

令和 2 年 5 月 28 日現在

機関番号：15301

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2016～2019

課題番号：16K07517

研究課題名(和文) 資源制限がもたらす植物の性表現決定機構の解明

研究課題名(英文) Study on the mechanism of sexual expression of individual flowers in plants due to resource limitation

研究代表者

宮崎 祐子 (MIYAZAKI, Yuko)

岡山大学・環境生命科学研究所・准教授

研究者番号：20443583

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,500,000円

研究成果の概要(和文)：植物における個々の花の可塑性な性表現決定機構には個体内資源の関与が示唆されているが、詳細は不明である。本研究では個体内で局所的に発生する資源制限が個花の性決定を説明するかどうかについて検証を行った。

材料には個体内に両性花と雄花を持つツユクサを用い、花序内で最初に咲く両性花(B1)の結実の有無と次に咲く花(B2)の性表現と資源量を調べた。また、雄花と雌花の比較トランスクリプトーム解析を行った。B1結実に伴う花序内の資源の減少は顕著でなく、B2つぼみ内の窒素・リン濃度にはB1の結実の有無による差がなかった。以上から、花序内の資源制限が直接的にB2の性を制御する要因ではないことが示唆された。

研究成果の学術的意義や社会的意義

花の雌雄性については、重要作物等を材料にその分子機構の解明が進んできたが、周囲の環境条件に応じて可塑性な性表現の制御を行う植物における性決定機構に関する研究はこれまでになく、本研究で新たな知見が得られた。また、資源量が植物の花の性表現に影響するかどうかを明らかにすることで、都市化がもたらす資源制限が、種子生産を介して植物の遺伝的多様性や生育地の縮小化を引き起こすかどうかを検討する材料を提供することができる。

研究成果の概要(英文)：It has been suggested that internal resources are involved in the mechanism of plastic sexual expression determination of individual flowers in plants, but the details are unknown. In this study, we tested whether locally occurring resource limitations within individuals could explain the sex determination of individual flowers.

Using *Commelina communis* f. *ciliata*, which has hermaphroditic and male flowers in a single plant, we examined the existence of fruiting of first flower (B1) in the inflorescence, and sex expression and resources of next blooming flower (B2). We also performed a comparative transcriptome analysis of male and female flowers. As a result, the decrease of resources in the inflorescence was not remarkable, and the nitrogen and phosphorus concentration in the bud of B2 did not differ by the existence of B1 fruiting. These results suggest that the resource limitation in the inflorescence is not a factor that directly controls the sex of B2.

研究分野：植物繁殖生態学

キーワード：資源制限 窒素 リン ツユクサ 花の性表現決定

## 様式 C - 19、F - 19 - 1、Z - 19 (共通)

### 1. 研究開始当初の背景

被子植物の花における性表現は、7割程度が雌雄の機能を一つに持つ両性花であるが、3割程度は雌雄の単性花をつける植物が存在し、その組み合わせによって多様な花の性表現が認められる。幅広い植物種において花の性表現型決定は個体サイズに依存するサイズアドバンテージモデルで説明されている (Ushimaru & Matsui 2001, Ushimaru & Genkai-Kato 2011; カエデ属, Bierzychudek 1982, 1984a, b, Kinoshita 1987; テンナンショウ属)。それは「雄花と比較して結実を伴うために多くの資源を必要とする雌花(両性花)の生産は、有する資源の多いサイズの大きな個体で可能となる」とするものである。

両性花と雄花を同一個体内に持つ雄性両全性同株の場合、雄花は訪花昆虫への誘因効果を高めることや、少ない資源で雄親成功を高める効果があることが知られている (Bertin 1982)。雄性両全性同株の代表例であるツユクサ (*Commelina communis*) は、一つの花序内で両性花の開花・結実後に雄花が生産される傾向がある、つまり資源依存的な性表現の制御機構を有していることが分かっているが、それは果実・種子生産といった資源の消費を伴う両性花を生産した後でも、比較的少ない資源で生産できる雄花をつけ、雄親としての成功を高めるためであると考えられている (森田・濁川 1999)。そのためツユクサのような雄性両全性同株では、雄花をどの程度生産するかは個体の繁殖成功(適応度)に影響する重要な繁殖戦略であると言える。

