

令和 4 年 6 月 23 日現在

機関番号：13701

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K05743

研究課題名(和文)なぜヒノキは特定のジベレリンのみに花成応答するのか？

研究課題名(英文)Flowering Response to Gibberellin 4/7 in *Chamaecyparis obtusa*

研究代表者

片畑 伸一郎 (Katahata, Shin-ichiro)

岐阜大学・応用生物科学部・助教

研究者番号：80648395

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：ヒノキの花成を誘導するには、通常使われる植物ホルモンのジベレリン3(GA3)ではなくGA4/7(GA4とGA7を混ぜたもの)の方が効果的であった。また、GA4/7処理後に花成関連遺伝子のCoLFY遺伝子の発現量が増加し、この発現量と着花量との間に相関が確認された。しかし、GA4/7の効果極めて低いヒノキ系統も存在していた。このような系統は少花粉(雄花が少ない)の性質をより強く持っている可能性があると考えられ、花粉症対策を考慮した森づくりを考える上で重要な系統であると考えられる。

研究成果の学術的意義や社会的意義

研究例が少ないヒノキの花成メカニズムの一部を明らかにした点は重要な意味を持ち、裸子植物の花成メカニズムの解明に繋がる成果である。また、これまで林木育種の現場では、樹木を着花させるために経験的知見に基づいてジベレリンが使用されてきた。本研究の成果は、経験的知見に基づいて行われてきた林木育種に科学的理論を提供できると考えている。さらに、本研究が提案したヒノキの新たな着花促進技術は、将来的にヒノキの種子生産の安定性に寄与すると考えている。

研究成果の概要(英文)：GA 4/7 (a mixture of GA4 and GA7), but not the commonly used phytohormone gibberellin 3 (GA3), was more effective at inducing flowering in cypress. In addition, the expression level of CoLFY gene, a flowering-related gene, increased after GA 4/7 treatment, and a correlation was confirmed between this expression level and the amount of flower setting. However, there were some cypress lines in which the GA 4/7 effect was extremely low. It is inferred that there is a possibility that such a line has the property of low pollen (less male flowers) more strongly, and it is an important line for forestation considering pollinosis countermeasures.

研究分野：樹木生理生態学

キーワード：ヒノキ ジベレリン 花成 遺伝子発現

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

戦後の拡大造林政策から約 60 年が経過し、日本の主要な造林樹種であるスギ・ヒノキは伐採期を迎えている。しかし、全国的に再造林用の苗木が不足しており、効果的な苗木生産技術が求められている。苗木を生産するためには、効果的な着花や種子生産が必要である。樹木の着花を自然に任せると年変動するため、例えばスギにおいては、植物ホルモンのジベレリン 3 (GA_3) を葉面散布する着花促進技術が開発されている。しかし、ヒノキは GA_3 に対する感受性が低く、 GA_3 を葉面散布するだけでは着花促進効果はほとんどないため、ヒノキにおいても GA_3 に代わる簡便で効果的な着花技術の開発が求められている。

2. 研究の目的

我々の予備実験において、ヒノキの花成を誘導するには、通常使われる GA_3 ではなく $GA_{4/7}$ (GA_4 と GA_7 を混ぜたもの) の方が効果的であることが明らかになった。なぜヒノキは GA_3 ではなく $GA_{4/7}$ にのみ花成応答するのだろうか？この問いに答え、効果的な着花促進技術を開発するためには、針葉樹の花成の仕組みを理解する必要がある。そこで本研究では、ヒノキのジベレリンに対する花成応答メカニズムを明らかにすることを目的に以下のことに取り組んだ。

- (1) ヒノキのクローン系統を対象に $GA_{4/7}$ に対する花成応答の解析
- (2) RNA-seq によって、 $GA_{4/7}$ に応答して発現する遺伝子を網羅的に解析し、遺伝子発現ライブラリーの構築
- (3) 遺伝子発現ライブラリー内にあるヒノキの花成関連遺伝子の発現特性 (発現時期、系統間変異等) の解析

3. 研究の方法

静岡県森林・林業研究センターの苗畑で生育するヒノキのクローン系統を対象に以下の調査をおこなった。これらの系統は、挿し木増殖が困難な小花粉ヒノキ系統を平成 25 年に接ぎ木で増殖させたものである。

