

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 15 日現在

機関番号：12201
 研究種目：基盤研究（B）（一般）
 研究期間：2009～2011
 課題番号：21380089
 研究課題名（和文） タケ類における花成制御遺伝子群の単離と同定に基づく一斉開花現象の分子機構の解明
 研究課題名（英文） Molecular mechanism of the bamboo mass flowering revealed with cloning and identification of the flowering gene homologs
 研究代表者
 小林幹夫（KOBAYASHI MIKIO）
 宇都宮大学・農学部・教授
 研究者番号 80111392

研究成果の概要（和文）：

モウハイチクおよびトウオカメザサの一斉開花時から数年間、花成促進遺伝子の発現量を解析した結果、前者では、一斉開花後速やかに消失し、後者では数年間維持された。モウハイチクの葉のプロトプラストに単離した花成促進遺伝子をエレクトロポレーション法により導入し、発現を確認した。未開花なタケのクローンの隅々まで花成促進遺伝子を過剰発現させて遺伝子機能を確認するため、タケモザイクウイルスのベクター化を図った。

研究成果の概要（英文）：Expression of flowering promoting gene, *FT* homologs in *Phyllostachys meyeri* and *Shibataea chinensis* was analyzed with a real-time RT-PCR technique from the beginning of mass flowering through the following several years. The expression was disappeared soon after the flowering in *P. meyeri*, while sustained same higher level for several years in *S. chinensis*. Cloned *FT* homolog, *PmFT* was confirmed extopic expression in protoplasts of *P. meyeri* by an electroporation method. Developing a new vector for *PmFT* identification based on bamboo mosaic virus was tried.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	6,700,000	2,010,000	8,710,000
2010年度	3,900,000	1,170,000	5,070,000
2011年度	2,900,000	870,000	3,770,000
年度			
年度			
総計	13,500,000	4,050,000	17,550,000

研究分野：農学

科研費の分科・細目：森林学・森林科学

キーワード：森林生物、一斉開花

1. 研究開始当初の背景

申請者は1997年に伊豆諸島・御蔵島で起きたミクラザサ個体群の一斉開花枯死・個体群の回復過程に関する生態学的・分子生態学的研究を通じて（Kobayashi 2005, 小林 2005），タケ類の一斉開花枯死現象が3つの側面；開花・枯死・周期性に分割して把握され、開花の事象が、シロイヌナズナ、イネなどのモデル植物にお

ける突然変異体や花成遺伝子群に関する知見（日向 2001, 岡田ら 2003）と対置できることに気付いた（小林 2004）。モデル植物を使用した広範囲かつ精密な花成遺伝子の研究は、2007年にはこれまで謎であった花成ホルモン・フロリゲンの実体がFTタンパク質であることを解明した（Tamaki *et al.* 2007）。

本研究はこのようにして蓄積された花成

遺伝子の分子生物学的な知見を利用し、これまで取り上げられなかったタケ類の開花の分子機構を明らかにする最初の試みである。

2. 研究の目的

2004年2月に研究協力者の久本洋子氏と共に富士竹類植物園を訪れた時、偶然、モウハイチクの一斉開花の始まりに遭遇し、ただちに、遺伝子の解析実験に着手した。同時に、モウハイチクの一斉開花枯死過程と花序や花の形態を記述した (Hisamoto *et al.* 2005)。開花結実後、実生を得て、開花試料の対照区と単離した遺伝子の導入・強制発現による確認実験に備えた (久本・小林2005)。

平成18年度以降は萌芽研究として進められ、2006年には、タケ類では世界に先駆けてイネの *RFT1* 遺伝子を手掛かりとしてモウハイチクの花成促進遺伝子 *PmFT* の全塩基配列を決定し (AB240578)、クローニングした。*FT* ホモログのイネ科における進化傾向を明らかにするため、サザンブロット法に基づき4コピーの存在を推定し、クローニングにより確認のうえ、初期分岐群、イネおよび世界の代表的なタケ類を含む27分類群の最節約法による系統類縁関係を解析した (Monocots IV 2008, Hisamoto *et al.* 2008)。一斉開花枯死・個体群の回復過程で得られた各期の試料について、*PmFT* の発現を解析した結果、他の遺伝子の関与が示唆された (Hisamoto & Kobayashi 2007)。そこで、イネの *CEN* 遺伝子ホモログを参照し、*PmCEN* の断片を取得し、プローブとして、生活史上の発現を解析した (日本植物学会大会 2008)。*PmCEN* は一斉開花時の *PmFT* に替わって再生稈の開花に関わるとともに、実生や幼若個体にも高い発現が認められた。これらの結果は、実生～幼若期には、*PmCEN* が開花を抑制し、花成誘導には、単に *PmFT* の導入以外に、*PmCEN* の抑制を解除する必要性を示唆した。

