

平成 30 年 6 月 8 日現在

機関番号：82105

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2016～2017

課題番号：16K21596

研究課題名(和文) スギにおけるマルチ・オルガンの同時並行遺伝子発現ネットワークの構築

研究課題名(英文) Construction of multi-organ simultaneous parallel gene expression network in *Cryptomeria japonica*.

研究代表者

三嶋 賢太郎 (MISHIMA, KENTARO)

国立研究開発法人森林研究・整備機構・森林総合研究所林木育種センター・主任研究員 等

研究者番号：30438098

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、1個体のマルチオルガン(頂端・針葉・形成層)から通年サンプルを採取し、一度に数万遺伝子の発現情報の取得が行えるマイクロアレイ分析を行うことで、発現遺伝子ネットワークを構築した。得られた発現データからは、器官・時期別に関わらず変動を見せない遺伝子群がある一方で、変動する遺伝子は大きく2つの傾向がみられた。1つ目は、形成層帯と頂端・葉のグループの2つにクラスターが分かれた。この結果は、両者の組織における機能的機能的な違いに起因するものと考えられた。2つ目は、形成層帯と頂端・葉のグループのにおいて、さらに細胞活動期のサンプルと細胞休止期のサンプルの2つにグループ化された。

研究成果の概要(英文)：In this study, we have sampled multi-organ (apical-shoot, needle-leaf, cambium) from single tree throughout a year, and then constructed a gene expression network using microarray analysis, which can examine the expression levels of several tens of thousands of genes at the same time. In gene expression data, there were gene groups that do not indicate fluctuation regardless of organ or time, on the other hand, two fluctuation gene expression trends were indicated. Firstly, gene expression pattern was divided into two groups as the cambium group and apical-shoot/needle-leaf group. These findings suggest that difference among two groups indicated in functional difference in tissue. Secondly, gene expression pattern in each group was split into the growing season and dormant season.

研究分野：林木育種

キーワード：スギ 遺伝子発現 マルチオルガン

## 1. 研究開始当初の背景

スギにおける複数部位の遺伝子発現解析 (Mishima et al. 2014, Nose and Watanabe 2014) において、それぞれ部位の発現遺伝子解析から、モデル植物と配列とその発現との類似性が存在することが明らかになった。これらの研究を基に、今後は、スギにおけるこれらのデータの統合を行うとともに、他の成長期に分裂する器官 (例えば、頂端や根など) の発現遺伝子データ解析も行い、これらをあわせて発現ネットワークを構築し、樹体全体の統合的な発現動態を理解する必要があるとの着想に至った。従って、新たに1個体のマルチオルガン (複数の器官) から同時にサンプリングを行い、発現遺伝子解析を行うこととした。この発現遺伝子解析を通年にわたって行うことで、スギの複数の分裂器官における通年の発現動態を理解できると考えた。

## 2. 研究の目的

本研究では、1個体のマルチオルガンから同時にサンプリングを通年に渡って行い、発現遺伝子解析を行う。発現解析にあたっては、成熟個体を対象とした。また、これらの目的のため、サンプリング回数は、形成層帯で行った成果 (Mishima et al., 2014) に基づき、通年にわたって8回とし、また、サンプリング箇所は、頂端、葉、形成層帯とした。これらのマイクロアレイ解析によって得られる発現データを解析対象とし、器官を横断した発現ネットワークの構築を試みた。

得られるデータの解析データは、マルチオルガンを統合的に解釈できるため、器官間の成長パターンとの関係性や様々な生理現象を担う遺伝子を明らかにできる。また、モデル植物との比較および新規の遺伝子の発現の関与なども推定可能となる。

さらに、スギのような、非モデル植物であっても、遺伝子発現ネットワークが構築できれば、様々な既知の生理現象のカスケードにおけるこれらの発現遺伝子の統合ネットワークと比較可能となる。これらから得られるデータは、分子育種を行うにあたって、様々な育種形質の選抜マーカーの信頼性向上や多環境下における選抜マーカーの発現調節の理解に寄与できると考えられる。

## 3. 研究の方法

本研究では、1個体のマルチオルガンから同時にサンプリングを行い、発現遺伝子解析を行う。発現解析にあたっては、成熟個体の頂端、葉、形成層帯を対象とした。マイクロアレイ解析によって得られる発現データを解析対象とし、器官を横断した発現ネットワークを構築した。

### (1) マルチオルガンからのサンプル採取

サンプリング対象としては、スギ成熟個体を対象とした。発現遺伝子解析解析においては、Biological replicate (個体反復) を必要とするため、同じサンプリングを最低3個体行う

必要がある。また、サンプリング回数は、形成層帯で行った成果 (Mishima et al. 2014) から、通年にわたって8回によって行った。また、サンプリング箇所は、頂端、葉、形成層帯とした。従って、3個体×8回 (時期) ×3カ所 (頂端、葉、形成層帯) の72回分のサンプルを収集した。

