

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 26 年 6 月 26 日現在

機関番号：18001

研究種目：挑戦的萌芽研究

研究期間：2011～2013

課題番号：23658132

研究課題名(和文) 潮汐リズム環境におけるマングローブ樹木の概日リズム制御

研究課題名(英文) Circadian rhythm regulation in mangrove tree under aquatic environment controlled by tidal rhythm

研究代表者

渡辺 信 (WATANABE, SHIN)

琉球大学・熱帯生物圏研究センター・准教授

研究者番号：10396608

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,000,000円、(間接経費) 900,000円

研究成果の概要(和文)：マングローブの生理現象においても、概日リズムによる制御が重要な役割を果たしていることが予想されるが、マングローブの分布域である潮間帯は月の公転運動による潮汐作用により、常に概日リズムとずれた異なるリズムで湛水ストレスに曝されている。そこで本研究では、沖縄県西表島のマングローブ樹種を研究材料とし、潮汐リズムで変動する水環境に生育する主要なマングローブ樹木の生理現象と概日リズムとの関係を明らかにするために、潮汐リズム環境下で生育したマングローブの遺伝子発現解析を行った。その結果、時計中核振動子のリズムは湛水状態の違いによってリセットされることはなく、概日リズムに支配されていることが推察された。

研究成果の概要(英文)：Circadian rhythm is one of the most crucial mechanisms for controlling physiological function in plant species. In mangrove trees, circadian rhythm must be very significant, however the ecological niche of mangrove ecosystem is exposed to unusual aquatic environment controlled by tidal inundation, which has different rhythm (12 hours and 25 minutes) with circadian rhythm (24 hours). In order to elucidate the relationship between circadian rhythm and the physiological reaction of mangrove species exposed to tidal rhythmic aquatic environment, we studied especially about the gene expression of circadian rhythm related functional gene, chlorophyll a/b-binding protein (CAB2). As the result, it was suggested that the circadian rhythm was maintained regularly in mangrove tree even under aquatic environment controlled by tidal rhythm.

研究分野：農学

科研費の分科・細目：森林学・森林科学

キーワード：森林生態 マングローブ 概日リズム

### 1. 研究開始当初の背景

植物の概日リズム研究はほとんどが一年生草本のモデル植物を材料としており、現在得られている知見の大部分は人工環境下での実験に基づくものである。そのため、植物と自然生態系に多様に存在する各種情報因子との相互作用に関するデータ蓄積は少なく、自然界の植物生態系で優占種となる樹木に至っては、概日時計の研究は殆ど行われていない。しかしながら、樹木を研究材料とした概日時計の数少ない研究例からは一年生草本では得難い興味深い知見が得られている。Wilkinson et al. (2006, Plant J.: 47)による「オイルパーム(*Elaeis guineensis*)のイソブレン放出は従来提唱されてきた光制御ではなく、概日リズムに制御されている。」という報告は、光や温度といった制御要因で説明されてきた多くの生理現象の中に、実は概日リズムが制御要因として関与しているものがある可能性を示唆している。本研究代表者は過去に沙漠に生育する樹木の環境ストレス耐性に関して生態生理学的な研究に従事してきたことから(Watanabe et al. 2000 Plant cell, Tiss and Org Cult 63) マングローブ樹木の環境ストレス耐性と立地環境との関係解明は非常に興味深いテーマである。また、本研究代表者が草本植物のエチレン受容体研究に従事した際(Watanabe et al. 2006 Biochem Biophys Res Com 351, Ishimaru et al. 2006 Plant Sci 171)、低酸素条件下の根系で通気組織が形成される現象に、エチレンが関与していることに強い関心を抱いていた。そして現在、西表島で進めているマングローブの湛水ストレス研究において、昼夜関係なく潮の干満で湛水するマングローブを調査する中で、概日リズム制御であるはずの光合成や花成はどのように調節されているかという疑問を抱くようになり、本研究の着想に至った。

### 2. 研究の目的

概日リズムは約24時間周期の生命活動の変動で、個体における時間生成機構として生物界に普遍的に存在する制御機構である。植物においても花芽形成制御や光合成活性など、重要な生理現象が概日リズムの制御を受けている。一方、マングローブは熱帯・亜熱帯の潮間帯に成立する森林を構成する樹木の総称であり、ヒトも含めた多種多様な生物の重要な生活圏となっている。マングローブの生理現象においても、概日リズムによる制御が重要な役割を果たしていることが予想されるが、マングローブの分布域である潮間帯は月の公転運動(12時間25分周期)による潮汐作用により、常に概日リズム(24時間)とずれた異なるリズムで湛水ストレスに曝されている。そこで本研究では、沖縄県西表島のマングローブ生態系をフィールドとし、潮汐リズムで変動する水環境に生育する主要なマングローブ樹木の生理現象と概

