

## 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25年 6月11日現在

機関番号：82105

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2012

課題番号：22780151

研究課題名（和文）カラマツをモデルとした光周性関連遺伝子のリソース整備および有用形質との関連性解析

研究課題名（英文）The isolation of photoperiodically regulated genes and the relationship between the photoperiod and useful traits in *Larix kaempferi*

研究代表者

武津 英太郎（FUKATSU EITARO）

独立行政法人森林総合研究所・林木育種センター九州育種場・主任研究員

研究者番号：10370826

研究成果の概要（和文）：

樹木の多くの生理プロセスが光周性関連遺伝子に影響をうけると考えられる。一方、その基礎となる遺伝子のリソースが整備されていない。また、材形成フェノロジーと日長との関係は明らかにされていない。本研究ではカラマツをモデルとし、光周性関連遺伝子の単離と塩基配列の決定を行い、その日周期発現パターンの解析を行った。また、異なる日長下で形成層フェノロジーの観察を行い、日長の違いにかかわらず同時期に早材から晩材への移行が起きることを示した。

研究成果の概要（英文）：

The resources for photoperiodically regulated genes for woody plants in Japan is not prepared yet. Wood density is a particularly important trait because it affects other traits such as the mechanical properties of wood and carbon-sequestration performance in woods. The wood density would be affected by photoperiod, whereas the relationship between wood density and the difference of photoperiod is not well understood. We used *Larix kaempferi* for the research material. The homologs of *CONSTANS* and *FLOWERING LOCUS T* were isolated and the pattern of circadian rhythms were analyzed. The phenology of cambium activity were observed and the timing of the transition from earlywood to latewood were not affected by the difference of photoperiod.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2010年度	1,500,000	450,000	1,950,000
2011年度	600,000	180,000	780,000
2012年度	500,000	150,000	650,000
年度			
年度			
総計	2,600,000	780,000	3,380,000

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：森林生産、育種

## 1. 研究開始当初の背景

植物の生理プロセスの多くは季節変化に適応する必要から、日長変化をシグナルとして制御されると考えられる。近年、植物の体内時計といえるサーカディアンクロックの

分子機構の解明がモデル植物において進んでいる（Searle et al. 2004）。サーカディアンクロックは、光を受容するセンサー、周期的に振動を行う振動体（時計遺伝子）、時計遺伝子に制御されて周期的に発現される

遺伝子群（光周性関連遺伝子群）により構成される（Salome and McClung, 2004）。この遺伝子群の日周期発現パターンが日長変化を認識し、様々な生理プロセスを季節制御することが報告されている。木本植物のモデル植物であるポプラにおいても時計遺伝子に制御される光周性関連遺伝子であるCONSTANS (CO) により成長や着花の季節変化が制御されていること、さらに CO の日周期発現パターンに地理変異が存在し、それが樹高成長の停止時期や着花性の遺伝的変異に影響することが示されている（Bohlenius et al. 2006）。

日長に制御されると想定される樹木の多くの形質（着花、成長、材形成など）について、これまで制御実験や形質の詳細観察などにより制御因子を推定する研究が主であったが、そのメカニズムは未解明なものが多い。近年になりモデル植物において日長制御の出発点となるシステムが明らかにされたことで、これまでのような末端形質から上流へ遡るのではなく、上流のシステムを解明した上で下流の形質の制御メカニズムを解明する研究にシフトすると予想される。そのために制御の出発点となる光周性関連遺伝子群の単離と機能推定が必要となるが、日本の針葉樹においてそのリソース整備はなされていない。

樹木の材密度は森林の炭素固定量や生産される材の強度に影響する重要な形質である。材密度は、年輪内の細胞直径や細胞サイズにより決定される。特に針葉樹においては、春の形成層活動開始直後から形成される早材と、その後1成長期の後半に形成される晩材とで細胞直径や細胞サイズに大きな違いがあり、晩材の割合（晩材率）が材密度に大きな影響をもつ。早材形成期から晩材形成期への移行時期の決定要因はまだ明らかにされていない。Larson (1964) は早材から晩材の移行は日長の影響を受け、その影響は頂端部の伸長成長の停止を介した間接的なものであるとしている。日長と材形成フェノロジーや材密度との関係についてはまだ明らかにされていない。

