

機関番号：63801

研究種目：特定領域研究

研究期間：2006～2010

課題番号：18075012

研究課題名（和文） 植物の生殖過程を通じた遺伝子発現プロファイリング

研究課題名（英文） Gene expression Profiling in plant reproductive process

研究代表者

倉田 のり (KURATA NORI)

国立遺伝学研究所・系統生物研究センター・教授

研究者番号：90178088

研究成果の概要（和文）：生殖過程全体におけるイネ全遺伝子の発現解析を行い、発達ステージおよび組織特異的な発現パターンを示す遺伝子を多数見出した。これらの遺伝子は、イネの生殖細胞（花粉・卵）の発達過程や受粉・受精過程、および胚発生初期において重要な機能を担っているものと考えられる。また微小組織中の特定の細胞群を取り出し、その中での遺伝子発現を定量する手法を確立した。この手法を用いてイネの発達中の花粉および卵における遺伝子発現パターンを明らかにした。

研究成果の概要（英文）：We revealed the gene expression profiles throughout whole reproductive stages/tissues of rice, and found many genes which were expressed in the tissues as a developmental stage-dependent manner. The genes which showed tissue-/stage-specific expression were supposed to have specialized function in plant reproduction steps, such as development of gametophytes (pollen grains and egg cells), pollination, fertilization, and early developmental stages of embryos. We also established methods of the genome-wide gene expression analysis for small amount of tissues. Based on the established methods, the gene expression profiles in developing microspores and egg cells were revealed.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	20,400,000	0	20,400,000
2007年度	20,600,000	0	20,600,000
2008年度	29,700,000	0	29,700,000
2009年度	19,700,000	0	19,700,000
2010年度	17,900,000	0	17,900,000
総計	108,300,000	0	108,300,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学・遺伝・ゲノム動態

キーワード：植物生殖、発現解析、マイクロアレイ

## 1. 研究開始当初の背景

生物種が種として安定的に存続する条件として、他の近縁種との交雑を不可能にする機構が必須である。これをゲノムという観点から見ると、ある種のゲノムが安定的に維持されるためには、他種のゲノムと混ざり合わない機構が必要であると言える。このように、

ある生物種に固有なゲノムが他のゲノムと混ざり合わないよう維持する要因を、ここでは「ゲノム障壁」と呼ぶ。「ゲノム障壁」は種子（子孫）を作る生殖過程の様々な場面で機能する遺伝子に原因があると考えられる。生殖過程で起きる不具合（主として種子形成不全）を分子レベルで理解し、生殖過程

に関与する因子を見つけ出すことは、「ゲノム障壁」因子の解明に直結することが期待された。

本研究が取り扱う生殖過程は植物科学の中で非常に重要なテーマであり、平成16年に米国植物生理学会発行のPlant Cell誌において植物生殖に関する特集号が発刊されたことから明らかなように、国際的にも注目される分野であった。日本における植物生殖研究は、自家不和合性研究に代表される受粉反応、胚珠への花粉管誘導過程、胚乳形成とゲノムインプリンティングなどの研究において世界の最先端を走り、この分野の研究発展に大きく貢献してきた。しかしながら、体系だったゲノムワイドな生殖研究については、ほとんど手付かずの状態であった。主要穀類であるイネの全塩基配列は、モデル植物であるシロイヌナズナに続いて、平成16年末に我が国が中心となった国際コンソーシアムによって決定された。この機会を捉えて、発生・発育段階の区別が容易なイネを材料に、生殖の全過程を通して機能する遺伝子の網羅的解析を行うことを決意した。本研究により、植物の生殖機構の分子生物学的かつゲノムワイドな理解が進むと同時に、ゲノム障壁打破による新たな育種技術の確立につながることが期待された。

## 2. 研究の目的

(1)「植物ゲノム障壁」の支援班における研究サポートは、主に生殖の全過程についてマイクロアレイを用いて遺伝子発現のプロファイルを取得し、遺伝子発現の全体像を基盤情報として整備し、速やかに個々の班員の研究に役立てることであった。イネはゲノム配列情報が利用でき、かつ生殖の各ステップを時間軸で細かに区切ることが可能であったため、本研究ではイネを材料として用いた。(2)植物の生殖器官(葯、雄蕊)は、複数種の細胞から構成されており、生殖器官全体を用いた遺伝子発現解析では各細胞種における遺伝子発現プロファイルを知ることができない。この問題を打破すべく、微小組織から特定ステージの細胞群をマイクロダイセクションにより切り取ったサンプルを用いた遺伝子発現解析手法の確立を目指した。これにより、より詳細な遺伝子発現プロファイルの取得および解析を可能とすることを目的とした。特に雌性配偶体は周囲を孢子体組織に囲まれた微小組織であり、これまでは解析が困難であった。そこで本研究で確立される解析手法を用いて遺伝子発現解析を行うことも目的とした。(3)班員の個別の研究計画を、マイクロアレイを用いた遺伝子発現解析によってサポートすることを目指した。遺伝子発現情報の速やかな利用を促すことによって、班員の効率

