

令和 4 年 6 月 21 日現在

機関番号：22701

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2017～2020

課題番号：17H03749

研究課題名(和文) ミトコンドリアに由来するエピジェネティック経路の解明と育種利用

研究課題名(英文) Epigenetic signaling pathway between mitochondria and nucleus

研究代表者

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

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 14,000,000円

研究成果の概要(和文)：ミトコンドリアと核は相互に依存した関係にある。核内のDNA脱メチル化は鉄硫黄クラスターを補因子として必要とし、鉄硫黄クラスターの生合成系はミトコンドリアの内膜タンパク質を通じて排出されるグルタチオンに依存していると考えられている。シロイヌナズナの変異体選抜から、この経路のいくつかの因子を単離してきた。本研究では、育種利用も見据えてイネのミトコンドリア内膜に存在すると考えられるOsATM3遺伝子に着目し、ゲノム編集個体を作成し表現型解析などを進めて来た。その結果、osatm3ホモ接合体の胚乳における表現型がイネのDNA脱メチル化酵素ROS1aの表現型に酷似していることなどが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

ミトコンドリアから核へのエピジェネティックなレトログレードシグナルには不明な点が多い。今回、核においてDNAメチル化の消去を行うDNA脱メチル化酵素の変異体と、DNA脱メチル化酵素に必要とされる補酵素の生合成の初発段階を担うミトコンドリア内膜のATM3トランスポーターの

研究成果の概要(英文)：It is well known that mitochondria and nucleus are interdependent. DNA demethylases in the nucleus require Fe-S clusters as cofactors. The biogenesis of this Fe-S cofactor starts from glutathione, which is exported through mitochondrial ATM3 transporter. We previously identified several Arabidopsis mutants related to this cytosolic Fe-S cluster biogenesis pathway, based on the phenotype that do not activate the imprinted FWA expression. In this study, we focus on the OsATM3 gene and generate its knock out plants by CRISPR/Cas9 system to understand role of ATM3. As a result, we found that phenotype of osatm2^{-/-} is closely resembles to DNA demethylase mutant in the endosperm.

研究分野：エピジェネティクス

キーワード：エピジェネティクス ミトコンドリア イネ ATM3 鉄硫黄クラスター

1. 研究開始当初の背景

ミトコンドリアから核へのエピジェネティックなレトログレードシグナルの実体は、いくつかの報告はあるもののその生物学的な意義など未解明な部分が多い。シロイヌナズナを用いた解析から DEMETER(DME)などの DNA 脱メチル化酵素の活性には、鉄硫黄クラスターと呼ばれる補因子が必要であり、その生合成経路の初発段階はミトコンドリアの内膜に存在する ATM3 トランスポーターであると考えられている。これまでのシロイヌナズナを用いた研究により、鉄硫黄クラスター生合成経路の *NAR1*, *DRE2* 遺伝子の変異体では、雌性配偶体の中央細胞において、DNA 脱メチル化酵素 DME により活性化されるインプリント遺伝子 *FWA* の発現に影響することを明らかにしている (Nakamura M. et al., *New Phytologist* 2013, Buzas M. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2014)。また、*dre2* 変異を用いた解析では、複数のインプリント遺伝子の DNA メチル化に影響することを明らかにしている。こうした状況を踏まえ、育種上重要な作物であるイネを用いてミトコンドリアから核へのエピジェネティックなレトログレードシグナルを検証することを発案した。

シロイヌナズナからイネに材料を変更する理由は、シロイヌナズナは細胞質雄性不稔などミトコンドリアの多様性が原因で引き起こされる現象が殆ど報告されていないこと、種間交雑において生逆交雑可能な組み合わせが知られていないこと、近縁野生種との染色体数が異なるため、F₂ 世代以降へ展開出来ないことなどがあげられる。さらに、ミトコンドリアゲノムも育種において重要な遺伝資源であることから、その多様性が高いイネを材料とした。

2. 研究の目的

イネのミトコンドリア内膜の ATM3 トランスポーターに焦点をあて、ミトコンドリアから核へのエピジェネティックなレトログレードシグナルを検証する(図 1)。ATM3 トランスポーターは細胞質の鉄硫黄クラスター生合成経路の初発段階の輸送体であり、鉄硫黄クラスターは DNA 脱メチル化酵素に必須な補因子である。

ゲノム編集により ATM3 遺伝子のノックアウト個体の作出とその詳細な表現型解析、さらには変異体において影響を受ける遺伝子発現の解析、DNA メチル化解析の準備を本研究では計画した。

