

令和 3 年 6 月 7 日現在

機関番号：14301

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2017～2020

課題番号：17K19391

研究課題名（和文）植物生理学と生態学の融合による野外光応答の実態解明と原理探究

研究課題名（英文）Integration of physiology and ecology to study light responses in a natural environment

研究代表者

長谷 あきら（Nagatani, Akira）

京都大学・理学研究科・教授

研究者番号：40183082

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,900,000円

研究成果の概要（和文）：植物は、光環境の変化を敏感に感知し、それに対して適切に応答している。実験室内における均一な環境で行われた研究により、その分子機構の詳細が明らかにされつつある。一方、複雑な野外の環境下で植物がどのように光応答しているかについては、ほとんど知られていない。そこで本研究では、野外の光環境を詳細に測定し、その特性を明らかにするとともに、野外トランスクリプトーム解析を行うことで、野外で実際に光応答している遺伝子の内容や特性を調べた。その結果、野外の光応答が、色々な面で実験室内で知られていた応答とは異なることが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究の学術的意義は、これまでほとんど顧みられることが無かった野外の光応答に真正面から取り組み、その実態の一端を明らかにしたことにある。この結果、人為的な条件下で行われてきた従来型の研究からは予想できなかったような光応答の側面が明らかにされつつある。これによって、植物のより深い理解に向けた新しい分野が拓かれる端緒となった。植物研究は、農業や環境保護などにつながる社会的にも重要なテーマであり、本研究をさらに進めることで、人類の維持・発展に資する重要な成果が得られると期待される。

研究成果の概要（英文）：Plants can perceive light stimuli and respond to them properly. Molecular mechanisms for such responses have been elucidated through the intensive experiments performed under controlled light conditions in laboratories. However, much less is known about the responses under natural complex conditions. In this study, we conducted continuous light measurements in the field and figured out its characteristics. We then collected large scale transcriptome data from plants growing in the field and identified light responsive genes. The results indicated that the responses in the field are different from ones observed in the laboratory in several important aspects. Thereby, a new research field is opened to gain deeper insights into the plant life.

研究分野：植物生理学

キーワード：光応答 野外 トランスクリプトーム 光受容体 スペクトル解析

1. 研究開始当初の背景

植物は、環境の変化を敏感に感知し、それに対して適切に応答する能力を発達させてきた。生存に必要なエネルギーを光合成によって得ている植物にとって光は、最も重要な環境要因といえる。植物が光感知能力をもつことは、光屈性やモヤシの緑化など、多くの人が知るところである。我々生理学者は、十分に制御された環境下でいわゆる生理学的実験を重ねることで、その仕組みを明らかにしてきた。特に、遺伝学、分子生物学を取り入れることで、植物の光応答に関する分子レベルの知見は飛躍的に向上した。

植物に限らず、光応答は、光受容体による光刺激の感知、光シグナルとそれに対する生理応答をつなぐシグナル伝達鎖、およびそれによって制御される具体的な生理応答に分けて考えることができる。植物の光受容体としては、古くより知られるフィトクロムに加え、クリプトクロム、フォトロボリン、UVR8 などの存在が次々と明らかにされた。シグナル伝達系についても、大きく、PIF 転写因子を介したフィトクロムのシグナル伝達系、COP1 ユビキチン化酵素 / HY5 転写因子を介したクリプトクロム / UVR8 のシグナル伝達系、膜機能に関わるフォトロボリンのシグナル伝達系などが知られる。

変異体などを駆使した最近の研究によれば、異なる光受容体の間に様々なレベルでクロストークが存在する。さらに、光シグナルと他の環境シグナルの間のクロストーク研究についても次々と明らかにされている(図1)。例えば、成長に対する高温の効果と、植物が陰に入った時に起こる避陰応答は、見かけ上よく似ているだけでなく、PIF と呼ばれるシグナル伝達因子を共有する。さらには、避陰応答に伴い、防御応答が抑制されることも明らかになった。このことは、避陰応答のシグナル伝達と防御応答のそれが緊密に関係していることを示している。

