

令和 3 年 6 月 11 日現在

機関番号：63801

研究種目：若手研究

研究期間：2018～2020

課題番号：18K14446

研究課題名(和文) イネ幹細胞リプログラミングを制御する遺伝子群の探索

研究課題名(英文) Investigation of genes controlling reprogramming during stem cell formation in rice

研究代表者

高橋 実鈴(野坂実鈴)(Nosaka-T, Misuzu)

国立遺伝学研究所・ゲノム・進化研究系・助教

研究者番号：20738091

交付決定額(研究期間全体):(直接経費) 3,200,000円

研究成果の概要(和文):本研究では、イネのリプログラミングの遺伝子スイッチとして幹細胞化を正に制御する因子を探索するため、胚の地上部幹細胞(茎頂分裂組織)を欠失する変異体の初期胚で野生型の初期胚と比べて発現の低下した遺伝子群を同定した。その結果、転写因子をコードする24個の候補遺伝子が得られ、これらの候補遺伝子は地上部幹細胞が形成される初期胚の腹側で発現していることを確認した。これらの候補遺伝子にはシロイヌナズナ、トウモロコシ、イネにおいて幹細胞形成に関与することが知られている多数の既知の遺伝子と複数の新規遺伝子が含まれていた。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究はイネのリプログラミングの遺伝子スイッチとして幹細胞化を正に制御する因子を探索した結果、イネ胚の地上部幹細胞の形成過程において24個の幹細胞化を正に制御する遺伝子候補を見出した。これらの遺伝子を活用することで、植物培養における植物細胞の再分化の高効率化に寄与することが予想され、遺伝子組換えが難しい作物への利用など育種分野への貢献が期待される。

研究成果の概要(英文):To investigate factors controlling reprogramming during stem cell formation in rice, we compared the gene expression of the wild-type embryos and the mutant embryos lacking shoot apical meristem including stem cells. As a result, we detected 24 genes encoding transcription factors as candidates of factors controlling reprogramming during shoot apical meristem formation in rice embryogenesis. We confirmed that these factors were expressed in the embryo during shoot apical meristem formation. These factors included well-known genes acting in shoot apical meristem formation in Arabidopsis, maize, and rice. We also found several new factors related to reprogramming during shoot apical meristem formation in rice embryogenesis.

研究分野：植物遺伝育種学

キーワード：茎頂分裂組織 幹細胞 イネ 再分化

1. 研究開始当初の背景

高等植物の地上部は、葉・茎・腋芽等の器官が茎頂分裂組織において連続的に形成されることにより作られる。茎頂分裂組織は幹細胞のように機能する細胞集団(以降、幹細胞と略す)を含んでおり、器官分化に消費された茎頂分裂組織の細胞を補いつつ、長期にわたり葉・茎・腋芽を作り続け、植物の持続的成長を可能にする。茎頂分裂組織に含まれる幹細胞は、受精後の胚形成過程で作られることが知られているが、その詳細な分子基盤、特に幹細胞の特徴を持つ細胞がどのように作られているかは明らかにされていない。

一方、植物細胞は分化全能性を持つことが古くから知られている。植物片を適切な濃度の植物ホルモンを含む培地で育てると、体細胞がカルスを経て新たな茎頂分裂組織を形成し、植物体が再生する。すなわちカルスからの再分化の過程において、幹細胞は体細胞の遺伝子発現リプログラミングを経て新たに形成される。しかし幹細胞化する細胞は一部の細胞に限られるため、ホルモンの応答して変化する大多数の細胞の遺伝子発現に隠されてしまい、リプログラミングを実際に起動する因子については解明されていない。

以上の背景をふまえて、本研究では植物における体細胞の遺伝子発現リプログラミングを誘導して幹細胞化させる因子を明らかにすることを目指した。本研究により幹細胞化を正に制御する因子を明らかにできれば、植物細胞の再分化の高効率化に寄与することが予想され、遺伝子組換えが難しい作物への利用など、育種分野への貢献を目指した。

2. 研究の目的

本研究は、植物において体細胞の遺伝子発現リプログラミングを誘導して幹細胞化させる因子を明らかにすることを目的とした。そのために、イネ胚発生突然変異系統のうち、幹細胞を含む茎頂分裂組織を特異的に欠失する *shootless (shl)* 突然変異体を研究材料として用いた。*shl* 変異体は胚における幹細胞を欠失するだけでなく、カルス化した細胞からの幹細胞形成能も失われる (PNAS, 2007)。一方、変異の原因遺伝子を変異型カルスに戻す相補実験により、カルスからの再分化能が復帰する。このことは、胚形成過程とカルスからの再分化過程における幹細胞の新生に同様のリプログラミングが働いていることを意味する。

本研究では、*shl* 変異体と野生型の遺伝子発現比較から、リプログラミングに機能する遺伝子候補群を特定し、これらの遺伝子を *shl* 変異型カルスで強制発現させることにより、リプログラミングを起動する因子、すなわちリプログラミングの遺伝子スイッチを明らかにすることを目指した。

