

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 5 月 31 日現在

機関番号：38005

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26870796

研究課題名(和文)植物生殖細胞のnon-coding RNAネットワークモデル

研究課題名(英文)A RNA network of reproductive specific non-coding RNAs

研究代表者

小宮 怜奈(Reina, Komiya)

沖縄科学技術大学院大学・サイエンステクノロジーグループ・サイエンス・テクノロジー アソシエート

研究者番号：90631416

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：被子植物の生殖細胞発生機構は、性の運命を決定する重要な現象にもかかわらず、遺伝学的、及び、生化学的な知見は極めて乏しい。本研究では、減数分裂前の生殖初期に、特異的に発現する700種以上の生殖non-coding RNAを軸に、植物生殖細胞発生のメカニズム解明を目指す。生殖長鎖non-coding RNAは、21塩基の長さの小分子RNAに切断され、イネの生殖細胞特異的に働くArgonauteタンパク質と結合することを報告した(Komiya et al., 2014, 2017)。さらに、これら生殖長鎖non-coding RNAsの機能とその転写を制御する上流制御因子の同定を試みた。

研究成果の概要(英文)：Successful sexual reproduction in flowering plants depends on accurate germ cell differentiation. Molecular mechanisms of germ cell development during pre-meiotic stages remain unknown in plants. I have identified over 700 types of long intergenic non-coding RNAs (lincRNAs) specifically expressed during rice reproductive stages. These lincRNAs that contain the consensus sequences of microRNA 2118 (miR2118), are precursors of 21-nucleotides small RNAs (Komiya et al., 2014, Komiya 2017). Furthermore, I am engaged in two main projects using rice: 1. Roles of over 700 lincRNAs and 21-nt small RNAs in early reproduction and 2. Transcriptional regulation of 700 lincRNAs by CRF1. Some lincRNA mutants and crf1 mutants showed sterility. Furthermore, some lincRNAs expressions are suppressed in crf mutants. These results suggest that multiple lincRNAs may regulate early reproduction and CRF is required for development of rice reproductive tissues (Komiya unpublished data).

研究分野：発生

キーワード：長鎖non-coding RNA small RNA 非コードゲノム イネ 生殖

1. 研究開始当初の背景

高等生物のゲノムは、90%以上の非コードゲノム領域から構成される。近年、ヒトやマウスのゲノムからタンパク質をコードしない non-coding RNA が大量に転写され、生殖を含む生命機能を制御することから、非コード領域の新たな機能が報告されている (Guttman and Rinn., 2012)。一方、植物の non-coding RNA は、日長感受型雄性不稔の機能に関与する等、個々の non-coding RNA 研究が報告されているが (Ding *et al.*, 2012)、ゲノムワイドな非コードゲノム領域の機能と存在意義に関する知見は極めて乏しい。

申請者は、現在までに、イネゲノム上、約 700 カ所に及ぶ非コードゲノム領域 (遺伝子間領域) から、生殖期に特異的に発現する新規長鎖 non-coding RNA を発見している。これら生殖 non-coding RNA は、21 塩基ごとに規則的に切断されて多量の小分子 RNA (small RNA) が生成される。さらに生殖細胞の発生に必須な Argonaute タンパク質 (AGO) が、これらの生殖 small RNA に特異的に結合する (Komiya unpublished data, 研究開始当初の背景)。しかし、生殖 non-coding RNA の生殖組織における生理機能と存在意義、700 カ所に及ぶ非コードゲノム領域からの生殖 non-coding RNA の一斉発現のメカニズム、及び、生殖 AGO-small RNA の標的因子等、中核部分は未解明である。

2. 研究の目的

生殖は、次世代に遺伝情報が引き継がれる重要な現象であり、古来より、生殖に関する多くの有用な形質が、育種に利用されている。申請者は、修士課程で、イネを用いた雄性不稔研究、博士後期課程で、花成を誘導するフロリゲンの研究と、植物の生殖分野で研究を進めてきた。両分野とも植物の生殖領域では、国内外ともに研究が盛んな分野である。しかし、体細胞から始原生殖細胞への分化、及び、生殖細胞発生の機構は、性の運命を決定する

重要な現象にもかかわらず、植物における遺伝学的・生化学的な知見は極めて乏しい。

本申請では、生殖長鎖 non-coding RNAs を軸に、生殖長鎖 non-coding RNA 変異体作出による機能解析、及び、700 を超える非コード領域の時期特異的な転写の制御機構を明らかにすることを目的としている。

