0.05$ ) があり、かつ 2 倍以上 ( $0.5 < rrp44aKD/gusKD$ 、もしくは  $2 < rrp44aKD/gusKD$ ) の差があるもの。最も FDR の低い (AtRRP44AKD による蓄積量変動の影響が大きい) 20 個の GO term クラスターを Enrichment score ( $-\log_{10}(P\text{-value})$ ) と共に横棒グラフで表示した。P 値 = 0.05 のとき、Enrichment score は  $-\log_{10}(0.05) = 1.30$ 。Enrichment score が 1.30 以上の場合は無作為に選出した場合との間に有意差がある。

**A** AtRRP44A ノックダウン植物で蓄積量が増加した 128 遺伝子の GO 解析



**B** AtRRP44A ノックダウン植物で蓄積が減少した 53 遺伝子の GO 解析

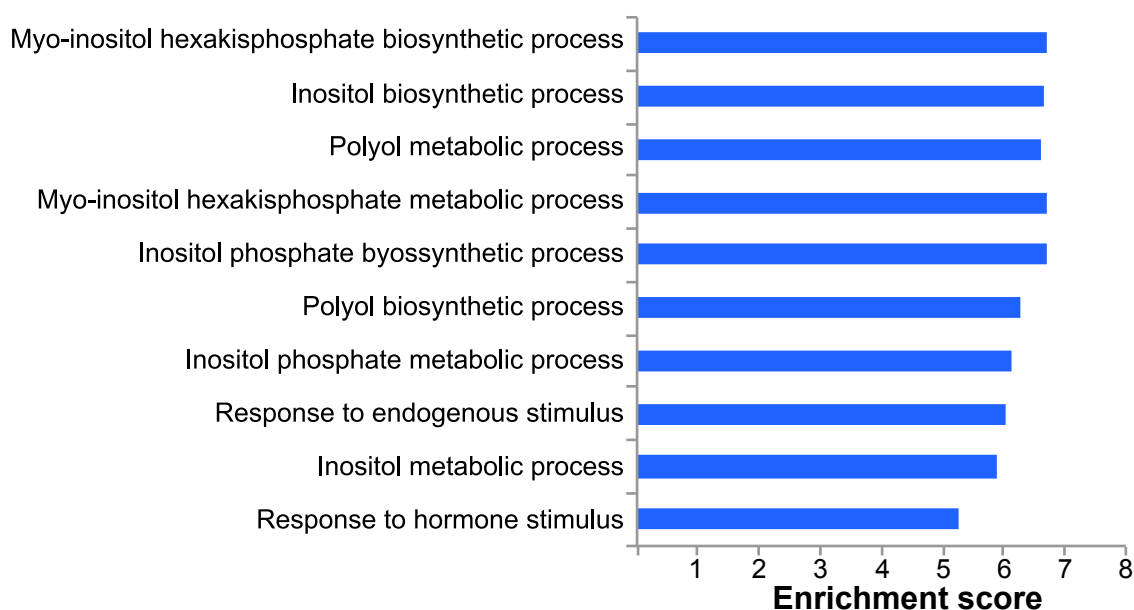


図 22. AtRRP44A ノックダウン植物で蓄積量に変化した遺伝子の GO 解析。

(A) 蓄積量が増加した 128 の mRNA の GO 解析結果。(B) 蓄積量が減少した 53 の mRNA の GO 解析。解析した遺伝子群が含まれる GO term で、全ゲノム中から無作為に選んだ場合に含まれる場合と比較して、有意な差が大きな方から (false discovery rate (FDR) の最も低いもの) 10 個の GO term を Enrichment score ( $-\log_{10}(\text{P-value})$ ) と共に横棒グラフで表示した。 $-\log_{10}(0.05)=1.30$ 。

**A** 概日リズムの GO term を持ち、蓄積が増加した遺伝子

Name	AGI code	<i>gusKD</i>	<i>rrp44aKD</i>	<i>rrp44aKD/gusKD</i>
JMJD5	AT3G20810	3.25	20.04	6.17
APRR3	AT5G60100	1.57	8.73	5.56
-	AT1G07050	3.50	15.39	4.40
-	AT4G16146	15.52	53.50	3.45
FKF1	AT1G68050	1.26	4.23	3.35
-	AT5G59570	5.96	19.04	3.20
-	AT5G48250	5.22	16.48	3.16
COL9	AT3G07650	10.54	32.30	3.06
ATDGAT	AT2G19450	5.53	15.56	2.81
-	AT4G33980	4.08	11.12	2.72
-	AT4G26670	13.31	35.09	2.64
-	AT2G22450	6.92	17.87	2.58
ELF4	AT2G40080	10.47	24.98	2.39
-	AT2G21130	12.06	28.88	2.39
-	AT5G39410	3.53	8.40	2.38
ELF3	AT2G25930	5.54	12.77	2.30
LUX	AT3G46640	10.68	23.58	2.21
-	AT4G34950	11.96	23.97	2.00

**B** 概日リズムの GO term を持ち、蓄積が減少した遺伝子

Name	AGI code	<i>gusKD</i>	<i>rrp44aKD</i>	<i>rrp44aKD/gusKD</i>
-	AT3G12320	61.00	16.72	0.27
PIF4 (SRL2)	AT2G43010	38.74	15.92	0.41
CCA1	AT2G46830	69.20	28.79	0.42

図 23. AtRRP44A ノックダウン植物で蓄積が変動した概日リズムに関わる遺伝子。

(A) 表 1 の 128 遺伝子より、概日リズム (Circadian rhythm) の GO term を持つもののみ選出した。(B) 表 2 の 53 遺伝子より、概日リズム (Circadian rhythm) の GO term を持つもののみ選出した。

**A** 光合成の GO term を持ち、蓄積が増加した遺伝子

Name	AGI code	<i>gusKD</i>	<i>rrp44aKD</i>	<i>rrp44aKD/gusKD</i>
PSBA	ATCG00020	83.10	1536.49	18.49
RBCL	ATCG00490	35.94	527.62	14.68
ATCG00040	ATCG00040	2.33	26.39	11.34
PSBD	ATCG00270	5.68	62.90	11.07
PSBC	ATCG00280	14.20	135.97	9.57
NDHA	ATCG01100	1.31	11.72	8.96
NDHF	ATCG01010	0.54	4.35	8.03
YCF3	ATCG00360	2.38	16.55	6.96
GLP3A	AT5G20630	100.00	568.17	5.68
PSBG	ATCG00430	2.53	13.52	5.35
NDHJ	ATCG00420	3.64	15.14	4.16
CLPP1	ATCG00670	5.00	18.79	3.76
RPOC1	ATCG00180	1.94	6.02	3.10
pEARLI 1	AT4G12480	33.66	75.07	2.23
emb2746	AT5G63420	8.30	17.83	2.15

**B** 光合成の GO term を持ち、蓄積が減少した遺伝子

Name	AGI code	<i>gusKD</i>	<i>rrp44aKD</i>	<i>rrp44aKD/gusKD</i>
LHCB2.4	AT3G27690	1265.60	554.62	0.44
SIG5	AT5G24120	41.06	18.64	0.45
LHCB2	AT2G05070	1426.39	684.19	0.48
LHCB2.1	AT2G05100	1692.80	844.07	0.50

