

令和 4 年 4 月 15 日現在

機関番号：13101

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K05976

研究課題名(和文)花粉数を制御する遺伝子ネットワークの解明と作物への応用

研究課題名(英文) Analysis of pollen number controlling genes in Arabidopsis thaliana and crops

研究代表者

角井 宏行 (Kakui, Hiroyuki)

新潟大学・自然科学系・特任助教

研究者番号：60783199

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では花粉数を制御する遺伝子を解析し、その知見を作物へ応用することを目的とした。まず、花粉数を効率的に計測する手法を確立した。ゲノムワイド関連解析やゲノム編集などを行い、花粉数を制御する遺伝子RDP1を同定した。トランスクリプトーム解析を行い、RDP1変異体で発現変動する遺伝子を明らかにした。数多くのゲノム編集個体を作製する過程で効率的にゲノム編集個体を選抜できる手法PRIMAを開発した。さらに無花粉スギMS4遺伝子座を解析し、TKPR1遺伝子の1塩基置換が無花粉スギの原因であることを明らかにした。

研究成果の学術的意義や社会的意義

花粉数は植物にとって次世代の子孫数に直結するため植物学上基本的かつ重要な形質である。一方で花粉症は世界中で問題になっており、花粉形成の遺伝子を解析することは社会的な意義も大きい。本研究によってモデル植物シロイヌナズナから植物で初めて花粉数を制御する遺伝子の同定に成功し、さらに自殖植物では花粉数が少ない方が正の選択を受けていることを示唆する結果が得られた。さらに日本で最も重大な花粉症の原因であるスギ花粉の無花粉スギの原因遺伝子の同定にも成功した。これらの結果は今後の花粉数研究の基盤となるとともに、無花粉スギのさらなる普及にも貢献するものと考えられた。

研究成果の概要(英文)：In this study, we developed high-throughput pollen counting method. We found RDP1 as pollen number controlling gene by using GWAS and genome-editing. Transcriptome analysis revealed DEGs in RDP1 mutant. We developed PRIMA, which is enable to distinguish 1-bp difference by PCR and electrophoresis. Furthermore, we identified the causal gene of MS4 in Japanese cedar.

研究分野：植物分子生物学、植物育種学、花粉学

キーワード：花粉 花粉数 ゲノム編集 ゲノムワイド関連解析 シロイヌナズナ スギ 花粉症 ジェノタイプ
ク

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

植物において雄性配偶体である花粉数を制御することは生存戦略上重要な形質である。例えば、他家受粉を行う植物において、多くの花粉を生産する個体はより多くの他個体と受精することができる。一方で自家受粉を行う植物では、自個体が生産する胚珠には限りがあるため、過剰な花粉数を生産する個体は無駄なエネルギー投資を行っていることになり生存に不利だと考えられる。実際に自然界において自殖率が増加すると花粉数が少なくなるということが観察されており(Inoue, *Plant Species Biology* 1990; Charnov, Princeton University press, 1982)、植物は形質や環境に対応して花粉数を柔軟に変化させていると考えられている (Tsuchimatsu and Shimizu, *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* 2015)。このように、植物には花粉数を制御するシステムが存在すると考えられていたものの、実際に花粉数を制御する遺伝子を同定した例は今までになかった。

2. 研究の目的

(研究 1) 本研究では、花粉数を制御することが明らかになりつつあった RDP1 を花粉数制御遺伝子として決定し、さらにその遺伝子を詳細に解析することでどのように花粉数が変わるかを考察することを目的とした。

(研究 2) 花粉数は農業分野・医療分野においても重要な形質である。現在、多くの作物は F1 ハイブリットによって作出されているが、この場合雄親に関しては大量の花粉が必要になる一方で雌親に関しては F1 ハイブリット作物の純度を保つ上では花粉を全く生産しないことが望ましい。さらに花粉数は我々の健康を保つ上でも重要な形質である。近年、花粉症患者は増加し続けており、約半数の東京都民がスギ花粉症有病者であるという推定がされている(東京都による花粉症患者実態調査, 2017)。一方で花粉数を効率的に計測する手法がこれまでになかったことから、実際にスギやコムギの 1 花がどのくらいの花粉を生産するのか、また、系統間差はあるのかなどは全く不明であった。このことから本研究では幅広い植物に適用できる効率的な花粉数の計測法を確立し、さまざまな植物の花粉数研究の基盤を構築することを目的とした。

