

**科学研究費助成事業 研究成果報告書**

平成 27 年 6 月 19 日現在

機関番号：82105

研究種目：基盤研究(B)

研究期間：2012～2014

課題番号：24380098

研究課題名(和文)スギ木部形成関連遺伝子データベースの構築に向けたEST単離と網羅的発現解析

研究課題名(英文) Transcriptome sequencing in cambial zone and differentiating xylem of Japanese cedar (*Cryptomeria japonica*) and seasonal profiling of the expressed genes throughout a growing season

研究代表者

藤原 健 (FUJIWARA, Takeshi)

独立行政法人森林総合研究所・木材特性研究領域・室長

研究者番号：00353839

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 13,600,000円

研究成果の概要(和文)：スギ精英樹クローンをを用いて成長期及び休眠期を通して定期的に試料を採取し、形成層帯及び分化帯で発現する遺伝子の末端塩基配列(EST)を55,051配列収集した。さらに、得られた配列のうち高発現していると考えられる14,616 isotigに、ForestGenの材関連データベースの既存配列を加えた18,082 probeのマイクロアレイを設計し、成長期を通じた遺伝子発現を網羅的に解析した。その結果、18,082遺伝子中10,380遺伝子が材形成期間に有意な発現挙動を見せ、木部形成が活発な時期に発現が上昇する4,019遺伝子とそれ以降から成長停止期に発現が上昇する6,361遺伝子とに区分された。

研究成果の概要(英文)：Japanese cedar is one of the most valuable species for wood industries and it has been target species of tree breeding program because of its wide diversity in wood properties. Thus, molecular aspects of wood formation offer practical information that can be used for screening and forward genetic approaches to improve wood quality.

Total RNA was isolated from samples including cambium and differentiating xylem collected from trunks of plus trees and 55,051 unique sequences were obtained. After identifying expressed sequence tags, we designed a custom cDNA microarray with 18,082 probes to compare expression of highly regulated genes throughout a growing season. Among various types of the gene expression profiles provided by the microarray, groups of genes regulated in growing season were detected, which were assigned to the functional classes such as "Carbohydrate transport and metabolism" and "Cell wall/membrane/envelope biogenesis" which are supposed to relate with wood formation.

研究分野：木材組織学

キーワード：スギ EST マイクロアレイ 木部形成

1. 研究開始当初の背景

テダマツをはじめとする針葉樹では、大規模ゲノムプロジェクトを進めることで効率的な育種を目指すと共に、針葉樹の本質的理解に向けた試みが行われ始めた。特に、木部は木本性植物を特徴づける重要な部位であるだけでなく、用材としての利用を考慮した材質育種の対象としても重要視されている。アメリカではテダマツについてすでに30万以上のESTが集積され<sup>1)</sup>、数多くの材質形質が連鎖地図上に位置づけられている。さらに、カナダではトウヒ属<sup>2)</sup>を、EUではフランスカイガンショウ<sup>3)</sup>を対象に同様の動きが認められる。日本では、日本固有種であり、重要な林業用樹種であるスギを対象に、森林総合研究所を中心にゲノムプロジェクトが実施されているが、スギ花粉症対策が重要視されている結果、雄花を中心とした遺伝子集積が行われてきており、木部を対象とした遺伝子レベルでの本格的な取り組みは実施されていなかった。

2. 研究の目的

スギの材質発現に関連する遺伝子を特定し、木部形成メカニズムを解明するためには、木部形成時に発現する遺伝子を収集する必要がある。本研究では、スギ精英樹クローンを用いて成長期及び休眠期を通して定期的に試料を採取し、形成層帯及び分化帯で発現する遺伝子の発現塩基配列 (EST) を集積することを目的とする。また、マイクロアレイにより時期別に遺伝子発現プロファイルを取得し、形成中木部の観察により得た細胞分化段階と対比することにより、木部形成段階と遺伝子発現の関連を検討する。

