

令和 4 年 6 月 6 日現在

機関番号：14101

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2018～2021

課題番号：18K19211

研究課題名（和文）ムギ類卵細胞の人為活性化とRNP-CRISPRによるゲノム編集半数体植物の創出

研究課題名（英文）Genome-edited haploid induction via RNP-CRISPR of activated egg cells in Triticeae

研究代表者

掛田 克行（Kakeda, Katsuyuki）

三重大学・生物資源学研究所・教授

研究者番号：50221867

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,800,000円

研究成果の概要（和文）：コムギ卵細胞とトウモロコシ精細胞を単離し、電気融合法を用いたin vitro受精により、コムギ-トウモロコシ交雑受精卵を作成した。この交雑受精卵由来のカルス培養から再分化した植物体が得られ、形態観察、フローサイトメトリーおよびゲノムシーケンスの解析から、コムギ半数体であることが示された。本研究より、当該in vitro交雑受精卵の発生・再生過程において、in planta交配の場合と同様に、トウモロコシ精細胞ゲノムが選択的に脱落し、コムギ卵細胞ゲノムを有する半数体が生じることが実証された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

コムギおよびトウモロコシから単離した雌雄配偶子のin vitro交雑受精卵からコムギ半数体が獲得されたのは世界で初めての成果であり、この実証には挑戦的研究として大きな意義がある。今後、本研究をさらに発展させ、ムギ類の単離卵細胞および受精卵への物質導入系技術の革新を進めることで、形質転換を伴わないDNAフリーゲノム編集体の獲得が可能となり、ゲノム編集を組み入れたムギ類の新たな半数体育種法の開発につながることを期待される。

研究成果の概要（英文）：Wheat egg cells and maize sperm cells were isolated and in vitro-fertilized using electric fusion to produce wheat-maize hybrid zygotes. Plantlets were regenerated from callus cultures derived from these cross-fertilized eggs. Morphological observation, flow cytometry and genome sequencing analysis of the regenerated plants indicated that they were haploid plants of wheat. This study demonstrates that, during the development and regeneration of wheat-maize hybrid zygotes produced in vitro, the sperm cell-derived maize genome is selectively eliminated, as in the case of in planta crosses, resulting in the induction of haploid plants carrying the egg cell-derived wheat genome.

研究分野：植物遺伝育種学

キーワード：ゲノム編集 in vitro受精 Triticeae

1. 研究開始当初の背景

ムギ類では遠縁交雑による半数体育種法が確立され、実際の交配育種に利用されている。コムギまたはオオムギを雌親として、トウモロコシの花粉を受粉させると、受精後の交雑胚の発達途中でトウモロコシの染色体が選択的に消失する。交雑から数日後の適切な時期に、発達中の胚を摘出し、無菌培養することで、コムギまたはオオムギの半数体が効率よく得られる。このようにして品種間 F_1 から半数体を作成し、染色体倍加すれば、遺伝的に固定した個体が迅速に得られ、育種選抜に要する期間を大幅に短縮できる。これまで、研究代表者(掛田)はムギ類の生殖関連形質(自家不和合性、開花・閉花受粉性など)の遺伝子機能解析を、研究分担者(岡本)はイネやトウモロコシの単離配偶子の *in vitro* 受精系を用いた受精および初期胚発生過程の解析をそれぞれ進めてきた。両者は、配偶子単離や *in vitro* 受精の技術を、農学・育種学分野へ応用展開することに共通の関心を持ち、上述のムギ類の半数体出現メカニズムを議論する中で、「半数体のゲノム編集ができないか」という斬新な研究構想が生まれた。ムギ類では、シロイヌナズナやイネに比べ、遺伝子導入・形質転換体作出の効率が低い点が遺伝子機能解析の一つのネックになっており、ゲノム編集に際してもこの形質転換の難点が高いハードルとなっている。一方、岡本らは、単離した卵細胞または受精卵を DNA コンストラクトなどの導入物質と数分間共存培養し、そこに PEG- Ca^{2+} 溶液を加えることによって導入物質が細胞内に取り込まれることを見出した(図1; Koiso et al. 2017)。この物質導入系を利用して、単離受精卵をダイレクトにゲノム編集することができれば、ゲノム編集植物作出の簡便性とスピードが飛躍的に向上するだけでなく、DNA フリーのゲノム編集体が獲得できる画期的な手法となりうる。以上の経緯より、ムギ類独自の半数体レベルでの DNA フリーゲノム編集技術を着想するに至った。

