

研 究 報 告 書

「イネ生殖分子機構の解明と操作を基盤としたアポミクシスへの挑戦」

研究タイプ: 通常型

研究期間: 平成 25 年 10 月～平成 29 年 3 月

研 究 者: 笠原 竜四郎

1. 研究のねらい

日本人は古くからイネを主食とし、植物育種家は多収性、耐病性、耐虫性をもつイネを目指して交雑育種を繰り返し、現在までに優良品種を多数作り上げてきた。受精によって胚と胚乳を形成した結果生じるイネの種子は人類にとって貴重な食糧となる。これまで、イネの場合は受精を経ずに単為発生するアポミクシス現象が未だに確認されておらず、イネの種子形成は受精に依存していると考えられている。このため、仮に冷夏或いは豪雨が続くなど花粉にとって極めて厳しい気象条件下や、植物体が害虫、病気にさらされている状態では、花粉管を介した受精効率が下がり、稔実率低下につながることがわかっている。ここで私は、イネにおいて受精を経ずに胚や胚乳が形成される、アポミクシスを達成出来れば、厳しい条件下でも常に稔性を100%にすることが出来ると考えた。このために、自らが見出した花粉管依存的胚珠肥大 (POEM: Pollen tube-dependent Ovule Enlargement Morphology) (Kasahara *et al.*, *Science Advances*, 2016) 現象から着想を得た、ハイスループットなスクリーニングを用いて卵細胞の単為発生を引き起こす遺伝子など、本研究で新たに同定されることが期待されるシロイヌナズナの遺伝子に加え、すでにシロイヌナズナで同定されている非減数性の胚嚢形成を引き起こす遺伝子や、受精せずに胚乳形成が起こる遺伝子も含めてノックアウトする。イネのアポミクシスが成功すれば、一代雑種の有用な遺伝子型をそのまま維持した種子を即座に固定でき、育種年限を大幅に短縮できるなど農業的に極めて有益である。また、冷夏のようなイネにとっての悪条件下でも100%の種子稔性が期待できるなど、地球レベルでの食糧増産にも貢献することができる。

2. 研究成果

(1) 概要

本研究は、イネのアポミクシスの達成を最終目標とし、まずシロイヌナズナでアポミクシスに必要な因子を見つけるべく、花粉管依存的胚珠肥大 (POEM) 現象を用いたスクリーニングを行ってきた。アポミクシスを達成するには3つの関門がある。まず、受精をしてはいけないので、①受精に失敗する因子を見つける事である。次に、②受精をせずとも胚および胚乳が生じる因子を見つける事である。そして最後に、③シロイヌナズナで獲得できた遺伝子がイネでも応用できる事である。そこでまず、①受精に失敗する変異体を獲得するスクリーニングを行ってきた。このスクリーニングは非常に効率が良く、新奇であると考えられる 2 つの変異体を単離することができた。今後はその他の変異体も含め新規因子の同定に努めていく予定である。

また、②受精せずとも自動的に胚や胚乳を形成する変異体に関しては2次スクリーニングが完了し、その候補数を絞り込むことができた。ある程度の数まで絞り込めたので、受精に失敗

する変異体同様、原因遺伝子の同定作業を進行中である。

最後に、③イネのアポミクシス化に関する研究であるが、まず受精に失敗することでよく知られているシロイヌナズナの *GCS1* 遺伝子のホモログをイネで検索したところ、*tos17* のラインで水イネ表現型が多数確認できた。また、イネ *GCS1* 遺伝子を CRISPR でゲノム編集した個体からも POEM 表現型を確認することができた。このことから、POEM 現象はシロイヌナズナだけではなく、イネにも存在する単子葉、双子葉共通の現象であると証明することができた。

(2) 詳細

計画 1 受精に失敗する変異体の獲得

まず、アポミクシス達成に必要であると考えられる受精に失敗する変異体であるが、総スクリーニング数 13698 個体に対して配偶体が受精に失敗する変異体が 23 株獲得できている(図 1)。これらの変異体は現在次世代シーケンサーとエコタイプマッピングの併用による原因遺伝子の同定作業中である。これらのうち、雌性配偶体の変異体である *4f2028* 株の原因遺伝子は 4 番染色体下腕に坐乗しており、1.3Mbps の領域内、21 個の候補遺伝子に絞ることができた(図2)。この変異体は図2のように精細胞が受精できずにとどまっている受精異常の変異体であった(図2)。また、もう一つの雌性配偶体変異体である *tri2407* 株の原因遺伝子も 5 番染色体上腕に坐乗していることがわかった。これら 2 つの領域内には既知の受精因子が存在しないため、これら 2 つの変異体は新規の受精因子であり、新規因子の同定を達成することができそうである。今後はその他の変異体も含め新規因子の同定に努めていく予定である。

