

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 5 日現在

機関番号：82617

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2014～2016

課題番号：26840126

研究課題名(和文) 周期植物の種間比較による周期遺伝子の探索

研究課題名(英文) Research on periodical genes in periodical plants by interspecific comparisons

研究代表者

柿嶋 聡 (Kakishima, Satoshi)

独立行政法人国立科学博物館・植物研究部・支援研究員

研究者番号：30648580

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,100,000円

研究成果の概要(和文)：周期植物とは、それぞれの種に特異的な1年を超える周期で一斉に開花・枯死を繰り返す植物である。本研究で材料としたキツネノマゴ科コダチスズムシソウは、沖縄本島において6年周期で一斉開花する周期植物である。コダチスズムシソウの各個体は発芽から6年目に開花し、枯死することから、発芽から開花までの6年間を測る生物時計を持つと考えられる。そこで、近縁の周期を持たない種類と比較することで、6年間を測る周期遺伝子を探索するとともに、栽培環境をコントロールした栽培実験を行い、時間を測る環境シグナルとして、気温が重要であることを明らかとした。

研究成果の概要(英文)：Periodical plants repeat mass flowering and withering at a species-specific interval more than one year. *Strobilanthes flexicaulis* (Acanthaceae) is a periodical plant that repeats mass flowering every six years in Okinawa Island, Japan. *S. flexicaulis* may have a biological clock measuring six years from germination to flowering, because they flower and wither in the sixth year from their germination. In this study, we explored periodical genes measuring six years by comparisons with non-periodical relative species, and performed cultivation experiments controlling cultivation environments. The cultivation experiments suggested that air temperature is an important signal to count time from germination to flowering.

研究分野：進化生物学

キーワード：一斉開花 周期植物 周期遺伝子 一回繁殖型 キツネノマゴ科 生物時計

1. 研究開始当初の背景

周期植物は、それぞれの種に特異的な1年を越える周期で一斉に開花・枯死(周期的一斉開花・枯死)を繰り返す植物である。東南アジアの熱帯雨林における一斉開花や、ブナなどの豊凶現象は、気象条件や栄養条件で起こると言われているため、周期的一斉開花・枯死とは明確に異なる現象である。周期植物は、イネ科タケ亜科、キツネノマゴ科イセハナビ属で知られている(Janzen 1976)。これまでタケを材料に多くの研究が行われてきたが、長期の一斉開花周期(多くの種類は30年以上周期)がネックとなり、詳細な研究は進んでいない。また、長期間を測るためにどのような生物時計システムを持ち、どのようにしてそれを獲得してきたのかを明らかにするためには、周期性を持たない近縁種との比較が欠かせないが、タケでは周期が長いうえ、クローン増殖を繰り返すため、周期植物であるかどうか分かっていない種類も多く、検証することが困難である。

2. 研究の目的

本研究では、一斉開花周期が比較的短く、分子系統解析(Moylan et al. 2004)から周期的一斉開花・枯死が複数回平行的に進化したことが推定されているイセハナビ属を材料とした。イセハナビ属のコダチスズムシソウ *Strobilanthes flexicaulis*(図1)は沖縄本島で6年という周期植物としては短い周期で一斉開花・枯死を繰り返す(Kakishima et al. 2011)。コダチスズムシソウを材料に、発芽から開花までの時間を測る生物時計に関連した周期遺伝子の探索を行うとともに、栽培実験から、生物時計の生理メカニズムの解明を目指した。

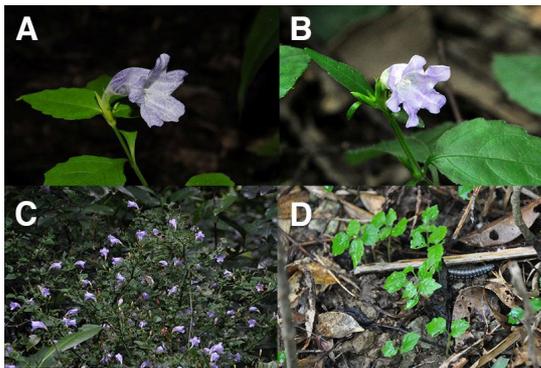


図1 コダチスズムシソウとオキナワスズムシソウの野外での様子。(A)コダチスズムシソウの花。(B)近縁種のオキナワスズムシソウの花。(C)コダチスズムシソウの一斉開花。(D)コダチスズムシソウの実生。

3. 研究の方法

(1) 野外調査、分子系統解析

沖縄本島、八重山諸島、台湾で野外調査を

行い、コダチスズムシソウ、および近縁のオキナワスズムシソウ *S. tashiroi* と台湾固有種 *S. lanyuensis* のサンプルを採取するとともに、生活史を観察した。野外調査から明らかとなった生活史をもとに、分子系統解析と組み合わせることで祖先形質を推定し、生活史が進化過程を推定した。

