



生物情報科学・細胞生物学的手法から見えてきた 植物栄養応答

6. 次世代トランスクリプトーム解析による 植物の新しい無機栄養応答機構の探索

西田 翔
中央大学理工学部

キーワード 次世代シーケンサー, RNA-Seq, エキソン, 選択的スプライシング

1. はじめに

トランスクリプトーム解析とは、個体、組織、細胞における転写産物の全体像を、定量的あるいは定性的に把握するオミクス手法の一つである。これまでに、植物の栄養応答に関わるいくつかの重要な遺伝子や制御機構は、このトランスクリプトーム解析により明らかにされてきた。一昔前までのトランスクリプトーム解析といえば、RNAのハイブリダイゼーションを利用したマイクロアレイ法による遺伝子の発現定量解析が主流であった。しかし近年では、次世代シーケンサー (Next-Generation Sequencer, NGS) の性能が向上するにつれて、トランスクリプトーム解析をNGSで行う「RNA sequencing (RNA-Seq)」が広く利用されるようになってきた。RNA-Seqの最大の特徴は、転写産物の量的情報だけでなく、配列情報も同時に取得できることにあり、転写産物の構造変化の検出や、新奇転写産物の網羅的探索などにおいてその威力を発揮する。最近では、植物栄養学の分野においても、RNA-Seqを用いた研究成果が報告されている。しかしその多くでは、遺伝子の発現量の解析を目的とした利用に留まり、RNA-Seqの優位性を活かした研究例は未だに少ないのが現状である。本稿では、RNA-Seq解析における筆者の経験を踏まえ、RNA-Seq技術の概要からRNA-Seqの特徴を活かしたアプリケーション、実際のRNA-Seq解析の流れについて解説するとともに、後半では筆者らがRNA-Seq解析

により明らかにした、低栄養ストレスに応答した mRNA のエキソン構造制御に関する知見について紹介する。

2. RNA-Seq 解析

1) RNA-Seq 技術

RNA-Seq は、NGS を用いて RNA の逆転写産物である cDNA の配列情報を網羅的に定量分析する技術である。NGS には複数の方法論が提唱、実用化されており、主に定量性と正確性に優れたショートリードシーケンシングと、数 kb 以上の配列を連続して解読することができるロングリードシーケンシングで使い分けられている。ショートリードシーケンシングは、Sequence-by-synthesis 法を用いた Illumina 社の NGS プラットフォーム (HiSeq 等) や、半導体シーケンシング法を用いた Thermo Fisher Scientific 社の Ion Proton/PGM システムなど、いくつかある。一方、ロングリードシーケンシングにおいては、一分子モニタリングシーケンサーである PacBio®RSII がよく利用される。PacBio®RSII の定量性や配列の精度はショートリードシーケンスより劣るものの、kb レベルで塩基配列を出力することができるため、リファレンス情報 (ゲノムやトランスクリプトームの塩基配列情報) が存在しない非モデル生物における *de novo* RNA-Seq 解析などで重宝される。また、2015 年より MinION (Oxford NANOPORE Technologies 社) という手のひらサイズの使い捨て一分子モニタリングシーケンサーが販売されている。MinION をパソコンに USB 接続することで、メーカーのクラウドに生データが送信され、解析後のデータがユーザーにオンラインで送付されるというユニークなシステムをとっている。5~10 Gb/run, 2 run 分のキットが約 10 万円と安価であることも魅力の一つである。

2) RNA-Seq のアプリケーション

(1) 遺伝子発現量解析

リファレンスとなるゲノムおよびトランスクリプトーム

Sho NISHIDA: Plant responses to nutrition revealed by bioinformatics and cell biology. 6. Genome-wide exploration of novel mechanisms involved in plant response to mineral nutrition using next-generation transcriptome analysis 112-8551 文京区春日 1-13-27

Corresponding Author: 西田 翔 shon@kc.chuo-u.ac.jp

2017 年 2 月 2 日受付・2017 年 2 月 7 日受理

日本土壌肥科学雑誌 第 88 巻 第 3 号 p. 242~247 (2017)

