

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 18 日現在

機関番号：35308

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26850005

研究課題名(和文) イネの胚発生に関わるSEGMENTED EMBRYO遺伝子の解析

研究課題名(英文) The analysis of SEGMENTED EMBRYO gene involved in rice embryo development

研究代表者

吉川 貴徳 (Yoshikawa, Takanori)

吉備国際大学・地域創成農学部・講師

研究者番号：00721606

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：イネ品種台中65号のMNNU処理後代より同定されたsegmented embryo (sem) 変異体は一つの胚が複数に分割された胚発生変異体である。胚発生初期において、sem変異体では極性の構築が異常となり、一つの未熟胚から複数の細胞塊が分割され複数の胚が形成された。SEM遺伝子はメバロン酸合成経路に關与する酵素をコードしており、メバロン酸合成の阻害剤処理を行ったところsem表現型を再現することができた。以上の結果から、メバロン酸合成経路により作り出される代謝産物はイネ胚発生初期における極性の構築とその後の器官形成において重要な役割を担うことが明らかとなった。

研究成果の概要(英文)：Rice segmented embryo (sem) mutant, identified from the rice variety Taichung 65 population mutagenized with N-methyl-N-nitrosourea, develops multiple embryo derived from one fertilized egg cell. In the procedure of embryo development, sem showed abnormal polarity, leading to the segmentation of embryo in the peripheral region of immature embryo. SEM gene encodes an enzyme involved in the mevalonic acid biosynthetic pathway, and wild-type embryo treated with the inhibitor of the mevalonic acid biosynthetic pathway exhibited malformed multiple embryo similar to the sem embryo. These results suggested that metabolites derived from the mevalonic acid biosynthetic pathway play the pivotal role in the construction of embryo polarity and subsequent organ development in rice.

研究分野：植物育種学

キーワード：イネ 胚発生 多胚 変異体 形態形成

1. 研究開始当初の背景

イネはわが国の主要作物であり、世界においてもトウモロコシやコムギとともに世界三大穀物のひとつである。イネの可食部である米は胚と胚乳より構成され、胚乳には発芽に必要な栄養分がデンプンとして蓄積されている。一方、胚は種粒の中で生命力を有する唯一の組織で、大きく幼芽、幼根、胚盤より構成される。このような胚の構造は受精から 10 日程でほぼ形成されてしまうが、このような形態形成を制御する遺伝的メカニズムは未解明である。したがって、我々はイネゲノムに突然変異を誘発する N-methyl-N-nitrosourea (MNU) 処理を施し、形態形成が異常になった様々な変異体を解析することにより、イネの形態形成を制御する遺伝子の同定・機能解析に取り組んでおり、本課題はその過程で同定された胚発生変異体 *segmented embryo (sem)* の解析を行うものである。

2. 研究の目的

イネ品種台中 65 号の MNU 処理後代より同定された *sem* 変異体では胚が分割され、複数のセグメントに分かれている胚が多く観察された(図 1)。これまで、胚の大きさや形態が異常になる変異体はいくつか報告されてきたが、胚そのものが複数形成される変異体は他の植物を含めてほとんど前例がないため、*sem* は極めて珍しい変異体であると考えられる。このような変異体表現型を生じる原因遺伝子を同定するためマッピングを行なった結果、変異体表現型との強い連鎖が認められる領域が特定され、*SEM* 遺伝子がこの近傍領域に座することが明らかになっている。本課題では *SEM* 遺伝子の同定および機能解析を目的として、3 ケ年計画で実験を行なった。

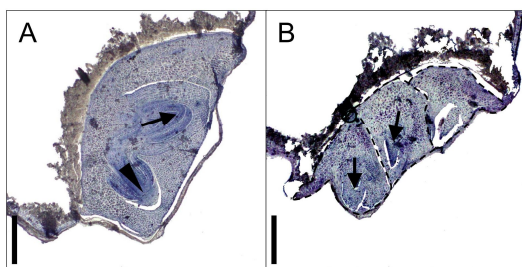


図1. 野生型(A)および*sem*(B)完成胚の表現型。*sem*の分割された各セグメントを点線で示した。矢印は幼芽を、矢頭は幼根を示す。スケールバーは500 μ m.

