

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 4 月 12 日現在

機関番号：11301

研究種目：若手研究(S)

研究期間：2008～2012

課題番号：20678001

研究課題名（和文）アブラナ科植物の自家不和合性における自己・非自己識別機構の分子基盤

研究課題名（英文）Molecular basis of self/non-self recognition in self-incompatibility on cruciferous plants

研究代表者

渡辺 正夫 (WATANABE MASAO)

東北大学・大学院生命科学研究所・教授

研究者番号：90240522

研究成果の概要（和文）：

本研究では、*S* 遺伝子以外の原因で自家不和合性に変異した系統を遺伝解析し、原因遺伝子の単離を目的として、染色体のどの領域に変異が生じているかを明らかにした。シロイヌナズナの花粉側 *S* 因子の *SP11* に逆位がある系統を見だし、遺伝子改変、遺伝子導入により、自家不和合性にすることに世界で初めて成功した。受粉反応が起きる乳頭細胞を LMD で切り出し、次世代シーケンサーと組合せて、下流因子の候補の基盤構築も行った。

研究成果の概要（英文）：

In this project, at first, I tried to isolate mutated genes related to self-incompatibility (SI) signaling downstream by using combination between self-compatible mutants and QTL analysis. I identified QTL regulating SI downstream on several chromosomes. Secondly, from surveying *Arabidopsis* lines, I identified inversion on *SP11* gene functioning male *S* determinant. When repaired *SP11* on inversion was introduced into *Arabidopsis*, I succeeded to take SI *Arabidopsis* line, and published the data on International Journal "Nature". As other topics, I set up gene catalog expressing on papilla cell by using laser microdissection and next generation sequencer. For characterizing pollen-stigma interaction dynamics, I established time-lapse imaging system for observation by microscope.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	12,000,000	3,600,000	15,600,000
2009 年度	24,000,000	7,200,000	31,200,000
2010 年度	15,200,000	4,560,000	19,760,000
2011 年度	14,400,000	4,320,000	18,720,000
2012 年度	14,400,000	4,320,000	18,720,000
総計			

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農学・育種学

キーワード：アブラナ科植物，自家不和合性，花粉・柱頭相互作用，細胞内情報伝達，自家不和合性変異系統，遺伝子マッピング，遺伝子発現，分子マーカー

1. 研究開始当初の背景

アブラナ科植物 *Brassica campestris* (syn. *rapa*) の自家不和合性について、申請者らは *S* 遺伝子の実態・*S* 対立遺伝子間で生じる優劣性発現機構・*S* 遺伝子の下流で機能する *M* 遺伝子を明らかにしてきた。従来の研究が、*S*

遺伝子を中心とした研究であったことから、*S* 遺伝子の下流、つまり、*SP11* のシグナルを *SRK* が受容した後、どのようなシグナル分子が機能しているのか、*M* 遺伝子の他にはほとんど不明であった。

2. 研究の目的

アブラナ科自家不和合性研究において欠落している「*S* 遺伝子下流因子」を解明するために、*B. rapa* を材料とするだけでなく、同科のシロイヌナズナの遺伝資源を利用して、今まで展開されていない新規な試みで *S* 遺伝子の下流の全体像を解明する。

3. 研究の方法

B. rapa 自家和合性系統、自家不和合性シロイヌナズナは、分子遺伝学的解析と QTL 解析を融合することにより、原因遺伝子の単離・機能解析を行った。遺伝子単離の基盤情報として、乳頭細胞発現遺伝子を次世代シーケンサーで解析した。下流因子と自家不和合性反応の連関を見るために、花粉動態の動的解析技術の開発を行った。花粉 *S* 因子の影響を理解するために、優劣性解析も行った。

4. 研究成果

(1) *S* 遺伝子以外の変異による自家和合性変異系統の遺伝解析

425 系統の自然集団から見出した自家和合性系統(TSC4, TSC28)について、遺伝学的解析から *S* 遺伝子以外の変異によるものではないことを明らかにし、QTL 解析を行った。SSR マーカーにより構築された遺伝子地図上にマッピングしたところ、TSC4 の和合性因子は第3染色体上に、TSC28 は第1染色体上に位置しており、これらは新規の *S* 遺伝子下流因子をコードしていることを示した(Isokawa et al. 2010)。また、昨年公開された *B. rapa* のゲノム情報を活用し、原因遺伝子単離に向けた基盤が構築できた。