(1) ジベレリンによる花成誘導

GA_3 と $GA_{4/7}$ の 2 種類のジベレリン水溶液 (150 ppm) を葉面散布し、花成を誘導した。ジベレリン処理後、定期的に針葉を採取し (午前 10:00 ~ 12:00)、素早く液体窒素で凍結させた。

(2) 枝の乾重量を推定するアロメトリー式の開発と着花量の調査

ジベレリンに対する着花の有無、着花量や性比を解析した。ジベレリン処理した枝のサイズが着花量に影響を及ぼす可能性があるため、本研究では、着花量を枝の乾重量当たりで評価した。そのため、枝の直径と長さから枝の乾重量を推定するアロメトリー式を作成した。

(3) RNA-seq 解析

採取した針葉より total RNA を抽出し、次世代シーケンサーで数億塩基対程度の配列を得た。取得した生データには低品質の配列が含まれているので、このような配列を除去し、整理した。取得した配列を用いて発現解析をおこない、 $GA_{4/7}$ に応答する配列を抽出した。さらに BLASTX プログラムを用いて、データベース上の既知遺伝子との相同性検索を行い、 $GA_{4/7}$ に応答する花成関連遺伝子を推定した。

(4) 花成関連遺伝子の発現解析

遺伝子発現は SYBR Green を利用したリアルタイム PCR によって解析した (CFX98, Bio-Rad)。また、遺伝子発現の定量法として検量線法を採用し、cDNA の希釈系列から毎回検量線を作成し定量した。反応系は、5 μ l の THUNDERBIRD SYBR qPCR mix (TOYOBO)、0.3 μ l の 10 μ M Forward primer、0.3 μ l の 10 μ M Reverse primer (最終濃度 0.3 μ M)、2 μ l cDNA (RNA 換算で 10 ng 相当)、滅菌水を加え 10 μ l に調製した。PCR 反応は、95 で 60 秒の熱変性処理を行い、続いて 95 で 10 秒の熱変性処理、58 で 15 秒のアニーリング処理、72 で 60 秒の伸長反応処理を 40 サイクル繰り返し、その後、65 から 95 の温度域で融解曲線分析を行った。また、データコレクションは伸長反応ステップに設定した。データ解析した遺伝子及びプライマーを表 2 に示す。また、リアルタイム PCR におけるハウスキープング遺伝子 (内在性コントロール) として eukaryotic initiation factor (eIF) を使用した。

4. 研究成果

(1) ジベレリンによる花成誘導

多くの系統において、ジベレリン処理後約 1 か月で雄花の膨らみを目視で確認することができた（図 1）。しかし、応答性の悪い系統も存在しており、ジベレリンに対するヒノキの花成応答には系統間差があることが明らかになった。

(2) 枝の乾重量を推定するアロメトリー式的開発と着花量の調査

21 個体から 104 本の枝を採取し、枝の直径と長さから枝の乾重量を推定するアロメトリー式を作成した（図 2）。このモデルの適合性は良好で、決定係数は約 0.981 であった。

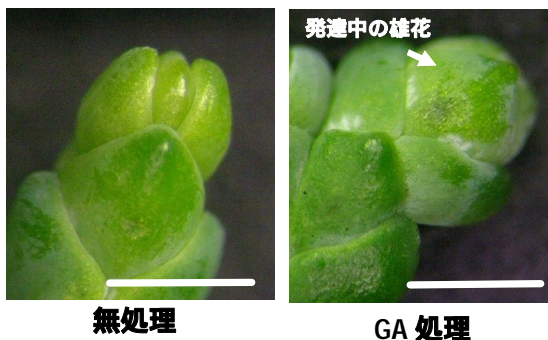


図 1. GA_{4/7} による雄花の着花
撮影日：2018 年 8 月 30 日
写真の白いバーは 1 mm を表している

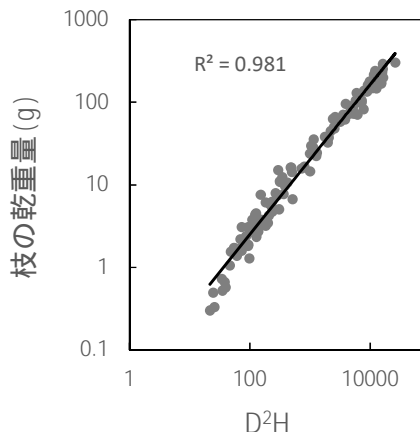


図 2. ヒノキの幹の直径(D)、樹高(H)と枝の乾燥重量の関係 (n=104)

