

# ゲノムインプリンティング制御によるイネ胚乳の生殖的隔離打破

殿崎 薫 (横浜市立大学・木原生物学研究所)

tonosaki@yokohama-cu.ac.jp

## はじめに

野生種は栽培種に比べて高い遺伝的多様性を保持しており、環境ストレス耐性や病虫害抵抗性などの優良形質を有する。これらの野生種がもつ有用遺伝子資源を栽培種へ導入できれば、環境変動や病害に強い新たな作物育種への展開が期待される。しかし、栽培種と野生種の間では、様々な生殖的隔離がしばしば生じ、種間交雑による遺伝子導入を困難にしている。植物における生殖的隔離のなかでも、胚乳発生の異常は特に普遍的な現象として多くの種で報告されており、ある一定の法則性が見出されているものの、その分子基盤は明らかになっていない<sup>1,2)</sup>。

私はこれまでの研究で、胚乳の生殖的隔離がゲノムインプリンティング（親依存的遺伝子発現）の破綻と密接に関係することを明らかにしてきた。さらに、インプリント遺伝子群を制御するエピジェネティック因子の改変によって、隔離現象を部分的に打破できる可能性を見出した。本講演では、倍数性改変やエピゲノム制御因子の機能解析を通じて明らかになった、胚乳発生のエピジェネティック制御機構と生殖的隔離の分子基盤について紹介する。

## 1. 倍数性改変による胚乳の生殖的隔離打破

被子植物の胚乳は、重複受精によって受精卵とは別に形成される三倍体組織であり、胚に栄養を供給する重要な器官である。したがって、胚乳発生の異常は種子致死を引き起こす原因となる。栽培イネである *Oryza sativa* と野生イネの種間交雑では、胚乳の「過成長」あるいは「萎縮」という相反する表現型が観察され、交雑の方向（母・父の組合せ）によって表現型が逆転する<sup>3)</sup>。この現象は単なる特定の遺伝子間の不具合で生じるものではなく、胚乳形成における母性と父性ゲノムの寄与バランスが崩れることによって引き起こされると考えられている。

興味深いことに、同様の胚乳異常は、倍数間交雑（同一種内で倍数性の異なる個体を交雑）でも再現される。例えば、4倍体 *O. sativa* を母親に、2倍体 *O. sativa* を父親に用いると萎縮した胚乳が、逆の組合せでは過成長した胚乳が形成される<sup>4)</sup>。すなわち、母性と父性の倍数性バランスの崩壊が、種間交雑での異常と同様の表現型を誘発することを示している。

そこで、この種間交雑と倍数間交雑の相似性に着目し、「種間交雑で過成長を示す栽培イネ *O. sativa* と野生イネ *O. longistaminata* の組合せにおいて(図1中央)、母親の倍数性を上昇させれば、胚乳発生の正常化するのはないか」とい

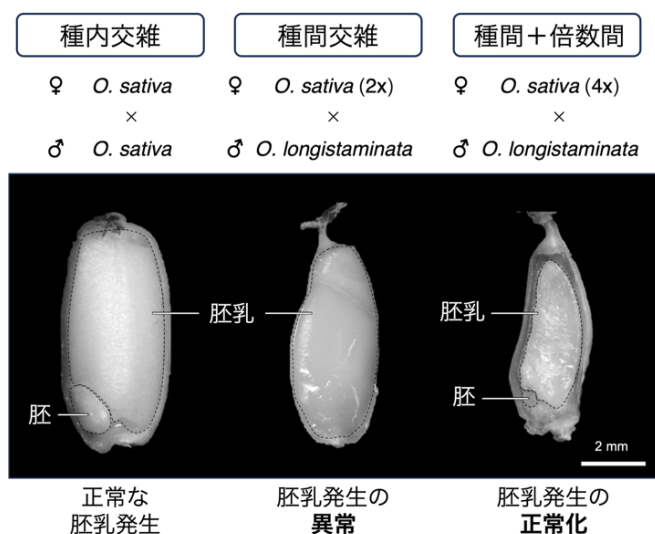


図1. 倍数性改変による胚乳発生の正常化

う仮説を立てた<sup>5)</sup>。実際に、4倍体の栽培イネ *O. sativa* を母親に、野生イネ *O. longistaminata* を父親として種間交雑を行った結果、わずかに萎縮した胚乳が形成されたが (図1右)、胚乳発生は正常に進行し、雑種種子の98%が正常に発芽・生育した。このことから、種間交雑で生じる胚乳発生異常は、倍数性の操作によって打破可能であることが示されるとともに、種間交雑と倍数間交雑で生じる胚乳発生異常が同様のメカニズムによって生じている可能性が示唆された。