他方、台湾での2度にわたる探索により (久本・小林 2007)、6種類のタケ類より BaMV の変異体を分離し、部分配列を解析した結果に基づき、最も宿主特異性の弱いリョクチクを宿主とするウイルスをベクター化する。同時に、通常の pUC ベクターに *GFP* 遺伝子をレポーターとして、*PmFT* および *PmCEN* を組換え、エレクトロポレーション法によってタケ類のプロトプラストに導入し、リアルタイム PCR 法によって発現を確認する。最後に、自己増殖したタケ類のクローン全体に蔓延する特性を持つ BaMV ベクターによって *PmFT* の導

入と強制発現・開花を試みる。

本研究の目的は、タケ類の開花を一斉開花枯死という高次の複合現象の一部として捉え、モデル植物を通して得られた分子生物学的知見を利用し、その分子機構を解明することである。一斉開花枯死という生活史戦略はモデル植物には存在せず、本研究は基礎生物学への重要な貢献が期待される。他方、タケ類はゼロ・エミッション素材として世界各国で日常生活や文化に深く関わっている (Li & Kobayashi 2004)。全日本竹産業連合会主催で2007年11月に開催された第48回全国竹の大会のメインテーマは“放置竹林”であった。西日本を中心に猛威を振るう放置竹林の取り扱いと竹の持続可能な利用は竹産業界にとって焦眉の課題であることを示している。本研究成果は、タケ類における抜本的な増殖制御技術の開発に道を拓き、森林の新たな更新技術の開発につながり、竹の利用に大きなインパクトを与えるに違いない。

3. 研究の方法

本研究計画の中心課題は、モウハイチクより単離した花成促進遺伝子 *PmFT* を BaMV 改変ベクターにより、未開花個体に接種・導入し、強制発現により開花させることである。研究の大半は研究代表者の小林と協力者の久本洋子 (東京農工大学連合農学研究科博士課程3年) が実施する。分担者の夏秋はこれまで、キュウリの弱毒ウイルスをワクチンに改変し、実用化するなど、豊富な実績を持っており、その指導の下に短期間で BaMV 改変ベクターの完成が期待される。また、連携研究者の福原は、植物 RNA ウイルスにおける遺伝子発現制御、特に小型 RNA や RNAi による転写後調節機構の研究に優れた実績を持ち、本研究の遂行の上で、花成遺伝子発現制御に関して重要な示唆を得られるであろう。21年度から22年度前期にかけ、BaMV 改変ベクターを完成させる。同時に、既にクローニングの終了した *PmFT* から順次、pUC ベクターを使用して組換え分子を作製し、タケ類 (草本性2倍体のリサクネ・パウシフロラ *Lithachne pauciflora* およびモウハイチク) の葉より調整したプロトプラストへの導入実験を実施する。22年度後期には、ウイルスベクターを使用した2種類の花成制御遺伝子の未開花個体への形質導入実験を実施し、発現と抑制の様相を解析する。

4. 研究成果

(1) 生活史の異なる2種のタケ類の一斉開花時における花成制御遺伝子群の発現解析

一斉開花を起こしたマダケ属モウハイチクならびにオカメザサ属トウオカメザサにおいて、開花からクローンの再生の過程における花成促進遺伝子 *FT* および花成抑制遺伝子 *CEN* ホモログの発現をリアルタイム RT-PCR 法によって解析した (図 1)。

