

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 4 月 30 日現在

機関番号：63801  
 研究種目：若手研究 (S)  
 研究期間：2009 ~ 2012  
 課題番号：21678001  
 研究課題名 (和文) 植物生殖細胞の初期発生を制御する遺伝システムの解明  
 研究課題名 (英文) Elucidation of genetic systems conducting an early development of plant germ cells  
 研究代表者  
 野々村 賢一 (NONOMURA, KENICHI)  
 国立遺伝学研究所・実験圃場・准教授  
 研究者番号：10291890

研究成果の概要 (和文)：生殖細胞の初期発生および減数分裂は遺伝の根幹をなす現象であり、その分子機構の解明は基礎・応用遺伝学的な観点から重要な課題である。本課題では、モデル作物であるイネの2つの RNA 結合蛋白質 MEL1 と MEL2 の機能解析を行った。MEL1 は減数分裂初期過程の進行に重要な役割を担う。MEL1 は主に 21 および 24 塩基長の短い RNA (mipsRNA) 配列と結合することを明らかにした。またそれら配列をイネゲノムにマップし、遺伝子間領域に由来する 700 種類以上の蛋白質非コード RNA (lincRNA) から生合成されることを示した。MEL2 は体細胞分裂から減数分裂への移行タイミングを制御する。更に本課題では、MEL2 の RNA 認識モチーフ (RRM) が AU リッチな配列 (UUAGUU(U/A)(U/G)(A/U/G)U) に結合すること、同コンセンサス配列をもつ遺伝子がイネゲノム中に 249 個あることを見いだした。今後、本成果から2つの RNA 結合蛋白質の直接的な制御下にある標的遺伝子が同定され、植物の生殖および減数分裂における RNA 結合蛋白質を介した転写あるいは転写後制御ネットワークの理解が進むと期待される。

研究成果の概要 (英文)：Germline development and meiosis are pivotal for all genetic events, and elucidation of the molecular mechanisms is an important subject for both basic and applied genetics. Here I used genetic resources of rice, a model crop, and analyzed the functions of two RNA-binding proteins, MEL1 and MEL2. MEL1 is known to play important roles in early meiotic processes. In this study, 21- and 24-nucleotides small RNAs that bind to MEL1 (mipsRNAs) were identified. Mapping onto the rice genome revealed that the mipsRNAs were processed from 700 species of long intergenic non-coding RNAs (lincRNAs). MEL2 functions to promote mitosis-meiosis transition in appropriate timing. This study revealed that RNA recognition motif (RRM) of MEL2 preferentially binded to the AU-rich RNA sequences (UUAGUU(U/A)(U/G)(A/U/G)U), and that 249 rice genes conserved the AU-rich consensus sequence. Identification of genes directly targeted by MEL1 and MEL2 will open the door to understanding transcriptional or post-transcriptional regulatory networks mediated by RNA-binding proteins in plant reproduction and meiosis.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：育種学

キーワード：植物、生殖、減数分裂、RNA、発生、遺伝子、イネ

### 1. 研究開始当初の背景

生殖は遺伝の根幹を成す生命現象であり、植物にとっては種子生産に直結する重要な過程であるが、特に生殖細胞の初期発生過程を制御する遺伝システムは、そのほとんどが

未解明のままである。

私たちは以前、植物生殖細胞で特異的に機能するアルゴノート蛋白質 (AGO) としては世界で初めてとなる、イネ MEL1 の同定に成功した。AGO は、20~30 塩基長程度の小分

子 RNA (small RNA) を介して標的 RNA と結合し、遺伝子発現抑制やクロマチン修飾、外来ウィルスの抑制など、多岐にわたる現象を司ることで知られる。それ以外にも、減数分裂への移行過程で必須の役割を果たし、RNA 認識モチーフ (RRM) をもつイネ新規蛋白質 MEL2 の同定にも成功した。

2つのイネ遺伝子が共に、期せずして RNA への結合が予想される蛋白質であったことは、植物の生殖細胞の発生過程、特に減数分裂において、RNA を介した転写あるいは転写後の遺伝子発現制御機構が重要な役割を果たしている可能性を示唆する。