(2) シロイヌナズナ自家和合性原因解明と自家不和合性シロイヌナズナの作出

シロイヌナズナ Col-0 は SP11, SRK の変異により自家和合性となっているが、エコタイプ解析から、Wei-1 エコタイプが自家和合性になった原因は雄ずい側因子 SP11 の逆位であった。この逆位を修復した遺伝子を Wei-1 に導入したところ、シロイヌナズナの自家不和合性を復活させることに世界で初めて成功した。分子進化的な解析から、これら一連の遺伝的変異は~41 万年前にヨーロッパ中央部で起きたことを突き止め、シロイヌナズナの自家和合性になった原因を様々な角度から考察した(Tsuchimatsu et al. 2010)。

(3) 花粉側における *S* 対立遺伝子間の優劣性関係の分子メカニズム解明

アブラナ科植物の自家不和合性は胞子体的に機能することから、対立遺伝子間で優劣性が生じる。花粉側での優劣性は、優劣性の異なる対立遺伝子がヘテロになったときに、劣性対立遺伝子のプロモーター領域がメチ

ル化されることによって、発現が抑制されることは解明されていたが、そこに関わる分子メカニズムは不明であった。class I と class II のゲノム構造の比較、発現解析などから、優性対立遺伝子由来の低分子 RNA が劣性対立遺伝子のプロモーター領域をメチル化するエピジェネティック制御であることを証明した(Tarutani et al. 2010)。

(4) 乳頭細胞発現遺伝子の網羅的解析と遺伝子情報基盤構築

これまでの手法では、柱頭のサンプリングが困難であったため、レーザーマイクロディゼクション(LDM)により、自家不和合性反応に機能している乳頭細胞を切り出し、次世代シーケンサー(NGS)との融合で、局所的な遺伝子情報基盤を構築できると考えた。不和合性程度の異なる *Brassica rapa* 4 系統を材料に、網羅的トランスクリプトーム解析を行ったところ、約 11,800 種類の遺伝子が共通に発現していた。この乳頭細胞発現遺伝子情報は、自家不和合性反応、受粉反応の分子機構を解明する上でも有用な遺伝子情報となった。

(5) 柱頭上での花粉動態の動的解析と表現型評価基準構築

これまでの自家不和合性研究では、乳頭細胞上での不和合・和合反応については、細胞を固定し、染色する方法、あるいは、バイオアッセイ系として確立された1つの乳頭細胞上での花粉管動態観察であった。自然界では多数の花粉が柱頭に受粉し、それらが同時並行的に、様々な反応をすると考えられるが、詳細は不明である。そこで、表現型の違いが、*S* 遺伝子によるものか、下流因子によるものかかを解明するために、*S* 対立遺伝子の異なる3系統を用いて、実体顕微鏡下で観察した。初期反応の10分間で花粉吸水に不和合と和合で異なる反応が見られた。この結果から受粉反応を分類したところ、収縮、膨張、破裂、脈動、発芽、無反応という5パターンの表現型に分類できた。つまり、受粉における花粉の表現型は一様ではなく、*S* 対立遺伝子が同じでも個体間で差異があることから、下流因子の変異によると考えられた(Hiroi et al. in press)。

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 24 件)

- ① Watanabe, M., Suwabe, K., and Suzuki, G. (2012) Molecular genetics, physiology and biology of self-incompatibility in Brassicaceae. Proc. Jpn. Acad. Ser. B. 88: 519-535. (DOI: 10.2183/pjab.88.519) (査読あり)

