

京都大学教育研究振興財団助成事業
成 果 報 告 書

令和 2年 4月 23日

公益財団法人京都大学教育研究振興財団

会 長 藤 洋 作 様

所 属 部 局 生 存 圏 研 究 所

職 名 助 教

氏 名 馬 場 啓 一

助 成 の 種 類	令和元年度 ・ 研究活動推進助成			
申請時の科研費 研究 課 題 名	木部組織構造の変化と細胞壁成分の関係			
上記以外で助成金 を 充 当 した 研 究 内 容	該当なし			
助成金充当に関 わる共同研究者	(所属・職名・氏名) 該当なし			
発表学会文献等	(この研究成果を発表した学会・文献等) 日本植物学会第83回大会, 樹木年輪研究会, 第70回日本木材学会大会			
成 果 の 概 要	研究内容・研究成果・今後の見通しなどについて、簡略に、A4版・和文で作成し、 添付して下さい。(タイトルは「成果の概要／報告者名」)			
会 計 報 告	交付を受けた助成金額	700,000 円		
	使用した助成金額	700,000 円		
	返納すべき助成金額	0 円		
	助成金の使途内訳	費 目	金 額	
		人工気象器LED化改造 2台	487,080	
		RNA-seq 解析 (一部)	212,920	
当財団の助成に つ いて	(今回の助成に対する感想、今後の助成に望むこと等お書き下さい。助成事業の参考にさせていただきます。)			

成果の概要 / 馬場 啓一

研究内容

本研究は、実施者らの開発した周年短縮樹木育成システムと称する人工環境下においてポプラを育成した時の、形成される木部の組織構造と細胞壁成分の形成に関わる遺伝子(群)を対応させることによって、木部構造の変化と細胞壁成分の関係を論ずることを目的としている。周年短縮育成システムは、人工気象器と培養室を用いて温度と日長を3段階で制御することにより、通常は1年かかる樹木の成長・落葉・休眠・休眠打破の期間を5ヶ月に短縮して繰り返させることができる。また、一定の人工環境下において樹木を生育させるため、同じ育成条件であればいつでも同じ組織構造を形成した試料を採取することが可能である。そこで、高温/長日、中温/短日、低温/短日の3つのステージそれぞれで形成される木部組織が正確には年輪内のどの部分に相当しているのか、ナイフマーク法によって特定していくことで、与える環境条件と組織構造の紐付けをおこなった。また、定期的にRNA抽出用試料を採取できるよう、挿し木苗を常時生産し、順次、周年短縮サイクル系に投入して育成、定期的に4個体ずつから樹幹試料を採取・凍結保存し、最終的に次世代シーケンサーによるRNA-seq解析をおこない、それぞれのステージにおける細胞壁成分関連遺伝子の発現変動について解析する。また、これらの実験に先立って、培養室と人工気象器との育成条件を同じにするために、光源が蛍光灯であった人工気象器を培養室と同じLEDに換装する工事を行った。蛍光灯には輝線スペクトルという決まった波長に強い光があることと紫外線を発生することがLEDとの大きな違いであり、周年短縮系のそれぞれのステージを受け持つ培養室と人工気象器を植物が行き来した時の条件が極力同じになるように下準備をした。

研究成果

本助成金によって全ての光源をLEDに統一した培養室・人工気象器を用いて、木部組織観察用のポプラとRNA抽出用のポプラを並行して周年短縮育成した。ステージ1を長日高温(14時間明期・24~28°C)、ステージ2を短日中温(8時間明期・15°C)、ステージ3を短日低温(8時間明期・5°C)とし培養期間は、ステージ1とステージ2をそれぞれ1ヶ月、ステージ3を3ヶ月とした。

組織観察用の試料木では、ステージ2およびステージ3に移行する時、幹にナイフマークを施した。ナイフには両刃剃刀を3mm程度に割ったものを用いた。マークを含む樹幹試料は採取後FAA固定液で保存し、切片を作製したのち、サフラニン/アストラブルーで二重染色し、脱水・封入により永久プレパラートを作製して、通常の光学顕微鏡観察に供した。周年短縮サイクル系のステージ1から2へ移行する際に施したナイフマークの結果から、ステージ2で形成された繊維細胞壁がステージ1のものより厚いことが示唆された。また、ステージ2に移行した時に壁肥厚帯にあった細胞群では中間的な壁厚を示した。ステージ3に移行する際にナイフで傷を付けられた欠損部分には障害組織による充填が見られず、ステージ3に移行してから細胞分裂が行われなかったことが示唆された。またステージ3では、移行直前のステージ2で分化中木部にあった細胞の壁肥厚が進行していたことがわか

った。

RNA-seq 解析を行うための試料は、4 個体 1 セットとして、各ステージに移行させた翌日とステージ開始から 1 週間置きに次のステージに移行する直前まで採取した。従って、ステージ 1 と 2 ではそれぞれ 5 回、ステージの 3 では 13 回のサンプリングを行い、RNA-seq を委託するまで -80°C の冷凍庫で保存した。全ての試料を採取したのち、龍谷大学農学部の永野研究室に RNA-seq 業務を委託した。採取した試料から RNA を抽出して cDNA ライブラリーを構築後、次世代シーケンサーで塩基配列を網羅的に読み取った。現在のところ、ウイルスや rRNA のコンタミもなく、10 の 5.5 乗以上の遺伝子数で時系列 23 回の全試料が読めていることが報告された。

今後の見通し

組織観察用試料は 4 個体 1 セットを周年短縮系で 1 巡だけの育成で複数個体が得られ、組織構造の観察結果は十分な数が得られたので、周年短縮系 3 ステージのそれぞれで形成される木部構造の特定は先行して結果が得られた。一方、RNA-seq 解析用試料は、ステージ移動の翌日と各週の全部で 23 回分をそれぞれ 4 個体ずつ準備する必要があり、全試料の採取に半年以上の時間がかかった。そのため、年度末ギリギリにようやく RNA-seq の結果が出ているものの、発現遺伝子の膨大な情報を整理して各種細胞壁関連遺伝子それぞれを解析には至っていない。但し、得られた RNA-Seq データのクオリティは今後の発現解析をおこなうための基準を満たしており、どの試料についても 10 の 5.5 乗以上のカウント数があるので、個々の遺伝子発現解析に十分なデータ量を得ていることがわかっている。そこで現在は遺伝子発現の解析を進めているところであり、今秋の日本植物学会では結果を発表する予定である。