

令和 6 年 5 月 28 日現在

機関番号：12601

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2021～2023

課題番号：21K06225

研究課題名(和文) 栄養成長期から生殖成長期への移行における核ゲノムDNA周辺の動態変化の解析

研究課題名(英文) Genome DNA dynamics in the transition from vegetative to reproductive growth stages

研究代表者

渡邊 雄一郎 (WATANAABE, Yuichiro)

東京大学・大学院総合文化研究科・教授

研究者番号：60183125

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文)：植物が成長する過程には、からだを大きくしていく過程である栄養成長と次の世代につながる細胞を作る生殖成長の二つがある。栄養成長から生殖成長を行うタイミングを調節することは、植物が環境変化に対抗して確実に子孫を残す上で重要である。そのためにはさまざまな遺伝子の発現の切り替えが重要で、その分子レベルでの切り替え機構には未知の点が多い。今回の研究によって発現調節因子であるマイクロRNAが形成される(プロセッシングを受ける)部位は核質の中でかなり散在していた。従来の報告では核内で数個の顆粒状構造に局在するとされていたが、その生物学的な存在意義については再検討が必要であることが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

植物は動きがないという見方から、細胞内のダイナミクスや自分の遺伝子の発現は非常に緩慢であるように思われている傾向がある。しかし個体としては動けないが、植物の細胞レベルや自らの遺伝子の発現調節ということに目を向けると、非常にダイナミックに活動をしていることがわかる。植物細胞内で環境応答や発生の過程で見せる遺伝子発現の切り替え機構を知るには、研究解析のためであっても本来植物が行なっている状況に近づける必要があり、研究対象としたい一つのタンパク質に注目するあまり、過剰に細胞内で作らせると、細胞内で本来と異なる挙動を示す可能性が明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Plants show two different growing processes: vegetative growth, which is the process of enlarging the body, and reproductive growth, which is the process of producing reproductive cells for the next generation. It is important to regulate the timing of reproductive growth from vegetative growth in order to ensure that plants can survive and produce offspring in response to environmental changes. The molecular switch mechanism of gene expression is important for this process, and there are many unknowns about the molecular level switching mechanism. This study revealed that the sites where microRNAs, which are regulators of expression, are formed (undergo processing) are quite scattered in the nucleus. Previous reports suggested that microRNAs are localized in a few granular structures in the nuclei, but the present study clearly showed that such results of preceding reports need to be reexamined in a condition as natural as possible.

研究分野：植物分子生物学

キーワード：成長期変換 マイクロRNA プロセッシング シロイヌナズナ

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

植物は環境変化に適応しながら発生過程を進行させる中で、状況に応じて異なる遺伝子セットを発現していく。申請者グループはゼニゴケにおいて栄養成長から生殖成長期へ移行時に発現遺伝子セットを変換させる上でマイクロRNA529c (miR529c)が重要であることを見出した。この *MpmiR529c* 遺伝子座を破壊すると、その標的である転写因子 SPL2 の発現が促され生殖成長へと移行する (図 1)。

2. 研究の目的

ゼニゴケの miR529c-MpSPL2 の制御モジュール系、あるいはシロイヌナズナで機能的に相同と考えられる miR156a-h/AtSPL2/3/4/5/9/10/11/13/15 の制御モジュールはマイクロRNA の発現を抑えてやれば、環境変化と切り離して成長期移行に関係する各種遺伝子座の動態変化を的確に知ることができると考えた。具体的には miR529c と標的 SPL2 遺伝子の転写部位、プロセッシングゾーンについて関連遺伝子周辺の DNA メチル化状態、クロマチン状態、核内における局在、互いの相対位置などについて解析を加え、成長期移行の際に起こると想定される核内変化についての総合的な理解を目指した。

