

【特 集】さし木技術の進展と将来展望

スギさし木発根における遺伝子発現プロファイルの構築

—大量増殖手法の確立を目指して—

渡辺 敦史^{*,1}・田中 杏奈¹

大量増殖手法の確立を目指して

さし木は、クローン化を図る上で重要な増殖技術である。最近、森林総合研究所林木育種センター（以下、育種センター）において長年取り組んできた第二世代スギ精英樹等優良品種が普及段階に入ってきた。これら優良品種の特性を発揮するためには、さし木は最も有効な増殖形態と言える。

優良品種の原種配布はともかく、さし木による山行き苗を想定した場合には、問題点が存在する。さし穂を挿し床等で挿した場合に良好な発根が得られているかどうかについての確認は、掘り取りを行う他に手段がない。山行き苗を想定すれば、苗数は数千、場合によっては万を超えるオーダーとなる可能性があり、これら膨大な数の苗の掘り取りとその後の優良発根苗の選別にかかる労力を考えれば、如何に優良品種のさし木増殖が特性を生かす上で有効としても労力的負担は大きく、最近の方向性である省力化の趣旨に反する。そこで、さし木による山行き苗を想定した大量増殖手法開発に向けた取り組みを開始した。

労力軽減に向けた1つの解決策は、挿し床に基質として鹿沼土等土の代わりに水を利用することである。基質が水になることにより、掘り取り作業がなくなり、大幅な労力の軽減に繋がるほか、発根の段階などを容易に確認可能であり、さらに苗を束ねることで挿し床よりもより省スペースで苗木生産が可能となる。育種センター九州育種場と共同して、予備的に水を基質としたさし木発根に取り組んだところ、良好とは言えないまでも、水でも発根は認められ、解決策の1つとして示した基質を水に代える手段は荒唐無稽な策ではないことを確認した。この結果を受けて、水を基質とした現実的な植物工場化による大量増殖手法開発へと考え方を更に発展させることを試みている。

農林水産省と経済産業省が平成21年11月に公表した植物工場の事例集 (http://www.meti.go.jp/policy/local_economy/nipponsaikoh/syokubutsukojo_jireisyu.pdf) の冒頭には、「植物工場は、施設内で植物の生育環境（光、温度、湿度、二酸化炭素濃度、養分、水分等）を制御して栽培を行う施設園芸のうち、環境及び生育のモニタリングを基礎として、高度な環境制御と生育予測を行うことにより、野菜等の植物の周年・計画生産が可能な栽培施設である。」と記載されている。施設内で環境制御を行い、対象植物を周年・計画生産を行うことが植物工場であると言い切ってしまうと、施設の利用が前提にあり、その場合でも水は土よりも遥かに利点があると考えられる。それは土を交換する作業に伴う労力が水を利用することで軽減することが出来るからである。環境制御に含められた諸因子のうち、養分についても基質が水であれば液体肥料の活用により比較的容易に濃度調整が可能となり、温度制御も水であればそれほど難しくはない。

植物工場化に向けたさし木大量増殖を図る上で、基質を土から水に代える利点はここに列挙した通りであるが、本質的な問題点を解決出来なければ、植物工場化によるさし木大量増殖は画餅に帰すというよりも、非現実的であることは言うまでもない。

スギさし木に関する本質的理解に向けて

植物工場化を想定する以前にさし木については、明確にすべき課題がいくつか存在する。さし穂を採取する時期やさし木する時期はその一例として挙げることが出来る。他にも、さし穂を樹幹のどの部位から採取することが有効か、についても過去の文献からこの問題を見ることが出来る。クローンによるさし木発根率の違いは、

* E-mail: nabeatsu@agr.kyushu-u.ac.jp

¹わたなべ あつし、たなか あんな 九州大学大学院農学研究院

極めて重要な問題点である一方で、他の植物種においてもクローン間差についての本質的な理解には至っていないのが現状であり、スギでもさし木発根性には明確にクローン間差が存在するものの、その要因は不明である。林木育種においてさし木は重要なテーマであり、解説記事や話題、報告書などでさし木を取り扱った文献を目にする機会は多い一方で、スギに関して言えば学術論文の報告は1950年代が中心であり、近年ではほとんど報告はなく、英文でも見る機会が極めて少ないことも大きな問題の1つとして挙げる事が出来る。但し、学術論文として見る機会は少ないとはいえ、ここで挙げたさし木の諸問題や諸課題は、現場レベルではそれぞれについて一定の解決が図られているのではないかと予想される。実際、林木育種センターでは、前述の諸課題については一定の知見が得られるまでとなっている。

