

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 17 日現在

機関番号：63801

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2013

課題番号：24770048

研究課題名(和文)植物の減数分裂移行を促進する分子機構の研究

研究課題名(英文)The molecular mechanism to control the transition of meiosis

研究代表者

宮崎 さおり (Miyazaki, Saori)

国立遺伝学研究所・実験圃場・助教

研究者番号：40390687

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円、(間接経費) 1,080,000円

研究成果の概要(和文)：イネMEL2遺伝子は変異体が完全不稔を示すことから同定された。本研究はMEL2のターゲットを同定し、植物の減数分裂開始の分子基盤を明らかにすることによって基礎科学に貢献し、食料政策などの社会的重要な事項に新しい解決策を提供することを目的とする。MEL2のRNA認識モチーフがU-richな配列に結合することを示し、さらにその配列を介し、MEL2がタンパク質の翻訳制御に関係するかを調べるために野生株と変異体の花と約からタンパク質を抽出し、2次元電気泳動で差異のあるものを同定した。ミトコンドリアで酸化還元に関係するタンパク質が多く同定された。MEL2が前減数分裂期に酸化還元状態を制御する可能性がある。

研究成果の概要(英文)：The mel2 mutant shows both male and female sterility. It expresses in meiocyte in premeiotic interphase and related to the synchronous transition to meiosis from mitosis. The purpose of this study is to contribution to the problem such as food shortage over the world by studying basic science of meiosis. We have identified that RRM of MEL2 bind to U-rich sequence. Through the binding via U-rich sequence, MEL2 could regulate translation. To test it, we extracted protein from anthers and flowers of mel2 mutant and wild type. 2D gel and LC-MS analyses showed the proteins changed in mel2 mutant were related to the protein worked for Redox control. We are now investigating how redox are related to the transition of meiosis.

研究分野：植物生理

科研費の分科・細目：生殖 減数分裂

キーワード：減数分裂 RNA 認識モチーフ SELEX プロテオミクス 2次元電気泳動

1. 研究開始当初の背景

減数分裂は、ゲノム多様性を産み出す組換えと有性生殖の前提となる染色体の半数化を特長とする。一方、体細胞分裂では倍数が維持され、組換えは抑制されている。生殖母細胞は体細胞分裂を経て減数分裂を始めるので、分子機構をそれぞれに合わせてスイッチさせる必要がある。分裂酵母と動物の知見から、減数分裂に直接関わる減数分裂に特異的な遺伝子も減数分裂が始まる前から既に転写され、準備されている。よって、減数分裂移行のタイミングは遺伝子の転写制御だけではなく、翻訳制御を介して決定されると考えられていた。

植物で減数分裂への移行を促進する分子機構はほとんど解明されていない。減数分裂移行への関与が知られる数少ない植物タンパク質としてトウモロコシ AM1 とシロイヌナズナ SWI1 があるが、減数分裂初期でも機能することが示唆されており、減数分裂移行に特異的に関与するかは未だ不明である。

研究開始当初、申請者の所属研究室は、雌雄の生殖細胞において、前減数分裂 S への移行に必須であるイネ MEL2 遺伝子を同定していた。mel2 変異体は完全不稔を示した。MEL2 は RNA 認識およびタンパク質分解への関与が示唆されるタンパク質をコードしており、植物では世界初の報告となる。また RNA 認識モチーフは DAZAP1 と高い類似性を示した。DAZAP1 の細胞内局在が核から細胞質へ変化すること、ポリソームとも結合することから、ターゲット mRNA の成熟および核から細胞質への移動と翻訳に重要な役割を果たすことが知られていた。

申請者は、MEL2 の RNA リガンド遺伝子の探索を進めており、ランダム合成した RNA ミックスから RNA リガンドを同定する方法(SELEX)により、MEL2 タンパク質の RNA 認識モチーフ RRM が、共通配列 UUAGUU[A/U]を認識することを見いだしていた。この配列を参考にした生体内でのターゲット遺伝子の同定を同時に進行中であった。

