

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 14 日現在

機関番号：13901

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2013～2016

課題番号：25450005

研究課題名(和文) イネ無胚乳変異体の解析による多核胚乳形成機構の解明

研究課題名(英文) Mechanisms underlying the formation of syncytial endosperm using endospermless mutants in rice

研究代表者

服部 束穂 (HATTORI, TSUKAHO)

名古屋大学・生物機能開発利用研究センター・教授

研究者番号：10164865

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 4,000,000円

研究成果の概要(和文)：多くの被子植物の種子形成過程では、重複受精によって生じた胚乳原核は細胞質分裂を経ない核分裂により多核胚乳形成する。イネでは数千個の核をもつ多核胚乳が形成される。このようなイネ胚乳初期発生の制御メカニズムに関する知見を深めるために、成熟種子においては胚乳組織が欠損しているイネの無胚乳変異体enl2の解析を進めた。その結果enl2変異体は多核胚乳期における染色体分離や核の離散に異常を示すことが明らかになった。さらに変異の原因遺伝子候補を次世代シーケンサで同定したところ、クラミドモナス等の生物で核膜融合や減数分裂にも機能するとされるタンパク質に類似したタンパク質をコードする遺伝子が浮かび上がった。

研究成果の概要(英文)：In many angiosperms, the primary endosperm nucleus produced by double fertilization undergoes division without cytokinesis resulting in the formation of syncytial nuclear endosperm. In rice nuclear endosperm with several thousands of free nuclei is observed 3 days after pollination. To obtain deeper insight into the regulatory mechanism, we investigated a rice endospermless mutant, enl2, which lacks endosperm tissues in its mature seeds. We found that the mutant had defects in chromosome segregation and separation of free nuclei. In addition, we identified a candidate causal gene of enl2 by NGS. The gene encoded a protein, of which orthologs in some lower eukaryote including Chlamydomonas have been reported to function in nuclear envelope fusion and meiosis.

研究分野：植物分子生物学

キーワード：胚乳 穀類 核

### 1. 研究開始当初の背景

重複受精により精核と2つの中央細胞核とが融合して生じた胚乳核原(3n)はまず、細胞質分裂なしに分裂を続け、シウジョウバエ初期胚のような多核細胞(syncytium)を生じる。イネでは、受精後2.5日以内に4000個以上もの胚乳核が生じ、胚嚢内周に一樣に並ぶ。驚くべき分裂速度である。その後一斉に細胞化し通常の細胞分裂により胚乳組織が形成されていく。胚乳の正常な発生には、両親ゲノムの寄与率や組み合わせが重要であり交雑不和合の原因となることから、胚乳発生は、育種学的にも重要な研究課題である。近年、これに関連する研究が進展している。たとえば、胚乳発生にはゲノムインプリンティングが関与し、インプリンティングやエピジェネティック制御の異常が細胞化のタイミング異常を引き起こすことが明らかにされている。他にも胚乳の細胞化のタイミング異常が見られるシロイヌナズナ変異体とその原因遺伝子が同定されるなど、細胞化の制御に関する知見は広がっている。一方、多核胚乳の形成過程については分子遺伝学的知見が乏しい。急速な核分裂による多核化は、短期間に効率よく細胞数を増加させるための手段であると考えられるが、この過程が支障なく進行するか否かは、その後の胚乳形成や形質に重大な影響を与えると推定される。多核状態の細胞質の様態や核分裂および細胞化に関して多くの細胞生物学的知見があり、特有の微小管構造の役割などが明らかにされているが、急速な核の増殖を可能にし、正確なゲノムの複製を保障するためのメカニズムに関する知見は極めて乏しい。

このような背景のもと我々はこれまで、イネの無胚乳変異体 *endospermless1* (*enl1*) の解析を進めてきた。*enl1* 変異体では、胚乳初期発生に異常があり胚乳組織が形成しない。また、胚乳が存在しないため、胚が巨大化する。胚を乾燥前にレスキューすることで次世代個体を形成することができる変異ホモ型個体を得ることができる。我々はこの点に注目した。シロイヌナズナでは、胚乳発生に異常がある変異体のほとんどが胚発生を中断することと対比的で、イネには胚乳発生に特異的な過程に異常を持つ新奇変異体の分離や解析に適した材料であると考えた。これまでに、*enl1* 変異体の胚乳初期発生過程の観察から、この変異体では多核化過程での核分裂、染色体の分離に異常があり、不定形の巨大な核を形成しその後の組織形成ができないことを明らかにした。、*enl1* の原因遺伝子をクローニングしところ、SNF2 ファミリーのクロマチンリモデリングヘリカーゼ様タンパク質で、染色体分離の際に残る DNA カテネーションの処理にかかわるヒト PICH のオルソログをコードすることがわかった。これらの結果から ENL1 は胚乳核の分裂時に、染色体の分離を確実にを行うために必要なタンパク質であると考えられた。

### 2. 研究の目的

本研究では、これまで進めてきた *enl1* 変異体に加えて新規無胚乳変異体 *endospermless2* (*enl2*) の解析を進めることで多核胚乳形成の制御メカニズムを明らかにし、我々のきわめて重要な食料そのものであるイネ胚乳の形成機構に関する知見を深めることを目的とした。

