

シロイヌナズナ DNA アレイを用いた遺伝子発現制御ネットワークの解析

● 関 原明

理化学研究所 植物分子生物学研究室

<研究の目的と進め方>

本研究では実験対象植物としてモデル高等植物のシロイヌナズナを用い、種々の DNA マイクロアレイを用いた解析により、種々のストレス（乾燥、低温、塩など）、ホルモン（ABA など）にตอบสนองする遺伝子や種々の組織（葉、花、根など）特異的に発現する遺伝子などを単離、同定する。

アレイ解析で同定されたストレスやホルモン誘導性の制御遺伝子（転写因子、プロテインキナーゼ、F box タンパク質など）に関しては、過剰発現型植物や遺伝子破壊型植物をマイクロアレイなどを用いて解析することにより、制御遺伝子により制御される下流のターゲット遺伝子の探索・同定を行う。

アレイ解析で同定された、制御遺伝子および興味深い発現パターンを示す遺伝子に関しては、レポーター（GUS または LUC）遺伝子を用いたトランスジェニック植物の解析により、遺伝子の植物体内での発現部位を調べる。興味深い発現パターンを示す遺伝子に関しては、バイオインフォマティクスを駆使してシス因子の探索を行った後、シス因子を同定する。

上記の研究を通して植物における遺伝子発現制御ネットワークの解明を目指す。

<研究開始時の研究計画>

DNA マイクロアレイを用いた解析により、種々のストレス（乾燥、低温、塩など）、ホルモン（ABA など）にตอบสนองする遺伝子などを単離、同定する。

アレイ解析で同定されたストレスやホルモン誘導性の制御遺伝子（転写因子、プロテインキナーゼなど）などに関して、過剰発現型植物や遺伝子破壊型植物をマイクロアレイなどを用いて解析することにより、制御遺伝子により制御される下流のターゲット遺伝子の探索・同定を行う。

これまでに 7K cDNA マイクロアレイ（シロイヌナズナの約 7,000 個の cDNA を含む）解析により同定した約 600 個のストレス誘導性遺伝子に関して、レポーター（GUS または LUC）遺伝子を用いたトランスジェニック植物の解析により、遺伝子の植物体内での発現部位を調べる。同定された遺伝子内、興味深い発現パターンを示すものに関しては、バイオインフォマティクスを駆使してシス因子の探索を行う。

全ゲノムタイリングアレイは、全ゲノム領域（アノテーションされていない領域を含む）にわたって遺伝子発現地図を作成する 1 つの有効な方法である。全ゲノムタイリングアレイを用いて解析する事により、従来のエキソンアレイでは単離出来ない新規な遺伝子（機能性 RNA を含む）の同定が期待される。本年度は、高密度シロイヌナズナ全ゲノムタイリングアレイを用いた遺伝子発現解析システムの立ち上げも行う。本年度中に、プローブの調製方法やデータの解析方法などに関して条件検討を行い、シロイヌナズナ全ゲノムタイリングアレイ解析のプロトコルを確立する。

<研究期間の成果>

低温ストレスから回復までの過程の遺伝子発現プロファイル解析を行った。低温ストレス処理または低温ストレスからの回復過程で発現が変動する 618 個の遺伝子（3 倍以上発現が誘導される遺伝子、または、1/3 以下に発現が抑制される遺伝子）をクラスタリングして発現パターンでグループ分けした。その結果、①低温ストレスからの回復過程で発現誘導される遺伝子の多くは、低温ストレス処理で発現が抑制され、また逆に②低温ストレスからの回復過程で発現が抑制される遺伝子の多くは、低温ストレス処理で発現が誘導されていることが明らかになった。また、低温ストレスからの回復過程で発現誘導される遺伝子と再吸水処理（乾燥ストレスからの回復過程）で誘導される遺伝子を比較したところ、両方の回復過程で発現誘導される遺伝子（光合成関連遺伝子などを含む）が 76 個存在していた。これらの遺伝子は、ストレスからの回復過程での植物の生長の再開において共通して機能していることが示唆された。

