

平成 21 年 6 月 19 日現在

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2007～2008

課題番号：19770024

研究課題名 (和文) 北方林樹木グイマツにおける開花の分子機構の解明

研究課題名 (英文) Molecular mechanism of floral determination in boreal forest tree *Larix gmelinii* var *japonica*

研究代表者

岩崎 (葉田野) 郁 (Hatano-Iwasaki Aya)

岡山県生物科学総合研究所・流動研究員

研究者番号：40443593

研究成果の概要：

野外に生育するカラマツ属グイマツ (*Larix gmelinii* var. *japonica*) を用いて、シロイヌナズナ花芽形成遺伝子 *LEAFY* と相同な *LgLFY* 遺伝子の発現と花芽形成との関係を調べた。*LgLFY* の発現は翌年に花となる芽で高く、その発現開始時期は 5 月で花器官形成より早いと考えられた。5 月、6 月の *LgLFY* 発現量と雄花数とに高い相関関係がみとめられたことから、グイマツの雄花の決定に *LgLFY* 遺伝子が関与することが明らかとなった。

交付額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2007 年度	2,200,000	0	2,200,000
2008 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,400,000	360,000	3,760,000

研究分野：生物学

科研費の分科・細目：基礎生物学・生態・環境

キーワード：*Larix gmelinii* var *japonica*, 花成, *LEAFY* 相同遺伝子

## 1. 研究開始当初の背景

植物の開花に関する研究は、生態学分野では、数年周期で多量に開花・結実する「生り年」現象について行われている。「結実」現象に注目し、結実数の年変動に影響を与える環境要因についての研究が多く行われており、結実数の変動が気象要因に依存するという報告もある。しかし「生り

年」現象の分子レベルでの研究はほとんど行われていなかった。一方、植物生理学、形態学、あるいは分子生物学分野では、開花＝花成(栄養成長から生殖成長への転換)の研究が盛んに行われ、モデル植物を用いた分子生物学的・分子遺伝学的手法の進歩により多くの花成関連遺伝子が同定されている。

樹木においても、1995年にWeigelらによ

ってシロイヌナズナの花芽形成遺伝子 *LEAFY* の導入により早咲きになったポプラが報告され[1]、その後、さまざまな樹木において *LEAFY* 遺伝子をはじめとする草本モデル植物と相同な花成関連遺伝子が同定されてきた。しかし、遺伝子の機能や制御機構についての研究はあまり進んでいない。また野外に生育する「多年生」を考慮した樹木の開花について、分子レベルで解析した研究はなかった。

## 2. 研究の目的

本研究では、野外に生育する樹木において、季節変化を含む環境要因によってどのような遺伝子が制御されて開花が誘導されているのかを明らかにすることを目的とし、研究対象として、北方林の主要構成樹種であるカラマツ属グイマツ (*Larix gmelinii* var. *japonica*) を用いて解析を行った。グイマツは、北海道において5月上旬に開花する。これまでに、北海道立林業試験場・中川採取園におけるグイマツの結実数調査結果とアメダス気象観測データを用いた回帰分析の結果から、開花する前年の5月から6月の気象要因が翌年の結実数の豊凶と相関が高いことが示されている (Uchiyama K, Kita K and Kuromaru M, 未発表)。そこで、まずグイマツから花成に関与する遺伝子を単離・同定し、それらの遺伝子発現量の季節的な変化を調べ、それらの花成遺伝子の発現量の変動と開花数、環境要因との関係を明らかにすることを目指した。

## 3. 研究の方法

### (1) 植物材料

北海道立林業試験場(美唄市)構内の集植所に生育するグイマツ (*Larix gmelinii* var. *japonica*) の3種のクローン(V544、樺岡455、樺岡484)から月1回(各月下旬)葉および枝を採取した。

