

課題名 RFd-1101 遺伝子情報に立脚した開花時期予測モデルの開発：
一斉開花現象の分子レベルでの解明

課題代表者名 佐竹 暁子（北海道大学大学院地球環境科学研究院 准教授）

研究実施期間 平成23～24年度

累計予算額 23,383千円（うち24年度10,390千円）
予算額は、間接経費を含む。

本研究のキーワード 気候変動、温度、開花時期、フェノロジー、開花遺伝子ネットワーク

研究体制

- (1) 総括および数理モデル解析（北海道大学大学院地球環境科学研究院）
- (2) 野外調査監督（首都大学東京観光科学域）
- (3) 分子実験監督（国際農業水産業研究センター）

研究協力機関

該当なし

研究概要

1. はじめに（研究背景等）

東南アジアの熱帯雨林はスダ大陸棚上およびフィリピンやスラウェシ、ジャワの湿潤な地域に成立する。この熱帯雨林は、この地域の植生タイプの中でバイオマスが最も大きく、構造が最も複雑で、植物および動物の多様性が最も高い。熱帯は温度季節性がないため常に開花できる環境にあるにも関わらず、東南アジアにおいて主要な木材樹種であるフタバガキは、数年に1度だけ様々な分類群の樹種と共に一斉に開花する。この一斉開花は、送粉者や種子捕食者の活動源である餌を提供する重要なイベントであり、生物多様性を支える基盤でもある。地球環境変化によって開花時期に異変が生じれば、複雑な食物網を通じて、豊かな生態系に影響が及びかねない。そこで、気候変化に応答した植物の開花時期変化を予測し、地球環境変化への対応策を提案することが求められている。

開花は、植物が種子を実らせて子孫を残す重要なイベントである。植物は長い進化の過程で、日照時間や温度などの環境要因に응答して、適した時期に花を咲かせる仕組みを進化させてきた。近年、シロイヌナズナやイネをモデル植物として、開花時期制御メカニズムの分子レベルでの解明が急速に進み、気温・乾燥ストレス・日長などの環境要因が開花時期を左右する仕組みが次々と明らかになってきた。しかし、非モデル植物であるフタバガキ科においては、低温や乾燥および個体内養分量の充実度が開花の引き金になる可能性は指摘されているが、開花時期制御の分子メカニズムは全く研究されておらず完全にブラックボックスにされてきた。

2. 研究開発目的

本研究ではフタバガキ科を対象に、一斉開花の分子メカニズムの解明に理論と実証の双方から迫り、遺伝子情報に立脚した開花時期予測モデルを確立することを目的とする。熱帯において有用な木材樹種である *Shorea leprosula* を対象に、主要なシロイヌナズナ花成関連遺伝子の相同遺伝子を単離する。それらの葉または芽における発現量の経時変化を2週間毎に長期間継続して観測することで、季節のない熱帯で生じる微小な温度・降水量・日長の変化が花成プロセスに与える影響を可視化する。芽と葉の付け根に位置する枝を用いて、可溶性糖類デンプン等の非構造体炭水化物、全窒素、全リン量を測定し、遺伝子発現量と合わせて解析することで個体内養分量が花成に与える影響を定量化する。芽の組織切片を用いた形態観察を合わせて行い、花芽と葉芽を分類し、各遺伝子発現量と花芽分化の関係性を明らかにする。温度・降水量・日照量などの環境要因および個体内養分量と遺伝子発現量との関係を明らかにすることで、一斉開花を引き起こす至近要因を特定する。

3. 研究開発の方法

(1) 気象データの観測と解析

林冠観測用タワーの完成後、遺伝子発現用サンプリングに加えて、展葉、落葉等の生物季節（フェ

ノロジー）観察、微気象観測を開始し、圃場において実生、稚樹を育成し、それらを対象に遺伝子発現解析を行うための準備を行った。観測、実験設備の整備に加えて、以下の項目を実施した。

- 1) フェノロジー及び気象観測体制の整備
- 2) 一斉開花の生物季節に関する基本情報を収集と解析
- 3) 開花を誘導する気象条件の検討

(2) インフラ整備と遺伝子発現解析

開花遺伝子の動態を明らかにするために、以下の項目のインフラ整備及び実験を行った。

1) 林冠観測用タワー（研究用足場）の建設

これまでに遺伝子ライブラリを蓄積していたフタバガキ科 (Dipterocarpaceae) サラノキ属 (*Shorea*) の *Shorea leprosula* を対象とすることにした。林冠観測用タワーを建設するために、マレーシア森林研究所内の研究所所有林の調査を行い、*Shorea leprosula* の密度が高く、開花履歴があり、且つ、車道から遠くない、平坦な立地を探す必要があった。調査の結果、16林班に比較的上記条件を満たす立地を発見し、候補地とした。候補地を決定した後、マレーシア森林研究所に対して、タワー建設の許可を申請し、覚書を交わした。覚書には以下の項目を明記した。

- a) 予算は環境研究総合推進費から出費する。
- b) 環境研究総合推進費を用いて（独）国際農林水産業研究センターが主体となり建設する。
- c) マレーシア森林研究所と（独）森林総合研究所との MOU の元で建設・研究を行う（佐竹暁子（北海道大学）と谷尚樹（国際農林水産業研究センター）は研究協力者）。
- d) 環境省と国際農林水産業研究センターは所有権を保持しない。

タワーは建設後、マレーシア森林研究所が保有し、北海道大学及び国際農林水産業研究センターは使用权を保持している。覚書を交わした後は、マレーシア国内で林冠アクセスタワーの建設実績のある ITSEN アルミニウム足場（マレーシア）株式会社と契約し、建設を行った。

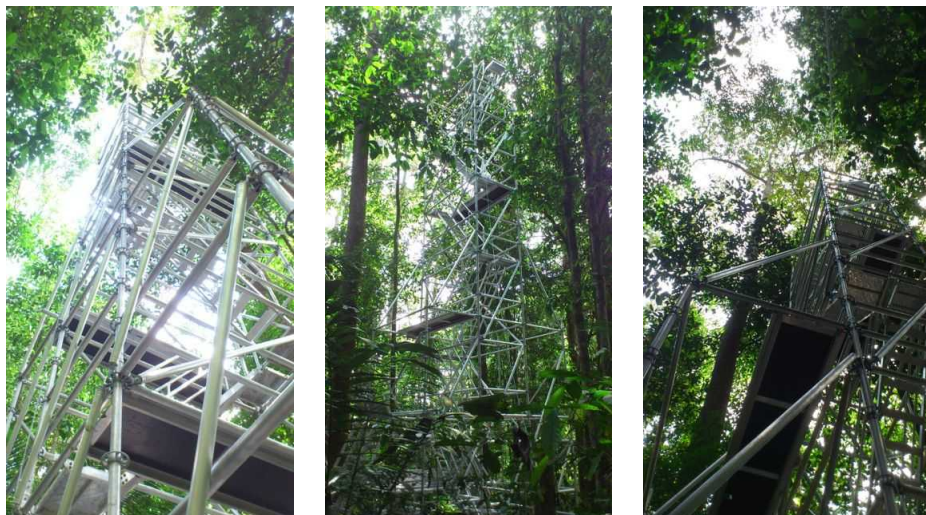


図1. FRIM内に建設した林冠アクセスタワー

2) 花芽で発現する開花遺伝子の発現動態解明のための遺伝子ライブラリーの整備

林冠建設用タワーの建設が、最適な建設立地を探す調査や雨期などで遅れたため、クアラルンプールから約60キロメートル北のマレー半島脊梁山脈に位置するセマンコック森林保護区30林班に設定した6ヘクタールプロット内の *Shorea curtisii*（セラヤ）二個体に林冠アクセス用のアルミニウム梯子を設置した（図1）。この林冠アクセス梯子を用いて2011年6月から定期的に新芽と枝及び葉の採取を開始した。新芽と葉は遺伝子発現動態を調べるため、枝は蓄積した多糖類を定量するためにサンプリングした（表1）。本試験地は実験室から日帰り可能な距離ではあるが2時間程度の時間を要するため、採取した材料はすぐにRNA later 液（Ambion社製）に浸した。2011年10月にセマンコック森林保護区を中心に、一斉開花が生じた。一斉開花とは東南アジアの熱帯雨林で観察される特有の現象で、様々な分類群に属す

る樹木種が一斉に同調して開花する現象である。この時、対象木としていた2個体（F063及びF278）の2個体の花芽を8/3に確認した。F278の開花規模は大きく、花芽の採取に成功したが、F063は一部の枝が開花したのみであった。よってF063の花芽サンプルは取得できなかった。

表1. セマンコック試験地のセラヤ2対象木のサンプリング日時とサンプリング部位

採取日時	対象木（F063）	対象木（F278）
2011/06/09	新芽 枝 採取	
2011/06/21	新芽 枝 採取	新芽 枝 採取
2011/07/07	新芽 枝 採取	新芽 枝 採取
2011/08/03	新芽 枝 採取	新芽 枝 採取
2011/08/09	新芽 枝 採取	新芽 枝 採取
2011/08/24	新芽 枝 採取	新芽 枝 採取
2011/08/30	新芽 枝 採取	新芽 枝 採取
2011/09/02		新芽 枝 採取
2011/09/06	新芽 葉 枝 採取	新芽 葉 枝 採取
2011/09/12		新芽 葉 3時間毎の採取
2011/09/26		新芽 葉 枝 採取
2011/10/10		新芽 葉 枝 採取
2011/10/13	新芽 葉 枝 採取	
2011/10/20		新芽 葉 枝 採取
2011/11/03	新芽 葉 枝 採取	
2011/11/21		新芽 葉 枝 採取
2011/12/13		新芽 葉 枝 採取
2011/12/27	新芽 葉 枝 採取	

フタバガキ科植物では花芽形成に関わる遺伝子情報は収集されていない。*Arabidopsis*などモデル植物と呼ばれる遺伝子情報が集積された植物の遺伝情報からPCRプライマーを作成し、援用することも可能であるが、確実性が低い。本研究推進期間中に一斉開花が起こったため、F278個体から大量に花芽を採取し、RNAを抽出し、花芽で発現している遺伝子群を次世代シーケンサーを用いることで大量に収集することにした。サンプルには8/24（前期）、9/12（中期）、10/10（後期）に採取した花芽を使用した。更に、スタートアップ会議において評価員である京都大学の工藤洋教授より、遺伝子発現の日内的変化にも注意をすべきであるとの指摘を受け、9/12に午前9:00、正午、午後3時、午後6時の4サンプルを収集した。

3) 操作実験による開花遺伝子動態の確認のための実生集団の整備

建設したタワーや梯子を用いてフタバガキ科植物の花芽を採取することは可能になったが、アクセスできる個体数が非常に限られている。また、野外における遺伝子発現は微環境の影響を受け易いので、厳密にコントロールされた人工気象室などを用いた遺伝子発現動態の検証を行う必要がある。しかしながら、樹木は個体サイズが大きく人工気象室内に入れることは困難である。そこで、実生はまだ繁殖齢には達していないが、外的環境への刺激に対して遺伝子が同じように反応することが予想され、実生を用いた検証は有効である。よって、本年度生じた一斉開花時に種子を採取し、人工気象室を用いた操作実験のための実生集団の整備を行った。

4) リアルタイム PCR プライマーの検討と遺伝子発現解析

設計されたリアルタイム PCR プライマーが十分な増幅効率を示すかどうかを検討した後、 $\Delta\Delta Ct$ 法を用いて mRNA 量を測定した。

(3) 遺伝子情報に立脚した開花時期予測：数理モデルの開発と解析

野外調査と分子実験によって得られたデータをもとに、開花遺伝子の発現量の変化をとらえた数理モデルを開発し、開花フェノロジーを予測した。本研究課題の全体スケジュールを、表2に示す。

全体スケジュール	23年度	24年度
<i>Shorea leprosula</i> を対象に葉・芽・枝のサンプル採取	○	○
SuperSAGE 法による網羅的遺伝子発現解析と相同遺伝子クローニング	○	○
枝内の可溶性糖類デンプン等の非構造体炭水化物・全窒素・全リン量測定	○	○
芽の組織切片の作成と組織形態観察	○	○
データ解析・数理モデルの開発		○

表2. 本プロジェクトの全体スケジュール

4. 結果及び考察

(1) 気象データの観測と解析

マレーシア森林研究所 (Forest Research Institute Malaysia) において建設された林冠観察用足場において、日射量、光合成有効放射量、相対湿度、気温の観測を3分おきに行った（マイクロステーションロガー (HOBO Micro Station Logger) 及び日射センサー (S-LIB-M003)、光量子センサー (S-LIA-M003)、高分解能湿温度センサー (S-THB-M002)）。観測は2012年6月1日から行ったが、小動物による観測の妨害により、8月上旬から、観測は一時中断した。

その結果、2012年6月1日から8月3日までの微気象データが得られた（図2）。観測期間中、日射量は変動が大きかったものの、6月上旬が最も高く、以降は減少する傾向にあった。日最高相対湿度の日変動は小さく、概ね90%前後を推移していたが、日最低湿度は変動が大きく、2012年6月12日に最低湿度40.8%を記録していた。日最高気温、日最低気温については、日射量と同様に6月上旬が高く、その後低下する傾向にあったが、20度以下の気温は観測されなかった。ただし、6月9-10日、6月24日、7月3日、5-6日、8日において最低気温の低下（22度未満）が観測されていた。

Meteorological condition before flowering episode at the FRIM tower in 2012

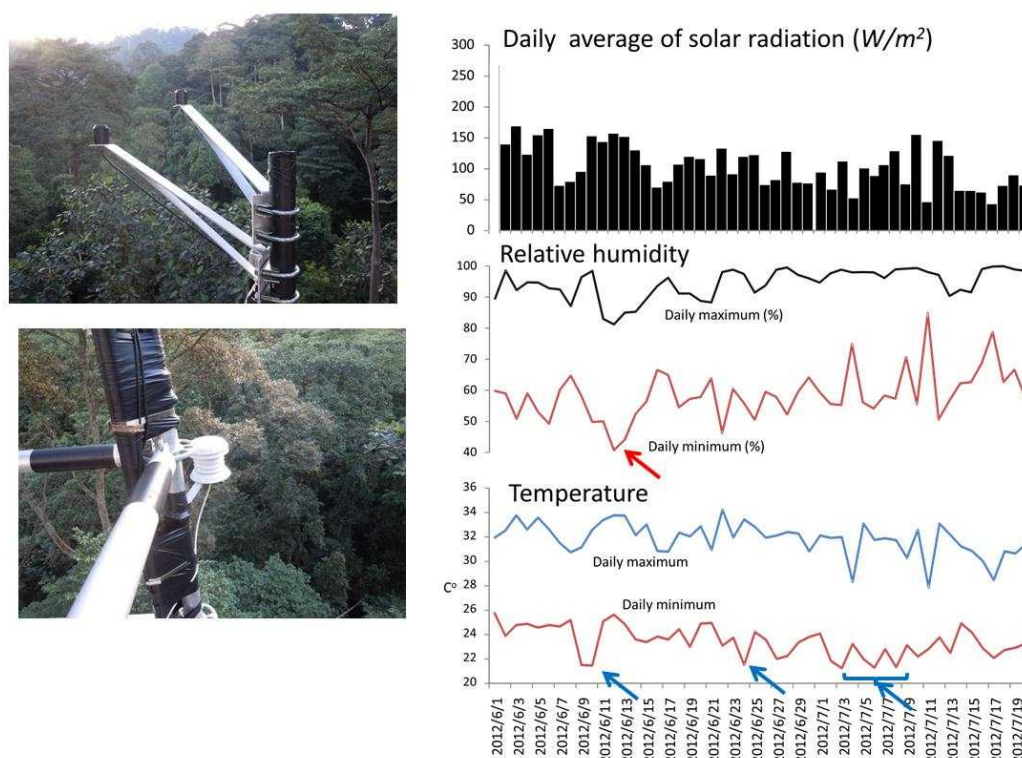


図2. 2012年6-7月においてマレーシア森林研究所で行った微気象観測の結果

観測した気象データ間の関係を検討するため、11変数（日最高気温 (Daily Max. Tmp.)、日最低気温 (Daily Min. Tmp.)、日気温較差 (Daily Tmp. range)、日最高相対湿度 (Daily Max. RH)、日最低相対湿度 (Daily Min. RH)、日平均相対湿度 (Daily RH average)、日相対湿度格差 (Daily RH range)、日最大日射量 (Daily Max. SR)、日最大光量子密度 (Daily Max. PAR)、日平均日射量 (Daily SR average)、