3. 研究の方法

(1) 材形成関連の EST 情報の取得のために1年を通じた経時的なサンプリングを行った。日立市にある林木育種センター構内に植栽されているスギ精英樹クローンを対象として、3/9, 4/9, 5/10, 6/1, 6/24, 7/16, 8/16, 9/19, 9/29, 10/29の合計10回、定時に形成層を含む短冊状の木片を採取毎に個体を変えて採取した。なお、この時に同時に組織観察用のサンプル片も採取した。採取した木片を形成層帯付近で割り、割った内側の両面を削ぎ落とした細胞/組織をRNA抽出に用いた。RNA抽出後のサンプル片を顕微鏡観察し、用いた組織が師部と形成中木部及び形成層帯であることを確認した。抽出したRNAサンプルをバルクにしてRoche454において、標準化せず塩基配列を取得し、*de novo* アセンブルを行った。アセンブルにより得られた配列と、NCBI (National Center for Biotechnology Information) non-redundant protein database, TAIR (The Arabidopsis Information Resource), ForestGen (Forest EST and Genome database)の材関連データベース (inner bark and sapwood library)

The Gene Index の *Pinus*, *Populus* and *Picea* における Xylem および Cambium に関するライブラリーの塩基配列との類似性をBLASTにより解析した。

(2) アセンブルによって得られた配列のうち高発現していると考えられる 14,616 isotigs に加え、ForestGen の材関連データベース (inner bark and sapwood library) の配列を加えて、18,082 probe を設計し3-4反復の72K マイクロアレイスライドガラスを設計した。

また、成層帯の活動期における形成層帯及び形成中木部における細胞の変化を一通り捉えられるように3/24, 4/27, 6/22, 8/27, 10/7の5時期を選び、形成層帯及び形成中木部の組織観察を行った。試料を樹脂包埋して切削した薄片をサフランin・アルシアンブルー2重染色したものを通常光顕及び偏光顕微鏡により観察を行った。

4. 研究成果

(1) 次世代シーケンサー (Roche454) によって約30万リードを読み取り、その後 *de novo* アセンブルを行った結果、平均長1,069 bp の14,616 isotigs (isotig: 塩基配列のアセンブルの結果得られた Contig をさらに連結して得られた配列) と 40,435 singlets (singlets: オーバーラップ配列がなく、アセンブルされなかった塩基配列) の合計55,051 配列を取得できた (表-1)。

取得した55,051 配列について、既存のライブラリ「NCBI non-redundant protein database、TAIR、ForestGen および ForestGen の材関連データベース (inner bark and sapwood ライブラリー)、The Gene Index の *Pinus*, *Populus* and *Picea* に

表-1. 得られた配列とアセンブルの概要

配列	配列数		塩基数(Mbp)
	総リード数	平均リード長	
配列	308,542	405.29bp	125.1
アセンブル	使用不能リード数	9764	
	アセンブルに使用したリード数	298,778	121.2
	平均リード数	405.69bp	
Contig			
総Contigs	contigとしてアセンブルされたリード数	241,696	98.6
	contig数 (100bp以上)	15,521	12.7
Contigs(500bp以上)			
	contig数	11,022	11.2
	平均contig数	1,014	
	最長contig長	9,656	
	50%以上のcontig長	1,102	
Isotigs			
	isotig数	14,616	15.6
	平均isotig長	1,069	
	最長isotig長	9,656	
	50%以上のisotig長	1,261	
	isotigを形成するcontigの平均数	1.7	
Singletons		40,435	
総配列数		55,051	

おける木部 ( Xylem ) および形成層 ( Cambium ) の塩基配列との類似性を BLAST 検索により解析した(図 - 1)。スギのデータベースである ForestGen の登録配列と最も類似性が高いことに加え、広葉樹である *Populus* よりも針葉樹との類似性の方が高いという結果が得られた。また、木部および形成層に関する既知のライブラリーとの比較では、今回取得した配列は ForestGen の材関連データと最も類似性が低く、むしろ既に良く知られている *Pinus*、*Populus* および *Picea* との方が高かった。これらの結果は、今回取得した配列が、ForestGen における材関連の EST データの不足を補うとともに、他器官で取られた EST との共通性を示唆するものと考えられる。

