

令和 4 年 6 月 23 日現在

機関番号：11201

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2018～2021

課題番号：18K19319

研究課題名（和文）秋において植物が温度ノイズの中から冬を感知するメカニズム

研究課題名（英文）Mechanism by which plants in autumn sense the winter coming through noisy changes in air temperature

研究代表者

河村 幸男（Kawamura, Yukio）

岩手大学・農学部・准教授

研究者番号：10400186

交付決定額（研究期間全体）：（直接経費） 4,800,000円

研究成果の概要（和文）：植物の低温馴化の分子メカニズムに関する研究は、単純な人工環境で行われてきたため、依然、野外での季節感知メカニズムは全くの未知であり、推測の域を出ていない。本課題では、まず、野外での凍結耐性の変遷と気象データを合わせ、機械学習による解析を行ったところ、野外の馴化では植物は日長では無く温度変化を鋭敏に読んでいる可能性が示唆された。また、それぞれの温度域で特徴的な馴化制御がある可能性がRNA-seq解析から明らかとなった。一方で、秋から冬にかけての平均的な気温変化を再現した人工気象器を用いた実験により、フィトクロムを介した日長による馴化制御は12月以降の真冬のみが生じている可能性が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究では、野外データと気象データを組み合わせ、また、機械学習も導入することにより、植物は温度に対し鋭敏に対応し、温度域により低温馴化制御のメカニズムが異なることが明らかに出来た。野外実験では気象データを含む膨大なデータが生じるが、機械学習を用いることにより生理学的データと結びつけられ、生理変化をもたらす野外環境の因子を特定できる可能性を示せたことは、本研究の大きな成果であった。また、これまで日長や光質の季節変化も植物の冬季感知に用いられている可能性が指摘されていたが、野外実験や野外を再現した人工気象器を用いた実験により、これらの可能性が低いことが示せたことも学術的な意義が高いと考える。

研究成果の概要（英文）：Studies on the molecular mechanisms of cold acclimation in plants have been carried out in simple artificial environments, so the mechanisms of seasonal sensing in the field remain completely unknown. In this study, changes in freezing tolerance in the field and weather data were combined and analyzed by machine learning. As a result, it was suggested that in field cold acclimation, plants may mainly use temperature change, not photoperiod, for the control of cold acclimation. RNA-seq analysis revealed the possibility of a characteristic control of acclimation in each temperature range. On the other hand, an experiment using growth chamber which simulated the average temperature change from autumn to winter suggested that the control of cold acclimation by day length through phytochrome occurred only in the mid-winter after December.

研究分野：植物生理学

キーワード：低温馴化 植物 冬季感知 温度ノイズ 季節情報 機械学習

1. 研究開始当初の背景

古くからの多くの研究により、低温馴化の引き金となる第一環境要因は低温であることが示されてきた(酒井 1982)。そこで、野外での低温馴化と人工的な低温環境下での低温馴化とは基本メカニズムが同じであると仮定され、多くの研究がなされてきた。例えば、人工気象器内の一定の下で低温馴化が行われ、その馴化プロセスや凍結耐性向上の分子メカニズムが解明されてきた。加えて、日長の短日化も低温馴化に影響することが知られていたが、近年、この現象がファイトクロムを介した制御であることが、分子レベルで示された(Franklin & Whitelam Nat Genet 2007, Lee & Thomashow PNAS 2012)。この様にして、零下になる前の季節感知は、気温低下と日長の組み合わせにより行われていることが推定され、秋における冬季感知のメカニズムは明らかになったように一見思える。しかし、実際の野外環境は複雑で、特に、温度変化はかなり複雑である。気象庁データベースにある盛岡市内での1時間毎気温変化を観察しても、1)温度の日周変化や2)日ごとのランダムな温度上下、すなわち温度ノイズにより季節変化の情報は埋もれ、1週間程度の気象データからは季節は読み取れないように見える。しかし、植物は確実に1週間の情報からでも季節を読み取り低温馴化を行える。依然、植物が季節情報を取り出すメカニズムは全くの未知であり、植物が野外でどの様に冬季の到来を感知しているかはほとんど推測の域を出ていない。

