

平成 21 年 6 月 15 日現在

研究種目：若手研究 (A)
 研究期間：平成 18 年度～平成 20 年度
 課題番号：18688001
 研究課題名 (和文) SuperSAGE 法による耐冷性イネ育種のためのプロモーターと DNA マーカー探索
 研究課題名 (英文) Identification of DNA markers and promoters for rice cold tolerance breeding using SuperSAGE
 研究代表者
 松村 英生 (MATSUMURA HIDEO)
 財団法人岩手生物工学研究センター・生命科学研究所・主任研究員
 研究者番号：40390885

研究成果の概要：イネ栽培過程において最も強く低温による障害をうける出穂前の葯および花粉における SuperSAGE 法を用いた網羅的な遺伝子発現解析を試みた。耐冷性の強い品種ひとめぼれと弱い品種ササニシキの穂ばらみ期の植物体を各々 28 および 15 で 1 日間処理し、各試料の凍結切片から葯組織、花粉を各々レーザーマイクロダイセクション装置を用いて単離し、RNA 抽出を行った。抽出した RNA は増幅を行った後に SuperSAGE 法による遺伝子発現解析に供試した。これらの試料での解析を行うに当たって近年に急速に進歩した次世代 DNA シークエンサーを活用した SuperSAGE 法の確立を行った。454 社の機器を用いた SuperSAGE 法を確立後に花粉等の試料の遺伝子発現解析を実施して 10 万タグ以上の花粉および葯壁の遺伝子発現情報を収集した。花粉については低温処理区との発現データ比較により低温応答性遺伝子候補を多数見出した。また DNA マーカー探索のために独自にイネインド型品種の全ゲノム配列解析を実施して SNPs 情報を収集した。これらの情報を組み合わせて耐冷性プロモーター、マーカーの同定を進めている。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006 年度	7,900,000	2,370,000	10,270,000
2007 年度	7,400,000	2,220,000	9,620,000
2008 年度	7,400,000	2,220,000	9,620,000
年度			
年度			
総計	22,700,000	6,810,000	29,510,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農学・育種学

キーワード：イネ、耐冷性、花粉、遺伝子発現、SuperSAGE、次世代 DNA シークエンサー

1. 研究開始当初の背景

耐冷性は我が国におけるイネ育種の最も重要な育種目標の一つであり、耐冷性品種の育成を促進するためには、本申請課題で述べるような遺伝子組み換えによる分子育種の

導入および DNA マーカーを利用した交雑育種技術の確立が必要である。

このような研究の実施において申請者が開発した SuperSAGE 法(Matsumura et al., PNAS,

2003)の活用は独創的かつ有効な方法であると考へた。

2. 研究の目的

イネ耐冷性品種の分子育種および交雑育種の効率化を目的として、網羅的な遺伝子発現解析法 SuperSAGE により組織特異的な低温応答性の遺伝子群を同定し、それらの遺伝子のプロモーターの単離ならびに多品種間における一塩基配列多型 (SNPs) を解析する。これらの解析により耐冷性分子育種に利用できる新規な組織特異的かつ低温誘導性の発現制御が可能なプロモーターを複数単離する。さらに耐冷性形質と連鎖した SNPs をイネ耐冷性育種における DNA マーカーとして利用する。

3. 研究の方法

穂ばらみ期、開花期において最も低温障害を受けやすい花粉における低温応答性の遺伝子発現解析を行うため、耐冷性の異なる品種 (ササニシキ、雲冷 17 など) を 28 で育成し、穂ばらみ期から開花期にかけて低温恒温水槽を用いて 19 の低温処理を行う。穂ばらみ期、出穂時、開花時の低温処理個体と非処理の個体から薬を採取し、酢酸-エタノール混合液で固定し、10%PBS-スクロース溶液で置換後に包埋剤で -60 で凍結包埋する。包埋した試料は凍結マイクロトームを用いて凍結切片を作成する。切片中の花粉細胞をレーザーマイクロダイセクション装置を用いて回収し、50 細胞程度の花粉試料から RNA を抽出する。抽出した RNA (1ng 以下、バイオアナライザーを利用して正確に定量し RNA の質を確認する) から T7 オリゴ dT プライマーを用いて 2 本鎖 cDNA を合成し、これを鋳型にして T7 RNA ポリメラーゼにより *in vitro* 転写を行う。In vitro 転写で増幅された RNA からピオチン化したオリゴ dT プライマーで

cDNA 合成した後に制限酵素処理し、cDNA 末端に T7 配列を持つリンカーをつなげる。この DNA を鋳型にして再度 *in vitro* 転写で RNA を増幅する。この 2 段階の増幅で 1ng 以下の RNA から数 μ g 以上の polyA RNA が得られ、この増幅 RNA を以下の発現解析に供試する。