日リズムとの関係を森林生態学、植物生理学、分子生物学的手法を用いて探求し、マングローブ生態系成立の仕組みを解明することを目的とする。

本研究では、潮汐リズム環境に生育するマングローブ樹木の生理現象と概日リズムとの関係を探求することでマングローブ生態系成立の仕組みを解明することを目的としており、後述の二つの目標を設定した。自然環境下のマングローブより概日時計遺伝子群の単離と発現解析を行い、潮汐リズムと概日リズムの関係を明らかにする。マングローブの湛水状態と周囲の環境因子をモニタリングし、マングローブ生態系が成立可能な水環境の動態を明らかにする。

### 3. 研究の方法

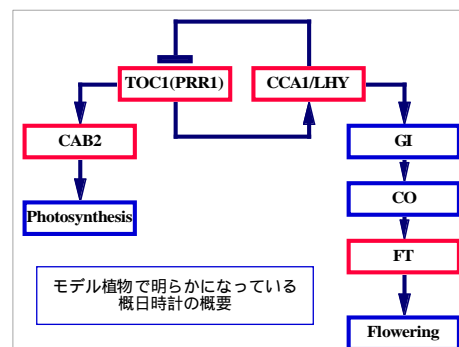
#### 【研究材料】

沖縄県八重山郡の西表島に生育する代表的なマングローブ樹木である *Rhizophora stylosa* (以下ヤエヤマヒルギと称する)、*Bruguiera gymnorhiza* (以下オヒルギと称する)の2種を本研究の材料とした。

#### 【研究体制】

本研究では沖縄県西表島の琉球大学熱帯生物圏研究センター西表研究施設を拠点とし、野外調査、栽培実験、実験試料の調整と各種実験を実施した。野外調査と栽培実験、試料抽出作業では西表研究施設の技術専門員と非常勤職員が行った。DNAの抽出及びRNAの抽出、cDNA合成、発現解析は西表研究施設で実施したが、核酸配列のシーケンスは外注とした。

#### 【標的遺伝子の情報】



始めに、標的となる各遺伝子の概要(シロイヌナズナの情報に基づく:赤枠表示は本研究で特に重要と思われる遺伝子を表す)を上図に図示すると共に、その特徴を以下に箇条書きで記述する。

LHY (LATE ELONGATED HYPOCOTYL) 概日時計のリズムを制御する MyB タイプの転写調節因子。

CCA1 (CIRCADIAN CLOCK ASSOCIATED 1) 概日時計のリズムを制御する MyB タイプの転写調節因子。LHY のホモログ。

CAB2 (CHLOROPHYLL A/B BINDING PROTEIN 2)

早朝に mRNA 量が最大となる morning gene として知られている。

TOC1 (TIMING OF CAB EXPRESSION 1) 概日時計のリズムを制御する MADS-box タイプの転写因子。

GI (GIGANTIA) 概日時計のシグナル伝達経路中盤の巨大蛋白質のコード遺伝子。ホモログ無し。

CO (CONSTANS) 概日時計のシグナル伝達経路中盤の zinc finger タンパクをコードする遺伝子。

FT (FLOWERING LOCUS T) 概日時計のシグナル伝達経路終盤を制御する。花成ホルモン、フロリゲンの第一候補遺伝子。

#### 【研究方法】

沖縄県八重山諸島、西表島に位置する琉球大学熱帯生物圏研究センター西表研究施設を本研究の拠点とし、その東側 400 メートルに位置する船浦湾外周を覆うマングローブ林（西表研究施設実験林）を調査フィールドとした。林内の調査プロットは樹種の分布毎に地盤高が異なり湛水頻度が異なるため、比較対象のために林外の地盤高が一定な場所にも調査プロットを設置し、ヤエヤマヒルギ、オヒルギの実生を定植、実験材料とした。

潮汐作用による水環境の変化とそれぞれの調査プロットにおける植物体の様子を防水デジタルカメラのインターバル撮影機能により連続画像として記録し、概日リズムと連動して起こる葉の就眠運動等の視覚的な現象を定量化(アクトグラフ化)した。同時に、概日遺伝子群の発現に影響を及ぼすことが予想される環境因子データ(気温、湿度、雨量、風速、日射量、潮位変動、水温、塩分濃度)を各種センサーとデータロガーを用いて記録し、フィールドで観察される植物の状態との関係を解析した。

