

令和 4 年 6 月 4 日現在

機関番号：34315

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2019～2021

課題番号：19K06861

研究課題名(和文)植物の器官特異的な遺伝子発現プロファイルに基づく環境応答メカニズムの解明

研究課題名(英文) Analysis of mechanisms of environmental responses based on profiling of organ-specific gene expressions in plants

研究代表者

荒木 希和子 (Araki, Kiwako)

立命館大学・生命科学部・講師

研究者番号：30580930

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,400,000円

研究成果の概要(和文)：茎頂分裂組織に由来し、土壤中を水平方向に伸長する植物の地下茎について、その成長と遺伝子発現パターンに基づいた環境応答性の解明を目的として研究を実施した。野外環境下では、器官の成長や分化にともなって地下茎の遺伝子発現パターンは変化するが、地下部の生物防御応答性は維持されることが確認された。この応答性の程度は土壌組成や地下茎の挙動によって変化し、地下部である根とも異なることがわかった。したがって、地下茎の成長と応答性には地上と地下の両方の環境が影響し、季節変化や土壌環境に安定的な応答性を維持しつつ、土壤中の環境変化に柔軟に反応することが明らかとなった。

研究成果の学術的意義や社会的意義

本研究は地上と地下の環境を連続的に伸長する地下茎に着目して、器官特異的な環境応答を遺伝子発現パターンから調べた。地下茎の防御応答が維持され、土壌環境によりその程度が変化するという結果は、土壌中の植物と環境の相互作用に対する知見であることに加え、防御応答が生存にとって必須であることを示している。地下茎は次世代の株を形成することから、この応答性は適応度を高める上でも重要な機構であると考えられ、野生植物の環境適応メカニズムの解明につながるものである。地下部器官でクローン成長を行う種は外来植物や農作物にも広く見られ、増殖抑制や生産性向上などの技術にもつなげられることが期待される。

研究成果の概要(英文)：A study was conducted to elucidate the environmental responses based on the growth and gene expression pattern of rhizomes, underground stems, derived from the shoot apical meristem of plants and extended horizontally in the soil. In the field environment, it was confirmed that the gene expression pattern gradually changed with the expansion and development of rhizomes, but the biological defense responses were maintained as the subterranean part. It was also found that this responsiveness was related to the soil environment and the rhizomatous behaviors, while the responses were different between rhizomes and roots of underground organs. As conclusion, this study clarified that both the above- and under-ground environments affect the development and responsiveness of rhizomes, and that rhizomes plastically respond to heterogeneous environment in the soil with maintaining its responsiveness stably to the seasonal changes and underground environment.

研究分野：植物生態学

キーワード：地下茎 クローナル植物 クローン成長 遺伝子発現 生物防御応答 季節変化 土壌環境

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

植物の器官は茎頂分裂組織もしくは根端分裂組織から分化し、茎頂分裂組織から茎や葉、花が形成されて地上部を構成し、根端分裂組織から地下部の根を伸長させる。一方で、個体の成立後も維持される分裂組織から新たな器官を分化させ、さらにそこから新たな個体が成立するクローン成長(栄養繁殖)もなされる。このクローン成長では匍匐枝や地下茎、塊茎といった特殊なクローン成長器官の形成をとまなう場合もある。

植物体が晒される環境のうち、地上部の位置する大気と地下部のある土壌では環境条件が大きく異なる。物理的には特に光や温度環境が大きく異なり、土壌中では光がほとんど当たらず、温度の変動が少ない。また生物的には、細菌や菌類を含む微生物の数や組成が異なり、土壌中では微生物が著しく多いことが知られている。したがって、器官や組織の伸長や挙動はこの環境にも影響を受けると考えられる。クローン成長器官の中でも根と同様に地下部として形成されるものは、その由来にかかわらず土壌環境に影響を受けることが推測されるが、その器官形成や成長過程における周囲環境の影響は十分理解されていない。