しかしながらこれまで花の性表現に影響する資源については、観察される現象とその現象を説明する制御機構の間をつなぐ研究がなく、性表現と個体サイズ(有する資源)との相関を示した現象論的な説明に終始し、資源が個花の性表現決定因子の発現に関与するのかどうか、またどの個体内資源(炭水化物、無機栄養塩類など)が関与するのかなど、個体内の養分環境に依存した個花の性表現の制御機構を解明できていない。

### 2. 研究の目的

以上のことから、本研究では資源に依存した可塑的な性表現の制御機構、すなわち、個体内資源が花の性表現制御のシグナルとして作用するのか、について明らかにすることとした。ツユクサは花序内の個々の花の性表現を操作実験により制御できる材料であることが既往の研究から明らかになっており、確実に成果を得られる可能性が高いため研究材料とした。また、ツユクサは路傍や畑地に普通に見られる身近な植物であるが、都市域では生育環境の悪化に伴う資源制限が存在し、花数が減少するとともに雄花の割合が高くなることが示唆されている (Ushimaru et al. 2014)。本研究により個体内資源量に依存した性表現決定機構を明らかにすることで、都市環境への改変がもたらす資源制限が植物の種子繁殖に与える影響について考察することが可能になると考えられる。

### 3. 研究の方法

日本に生育するツユクサ(ツユクサ科、一年生草本)には4倍体と8倍体およびそれらの異数体の存在が報告されている(藤島 1981)が、総苞に毛のあるもの(以降、ケツユクサと呼ぶ)は4倍体である(藤島 2010)。本研究では候補遺伝子の単離などの分子生物学的実験を行うため、4倍体のケツユクサ (*Commelina communis* f. *ciliata*) を用いた。なお、ケツユクサでもツユクサと同様に、花の性表現には可塑性がみとめられる(邑上・勝原・丑丸 未発表)。本研究では野外のケツユクサから採取した幼苗あるいは種子を、施肥などの管理を行うことが可能な圃場あるいはガラス温室内のポットで栽培して用いた。

ケツユクサでは、一つの花序内で最初に咲く花(以後 B1)は両性花であり、B1 両性花が結実成功すれば次に咲く花(以後 B2)は雄花に、B1 両性花が結実に失敗すれば B2 は再び両性花になる。このように B2 の性は B1 両性花の結実の成否によって可塑的に決定される。B2 の性が B1 両性花の結実の成否によって可塑的に決定すること、また一般に両性花は雌蕊や子房などの器官を有することから雄花よりも生産コストが高いと考えられる(実際に、ケツユクサの雄花は雌ずいが伸長せず、胚珠が未熟となった花である)ことから、B1 の結実の成否によって B2 が利用可能な資源量が変化するような自律的な資源利用の仕組みが花序単位で存在し、また B2 が両性花になるためには何らかの資源が必要なのではないかと仮定して以下の実験を行った。

(1) ケツユクサの性表現決定、すなわち雌ずいの発達の制御に関わる遺伝子を明らかにするため、温室内で生育させたケツユクサから開花前日の両性花、雄花を採取して RNA を抽出し、次世代シーケンサー(Hiseq 4000, Illumina; 100bp ペアエンド、データ量 4GB/サンプル)による mRNA の解読を行った。得られたリードデータからコンティングを作成し、BLAST 検索、GO アノテーションなどの解析を行い、両性花と雄花で発現量に差のある遺伝子について解析した。

(2) B1 両性花の摘花実験により B2 に両性花および雄花を誘導し、花序内の各器官内の資源濃度(全窒素、リン)を測定し、花序内に局所的な資源制限が存在するかどうか、またそのことが花の性表現に影響するかどうかを検討した。当初は非構造体炭水化物についても測定予定であったが、予備実験の結果、非構造体炭水化物の関与は低いと考えられたため、測定に必要な組織量(質量)の多い非構造体炭水化物については省略した。栽培したケツユクサ 10 個体を使用して 2018 年および 2019 年の 7 月後半から 9 月後半