種子発芽期における低温応答性の遺伝子発現解析を行うため、低温発芽能の異なる品種 (ササニシキ、Dunghan shali 等) の種子を冠水条件下で 28 および 15 で発芽させる。播種後 1-3 日の発芽種子を採取し、RNA を抽出する。抽出した RNA (3 μ g 以上の polyA RNA) を以下の SuperSAGE 法を用いた遺伝子発現解析に供試する。

SuperSAGE 法は cDNA (mRNA) 中の特定の位置から抽出した 26bp 断片 (tag) を数千個以上解析し、各 tag の頻度から tag の由来する遺伝子の転写産物量を定量的に明らかにする方法である。この SuperSAGE による解析結果を試料間で比較することにより、正確に各遺伝子の発現量の差を捉えることができる。つまり SuperSAGE は同時に数千種類以上の遺伝子の発現量を定量的に解析することが可能な方法である。同様な網羅的遺伝子解析法であるマイクロアレイと比較して、SuperSAGE は mRNA の絶対量を反映したデジタルデータによる解析であり、全ての真核生物において新規遺伝子の探索にも利用可能である、という 2 点において優れている。

さらに最近の技術進歩により次世代 DNA シークエンサーと呼ばれる安価に大量の DNA 配列解析を実施できる装置が利用できるようになった。本研究でもいち早くその技術を取り入れて花粉、薬組織などの SuperSAGE 解析に活用して従来よりも 10 倍以上データ量の遺伝子発現解析を実施した。

4. 研究成果

イネ栽培過程において最も強く低温による

障害をうける出穂前の葯および花粉における SuperSAGE 法を用いた網羅的な遺伝子発現解析を試みた。耐冷性の強い品種ひとめぼれと弱い品種ササニシキの穂ばらみ期の植物体を各々28 および 15 で1日間処理し、その葯を凍結切片作成用に固定、包埋した。各試料の凍結切片から葯組織、花粉を各々レーザーマイクロダイセクション装置を用いて単離し、RNA 抽出を行った(図1)。抽出した RNA は Agilent バイオアナライザーを用いてその quality および量を評価して RNA 増幅に供試した(図1及び2)。RNA 増幅法では増幅バイアス(偏り)が大きな問題であるため、それらを従来法より抑制し、かつより微量な RNA から確実に増幅できる技術の改良を行った。この技術により、単一の花粉細胞からでも SuperSAGE 解析が可能となった。

