

令和元年6月19日現在

機関番号：14301

研究種目：基盤研究(S)

研究期間：2014～2018

課題番号：26221106

研究課題名(和文)自然条件下における生物同調現象

研究課題名(英文)Biological synchronization in natural environments

研究代表者

工藤 洋(Kudoh, Hiroshi)

京都大学・生態学研究センター・教授

研究者番号：10291569

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 153,100,000円

研究成果の概要(和文)：本研究では、植物の季節同調を対象にその仕組みと利用法を研究した。一年草の生育が同調して終了する現象(課題1)、植物の応答が環境の長期傾向に同調する現象(課題2)、植物が感知している環境を推測する技術(課題3)に着目して研究を進めた。課題1では、シロイヌナズナの開花の最盛期が生育終了に先立って同調することを見出した。課題2では、葉で発現するほぼ全ての遺伝子の働きの季節変化についての2年分のデータを公開した。環境の長期傾向に応答する遺伝子の一部で、ヒストン修飾が季節に沿った応答を逆行させない仕組みとして働くことを明らかにした。課題3では、遺伝子発現をバイオマーカーとして植物ウイルスの量を推定した。

研究成果の学術的意義や社会的意義

野外での時系列トランスクリプトームや時系列エピジェネティクスが遺伝子制御の機能を理解する上で強力な手法であることが示された。本課題で公表した遺伝子発現の季節変化データベースは、植物にかかわる様々な学問分野に波及効果を持つ。また、植物のトランスクリプトームを病原生物のバイオマーカーとして用いる道が拓かれた。

研究成果の概要(英文)：Synchronizations between individuals in biological responses are often observed under natural seasonal conditions. This project aimed to understand functions of mechanisms that underlie synchronization of plant reproduction, especially in natural fluctuating environments. By the combination of growth experiments, time-series transcriptomic and epigenomic analyses in a natural plant population, and mathematical analyses, we identified genes that alter degree of reproductive synchronization, evaluated roles of histone modification, H3K27me3, as a seasonal environmental memory, and developed the method that estimate plant virus infection from host transcriptome data.

研究分野：生態学

キーワード：フェノロジー トランスクリプトーム 遺伝子発現 ヒストン修飾

## 1. 研究開始当初の背景

同調現象は、生物の複数個体間の同時応答である。自然条件下で観察され、交配のタイミングをそろえる現象において卓越している。植物が決まった季節に開花するのも、個体間の交配を可能にする同調現象である。地球環境の変化に対する生物の応答を予測することが急務となる中で、植物のフェノロジー（季節環境下での生物の活動タイミング）が決定されるメカニズムを理解することが生態学的・農学的要請となっていた。

研究代表者は、自然条件下で遺伝子の機能解析をすすめる‘イン・ナチュラ’アプローチの重要性にいち早く着目し、野外における分子遺伝学的手法を用いたフェノロジー研究を開始した。シロイヌナズナの野外栽培株と同属の野生種ハクサンハタザオの自然集団を研究対象とした。自然条件下での遺伝子発現を時系列モデリングし、これらのモデルが温暖化に対する植物の応答予測に使えることを示した。

花成制御の分子遺伝学研究は、発生タイミングとして花成の促進・遅延（発芽からの日数）を解析することで目覚ましい成果を上げてきた。このメカニズム研究の成果を自然条件（イン・ナチュラ）での同調現象として再評価することが必須であった。

## 2. 研究の目的

本課題では、「生物の同調現象」として植物応答を研究することにより、それにかかわるメカニズムの機能を自然条件下で理解することを目的とした。時系列トランスクリプトーム解析を元に3つの研究課題を実施した（図1）。