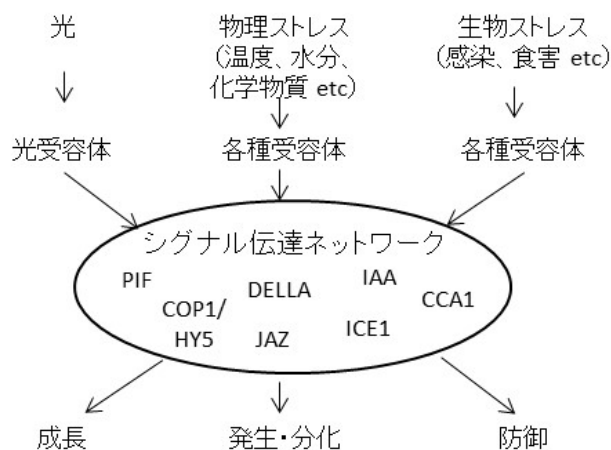


図1 環境刺激に対応する応答ネットワーク

以上のような分子レベルの知見は、全て均一の人為的実験条件下で得られたものである。一方、植物の光応答が実際に機能し、また進化してきた野外環境においては、光環境ひとつとっても、様々な時間スケールで大きく変動していることが想定される。さらには、光環境の変化と同時に、温度、湿度、病原菌の攻撃など、多種多様な環境条件が刻一刻と変化しているはずである。このように複雑に変動する野外環境下で、実験室内で明らかにされた光応答分子ネットワークがどのように作用しているのか、その実態については極端に情報が不足している。

野外における生理応答の研究は、主に生態学者によって行われてきた。最近では、野外における光応答が遺伝的背景によってどのように異なるかについて、様々な研究が行われている。一方、生理学的な立場からの野外光応答研究については、様々な困難が存在するためか、未開拓の分野として留まっている。しかしながら、環境測定機器の発達や、野外植物を材料とした分子生物学的実験手法の確立により、完全な形ではないものの、それが実現可能になりつつある。実際、研究分担者である工藤洋教授(京大・生態学研究センター)の研究グループは、野外で生育するハクサンハタザオを材料に、経年的にトランスクリプトーム解析を行うためのプラットフォームを確立しており、これを用いることによって、これまでほとんど調べられなかった野外での分子レベルの光応答について、重要な知見が得られると期待された。

2. 研究の目的

上に述べたように、本研究の最終目標は、野外で実際に起きている光応答を分子レベルで明らかにすることである。このようにして得た結果を、室内生理実験により明らかにされた光応答ネットワーク(他の刺激とのクロストークを含む、図1)と照合することで、1) 既知のネットワークを構成する個々の応答機構が、野外のどのような場面でどのくらい機能しているのか、さらには、2) これまで見逃されていたような光応答機構の存在、などが明らかになり、植物の光応答に関するさらに深い理解が得られることが期待される。以上の目標に向け、本研究では、以下のような研究を実施した。

(1) 本研究が対象とする野外ハクサンハタザオ集団を念頭に、ハクサンハタザオが実際に経験する光環境変化について、継時的な光強度測定や光スペクトル測定によって明らかにする。併せて、光シグナルとの間に強いクロストークが存在する温度応答を念頭に、気温の変化についても同様の検討を加える。また、ハクサンハタザオの生育や周囲の環境に関する経年観察を実施する。

(2) 実験室内において単色光を混合することにより、上記で明らかになった野外光環境を模した光条件を作り出し、それに対するハクサンハタザオやその近縁種であるシロイヌナズナを用いた生理応答実験を実施することにより、どのような原理で野外の光応答が起こるかを予想する。また、シロイヌナズナについては、光受容体を欠損する変異体を利用し、野外で起こることが予想される応答に各光受容体がどのように関与するかを推定する。

(3) 上で述べた野外トランスクリプトーム解析プラットフォームを利用して、トランスクリプトームの経年変化を追跡するとともに、同時的・同所的な環境測定を行いデータを集積する。これらについて様々な情報工学的な解析を行い、特定の光パラメータや温度パラメータの変化に対して応答し、発現量を変化させる遺伝子を選別する。さらに、それらがどのような様式で光や温度に応答しているのか、あるいは、どのような機能を持った遺伝子群を含むか、を明らかにすることにより、野外光応答において卓越している光応答モードや、その機能的意義について考察する。

3. 研究の方法

(1) 植物材料、調査地

本研究に用いる植物種はシロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*) と、同じ *Arabidopsis* 属のハクサンハタザオ (*Arabidopsis halleri* subsp. *gemmifera*) である。二種は近縁であるが、前者が一年草であるのに対して、後者は多年草である。シロイヌナズナを用いた生理実験には、野生株である Ler とそこから派生した *phyA*, *phyB*, *cry1cry2* 変異体などを用いた。トランスクリプトーム解析には、工藤らが兵庫県多可郡に設定したトランスクリプトーム解析プラットフォーム内に自生するハクサンハタザオ集団を用いた。ハクサンハタザオを用いた室内実験には、京都府京都市左京区の各自生地から採取した個体から、栽培室内でクローン繁殖したものをを用いた。また、光環境測定は、上記プラットフォームに加えて、京都市左京区鞍馬町のハクサンハタザオ自生地を中心に行った。鞍馬調査地においては、上記に加えて、栽培維持システムのクローン個体の野外栽培と観察も行った。