3. 研究の方法

(1) *SEM* 遺伝子のファインマッピング

SEM 遺伝子を同定するため、*sem* 変異体に品種 Kasalath を交配し、その後の自殖により得られた F₂ 集団をマッピングの材料として供試した。*sem* 変異は劣性遺伝するため、F₂ 集団より *sem* 表現型を呈する個体をスクリーニングし、これらの個体全てに共通する *japonica* 型の染色体領域を同定することに

よりファインマッピングを行なった。

(2) 組織形態解析

植物組織の形態解析を行うため、FAA (*in situ* hybridization には PFA) で組織固定を行い、エタノール上昇系列により液置換を行なって脱水し、パラフィン包埋を行なった。得られたパラフィンブロックをマイクロトームを用いて 8 μ m 切片を作成し、ヒストクリアで組織内のパラフィンを溶解した後にヘマトキシリン染色を行い、顕微鏡により組織観察を行なった。

(3) *in situ* hybridization

組織形態解析と同様の方法で作成したパラフィン切片を用いて *in situ* hybridization を行なった。Total RNA を用いて cDNA を作成し、遺伝子の一部または全長を PCR により増幅し、プラスミドベクターにクローニングした。得られたプラスミドは DIG 標識された UTP を用いて *in vitro* transcription を行い、プローブとして実験に供試した。

(4) CRISPR 法を用いたジーンターゲティング

形質転換にはイネ胚盤上皮細胞より作成したカルスを供試した。特定の遺伝子変異体を作成するため、CRISPR 法を用いて変異創成を行なった。ターゲット配列を pU6gRNA ベクターに導入し、OsU6pro::gRNA::PolyT を pZDgRNA ベクターへ移し替えた後、アグロバクテリウムを用いてイネカルス細胞の形質転換を行なった。形質転換した細胞から植物体を再分化させた後に形態解析を行なった。

4. 研究成果

(1) *sem* 変異体の栄養成長器官の調査

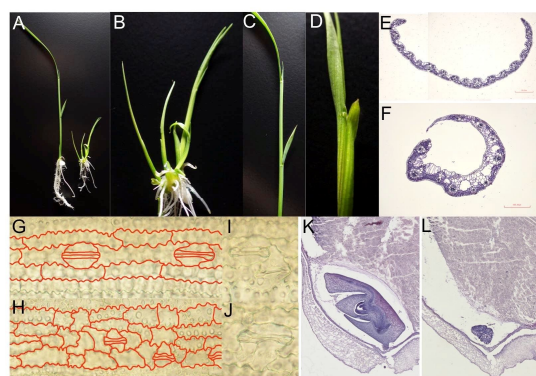


図2. *sem*変異体の形態的特徴。

(A) 野生型(左)および*sem*変異体(右)の発芽後2週間のシュート。
(B) (A)の*sem*変異体の拡大写真。
(C, D) 野生型(C)および*sem*変異体(D)の第2葉ラミナジョイント。
(E, F) 野生型(E)および*sem*変異体(F)の第2葉横断切片。
(G, H) 野生型(G)および*sem*変異体(H)の第2葉葉身表皮細胞。写真では表皮細胞の輪郭を赤線で囲っている。
(I, J) *sem*の第2葉葉身における奇形の孔辺細胞。
(K, L) 野生型(K)および*sem*変異体(L)における完成胚の縦断切片。*sem*では高い頻度で写真のような発達が停止した胚が観察された。
Scale bar = 200 μ m (E, F).