2. 研究の目的

イネ MEL2 は Ankyrin、RRM、および Ring finger(E3 ligase)の 3 つのモチーフを持つタンパク質である。RRM と RING は、遺伝子の転写後あるいは翻訳後の制御に関わると一般に考えられている。MEL2 は、前減数分裂初期には細胞質全体に分布するが、後期では核周辺に集まる傾向が報告されている。細胞質の核膜周辺は、リボソームなど翻訳装置が局在している。モチーフ構成、および MEL2 と類似性の高いヒト DAZAP1 が翻訳制御に関わることを考え合わせると、MEL2 がターゲット遺伝子

の翻訳あるいは翻訳後制御に関わる可能性、そして局在の変化が MEL2 の分子機能に係している可能性がある。本研究では、MEL2 タンパク質の細胞内局在とその機能的な活性化に注目して研究を始めた。

2 番目にタンパク質ターゲットを調べるために、mel2 変異体と野生株を用いて発現タンパク質の差異を調べるためにプロテオミクス解析を行った。作業仮説では、RNA ターゲットの 3'-UTR のコンセンサス配列に MEL2 タンパク質が結合し、ターゲット RNA の翻訳を制御する。その場合、MEL2 Ring finger モチーフのタンパク質ターゲットとしては RNA ターゲットそのものがタンパク質ターゲットである場合と RNA の翻訳や RNA の安定化に関わる普遍的なタンパク質がターゲットの場合が考えられた。その仮説を確かめるために mel2 変異体でタンパク質量が変化しているものに関して調べた。

3. 研究の方法

<MEL2 細胞内局在の観察>

(1) タグ付き融合タンパク質を発現する形質転換イネを作成し、抗体染色などで花粉母細胞における局在を観察する。

(2) 抗体を作成する。MEL2-RRM 領域と C 末、また Ring finger モチーフと RRM モチーフの間の遺伝子特異的な領域を抗原部位として抗体作成。

<MEL2 に関係するタンパク質の同定>

mel2 変異体と野生株から抽出したタンパク質を用い 2 次元電気泳動を行い、タンパク質発現に差異の見られるものを LC-MS 解析に引き続き用いタンパク質を同定した。