地下茎(rhizome, underground stolon)はクローン成長器官の一つであり、茎頂分裂組織に由来するが、土壌中を水平方向に伸長するという性質を持つ地下部器官である。そして地下茎が伸長した先には新たな植物体が形成され、その株の地上茎は再び地上へ展葉する。遺伝子機能の一部は成長過程や器官によって特異的であることから、植物体の部位ごとの遺伝子発現の違いについて、地下茎を持つコンロンソウ(*Cardamine leucantha*)の4部位(シュート先端、地下茎先端、根先端、葉)の組織のRNA-seqを行ったところ、地下茎の遺伝子発現は茎と根の間的なパターンを示した。地下茎と根で共通する発現パターンの遺伝子には、生物防御や光受容などの環境応答に関連するものが含まれていることがわかった。生物防御応答の中では、特に*Arabidopsis thaliana*では根や胚軸で恒常的に維持されていると言われているER body(endoplasmic reticulum body)が地下茎に存在していることが確認された。しかしながら、これらの遺伝子発現パターンが、成長過程や周囲の環境によってどのように変化するかは不明瞭である。地上と地下の環境を連続的に伸長するこの地下茎の環境応答の詳細な解析は、植物の環境応答の柔軟性と安定性の理解にもつながると考えられる。

### 2. 研究の目的

本研究の目的は「器官(地下茎)特異的な遺伝子発現プロファイルに基づいた、植物の環境応答メカニズムの解明」である。特にクローン成長器官である地下茎の遺伝子発現に着目し、野外の季節変化および周囲の環境による発現パターンの特徴を調べることに加え、一定の環境条件下において地下茎の生存と伸長に影響を与える環境要因を特定することで、植物が周囲環境へ応答する仕組みの解明につなげる。

### 3. 研究の方法

主な対象植物は、アブラナ科タネツケバナ属のコンロンソウ(*Cardamine leucantha*)である。春に花茎を発達させて開花すると同時に、親株の基部から数本の地下茎が伸長し始める。秋には地下茎先端に娘株の根出葉を展葉させる。翌年には親株は枯死して、娘株のみが地上に成長する疑似一年生の生活史を持つ種である。

(1) 野外における地下茎のフェノロジーと防御応答性の変化を調べるために、滋賀県内の自生集団において、2018年4月から2021年3月にかけて月に1-2回、コンロンソウの株全体の成長および地下茎の成長と組織分化を観察した。また3-10株から地下茎もしくは全部位を採取し、開花期の地下部で発現の高かった遺伝子の発現量をreal-time定量PCRにより調べた。さらに地下茎の伸長が停止する7月下旬から11月上旬および地上部伸長前の12月から3月の地下茎のRNA-seqを行い、開花期における遺伝子発現パターンに対する変化を解析した。

(2) 地下茎の挙動に影響を与える要因を特定するため、はじめに7月から10月にかけて野外の自生集団から地下茎の生存率(健全性)および根出葉の展葉フェノロジーの異なる株を採取し、地下茎での生物防御に機能するER body関連遺伝子(*ClePYK10*, *CleNAI2*, *CleGLL23*他)の発現量の定量から、生存と成長による生物防御応答の変化を調べた。

次に、土壌粒子サイズと生物性を变化させた土壌条件でコンロンソウの栽培実験を行った。土壌粒子サイズは砂と赤玉土を混合して調整し、生物性としてミミズ、糸状菌、細菌数もしくは有機肥料の量を変化させ、5-6ヶ月栽培後に地下茎の数と長さ、生存率を計測し、生物防御応答を含む地下部特異的な発現パターンの遺伝子の発現量を定量した。

さらに、野外における土壌環境と地下部の関係について、コンロンソウ分布域の5地点から採取した株の根と地下茎のメタゲノム解析により微生物叢を調査した。また栽培条件による地下茎と根に内生する細菌叢も解析した。