sem 変異体の発芽率は約 42%であり、不発芽個体が多く観察された。発芽個体のうち約 32%は複数のシュートを形成した(図 2A, B)。

通常、イネの葉は葉身と葉鞘を明確に区別することができるのに対し、*sem* 変異体の初生葉はこれらの区別が不明確であることが多かった(図 2C,D)。葉身の横断切片を作成したところ、*sem* 変異体の葉身は部分的に葉鞘器官が混在しており、基部頂部方向の極性構築に異常を有すると考えられた。しかし、生育の進行とともに葉身は正常化したため、これらの変異は胚発生時の異常を反映していると考えられた。また、初生葉の表皮細胞を観察したところ、*sem* では気孔列が大きく乱れており、孔辺細胞における奇形が多数確認された(図 2G-J)。このような表現型は細胞分裂の異常を示唆している可能性があると考えられる。*sem* 完熟胚の切片を多数作成したところ、半数以上が胚発生初期で発達が停止しており(図 2K,L)。このような発達異常が低発芽率の原因であると考えられた。また、*sem* の生殖器官には明確な形態異常は認められなかった。以上の結果から、*sem* は胚形成特異的な変異体であると考えられた。

(2) *sem* 変異体の胚発生過程の調査

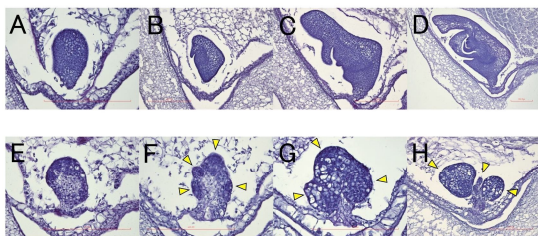


図3 野生型および*sem*変異体の胚発生過程。
(A-D) 受粉後3日目(A)、4日目(B)、5日目(C)、6日目(D)における野生型未熟胚。
(E-H) 受粉後3日目(E)、4日目(F)、5日目(G)、6日目(H)における*sem*未熟胚。矢頭は異常的に発生した未熟胚を示す。
Scale bar = 200 μ m.

sem の異常胚が形成されるメカニズムを明らかにするため、受粉後3日目~6日目の未熟胚発達過程を調査した。正常なイネでは3日目は球状胚で明確な器官形成は認められないが、4日目には鞘葉原基および茎頂分裂組織が形成され、5日目には第1葉原基および根端分裂組織、6日目には第2葉原基の形成が認められる(図 3A-D)。一方、*sem* では受粉後4日目に胚周縁部より細胞質密度の高い細胞塊が隆起し、5日目~6日目にかけてこれらの細胞塊が肥大していき、最終的には一定の頻度で器官形成を行い個々の胚が形成される様子が観察された(図 3E-H)。また、受粉後3日目は野生型と同様の球状胚であったが、細胞質密度の分布が明確に異なり、*sem* では胚周縁の細胞質密度が高く、内部の細胞質密度は低かった。*sem* 変異体に野生型花粉を受粉させたところ、正常な胚形成が確認された。このことから、*sem* は野生型と比較して胚の器官形成が明らかに遅れており、これらのことが受粉後~胚発生初期における現象に起因すると考えられた。

sem の胚発達をより詳細に解析するため、*sem* 未熟胚を用いて種々の遺伝子発現パターンを *in situ* hybridization により調査した。*Histone H4* は細胞周期のS期特異的に発現す

ることが報告されており、細胞分裂活性の指標として用いることができる。野生型未熟胚では受粉後3日目~5日目においては胚全体的に均一な発現が認められ、未熟胚全体で細胞分裂が活発に行われていることが示唆される(図 4A-C)。一方、*sem* 未熟胚では *Histone H4* のシグナルは胚周縁の細胞質密度の高い領域に集中しており(図 4D-F)。同様の結果は細胞周期のM期特異的に発現する *OsCSLD4* を用いた実験においても確認された(図 4O,P)。これらの結果から、*sem* 未熟胚では細胞分裂が局所的に行われていることが示唆された。*OSH1* は茎頂分裂組織で発現する *KNOX* ファミリー遺伝子であり、受粉後3日目の野生型未熟胚では胚中央部に発現が認められ、茎頂分裂組織の形成予定領域のマーカーとして用いることができる(図 4G-I)。ところが *sem* 変異体では胚発生初期では *OSH1* の発現が認められず(図 4J-L)。胚発生後期にさしかかってわずかな発現が観察された。栄養成長期における茎頂分裂組織では野生型と同様の *OSH1* シグナルが観察されることから、この現象は胚発生期特異的なものであると考えられる。また、受粉後3日目の野生型未熟胚で頂部特異的に発現する *GE* のシグナルも *sem* 未熟胚では観察されなかった(図 4M,N)。以上の結果から、*sem* では胚発生初期において胚の極性に異常が認められ、胚極性の構築が野生型と比較して遅れていることが推察された。これは *sem* 未熟胚において器官形成が野生型より大幅に遅れている結果を裏付けるものであると考えられる。