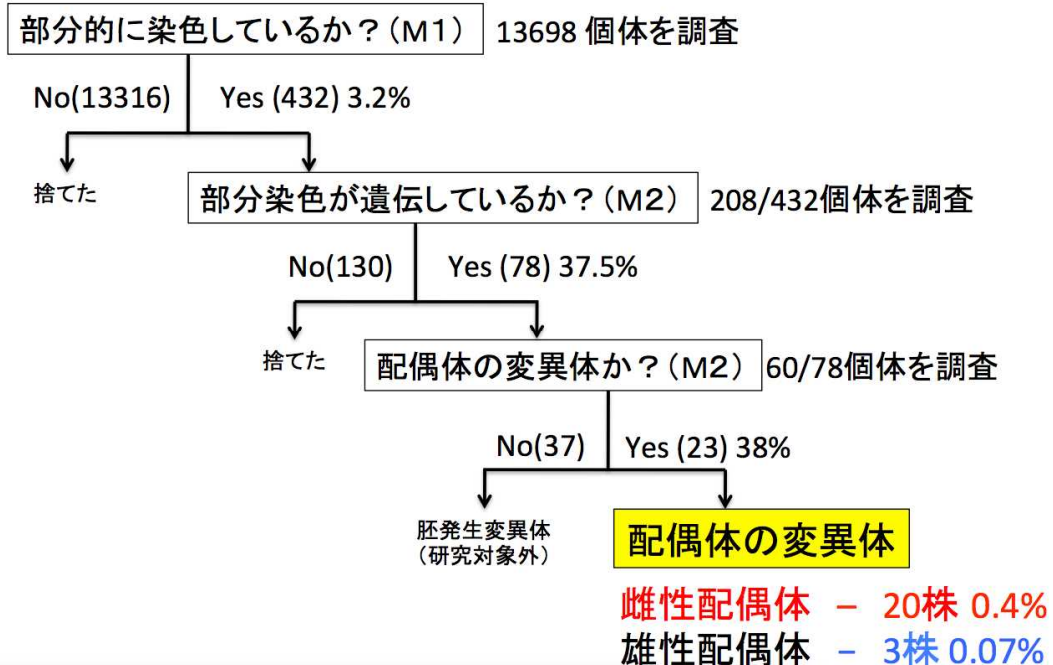


図 1. 計画1のスクリーニングのフローチャート

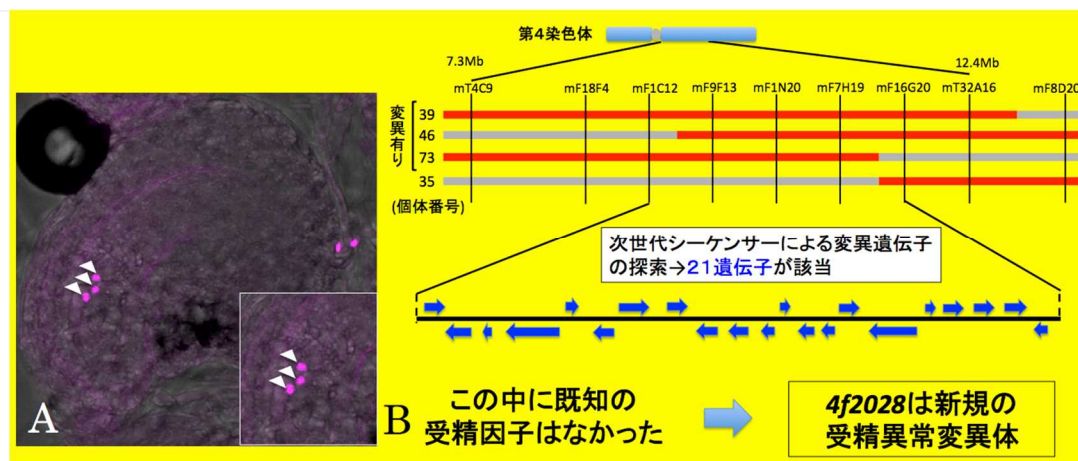


図 2. スクリーニングにより同定された新規変異体 4f2028 の解析

(A) 胚珠内の表現型。花粉管から放出された2つの精細胞と1つの栄養核が3つの輝点として発現している。2つの精細胞が受精できずに留まっており、4f2028 は受精に失敗する変異体であることが示唆された。

(B) 遺伝子マッピングの結果、原因遺伝子は第4染色体中程、7.3Mb～12.4Mb に位置していることがわかった。この位置に既知の受精因子はなく、4f2028 は新規受精因子であった。