- ②Tsuchimatsu, T., Suwabe, K., Shimizu-Inatsugi, R., Isokawa, S., Pavlidis, P., Stadler, T., Suzuki, G., Takayama, S., Watanabe, M., and Shimizu, K. K. (2010) Evolution of self-compatibility in *Arabidopsis* by a mutation in the male specificity gene. *Nature* 464: 1342-1346. (DOI: 10.1038/nature08927) (査読あり)
- ③Isokawa, S., Osaka, M., Shirasawa, A., Kikuta, R., Komatsu, S., Horisaki, A., Niikura, S., Takada, Y., Shiba, H., Isogai, A., Takayama, S., Suzuki, G., Suwabe, K., and Watanabe, M. (2010) Novel self-compatible lines of *Brassica rapa* L. isolated from the Japanese bulk- populations. *Genes Genet. Syst.* 85: 87-96. (https://www.jstage.jst.go.jp/article/ggs/85/2/85_2_87_article) (査読あり)
- ④Tarutani, Y., Shiba, H., Iwano, M., Kakizaki, T., Suzuki, G., Watanabe, M., Isogai, A., and Takayama S. (2010) *Trans*-acting small RNA determines dominance relationships in *Brassica* self-incompatibility. *Nature* 466: 983-986. (DOI: 10.1038/nature09308) (査読あり)
- ⑤Suwabe, K., Suzuki, G., and Watanabe, M. (2010) Achievement of genetics in plant reproduction research: past decade for coming decade. *Genes Genet. Syst.* 85: 297-310. (DOI: 10.1266/ggs.85.297) (査読あり)
- ⑥ Watanabe, M. (2008) Towards a comprehensive understanding of molecular mechanisms of sexual reproduction in higher plants. *Plant Cell Physiol.* 49: 1404-1406. (DOI: 10.1093/pcp/pcn138) (査読あり)

他 18 件

[学会発表] (計 80 件)

- ① Osaka, M., Matsuda, T., Kobushiro, Y., Nagasaka, K., Takahashi, T., Nakazono, M., Suzuki, G., Lim, Y.-P., Suwabe, K., and Watanabe, M. (2012) Laser Microdissection-Next Generation Sequence Transcriptome Analysis in the Papilla Cell of *Brassica rapa*. *Plant and Animal Genome XX*, Jan 14-18, San Diego, CA, USA.
- ② Hiroi, K., Suwabe, K., Suzuki, G., and Watanabe, M. (2012) Analysis of Pollen Behavior on *Brassica* Self-Incompatibility. *Plant and Animal Genome XX*, Jan 14-18, San Diego, CA, USA.
- ③大坂正明, 松田智貴, 藤岡智明, 坂園聡美, 高橋宏和, 中園幹夫, 岩野恵, 高山誠司, Yong Pyo Lim, 鈴木剛, 訪部圭太, 渡辺正夫 (2012) アブラナ科植物における乳頭細胞特異的発現遺伝子群の情報基盤構築. 第 122 回日本育種学会講演会, 京都市, 2012/09/14.
- ④渡辺正夫 (2011) アブラナ科植物の自家不和合性--花粉と雌ずいにおける自他識別分子機構--. 東京大学大学院総合文化研究科特別セミナー, 東京, 2011/07/01.
- ⑤ Watanabe, M., Suwabe, K., Suzuki, G., Shimizu, K. K., and Takayama, S. (2011) Self- incompatibility in Brassicaceae --Molecular recognition mechanism of self and non-self and dominance relationship between alleles--, *Plant and Animal Genome 2010*, San Diego, USA, 2011/01/15-19.
- ⑥渡辺正夫, 諏訪部圭太, 鈴木剛, 清水健太郎, 高山誠司 (2010) アブラナ科植物の自家不和合性における花粉・雌ずい認識分子メカニズム. *BMB2010*, 神戸, 2010/12/07-10.
- ⑦渡辺正夫, 諏訪部圭太, 鈴木剛, 清水健太郎, 高山誠司 (2010) 自家不和合性: 細胞間相互作用による生物多様性の獲得. 日本遺伝学会第 82 回札幌大会, 札幌, 2010/09/20-22.
- ⑧Tsuchimatsu, T., Suwabe, K., Shimizu-Inatsugi, R., Isokawa, S., Pavlidis, P., Stadler, T., Suzuki, G., Takayama, S., Watanabe, M., and Shimizu, K. K. (2010) Evolution of self-compatibility in *Arabidopsis* by a mutation in the male specificity gene. "Evolution 2010", Oregon, USA, 2010/06/25-29.
- ⑨ Suwabe, K., Isokawa, S., Shirasawa, A., Takada, Y., Suzuki, G., Isogai, A., Takayama, S., and Watanabe, M. (2009) Genetic characterization of self-compatible mutants in *Brassica rapa*. *Plant Biology 2009*, Hawaii, USA, 2009/07/17-23.
- ⑩渡辺正夫 (2009) 植物の生殖と自家不和合性. 鹿児島大学大学院・理工学研究科特別セミナー, 鹿児島, 2009/05/20.
- ⑪渡辺正夫 (2009) アブラナ科植物の多様性 --自家不和合性と形態. 福井県立大学・生物資源学部特別セミナー, 永平寺町, 2009/03/16.
- ⑫渡辺正夫 (2008) 高等植物の自家不和合性における自他識別と生殖制御因子., 「階層構造の科学+現象数理学」研究会, 熱海, 2008/11/30-12/01
- ⑬ Watanabe, M., Isokawa, S., Takada, Y., Suwabe, K., Isogai, A., Takayama, S., and Suzuki, G. (2008) Molecular mechanism of self/non-self recognition in *Brassica* self-incompatibility. 2008 IU-UGAS/ IU-GSA/ IU-COE Joint Symposium - The Effect of Climate Change on Biological Systems in Cold Regions -, Iwate, Japan, 2008/10/27-29.
- ⑭渡辺正夫 (2008) アブラナ科植物の自家不和合性の分子認識機構., 九州工業大学工

