

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2006～2008

課題番号：18780123

研究課題名 (和文) EST 情報を活用したスギ雄性不稔原因遺伝子の解明

研究課題名 (英文) Research on male sterility-related genes of sugi (*Cryptomeria japonica* D. Don) utilizing EST data

研究代表者

二村 典宏 (FUTAMURA NORIHIRO)

独立行政法人森林総合研究所・生物工学研究領域・主任研究員

研究者番号：80343804

研究成果の概要：スギの雄性不稔形質に関連する遺伝子を探索するため、既知の雄性不稔遺伝子と相同なスギ遺伝子を解析するとともに、雄性不稔個体と正常個体の雄花で発現する遺伝子の網羅的解析を行った。スギ遺伝子の網羅的解析には、既知のスギ EST 情報を利用して作製した DNA マイクロアレイを用いた。原因遺伝子の特定には至らなかったが、雄性不稔に関連する遺伝子を絞り込むことができた。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	1,200,000	0	1,200,000
2007年度	1,200,000	0	1,200,000
2008年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	300,000	3,700,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：林学・森林工学

キーワード：スギ、雄性不稔、遺伝子発現

1. 研究開始当初の背景

(1) スギ花粉の飛散量は年々増加する傾向にあり、スギ花粉症患者は日本の人口の 15% を超えたといわれている。近年、花粉が飛散しない雄性不稔スギが相次いで発見され、花粉症対策のための育種素材として注目されている。スギの雄性不稔の原因は花粉形成に関わる遺伝子の異常と推定されるが、その原因遺伝子は明らかになっていない。

(2) モデル植物であるシロイヌナズナやイネでは、花粉発達過程での様々な異常により雄性不稔となる突然変異体が解析され、その原因遺伝子が明らかになっている。また、こ

れらのモデル植物では、葯や花粉の形成時に発現する遺伝子が大規模に収集されている。しかし、樹木では、ラジアータマツで雄花特異的に発現する遺伝子がいくつか解析されているのみで、雄性不稔に関わる遺伝子の解析や雄花の発達過程で働く遺伝子の大規模解析は行われていなかった。

2. 研究の目的

本研究では、雄性不稔の原因となっている可能性のある候補遺伝子をスギの EST 情報から探索することを目的とする。EST とは、Expressed Sequence Tag の略で、細胞中で発現している遺伝子の RNA から合成された

DNA の部分塩基配列のことをいう。スギの EST 情報を集積し、バイオインフォマティクス (生物情報科学) 技術を活用することにより、EST 情報から雄性不稔原因遺伝子を選抜する。また、雄性不稔個体と正常個体の間で、候補遺伝子の発現量や発現部位の差異を比較解析し、花粉形成に果たす役割を検証する。

3. 研究の方法

(1) 植物材料

スギ雄性不稔家系として、(富山不稔 1 号 × ミオ 4 号) F1 と (富山不稔 1 号 × 東西原 2 号) F1 を掛け合わせた F2 家系の正常個体と雄性不稔個体を用いた。7 月末に 100ppm のジベレリン (GA3) を散布し、花芽形成を促進した。雄花分化初期の 8 月中旬から成熟花粉を形成する 11 月中旬にかけて、1 週間ごとにスギ雄花を採取し、一部を FAA (エタノール 50%、酢酸 5%、ホルマリン 10%) で固定し、残りを -80°C で保存した。固定したサンプルは、エタノールシリーズで脱水後パラフィン包埋し、マイクロトームで厚さ約 $6\mu\text{m}$ の切片を作成した。キシレン・エタノールシリーズで切片を脱パラフィンし、ヘマトキシリン及びエオジンで染色した後、光学顕微鏡下で観察した。

