

## 【第2回森林遺伝育種学会奨励賞受賞研究】

スギの木部組織における木部活動期を通じた遺伝子発現パターンの解明と  
発現遺伝子群のプロファイリング三嶋 賢太郎<sup>\*1</sup>

## はじめに

この度は、大変栄誉ある賞を頂き、誠にありがとうございました。今回の受賞対象となった研究内容は、極めて基礎的なものであるにも関わらず評価を頂き、推薦頂いた林木育種センター星比呂志育種部長、秋田県立大学木材高度研究所の高田克彦教授および選考に携わって頂いた多くの先生方や学会会員の皆様にも重ねて御礼申し上げます。また、このような機会を得られましたのも、本研究の共同研究者である九州大学の渡辺敦史准教授、森林総合研究所組織材質研究室の藤原健室長をはじめ、職場である林木育種センター育種部の皆様のお引き立てによるものであり、この場を借りて心より御礼を申し上げます。本稿では、本受賞研究を報告したMishima et al. (2014) から一部を引用する形で報告させていただきます。

## 研究の背景

スギの育種を進めるうえで、材質形質は最も重要な育種目標の一つであり、これまで森林総合研究所林木育種センターではスギ精英樹の材質に関わる諸形質について評価し、材料の整備を継続して行っている。これらの材料を背景に数年前からゲノム情報を利用した早期選抜手法についても取り組んでいる。ゲノム情報に関しては、近年のシーケンズ技術の進展による塩基配列取得の大量化、高速化かつ低価格化とそれに伴う解析手法の進展により、樹木の分子育種についても着手が容易になった。

既に約10年前から *Pinus*、*Populus*、*Picea* 等の主要な育種対象樹種で材形成に関わる発現遺伝子 (EST :

Expressed Sequence Tags) の配列情報の集積とその発現パターンに関する研究行われてきている (Allona et al. 1998 ; Sterky et al. 1998 ; Pavy et al. 2008)。また、*Pradiata* の6-7年生の材質形質の異なる若齢木間における剛性に関わる候補遺伝子の発現量の違いを網羅的に明らかにした報告もされている (Li et al. 2011)。一方スギにおいては、ForestGen (Forest EST and Genome database) に内樹皮や辺材、Yoshida et al. (2012) による白線帯 (移行帯) のESTが登録されているにすぎない。うえ、材関連の遺伝子発現に関しては知見がほぼなく、欧米での取り組みとは大きな開きがある。

従って、材となる細胞を生み出す場となる形成層帯から材関連の遺伝子の収集とその発現データの集積を行った。

## 形成層帯からの網羅的な発現遺伝子情報の収集

日立市にある林木育種センター場内に植栽されている数クロンを対象として、1年にわたって形成層を含む短冊状の木片を採取毎に同一クロンの別個体から採取した。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。また、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 (拡大帯) を含む形成層帯であることも確認した。抽出した通年のRNAサンプルを混合した後、標準化することなく、次世代シーケンサー (Roche454) を利用して発現遺伝子の塩基配列情報、約30万リードを取得した。これらのリードをアセンブル後、平均長1,069bpの14,616 isotigs (isotig : リード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

\* E-mail: mishimak@affrc.go.jp

<sup>1</sup>みしまけんたろう 森林総合研究所 林木育種センター

列)と40,435singlets (singlet: オーバーラップ配列がなく、アセンブルされなかったリード)の合計55,051の配列を得た。取得した55,051配列は、既知のライブラリーとの塩基配列の類似性をBLAST検索により解析した。その結果、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、木部及び形成層に関する既知のライブラリーに限って比較すると、今回取得した配列はForestGenの材関連データよりも、むしろ既に良く知られている*Pinus*、*Populus*及び*Picea*との類似性の方が高かった。詳細な(図を含む)、形成層帯からの網羅的遺伝子収集においては、既に本学会誌3:167-172に記しており、原著論文Mishima et al. (2014)も参照されたい。

### 形成層帯における遺伝子発現データの集積

得られた配列から高発現していると考えられる14,616isotigsに加え、ForestGenの既知の材関連データベースの配列を加えて、18,082プローブを3-4反復した72Kマイクロアレイスライドガラスを設計した。これらのマイクロアレイに成層帯の活動期における細胞の変化を一通り捉えられるように3月24日、4月27日、6月22日、8月27日、10月7日の5時期を選びRNA抽出後、マイクロアレイ解析に用いると共に、形成層帯の組織を観察した。の結果、18,082遺伝子中10,380遺伝子が材形成期間に有為に異なる挙動を見せた( $p < 0.05$ ,  $q < 0.2$ )。発現パターンは、形成層活動開始時期及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及び成長停止期に発現が上昇する6,361遺伝子の大きく2つに分かれた。