日平均光量子密度 (Daily PAR average)) について相関行列を作成した。特に、乾燥の指標として日最低相対湿度 (Daily Min. RH) と他の変数の関連性に注目したところ、日最低気温を除いて有意な相関関係が見られることが明らかになった。特に、日最高気温との相関係数は高く ($r = -0.92$)、気温が高い日ほど、日最低相対湿度が低くなるということが予想された。

研究期間中に異なる地域において2つの開花イベントが観察された。それぞれの開花イベントの前(推定開花誘導期間)は乾燥していたことが明らかになったが、気温の低下についてはSemangkok森林保護区で観察されたものの、マレーシア森林研究所では観察されなかった。ただし、Semangkok森林保護区の気温の低下は以前にも高頻度で記録されており、気温低温の有無と開花の発生は必ずしも対応するものではないと考えられる。一方、半島マレーシアでは30日積算降水量が40 mmを下回るような強い乾燥も高頻度で、ほぼ毎年発生しているため、必ずしも一斉開花の発生と対応している訳ではない。そのため、一斉開花を誘導し、低温の発生などに関連がある特殊な乾燥条件が存在する可能性があるが、今後の詳細な解析が求められる。

(2) インフラ整備と遺伝子発現解析

クアラルンプールから約60キロメートル北のマレー半島脊梁山脈に位置するセマンコック森林保護区30林班に設定した6ヘクタールプロット内の *Shorea curtisii* (セラヤ) 二個体に林冠アクセス用のアルミニウム梯子を設置した。この林冠アクセス梯子を用いて2011年6月から定期的に新芽と枝及び葉の採取を開始した。新芽と葉は遺伝子発現動態を調べるため、枝は蓄積した多糖類を定量するためにサンプリングした。本試験地は実験室から日帰り可能な距離ではあるが2時間程度の時間を要するため、採取した材料はすぐにRNA later液 (Ambion社製) に浸した。2011年10月にセマンコック森林保護区を中心に、一斉開花が生じた。一斉開花とは東南アジアの熱帯雨林で観察される特有の現象で、様々な分類群に属する樹木種が一斉に同調して開花する現象である。この時、対象木としていた2個体 (F063及びF278) の2個体の花芽を2011年8月3日に確認した。F278の開花規模は大きく、花芽の採取に成功したが、F063は一部の枝が開花したのみであった。よってF063の花芽サンプルは取得できなかった。この新芽及び花芽からRNAを抽出した。RNA抽出はCTAB法で粗抽出を行った後、Turbo DNase Kit (Ambion社) を用いてDNAの除去を行った。DNA除去後、RNeasy mini extraction kitを用いて (QIAGEN社)、精製を行った。抽出したRNAはNano drop (Thermo Scientific社) を用いて濃度及び純度を測定し、全RNAの濃度が25ng/μLになるように調整した。濃度調整後、High Capacity RNA-to-cDNA Kit (Applied Biosystems社) を用いて逆転写反応を行い、cDNAを合成した。採取された花芽を用いたトランスクリプトーム解析では、約2億5000万の総リード数が得られ、その結果2万5千Mbpの塩基数を取得した。アダプタートリミング後のリードデータを用いてプログラムvelvetによるアセンブル、及びその拡張プログラムoasesによるtranscriptomeアセンブルを行った結果、約15万個のコンティグが得られ、その平均長と最長コンティグの長さはそれぞれ402bp, 7,020bpであった。作成したライブラリーを用いて、シロイヌナズナの開花時期制御に関連した遺伝子と概日時計に関連した遺伝子の塩基配列をもとにBLAST検索を行った。開花遺伝子に関しては、検索に用いた24の開花遺伝子のうち19、時計遺伝子に関しては検索に用いた7つの遺伝子の全てにおいて対応するcontig配列が見つかった。

合成したcDNAとリアルタイムPCR (以下、RT-PCR) 装置を用いて遺伝子発現量を定量した。本実験ではCP機関 (マレーシア森林研究所) に設置されたApplied Biosystems 7500リアルタイムPCRシステムを用いた。このシステムを用いて簡便に遺伝子発現量を定量するには $\Delta\Delta CT$ 法を用いる。この方法では内在的に安定的に発現している遺伝子 (通常ハウスキーピング遺伝子を使用) をコントロールとして用い、この遺伝子とターゲット遺伝子の差分を遺伝子発現量の変動と捕らえて定量を行った。

次に開花遺伝子の一つである *ScFT1* 遺伝子の発現動態を時系列にサンプリングされた *Shorea curtisii* の新芽及び花芽を用いて調べた。開花量の多かったF278個体では外見上8月9日のサンプルは花芽として認識できなかった。しかし、次のサンプリング日である8月24日には外見上花芽であると認識できた。*ScFT1* の遺伝子発現量を調べたところ外見上花芽と認識できなかった8月9日のサンプルにおいて *ScFT1* の発現が若干ながら増加していることが認識でき、外見上花芽と認識できる8月24日のサンプルでは確実にその発現量が増加していた。その後、9月6日には次第に増加し始め、開花直前の10月10日、10月20日に発現のピークを迎えた。一方、開花後の11月20日以降においては開花前から成長を始めているごく少数の花芽とは認識できない新芽を採取した。

この新芽においては *SCFT* 遺伝子の発現は確認できなかった (図3)。*FT* 遺伝子は温度・成長度合と光条件を統合し開花を制御する *FLC* 遺伝子や光条件を感受する *CO* 遺伝子の下流に位置し、シロイヌナズナにおける研究でも開花直前にその発現量が最大になることが報告されている。*Shorea* 属の花芽においても初期には発現量が低く、開花直前の10月20日に発現のピークを迎えた (図3)。これらのデータを

活用し、数理モデルによって開花予測を行うための基盤が出来たと考えている。

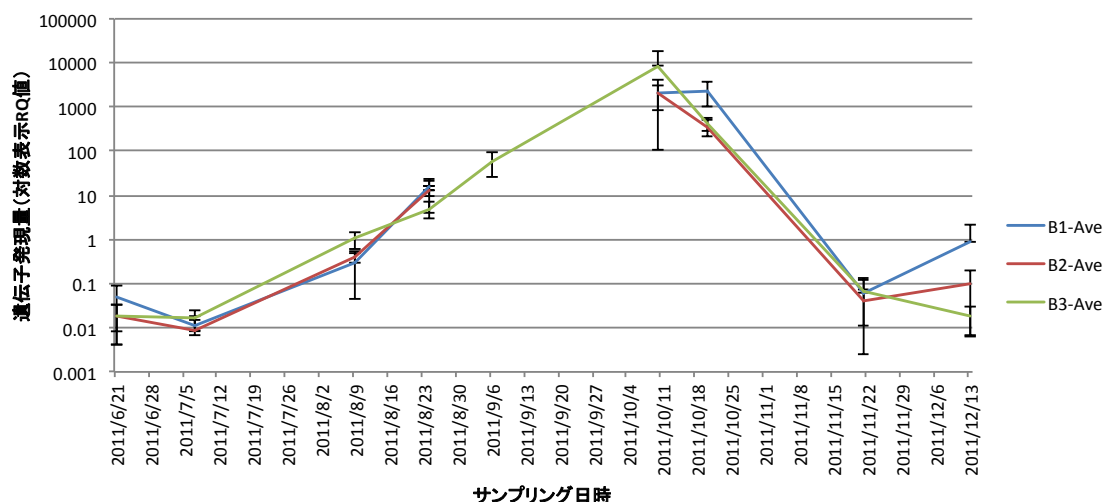


図3. 初期における（8月24日まで）*ScFT1*遺伝子の発現量（各枝（B1～B3）の平均値）とその標準偏差（縦バーによって表示）

サンプリングと同時に、枝内の無機物・有機物量の測定のために、新芽・花芽を採取した枝も採取した。採取後はすぐに冷凍庫内に保管し、その後、60度で72時間インキュベートし完全に乾燥させ、無機物・有機物を固定した。炭素量、窒素量に関してはCNコーダーを用いて、リンはモリブデンブルーを利用した比色定量法を用いて測定した。炭素に関しては開花した枝であるF278個体、一部の枝が開花したが、サンプリング出来た枝は開花しなかったF063個体とも季節変動はあまりなかった。しかし、開花した枝であるF278個体では開花後、果実の成長が進むにつれて低下傾向にあった。一方で、窒素とリンは開花直前に枝内の濃度、量の増加が確認された。この傾向はリンでより顕著であった。開花後は両元素とも低下する傾向が見られた。しかし、非開花枝であるF063ではその傾向は見られなかった（図4）。

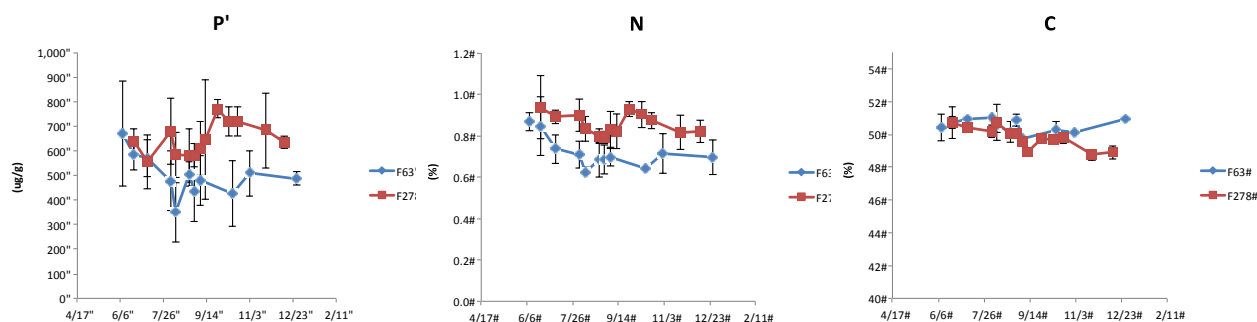


図4. 新芽・花芽を継続サンプリングした枝の含有元素量の季節変動

(3) 遺伝子情報に立脚した開花時期予測：数理モデルの開発と解析

H25年度に得られたデータから、開花遺伝子*ScFT1*の発現量が上昇する以前に開花木と非開花木間で枝における窒素含量の違いがみられたことから、数理モデルでは樹体内における窒素含量が*ScFT1*の発現に影響を及ぼすと仮定した（図5）。また、20℃を下回る低温が生じる頻度を気象データから推定し、低温シグナルによって*ScFT1*の発現が誘導されると仮定した。

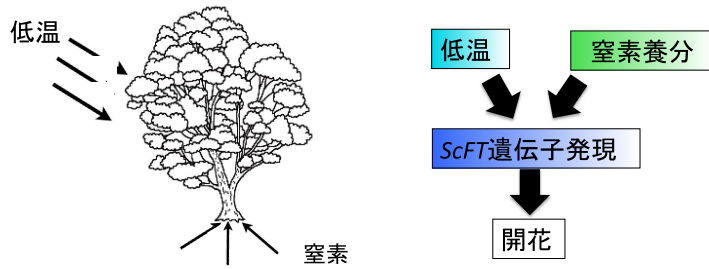


図5. 樹体内における窒素含量と低温シグナルによって *ScFT1* の発現量が制御されると仮定した数理モデル。

$$\begin{aligned}\frac{dx_{FT}}{dt} &= \alpha_{FT}f(LT)g(N) - \beta_{FT}x_{FT} \\ \frac{dN}{dt} &= a - \Theta(x_{FT} > K_{FT})C_{flower} - \Theta(x_{FT} > K_{FT})C_{seed} - bN \\ f(LT) &= \begin{cases} 1 & \text{if } p < p_{LT} \\ 0 & \text{otherwise} \end{cases} \quad \begin{array}{l} 20^{\circ}\text{C以下の低温が} \\ \text{生じる確率 } p_{LT} 0.057 \text{ d}^{-1} \end{array}\end{aligned}$$

図5における x_{FT} は *ScFT* の発現量を、 N は枝における窒素含量をあらわす。 α_{FT} と β_{FT} はそれぞれ *ScFT* 遺伝子mRNAの生産率と分解率を意味する。 $f(LT)$ と $g(N)$ は低温と窒素資源量による制御を指す。 Θ はヘビサイド関数を意味し、*ScFT* の発現上昇がみられたときに花器官が形成され、窒素資源が繁殖に投資され则认为している。

数理モデルを解析した結果、低温シグナルが1日生じただけで *ScFT1* の発現が誘導されると仮定した場合には、低温シグナルが1年以内に10回以上の高頻度で生じるため、開花後の窒素枯渇による回復が間に合わずそれらのほとんどの低温シグナルが無視されることが予想された（図6）。また、開花周期は窒素蓄積量の動態によって強く制限されることが示された。

より長期の低温シグナルに応答するとどのように開花動態が変化するかを検討した結果、2日間継続した低温が生じた場合のみ *ScFT1* の発現が誘導されると仮定すると、低温シグナル頻度が減少し、開花後に窒素蓄積量が緩やかに回復し十分な蓄積レベルになってから開花が生じることが予測され、その周期は約2年に一度になることが示された（図6）。さらに3日の低温が生じたときのみ *ScFT1* が発現誘導されとした場合には、開花によって一度枯渇した窒素が回復するまでの期間内に低温シグナルが生じることはほとんどないため、窒素による開花制御の相対的重要性は低温シグナルに比較すると弱くなることが予測された（図6）。このように、窒素蓄積量という内的シグナルと低温という外的シグナルの相対的重要性を評価する数理モデルを開発できたことは、今後地球温暖化を代表する環境変動や土地利用改変による窒素循環の変化が生じた場合、フタバガキの開花挙動がどのように変化するかを予測するための基盤となると考えられる。

