

令和 5 年 6 月 9 日現在

機関番号：82105

研究種目：若手研究

研究期間：2019～2022

課題番号：19K15876

研究課題名(和文) スギの環境適応における時計遺伝子の役割の解明：網羅的遺伝子発現解析を用いて

研究課題名(英文) The role of clock genes in environmental adaptation of Japanese cedar: Insights from transcriptome analysis

研究代表者

能勢 美峰 (Nose, Mine)

国立研究開発法人森林研究・整備機構・森林総合研究所 林木育種センター・主任研究員 等

研究者番号：20582753

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,300,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、林業用主要樹種であるスギ(*Cryptomeria japonica* D. Don)のフェノロジー(生物季節)制御における時計遺伝子(GIGANTEA)の役割を明らかにするため、時計遺伝子CjGIを過剰に発現させたスギの組換え体を作製した。組換え体では非組換え体と比べて、フェノロジーが遅れること、秋(9月から11月)の遺伝子発現が大きく異なっており、それらは短日応答遺伝子を多く含んでいることが明らかになった。これらの結果から、CjGIは秋の短日に応答し、シグナル経路の下流に位置する遺伝子の発現量を制御することで、秋のフェノロジーを制御していると推定された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

スギのフェノロジーは、樹高や材質などの有用形質に影響を与えるだけでなく、多様な気候や季節変化する環境に適応するために非常に重要な役割を果たしている。そのため、気候変動による環境の変化が危惧される近年、スギのフェノロジーの制御機構の解明がますます重要になっている。本研究の成果を今後さらに発展させることによって、気候変動下におけるスギの環境適応性の予測や各植栽地の環境に適したクローン(系統)の選抜が可能になると考える。

研究成果の概要(英文)：In this study, we generated transgenic lines overexpressing the orthologs of CjGI to understand the role of the clock gene GIGANTEA (CjGI) in controlling phenology in Japanese cedar (*Cryptomeria japonica* D. Don). Potted transgenic seedlings of Japanese cedars exhibited clear differences in phenology compared to the wild type seedlings. In addition, significant differentially expressed genes were observed, including short-day response genes, particularly during autumn (from September to November). From these results, it is inferred that CjGI regulates autumn phenology by responding to short days in autumn and controlling the expression levels of downstream genes in the signaling pathway.

研究分野：林木育種

キーワード：時計遺伝子 フェノロジー 遺伝子組換え トランスクリプトーム解析 スギ RNA-seq 環境適応 成長

科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属します。

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

スギ(*Cryptomeria japonica* (L.f.) D. Don)のフェノロジー(生物季節)には、伸長成長をはじめ幅広い変異が存在することが報告されている。このフェノロジーの違いは、材質や樹高などの有用形質に与える影響が大きいだけでなく、季節変化する環境への適応においても重要な役割を果たしている。しかし、スギをはじめとする針葉樹のフェノロジーがどのように制御されているのか、その分子機構は明らかにされていない。

時計遺伝子は、概日リズムを制御する遺伝子として知られている。これまでに行なった様々な環境下におけるスギの網羅的な遺伝子発現解析によって、時計遺伝子は自然環境下においては日周・年周リズムを刻んでおり、人工環境下においては温度や日長の変化に迅速に応答して発現量を変化させることが明らかになった(Nose & Watanabe 2014, Nose et al. 2020)。これらの結果から、時計遺伝子がスギのフェノロジーの制御においても重要な働きをする可能性が推定された。しかし、針葉樹における時計遺伝子の役割についてこれまで報告はなく、その働きについては不明であった。

### 2. 研究の目的

#### (1) スギの時計遺伝子の役割の解明

本研究では、時計遺伝子のフェノロジー制御における役割を明らかにすることを目的とした。スギの時計遺伝子を過剰発現させたスギの遺伝子組換え体を作成し、フェノロジーに関わる形質を評価することによって、時計遺伝子がフェノロジーに与える影響を明らかにした。

#### (2) 時計遺伝子によるフェノロジー制御の分子機構の解明

時計遺伝子によって、針葉樹のフェノロジーが分子レベルでどのように制御されているのか明らかにすることを目的とした。組換え体と非組換え体において発現している遺伝子を比較することによって、時計遺伝子が影響を与える遺伝子群を明らかにし、その制御メカニズムを推定した。

### 3. 研究の方法

#### (1) 組換え体と非組換え体のフェノロジー形質の測定

他の植物の時計遺伝子(*GIGANTEA*)の塩基配列と相同性の高い遺伝子をスギから単離し(以下、*CjGI*)、過剰発現させたスギの組換え体を作成した。組換え体と非組換え体をポットに植栽し、特定網室で1年半育成した。形質評価として、定期的に苗高の測定を行うとともに、春(4月)と秋(11月)にシュート先端の芽の様子を観察した。