の配列情報を元に、リードを遺伝子領域にマッピングし、アライメントのスコアを元に遺伝子の発現量を算出する。遺伝子発現解析には、定量性とシーケンシングの正確性に優れたショートリードシーケンシングが用いられる。マイクロアレイと異なりプローブの設計を必要としないため、得られる情報量はマイクロアレイのそれに優る。一方、マイクロアレイと RNA-Seq の定量精度の優劣については広く議論されており、未だ意見が分れているようだが、少なくとも両手法間で顕著な違いは無いようである (Willenbrock *et al.*, 2009; Zhao *et al.*, 2014)。

(2) 転写産物の配列変化の検出

ショートリードの配列情報を元に、選択的スプライシング等により生じるアイソフォームの存在比を算出することで、サンプル間での転写産物の配列構造の変化を検出する。大抵の解析パイプラインでは、新奇のアイソフォームの検出も同時に行う。選択的スプライシングの他、選択的転写開始点や RNA エディティングなどの検出も可能。

(3) 新規転写領域の検出

リファレンス上では非転写領域とされているゲノム領域上にマップされたリード情報を元に、新奇の転写領域を検出する。この方法により、これまで非転写領域とされていた遺伝子間領域から数百～数千の非翻訳 RNA が合成されることが複数の植物種で明らかとなっており、それらの中には生理学的役割が明らかにされたものもある (Li *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2014)。

(4) 非モデル植物のトランスクリプトーム解析

リファレンス情報が無い生物種の場合は、リードデータからトランスクリプトームの配列情報を 0 から構築し、その配列情報を元に遺伝子の発現量を算出する *de novo* RNA-Seq 解析を行うことができる。一般的には、ショートリードをつなぎ合わせた転写産物の断片をアッセンブルし、BLAT 等を用いて他の植物種由来の遺伝子配列との相同性を調べることで、遺伝子としての機能を予測する。*de novo* アッセンブルの精度は、その生物種が持つトランスクリプトームの複雑さに依存し、*de novo* アッセンブルで得られる断片の 70～80% 程度が誤った配列を含む偽陽性であるという報告もある (Chang *et al.*, 2014; Liu *et al.*, 2016)。そこで最近では、ロングリードシーケンシングとショートリードシーケンシングを組み合わせることで、精度の高い *de novo* アッセンブルデータを得る解析手法が提案されている (Koren *et al.*, 2012)。

3) RNA-Seq 解析の流れ

いざ RNA-Seq 解析を始めるとなった時、どのように進めればよいのだろうか？ ここでは、実際に RNA-Seq 解析を行う時の全体の流れについて概説する。

(1) 実験目的を明確にする

RNA-Seq 解析では、実験の目的によって、NGS の種類やシーケンシングのメソッド、データの解析方法などの条件が変わってくる。そのため、「何を知りたいのか」、「何を探したいのか」といった疑問を整理し、実験の目的をで

きるだけ明確に設定することから始める。あまり考えずに「とりあえずやってみた」後に、使いづらい RNA-Seq データだったことに気づくことだけは避けたい。

(2) 実験を設計する

実験目的が類似する文献を参考にしながら、処理数、繰返し数、シーケンシングのメソッド等々を慎重に決定していく。後のデータ解析で統計的手法を行う場合 (遺伝子の発現変動解析など)、いわゆる「生物学的ばらつき」の程度を考慮できるよう二反復以上のデータを取ることが強く推奨されている (Trapnell *et al.*, 2012)。筆者は、コストとの兼ね合いから、二回分の実験データを取るようにしている。

(3) RNA-Seq を行う

RNA-Seq は、「RNA 品質チェック」→「ライブラリー調製」→「NGS 解析」の工程から成る。NGS の装置自体は大変高価であり、研究室単位で所有することは稀である。そのため、自前でライブラリー調製までを行い、所属の研究機関や共同研究機関に設置された NGS を利用するか、全ての工程を国内外の解析受託サービスに依頼するのが一般的である。筆者は外資の NGS 解析受託サービスを利用しており、費用は 1 サンプル当たりおよそ 5～7 万円＋税 (HiSeq を用いた paired-end sequence の場合) で、だいたい 40 日前後でデータが納品される。

