

令和 4 年 6 月 24 日現在

機関番号：10101

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2019～2021

課題番号：19K22902

研究課題名（和文）エピゲノムによるブナ林衰退と一斉開花の環境影響評価：季節の隔たりがある因果解析

研究課題名（英文）Environmental impact assessment of cause and seasonally delayed effect by epigenomic marker, a case study of decline and flower-initiation relations of beech forest

研究代表者

齋藤 秀之（Saito, Hideyuki）

北海道大学・農学研究院・講師

研究者番号：70312395

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）：ブナの葉は、開芽期の短期のオゾン曝露により、夏期以降に光合成能力の低下を遅発的に誘発することを明らかにした。この光合成能力の遅発影響には葉緑体ゲノムの16S rRNA遺伝子のDNAメチル化をとめない、エピゲノム機序の関与が示唆された。また開芽期におけるブナの葉の糖とリンの不足は花成遺伝子（FT）のDNAメチル化に影響を与えることが示され、余剰光合成生産から供給される開芽期の葉の養分状態が夏期の花芽分化の可否を決めるエピゲノム機序の関与が示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

森林衰退現象と樹木の一斉開花現象における環境影響評価では、誘因となる「環境変動」と「植物影響」に季節的な時間のズレがある場合の因果関係を評価することは困難であった。この時系列関係を含む因果解析の技術開発にあたり、本課題では、ブナの光合成能力の季節変化と花成を研究対象にして、環境情報をDNAの化学修飾として記録して遺伝子発現を制御するゲノムのメカニズム（エピゲノム機序）が生物指標として有望であることを明らかにした。この研究成果は環境変動下におけるブナ林の影響評価の精度向上に貢献できると考えられた。

研究成果の概要（英文）：We showed a delayed reduction of photosynthetic capacity in summer season caused by O<sub>3</sub> exposure during bud break period, associated with increased DNA methylation of 16S rRNA gene in chloroplast genome in beech saplings, suggesting epigenomic regulation in photosynthesis. Also in bud break period, we showed lacks of sugars and/or phosphorus in the developing leaves affected DNA methylation level of FT homologous gene in leaves, suggesting the nutrients supplied from carry-over products determined the availability of flower bud differentiation in summer.

研究分野：森林ゲノム生理生態学

キーワード：ブナ 花成 光合成 葉緑体リボソーム DNAメチル化 エピゲノム

## 1. 研究開始当初の背景

森林生態系の環境影響評価では、環境因子が複合的・時間的に変動して樹木へ作用するため、因果関係の評価が難しい。特に樹木は永年性であるため、過去に受けた環境ストレスによって環境影響の現れ方が異なる可能性がある。例えば、大気汚染物質の一つであるオゾン ( $O_3$ : 強酸化物質) は森林衰退の誘因として懸念されているが、日本での実測データではオゾンの濃度上昇が冬から早春期にあり、夏期にはオゾン濃度が低下する。このような事例では、春期のオゾン濃度上昇が開芽時の葉に影響を与える現象と合わせて夏期に遅発的に現れる植物影響との因果関係を解明する必要がある。しかしながら、従来の環境影響評価の技術では、環境変化に対する植物の即時的応答、あるいは長期的環境変化に対する植物の長期応答に関する知見が多くを占めており、過去の短期的な環境変動の影響によって遅発的に誘発される生理現象に関する知見は乏しい。したがって、季節的な時間の隔たりがある因果関係を評価できる生物学的基盤とその解析技術の開発が求められていた。

ゲノムにおける DNA メチル化は、環境情報を DNA の化学修飾として記録して、その後の遺伝子発現を制御する機能、すなわちエピゲノム機序の役割をもつ。このエピゲノム機序を生物指標として活用しようとした場合、遺伝子の DNA メチル化は「時間的ズレがある因果関係の評価」の指標として利用できる可能性がある。