図 24. AtRRP44A ノックダウン植物で蓄積が変動した光合成に関わる遺伝子。

(A) 表 1 の 128 遺伝子より、光合成 (Photosynthesis) の GO term を持つもののみ選出した。

(B) 表 2 の 53 遺伝子より、光合成 (Photosynthesis) の GO term を持つもののみ選出した。

*gusKD*、*rrp44aKD* の値の単位は FPKM。

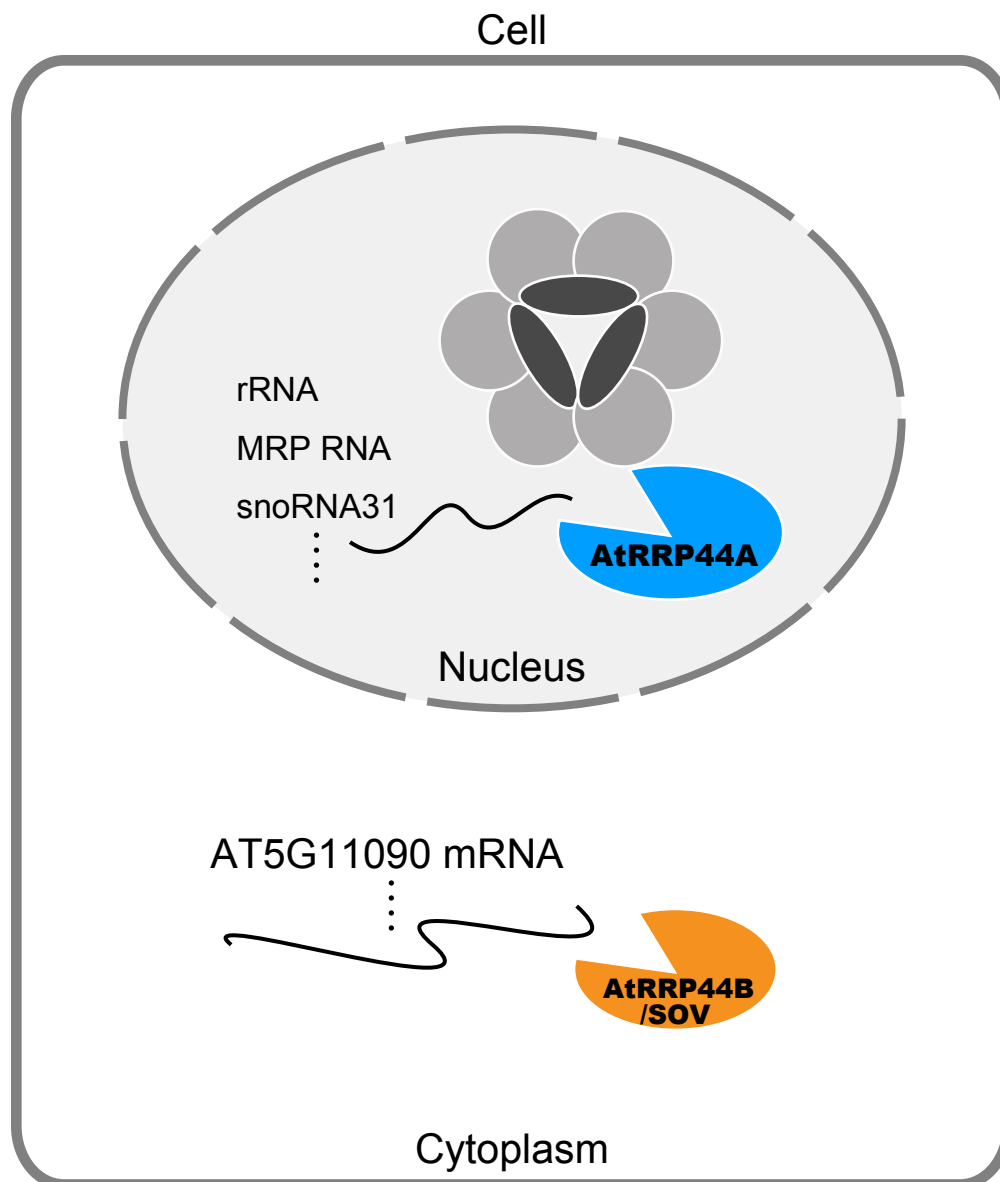


図 25. AtRRP44A と AtRRP44B/SOV のモデル図

表 (4)



表1 AtRRP44Aノックダウン植物において発現が増加した遺伝子

#	遺伝子名	AGIコード	<i>gusKD</i> (FPKM)	<i>rrp44aKD</i> (FPKM)	<i>rrp44aKD/gusKD</i>	p value	false discovery rate (FDR)
1	AT2G01021	AT2G01021	0.00	63782.90	-	0.00005	0.0029
2	PSBA	ATCG00020	83.10	1536.49	18.49	0.00005	0.0029
3	RBCL	ATCG00490	35.94	527.62	14.68	0.00005	0.0029
4	ATCG00040	ATCG00040	2.33	26.39	11.34	0.00005	0.0029
5	PSBD	ATCG00270	5.68	62.90	11.07	0.00005	0.0029
6	PSBC	ATCG00280	14.20	135.97	9.57	0.00005	0.0029
7	NDHA	ATCG01100	1.31	11.72	8.96	0.00005	0.0029
8	NDHF	ATCG01010	0.54	4.35	8.03	0.00005	0.0029
9	YCF3	ATCG00360	2.38	16.55	6.96	0.00005	0.0029
10	AT5G23240	AT5G23240	7.13	47.50	6.66	0.00005	0.0029
11	COR15B	AT2G42530	6.02	39.23	6.51	0.00005	0.0029
12	JMJD5	AT3G20810	3.25	20.04	6.17	0.00005	0.0029
13	DAD1	AT2G44810	1.49	8.94	6.02	0.00005	0.0029
14	AT2G16586	AT2G16586	16.34	95.33	5.83	0.00005	0.0029
15	GLP3A	AT5G20630	100.00	568.17	5.68	0.00005	0.0029
16	APRR3	AT5G60100	1.57	8.73	5.56	0.00005	0.0029
17	YDK1	AT4G37390	0.86	4.77	5.54	0.00005	0.0029
18	PSBG	ATCG00430	2.53	13.52	5.35	0.00005	0.0029
19	AT2G07671	AT2G07671	2.73	12.66	4.64	0.00050	0.0202
20	RAP2.6	AT1G43160	7.42	33.38	4.50	0.00005	0.0029
21	UGT76E1	AT5G59580	0.69	3.08	4.44	0.00005	0.0029
22	AT4G30650	AT4G30650	29.43	130.18	4.42	0.00005	0.0029
23	AT1G07050	AT1G07050	3.50	15.39	4.40	0.00005	0.0029
24	ATP9	ATMG01080	2.57	11.19	4.36	0.00020	0.0094
25	NDHJ	ATCG00420	3.64	15.14	4.16	0.00025	0.0112
26	AT5G62360	AT5G62360	16.08	66.80	4.15	0.00005	0.0029
27	PDCB2	AT5G08000	1.42	5.88	4.14	0.00005	0.0029
28	RNS1	AT2G02990	1.23	5.01	4.08	0.00010	0.0052
29	COX1	ATMG01360	0.81	3.23	3.99	0.00010	0.0052
30	MAPKKK15	AT5G55090	5.84	22.74	3.89	0.00005	0.0029
31	AT3G20340	AT3G20340	1.83	7.10	3.89	0.00035	0.0151
32	SESA1	AT4G27140	1.56	6.05	3.87	0.00030	0.0132
33	UGT76E12	AT3G46660	11.53	43.77	3.80	0.00005	0.0029
34	GH3.3	AT2G23170	2.32	8.78	3.78	0.00005	0.0029
35	AT4G04330	AT4G04330	31.08	117.28	3.77	0.00005	0.0029
36	LTP2	AT2G38530	2.64	9.90	3.76	0.00005	0.0029
37	CLPP1	ATCG00670	5.00	18.79	3.76	0.00005	0.0029
38	AT2G38240	AT2G38240	10.98	40.78	3.71	0.00005	0.0029
39	AT1G76790	AT1G76790	3.52	12.87	3.66	0.00005	0.0029
40	PRN	AT3G59220	1.04	3.75	3.61	0.00015	0.0074
41	COX2	ATMG00160	1.61	5.70	3.55	0.00045	0.0186
42	AT2G33830	AT2G33830	45.76	158.73	3.47	0.00005	0.0029
43	AT2G35750	AT2G35750	7.59	26.27	3.46	0.00005	0.0029

