

細胞分裂から見たブナ花成の制御時期

北海道大学農学院
北海道大学農学研究院
北海道大学農学部
北海道大学北方生物圏フィールド科学センター

和田 尚之
斎藤 秀之
小林 壱徳久
星野 洋一郎

はじめに

着花促進や開花予測などの開花に関わる造林技術は再現性に乏しく、確立した技術は少ない。この原因は樹木の花成に関する生理学的な知見が少ないためである。経験的に、花成の誘導は内的外的環境要因の多重かつ複合的な作用によると考えられている。これらを踏まえ、花成誘導のメカニズムの解明が必要である^(8,12)。

ブナはマスティングの花成周期性をもつ樹木である^(5,7,13)。先行研究により、ブナの花成のタイミング（年次）を決定するメカニズムとしてエピジェネティックな制御機構の存在が明らかになっている⁽¹⁷⁾。エピジェネティック制御とは、花芽分化時の直接的な花成誘導に対して事前にその作用の効果の可否を決める仕組みである。ブナの花成はフロリゲンをコードする *FT* 遺伝子^(1,11)の発現調節下にあり、DNA メチル化した *FT* 遺伝子のコピー数が増えると *FT* 遺伝子の発現量も増加した⁽¹⁷⁾。また、*FT* 遺伝子の DNA メチル化の状態が、花芽分化時の窒素による花成誘導を制御していた⁽¹⁷⁾。このことから、花成の多重な制御機構において、*FT* 遺伝子の DNA メチル化によるエピジェネティック制御が主要な規定要因として作用していると考えられた。したがって、DNA メチル化/脱メチル化の決定の時期を特定できれば、花成のエピジェネティック制御に関与する環境条件を特定する手掛かりが得られると考えられる。

DNA メチル化/脱メチル化は、細胞分裂におけるゲノムの複製の際に生じる^(15,19)。*FT* 遺伝子が発現する器官は葉であるため、個葉の形態形成の過程における細胞分裂の時期を特定することで、個葉の細胞にある DNA のメチル化状態を決定する時期を推定することが可能である。

ブナの葉の形態形成は、腋芽における葉原基の発生に始まり、胚葉の発達、冬芽における休眠を経て、開芽後の開葉と発達により成葉となる。先行研究では、葉原基の発生時期が6月下旬であること^(3,9)、開葉の前年には表皮細胞、柵状組織、海綿状柔組織などの組織の分化が現れること^(2,14)、開葉後にも細胞分裂が行われること⁽¹⁶⁾などが報告されている。これらの知見から、葉形成のための細胞分裂は、開葉前年と当年の両方の期間に行われていることがわかる。しかし、葉原基から成葉への全ての発達段階を通じた細胞分裂の量比については明らかでない。

本研究の目的は、ブナの個葉を構成する細胞の分裂時期を量的に調べ、個葉の DNA メチル化/脱メチル化が決定する時期を明らかにする。これにより、ブナ花成における

エピジェネティック制御の時期について検討する。なお、試料収集の都合で年次と場所の異なる試料に基づく解析のため、予稿としたい。

材料と方法

1. 調査地と材料

調査地は、北海道黒松内町の添別にある約 80 年生のブナ二次林と北海道大学札幌キャンパスである。調査木は両地域とも林冠に達した成木個体を用いた。黒松内の調査木 3 個体のサイズは樹高が 22.7±1.4 m、胸高直径が 26.7±5.0 cm であった。北海道大学の 2 個体のサイズは樹高が 22.3 m と 24.8 m、胸高直径が 81.1 cm と 71.9 cm であった。

実験試料の胚葉と葉は、調査木の陽樹冠から採取し、凍結保存して実験に供した。黒松内の供試葉は各個体から 1 反復、北海道大学の供試葉は 3 反復であった。採取時期は、黒松内では 2013 年 9 月～11 月に月 1 回、2016 年 4 月～5 月に月 2 回、8 月に 1 回、北海道大学では 2016 年 4 月～5 月に月 4 回行った。