までの開花期間中に花序の採取を行った。花序内の器官は、B1 および B2 の共通した基部である花柄、花序全体を基部から包む総苞、B1 両性花の子房、B2 つぼみの4つに分けて評価を行った。B1 両性花は受精のタイミングを統一するため、開花直後に強制他家受粉を行った（これを0時間後とする）。2018年は花柄および総苞についてはB1 両性花の開花からB2が開花するまでの期間（72時間）において、0, 6, 12, 24, 48, 72時間後に採取した。B1子房は0, 1, 2, 3, 5, 7, 14, 21日後に採取した。2019年は花柄、総苞、B2つぼみ、B1両性花について、開花前12時間、1, 6, 12, 24時間後に採取した。採取後、各器官の窒素濃度およびリン濃度を測定した。これまでの研究により、B2の性はB1両性花の開花から24時間以内に決定することが明らかになっている。そのため、特にB1両性花の開花から24時間内の花序内の各器官における窒素濃度およびリン濃度の増減に着目して解析を行った。

- (3) 得られた結果を統合して考察し、ケツクサにおいて個体内資源（全窒素、リン）が性表現制御のシグナルとして作用し、両性花および雄花を誘導するのかを考察した。

#### 4. 研究成果

- (1) 両性花と雄花を edgeR (Robinson et al. 2010) を用いて比較し、発現量が変化している遺伝子を抽出した。また、Gene Ontology に基づいて結果を整理し、発現変動遺伝子だけが持つ GO term が全遺伝子の持つ GO term に比べ、どれくらい異なっているのかを topGO (Alexa & Rahnenfuhrer 2016) を用いたエンリッチメント解析によって評価した。GO の biological process (生物学的プロセス) に基づいて解析結果を整理した結果、B1 両性花で発現が高くなる遺伝子群に、胚嚢における卵細胞分化に関与する遺伝子群が含まれていたことから、解析の妥当性が評価できた。また、以下のことが明らかになった。

雄花でアブシジン酸の合成と応答がみられる、両性花でジベレリンの合成と応答がみられる、雄花でリン欠乏応答がみられる、発現変化した遺伝子に日長応答遺伝子が多く含まれている、両性花で細胞分裂に関わる遺伝子が多く含まれている、雄花で様々なストレス応答がみられる。これらのことから、ケツクサの雄花において雌ずいおよび子房が発達しないのは、細胞分裂が阻害されている可能性が考えられた。細胞分裂が起こらないのは、雄花でジベレリンの合成が抑制されており、ジベレリンの合成の抑制は、アブシジン酸の働きが高くなっているためではないかと考えられる。この結果を受けて、植物ホルモンの関与についてはアブシジン酸およびジベレリンを総苞および B2 つぼみに塗布し、摘花実験によって B2 に期待される花の性表現が変化するかどうか確認したが、変化は確認できなかった。塗布濃度や時期などを再検討して再実験を行う必要があると考えられる。

- (2) B1子房において時間経過に伴う窒素含有量およびリン含有量の増加が見られ、B1子房へ窒素およびリンが分配されていることが確認できた。一方で、花柄と総苞ではB1両性花の開花から24時間までに窒素濃度およびリン濃度のどちらも減少しなかった。また、B1の開花から24時間の間にB1の結実失敗に伴うB1からの窒素・リンの引き戻しは存在するが、他の花序内器官（花柄、総苞）で一貫した窒素・リン濃度の増加傾向は見られなかった。また、B2つぼみ内の窒素・リン濃度には処理間で違いがなかった（図1）。

