

令和 2 年 6 月 8 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2016～2018

課題番号：16H04861

研究課題名(和文) イネ胚乳におけるアリユロンおよびデンプン性胚乳細胞分化メカニズムに関する研究

研究課題名(英文) Studies on the mechanisms for starchy endosperm and aleurone cell differentiation in rice endosperm

研究代表者

服部 束穂 (Hattori, Tsukaho)

名古屋大学・生命農学研究科・教授

研究者番号：10164865

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,200,000円

研究成果の概要(和文)：私たちの重要な食料であるコメはイネの種子の胚乳という組織にあたる。胚乳の組織は主にほぼ全体を占める澱粉性胚乳細胞(SE)と一番外側のほぼ1細胞層のみを占める糊粉層細胞(AL)からなる。このような2種類の細胞が分化するメカニズム、わかりやすく言えばコメの細胞が分化する仕組みを解明するために、ALが多層化したり、SE組織の中にAL細胞が異常分化してしまう変異体を解析した。その結果、正しく2種類の細胞が分化するためには、統制のとれた細胞分裂と増殖が必須であることがわかった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究での成果は、SE細胞の生成、すなわちコメの細胞形成と充実という食糧生産に関わる極めて重要な生物現象のメカニズムの一端を明らかにした点において社会的意義がある。細胞分裂の向きによって同質の娘細胞を生ずる等分裂と異なる運命を生み出す不等分裂が起こるとい現象を解明に寄与する成果でもある点で学術的意義がある。

研究成果の概要(英文)：The rice grain as our important food corresponds to the endosperm of rice seed. Rice endosperm consists two types of tissues, namely starchy endosperm (SE) and the aleurone layer(AL). SE occupies the most of inside portion of the endosperm, whereas AL is mostly single cell layered tissue and positioned at the periphery of the endosperm. This research investigated the mechanisms whereby the two types of cells differentiate, using two newly screened mutants; one having extra cell layers of AL and the other forming ectopic AL-like cells in SE region. The results indicated that precise regulation of cell division and proliferation was essential for proper differentiation of the two cell types.

研究分野：植物分子遺伝学

キーワード：イネ 胚乳 細胞分化 運命特定 変異体

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

私たちがコメとして食べるイネ種子の胚乳は、主に、デンプン性胚乳 (SE) と最外層にあるアリュuron層 (AL) から構成されているが、両組織の細胞は極めて異なる性質を持つ。SE 細胞は肥大し不規則な形をしているのに対し、AL 細胞は比較的小さく規則正しい形をした細胞で厚い細胞壁をもち、油脂を多量に貯蔵する。背側維管束側の”modified” AL (mAL) 部分を除き、AL は、殆ど 1 細胞層に限られている。イネの胚乳を構成する細胞の大部分は外側数細胞層の分裂によって供給されるが、最外層以外の細胞分裂では常に SE 細胞に分化する細胞が生じる。しかし最外層細胞が並層分裂すると、生じた内側娘細胞は SE 細胞に、外側娘細胞は AL 細胞へ分化する運命を保つ。AL 分化が進んで並層分裂した場合には AL が 2 細胞層になることから、分裂能をもつ未熟 AL 細胞が並層分裂すると内側娘細胞は SE に分化転換すると思われる。一方、垂層分裂によって生じた娘細胞はどちらも同じように AL 細胞に分化する運命を保つ。すなわち胚乳最外層での細胞分裂において、垂層分裂は同じ運命を持つ娘細胞を生じる等分裂、並層分裂は異なる運命を持つ不等分裂を行っていることになる。胚乳最外層の細胞分裂ではこのように極めて興味深い細胞の運命特定と分化が起こっているが、その分子メカニズムに関する知見は乏しく、しかも得られている知見の殆どがトウモロコシにおける研究によるものである。

トウモロコシでは、AL/SE の運命特定・分化に関する遺伝子が分子遺伝学的に幾つか同定されている。その一つ *DEK1* は、膜局在のカルパイン様プロテアーゼをコードし、その変異体は胚乳最外層細胞が SE に分化する。*DEK1* のイネオルソログの変異体 *adaxialized leaf1 (adl1)* は葉の裏面が表化する変異体として同定されており、やはり最外層が SE 化する。葉の表皮に異常がある変異体として同定されたトウモロコシ *cr4* も最外層がパッチ状に SE 化し、原因遺伝子は受容体型キナーゼをコードする。*sal1* はアリュuron層が多層化する変異体として同定されたもので、液胞輸送受容体をコードする。*dek1* は *sal1* に対して遺伝学的に上位であること、*SAL1* および *CR4* は細胞内で共局在がみられることなどから、これらが同じ経路で働いていると予想されている。しかし、これらがどのように SE/AL の運命特定・分化に結びつくかについての核心に迫る知見はない。

