

平成 21 年 3 月 31 日現在

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2006～2008

課題番号：18780246

研究課題名（和文）組換え遺伝子拡散防止のための樹木の開花制御

研究課題名（英文）Regulations of flowering for preventions of gene flow in woody plants.

研究代表者

伊ヶ崎 知弘 (IGASAKI TOMOHIRO)

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：10353567

研究成果の概要：

モデル樹木として遺伝子情報や実験技術等が蓄積・整備されつつあるポプラ（セイヨウハコヤナギ）を研究対象とし、樹木全般に応用可能な花成抑制技術の開発に必要不可欠と考えられる、花成抑制に関わる遺伝子の単離とその発現特性及びポプラやシロイヌナズナの組換え実験系を利用した遺伝子ごとの花成抑制効果について解析した。さらに、ポプラから単離した減数分裂に関与する PnDmc1 を抑制し、さらに、早期開花になるように組換えたポプラでは、胚珠の形成が異常になった花が観察された。

交付額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2006年度	1,400,000	0	1,400,000
2007年度	1,200,000	0	1,200,000
2008年度	800,000	240,000	1,040,000
年度			
年度			
総計	3,400,000	240,000	3,640,000

研究分野：植物生理学

科研費の分科・細目：境界農学・環境農学

キーワード：遺伝子組換え、組換え樹木、ポプラ、組換え遺伝子拡散防止策、花成制御

1. 研究開始当初の背景

世界人口は推計 65 億人を突破し、環境問題は、今や世界的規模となっている。そこで、地球温暖化対策、地球環境の保全や修復を行う目的で、様々な組換え樹木を利用することが、気候変動枠組条約第 9 回締約国会議（COP9）で提案された。しかしながら、遺伝子組換え樹木を植栽した際に、その花粉や種子の飛散による遺伝子攪乱や生態系の破壊が生じることが懸念されるが、それに対しては、対策が講じられていないのが現状である。

2. 研究の目的

申請者たちの研究グループでは、遺伝子組換え技術を利用し、砂漠や大気汚染・土壌汚染の深刻な地域等の劣悪環境下で生育可能な樹木の作出を目的に研究を進めている。既に申請者たちのグループでは、ポプラ（セイヨウハコヤナギ、ギンドロ）、ニセアカシア、シラカンバ、キリ等広葉樹の遺伝子組換え系やスギ等針葉樹の個体再生系を確立するとともに、4 千以上の完全鎖長の発現遺伝子をポプラ等樹木から単離している。また、草本植物の遺伝子を利用して成長の制御にも成

功しており、実用性のある有用形質を持った遺伝子組換え樹木の作出は目前である。そこで、本研究では、遺伝子の解析技術や遺伝子組換え技術を利用し、遺伝子組換え樹木を植栽した際の遺伝子攪乱や生態系の破壊を抑制するための樹木の花成抑制技術や不稔技術を確立することを目的とする。さらに、これらの技術は、スギ・ヒノキ花粉症問題等、樹木の花成に起因する諸問題の一つの解決手法として利用できると考えられる。

具体的には、モデル樹木として遺伝子情報や実験技術等が蓄積・整備されつつあるポプラ（セイヨウハコヤナギ）を対象とし、主に下記2点について研究を推進する。

(1) ポプラから花成抑制に関わる遺伝子を単離し、その発現特性等を解析する。

(2) ポプラやシロイヌナズナ組換え実験系を利用して、遺伝子ごとの花成抑制効果の程度を判定する。

3. 研究の方法

(1) ポプラから花成抑制に関わる遺伝子の単離、及びその発現特性等の解析

①プロメガ社製のRNA精製キットを用い、ポプラの芽や花芽など複数の器官・組織からRNAを単離した。

②他の植物種で既知の遺伝子の保存配列等を利用して、逆転写酵素等を利用したPCR法により花成抑制候補遺伝子の保存領域を特異的に増幅し、部分塩基配列を決定した。その後、得られた配列を利用して完全長の遺伝子配列を決定した。東洋紡社製の試薬を用いた。

③単離した時期の異なるポプラの芽や花芽など複数の器官・組織由来のRNAを用いて、各遺伝子の発現様式を調査した。試薬はロシユ社製のものを用いた。

(2) ポプラやシロイヌナズナ組換え実験系を利用した、遺伝子ごとの花成抑制効果の判定

①ポプラから単離した花成抑制候補遺伝子の機能を同定するために、シロイヌナズナ組換え体を作成した。プロモーターはカリフラワーモザイクウイルス(CaMV)の35Sプロモーターを用いた。