### (2) 花成関連遺伝子の単離

グイマツから全RNAを回収した。DNase

I (Invitrogen, San Diego, USA) で処理した後、全RNA 1 $\mu$ g から Transcriptor first strand cDNA synthesis kit (Roche, Penzberg, Germany) を用いて cDNA を合成した。合成した cDNA を鋳型として *Pinus radiata* の *PRFLL* (U92008) および *NEEDLY* (U76757) 遺伝子、*Picea abies* の *DAL2* 遺伝子 (X79280) の配列を参考にプライマーを設計し、PCR 法によってそれぞれ *LgLFY*、*LgNDLY*、*LgAG* 遺伝子の部分配列を決定した。さらに *LgLFY*、*LgNDLY* 遺伝子については 5'RACE 法および 3'RACE 法により、全遺伝子配列を決定した。各相同遺伝子単離に用いたプライマーは以下の通りである。

#### *PRFLL*:

5'-GAGAAGGCTGGAAGAAGCAGAA-3' および

5'-TAGTTGGTGTCAGGCATTCC-3'

#### *NEEDLY*:

5'-AATCTGCCATAAGAGCAGA-3' および 5'-CGGTTCAGTGACAATGAAAG-3'

#### *DAL2*:

5'-CAACCACAGCGTGAAGAGAA-3' および 5'-TATTCTGACACTCGGCTATC-3'

### (3) 遺伝子発現解析

グイマツから回収した全RNAを用いて cDNA を合成し、定量的 RT-PCR によって発現量を調べた。コントロールには 18S rRNA 量を用いた。

## 4. 研究成果

北海道立林業試験場(美唄市)構内のクローン集植所に生育するグイマツからシロイヌナズナの花芽形成遺伝子 *LEAFY* と相同な2つの遺伝子 *LgLFY*、*LgNDLY* を単離した。*LgLFY*、*LgNDLY* 遺伝子は、どちらもシロイヌナズナ *LEAFY* のアミノ酸配列と71%の相同性を持ち、多くの植物種の *LEAFY* 相同遺伝子間で高度に保存され、その機能に重要だと考えられている領域が保存されていることがわかった。これらの遺伝子の発現部位を調べたところ、*LgLFY*、*LgNDLY* 遺伝子はどちらも、翌年の花器官

が形成される芽で高い発現が認められ、葉や長枝ではほとんど発現は認められなかった(図1)。

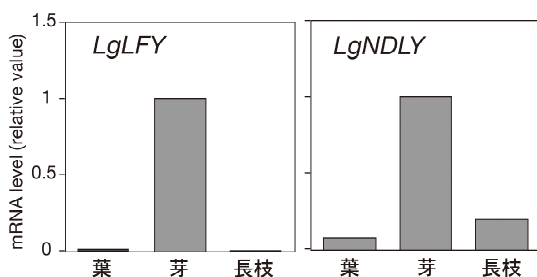


図1 *LgLFY* および *LgNDLY* 遺伝子の発現部位

5月の葉、芽(短枝を含む)、長枝における *LgLFY* および *LgNDLY* 遺伝子の発現量を定量的 RT-PCR によって調べた。18S rRNA 量で標準化し、芽での発現量を 1 としたときの相対値で示してある。

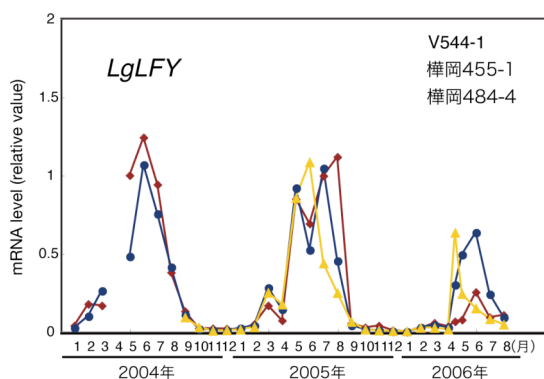


図2 *LgLFY* 遺伝子発現量の季節変動

月1回下旬に採取したグイマツクローン V544、樺岡 455 および樺岡 484 の1年生枝を用いて、*LgLFY* の発現量を定量的 RT-PCR によって調べた。18S rRNA 量で標準化し、V544 の2004年5月を1としたときの相対値で示している。

