

令和 3 年 6 月 22 日現在

機関番号：22701

研究種目：新学術領域研究(研究領域提案型)

研究期間：2016～2020

課題番号：16H06471

研究課題名(和文) 胚乳における種の障壁：エピゲノム制御の鍵分子機構

研究課題名(英文) Species barriers in endosperm: key molecular mechanisms of epigenetic regulation

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) 94,700,000円

研究成果の概要(和文)：受精後の胚乳においては、極めて鋭敏に異種ゲノムを感知する「鍵と鍵穴」が配置されている。ここでは、両親ゲノムにおける塩基配列レベルの違いのみならず、可塑性の高いエピジェネティックな制御機構がその重要な役割を担っている。本研究では、植物の新種誕生原理の解明のため、受精後の胚乳の生殖障壁をエピジェネティックに誘導するDNA脱メチル化に必須であるFACTヒストンシャペロンの役割と、受精後の胚乳が自らを崩壊させることにより異種ゲノムを排除する機構、さらには種の障壁が倍数性により打破できる機構を明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

胚乳胚乳の発生は塩基配列レベルのみならず、ゲノムインプリンティングを介したエピジェネティックな機構によりオス由来とメス由来のゲノムのバランスが保たれている。この機構は同種の交雑ではバランスが保たれているが、異種の交雑ではそのバランスが崩れる致死となる。本研究では、その分子機構を明らかにし、異種の交雑においても片親の倍数性を操作するとバランスが復帰して発芽可能な雑種種子が得られることを明らかにした。

研究成果の概要(英文)：The mechanism of species hybridization barrier is arranged in the plant endosperm to avoid heterologous fertilization with different species, which is controlled by not only nucleotide sequence but also epigenetic mechanisms. In this study, in order to elucidate the principle of the birth of new plant species, we clarified the role of FACT histone chaperones, which are essential for DNA demethylation to epigenetically induce reproductive barriers in the endosperm. We also identified basics that species barrier can be overcome by increased ploidy levels in one parent.

研究分野：植物分子遺伝学

キーワード：胚乳 生殖的隔離 エピジェネティクス

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

受精後の胚乳においては、極めて鋭敏に異種ゲノムを感知する「鍵と鍵穴」が配置されていることが知られている。ここでは、異種ゲノムとの交雑時における両親ゲノムにおける塩基配列レベルの違いのみならず、可塑性の高いエピジェネティックな制御機構がその重要な役割を担っている。その一つとしてゲノムインプリンティングが同定されており、その制御機構の解明は胚乳における生殖隔離の一端、すなわち新学術領域のテーマである植物新種誕生の原理の解明のために重要である。

2. 研究の目的

本研究計画では、新学術領域のテーマである植物の新種誕生原理の解明のため、受精後の胚乳の生殖障壁をエピジェネティックに誘導する DNA 脱メチル化と FACT ヒストンシャペロンの役割の解明、ならびに受精後の胚乳が自らを崩壊させることにより異種ゲノムを排除する機構を明らかにすることを目的とする。また、古くから園芸分野等で知られていた、胚乳における種間障壁に対して、倍数体を組み合わせるとこれが打破される現象に関して、イネ属を用いてその分子機構に迫ることを目的とした。

3. 研究の方法

1) シロイヌナズナの DNA 脱メチル化に関与する FACT ヒストンシャペロンの構成因子の *ssrp1* 変異体の胚乳と DNA 脱メチル化酵素 *demeter* 変異体を用いて、ゲノムワイドなエピゲノム解析比較を行った。

2) イネ属の *O. sativa* とアフリカ由来野生イネ *O. longistaminata* の異種間交雑と母親 *O. sativa* に 4 倍体を用いて胚乳発生における細胞化などの形態マーカーを用いた胚乳発生の比較、インプリント遺伝子を中心とした遺伝子発現比較を行った。

3) イネのインプリント遺伝子を制御すると予想されるポリコーム複合体構成因子の *OsEMF2a* に着目し、Crispr/Cas9 によるゲノム編集を用いて突然変異体を得て、その機能の詳細を解析した。

4. 研究成果

1) シロイヌナズナの微量組織である胚乳を用いて、ショットガンバイサルファイトシーケンシングによるゲノムワイドなメチローム解析を行った。その結果、FACT ヒストンシャペロン構成因子の *SSRP1* は、DNA 脱メチル化酵素の *DEMETER* とオーバーラップした標的の DNA 脱メチル化に関与していることが明らかとなった。*DEMETER* は比較的短いトランスポソンの DNA 脱メチル化にも影響する。これに対して、*SSRP1* は比較的長いトランスポソンの DNA 脱メチル化に影響する。シロイヌナズナでは、短いトランスポソンはユークロマチン領域に存在するのに対して、長いトランスポソンはペリセントロメアなどのヘテロクロマチン領域に存在する。標的領域のヒストン修飾等のエピゲノム情報解析もこのことを支持する結果が得られている。従って、*DEMETER* はユークロマチン領域には単独で DNA 脱メチル化するのに対して、ヘテロクロマチン領域に対しては *SSRP1* の機能に依存しているというモデルを得るに至った (Frost et al, PNAS 2018)。

