

平成 30 年 6 月 20 日現在

機関番号：22701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2015～2017

課題番号：15K07262

研究課題名(和文) イネのlncRNAによる遺伝子発現制御機構の解明とDNA脱メチル化の役割の理解

研究課題名(英文) Analysis of rice lncRNAs dynamics under the epigenetic regulation

研究代表者

小野 明美 (ono, akemi)

横浜市立大学・木原生物学研究所・特任助教

研究者番号：90732826

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,800,000円

研究成果の概要(和文)：long noncoding RNA (lncRNA)は、急速な解析技術の進展の中でその機能の重要性が明らかになってきた歴史の浅い分子種である。本研究ではイネを対象として、イネの生産性にとって重要な、胚乳の発生と環境に応答する際に生じるlncRNAを網羅的に探索した。胚乳の初期発生と環境応答時には、それぞれ様々な種類のlncRNAが転写されること、それぞれの組織、応答によって生成されるlncRNAの組成は異なることを明らかにした。また、DNA脱メチル化酵素の変異体を用いて、そのエピジェネティックな制御の関わりを解析することを試みた。

研究成果の概要(英文)：Long noncoding RNA (lncRNA) is one of the newly discovered molecules, which potentially regulate many aspects of biological functions. To understand the many layers of molecular mechanisms governing the critical processes for rice productivity, I assayed the transcriptome (RNA seq.) focusing on the lncRNA population and the influence of its epigenetic regulation on lncRNA. A wide variety of lncRNAs were detected and many of them were expressed in tissue and/or response specific manner.

研究分野：遺伝育種

キーワード：lncRNA DNA脱メチル化 遺伝子発現制御 エピゲノム 胚乳発生 環境応答

## 1. 研究開始当初の背景

ゲノム解析技術の急速な発展に伴い、それまでに想定されていなかった分子種の1つとして long noncoding RNA (lncRNA) と呼ばれる一群の RNA が真核生物に存在することが明らかとされてきた。動物を中心として進められた研究により、明白なタンパク質をコードしていない長さ 200 塩基以上の RNA として緩く定義される lncRNA は、進化速度が速く種間でその配列が保存されないこと、自身の発現やその生物学的機能にトランスポゾン配列が貢献していることが多いこと、組織や時期特異的に発現していること等が特徴としてあげられる。その生物学的機能については、遺伝子の発現制御を初めとする生物現象の多岐に渡る局面で、重要な役割を果たしていることが解りつつあったが、分子メカニズムについては多くの部分が未解明であった。植物においては、体系だった網羅的探索の方法論の確立、探索そのものがなされていないという状況にあり、生物学的様々な局面、殊に穀物においてはその農業形質の制御機構に関わることが十分に予測されるものの、構成する分子種の多様性や、制御機構および分子メカニズムについては情報が非常に限られていた。一方で lncRNA の生成や機能に関わるとされる要素の1つであるトランスポゾンについてはその制御および役割において、DNA やヒストンの修飾によるエピジェネティックな制御下にあること等が精力的な研究により次々と解明されてきた。植物における初期胚乳発生を初めとする農業形質の制御にも、トランスポゾンのエピジェネティックな制御が重要な役割を果たすことが研究代表者を含む研究により明らかにされつつあった。ホストゲノム、トランスポゾン、lncRNA という枠組みの中で、lncRNA は進化速度が速く多くのケースで自身の発現やその生物学的機能にトランスポゾン配列が貢献していることから、ホストゲノムが進化の過程でゲノム中のトランスポゾン配列に lncRNA という形で機能を与えた、言い換えれば、トランスポゾンの機能獲得の1つの形として lncRNA を捉えることができる。しかしながら、生物学的機能におけるトランスポゾンと lncRNA の両者をつなぐ分子機構については不明な点が多い。そこで、トランスポゾンのエピジェネティックな制御が、lncRNA の生物学的機能発現に少なからぬ貢献をしているとの作業仮説をたてた。lncRNA による遺伝子制御機構を分子生物学的に解明していくとともに、エピジェネティックな修飾に関わる変異体と野生型との比較を総括的に行うことで、lncRNA とトランスポゾンのエピジェネティックな制御との関わりについての作業仮説を検証することが可能になるのではないかと考え、本研究を実施するに至った。

