

令和 5 年 5 月 31 日現在

機関番号：12601

研究種目：挑戦的研究（萌芽）

研究期間：2021～2022

課題番号：21K19135

研究課題名（和文）遺伝子発現解析によるカエデ2属の繁殖開始メカニズムの解明

研究課題名（英文）Gene expression analysis of trigger mechanisms of reproduction in two maple species

研究代表者

鈴木 牧（SUZUKI, Maki）

東京大学・大学院新領域創成科学研究科・准教授

研究者番号：40396817

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）：イタヤカエデとオオモミジの様々なサイズや環境条件の多数個体を対象に、花成誘導に関わる遺伝子群の発現状況を網羅的遺伝子発現解析（RNA-seq法）で調べた。その結果、両樹種のFLOWERING LOCUS T (FT) 遺伝子を初めて同定した。また、FTの制御因子群に相同な複数の遺伝子について、FTの発現量と光環境や個体サイズに連動した発現量の変動を認めた。これらの遺伝子群が、対象樹種の生育段階依存的な花成開始に関わっている可能性がある。

研究成果の学術的意義や社会的意義

高木種は生活史後期に開花を開始するが、その遺伝的機構は解明されていない。本研究では、この機構に関わる遺伝子を世界で初めて探索し、芽形成期に発現量が変動する遺伝子の情報から、開花の開始に関わっている可能性の高い遺伝子群を絞り込むことに成功した。これにより、対象樹種の開花開始に関わる遺伝機構の解明に向け、大きく前進した。また、今回同定した2樹種のFT遺伝子座の情報は、カエデ属の近縁種の花成研究に直接役立つため、園芸や林業への応用が期待できる。

研究成果の概要（英文）：The expression status of genes involved in initiation of flowering was investigated for two acer species (*Acer mono* and *Acer amoenum*) by using comprehensive gene expression analysis (RNA-seq). Canopy leaves of trees of various sizes and in environmental conditions were repeatedly sampled before, during and after bud formation to track change in gene expression. As the first step, we identified probable FLOWERING LOCUS T (FT) genes for the first time for both species. According to the results of RNA-seq analysis, the expression levels of genes homologous to several regulators of FT were correlated with FT gene expression, and they were also significantly correlated with the light environment and/or size of target individuals. These genes were suggested to be involved in life-stage related initiation of flowering in the target tree species.

研究分野：森林生態学

キーワード：開花開始 Flowering locus T 生活史戦略 個体サイズ 光条件

様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

1. 研究開始当初の背景

樹木では一般に、生育初期の段階では専ら栄養成長を行い、ある段階から繁殖を開始する現象がみられる。野外での観察などから、様々な樹木種の開花開始には個体の大きさや光環境の変化が関係していると推測されていた。しかし、この現象にまつわる個体内の作用機序はいまだ解明されていない。

顕花植物の開花をめぐる遺伝的機構については、モデル植物などを用いた研究が進められている。それらの既往研究から、光や温度、個体サイズ、齢などの変化に反応し発現量が変化する様々な遺伝子が、花成のスイッチである *FLOWERING LOCUS T (FT)* 遺伝子の発現変動を、複合的に制御していることがわかってきた^{1), 2)}。以下ではこれらの、*FT* 発現を制御する遺伝子群を仮に *FT* 制御因子群と呼ぶ。もし、これらの *FT* 制御因子群の中に、樹木個体のサイズや光条件の変化に反応して発現量が顕著に変化するものがあれば、その変化が *FT* の発現を誘導し、開花が始まるというメカニズムが考えられる。しかし、*FT* の制御にまつわる遺伝子は多岐にわたり、しかもそれぞれに、機能の異なる多数のホモログ(相同遺伝子)が存在することが知られる。そのため、樹木の個体成長に伴う開花開始の遺伝的機構を調べる取り組みは行われてこなかった。

本研究に先立ち、申請者たちは北海道に自生する2種の高木種、イタヤカエデとオオモミジについて野外観測を行い、前者は個体サイズと光環境、後者は個体サイズの変化に反応して、開花を開始するということを確かめた。また、これら2種の林冠から芽形成後期の葉を採取して予備的な遺伝子発現解析(RNA-seq法)を行い、いくつかの既知の *FT* 制御因子と相同な遺伝子の発現を確認していた。

