

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成25年 6月 7日現在

機関番号：82105

研究種目：基盤研究（C）

研究期間：2010～2012

課題番号：22580168

研究課題名（和文） スギの雌性不稔化の基盤：雌性生殖器官発現遺伝子のプロファイリングと遺伝子機能解析

研究課題名（英文） Towards female sterility of *Cryptomeria japonica*: profile of expression genes at female reproductive organ and analysis of their gene function

研究代表者

谷口 亨 (TANIGUCHI TORU)

独立行政法人森林総合研究所・森林バイオ研究センター・室長

研究者番号：00360470

研究成果の概要（和文）：遺伝子組換え技術は、短期間で大きな改良効果が期待できるために樹木の育種には効果的な手法と考えられる。しかし、組換え樹木からの種子や花粉による遺伝子拡散が懸念されている。本研究では種子形成を抑制する雌性不稔化の基盤情報として、スギの雌性生殖器官で発現する遺伝子情報を蓄積することを目的とした。まず、スギの胚珠を単離し、RNAを抽出する技術を開発した。次に胚珠で特異的に高発現する遺伝子群のライブラリーを作製し、次世代シーケンス解析を行った。これらの結果、胚珠で特異的に高発現する遺伝子を特定することに成功した。本研究成果は、遺伝子組換えにより作製した雄性不稔化スギからの種子による遺伝子拡散防止技術の開発に活用できる。

研究成果の概要（英文）：Genetic engineering is a powerful tool for tree breeding with achievement of large genetic gain in short time. However, dispersal of transgenes by pollen or seeds should be prevented. In this study, expression genes in *Cryptomeria japonica* female reproductive organ was profiled through steps as follows: micro-dissection of micro tissues, ovule, and RNA extraction from the tissue; next generation sequence of ovule-specific suppression subtractive hybridization library; identifications of the ovule specific genes. Our results will be used for female sterilization of no-pollen *C. japonica* that have been produced by genetic engineering.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2011年度	1,100,000	330,000	1,430,000
2012年度	1,100,000	330,000	1,430,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	1,020,000	4,420,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：森林学・森林科学

キーワード：育種・遺伝子組換え・雌性不稔化・遺伝子解析

1. 研究開始当初の背景

スギ花粉症対策として雄性不稔化遺伝子組換えスギの作製を進めている。これを実用

化するためには、種子による組換えスギからの遺伝子拡散を防止するための雌性不稔化を行なうことが必要である。

2. 研究の目的

遺伝子組換えによりスギを雌性不稔化する技術の開発を最終目的とする。そのためには、胚珠等の雌性生殖器官の分化に必須の遺伝子をノックアウトする、雌性生殖器官で細胞致死遺伝子を特異的に発現させる等、雌性生殖器官の分化を阻害する方法が考えられる。これらの手法をとるためには、スギの雌性生殖器官で発現する遺伝子の収集とその機能解析が必要となる。

3. 研究の方法

(1) スギの雌性生殖器官からの RNA 抽出

ジベレリン水溶液の噴霧処理を行い、雌花の着花誘導を行った後、9月上旬に形成された分化途中のスギの雌花を採取し、植物試料として用いた。

顕微鏡下で組織切片にレーザーを照射して、微小組織を切り出す方法であるレーザーマイクロダイセクション (LMD、文献1) を検討した (図1)。切片の作製は以下のように行った。まず、採取した試料を、アセトンまたは Farmer's 固定液 (エタノール:酢酸=3:1) を用い、氷上で2時間脱気後、4℃で一晩攪拌しながら固定した。さらに、4℃で一晩、攪拌しながら10%ショ糖溶液で置換した。置換した試料は、川本法 (文献2) により凍結切片を作製した。すなわち、液体窒素で冷却したヘキサン中で凍結包埋剤 (SCEM, Leica) に包埋・凍結させ、LMD用 Cryofilm (Leica) を試料表面に接着後、凍結ミクロトーム用いて10 μm厚の雌花組織切片を作製した。切片を接着させたCryofilmは、100%エタノールに10秒間浸漬し脱水後、風乾してからフویل付きフレーム (フویلを除去しフレームのみを使用, Leica) に貼付けた。LMDによる胚珠組織の単離は、LMD6000 (Leica) およびLMD7000 (Leica) を使用し、切片を接着した面が上を向くようにフレームを顕微鏡ステージにセット後、レーザーにより切断した組織はチューブキャップへ捕集した。単離した組織からのRNA抽出はPicoPure RNA Isolation Kit (Arcturus) を用い、Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies) により定量と品質を測定した。