### 3. 研究の方法

#### <植物材料>

植物は、名古屋大学附属フィールド教育研究センター圃場および東山キャンパス内の開放系ガラス室にて栽培した。*enl2* 変異体は日本晴の変異誘起剤 NMU 処理によって得られた集団の中から連携研究者の長戸が胚乳変異体候補として選抜したものの1つである。*enl2* ヘテロ個体につく無胚乳種子の胚は強い穂発芽性を示し、乾燥により枯死するため完熟前に採取し、レスキューした。採取した種子を 25% アンチホルミン溶液で 20 分間浸透滅菌した後、滅菌水で洗浄し、MS 培地に播種して 28 日の連続明所で発芽、幼苗に生育させたのちポットあるいは圃場に移植した。

#### <次世代シーケンサによるリシーケンシング>

MutMap 法による原因遺伝子の同定のためのリシーケンシングには次世代シーケンサ Ion Proton™ システム (Thermo Fisher Scientific Inc.) を用いた。出力されたリードのアライメントと SNV の検出は CLC Genomics Workbench (CLC bio Inc.) (<http://www.clcbio.co.jp/index.php?id=78>) を用いた。

#### <ヨウ化プロピディウム (PI) 染色と共焦点レーザー顕微鏡での観察>

開花前および開花後 6 時間ごとに 48 時間後までの穎果を採取し、内穎と外穎を取り除き、FAA 固定液し、70% エタノールに置換後エタノールシリーズ(70%、50%、30% エタノール)を経て PBS(0.9% NaCl、50mM リン酸バッファー pH7.4)に置き換え RNaseA で処理した。次に 1/200 量の PI(1mg/mL)を加え、遮光して 12 時間以上静置した後、新しい PBS と置換し、エタノールシリーズを経て無水エタノールに置換、さらにエタノール-サリチル酸メチルシリーズで 100% サリチル酸メチルに置換した。完成したサンプルをガラススペースディッシュ (IWAKI) に乗せ、倒立型共焦点レーザー顕微鏡 (OLYMPUS FV-1000-D) を用いて観察した。

### 4. 研究成果

#### <*enl2* の外見的表現型>

*enl2* の種子は *enl1* と同様に最終的に胚乳を持たない潰れた穀粒を生じる。*enl1* の場合と同様に胚の肥大化と穂発芽性を示す。しかし、*enl1* 植物の地上部は野生型と比較して分

げつが少ないのに対して、*enl2* では野生型との差は見られなかった。また、*enl2* は *enl1* に比べて穎果の発達極めて初期段階で停止する頻度が高いことが観察された。

#### < *enl2* の胚乳核 >

PI 染色した受粉後の子房を共焦点レーザー顕微鏡観察したところ、開花後 34 時間以降の胚乳での核の巨大化が観察されたため、さらに初期の胚乳核の観察を進めた。その結果、受粉後 12 時間以降では核のサイズが野生型より大きいものがすでにみとめられた。受粉後 30 時間以降では、さらに顕著になり核小体の数やサイズが大きくなった不定形な巨大核が観察された。また、受粉後 6 時間において、野生型では胚乳原核の最初の分裂直後における 2 つの娘核の明瞭な分離がみられたのに対し、変異体では極めて近接あるいは融合している様子がみとめられた。分裂期の核においては染色体分離異常も観察された。染色体分離異常など、*enl2* の異常は *enl1* のそれと類似している点もある一方、巨大化した核の様子は必ずしも同じとは言えず、核の融合の様子も *enl1* では観察されていないものであった。これらの結果は、*ENL2* は多核胚乳初期の染色体分離に加えて分裂後の核の離散に重要な働きをしていることを示唆する。

#### < *enl2* の原因遺伝子 >

コシヒカリとの F2 種子を用いたマーカーマッピングと、戻し交配後の BC1F2 の無胚乳種子から得た幼苗を材料とした次世代シーケンサーによる MutMap 法を用いて、*enl2* 原因遺伝子候補の同定を進めた。その結果、MutMap 法およびマーカーマッピングで絞り込まれた第 9 染色体上の領域にアノテートされた遺伝子上における唯一の塩基配列変化として候補を 1 つに絞り込んだ。この候補遺伝子はシロイヌナズナの配偶体において発現する遺伝子として報告されたものオルソログで、その機能喪失変異体は胚致死になるとされている。変異体ではアミノ酸置換 (Phe Ile) を伴う塩基置換が起っていた。この候補遺伝子タンパク質のもつ特徴的な配列は、保存度は高くないもの様々な生物種に見つかり、広く真核生物にオルソログが存在するとされている。酵母では接合における核膜融合に働くとの報告がある。また、クラミドモナスでは核膜融合に加え、減数分裂にも機能しているとされている。*enl2* 変異体の表現型を考えるとイネにおいてもそれらに関連した機能をもつことが予想される。