NGS では取得するリード数がある程度調節することができる。筆者らがシロイヌナズナ由来の RNA-Seq データを用いて遺伝子の検出数とリード数との関係を調べたところ、500 万ペアリード以上で遺伝子の検出数がおおよそ一定になったことから (Nishida *et al.*, 2017)、最低でも 500 万ペアリード以上は取得した方がよいであろう。また、遺伝子の数は植物種間で大きく変わらないと考えられており、RNA-Seq においては種の違いをあまり気にする必要は無いと思われる。

(4) RNA-Seq データを解析する

得られたシーケンスデータは品質チェックを行い、破損や異常が無いか確認した後、目的に合ったデータ解析を行う。RNA-Seq データ解析用のフリーのプログラムが多数リリースされており、目的や状況によって使い分ける。解析プログラム (の恐らくほぼ全て) は、Linux 用あるいは Unix 系の Mac 用に作られており、ターミナル上でコマンドにより操作する。自身でデータ解析をする場合はこれらの操作技術を身につける必要があり、それまで実験系が中心であった研究者にとって RNA-Seq のデータ解析に対する壁は高く感じられるであろう。しかし、トランスクリプトーム解析のようなビッグデータを扱う場面では、Linux コマンドやプログラミングの知識は何かと役に立つので、比較的時間がある若手研究者 (大学院生やポスドク) などは解析技術の習得に挑戦するのも良い。自身でデータ解析をする場合、メモリー容量の大きいコンピューターが必要となる。筆者はメモリー容量が 64 GB の OS フリーパソコンを安く購入し、無償の Linux OS (Ubuntu や CentOS)

をインストールして計算サーバーとして使用している。また、*de novo* RNA-Seq のようなメモリー消費量の大きい計算を行う場合は、外部機関のスーパーコンピューターを利用している。一方、プログラム操作技術の習得に時間を割くことが困難な研究者は、DNA Data Bank of Japan (DDBJ) が提供するクラウド型 RNA-Seq 解析パイプラインを利用するのが良い (<https://p.ddbj.nig.ac.jp/pipeline/Login.do> を参照)。利用できるアプリケーションは限られるが、Linux コマンドを使うこと無く、Web ブラウザー上での簡単な操作で、リードのマッピング、遺伝子の発現量解析、*de novo* アセンブルなどができる。

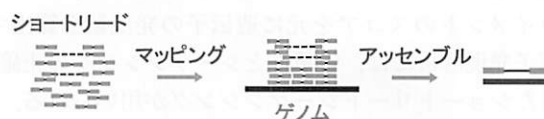
3. RNA-Seq を使った次世代トランスクリプトーム解析： 栄養応答に関わる mRNA 構造制御の探索

1) エキシソンの組合せ制御とその生物学的意義

真核生物では、選択的スプライシング、あるいは選択的転写開始に由来する 5' 末端におけるエキソンスキッピングにより、単一の遺伝子からエキソンの組合わせが異なる複数の mRNA が合成される。この現象は、mRNA の安定性や翻訳されるタンパク質の機能に変化を与えることから、トランスクリプトームやプロテオームの複雑性と柔軟性の創造に必要不可欠な転写後制御の一つとして知られ、多細胞生物における複雑な進化の駆動力になってきたと考えられている (Kelemen *et al.*, 2013)。

