

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 27 日現在

機関番号：17102

研究種目：基盤研究(A) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26251042

研究課題名(和文) 開花遺伝子発現量と土壌・植物養分条件の統合分析による一斉開花機構の解明

研究課題名(英文) Elucidating the mechanism of masting by integrated analysis of flowering gene expression and soil / plant nutrient conditions

研究代表者

佐竹 暁子 (Satake, Akiko)

九州大学・理学研究院・准教授

研究者番号：70506237

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 31,300,000円

研究成果の概要(和文)：一斉開花現象のメカニズムを明らかにするために、フタバガキ科樹木2種とブナを対象に、開花遺伝子発現量の解析と栄養塩量および気象因子の測定を行い、数理モデルを用いた分析を行った。フタバガキ科樹木においては、低温および降水量と花芽形成に関わる遺伝子発現量との間の制御関係を仮定したモデルによって、本調査期間に観測された遺伝子発現上昇が説明された。ブナにおいて生息地土壌中の無機態窒素量を3年間測定したところ、2014年から2016年にかけて減少傾向にあることが示された。開花遺伝子発現量は2周期の年変動を示したことから、ブナの豊凶は土壌からの窒素供給量の年変動によって生じる可能性は低いことが示唆された。

研究成果の概要(英文)：To investigate the requirements for floral initiation of mass flowering trees, we monitored expression of key flowering pathway genes, meteorological conditions and endogenous resources over four years in *Shorea curtisii* and *S. leprosula*. We introduced a dynamical mathematical model based on cues from drought and low temperature that coincide with activation of flowering gene to explain floral initiation of dipterocarps. The long duration from signal to trigger of 2-3 months was predicted by the model. To investigate the relationship between nitrogen and flowering in Japanese beech, nitrogen supply in the soil were monitored. Inorganic nitrogen contents peaked in summer and gradually decreased from 2014 to 2016. Comparing the expression pattern of key flowering gene in *F. crenata* and soil nitrogen content showed that masting of Japanese beech is not caused by the fluctuation in the supply of soil nitrogen.

研究分野：生態・環境

キーワード：花成 環境応答 気候変動 数理モデル 窒素循環

1. 研究開始当初の背景

東南アジアの熱帯雨林や温帯林では、数年に1度不規則な間隔で同調して開花が生じる一斉開花現象あるいは豊凶現象(以下、一斉開花)が顕著であるが、そのメカニズムには未だ未解明な点が多い。近年、一斉開花種を対象に系統間で高度に保存された開花遺伝子の発現量を、複雑な自然環境で経時的に追跡し、花芽形成のマーカーとして用いるアプローチが生態学に新しく導入されてきた。花芽形成に関しては、モデル植物において、温度や日長シグナルの伝達を担う遺伝子、異なるシグナルを統合する遺伝子、そして花器官の形成に関わる数々の遺伝子が同定され、それらの制御関係の詳細が明らかになってきた。

さらに最近では、これらの開花遺伝子の働きを自然環境で経時的に追跡するアプローチが生態学的研究に導入されたことで、遺伝子情報に立脚した開花時期の予測が可能になり、将来の気候変動が開花時期や開花期間にもたらす影響を分子レベルで評価する新しい手法が提案されている。その結果、典型的な豊凶を示すブナにおいては窒素資源による開花遺伝子の発現制御が明らかとなり、窒素循環と一斉開花サイクルの間に強い相関があることが示唆されている。しかし森林生態系の主要樹種では、開花に関する分子遺伝学的研究が遅れており、遺伝子情報に基づいた開花予想の妨げとなっている。さらに、東南アジアの熱帯雨林や温帯林では数年に1度不規則な間隔で開花が生じる一斉開花現象が顕著であることが、開花予想を一層困難にさせ、計画的な種苗生産を阻害する主要要因にもなっている。これまでモデル植物で蓄積されてきた分子遺伝学的知見を、典型的な一斉開花樹種に適用することは、一斉開花の至近要因を特定し、気候変動下における開花挙動の予測を可能にするだけでなく、森林の天然更新を触発する方策提案、環境変化に