#### < 変異アレル作出による原因遺伝子の裏付けの試み >

この候補遺伝子が実際に *enl2* の原因遺伝子であることを裏付けるために、CRISPR/CAS 法によりフレームシフトを起こす変異体を複数作製した。しかし、得られ

た何れの変異系統において明確な *enl2* 様表現型を示す種子は形成されなかった。この結果は、候補遺伝子が原因遺伝子であるとの結論に対して否定的なものである。しかし、コシヒカリとの F2 を用いたマッピングおよび MutMap 法によるマッピング、さらには MutMap 法に供した個別個体を用いたマッピングにおいて絞り込まれた領域内には変異は 2 カ所しかなく、さらに遺伝子内にあるものはこの候補遺伝子における変異のみであったことなどを考えると、この候補遺伝子が実際には原因遺伝子ではない可能性は低いと考える。ではどのような説明が可能であろうか？シロイヌナズナでは、この遺伝子のオルソログは 1 コピーでその機能喪失変異は胚発生致死となることが報告されている。このことを考えると、変異導入により機能欠損が起こってなかった可能性もあり得る。今回導入した変異部位より下流のメチオニンコドンから開始したタンパク質が機能的だったのかもしれない。ただ、イネには候補遺伝子のホモログで C 末端側が欠損した遺伝子がもう 1 コピー存在するために致死にならなかった可能性も否定できない。もう一つの十分想定しうる可能性は、*enl2* 変異が機能獲得的な変異であった可能性である。すなわち、候補遺伝子における Phe Ile 置換により標的分子との相互作用に異常が生じたために *enl2* 表現型が現れるという可能性である。*enl2* 表現型を示す個体の 1 % 程度に遺伝子型がヘテロに現れる一方野生型ホモの個体は全く検出されていない。このことは *enl2* 変異が弱い優性をもつことを示唆し、機能獲得型の変異であるという仮説に合致する。現在、これらの点を解決するために野生型ゲノム断片の導入やさらなる変異アレルの作出を試みている。

#### 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 2 件)

Hara, T., Katoh, H., Ogawa, D., Kagaya, Y., Sato, Y., Kitano, H., Nagato, Y., Ishikawa, R., Ono, A., Kinoshita, T., Takeda, S. and Hattori, T. Rice SNF2 family helicase ENL1 is essential for syncytial endosperm development. *Plant J.* 81. 1-12 (2015) (査読あり)  
伊藤純一、佐藤豊、桧原健一郎、服部束穂、岩崎行弦 種子形成シナリオの分子遺伝学 育種学研究 15. 128-133 (2013) (査読なし)

##### [学会発表](計 5 件)

加藤大和、深井麻央、黒谷賢一、佐藤豊、北野英己、長戸康郎、小林裕子、小林一成、武田真、服部束穂 アリユーロンが

多層化するイネ胚乳変異体 *abnormal aleurone layer 1 (aal1)* の解析. 日本育種学会第 128 回講演会 2015 年 09 月 11-12 日 新潟

黒谷賢一、加藤大和、高藤良典、小林裕子、小林一成、佐藤豊、桧原健一郎、長戸康郎、北野英己、In-Sun Yoon、武田真、服部束穂 イネ胚乳発生異常変異体 *endosperm defective 1 (end1)* の原因遺伝子はシキミ酸経路初発酵素をコードする. 日本育種学会第 128 回講演会 2015 年 09 月 11-12 日 新潟

Kurotani, K., Katoh, H., Suzuki, T., Kobayashi, Y., Kobayashi, Sato, Y., Nagato, Y., Kitano, H., Yoon, I.S., Takeda, T. and Hattori, T.

Characterization of rice seed mutants --- toward identification of mutated loci using NGS. XII France-Japan Workshop on Plant Science 2014 -Plant Responses to Environment 2014 年 10 月 27-29 日 東京

Katoh, H., Hara, T., Ogawa, D., Kagaya, Y., Sato, Y., Kitano, H., Nagato, Y., Ishikawa, R., Ono, A., Kinoshita, T., Kurotani, K., Miyata, Y., Nishio, M., Kojima, S., Takeda, S. and Hattori, T. Rice ENDOSPERMLESS1, an SNF2 family chromatin remodeling helicase, plays an essential role in nuclear proliferation during syncytial endosperm development in rice. XII France-Japan Workshop on Plant Science 2014 -Plant Responses to Environment (招待講演) 2014 年 10 月 27-29 日 東京

服部束穂 イネの胚乳形成について 第 34 回種子生理生化学研究会年会 2013 年 12 月 6-7 日 箱根

〔図書〕(計 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

服部 束穂 (HATTORI, Tsukahō)  
名古屋大学・生物機能開発利用研究センター・教授  
研究者番号: 10164865

### (2) 研究分担者

なし

### (3) 連携研究者

長戸 康郎 (NAGATO, Yasuo)

東京大学・名誉教授

研究者番号: 10143403

### (4) 研究協力者

加藤 大和 (KATO, Hirokazu)

黒谷 賢一 (KUROTANI, Ken-ichi)

宮田 康弘 (MIYATA, Yasuhiro)