

## 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 24 年 4 月 9 日現在

機関番号：14101

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22780002

研究課題名（和文）シロイヌナズナを用いたアブラナ科自家不和合性機構の解明

研究課題名（英文） Study of the self-incompatibility system in *Arabidopsis thaliana*.

研究代表者

諏訪部 圭太（SUWABE KEITA）

三重大学・大学院生物資源学研究科・准教授

研究者番号：50451612

研究成果の概要（和文）：重要な育種形質の 1 つである自家不和合性は、近交弱勢を回避し種内の多様性を維持する遺伝的機構としてダーウィンによる発見以来精力的に研究が行われている。本研究は、遺伝学および乳頭細胞トランスクリプトーム解析によって、遺伝資源・ゲノム情報などで優れるアブラナ科モデル植物シロイヌナズナでの本機構崩壊の歴史・過程と自家不和合性ネットワークに関与する遺伝子群を明らかにした。

研究成果の概要（英文）：Self-incompatibility is defined as the inability of a fertile hermaphrodite plant to produce zygotes after self-pollination. In this research, we elucidated causal reasons of a disruption of the self-incompatibility system in *Arabidopsis thaliana*. Also, we obtained gene information involving in a self-incompatibility network, by the Laser Microdissection-Next Generation Sequencing transcriptome analysis of *Arabidopsis* papilla cell.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010 年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2011 年度	1,300,000	390,000	1,690,000
年度			
年度			
年度			
総計	2,700,000	810,000	3,510,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：農学・育種学

キーワード：シロイヌナズナ・自家不和合性・自他認識下流因子・シグナル伝達・柱頭・近縁野生種・トランスクリプトーム・次世代シーケンサー

## 1. 研究開始当初の背景

F<sub>1</sub> 品種を中心とする現在の植物育種では、効率的かつ確実に F<sub>1</sub> を作出するために自家不和合性が利用されている。しかしながら、本機構の分子メカニズムは大部分が未解明

で、一番研究の進んでいるアブラナ科植物においても雌雄自他認識因子と下流因子のごく一部が同定されているに過ぎない。

## 2. 研究の目的

これまでに、シロイヌナズナにおける自家不和合性の崩壊は雄性自他認識因子 *SP11/SCR* の機能喪失が原因であることを明らかにした。この情報を起点に、その機能喪失の詳細を明らかにするとともに、自他認識反応から自家受粉の拒絶・他家花粉の受け入れに至る一連のアブラナ科自家不和合性分子機構の全貌を明らかにする。

### 3. 研究の方法

(1) シロイヌナズナとその近縁自家不和合性種ハクサンハタザオを用い、両種間での *SP11/SCR* のゲノム内構造およびコード領域の塩基配列を比較解析することで、シロイヌナズナにおける機能喪失の原因の詳細を明らかにする。

(2) アブラナ科自家不和合性分子機構の全貌解明について、レーザーマイクロダイセクション技術による乳頭細胞の特異的単離と次世代シーケンサーによる大規模塩基配列情報収集を組み合わせた乳頭細胞トランスクリプトーム解析を行う。得られた塩基配列は、種々のデータベース等を用いてバイオインフォマティクス解析し、自家不和合性関連因子群および自他認識～花粉の受け入れ・拒絶に至る一連の受粉システム関連因子群を明らかにする。

### 4. 研究成果

(1) シロイヌナズナとハクサンハタザオでの *SP11/SCR* の塩基配列比較によって、シロイヌナズナ *SP11/SCR* にはすでに明らかにしていた第2エキソン内の翻訳を妨げる逆位に加え、第1・第2エキソン間のイントロン (1157bp) 内に258bpの欠失があることを明らかにした。また、両種における *SP11/SCR* の発現パターン・量を比較すると、花発達ステージに沿った発現プロファイルは両種でほぼ同じであったが、シロイヌナズナの *SP11/SCR* の転写量はハクサンハタザオのそれに比べて約1/10まで低下していた。プロモーター領域の塩基配列を比較すると、翻訳開始点上流262bpまでは両種でほぼ共通していたが、それより上流領域では相同性は極めて低かった。以上の結果より、シロイヌナズナとハクサンハタザオの *SP11/SCR* には、1. 第2エキソンの逆位の有無、2. イントロン内の258bpの挿入・欠失、3. 転写量の差異 (プロモーター配列の違い) があり、正常な *SP11/SCR* タンパク質を生成するための遺伝子情報と発現制御機構の両方に違いがあることを明らかにした。これらの違いがシロイヌナズナにおける *SP11/SCR* の機能喪失の原因であると考えられる。