## 2. 研究の目的

本研究では野生型イネ(日本晴)とエピジェネティックな代表的な修飾の1つであ

る DNA 脱メチル化酵素変異体とを用いて、農業形質への関与が予測される lncRNA による新規の遺伝子制御機構を分子生物学的に明らかにし、その分子機構におけるトランスポゾン脱メチル化を介したエピゲノム制御の関与を検証していくことを目的とする。この研究目的の到達に向けた道筋として、農業形質を左右する初期胚乳発生および環境応答に関わる lncRNA 探索に向けた実験系の確立、RNA seq. を用いた網羅的な探索による lncRNA の多様性の理解、DNA 脱メチル化酵素変異体を利用した lncRNA の生物学的機能におけるエピゲノム制御の関与の理解へのアプローチ、を段階的かつ具体的な目的として推進していく。

## 3. 研究の方法

### (1) 実験系の確立

イネ胚乳の初期発生過程における lncRNA 探索へ向けた網羅的な RNA 解析を行うにあたり、胚乳発生の key event となる受精前の中央細胞および受精後 2 日目の胚乳細胞を対象組織の候補とし、それぞれの細胞の単離、RNA 抽出方法の構築を試みた。受精後 2 日目の胚乳細胞については、ガラスキャピラリーを用いて細胞を単離し、RNA を抽出した。受精前の中央細胞については、解剖と酵素処理により細胞を単離し、ピコピペットにより回収後、RNA の抽出を行った。RNA の量、純度ともに安定して回収が可能であることを比較検討し、対象組織を決定した。環境応答の解析系については、乾燥、低温、高塩濃度、各種植物ホルモン処理を行った。その後の形態の変化、あるいは遺伝子発現の変動の様子などから、実験系の評価選択を行った。簡便に再現性よく応答し、多数の植物体を扱うことの可能な、幼植物体の水耕栽培による高塩濃度処理を選択し、処理前後の地上部から、それぞれ RNA を抽出した。

### (2) RNA seq. による網羅的な lncRNA の探索

抽出した RNA について、量と純度を確認後 Illumina 社のプロトコルに従って RNAseq. 解析にむけたライブラリーを構築した。HiSeq 4000 シーケンサーを用いて、150 nt ペアエンド平均リード 10M 以上で RNAseq を行った。通常の遺伝子発現解析に加え、研究代表者の所属する研究室にて開発された lncRNA の検出に特化したパイプライン (Tonosaki 未発表) を用いて lncRNA の網羅的探索を行った。それぞれについて 3 反復行い、統計的な処理後比較検討した。

### (3) 脱メチル化酵素変異体を利用したエピゲノム制御の関与の理解へのアプローチ

イネゲノム中のトランスポゾンの発現をモニターする為に作製された (Ishiguro *et al.*, Plant Physiol. 2014) Agilent 社の 44K カスタムマイクロアレイを用いて、イネゲノムに散在するトランスポゾンの初期胚乳発生時における経時的な発現変動の様子を追跡した。同じタイムポイントで DNA 脱メチル化酵素の複数の変異体についてもマイクロ

アレイ解析を行い、その経時的な変動パターンを比較検討した。それぞれのタイムポイントについて3反復行い、統計的な処理後比較検討した。

#### 4. 研究成果

(1) 農業形質に関わる初期胚乳発生および環境応答における lncRNA 探索に向けた実験系の確立

一連のイネ胚乳発生においていくつかの鍵となる event にとって重要なタイムポイントと考えられる、受精前の中央細胞および受精後2日目の胚乳細胞を、イネの農業形質に直結した初期胚乳発生に関わる lncRNA 探索の対象組織と考え実験系の構築を試みた。計画当初は、受精前の中央細胞を胚乳発生過程におけるより初期の段階としてとらえ、重点的に扱うことを計画していた。しかし、網羅的に lncRNA を抽出し初期胚乳発生時に存在する lncRNA のカタログを作成していくためには、安定して一定量以上かつ高品質の RNA の獲得が必須であることから、受精後2日目の胚乳細胞へと重点をシフトした。この受精後2日目というタイミングは、雑種成立の成否に関わる event である胚乳細胞の細胞化前の重要なタイムポイントである。また DNA 脱メチル化酵素の1つである ROS1a 変異体での表現型の差が顕著になる直前の時期でもあることから、胚乳発生におけるエピジェネティックな制御の観点からもその重要性が示唆される。この実験系ではガラスキャピラリーを用いて胚乳細胞を回収するため、GFP マーカーを持つ花粉を掛け合わせることで、マーカーの活性を指標に受精によって生じた胚乳細胞を顕微鏡下で確認し、母親由来の組織との区別をしながら確実に回収することができる。これは ROS1a homo 変異体等を利用する際に適した利点であり、また、マーカーをもつ花粉親として異なる品種を使うことで、SNPs を利用した親の由来の解析も可能であることなど、今後の解析にとって様々な応用が可能な利用範囲の広い実験系を確立することができた。