頑健な系統の選抜にも繋がるのが期待されるが、一斉開花種を対象にした開花の分子メカニズムに関する研究は未だに十分とは言えない。

2. 研究の目的

本研究では開花遺伝子発現解析を、植物体内と土壤中の栄養塩量、および気象因子とともに数理モデルを用いて統合することで、異なる地域・分類群に属する一斉開花種(ブナとフタバガキ)がどのように内的栄養因子と外的気象因子を統合し開花に至るのか、そのメカニズムを明らかにし、将来の気候変動下における一斉開花種の応答を遺伝子情報に立脚した数理モデルによって予測することを目的とする。

3. 研究の方法

研究対象: 東南アジアにおいて主要な木材樹種である *Shorea leprosula* と *S. curtisii* (調査地; 半島マレーシアのケボンとセマンコック) と冷温帯極相林を優占するブナ(調査地; 北海道羊ヶ丘と新潟県苗場) を対象とする。

サンプル採取方法: 枝、芽、葉、土壌サンプルを2週間から1ヶ月間隔で継続的に採取する。芽と葉からはRNAを抽出し、定量PCRに用いる。枝と葉は、植物体内の栄養塩量(窒素・リン・炭素)の測定に用いる。加えて、対象木から半径1.5mの位置においてイオン交換樹脂を埋め定期的に回収し吸着した栄養塩量を測定することで、アンモニウム態窒素、硝酸態窒素、リンなどの栄養塩量の季節変化と年変化をモニタリングする。温度と降水量データは対象木と近隣の気象観測所で観測されたデータを入手する。

サンプル分析方法: 芽と葉から抽出されたRNAを用いて、フロリゲンとして知られる *FLOWERING LOCUS T(FT)* および花芽分裂組織決定遺伝子である *LEAFY(LFY)* や *APETALA1(AP1)* の発現量変化を定量PCRによ

ってモニタリングする。各遺伝子は対象種において新規に同定し、得られた塩基配列から定量 PCR のプライマーを設計する。植物体内の栄養塩量は、燃焼法とモリデブン青吸光光度法により分析する。

データ分析方法：得られた遺伝子発現量データ、栄養塩量データ、および気象データとの相関を分析するとともに、遺伝子発現量変化を記述する数理モデルを構築する。数理モデルでは、花芽形成に関わる遺伝子の転写産物の生産は温度と乾燥指標によって影響を受けると仮定し、温度と乾燥指標からの影響は実測データから推定する。

4. 研究成果

マレーシア調査地において対象とした *S. leprosula* と *S. curtisii* において FT 遺伝子は 2 つ、LFY 遺伝子は一つ存在し、それぞれ *SIFT1*, *SIFT2*, *ScFT1*, *ScFT2* および *SILFY*, *ScLFY* と名付けた。分子系統樹の分析から、これら遺伝子はそれぞれ FT クレードと LFY クレードに分類されることが示された(図 1)。

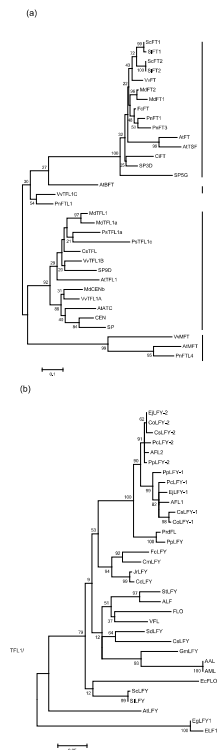


図 1: (a) FT 遺伝子と (b) LFY 遺伝子の分子系統樹

Shorea leprosula と *S. curtisii* においてそれぞれ 2012-2014 年および 2011-2014 年まで遺伝子発現量をモニタリングしたところ、発現が上昇するイベントが 2 度観測され、発現上昇後は開花が観測された(図 2)。

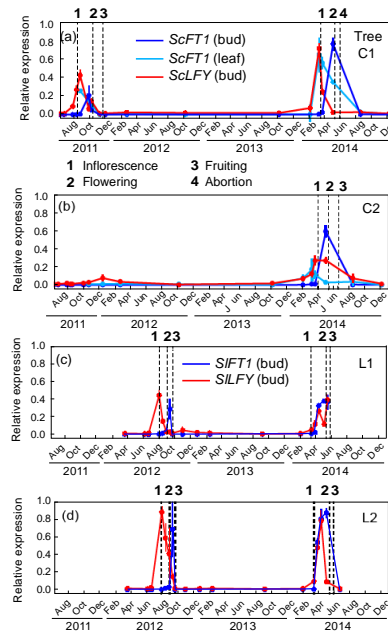


図 2: (a)、(b) *S. curtisii* (C1, C2) と (c)、(d) *S. leprosula* (L1, L2) における FT1 遺伝子と LFY 遺伝子の発現変化。FT1 遺伝子は芽と葉の両方において測定された。1: 花序、2: 開花、3: 結実、4: 種子の中絶。FT1 と FT2 遺伝子の発現パターンは類似していたため、FT1 遺伝子の結果のみを示した。

