

二国間交流事業 共同研究報告書

令和5年4月4日

独立行政法人日本学術振興会理事長 殿

[日本側代表者所属機関・部局]
 大学共同利用機関法人 情報・システム研究機構
 国立遺伝学研究所
 [職・氏名]
 准教授・野々村賢一
 [課題番号]
 JPJSBP 120213510

1. 事業名 相手国: ドイツ (振興会対応機関: DAAD) との共同研究

2. 研究課題名

(和文) 植物減数分裂研究のための技術拡張 - ライブイメージングとエピゲノム科学の融合

(英文) Extending the toolbox to analyze plant meiosis - from live cell imaging to genome wide epigenetic studies

3. 共同研究実施期間 2021年4月1日 ~ 2023年3月31日 (2年 ヶ月)【延長前】 2021年4月1日 ~ 2023年3月31日 (2年 ヶ月)

4. 相手国側代表者(所属機関名・職名・氏名【全て英文】)

University of Hamburg, ・ Professor ・ Schnittger Arp

5. 委託費総額(返還額を除く)

本事業により執行した委託費総額		3,642,300 円
内訳	1年度目執行経費	1,894,300 円
	2年度目執行経費	1,748,000 円
	3年度目執行経費	- 円

6. 共同研究実施期間を通じた参加者数(代表者を含む)

日本側参加者等	4 名
相手国側参加者等	6 名

* 参加者リスト(様式 B1(1))に表示される合計数を転記してください(途中で不参加となった方も含め、全ての期間で参加した通算の参加者数となります)。

7. 派遣・受入実績

	派遣		受入
	相手国	第三国	
1年度目			()
2年度目	2	2	()
3年度目			()

* 派遣・受入実績(様式 B1(3))に表示される合計数を転記してください。

派遣: 委託費を使用した日本側参加者等の相手国及び相手国以外への渡航実績(延べ人数)。

受入: 相手国側参加者等の来日実績(延べ人数)。カッコ内は委託費で滞在費等を負担した内数。

8. 研究交流の概要・成果等

(1)研究交流概要(全期間を通じた研究交流の目的・実施状況)

本事業の共同申請代表者の Arp Schnittger(ドイツ)と野々村賢一(日本)は、共に植物の減数分裂制御を研究対象にしている。Schnittger 博士は、植物の細胞周期制御因子の解析を通じ、減数分裂に特有の制御機構を次々と明らかにしてきた。また、シロイヌナズナ減数分裂染色体の動態のライブイメージング技術を確立し、数多くの減数分裂タンパク質の視覚化や突然変異体を用いた染色体動態異常の解析を精力的に行っている。野々村は、イネを対象として植物特有の減数分裂関連遺伝子の機能を明らかにしてきた。なかでも、減数分裂進行に必須のエピジェネティック制御機構の解析で世界的に重要な成果を挙げてきた。本事業では、ドイツ側が得意とする減数分裂ライブイメージング手法と、日本側が得意な減数分裂期におけるオミックス解析の手法を持ち寄り、被子植物モデルの代表であるシロイヌナズナとイネのエピジェネティックな減数分裂制御機構の共通点と相違点に迫ることを目的とした。

① レポーター発現系統(R 系統)を用いた蛍光タンパク質のライブイメージ解析

イネで、エピジェネティックな遺伝子発現制御に関わる RND-directed DNA methylation (RdDM)への関与が知られる AGO4a、AGO4b、NRPD1a、NRPD1b、NRPE1a、NRPE1b(イネではそれぞれの因子に 2 種以上のパラログが存在し、それぞれ a、b と呼称される)について、蛍光タンパク質 GFP あるいは mCherry と融合した蛍光標識タンパク質を発現するイネ(以下、R イネ系統と呼ぶ)を作成した。

次に、共焦点レーザー走査顕微鏡を用いて、葯における上記 RdDM 関連タンパク質の局在性解析を行った。NRPD1a および NRPD1b はいずれも、葯内部にある雄性減数分裂細胞(PMC)および PMC を取り囲むように接するタペート細胞(TC)の核に非常に弱いシグナルが検出された。NRPE1a および NRPE1b はいずれも、TC の核で強いシグナルが検出された。これらの結果から、減数分裂期の RdDM 経路は、特に葯内部の PMC および TC で活性が高い可能性が示唆された。