2. 研究の目的

樹木の生育段階後期の開花開始をもたらす個体内メカニズムの解明に必要な、以下の2段階の研究を行った。

(1) 対象樹種であるイタヤカエデとオオモミジについて、*FT* 遺伝子のホモログを探し、それらの遺伝情報を明らかにする。

(2) (1) の情報を用いて、対象樹種の成長段階依存的な開花制御に関わっている可能性のある遺伝子群を探索する。

3. 研究の方法

北海道大学苫小牧研究林内の成熟林に設置された林冠クレーン(図1上)を利用して、光条件やサイズの異なるイタヤカエデとオオモミジの各10個体から、樹冠頂部の葉と腋芽を採取した。サンプリングは花芽形成の直前から終期に対応する2021年7月から8月の1か月間、各週1回行った。採取した葉(葉脈を含む基部)と芽からRNAを抽出し、RNA-seq法で全転写産物の発現量を定量した。

(1) 次世代シーケンサーで読まれた塩基配列情報が登録されるデータベースにて公開されていた近縁種サトウカエデのDNA配列(SRR15192914)に対し、BLAST検索によりシロイヌナズナの *FT* 配列との相同性検索を実施し、サトウカエデの *FT* 遺伝子を探索した。見つかった遺伝子の塩基配列を本研究の全転写産物の塩基配列と照合することにより、イタヤカエデとオオモミジにおける相同なホモログを探索した。

(2) 既往文献^{2)~5)}から、光・年齢・サイズなどに依存して発現量が変化し、*FT* の発現量の制御に関わると報告されている *FT* 制御因子を探索対象とした(表1)。RNA-seq法で得られた全転写産物のデータから、以下の条件をすべて満たす配列を、専用プログラムを作成して検索した：

- ✓ 表1のいずれかと相同性が高い(50%以上)
- ✓ “transition from vegetative to reproductive phase(生長段階から繁殖段階への移行)”等のアノテーションがついている
- ✓ 発現量が同一サンプル中の *FT* の発現量と有意な発現相関を示す
- ✓ サンプル個体の光環境・サイズ(樹高)・開花量とも発現量が有意に相関している

以上の条件をすべて満たす配列の遺伝子が、目的(2)の *FT* 制御因子の候補となる。



図1 本研究で使用したサンプリング設備
林冠クレーン(上)、観測用足場(下)。

ただし後述のように、上記のサンプルでは個体サイズと光条件がある程度交絡していたため、遺伝子発現に対する光環境と個体サイズの関与を分離して定量しきれない、という問題が発生した。この問題を解消するため、2022年6月に追加サンプリングを行った。同研究林内の明るい若齢二次林において、各樹種の樹高10m前後の3個体にそれぞれ観測用足場を設置し、樹冠へアクセスできるようにした(図1下)。各個体の、頂端部の一部の枝を寒冷紗または赤色光フィルターで覆うことにより、個体サイズが同程度で光条件の異なるサンプル枝(明るい, 暗い, 寒冷紗, R:FR比が高い)を得た。これらのサンプル枝について、2022年6月末~8月上旬に繰り返しサンプリングを行い、採取した葉を再びRNA-seq法に供した。現在、この追加サンプルと昨年度のサンプルを統合して再解析を行っているが、以下では、2021年度のサンプル解析に基づく暫定的な結果を報告する。

表1. 探索対象としたFT制御因子群(文献2)~5)に基づき選択)。

光依存経路 (10個)	自律的経路 (4個)	加齢経路 (1個)
<i>TEM1</i>	<i>FLD</i>	<i>SPL</i>
<i>PIF4</i>	<i>LD</i>	
<i>PIF5</i>	<i>TEK</i>	
<i>CDF1</i>	<i>FPA</i>	
<i>SVP</i>		
<i>FCA</i>		
<i>DELLA</i>		
<i>PHL</i>		
<i>COP1</i>		
<i>HOS1</i>		

4. 研究成果

(1) カエデ属2種のFT遺伝子サトウカエデのDNA配列に対するBLAST検索の結果、シロイヌナズナのFT配列に70%相同な約200塩基数の配列を検出した。この、サトウカエデのFTであると考えられる配列と、2021年度の4週分の葉から抽出された全転写産物のデータについて相同性検索を実施したところ、サトウカエデのFTと相同率の高い配列がイタヤカエデ、オオモミジの各樹種で2配列ずつ認められた。サトウカエデのFT様配列との相同性はそれぞれ90%と80%で、いずれの配列も発現量は微量であったが、相同性90%のものの方が比較的発現量が多かった。