また、組織をドライアイスで凍結させ、凍結状態で目的組織を取り出す方法であるクライオマイクロダイセクション (CMD、文献3) も検討した。採取した雌花を挟み込むようにドライアイス置き、実体顕微鏡下で雌花の苞鱗をピンセット等で除去し、胚珠を露出させた (図2)。胚珠を単離後に、RNAを抽出し、Bioanalyzerにより定量と品質を測定した。

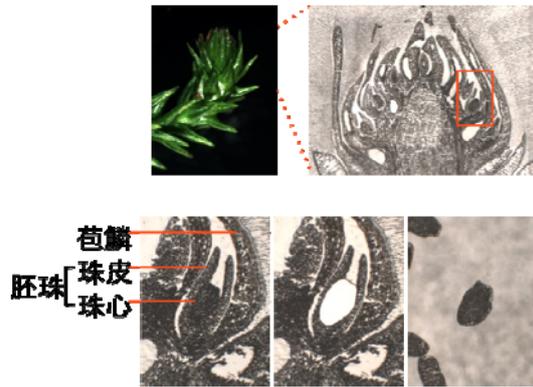


図1 レーザーマイクロダイセクション (使用した装置はLMD7000) によるスギの珠心の切り取り

上左, スギの雌花: 上右, 雌花の縦断面切片: 下左, 上右の囲み部分の拡大図: 下中央, 胚珠のうちの珠心部分のみを切取った後の様子: 下右, 切取られた珠心



図2 クライオマイクロダイセクションによる胚珠の単離

左, サンプルとドライアイスの配置: 右, 苞鱗を除去し、露出させた胚珠

(2) スギ雌性生殖器官発現遺伝子のシーケンス解析

10月下旬に採取した雌花より、クライオマイクロダイセクション法で胚珠を分離し、それらより抽出したRNAからcDNAを合成した。次にサブトラクション (SSH) ライブラリーを作成した。SSHライブラリーとは、テスターに含まれるcDNAよりドライバーに含まれるcDNAを差し引くことにより、テスターに特異的に含まれるcDNAを収集する方法である。テスターには胚珠のcDNAを、ドライバーには栄養生殖組織 (成木シュート先端、無菌培養物のシュートと根、培養細胞 (不定胚形成細胞)) のcDNAを用いた。PCR-Select cDNA Synthesis Kit (Clontech) によりサブトラクション反応させ、増殖したcDNA産物を次世代シーケンス解析 (Roche GS-FLX Titanium, 1/16 regions) に、プラスミドベクターのサブクローンをサンガー法によるシーケンス解析に供した。

4. 研究成果

(1) スギの雌性生殖器官からの RNA 抽出

本研究では、スギの雌花のごく一部の組織である胚珠や珠心で発現する遺伝子の解析が目的であり、これら微小な組織から RNA を抽出する手法の確立を第一の目的とした。

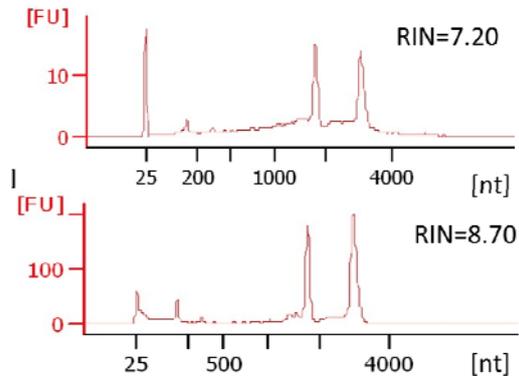


図3 レーザーマイクロダイセクションで単離した珠心から抽出した RNA (上) とクライオマイクロダイセクションにより単離した胚珠から抽出した RNA (下) のバイオアナライザーによる品質の比較 (RIN 値の比較) 両方法とも十分な品質の RNA を単離することができた。

