

## 科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 28 年 5 月 25 日現在

機関番号：15301

研究種目：若手研究(B)

研究期間：2012～2015

課題番号：24770021

研究課題名(和文) 環境変化がコナラ属の開花・結実様式に与える影響の解明

研究課題名(英文) Elucidation of impact of environmental change on the flowering and fruiting in Quercus species

研究代表者

宮崎 祐子 (Miyazaki, Yuko)

岡山大学・その他の研究科・助教

研究者番号：20443583

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 3,600,000円

研究成果の概要(和文)：多くの植物種では開花・結実量に年変動がみられる。本研究ではコナラ属を用いて、1)野外実験により環境条件を操作して開花・結実量の変化を調査し、2)同実験環境下で花芽形成から種子成熟までに起こる遺伝子発現変化を捉えることで、3)年変動を引き起こす至近要因を抽出することを目的とした。その結果、北海道のコナラに対して、高い気温は当年の結実には正に、翌年の花成には負に影響を与える可能性が示唆された。また、窒素の施肥はミズナラの繁殖に対し、窒素要求量以外の種子生産量を決定づける要因(例えば気温や降水量など)が不適切であったとしても、その効果を緩和する可能性が示唆された。

研究成果の概要(英文)：Year-to-year variation in the amount of flower and fruit can be seen in many plant species. In this study, I conducted following analysis. 1) investigating the changes of the amount of the flower and fruit by the field experiment manipulating the environmental conditions, 2) figuring out the gene expression changes that occur from flower bud formation to seed maturation under the same experimental environment, 3) extracting the proximate factor causing the annual variation, using two Quercus species. The high temperature had a possibility to affect positively for current fruiting, while it had negative effect for flowering in the following year. In addition, fertilization experiment suggested that nitrogen may alleviate the requirement for seed production, even if a factor to determine seed amount except nitrogen availability (e.g., temperature or precipitation) was inappropriate.

研究分野：森林生態学

キーワード：トランスクリプトーム解析 遺伝子発現解析 マスティング 加温実験 窒素施肥実験 コナラ属

### 1. 研究開始当初の背景

多くの植物種では、開花量や種子量が著しく年変動し、個体間で同調することが知られている。この現象はマスティングと呼ばれ、古くから生態学者の興味を惹いてきた。マスティングの至近要因には外生要因である環境(気象)要因のほか、内生要因である個体内養分量が関与している可能性がこれまでの研究で示唆されているが、未だ解明には至っていない。

一方、近年の温暖化や窒素降下物の増加などの地球規模の環境変化によって、森林生態系への種子の供給量および供給サイクルが変化する可能性が指摘されている(Overgaard et al. 2007; Smaill et al. 2011)。そのようなマスティング様式の変化は、動物との相互作用や植物種間および種内の競争を介して、森林生態系の維持に大きな影響を及ぼすことが予想される。したがって、地球規模の環境変化が森林生態系にどのような変化をもたらすかを予測するためには、どのようにしてマスティングが引き起こされるのか、その至近要因を明らかにすることが不可欠である。

落葉性のブナ科コナラ属は典型的なマスティング種として日本のみならず、北米や欧州においても最もよく研究されている属である。また、コナラ属は初夏の気温が種子残存率に影響することが示唆されている(Sork et al. 1993; 生方ら 2000)。さらに、北米や欧州の研究グループによってゲノム情報の整備が進められ、一部が公開されており、情報が得やすいメリットがある。これらのことから、本研究ではコナラ属(開花から種子成熟までが一年以内に終了するミズナラとコナラ)を対象とすることとした。

### 2. 研究の目的

樹冠部分を暖める野外操作実験、および施肥実験を行い、気温および個体内養分が花芽形成段階から種子成熟までの各発達ステージにどのような影響を及ぼすかを明らかにする。また、上記の加温実験供試個体および対照個体について、花芽形成から種子成熟までの各発達ステージにおいて花成制御遺伝子、および種子成熟に伴って発現する遺伝子について次世代シーケンサーを用いて探索し、発現量を定量する。得られた結果から、落葉性コナラ属においてマスティングを規定する至近要因の抽出を行うことを目的とした。

### 3. 研究の方法

(1) 気温の影響：北海道大学苫小牧研究林(以下、苫小牧)および鳥取大学教育研究林蒜山の森(以下、蒜山)に設置された、樹冠部分にアクセスできる足場へ取り付けられたオープントップチャンパー(以下、OTCC: 2m四方の透明アクリル板で樹冠上部の一部を囲う)を用いて加温実験を行った。苫小牧、蒜