カエデ属と同じムクロジ科のリウガン(ロンガン)では、シロイヌナズナFTと約70%相同で、他の高木種のFTとも相同性の高い遺伝子が2種類(*DIFT1*, *DIFT2*)報告されている⁶⁾。このことから、カエデ属も2種類のFT様遺伝子をもつ可能性が高いと考えられる。以下、暫定的に、イタヤカエデとオオモミジの2種類のFT様配列(遺伝子)を、発現量の多い方から*AmFT1*, *AmFT2* および *AaFT1*, *AaFT2* と呼ぶ。それらの作用機序は不明であるが、リウガンとの類似性を仮定すると、*FT1* と *FT2* のどちらかが花芽形成の開始を司るスイッチである可能性が高い。

発現量（各個体の平均値からの偏差）

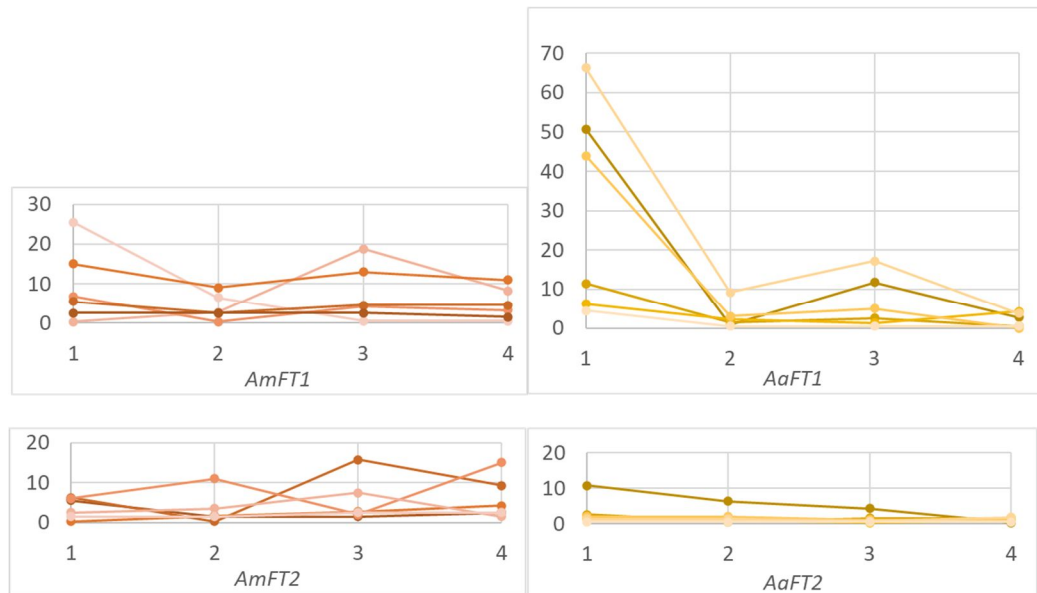


図2 FT様遺伝子群の発現量の季節変化（横軸は7/12～8/3の各週）
折れ線は同一個体サンプルの発現量。

なお、*AaFT1*と*AaFT2*では発現量に季節変化がみられ、どちらも花芽形成の初期または開始前にあたる1週目頃に比較的多く発現し、その後発現が低下する傾向があった（図2）。このような季節変化は*AmFT1*および*AmFT2*には認められなかった。オオモミジの開花個体では、個体内の70%以上の芽が花を形成するが、イタヤカエデでは成熟個体の殆どにおいて、花を形成する芽の割合が40%未満にとどまる。そのため、葉によって同時期のFT発現量のばらつきが大きく、季節変動を捉えることができなかつた可能性がある。

（2）既知FT制御因子との相同性解析

（1）の結果に基づき、*AmFT1*または*AmFT2*、および*AaFT1*または*AaFT2*が花芽形成を司るスイッチであると仮定した上で、比較的发現量が多く季節変動も大きい*AmFT1*および*AaFT1*（以下、*FT1*）と発現相関を示す遺伝子群を探索した。各個体4週分の全転写産物から3 - （2）に記した4条件をすべて満たす配列を検索したところ、表2に示す配列が該当した。この結果から、これらの配列が個体成長に伴う開花の開始に関わっている可能性が示唆される。