次に、2017 年～2020 年における枝の乾燥重量当たりの着花量を図 3 に示した。全ての系統の雄花において、GA_{4/7} によって着花量が増加していた。しかし、GA_{4/7} に対する花成応答が極めて低い系統も存在していた。一方、雌花においても GA_{4/7} の効果は確認できたが、雄花に比べ、経年変化が大きいことが明らかになった。これは、ヒノキが持つ豊凶特性が関係していると思われる。

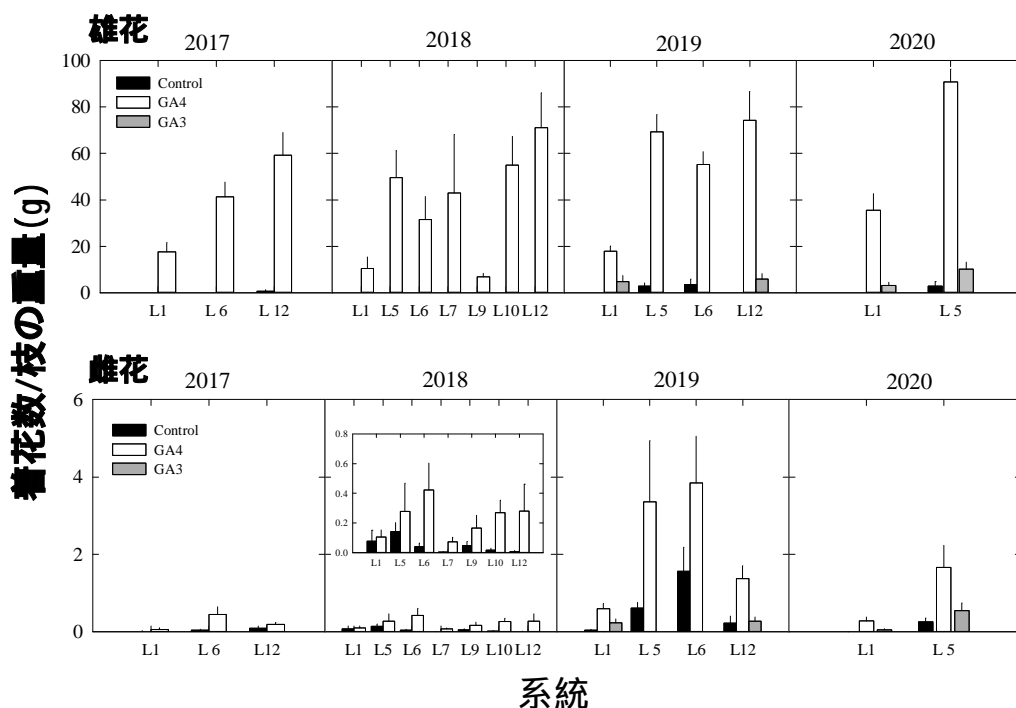


図 3. ヒノキの着花量の経年変化と系統間差

(3) RNA-seq 解析

RNA-seq によって合計 220,519,846 のリード(塩基配列の断片)が得られた。それらを De novo アセンブリング(リードの連結)によって 139,973 個の推定遺伝子からなる 140,034 個のコンティグ配列(転写産物、平均長 1124bp)を得た。このコンティグ配列に各サンプル由来のリードをマッピングすることで、発現量を比較した。その結果、GA_{4/7} 処理に対し発現が増加していた遺伝子が 386 個あり、発現が減少していた遺伝子が 438 個あった。遺伝子発現量が増加していた遺伝子の中には、MADS-box 遺伝子群、SPL 遺伝子群や BBX 遺伝子群などに属する花の形態形成に関わる遺伝子が含まれていた。

(4) 花成関連遺伝子の発現解析

RNA-seq 解析から抽出した花成関連遺伝子の発現特性を解析した。その結果、GA_{4/7} 処理後 2 週間で *CoLFY* 遺伝子の発現が増加していた(図 4)。シロイヌナズナの *LFY* 遺伝子は栄養成長から生殖成長に切り替わるマスタースイッチであり、複数の伝達経路からの情報を多重かつ冗長に受け取り、花成の決定に繋げている。それ故、ヒノキにおいても同様の伝達経路が存在し、花成促進遺伝子として機能している可能性がある。また、この *CoLFY* の発現と雄花着花量の関係を調べた(図 5)。その結果、GA_{4/7} 処理後 2 週間の *CoLFY* の発現増加が枝の重さあたりの雄花量と相関があった。それ故、この遺伝子の発現変化が雄花生産量により強い影響を与えているかもしれない。