AGO4a は、葯のすべての細胞核に局在が認められたが、PMC を除く体細胞では、シグナルが検出される核とされない核が入り混じっていた。すなわち、AGO4a の体細胞核への局在は、細胞周期依存的である可能性が示唆される。1 つの葯室には 100 個以上の PMC が包含されるが、それらの細胞周期は減数分裂への移行を境に高い同調性をもって進行することが知られる。それを裏付けるかのように、減数分裂に移行した直後の葯では、すべての PMC で同調的に核への AGO4a 局在が観察された。一方、AGO4b は、AGO4a でみられた PMC 核への顕著な局在は検出されなかった。従って、減数分裂細胞核において RdDM 経路で働く主要な AGO4 タンパク質は AGO4a であると結論付けた。

上記の結果および②で述べる sRIP-seq 解析の結果から、AGO4a が減数分裂期染色体のエピジェネティック修飾に重要な役割を果たす高い可能性が予想されたため、GFP-AGO4a を発現する R イネ系統をライブイメージング解析に用いた。その結果などから、AGO4a は、細胞周期依存的にイネ細胞核に局在することが示された。

② GFP-AGO4 を発現するイネおよびシロイヌナズナを用いた sRIP-seq 結果の解析

GFP-AGO4a と結合する小分子 RNA のシーケンスデータについて、イネゲノムへのマッピングと配列の仕分けを行った。検出された 16 から 33 塩基長の小分子 RNA 約 1000 万リードの中で、24 塩基長 RNA が 34%と最多であり、AGO4a が 24 塩基長小分子 RNA と親和性が高いことが改めて示された。それらの 24 塩基長 RNA が由来するイネゲノム領域を調べたところ、トランスポゾン様配列が 38.8%、次いで遺伝子間領域が 37.9%を占めたが、それらに次いで多かったのは減数分裂特異的に生産されることが知られる 24 塩基長 phasiRNA の 16.4%であった。AGO4a/24 塩基長 RNA 複合体が、イネの減数分裂で重要な役割を果たしている可能性が改めて示唆される結果となった。

(2)学術的価値(本研究交流により得られた新たな知見や概念の展開等、学術的成果)

本事業では、植物の減数分裂染色体のエピジェネティック制御機構、すなわち同一のゲノム配列を持つ体細胞

胞とは異なる構造や動態特性を持つ様に、後天的に染色体をリプログラミングする機構を対象とする。植物では、動物で知られる対称配列 CG ジヌクレオチドのメチル基の付加に加え、非対称配列 (CHG、CHH (H は G 以外)) のメチル化によるエピジェネティック制御が知られる。植物に特徴的な非対称配列のメチル化には、低分子干渉 RNA (small interfering RNA; siRNA) を介したメチル化強化機構 (RNA-directed DNA methylation; RdDM) が重要な役割を果たすことが明らかになっている。

本研究成果から、AGO4a が、減数分裂特異的な 24 塩基長 phasiRNA と結合することが示された。AGO4a を含む RdDM は複雑で、かつ減数分裂染色体上での機能は、シロイヌナズナで限定的な機能が報告されているのみであり、イネを含む他の植物では報告例が極めて限られている。AGO4a および 24 塩基長 phasiRNA の減数分裂における機能は非常に複雑であり、残念ながら研究期間内に成果発表することはできなかった。しかし、研究代表者の野々村は、24 塩基長 phasiRNA が欠損する変異体では、上述した AGO4a の PMC 核への蓄積と減数分裂染色体への結合が起こらなくなる結果を得ており、今後、AGO4a および減数分裂特異的な 24 塩基長 phasiRNA の機能解明が、植物の減数分裂研究に新たな展開をもたらす可能性が非常に高いと考えている。

また、本研究で作成した 6 種類の R イネ系統は、今後、減数分裂期のみならず、イネ生活環全般を通じて RdDM 機構の機能研究をする上で有用な材料となることが期待できる。

(3) 相手国との交流 (両国の研究者が協力して学術交流することによって得られた成果)

当初計画していた共同研究先機関 (ドイツ・ハンブルグ大学) への出張は、コロナ禍の影響から、R3 年度は中止し、R3 年度配分額を一部繰越した上で、R4 年度に実施した。研究代表者の野々村、および研究協力者である総研大学生 Somashekar の 2 名が、日本側研究者として渡航した。

ドイツ・ハンブルグ大学への訪問に先立ち、実施計画書に記載の通り、第三国であるチェコ・プラハで開催された第 26 回国際植物生殖学会 (ICSPR, R4.6.26-R4.6.30 開催) に参加し、研究発表を行うとともに、同じく同学会に参加した共同研究者である Arp Schnittger 博士、および植物生殖で機能する RdDM 因子に関する研究者らとの交流・情報収集を行った。

