

## 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 10 日現在

機関番号：10101

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2010～2011

課題番号：22780135

研究課題名（和文）光合成のストレス後遺症の原因を指標する発現遺伝子のゲノム網羅的探索

研究課題名（英文）Comprehensive screening of gene expression pattern as indicator of stress diagnosis in leaf photosynthesis

研究代表者

齋藤 秀之（SAITO HIDEYUKI）

北海道大学・大学院農学研究院・講師

研究者番号：70312395

研究成果の概要（和文）：ブナ葉の発現遺伝子について次世代シーケンサーで 355,845,739 塩基を解読した。ブナ葉の遺伝子発現をゲノム網羅的に解析できる DNA マイクロアレイを開発した（機能推定済みが 12,446 個と未推定が 31,357 個）。ブナ成木の葉で高温、乾燥、酸化（過酸化水素）に特異的に発現する遺伝子を明らかにした。土壌乾燥の強度ならびにその前歴と光合成低下の関係性を明らかにし、これらの土壌乾燥ストレスに特異的な発現遺伝子を明らかにした。以上、発現遺伝子はブナ葉のストレス診断において有望な指標になると考えられた。

研究成果の概要（英文）：We generated 355,845,739 sequence from a full-length enriched cDNA library of beech (*Fagus crenata*) leaves by using 454 next generation sequencer. The DNA microarray for analysis of gene expression of beech leaves was developed, 12,446 annotated genes and 31,357 non-annotated genes. The high temperature-, drought- and acidification ( $H_2O_2$ )- specific gene expression patterns were found. The soil-drought intensity- and its history-dependent gene expression pattern related to photosynthetic reduction were found. These results suggested that transcriptome analysis will become promising method that provides useful indicators for diagnosis of health and stress of beech leaves.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
22 年度	1,900,000	570,000	2,470,000
23 年度	1,200,000	360,000	1,560,000
年度			
年度			
年度			
総計	3,100,000	930,000	4,030,000

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：遺伝子発現、機能ゲノム学、ゲノム生物学的情報、ストレス診断、DNA マイクロアレイ、ブナ

## 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、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、現場での診断技術が未熟なため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現状があった。

林木のストレス診断指標としてゲノム生物学的情報に着目した。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、近年におけるゲノム解析技術の革新は、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、申請者が目指す樹木のストレス診断技術が確立できるものと考えているに至った。

## 2. 研究の目的

### (1) ブナ DNA マイクロアレイの開発

ブナ葉の遺伝子発現をゲノム網羅的に解析できる DNA マイクロアレイの開発する。

### (2) 環境ストレス要因に特異的な発現遺伝子の探索

ブナ林の衰退原因として危惧される環境ストレス要因として高温、乾燥、酸化性ストレスに注目して、ブナ葉で各環境ストレスに特異的な発現パターンを示す発現遺伝子を探索する。

### (3) 土壌乾燥ストレス前歴の診断指標性がある発現遺伝子の探索

土壌乾燥によって低下する光合成速度の律速要因を気孔コンダクタンス、光化学系 II の量子収率、RuBisCO の最大炭酸同化速度に着目して明らかにしたうえで、乾燥回避後の光合成機能の後遺症について明らかにした。さらに、遺伝子の発現パターンをゲノム網羅的にプロファイリングして、土壌乾燥ストレスとその前歴の診断指標となる発現遺伝子を探索する。

以上から、遺伝子発現パターンがブナ葉のストレス診断の有効な指標になることを明

らかにする。

## 3. 研究の方法

### (1) ブナ DNA マイクロアレイの開発

ブナ DNA マイクロアレイの開発手順の概要は、① cDNA の調製、② DNA の塩基配列の解読、③ 遺伝子の塩基配列情報の拡充と機能注釈データベースの精緻化、④ DNA マイクロアレイのプロブ設計、⑤ DNA マイクロアレイの有効性の検証、以上の流れであった。cDNA ライブラリーは既存のもので、様々な発達段階の個葉と様々な環境ストレスを与えた個葉から全 RNA を抽出して mRNA を調製し、さらに均一化と完全長化を行った cDNA ライブラリーを用いた。