mRNA のエキソンの組合せは、細胞や組織の種類、発生段階などの条件によって特異的に変化し、生体内における種々の生物学的イベントを制御することが動物の研究を中心に明らかにされている (Kelemen *et al.*, 2013; Nilsen and Graveley, 2010)。植物においては、温度や光などの環境条件への応答において、エキソンの組合せ制御が重要な役割を担うことが報告されている。例えば、シロイヌナズナの開花調節に関わる転写因子 *FLOWERING LOCUS M (FLM)* では、温度依存的な選択的スプライシングにより、常温下と低温下で合成されるタンパク質の構造が変化する (Posé *et al.*, 2013)。これにより *FLM* による開花関連遺伝子の発現制御パターンが変化することで、低温下では開花が抑制され、温度の上昇とともに開花が促される。また、シロイヌナズナにおける光に応答した形態変化は、光シグナリング調節因子である *SPA1-RELATED 3* における光依存的な選択スプライシングと、スプライシング調節因子である *RS31* における光依存的な選択的スプライシングの、2つの独立した機構を介して制御されることが明らかにされている (Petrillo *et al.*, 2014; Shikata *et al.*, 2014)。その他にも、塩ストレス、過剰金属ストレス、温度ストレス、乾燥ストレス、食害ストレスなど、様々な環境ストレスに応答して mRNA のエキソンの組合せパターンが変化することが RNA-Seq を用いた網羅的解析により明らかにされており、エキソンの組合せ制御を介した未知の環境応答制御機構の存在が示唆されている (Ding *et al.*, 2014; Filichkin *et al.*, 2010; Li *et al.*, 2013;

STEP1. アッセンブル



STEP2. 存在比の算出



STEP3. 存在比の比較

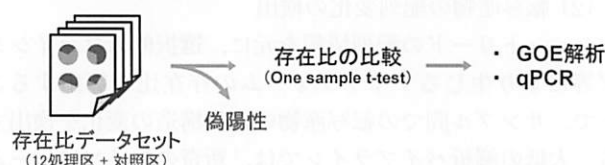


図1 Differential exon combination (DC) 解析のワークフロー

Mandadi and Scholthof, 2015; Remy *et al.*, 2014)。

2) 低栄養に応答したエキソンの組合せ変化の網羅的探索

植物の栄養欠乏応答において、遺伝子の発現量を調節する転写制御と、タンパク質の集積量を調節する転写後制御が必須であることは既知の事実である。一方、エキソンの組合せ変化など、転写後の mRNA の構造修飾が植物の栄養欠乏応答にどれだけ寄与するのかは明らかにされていない。Li *et al.* (2013) は、鉄 (Fe) 欠乏およびリン (P) 欠乏に暴露したシロイヌナズナの根における選択的スプライシングパターンを RNA-Seq を用いて網羅的に調査し、868 個の低 Fe または低 P に応答してスプライシングパターンが変化する遺伝子を同定している。このことから、光や温度と同じように、栄養条件もまた mRNA のエキソンの組合せを制御する環境因子の一つであることが示され、エキソンの組合せ制御を介した栄養欠乏応答機構が存在する可能性が示唆された。

筆者らは、栄養欠乏応答に関わるエキソンの組合せ制御の存在を探索するため、RNA-Seq を用いた低栄養条件下における大規模トランスクリプトーム解析を行った (Nishida *et al.*, 2017)。水耕栽培したシロイヌナズナを、窒素 (N)、カリウム (K)、カルシウム (Ca)、マグネシウム (Mg)、P、硫黄 (S)、ホウ素 (B)、Fe、マンガン (Mn)、亜鉛 (Zn)、銅 (Cu)、モリブデン (Mo) をそれぞれ除去した水耕液に 4 日間暴露した後、根から RNA を抽出し RNA-Seq (HiSeq2000) に供した。得られた RNA-Seq データは、独自のパイプラインにより解析を行った (図1)。解析は、mRNA のアッセンブル、アイソフォームの存在比の算出、存在比の比較解析の 3 段階から構成される (解析法の詳細は Nishida *et al.*, 2017 を参照)。最終的に、低栄養に応答してアイソフォームの存在比が有意に変動した遺伝子を抽出し、それらを Differentially exon

