

令和 5 年 6 月 12 日現在

機関番号：22604

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2020～2022

課題番号：20K21317

研究課題名（和文）交雑受精卵の作出およびゲノム動態制御によるC3-C4光合成細胞質置換

研究課題名（英文）C3-C4 cytoplasmic replacement via production of hybrid zygotes and regulation of genome dynamics

研究代表者

岡本 龍史（Okamoto, Takashi）

東京都立大学・理学研究科・教授

研究者番号：50285095

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 5,000,000円

研究成果の概要（和文）：本研究では、C4型光合成を行うトウモロコシおよびパールミレットとC3型光合成を行うコムギの配偶子を、任意の組み合わせで顕微受精することで様々な組み合わせの交雑受精卵を作出し、コムギ核C4光合成細胞質雑種・置換植物を創出することを目的として研究を遂行した。トウモロコシ-コムギ、およびパールミレット-コムギ間の異質倍数性交雑受精卵は発生・増殖・再分化し、植物体にまで成長した個体が得られた。交雑植物の形態はコムギと同様であった。また倍数性解析の結果より、これらの交雑植物のゲノムサイズがコムギとほぼ一致していたことから、それら交雑植物は、C3細胞質とC4細胞質の細胞質雑種コムギであることが推定された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

核と細胞内小器官（細胞質）の間には密接な情報と物質のやり取りがあり、これらの相互作用の上に真核細胞の存在がある。本研究の核心は、異種の配偶子を融合させることで異なる種の核と細胞内小器官を一つの細胞に共存させ、異種間の核-細胞内小器官の関係性を浮かび上がらせる点にある。本研究では、新たな核-細胞内小器官の組み合わせをもつ細胞の作出に成功し、異種間の核-細胞質の相互作用解析への礎を築いた。また、「核ゲノムと細胞内小器官（細胞質）の人為的組み合わせによる植物の新形質」という観点から考えた際には、「C3型光合成を行うコムギ細胞質のC4型光合成への置換」に向けた大きな一歩といえる。

研究成果の概要（英文）：Hybridization drives speciation and generates biodiversity, and wide hybridization plays a pivotal role in enhancing and broadening the useful attributes of crops by crossing species from distant gene pools. In the project, gametes isolated from C4-photosynthetic crops, such as maize and pearl millet, and wheat, an C3-photosynthetic crop, were used to generate allopolyploid zygotes in order to generate wheat plants possessing C3 and C4 cytoplasm. Allopolyploid wheat-maize hybrid zygotes with various gamete combinations have been produced and developed into possible wheat-maize hybrid plants, which appeared to possess a wheat nuclear genome and a wheat + maize cytoplasmic genome. In addition, allopolyploid wheat-pearlmillet hybrid zygotes with various gamete combinations were also produced and developed into possible wheat-pearlmillet hybrid plants, which appeared to possess a wheat nuclear genome and a wheat + pearl millet cytoplasmic genome.

研究分野：植物発生学

キーワード：交雑受精卵 細胞質置換 細胞質雑種 C4型光合成 C3型光合成 コムギ トウモロコシ パールミレット

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

1. 研究開始当初の背景

異種交雑は新たな形質をもつ生物が誕生する大きな原動力の一つであるが、種間の生殖的隔離によって交雑個体の形成が妨げられることが多い。被子植物の場合、生殖的隔離は花粉の発芽や花粉管の伸長が正常に行われないことによって配偶子融合が起こらない「受精不全」と、受精が生じてその受精卵の発生が停止してしまう「発生不全」の二つに分けられる。このうち受精不全は体細胞プロトプラストの融合や単離配偶子の人工受精などの細胞操作によって回避することが可能である。一方、交雑融合細胞などの発生不全は2種の細胞内容物が混在することによって引き起こされる細胞の恒常性の異常に起因することが多く、回避が困難である。真核細胞は核と細胞内小器官を含む細胞質から成り立っており、核-細胞内小器官間の密接な情報・物質の相互作用の上に、真核細胞の恒常性は維持されている。交雑細胞内では異なる二つの種に由来する核ゲノムと細胞内小器官が一つの細胞内に共存することになり、通常このような状態を維持したままその細胞が増殖することはなく、ゲノム(染色体)や細胞内小器官の脱落が生じる。これにより細胞の恒常性が失われ、結果として異種交雑細胞由来の個体の創出には至らない。このことは異種交雑によって生じた細胞は両親のゲノムおよび細胞内小器官を一過的に保持するが、多くの場合、細胞分裂を経るに従って片親あるいは両親由来のゲノム・細胞内小器官の一部あるいは全体が脱落してしまうことを意味する。しかしながら、このゲノムや細胞内小器官の脱落機構を制御することができれば、目的に沿ったゲノムと細胞内小器官のみを交雑細胞内に残存させることが可能になり、特定のゲノムと細胞内小器官を合わせ持つ細胞が創出できる可能性がある。さらに、この異種細胞の作出の際に雌雄の配偶子を *in vitro* 受精させることで、細胞内小器官と核の組み合わせをより自由に設定することが可能である。これは、卵細胞(雌性配偶子)はプラスチドやミトコンドリアなどの細胞内小器官を豊富に有するが、精細胞(雄性配偶子)はそれらをほぼ保持していないという配偶子の細胞学的特性による。

