

ポストゲノムとしてのポプラ
完全長 cDNA ライブラリ
ーコレクションの整備

研究課題：ポストゲノムとしてのポプラ完全長cDNAライブラリーコレクションの整備

目

次

研究の要約 ----- 106

ポストゲノムとしてのポプラ完全長 cDNA ライブラリーコレクションの整備 ----- 111

研 究 の 要 約

I 研究年次及び予算区分

平成 15～17 年（3 か年）

予算区分：運営交付金（交付金プロジェクトⅡ）

II 主任研究者

主査：生物工学研究領域長 篠原健司

取りまとめ責任者： 篠原健司

III 研究場所

森林総合研究所・本所

IV 研究目的

生物のゲノム情報は、基礎生物学の分野にとどまらず、産業や地球環境問題といった応用分野においても革命的な効果をもたらすと予想されている。しかし、遺伝子構造や機能の確定にはゲノム DNA 配列の情報だけでは不完全であり、ゲノム上の各遺伝子から発現する mRNA（cDNA）との比較が必要である。日本では、世界に先駆けて、ヒト、マウス、シロイヌナズナ等の完全長 cDNA ライブラリーの作製と解析が行われている。一方、樹木に関しては、米国を中心とする国際コンソーシアムにより、2003 年末にポプラゲノム DNA の概要解読が終了すると言われている。同計画に関する森林総合研究所への問い合わせや国際貢献への要望も多数寄せられている。本研究課題は、ポプラゲノム解読後に到来する「ポストゲノム時代」を見据えた緊急的なバイオリソースの整備と、本研究所による当該分野への国際貢献を目的とする。具体的には、ポプラの完全長 cDNA 及びその配列情報を世界へ提供するため、完全長 cDNA ライブラリーの作製と多数の cDNA の構造解析を実施する。

V 研究方法

（1）ポプラ RNA の調製

ポプラ（セイヨウハコヤナギ、*Populus nigra* L. var. *italica* Koehne）の本葉に環境ストレス処理を行い、全 RNA を調製する。

（2）ポプラ完全長 cDNA ライブラリーの作製

mRNA を精製し、完全長鎖に富む cDNA ライブラリーを作製する。

（3）ポプラ完全長 cDNA の末端塩基配列の解析と機能分類

ポプラ完全長 cDNA クローンの末端塩基配列を解析し、各種遺伝子を機能分類する。

（4）環境ストレス応答性関連遺伝子の解析

ポプラ完全長 cDNA リソースに含まれる環境ストレス応答性関連遺伝子の発現特性を解析する。

（5）ポプラ完全長 cDNA の末端塩基配列情報のデータベース化と完全長 cDNA クローンの公的配布システムの構築

ポプラ完全長 cDNA の末端塩基配列情報を公的データベースへ登録する。また、ポプラ完

全長cDNAライブラリーに含まれるcDNAクローンの公的配布システムを構築する。さらに、インターフェイスに優れたデータベースの構築を目指す。

VI 研究結果

(研究計画表)

研 究 課 題	研究期間	研究分担
ポストゲノムとしてのポプラ完全長cDNAライブラリーコレクションの整備	15～17	生物学 形質転換研、樹木分子生物研

ポプラ完全長 cDNA クローンの末端塩基配列情報に基づき、各種遺伝子を機能分類した。最終的に、様々な機能を持つタンパク質をコードする 4,522 種の遺伝子を同定した。また、これらポプラ完全長 cDNA に含まれる環境ストレス応答性関連遺伝子の発現特性を解析した。さらに、ポプラ完全長 cDNA の塩基配列情報を公的データベースに公開するとともに、国際ポプラゲノムコンソーシアムへもそれらの情報を提供し、理化学研究所バイオリソースセンターに寄託して完全長 cDNA クローンの配布を開始した。

VII 今後の問題点

樹木のポストゲノム研究に対応したリソース整備のため、ポプラ完全長cDNAクローンの末端塩基配列解析を更に推進する必要がある。平成18年度開始の交付金プロジェクト「ポプラ等樹木の完全長cDNA塩基配列情報の充実」では、均一化したポプラ完全長cDNAライブラリーを用い、完全長cDNAを10,000種以上単離する予定である。一方、ポプラ完全長cDNAの末端塩基配列情報を公的データベースへ登録し公表したものの、利便性の高いデータベースを構築できなかった。今後、国内外の専門家と協力して、インターフェイスに優れたデータベース構築を目指す予定である。

VII 研究発表

(1) 論文・総説

- 1) Urano K., Yoshiba Y., Nanjo T., Ito T., Yamaguchi-Shinozakie K., Shinozaki K. (2003) *Arabidopsis* stress-inducible gene for arginine decarboxylase AtADC2 is required for accumulation of putrescine in salt tolerance. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 313: 369-375.
- 2) Urano K., Yoshiba Y., Nanjo T., Igarashi Y., Seki M., Sekiguchi F., Yamaguchi-Shinozaki K., Shinozaki K. (2003) Characterization of *Arabidopsis* genes involved in biosynthesis of polyamines in abiotic stress responses and developmental stages. *Plant Cell Environ.* 26: 1917-1926.
- 3) 楠城時彦 (2003)第114回日本林学会大会短信：生理部門. 林業技術 No.734: 15.
- 4) 楠城時彦 (2003)加速し始めた樹木ゲノム研究. *STAFF newsletter* 14: 7.
- 5) Nanjo T., Fujita M., Seki M., Kato T., Tabata S., Shinozaki K. (2003) Toxicity of free proline revealed in an *Arabidopsis* T-DNA-tagged mutant deficient in praline dehydrogenase. *Plant Cell Physiol.* 44: 541-548.