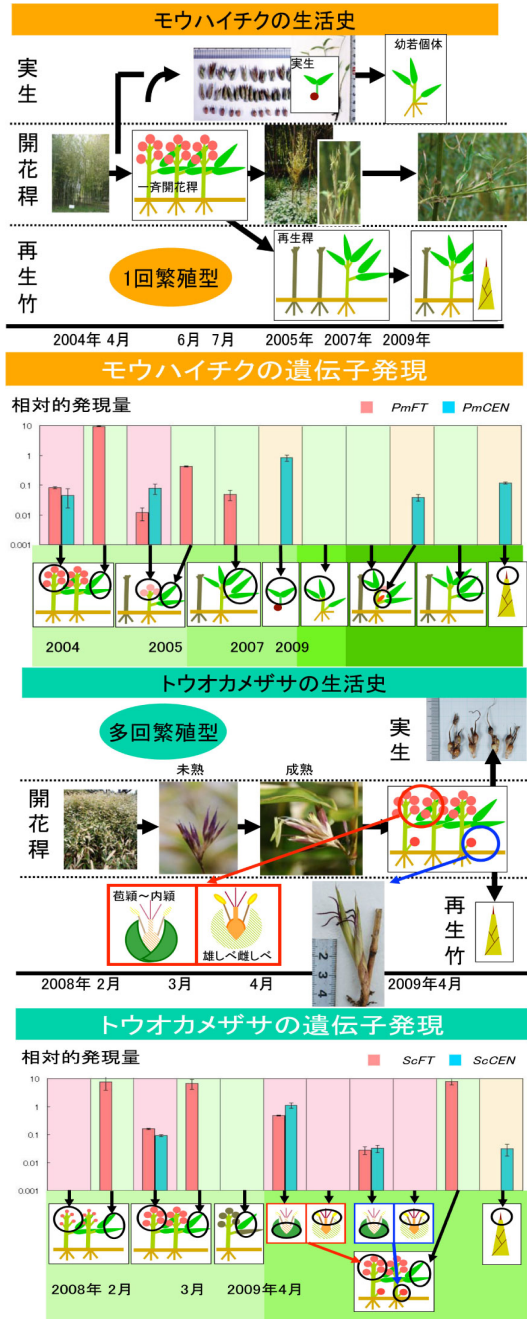


図 1 モウハイチクとトウオカメザサにおける生活史と花成制御遺伝子の発現

FT ホモログはそれぞれ、開花中の葉において最も高い発現量が検出され、モウハイチクでは一斉開花が終了して開花稈が枯死し、蘖が回復するにつれ、検出されなくなったのに対して、トウオカメザサでは、開花稈は枯れ

ることなく、3年間にわたり開花を繰り返し、それを裏付けるように *FT* ホモログの発現量は低下しなかった。他方、*CEN* ホモログは開花結実後に発芽した実生や幼若個体、もしくはタケノコの稈鞘や腋芽において単独で発現が検出された。これらは 2009 年 9 月にタイ・バンコックで開催された第 8 回世界竹会議において口頭発表を行った。また、その発表に先立ち、これらの知見は、開花間際のクローンを識別する技術発明として、特許出願を行った。

異なった一斉開花挙動を示す 2 種のタケ類において同じ花成制御遺伝子群が発現することは、これらの遺伝子群を統御する別の遺伝子が上流に存在し、一斉開花現象に深く関わっている可能性を示唆している。この新たな遺伝子の探索の課題は、本プロジェクトに研究協力者として中心的な役割を果たした現東京大学大学院農学生命科学研究科附属演習林千葉演習林助教の久本洋子博士に引継がれた。

(2) タケ類のプロトプラスト中での遺伝子発現の確認

世界に先駆けてタケよりクローニングした花成促進遺伝子ホモログ *PmFT* の最終的な機能を確認するためには、未開花な幼若個体へ強制的に導入し、花成を実験的に誘導する必要がある。このために、まず、4 種類のタケ類の葉から効率よくプロトプラストを調整する方法を開発した。展開前で針状に巻き、葉鞘に包まれた部分を無菌的に切出し、0.8 M マニトール・改変ホワイト培地中で 3% マセロザイム R-10、2.5% メイセラージェ、2% セルラーゼオノズカにより、32°C・4 時間の酵素解離処理により、生残率 83% で 2.0×10^6 細胞/0.3 g 生葉が得られた (図 2)。

