

遺伝子発現を指標としたヒノキ圧縮あて材形成の判定¹

山下彩織²・岡田雅子²・吉田正人²・奥山 剛²

新しいあて材検出法の開発を目指して、ヒノキ圧縮あて材と正常材における遺伝子発現パターンを比較した。遺伝子発現を利用した判定には、あて材を早期に検出できるという利点がある。傾斜した5個体の樹幹から、あて材部と正常材部の分化中木部を採取した。成長応力解放ひずみの測定と組織観察の結果から、5個体のあて材の程度を推定した。最もあて材の程度が強かった個体について蛍光ディフレンシャルディスプレイを行い、あて材と正常材のバンドパターンを比較した。他個体での再現性を検討すると、1個体目と共通した発現パターンを示すバンドが298検出された。この中から判定指標に最も適したバンドを選んでいくことで、あて材の検出や程度の推定が可能になると考えられる。

キーワード：圧縮あて材、遺伝子発現、蛍光ディフレンシャルディスプレイ

はじめに

あて材とは樹木が傾斜地に生育していたり、風が強かったりして、樹幹が傾いた状態で肥大成長した場合に、傾きを本来の鉛直な状態に戻そうとして形成される組織である。あて材は針葉樹、広葉樹のいずれにも生じるが、本研究で用いたヒノキのような針葉樹では、傾斜した樹幹の下側に形成され、圧縮あて材と呼ばれる。一方、広葉樹では傾斜した樹幹の上側に形成され、引張あて材と呼ばれる。あて材に発生する大きな成長応力は、玉切り時の心割れや製材時の反りや曲がりなどの原因となって、利用歩留まりの低下を導いている (Okuyama *et al.* 2004)。

人工林において、鉛直な樹幹であってもあて材を形成していたり、同一クローンでもあて材を形成しやすい個体があったりと、外見であて材の有無を判断できないことが問題となっている。当年成長後に樹幹の木部表面の成長応力を測定することにより、あて材の程度を定量化することは可能 (Okuyama *et al.* 1990; Yamamoto *et al.* 1991) だが、より効率的な育林のためには、より早い段階、すなわち、あて材形成途中からでも判定を行う方法が求められる。

あて材、正常材という区別はあるが、それぞれの形成に至るまでの形成層始原細胞の分裂-伸長成長-二次壁の形成-木化-細胞死という過程は同じである。それにもかかわらず、あて材と正常材組織の特徴が異なるのは、遺伝子の発現の仕方が異なるからだと考えられる。この考え方にに基づき、McDougall (2000) はあて材部と正常材部のそれぞれの分化中木部から抽出したタンパク質を比較し、リグニン生合成に関わっていると思われる遺伝子の発現が、圧縮あて材部において正常材部よりも多かつ

たことを報告している。Moyle ら (2002) は、オーキシンによって誘導される遺伝子を単離し、曲げ刺激開始6時間後から、引張あて材形成側の発現量が50%減少していることを明らかにした。遺伝子発現を指標とすれば、あて材形成が今まきに行われているという段階からの判定が可能となると考えられる。

本研究では、ヒノキの圧縮あて材と正常材の分化中木部から mRNA を抽出することによって、発現している遺伝子を比較し、圧縮あて材形成の最も良い指標となるフラグメントを得ることを目的とした。遺伝子の発現を見ることであて材形成の有無がわかれば、植林に用いる苗の選抜育種にも応用していくことができるのではないかと考えている。

実験方法

2003年6月27日、名古屋大学附属演習林に生育していたヒノキ (*Chamaecyparis obtusa*) のうち傾斜していた5個体 (平均胸高直径 67.5 cm) を選び、試料採取を行った。

5個体の傾斜下側と傾斜の回復した鉛直部位から分化中木部を採取し、前者を圧縮あて材形成中の試料 (あて材試料)、後者を正常材形成中の試料 (正常材試料) とした。圧縮あて材には、正常材よりも色が濃いという巨視的特徴があるため、あて材試料として採取する位置は、樹皮を剥がしたときの色で判断した。分化中木部は採取直後に液体窒素で凍結し、 -80°C で保存した。

あて材試料を採取した部位でのあて材形成を確認するために、ひずみゲージ (KFG-10-120-C1-11L5M3R, Kyowa) を用いた成長応力解放ひずみの測定 (Yoshida and Okuyama 2002) と、

¹本報告の一部は第54回日本木材学会 (2004年8月) で発表した

Part of this study was presented at the 54th Annual Meeting of the Japanese Forestry Society (Aug. 2004)

²名古屋大学大学院生命農学研究科 生物材料物理学研究室

Laboratory of Bio-material Physics, Graduate School of Bioagricultural Sciences, Nagoya University, Nagoya 464-8601, Japan.