- 6) Oono Y., Seki M., Nanjo T., Narusaka M., Fujita M., Satoh R., Satou M., Sakurai T., Ishida J., Akiyama K., Iida K., Maruyama K., Satoh S., Yamaguchi-Shinozaki K., Shinozaki K. (2003) Monitoring expression profiles of *Arabidopsis* gene expression during rehydration process after dehydration using ca.7000 full-length cDNA microarray. *Plant J.* 34: 868-887.
 - 7) 楠城時彦・篠崎一雄・篠原健司 (2004)ゲノム科学的手法を用いた樹木の環境ストレス応答機構の解明. 日本林学会誌 86: 69-73.
 - 8) 楠城時彦 (2004) ポストゲノム時代の樹木研究. 林木の育種 211: 35-37.
 - 9) Nanjo, T., Futamura, N., Nishiguchi, M., Igasaki, T., Shinozaki, K., Shinohara, K. (2004) Characterization of full-length enriched expressed sequence tags of stress-treated poplar leaves. *Plant Cell Physiol.* 45: 1738-1748.
- (2) 学会発表
- 1) 楠城時彦・二村典宏・西口 満・伊ヶ崎知弘・篠崎一雄・篠原健司 (2004) ポプラの環境ストレス関連遺伝子群の解析. 第115回日本林学会大会学術講演集 p.204.
 - 2) 楠城時彦・二村典宏・西口 満・伊ヶ崎知弘・篠崎一雄・篠原健司 (2004) ポプラの環境ストレス関連ESTsの解析. 第45回日本植物生理学会年会講演要旨集 p. 278.
 - 3) 浦野 薫・吉羽洋周・楠城時彦・伊藤卓也・篠崎和子・篠崎一雄 (2004) 乾燥, 塩ストレス応答におけるプトレスシンとその合成に関わるAtADC2遺伝子の解析. 第45回日本植物生理学会年会講演要旨集 p. 194.
 - 4) 藤原すみれ・小田 篤・田島武臣・Martin Calvino・大越友里・黒森 崇・平山隆志・楠城時彦・篠崎一雄・鎌田 博・溝口 剛 (2004) シロイヌナズナの概日リズム制御と光周性花成. 第45回日本植物生理学会年会講演要旨集 p. 91.
 - 5) 森永紗也佳・佐々木慎弥・楠城時彦・篠原健司・堤 祐司・近藤隆一郎 (2004) ポプラペルオキシダーゼ遺伝子の単離とそれらのストレス誘導発現解析. 第49回リグニン討論会講演集 p. 25-28.
 - 6) 森永紗也佳・楠城時彦・篠原健司・堤 祐司・近藤隆一郎 (2005) ポプラペルオキシダーゼ遺伝子のストレス誘導性および部位特異性について. 第55回日本木材学会年会講演要旨集 p.122.
 - 7) 楠城時彦・二村典宏・西口 満・春日美江・篠崎和子・篠崎一雄・篠原健司 (2005) ポプラにおけるERF/AP2ドメイン転写因子の解析と環境耐性樹木作出への応用. 第116回日本林学会大会学術講演集 p.3 A21
 - 8) 堤 祐司・森永紗也佳・楠城時彦・篠原健司・近藤隆一郎 (2005) ストレス応答におけるポプラペルオキシダーゼ遺伝子の発現誘導および部位特異性. 第46回日本植物生理学会講演要旨集 p.133
 - 9) Shinohara K. (2005) Growth control of woody plants through genetic engineering. *The International Forestry Review* 7: 49
 - 10) Tsutsumi, Y., Morinaga, S., Sasaki, S., Etho, Y., Nanjo, T., Shinohara, K., Kondo, R. (2005) The peroxidase multigene family in poplar: lignification, stress-induction, and organspecific expression. IAWPS2005 International Symposium on Wood Science and Technology 1: 321-322.
 - 11) 西口 満・楠城時彦 (2006) ポプラのDNA修復遺伝子の発現様式. 第47回日本植物生理学会年会 日本植物生理学会年会要旨集 p.155
 - 12) 櫻井哲也・楠城時彦・十時 泰・秋山顕治・湯口雅大・豊田 敦・篠原健司・斉藤和季・篠崎一雄 (2006) ポプラ完全長cDNAデータベースの構築. 第47回日本植物生理学会年会要旨集 p.163
 - 13) 楠城時彦・櫻井哲也・十時 泰・豊田 敦・西口 満・二村典宏・伊ヶ崎知弘・角 友

- 6) Oono Y., Seki M., Nanjo T., Narusaka M., Fujita M., Satoh R., Satou M., Sakurai T., Ishida J., Akiyama K., Iida K., Maruyama K., Satoh S., Yamaguchi-Shinozaki K., Shinozaki K. (2003) Monitoring expression profiles of *Arabidopsis* gene expression during rehydration process after dehydration using ca.7000 full-length cDNA microarray. *Plant J.* 34: 868-887.
- 7) 楠城時彦・篠崎一雄・篠原健司 (2004)ゲノム科学的手法を用いた樹木の環境ストレス応答機構の解明. 日本林学会誌 86: 69-73.
- 8) 楠城時彦 (2004) ポストゲノム時代の樹木研究. 林木の育種 211: 35-37.
- 9) Nanjo, T., Futamura, N., Nishiguchi, M., Igasaki, T., Shinozaki, K., Shinohara, K. (2004) Characterization of full-length enriched expressed sequence tags of stress-treated poplar leaves. *Plant Cell Physiol.* 45: 1738-1748.

