

平成 29 年 6 月 20 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：2011～2015

課題番号：23113003

研究課題名(和文) イネ属胚乳における父・母ゲノムのエピジェネティックな調和と軋轢の分子機構

研究課題名(英文) Mechanisms of hybridization barriers in rice endosperm

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) 109,800,000円

研究成果の概要(和文)：植物の胚乳では、父由来と母由来のゲノムの機能が異なることが知られており、このことが受精後の生殖隔離の原因となると考えられてきた。本研究課題では、イネの種間交雑や倍数体間交雑、あるいは両者の組合せを解析することにより、ポリコム複合体により制御されている胚乳の発生進行が生殖隔離の鍵を握ること、倍数性操作により種の障壁を打破できることなどを明らかにした。平行して、インプリントされたポリコム複合体の構成因子の活性化機構の詳細を、シロイヌナズナの変異体解析により明らかにした。

研究成果の概要(英文)：In plants, the endosperm is a site for hybridization barrier, where maternally- and paternally derived genomes have distinct roles for their development. Classical studies predicted that the maternal genome represses endosperm growth and the paternal genome promote it. In this study, we conducted detailed analyses of the hybrid endosperms in interspecific or interploidy cross of rice or combination of those (Plant J. 2011, 2013, and in preparation). These analysis revealed that developmental transition under the control of Polycomb Repressive Complex 2 (PRC2) is a key determinant for this phenomena. We also identified several components for DNA demethylation that is required for activation of imprinted genes in Arabidopsis thaliana (Dev Cell 2011, New Phytologist 2013, PNAS 2014).

研究分野：植物分子遺伝学

キーワード：エピジェネティクス イネ 胚乳 シロイヌナズナ 生殖隔離機構 ゲノムインプリンティング

1. 研究開始当初の背景

哺乳動物および被子植物において、様々な現象の詳細な観察から、父由来と母由来のゲノムの機能が異なることが知られていた。古くから植物では、倍数体間交雑、種間交雑をおこなうと胚乳の過成長や萎縮といった発生異常がおこり、またこの現象は正逆の交雑方向に依存することから、母由来のゲノムは抑制的に、父由来のゲノムは促進的に機能することが指摘されていた。哺乳動物では、母由来のゲノムは胎盤を抑制するのに対し、父由来のゲノムは促進することが知られていることから、哺乳動物や被子植物では、胎盤と胚乳といった胚への栄養供給を担う組織において両親由来のそれぞれのゲノムの機能は共通していることも指摘されていた。

しかしながら、種間交雑実験はモデル生物のみでは行えないため、その分子機構の全容は長らく不明であった。ひとつの作業仮説は、父由来と母由来とで異なる遺伝子発現をするインプリント遺伝子が介在するというものであるが、その実態も殆ど明らかではなかった。

2. 研究の目的

哺乳動物と被子植物においては、胚への栄養供給を担う組織（胎盤と胚乳）において上述のような興味深い収斂した制御機構が存在する。これまでの知見から、雌雄生殖細胞におけるエピジェネティックな情報制御により、オス由来ゲノムは胎盤や胚乳発生に正（過成長）に働き、メス由来ゲノムは負（矮小化）に働くと理解されている。このようなゲノムの機能差は、オス由来とメス由来のそれぞれのゲノムから特異的に発現するインプリント遺伝子によってもたらされているという仮説が一般的である。

こうした仮説に関して、1) イネの栽培種や野生種、さらには倍数体種間の交雑を行い、その分子メカニズムを明らかにすること。2) シロイヌナズナのインプリント遺伝子を活性化できない変異体の解析から、詳細なエピジェネティック制御機構を明らかにすること。これら両面から胚乳における生殖隔離機構を紐解くことを研究の目的とした。

3. 研究の方法

1) イネ属をモデルに、胚乳における生殖隔離の分子機構を明らかにする目的で、栽培イネ (*Oryza sativa*) と各種野生イネの中からモデルとして扱い易い (*O. longistaminata*)、(*O. punctata*) を選抜し種間交雑を行った。同様に、倍数体間交雑を行い、テクノビット樹脂切片による胚乳発生解析、遺伝子発現解析、透明化後 PI 染色、共焦点顕微鏡観察による解析などを行った。

2) インプリント遺伝子 *FWA* をモニターでき

るリポーターコンストラクトを導入したシロイヌナズナを変異原処理し、*FWA-GFP* を活性化できない変異体をこれまでに複数得ている。これら複数の変異体に関して分子遺伝学的な解析を加えた。

