

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 6 月 15 日現在

機関番号：82105

研究種目：基盤研究(B) (一般)

研究期間：2013～2015

課題番号：25292093

研究課題名(和文) RNA分解酵素の発現制御によるスギの雌雄両性不稔化技術の開発

研究課題名(英文) Towards male and female sterility of *Cryptomeria japonica* by barnase expression control

研究代表者

谷口 亨 (Taniguchi, Toru)

国立研究開発法人 森林総合研究所・林木育種センター・課長

研究者番号：00360470

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,400,000円

研究成果の概要(和文)：遺伝子組換えスギを安定的に作製するために、遺伝子導入のターゲットとなる不定胚形成能力を有する胚性細胞の液体窒素中での保存技術を開発した。また、バルナーゼにより雄性不稔化したスギの不稔形質安定性と成長の健全性を温室栽培により確認した。また、雌性生殖器官での発現遺伝子を網羅的に解析し、栄養器官で発現しない遺伝子を特定し、これらの遺伝子の雌性生殖器官の発達段階別の発現様式を明らかにした。これらの成果は、種子による遺伝子拡散を抑制した無花粉スギの作製に活用できる。

研究成果の概要(英文)：Cryo-preservation methods of embryogenic cells were developed for being ready to produce transgenic *Cryptomeria japonica*. Transgenic *C. japonica* expressing barnase controlled by male cone specific promoter were stably male sterility and grew identically to non-transgenic trees in a greenhouse. By comprehensive analysis of expressing genes at female reproductive organs, we collected the genes which did not expressed at vegetative organs, and elucidated spatiotemporal expression pattern of the genes associated with female reproductive development. These results will be useful for the production of non-pollen *C. japonica* without transgene dispersal by seeds.

研究分野：森林科学

キーワード：育種 遺伝子組換えスギ 雄性不稔 雌性不稔 凍結保存

1. 研究開始当初の背景

スギ花粉症対策として雄性不稔化遺伝子を用いた組換えスギの作製技術の開発を進め、遺伝子組換えでスギを雄性不稔化できることが示唆された。一方、この技術を実用化するためには、雄性不稔化形質の安定性や成長形質への影響の評価による導入遺伝子の効果の検証が必要である。また、種子による組換えスギからの遺伝子拡散を防止するためには、雌性不稔化技術の開発も必要である。また、遺伝子導入を安定的に行うためには、スギの胚性細胞の凍結保存技術も求められる。

2. 研究の目的

遺伝子組換えによる雄性不稔化スギを実用化するための基盤研究として、(1)スギの胚性細胞(バイオリソース)整備、(2)雄性不稔化スギの特性評価、(3)雌性不稔化のための遺伝子情報の整備を行う。

3. 研究の方法

(1) 胚性細胞(バイオリソース)整備

スギの遺伝子導入では、不定胚形成能力を有する胚性細胞にアグロバクテリウム法で遺伝子組換えを行い、不定胚経路で組換えスギを誘導する。しかし、スギの胚性細胞の胚形成能力は継代培養において喪失することから、安定的に遺伝子組換えスギを作製するためには、胚性細胞の液体室素中での保存技術の開発が必要である。そこで、スギの精英樹等の人工交配を行い、7月上旬に未熟種子より不定胚形成能力を有する胚性細胞を誘導した。約半年間、継代培養を繰り返して増殖した胚性細胞を材料とし、液体室素中での培養細胞の保存条件を検討した。保存方法はシロイヌナズナ、イネ、タバコ等の培養細胞で報告されている緩速予備凍結法を参考とした(文献1)。また、最適化したと考えられる保存条件で複数系統の胚性細胞を供試し、その汎用性を評価した。

(2) 雄性不稔化スギの特性評価

*Bacillus amyloliquefaciens*由来のRNA分解酵素(リボヌクレアーゼ)であるバルナーゼを雄花で特異的に高発現させることにより、花粉形成を阻害した。また、雄花以外で異所的に発現するバルナーゼの活性を阻害するために *Bacillus amyloliquefaciens* 由来のリボヌクレアーゼインヒビターであるバルスターを構成発現させた。バルナーゼとバルスターの発現を制御するプロモーターを数種類組み合わせ合わせたベクター(図1)を作製し、アグロバクテリウム法でスギの胚性細胞に遺伝子導入した。カナマイシンにより選抜した組換え細胞より不定胚経路で植物体を作製し、閉鎖系温室で順化後に特定網室で栽培した。その後、花粉形成能力を3年間、成長形質を2年間調査した。

