

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）研究成果報告書

平成25年 6月 7日現在

機関番号：82105

研究種目：若手研究（B）

研究期間：2011～2012

課題番号：23780173

研究課題名（和文）スギの花形成に関与するジベレリン生合成関連遺伝子の同定

研究課題名（英文）Isolation of *Cryptomeria japonica* genes related to the gibberellin biosynthesis

研究代表者

坪村 美代子 (TSUBOMURA MIYOKO)

独立行政法人森林総合研究所・林木育種センター・研究員

研究者番号：70415040

研究成果の概要（和文）：

スギの成木および3年生さし木苗に着花促進処理を行い、雄花着花に至るまで経時的にサンプルを採取し、マイクロアレイ解析により雄花が着花するまでの遺伝子の発現プロファイルを作成した。また、サンプルから単離したRNAより、シロイヌナズナ等のモデル植物においてジベレリン生合成に関与するとされている遺伝子と相同性の高い配列の単離を行い、その経時的な発現の変化をリアルタイムPCRにより明らかにした。

研究成果の概要（英文）：

A mature tree and 3-year old cuttings of *Cryptomeria japonica* were treated by gibberellin for flowering promotion and the gene expression profiling during male flower setting was investigated using microarray analysis. The genes similar to *Arabidopsis* genes related to gibberellin biosynthesis was isolated and its expression was investigated by real time PCR.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
交付決定額	3,500,000	1,050,000	4,550,000

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：スギ雄花、ジベレリン

1. 研究開始当初の背景

ジベレリン（GA）は植物ホルモンの一種であり、細胞分裂や細胞伸長、種子の発芽や花形成に関与することが報告されている。

日本の代表的な造林樹種であるスギは、針葉樹でも特異であり1年生個体でもジベレリン（GA₃）処理により着花が可能である。これまで、林木育種や花粉症対策品種開発等の観点からスギの着花特性は多く調べられており、花形成過程中的各ジベレリン含量の推移等も研究されている。しかし、ジベレリンを処理することにより、どのような遺伝子が働

いて花成へと至るのか、そのメカニズムは未だ解明されていない。

近年、スギの EST（Expressed sequenced tags）情報が整備されつつあり、公開データベースによりその情報が利用可能となってきた。モデル植物及び既報の他の植物種においてジベレリン生合成経路は保存性が高いことから、スギにおいてもその機構は保存されている可能性が高い。これらの情報を活用することにより、スギのジベレリン生合成関連遺伝子の単離、同定を行えると考えられる。スギの着花メカニズムの一端が解明され

ば、針葉樹において初めてジベレリン生合成経路から花形成過程をとらえることとなり、難着花性樹種の多い針葉樹の着花制御へ向けた基礎データとなると考えられた。

2. 研究の目的

(1) スギにジベレリンを処理する事により発現が変化する遺伝子群を明らかにし、雄花着花に関連する遺伝子の絞り込みを行う。

(2) シロイヌナズナやポプラ等のモデル植物で明らかとなっているジベレリン生合成に関与している遺伝子と相同性の高い配列をスギにおいて単離し、着花に至るまでの間の発現の変化を明らかにする。

3. 研究の方法

(1) 遺伝子発現解析

2011年は関東育種基本区内のスギ精英樹の雄花着花量を指数により評価し、その着花量が多いクローン (F1、指数4.57) の16年生個体を用いた。2012年は着花量が中程度のクローン同士 (M1、指数3.19とS23、指数2.83) の交配家系 (Y6) の3年生さし木苗を用いた。

7月上旬にジベレリン水溶液 (100ppm) を散布し、1日後から着花が認められる8月下旬まで、処理区、無処理区それぞれ複数回シュートの先端部2cm程度を採取し、サンプルは実験を行うまで -80°C で保存した。2011年は日長の影響を避けるために毎回午後7時半~8時にサンプリングを行った。2012年は毎回午前8時にサンプルを採取した。