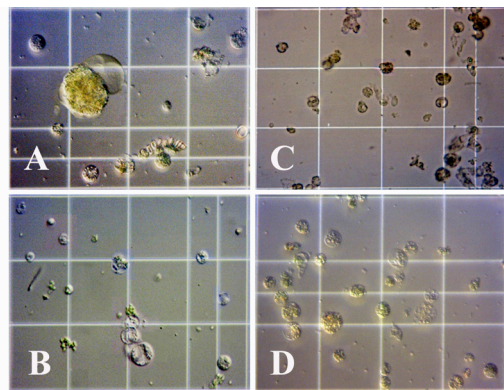


図 2 各種タケ類からのプロトプラスト; (A) リサクネ・パウシフロラ、(B) モウハイチク、(C) ミクラザサ、(D) ダイサンチク。1 柘は $50 \times 50 \mu\text{m}$ 。

次に、*GFP* 遺伝子を目印としたベクターにこの遺伝子を挿入し、エレクトロポレーション法により、*PmFT* を組込んだ *GFP* ベクターを取り込ませ、発現を確認した (図 3)。

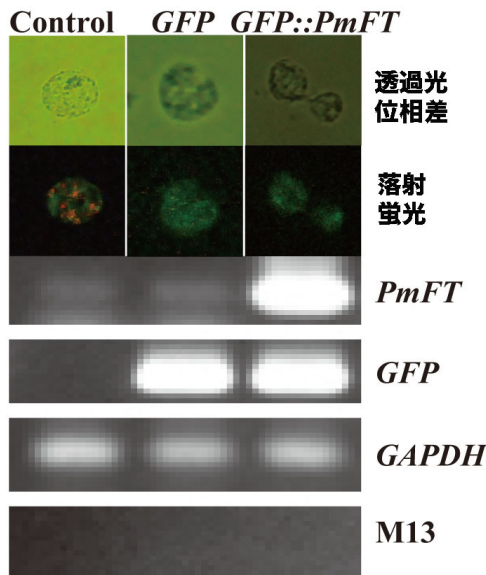


図 3 モウハイチクのプロトプラスト中での *GFP* と *PmFT* の発現。 *GAPDH*: グリセロアルデヒド-3-リン酸脱水素酵素、M13: ユニバーサルプライマー。

(3) タケモザイクウイルス BaMV のベクター化

タケ類に取り込ませた遺伝子をクローン全体に運搬することを可能にするベクターとして、タケモザイクウイルス BaMV をベクター化することを企図した。BaMV はポテックスウイルス *Potexvirus* の 1 種で、接触感染で伝播する長さ約 420 nm の紐状一本鎖 RNA ウイルスで、ゲノムサイズは約 6.4 kb である。台湾産リョクチク *Bambusa oldhami* より分離した野生株のゲノムサイズは 6,365 塩基であった (図 4)。

5つの ORF (タンパクのコード領域) で構成され、ORF1 はメチルトランスフェラーゼ、ヘリカーゼ、RNA ポリメラーゼの領域、ORF2~4 は、それぞれトリプル・ジーン・ブロック (TGB) と呼ばれる領域、そして ORF5 はウイルス殻タンパク (CP) のコード領域である。

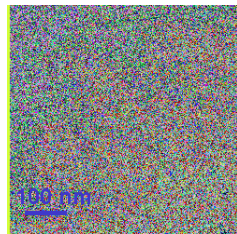


図 4 台湾産リョクチク由来タケモザイクウイルス BaMV の電子顕微鏡写真。

BaMV に感染した台湾産リョクチクの葉からウイルスを抽出・精製し、4つの巨大断片に分割し、35S プロモーターと NOS ターミナーを持つ完全長 cDNA クロンを構築した (図 5A)。さらに、ORF5 の上流近傍に存在す