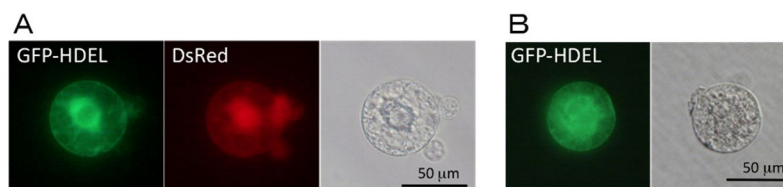


図1. イネ卵細胞(A)および受精卵(B)における蛍光タンパク質遺伝子の一過的発現

2. 研究の目的

2012年に報告されたCRISPR/Cas9法によるゲノム編集は、簡便に効率よく標的遺伝子の特異的改変を可能とする技術として、多くの生物研究分野で爆発的に広がっている。特に、動物とは異なり遺伝子ターゲティングが困難な植物においては画期的な技術であり、シロイヌナズナなどのモデル植物だけでなく、イネ、トウモロコシ、トマトなどの農業上重要な作物でもゲノム編集が可能になっている。しかしながら、それらのゲノム編集植物はCas9およびガイドRNA(gRNA)をコードするDNA(および薬剤耐性マーカーDNA)を遺伝子導入して作成されるため、遺伝子組換え体として扱われる。このため、特に作物育種への実利用を視野に入れ、DNAフリーのゲノム編集技術の確立を目的とした研究が世界中で活発に行われている。これには、Cas9タンパク質とgRNAの複合体(Cas9-gRNA ribonucleoprotein(RNP))を直接導入する手法が用いられている。Cas9-gRNA RNP導入細胞ではゲノム編集が生じるが、細胞内のCas9タンパク質とgRNAは分解されてしまうので、当該細胞のゲノム中に外来性DNAが挿入する可能性がない。これまでに、タバコやシロイヌナズナにおいて、Cas9-gRNA RNPを導入した体細胞プロトプラストを増殖・再分化させてゲノム編集植物を得る系が報告されている。近年、研究分担者の岡本らは、イネおよびトウモロコシから単離した卵細胞および受精卵中に、PEG- Ca^{2+} 法によりプラスミドDNAを導入し、その遺伝子を発現させる系を確立した(図1)。さらに、この系を応用して受精卵にCas9-gRNA RNPを導入する実験系(以下、RNP-CRISPRと記す)の検討を開始している。

一方、コムギやオオムギにおいては、ゲノム編集が可能になりつつあるものの、形質転換効率の低さがネックとなり、効率的なゲノム編集植物の作出は一般に困難な現状にある。本研究では、従来ムギ類で確立されている遠縁交雑による半数体作出法にヒントを得て、受精卵を用いたDNAフリーの斬新なゲノム編集技術の開発を目的とした。すなわち、単離したムギ類の卵細胞とトウモロコシの精細胞を *in vitro* 受精により融合させたのち、その交雑受精卵にCas9-gRNA RNPを導入し、さらにそれを増殖・発生させるものである。この組み合わせの交雑受精卵では、胚発生過程で精細胞ゲノムが脱落することが想定され、結果的に、ムギ類卵細胞からゲノム編集半数体植物を直接作出できることになる。本研究は、このムギ類卵細胞の人為活性化とRNP-CRISPRによるゲノム編集半数体の作出に向けた新たな実験系の確立を目的とする。本研究により、ムギ類の高効率なゲノム編集が可能となるだけでなく、DNAフリーのゲノム編集技術を用いたムギ類の半数体育種法として将来的な利用が期待できる。

3. 研究の方法

(1) *in vitro* 受精系を用いたムギ類半数体植物の作出

コムギ(cv. Fielder)の花の子房から卵細胞を、トウモロコシ(Inbred line A188)の葯から精

細胞をそれぞれ単離したのち、それら配偶子を電気融合法により融合させることでコムギ-トウモロコシ交雑受精卵を得た。作出した交雑受精卵をコムギ受精卵培養用の培地で培養し、増殖カルスにまで発生させた。最終的に、増殖したカルスを植物体に再分化させ、当該植物体の形態特性、倍数性およびゲノムシーケンスの解析を行った。