3. 研究の方法

- ・CRISPR/Cas9 のシステムを用いて、*OsATM3* (LOC_06g03770)の第 1 エクソンを標的としたゲノム編集個体を作成
- ・変異体の種子発達過程の表現型に関して、テクノビッド樹脂切片などを用いた組織化学的解析
- ・詳細な DNA メチル化解析のための連続戻し交配 (イネの形質転換は組織培養を経るため、DNA メチル化などのエピジェネティックな情報が変化することが知られている。これを排除するために連続戻し交配が必要)
- ・戻し交配途中の植物体を用いた予備的な RNA-seq 解析などバイオインフォマティクス解析
- ・遺伝学的解析による、イネの受精から種子形成過程における *ATM3* 遺伝子機能解明
- ・Whole-genome bisulfite シーケンス準備

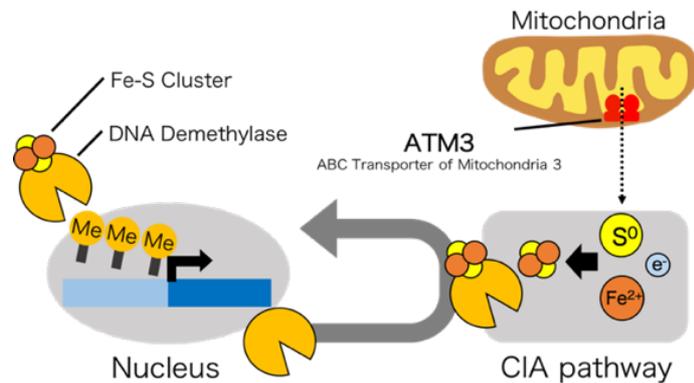


図 1. 細胞質鉄硫黄クラスター経路による DNA 脱メチル化酵素への補因子付加モデル

4. 研究成果

(1) *OsATM3* ゲノム編集個体の作出と表現型解析

CRISPR/Cas9 のシステムを用いて、*OsATM3* (LOC_06g03770) 遺伝子の第 1 エクソンを標的としたゲノム編集により、異なるフレームシフトを起こすラインを複数個体得た(図 2)。*atm3* ヘテロ変異体の自殖種子では、胚乳発生が不完全で、胚が肥大化する異常種子が出現した。自殖によって生じた後代の遺伝子型解析の結果、*atm3* ホモ変異型の種子では異常な胚乳発生を引き起こすことが示唆された(図 3)。

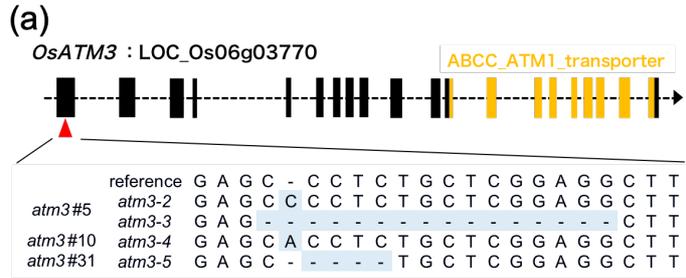


図 2. ゲノム編集により作出した *atm3* 変異アレル

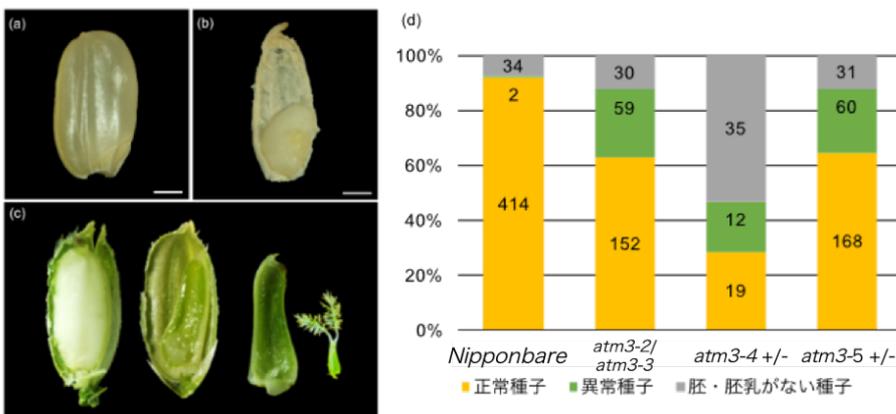


図 3. *atm3* ヘテロ接合変異体の自殖種子における表現型

(2) テクノビッド樹脂切片を用いた組織化学的解析

次に詳細な胚乳発生、胚発生過程を解析するために、*atm3-4* のヘテロ接合体の受粉後 2-7 日目の自殖種子をサンプリングし、テクノビッド樹脂に包埋後マイクロトームにより薄切片を作成しトルイジンブルー染色等により組織化学的解析を行った。その結果、野生型の胚乳では受精後多核体核の分裂、その後の細胞化、中心液胞の消失、デンプンや貯蔵タンパク質などの蓄積が胚乳のそれぞれの発生ステージにしたがって進行する。また、胚発生に関しても記載されている発生プログラムに従って、葉原基の形成などが進行している(図 4)。