(研究 3) 日本では花粉と聞くと、スギ花粉を連想する人も多い。これはスギ花粉症が日本で最も重大な花粉症であることが原因であろう。実際に花粉症患者は年々増加傾向にあるという報告もあることから、スギ花粉を解析することは学術的にも社会的にも意義深い研究である。本研究では無花粉スギの原因遺伝子座 MS4 の原因遺伝子の同定を目的に研究を行った。

3. 研究の方法

(研究 1) シロイヌナズナ 144 系統から花粉数を計測し、ゲノムワイド関連解析およびゲノム編集、in situ hybridization, 統計進化的解析を行い、RDP1 遺伝子の機能を明らかにした。さらに RDP1 変異体について、発現変動する遺伝子を明らかにする目的で、シロイヌナズナの野生型と RDP1 変異体の花芽から RNA を抽出し、次世代シーケンサーで解析し、GO 解析を行った。

(研究 2) シロイヌナズナで確立した花粉数計測法を幅広い植物種に適用できるようにする目的で、葯や雄花から効率的に花粉を抽出できる手法を検討した。ここで確立した改良法を用いてスギ 26 系統 523 サンプルの花粉数を計測し、さらにサンプリング条件(系統、1 雄花あたりの花粉数、花粉サイズ、1 雄花あたりの重量、着花方角、着花高)を統計モデリング手法 pSEM (piecewise Structural Equation Modeling: 区分構造方程式モデリング)により解析することでどの条件が花粉数を変化させることに重要なのかを検討した。

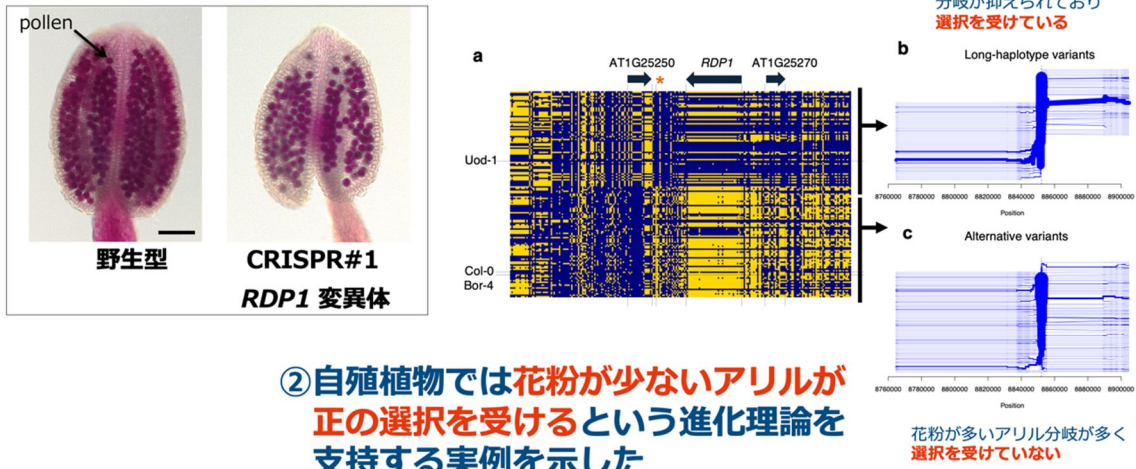
(研究 3) 無花粉スギ MS4 遺伝子座の原因遺伝子の同定を目的に、花粉の観察、RNA-seq データの解析、RT-PCR および in situ hybridization 解析、形質転換実験による機能証明実験を行った。

4. 研究成果

(研究 1) シロイヌナズナ 144 系統のゲノムワイド関連解析やゲノム編集などによる機能解析により RDP1 遺伝子が花粉数を制御する遺伝子であることを植物で初めて示した(図 1)。さらに進化的な解析により、花粉数の少ないアリの RDP1 近辺の領域は組み替えが抑制されており、正の選択を受けていることが明らかになった。これは自殖植物であるシロイヌナズナでは花粉数が少ないことが有利であると考えられていた進化理論を支持する結果であった(Tsuchimatsu & Kakui et al. 2020 *Nature Communications*)。この研究は国内・国外でも大きく取り上げられ、5 以上のメディア報道、2 つの招待解説記事の依頼を受けるなど学術的にも社会的にも大き

