

ポプラの休眠における miRNA の長距離輸送と作用

松澤 杜太郎 (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。本研究では長日/短日条件のポプラ篩管液中の miRNA 量比較による miRNA の葉から根への長距離輸送の検討や、長日/短日条件の根における RNA の発現解析を目的とする。また、ポプラが持つショ糖輸送体 SWEET の遺伝子で、アブシジン酸により発現が誘導される *PtSWEETb* と、発現が誘導されない *PtSWEETc* がある。これらが表現型に与える影響を調べるため、研究室で作出された *PtSWEETb*, *PtSWEETc* の片方あるいは両方のノックダウン体の根の伸長量の変化も計測する。

【材料】

・ *Populus trichocarpa*

アイソトープ総合センター敷地内にある *P. trichocarpa* の枝を採取し、次亜塩素酸ナトリウムで無菌化処理し、無菌栽培を開始した。

【方法】

・ 短日処理

3 週間長日条件下で生育させた *P. trichocarpa* を短日条件 (8 時間明期/16 時間暗期, 23°C) で 6 週間生育し、サンプリングした

・ 篩管液の回収

RNase inhibitor などを含む EDTA 溶液に *P. trichocarpa* の葉を切り落とした茎を約 2 時間浸けて篩管液に含まれる物質を回収した

・ miRNA の単離、濃縮

回収した篩管液から、*miVANA*TM miRNA isolation Kit を用いて miRNA を単離し、カラムで濃縮した。

・ miRNA の増幅

Poly(A)-tailing Kit で miRNA の配列に A 塩基を多数付加し、Poly(T)-Adapter で First-strand cDNA を合成した。この cDNA を、miRNA 特異的な Primer などを用いて qPCR で増幅・定量した。

・ 根の伸長量の計測

ポプラをポットに植えてから 2 week, 3 week, 2 month 経過時に根が見えるようポットの底を撮影し、Image J を用いて根の長さを計測し、伸長量を算出した。

【結果】

miRNA の増幅には成功したが、内在性コントロールを用いた相対濃度の補正が出来ておらず、長距離輸送の検討はできていない。長日/短日条件の根の RNA 発現解析については、両条件の根のサンプリングまで終わっており、RNA 抽出後に RNA seq にかける予定である。*SWEET* ノックダウン体の根の伸長については、ノックダウン体の伸長量が野生型のものよりも減少する傾向が見られ、*SWEET* ノックダウンが根の伸長を抑制する可能性が示唆された。

【参考文献】

Aohara T, Mizuno H, et al. (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, et al. (2011a) Seasonal fluctuation of organic and inorganic components in xylem sap of *Populus nigra*. *Plant Root* 5: 56-62

Furukawa J, Abe Y, et al. (2011b) Abscisic acid-inducible 25 kDa xylem sap protein abundant in winter poplar. *Plant Root* 5:63-68