体細胞分裂から減数分裂への移行過程では、相同な相手を認識するためにダイナミックなクロマチン構造変化が起こる。また植物でも、環境シグナルに応答して誘導されたクロマチン修飾の変化が、生殖過程でリセットされるゲノム再プログラム過程の存在が示唆されている。すなわち、植物生殖細胞の発生過程はダイナミックなクロマチン構造の変化を伴うと予測される。減数分裂移行・進行過程に必須のイネ MEL1・MEL2 蛋白質の機能解析を通じて、植物の減数分裂における RNA を介した遺伝子発現・クロマチン構造の制御機構の一端を解明し、減数分裂組換え工学の確立と育種効率の向上に向けた基盤研究になると期待できる (図1)。

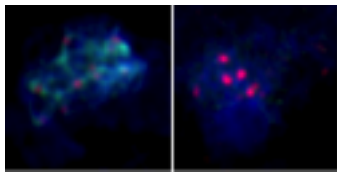


図1 *me11* 突然変異体では減数分裂染色体のクロマチン修飾が変化する。正常型イネの減数分裂細胞 (左) では、動原体 (赤) 周辺ヒストン H3 の9番目のリジン残基がジメチル化されるが (緑)、*me11* 変異体 (右) ではジメチル化が低下する。青は染色体。

## 2. 研究の目的

植物の生殖細胞が体細胞から分化して減数分裂に至るまでの過程について、突然変異体などを用いた解析を中心に研究する。MEL1 など植物の生殖関連蛋白質の機能解析を通じて、植物生殖細胞の初期発生および減数分裂を促進する制御機構の解明を目的とする。

## 3. 研究の方法

### (1) MEL1 遺伝子・蛋白質の解析

MEL1 遺伝子の発現開始時期は、始原生殖細胞の分化直後まで遡ることができる。植物生殖細胞系列が減数分裂に至るまでの運命決定機構に MEL1 遺伝子発現が密接に関連することが考えられたため、MEL1 の発現開始と始原生殖細胞分化との関係について発生学的

解析を行った。花器官の形態形成に関わる遺伝子および突然変異体について、始原生殖細胞分化期前後の幼穂 (0.5mm 前後) の切片を作成し、形態観察および MEL1 などの遺伝子発現解析に供した。

MEL1 蛋白質の分子機能を解析するため、MEL1 に対する特異的抗体を作成した。減数分裂直前の花を含むイネ幼穂から抽出した蛋白質と MEL1 抗体を反応させて免疫沈降し、MEL1 蛋白質と結合する small RNA を単離した。次世代シーケンサーで small RNA 配列の大量解読を行い、イネゲノム上にマッピングした。同時期の葯から転写産物を抽出し、同様に大量解読とマッピングを行った。また、MEL1 および関連蛋白質に対する抗体を用いて、各蛋白質の減数分裂細胞内の局在を、間接蛍光抗体法により共焦点レーザー走査顕微鏡下で解析した。

### (2) MEL2 遺伝子・蛋白質の解析

正常イネ個体および *me12* 突然変異体の減数分裂細胞の形態および減数分裂染色体の挙動を、樹脂切片および間接蛍光抗体法により観察した。MEL2 に T7 ペプチドを付加した融合蛋白質を発現する形質転換イネを作成し、T7 抗体により MEL2 蛋白質の細胞内局在性を観察した。

MEL2 の RRM が結合する RNA 配列を同定する目的で、RRM を含む領域の N 末端に GST タグを付加した融合蛋白質を精製し、人工合成した 50 塩基長のランダム RNA 配列と混合した。蛋白質-RNA 複合体を GST カラムで精製した後 RNA を回収し、RNA の両末端に付加した共通配列により逆転写・PCR 増幅した。このサイクルを 8~9 回繰り返して、MEL2 の RRM と結合する RNA 配列を濃縮、配列解読した (SELEX 法)。

