

非コードゲノムに由来する phasiRNAs の雄しべサイレンシング機構

小宮 怜奈

1. はじめに

1990年代RNA干渉 (RNA interference: RNAi) 発見のきっかけとなったペチュニア研究を発端として、植物では多くの small RNA 研究が進められてきた。近年、長鎖 non-coding RNA (lncRNA) も多く同定され、その機能についても注目が集まっているが、植物 lncRNA の分子機能に関する知見はまだまだ乏しい。

イネやトウモロコシを中心に、700か所を超える非コードゲノム領域から、雄の生殖組織(葯)特異的に発現する lncRNA と、そこから由来する膨大な種類の二次的な small RNA が見つかっている。これら二次的な small RNA は Dicer 様タンパク質 (Dicer like protein: DCL) により、21塩基ないし24塩基ごとの規則的なプロセッシングを受け、21塩基長または24塩基長のフェーズを示すことから phased small interfering RNA (phasiRNA) とも呼ばれている。

これら葯特異的な phasiRNA の生成を抑制した変異イネでは、体細胞からなる葯壁に発生異常が生じ、最終的に花粉 (生殖細胞) に影響を及ぼすことから、phasiRNA を介した非細胞自律性制御が葯の発生に重要な役割を果たすことが示唆される。シロイヌナズナのトランスポゾン由来の small RNA は、葯壁のタペート層から生殖細胞に移動することが *Science* 誌に報告され¹⁾、small RNA を介した植物の生殖組織発生分野はホットな領域となりつつある。しかし、植物の生殖組織の非細胞自律性制御の分子メカニズムといった中核部分は未解明である。本稿では、非コードゲノム由来の phasiRNA 群のサイレンシングを介した葯の発生機構を中心に植物の生殖システム全貌解明の糸口を探索したい。

2. 植物 phasiRNA の生合成経路と多様性

phasiRNA は、大きく21塩基と24塩基の長さに分類され、21-PHAS または24-PHAS と名づけられた phasiRNA の前駆体 RNA から由来する。PHAS の最大の特徴は、22塩基の microRNA が認識する共通配列の存在である。興味深いことに、21-PHAS の多くは、microRNA2118 (miR2118) が認識する共通配列を、また、24-PHAS では microRNA2275 (miR2275) の認識する共通配列を持つ。22塩基の microRNA によって PHAS が切断されると、この切断が引き金となり、RNA-dependent RNA polymerase 6 (RDR6) を介して二本鎖 RNA が合成される。さらに、エンドヌクレアーゼをコードする Dicer like Proteins (DCLs) により二本鎖 RNA がプロセッシングを受け、DCL4 では21塩基長の phasiRNA、また、DCL3b/5 によって24塩基長の phasiRNA が生成される^{2,3)} (図1)。

miR2118 の切断が引き金となって生成される21塩基 phasiRNA の生合成経路は、被子・裸子植物を含む陸上植物に広く保存されている²⁾。一方で、phasiRNA の前駆体となる PHAS の種類は、単子葉植物と双子葉植物で大きく異なる。イネやトウモロコシなどのイネ科作物を含む単子葉植物の21-PHAS は、700~2000か所の非コードゲノム領域から生殖期特異的に発現する lncRNA となる。これら生殖特異的な lncRNA は、miR2118 が標的とする共通配列を含み、共通配列以外のほとんどはユニークな配列となる³⁾。一方、双子葉植物の21-PHAS は、タンパク質をコードした転写因子や防御応答に関与する遺伝子群からなる。これらは数十から数百に至る相同性の高いファミリー遺伝子群から構成されている⁴⁾。多様な配列から構成される PHASs と種を超えて高く保存される miR2118/2275 の組み合わせによって生成される最終産物 phasiRNA とは、どのような機能があるのだろうか。

3. 葯の phasiRNA 空間制御機能

タンパク質やRNAの時空間制御は生殖組織発生に必要な不可欠となっている。植物の雄の生殖器官となる雄しべは、主要部分を構成する葯と葯糸からなる。葯は後に花粉となる生殖細胞と、葯壁と称する体細胞層からなり、葯壁によって生殖細胞を包み込んだ筒状の形をしてい

沖縄科学技術大学院大学 (〒904-0495 沖縄県恩納村谷茶 1919-1)

Silencing system of anther-specific phasiRNAs derived from non-coding RNAs

Reina Komiya (Okinawa Institute of Science and Technology Graduate University (OIST), 1919-1 Tancha, Onna-son, Okinawa 904-0495, Japan)