植物工場化による大量増殖手法確立に向けて本質的に解決すべき点は、また別に存在する。さし木は、基本的にある条件下もしくはある処理でさし付けを行い、その成否によって、その条件もしくは処理が適しているかどうかを判断することが一般的である。場合によっては、扱うN数を大きくし、統計的処理を加えることが出来れば、より正しく取り扱った条件や処理の適切さを評価できると考えられる。一方で、条件もしくは処理区間の成否が何に起因しているかについては基本的には不明である。例えば、さし付け後の光条件についていくつかの処理区を設定し、ある条件Aでは発根が認められたさし穂数が一定以上であったのに対し、ある条件Bではほとんどの穂で発根が認められなかった場合には、条件Aがより効果的な条件と判断できる一方で、条件Bが良好な結果が得られなかった理由を明確に説明するためには、新たに別の実験を計画する必要がある。さし木の場合には、より得苗率の高く得られる条件が見つかれば生産性向上と直結するため目的達成と判断されることが多く、条件もしくは処理区間の差異を生み出す要因の解明までに結びつかない事例は多く存在すると考えられる。その結果、学術論文としても少なくならざるを得ないのが現状ではないかと推察される。しかし、さし木発根の成否に関わる条件設定の本質的意味が理解出来れば、一定の根拠と共に更に効果的な条件検討が出来ると考えられる。

マイクロアレイ分析を利用した 遺伝子発現プロファイルの意義

植物工場化によるさし木大量増殖手法の確立を行うためには、施設を使用することを念頭に置いた上でこれまで検討されてこなかったいくつかの環境条件を検討する必要がある。これに関する具体的内容は、現在実施中であることから割愛させていただくが、発根を促す一定の環境条件が存在する可能性が示唆されている状況にある。しかし、現段階でこの環境条件が発根を促す要因の本質的理由は、これまで行われてきたさし木処理同様に不明のままである。

第5回森林遺伝育種学会シンポジウムでは、さし木に関する本質的理解に向けた遺伝子発現プロファイルに関する結果の一部を話す機会を頂いた。まだ、開始したばかりの研究で、拍子抜けした方もいたかもしれないが、本シンポでお話した内容はこれまで長々と記述してきたことを研究の最終的な目的として、さし木発根に関する理解を更に進め、諸条件下での成否をより深く理解することを目指した取り組みとなる。

遺伝子発現プロファイルをもってさし木発根の本質的理解が可能か、というご意見には耳を傾ける必要があるものの、プロテオミクスやメタボロミクス解析がまだまだ難しいスギでは、これまで行われてきた表現型による評価に、トランスクリプトミクス解析を加えるのが精一杯の状態である。とはいえ、遺伝子発現レベルの解析であり、これまでよりも一歩踏み込んでさし木発根を理解することが出来るのではないかと考えている。

遺伝子発現プロファイルを作成するため、本研究ではマイクロアレイ分析を採用した。2005年発行の植物育種学事典(日本育種学会編)では、マイクロアレイについて、「ガラス板に数千から数万のDNA断片をスポット状に固定し、細胞から抽出したmRNAを逆転写過程などで蛍光標識したものをハイブリダイズさせ、異なった細胞から抽出したmRNAを同時にハイブリダイズさせ、スキャナーによりスポットごとの蛍光強度を測定し、スポットごとの強度比から遺伝子発現量の変化を推定するのが一般的な方法」と説明されている。ここでは、異なる細胞と記述されているが、花と根のような器官が異なる細胞だけでなく、処理を行った後の時間経過に伴う遺伝子発現レベルの変化を同一器官や組織の細胞で比較することも多い。