( 2 ) 供試サンプルの形成層帯の活動期における細胞の変化を観察した(図 - 2)。3/24 に採取したサンプルの形成層帯では細胞分裂が見られず、休眠状態であると判断できた。また、細胞放射列 1 列当たりの平均形成層細胞数( 4.8 個)は、4 月(  $p < 0.01$  ) 6 月(  $p < 0.01$  )、8 月(  $p < 0.05$  ) のサンプルで見られるよりも有意に少なかった。拡大中仮道管は 4/27 のサンプルにおいて最も多く、この時期には形成層から派生した細胞からの仮道管への分化が最も盛んであると考えられた。また、4/27 のサンプルにおいて一部の仮道管には二次壁の肥厚が見られ、二次壁形成はこの頃から始まると考えられた。6/22 のサンプルでは、二次壁形成と木化の段階にある仮道管数が他の時期より有意に多く(  $p < 0.01$  )、6/22 のサンプルは、細胞分化および二次壁形成を含む木部形成の活動のピークであると考えられた。6/22 に拡大中の仮道管数の平均数が 8.8 細胞であったものが、8/24 には 1.7 細胞と大幅に減少しており(  $p < 0.01$  )、この時期には形成層活動が初期と比べて減退していることを示していると判断できた。従って、8/24 および 10/7 には、細胞の分裂および拡

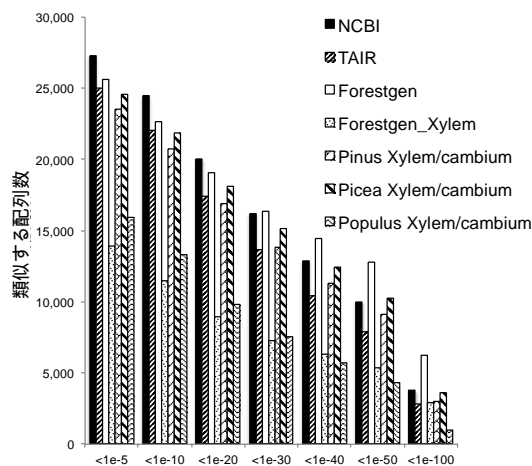


図 - 1 BLASTx/tBLASTx E-value cutoff 値による NCBI, TAIR, ForestGen\_Xylem, pine, spruce, poplar データベースと類似する配列数

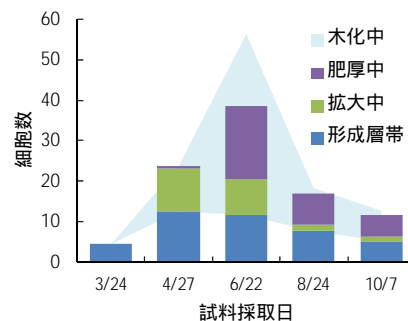
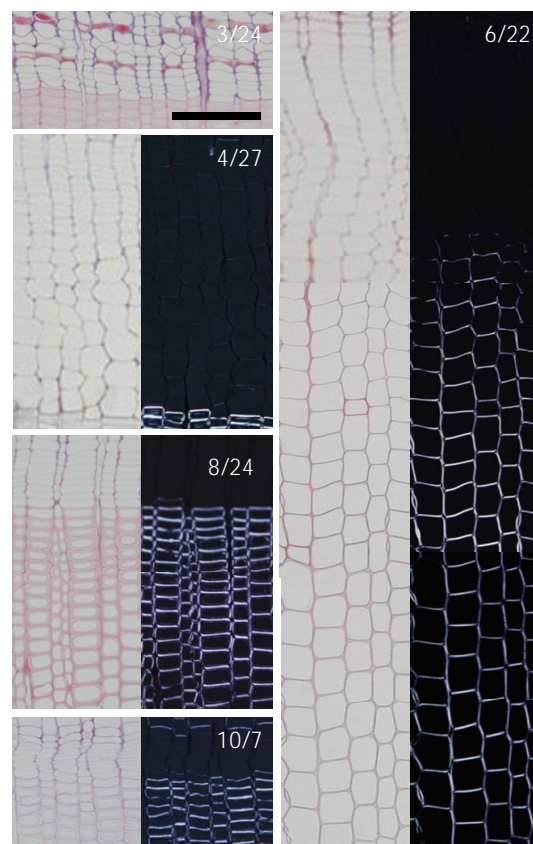