塩基配列の解読は、Sanger 法によって既に解読された塩基配列データとパイロシーケンス式の Roche 社製による 454 法で新たに解析する 2 種類のデータを用いた。得られた塩基配列情報は、シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) の cDNA 塩基配列情報に基づいてマッピングを行い、ブナの遺伝子の塩基配列と機能を推定した。さらに、シロイヌナズナにマッピングされなかった断片配列は、シロイヌナズナよりも進化的にブナに近縁でゲノム解析が行われているミヤコグサ (*Lotus japonicus*) の cDNA 塩基配列情報に基づいてマッピングを行った。この 2 つの解析でマッピングされずに残されたブナの断片配列はアッセンブルを行い、機能未推定の断片配列とした。

DNA マイクロアレイは Agilent 社のシステム用に設計した。Agilent 社の特徴は、プローブが 60 塩基の遺伝子断片配列で設計されている点である。プローブの設計には、ブナの遺伝子の塩基配列に基づき、重複せずに遺伝子特異的な 60 塩基の配列を 3' 端側を優先して探索した。

### (2) 環境ストレス要因に特異的な発現遺伝子の探索

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 7 月中旬に陽樹冠から採取し、現地地で乾燥、高温 (34°C)、H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (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 CTAB 法で行った。ゲノム網羅的な遺伝子群を対象とした mRNA の定量は上記のブナ DNA マイクロアレイを用いた。DNA マイクロアレイの測定にはアジレント社製のシステムを用いた。発現量の増減の閾値は 5 倍と 0.2 倍として解析を行った。

### (3) 土壌乾燥ストレス前歴の診断指標性がある発現遺伝子の探索

研究材料はポット植えの 5 年生ブナ苗木であった。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:  $200 \mu \text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) 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)。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:  $200 \mu \text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) 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 ( $\Psi$ ) 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 ( $A_{\text{sat}}$ ) を調べ、さらに  $A_{\text{sat}}$  の律速要因として気孔コンダクタンス ( $g_s$ )、RuBisCO の最大炭酸固定速度 ( $V_{\text{cmax}}$ )、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)。mRNA の定量は、量的リアルタイム PCR 法と DNA マイクロアレイ法を用いた (n = 4)。光合成速度の測定結果から平均的な挙動を示した 4 個体を対象木に絞り込み、遺伝子発現の解析を行った。遺伝子発現解析は DNA マイクロアレイ法を用い、機能推定した約 12,446 個の遺伝子を含む合計 43,803 個の遺伝子の mRNA 量を調べた

#### 4. 研究成果

##### (1) ブナ DNA マイクロアレイの開発

Sagner 法と 454 法で解読された塩基配列は、Vector 配列および品質不良配列を削除した後において、それぞれ 2,526,181 塩基と 355,845,739 塩基であった。これらの結果を合わせてシロイヌナズナおよびミヤコグサの既知の遺伝子の配列情報にマッピングを行ったところ、最終的に 30,653 遺伝子(断片)の塩基配列を決定できた。この内訳として、全長の塩基配列を決定できた遺伝子数は 740 個、全長の 80% の塩基配列を決定できた遺伝子数は 5,550 個であった。また、46,465 本の機能未推定の断片配列が得られた。

DNA マイクロアレイのプロープとして設計された数は 43,803 遺伝子で、内訳として機能推定済みが 12,446 個と未推定が 31,357 個であった。この機能推定済みの遺伝子数は、シロイヌナズナを対照とした場合に、葉で発現する遺伝子の約 9 割をカバーしていると考えられた。なお、このカバー率については、ブナでは全ゲノム配列の解読が行われていないため、正確には評価できていない。

このブナ DNA マイクロアレイを用いて、これまでに 80 検体の実験を行ってきたが、この 80 回の実験を通じて一度もシグナルを検出しなかったプロープは極めて少なかった。例えば、バックグラウンドのシグナル値に対

して 1.1 倍を検出の閾値とした場合に、80 検体を通じてシグナルを検出しなかったプロープの数はわずか 4 プロープであった。この結果から、設計したプロープの配列はブナの発現遺伝子を検出する意味においてほぼ全てにおいて機能していると判断できた。