(2) スギ完全長 cDNA ライブラリーの作製と DNA シーケンシング

CTAB 法と SV Total RNA Isolation System (Promega) を用いた精製により、8 月中旬から 11 月中旬にかけて採取したスギ雄花から全 RNA を抽出し、poly(A)⁺RNA を調製した。これをもとにノーマライズ化された完全長 cDNA ライブラリーを作製した。ランダムにピックアップした cDNA クローンについて、cDNA 両端の塩基配列を決定し、クラスタリング及びアノテーションを行った。さらに、KOG データベースを用いて転写産物の機能分類を行った。

(3) EST 情報からの雄性不稔候補遺伝子群の抽出

シロイヌナズナなどで報告されている遺伝子情報をもとに、TBLASTN を使用してスギの EST 情報から雄性不稔候補遺伝子群を抽出した。相同性の検索条件は以下の通りである。雄性不稔性の原因遺伝子やタペータムで発現していることが知られている遺伝子と相同性を示す EST (E-value にかかわらず高いスコアのもの及び E-value $< 1e^{-21}$ のもの)、雄性不稔性の原因遺伝子 *MS1* と *MS2* に相同性を示す EST (E-value $< 1e^{-4}$)、雄性不稔性の原因遺伝子 *MIA* と *APT1* に相同性を示す EST

(E-value $< 1e^{-10}$)、単核期の小胞子で特異的に発現する遺伝子に相同性を示す EST (雄花完全長 cDNA 由来 EST から E-value $< 1e^{-38}$ の

もの、雄花もしくは葉芽由来 EST から E-value $< 1e^{-19}$ のもの)。

(4) スギ EST 情報をもとにしたマイクロアレイ作製

スギ EST 総数 56,268 を CAP3 アセンブラにより統合した。その結果をもとに 60 塩基からなるプローブを設計した。

(5) マイクロアレイを用いた雄性不稔原因遺伝子の探索

正常個体と雄性不稔個体それぞれ 7 個体ずつから調製した RNA を用いて、別々に DNA マイクロアレイ解析を行った。ビオチン標識、断片化、ハイブリダイゼーション及びスキヤンは、NimbleGen 社のシステムにより行った。

4. 研究成果

(1) 雄性不稔個体における花粉崩壊過程の観察

雄花分化初期の 8 月中旬から成熟花粉を形成する 11 月中旬にかけて、1 週間ごとにスギ雄花を採取し、正常個体と雄性不稔個体における花粉発達過程を観察した。その結果、花粉母細胞が減数分裂を行う時期までは、両者の間に違いは認められず、四分子を形成する 10 月中旬頃から小胞子の崩壊が認められた。(図 1)。

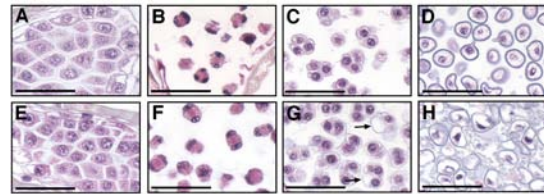


図1 スギ正常個体と雄性不稔個体における花粉発達過程
A-D: 正常個体の花粉発達過程。A: 花粉母細胞期。B: 減数分裂期。C: 四分子期。D: 小胞子期。
E-H: 雄性不稔個体の花粉発達過程。E: 花粉母細胞期。F: 減数分裂期。G: 四分子期。H: 小胞子期。
矢印は崩壊した花粉四分子(G)。スケールバーは50 μm

(2) スギ EST 情報の取得

スギ EST 情報の拡充のため、スギ雄花に由来する完全長 cDNA ライブラリーから 19,437 クローンの両末端の塩基配列を解析し、36,102 の EST を得た。クラスタリングの結果、10,463 種類の転写産物にまとめられた。既知のデータベースとの相同性検索によってアノテーションを行い、雄花で発現する遺伝子群の機能分類を行った (図 2)。KOG データベースを用いた機能分類の結果、全体の 70.4% にあたる 7,370 の転写産物について機能分類でき、様々なタイプの遺伝子が存在することが明らかになった。