#### (2) 組換え体と非組換え体のトランスクリプトームの年周性を解析

組換え体と非組換え体から年間8回、定期的にシュートを採取した。合計48サンプル(2系統×8時系列×3個体)からRNAを抽出し、次世代シーケンサーによる網羅的な遺伝子発現解析(RNA-seq)を行なった。組換え体と非組換え体で発現量が異なっている遺伝子は、時計遺伝子のシグナル経路の下流に位置し、時計遺伝子の影響を受けている遺伝子群だと推定される。そこで、組換え体と非組換え体で発現している遺伝子をサンプリングを行なった時期ごとに比較し、発現量に有意差の見られた遺伝子を明らかにした( $p$ -value < 0.001)。

### 4. 研究成果

#### (1) 時計遺伝子によるスギのフェノロジー制御(能勢ら 2022)

苗高測定の結果から、組換え体は非組換え体に比べて、春(3~5月)の成長量が小さく、秋(9~11月)の成長量が大きいことが明らかになった。年間を通した成長量は組換え体の方が大きく、結果として苗高に差が生じたことがわかった。また、春(3月)と秋(11月)にシュート先端の芽の観察を行なったところ、組換え体では非組換え体に比べて、春の開葉と秋の冬芽の形成が有意に遅いことが明らかになった。これらのことから、時計遺伝子がスギのフェノロジーを制御しており、高発現させることによってフェノロジーが遅れたと推定した。

#### (2) 秋のフェノロジー制御を時計遺伝子は遺伝子発現レベルから制御(能勢ら 2023)

時計遺伝子によるフェノロジーの制御機構を解明するため、組換え体と非組換え体を用いてRNA-seq解析を行なった結果、両者間で合計約1900遺伝子の発現量に有意差がみられた。時期ごとにみると、冬から夏(2~8月)にかけては発現量に差があった遺伝子数は少ないのに対して、秋(9~12月)にはその数が倍以上に増加した。11月には発現量に差のある遺伝子数が最も多くなった。また、発現量に差の見られた合計約1900遺伝子には、多くの短日応答遺伝子が含まれており、時期ごとにみると11月にその割合が最も高くなった。これらの結果から、時計遺伝子が秋の短日に応答し、シグナル経路の下流に位置する遺伝子群の発現量を変化させることで、成長停止時期を制御していると推定された。スギの秋の成長停止時期には幅広い変異があることが報告されているが、その制御には時計遺伝子をは

じめとするこれらの遺伝子が関わっている可能性が高い。一方、組換え体と非組換え体では、春の成長開始や開葉時期に大きな違いがみられたにも関わらず、この時期の発現遺伝子群には両者間で大きな違いがないことが明らかになった。これらの結果から、時計遺伝子が春の成長開始時期に与える影響は、転写後制御によるものと推定した。

<引用文献>

- 能勢美峰, 小長谷賢一, 栗田学, 安田悠子 (2022) スギにおける時計遺伝子の過剰発現体を用いたフェノロジーの解析: 第 63 回日本植物生理学会大会講演要旨集, p566
- 能勢美峰, 小長谷賢一, 栗田学 (2023) スギ CjGI 遺伝子過剰発現体におけるトランスクリプトームの年周性: 第 64 回日本植物生理学会大会講演要旨集, p756
- Nose M, Kurita M, Tamura M, Matsushita M, Hiraoka Y, Iki T, Hanaoka S, Mishima K, Tsubomura M, Watanabe A (2020) Effects of day length- and temperature-regulated genes on annual transcriptome dynamics in Japanese cedar (*Cryptomeria japonica* D. Don), a gymnosperm indeterminate species. PLOS ONE 15(3):e0229843
- Nose M, Watanabe A (2014) Clock genes and diurnal transcriptome dynamics in summer and winter in the gymnosperm Japanese cedar (*Cryptomeria japonica* (L.f.) D. Don). BMC Plant Bio 14:308

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計4件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 能勢美峰、小長谷賢一、栗田学、安田悠子
2. 発表標題 スギにおける時計遺伝子の過剰発現体を用いたフェノロジーの解析
3. 学会等名 第63回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 能勢美峰
2. 発表標題 遺伝子発現からみたスギのフェノロジー制御機構
3. 学会等名 日本木材学会 組織と材質研究会 2022年冬季シンポジウム（招待講演）
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 能勢美峰、小長谷賢一、栗田学
2. 発表標題 スギCjGI遺伝子過剰発現体におけるトランスクリプトームの年周性
3. 学会等名 第64回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2023年

1. 発表者名 能勢美峰、遠藤圭太、大平峰子、田村 明、小長谷賢一、栗田学
2. 発表標題 遺伝子発現解析から見たスギの越冬
3. 学会等名 第134回日本森林学会大会
4. 発表年 2023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
--	---------------------------	-----------------------	----

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
---------	---------