##### (2) 環境ストレス要因に特異的な発現遺伝子の探索

各ストレスで mRNA 量に変動した遺伝子の数は図 1 と図 2 の通りで、各ストレスに対して特異的に発現量に変動した遺伝子を確認できた。高温ストレスで発現が誘導された遺伝子群には、分子シャペロンである熱ショックタンパク質 (HSP) をコードする遺伝子群や HSP の転写因子 (HSF) などが認められた。HSP ファミリーは様々な環境ストレスで発現誘導されることが知られているが、ここでは高温に対して特異的に発現量を増加させる遺伝子が特定できた。乾燥ストレスで発現が誘導された遺伝子群では、植物ホルモンである ABA 合成と ABA に関連したシグナル伝達に関わる遺伝子群や細胞内の浸透圧調節に関連するタンパク質をコードする遺伝子が特徴的に認められた。酸化ストレスで特異的に発現が誘導された遺伝子群には、抗酸化防御系に関わる遺伝子が多く認められたが、その一方で、予想を反して発現量に影響が認められなかった遺伝子として、活性酸素の消去系の酵素群をコードする遺伝子群の多くがあった。この理由は、対照でも発現量が比較的高いレベルにあったので、野外環境条件に対して比較的恒常的に発現しているためにストレス特異的な発現誘導が示されなかったと考えられた。

以上の通り、各ストレスに対する応答として特徴的な機能をもつ遺伝子群ファミリーが明らかとなり、その中で各環境ストレスに特異的な発現誘導を示す遺伝子を明らかにすることができた。その中には、植物生理学の知見と一致する傾向を示す発現パターンの遺伝子が多かったが、他方で、従来の一般的な知見に反する野外サンプル特有と考えられる発現パターンも確認できた。さらに、複数の環境ストレス要因に共通で発現量を変動させる遺伝子が比較的少なかった。このことは、遺伝子間のネットワークが環境ストレスに対して独立に作用していることを示唆しており、発現遺伝子の診断手法の利用を進めて行くにあたり好都合な特徴と言えた。今後の課題として、環境ストレスの強度依存性や持続性について検討すると共に、多種多様な環境ストレス要因に対する発現遺伝子の応答性に関する研究を進めて行く必要がある。

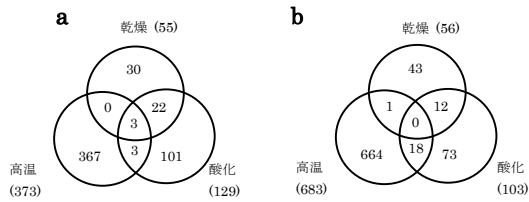


図1. mRNA量が増加 (a)・減少 (b) した遺伝子数  
処理時間は2時間、mRNA量が対照と比較し5倍以上増えることを増加、0.2倍以下に減ることを減少とした。

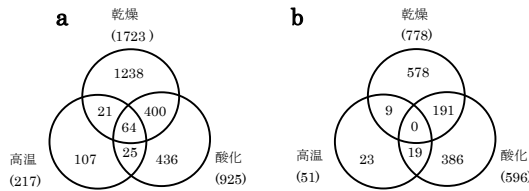


図2. mRNA量が増加 (a)・減少 (b) した遺伝子数  
処理時間は10時間、mRNA量が対照と比較し5倍以上増えることを増加、0.2倍以下に減ることを減少とした。

(3) 土壤乾燥ストレス前歴の診断指標性がある発現遺伝子の探索

光飽和光合成速度 ( $A_{sat}$ ) 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、 $V_{cmax}$  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、 $V_{cmax}$  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  $V_{cmax}$  は対照区と同程度まで回復した。したがって、土壤水分は葉を萎れさせる直前の乾燥強度でもブナの葉の光合成機能に不可逆的な障害を生じさせなかった。*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、土壤乾燥による最大炭酸同化速度の低下は、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。

DNA マイクロアレイ法による測定からは土壤乾燥強度やその前歴に依存した発現パターンがクラスタリングされた。土壤乾燥の時、発現量を2倍以上に増加させた遺伝子の数は弱乾燥 ( $pF = 2.6$ ,  $\Psi_L = -2.0$  MPa) で615個と強乾燥 ( $pF = 2.9$ ,  $\Psi_L = -2.1$  MPa) で1,713

個あった。とくに弱乾燥と強乾燥に特異的な発現量の増加を示した遺伝子の数はそれぞれ320個と1,408個であった。弱乾燥と強乾燥から再灌水10日後において発現量が2倍以上に増加した遺伝子の数は、それぞれ801個と558個であった。とくに弱乾燥と強乾燥の前歴に特異的な発現の増加を示した遺伝子の数はそれぞれ515個と272個であった。以上から、土壤乾燥強度に依存した発現を示す遺伝子と土壤乾燥強度の前歴に依存した発現を示す遺伝子の存在を明らかにできた。発現遺伝子はブナの水ストレスの大きさとその前歴を指標することができると思えることができた。