(2) 環境測定

野外光強度解析は、トランスクリプトーム解析プラットフォーム内に設置した自動測定器によって記録した 2017 年 6 月~2018 年 9 月の 1.25 年分の 10 分間隔データを用いた。さらに、気温の推移についても同機器を用いて記録した。これに加えて、鞍馬調査地および京都大学理学研究科附属植物園において、簡易スペクトロラジオメーターを用いて、野外光のスペクトルを手動、半自動で測定した。

(3) 室内光応答実験

シロイヌナズナについては、種子から寒天培地上で生育させた芽生えについて光処理を行い、典型的な光応答である胚軸伸長阻害を測定した。ハクサンハタザオについては、鉢植えで生育させた若いロゼット植物について、やはり光応答が良く研究されている葉柄伸長の阻害について調べた。光処理には、青、赤、遠赤色 LED の光を目的に応じて混合したものをを用いた。すべての実験は 22 度で行った。

(4) トランスクリプトーム解析

トランスクリプトーム解析には、上記プラットフォーム内で生育する 5 個体について、毎週 1 回、12:00 前後に若い葉を採取し、工藤らが開発した方法で RNA-seq 解析を行った。用いたデータは、2017 年 6 月~2018 年 9 月の 65 週分のデータとなる。これらの個体の近傍では、光強度と温度の連続記録も行った。得られたトランスクリプトームデータおよび光・温度データの解析は、パーソナルコンピューター上で、R 言語、Cytoscape 等のソフトを用いて行った。

4. 研究成果

(1) 環境測定

光強度の変化

光強度の解析には、兵庫県多可郡で測定した 2017 年 6 月~2018 年 9 月の 1.25 年分の 10 分間隔データ (調査地内 4 か所) を用いた。これらのデータから、光応答と関係しそうな各種パラメータ (例: 10:00-12:00 の平均値、前日没前 3 時間の平均値など) を抽出し、同期間内の日々の変化を解析した。その結果、1) 日々の光強度の変化幅 (= 天気による変化) は、長期的な季節変化による変化幅よりもはるかに大きいこと、2) 当日の値と前日の値の相関は低く、ある日の値からその前後の日の値を予想することはむずかしいこと、等が明らかとなった (図 2)。

光スペクトルの変化

光スペクトルの測定は、主に鞍馬調査地において、様々な季節、天気の下で行った。測定したデータから、光応答に関係する青、赤、遠赤色光成分の値を抽出しプロットした結果、1) 赤と青の成分比はいつでもほぼ 1 であること、2) フィトクロムの応答に直接関わる R:FR 比は、ごくまれに 0.2 程度に下がるものの、概ね高い値を示すこと、3) R:FR 比の低下は、可視光領域の著しい光量低下を伴うこと、4) R:FR 比が下がるのは晴天の日に限られること、などが明らかとなった。