## 4. 研究成果

(1) MEL1 遺伝子は始原生殖細胞の分化初期に発現を開始する

MEL1 遺伝子は、形成直後の葯および胚珠原基の皮下に分化した始原生殖細胞で発現を開始する。MEL1 発現の誘導機構に関する解析の糸口をつかむため、雌性生殖器官である胚珠の運命決定を担う転写因子 OsMADS13 の突然変異体で MEL1 発現を観察した。osmads13 変異体では胚珠が完全に欠損し、代わりに花メリステムが異所的かつ連続的に心皮を分化するため、雌性生殖細胞も完全に欠損する。従って MEL1 は全く発現しないはずである。しかし予想に反して、MEL1 遺伝子発現は胚珠予定領域で発現誘導され、1つ目の異所的な心皮が分化するまでに速やかに消失すること

がわかった。

また *MEL1* が発現する生殖細胞と接する表皮細胞では、サイトカニン活性化酵素である *LOG* 遺伝子が、*MEL1* 発現の直前に一過的に発現することを見いだした (図2)。*LOG* 遺伝子の発現は、花序および花の幹細胞 (メリステム) の表皮で発現し、メリステムの維持に必要であることが知られるが、生殖細胞発生予定領域における一過的な発現は過去に報告が無い。

*MEL1* 機能は減数分裂初期過程の進行に必須である。従って、*MEL1* 遺伝子の始原生殖細胞分化直後の発現は、植物ではこの時期から既に減数分裂の運命獲得に向けたプログラムが始動することを示唆する。生殖細胞の発生初期過程において、予定領域細胞は花メリステムになるよう初期設定されているが、*OsMADS13* 機能によって抑制され、生殖細胞発生および減数分裂の運命獲得に向けたプログラムが始動することが明らかとなった。また、*MEL1* 発現誘導には、植物ホルモンであるサイトカニンが必要である可能性が示唆される一方、*OsMADS13* 機能とは独立であることが示された。

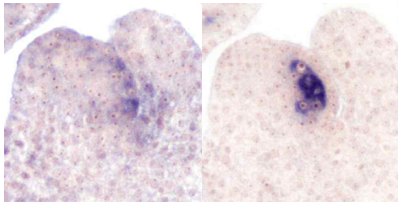


図2 始原生殖細胞分化初期における *LOG* と *MEL1* の発現  
*LOG* 遺伝子は胚珠予定領域の表皮で一過的に発現し (左図の青く染色された領域)、*MEL1* は *LOG* 発現領域に接する第二層で強く発現する (右)。

(2) *MEL1* が結合する 21C-small RNA は 700 種類以上の lincRNA から生合成される

*MEL1* 抗体を用いた免疫沈降画分から 18~32 塩基長の small RNA を抽出し、次世代シーケンサーで解読したところ、約 1200 万個の配列 (重複を含む) をイネゲノムにマップすることができた。*MEL1* と結合する small RNA (*MEL1*-interacting small RNA (*mipsRNA*)) の特徴は以下の通りであった; (1) 全体の約 70% が 21 塩基長、(2) 全体の約 85% は 5' 末端の塩基がシトシン、(3) 5' 末端以外の配列には全く共通性がない。以下では、(1) から (3) の特徴をもつものを特に 21C-*mipsRNA* と表記する。

21C-*mipsRNA* は、イネゲノムの 1000 カ所以上にマップされ、主に機能が未知の遺伝子間領域でクラスターを形成していた。驚いたことに 21C-*mipsRNA* クラスターは、イネの全ての染色体に不均等に分布していた (図3)。

ほとんどのクラスターは、上流領域に 22 塩基長の *miR2118* 標的配列を保持していた。

またクラスター内部では、*mipsRNA* がセンス鎖とアンチセンス鎖の両方で 21 塩基の間隔に整列した。これらの特徴は、*mipsRNA* クラスターから転写された RNA が *miR2118* に依存した切断を受け、二重鎖化したのち、*miR2118* 切断点を起点として 21 塩基の間隔で切断されて *mipsRNA* が生合成されることを示唆する (図4)。これは従来知られる *tasiRNA* 生合成経路によく一致する。