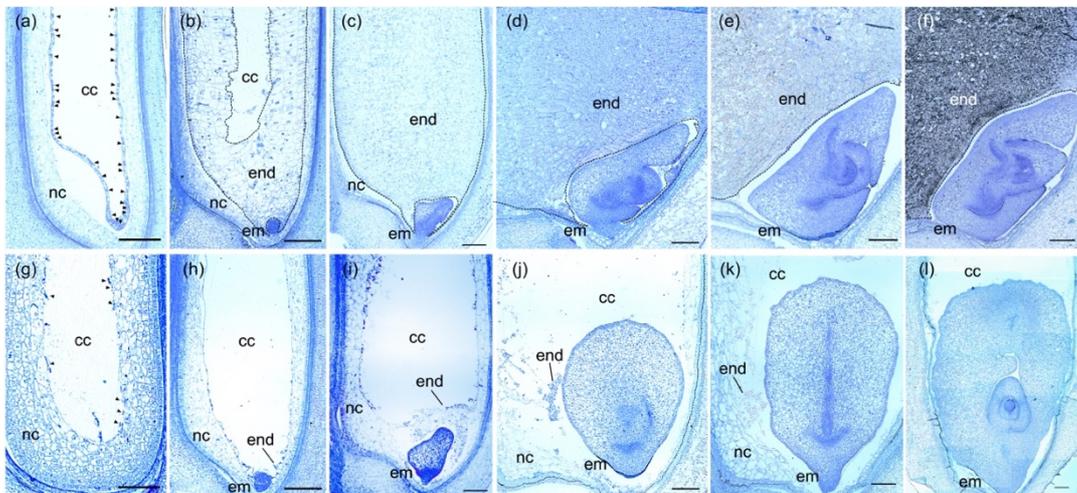


図 4. 野生型と *atm3-4* 変異体の胚と胚乳の表現型

一方で、*atm3-4* ヘテロ接合体の自殖種子形成過程では、胚乳の細胞化の遅れや形成異常などの異常が見られ、胚発生においても葉原基の発生位置の異常や胚盤が形成されないことなどの異常が見つかる（図4）。また、ホモ接合体の中には発芽可能な種子もあるが、概ね4葉期までに成長を停止することが明らかとなった。

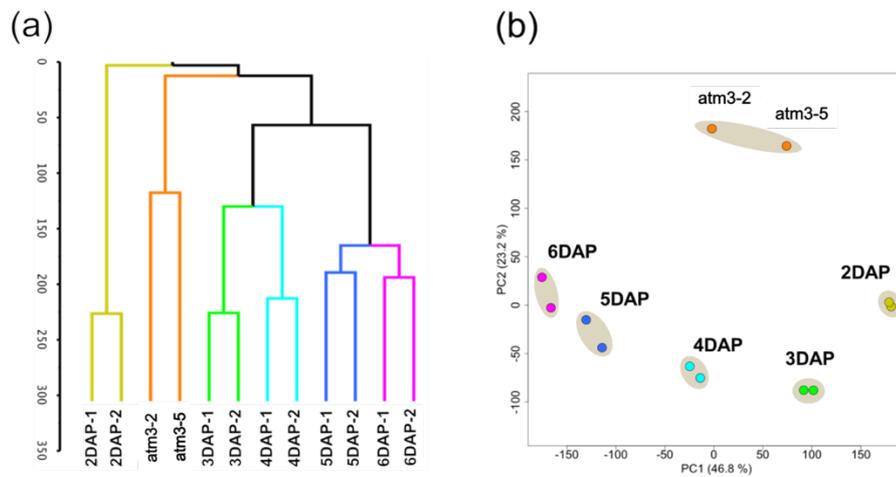


図4. 予備的な RNA-seq 解析

(3) *atm3-2*, *atm3-5* を用いた予備的な RNA-seq 解析

atm3-4, *atm3-5* それぞれのヘテロ接合体より生じるホモ接合種子を用いて胚乳組織を単離し、主成分分析などにより、野生型で行っている胚乳発生時系列 RNA-seq のデータと比較した。それぞれの変異体では胚乳に顕著な異常が現れるため、それを反映した RNA-seq の結果となっている。

今後、戻し交配が進んだバッククロス集団を用いて、RNA-seq, 全ゲノムバイサルファイトシーケンスを予定している。オスメスの区別が可能となるように、且つ中央細胞での機能を解明するために、*atm3* ヘテロ接合体とカサラスとの正逆交雑、その後のサンプリングを予定している。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計1件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 丸岡博、小野明美、永田博基、遠藤真咲、三上雅史、木下哲
2. 発表標題 イネの鉄硫黄クラスター生合成経路遺伝子OsATM3の機能解析
3. 学会等名 日本育種学会第136回講演会
4. 発表年 2019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
---------------------------	-----------------------	----

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------