実際に開花が観測された時期より 1-3 ヶ月前に葉においては FT1 遺伝子が芽においては LFY 遺伝子が発現上昇し、その後芽において FT1 遺伝子が活性化することが示された。

Shorea curtisii の枝における炭素、窒素、リン量は、2011 年の開花イベント後に減少したが、炭素と窒素はその後すぐに回復をみせたのに対してリン量は元のレベルまで回復するまで約 1 年半を要した(図 3)。2014 年

の開花イベント後においても各資源の低下がみられたが、2011年に比べると減少の程度は小さく回復までの時間も短かった。この違いは、2014年の開花は結実まで至らなかったために生じたと考えられる。

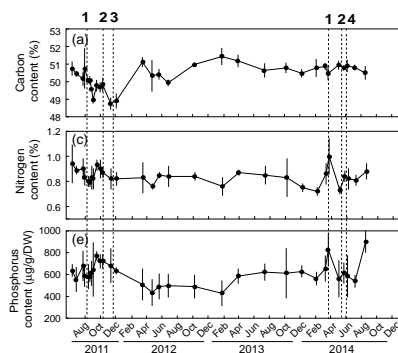


図 3: (a) 炭素、(b)窒素、(c)リンの測定結果。S. curtisi C1 個体の結果を示す。1, 2, 3, 4 はそれぞれ図 2 と同様。

フタバガキ科の花芽形成には温度と乾燥が関わることが示唆されている。そこで、遺伝子発現量と温度、乾燥指標の関係を実測データに基づき分析した結果、約 2 ヶ月間の期間の積算温度（低温）および降水量と発現量との間に強い関係が示された。推定された関係性に基づいて遺伝子発現量の変化を予測した結果、本調査期間に観測された LFY 遺伝子の発現上昇パターンを十分説明できることが示された（図 4）。以上の結果から、本研究で対象としたフタバガキ科樹木においては、低温と乾燥によって花成が誘導されることが示唆された。花成誘導を引き起こすこれらの環境シグナルは、繁殖後に枯渇するリンなどの栄養資源が回復するよりも稀に生じるため、栄養条件による花成の制約は顕著ではなかったと推察される。

一方で日本調査地における対象種であるブナにおいては、植物体内で利用可能な窒素量が繁殖前後で大きく変動することが花芽形成に関わる遺伝子の発現量変化を引き起こすことが報告されている。植物内での窒素

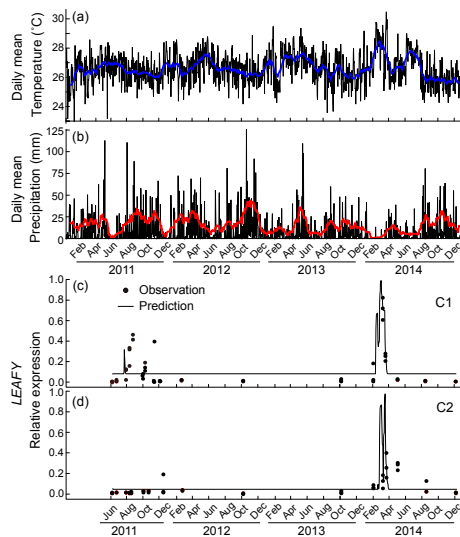


図 4: (a) 日平均気温（黒線）と 30 日間平均気温（青線）、(b) 日降水量（黒線）とその 30 日間平均（赤線）、(c) S. curtisi C1 個体の LFY 発現量の予測（黒丸）と実測（黒線）、(d) S. curtisi C2 個体の LFY 発現量の予測（黒丸）と実測（黒線）。

