

令和 2 年 6 月 8 日現在

機関番号：63801

研究種目：国際共同研究加速基金（国際共同研究強化）

研究期間：2016～2019

課題番号：15KK0279

研究課題名（和文）イネの初期胚をモデルとした細胞分化機構の理解と形態形質変化への利用（国際共同研究強化）

研究課題名（英文）Understanding a mechanism regulating cellular differentiation using rice embryo. (Fostering Joint International Research)

研究代表者

佐藤 豊 (Yutaka, Sato)

国立遺伝学研究所・ゲノム・進化研究系・教授

研究者番号：40345872

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 10,800,000円

渡航期間： 3ヶ月

研究成果の概要（和文）：本国際共同研究は、イネと同じイネ科に属しており、極力イネと遠縁で、かつ、分子遺伝学的な実験材料としてよく整備されているトウモロコシを研究材料に用い、トウモロコシの変異系統集団から、イネのgle変異体と類似した系統を選抜し、その解析を通して、イネ科植物の初期胚の細胞分化機構の普遍性と特異性を明らかにすることを目指した。具体的には、変異体のスクリーニング並びに、次世代シーケンサーを用いたトランスポゾンタギング法による原因遺伝子の単離を行った。また、リバースジェネティクスによるイネ胚形成突然変異のオルソログ遺伝子のトウモロコシ変異の同定も行った。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究により、日本のイネ研究者が主導する植物発生学と、米国のトウモロコシ用いた植物発生学研究者との国際的な連携を通して、同じイネ科作物であるイネとトウモロコシの発生の共通性と特異性を議論することができるようになった。今後、シロイヌナズナ一辺倒の現在の偏った植物発生学をより幅広い考察が可能な学問分野へと発展させることが期待される。

研究成果の概要（英文）：In order to understand the conservation and diversities of molecular mechanism governing plant embryogenesis, I tried to compare embryogenesis of rice and maize through identification of similar set of mutations between them. I screened gle-like mutants in maize and identified several causal genes that give rise to gle phenotype. It turned out that all the causal mutations for gle found in maize are not the one previously identified in rice gle mutations. This suggests that embryo mutations recovered in maize and rice look similar but the pathway identified through these mutations are different. This is possibly due to the difference in genetic redundancy in these pathways. Thus, it is worth analyzing the embryo mutant in different plant materials so that whole pivotal pathways for plant embryogenesis become elucidated.

研究分野：植物発生遺伝学

キーワード：イネ トウモロコシ 胚

1. 研究開始当初の背景

本課題は、科研費・基盤(B)「イネの初期胚をモデルとした細胞分化機構の理解と形態形質改変への利用」を基課題として、国際共同研究により基課題の成果を国際的に認知度が高く、より影響力のある研究へと格段に発展させることを目的とした研究である。

基課題は、イネの初期胚形成時の細胞分化機構を明らかにすることを研究目的としている。基課題のこれまでの研究で、イネ胚形成初期の細胞分化に関わる一連の突然変異体(*globular embryo: gle* 変異体)の解析から、受容体型キナーゼを介した情報伝達がイネ初期胚の細胞分化に働くことを明らかにした。受容体型キナーゼは細胞間情報伝達の基本的な構成要素であり、胚形成時の細胞分化を誘導する新規シグナルの存在を意味している。また、この受容体型キナーゼはシロイヌナズナにおいては、異なる発生過程に関与する事が知られており、そのリガンド分子も明らかにされている。すなわち、シロイヌナズナにおいては、別の発生過程に関わるシグナル伝達が、イネにおいては、初期胚の細胞分化に機能することが示唆される。

基課題におけるこれらの発見は、次の二つの点で大きなインパクトをもたらした。(1)イネ初期胚の細胞分化が、シロイヌナズナとは異なる制御を受けている。(2)シグナル伝達の主要構成要素(受容体型キナーゼ)が、種によって異なるシグナリングイベントに使われている。一方、シロイヌナズナを用いた研究に主導されている植物発生学において、研究代表者の発見は、イネ特有の例外的な発生経路であるとの誤解を受けやすいのが現状である。実際には、多数の植物の初期胚形成イベントを解析し、何が普遍的で何が種特異的な制御なのかを理解することが何よりも必要である。

2. 研究の目的

本研究課題は、イネ以外の植物を材料に初期胚における細胞分化機構を解析し、その種を越えた普遍性を検証することを研究目的とする。本国際共同研究により、イネで発見した初期胚の細胞分化機構が普遍的な現象であることの確認を目指した。また、もし基課題の発見がイネに特有の現象であったとしても、既存のシグナル伝達経路等の構成要素が、その作用点を種ごとに頻繁に変更できることを意味しており、植物の発生機構の進化を考える上で、鍵となる重要な知見をもたらすことが期待できる。

