

平成21年 6月 1日現在

研究種目：基盤研究（B）
 研究期間：2006～2008
 課題番号：18380003
 研究課題名（和文） 小孢子胚発生関連遺伝子の同定と機能解析
 研究課題名（英文） Identification and functional analysis of genes related with microspore embryogenesis
 研究代表者
 高畑 義人（TAKAHATA YOSHIHITO）
 岩手大学・農学部・教授
 研究者番号：10133894

研究成果の概要：

アブラナ科作物の小孢子からの胚発生の機構を解析するために、胚発生に特異的な遺伝子の網羅的な単離を行い、さらにそれら遺伝子についてシロイヌナズナの相同遺伝子を利用した機能解析を行った。*GASSHO*と名付けた遺伝子は胚の表面組織の形成に関与し、*EMK*と名付けた遺伝子は胚形成に関与していることが推察された。また分子連鎖地図の構築を行い胚形成領域の予備的なマッピングを行った。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	6,800,000	2,040,000	8,840,000
2007年度	3,700,000	1,110,000	4,810,000
2008年度	3,700,000	1,110,000	4,810,000
年度			
年度			
総計	14,200,000	4,260,000	18,460,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農学・育種学

キーワード：*Brassica*、小孢子培養、胚発生、遺伝子単離、DNA マーカー、機能解析

1. 研究開始当初の背景

ナタネ・ハクサイ等のアブラナ科作物は、雄性の配偶体である小孢子に 32-33℃の温度処理を1-4日間行うことで、個々の小孢子から効率的に不定胚発生を誘導し完全な植物体を形成させることができる小孢子培養技術が開発されている。この現象は形成した植物が半数体あるいは倍加半数体であるため育種手法として高い利用価値を持つと同時に、植物の発生・分化の基本的理解という面からも重要な問題を提起する。すなわち、「配偶体的生長をしている細胞（小孢子）が

胞子体的生長（不定胚発生）へ転換する機構は何か?」、「胚発生初期からどのような遺伝子群が発現制御され成熟に至るのか?」、「同一種でも大きな品種間差異が生じる遺伝的原因は何か」等である。現在までこれらのほとんどは不明のままであるが、研究代表者は、現在まで形態学的及び遺伝学的解析を進めており、さらに小孢子胚発生初期に発現している遺伝子群を網羅的に単離、カタログ化し、それらの遺伝子の一部について発現解析を行い、それらの機能解析に着手し始めた。また、研究分担者はアブラナ科作物について

小胞子胚発生の品種間差異の同定や遺伝子マッピングのツールである SNP マーカーを多数作成している。

2. 研究の目的

本研究は、アブラナ科作物の小胞子から不定胚形成への機構を理解するために、(1) 劇的な形態的变化が生ずる直前の球状胚期に特異的な遺伝子の網羅的な単離を行い、さらにこれら遺伝子及びすでに我々が単離している小胞子胚発生誘導初期に発現する遺伝子について、ゲノム情報の明らかになっているシロイヌナズナ(*Arabidopsis thaliana*) を利用した遺伝子の機能解析を行い、(2) 不定胚誘導小胞子(約 5%)を非誘導小胞子(約 95%)から効率的に仕分け、収集するための実験系の開発し、それを利用した遺伝子単離を試み、(3) 小胞子胚形成には極めて大きな品種間差異が存在することが知られており、この品種間差異をもたらす遺伝子のマッピングとマップベースクローニングによる遺伝子の解明という、3つの側面から解析することを試みる。

3. 研究の方法

(1) 胚形成に際して劇的な形態的变化が生ずる直前の球状胚期に焦点を当て、suppression subtractive hybridization (SSH) 法によりナタネ(*Brassica napus*) 小胞子由来の球状胚で特異的に発現する遺伝子群の網羅的な単離を試みた。さらに、これらの遺伝子及び研究代表者が以前に単離した小胞子胚発生初期に発現する遺伝子について、シロイヌナズナの相同遺伝子のノックアウトミュータントの解析、プロモータ等を行い、単離した遺伝子の機能を明らかにすることで、小胞子胚発生の機構を解析した。

(2) 不定胚誘導小胞子を非誘導小胞子から効率的に仕分け、収集するための実験システムを開発するために、胚発生の初期から特異的に発現するプロモータ P22a1 に先導される緑色蛍光タンパク質 (GFP) 遺伝子を導入した形質転換ナタネを作成し、この形質転換体より単離した小胞子を用いて不定胚誘導を行い、胚発生へと発生プロセス変換した細胞 (GFP 蛍光)のみを大量に収集し、胚発生初期で特異的に発現する遺伝子群の網羅的な単離を SSH 法により行った。