マイクロアレイ分析の有効な点は、例えば同一組織や器官における遺伝子発現レベルでの時間的変化を数千

から数万単位の遺伝子レベルから追跡することが可能な点にあり、加えてその変化を視覚的に捉えることができる点にある。モデル生物では、遺伝子機能などが次々と明らかにされている一方で、ノンモデル生物では、遺伝子機能についてはモデル生物の知見を利用することが多い。但し、針葉樹類は、進化的位置が特異であり、被子植物で構成されるモデル植物群の知見を直接利用出来るかどうかについては、慎重な態度が必要である。マイクロアレイ分析は、細胞レベルでの変化を多数の遺伝子発現レベルの変化として定量的かつ視覚的に理解することを可能にするため、特に遺伝子情報の知見が少ない、ノンモデル生物では威力を発揮すると考えられる。既に、スギを中心として、木部 (Mishima et al. 2014) やシュート (Nose and Watanabe 2014) および雄花 (Tsubomura et al 2016) に関するマイクロアレイ分析を利用した研究報告を行っている。特に雄花形成発達段階に応じて遺伝子発現が変化する過程を明確に示した報告では、細胞学的観察と併せて雄花の発達過程をいくつかのステージに分類することが出来た。

これら既報同様に、マイクロアレイ分析を利用すれば、さし付けから発根までの過程を遺伝子発現レベルでプロファイリングできると考えられる。この遺伝子発現プロファイルのリファレンスとすれば、様々な処理に対して通常とは異なる反応を示す遺伝子からその処理の意味を細胞学的観察と併せて一歩踏み込んで理解出来る可能性が高い。

さし木発根に関する遺伝子プロファイルの構築

マイクロアレイ分析によるさし木発根過程における遺伝子発現プロファイルの構築を行うため、2015年4月にスギ精英樹筑波1号を採穂クローンとして、実際のさし付けを行った。筑波1号を選んだ理由は、精英樹特性表をはじめ、これまでの取り組みで発根が容易なクローンであることが明らかとなっていたからである。なお、さし付けは野外環境下で行い、基質には鹿沼土小粒を利用した。さし付け後、2週目からさし穂を回収し、遺伝子単離のサンプルとした。さし付け後、4週目には発根が認められたものの、5週目には発根は認められなかった。これは、露地挿しにより環境が安定しないことと、さし付けに利用した穂の状態によるものが原因と推察された。7週目まで一週毎にさし穂を回収し、マイクロアレイ分析を行った。このマイクロアレイ分析では、総数 19,360 遺伝子 (実際には遺伝子ではなく、

isotig であるが、ここでは便宜上遺伝子と記述する。以下、遺伝子として記述している場合も、実際には isotig である) が搭載されたチップを利用している。得られた結果に基づいて主成分分析した結果、発根前と発根後では、発現する遺伝子が大きく異なっていることが示唆された。RNA 抽出時に目視で根は取り除いているとはいえ、根原基がさし付け部位に残っている可能性があるため、これらは根由来の遺伝子によるものと考えられた。変化した一部の遺伝子については、さらに定量 PCR を利用して発現量の再現性を確認した。発根後 4 週目以降に急速に発現上昇する遺伝子については、モデル生物の知見と照合した結果、やはり根で発現する遺伝子と推測され、マイクロアレイ分析で認められた変化の一つは根が形成されたことによるものと考えられる一方で、同一時期に急速に発現量が低下する遺伝子も認められ、これらはさし付け部位の機能が変化した可能性を示唆するものであった。

4 月時に行った実験には、いくつかの問題点が存在する。例えば、リファレンスとすべき 0 時間目のサンプルを準備しなかったことやホルモン処理後のサンプルを採取しなかったことは大きな問題点として挙げることが出来る。そこで、これらを改善するため 11 月下旬から再度取り組みを行った。再実験を 11 月下旬に設定した理由は、前述にも示したさし付け時期の問題であり、スギの成長期に相当する時期のさし木成功率が低いとする事前の結果に基づいている。さらに、木部やシュートを対象としたマイクロアレイ分析から、9 月下旬～10 月上旬にかけてスギの遺伝子発現は、いわゆる冬期に発現する遺伝子に切り替わり、年間を通した遺伝子発現レベルでのリズムが発根に影響している可能性もこの時期に再実験を実施した理由である。