4. 研究成果

<MEL2 局在のための実験>

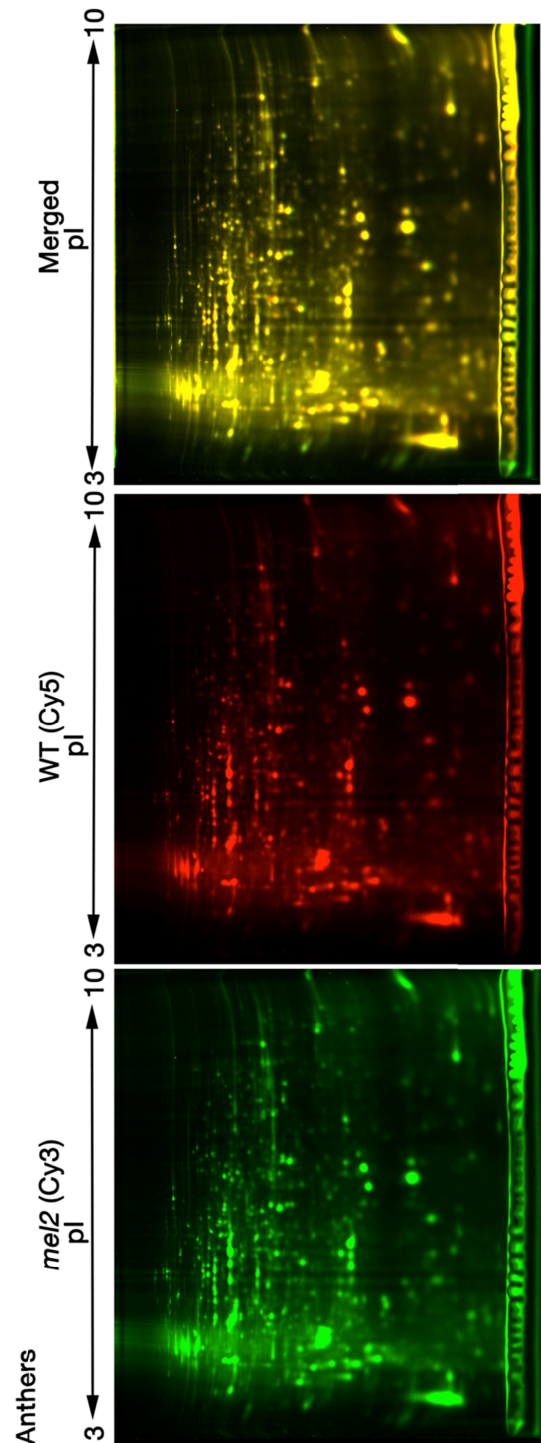
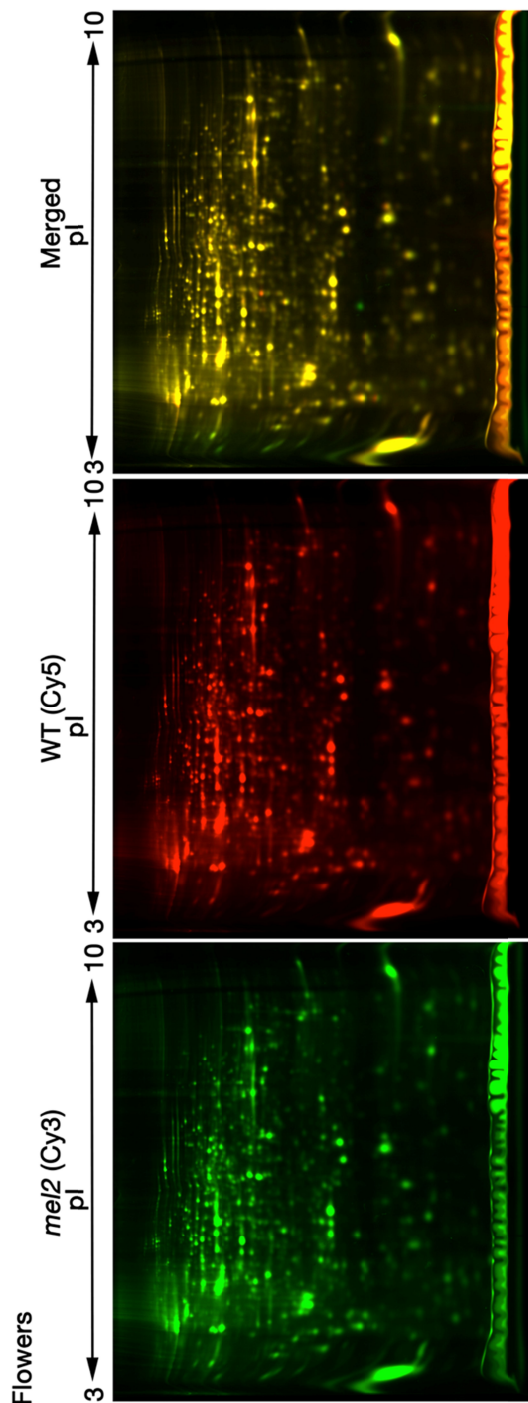
まず抗体作成に着手したが 2 度の試みにも関わらず活性のある抗体を得ることができなかった。そこで GFP 融合タンパク質を形質転換し GFP 蛍光を観察、もしくは抗 GFP 抗体を用いてタンパク質ターゲットを探索することを試みた。MEL2 と GFP 融合タンパク質のコンストラクトを作成しイネとシロイヌナズナに形質転換した。イネの他にシロイヌナズナを用いた理由は、シロイヌナズナの世帯時間が短く植物体も小さいので固定しない生のサンプルを常に準備しておくために都合が良いと考えたからである。イネ、シロイヌナズナ共に形質転換体は RNA の発現は確認できたものの、タンパク質として翻訳されていないことが分かった。いくつかの原因が考えられたが、MEL2 自身が RING フィンガーモチーフを持つことから、ターンオーバー分解が早いことやその他の翻訳後修飾などが考えられた。そこで、プロテオソーム阻害剤などを外部から添付して行う実験が必要である

と考へ、イネの培養細胞 OC 細胞を実験に用いる計画に変えた。以後の実験に *mel2* 変異体の OC 細胞が必要になるであろうことが予測されたため、その作成に着手した。種子のカルス誘導から初め、現在、液体培養としてラインを確立しつつある。