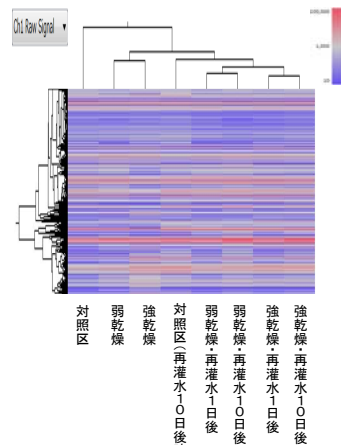


図3. 発現遺伝子のクラスター分析  
(縦: 遺伝子の種類; 横: 環境要因)

(4) まとめ

本研究より発現遺伝子は林木のストレス診断において有望な指標になることが示唆された。本研究でブナ DNA マイクロアレイの開発に成功したことは、ブナにおいてストレス診断指標となる発現遺伝子の探索や診断基準の策定に関する研究の効率を飛躍的に向上させる意義があった。今後、野外におけるブナ葉の発現遺伝子のプロファイリングを蓄積することで、発現遺伝子によるストレス診断を実用性のある技術へと開発できるものと期待できた。

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2件)

- ① 斎藤秀之、ブナ林のたどっている道一分布域北限の動向一、北方林業、査読有、64巻(2)、2012、38-41
- ② 斎藤秀之、瀬々潤、清水(稻継)理恵、神村章子、山田幸靖、清水健太郎、ブナのDNAマイクロアレイの開発、北海道の林木育種、査読無、54巻(2)、2011、11-14

〔学会発表〕（計8件）

- ① 齋藤秀之、石堂光、神村章子、瀬々潤、清水（稲継）理恵、清水健太郎、土壌水分変動がブナ苗木の葉の遺伝子発現に与える影響のゲノム網羅的解析、第123回日本森林学会、2012年3月28日、宇都宮大学（宇都宮市）
- ② 小倉俊治、齋藤秀之、門松昌彦、渋谷正人、小池孝良、ブナにおける花芽形成の日長誘導経路に関わる遺伝子群の発現特性、第123回日本森林学会、2012年3月28日、宇都宮大学（宇都宮市）
- ③ 齋藤秀之、ブナ林の遺伝子診断による環境ストレス評価、富士山の自然環境保全に関するワークショップ2012、2012年3月26日、静岡県環境衛生科学研究所（静岡市）
- ④ 齋藤秀之、ブナの遺伝子発現情報を用いたストレス診断技術の開発に向けてーコンセプトと診断指標性のある遺伝子の探索ーワークショップ「ブナ林生態系における生物・環境モニタリングシステムの構築」（招待講演）、2012年3月11日、国立環境研究所（つくば市）
- ⑤ 齋藤秀之、ブナ林の衰退現象と樹木のストレス評価についてー遺伝子発現情報を用いたストレス診断技術の開発ー、神奈川県研究人材活性化のための講演会（招待講演）、2012年2月21日、神奈川県自然環境保全センター（厚木市）
- ⑥ 齋藤秀之、山田宰靖、神村章子、瀬々潤、福崎睦美、清水（稲継）理恵、清水健太郎、ブナのDNAマイクロアレイの開発ー遺伝子発現情報によるストレス診断技術にむけてー、第60回北方森林学会、2011年11月15日、札幌市コンベンションセンター（札幌市）
- ⑦ 齋藤秀之、山田宰靖、瀬々潤、福崎睦美、清水（稲継）理恵、清水健太郎、ブナ葉の高温・乾燥・酸化ストレスに応答する発現遺伝子の網羅的探索、第122回日本森林学会、2011年3月25-28日、静岡大学（静岡市）
- ⑧ 山口高志、龍田慎平、渡辺誠、渡邊忠、久保島康行、齋藤秀之、野口泉、小池孝良、摩周湖における対流圏オゾン濃度とその植物影響について、第51回大気環境学、2010年9月8-10日、大阪大学（豊中市）

〔図書〕（計0件）

〔産業財産権〕

○出願状況（計0件）

○取得状況（計0件）

〔その他〕

なし

6. 研究組織

(1) 研究代表者

齋藤 秀之 (SAITO HIDEYUKI)

北海道大学・大学院農学研究院・講師

研究者番号：70312395