## 2. 研究の目的

本研究では日本および世界において主要な造林樹種であるカラマツをモデルとする。カラマツ属は日本および世界で主要な造林樹種でありかつ育種対象樹種である。カラマツ属に関する研究は海外においても多くなされている。

モデル植物の遺伝子情報を元に光周性関連遺伝子群の単離と塩基配列の決定を行う。得られた配列情報を基に光周性関連遺伝子の発現パターンを明らかにする。同時に形質が異なるクローン間で発現パターンの比較

を行い、光周性関連遺伝子と形質との関係の解析を行う。また、緯度の大きく異なる箇所でも生育した同一クローン群を対象に材形成フェノロジーの調査を行い、日長が材形成フェノロジーや材密度に与える影響を明らかにする。

## 3. 研究の方法

(1) 光周性関連遺伝子の単離と塩基配列の決定および多型箇所の探索

カラマツにおいて cDNA より縮重プライマー法により単離された Constans (CO) と Flowering locus T (FL) のホモログ（それぞれ、LxCO および LxFL）の cDNA 部分配列を研究協力者より提供を受けた。その配列情報を基に、Tail-PCR 法 (Liu, 1995) により隣接する未知 DNA 配列の増幅し配列の決定を試みた。また、将来の連鎖解析に向け、材密度が異なるカラマツクローン群を対象に、ダイレクトシーケンスにより LxCO 領域の塩基配列の多型性の探索を行った。

(2) 光周性関連遺伝子の発現解析

光周性関連遺伝子の発現解析を行うための材料として、材質や着花性の異なるクローンを接ぎ木増殖した。苗畑で1年間幼苗の後、人工環境制御下で育成させた。育成条件は19時間明期/5時間暗期、25°C/20°Cとした。各クローン・個体の成熟葉を3時間おきに連続サンプリングし、サンプリング後すぐに液体窒素にて凍結した。各サンプルより RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen 社) を用いて RNA 抽出を行った。High Capacity RNA-to-cDNA Kit (Applied bio systems 社) を用いた逆転写反応により cDNA を合成し、リアルタイム PCR 法により LxCO および LxFT の発現定量を行った。コントロール遺伝子として Actin のホモログおよび 35S rRNA を用いた。

(3) 材形成フェノロジーの調査

図1に示した3箇所（長野県小諸市、岩手県滝沢村、北海道江別市）の育種素材保存園（設定年1960年～1962年）に植栽された3箇所共通の7クローンを対象とした。各クローン内2～3個体を選び供試個体とした。各クローン・個体はSSRマーカーを用いてクローンの同一性の確認を行った。6月下旬より9月下旬まで1週間～2週間間隔で形成層部位のサンプリングを行った。サンプリングには、Trepbor (Rossi et al. 2006) により行い、直径2mmのサンプルを採取しFAAで固定した。川本法により切片を作成し、染色のち光学顕微鏡下で観察を行った。直交ニコル下で二次壁堆積が確認された最新の細胞のサイズより早材細胞形成期・晩材細胞形成期・細胞分裂停止期を判断し、材形成のフェノロジーを求めた。



図-1 サンプルを行った育種素材保存園の所在地

#### 4. 研究成果

(1) 光周性関連遺伝子の単離と塩基配列の決定および多型箇所の探索

cDNA の部分配列を基に TAIL-PCR 法により、*LxCO* では 2237base、*LxFL* では 713base のゲノム DNA 配列を取得した。それぞれ *Picea abies* の CONSTANS like protein および Flowering locus T-like protein の配列と高い相同性を示した。イントロンを含む *LxCO* の一部領域を対象に、材密度が異なる 8 クロウンをパネルとしてダイレクトシーケンスにより塩基配列を決定し多型を探索したが、現在までに多型は見つかっていない。