計画2 胚、胚乳単為発生変異体の獲得

受精せずとも自動的に胚や胚乳を形成する変異体に関しては総スクリーニング数 8986 個体に対して一次スクリーニングを通過した個体が342 個体獲得できている。これらの植物は現在遺伝性の確認などの2次スクリーニングが完了し、その候補数を105 個まで絞り込むことができたので、現在受精に失敗する変異体同様、原因遺伝子の同定作業に入る予定である(図3)。

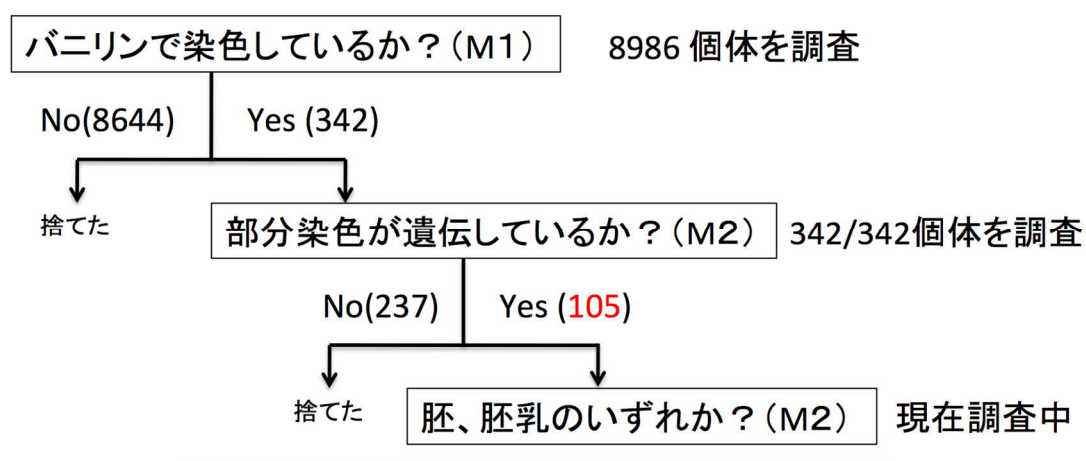


図 3. 計画1のスクリーニングのフローチャート

計画3 イネアポミクシス遺伝子の改変

最後にイネのアポミクシス化に関する研究であるが、まず受精に失敗することでよく知られているシロイヌナズナの *GCS1* 遺伝子のホモログをイネで検索したところ、興味深いことにホモログが2つ見つかったため、これら2つの遺伝子 *GCS1A* (第9染色体)、*GCS1B* (第5染色体) をターゲットとした CRISPR のコンストラクトを作成し、イネへのトランスフォーメーションを行った。*gcs1B* に関してはホモ個体が獲得できた。また、*tos17* のラインを取り寄せ *gcs1A* に変異の入っていた個体を育成した結果、非常に興味深いことに、*gcs1A*、*gcs1B* それぞれの種子の糊殻を取り除いた後観察すると中途半端に肥大した受精に失敗した POEM 表現型が多数確認できた。このことから、POEM 現象はシロイヌナズナだけではなく、イネにも存在する単子葉、双子葉共通の現象であると証明することができた。

また、さがけ期間中に POEM 現象を論文にまとめることができた (Kasahara *et al.*, *Science Advances*, 2016)。その内容は以下の通りである。シロイヌナズナの胚珠内の胚のうは花粉管を受け入れて、2つの精細胞が卵細胞と中央細胞に受精し種子形成する。一方、2つの精細胞に受精能のない変異体、例えば *gcs1* を用いた場合、花粉管は胚のうに進入するが、放出された精細胞は受精出来ないため、この胚珠は種子形成出来ない。しかしながら、非常に興味深いことに受精に失敗した胚珠は花粉管進入前の胚珠に比べて明らかに肥大していた。また、花粉管の破裂が胚珠を肥大させていることから、花粉管内容物がこの現象の引き金となっていることも示唆された。また花粉管内容物は胚乳自動発生の変異体の胚乳形成率を大幅に高めていることも示唆された。POEM 研究のほとんどはさがけ研究期間中に実施した。

3. 今後の展開

研究計画1で受精が不全であると考えられる変異体を獲得したので、新規因子が獲得出来る可能性は高い。このことから、今後はその原因遺伝子の同定を進めていき、分子生物学的な植物受精の基盤を確立する。現在までに植物の受精の段階で直接働く因子は非常に少ないため、これらと共同して働く因子が同定されれば、それだけで当該分野の進展に貢献出来る。研究計画2では胚乳単為発生因子である *MEA* や *FIS2* などが過去に同定されているものの、胚乳単為発生因子は未だに同定されていない。今回のスクリーニング法は非常に効率的であるので、このような因子が数多く獲得できる可能性は高い。この様に、植物受精の分子生物学的な基盤が整い、単為発生因子が獲得出来れば、いよいよその因子を活用してイネのアポミクシス化に取り組む。イネのアポミクシスが達成できれば、花粉機能に影響の出る冷害などの悪天候でも100%の種子稔性が期待できる体制が整うという意味で、その貢献は莫大なものとなる。更に、イネの優良系統同士を掛けあわせして新品種を作る場合に、アポミクシス系統が確立していれば掛け合わせ可能であればいかなる優良形質もF2の分離で失われることがなく、優良品種の維持や大量生産に大きく貢献できる。