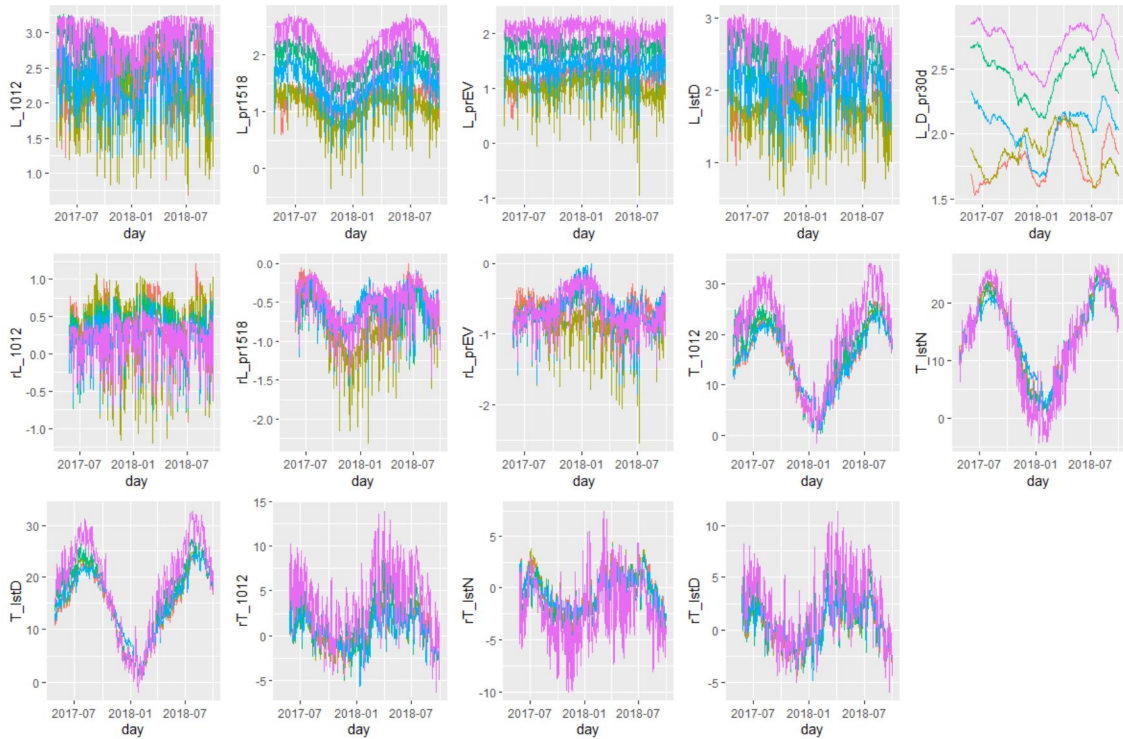


図2 1.25年間にわたる各種環境パラメーターの日々の変化

温度の変化

光強度の変化に比べて、日々の温度変化は小さく、むしろ季節による規則的な変化の方が大きかった(図2)。一方、光パラメーターと温度の相関は予想より低く、必ずしも「天気」と気温の傾向が一致しないことが分かった。

(2) 室内光応答実験

ハクサンハタザオの葉柄伸長

上記の結果をもとに、青、赤、遠赤色 LED 光を組合せ、典型的な晴天/直射、曇天、晴天/木陰の3条件を再現した。まず、これらの光条件についてハクサンハタザオの葉柄応答を調べたところ、シロイヌナズナや他の植物種で知られているように、晴天/木陰条件では明確な伸長促進が見られた。一方、曇天では晴天/木陰条件ほど顕著ではないものの、一定の効果が認められた。

シロイヌナズナの光受容体欠損変異体の胚軸伸長応答

上記のような混合光への応答に、それぞれの光受容体がどのように関与するかを知るため、シロイヌナズナの変異体を用いた実験を行った。その結果、ハクサンハタザオが経験するような環境における光スペクトルおよび光強度の変化に対しては、それぞれの光受容体 (phyB, phyA, cry1cry2) が、対応するスペクトル成分に単純に応答するだけでなく、お互いの働きを複雑に抑制していることが分かった。すなわち、自然環境下における光受容体の働きを理解するには、相互作用の理解が不可欠であることが分かった。

(3) トランスクリプトーム解析による光応答遺伝子の抽出

5個体、2017年6月~2018年9月の65週分のデータ(合計325トランスクリプトーム)を用いて、光応答遺伝子の選別を行った。予備解析の結果から、季節によって光応答が異なる場合があることが予想されたため、データを四季(3か月)を元に、2017年夏、2017年秋、2017/18年冬、2018年春、2018年夏の5期に分けて解析を行った。

各季節について、正午に行われた試料採取を起点に、2時間前までの光強度の平均値を各トランスクリプトームについて求め、光パラメーターと発現レベルが統計的に有意に相関する遺伝子を抽出した。さらに、植物による応答の差、応答の強さ、季節ごとの応答の差などについてAMNCOVA解析を行い、不適切なものを排除し、季節的な応答パターンをもとに「通年応答型210遺伝子」、「通年応答季節シフト型182遺伝子」、「夏応答型303遺伝子」、「冬応答型112遺伝子」の4型に排他的に分類した(図3)。

これらの野外光遺伝子の内容を見ると、典型的な避陰応答遺伝子として知られる遺伝子は予想以上に少なかった。今回試料とした植物は、大きな光強度の変動にさらされていたものの、

R:FR 比の変化はそれほどではなかったと推定されるため、このような結果となった可能性がある。一方、青色光の強度低下に応じて発現が上昇する遺伝子については、ある程度の応答が見られた。

上記の光応答遺伝子について過度に検出された GO term を調べたところ、「夏型」「通年季節シフト型」については、物理的ストレス応答に関する term が多数見られた。ヒートショックタンパク質や ROS 防御遺伝子の発現が光によって増加することが報告されており、このような応答が野外では非常に重要なものかもしれない。一方、「冬型」「通年型」については、光応答であることが知られているフラボノイド合成などが見られた。さらに「通年型」については、植物ホルモン応答に関連する遺伝子が含まれることも分かった。すなわち、よく知られている光応答が確かに起きていることが確認されたが、それが冬に顕著であった点は非常に興味を持たれる。また、検出されたホルモン応答は、従来知られていたオーキシン応答以外にも様々なホルモンに対する応答を含んでおり、光応答に関する植物ホルモンについても、野外応答においては見直しが必要な可能性が示唆された。

