

平成 29 年 5 月 30 日現在

機関番号：12601

研究種目：若手研究(A)

研究期間：2013～2016

課題番号：25712001

研究課題名(和文) イネの胚サイズを規定する胚乳領域構築機構の解明

研究課題名(英文) Analysis of embryo facing endosperm region regulating embryo-endosperm ratio of albuminous seed in rice

研究代表者

桧原 健一郎 (Hibara, Ken-ichiro)

東京大学・農学生命科学研究科・助教

研究者番号：10595713

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 18,000,000円

研究成果の概要(和文)：有胚乳種子における胚と胚乳の比率を規定する胚周辺胚乳組織の構築過程を3つのフェーズ(確立、維持、領域規定)にわけて、それぞれの過程に関わる遺伝子の同定や機能解析を行った。確立フェーズでは、胚周辺胚乳組織の細胞形態学的特徴とEML1遺伝子の同定、維持フェーズでは、RE遺伝子の下流で働く遺伝子やRE3遺伝子の同定、領域規定フェーズでは、GE-GO経路に関わる物質の探索とGEの下流で働くHER遺伝子の同定などを行った。本研究結果から、胚と胚乳のサイズを規定する胚周辺胚乳組織の構築過程には、低酸素やオーキシシンシグナル伝達が関わるという新たな知見を得ることができた。

研究成果の概要(英文)：I have been previously found that the embryo facing endosperm region (EFR) is important for proper embryo-endosperm ratio of albuminous seed in rice. This study investigated the molecular mechanisms for developmental process of EFR, which was divided into three developmental phases (initiation, maintenance and regional determination). I performed the cytological characterization of EFR in 2-4 days after pollination, the cloning of EML1 gene involved in the initiation phase, RE3 gene involved in the maintenance phase and HER gene act downstream of GE gene to influence the regional determination. I inferred from these results that the oxygen sensing and auxin signaling molecules might be involved in the organization of EFR in rice.

研究分野：植物分子遺伝学

キーワード：イネ 胚発生 胚乳発生 細胞死 胚サイズ 有胚乳種子

1. 研究開始当初の背景

被子植物は重複受精によって胚と胚乳を形成する。受精後、胚と胚乳は異なるプロセスを経て、細胞増殖、分化を行っていく。穀物の胚乳は世界の多くの国において主要食料として使用されている。また、胚は次世代の植物体の基となるだけでなく、胚乳には含まれない油脂や多くの有用な栄養成分の供給源でもある。

多くの被子植物(とくに双子葉植物)では、胚乳が種子成熟過程で衰退し、無胚乳種子を作るため、シロイヌナズナなどの双子葉モデル植物での種子内の最終的な胚と胚乳の大きさに着目した解析例はほとんどなく、イネやトウモロコシのような有胚乳種子における胚-胚乳サイズを規定する形態学的基盤や分子機構についてはほとんど知見がなかった。申請者は、これまでに有胚乳種子における胚-胚乳比率の発生学的基盤と分子機構の解明に向けて、イネを材料に MNU 変異原処理によって種子体積は変わらず胚が小さくなる *reduced embryo1 (re1)*、*re2*、*re3* 変異体と胚が大きくなる *giant embryo (ge)*、*goliath (go)* 変異体を用いて、研究を行ってきた。これまでの解析から、(1)胚-胚乳サイズの決定要因は、胚よりも胚乳側に存在すること、(2)胚の周辺に存在する胚乳(胚周辺胚乳)には層構造が見られ、層構造の構築には細胞死が関与すること、(3)胚-胚乳サイズが変化する *re* や *ge* 変異体では EFR の層構造に形態学的な異常があること、(4)*RE1*、*RE2* はそれぞれ異なるファミリーに属する転写因子を、*GE* はシトクロム P450 ファミリーに属する CYP78A13 を、*GO* は、グルタミン酸カルボキシペプチダーゼをそれぞれコードしていること、(5)*RE1*、*RE2*、*GE* は子房で特異的に発現し、とくに胚周辺胚乳組織に局在化した発現パターンを示すことなどを明らかにした。しかし、胚周辺胚乳組織形成に働くこれらの分子の機能や発生学的プロセスについては不明な点が多く残されていた。

