

令和 4 年 6 月 7 日現在

機関番号：63801

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2018～2020

課題番号：18H02181

研究課題名(和文)植物減数分裂のエピジェネティック制御と生殖細胞-体細胞間相互作用の解析

研究課題名(英文)Analyses of epigenetic regulation of plant meiosis and intercellular communication between germ and somatic cells

研究代表者

野々村 賢一 (Kenichi, Nonomura)

国立遺伝学研究所・遺伝形質研究系・准教授

研究者番号：10291890

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：本課題では、small RNA (sRNA) をガイド分子として遺伝子発現抑制などに機能する2種類のイネArgonaute (AGO) タンパク質の分子機能の解析を行った。その結果、一方は特異的な21塩基長sRNAと結合して、花粉形成に必要な遺伝子の発現抑制に、もう一方は減数分裂特異的な24塩基長sRNAと結合して、減数分裂染色体の凝縮制御に関わる可能性を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

減数分裂は交雑育種による品種改良の根本原理であり、減数分裂期に特有のDNAおよびヒストンの修飾パターンは、減数分裂組換えの頻度や位置に影響する。今回、2つのイネAGOタンパク質について解析を行い、一方は減数分裂に不必要な遺伝子の誤作動を防止する抑制機能、もう一方は減数分裂染色体に直接結合して染色体凝縮を制御する可能性が示唆された。遺伝子機能を欠損した変異体では減数分裂染色体の凝縮異常が認められたことから、減数分裂組換え頻度・位置の決定にAGO/sRNA複合体を介したクロマチン修飾機構が重要である可能性が示唆された。品種改良の効率向上に向けて学術的・社会的意義は大きいと考える。

研究成果の概要(英文)：Meiosis is a fundamental event for breeding by hybridization. It is known that meiosis-specific DNA/histone modification patterns influence frequencies and genomic positions of meiotic recombination. In this study, we analyzed molecular functions of two rice Argonaute proteins, both of which bind to small RNAs as guides. The results of this study suggest a possibility that either of two AGOs represses a gene required for pollen development during premeiotic and meiotic phases with anther-specific 21nucleotides (nt)-phasiRNAs, and further that another AGO regulates condensation of meiotic chromosomes with meiosis-specific 24nt-phasiRNAs.

研究分野：植物細胞遺伝学

キーワード：減数分裂 植物生殖 イネ Argonaute Small RNA 品種改良 エピジェネティクス

## 1. 研究開始当初の背景

減数分裂は、新たな遺伝子組み合わせを創出して子孫に伝達する重要な役割 (減数分裂組換え) を担っており、交雑育種による品種改良の根本原理である。従って減数分裂の分子機構の理解は、品種改良の効率向上や利用可能な遺伝資源の拡大に貢献する。私たちは、日本人の主食であるイネを研究材料として、減数分裂を促進する分子機構の研究を行なっている。

減数分裂期に特有の DNA およびヒストンの修飾パターンは、減数分裂組換えの頻度や位置に影響する。私たちは最近、第一減数分裂でヒストン H3 の 9 番目リジンのジメチル化 (H3K9me2) が染色体の広範囲で上昇する現象 (減数分裂染色体リモデリング) を発見した (引用文献 1)。また、雄性減数分裂細胞と隣接する葯タペート細胞で特異的に発現する EAT1 転写因子が、減数分裂期特異的に 24 塩基長 small RNA (24-phasiRNA) 生産を促進することを明らかにした (引用文献 2)。24 塩基長 small RNA は、RNA 指向性 DNA メチル化機構 (RdDM) を介した DNA メチル化および H3K9me2 を促進することが知られる。葯では、21 塩基長 phasiRNA (21-phasiRNA) も豊富に発現するが、phasiRNA の減数分裂における役割はよくわかっていない。

## 2. 研究の目的

small RNA をガイド分子として遺伝子発現抑制などに機能するイネ Argonaute (AGO) タンパク質のうち、MEL1 と AGO-X (仮称) の分子機能の解析を通じて、生殖特異的 AGO/small RNA 複合体が、植物の減数分裂染色体リモデリングに果たす役割を明らかにする。

## 3. 研究の方法

MEL1・AGO-X それぞれに対する特異的抗体を作成した。減数分裂前および減数分裂初期に相当するイネの葯 (0.3-0.4mm および 0.4-0.5mm 長) から RNA/タンパク質を抽出し、特異的抗体を用いて免疫沈降し、沈降画分中に含まれる small RNA を次世代シーケンサーにより解読した (sRIP-seq)。AGO 結合 small RNA に相補的に結合する RNA を同定する際は、葯サンプルをホルマリン固定して、タンパク質-RNA を架橋してから sRIP-seq と同様の操作をおこなった (CLIP-seq)。