DOI: 10.14952/SEIKAGAKU.2023.950394

© 2023 公益社団法人日本生化学会

る⁵⁾ (図2A). 葯においても, *PHAS*/miR2118/miR2275/phasRNAの時期特異的, かつ, 部位特異的な発現パターンが報告されている. 始原生殖細胞が発生するステージから, 21-*PHAS* (lncRNA), および, miR2118の発現が上昇し始

める. さらに相同染色体の対合が始まる減数分裂前期に入ると, 21塩基phasRNAの発現が上昇する. 21塩基phasRNAの発現に続いて, 24塩基phasRNAの発現が高くなる. phasRNAの長さによって時期特異的な発現がみられるこ

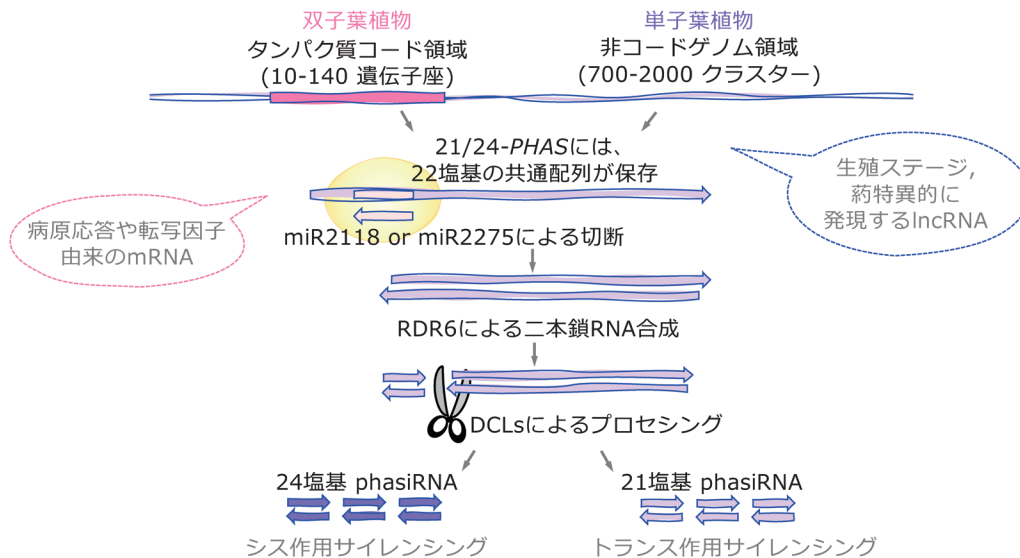


図1 植物のphasRNA生合成経路

単子葉植物では, 700種を超える非コードゲノム領域から生殖ステージ特異的にlncRNA (*PHASs*)が発現する. miR2118/miR2275が認識する22塩基の共通配列内で「生殖lncRNAs」が切断された後, RDR6/DCL4のプロセッシングを経て, 多種多様な21塩基phasRNAが生成する. また, DCL3b/5のプロセッシングにより24塩基のphasRNAが生成する. トマトやマメ科作物を含む双子葉植物においても, miR2118は高く保存される. しかし, phasRNAの前駆体となるRNA (*PHAS*)はタンパク質をコードする遺伝子群から葉を作る栄養成長期にも発現し, 単子葉植物の生殖lncRNAとは異なる.