例えば、植物の花成を誘導する遺伝子発現のシグナル伝達経路では、花成関連遺伝子の DNA メチル化が転写の可否を決定する、いわゆる遺伝子のスイッチの役割を担っていることが知られている。森林樹木においても着花のタイミングは花成遺伝子の発現調節の制御下にあることが知られている。特にブナのような一斉開花によって繁殖の成功度を高めている樹木では、樹体内の養分利用が花成を誘導する年のタイミングを決定していると考えられるため、花成関連遺伝子は樹体内の養分濃度を感受してエピゲノム機序により環境情報を記録する機能が備わっていると予想される。さらに、遺伝子の DNA メチル化は細胞分裂時のゲノム複製の際に最初の決定がなされるため、細胞分裂が盛んに行われる開芽期の環境条件は DNA メチル化に大きな影響を与えたと考えられる。したがって、花成関連遺伝子の DNA メチル化は、樹体の養分状態の影響を受けている可能性があり、樹木の花成の環境応答の遺伝子指標として利用できる可能性が考えられた。

一方で、樹冠の葉の光合成能力は樹体の養分状態に影響を与え、延いては花成の誘導に影響を与える可能性がある重要な生理プロセスである。ブナの光合成能力に関する先行研究では、葉緑体リボソーム量と光合成能力に正の関係性が見出され、さらに葉緑体リボソームをコードする遺伝子の一つである葉緑体 rRNA 遺伝子の DNA メチル化率とも見かけの関係性が明らかになっていた。この結果から、葉緑体リボソームの量的変動は光合成能力の発達とその後の機能維持や修復に重要な役割を担っていると考えられた。さらに、これら機能維持や修復に代表される光合成能力の恒常性維持機能がエピゲノム機序の制御下にあると予想された。もしも葉緑体リボソームをコードしている遺伝子群が開芽期の環境ストレスによりエピゲノム機序が作用してならば、春の環境ストレスが葉緑体の恒常性維持機能の低下により夏期の光合成能力の低下を遅発的に誘発している可能性が予想され、葉緑体リボソームの遺伝子群の DNA メチル化は、葉の恒常性維持の遺伝子指標として利用できる可能性が考えられた。

近年、全国のブナ林では着花周期が乱れて一斉開花の規模が衰えている可能性が指摘されている。着花年のタイミングを司る花成は樹体の内的な養分濃度が重要なトリガーとなっている可能性が高く、光合成余剰産物と密接な関係が予想された。さらに光合成余剰産物は光合成能力の季節変化に制限されると考えられた。これら花成と光合成能力の共通性は、春期の環境に対する DNA メチル化を介したエピゲノム機序の制御下にある可能性がある点であり、花成の DNA メチル化が前年の光合成能力の季節変化の影響を受けるといった点においては、連年の連続的な関係を示すものである。したがって、開芽期のオゾン濃度上昇による酸化ストレスは、エピゲノム機序を介してブナ林の着花周期に影響を与えている可能性が考えられた。以上を踏まえ、ブナ林の着花周期に関する環境影響は、早春の高濃度オゾンと葉緑体リボソーム関連遺伝子ならびに花成関連遺伝子のエピゲノム機序を介した影響として解析する必要が考えられた。

## 2. 研究の目的

ブナを対象にエピゲノム機序の関与が予想される光合成能力と花成について、それぞれに関連する遺伝子の DNA メチル化との関係を調べる。具体的には次の通りである。

- (1) 開芽期の高濃度オゾンによる葉の酸化ストレスが光合成能力の季節変化に対して遅発的に光合成能力を低下させ、この遅発影響において、葉緑体リボソーム遺伝子の DNA メチル化が量的に関連することを明らかにする。
- (2) 開芽期の葉の養分不足が花成遺伝子のプロモータ領域付近の DNA メチル化に影響を与えて、夏期の花成遺伝子の転写を抑制し、着花年のタイミングを関与していることを明らかにする。

以上を踏まえ、表現形質の発現調節を司る遺伝子の DNA メチル化が、エピゲノム機序に基づき、季節の隔たりのある因果関係を指標する評価基準としての有効性を検討する。

なお、新型コロナによる研究活動自粛の要請をうけて、当初、フィールドで計画した研究内容を縮小してコロナ下で活動可能な大学構内および実験室で実施可能な方法に修正して研究を実施した。