1. 新規に発見した‘生育終了’同調現象の制御因子を同定し、機能を解明する。

2. 複雑な自然状況下での遺伝子ネットワークの機能を理解する。

3. 遺伝子発現の応答をバイオマーカーとして利用し、環境を推定する。

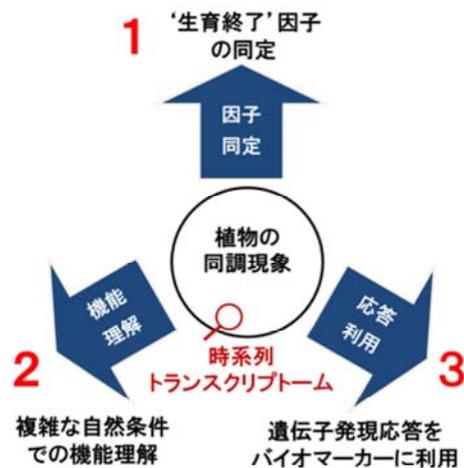


図1. 植物の同調現象に関する3つの課題

## 3. 研究の方法

分子遺伝学的手法と生態学的手法を融合することにより、野外でみられる同調現象を解析した。それにより、生態学的現象のメカニズムを理解すること、また、分子生物学的メカニズムの自然条件下における機能を明らかにすることを目的とした。そのために、研究対象としてモデル植物シロイヌナズナを用いた解析と近縁のハクサンハタザオ自然集団の長期モニタリングとを組み合わせる研究をすすめた。これらの統合したアプローチの現れとして、本課題の成果論文は、生態学と分子生物学の両分野の学術雑誌に発表されている。

本計画では、自然条件下での生物同調現象を研究するための①コンセプトの構築を行い、②シロイヌナズナの野外栽培実験とハクサンハタザオの自然集団において同調現象を捕捉した。捕捉された生育終了、遺伝子発現の長期応答、ウイルス量の増加という同調現象について、③因子同定、④機能理解、⑤応答利用の3つのテーマで、図2（次ページ）に示した計画・方法に従って研究を進め、予定通りの成果が得られた。また、因子同定のための野外栽培実験で、花成（花芽が形成される発生学的なタイミング）の同調の有無にかかわらず、生育終了の同調に先立って開花の最盛期（1日当たりに開花する花の数が最大となる生態学的なタイミング）が強く同調することを発見するとともに、主要な花成関連因子の発現変化との関係を調べた。機能理解においては、代表的ヒストン修飾 H3K27me3 の同調的季節変化を見出したので、平成29年度に追加配分を受けて全ゲノム的染色体立体配置を調べる Hi-C 法を導入し、同調的にヒストン修飾が変化する領域におけるクロマチンの3次元構造を解析した。さらに、応答利用ではハクサンハタザオのトランスクリプトームから、この植物を宿主とするカブモザイクウイルスの感染の有無とウイルス量を推定することを目指した。野外で得られたトランスクリプトームデータが複雑であったため、最終年度には機械学習の専門家との共同研究を実施し、遺伝子発現をウイルス量のバイオマーカーとすることに成功した。

## 4. 研究成果

本計画では、植物の季節同調を分子生物学的手法により研究するためのコンセプトを構築し（図2の①）、栽培圃場・自然集団において同調現象を捕捉し（②）、目的で設定した3つの課題（③、④、⑤）について、計画に従って研究が進捗した（図2）。

コンセプトの構築（①）：自然生育地における季節同調研究に遺伝子発現とモデリングの手法を取り込んだ新しい研究アプローチを提唱し、次の用語を定義した(Kudoh, New Phytologist, 2016)。

イン・ナチュラ：自然生育地での研究。実験室研究と併せて遺伝子機能の包括的理解をもたらす。分子フェノロジー：分子生物学の手法でとらえた生物の季節応答。高解像度分子フェノロジー(HMP)：時間分解能が高い分子フェノロジー。時系列モデリングが可能。同調の定義と定量：発芽のタイミングの違いに比して、後のイベント（開花など）のタイミングがそろふことを同調、違いが大きくなることを脱同調と定義した。これにより、連続播種実験をおこなうことで、同調が測定可能とし、同調指数  $SI_g$  を提案した。



図2. 研究方法、主構成(①-⑤)、年度ごとの進捗および新規に実施した項目(青)

同調現象の捕捉(②):シロイヌナズナの野外栽培実験とハクサンハタザオの自然集団において同調現象を捕捉した(図2, ②)。前者では生育終了という新しい同調現象を発見した。後者においては開花応答・クロロフィル代謝・昆虫食害防御・植物ウイルス防御に関連する遺伝子発現の季節同調を捕捉した。

・シロイヌナズナの野外実験で同調を定量した。その結果、バーナリゼーション応答(長期の低温感受により花成が促進される応答)が季節同調のために機能することを示すと同時に、生育終了の同調という新規同調現象を発見した(Miryeganeh, Kudoh et al. Scientific Report, 2018)。

・ハクサンハタザオの自然集団において、2年間のHMPデータを取得し、季節同調にかかわる遺伝子の動態をモデリングした。さらに、春分・夏至・秋分・冬至に48時間サンプリ