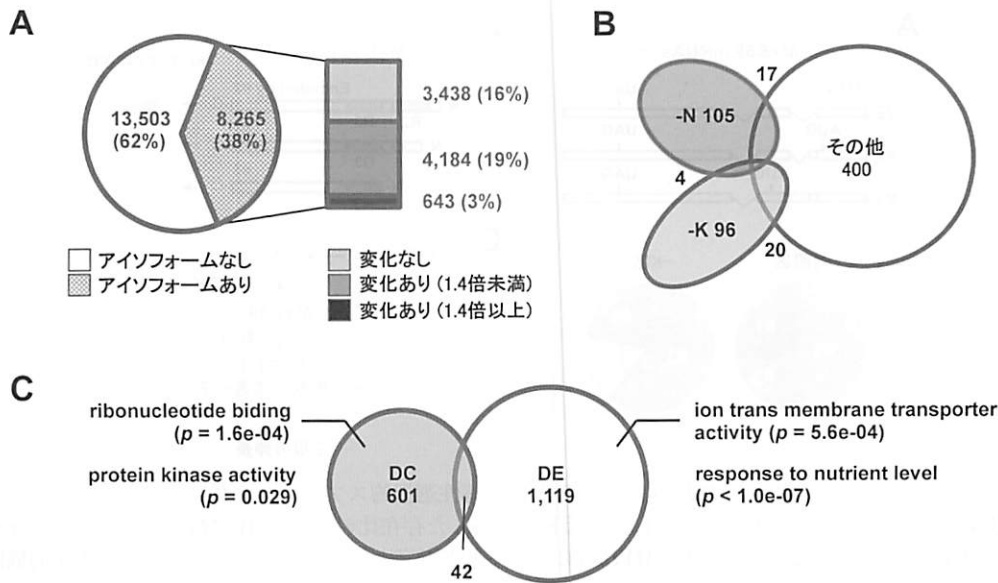


図2 DC遺伝子群の特徴

(A) mRNAのアイソフォームを持つ遺伝子の割合、および低栄養に反応してエキソン構造が変化した遺伝子の割合。(B) 各低栄養処理におけるDC遺伝子の数(オイラー図)。(C) DC遺伝子群と転写量が変化(DE)を示した遺伝子群の比較、各遺伝子群で有意に濃縮されるGO termとFisher's exact testによるP値を示した。

combination (DC) を示す遺伝子と定義した。

今回の解析で発現が検出された遺伝子の内、38% (8,265 遺伝子) からエキソン構造の異なるアイソフォームが転写されると推定され、その半数以上 (4,827 遺伝子) で低栄養に反応したエキソンの組合せ変化が検出された(図2)。ただし、その変化(対照区と比較したときの存在比の変化率)は全体的に小さく、低栄養ストレスによるエキソン構造への影響は限定的であることが示唆された。一方、643個の遺伝子では低栄養処理によりアイソフォームの存在比が1.4倍以上、高いもので数十倍変動することが明らかとなった。これら643個の遺伝子を低栄養処理ごとに分類した結果、2種類以上の処理条件でエキソンの構造変化が検出された遺伝子は全体の7%未満であり、大多数は栄養特異的な変化を示す遺伝子であった。Li *et al.* (2013) も、低Feと低Pにおける選択的スプライシングの比較解析において同様のことを報告しており、栄養特異的なエキソン構造の制御機構が存在することが推測された。一方、複数の処理条件でエキソン構造に変化を示した遺伝子の中には *CBL-INTERACTING PROTEIN KINASE 3 (CIPK3)* が含まれていた。*CIPK3* はアブシン酸シグナリングを介した非生物学的ストレス応答全般に関与する遺伝子として知られている(Kim *et al.*, 2003)。また、*CIPK3* は塩ストレスに反応して選択的スプライシングのパターンが変動することが報告されているが(Ding *et al.*, 2014)、興味深いことに低栄養ストレス下では、塩ストレス下とは異なったスプライシングパターンを示した(Nishida *et al.*, 2017)。これは、*CIPK3* はストレスごとに複数のアイソフォームを使い分けている可能性を示唆している。