量の変動が土壌から供給される無機態窒素量の変動に依存するかを調べるために、土壌中のアンモニウム態窒素と硝酸態窒素を測定したところ、これらの無機態窒素量は 7 月から 8 月にかけてピークが見られ、2014 年から 2016 年にかけて減少傾向にあることが示された。このような土壌中無機態窒素量の変動に対して、FT 遺伝子発現量は 2 周期の変動を示したことから、ブナの豊凶は土壌から供給される窒素量の年変動によって引き起こされる可能性は低いことが示唆された。以上の結果は、ブナでは繁殖後の資源枯渇がもたらす自律的な資源量の年変動が豊凶を生み出す主要因であることを支持する。

本研究によって、将来の気候変動下における一斉開花種の応答を遺伝子情報に立脚した数理モデルによって予測するための基盤を整備することができた。今後は、本予測モ

デルを様々な環境条件で取得されたデータに適用し、モデルの汎用性を検討することが課題である。

5. 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

[雑誌論文](計 17件)

1. Yeoh, S. H., Satake, A., Numata, S., Ichie, T., Lee, S. L., Basherudin, N., Muhammad, N., Kondo, T., Otani, T., Hashim, M., Tani, N. (*In Press*). Unraveling proximate cues of mass flowering in the tropical forests of Southeast Asia from gene expression analyses. *Molecular Ecology*.
2. Miyazaki, Y., Satake, A. (*In Press*). Relationship between seasonal progression of floral meristem development and *FLOWERING LOCUS T* expression in the deciduous tree *Fagus crenata*. *Ecological Research*.
3. Inoue, Y., Ichie, T., Kenzo, T., Yoneyama, A., Kumagai, T., Nakashizuka, T. (*In Press*). Effects of rainfall exclusion on leaf gas exchange traits and osmotic adjustment in mature canopy trees of *Dryobalanops aromatica* (Dipterocarpaceae) in a Malaysian tropical rain forest. *Tree Physiology*.
4. Nagai, S., Ichie, T., Yoneyama, A., Kobayashi, H., Inoue, T., Ishii, R., Suzuki, R., Itoioka, T. (2016). Usability of time-lapse digital camera images to detect characteristics of tree phenology in a tropical rainforest. *Ecological Informatics* **32**, 91-106.
5. Tanaka-Oda, A., Kenzo, T., Inoue, Y., Yano, M., Koba, K., Ichie, T. (2016). Variation in leaf and soil ^{15}N in diverse tree species in a lowland dipterocarp rainforest, Malaysia. *Trees-Structure & Function* **30**, 509-522.
6. 佐竹暁子 (2016). 数理モデルを通してみる植物の環境応答力. *化学と生物* **54**, 205-211.
7. Ichie, T., Inoue, Y., Takahashi, N., Kamiya, K., Kenzo, T. (2016). Ecological distribution of leaf stomata and trichomes among tree species in a Malaysian lowland tropical rain forest. *Journal of Plant Research* **129**, 625-635.
8. Han, Q., Kagawa, A., Kabeya, D., Inagaki, Y. (2016). Reproduction-related variation in carbon allocation to woody tissues in *Fagus crenata* using a natural ^{13}C approach. *Tree Physiology* **36**, 1343-1352.
9. Azmy, M. M., Hashim, M., Numata, S., Hosaka, T., Nur Supardi, M. N., Fletcher, C. (2016). Satellite-based characterization of climatic conditions before large-scale general flowering events in Peninsular Malaysia. *Scientific Reports* **6**, 32329.
10. Abe, T., Tachiki, Y., Kon, H., Nagasaka, A., Onodera, K., Minamino, K., Han, Q., Satake, A. (2016). Parameterisation and validation of a resource budget model for masting using spatiotemporal flowering data of individual trees. *Ecology Letters* **19**, 1129-1130.