(2) 交雑受精卵への物質導入系の検討

コムギ-トウモロコシ交雑受精卵の Cas9-gRNA RNP 処理の前段階として、コムギ卵細胞および受精卵への物質導入系の検討を行った。イネ卵細胞・受精卵と同様または一部の改変を加えた条件下で、コムギ卵細胞および受精卵への PEG-Ca²⁺法によるプラスミド DNA の導入を試みた。

4. 研究成果

(1) コムギの子房から卵細胞を、トウモロコシの花粉から精細胞をそれぞれ単離し、それらの雌雄配偶子をコムギ *in vitro* 受精 (IVF) 系 (Maryenti et al. 2019) の手法を用いて融合させることでコムギ-トウモロコシ交雑受精卵を 5 個体作出した。その後、それら交雑受精卵を培養・再分化させることで植物体 (4 ライン) を得た (図 2)。得られた交雑受精卵由来の植物体はコムギ親の形態をしていたが、植物体の穂、種子、子房、葯の大きさはコムギ親よりも小さく (図 3)、フローサイトメトリー解析からコムギ親の約半分の核 DNA 量をもつことが示された。さらに、再生植物体の全ゲノム解析を行い、トウモロコシゲノム断片の当該植物ゲノム中への挿入の有無を調べた。次世代シーケンスの結果から得られたシーケンスリードをコムギおよびトウモロコシゲノムへマッピングしたところ、核ゲノム、ミトコンドリアおよびプラスチドゲノム断片が挿入されている可能性が示された。しかし、核ゲノムに関しては 5 カ所の推定挿入部位に対するゲノム PCR 解析を行ったが、挿入は確認されなかった。また、ミトコンドリアおよびプラスチドゲノムについても推定挿入部位におけるトウモロコシゲノム断片の挿入は確認されなかった。これらのことから、*in vitro* 受精系で作出したコムギ-トウモロコシ交雑受精卵の発生・再生過程においてトウモロコシゲノムがほぼ完全に脱落すること、および再生した植物体はほぼ純粋なコムギ半数体であることが示された。

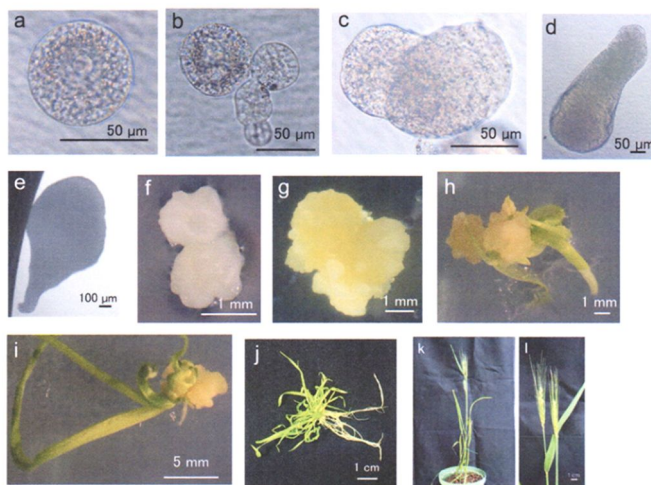


図2. コムギ卵細胞とトウモロコシ精細胞の融合交雑受精卵の発生および再分化過程 (a) 融合直後、(b) 融合1日後、(c) 融合4日後、球状様胚期、(d) 融合7日後、初期胚期、(e) 融合11日後、器官分化期様胚期、(f) 融合19日後、細胞塊 (カルス) 期、(g) 融合43日後、カルス期、(h) 融合50日後、シュート再分化期I、(i) 融合54日後、シュート再分化期II、(j) 融合67日後、発根誘導期、(k) 融合130日後、成熟植物、(l) 融合130日後、小穂の拡大写真。

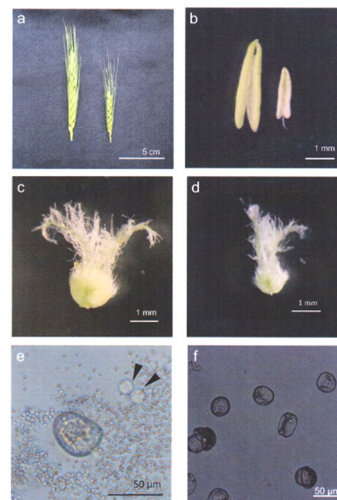


図3. 再生植物体の花および雌雄生殖器官・組織 (a) コムギ (左) と再生植物 (右) の小穂、(b) コムギ (左) と再生植物 (右) の葯、(c) コムギの成熟子房、(d) 再生植物の成熟子房、(e) コムギ花粉から放出された精細胞 (黒矢頭)、(f) 再生植物の花粉、デンプンなどの内容物は確認されない。