図 - 2 形成層帯及び形成中木部の組織観察  
上図 通常光顕及び偏光顕微鏡写真

bar = 100  $\mu$ m

下図 分化段階ごとの細胞放射列あたりの平均細胞数

大というよりも二次壁形成と木化が主に行われていると考えられた(図 - 2)。

組織観察により分化段階を特徴づけた 5 時期( 3/24、4/27、6/22、8/24、10/7 )のサンプルについてマイクロアレイにより発現遺伝子の挙動を調べた。その結果、18,082 遺伝子中 10,380 遺伝子が材形成期間に有意な発現挙動を見せた(  $p < 0.05$ 、 $q < 0.2$  )。それらの発現パターンは、2 つのパターンに分かれ、形成層活動開始時期および材形成のピーク時に発現が上昇する 4,019 遺伝子とそれとは反対に分裂の減少期および成長停止期に発現が上昇する 6,361 遺伝子とに区分された。さらにそれぞれのパターンは、7 つずつに細かく分かれ、合計 14 のパターン( クラスタ )に分割できた(図 - 3)。このうち、クラスタ A5 は、形成層活動開始時期および材

形成のピーク時に最も多くの遺伝子が高発現しているクラスターとなった。同様に、分裂の減少期および成長停止期には、クラスターB2、B6、B7に属する遺伝子が高発現しているという結果となった。

各クラスターにおける全ての遺伝子の配

列情報を COGs (clusters of orthologous) により類似性を解析し、遺伝子の機能を分類化した。その結果、クラスターA5の遺伝子群には、形成層活動開始時期および材形成のピーク時に高発現すると考えられており、材形成に関連する遺伝子の機能グループである