\*FPKM (Fragments Per Kilobase of exon model per Million mapped fragments)

表1 (続き1) AtRRP44Aノックダウン植物において発現が増加した遺伝子

#	遺伝子名	AGIコード	<i>gusKD</i> (FPKM)	<i>rrp44aKD</i> (FPKM)	<i>rrp44aKD/gusKD</i>	p value	false discovery rate (FDR)
44	AT4G16146	AT4G16146	15.52	53.50	3.45	0.00005	0.0029
45	AtMC7	AT1G79310	0.72	2.48	3.42	0.00050	0.0202
46	FKF1	AT1G68050	1.26	4.23	3.35	0.00005	0.0029
47	AT5G59570	AT5G59570	5.96	19.04	3.20	0.00005	0.0029
48	AT5G48250	AT5G48250	5.22	16.48	3.16	0.00005	0.0029
49	AT1G56300	AT1G56300	14.26	44.56	3.13	0.00005	0.0029
50	RPOC1	ATCG00180	1.94	6.02	3.10	0.00005	0.0029
51	COL9	AT3G07650	10.54	32.30	3.06	0.00005	0.0029
52	AT4G29700	AT4G29700	6.76	19.55	2.89	0.00005	0.0029
53	ENT3	AT4G05120	3.29	9.41	2.86	0.00005	0.0029
54	AT1G76640	AT1G76640	5.30	15.08	2.84	0.00005	0.0029
55	DRM1	AT1G28330	13.23	37.56	2.84	0.00135	0.0446
56	ATDGAT	AT2G19450	5.53	15.56	2.81	0.00005	0.0029
57	AT3G15630	AT3G15630	15.23	42.60	2.80	0.00005	0.0029
58	CCL	AT3G26740	226.79	619.06	2.73	0.00005	0.0029
59	AT4G33980	AT4G33980	4.08	11.12	2.72	0.00005	0.0029
60	OEP16	AT2G28900	86.69	232.48	2.68	0.00005	0.0029
61	AT4G26670	AT4G26670	13.31	35.09	2.64	0.00005	0.0029
62	AT2G22450	AT2G22450	6.92	17.87	2.58	0.00005	0.0029
63	CYP82G1	AT3G25180	3.64	9.28	2.55	0.00005	0.0029
64	SSADH	AT1G79440	20.18	51.36	2.54	0.00005	0.0029
65	HPL1	AT4G15440	2.80	7.10	2.54	0.00005	0.0029
66	AT5G14920	AT5G14920	12.75	32.07	2.52	0.00005	0.0029
67	CCR2	AT1G06820	159.13	399.41	2.51	0.00005	0.0029
68	AT4G10390	AT4G10390	7.35	18.22	2.48	0.00005	0.0029
69	AT1G17090	AT1G17090	3.23	7.95	2.46	0.00125	0.0421
70	WCRKC1	AT5G06690	32.26	79.39	2.46	0.00005	0.0029
71	AT2G36780	AT2G36780	1.29	3.16	2.44	0.00020	0.0094
72	AT2G21130	AT2G21130	12.06	28.88	2.39	0.00005	0.0029
73	OK1	AT5G26570	23.92	57.13	2.39	0.00005	0.0029
74	ELF4	AT2G40080	10.47	24.98	2.39	0.00005	0.0029
75	AT5G39410	AT5G39410	3.53	8.40	2.38	0.00005	0.0029
76	ATCHX17	AT4G23700	2.28	5.42	2.38	0.00005	0.0029
77	CYP94B1	AT5G63450	21.25	50.39	2.37	0.00005	0.0029
78	AT4G08170	AT4G08170	18.52	43.62	2.36	0.00005	0.0029
79	OTP81	AT2G29760	1.14	2.65	2.33	0.00010	0.0052
80	CHL	AT3G47860	28.74	66.63	2.32	0.00005	0.0029
81	AT5G49410	AT5G49410	2.02	4.67	2.31	0.00080	0.0298
82	AT4G30660	AT4G30660	37.46	86.49	2.31	0.00005	0.0029
83	ELF3	AT2G25930	5.54	12.77	2.30	0.00005	0.0029
84	AT2G37310	AT2G37310	0.85	1.95	2.29	0.00140	0.0457
85	AT1G23205	AT1G23205	5.96	13.63	2.29	0.00015	0.0074
86	WRKY23	AT2G47260	1.26	2.88	2.28	0.00055	0.0217

\*FPKM (Fragments Per Kilobase of exon model per Million mapped fragments)

表1 (続き2) AtRRP44Aノックダウン植物において発現が増加した遺伝子

#	遺伝子名	AGIコード	<i>gusKD</i> (FPKM)	<i>rrp44aKD</i> (FPKM)	<i>rrp44aKD/gusKD</i>	p value	false discovery rate (FDR)
87	UVR3	AT3G15620	1.99	4.55	2.28	0.00015	0.0074
88	AT1G52000	AT1G52000	5.96	13.52	2.27	0.00005	0.0029
89	BGLU44	AT3G18080	59.98	135.25	2.25	0.00005	0.0029
90	AT3G46280	AT3G46280	5.28	11.87	2.25	0.00005	0.0029
91	KIN1	AT1G14370	10.65	23.93	2.25	0.00005	0.0029
92	AT2G47890	AT2G47890	4.49	10.09	2.25	0.00005	0.0029
93	ATISA3	AT4G09020	7.38	16.58	2.25	0.00005	0.0029
94	AT2G23910	AT2G23910	2.11	4.71	2.24	0.00035	0.0151
95	pEARLI 1	AT4G12480	33.66	75.07	2.23	0.00005	0.0029
96	AtMYB108	AT3G06490	1.27	2.82	2.23	0.00105	0.0367
97	AT1G51090	AT1G51090	18.58	41.36	2.23	0.00005	0.0029
98	AT4G11320	AT4G11320	1.77	3.92	2.22	0.00100	0.0356
99	DIN11	AT3G49620	10.94	24.20	2.21	0.00005	0.0029
100	AT4G27130	AT4G27130	50.08	110.63	2.21	0.00005	0.0029
101	LUX	AT3G46640	10.68	23.58	2.21	0.00005	0.0029
102	AT-ACA8	AT5G57110	9.09	19.96	2.20	0.00005	0.0029
103	ATGSTU6	AT2G29440	23.45	51.38	2.19	0.00005	0.0029
104	MIOX2	AT2G19800	22.79	49.85	2.19	0.00005	0.0029
105	AT3G02480	AT3G02480	7.72	16.77	2.17	0.00100	0.0356
106	SIP2	AT3G56950	49.75	107.99	2.17	0.00005	0.0029
107	AT1G16850	AT1G16850	3.35	7.23	2.16	0.00110	0.0381
108	MEE14	AT2G15890	52.71	113.63	2.16	0.00005	0.0029
109	DVL18	AT5G59510	19.90	42.86	2.15	0.00005	0.0029
110	emb2746	AT5G63420	8.30	17.83	2.15	0.00005	0.0029
111	AT2G17280	AT2G17280	4.70	10.10	2.15	0.00005	0.0029
112	AT4G01130	AT4G01130	5.27	11.01	2.09	0.00005	0.0029
113	AT1G27020	AT1G27020	62.08	129.19	2.08	0.00005	0.0029
114	PDX2	AT5G60540	23.50	48.70	2.07	0.00005	0.0029
115	PDC2	AT5G54960	17.20	35.58	2.07	0.00005	0.0029
116	AT4G32340	AT4G32340	45.62	94.38	2.07	0.00005	0.0029
117	AT4G14270	AT4G14270	12.69	26.21	2.06	0.00005	0.0029
118	AT1G31850	AT1G31850	8.27	17.05	2.06	0.00005	0.0029
119	XDH2	AT4G34900	1.61	3.32	2.06	0.00005	0.0029
120	AT2G38465	AT2G38465	9.75	20.00	2.05	0.00055	0.0217
121	AT2G43620	AT2G43620	22.95	47.03	2.05	0.00005	0.0029
122	ATPOX	AT3G30775	33.36	68.04	2.04	0.00005	0.0029
123	atnudt8	AT5G47240	48.28	98.21	2.03	0.00005	0.0029
124	ATPHS2	AT3G46970	36.78	74.68	2.03	0.00005	0.0029
125	AT1G76590	AT1G76590	10.06	20.34	2.02	0.00005	0.0029
126	AT3G56720	AT3G56720	6.19	12.52	2.02	0.00115	0.0395
127	AT2G29500	AT2G29500	5.53	11.15	2.02	0.00025	0.0112
128	AT4G34950	AT4G34950	11.96	23.97	2.00	0.00005	0.0029