(2) コムギ受精卵への物質導入の確立にあたって、まず、コムギ卵細胞への PEG-Ca²⁺法によるプラスミド DNA 挿入を試みた。これは、PEG-Ca²⁺法の条件検討・設定にあたって、IVF 系で作出したコムギ受精卵よりもコムギ卵細胞をそのまま用いた方が処理検体数を増やすことができ、解析効率が上がると考えたからである。ちなみに、イネにおいては、卵細胞および受精卵への導入効率はそれぞれ約 30% および 70% である (Koiso et al. 2017)。

イネ卵細胞・受精卵の PEG-Ca²⁺法と同様の手法でコムギ卵細胞を処理したところ、処理中に大部分の卵細胞がカバーガラス表面に接着してしまい、細胞が崩壊してしまった。これは、コムギ卵細胞の細胞膜の性質がイネ卵細胞のそれと異なること (Maryenti et al. 2019) に起因している可能性が考えられた。卵細胞のカバーガラスへの接着を回避するために実験条件を検討した結果、PEG-Ca²⁺に 0.3% アガロースを加えることが有効であることを見出した。しかしながら、この +0.3% アガロース改変法を用いることで PEG-Ca²⁺処理後のコムギ卵細胞生存率は約 70% と著しく増加したが、導入プラスミド由来の蛍光タンパク質の検出には至らなかった。

コムギ卵細胞での物質導入が困難なことが示されたことから、前述のイネのケースのように、コムギにおいても卵細胞に比べて受精卵への物質導入の方が細胞あたりの導入効率が高いと考え、コムギ受精卵を IVF により作出し、PEG-Ca²⁺処理に供した。まず、イネ卵細胞・受精卵の PEG-

Ca²⁺法と同様の手法でコムギ受精卵を処理したところ、コムギ卵細胞の場合とは異なり、PEG-Ca²⁺処理中のカバーガラスへの接着は見られなかった。しかしながら、PEG-Ca²⁺処理後に培養したコムギ受精卵の発生率（分裂率）は約 20%と著しく低く、導入プラスミド由来の蛍光タンパク質は検出されなかった。このことから、PEG-Ca²⁺処理時の細胞ストレス低減のために +0.3%アガロース改変法を用いてプラスミド導入をコムギ *in vitro* 受精卵に対して行った。その結果、PEG-Ca²⁺処理受精卵の発生率はほぼ 100%へと改善したが（図 4）、導入プラスミド由来の蛍光タンパク質シグナルは検出できなかった。

以上より、コムギ受精卵へのプラスミド DNA の導入系が確立できなかったことから、本研究におけるゲノム編集部分に関しては、今後の検討課題として残された。

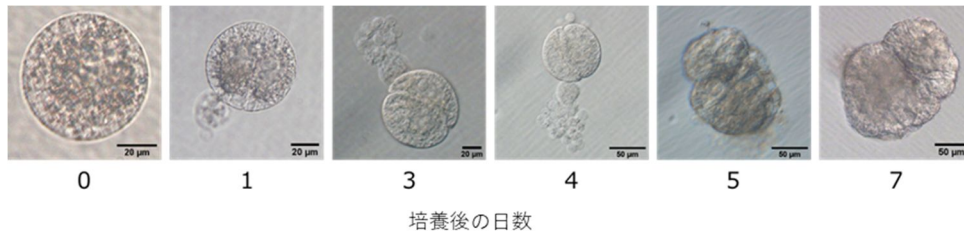


図4. PEG-Ca²⁺処理後に培養したコムギ受精卵の発生

PEG処理時に0.3%アガロースを加えることにより、コムギ受精卵は正常に発生するようになった。

< 引用文献 >

Koiso N, Toda E, Ichikawa M, Kato N, Okamoto T (2017) Development of gene expression system in egg cells and zygotes isolated from rice and maize. *Plant Direct* Sep 6; 1(3)

Maryenti T., Kato N., Ichikawa M., Okamoto T. (2019) Establishment of an *in vitro* fertilization system in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Plant Cell Physiol.* 60: 835-843