### 2. 研究の目的

上述のようにイネ種子の胚乳形成過程における最外層細胞の並層分裂では、生じた娘細胞のうち内側に配置されたものは SE に分化する運命をもつが、外側娘細胞は同じ性質を保ち AL に分化していく。このような細胞運命特定の分子メカニズムを明らかにすることが本研究の目的である。そのために、我々が新規に同定した AL が複層化する変異体 *abnormal aleurone layer1 (aal1)* 変異体、ならびに AL 細胞が SE 領域に異所形成される *aal2* 変異体の詳細な表現型解析、ならびにその原因遺伝子同定および分子機能の解明をすすめる。

### 3. 研究の方法

日本晴背景の *aal1* 変異体の原因遺伝子候補の同定は、コシヒカリとの交雑 F2 集団を用いたマーカーマッピングと野生型日本晴へのバッククロス F2 集団の変異ホモ型個体の DNA プールを NGS 解析する MutMap 法により行った。*aal2* (コシヒカリ背景) の変異原因遺伝子も同様な方法で行った。野生型および *aal1* 変異体胚乳のトランスクリプトーム比較は、受粉後 7 日目の子房より摘出した胚乳から抽出した全 RNA を Ribo-Zero™ 処理して rRNA を除去したものを鋳型に cDNA ライブラリーを作成し、RNA-seq 解析に供することにより行った。その他は一般的な組織学、分子生物学および細胞生物学的手法を用いた。

### 4. 研究成果

#### (1) *aal1* 変異体の原因遺伝子同定と遺伝子機能の解析

*aal1* 変異体での AL 多層化の原因を組織学的に解明するために、完熟種子および開花後 3 - 21 日目 (3 - 21 DAF) の胚乳を PI 染色し共焦点レーザー顕微鏡を用いて観察を行った。その結果、胚乳発達過程において変異体では並層分裂方向の細胞増殖が野生型よりも長く続き、細胞伸長 (肥大) が鈍っていることがわかった。このことから、*AAL1* は胚乳発生過程の中で細胞増殖と分化速度の均衡の制御に関与することが予想された。

次世代シーケンサと遺伝的マッピングによる解析により原因遺伝子候補を 1 つに絞り込んだ。この候補遺伝子について CRISPR/Cas9 による機能欠損変異アレル作出したところ胚乳における AL の多層化の様子や植物体の表現型 (幼植物が白色で遅延して緑化する表現型) が *aal1* 変異と酷似していたこと、さらに同様の表現型を示す新たな変異体系統を同定し原因遺伝子候補を塩基配列解析を行ったところ機能喪失を予見できる変異が見つかったことから、この遺伝子が原因遺伝子であることを確定した。*AAL1* は、プラスチドゲノムの転写に中心的な役割を果たすタンパク質をコードしていた。このことは幼植物が白色であるという表現型と合致している。

7 DAF の胚乳のトランスクリプトームを RNAseq により比較したところ、*aal1* で顕著に発現減少していたものには、SE 分化の指標となる胚乳貯蔵タンパク質遺伝子群が、また、顕著に発現上

昇した遺伝子には Cyclin B2 などの細胞周期に関わる遺伝子が有意に多く含まれていた。したがってこのステージの変異体の胚乳では、細胞増殖が活発な一方 SE の分化が遅延していると判断された。

以上の結果から、AL 細胞の運命をたどる細胞を胚乳の最外層 1 層にとどめておくためには、細胞分化と細胞増殖の緊密な制御が必要であり、何らかの形で正常なプラスチドゲノムの転写が必要であること、言いかえると、そこにはレトログレードシグナリングが働いていることが示唆された。

## (2) *aal2* 変異体の原因遺伝子同定と遺伝子機能の解析

*aal2* の示す異所的 AL 様細胞の様態を樹脂切片や共焦点レーザー顕微鏡を用いて詳細に観察した。異所的 AL 様細胞は、SE 領域の中心部から縁辺部まで様々な部位で観察された。何れの場合も周囲の SE 細胞とは形態が異なる細胞クラスターを形成していたことから、何らかの細胞増殖制御の異常により本来 SE に運命特定された、あるいはされるべき細胞が AL 運命に転換されその子孫細胞がさらに増殖してクラスターを形成したものと考えられた。実際、胚乳発達の比較的初期の共焦点レーザー顕微鏡観察においては、異常な分裂細胞のクラスターが観察された。これらの結果からは、AL/SE 運命特定における位置情報の細胞による解釈は統制のとれた細胞分裂の上に成り立っていることが示唆される。

興味深いことに、このような細胞クラスターのなかには、AL 様細胞と SE 様細胞のセクターからなるものが見られた。また、周辺に 1~2 層の AL 様細胞が配置され内部が SE 様細胞で占められている「ミニ胚乳」構造を示すクラスターも頻繁に観察された。通常の胚乳形成においては、胚乳最外層の細胞が AL への分化を開始しても、その並層分裂により生じた内側娘細胞は SE 運命へと転換するとされている。このような「ミニ胚乳」構造は、細胞増殖異常により一旦 AL に運命転換した細胞の小集団において、その分裂により生じた内部細胞が、通常の最外層並層分裂の場合のように、再び SE 運命に転換されることによって生じたものと推察された。通常最外層とその内側を区別する情報は外側に何も無いことに由来するとされているが、変異体におけるミニ胚乳の形成はこの原則に反している。したがってこのような観察結果は、内外という位置情報の本質を理解する上で何らかの有益な情報を与えることになるものと期待される。

