

機関番号：14603

研究種目：特定領域研究

研究期間：2006～2010

課題番号：18075010

研究課題名（和文） 胚乳発生過程におけるゲノム障壁の解析

研究課題名（英文） Genomic barriers during endosperm development

研究代表者

木下 哲 (KINOSHITA TETSU)

奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科・特任准教授

研究者番号：60342630

研究成果の概要（和文）：多くの被子植物において、胚乳発生異常が原因で種間の生殖隔離が生じることが知られている。我々は、胚乳におけるゲノム障壁（生殖隔離）の原因にゲノムインプリンティングが介在していると考え(GGS 2007)、シロイヌナズナを用いたその制御機構の解析と、イネ属種間交雑を用いてその検証をおこなった。その結果、制御機構としては FACT ヒストンシャペロンの構成因子の *SSRP1* がインプリンティングと DNA 脱メチル化に必要であることを示し (Dev. Cell 2011) 種間交雑では、インプリントされた構成因子をもつポリコーム複合体が関与しているだろうという仮説を考える様々な根拠を得た (Plant J. 2011)。

研究成果の概要（英文）：In plants, interspecific cross often display hybrid incompatibility in the endosperm. We speculated that epigenetic mechanisms such as genomic imprinting contribute to this phenomena (GGS 2007). In this project, we identified the fact that *SSRP1*, know as a component of FACT histone chaperon component, is required for DNA demethylation and activation of imprinted genes (Dev. Cell 2011). We also investigated endosperm development in the hybrid endosperm in rice, and identified that developmental alteration is the cause of hybrid incompatibility (Plant J. 2011).

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	16,800,000	0	16,800,000
2007 年度	15,500,000	0	15,500,000
2008 年度	15,500,000	0	15,500,000
2009 年度	15,500,000	0	15,500,000
2010 年度	15,500,000	0	15,500,000
総計	78,800,000	0	78,800,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学・植物分子生物・生理学

キーワード：生殖、エピジェネティクス、胚乳、DNA メチル化、ゲノム障壁、シロイヌナズナ

1. 研究開始当初の背景

研究開始当初までには、シロイヌナズナにおいて、*FWA* 遺伝子に代表されるいくつかのインプリント遺伝子が同定されていた。また、*FWA* 遺伝子をはじめ、*FIS2*, *MPC* 遺伝子が胚乳において母由来の対立遺伝子のみ発現するインプリンティング遺伝子であること、DNA

のメチル化により制御を受ける事が明らかにした (Kinoshita et al, Science 2004, Jullien Plant Cell 2006, Tiwari Plant Cell 2008)。しかしながら、その分子機構の詳細の多くは不明であった。

また、胚乳では多くの植物において父由来と母由来のゲノムが相反する機能を持って

いるとされ、胚乳発生を巡ってせめぎ合うことが知られていたが、その分子機構の一つにゲノムインプリンティングが挙げられるものの、その詳細は全く不明であった。

2. 研究の目的

胚乳におけるゲノム障壁を明らかにする目的の一環として、その原因となり得るゲノムインプリンティングの制御機構をシロイヌナズナを用いて明らかにするとともに、イネ属の種間交雑実験により、胚乳における生殖隔離に、ゲノムインプリンティングが介在しているかどうかを検証することを目的とした。

3. 研究の方法

インプリンティングの制御機構に関しては、これまでに同定した *FWA* 遺伝子とそのモデルとして、*FWA-GFP* のリポーターラインを構築した。さらにリポーターを持つ形質転換シロイヌナズナを EMS 変異源処理し、*FWA-GFP* が胚乳において発現しない表現型を指標に変異体を選抜した。得られた変異体 *alac1* (*alarm clock for FWA*) をマップベースでクローニングするとともにその詳細を解析した。

イネ属の種間交雑実験では、日本晴 (*O. sativa*) を母親に各種野生イネを父親にし、多くの組み合わせを試みた。その中から、日本晴と *O. punctata* 並びに、日本晴と *O. longistaminata* の組み合わせをモデルとして選抜した。種間交雑後の胚乳発生を細胞化のタイミング等を指標とし、また *OsMADS87* 遺伝子等の発現を指標に詳細に解析した。