②ポプラから単離した花成抑制候補遺伝子を過剰発現するシロイヌナズナ組換え体について、花成遅延効果の有無や、導入遺伝子の発現量と花成時期の関係等に注目して解析した。

③シロイヌナズナ組換え体の花成解析で、花成抑制効果が高いと判定された遺伝子については、遺伝子の発現を抑制するようにコンストラクトを用いて組換えポプラを作成した。また、花成促進効果が高いと判定された遺伝子については、過剰発現するようなコンストラクトを用いて組換えポプラを作成した。

④花器官形成関連遺伝子 Dmc1 については、花成時期に影響を及ぼさないことから、すでに単離した顕著な花成抑制因子とともにダブルブロックアウトになるようなコンストラクトを用いて、組換えポプラを作成した。

4. 研究成果

(1) ポプラから花成抑制に関わる遺伝子の単離、及びその発現特性等の解析

①ポプラの芽や花芽など複数の器官・組織からRNAを単離し、逆転写酵素等を利用したPCR法により花成抑制候補遺伝子として、シロイヌナズナの花成抑制因子 Flowering locus C (FLC)と推定アミノ酸配列で43~45%の相同性を持つ3種類の遺伝子 PnFLC1、PnFLC2、及び PnFLC3 を単離し、塩基配列を決定した。遺伝子発現については、PnFLC1 はほぼすべての器官で発現していたが、PnFLC2 は花器官で、PnFLC3 は花器官以外の組織で発現が観察された。

②同様の手法を用いて、花成促進効果を示す因子として、SUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CONSTANCE 1 (SOC1)、APETALA 1 (AP1)やFLOWERING LOCUS T (FT)を、花成を抑制する因子として TERMINAL FLOWER 1 等を単離した。

③真核生物に広く存在する減数分裂に関与する遺伝子 Dmc1 のポプラでの相同遺伝子 PnDmc1 についても、同様の手法を用いて単離し、塩基配列を決定した。この遺伝子は、シロイヌナズナの Dmc1 (AtDmc1) と比較すると、配列の同一性(identity)が87.5%、類似性が94.2%と非常に高いものであった。

(2) ポプラやシロイヌナズナ組換え実験系を利用した、遺伝子ごとの花成抑制効果の判定

①ポプラから単離した、PnFLC1、PnFLC2、及び PnFLC3 が FLC と同様に花成を抑制する、または、逆に促進する機能を持つのかを同定するために、CaMV35S プロモーター下流に正向きに連結したコンストラクトを用いて、シロイヌナズナ組換え体を作成した。各遺伝子とも10系統の組換え体を解析したところ、一部の組換え体では、花成の遅延が観察されたが、コントロールとして作成した、CaMV35S プロモーター-FLC ほど顕著に花成を抑制する系統は得られなかった。

②ポプラ SOC1 ホモログや AP1 ホモログ、FT ホモログを過剰に発現するシロイヌナズナも顕著な早期開花性を示した。ポプラ FT ホモログを過剰発現する組換えポプラを作成したところ、通常の生育条件下では早期開花しなかったが、薬剤で処理することで、1ヶ月ほどで花様の器官形成が観察された。

③ポプラ TFL1 ホモログを過剰に発現するシロイヌナズナは、顕著に花成が抑制された。また、同遺伝子の発現を抑制するコンストラクトを用いて作成した組換えポプラは、顕著

な早期開花性を示した。

④PnDmc1の発現を抑制し、さらに、早期開花になるようにコンストラクトしたバイナリーベクターを用いて作出した組換えポプラでは、早期開花性を示し、かつ、胚珠の形成に異常がある花が観察された。これについては、今後、詳細に検討する予定である。

本研究で得られた、ポプラの花成抑制技術に関する知見は、既に組換え樹木の導入が検討されているユーカリの植林事業などへの応用が期待できる。また、スギ・ヒノキ花粉症対策としても、花成抑制技術は応用可能であると考えられる。

花芽形成機構に関する研究は、シロイヌナズナなどのモデル実験植物では進展がめざましく、近年、その知見を応用する形で、ポプラやカンキツなどの樹木で研究が進められるようになってきてはいるが、樹木の花成メカニズムや花成抑制に関する詳細な研究はなされていない。本研究は、樹木の花成メカニズムの解明と遺伝子工学的手法による樹木の花成抑制を目的としたものであり、先駆的で有用な研究であったと考えられる。

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8件)