(3) EST の塩基配列情報をもとに *Brassica rapa* のゲノム DNA を増幅し、電気泳動分析や塩基配列決定によって、イエローサルソン自殖系統とコマツナ品種おそめの小胞子培養系統との間で多型がある DNA をマーカーとした。見出した DNA 多型を上記 2 系統間の F₂ の 266 個体について分析し、連鎖地図を構築した。塩基配列決定によって同定した一塩基多型 (SNP) については、ドットプロット SNP

分析法により多型を検出した。小胞子培養が容易な小型ハクサイ品種 HoMei の小胞子培養系統と小胞子培養が困難な大型ハクサイ品種 CR-Seiga-65 の自殖系統との間の F₁ 個体を用いて小胞子培養を行い、得られた胚様体の遺伝子型を両親間で多型を示す DNA マーカーで分析し、分離比が大きく偏る染色体領域を調査した。また、HoMei の高い胚様体形成能を戻し交雑により大型ハクサイ品種に導入した系統のグラフ遺伝子型を分析した。

4. 研究成果

(1) SSH 法によりナタネ小胞子由来の球状胚で特異的に発現する遺伝子群を単離した。単離した 254 の ESTs の塩基配列を決定した後グルーピングした結果、82 が singleton、残り 172 が 28 の EST グループに整理され、最終的に小胞子由来の球状胚特異的と予想される 110 の ESTs に整頓された。相同性検索により単離遺伝子の機能を推定した結果、96.4%が既知の遺伝子と相同性を示し、このうち 42.7%は unclassified protein と、13.6%は metabolism 関連遺伝子と予想された。さらに、単離遺伝子の小胞子胚形成時における遺伝子発現を定量的 RT-PCR により解析した結果、解析に供した 6 遺伝子すべてが胚形成時に高い発現パターンを示し、また種子中の受精胚においても同様の発現が認められた。これらの結果は、単離遺伝子の多くが小胞子胚発生、受精胚発生において共通に発現することを示すものであり、今後胚形成の分子機構を明らかにするための基盤を提供した。

単離した遺伝子のうち BnGemb-82 について Blast x 検索により相同遺伝子として見出されたシロイヌナズナ遺伝子を *GASSHO 1* (*GS01*), *GS02* と命名した。この遺伝子はアミノ酸レベルで 85%の相同性を示す LRR-RLK 遺伝子であり、RT-PCR の結果、何れも種子で特に強く発現する事が判明した。そこで、種子の各発達段階における空間的発現パターンを調査するため、promoter-GUS 解析を実施したところ、*GS01*, *GS02* はいずれも球状胚より発現が認められ、子葉胚に至るまで胚の全体で発現する事が明らかとなった。一方、発芽後においては地上部のほぼ全体で発現が確認されたが、根における発現は *GS01* に限られており、本葉においては何れの発現も確認されなかった (Fig. 1)。

これら遺伝子の機能を解明するため、両遺伝子に T-DNA が挿入された変異体を利用して表現型解析を行ったところ、各変異体は表現型を示さない一方で、これらを交配して作成した二重変異体は発達途上の胚の屈曲異常を示した (Fig. 2)。さらに、発芽後において二重変異体は胚軸の短小化と子葉同士の癒着 (この表現型よりこれらの遺伝子を *GASSHO* と命名) を示し、通常の湿度条件下ではほと

