

京都大学若手人材海外派遣事業 ジョン万プログラム
研究者派遣プログラム

成果報告書

提出日：令和2年 3月23日

【基本情報】

○申請者

採 択 年 度：平成30年度

部 局 名 等：農学研究科農学専攻 蔬菜花卉園芸学研究室

職 名：助教

氏 名：大野 翔

研究課題名：植物の誘導個体再生において生じる形質の揺らぎの分子基盤

○渡航先

国 名：英国

研究機関名：ウォーリック大学 (University of Warwick)

研究室名等：[研究室名] Epigenetic Control of Plant Development

[職名等・氏名] Reader Dr. Jose Gutierrez-Marcos

渡 航 期 間：平成30年9月17日～令和2年3月18日 (548日)

○渡航期間中の出張

なし

京都大学若手人材海外派遣事業 ジョン万プログラム 研究者派遣プログラム

【成果】

○プロジェクトの成果及び今後の展開

・研究概要

シロイヌナズナ(*Arabidopsis thaliana*)では *GROUNDED/RKD4* (Waki ら, 2011) の異所的発現を介して体細胞胚様構造を形成させ (Somatic Embryogenesis: SE)、植物ホルモンを使うことなくダイレクトに個体再生を誘導できる。この現象を再分化が難しい農業作物に応用できれば画期的な技術となり得るが、そのプロセスに関わるメカニズムは不明である。そこでメインのプロジェクトとして、*AtRKD4* をデキサメタゾンによって誘導発現できる *indoxRKD4* (Waki ら, 2011) 系統に EMS を処理して突然変異誘導した集団を供試し、*AtRKD4* による SE 発生メカニズムに関わる遺伝子を探索した。1 次スクリーニングにより 701 の M₃ 集団から 199 個体を選抜し、さらに 2 次スクリーニングを行い 19 の候補変異個体を選抜した。そのうちの 12 系統について M₅ 世代、およびそのうちの 8 系統について M₄ 世代の戻し交雑 BCF₂ 集団を作成し、NGS による全ゲノム解析を行った。現段階で二つの候補変異系統について候補遺伝子を推定しており、今後共同研究の下でゲノム編集による変異体の作出、機能解析を進めて研究を完成させていく予定である。

サブプロジェクトとしてコショウラン (*Phalaenopsis amabilis*) における *AtRKD4* オーソログ (*PaRKD*) をシロイヌナズナにおいて異所的発現して SE を誘導し、*AtRKD4* と同様の機能を持つことを明らかにした。

さらに別のサブプロジェクトとして、H3K27me3 メチルトランスメチルトランスフェラーゼとして知られている *EARLY FLOWERING 6 (ELF6)* および *RELATIVE OF EARLY FLOWERING 6 (REF6)* の 2 重変異体 (*elf6-C/ref6-5*) を野生型と交雑すると epimutant を生じるという現象の解明にも携わった。*elf6-C/ref6-5* と野生型の F₂ 集団では H3K27me3 の増加及び DNA の低メチル化を生じる個体があり、葉序の異常・種皮の着色喪失・花粉稔性の低下など様々な形態異常を生じる。ヒストンや DNA のメチル化異常は後代にも遺伝し、NGS データからトランスポゾン *AtCACTAI* が転移していることが示唆され、その新規挿入部位の特定や、転移によるフットプリントの特定を行った (Antunez-Sanchez ら, submitted)。

・国際共同研究の立上げ・ネットワークの構築

メインのプロジェクトは候補遺伝子をゲノム編集により破壊し機能を確認する実験、サブのプロジェクトは *ELF6* および *REF6* の機能解析に必要な遺伝子組み換え体を作成する実験が最低限必要で、共にさらなる追加実験を要するので、申請者の帰国後も引き続き国際共同研究として継続し、論文投稿を目指す予定である。また、科研費の国際共同研究加速基金 (国際共同研究強化 (A))、あるいは二国間交流事業・共同研究への応募も検討していきたいと考えている。

2020 年 1 月にウォーリック大学の植物科学関連の構成員が集まる Plants And Crops: Methodologies, Answers and Nightmares (PAC-MAN) Seminar において「Colorful world by small RNAs. Color patterns formed by post-transcriptional gene silencing」というタイトルで口頭発表を行い、自分自身の研究内容を発表でき、多数の方に興味深かったとのコメントも頂けた。