表2. 開花開始に関与している可能性のある遺伝子の一覧。

樹種	相同なFT制御因子			各パラメタとの相関係数			
	略号	経路	相同性%	FT1発現量	樹高	光環境	開花量
イタヤカエデ	<i>FCA</i>	自律的	53.74%	-0.52 [*]	-0.59 ^{**}	-0.49 [*]	-0.51 [*]
	<i>COP1</i>	光依存	54.79%	0.46 [*]	0.64 ^{**}	0.52 ^{**}	0.51 ^{**}
	<i>SPL</i>	加齢	71.28%	0.43 [*]	0.57 ^{**}	0.53 ^{**}	0.64 ^{**}
オオモミジ	<i>FCA</i>	自律的	61.76%	-0.54 ^{**}	-0.90 ^{***}	-0.55 ^{**}	-0.83 ^{***}
	<i>FCA</i>	自律的	68.10%	0.82 ^{***}	0.45 [*]	0.37 ^{ns}	0.43 [*]
	<i>PHL</i>	光依存	66.18%	0.42 [*]	0.66 ^{***}	0.70 ^{***}	0.68 ^{***}
	<i>SPL</i>	加齢	82.43%	0.49 [*]	0.57 ^{**}	0.29 ^{ns}	0.70 ^{***}

興味深いことに、イタヤカエデとオオモミジでは、光依存経路の遺伝子群の挙動に差がみられた。例えば、*COP1*は光環境依存反応の随所で作用する重要な制御因子⁵⁾で、光依存的にFT生産を駆動する*CO*様遺伝子の生産調整にも関わっている。ここで、イタヤカエデでは全探索条件に合致する*COP1*様遺伝子が2個見つかったのに対し、オオモミジの*COP1*様遺伝子はいずれも開花量やFT1量と相関しなかつた。一方、オオモミジでは*PHL*様遺伝子がFT1発現量や開花量と相関を示した。*PHL*は弱光下でFTの発現を促進する作用が知られており⁵⁾、この遺伝子が、やや暗い環境でも開花できるオオモミジの性質を支えている可能性がある。以上のような種間の違いは、「1. 背景」で述べた開花開始条件の違い、すなわちイタヤカエデの開花は光環

境と個体サイズの両方に依存する一方、オオモミジの開花条件は個体サイズのみ反応するという傾向と矛盾しない。この結果は、光をめぐる樹種ごとの繁殖戦略が、遺伝的機構の差異と対応している可能性を示唆している。

ただし表2のとおり、これらの遺伝子は既知遺伝子との相同性が必ずしも高くなく、既知遺伝子とは異なる機能を果たしている可能性がある。例えば、自律的経路の制御因子である *FCA* は、シロイヌナズナでは *FT* の発現を促進する作用をもつとされるが、表2にある *FCA* 様遺伝子には、*FT1* の発現量や開花量と逆相関を示すものもある。それらは *FCA* と類似した構造をもち、逆の作用をもつ遺伝子である可能性がある。そこで、これら各遺伝子の作用について、現在、物理構造からの解析を試みている。これらの遺伝子の機能が明らかになることで、将来、開花条件の種間差をもたらす作用機序の違いを解明することが期待される。

<引用文献>

- 1) Kim D-H. 2020. *Hortic. Environ. Biotechnol.* 61: 209-227.
- 2) Minamida et al. 2013. *Sci. Hortic.* 156: 106-112.
- 3) Thomas B. 2006. *J Exp Bot* 57: 3387-3393.
- 4) Ito et al. 2014. *Tree Physiol.* 34: 534-546.
- 5) Endo et al. 2016. *Cell. Mol. Life Sci.* 73: 829-839.

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計0件

〔学会発表〕 計2件（うち招待講演 0件 / うち国際学会 0件）

1. 発表者名 藤岡薫子, 鈴木牧, 久本洋子
2. 発表標題 イタヤカエドとオオモミジにおける成長フェーズから繁殖フェーズへの変化
3. 学会等名 日本生態学会第69回全国大会
4. 発表年 2022年

1. 発表者名 藤岡薫子, 鈴木牧, 久本洋子
2. 発表標題 カエド属 2 種の花芽形成期に発現する花成関連遺伝子の探索
3. 学会等名 第133回日本森林学会大会
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
研究分担者	久本 洋子 (HISAMOTO Yoko) (60586014)	東京大学・大学院農学生命科学研究科（農学部）・助教 (12601)	

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
---------	---------