

令和 5 年 6 月 14 日現在

機関番号：35308

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2020～2022

課題番号：20K05975

研究課題名(和文) イネ巨大胚変異体を利用した胚-胚乳間相互作用における胚側要因の解明

研究課題名(英文) Efforts to identify embryo-side factors in embryo-endosperm interactions using rice giant embryo mutants.

研究代表者

桧原 健一郎 (Hibara, Ken-ichiro)

吉備国際大学・農学部・准教授

研究者番号：10595713

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究課題から以下の3つの成果が得られた。(1) LMD法を用いた発現解析から胚が大きくなるge変異体の胚盤で特異的に発現変動する遺伝子群を同定した。(2) NGS解析、相補性試験ならびにゲノム編集を利用した遺伝子欠損変異体の作成・観察から胚盤を欠損するapd1変異体の原因遺伝子はビオチンを効果的に利用するために必要な酵素であることが明らかとなった。(3) 巨大胚の表現型を抑圧する5系統のges変異体の表現型解析やNGS解析を実施し、ges1とges2の原因遺伝子がそれぞれ転写因子様タンパク質、トランスポーター様タンパク質をコードすることを明らかとした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

イネ種子において、食用とされる部分は胚乳であるが、胚にはGABAやビタミン類など胚乳に含まれない栄養分や油脂成分が多く含まれるため、胚/胚乳比率の改変は、穀物の栄養成分の増減など様々な応用の可能性を秘めている。今回の解析では胚/胚乳比率の制御機構において胚側要因に着目し、胚乳と接する胚盤形成に関与する因子やGEタンパク質が作用する代謝経路や基質に関与する可能性がある因子を特定することができた。本研究でこれまでは発見されていなかった胚/胚乳比率における胚側要因を複数同定することができたが、これら因子の機能、役割についてはさらに研究を進める必要がある。

研究成果の概要(英文)：This research project yielded the following three results. (1) Gene expression analysis using LMD identified a group of genes whose expression fluctuates specifically in the scutellum of ge mutants. (2) NGS analyses, complementation studies, and genetic modification by genome editing revealed that the gene responsible for the apd1 mutant, which lacks the scutellum, is the enzyme required for the effective utilization of biotin. (3) Phenotypic and NGS analysis of five lines of ges mutants that suppress the giant embryo phenotype revealed that the causal genes of ges1 and ges2 mutants encode a transcriptional regulator and transporter-like protein, respectively.

研究分野：植物分子遺伝学

キーワード：イネ 胚発生 胚乳発生 細胞死 胚サイズ 有胚乳種子 シトクロムP450

1. 研究開始当初の背景

被子植物は重複受精によって胚と胚乳を形成する。受精後、胚と胚乳は異なるプロセスを経て、細胞増殖、分化を行っていく。穀物の胚乳は世界の多くの国において主要食料として使用されている。また、胚は次世代の植物体の基となるだけでなく、胚乳には含まれない油脂や多くの有用な栄養成分の供給源でもある。

多くの被子植物(とくに双子葉植物)では、胚乳が種子成熟過程で衰退し、無胚乳種子を作る。そのため、シロイヌナズナを含めた双子葉モデル植物では、種子内における胚と胚乳サイズについての解析例はなく、有胚乳種子における胚 - 胚乳サイズを規定する形態学的基盤や分子機構についてほとんど知見がなかった。

申請者は、平成 23-24 年度若手研究(B)『イネにおける胚と胚乳比率を決める分子メカニズムの解明』、平成 25-28 年度若手研究(A)『イネの胚サイズを規定する胚乳領域構築機構の解明』において、イネを材料に MNU 変異原処理によって得られた胚が小さくなる *embryoless1 (eml1)*、*reduced embryo1 (re1)*、*re2* 変異体と胚が大きくなる *giant embryo (ge)*、*goliath (go)* 変異体を用いて、研究を行い、