花粉形成能力の評価は、ジベレリンを7月

月上旬に枝葉に浸漬処理して誘導した雄花の切片観察により実施した。ジベレリン処理当年の12月まで、野生型スギと遺伝子組換えスギの雄花を採取し、FAAで固定後に凍結ミクロトームを用い、川本法(文献2)で雄花の縦切片を作製した。ヘマトキシリンとエオジンで染色し、野生型スギと遺伝子組換えスギの花粉発達を比較した。成長量の比較は、6月から8月にかけて苗高を測定し、1日当たりの伸長生長量を遺伝子組換えスギと野生型スギで比較した。

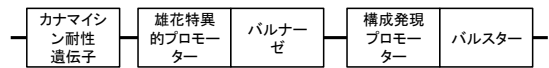


図1 雄性不稔化のためにスギに導入したベクターのT-DNA領域の概要

(3) 雌性不稔化のための遺伝子情報

雌性生殖器官における発現遺伝子を単離するため、7月末の雌花分化前の枝先端と、8月上旬のジベレリン噴霧処理による着花誘導後3週間ごとに約11ヶ月間雌花を採取した。採取した雌花はFAAで固定後、10%シヨ糖溶液で置換し、川本法(文献2)により凍結切片を作製した。胚珠および造卵器の発達段階を観察することで、ジベレリン処理前、胚珠分化前、胚珠形成期、休眠期、開花前、開花・減数分裂期、造卵器形成期の計7ステージに分類した。次に、cryomicrodissection法により胚珠組織を単離した。すなわち、採取した雌花を凍結後、ドライアイスで低温環境にした実体顕微鏡下で雌花の苞鱗をマイクロピンセットで除去し、露出させた胚珠のみをマイクロチューブへ回収した。回収した組織よりPicoPure RNA Isolation Kit (Arcturus)を用いてtotal RNAを抽出し、前述の7ステージと栄養器官(シュート、根、ジベレリン無処理の枝先端)ごとにtotal RNAを等量ずつ混合した。得られたRNAからMint-2 cDNA synthesis kit (Evrogen)を用いてcDNAライブラリーを作製し、GS-FLX Titanium (Roche)によるRNA-seqを行った。得られたESTをアセンブルして得られたunigeneはBLASTXによる相同性検索とBlast2GO (Biobam)によるアノテーション解析を行った。また、GS Reference Mapper (Roche)によるunigeneへの再マッピングを行い、得られたリードカウントデータについて、TCCパッケージ(文献3)を用いたiDEGES/DESeq-DESeq解析パイプラインによる正規化と発現変動遺伝子の抽出を行った。得られた候補遺伝子の発現変動を調査するため、前述の抽出RNAからHigh-Capacity RNA-to-cDNA Kit (Thermo Fisher Scientific)によりcDNAを合成し、3'または5'非翻訳領域をPCR増幅するプライマーと、Power SYBR Green PCR Master Mix (Thermo Fisher Scientific)を用いてリアルタイムRT-PCRを行った。

#### 4. 研究成果

##### (1) 胚性細胞 (バイオリソース) 整備

緩速予備凍結法によるスギの胚性細胞の凍結保存方法を検討し、以下の最適と考えられる条件を見出した。胚性細胞を凍結防御液 (LSP 液: 2M グリセリン、0.4M しよ糖、プロリン 1g/L を含む液体の継代培養培地) に懸濁し、60rpm で 90 分間震盪する。その後、細胞を LSP 液とともに凍結保存用のバイアルに入れ、発砲スチロール製の容器にセットし、 $-30^{\circ}\text{C}$  で 6 時間保持することにより緩速予備凍結を行う。その後、バイアルを液体窒素に投入し、急速凍結する。液体窒素中に 1 時間以上保持した後に  $40^{\circ}\text{C}$  の温水に入れ、急速融解する。2 枚重ねのろ紙上に培養細胞を広げ、翌日に上側のろ紙を新しい培地に移す。

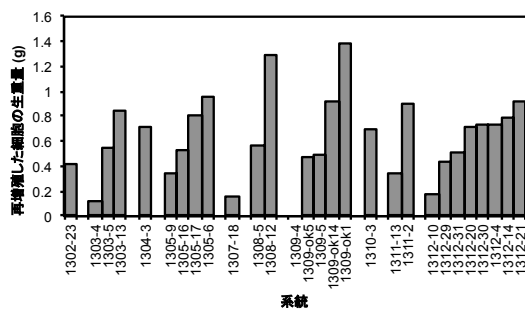


図 2 液体窒素保存したスギの胚性細胞の融解後の増殖に及ぼす胚性細胞の系統の影響 (融解 4 週間後の生重量を示す)