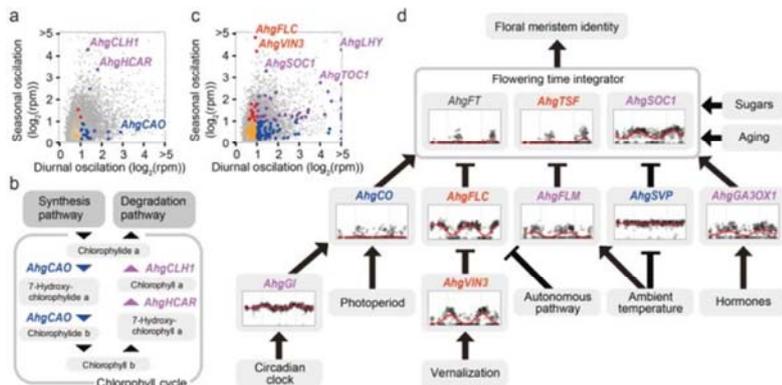


図3. クロロフィル代謝(a, b)、花成経路(c, d)遺伝子のうち、季節変動(赤)、日周変動(青)するもの。紫は両方(Nagano, Kudoh et al., Nature Plants, 2019)。

グを行い、ゲノムワイドに日周変動のある遺伝子、季節変動のある遺伝子を特定した。この結果に基づき、自然の複雑な状況における年間を通じた季節トランスクリプトームを世界で初めて論文発表し (Nagano, Kudoh et al. Nature Plants, 2019)、データベースを公開した。季節変動の有無は新規の遺伝子アノテーションであり、遺伝子の機能理解に対する波及効果は大きい (図 3 クロロフィル代謝と花成経路関連遺伝子の例)。

因子同定 (③): 新しく発見した生育終了の同調については、屋外環境下で生育終了が遅延するシロイヌナズナミュータントをスクリーニングするための実験を実施し、26 系統を得た。このうち 6 系統について、リシーケンスを実施し、変異のある遺伝子を探索した (図 4)。また、野生型 (Col-0) の葉の季節サンプルを対象に、トランスクリプトームの時系列解析をすすめ、上記の変異遺伝子のうち生育終了時に発現上昇する遺伝子を探索した。そのうち 3 遺伝子が新規因子候補としてあげられた。

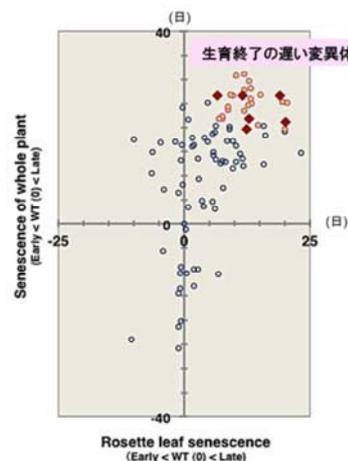


図4. ロゼット葉(X軸)、全草(Y軸)の両方で枯死が遅れた26系統(色付)。6はリシーケンス系統(菱形)。

機能理解 (④): 自然の変動環境下での機能に焦点を当て、ハクサンハタザオ自然集団において時系列ヒストン修飾解析を実施した。まず、野外で想定されるサンプル量・時間・輸送条件に対応するフィールド・ChIP (クロマチン免疫沈降) 法を確立した (Nishio, Kudoh et al. Genes & Genetic System 2016)。次に、2 週間毎の野外サンプルに対し、花成抑制因子である FLC 遺伝子領域における H3K4me3 (活性修飾) と H3K27me3 (抑制修飾) の 2 年間の季節動態を明らかにした。これは、ヒストン修飾の長期季節動態の世界初のデータである。位相解析により、H3K27me3 が H3K4me3 に遅れて変化することがわかった。微分方程式モデルによる数理シミュレーションにより、FLC 遺伝子が気温の短期変動に感わずに長期傾向にのみ応答するしくみに両修飾間のフィードバック制御が重要な役割を果たすことを示唆した (Nishio, Kudoh et al. 投稿準備中)。