一方環境応答の実験系については、簡便に再現性よく応答することが重要な要素である。これを満たす実験系として幼植物体の水耕栽培による高塩濃度処理を確立した。この実験系は多数の植物体を扱うことも可能であり、更には、そのまま栽培を継続することで種子を採ることが可能であることも確認している。処理の時間や、また水耕液を変えることで様々な処理の強度や種類を安定して供給できるものと考えている。こちらの実験系についても応答性が高く汎用性も高いものを確立することができた。

(2) RNA seq. による網羅的な lncRNA の探索と多様性の理解

確立したそれぞれの実験系において野生型イネ日本晴より抽出した RNA (受精後2日目胚乳、高塩濃度処理前・後の幼植物体地上部)より tRNAs、rRNAs、snRNAs、snoRNAs、

smallRNA を除く polyA の付加したものについて、転写の方向性を考慮した RNAseq. を次世代シーケンサー HiSeq 4000 により行った。得られた転写産物の情報の中から、RNA の長さ、オープンリーディングフレームのサイズ、タンパク質をコードする可能性等を基準に、研究代表者の所属する研究室にて構築されたパイプラインにて lncRNA を網羅的に抽出した。その結果、まず両解析系において新規 lncRNA を含む多数の lncRNA が存在することが明らかとなった。それら lncRNA のイネゲノムにおける分布の様子は様々で、他の遺伝子とオーバーラップするもの、遺伝子間に存在するもの、他の遺伝子のプロモーター近傍で転写されるものなどが存在した。また転写の向きについても、オーバーラップあるいは近接する遺伝子に対してアンチセンスのもの、センスのもの両者が認められた(図1)。更に発現量についても様々であることが解った。トランスポゾン配列との関わりについては、抽出された lncRNA の多くの転写領域にはトランスポゾン配列がいろいろな形で関与することが明らかとなった。トランスポゾン配列全体が転写物に取り込まれる場合、5'、3' 側の一部にトランスポゾン配列がオーバーラップするもの等、様々なケースが見られた。また lncRNA の転写開始の近傍にトランスポゾン配列が存在するケースも見られた。対象としたそれぞれの組織、環境応答に着目した場合、初期胚乳と幼植物体の地上部で生成される lncRNA にはオーバーラップしないものが多く存在すること、更に高塩処理時に、無処理の場合に対し特異的に生成されるものがあること、などが明らかとなった。この解析の結果、それぞれの組織・環境応答における lncRNA を含むゲノムワイドな遺伝子発現の様子が明らかとなったと同時に、これらを発現のレファレンスとして確立するに至った。変異体等を用いた今後の解析の際に不可欠であり、今後広く活用していくことができる。

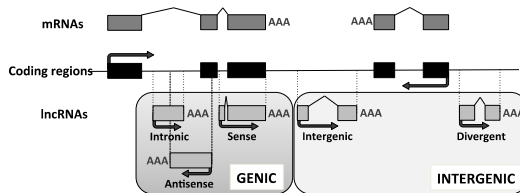


図1. ゲノム中の様々なlncRNA

(3) 脱メチル化酵素変異体を利用した lncRNA の生物学的機能におけるエピゲノム制御の関与の理解へのアプローチ

トランスポゾンの lncRNA の生物学的機能への寄与を考察していく為に、初期胚乳発生での、そのグローバルな挙動を把握する手掛かりとして、イネゲノム中のトランスポゾンの経時的な発現変動を解析した。Agilent 44K カスタムアレイを用いて、受精後2、3、4、5、6、7日目の胚乳における発現を比較した。その結果、多くの種類のトランスポゾンについて経時的な発現の変動に様々なパターンが

