

令和 3 年 10 月 21 日現在

機関番号：11201

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2017～2019

課題番号：17K15210

研究課題名(和文) イネPolycomb複合体が制御する胚乳発生機構の解明

研究課題名(英文) Mechanisms of endosperm development controlled by Polycomb repressive complex 2 in rice

研究代表者

殿崎 薫 (Tonosaki, Kaoru)

岩手大学・農学部・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)：本研究では、ヒストン修飾に関与するPRC2(ポリコム複合体)構成因子をコードするOsEMF2aが、イネの胚乳発生を制御することを明らかにした。また、Osemf2a変異体におけるRNA-seqおよびChIP-seq解析から、胚乳発生に関与するOsEMF2aの標的遺伝子を見出した。加えて、Osemf2a変異体において、受精せずに胚乳発生が進行する自律的胚乳発生を観察し、自律的に発生した胚乳ではタンパク粒やデンプン蓄積が起こることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

イネの胚乳は、可食部となる器官であり、その大きさや品質が商品価値を決定する主要因であるため、胚乳の発生機構の理解は農作物としてのイネの重要な課題である。そのため、胚乳発生制御を担うPRC2の機能とその標的遺伝子を明らかにできたことで、胚乳発生制御ネットワークの理解が深まると期待される。また、イネの胚乳におけるPRC2の機能に関する報告は本研究が初めてであり、PRC2の機能が広範な植物種に保存されていることを示すことができた。

研究成果の概要(英文)：In this study, we demonstrate that mutation of the rice gene OsEMF2a, which encodes a component of PRC2, causes an abnormally delayed developmental transition in the endosperm.

In addition, transcriptome and H3K27me3 ChIP-seq analyses in Osemf2a mutant identified the putative downstream targets of PRC2, that are required for endosperm development. Before fertilization, we observed an autonomous endosperm phenotype in Osemf2a mutant, even in the absence of fertilization. Detailed histological and transcriptomic analyses revealed that the autonomous endosperm can produce storage compounds, starch granules and protein bodies specific to the endosperm.

研究分野：植物遺伝育種学

キーワード：イネ 胚乳 ポリコム複合体

様式 C-19、F-19-1、Z-19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

イネの胚乳の大きさや品質は商品価値を決定する主要因であるため、胚乳発生機構の理解は農作物としてのイネの重要な課題である。重複受精によって生じた胚乳核は、細胞質分裂を伴わずに分裂し、多核体を形成する(多核体期)。続いて、胚乳核が細胞壁を形成することで細胞構造が形成され(細胞化)、内側に細胞分裂を繰り返すことで、胚乳が形成される。その後、登熟期に貯蔵物質を蓄積し、正常な胚乳が成熟する(図1A)。成熟期はコメの主成分であるデンプン合成が行われる過程であるため研究は古くから行われており、関連する因子も数多く単離されている(Zhou et al., Curr. Opin. Plant Biol, 2013)。一方で、登熟期以前の過程は胚乳細胞数を決定し、胚乳細胞が形成される重要な過程であるにも関わらず、有効な変異体がないことや、発生期間が短く観察が困難なために、初期胚乳発生に関わる分子はほとんど明らかになっていない(図1B)。

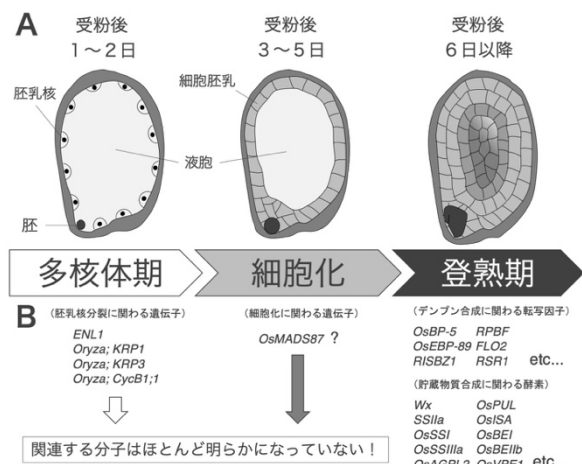


図1. イネの胚乳発生 (A) と関連遺伝子 (B)

シロイヌナズナでは、ヒストン修飾に関与する Polycomb repressive complex 2 (PRC2) が胚乳の細胞化を制御していることが知られているが、イネでは関連が示されていない。我々は、CRISPR/Cas9 システムを用いて、イネの PRC2 構成因子の1つである *OsEMF2a* の遺伝子破壊システムを作出し、*Osemf2a* 変異体では種子形成に異常が生じることを明らかにしている。

2. 研究の目的

本研究では *Osemf2a* 変異体の詳細な表現型解析および、*OsEMF2a* が制御する標的遺伝子の機能を明らかにすることで、イネ PRC2 が制御するイネ胚乳発生メカニズムを理解することを目的とした。