(2) 学会発表

- 1) 楠城時彦・二村典宏・西口 満・伊ヶ崎知弘・篠崎一雄・篠原健司 (2004) ポプラの環境ストレス関連遺伝子群の解析. 第115回日本林学会大会学術講演集 p.204.
- 2) 楠城時彦・二村典宏・西口 満・伊ヶ崎知弘・篠崎一雄・篠原健司 (2004) ポプラの環境ストレス関連ESTsの解析. 第45回日本植物生理学会年会講演要旨集 p. 278.
- 3) 浦野 薫・吉羽洋周・楠城時彦・伊藤卓也・篠崎和子・篠崎一雄 (2004) 乾燥, 塩ストレス応答におけるブトレスシンとその合成に関わるAtADC2遺伝子の解析. 第45回日本植物生理学会年会講演要旨集 p. 194.
- 4) 藤原すみれ・小田 篤・田島武臣・Martin Calvino・大越友里・黒森 崇・平山隆志・楠城時彦・篠崎一雄・鎌田 博・溝口 剛 (2004) シロイヌナズナの概日リズム制御と光周性花成. 第45回日本植物生理学会年会講演要旨集 p. 91.
- 5) 森永紗也佳・佐々木慎弥・楠城時彦・篠原健司・堤 祐司・近藤隆一郎 (2004) ポプラペルオキシダーゼ遺伝子の単離とそれらのストレス誘導発現解析. 第49回リグニン討論会講演集 p. 25-28.
- 6) 森永紗也佳・楠城時彦・篠原健司・堤 祐司・近藤隆一郎 (2005) ポプラペルオキシダーゼ遺伝子のストレス誘導性および部位特異性について. 第55回日本木材学会年会講演要旨集 p.122.
- 7) 楠城時彦・二村典宏・西口 満・春日美江・篠崎和子・篠崎一雄・篠原健司 (2005) ポプラにおけるERF/AP2ドメイン転写因子の解析と環境耐性樹木作出への応用. 第116回日本林学会大会学術講演集 p.3 A21
- 8) 堤 祐司・森永紗也佳・楠城時彦・篠原健司・近藤隆一郎 (2005) ストレス応答におけるポプラペルオキシダーゼ遺伝子の発現誘導および部位特異性. 第46回日本植物生理学会講演要旨集 p.133
- 9) Shinohara K. (2005) Growth control of woody plants through genetic engineering. *The International Forestry Review* 7: 49
- 10) Tsutsumi, Y., Morinaga, S., Sasaki, S., Etho, Y., Nanjo, T., Shinohara, K., Kondo, R. (2005) The peroxidase multigene family in poplar: lignification, stress-induction, and organspecific expression. IAWPS2005 International Symposium on Wood Science and Technology 1: 321-322.
- 11) 西口 満・楠城時彦 (2006) ポプラのDNA修復遺伝子の発現様式. 第47回日本植物生理学会年会 日本植物生理学会年会要旨集 p.155
- 12) 櫻井哲也・楠城時彦・十時 泰・秋山顕治・湯口雅大・豊田 敦・篠原健司・斉藤和季・篠崎一雄 (2006) ポプラ完全長cDNAデータベースの構築. 第47回日本植物生理学会年会要旨集 p.163
- 13) 楠城時彦・櫻井哲也・十時 泰・豊田 敦・西口 満・二村典宏・伊ヶ崎知弘・角 友

之・関原明・榑 佳之・篠崎一雄・篠原健司（2006）ポプラ完全長cDNAの大規模収集.
第47回日本植物生理学会年会要旨 p.325

（3）その他

- 1）ポプラの完全長cDNA –森林総研が大規模収集– 日刊工業新聞 2004年12月21日付
- 2）ポプラの完全長cDNAライブラリー作製 –森林総研約4500種を同定– 化学工業日報
2004年12月21日付
- 3）森林総合研究所, ポプラ完全長cDNAの大規模収集に成功 NIKKEI NET（日経新聞オンライン
配信） 2004年12月20日付