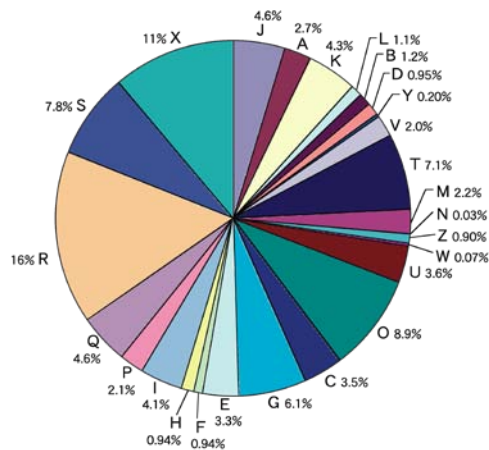


図2 スギ雄花完全長cDNAの機能分類

10,463種類のスギ雄花完全長cDNAのうち7,370について、相同性検索によりそれぞれの塩基配列がコードするタンパク質の機能分類した。J: タンパク質の翻訳、A: RNAのプロセッシングと修飾、K: 転写、L: DNAの複製・組換え・修飾、B: クロマチンの構造変換、D: 細胞周期・細胞分裂の制御、Y: 核構造、V: 防御機構、T: シグナル伝達、M: 細胞壁・細胞膜の合成、N: 細胞運動、Z: 細胞骨格、W: 細胞外構造、U: 細胞内輸送・分泌、O: タンパク質の翻訳後修飾・代謝、C: エネルギー生産・変換、G: 炭水化物の輸送・代謝、E: アミノ酸の輸送・代謝、F: 核糖の輸送・代謝、H: 補酵素の輸送・代謝、I: 脂質の輸送・代謝、P: 無機イオンの輸送・代謝、Q: 二次代謝成分の合成・輸送、R・S・X: 不明。

(3) スギ雄性不稔候補遺伝子の抽出

シロイヌナズナ等モデル植物のゲノム情報から、雄性不稔や花粉発達に関わる遺伝子の情報を収集した。雄性不稔の原因となる遺伝子、タペータムで発現する遺伝子、単核期の小胞子で発現する遺伝子を合計で739選び、拡充したスギEST情報と相同性検索した。その結果、254のスギESTが相同性を示した。

(4) DNA マイクロアレイ解析を用いた正常個体と雄性不稔個体の雄花における発現遺伝子の比較

① DNA マイクロアレイの設計

本研究で収集したスギ雄花由来のESTと既知のスギESTを合わせた総計56,000以上のEST情報を統合し、22,882のクラスタ配列にまとめた。クラスタ配列の塩基配列情報をもとに、各クラスタ配列に対応する複数の60merオリゴヌクレオチドプローブを設計し、DNAマイクロアレイを構築した。

② DNA マイクロアレイを用いた雄花発達過程における発現遺伝子の比較

9月下旬(花粉母細胞期)、10月中旬(減数分裂・四分体期)、11月初め(小胞子期)に、正常個体と雄性不稔個体の雄花から抽出したRNAを用いて、マイクロアレイによる発現遺伝子の網羅的解析を行った。

正常個体と雄性不稔個体との間で4倍以上の発現量の差が見られた転写産物数は、花粉母細胞期と減数分裂期ではそれぞれ20あまりであるのに対して、雄性不稔個体で小胞子が崩壊する時期には200以上存在することが明らかになった。花粉発達の初期段階で発現量に違いが見られた遺伝子のなかに、小胞子形成を制御する遺伝子があ

ると考えられる。また、小胞子期に発現量の差が見られた遺伝子は、小胞子形成に直接関わる遺伝子が多いとみられる。

マイクロアレイによる解析で発現量に違いが見られた転写産物には、相同性検索により雄性不稔候補遺伝子とされたスギESTが1種類含まれていた。このESTはシロイヌナズナの雄性不稔遺伝子のひとつである *MALE STERILITY2 (MS2)* と高い相同性を示した。減数分裂期において、雄性不稔個体の雄花では、この転写産物の発現量が正常個体の約10分の1程度に減少していた(図3)。しかし、花粉母細胞期や小胞子期では、両者の発現量の違いは殆ど認められなかった。減数分裂期におけるこの遺伝子の発現が、花粉形成に重要な役割を果たしている可能性がある。