4. 評価

- (1) 自己評価
- (研究者)

研究計画 1 においては、有力な受精変異体を2つ獲得できた。遺伝子同定はまだ時間がかかるとはいえ、今までほんの少ししか受精に直接関わる変異体は同定されていなかったのも、遺伝子が同定されればようやく植物の受精の分子生物学的なネットワークが構築されることとなり、今後大いに期待がかかる分野となる。研究計画2については、有力な胚あるいは胚乳自動発生因子がシロイヌナズナで獲得されつつあるので、もしこれがイネで応用できれば生物学的にも、農学的にも応用が期待できる分野となる。また、研究計画3については POEM 現象がイネでも見出されたことから今後はイネでの POEM 現象を生かして、受精をしなくても胚乳を形成するイネの作成に期待できる。また、これら3つの結果を合わせて、イネのアポミクシスが達成できれば、人類の食へ直接繋がる技術となり、その効果は絶大である。

(2) 研究総括評価(本研究課題について、研究期間中に実施された、年2回の領域会議での評価フィードバックを踏まえつつ、以下の通り、事後評価を行った)。

(研究総括)

笠原氏は、バイオマス生産性の高い系統の増殖を可能にするため、受精を伴わずに種子などの繁殖体を生産するアポミクシス形質をイネに導入することを、本研究の目的とした。研究の過程では、まずシロイヌナズナを用い、受精不成立変異体の選抜と遺伝子の同定を進め、また受精せずに胚および胚乳が分化する変異体の選抜も行い、重要な変異体の獲得に成功した。しかしながら、まだ原因遺伝子の特定には至っておらず、現象論の段階にとどまっていることは残念である。最終目標のイネアポミクシス系統の育成にはまだ遠く、まずはシロイヌナズナに集中した基礎研究に注力し、植物の胚珠発生の制御機構の分子基盤の解明につなげてほしい。

5. 主な研究成果リスト

(1) 論文(原著論文)発表

1. Ryushiro D. Kasahara, Michitaka Notaguchi, Shiori Nagahara, Takamasa Suzuki, Daichi Susaki, Yujiro Honma, Daisuke Maruyama, Tetsuya Higashiyama. Pollen tube contents initiate ovule enlargement and enhance seed coat development without fertilization. *Science Advances* 2: e1600554 (2016)

(2) 特許出願

研究期間累積件数: 1 件

(3) その他の成果(主要な学会発表、受賞、著作物、プレスリリース等)

1. 笠原 竜四郎, Discovery and Application of the POEM Phenomenon, シンガポール テマセク 研究所 招待講演, 2014 年 2 月 12 日

2. 笠原 竜四郎・木下 佳裕・東山 哲也, イネ生殖分子機構の解明と操作を基盤としたアポミクシスへの挑戦, 第 55 回日本植物生理学会 年会, 2014 年 3 月 18 日

3. 笠原竜四郎, Challenging to establish the rice apomixis system by analyzing and manipulating mechanisms of rice reproductive molecules, 23rd International Congress On Sexual Plant Reproduction, 2014/7/12
4. 笠原 竜四郎、植物の受精学、静岡大学理学部 集中講義、2014/10/17(招待講演)
5. 笠原 竜四郎、Discovery and Application of the POEM Phenomenon, University of Utah, 2015/2/18(招待講演)
6. 笠原 竜四郎、Female (female Gametophyte) and Male (pollen tube) interaction in plants, Colorado State University, 2015/2/23(招待講演)
7. 笠原 竜四郎、Imaginary Pregnancy in Plants, University of Montreal, 2015/2/27 (招待講演)
8. 笠原 竜四郎、POEM 現象は花粉管内容物によって引き起こされる植物の新現象である。第 55 回日本植物生理学会年会、2015/3/18
9. 笠原 竜四郎、花粉管誘引と重複受精の間にある、植物の生殖に重要な POEM 現象の発見-動物と植物の受精現象の共通点に迫る-
日本動物学会 シンポジウム 受精から生殖システムの進化を考える 2015/9/18(招待講演)
10. 笠原 竜四郎、Discovery of POEM Phenomenon Induced by Pollen Tube Contents. 24th International Congress on Sexual Plant Reproduction, USA 2016/3/21(招待講演)