んどが枯死した(Fig. 3)。

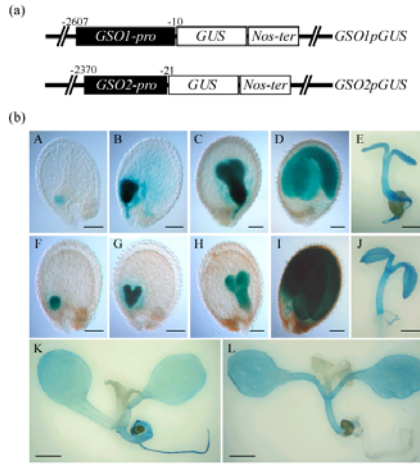


Figure 1 Expression pattern of *GSO1* and *GSO2* in developing embryos embedded in ovules and seedlings. (a) Structure of constructs used for promoter GUS assay. GUS gene following promoter sequences of *GSO1* and *GSO2* start in pBI121 were transformed to Arabidopsis plant by floral dipping. (b) GUS staining of transgenic *GSO1*pGUS and *GSO2*pGUS *Arabidopsis* plant. GUS expression patterns in developing embryos and juvenile seedlings of transgenic GSH1pGUS (A-E and K) and GSH2pGUS (F-J and L) plant were determined at different stages. Scale bars: 100 μ m in A-D and F-I, 1 mm in E and J-L. (A) and (F) Globular stage. (B) and (G) Late-heart stage. (C) and (H) Late-torpedo stage. (D) and (I) Mature embryos at cotyledon stage. (E) and (J) Germinating seedling. (F) and (K) Seedling with foliage leaves.

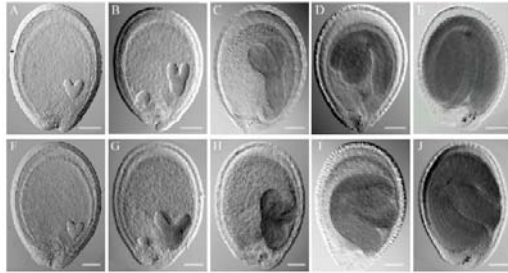


Figure 2 Morphological analysis of developing embryos in wildtype and *gso1 gso2* homozygote. Ovules from wildtype (A-E) and *gso1 gso2* homozygous (F-J) plants containing developing embryos were examined at various stages of seed growing. In result, aberrant bending patterns of *gso1 gso2* embryos were appeared. Scale bars: 100 μ m. (A) and (F) Heart stage. (B) and (G) Late-heart stage. (C) and (H) Late-torpedo stage. (D) and (I) Curled cotyledon stage. (E) and (J) Mature embryo.

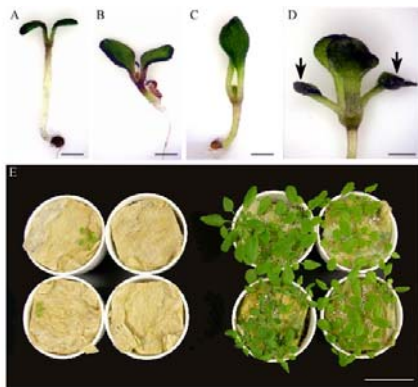


Figure 3. Abnormal phenotypes of *gso1 gso2* juvenile and adult plants. (A-D) Morphology of wildtype seedlings (A), *gso1 gso2* seedling with spread cotyledons (B), and *gso1 gso2* seedling with adhered cotyledons (C) at 4 days after chilling (DAC). At 6 DAC, *gso1 gso2* seedling generated foliage leaves from lateral apertures of attached cotyledons (D). Arrows indicate foliage leaves. (E) Overview of 40 days old wildtype (right) and *gso1 gso2* (left) plants. Growth of *gso1 gso2* plant was limited markedly under aerial condition. Scale bars: 1 mm in A-D, 5 cm in E.

このような組織間の癒着や湿度への過剰な感受性は植物の表面構造、特にクチクラ層が欠損した際に生ずる事が知られている。そこで、トルイジンブルー染色によりクチクラの欠損を解析した結果、二重変異体では地上

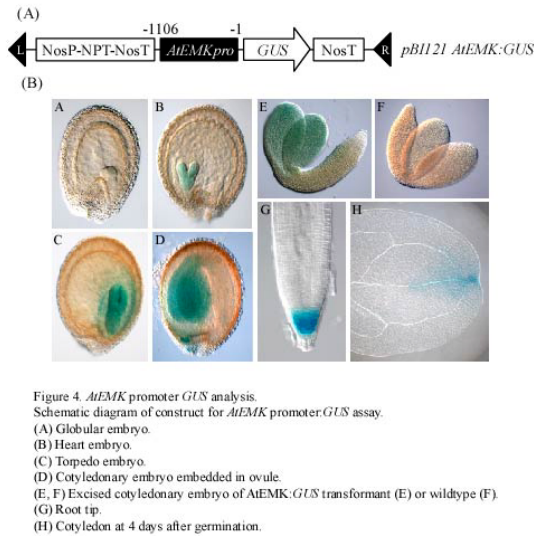
部全体のクチクラが欠損する事が明らかとなった。しかし、本葉においてはクチクラの欠損は確認されず、これらの事実と発現解析の結果より、*GSO1*, *GSO2* 遺伝子は胚における表層形成を制御する事が推察された。また、胚の異常屈曲についても、表層の欠損に由来する胚と周辺組織の癒着が原因であると考えられた。

