

平成30年6月1日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2016～2017

課題番号：16K14903

研究課題名（和文）胚乳発達制御に関わる父性インプリント遺伝子の探索

研究課題名（英文）Search for paternally expressed imprinted genes regulating endosperm development

研究代表者

高山 誠司（TAKAYAMA, Seiji）

東京大学・大学院農学生命科学研究科（農学部）・教授

研究者番号：70273836

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 2,900,000円

研究成果の概要（和文）：胚乳発達を制御する父性インプリント遺伝子の同定を目的として探索を進めた。

1．母性インプリント遺伝子とのコンフリクトに着目した探索：シロイヌナズナCol-0株に各種野生系統の花粉を受粉させて得た種子の多様性を指標にGWASを行い、種子サイズに影響を与える複数の遺伝子座と、複数の父性インプリント遺伝子候補を同定した。

2．DNAメチル化による発現制御に着目した探索：目的とする遺伝子の発現のDNAメチル化依存性に着目し、DNAメチル化変異株のトランスクリプトーム解析データをもとに候補遺伝子を抽出した。さらに、epiRIL系統との交配データをもとに種子サイズに影響を与えるメチル化ゲノム領域を絞り込んだ。

研究成果の概要（英文）：This project aims to identify paternally expressed imprinted genes that regulate endosperm development. We searched for these genes through the following strategies.

1. Search based on the conflict between maternal and paternal genomes: When *Arabidopsis thaliana* Col-0 strain was crossed with other natural *A. thaliana* strains, the obtained F1 seeds exhibited high phenotypic variation in size. A genome-wide association study of seed size identified some associated loci, in which some paternally expressed genes were located.

2. Search based on the gene expression dependent on DNA methylation: The expression of target genes is suggested to be dependent on DNA methylation. The comparative pollen transcriptome analysis of wild type and a DNA methylation mutant identified several candidate genes. Furthermore, the analysis of F1 hybrids between wild type and epiRIL lines identified some loci that affect seed size dependent on DNA methylation.

研究分野：細胞間情報学

キーワード：植物 遺伝子 発生 生殖 ゲノムインプリンティング 胚乳

1. 研究開始当初の背景

種子のサイズは植物種毎に極めて多様である。このサイズは種子数や発芽後の生存率に直結するため、個々の種は進化の過程で自らの生存をかけて至適の種子サイズを選択したと推察されるが、その分子基盤はほとんど明らかにされていない。

種子サイズに影響を与える要因として、胚乳の発達を挙げることができる。被子植物では、重複受精により2つの精細胞が卵細胞と中央細胞にそれぞれ受精し、前者は次世代の胚となり、後者は胚へ養分を送るための胚乳となる。胚乳は、受精後に急速に核分裂を繰り返して、多核体を形成した後に、核が細胞壁で仕切られることで細胞化し、胚乳の拡大は停止する(文献)。種子の胚乳部分の大きさは細胞数に依存し、また一旦細胞化した後は細胞分裂を行わないため、細胞化が遅くなると胚乳は大きくなり、逆に細胞化が早ければ胚乳は小さくなる傾向にある。

これまでに倍数性が異なる植物を用いた相互交配実験により、胚乳発達に対して、父性ゲノムと母性ゲノムが拮抗的に作用することが報告されている。すなわち、父方にゲノムを倍化させた株を用いると胚乳の細胞化が遅れて種子が大きくなること、逆に母方にゲノムを倍化させた株を用いると胚乳の細胞化が早まり種子が小さくなることが報告されている(文献)。この胚乳の発達に対する両親のゲノムの拮抗的な作用は、哺乳類の胎盤の発達におけるインプリント遺伝子の作用と対比され、進化理論上のコンフリクト仮説とあいまって多くの議論をよんできた。すなわち、哺乳類では、父性インプリント遺伝子は胎盤の発達に促進的に働く一方、母性インプリント遺伝子は逆に胎盤の発達を抑制することが示されており(文献)。植物の胚乳発達にもゲノムインプリンティングが関わる可能性が強く示唆されてきた。実際、シロイヌナズナにおいて母性インプリント遺伝子として *MEDEA* (*MEA*) 遺伝子が知られ(文献)、*mea* 変異体を母方にして野生株の花粉と受精させると、通常受精後7日目に起きる細胞化が10日経っても起きず、核分裂および胚乳発達が過剰となり、種子崩壊が起きることが報告されている(文献)。従って、*MEA* は胚乳の発達に抑制的に働く母性インプリント遺伝子であると考えられている。*MEA* はポリコム複合体の構成因子をコードし、同様な表現型を示す変異体の原因遺伝子の *FIS2*、*FIE* も同一複合体の構成因子をコードすることが示されている(文献)。