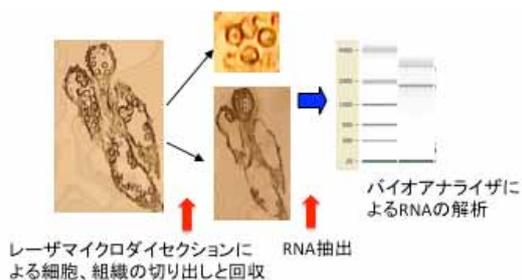


図1 レーザーマイクロダイセクションを用いたイネ葯組織からの花粉、葯壁の回収と RNA 抽出

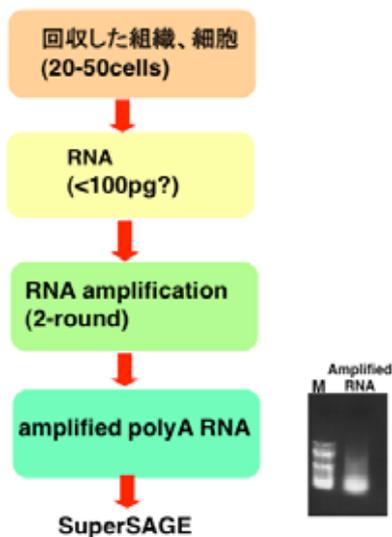


図2 レーザーマイクロダイセクションで回

収した組織、細胞からの RNA を増幅、SuperSAGE 解析まで行う手順

上記の花粉、葯組織の試料の SuperSAGE 解析を行う前段階に当たって次世代 DNA シークエンサーを活用した SuperSAGE 法の確立を行った。米国 454 life science 社の DNA シークエンサー (Genome sequencer-20; 以下 GS20 と略) では、DNA 断片をクローニングすることなく直接解析を行い、DNA 一断片につき平均 100 塩基の配列を一度に 20 万断片以上で解析可能である。その結果、約 20Mbase の DNA 配列を読み取ることが可能である。この解析技術を SuperSAGE に利用するため、従来行っていた tag のライゲーションによる長鎖コンカテマー形成およびベクタークローニングをせずに ditag PCR 産物を直接シーケンス解析に供試することとした。このような ditag の直接シーケンス解析により、1 回のシーケンスで 20 万以上の ditag すなわち、40 万 tag 以上が解析可能と推定できたが、多くの SuperSAGE 解析の利用場面ではこれだけの tag 数を必要とすることは少ない。つまり、40 万 tag よりも少ない tag 数であっても、多くの種類の異なる試料のデータを得られる方が有益な場面が多いと考えられた。そこで、1 回のシーケンスで複数試料の ditag PCR 産物を解析しても後のデータ解析で試料間の仕分けが可能ないように、試料間で異なる配列のリンカーおよび PCR primer を設計して用いることを試みた。実際には表 1 に示すような 3 塩基程度の配列が異なるリンカーを 4 組み合わせ (8 種類) を設計した。試験的な解析試料として、全ゲノム配列情報を持つイネ 2 試料およびゲノム情報を持たない *N. benthamiana*2 試料を用いて、RNA 抽出を行い、各々異なるリンカーを用いて SuperSAGE の ditag 形成を行った。その後、各試料の ditag について PCR を行い、1 μ g ずつの PCR 産物を

得た後に、等量ずつ混合して1回のGS-20によるシーケンス解析に供試した結果、リンカー配列情報で各試料のタグを仕分け可能であり、各々の試料で数万から十万個以上のタグを解析する事ができた(表2)

表1 SuperSAGE 解析に用いたリンカー配列

linker 1	CAACTAGGCTTAATACAGCAGCATG
linker 2	CTAACGATGTACGCAGCAGCATG
linker 3	CAACTAGACTAAGTACAGCAGCATG
linker 4	CTAACGATCGACGCAGCAGCATG
linker 5	CAAGAAGGCTTAATACAGCAGCATG
linker 6	CTATCGATGCACGCAGCAGCATG
linker 7	CAACTACGCTAAATACAGCAGCATG
linker 8	CTAACGGTGTGCGCAGCAGCATG

表2 454 シーケンスによる複数試料の SuperSAGE 解析の結果

sample	No. 26bp-tags
rice <i>lm1</i> leaves	99,582
rice wt leaves	64,220
TMV-infected <i>N. benthamiana</i>	89,532
Mock-infected <i>N. benthamiana</i>	105,476
Total	358,810

上述の花粉、葯組織からのRNA抽出と増幅、および次世代シーケンサーを用いた SuperSAGE 法の確立を受けて花粉、葯組織における大規模な遺伝子発現解析を実施した。実際には耐冷性の強い品種ひとめぼれの穂ばらみ期の植物体を各々28 および15 で1日間処理し、その葯を凍結切片作成用に固定、包埋した。各試料の凍結切片から葯組織、花粉を各々レーザーマイクロダイセクション装置を用いて単離し、RNA抽出を行い、さらに増幅処理を行ったRNAを用いて SuperSAGE 解析を行った。

その結果、非低温処理花粉で140,072タグ、低温処理花粉で137,212タグ、低温処理の葯壁組織で151,864タグを解析する事ができた(表1)。これらのデータ中には各々40,000種類のタグ配列が含まれており恐らく花粉および葯壁で発現している全ての遺伝子を

モニターしていると予測できる。これらの SuperSAGE データから花粉と葯壁で発現量に差のある遺伝子を20種類ほど選びRT-PCRで発現様式を確認した結果、ほとんどの遺伝子で SuperSAGE 解析と同様な結果が得られた