「核ゲノムと細胞内小器官(細胞質)の人為的組み合わせによる植物の新形質」という観点から考えた際、植物育種学上最も重要であるのは、C3型光合成を行うコムギやイネなどの細胞質を、より高い効率で光合成を行うC4型光合成へと置換することである。C3C4光合成置換の重要性から、これまでC4型の代謝酵素群をC3型植物で発現させるなどの還元型アプローチを用いた研究が多数行われてきたが、めばしい成果は得られていない。

2. 研究の目的

今回の申請課題で行うC3C4置換法は、「C4型光合成を行う細胞が構成する細胞内小器官・細胞質」と「C3型光合成を行う細胞の細胞核」からなる細胞を作製し、その交雑細胞の分裂・発生過程におけるゲノム・細胞内小器官の脱落機構を制御することでC3核-C4光合成細胞質の組み合わせをもつ植物体を作成する構成的なアプローチを行うものである。

本研究では、C4型光合成を行うトウモロコシとC3型光合成を行うコムギまたはイネの配偶子を任意の組み合わせで融合させることで、様々な組み合わせの交雑受精卵を作成し、それら交雑受精卵の発生過程における異種ゲノムや細胞内小器官の安定性機構を解明することを第一の目的とした。さらにはその安定性機構を制御することで、トウモロコシの細胞質・細胞内小器官とコムギの核からなるコムギ核C4光合成細胞質置換植物や、イネ核C4光合成細胞質置換植物の創出も視野に入れ研究を遂行した。

3. 研究の方法

【コムギ-トウモロコシ交雑植物の作出】

コムギ花およびトウモロコシ花から卵細胞および精細胞をそれぞれ単離した。①コムギ卵細胞、②コムギ精細胞、③トウモロコシ卵細胞を融合させた交雑受精卵(MeWeWs交雑受精卵)、および①コムギ卵細胞、②コムギ精細胞、③トウモロコシ卵細胞、④トウモロコシ精細胞を融合させた交雑受精卵(MeMsWeWs-DZ交雑受精卵)をそれぞれ作成した。これらの受精卵をN6Z培地でカルスにまで培養し、その後植物体へと再分化させた。

【コムギ-パールミレット交雑植物の作出】

コムギ花およびパールミレット花から卵細胞および精細胞をそれぞれ単離した。①コムギ卵細胞、②コムギ精細胞、③パールミレット卵細胞を融合させた交雑受精卵 (PeWeWs 交雑受精卵)、および①コムギ卵細胞、②コムギ精細胞、③パールミレット卵細胞、④パールミレット精細胞を融合させた交雑受精卵 (PePsWeWs-DZ 交雑受精卵) をそれぞれ作成した。これらの受精卵を N6Z 培地でカルスにまで培養し、その後植物体へと再分化させた。

【交雑植物のゲノム組成解析】

交雑植物から Nucleo Spin II Kit (Macherey-Nagel, Duren, Germany)を用いてゲノム DNA を抽出したのち、Nextera DNA Flex Library Preparation Kit (Illumina, California, USA)を用いてゲノム DNA ライブラリーを作成した。作成したライブラリーは Agilent 2100 BioAnalyzer (Agilent Technologies, California, USA)を用いて定量・定性的な品質確認を行ったのち、HiSeqX_Ten (イルミナ) で 150bp ペアエンドシーケンシングを行った。

4. 研究成果

【コムギ-トウモロコシ交雑植物の作出】

MeWeWs 交雑受精卵および MeMsWeWs-DZ 交雑受精卵ともに 2 細胞胚、多細胞胚、細胞増殖塊、カルスを経て、植物体へと再分化した (図 1)。その際、MeWeWs 交雑受精卵および MeMsWeWs-DZ 交雑受精卵のうち、植物体へと再分化した受精卵の割合はそれぞれ 83%および 25%であった (表 1)。