- (1) 胚 - 胚乳サイズの 1 つの大きな決定要因は、胚組織よりも胚乳組織側に存在すること、
- (2) 胚の周辺に存在する胚乳組織には層構造が見られ、層構造の構築には細胞死が関与し、その領域を EFR (Embryo Facing Region; 胚周辺胚乳領域) と命名したこと、
- (3) 胚 - 胚乳サイズが変化する *re* や *ge* 変異体では EFR の層構造に形態異常が観察されること、
- (4) *EML1*、*RE1*、*RE2* はそれぞれ異なるファミリーに属する転写因子を、*GE* はシトクロム P450 の 1 つである CYP78A13 をそれぞれコードすること、
- (5) *RE1*、*RE2*、*GE* は子房で特異的に発現し、とくに EFR に局在化した発現パターンを示すという 5 つの点を明らかにし、その一部を学術雑誌に報告している (Nagasawa *et al.* 2013)。

有胚乳種子では、胚と胚乳のサイズは植物種によって保存されていることから、胚/胚乳サイズ比率は、遺伝的に制御された未同定の胚 - 胚乳間相互作用により成し遂げられていると考えられていた (Ingram, 2010) が、これまでの申請者の解析からこの相互作用において“細胞死”というキーワードが見えてきた。しかし、胚乳から胚への情報伝達が如何に行われ、どのように胚成長に結びつくのかなど不明な点は多く残されている。

2. 研究の目的

申請者はこれまでの研究で胚 - 胚乳サイズに関わる胚乳側の要因である EFR の分子基盤を明らかにしてきたが、EFR における細胞死を認識し、胚成長を引き起こすための胚側要因についてはまだわかっていない。胚/胚乳サイズ比率を規定する胚乳側組織に着目したこれまでの研究をさらに発展させ、胚乳細胞死を認識し、胚成長を引き起こす胚側の実行要因を特定するため、胚乳の過剰細胞死を引き起こし胚の巨大化が起こる『巨大胚変異体』と胚乳に隣接した胚組織である『胚盤』に着目し、胚 - 胚乳間相互作用における胚側の役割を明らかにするとともに、有胚乳種子中の胚/胚乳比率制御の包括的な理解に向けた分子メカニズム解明を目的とする。

3. 研究の方法

(1) 胚 - 胚乳間相互作用における胚盤の役割

胚と胚乳は隣接して種子中に存在しているが、実際に胚乳と最も接している胚組織は胚盤であり、胚 - 胚乳間相互作用において胚盤が重要な役割を担うことが推察される。イネ科植物に見られる胚盤は、双子葉植物の子葉の相同器官であり、発芽、初期生育において胚乳から養分吸収を行う組織として知られているが、胚盤の発生機序やそれに関わる分子についてはほとんど報告例がない。これまでに行ってきた解析から巨大胚 (*giant embryo (ge)* 変異体) の原因遺伝子は EFR だけでなく、胚盤組織でも特異的に発現することや胚の巨大化では特に胚盤細胞の肥大化が顕著であることを見出している。そこで、*ge* 変異体が胚成長が著しく起こる受粉後 5-6 日目の胚を利用し、LMD (Laser Microdissection) 法を用いて胚盤組織から RNA を抽出し、RNA-seq 解析を行う。野生型と *ge* 変異体間で発現変動を示す遺伝子を比較し、得られた遺伝子プロファイルから胚サイズとの関与が疑われる遺伝子について、CRISPR-Cas9 法を用いた機能欠損変異体の作成、様々な胚サイズや胚サイズ変異体下における発現挙動を調査し、胚 - 胚乳間相互作用における胚側要因となり得る分子実体を明らかにする。

また、これまでに胚盤頂部がほぼ欠失する *apical displacement1 (apd1)* 変異体が単離されている (Kinae *et al.* 1999)。*apd1* の詳細な表現型解析ならびに原因遺伝子の特定を行うと同時に、*ge apd1* 二重変異体の表現型解析を行うことにより、胚の巨大化における胚盤の役割について考察する。なお、マッピングや二重変異体作成には多大な時間を要するため、課題準備として交配種子 (F1) の作成はすでに終了している。

(2) 巨大胚系統を用いた胚巨大化因子の同定

これまでに巨大胚性を示す *ge* 変異体では EFR で過剰な細胞死が生じていることを明らかにしてきたが、過剰な胚乳細胞死がどのようにして胚を著しく成長させることができるのかについ