2. 研究の目的

本課題では、この野外における冬季感知の問題に正面から取り組み、1)植物が温度ノイズの中から冬季感知に利用している環境パラメーターを特定し、2)その分子メカニズムの解明を目標とする。具体的には、まず、野外生理学実験と気象データを組み合わせる新たな実験系を築き、その結果、得られる環境パラメーターを人工環境で検討を行う。また、低温感知と短日感知を繋ぐキーファクターとしてフィトクロムに着目し、遺伝学的実験も①と②の実験に組み入れる、④最終的にトランスクリプトーム解析を行い、①～④の結果を総合的に判断し、植物の冬季感知の問題に取り組む。

3. 研究の方法

(1) 秋における冬季感知に関与する環境パラメーターの特定

野外環境におけるランダム性を利用した環境パラメーターの特定

本実験では、人工気象器かつ寒天プレートで育てた均一な状態の植物サンプルを用いて、1週間の低温馴化処理を、直達光の当たらない野外環境で行い(野外処理)、凍結耐性試験により馴化の深まりを測定した。また、凍結耐性試験は大量の試験を行うため比較的簡便な光合成活性 Fv/Fm を指標とした方法を用いた。加えて、野外処理と同じ場所において、寒天プレート内およびその外気の気温を2分間隔で、また、360nm から 780nm の 1nm 間隔の波長分布を 10 分間隔で測定を行い、気象データを集めた。この実験を 2018 年 8 月より定期的に(3日毎など)行い、馴化の程度およびその期間の気象データを組み合わせ、機械学習により解析を行った。

上記の実験で特定された環境パラメーターの人工環境での確認

上記の実験では、依然、曖昧性が残るため、人工環境での確認を行う。の実験で特定された環境パラメーター(例えば、日長や温度日較差、閾値温度以下の時間など)を単独もしくは複数組み合わせ、冬季感知に必須の環境パラメーターの特定を行う。

(2) 冬季感知の分子メカニズムの解明

日長と温度変化の情報の分子的相互作用

日長の短日化が低温馴化制御に関与することはこれまで報告されてきた。シロイヌナズナにおいては、フィトクロム PHYB が日長による低温馴化プロセスの制御を結びつけるキーファクターであることが明らかになりつつある。一方で、シロイヌナズナにはフィトクロムが A から E までがあるが、同じ低温馴化条件で、全てのフィトクロムの影響が検討されたことはない。そこで、それぞれの欠損株を用いて、野外および人工環境での低温馴化処理を試み、特にどの環境パラメーター感知に関与しているかについて検討を行う。

トランスクリプトーム解析による季節段階に応じた馴化の発現レベルでの特徴付け

野外および人工環境での実験においてサンプリングを行い、各段階の馴化を特徴付けるポイントにおいてマイクロアレイ解析を行い、発現レベルでの特徴付けを試みる。また、関

与が明らかになったフィトクロムについても欠損株により検討を行う。

4. 研究成果

(1) 野外での光質変化

これまでのフィトクロムによる低温馴化制御の研究から、秋から初冬にかけての赤/遠赤光の比率の低下が低温馴化に影響する可能性が指摘されていた。実際に、16 においては、赤/遠赤光の比率が低下すると *COR15A* などの低温誘導性遺伝子の発現が誘導され、また、凍結耐性も上昇することが報告されている (Franklin & Whitelam 2007)。しかし、日中における光の波長分布の季節変化を記録したデータが無く、また、日周変化のデータも限定的であった。本研究では、2年間にわたり、直達光の当たらない野外での馴化处理を行った同じ場所で、10分間隔で測定を行い続けた。赤光 (650-670 nm) /遠赤光 (720-740 nm) の比率を計算しグラフ化したところ (図 1)、日周変化では日の入り後よりこの比率の低下は見られた。一方で、季節性による赤光/遠赤光の比率は、5月から10月の間は、他の月と比べて低い傾向が見られた。この結果は、季節的な波長変化による低温馴化プロセスの制御がない事を意味し、少なくとも盛岡では、この気象パラメータによる季節感知の可能性が低いことが見出された。