4. 研究成果

ゲノムインプリンティングの制御機構に関しては、*FWA* インプリント遺伝子は、5' 領域に存在する SINE レトロトランスポゾン由来のシス領域の DNA メチル化によって遺伝子発現のオンとオフが決定されることを明らかにした (Kinoshita Y. et al, 2007, Fujimoto R. et al, 2008)。このシス制御領域を含むリポーターの発現を指標に、*FWA* を活性化できない変異体を選抜した。そのうちのひとつ *alac1* (*alarm clock for FWA*) をマップベースで遺伝子クローニングした結果、FACT と呼ばれるタイプのヒストンシャペロンの構成因子 *SSRP1* をコードする遺伝子が原因であることが明らかになった。詳細な解析の結果、*alac1/ssrp1* 変異体は、*FWA* のみならず、*MEDEA*, *FIS2* といった他のインプリント遺伝子の活性化にも影響しており、また *FWA* のシス制御領域の DNA 脱メチル化にも影響することが明らかになった (Ikeda et al, Dev. Cell 2011)。

イネ属を用いた種間交雑実験では、詳細な

解析から、日本晴と *O. punctata* の組み合わせでは、胚乳発生の亢進がおこり、細胞化、デンプン粒の蓄積等が早まることを明らかにした。結果として、胚乳核の分裂が不十分なまま、胚乳細胞が成熟してしまうため胚乳が小さくなることが理解された。一方、日本晴と *O. longistaminata* の組み合わせでは、逆の現象が観察された。すなわち、胚乳発生の著しい遅延がおこり、細胞化やデンプン粒の蓄積が観察されず、多核体のまま分裂を続けるため胚乳が肥大し致死性を示すことが明らかとなった。これと似たような表現型はシロイヌナズナのポリコム複合体の構成因子の変異体にも観察される。また、イネ種間交雑ではポリコム複合体の標的遺伝子と考えられる *OsMADS87* 遺伝子が胚乳発生の変化と関連した発現パターンを示すことから、これらの現象を説明する鍵因子はポリコム複合体である可能性が浮かびあがった (Ishikawa et al, Plant J. 2011)。

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 10 件)

1. Ikeda, Y., Kinoshita, Y., Susaki, D., Ikeda, Y., Iwano, M., Takayama, S., Higashiyama, T., Kakutani, T. and Kinoshita, T. HMG domain containing SSRP1 is required for DNA demethylation and genomic imprinting in Arabidopsis. *Dev. Cell* 13: 589-596, 2011 査読有
2. Ishikawa, R., Ohnishi, T., Kinoshita, Y., Eiguchi, M., Kurata, N., Kinoshita, T. Rice interspecies hybrids show precocious or delayed developmental transitions in the endosperm without change to the rate of syncytial nuclear division. *Plant J.* 65:798-806, 2011 査読有
3. Ishikawa, R., and Kinoshita, T. Epigenetic programming: The challenge to species hybridization. *Molecular Plant* 2:589-599, 2009 査読有
4. Fujimoto, R., Kinoshita, Y., Kawabe, A., Kinoshita, T., Takashima, K., Nordborg, M., Masrallah, M.E., Shimizu, K.K., Kudoh, H., and Kakutani, T., Evolution and control of imprinted *FWA* genes in the genus *Arabidopsis*. *Plos Genetics* 4:e100048, 2008 査読有
5. Kinoshita, T., Ikeda, Y., and Ishikawa, R., Genomic Imprinting: A balance between antagonistic roles of