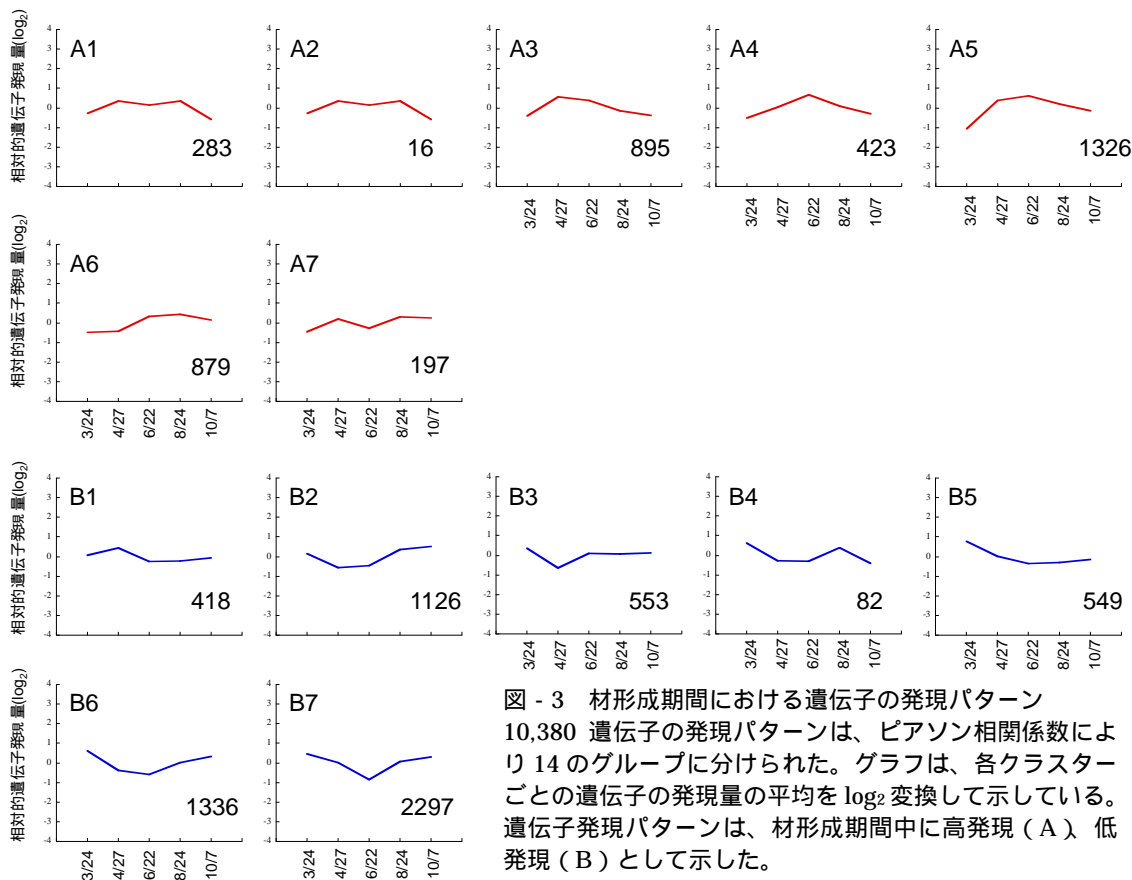


図 - 3 材形成期間における遺伝子の発現パターン  
10,380 遺伝子の発現パターンは、ピアソン相関係数により 14 のグループに分けられた。グラフは、各クラスターごとの遺伝子の発現量の平均を  $\log_2$  変換して示している。遺伝子発現パターンは、材形成期間中に高発現 (A)、低発現 (B) として示した。

表2 各クラスターとCOGデータベースの分類に基づく発現遺伝子数。

	A1	A2	A3	A4	A5	A6	A7	B1	B2	B3	B4	B5	B6	B7
[A] RNA processing and modification	3	0	6	3	11	21	0	3	23	9	4	15	60	123
[B] Chromatin structure and dynamics	1	0	7	0	13	2	4	8	10	1	1	5	18	78
[C] Energy production and conversion	20	0	25	26	37	29	0	8	31	18	0	6	32	10
[D] Cell cycle control, cell division, chromosome partitioning	1	0	8	4	23	5	0	3	12	3	0	2	20	21
[E] Amino acid transport and metabolism	7	2	32	11	39	28	4	10	23	16	1	7	8	53
[F] Nucleotide transport and metabolism	0	0	2	0	12	11	0	1	8	2	2	4	6	15
[G] Carbohydrate transport and metabolism	9	0	65	26	113	41	9	29	32	23	2	19	69	47
[H] Coenzyme transport and metabolism	11	0	2	7	19	7	1	1	8	2	0	1	3	5
[I] Lipid transport and metabolism	6	0	34	10	53	33	9	13	37	18	1	18	17	40
[J] Translation, ribosomal structure and biogenesis	7	0	28	1	11	8	0	35	9	5	0	4	13	42
[K] Transcription	15	2	19	7	30	23	3	12	59	24	2	20	91	98
[L] Replication, recombination and repair	0	0	8	5	8	4	2	7	16	4	1	5	18	35
[M] Cell wall/membrane/envelope biogenesis	2	1	29	9	65	17	5	11	19	3	0	3	14	38
[N] Cell motility	0	0	0	2	1	0	0	0	1	0	0	0	1	2
[O] Posttranslational modification, protein turnover, chaperon	18	0	30	37	51	84	29	21	44	33	10	20	62	110
[P] Inorganic ion transport and metabolism	9	0	24	8	11	15	5	7	8	8	1	9	12	48
[Q] Secondary metabolites biosynthesis, transport and catabolism	8	2	17	11	50	31	9	18	68	36	1	7	36	48
[R] General function prediction only	16	0	104	52	133	121	26	45	159	60	7	50	132	263
[S] Function unknown	18	0	61	23	87	39	5	22	37	50	4	33	68	69
[T] Signal transduction mechanisms	23	4	97	22	126	40	32	51	77	40	10	88	144	435
[U] Intracellular trafficking, secretion, and vesicular transport	5	0	48	26	45	17	3	20	12	6	0	8	25	28
[V] Defense mechanisms	2	0	8	8	35	19	7	19	20	15	3	55	64	227
[W] Extracellular structures	1	0	2	1	22	2	1	0	0	0	0	0	1	3
[X] Unassigned	21	2	70	25	123	67	24	19	87	36	5	43	98	146
[Y] Nuclear structure	1	0	3	0	1	0	1	5	1	0	0	3	0	9
[Z] Cytoskeleton	4	0	32	19	41	9	0	14	5	1	0	9	15	8

“Carbohydrate transport and metabolism (G: 炭水化物の輸送と代謝)”、“Cell wall/membrane/envelope biogenesis (M: 細胞壁/膜組織等の生合成)”及び“Cytoskeleton (Z: 細胞骨格)”が顕著に見られた。一方、分裂の減少期および成長停止期では様々な環境状態に対する耐性や細胞プロセスに関連すると思われる“RNA processing and modification (A: RNAの転写後の加工過程と修飾)”、“Signal transduction mechanisms (T: シグナル伝達機構),” and “Defense mechanisms (V: 防御機構)”等の機能グループが顕著に見られた(表-2)。(三嶋ら、2014 森林遺伝育種より転載)