3. 研究の方法

- a. 転写発現ゾーンとD-bodyの核内所在の解析: ゼニゴケのmiR529c-SPL2モジュール、シロイヌナズナのmiR156a-hとAtSPL2/3/4/5/9/10/11/13/15のモジュールに注目し、双方での遺伝子座の位置(転写発現ゾーン)を核内で検出し、マイクロRNA(miRNA)のプロセッシングに関わるD-body(発現調節ゾーン)との相対位置を解析し、機能的な関連性の有無を調べる。クロマチン上での物理的距離、miRNA前駆体プロセッシングに関係する因子の局在位置を解析する。MIRNA遺伝子座、標的遺伝子座が共に1つずつといった冗長性の低いゼニゴケを用いた解析、複数の遺伝子座が関係するシロイヌナズナでの解析を準備し、解析の容易さ、再現性を検討する。次段階で本格的な解析を行う基盤を形成する。
- b. 蛍光タンパク質融合型のDCL1を発現する相補植物体の作成と発現調節ゾーンの検出: 過去の解析では、*Nicotiana benthamiana* タバコに35SプロモーターによってDCL1-GFPを強制発現させて解析をして、D-bodyというmiRNAの前駆体のプロセッシングに関与する因子が局在している構造が報告されていた。その顆粒状の構造については研究者毎に解析する植物の違い、生育環境の違い、観察しようとするタンパク質の発現レベルの違いがあり、実際の状況を伝えるものばかりではないと思われた。野生型植物が穏やかに成長するナチュラルな状況に近づける最善の手法を用いて蛍光タンパク質融合型のDCL1を発現する相補植物体の作成を目指す。その上でD-body に相当する構造体を観察する。
- c. miRNA遺伝子座・標的遺伝子座双方に目を向けた転写発現ゾーンの検出: ゼニゴケのmiR529c-SPL2、シロイヌナズナのmiR156a-hとAtSPL2/3/4/5/9/10/11/13/15の遺伝子領域を、最新のプローブ系を用いて、核内での位置をb.で可視化する発現調節ゾーンとの関連で解析を行う。具体的には、1遺伝子座が可視化できるFISH法およびRNAの転写を可視化できるMS2レポーター法といった技術導入を意欲的に行う。

4. 研究成果

- a. 転写発現ゾーンとD-bodyの核内所在の解析: 各MIRNA遺伝子座と標的遺伝子座周辺でのクロマチン状態変化を知る上で、動物の遺伝子発現などの解析で応用されている、ATAC-seqによる解析をまず試した。そのために関連する変異体が多く備わっている、シロイヌナズナをまず用いた。 *dcl1-9*, *hyl1*, *se-1* といったmiRNA生成に関わる因子の変異体と野生型植物のロゼット葉/花序から核を精製、その後

Tn5トランスポザーゼによるDNA断片化、DNAライブラリー調整、その後「先進ゲノム支援」によるデータ取得した。結論を言うと、核を取るところは一見成功しているが、最後のリード解析結果を見ると、肝心な知りたい核ゲノム配列由来が約1/3、他の多くが葉緑体ゲノム由来と判明。生物学的に意義のありそうなシグナルを読み取るのが困難な状況となっている。

b. 蛍光タンパク質融合型の DCL1 を発現する相補植物体の作成と発現調節ゾーンの検出:

D-body の形成能力、さらに変異体の表現型との対応について情報の蓄積があるものを検討した。その結果として *DCL1* 遺伝子に関する変異体のうち、種子形成能が保持されホモ接合体が育成できる *dcl1-5* のホモ接合体 *dcl1-5* (-/-) を遺伝子導入時のレシピエントとすることにした。観察される側の DCL1 タンパク質の発現/観察に関しては、検出の容易さから YFP 蛍光タンパク質、これを野生型あるいは既知の変異型 *DCL1* 遺伝子ゲノム配列(19個のイントロンを残したままの)の C 末側と融合させた人工遺伝子を作成。native *DCL1* 遺伝子 gene body の上流約 3kbp の領域をプロモーターとし、その下流に人工遺伝子を結合させた各種 *DCL1-YFP* 遺伝子を用意し、*dcl1-5* (-/-) 植物体に導入、形質転換体をそれぞれ選抜した。野生型となる *proDCL1::gDCL1-YFP/dcl1-5* (-/-) の幼植物を観察すると、根の根端など分裂能力の高いところでの DCL1 発現が顕著であった。ただ従来の、核内、それも核小体に近いところに顆粒状に数個存在するという報告、観察結果との矛盾がある。今回の植物体は正常な成長を示し、その DCL1 局在は核質にあまねく広がった状態に見えた。D-body として報告されたような顆粒状態が認められたのは予想に反して全体のうち少数であった。その結果は並行して行った抗 DCL1 抗体を用いた whole mount immunostaining の結果でも追認された。*DCL1* アリルのなかで C 末端に存在する dsRBD2 というドメインを欠失した変異体で同様に作成した *dcl1-5* への相補体はその核質での局在が薄まっていた。報告されている DCL1 タンパク質の立体構造の中でこのドメインは明確な状態をとっていない。このいわゆる不規則構造をとっていると思われるドメインが、DCL1 の核内での局在を支配している可能性が示唆された。DCL1 と並んで前駆体 miRNA のプロセッシングに関与し、さらに DCL1 とともに D-body の形成に関わるとされる HYL1、そして SE タンパク質に関しても同様の形で *proHYL1::gHYL1-RFP/hyl1-2* (-/-) と *proSE::gSE-SGFP/se-1* (-/-) 相補体植物を作成し、HYL1 タンパク質、SE タンパク質の局在を観察した。結果、両タンパク質ともに根端組織の中で DCL1 タンパク質が多く発現していた分裂組織周辺での発現が同様に多かった。発現が認められた HYL1 と SE タンパク質が示した細胞内局在はやはり核質に広がった状態であり、D-body のような顆粒状態が認められたのは全体のうち少数であった。D-body という構造のイメージの修正が必要か否か、そして最近多くの生物現象に関連して言われている condensates と総称されるような膜には囲まれていない機能を持った構造体として記述することの可否について現在検討を重ねている。

