

令和 4 年 6 月 8 日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2018～2021

課題番号：18K05761

研究課題名(和文) 木部形成に対する周年短縮育成系の展開

研究課題名(英文) Improvement on the shortened annual cycle system for xylem formation

研究代表者

馬場 啓一 (Baba, Kei'ichi)

京都大学・生存圏研究所・助教

研究者番号：20238223

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)：本研究では周年短縮系と名付けた樹木の人工育成系環境を構築し、樹木の成長・休眠の周年リズムを5ヶ月程度に短縮して繰り返させ、人為的に短期間で年輪を形成させた。この系で形成される木材等の構造的特徴を詳細に調べ、また温度の変化によって細胞のサイズ推移や細胞壁厚に違いが生じることを明らかにした。節部においては繊維束が休眠を経ることに発達していくことを明らかにした。この系における樹幹内の遺伝子発現の変動についても網羅的に調査した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

木材は年輪を形成しながら樹幹の中で生産される。年輪は通常1年に1つしかできないため、年輪形成の研究には時間的制約があった。そこで樹木の成長・休眠の周年リズムを短縮できる人工環境条件を構築することによって樹木研究の時間的促進に寄与することができた。さらに形成される木材の構造的・化学的特徴と育成中に樹幹で発現する遺伝子の変動を明らかにしたことによって、この周年短縮系が木部形成研究のモデルシステムとして普遍的に使用できる基盤を形成した。

研究成果の概要(英文)：In this study, an artificial condition for sapling growth named shortened annual cycle system was constructed and the wood microstructure formed in this system was investigated. The shortened system shorten annual cycle of poplar sapling for about five months and artificial growth ring is formed in the wood. The structure alteration with temperature condition was studied. Gene expression in the stem also analyzed by RNA-seq method. The results would be useful when this shortened annual cycle system is utilized for the other investigation of wood formation as a model system.

研究分野：森林科学

キーワード：木部形成 植物の成長 環境応答 人工気象器 周年性 休眠

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

(1) 樹木を対象とした生理学的研究は、他の植物分野と比較した場合に、その進捗が早いとは言いがたい。樹木の成長には周年性があり、その季節依存性が樹木の生理学的研究を行う上で大きな時間的制約となっている。例えば、休眠打破や早材形成の研究は春先に、晩材形成の研究は晩夏～秋、休眠導入は秋～冬にしか試料採取や樹幹への処理ができない。

(2) これまでに申請者は人工気象器と培養室を用いて黄葉・落葉・休眠・休眠打破を含む周年期間を4～5ヶ月に短縮してポプラを育成する系を開発した(引用1)。この周年短縮系で3周ポプラを育成すると明確な境界をもつ成長輪が3つ形成され、年輪界における組織構造は野外のものと酷似していた(引用2)。その一方で、年輪内の道管サイズの推移においては野外のものが徐々に変化するのに対して、本系で育成した物では急にサイズが小さくなる部分が生じることに問題があった。

2. 研究の目的

本研究の目的は、人工環境下においてポプラの周年性を短縮させつつ、より自然な周年性組織構造をもった木部を形成させる条件を見出し、季節依存的な木部構造の形成を実験室内で短期間に現出させるモデル実験系を確立することである。より自然な成長輪が形成されるようになれば、より多くの研究目的に使用できるようになり、最終的な実験を野外で行う場合でも事前に本モデル系でさまざまな条件を検討すれば、研究期間を大幅に短縮できるようになる。また、この周年短縮系を用いた樹木の育成によって得られる組織構造形成に関する知見を蓄積し、与える環境条件と組織形成の関係についての理解をより深化させることにある。

3. 研究の方法

基本的にはこれまでに用いてきた周年短縮系(表1)の培養条件を用いてポプラを育成し、形成された組織の観察を中心とした解析を行った。

(1) 周年短縮系のステージ2における日長または温度のいずれかはこれまで通りの条件で固定し、他方を徐々に下げていく方

	季節想定	気温	明期/暗期	育成期間
ステージ1	春/夏	22-28	14/10 時間	1ヶ月
ステージ2	秋	15	8/16 時間	1ヶ月
ステージ3	冬	5	8/16 時間	2-3ヶ月