2. 研究の目的

本研究では、イネ種子を構成する胚と胚乳において、それぞれのサイズを規定する胚乳側の要因である胚周辺胚乳組織の構築過程を3つのフェーズ(確立、維持、領域規定)にわけ、胚-胚乳サイズに重要な鍵因子である *REDUCED EMBRYO(RE)*、*GIANT EMBRYO(GE)*、*GOLIATH(GO)* 遺伝子の機能解析ならびに新奇因子の同定を通じて、それぞれの分子発生学的基盤を明らかにすることを目的とする。そして、得られた知見をもとに胚-胚乳サイズを人為的に制御し、胚と胚乳に含まれる栄養成分をニーズに見合った量に改変する分子育種技術の獲得の可能性について検証する。

3. 研究の方法

胚-胚乳サイズを規定する胚周辺胚乳組織の構築過程を確立・維持・領域規定の3つのフェーズにわけて、以下の解析を行うことにより、その発生学的分子基盤を明らかにする。(1)確立フェーズ:胚周辺胚乳組織に着目した初期胚乳発生の形態学的解析。初期の胚周辺胚乳組織に異常があることが予想される *embryoless1(eml1)* 変異体の原因遺伝子の同定と機能解析を行う。

(2)維持フェーズ:胚サイズに異常を示す変異体(*re*、*ge*、*eml1*)や *RE1*、*RE2* の発現誘導系を確立し、それら植物体から RNA を抽出してマイクロアレイ解析を行い、転写因子である *RE1*、*RE2* が直接的に制御する遺伝子を探索する。胚周辺胚乳組織の維持に異常を示す *re1*、*re2* 変異体と類似した表現型を示す *re3*、*re4* 変異体の原因遺伝子の同定と機能解析を行う。

(3)領域規定フェーズ:胚周辺胚乳組織に見られる細胞死に関わる *GE* や *GO* 遺伝子の機能を明らかにするため、メタボローム解析を用いて、*GE* や *GO* が関与する代謝経路ならびに基質物質の同定を試みる。*ge* 変異体に変異原処理を行い、表現型を抑圧するサプレッサー変異体の単離やその原因遺伝子の同定から *GE-GO* 経路で働く因子の特定を試みる。

4. 研究成果

(1) 確立フェーズに関わる研究成果

胚周辺胚乳組織に着目して受精後2-4日目の子房の樹脂切片作製し、詳細な形態観察を行った結果、胚乳細胞の“細胞化”直後から胚周辺胚乳組織では、細胞密度の高い細胞が存在し、通常の胚乳細胞とは異なる細胞分裂パターンを示すことが明らかとなった。また、*re* や *eml1* 変異体では細胞化直後の胚周辺胚乳細胞において異常な形態をもつ細胞が存在することが明らかとなった。

eml1 変異体のマッピングを行った結果、これまで報告例がない新奇転写因子に変異を見つけた。ゲノム断片を用いた相補性試験からこの変異が *eml1* 変異体の原因であることが明らかとなった。*in situ* hybridization 法に発現パターンを観察したところ、*EML1* 遺伝子は *RE* や *GE* 遺伝子とは異なり、植物体の様々な組織で発現していることが明らかとなった。また、胚乳組織発生が不全となり、巨大胚となる *endospermless(enl)* と *eml1* の二重変異体は *enl* 単独変異体と同じ表現型を示すことがわかった。この結果は、*eml1* の極小胚の表現型が現れるためには機能的な胚乳が必要であることを示しており、*EML1* は胚サイズ制御において胚乳組織で機能していることが示唆された。

(2) 維持フェーズに関わる研究成果

re1、*re2*、*ge*、*eml1* 変異体の受粉後3、5日目の子房の RNA を用いたマイクロアレイ解

析ならびに先行研究で得られていたレーザーマイクロダイセクション法による胚周辺胚乳組織特異的に発現する遺伝子データから胚サイズに依存して発現が変動する 14 個の遺伝子を抽出した。また、*RE1*、*RE2* 過剰発現体の作成から *RE2* 過剰発現体では地上部の矮化、節間伸長異常などの表現型をもつことが明らかとなった。この過剰発現体において上記の 14 遺伝子の発現レベルを観察したところ、1 つの遺伝子が異所的に発現誘導されていることが明らかとなった。この遺伝子については現在 CRISPR-Cas9 法を用いて機能欠損変異体の作出を行っている。今後、残りの遺伝子の機能について明らかにしていくことは、胚サイズ制御における分子ネットワークを知る上で重要な情報となると思われる。

