

花粉壁構築の分子基盤と花粉情報伝達機構の解明

(課題番号 16380002)

平成16年度～平成18年度 科学研究費補助金

(基盤研究(B)) 研究成果報告書

平成19年3月

研究代表者 鳥山欽哉

(東北大学大学院農学研究科教授)

はしがき

本報告書は平成16年度から平成18年度まで、科学研究費補助金（基盤研究B）によって行なった「花粉壁構築の分子基盤と花粉情報伝達機構の解明」（課題番号16380002）の成果についてまとめたものである。

花粉壁の外側を構成するエキシンは、花粉を外界の環境ストレスや病原菌から花粉を保護する役割を持つ。エキシンの隙間には粘着性のある脂質とタンパク質からなる層であるポーレンコート(pollen coat)がある。ポーレンコートは花粉を媒介昆虫などに付着させる役割や、花粉と柱頭の接着、情報伝達などに関与している。エキシンを構成するスポロポレニンの前駆体とポーレンコートはタペート組織に由来する。花粉が柱頭に付着すると、花粉から柱頭に何らかのシグナルが伝わり、その結果花粉が柱頭から吸水して発芽する。

本研究では、我々が独自に単離したエキシン合成とポーレンコート合成に欠陥のあるシロイヌナズナのミュータントおよび自家不和合性を示すアブラナを用いて、花粉のエキシンとポーレンコートの合成に関与する遺伝子を明らかにするとともに、花粉の吸水シグナル、および、種間不和合性と自家不和合性に見られる花粉と柱頭の情報伝達に関与する物質の単離・同定および機構解明を行うことを目的とした。

本研究により、エキシン合成の足場となるプライムエキシン、および、エキシンの柱になるバキュラの形成が孢子体型に支配されることなどを明らかにした。これらの知見は、原著論文として発表するとともに、日本語と英語の総説を発表した。International Journal of Plant Developmental Biology に掲載予定の総説は招待執筆 (Invited Review) であり、本科学研究費の成果は高く評価されている。この総説では、エキシン形成には3つの重要な発育プロセス、すなわち、(1) スポロポレニンの合成と沈着、(2) プライムエキシンの合成、(3) カロース壁の合成と分解が重要であることをまとめてある。また、植物育種学への応用に関する総説を育種学研究に2報発表した。

研究組織

研究代表者：鳥山 欽哉（東北大学大学院農学研究科 教授）

花粉壁構築の研究

花粉吸水シグナルに関する花粉情報伝達機構の解明

研究分担者：西尾 剛（東北大学大学院農学研究科 教授）

花粉と柱頭の不和合性に関する花粉情報伝達機構の研究

交付決定額（金額単位：千円）

(配分額)

	直接経費	間接経費	合計
平成16年度	6,700	0	6,700
平成17年度	4,200	0	4,200
平成18年度	4,300	0	4,300
総計	15,200	0	15,200

研究発表

(1) 学会誌等

原著論文

Ariizumi T, Hatakeyama K, Hinata K, Inatsugi R, Nishida I, Sato S, Kato T, Tabata S, Toriyama K: Disruption of the novel plant protein, NEF1, affects lipid accumulation in the plastids of the tapetum and exine formation of pollen resulting in male sterility in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 39: 170-181 (2004)

Okuzaki A, Toriyama K: Chimeric RNA·DNA oligonucleotide-directed gene targeting in rice. *Plant Cell Rep.* 22: 509-512 (2004)

Kazama T, Toriyama K: Genetic evolution of Rf1 locus for the fertility restorer gene of BT-type CMS rice. in "Rice is life: scientific perspectives for the 21st century" Ed. IRRI, pp170-171 (2004)

Shirasawa K, Monna L, Kishitani S, Nishio T: Single nucleotide polymorphisms in randomly selected genes among *japonica* rice (*Oryza sativa* L.) varieties identified by PCR-RF-SSCP. *DNA Research* 11: 275-283 (2004)

Shirasawa K, Kishitani S, Nishio T: Conversion of AFLP markers to sequence-specific markers for closely related lines in rice by use of the rice genome sequence.