\*FPKM (Fragments Per Kilobase of exon model per Million mapped fragments)

表2 AtRRP44Aノックダウン植物において発現が減少した遺伝子

#	遺伝子名	AGIコード	<i>gusKD</i> (FPKM)	<i>rrp44aKD</i> (FPKM)	<i>rrp44aKD/gusKD</i>	p value	false discovery rate (FDR)
1	AT5G06980	AT5G06980	20.43	2.38	0.12	0.00010	0.0052
2	PDF1.2	AT5G44420	18.52	2.81	0.15	0.00005	0.0029
3	AT1G77960	AT1G77960	2.32	0.56	0.24	0.00015	0.0074
4	AT3G12320	AT3G12320	61.00	16.72	0.27	0.00005	0.0029
5	AT1G73870	AT1G73870	28.11	8.36	0.30	0.00005	0.0029
6	AT4G13575	AT4G13575	11.96	3.69	0.31	0.00070	0.0269
7	AT3G54500	AT3G54500	105.03	33.48	0.32	0.00005	0.0029
8	AT5G64170	AT5G64170	14.11	4.73	0.34	0.00015	0.0074
9	cdf3	AT3G47500	10.09	3.67	0.36	0.00005	0.0029
10	THI2.2	AT5G36910	126.84	45.95	0.36	0.00005	0.0029
11	ATEXPB1	AT2G20750	3.87	1.45	0.37	0.00080	0.0298
12	CIPK20	AT5G45820	15.24	5.67	0.37	0.00005	0.0029
13	CAO	AT1G44446	153.88	58.01	0.38	0.00005	0.0029
14	AT3G55240	AT3G55240	62.73	24.34	0.39	0.00005	0.0029
15	COL2	AT3G02380	31.71	12.28	0.39	0.00005	0.0029
16	AT1G33770	AT1G33770	2.41	0.96	0.40	0.00045	0.0186
17	SRL2	AT2G43010	38.74	15.92	0.41	0.00005	0.0029
18	NAP	AT1G69490	11.75	4.98	0.42	0.00005	0.0029
19	NRT1.5	AT1G32450	2.22	0.92	0.42	0.00095	0.0342
20	CCA1	AT2G46830	69.20	28.79	0.42	0.00005	0.0029
21	AT5G25190	AT5G25190	10.09	4.19	0.42	0.00005	0.0029
22	STO	AT1G06040	138.49	59.82	0.43	0.00005	0.0029
23	AT3G22235	AT3G22235	37.23	15.83	0.43	0.00015	0.0074
24	AT1G73480	AT1G73480	54.08	23.89	0.44	0.00005	0.0029
25	AT2G21320	AT2G21320	13.21	5.82	0.44	0.00005	0.0029
26	CIPK17	AT1G48260	2.88	1.26	0.44	0.00120	0.0408
27	LHCB2.4	AT3G27690	1265.60	554.62	0.44	0.00005	0.0029
28	AT5G03350	AT5G03350	6.47	2.94	0.45	0.00105	0.0367
29	SIG5	AT5G24120	41.06	18.64	0.45	0.00005	0.0029
30	JAL22	AT2G39310	19.82	8.96	0.45	0.00005	0.0029
31	AT5G03230	AT5G03230	18.94	8.47	0.45	0.00005	0.0029
32	CYP71B13	AT5G25140	10.44	4.66	0.45	0.00005	0.0029
33	ANTR1	AT2G29650	96.51	44.43	0.46	0.00005	0.0029
34	JAC1	AT1G75100	47.41	21.76	0.46	0.00005	0.0029
35	AT2G28570	AT2G28570	17.97	8.49	0.47	0.00010	0.0052
36	ACS11	AT4G08040	10.53	4.94	0.47	0.00005	0.0029
37	ATOBGM	AT1G07620	5.45	2.54	0.47	0.00005	0.0029
38	AT3G56080	AT3G56080	6.90	3.34	0.48	0.00040	0.0169
39	AT5G42530	AT5G42530	319.60	153.75	0.48	0.00005	0.0029
40	LHCB2	AT2G05070	1426.39	684.19	0.48	0.00005	0.0029

\*FPKM (Fragments Per Kilobase of exon model per Million mapped fragments)

表2 (続き) AtRRP44Aノックダウン植物において発現が減少した遺伝子

#	遺伝子名	AGIコード	<i>gusKD</i> (FPKM)	<i>rrp44aKD</i> (FPKM)	<i>rrp44aKD/gusKD</i>	p_value	false discovery rate (FDR)
41	GRF11	AT1G34760	20.04	9.55	0.48	0.00050	0.0202
42	AT5G08030	AT5G08030	5.33	2.54	0.48	0.00055	0.0217
43	TT4	AT5G13930	139.64	69.10	0.49	0.00005	0.0029
44	AT1G80130	AT1G80130	11.27	5.56	0.49	0.00005	0.0029
45	AT1G73600	AT1G73600	137.77	67.64	0.49	0.00005	0.0029
46	TAR2	AT4G24670	6.83	3.34	0.49	0.00005	0.0029
47	AT1G13650	AT1G13650	31.41	15.25	0.49	0.00005	0.0029
48	AT5G35970	AT5G35970	156.79	79.10	0.50	0.00005	0.0029
49	AT5G54470	AT5G54470	8.39	4.22	0.50	0.00030	0.0132
50	AT5G48490	AT5G48490	87.33	43.62	0.50	0.00005	0.0029
51	LHCB2.1	AT2G05100	1692.80	844.07	0.50	0.00005	0.0029
52	WAK1	AT1G21250	12.68	6.29	0.50	0.00005	0.0029
53	CYP71B4	AT3G26280	25.63	12.71	0.50	0.00005	0.0029

\* FPKM (Fragments Per Kilobase of exon model per Million mapped fragments)

表3 本研究で使したプラスミド

名前	備考
pWAT208	pWAT2 derivate containing a mesophyll-specific CAB3 promoter and an <i>Agrobacterium</i> 6b terminator
pWAT208-MASS-GUS	pWAT208 derivate
pWAT208-MIR390Bsa	pWAT208 derivate
pSoup-Spec	A helper plasmid pSoup derivate
pNK009	pWAT208-MIR390Bsa_RRP4_2 (For the expression of amiR_RRP4-2)
pNK010	pWAT208-MIR390Bsa_RRP4_3 (For the expression of amiR_RRP4-3)
pNK011	pWAT208-MIR390Bsa_RRP41_1 (For the expression of amiR_RRP41-1)
pNK012	pWAT208-MIR390Bsa_RRP41_3 (For the expression of amiR_RRP41-3)
pNK013	pWAT208-MIR390Bsa_RRP44A_1 (For the expression of amiR_RRP44A-1)
pNK014	pWAT208-MIR390Bsa_RRP44A_2 (For the expression of amiR_RRP44A-2)
pNK015	pWAT208-MIR390Bsa_GUS-2 (For the expression of amiR_GUS-2)
pTCV-t1d1	TCVゲノムRNA転写用
pBIN CMV-Q	Binary vector expressing CMV-Q in planta
pOH005.1	pETM-11_AtRRP44A
pOH007	pETM-11_AtRRP44A (D132N,D158N,D489N)
pOH008	pETM-11_AtRRP44A (D132N D158N)
pOH009	pETM-11_AtRRP44A (D489N)
pNK025	pWAT3_P::RRP4-RRP4:Venus-Ter::RRP4 #3
p35S::RRP44:CFP	植物体に導入済みのものをLeslie Sieburth氏より譲渡していただいた
PCR4_CMVQ QR1	RNA分解活性アッセイの基質RNA転写用