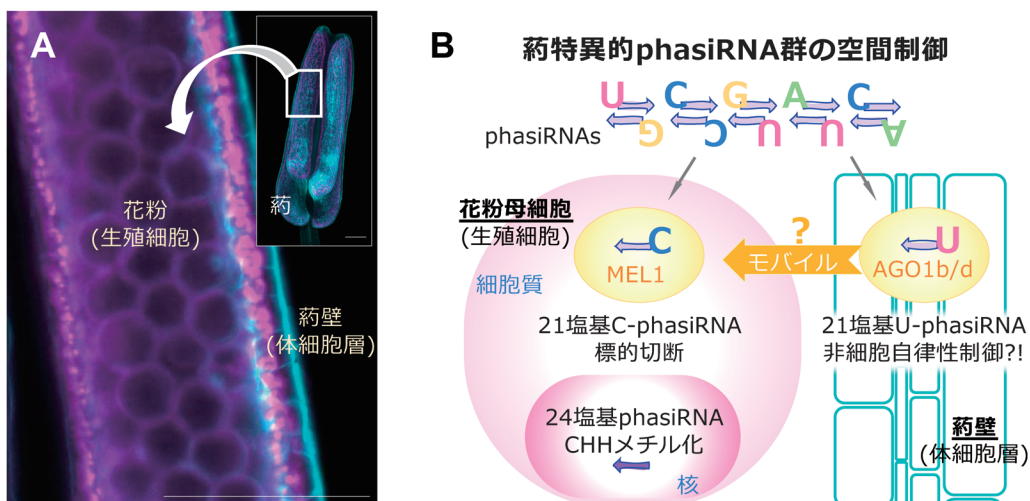


図2 イネの葯立体構造と3種のRNAサイレンシングによる組織・細胞内空間制御

(A)生殖細胞と体細胞層の識別が可能となるイネの葯3Dイメージング. 右上部は葯を示す. 葯の内側に位置する花粉(生殖細胞)のシグナルは自家蛍光(マゼンタ)を撮像した. 生殖細胞を取り囲む葯壁(体細胞層)をカルコフロウで染色した(水色). スケールバー 100 μm . (B)葯特異的に発現するphasRNAの空間制御機構. AGO1b/dは, ウラシル-phasRNA (U-phasRNA)と結合する. AGO1b/dは, U-phasRNAのモバイルキャリアとして体細胞層から生殖細胞に移動する可能性が示唆された. 一方, MEL1-シトシン-phasRNA (C-phasRNA)複合体は, 花粉母細胞特異的に局在し, 標的因子の切断を介したトランス型サイレンシングを引き起こす. 3種類のAGOsによる細胞間・細胞内の空間制御が明らかとなった.

とから、トウモロコシでは21塩基premeiotic phasiRNAと24塩基meiotic phasiRNAとも称される^{6,7)}。

small RNAは、Argonaute (AGO)に取り込まれ、これらsmall RNA-AGO複合体が、転写を抑制するサイレンシング機構の中心を担っている。small RNAのサイレンシング機構は、昆虫、動物、植物とさまざまな生物種に保存される。イネゲノムには、19個のAGOファミリー遺伝子群が存在する。21塩基phasiRNAがAGOに取り込まれる過程で、5'末端の塩基がシトシンであるphasiRNA (C-phasiRNAs)は、花粉母細胞(生殖細胞)特異的に機能するAGO (MEL1)に優先的に取り込まれる⁸⁾。一方、5'末端の塩基がウラシルであるphasiRNA (U-phasiRNAs)は、薬壁(体細胞層)の発生にも必要な因子として予測されている。薬壁と花粉母細胞の両方で発現するAGO1bとAGO1dは、U-phasiRNAに結合する^{9,10)}(図2B)。phasiRNAの1番目の塩基の特異性が、薬の体細胞層/生殖細胞のphasiRNA局在に重要であり、さらに、U-phasiRNAにはAGO1サブグループのAGO1b/dが、C-phasiRNAにはMEL1が結合し、MEL1, AGO1b, AGO1dの3種類のRNAサイレンシングの局在特異性とその組み合わせによって薬の発生が制御される。

4. phasiRNAの機能と環境応答

近年、イネやトウモロコシといった作物を中心に、薬phasiRNAの機能が報告されている。減数分裂期の花粉母細胞を用いたトランスクリプトームやRNAデグラドームの解析により、21塩基のC-phasiRNAはトランスに働き、標的mRNAを切断することが明らかとなった。これら21塩基C-phasiRNAが標的とするmRNAを過剰発現すると減数分裂異常が起きる。このことから、phasiRNAのターゲット切断を介したサイレンシングが、正常な減数分裂の進行に大きく関与していることが示唆される。また、21塩基のC-phasiRNAと結合するMEL1は、主に花粉母細胞の細胞質に局在が観察され、減数分裂レプトテン期の相同染色体対合に必須であることから、C-phasiRNAのトランス型サイレンシング機能による減数分裂前期の制御が示唆された^{11,12)}。

一方、U-phasiRNAの生成が減少する*miR2118*の変異イネでは、薬壁の細胞伸長の阻害が観察され最終的に花粉の発生に異常がみられ不稔を示す⁹⁾。生殖細胞発生異常や減数分裂停止にみられる*mell*の生殖細胞でのみの表現型とも異なっている。U-phasiRNAと結合するAGO1bとAGO1dタンパク質は、薬壁(体細胞層)および、花粉母細胞(生殖細胞)の両方で発現がみられる。一方、*AGO1b*と*AGO1d*のmRNAの発現は花粉母細胞で著しく低く、薬壁における強い特異的な発現がみられる。mRNAとタ