タンパク質の組織・細胞内の局在性解析では、蛍光タンパク質で標識した MEL1・AGO-X を発現する形質転換イネの花を固定後にビブラトームで切片化した標本、あるいは正常なイネ個体の花のパラフィン切片をマイクロトームで作成して間接蛍光抗体法で染色した標本を、共焦点レーザー操作顕微鏡で観察・写真撮影した。

AGO-X の変異体は、ゲノム編集技術の一つである CRISPR/Cas9 法で作成した。遺伝子組換え体に相当する植物体は、組換え遺伝子が漏洩しないよう全て閉鎖系温室で栽培管理した。

## 4. 研究成果

(1) MEL1 の解析: MEL1 は、減数分裂前のイネ生殖細胞で特異的に発現する AGO タンパク質であり (引用文献 3)、葯で高発現する 21-phasiRNA と結合することが知られる (引用文献 2、4)。mel1 変異体は減数分裂染色体の凝縮が停止するなどの異常から不稔となるため、MEL1 は減数分裂運命の決定に重要な役割を担うと考えられる。

MEL1 は、21-phasiRNA に加え、低頻度だが減数分裂特異的な 24-phasiRNA とも結合する (引用文献 2)。また、減数分裂移行前の生殖細胞では MEL1 は細胞質に局在するが、減数分裂移行直後には、細胞質に加えて核にも局在することがわかった (図 1)。そのため当初は、減数分裂移行期に発現を開始する 24-phasiRNA との結合を契機として MEL1 が核移行し、減数分裂染色体の修飾パターンや高次構造変化を誘導する可能性を考えた。しかし、蛍光イメージング解析からは MEL1 が減数分裂染色体と直接的に結合する証拠は得られなかった。

そこで、減数分裂前の生殖細胞で MEL1 が発現制御する遺伝子の同定に目的を切り替え、MEL1 特異的抗体を用いた CLIP-seq 解析を行った。同法は、RNA とタンパク質の複合体を架橋し、免疫沈降した後に沈降画分中の RNA を解読して、タンパク質と結合する RNA (以下、CLIP 配列と呼ぶ) を網羅的に同定する手法である。21 あるいは 24 塩基長の AGO ガイド RNA も多数含まれるが、それらと区別するため 26-50 塩基長の CLIP 配列を解析対象とした。その結果、遺伝子領域にマップされ、かつ比較的信頼性の高い 75 個の CLIP 配列を同定した。そのなかで特にリード数が上位の 9 つの CLIP 配列を有力な MEL1 標的 RNA として解析を進めた。

9 つの CLIP 配列を、数塩基のミスマッチを許容して 21 塩基長の MEL1 ガイド RNA 配列 (引用

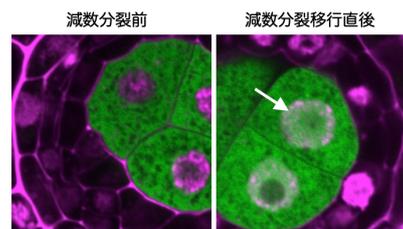


図1. 減数分裂期のイネ葯におけるMEL1の細胞内局在性の変化  
減数分裂前にはイネの葯に含まれる花粉母細胞 (生殖細胞) の細胞質のみMEL1-GFP (緑) が検出されるが (左)、減数分裂移行直後には核でも検出されるようになる (右、矢印)。

文献2)と相補性を検索したところ、9つ全てが MEL1 結合 21-phasiRNA (21-MEL1phR) と相補的な配列を含むことがわかった。そのうち1つの CLIP 配列は、減数分裂後の花粉の初期発生過程に重要な役割が報告されている遺伝子(仮に「遺伝子 A」と呼ぶ)の mRNA に含まれる配列だった。遺伝子 A に由来する CLIP 配列のリード数は、9つの CLIP 配列の中で最も高く、また相補的な 21-MEL1phR のリード数も非常に高い値を示した(図2)。すなわち、MEL1/21-MEL1phR 複合体は遺伝子 A を標的として、mRNA 分解もしくは翻訳抑制している可能性を示唆する。