(2) 乳頭細胞トランスクリプトーム解析に

ついては、最初にレーザーマイクロダイセクションによる乳頭細胞の特異的単離と mRNA 調整に関する各種実験条件検討を行った。乳頭細胞をパラフィン包埋するための組織固定液は、エタノールやアセトン等の収縮作用のあるアルコールのみではなく膨潤作用のある酢酸との混合液が適しており、シロイヌナズナはエタノール:酢酸=3:1 溶液、ハクサンハタザオはエタノール:酢酸=3:2 溶液が最適と規定した。また LM 単離した極微量の組織片からの mRNA 単離・調整は、Pico Pure RNA isolation kit と RiboAmp HS plus RNA amplification kit (共に Applied Biosystems) の併用が適切と規定した。これら方法を組み合わせ、NGS に適するシロイヌナズナおよびハクサンハタザオの乳頭細胞 mRNA 調整法を確立した。次に、本法により各サンプルから乳頭細胞 mRNA を調整し、次世代シーケンサー SOLiD 5500xl (Applied Biosystems) を用いてシーケンス解析を行い、シロイヌナズナからは 65,690,858 個、受粉前ハクサンハタザオからは 101,509,267 個、受粉後ハクサンハタザオからは 180,513,651 個のシーケンスリードを獲得した。これらシーケンスリードをゲノム配列にマッピングし TAIR データベースの遺伝子情報と比較することで、シロイヌナズナおよびハクサンハタザオの乳頭細胞ではそれぞれ 17,240 種、19,260 種の遺伝子が発現していることを明らかにした。これら遺伝子の大部分 (14,859 種) はすべてに共通するものであったが、種々のバイオインフォマティクス解析により自家不和合性関連 886 種、花粉の吸水促進 569 種、吸水阻害 713 種、花粉発芽・誘導 569 種に関与遺伝子を絞り込み、自家不和合性を含む乳頭細胞における様々な受粉機能に関連する遺伝子群を明らかにした。

### 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 5 件)

- ① Keita Suwabe, Go Suzuki, Tsukasa Nunome, Katsunori Hatakeyama, Yasuhiko Mukai, Hiroyuki Fukuoka, Satoru Matsumoto, Microstructure of a *Brassica rapa* genome segment homoeologous to the resistance gene cluster on *Arabidopsis* chromosome 4. *Breeding Science*, 査読有, 掲載決定.
- ② Koichiro Aya, Go Suzuki, Keita Suwabe, Tokunori Hobo, Hirokazu Takahashi, Katsuhiro Shiono, Kentaro Yano, Nobuhiro Tsutsumi, Mikio Nakazono, Yoshiaki Nagamura, Makoto Matsuoka, Masao Watanabe, Comprehensive network analysis

of anther-expressed genes in rice by the combination of 33 laser microdissection and 143 spatiotemporal microarrays. PLoS ONE, 査読有, Vol. 6, 2011, pp. e26162.

- ③ Kazuki Hamada, Kohei Hongo, Keita Suwabe, Akifumi Shimizu, Taishi Nagayama, Reina Abe, Shunsuke Kikuchi, Naoki Yamamoto, Takaaki Fujii, Koji Yokoyama, Hiroko Tsuchida, Kazumi Sano, Takako Mochizuki, Nobuhiko Oki, Youko Horiuchi, Masahiro Fujita, Masao Watanabe, Makoto Matsuoka, Nori Kurata, Kentaro Yano, OryzaExpress: an integrated database of gene expression networks and omics annotations in rice. Plant & Cell Physiology, 査読有, Vol. 52, 2011, pp. 220-229.
- ④ 安益公一郎、諏訪部圭太、イネにおけるマイクロアレイ解析の現状と今後の展望、化学と生物、査読無、Vol. 49, 2011, pp. 261-268.
- ⑤ Keita Suwabe, Go Suzuki, Masao Watanabe, Achievement of genetics in plant reproduction research: the past decade for the coming decade. Genes & Genetic Systems, 査読有, Vol. 85, 2010, pp. 297-310.

[学会発表] (計 16 件)

- ① 諏訪部圭太、アブラナ科植物における分子遺伝学研究基盤の構築と育種学的研究、日本育種学会第 121 回講演会、2012 年 3 月 29-30 日、宇都宮大学 (招待講演)
- ② 松田智貴、大坂正明、藤岡智明、坂園聡美、高橋宏和、中園幹生、岩野恵、高山誠司、鈴木剛、渡辺正夫、諏訪部圭太、レーザーマイクロダイセクションによるアブラナ科乳頭細胞の単離法の構築、日本育種学会第 121 回講演会、2012 年 3 月 29-30 日、宇都宮大学
- ③ 大坂正明、松田智貴、藤岡智明、坂園聡美、高橋宏和、中園幹生、岩野恵、高山誠司、鈴木剛、諏訪部圭太、渡辺正夫、LM-NGS 法によるアブラナ科乳頭細胞のトランスクリプトーム解析、日本育種学会第 121 回講演会、2012 年 3 月 29-30 日、宇都宮大学
- ④ 藤岡智明、浜田和輝、本郷耕平、矢野健太郎、増子潤美、牧野周、前忠彦、諏訪部圭太、鈴木剛、渡辺正夫、イネ雄性生殖器官における small RNA の網羅的解析、日本育種学会第 121 回講演会、2012 年 3 月 29-30 日、宇都宮大学
- ⑤ Masaaki Osaka, Tomoki Matsuda, Yuki Kobushiro, Kaori Nagasaka, Hirokazu Takahashi, Mikio Nakazono, Go Suzuki, Yong-Pyo Lim, Keita Suwabe, Masao Watanabe, Laser Microdissection-Next