また、開花した花器官においては、これらの遺伝子は、雄花、雌花ともに発現が認められたものの、翌年の花器官が形成される芽での発現より低いことがわかった。したがって、これらの遺伝子は、雄花・雌花の両花器官の形成に加え、花芽形成の開始に関与すると考えられた。これらの遺伝子の芽における発現量の季節変動を調べたところ、*LgLFY* は

花芽形成が開始すると考えられる5月から増加し9月に減少することがわかった(図2)。一方、*LgNDLY* ではそのような季節変動は認められなかった(図3)。

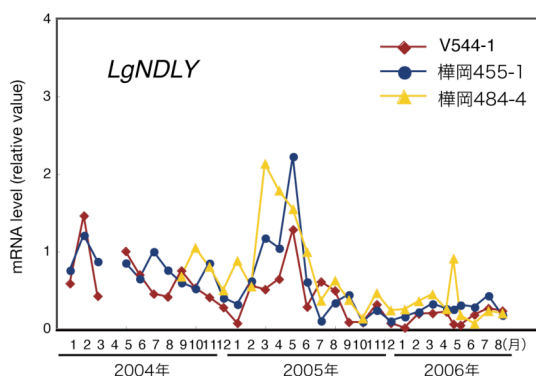


図3 *LgNDLY* 発現量の季節変動

月1回下旬に採取したグイマツクローン V544、樺岡 455 および樺岡 484 の1年生枝を用いて、*LgNDLY* の発現量を定量的 RT-PCR によって調べた

グイマツにおける花器官の形成開始時期を調べるため、グイマツからシロイヌナズナ花器官形成遺伝子 *AGAMOUS* と相同な遺伝子 (*LgAG*) を単離した。このグイマツ *LgAG* 遺伝子は、シロイヌナズナ *AGAMOUS* 遺伝子と相同な機能をもつと報告されているトウヒ属 (*Picea*) の *DAL2* 遺伝子[2]や *SAG1* 遺伝子[3]と非常に高い相同性(99.5%)を示した。その発現部位を調べたところ、翌年の花器官が形成されていると考えられる芽に比べ、開花した雄花および雌花で20-30倍の高い発現が認められ、グイマツの花器官形成に関わる遺伝子であると考えられた。

そこで、グイマツ *AGAMOUS* 相同遺伝子の芽における発現時期を調べたところ、7-8月から発現が認められたことから(図4)、グイマツでは7-8月頃には花器官が形成されていると考えられる。この時期は、*LgLFY* の発現開始時期よりも遅いことから、*LgLFY* は花器官が形成されるより前に発現することが示唆される。

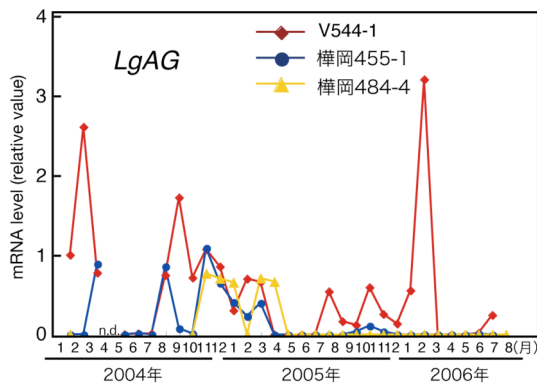


図4 *LgAG* 遺伝子発現量の季節変動

月1回下旬に採取したグイマツクローンV544、樺岡455および樺岡484の1年生枝を用いて、*LgAG* 遺伝子の発現量を定量的RT-PCRによって調べた。18S rRNA量で標準化し、V544の2004年1月を1としたときの相対値で示している。