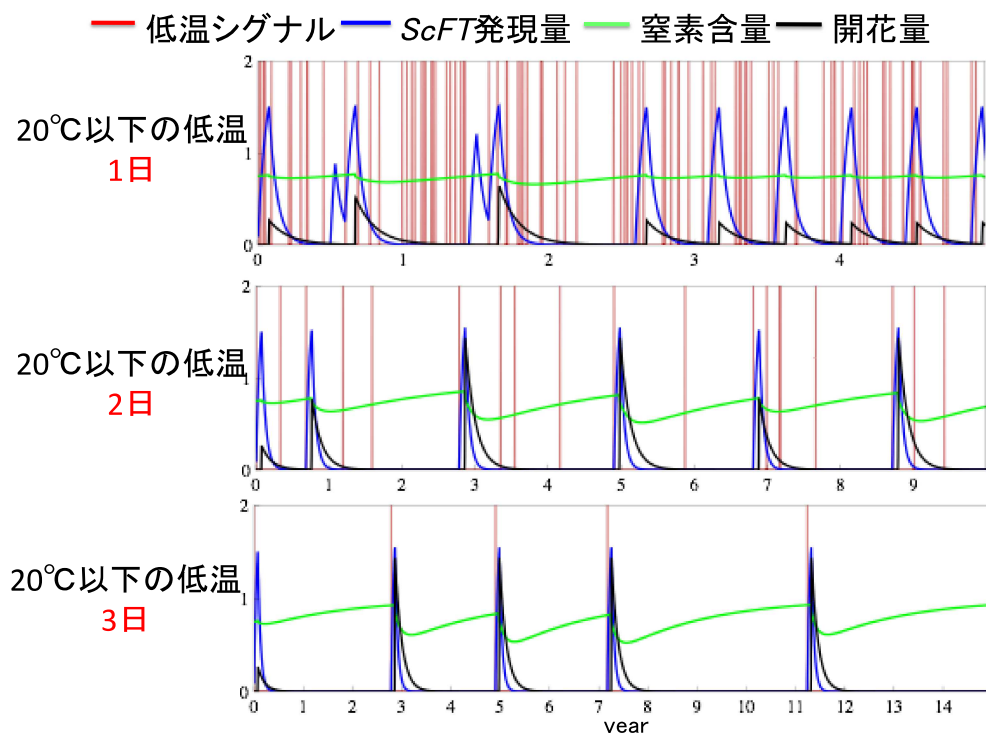


図6. 数理モデルによる予測

本研究により得られた成果

(1) 科学的意義

一斉開花を引き起こす、東南アジアの熱帯雨林において生態学的にも、木材資源の持続的利用にも重要な開花遺伝子のほとんどを世界に先駆けて大量収集することに成功した。中でもフロリゲンとして知られる *ScFT1* 遺伝子の発現量を、開花前から開花後にかけて定量化したところ、肉眼で観察されるより以前に発現上昇が見られること、実際に開花が開始された時には発現量のピークが生じた後であることが明らかとなった。

枝における資源量を測定した結果、*ScFT1* 遺伝子の発現情報前にも開花木においては窒素含量が高く維持されていたため、窒素含量が *ScFT1* の発現を制御する可能性が示された。

推定開花誘導期間における気象条件について分析したところ、はっきりとした異常気象は確認されなかった。しかし、少なくとも何らかの乾燥条件が一斉開花と関わるが見出された。今後は遺伝子発現との関連性を分析することで、一斉開花に関連する気象条件の特定が可能になると期待される。

(2) 環境政策への貢献

<行政が既に活用した成果>

「特に記載すべき事項はない」

<行政が活用することが見込まれる成果>

本研究による直接的な環境政策への貢献は限られるが、本プロジェクトで得られた成果を①東南アジアに特異的に見られる一斉開花現象の予測による森林再生・修復プロジェクトの支援、②フタバカリ開花誘導の基盤技術の提供へ結びつけたい。

6. 研究成果の主な発表状況

(1) 主な誌上発表

<論文(査読あり)>

- 1) Numata, S., Suzuki, R. O., Nishimura, S., Naito, Y., Konuma, A., Tsumura, Y., Tani, N., Okuda, T., and Nur Supardi M. N. Journal of Forest Research, (2012) 17: 378-387

“Fruiting behavior of dipterocarps in two consecutive episodes of general flowering in a Malaysian lowland rain forest.

- 2) Suzuki, R.O. Numata, S., Okuda, T., Nur Supardi M.N., Abd. Rahman K. and Kachi, N.: Journal of Tropical Ecology (in press) “Species associations among dipterocarp species coexisting in a Malaysian tropical rain forest.

＜査読付論文に準ずる成果発表＞（「持続可能な社会・政策研究分野」の課題のみ記載可。）
「特に記載すべき事項はない」

＜その他誌上発表（査読なし）＞
「特に記載すべき事項はない」

（２）主な口頭発表（学会等）

- 1) Hosaka, T., Numata, S. Arima, T., and Mazlan H. (2012) Urban Biodiversity Conference (URBIO) 2012, Mumbai. October 2012.
“Current status and perspectives of biodiversity in Tokyo, Japan.”
- 2) 沼田真也、安田雅俊、鈴木亮、保坂哲朗、Nur Supardi M, N., C. D. Fretcher, M., Hashim 日本生態学会 静岡 2013年3月
「一斉開花する森林の地理的パターンはどのように決定されるか？」
- 3) 福盛浩介、保坂哲朗、Mazlan Hashim、沼田真也 日本生態学会 静岡 2013年3月
「マレーシアエンダウロンピン国立公園における外来種アメリカクサノボタンの分布パターン」

（３）出願特許

「特に記載すべき事項はない」

（４）シンポジウム、セミナー等の開催（主催のもの）

「特に記載すべき事項はない」

（５）マスコミ等への公表・報道等

「特に記載すべき事項はない」

（６）その他

「特に記載すべき事項はない」

7. 研究者略歴

課題代表者：佐竹 暁子

九州大学理学部卒業、理学博士、現在北海道大学大学院環境科学研究院准教授

研究参画者：沼田 真也

首都大学東京卒業、理学博士、現在首都大学東京准教授

研究参画者：谷 尚樹

筑波大学卒業、理学博士、現在国際農業水産業研究センター主任研究員

RFd-1101 遺伝子情報に立脚した開花時期予測モデルの開発：一斉開花現象の分子レベルでの解明

北海道大学大学院地球環境科学研究院

佐竹 暁子

首都大学東京観光科学域

沼田 真也

国際農業水産業研究センター

谷 尚樹

平成23～24年度累計予算額：23,383千円（うち、平成24年度予算額：10,390千円）

予算額は、間接経費を含む。

【要旨】

東南アジア熱帯雨林を優占し主要な木材樹種であるフタバガキは、数年に一度様々な分類群の樹種と共に一斉に開花する。一斉開花を引き起こすメカニズムについては、低温や乾燥といった環境シグナルがトリガーとなる可能性や貯蔵資源量の関与が指摘されてきたが、これらのシグナルがどのように統合され開花に至るのかは未だにわかっていない。近年、分子遺伝学的研究の進展によって、モデル植物において開花時期制御メカニズムの理解が急速に進み、日長や温度、炭素資源量などの異なるシグナルが、独立の経路で伝達され統合されることで適切な季節に開花に至る仕組みが明らかとなってきた。本研究では、これらの分子遺伝学的知見を非モデル植物であるフタバガキ科に適用することで、外的環境要因と内的資源量がどのように相互作用し一斉開花が生じるのかを明らかにすることを目的とする。*Shorea curtisii*と*Shorea leprosula*を対象に、主要なシロイヌナズナ花成関連遺伝子の相同遺伝子を単離したところ、多くの開花遺伝子においてシロイヌナズナに対応する遺伝子と高いアミノ酸配列上の相同性が見られた。フロリゲンとして知られる*FLOWERING LOCUS T*遺伝子(*ScFT*)の発現量を長期間継続して観測した結果、肉眼で花芽を認識できる一ヶ月前に発現量の上昇が見られること、実際の開花時点では発現量はすでに低下傾向にあることが明らかとなった。枝における非構造体炭水化物、全窒素、全リン量を測定し、遺伝子発現量と合わせて解析したところ、開花木と非開花間で*ScFT*遺伝子の発現上昇前に違いが見られたのは、窒素濃度のみであった。この結果は、窒素資源量が*ScFT*遺伝子の発現を制御する可能性を示唆するものである。数理モデルを構築し、窒素資源量の動態と*ScFT*遺伝子の発現量変化を予測した結果、窒素資源量と低温シグナルの両者によって*FT*遺伝子が制御される場合に、実際に見られる不規則な開花イベントを再現できた。本研究によって得られた成果は、将来の気候変化に応答した植物の開花時期変化を予測し、地球環境変化への対応策を提案することに繋がる。

【キーワード】

気候変動、温度、開花時期、フェノロジー、開花遺伝子ネットワーク

1. はじめに

東南アジアの熱帯雨林はスンダ大陸棚上およびフィリピンやスラウェシ、ジャワの湿潤な地域に成立する。この熱帯雨林は、この地域の植生タイプの中でバイオマスが最も大きく、構造が最も複雑で、植物および動物の多様性が最も高い。熱帯は温度季節性がないため常に開花できる環境にあるにも関わらず、東南アジアを優占し主要な木材樹種であるフタバガキは、数年に1度だけ様々な分類群の樹種と共に一斉に開花する。この一斉開花は、送粉者や種子捕食者の活動源であ

る餌を提供する重要なイベントであり、生物多様性を支える基盤でもある。地球環境変化によって開花時期に異変が生じれば、複雑な食物網を通じて、豊かな生態系に影響が及びかねない。そこで、気候変化に応答した植物の開花時期変化を予測し、地球環境変化への対応策を提案することが求められている。

この一斉開花は古くから多くの生態学者の興味を惹いてきた。なかでも、進化生態学的視点から、大量の種子を一斉に実らせることにはどのような適応的利点があるかについて数々の議論がなされ、捕食者飽食仮説や受粉効率仮説などが提案されてきた^{1,2}。一方で、一斉開花を引き起こすメカニズムについては、低温や乾燥といった環境シグナルがトリガーとなる可能性や貯蔵資源量の関与が指摘されてきたが^{3,4}、これらの異なるシグナルがどのように統合され開花に至るのかについては未だにわかっていない。近年、分子遺伝学的研究の進展によって、シロイヌナズナやイネをモデル植物として、開花時期制御メカニズムの分子レベルでの解明が急速に進み、気温・乾燥ストレス・日長などの環境要因が、開花時期を左右する仕組みが次々と明らかになってきた^{5,6}。モデル植物において明らかにされた開花遺伝子ネットワークでは、日長や温度、そして炭素資源量といった異なるシグナルが独立の経路で伝達され、それらが統合されるという非常に合理的な構造が見られる。植物は長い進化の過程でこのような遺伝子ネットワークを獲得することによって、十分に資源がある状態で適した季節が訪れたときのみ開花することを可能にし、より多くの種子を実らせ次世代を残している。このような合理的な開花制御の仕組みは異なる種間で共通していると考えられる。しかし、非モデル植物であるフタバガキ科においては、開花時期制御の分子メカニズムは全く研究されておらず完全にブラックボックスにされてきた。

2. 研究開発目的

本研究ではフタバガキ科を対象に、一斉開花の分子メカニズムの解明に理論と実証の双方から迫り、遺伝子情報に立脚した開花時期予測モデルを確立することを目的とする。マレーシア熱帯雨林において有用な木材樹種である *Shorea curtisii* と *Shorea leprosula* を対象に、主要なシロイヌナズナ花成関連遺伝子の相同遺伝子を単離する。それらの葉または芽における発現量の経時変化を2週間毎に長期間継続して観測することで、季節のない熱帯で生じる微小な温度・降水量・日長の変化が花成プロセスに与える影響を可視化する。芽と葉の付け根に位置する枝を用いて、可溶性糖類デンプン等の非構造体炭水化物、全窒素、全リン量を測定し、遺伝子発現量と合わせて解析することで個体内養分量が花成に与える影響を定量化する。温度・降水量・日照量などの環境要因および個体内養分量と遺伝子発現量の関係を明らかにすることで、一斉開花を引き起こす至近要因を特定する。

3. 研究開発方法

(1) 気象データの観測と解析

林冠観測用タワーの完成後、遺伝子発現用サンプリングに加えて、展葉、落葉等の生物季節（フェノロジー）観察、微気象観測を開始し、圃場において実生、稚樹を育成し、それらを対象に遺伝子発現解析を行うための準備を行った。本年度はタワーの建設に時間を費やしたため、観測、実験設備の整備に加えて、以下の項目を実施した。

1) フェノロジー及び気象観測体制の整備

- 2) 一斉開花の生物季節に関する基本情報を収集と解析
- 3) 開花を誘導する気象条件の検討
- 4) 2002年の開花

(2) インフラ整備と遺伝子発現解析

開花遺伝子の動態を明らかにするために、以下の項目のインフラ整備及び実験を行った。

1) 林冠観測用タワー（研究用足場）の建設

これまでに遺伝子ライブラリを蓄積していたフタバガキ科（Dipterocarpaceae）サラノキ属（*Shorea*）の*Shorea leprosula*を対象とすることにした。林冠観測用タワーを建設するために、マレーシア森林研究所内の研究所所有林の調査を行い、*Shorea leprosula*の密度が高く、開花履歴があり、且つ、車道から遠くない、平坦な立地を探す必要があった。調査の結果、16林班に比較的上記条件を満たす立地を発見し、候補地とした。候補地を決定した後、マレーシア森林研究所に対して、タワー建設の許可を申請し、覚書を交わした。覚書には以下の項目を明記した。

- a) 予算は環境研究総合推進費から出費する。
- b) 環境研究総合推進費を用いて（独）国際農林水産業研究センターが主体となり建設する。
- c) マレーシア森林研究所と（独）森林総合研究所との契約（MOU）の元で建設・研究を行う（佐竹暁子（北海道大学）と谷尚樹（国際農林水産業研究センター）は研究協力者）。
- d) 環境省と国際農林水産業研究センターは所有権を保持しない。

タワーは建設後、マレーシア森林研究所（FRIM）が保有し、北海道大学及び国際農林水産業研究センターは使用权を保持している。覚書を交わした後は、マレーシア国内で林冠アクセスタワーの建設実績のあるITSENアルミニウム足場（マレーシア）株式会社と契約し、建設を行った。



図1. FRIM内に建設した林冠アクセスタワー

2) 花芽で発現する開花遺伝子の発現動態解明のための遺伝子ライブラリーの整備

林冠建設用タワーの建設が、最適な建設立地を探す調査や雨期などで遅れたため、クアラルンプールから約60キロメートル北のマレー半島脊梁山脈に位置するセマンコック森林保護区30林班に設定した6ヘクタールプロット内の *Shorea curtisii* (セラヤ) 二個体に林冠アクセス用のアルミニウム梯子を設置した(図1)。この林冠アクセス梯子を用いて2011年6月から定期的に新芽と枝及び葉の採取を開始した。新芽と葉は遺伝子発現動態を調べるため、枝は蓄積した多糖類を定量するためにサンプリングした(表1)。本試験地は実験室から日帰り可能な距離ではあるが2時間程度の時間を要するため、採取した材料はすぐにRNAlater液(Ambion社製)に浸した。2011年10月にセマンコック森林保護区を中心に、一斉開花が生じた。一斉開花とは東南アジアの熱帯雨林で観察される特有の現象で、様々な分類群に属する樹木種が一斉に同調して開花する現象である。この時、対象木としていた2個体(F063及びF278)の2個体の花芽を8/3に確認した。F278の開花規模は大きく、花芽の採取に成功したが、F063は一部の枝が開花したのみであった。よってF063の花芽サンプルは取得できなかった。