LMD では、凍結切片作成前に組織の固定操作が必要とされる。そこで、固定液を検討した結果、アセトン固定組織から LMD による切り出しを行う前に抽出した RNA は RNA Integrity Number (RIN) が 4.4 であり、RNA の品質は悪かった。これに対し、Farmer's 固定組織では 8.3 と高く、実用的品質であることが示された。このことより、以後の操作では Farmer's 固定液を用いることとした。固定済みの雌花より凍結切片を作製し、LMD6000 を使い、各種パラメーターを検討した結果、珠心を切り出すことに成功した。しかし、抽出した RNA の RIN は 2.9 と低く、実用的品質には至らなかった。これは、川本法で用いた Cryofilm は一般的な LMD で用いるフィルムよりも切断に強いレーザーエネルギーを必要とし、さらに、今回標的とした切断領域も小さいため、切断時のレーザーによる RNA への障害が大きいと推測された。そこで、レーザーの強度が高く、鋭利に高速切断が可能な LMD7000 を用いて実施した結果、RIN は 7.2 となり、LMD により実用的品質の RNA を得ることができることを明らかにした (図 3)。また、CMD では単離した胚珠の RNA の RIN は 8.7 であり (図 3)、この方法により単離した胚珠からも実用品質の RNA を抽出できることが明らかになった。

LMD と CMD を比較すると、LMD の方がより小さい領域を単離することができることがメリットであるが、操作が煩雑で十分な量の

RNA を抽出するためには多くの切片作製と組織片の切り出しが必要であり、また高価な装置が必要となる。一方、CMD は操作が単純で特別な装置も不要であり、抽出される RNA の品質も高い。本研究で注目する胚珠組織は、苞鱗に包まれる突起状の組織であるために凍結下で簡単に単離することができ、CMD 法の方が有効であると考えられた。そこで、本研究では CMD 法を採用することとした。

(2) スギ雌性生殖器官発現遺伝子のシーケンス解析

SSH 法による cDNA 産物の次世代シーケンス解析の実績はなかったために、シーケンス解析を 2 種類の方法で行い、結果を比較した。SSH ライブラリーの次世代シーケンス解析を約 65,000 リードについて、また、サンガー法による解析では約 1,000 クローンについて行った。各解析結果の概要を表 1 と図 4 に示す。まず、次世代シーケンス解析については結果概要 (表 1) とリード長の分布図 (図 4) が示すように、Quality の平均値が 34 であり、またリード長の平均値が 394bp、リード長のピークが約 500bp と解析に用いた装置である GS-FLX のスペックにほぼ一致し、正常に解析されたことが示唆された。また、SSH ライブラリーは作製の過程で制限酵素による分断を行っているため、複数の cDNA がコンカテマーを形成しているリードが幾つか存在していた。そこで、ソフトウェア上でこれらのリードを再度分割し、別々のリードとして使用した。その結果、サンガー法による解析では 1,137 リード、次世代シーケンス解析ではおよそ 76,000 リードが得られた。アセンブルの結果、得られた unigene を構成していたリード数の分布は、サンガー法と次世代シーケンス解析ともに多くが singleton であり、リード数が 10 リード以下で構成される unigene はいずれも 9 割程度以上と、次世代解析でもサンガー法と同等の高いバリエーションと均一化された形で解析できていることが示された。以上のことから SSH ライブラリーの次世代シーケンサーによるアンプリコン解析が正常に行われていると予想された。そこで、サンガー法と次世代解析で得られたリードを混合し、再度アセンブルし、最終的に約 27,000 の unigene を得た。

表 1 胚珠の SSH ライブラリーに含まれる cDNA のシーケンス解析の概要

	Sanger	GS-FLX	(Spec of GS-FLX)
Sequencing reads ¹⁾	944	69,510	(20-40x10 ³)
Total bases	460,127 bp	27,403,136 bp	(10-20Mbp)
Average read length	487 bp	394 bp	(400bp)
Average read quality		34	(>30 [Err 0.1%])
Reads used in assembly (after trimming and dividing)	1,137	76,142	
Total bases used in assembly	436,244 bp	24,744,419 bp	
Average read length (after trimming and dividing)	384 bp	325 bp	