潮の干満が明瞭な大潮の状況を中心に、それぞれの調査プロットの植物体から時系列毎に葉を中心とした試料を採取した。4 時間おきに水上もしくは水没した材料の葉を採取した。試料は採取直後に洗浄し、デュワー瓶内の液体窒素に投入、西表研究施設に持ち帰り、RNA 抽出まで -80 で保管した。

RNA 抽出は、既に実績のある改良 CTAB 法を用い、逆転写反応により cDNA を合成後、5' & 3' RACE-PCR により標的遺伝子の単離を行った。フィールドで採取した試料の概日時計関連遺伝子の発現解析はリアルタイム PCR 法で行った。

上述のフィールドと室内実験で収集した各々のデータを統合的に解析し、更にファインスケールでの解析が必要と判断される事象に関しては、実験室内の植物培養用インキュベーターで異なる湛水水位と光、温度条件等を解明すべき事象に最適に組み合わせた栽培を行い、複合環境要因の変化に対する植物体の反応と概日リズム関連遺伝子の発現様式を調べた。

#### 4. 研究成果

沖縄県八重山諸島西表島にある琉球大学熱帯生物圏研究センター西表研究施設のマングローブ実験林において、オヒルギ実生が生育するマングローブ林に調査プロットを設置し、概日時計関連遺伝子群の発現に関係すると予想される光や潮位変動、水温等の環境モニタリングデータを収集した。

一方で、ディジェネレイトプライマー及び 5' & 3' RACE-PCR 方で標的遺伝子の単離を試みたが、研究を進めるのに十分なシーケンス情報を得られなかったため、大学共同利用機関法人自然科学研究機構基礎生物学研究所の次世代シーケンサー、Illumina HiSeq200 による RNA-Seq を行った。まずリファレンスとなるトランスクリプトームデータベースを作成するためにオヒルギの異なる器官、湛水条件、及び試料採取時間を組み合わせて 18 のライブラリーを作成した。シーケンス後、Trinity によるアッセンブルを進めた結果、約 10 万のコンティグに情報が収束した。現在アノテーション付けの作業を進めている。一方、潮汐リズムの存在を確認するために、室内で発芽させたオヒルギ実生を自然界の潮汐リズムと湛水タイミングをシンクロするようにプログラミングした水耕栽培装置で 1 ヶ月間栽培した後、4 時間おきに水上もしくは水没した状態のオヒルギ実生の葉を採取した。採取した試料から RNA 抽出後、次世代シーケンサーによる RNA-Seq を行い、リファレンスのアノテーション付け作業完了後にトランスクリプトーム解析を実施する。野外実験で採取したサンプルについても、リファレンスデータベース作成完了後に発現解析を進めていく。

また、先に得られたトランスクリプトームリファレンス情報から、時計関連遺伝子群の鍵遺伝子の一つである chlorophyll a/b-binding protein (CAB2) 様遺伝子を別個に単離し、人工的に作り出した潮汐リズムで湛水処理したオヒルギ実生の葉の遺伝子発現を RealTime PCR で調べた。その結果、湛水、非湛水の水環境の差に拘わらず、概日リズムと考えられる規則的な遺伝子発現パターンが確認された。この結果から、オヒルギ実生の葉の時計中核振動子のリズムは湛水状態の違いによってリセットされることはなく、概日リズムに支配されていることが推察された。このことから花成や光合成のように湛水環境では不都合を伴う生理現象は、概日リズムシグナル制御の下流域で何らかの調節を受けている可能性が示唆された。現在作成中のトランスクリプトームデータベース完成後、潮汐環境に於ける儀実リズムがどのように制御されるのかを In Silico 解析で調べる予定である。

#### 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 0件)

〔学会発表〕(計 1件)

Shin Watanabe

Effect of light to succession of mangrove forest in Iriomote.

East Asian Federation of Ecological Societies, Ohtsu/Japan

発表年月日 2012年3月20日

〔図書〕(計 0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計 0件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

出願年月日：

国内外の別：

取得状況(計 0件)

名称：

発明者：

権利者：

種類：

番号：

取得年月日：

国内外の別：

〔その他〕

ホームページ等

6. 研究組織

(1) 研究代表者

渡辺信 (WATANABE, Shin)

琉球大学・熱帯生物圏研究センター・准教授

研究者番号：50532131