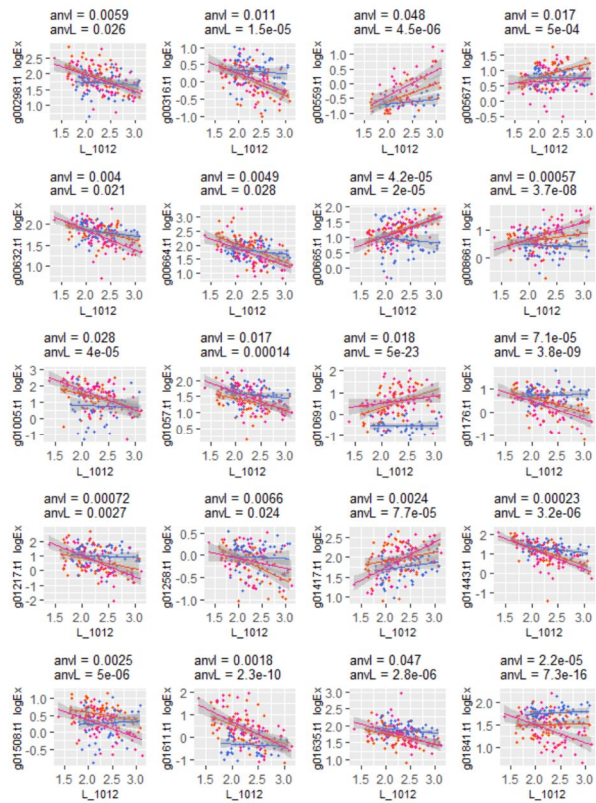


図3 夏型応答遺伝子の一例

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計1件（うち査読付論文 1件/うち国際共著 1件/うちオープンアクセス 0件）

| | |
|---|-----------------------|
| 1. 著者名 Ikeda Hajime, Suzuki Tomomi, Oka Yoshito, Gustafsson A. Lovisa S., Brochmann Christian, Mochizuki Nobuyoshi, Nagatani Akira | 4. 巻 231 |
| 2. 論文標題 Divergence in red light responses associated with thermal reversion of phytochrome B between high and low latitude species | 5. 発行年 2021年 |
| 3. 雑誌名 New Phytologist | 6. 最初と最後の頁 75 ~ 84 |
| 掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） 10.1111/nph.17381 | 査読の有無 有 |
| オープンアクセス オープンアクセスではない、又はオープンアクセスが困難 | 国際共著 該当する |

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 1件/うち国際学会 1件）

| |
|---|
| 1. 発表者名 大月亮太 et al. |
| 2. 発表標題 強い陰環境におけるphyA 依存的な避陰応答抑制に関する研究 |
| 3. 学会等名 第60回 日本植物生理学会年会（名古屋） |
| 4. 発表年 2019年 |

| |
|---|
| 1. 発表者名 Akira Nagatani et al |
| 2. 発表標題 A full-year transcriptome analysis of the light response of Arabidopsis halleri subsp. gemmifera in a natural environment. |
| 3. 学会等名 International Symposium on Plant Photobiology 2021（招待講演）（国際学会） |
| 4. 発表年 2021年 |

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

京都大学大学院理学研究科 長谷研ホームページ
<http://physiol2.bot.kyoto-u.ac.jp/HP3/>
 京都大学大学院理学研究科 生物科学専攻植物学教室ホームページ
http://www.bot.kyoto-u.ac.jp/j/1_seiri.html
 京都大学大学院理学研究科植物生理学研究室ホームページ
<http://physiol2.bot.kyoto-u.ac.jp/HP3/index.html>
 京都大学大学院理学研究科植物学教室ホームページ
<http://www.bot.kyoto-u.ac.jp/j/index.html>

6. 研究組織

| | 氏名 (ローマ字氏名) (研究者番号) | 所属研究機関・部局・職 (機関番号) | 備考 |
|-------------------|---------------------------|-----------------------|----|
| 研究 分 担 者 | 工藤 洋 | 京都大学・生態学研究センター・教授 | |
| | (Kudoh Hiroshi) | | |
| | (10291569) | (14301) | |

7. 科研費を使用して開催した国際研究集会

〔国際研究集会〕 計0件

8. 本研究に関連して実施した国際共同研究の実施状況

| 共同研究相手国 | 相手方研究機関 |
|---------|---------|
| | |