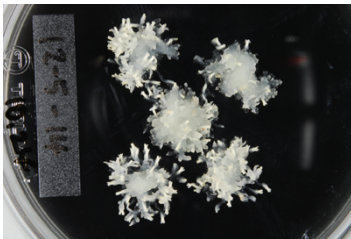


図 3 液体窒素保存したスギの胚性細胞から誘導した不定胚

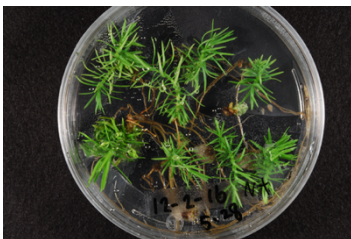


図 4 液体窒素保存したスギの胚性細胞から誘導した不定胚に由来する幼植物体

この方法により液体窒素に入れ、融解 4 週間後に再増殖する細胞が見られた場合、凍結保存が成功したと判定した。また、再増殖した細胞のシャーレ 1 枚当たりの生重量を測定した。28 系統の培養細胞の凍結保存を試みたところ、27 系統 (96%) で再増殖が確認さ

れた (図 2)。このことより、本方法は汎用性の高い保存方法であると判断した。液体窒素から出してから再増殖を開始する期間は系統により異なり、再増殖の早い系統は 4 週間後の細胞の生重量が大きくなる傾向が見られた。また、融解後にろ紙上で再培養する細胞量も凍結保存の正否や融解後の再増殖までの早さに影響した。

液体窒素から出した細胞を不定胚誘導培地で培養したところ、液体窒素に浸けていない細胞と同様に不定胚を形成し (図 2)、発芽して植物体となった (図 3)。これらのことより、本研究で開発した方法は、不定胚を経由した植物体再分化能力を安定的に維持できる胚性細胞の保存に有効と考えられた。

##### (2) 雄性不稔化スギの特性評価

バルナーゼの発現を制御する雄花特異的遺伝子のプロモーターとして *CjMALE1* プロモーター (文献 4) を使い、バルスターの発現の制御には *nos* プロモーターを用いた場合、最も完全な雄性不稔化スギが得られることが 3 カ年間の観察により明らかになった。すなわち、この遺伝子組換えスギでは、花粉母細胞期までは野生型スギと同様だが、野生型スギが四分母期を経て小孢子期になった時、組換えスギは四分母期に進まず、野生型スギでタペート層の分解が観察される時期には組換えスギの花粉母細胞は崩壊する。野生型スギが成熟花粉期となる 12 月後半には組換えスギの花粉嚢は空洞化した (図 5)。樹高伸長速度を野生型と比較すると、供試した 3 系統ともに野生型と有意な差は認められなかった (図 6) (Tukey HRD,  $P < 0.05$ )。これらの系統は、大臣承認を得て、平成 27 年度から 3 年間の予定で隔離ほ場で野外栽培試験を実施している。

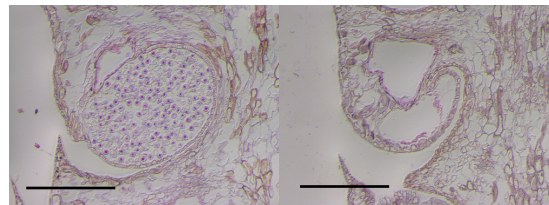


図 5 網室栽培 2 年目の雄性不稔化した遺伝子組換えスギの花粉嚢切片 (左が野生型、右が組換えスギ、バーは 0.5mm)

スギの雄花での発現の特異性が高い遺伝子 (文献 5) のプロモーターでバルナーゼの発現を制御した組換えスギも作製し、花粉形成能を調査した。その結果、発達途中で花粉分化が阻害されたと考えられる異形な花粉細胞が花粉嚢に存在していた。この異形細胞は、花粉発芽能力を持たず、得られたスギは雄性不稔化スギであると考えられた。しかし、野生型との成長比較では成長が阻害される場合も見られた。