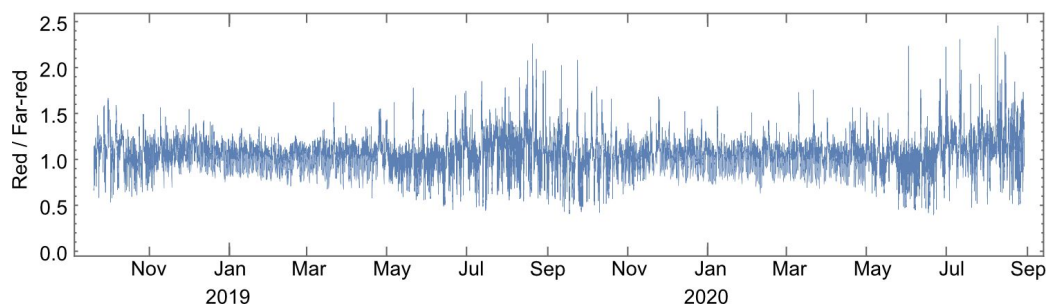


図 1. 赤光 (650-670 nm) /遠赤光 (720-740 nm) の比率の季節的な変遷

(2) 野外での低温馴化

凍結耐性試験の解析では、シグモイド曲線による数理解析を導入した (図 2)。その結果、一般的な耐凍性を示す死亡率 50% 温度 (LT50) 以外にもう一つのパラメータとして LT50 の温度における傾斜 (LT50 傾斜) を加えることにより、凍結耐性全体の特徴を示せることが明らかとなった。次に、野外での低温馴化を 2018 年 9 月から 2019 年 3 月まではおよそ 3 日おきのペースで、また、2019 年 4 月から 12 月まではおよそ 2 週間おきのペースで行い、全ての試験区で凍結耐性試験を行い、シグモイド曲線による解析で LT50 および LT50 傾斜を計算した。まず、LT50 は 10 月中頃から低下し、12 月後半から 1 月にかけて最低値、すなわち最大の凍結耐性を獲得したことを示した (図 3A)。一方、LT50 傾斜は対数値で示した方が、より変化を鋭敏に示せた (図 3B)。季節的な変化の傾向は LT50 と似たようなものではあったが、変動の相対的な大きさは LT50 よりも大きな傾向が見られた。この両パラメータの特徴と季節的な凍結耐性の変遷との関係を明らかにするために、LT50 を縦軸に、LT50 傾斜を横軸に取ったプロットをおこなった (図 3C)。その結果、凍結耐性の季節的な変遷は大きく 2 つのパターンに分かれ、1 つ目は主に LT50 傾斜のみで凍結耐性を調整するパターン、2 つ目は LT50 および LT50 傾斜の両方で調節するパターンになった。1 つ目のパターンは、夏から秋にかけてみられ、凍結耐性を必要としない時期での特徴的なパターンであった。一方、2 つ目のパターンは、晩秋から次の年の春の初め頃まで見られ、凍結耐性を十分に上げる必要があるときに見られるものであった。

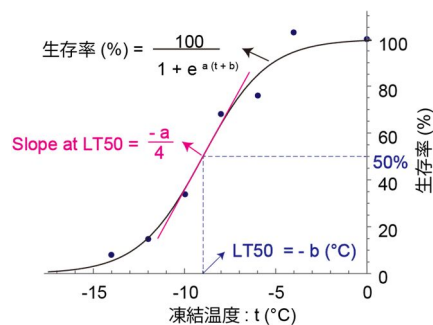


図 2. シグモイド曲線による凍結耐性の数理解析

(3) 機械学習による解析

次に、凍結耐性の季節的な変化に關与するパラメーターを特定するために、機械学習により、日長および気温変化の気象データより凍結耐性が予測できるかを試みた。まず、複数ある機械学習の方法のうち、最もよい方法を検討するため、野外実験で得られた 67 組全てのデータを用いて気象データから正確に凍結耐性を予測できるものを検討した。その結果、ベイズ線形回帰が最も適したものであることが明らかとなった。また、この検討過程で気象データも、日長と温度の組み合わせ、温度のみ、日長のみで検討を行ったが、温度のみのデータで正確に凍結耐性が機械学習で得られることが明らかとなった。一方で、上記の検討は未知データによる予測ではないので、実際に、ベイズ線形回帰による機械学習でどの程度の予測が出来るかは分からない。そこで、1 個抜き交差法、すなわち、全データのうち 1 組だけ取り除いて予測モデルを作り、残りの 1 組のデータを使用し、得られた予測モデルによる未知データ予測を検討する方法を試みた。その結果、完全なる予測は出来なかったものの、予測値と実験値との平均的なズレは $-0.056 \pm 1.5^\circ\text{C}$ であった。正確なシミュレーション実験を行うには精度不足であり、今後、更なるデータを必要とするが、以上の結果は、凍結耐性の季節的な変遷が、周囲の気温変化に鋭敏に反応していることを示す。