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計19件（うち査読付論文 16件 / うち国際共著 2件 / うちオープンアクセス 3件）

| | |
|--|---------------------------|
| 1. 著者名 Wang Ning, Kakeda Katsuyuki, Tomokazu Masahiro, Liu Cheng, Yoshida Megumi, Kawada Naoyuki, Komatsuda Takao | 4. 巻 134 |
| 2. 論文標題 A novel mutant allele at the Cleistogamy 1 locus in barley | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Theoretical and Applied Genetics | 6. 最初と最後の頁 3183 ~ 3193 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00122-021-03884-1 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 該当する |
| 1. 著者名 Maryenti Tety, Ishii Takayoshi, Okamoto Takashi | 4. 巻 232 |
| 2. 論文標題 Development and regeneration of wheat-rice hybrid zygotes produced by in vitro fertilization system | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 New Phytologist | 6. 最初と最後の頁 2369 ~ 2383 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/nph.17747 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |
| 1. 著者名 Rattanawong Kasidit, Koiso Narumi, Toda Erika, Kinoshita Atsuko, Tanaka Mari, Tsuji Hiroyuki, Okamoto Takashi | 4. 巻 108 |
| 2. 論文標題 Regulatory functions of ROS dynamics via glutathione metabolism and glutathione peroxidase activity in developing rice zygote | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 The Plant Journal | 6. 最初と最後の頁 1097 ~ 1115 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/tpj.15497 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |
| 1. 著者名 Aini Hanifah, Sato Yoshikatsu, Uno Kakishi, Higashiyama Tetsuya, Okamoto Takashi | 4. 巻 35 |
| 2. 論文標題 Dynamics of mitochondrial distribution during development and asymmetric division of rice zygotes | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Plant Reproduction | 6. 最初と最後の頁 47 ~ 60 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/s00497-021-00430-3 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

| | |
|--|-------------------------|
| 1. 著者名 Deushi Ryouya, Toda Erika, Koshimizu Shizuka, Yano Kentaro, Okamoto Takashi | 4. 巻 10 |
| 2. 論文標題 Effect of Paternal Genome Excess on the Developmental and Gene Expression Profiles of Polyspermic Zygotes in Rice | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 Plants | 6. 最初と最後の頁 255 ~ 255 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3390/plants10020255 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である) | 国際共著 - |

| | |
|---|-------------------------|
| 1. 著者名 Maryenti Tety, Kato Norio, Ichikawa Masako, Okamoto Takashi | 4. 巻 2484 |
| 2. 論文標題 In Vitro Fertilization System Using Wheat Gametes by Electric Fusion | 5. 発行年 2022年 |
| 3. 雑誌名 Methods Mol. Biol. | 6. 最初と最後の頁 259 ~ 273 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/978-1-0716-2253-7_18 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

| | |
|--|----------------------|
| 1. 著者名 Toda Erika, Okamoto Takashi | 4. 巻 5 |
| 2. 論文標題 CRISPR/Cas9 Based Genome Editing Using Rice Zygotes | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Current Protocols in Plant Biology | 6. 最初と最後の頁 e20111 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/cppb.20111 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

| | |
|--|---------------------|
| 1. 著者名 Toda Erika, Okamoto Takashi | 4. 巻 10 |
| 2. 論文標題 Gene Expression and Genome Editing Systems by Direct Delivery of Macromolecules Into Rice Egg Cells and Zygotes | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 BIO-PROTOCOL | 6. 最初と最後の頁 e3681 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.21769/BioProtoc.3681 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

| | |
|--|-------------------------|
| 1. 著者名 Toda Erika, Okamoto Takashi | 4. 巻 87 |
| 2. 論文標題 Polyspermy in angiosperms: Its contribution to polyploid formation and speciation | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Molecular Reproduction and Development | 6. 最初と最後の頁 374 ~ 379 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1002/mrd.23295 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である) | 国際共著 - |

| | |
|--|-------------------------|
| 1. 著者名 Rahman Md Hassanur, Toda Erika, Okamoto Takashi | 4. 巻 2122 |
| 2. 論文標題 In Vitro Production of Zygotes by Electrofusion of Rice Gametes | 5. 発行年 2020年 |
| 3. 雑誌名 Methods Mol. Biol. | 6. 最初と最後の頁 257 ~ 267 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1007/978-1-0716-0342-0_18 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