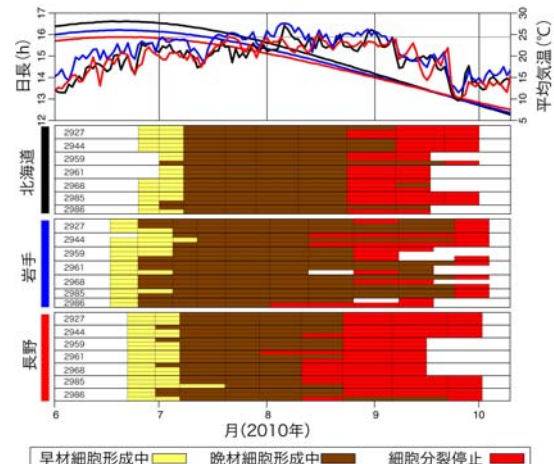
(2) 光周性関連遺伝子の日周期発現解析

明期に発現量が少なく、暗期に発現量が高まる日周期パターンを示す個体が見られたが、明瞭な日周期パターンを示さない個体も存在した。Bohlenius et al. (2006) はポプラでは明期から暗期にかけて CO の発現量が増加する一般的な日周期パターンをもち、異なる緯度由来する個体では日周期パターンのピークが示す時刻が異なること、そしてそのピークと明期/暗期の重なり程度により FL 遺伝子の発現が異なることを報告している。本研究の *LxCO* の日周期での発現パターンの結果は個体間内や個体間のバラツキが大きく、必ずしも明期から暗期にかけて発現量が上昇するという一般的なパターンは示さなかった。また、*LxFL* については明瞭な日周期パターンは示さなかった。樹種間で異なる可能性もあるが、実験条件やコントロール遺伝子の種類、サンプリング手法、遺伝子ファミリーの可能性など、様々な要因が影響していると考えられる。今後検討を重ねる必要がある。

(3) 材形成フェノロジーに与える遺伝と環境の影響

最初のサンプリングを行った 6 月中下旬は、どの個体も早材形成期であった。早材形成か

ら晩材形成の移行はどの試験地・どのクローン・個体においても 6 月下旬から 7 月上旬にかけて確認された (図-2)。岩手県の個体が若干早い傾向は示したが、その差は 3 試験地間での大きな違いは認められなかった。3 試験地で日長は異なり、長野での 7 月上旬の日長に達するには北海道では 7 月下旬になるが、北海道でも長野とほぼ同時期の 7 月上旬には晩材への移行が終了していた。これらの結果から、晩材への移行は限界日長のみで制御されるものではないことが示唆された。日平均気温形成層における細胞分裂の停止は 8 月中旬から 9 月下旬にかけてであり、個体間でバラツキが大きく、明瞭なクローン間差は認め



られなかった。また、日長・温度との明瞭な関係は認められなかった。

図-2 対象とした 3 試験地の日長、平均気温と材形成のフェノロジー。日長は市民薄明に基づいて計算した。細胞形成のステージは二次壁形成の開始が始まった細胞の状態で判断した。下図の数字は精英樹コードを示し、1 行は 1 個体を示す。

#### 引用文献

Bohlenius et al. 2006 Science 312:1041-1043  
 武津ら 2008 日本木材学会大会  
 Liu et al. 1995 Genomics 25:674-681  
 Rossi et al. 2006 IAWA J. 27:89-97  
 Salome and McClung. 2004 J. Biol. Rhythms. 19:425-435  
 Searle et al. 2004. EMBO J. 23:1217-1222

#### 5. 主な発表論文等

[学会発表] (計 4 件)

- ① 武津英太郎、渡辺敦史、栗田学、織部雄一朗、渡邊智美、梶田真也 (2011) カラマツにおける光周性関連遺伝子の単離と発現解析. 第 122 回日本森林学会大会 (学会中止、日本森林学会大会発表データベースに要旨が掲載)
- ② 武津英太郎、織部雄一朗、田村明、織田

春紀、古本良、渡辺敦史、中田了五  
(2011) カラマツの材形成フェノロジー  
への環境と遺伝の影響. 第61回日本木  
材学会大会、2011年3月18日、京都大  
学(京都府京都市)

- ③ Eitaro Fukatsu, Ryo Furumoto, Ryogo Nakada (2010) Genetic variation on the phenology of cambial activities in *Larix kaempferi*. LARIX 2010:International Symposium of the IUFRO Working Group S2.02.07.、2010年9月10日、Institute of Biology of Komi Scientific Centre (ロシア、コミ共和国スィクティフィカル)
- ④ Eitaro FUKATSU, Ryogo NAKADA (2010) Clonal variation on the phenology of cambial activities in two Japanese conifers, *Cryptomeria japonica* and *Larix kaempferi*. Joint Japanese-Finnish Forest Research Seminar: Forestry in changing environment、2010年8月30日、森林総合研究所(茨城県つくば市)

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

武津 英太郎 (FUKATSU EITARO)

独立行政法人森林総合研究所・林木育種セン  
ター・九州育種場・主任研究員

研究者番号：10370826