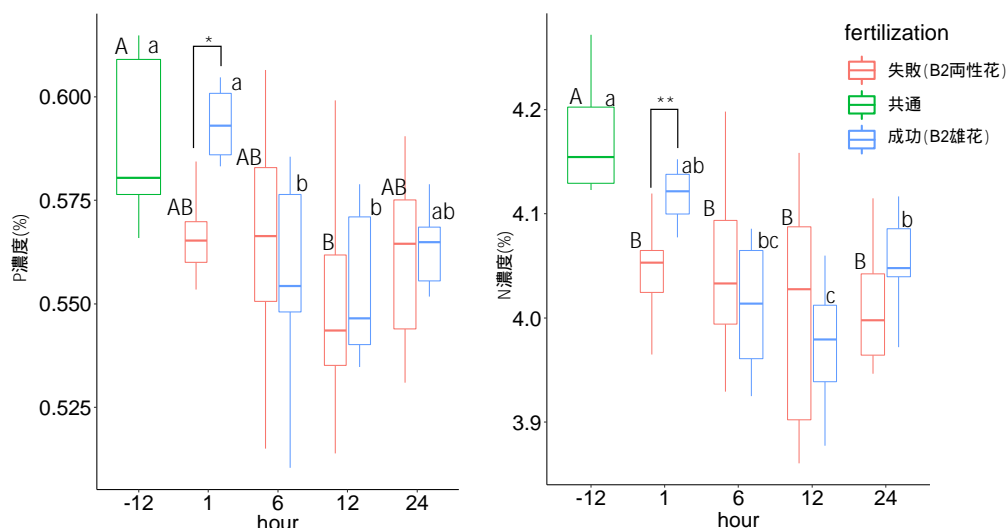


図1 B2つぼみ内のリン濃度および窒素濃度

- ( 3 ) 網羅的遺伝子発現解析の結果、雄花でリン欠乏応答がみられた。一方、花序内の資源濃度の測定の結果、B2 の性が決定すると考えられる B1 開花後 24 時間以内に、花序内で B1 結実に伴う局所的な窒素濃度およびリン濃度の低減はみられず、B2 つぼみ内の窒素濃度およびリン濃度にも、B1 開花後 1 時間の時点を除き、差が見られなかった。B1 両性花の結実には花序外から窒素およびリンが供給されることが示唆され、B1 両性花の結実に伴う花序内の資源制限が B2 を雄花に誘導するという仮説は支持されなかった。網羅的遺伝子発現解析は開花前日のつぼみを用いて行ったが、摘花実験の結果、B2 の性決定は B1 開花から 24 時間以内には完了していることが明らかになった。そのため、網羅的遺伝子発現解析でみられた雄花でのリン欠乏応答と、実際の B2 のリン濃度に両性花と雄花とで差がないという結果の矛盾が生じたことが考えられる。
- また、本実験を継続していく中で、ケツユクサの B2 花の性表現は日長条件に強く影響されることが見出された。また、日長条件に対する応答が栄養状態によって異なるという結果も得られた。今回の実験では局所的な資源環境の直接的な影響はみられなかったが、栄養、日長、温度など複数の環境条件が複合的に作用している可能性が示唆された。そのため、今後は花の詳細な発達段階とともに、それらの環境要因の複合作用について検討していく必要があると考えられる。

5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕 計2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 1件）

1. 著者名 Katsuhara KR, Nakahama N, Komura T, Kato M, Miyazaki Y, Isagi Y, Ito M, Ushimaru A	4. 巻 94
2. 論文標題 Development of microsatellite markers for the annual andromonoecious herb <i>Commelina communis</i> f. <i>ciliata</i> (Commelinaceae)	5. 発行年 2019年
3. 雑誌名 Genes & Genetics Systems	6. 最初と最後の頁 133-138
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） <a href="https://doi.org/10.1266/ggs.18-00058">https://doi.org/10.1266/ggs.18-00058</a>	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 -