### 3. 研究の方法

#### (1) 開芽期のオゾン酸化ストレスと光合成能力の季節変化

##### 材料

材料にはブナの7年生ポット苗(19個体)を用いた。苗高は平均41.2cmであった。

オゾン曝露には人工気象室内に設けたオゾン発生装置と曝露チェンバーを用いた。オゾン曝露のタイミングと日数は個体の開葉フェノロジーに合わせて行った。オゾンの曝露強度と時間数ならびに日数は約110ppb・4時間/日の曝露量を平均9.4日であった。

##### 光合成解析

クロロフィル濃度の季節変化は分光測色計(SPAD-502Plus, Konica-Minolta社製)で行った。光合成能力は開放型通気法により光飽和光合成速度を測定することで評価した(Li6400, Licor社製)。測定条件は、光量子束密度  $1500 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 、温度 25、葉面飽差 0.7~1.0 kPa、 $\text{CO}_2$  400  $\mu\text{mol/mol}$  であった。

##### 遺伝子解析

葉緑体リボソーム量は、葉緑体リボソームの活性部位として構成される16SリボソームRNAを定量することで評価した。葉から全RNAを抽出してマイクロチップ型電気泳動(バイオアナライザー)により定量した。

葉緑体リボソームのエピゲノム機序解析については、16SリボソームRNA遺伝子を対象に行った。16SリボソームRNA量は、葉緑体リボソームRNA遺伝子の塩基配列は、DNA-seq法による葉緑体ゲノムのアセンブリで決定してサンガー法にて確認した。パイサルファイト・ゲノムシーケンス法によりDNAメチル化サイトを探索した。葉緑体ゲノムのコピー数の定量は、ゲノムDNAを抽出して核ゲノムにコードされるFT遺伝子と葉緑体ゲノムにコードされるrbcL遺伝子のDNA量をリアルタイムPCR法で定量して量比により核ゲノムあたりの葉緑体ゲノムコピー数を求めた。葉緑体リボソームRNA遺伝子のDNAメチル化率は、DNAメチル化感受性制限酵素を用いたリアルタイムPCR法で定量した。

#### (2) 花成遺伝子の発現と着花の年変動

##### 材料

調査地は黒松内町ブナ二次林(約100年生)であり、供試葉は林冠木6個体の陽葉を対象にした。供試葉の採取時期は花芽分化時期(6月下旬~7月上旬)であった。着花量の調査は、4月下旬から5月上旬の開花時期に目視で行った。

##### 遺伝子発現解析

花成に関連する遺伝子としてFT遺伝子、FT遺伝子の転写因子として日長制御からのシグナル伝達の役割をもつCO遺伝子の転写量をリアルタイムPCR法で定量した。花成遺伝子の発現と花芽分化の関係を解析するために、翌年春期の着花状況を観察した。2011年からの調査データを含めて年変動におけるFT遺伝子の役割を検討した。

#### (3) 夏期における花成(FT)遺伝子の酸性ストレスに対する即時応答

##### 材料

調査地は静岡県富士山ブナ天然林であった。酸性ストレス操作実験は、ブナ成木1個体の陽樹冠において4反復となるように異なる大枝に処理区を設けた。花成遺伝子(FT)の転写量に対して即時的に影響を与える可能性がある大気汚染物質として硫酸と硝酸(いずれも酸性雨の主成分)を用いて、ブナ成木の樹冠を対象に枝単位の硫酸、硝酸、硫酸+硝酸(いずれもpH2.5に調製)の曝露処理を行った。供試葉の採取は曝露直前と曝露翌日の同時刻であった。

##### 遺伝子発現解析

花成に関連する遺伝子としてFT遺伝子とCO遺伝子の転写量をリアルタイムPCR法で定量した。

#### (4) 開芽期における葉の養分と花成遺伝子のDNAメチル化

##### 材料

材料にはブナ成木から採取した切り枝を用いた。採取時期は開芽直前の4月であった。切り枝の生育環境は人工気象室であった。切り枝は水切り後に養分濃度の異なる水溶液を吸水させながら人工気象室内で培養して開葉させた。水溶液にはWPM培地の養分組成を10倍希釈で用いてポジティブコントロールとした。このWPM溶液から窒素欠乏、リン欠乏、糖欠乏ならびに純水(ネガティブコントロール)の処理区を設けた。生育条件は、日長が14時間、光合成有効波長域の光量子束密度が枝先端で  $1050 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ 、気温が20/10(昼/夜)、湿度が約30%であった。

