

令和 5 年 6 月 26 日現在

機関番号：22701

研究種目：若手研究

研究期間：2020～2022

課題番号：20K15504

研究課題名（和文）種間雑種胚乳で生じるエピゲノム異常の検証とその原因メカニズムの推定

研究課題名（英文）Verification of epigenetic abnormalities in hybrid endosperm and estimation of its mechanism

研究代表者

殿崎 薫 (Tonosaki, Kaoru)

横浜市立大学・木原生物学研究所・助教

研究者番号：20749494

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）：栽培イネと野生イネの種間交雑で得られる雑種種子は雑種胚乳の発生異常によって致死を示す。本研究では、雑種胚乳では、ゲノムワイドな父親特異的なインプリント遺伝子の片親特異的な発現パターンに乱れが生じることを明らかにした。また、それら父親特異的なインプリント遺伝子は、抑制型ヒストン修飾であるH3K27me3によって片親特異的な発現が維持されることを明らかにした。加えて、H3K27me3修飾に関わるポリコム複合体の変異体システムを利用した種間交雑実験において生殖的隔離を打破することに成功しており、胚乳における生殖的隔離が雑種胚乳におけるH3K27me3修飾の異常が関与することを示唆する結果を得た。

研究成果の学術的意義や社会的意義

胚乳で見られる生殖的隔離は、様々な植物種で観察されるものの、その分子メカニズム解明には至っていなかった。本研究では、その分子メカニズム解明への足がかりとなる成果を得た。また、物種に近縁な野生種は、既存の栽培種には存在しない様々な環境適応能力を保持した優良な遺伝資源であるが、生殖的隔離のために遺伝資源のほとんどが利用されていないのが現状であった。本研究成果によって野生イネとの種間交雑を打破することに成功したことから、これまでは育種利用が不可能であった野生イネを遺伝資源として利用可能となることが期待される。

研究成果の概要（英文）：The interspecific crossing between cultivated rice and wild rice shows lethal phenotypes in hybrid seeds due to the hybrid endosperm abnormality. Our study revealed that almost paternally imprinted genes were de-repressed in the hybrid endosperm. We also revealed a repressive histone mark, H3K27me3, controls the mono-allelic expression pattern of paternally imprinted genes in rice endosperm. In addition, we succeeded in overcoming the hybridization barrier using mutant rice of OsEMF2a involved in catalytic H3K27me3. These results show that H3K27me3 involves the hybridization barrier in rice endosperm.

研究分野：植物遺伝育種学

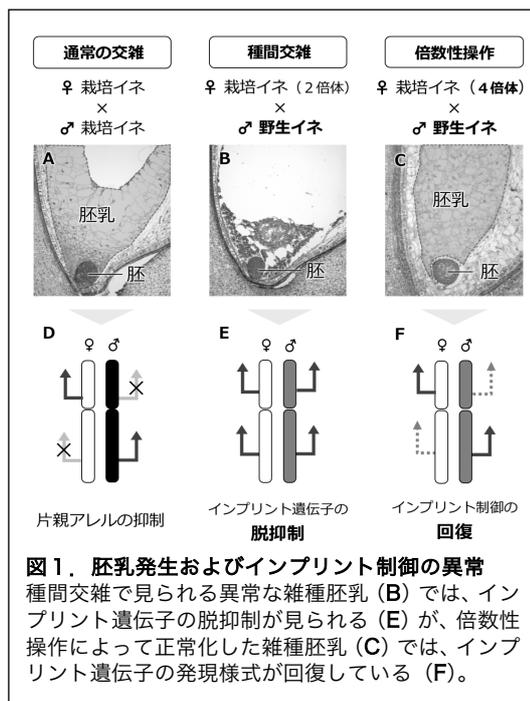
キーワード：生殖的隔離 野生イネ 胚乳 ゲノムインプリンティング

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

作物種に近縁な野生種は、様々な環境適応能力を保持した優良な遺伝資源である。しかしながら、野生種との種間交雑は多くの場合、その雑種形成が生殖的隔離によって妨げられるため、野生種などの遺伝資源のほとんどが利用されていないのが現状である。種間交雑で見られる生殖的隔離の主要因に、種子形成過程で生じる「胚乳発生の異常」がある。様々な植物種における交雑実験の結果から、種間交雑によって生じる胚乳発生の異常には、一定の法則性が見出されているが (Johnston et al., Theor Appl Genet, 1980; Nishiyama and Yabuno, Cytologia 1978)、その分子メカニズム解明には至っていない。