さらにそれぞれのパターンは、7ずつに細かく分かかれ、合計14のパターン(クラスター)に分割できた。各クラスターにおける全ての遺伝子の配列情報は、COGs (clusters of orthologous groups) database に対して、BLSTX検索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、形成層活動開始時期及び材形成のピーク時に高発現すると考えられ、材形成遺伝子としてよく知られている機能グループである「炭水化物の輸送と代謝 (Carbohydrate transport and metabolism)」、「細胞壁・膜組織等の生合成 (Cell wall/membrane/envelope biogenesis)」や「細胞骨格 (Cytoskeleton)」が材形成活動期に高発現するグルー

プに見られた。一方、分裂の減少期及び成長停止期では様々な環境状態に対する耐性或細胞プロセスに関連すると考えられる「転写後の加工過程と修飾 (RNA processing and modification)」、「シグナル伝達機構 (Signal transduction mechanisms)」や「防御機構 (Defense mechanisms)」等の機能グループが顕著に認められた。以上の遺伝子の発現データの集積においても本学会誌3:167-172、原著論文Mishima et al. (2014)も参照されたい。

### 発現遺伝子の季節変動

得られた個々の遺伝子発現情報は、BLAST検索による既知のデータとの比較により、機能グループに分けられるのに加え、他樹種での報告と比較できる。本パラグラフでは、原著論文内で取り上げた主にスギの材形成に関連するいくつかの機能グループの遺伝子の季節変動を取り上げる。

#### 細胞周期に関連する遺伝子群

材形成においては、これらの遺伝子群の動態は、細胞分裂のシグナル、成長開始のシグナルととらえる事ができる。Druart et al. (2007) は、*Populus tremula* において*Arabidopsis* で明らかとなった細胞周期に関連する主要な80遺伝子の発現挙動を調べ、68遺伝子が同様に発現している事を明にしている。スギにおいては、これらの遺伝子のうち25遺伝子がマイクロアレイ上に存在し、16遺伝子が3月から4月にかけての分裂初期に高発現していた。また、Druart et al. (2007) は、分裂初期の細胞分裂増大の観察結果と発現挙動が、一致していないことから、前年度の分裂停止後からこれらの遺伝子において転写調節が働いている事を示唆している。今回のスギでの結果は、分裂直後のサンプルを採取できていないため検証できないが、スギの成長サイクルを詳細に理解する上で、形質からは判断できない成長開始時期の特定がこの遺伝子群の挙動から判断できる可能性がある。

#### 細胞壁形成関連遺伝子群

これらの遺伝子群はおもにリグニン、セルロースおよびマトリックス多糖類関連遺伝子群に分類できる。リグニン関連遺伝子群については、リグニンの生合成経路がその関連遺伝子と共にすでに明らかとなっている。*P. trichocarpa*、*P. abies*、*P. taeda*では、生合成経

路で発現する遺伝子の同定とその遺伝子ファミリーも報告されている (Koutamieni et al. 2007 ; Shi et al. 2010 ; Anterola et al. 2002)。スギにおいても本研究のマイクロアレイの発現動態から生合成経路で発現する候補遺伝子が明らかとなっており、今後は、完全長の決定による遺伝子ファミリーの同定などを行う必要がある。

セルロースおよびマトリックス多糖類関連遺伝子群については、モデル植物においてノックアウト変異体での候補遺伝子の材形成変化に関する事例も多く存在する (Taylor et al. 2003 ; Brown et al. 2007 など)。これらの研究では、ノックアウト変異体において細胞壁の表現型が変化する事から、明らかとなった候補遺伝子は IRX (irregular xylem) と冠されている。今回のマイクロアレイ解析においても活動期に、これら IRX を冠するセルロースおよびマトリックス多糖類関連遺伝子群と極めて類似性の高いホモログが高発現していた。この事は、それらが細胞壁形成におけるスギでの候補遺伝子であると共に、モデル植物と種としての系統が大きく離れているにも関わらず配列と機能の保存性があること示唆している。

#### 細胞骨格に関連する遺伝子群

これらの遺伝子群は細胞にいわばワイヤーのような働きを担い細胞の維持に重要な役割を持つ。とくに、2次壁において最大である S2 層における微小管 (microfibril) の配向は、材質において重要なとなるマイクロフィブリル傾角として知られている (Spokenvicius et al. 2007)。この微小管を2量体の形で形成する  $\alpha / \beta$  tubulin や微小管の配向の安定化、不安定化、束化に関する Microtubule-associated protein gene (MAPs)、微小管に沿って移動でき細胞内輸送をになう Kinesin gene family、またアクチンフィラメントを形成する Actin/Actin related genes については、マイクロアレイの発現動態から、材形成活動期に高発現する遺伝子が存在し、微小管の配向等の候補遺伝子となると考えられる。微小管の配向のメカニズムは分かっているが、材質性質のとくに弾性について大きな影響がある事から、スギにおいてもこれらの遺伝子の制御機構の解明が期待される。