4. 研究成果

1) イネやシロイヌナズナを含め、多くの植物の胚乳核は受精後、卵細胞の核分裂に先だって、一次胚乳が核分裂を開始する。加えて、短時間に細胞数を稼ぐためと考えられているが、細胞質分裂を伴わずに多核体を生ずる。その後、決まった発生のタイミングで一斉に細胞化する。種間交雑において萎縮する組合せでは、発生進行プログラムが早く、核分裂が十分に進まないうちに細胞化し成熟する。一方で、過成長する組合せでは、多核体期が極端に長くなっており、胚乳が肥大してしまうことが明らかとなり、本研究領域が発足する直前に報告した (Ishikawa R, Plant J. 2011)。本研究領域では、倍数体間交雑に関しても検証し、同様に胚乳発生の亢進、遅延が胚乳の過成長と萎縮に関与していることを明らかにした (Sekine D, Plant J. 2013)。

種間交雑では、ゲノムの配列が異なる2種を掛け合わせる。一方倍数体間交雑では、ゲノムの配列が同じで、ゲノムの倍数性(量)が異なる2種を掛け合わせる。両者は本質的には異なる交雑であるが、胚乳で観察される表現型は酷似している。実際、シロイヌナズナの研究でも両者を明確に区別できる分子メカニズムは報告されていない。しかしながらイネの種間交雑と倍数体間交雑では、明確な違いが認められる。すなわち、種間交雑では胚乳発生の進行にのみ影響が現れるのに対して、倍数体間交雑では胚乳発生の進行に加えて、核分裂の rate にも違いが見られることを明らかにした。さらには、倍数体を操作すると日本晴と *O. longistaminata* の種の障壁を打破できることを明らかにした (Tonosaki et al, 投稿準備中)

2) シロイヌナズナを用いインプリント遺伝子の発現に影響を与える変異体の解析を行った。一つ目の変異体は、詳細な解析の結果 FACT ヒストンシャペロンの構成因子 SSRP1 をコードし、DNA 脱メチル化酵素がヘテロクロマチン領域にアクセスするために必要であることが判った (Ikeda Y, et al, Dev. Cell 2011, Frost JM, 投稿準備中)。さらに、細胞質の Fe-S クラスター生合成経路の因子として *AtNAR1* (Nakamura M, et al, New Phytologist 2013)、*AtDRE2* (Buzas D, et al, PNAS 2014) などが明らかとなり、中央細胞におけるこれらの因子がインプリント遺伝子の活性化に必要であることを明らかにした。

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 12 件)

1. Hara T, Katoh H, Ogawa D, Kagaya Y, Sato Y, Kitano H, Nagato Y, Ishikawa R, Ono A, Kinoshita T, Takeda S, Hattori T. Rice SNF2 family helicase ENL1 is essential for syncytial endosperm development. *Plant J.* 81: 1-12 (2015) (査読有り)

2. Tonosaki K, Kinoshita T. Possible roles for polycomb repressive complex 2 in cereal endosperm. *Front. Plant Sci.* 12;6:144 doi: 10.3389/fpls.2015.00144. eCollection (2015) (査読有り)

3. Ohnishi T, Sekine D, Kinoshita T. Genomic imprinting in plants: what makes the functions of paternal and maternal genes different in endosperm formation? *Adv Genet.* 86:1-25. (2014) (査読有り)

4. Kinoshita T, Seki M. Epigenetic Memory for Stress Response and Adaptation in plants. *Plant Cell Physiol.* Oct 8. 55: 1859-63. (2014) (査読有り)

5. Kurusu T, Koyano T, Hanamata S, Kubo T, Noguchi Y, Yagi C, Nagata N, Yamamoto T, Ohnishi T, Okazaki Y, Kitahata N, Ando D, Ishikawa M, Wada S, Miyao A, Hirochika H, Shimada H, Makino A, Saito K, Ishida H, Kinoshita T, Kurata N, Kuchitsu K. OsATG7 is required for autophagy-dependent lipid metabolism in rice postmeiotic anther development. *Autophagy* 10 (5): 887-888 (2014) (査読有り)

6. Buzas DM, Nakamura M, and Kinoshita T. Epigenetic role for the conserved Fe-S cluster biogenesis protein AtDRE2 in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 111:13655-70 (2014) (査読有り)