IX 研究担当者

課題担当者：楠城時彦（形質転換研究室）

研究協力者：西口 満・二村典宏・伊ヶ崎知弘（樹木分子生物研究室）

共同研究者：篠崎一雄（理研・植物科学研究センター）

ポストゲノムとしてのポプラ完全長 cDNA ライブラリー

コレクションの整備

ア 研究目的

ヒト、シロイヌナズナ、イネなど様々な生物のゲノム（全遺伝子）研究プロジェクトが活発に推進されている。これらゲノム情報がもたらす効果は、基礎生物学の分野にとどまらず、産業や地球環境問題といった応用分野においても革命的な影響を及ぼすと予想されている。しかし、遺伝子構造や機能の確定にはゲノム DNA 配列の情報だけでは不完全であり、ゲノム上の各遺伝子から発現する mRNA（cDNA）との比較が必要である。日本では、世界に先駆けて、ヒト、マウス、シロイヌナズナなどの完全長 cDNA ライブラリーの作製と解析が行われている（図 1）。一方、樹木に関しては、米国を中心とする国際コンソーシアムにより、2003 年末にポプラゲノム DNA の概要解読が終了すると言われている。同計画に関する森林総合研究所への問い合わせや国際貢献への要望も多数寄せられている。本研究課題は、ポプラゲノム解読後に到来する「ポストゲノム時代」を見据えた緊急的なバイオリソースの整備と、本研究所による当該分野への国際貢献を目的とする。具体的には、ポプラの完全長 cDNA 及びその配列情報を世界へ提供するため、理化学研究所との共同研究により、完全長 cDNA ライブラリーの作製と多数の cDNA の構造解析を実施する。

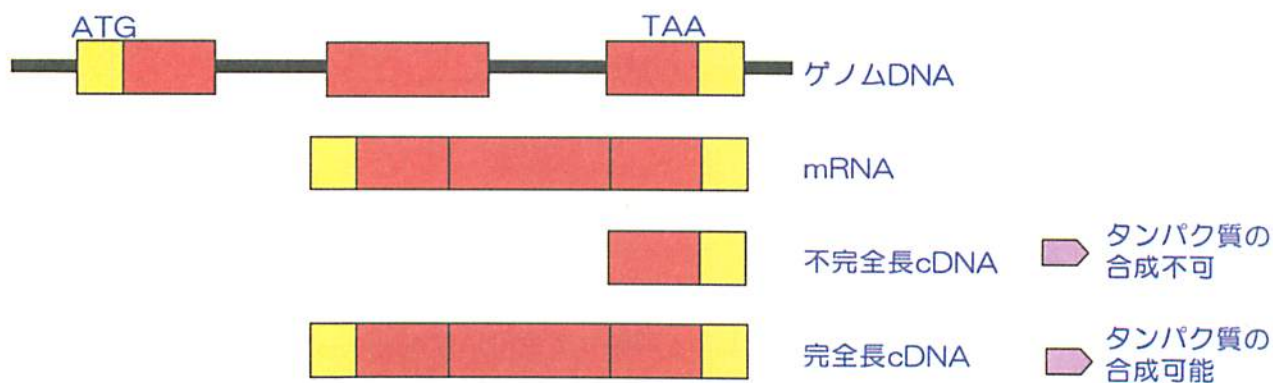


図 1. 完全長 cDNA の利点

完全長 cDNA は、完全長のタンパク質の合成、遺伝子のプロモーター領域の探索、ゲノムのアノテーションに有効利用できる。

イ 研究方法

(1) ポプラ全RNAの調製

ポプラ（セイヨウハコヤナギ、*Populus nigra* L. var. *italica* Koehne）の雌性個体由来の組織培養体本葉に環境ストレス処理（乾燥・高塩濃度・低温・高温・ABA・H₂O₂）を行った後、

Trizol試薬を用いて全RNAを調製する。また、RNA調製法を改良し、野外で生育したポプラの様々な器官・組織から高品質のRNAを調整する。

(2) ポプラ完全長cDNAライブラリーの作製

ポプラ全RNAからmRNAを精製し、オリゴキャップ法により完全長鎖に富むcDNAライブラリーを作製する。また、ビオチン化キャップトラッパー法を用い、重複の少ない均一化した完全長cDNAライブラリーを作製する。

(3) ポプラ完全長cDNAの末端塩基配列の解析と機能分類

完全長鎖に富む完全長cDNAライブラリーに含まれるcDNAクローンの末端塩基配列を解析する。それらの末端塩基配列情報とシロイヌナズナやイネ等植物のDNAデータベースの情報を比較して、ポプラ遺伝子を分類・同定する。

(4) 環境ストレス応答性関連遺伝子の解析

ポプラ完全長cDNAリソースに含まれる環境ストレス応答性関連遺伝子を用い、環境ストレス処理（乾燥・高塩濃度・低温・高温・ABA・H₂O₂）後の遺伝子発現の変化を解析する。

(5) ポプラ完全長cDNAの末端塩基配列情報のデータベース化と完全長cDNAクローンの公的配布システムの構築

ポプラ完全長cDNAの末端塩基配列情報を公的データベースへ登録する。また、ポプラ完全長cDNAライブラリーに含まれるcDNAクローンの公的配布システムを構築する。さらに、インターフェイスに優れたデータベースの構築を目指す。

ウ 結果

(1) ポプラ全RNAの調製

環境ストレス処理したポプラ組織培養体本葉から、Trizol（グアニジンチオシアネート系試薬）を用いて高品質の全RNAを調製した。調製した全RNAはA₂₆₀/A₂₈₀、A₂₆₀/A₂₃₀の吸光度の比も約2前後であり、電気泳動の結果も高品質であることを示している（図2）。また、RNA調製法を改良し、野外で生育したポプラの様々な葉芽、花芽、茎、根等様々な器官や組織から高品質のRNAを調製することにも成功した。