RE1、*RE2* のデキサメタゾン誘導系の確立を試みた。胚乳特異的あるいは植物体全体で高発現するプロモーター配列を用いて、*RE1*、*RE2DEX* 誘導型形質転換体を作成し、受精後 5 日目の子房や脱分化させたカルス組織などから RNA を抽出し、発現レベルを確認した。しかし、*RE1*、*RE2* を発現誘導させることができる系統あるいは組織を見出すことができなかった。そのため、*RE1* や *RE2* の一過的な発現誘導による直接的な下流遺伝子の探索を断念した。今後は異なる誘導系の利用や ChIP-seq 法による DNA 結合サイトの探索などによって *RE1*、*RE2* 転写因子の直接的な制御遺伝子を見出すことができるだろう。

小胚の表現型を示す *re3*、*re4* 変異体の原因遺伝子の同定のため、マッピングや次世代シーケンス解析を行った。その結果、*re3* は、候補遺伝子を同定できたが、*re4* は環境要因などによって表現型が変化したため、遺伝子同定には至らなかった。*RE3* の候補原因遺伝子についてゲノム断片を用いた相補性試験ならびに CRISPR-Cas9 法による新奇アレルの作出を行った結果、候補遺伝子であった cystein oxidase をコードする遺伝子が原因であることが明らかとなった。発現解析を行った結果、この遺伝子は根で強く発現しているが胚や胚乳でも発現しており、*in situ* hybridization で発現パターンを観察したところ、胚、胚乳でも一様に発現していることが明らかとなった。近年、シロイヌナズナの *RE3* オソログ遺伝子が低酸素条件下で誘導される遺伝子の発現調節を行うセンサーとして機能することが報告されている。このことから、*RE3* 遺伝子がイネの胚サイズの維持フェーズにおいて胚乳組織における酸素状態を認識して様々な遺伝子の発現調節を行っている可能性が示唆された。

(3) 胚周辺胚乳領域の範囲を規定する *GE* 遺伝子はシトクロム P450 の一つである *CYP78A13* 遺伝子を *GO* 遺伝子はグルタミン酸カルボキシペプチダーゼをコードする。この 2 つの遺伝子の表現型が様々な点で共通点をもつことから同じ経路上で働くことが示唆

される。*ge*、*go* 変異体の完熟種子を用いてメタボローム解析を行った結果、アルギニンや GABA などが巨大胚系統で共通して蓄積していることが明らかとなった。しかし、代謝物質の経路図の比較からは *GE-GO* が作用する生化学経路を推定することはできなかった。メタボローム解析では、アミノ酸、フラボノイド類、糖など植物で蓄積されているものは測定できている反面で、極少量しか存在しない物質の同定は困難であった。そのため、*GE* や *GO* の代謝産物の同定のためには、広範囲な解析よりも焦点を絞った化合物や代謝経路を綿密に調査する必要があるだろう。

ge 変異体を EMS 処理し、巨大胚の表現型を抑圧する半優性変異体 *heracles* (*her*) 変異体を単離した。次世代シーケンスを用いて原因遺伝子の同定を試みた結果、ARF ファミリーに属する転写因子に変異を見つけた。CRISPR-Cas9 法による確認作業を行った結果、この遺伝子が *her* 変異体の原因遺伝子であることが明らかとなった。発現解析の結果、*HER* は植物体全体で発現をしているが、受精後 5 日目の子房では *GE* と同様に胚周辺胚乳組織に局在して発現していた。ARF ファミリー転写因子の一部は植物ホルモンであるオーキシンのシグナル伝達に関わることが様々な研究から明らかとなっている。これら結果から *GE-GO* 経路内にオーキシンが介在している可能性や *GE* の下流で *HER* 転写因子がシグナル伝達に関与する可能性などこれまで予想していなかった新しい知見を得ることができた。領域規定フェーズに関わる *GE-GO* 経路の役割を明らかにするため、今後は、生化学、遺伝学、分子生物学など多面的アプローチから *GE* や *GO* に関する情報を集積することが基質同定のために必要である。

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 11 件)

(1) 著者名: Hashida, Y., Hirose, T. *et al.*
(6 人中 4 番目)

論文標題: A reduction of sucrose phosphate synthase (SPS) activity affects sucrose/starch ratio in leaves but does not inhibit normal plant growth in rice.
雑誌名: Plant Science、査読: 有、巻: 253、発行年: 2016、頁: 40-49.

