

平成 22 年 5 月 14 日現在

研究種目：若手研究 (B)

研究期間：2008～2009

課題番号：20780108

研究課題名 (和文)

光合成に現れるストレス後遺症とその原因を評価するゲノム生物学的手法の開発

研究課題名 (英文)

Development of stress diagnosis technology for photosynthesis based on genomic biology

研究代表者

斎藤 秀之 (SAITO HIDEYUKI)

北海道大学・大学院農学研究院・助教

研究者番号：70312395

研究成果の概要 (和文)：

ブナの葉で発現する完全長 cDNA ライブラリーを作成して 5,376 クローンの 5' 端塩基配列の解読結果から機能を推定し、3,629 クローンの重複しない遺伝子を単離した。リファレンス遺伝子の探索を行ったところ、*ef1 α* と *EIF1A* 遺伝子は様々なストレスに対して安定的に発現しており、リファレンス遺伝子として相応しいことがわかった。環境ストレス特異的な発現パターンを示し遺伝子を明らかにした。これらのことから、遺伝子発現解析は野外に生育するブナの有望なストレス診断技術になる可能性が示された。

研究成果の概要 (英文)：

We firstly generated a normalized and full-length enriched cDNA library of leaves of beech (*Fagus crenata* Blume). The 5' end one pass sequence for 5,376 clones was analyzed, and 3,629 non-redundant clones were annotated. Second, we evaluated the stability of candidate reference gene mRNA transcript level to seasonal change and various abiotic stresses; remove of leaf, dry, heat, chilling, hydrogen peroxide, resulting that *ef1 α* and *EIF1A* were relatively universally available reference gene of *F. crenata* leave from the different season and stresses. Third, we found abiotic stress-dependent expression of genes. Consequently, we suggested transcriptome analysis was a promising approach for stress diagnosis of beech tree in field.

交付決定額

(金額単位：円)

	直接経費	間接経費	合計
2008 年度	1,700,000	510,000	2,210,000
2009 年度	1,500,000	450,000	1,950,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,200,000	960,000	4,160,000

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：ストレス診断、ブナ、ゲノム生態学、光合成、遺伝子発現

1. 研究開始当初の背景

気候変動や酸性降下物による環境負荷

など、外的環境要因が林木の成長に与える影響は、これまで以上に多様かつ複雑になって

いる。育林や森林の保全管理、森林衰退現象への対策など、これらの指針を得るためには、樹木の成長と環境の関係を正しく理解する必要があり、森林科学、とりわけ造林学における森林生態生理学の役割は、この樹木の成長と環境の関係を正確に評価するための知見と技術を提供することである。これまでの研究により、林木の環境応答や衰退に関するメカニズムは、数多くが解明されてきた。また、環境や生理学的パラメータの測定技術の飛躍的な向上により、詳細な研究が可能になった。しかし、現場の視点に立つと、野外の複合ストレス環境下において成長を阻害する内的・外的要因を過去に遡って特定するための簡便かつ精度良い評価手段がない。このため、樹木の診断は現在でも旧来の視覚と状況証拠に頼るところが大きい。つまり、メカニズム研究で得られた成果が森林管理や対策に生かし切れていないと言える。

そこで注目したのはゲノム生物学的な情報である。ゲノム生物学的情報とは、ここではメッセンジャーRNA (mRNA) 量の解析でわかる遺伝子による生理機能の調節を指す。一般に、生理機能は遺伝子から転写されるmRNAを介して調節される。ストレスを受けて損傷した光合成器官の修復や老化誘導なども、この遺伝子発現により調節される。よって、mRNAの定量から得られるゲノム生物学的情報には、生体内のあらゆる機能調節の情報が集約されている。他方、マイクロアレイ技術の汎用化は、あらゆる生物で大量の遺伝子の発現解析を一度に短時間で行うことを可能にした。この測定技術により、林木の遺伝子発現情報を網羅的に解析して、そこから機能調節の情報を的確に抽出・判読することが可能になれば、樹木のストレス診断技術が確立できるものと考えられるに至った。

