

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 19 日現在

機関番号：82105

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26450209

研究課題名(和文)ブナの外的環境による花成誘導のしくみを紐解く - ブナ苗木の安定供給に向けて -

研究課題名(英文)Unraveling flowering system of Japanese beech tree affected by external environments

研究代表者

大宮 泰徳 (Ohmiya, Yasunori)

国立研究開発法人森林総合研究所・樹木分子遺伝研究領域・主任研究員

研究者番号：70360469

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,900,000円

研究成果の概要(和文)：ブナFT遺伝子は開花前年の花芽形成期に花芽が誘導される枝の葉で発現し、ブナ花芽形成の指標としての利用の可能性が示唆された。ブナFT遺伝子プロモーター領域全長(5.3kbp)を単離し、青色光によって誘導されるE-box配列、白色光によって誘導されるモチーフ配列を同定した。シロイヌナズナPIF4ホモログFcPIF3の発現パターンがFcFTと正の相関がみられ、FcPIF3はシロイヌナズナと同様にFcFTの転写因子としての機能があることが示唆された。温度により発現量が変化するタンパク質のプロテオミクス解析を行い、高温環境下において発現量が変化するタンパク質の候補を複数抽出した。

研究成果の概要(英文)：FT gene from Japanese beech tree (*Fagus crenata*) (FcFT) transcripts increased in the leaves of flowered branches a year before. The result suggests application of FcFT gene expression pattern as prediction indicator of flowering following year, by measuring FcFT gene expression. E-box motif induced by blue light and motifs induced by white light were identified from FcFT gene regulated promoter sequences. Arabidopsis PIF4 homologue FcPIF3 expression pattern was positively correlated with FcFT expression. This correlation suggests that FcPIF4 transcript directly induce FcFT gene as formerly reported in Arabidopsis. Several proteins in which their production amounts are influenced by temperature were also identified by proteomics analysis.

研究分野：樹木分子生物学

キーワード：ブナ 花芽形成

1. 研究開始当初の背景

ブナの生息域は、地球温暖化の急激な環境変化の中で 100 年後には 1/10 にまで失われると予想されている。そのようなブナの環境に対する適応性を判断するために、様々な環境下で機能するマーカー遺伝子の発現量や酵素の機能、活性などの客観的かつ定量的な環境適応性のモニタリングや評価が可能な解析ツールを開発できないかと考えた。

我々は、ブナの花芽形成遺伝子について研究を進めてきた。また赤田らは、環境適応に関わる転写因子 R2R3-MYB 遺伝子群の解析を精力的に進め、花芽形成と関連する遺伝子を同定した。同時期に Nature 誌に bHLH 転写因子である *PHYTOCHROME INTERACTING FACTOR4* (*PIF4*) が外的温度変化に応じて花芽形成遺伝子を活性化させる論文が発表された。そこで、外的環境変化によるブナの着花誘導に関わると予想される上記の遺伝子に着目して研究を進展させた。

2. 研究の目的

移動できない植物は時々刻々変化する外的環境を敏感に読み取り、栄養成長か生殖か、速やかに判断を行わねばならない。複数の異なる転写因子が単独もしくは連動して温度、日長、乾燥などの外的環境変化に应答し、下流への情報伝達を制御していることが容易に予想される。

そこで、花芽形成ホルモンとして中心的な役割を担う *FT* 遺伝子及び高温などの外的環境変化に应答して *FT* 遺伝子を誘導する *PIF4* 遺伝子を中心に、詳細に解析するとともに、これらの環境应答および花成に関わる遺伝子によって外的環境変化に与える影響についてゲノミクス、プロテオミクス解析の手法を用いてよりワイドな解析を試みる。

その結果、ブナの適応環境による花成転換のしくみが明らかとなることが期待できる。

3. 研究の方法

シロイヌナズナ *FT* および *PIF4* ホモログ遺伝子をブナから単離し、その機能解析をすすめるとともにポプラ野生型や上記遺伝子を過剰発現させた組換え個体を用い、温度や乾燥処理によって発現量に変化するポプラ下流産物をゲノミクス・プロテオミクス解析の両側面から網羅的に同定を試みる。

(1) ブナ *FT* 遺伝子の機能解析

ブナ *FT* ゲノムの全塩基配列は弘前大・赤田らの作成したブナゲノムライブラリーから単離・同定した。

遺伝子発現解析は東北育種場に植栽のブナについて、2013 年に開花した個体 (三本木 103) および開花しなかった個体 (鱈ヶ沢 102) の枝の先端から 2, 4, 5, 7 枚目の葉をそ