3. 研究の方法

(1) *Osemf2a* 変異体の表現型解析

我々のこれまでの研究から、*OsEMF2a* が母親対立遺伝子からのみ発現するインプリント遺伝子であることを明らかにしている。そこで、*Osemf2a* 変異体の種子形成に見られる異常の遺伝様式を調べるために、*Osemf2a* 変異体の自殖および、野生型との相互交雑を行い、異常な種子の出現頻度を調査した。また、*OsEMF2a* が関与する胚乳発生過程を詳細に調べるために、野生型および *Osemf2a* 変異体から得られる自殖種子の樹脂切片による組織学的観察を行い、交配後日数ごとの胚乳発生程度を比較した。なお、*Osemf2a* 変異体は、ホモ致死であるため、変異アレルをヘテロにもつ *Osemf2a/+* を実験に用いた。

(2) 胚乳発生に関わる PRC2 標的遺伝子の検出および機能解析

PRC2 は H3K27me3 のヒストン修飾によって標的遺伝子の転写を抑制する機能を担っている。そのため、PRC2 が制御する標的遺伝子は、*Osemf2a* 変異体では脱抑制され、遺伝

子発現が上昇していると考えられる。そこで、胚乳における RNA-seq 解析および H3K27me3 についての ChIP-seq 解析を実施し、胚乳発生過程で *OsEMF2a* に制御される標的遺伝子の候補遺伝子を探索した。見出された候補遺伝子については、CRISPR/Cas9 によって遺伝子破壊系統を作出し、その機能解析を実施した。

(3) *Osemf2a* 変異体における自律的胚乳発生

シロイヌナズナの PRC2 変異体では、胚乳発生の異常と共に、自律的胚乳発生が観察される。自律的胚乳発生は、受精せずに胚乳核分裂が引き起こされる現象である。そこで、*Osemf2a* 変異体においても自律的胚乳発生が生じるかの検証を行った。*Osemf2a* 変異体において除雄後に子房の肥大が見られるかを観察し、肥大の見られた子房については、樹脂切片を作成して胚乳核分裂の有無を調査した。更に、自律的な胚乳発生の見られる子房におけるトランスクリプトーム解析を実施し、胚乳発生に特徴的な遺伝子の活性化が見られるかについて調査した。

4. 研究成果

(1) *Osemf2a* 変異体の表現型解析

Osemf2a 変異体の自殖では、約半数で異常な種子が見られ (図 2)、通常の変異でみられる 3:1 分離を示さなかった。また、野生型と *Osemf2a/+* の相互交雑を行ったところ、*Osemf2a/+* を父親に用いた交配では全て正常な種子が得られたが、*Osemf2a/+* を母親に用いた場合には、異常な種子が見られた。この結果から、*OsEMF2a* の機能が parent-of-origin 効果を示すことが明らかになった。

更に、野生型および *Osemf2a* 変異体から得られる自殖種子における胚乳発生を交配後日数ごとに調査したところ、*Osemf2a/+* の自殖種子の約半数の種子では、野生型と同じタイミングで胚乳発生が進行していた。しかし、それ以外の種子では、野生型では胚乳の細胞化が完了する交配後 5 日目においても、多核体期の胚乳が観察された (図 2)。しかし、*Osemf2a/+* の交配後 7 日目には、全ての種子で細胞化が開始されていたことから、*OsEMF2a* の機能欠損によって、胚乳発生の進行が遅延することが明らかとなった。

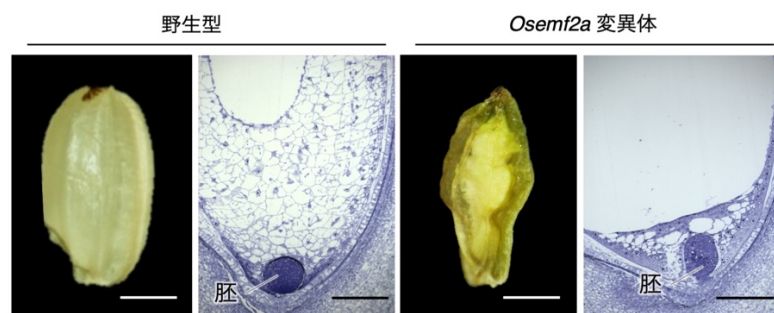


図 2. *Osemf2a* 変異体の完熟種子と胚乳発生

左：野生型の自殖種子の形態。受粉後 3 日目には細胞化した胚乳が観察できる。右：一方、*Osemf2a* の成熟種子は異常な形態を示し、受粉後 5 日目の種子では胚乳の細胞化は見られない。

(2) 胚乳発生に関わる PRC2 標的遺伝子の検出および機能解析

RNA-seq 解析および ChIP-seq 解析の結果から、野生型の胚乳と比較して、*Osemf2a* の胚乳で発現量が上昇し、かつ H3K27me3 の修飾を受ける遺伝子を網羅的に探索したところ、3,000 個以上の多くの遺伝子が見出された。それらの遺伝子の中には、シロイヌナズナにおける先行研究において、胚乳の細胞化に関わることが報告されている MADS-box 転写因子