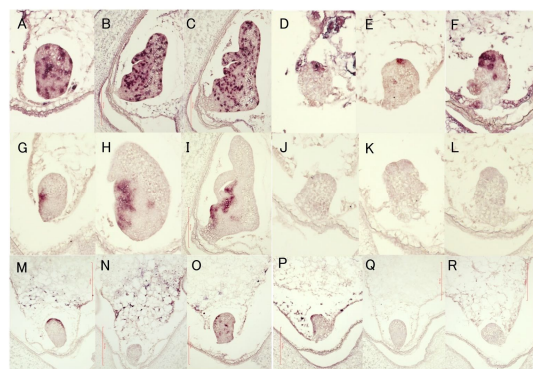


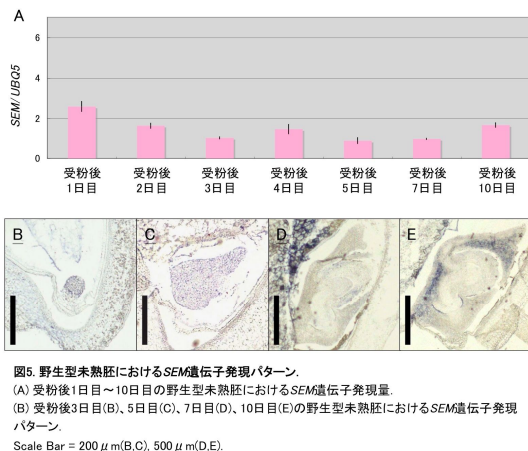
図4 野生型および*sem*変異体の未熟胚における遺伝子発現パターン。
(A-C, G-I, M, O, Q) 受粉後3日目(A,G,M,O,Q)、4日目(B,H), 5日目(C,I)における野生型未熟胚。
(D-F, J-L, N, P, R) 受粉後3日目(D,E,J,N,P,R)、4日目(F, K, L)における*sem*変異体未熟胚。
(A-F) *Histone H4*アンチセンスプローブをハイブリダイズさせた胚切片。
(G-L) *OSH1*アンチセンスプローブをハイブリダイズさせた胚切片。
(M, N) *GE*アンチセンスプローブをハイブリダイズさせた胚切片。
(O, P) *OsCSLD4*アンチセンスプローブをハイブリダイズさせた胚切片。
(Q, R) *Ramy1A*アンチセンスプローブをハイブリダイズさせた胚切片。
Scale bar = 200 μ m.(B,C,I,M,N,O,P,Q,R).

(3) SEM 遺伝子の同定

SEM 遺伝子を同定するため、*sem* 変異体に品種 Kasalath を交配した F₂ マッピング集団を供試してファインマッピングを行なった。その結果、*sem* 表現型と密接に連鎖する候補領域を特定することができ、領域内に座乗する遺伝子をシークエンスしたところ一つの遺伝子にアミノ酸置換を伴う塩基配列の変異が認められた。同遺伝子はメバロン酸

合成経路に關する酵素をコードしており、動植物を通して高く保存されていた。相補性試験を目的として *SEM* 遺伝子のクローニングを試みたが、大腸菌に導入したところ大腸菌が致死してしまっただため、クローニングを行うことはできなかった。そこで新たな *SEM* 遺伝子の変異創出を行うため、CRISPR 法を用いて *SEM* 遺伝子にアミノ酸置換を伴う塩基配列の変異を引き起こしたが、得られた変異体の胚形態は正常であった。このような原因として、*SEM* タンパクのごく限られた領域における変異が *sem* 表現型に重要な意味合いを有する可能性があると考えられる。次に、イネデータベースを用いて *SEM* 様遺伝子を検索したところ、*SEM* を含めて合計 3 遺伝子の存在が確認された。そこでこれら全ての遺伝子に共通する配列をターゲットとして CRISPR 法で変異創出を行なったところ、形質転換を行なったカルスは再分化中に全て枯死した。以上の結果から、メバロン酸経路はイネの胚発生のみならず、栄養成長期間においても重要な役割を果たしており、*SEM* ファミリー内において機能分化がなされている可能性があると考えられた。