ンパク質の局在が異なることから、薬壁で翻訳されたAGO1b/dタンパク質が、U-phasiRNAのモバイルキャリアとして薬壁から花粉母細胞へ移動し発生を制御する可能性も示唆される¹⁰⁾(図2B)。AGO1b/d-U-phasiRNAは薬壁から体細胞層への動きを持った中での薬全体の発生制御に、一方、MEL1-C-phasiRNAは生殖細胞制御に関与しており、small RNAの薬における機能分化も示唆される。生殖細胞の発生は薬壁の発生と同調しており、薬壁の発生に異常を示す変異体では生殖細胞の発生にも異常がみられる。このことから、長らく非細胞自立性の生殖細胞発生機構が示唆されてきたが、薬壁と生殖細胞との細胞間コミュニケーションやモバイルタンパク質などその分子メカニズムは解明されていない。AGO1b/d-UphasiRNA複合体や*miR2118*の薬壁から花粉母細胞への非細胞自律性制御も示唆され、今後の細胞間移行・相互作用の研究展開が期待される。

トウモロコシの24塩基phasiRNAは、減数分裂前期に24-*PHAS*ゲノム領域のCHH DNAメチル化に影響を及ぼし、シス作用のサイレンシングが報告されている¹³⁾。興味深いことに、*rdr6*変異イネでは、21塩基small RNAが減少し、CHH DNAメチル化に影響を及ぼす24塩基small RNAが増幅される。さらに、減数分裂前期の組換えを促す二本鎖切断に異常がみられた¹⁴⁾。減数分裂は遺伝情報が次世代に受け継がれる重要なライフイベントであることから、phasiRNAと減数分裂をひもづけるエピジェネティックな制御機構は、植物の生殖メカニズムに新たな見識をもたらすと期待される。

phasiRNAの生殖機能において、環境応答との関連も非常に興味深い。移動できない植物にとって、厳しい環境においても生殖組織を正常に発生させ子孫を残す戦略が必要となる。phasiRNAのプロセッシングを担うトウモロコシDCL3b/5、トウモロコシMALE-ASSOCIATED ARGONAUTE-1/-2 (MAGO1/MAGO2)、イネRDR6、および、イネAGO1dの変異体は、温度に依存して薬の発生が異常となり雄性不稔を示す。温度に応答したphasiRNAの機能に加え、*mir2118*変異イネや21-*PHAS*遺伝子座に多型が生じたイネでは、一日の日の長さ(日長)に応答して不稔を示す^{7,9,15)}。このようにphasiRNAの生合成経路の因子群は、気温や日長に依存した生殖システムと強くリンクしている。環境に応答したphasiRNAの分子機構の解明は、厳しい環境条件下でも安定した収量を確保するための応用研究への展開も期待できる。

5. おわりに

植物の雄の生殖器官である薬の発生には、miRNA, phasiRNA, AGOの時空間的な制御が必要不可欠であることが示された。特に、MEL1とC-phasiRNA複合体は生殖細胞

の減数分裂前期に、トランス作用のサイレンシングに関与している。一方で、AGO1b/dとU-phasiRNAのサイレンシングの機能はまだ未解明である。しかし、葯壁（体細胞層）と生殖細胞においてAGO1b/dのmRNAとタンパク質との局在が異なること、また、変異体の表現型から洞察するに、非細胞自律型の発生制御への関与が示唆される。AGO-phasiRNAを介した体細胞と生殖細胞間コミュニケーションの分子メカニズム解明にも今後注目したい。

phasiRNAの前駆体となるlncRNAの生殖ステージ齊の転写制御には、多くの転写因子が関与することも報告されているが⁶⁾、*in vitro*の実験系では、転写因子が直接lncRNAの転写領域に結合することは確認できていない。1000種類を超えるlncRNAの時期特異的な転写制御の仕組みもまた興味深く、phasiRNAの機能解明と並行して、高等生物のゲノムの大部分を占める非コードゲノム領域の役割が明らかになることも期待される。

謝辞

0.5mmの葯のサンプリングからのRNA・タンパク質実験と、精力的に実験を進めている保日奈子氏、Holly Morris氏、そして3D-イメージングにとことんおつきあいでいただいている小泉好司氏に感謝申し上げます。本稿のイネRNAサイレンシング研究は、JST創発的研究支援事業（JPMJFR204U）、JSPS科研費（JP23H04752）および、内藤記念科学振興財団の支援を受けています。