的かつ速やかな研究展開を推進することを目的とした。

## 3. 研究の方法

(1)イネの連続的な生殖ステージのサンプルを用いて約5万のイネ全遺伝子に対するマイクロアレイによる発現解析を行った。解析したステージは、始原生殖細胞の初期分化から花粉成熟期までの葯8ステージ、授粉から受精までの柱頭および子房7ステージ、受精から4日目までの初期胚5ステージおよび胚乳5ステージで、計25ステージに渡った。対照区として栄養組織8ステージの発現解析も行った。

(2)減数分裂期から花粉成熟期までのイネ小孢子5ステージおよびタペート組織3ステージ、計8ステージについて、ステージ毎にマイクロダイセクションにより切り取った微量サンプルを用いて遺伝子発現解析を行った。また減数分裂前の卵母細胞期から成熟期までの胚珠6ステージについて、ステージ毎にマイクロダイセクションにより切り取り、発現解析を行った。マイクロダイセクションは分担者の堤が担当した。成熟期の卵および助細胞については、マイクロダイセクションによらない単離法が他の研究者によって開発されたため、その手法を導入した解析も行った。

(3)班員からのリクエストを受けてマイクロアレイを用いた遺伝子発現解析を行い、班員による候補遺伝子の絞り込みやシグナル経路上の関連遺伝子の抽出に必要な情報を提供した。班員が解析結果を論文発表するに際しては、発現解析データは原則として公共データベースへの登録・公開が義務付けられており、必要に応じて手続きをサポートした。

## 4. 研究成果

(1)イネ生殖過程全体を網羅する遺伝子発現解析を行い、解析データを公共データベースに登録・公開すると共に、論文を発表した。平成22年3月に国外の研究グループからイネ生活環全体をカバーする遺伝子発現プロファイルの報告が為されたが、生殖ステージについての詳細な報告は我々の報告が初めてである。発現データからは、生殖組織の中では葯、特に花粉成熟期の葯において特異的に発現する遺伝子が多いことが明らかとなった。また花粉母細胞減数分裂期の葯において特異的な発現が認められる遺伝子群や授粉・受精過程に関与する可能性のある種々の遺伝子群が見出された。一例として、花粉成熟期において発現が誘導される遺伝子群の発現プロファイルを図1に示した。この遺伝子群は、花粉母細胞減数分裂期(図中An1)~小孢子一核期(図中P1)の葯では発現レベルが低い、二細胞期(図中P2)において同

調的に発現誘導され、三細胞期（成熟花粉を含む葯、図中 P3）においては高い発現レベルを示す。この中には、細胞壁の構成成分であるペクチンやグルカン、セルロースの合成・代謝に関与すると推定される遺伝子が含まれており、来たるべき授粉時の花粉管伸長に必要な酵素の遺伝子が花粉成熟期において既に発現されていることが明らかとなった。このように、我々の研究成果はイネ生殖ステージの研究において重要な手掛かりを数多く提供できた。