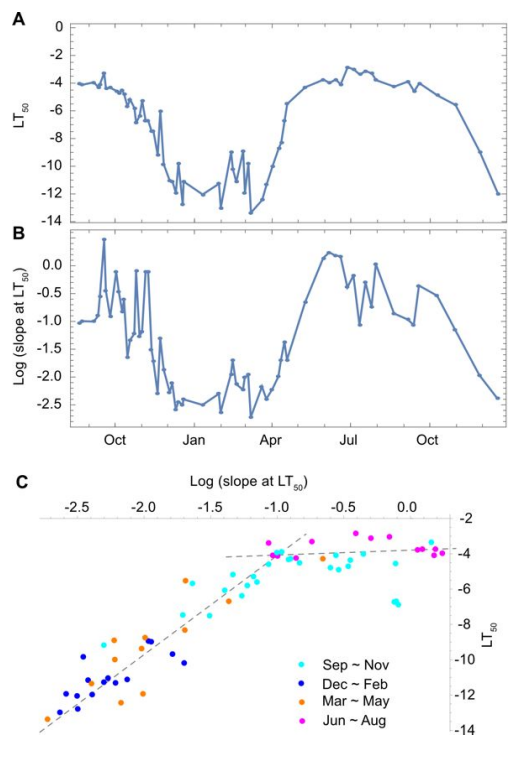


図 3 . 野外馴化における凍結耐性の季節的な変遷。凍結耐性は LT50 (A) および LT50 傾斜 (B) により示される。また、LT50 を縦軸に、LT50 傾斜を横軸に取ったプロットも行った (C)。

(4) 野外馴化での RNA-seq 解析分子メカニズムの解明では、野外馴化での RNA-seq 解析を行った。野外での馴化は 2019 年 9 月から 2019 年 12 月の間で 5 つの異なる季節で行われ、また、各 1 週間の馴化期間の間に計 12 回のサンプリングが行われた。また、低温馴化の 1 つの基準として、2 一定 12 時間日長での人工条件でも RNA-seq 解析を行った。まず、凍結耐性は季節と共に上昇することが確認され、また、10 月末より大きく凍結耐性が上昇し始めることが確認された(図 5 左図)。次に、RNA-seq のデータを用いて PCA 解析を行ったところ、9 月中旬から 10 月末まではそれぞれ大きく異なるが、11 月下旬以降は 2 一定の低温馴化の結果に近くなった(図 5 右図)。

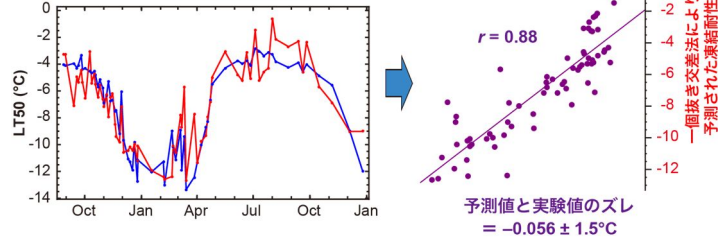


図 4 . 気温データを用いた機械学習による凍結耐性を予測

次に、低温馴化制御に深く關与する 3 つの CBF 転写因子について挙動を見たところ、まず、9 月中旬から 10 月末までほとんど発現が見られなかった。11 月下旬および 12 月中旬では発現量が非常に増えたものの、両季節のパターンは異なり、また、2

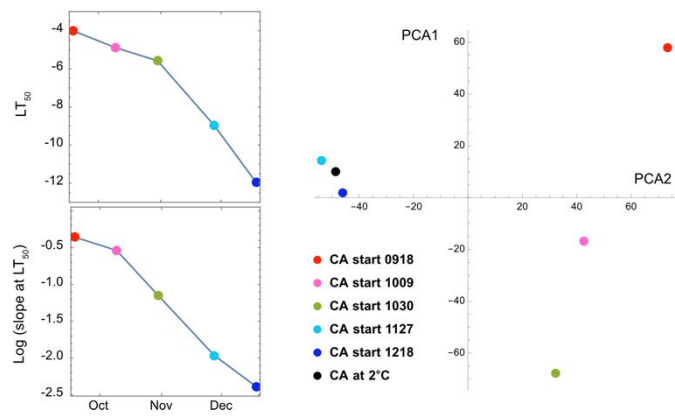


図 5 . 野外馴化における RNA-seq 解析は 5 つの季節で行われ、その時の凍結耐性も測定された (左図)。PCA 解析を行ったところ、季節的な特徴が見られた (右図)。