次に、単離した遺伝子のうち、BnGemb-58 について同様にシロイヌナズナ相同遺伝子を利用した機能解析を行った。BnGemb-58 の配列を基に、3' / 5' RACE を行った結果、1つの ORF を含む 1,758bp の完全長 cDNA 配列を得た。*BnEMK* と命名したこの遺伝子は、AP2 転写因子 family の aintegumenta group に属し、相同性検索の結果、*A. thaliana* ゲノム内に 85% の高い相同性を有する遺伝子の存在が確認された (*AtEMK*)。EMK を含めた aintegumenta group に属する 10 遺伝子のアミノ酸配列を基に、分子系統樹を作成した結果、2つの EMK 遺伝子は互いに近傍に存在し、機能の同一性が示唆された。発現解析の結果、*BnEMK* (BnGemb-58) は *B. napus* の小孢子由来胚において球状胚から魚雷胚までの胚発生中期と成熟種子で特に高発現することが明らかとなった。一方、*AtEMK* の器官特異的な発現および種子発達・発芽時における発現量の推移を解析した結果、*AtEMK* は *A. thaliana* の成熟種子および発達中の種子を含む莢でのみ発現し、その他の組織では発現が見られなかった。

その器官特異的な発現パターンを解析するため、*AtEMK* promoter:GUS 導入 *A. thaliana* 個体を作成し、GUS 活性の組織特異性を調査した結果、*AtEMK* は心臓型胚より子葉胚までの胚形成中、後期において発現しており、心臓型胚から魚雷胚においては胚全体での発現が認められたものの、子葉胚においては胚上部のみに発現が局在していた (Fig. 4A-F)。また、発芽後の実生においても根端 (Fig. 4G) や子葉の先端部位 (Fig. 4H) における発現が確認された。

AtEMK の機能を解明するため、CaMV35s プロモータに *AtEMK* 全長 cDNA を連結したキメラ遺伝子を導入した *A. thaliana* 系統 (35s:AtEMK-1, 2) を作出し、本来なら *AtEMK* が発現しない器官である葉における異所発現を RT-PCR で確認した後、その表現型を解析した。その結果、胚形成における異常は確認されなかったが、その実生において根の発達の遅延等多様な表現型が確認された。それに加えて、35s:AtEMK 導入個体は、子葉先端部からの胚様体形成が見られた。低温処理後 4-5 日目の実生における子葉先端より、胚に似た黄色の構造体が出現し、その後、この胚様体が生じた子葉からの発根や子葉全体のカルス化が低頻度で生じた。この胚様体はそ

の後、発根や本葉形成するため、通常の受精



胚同様の機能・特性を保有すると考えられた。現在、この遺伝子について更に機能解析を続けている。

(3) P22a1: sGFP 導入 *B. napus* の小孢子培養における蛍光観察の結果、系統番号 1、10、17、18 の全個体において蛍光を発する小孢子が確認された。Fig. 5 に比較的安定した発現を示した系統 17 の 3 個体における、sGFP 発現小孢子的推移の平均値を示した。

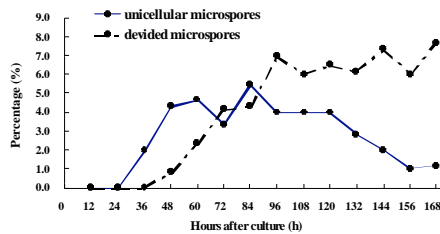


Figure 5 Transition of percentage of fluorescent microspheres in line 17.

GFP 蛍光が確認された系統は、いずれも系統 17 と同様の推移を示し、培養開始 36-48 時間後から 1 細胞の小孢子が蛍光を発し、72-84 時間後にかけて 2 細胞以上の胚発生小孢子が急激に増加した。この結果から、細胞分裂はしていないが細胞内で小孢子胚発生関連遺伝子は発現し始めていると考えられる段階である 48-54 時間後、および胚発生が開始された頃である 72-78 時間後において SSH を行うこととした。

培養 48-54 時間での SSH の結果、312ESTs の配列を決定した。それらの ESTs はグルーピングの結果 247 の遺伝子群に集約され、singleton が 215、contig が 32 であった。選抜した 15ESTs について、tester, driver cDNA

を用いて RT-PCR により発現を調査したところ、ポジティブ・コントロールとして用いた *OLEOSIN1* (BDF2D-159) を含む 6ESTs において tester 特異的な高発現が確認された (Fig. 6)。