表1: 人工気象器等を用いた周年短縮系育成条件

法でポプラを育成した。即ち、日長を8時間に固定して、温度を徐々に下げていくパターン(T変)と、温度を15℃に固定して、日長を徐々に短くしていくパターン(D変)を用いた。育成は2セット行い、1セットは先にT変育成して後にD変育成、もう1セットはその逆でD変育成した後にT変育成した。いずれも2週育成した後に樹幹を採取して形成された木部の組織構造を観察した。

(2) 樹皮における組織構造の形成と周年性に関する知見がこれまでなかったため、周年短縮系を用いて3週育成したポプラの樹皮について組織構造の観察をおこなった。観察は1周目、2周目、3周目で行い、いずれも樹皮における韌皮繊維の個々の断面形状とクラスタの形状に着目した。比較対照として同じ期間、継続的に成長する環境条件(ステージ1と同等)で育てたポプラの樹皮と比較した。

(3) 周年短縮系の各ステージで形成されている木部を明らかにするためにナイフマーク法を施して各ステージで形成される木部組織の位置を特定し、その構造の特徴を表すために顕微鏡写真を用いて各組織の計測を行った。一方で、樹幹部における遺伝子発現の変化を明らかにするために、定期的なサンプリングを行いRNA-seq解析をおこなった。RNA-seqに供する樹幹試料は各ステージに移行した翌日とそのステージが終了するまで1週おきに採取した。採取した試料はRNA抽出するまで-80℃で保存した。RNA抽出後はライブラリー作製、次世代シーケンサーで塩基配列を決定して、*Populus trichocarpa*のprimary transcripts配列にmapping後、ANOVAで発現変動のある遺伝子を抜き出した。細胞壁関連遺伝子については、シロイヌナズナの既知遺伝子をもとにBLASTPを用いて相同性のある遺伝子を選出し、発現量の変動を調べた。

4. 研究成果

(1) 周年短縮系のステージ2における日長または温度のいずれかを固定し、他方を徐々に下げていく方法でポプラを育成した結果、道管の形状については、温度を徐々に下げたT変におい

て野外の年輪内変動に近い、道管の形状が丸さを保ったまま徐々に小さくなる形状変化を示した。繊維細胞の細胞壁厚についても気温を徐々に下げた T 変において、一見すると野外における年輪に近い厚さ推移を示しているように見られたが、画像計測の結果では年輪中央付近で一旦薄くなっていることがわかった。一方の日長を徐々に短くした D 変では、繊維壁厚は年輪中央付近から急に厚くなっており、野外で育成した年輪の組織構造とはずいぶん異なることがわかった。このことは、前者では気温が十分な時に日長が急に短くなり細胞壁の材料となる光合成産物が不足したこと、後者では逆に気温が中温の時に過大な光量があったことで壁厚が急に厚くなったと考えられる(引用 3)。