最近、21-phasiRNA が欠損したイネ変異体の解析から、21-phasiRNA は葯壁の正常な発生に重要な役割をもつことを共同研究者らが明らかにした(引用文献5)。しかし、21-phasiRNA は配列の冗長性を除いても15万種以上が確認されており、同変異体ではかなりの数の 21-phasiRNA 発現が残存しているため、この報告をもって 21-phasiRNA の生殖細胞での機能が否定された訳ではない。本課題の解析から、MEL1/21-MEL1phR 複合体は、花粉の初期発生過程に重要な役割が報告されている遺伝子 A の転写後発現抑制に関わっている可能性が浮上した。この解釈として、遺伝子 A が減数分裂が終わった直後すぐに機能できるよう、花粉形成前に予め転写される必要があるが、それが減数分裂中に誤作動しないよう MEL1/21-MEL1phR 複合体が転写後抑制するなどが考えられる。

今回は、MEL1 が減数分裂染色体に特徴的な高次構造の構築に関わるとの当初の目論見とは異なる結果となったが、植物の減数分裂運命の決定における small RNA を介した AGO の知られざる機能に迫る可能性を秘めた結果が得られた意義は大きい。現在は、遺伝子 A を含む候補遺伝子の MEL1/21-MEL1phR 複合体による翻訳抑制を検証するためのアッセイ系を構築中である。

(2) AGO-X の解析: 上記の MEL1 は当初の目論見とは異なり、減数分裂染色体に直接結合していなかった。そこで MEL1 に代わるイネ AGO タンパク質を探したところ、AGO-X が条件に該当することがわかったため、本課題の途中から解析対象として加えることとした。

MEL1 とは異なり、AGO-X は体細胞と生殖細胞のどちらでも発現するタイプの AGO タンパク質である。AGO-X-GFP を発現する形質転換イネの減数分裂期の葯を観察したところ、予想通り葯を構成する体細胞と生殖細胞の両方で AGO-X の発現が認められた。しかし生殖細胞(花粉母細胞)では、減数分裂直前の間期で AGO-X の蓄積は全く見られない一方、減数分裂移行直後では AGO-X が全ての細胞核に同調的に蓄積することがわかった。雄性の減数分裂周期は、直前の間期を境に高度に同調化することが知られており、AGO-X の同調的な核蓄積は、雄性減数分裂の同調化の結果を反映したと思われる。すなわち AGO-X の核蓄積は、細胞周期依存的に開始すると考えられる。

次に AGO-X の sRIP-seq 解析により、AGO-X と結合する small RNA 分子種の網羅的な同定を行った。AGO-X はイネゲノムの多様な領域に由来する 24-sRNA と結合していたが、特筆すべきは、減数分裂初期に AGO-X と結合する 24-sRNA の 20%程度が減数分裂特異的な 24-phasiRNA で占められていたことである。AGO-X は生殖細胞および体細胞の両方に局在するため、今回検出された 24-phasiRNA との結合がどちらのタイプの細胞で起こっているか区別することはできないが、AGO-X が減数分裂初期で同調的に全ての生殖細胞核に蓄積することから、相当量の 24-phasiRNA が生殖細胞で AGO-X と結合している可能性が十分考えられる。ゲノム編集により *ago-x* 変異体を作成し、その減数分裂を観察したところ、種子稔性は正常だったものの、減数分裂染色体が部分的に凝縮異常を示すことが明らかとなった(図3)。これらの結果は、AGO-X が減数分裂染色体の高次構造やクロマチン修飾パターンに何らかの役割を果たしている可能性を示唆する。

現在は、減数分裂初期の花粉母細胞を実体顕微鏡化で機械的に抽出し、減数分裂染色体の DNA メチル化パターンを正常イネと *ago-x* 変異体の間で比較し、AGO-X が減数分裂期にクロマチン修飾の標的とするイネゲノム領域を特定することを試みている。

<引用文献>

- 1) Liu H, Nonomura KI (2016) A wide reprogramming of histone H3 modifications during male meiosis I in rice is dependent on the Argonaute protein MEL1. J. Cell Sci. 129: 3553-3561.
- 2) Ono S, Liu H, Tsuda K, Fukai E, Tanaka K, Sasaki T, Nonomura KI (2018) EAT1 transcription factor, a non-cell-autonomous regulator of pollen production,

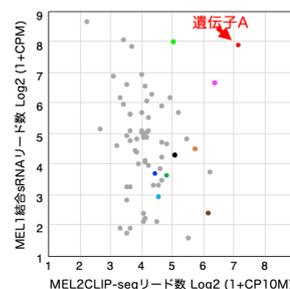


図2. CLIP配列およびそれに相補的なガイドRNA (21塩基長) のリード数の相関。色付きのドット(灰色を除く)は、MEL1との結合が有力な9つのCLIP配列。遺伝子AのmRNA配列に由来するCLIP配列は、CLIPリード数、相補的なMEL1結合sRNAのリード数ともに非常に高い値を示す。