エキソンの構造変化を示した643個の遺伝子と、転写

レベルでの変化(Differential expression, DE)を示した1,161個の遺伝子の比較を行ったところ、DE遺伝子群に含まれるDC遺伝子(42個)の割合は、アイソフォームを持つ遺伝子全体(8,265個)におけるDC遺伝子の割合より有意に小さいことが明らかとなった(p -value=2.4e-07, Fisher's exact test)(図2C)。さらに、Gene Ontology (GO) Enrichment解析を行った結果、DC遺伝子群とDE遺伝子群で濃縮されるGOカテゴリーに違いが認められた。これらの結果は、エキソンの組合せ制御を受ける遺伝子が転写制御を受ける遺伝子とは異なる機能や役割を持つことを示唆している。

3) MYB59/MYB48における低Kストレスに反応した選択的スプライシング

筆者らは低Kに特異的に応答するMYB59とMYB48に着目した。MYB59とMYB48はともに転写因子であるR2R3-type MYBファミリーに属する遺伝子であり、互いに高い相同性を有する。MYB59およびMYB48は、それぞれアイソフォームを3種類および4種類持ち、さらにそれらの転写産物から、DNA結合サイトであるR2とR3の両方を有する「完全型」と、R2の一部または完全に欠損しR3しか持たない「欠損型」が翻訳されることが予想された(図3A, B; MYB48についてはNishida *et al.*, 2017を参照)。どちらの遺伝子においても、低Kに反応して第一イントロンにおけるスプライシングパターンが変動し、それにより欠損型をコードするアイソフォームが減少すると同時に完全型をコードするアイソフォームが増加する。このことは完全型が低K応答に必要なことを示唆している。

MYB59は根端の細胞周期を制御する転写因子で、主根の伸長を負に制御することが明らかとなっている(Mu

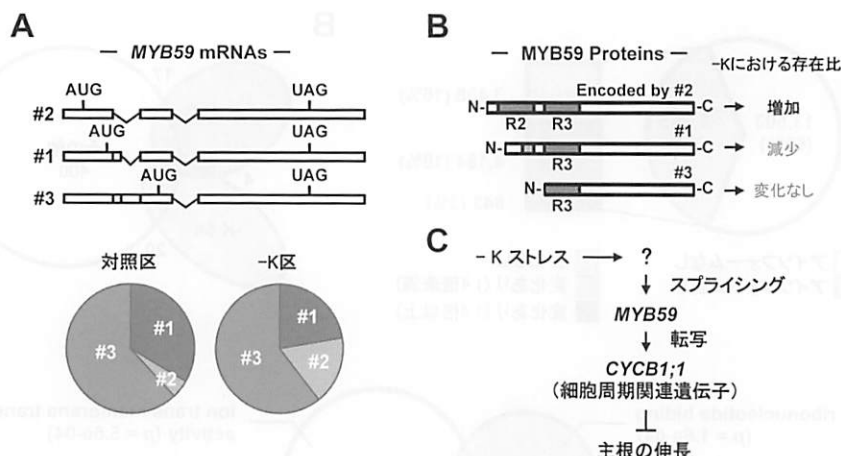


図3 MYB59における低K応答性選択的スプライシング

(A) MYB59のmRNAアイソフォームのモデル図, および低Kに応答した存在比の変動. (B) MYB59のアイソフォームがコードするタンパク質, および低Kによる存在比の変動. (C) MYB59における低K応答性選択的スプライシングの生理学的機能の予測モデル.

et al., 2009). MYB59の欠損型が正常な機能を有していないと仮定すると, 低Kに応答して欠損型が減り, 完全型が増えることで, 主根の伸長に負の制御が掛かることが想像できる. MYB59による主根の伸長抑制は, CYCB1;1などの根端における細胞周期関連遺伝子の発現がMYB59により正に制御されることで起こる (Mu et al., 2009). 筆者らのRNA-Seq解析データにおいても, 低K条件下におけるCYCB1;1の発現上昇が確認されており, MYB59の完全型の増加により主根の伸長抑制応答が誘導されるという仮説を支持している.