#### おわりに

本稿では、形成層活動期の形成層帯からの EST 集積

とそれに基づくマクロアレイ解析の概要を述べた。詳細なマイクロアレイ解析から別の遺伝群の季節変動については、原著論文 Mishima et al. (2014) を参照されたい。

また、今回の論文に記した EST データや個々の遺伝子の発現情報が、今後の樹木の遺伝子研究、特にスギの材質育種に貢献するものとなれば幸いです。

#### 引用文献

- Allona I, Quinn M, Shoop E, Swope K, St Cyr S, Carlis J, Riedl J, Retzel E, Campbell MM, Sederoff R, Whetten RW (1998) Analysis of xylem formation in pine by cDNA sequencing. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95: 9693–9698
- Anterola AM, Jeon JH, Davin LB, Lewis NG (2002) Transcriptional control of monolignol biosynthesis in *Pinus taeda*: factors affecting monolignol ratios and carbon allocation in phenylpropanoid metabolism. *The Journal of Biological Chemistry* 277: 18272–18280
- Bhalerao RP (2007) Environment and hormonal regulation of the activity–dormancy cycle in the cambial meristem involves stage–specific modulation of transcriptional and metabolic network. *The Plant Journal* 50: 557–573
- Brown DM, Goubet F, Wong VW, Goodacre R, Stephens E, Dupree P, Turner SR (2007) Comparison of five xylan synthesis mutants reveals new insight into the mechanisms of xylan synthesis. *The Plant Journal* 52: 1154–1168
- Druart N, Johansson A, Baba K, Schrader J, Sjödin A, Bhalerao RR, Resman L, Trygg J, Moritz T, Koutaniemi S, Warinowski T, Kärkönen A, Alatalo E, Fossdal CG, Saranpää P, Laakso T, Fagerstedt KV, Simola LK, Paulin L, Rudd S, Teeri TH (2007) Expression profiling of the lignin biosynthetic pathway in Norway spruce using EST sequencing and real–time RT–PCR. *Plant Molecular Biology* 65: 311–328
- Li X, Wu HX, Dillon SK, Southerton SG (2011) Transcriptome profiling of *Pinus radiata* juvenile wood with contrasting stiffness identifies putative orientation and cell wall mechanics. *BMC Genomics* 12: 480
- Mishima K, Fujiwara T, Iki T, Kuroda K, Yamashita K, Tamura M, Fujisawa Y, Watanabe A (2014) Transcriptome sequencing and profiling of expressed genes in cambial zone and differentiating xylem of Japanese cedar

- (*Cryptomeria japonica*). BMC genomics 15: 219
- Pavy N, Boyle B, Nelson C, Paule C, Giguère I, Caron S, Parsons LS, Dallaire N, Bedon F, Bérubé H, Cooke J, Mackay J (2008) Identification of conserved core xylem gene sets: conifer cDNA microarray development, transcript profiling and computational analyses. New Phytologist 180: 766–786
- Shi R, Sun YH, Li Q, Heber S, Sederoff R, Chiang VL (2010) Towards a systems approach for lignin biosynthesis in *Populus trichocarpa*: transcript abundance and specificity of the monolignol biosynthetic genes. Plant and Cell Physiology 51: 144–163
- Spokevicus AV, Southerton SG, MacMillan CP, Qiu D, Gan S, Tibbits JF, Moran GF, Bossinger G (2007) beta-Tubulin affects cellulose microfibril orientation in plant secondary fibre cell walls. The Plant Journal 51: 717–806
- Sterky F, Regan S, Karlsson J, Hertzberg M, Rohde A, Holmberg A, Amini B, Bhalerao R, Larsson M, Villarroel R, Van Montagu M, Sandberg G, Olsson O, Teeri TT, Boerjan W, Gustafsson P, Uhlén M, Sundberg B, Lundeberg J (1998) Gene discovery in the wood-forming tissues of poplar: analysis of 5,692 expressed sequence tags. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 95: 13330–13335
- Taylor NG, Howells RM, Huttly AK, Vickers K, Turner SR (2003) Interactions among three distinct CesA proteins essential for cellulose synthesis. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 100: 1450–1455
- Yoshida K, Futamura N, Nishiguchi M (2012) Collection of expressed genes from the transition zone of *Cryptomeria japonica* in the dormant season. Journal of Wood Science 58: 89–103