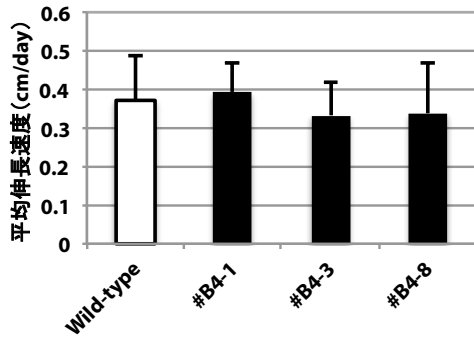


図 6 雄性不稔化した遺伝子組換えスギ (#B4-1, #B4-3, #B4-8) と野生型スギの網室栽培 2 年目の成長比較

### (3) 雌性不稔化のための遺伝子情報

雌花の発達段階により区分した 7 ステージ由来の胚珠と栄養器官からの cDNA ライブラリーについて、2.5 プレートを用いた GS-FLX Titanium による RNA-seq を行った結果、総計約 376 万リード、約 1.5 Gbp の EST が得られた。得られた EST のアセンブルにより、約 3 万の isotig、約 15 万の singleton、合計約 19 万の unigene の取得に成功した。Unigene の約 3 割に公共データベース上で相同性のある遺伝子とヒットし、アノテーションが付与された。アノテーション解析の結果から、ジベレリン処理後の胚珠分化前と胚珠形成期には転写や翻訳に関する遺伝子が、開花・減数分裂期、造卵器形成期には代謝や輸送に関する遺伝子が多く発現することが示唆された。

雌花で特異的に発現する遺伝子を選抜するため、unigene ヘマッピングしたリードカウントデータについて、栄養器官と各ステージについてそれぞれ 2 群間の比較解析を行い、発現変動した候補遺伝子の上位 500 遺伝子のうち発現上昇が検出された遺伝子をピックアップした。その結果、全ステージから総計 556 遺伝子の発現変動遺伝子が抽出された。これら発現変動遺伝子にはシロイヌナズナの *AGAMOUS* や *AGL6* 等の MADS-box や、それらの発現を制御している *CLV*、*WUS*、*LFY*、*UFO* 等の転写因子、substilase 等のペプチダーゼと相同性の高い遺伝子が多く存在していた。リアルタイム RT-PCR の結果、*AGAMOUS* や *AGL6* と相同性のある遺伝子は根とシュートの栄養器官では発現しないが、ジベレリン処理後の胚珠原基、胚珠、造卵器で発現上昇することが明らかとなった(図 7)。また、substilase と相同性のある遺伝子は造卵器形成期に特異的に発現上昇することも明らかとなった(図 7)。雄性不稔化の手法と同様に、これら雌性生殖器官特異的な発現遺伝子のプロモーターが雌性不稔化へ利用できると考えられる。

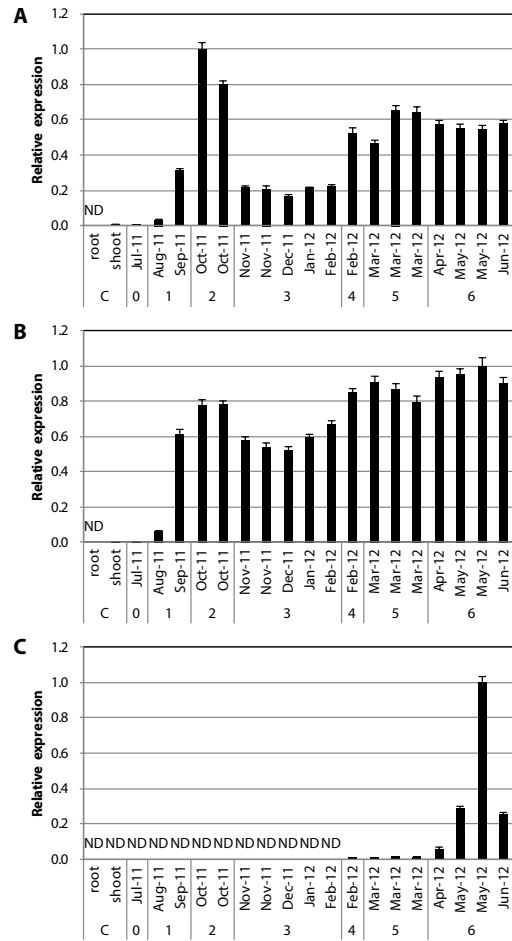


図 7 リアルタイム RT-PCR による発現解析 A: *AGAMOUS* 様遺伝子、B: *AGL6* 様遺伝子、C: substilase 様遺伝子。X 軸はサンプリング日、その下の数値は発達ステージを示す。C: 栄養器官、0: ジベレリン処理前、1: 胚珠分化前、2: 胚珠形成期、3: 休眠期、4: 開花前、5: 開花・減数分裂期、6: 造卵器形成期。ND は検出限界以下を示す。