表3 花粉、葯壁における SuperSAGE 解析の結果

Tag sequence	count		Acc. No.		
	pollen	anther			
CATGAAGTAAATATATATATTTTGT	559	17	pol1	AP003224	Not amplified
CATGCAATATATATATATATATAAG	549	11	pol2	NM_001060730	Not amplified
CATGTTTTGAAATATATATATTTAT	416	7	pol3	NM_001058985	Not amplified
CATGATGAACTAGCTTAACTGTTCT	326	15	pol4	NM_001072325	Not amplified
CATGAGACGCTGATATATATTTA	321	19	pol5	NM_001051707	Not amplified
CATGAATCTTTTAAAGATCTTTA	312	9	pol6	NM_001069664	Not amplified
CATGCATATGTTAAAGTCAATCAAC	295	7	pol7	NM_001062735	Not amplified
CATGCTTTGTTAGCAATATCCATA	205	9	pol8	AC120888.2	Not amplified
CATGAATAAATAAGTTTATAAGTGT	146	1	pol9	NM_001064142	Not amplified
CATGTTATATATCGAAGCTTATGCT	129	5	pol10	NM_001050836	Not amplified
CATGGTTCTTCTATTTATTTATTA	62	0	pol12	NM_001063060	Not amplified
CATGAATAAAGTAACTGACTTCT	235	9248	ant1	NM_001062013	Not amplified
CATGCAATAAAGATCGAAGGATATA	35	733	ant2	NM_001069073	Not amplified
CATGGCTGTTGCGAAGCAATTTTGT	15	657	ant3	AK071106	Not amplified
CATGTAATGAACTACTGATGTTGAA	17	527	ant4	AK243228	Not amplified
CATGAGTGAATAAATAAGTCTCAG	11	518	ant5	NM_001059561	Not amplified
CATGAGGCAAGTACTCTTTCAATG	15	351	ant6	CT830627	Not amplified
CATGACTCCAACTATGTAAGGATTA	8	242	ant7	NM_001052333	Not amplified
CATGATGTTGAACTATGTTCAAGTT	2	201	ant8	EF122480.11	Not amplified
CATGTACAAAGGAGTCTGTTGTTTC	7	183	ant9	NM_001055983	Not amplified
CATGACGGCAGGATCGGCTGTTTFA	5	157	ant10	NM_001070347	Not amplified
CATGAGCTACTAACTAAATGTTAAAG	7	153	ant11	NM_001055403	Not amplified
CATGATTTGTTATGATTAATTAAT	1	135	ant12	CT836541	Not amplified

この結果から本技術で花粉および葯壁特異的な遺伝子発現を網羅的かつ正確に解析する事ができた。

同様な解析により、ひとめぼれの28 処理の花粉と15 処理の花粉の遺伝子発現を解析、比較する事で低温応答の発現を示すと思われる遺伝子候補を見出した。(表4)

表4 28 と15 処理の花粉の SuperSAGE 解析の結果

タグ配列	28℃	15℃	
GATGAAAAATGAGAGCTTCATTTGAT	2894	1248	Z16402: pollen specific gene
CATGATTTTGATATAATCCAGTGCAC	1990	1284	CAH67548: ribosomal protein
CATGAATTTGAGTGGCTTTGTTTATG	1044	1053	EF576410.1: glycine-rich prot
CATGCAAAATGATGAGTTAAATAAAG	981	549	NM_001060730
CATGAAATGCTTTGAGGATCTTTTA	687	312	NM_001069664
CATGTTTTGAAATATATATTTTAT	500	416	NM_001058985
CATGATTAAGATATATCTAGTACT	447	119	NM_001063114.11
CATUTGAACTGAAAGAGAGAGA	444	100	idospem lumeral binding probe
CATGAGACGAGAAAGAAATGTTGT	340	118	AC120888.2
CATGCATATGTTAAAGTCAATCAAC	321	295	NM_001062735
CATGATTTTATCAATATAGCATT	317	450	Cytochrome c
CATUTAAATTTGTTATCTGTTGTTA	270	146	ribosomal protein
CATGTCAGCAATTTGAAAGGCTT	247	74	glaberrin 20-dioxigenase
CATGATAACTGCTTAACTGTTTCT	220	326	NM_001072325