一方、父方に DNA メチル化レベルが低下した *met1* 変異体あるいは *ddm1* 変異体の花粉を用い、野生株と交配させると、得られる種子は野生株と比較して、小型化することが知られている(文献)。この現象には、胚乳の発達を促進する父性インプリント遺伝子の関与が考えられ、DNA メチル化の欠如

により、その発現が失われると予測されている。実際、DNA メチル化が発現に必要な父性インプリント遺伝子の存在も知られてきている。また、前述のように、*mea* 変異株を母方に用いて野生株の花粉と交配すると胚乳の過発達が起こり種子が崩壊するが、父方に *MET1* の発現抑制体の花粉を用いると、崩壊が回避されることも知られている(文献)。この現象は、*mea* 変異による過剰な胚乳発達に対し、胚乳発達を促進する父性インプリント遺伝子の発現も抑制されることで、両者のバランスが回復すると考えることが可能であるが、分子機構の詳細は明らかにされていない。

2. 研究の目的

本研究では、(1) 母性インプリント遺伝子とのコンフリクト、(2) DNA メチル化による発現制御、という本遺伝子に期待される2つの性状に着目した独自の探索により、胚乳発達を正に制御する父性インプリント遺伝子の同定を目指した。

3. 研究の方法

目的とする父性インプリント遺伝子に期待される2つの性状に着目し、以下の2方向から探索を進めた。

(1) 母性インプリント遺伝子とのコンフリクトに着目した探索

シロイヌナズナには多数の野生系統が存在し、ゲノム配列解析も進んでいる。これら系統間交配により得られた種子は、自殖種子と比較して大きさが変化することが一部の系統で報告されている(文献)。また、我々もシロイヌナズナの野生系統間交雑により得られた F₁ 種子が親とは異なる多様な種子サイズを示すことを見出ししてきた。これは、個々の系統内で適度に調整されてきた父性・母性インプリント遺伝子の活性バランスが、雑種にすることで崩れたことに起因する可能性が推察された。そこで、母系統を Col-0 株に固定し、父系統に多様な野生株を交配させて得た F₁ 種子のサイズの多様性を指標とする全ゲノム関連解析(GWAS)を行い、種子サイズに影響を与える遺伝子座の特定を目指した。

(2) DNA メチル化による発現制御に着目した探索

シロイヌナズナにおける母性インプリント遺伝子の発現には、脱メチル化酵素 *DEMETER* による DNA 脱メチル化が関与することが示されている(文献)。一方、父性インプリント遺伝子の1つである *PHERES1* の発現には、3'非翻訳領域の DNA メチル化の維持が発現に必要であることが示されている(文献)。前述の *met1* 変異体や *ddm1* 変異体を用いた解析でも、目的とする胚乳発達を正に制御する父性インプリ

ト遺伝子の発現にも DNA メチル化状態の維持が重要であることが示唆される。我々は *met1* 変異株の花粉において複数の父性インプリント遺伝子が発現低下を示すことを見出し、これらの中から目的遺伝子候補を絞り込むことを目指した。

4. 研究成果

胚乳発達を制御する父性インプリント遺伝子の同定を目的として、研究実施計画に掲げた以下の2つの方向から探索を進め、候補遺伝子を同定した。

(1) 母性インプリント遺伝子とのコンフリクトに着目した探索

シロイヌナズナ野生系統株間で交雑して得られる種子のサイズの多様性に着目した GWAS を行った。

まず、母方系統 Col-0 の雌ずいに対し、計 165 の野生系統の花粉を受粉させ、得られた種子のサイズを画像処理により計測し、GWAS に供した。しかし、種子サイズが同じ Col-0 同士の自殖種子でも測定条件によって大きく変化することが判明した。特に、母方系統の植物体の生育状況と一さや当たりの種子数の影響を強く受けることが判明した。さや当たりの種子数と種子サイズにはトレードオフの逆相関の関係が認められる一方、種子数を人為的に制御することは困難であることが判明した。

そこで、父方の野生系統の花粉を受粉させる際に蛍光標識した母方系統 Col-0 の花粉も同時に受粉し、1 つのさやの中で蛍光標識された自殖種子を内部標準として雑種の種子サイズを相対値として求める処理を行うことにした。その結果、生育環境や種子数の影響を抑えて、遺伝的要因に起因する種子サイズ変化を追求することが可能となった。

実際、GWAS により種子サイズに影響を与える複数の遺伝子座の存在が示唆された。当該領域には、胚乳において父方特異的発現を示す複数のインプリント遺伝子の存在が確認され、現在胚乳発達制御への関与を検証中である。