7. Sekine D, Ohnishi T, Furuumi H, Ono A, Yamada T, Kurata N, Kinoshita T. Dissection of two major components of the post-zygotic hybridization barrier in rice endosperm. *Plant J.* 76: 792-799. (2013) (査読有り)

8. Ohnishi T, Yoshino M, Toriyama K, Kinoshita T. Rapid establishment of introgression lines using cytoplasmic male sterility and a restorer gene in *Oryza sativa* cv. Nipponbare. *Molecular Breeding* 32: 831-839. (2013) (査読有り)

9. Vu TM, Nakamura M, Calarco JP, Susaki D, Lim PQ, Kinoshita T, Higashiyama T, Martienssen RA, Berger F. RNA-directed DNA methylation regulates parental genomic imprinting at several loci in *Arabidopsis*. *Development* 140: 2953-2960. (2013) (査読有り)

10. Nakamura M, Buzas DM, Kato A, Fujita M, Kurata N, Kinoshita T. The role of *Arabidopsis thaliana* NAR1, a cytosolic iron-sulfur cluster assembly component, in gametophytic gene expression and oxidative stress responses in vegetative tissue. *New Phytologist* 199: 925-935. (2013) (査読有り)

11. Kinoshita T. Jacobsen SE. Opening the Door to Epigenetics in PCP. *Plant Cell Physiol.* 53: 763-765. (2012) (査読有り)

12. Ikeda Y., Kinoshita Y., Susaki D., Ikeda Y., Iwano M., Takayama S., Higashiyama T., Kakutani T., Kinoshita T. (2011) HMG domain containing *SSRP1* is required for DNA demethylation and genomic imprinting in *Arabidopsis*. *Developmental Cell* 21: 589-96. (2011) (査読有り)

〔学会発表〕(計 18 件)

1. Tetsu Kinoshita, Epigenetic control and reproductive barrier in endosperm. 24th International Congress on Sexual Plant Reproduction, University of Arizona, Arizona, USA, 2016/03/19. (招待講演)

2. Tetsu Kinoshita, Mechanism of Hybridization Barrier in Plant Endosperm, 17th Annual Meeting of Society of Evolutionary Studies, Japan, Meiji University, Tokyo, September 21, 2015

3. 大西 孝幸、高松 壮、及川 和聡、猪俣 拓也、田中 啓介、古海 弘康、倉田 のり、小林 久人、三ツ井 敏明、木下哲、イネのオルガネラゲノムのリシーケンス、日本育種学会第 128 回講演会、新潟大学、新潟県新潟市、2015 年 9 月 11 日

4. 木下哲、シロイヌナズナにおける DNA 脱メチル化機構、日本遺伝学会第 86 回大会、長浜バイオ大学、滋賀県長浜市、2014 年 9 月 17 日

5. 木下哲、オス・メスのせめぎ合い ~植物ゲノムの場合~、日本動物学会第 85 回仙台大会シンポジウム、東北大学、宮城県仙台市、2014 年 9 月 12 日

6. 木下哲、植物におけるエピジェネティックリプログラミングの役割、第30回資源植物科学シンポジウム及び、第6回植物ストレス科学研究シンポジウム、岡山大学資源植物科学研究所、岡山県倉敷市、2014年3月7日
7. 木下哲、男と女の争い～ただし植物ゲノムの場合～、第8回アロ認証領域会議、名古屋大学、愛知県名古屋市、2014年1月8日
8. 木下哲、男と女の争い～ただし植物編～、第91回バイオセミナー、長浜バイオ大学、滋賀県長浜市、2013年8月6日
9. 木下哲、オスゲノムとメスゲノムの争い～イネ属胚乳における生殖隔離とエピジェネティック制御～、83th CRC Seminar & 第35回岩手育種談話会、岩手大学、岩手県盛岡市、2013年7月19日
10. 池田陽子、木下哲、植物生殖過程におけるリプログラミングとセクシャルコンフリクト、有性生殖におけるゲノム・遺伝子相関、第35回日本分子生物学会年会ワークショップ、福岡国際会議場・マリンメッセ福岡、福岡県福岡市、2012年12月11日
11. Tetsu Kinoshita, "Control of genomic imprinting by a component of the FACT histone chaperon", -A New Generation of Plant Embryo Research-, NAIST International Symposium, NAIST, Nara, Japan, Oct. 29, 2012 (Organizer)
12. Tetsu Kinoshita, "Control of genomic imprinting by a component of the FACT histone chaperon" -Reproductive Organ Development I: Genetic and Epigenetic Aspects of Seed Development-, The 10th International Congress on Plant Molecular Biology, Juju, Korea, Oct. 22, 2012. (Session co-chair)
13. Tetsu Kinoshita, "Implications of parental genome imbalance for plant endosperm development, -Plant Genetics in Asia-, 日本遺伝学会ワークショップ、九州大学、福岡県福岡市、2012年9月26日
14. 木下哲、「変異体解析による作物の形態に關与する遺伝子の解明」、植物の種間交雑による胚乳形態変化のルールとイネ属を用いた分子機構の解明、第51回ガンマワールドシンポジウム、三の丸ホテル、茨城県水戸市、2012年7月11日
15. 関根大輔、大西孝幸、古海弘康、倉田のり、木下哲、「イネの胚乳発生・サイズを制御する父・母ゲノムの効果」、日本育種学会