さらに、これら雑種胚乳に対してアレル特異的 RNA-seq 解析を行ったところ、過成長した胚乳が形成される通常の種間交雑ではインプリント遺伝子の片親特異的発現が失われていたが、倍数性改変によってこの発現パターンが部分的に回復することが明らかとなった。この結果は、種間交雑における胚乳発生異常、ひいては胚乳形成における母性と父性ゲノムの寄与バランスの背景に、エピジェネティックなインプリンティング制御の破綻が存在することが示唆された。

## 2. ゲノムインプリンティング制御因子 *OsEMF2a* の機能解析

胚乳発生におけるエピゲノム制御の理解をさらに進めるため、私はポリコーム複合体 (PRC2) に着目した。シロイヌナズナでは、PRC2 がヒストン H3 の 27 番リジンのトリメチル化 (H3K27me3) を介して胚乳発生を制御することが報告されている<sup>6,7)</sup>。一方、イネにおける PRC2 の役割は十分に理解されていなかった。そこで、イネ PRC2 構成因子のひとつであり、母性発現型のインプリント遺伝子でもある *OsEMF2a* に注目し、その機能解析を行った<sup>8)</sup>。*Osemf2a* 変異体では、胚乳発生が著しく遅延し、種子致死を示す異常が観察された (図2)。また、RNA-seq および ChIP-seq 解析から、*OsEMF2a* は H3K27me3 修飾を介して、胚乳発生に関わる多数の転写因子やインプリント遺伝子群を抑制していることが明らかになった<sup>8)</sup>。

興味深いことに、*OsEMF2a* 自身もインプリント遺伝子として母性由来アレルから特異的に発現するが、同時に他のインプリント遺伝子群の発現を制御しており、「インプリント遺伝子を制御するインプリント遺伝子」であることが示された。すなわち、*OsEMF2a* は胚乳発生におけるエピゲノム制御のハブとして機能している可能性が高い。

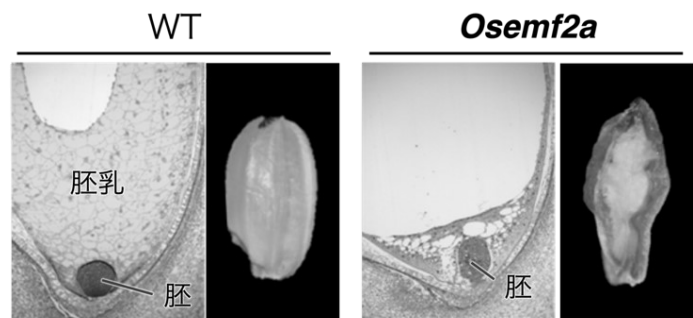


図2. *Osemf2a* 変異体における胚乳発生 (左パネル) および種子形成 (右パネル) の異常

## 3. ゲノムインプリンティングの時空間的制御機構

種間交雑で見られる胚乳発生異常は、インプリンティング制御の破綻によって生じる可能性が高い。しかし、イネではどのようにして親性ゲノム特異的な発現が確立され、どのようなエピゲノム修飾によって維持されているのかについての理解は進んでいなかった。そこで私は、胚乳発生過程におけるインプリンティングの確立・維持過程の動的変化を明らかにするため、まず胚乳発生ステージ別のアレル特異的 RNA-seq 解析を行った。その結果、胚乳発生過程の全期間でインプリント状態を維持する「安定的インプリント遺伝子」と、特定ステージでのみ片親発現を示す「ステージ特異的インプリント遺伝子」が存在することを明らかにした<sup>9)</sup>。さらに、whole-genome bisulfite sequencing (WGBS) および CUT&RUN 法によるエピゲノム解析を実施したところ、雌雄のアレルで DNA メチル化および H3K27me3 修飾の分布が顕著に異なり、とくに雌性配偶子 (中央細胞) における DNA 脱メチル化が