・国際共著論文の投稿・発表等の状況、国際学会等での発表状況 [予定を含む]

<論文>

Antunez-Sanchez J, Naish M, Ramirez-Prado JS, Ohno S, Huang Y, Dawson A, Manza-Mianza D, Ariel F, Raynaud C, Wilbowo A, Daron J, Ueda M, Latrasse D, Slotkin RK, Weigel D, Benhamed M*, Gutierrez-Marcos J*. A new role for histone demethylases in the maintenance of genome integrity in *Arabidopsis thaliana*. Submitted. Biorxiv: doi: <https://doi.org/10.1101/2020.03.02.972752>

京都大学若手人材海外派遣事業 ジョン万プログラム 研究者派遣プログラム

<学会発表>

○Mose W, Dawson A, Ohno S, Marisa F, Semiarti E, Gutierrez-Macos J. 2019. Transcriptional dynamics during induced somatic embryogenesis in *Phalaenopsis amabilis* (L.) Blume orchid. 2nd International Conference on Bioinformatics, Biotechnology, and Biomedical Engineering (BioMIC 2019), Yogyakarta, Indonesia. (September 2019) (発表者：Mose W)

メインのプロジェクトについては引き続き共同研究を行っていく予定であり、成果が得られ次第随時学会発表や論文投稿を行う予定である。また、受入研究者と申請者でトランスポゾンと遺伝子発現に関する総説を執筆し、The Plant Journal 誌に投稿する予定である。

・在外研究経験によって習得した能力等

渡航先機関のウォーリック大学 School of Life Sciences では大講座制のオープンラボ形式が用いられていた。申請者が所属している京都大学農学研究科では小講座制なのでシステムが大きく異なるが、オープンラボ形式による機器等の共同利用は資金面での効率性が強く感じられた。また、博士の学位を持ったテクニカルスタッフが数多く所属しており、Bioanalyzer・Bioruptor・Miseq 等の高額機器による解析も依頼できる他、海外へのサンプル発送もサポート頂けるなど、研究を行いやすい仕組み作りがなされていた。さらに Phytobiology Facility という植物育成用の施設が別途存在し、週末・祝日も含めて植物の管理がなされるような仕組み作りもなされていた。

School of Life Sciences には数多くのポスドクが在籍し、ラボを問わず研究上の様々な相談ができる環境が整っていた。研究室の内部では wet な研究と dry な研究を担当する学生が明確に分けられており、dry を担当する学生の中でもゲノムのマッピング、RNA-seq、ヒストン・DNA メチル化関連、ATAC-seq・NOME-seq といったように明確な役割分担がなされていたのが印象的であった（解析用のサーバーは大学が提供している）。基本的に PhD1 年次は上級生の実験を手伝い、技術習得をしながら自分の実験を進めていくというような教育方針であった。（プロジェクトや奨学金により異なる場合があるが、イギリスでは学部3年間・修士課程1年間・博士課程4年間が一般的である。）

研究の展開方法に関しては『植物の表現型に着目する』という点に関しては、それほど大きな違いを感じなかったもので、少し安心した部分でもある。ただ、共同研究のフットワークが非常に軽いというのは大きな違いで、他の研究者が得意な部分は任せて連携するということが研究のアクティビティの向上に非常に大きな役割を果たしているように感じられた。

・在外研究経験を活かした今後の展開

申請者は博士課程修了前に所属研究室の助教に着任していたので、基礎生物学研究所に短期間派遣された機会を除けば他の研究室に所属したことが無く、そういう意味ではポスドクに近いポジション (Research Visiting Fellow) で日本の所属研究室とはシステムが大きく異なる研究室で研究できたことは大変貴重な経験であった。シロイヌナズナの遺伝子組み換え・NGS ライブラリーの作成などの技術習得に加え、研究室の運営方法や研究の進展方法も非常に参考になる部分があった。また、かなり基礎研究よりのラボであるにもかかわらず応用・実用への意識がかなり高いことが印象的であった。さらに、所属したラボは非常に多国籍で、イギリス・アイルランド・イタリア・ドイツ・スペイン・シリア・サウジアラビア・パキスタン・インドネシア・タイ・中国・韓国出身のメンバーがおり、国際色豊かな経験ができた。