その後、R4.6.25 にハンブルグに移動し、R4.6.27 に Arp Schnittger 博士の研究室を訪問する予定だった。しかし、R4.6.26 までに野々村および Somashekar の両名ともコロナ感染が発覚したため、回復までホテルでの自主隔離を余儀なくされた。自主隔離中も、ドイツ側共同研究者とオンラインでの研究打ち合わせや互いの研究内容の紹介などを行なった。R4.7.6 に陰性となったため実際に研究室を訪問し、シロイヌナズナおよびトウモロコシの減数分裂期の葯の細胞で発現する蛍光標識タンパク質のライブセルイメージング法の習得に努めるとともに、施設見学や共同研究方針など意見交換を行なった。

シロイヌナズナの葯を用いたライブセルイメージング法は、既に Schnittger 博士らのグループが論文を発表しているが、細かい点は論文に示されておらず、実地で作業を見学し、話を伺うことで同技術について深く学ぶことができた。習得した手法は、上記「(1) 研究交流概要」で述べた AGO4a および MEL2 のライブセルイメージング解析を行う上で非常に役に立った。

(4) 社会的貢献 (社会の基盤となる文化の継承と発展、社会生活の質の改善、現代的諸問題の克服と解決に資する等の社会的貢献はどのようにあったか)

減数分裂期には、両親から引き継いだ相同染色体がペアを形成し、両者の間で生じる相同組換えにより、両親の遺伝子がシャッフルされ、新たな遺伝子組合せが子に継承される。この原理を利用したのが、作物や家畜で普遍に行われる交雑育種である。すなわち、減数分裂染色体のエピジェネティック修飾に関する研究は、相同組換えの位置・頻度の決定機構、ひいては品種改良の効率に直結する重要なテーマである。

一連の解析から、将来的に相同組換えの位置・頻度の決定における AGO4a の機能が明らかとなり、ひいては相同組換えの位置・頻度の人為的な操作から品種改良の効率改善につながる糸口が得られるものと期待して

いる。

(5)若手研究者養成への貢献(若手研究者養成への取組、成果)

R4年度の相手国研究室への訪問に同道した大学院生の Somashekar は、今回の交流から多くの刺激を受け、その後の研究活動が以前にも増して活発になっており、若手育成の観点から非常に有効であったと考える。

(6)将来発展可能性(本事業を実施したことにより、今後どのような発展の可能性が認められるか)

本研究から、AGO4a/24 塩基長 phasiRNA 複合体が、細胞周期依存的に減数分裂細胞核に局在し、減数分裂染色体と緊密に結合する可能性が示された。現在、ago4a 変異体を作成して減数分裂への影響を調査中である。また、AGO4a/24 塩基長 phasiRNA 複合体が標的とするイネゲノム領域についても探索を行っている。これら一連の解析、および本研究で得られたライブイメージング技術を合わせて、イネ減数分裂における AGO4a を含む RdDM 経路の新たな機能に迫ることができると考えている。

(7)その他(上記(2)~(6)以外に得られた成果があれば記載してください)

例:大学間協定の締結、他事業への展開、受賞など

(a) RdDM 経路に直接関わらない因子の解析

本研究の最終年度である R4 年度に入るところから、減数分裂期における AGO4a の同調的な PMC 核への局在性が、減数分裂移行直前で機能する RNA 結合タンパク質 MEL2、およびその下流で機能するカロース合成酵素 GSL5 によって制御されることが、本課題の日本側研究者である野々村、Somashekar、三村による研究から次々と明らかになった(提出書類 様式 B1 研究発表実績 3,5,6,7,9,11,13)。そこで、年度当初の実施計画書には含まれていなかったが、イネの成葉由来のプロトプラスト細胞を用いて GFP-MEL2 のライブイメージング解析などを行い、本課題研究の関連成果として学会・論文発表を行った。MEL2 がイネ葯内の PMC、およびイネ成葉由来プロトプラストの細胞質で大小複数の RNA を含む顆粒様構造を形成し、顆粒同士が融合・分離を行うなどダイナミックな動態を示す可能性が示された。

(b) 受賞

本研究の参加者である大学院生の Somashekar Harsha が、2021 年 9 月に行われた日本遺伝学会第 93 回大会で Best Papers 賞(2021 年度)を授与された。