表4 本研究で使したオリゴヌクレオチド

名前	配列
SALK_037533_LP	ATCCAAAGGAGTACCAGGGTG
SALK_037533_RP	ACGGCACATGCTTTATTTGTC
SALK_141741_LP	ATGAGCCATTTCAATGCTTTG
SALK_141741_RP	TTCAGTGTCTTTGTCTGTGC
SALK_051800_2_LP	TATGAGCCATTTCAATGCTTTG
SALK_051800_2_RP	TTGGCACTCGTGAGTTCATTAC
SAIL_804_F05-LP	TACAATTTGGGCAGCTACCAG
SAIL_804_F05-RP	TTCAATTCTATGCCGCCTATG
SALK_017934-LP	AAAAGGCAAACACATCAGTCG
SALK_017934-RP	CCCGAAATAGCGCTTTAAAAG
SALK_010765-LP	AGCTCCTCGAACCGACTTAAC
SALK_010765-RP	TCATACTCAAATTCAGGTTTTTG
LBa1	TGGTTCACGTAGTGGGCCATCG
LBb1.3	ATTTTGCCGATTTTCGGAAC
SAIL_LB3	TAGCATCTGAATTTTATAACCAATCTCGATACAC
Probe-amiR_RRP44A-1	GAGGTATTCGCGTCGCTACTA
Probe-amiR_RRP44A-2	CAGCACGCCTGTATACTCATA
U6 probe	AGGGGCCATGCTAATCTTCTC
Probe1	GCAAAGGA TGGTGAGGGACGACG
Probe2	TCACTTCGAGTCACCGTCGACA
pGN-MCS-F	CTGCAAGGCGATTAAGTTG
Kan-dBsmBI-R	GTATTTTCGTCTTGCTCAGGCG
Kan-dBsmBI-F	CGCCTGAGCAAGACGAAATAC
pGN-Kan-R	GTGTCTCAAATCTCTGATG
Hpa-ocsP-F	GTTGTTAACATCTACAAATTGCC
ocsP(-)Bsal-R	CCATCTTGATACCACAGGC
ocsP(-)Bsal-F	GCCTGTGGTATCAAGATGG
ocsP-bar-R	GTCGTTCTGGGCTCATAGCTCGTGATCTGAGTCC
ocsP-bar-F	CTCAGATCACGAGCTATGAGCCCAGAACGACGCC
ocsT-bar-R	AAGCAGGACTCTAGGGTCAGATTTTCGGTGACGGG
bar-ocsT-F	GTCACCGAAATCTGACCCTAGAGTCCTGCTTTAA
Hpa-ocsT-R	GTTGTTAACGGCCACATACACCAAAAA
bar-dBsmBI-R	GCGGGGGGACACGTACACG
bar-dBsmBI-F	CGTGACGTGTCCCCCGC
ocsT-dBsmBI-R	ATCATAGGCATCTCGCATA
ocsT-dBsmBI-F	TATGCGAGATGCCTATGAT
pGN-LB-F	AGCGCCTTTGCCCCACAAC
Bar-dSacII-F	TATGCCCCCGTGGCATGCTGCGG
Bar-dSacII-R	CAGCATGCCACGGGGGGCATATCC
Bar-dSaldBsmB-F	GTCTACCGTGTACGTTTCCCCCGCC
Bar-dSaldBsmB-R	GGGGAAACGTACACGGTAGACTCGGCCG
pGN-Hpa-R	CTGGCGTAATAGCGAAGAG
ocsT-410R	GGTGTGTCGTAGATACTAG
CAB3-Pro-F	AAATCAAGAGAAAATGTGATTCTCGG
CAB3-Pro-R	TGAAACTTTTTGTGTTTTTTTTTTTTTTTG
Kpn-CAB3Pro-F	GTTGGTACCAAATCAAGAGAAAATGTGATTCTC
CAB3P-24R	TGTTATCCACATATCGTATG

表4 (続き1) 本研究で使用したオリゴヌクレオチド

名前	配列
CAB3P-26F	CATACGATATGTGGATAACA
CAB3P-55R	GCAATTTCTCAGCTTTGGG
CAB3P-57F	CCCAAAGCTGAGAAATTGC
CAB3P-58R	CTCACACATCAATTCACCC
CAB3P-60F	GGGTGAATTGATGTGTGAG
CAB3P-129R	AAGCATTTCCAGACCACAT
CAB3P-131F	ATGTGGTCTGGAAATGCTT
Xho-CAB3Pro-R	TTCTCGAGGATTGAAAATGGTTAGGTAGG
6b-Ter-F1	TGTGCTTTGGATCTCTGTTATTTTTCTGTTTCCAATGTCATCTAGT AACGAAATAAATACGTTATCTTC
6b-Ter-R1	AGCAACACCCATGATGGGTGGTGATGTTTTCCGAAAAAATTCCCT GCTTTTAGACGAAGATAACGTATTT
Xba-6b-Ter-F2	TTTCTAGATTCCCTTCGACGACTCCTAATAAAGTCGCATAATCTATG AGAGTGTGCTTTGGATCTC
Sac-6b-Ter-R2	TGAGCTCAGATTGTTACCAGGCTAGATTGCGAAACTGCAAGCAAC ACCCATGAT
Xho_MASS-GUS-F	TTCTCGAGAAGGAGATATAACAATGGCTTCCTCCCCAACTTTGTAC AAAAAAG
Xba_GUS-R	TTTCTAGATTATTGTTTGCCTCCCTGC
Sal-MIR390a-F	GTTGTCGACTATAGGGGGGAAAAAAGGTAGTC
Spe-MIR390a-R	TACTAGTGAGACTAAAGATGAGATCTAATCTG
Bsa-390F	GAGACCGTTGTTGGTCTCTCATTGGCTCTTCTTACTAC
Bsa-390R	GAGACCAACAACGGTCTCTTACAGATTCTTCTCTACTTTG
HindIII-pSoup-F	CAAGCTTGAGTATTCTATAGT
SpecR-Pro-R	AAACATGTCATACACGGTGCCTGACTGC
SpecR-Ter-F	TCGGCAAATAAATGGAAGCCGGCGGCACC
NdeI-pSoup-R	CCATATGAATTTCTGTAGTGG
pSoup-SpecR-F	GGCACCGTGATGACATGTTTTTTTGGGGTAC
pSoup-SpecR-R	CGGCTTCCATTTATTTGCCGACTACCTTGG
390amiR_RRP4_2-F	GTTGGTCTCCTGTATAGTTGCGTACTTCAGCACAAATGATGATCAC ATTCGTTATCTA
390amiR_RRP4_2-R	GTTGGTCTCCAATGTAATTGCGTATTTTCAGCACAAAAAATAGATA ACGAATGTGATC
390amiR_RRP4_3-F	GTTGGTCTCCTGTATATTCCGCATATTGCGTTCATATGATGATCACA TTCGTTATCTA
390amiR_RRP4_3-R	GTTGGTCTCCAATGTACTCCGCATCTTGCGTTCATAAAAAAATAGATA ACGAATGTGATC
390amiR_RRP41_1-F	GTTGGTCTCCTGTATCTAAAGTTTATGCAGCCCGGATGATGATCAC ATTCGTTATCTA
390amiR_RRP41_1-R	GTTGGTCTCCAATGTCCAAAGTTTGTGCAGCCCGGAAAAAATAGAT AACGAATGTGATC
390amiR_RRP41_3-F	GTTGGTCTCCTGTATTTCCGGTTAATATGCAGGCTTATGATGATCACA TTCGTTATCTA
390amiR_RRP41_3-R	GTTGGTCTCCAATGTTCCGGTTAAGATGCAGGCTTAAAAAATAGAT AACGAATGTGATC
390amiR_RRP44A_1-F	GTTGGTCTCCTGTATAGTAGCGACGCGAATACCTCATGATGATCAC ATTCGTTATCTA