- markers for closely related lines in rice by use of the rice genome sequence. *Mol. Breed.* 14: 283-292 (2004)
- Inoue H, Nishio T: Efficiency of PCR-RF-SSCP marker production in *Brassica oleracea* using *Brassica* EST sequences. *Euphytica* 137: 233-242 (2004)
- Okamoto S, Sato Y, Sakamoto K, Nishio T: Distribution of similar self-incompatibility (*S*) haplotypes in different genera, *Raphanus* and *Brassica*. *Sex. Plant Reprod.* 17: 33-39 (2004)
- Sato Y, Okamoto S, Nishio T: Diversification and alteration of recognition specificity of the pollen ligand, SP11/SCR, in self-incompatibility of *Brassica* and *Raphanus*. *Plant Cell* 16: 3230-3241 (2004)
- Ariizumi T, Hatakeyama K, Hinata K, Sato, S, Kato, T, Tabata S, Toriyama K: The *HKM* gene, which is identical to the *MSI* gene of *Arabidopsis thaliana*, is essential for primexine formation and exine pattern formation. *Sex. Plant Reprod.* 18: 1-7 (2005)
- Fujii S, Toriyama K: Molecular mapping of the fertility restorer gene for ms-CW-type cytoplasmic male sterility of rice. *Theor. Appl. Genet.* 111: 696-701 (2005)
- Shirasawa K, Kishitani S, Nishio T: Dot-blot analysis for identification of *japonica* rice cultivars and genotyping of recombinant inbred lines. *Breed Science* 55: 187-192 (2005)
- Fujimoto R, Sugimura T, Nishio T: Gene conversion from *SLG* to *SRK* resulting in self-incompatibility in *Brassica rapa*. *FEBS Lett.* 580: 425-430 (2006)
- Sato Y, Sato K, Nishio T: Interspecific pairs of class-II *S* haplotypes having different recognition specificities between *Brassica oleracea* and *Brassica rapa*. *Plant Cell Physiol.* 47: 340-345 (2006)
- Sato Y, Shirasawa K, Takahashi Y, Nishimura M, Nishio T: Mutant selection from g-ray-irradiated rice by heteroduplex cleavage. *Breed. Science* 56:179-183 (2006)
- Shirasawa K, Shiokai S, Yamaguchi M, Kishitani S, Nishio T: Dot-blot-SNP analysis for practical plant breeding and cultivar identification in rice.. *Theor. Appl. Genet.* 113:147-155(2006)
- Fujimoto R, Sugimura T, Fukai E, Nishio T: Suppression of gene expression of a recessive *SP11/SCR* allele by an untranscribed *SP11/SCR* allele in *Brassica* self-incompatibility. *Plant Mol. Biol.* 61: 577-587 (2006)

- Fujimoto R, Okazaki K, Fukai E, Kusaba M, Nishio T: Comparison of the genome structure of the self-incompatibility (*S*) locus in interspecific pairs of *S* haplotypes. *Genetics* 173: 1157-1167 (2006)
- Fujimoto R, Sasaki T, Nishio T: Characterization of DNA methyltransferase genes in *Brassica rapa*. *Genes Genet. Syst.* 81: 235-242 (2006)
- Kawanabe T, Ariizumi T, Kawai-Yamada M, Uchimiya H, Toriyama K: Abolition of the tapetum suicide program ruins microsporogenesis. *Plant Cell Physiol* 47: 784-787 (2006)
- Fujii S, Komatsu S, Toriyama K: Retrograde regulation of nuclear gene expression in CW-CMS of rice. *Plant Mol Biol* 63: 405-417 (2007)
- Okuzaki A, Shimizu T, Kaku K, Kawai K, Toriyama K: A novel mutated acetolactate synthase gene conferring specific resistance to Pyrimidinyl Carboxy herbicides in rice. *Plant Mol Biol* (in press)
- Okamoto S, Odashima M, Fujimoto R, Sato Y, Kitashiba H, Nishio T: Self-compatibility in *Brassica napus* is caused by independent mutations in *S*-locus genes. *Plant J.* (in press)
- Zhang S-L, Huang S-X, Kitashiba H, Nishio T: Identification of *S*-haplotype-specific F-box gene in Japanese plum (*Prunus salicina* Lindl.). *Sex. Plant Reprod.* (in press)