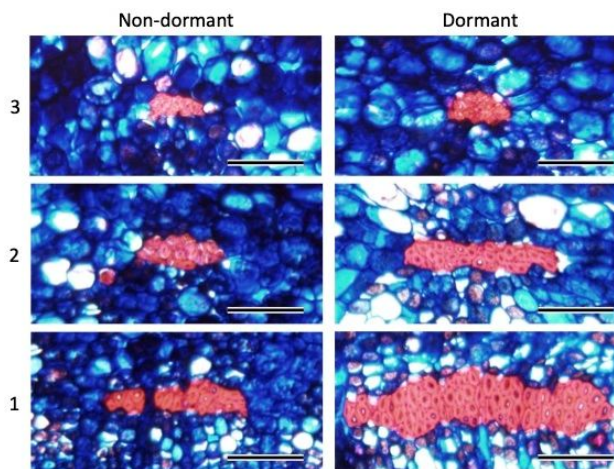


図 1: ポプラ樹皮の靱皮繊維クラスターの顕微鏡写真

Non-dormant: 休眠なしで継続成長させたもの

Dormant: 周年短縮系を用いて休眠 2 回を挟んで成長させたもの

赤く染色された部分が繊維クラスター。左の数字は形成層に近い(あとから形成された)順

(2) いずれの条件で育成したポプラの樹皮にも 2~3 層の靱皮繊維が形成されたが、継続的に成長する環境条件(ステージ 1 と同等)で育てたポプラの樹皮では、靱皮繊維の集合体は形成層に遠い物(初期に形成)も近い物(後で形成)も全て小さかったが、周年短縮サイクルで育成されたものでは、周回を重ねるごとに靱皮繊維の集合体が大きくなっており、個々の繊維細胞の断面積も徐々に大きくなっていった(図 1)。この構造変化は野外で育成したものに酷似していた。これらの結果から、周年短縮サイクル育成下で休眠・開芽の過程を重ねることによって、樹皮における組織分化の成熟が進んでいることが示唆された(引用 4)。

(3) 周年短縮系で形成された木部の、ナイフマーク法によって特定された各ステージの組織構造的特徴について、繊維細胞は、その壁厚がステージ 1 で薄く、ステージ 2・3 に対して有意差があった。

ステージ 3 の壁厚が最も厚かったが、ステージ 2 との有意差は認められなかった。繊維径は、ステージ 3 の放射径が他の放射径と比べて有意に小さかった。道管は放射径、接線径ともにステージ 1、2、3 となるに従って有意差を伴って徐々に小さくなった。

周年短縮系の経時的 RNA-seq の結果について、各採取日で発現している遺伝子の相関を多次元尺度更生法(MDS)で二次元空間に変換プロットした図において、概ねステージおよび採取週順に並んだことから、本周年短縮系において遺伝子発現の変動は概ね周期性を示すことが明らかとなった(図 2)。K-means クラスタリングで発現パターンの似ている遺伝子を 7 つのクラスターに分けたのち、シロイヌナズナの細胞壁関連遺伝子に相同性のある個別の遺伝子について発現プロファイルのプロットし、それぞれどのクラスターに分類されるかについてもまとめた。クラスターごとに GO enrichment 解析を行った結果、木部や師部の分化に関与する遺伝子群はステージ 1 でピークになるクラスターに多く、細胞壁形成関連の遺伝子群はステージ 2 でピークになるクラスターに多かった(引用 5)。