1. 著者名 Koki R. Katsuhara, Yuuya Tachiki, Ryosuke Iritani, Atushi Ushimaru	4. 巻 1
2. 論文標題 Eco-evolutionary dynamics of prior selfing rate promotes the coexistence without niche partitioning under reproductive interference	5. 発行年 2020年
3. 雑誌名 bioRxiv	6. 最初と最後の頁 1-35
掲載論文のDOI（デジタルオブジェクト識別子） <a href="https://doi.org/10.1101/2020.04.07.029082">https://doi.org/10.1101/2020.04.07.029082</a>	査読の有無 無
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 -

〔学会発表〕 計8件（うち招待講演 0件/うち国際学会 0件）

1. 発表者名 宮崎祐子, 佐藤弘大, 井上智美, 赤路康朗, 勝原光希, 邑上夏菜, 丑丸敦史
2. 発表標題 雄性両全性同株ケツクサの個花における日長と養分環境依存的性決定
3. 学会等名 日本生態学会第67回全国大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 佐藤弘大, 宮崎祐子, 勝原光希, 邑上夏菜, 廣部宗, 兵藤不二夫, 丑丸敦史
2. 発表標題 ケツクサにおける花の可塑的な性決定と花序内資源量の関係
3. 学会等名 日本生態学会第67回全国大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 増田佳奈, 邑上夏菜, 勝原光希, 宮崎祐子, 丑丸敦史
2. 発表標題 都市域と里山域での自殖率の集団間比較：一年生草本ツユクサを用いて
3. 学会等名 日本生態学会第67回全国大会
4. 発表年 2020年

1. 発表者名 宮崎祐子, 佐藤弘大, 井上智美, 赤路康朗, 勝原光希, 邑上夏菜, 丑丸敦史
2. 発表標題 日長と養分環境に応答した雄性両全性同株ケツユクサの花の性制御
3. 学会等名 2019年度中国四国地区生物系三学会合同大会広島大会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 邑上夏菜, 勝原光希, 宮崎祐子, 丑丸敦史
2. 発表標題 送粉環境と花形質が自殖率に与える影響：ツユクサの集団間変異を用いた検証
3. 学会等名 第66回日本生態学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 佐藤弘大, 宮崎祐子, 勝原光希, 邑上夏菜, 廣部宗, 兵藤不二夫, 丑丸敦史
2. 発表標題 雄性両全性同株ケツユクサの花の性は資源依存的に決まるのか？
3. 学会等名 第66回日本生態学会
4. 発表年 2019年

1. 発表者名 原 里美, 宮崎祐子, 邑上夏菜, 勝原光輝, 丑丸敦史
2. 発表標題 雄性両全性同株ケツユクサにおける花の性表現決定時期
3. 学会等名 生物系三学会中国四国支部大会 (高知大会)
4. 発表年 2017年

1. 発表者名 宮崎祐子, 原 里美, 邑上夏菜, 勝原光輝, 丑丸敦史
2. 発表標題 ケツユクサの花の性決定に関わる遺伝子発現
3. 学会等名 日本生態学会第65回大会
4. 発表年 2018年

〔図書〕 計0件

〔産業財産権〕

〔その他〕

<p>資源制限がもたらす植物の性表現決定機構の解明 (生命環境学専攻)  <a href="http://www.gels.okayama-u.ac.jp/tp/column/column_id77.html">http://www.gels.okayama-u.ac.jp/tp/column/column_id77.html</a></p>
--

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	丑丸 敦史  (Ushimaru Atsushi)  (70399327)	神戸大学・人間発達環境学研究科・教授    (14501)	

## 6. 研究組織（つづき）

	氏名 (研究者番号)	所属研究機関・部局・職 (機関番号)	備考
研究協力者	井上 智美  (Inoue Tomomi)  (80435578)	国立研究開発法人国立環境研究所・生物・生態系環境研究センター・主任研究員   (82101)	
研究協力者	赤路 康朗  (Akaji Yasuaki)	国立研究開発法人国立環境研究所・生物・生態系環境研究センター・研究員   (82101)	
研究協力者	佐藤 弘大  (Sato Kodai)	岡山大学・環境生命科学研究科   (15301)	
研究協力者	勝原 光希  (Katsuhara Koki)	神戸大学・人間発達環境学研究科   (14501)	