3. 研究の方法

イネの生殖細胞が発生する初期のステージに着目し、下記の方法により、植物生殖細胞発生の制御機構を解明する。

(1) イネ生殖長鎖 non-coding RNA 変異体を用いた機能解析

生殖細胞発生初期から、減数分裂期にかけて、生殖長鎖 non-coding RNA の詳細な発現解析を行う。生殖 non-coding RNA 変異体を用いた植物生殖細胞発生の機能を明らかにする。

(2) クロマチン修飾による生殖長鎖 non-coding RNA の転写制御機構

次世代シーケンサーを用いて、700 箇所を超える非コードゲノム領域・その周辺領域の DNA メチル化によるエピジェネティック解析を行う。

(3) 生殖 non-coding RNA の転写を制御する上流因子の同定

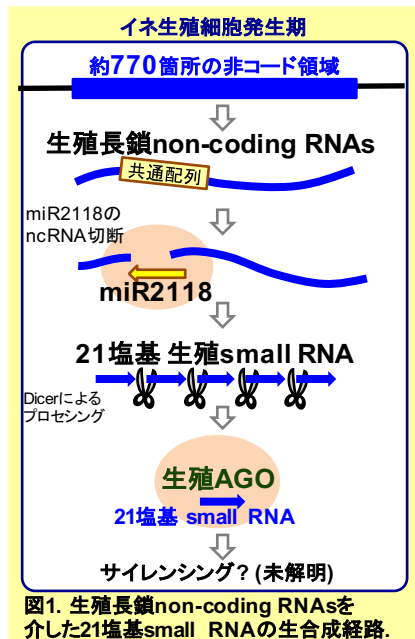
逆遺伝学により、生殖 non-coding RNA の転写制御に関与する上流因子 (クロマチン制御に関与する因子) を同定し機能を解析する。クロマチン制御因子による生殖長鎖 non-coding RNAs の転写制御機構の解明に挑む。

4. 研究成果

(1) イネ生殖 non-coding RNA に由来する small RNA の生合成経路

イネゲノム上、約 700 カ所に及ぶ遺伝子間領域から、生殖期に特異的に発現する新規長鎖 non-coding RNAs を同定した。771 種のこれら生殖長鎖 non-coding RNAs 内には、microRNA (miR2118) が認識する 22 塩基の共通配列が存在する。生殖長鎖 non-coding RNAs は、

miR2118 切断を介してプロセッシングされ、21塩基毎の生殖 small RNAs が生成される。最終的にこれら small RNAs に生殖 Argonaute (AGO) が結合していることを small RNA 免疫沈降と情報科学解析により明らかにした。(図 1)。



これら生殖長鎖 non-coding RNA/miR2118 は生殖細胞が発生する時期 (イネの生殖組織 約 0.4mm) でもっとも発現が上昇する。また、生殖 AGO は花粉母細胞の細胞質に局在し、生殖 AGO の変異イネでは、減数分裂に関与する相同染色体対合因子の局在が変化していたことから、生殖 AGO-small RNA 複合体の減数分裂制御が示唆された。

この成果は国際的に著名な植物の科学雑誌 *The Plant Journal* に報告した (Komiya et al., 2014)。

(2) 生殖 non-coding RNAs 変異体を用いた機能解析

RNA interference (RNAi)、及び、ゲノム編集技術により生殖 non-coding RNA のゲノム領域に欠失・挿入変異をおこしたイネ、または、生殖 non-coding RNA の発現抑制を試みたイネを作成した。RNAi 抑制イネでは、生殖長

鎖 non-coding RNAs の発現を抑制した系統が得られなかった。また、単独の生殖 non-coding RNA に変異が起こった系統でも可検がみられ、単独の生殖 non-coding RNA に変異、もしくは抑制イネでは、他の生殖 non-coding RNA が機能し、制御機構を解明することは困難であることがあきらかと明らかとなった。

一方、変異イネのうち、複数の生殖 non-coding RNAs の発現が制御された変異イネは種子が実らず不稔を示した (図 2)。生殖 non-coding RNAs/small RNAs が生殖制御に関与している可能性が示唆された重要な結果を得た。現在、作出した変異イネを用いて詳細な生殖研究を進めている。

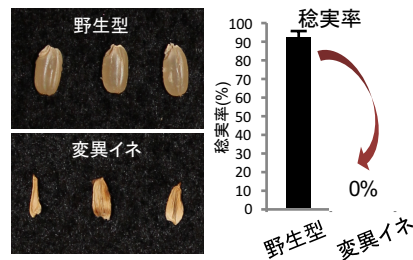


図2. 変異イネと野生型イネの種子 (左) と種子稔実率 (右)。

(3) DNA メチロームによる生殖 non-coding RNA の転写制御機構

700 種を超える生殖 non-coding RNA の生殖時期特異的な発現には、クロマチン制御を伴った転写制御機構が示唆される。そこで、イネの葉組織と生殖組織を用いたゲノムワイドなメチローム解析を行った結果、生殖組織特異的に DNA メチル化が上昇する約 1000 箇所の領域と約 900 箇所の DNA メチル化現象領域を同定した (Komiya unpublished data)。