(2) ポプラ完全長cDNAライブラリーの作製

環境ストレス処理を施した葉から調製した全RNAを混合し、mRNAを精製し、オリゴキャップ法により完全長鎖に富むcDNAライブラリーを作製した。無作為に選抜した96種類の完全長cDNAの末端塩基配列を解析したところ、cDNAのインサート率は約80以上、平均インサート長は1.8kb、完全長率は約62%であった。そこで、この完全長cDNAライブラリーを用い、ポプラ完全長cDNAの末端塩基配列の解析と機能分類に用いた。後述するが、完全長cDNAライブラリーにはクローンの重複が多数見られた。そこで、環境ストレス処理をした葉から調

製した全RNAと野外のポプラの様々な葉芽、花芽、茎、根等様々な器官や組織から調製したRNAを混合し、mRNAを精製し、均一化工程を経た後、ビオチン化キャップトラッパー法を用い、重複の少ない均一化した完全長cDNAライブラリーも作製した。

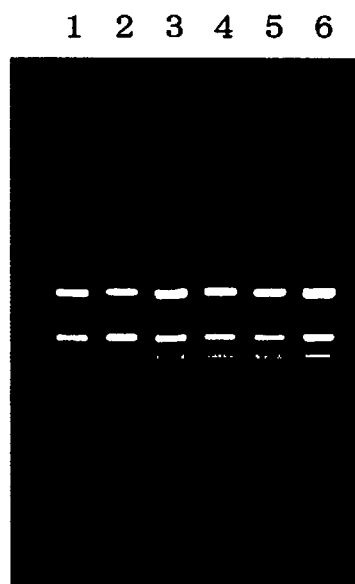


図1. ポプラ全RNAの品質

乾燥（レーン1）、高塩濃度（レーン2）、低温（レーン3）、高温（レーン4）、ABA（レーン5）、 H_2O_2 （レーン6）の環境ストレス処理を施したポプラの葉から全RNAを調製し、変性アガロースゲルの電気泳動を行い、その品質を調べた。

（3）ポプラ完全長cDNAの末端塩基配列の解析と機能分類

ポプラcDNAクローン約30,000個について、5'末端の塩基配列情報を得た。その結果、完全長cDNAライブラリーにはcDNAクローンの重複が多数見られた（表1）。選抜した約7,800個のクローンについて、3'末端の塩基配列情報を得た。それらの末端塩基配列情報とシロイヌナズナやイネ等植物のDNAデータベースの情報を比較して、最終的に4522種類の遺伝子を分類・同定した（図3）。

（4）環境ストレス応答性関連遺伝子の解析

ポプラ完全長cDNAリソースには、多数の環境ストレス応答性遺伝子の相同遺伝子が含まれていた（表2）。代表的な遺伝子を10種類選抜し（表2にリストした10番目までの遺伝子）、環境ストレス処理後1時間、2時間、5時間の遺伝子発現の変化を解析した（図4）。多くの遺伝子は環境ストレス処理後に発現誘導がみられるものの、ある遺伝子(98-i07)の発現は抑制された。また、同一の遺伝子でも環境ストレス処理毎に発現パターンの変化は異なっていた。マスタースイッチとして働くストレス応答性の転写制御因子やペルオキシダーゼをコードする遺伝子群についても、各種環境ストレス処理毎の発現誘導の差異を詳細に解明した。

表 1. 完全長cDNAライブラリー中に重複するcDNAクローンのランキング (30位以内)