総説

- 有泉亨・鳥山欽哉：シロイヌナズナの核遺伝子雄性不稔における研究の現状と応用への展望 *育種学研究* 6：195-203 (2004)
- 有泉亨・鳥山欽哉：遺伝子工学的手法を用いた雄性不稔作出技術と一代雑種 *育種学研究* 9：印刷中 (2007)
- Ariizumi T, Toriyama K: Pollen exine pattern formation is dependent on three major developmental process in *Arabidopsis thaliana*. *Intl J Plant Dev Bio* (in press)
- Fujii S, Kazama T, Toriyama K: Molecular studies on cytoplasmic male sterility-associated genes and restorer genes in rice. In “Rice Biology in the Genomics Era” Hira A, Sasaki T, Sano Y, Hirano H (eds) *Biotechnology in Agriculture and Forestry*, Springer (in press)

(2) 口頭発表

- Nishio, T., Y. Sato, R. Fujimoto & S. Okamoto: Diversification and evolution of *S* haplotypes revealed by the study of *Brassica* and *Raphanus* self-incompatibility. 18th International Congress on Sexual Plant Reproduction (2004.8.20-24 Beijing, China)
- Fujimoto, R., K. Okazaki, M. Kusaba & T. Nishio: Comparison of the genome structure of the self-incompatibility (*S*) locus in interspecific pairs of *S* haplotypes. 18th International Congress on Sexual Plant Reproduction (2004.8.20-24 Beijing, China)
- Toriyama, K. & T. Kazama: Cloning and Characterisation of *Rf1*, a Fertility Restorer Gene for *ms-bo* type CMS Rice. Proceedings of the 4th International Crop Science Congress (2004.9.26-10.1 Brisbane, Australia)
- Nishio, T., A. Izumida, H. Hanzawa & K. Sakamoto: Development of *S* tester lines of *Brassica oleracea*, *Brassica rapa*, and *Raphanus sativus* as genetic resources. Joint Meeting of 14th Crucifer Genetics Workshop and 4th ISHS Symposium on Brassicas (BRASSICA2004) (2004.10.24-28 Daejeon, Korea)
- Fujimoto, R., A. Sawasato, E. Fukai & T. Nishio: Gene structure of *SRK* and *SP11/SCR* in self-compatible *B. rapa* L. var. *Yellow Sarson*. Joint Meeting of 14th Crucifer Genetics Workshop and 4th ISHS Symposium on Brassicas (BRASSICA2004) (2004.10.24-28 Daejeon, Korea)
- Nishio, T., Y. Sato, & K. Shirasawa: Perspectives on mutation breeding of rice: Application of the information on rice genome. World Rice Research Conference 2004 (2004.11.5-7 Tsukuba, Japan)
- Fujii, S. & K. Toriyama: Mapping of a fertility restorer gene for male-sterile cytoplasm of rice reported by Katsuo and Mizushima (1958). World Rice Research Conference 2004 (2004.11.5-7 Tsukuba, Japan)
- Kazama, T. & K. Toriyama: Genetic evolution of *Rf1* locus for the fertility restorer gene of BT-type CMS rice. World Rice Research Conference 2004 (2004.11.5-7 Tsukuba, Japan)
- Okuzaki, A. & K. Toriyama: Production of rice plants with a site-specific base change in acetolactate synthase gene by chimera-plast-directed gene targeting. World Rice Research Conference 2004 (2004.11.5-7 Tsukuba, Japan)
- Shirasawa, K., L. Monna, S. Kishitani & T. Nishio: Single nucleotide polymorphisms in

randomly selected genes among japonica rice (*Oryza sativa* L.) varieties identified by PCR-RF-SSCP. World Rice Research Conference 2004 (2004.11.5-7 Tsukuba, Japan)

Shirasawa, K., S. Kishitani & T. Nishio: Single nucleotide polymorphisms in genes among Japanese leading cultivars and their parental cultivars of japonica paddy-rice identified by PCR-RF-SSCP. 2nd International Symposium of Rice Functional Genomics (2004.11.15-17 Tucson, USA)

Toriyama, K. & S. Fujii: Breeding and genetic analysis of a fertility restorer line for a male-sterile cytoplasm [cms-CW] of rice. 2nd International Symposium of Rice Functional Genomics (2004.11.15-17 Tucson, USA)

有泉亨、畠山勝徳、日向康吉、稲継理恵、西田生郎、佐藤修正、加藤友彦、田畑哲之、鳥山欽哉：シロイヌナズナの *nef1* 雄性不稔変異体の解析 第45回日本植物生理学会 (2004. 3. 27-29 東京都立大学)

