

## ポプラの短日による休眠移行における microRNA の長距離輸送と機能に関する研究

廣岡 慎也 (筑波大学 生物学類) 指導教員: 佐藤 忍 (筑波大学 生命環境系)

## 【背景・目的】

落葉性木本植物は冬の低温や乾燥といった環境ストレスに対して、低温馴化や休眠によって適応している。落葉性木本植物のモデル植物であるポプラ (*Populus trichocarpa*) は日が短く気温の低くなる秋から冬にかけて植物体全体が成長を止めて休眠し、春になると開芽して再び成長する年周期性の成長サイクルを示す。また、導管液に含まれる糖やタンパク質が冬季に増加することが明らかになっており、短日や低温が根の生理機能に影響を及ぼしていることが示唆されている (Furukawa *et al*, 2011a, b)。さらに、根の成長休止や導管液物質に関わる遺伝子の発現は短日条件だけでも誘導されることも示されている (Aohara *et al*, 2016)。日長はシュートで受容されることから、短日条件下に根で起こる現象は、シュートから根へ輸送されて働くシグナル分子によって誘導されており、その輸送経路は篩管である可能性が考えられた。そのシグナル分子の1つとして休眠芽形成を誘導することが知られる植物ホルモンであるアブシジン酸の投与により導管液有機物質組成の変化に関連する遺伝子のいくつかが発現誘導されていることが分かった。しかし、短日条件で発現が誘導されているにも関わらず、アブシジン酸による誘導が起らない遺伝子もあり、短日条件による休眠移行時の根の機能制御には新たなメカニズムが関与している可能性が考えられた。そこで短日条件下にシュートから根へと長距離輸送されるシグナル分子として microRNA (以下 miRNA) が働いているのではないかと仮説を立てた。

miRNA は 20~25 nt の 1 本鎖 small RNA であり、相同な mRNA や DNA に結合して正常な翻訳の阻害や DNA メチル化を誘導して転写を抑制する転写型遺伝子サイレンシングに働いている。先行研究において *Populus trichocarpa* を用いて長日条件と短日条件の葉で発現している miRNA が次世代シーケンサーにより解析された。その結果、発現量が大きく増減している miRNA が複数確認された。よって、本研究ではこの解析結果を基に短日のシグナル分子と想定される miRNA に関して機能解析を行い、ポプラの休眠移行に伴う根の生理的变化の制御機構を明らかにすることを目的とする。

## 【材料・方法】

## ・ CRISPR/Cas9 によるポプラのゲノム編集

*Populus trichocarpa* の葉において短日条件で発現量が高い *MIR* 遺伝子の欠損を目的に gRNA を設計し、*Cas9* を含むデスチネーションベクターを作成した。形質転換用のポプラ (ハイブリッドアスペン T89 系統) の茎切片に前述のベクターを導入したアグロバクテリウムを感染させて培養し形質転換体を作成した。選抜マーカーにはカナマイシン耐性遺伝子の *Neomycin PhosphoTransferase II* (*NPTII*) を用いた。また、いくつかのベクターにおいては緑色蛍光タンパク質をコードする *ZsGreen* を導入して選抜マーカーとして用いた。

## ・ 形質転換体作出の確認

上記で作成した形質転換体ポプラにおいて形質転換が確かに起こったかを確認するため、抽出ゲノム中の導入遺伝子 *NPTII* の PCR 解析および蛍光観察を行った。

## ・ 篩管液物質の回収

RNase out などを含む EDTA 溶液に *Populus trichocarpa* の葉を切り落とした茎、または、葉のついた葉柄を約 2 時間浸けて篩管液に含まれる物質を回収した。

## 【結果】

アグロバクテリウム感染させたポプラの抽出ゲノムを用いて導入遺伝子の1つであるカナマイシン耐性遺伝子の *Neomycin PhosphoTransferase II* を PCR により検出したところ、複数個体で増幅が確認できた。蛍光観察においても *ZsGreen* を導入した個体では緑色の蛍光が確認できた。

## 【考察・展望】

結果よりポプラの形質転換体の作出が確認できた。今後は形質転換体において *MIR* 遺伝子のゲノム編集がされていることを確認し、人工的年間環境サイクル下での栽培において表現型及び miRNA の機能の解析を行う。また、抽出した篩管液物質の解析を行い、miRNA が長距離輸送されているかを調べる。

## 【参考文献】

Aohara T, Mizuno H, Kiyomichi D, Abe Y, Matsuki K, Sagawa K, Mori H, Iwai H, Furukawa J, Satoh S (2016) Identification of a xylem sap germin-like protein and its expression under short-day and non-freezing low-temperature conditions in poplar root. *Plant Biotechnol* 33:123-127

Furukawa J, Abe Y, Mizuno H, Matsuki K, Sagawa K, Kojima M, Sakakibara H, Iwai H, Satoh S (2011a) Seasonal fluctuation of organic and inorganic components in xylem sap of *Populus nigra*. *Plant Root* 5: 56-62

Furukawa J, Abe Y, Mizuno H, Matsuki K, Sagawa K, Mori H, Iwai H, Satoh S (2011b) Abscisic acid-inducible 25 kDa xylem sap protein abundant in winter poplar. *Plant Root* 5:63-68