種々の転写因子（bZIP 型転写因子の AREB1 や NAC 転写因子の NST1 など）に関して、過剰発現型トランスジェニック植物などをマイクロアレイを用いて解析することにより、転写因子により制御される下流のターゲット遺伝子を同定した。ストレスや ABA に対する応答に関与する種々の制御遺伝子（Ser/Thr 型プロテインキナーゼの SOS2、カルシニューリンの β サブユニットをコードする SOS3、WRKY ドメインを持つ SLH1、ABA 誘導性のレセプター型プロテインキナーゼの RPK1 など）に関して、遺伝子破壊系統のマイクロアレイ解析を行うなどして制御遺伝子の機能解析を行った。

これまでに同定した約 600 個のストレス誘導性遺伝子に関して、1 kb のプロモーター断片を回収し、プロモーター + LUC、プロモーター + GUS のベクターコンストラクトを作製した。それらコンストラクトを含むトランスジェニック植物の作出を進めた。これまでにプロモーター + LUC の T2 植物が得られた系統について、LUC の発現解析を進めている。

乾燥ストレス処理したサンプルを用いて、シロイヌナズナ全ゲノムタイリングアレイを用いた遺伝子発現解析システムの立ち上げを進めた。プローブの調製方法などタイリングアレイ実験のプロトコルをほぼ確立した。

<国内外での成果の位置づけ>

申請者らは世界に先駆けてシロイヌナズナの完全長 cDNA ライブラリーを作製し、これまでに 18,127 個の独立した cDNA グループ（全遺伝子の約 70% に相当、世界最大のシロイヌナズナ完全長 cDNA のコレクション）の cDNA を収集している。申請者らは、種々の DNA マイクロアレイ（7K cDNA マイクロアレイ、アジレント 22K オリゴアレイ、全ゲノムタイリングアレイなど）を用いて解析することにより、種々のストレスやホルモンにตอบสนองする遺伝子などを多数同定しており、DNA マイクロアレイを用いた遺伝子発現解析に関する論文を多数発表している。申請者らのグ

ループは今後全ゲノムタイリングアレイを用いて、植物の遺伝子発現制御ネットワークの全貌解明を目指した研究を進めていく予定である。全ゲノムタイリングアレイを用いて植物の遺伝子発現制御ネットワークの全貌解明を目指しているグループは、現在のところ申請者のグループのみである。

<達成できなかったこと、予想外の困難、その理由>

プロモーター+LUC, プロモーター+GUSのトランスジェニック植物の作成は、予想以上に大変な時間と労力を要することがわかった。

<今後の課題、展望>

シロイヌナズナでは、種々のDNAマイクロアレイを用いた解析により、乾燥・低温・塩などのストレスやABAなどの植物ホルモン処理により発現誘導される遺伝子がこれまでに約1000個同定されている。しかしながら、まだアノテーションされていない領域などに、ストレスや植物ホルモンに対して応答する新規な機能性RNA (small RNAを含む) が多く存在することが予想される。アノテーションされていない領域に存在する新規な機能性RNAを同定する一つの方法として全ゲノムタイリングアレイ解析がある。

そこで、ストレスやホルモン応答性の新規な機能性RNAを同定することを目指して、シロイヌナズナ全ゲノムタイリングアレイを用いて、乾燥・低温・塩などのストレスやABAなどのホルモン処理条件下で発現解析を行う。上記ストレスやホルモン処理条件下での選択的スプライシングパターンの解析や、センスアンチセンス転写産物の同定も行う。新規に同定されたストレスやホルモン応答性の機能性RNA (small RNAを含む) に関しては、遺伝子破壊系統などを用いて遺伝子の機能解析を行う。

<研究期間の全成果公表リスト>

1) 論文:

1. 0601280835

Oono, Y., Seki, M., Satou, M., Iida, K., Akiyama, K., Sakurai, T., Fujita, M., Yamaguchi-Shinozaki, K. and Shinozaki, K. (2005) Monitoring expression profiles of *Arabidopsis* genes during cold acclimation and deacclimation using DNA microarrays. *Funct. Integr. Genomics* (in press)

2. 0601271901

Osakabe Y, Maruyama K, Seki M, Satou M, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2005) An LRR receptor kinase, RPK1, is a key membrane-bound regulator of abscisic acid early signaling in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 17:1105-1119.