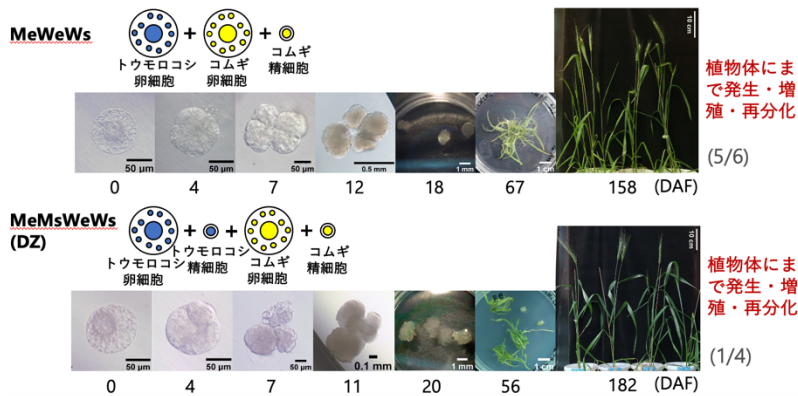


図 1. MeWeWs 交雑受精卵および MeMsWeWs-DZ 交雑受精卵の発生プロフィール

交雑植物の種類	配偶子の組み合わせ	交雑受精卵の発生プロフィール					植物体にまで成長した受精卵の割合 (%)	作成した植物体 ※同一の数字は同一の受精卵から由来する植物体
		作成した受精卵の数	2細胞胚	細胞塊	カルス	植物体		
コムギ-トウモロコシ	MeWeWs	6	6	5	5	5	83	1A, 1B, 1C, 2A, 2B, 2C, 3A, 3B, 3C, 3D, 3E, 4A, 4B, 4C, 4D, 4E, 5A, 5B, 5C, 5D, 5E
	MeMsWeWs (DZ)	4	4	3	2	1	25	1A, 1C, 1D, 1E, 1F, 1G, 1H, 1I, 1J, 1K
コムギ-パールミレット	PeWeWs	3	3	3	3	3	100	1A, 1B, 1C, 1D, 2A, 3A, 3B, 3C, 3D, 3E
	PePsWeWs (DZ)	8	5	5	4	4	50	1A, 2A, 2B, 2C, 3A, 3B, 3C, 4A, 4B, 4C, 4D, 4E, 4F

表 1. コムギ-トウモロコシ交雑受精卵およびコムギ-パールミレット交雑受精卵の発生および再分化

【コムギ-パールミレット交雑植物の作出】

PeWeWs 交雑受精卵および PePsWeWs-DZ 交雑受精卵ともに 2 細胞胚、多細胞胚、細胞増殖塊、カルスを経て、植物体へと再分化した (図 2)。その際、PeWeWs 交雑受精卵および PePsWeWs-DZ 交雑受精卵のうち、植物体へと再分化した受精卵の割合はそれぞれ 100%および 50%であった (表 1)。