次世代シーケンサと遺伝的マッピングによる解析により、*aal2* 変異原因遺伝子候補を第 1 染色体短腕末端付近に存在する遺伝子 1 つに絞り込んだ。見つかった変異は塩基置換変異で、候補遺伝子内の 5' 非翻訳領域内にあったが、*in silico* 解析と文献情報から *telo-box* と呼ばれる、ペプチド伸長因子、リボソームタンパク質、リボソームプロセシングタンパク質、ならびに細胞周期関連遺伝子の主に 5' 非翻訳領域あるいは転写開始付近に頻繁に存在する転写のシスエレメント配列と合致する配列内に存在していた。実際この遺伝子の発現を定量 RT-PCR により調べると、その転写産物レベルは野生型のものに比べ顕著に低下していた。また、CRISPR/Cas9 法により、野生型アレルの *telo-box* 内に変異を導入すると *aal2* 表現型が確認された。これらの結果から、この遺伝子が *aal2* の原因遺伝子であることが確定されるとともに、この 5' UTR に存在する *telo-box* 配列が実際にシスエレメントとして機能していることが明らかとなった。

AAL2 タンパク質は植物のみに存在するタンパク質で、その機能に関する情報は多くはないが、シロイヌナズナではそのオルソログが rRNA のプロセシング複合体の構成要素と相互作用するとの報告がある。この情報をもとに、一過的発現系を用いて BiFC 実験をおこなったところ、イネの対応タンパク質同士での相互作用が確認できた。また、AAL2 タンパク質と YFP の融合タンパク質を一過的発現系およびトランスジェニック植物で発現させると核小体に局在することがわかった。このことは ALL2 が rRNA プロセシング複合体構成要素と相互作用するという結果と一致する。イネゲノムには他の AAL2 パラログは存在せず、一方で CRISPR/CAS9 で作り出した機能欠損変異ホモ型個体は葯の発達異常は示すものの、正常に生育することから、rRNA プロセシングにおける必須因子であるとは考えにくく、rRNA 合成の何らかの調節因子である可能性が考えられる。また、この相互作用が AAL2 の唯一の作用様式ではなく、*aal2* の胚乳表現型からは細胞増殖の制御因子である可能性も想定しうる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計16件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 1件）

1. 発表者名 李萌、加藤大和、Insun Yoon、小林裕子、小林一成、武田真、服部束穂
2. 発表標題 NGS を用いた穂発芽極易イネ品種Gopum の低休眠性原因遺伝子の究明.
3. 学会等名 イネ遺伝学・分子生物学ワークショップ2016（名古屋）
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 李萌、Insun Yoon、加藤大和、小林裕子、小林一成、武田真、服部束穂
2. 発表標題 NGSを用いた穂発芽極易イネ品種Gopumの低休眠性原因遺伝子の解析.
3. 学会等名 第37回種子生理生化学研究会年会（南あわじ）
4. 発表年 2016年

1. 発表者名 加藤大和、小林裕子、小林一成、北野英己、武田真、服部束穂
2. 発表標題 異所的なアリューロン様細胞を生じるイネ新規変異体abnormal alueurone layer 2の解析
3. 学会等名 日本育種学会第134回講演会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 加藤大和、深井麻央、阿南秀、佐藤豊、志水佐江、北野英己、小林裕子、小林一成、武田真、服部束穂
2. 発表標題 イネ胚乳の発生におけるプラスチドシグナリングの関与
3. 学会等名 第60回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 加藤大和, 小林裕子, 小林一成, 北野英己, 武田真, 服部束穂
2. 発表標題 イネ胚乳変異体の分子遺伝学的解析.
3. 学会等名 第61回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 服部束穂
2. 発表標題 「コメのいいところ」
3. 学会等名 国立遺伝学研究所研究会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 鈴木俊哉, 伊澤康太郎, 高藤良典, 服部束穂, 野坂実鈴, Kim Nhung Ta, 佐藤(志水)佐江, 佐藤豊
2. 発表標題 イネ胚乳形成過程における細胞の分裂と分化に異常を示すabnormal cell division 1 (abc1) 突然変異体の解析
3. 学会等名 日本育種学会第137回講演会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 高藤良典, Kim Nhung Ta, 鈴木俊哉, 佐藤(志水)佐江, 高橋(野坂)実鈴, 佐藤豊, 木村若菜, 大岩徹郎, 武田真, 服部束穂
2. 発表標題 イネ胚乳発生過程における細胞運命特定機構について
3. 学会等名 日本育種学会第137回講演会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分担 者	武田 真  (Takeda Shin)  (00432253)	名古屋大学・生物機能開発利用研究センター・准教授   (13901)	