

平成 21年 6月 1日現在

研究種目：若手研究 (B)  
 研究期間：2007～2008  
 課題番号：19780134  
 研究課題名 (和文) 熱帯早生樹アカシア・マンギウムの木部発現遺伝子の網羅的解析  
 研究課題名 (英文) TRANSCRIPTOMIC ANALYSIS OF GENES EXPRESSED IN XYLEM OF A TROPICAL  
 FAST GROWING TREE *ACACIA MANGIUM*  
 研究代表者  
 鈴木 史朗 (Suzuki Shiro)  
 京大大学生存基盤科学研究ユニット・助教  
 研究者番号：70437268

研究成果の概要：アカシア・マンギウムは、パルプ用材として重要な熱帯早生樹であるが、分子育種に必要な遺伝子情報はほとんど整備されていない。本研究では、アカシア・マンギウム遺伝子情報を整備するため、1万弱の配列からなる分化中の木部およびシュートの発現配列タグ(EST)を作製した。これらのESTは、電子計算機を用いた配列解析に供し、6,252個の重複のない配列に統合された。これらの配列につき、インターネットを通じて検索可能なデータベースを作成した。

## 交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007年度	1,800,000	0	1,800,000
2008年度	1,600,000	480,000	2,080,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	480,000	3,880,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：林学、林産科学・木質工学

キーワード：アカシア・マンギウム、リグニン、EST、データベース、トランスクリプトーム

## 1. 研究開始当初の背景

アカシア・マンギウムは、東南アジアの高温多湿の低地における主要な実用熱帯早生樹である。年間1ヘクタール当たり30立方メートルの木材体積の増加という極めて活発な成長性を示し、酸性および貧栄養土壌に強く、比較的病害が少ない。木材は紙・パルプ用はもとより、薪炭材、建材、パーティクルボードなど、様々な目的に利用される森林バイオマスであり、日本へもパルプ用材、床板材などとして大量に輸入され、今後もアカシア・マンギウムの大規模植林が期待されて

いる。しかし、上記のような利点の反面、心材色や、材質、心材腐朽、木材乾燥が困難などの欠点や改良すべき点も兼ね備えており、このような特徴を克服するための育種が必要である。

樹木の育種は、数世代にわたり形質の優れた個体を交配・選抜することにより従来行われてきた。しかし、生殖周期の長い樹木ではこのような方法は非常に時間がかかるので、一年生の作物の場合と比べ、品種改良は進んでいない。さらに、形態や材質などの形質発現には多くの遺伝的素質が複雑に影響しあ

っており、樹木ではこれらの知見は未解明であるので、優良個体が得られる割合は偶然に左右されていることが多い。つまり、従来の方法による育種は非効率である。そこで、近年作物で盛んに行われているバイオテクノロジーによる育種を活用すれば、ライフサイクルの長い樹木においても効率的な育種が可能となると期待される。

実際、早生樹では主に冷温帯に適するポプラを中心にバイオテクノロジーによる育種が進められている。理由として、遺伝子組換えが容易で成長が早いこと、発現配列タグ (EST) データベースやゲノム配列データベースなどの網羅的な遺伝子塩基配列情報が整備されていることなどが挙げられる。これらの研究基盤が活用され、近年、遺伝子の網羅的解析によって得られた知見を反映させた樹木バイオテクノロジーが、スウェーデンや米国などの国々を中心に盛んになってきている。

ポプラ以外の樹木バイオテクノロジーの例は、ユーカリやスプルースにおいて若干見られる程度であり、あまり進んでいないが、欧米を中心に今後進展すると考えられる。なお、温帯～亜熱帯の早生樹であるユーカリに関しては、ポプラに続き、全ゲノム遺伝子配列解析が米国を中心に進んでおり、北米や欧州における重要な造林木であるスプルースやテグダ松についても既に EST データベースが整備されている。一方、アカシア・マンギウムに関しては、東南アジア熱帯域の最重要早生樹であるにもかかわらず、花で特異的に発現している遺伝子の EST データベース作成例が一例あるのみであり、アカシア・マンギウム木部発現遺伝子の EST データベースは未だに作成されていない。従って効率的なバイオテクノロジーによる育種を可能とするための基盤として、アカシア・マンギウム木部発現遺伝子の EST データベース構築が必要である。