ranking	annotation	number of clones (redundancy)
1	sp P12858 G3PA_PEA Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase A, chloroplast precursor (NADP-dependent glyceraldehydophosphate dehydrogenase subunit A)	1131
2	gb AAK52084.1 peroxidase [Nicotiana tabacum]	1062
3	gb AAM46780.1 AF467803_1 latex plastidic aldolase-like protein [Hevea brasiliensis]	799
4	sp P47916 METK_POPDE S-adenosylmethionine synthetase (Methionine adenosyltransferase) (AdoMet synthetase)	734
5	gb AAD27590.1 AF121261_1 elongation factor 1-alpha 1; EF-1-alpha1 [Lilium longiflorum]	642
6	ref NP_850759.1 fructose-bisphosphate aldolase, putative [Arabidopsis thaliana]	543
7	gb AAC99310.1 CONSTANS-like protein 2 [Malus x domestica]	535
8	ref NP_188317.1 glycosyl hydrolase family 19 (chitinase) [Arabidopsis thaliana]	436
9	gb AAB40396.1 glycolate oxidase [Mesembryanthemum crystallinum]	417
10	gb AAK51153.1 peroxidase [Manihot esculenta]	369
11	gb AAF42979.1 elongation factor 1 alpha [Zea mays]	247
12	emb CAC10208.1 cytosolic malate dehydrogenase [Cicer arietinum]	243
13	sp Q22342 ADT1_GOSHI ADP,ATP carrier protein 1, mitochondrial precursor (ADP/ATP translocase 1) (Adenine nucleotide translocator 1) (ANT 1)	236
14	gb AAG01382.1 AF194174_1 alcohol dehydrogenase 2 [Vitis vinifera]	229
15	db BAA23657.1 EF-1 alpha [Oryza sativa]	221
16	sp Q41249 PORA_CUCSA Protochlorophyllide reductase, chloroplast precursor (PCR) (NADPH-protochlorophyllide oxidoreductase) (POR)	198
17	emb CAC37356.1 putative membrane protein [Solanum tuberosum]	194
18	sp P93836 HPPD_ARATH 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase (4HPPD) (HPD) (HPPDase)	185
19	gb AAM65162.1 cysteine proteinase RD19A [Arabidopsis thaliana]	181
20	gb AAG61120.1 ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase activase 1 [Gossypium hirsutum]	175
21	sp P12859 G3PB_PEA Glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase B, chloroplast precursor (NADP-dependent glyceraldehydophosphate dehydrogenase subunit B)	174
22	ref NP_197875.2 CONSTANS B-box zinc finger family protein [Arabidopsis thaliana]	168
23	pir T04121 (S)-2-hydroxy-acid oxidase (EC 1.1.3.15), peroxisomal [Nicotiana tabacum]	162
24	db BAB40143.1 plasma membrane intrinsic protein 2-2 [Pyrus communis]	139
25	emb CAA66667.1 polyubiquitin [Pinus sylvestris]	136
26	gb AAM64770.1 unknown [Arabidopsis thaliana]	133
27	gb AAL69381.1 AF462218_1 putative DEAD/DEAH box helicase [Narcissus pseudonarcissus]	118
28	gb AAF86906.1 AF223358_1 triose phosphate/phosphate translocator precursor [Mesembryanthemum crystallinum]	116
29	gb AAQ74875.1 actin [Trifolium pratense]	107
30	gb AAP80800.1 class VII chitinase precursor [Gossypium hirsutum]	92

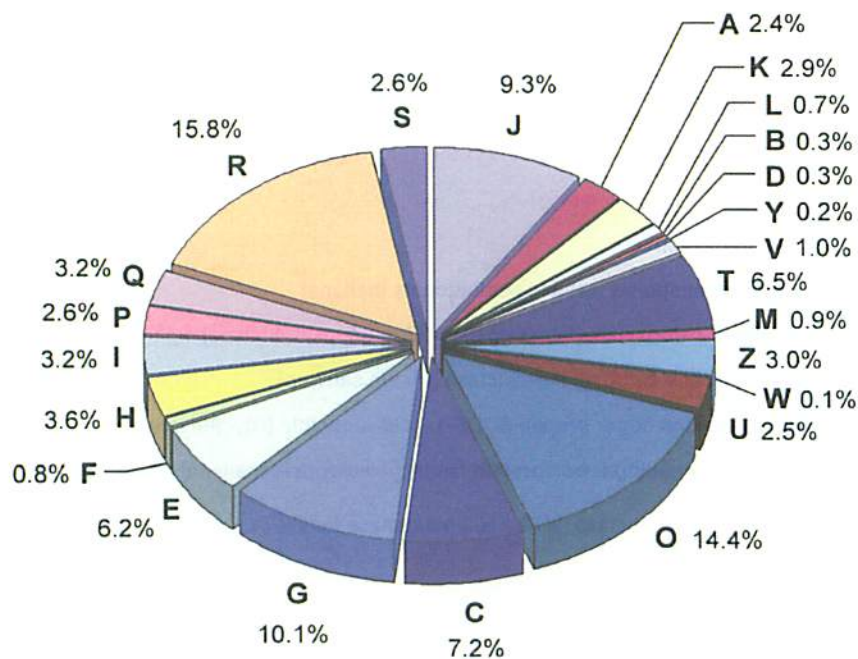


図3. ポプラ完全長 cDNA の機能分類

ポプラ完全長 cDNA をそれぞれの塩基配列がコードするタンパク質の機能によって分類した。
 J: タンパク質の翻訳, A: RNA のプロセッシングと修飾, K: 転写, L: DNA の複製・組換え・修復, B: クロマチンの構造変換, D: 細胞周期・細胞分裂の制御, Y: 核構造, V: 防御機構, T: シグナル伝達, M: 細胞壁・細胞膜の合成, Z: 細胞骨格, W: 細胞外構造, U: 細胞内輸送・分泌, O: タンパク質の翻訳後修飾・代謝, C: エネルギー生産・変換, G: 炭水化物の輸送・代謝, E: アミノ酸の輸送・代謝, F: 核酸の輸送・代謝, H: 補酵素の輸送・代謝, I: 脂質の輸送・代謝, P: 無機イオンの輸送・代謝, Q: 二次代謝産物の合成・輸送, R・S: 不明