山ともにコナラ(*Quercus serrata*)を3個体ずつ用いた。

生理反応の初期段階として起こる遺伝子発現の変化を捉えるため、苫小牧に設置したOTCC内部(加温処理区)および外部(対照区)からそれぞれ葉、芽、雌花、雄花(開花直後のみ)を2012年6月~7月に採取し、遺伝子発現解析試料とした。採取した試料は次世代シーケンサー(Illumina HiSeq 2000)を用いてde novoトランスクリプトーム解析を行った。マッピングされたリードを用いてDEGseq(Wang et al. 2010)により発現解析を行い、温暖化処理と無処理の間で発現に差のある塩基配列を抽出した。さらにBLASTプログラムを用いてデータベース(DDBJ/EMBL/GenBank)上の既知遺伝子との相同性検索を行った。同時に、開花開始から結実終了まで、加温処理区と対照区で雌花数を月に1回程度の頻度で計測し、生残する雌花(堅果)数を比較した。

以上から得られた花成制御遺伝子の発現量の季節変化を詳細に調べるため、苫小牧および蒜山の加温実験において、2013年5月~9月に月に1度の頻度で加温処理区および対照区からそれぞれ6シュートを採取し、雌花および翌年のために準備される芽において遺伝子発現解析を行った。解析対象とした遺伝子は、シロイヌナズナにおいて花成経路統合遺伝子とされるSUPPRESSOR OF OVEREXPRESSION OF CONSTANS 1(SOC1)および花芽分裂組織決定遺伝子のSEPALLATA 3(SEP3)の相同遺伝子(それぞれQsSOC1およびQsSEP3とする)とした。それぞれ、リアルタイムPCR法によって遺伝子発現解析を行った。また、RNA抽出に供試した芽および雌花のサイズ測定を行った。

(2) 個体内養分(窒素)量の影響：北海道大学苫小牧研究林内のミズナラおよびシラカンバが優占する広葉樹二次林10.63haに対して窒素施肥を行った。2013年~2015年の3年間、成長開始前である春季に粒状の尿素を窒素に換算して100kg/ha・yearとなるように地表面へ散布した。対照区は施肥区と同様の構成樹種を持つ二次林に設定した。開花期から種子落下時期までシードトラップをそれぞれ20基ずつ設置し、落下する全ての繁殖器官を月に1回採取した。採取した繁殖器官は乾燥させて樹種毎に数および重量を測定し、窒素施肥の影響の有無を評価した。解析はミズナラに対して、3年間における年次変化について行った。

### 4. 研究成果

(1) トランスクリプトーム解析の結果、加温処理により花成制御遺伝子のうち、AP1-like、AGAMOUS-like、CONSTANS-like、LEAFY-like、AP2-likeなどの花成に正に働くと考えられるものが加温によって低く制御され、PHYB-likeなど花成に負に働くと考えられるものが高く制御されていた。また、光

化学系 1 及び 2 に関与すると考えられる遺伝子、*CDEF1*-like というシロイヌナズナで花粉管伸長に関与するという報告のある遺伝子については高く制御されていた。翌年(2013年)春の実際の開花量について計測を行ったところ、枝の位置に関係なく、加温処理区で少ない値となっており、遺伝子発現解析の結果と矛盾しなかった。また、2012年における堅果の生残率は、開花から1ヶ月半の間は加温処理区で高く、加温が雌花の中途落下を抑制することが考えられた。これらのことから、加温処理は当年の結実には正に、翌年の花成には負に影響を与える可能性が示唆された。

*QsSOC1* は芽で発現が確認され、一方で雌花では早期(苫小牧6月、蒜山5月)を除いて殆ど発現がみられなかった。苫小牧においては、*QsSOC1* の発現は6月に最も発現量が高く、それ以降は発現量は低く推移した。*SEP3* はシロイヌナズナにおいて花器官形成の決定や開花期の調節などに寄与するが、コナラでは *QsSEP3* は芽よりも雌花でより高く発現していた。*SEP3* 相同遺伝子はブドウやトマトなど様々な植物において果実での発現が確認されており、果実の成熟に関与している可能性が示唆されている (Boss & Thomas 2002; Mellway & Lund 2013)。本研究でも、雌花(幼堅果)が急速に伸長する段階に相当する苫小牧の9月のサンプルにおいて、堅果の軸方向の長さが大きいほど *QsSEP3* の発現が高くなる傾向がみられた。また、蒜山の対照区では *QsSEP3* 発現量は6月から7月にかけて低かったが、加温処理区では処理効果の大きかった3個体中2個体において6月から7月にかけて高くなっていった。コナラの堅果は鳥取および蒜山において8月に急速に成長することから(橋詰・尾崎 1979)、*QsSEP3* の発現増加と堅果の成長に関連があることが示唆された。以上の結果から、コナラでは加温処理が *QsSEP3* の発現特性を変化させ、分化後の花芽の発達および雌花の成長を促進する可能性があると考えられた。