く取り上げられた研究であった。

① RDP1 のゲノム編集個体は花粉数が半減する

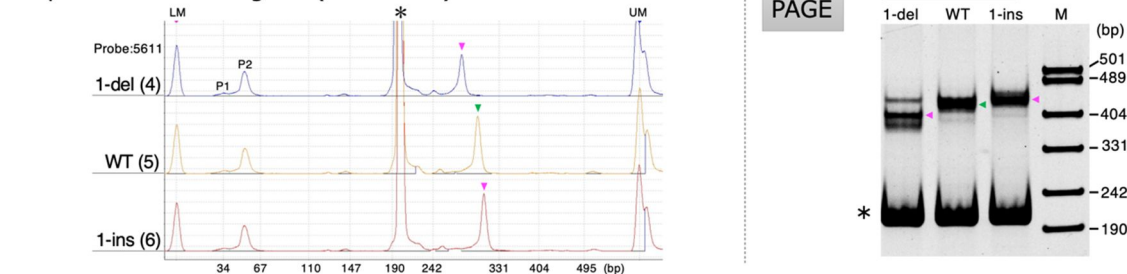


② 自殖植物では花粉が少ないアリルが正の選択を受けるという進化理論を支持する実例を示した

図 1 研究 1 のまとめ

(研究 1-2) シロイヌナズナで数多くのゲノム編集個体を作製する中で、効率的にゲノム編集個体を検出する手法を開発した。これまで、野生型配列と 1 塩基挿入・欠失配列を見分けるには Sanger sequencing, PCR-RFLP, Cel-1 assay, 蛍光プライマー法などがあったが、安価・迅速に 1 塩基挿入・欠失配列を見分けることが難しかった。そこで我々は HMA 法 (Heteroduplex Mobility Assay: ヘテロ二本鎖移動度分析) を改良し、5 塩基欠失の配列をプローブとして用いることで 1 塩基挿入・欠失配列を判別することができることを明らかにした。さらにプローブの条件を検討し、40mer の 1 本鎖 DNA でプローブが機能することを確認した(図 2)。これにより DNA オリゴとして、プライマーを注文するのと同様の手軽さでプローブを取得することができるようになった。これらの研究内容を論文としてまとめ(Kakui et al. 2021 Sci Rep)、さらに実験医学誌の招待を受けたためプロトコル文を寄稿した(角井ら 2022 実験医学)。国際特許も取得した(チューリヒ大学と横浜市立大学による国際特許出願、PCT/EP2020/072434)。

Ampicillin resistance gene (バクテリア)



Alcohol dehydrogenase 1B (ヒト)

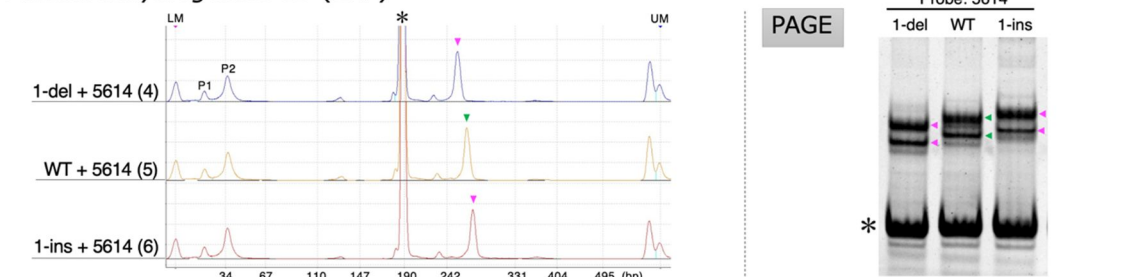
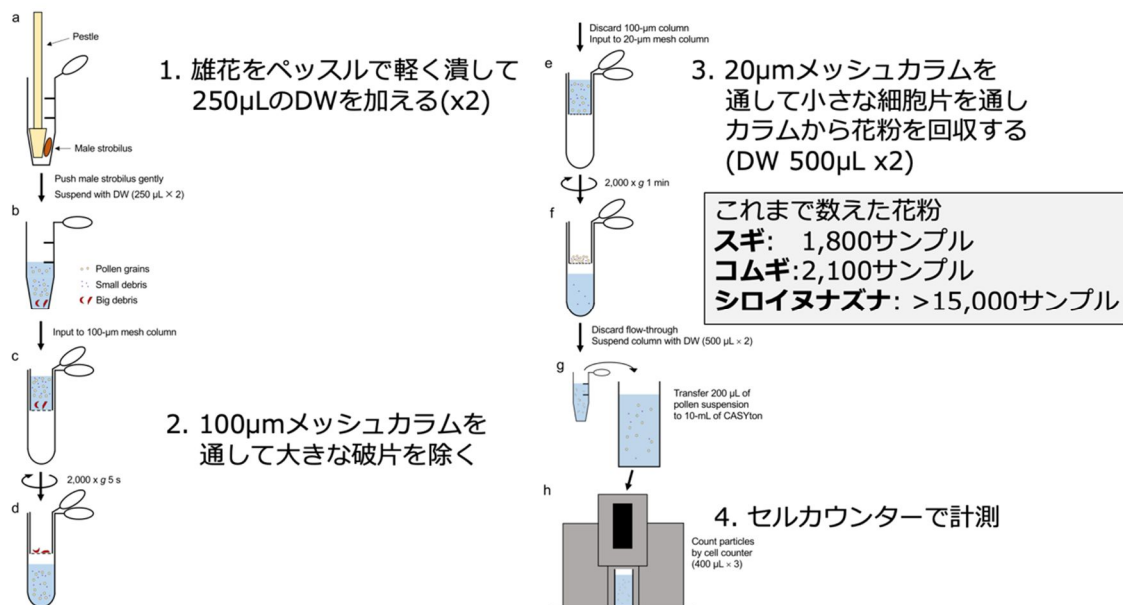