2. 研究の目的

遺伝子発現情報を用いたブナの樹木診断技術の開発研究の一環として、次に挙げる4つの目的の小課題を行った。

- (1) ブナの完全長cDNAの収集を行い、遺伝子の塩基配列を明らかにする (ESTs: Expression sequence tagsの構築)。
- (2) 量的リアルタイムPCR法に必要なリファレンス遺伝子を明らかにする。
- (3) 遺伝子発現の環境ストレス特異性を明らかにする。
- (4) 土壌水分の乾燥および緩和の過程での遺伝子発現パターンを明らかにする。

3. 研究の方法

(1) ESTの構築

供試木は北海道黒松内町のブナ二次林に生育するブナの成木である。供試葉は、陽樹冠から採取し、採取時期は開葉前の5月から

落葉直前の11月までの期間の合計14回であった。また5月下旬、7月中旬、9月下旬の供試葉に対して、乾燥、高温(34°C)、低温(4°C)、H₂O₂(200 mM)のストレスを2時間および10時間施した。全RNAの抽出は改良型CTAB法で行った。各試料から抽出した全RNAをプールしてメッセンジャーRNAを調整した後、均一化処理を行い、ビオチン化キャップトラッパー法で完全長に富んだcDNAライブラリーを作成した。使用したファージベクターはλ-FLC-IIIである。遺伝子の機能推定にはKOGデータベースを用いた。

(2) リファレンス遺伝子の探索

供試木は北海道黒松内町ブナ二次林に生育するブナで、供試葉は陽樹冠から採取した。季節変化の解析は、開葉前の5月上旬から落葉前の10月下旬までの供試葉を用いた。ストレス応答の解析は、5月下旬、7月中旬、9月下旬の供試葉に、切除、乾燥、高温(34°C)、低温(4°C)、H₂O₂(200 mM)を2時間および10時間施した。検討した遺伝子は、一般に恒常的に発現していると考えられているGAPDH (Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase), TUA(tubulin α), UBC(Ubiquitin conjugating enzyme), apt(adenine phosphoribosyl transferase), EIF1A(Eukaryotic translation initiation factor1A), e1 α (elongation factor1 α)をコードしている6遺伝子とした。遺伝子のmRNA量の定量には、LightCycler (Roche Applied Science)を用いた(量的リアルタイムPCR法)。発現安定性は、GeNorm (Vandesompele et al. 2002)で解析した。

(3) 遺伝子発現の環境ストレス特異性

供試木は北海道黒松内町ブナ二次林に生育するブナで、供試葉は陽樹冠から採取した。開葉前の5月上旬から落葉前の11月初旬にかけて15回採取した。葉の発達時期(5月下旬)、成熟期(7月中旬)、老化期(9月下旬)に1)シリカゲルによる極度の乾燥、2)高温(34°C)、3)低温(4°C)、4)H₂O₂(200 mM)のストレス処置を2時間および10時間施した。目的遺伝子のmRNA量の定量はreal-time PCR法によった。

(4) 土壌乾燥ストレスに対する遺伝子発現

供試木には5年生の北海道産のブナ苗木を用いた。生育環境は人工気象室(日長:15h/9h, 気温:25°C/18°C, 湿度:68%, 光強度:200 μ mol m⁻²s⁻¹)で制御した。土壌水分条件は、無灌水期間の長さで調節し、異なる強度の土壌乾燥処理を行った(対照、弱乾燥、強乾燥処理区; n=7)。土壌水分はテンシオメーター法で、葉の水ポテンシャル(Ψ_l)はサイ