(2) 採取したマルチオルガンからの RNA 抽出  
サンプリングを行ったそれぞれの器官から RNA 抽出を行った。抽出器官間の RNA 抽出の予備実験において、既にそれぞれ器官間で抽出条件の最適化が図られていたため、サンプルの抽出を順次行った。

(3) マイクロアレイ解析およびデータ解析  
抽出した RNA を用いて、順次マイクロアレイ解析を行った。使用するマイクロアレイに関しては、形成層帯について既に報告したもの (Mishima et al. 2014) に、Nose and Watanabe (2014) らが、葉で使用したものを組み込み新たなマルチオルガンに対応可能なデザインを Agilent 社マイクロアレイデザイン web : e-array (フリーソフト) にて設計し、これを使用した。データ解析においては、既報の通り (Mishima et al. 2014) 解析技術は習得済みであったため、解析も順次行った。すべてのマイクロアレイデータを用いて発現ネットワーク解析を行った。マイクロアレイ解析では、1回に約2万の発現データが得られる。本実験計画では、3個体×8回×3カ所 (頂端、葉、形成層帯) の72回分のデータを対象とするため、54回×2万の108万データが対象とした。ネットワーク解析は、遺伝子発現データの解析から、3部位の活動期データ、休眠期データ、両者をまとめたデータのセットの3パターンを用いて行った。

## 4. 研究成果

### (1) サンプル採取の概要

マルチオルガンとして、頂端、葉、形成層帯を対象とし、これらについて、1/19, 3/10, 4/7, 4/25, 6/13, 7/17, 9/16, 11/14 のサンプルを採取した。対象とした部位は、生物学的な機能の違いによって、それぞれ特異性を持つことが考えられる。これまでの既存の研究報告から形成層における知見は多く、組織解剖学的見地から活動期には早材・晩材が夏至を境に作られることが知られており、今回のサンプリングでは、3/10の分裂開始から、6/13までのサンプルが早材期であり、7/17から11/4までのサンプルが晩材期であると考えられた。1/19のサンプルについては休眠期として用いた。頂端、葉については、形成層と比べて知見は少ないが、4/25から7/17までのサンプルは、一次伸長期であり、9/16から11/14までのサンプルは、二次伸長期であると考えられた。1/19から4/7のサンプルについては休眠期として用いた。上記ことから、サンプリングされた時期は各部位の年周サイクルに基づいた組織解剖学的なイベントを網羅したものと考えられる。

(2) マイクロアレイによるマルチオルガンの遺伝子発現解析

設計したスギマイクロアレイには 19,360 遺伝子が搭載されている。マルチオルガンを網羅した全ての発現データを用いて、繰り返し及び発現変動のない遺伝子を除くフィルタリングを行い、13,381 遺伝子に絞り込んだ。

絞り込んだ遺伝子により PCA 解析及び階層クラスタリング解析を行った (図-1)。

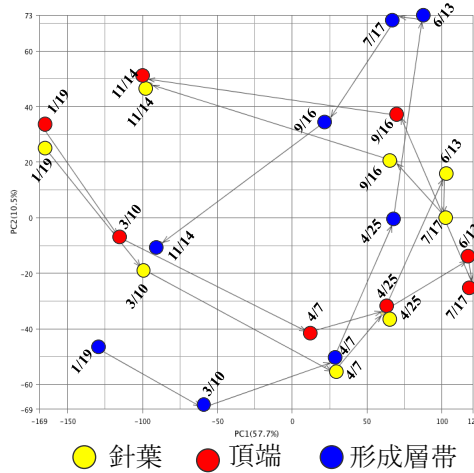


図-1 PCA 解析

その結果、第一主成分 (pc1) と第二主成分 (pc2) を軸にとって各実験区の平均値をプロットすると、反時計回りの円を描くようにプロットされたことから、多くの遺伝子が周期的な発現変動をしていることが示唆された。また、葉と頂端は非常に近いのに対して形成層は他の組織とは違った発現パターンであることが示唆された。また、階層クラスタリング解析からは、PCA 解析と同様に多くの遺伝子が周期的な発現変動を行っていることが示された。さらに、サンプリングを行った 8 つのタイムポイントは、大きく分けると 4/15 から 9/16 の活動期に遺伝子発現が高くなっているグループと 11/14 から 3/10 の休眠期に遺伝子発現が高くなっているグループ分けられることが明らかになった。4/7 のサンプルにおける遺伝子発現挙動は、活動期・休眠期の中間的な挙動であることに加え、形成層では活動期に葉と頂端と比べて著しく発現変動のない遺伝子が存在することが明らかになった。