風間智彦、鳥山欽哉：イネ細胞質雄性不稔稔性回復遺伝子による B-*atp6* RNA の転写後制御 第45回日本植物生理学会 (2004. 3. 27-29 東京都立大学)

白澤健太、岸谷幸枝、西尾剛：日本型水稻の育種過程で選抜された染色体領域の PRS 法による解析 第105回日本育種学会 (2004. 3. 30-31 東京大学)

白澤健太、岸谷幸枝、西尾剛：一塩基多型 (SNPs) 分析により明らかとなったイネ主要品種間の遺伝子変異 第1回東北大学バイオサイエンスシンポジウム (2004. 5. 14 仙台)

白澤健太、岸谷幸枝、西尾剛：ドットプロット分析によるイネの品種判別と組換え自殖系統群の遺伝子型判定 イネ遺伝学・分子生物学ワークショップ 2004 (2004. 7. 8-9 つくば)

藤井壮太、鳥山欽哉：CW 型細胞質雄性不稔イネにおける稔性回復遺伝子の連鎖解析 イネ遺伝学・分子生物学ワークショップ 2004 (2004. 7. 8-9 つくば)

川邊隆大、有泉亨、鳥山欽哉：*Bax* と *AtBI-1* をタペート組織で発現させたシロイヌナズナの解析 第106回日本育種学会 (2004. 9. 21-22 三重大学)

品田智隆、菊池洋介、岸谷幸枝：*mur* 型細胞質雄性不稔 *Brassica oleracea* で特異的に発現するミトコンドリアキメラ ORF72 第106回日本育種学会 (2004. 9. 21-22 三重大学)

白澤健太、佐藤豊、岸谷幸枝、西尾剛：アブラナ科野菜のミスマッチ切断酵素

- のよる日本型イネ品種の一塩基多型の解析 第 106 回日本育種学会
(2004. 9. 21-22 三重大学)
- 藤井壮太、鳥山欽哉 : CW 型細胞質雄性不稔イネにおける稔性回復遺伝子 *Rfcw* の
マッピング 第 106 回日本育種学会 (2004. 9. 21-22 三重大学)
- Sato Y, Nishio T: Diversification of recognition specificity of *S* haplotypes in Brassica.
Plant Biology (2005.7.16-20 Seattle, Washington)
- Shirasawa K, Shiokai S, Kishitani S, Nishio T: Dot-blot analysis to detect SNPs and
indels of rice (*Oryza sativa* L.). Plant Biology 2005 (2005.7.16-20 Seattle,
Washington)
- Shirasawa K, Shiokai S, Nagano K, Yamaguchi M, Kishitani S, Nishio T: Dot-blot-SNP
analysis for quantitative trait loci analysis and plant breeding in rice. 10th
International Congress of SABRAO (2005.8 Tsukuba, Japan)
- Shirasawa K, Shiokai S, Nagano K, Kishitani S, Nishio T: A simple and cost-effective
SNP detection method, dot-blot-SNP analysis, for cultivar identification and
QTL analysis. 5th International Rice Genetics Symposium and 3rd
International Symposium of Rice Functional Genomics (2005.11 Manila,
Philippines)
- 有泉亨、畠山勝徳、日向康吉、佐藤修正、加藤友彦、田畑哲之、鳥山欽哉 : シ
ロイヌナズナの *mojyao* 雄性不稔変異体の単離と解析 第 46 回日本植物
生理学会年会 (2005. 3. 24-26 新潟)
- 堀泰子・西尾剛 : イネのモチ品種における *wx* 遺伝子の変異解析 日本育種学会
(2005. 8 つくば)
- 白澤健太・汐海沙知子・岸谷幸枝・西尾剛 : ドットプロット分析による日本型
イネ品種の一塩基多型の解析 日本育種学会 (2005. 8 つくば)
- 品田智隆。岸谷幸枝。西尾剛 : SNPs マーカーを利用した *Brassica oleracea* の
マップ作成 日本育種学会 (2005. 8 つくば)
- Fujii S, Toriyama K (2005) Fine mapping of *Rfcw*, the fertility restorer gene for
CW-type cytoplasmic male sterility. 5th International Rice Genetics
Symposium, Manila, Philippines, 19-23 Nov. 2005, P73
- Okuzaki A, Toriyama K (2005) A novel mutated actolactate synthase gene conferring
specific resistance to pyrimidinyl carboxy herbicides in rice. 5th International
Rice Genetics Symposium, Manila, Philippines, 19-23 Nov. 2005, P376