我々は、栽培イネ *Oryza sativa* と野生イネ *O. longistaminata* との種間交雑で生じる胚乳の生殖的隔離に関する研究を実施してきた。これまでの研究から、栽培イネ *O. sativa* と野生イネ *O. longistaminata* の種間交雑では、胚乳発生の異常によって雑種種子が致死するが (図 1 B)、雌性親の *O. sativa* の倍数性を上昇させることで、胚乳発生が正常化し、発芽可能な雑種種子を得られることを明らかにしている (図 1 C; Tonosaki et al., Plant J. 2018)。同時に、生殖的隔離が生じる交配組合せでは特定のインプリント遺伝子の脱抑制が見られるのに対し (図 1 E)、生殖的隔離が打破される交配組合せでは、インプリント遺伝子の制御様式の回復が見られることを見出している (図 1 F)。



2. 研究の目的

雑種胚乳で見られるインプリント遺伝子の挙動をゲノムワイドに明らかにするとともに、種間交雑で発現様式が変動するインプリント遺伝子のエピゲノム制御を明らかにすることで、雑種胚乳発生異常の原因メカニズム解明の足掛かりを得ることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 雑種胚乳におけるゲノムワイドなインプリント遺伝子の発現解析

胚乳発生には、インプリント遺伝子の正常な発現が必須であることがいくつかの植物種で報告されており (Jin et al., Current Opinion in Genetics & Development 2007)、インプリント遺伝子の脱抑制が、胚乳発生の異常の原因である可能性が高い。しかし、雑種胚乳においてインプリント遺伝子の脱抑制がゲノムワイドに見られるのか、特定の遺伝子のみで生じるかについては明らかではない。そこで、我々がこれまでに見出した生殖的隔離の生じる組合せ (♀ 2 倍体 *O. sativa* × ♂ *O. longistaminata*, 図 1 B) と生殖的隔離を打破する組合せ (♀ 4 倍体 *O. sativa* × ♂ *O. longistaminata*, 図 1 C) を対象に、それぞれの交配組合せから得られた雑種胚乳におけるアレル特異的な RNA-seq 解析を実施し、インプリント遺伝子の片親特異的な発現パターンの比較解析を実施した。

(2) インプリント遺伝子のエピゲノム制御解析

インプリント遺伝子の片親特異的な発現制御は、母親・父親由来の対立遺伝子特異的なエピジェネティックな制御機構（エピゲノム）によって成立しているが、イネのインプリント遺伝子のエピゲノム制御についての知見はほとんど得られていない。そこで、栽培イネの胚乳で観察されるインプリント遺伝子がどのようなエピゲノム制御によって成立しているかを明らかにするために、栽培イネの胚乳におけるアレル特異的な WGBS (whole genome bisulfite sequence) および抑制型のヒストン修飾である H3K27me3 についての CUT&RUN 解析を実施した。

(3) エピゲノム変異体を利用した生殖的隔離メカニズムの検証

先行する実験 1 および 2 の結果から、インプリント遺伝子の脱抑制との関与が想定されるエピゲノム制御が胚乳の生殖的隔離に関与するかの証明実験を実施する。インプリント遺伝子の脱抑制は、一方の親の対立遺伝子におけるエピゲノム情報が変化していることが想定されるため、エピゲノム変異体を片親に用いた種間交雑を実施し、胚乳発生および種子稔性、生存率についての表現型観察を実施した。

4. 研究成果

(1) 雑種胚乳におけるゲノムワイドなインプリント遺伝子の発現解析

生殖的隔離の生じる組合せでは、多くのインプリント遺伝子の片親特異的な発現の偏りが変動しており、インプリント遺伝子の発現様式に乱れが観察された。特に、父親特異的なインプリント遺伝子で顕著に見られた (図 2B)。一方で、倍数性の上昇によって生殖的隔離を打破した組合せでは、一部のインプリント遺伝子で発現様式の乱れが観察されるものの、父親特異的なインプリント遺伝子の多くが片親特異的な発現を示した (図 2C)。このことから、生殖的隔離が生じる雑種胚乳では、父親特異的なインプリント遺伝子の制御の乱れがゲノムワイドに生じていることが明らかとなった。