一定の人工的な低温馴化でのパターンとも異なった。次に、凍結耐性の上昇に直接関すると推定されている *COR* 遺伝子群の一部のものについて見たところ、*CBF* 遺伝子の発現とは異なり、11月下旬以降の結果は2一定の低温馴化の結果と似ていた。また、*COR15A* や *COR6.6* は10月下旬からも上昇していることが明らかとなった。以上の結果より、1) 10月末頃の晩秋までの低温馴化の制御メカニズムと11月末以降の初冬からの低温馴化の制御メカニズムは異なる可能性が高いこと、2) 初冬からの低温馴化の制御メカニズムは *CBF* 転写因子を中心としたメカニズムは人工的馴化と変わらないが、細かい制御で異なる可能性が高いこと、3) 一方で、*COR* 遺伝子群などの凍結耐性の上昇などに関わる遺伝子は、制御メカニズムに関わらず結果的に必要な分だけ上昇すること、が考えられた。

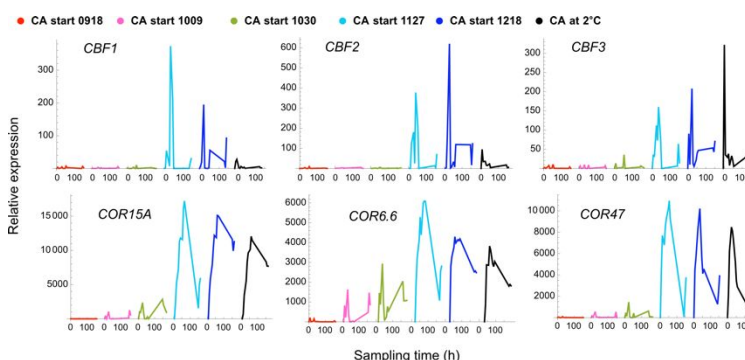


図6 . RNA-seq 解析における各遺伝子の発現パターン

(5) フィトクロム欠損株を用いた解析

次に、フィトクロム欠損株を用いた解析では、5つの欠損株 (*phyA* から *phyE*) を用いて、まず、一般的な2一定12時間明期での低温馴化処理で検討を行った。明確に野生型と異なるのは、*phyB* および *phyD* 欠損株のみであった。次に、文献的に最も低温馴化との関係が調べられている *PHYB* に着目し、日長制御との関係を検討した。野外での温度変化は日長に影響されるため、野外の温度データは暗に日長データを含む。その為、*phyB* 欠損株の実験では人工気象器を利用し、そこで、盛岡の9月末、11月初旬、12月初旬の平均的な気温変化を再現した人工気象器を作り、それぞれで3つの日長、すなわち、12時間日長(9月末) 10.5時間日長(11月初旬) 9.5時間