樹木の木部形成機構の解明は、林産科学上の重要課題であるだけでなく、得られた知見を上述のように樹木バイオテクノロジーに応用して、優れた形質を持つ早生樹を作出し、持続的な生産と利用を行うために不可欠である。従来、木部形成機構は、草本であるシロイヌナズナなどをモデルとして、突然変異体の形質変化を解析する分子遺伝学的手法などにより明らかにされてきた。最近これに加え、全遺伝子発現の変化をマイクロアレイと呼ばれる技術により網羅的に調べ、木部形成を誘導する遺伝子の同定に成功している例も見られる。しかし、シロイヌナズナで得られる知見は、一次木部という草本と木部に共通の組織の形成に関するものであって、様々な種類の二次木部細胞への分化・成熟といった樹木に独自の生命現象は、樹木を使わ

なければ解明できない。樹木の場合、多数の突然変異体のスクリーニングを行うような分子遺伝学的手法は、長い時間と広い場所を必要とするので現実的ではない。そこで、樹木では、前述のマイクロアレイを使って、様々な条件・組織における遺伝子発現を網羅的に解析して、遺伝子の機能を推定するという方法が主流となっている。ただし、ポプラはあくまで樹木としてのモデルであるので、実用早生樹における効果的な樹木バイオテクノロジーを進めるためには、当該樹種における網羅的な遺伝子発現解析も平行して進める必要がある。しかし、現在のところアカシア・マンギウム木部における網羅的遺伝子発現解析の例はない。更に、木部形成機構の解明が最も進んでいるシロイヌナズナでさえ、例えば、いつ、どこで、どのようにセルロースなど木部成分の「合成開始のスイッチ」が入り、「スイッチが入った」という情報が植物体内で伝達され、制御されているのかといった複雑なメカニズムは未解明の部分が多い。しかし、近年、植物科学の分野では、情報科学の理論を取り入れたシステム生物学的研究が急速に興隆しており、解明に効果を上げている。従って、このような先端的手法を用いれば、植物科学としても最先端の成果を生み出すことができるだけでなく、アカシア・マンギウムにおける木部形成の遺伝子発現ネットワークを解明することができると期待される。

## 2. 研究の目的

前項で述べたような内外の学術情勢を鑑み、本研究では、東南アジアにおける主要早生樹であるアカシア・マンギウムの樹木バイオテクノロジーを行うための前段階として「熱帯早生樹アカシア・マンギウムの木部遺伝子の網羅的解析」を2年間の研究期間で行うことを目的とした。

## 3. 研究の方法

アカシア・マンギウムの木部などの組織で発現している遺伝子を網羅的に調べるために、これまで他の植物種で行われているような方法を採用した。すなわち、まず組織からトータル RNA を抽出し、逆転写酵素により cDNA を合成する。つぎに cDNA をベクターに連結し、大腸菌に導入し、cDNA ライブラリを作成する。最後に、シーケンサーで個々の cDNA の塩基配列を解読し、データベース検索を行う、という方法をとった。

### (1) アカシア・マンギウムからのトータル RNA の抽出と精製

京大大学生存圏研究所で約1年間培養したアカシア・マンギウムより、分化中の木部と、シュートおよび葉を別々に採取し、液体窒素

で凍結した。これらの組織各々約 1g より、Bugos らの方法に従って、トータル RNA を抽出した。トータル RNA は変性ゲル電気泳動における泳動パターンおよび分光光度計によって得られたスペクトルより、分解しておらず、混入物も少ないことが示された。

次に、これらのトータル RNA をキアゲン社製 RNeasy Plant Mini Kit を用いて精製し、さらにエタノール沈殿を繰り返すことによる糖除去操作を行った。精製された RNA をアジレント社製バイオアナライザーによって分析したところ、分解しておらず、混入物も少ないことが示された。

#### (2) トータル RNA からの cDNA の合成と cDNA ライブラリの作製

アカシア・マンギウム の分化中木部由来のトータル RNA を 0.91  $\mu$ g、シュートおよび葉由来トータル RNA を 0.7  $\mu$ g ずつ混合し、この混合サンプルを出発材料として、Evrogen 社製 Trimmer-Direct cDNA Normalization Kit および Clontech 社製 Creator SMART cDNA Library Construction Kit を用いて平均化大腸菌 cDNA ライブラリの作製を行った。

具体的には、これらの混合物から CDS-3M アダプターと SMART IV オリゴヌクレオチドを用いて逆転写反応を行い cDNA を得て、その後の PCR 反応により cDNA を増幅した。得られた増幅産物は QIAquick PCR Purification Kit を用いて精製した。次に、Trimmer-Direct cDNA Normalization Kit のプロトコールに沿って、DSN (Duplex-specific nuclease) を用いた cDNA 平均化を行い、平均化された cDNA を得た。cDNA は再度 PCR により増幅し、Sfi I で制限酵素処理後、ゲルろ過カラムによってサイズ分画し、長さが 0.5 kb 以上の画分を集めた。得られた画分は濃縮後、pDNR-LIB ベクターにライゲーションした。ライゲーション産物はインビトロジェン社製 DH10B-T1<sup>R</sup> コンピテントセルにエレクトロポレーションし、大腸菌 cDNA ライブラリを得た。また、当該大腸菌 cDNA ライブラリの力価及び平均長を算出した。