図 2 40mer の 5 塩基欠失をもつ短い一本鎖 DNA で 1 塩基挿入・欠失配列を識別できる

(研究 2) 研究 1 でシロイヌナズナで確立した花粉数計測法(Kakui et al. 2020 Methods in Mol Biol)について、これまでは熱によって開薬させていたものの、スギやコムギではこの方法は花粉が抽出できないことがわかった。そこで花粉を確実にかつ効率的に抽出する方法を条件検討したところ、ペッスルで軽く薬や雄花を押しつぶすことで効率的に花粉を抽出することができることがわかった。スギでさらに条件検討を行い、最適な花粉計測プロトコルを作成できた(図 3, Kakui et al. 2020 Plant Methods)。この手法を用いてスギ 26 系統 523 サンプルの雄花を計測し、系統間差を明らかにするとともに pSEM によってどのような条件で花粉数が影響を受けるのかを検討した。その結果、計測した系統内では系統間差が 3 倍以上あり、1 雄花あたり 10-30 万粒の花粉を生産すること、花粉数は系統・雄花重量・花粉サイズ・着花方角に影響を受けることがわかった。これまでは系統によって花粉数が変わることは報告があるものの、花粉サイズや着

花方角の影響はあまり考慮されてこなかったため、今後少花粉スギ系統を選抜する上でこれらの条件を含めて検討することが重要だと考えられた。

図3 花粉計測プロトコル



(研究3) 無花粉スギの MS4 遺伝子座の原因遺伝子の同定を目的に研究を行った。まず ms4 変異体からごくわずかに生産される花粉を観察したところ、花粉壁構造に異常が見られること、花粉小孢子期に明らかな異常が見られることがわかった。続いて ms4 ホモ (ms4/ms4) とヘテロ (Ms4/ms4) の後代 94 個体を用いて連鎖解析を行ったところ、10Gb をもつスギゲノムから MS4 遺伝子座を 7.65Mb まで絞り込むことができた。この領域内に含まれる遺伝子を探索したところ 67 個の遺伝子が含まれることがわかった。RNA-seq や発現解析によりそのうちの 1 つの遺伝子、TKPR1 が雄花で特異的に発現していることがわかった。TKPR1 はシロイヌナズナやイネで花粉の形成に必須であることがわかっており、これらの植物での TKPR1 の変異体は花粉壁に異常が生じること、花粉小孢子期に顕著な異常が見られることがわかっており、これらのことは、スギ ms4 変異体の原因は TKPR1 であることを支持する。スギ TKPR1 が MS4 の原因遺伝子であることを確かめる目的で、シロイヌナズナの TKPR1 の変異体にスギ TKPR1 配列を導入し、花粉の有無を確認することでスギ TKPR1 配列の機能証明を行った。その結果、スギ TKPR1 の野生型配列を入れた場合は花粉生産がされたのに対して、ms4 変異型の TKPR1 を入れた場合は花粉生産が回復しないことが明らかになった。さらに TKPR1 の 1 塩基を置換するだけで花粉生産の有無が制御されていることが明らかになった。これらの結果をまとめ、現在論文を投稿中である (preprint を bioRxiv にて閲覧可能)。この研究に関して日本育種学会第 141 回講演会の記者発表課題に選出され、朝日新聞にも掲載された (朝日新聞、3/23 夕刊)。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計9件（うち査読付論文 5件/うち国際共著 6件/うちオープンアクセス 7件）