表4 (続き2) 本研究で使用したオリゴヌクレオチド

名前	配列
390amiR_RRP44A_1-R	GTTGGTCTCCAATGTAATAGCGACCCGAATACCTCAAAAAATAGAT AACGAATGTGATC
390amiR_RRP44A_2-F	GTTGGTCTCCTGTATATGAGTATACAGGCGTGCTGATGATGATCAC ATTCGTTATCTA
390amiR_RRP44A_2-R	GTTGGTCTCCAATGTACGAGTATAAAGGCGTGCTGAAAAAATAGAT AACGAATGTGATC
390amiRgus-2-F	GTTGGTCTCCTGTATGTTTCGGCGTGGTGTAGACTAATGATGATCAC ATTCGTTATCTA
390amiRgus-2-R	GTTGGTCTCCAATGTGCTCGGCGTTGTGTAGACTAAAAAATAGAT AACGAATGTGATC
qRRP4(3rd)_F	CTTGTCTATGTACGCACCTTGC
qRRP4(3rd)_R	CACGGCCTACCACAATATCC
qRRP41(90)_F	GACAAAGTGTCACTCCTTCAGATG
qRRP41(90)_R	GCAATTGCCTTGCAACCT
qRRP44A-3'_F	TGGTTTTATAGTATTTGTCCCAAG
qRRP44A-3'_R	GCTTCTCCTCATCAACATACCA
qMRP_F	TCGGCGGAGAGACCACAT
qMRP_R	CTTGCGGTGGAGAGATTCAA
qsnoRNA31_F	GCAAAATTAATCTAATCCAACACTTGAT
qsnoRNA31_R	TGGAGATGCACATAGTATCTCTCAGA
qPCR_F_5g11090	GCGATGACTAATTCGCTGGT
qPCR_R_5g11090	AGCTCTTCTCACCCACTCTCC
qAt5g11090-3'_F	TCGTGTCCCGTCAAGTCAAC
qAt5g11090-3'_R	CGACGGATAATGGCAAACAA
qPCR_F_5g27720_Up	GCAGATGGTGTGCCTCTTGT
qPCR_R_5g27720_Up	AAGTGGGTCAACATTCTGGTCA
qPCR_F_5g27720	GAGGAGAAGACACGCACAGA
qPCR_R_5g27720	ATCCACACCACGTCCTCTTC
qTCV-5'_F	TCTTCTACACACACTCAACACAGC
qTCV-5'_R	GAAGGTTTGAACCTCAGGGTAG
qTCV_20_F	GTGGCGTACCAGTGTTACAATC
qTCV_20_R	GCCAGGGGTCCAAAATTC
qTCV-3'(-)_F	CTGCCCATTGGACACTACCT
qTCV-3'(-)_R	GCAGACGCCTCTGACTTCTC
EF1 $\alpha$ _F 3'-integrity	GACTCTCTTATGGTTTTCTTTGGTTC
EF1 $\alpha$ _R 3'-integrity	GGAGGGAGAGAGAAAGTCACAG
WG-Ctag_AtRRP44A-F	CACAAAACATTTCCCTACATACAACCTTCAACTTCCTATTATGTTGC AGAGCAAAGTTTTTC
WG-Ctag_AtRRP44A-R	GTCCCTGAAAGAGGACTTCAAGCAAGAGAGTGAGTTGGAGTTTC GG
T7Eu-F2	CCCGCGAAATTAATACGACTCACTATAGGGCTCACCTATCTCTCTA CACAAAACATTTCCCTAC
HRV3C-FLAG	CCCTCGAAGGATCAGGCCCTTATGGCCGGATCCAAGAGCTCTTTT TTTTTTTTAGCTGCTGCCCTTGTGCATCGTCATCCTTGTAAGTCAGCC GCGGAGGGTCCCTGAAAGAGGACTTCAAG
RAFL09_R	CGGGCCCCCCTCGAAGG
QR1-300F	ATTCGGAAGTGGTATGGTG

表4 (続き3) 本研究で使したオリゴヌクレオチド

名前	配列
QR1-540R	GATCGTTTAAAATGACCTTGC
Sal1+RRP4(np+ORF)_F	GTTGTTGTCGACAGCTTTGGATGATGATGATTCT
EcoRV+RRP4_R	GATATCCTTTTTCTCTTTGTACGTCTT
EcoRV+Venus_F	TTGATATCGTGAGCAAGGGCGAGGAGC
BamH1+Venus_R	AAGGATCCTTAGGCGGCGGTCACGAACT
BamH1+RRP4(native Terminator)_F	GGATCCAAACTACCCCTTTTTGTCACT
Spe1+RRP4(native Terminator)_R	GTTACTAGTTCATGAGGGTATTTTAGTCATTT
F_IF_RRP44A_pOH005.1	TTTCAGGGCGCCATGTTGCAGAGCAAAGTTTTCAATAAG
R_IF_RRP44A_pOH005.1	GGTGGTGGTGCTCGAGCAAGAGAGTGAGTTGGAGTTTC
F_D177N_pOH005	CGCCCATGGAGAAAGAGAGTGCAAATGACCACAACAATAGAGCTA TTC
R_D177N_pOH005	CGCGGTACCATAGAGTAGCGACGCGA
F_D203N_pOH005	CGCGGTACCAGAAGCATCTAGGGGATACATCTCAG
R_D203N_pOH005	CGCCAATTGTCTCCGCAGATATTCCCTCTTCAGTGGCCTTCCGTTT ATTTTCCCTATTATTAGTTACA
F_D556N_pOH005	CGCTACGTACGACCAATCGGCAAAAT
R_D556N_pOH005	CGCTGTACAGTGCAATGCATCATTAAATATCCTTGC

## 参考文献

- Allmang, C., Kufel, J., Chanfreau, G., Mitchell, P., Petfalski, E., and Tollervey, D. (1999a). Functions of the exosome in rRNA, snoRNA and snRNA synthesis. *The EMBO Journal* 18, 5399–5410.
- Allmang, C., Petfalski, E., Podtelejnikov, A., Mann, M., Tollervey, D., and Mitchell, P. (1999b). The yeast exosome and human PM-Scl are related complexes of 3'→5' exonucleases. *Genes & Development* 13, 2148–2158.
- Alonso, J.M., Stepanova, A.N., Leisse, T.J., Kim, C.J., Chen, H., Shinn, P., Stevenson, D.K., Zimmerman, J., Barajas, P., Cheuk, R., et al. (2003). Genome-wide insertional mutagenesis of *Arabidopsis thaliana*. *Science* 301, 653–657.
- Belostotsky, D. (2009). Exosome complex and pervasive transcription in eukaryotic genomes. *Curr. Opin. Cell Biol.* 21, 352–358.
- Bonneau, F., Basquin, J., Ebert, J., Lorentzen, E., and Conti, E. (2009). The yeast exosome functions as a macromolecular cage to channel RNA substrates for degradation. *Cell* 139, 547–559.
- Briggs, M.W., Burkard, T.D.B., and Butler, J.S. (1998). Rrp6p, the Yeast Homologue of the Human PM-Scl 100-kDa Autoantigen, Is Essential for Efficient 5.8 S rRNA 3' End Formation. *Journal of Biological Chemistry* 273, 13255–13263.
- Brouwer, R., Allmang, C., Raijmakers, R., Aarssen, Y.V., Egberts, W.V., Petfalski, E., Venrooij, W.J.V., Tollervey, D., and Pruijn, G.J.M. (2000). Three Novel Components of the Human Exosome. *Journal of Biological Chemistry* 276, 6177–6184.
- Buchan, J.R., and Parker, R. (2009). Eukaryotic stress granules: the ins and outs of translation. *Molecular Cell* 36, 932–941.
- Bustin, S.A., Benes, V., Garson, J.A., Hellemans, J., Huggett, J., Kubista, M., Mueller, R., Nolan, T., Pfaffl, M.W., Shipley, G.L., et al. (2009). The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. *Clin. Chem.* 55, 611–622.