3. 研究の方法

本研究は、イネの *shl* 変異体と野生型の初期胚の遺伝子発現比較を通して、リプログラミングの遺伝子スイッチを明らかにすることを目指した。*shl* 変異体は胚形成の初期に作られる地上部幹細胞(茎頂分裂組織)を欠失する変異体である。三つの *SHL* 遺伝子 (*SHL1*, *SHL2*, *SHL4*) は *tasiARF* と呼ばれる小分子 RNA の合成に必須で、*tasiARF* は *OsETTIN (OsETT)* 転写因子を負に制御している。*shl* 変異体においては、*tasiARF* が合成できないために *OsETT* が過剰に発現し幹細胞を欠失する。このことから、転写抑制因子である *OsETT* の *tasiARF* による負の発現制御が幹細胞形成に必須であり、*OsETT* の下流で機能する遺伝子群にリプログラミングの遺伝子スイッチが含まれる可能性が高いと考えた。そこで、本研究では *shl* 変異体と野生型の初期胚の遺伝子発現比較から、*OsETT* の下流で機能する遺伝子群を特定し、これらの中からリプログラミングの遺伝子スイッチを明らかにすることを目指した。

まず *OsETT* の下流で機能する遺伝子群を明らかにするため、レーザーマイクロダイセクション法により、*shl* 変異体と野生型の初期胚の RNA を 1 個体毎に抽出し、次世代シーケンサーを用いて 1 個体毎の遺伝子発現プロファイルを明らかにした。そして *shl* 変異体と野生型の初期胚の遺伝子発現を比較することで、*OsETT* の下流で機能する遺伝子群を抽出した。

次に *OsETT* の下流で機能する遺伝子群について、初期胚の幹細胞が形成される時期における発現を明らかにするため、*in situ* ハイブリダイゼーション法を用いて解析を行った。また、カルスからの再分化過程においても、幹細胞が新たに作られる時期に *OsETT* の下流で機能する遺伝子群が機能していることを確認するために、再分化前後のカルスから RNA を抽出し、トランスクリプトーム解析を行った。

4. 研究成果

(1) *OsETT* の下流で機能する遺伝子群の同定によりリプログラミングの制御因子候補を抽出した

イネのリプログラミングの遺伝子スイッチとして幹細胞化を正に制御する因子を探索するため、胚の地上部幹細胞(茎頂分裂組織)を欠失する *shl* 変異体と野生型の初期胚の遺伝子発現を比較して発現が変動した遺伝子群を同定した。これまでの *shl* 変異体の解析より、胚の地上部幹細胞形成には転写抑制因子である *OsETT* の小分子 RNA (*tasiARF*) による負の制御が必須であ

ることが明らかにされている。そのため、*tasiARF* を合成できない *shl* 変異体においては、*OsETT* の発現が上昇し、*OsETT* の下流で機能する遺伝子群の発現が低下していることが考えられた。そして、この *shl* 変異体で発現が低下している遺伝子群にリプログラミングの制御因子候補が含まれていると考えられた。

そこで3つの *shl* 変異体 (*shl1*, *shl2*, *shl4*) で共通して発現の低下している遺伝子群を探索した結果、67個の遺伝子が同定された。これら67個の遺伝子には転写因子をコードする遺伝子が多く含まれていた。先行研究により、胚の地上部幹細胞(茎頂分裂組織)の形成には転写因子の発現制御ネットワークが関与していることが明らかにされているため、*shl* 変異体で共通して発現の低下していた67個の遺伝子のうち、転写因子をコードする24個の遺伝子をリプログラミングの制御因子候補として抽出した。これらの候補遺伝子にはシロイヌナズナ、トウモロコシ、イネにおいて茎頂分裂組織で発現する既知の遺伝子が多く含まれていた。また、これまでに茎頂分裂組織の幹細胞形成過程での機能が知られていなかった複数の新規因子が含まれていた。

(2) *OsETT* の下流で機能する遺伝子群は初期胚の幹細胞を形成する領域で発現していた

リプログラミングの制御因子候補として抽出された *OsETT* の下流で機能する24個の候補遺伝子について、地上部幹細胞を形成する時期の初期胚における発現を *in situ* ハイブリダイゼーション法を用いて解析した。その結果、24個の候補遺伝子は地上部幹細胞が形成される初期胚の腹側で発現していた。

(3) *OsETT* の下流で機能する遺伝子群はカルスの再分化過程で発現していた

リプログラミングの制御因子候補として抽出された *OsETT* の下流で機能する24個の候補遺伝子について、カルスからの再分化過程においても、幹細胞が新たに作られる時期に機能しているか確認するために、再分化前後のカルスからRNAを抽出し、トランスクリプトーム解析を行った。その結果、23個の候補遺伝子が再分化前後のカルスで発現していることを確認した。

以上の結果より、本研究で見出した *OsETT* の下流で機能する転写因子群は、イネのリプログラミングの遺伝子スイッチとして幹細胞化を正に制御する因子として機能する可能性が示された。これらの転写因子群のリストは、植物細胞の再分化の高効率化に役立つことが期待される。今後は、これらの転写因子群のうち、リプログラミングを誘導して幹細胞形成を促進する必要十分な因子を同定するため、転写因子群に含まれる複数の遺伝子を *shl* 変異体カルスで強制発現させて、再分化能が復活する遺伝子セットを同定する。

< 引用文献 >

Nagasaki *et al.* (2007) PNAS **104**, 14867-14871.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 野坂実鈴
2. 発表標題 イネETTIN遺伝子の下流で茎頂分裂組織形成を起動する因子群の探索
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 高橋（野坂）実鈴、鈴木俊哉、佐藤（志水）佐江、タ・キム・ニユング、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

〔図書〕 計0件

〔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
---------------------------	-----------------------	----

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