学部セミナー, 飯塚, 2008/10/09

- ⑫ Isokawa, S., Shirasawa, A., Takada, Y., Suwabe, K., Suzuki, G., Isogai, A., Takayama, S., and Watanabe, M. (2008) Genetic analysis of self-compatible mutants in Brassica rapa. 19th International Conference on Arabidopsis Research, Montreal, Canada, 2008/07/23-27. 他 65 件

[図書] (計 21 件)

- ①渡辺正夫 (2011) 3.5 植物科学分野の文献調査法. (In 農学・生命学のための学術情報リテラシー, 齋藤忠夫編著), 浅倉書店, pp84-99.
- ②渡辺正夫 (2011) あすを拓く--innovation--渡辺正夫氏 東北大学 大学院生命科学研究科 教授, 宮城県発行・人材育成情報誌「O-ga-le!」, 5: 16-17.
- ③渡辺正夫 (2010) 化学の本だな・読書のススメ. 化学, 65: 44.
- ④渡辺正夫, 高山誠司 (2009) "自家不和合性関連用語 10 項目", In "植物ゲノム科学辞典", 朝倉書店, p56, 57, 150.
- ⑤Watanabe, M., Suzuki, G., and Takayama, S. (2008) Chapter 7 "Milestones identifying self-incompatibility genes in Brassica species: From old stories to new findings", In "Self-incompatibility in Flowering Plants - Evolution, Diversity, and Mechanisms" (Ed.: V. E. Franklin-Tong), Springer, pp151-172.
- ⑥渡辺正夫, 鈴木剛, 高山誠司 (2008) "自家不和合性", In "分子細胞生物学辞典", 東京化学同人, pp399-400. 他 14 件

[その他]

- (1) ホームページ

<http://www.ige.tohoku.ac.jp/prg/watanabe/>
<http://www.ige.tohoku.ac.jp/prg/watanabe/project-startup/>

- (2) 受賞

- ①渡辺正夫 (2011) アブラナ科植物の自家不和合性における自他識別責任遺伝子座の同定と分子識別機構の解明 (第 7 回(平成 22 年度)日本学術振興会賞) 他 2 件 (計 3 件)

- (3) 新聞記事等

- ①気合と根性で挑戦 東北大院 渡辺教授 後輩にエール 今治西高. 愛媛新聞, 2012 年 11 月 19 日.
- ②FM ラヂオバリバリ・「すっぴん小町」ゲスト出演, FM ラヂオバリバリ, 2012 年 11 月 13 日.
(<http://www.ige.tohoku.ac.jp/prg/watanabe/> から視聴可能)

- ③道標 ふるさと伝言 実体験の大切さ、今の子どもに教えよう. 愛媛新聞, 2012 年 1 月 8 日.

- ④小松高 1 年生 進路を考える. 北國新聞, 2011 年 10 月 8 日.

- ⑤被災児童癒やす授業、渡辺・東北大教授(今治出身)、農学テーマ出前講座、放射線量も測定も. 愛媛新聞, 2011 年 7 月 3 日.