18 か月という長い期間留学することができ、留学先で多くのプロジェクトにも参画することができた。最終的には 5 報程度の国際共同研究論文として発表できたらと考えている。また英語力（特にスピーキング）も少しは向上してきたと思うので、海外からの学生の受け入れや国際学会などの機会に発揮していきたい。そして、留学中も Skype や Chatwork などを用いて日本にいる学生の指導も同時に行っていたが（2018 年度 5 名・2019 年度 3 名）、こちらも得られたことが多かったため、今回の留学で得られたすべてを今後の研究人生に活かしていきたい。

京都大学若手人材海外派遣事業 ジョン万プログラム
研究者派遣プログラム

英文成果報告書

○申請者情報

部 局 名 : Graduate School of Agriculture

職 名 : Assistant Professor

氏 名 : Sho Ohno

研究課題名 : Molecular basis of the phenotypic variation associated with induced-organogenesis in plants

渡 航 期 間 : 17.9.2018-18.3.2020

○渡航先情報

国 名 : United Kingdom

研究機関名 : University of Warwick

研究室名等 : Epigenetic Control of Plant Development

受入研究者名 : Dr. Jose Gutierrez-Marcos

○渡航報告

University of Warwick is located in the heart of England, 3 miles from the centre of Coventry, on the border with Warwickshire. University of Warwick is ranked 9th in the UK (The Guardian 2020 league table) and ranked 62th in the world (QS World University Rankings 2020). Among UK Universities, University of Warwick is relatively young University, which was established in 1965. Total number of students is 27,278 (15,998 for undergraduate, 9,799 for postgraduate and 1,481 for Exchange/ Visiting/ Study Abroad/ IFP**/ Industry) and total number of staff is 6,947 (2,610 for Academic/Researcher/Teaching and 4,337 for Professional and Support) in 2019. University of Warwick is home to over 9,500 international students from 147 countries.

I stayed at University of Warwick as a Visiting Research Fellow of School of Life Sciences (SLS). SLS is located at the Gibbet Hill Campus near the Gibbet Hill Woods. There are about 25 principle investigators for Plant and Crop Sciences in SLS. The lab is open laboratory system, the laboratory room C030 was shared with members of eight PI groups (PhD students and posdocs). In SLS, there is Genomics facility room that has shared machines such as Bioruptor, Biosnalyzer and Miseq, and we can ask technical staffs to run the machines. And also there are another staffs in prep room, they prepare autoclaved tips, a lot of culture media and glass stuffs. These systems are very nice environment for proceeding research. The lab I belonged was Dr. Jose Gutierrez-Marcos lab, laboratory for epigenetic control of plant development. This lab is multinational, members come from UK, Ireland, Italy, Germany, Spain, Silia, Saudiarabia, Pakistan, Indonesia, Thailand, China and South Korea. It was very impressive for me to experience a lot of different countries and cultures. The lab meeting was held on every Monday, and we have presentation of recent progress by one member and literature review in rotation.

Laboratory experiments are done at C030 of Gibbet Hill campus, while plants for experiment are grown at the building called as Phytobiology Facility (PBF). PBF is located 15 min walk from Gibbet Hill campus, and it fully contained stand-alone facility arranged on two floors to grow plants in precisely

京都大学若手人材海外派遣事業 ジョン万プログラム
研究者派遣プログラム

controlled environmental conditions. There are a more than 10 compartments of controlled greenhouses on the upstairs and several controlled plant growth rooms in the downstairs. PBF has seed cleaning equipments, seed storage rooms, soil preparation room and microscopes. I grew more than 1000 *Arabidopsis* plants at the same time in maximum there.

From the 2019-2020 term, we have a weekly seminar series, Plants And Crops: Methodologies, Answers and Nightmares (PAC-MAN) seminar. PhD students and postdocs and sometimes PIs from the entire plant sciences division attend this seminar. This seminar was very nice opportunity not only to know other researchers research but also to have some advices from other members. I had a presentation entitled “Colorful world by small RNAs. Color patterns formed by post-transcriptional gene silencing”, introduced my own research and related literatures.