## 遺伝子解析

ブナ成木の切り枝を用いてオゾン曝露が葉の *FT* 遺伝子のプロモータ領域における DNA メチル化に与える影響を DNA メチル化感受性制限酵素とリアルタイム PCR 法により調べた。

### (5) 花成 (*FT*) 遺伝子のエピゲノム機序に関わる拮抗遺伝子

#### 材料

ブナのドラフトゲノムが解析された個体であった。供試葉は7月上旬に *FT* 遺伝子の発現量が少なく翌年に着花が認められなかった時に採取された材料であった。

#### 遺伝子解析

*FT* 遺伝子の構造について、翻訳開始点の上流-750 ポジションから翻訳停止点の下流 147 ポジションまでの塩基配列をサンガー法で決定した。転写開始点付近の DNA メチル化サイトを塩基配列パターンとバイサルファイト・ゲノムシーケンス法にて精査して、転写開始点を対象に DNA メチル化感受性制限酵素とリアルタイム PCR 法の組合せによって DNA メチル化率の変動を検出できるサイトを探索した。また *FT* 遺伝子のコード領域と重複して *FT* 遺伝子の転写と緩衝して阻害的に作用することが予想されるトランスポゾン様遺伝子の探索を行った。

## 4. 研究成果

### (1) 開芽期のオゾン曝露が光合成能力の季節変化に与える遅発影響

開芽期のオゾン曝露の即発影響として可視障害は認められず、5月~6月の葉の形態、クロロフィル濃度、光合成能力にも影響は認められなかった。7月、光合成能力はオゾン曝露の遅発影響として低下が認められ、その後の季節変化は一定の低いレベルで推移した。

5月の 16SrRNA 量は対照に比べてオゾン曝露で増加したが、夏期の 16SrRNA 量は対照に比べて減少した。夏期における 16SrRNA 遺伝子の DNA メチル化率はオゾン曝露で上昇した。以上から、光合成の季節変化に認めた遅発性影響は葉緑体リボソーム量の減少と 16SrRNA 遺伝子の DNA メチル化の上昇をとまなっており、エピゲノム機序の制御下にある可能性が示された。

### (2) 花成遺伝子の発現と着花の年変動

6月下旬から7月上旬の時期に花成に関連する遺伝子 (*FT* と *CO*) の発現レベルが高いと翌年の着花量が増加する関係にあり、*CO-FT* 遺伝子の発現調節経路の年変動が着花の年変動を規定していることが示唆された。

### (3) 夏期の酸性物質に対する花成遺伝子発現の即時応答

硫酸 (pH2.5) と硝酸 (pH2.5) はそれぞれ *FT* 遺伝子の発現を低下させた。さらに硫酸 + 硝酸の混合 (pH2.5) による *FT* 遺伝子の発現低下量は、硫酸と硝酸のそれぞれによる低下量と比べて加算的であった。*FT* 遺伝子の発現調節において、日長経路の転写因子である *CO* 遺伝子の発現は、硫酸の影響を受けず、硝酸のみで発現量を低下させた。これらの結果から、硫酸と硝酸の *FT* 遺伝子に対する作用経路は異なり独立であると考えられた。また *FT* 遺伝子の低下をもたらす原因物質は、プロトンではなく、硫酸イオンと硝酸イオンであると考えられた。以上から、酸性雨がブナ林の着花に及ぼす影響は、硫酸と硝酸のそれぞれが抑制的に作用すると考えられた。

### (4) 開芽時の養分と花成 (*FT*) 遺伝子の DNA メチル化

純水で育成した葉の DNA メチル化率に対して WPM で育成した葉の DNA メチル化率は有意に高かった。WPM の P 欠処理と糖欠処理では純水と比べて有意差は認められなかった。N 欠処理では純水処理に比べて DNA メチル化率の有意な上昇が認められた。したがって、開芽期の葉のリン濃度と糖濃度は *FT* 遺伝子の DNA メチル化に影響を及ぼすことが明らかになった。