- ⑥遺伝子操作で自家受粉ブロック 品種改良効率に光 東北大・渡辺教授ら成功. 読売新聞, 2010 年 4 月 19 日.

- ⑦自家受粉 遺伝子の働き解明 東北大 作物への応用期待. 日経産業新聞, 2010 年 4 月 19 日.

- ⑧「かがく de ムチャミタス」番組、「春が来た、菜の花」の回. テレビ大阪, 2009 年 4 月 4 日.

- ⑨「てらスクール」で命みつめる. 下野新聞, 2008 年 8 月 12 日. 他 45 件 (計 54 件)

- (4) アウトリーチ活動

- ①大阪府立天王寺高等学校「進化論を唱えたダーウィンも注目した高等植物の自家不和合性」(2012), 大阪, 2012/11/21

- ②愛媛県立今治西高等学校「今西 35 期、一(いち)卒業生が見た教育、研究、人生---今西在学中、卒業後、そして出前講義に伺い、考えたこと---」(2012), 今治, 2012/11/13

- ③金光学園中学高等学校・課題研究合同発表会・助言者(2012), 浅口, 2012/11/10

- ④兵庫県立豊岡高等学校「進化論を唱えたダーウィンも注目した高等植物の自家不和合性」(2012), 豊岡, 2012/10/06

- ⑤秋田県教育委員会高校教員研修・特別講演「高大連携: 課題研究をモデルとして」「研究室見学」(2012), 仙台, 2012/08/01

- ⑥山形県立鶴岡南高等学校「バナナから DNA を」「自家不和合性、植物の生殖」(2012), 仙台, 2012/03/22

- ⑦埼玉県立浦和第一女子高等学校「高等植物における受粉反応の観察」(2011), さいたま, 2011/09/8

- ⑧今治自然科学教室「博士になろう! 研究をしてみよう! -東北大・渡辺教授はどのような子ども時代を過ごし、研究者になったのだろうか?」(2011), 今治, 2011/03/5

- ⑨岩手県矢巾町立徳田小学校「花の不思議な世界--りんごの花からリンゴができるまで?」(2010), 矢巾, 2010/12/20

- ⑩栃木県立宇都宮女子高等学校「進路を決めるために必要なことは?」-東北大・生命科学・渡辺教授はどのような子ども時代を過ごし、どうやって進路を決めたのだろうか?」(2010), 宇都宮, 2010/10/25

- ⑪香川県立観音寺第一高等学校「博士になるとは? 研究者とは? ---いろいろな出会い

- があり、決断があり、そして。。。---」(2010),
観音寺, 2010/06/9
- ⑫石川県立小松高等学校「進化論を唱えたダー
ウインも注目した高等植物の自家不和
合性--花粉と雌しべの細胞間コミュニケ
ーションとその分子機構--(2009), 小松,
2009/12/18
- ⑬広島県立広島国泰寺高等学校「進化論を唱
えたダーウインも注目した高等植物の自
家不和合性--花粉と雌しべの細胞間コミ
ュニケーションとその分子機構--」(2009),
広島, 2009/10/28
- ⑭青森県立弘前高等学校「研究職になるに
は・・・」(2009), 弘前, 2009/10/17
- ⑮和歌山県立日高高等学校「アブラナ科植物
の多様性と自家不和合性」(2009), 御坊,
2009/07/14
- ⑯仙台市立七北田小学校「キャベツとプロッ
コリー--何が同じで何が違うの??--」
(2009), 仙台, 2009/06/16
- ⑰鹿児島県立錦江湾高等学校「ダイコン多様
性の意味・意義と生育調査・遺伝的交配実
験」(2009), 鹿児島, 2009/05/21
- ⑱工学院大学附属中学高等学校「植物の生殖
システムにおける最近のトピックス--自
他識別が起きる自家不和合性反応と受精
反応--」(2008), 八王子, 2008/12/16
- ⑲沖縄県立八重山高等学校「植物の生殖シス
テムにおける最近のトピックス--自他識
別が起きる自家不和合性反応と受精反応
--」(2008), 石垣, 2008/11/19-21
- ⑳福島県立福島高等学校「アブラナ科植物の
形態的多様性とその意義」(2008), 福島,
2008/05/26
- 他 370 件 (計 390 件)

6. 研究組織

(1)研究代表者

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