- Fujii, S. & K. Toriyama (2006) Cytoplasmic effect on nuclear gene expression in cms-CW type cytoplasmic male sterility of rice. The 53rd NIBB Conference, Dynamic Organelles in Plants
- Itabashi E, Kazama T, Toriyama K (2006) Structure, post-transcriptional and translational regulation of mitochondrial *atp6* and *orf79* genes under the control of restorer genes, *Rf1* or *Rf2*, in LD-type and BT-type cytoplasmic male sterility of rice. Tropical Crop Biotechnology Conference 2006, 16-19 August, Cairns, Australia, (Abstract p.94)
- Fujii S, Komatsu S, Toriyama K (2006) Cytoplasmic regulation of nuclear gene expression in ms-CW-type cytoplasmic male sterility of rice. 8th International Congress of Plant Molecular Biology. Aug. 20-25, 2006. Adelaide, Australia. POS-TUE-173
- Kazama T, Nakamura T, Sugita M, Toriyama K (2006) How does rice protein gene diminish the expression of mitochondrial aberrant orf. 8th International Congress of Plant Molecular Biology. Aug. 20-25, 2006. Adelaide, Australia. POS-TUE-293
- Okuzaki A, Toriyama K (2006) An approach toward improving oligonucleotide-directed gene targeting through repairing assay of chromosomal *gus* gene in rice. 8th International Congress of Plant Molecular Biology. Aug. 20-25, 2006. Adelaide, Australia. POS-TUE-303
- Toriyama K (2006) Molecular study on cytoplasmic male sterility in rice The 100th Anniversary of Tohoku University, International Symposium Frontiers in Rice Science– from Gene to Field. Nov. 6-8 Sendai (Invited)
- Wu XL, Shioto Y, Kishitani S, Toriyama K (2006) Expression analysis of WRKY16 regulated by HSP101 promoter in transgenic rice. The 100th Anniversary of Tohoku University, International Symposium Frontiers in Rice Science– from Gene to Field. Nov. 6-8 Sendai Poster 6
- Iwata N, Fujii S, Toriyama K (2006) Molecular mapping of the fertility restorer gene for LD-type cytoplasmic male sterility of rice. The 100th Anniversary of Tohoku University, International Symposium Frontiers in Rice Science– from Gene to Field. Nov. 6-8 Sendai Poster 7
- Kojima H, Kazama T, Fujii S, Toriyama K (2006) An approach toward understanding the function of a CMS-associated gene, *orf79*, of rice. The 100th Anniversary

of Tohoku University, International Symposium Frontiers in Rice Science—
from Gene to Field. Nov. 6-8 Sendai, Poster 9

Kato T, Sasaki A, Ogawa T, Hori M, Toriyama K (2006) An approach toward
producing insect-resistant crops expressing yam tuber lectin (DB1). The 100th
Anniversary of Tohoku University, International Symposium Frontiers in Rice
Science— from Gene to Field. Nov. 6-8 Sendai Poster 8

Okuzaki A, Shimizu T, Kaku K, Kawai K, Toriyama K (2006) A novel mutated
acetolactate synthase gene conferring specific resistance to pyrimidinyl
carboxy herbicides in rice. The 100th Anniversary of Tohoku University,
International Symposium Frontiers in Rice Science— from Gene to Field. Nov.
6-8 Sendai Poster 10.

Itabashi E, Kazama T, Toriyama K (2006) Post-transcriptional regulation of
mitochondrial atp6 RNA by fertility restorer genes in LD-type and BT-type
cytoplasmic male sterile rice. The 100th Anniversary of Tohoku University,
International Symposium Frontiers in Rice Science— from Gene to Field. Nov.
6-8 Sendai Poster 11.