- parental chromosomes. *Seminars in Cell and Dev. Biol.* 19:574-579, 2008 査読有
6. Tiwari, S., Schulz, R., Ikeda, Y., Dytham, L., Bravo, J., Mathers, L., Spielman, M., Guzman, P., Oakey, R.J., Kinoshita, T., and Scott, R.J., MATERNALLY EXPRESSED PAB C-TERMINAL, a Novel Imprinted Gene in *Arabidopsis*, Encodes the Conserved C-Terminal Domain of Polyadenylate Bindeing Proteins. *Plant Cell* 20:2387-2398, 2008 査読有
 7. Ikeda, Y., and Kinoshita, T., DNA demethylation: a lesson from the garden. *Chromosoma* 118: 37-41, 2009 査読有
 8. Kinoshita, T., Reproductive Barrier and Genomic Imprinting in the Endosperm of Flowering Plants. *Gene & Genetics System* 82, 177-186, 2007 査読有
 9. Kinoshita, Y., Saze, H., Kinoshita, T., Miura, A., Soppe, W.J., Koorneef, M., and Kakutani, T., Control of *FWA* gene silencing in *Arabidopsis thaliana* by SINE-related direct repeats. *Plant J.* 49, 38-45, 2007 査読有
 10. Jullien, P.E., Kinoshita, T., Ohad, N., and Berger, F. Maintenance of DNA methylation during the life cycle is essential for parental imprinting. *Plant Cell* 18, 1360-72, 2006 査読有
- [学会発表] (計 26 件)
1. 関根大輔、大西孝幸、古海弘康、倉田のり、木下哲 (2012) イネの胚乳発生・サイズを制御する父・母ゲノムの効果 日本育種学会第 121 回講演会 3 月 29 日、栃木
 2. Ishikawa, R., Ohnishi, T., Kinoshita, Y., Eiguchi, M., Kurata, N., and Kinoshita, T., Epigenetic Control of Species Hybridization in Plant Endosperm Speciation and Adaptation II - Environment and Epigenetics 愛知 岡崎カンファレンスセンター, 3 月 22 日 2012
 3. 関根大輔、大西孝幸、古海弘康、吉野みほ子、倉田のり、木下哲 (2012) イネの倍数体間交雑における胚乳発生異常の解析第 53 回植物生理学会、3 月 16 日、京都
 4. 大西 孝幸、関根 大輔、木下哲 (2012) 一過的な高温処理による胴割れ米の発生機構 日本育種学会第 121 回講演会、3 月 29 日、栃木
 5. 中村みゆき、木下由紀、木下哲 (2012) 細胞質性鉄硫黄クラスターアセンブリ経路の因子は正常な種子形成に必須である第 53 回植物生理学会、3 月 16 日、京都
 6. Nakamura, M., Kinoshita, Y., and Kinoshita, T., Cytosolic electron transfer component-like protein deficiency impaired expression of imprinted gene *FWA* in the endosperm International Conference on Arabidopsis research Wisconsin U. S. A. Jun. 24. 2011
 7. Buzas, D., Kinoshita, Y., Sugimoto, Y., and Kinoshita, T., Initial Characterization of Alarm Clock for *FWA* imprinting 4. Gordon Research Conference Boston U. S. A. Aug. 8. 2011
 8. 大西 孝幸、山川 博幹、木下哲 (2011) イネ屋内栽培系の開発 日本遺伝学会第 83 回大、9 月 20 日、京都
 9. 塚谷裕一、木下哲 (2010) ゲノムの要素が重なる時に何が起きるのかー植物科学からのアプローチ 第 33 回日本分子生物学会年会 兵庫 神戸ポートピアランド 12 月 9 日 (シンポジウム主催)
 10. 渡辺正夫、木下哲 (2010) ゲノム間の軌轢と調和が生物多様性を生み出す分子機構 日本遺伝学会第 82 回大会 札幌 北海道大学 9 月 20 日 (シンポジウム主催)
 11. 大西孝幸、石川亮、山川博幹、木下哲 (2010) イネのバイオトロン Breeding System ; 年 6 度の戻し交配法 日本育種学会第 118 回講演会 秋田大学 9 月 25 日
 12. 石川亮、大西孝幸、永口貢、倉田のり、木下哲 (2009) 胚乳におけるエピジェネティック制御を介した生殖隔離 第 32 回日本分子生物学会 パシフィコ横浜 12 月 11 日
 13. 木下哲 (2009) シロイヌナズナにおけるアラームクロック遺伝子によるゲノムインプリンティングと DNA 脱メチル化の制御 第 82 回日本生化学会 神戸ポートアイランド 10 月 24 日
 14. 池田陽子、木下由紀、池田有理子、木下哲 (2009) マイクロアレイを用いた新規インプリント遺伝子の探索 日本植物学会 73 回大会 山形 9 月 18 日
 15. 木下哲 (2009) アラームクロック遺伝子によるゲノムインプリンティングの覚醒 日本植物学会 73 回大会 山形 9 月 19 日
 16. 池田陽子、木下由紀、池田有理子、角谷徹仁、木下哲 (2009) シロイヌナズナに