発生ステージ変化の前後で起こる関連遺伝子座周辺のクロマチン状態の変化、遺伝子間の距離の検出を目指し、動物の系で行われている手法を応用しようと当初企画した。しかし、単純には応用が効かず、別のアプローチで目標として情報に近づくことを行なった。今後まずはモデル植物を舞台に、こうした解析が安定して再現的に行える系を作る必要性を知ることとなった。新たなチャレンジも必要であることを感じた。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 3件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Pietrykowska, H., Alisha, A., Aggarwal, B., Watanabe, Y., Ohtani, M., Jarmolowski, A., Sierocka, I., Szwejkowska-Kulinska, Z	4. 巻 113
2. 論文標題 Conserved and non-conserved RNA-target modules in plants: Lessons for a better understanding Marchantia development	5. 発行年 2023年
3. 雑誌名 Plant Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 121-142
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1007/s11103-023-01392-y	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

1. 著者名 Takei, T., Tsukada, M., Tamura, K., Hara-Nishimura, I., Fukao, Y., Kurihara, Y., Matsui, M., Saze, H., Tsuzuki, M., Watanabe, Y., Hamada, T.	4. 巻 kiae135
2. 論文標題 ARGONAUTE1-binding Tudor domain proteins function in small interfering RNA production for RNA-directed DNA methylation	5. 発行年 2024年
3. 雑誌名 Plant Physiology	6. 最初と最後の頁 kiae135
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/plphys/kiae135	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Bowman, J.L., Berger, F., Briginshaw, L.N., Davies, K.M., Dierschke, T., Dolan, L., Fisher, T.J., Flores-Sandoval, E., Futagami, K., Ishizaki, K., Kato, H., Kohchi, T., Levins, J., Lin, S-S., Nishihama, R., Romani, R., Tanizawa, Y., Tsuzuki, M., Watanabe, Y., Yamato, K.T., Zachgo, S.	4. 巻 34
2. 論文標題 The Renaissance and Enlightenment of Marchantia as a model system	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 The Plant Cell	6. 最初と最後の頁 3512-3542
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/plcell/koac219	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

1. 著者名 Rothi, M. Hafiz Tsuzuki, Masayuki Sethuraman, Shriya Wierzbicki, Andrzej T.	4. 巻 49
2. 論文標題 Reinforcement of transcriptional silencing by a positive feedback between DNA methylation and non-coding transcription	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Nucleic Acids Research	6. 最初と最後の頁 9799-9808
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/nar/gkab746	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 2件）

1. 発表者名 Hashimoto, R., Tsuzuki, M., Higashiyama, T. and Watanabe, Y.
2. 発表標題 Reevaluation of Intracellular DCL1 Localization of Wild-type and Mutant Alleles in Relevance to Functional Ability and Phenotype
3. 学会等名 The 33rd International Conference on Arabidopsis Research (国際学会)
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 二神和敬、都筑正行、渡邊雄一郎
2. 発表標題 microRNA319標的遺伝子の進化的解析
3. 学会等名 第63回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 橋下梨乃、都筑正行、東山哲也、渡邊雄一郎
2. 発表標題 シロイヌナズナのmiRNA生産におけるDICER-LIKE 1 C末端領域の重要性の再検証
3. 学会等名 第63回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 二神和敬、都筑正行、渡邊雄一郎
2. 発表標題 microRNA319 標的遺伝子の進化的解析
3. 学会等名 日本植物生理学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 橋下梨乃、都筑正行、東山哲也、渡邊雄一郎
2. 発表標題 シロイヌナズナの miRNA 生産における DICER-LIKE 1 C 末端領域の重要性 の再検証
3. 学会等名 日本植物生理学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 都筑正行
2. 発表標題 植物における非コード転写の機能とメカニズム
3. 学会等名 日本植物生理学会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 Masayuki Tsuzuki
2. 発表標題 Pervasive non-coding transcription by Pol V suggesting a genome surveillance mechanism
3. 学会等名 The 44th annual meeting of the molecular biology society of Japan (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>東京大学大学院総合文化研究科 渡邊雄一郎研究室 https://park.itc.u-tokyo.ac.jp/RNAwatanabe/ 渡邊雄一郎研究室 HP http://park.itc.u-tokyo.ac.jp/RNAwatanabe/</p>

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	阿部 光知 (ABE Mitsutomo) (20343238)	東京大学・大学院総合文化研究科・教授 (12601)	
研究 分 担 者	都筑 正行 (TSUZUKI Masayuki) (40845616)	東京大学・大学院総合文化研究科・助教 (12601)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関			
ポーランド	Adam Michiewicz University Poznan			
オーストラリア	Monash University			