採取したサンプルよりRNAを抽出し、マイクロアレイ解析に供した。スギESTデータベースForestGENの雄花ライブラリー由来の18130ESTと、林木育種センターにおいて取得されたSSH (Suppression Subtractive Hybridization) ライブラリー由来の1129ESTを基にマイクロアレイチップを作成した。また、林木育種センターにおいて取得されたスギ針葉ESTデータ (未公表) より作成された約15000EST情報を載せたマイクロアレイチップも解析に使用した。

(2) 遺伝子単離

ポプラの遺伝子情報をもとに、活性型ジベレリン合成に関わるCPS (ent-copalyl diphosphate synthase)、KS (ent-kaurene synthase)、 $\text{GA}_{20\text{ox}}$ (gibberellin 20-oxidase)、 $\text{GA}_{3\text{ox}}$ (gibberellin 3-oxidase) の各遺伝子について、ディジェネレイトプライマーを作成した。スギの実生よりRNAを抽出、cDNA作成後、これらのプライマーを用いてPCRを行った。

(3) リアルタイムPCR

CPS、KS、 $\text{GA}_{3\text{ox}}$ 遺伝子について、ジベレリン処理後から雄花着花までのサンプルを用いてリアルタイムPCRを行った。

4. 研究成果

(1) 遺伝子発現解析

2011年にF1クローンを用いて行ったマイクロアレイ解析では、無処理とGA処理区間では、多くのESTの発現量が上がる時期に差が見られた。無処理では7月25日 (GA処理後21日目) に極大となり、その後下がる傾向を示したが、GA処理区では8月12日 (GA処理後39日後) に極大となっていた。これらのESTは約800あり、各処理区で発現しているESTはほぼ同一のものであった。これらは特定の機能に関わる遺伝子ではなく、様々な機能に関わるものであったことから、これらのESTはシュートの発達に応じて発現量が変化する遺伝子群であると考えられ、GA処理によりシュートの発達過程がずれたと考えられた。各時期において各処理区間で2倍以上発現量が異なるESTを解析した (表1)。7月5日に発現量が增大していたESTは防御反応に関するものが多く、これはGAがストレス刺激となっていることを示唆していた。一方着花が確認された8月25日はMADS-box遺伝子を含む転写因子の発現量が增大していた。

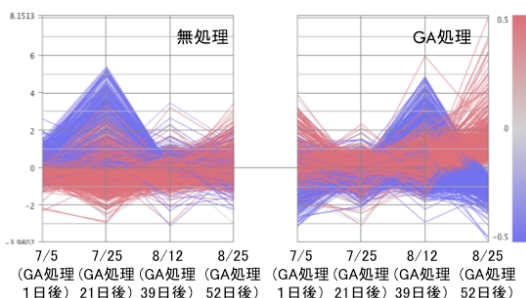


図1. F1クローンの遺伝子発現パターン

表1. F1クローンにおいて各時期において2倍以上発現量が異なっていたEST数

F1	7月5日	7月25日	8月12日	8月25日
2倍以上増大	176	130	84	640
2倍以上減少	377	618	9	464

2012年には再度、昼間の反応を解析するため、Y6クローンを用いてマイクロアレイ解析を行った (図2)。雄花アレイチップでは2011年の結果とは異なり、大きく発現量が增大する時期は認められなかった。これは、サンプリングを行った時期がその変化を捉えられない時期ではなかったと考えられた。全処理区間で発現量が增大したESTの方が減少したもののよりも多かった (表2)。全時期において、GA処理区では二次代謝に関する遺伝子の発

現が増大していた。GA 処理 1 日後の 7 月 11 日にはストレス応答性の遺伝子の発現量が增大しており、着花が認められた 8 月 20 日には MADS-box 遺伝子の発現が増大しており、2011 年と同様の結果となった。ジベレリンを始めとするテルペノイド合成系に関わる遺伝子と相同性の高い EST はチップ上に 42 個あったが、そのうちの 하나가処理区間で大きく発現量が異なっていた。また、ジベレリン生合成にも関わっている 2OG (2-oxoglutarate and Fe(II)-dependent oxygenase) 遺伝子ファミリーと相同性の高い EST は 88 個中 11 個が 7 月 11 日に大きく発現量が增大していた。これらの遺伝子は GA 処理に応答したものと考えられたが、モデル植物のジベレリン生合成遺伝子との相同性は低かった。2011 年、2012 年共にシロイヌナズナにおいてジベレリン応答に関与する遺伝子と相同性の高い EST の発現には変化が見られなかった。