表1. セマンコック試験地のセラヤ2対象木のサンプリング日時とサンプリング部位

採取日時	対象木 (F063)	対象木 (F278)
2011/06/09	新芽 枝 採取	
2011/06/21	新芽 枝 採取	新芽 枝 採取
2011/07/07	新芽 枝 採取	新芽 枝 採取
2011/08/03	新芽 枝 採取	新芽 枝 採取
2011/08/09	新芽 枝 採取	新芽 枝 採取
2011/08/24	新芽 枝 採取	新芽 枝 採取
2011/08/30	新芽 枝 採取	新芽 枝 採取
2011/09/02		新芽 枝 採取
2011/09/06	新芽 葉 枝 採取	新芽 葉 枝 採取
2011/09/12		新芽 葉 3時間毎の採取
2011/09/26		新芽 葉 枝 採取
2011/10/10		新芽 葉 枝 採取
2011/10/13	新芽 葉 枝 採取	
2011/10/20		新芽 葉 枝 採取
2011/11/03	新芽 葉 枝 採取	
2011/11/21		新芽 葉 枝 採取
2011/12/13		新芽 葉 枝 採取
2011/12/27	新芽 葉 枝 採取	

フタバガキ科植物では花芽形成に関わる遺伝子情報は収集されていない。*Arabidopsis* などモデル植物と呼ばれる遺伝子情報が集積された植物の遺伝情報からPCRプライマーを作成し援用することも可能であるが、確実性が低い。よって今年度は一斉開花が起こったので、F278個体から大量に花芽を採取し、RNAを抽出し、花芽で発現している遺伝子群を次世代シーケンサーを用いることで大量に収集することにした。サンプルには8/24(前期)、9/12(中期)、10/10(後期)に採取した花芽を使用した。更に、スタートアップ会議において評価員である京都大学の工藤洋教授より、遺伝子発現の

日内の変化にも注意をすべきであるとの指摘を受け、9/12に午前9:00、正午、午後3時、午後6時の4サンプルを収集した。

3) 操作実験による開花遺伝子動態の確認のための実生集団の整備

建設したタワーや梯子を用いてフタバガキ科植物の花芽を採取することは可能になったが、アクセスできる個体数が非常に限られている。また、野外における遺伝子発現は微環境の影響を受け易いので、厳密にコントロールされた人工気象室などを用いた遺伝子発現動態の検証を行う必要がある。しかしながら、樹木は個体サイズが大きく人工気象室内に入れることは困難である。そこで、実生はまだ繁殖齢には達していないが、外的環境への刺激に対して遺伝子が同じように反応することが予想され、実生を用いた検証は有効である。よって、本年度生じた一斉開花時に種子を採取し、人工気象室を用いた操作実験のための実生集団の整備を行った。

4) リアルタイム PCR プライマーの検討と遺伝子発現解析

設計されたリアルタイム PCR プライマーが十分な増幅効率を示すかどうかを検討した後、 $\Delta \Delta Ct$ 法を用いて mRNA 量を測定した。

(3) 遺伝子情報に立脚した開花時期予測:数理モデルの開発と解析

野外調査と分子実験によって得られたデータをもとに、開花遺伝子の発現量の変化をとらえた数理モデルを開発し、開花フェノロジーを予測した。本研究課題の全体スケジュールを、表2に示す。

全体スケジュール	23 年度	24 年度
<i>Shorea leprosula</i> を対象に葉・芽・枝のサンプル採取	○	○
SuperSAGE 法による網羅的遺伝子発現解析と相同遺伝子クローニング	○	○
枝内の可溶性糖類デンプン等の非構造炭水化物・全窒素・全リン量測定	○	○
芽の組織切片の作成と組織形態観察	○	○
データ解析・数理モデルの開発		○

表2. 本プロジェクトの全体スケジュール

4. 結果及び考察

(1) 気象データの観測と解析

1) フェノロジー及び気象観測体制の整備

展葉、落葉等のフェノロジー観察、微気象観測を行うため、観測機器を整備し、設置準備を行った。H23年はフェノロジー及び気象観測体制を行うため、必要機材の調達と予備的な観測を行った。また、気象データの収集を行い、今後の観測に向けた準備を行った。過去の気象データを収集し、開花結実を誘導する可能性がある2つの気象条件（PD:異常乾燥（30日間積算降水量が30mm未満）とLT:異常低温（最低気温が20度未満））についてその発生頻度をみたところ、観測地によって異なるものの、概ね異常乾燥は異常低温に比べて20倍以上の頻度で発生していたことが明らかになった（図2）。フタバガキ科の開花結実は多くの場合、数年に一度程度であるものの、その頻度と比べて極めて高い頻度で異常乾燥が発生していた。そのため、現在の定説である異常乾燥による一斉開花の誘導は少なくとも半島地域では一斉開花の発生を説明できず、必要条件に過ぎ

ないことが示唆された。一方異常低温は一斉開花の発生頻度に比較的近い頻度で発生し、一斉開花が発生した年にも記録されていた。そのため、異常低温は半島マレーシアにおいては一斉開花の発生と関連する可能性が高く、実験においてはそれらの両者を観測することが重要である。

Meteorological station	Long. (E)	Lat. (N)	Alt (m)	Ann. rainfall (mm) (1981-2008)	Seasonality (CV of mo. rainfall)	Frequency of LT(d ⁻¹) 1981-2008	Frequency of PD(d ⁻¹) 1981-2008	Rank correlation between PD and LT (r)
1. Sitiawan	100° 42'	4° 13'	7	1808	0.59	0.0008	0.0543	0.039
2. Temerloh	100° 23'	3° 28'	39.1	1948	0.58	0.0054	0.0375	0.290***
3. Alor Star	100° 24'	6° 12'	3.9	1994	0.65	0.0038	0.1189	0.514***
4. Malacca	102° 15'	2° 16'	8.5	2022	0.54	0.0006	0.0413	0.020
5. Kluang	103° 19'	2° 01'	88.1	2194	0.61	0.0001	0.0196	0.155**
6. Langkawi	99° 44'	6° 20'	6.4	2435	0.75	0.0004	0.1481	0.133*
7. Muadzam Shaw	103° 05'	3° 03'	33.3	2446	0.71	0.0057	0.0285	0.176**
8. K. Krai	102° 12'	5° 32'	68.3	2485	0.85	0.0205	0.0557	0.128*
9. Senai	103° 40'	1° 38'	37.8	2500	0.52	0.0047	0.0114	0.248***
10. Kota Bharu	102° 17'	6° 10'	4.6	2530	1.20	0.0015	0.1120	0.038
11. Ipoh	101° 06'	4° 34'	40.1	2581	0.49	0.0001	0.0101	0.068
12. K. Terengganu	103° 06'	5° 23'	5.2	2591	1.16	0.0018	0.0844	0.022
13. Mersing	103° 50'	2° 27'	43.6	2658	0.89	0.0003	0.0372	-0.038
14. Kuantan	103° 13'	3° 47'	15.3	2967	0.85	0.0037	0.0402	-0.001

Frequencies of LT: 0.0035 ± 0.0053 (d⁻¹) -> 285 d intervals

Frequencies of PD: 0.0781 ± 0.0427 (d⁻¹) -> 13 d intervals

Only 7 meteorological stations showed significant positive correlation between monthly PD (monthly lowest 30d MTR) and LT (monthly lowest low temp)

図2. 半島マレーシアにおける異常気象の発生パターン

圃場実験の準備のため、近隣のパソ森林保護区とセマンコック試験林において開花・結実調査と林床におけるフタバガキ科実生の生残状態について確認を行った。

パソ森林保護区では2009年、2010年に中規模の一斉開花現象が発生し、2011年にはごく少数のフタバガキ科の開花がみられたことが明らかになった。2011年11月に林内を観察したところ、フタバガキ科では*Shorea macroptera*、*S. maxima*、*Dipterocarpus sublamellatus*の種子が確認された（図3）。*S. macroptera*と*D. sublamellatus*については未成熟果実であったことから、7-8月頃に開花が始まる秋咲き型¹⁰の一斉開花に該当するものであったと考えられる。

パソ森林保護区では2009年、2010年の一斉開花により、林床においてはフタバガキ科の実生が複数観察された。しかし、いずれの年も1996年、2002年、2005年と比べて開花規模は小さく、実生の生息密度は低かった。そのため、実験のために同一母樹から苗木を採集するには、ある程度樹種を絞る必要がでてくるものと考えられる。



図3. ネグリ・スンビラン州パソ森林保護区で観察された *Shorea macroptera* と *Dipterocarpus sublamellatus* の未成熟果実

一方、スランゴール州・セマンコック試験林では2011年11月に半島マレーシアの丘陵林において優占する *S. curtisii* の開花が複数個体で観察された（図4）。今回の開花は10月から始まったため、秋咲き型の一斉開花であると考えられる。なお、Burgess (1972)¹¹によると半島マレーシア北部における *S. curtisii* の開花時期は半島マレーシア北部では4月と7月にピークがあるようだが、半島南部においては分かっていない。北部では明らかに乾燥による影響が強いため、丘陵林についてはフェノロジーに関する情報が不足しているため、検討が必要である。



図4. スランゴール州・セマンコック試験林で観察された *Shoera curtisii* の開花

2) 一斉開花の生物季節に関する基本情報の収集と解析

東南アジアにおいては、緯度、経度だけでなく、標高や地形などによって降雨量、気温や日射などの気象条件は地域間で大きく異なる。一斉開花は地域における気候特性と密接に関連していることが予想され、一斉開花の地理的パターンとそれに関係する要因を検討することで、一斉開花の発生メカニズムに迫ることができると考えられる。しかし、多くの熱帯林研究は、少数の調査地において集中的に研究を行うようなアプローチを用いており、一斉開花やそれに関わる要因の地理的パターンに関する情報は極めて限られている。そこで、花成関連遺伝子の発現量変化に

関連する環境因子を絞り込むことを目的として、一斉開花の地理的分布をより詳細に評価、分析した。一斉開花に関する公表データをGISデータベースとしてとりまとめた^{3, 11, 12}。

Burgess (1972)¹¹で用いられた半島マレーシアの州毎の一斉開花発生データを用いた。データはマレーシア森林局発行のレポートをとりまとめ、一斉開花の状況を一斉開花、一斉開花なし、データなしの3種類で州毎に評価したものである。これらのデータを取りまとめた結果、1925年から1970年までに一斉開花が発生した州は空間的に図5のような様式を示すことが明らかになった。戦前については1930年、1933年、1940年に対象の四分の三以上の州で一斉開花が確認されていた。また、戦後では1963年、1968年において四分の三以上の州で一斉開花が確認されていた。特にほぼ全域で一斉開花が見られた1963年と1968年にはエルニーニョ現象が発生し、非常に乾燥していた年であり¹³、このような異常気象と一斉開花の関連性が伺われる。

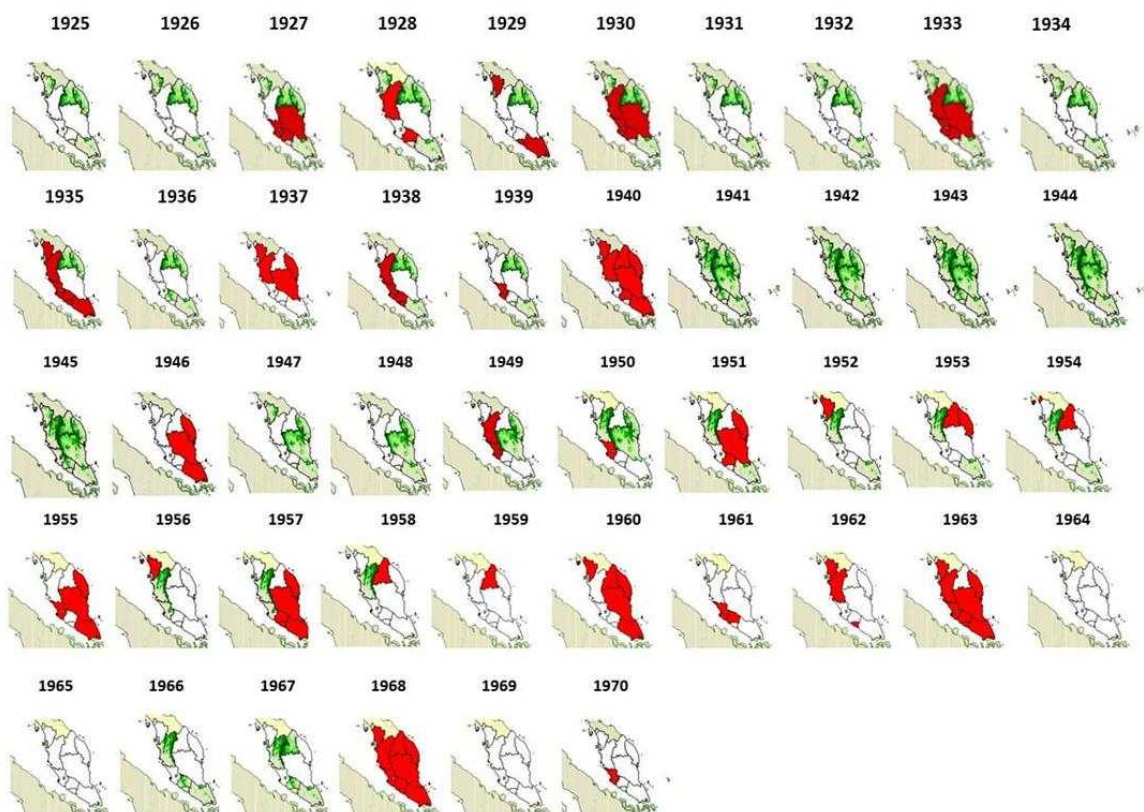


図5. 一斉開花データベースの出力例（1925年から1970年までに半島マレーシアで発生した一斉開花）。これまでに公表されている一斉開花分布データを収集し、GISデータベースとしてとりまとめた（沼田・未発表）。一斉開花が発生した州を赤で、一斉開花が発生しなかった州を白で、データがない州は透明で示す。

続いて、半島マレーシア内における一斉開花の地理的特性を明らかにすることを目的とし、Burgess (1972)¹¹により用いられた1925年から1970年まで州ごとに記録された結実情報について、

クラスター分析を用いて分析し、一斉開花の地理的特性を検討した。その結果、Burgessのデータからは半島マレーシアの一斉開花発生パターンは、北部、西部、東部の3つの地理的グループに分けられることが明らかになった（図6）。これらの違いは降雨パターンに違いを反映しているものと考えられる。例えば、半島北部の州は降雨季節性が強く、乾季における乾燥の程度がそれ以外の州と比べて強い。また、東側はアジアモンスーンの影響を強く受け、11月から1月にかけての降水量が多い。今回得られた地理的な違いはこのような降雨パターン、さらにはフロラなどの違いを反映しているものと考えられる。

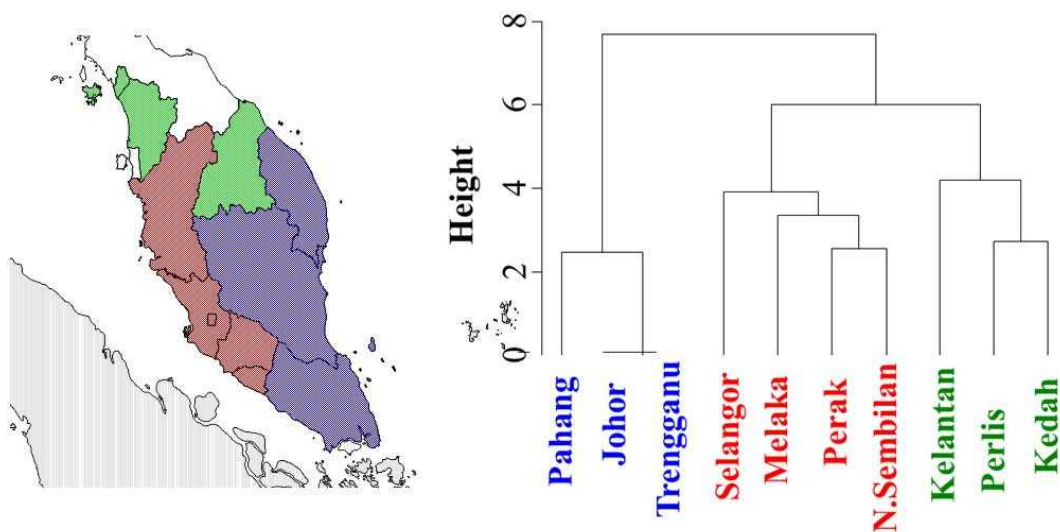


図6. 半島マレーシアにおける一斉開花の季節性の地理的パターン。1925年から1970年までに半島マレーシアで発生した一斉開花のデータ（州毎）についてクラスター解析(Wald法)を行い、半島マレーシアの一斉開花の発生パターンは3つのクラスターに分けられることが明らかになった（沼田・未発表）。右図、クラスター分析のHeightは枝長を表す。