1) GS RunProcessorのQuality Filterを通過したリード数

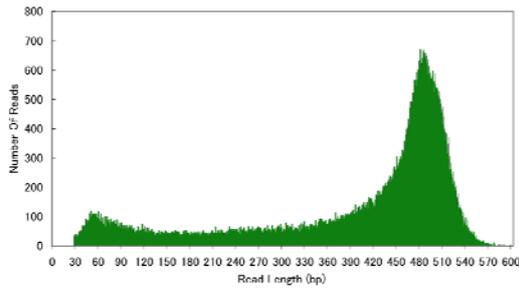


図4 胚珠のSSHライブラリーに含まれるcDNAの次世代シーケンス(GS-FLX)解析におけるリード長分布

胚珠における発現量が高いと推定される遺伝子の機能を推定するためにBLASTXによる同源性検索とBlast2GOソフトウェアによるアノテーション解析を行った。その結果、雌花形成に関与すると考えられるclass BなどのMADS-box様の遺伝子が複数存在した。また、耐凍性、耐乾燥性に関与する遺伝子も多く存在し、10月下旬に採取した雌花の胚珠では、MADS-boxのような形態形成関与遺伝子の他に、越冬に必要と考えられる遺伝子が発現していることが示唆された。

また、Real-time RT-PCRにより、発現の組織特異性を解析したところ、解析した多くの遺伝子は、胚珠での発現が高く、シュート、根、培養細胞での発現量が低いことが確認された。このことより、組織特異的に発現する遺伝子がSSH法により効率的に得られていることが明らかになるとともに、スギの雌性生殖器官で特異的に高発現する遺伝子を特定することができた。

現在、雌性生殖器官の分化段階別の発現遺伝子の詳細な情報の集積を進めている。即ち、雌性生殖器官の分化段階別(胚珠原基分化、胚珠形成時期、雌花開花、雌性配偶子形成)に雌花を採取した。クライオマイクロダイセクションにより雌花から単離した胚珠等からRNAを抽出し、分化段階別のcDNAライブラリーを作製した。これらのライブラリーについては、次世代シーケンス解析を行い、*in silico*での解析により雌性生殖器官で高発現する遺伝子情報を収集することとしている。

以上のようにスギの雌性生殖器官で特異的に高発現する遺伝子を特定することができた。また、現在進めている解析の結果と合わせると、雌性生殖器官の分化段階別の発現遺伝子やそれらの遺伝子が発現する期間(長さ)などに関する情報も蓄積される。それらを網羅的に解析し、スギの雌性不稔化に最適な遺伝子を特定する。研究代表者らのグループは遺伝子組換えによるスギの雄性不稔化技術を既に開発している(文献4)。既開発の雄性不稔化技術に本研究成果を利用する

雌性不稔化技術を組み合わせることにより、両性不稔のスギ、即ち遺伝子拡散を防止した、花粉を飛散しないスギを作製する技術が開発される。

引用文献

1. Nakazono, M. et al. (2003) Laser-capture microdissection, a tool for the global analysis of gene expression in specific plant cell types: identification of genes expressed differentially in epidermal cells or vascular tissues of maize. *The Plant Cell Online*, 15(3), 583-596.
2. Kawamoto, T. (2003) Use of a new adhesive film for the preparation of multi-purpose fresh-frozen sections from hard tissues, whole-animals, insects and plants. *Archives of histology and cytology*, 66(2), 123-143.
3. Horowitz, S. B., & Miller, D. S. (1984) Solvent properties of ground substance studied by cryo-microdissection and intracellular reference-phase techniques. *The Journal of cell biology*, 99(1), 172s-179s.
4. 小長谷賢一他(2013) 遺伝子組換え技術による雄性不稔スキの作出. 第124回日本森林学会大会(岩手)講演要旨集, F25

5. 主な発表論文等

[学会発表](計1件)

- ① 小長谷賢一、栗田学、谷口亨、石井克明. Cryomicrodissection法によるスギ胚珠組織の単離と発現遺伝子プロファイリングへの試み. 第29回日本植物細胞分子生物学会大会・シンポジウム(福岡)講演要旨集.p103 2011年9月

[その他]

- ① 谷口亨、小長谷賢一、栗田学. スギの雌花で発現する遺伝子の解析のためのレーザーマイクロダイセクション法の検討. NIMS国際ナノテクノロジーネットワーク拠点(ナノネット)利用2010年度成果報告書

6. 研究組織

(1) 研究代表者

谷口 亨 (TANIGUCHI TORU)
森林総合研究所・森林バイオ研究センター・室長
研究者番号: 00360470

(2) 研究分担者

小長谷 賢一 (KONAGAY KEN-ICHI)

森林総合研究所・森林バイオ研究センター・主任研究員
研究者番号：30582762
栗田 学 (KURITA MANABU)
森林総合研究所・林木育種センター・室長
研究者番号：40370829