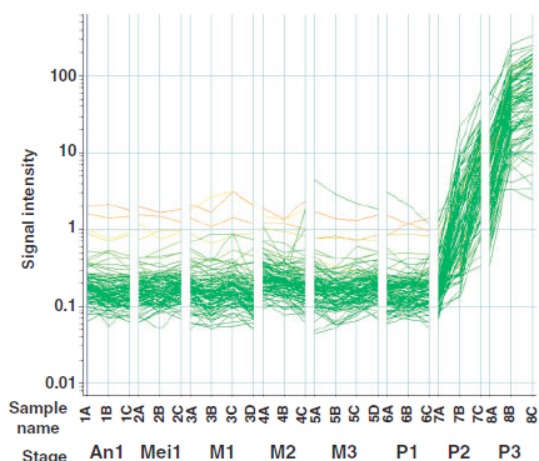


図1 花粉成熟期において発現が誘導される遺伝子群。

葯 8 ステージでの発現プロファイルを示す。横軸は、左から右へと順を追って発生が進行する。

(2)減数分裂期から花粉成熟期までのイネ小孢子およびタペト組織をステージ毎にマイクロダイセクションにより切り取った微量サンプルを用いた遺伝子発現解析に成功した。図2にマイクロダイセクションの概要を示した。本研究で使用した Veritas 社の機器は、赤外線レーザーと紫外線レーザーを組み合わせて使用することにより、効率よく微小組織を切り出すことができる。この手法によって調製できた1サンプル当たりのRNA量は平均 12.6ng、最少では 2.2ngであったが、以降の反応系を工夫することにより、再現性のある遺伝子発現データを得ることができるようになった。これにより、微量サンプルを用いた発現解析の実験系を構築できたと同時に、小孢子およびタペト組織それぞれの詳細な発現データを得ることができた。データ解析結果からはタペト組織特異的に発現する遺伝子は期待したよりもはるかに少ないことが明らかとなった他、脂質代謝に関与する遺伝子群や植物ホルモンの合成および受容に関わる遺伝子群の、小孢子およびタペト組織における詳細な発現プロファイルを得ることができた。

雌性配偶体についても成熟期の卵および助細胞の発現データについて論文を発表すると共にデータを一般公開し、現在までに中央細胞および反足細胞の発現データも取得した。本研究で見出された卵および助細胞特異的遺伝子の例を図3に示した。また子房発達過程の遺伝子発現解析においては、花粉発達過程のものと比較することにより雄性・雌性配偶子間の発現プロファイルの異同を明らかにしつつある。

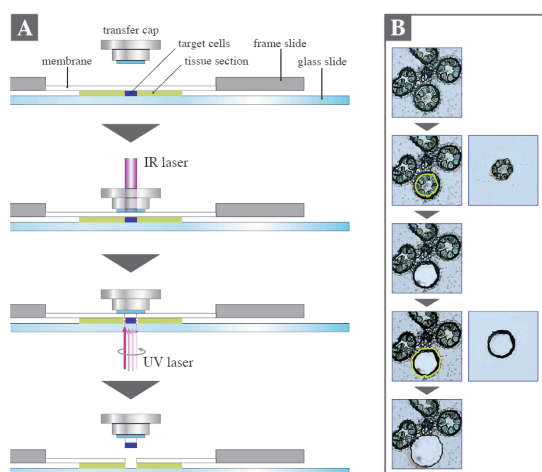


図2 マイクロダイセクションの概略図。

A に装置の概念図を示す。最初に赤外線レーザーを用いて標的細胞群を transfer cap に吸着した後、紫外線レーザーを用いて周囲の組織から切り離す。B は四分子期葯から小孢子およびタペト組織を単離した時の顕微鏡写真である。最初に小孢子を切り取り、続いて周囲にあるタペト組織を切り取っている。

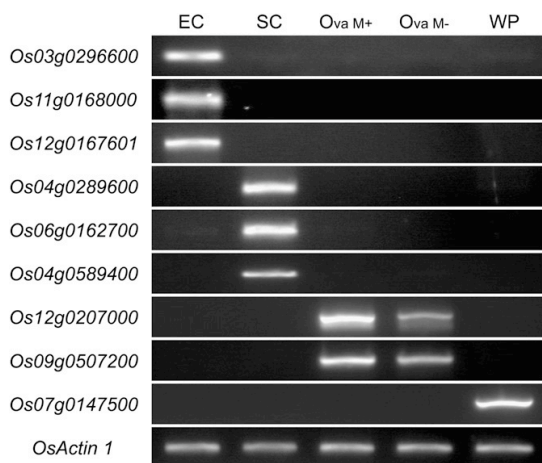


図3 本研究によって見出された卵および助細胞特異的遺伝子の例。

マイクロアレイを用いて同定された組織特異的遺伝子群について、RT-PCR 法によって発現を確認した。一番上の3遺伝子は卵特異的、続く3遺伝子は助細胞特異的、その下2

遺伝子は胚珠特異的な発現を示す。EC：卵、SC：助細胞、Ova M+：胚珠（マンニトール処理有）、Ova M-：胚珠（マンニトール処理無）、WP：植物体全体。

(3) 班員からのリクエストを受け、各年度において40～100サンプルの発現解析を、マイクロアレイを用いて行った。いずれも再現性のある良好な結果が得られた。これらに関しては複数の共同実験者が論文発表を準備中である。