#### (3) cDNA ライブラリからの cDNA クローンの単離と DNA シークエンシング

得られた大腸菌 cDNA ライブラリから 10752 個 (384 穴プレート×28 枚) の独立したコロニーをピックアップし、それぞれのコロニーに含まれるインサート配列をコロニー PCR により増幅し、挿入配列の 5' -末端側のベクターにアニールするプライマーを用いてサンガー法により ABI 社のシーケンサーを用いてシーケンスした。

#### (4) シークエンスデータのコンピュータ解析

得られたクロマトデータは、その後、コンピュータプログラム処理を行った。まず、phred プログラムを用い、オプション-trim\_alt0.01 (QV 値=20) の条件で塩基配列情報の抽出を行った。ここで、150bp 以上の配列が得られた配列を選抜し、ベクター配列を除去するために、-minmatch 12、-minscore 20 の条件で cross\_match プログラム処理を行った。その後、phrap プログラム処理を行い、コンティグ配列とシングルトン配列を得た。得られた配列について、NCBI (<http://www.ncbi.nih.gov>) に登録されている遺伝子配列データベースに対して blast 解析を行った。

#### (5) EST データベースの構築

コンティグ配列とシングルトン配列を用いて、fasta 形式のデータベースファイルを作成し、上記コンティグ配列とシングルトン配列に対し blast 検索可能なデータベースを試作した。

### 4. 研究成果

#### (1) アカシア・マンギウムからのトータル RNA の抽出と精製

今回、解析する遺伝子の種類をできるだけ多くするために、当初予定していた分化中木部だけではなく、シュートおよび葉からもトータル RNA を抽出することに変更した。従来様々な植物種でよく使われている RNA 抽出法 (AGPC 法、Trizol 法等) をいくつか試みたが、純度が高く、分解されていないトータル RNA を調製できなかった。そこで、Bugos らによる、木本植物からの RNA 抽出法を参考に抽出したところ、純度の高く分解されていないトータル RNA を得ることができた。

#### (2) トータル RNA からの cDNA の合成と cDNA ライブラリの作製

cDNA 合成、cDNA のノーマライゼーション、および大腸菌 cDNA ライブラリの作製はキット添付の説明書の通り行った。得られた cDNA ライブラリの力価及び当該大腸菌 cDNA ライブラリの力価は、 $3.25 \times 10^9$  cfu/ $\mu$ g であった。また、ランダムに選択した 15 クローンのインサート配列を PCR によって増幅し、電気泳動によって長さを調べ、平均長を算出したところ、約 1.2 kb であった。

#### (3) cDNA ライブラリからの個々の遺伝子の単離と DNA シークエンシング

大腸菌 cDNA ライブラリから 10,752 個の独立した大腸菌のコロニーを鋳型として、PCR 反応を行い、PCR によるインサート配列の増幅状況について電気泳動で確認したところ、

8割程度のインサートについては問題なく増幅されていることが確認できた。なお、増幅に成功したかしなかったに拘わらず、PCR産物を希釈し、シーケンス反応に供した。

#### (4) シークエンスデータのコンピュータ解析

得られたクロマトデータはすでに述べたとおり、コンピュータ解析に供した。SwissProt データベース（既知の全タンパク質のアミノ配列が登録されているデータベース）に対して、今回得られた全配列をBLASTX 検索に供することで、完全長率を求めた。計算方法にもよるが、完全長率は60~70%と予想され、完全長クローンがかなり高い割合で保存されていることが明らかとなった。

このライブラリから得た150bp以上の配列は、cross\_match プログラムにより、9175個と解析された。これらの配列のうち、BLASTX 解析でE値が $1e^{-5}$ 以下のもの（すなわち、既知のタンパク質と相同性を示す配列）は7,710個であった。

この9,175個の有効配列は、phrap プログラムにより、2,784個のコンティグ配列（オーバーラップする部分により配列をつなぎ合わせたもの）と、3,468個のシングルトン配列（他のどの配列ともオーバーラップのなかったもの）に分類された。singleton が比較的多いのは、cDNAの平均化に成功していることを示唆している。