本国際共同研究の目的を達成するためには、イネと同じイネ科に属しており、極力イネと遠縁で、かつ、分子遺伝学的な実験材料としてよく整備されているトウモロコシを研究材料に用いることが最適である。そこで、本研究では、トウモロコシの変異系統集団から、イネの *gle* 変異体と類似した系統を選抜し、その解析を通して、イネ科植物の初期胚の細胞分化機構の普遍性と特異性を明らかにすることを目指した。

本国際共同研究では、トウモロコシの変異系統の蓄積がある米国の研究者(フロリダ大学教授 Donald McCarty 博士)との共同研究を行った。渡米期間中に、変異体のスクリーニング並びに、次世代シーケンサーを用いたトランスポゾンタギング法による原因遺伝子の単離を行うことを計画した。次世代シーケンシングを含むこれらの実験は、相手先研究室でルーチンに行われており、材料となるトウモロコシの育成後のスクリーニングと分子遺伝学実験も、滞在中に行うことがベストである。一方、原因遺伝子単離のための情報解析など、日本国内でも行える解析も計画した。

3. 研究の方法

本研究の研究代表者がこれまで解析対象にしてきたイネの *gle* 変異体は、球状の変異型胚であるにもかかわらず正常な胚乳をもつ系統を解析材料にしている。胚と胚乳は重複受精により細胞あたりの染色体数が異なるが、胚における機能欠損型の劣性突然変異は胚乳でも同様に劣性突然変異として振舞う。すなわち、胚乳が正常である胚形成の突然変異体を選抜することにより、ハウスキーピング遺伝子の変異を除外し、胚発生に特異的に関わる変異の濃縮を可能にしている。

トウモロコシを研究材料にして分子遺伝学的方法で研究を行っている Donald McCarty 博士らは、トウモロコシの種子の着色と種子の休眠に関する研究の世界的権威である。種子着色と種子休眠に関する突然変異は、トウモロコシの実(ear)において分離する種子着色や種子休眠に関する突然変異体を長年スクリーニングしそれらを主な解析材料としている。このスクリーニングの過程で、トウモロコシの変異集団においてもイネの *gle* と同様の正常な胚乳をもつ *gle* 型突然変異系統が多数出現することに気がついていた(Donald McCarty 博士私信)。研究代表者は、これまでにトウモロコシの種子着色と休眠に関連する変異体の表現型解析を Donald McCarty 博士と共同で行ってきた関係があり、自身が最も興味のあるイネ変異体に類似したものがトウモロコシにも存在する可能性が高いことを Donald McCarty 博士に指摘された。これまでのこのような情報交換を通して、トウモロコシの胚形成突然変異の解析を行う国際共同研究を進める十分な根拠と準備を整えた。

滞在研究室では、Uniform Mu と呼ばれる遺伝的背景が整ったトランスポゾンによる変異系統を整備している。本研究の目的である、トウモロコシの *gle* 型変異体のスクリーニングおよび変異の原因となる遺伝子単離を短期間に行うためには、Uniform Mu 集団を利用したトランスポゾンタギング法がもっとも効果的である。また、相手先研究分野では、種子の着色に関する変異体と Uniform Mu 集団から単離しており、研究代表者がスクリーニングする材料とほぼ

同じ材料をシェアすることができるので、材料の準備に必要な時間を大幅に短縮できる。そこで、滞在期間中に、変異体のスクリーニング並びに、次世代シーケンサーを用いたトランスポゾンタギング法による原因遺伝子の単離を行うことを計画した。Donald McCarty 博士には、スクリーニングの材料の提供とトウモロコシの育成に関する協力をお願いした。

また、滞在先研究室では、Mu トランスポゾンによる変異体ライブラリからのリバースジェネティクスによる突然変異の同定も盛んに行われていた。そこで、イネの *gle* 型突然変異のうち、原因遺伝子単離まで進んでいる系統について、原因遺伝子のトウモロコシオルソログにおける変異体のスクリーニングを行い、イネとトウモロコシにおける変異体の表現型比較も行った。

