

機関番号：82105

研究種目：基盤研究 (C)

研究期間：2008～2010

課題番号：20580168

研究課題名 (和文) ブナ花成変異系統の解析による広葉樹開花・結実周期の予測

研究課題名 (英文) A trial for establishing methods for predicting flowering and bearing stages of broad-leaved trees by functional analysis of flowering mutants from Japanese beech tree.

研究代表者

大宮 泰徳 (OHMIYA YASUNORI)

独立行政法人森林総合研究所・林木育種センター東北育種場・主任研究員

研究者番号：70360469

研究成果の概要 (和文)：ブナの花成誘導に中心的な役割を担うと考えられる CO, FT 遺伝子を単離し、全長の配列を同定した。CO 遺伝子の季節変動をリアルタイム PCR を用いて調べたところ、着花した年の前年の5月の開葉直後の花芽形成期に、着花した年には見られなかった非常に高い発現のピークが検出され、花芽形成に深く関与していることが示唆された。また、シロイヌナズナにブナの CO 遺伝子を過剰発現させた形質転換体を作成したところ、早咲きの表現型を示し、ブナの CO 遺伝子の花成促進機能が証明された。

研究成果の概要 (英文)：

We have isolated *Arabidopsis* orthologs, constans (CO) and flowering locus T (FT) genes from Japanese beech tree, which are mainly function in flower transition, and their full sequences were identified. Real-Time PCR analysis revealed that CO transcripts are closely related to flowering initiation with high expression level of CO mRNAs during the period in May, a year before flowering. Transgenic *Arabidopsis* overexpressing CO product represented early flowering phenotype, this is a result of revealing its flowering enhancement function of CO. Their comparisons of nucleotide sequences were performed among 38 clones collected from Tohoku area. It seemed likely that there are possibilities of insertion/deletion including nucleotide polymorphisms (SNPs) within several FT genes that might influence its function, while there are no differences among CO sequences. Further analyses of FT including SNPs and producing overexpressing lines are ongoing.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008年度	1,400,000	420,000	1,820,000
2009年度	1,200,000	360,000	1,560,000
2010年度	1,000,000	300,000	1,300,000
年度			
年度			
総計	3,600,000	1,080,000	4,680,000

研究分野：樹木分子生物学

科研費の分科・細目：森林学・森林科学

キーワード：遺伝子、樹木、発現制御、森林工学、ブナ

1. 研究開始当初の背景

ブナの開花・結実には豊凶の周期性があつて、豊作の年は5~7年毎に1回のみである。東北地方では、昨年が大凶作の年にあたり、ごくわずかな地域を除きほぼ全域で種子が収穫できなかった。苗木の安定供給には豊凶の正確な予測が不可欠であるが、これまで、ブナの豊凶予測には、毎年枝を採集し冬芽や雌花序痕を数えるなど、多大な労力を必要とする統計学的手法しかなかった。

研究開始の2年前、*Science* 誌に、広葉樹の花成誘導に関する興味深い仮説が発表された。すなわち、広葉樹（ポプラ）は発芽から開花期までの数年間に花成誘導因子 FT 遺伝子の蓄積量が徐々に増加し、ある一定の閾値を越えると花成が誘導される。この研究結果から、FT 遺伝子や、FT 遺伝子の発現を正に制御する CO 遺伝子、及び FT 遺伝子のリプレッサーとして働く FLC や EBS 遺伝子などが、周期的な広葉樹花芽誘導のしくみに深く関わっていることが示唆された。さらに、当育種場内に、豊凶の周期性を失い、毎年開花・結実する変異系統の存在が明らかとなった。

2. 研究の目的

正常な系統と変異系統について花芽形成関連遺伝子 (FT, CO, FLC, EBS) の遺伝子多型を解析し、豊凶が失われた原因となる遺伝子変異をつきとめることによって、ブナ開花・結実の豊凶のしくみを分子レベルで解明する。また、本研究を通して、CO から FT 遺伝子への情報の流れを軸としたブナの光周性花成制御経路とその制御機構を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 毎年開花・結実するブナ変異系統から単離した FT, CO などの花芽形成遺伝子のゲノムを含むコード領域の解析から遺伝子多型を明らかにする。

(2) 花芽形成期における、FT を中心としたこれらの遺伝子群の局在や発現量と明らかにするとともに、アラビドプシス遺伝子欠損株で発現させる、もしくは過剰発現により花成の回復率もしくは早咲きなどの表現型との関連性を解析するなどの分子生物学的手法を用いて、ブナ豊凶の周期性が失われた原因となる遺伝子多型を探索する。

4. 研究成果

(1) ブナ花成関連遺伝子の単離と構造解析
4種類の CO-Like (COL) 遺伝子の cDNA 全長

を単離し、16種類のシロイヌナズナ COL 遺伝子との系統樹解析から CO に相当する機能を持つ遺伝子を特定し(図1)、ゲノム DNA から PCR 増幅によりイントロンの塩基配列を決定した。



図1 CO cDNA のドメイン構造

また、ポプラの FT 遺伝子と86%と高い相同性を持つ、4つのエキソン構造からなる全長約5kbpと推定される FT 遺伝子のゲノム DNA を単離した(図2)。



図2 FT ゲノムの構造(白抜きボックスがエキソン構造を示す。巨大なイントロンで断断されており、コード領域は0.5kb。)

(2) 遺伝子変異解析

東北育種場が保有する38系統からそれぞれゲノム DNA を抽出し、CO 遺伝子全長について、PCR により増幅し、ベクターにクローニングした後に塩基配列を決定・比較した。しかし、これらの系統の中に CO 遺伝子の変異は検出されなかった。