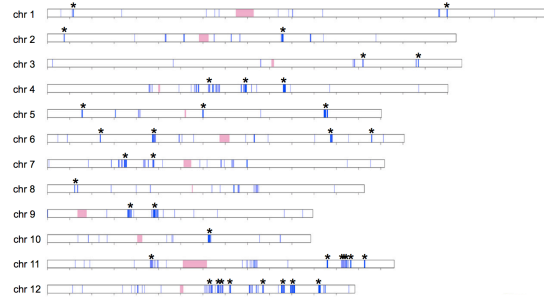


図3 12本のイネ染色体上の *mipsRNA* クラスターの分布  
青い縦線が1つの *mipsRNA* クラスターを表す。クラスターが集中する領域は星印を付した。赤は動原体領域。

*mipsRNA* クラスターから、蛋白質をコードしない長い RNA (long intergenic non-coding RNA) が転写されている可能性を調べるため、減数分裂直前の葯に由来し、かつ 3' 末端にポリ A をもつ RNA の配列を次世代シーケンサーで解読し、イネゲノムにマップして多くの転写単位を同定した。遺伝子領域だけでなく遺伝子間領域にも非常に多くの転写単位が同定され、本課題で同定された 700 以上の 21C-*mipsRNA* クラスターから lincRNA が転写されていることが明らかとなった (図4)。

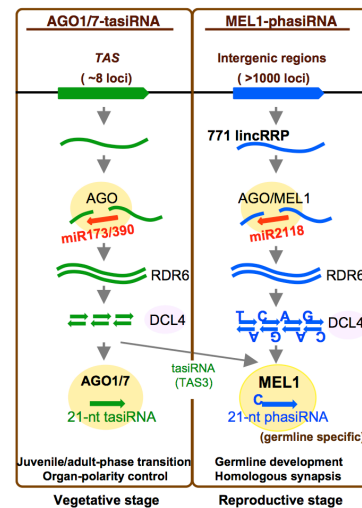


図4 *mipsRNA* 生合成経路と *tasiRNA* 生合成経路の比較

(3) *MEL2* は減数分裂移行のタイミングを制御 *mel2* 突然変異体は、種子稔性が完全に欠損するイネ系統の中から選抜された。原因遺伝子は RRM を中央にもつ新規遺伝子であった。

*mel2* 変異体では、雌雄の生殖細胞が減数分裂に移行するタイミングが異常になり、減数分裂の進行をモニターする未知の機構にひっきり細胞死を引き起こす可能性を明らかにした。また MEL2 プロモーターにより融合蛋白質を発現する形質転換イネの細胞学的観察から、MEL2 蛋白質は減数分裂細胞の細胞質に局在し、特に減数分裂移行期に核の周辺部分に局在する傾向が観察された。

上記の結果から、MEL2 蛋白質は生殖細胞が減数分裂へ移行するタイミングを制御している可能性が示唆された。同一の葯内には多くの雄性生殖細胞が含まれるが、それらは同調的に減数分裂前 DNA 複製を行い、同調的に減数分裂に移行する。*mel2* 変異体では、同調的 DNA 複製が起こらないことから、MEL2 蛋白質は減数分裂前 DNA 複製期の直前で標的遺伝子の翻訳制御を介して生殖細胞の分裂周期を一時停止させ、適切な時期に周期を再開させることで正常な減数分裂への移行を制御する可能性が考えられた (図 5)。

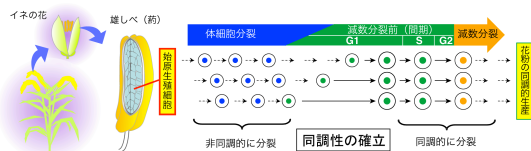


図 5 葯内の生殖細胞は同調的に減数分裂に移行する。発生初期の雄性生殖細胞は、葯内で非同調的に体細胞分裂して増殖する。減数分裂前 G1 期に到達すると、分裂周期が一旦停止し、全ての生殖細胞が G1 期に到達してから一斉に減数分裂前 DNA 複製期 (S 期) に移行する。MEL2 は生殖細胞の減数分裂前 G1 期から S 期への移行のタイミングを制御していると推察された。