### (5) トランスポゾン様遺伝子と花成遺伝子 (*FT*) との拮抗作用

*FT* 遺伝子の転写量と DNA メチル化は正の相関を示し、同時に *FT* 遺伝子の転写量と負の相関を示す転写産物を発見した。この転写産物は、poly-A を持ち、全長が少なくとも推定 5643 bp 以上の長さで、*FT* 遺伝子のプロモータ領域から 4 番(最後)のエクソンまでカバーすることを Long-PCR の電気泳動で確認した。この転写産物はトランスポゾン様遺伝子である可能性が考えられた。したがって、*FT* 遺伝子のプロモータ領域で確認した DNA メチル化率の変動は、このトランスポゾン様遺伝子の転写抑制として作用していると考えられ、*FT* 遺伝子の転写に対して、トランスポゾン様遺伝子との拮抗作用を通して間接的に影響を与えていた可能性が考えられた。

### (6) まとめ

ブナの光合成能力の季節変化と着花の年変動には開芽期の内的外的な環境影響を受けたエピゲノム機序が介在する点で共通性が示唆され、衰退現象と着花現象を関連付けるメカニズムの一端を明らかにした。さらに、光合成能力と花成に関連する各遺伝子の DNA メチル化は環境影響評価において時間差のある因果関係を解析する指標として有望であることが示された。この成果は環境変動下におけるブナ林の影響評価の精度向上に貢献できると考えられた。

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 0件 / うちオープンアクセス 0件）

1. 著者名 馬場俊希・斎藤秀之・宮本敏澄・渋谷正人	4. 巻 68
2. 論文標題 カラマツの枝条形成における長枝化と花芽分化の関係	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 北方森林研究	6. 最初と最後の頁 53-56
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） なし	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10件（うち招待講演 2件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 斎藤秀之
2. 発表標題 ゲノムのDNAメチル化修飾は樹木のストレス診断マーカーに有効か？
3. 学会等名 第69回北方森林学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 岡崎裕平・斎藤秀之・宮本敏澄・渋谷正人
2. 発表標題 開芽期の短期酸化ストレスがブナ葉の発達と老化に与える影響
3. 学会等名 第69回北方森林学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 馬場俊希・斎藤秀之・宮本敏澄・渋谷正人
2. 発表標題 リン葉面施肥がカラマツのシュート成長と花芽分化に与える影響
3. 学会等名 第69回北方森林学会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 岡崎裕平・斎藤秀之・宮本敏澄・渋谷正人
2. 発表標題 葉緑素濃度の季節変化に現れるエピゲノムを介したストレス後遺症の可能性
3. 学会等名 第132回日本森林学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 斎藤秀之・岡崎裕平・神村章子
2. 発表標題 ブナ葉のオルガネラDNAコピー数の季節変化
3. 学会等名 第132回日本森林学会大会
4. 発表年 2021年

1. 発表者名 斎藤秀之
2. 発表標題 機能ゲノム学的研究は森林樹木の環境応答の疑問にどこまで答えられるか？
3. 学会等名 樹木の生態に対するシンクベースの生理的機序からの探求-現象から解析手法まで（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 和田尚之・斎藤秀之
2. 発表標題 細胞分裂の季節変動からみた葉の形成
3. 学会等名 樹木の生態に対するシンクベースの生理的機序からの探求-現象から解析手法まで（招待講演）
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 斎藤秀之・神村章子
2. 発表標題 ブナ樹冠における葉の花成遺伝子の発現に及ぼす酸化ストレスの影響
3. 学会等名 第68回北方森林学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 馬場俊希・斎藤秀之・宮本敏澄・渋谷正人
2. 発表標題 カラマツの枝条形成における長枝化と花芽分化の関係
3. 学会等名 第68回北方森林学会大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 斎藤秀之・神村章子
2. 発表標題 ナ樹冠の花成遺伝子の発現に及ぼす硫酸と硝酸の異なる影響
3. 学会等名 第131回日本森林学会大会
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
---------	---------