1. 著者名 Kakui Hiroyuki, Tsurisaki Eriko, Sassa Hidenori, Moriguchi Yoshinari	4. 巻 16
2. 論文標題 An improved pollen number counting method using a cell counter and mesh columns	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Plant Methods	6. 最初と最後の頁 124
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s13007-020-00668-4	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 Kakui Hiroyuki, Tsurisaki Eriko, Shibata Rei, Moriguchi Yoshinari	4. 巻 10
2. 論文標題 Factors Affecting the Number of Pollen Grains per Male Strobilus in Japanese Cedar (<i>Cryptomeria japonica</i>)	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Plants	6. 最初と最後の頁 856 ~ 856
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.3390/plants10050856	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 角井宏行、土松隆志、山崎美紗子、清水健太郎	4. 巻 79
2. 論文標題 花粉数を制御する遺伝子の発見	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 バイオとインダストリー	6. 最初と最後の頁 21-33
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
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 角井宏行、土松隆志、山崎美紗子、清水健太郎	4. 巻 1
2. 論文標題 シロイヌナズナの花粉数を制御する遺伝子 -少ない花粉と生育メ リットを両立するカギ-	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Academist Journal	6. 最初と最後の頁 14530
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	査読の有無 無
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 該当する

1. 著者名 Takashi Tsuchimatsu, Hiroyuki Kakui, Misako Yamazaki, Cindy Marona, Hiroki Tsutsui, Afif Hedhly, Dazhe Meng, Yutaka Sato, Thomas Studler, Ueli Grossniklaus, Masahiro M. Kanaoka, Michael Lenhard, Magnus Nordborg and Kentaro K. Shimizu	4. 巻 11
2. 論文標題 Adaptive reduction of male gamete number in the selfing plant Arabidopsis thaliana	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Nature Communications	6. 最初と最後の頁 2885
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41467-020-16679-7	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 該当する

1. 著者名 Kakui Hiroyuki, Yamazaki Misako, Shimizu Kentaro K.	4. 巻 11
2. 論文標題 PRIMA: a rapid and cost-effective genotyping method to detect single-nucleotide differences using probe-induced heteroduplexes	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 1-10
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-021-99641-x	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 該当する

1. 著者名 Kakui Hiroyuki, Tsuchimatsu Takashi, Yamazaki Misako, Hatakeyama Masaomi, Shimizu Kentaro K.	4. 巻 12
2. 論文標題 Pollen Number and Ribosome Gene Expression Altered in a Genome-Editing Mutant of REDUCED POLLEN NUMBER1 Gene	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 Frontiers in Plant Science	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.3389/fpls.2021.768584	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 該当する

1. 著者名 角井宏行、山崎美紗子、清水健太郎	4. 巻 4
2. 論文標題 電気泳動でDNAの1塩基差を迅速・簡便に識別する遺伝子型判別法: PRIMA	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 実験医学	6. 最初と最後の頁 601~
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.18958/6991-00005-0000081-00	査読の有無 無
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 Kakui Hiroyuki, Ujino-Ihara Tokuko, Hasegawa Yoichi, Tsurisaki Eriko, Futamura Norihiro, Iwai Junji, Higuchi Yuumi, Fujino Takeshi, Suzuki Yutaka, Kasahara Masahiro, Yamaguchi Katsushi, Shigenobu Shuji, Otani Masahiro, Nakano Masaru, Ueno Saneyoshi, Moriguchi Yoshinari	4. 巻 1
2. 論文標題 Single-nucleotide substitution determines pollen production in Japanese cedar	5. 発行年 2022年
3. 雑誌名 bioRxiv(preprint)	6. 最初と最後の頁 -
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1101/2022.03.17.484665	査読の有無 無
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9件(うち招待講演 1件/うち国際学会 1件)