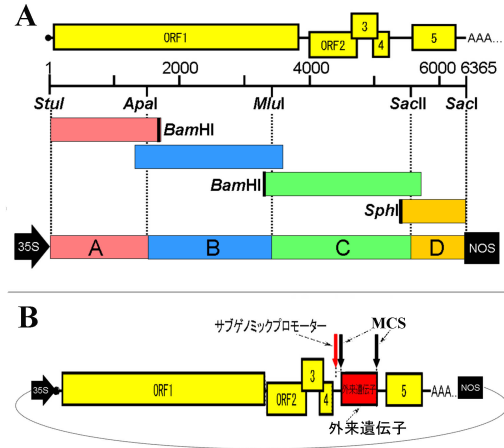


図 5 BaMV 完全長 cDNA クロンの構築法 (A); 作製された BaMV ベクターの原型 (B)。

る約 50 塩基からなるサブゲノムプロモーター領域との間に、*BamHI*, *Nae I*, *Hind III* の制限サイトを持つマルチクロニングサイト MCS を付加し、全長 10,162 塩基からなり外来遺伝子を導入可能なベクターの原型を作製した (図 5B)。他方、BaMV 感染リョクチクの葉の搾汁をカーボランダム法によりタバコ *Nicotiana benthamiana* の葉に擦り付け接種すると、容易に感染が確認された。

この組換え分子 (図 5B) を $2 \mu\text{g}/\mu\text{l}$ の濃度で $50 \mu\text{l}$ タバコの苗にパーティクルガン法で接種した。1ヶ月後に、4検体中の矮生症状を呈した 1 検体 (図 6 左端) の上葉から BaMV 由来の RNA を RT-PCR 法によって検出した。



図 6 BaMV ベクターの原型をタバコに接種し、感染の確認された検体 (左端)。

これらの課題は本プロジェクトの分担者である宇都宮大学農学部教授の夏秋知英博士によって引継がれ、進展しつつある。

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4件)

①Hisamoto, Y. and Kobayashi, M. Flowering habit of two bamboos *Phyllostachys meyeri* and *Shibataea chinensis* analyzed with flowering gene expression. *Plant Species Biology* 27 (2), 2012, DOI:10.1111/j.1442-1984.2012.00369.x

②小林幹夫 日本産タケ類における推定雑種分類群の存在意義と識別法 東北植物研究 16 巻,2011.1-15

③Hisamoto, Y. and Kobayashi, M. Protoplast isolation from bamboo leaves. *Plant Biotechnology* 27, 2010.353-358

④,小林幹夫・久本洋子 竹は貧困と地球温暖化の救世主となり得るか? 竹 110 号, 2009.22-26

〔学会発表〕(計3件)

①Hisamoto, Y., T. Natsuaki and M.Kobayashi A survey of bamboo mosaic virus and its modification to express foreign genes focusing on temperate strains, IBC2011 XVIII International Botanical Congress 第18回国際植物学会議 2011年7月26日メルボルン(オーストラリア国)

② 小林幹夫・久本洋子,タケ類の葉からのプロトプラストの調整と電気穿孔法による GFP ベクターの導入, 日本植物学会第74回大会,2010年9月11日,中部大学

③Y. Hisamoto and M.Kobayashi, Flowering gene expression in the life history of two mass-flowered bamboos, *Phyllostachys meyeri* and *Shibataea chinensis* (Poaceae: Bambusoideae), 8th World Bamboo Congress (第八回世界竹会議), 2009年9月17日,バンコック (タイ国)

〔産業財産権〕

○出願状況(計1件)

名称: タケ類の開花予測方法

発明者: 小林幹夫・久本洋子

権利者: 国立大学法人宇都宮大学

種類: 新規国内優先権主張出願

番号: 特願 2010-205180

出願年月日: 平成 22 年 9 月 14 日

国内外の別: 国内

6. 研究組織

(1) 研究代表者

小林幹夫 (KOBAYASHI MIKIO)

宇都宮大学・農学部・教授

研究者番号: 80111392

(2) 研究分担者

夏秋知英 (NATSUAKI TOMOHIDE)

宇都宮大学・農学部・教授

研究者番号: 10134264

(3) 連携研究者

福原敏行 (FUKUHARA TOSHIYUKI)

東京農工大学・共生科学技術研究科・教授

研究者番号: 90228924