#### (4) MEL2 は AU リッチな RNA 配列に結合

SELEX 法 (「3. 研究の方法」を参照) により、MEL2 蛋白質が結合する RNA コンセンサス配列が、約 12 塩基長の AU リッチな配列であることを見いだした (図 6)。生殖細胞発生に機能をもつ動物 RRM の多くは、mRNA の 3' 末端の非翻訳領域 (3'-UTR) に結合して、標的遺伝子の翻訳を制御することから、このコンセンサス配列を 3'-UTR 内に保存するイネ遺伝子を検索したところ、249 遺伝子が該当した。これらを MEL2 の標的遺伝子候補として更なる絞り込みを行う予定である。



図 6 MEL2 が結合するコンセンサス RNA 配列

#### (6) まとめと今後の展望

本課題では、減数分裂の進行に重要な役割を果たす MEL1 と MEL2 の 2 つの RNA 結合蛋白質の標的 RNA 配列の解読に成功した。

特に MEL1 に関しては、免疫沈降実験で共沈してくる RNA を大量解読することで、生体内で実際に MEL1 と結合している mipsRNA の大量同定に成功した。動物では PIWI サブファミリーに属する Argonaute 蛋白質が、small RNA の一種である piRNA と結合して生殖細胞の発生・分化に重要な役割を果たすことが知られる。本課題で同定した mipsRNA は、動物の piRNA とは異なる特徴を示しており、動物の small RNA を介した生殖細胞発生・減数分裂メカニズムの多様性を示唆する。

イネの幼穂では、遺伝子間領域から機能未知の 21 および 24 塩基長の small RNA (phasiRNA) が大量に発現することが報告されている (Johnson et al. 2009)。21C-mipsRNA は、これら phasiRNA である可能性がある。phasiRNA の発現は必ずしも生殖細胞のみに局限されない可能性が高く、mipsRNA が生殖細胞の周辺体細胞から細胞間移動する可能性も考えられる。これらの関係を明らかにすることで、植物生殖細胞が減数分裂運命を獲得するプロセスの理解がより深まると期待される。

被子植物の減数分裂が同一葯内で同調化されることはよく知られるが、その分子機構はほとんどわかっていない。本成果から、MEL2 蛋白質が AU リッチな RNA 配列、恐らくは標的遺伝子 mRNA の 3'-UTR と結合し、イネ生殖細胞の減数分裂への移行タイミングを制御する可能性が示された。MEL2 蛋白質の RRM を含む中央領域は、ヒトの無精子症原因蛋白質と結合する DAZP1 の RRM 周辺配列と高い相同性を示す (Nonomura et al. 2011)。動物でも、RNA 結合蛋白質の 3'-UTR への結合を通じて標的遺伝子の翻訳制御が生殖細胞発生あるいは減数分裂移行に重要な働きをすることが知られる。RRM 蛋白質は複数の異なる遺伝子を標的とし得ることが知られており、本成果で得られた 200 以上の標的候補遺伝子の中には、MEL2 が生体内で直接結合して制御する遺伝子を複数含むことが十分期待できる。

#### 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 3 件)

1. 米田典央、野々村賢一「減数分裂：相方を探すための植物染色体のダイナミックな挙動」、生物の科学遺伝 63 (5 月号)、p. 48-54 (2009) (査読なし)
2. Nonomura, K. I., Eiguchi, M., Nakano, M., Takashima, K., Komeda, N., Fukuchi,

- S., Miyazaki, S., et al. A novel RNA recognition motif protein is required for premeiotic G1/S-phase transition in rice (*Oryza sativa* L.). *PLoS Genetics* 7: e1001265 (2011) (査読あり)
3. Yamaki, S., Nagato, Y., Kurata, N., Nonomura, K.I. Ovule is a lateral organ finally differentiated from the terminating floral meristem in rice. *Dev. Biol.* 361: 208-216 (2011) (査読あり)

[学会発表] (計 26 件)