これらの結果を基に候補プロモーター単離および耐冷性マーカー遺伝子の単離を進めている。

またさらに効率的かつ多数の花粉等における遺伝子発現解析を可能にする技術としてイルミナ社の次世代シーケンサーを活用した SuperSAGE 解析法の確立を試みた。その結果、花粉、葯組織を各々30万タグ以上解析した(論文投稿中)。これらのうち花粉での発現しているタグおよび低温応答性のタグ配列について遺伝子のアノテーションを行った。それらアノテーションされた遺伝子配列についてデータベースに登録されているイネ日本型とインド型品種間での多型を比較した結果、花粉で発現している遺伝子ではアミノ酸置換を伴う多型が多いことが明らかになった。同時にそれらの遺伝子のプロモーター領域の多型も解析している。データベース中のインド型イネ品種のゲノム配列情報は限られていることから、独自にインド型イネ品種の全ゲノム配列を次世代シーケンサーにより解析し、配列多型情報を収集した。それらのデータと品種日本晴のゲノム配列との比較の結果、多くの配列多型を見出すことができた。それらの多型、花粉での遺伝子発現情報を組み合わせて耐冷性識別マーカーの同定を実施中である。本研究によるデジタル遺伝子発現情報とゲノム配列情報を組み合わせて育種への利用を目指した多型(マーカー情報)を収集する解析戦略を確立できた。

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6件)

松村英生、寺内良平 SAGE法による耐病性遺伝子発現解析 蛋白質核酸酵素 52巻 660-666. (2007) 査読無
Takahashi, Y., Bin Nasir, K. H., Ito, A., Kanzaki, H., Matsumura, H., Saitoh, H., Fujisawa, S., Kamoun, S. and Terauchi, R. High-throughput screen of cell death-inducing factors in *Nicotiana benthamiana* identifies a

novel MAPKK that mediates INF1-induced cell death signaling and non-host resistance to *Pseudomonas cichorii*. *Plant J.* 49: 1030-1040 (2007) 査読有

Carpentier, S.C., Coemans, B., Podevin, N., Laukens, K., Witters, E., Matsumura, H., Terauchi, R. Swennen, R. Panis, B. Functional genomics in a non-model crop: transcriptomics or proteomics? *Physiol Plant* 133 : 117-130 (2007) 査読有

Hamada, H., Matsumura, H., Tomita, R., Terauchi, R., Suzuki, K., Kobayashi, K. SuperSAGE revealed different classes of early resistance response genes in *Capsicum chinense* plants harboring L3-resistance gene infected with Pepper mild mottle virus. *J. General Plant Pathol.* 74:313-321 (2008) 査読有

Matsumura H., Detlev H. Krueger, G. Kahl and R. Terauchi SuperSAGE: A modern platform for genome-wide quantitative transcript profiling. *Curr. Pharma. Biotech.* 9, 368-374. (2008) 査読有

Molina C. M. M., Rotter, B., Horres, R., Udupa, S., Besser, B., Bellarmino, L. C., Baum, M., Matsumura, H., Terauchi, R., Kahl, G., Winter, P. SuperSAGE: The drought stress-responsive transcriptome of chickpea roots. *BMC Genomics* 9:553 (2009) 査読有

[学会発表](計3件)

Hideo Matsumura SuperSAGE: Most advanced transcriptome technology based on 26-bp tag for functional genomics. Next Generation Sequencing Providence (米国、ロードアイランド州) 2007年10月

Hideo Matsumura Digital Gene Expression analysis platform of multiple tissue samples using Next Gen Sequencers. Next Generation Sequencing カリフォルニア州 San Diego, 2009年3月

松村英生 イネゲノム育種への次世代シーケンシング技術の活用 日本育種学会第115回講演会 つくば国際会議場 2009年3月

[図書](計2件)

Matsumura H., Detlev H. Krueger, G. Kahl and R. Terauchi SuperSAGE

Methods in Molecular Biology: vol387
Serial Analysis of Gene Expression
55-70 (Nielsen K.L., Ed.), Humana
Press (2008).

Terauchi, R., Matsumura, H., Krueger,
D. H., Kahl, G. SuperSAGE: The most
advanced transcriptome technology for
functional genomics. Handbook of
plant functional genomics. (Kahl, G.,
Meksam, K. eds) Wiley VCH. p 37-54.

6 . 研究組織

(1)研究代表者

松村英生 (MATSUMURA HIDEO)

財団法人岩手生物工学研究センター・生命
科学研究部・主任研究員

研究者番号：40390885

(2)研究分担者

該当なし

(3)連携研究者

該当なし