クロメーター法で測定した。光合成機能としてみかけの光飽和光合成速度 (A_{sat}) を調べ、さらに A_{sat} の律速要因として気孔コンダクタンス (g_s)、RuBisCO の炭酸固定速度 (V_{cmax})、光化学系IIの量子収率 (F_v'/F_m') と最大量子収率 (F_v/F_m) を調べた。それぞれ開放型通気法とクロロフィル蛍光反応法で測定した (LI6400, Li-Cor 社)。 V_{cmax} は Farquhar らの光合成の生化学モデルに基づいて計算した。遺伝子発現の解析では、mRNA 量を real-time PCR 法で調べた。 mRNA 量を調べた遺伝子の種類は、*rbcS* (RuBisCO 小サブユニットの合成の役割)、*cab* (光化学系IIの集光性クロロフィル *a/b* 結合タンパク質の合成の役割)、BADH (グリシンベタイン合成酵素)、CHAP (葉緑体シヤペロニンの合成の役割) である。

4. 研究成果

(1) EST の構築

① cDNA ライブラリーの品質

パイロット解析 ($n = 96$) では、クローンの平均鎖長が 2.00 kbp、インサート保有率が 100%、クローンの重複率が 0%、完全長率が 100%であった。アラビドプシス、イネ、ポプラなどの先行事例に比べて、本研究で作成した cDNA ライブラリーの品質は同水準もしくはそれ以上の良好なものであった。

② 遺伝子の機能類型

完成した完全長 cDNA ライブラリーから無作為に選んだ 5,376 クローンについて 5' 端塩基配列を解析したところ、4,892 クローンで有効な塩基配列解析を行うことができ、3,629 クローンの重複しない遺伝子を単離できた。このうち 98%にあたる 3,574 クローンでは機能推定が行えた。これらの結果に基づき、各クローンの塩基配列、推定された機能、関連する塩基配列資料などをブナの ESTs データベースとして構築した。遺伝子の機能に関して既存の類型区分 (24 種類) で検討したところ、全ての機能分類で遺伝子が存在しており、その割合はほぼ均等であった。当データベースには多種多様な機能に対応する遺伝子の塩基配列情報が納められていた。

③ ゲノム生物学的手法を利用したブナのストレス診断技術開発へむけて

野外に生育するブナで発現している遺伝子は、その大多数が他のモデル植物で既知となっている遺伝子と塩基配列の相同性が高く、遺伝子の機能を推定することができた。このことから、他の生物種で研究された遺伝子の機能に関する知見がブナでの研究に応用できる可能性が高まった。さらに、単離された遺伝子の中には、光合成などの成長生理に関わる遺伝子群、ストレス防御に関わる遺伝子群、植物ホルモンやシグナル伝達物質に

関わる遺伝子群、転写因子に関わる遺伝子群などが含まれており、これらはブナのストレス診断技術の開発研究において生理状態や環境ストレスの指標性遺伝子の候補として期待できるものであった。この完全長 cDNA ライブラリーの解析を継続して ESTs データベースを充実させることで、ブナのゲノム生物学的手法を利用したストレス診断技術の開発研究に貢献できると考えられた。

(2) リファレンス遺伝子

季節変化、切除、高温、 H_2O_2 では、*ef1 α* と EIF1A の発現量が最も安定していた。乾燥と低温では、それぞれ *ef1 α* と UBC、*aprt* と GAPDH の発現量が最も安定していた。各ストレス応答の結果をプール (全ストレス) して解析すると、*ef1 α* と EIF1A の発現量が最も安定していた。さらに、季節変化とストレス応答の材料を全てプールして解析すると、同様の結果となった。次に、補正係数を安定性が高かった上位 2 遺伝子を用いて算出した。季節変化の解析では、補正係数が 0.4~2.5 の間で変動しており、特に、開葉時期で大きな補正が必要であった。ストレス応答の解析では、乾燥ストレスで補正が最も大きく、0.5~2.3 の補正を必要とした。以上より、野外に生育するブナの葉を対象に量的リアルタイム PCR 法で mRNA 量を測定する場合には、適切なリファレンス遺伝子を選抜して mRNA の定量結果を補正することの重要性が示された。

