

研究終了報告書

「日長環境応答性を利用した生殖 RNA による基盤育種の構築」

研究期間：2017 年 10 月～2021 年 3 月

研究者：小宮 怜奈

1. 研究のねらい

イネをはじめとした多くの作物は開花以後の種子を利用する。そのため、生殖のコントロールは開花後の収量を決定する大きな要因となる。現在までに、700 箇所を超えるイネの非コードゲノム領域から、生殖期特異的に発現する長鎖 non-coding RNAs を同定している。これら 771 種の生殖長鎖 non-coding RNAs は、22 塩基の生殖 micro RNA (miR2118) が認識する共通配列が存在する。miR2118 の切断が引き金となり、最終的に、21 塩基毎の規則的な小分子 RNA (small RNA) に切断される (図 1; Komiya *et al.*, *Plant J* 2014; Komiya., *J Plant Research* 2017)。しかし、これら長鎖 non-coding RNAs やそこから由来する膨大な種類の small RNA の種類は、非常に多く、個々の non-coding RNA の生理機能やその RNA ネットワーク機構は、未だ明らかになっていない。

本研究では、ゲノム編集により、生殖長鎖 non-coding RNA の共通配列などを利用し、長鎖 non-coding RNA 群や small RNA の発現に影響を及ぼすさまざまな変異イネ系統を作出する。これら変異イネの中から、一日の日の長さに応答した日長感応型不稔イネ、及び、栄養繁殖イネなど、生殖制御に関与するイネの創出を試みる。さらに、変異イネのフェノームに、non-coding RNAs トランスクリプトーム/プロテオームの定量解析を統合し、植物の生殖に有用な RNA/領域の同定を絞り込み、RNA を介した生殖制御機構の解明を試みる。

2. 研究成果

(1) 概要

2050 年には世界人口が 90 億人に達することが予想され、農作物の多収育種、及び、安定的な食料供給は、最重要課題であることから、作物を用いた外的環境応答性の生殖研究は、必要不可欠である。

本研究において、生殖 non-coding RNA の発現に影響を及ぼすゲノム編集変異イネのソースを構築した。これら 50 系統を超える変異イネの表現型解析から、small RNA を含む生殖 non-coding RNA 群を介した外的環境の応答性機構 (日長)、生殖様式の制御、生殖組織発生の制御機構が示唆された。

さらに、不稔を示す変異イネを用いた whole genome sequence と small RNA トランスクリプトームに、プロテオームの生殖データを統合することにより、生殖に重要な microRNA、雄しべの葯壁に局在する small RNA、及び、small RNA の作用因子など、生殖に有用な候補因子の単離に至った (Komiya *et al.*, *Nature Communications* 2020; Komiya *et al.*, OIST/JST 共同プレスリリース 2020)。

本研究により、外的環境応答と生殖制御に重要な non-coding RNAs による生殖システムの一部が明らかとなってきた。

(2) 詳細

研究テーマ A 「生殖変異バリエーションイネの創出と日長環境応答生殖性の評価」

生殖長鎖 non-coding RNAs の共通配列や上流因子などの作用因子に着目し、下記の①～④の複数の生殖長鎖 non-coding/small RNA の発現に影響を及ぼすゲノム編集変異イネを多系統作出した (図 1)。

- ① 上流因子変異イネ
- ② 複数の長鎖non-coding RNA群の変異イネ
- ③ 生殖microRNA変異イネ
- ④ small RNA作用因子、Argonaute変異イネ

短日・長日の日長制御のもと、これら変異イネの日長環境応答を介した生殖を評価した結果、1 日の日の長さが短くなる短日条件特異的に不稔を示すイネ、雄しべ葯の発生に異常を示すイネ、栄養繁殖性が強くなるイネなど、生殖制御のあらゆる事象に関連する変異イネの構築に成功した。

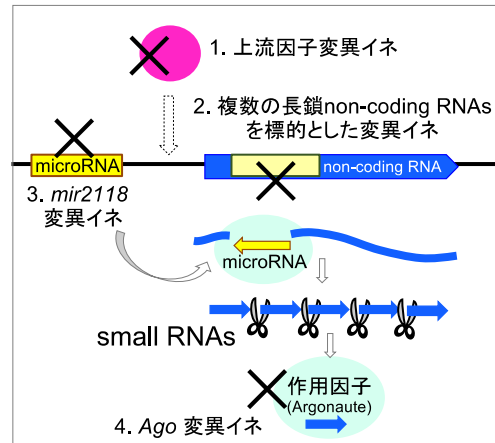


図1. ゲノム編集による変異イネ

研究テーマ B 「生殖 microRNA 変異イネを用いた生殖重要因子の同定」

700 種を超える生殖長鎖 non-coding RNAs 群には、22 塩基の生殖 micro RNA (miR2118) が認識する共通配列が存在する。この miR2118 の変異イネ(研究テーマ A-③)は、雄しべの葯壁に発生異常がみられ、短日条件下で種子が実らず日長感応型不稔を示した (図 2 左下)。