[学会発表](計 45件)

1. Satake, A. Developing predictive models based on genetic information to forecast future phenological change. 第64回日本生態学会大会. 早稲田大学, 東京都. 2017年3月16日.
2. Han, Q., Kabeya, D., Satake, A. Influence of resource dynamics on flowering gene expression in masting *Fagus crenata* trees. The 101th Annual Meeting of the Ecological Society of America. Greater Fort Lauderdale/Broward County Convention Center, Fort Lauderdale, FL, USA. August 9, 2016.
3. Satake, A. Flowering phenology under seasonal and aseasonal environments: gene expression assessment in the temperate and tropical zones. The 64th National Institute for Basic Biology Conference: Evolution of Seasonal Timers. Okazaki Conference Center, Okazaki, Japan. April 22, 2016.
4. 佐竹暁子, 韓慶民, 沼田真也, 市栄智明, 谷尚樹. 一斉開花研究のフロンティア: 気象と栄養シグナルに対して植物は遺伝子レベルでどのように応答しているか? 第63回日本生態学会大会. 仙台国際センター, 宮城県仙台市. 2016年3月24日.
5. Han, Q., Kabeya D., Satake, A. Flowering gene expression in masting

- Fagus crenata* trees and related dynamics of nutrients in plants and soil. 第63回日本生態学会大会. 仙台国際センター, 宮城県仙台市. 2016年3月24日.
6. Chen, Y.-Y., Satake, A., Numata, S., Kosugi, Y., Tani, M., Yeoh, S. H., Nor Supardi, M. N., Wright, S. J., Sun, I-F., Tani, N. Exploring the mechanism of mass flowering using long-term dipterocarp phenology data. The 100th Annual Meeting of Ecological Society of America. Baltimore Convention Center, Baltimore, USA. August 12, 2015.
 7. Ichie, T., Yoshihara, R., Takayama, K., Igarashi, S., Kenzo, T., Niiyama, K., Kassim, A. R., Fletcher, C., Tayasu, I. Analysis of the past 50 years' tree growth by using ^{14}C dating in an aseasonal tropical rain forest. The 52nd Annual Meeting of the Association for Tropical Biology and Conservation. Hawaii Convention Center, Honolulu, Hawaii. July 14, 2015.
 8. Tani N. Current outcomes of the genetic study for dipterocarps to understand their life history. The 20th annual general meeting of Genetic Society of Malaysia. Universiti Putra Malaysia, Serdang, Malaysia. March 19, 2015.
 9. Satake, A. Exploring the mechanism of synchronized flowering by integrating molecular and modeling approaches. Joint Annual Meeting of Japanese Society for Mathematical Biology & Society for Mathematical Biology. Osaka International Convention Center, Osaka, Japan. July 31, 2014.
 10. Numata, S., Hosaka, T., Amemiya, N., Hashim, M., Yamada, T., Tani, N., Tsumura, Y., Lee, S. K., Muhammad, N. Dipterocarp flora of Peninsular Malaysia: A preliminary analysis. The 51st Annual Meeting of the Association for Tropical Biology and Conservation. Cairns Convention Center, Cairns, Australia. July 21, 2014.
 11. Satake, A., Miyazaki, Y., Maruyama, Y., Chiba, Y., Kobayashi, M. J., Joseph, B., Shimizu, K. K., Mochida, K., Hiura, T., Kon, H. Nitrogen as a key regulator. The 51st Annual Meeting of the Association for Tropical Biology and Conservation. Cairns Convention Center, Cairns, Australia. July 21, 2014.
 12. Yeoh, S. H., Satake, A., Numata, S., Ichie, T., Leong, L. S., Basherudin, N., Muhammad, N., Chen, Y.-Y., Kosugi, Y., Tani, M., Tani, N. Flowering phenology and environmental change: comparison between temperate and tropical rain forests. 第56回日本植物生理学会年大会. 東京農業大学, 東京都. 2014年3月17日.
- 〔図書〕(計0件)
- 〔産業財産権〕
出願状況(計0件)
- 取得状況(計0件)
6. 研究組織
- (1)研究代表者
佐竹 暁子(SATAKE, Akiko)
九州大学・理学研究院・准教授
研究者番号: 70506237
 - (2)研究分担者
沼田 真也(NUMATA, Shinya)
首都大学東京・都市観光科学研究科・准教授
研究者番号: 20391138
 - (3)研究分担者
韓 慶民(HAN, Qingmin)
国立研究開発法人森林総合研究所・植物生態研究領域・チーフ長
研究者番号: 40391180
 - (4)研究分担者
市栄 智明(ICHIE, Tomoaki)
高知大学・教育研究部自然科学系農学部
問・准教授
研究者番号: 80403872
 - (5)研究分担者
谷 尚樹(TANI, Naoki)
国立研究開発法人国際農林水産業研究センター・主任研究員
研究者番号: 90343798