(4) 本研究で得られた遺伝子発現データに基づいて見出された種々の特異的遺伝子についての具体的な機能解析は今後の課題である。また遺伝子発現情報に基づいて生物学的な意味を抽出する方法は、特にイネにおいては有効な手法を確立するには至っていない。問題解決のためには少なくとも、もう一つの代表的モデル植物であるシロイヌナズナと同程度の正確さでイネ遺伝子のアノテーションを行うことが必須である。また本研究で得られた遺伝子発現データと、既知のタンパク間相互作用の知見を組み合わせることにより、遺伝子発現制御ネットワークの解明につながることを期待される。

#### 5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計127件)

(1) Ito Y, Kurata N(8番目), 他6名(2011) Fatty acid elongase is required for shoot development in rice. *Plant J.* 66:680-688, 査読有

(2) Hamada K, Watanabe M(17番目), Matsuoka M(18番目), Kurata N(19番目), 他16名(2011) OryzaExpress: an integrated database of gene expression networks and omics annotations in rice. *Plant Cell Physiol.* 52:220-229, 査読有

(3) Ishikawa R, Kurata N(5番目), Kinoshita T(6番目), 他3名(2011) Rice interspecies hybrids show precocious or delayed developmental transitions in the endosperm without change to the rate of syncytial nuclear division. *Plant J.* 65:798-806, 査読有

(4) Ohnishi T, Kurata N(9番目), Tsutsumi N(10番目), 他7名(2011) Distinct gene expression profiles in egg and synergid cells of rice as revealed by cell type-specific microarrays. *Plant Physiol.*

155:881-891, 査読有

(5) Fujita M, Tsutsumi N(17番目), Kurata N(18番目), 他15名(2010) Rice expression atlas in reproductive development. *Plant Cell Physiol.* 51:2060-2081, 査読有

(6) Fujii S, Kurata N(7番目), Toriyama K(8番目), 他5名(2010) Cytoplasmic-nuclear genomic barriers in rice pollen development revealed by comparison of global gene expression profiles among five independent cytoplasmic male sterile lines. *Plant Cell Physiol.* 51:610-620, 査読有

(7) Hobo T, Tsutsumi N(18番目), Kurata N(20番目), Watanabe M(21番目), Matsuoka M(22番目), 他17名(2008) Various spatiotemporal expression profiles of anther-expressed genes in rice. *Plant Cell Physiol.* 49:1417-1428, 査読有

(8) Suwabe K, Tsutsumi N(15番目), Kurata N(16番目), Watanabe M(18番目), 他14名(2008) Separated transcriptomes of male gametophyte and tapetum in rice: validity of a laser microdissection (LM) microarray. *Plant Cell Physiol.* 49:1407-1416, 査読有

〔学会発表〕(計296件)

(1) Hamada K, Gene expression network analysis from large-scale microarray data in rice. BMB2010 (第33回日本分子生物学会年会・第83回日本生化学会大会 合同大会)、2010年12月10日、神戸ポートアイランド

(2) 濱田和輝, OryzaExpress: イネの遺伝子発現ネットワーク解析とデータベース構築、日本育種学会第118回講演会、2010年9月24日、秋田県立大学

(3) 高橋秀樹, イネ雌性配偶体構成細胞における遺伝子発現プロファイリング、イネ遺伝学・分子生物学ワークショップ2010、2010年7月3日、つくば国際会議場

(4) 高橋秀樹, イネ雌性配偶体構成細胞における遺伝子発現プロファイリング、第51回日本植物生理学会年会、2010年3月20日、熊本大学

(5) Xintian Lao, Analysis of molecular mechanism of self-incompatibility in the Brassicaceae, 第51回日本植物生理学会年会、2010年3月18-19日、熊本大学

(6) 小川宣仁、アブラナ科植物の受粉時におけるアクアポリンの役割、第 51 回日本植物生理学会年会、2010 年 3 月 18-19 日、熊本大学

(7) 濱田和輝、イネの遺伝子発現ネットワーク構築、第 51 回日本植物生理学会年会、2010 年 3 月 18-19 日、熊本大学

(8) Fujii S, Cytoplasmic-nuclear genomic barriers in pollen development revealed by comparison of global gene expression profiles among five independent cytoplasmic male sterile lines of rice. International Symposium of Cell-Cell Communication in Plant Reproduction: from pollination to fertilization, 2010 年 3 月 11 日、奈良県新公会堂