が多く含まれていた。そこで、これら複数の MADS 遺伝子のうち、*Osemf2a* の胚乳で発現量の上昇が顕著ないくつかの MADS 遺伝子の変異体を作成し、機能解析を実施した。しかしながら、単一の MADS 遺伝子の変異体では、表現型の変化は見られなかった。一方、MADS 遺伝子と *Osemf2a/+* の二重変異体系統を作成したところ、*Osemf2a/+* 変異体で見られていた種子形成異常の割合が顕著に低下する系統が見られた。この結果から、PRC2 に制御される胚乳細胞化の調節に関与する MADS 遺伝子を見出すことができた。

(3) *Osemf2a* 変異体における自律的胚乳発生

Osemf2a/+ 変異体では、除雄後 10 日には約半数の子房で肥大が確認できた。肥大した子房を組織学的に観察したところ、胚乳核の分裂を確認することができた (図 3)。さらに、肥大した子房内には、胚乳細胞の形成は見られないものの、デンプンや protein-body などの蓄積が確認できた。更に、自律的胚乳核分裂の生じた子房におけるトランスクリプトーム解析を実施したところ、通常は受精後の胚乳でのみ活性化されるオーキシン関連遺伝子や転写因子、更には、デンプンなどの貯蔵物質合成に関与する遺伝子群の高発現が見られた。これら結果から、*Osemf2a/+* 変異体では自律的胚乳発生が誘導され、更には貯蔵物質の合成も開始することを明らかにした。

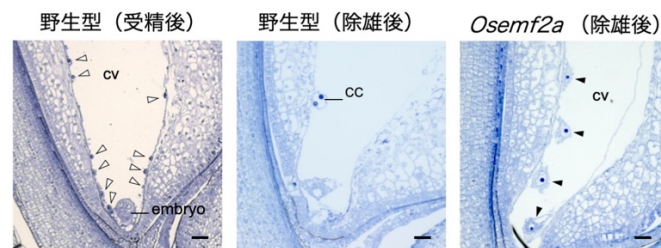


図 3. *Osemf2a* 変異体でみられる自律的胚乳発生

野生型の受粉後 2 日目の自殖種子では、分裂した胚乳核と胚が観察できるが (左)、野生型の除雄した子房では、2 つの極核 (cc) が観察されるのみである (中央)。受粉後 3 日目には細胞化した胚乳が観察できる。右：一方、*Osemf2a* の除雄後の子房では、胚の発達は見られないにもかかわらず、胚乳核の分裂が見られた (右)。

以上の (1) ~ (3) の結果から、イネの PRC2 が胚乳発生の制御および受精するまでの胚乳核分裂を抑制する機能を持っていることを明らかにした。これらの機能は、先行研究であるシロイヌナズナ PRC2 の機能と類似しており、単子葉植物と双葉植物で PRC2 の機能が保存されていることを初めて明らかにすることができた。以上の結果をまとめた論文を現在投稿中である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計3件（うち査読付論文 2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 Kaoru Tonosaki and Tetsu Kinoshita	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 -
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 石井孝佳・岡本龍史・殿崎 薫・長岐清孝・木下 哲	4. 巻 19
2. 論文標題 特集記事 ワークショップ報告「受精後雑種障壁研究の育種利用に向けて」	5. 発行年 2017年
3. 雑誌名 育種学研究	6. 最初と最後の頁 35～40
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1270/jsbbr.19.35	査読の有無 無
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 Tonosaki Kaoru, Sekine Daisuke, Ohnishi Takayuki, Ono Akemi, Furuumi Hiroyasu, Kurata Nori, Kinoshita Tetsu	4. 巻 93
2. 論文標題 Overcoming the species barrier by ploidy manipulation in the genus Oryza	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 オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 西野愛、殿崎薫、国定愛美、小野明美、木下哲
2. 発表標題 イネ胚乳発生におけるOsEMF2aの機能解析
3. 学会等名 日本育種学会 第135回講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 殿崎 薫, 川勝 泰二, 小野 明美, 古海 弘康, 野々村 賢一, Luca Comai, 木下 哲
2. 発表標題 イネ種間雑種胚乳におけるインプリントーム解析
3. 学会等名 日本育種学会第136回講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 国定愛美, 殿崎薫, 西野愛, 小野明美, 木下哲
2. 発表標題 自律的胚乳発生を示すOsEMF2aの形態学的解析
3. 学会等名 日本育種学会第136回講演会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 鎌田千裕, 長谷川綾子, 殿崎薫, 須崎大地, 丸山大輔, 木下哲
2. 発表標題 シロイヌナズナの雌性配偶体細胞におけるエピゲノム制御機構の解析
3. 学会等名 日本植物学会第83回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 Kaoru Tonosaki and TetsuKinoshita
2. 発表標題 Role of imprinted genes in relation to sexual and asexual endosperm development in rice
3. 学会等名 第61回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2020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 佐々木祥子, 白澤健太, 殿崎薫, 高畑義人, 畠山勝徳
2. 発表標題 エンドウにおける莢可食性関連形質の遺伝解析
3. 学会等名 日本育種学会第137回講演会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

research map https://researchmap.jp/ktonosaki

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