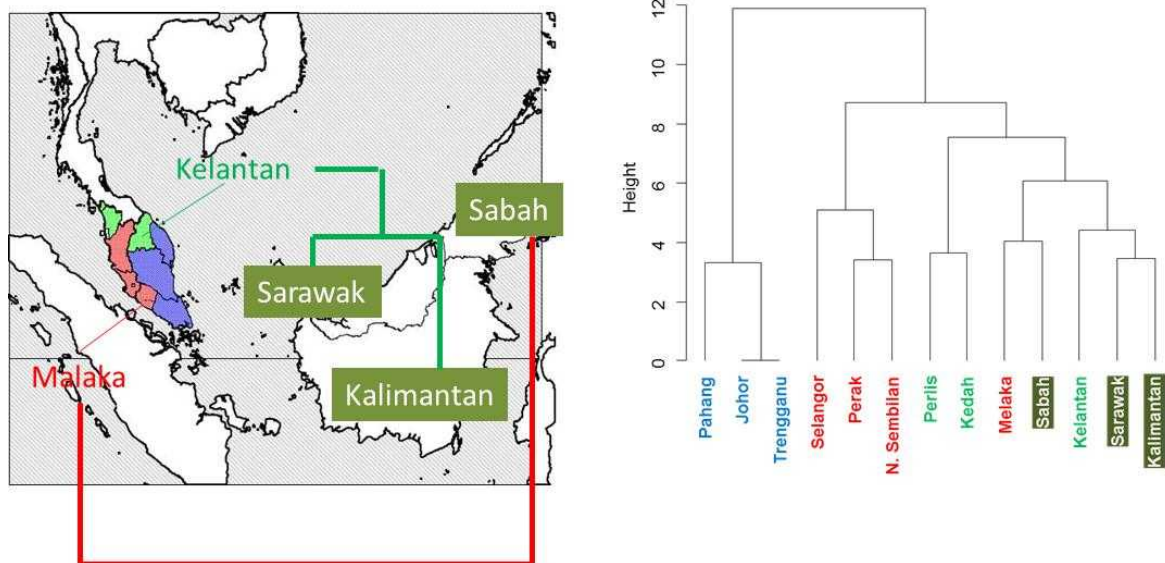


図7. 半島マレーシアとボルネオにおける一斉開花の季節性の地理的パターン（沼田・未発表）。半島マレーシア、ボルネオ（サラワク、サバ）、カリマンタンで発生した一斉開花のデータについてクラスター解析(Wald法)を行ったところ、半島マレーシア北部の州及びマラッカ州の一斉開花発生パターンはボルネオやカリマンタンと類似度が高いことが明らかになった（沼田・未発表）。右図、クラスター分析のHeightは枝長を表す。

さらに、半島マレーシアとボルネオにおける一斉開花の地理的特性の類似性を明らかにするため、同様にクラスター分析を用いて分析した（図7）。その結果、Burgessのデータからは半島マレーシアの一斉開花発生パターンは、北部、西部、東部の3つの地理的グループに分けられることが明らかになった（図7）。その結果、半島マレーシア内であってもいくつかのグループに分けられ、半島北部の州やマラッカ州はむしろサバ州やボルネオ州の一斉開花発生パターンに近いことが明らかになった。全体的には半島マレーシアよりもボルネオの方が降雨量が多いが、降雨季節性は半島マレーシア内だけでなく、州内でも大きく異なる。そのため、もう少し詳細なスケールで一斉開花の発生を記録したデータを探索し、分析を試みる必要があると思われる。

このような一斉開花の地理的パターンは何によって決定されるのであろうか？図8は半島マレーシアにおける2001年、2002年、2005年に発生した一斉開花の地理的パターンと異常気象（PD：異常乾燥、LT：低温）の関係である。一斉開花の発生については半島マレーシアの約100カ所で実施してきた一斉開花の定期観測による結果を用いた。また、異常気象については、半島マレーシアの14カ所の気象観測所気象データを分析した。その結果、2001年以降の結実については明瞭な地理的特徴は見いだせなかった。一方で、気象条件の発生様式については地理的特徴が見いだされたものの、その様式は季節や気象要因間で異なっていた。

Geographical relationships between GF, PD and LT

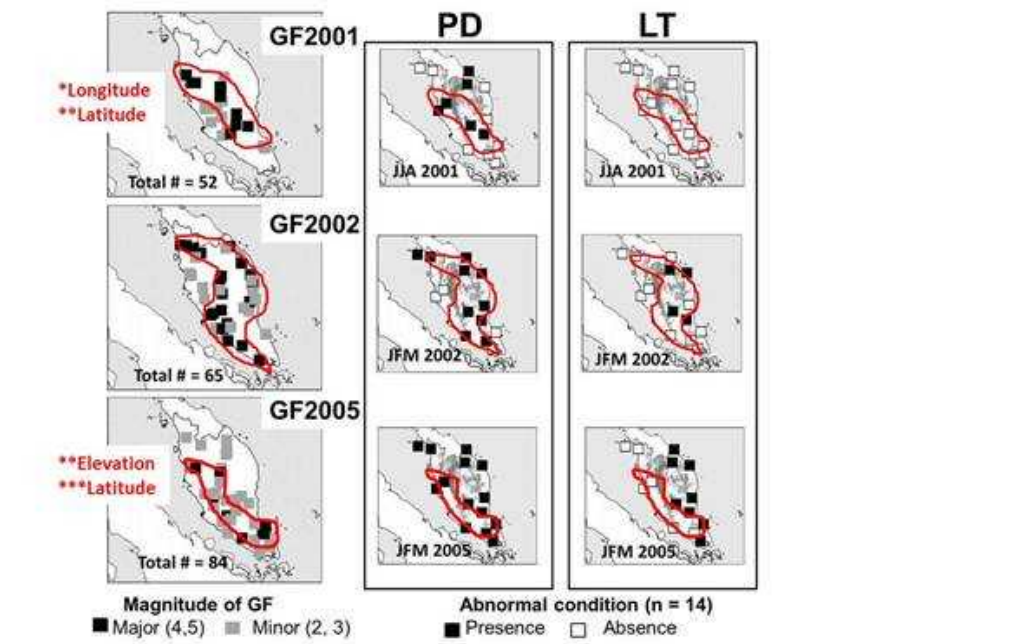


図8. 半島マレーシアにおける一斉開花の地理的パターンと異常気象 (PD: 異常乾燥、LT: 低温) の地理的パターンの関係 (沼田・未発表)。赤線で囲まれた部分は大規模な一斉開花 (スコア4-5) が観察された地域を表す。

Effect of geography on GF scores (0-5) (GLM with poisson error structure)

	GF2001	GF2002	GF2005
Intercept	37.9*	-3.47	10.1
Elevation	-0.000193	0.000141	0.000158**
Longitude	-0.351*	0.0371	-0.0821
Latitude	-0.377**	0.118	-0.379***

*: $p < 0.05$, **: $p < 0.01$, ***: $p < 0.001$

図9. 半島マレーシアにおける一斉開花における地理的特性の影響 (沼田・未発表)。一般化線形モデルを用いて、GF2001、GF2002、GF2005における各森林の一斉開花の規模が、地理的にどのような影響を受けているのかを検討した。

2001年、2002年、2005年に発生した一斉開花の地理的パターンが、地理的特性（緯度、経度、標高）とどのような関係にあるかを解析した（図9）。その結果、2001年の一斉開花（GF2001）については、緯度と経度について有意な負の効果が見られたことから、緯度が低くなるほど（南に行くほど）、また経度が低くなるほど（西へ行くほど）一斉開花の規模が大きくなる傾向があることが明らかになった。2002年（GF2002）については緯度、経度、標高による有意な効果は見られなかった。2005年（GF2005）については、緯度については負の効果が、標高については正の効果が見られたことから、緯度が低くなるほど（南に行くほど）、標高が高くなるほど一斉開花の規模が大きくなることが明らかになった。この結果は半島マレーシアで広域的に見られる一斉開花は年によって地理的パターンは異なることを示唆するものである。特に、2001年と2005年の一斉開花には地理的パターンが見られ、2001年には見られなかったが、これらの違いは異常気象、特に異常乾燥の地理的パターンに関連している可能性があるが、2005年については半島全域で異常乾燥が確認されたのにもかかわらず、一斉開花には地理的な偏りがみられたため、今後、更なる検討が必要であると考えられる。

近年、モデル植物においては気温・乾燥ストレス・日長などの環境要因が、開花時期を左右する仕組みが次々と明らかになってきている。フタバガキ科にでも、低温や乾燥および個体内養分量の充実度が開花の引き金になる可能性は指摘されているが、そのメカニズムはほとんど何も分かっていない。一斉開花の観点から、古くは乾燥（少雨）が注目され、1980年代以降は夜間最低気温の低下が注目されるようになったが、近年は最低気温の低下を伴わない一斉開花の存在が報告され、ボルネオにおいて、不定期に発生する異常乾燥（30日積算降雨量<40mm）と一斉開花の強い関連性が指摘された。しかし、半島マレーシアでは地域によって異なるものの、約13日に一度の高頻度で異常乾燥が発生しており、異常乾燥の発生は一斉開花の発生を必ずしも伴わないことが明らかになった。これらは、一斉開花の季節性、すなわち夏と冬のモンスーンに対応する開花季節性と関連し、日長のような年変化を利用することで、頑健性が高い一斉開花のメカニズムが維持されている可能性がある。そのため、来年度の本格的な実験においては、低温、乾燥、個体内養分量に加えて、日射量についても検討することで、遺伝子制御ネットワークモデルを構築することが必要であると考えられる。

3) 開花を誘導する気象条件の検討

一斉開花は超年周期的、広域的に、多岐に渡る分類群の樹木が同調的に繁殖する現象であるため、様々な植物種が同調を可能にする外的シグナル、すなわち異常気象が重要であると考えられてきた。古くは乾燥（少雨）が注目され、1980年代以降は夜間最低気温の低下が注目されるようになった。しかし、近年最低気温の低下を伴わない一斉開花の存在が報告され、ボルネオにおいて、不定期に発生する異常乾燥（30日積算降雨量<40mm）と一斉開花の強い関連性が指摘された。そこで、本研究では一斉開花と関連する気象条件として、「低温」と「乾燥」に焦点を当て、2011年と2012年の開花前の状況を評価した。

始めに気象庁にて公開しているマレーシア各都市の月降水量データを用いて、2011年の降水量のパターンを調査した（図10）。その結果、2011年の6-8月はKuantanやMalaccaで平年よりも乾燥気味であった。また、調査地があるSemangkok森林保護区に比較的近いSitiawanとKuala Lumpurで

は、Sitaiwanでは7-8月は平年よりも乾燥気味であったが、Kuala Lumpurでは6-7月が平年よりも乾燥気味であった。

Monthly rainfall anomalies (2011-2012)

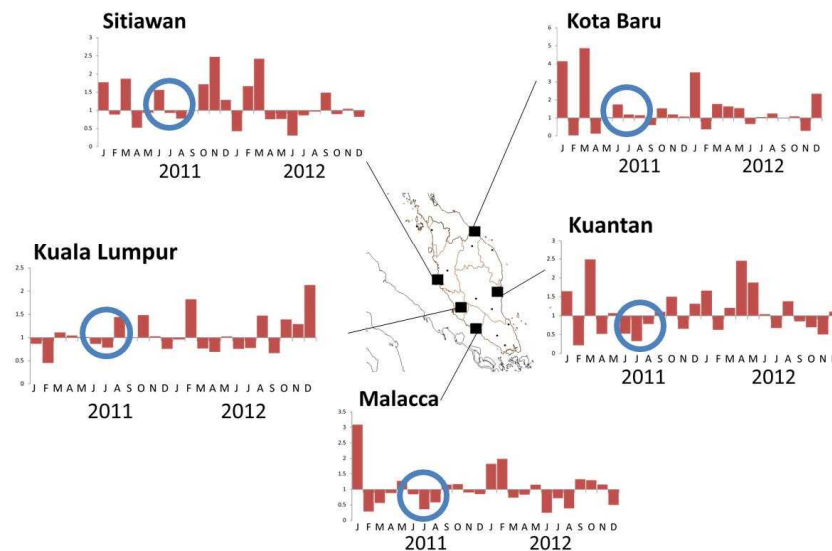


図10. 2011年、2012年における半島マレーシアにおける降雨パターン。縦軸は降水量偏差を表す。

スランゴール州Semangkok森林保護区において観測された日気温データを図11に示す。この地域では2011年11月頃から半島マレーシアの丘陵林において優占する*S. curtisii*の開花が複数個体で観察された。今回の開花は10月から始まったため、秋咲き型の一斉開花と考えられ、開花誘導はおおよそ6月から8月の間に起こったものと推定される。その結果、一斉開花の推定誘導期間においては2011年7月下旬に林冠及び林床において20度を下回る最低気温の低下が記録されていたことが明らかになった。また、この時期はダムの水位が低下するなど、比較的乾燥していた。残念ながら現時点では降水量データは得られていないものの、一斉開花の推定誘導期間には乾燥、低温ともに発生していたと推定される。

Air temperature before flowering

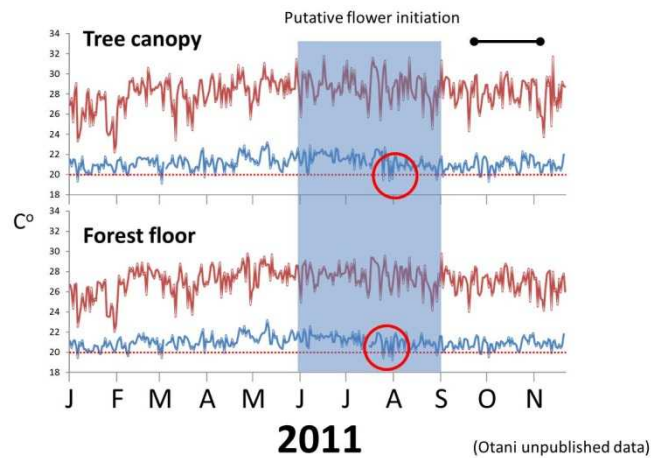


図11. Semangkok森林保護区における開花前の気温の推移。上は林冠、下は林床。

4) 2002年の開花

2012年は2011年よりも乾燥気味であった。北東部に位置するKota Baruを除き、月降水量は平年よりも少ない傾向にあった。また、マレーシア気象局(Malaysian Meteorological Department)が提供する月別降水量マップ見たところ、2012年6月は全半島的に乾燥気味であったことが明らかになった（図12）。特に、西側は月降水量が50 mm未満のところが多く、極めて強い乾燥が記録されていた。