(9) 藤田雅丈、イネ全生殖過程における遺伝子発現解析を用いた多様な因子の捕捉、第 32 回日本分子生物学会年会、2009 年 12 月 9 日、パシフィコ横浜

(10) 濱田和輝、イネの大規模な遺伝子発現データに基づく発現制御ネットワーク構築、第 32 回日本分子生物学会年会、2009 年 12 月 9 日、パシフィコ横浜

(11) 藤田雅丈、イネ全生殖過程における遺伝子発現解析を用いた多様な因子の捕捉、日本育種学会第 115 回講演会、2009 年 3 月 27 日-28 日、つくば国際会議場

(12) 沖山友哉、Hwc1, Hwc2 によって生じるイネ雑種弱勢における細胞死、日本育種学会第 115 回講演会、2009 年 3 月 27 日-28 日、つくば国際会議場

(13) 保浦徳昇、イネの雄性配偶子とタペータム細胞でのトランスクリプトーム解析、第 50 回日本植物生理学会年会、2009 年 3 月 21 日-24 日、名古屋大学

(14) 伊藤幸博、イネの *PIN* 遺伝子の同定と発現解析、日本育種学会第 114 回講演会、2008 年 10 月 11 日-12 日、滋賀県立大学

(15) 藤田雅丈、Affymetrix マイクロアレイプローブ再定義とイネ生殖過程の遺伝子発現解析、日本育種学会第 113 回講演会、2008 年 3 月 28 日、明治大学

(16) 大西孝幸、イネ卵細胞の遺伝子発現プロファイリング、日本育種学会第 113 回講演会、2008 年 3 月 28 日、明治大学

(17) 矢野健太郎、OryzaExpress:イネのゲノム・アノテーションとオミックス統合データベース、日本育種学会第 113 回講演会、2008 年 3 月 28 日、明治大学

(18) 板橋悦子、BT 型細胞質雄性不稔イネの花粉発達に関与する核遺伝子の発現解析、日本育種学会第 112 回講演会、2007 年 9 月 23 日、山形大学

(19) 藤田雅丈、イネの生殖過程を通じた遺伝子発現プロファイリング、日本遺伝学会第 79 回大会、2007 年 9 月 20 日、岡山大学

〔図書〕(計 25 件)

(1) Watanabe M, Suzuki G, Takayama S, Springer-verlag Berlin Heiderberg, Self-incompatibility in Flowering Plants - Evolution, Diversity, and Mechanisms (2008) :151-172

〔その他〕

(1) イネ生殖ステージの遺伝子発現プロファイルデータベース: OryzaExpress  
[http://gbarrier.lab.nig.ac.jp/oryza\\_exp/ress/](http://gbarrier.lab.nig.ac.jp/oryza_exp/ress/)  
(震災の影響により利用できなくなったため、下記へ移動 (2011 年 6 月時点)  
<http://bioinf.mind.meiji.ac.jp/OryzaExpress/>)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

倉田 のり (KURATA NORI)

国立遺伝学研究所・系統生物研究センター・教授

研究者番号: 90178088

### (2) 研究分担者

渡辺 正夫 (WATANABE MASAO)

東北大学・大学院生命科学研究科・教授  
研究者番号: 90240522

堤 伸浩 (TSUTSUMI NOBUHIRO)

東京大学・大学院農学生命科学研究科・教授

研究者番号: 00202185

伊藤 幸博 (ITO YUKIHIRO)

東北大学・大学院農学研究科・准教授  
研究者番号: 70280576

鳥山 欽哉 (TORIYAMA KINYA)

東北大学・大学院農学研究科・教授  
研究者番号: 20183882

(H20→H22：連携研究者)

松岡 信 (MATSUOKA MAKOTO)  
名古屋大学・生物機能開発利用研究センター・教授  
研究者番号：00270992  
(H20→H22：連携研究者)

服部 束穂 (HATTORI TSUKAHO)  
名古屋大学・生物機能開発利用研究センター・教授  
研究者番号：10164865  
(H20→H22：連携研究者)

木下 哲 (KINOSHITA TETSU)  
奈良先端科学技術大学院大学・バイオサイエンス研究科・准教授  
研究者番号：60342630  
(H20→H22：連携研究者)