(2) 各トラップにおける期間を通じた全ての繁殖器官(雄花および雌花・堅果)の生産量を、不作年(2013年、2015年)と豊作年(2014年)とで比較したところ、施肥区においては不作年であってもより多くの繁殖器官が生産される傾向がみられた。この傾向は主に堅果の生産量の違いによってもたらされていた。また、2013年との比較においても、2015年との比較においても同様の傾向であった。このことは窒素要求量以外の繁殖器官生産量を決定づける要因(例えば気温や降水量など)が種子生産に不適切であったとしても、その効果を窒素施肥が緩和している可能性を示唆していると考えられた。

#### 引用文献

Boss PK, Thomas MR (2002) Association of dwarfism and floral induction with a grape 'green revolution' mutation.

Nature 416: 847-850.

Mellway RD, Lund ST (2013) Interaction analysis of grapevine M1KC<sup>c</sup>-type MADS transcription factors and heterologous expression of putative *véraison* regulators in tomato. *Journal of Plant Physiology* 170: 1424-1433.

橋詰 隼人, 尾崎 栄一 (1979) クヌギおよびコナラの果実の発達と成熟. 鳥取大学農学部研究報告 31: 189-195.

Overgaard R, Gemmel P, Karlsson M (2007) Effects of weather conditions on mast year frequency in beech (*Fagus sylvatica* L.) in Sweden. *Forestry* 80: 555-565.

Smaill JS, Clinton PW, Allen RB, Davis MR (2011) Climate cues and resources interact to determine seed production by a masting species. *Journal of Ecology* 99: 870-877.

Sork VL, Bramble JE, Sexton O (1993) Ecology of mast fruiting in three species of North American deciduous oaks. *Ecology* 74: 528-541.

生方 正俊, 飯塚 和也, 板鼻 直栄 (2000) ミズナラ交配園における堅果生産過程と堅果生産数の年次変動. 日本林学会誌 82: 44-49.

Wang L, Feng Z, Wang X, Wang X, Zhang X (2010) DEGseq: an R package for identifying differentially expressed genes from RNA-seq data. *Bioinformatics* 26: 136-138.

#### 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 1 件)

Miyazaki Y, Maruyama Y, Chiba Y, Kobayashi MJ, Joseph B, Shimizu KK, Mochida K, Hiura T, Kon H, Satake A (2014) Nitrogen as a key regulator of flowering in *Fagus crenata*: understanding the physiological mechanism of masting by gene expression analysis. *Ecology Letters* 17: 1299-1309. DOI: 10.1111/ele.12338 査読有.

[学会発表](計 5 件)

宮崎祐子, 門田有希, 中路達郎, 日浦勉. 野外操作実験による樹木の温暖化への応答: コナラにおけるトランスクリプトーム解析. 2013年3月8日. 日本生態学会第60回大会(静岡市)

Yuko Miyazaki, Yuki Monden, Tatsuro Nakaji, Tsutomu Hiura. Transcriptome analysis of flowering and fruiting under the experimental warming in *Quercus serrata*. 2013年3月23日. 第54

回日本植物生理学会年会（岡山市）

宮崎祐子，門田有希，中路達郎，日浦勉.  
野外操作実験と RNA-seq による樹木の温暖化  
への応答解析. 2013 年 9 月 4-5 日. NGS 現場  
の会第三回研究会（神戸市）

星野航，赤路康朗，\*宮崎祐子. コナラ属  
における堅果生産と樹冠成長のトレードオ  
フ. 2015 年 3 月 21 日. 日本生態学会第 62 回  
大会企画集会「木に登って調べる！～“Tree  
Climbing”の生態学への応用～」(鹿児島市)

宮崎祐子，金原悠紀，李真，長田典之，  
中路達郎，日浦勉. 窒素施肥が樹木の繁殖へ  
与える影響. 2015 年 3 月 28 日. 第 126 回日  
本森林学会大会（札幌市）

## 6. 研究組織

### (1) 研究代表者

宮崎 祐子 (MIYAZAKI YUKO)

岡山大学・大学院環境生命科学研究科・助  
教

研究者番号：20443583