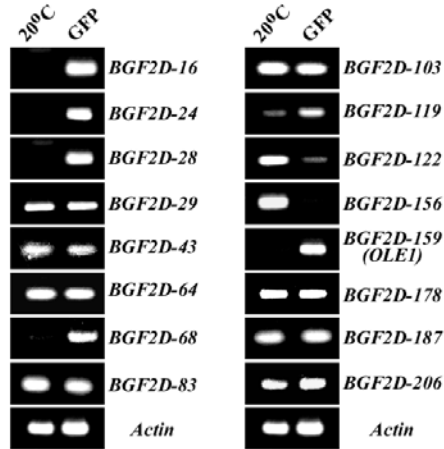


Figure 6 Expression profiles of isolated 16 ESTs. To select ESTs concerning with embryogenesis from microspores, RT-PCR analysis for 16 ESTs. cDNA from GFP-fluorescent microspores cultured at 32.5°C and cultured ones at 20°C was employed as the template. *ACTIN* and BGF2D-159 (*OLE1*) were used as the positive control and to confirm the high expression of seed specific genes in fluorescent microspores respectively.

しかし、その他の 10ESTs については driver でも高発現が確認され、その中で 2ESTs については、driver 特異的な高発現を示した。このことから、subtraction の効率が低いことが示唆された。原因として、培養 48 時間後では胚発生は既に開始されているものの、まだ十分に胚発生関連遺伝子の発現が上昇しておらず、また花粉の形質も残しているため、tester, driver 間での遺伝子発現の差が十分ではなく、tester の発現遺伝子が subtract されてしまったことなどが考えられる。

培養 72-78 時間での SSH においては、tester 特異的に発現する 301ESTs の配列を決定した。ESTs はグルーピングの結果 171 の遺伝子群に集約され、うち singleton が 130、contig が 41 であった。選抜した 8ESTs について tester, driver 間で行った RT-PCR の結果、7ESTs において tester 特異的な高発現が確認され、SSH が効率的に行われた事が確認された (Fig. 7)。また tester に特異的な高

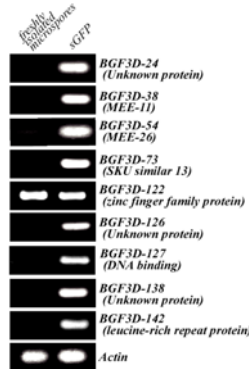


Figure 7 Expression of isolated ESTs at tester and driver.

発現を示した 7ESTs について行った *B. napus* の各組織および発達中の受精胚における RT-PCR を行ったところ、多くの ESTs が受精胚発達中に発現する事が確認された。

(3) *B. rapa* について 69 の CAPS マーカー、7 つの SCAR マーカー、145 の SNP マーカーの連鎖地図ができた。既報の染色体番号と統合するため、11 の SSR マーカーの分析も行い、合計 232 マーカーからなる 1450cM をカバーする連鎖地図を構築した (Fig. 8)。まだ一部にマーカー間が 20cM 以上空いている領域があるため、公開されている BAC クローンの塩基配列情報を用いて DNA マーカーを作成し、連鎖地図の充実を図っている。HoMei 小孢子培養系統と CR-Seiga-65 自殖系統間の F₁ 個体から小孢子培養を行い、135 個体の胚様体を得た。両親間で多型を示す DNA マーカーを 62 種類見出し、135 個体の胚様体の遺伝子型分析により連鎖解析を行い、57 種類を連鎖地図上に位置づけた。第 8 染色体の末端付近と第 5 染色体の末端領域の DNA マーカーの分離比が大きく偏った。第 8 染色体の末端付近と第 5 染色体の末端領域の内で高不定胚形成能系統のグラフィカルジェノタイプングで HoMei 型であったのは、第 8 染色体の末端付近であり、今後この領域を絞り込み、高不定胚形成能遺伝子の解明を図る予定である。