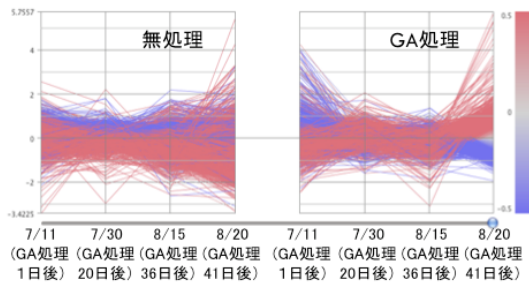


図 2. Y6 クローンの遺伝子発現パターン

表 2. Y6 クローンにおいて 2 倍以上発現量が異なっていた EST 数

アレイ		7月11日	7月30日	8月15日	8月20日
雄花	2倍以上増大	140	42	87	820
	2倍以上減少	10	26	19	205
針葉	2倍以上増大	49	20	65	570
	2倍以上減少	7	10	17	82

針葉アレイチップにおいても全体的な傾向は雄花チップと同様であったが、各時期において各処理区間で 2 倍以上発現量が異なる EST は一部異なっていた。7 月 11 日と 30 日では GA 応答に関連する SLY1 (Sleepy1) 遺伝子と相同性の高い EST の発現が減少していたが、雄花アレイでは発現量に変化は見られなかった。これは、各アレイの EST が異なる配列を有していることに起因すると考えられた。

雄花アレイにおいて各時期、処理区間で発現量が 2 倍以上異なる EST は合計 1195 個、葉アレイにおいては合計 727 個あった。これらの EST は雄花形成あるいは GA 応答に関連する遺伝子群である可能性が高く、スギ雄花着花の遺伝子発現プロファイルを作成することができた。

(2) 遺伝子単離

KS 遺伝子、CPS 遺伝子、GA_{20ox} 遺伝子については、ディジェネレイトプライマーによる PCR では増幅が見られなかった。GA3ox 遺伝子については増幅が見られたので、3'RACE、5'RACE 法により全長を単離した。単離した GA3ox とアミノ酸配列ベースで相同性の高い配列 (以下 CjGA_{3ox}) は全長約 1800bp で、ForestGEN データベース、マイクロアレイチップ上にも存在せず、新規の配列であることがわかった。系統関係は図 3 のようになり、CjGA_{3ox} は他の植物種と非常に相同性の高い配列であることが示された。

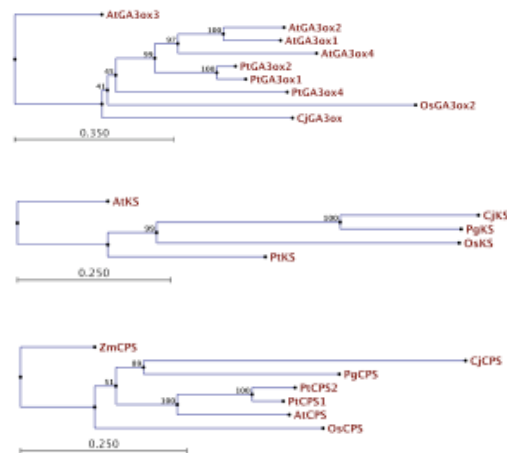


図 3. GA3ox、CPS、KS 遺伝子の系統関係

At: *A. thaliana*、Pg: *P. glauca*、Pt: *P. tricarpha*、Os: *O. sativa*、Zm: *Z. mays*

CPS、KS についてはモデル植物およびトウヒの遺伝子について林木育種センター内スギ雄花 EST データ (未公表) において blast 検索を行ったところ、それぞれ相同性の高い配列が認められた。スギ雄花 EST データから単離した CPS、KS と相同性の高い配列 (以下 CjCPS、CjKS) のアミノ酸配列は、それぞれ他の植物種においても保存されている DXDD モチーフと DDXXD モチーフを持ち、他の植物種と非常に高い相同性を示した。系統樹は図 3 のようになり、同じ針葉樹であるトウヒ (*P. glauca*) と相同性が高かった。CjCPS は ForestGEN データベース、マイクロアレイチップ上に存在しなかったが、CjKS と相同な配列は 4 EST 存在した。それらの発現量は全時期を通して処理区間で差が見られなかった。