表 2. 代表的なポプラの環境ストレス応答性関連遺伝子

annotation	number of clones	clone ID
emb CAB64356.1 alternative oxidase [Populus tremula x Populus tremuloides]	72	10-D11
ref NP_194188.1 mitochondrial carrier protein family [Arabidopsis thaliana]	166	98-i07
gb AAM34773.1 NAM-like protein 10 [Petunia x hybrida]	78	37-E09
No apical meristem (NAM) protein family (RD26) [Arabidopsis thaliana]	5	6-C18
homeobox-leucine zipper protein ATHB-7 [Arabidopsis thaliana]	3	38-K14
gb AAL06547.1 galactinol synthase (AtGolS2) [Arabidopsis thaliana]	6	8-G24
emb CAB90633.1 protein phosphatase 2C (PP2C) [Fagus sylvatica]	1	68-G16
gb AAK52084.1 peroxidase [Nicotiana tabacum]	1062	54-G19
gi 423821 pir A46295 delta 1-pyrroline-5-carboxylate synthetase - moth bean	1	40-G23
emb CAA66667.1 polyubiquitin [Pinus sylvestris]	136	29-o12
ubiquitin-conjugating enzyme, putative	13	30-G23
ref NP_173670.2 oligopeptide transporter -related [Arabidopsis thaliana]	4	73-K09
gi 15383744 delta-1-pyrroline-5-carboxylate dehydrogenase [Arabidopsis thaliana]	2	75-D03
gi 20851 emb CAA44646.1 pyrroline carboxylate reductase [Pisum sativum]	2	90-J18
gi 7488707 pir T09602 probable zinc finger protein SCOF-1, cold-inducible [Glycine max]	1	67-M24
ref NP_566009.1 Kelch repeat containing F-box protein family [Arabidopsis thaliana]	175	7-D15
gi 15239179 ref NP_196179.1 oxidoreductase, 2OG-Fe(II) oxygenase family [Arabidopsis thaliana]	103	14-L02
gi 2462661 emb CAB16749.1 catalase [Soldanella alpina]	62	58-B22
gi 6646840 emb CAB64599.1 arginine decarboxylase 1 [Datura stramonium]	34	68-D19
gi 2231615 gb AAC49815.1 4-hydroxyphenylpyruvate dioxygenase [Daucus carota]	23	58-M13
gb AAO34703.1 ethylene response factor 1 [Lycopersicon esculentum]	20	33-M08
emb CAD92449.1 amino acid permease 1 [Brassica napus]	12	11-E21
gi 18411686 ref NP_567215.1 cathepsin B-like cysteine protease, putative [Arabidopsis thaliana]	11	7-A12
gi 7488773 pir T10861 phaseolin G-box binding protein PG1 - kidneybean	11	12-E19
gi 11493822 gb AAG35658.1 transcription factor WRKY4 [Petroselinum crispum]	10	14-G13
gb AAO13360.1 dehydration-responsive element binding protein 3 [Lycopersicon esculentum]	5	55-B24
●		
●		
●		