れぞれサンプリングした。全 RNA は CTAB 法により抽出し、目的遺伝子の mRNA の定量は量的リアルタイム PCR 法で行った。

(2) ブナ *PIF4* 遺伝子ホモログの解析

シロイヌナズナの *AtPIF4* 遺伝子の配列と相同性の高いブナの遺伝子の探索は、ブナのドラフトゲノムデータベース (Ver. 1; 斎藤, 未発表データ) を利用した。ブナのドラフトゲノムデータベース (Ver. 1) は推定された遺伝子の機能注釈情報が整備されており、今回は遺伝子名のキーワード検索によって候補配列を選抜した。

選抜された候補遺伝子のドメイン解析は、塩基配列からアミノ酸配列を推定し、推定アミノ酸配列をシロイヌナズナの *PIF* ファミリー遺伝子とアライメントの比較を行い、ドメイン (Huq & Quail, 2002, EMBO J.) の保存性を検討した。

遺伝子発現解析は北海道黒松内町のブナ天然生二次林の成木を供試木として行った。供試木はブナ林の林冠を構成するブナ成木 6 個体であり、供試葉は日当たりのよい陽樹冠の葉を対象にした。供試葉の採取日は、2013 年から 2016 年までの 7 月上~中旬であった。全 RNA は CTAB 法により抽出し、目的遺伝子の mRNA の定量は量的リアルタイム PCR 法で行った。対照遺伝子とし *FcEIF-1A* 遺伝子を用いた。

4. 研究成果

(1) ブナ *FT* 遺伝子の機能解析

ブナ *FT* (*FcFT*) 遺伝子の制御領域約 5.3 kbp の塩基配列を解読し、*CO* 結合配列の他に、青色光によって誘導される E-box 配列、白色光によって誘導されるモチーフ配列を同定した (図 1)。



図 1 *FcFT* 転写調節領域の模式図

また、赤田らは *FT* 遺伝子と相同な配列を持つが機能としては *FT* と逆に花芽形成を抑制する機能を持つ *TFL* 遺伝子をブナから単離し、その機能解析を進めた。

ブナ *FT* 遺伝子は開花前年の花芽形成期 (6 月) に花芽誘導が起こる枝の葉で高発現しており、ブナ花成誘導の指標としての利用の可能性が示唆された (図 2)。

さらに、斎藤らの研究により間接的ではあるが窒素による *FT* 遺伝子の転写促進効果との関連がみられ、*FT* 遺伝子制御領域の DNA メチル化によるエピジェネティック制御の可

能性について示唆された。

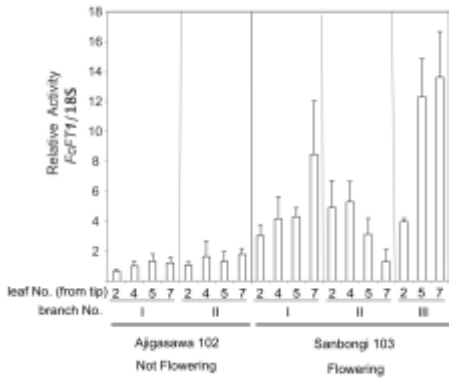


図2 開花年およびその前年の FT 遺伝子発現比較

(2) *AtPIF4* 遺伝子ブナホモログの解析

ブナの PIF ファミリー遺伝子として *AtPIF4* とオーソログ関係にある遺伝子は見当たらず、*AtPIF1* および *AtPIF3* とオーソログ関係にある遺伝子が見つかった (それぞれ *FcPIF1* と *FcPIF3*)。推定アミノ酸配列のアライメントを図3に示す。

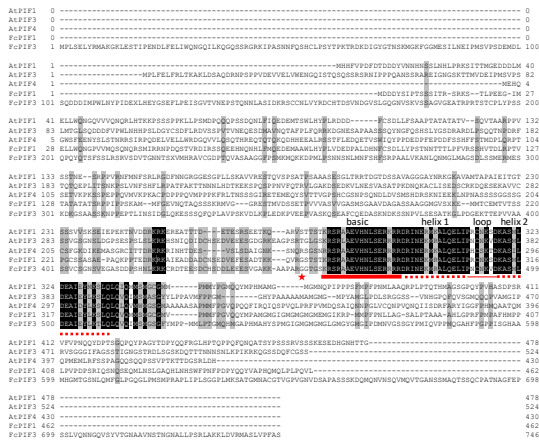


図3 ブナの PIF ファミリー遺伝子 (*FcPIF1* と *FcPIF3*) の推定アミノ酸のアライメント。参照配列としてシロイヌナズナの *AtPIF1*, *AtPIF3*, *AtPIF4* を用いた。赤線はドメイン配列を示した。