(受理: 2004年12月10日)

ひずみ測定点における組織の光学顕微鏡観察を行った。全個体のあて材部、正常材部それぞれについて、ひずみ測定と組織観察を行った結果から、最もあての程度が強いと思われる個体を選び出した。まず、この個体を用いて蛍光ディフレンシャルディスプレイ (Ito *et al.* 1994) を行った。

あて材試料、正常材試料から、CTAB 法 (Chang *et al.* 1993) を一部改変して total RNA を抽出し、TAKARA BIO 製の Enzyme Set-FDD と Fluorescence Differential Display Kit を用いてゲノム DNA の除去、逆転写、PCR を行い、遺伝子発現に由来するフラグメントを増幅させた。PCR には 9 種類の Downstream primer と 24 種類の Upstream primer を用い、計 216 通りの条件で転写産物を増幅した。同じプライマーの組み合わせで増幅させたあて材試料と正常材試料由来の PCR 産物を、尿素変性 4% アクリルアミドゲルを用いて隣り合ったレーンで電気泳動し、バンドパターンを比較した。泳動終了後、蛍光イメージアナライザー (FMBIO® II Multi-View, Hitachi Software Engineering) を使用して画像を読み取り、解析を行った。

1 個体を用いた 216 通り全ての泳動が終了したところで、遺伝子発現の違いがあて材形成判定の指標となり得ると考えられたプライマーの組み合わせを選び、候補を 86 通りにしぼった。

次に、1 個体目と同様の手順、条件で用意した 2 個体目の PCR 産物を用い、バンドの再現性を検討した。

結 果

あて材と正常材で遺伝子発現の様子 (有無、量) に違いがあり、かつ、その違いが比較した 2 個体に共通していたバンドの数は 298 であった (表 1)。このうち、あて材試料でのみ検出されたバンドの数は 41、逆に正常材試料でのみ検出されたものは 14 であった。また、両方のレーンで検出されたが、あて材試料でのシグナル強度が高かったバンドは 158、正常材試料で高かったものは 85 であった。正常材試料で特異的に検出されたバンドよりも、あて材試料で検出されたバンドの方が多かった。また、あて材と正常材の違いは遺伝子発現の有/無という完全な切り替わりよりも、量の違いによるところが大きかった。

表 1 に載せた 298 のバンドを構成するフラグメントの中には、900bp を超える長いものから 200bp 程度の短いものまであり、各々が示すシグナル強度もさまざまであった。そのため、

表 1. 2 個体に共通したパターンで検出されたバンドの数

	c 有 / 無	d 量	計
a あて材 > 正常材	41	158	199
b あて材 < 正常材	14	85	99
計	55	243	298





a 行: あて材試料でのみ検出, または, あて材試料でのシグナル強度が正常材試料よりも高い

b 行: 正常材試料でのみ検出, または, 正常材試料でのシグナル強度があて材試料よりも高い

c 列: あて, または, 正常材試料のどちらかでのみ検出

d 列: あて, 正常材試料のどちらでも検出されるがシグナル強度に違いがある

表 2. あて材形成判定指標の候補となるバンド

	泳動結果 1 あて, 2 あて, 1 正常, 2 正常	フラグメント サイズ (bp)	プライマー組み合わせ	
			Downstream	Upstream
ac		839	5' TnGA	5' GTTTTCGCAG
ad		788	5' TnAA	5' GTTGCGATCC
bc		411	5' TnCG	5' GATCTGACTG
bd		329	5' TnCC	5' GATCTGACAC

写真は左のレーンから順に 1 個体目のあて材, 2 個体目のあて材, 1 個体目の正常材, 2 個体目の正常材由来の PCR 産物を泳動したもの。Tn はオリゴ dT を表し, T の数 n は 13 ~ 15 である。記号 a ~ d は表 1 と対応している。

ac: あて材試料でのみ検出されたバンド

ad: あて材試料でのシグナル強度が正常材試料よりも高かったバンド

bc: 正常材試料でのみ検出されたバンド

bd: 正常材試料でのシグナル強度があて材試料よりも高かったバンド

あて材, 正常材間の差が明白なバンドもあれば, わずかな差しかないものもあった。表2は, 判定指標候補として考えているバンドの写真とプライマーの組み合わせを, 表1に載せた4つの分類に沿って1例ずつまとめたものである。