4. 研究成果

具体的な研究成果としては、まずトウモロコシの変異系統ライブラリーから胚形成に関わる突然変異を多数スクリーニングした。その結果、イネの *gle* 型突然変異系統に類似しており、器官を分化しないにも関わらず、ある程度の大きさになるまで変異型胚が発達する突然変異系統を多数単離できた。その後、自殖後代を育成し、次世代への遺伝を確認した。次に、このうちの約 30 系統について、アウトクロスを一度行い、Mu トランスポゾンとの連鎖を解析する材料の育成を行なった。その後、各個体からゲノム DNA を抽出し、次世代シーケンス解析のためのライブラリー作成も行なった。このライブラリーを次世代シーケンス解析に供し、情報解析を行なった。その結果、複数の胚形成を制御する新規因子の候補を得た。この中から、Mu トランスポゾン変異ライブラリーのデータに対立遺伝子変異がある系統に着目して、これら対立遺伝子変異系統も含め表現型の解析を行うための材料を育成し、胚の形態的表現型を詳細に観察した。その結果、フォワードジェネティクスで見つけたものと同様の変異形態を示す系統が複数見つかった。このことから、複数の胚形成を制御する新規因子の同定に成功したと結論づけた。

このように、フォワードジェネティクスで、イネの *gle* 型突然変異系統に類似したトウモロコシでの胚形成突然変異をスクリーニングし原因遺伝子を単離するアプローチについては、多数の原因遺伝子を明らかにしたものの、イネで明らかにされている胚形成遺伝子群とは全く異なる新規因子が多数単離されている。このことは、イネとトウモロコシで、突然変異体の表現型が類似していても異なる経路に機能する遺伝子が得られることを意味している。表現型の類似度から、胚形成のプロセスそのものは、イネとトウモロコシである程度保存されていることが予想されるが、材料を変えることにより、遺伝的に重複している経路が異なるためか、突然変異の原因として見いだすことができる発生経路が異なることが考えられる。このことから、異なる植物材料で胚発生突然変異の解析を行うことで、植物の胚発生経路の全貌に迫ることができると考えられる。これらについても発表準備を進めている。

次に、リバースジェネティクスによる、トウモロコシ胚形成突然変異の単離については、イネの胚形成に関わることがわかっている遺伝子上の突然変異もひとつ同定できた。イネの突然変異の解析において、原因遺伝子は、トウモロコシでもシングルコピー遺伝子であることがわかっていった。そこで、この遺伝子のトウモロコシオルソログにおける、Mu トランスポゾンの挿入系統を検索した。

その結果、2 系統の挿入系統を見つけることができた。一つは、開始メチオニンの直下に挿入があり、もう一系統は、エクソン 2 への挿入であった。エクソン 2 への挿入はノックアウトになっている可能性が高いと思われたが、開始メチオニン直下の挿入は、遺伝子機能に影響がない可能性も考えられた。一方、この遺伝子は、局在シグナルが N 末端部にあることもわかっており、開始メチオニン直下の挿入がタンパク質局在に影響を与えることも考えられた。そこで、開始メチオニン直下に Mu トランスポゾンの挿入がある系統の Mu トランスポゾンの LTR 内からの転写物に含まれる開始メチオニンをつかった変異型タンパク質および野生型タンパク質を蛍光レポータータンパク質に融合させて、玉ねぎの表皮細胞で一過的発現させることにより、野生型と変異型タンパク質の細胞内局在を観察した。その結果、変異型タンパク質では、野生型における細胞内局在が弱くなる表現型が観察された。また、胚の表現型については、エクソン 2 への挿入系統は、イネオルソログの突然変異と極めて類似した表現型を示すことから、ノックアウトであることが強く示唆された。一方、開始メチオニン直下への挿入系統は、胚の表現型はほとんどみられなかったが、発芽後の植物体に一部表現型が観察されたことから、弱アレルであると結論づけた。

この遺伝子は、本スクリーニングシステムには珍しいハウスキーピング遺伝子であった。一方、胚乳は正常に発達することから、母体から必要な成分が供給されることにより胚乳は発達するが、胚の発達には不十分なため、胚の表現型だけが観察されたと考えた。そこで、トウモロコシの弱アレルを使い、親の遺伝子型が種子の表現型に影響を及ぼすかどうかを調べたところ、弱アレルホモの親に、ノックアウトアレルのヘテロを交配したところ、ノックアウトアレルホモの胚と類似した表現型の胚が分離するのに対し、弱アレルヘテロの親では、同様の交雑

後に、ノックアウトに類似した胚は分離してこなかった。このことから、親の遺伝子型に応じて、子の表現型が変化することが明らかになった。このことは、親から子へこのハウスキーピング遺伝子が生産に関わる物質にコミュニケーションが存在することが示唆された（論文投稿準備中）。