| | |
|--|---------------------------|
| 1. 著者名 Kim M. Yvonne, Ono Akemi, Scholten Stefan, Kinoshita Tetsu, Zilberman Daniel, Okamoto Takashi, Fischer Robert L. | 4. 巻 116 |
| 2. 論文標題 DNA demethylation by ROS1a in rice vegetative cells promotes methylation in sperm | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Proceedings of the National Academy of Sciences | 6. 最初と最後の頁 9652 ~ 9657 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1073/pnas.1821435116 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 該当する |

| | |
|--|-------------------------|
| 1. 著者名 Maryenti Tety, Kato Norio, Ichikawa Masako, Okamoto Takashi | 4. 巻 60 |
| 2. 論文標題 Establishment of an In Vitro Fertilization System in Wheat (<i>Triticum aestivum</i> L.) | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Plant and Cell Physiology | 6. 最初と最後の頁 835 ~ 843 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/pcp/pcy250 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

| | |
|---|---------------------------|
| 1. 著者名 Ohnishi Yukinosuke, Kokubu Iwao, Kinoshita Tetsu, Okamoto Takashi | 4. 巻 60 |
| 2. 論文標題 Sperm Entry into the Egg Cell Induces the Progression of Karyogamy in Rice Zygotes | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Plant and Cell Physiology | 6. 最初と最後の頁 1656 ~ 1665 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/pcp/pcz077 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

| | |
|--|-------------------------|
| 1. 著者名 Rahman Md Hassanur, Toda Erika, Kobayashi Masaaki, Kudo Toru, Koshimizu Shizuka, Takahara Mirei, Iwami Momoka, Watanabe Yoriko, Sekimoto Hiroyuki, Yano Kentaro, Okamoto Takashi | 4. 巻 60 |
| 2. 論文標題 Expression of Genes from Paternal Alleles in Rice Zygotes and Involvement of OsASGR-BBML1 in Initiation of Zygotic Development | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Plant and Cell Physiology | 6. 最初と最後の頁 725 ~ 737 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/pcp/pcz030 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

| | |
|---|-------------------------|
| 1. 著者名 Toda Erika, Koiso Narumi, Takebayashi Arika, Ichikawa Masako, Kiba Takatoshi, Osakabe Keishi, Osakabe Yuriko, Sakakibara Hitoshi, Kato Norio, Okamoto Takashi | 4. 巻 5 |
| 2. 論文標題 An efficient DNA- and selectable-marker-free genome-editing system using zygotes in rice | 5. 発行年 2019年 |
| 3. 雑誌名 Nature Plants | 6. 最初と最後の頁 363 ~ 368 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41477-019-0386-z | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 - |

| | |
|--|---------------------------|
| 1. 著者名 Toda Erika, Ohnishi Yukinosuke, Okamoto Takashi | 4. 巻 69 |
| 2. 論文標題 An imbalanced parental genome ratio affects the development of rice zygotes | 5. 発行年 2018年 |
| 3. 雑誌名 Journal of Experimental Botany | 6. 最初と最後の頁 2609 ~ 2619 |
| 掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/jxb/ery094 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である) | 国際共著 - |

