

次世代シーケンサーを用いたヒノキ圧縮あて材の遺伝子発現解析

(名大院生命農)佐藤彩織, ○平出秀人, 吉田正人, 松尾美幸, 山本浩之

(名大遺伝)井原邦夫

圧縮あて材形成の分子メカニズム解明を目指して、これまでもあて材部で特異的に働く遺伝子のスクリーニングがなされてきた。しかし、どんな刺激がどう細胞内に伝わってあて材が形成され始めるのか、という引き金の部分は不明なままである。そこで本研究では、より低発現の遺伝子でも検出可能なRNA-Seq解析を用いて、ヒノキ正常材、圧縮あて材間の遺伝子発現を比較した。実際に転写産物量に差が見られるかの確認は、定量PCRによって行った。比較の結果をもとに、圧縮あて材組織の特徴がどのようなメカニズムで表われるのかを考察した。

RNA-Seq による発現変動遺伝子の検出

試料採取 ~ シーケンシング



De novo アセンブリによるコンティグの作成



コンティグの相同性検索

データベース上の既知タンパク質との相同性を検索 (Blastx)
→ 22,005 個のコンティグが相同性を示した

コンティグの機能分類

COG (Clusters of Orthologous Groups) に基づくコンティグの機能分類を行ったところ、11,769 個のコンティグが 25 のカテゴリーに分類された (右図 ■)

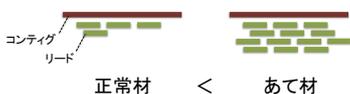
参考として、現在データベース上に登録されているヒノキ EST (発現配列タグ) を分類した結果も示す (右図 □)

→ どのカテゴリーにおいても、コンティグ (■) の方が EST (□) よりも分類される配列数が多くなっていた

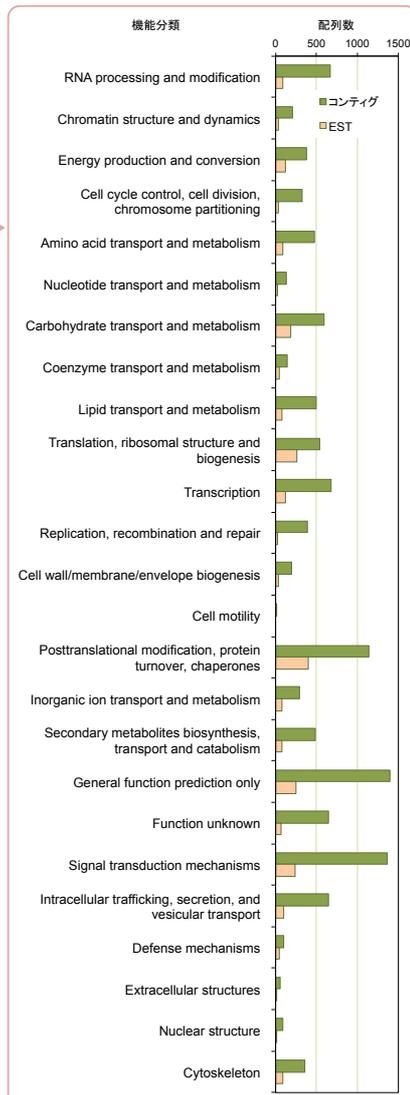
データベース上に登録されている EST よりも、今回得られたコンティグの方が幅広く転写産物を網羅できている

遺伝子発現量を比較

コンティグに各サンプル由来のリードをマッピングすることで、発現量を比較した



→ あて材で増加していた遺伝子 = 1,207 個
あて材で減少していた遺伝子 = 1,668 個



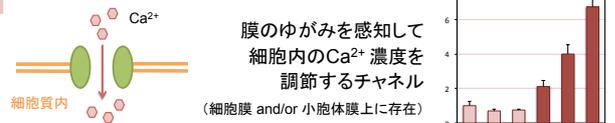
RNA-Seq で得られた結果を検証

RNA-Seq で正常材・あて材間に発現量の差が見られた 2,875 遺伝子の中から 30 遺伝子を選び、定量 PCR によって転写産物量を調べたところ、27 遺伝子については発現量の差を確認できた。以下に 6 例を示す。

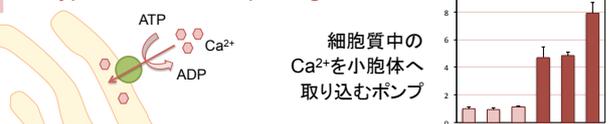
試料: RNA-Seq 解析時と同様に生育させたヒノキの苗木 6 個体
傾斜開始から 21, 25, 28 日後に分化中木部を採取

発現量 (グラフ縦軸): 正常材 (21日後) の発現量を 1 としたときの相対値

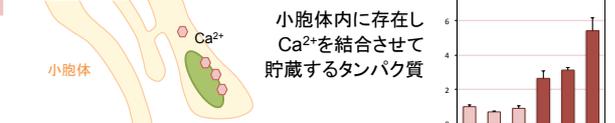
mechanosensitive ion channel



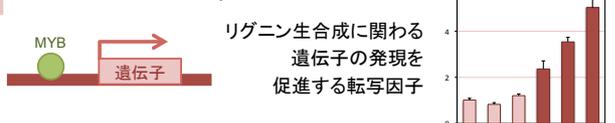
ER-type calcium-transporting ATPase



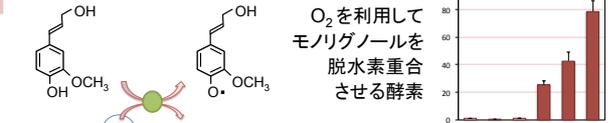
calreticulin



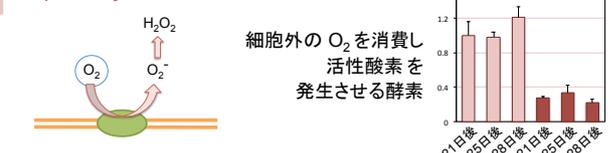
R2R3-MYB transcription factor



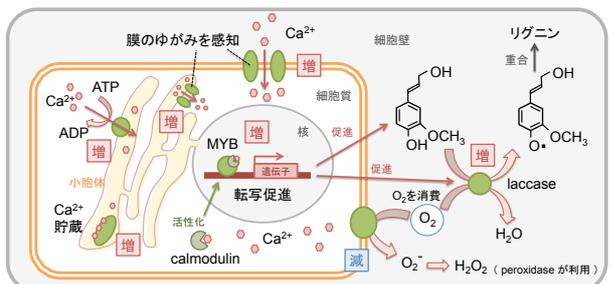
laccase



respiratory burst oxidase



圧縮あて材細胞の形成機構を考察



圧縮あて材組織が示す高いリグニン量は、細胞質内のCa²⁺濃度を調節することによって引き起こされている可能性がある