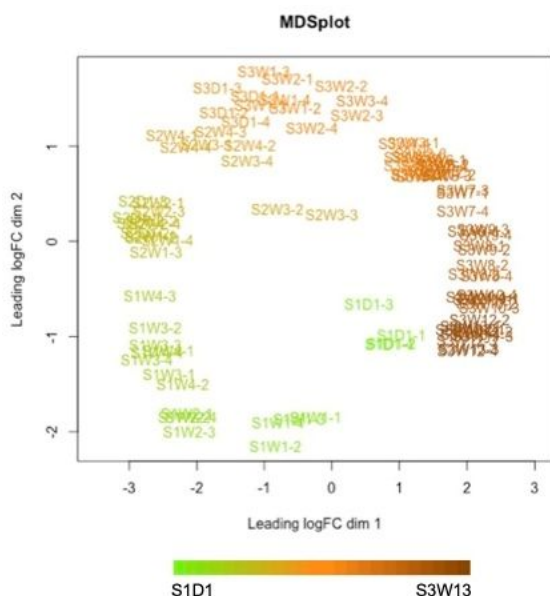


図 2 発現変動のある遺伝子による MDS plot

各マークはステージ 1 の 1 日後(S1D1)、1 週目(S1W1)と表記してステージ 3 の 13 週目(S3W13)までプロット

- 1 . Kurita, Y., Baba, K., Ohnishi, M., Anegawa, A., Shichijo, C., Kosuge, K., Fukaki, H., Mimura, T.: Establishment of a shortened annual cycle system; a tool for the analysis of annual re-translocation of phosphorus in the deciduous woody plant (*Populus alba* L.). *J Plant Res*, 127, 545-551 (2014)
- 2 . Baba, K., Kurita, Y., Mimura, T.: Wood structure of *Populus alba* formed in a shortened annual cycle system. *J Wood Sci*, 64 (1), 1-5 (2018)
3. 馬場啓一、栗田悠子、三村徹郎 周年短縮サイクル系を用いた年輪形成に及ぼす温度と日長の影響 . 第 69 回日本木材学会大会要旨集 2019.3.14-16
4. Baba, K., Kurita, Y., Mimura, T.: Effect of dormancy on the development of phloem fiber clusters. *J Wood Sci*, 65, 40-45 (2019)
5. 馬場啓一、栗田悠子、永野 惇、三村徹郎 短縮周年系で育成したギンドロ木部構造の年輪内変動 . 第 72 回日本木材学会大会要旨集 2022.15-17

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件／うち国際共著 0件／うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Baba Kei ' ichi, Kurita Yuko, Mimura Tetsuro	4. 巻 65
2. 論文標題 Effect of dormancy on the development of phloem fiber clusters	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Journal of Wood Science	6. 最初と最後の頁 40-45
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1186/s10086-019-1819-z	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている（また、その予定である）	国際共著 -

〔学会発表〕 計10件（うち招待講演 0件／うち国際学会 1件）

1. 発表者名 馬場啓一, 栗田悠子, 永野 惇, 三村徹郎
2. 発表標題 短縮周年系で育成したギンドロ木部構造の年輪内変動
3. 学会等名 第72回日本木材学会大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 馬場啓一, 栗田悠子, 永野 惇, 三村徹郎
2. 発表標題 ポプラ短縮周年系における細胞壁関連遺伝子の発現変動
3. 学会等名 第71回日本木材学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 馬場啓一, 栗田悠子, 永野 惇, 三村徹郎
2. 発表標題 短縮周年系で育成したポプラ木部細胞壁の年輪内変動
3. 学会等名 日本植物学会第85回大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 馬場啓一, 栗田悠子, 永野 惇, 三村徹郎
2. 発表標題 短縮周年系で育成したポプラの木部構造と遺伝子発現の関係
3. 学会等名 日本植物学会第84回大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 馬場啓一, 栗田悠子, 三村徹郎
2. 発表標題 周年短縮サイクル系で形成される木部と環境条件との対応
3. 学会等名 第70回日本木材学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 馬場啓一, 栗田悠子, 三村徹郎
2. 発表標題 周年短縮サイクル系の環境条件と形成される木部構造の関係
3. 学会等名 日本植物学会第83回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 馬場啓一, 栗田悠子, 三村徹郎
2. 発表標題 人工環境を用いた周年短縮サイクル系培養による成長輪の形成
3. 学会等名 樹木年輪研究会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 馬場啓一、栗田悠子、三村徹郎
2. 発表標題 周年短縮サイクル系を用いた年輪形成に及ぼす温度と日長の影響
3. 学会等名 第69回日本木材学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 馬場啓一、栗田悠子、三村徹郎
2. 発表標題 周年短縮サイクル系におけるポプラの木部形成
3. 学会等名 日本植物学会第82回大会
4. 発表年 2018年

1. 発表者名 BABA Kei'ichi, Yuko Kurita, Tetsuro Mimura
2. 発表標題 Tissue structure of stems of poplar trees grown under shortened annual cycle system in artificial climate chambers
3. 学会等名 6th Plant Dormancy Symposiom 2018 (国際学会)
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>Sustainable Humanosphere No. 14 http://www.rish.kyoto-u.ac.jp/logos/wp-content/uploads/2018/11/ISSN1880-6503_No.014s_with_Errata.pdf</p>

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