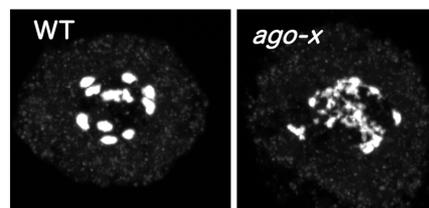


図3. イネ *ago-x* 変異体では減数分裂染色体の凝縮が部分的に異常になる。正常イネの花粉母細胞(雄性減数分裂細胞)のデアキネシス期でみられる相同染色体対の凝縮(右)、および *ago-x* 変異体の同時期にみられる凝縮異常を示す減数分裂染色体。

- activates meiotic small RNA biogenesis in rice anther tapetum. *PLoS Genet.* 14 (2): e1007238.
- 3) Nonomura KI, Morohoshi A, Nakano M, Eiguchi M, Miyao A, Hirochika H, Kurata N (2007) A germ cell-specific gene of ARGONAUTE family is essential for the progression of premeiotic mitosis and meiosis during sporogenesis in rice. *Plant Cell* 19: 2583-2594.
  - 4) Komiya R, Ohyanagi H, Niihama M, Watanabe T, Nakano M, Kurata N, Nonomura KI (2014) Rice germline-specific Argonaute MEL1 protein binds to phasiRNAs generated from more than 700 lincRNAs. *Plant J.* 78: 385-397.
  - 5) Araki S, Le NT, Koizumi K, Villar-Briones S, Nonomura KI, Endo M, Inoue H, Saze H, Komiya R (2020) miR2118-dependent U-rich phasiRNA production in rice anther wall development. *Nat. Commun.* 11: 3115.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 4件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 4件）

1. 著者名 野々村 賢一	4. 巻 4
2. 論文標題 小分子RNAを介した植物の減数分裂制御機構の研究	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 アグリバイオ 2020年3月号	6. 最初と最後の頁 200-203
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	査読の有無 無
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 Ono Seijiro, Nonomura Ken-Ichi	4. 巻 8
2. 論文標題 Microscopic Observation of Subcellular GFP-tagged Protein Localization in Rice Anthers	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 BIO-PROTOCOL Bio101	6. 最初と最後の頁 e2956
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21769/BioProtoc.2956	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 -
1. 著者名 Nonomura Ken-Ichi	4. 巻 31
2. 論文標題 Small RNA pathways responsible for non-cell-autonomous regulation of plant reproduction	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Plant Reproduction	6. 最初と最後の頁 21 ~ 29
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00497-018-0321-x	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 -
1. 著者名 小野聖二郎, 野々村賢一	4. 巻 8
2. 論文標題 植物において減数分裂期に高発現するphasRNAの産生経路および機能	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 領域融合レビュー	6. 最初と最後の頁 e002
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.7875/leading.author.8.e002	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 -

1. 著者名 Araki Saori, Le Ngoc Tu, Koizumi Koji, Villar-Briones Alejandro, Nonomura Ken-Ichi, Endo Masaki, Inoue Haruhiko, Saze Hidetoshi, Komiya Reina	4. 巻 11
2. 論文標題 miR2118-dependent U-rich phasiRNA production in rice anther wall development	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 3115
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-020-16637-3	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 -

[学会発表] 計20件(うち招待講演 8件/うち国際学会 4件)