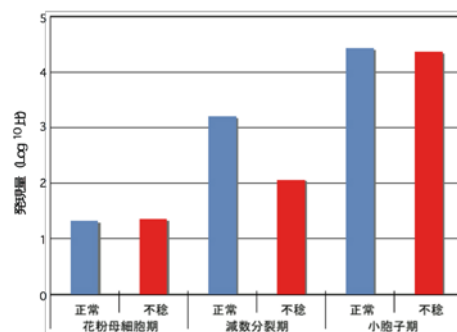


図3 スギMS2相同遺伝子の発現

以上のように、スギEST情報をもとに作成したDNAマイクロアレイを用いて、正常個体と不稔個体の雄花で発現する遺伝子を比較解析した結果、雄性不稔に関わる遺伝子を絞り込むことができた。今後、個々の遺伝子について詳細な解析をすることにより、雄性不稔の原因遺伝子の特定に結びつけたい。

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 Norihiro Futamura, Yasushi Totoki, Atsushi Toyoda, Tomohiro Igasaki, Tokihiko Nanjo, Motoaki Seki, Yoshiyuki Sakaki, Adriano Mari, Kazuo Shinozaki, Kenji Shinohara, Characterization of expressed sequence tags from a full-length enriched cDNA library of *Cryptomeria japonica* male strobili, BMC Genomics, 9, 383, 2008, 査読有
- ② Norihiro Futamura, Yasunobu Kusunoki, Yuzuru Mukai, Kenji Shinohara, Characterization of genes for a pollen allergen, Cry j 2, of *Cryptomeria*

japonica, International Archives of Allergy and Immunology, 143, 59-68, 2007、査読有

- ③ Norihiro Futamura, Tokuko Ujino-Ihara, Mitsuru Nishiguchi, Hiroyuki Kanamori, Kensuke Yoshimura, Masahiro Sakaguchi, Kenji Shinohara, Analysis of expressed sequence tags from *Cryptomeria japonica* pollen reveals novel pollen-specific transcripts, Tree Physiology, 26, 1517-1528, 2006、査読有

[学会発表] (計 9 件)

- ① 篠原健司、スギ雄花形成の機構解明、日本森林学会、2009年3月27日、京都大学
② 森口喜成、有用形質を支配する遺伝子座の単離に向けたスギ基盤連鎖地図の高度化、日本森林学会、2009年3月26日、京都大学
③ 二村典宏、スギ花粉の発達過程における発現遺伝子の網羅的解析、日本森林学会、2009年3月26日、京都大学
④ 篠原健司、樹木のバイオリソース、日本植物生理学会、2009年3月24日、名古屋大学
⑤ 二村典宏、マイクロアレイを用いたスギ雄性不稔に関連する遺伝子群の解析、日本植物生理学会、2009年3月22日、名古屋大学
⑥ 二村典宏、スギ雄性不稔家系の花粉発達過程に発現する遺伝子の網羅的解析、日本森林学会、2008年3月28日、東京農工大学
⑦ 二村典宏、スギ雄花で発現する遺伝子群の解析、日本森林学会、2007年4月2日、九州大学
⑧ 二村典宏、スギ雄花完全長 cDNA の大規模収集、日本植物生理学会、2007年3月29日、愛媛大学
⑨ Norihiro Futamura, Characterization of expressed sequence tags from the pollen of *Cryptomeria japonica*, 8th INTERNATIONAL CONGRESS OF PLANT MOLECULAR BIOLOGY, 2006年8月22日、アデレード

[その他]

ホームページ等

<http://forestgen.ffpri.affrc.go.jp>

6. 研究組織

(1) 研究代表者

二村 典宏 (FUTAMURA NORIHIRO)

独立行政法人 森林総合研究所・生物工学
研究領域・主任研究員

研究者番号：80343804