Rainfall map for Malaysia (MMD)

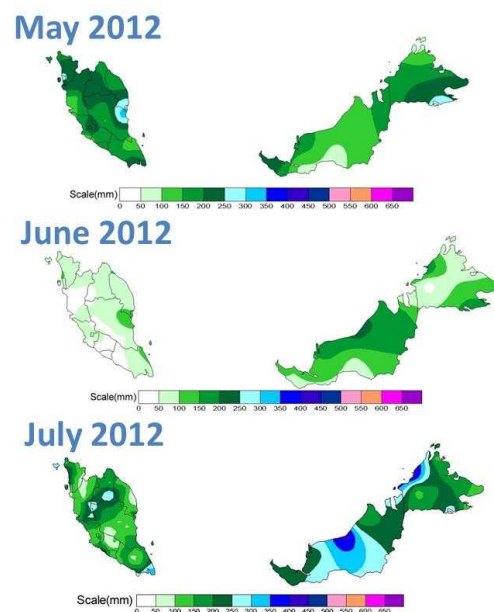


図12. 2012年5-7月における半島マレーシアの月降水量マップ（マレーシア気象局から）。

マレーシア森林研究所 (Forest Research Institute Malaysia) において建設された林冠観察用足場において、日射量、光合成有効放射量、相対湿度、気温の観測を3分おきに行った（マイクロステーションロガー（HOB0 Micro Station Logger）及び日射センサー（S-LIB-M003）、光量子センサー（S-LIA-M003）、高分解能湿温度センサー（S-THB-M002））。観測は2012年6月1日から行ったが、小動物による観測の妨害により、8月上旬から、観測は一時中断した。

その結果、2012年6月1日から8月3日までの微気象データが得られた（図13）。観測期間中、日射量は変動が大きかったものの、6月上旬が最も高く、以降は減少する傾向にあった。日最高相対湿度の日変動は小さく、概ね90%前後を推移していたが、日最低湿度は変動が大きく、2012年6月12日に最低湿度40.8%を記録していた。日最高気温、日最低気温については、日射量と同様に6月上旬が高く、その後低下する傾向にあったが、20度以下の気温は観測されなかった。ただし、6月9-10日、6月24日、7月3日、5-6日、8日において最低気温の低下（22度未満）が観測されていた。

Meteorological condition before flowering episode at the FRIM tower in 2012

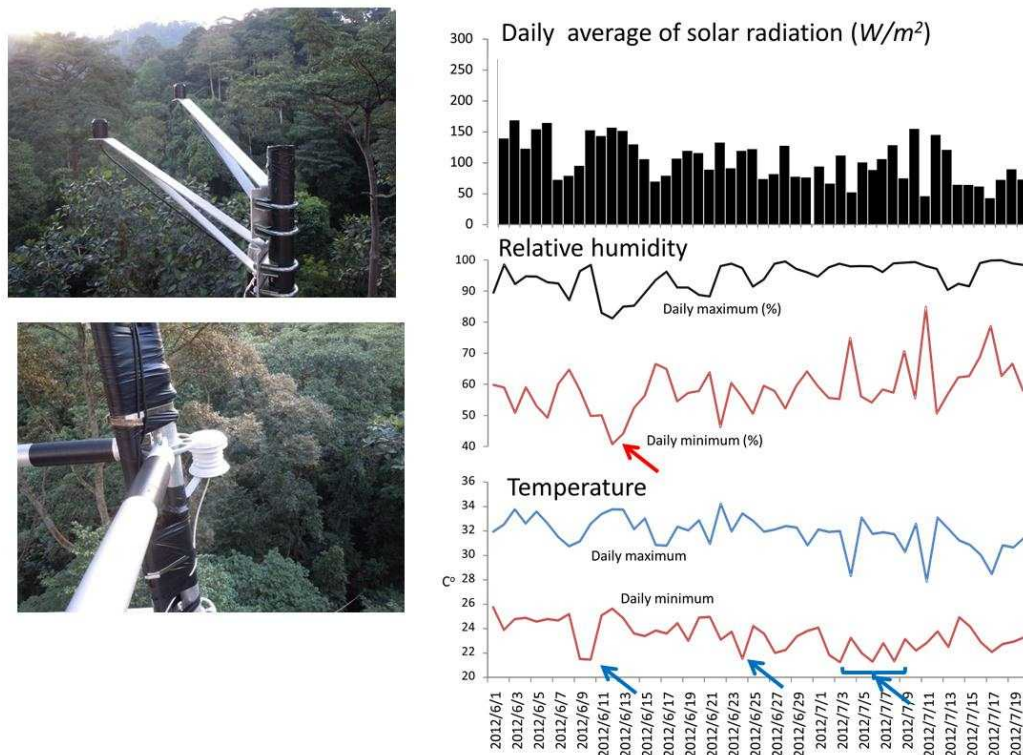


図13. 2012年6-7月においてマレーシア森林研究所で行った微気象観測の結果

観測した気象データ間の関係を検討するため、11変数（日最高気温 (Daily Max. Tmp.)、日最低気温 (Daily Min. Tmp.)、日気温較差 (Daily Tmp. range)、日最高相対湿度 (Daily Max. RH)、日最低相対湿度 (Daily Min. RH)、日平均相対湿度 (Daily RH average)、日相対湿度格差 (Daily RH range)、日最大日射量 (Daily Max. SR)、日最大光量子密度 (Daily Max. PAR)、日平均日射量 (Daily SR average)、日平均光量子密度 (Daily PAR average)）について相関行列を作成した（表3）。特に、乾燥の指標として日最低相対湿度（Daily Min. RH）と他の変数の関連性に注目したところ、

日最低気温を除いて有意な相関関係が見られることが明らかになった。特に、日最高気温との相関係数は高く ($r = -0.92$)、気温が高い日ほど、日最低相対湿度が低くなるということが予想された。

表3. 2012年6-7月においてマレーシア森林研究所で行った微気象データ間の相関行列。日最低相対湿度 (Daily Min. RH) は日最低気温 (Daily Min. Tmp) を除いて有意な相関関係が見られた (黄色塗りつぶし)。

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1 Daily Max. Tmp.	-	0.19	0.68	-0.34	-0.92	-0.75	0.76	0.62	0.59	0.77	0.81
2 Daily Min. Tmp.		-	-0.59	-0.71	-0.14	-0.50	-0.30	-0.03	-0.01	0.17	0.18
3 Daily Tmp. range			-	0.25	-0.65	-0.24	0.85	0.54	0.49	0.52	0.55
4 Daily Max. RH				-	0.39	0.80	0.22	0.06	0.06	-0.28	-0.33
5 Daily Min. RH					-	0.78	-0.81	-0.56	-0.54	-0.77	-0.81
6 Daily RH average						-	-0.33	-0.29	-0.29	-0.67	-0.72
7 Daily RH range							-	0.63	0.61	0.65	0.66
8 Daily Max. SR								-	0.98	0.66	0.65
9 Daily Max. PAR									-	0.72	0.68
10 Daily Avg PAR										-	0.99
11 Daily Avg SR											-

一方で、日データを解析に用いることについての注意点も浮かび上がった。図14は2012年6月8日から12日まで観測された相対湿度と気温の変化であるが、最低気温の低下は6月9日の午後10時から10日の午前7時まで継続して起こっていた。このように気温の低下は日をまたいで発生することがあるため、多くの気象観測所が提供する日最低気温を解析する際には注意が必要であると考えられる。

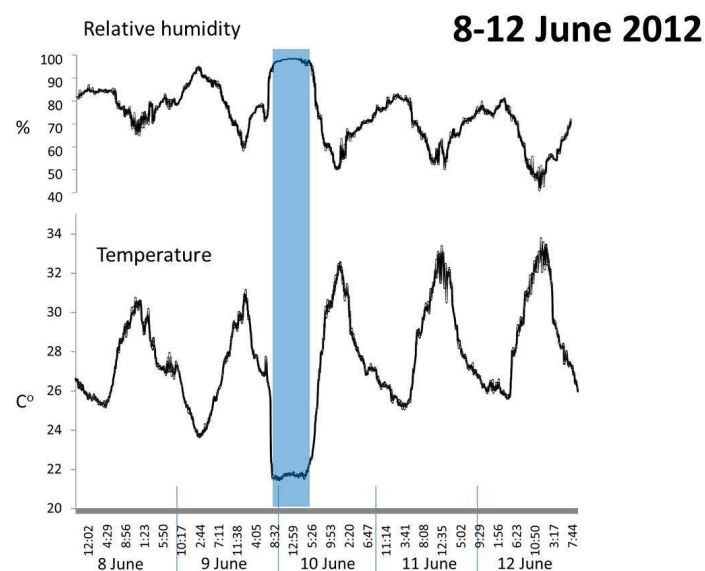


図14. 2012年6月8日から12日まで観測された相対湿度と気温の変化

以上のように、研究期間中に異なる地域において2つの開花イベントが観察された。それぞれの開花イベントの前（推定開花誘導期間）は乾燥していたことが明らかになったが、気温の低下についてはSemangkok森林保護区で観察されたものの、マレーシア森林研究所では観察されなかった。

ただし、Semangkok森林保護区の気温の低下は以前にも高頻度で記録されており、気温低温の有無と開花の発生は必ずしも対応するものではないと考えられる。一方、半島マレーシアでは30日積算降水量が40 mmを下回るような強い乾燥も高頻度で、ほぼ毎年発生しているため、必ずしも一斉開花の発生と対応している訳ではない。そのため、一斉開花を誘導し、低温の発生などに関連がある特殊な乾燥条件が存在する可能性があるが、今後の詳細な解析が求められる。

(2) インフラ整備と遺伝子発現解析

1) 林冠観測用タワー（研究用足場）の建設

林冠観測用タワーの建設には、契約の手続き、雨期などのより時間を要したがH23度中に建設を終了した後、すぐさまタワーを用いた新芽の定期的なサンプル採取を実施した。

2) 花芽で発現する開花遺伝子の発現動態解明のための遺伝子ライブラリーの整備

マレーシア森林研究所内の林冠アクセスタワーの建設に時間を要するため、国際農林水産業研究センター交付金プロジェクトで使用しているセランゴール州セマンコック試験地において2011年6月9日から新芽、葉および枝のサンプリングを開始した。2011年8月24日に花芽に分化していることを確認し、本年度は花芽形成遺伝子の発現動態を調査するためのプライマー設計のため、花芽を大量にサンプリングし、花芽で発現している遺伝子群を網羅的に収集するため、RNA抽出及び次世代シーケンサーを用いた次世代シーケンサーによるトランスクリプトーム解析を行った。サンプルには初期（8/24）、中期（9/12）、後期（10/10）に採取したF278の花芽を用いた（図15）。



図15. ラダーシステムによる林冠アクセスと左より8/24、9/12、10/10の花芽の成長

RNA抽出はCTAB法で粗抽出を行った後、QIAGEN社のRNeasy mini extraction kitを用いて、精製ならびにDNAの除去を行った。抽出したRNAはAgilent社製2100 BioanalyzerのRNAチップを用いて品質及び終了の確認後（図16、図17）、イルミナ社の次世代シーケンサーGene Analyzerシステムを利用し、花芽で発現している遺伝子の網羅的な収集を行った（トランスクリプトーム解析）。

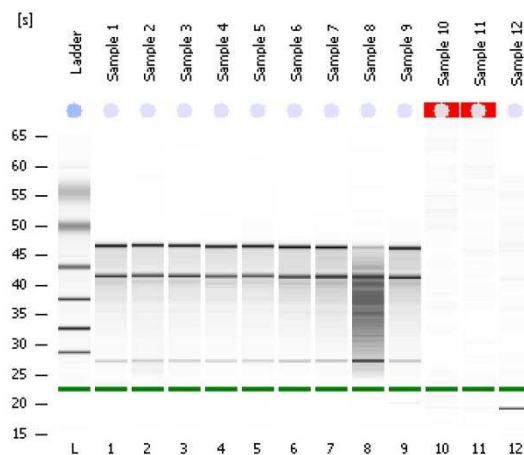


図16. 抽出したRNAをAgilent社Bioanalyzer 2100で電気泳動したイメージ
Sample番号1から3が8/24、4から6が9/12、7から9が10/10のサンプル

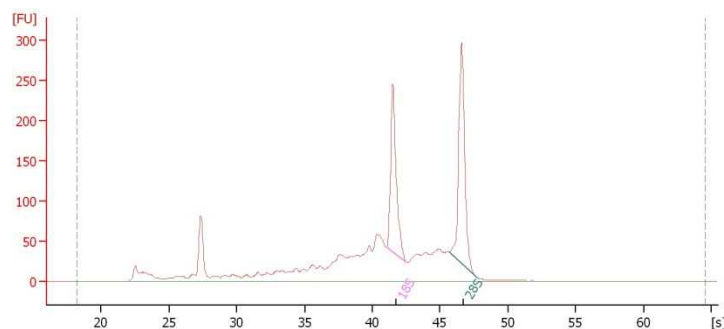


図17. Sample 1 (8/24) のクロマトグラムの例

RNAの収量は962 ng/ul。18S及び28S RNAの収量から算出されるRNAの純度を表すRNA Integrity Number (RIN)は7.1であり、ライブラリー作成に十分なRNAを取得した。

トランスクリプトーム解析では、約2億5000万の総リード数が得られ、その結果2万5千Mbpの塩基数を取得した。アダプタートリミング後のリードデータを用いてプログラムvelvetによるアセンブル、及びその拡張プログラムoasesによるtranscriptomeアセンブルを行った結果、約15万個のコンティグ（連結した読み取り塩基配列断片のセット）が得られ、その平均長と最長コンティグの長さはそれぞれ402bp, 7,020bpであった。作成したライブラリーを用いて、シロイヌナズナの開花時期制御に関連した遺伝子と概日時計に関連した遺伝子の塩基配列をもとにBLAST検索（バイオインフォマティクスでDNAの塩基配列あるいはタンパク質のアミノ酸配列のシーケンスアライメントを行うためのアルゴリズム）を行った。開花遺伝子に関しては、検索に用いた24の開花遺伝子のうち19、時計遺伝子に関しては検索に用いた7つの遺伝子の全てにおいて対応するコンティグ配列が見つかった。結果を以下の表4と表5に示す。

表4. 開花遺伝子

A. thaliana gene	Contig ID	# sequence (bp)*	Identity (%)
FLD	Locus_7745	1022	79.55
GA5	Locus_30363	203	81.28
FCA	Locus_6774	349	80.23
CAL	Locus_3142, 8658, 7332	116, 131, 221	84.48, 83.21, 79.19
AG	Locus_14362	222	82.43
CLV1	Locus_247	224	80.80
FUL	Locus_3142, 7332	203, 212	87.68, 83.96
FT	Locus_29812, 4391	349, 158	78.80, 81.65
LFY	Locus_19547	278	79.86
SOC1	Locus_18098, 1037	171, 216	83.63, 81.48
FD	Locus_29504	121	84.30
SVP	Locus_6900	128	87.50
AP2	Locus_3309, 6776	431, 428	81.67, 81.31
AP3	Locus_21201	95	86.32
AP1	Locus_3142, 7332	234, 215	84.62, 82.33
FDP	Locus_29504	109	81.65
TEM1	Locus_4218	92	86.96
SPL9	Locus_16832, 6948	163, 153	82.21, 82.21
CO	Locus_16154, 8926	138, 139	86.23, 85.61