(2) 周期遺伝子の探索

トランスクリプトーム解析

周期遺伝子の探索のため、発芽から開花までの遺伝子発現変動を調べた。野外集団には一斉開花年以外の年に開花する個体がわずかながら存在し、それらの個体の種子を蒔くとやはりほとんどが6年目に開花する(Kakishima et al. 2011)。そのため、これらの個体は一斉開花年に咲く個体とは別の年に咲いているだけで、周期遺伝子は正常に働いていると考えられる。同じ個体からのサンプリングでは6年間が必要であるため、開花年がずれた個体を使用して、6年間かけることなく発芽から開花までのサンプルを採取した。RNA-seqによるトランスクリプトーム解析を行い、周期遺伝子の候補を探索した。キツネノマゴ科にはモデル植物が存在しないことから、同時にリファレンスゲノムの構築を目指した。

QTL マッピング

近縁種オキナワスズムシソウ(図1)は毎年開花する多回繁殖型植物である(Kakishima et al. 2011)。コダチスズムシソウとオキナワスズムシソウの自然雑種が多回繁殖型になることから、多回繁殖型が優性であると考えられる。ゲノム上の周期遺伝子の位置や数を推定することを目的としたQTL解析を行なうため、コダチスズムシソウとオキナワスズムシソウのF₂雑種を作成した。開花まで年数と、開花後に枯死するかどうかについて、フェノタイピングを進めた。同時に、RAD-seqを用いてジェノタイピングを進めた。

(3) 栽培実験

温室での栽培実験から、コダチスズムシソウは栽培下でも基本的に6年目に開花するだけでなく、挿し木をしても発芽からの時間の記憶は維持されることから、個体サイズは開花シグナルとして重要ではないと考えられている。また、9年周期で一斉開花することが知られているジャワ島原産の近縁種 *S. cernua* は、温室栽培下で8年目に開花し、恒明・定温条件の栽培で7年目に開花した(Tsukaya et al. 2012)。このことは環境変化のない条件で栽培しても、ある程度は時間を測ることができる一方で、周囲の環境によって時計を調節している可能性を示唆している。つまり、ある程度の時間を計測できる生物時計システムに加え、環境シグナルによる調節機構が存在することが推測される。

そこで、発芽から開花までの6年間を測るために重要な環境シグナルを明らかとするため、気温と日長をコントロールした栽培実験を行った。気温条件として、28の高温、16の低温、28と16を3ヵ月ごとに移動させる気温シフトの3条件を用いた。日長条件として、「16時間明期、8時間暗期」の長日、「8時間明期、16時間暗期」の短日、「16時間明期、8時間暗期」と「8時間明期、16時間暗期」を3ヵ月ごとに移動させる日長シフトの3条件を用いた。これらの条件を組み合わせ、高温・長日(図2A)、温度シフト・長日(図2B)、温度シフト・日長シフト(図2C)、温度シフト・短日(図2D)、低温・日長シフト(図2E)、低温・長日(図2F)の6つの栽培条件で実験を行い、初めて開花した日を記録した。実験には2015年12月頃に一斉開花が始まる個体を挿し木で増やして使用した。

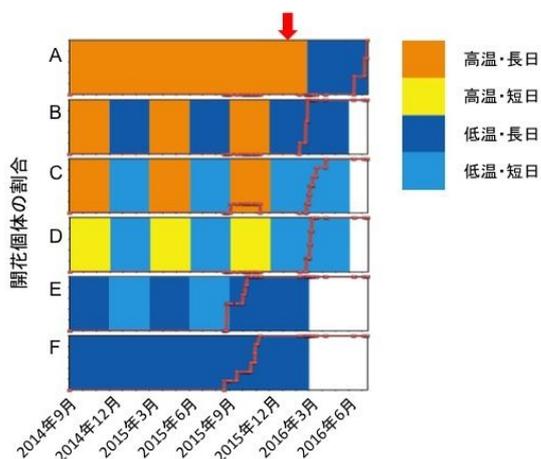


図2 気温と日長を制御した栽培実験。(A) 高温、長日。N=3。(B) 気温シフト、長日。N=5。(C) 気温シフト、日長シフト。N=6。(D) 気温シフト、短日。N=4。(E) 低温、日長シフト。N=6。(F) 低温、長日。N=6。シフトは3ヵ月ごとに条件変更。赤矢印は野外での一斉開花の開始時期。(A) 2016年2月29日に低温に移行。(B-D) 2016年6月24日に実験終了。(E、F) 2016年2月29日に実験終了。

