

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 27 年 6 月 23 日現在

機関番号：82105

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2013～2014

課題番号：25660127

研究課題名(和文)次世代シーケンシングによる網羅的解析でヒノキ発根性関連遺伝子に迫る

研究課題名(英文) Approach to Chamaecyparis obtusa root inducing candidate genes by an exhaustive analysis using next-generation sequencing

## 研究代表者

松本 麻子 (MATSUMOTO, ASAKO)

独立行政法人森林総合研究所・森林遺伝研究領域・室長

研究者番号：90353862

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：ヒノキは一般的に発根性が低いため挿し木が難しい針葉樹と認識されているが、この課題では発根性に優れた挿し木品種であるナンゴウヒに着目し、一般的なヒノキと比べてどのような遺伝子に発現の違いがみられるかを調査し、発根性関連の候補遺伝子の検出を試みた。RNAシーケンスの結果、148,163の挿し木発根性に関連すると考えられる発現遺伝子群を収集することができた。シロイヌナズナの発根性関連候補遺伝子との配列類似性を調べたところ、90遺伝子がヒノキの配列との類似性を示した。ナンゴウヒと普通ヒノキの間では1,312の遺伝子で発現量に違いがあり、その多くがストレス応答やシグナル伝達に関係する遺伝子であった。

研究成果の概要(英文)：It has been recognized that hinoki (*Chamaecyparis obtusa*) has a characteristic that generally rooting difficult. We focused on cutting cultivar 'Nangouhi' with superior originating nature in rooting ability and investigated whether differences in expression genes can be seen between 'Nangouhi' and ordinary hinoki to detect the root-inducing candidate genes.

In the results of the RNA sequences, it was possible to collect 148,163 of expression genes which are believed to be related to rooting after cuttings. Examination of the nucleotide sequence similarity with rooting related candidate genes of *Arabidopsis*, 90 genes showed similarity to sequences of hinoki. In between 'Nangouhi' and ordinary hinoki, there were differences in the amount of expression level in the 1,312 genes. Many of them were related to the stress response and the signal transduction.

研究分野：森林遺伝育種学

キーワード：発現遺伝子 発根性 ヒノキ

## 1. 研究開始当初の背景

ヒノキはスギに次いで重要な造林樹種であり、ヒノキの造林は長きにわたり実生苗より行われ、挿し木増殖は難しいという認識が強く定着している。スギでは実生苗による造林のほか、九州地方で挿し木による苗木の育成・造林も行われており、挿し木発根性に優れているという性質が林業の幅を広げていることは明らかである。挿し木発根性は、植物ホルモンであるオーキシシンで挿し穂を処理し、植物体の内生オーキシシンのレベルアップを計ることで促される植物種が多く、スギはこの類に当てはまる。一方、ヒノキの挿し木では一般的に、オーキシシン処理を行っても発根性はそれほど大きく向上しない。この理由として、発根性に優れた樹種と発根が難しい樹種では、そもそも内生オーキシシンの違いだけでなく、人為的なオーキシシン処理による内生オーキシシンのレベルアップの試みに対しても反応が異なるのではないかと考えた。つまり、内ホルモンのレベルアップとそれに伴う根の原基発生誘導、そして後続して起こるオーキシシン濃度の速やかな低下と根の原基発達、発根促進に至る過程で、応答する遺伝子の発現に違いがあるのではないだろうか。ヒノキにおいてはこれまで、このようなオーキシシン処理についてどのような遺伝子が初期に応答しているかは全く不明である。

## 2. 研究の目的

熊本県阿蘇地方の南郷谷で発見されたヒノキ(ナンゴウヒ)発根性に優れており、樹齢が高まっても発根率は低下せず、オーキシシン製剤のオキシベロンで処理をするとさらに発根率が安定して高まる系統である。この系統は、初期成長は遅いものの材質は優れ、特に熊本県内では造林面積が増している。そこで本研究課題では、この系統をモデル植物における変異体のような位置づけで利用し、挿し木から発根に至るまでに発現量が増える(あるいは減る)遺伝子を網羅的に収集し、一般的なヒノキとナン

ゴウヒ間で発現パターンが異なる遺伝子を探査することで、発根性に関連する初期応答遺伝子に迫ることを目的とした。

## 3. 研究の方法

### (1) ナンゴウヒおよび大井6号の挿し木と発根調査

ナンゴウヒは複数系統あるが、本研究では主要系統であるナンゴウヒ14型(以後、N14型という)を対象とした。発根性が劣る一般的なヒノキとしては、静岡県精英樹大井6号(以後大井6号とする)を用いた。2013年4月におよそ20年生の成木の枝より荒穂を採取し、長さ約20cmの挿し穂を作った。鹿沼土(小粒)を敷いた挿し床に挿し木を行い、発根率の調査を行った。発根の確認は、挿し木後10日ごとに行い、3ヶ月後まで継続した。その後、さらに3ヶ月育成し、最終的な発根の評価は挿し木6ヶ月後に行った。

### (2) 挿し穂からのRNA抽出

N14型および大井6号のRNA抽出はスピニング法を用いて行った。N14型の挿し木当日の針葉およびN14型と大井6号の挿し木1ヶ月後の枝部分を含む挿し穂全体を用いてRNAを抽出した。各サンプルのRNA量は、バイオアナライザーを用いて定量した。