Carrington, J.C., Heaton, L.A., Zuidema, D., Hillman, B.I., and Morris, T.J. (1989). The genome structure of turnip crinkle virus. *Virology* 170, 219–226.

Chang, H.-M., Triboulet, R., Thornton, J.E., and Gregory, R.I. (2013). A role for the Perlman syndrome exonuclease Dis3l2 in the Lin28-let-7 pathway. *Nature* 497, 244–248.

Chekanova, J.A., Gregory, B.D., Reverdatto, S.V., Chen, H., Kumar, R., Hooker, T., Yazaki, J., Li, P., Skiba, N., Peng, Q., et al. (2007). Genome-Wide High-Resolution Mapping of Exosome Substrates Reveals Hidden Features in the Arabidopsis Transcriptome. *Cell* 131, 1340–1353.

Chekanova, J.A., Shaw, R.J., Wills, M.A., and Belostotsky, D.A. (2000). Poly (A) Tail-dependent Exonuclease AtRrp41p from *Arabidopsis thaliana* Rescues 5.8 S rRNA Processing and mRNA Decay Defects of the Yeast *ski6* Mutant and Is Found in an Exosome-sized Complex in Plant and Yeast Cells. *Journal of Biological Chemistry* 275, 33158–33166.

Chlebowski, A., Lubas, M., Jensen, T.H., and Dziembowski, A. (2013). RNA decay machines: The exosome. *Biochimica Et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms* 1829, 552–560.

Crick, F.H. (1958). On protein synthesis. *Symposia of the Society for Experimental Biology*.

Cuperus, J.T., Montgomery, T.A., Fahlgren, N., Burke, R.T., Townsend, T., Sullivan, C.M., and Carrington, J.C. (2010). Identification of MIR390a precursor processing-defective mutants in *Arabidopsis* by direct genome sequencing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 107, 466–471.

Ding, S.W., Rathjen, J.P., Li, W.X., Swanson, R., Healy, H., and Symons, R.H. (1995). Efficient infection from cDNA clones of cucumber mosaic cucumovirus RNAs in a new plasmid vector. *Journal of General Virology* 76, 459–464.

- Dougherty, W. (1980). Translation of potyvirus,rna in a rabbit reticulocyte lysate: Reaction conditions and identification of capsid protein as one of the products of in vitro translation of tobacco etch and pepper mottle viral RNAs. *Virology* *101*, 466–474.
- Du, Z., Zhou, X., Ling, Y., Zhang, Z., and Su, Z. (2010). agriGO: a GO analysis toolkit for the agricultural community. *Nucleic Acids Research* *38*, W64–W70.
- Dziembowski, A., Lorentzen, E., Conti, E., and Séraphin, B. (2007). A single subunit, Dis3, is essentially responsible for yeast exosome core activity. *Nature Structural & Molecular Biology* *14*, 15–22.
- Fujioka, Y., Utsumi, M., Ohba, Y., and Watanabe, Y. (2007). Location of a possible miRNA processing site in SmD3/SmB nuclear bodies in Arabidopsis. *Plant Cell Physiol.* *48*, 1243–1253.
- Golisz, A., Sikorski, P.J., Kruszka, K., and Kufel, J. (2013). Arabidopsis thaliana LSM proteins function in mRNA splicing and degradation. *Nucleic Acids Research* *41*, 6232–6249.
- Guo, X., Ma, J., Sun, J., and Gao, G. (2007). The zinc-finger antiviral protein recruits the RNA processing exosome to degrade the target mRNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *104*, 151–156.
- Heaton, L.A., Carrington, J.C., and Morris, T.J. (1989). Turnip crinkle virus infection from RNA synthesized in Vitro. *Virology* *170*, 214–218.
- Hooker, T.S., Lam, P., Zheng, H., and Kunst, L. (2007). A core subunit of the RNA-processing/degrading exosome specifically influences cuticular wax biosynthesis in Arabidopsis. *The Plant Cell* *19*, 904–913.
- Houseley, J., LaCava, J., and Tollervey, D. (2006). RNA-quality control by the exosome. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *7*, 529–539.
- Iwasaki, S., Takeda, A., Motose, H., and 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., and Maizel, A. (2012). Cytoplasmic Arabidopsis AGO7 accumulates in membrane-associated siRNA bodies and is required for ta-siRNA biogenesis. *The EMBO Journal* 31, 1704–1713.
- Kumakura, N., Otsuki, H., Tsuzuki, M., Takeda, A., and Watanabe, Y. (2013). Arabidopsis AtRRP44A Is the Functional Homolog of Rrp44/Dis3, an Exosome Component, Is Essential for Viability and Is Required for RNA Processing and Degradation. *PLoS ONE* 8, e79219.
- 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 Letters* 583, 1261–1266.
- Lam, P., Zhao, L., McFarlane, H.E., Aiga, M., Lam, V., Hooker, T.S., and Kunst, L. (2012). RDR1 and SGS3, Components of RNA-Mediated Gene Silencing, Are Required for the Regulation of Cuticular Wax Biosynthesis in Developing Inflorescence Stems of Arabidopsis. *Plant Physiol.*
- Lange, H., Holec, S., Cognat, V., Pieuchot, L., Le Ret, M., Canaday, J., and Gagliardi, D. (2008). Degradation of a polyadenylated rRNA maturation by-product involves one of the three RRP6-like proteins in Arabidopsis thaliana. *Molecular and Cellular Biology* 28, 3038–3044.
- Lange, H., Sement, F.M., and Gagliardi, D. (2011). MTR4, a putative RNA helicase and exosome co-factor, is required for proper rRNA biogenesis and development in Arabidopsis thaliana. *The Plant Journal* 68, 51–63.
- Lebreton, A., Tomecki, R., Dziembowski, A., and Séraphin, B. (2008). Endonucleolytic RNA cleavage by a eukaryotic exosome. *Nature* 456, 993–996.
- Liu, Q., Greimann, J.C., and Lima, C.D. (2006). Reconstitution, Activities, and Structure of the Eukaryotic RNA Exosome. *Cell* 127, 1223–1237.
- Lorentzen, E., Basquin, J., Tomecki, R., Dziembowski, A., and Conti, E. (2008). Structure of the Active Subunit of the Yeast Exosome Core, Rrp44: Diverse Modes of Substrate Recruitment in the RNase II Nuclease Family. *Molecular Cell* 29, 717–728.

Lubas, M., Damgaard, C.K., Tomecki, R., Cysewski, D., Jensen, T.H., and Dziembowski, A. (2013). Exonuclease hDIS3L2 specifies an exosome-independent 3'-5' degradation pathway of human cytoplasmic mRNA. *The EMBO Journal* 32, 1855–1868.