ては分かっていない。申請者の先行研究から *GE* 遺伝子はシトクロム P450 をコードすることが明らかとなったが、*GE* が作用する代謝経路や基質ならびにシグナル伝達経路については全くわかっていない。代謝経路が全く不明なシトクロム P450 の基質を生化学的に見つけることは非常に困難であるため、本研究では、遺伝学的アプローチを用いてその代謝経路やシグナル伝達経路に関与する分子の特定を試みる。具体的には、*ge* 変異体に変異原処理を行い、表現型が野生型に戻る抑圧変異体やより巨大な胚を形成する亢進変異体を単離ならびに原因遺伝子の同定を行い、*GE* が関与する代謝経路やその下流に存在するシグナル伝達経路に関わる分子実体を明らかにする。課題準備として、*ge* の表現型を抑圧する独立の遺伝子座に由来する *ge suppressor1(ges1)*、*ges2*、*ges3* 変異体、*ge* の表現型を亢進する *ge enhancer1(gee1)* をすでに単離し、マッピング集団を作成済みである。個々の変異体の詳細な表現型解析には至っていないため、各二重変異体の形態学的観察や原因遺伝子の特定やそれらの発現解析を実施する。これら解析から *GE* を介した胚サイズ制御に関与する代謝経路、シグナル伝達経路に関わる分子実体を明らかにするとともに上述した(1)との関係性について考察を行うことにより、胚/胚乳サイズ比率制御における胚側要因の分子機構を明らかにする。

4. 研究成果

(1) 胚 - 胚乳間相互作用における胚盤の役割

受粉後 3 日目と 5 日目の野生型と *ge-2* 変異体子房から LMD 法を用いて、胚全体、胚盤領域のみ、EFR 領域、胚乳中央領域の組織を切り出し、RNA を抽出し、RNA-seq 解析を実施した。RN 得られたデータから野生型と比較し、*ge* 変異体の胚や胚盤領域で特異的に発現変動する遺伝子群を多数同定することができた。これらの遺伝子群について GO 解析などを行ったが、特徴的な遺伝子機能や生命現象とのつながりは見られなかった。今後、個々の遺伝子の発現パターンや機能欠損の影響などについて調査を進めていく予定である。

イネの胚において胚乳と隣接する胚盤を完全に欠失する *apd1* 変異体の原因遺伝子を特定するため、マッピング集団を作成し、NGS 解析を実施した。その結果、ビタミン B 群に属する水溶性ビタミンの 1 種『ビオチン』を効果的に利用するために必要なタンパク質をコードする遺伝子にミスセンス変異があることを見出した。野生型ゲノム配列を用いた相補性試験ならびに CRISPR-Cas9 法による機能欠損変異体を作成し、表現型の相補や変異体の表現型を再現できたことからこの遺伝子が *apd* 変異体であると結論づけた。*apd* 変異体の詳細な表現型解析や *ge apd* 二重変異体の解析を予定していたがパラフィン切片作成装置の故障により、詳しい解析をすることはできなかった。今後、さらに表現型の解析、発現解析、タンパク質の機能解析を進展させる必要がある。

(2) 巨大胚システムを用いた胚巨大化要因の同定

巨大胚を促す *GE* 遺伝子がコードするシトクロム P450 タンパク質を介した代謝経路ならびにシグナル伝達経路を同定するため、巨大胚の表現型を亢進する *gee1* 変異体、抑圧する *ges1*、*ges2*、*ges3* 変異体と 2022 年度からは *ge* 抑圧変異体スクリーニングから新たに単離した *ges4*、*ges5* 変異体も加え、6 系統に関して表現型解析ならびに遺伝子同定に向けた解析を実施した。*gee1* 変異体では 2020 年度の解析では以前に行っていた申請者の結果とは異なり *ge* 変異体の表現型亢進効果がほとんど見られなかった。この要因として、気温や日照量など生育環境の違いが考えられた。本研究では、表現型が明確かつ普遍的であった *ges1-ges5* 変異に着目して原因遺伝子の同定などを旨とするとし、NGS 解析などを実施した。