以上の状況から、違う方法でのタンパク質の解析が必要となったため、野生株と変異体を用いて発現しているタンパク質を比較することとした。

<MEL2 に関するタンパク質の同定>

前減数分裂期の葯 0.3-0.4mm をそれぞれ約 800 個ずつ集めタンパク抽出を行った。花のサンプルの場合は 2.0-2.4mm のサイズのものを 60 個ずつ集めサンプルとした。



サンプルは TCA 法を用いてタンパク抽出し、それぞれのタンパク質を Cy3 と Cy5 でラベルし、2 次元電気泳動を行い差異を調べた。差異のあるものに関してはスポットを切り出し、LC-MS 解析を行った。図はそれぞれ花と葯に関する 2 次元電気泳動写真である。差異のあったスポットは黄色ではなく、赤や緑に偏った色として検出できた。

LC-MS 解析を行ったスポットは花において 17 スポット、葯において 13 スポットであった。

花で同定された 17 タンパク質のうち 7 つは薬でも同定され、再現性の高い結果となった。

それらのタンパク質にはミトコンドリアで酸化還元に関係しているものとタンパク質翻訳開始に関係する eIF3 が含まれていた。このことから MEL2 が減数分裂期に酸化還元状態を制御することによって減数分裂への移行を制御している可能性が示された。最近の知見により低酸素状態がトウモロコシで生殖細胞を誘導することやそのあと酸化ストレスに関係するタンパク質が生殖母細胞で働くことが示されている。MEL2 がそのようなシグナル伝達系に関係している可能性がある。

<SELEX によるターゲットの絞り込み>

一方で SELEX を用いた RNA ターゲットの探索は進んでいたことから、その情報を元にタンパク質ターゲットを絞ることを試みた。

ターゲット候補は翻訳制御因子である CAF1 複合体の subunit7 や減数分裂の開始時期に一本差 DNA に結合する Replication factor A などがあつた。残念ながら候補遺伝子は 2 次元電気泳動の解析ではタンパク質レベルで変化していなかった。タンパク質としての発現が少ないことがその一因かもしれない 2 次元電気泳動の結果から *mel2* 変異体で eIF3 のタンパク質量が減少していたことから RNA ターゲットは 2 次的にそのタンパク質量が減少している可能性は残る。

今後は MEL2 が生殖細胞で酸化還元のシグナル伝達系に関係しているかどうか、またタンパク質の翻訳開始に関係しているかをより詳細に解析して行く必要がある。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 0 件)

[学会発表](計 5 件)

1. 宮崎さおり、浅野智哉、野々村賢一、減数分裂の移行に関係するイネ MEL2 遺伝子のターゲット探索、日本育種学会第 125 回講演会 2014 年 3/20-22 日 仙台

2. 宮崎さおり、野々村賢一、RNA recognition motif-containing protein, which regulates meiotic transition and initiation in rice, binds to a U-rich sequence *in vitro*. 第 55 回 日本植物学会年会 2014 年 3/18-20 日 富山

3. 宮崎さおり 国立遺伝学研究所研究会「イネ分子遺伝学の未来」
「減数分裂、いつやるか？ 今でしょ！」2013 年 10/19 日 三島

4. 宮崎さおり、前減数分裂 S 期への移行に

関わる MEL2 遺伝子について、イネ遺伝学分子生物学ワークショップ 2012 2012 年 7 月 5-6 日 奈良

5. 宮崎さおり、野々村賢一、RNA recognition motif of rice MEL2 regulating transition from mitosis to meiosis binds to U-rich RNA conserved sequence. 第 53 回植物生理学会年会 2012 年 3 月 16-18 日 京都

[図書](計 0 件)

[産業財産権]
出願状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
出願年月日：
国内外の別：

取得状況(計 0 件)

名称：
発明者：
権利者：
種類：
番号：
取得年月日：
国内外の別：

[その他]
ホームページ等
無し

6. 研究組織

(1)研究代表者
宮崎さおり (Miyazaki, Saori)
国立遺伝学研究所・実験圃場・助教
研究者番号：40390687

(2)研究分担者
該当者無し

(3)連携研究者
浅野智哉 (Asano, Tomoya)
金沢大学・学際科学実験センター・博士研究員
研究者番号：00377409