Lykke-Andersen, S., Tomecki, R., Jensen, T.H., and Dziembowski, A. (2011). The eukaryotic RNA exosome: same scaffold but variable catalytic subunits. *RNA Biology* 8, 61–66.

Malecki, M., Viegas, S.C., Carneiro, T., Golik, P., Dressaire, C., Ferreira, M.G., and Arraiano, C.M. (2013). The exoribonuclease Dis3L2 defines a novel eukaryotic RNA degradation pathway. *The EMBO Journal* 32, 1842–1854.

Mitchell, P., Petfalski, E., Shevchenko, A., Mann, M., and Tollervey, D. (1997). The exosome: a conserved eukaryotic RNA processing complex containing multiple 3'→5' exoribonucleases. *Cell* 91, 457–466.

Moreno, A.B., Martínez de Alba, A.E., Bardou, F., Crespi, M.D., Vaucheret, H., Maizel, A., and Mallory, A.C. (2013). Cytoplasmic and nuclear quality control and turnover of single-stranded RNA modulate post-transcriptional gene silencing in plants. *Nucleic Acids Research* 41, 4699–4708.

Motomura, K., Le, Q.T., Kumakura, N., Fukaya, T., Takeda, A., and Watanabe, Y. (2012). The role of decapping proteins in the miRNA accumulation in *Arabidopsis thaliana*. *RNA Biology* 9, 644–652.

Murakami, H., Goto, D.B., Toda, T., Chen, E.S., Grewal, S.I., Martienssen, R.A., and Yanagida, M. (2007). Ribonuclease Activity of Dis3 Is Required for Mitotic Progression and Provides a Possible Link between Heterochromatin and Kinetochore Function. *PLoS ONE* 2, e317.

Nakamichi, N. (2011). Molecular mechanisms underlying the *Arabidopsis* circadian clock. *Plant Cell Physiol.* 52, 1709–1718.

- Nissan, T., Rajyaguru, P., She, M., Song, H., and Parker, R. (2010). Decapping activators in *Saccharomyces cerevisiae* act by multiple mechanisms. *Molecular Cell* 39, 773–783.
- Nusinow, D.A., Helfer, A., Hamilton, E.E., King, J.J., Imaizumi, T., Schultz, T.F., Farré, E.M., and Kay, S.A. (2011). The ELF4-ELF3-LUX complex links the circadian clock to diurnal control of hypocotyl growth. *Nature* 475, 398–402.
- Ossowski, S., Schwab, R., and Weigel, D. (2008). Gene silencing in plants using artificial microRNAs and other small RNAs. *The Plant Journal* 53, 674–690.
- Perea-Resa, C., Hernández-Verdeja, T., López-Cobollo, R., del Mar Castellano, M., and Salinas, J. (2012). LSM proteins provide accurate splicing and decay of selected transcripts to ensure normal Arabidopsis development. *The Plant Cell* 24, 4930–4947.
- Schaeffer, D., Tsanova, B., Barbas, A., Reis, F.P., Dastidar, E.G., Sanchez-Rotunno, M., Arraiano, C.M., and van Hoof, A. (2009). The exosome contains domains with specific endoribonuclease, exoribonuclease and cytoplasmic mRNA decay activities. *Nature Structural & Molecular Biology* 16, 56–62.
- Schneider, C., Leung, E., Brown, J., and Tollervey, D. (2009). The N-terminal PIN domain of the exosome subunit Rrp44 harbors endonuclease activity and tethers Rrp44 to the yeast core exosome. *Nucleic Acids Research* 37, 1127–1140.
- Schwab, R., Ossowski, S., Riester, M., Warthmann, N., and Weigel, D. (2006). Highly specific gene silencing by artificial microRNAs in Arabidopsis. *The Plant Cell* 18, 1121–1133.
- Sement, F.M., Ferrier, E., Zuber, H., Merret, R., Alioua, M., Deragon, J.-M., Bousquet-Antonelli, C., Lange, H., and Gagliardi, D. (2013). Uridylation prevents 3' trimming of oligoadenylated mRNAs. *Nucleic Acids Research*.
- Shin, J.-H., Wang, H.-L.V., Lee, J., Dinwiddie, B.L., Belostotsky, D.A., and Chekanova, J.A. (2013). The Role of the Arabidopsis Exosome in siRNA-Independent Silencing of Heterochromatic Loci. *PLoS Genet* 9, e1003411.



Souret, F.F., Kastenmayer, J.P., and Green, P.J. (2004). AtXRN4 Degrades mRNA in Arabidopsis and Its Substrates Include Selected miRNA Targets. *Molecular Cell* *15*, 173–183.

Subramanian, A., Tamayo, P., Mootha, V.K., Mukherjee, S., Ebert, B.L., Gillette, M.A., Paulovich, A., Pomeroy, S.L., Golub, T.R., Lander, E.S., et al. (2005). Gene set enrichment analysis: A knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *102*, 15278–15279.

Trapnell, C., Roberts, A., Goff, L., Pertea, G., Kim, D., Kelley, D.R., Pimentel, H., Salzberg, S.L., Rinn, J.L., and Pachter, L. (2012). Differential gene and transcript expression analysis of RNA-seq experiments with TopHat and Cufflinks. *Nature Protocols* *7*, 562–578.

Wang, H.W., Wang, J., Ding, F., Callahan, K., Bratkowski, M.A., Butler, J.S., Nogales, E., and Ke, A. (2007). Architecture of the yeast Rrp44 exosome complex suggests routes of RNA recruitment for 3' end processing. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *104*, 16844–16849.

Weber, C., Nover, L., and Fauth, M. (2008). Plant stress granules and mRNA processing bodies are distinct from heat stress granules. *The Plant Journal* *56*, 517–530.

Weiberg, A., Wang, M., Lin, F.-M., Zhao, H., Zhang, Z., Kaloshian, I., Huang, H.-D., and Jin, H. (2013). Fungal Small RNAs Suppress Plant Immunity by Hijacking Host RNA Interference Pathways. *Science* *342*, 118–123.

Xu, J., Yang, J.-Y., Niu, Q.-W., and Chua, N.-H. (2006). Arabidopsis DCP2, DCP1, and VARICOSE form a decapping complex required for postembryonic development. *The Plant Cell* *18*, 3386–3398.

Yang, M., Zhang, B., Jia, J., Yan, C., Habaike, A., and Han, Y. (2013). RRP41L, a Putative Core Subunit of the Exosome, Plays an Important Role in Seed Germination and Early Seedling Growth in Arabidopsis. *Plant Physiol* *161*, 165–178.

Zhang, W., Murphy, C., and Sieburth, L.E. (2010). Conserved RNaseII domain protein functions in cytoplasmic mRNA decay and suppresses Arabidopsis decapping mutant phenotypes. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* *107*, 15981–15985.

## 謝辞

本研究の全ての過程において、多大なご指導を頂きました東京大学の渡邊雄一郎教授に深く感謝申し上げます。

本研究の遂行に際し、微に入り細にわたるご指導を頂いた立命館大学の竹田篤史准教授に深く感謝致します。

次世代シーケンサーによる解析に際し、ご協力を頂いた基礎生物学研究所の佐藤昌直助教に深く感謝致します。

本研究の遂行にあたり、多くの協力をいただいた東京大学大学院の大月陽路香氏に深く感謝致します。

小麦胚芽無細胞翻訳系に必要な材料の供与と、技術支援をしてくださった香川大学の多田安臣博士と野元美佳氏に感謝致します。

日々の研究で様々なご指導・ご支援を頂いた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渡邊研究室の濱田隆宏博士、山下裕美氏、大石梨沙氏、元村一基氏、都筑正行氏、唐戸俊介氏、重政理紗氏、福澤麻里奈氏、吉田誠也氏、藤本剛史氏に感謝致します。