3. 0601281156

Fujita, Y., Fujita, M., Satoh, R., Maruyama, K., Parvez, M.M., Seki, M., Hiratsu, K., Ohme-Takagi, M., Shinozaki, K. and Yamaguchi-Shinozaki, K. (2005) AREB1 is a transcription activator of novel ABRE-dependent ABA-signaling that enhances drought stress tolerance in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 17:3470-3488.

4. 0601281118

Mitsuda, N., Seki, M., Shinozaki, K. and Ohme-Takagi, M. (2005) The NAC transcription factors NST1 and NST2 of *Arabidopsis* regulate secondary wall thickenings and are required for anther dehiscence. *Plant Cell* 17:2993-3006.

5. 0601271950

Noutoshi, Y., Ito, T., Seki, M., Nakashita, H., Yoshida, S.,

Marco, Y., Shirasu, K. and Shinozaki, K. (2005) A single amino acid insertion in the WRKY domain of the *Arabidopsis* TIR-NBS-LRR-WRKY type disease resistance protein SLH1 (SENSITIVE TO LOW HUMIDITY 1) causes activation of defense responses and hypersensitive cell death. *Plant J.* 43:873-888.

6. 0601281134

Nishimura, N., Kitahata, N., Seki, M., Narusaka, Y., Narusaka, M., Kuromori, T., Asami, T., Shinozaki, K. and Hirayama, T. (2005) Analysis of ABA hypersensitive germination 2 (*ahg2*) revealed the pivotal functions of PARN in stress response in *Arabidopsis*. *Plant J.* 44:972-984.

7. 0601281249

Umezawa, T., Okamoto, M., Kushiro, T., Nambara, E., Oono, Y., Seki, M., Kobayashi, M., Koshiba, T., Kamiya, Y. and Shinozaki, K. (2006) CYP707A3, a major ABA 8'-hydroxylase involved in dehydration and rehydration response in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* (in press).

8. 0601271735

Kamei A, Seki M, Umezawa T, Ishida J, Satou M, Akiyama K, Zhu JK, Shinozaki K (2005) Analysis of gene expression profiles in *Arabidopsis* salt overly sensitive mutants, *sos2* and *sos3* mutants. *Plant Cell and Environ* 28:1267-1275.

9. 0601271559

Sakurai T, Satou M, Akiyama K, Iida K, Seki M, Kuromori T, Ito T, Konagaya A, Toyoda T, Shinozaki K (2005) RARGE: a large-scale database of RIKEN *Arabidopsis* resources ranging from transcriptome to phenome. *Nucleic Acids Res* 33:D647-D650.

10. 0601272036

Savitch, L.V., Allard, G., Seki, M., Robert, L.S., Tinker, N.A., Huner, N.P.A., Shinozaki, K. and Singh, J. (2005) The Effect of Over-Expression of Two *Brassica* CBF/DREB1-Like Transcription Factors on Photosynthetic Capacity and Freezing Tolerance in *Brassica napus*. *Plant Cell Physiol.* 46:1525-1539

11. 0601280001

Narusaka, Y., Narusaka, M., Seki, M., Ishida, J., Shinozaki, K., Nan, Y., Park, P., Shiraishi, T. and Kobayashi, M. (2005) Cytological and molecular analyses of non-host resistance of *Arabidopsis thaliana* to *Alternaria alternata*. *Molecular Plant Pathology*. 6 (6): 615-627

12. 0601271910

Iida, K., Seki, M., Sakurai, T., Satou, M., Akiyama, K., Toyoda, T., Konagaya, A. and Shinozaki, K. (2005) RARTF: database and tools for complete sets of *Arabidopsis* transcription factors. *DNA Res.*12:247-256.

2) データベース:

1. 0601281342

理研シロイヌナズナ転写因子データベース RARTF(RIKEN *Arabidopsis* Transcription Factor database;
<http://rarge.gsc.riken.jp/rartf/>)