

様 式 F - 7 - 1

科学研究費助成事業（学術研究助成基金助成金）実施状況報告書（研究実施状況報告書）（平成 28 年度）

1. 機関番号

1	4	6	0	3
---	---	---	---	---

 2. 研究機関名 奈良先端科学技術大学院大学
3. 研究種目名 基盤研究(C)（一般） 4. 補助事業期間 平成 28 年度～平成 30 年度

5. 課題番号

1	6	K	0	7	4	0	2
---	---	---	---	---	---	---	---

6. 研究課題名 テンションウッド誘導系を用いたG層形成のマスター制御因子の探索

7. 研究代表者

研究者番号	研究代表者名	所属部局名	職名
3 0 3 4 2 7 7 8	クボ ミノル 久保 稔	研究推進機構	特任准教授

8. 研究分担者

研究者番号	研究分担者名	所属研究機関名・部局名	職名

9. 研究実績の概要

テンションウッド形成を効率よく再現しかつ様々な過程において観察可能な実験系を構築するために、無菌的にポット栽培した交雑ポプラの挿し木苗をポットごと傾斜させ、テンションウッドを形成させる実験系を構築した。この実験系では、テンションウッド形成の特徴である、幹の屈曲、木部の偏心成長、G層形成が再現よくかつ同調的に観察されることがわかった。

この系を用いてテンションウッド形成過程における網羅的遺伝子発現解析を実施するため、傾斜後のポプラ挿し木苗の屈曲部から基部におけるテンションウッド形成側（TW）と同じ樹齢の傾斜させていないポプラの木部を継時的にサンプリングし、RNA抽出後、cDNAライブラリーの作成を行い、次世代シーケンサーを用いた網羅的遺伝子発現解析（RNA-seq）を行った。

上記で得られたRNA-seqデータを用いて統計的解析を行った結果、発現変動を示す1881個の遺伝子を検出した。次にこれらを用いて多変量解析の一つである階層クラスタリングを行ったところ、傾斜後4-21日目にかけてテンションウッドで特異的に発現上昇を示す580個の遺伝子を見いだすことができた。さらにこれらの遺伝子について類似性の高い遺伝子を探索し、それらの配列情報から得られる遺伝子機能の推定やジーンオントロジー（GO）解析を行ったところ、テンションウッドマスター制御因子の候補となり得る33個の転写因子を同定することができた。

10. キーワード

- | | | | |
|--------------|----------------|--------|----------------|
| (1) テンションウッド | (2) 細胞壁 | (3) G層 | (4) 網羅的遺伝子発現解析 |
| (5) ポプラ | (6) 次世代シーケンシング | (7) | (8) |

11. 現在までの進捗状況

(区分)(2) おおむね順調に進展している。

(理由)

平成28年度においては以下の研究を中心に行った。

1) ポプラ挿し木苗のテンションウッド形成過程における網羅的遺伝子発現解析
無菌的にポット栽培した交雑ポプラ(T89)の挿し木苗をポットごと傾斜させ、テンションウッド形成過程について幹の横断面・縦断面の観察を行った。その結果、傾斜後12時間で茎の屈曲が観察され、傾斜後4日目から屈曲部から基部にかけて幹の上面側の木部において、一様に偏心成長が観察された。さらに、傾斜後21日目以降ではテンションウッドの特徴であるG層形成が観察された。傾斜後0、4、7、14、21日目のポプラ挿し木苗のテンションウッド形成側(TW)木部と傾斜させていないポプラ木部のサンプルから RNA を抽出し、cDNA ライブラリーを作成後、次世代シーケンサーを用いた網羅的遺伝子発現解析を行った結果、1881個の発現変動を示す遺伝子を検出した。これらを用いて階層クラスタリングを行ったところ、9つのクラスタの内、クラスタ1、クラスタ4、クラスタ7において、傾斜後4-21日目にかけてテンションウッドで特異的に発現上昇を示す遺伝子群を見いだすことができた。これらのクラスタにおいてはそれぞれ109、238、233遺伝子が含まれており、さらにそれぞれ10個、12個、11個の転写因子を同定することができた。