確認され、この時期にトランスポゾンのエピジェネティックな修飾にも変化があるであろうことが示唆された。トランスポゾンを既知のサブクラスごとにわけ、それぞれの発現に着目すると、ユニークな発現変動パターンを示すものが多くあることが明らかとなった。トランスポゾンのサブクラスごとにゲノムでの挙動が異なる可能性が示唆される。中でも他の植物種と比較して特徴的にイネゲノム中に最も多く存在する MITE (Minature Inverted-repeat Transposable Elements) はイネゲノムにおけるトランスポゾンを考える上で重要な要素である。その転写物は、それ自身がタンパク質をコードせず lncRNA のカテゴリーに入ることも可能であり lncRNA として機能し得ることも示唆される。この MITE のサブクラスについても、非常に特徴的な発現変動パターンを示すサブクラスが多く見られた。DNA 脱メチル化酵素の変異体の中で、胚乳発生に大きな欠陥の見られない ROS1b, c, d, DML3a, b の単独あるいは組み合わせの変異体についても、同様にトランスポゾンの経時的な発現変動を解析した。その結果、発現変動のパターンが変異体で顕著に異なるサブクラスがあることが明らかとなった。これは DNA 脱メチル化の下流に特定のトランスポゾンの発現制御が存在することを示唆するものと考えられる。ゲノムのエピジェネティックな環境変化に伴う発現変化を示すものと考えられるこれらのトランスポゾンの、ゲノムでの位置情報と網羅的に探索した lncRNA との位置関係、更にはその lncRNA に隣接する遺伝子を含めた経時的あるいは変異体での発現変動パターンの共発現解析を通して、今後 lncRNA の機能解析を順次展開していくことが可能である。今回得られた情報を基盤に DNA メチル化等の情報を重ね合わせていくことで、lncRNA とトランスポゾンのエピジェネティックな制御との関わり、そして初期胚乳発生や環境応答における lncRNA の寄与とその分子機構が明確になっていくものと考えられる。

#### 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 1 件)

Kaoru Tonosaki, Daisuke Sekine, Takayuki Ohnishi, Akemi Ono, Hiroyasu Furuumi, Nori Kurata, Tetsu Kinoshita, Overcoming the species hybridization barrier by ploidy manipulation in the genus *Oryza*, Plant J., 査読有, 2018 vol. 93, No.3, 2018, pp.534-544, doi: 10.1111/tpj.13803

〔学会発表〕(計 4 件)

Hiroki Nagata, Akemi Ono, Yuichi Fukuda, Yuji Kishima, Kentaro Yano, Tetsu Kinoshita, Dynamics of Transposon Expression during Rice

Endosperm Development. 第 12 回日本エピジェネティクス研究会年会

Akemi Ono, Takayuki Ohnishi, Kaoru Tonosaki, Yuichi Fukuda, Tetsu Kinoshita, Traditional and untraditional "boy-meets-girl" stories in endosperm production; the role of DME/ROS1/DML3 family DNA glycosylases in rice endosperm development. 4th CSRS-ITBM Joint Workshop with Kihara

Yuichi Fukuda, Hiroki Nagata, Akemi Ono, Kaoru Tonosaki, Takayuki Ohnishi, Masaki Endo, Seiichi Toki, Tetsu Kinoshita, Analysis of DNA demethylase mutants in rice. Taiwan-Japan Plant Biology 2017

Akemi Ono, Takayuki Ohnishi, Kaoru Tonosaki, Tetsu Kinoshita, The role of ROS1a in rice endosperm development. The 24th International Congress on Sexual Plant Reproduction.

図書)(計 件)

該当なし

〔産業財産権〕

該当なし

出願状況(計 件)

該当なし

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 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

<https://www.yokohama-cu.ac.jp/news/2016/20160518.html>

#### 6. 研究組織

(1)研究代表者

小野 明美 (ONO, Akemi)

横浜市立大学・木原生物学研究所・特任助教  
研究者番号: 90732826

(2)研究分担者

該当なし ( )

研究者番号：

(3)連携研究者  
該当なし ( )

研究者番号：

(4)研究協力者  
該当なし ( )