(4) 胚発生過程における *SEM* 遺伝子の発現パターンの調査



SEM 遺伝子の発現パターンを明らかにするため、リアルタイム RT-PCR 法を用いて受粉後 1 日目～10 日目における野生型子房内での *SEM* 発現量を定量した。その結果、*SEM* 遺伝子は受粉直後が最も発現量が高く、その後日数の経過とともに発現量が低下していくことが明らかになった (図 5A)。これは *sem* 未熟胚の表現型から推察された *SEM* 遺伝子の作用時期を裏付ける結果であると考えられた。次に *SEM* 遺伝子の時空間的発現部位を調査するため、野生型未熟胚を用いて *in situ* hybridization を行なった。受粉後 3 日目～5 日目では明確な局在性は認められず、胚全体で *SEM* のシグナルが観察された (図 5B, C)。一方、受粉後 10 日目にはほぼ全ての胚組織が完成しており、*SEM* のシグナルは胚盤に局在していた。(図 5E)。

(5) 野生型に対するメバロン酸経路の阻害剤投与

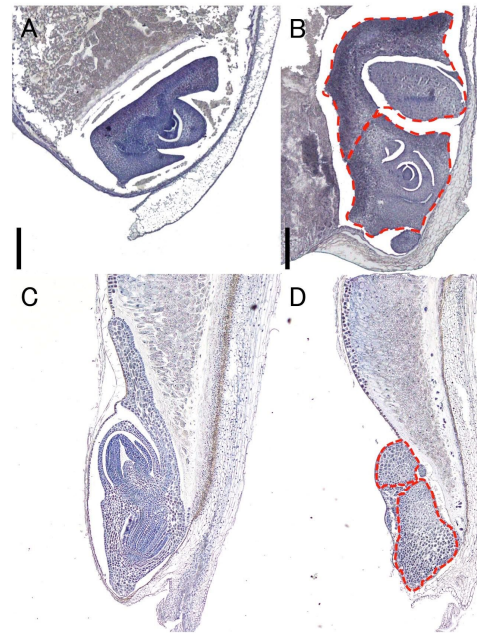


図6 メバロン酸経路阻害剤処理による胚形態の変化。
(A, B) イネ受粉後に蒸留水(A)または50 μM阻害剤処理(B)を7日間行なった未熟胚。
(C, D) オオムギ受粉後に蒸留水(C)または10 μM阻害剤処理(D)を2週間行なった完成胚。
分割した胚を赤点線で囲った。
Scale bar = 200 μm (A, B)。

イネの成長発達におけるメバロン酸経路の役割を解明するため、野生型未熟胚にメバロン酸合成阻害剤を投与した。その結果、形成された胚形態は *sem* のように複数に分割しており、器官形成も不完全であった (図 6A, B)。同様の実験をオオムギを用いて行なった結果、オオムギにおいても胚の分割が確認された (図 6C, D)。これらのことから、イネ科においてメバロン酸は胚の正常な発達や極性の構築において重要な役割を担うと考えられた。

