

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

Elucidation of genetic systems conducting an early development of plant germ cells

野々村 賢一 (NONOMURA KENICHI)

国立遺伝学研究所・実験圃場・准教授



研究の概要

減数分裂前のイネ生殖細胞の発生・維持、および減数分裂への移行に必須である2つのRNA結合蛋白質について、それぞれに結合するRNA分子種を特定し、同過程を制御する転写後制御ネットワークの解明を目指している。本研究により、生殖細胞で特異的に機能する新規RNA分子種が同定されるなど、植物の生殖過程に特有の遺伝システムの存在が明らかになりつつある。

研究分野：生物系・農学

科研費の分科・細目：農学・育種学

キーワード：植物育種・遺伝、遺伝子・蛋白質、発生遺伝、生殖

1. 研究開始当初の背景

自ら移動できない植物は、日長や温度の変化を鋭敏に感じてクロマチン構造の変化を伴った複雑な遺伝子発現制御を行い、子孫を残すため生殖生長に移行する。

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。生殖生長に移行後、花器官の一部の体細胞から始原生殖細胞が誕生し、減数分裂に至る過程では、生殖生長への移行期と同様、あるいはそれ以上にダイナミックなクロマチン動態や遺伝子発現制御メカニズムが存在することは想像に難くない。しかし、この過程を制御する遺伝システムのほとんどが未解明のままである。

2. 研究の目的

研究代表者はこれまで、減数分裂前の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) としてイネ MEL1 を同定した。AGO は、small RNA 分子を介して標的 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に機能することが知られる。さらに近年、減数分裂への移行に必須のイネ蛋白質 MEL2 の同定にも成功した。MEL2 も、そのアミノ酸配列から RNA 結合が予測される蛋白質であった。

本研究では、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焦点

を絞って研究する。特に、同過程で中心的な役割を担う MEL1 および MEL2 が結合する RNA 分子種を同定することにより、植物生殖細胞の初期発生を促進する新規の転写後遺伝子発現制御システムを解明することを目的とする。動物の生殖特異的 AGO と同様に、イネ MEL1 がクロマチン修飾を介したエピジェネティックな遺伝子制御に関与する可能性も併せて検証する。

3. 研究の方法

(1) 生殖特異的 AGO 蛋白質 MEL1 の解析

MEL1 を特異的に認識する抗体を作成し、約 3cm のイネ幼穂から得た粗抽出液を用いて免疫共沈実験を行った。沈降画分から 18~28 塩基長の small RNA を精製し、大量配列解読とイネゲノム上へのマッピングを行った。

MEL1 遺伝子発現の厳密な開始時期を調べるため、花器官の形成後期から始原生殖細胞の発生初期における組織学的解析を行った。

(2) 減数分裂移行を制御する MEL2 の解析

MEL2 蛋白質がもつ RNA 認識モチーフ (RRM) 配列と標識ペプチドの融合蛋白質を作成、人工合成した 50 塩基長のランダム RNA 配列と混合し、融合蛋白質の精製と結合 RNA の増幅を繰り返して、RRM に結合する RNA 分子種の濃縮を行った。

4. これまでの成果

(1) MEL1 と結合する small RNA の特定

MEL1 蛋白質と結合する small RNA は、86 万種類以上と極めて多様な配列で構成されており、その多くは 21 塩基長であった。21 塩基長配列の 5' 末端はシトシン残基で保存されるが、残りの 20 塩基では保存性が認められなかった。21 塩基長配列は、その多くが機能未知の遺伝子間領域に由来し、ある規則性をもった極めて特徴的な分布パターンを示した（投稿準備中）。遺伝子間領域に由来する small RNA が AGO 蛋白質と結合して、減数分裂前の植物生殖細胞の発生に機能することを示した世界で初めての成果となる。

(2) MEL1 は始原生殖細胞形成直後に発現開始

顕花植物の地上部メリステムは、生殖生長に移行後、花序および花器官を形成し、最終的に消失する。花メリステムや雌しべで発現する遺伝子および突然変異体を利用し、MEL1 遺伝子の発現タイミングを厳密に解析した。その結果、MEL1 遺伝子は始原生殖細胞の形成直後に発現を開始すること、始原生殖細胞は花メリステムの最後の側生器官として形成される可能性、などを明らかにした。

(3) MEL2 は減数分裂への移行に必須

me12 突然変異体の解析から、MEL2 は減数分裂前のイネ生殖細胞が、体細胞分裂から減数分裂への移行に必須の蛋白質であることを明らかにした。興味深いことに、イネ MEL2 の RRM 周辺の配列は、ヒト無精子症の原因蛋白質 DAZ と結合する DAZAP1 と非常によく似ていた。DAZ ファミリー蛋白質も、減数分裂の正常な進行に必要であることが知られており、同過程で動植物で共通のシステムが使われている可能性が初めて示された。

これまで被子植物の同一葯内に含まれる複数の生殖細胞が、どのようにして同調的に減数分裂に移行するのかは謎であったが、本研究から、MEL2 がその同調性を制御している可能性が初めて示された。

(4) MEL2 は特定の RNA 配列を認識して結合

MEL2 融合タンパク質を用いて濃縮された人工合成 RNA 配列を解読したところ、約 12 塩基長の U（ウラシル残基）リッチな共通配列を見いだすことに成功した。動物の DAZ ファミリー蛋白質も U リッチ配列に結合する傾向が報告されていることから、生殖細胞で機能する RRM 蛋白質は、動植物で共通する機能を果たしている可能性が示唆された。

5. 今後の計画

MEL1 蛋白質は、結合する small RNA 配列依存的に、標的とする遺伝子の転写後発現制御を行う可能性が考えられる。そこで、MEL1 結合 small RNA の配列を含み、かつ *me11* 突然変異体において、正常植物と比較して転写産物量に明らかな変動がみられる遺伝子を絞り込み、MEL1 の標的となる下流遺伝子を同定する。MEL1 small RNA が由来するゲノム領域が極めて特徴的な分布パターンを示すことから、同領域のクロマチン修飾についても併せて解析する。

MEL2 蛋白質について、RRM が U リッチな RNA 配列と結合することがわかったので、今後は植物体内で実際にどのような RNA 配列に結合するかを明らかにする。具体的には、MEL2 蛋白質を得意的に認識する抗体を作成する、あるいはペプチド標識した MEL2 融合蛋白質を発現する形質転換イネを作成するなどして、幼穂粗抽出液から MEL2 に結合する RNA を単離する。

以上から、減数分裂前のイネ生殖細胞の発生・維持および減数分裂への移行に関する転写後制御およびエピジェネティック制御のメカニズム解明を目指す。

6. これまでの発表論文等（受賞等も含む）

◆ Nonomura KI, Eiguchi M, Nakano M, 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).

◆ Yamaki S, Nagato Y, Kurata N, Nonomura KI. Ovule is a lateral organ finally differentiated from the terminating floral meristem in rice. *Dev. Biol.* 35: 208-216 (2011).

◆ 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、学会出版センター：13-16 (2009)

◆ 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 (5月号)「特集 I：植物染色体の最前線」、株式会社エヌ・ティー・エス：48-54 (2009)

ホームページ等

<http://www.nig.ac.jp/labs/ExpFarm/jweb/jtop/jlab.html>