4 月期に行った実験ではさし付け後 4 週目には既にさし木発根が認められたことから、11 月期の再実験では、0 時間目 (採穂直後)、ホルモン塗布直後・1 週目から 5 週目の各週毎の時系列で再度、取り組みを行った。得られたマイクロアレイ分析結果から、ほとんど発現していない遺伝子や時期間での変動がほとんど認められない遺伝子を取り除いた約 800 遺伝子のマイクロアレイ分析結果 (ヒートマップ) を図-1 に示す。

図-1 で赤く明るく示されているところは、基点に対して発現が上昇した遺伝子であり、濃度が高くなるに従って発現量が高いことを示し、同様に青については基点から発現量が低下していることを示す遺伝子である。このヒートマップからいくつかの示唆が得られた。ホルモン塗布後から発現する遺伝子は大きく変化し、し

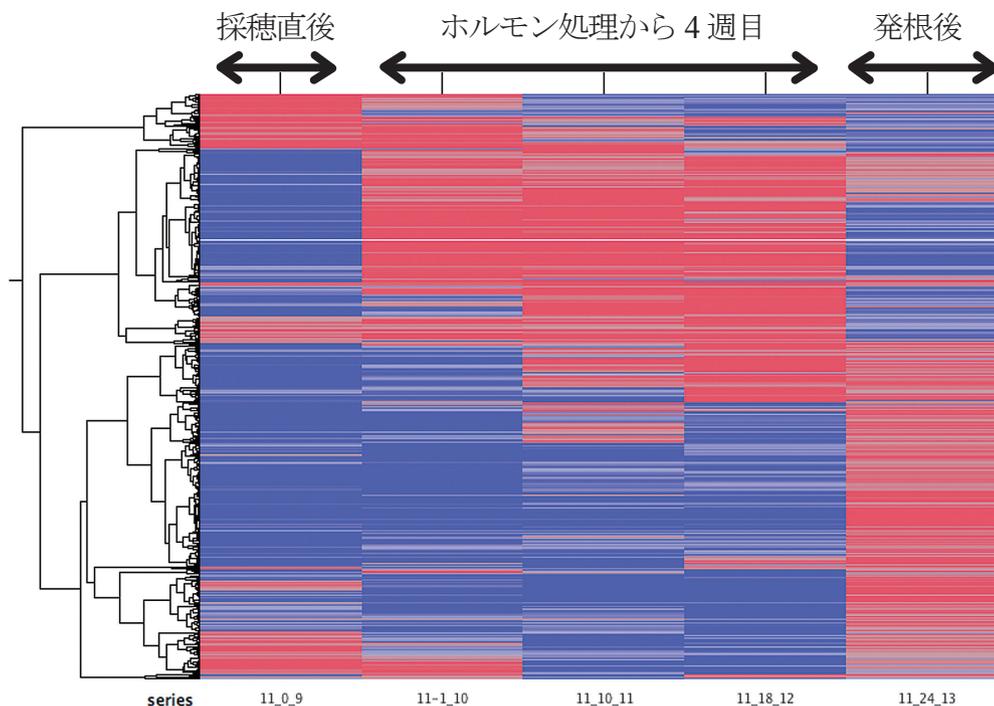


図-1 マイクロアレイ分析によるスギさし木遺伝子発現プロファイル

ばらくの間、一部の遺伝子については基本的に同一遺伝子群が強く発現する。発根時には、それまで発現していなかった遺伝子が急激に発現上昇しており、逆にそれまで発現していた遺伝子発現量は急速に低下することを示していた。

2度に亘るマイクロアレイ分析の結果から、通常のさし木工程に従った遺伝子発現プロファイルは、少なくとも3ステージに分けられることが明らかとなった。細胞学的知見でもまた、① induction もしくは activation ② initiation ③ extension の3ステージに分けられており、遺伝子発現レベルと一致する。但し、マイクロアレイ分析ではステージ間の切り替わりには連続性がなく、かなり急激に切り替わっている印象を受ける。このことから、今後さし木発根に関する遺伝子発現レベルでの研究対象は、ステージ間の変化が焦点になると考えられる。