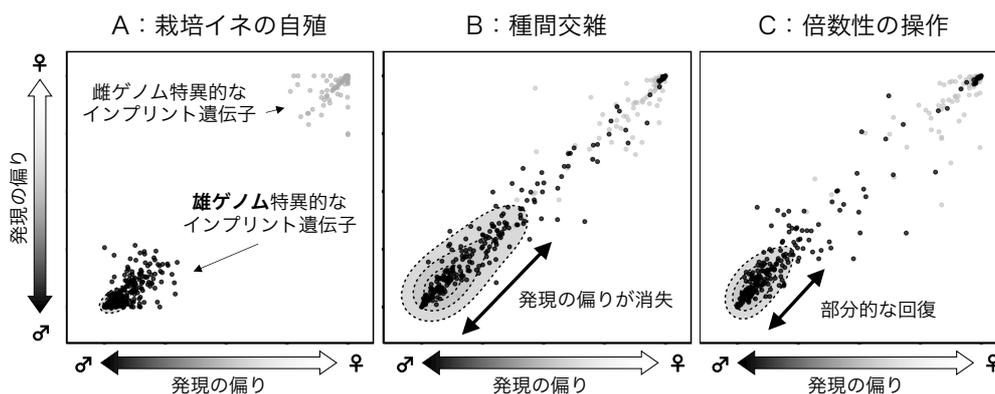


図 2. 生殖的隔離打破によるインプリント遺伝子の片親特異的な発現の回復

発現の偏りはオス・メスアレルの発現比を示しており、x 軸および y 軸は biological replicate を示す。通常の発生を示す胚乳では父親特異的なインプリント遺伝子に発現は左下に偏るが (A)、異種間交雑ではゲノムワイドに父親特異的なインプリント遺伝子の発現の偏りが乱れる (B)。一方で、倍数性の操作によって正常化した胚乳では、父親特異的なインプリント遺伝子の乱れが部分的に回復している (C)。

(2) インプリント遺伝子のエピゲノム制御解析

アレル特異的な WGBS および H3K27me3 についての CUT&RUN 解析の結果から、イネの母親特異的なインプリント遺伝子は、父親アレルの転写開始点周辺における CG およ

び CHG メチル化によってサイレンシングされており、母親アレル特異的な脱メチル化によって片親特異的な発現様式が成立していることを明らかにした。一方で、父親特異的なインプリント遺伝子のうちの約半数の遺伝子では、母親アレル特異的な H3K27me3 によって抑制されることで、父親アレル特異的な発現様式が成立していることが明らかになった。

(3) エピゲノム変異体を利用した生殖的隔離メカニズムの検証

これまでの研究結果から、生殖的隔離が生じる組み合わせでは父親特異的なインプリント遺伝子の発現様式の乱れが観察されており、それら父親特異的なインプリント遺伝子の発現制御には H3K27me3 が関与することを明らかにしてきた。そのため、種間交雑で生じる胚乳発生の異常には、H3K27me3 による制御が関与している可能性が示唆される。そこで検証実験として、H3K27me3 に関与するポリコム複合体因子の変異体系統 *Osemf2a* (Tonosaki et al., Plant Cell 2022) を利用して、生殖的隔離の表現型への影響を調査した。その結果、栽培イネと野生イネ *O. australiensis* との種間交雑では雑種胚乳の萎縮が観察されるが、*Osemf2a* を母親に用いることで胚乳発生が正常化することが明らかになった (図 3)。また、栽培イネと *O. australiensis* との雑種種子は播種後 30 日以降の雑種植物の生存率が 20%ほどであるのに対して、*Osemf2a* と *O. australiensis* との雑種種子では、60%以上が生存していた。