植物の根は, 栄養欠乏にตอบสนองしてその形態を多様に変化させる. K欠乏下の場合, 主根の伸長が抑制されることがシロイヌナズナにおいて知られているが, 未だその原因や理由は明らかにされていない (Sánchez-Calderón et al., 2013). 筆者は, MYB59 (あるいはMYB48) における選択的スプライシングを介した, K欠乏ストレス下における積極的な主根の伸長抑制機構が存在するのではないか, と考えている (図3C). 今後, 低KにตอบสนองしたMYB59やMYB48における選択的スプライシングの生理学的意義やその分子メカニズムを明らかにしていく必要がある.

4. おわりに

近年, 植物の栄養応答に関する研究が飛躍的に進み, その制御機構は多様かつ複雑なものであることが明らかになってきた. 筆者らのエキソン構造変化に関する知見もまた, 植物の栄養応答機構に新たな洞察を与えるものと考えている. 本稿では, 根全体を対象にしてRNA-Seq解析を行った結果について紹介した. しかし, 根の内部では, 細胞や組織によって栄養輸送や代謝における役割が異なっており, 細胞ごと, 組織ごとで栄養に対する応答性が異なる可能性が十分に考えられる. Li et al. (2016) は, シロイヌナズナの根において, 細胞や組織に特異的に起こる選択的スプライシングが多数存在することを報告している. 今

後は, トランスクリプトームにおける変化を細胞レベル, 組織レベルで追跡することが, 植物の栄養応答における理解を深める上で重要なポイントになると筆者は考えている.

NGSの性能の向上, あるいはデータ解析技術の向上により, RNA-Seqの可能性は進化し続けている. 多くの植物栄養学分野の研究者が, RNA-Seqの魅力や可能性を理解し, RNA-Seqを最大限に活用することで, 植物の多様な栄養適応戦略が明らかになるのではないかと期待している. 本稿がその一助となれば幸いである.

謝辞: 本稿で紹介した研究の一部は, 日本学術振興会特別研究員奨励費 (13J08293), および科研費若手B (16K18667) の助成により行われました.

文 献

- Chang, Z., Wang, Z., and Li, G. 2014. The impacts of read length and transcriptome complexity for *de novo* assembly: A simulation study. *PLoS ONE*, **9**, e94825.
- Ding, F., Cui, P., Wang, Z., Zhang, S., Ali, S., and Xiong, L. 2014. Genome-wide analysis of alternative splicing of pre-mRNA under salt stress in *Arabidopsis*. *BMC Genomics*, **15**, 431.
- Filichkin, S.A., Priest, H.D., Givan, S.A., Shen, R., Bryant, D.W., Fox, S.E., Wong, W.-K., and Mockler, T.C. 2010. Genome-wide mapping of alternative splicing in *Arabidopsis thaliana*. *Genome Res.*, **20**, 45–58.
- Kelemen, O., Convertini, P., Zhang, Z., Wen, Y., Shen, M., Falaleeva, M., and Stamm, S. 2013. Function of alternative splicing. *Gene*, **514**, 1–30.
- Kim, K.N., Cheong, Y.H., Grant, J.J., Pandey, G.K., and Luan, S. 2003. CIPK3, a calcium sensor-associated protein kinase that regulates abscisic acid and cold signal transduction in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, **15**, 411–423.
- Koren, S., Schatz, M.C., Walenz, B.P., Martin, J., Howard, J.T., Ganapathy, G., Wang, Z., Rasko, D.A., McCombie, W.R., Jarvis, E.D., and Phillippy, A.M. 2012. Hybrid error correction and *de novo* assembly of single-molecule sequencing reads. *Nat. Biotechnol.*, **30**, 693–700.