しかし、これら同定領域と生殖 non-coding RNA の発現に関連性がみられなかったことから、small RNA を介した DNA メチル化制御、及び、DNA メチル化を介した生殖長鎖 non-coding RNA の転写制御の可能性は低いことが示唆された。

(4) 生殖 non-coding RNA の転写を制御する上流因子の同定

逆遺伝学ゲノム編集技術を用いて、生殖 non-coding RNA の転写を制御する候補因子 CRF1 (Chromatin Regulated Factor1) の欠失・挿入変異がおこった 10 系統のイネを作出した。crf1 変異イネは、種子が実らず不稔性を示し、複数の生殖 non-coding RNA、及び、開花制御因子の発現が抑制された (Komiya unpublished data)。CRF1 は、花成を含む初期の生殖を制御している可能性が示唆され、現在、詳細な解析を進めている。

(5) 植物 RNAi と生殖 small RNA に関する執筆活動

植物生殖 small RNA の生合成経路と進化に関する英文総説を *Journal of Plant Research* に報告した (Komiya et al., 2017)。また、2017 年 1 月 *Journal of Plant Research* の植物 non-coding RNA の特集号の監修に携わった。

2015 年には、植物の RNAi に関する和文総説を実験医学 ノンコーディング RNA テキストブックに寄稿するなど、執筆活動を通じて、non-coding RNA 研究を社会にわかりやすく発信することにも務めた。

また、2015 年 9 月日本植物学会第 79 回大会で植物 non-coding RNA に関するシンポジウムを主催し、研究交流と成果発信に務めた。

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. *Komiya, R. Biogenesis of diverse plant phasiRNAs involves an miRNA-trigger and Dicer-processing. *Journal of Plant Research*. 130, 17-23 (2016). 査読あり.

2. *小宮 怜奈. 植物「コサプレッション」が先駆けとなった RNAi. *実験医学 増刊 ノンコーディング RNA テキ*

ストブック. 33, 26-27 (2015). 査読なし.

3. *Komiya, R., Ohyanagi, H., Niihama, M., Watanabe, T., Nakano, M., Kurata, N. and Nonomura, K. I. Rice germline-specific Argonaute MEL1 protein binds to phasiRNAs generated from more than 700 lincRNAs. *The Plant Journal*. 78, 385-397 (2014). 査読あり

(* Corresponding author)

[学会発表] (計 7 件)

1. Komiya, R. Small RNAs derived from reproductive specific lincRNAs in the Family Poaceae. STG Forum. 2017 Feb.
2. 小宮 怜奈. 生殖 lincRNA と miR2118 によるイネの新しい生殖メカニズム. 第三回領域班会議 2016 年 10 月.
3. Komiya, R. The biogenesis of small RNAs derived from over 700 reproductive lincRNAs. 日本植物学会第 79 回大会 2015 年 9 月.
4. 小宮 怜奈. 生殖 lincRNA と miR2118 によるイネの新しい生殖メカニズム. 第二回領域班会議. 2015 年 6 月.
5. 小宮 怜奈. イネ生殖 Argonaute に結合する small RNA の生合成経路. 奈良先端科学技術大学院大学 バイオサイエンス研究科 招待セミナー. 2015 年 1 月.
6. 小宮 怜奈. 生殖 lincRNA を介した small RNA 生合成経路. 第 4 回植物 RNA 研究者ネットワークシンポジウム. 2015 年 1 月.
7. Komiya, R., Ohyanagi, H. and Nonomura, K. I. Rice Germline-specific Argonaute MEL1 protein binds to phasiRNAs generated from more than 700 lincRNAs. The 38th Naito Conference on molecule-based

〔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

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小宮 怜奈 (Komiya, Reina)
沖縄科学技術大学院大学・サイエンステク
ノロジーグループ・サイエンステクノロジ
ーアソシエート
研究者番号：90631416

(2) 研究分担者

該当なし

(4) 連携研究者

該当なし

(5) 研究協力者

Le Tu Ngoc (Le Tu Ngoc)
大柳 一 (Ohouanagi, Hajime)
野々村 賢一 (Nonomura, Ken-ichi)
遠藤 真咲 (Endo, Masaki)