1. Nonomura, K.I. Plant germ-cell development is supported by RNA-mediated genetic systems. Symposium of Plant Genomics and Breed. Inst. (invited), Seoul, Korea (2009)
2. Yamaki, S., Nonomura, K.I. What triggers the initiation of primordial plant germ cells? 32nd Annual Meeting of Molecular Biology Society of Japan, Yokohama (2009)
3. Nonomura, K.I. A rice gene regulating proper timing of the transition to meiosis, China-Japan Rice Developmental Biology Meeting, Hangzhou, China (2009)
4. 野々村賢一「植物が減数分裂を同調化させるメカニズム」、第60回染色体学会年会、松江 (2009)
5. 野々村賢一、中野睦子、福地佐斗志、永口貢、宮尾安藝雄、廣近洋彦、倉田のり「減数分裂の進行に必須のイネ MEL2 遺伝子はイネ科植物で保存されている」、日本育種学会第116回講演会、札幌 (2009)
6. Nonomura, K.I., et al. Analysis of putative RNA-binding proteins promoting plant germ-cell development in rice. 9th Internat. Plant Mol. Biol. Congr., St. Louis, USA (2009)
7. Nonomura, K.I., Yamaki, S. What triggers the initiation of primordial plant germ cells? 32nd Ann. Meet. Mol. Biol. Society of Japan, Yokohama (2009)
8. 米田典央、野々村賢一「イネ減数分裂におけるシナプトネマ複合体タンパク質 ZYP1 の機能」、日本育種学会第117回春季大会、京都 (2010)
9. 野々村賢一「植物の減数分裂への移行を制御する RNA 結合蛋白質の解析」、日本植物学会第74回大会ワークショップ (招待講演)、中部大学 (2010)
10. 野々村賢一、永口貢、宮崎さおり、米田典央、宮尾安藝雄、廣近洋彦、倉田のり「植物の減数分裂前 G1/S 移行を制御する新規 RRM 蛋白質の解析」、第33回日本

- 分子生物学会年会、神戸 (2010)
11. 小宮怜奈、野々村賢一「イネ生殖細胞特異的 Argonaute タンパク質 MEL1 と結合する small RNAs の同定」、第5回日本エピジェネティクス研究会年会、熊本 (2011)
  12. Nonomura, K.I. A novel small RNA pathway regulates pre-meiotic germline development and cell division in plants. *Frontiers of Plant Chromosome Research: Centromeres and Artificial Chromosomes*, Germany (2011)
  13. 野々村賢一、小宮怜奈、宮崎さおり「減数分裂前のイネ生殖細胞発生を制御する新規の RNA 経路」、日本遺伝学会第83回大会、京都 (2011)
  14. Nonomura, K.I. RNA-binding protein play central roles in germline cells to go through premeiosis and early meiosis in rice. *Plant Reproduction for Food 2012*, Melbourne, Australia (2012)
  15. Miyazaki, S., Nonomura, K.I. RNA recognition motif of rice MEL2 regulating transition from mitosis to meiosis binds to U-rich RNA conserved sequence. 第53回日本植物生理学会年会、京都 (2012)
  16. Komiya, R., Ohyanagi, H., Niihama, M., Watanabe, T., Tsutsui, Y., Kaminuma, E., Kurata, N. Nonomura, K.I. Biogenesis of small RNAs interacting with rice MEL1, a germ-cell specific AGO protein. 35th Annual Meet. Mol. Biol. Society of Japan, Fukuoka (2012)
  17. Nonomura, K.I. MEL1 Argonaute controlling early germ-cell development and meiosis in rice. *Japan-China Joint symposium on Rice Developmental Biology*, Oita (2013)

他 9 件

[図書] (計 1 件)

1. 野々村賢一「受粉と受精」、種子の科学とバイオテクノロジー (原田久也監修)、学会出版センター、p. 13-16 (2009)
6. 研究組織
- (1) 研究代表者  
野々村 賢一 (NONOMURA, KENICHI)  
国立遺伝学研究所・実験圃場・准教授  
研究者番号: 10291890
  - (2) 研究分担者  
該当なし
  - (3) 連携研究者  
該当なし