- ① Tomohiro Igasaki, Yumiko Watanabe, Mitsuru Nishiguchi, Nobuhiro Kotoda (2008) The FLOWERING LOCUS T/TERMINAL FLOWER 1 family in Lombardy poplar. *Plant Cell Physiol.* 49:291-300. 査読有.
- ② Norihiro Futamura, Yasushi Totoki, Atsushi Toyoda, Tomohiro Igasaki, Tokihiko Nanjo, Motoaki Seki, Yoshiyuki Sakaki, Adriano Mari, Kazuo Shinozaki, Kenji Shinohara (2008) Characterization of expressed sequence tags from a full-length enriched cDNA library of *Cryptomeria japonica* male strobili. *BMC Genomics* 9: 383. 査読有.
- ③ Tomohiro Igasaki, Kenji Shinohara (2008) Genetic transformation of tree legume, *Robinia*. Pages 331-338. in "Handbook of new technologies for genetic improvement of legumes", (*Kirti PB, ed.*), The Haworth Press, Inc. NY, USA. 査読有.
- ④ Tokihiko Nanjo, Tetsuya Sakurai, Yasushi Totoki, Atsushi Toyoda, Mitsuru Nishiguchi, Tomoyuki Kado, Tomohiro Igasaki, Norihiro Futamura, Motoaki Seki, Yoshiyuki Sakaki, Kazuo Shinozaki, Kenji Shinohara (2007) Functional annotation of 19,481 *Populus nigra*

full-length enriched cDNA clones. *BMC Genomics* 8: 448. 査読有.

- ⑤ 吉田和正, 香川聡, 伊ヶ崎知弘, 西口満, 向井譲 (2006) 木材の部位、保存期間、熱処理が木材からのDNA抽出効率とDNAの質に及ぼす影響. *森林総合研究所研究報告* 5: 289-298. 査読有.
- ⑥ Hitishi Murata, Tomohiro Igasaki, Kazuo Shishido, Masahide Sunagawa (2006) *Agrobacterium*-mediated transformation of the ectomycorrhizal basidiomycete *Tricoloma matsutake* that produces commercially valuable fruit bodies, matsutake. *Mycoscience* 47: 228-231. 査読有.
- ⑦ Hitishi Murata, Masahide Sunagawa, Takeshi Yamazaki, Kazuo Shishido, Tomohiro Igasaki (2006) Expression of the autofluorescent protein, DsRED2, in the recombinants of the ectomycorrhizal basidiomycete, *Suillus grevillei*, generated by *Agrobacterium*-mediated transformation. *Mycorrhiza* 16: 407-412. 査読有.
- ⑧ Mitsuru Nishiguchi, Kazumasa Yoshida, Takeshi Mohri, Tomohiro Igasaki, Kenji Shinohara (2006) An improved transformation system for Lombardy poplar (*Populus nigra* var. *italica*). *J. For. Res.* 11: 175-180. 査読有.

[学会発表] (計18件)

- ① 伊ヶ崎知弘, 西口満 (2009) FT/TFL1ファミリーを利用したポプラの早期開花. 第50回日本植物生理学会年会要旨集 3aD07. 2009. 3. 23. 名古屋大学.
- ② 中路達郎, 野口享太郎, 伊ヶ崎知弘, 小熊宏之 (2009) 近赤外分光法による根圏有機物組成の分析. 第120回日本森林学会大会要旨集 F51. 2009. 3. 27. 京都大学.
- ③ 毛利武, 伊ヶ崎知弘, 中嶋信美, 篠原健司 (2008) オゾン耐性を強化した組換えポプラの生理的分析及び遺伝子特性. 第119回日本森林学会大会学術講演集 P3g09. 2008. 3. 27. 東京農工大学.
- ④ 伊ヶ崎知弘, 西口満, 二村典宏, 古藤田信博 (2008) ポプラ FT/TFL1 遺伝子の単離及び解析. 日本植物生理学会年会要旨集, 49:205. 2008. 3. 22. 札幌コンベンションセンター.
- ⑤ 西口満, 伊ヶ崎知弘, 二村典宏, 古藤田信博 (2007) ポプラ PnTFL1 遺伝子の発現抑制は花成までの期間を著しく短縮する. BMB2007 (第30回日本分子生物学会年会・第80回日本生化学会大会 合同大会) 講演要旨集, 337. 2007. 12. 13. パシフィコ横浜.