1. 発表者名 角井宏行, 釣崎恵里子, 柴田嶺, 佐々英徳, 森口喜成
2. 発表標題 効率的な花粉数計測法の開発とスギ雄花一粒あたりの花粉数に影響する要因
3. 学会等名 第132回日本森林学会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 角井宏行, 釣崎恵里子, 柴田嶺, 森口喜成
2. 発表標題 自作カラムとセルカウンターを用いた迅速で効率的な花粉数計測法の開発
3. 学会等名 日本育種学会 第138回講演会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 角井宏行
2. 発表標題 “花粉数”から読みとく、植物種・研究分野を超えた現象の理解
3. 学会等名 第一回超分野植物科学研究会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 角井宏行, 釣崎恵里子, 柴田嶺, 佐々英徳, 森口喜成
2. 発表標題 様々な植物に適用できる効率的な花粉数計測法の開発と スギ1雄花あたりの花粉数に与える要因について
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 角井宏行, 山崎美紗子, 清水健太郎
2. 発表標題 DNAの1塩基差を迅速・簡便に判別できるPRIMA (Probe-induced heteroduplex mobility assay) 法の開発
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 角井宏行, 山崎美紗子, 清水健太郎
2. 発表標題 電気泳動でDNAの1塩基差を迅速・簡便・安価に判別できるPRIMA法の開発
3. 学会等名 北陸植物学会 2021年度大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 Hiroyuki Kakui, Misako Yamazaki, Kentaro K Shimizu
2. 発表標題 PRIMA: a simple and rapid genotyping method to detect single-nucleotide differences by probe-induced heteroduplex mobility assay
3. 学会等名 第44回日本分子生物学会 (国際学会)
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 角井 宏行, 伊原 徳子, 長谷川 陽一, 釣崎 恵里子, 二村 典宏, 岩井 淳治, 樋口 有未, 藤野 健, 鈴木 穰, 笠原 雅弘, 山口 勝司, 重信 秀治, 大谷 真広, 中野 優, 上野 真義, 森口 喜成
2. 発表標題 無花粉スギMS4の原因はCjTKPR1の1塩基置換変異である
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 角井 宏行, 伊原 徳子, 長谷川 陽一, 釣崎 恵里子, 二村 典宏, 岩井 淳治, 樋口 有未, 藤野 健, 鈴木 穰, 笠原 雅弘, 山口 勝司, 重信 秀治, 大谷 真広, 中野 優, 上野 真義, 森口 喜成
2. 発表標題 機能証明実験による無花粉スギMS4原因遺伝子の同定
3. 学会等名 第133回日本森林学会大会 (招待講演)
4. 発表年 2022年

〔図書〕 計1件

1. 著者名 Hiroyuki Kakui, Misako Yamazaki, Naoto-Benjamin Hamaya, and Kentaro K. Shimizu	4. 発行年 2020年
2. 出版社 Humana Press	5. 総ページ数 11(プロトコル本のうちの1章を担当した(p1-11))
3. 書名 Pollen Grain Counting Using a Cell Counter: in Pollen and Pollen Tube Biology: Methods and Protocols	

〔出願〕 計1件

産業財産権の名称 PRIMAによるDNA1塩基差の検出法の開発	発明者 角井宏行, 清水健太郎, 山崎美紗子	権利者 チューリヒ大学, 横浜市立大学
産業財産権の種類、番号 特許、EA Nr. 19190891.2	出願年 2019年	国内・外国の別 外国

〔取得〕 計0件

〔その他〕

<p>Researchmap https://researchmap.jp/kakuihiroyuki</p> <p><メディア報道> 無花粉スギ原因遺伝子の特定に成功～スギゲノム100億塩基のわずか1塩基の違いが無花粉スギの原因であることを発見/無花粉スギの効率的な選抜・育種に光明～ https://jsbreeding.jp/2022/04/07/post-511/</p> <p>花粉のないスギ 遺伝子を特定 https://www.asahi.com/articles/DA3S15242849.html?iref=pc_ss_date_article</p> <p>DNAの1塩基の違いをハイスループットに判別できる新技術「PRIMA」を開発 - ゲノム編集個体を迅速・簡便・安価に選抜 - https://www.yokohama-cu.ac.jp/news/2021/20211022kakui.html</p> <p>新潟大学などの研究グループが花粉数を制御する遺伝子を発見 https://www.niikei.jp/38278/</p> <p>花粉数を減少させる遺伝子を発見 https://www.yokohama-cu.ac.jp/news/2020/202006shimizu_NC.html</p> <p>Newly Identified Gene Reduces Pollen Number https://www.media.uzh.ch/en/Press-Releases/2020/Pollen-Number.html</p>
--

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
---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------