- おけるインプリント遺伝子 FWA の DNA 脱メチル化と転写活性化 第三回エピジェネティクス研究会 東京医科歯科大学 5月23日 年会長賞受賞講演
17. 木下 哲 (2009) シロイヌナズナ ALARM CLOCK1 はゲノムインプリンティングの確立に関与する 第三回エピジェネティクス研究会 東京医科歯科大学 5月22日
 18. Ikeda, Y., Kinoshita, Y., Ikeda, Y., Kakutani, T., and Kinoshita, T., (2009) Critical role of *ALAC1* chromatin related gene in establishment of genomic imprinting and DNA demethylation in *Arabidopsis*. ISPMB, St Louis, Oct. 25 U.S.A
 19. Kinoshita, T., Establishment of genomic imprinting by *ALARM CLOCK* genes in *Arabidopsis*. EMBO Workshop, Sep. 22, 2008 Singapore
 20. Ikeda, Y., Kinoshita, Y., Kakutani, T., and Kinoshita, T., Control of genomic imprinting by *ALARM CLOCK1* gene in *Arabidopsis*. Frontiers of Sexual Plant Reproduction III, Oct. 17, 2008, Arizona
 21. Kinoshita T. (2007) Mechanism of Genomic Imprinting in Arabidopsis Global COE Symposium at NAIST Oct. 19
 22. 木下 哲 (2007) 植物におけるゲノムインプリンティングの同定とその制御機構に関する研究 第48回日本植物生理学会 愛媛大学 3月29日
 23. 木下 哲 (2006) 植物のゲノムインプリンティングと胚乳の生殖隔離機構 インターゲノミクス研究会 神戸大学 12月18日
 24. 木下 哲 (2006) 植物のゲノムインプリンティング機構 日本植物学会フォーラム 名古屋 12月6日
 25. 木下 哲 (2006) ゲノムインプリンティングと生殖隔離機構 日本進化学会 2006年大会シンポジウム 東京 8月30日
 26. Kinoshita T., Kinoshita Y. and Kakutani T. Control of imprinted FWA gene in Arabidopsis endosperm Genomic Imprinting Workshop, Tokyo, Nov. 31

[図書] (計4件)

1. 木下 哲 ゲノムに刷り込まれた生殖隔離機構 ゲノムが開く生態学 種生物学研究 p141-155 文一出版 (2011)
2. 木下 哲 中村みゆき エピジェネティクス ゲノムが開く生態学 種生物学研究 p109-122 文一出版 (2011)

3. 池田 陽子 木下 哲 HMG 遺伝子 SSRP1 はシロイヌナズナにおける DNA 脱メチル化およびゲノムインプリンティングに必要である 細胞工学 学研メディカル秀順社 (2011)
4. 星野 敦、木下 哲 (2007) 反復配列・DNA メチル化により制御される植物の生命現象 化学と生物 45 119-125

[その他]

ホームページアドレス

<http://bsgcoe.naist.jp/special-grp02.html>

新聞報道 (計7件)

1. 科学新聞 2011年9月16日 ロックされた遺伝子の活性化の必要な因子同定
2. 日経産業新聞 2011年9月13日 DNAのメチル化制御物質、植物で特定
3. 日刊工業新聞 2011年9月13日 脱メチル化で遺伝子活性化 関与たんぱく質特定
4. 科学工業日報 2011年9月13日 遺伝子活性化で新因子
5. 日経産業新聞 2011年1月20日 イネの室内栽培 期間半減
6. 化学新聞 2010年10月1日 イネの1世代あたり2カ月の促進栽培法
7. 読売新聞 2010年9月25日 イネの1世代あたり2カ月の促進栽培法

6. 研究組織

(1) 研究代表者

木下 哲 (KINOSHITA・TETSU)
奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科・特任准教授
研究者番号：60342630