(2) 著者名: Hibara, K-I^{*,**}. *et al.*

(10 人中 1 番目)

^{*}Co-first Author, ^{**}Corresponding Author
論文標題: Jasmonate regulates juvenile-adult phase transition in rice. 雑誌名: Development、査読: 有、巻: 143、発行年: 2016、頁: 3407-3416

(3) 著者名: Yoshikawa, T., Tanaka, S-Y.

et al. (9人中6番目)
論文標題: Barley NARROW LEAFED DWARF1 encoding a WUSCHEL-RELATED HOMEBOX 3 (WOX3) regulates the marginal development of lateral organs.

雑誌名: Breeding Science、査読: 有、巻: 66、発行年: 2016、頁: 1-9

(4) 著者名: Itoh, J-I., Sato, Y. *et al.* (10人中4番目)

論文標題: Genome-wide analysis of spatio-temporal gene expression patterns during early embryogenesis in rice.

雑誌名: Development、査読: 有、巻: 143、発行年: 2016、頁: 1217-1227

(5) 著者名: 桧原健一郎

論文標題: イネにおける初期発生制御機構の分子遺伝学的研究 (Molecular genetics of the events of early differentiation in rice). 雑誌名: 育種学研究、査読: 無 (依頼投稿)、巻: 17、発行年: 2015、頁: 115-119、その他: 特集記事、表紙掲載

(6) 著者名: Yoshikawa, T., Ito, M. *et al.* (11人中9番目)

論文標題: The rice FISH BONE gene encodes a tryptophan aminotransferase, which affects pleiotropic auxin-related processes.

雑誌名: The Plant Journal、査読: 有、巻: 78、発行年: 2014、頁: 927-936.

(7) 著者名: Akiba, T., Hibara K. *et al.* (11人中2番目)

論文標題: Organ fusion and defective shoot development in *oni3* mutants of rice.

雑誌名: Plant Cell Physiology、査読: 有、巻: 55、発行年: 2014、頁: 42-51.

(8) 著者名: 伊藤純一、佐藤豊、桧原健一郎、服部束穂、岩崎行玄。

論文標題: 種子形成シナリオの分子遺伝学 (Molecular genetics of seed formation scenario).

雑誌名: 育種学研究、査読: 無、巻: 15、発行年: 2013、頁: 128-133

(9) 著者名: Nagasawa, N*, Hibara, K* *et al.* (8人中2番目) *Co-first Author

論文標題: GIANT EMBRYO encodes CYP78A13, required for proper size balance between embryo and endosperm in rice.

雑誌名: The Plant Journal、査読: 有、巻: 75、発行年: 2013、頁: 592-605

(10) 著者名: Hibara, K*, Hosoki, W* *et al.* (7人中1番目) *Co-first Author

論文標題: ABNORMAL SHOOT IN YOUTH, a homolog of molybdate transporter gene,

regulates early shoot development in rice.
雑誌名: American Journal of Plant Sciences、査読: 有、巻: 4(5A)

(11) 著者名: Yoshikawa, T. *et al.*

(5人中3番目)

論文標題: Rice SLENDER LEAF 1 gene encodes cellulose synthase-like D4 and is specifically expressed in M-phase cells to regulate cell proliferation.

雑誌名: Journal of Experimental Botany、査読: 有、巻: 64、発行年: 2013、頁: 2049-2061.

[学会発表](計 18 件)

(1) 発表者: 桧原 健一郎

発表標題: 胚と胚乳サイズを規定する分子機構の解明に向けて

学会名: 第 37 回種子生理生化学会

発表年月日: 2016 年 11 月 12 日

発表場所: 南あわじロイヤルホテル

(2) 発表者: 伊久 力也、伊藤 純一、桧原 健一郎

発表標題: イネの胚性器官に異常を示す変異体の解析

学会名: 日本育種学会第 130 回講演会

発表年月日: 2016 年 9 月 25 日

発表場所: 鳥取大学

(3) 発表者: 桧原 健一郎

発表標題: 胚/胚乳比率を制御する分子機構の解析

学会名: イネ遺伝学・分子生物学ワークショップ 2016

発表年月日: 2016 年 7 月 4 日

発表場所: 名古屋大学

(4) 発表者: 水野泉、伊藤純一、桧原健一郎

発表標題: 器官や果実サイズを制御する CYP78 の分子遺伝学的解析

学会名: 育種学会第 129 回講演会

発表年月日: 2016 年 3 月 22 日

発表場所: 横浜市立大学

(5) 発表者: Mizuno, I., Itoh, J. and Hibara K.
発表標題: A framework for identification of the substrate and signaling pathway of CYP78 regulating lateral organ and seed size.