FT 遺伝子についても同様の解析を進めた。FT 遺伝子は全長が5kbpと巨大であり PCR により全長のクローニングが困難であったため、前後二つの断片に分けて試みた。前半2.5kbpは38系統全てにおいて容易にクローニングできたが、3'末端側、後半2.5kbpの断片のクローニングに手こずり、なかなかクローニングできなかった。ベクターや手法を種々変えて、最近ようやく1/3系統についてクローニングに成功した。現在塩基配列の解析を進めているところであるが、PCR増幅の段階で3'末端側に異なるサイズの断片が増幅される系統が数系統見いだされていた。FT 遺伝子の機能を欠失したシロイヌナズナ変異体のほとんどが FT 遺伝子の3'末端側第4

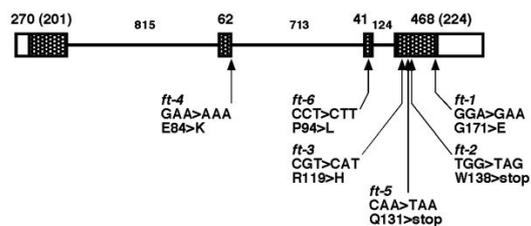


図3 シロイヌナズナ FT 変異系統

エキソン由来のものであり(図3)、FT 遺伝子機能に差異があることが示唆された。現在、塩基配列から SNP を同定し変異の解析を進めている。

(3) ブナ花成関連遺伝子の発現解析

東北育種場が保有する開花・結実に周期性を有する正常な系統と周期性が失われており毎年着花するといわれる変異系統について数年間着花特性を調査したところ、毎年着花する変異系統においては、実際には枝毎に隔年で着花することを見いだした。そこで、この変異系統の特定の枝に着目し、CO 遺伝子の季節変動をリアルタイム PCR を用いて調べたところ、着花した年の前年の6月の開葉直後の花芽形成期に、着花した年には見られなかった非常に高い発現のピークが検出され、CO 遺伝子の関与が示唆された。

ブナの FT mRNA 全長の発現は RT-PCR によって確認できた(図4)が、発現量が低く、その検出には RT-PCR でも 40 サイクル以上の増幅が必要であり、リアルタイム PCR による解析がなかなか進んでいない。

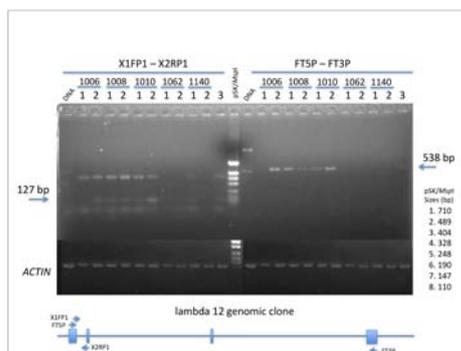


図4 ブナ FT 遺伝子の発現解析

白神山地の試験地から採集した個体番号 1006, 1008, 1010, 1062, 1140 の葉からそれぞれ mRNA を抽出し、全長 (FT5P - FT3P) および 5' 末端 (X1FP1 - X2RP1) の 2 セットのプライマーを用いて解析した。各 1-2 レーンは 18 時のサンプリング、3 レーンのみ 15:30 のサンプリング

これに加え、2010 年 12 月 31-1 月 2 日の大雪と 2011 年 3 月、4 月の震災・余震による 3 度の長期停電によって、東北育種場と岩手大学とに分散してサンプルを保存していたにもかかわらず、特に FT が高発現していると予想される夜 21 時の未解析サンプルの大部分が失われてしまったことが大きく影響し、期間内に思うように解析が進められなかった。

(4) ブナ花成関連遺伝子のシロイヌナズナへの遺伝子導入と機能の推定

弘前大学において、シロイヌナズナにブナの CO 遺伝子を過剰発現させた形質転換体を作成したところ(写真)、早咲きの表現型を示し、ブナの CO 遺伝子が花成促進に機能していることが証明された。



ブナの FT 遺伝子についても、シロイヌナズナへの過剰発現によってその機能を推定するため、バイナリベクターを構築し、形質転換体の作出を進めている。

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 2 件)

- ① 大宮泰徳、毎年花を着ける？ブナのお話、みどりの東北、査読無、65 巻、2009、p. 4-4.
- ② 大宮泰徳、ブナ花成研究事始め、林木の育種、査読無、233 巻、2009、p. 52-52

〔学会発表〕(計 2 件)

- ① 大宮泰徳、ブナ花成関連遺伝子 FcCO, FcFT の単離と発現解析、第 61 回日本木材学会大会、2011 年 3 月 19 日、京都大学(京都市)
- ② 大宮泰徳、ブナ花成関連遺伝子の単離と解析、第 51 回日本植物生理学会、2010 年 3 月 21 日、熊本大学(熊本市)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

大宮 泰徳 (OHMIYA YASUNORI)

独立行政法人森林総合研究所・林木育種
センター東北育種場・主任研究員
研究者番号：70360469

(2)研究分担者

赤田 辰治 (AKADA SHINJI)
弘前大学・遺伝子実験施設・准教授
研究者番号：10250630
上村 松生 (UEMURA MATSUO)
岩手大学・農学部附属寒冷バイオフィロンテ
ィア研究センター生命適応機能研究分野・
教授
研究者番号：00213398

(3)連携研究者

斎藤 秀之 (SAITO HIDEYUKI)
北海道大学・農学研究科・助教
研究者番号：70312395