したがって、*LgLFY* 遺伝子はグイマツの花芽の決定に関与すると考えられる。*LgLFY* 遺伝子はラジアータパイン (*Pinus radiata*) の *PRFLL* と高い相同性 (99%) を示す。*PRFLL* はシロイヌナズナの花器官形成に関わる MADS-box 遺伝子 *APETALA1 (API)* および *AGAMOUS* の *LEAFY* 結合部位に結合できることが報告されている[4]。グイマツにおいては、その発現部位と発現時期から *LgLFY* 遺伝子が花芽の決定に機能すると考えられ、これは *PRFLL* の結果と矛盾しない。

これまでに、回帰分析の結果から5月上旬までの低温が翌年の結実数の豊凶と相関が高いことが示されている (Uchiyama K, Kita K and Kuromaru M, 未発表)。美唄市におけるアメダス気象観測データを用いて、2004年から2006年までの気温と *LgLFY* 遺伝子発現量の季節変動を比較したところ、5月に低温が続いた2005年では、2004年、2006年に比べ *LgLFY* 遺伝子の発現開始時期が早まっていた。低温によって *LgLFY* 遺伝子の発現が誘導されるのかを調べるため、カラマツの台木に接ぎ木した鉢植えのグイマツを用いて操作実験をおこなった。接ぎ木した後に1年生枝が伸長した鉢植えのグイマツを、4月下旬に人工気象室で低温処理 (明期 15 時間・7度、暗期 9 時間・2度) および常温処理 (明期 15

時間・17度、暗期 9 時間・7度) を3週間おこなった後、常温処理条件下へ移して20日間栽培した。低温処理および常温処理による *LgLFY* 遺伝子の発現量の変化を調べた結果、*LgLFY* 遺伝子において、低温処理後10日目に発現の上昇が認められ、低温によって発現が誘導されることがわかった (図5)。

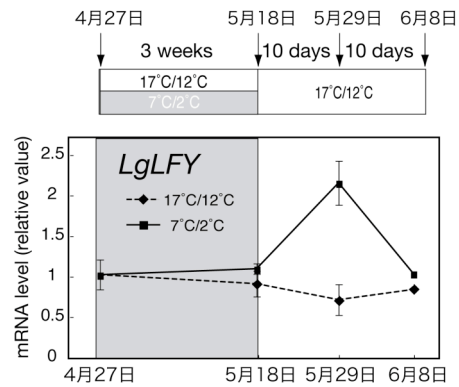


図5 低温による *LgLFY* 遺伝子の発現誘導  
接ぎ木した鉢植えのグイマツを3週間の低温 (明期 15 時間・7°C、暗期 9 時間・2°C) または常温 (明期 15 時間・17°C、暗期 9 時間・12°C) 処理後、常温条件下へ移したときの *LgLFY* 遺伝子の発現量を定量的 RT-PCR によって調べた。18S rRNA量で標準化し、4月27日の発現量を1とした相対値で示している。

2004年から2007年までの3年間の3種のクローン (V544、樺岡455、樺岡484) における *LgLFY* 遺伝子の発現量と翌年の開花数との関係を調べた。その結果、V544では5月下旬、樺岡455では6月下旬、樺岡484では5月下旬の *LgLFY* 発現量と雄花数とに  $R^2$  が0.48以上の高い相関がみとめられた (図6)。回帰分析の結果から5月の低温と6月の高温が翌年の結実数の豊凶と相関が高いことが示されている (Uchiyama K, Kita K and Kuromaru M, 未発表)。*LgLFY* 遺伝子の発現量が開花数に影響を与える時期は、生り年に影響を与える気象要因が認められる時期と一致する。

以上の結果より、グイマツにおいて *LgLFY* 遺伝子が雄花の花芽形成の決定に重要であることが明らかとなった。また6月までの気温変化が *LgLFY* 遺伝子の発現と花芽形成に影響を与えると考えられる。