学会名: 第 57 回植物生理学会

発表年月日: 2016 年 3 月 18 日

発表場所: 岩手大学

(6) 発表者: 桧原 健一郎、水野 泉

発表標題: 表現型が出ないことが重要

学会名: 2015 年遺伝学研究所研究会

発表年月日: 2015 年 10 月 10 日

発表場所: 国立遺伝学研究所

(7)発表者：水野 泉、伊藤 純一、桧原 健一郎

発表標題：heracles は巨大胚変異体(ge)を半優性に抑圧する

学会名：育種学会第 128 回講演会

発表年月日：2015 年 9 月 12 日

発表場所：新潟大学

(8)発表者：小林 裕美、永澤 信洋、佐藤 豊、伊藤 純一、Sakai Hajime、長戸 康郎、桧原 健一郎

発表標題：イネ胚乳で発現する *REDUCED EMBRYO1(RE1)* , *RE2* は胚-胚乳比率を制御する

学会名：育種学会第 127 回講演会

発表年月日：2015 年 3 月 22 日

発表場所：玉川大学

(9)発表者：桧原 健一郎

発表標題：イネにおける初期発生制御機構の分子遺伝学的研究

学会名：育種学会第 127 回講演会

(日本育種学会奨励賞受賞講演)

発表年月日：2015 年 3 月 21 日

発表場所：玉川大学

(10)発表者：桧原 健一郎、水野 泉

発表標題：植物版“EAT ME”ケーキを求めて～器官サイズを制御する P450 の基質同定に向けた第一段階～

学会名：2014 年遺伝学研究所研究会

発表年月日：2014 年 10 月 17 日

発表場所：国立遺伝学研究所

(11)発表者：水野 泉、三村 真生、伊藤 純一、桧原 健一郎

発表標題：葉や胚のサイズを制御する CYP78 の基質同定を目指して

学会名：育種学会第 126 回講演会

発表年月日：2014 年 9 月 27 日

発表場所：南九州大学

(12)発表者：桧原 健一郎、小林 裕美、伊藤 純一、長戸 康郎

発表標題：イネ種子の胚-胚乳比率を規定する胚周辺胚乳領域の解析

学会名：第 55 回植物生理学会

発表年月日：2014 年 3 月 18 日

発表場所：富山大学

(13)発表者：Hibara, K., Itoh, J. and Nagato Y.

Identification of *ADAXIALIZED LEAF2* gene involved in the patterning of leaf, embryo and endosperm throughout proper epidermal development

学会名：The 7th International Rice Genetics Symposium

発表年月日：2013 年 11 月 6 日

発表場所：Manila, Philippines

(14)発表者：桧原 健一郎、小林 裕美、伊藤 純一、長戸 康郎

発表標題：イネ胚の巨大化を促す遺伝学的要因

学会名：育種学会第 124 回講演会

発表年月日：2013 年 10 月 12 日

発表場所：鹿児島大学

(15)発表者：堀島 佑月、琴 梨世、石川 亮、桧原 健一郎、伊藤 純一、長戸 康郎

発表標題：胚-胚乳比率に影響を及ぼす EMBRYOLESS1 遺伝子の解析

学会名：育種学会第 124 回講演会

発表年月日：2013 年 10 月 12 日、鹿児島大学

発表場所：鹿児島大学

その他 3 件

〔図書〕(計 0 件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0 件)

取得状況(計 0 件)

〔その他〕

ホームページ

http://park.itc.u-tokyo.ac.jp/pbg/yy_zhong_yanHP/TOP.html

6. 研究組織

(1)研究代表者

桧原 健一郎 (HIBARA KEN-ICHIRO)

東京大学・大学院農学生命科学研究科・助教

研究者番号：1 0 5 9 5 7 1 3