- Li, W., Lin, W.D., Ray, P., Lan, P., and Schmidt, W. 2013. Genome-wide detection of condition-sensitive alternative splicing in *Arabidopsis* roots. *Plant Physiol.*, **162**, 1750–1763.
- Li, S., Yamada, M., Han, X., Ohler, U., and Benfey, P.N. 2016. High-resolution expression map of the *Arabidopsis* root reveals alternative splicing and lincRNA regulation. *Dev. Cell*, **39**, 508–522.
- Liu, J., Li, G., Chang, Z., Yu, T., Liu, B., McMullen, R., Chen, P., and Huang, X. 2016. BinPacker: Packing-based *de novo* transcriptome assembly from RNA-seq data. *PLoS Comput. Biol.*, **12**, e1004772.
- Mandadi, K.K., and Scholthof, K.B.G. 2015. Genome-wide analysis of alternative splicing landscapes modulated during plant-virus interactions in *Brachypodium distachyon*. *Plant Cell*, **27**, 71–85.
- Mu, R.-L., Cao, Y.-R., Liu, Y.F., Lei, G., Zou, H.-F., Liao, Y., Wang, H.-W., Zhang, W.-K., Ma, B., Du, J.-Z., Yuan, M., Zhang, J.-S., and Chen, S.-Y. 2009. An R2R3-type transcription factor gene *AtMYB59* regulates root growth and cell cycle progression in *Arabidopsis*. *Cell Res.*, **19**, 1291–1304.
- Nilsen, T.W., and Graveley, B.R. 2010. Expansion of the eukaryotic proteome by alternative splicing. *Nature*, **463**, 457–463.
- Nishida, S., Kakei, Y., Shimada, Y., and Fujiwara, T. 2017. Genome-wide analysis of specific alterations in transcript structure and accumulation caused by nutrient deficiencies in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.*, (in press).
- Petrillo, E., Herz, M. A. G., Fuchs, A., Reifer, D., Fuller, J., Yanovsky, M. J., Simpson, C., Brown, J. W., Barta, A., Kalyna, M., and Kornblihtt, A. R. 2014. A chloroplast retrograde signal regulates nuclear alternative splicing. *Science*, **344**, 427–430.
- Posé, D., Verhage, L., Ott, F., Yant, L., Mathieu, J., Angenent, G.C., Immink, R.G., and Schmid, M. 2013. Temperature-dependent regulation of flowering by antagonistic FLM variants. *Nature*, **503**, 414–417.
- Remy, E., Cabrito, T.R., Batista, R.A., Hussein, M.A., Teixeira, M.C., Athanasiadis, A., Sá-Correia, I., and Duque, P. 2014. Intron retention in the 5' UTR of the novel ZIF2 transporter enhances translation to promote zinc tolerance in *Arabidopsis*. *PLoS Genet.*, **10**, e1004375.
- Sánchez-Calderón, L., Ibarra-Cortés, M.E., and Zepeda-Jazo-Vahdati, I. 2013. Root development and abiotic stress adaptation. In K. Vahdati (ed.) *Abiotic stress—Plant responses and applications in agriculture*, p. 135–168. InTech.
- Shikata, H., Hanada, K., Ushijima, T., Nakashima, M., Suzuki, Y., and Matsushita, T. 2014. Phytochrome controls alternative splicing to mediate light responses in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **111**, 18781–18786.
- 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. *Nat. Protoc.*, **7**, 562–578.
- Willenbrock, H., Salomon, J., Søkilde, R., Barken, K.B., Hansen, T.N., Nielsen, F.C., Møller, S., and Litman, T. 2009. Quantitative miRNA expression analysis: comparing microarrays with next-generation sequencing. *RNA*, **15**, 2028–2034.
- Zhang, Y.-C., Liao, J.-Y., Li, Z.-Y., Yu, Y., Zhang, J.-P., Li, Q.-F., Qu, L.-H., Shu, W.-S., and Chen, Y.-Q. 2014. Genome-wide screening and functional analysis identify a large number of long noncoding RNAs involved in the sexual reproduction of rice. *Genome Biol.*, **15**, 512.
- Zhao, S., Fung-Leung, W.-P., Bittner, A., Ngo, K., and Liu, X. 2014. Comparison of RNA-Seq and microarray in transcriptome profiling of activated T cells. *PLoS ONE*, **9**, e78644.