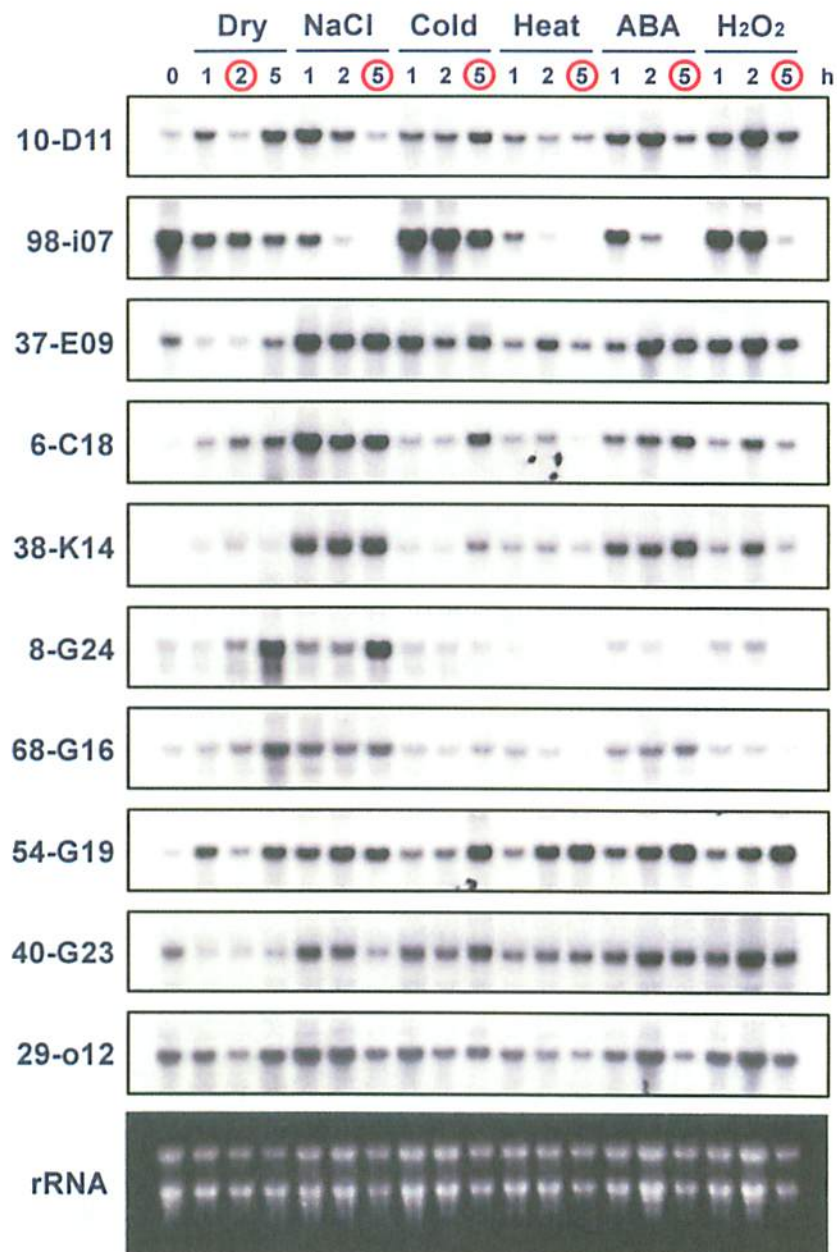


図4. ポプラ環境ストレス応答性関連遺伝子のストレス応答

(5) ポプラ完全長cDNAの末端塩基配列情報のデータベース化と完全長cDNAクローンの公的配布システムの構築

ポプラ完全長cDNAの塩基配列情報を公的データベースに公開するとともに、国際ポプラゲノムコンソシアムへもそれらの情報を提供した。また、理化学研究所バイオリソースセンターに寄託し、ポプラ完全長cDNAクローンの配布を開始した。しかし、インターフェイスに優れたデータベースの構築を目指したが、達成できなかった。

エ 考察

樹木のポストゲノムに対応したリソース整備を目指して、ポプラ完全長cDNAの収集を進めた。最終的に、様々な機能を持つタンパク質をコードする4,522種の遺伝子を同定した。樹木における完全長cDNAの大規模収集は、樹木で世界初の成功例である。また、ポプラ完全長cDNAリソースの中には、多数のストレス関連遺伝子群が含まれていた。

樹木の環境ストレス応答機構や耐性機構の解明は、砂漠緑化、温暖化防止や有害汚染物質の除去などの持続的な地球環境の保全を考える上で極めて重要な課題である。ポプラはモデル樹木であり、分子生物学的手法による樹木の環境応答機構や耐性機構の解析に適している。樹木の環境ストレス応答機構を分子レベルで理解するためには、細胞内で機能する遺伝子群の収集と網羅的発現解析が必要である。とりわけ完全長cDNAには、①完全長のタンパク質が合成できる、②遺伝子の発現を制御するプロモーター領域を正確に同定できる、③ゲノム解析に正確な情報が提供できる、といった利点がある（図1）。本研究プロジェクトにより収集したポプラ完全長cDNAは、ポストゲノム時代における樹木の基礎生物学的知見の集積に役立つだけでなく、遺伝子組換えによる環境ストレス耐性樹木の創出や優良個体を選抜する際のDNAマーカーとしての利用など、今後多方面での活用が期待される。本研究成果は、専門誌や学会に発表されただけでなく、平成16年にプレスリリース後新聞紙上にも報道された。また、国際ポプラゲノムコンソシアムからも完全長cDNAの情報提供を依頼され、国内外から高い評価を受けている。

オ 今後の問題点

樹木のポストゲノム研究に対応したリソース整備のため、ポプラ完全長cDNAクローンの末端塩基配列解析を更に推進する必要がある。平成18年度開始の交付金プロジェクト「ポプラ等樹木の完全長cDNA塩基配列情報の充実」では、均一化したポプラ完全長cDNAライブラリーを用い、完全長cDNAを10,000種以上単離する予定である。一方、ポプラ完全長cDNAの末端塩基配列情報を公的データベースへ登録し公表したものの、利便性の高いデータベースを構築できなかった。今後、国内外の専門家と協力して、インターフェイスに優れたデータベース構築を目指す予定である。

本プロジェクトを推進した結果、想定以上の成果が得られた。しかし、樹木のポストゲノム研究を加速化するため、大型予算や要員の確保が必要である。現在のところ、他のプロジェクト予算の活用や特定の研究職員の努力により推進している。今後は、一層の自助努力により、大型の外部競争資金を獲得する必要がある。

カ 要約

ポプラ完全長 cDNA クローンの末端塩基配列情報に基づき、各種遺伝子を機能分類した。最終的に、様々な機能を持つタンパク質をコードする 4,522 種の遺伝子を同定した。また、これらポプラ完全長 cDNA に含まれる数種類の環境ストレス応答性関連遺伝子の発現特性を解析した。さらに、ポプラ完全長 cDNA の塩基配列情報を公的データベースに公開するとともに、国際ポプラゲノムコンソシアムへもそれらの情報を提供し、理化学研究所バイオリソースセンターに寄託して完全長 cDNA クローンの配布を開始した。

キ 引用文献

- 1) 楠城時彦・篠崎一雄・篠原健司 (2004)ゲノム科学的手法を用いた樹木の環境ストレス応答機構の解明. 日本林学会誌 86: 69-73.
- 2) Nanjo, T., Futamura, N., Nishiguchi, M., Igasaki, T., Shinozaki, K., Shinohara, K. (2004) Characterization of full-length enriched expressed sequence tags of stress-treated poplar leaves. *Plant Cell Physiol.* 45: 1738-1748.
- 3) Tsutsumi, Y., Morinaga, S., Sasaki, S., Etho, Y., Nanjo, T., Shinohara, K., Kondo, R. (2005) The peroxidase multigene family in poplar; Lignification, stress-induction, and organ-specific expression. IAWPS2005 International Symposium on Wood Science and Technology, 1: 321-322.

(篠原健司・楠城時彦)