(2) DNA メチル化による発現制御に着目した探索

目的とする父性インプリント遺伝子の発現には、DNA メチル化の維持が必要である可能性が示唆されていたため、まず DNA メチル化に関わる遺伝子の変異株について、花粉のトランスクリプトーム解析を実施した。野生株と比較して発現が有意に低下している遺伝子を抽出したところ、多くの父性インプリント遺伝子が含まれることが判明した。

そこで次に、ゲノムの特定領域が低メチル化した自殖系統 (epiRIL) を父方に用い、種子サイズに影響を与える DNA メチル化領域を絞り込むことにした。さらに、同じ解析を *mea* 変異株を母方に用いて種子崩壊を指標

に実施し、関与するメチル化領域の特定を進めた。現在、これらの解析データを合わせて目的遺伝子の特定を進めている。

< 引用文献 >

- Berger, F. Endosperm development. *Curr. Opin. Plant Biol.* 2: 28-32, 1999.
- Scott, R.J., Spielman, M., Bailey, J., and Dickinson, H.G. Parent-of-origin effects on seed development in *Arabidopsis thaliana*. *Development* 125: 3329-3341, 1998.
- McGrath, J., and Solter, D. Completion of mouse embryogenesis requires both the maternal and paternal genomes. *Cell* 37: 179-183, 1984.
- Grossniklaus, U., Vielle-Calzada, J.P., Hoepfner, M.A., and Gagliano, W.B. Maternal control of embryogenesis by MEDEA, a polycomb group gene in *Arabidopsis*. *Science* 280: 446-450, 1998.
- Kinoshita, T., Yadegari, R., Harada, J.J., Goldberg, R.B., and Fischer, R.L. Imprinting of the MEDEA polycomb gene in the *Arabidopsis* endosperm. *Plant Cell* 11: 1945-1952, 1999.
- Kiyosue, T., Ohad, N., Yadegari, R., Hannon, M., Dinneny, J., Wells, D., Katz, A., Margossian, L., Harada, J.J., Goldberg, R.B., and Fisher, R.L. Control of fertilization-independent endosperm development by the MEDEA polycomb gene in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 96: 4186-4191, 1999.
- Luo, M., Bilodeau, P., Dennis, E.S., Peacock, W.J., and Chaudhury, A. Expression and parent-of-origin effects for FIS2, MEA, and FIE in the endosperm and embryo of developing *Arabidopsis* seeds. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97: 10637-10642, 2000.
- Xiao, W., Brown, R.C., Lemmon, B.E., Harada, J.J., Goldberg, R.B., and Fischer, R.L. Regulation of seed size by hypomethylation of maternal and paternal genomes. *Plant Physiol.* 142: 1160-1168, 2006.
- House, C., Roth, C., Hunt, J., and Kover, P.X. Paternal effects in *Arabidopsis* indicate that offspring can influence their own size. *Proc. Biol. Sci.* 277: 2885-2893, 2010.
- Kinoshita, T., Miura, A., Choi, Y.H., Kinoshita, Y., Cao, X.F., Jacobsen, S.E., Fischer, R.L., and Kakutani, T. One-way control of FWA imprinting in *Arabidopsis* endosperm by DNA methylation. *Science* 303: 521-523,

2004.

Gehring, M., Huh, J.H., Hsieh, T.F., Penterman, J., Choi, Y., Harada, J.J., Goldberg, R.B., and Fischer, R.L. DEMETER DNA glycosylase establishes MEDEA polycomb gene self-imprinting by allele-specific demethylation. Cell 124: 495-506, 2006.

Makarevich, G., Villar, C.B.R., Erilova, A., and Kohler, C. Mechanism of PHERES1 imprinting in Arabidopsis. J. Cell Sci. 121: 906-912, 2008.

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 0件)

〔学会発表〕(計 1件)

山口京、和田七夕子、高山誠司、伊藤寿朗．母方インプリント異常による種子崩壊に拮抗的に作用するゲノム領域の探索．2017年度生命科学系学会合同年次大会 (ConBio2017) 12月6日、神戸

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0件)

取得状況 (計 0件)

〔その他〕

ホームページ等

<http://park.itc.u-tokyo.ac.jp/seiyu/>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高山 誠司 (TAKAYAMA, Seiji)
東京大学・大学院農学生命科学研究科・教授
研究者番号：70273836

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし

(4) 研究協力者

和田 七夕子 (WADA, Yuko)
奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科・助教
研究者番号：50379541

土松 隆志 (TSUCHIMATSU, Takashi)
千葉大学・大学院理学研究院・准教授

研究者番号：60740107

木下 哲 (KINOSHITA, Tetsu)

横浜市立大学・木原生物学研究所・教授

研究者番号：60342630

伊藤 寿朗 (ITO, Toshiro)

奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科・教授

研究者番号：90517096