インプリンティング確立の起点となることが示唆された (図3)。これらの結果は、インプリンティングが単一のエピジェネティック因子ではなく、DNAメチル化とヒストン修飾の多層的制御によって形成・維持されることを意味している。

さらに、独自に構築した胚乳単核 RNA-seq (single-nucleus RNA-seq) 解析系を用いたところ、インプリント遺伝子の発現様式が胚乳内の細胞種ごとに大きく異なることを見出した。すなわち、胚乳を構成する細胞層 (周辺部・中心部・アリューロン層 (糊粉層) など) に応じてインプリンティング制御が空間的に分化しており、胚乳発生を支える精緻なエピゲノム制御の存在を明らかにした。

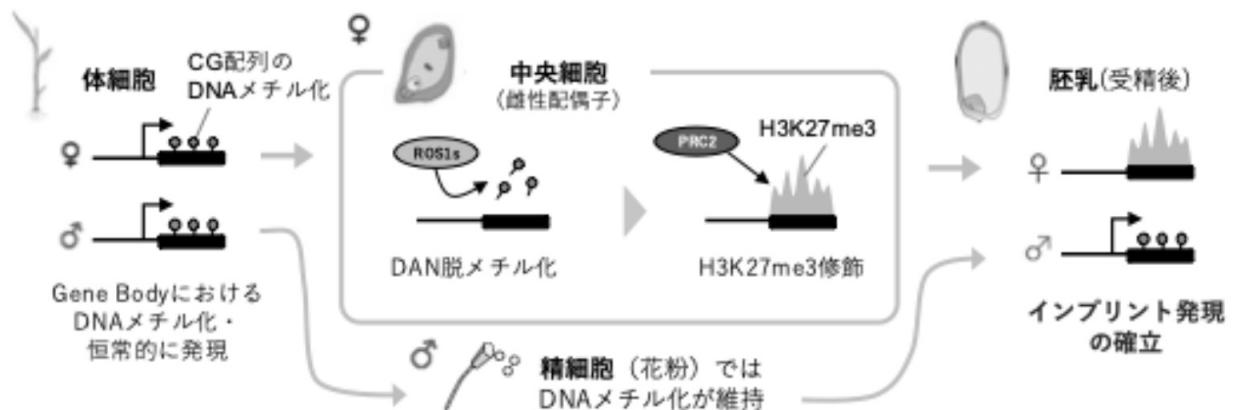


図3. インプリント遺伝子の多層的な制御

父性発現型のインプリント遺伝子は、体細胞では遺伝子本体における DNAメチル化を持ち、どちらのアレルからも安定した発現が見られる。しかし、雌性配偶子 (中央細胞) での DNA 脱メチル化・PRC2 (OsEMF2a を含む) によるヒストン修飾を受けることで母親アレルはサイレンシングされる。一方、父親アレルでは、遺伝子本体における DNAメチル化が維持され、胚乳でも安定した発現が見られる。

#### 4. 胚乳発生を制御するエピジェネティック機構と生殖的隔離の分子基盤

これまでの知見を踏まえ、OsEMF2a によるエピジェネティック制御と種間交雑における生殖的隔離との関連性を調査した。O. sativa の自殖種子および O. sativa × O. longistaminata の雑種胚乳において OsEMF2a 標的遺伝子群の発現量を比較したところ、過成長する胚乳では多数の標的遺伝子群が過剰発現していた。一方、胚乳発生が正常化する 4 倍体 O. sativa を母親に用いた種間交雑では、これらの遺伝子発現が自殖種子と同程度まで回復していた。対照的に、萎縮を示す種間交雑の組合せでは標的遺伝子群の発現が低下していた。これらの結果から、種間交雑によって H3K27me3 修飾レベルが変動し、インプリント遺伝子を含む OsEMF2a 標的遺伝子群の発現バランスが崩れることで胚乳発生異常が生じると考えられた。