オルガン毎に、活動期と休眠期に発現差のある遺伝子を 1.8 倍の発現量かつ Student-test FDR<0.1 の条件で抽出した。葉では、活動期に遺伝子発現が高くなっているグループは、3,661 遺伝子あり、エンリッチメント解析の結果 “Cell wall organization”, “microtubule-based movement”, “Protein phosphorylation” の機能を持つ遺伝子群等が有意に高発現していた。一方、休眠期に遺伝子発現が高くなっているグループは、2,3271 遺伝子あり、“transcription, DNA-templated”, “response to cold” “ethylene-

activated signaling pathway” の機能を持つ遺伝子群等が有意に高発現していた。頂端では、活動期には 3,868 遺伝子 “Cell wall organization”, “defense response”, “microtubule-based movement” が、休眠期には 2,685 遺伝子, “flavonoid biosynthetic process”, “response to cold”, “regulation of circadian rhythm” 等が高発現していた。同様に、形成層では、活動期には 2,774 遺伝子 “lignin biosynthetic process”, “plant-type secondary cell wall biogenesis”, “microtubule-based movement” が、休眠期には 2,478 遺伝子, “ethylene-activated signaling pathway”, “starch catabolic process”, “flavonoid biosynthetic process” 等が高発現していた。これらの結果から、どのオルガンにおいても活動期に細胞分裂関連の遺伝子が高発現し、休眠期には、耐寒性等の防御関連の遺伝子が高発現していることが示唆された。葉と頂端は発現遺伝子の機能推定結果においても非常に類似していた。また、形成層特に二次壁関連の遺伝子が活動期に特徴的であった。

各オルガンで明らかになった活動期・休眠期の発現遺伝子グループの共通性をまとめて解析し、活動期 4,776 遺伝子、休眠期 3,797 遺伝子を抽出した (図-2)。

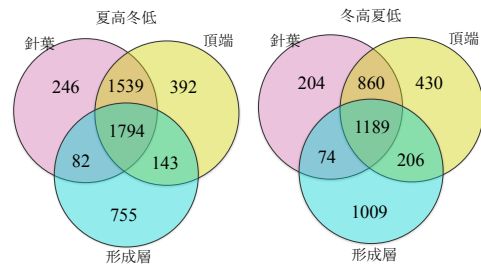


図-2 オルガン間の共通性

ベン図によって各オルガンの共通性を明らかにした結果、活動期には各オルガン共通な遺伝子が 36%, 葉特異的 5%, 頂端特異的 8%, 形成層特異的 15%, 休眠期には各オルガン共通な遺伝子が 30%, 葉特異的 5%, 頂端特異的 11%, 形成層特異的 25%, となった。また、活動期・休眠期それぞれ、葉・頂端と形成層を比べた場合に、恒常的に発現すると思われる遺伝子は、活動期で、葉・頂端 234 遺伝子、形成層 271 遺伝子、休眠期で、葉・頂端 674 遺伝子、形成層 167 遺伝子抽出できた。この中で特徴的であったのは、特に活動期において、葉・頂端 234 遺伝子が光合成関連の遺伝子群が多かった点であった。

ネットワーク解析では、全てのデータ、夏高発現のグループ、冬高発現のグループの 3 つのデータセットを用いて解析をおこなった。データセット毎に、発現変動幅が大きい 1000 遺伝子を解析対象とした。全てのデータは、ネットワークの頂上に位置し、多くの下流遺伝子を持つ遺伝子は、Auxin-response,

lignine biosynthesis に関わる遺伝子であり、いずれも夏に高発現するグループのものであり、活動期の細胞形成に関わるものであった。夏高発現のグループでは、全てのデータを使った結果とほぼ同じであったが、加水分解酵素に関わる遺伝子は、葉・頂端では、多くの下流遺伝子を持つ遺伝子であったのに対し、形成層では変動が小さかった。冬高発現のグループでは、cell-fate determination 関連遺伝子などの細胞の維持に関わる機能を持つ遺伝子が多くの下流遺伝子を支配している傾向が明らかになった。

本研究を通じて、マルチオルガンにおける遺伝子発現解析を行い、様々な角度から比較検討を行った。その結果、ノンモデル植物ではあるものの多くの遺伝子発現を集積でき、既報との比較によって多くの知見が得られた。本研究の成果は、今後の針葉樹における育種を含めた様々な研究における基盤情報を提供できると考えられる。

#### <引用文献>

- ① Kentaro Mishima et al. Transcriptome sequencing and profiling of expressed genes in cambial zone and differentiating xylem of Japanese cedar (*Cryptomeria japonica*). BMC Genomics. 2014;15:219.
- ② Nose M and Watanabe A. Clock genes and diurnal transcriptome dynamics in summer and winter in the Gymnosperm Japanese cedar (*Cryptomeria japonica* (L. f) D. Don) . BMC Plant biology. 2014;14:308.

#### 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)

[学会発表] (計 1 件)

- ① 三嶋賢太郎、能勢美峰、栗田学、坪村美代子、平尾知士、平岡裕一郎、花岡創、井城泰一、大平峰子、高島有哉、松下通也、高橋誠 スギの複数器官における遺伝子発現の統合解析、第6回森林遺伝育種学会、2017年

#### 6. 研究組織

##### (1) 研究代表者

三嶋 賢太郎 (MISHIMA Kentaro)

国立研究開発法人森林研究・整備機構・

森林総合研究所林木育種センター・主任研究員等

研究者番号：30438098