4. 研究成果

(1) 野外調査、分子系統解析

コダチスズムシソウの生活史を観察した結果、これまでの予備的な観察の通り、八重山諸島や台湾ではコダチスズムシソウの一斉開花は見られず、八重山諸島では一回繁殖型、台湾では多回繁殖型であった。また、近縁種の *S. lanyuensis* でも一斉開花は見られず、多回繁殖型であることが明らかとなった。分子系統解析の結果、オキナワスズムシソウがもっとも祖先的であり、一斉開花しない多回繁殖型が祖先形質であると推定された。さらに、コダチスズムシソウの周期的な一斉開

花・枯死は沖縄本島で比較的最近に進化した可能性が示唆された。

(2) 周期遺伝子の探索

トランスクリプトーム解析

発芽から開花までのステージを網羅した代表サンプルに関して、RNA-seqを用いたトランスクリプトーム解析を行った。これまでに、シロイヌナズナの花成関連遺伝子のホモログと推定される配列が635個検出された。花成関連遺伝子のホモログについて、開花時のみ発現が上昇・減少する、発芽から開花まで、開花する季節ごとに発現が上昇・減少する、発芽から開花まで徐々に発現が上昇・減少する、といったパターンに当てはまる遺伝子の検出を進めている。また、リファレンスゲノムを作成するため、PacBioRSIIにより、ゲノム情報の取得を試みた。現在、このデータをもとにリファレンスゲノムを作成するため、アセンブル作業を進めている。

QTL マッピング

実験に使用したコダチスズムシソウとオキナワスズムシソウのF₂雑種は2013年に播種、発芽したものであり、2017年現在で4年が経過している。現在生存している個体のうち、101個体はすでに開花済みであるが、60個体は未開花である。また、開花済みの個体のうち、7個体は開花後に枯死したが、残りの94個体は生存しており、一部の個体は繰り返し開花している。F₂雑種のジェノタイプピングはRAD-seqにより行い、連鎖地図作成のため、現在解析を進めている。

(3) 気温と日長をコントロールした栽培実験

栽培実験の結果、低温条件で栽培した場合に最も早く開花することが明らかとなった(図2E、F)。次に開花するのは、温度シフト条件で栽培した場合であり(図2B-D)、高温条件では開花しなかった(図2A)。高温条件で栽培していた植物を低温に移すと開花が生じた。いずれの条件でも、低温に移して約3ヵ月後に開花した。一方で、日長条件の違いは開花の時期に影響を与えなかった。以上の結果から、コダチスズムシソウの6年間を測る生物時計システムにおいて、気温が重要な環境シグナルであり、低温栽培下で開花が早まることが明らかとなった。また、花芽の形成にも低温が重要であることも示唆された。一方で、日長は環境シグナルとして重要でないことが示唆された。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕(計9件)

Takuya Koyama, Hiromu Ito,
Tomochika Fujisawa, Hiroshi Ikeda,

Satoshi Kakishima, John Cooley, Chris Simon, Jin Yoshimura, *Teiji Sota. Genomic divergence and lack of introgressive hybridization between two 13-year periodical cicadas supports life-cycle switching in the face of climate change. *Molecular Ecology* 25: 5543–5556. 2016. Peer-reviewed. doi: 10.1111/mec.13858

Koshi Kitamura, *Satoshi Kakishima, Takashi Uehara, Satoru Morita, Kei-ichi Tainaka, Jin Yoshimura. The effects of rainfall on the population dynamics of an endangered aquatic plant, *Schoenoplectus gemmifer* (Cyperaceae). *PLoS ONE* 11: e0157773. 2016. Peer-reviewed. doi: 10.1371/journal.pone.0157773

Jomar F. Rabajante, Jerrold M. Tubay, Hiromu Ito, Takashi Uehara, Satoshi Kakishima, Satoru Morita, Jin Yoshimura, Dieter Ebert. Host-parasite Red Queen dynamics with phase-locked rare genotypes. *Science Advances* 2: e1501548. 2016. Peer-reviewed. doi: 10.1126/sciadv.1501548

*Satoshi Kakishima, Tomoe Morimoto. First record of dusky woodswallow (*Artamus cyanopterus*) in New Zealand. *Notornis* 62: 231–232. 2015. Peer-reviewed.