Generation Sequence Transcriptome Analysis in the Papilla Cell of Brassica rapa. Plant & Animal Genome XX, 2012 年 1 月 14-18 日, San Diego, USA

- ⑥ Kenichiro Hiroi, Keita Suwabe, Go Suzuki, Masao Watanabe, Analysis of Pollen Behavior on Brassica Self-Incompatibility. Plant & Animal Genome XX, 2012 年 1 月 14-18 日, San Diego, USA
- ⑦ Tomoaki Fujioka, Kazuki Hamada, Kohei Hongo, Kentaro Yano, Hiromi Masuko-Suzuki, Kaori Yamamura, Amane Makino, Tadahiko Mae, Keita Suwabe, Go Suzuki, Masao Watanabe, NGS Transcriptome of Small RNAs in Rice Male Gametophyte Development. Plant & Animal Genome XX, 2012 年 1 月 14-18 日, San Diego, USA
- ⑧ Keisuke Sudo, Jong-In Park, Keita Suwabe, Go Suzuki, Masao Watanabe, The pollen specific LIM gene for pollen germination and pollen tube growth in Arabidopsis thaliana. Plant & Animal Genome XX, 2012 年 1 月 14-18 日, San Diego, USA
- ⑨ Seiya Goto, Tomoaki Fujioka, Takahiro Akimoto, Hiromi Masuko-Suzuki, Masao Watanabe, Go Suzuki, Silvia C. Alves, Keita Suwabe, Improving the Agrobacterium-Mediated Transformation Protocol for Brachypodium Distachyon. Plant & Animal Genome XX, 2012 年 1 月 14-18 日, San Diego, USA
- ⑩ Kazuki Hamada, Kai Fukazawa, Taishi Nagayama, Koji Yokoyama, Hiroko Tsuchida, Kaori Igarashi, Keita Suwabe, Masao Watanabe, Makoto Matsuoka, Nori Kurata, Kentaro Yano, OryzaExpress : An integrated Database for Gene Expression Networks in Rice. Plant & Animal Genome XX, 2012 年 1 月 14-18 日, San Diego, USA
- ⑪ 広井健一郎、高山誠司、鈴木剛、諏訪部圭太、渡辺正夫、アブラナ科植物自家不和合性反応における花粉動態の解析、日本育種学会第 120 回講演会、2011 年 9 月 23-24 日、福井県立大学
- ⑫ Keita Suwabe, Significance of genetic resources for self-incompatibility research in Brassica and Brassicaceae. Importance of Germplasm in Crop Genomics and Breeding, 2011 年 8 月 9 日、Chungnam National University, Korea (招待講演)
- ⑬ 濱田和輝、本郷耕平、諏訪部圭太、清水顕史、長山大志、阿部玲奈、菊池俊介、山本直樹、藤井貴朗、横山幸治、土田博子、佐野和美、望月孝子、大木信彦、堀内陽子、藤田雅丈、渡辺正夫、松岡信、倉田のり、矢野健太郎、OryzaExpress :

イネの遺伝子発現ネットワークとオミックス情報統合データベース、日本育種学会第 118 回講演会、2011 年 3 月 29-30 日、横浜市立大学

- ⑭ 大坂正明、五十川祥代、白澤彰、菊田利奈、小松聡、新倉聡、高田美信、柴博史、磯貝彰、高山誠司、鈴木剛、諏訪部圭太、渡辺正夫、アブラナ科自家和合変異系統の分子遺伝学的解析と連鎖地図へのマッピング、日本育種学会第 118 回講演会、2010 年 9 月 24-25 日、秋田県立大学
- ⑮ 畠山勝徳、諏訪部圭太、加藤丈幸、布目司、福岡浩之、松元哲、ハクサイ根こぶ病抵抗性遺伝子 *Crr1* のマップベースクローニング、日本育種学会第 118 回講演会、2010 年 9 月 24-25 日、秋田県立大学
- ⑯ 濱田和輝、本郷耕平、山本直樹、藤井貴朗、望月孝子、諏訪部圭太、倉田のり、矢野健太郎、*OryzaExpress* : イネの遺伝子発現ネットワーク解析とデータベース構築、日本育種学会第 118 回講演会、2010 年 9 月 24-25 日、秋田県立大学

[図書] (計 1 件)

- ① Ayako Suzuki, Keita Suwabe, Kentaro Yano, The Use of Omics Databases for Plant. *In: Sustainable Agriculture and New Biotechnologies*. CRC Press, 2011, pp. 1-22

[その他]

ホームページ等

<受賞>

日本育種学会奨励賞、2012 年 3 月 29 日

日本育種学会第 118 回講演会優秀発表賞、  
2010 年 9 月 24-25 日

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

諏訪部 圭太 (SUWABE KEITA)

三重大学・大学院生物資源学研究科・准教授

研究者番号 : 50451612