本研究において、不定胚形成能力を安定的に保持するための胚性細胞の液体窒素中での保存技術が開発でき、スギの遺伝子組換えを安定的にできる条件が整った。雄性不稔化に関しては、温室内の評価では雄性不稔性と健全な成長性を確認することができた。また、雌性不稔化に利用可能な雌性生殖器官で特異的に機能する遺伝子を同定することができた。これらのことより、遺伝子組換えによるスギの雌雄両性不稔化の基盤が整ったと考えられる。

### <引用文献>

- Ogawa Y, Sakurai N, Oikawa A, Kai K, Morishita Y, Mori K, Moriya K, Fujii F, Aoki K, Suzuki H, Ohta D, Kazuki Saito K, Shibata D (2012). High-throughput cryopreservation of plant cell cultures for functional

- genomics. *Plant and Cell Physiology*, 53(5), 943-952.
2. Kawamoto T. (2003) Use of a new adhesive film for the preparation of multi-purpose fresh-frozen sections from hard tissues, whole-animals, insects and plants. *Archives of histology and cytology*, 66(2), 123-143.
  3. Sun J, Nishiyama T, Shimizu K, Kadota K (2013) TCC: an R package for comparing tag count data with robust normalization strategies. *BMC Bioinformatics*, 14:219
  4. Kurita M, Konagaya K, Watanabe A, Kondo T, Ishii K, Taniguchi T (2013) The promoter of an A9 homolog from the conifer *Cryptomeria japonica* imparts male strobilus-dominant expression in transgenic trees. *Plant Cell Reports* 32:319-328
  5. Kurita M, Taniguchi T, Nakada R, Kondo T, Watanabe A (2011) Spatiotemporal gene expression profiles associated with male strobilus development in *Cryptomeria japonica* by suppression subtractive hybridization. *Breeding science*, 61: 174-182

#### 5. 主な発表論文等

[雑誌論文] (計1件)

- ① Konagaya K, Kurita M, Taniguchi T (2013) High-efficiency *Agrobacterium*-mediated transformation of *Cryptomeria japonica* D. Don by co-cultivation on filter paper wicks followed by meropenem treatment to eliminate *Agrobacterium*. *Plant Biotechnology* 30:523-528 (査読有)

[学会発表] (計5件)

- ① 小長谷賢一、栗田学、二村典宏、櫻井哲也、篠原健司、谷口亨. スギにおける雌性生殖器官の遺伝子発現プロファイリングと EST データベースの構築. 日本植物細胞分子生物学会大会・シンポジウム講演要旨集 32:130. 2014年8月21~22日. アイーナ岩手県民情報交流センター (岩手県盛岡市)
- ② 谷口亨、小長谷賢一、栗田学. 緩速予備凍結法によるスギの不定胚形成細胞の超低温保存. 日本植物細胞分子生物学会大会・シンポジウム講演要旨集 31:159. 2013年9月10~12日. 北海道大学 (北海道札幌市)
- ③ Konagaya K, Kurita M, Tsubomura M, Hirao T, Watanabe A, Ishii K, Taniguchi T (2013年5月) Induction of

male sterility in transgenic sugi (*Cryptomeria japonica*) by barnase/barstar system. Abstracts of IUFRO Tree Biotechnology 2013 (Asheville, USA) SI.P07

[図書] (計1件)

- ① Konagaya K, Taniguchi T "Somatic Embryogenesis and Genetic Transformation in Cupressaceae Trees." *Somatic Embryogenesis in Ornamentals and Its Applications*. Springer India, 2016. 203-216.

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

谷口 亨 (TANIGUCHI, Toru)  
国立研究開発法人森林総合研究所・林木育種センター・課長  
研究者番号：00360470

##### (2) 研究分担者

小長谷 賢一 (KONAGAYA, Ken-ichi)  
国立研究開発法人森林総合研究所・森林バイオ研究センター・主任研究員  
研究者番号：30582762

栗田 学 (KURITA, Manabu)  
国立研究開発法人森林総合研究所・林木育種センター九州育種場・室長  
研究者番号：40370829