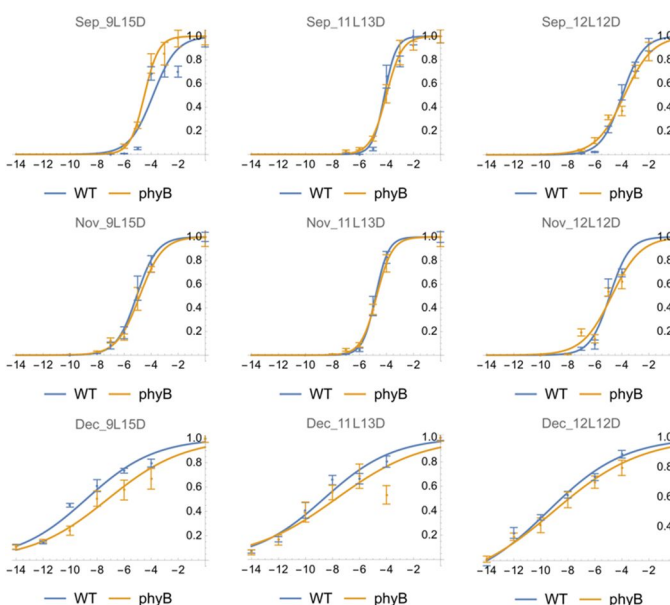


図7 . 人工気象器での季節の再現と *PHYB* による低温馴化制御

日長(12月初旬)を検討した。その結果、日長と温度変化で自然な組み合わせの条件(例えば、9月末であれば12時間日長)では、*phyB* の影響は12月初旬の気温でしか見られず、また、その制御はポジティブ制御であり、*PHYB* は凍結耐性の上昇に関与していた。9月末の気温変化では9.5時間日長の短日条件で *PHYB* のネガティブ制御が観察されたが、実際の自然条件ではあり得ないので、*PHYB* による低温馴化制御は、野外では12月以降のポジティブ制御のみであることが示された。

(6) まとめ

機械学習による解析結果を考慮すると、野外の馴化では温度変化を読む事が重要であり(図4) また、それぞれの温度域で特徴的な馴化制御がある可能性がRNA-seq解析の結果明らかとなった(図5 & 6)。今後、より正確な機械学習によるシミュレーションにより、どの時期の温度変化が重要かを明らかに出来る。一方で、これまで示唆されてきた光質変化による馴化制御は、野外データの結果を考慮すると(図1) 野外ではほとんど行われていない可能性が高いことが示唆された。また、フィトクロム *PHYB* を介した日長による馴化制御は12月以降の真冬のみが生じている可能性も示唆された(図7)。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計4件（うち査読付論文 4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 Hiraki Hayato, Watanabe Manabu, Uemura Matsuo, Kawamura Yukio	4. 巻 168
2. 論文標題 Season specificity in the cold induced calcium signal and the volatile chemicals in the atmosphere	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Physiologia Plantarum	6. 最初と最後の頁 803~818
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/ppl.13019	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 -
1. 著者名 HIRAKI, H., TANINO, K., WATANABE, E., MANO, S., UEMURA, M., and KAWAMURA, Y.	4. 巻 65
2. 論文標題 Effect of Temperature Fluctuating Cyclic Cold Acclimation on Freezing Tolerance in Three Arabidopsis Accessions	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 低温生物工学会誌	6. 最初と最後の頁 17-22
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.20585/cryobolcryotechnol.65.1_17	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
1. 著者名 Hiraki Hayato, Uemura Matsuo, Kawamura Yukio	4. 巻 60
2. 論文標題 Calcium Signaling-Linked CBF/DREB1 Gene Expression was Induced Depending on the Temperature Fluctuation in the Field: Views from the Natural Condition of Cold Acclimation	5. 発行年 2018年
3. 雑誌名 Plant and Cell Physiology	6. 最初と最後の頁 303~317
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/pcp/pcy210	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 -
1. 著者名 Tominaga Y, Suzuki K, Uemura M, Kawamura Y	4. 巻 62
2. 論文標題 In Planta Monitoring of Cold-Responsive Promoter Activity Reveals a Distinctive Photoperiodic Response in Cold Acclimation	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Plant and Cell Physiology	6. 最初と最後の頁 43-52
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1093/pcp/pcaa138	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 -

〔学会発表〕 計5件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 河村幸男、上村松生
2. 発表標題 野外でのシロイヌナズナの凍結耐性の季節的変遷と機械学習によるその予測
3. 学会等名 日本植物学会第85回大会（東京(オンライン大会)）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 笠松勇登、上村松生、河村幸男
2. 発表標題 フィトクロムを介した日長および温度による低温誘導性遺伝子の発現制御とその解析
3. 学会等名 東北植物学会第11回大会（福島）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 下平基、高橋亜未、上村松生、河村幸男
2. 発表標題 光を介した低温馴化プロセスにおけるクリプトクロムの役割
3. 学会等名 東北植物学会第11回大会（福島）
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 河村幸男、上村松生
2. 発表標題 植物の冬の感知と秋から冬にかけての気温と日長の特徴的な変化
3. 学会等名 第61回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 河村 幸男, 上村 松生
2. 発表標題 Plant winter sensing and characteristic changes in air temperature and day length from autumn to winter
3. 学会等名 第61回日本植物生理学会年会
4. 発表年 2020年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

-

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

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