板橋悦子・風間智彦・鳥山欽哉 (2006) Ld 型および Bo 型細胞質雄性不稔イネに
おけるミトコンドリア atp6 遺伝子の稔性回復遺伝子による転写後制御
育種学研究 8 (別 1) 112

藤井壮太・小松節子・鳥山欽哉 (2006) CW 型細胞質雄性不稔系統における核遺
伝子発現の網羅的解析 育種学研究 8 (別 1) 116

奥崎文子・角康一郎・清水力・鳥山欽哉 (2006) ピリミジニルカルボキシ系除
草剤に耐性を示すイネアセト乳酸合成酵素遺伝子の新規変異 育種学
研究 8 (別 1) 130

藤井壮太、鳥山欽哉 (2006) CW 型細胞質雄性不稔イネにおいてミトコンドリア
による発現制御を受ける核遺伝子の網羅的解析 東北大学バイオサイ
エンスシンポジウム PS-116

板橋悦子、風間智彦、鳥山欽哉 (2006) LD 型細胞質雄性不稔イネにおけるミト
コンドリア atp6 と orf79 の構造および稔性回復遺伝子 Rf1 と Rf2 によ
る転写後制御 東北大学バイオサイエンスシンポジウム PS-117

風間智彦、鳥山欽哉 (2006) イネ細胞質雄性不稔とミトコンドリア遺伝子の転
写後制御についての解析、東北大学バイオサイエンスシンポジウム

PS128

- 鳥山欽哉・板橋悦子・岩田夏子・藤井壮太・風間智彦 (2006) BT型・LD型・CW型細胞質雄性不稔イネの比較解析 イネ遺伝学・分子生物学ワークショップ 2006 (2006. 7. 7-8 東京大学)
- 藤井壮太・鳥山欽哉 (2006) CW型細胞質雄性不稔イネの成熟葯においてミトコンドリアによる発現制御を受ける核遺伝子の探索 日本植物学会第70回大会 (2006年9月13-16日, 熊本)
- 岩田夏子・藤井壮太・鳥山欽哉 (2006) イネLD型細胞質雄性不稔性における稔性回復遺伝子 Rf2 のマッピング 育種学研究 8 (別2) p. 94
- 藤井壮太・小松節子・鳥山欽哉 (2006) CW型細胞質雄性不稔イネにおける稔性回復系統特異的な ALDH2b の解析 育種学研究 8 (別2) p. 306
- 板橋悦子・風間智彦・鳥山欽哉 (2006) Ld型およびBo型細胞質雄性不稔イネにおけるミトコンドリア *atp6* 遺伝子の稔性回復遺伝子による転写後制御 第109回日本育種学会 2006. 3. 29-30 育種学研究 8 (別-1) p. 112

(3) 著書・出版物

- 西尾剛: 植物の性と生殖 三上哲夫編「植物遺伝学入門」朝倉書店 pp1-32 (2004)
- 鳥山欽哉・風間智彦: 細胞質雄性不稔植物の稔性回復遺伝子の正体とは? 化学と生物 43: 212-213 (2005)
- 西尾剛・向井康比己・大澤良・草場信・鳥山欽哉: 遺伝学の基礎 見て分かる農学シリーズ1 朝倉書店 (2006) p1-169

(4) 特許等

特許

- 鳥山欽哉・奥崎文子・角康一郎・河合清・清水力 「変異型アセト乳酸シンターゼ遺伝子を用いた形質転換方法」 (出願日: 平成17年5月9日 特願2005-136186)

鳥山欽哉・奥崎文子・角康一郎・河合清・清水力 「変異型アセト乳酸シンターゼ遺伝子を用いた形質転換方法」(出願日：平成18年5月9日 国際出願番号：PCT/JP2006/309622)

鳥山欽哉、川邊隆大、内宮博文、山田真紀「AtBI-1を用いた雄性不稔植物の製造方法」(出願日：平成17年6月14日 特願2005-174312)

エキシン合成とポーレンコート合成に欠陥のある変異体の解析

シロイヌナズナの T-DNA タグライン (かずさ DNA 研究所、2,250 系統) をスクリーニングして、雄性不稔を示す変異体を得ていた。この中で、エキシン合成に異常のある 3 種類の変異体 (*nef*, *hkm*, *mojyao*) について詳細に解析した。

変異体 *nef1* (*no exine formation 1*) は開花期に花粉が完全に消失する変異体である。プライムエキシンはすかさずでスポロポレニンが小胞子に付着できず葯腔に蓄積していた。その後、花粉は断片化して消失した。*nef1* 変異体ではタペート組織中のプラスチドや脂肪体の脂質蓄積に欠陥が見られた。原因遺伝子をクローニングしたところ、プラスチド移行シグナルと 26 個の膜貫通領域を有するタンパク質をコードする機能未知の遺伝子の突然変異であることがわかった。