The research project in University of Warwick was entitled “Molecular basis of the phenotypic variation associated with induced-organogenesis in plants”, screening of genes associated with *AtRKD4* somatic embryogenesis in *Arabidopsis thaliana*. It was reported that ectopic expression of *GROUNDED/RKD4* induces somatic embryo-like structures and whole-plant regeneration (Waki et al, 2011). But the molecular mechanisms associated with this plant regeneration is still unknown. To address this question, I screened of 701 EMS mutagenesis M₃ populations of *indoxRKD4* line, which *AtRKD4* gene expression can be induced by DEX. Finally, I screened 19 candidate mutants and whole genome sequencing analysis was performed, and I identified two candidate genes. We need further confirmation experiment in future. I also got involved in the project to elucidate a role of plant histone demethylases in the maintenance of genome integrity. *EARLY FLOWERING 6 (ELF6)* and *RELATIVE OF EARLY FLOWERING 6 (REF6)* are known as H3K27me₃ demethylases in plant (Lu et al, 2011; Crevillen et al, 2014). We analyzed *elf6-C*, *ref6-5*, *elf6-C/ref6-5* and crossed sibling plants, and we found that failure to reset these chromatin marks during sexual reproduction results in the inheritance of epigenetic imprints, which cause a loss of DNA methylation at heterochromatic loci and transposon activation. This content was submitted as a manuscript entitled “A new role for histone demethylases in the maintenance of genome integrity in *Arabidopsis thaliana*.” (Antunez-Sanchez et al, submitted, biorxiv: doi: <https://doi.org/10.1101/2020.03.02.972752>). During my stay, I could have learned how to manipulate *Arabidopsis* plants, transformation techniques, NGS library construction and a lot of knowledge about plant epigenetics. Since still we have to collect a lot of data to complete our projects, we will continue this international collaboration.

Finally, I would like to appreciate Dr. Jose Gutierrez-Marcos and the John Mung program to give me the opportunity for studying in the University of Warwick.

京都大学若手人材海外派遣事業 ジョン万プログラム
研究者派遣プログラム



School of Life Sciences



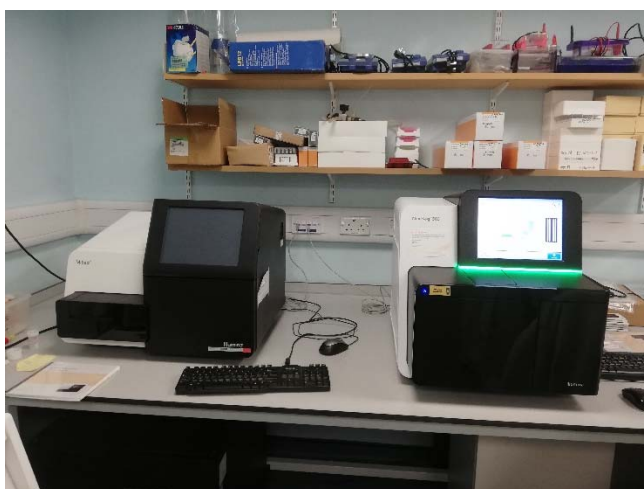
SLS Atrium



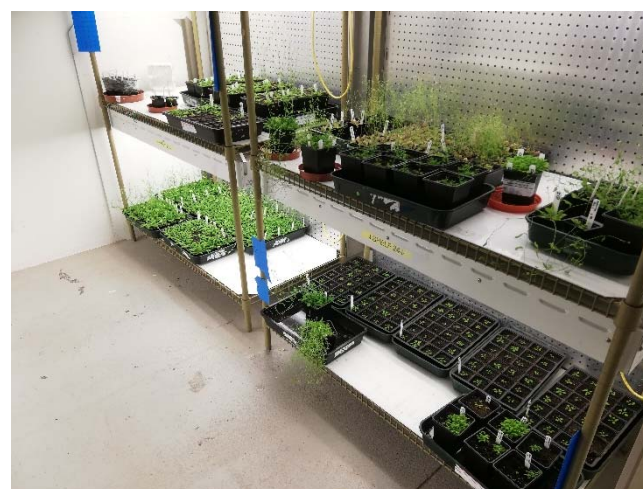
Lab C030



Lab members



NGS machines in Genomic Facility



Plants in the PBF