### (3) 次世代シーケンサーでの塩基配列の獲得と整列化

RNAシーケンスは Illumina社のHiSeq2000を用いて行った。1サンプルあたり $4 \times 10^9$ 塩基、総計約 $12.5 \times 10^9$ 塩基の配列データを収集した。配列データをクリーニングしてアダプター配列や、品質の低い不要な配列を除去し、Trinityでアセンブル(整列化)を行った。

### (4) 発現遺伝子解析

整列化で得られたコンティグ配列については、モデル植物であるシロイヌナズナのタンパク質

配列 (TAIR10の35,386本の配列)とBLASTXによる相同性探索を行った。E-valueの閾値は $1E-3$ とした。さらにシロイヌナズナで側根と不定根の発生に関係のある139個の候補遺伝子に着目し、ヒノキのコンティグ配列との類似性検索を行った。また、発現量はコンティグ配列にマップされたリードの本数として評価した。2つのサンプル間でリード本数に有意差がある配列を発現量に違いがあるとみなして、該当する遺伝子の探索を行った。

#### 4. 研究成果

平成 25 年 4 月 26 日および 4 月 30 日に、N14 型および大井 6 号の挿し木を行った。各系統 30 本の挿し木を行い、10 日ごとに 3 ヶ月後まで発根調査を行った。最終的な発根の有無の評価は 6 ヶ月後にあたる 10 月下旬に行った。その結果、N14 型では早い挿し穂では、挿し木 1 ヶ月後には発根が確認され、3 ヶ月後には 85%にあたる 25 本、最終的には 90%に相当する 27 本で発根した (図)。一方、大井 6 号は調査期間を通じて発根がみられず、3 ヶ月後にはほとんどの挿し穂の切り口がカルス化していた。6 ヶ月後の最終判断時には、1 個体で発根が見られた以外は、全てカルスを形成していた。以上から、N14 型が極めて高い発根性を示すこと、



図 挿し木 3 ヶ月後のナンゴウヒ 14 型の発根の状況

大井 6 号は発根率が低く、挿し木での発根が難しい系統である事が確認出来た。

RNA 抽出には、挿し木当日と挿し木 10 日後、20 日後の本葉及び 1 ヶ月後の挿し木全体を用いたところ、挿し木当日と 1 ヶ月後のサンプルからシーケンスを行うのに十分量の RNA を抽出することができた。挿し木当日の N14 型、挿し木 1 ヶ月後の N14 型および挿し木 1 ヶ月後の大井 6 号の 3 サンプルから得たシーケンスデータを整理化した結果、148,163 本のコンティグ配列 (平均長約 700 塩基) が検出され、ヒノキの挿し木後から発根までの間に発現している遺伝子群を収集することができた。得られた発現遺伝子のうち、約 3 割はシロイヌナズナのコンティグ配列との高い類似性がみられた。さらにシロイヌナズナにおいて側根と不定根の発生に関係があるとされる 139 の候補遺伝子に着目したところ、そのうちの 90 遺伝子が 993 本のヒノキのコンティグ配列との配列類似性を示した。また、挿し木後 1 ヶ月経過した N14 型と大井 6 号の間では 1,312 の遺伝子で発現量に違いがあり、その多くがストレスへの応答やシグナル伝達に関係する遺伝子であることが明らかになった。中には、広葉樹の成長部位において同定され、ロブローリーパインでは不定根形成のための細胞分裂開始に関与すると報告されている -expansins 遺伝子群も多数含まれていた。それ以外の幾つかの例について下表に示す。これらの候補遺伝子については、それらの最終産物である酵素タンパク等の生理的機能や発根性と

表 挿し木 1 ヶ月後にナンゴウヒ 14 型と大井 6 号の間で発現量に違いがみられた遺伝子

ID	Description
c55816_g1_i2	chlorophyllase 1
c42586_g1_i1	hydroxyproline-rich glycoprotein family protein
c45913_g1_i1	Serine protease inhibitor (SERPIN) family protein
c57337_g2_i1	PLAT/LH2 domain-containing lipoygenase family protein
c53166_g3_i1	Leucine-rich repeat transmembrane protein kinase
c56428_g8_i1	alpha/beta-Hydrolases superfamily protein
c53166_g2_i1	Protein kinase superfamily protein
c48974_g1_i1	allene oxide synthase

の関連性については、本研究では結論づけられる段階には至れなかった。今後は、開発した発現量解析のためのマーカーを用いて他のヒノキ系統でもその発現について詳細に調査し、ナンゴウヒと比較することによって、ヒノキに優れた発根性をもたらすための初期応答遺伝子の同定に繋げたい。

#### 5. 主な発表論文等 なし

#### 6. 研究組織

##### (1)研究代表者

松本 麻子 (MATSUMOTO, Asako)  
森林総合研究所・森林遺伝研究領域・樹木遺伝研究室長  
研究者番号:90353862

##### (2)研究分担者

上野 真義 (UENO, Saneyoshi)  
森林総合研究所・森林遺伝研究領域・チーム長  
研究者番号:40414479