(3) リアルタイム PCR

単離した遺伝子それぞれについてリアルタイム PCR を、Y6 について行った (図 4)。CjGA_{3ox} は 7 月 13~30 日では GA 処理区の発現量が若干少なく、着花が認められた 8 月 20

日には GA 処理区の発現量が上がっていた。CjCPS は 7 月 30 日、8 月 20 日では若干 GA 処理区の発現量が多かったが、全体的にはほぼ同程度の発現を示した。CjKS はマイクロアレイでは変化が見られなかったが、リアルタイム PCR では 8 月 20 日に GA 処理区において若干発現量が下がっていた。GA_{3ox} はシロイヌナズナでは GA 処理により発現が抑制されることが知られているが、本研究ではそのような傾向は認められなかった。本研究では GA 処理 1 日後からサンプリングを開始しており、初期の GA 応答反応を捉えられなかった可能性が考えられた。今後は初期の GA 応答反応について研究を進める必要があると考えられた。

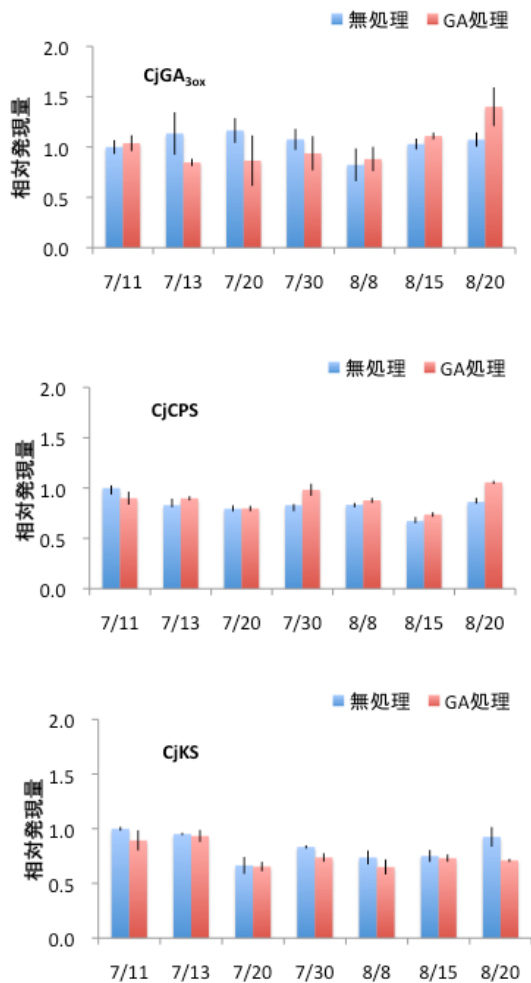


図 4. 各遺伝子のリアルタイム PCR 結果

本研究において、スギの雄花着花に関連する遺伝子の絞り込みを行うことができた。また、ジベレリン合成に関わる遺伝子をスギにおいて初めて単離することに成功した。今後はジベレリン応答に関する詳細な遺伝子発現解析および今回単離できなかった遺伝子の単離を進め、スギのジベレリンによる着花メカニズム解明を進めていく予定である。

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 1 件)
① 坪村美代子、武津英太郎、渡辺敦史、関東育種基本におけるスギ精英樹クローン雄花着花量の評価、日本森林学会誌 (2013) 印刷中 (掲載確定)、査読あり

[学会発表] (計 1 件)
① 坪村美代子、渡辺敦史、ジベレリン処理によるスギ花関連遺伝子発現動態、日本森林学会第 123 回大会、宇都宮大学、2012. 3. 27

6. 研究組織
(1) 研究代表者
坪村美代子 (TSUBOMURA MIYOKO)
森林総合研究所・林木育種センター・研究員
研究者番号：70415040

(2) 研究協力者
渡辺敦史 (WATANABE ATSUSHI)
九州大学大学院・農学研究院・准教授
研究者番号：10360471