1. 発表者名 Harsha Somashekar, Manaki Mimura, Ken-Ichi Nonomura
2. 発表標題 Callose accumulation at onset of meiosis is crucial for normal meiosis progression in Rice
3. 学会等名 日本育種学会第137回講演会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 野々村 賢一
2. 発表標題 植物の減数分裂を促進する遺伝的メカニズムの解明に向けて
3. 学会等名 南九州大学 特別講演(招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 野々村 賢一
2. 発表標題 イネ属ゲノム種間雑種の減数分裂期トランスクリプトーム解析
3. 学会等名 遺伝研研究集会「Oryza属ゲノム情報を活用した遺伝的多様性研究の推進」(招待講演)
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 野々村 賢一
2. 発表標題 植物の生殖研究はどのように育種に活かせるか？
3. 学会等名 第27回育種学会中部談話会（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 野々村 賢一
2. 発表標題 670万年かけて分化した異種ゲノムが 減数分裂で出会うと何が起こるのか？
3. 学会等名 遺伝研研究集会「イネ分子遺伝学の夢」（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 小川和准, 澤田隼平, 福永任吾, 陶 文紀, 橋本研志, 花俣繁, 小野聖二郎, 野々村賢一, 来須孝光, 朽津和幸
2. 発表標題 イネの葯タペート細胞のプログラム細胞死におけるオートファジーとRbohによるROS生成の役割
3. 学会等名 日本植物学会第83回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 三村真生, 小野聖二郎, 野々村賢一
2. 発表標題 体細胞分裂から減数分裂への移行を制御する イネ細胞質顆粒因子の解析
3. 学会等名 日本遺伝学会 第91回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 三村真生, 小野聖二郎, 野々村賢一
2. 発表標題 減数分裂移行タイミングの制御に関わる植物生殖細胞顆粒の解析とストレス顆粒との関係
3. 学会等名 日本育種学会 第136回講演会ワークショップ「植物の生殖と環境・ストレス」
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 イネ種間雑種胚乳におけるインプリントーム解析
2. 発表標題 殿崎 薫, 川勝 泰二, 小野明美, 古海弘康, 野々村賢一, Luca Comai, 木下哲
3. 学会等名 日本育種学会 第136回講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 野々村 賢一
2. 発表標題 植物の減数分裂進行を制御するArgonauteタンパク質
3. 学会等名 遺伝研研究集会「有性生殖における染色体・クロマチン・核動態に関する研究会」
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 野々村 賢一
2. 発表標題 組み換えがホットなスポットを求めて
3. 学会等名 遺伝研研究集会「イネ分子遺伝学の飛躍」(招待講演)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 小野聖二郎・野々村賢一
2. 発表標題 減数分裂24塩基長small RNAの葯タペート組織での特異的な生産を促進するイネbHLH転写因子の解析
3. 学会等名 日本遺伝学会第90回大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 三村真生・小野聖二郎・野々村賢一
2. 発表標題 イネ減数分裂細胞における細胞質RNA顆粒因子MEL2の機能ドメイン解析
3. 学会等名 日本植物学会第82回大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 小野聖二郎・田中啓介・佐々木卓治・野々村賢一
2. 発表標題 イネ葯タペート組織において減数分裂期 siRNAの生合成を制御するbHLH 転写因子のネットワーク
3. 学会等名 日本植物学会第82回大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 澤田隼平・福永任吾・花俣 繁・小野聖二郎・木村成介・野々村賢一・来須孝光・朽津和幸
2. 発表標題 イネの葯タペート細胞のプログラム細胞死制御における転写制御ネットワーク・オートファジー・ROS生成酵素の役割と花粉成熟における意義
3. 学会等名 日本植物学会第82回大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 来須孝光・瀬良ゆり・花俣繁・坂本真吾・小野聖二郎・金古堅太郎・三井 悠大・北畑 信隆・三ツ井敏明・野々村 賢一・光田 展隆・朽津和幸
2. 発表標題 イネ種子の登熟・品質制御におけるオートファジーの役割
3. 学会等名 日本植物学会第82回大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 NONOMURA Ken-ichi
2. 発表標題 bHLH transcription factors activate meiotic phasiRNA production in anther tapetum and promote meiotic chromosome condensation non-cell autonomously
3. 学会等名 16th International Symposium on Rice Functional Genomics (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 NONOMURA Ken-ichi
2. 発表標題 Post-transcriptional timing control of mitosis-meiosis transition
3. 学会等名 25th ICSPR Satellite Symposium (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Manaki Mimura, Seijiro Ono, Ken-Ichi Nonomura
2. 発表標題 RNA binding protein MEL2, a regulator of mitosis-meiosis transition, forms cytoplasmic granule-like structures in rice cells
3. 学会等名 25th International Congress on Sexual Plant Reproduction (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 Seijiro Ono, Hua Liu, Katsutoshi Tsuda, Eigo Fukai, Keisuke Tanaka, Takuji Sasaki, Ken-ichi Nonomura
2. 発表標題 bHLH transcription factors activate meiotic siRNA biogenesis in rice anther tapetum
3. 学会等名 25th International Congress on Sexual Plant Reproduction (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

野々村研究室ホームページ <a href="http://nonomuralab-nig.sakura.ne.jp/NonoLab_HP/top_j.html">http://nonomuralab-nig.sakura.ne.jp/NonoLab_HP/top_j.html</a>
---

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

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
---------	---------