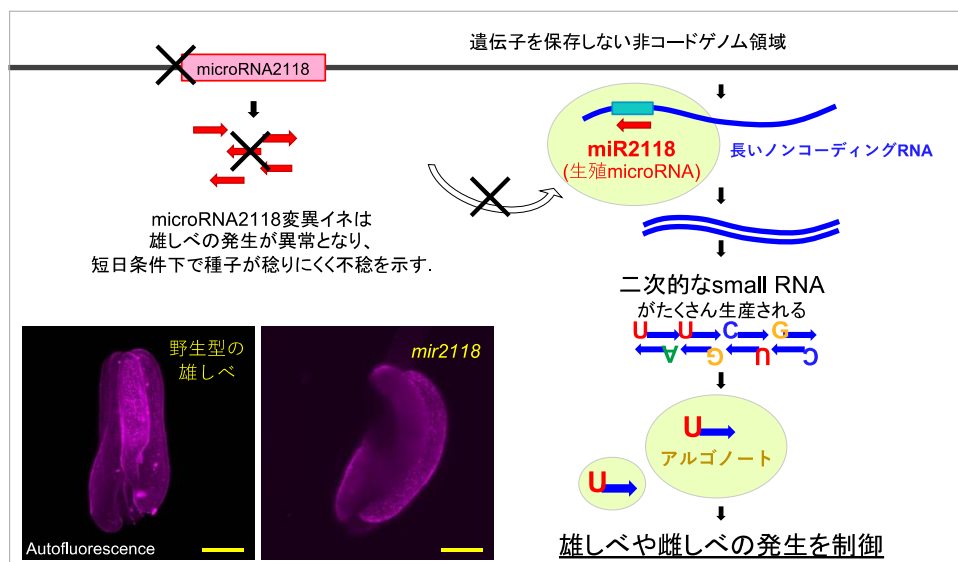


図2. 小さなノンコーディングRNAによるイネの生殖システムのモデル図。

生殖microRNA (miR2118)の変異イネは、雄しべの葯壁の発生が異常となり、野生型の雄しべと比較し丸くなる。最終的に不稔を示すことからmiR2118は生殖制御に重要な働きを示す。葯壁の発生を制御するmiR2118は、長鎖non-coding RNAの切断を介して大量の二次的なsmall RNAを生産する。さらに、雄しべでは、この二次的なsmall RNAには、核酸を構成するアデニン (A)、ウラシル (U)、グアニン (G)、シトシン(C)のうち、ウラシルが多い特徴的な配列が見られ、雄しべのアルゴノートタンパク質と結合して、発生を制御している可能性が示唆される。

変異イネを用いた small RNA トランスクリプトームなどにより、miR2118 が引き金となり 1300 種類を超える雄しべ長鎖 non-coding RNA 群を切断し、多種多様な二次的 small RNA 群の生成を促していることを明らかにした。興味深いことに、二次的な small RNA はウラシルリッチとなり、配列特異的な特徴が見られた。

さらに、プロテオームにより、二次的 small RNA の作用因子の候補として、二種類の Argonaute タンパク質を同定した。これら、2 種の Argonaute は、葯壁での特異的な発現がみられた。以上のことをまとめ、miR2118/ウラシルリッチな small RNA/葯壁 Argonaute による生殖システムの研究成果を報告した (図 2 右; Komiya *et al.*, *Nature Communications* 2020)。また、植物の生殖 small RNA の機能と時空間転写制御に関する総説を執筆している。

研究テーマ C 「植物生殖組織におけるイメージング技術の開発」

生殖システムの解明において、生殖組織の形態観察や生殖制御因子の局在などのイメージング技術の開発は必要不可欠となる。1. 自家蛍光を利用した「葯の 3D イメージング」 2. miRNA 発現部位を同定する *in situ* hybridization 法 3. 生殖組織 Wholemount を用いた免疫染色法の技術開発を行った。1.2. の 3D イメージングの手法と、miR2118 発現の詳細な解析による small RNA のイメージング技術をまとめたプロトコールを投稿した (Under review)。