本研究により、日本のイネ研究者が主導する植物発生学と、米国のトウモロコシ用いた植物発生学研究者との国際的な連携を通して、同じイネ科作物であるイネとトウモロコシの発生の共通性と特異性を議論することができるようになった。今後、シロイヌナズナ一辺倒の現在の偏った植物発生学をより幅広い考察が可能な学問分野へと発展させることが期待される。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計5件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 0件/うちオープンアクセス 2件）

1. 著者名 Fumika Clara Kubo, Yukiko Yasui, Toshihiro Kumamaru, Yutaka Sato, Hiro-Yuki Hirano	4. 巻 91
2. 論文標題 Genetic analysis of rice mutants responsible for narrow leaf phenotype and reduced vein number.	5. 発行年 2016年
3. 雑誌名 Genes Genet. Syst.	6. 最初と最後の頁 235-240
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) http://doi.org/10.1266/ggs.16-00018	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 -
1. 著者名 Yoshioka Miki, Adachi Ayako, Sato Yutaka, Doke Noriyuki, Kondo Tatsuhiko, Yoshioka Hirofumi	4. 巻 20
2. 論文標題 RNAi of the sesquiterpene cyclase gene for phytoalexin production impairs pre and postinvasive resistance to potato blight pathogens	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Molecular Plant Pathology	6. 最初と最後の頁 907 ~ 922
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.1111/mpp.12802	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 Tamura Taizo, Endo Hitoshi, Suzuki Atsunobu, Sato Yutaka, Kato Ko, Ohtani Misato, Yamaguchi Masatoshi, Demura Taku	4. 巻 100
2. 論文標題 Affinity based high resolution analysis of DNA binding by VASCULAR RELATED NAC DOMAIN7 via fluorescence correlation spectroscopy	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 The Plant Journal	6. 最初と最後の頁 298 ~ 313
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.1111/tbj.14443	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 Ishimoto Kiyoe, Sato Yutaka et al.	4. 巻 146
2. 論文標題 Specification of basal region identity after asymmetric zygotic division requires mitogenactivated protein kinase 6 in rice	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Development	6. 最初と最後の頁 dev176305
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.1242/dev.176305	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 Shenton Matt, Sato Yutaka et al.	4. 巻 12
2. 論文標題 Evolution and diversity of the wild rice <i>Oryza officinalis</i> complex, across continents genome types, and ploidy levels	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Genome Biology and Evolution	6. 最初と最後の頁 413 ~ 428
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) https://doi.org/10.1093/gbe/evaa037	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 -

〔学会発表〕 計6件 (うち招待講演 1件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 Yutaka Sato
2. 発表標題 Plant embryogenesis: Conservations and divergencies envisioned form rice research
3. 学会等名 16th International Symposium on Rice Functional Genomics (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 佐藤豊
2. 発表標題 NBRPイネリソースの紹介
3. 学会等名 日本育種学会第134回講演会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 高橋(野坂)実鈴、鈴木 俊哉、佐藤(志水)佐江、Nhung Ta、高橋 宏和、鈴木 孝征、豊田 敦、中園 幹生、佐藤 豊
2. 発表標題 イネ胚形成におけるETT転写因子の下流で機能する転写因子群の解析
3. 学会等名 第60回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 加藤大和、深井麻央、阿南秀、佐藤豊、志水佐江、北野英己、小林裕子、小林一成、武田真、服部束穂
2. 発表標題 イネ胚乳の発生におけるプラスチドシグナリングの関与
3. 学会等名 第60回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Masako Fuji, Yuniar Devi Utami, Shigetaka Yasuda, Rena Tani, Yuichi Hongoh, Yutaka Sato, Yusuke Saijo
2. 発表標題 Damage-associated Pep peptides influence root architecture and microbiome in rice
3. 学会等名 第60回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Yuniar Devi Utami, Masako Fuji, Yukiko Shimizu, Yuichi Hongoh, Yutaka Sato, Yusuke Saijo
2. 発表標題 Field Analysis for structural dynamics of rice associated microbiome
3. 学会等名 第60回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計2件

1. 著者名 Yutaka Sato, Misuzu Nosaka-Takahashi, Toshiya Suzuki, Sae Shimizu-Sato	4. 発行年 2018年
2. 出版社 Springer	5. 総ページ数 15
3. 書名 Rice Genomics, Genetics and Breeding	

1. 著者名 都筑正行、濱田隆宏、佐藤 豊	4. 発行年 2016年
2. 出版社 化学同人	5. 総ページ数 372(104-114)
3. 書名 ノンコーディングRNA	

〔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
主たる渡航先の主たる海外共同研究者	マッカーティー ドナルド (McCarty Donald)	フロリダ大学・園芸学部植物分子細胞生物学研究室・教授	