表5. 時計遺伝子

LUX	Locus_17308	125	81.60
ELF3	Locus_9500	147	85.71
ELF4	Locus_29452	50	90.00
CCA1	Locus_2799	326	78.83
LHY	Locus_2799, 1302	365, 276	81.92, 83.33
TOC1	Locus_783	408	79.41
GI	Locus_2518, 9645	1271, 1073	81.43, 81.83

#塩基配列情報は、コンティグの全長ではなくBLAST検索に使用された部分的塩基配列長であることに注意。

開花遺伝子のうち、フロリゲンとして知られる *FLOWERING LOCUS T* (*FT*)^{7,8}は2つ存在することがわかったため、それぞれ *ScFT1*, *ScFT2*と名付けた。これらの遺伝子に加え花芽分化決定遺伝子である *LEAFY*⁹も考慮し、シロイヌナズナで対応する遺伝子と比較したところ、アミノ酸配列で75%以上の高い相同性がみられた。これらの結果は、主要な開花遺伝子は種を超えて高く保存されていることを示唆するものである。これらの遺伝子を定量PCRの一つであるリアルタイムPCRで増幅させるためのプライマー（DNAポリメラーゼがDNAを合成する際の核酸の断片）を設計し、後に記述する遺伝子発現解析に用いた。

3) 操作実験による開花遺伝子動態の確認のための実生集団の整備

実生集団の整備の候補樹種として、ライブラリーを作成した *S. curtisii*、タワーに隣接する *S. leprosula*に加えて数樹種のフタバガキ科樹種（*S. parvifolia*、*S. platyclados*、*Anisoptera laevis*など）をマレーシア森林研究所内の苗畑で整備した。結実次期は種、及び標高によってずれるが、*S. curtisii*は二月初旬に成熟種子が落下し始めた。また、*S. leprosula*は遅く、二月中旬から下旬に成熟種子が落下し始めた。これらを採取し、苗畑で発芽させ栽培した。各樹種とも母樹別に種子を採取し、母樹の遺伝的効果を把握できる実験設定をした。概ね各樹種とも1000個体以上の実生を保存した（図18）。

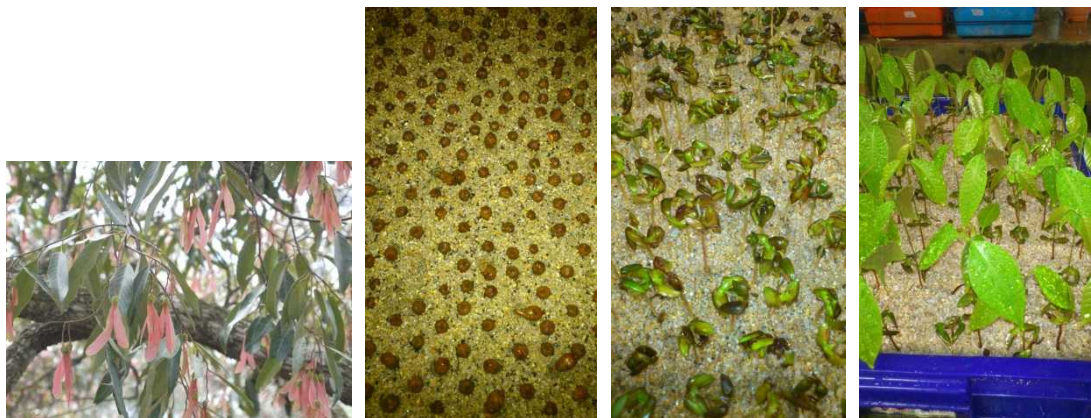


図18. *Shorea curtisii*の種子（左）と採取した種子を播種した様子

4) リアルタイムPCRプライマーの検討と遺伝子発現解析

$\Delta\Delta$ CT法を用いて遺伝子発現量の定量を行うために、遺伝子発現量の比較基準として用いる内在的遺伝子のスクリーニングをおこなった。このスクリーニングにおいて、1) 内在的遺伝子とターゲット遺伝子のPCR増幅効率、2) 内在的遺伝子の遺伝子発現の均一性の二点を確認する必要がある。もし、1) PCR増幅効率に違いがあると、 $\Delta\Delta$ CT法では内在的コントロール遺伝子を基準としてターゲット遺伝子の発現量を推定するため、人為的なPCR増幅効率の違いがターゲット遺伝子の発現量を左右してしまう。そこで、希釈サンプルによってPCR効率を検討した結果、*EF1A*と *GAPDH1*は反応効率がほぼ均一であったが、*GAPDH2*は *ScFT1*遺伝子に対して反応効率が悪かった。よって、*EF1A*と *GAPDH1*について2) 内在遺伝子の遺伝子発現の均一性について検討を行った。その

結果、*EF1A*遺伝子はサンプリングを行った季節によって遺伝子発現量にばらつきがあることが明らかになった。そこで、よりばらつきの少ない*GAPDH1*をコントロール遺伝子として活用することにした（図19）。

次に開花遺伝子の一つである*ScFT1*遺伝子の発現動態を時系列にサンプリングされた*Shorea curtisii*の新芽及び花芽を用いて調べた。開花量の多かったF278個体では外見上8月9日のサンプルは花芽として認識できなかった。しかし、次のサンプリング日である8月24日には外見上花芽であると認識できた。*ScFT1*の遺伝子発現量を調べたところ外見上花芽と認識できなかった8月9日のサンプルにおいて*ScFT1*の発現が若干ながら増加していることが認識でき、外見上花芽と認識できる8月24日のサンプルでは確実にその発現量が増加していた。その後、9月6日には次第に増加し始め、開花直前の10月10日、10月20日に発現のピークを迎えた。一方、開花後の11月20日以降においては開花前から成長を始めているごく少数の花芽とは認識できない新芽を採取した。

この新芽においては*ScFT*遺伝子の発現は確認できなかった（図20）。*FT*遺伝子は温度・成長度合と光条件を統合し開花を制御する*FLC*遺伝子や光条件を感受する*CO*遺伝子の下流に位置し、シロイヌナズナにおける研究でも開花直前にその発現量が最大になることが報告されている。*Shorea*属の花芽においても初期には発現量が低く、開花直前の10月20日に発現のピークを迎えた（図20）。これらのデータを活用し、数理モデルによって開花予測を行うための基盤が出来たと考えている。

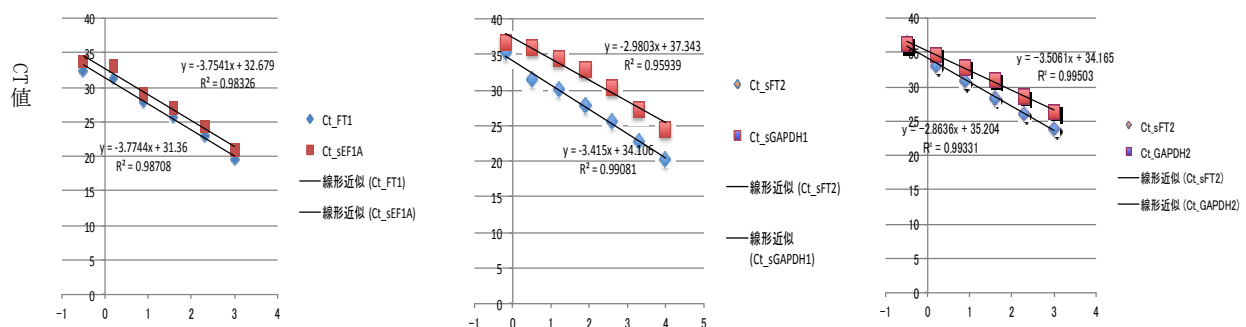


図19. 初期における（8月24日まで）SCFT1遺伝子の発現量（各枝（B1～B3）の平均値）とその標準偏差（縦バーによって表示）

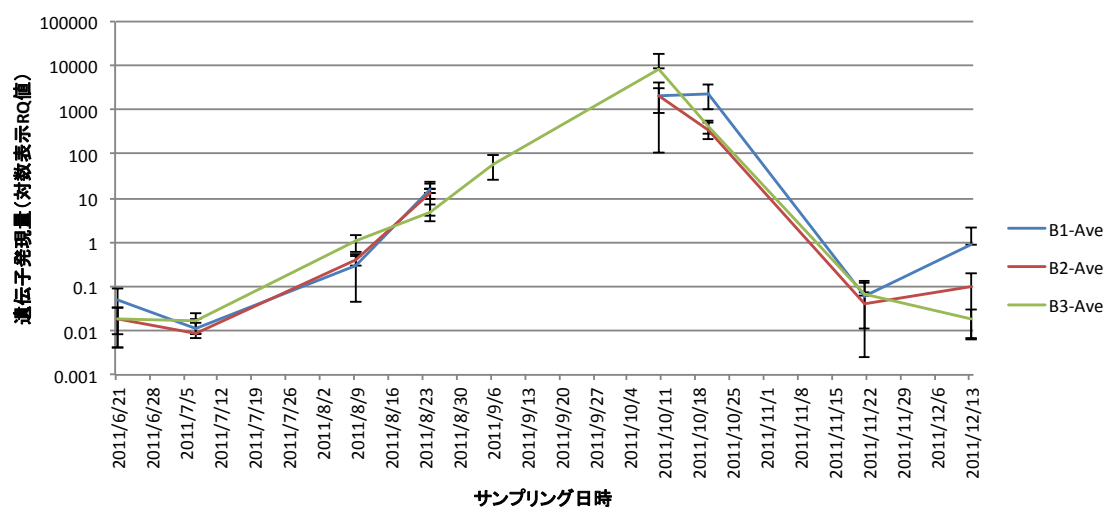


図20. 内在的コントロール遺伝子と開花遺伝子（*FT1*）のPCR効率の検討結果

サンプリングと同時に、枝内の無機物・有機物量の測定のために、新芽・花芽を採取した枝も採取した。採取後はすぐに冷凍庫内に保管し、その後、60度で72時間インキュベートし完全に乾燥させ、無機物・有機物を固定した。炭素量、窒素量に関してはCNコーダーを用いて、リンはモリブデンブルーを利用した比色定量法を用いて測定した。炭素に関しては開花した枝であるF278個体、一部の枝が開花したが、サンプリング出来た枝は開花しなかったF063個体とも季節変動はあまりなかった。しかし、開花した枝であるF278個体では開花後、果実の成長が進むにつれて低下傾向にあった。一方で、窒素とリンは開花直前に枝内の濃度、量の増加が確認された。この傾向はリンでより顕著であった。開花後は両元素とも低下する傾向が見られた。しかし、非開花枝であるF063ではその傾向は見られなかった（図21）。

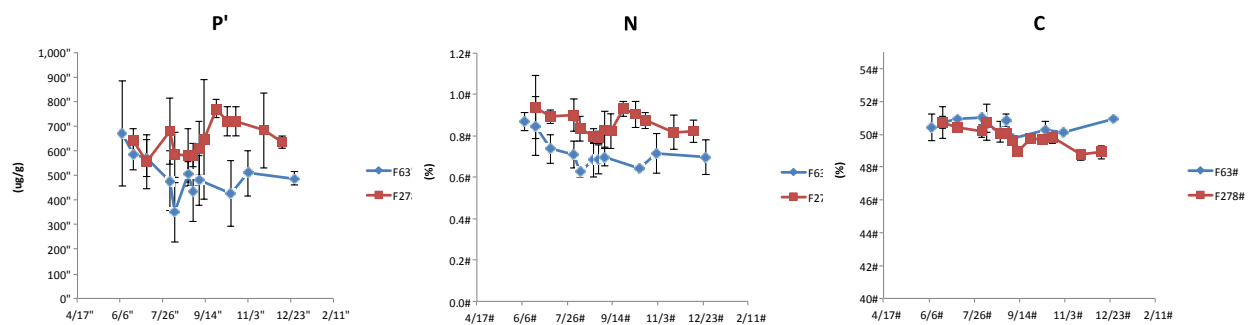


図21. 新芽・花芽を継続サンプリングした枝の含有元素量の季節変動

(3) 遺伝子情報に立脚した開花時期予測: 数理モデルの開発と解析

H25年度に得られたデータから、開花遺伝子 $ScFT1$ の発現量が上昇する以前に開花木と非開花木間で枝における窒素含量の違いがみられたことから、数理モデルでは樹体内における窒素含量が $ScFT1$ の発現に影響を及ぼすと仮定した（図22）。また、20℃を下回る低温が生じる頻度を気象データから推定し、低温シグナルによって $ScFT1$ の発現が誘導されると仮定した。

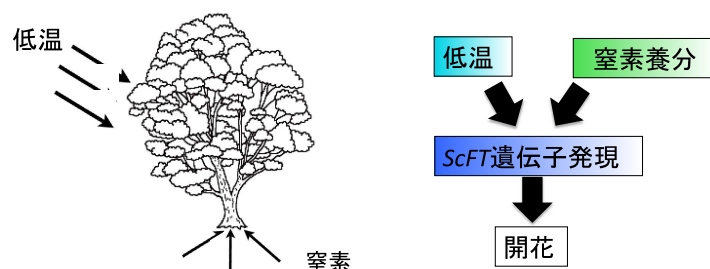


図22. 樹体内における窒素含量と低温シグナルによって $ScFT1$ の発現量が制御されると仮定した数理モデル。

$$\frac{dx_{FT}}{dt} = \alpha_{FT} f(LT) g(N) - \beta_{FT} x_{FT}$$

$$\frac{dN}{dt} = a - \Theta(x_{FT} > K_{FT}) C_{flower} - \Theta(x_{FT} > K_{FT}) C_{seed} - bN$$

$$f(LT) = \begin{cases} 1 & \text{if } p < p_{LT} \\ 0 & \text{otherwise} \end{cases} \quad \begin{matrix} 20^{\circ}\text{C以下の低温が生じる確率} \\ p_{LT} 0.057 \text{ d}^{-1} \end{matrix}$$

図22における x_{FT} は *ScFT* の発現量を、 N は枝における窒素含量をあらわす。 α_{FT} と β_{FT} はそれぞれ *ScFT* 遺伝子mRNAの生産率と分解率を意味する。 $f(LT)$ と $g(N)$ は低温と窒素資源量による制御を指す。 Θ はヘビサイド関数を意味し、*ScFT* の発現上昇がみられたときに花器官が形成され、窒素資源が繁殖に投資されると考えている。

数理モデルを解析した結果、低温シグナルが1日生じただけで *ScFT1* の発現が誘導されると仮定した場合には、低温シグナルが1年以内に10回以上の高頻度で生じるため、開花後の窒素枯渇による回復が間に合わずそれらのほとんどの低温シグナルが無視されることが予想された（図23）。また、開花周期は窒素蓄積量の動態によって強く制限されることが示された。

より長期の低温シグナルに応答するとどのように開花動態が変化するかを検討した結果、2日間継続した低温が生じた場合のみ *ScFT1* の発現が誘導されると仮定すると、低温シグナル頻度が減少し、開花後に窒素蓄積量が緩やかに回復し十分な蓄積レベルになってから開花が生じることが予測され、その周期は約2年に一度になることが示された（図23）。さらに3日の低温が生じたときのみ *ScFT1* が発現誘導されとした場合には、開花によって一度枯渇した窒素が回復するまでの期間内に低温シグナルが生じることはほとんどないため、窒素による開花制御の相対的重要性は低温シグナルに比較すると弱くなることが予測された（図23）。このように、窒素蓄積量という内的シグナルと低温という外的シグナルの相対的重要性を評価する数理モデルを開発できたことは、今後地球温暖化を代表する環境変動や土地利用改変による窒素循環の変化が生じた場合、フタバガキの開花挙動がどのように変化するかを予測するための基盤となると考えられる。