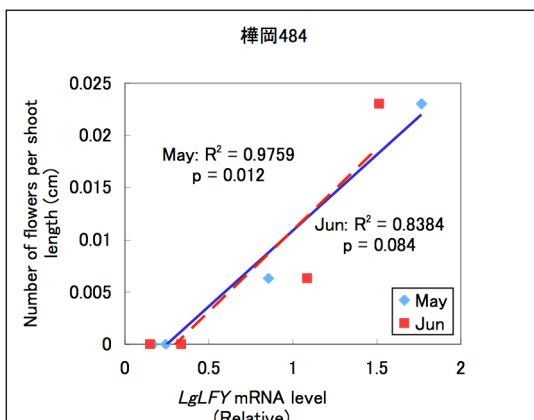
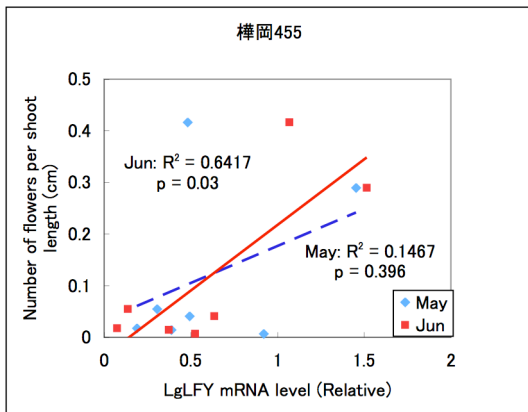
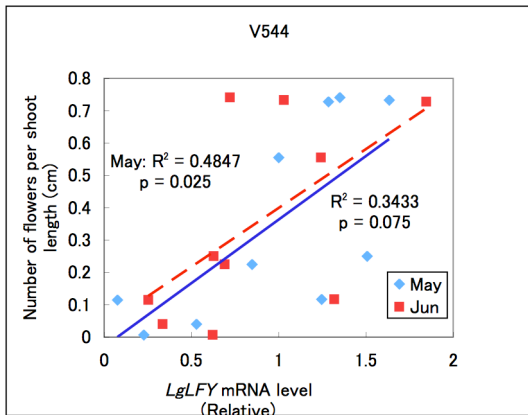


図6 5月、6月における *LgLFY* 遺伝子の発現量と開花数(雄花)との関係

[1] Weigel and Nilson (1995) *Nature* 377, 495-500

[2] Tandre *et al.* (1998) *Plant J* 15, 615-623

[3] Rutledge *et al.* (1998) *Plant J* 15, 625-634

[4] Maizel *et al.* (2005) *Science* 308, 260-263

#### 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1件)

岩崎(葉田野)郁、内山和子、小野清美、渡辺一郎、八坂通泰、来田和人、原登志彦、小川健一

北方林樹木グイマツにおける *LEAFY* 相同遺伝子の発現と花成の決定との関係

*Annu. Rep. RIBS Okayama* 2008 (査読無)

(2008) 1, 105-107

[学会発表] (計2件)

① 岩崎(葉田野)郁、内山和子、小野清美、渡辺一郎、八坂通泰、来田和人、原登志彦、小川健一

北方林樹木グイマツの花芽形成における *LEAFY* 相同遺伝子の機能

第56回日本生態学会岩手大会、2009年3月19日、岩手県滝沢村

② 岩崎(葉田野)郁、内山和子、小野清美、渡辺一郎、八坂通泰、来田和人、原登志彦、小川健一

北方林樹木グイマツの *LEAFY* 相同遺伝子による開花制御

第55回日本生態学会福岡大会、2008年3月15日、福岡

#### 6. 研究組織

(1)研究代表者

岩崎(葉田野)郁 (Hatano-Iwasaki Aya)

岡山県生物科学総合研究所・流動研究員

研究者番号：40443593