巨大胚の表現型を抑圧する *ges1*、*ges2*、*ges3* の胚発生過程における表現型解析を行ったところ、*ges1* は野生型とほぼ同程度まで胚の大きさが戻るのに対して、*ges2*、*ges3* では野生型と *ge* 変異体の中間型の胚サイズとなることが明らかとなった。*ges4*、*ges5* に関しては、今後詳細な解析を行う予定である。

NGS 解析を実施したところ、*ges1* は転写因子様タンパク質、*ges2* はトランスポーター様タンパク質をコードする遺伝子にミスセンス変異があることを同定した。変異が存在する遺伝子について野生型ゲノム配列を用いた相補性試験ならびに CRISPR-Cas9 法による機能欠損変異体を作成し、表現型の相補や変異体の表現型を再現できたことから発見した突然変異が *ges1*、*ges2* の原因変異であると結論づけた。*ges3* は、2020 年度に行った NGS 解析では変異を特定することができなかったため、戻し交配を行い、*ges4*、*ges5* とともに再度 NGS 解析を行った。現在、これらのリーシーケンスデータをもとに変異箇所の抽出作業を実施している。

LMD を用いた RNA-seq 解析や様々な変異体の原因遺伝子の特定から、胚/胚乳サイズ比率制御に関与する様々な胚側因子を特定することができたことは本研究において大きな成果であった。しかし、これら因子の機能や相互関係については全くわかっていない。今回得られた因子に関して発現解析、機能解析ならびに相互関係などをさらに調査することにより、子実における胚/胚乳サイズ比率を制御する分子機構の解明につながるだろう。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 3件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Asanga Deshappriya Nagalla, Noriko Nishide, Ken-Ichiro Hibara, Takeshi Izawa	4. 巻 62(11)
2. 論文標題 High Ambient Temperatures Inhibit Ghd7-Mediated Flowering Repression in Rice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Plant Cell Physiol.	6. 最初と最後の頁 1745-1759
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/pcp/pcab129.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Andree S Kusnandar, Jun-Ichi Itoh, Yutaka Sato, Eriko Honda, Ken-Ichiro Hibara, Junko Kyojuka, Satoshi Naramoto	4. 巻 63(2)
2. 論文標題 NARROW AND DWARF LEAF 1, the Ortholog of Arabidopsis ENHANCER OF SHOOT REGENERATION1/DORNROESCHEN, Mediates Leaf Development and Maintenance of the Shoot Apical Meristem in Oryza sativa L	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Plant Cell Physiol.	6. 最初と最後の頁 265-278
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/pcp/pcab169.	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難	国際共著 -

1. 著者名 Hibara K-I., Miya M., Benvenuto A. S., Hibara-Matsuo N., Mimura M., Yoshikawa T., Suzuki M., Kusaba M., Taketa S. and Itoh J-I.	4. 巻 17(5)
2. 論文標題 Regulation of the plastochron by three MANY-NODED DWARF genes in barley	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 PLOS Genetics	6. 最初と最後の頁 e1009292
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1371/journal.pgen.1009292	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 該当する

〔学会発表〕 計3件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 東 郁巳, 木村 理沙, 桧原 健一郎, 郷 達明, 間宮 章仁, 三村 徹郎, 近藤 侑貴, 石崎 公庸, 伊藤 純一, 深城 英弘
2. 発表標題 シロイヌナズナ根系構築におけるイネDECUSSATE相同遺伝子WAD1およびWAD2の機能解析
3. 学会等名 第63回日本植物生理学会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 桧原 健一郎, 味谷 雅之, ベンヴェヌート アキ, 桧原(松尾) 直子, 三村 真生, 吉川 貴徳, スズキ マサハル, 草場 信, 武田 真, 伊藤 純一
2. 発表標題 オオムギ多節矮性変異体を用いた葉間期制御に関わる3遺伝子座の同定
3. 学会等名 日本育種学会第139回講演会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Asanga Deshappriya Nagalla, Ken-ichiro Hibara, Takeshi Izawa
2. 発表標題 The effects of ambient temperature to photoperiodic flowering in rice
3. 学会等名 日本育種学会第139回講演会
4. 発表年 2021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
研究協力者	佐藤 豊 (Sato Yutaka)		

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
---------	---------