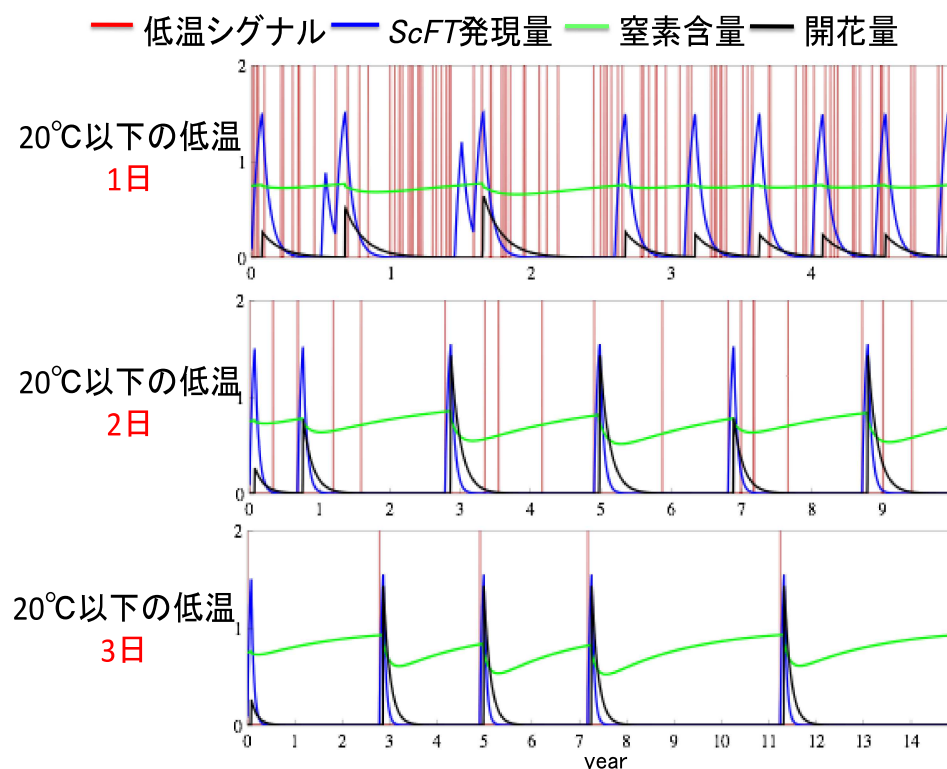


図23. 数理モデルによる予測

5. 本研究により得られた成果

(1) 科学的意義

一斉開花を引き起こす、東南アジアの熱帯雨林において生態学的にも、木材資源の持続的利用にも重要な開花遺伝子のほとんどを世界に先駆けて大量収集することに成功した。中でもフロリゲンとして知られる*ScFT1*遺伝子の発現量を、開花前から開花後にかけて定量化したところ、肉眼で観察されるより以前に発現上昇が見られること、実際に開花が開始された時には発現量のピークが生じた後であることが明らかとなった。

枝における資源量を測定した結果、*ScFT1*遺伝子の発現情報前にも開花木においては窒素含量が高く維持されていたため、窒素含量が*ScFT1*の発現を制御する可能性が示された。

推定開花誘導期間における気象条件について分析したところ、はっきりとした異常気象は確認されなかった。しかし、少なくとも何らかの乾燥条件が一斉開花と関わるが見出された。今後は遺伝子発現との関連性を分析することで、一斉開花に関連する気象条件の特定が可能になると期待される。

(2) 環境政策への貢献

<行政が既に活用した成果>

「特に記載すべき事項はない」

<行政が活用することが見込まれる成果>

本研究による直接的な環境政策への貢献は限られるが、本プロジェクトで得られた成果を
①東南アジアに特異的に見られる一斉開花現象の予測による森林再生・修復プロジェクトの支援、
②フタバカキ開花誘導の基盤技術の提供へ結びつけたい。

6. 国際共同研究等の状況

(独) 国際農林水産業研究センター交付金プロジェクト

c-5 東南アジアにおける持続的利用を通じた森林管理・保全技術の開発

II マレーシア、フタバカキ択伐林業の持続性評価及び向上技術の開発

国内参画メンバー 国際農林水産業研究センター 野田 巖、谷 尚樹、星野大介

森林総合研究所 津村義彦、新山馨

広島大学 近藤俊明

国外参画メンバー マレーシア森林研究所 Ismail Harun, Norwati Muhammad, Abd. Rhaman Kassim, Lee Soon Leong, Ng Chin Hong, Samsudin Musa

この他、マレーシア連邦森林局、ペラ州森林局、セランゴール州森林局と連携

平成24年度申請基盤研究(B) (海外学術調査)

東南アジア熱帯林の遺伝的保全のためのガイドラインの作成(代表:津村義彦)

国内参画メンバー 森林総合研究所 津村義彦

国際農林水産業研究センター 谷 尚樹

首都大学東京 沼田真也

国外参画メンバー マレーシア森林研究所 Norwati Muhammad, Lee Soon Leong

「熱帯地域の生態及び生物多様性における地理空間技術の応用に関する共同研究」

案件1：マレーシア国立公園の持続的管理に関する研究

案件2：アジア大都市圏の自然環境における生物多様性保全と持続的利用に関する研究

カウンターパート Prof. Mazlan Hashim マレーシア工科大学 マレーシア)

連携状況：マレーシア森林研究所、ジョホール国立公園公社、国立シンガポール教育研究所、シンガポール国立公園局

7. 研究成果の発表状況

(1) 誌上発表

<論文(査読あり)>

- 1) Numata, S., Suzuki, R. O., Nishimura, S., Naito, Y., Konuma, A., Tsumura, Y., Tani, N., Okuda, T., and Nur Supardi M. N. Journal of Forest Research, (2012) 17: 378-387
“Fruiting behavior of dipterocarps in two consecutive episodes of general flowering in a Malaysian lowland rain forest.
- 2) Suzuki, R.O. Numata, S., Okuda, T., Nur Supardi M.N., Abd. Rahman K. and Kachi, N.: Journal of Tropical Ecology (in press) “Species associations among dipterocarp species coexisting in a Malaysian tropical rain forest.

<査読付論文に準ずる成果発表> (「持続可能な社会・政策研究分野」の課題のみ記載可。)

「特に記載すべき事項はない」

<その他誌上発表(査読なし)>

「特に記載すべき事項はない」

(2) 口頭発表(学会等)

- 1) Hosaka, T., Numata, S. Arima, T., and Mazlan H. (2012) Urban Biodiversity Conference (URBIO) 2012, Mumbai. October 2012.
“Current status and perspectives of biodiversity in Tokyo, Japan.”
- 2) 沼田真也、安田雅俊、鈴木亮、保坂哲朗、Nur Supardi M, N., C. D. Fretcher, M., Hashim
日本生態学会 静岡 2013年3月
「一斉開花する森林の地理的パターンはどのように決定されるか？」
- 3) 福盛浩介、保坂哲朗、Mazlan Hashim、沼田真也 日本生態学会 静岡 2013年3月
「マレーシアエンダウロンピン国立公園における外来種アメリカクサノボタンの分布パターン」

(3) 出願特許

「特に記載すべき事項はない」

(4) シンポジウム、セミナー等の開催（主催のもの）

「特に記載すべき事項はない」

(5) マスコミ等への公表・報道等

「特に記載すべき事項はない」

(6) その他

「特に記載すべき事項はない」

8. 引用文献

1. Kelly, D. The evolutionary ecology of mast seeding. *Trends Ecol. Evol.* **9**, 465-470 (1994).
2. Kelly, D. & Sork, V.L. Mast seeding in perennial plants: why, how, where? *Annu. Rev. Ecol. Syst.* **33**, 427-447 (2002).
3. Ashton, P.S., Givnish, T.J., & Appanah, S. Staggered flowering in the Dipterocarpaceae: new insights into floral induction and the evolution of mast fruiting in the aseasonal tropics. *Am. Nat.* **132**, 44-66 (1988).
4. Sakai, S. *et al.* Plant reproductive phenology over four years including an episode of general flowering in a lowland dipterocarp forest, Sarawak, Malaysia. *Am. J. Bot.* **86**, 1414-1436 (1999).
5. Bäurle, I. & Dean, C. The timing of developmental transitions in plants. *Cell* **125**, 655-664 (2006).
6. Andrés, F. & Coupland, G. The genetic basis of flowering responses to seasonal cues. *Nat. Rev. Genet.* **13**, 627-639 (2012).
7. Kardailsky, I. *et al.* Activation tagging of the floral inducer FT. *Science* **286**, 1962-1965 (1999).
8. Kobayashi, Y., Kaya, H., Goto, K., Iwabuchi, M. & Araki, T. A pair of related genes with antagonistic roles in mediating flowering signals. *Science* **286**, 1960-1962 (1999).
9. Weigel, D., Alvarez, J., Smyth, D.R., Yanofsky, M.F. & Meyerowitz, E.M. Leafy controls floral meristem identity in Arabidopsis. *Cell* **69**, 843-859 (1992).
10. Numata, S., M. Yasuda, T. Okuda, N. Kachi, and N. S. M. Noor. Temporal and spatial patterns of mass flowerings on the Malay Peninsula. *American Journal of Botany* **90**, 1025-1031 (2003).
11. Burgess, P. F. Studies on the regeneration of the hill forests of the Malay peninsula. *Malaysian Forester* **35**, 103-123 (1972)
12. Blitcher-Mathiesen, U. Borneo illipe, a fat product from different *Shorea* spp. (Dipterocarpaceae). *Economic Botany* **48**, 231-242 (1994).
13. Cheang, B.-k. Interannual variability of monsoons in Malaysia and its relationship with ENSO. *Journal of Earth System Science* **102**, 219-239 (1993).

Plant Response to Environmental Change: Exploring the Mechanism of General Flowering by Integrating Molecular and Modeling Approaches

Principal Investigator: Akiko Satake

Institution: Graduate School of Environmental Sciences, Hokkaido University,
Sapporo 060-0810, Japan.

Tel: +81-11-706-2261 / Fax: +81-11-706-4954

E-mail: satake@ees.hokudai.ac.jp

Cooperated by: Tokyo Metropolitan University, Japan International Research Center for
Agricultural Sciences

[Abstract]

Key Words: Climate change, Temperature, Flowering timing, Phenology, Flowering gene network.

Plant reproductive tactics display a great diversity. While many of crop species are annuals that flower once in their life cycle and then die, the majority of plant species is perennial that flowers repeatedly and live for many years. Among perennials, many woody plants in diverse taxonomic groups reproduce synchronously with large interannual variations in flower and seed productions, which is known as “general flowering” both in tropical rain forests in South East Asia. The abundance of flowers and seeds in mast years provides major resource pulses to pollinators and seed consumers, which cascade through ecosystems by complicated food web and nutrient cycling. Therefore unraveling underlying mechanism of mast seeding is critical for biodiversity conservation and restoration. Despite its importance, little is known about the mechanism of general flowering. Proposed in *A. thaliana*, the gene regulatory model of floral transition describes the complex interactions between environmental signals (e.g., photoperiod and temperature) and endogenous cues (e.g., size, leaf number, or age). Here we applied these knowledge from molecular genetic studies to *Shorea curtisii* and *Shorea leprosula*, and investigated the role of resource availability and environmental signals in inducing annual variability in reproductive efforts. We first isolated major flowering-time genes, and found that these genes are highly conserved between *Arabidopsis* and *Shorea*. The expression level of *Shorea* homolog of *FLOWERING LOUS T* (*ScFT*), that is known as florigen, was continuously monitored before, during, and after the flowering event observed in 2011. *ScFT* expression level started to increase one month before the flowering event, and it has already declined when trees produced flowers. To investigate the effect of resource availability on the regulation of *ScFT*, we measured nitrogen, phosphorus, and total non-structural carbohydrates concentrations in current-year shoots. The nitrogen concentration was higher in reproductive shoots than non-reproductive shoots, suggesting the potential role of nitrogen in regulating *ScFT* expression. The analysis of mathematical model that integrates nitrogen and low temperature signals showed

that the observed intermittent flowering events can be reproduced by the model, although more detailed assessment of parameters is necessary. This study would provide a useful tool to forecast future trends in general flowering under climate change.

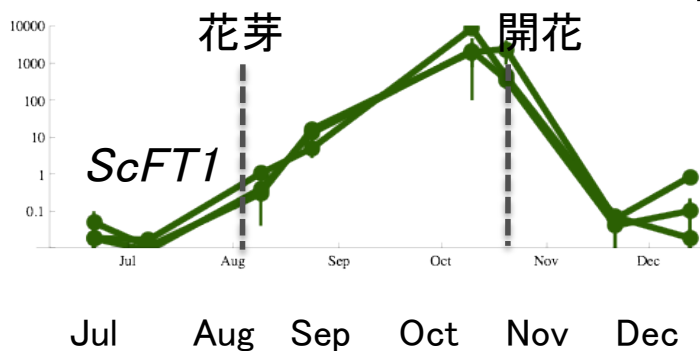
RFd-1101 遺伝子情報に立脚した開花時期予測モデルの開発 — 一斉開花の分子レベルでの解明 (北海道大学)

林冠アクセス用の足場



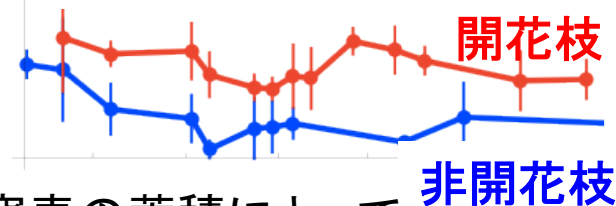
S. leprosula
S. curtisii

開花遺伝子の発現解析



+

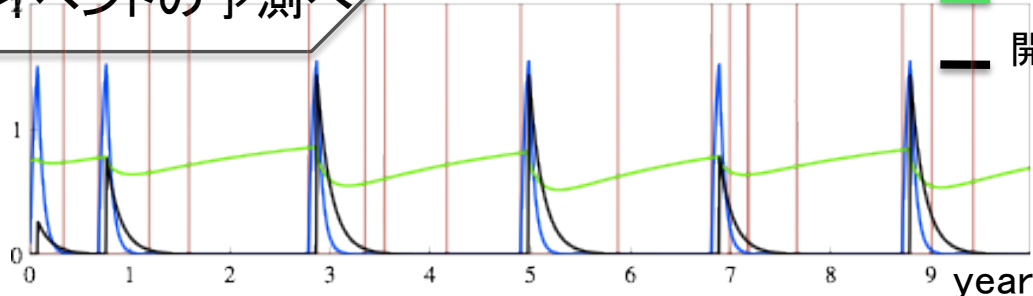
枝における資源量分析



窒素の蓄積によって
花成が制御される可能性
が示唆された

遺伝子発現情報をもとに
一斉開花イベントの予測へ

$$\frac{dx_{FT}}{dt} = \alpha_{FT} f(LT) g(N) - \beta_{FT} x_{FT}$$



継続してサンプル採取



RNA抽出

次世代
シーケンサー

開花遺伝子を単離した
ScFT1, *ScFT2*, *ScLFY*,
ScSVP, etc.

— 低温シグナル
— *ScFT*発現量
— 窒素含量
— 開花量