変異体 *hkm* は、ギザギザのエキシンを持つ小胞子を形成するため *hackly microspore (hkm)* と名付けた。プライムエキシンは極わずかで、スポロポレニンは小胞子にランダムに付着し、ギザギザのエキシンを形成した。その後、タペート細胞の肥大が見られ、小胞子は押しつぶされて消失した。表現型が類似している突然変異体の原因遺伝子のいくつかについて、SNP の有無をスクリーニングしたところ、雄性不稔原因遺伝子として報告されている *Ms1* (転写因子) に SNP を見いだした。相補性試験により *Ms1* 遺伝子が *hkm* の原因遺伝子であることを明らかにした。

mojyao と名付けた変異体は、植物体全体が矮性を示し、花糸が短いために自家受粉が起こらず雄性不稔を示した。プライムエキシンは薄く、スポロポレニンははじめランダムに小胞子に付着したが、プロバキュラは形成されず、スポロポレニンは葯腔に蓄積していた。しかし、その後、正常な花粉が形成された。ラフマッピングを行なったところ、ブラシノステロイドの合成に関わる *DE-ETIOLATED2* 遺伝子が原因と考えられたが、相補性試験の結果、異なる遺伝子が原因であることが明らかとなった。*mojyao* 変異体の原因遺伝子同定のため、精密マッピングを行なっている。

これらの変異体は、ヘテロの植物の花粉がすべて正常であるため、プライム

エキシンとバキュラの形成が孢子体型に支配されていることが明らかになった。従来の知見では、プライムエキシン形成とプロバキュラ形成は小孢子自身を作り出してきたと考えられてきたが、両者ともにタペート組織を作り出している可能性が強く示唆された。タペート組織で作られたスポロポレニンがカロース壁を通過して、小孢子に沈着するという新たなモデルを提唱した。

その他の雄性不稔原因遺伝子の解析

かずさ DNA 研究所で作製した gene trap line から、新規の葯特異的遺伝子のスクリーニングを行い、葯特異的に GUS が発現する系統を単離している。しかし、導入遺伝子が挿入された系統で雄性不稔を示すものは得られなかった。この原因の一つとして考えられるのが、機能を相補する遺伝子の存在である。そのため、単離した遺伝子と高い相同性を示す遺伝子を利用した機能解析をすることとした。At5g39930 に挿入をもつ gene trap line は葯において強い GUS 発現は観られるが、不稔性等の表現型は示さなかった。そこで At5g39930 と高い相同性をもつ At3g04680 (*AtCLP1* 遺伝子) の遺伝子破壊系統を取得して解析した。At3g04680 に T-DNA の挿入をもつヘテロ個体の後代において遺伝子型を調べたが、T-DNA の挿入をホモにもつ個体は得られることができなかった。ヘテロ個体の花粉を Alexander 染色、走査型電子顕微鏡 (SEM) で観察した結果、野生型花粉との違いは観察されなかった。このことより、*AtCLP1* 遺伝子は雄性側で働く場合は花粉管伸張時に働くと考えられた。

タペート組織のプログラム細胞死と花粉壁構築

葯のタペート組織は、花粉の発達において重要な組織であり、発育後期にプログラム細胞死を起こすことが知られている。そこで、人為的にタペート組織の細胞死を操作して花粉壁構築に及ぼす影響を調査した。*Bax* と *AtBI-1* の cDNA をタペート組織特異的に発現誘導する *Osg6B* プロモーターと *LTP12* プロモーターに連結してシロイヌナズナに導入した。本研究により、正常な花粉壁構築にはタペート組織のプログラム細胞死が必須であり、細胞死のタイミングが重要であることが明らかとなった。プログラム細胞死の始動のシグナルが四分子期に存在することを初めて示唆した。育種工学的応用に関して特許を申請した。