考 察

圧縮あて材と正常材における遺伝子発現の様子を見ると, 有/無という完全な切り替わりよりも, 一方が他方よりも多いという発現量の違いの方が多く見られた(表1)。これは, フランスカイガンショウ (*Pinus pinaster*) の圧縮あて材とオポジット材間で見られる遺伝子発現の違いは, 大部分が量的な差であったとする Le Provostら (2003) の報告とも一致する。あて材形成の有無のみを判定するには, 表2のacのようにあて材試料のみで検出されるバンドの方が, 量の差から判断するバンドよりも適している。成長応力解放ひずみや組織の光学顕微鏡観察から得られたあて材の程度とバンド強度との間に良い相関があれば, 形成中のあて材の程度も推定できるかもしれない。

個体が変わっても, あて材と正常材におけるパターンの違いに共通点の見られるバンドが見つかったため, 遺伝子発現を指標としたあて材形成の判定は可能であると考えられる。個体数を増やしていくことで, より適したプライマーの組み合わせやバンドをしぼり込んでいくことができる。候補の中からより適した指標を選んでいく際の基準として, 個体を変えても再現性が得られることのほか, 検出されるバンドの有無や強度の違いが明白な点, 早期検出が可能なが挙げられる。また, 塩基配列を読み, 他植物との相同性検索をかけていくことを念頭に置いた場合には, フラグメント長は長い方が良い。指標候補から最も適したものを選ぶことで, あて材形成判定をより早い段階で行うことが可能になると思われる。

引用文献

- Chang S., Puryear J. and Cairney J. (1993) A simple and efficient method for isolating RNA from pine trees. *Plant Molecular Biology Reporter* 11: 113-116.
- Ito T., Kito K., Adati N., Mitsui Y., Hagiwara H. and Sakaki Y. (1994) Fluorescent differential display: arbitrarily primed RT-PCR fingerprinting on an automated DNA sequencer. *FEBS Letters* 351: 231-236.
- Le Provost G., Paiva J., Pot D., Brach J. and Plomion C. (2003) Seasonal variation in transcript accumulation in wood-forming tissues of maritime pine (*Pinus pinaster* Ait.) with emphasis on a cell wall glycine-rich protein. *Planta* 217: 820-830.
- McDougall G.J. (2000) A comparison of proteins from the developing xylem of compression and non-compression wood of branches of Sitka spruce (*Picea sitchensis*) reveals a differentially expressed laccase. *Journal of Experimental Botany* 51: 1395-1401.
- Moyle R., Schrader J., Stenberg A., Olsson O., Saxena S., Sandberg G. and Bhalerao R.P. (2002) Environmental and auxin regulation of wood formation involves members of the *Aux/IAA* gene family in hybrid aspen. *The Plant Journal* 31: 675-685.
- Okuyama T., Yamamoto H., Iguchi M. and Yoshida M. (1990) Generation process of growth stresses in cell walls II. Growth stresses in tension wood. *Mokuzai Gakkaishi* 36: 797-803.
- Okuyama T., Doldán J., Yamamoto H. and Ona T. (2004) Heart splitting at crosscutting of eucalypt logs. *Journal of Wood Science* 50: 1-6.
- Yamamoto H., Okuyama T., Yoshida M. and Sugiyama K. (1991) Generation process of growth stresses in cell walls III. Growth stresses in compression wood. *Mokuzai Gakkaishi* 37: 94-100.
- Yoshida M. and Okuyama T. (2002) Techniques for measuring growth stress on the xylem surface using strain and dial gauges. *Holzforschung* 56: 461-467.

Assessment of compression wood formation in *Chamaecyparis obtusa* utilizing gene expression as an indicator

Saori YAMASHITA, Masako OKADA, Masato YOSHIDA and Takashi OKUYAMA

Gene expression patterns between compression wood (CW) and normal wood (NW) of *Chamaecyparis obtusa* were compared to develop a new method of detecting CW. Assessment based on gene expression has the advantage of being able to detect CW early. The differentiating xylem tissues in CW and NW were scraped from five inclined trunks. The degrees of CW were estimated by measuring the released strain of the growth stress and observing the anatomies. In the tree forming the severest CW, fluorescent differential display was performed to analyze differential gene expression exhibited between CW and NW. Testing band reproducibility in another tree revealed that 298 bands showed the expression patterns in common with the first tree. Selecting the appropriate bands for assessment will make it possible to detect CW formation and to estimate the degrees of CW.

Keywords: compression wood, gene expression, fluorescence differential display