PIF ファミリーのドメイン配列の特徴である Basic+ helix1+loop+helix2 の連続した構造はブナの *FcPIF1* および *FcPIF3* の両遺伝子で保存されており、系統樹解析により、*FcPIF3* がシロイヌナズナ *PIF4* に最も相同性が高いことが示された。

遺伝子発現解析では、*FcFT* 遺伝子ならびに *FcPIF1* と *FcPIF3* 遺伝子の発現量に年変動が見られた (図4)。

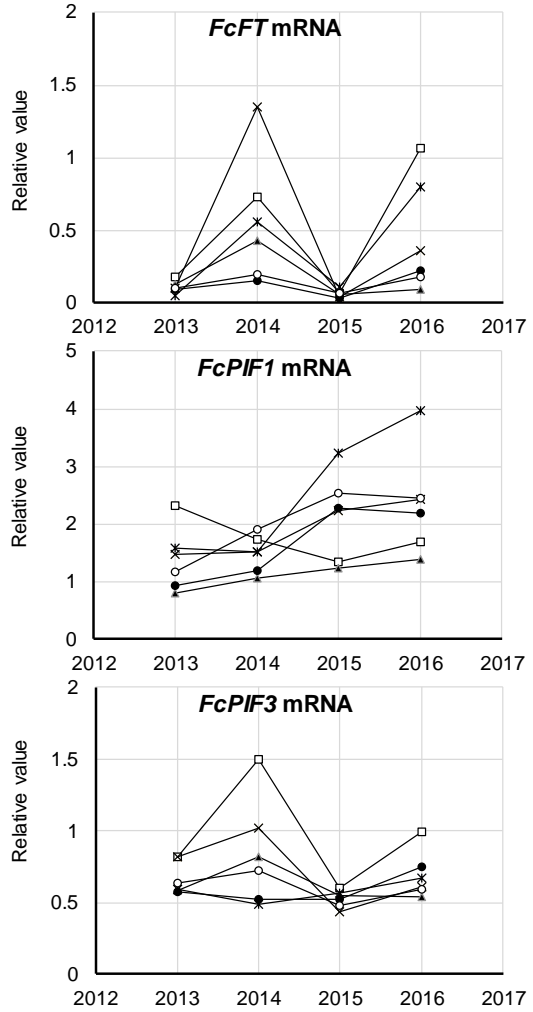


図4 *FcFT*, *FcPIF1*, *FcPIF3* mRNA 量の年変動

FcFT の発現量は *FcPIF1* とは相関関係が認められなかったが (Pearson $r = 0.114$, $P > 0.05$)、*FcFT* 遺伝子と *FcPIF3* 遺伝子の発現量には正の有意な相関が認められた (Pearson $r = 0.644$, $P < 0.01$)。

したがって、シロイヌナズナの結果と同様に *FcPIF3* 遺伝子は PIF ファミリー遺伝子のメンバーとして *FcFT* 遺伝子の転写因子としての機能を持つ可能性が示された。

次に、*FcPIF3* を 35S プロモーターに連結したキメラ遺伝子を構築し、ポプラに形質転換したが、組換え体は得られなかった。

そこで、人工気象棟で高温および低温で生育させた野生型ブナの葉を複数系統よりサンプリングし、プロテオミクス解析により高温環境下において発現量が変化するタンパク質の候補を複数抽出した。