花粉吸水シグナルに関する花粉情報伝達機構の解明

花粉壁に存在するポーレンコートに異常があり、柱頭上において花粉の吸水反応がおこらず、花粉管の発芽がおこらないシロイヌナズナの雄性不稔変異体 *flp1* を得ていた。この変異体を利用し、花粉と柱頭の相互作用、すなわち、花粉場伝達機構に関わる遺伝子を探索することを目的とした。 *faceless pollen-1 (flp1)* と名付けたこの突然変異体は孢子体型雄性不稔を示し、エキシンの網目状の模様がほとんど消失し、エキシンの構成物質であるスポロポレニンの合成に異常があると考えられた。高湿度条件下では花粉が発芽するため、*flp1* 変異体における雄性不稔の原因は、異常な花粉壁によるものではなく、ポーレンコートに花粉の吸水シグナルが欠如しているためと考えられた。

flp1 変異体ホモ個体から得た種子に EMS 処理を行い、その M2 世代において花粉の吸水反応が復帰する変異体のスクリーニングを行った。現在までに約 20,000 個体のスクリーニングを行ったが、目的の変異体は得られなかった。さらなるスクリーニングが必要であると考えられる。

花粉と柱頭の不和合性に関する花粉情報伝達機構の研究

アブラナ科植物の自家不和合性の花粉側認識物質として SP11 が明らかにされている。DNA シャッフリングと *in vitro* mutagenesis を用いて SP11 の変異遺伝子を作製し、バイオアッセイあるいは形質転換植物を用いて自家不和合性の認識特異性の変化を調査した。その結果、SP11 の特定の領域 Region III と Region V が認識特異性に重要であることがわかった。さらに、その変異の機構を明らかにした。

種間不和合性は、多数の系統を用いた解析から、単純な質的形質ではなく量的形質であることが分かったため、QTL 解析を行うための多数の DNA 多型マーカーを作成することとした。独自の DNA マーカー (SNP マーカーまたは PCR-RF-SSCP マーカー) を開発した。種間不和合性に関わる遺伝子のラフマッピングをするための準備が整ったと考えている。

まとめ

花粉情報伝達機構の解明には到らなかったが、花粉壁構築の分子基盤に関しては大きな進展があり、新たな花粉壁構築のモデルを提唱した。本研究の成果は、遺伝子工学的手法を用いた雄性不稔作出技術と一代雑種に応用できると期待される。それらの可能性については、次の2報の総説で詳しく記述している。

有泉亨・鳥山欽哉：シロイヌナズナの核遺伝子雄性不稔における研究の現状と応用への展望 育種学研究 6：195-203（2004）

有泉亨・鳥山欽哉：遺伝子工学的手法を用いた雄性不稔作出技術と一代雑種 育種学研究 9：印刷中（2007）

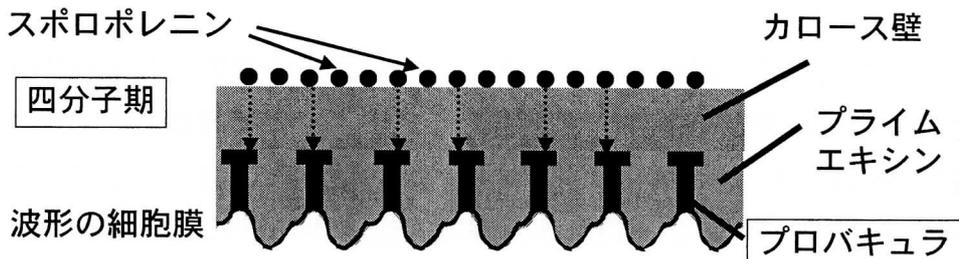
解析した変異体の特徴

	プライム エキシン	スポロポ レニン	花粉
nefl	すかすか	付着できず Loculeに蓄積	エキシンなし 断片化・消失
hkm	ごくわずか	ランダムに付着 ギザギザエキシン	肥大したタペートに つぶされる 消失
mojyao	薄い	はじめランダムに付着 プロバキュラできず Loculeに少し蓄積	正常花粉

ヘテロ植物の花粉はすべて正常、胞子体型に制御されている
→プライムエキシンとプロバキュラはタペート組織が作る

モデル

プライムエキシンとプロバキュラは
小胞子自身が作り出してきたと考えられてきたが、
両者ともタペート組織が作り出している可能性が
強く示唆された。
スポロポレニンがカロース壁を通過するのだろう。



本報告書収録の学術雑誌等発表論文は本ファイルに登録していません。なお、このうち東北大学在籍の研究者の論文で、かつ、出版社等から著作権の許諾が得られた論文は、個別に **TOUR** に登録しております。