〔学会発表〕 計32件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 7件）

| |
|--|
| 1. 発表者名 掛田 克行, 櫛部 七海, Agetha Nanape |
| 2. 発表標題 オオムギ開花性変異遺伝子c1y1.b4の遺伝解析 |
| 3. 学会等名 日本育種学会 第140回講演会 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 A. Nanape, C. Nakashima, K. Kakeda |
| 2. 発表標題 Characterization of floral/spike traits in the wheat AP2 mutants with reference to FHB resistance |
| 3. 学会等名 第16回ムギ類研究会 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Agetha Nanape, Katsuyuki Kakeda |
| 2. 発表標題 Pleiotropic effects of mutation at the miR172 target site in the wheat orthologs of Cly1 |
| 3. 学会等名 日本育種学会 第141回講演会 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Maryenti T., Ishii T., Okamoto T. |
| 2. 発表標題 Developmental profiles of inter-subfamily polyploid zygotes produced by the fusion of wheat and rice gametes |
| 3. 学会等名 日本育種学会 第141回講演会 |
| 4. 発表年 2022年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Aini H., Sato Y., Uno K., Higashiyama T., Okamoto T. |
| 2. 発表標題 Dynamics of mitochondrial distribution during development and asymmetric division of rice zygotes |
| 3. 学会等名 日本植物学会 第85回大会 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 澤本陸、大島良美、貴嶋紗久、光田展隆、池田美穂、高崎寛則、高木優、戸田絵梨香、岡本龍史 |
| 2. 発表標題 キメラリプレッサーを用いたイネ卵細胞の分裂・発生を誘導する新規転写因子の探索 |
| 3. 学会等名 日本植物学会 第85回大会 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 増尾心之介、大島良美、貴嶋紗久、光田展隆、池田美穂、高崎寛則、高木優、戸田絵梨香、木下温子、岡本龍史 |
| 2. 発表標題 イネ受精卵発生を誘導するOsASGR-BBML1の標的遺伝子群の同定 |
| 3. 学会等名 日本植物学会 第85回大会 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 岡本龍史 |
| 2. 発表標題 コムギ in vitro 受精系：異質倍数性受精卵の作出とその発生解析 |
| 3. 学会等名 麦学オンラインセミナー（招待講演） |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Toda E, Koiso N, Takebayashi A, Ichikawa M, Kiba T, Osakabe K, Osakabe Y, Sakakibara H, Kato N, Okamoto T. |
| 2. 発表標題 An efficient DNA- and selectable-marker-free genome-editing system using zygotes in rice and its possible application to other crop species. |
| 3. 学会等名 Keystone Symposia “Plant Genome Engineering: From Lab to Field” (国際学会) |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Maryenti Tety., Takayoshi Ishii., Okamoto T. |
| 2. 発表標題 Developmental profiles of inter-subfamily polyploid zygotes produced by the fusion of wheat and rice gametes |
| 3. 学会等名 日本植物生理学会 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Rahman MH, Toda E., Kobayashi M., Kudo T., Koshimizu S., Takahara M., Iwami M, Watanabe Y., Sekimoto H., Yano K., Okamoto T. |
| 2. 発表標題 Expression of Genes from Paternal Alleles in Rice Zygotes and Involvement of OsASGR-BBML1 in Initiation of Zygotic Development |
| 3. 学会等名 日本植物生理学会 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 A. Nanape, K. Kakeda |
| 2. 発表標題 Evaluation of the effect of mutations in the wheat AP2 homoeologs on cleistogamous flowering using near-isogenic lines |
| 3. 学会等名 日本育種学会 |
| 4. 発表年 2021年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Okamoto T. |
| 2. 発表標題 Initiation of zygotic development and fertilization-independent egg division in rice. Symposium of Frontiers of research on embryo and endosperm development: Induction of artificial apomixis. |
| 3. 学会等名 日本植物生理学会 |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Rattanawong K., Koiso N., Okamoto T. |
| 2. 発表標題 ROS-level dynamics during development of zygote in rice |
| 3. 学会等名 日本植物生理学会 |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Nanape A., Watanabe K., Haine H.M., Kakeda K. |
| 2. 発表標題 Accumulation effects of mutations in the wheat AP2 homoeologs on cleistogamous flowering |
| 3. 学会等名 日本育種学会 |
| 4. 発表年 2020年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Maryenti T., Kato N., Ichikawa M., Okamoto T. |
| 2. 発表標題 Establishment of an in vitro fertilization system in wheat |
| 3. 学会等名 △子類研究会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Nanape A., Watanabe K., Haine H., Kakeda K. |
| 2. 発表標題 Accumulation effects of mutant alleles of AP2 homoeologs on cleistogamous flowering in hexaploid wheat |
| 3. 学会等名 ムギ類研究会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 古野真由子, Tety Maryenti, 掛田克行, 岡本龍史 |
| 2. 発表標題 コムギ-トウモロコシ交雑受精卵の発生過程における片親ゲノムの選択的な脱落 |
| 3. 学会等名 日本植物学会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 大西 由之佑, 永田 博基, 戸田 絵梨香, 國分 巖, 岡本 龍史, 木下 哲 |
| 2. 発表標題 被子植物の受精に伴う遺伝子発現およびpaternal/maternal mRNA degradation の最初の報告 |
| 3. 学会等名 日本植物学会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 永田 博基, 大西 由之佑, 戸田 絵梨香, 國分 巖, 岡本 龍史, 木下 哲 |
| 2. 発表標題 被子植物の受精に伴うカルシウム応答性遺伝子発現およびmRNA分解 |
| 3. 学会等名 日本植物学会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 Toda E, Koiso N, Takebayashi A, Ichikawa M, Kiba T, Osakabe K, Osakabe Y, Sakakibara H, Kato N, Okamoto T. |
| 2. 発表標題 An efficient DNA- and selectable-marker-free genome-editing system using zygotes in rice |
| 3. 学会等名 Vienna International Science Conferences and Events Association, Plant Genome Editing & Genome Engineering (国際学会) |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Toda E, Koiso N, Takebayashi A, Ichikawa M, Kiba T, Osakabe K, Osakabe Y, Sakakibara H, Kato N, Okamoto T. |
| 2. 発表標題 Gene expression and genome editing systems in rice by direct delivery of macromolecules into egg cell and zygote |
| 3. 学会等名 EMBO Practical Course “Functional live imaging of plants” (国際学会) |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Okamoto, T., Toda E., Koiso, N., Rahman MH., Takebayashi, A., Ichikawa, M., Kiba, T., Osakabe, Y., Osakabe, T., Sakakibara, H., Kato, N. |
| 2. 発表標題 Development of gene expression and genome editing systems in rice egg cells and zygotes by direct delivery of macromolecules. |
| 3. 学会等名 25th International Congress on Sexual Plant Reproduction (国際学会) |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Okamoto, T., Toda E., Koiso, N., Takebayashi, A., Ichikawa, M., Kiba, T., Osakabe, Y., Osakabe, T., Sakakibara, H., Kato, N. |
| 2. 発表標題 Genome editing in rice by direct delivery of preassembled CRISPR-Cas9 vectors or ribonucleoproteins into zygotes. |
| 3. 学会等名 International Association for Plant Biotechnology Congress 2018 (国際学会) |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Rahman MH., Toda E., Ohnishi Y., Koiso N., Okamoto T. |
| 2. 発表標題 A paternally expressed transcription factor possibly initiates rice early zygotic development. |
| 3. 学会等名 25th International Congress on Sexual Plant Reproduction (国際学会) |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Toda E., Kobayashi M., Takahara M., Ohnishi Y., Kudo T., Rahman MH., Watanabe Y., Iwami M., Yano K., Okamoto T. |
| 2. 発表標題 Effects of an imbalanced parental genome ratio on development of rice zygotes and possible function of genes expressing in zygotes with paternal allele-specific manner. |
| 3. 学会等名 25th International Congress on Sexual Plant Reproduction (国際学会) |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|----------------------------------|
| 1. 発表者名 岡本龍史 |
| 2. 発表標題 in vitro 受精系：育種への展開. |
| 3. 学会等名 植物科学シンポジウム2018 (招待講演) |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 大西由之佑, 國分巖, 岡本龍史 |
| 2. 発表標題 精細胞侵入に伴う細胞内 Ca ²⁺ レベルの上昇はイネ受精卵内の核合一を促進する. |
| 3. 学会等名 日本植物学会第82回大会 |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 戸田絵梨香、古磯成美、竹林有理佳、市川雅子、木羽隆敏、刑部敬史、刑部祐里子、榊原均、岡本龍史、加藤紀夫 |
| 2. 発表標題 植物受精卵への Cas9タンパク質-gRNA 複合体の直接導入によるゲノム編集技術の確立と応用. |
| 3. 学会等名 日本植物学会第82回大会 |
| 4. 発表年 2018年 |