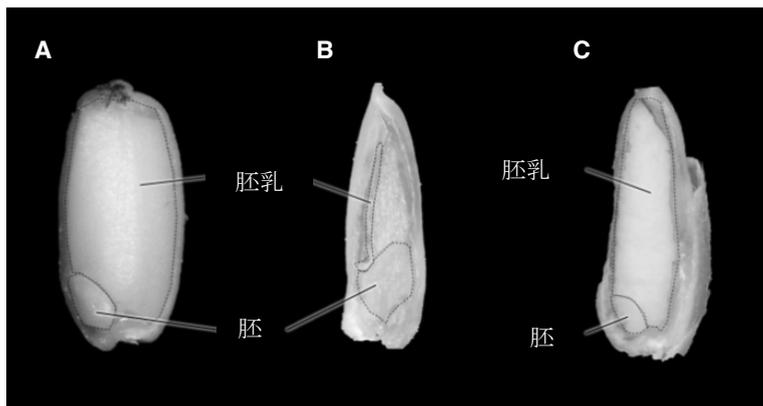


図 3. *Osemf2a* 変異体を用いた胚乳の生殖的隔離の打破。

A. *O. sativa* の自殖種子 (交配後 7 日目)

B. *O. sativa* x *O. australiensis* の種間交雑で得られた雑種種子では、胚乳が萎縮し、雑種個体を得ることはできない。

C. *Osemf2a* 変異体 (*O. sativa*) を母親に用い、野生イネ *O. australiensis* と交雑すると、胚乳発生が正常化し、雑種個体が得られた。

以上の (1) ~ (3) の結果から、栽培イネと野生イネの種間交雑で見られる胚乳発生の異常は、インプリント遺伝子の発現制御に関与する H3K27me3 による修飾が関与することを明らかにした。また、H3K27me3 に関わる *Osemf2a* 変異体を利用することによって、胚乳で生じる生殖的隔離を打破することに成功した。

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 3件/うちオープンアクセス 3件）

| | |
|--|-----------------|
| 1. 著者名 Kaoru Tonosaki, Ryo Fujimoto, Elizabeth S. Dennis, Victor Raboy, Kenji Osabe | 4. 巻 13 |
| 2. 論文標題 Will epigenetics be a key player in crop breeding? | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Frontiers in Plant Science | 6. 最初と最後の頁 - |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3389/fpls.2022.958350 | 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 |

| | |
|---|---------------------------|
| 1. 著者名 Nagata Hiroki, Ono Akemi, Tonosaki Kaoru, Kawakatsu Taiji, Sato Yutaka, Yano Kentaro, Kishima Yuji, Kinoshita Tetsu | 4. 巻 109 |
| 2. 論文標題 Temporal changes in transcripts of miniature inverted repeat transposable elements during rice endosperm development | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 The Plant Journal | 6. 最初と最後の頁 1035 ~ 1047 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/tpj.15698 | 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 |

| | |
|--|----------------------|
| 1. 著者名 Tonosaki Kaoru, Ono Akemi, Kunisada Megumi, Nishino Megumi, Nagata Hiroki, Sakamoto Shingo, Kijima Saku T, Furuumi Hiroyasu, Nonomura Ken-Ichi, Sato Yutaka, Ohme-Takagi Masaru, Endo Masaki, Comai Luca, Hatakeyama Katsunori, Kawakatsu Taiji, Kinoshita Tetsu | 4. 巻 33 |
| 2. 論文標題 Mutation of the imprinted gene OsEMF2a induces autonomous endosperm development and delayed cellularization in rice | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 The Plant Cell | 6. 最初と最後の頁 85-103 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1093/plcell/koaa006 | 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5件（うち招待講演 0件/うち国際学会 1件）

| |
|--|
| 1. 発表者名 Kaoru Tonosaki, Akemi Ono, Hiroyasu Furuumi, Yutaka Sato, Taiji Kawakatsu, Tetsu Kinoshita |
| 2. 発表標題 Multi-layers of epigenetic controls in the genomic imprinting during rice endosperm development |
| 3. 学会等名 CSHA Integrative Epigenetics in Plants (国際学会) |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 殿崎薫, 木下哲 |
| 2. 発表標題 イネの胚乳発生過程におけるゲノムインプリンティングの多層的なエピゲノム制御 |
| 3. 学会等名 第45回日本分子生物学会年会 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 殿崎薫、小野明美、永田博基、古海弘康、野々村賢一、川勝泰二、佐藤 豊、Luca Comai、木下 哲 |
| 2. 発表標題 栽培イネと野生イネにおけるインプリントームの比較 |
| 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 殿崎薫 |
| 2. 発表標題 The factor of transcriptional repression regulating endosperm development in rice |
| 3. 学会等名 第62回 日本植物生理学会年会 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 殿崎薫、小野明美、古海弘康、野々村賢一、佐藤豊、遠藤真咲、Luca Comai、畠山勝徳、川勝泰二、木下 哲 |
| 2. 発表標題 イネ胚乳発生を制御するポリコーム複合体の標的遺伝子の同定 |
| 3. 学会等名 日本育種学会第139回講演会 |
| 4. 発表年 2021年 |

〔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 |
|---------|---------|
|---------|---------|