(3) 遺伝子発現の環境ストレス特異性

① 季節変化

rbcS 量は開葉期に最も多く、葉の成熟完了後から老化にむけて減少した。また 7 月から 8 月中旬にかけて無降水期間があり土壤乾燥が原因と思われる *rbcS* 量の低下が認められた。*SOD* 量は着葉期間を通じて蓄積がみられ、9 月に増加傾向を示した点を除くと概ね一定した傾向を示した。*ACS2* 量は発達時期から成熟期に極めて少なく、老化が始まる 9 月から増加した。

表 1. ストレス状態を指標する遺伝子の

	① <i>rbcS</i>			② <i>SOD</i>			③ <i>ACS2</i>		
	5/22	7/13	9/24	5/22	7/13	9/24	5/22	7/13	9/24
乾燥	●	●				○	○	○	○
高温			●				○		○
低温									○
H_2O_2	●	●					○	○	○

* ○ : 発現量の増加によりストレス状態を指標する

* ● : 発現量の減少によりストレス状態を指標する

② ストレス応答性

rbcS 量は、発達時期に乾燥と H_2O_2 に対して発現量を低下させ、成熟期には乾燥、高温、 H_2O_2 に対して発現量を低下させ、老化期には高温に対して発現量を低下させた (表 1)。よ

って、*rbcS* のストレス状態の指標性はそれらのストレス要因に対して認められた。*SOD* 量は着葉期間を通じて蓄積がみられたが、発達時期と成熟期のストレス応答は認められず、老化期の乾燥に対してのみ発現量を増加させた。よって、*SOD* のストレス状態の指標性は限られた。*ACS2* 量は発達時期から成熟期に少なく、老化が始まる9月から増加した。発達時期では乾燥、高温、 H_2O_2 に対して発現量を増加させ、成熟期では乾燥と H_2O_2 に対して発現量を増加させ、老化期では全てのストレス要因に対して発現量を増加させた。よって、*ACS2* は老化誘導の指標性を示し、各時期の多くのストレス要因に対して衰退指標性を示した。

③ 指標性遺伝子としての適正

1. *rbcS* は、着葉期間を通して発現が見られ、また多くの時期、ストレスにより発現量が減少したため、健全性の指標性遺伝子として適当である可能性を示した。
2. *SOD* は、予想されたストレスによる発現量の増加が見られず、ここで検討したストレス要因に対するストレス防御を指標する遺伝子としての適正が低い可能性を示した。
3. *ACS2* は、老化が始まる季節に限定的な発現実態が示され、また多くの時期、ストレスにより発現量が増加したため、衰退と老化の指標性遺伝子として適当である可能性を示した。

また、遺伝子の発現量とストレス応答特性は季節により異なったため、指標性の確立のためには季節を考慮した発現特性の解明が必要であることがわかった。

(4) 土壤乾燥ストレスに対する遺伝子発現

① 水ストレスと光合成

A_{sat} は弱乾燥区 ($pF = 2.6$, $\Psi_l = -2.0$ MPa) で対照区の71%に、葉が萎れる直前の強乾燥区 ($pF = 2.9$, $\Psi_l = -2.1$ MPa) で14%に低下した。弱乾燥では g_s が47%に低下し、 V_{max} の低下はわずかで、 F_v'/F_m' と F_v/F_m には影響がなかった。強乾燥では、 g_s が12%に、 V_{max} が41%に低下し、 F_v'/F_m' と F_v/F_m には影響がなかった。よって、土壤乾燥によるみかけの光飽和光合成速度の低下は、弱乾燥では主に気孔閉鎖により、強乾燥では気孔閉鎖に加えて RuBisCO の機能低下によることがわかった。土壤を適潤に戻した後、各乾燥区の A_{sat} ならびに g_s と V_{max} は対照区と同程度まで回復した。したがって、今回の土壤乾燥条件はブナの光合成機能に不可逆的な障害を生じさせなかった。