文 献

- Long, J., Walker, J., She, W., Aldridge, B., Gao, H., Deans, S., Vickers, M., & Feng, X. (2021) Nurse cell-derived small RNAs define paternal epigenetic inheritance in *Arabidopsis*. *Science*, **373**, eabh0556.
- Komiya, R. (2017) Biogenesis of diverse plant phasiRNAs involves an miRNA-trigger and Dicer-processing. *J. Plant Res.*, **130**, 17–23.
- Johnson, C., Kasprzewska, A., Tennessen, K., Fernandes, J., Nan, G.L., Walbot, V., Sundaresan, V., Vance, V., & Bowman, L.H. (2009) Clusters and superclusters of phased small RNAs in the developing inflorescence of rice. *Genome Res.*, **19**, 1429–

- 1440.
- Liu, Y., Teng, C., Xia, R., & Meyers, B.C. (2020) PhasiRNAs in plants: their biogenesis, genic sources, and roles in stress responses, development, and reproduction. *Plant Cell*, **32**, 3059–3080.
- Araki, S., Tamotsu, H., & Komiya, R. (2022) 3D multiple immunostaining using whole male organs in rice. *Sci. Rep.*, **12**, 15426.
- Zhai, J., Zhang, H., Arikiti, S., Huang, K., Nan, G.L., Walbot, V., & Meyers, B.C. (2015) Spatiotemporally dynamic, cell-type-dependent premeiotic and meiotic phasiRNAs in maize anthers. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **112**, 3146–3151.
- Komiya, R. (2022) Spatiotemporal regulation and roles of reproductive phasiRNAs in plants. *Genes Genet. Syst.*, **96**, 209–215.
- Komiya, R., Ohyanagi, H., Niihama, M., Watanabe, T., Nakano, M., Kurata, N., & Nonomura, K. (2014) Rice germline-specific Argonaute MEL1 protein binds to phasiRNAs generated from more than 700 lincRNAs. *Plant J.*, **78**, 385–397.
- Araki, S., Le, N.T., Koizumi, K., Villar-Briones, A., Nonomura, K.I., Endo, M., Inoue, H., Saze, H., & Komiya, R. (2020) miR2118-dependent U-rich phasiRNA production in rice anther wall development. *Nat. Commun.*, **11**, 3115.
- Tamotsu, H., Koizumi, K., Briones, A.V., & Komiya, R. (2023) Spatial distribution of three ARGONAUTES regulates the anther phasiRNA pathway. *Nat. Commun.*, **14**, 3333.
- Nonomura, K., Morohoshi, A., Nakano, M., Eiguchi, M., Miyao, A., Hirochika, H., & Kurata, N. (2007) A germ cell specific gene of the ARGONAUTE family is essential for the progression of premeiotic mitosis and meiosis during sporogenesis in rice. *Plant Cell*, **19**, 2583–2594.
- Jiang, P., Lian, B., Liu, C., Fu, Z., Shen, Y., Cheng, Z., & Qi, Y. (2020) 21-nt phasiRNAs direct target mRNA cleavage in rice male germ cells. *Nat. Commun.*, **11**, 5191.
- Zhang, M., Ma, X., Wang, C., Li, Q., Meyers, B.C., Springer, N.M., & Walbot, V. (2021) CHH DNA methylation increases at 24-PHAS loci depend on 24-nt phased small interfering RNAs in maize meiotic anthers. *New Phytol.*, **229**, 2984–2997.
- Liu, C., Shen, Y., Qin, B., Wen, H., Cheng, J., Mao, F., Shi, W., Tang, D., Du, G., Li, Y., et al. (2020) *Oryza sativa* RNA-dependent RNA polymerase 6 contributes to double-strand break formation in meiosis. *Plant Cell*, **32**, 3273–3289.
- Lee, Y.S., Maple, R., Dürr, J., Dawson, A., Tamim, S., Del Genio, C., Papareddy, R., Luo, A., Lamb, J.C., Amantia, S., et al. (2021) A transposon surveillance mechanism that safeguards plant male fertility during stress. *Nat. Plants*, **7**, 34–41.

著者寸描

●小宮 怜奈（こみや れいな）



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イト（プロジェクトリーダー）。バイオサイエンス（博士）。

■略歴 2002年東北大学農学部卒業。04年同大学院修士課程修了。07年奈良先端科学技術大学院大学博士後期課程修了。日本学術振興会特別研究員・さきかけ研究者（兼任）等を経て14年より現職。

■研究テーマ 小宮の「small」と名のローマ字表記「REINA」

に、研究テーマとの縁を感じ、small RNAを含むNON-coding RNA群を軸に、植物の様々な生殖現象に着目して研究を進めています。

■ウェブサイト <https://groups.oist.jp/stg/reina-komiyama-phd>

■趣味 沖縄・鹿児島の高島巡り。