2) イネ属の異種間交雑、すなわち母親 *O. sativa* と父親アフリカ由来野生イネ *O. longistaminata* の交雑では、*OsMADS87* や *OsYUCCA11* 等のインプリント遺伝子の発現が異常となり、かつ胚乳発生が遅延する異常がおこる。一方で、母親の *O. sativa* を 4 倍体にしてオス親アフリカ野生イネと交雑した場合は、胚乳発生異常が緩和され、*OsMADS87* や *OsYUCCA11* 等のインプリント遺伝子の発現異常も緩和される。さらには、致死性を示していた種子も、90% 以上の発芽率を示す雑種種子が得られた (Tonosaki et al, Plant J. 2018)。このことは、ジャガイモ等で古くから知られていた、種の障壁を倍数性の操作で打破できるという現象に対して、その分子機構の鍵を握る因子にゲノムインプリンティングがあることを示唆している。

3) 胚乳で高発現するポリコーム複合体構成因子である *OsEMF2a* 遺伝子の解析により、同遺伝子は、母親特異的に発現するインプリント遺伝子であることが判明した。また、そのゲノム編集ノックアウト個体では、シロイヌナズナの *medea* 変異体で観察されている表現型に類似した受精に依存しない胚乳の核分裂が観察された。シロイヌナズナのポリコーム遺伝子変異体との違いは、イネの変異体ではデンプン蓄積や貯蔵タンパク質の蓄積が見られることである。従って、ポリコーム複合体は自律的な胚乳発生(アポミクシス様の胚乳発生)の抑制に働いているという更なる確証を得た。さらに、胚乳発生の解析から、母親から変異体の対立遺伝子が伝わった場合は胚乳発生異常が現れるのに対して、父親から変異体対立遺伝子が伝わった場合(母親の対立遺

伝子は野生型)は、殆ど異常が発生しないことが明らかとなった。このことも *OsEMF2a* 遺伝子が母性発現するインプリント遺伝子であることと一致している。ポリコーム複合体によりエピジェネティックに抑制される標的遺伝子を明らかにするために、H3K27me3 の ChIP-seq 解析を行った。その結果、多くの転写因子を含む父性発現インプリント遺伝子の H3K27me3 のマークの消失が観察されると同時に遺伝子発現抑制が解除されていることが明らかとなった (Plant Cell, 2021)。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計7件（うち査読付論文 6件/うち国際共著 4件/うちオープンアクセス 3件）

1. 著者名 Tonosaki Kaoru, Kinoshita Tetsu	4. 巻 -
2. 論文標題 Endosperm Development	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 eLS	6. 最初と最後の頁 1~7
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1002/9780470015902.a0020098.pub2	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 Frost JM, Kim MY, Park GT, Hsieh PH, Nakamura M, Lin SJH, Yoo H, Choi J, Ikeda Y, Kinoshita T, Choi Y, Zilberman D, Fischer RL.	4. 巻 115
2. 論文標題 FACT complex is required for DNA demethylation at heterochromatin during reproduction in Arabidopsis.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Proc. Natl. Acad. Sci USA	6. 最初と最後の頁 E4720-E4729
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1073/pnas.1713333115.	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 Kinoshita T	4. 巻 4
2. 論文標題 A parental tug-of-war	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Nat Plants	6. 最初と最後の頁 329-330
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1038/s41477-018-0179-9.	査読の有無 無
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 Motomura K, Kawashima T, Berger F, Kinoshita T, Higashiyama T, Maruyama D.	4. 巻 131
2. 論文標題 A pharmacological study of Arabidopsis cell fusion between the persistent synergid and endosperm.	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 J Cell Sci.	6. 最初と最後の頁 jcs204123
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1242/jcs.204123.	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 該当する

1. 著者名 Tonosaki K, Sekine D, Ohnishi T, Ono A, Furuumi H, Kurata N, Kinoshita T.	4. 巻 93
2. 論文標題 Overcoming the species hybridization barrier by ploidy manipulation in the genus <i>Oryza</i> .	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 The Plant Journal	6. 最初と最後の頁 534-544
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/tpj.13803.	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 Motomura K, Berger F, Kawashima T, Kinoshita T, Higashiyama T, Maruyama D	4. 巻 41
2. 論文標題 Fertilization-independent Cell-fusion between the Synergid and Central Cell in the Polycomb Mutant.	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Cell Struct Funct.	6. 最初と最後の頁 121-5
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1247/csf.16010.	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 Piskurewicz U, Iwasaki M, Susaki D, Megies C, Kinoshita T, Lopez-Molina L.	4. 巻 5
2. 論文標題 Dormancy-specific imprinting underlies maternal inheritance of seed dormancy in <i>Arabidopsis thaliana</i> .	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 eLIFE	6. 最初と最後の頁 e19573
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.7554/eLife.19573.	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0件

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

植物遺伝子発現スイッチの初発イベントを解明
<https://www.yokohama-cu.ac.jp/news/2018/20180501kinoshita.html>
 木原生物学研究所 木下 哲教授の解説記事がNature Plants誌に掲載されました
<https://www.yokohama-cu.ac.jp/news/2018/20180528kinoshita.html>
 お米（イネ胚乳）の生長を制御する遺伝子を同定〜受粉無しでデンプンを蓄積〜
https://www.yokohama-cu.ac.jp/news/2020/20201125kinoshita_PC.html

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
研究分担者	吉田 健太郎 (Yoshida Kentaro) (40570750)	神戸大学・農学研究科・准教授 (14501)	
研究分担者	赤木 剛士 (Akagi Takashi) (50611919)	京都大学・農学研究科・助教 (14301)	削除：2018年11月5日

	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
連携研究者	河邊 昭 (Kawabe Akira) (10582405)	京都産業大学・生命科学部・教授 (34304)	
連携研究者	大西 孝幸 (Ohnishi Takayuki) (60722311)	宇都宮大学・農学部・准教授 (12201)	

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