次に、長期応答性をもつ遺伝子を探索する目的で、ハクサンハタザオの全ゲノム領域についての H3K4me3 および H3K27me3 の 1 年間の季節動態データを ChIP-Seq 法により取得した。その結果、短期的に安定な抑制ヒストン修飾 H3K27me3 が、ゲノムワイドに長期的環境応答性を持つことを発見した。48 時間の動態を調べると、昼夜の大きな環境変動にもかかわらず、そのレベルは変化しない。一方、1 年間の動態では、H3K27me3 の修飾を受けるほとんどの遺伝子が、修飾レベルの季節変動を見せ、2 倍以上の変動を見せた遺伝子が 1,901 個あった。もっとも重要な発見は、H3K27me3 に特異的なゲノムワイドに同調した季節変動を示したことである (図 5)。H3K27me3 の修飾を受ける遺伝子には、様々な環境応答の制御因子が含まれていたが、H3K27me3 のエピゲノム状態は、冬型・夏型に類型化された (Nishio, Kudoh et al. 投稿準備中)。

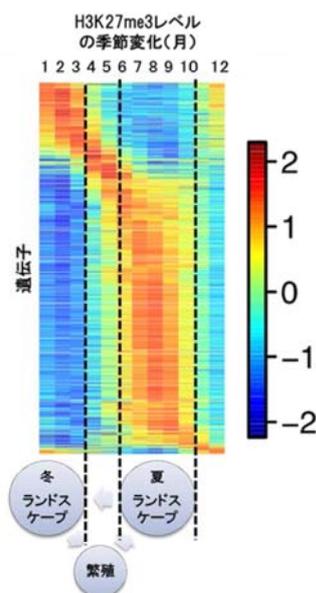


図5. ヒストン修飾H3K27me3のゲノムワイドな同調的季節変化

応答利用 (⑤): ハクサンハタザオのトランスクリプトームと植物のウイルスを同時検出するデュアル RNA-Seq 法を開発した (図 6, Kamitani, Kudoh et al. FEMS Microbiology Ecology 2016)。用いて、カブモザイクウイルス (TuMV) はしばしば宿主の mRNA と同等の量までも増殖することを明らかにした。また、植物ウイルスと宿主植物の長期共存が成立するための季節バランスについての詳細解析を実施した。その結果、TuMV 量が季節と同調して変動することを見出し、操作実験により、全身感染における葉内・葉間の増殖・移動速度の温度依存性を検出した (Honjo, Kudoh et al. 論文投稿準備中)。次に、遺伝子発現からウイルス量を推定するための解析を開始した。トランスクリプトームをバイオマーカーとし、自然集団に

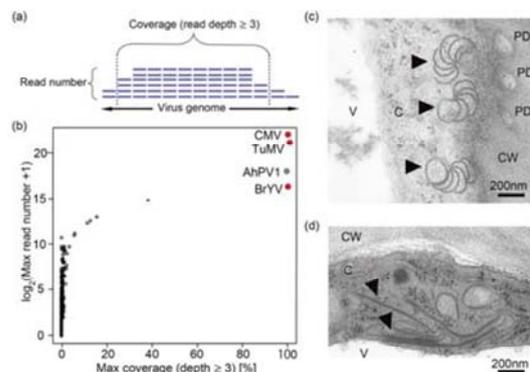


図6. デュアルRNA Seq法(a)でハクサンハタザオから4種のウイルスが検出され(b)、電子顕微鏡でTuMVの増殖が確認された(c, d)。

おける植物ウイルスの感染の有無と感染量の推定を行い、ウイルス量と発現量が相関する遺伝子をリストした。

新規追加の成果：課題③、④、⑤については、当初の計画書には含まれなかった、以下のような新規追加の成果があった（図2）。

・野外栽培実験により、開花のピークが生育終了に先立って同調することを見出した。そこで、形質転換体実験温室で栽培実験を実施し、複数の花成因子の主要な役割が開花ピークと同調であることを示した(Kami, Kudoh et al. 論文投稿準備中)。

・抑制型ヒストン修飾 H3K27me3 が多くの遺伝子で同調的に変化するという現象を発見したが、この同調的变化現象は、より高次元のクロマチン構造を介した制御の存在を示唆していた。そこで、平成29年度に追加配分を受け、超音波 DNA 切断装置を導入して、全ゲノムの染色体立体配置を調べる Hi-C 法による解析を実施した。同調的にヒストン修飾が変化する領域におけるクロマチンの3次元構造を解析することが目的として、シロイヌナズナの Hi-C 法をハクサンハタザオで実施可能とした。その結果、冬期のサンプルについて染色体領域の相互作用のデータの取得に成功した（図7）。野外環境下で長期の低温を経験した植物における、核内の染色体相互作用を解析した。