② 遺伝子発現

rbcS 遺伝子と *cab* 遺伝子の発現量は土壤乾燥の影響を受けず、その後の適潤な土壤条件

でも変動は認められなかった。したがって、RuBisCO の炭酸同化速度でみられた土壤乾燥による低下は、RuBisCO の量的な変動ではなく活性の低下によるものと考えられた。*cab* 遺伝子の mRNA 量が土壤乾燥の影響を受けず、 F_v'/F_m' と F_v/F_m も変化が認められなかったことから、集光性クロロフィル *a/b* 結合タンパク質量は土壤乾燥の影響を受けず、光化学系 II の機能は土壤乾燥に対して影響を受けにくいことが示唆された。BADH と CHAP は土壤乾燥が進む初期過程でのみ発現することがわかり、その後の回復過程では明瞭な発現量の増加は認められなかった。したがって、これらの遺伝子は、水不足に対する順化のための浸透圧調節とタンパク質変性の回避のために緊急応答的に発現していると考えられた。

(5) まとめ

以上の(1)から(4)の結果をまとめると、遺伝子発現解析は野外に生育するブナの有望なストレス診断技術になる可能性が示された。

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3件)

- ① 齋藤秀之, 伊森允一, 青山千穂, 渡辺誠, シンポジウム「エアロゾル・オゾン等による植物影響—増加する越境大気汚染から森林を守る—」に参加して, 北方林業 (受理, 2010年7月掲載予定)
- ② Saito H. Stress diagnosis of beech tree by genomic ecophysiology - A perspective. Proceedings of the 8th IUFRO International Beech Symposium "Ecology and Silviculture of Beech" held in 8-13 September 2008, Nanae, Hokkaido, Japan (Eds. Terazawa K. Madsen P. and Sagheb-Talebi K.), 2009, 178-180.
- ③ 齋藤秀之, ブナの葉で発現する遺伝子の完全長cDNAクローンの網羅的収集, 北海道の林木育種51 (2), 2009, 1-4

[学会発表] (計6件)

- ① 齋藤秀之・大宮泰徳・高田直樹, ブナ花成の光周性に関わる転写因子 *CONSTANS* 様遺伝子群の単離と発現特性〜どうして毎年花を咲かさないか?〜, 日本森林学会, 2010年4月4日, つくば市, 筑波大学
- ② 高田克彦・齋藤秀之・渡辺敦史・高橋 誠, ポストゲノム時代における新たな森林研究の展開 (テーマ別シンポジウム), 日本森林学会, 2010年4月4日, つくば市,

筑波大学

- ③ 大宮泰徳・松田修一・高田直樹・上村松生・斎藤秀之・赤田辰治, ブナ花成関連遺伝子の単離と解析, 日本植物生理学会, 2010年3月20日, 熊本市, 熊本大学
- ④ Saito H. Stress diagnosis of beech tree by genomic ecophysiology - A perspective. 8th IUFRO International Beech Symposium “ Ecology and Silviculture of Beech” 8-13 September 2008, Onuma International Seminar House, Nanae, Hokkaido.
- ⑤ 斎藤秀之・楠城時彦, 樹木の機能遺伝子研究の現状と今後の利用にむけて (テーマ別シンポジウム), 日本森林学会, 2009年3月26日, 京都大学 (京都)
- ⑥ 斎藤秀之, ブナの葉の遺伝子発現パターンを指標にした生理生態評価ー林木の生理生態評価における既存手法の限界、ゲノム情報への期待ー, 日本森林学会, 2009年3月26日, 京都大学 (京都)

6. 研究組織

(1) 研究代表者

斎藤秀之 (SAITO HIDEYUKI)

北海道大学・大学院農学研究院・助教

研究者番号：70312395