第121回講演会、宇都宮大学、栃木県宇都宮市、2012年3月29日

16. Ryo Ishikawa, Takayuki Ohnishi, Yuki Kinoshita, Mitsugu Eiguchi, Nori Kurata and Tetsu Kinoshita, "Epigenetic Control of Species Hybridization in Plant Endosperm". -Speciation and Adaptation II, Environment and Epigenetics-, Aichi, The 8th Okazaki Biological Conference, NIBB, Okazaki, Aichi, Mar. 22, 2012

17. 関根大輔、大西孝幸、古海弘康、吉野みほ子、倉田のり、木下哲、「イネの倍数体間交雑における胚乳発生異常の解析」、第53回植物生理学会、京都産業大学、京都府北区、2012年3月16日

18. Tetsu Kinoshita, "Role for imprinted genes in interspecies hybridization barrier in rice", XXII International Congress on Sexual Plant Reproduction, University of Melbourne, Melbourne, Australia, Feb. 16, 2012

〔図書〕(計9件)

1. 大西孝幸、吉野みほ子、山川博幹、木下哲、イネのバイオトロン栽培法の紹介 応用糖質科学 第4巻、3号 p215-218. (2014)

2. 木下哲 ～第21回木原記念財団学術賞受賞研究紹介～「植物におけるオス・メスゲノムのせめぎ合い」木原財団ニュースレター No30, p4-7 (2014)

3. 前川雅彦、金澤章、堤伸浩、木下哲、土生芳樹、柴博史、江面浩、エピミュタジェネシスと次世代育種への展開、育種学研究 15: 42-50. (2013)

4. 木下哲、小野明美、RdDMを介した植物におけるエピジェネティック変異の誘導と後代への伝達、「Induction of epigenetic modifications by RNA-directed DNA methylation (RdDM) and their inheritance to the next generation in plants」、植物の生長調節、48(2): 142-147. (2013)

5. 木下哲、「植物生殖過程におけるエピジェネティックな情報のリプログラミング」Epigenetic reprogramming of maternal and paternal genome during plant sexual reproduction. Leading Author's、ライフサイエンス領域融合レビュー、2:e001 (2013)

6. 中村みゆき、木下哲 (2011) エピジェネティクス ゲノムが拓く生態学種生物学会

編 文一総合出版 p109-122.4.

7. 木下哲 (2011) ゲノムに刷り込まれた生殖隔離 ゲノムが拓く生態学 種生物学会
編 文一総合出版 p141-155.

8. 池田陽子、木下哲 (2011) “ HMG 遺伝子 SSRP1 はシロイヌナズナにおける DNA 脱メチル化およびゲノムインプリンティングに必要である ” 細胞工学, 学研メディカル秀潤社, 30, 179-201.

9. 木下哲、池田陽子 (2011) シロイヌナズナにおけるゲノムインプリンティングと DNA の脱メチル化の制御には HMG ドメインを含むタンパク質 SSRP1 をコードする遺伝子が必要である ライフサイエンス新着論文レビュー
10.7875/first.author.2011.151

〔産業財産権〕

出願状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
出願年月日 :
国内外の別 :

取得状況 (計 0 件)

名称 :
発明者 :
権利者 :
種類 :
番号 :
取得年月日 :
国内外の別 :

〔その他〕

ホームページ等
<http://epigenome.jp/>

6. 研究組織

(1) 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

(2) 研究分担者

河邊 昭 (KAWABE Akira)
京都産業大学・総合生命科学部・准教授
研究者番号 : 10582405