マイクロアレイ分析を利用して遺伝子発現プロファイルの構築を行ってきたが、これにより問題点も明確化した。例えば、これまでの取り組みでは、サンプリングはあくまでも時系列に対して1つであり、反復は用意されていない。これには理由が存在し、これまで取り組んできた研究は当初の計画通りであるものの、この手法で本当に正しい結果が得られるのか、その見通しが立つまでは大規模な研究に伴うコストや労力面での負担が大きい、と判断したからである。シンポジウ

ムで紹介した内容を受けて、時系列の再設定と反復を準備する予定であり、次回分析でこれまでの再現性を確認できると共にスギさし木遺伝子発現プロファイルが構築できると考えられる。

スギ挿し木発根遺伝子発現プロファイルの利用と植物工場化を目指した条件検討

これまでの予備試験を受けて、マイクロアレイを利用したスギさし木発根遺伝子発現プロファイルについては、早い段階で構築できると考えている。この遺伝子発現プロファイルは、通常のさし木工程に従って得られたプロファイルであり、スギさし木発根における遺伝子発現レベルでのリファレンスに位置づけることが出来る。これにより、今後は、各処理条件に対する反応性を遺伝子発現レベルから検証することが可能となる。

処理条件の中でも、光やホルモンに対する処理条件の検討は極めて重要である。これら外部からの刺激応答は発根を促す要因と考えられるからである。例えば、さし穂採取の際の機械的切断が傷害応答ストレスもしくはシグナルを誘起後、内在性ホルモンの増加・減少に関与し、結果としてさし付け部位の器官もしくは組織の脱分化を含めた変化から発根を促すなどは考えられる

ストーリーの一つである。オーキシン以外のホルモン処理を外部から与えても、良好な結果が得られないとする意見は存在するものの、遺伝子発現プロファイルが手に入ることで、これら処理に対する応答はより詳細に理解出来るし、土と水との刺激応答に対する反応性の比較も同様である。光条件についても、これまでは暗所が比較的良好とする意見から、明所でもかまわないとする意見まで様々な意見が存在してきたが、光合成速度などの生理的評価に加え、遺伝子発現プロファイルが加われば、一層理解を深めるに違いない。マイクロアレイプロファイルからこれら処理に対するマーカー遺伝子を抽出できれば、より簡便にこれらの理解に貢献すると考えられる。それぞれの処理に対する応答が線として繋がり、理解が深まることで初めて実用化への扉を開けることが出来ると考えており、すぎし木発根に関する遺伝子発現レベルでの基本的な知見を整備し、その上で各処理条件に対する応答を線として整理出来れば、最も効果的な条件の抽出を可能にする。

遺伝子発現レベルでの解析は、極めて強力な手法であることは間違いない一方で、現在九州育種場を中心として、各処理条件など複数の条件に基づいて発根の成否に関する知見を蓄積している状況にある。これら地道な試験が存在し、遺伝子発現レベルでの解析が融合することで、厚みのある研究になると考えている。表題に示した大量増殖手法が確立については、ここ3～4年程度で一定の成果と共に達成できると確信している。

最後に

これまで林木育種に貢献する分子育種もしくはマ-

ーカー育種に向けた様々な基盤技術開発に携わってきた。さし木発根に関する研究は、これらとはやや趣が異なり、基盤技術に基づいて実用化に向けた条件を遺伝子発現レベルで定量化し、この定量化と実際の成否から最適な条件を見いだす試みとなる。

今回は、さし木大量増殖技術開発に向けて、現在取り組みを行っている概要を述べてきた。未発表データが多いことや詰め切れていない部分も多く、きちんとした報告をするためにはもう少し時間を要する。これらの取り組みに加えて、コンテナ苗利用を視野に入れた取り組みや林木育種におけるより現実的な植物工場の青写真を描くことも進めており、これらを紹介できる日が来るように取り組みを継続したいと考えている。

引用文献

- 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
- Nose M, Watanabe A (2014) Clock genes and diurnal transcriptome dynamics in summer and winter in the gymnosperm Japanese cedar (*Cryptomeria japonica* D. Don) BMC plant biology 14: 308
- Tsubomura M, Kurita M, Watanabe A (2016) Determination of male strobilus developmental stages by cytological and gene expression analyses in Japanese cedar (*Cryptomeria japonica*). Tree Physiology 36: 653–66