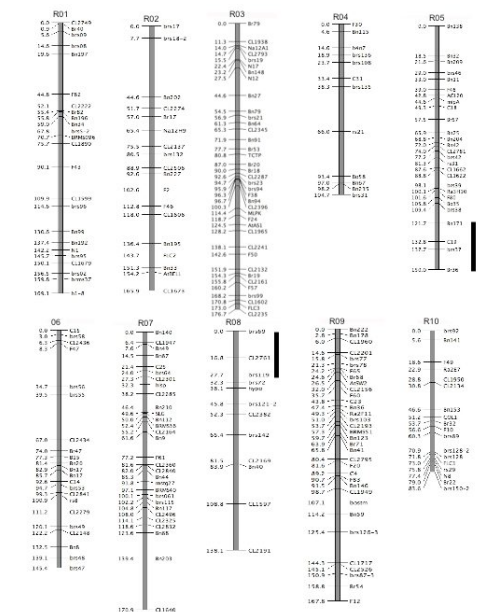


Figure 8 Linkage map based on SNP markers of *Brassica rapa*. Black lines showed regions distorted segregation in microspore-derived population

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 3 件)

- ① Tsuwamoto R, Takahata Y, Identification of genes specifically expressed in androgenesis-derived embryo in rapeseed (*Brassica napus* L.) Breed. Sci. 58: 251-259, 2008, 査読有
- ② Tsuwamoto R, Fukuoka H, Takahata Y, *GASSHO1* and *GASSHO2* encoding a putative leucine-rich repeat transmembrane-type receptor kinase are essential for the normal development of the epidermal surface in Arabidopsis embryos. Plant J. 54: 30-42, 2008, 査読有
- ③ Tsuwamoto R, Fukuoka H, Takahata Y, Identification and characterization of genes expressed in early embryogenesis from microspores of *Brassica napus*. Planta 225: 641-652, 2007, 査読有

[学会発表] (計 9 件)

- ① 酒井球絵・福岡浩之・横井修司・高畑義人、P22a1:sGFP 導入ナタネを用いた小孢子胚発生初期発現遺伝子の単離. 日本育種学会 114 回講演会、2008.10.12、彦根・滋賀県立大学
- ② Li F, Ishimaru Y, Kitashiba H, Nishio T, Construction of a linkage map of *Brassica rapa* based on dot-blot-SNP markers and QTL analysis for flowering time and leaf morphological traits. 日本育種学会 114 回講演会、2008.10.11、彦根・滋賀県立大学
- ③ Sakai M, Yokoi S, Takahata Y, Isolation of microspore embryogenesis specific genes in rapeseed using embryo specific promoter. 16th Crucifer Genetic Workshop, 2008. 9.10, Lillehammer
- ④ 津和本亮・横井修司・高畑義人、シロイヌナズナ胚特異的 PGD-finger タンパク質 (EPS) の欠損は初期胚の致死を引き起こす. 日本育種学会 113 回講演会、2008. 3. 28、川崎・明治大学
- ⑤ 津和本亮・横井修司・高畑義人、セイヨウナタネ雄性発生胚特異的遺伝子 ESP の同定および機能解析. 日本植物学会東北支部第 20 回秋田大会、2007, 12, 8、秋田・秋田県立大学
- ⑥ 津和本亮・横井修司・高畑義人、*EMBRYOMAKER* 遺伝子の異所発現は子葉からの不定胚形成を誘導する. 日本育種学会 112 回講演会、2007. 9. 22、鶴岡・山形大学

- ⑦Tsuwamoto R, Takahata Y, Identification and analysis of androgenesis-specific expressed sequence tags in rapeseed using suppression subtractive hybridization. The 12th International Rapeseed Congress, 2007. 3. 26-30, Wuhan
- ⑧Tsuwamoto R, Fukuoka H, Takahata Y, The lack of Arabidopsis *GASSHO1* and *GASSHO2* genes encoding LRR-RLKs leads to the defect in cuticle during embryo stages. 15th Crucifer Genetic Workshop, 2006. 9.30-10.4, Wageningen
- ⑨津和本亮・高畑義人、セイヨウナタネ小孢子由来球状胚特異的 ESTs の単離および発現解析. 日本育種学会 110 回講演会、2006. 9. 23、松山・愛媛大学

[図書] (計 1 件)

- ① Pratap A, Gupta SK, Takahata Y, Microsporogenesis and haploidy breeding. In, *Biology and Breeding of Crucifers* (Gupta, S.K. ed.), CRC Press, New York, pp. 293-307, 2009

[産業財産権]

○出願状況 (計 0 件)

○取得状況 (計 0 件)

[その他]

6. 研究組織

(1) 研究代表者

高畑 義人 (TAKAHATA YOSHIHITO)

岩手大学・農学部・教授

研究者番号：1 0 1 3 3 8 9 4

(2) 研究分担者

西尾 剛 (NISHIO TAKESHI)

東北大学・大学院農学研究科・教授

研究者番号：3 0 3 0 1 0 3 9