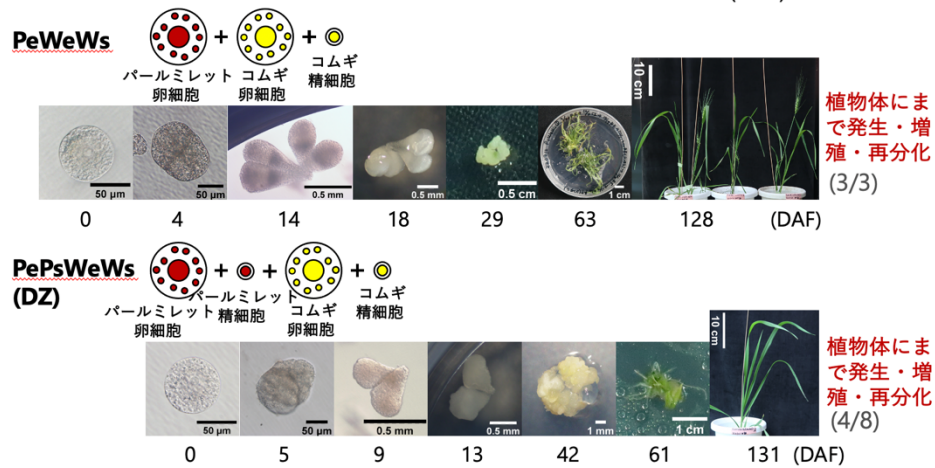


図 2. PeWeWs 交雑受精卵および PePsWeWs-DZ 交雑受精卵の発生プロファイル

【交雑植物のゲノム組成解析】

上記の交雑植物群の倍数性解析の結果より、それらの交雑植物のゲノムサイズがコムギとほぼ一致していたことから、トウモロコシ-コムギおよびパールミレット-コムギ交雑植物では、トウモロコシおよびパールミレットの核ゲノムの大部分がそれぞれ脱落していることが示唆された。また、トウモロコシ-コムギ交雑植物はコムギとトウモロコシの細胞質を、パールミレット-コムギ交雑植物はコムギとパールミレットの細胞質をそれぞれ保持している可能性が示された。

ゲノムシーケンシング解析については、パールミレット-コムギ交雑植物 6 ラインのゲノム配列 raw data 取得を取得し、現在解析中である。トウモロコシ-コムギ交雑植物については、11 ラインのゲノムライブラリーが作成済みであり、現在、ゲノム配列 raw data を取得中である。今後は、これらのゲノムデータを用いることで交雑植物のゲノム組成を明らかにする。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計10件（うち査読付論文 10件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 5件）

1. 著者名 Maryenti Tety, Ishii Takayoshi, Okamoto Takashi	4. 巻 232
2. 論文標題 Development and regeneration of wheat?rice hybrid zygotes produced by <i>in vitro</i> fertilization system	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 New Phytologist	6. 最初と最後の頁 2369 ~ 2383
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/nph.17747	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 Maryenti Tety, Kato Norio, Ichikawa Masako, Okamoto Takashi	4. 巻 2484
2. 論文標題 In Vitro Fertilization System Using Wheat Gametes by Electric Fusion	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Methods in Molecular Biology	6. 最初と最後の頁 259 ~ 273
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/978-1-0716-2253-7_18	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 Aini Hanifah, Sato Yoshikatsu, Uno Kakishi, Higashiyama Tetsuya, Okamoto Takashi	4. 巻 35
2. 論文標題 Dynamics of mitochondrial distribution during development and asymmetric division of rice zygotes	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Plant Reproduction	6. 最初と最後の頁 47 ~ 60
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00497-021-00430-3	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 Rattanawong Kasidit, Koiso Narumi, Toda Erika, Kinoshita Atsuko, Tanaka Mari, Tsuji Hiroyuki, Okamoto Takashi	4. 巻 108
2. 論文標題 Regulatory functions of ROS dynamics via glutathione metabolism and glutathione peroxidase activity in developing rice zygote	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 The Plant Journal	6. 最初と最後の頁 1097 ~ 1115
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/tbj.15497	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 Rahman Md Hassanur, Toda Erika, Okamoto Takashi	4. 巻 2122
2. 論文標題 In Vitro Production of Zygotes by Electrofusion of Rice Gametes	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Methods Mol. Biol.	6. 最初と最後の頁 257 ~ 267
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/978-1-0716-0342-0_18	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 Toda Erika, Okamoto Takashi	4. 巻 10
2. 論文標題 Gene Expression and Genome Editing Systems by Direct Delivery of Macromolecules Into Rice Egg Cells and Zygotes	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 BIO-PROTOCOL	6. 最初と最後の頁 e3681
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21769/BioProtoc.3681	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 Toda Erika, Okamoto Takashi	4. 巻 5
2. 論文標題 CRISPR/Cas9 Based Genome Editing Using Rice Zygotes	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Current Protocols in Plant Biology	6. 最初と最後の頁 e20111
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/cppb.20111	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 Deushi Ryouya, Toda Erika, Koshimizu Shizuka, Yano Kentaro, Okamoto Takashi	4. 巻 10
2. 論文標題 Effect of Paternal Genome Excess on the Developmental and Gene Expression Profiles of Polyspermic Zygotes in Rice	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Plants	6. 最初と最後の頁 255 ~ 255
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/plants10020255	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 Maryenti T., Kato N., Ichikawa M., Okamoto T.	4. 巻 in press
2. 論文標題 In vitro fertilization system using wheat gametes by electric fusion.	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Methods Mol. Biol.	6. 最初と最後の頁 in press
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 岡本 龍史、戸田絵梨香、加藤 紀夫	4. 巻 55
2. 論文標題 植物受精卵を用いたゲノム編集	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 植物の化学調節	6. 最初と最後の頁 52-56
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) なし	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 -

〔学会発表〕 計14件 (うち招待講演 3件 / うち国際学会 1件)