| |
|--|
| 1. 発表者名 戸田絵梨香、古磯成美、Tety Maryenti、竹林有理佳、市川雅子、木羽隆敏、刑部敬史、刑部祐里子、榊原均、加藤紀夫、岡本龍史 |
| 2. 発表標題 イネ受精卵を用いたDNAおよび選抜マーカーフリーなゲノム編集技術の確立と他作物種への応用. |
| 3. 学会等名 第60回日本植物生理学会年会 |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Maryenti, T., Kato, N., Ichikawa, M., Okamoto, T. |
| 2. 発表標題 Establishment of an in vitro fertilization system in wheat (<i>Triticum aestivum</i> L.). |
| 3. 学会等名 第60回日本植物生理学会年会 |
| 4. 発表年 2019年 |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

| | 氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号) | 所属研究機関・部局・職 (機関番号) | 備考 |
|---------------|--|--|----|
| 研究 分担 者 | 岡本 龍史 (Okamoto Takashi) (50285095) | 東京都立大学・理学研究科・教授 (22604) | |

6. 研究組織（つづき）

| | 氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号) | 所属研究機関・部局・職 (機関番号) | 備考 |
|-------|-----------------------------|-----------------------|----|
| 研究協力者 | 戸田 絵梨香 (Toda Erilka) | | |

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|
| | |