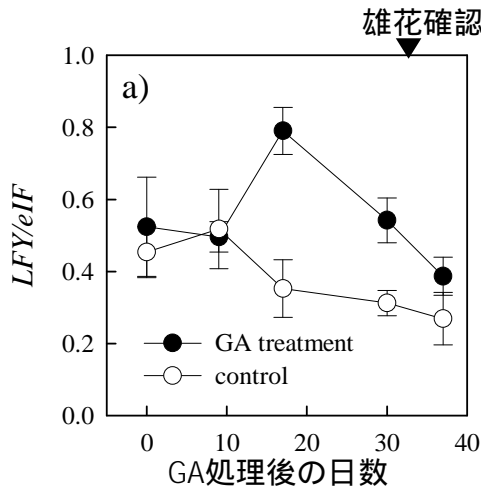
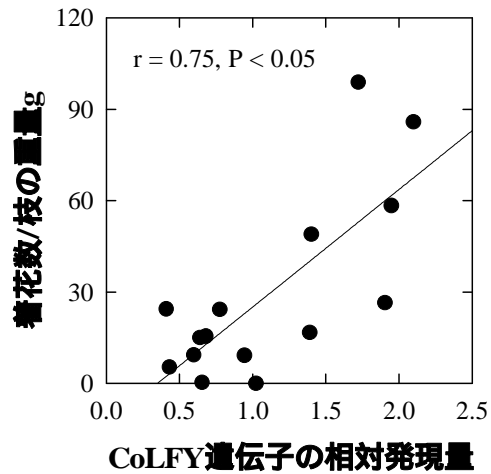


図 4. GA_{4/7} 処理によるヒノキの *LFY* 遺伝子の発現の経時変化



(GA処理後2週間での発現 / GA処理前の発現)

図 5. GA_{4/7} 処理によるヒノキの *LFY* 遺伝子の相対発現量と雄花着花量の関係

以上のように、ヒノキの花成を誘導するには、GA_{4/7} が効果的である。また、GA_{4/7} に対するヒノキの花成応答の背景にあるメカニズムには *CoLFY* 遺伝子が強く関与していることを明らかにした。しかし、GA_{4/7} に対する雌花の着花量には経年変化があり、GA_{4/7} だけでは、ヒノキの豊凶の影響を強く受けてしまうことも明らかにした。今後は、花の性比をコントロールできるかどうか鍵になる。一方、GA_{4/7} の効果が極めて低い系統も存在していた。このような系統は、少花粉の性質を保持している可能性があり、今後の再造林を考える上で非常に重要である。しかしながら、GA_{4/7} に対する花成応答性が低いということは安定的な種子増産が難しいということを示している。そのため、ヒノキのより詳細な花成メカニズムを明らかにし、GA_{4/7} に代わる新たな着花促進技術を開発する必要がある。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計7件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 兼松史奈、福田拓実、山田晋也、片畑伸一郎
2. 発表標題 水ストレス及びジベレリンに対するヒノキの花成応答
3. 学会等名 第133回日本森林学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 福田拓実、片畑伸一郎、山田晋也
2. 発表標題 若齢ヒノキの水分ストレスによる種子生産の可能性
3. 学会等名 第133回日本森林学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 兼松史奈、福田拓実、山田晋也、片畑伸一郎
2. 発表標題 水ストレスに対するヒノキの花成応答
3. 学会等名 第132回日本森林学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 福田拓実、片畑伸一郎、山田晋也、野末尚希
2. 発表標題 ヒノキの水分ストレスによる着花促進技術について
3. 学会等名 第132回日本森林学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 片畑伸一郎、山田晋也、向井謙
2. 発表標題 ジベレリンに対するヒノキの着花量と遺伝子発現
3. 学会等名 第131回日本森林学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 上兼栗ふく、山田晋也、片畑伸一郎
2. 発表標題 ヒノキのジベレリンに対する花成応答の系統間差
3. 学会等名 第130回日本森林学会大会
4. 発表年 2019年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

6. 研究組織

	氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究 分 担 者	山田 晋也 (Yamada Shinya) (20502579)	静岡県農林技術研究所・静岡県農林技術研究所・上席研究員 (83804)	

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

共同研究相手国	相手方研究機関
---------	---------