- ⑥ 田内裕之・河原崎里子・相川真一・毛利武・伊ヶ崎知弘・楠城時彦・篠原健司・宇津木玄・斎藤昌弘 (2007) 荒漠地におけるバイオマスエネルギー資源創出技術の研究開発シナリオ. 国際連携推進ワークショップ「東アジアの森林推移-点と線と面-」. 2007.11.19. つくば国際会議場エポカル.
- ⑦ Nobuhiro Kotoda, Naozumi Mimida, Shin-ichiro Kidou, Tomohiro Igasaki, Mitsuru Nishiguchi, Hiroshi Iwanami, Sae Takahashi, Shigeki Moriya, Kazuyuki Abe (2007) Molecular analyses of genes regulating flowering in apple. ASHS Annual Conference Program and Abstracts, HortScience. 42(4):975. 2007.7.17. Scottsdale, Arizona.
- ⑧ Tokihiko Nanjo, Tetsuya Sakurai, Yasushi Totoki, Atsushi Toyoda, Mitsuru Nishiguchi, Norihiro Futamura, Tomohiro Igasaki, Tomoyuki Kado, Motoaki Seki, Yoshiyuki Sakaki, Kazuo Shinozaki, Kenji Shinohara (2007) Collection and characterization of full-length enriched expressed sequence tags in populus nigra. IUFRO Tree Biotechnology(2007) Abstract, SIII. 15p. 2007.6.5. Ponta Delgada.
- ⑨ 伊ヶ崎知弘、西口満、二村典宏、古藤田信博 (2007) 花成関連遺伝子によるポプラの花成制御. 日本森林学会大会学術講演集(CD-ROM)、118:D32. 2007.4.3. 九州大学.
- ⑩ 毛利武、伊ヶ崎知弘、中嶋信美、篠原健司 (2007) ACC 合成酵素遺伝子を導入した組換えポプラのオゾン耐性評価. 第118回日本森林学会大会学術講演集(CD-ROM)、D31. 2007.4.3. 九州大学.
- ⑪ 二村典宏、十時泰、豊田敦、榊佳之、西口満、伊ヶ崎知弘、楠城時彦、関原明、篠崎一雄、篠原健司 (2007) スギ雄花で発現する遺伝子群の解析. 日本森林学会大会学術講演集(CD-ROM)、118:P1f02. 2007.4.3. 九州大学.
- ⑫ 伊ヶ崎知弘、西口満、二村典宏、古藤田信博 (2007) ポプラ TFL1 遺伝子の発現抑制によるポプラの花成促進. 第47回日本植物生理学会年会 P076. 2007.3.29. 愛媛大学.
- ⑬ 二村典宏、十時泰、豊田敦、西口満、伊ヶ崎知弘、楠城時彦、関原明、篠崎一雄、篠原健司 (2007) スギ雄花完全長 cDNA の大規模収集. 第47回日本植物生理学会年会 P351. 2007.3.29. 愛媛大学.
- ⑭ Tomohiro Igasaki, Mitsuru Nishiguchi, Norihiro Futamura, Nobuhiko Kotoda (2006) Down-regulation of PnTFL1, a poplar Terminal Flower 1 ortholog, confers acceleration of flowering in poplar. 8th International Congress of plant Molecular Biology, POS-TUE-192. 2006.8.23. Adelaide Convention Centre.
- ⑮ 吉田和正、香川聡、伊ヶ崎知弘、西口満、向井讓 (2006) 木材の部位、保存期間および熱処理が木材からの DNA 抽出効率と遺伝子検出に与える影響. 日本木材学会大会研究発表要旨集、56:95. 2006.8.9. 秋田大学.
- ⑯ 伊ヶ崎知弘、西口満、二村典宏、古藤田信博 (2006) ポプラの花成に関わる遺伝子の解析. 第117回日本森林学会大会学術講演集 B24. 2006.4.3. 東京農業大学.
- ⑰ 毛利武、伊ヶ崎知弘、中嶋信美、篠原健司 (2006) エチレン合成酵素を導入した組換えポプラの成長特性. 第117回日本森林学会大会学術講演集 B26. 2006.4.3. 東京農業大学.
- ⑱ 楠城時彦、櫻井哲也、十時泰、豊田敦、二村典宏、西口満、伊ヶ崎知弘、角友之、関原明、榊佳之、篠崎一雄、篠原健司 (2006) ポプラ完全長クローンの大規模収集. 第117回日本森林学会大会学術講演集 PE11. 2006.4.3. 東京農業大学.

〔図書〕 (計0件)

〔産業財産権〕

○出願状況 (計0件)

○取得状況 (計0件)

〔その他〕

6. 研究組織

(1) 研究代表者

伊ヶ崎 知弘 (IGASAKI TOMOHIRO)

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：10353567

(2) 研究分担者

なし

(3) 連携研究者

なし