2) 培養細胞における木部繊維細胞分化誘導系の構築

ポプラ種であるギンドロの培養細胞の継代培養を開始した。当初この培養細胞を用いて木部繊維細胞誘導系を構築し、そこに上記の解析で得られたG層形成のマスター制御因子の候補を導入する予定であったが、ギンドロ培養細胞における形質転換系の確立が未だできていないことから、木部繊維細胞分化誘導系の構築やG層形成のマスター制御因子の機能解析がより確実に簡便なアッセイ系の検討を行った。

12. 今後の研究の推進方策 等

(今後の推進方策)

以下の研究を順次遂行する。

1) 木部繊維細胞分化誘導系の構築：木部繊維細胞分化誘導系を構築するために、繊維細胞形成のマスター制御因子SND1/NST3 のオーソログである PtVNS11の cDNAを用いて、デキサメタゾン(DEX) 依存的に遺伝子機能を活性化することができる PtVNS11-GR 融合タンパク質を発現させるコンストラクトを作成し、従来から計画しているギンドロの培養細胞以外に交雑ポプラとベンサミアナタバコを用いた二つの実験系の構築を試みる。

2) テンションウッドマーカー株の作成：H28年度に見出したテンションウッド特異的発現遺伝子の配列情報を基に、公開されているポプラ種 コットンウッド(Populus trichocarpa)のゲノム情報から、プロモーター配列を抽出し、GUS や GFP 等のレポーター遺伝子をつないだコンストラクトを作成する。これらを交雑ポプラ T89 株に形質転換し、ポプラ挿し木苗のテンションウッド形成時における発現パターンを観察する。

3) G層形成のマスター制御因子の探索：1) で作成した木部繊維細胞誘導系において、H28年度に見出したテンションウッド特異的発現遺伝子をエストロゲン発現誘導ベクターに導入し、交雑ポプラT89株に形質転換し、エストロゲン依存的にテンションウッド以外の木部にG層が形成されるかを観察する。

(次年度使用額が生じた理由と使用計画)

(理由)

当初計画していたギンドロ培養細胞を用いた木部繊維細胞分化誘導系の構築について、形質転換体の作成や導入遺伝子の機能解析のし易さを検討した結果、交雑ポプラやベンサミアナタバコを用いた木部繊維細胞分化誘導系の構築を進める方が今後の研究計画の達成に貢献できると考え、培養試薬・器具類、分子生物学関連試薬・器具類の一部を次年度使用に繰り越した。

(使用計画)

木部繊維細胞分化誘導系を構築するために、繊維細胞形成のマスター制御因子SND1/NST3 のオーソログである PtVNS11の cDNAを用いて、デキサメタゾン(DEX) 依存的に遺伝子機能を活性化することができる PtVNS11-GR 融合タンパク質を発現させるコンストラクトを作成し、従来から計画しているギンドロの培養細胞に加えて、交雑ポプラとベンサミアナタバコを用いた二つの木部繊維細胞分化誘導系の構築を行う。

(課題番号： 16K07402)

(注) ・印刷に当たっては、A4判(縦長)・両面印刷すること。

13. 研究発表（平成28年度の研究成果）

〔雑誌論文〕 計（0）件 / うち査読付論文 計（0）件 / うち国際共著 計（0）件 / うちオープンアクセス 計（0）件

著者名		論文標題				
雑誌名	査読の有無	巻	発行年	最初と最後の頁	国際共著	
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子）						
オープンアクセス						

〔学会発表〕 計（1）件 / うち招待講演 計（0）件 / うち国際学会 計（0）件

発表者名		発表標題	
時田勝広、佐野亮輔、大谷美沙都、久保稔、出村拓		ポプラ挿し木苗ポット培養系を用いたテンションウッド形成過程の網羅的遺伝子発現解析	
学会等名	発表年月日	発表場所	
日本植物学会第80回大会	2016年09月16日～ 2016年09月19日	沖縄コンベンションセンター、沖縄県宜野湾市	

〔図書〕 計（0）件

著者名		出版社		
書名			発行年	総ページ数

14. 研究成果による産業財産権の出願・取得状況

〔出願〕 計（0）件

産業財産権の名称	発明者	権利者	産業財産権の種類、番号	出願年月日	国内・外国の別

〔取得〕 計（ 0 ）件

産業財産権の名称	発明者	権利者	産業財産権の種類、番号	取得年月日	国内・外国の別
				出願年月日	

15. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計（ 0 ）件

国際研究集会名	開催年月日	開催場所

16. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

（ 1 ）国際共同研究： -

17. 備考

--