(3) 伸長が停止後の地下茎における ER body 形成を確認するため、ER の GFP 一過的発現により冬季の娘株の基部を観察した。そして、他種での ER body 形成に関して、*Crdamine amara* と *Cardamine flexuosa* の匍匐枝および地上茎における ER body 局在を調べた。

#### 4. 研究成果

##### (1) 地下茎のフェノロジーと防御応答変化

3年間のフェノロジー調査により、親株は4月に花茎を発達させて開花すると同時に、その基部から1-12本の地下茎を伸長し始めるが、地下茎の伸長は7月から10月頃まで続き、伸長の停止時期には株間の違いが大きいことがわかった。秋から冬には繰り返し根出葉を展葉させ、解剖学的観察により2月頃に花芽の形成が確認された。また、温度と光の周期一定の条件で栽培すると地下茎が伸長しなかったことから、地下茎の伸長は地上の季節的な環境変化に規定されていることが考えられる。さらに地下茎伸長期であっても親株が枯死すると地下茎より根出葉が展葉したため、伸長停止には親株からのシグナルも関与している可能性が示唆される。

トランスクリプトーム解析の結果、地下茎の伸長が停止して娘株が形成される7月から11月にかけての地下茎では、生物防御およびストレス応答遺伝子の中で、開花期に地下部で高発現だった遺伝子の発現は維持されていた。一方で、地上部で高く地下部で低かったものも上昇傾向を示した。それ以外の発現パターンでは、葉緑体や光合成に関連する遺伝子の発現が徐々に上昇し、熱ストレスや細胞死に関わるものが低下していた。このことから、地下茎の伸長停止にしたがって地上部の分化に関与する遺伝子は機能しはじめるものの、地下部の防御応答性は維持されると考えられる。

そして、複数の株で地上部と地下部の差異の再現性が高かった遺伝子のうち、生物防御に機能する ER body 関連遺伝子の地下茎における発現量を経時的に調べた結果、ER body に含まれるβグルコシダーゼである *ClePYK10* の発現は地下茎の伸長開始期から、娘株の根出葉の形成期まで維持され、花芽が形成される1月から3月に低下傾向となることがわかった。個株内では前年の地下茎、株の基部、新しい地下茎の順で発現量が高く、地上茎より地下茎で高かったことから、地下茎の新しい組織ほど発現量が高く、地下茎から地上茎へと移行すると顕著に低下することが確認された。ゆえに遺伝子発現量に基づく生物防御応答性は、地下茎において恒常的に維持されるものの、その程度は成長や分化にともなって変化することが明らかとなった。

また一過的発現の顕微鏡観察によって、コンロンソウでは根出葉を展葉する時期の地下部においても ER body の存在が確認され、遺伝子発現の結果と一致した。*C. amara* や *C. flexuosa* では匍匐枝や茎でも存在する可能性があり、クローン株形成による発根部位と関連があるかもしれない。

##### (2) 地下茎の挙動に影響を与える要因

地下茎が伸長する時期の自生する株の地下茎では、地下茎の生存率と根出葉の展葉の有無により *ClePYK10* の遺伝子発現量に有意な違いが見られ、外的な環境変化よりも個株のフェノロジーにともなって防御応答が変化することが明らかとなった。また野外に自生する株の地下部である地下茎と根および土壌の菌叢比較では、全てに共通する微生物の割合が最も高く、Proteobacteria 門や Actinobacteria 門が多くを占めていた。土壌で割合の高かった Acidobacteria 門は地下茎と根ではあまり見られなかった。そして地下茎では、細菌類の Firmicutes 門と菌類の Basidiomycota 門や Ascomycota 門の種の相対割合が根と土壌とは異なっており、土壌微生物との相互作用も地下茎の器官特異性の一因になりうることを示唆された。