次に、これらのコンティグ配列とシングルトン配列をBLASTX またはBLASTN プログラムによってデータベース検索した。データベースとして選択した生物種によるが、アノテーションの付いていないブドウの塩基配列が検索される場合があり、これらに対しては何らかの対策が必要である。

ここで、具体的な成果として、木材の主要な構成成分の一つであるリグニンの生合成に関係する遺伝子配列について検索した結果を示す(Table)。リグニンの前駆体であるモノリグノール類の生合成に関与するほぼ全ての酵素について、相当する遺伝子配列が見出された。詳細な機能解析は今後の課題であるが、今回の研究によって一挙にアカシア・マンギウムの一連の遺伝子の配列が明らかとなったことは大きな成果である。

#### (5) EST データベースの構築

今回の成果をデータベースの形に編集し、インターネットを通じて検索できるようにするため、BLAST プログラムによって相同配列を検索できるデータベースを試作した。下記のURLを通じてアクセス可能である。

[http://www.rish.kyoto-u.ac.jp/W/LMSFPM/test/blast-2.2.20/blast\\_search.htm](http://www.rish.kyoto-u.ac.jp/W/LMSFPM/test/blast-2.2.20/blast_search.htm)

Table. List of unigenes putatively involved in lignin biosynthesis.

ID	Length	Description	AGI	E-value	Identity
Contig_487	698	PAL1	At2g37040	1E-90	77
Contig_59	800	C4H(CYP73A5)	At2g30490	4E-71	77
AM1016P04	830	4CL-like8	At5g63380	1E-69	71
AM1004N13	768	HCT	At5g48930	2E-30	81
Contig_536	795	CCoAOMT1	At4g34050	E-100	85
AM1018B14	778	CCoAOMT7	At4g26220	5E-77	77
Contig_2567	1037	CCR1	At1g15950	E-110	67
Contig_950	603	CCR-like3	At2g33590	1E-62	66
AM1013K06	848	CCR-like5	At5g58490	2E-76	78
Contig_2366	680	FAH1(CYP84A1)	At4g36220	5E-88	78
Contig_921	735	COMT	At5g54160	2E-76	78
AM1024H06	317	COMT-like9	At1g77520	5E-10	34
Contig_2232	650	CAD2	At3g19450	5E-71	67
AM1023D13	795	CAD4	At4g37980	1E-21	59

#### 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3件)

- ① マメ科 *Acacia* 属樹木バイオテクノロジー研究の現況について、鈴木史朗、梅澤俊明、生存圏研究、第3巻、41-42、2007、査読有
- ② *Acacia mangium* と *Acacia auriculiformis* の化学成分調査、梅澤俊明、鈴木史朗、生存圏研究、第3巻、43-47、2009、査読有
- ③ 梅澤俊明、鈴木史朗、柴田大輔、Tree Biotechnology of Tropical *Acacia*、Plant Biotechnology、第25巻、309-313、2009、査読有

[学会発表] (計4件)

- ① 梅澤俊明、鈴木史朗、柴田大輔、Tree Biotechnology of Tropical *Acacia*、JSPS-Sweden/Japan Colloquium on Frontiers of Plant Biotechnology、2007年10月4日、ストックホルム、スウェーデン
- ② 鈴木史朗、梅澤俊明、熱帯アカシアのバイオテクノロジー、第90回生存圏シンポジウム「未来を拓く樹木バイオテクノロジー」、2008年2月18日、横浜市理化学研究所横浜研究所
- ③ 鈴木史朗、須田邦裕、櫻井望、鶴巻勇太、服部武文、鈴木秀幸、柴田大輔、梅澤俊明、アカシア・マンギウムのEST解析、第59回日本木材学会大会、2009年3月16日、松本市、まつもと市民芸術館
- ④ 鈴木史朗、須田邦裕、櫻井望、鶴巻勇太、

服部武文、鈴木秀幸、柴田大輔、梅澤俊明、アカシア・マンギウムにおける分化中木部およびシュートの EST 解析、第 50 回日本植物生理学会年会、2009 年 3 月 22 日、名古屋市、名古屋大学

〔図書〕（計 0 件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
出願年月日：  
国内外の別：

○取得状況（計 0 件）

名称：  
発明者：  
権利者：  
種類：  
番号：  
取得年月日：  
国内外の別：

〔その他〕

ホームページ

<http://iss.iae.kyoto-u.ac.jp/iss/jp/index.html>

<http://www.rish.kyoto-u.ac.jp/W/LMSFPM/>

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

鈴木 史朗 (SUZUKI SHIRO)  
京都大学・生存基盤科学研究ユニット・助教  
研究者番号：70437268

### (2) 研究分担者

該当なし

### (3) 連携研究者

該当なし