Satoshi Kakishima, *Satoru Morita, Katsuhiko Yoshida, Atsushi Ishida, Saki Hayashi, Takahiro Asami, Hiromu Ito, Donald Miller III, Takashi Uehara, Shigeta Mori, Eisuke Hasegawa, Kenji Matsuura, Eiiti Kasuya, *Jin Yoshimura. The contribution of seed dispersers to tree species diversity in tropical rain forests. *Royal Society Open Science* 2: 150330. 2015. Peer-reviewed. doi: 10.1098/rsos.150330

*Jerrold M. Tubay, Keisuke Suzuki, Takashi Uehara, Satoshi Kakishima, Hiromu Ito, Atsushi Ishida, Katsuhiko Yoshida, Shigeta Mori, Jomar F. Rabajante, Satoru Morita, Masayuki Yokozawa, *Jin Yoshimura. Microhabitat locality allows multi-species coexistence in terrestrial plant communities. *Scientific Reports* 5: 15376. 2015. Peer-reviewed. doi: 10.1038/srep15376

Hiromu Ito, Satoshi Kakishima, Takashi Uehara, Satoru Morita, Takuya Koyama, John R. Cooley, *Jin Yoshimura. Evolution of periodicity in periodical cicadas. *Scientific Reports* 5: 14094. 2015. Peer-reviewed. doi: 10.1038/srep14094

Takuya Koyama, Hiromu Ito, Satoshi Kakishima, Jin Yoshimura, John R. Cooley, Chris Simon, *Teiji Sota. Geographic body size variation in the periodical cicadas *Magicicada*: implications for life cycle divergence and local adaptation. *Journal of evolutionary biology* 28: 1270–1277. 2015. Peer-reviewed. doi: 10.1111/jeb.12653

†Hiromi Asanuma, †Satoshi Kakishima, Hiromu Ito, Kazuya Kobayashi, Eisuke Hasegawa, Takahiro Asami, Kenji Matsuura, Derek A. Roff & *Jin Yoshimura. Evolutionary optimality in sex differences of longevity and athletic performances. *Scientific Reports* 4: 5425. 2014. Peer-reviewed. † These authors contributed to this study equally. doi: 10.1038/srep05425

[学会発表](計9件)

柿嶋聡、内貴章世、西田佐知子、6年周期植物コダチスズムシソウの一斉開花における送粉と繁殖干渉の検証、日本植物分類学会第15回大会、2017年3月10日、京都大学(京都府・京都市)

柿嶋聡、吉村仁、長谷部光泰、塚谷裕一、6年周期一斉開花植物コダチスズムシソウの生物時計に重要な環境シグナル、第48回種生物学シンポジウム、2016年12月3日、キロロトリビュートホテル北海道(北海道・余市郡赤井川村)

柿嶋聡、吉村仁、長谷部光泰、塚谷裕一、6年周期植物コダチスズムシソウの生物時計システムに重要な環境シグナルは何か?、日本植物学会第80回大会、2016年9月16日、沖縄コンベンションセンター(沖縄県・宜野湾市)

柿嶋聡、高橋尚也、渥美宏太、内貴章世、西田佐知子、吉村仁、個体ベースモデルを用いた6年周期一斉開花の進化における繁殖干渉仮説の検証、第47回種生物学シンポジウム、2015年12月5日、かんぼの宿岐阜羽島(岐阜県・羽島市)

柿嶋聡、種間交雑現象による植物の多様化に関する進化生態学的研究（若手奨励賞受賞講演）日本植物学会第79回大会、2015年9月6日、朱鷺メッセ（新潟県・新潟市）

柿嶋聡、守田智、吉村仁、邑田仁、周期植物と非周期植物の交雑における非対称性、第62回日本生態学会大会、2015年3月21日、（鹿児島県・鹿児島市）

柿嶋聡、高橋尚也、渥美宏太、吉村仁、6年周期一斉開花の進化における繁殖干渉仮説の格子シミュレーションを用いた検証、日本植物分類学会第14回大会、2015年3月8日、福島大学（福島県・福島市）

柿嶋聡、吉村仁、邑田仁、6年周期一斉開花植物コダチスズムシソウの生活史進化、第46回種生物学シンポジウム、2014年12月6日、富士 Calm（山梨県・富士吉田市）

柿嶋聡、林幸輝、守田智、吉村仁、熱帯雨林の樹木多様性の維持・進化における種子散布者の寄与の理論的検証、日本植物学会第78回大会、2014年9月14日、明治大学（神奈川県・川崎市）

6. 研究組織

(1) 研究代表者

柿嶋 聡 (KAKISHIMA, Satoshi)
国立科学博物館・植物研究部・支援研究員
研究者番号：30648580

(4) 研究協力者

吉村 仁 (YOSHIMURA, Jin)
長谷部 光泰 (HASEBE, Mitsuyasu)
塚谷 裕一 (TSUKAYA, Hirokazu)
永野 惇 (NAGANO, Atsushi)