・野外で得られたトランスクリプトームデータが複雑であったため、最終年度には機械学習の専門家と宿主植物ハクサンハタザオの遺伝子発現データから植物ウイルス感染量を機械学習により推定するための共同研究を実施した。ニューラルネットワークによる機械学習を用いた方法を開発した。最終的に49遺伝子の発現量よりウイルス感染の有無とウイルス量を推定した（論文準備中）。

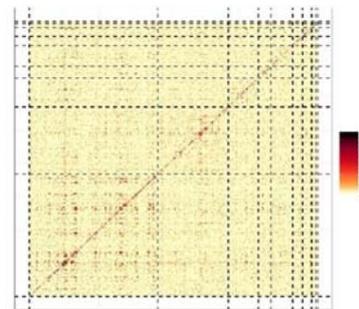


図7. 冬期ハクサンハタザオにおける染色体領域の相互作用

## 5. 主な発表論文等

〔雑誌論文〕（計 21 件）

1. Nagano AJ, Kawagoe T, Sugisaka J, Honjo MN, Iwayama K, Kudoh H (2019) Annual transcriptome dynamics in natural environments reveals plant seasonal adaptation. *Nature Plants* 5:74-83. <https://doi.org/10.1038/s41477-018-0338-z>.
2. Miryeganeh M, Yamaguchi M, Kudoh H (2018) Synchronisation of Arabidopsis flowering time and whole-plant senescence in seasonal environments. *Scientific Reports*, 8 10282. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-28580-x>
3. Sato Y, Kudoh H (2017) Herbivore-mediated interaction promotes the maintenance of trichome dimorphism through negative frequency-dependent selection. *The American Naturalist* 190(3) doi:10.1086/692603.
4. Kamitani M, Nagano AJ, Honjo MN, Kudoh H (2016) RNA-Seq reveals virus-virus and virus-plant interactions in nature. *FEMS Microbiology Ecology* 92:fiw1766.
5. Kudoh H (2016) Molecular phenology in plants: *in natura* systems biology for the comprehensive understanding of seasonal responses under natural environments. *New Phytologist* 210:399-412. <https://doi.org/10.1111/nph.13733>.

他 17 件

〔学会発表〕（計 25 件）

1. 工藤洋 (2018) フィールド・トランスクリプトミクス/エピゲノミクス：分子フェノロジーにみる植物の長期環境応答. 第 50 回種生物シンポジウム.
2. 工藤洋 (2018) 抑制型ヒストン修飾 H3K27me3 におけるエピジェネティックランドスケープの季節変化. 第 41 回日本分子生物学会年会.
3. Kudoh H (2018) Field epigenetics: seasonal analyses of histone modifications in a natural plant population. 4th East Asia Agricultural Genome Scientists Forum. 他 22 件

〔図書〕（計 1 件）

1. 工藤洋・永野惇 (2015) 開花季節の調節における気温の記憶：気象と分子生物学からみた生物機能の頑健性. *生物時計の生態学*, 種生物学会編, 文一総合出版, 東京, pp. 151-168.

他 3 件

〔産業財産権〕

○出願状況（計 0 件）

○取得状況（計 0 件）

〔その他〕

1. 「京大、植物の葉で機能している全遺伝子の働きの季節変化を自然条件下で捉えることに成功」日本経済新聞電子版、2019 年 1 月 9 日  
[https://www.nikkei.com/article/DGXLRSP499590\\_Z00C19A1000000/](https://www.nikkei.com/article/DGXLRSP499590_Z00C19A1000000/)
2. Dodd AN, Harper H, Hiscock S, Koch MA, Kudoh H, Oyama T, Schumacher K, Shimada T, Tamura MN (2018) Self-organizing researcher networks in the plant sciences. *Plants People Planer*, 44-47 DOI:10.1002/ppp3.2

他 7 件

ホームページ等京都大学生態学研究センター工藤研究室ホームページ

<http://www.ecology.kyoto-u.ac.jp/~kudoh/>

## 6. 研究組織

### (1)研究分担者

該当なし

### (2)研究協力者

氏名：永野 惇

ローマ字氏名：(Nagano, Atushi J.)

※科研費による研究は、研究者の自覚と責任において実施するものです。そのため、研究の実施や研究成果の公表等については、国の要請等に基づくものではなく、その研究成果に関する見解や責任は、研究者個人に帰属されます。