#### <引用文献>

- 1) C. J. NAIRN et al: Carbohydrate-related genes and cell wall biosynthesis in vascular tissues of loblolly pine (*Pinus taeda*). *Tree Physiology*, 28: 1099-1110 (2008)
- 2) S. G. Ralph et al: A conifer genomics resource of 200,000 spruce (*Picea* spp.) ESTs and 6,464 high-quality, sequence-finished full-length cDNAs for Sitka spruce (*Picea sitchensis*). *BMC Genomics*, 9:484 (2008)  
doi:10.1186/1471-2164-9-484
- 3) Noé Fernández-Pozo et al: EuroPineDB: a high-coverage web database for maritime pine transcriptome. *BMC Genomics*, 12:366 (2011)  
doi:10.1186/1471-2164-12-366

#### 5. 主な発表論文等

##### [雑誌論文](計 3件)

三嶋 賢太郎、藤原 健、井城 泰一、黒田 克志、山下 香菜、田村 美帆、藤澤 義武、渡辺 敦史、発現遺伝子による材関連遺伝子マーカーの開発の可能性、森林遺伝育種、査読有、Vol. 3、2014、pp.167-172  
DOI 2187-350X

Kentaro Mishima、Takeshi Fujiwara、Taiichi Iki、Katsushi Kuroda、Kana Yamashita、Miho Tamura、Yoshitake Fujisawa、Atsushi Watanabe、Transcriptome sequencing and profiling of expressed genes in cambial zone and differentiation of xylem of Japanese cedar (*Cryptomeria japonica*)、*BMC Genomics*、査読有、Vol. 15、2014、p.219  
DOI 10.1186・1471-2164-15-219

Katsushi Kuroda、Takeshi Fujiwara、Takanori Imai、Ruka Takama、Kaori Saito、Yasuyuki Matsushita、Kazuhiko Fukushima、The Cryo-TOF-SIMS/SEM

system for analysis of the chemical distribution in freeze-fixed *Cryptomeria* wood、*Surface and Interface Analysis*、査読有、Vol. 45、2013、pp.215-219

##### [学会発表](計 15件)

三嶋 賢太郎、平尾 知士、田村 美帆、井城 泰一、平岡 裕一郎、能勢 美峰、坪村 美代子、花岡 創、藤原 健、黒田 克志、栗田 学、高橋 誠、渡辺 敦史、スギの材質・成長形質に関する QTL 解析、第 126 回日本森林学会大会、2015 年 3 月 27 日、「北海道大学(北海道札幌市)」

三嶋 賢太郎、平尾 知士、井城 泰一、平岡 裕一郎、坪村 美代子、能勢 美峰、花岡 創、栗田 学、高橋 誠、黒田 克志、藤原 健、田村 美帆、渡辺 敦史、スギ連鎖地図作成と材質形質に関する QTL マッピング、第 65 回日本木材学会大会、2015 年 3 月 17 日、「タワーホール船堀(東京都江戸川区)」

三嶋 賢太郎、藤原 健、井城 泰一、高島 有哉、黒田 克志、栗田 学、渡辺 敦史、形成層活動期における材関連遺伝子の発現パターンのクローン間差、第 3 回森林遺伝育種学会大会、2014 年 11 月 7 日、「東京大学(東京都文京区)」

内山 憲太郎、岩田 洋佳、伊原 徳子、上野実義、森口 喜成、坪村 美代子、三嶋 賢太郎、井城 泰一、高橋 誠、渡辺 敦史、二村 典宏、篠原 健司、津村 義彦、スギの育種形質に対するゲノムワイド関連解析及び形質予測、第 125 回日本森林学会大会、2014 年 3 月 26 日~30 日、「大宮ソニックシティ(埼玉県さいたま市)」

田村 美帆、手島 康一、三嶋 賢太郎、井城 泰一、能勢 美峰、坪村 美代子、栗田 学、渡辺 敦史、スギ器官別 EST の基盤整備、第 125 回日本森林学会大会、2014 年 3 月 26 日~30 日、「大宮ソニックシティ(埼玉県さいたま市)」