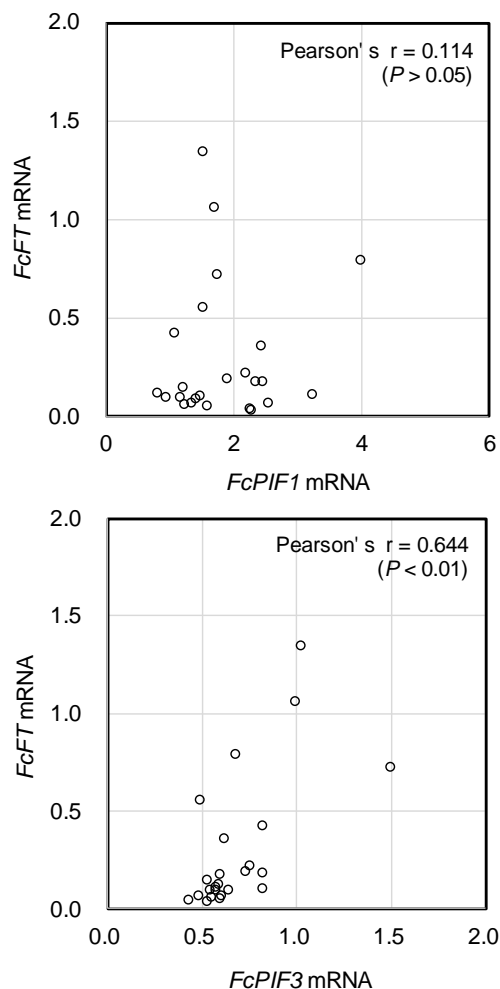


図5 *FcFT*mRNA量と*FcPIF1*ならびに*FcPIF3*mRNA量の関係

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 2件)

- ① 和田尚之・斎藤秀之・小林孝徳久・星野洋一郎、細胞分裂から見たブナ花成の制御時期、北方森林研究、査読有、Vol. 65、2017、pp. 39-42.
- ② 和田尚之・斎藤秀之、エピジェネティクスからみた林木の花成制御—ブナの研究事例から—、北海道の林木育種、Vol. 59、2016、pp. 19-22.

[学会発表] (計 10件)

- ① 和田尚之・斎藤秀之・小林孝徳久・星野洋一郎、ブナ花成のエピジェネティック制御—DNAメチル化の決定時期と養分の影響—、日本森林学会第128回大会、2017年3月26日~29日、鹿児島大学(鹿児島県鹿児島市)

- ② 和田尚之・斎藤秀之・小林孝徳久・星野洋一郎、細胞分裂から見たブナ花成の制御時期、北方森林学会第65回大会、2016年11月10日、札幌コンベンションセンター(北海道札幌市)
- ③ Hisayuki Wada・Hideyuki Saito、Epigenetic regulation of floral initiation induced by nitrogen in a mast-flowering tree Siebold's beech (*Fagus crenata*)、International Conference on Agricultural Biodiversity and Sustainability、22-24th Aug. 2016、Hokkaido University (Sapporo City, Hokkaido)
- ④ 國嶋俊輔・鳥丸猛・大宮泰徳・赤田辰治、乾燥ストレスによるブナ実生の成長遅延と乾燥応答性 *FcMYB1603* の発現、日本森林学会第127回大会、2016年3月27日~30日、日本大学(神奈川県藤沢市)
- ⑤ 和田尚之・斎藤秀之・渋谷正人・小池孝良、ブナ花成のエピジェネティック制御—開葉時の養分とDNAメチル化の関係—、日本森林学会第127回大会、2016年3月27日~30日、日本大学(神奈川県藤沢市)
- ⑥ 大宮泰徳・杉山奏澄・松田修一・井頭千明・宮本尚子・赤田辰治、ブナFT遺伝子の単離と発現解析、日本植物生理学会第57回年会、2016年3月18日~20日、岩手大学上田キャンパス(岩手県盛岡市)
- ⑦ 八木橋麻美・大宮泰徳・宮本尚子・赤田辰治、ブナにおけるTFL遺伝子の同定とその発現解析、東北植物学会第5回大会、2015年12月19日~20日、福島大学(福島県福島市)
- ⑧ 赤田辰治・國嶋俊輔・森野祥多・大宮泰徳・鳥丸猛、産地の異なるブナ実生の乾燥条件下における成長量の変異とその遺伝的解析、日本森林学会第126回大会、2015年3月27日~29日、北海道大学(北海道札幌市)
- ⑨ 小向愛・斎藤秀之・渋谷正人・小池孝良、ブナの花成におけるDNAメチル化によるエピジェネティック制御の可能性、日本森林学会第126回大会、2015年3月27日~29日、北海道大学(北海道札幌市)
- ⑩ 小向愛・斎藤秀之・渋谷正人・小池孝良、ブナのプロリゲン遺伝子エピジェネティック制御の可能性、北方森林学会第62回大会、2014年11月12日、札幌コンベンションセンター(北海道札幌市)

[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]

ホームページ等

なし

6. 研究組織

(1)研究代表者

大宮 泰徳 (OHMIYA, Yasunori)

国立研究開発法人森林総合研究所
樹木分子遺伝研究領域・主任研究員

研究者番号：70360469

(2)研究分担者

上村 松生 (UEMURA, Matsuo)

岩手大学・農学部・教授

研究者番号：00213398

赤田 辰治 (AKADA, Shinji)

弘前大学・農学生命科学部・准教授

研究者番号：10250630

斎藤 秀之 (SAITO, Hideyuki)

北海道大学・農学研究院・講師

研究者番号：70312395