研究テーマ D 「栄養繁殖イネを用いた分子メカニズム」

構築したゲノム編集イネの中から、栄養繁殖性が強くなるイネをスクリーニングした。開花以降にも分けつを増やし続け栄養繁殖性が強くみられることから、*Vegetative Propagation 1 (VP1)* と名付けた。

vp1 イネの生殖組織などを用いたトランスクリプトームを行い、標的因子の探索を行った。さらに、VP1 抗体を作成し、免疫染色、及び、免疫沈降を行い、VP1 を介した栄養繁殖のメカニズム解明に取り組んでいる。

本研究により、1345 箇所の雄しべ長鎖 non-coding RNA の候補領域を同定し、生殖制御に重要な miR2118 や二次的 small RNA 群 や その作用因子を明らかにした。さらに、50 系統を超える RNA 変異イネのリソース構築と解析から、small RNA を含む生殖 non-coding RNA 群を介した日長環境応答性生殖制御機構が示唆された。

3. 今後の展開

さきがけ研究により構築した変異イネの系統には、長日条件で種子が稔るのに対し、短日条件で不稔を示す日長応答性生殖制御に関与するイネや、栄養繁殖を続けるイネの作出に成功していることから、生殖 non-coding RNA 群の多様な役割が示唆される。今後は、これらの変異リソースを軸に、独自のフィルタリングを介したメタ解析やイメージング技術を駆使し、長鎖 non-coding RNA と small RNA の生殖機能や有用領域の絞り込みを行う。Small RNA、及び、長鎖 non-coding RNA を介した生殖機構の全貌解明を目指す。

4. 自己評価

ゲノム編集により、50 系統を超える変異イネのリソースを構築し、日長感応型不稔イネと栄養繁殖イネの作出に成功し、新たな non-coding RNA の機能が期待できる点において、研究が進展していると評価できる。また、さきがけ研究期間内に、生殖 microRNA の研究成果を国際的に著名な *Nature Communications* に報告し、日経バイオテック、日本農業新聞を含む 12 のニュースサイトで研究成果が紹介されるなど、動植物の垣根を超えて国内外で大きな反響を得ていることから、先駆的な基礎研究を推進したと考える。

一方、栄養繁殖の分子メカニズム解明には、いたらなかったため、難解な部分も再考察し、今後の課題として取り組んでいきたい。

さきがけ研究領域を通じて、3 人のさきがけ研究者と共同研究をはじめ、新たな研究展開が導かれていることから、異分野交流に積極的に努めた姿勢は評価している。

5. 主な研究成果リスト

(1) 代表的な論文(原著論文)発表

研究期間累積件数:1件

1. Araki, S., Le, TN., Koizumi, K., Briones, A., Nonomura, K., Endo, M., Inoue, H., Saze, H. and **Komiya, R**[†]. miR2118-dependent U-rich phasiRNA production in rice anther wall development. *Nature Communications* 11: 3115 (2020).[†]Corresponding Author

生殖長鎖 non-coding RNA の共通配列を標的とする microRNA (miR2118) の機能に関する論文。miR2118 のゲノム編集変異イネを作成し、miR2118 が葯壁の発生に必要なことを示した。さらに、miR2118 がトリガーとなり、葯壁特異的な二次的 small RNA の生成が促進されること、さらに、これら葯壁 small RNA に作用する候補のアルゴノートタンパク質の同定にいたった。

(2) 特許出願

研究期間累積件数:0 件(特許公開前のもも含む)

(3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

1. **Komiya, R.** miR2118-dependent U-rich phasiRNA production in rice anther wall development. 第 43 回 日本分子生物学会年会 (2020.12) (招待講演)
2. **小宮 怜奈** 生殖制御に関与する多彩な non-coding RNA. 生化学若い研究者の会九州支部主催 オンラインセミナー (2020.11) (招待講演)
3. **Komiya, R.** Reproductive system via microRNA producing secondary siRNAs in photoperiodic environment. 第 61 回 日本植物生理学会, 国際シンポジウム (2020.3)
4. **小宮 怜奈** 生殖 phasiRNA の生成を引き起こす miR2118 の機能. 第 40 回 日本分子生物学会年会 (2017.12) (招待講演)
5. **小宮 怜奈** 多種のノンコーディング RNA が担う多様な機能. 生物工学. 96, 349 (2018)