1. 発表者名 岡本龍史
2. 発表標題 コムギ in vitro 受精系 : 異質倍数性受精卵の作出とその発生解析
3. 学会等名 麦学オンラインセミナー (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 澤本陸、大島良美、貴嶋紗久、光田展隆、池田美穂、高崎寛則、高木優、戸田絵梨香、岡本龍史
2. 発表標題 キメラリプレッサーを用いたイネ卵細胞の分裂・発生を誘導する新規転写因子の探索
3. 学会等名 日本植物学会第85回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 増尾心之介、大島良美、貴嶋紗久、光田展隆、池田美穂、高崎寛則、高木優、戸田絵梨香、木下温子、岡本龍史
2. 発表標題 イネ受精卵発生を誘導するOsASGR-BBML1の標的遺伝子群の同定
3. 学会等名 日本植物学会第85回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Aini H., Sato Y., Uno K., Higashiyama T., Okamoto T.
2. 発表標題 Dynamics of mitochondrial distribution during development and asymmetric division of rice zygotes
3. 学会等名 日本植物学会第85回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Rattanawong K, Totsuka K, and Okamoto T.
2. 発表標題 Autonomous development and regeneration of rice egg cells in a fertilization-independent manner
3. 学会等名 日本植物学会第85回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Maryenti T., Ishii T., Okamoto T.
2. 発表標題 Developmental profiles of inter-subfamily polyploid zygotes produced by the fusion of wheat and rice gametes
3. 学会等名 日本育種学会第141回講演会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Toda E, Koiso N, Takebayashi A, Ichikawa M, Kiba T, Osakabe K, Osakabe Y, Sakakibara H, Kato N, Okamoto T.
2. 発表標題 An efficient DNA- and selectable-marker-free genome-editing system using zygotes in rice and its possible application to other crop species.
3. 学会等名 Keystone Symposia “Plant Genome Engineering: From Lab to Field” (招待講演) (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Rahman MH, Toda E., Kobayashi M., Kudo T., Koshimizu S., Takahara M., Iwami M, Watanabe Y., Sekimoto H., Yano K., Okamoto T.
2. 発表標題 Expression of Genes from Paternal Alleles in Rice Zygotes and Involvement of OsASGR-BBML1 in Initiation of Zygotic Development
3. 学会等名 第62回日本植物生理学会年会 (招待講演)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Maryenti Tety., Takayoshi Ishii., Okamoto T.
2. 発表標題 Developmental profiles of inter-subfamily polyploid zygotes produced by the fusion of wheat and rice gametes
3. 学会等名 第62回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Aini H., Nakahira O., Okamoto T.
2. 発表標題 Identification of proliferative cells among protoplasts prepared from rice scutellum callus
3. 学会等名 第62回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Rattanawong K., Koiso N., Toda E., Tanaka M., Tsuji H., Okamoto T.
2. 発表標題 ROS dynamics and GSH-mediated glutathione peroxidase functions in developing rice zygote
3. 学会等名 第62回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 木下 温子、Maryenti Tety、Aini Hanifah、戸田 絵梨香、岡本 龍史
2. 発表標題 単子葉植物イネ受精卵および初期胚における極性決定機構
3. 学会等名 第62回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 戸田絵梨香, 亀川拓夢, 岡本龍史
2. 発表標題 イネ受精卵と葉プロトプラストから作出した融合細胞における核合一および発生プロファイル
3. 学会等名 日本植物学会第84回大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 渡辺真史, 岡本龍史, 木下温子
2. 発表標題 シロイヌナズナの花成における茎頂メリステムサイズとアイデンティティ転換
3. 学会等名 第62回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2021年

〔図書〕 計0件

〔出願〕 計2件

産業財産権の名称 PTC出願	発明者 岡本龍史、石井孝佳、矢野健太郎、マリエンティ テティ	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、PCT/JP2021/041335	出願年 2021年	国内・外国の別 国内

産業財産権の名称 配偶子融合を用いた細胞質雑種植物の作出法	発明者 岡本龍史、マリエンティ テティ、石井孝佳、矢野健太郎	権利者 同左
産業財産権の種類、番号 特許、特願2020-187279	出願年 2020年	国内・外国の別 国内

〔取得〕 計0件

〔その他〕

植物発生生理学研究室ホームページ https://www.biol.se.tmu.ac.jp/labo.asp?ID=horcel

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	石井 孝佳 (Ishii Takayoshi) (80823880)	鳥取大学・乾燥地研究センター・准教授 (15101)	

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