ER body は食害や傷害によって誘導されることが知られており、次に土壌生物や土壌粒子の異なる土壌条件で、コンロンソウの地下茎と根に対する土壌環境の影響を調べた。土壌生物の種類による条件間での違いは認められなかったが、土壌細菌数と *ClePYK10* の発現量には正の相関が見られた。また土壌の有機物量や土壌粒子サイズによっても防御応答性に違いが見られ、その違いは地下茎よりも根で顕著であった。一方で塊茎や胚軸の葉柄で発現量が高いとされる遺伝子 (*CleLSH10*) では条件間で違いが見られなかった。また地下茎の長さや生存率の個体差も条件間で異なっていた。よって、これらの土壌の特性が各器官においても個株においても地下部の応答性の違いに関わると言える。

以上より、クローン成長器官の地下茎では、遺伝子発現パターンは地上部と地下部の両方の特徴を併せ持つが、防御応答性は伸長開始から地上部が分化するまでの期間を通じて地下部特異的な性質が維持されていることが明らかとなった。そしてその応答の程度は、地下茎内の部位や時期によって変化するのみならず、土壌の物理的および生物的要因によっても変化することがわかった。したがって地下茎では、地上と地下の両方の環境が器官の環境応答の特異性に関わっており、季節変化や土壌環境に安定的な応答性を維持しつつ、土壌中の環境変化に柔軟に反応することが明らかとなった。地下茎が健全な状態で維持され伸長し続けられるかは、次世代の娘株の形成に関わる。ゆえにその地下茎や親株の持つ複数の地下茎で防御応答性を高めることは、個体の適応度を高めることに寄与していると考えられる。実際に個体の適応度に違いをもたらすか、そして種間でどの程度共通するかについては、さらなる検証が必要である。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2件（うち査読付論文 2件 / うち国際共著 0件 / うちオープンアクセス 1件）

1. 著者名 Araki KS, Nagano AJ, Nakano RT, Kitazume T, Yamaguchi K, Hara-Nishimura I, Shigenobu S, Kudoh H	4. 巻 10
2. 論文標題 Characterization of rhizome transcriptome and identification of a rhizomatous ER body in the clonal plant <i>Cardamine leucantha</i>	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 Scientific Reports	6. 最初と最後の頁 13291
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1038/s41598-020-69941-9	査読の有無 有
オープンアクセス オープンアクセスとしている (また、その予定である)	国際共著 -

1. 著者名 Araki KS, Tsujimoto M, Iwasaki T, Kudoh H	4. 巻 36
2. 論文標題 Life-history monographs of Japanese plants 14: <i>Cardamine leucantha</i> (Tausch) O. E. Schulz (Brassicaceae).	5. 発行年 2021年
3. 雑誌名 Plant Species Biology	6. 最初と最後の頁 542-553
掲載論文のDOI (デジタルオブジェクト識別子) 10.1111/1442-1984.12345	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6件（うち招待講演 1件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 荒木 希和子, 安藤 葉生, 永野 惇, 工藤 洋, 久保 幹
2. 発表標題 コンロンソウ地下茎における遺伝子発現パターンの季節変化
3. 学会等名 日本植物学会第83回大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 安藤 葉生, 荒木 希和子, 久保 幹
2. 発表標題 コンロンソウ地下茎の伸長と土壌環境の関係解析
3. 学会等名 第67回日本生態学会大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 荒木 希和子
2. 発表標題 クローナル植物における環境応答の分子基盤
3. 学会等名 近畿植物学会2020年講演会（招待講演）
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 安藤 葉生, 荒木 希和子, 久保 幹
2. 発表標題 コンロンソウ地下茎の挙動と防御器官の関係解析
3. 学会等名 第52回種生物学シンポジウム
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 坪倉 美沙, 荒木 希和子, 久保 幹
2. 発表標題 土壌環境の違いが非根圏、根圏、および根内における細菌に及ぼす影響の解析
3. 学会等名 日本農芸化学会2021年度仙台大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 荒木 希和子, 大西 智也, 安藤 葉生, 久保 幹
2. 発表標題 コンロンソウ地下茎の挙動と土壌環境の関係解析
3. 学会等名 第69回日本生態学会
4. 発表年 2022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
---------	---------