平尾 知士、三嶋 賢太郎、田村 美帆、渡辺 敦史、スギ次世代育種に向けた DNA マーカーの開発とその適用、第 125 回日本森林学会大会、2014 年 3 月 26 日~30 日、「大宮ソニックシティ(埼玉県さいたま市)」

内山 憲太郎、岩田 洋佳、木村 恵、伊原 徳子、上野実義、森口 喜成、坪村 美代子、三嶋 賢太郎、井城 泰一、高橋 誠、渡辺 敦史、二村 典宏、篠原 健司、津村 義彦、スギ次世代検定林におけるゲノムワイドマーカーを用いた形質予測、日本育種学会第 125 回講演会、2014 年 3 月 20



日～22日、「東北大学（宮城県仙台市）」

能勢 美峰、田村 美帆、三嶋 賢太郎、井城 泰一、坪村 美代子、栗田 学、渡辺 敦史、スギの温度に伴う日周性の変化、第55回日本植物生理学会年会、2014年3月18日～20日、「富山大学（富山県富山市）」

三嶋 賢太郎、井城 泰一、平尾 知士、藤澤 義武、藤原 健、田村 美帆、渡辺 敦史、スギ材質形質に関するQTLマッピング、第64回日本木材学会大会、2014年3月13日～14日、「愛媛県県民文化会館（愛媛県松山市）」

Yuichiro Oribe、The continuity of cell division and the resumption of xylem differentiation of new cambial derivatives after the cambial reactivation induced by localized stem heating in temperate zone trees、9th International Conference on Dendrochronology、2014年1月11日～19日、「メルボルン（オーストラリア）」

三嶋 賢太郎、井城 泰一、藤原 健、黒田 克史、渡辺 敦史、スギ早期選抜にむけたEST情報の収集と網羅的発現解析、第124回日本森林学会大会、2013年3月27日～29日、「岩手大学（岩手県盛岡市）」

織部 雄一郎、形成層帯の休眠打破の前後における局部加温処理を施した冷温帯に生育する常緑針葉樹（スギ）の樹幹部における木部形成、第63回日本木材学会大会、2013年3月27日～29日、「岩手大学（岩手県盛岡市）」

三嶋 賢太郎、井城 泰一、藤澤 義武、藤原 健、黒田 克史、山下 香菜、渡辺 敦史、スギ材形成に関与する遺伝子群の探索（7）スギ形成層帯における通年の時系列発現プロファイル、第63回日本木材学会大会、2013年3月27日～29日、「岩手大学（岩手県盛岡市）」

黒田 克史、藤原 健、中田 了五、佐野 雄三、ヒノキ、カラマツ、トドマツ心材形成過程における木部の水分分布変化のCryo-SWM解析、第63回日本木材学会大会、2013年3月27日～29日、「岩手大学（岩手県盛岡市）」

Katsushi Kuroda、Takeshi Fujiwara、Takanori Imai、Ruka Takama、Kaori Saito、Yasuyuki Matsushita、Kazuhiko Fukushima、New approach of chemical distribution in a frozen-hydrated wood sample using Cryo-TOF-SIMS/SEM system、IUFRO All Division 5

Conference、2012年7月8日～13日、「エストリル（ポルトガル）」

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

藤原 健（FUJIWARA, Takeshi）  
森林総合研究所・木材特性研究領域・室長  
研究者番号：00353839

### (2) 研究分担者

渡辺 敦史（WATANABE, Atsushi）  
九州大学・農学研究院・准教授  
研究者番号：10360471

能勢 美峰（NOSE, Mine）  
森林総合研究所・林木育種センター・研究員  
研究者番号：20582753

栗田 学（KURITA, Manabu）  
森林総合研究所・林木育種センター・室長  
研究者番号：40370829

井城 泰一（IKI, Taiichi）  
森林総合研究所・林木育種センター・主任研究員  
研究者番号：40370845

織部 雄一郎（ORIBE, Yuichiro）  
森林総合研究所・東北育種場・課長  
研究者番号：40370853

山下 香菜（YAMASHITA, Kana）  
森林総合研究所・木材特性研究領域・主任研究員  
研究者番号：60353900

黒田 克志（KURODA, Katsushi）  
森林総合研究所・木材特性研究領域・主任研究員  
研究者番号：90399379