これらの観察結果から、OsEMF2a による H3K27me3 修飾レベルが胚乳発生の方向性を左右する主要因であると考えられた。この仮説を検証するため、種間交雑時における H3K27me3 修飾レベルを改変する目的で Osemf2a 変異体を母親に用いて野生イネとの交雑を行った。その結果、胚乳発生が正常化し、雑種種子の生存率が向上した。さらに胚乳におけるアレル特異的 RNA-seq 解析の結果、正常化した胚乳では低下していた標的遺伝子群の発現も回復しており、生殖的隔離が OsEMF2a による H3K27me3 修飾の変化によって生じることを実証する結果を得た。さらに、この現象は複数の野生イネ種との交雑でも共通して確認され、胚乳発生における生殖的隔離がイネ属に普遍的なエピジェネティック機構により制御されていることを示唆している。

## おわりに

イネ胚乳における生殖的隔離は、ゲノムインプリンティングの破綻と、それを担う H3K27me3 修飾の異常によって生じることが明らかとなった。特に OsEMF2a は、胚乳発生を統御する中心的エピジェネティック因子であり、種間交雑に伴うインプリンティング制御の攪乱に深く関与していると考えられる。今後は、雑種胚乳における H3K27me3 修飾の全ゲノム的変化を明らかにし、親性ゲノム間の発現バランス崩壊がどのように引き起こされるのか、その分子機構を解明することを目指す。また、エピゲノム改変によるインプリンティング制御の再構築を通じて、生殖的隔離の打破と野生イネの遺伝資源利用を両立させる新たな育種戦略の確立を展望している。

## 謝辞

本賞にご推薦くださいました横浜市立大学 木下哲教授、日本育種学会長 中園幹生教授ならびに関係者の皆様に深謝いたします。また、本研究を遂行するにあたり、木下哲教授をはじめ、国立遺伝学研究所 佐藤豊教授、野々村賢一准教授、理化学研究所 川勝泰二博士、カリフォルニア大学デイビス校 Luca Comai 教授、岩手大学 畠山勝徳教授にご懇篤なるご協力とご支援を賜りました。最後に、共に研究を行なってくれた木原生物学研究所の学生およびテクニカルスタッフの皆様、岩手大学の植物育種学研究室の学生に感謝申し上げます。

## 引用文献

- 1) Nishiyama, I. and T. Yabuno (1978) *Cytologia* 43: 453–466.
- 2) Johnston, S.A., T.P. den Nijs, S.J. Peloquin and R.E. Henneman Jr. (1980) *Theor. Appl. Genet.* 57: 5–9.
- 3) Ishikawa, R., T. Ohnishi, Y. Kinoshita, M. Eiguchi, N. Kurata and T. Kinoshita (2011) *Plant J.* 65: 798–806.
- 4) Sekine, D., T. Ohnishi, H. Furuumi, A. Ono, T. Yamada, N. Kurata and T. Kinoshita (2013) *Plant J.* 76: 792–799.
- 5) Tonosaki, K., D. Skine, T. Ohnishi, A. Ono, H. Furuumi, N. Kurata and T. Kinoshita (2018) *Plant J.* 93: 534–544.
- 6) Kiyosue, T., Ohad, N., Yadegari, R., Hannon, M., Dinneny, J., Wells, D., Katz, A., Mardossian, L., Harada, J.J., Goldberg, R.B. et al. (1999) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 96:4186–4191.
- 7) Luo, M., Bilodeau, P., Dennis, E.S., Peacock, W.J., and Chaudhury, A. (2000) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 97:10637–10642.
- 8) Tonosaki K, A. Ono, M. Kunisada, M. Nishino, H. Nagata, S. Sakamoto, S.T. Kijima, H. Furuumi, K. Nonomura, Y. Sato *et al.* (2021) *Plant Cell.* 33:85–103.
- 9) Tonosaki K, D. Susaki, H. Morinaka, A. Ono, H. Nagata, H. Furuumi, K. Nonomura, Y. Sato, K. Sugimoto, L. Comai, *et al.* (2024) *Nature Plants.* 10:1231–1245.