次に、栄養成長に及ぼす影響を調査するため、MS 培地中にメバロン酸合成阻害剤を投与し、野生型イネ種子を播種・生育させた。その結果、阻害剤の濃度が上昇するとともに地上部、地下部ともに顕著な生育阻害が認められた (図 7A, B)。この原因を明らかにするため、茎頂および根端の切片を作成し、観察した。茎頂分裂組織はややいびつな形状を呈したものの、明確な形態変化は認められなかった (図 7C, D)。一方、阻害剤処理を行なった植物体の根端は野生型とは明確に異なり、細胞分裂領域が顕著に減少していた。したがって、メバロン酸合成阻害による根長の減少は細胞分裂活性の低下に起因することが示唆された。また、阻害剤処理を行なった植物体から展開した葉身の表皮細胞を調査した結果、*sem* 様の気孔孔辺細胞の奇形が観察され、メバロン酸の合成阻害が細胞分裂に何らかの悪影響を及ぼすことが示唆された。

sem 変異体において確認された器官形成の異常は胚発生異常に起因しており、*SEM* 遺伝子が胚発生において重要な役割を担うことが示唆された。未熟胚の観察、*in situ*

hybridization およびメバロン酸合成阻害剤を用いた実験から、胚発生初期において合成されたメバロン酸が胚の極性構築とその後の器官形成に重要な役割を担うことが示唆された。これらの変異は野生型花粉を交配することで正常に回復するため、植物体で合成されたメバロン酸が転流されているのではなく、未熟胚の内部で受粉後に合成されたものが関与している可能性が高い。また、メバロン酸合成阻害により胚発生のみならず栄養成長にも重篤な影響を及ぼし、SEM ファミリー遺伝子の多重変異体は致死的であった。以上の結果から、イネにおいてメバロン酸は胚発生のみならず栄養成長においても必須であり、その作用機作については SEM ファミリー内で機能分担していると考えられた。

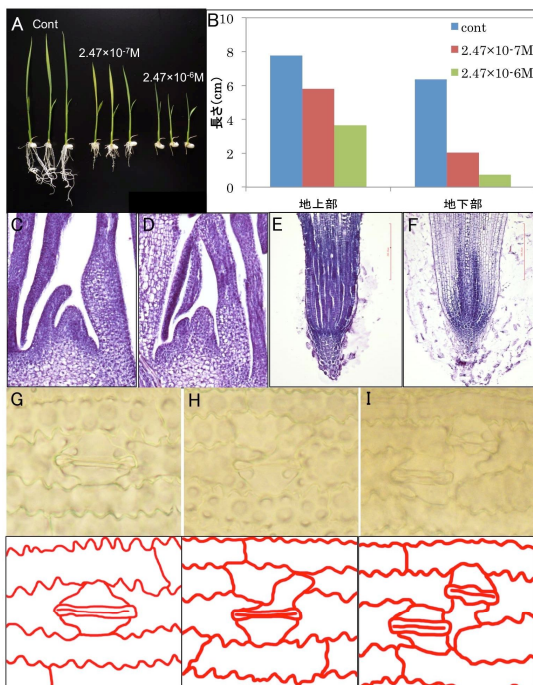


図7 メバロン酸経路阻害剤処理による栄養成長の変化。
 (A) 阻害剤を含むMS培地中で生育した発芽後10日目の野生型シュート。
 (B) 阻害剤処理による地上部および地下部の変化。
 (C, D) 対照区(C)および 2.47×10^{-6} M処理区(D)の茎頂縦断切片。
 (E, F) 対照区(E)および 2.47×10^{-6} M処理区(F)の根端縦断切片。
 (G-I) 対照区(G)および 2.47×10^{-6} M処理区(H, I)の第2葉葉身における孔辺細胞。
 Scale bar = 200 μ m (E, F).

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 0件)

〔学会発表〕(計 1件)

イネ胚発生変異体 *segmented embryo* の解析.
 増本悠樹, 高階泰宗, 森惠惠秀, 松原健一郎, 伊藤純一, 長戸康郎, 谷坂隆俊, 吉川貴徳. 近畿作物・育種研究会第181回例会 (2016年5月28日)

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

名称:
 発明者:
 権利者:
 種類:
 番号:
 出願年月日:
 国内外の別:

取得状況(計 0件)

名称:
 発明者:
 権利者:
 種類:
 番号:
 取得年月日:
 国内外の別:

〔その他〕
 ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

吉川 貴徳 (YOSHIKAWA, Takanori)
 吉備国際大学・地域創成農学部・講師
 研究者番号: 00721606

(2) 研究分担者

()

研究者番号:

(3) 連携研究者

()

研究者番号:

(4) 研究協力者

()