2. 葉サイズの季節変化と葉の細胞数

葉の成長段階の目安として、冬芽長と葉身長を測定した。成葉の面積は 8 月に採取した個葉を用いて調べた。個葉あたりの細胞総数を推定するために、細胞密度と葉面積を測定した。個葉面積の測定は、スキャナーで投影面積をデジタル画像化して、LIA32⁽¹⁸⁾を用いて面積を計測した。細胞密度の測定にはデジタルマイクロスコープ (VHX-6000, キーエンス, 大阪) を用いた。細胞密度の測定は、葉の表面と裏面の表皮細胞ならびに葉肉細胞 (柵状細胞と海綿状柔細胞) を区別して調べた。測定の反復は、個葉あたりの表皮細胞の測定が表裏を各 10 反復 (320µm×240µm)、葉肉細胞が断面を 1 反復であった。デジタルマイクロスコープでの撮影は、倍率が 1,000 倍の条件で行い、計数は撮影した写真を用いて行った。個葉あたりの細胞総数は、各組織の細胞密度と葉面積の積により求めた。

3. DNA 複製頻度の季節変化

DNA 複製頻度は、フローサイトメトリー法⁽⁶⁾により細胞分裂で倍加した核の割合を調べた。材料が胚葉の場合には、1 つの冬芽に含まれる胚葉 1 枚を対象に核の抽出を行い、開芽後の葉を材料にする場合には、葉から 5 mm×20 mm ほどの短冊状の葉片を切り出し、核の抽出に供した (Quantum Stain NA UV2, Quantum Analysis /QA, Münster Germany)。DNA の染色には DAPI (4', 6-diamidino-1-

Hisayuki WADA (Graduate School of Agriculture, Hokkaido Univ., Sapporo 060-8589), Hideyuki SAITO (Research Faculty of Agriculture, Hokkaido Univ., Sapporo 060-8589), Ittoku KOBAYASHI (School of Agriculture, Hokkaido Univ., Sapporo 060-8589), Yoichiro HOSHINO (Field Science Center for Northern Biosphere, Hokkaido Univ., Sapporo 060-0811)

Changes of cell division and genome duplication during leaf development of Siebold's beech (*Fagus crenata*): An implication to the timing of epigenetic control on floral initiation

phenylindole) を用いた (10 mM Tris, 50 mM sodium citrate, 2 mM MgCl₂, 1% (w/v) PVP K-30, 0.1% (v/v) Triton X-100, and 2 mg l⁻¹ DAPI (pH 7.5))⁽¹⁰⁾。DAPI 染色した蛍光強度はフローサイトメーター (Partec PA; Partec GmbH, Munster, Germany) を用いて測定した。測定の品質管理として、1 検体あたりに定量した細胞数は 5,000 個以上、ピーク検出の CV 値が 5%未満の条件を満たすデータを採用した。DNA 複製する細胞割合 (DNA 複製頻度) の計算は、ゲノム量 2C の細胞数と 4C の細胞数の割合から求めた (式 1)。なお予備実験として、2C が示す蛍光強度は、ブナの花粉から抽出した核の 1C と 2C の蛍光強度を基準にした。

$$\text{DNA 複製頻度 (\%)} = \frac{4C \text{ の細胞数}}{2C \text{ の細胞数} + 4C \text{ の細胞数}} \times 100$$

..... (式 1)

葉原基の発生初期段階の DNA 複製は測定することが困難なため、先行研究の解剖学的知見に基づいて葉原基の発生が 6 月 21 日と仮定し^(3,9)、細胞の増加速度がロジスティック曲線に従うことを仮定して求めた。

4. DNA 複製総数の季節変化

DNA 複製した細胞総数の季節変化は、DNA 複製する細胞割合 (DNA 複製する細胞割合) の季節変化と個葉あたりの細胞数から求めた (式 2)。

$$CN(t) = cn(t) \times \left(1 + \frac{F(t)}{100}\right)$$

..... (式 2)

CN(t): 任意時点 (t) までに DNA 複製した個葉あたりの細胞総数

cn(t): t での個葉あたりの細胞数

F(t): t での DNA 複製する細胞割合

結果

腋芽の出現は 5 月の開葉後すぐに目視で確認でき、その後は 10 月の落葉まで緩やかに伸長成長を続けた (図-1)。開芽は 4 月上旬で、葉伸長の成長の停止は 5 月 12 日であった (図-1)。8 月の個葉面積は 19.0 ± 0.82 cm² (平均 ± 標準誤差) であった。葉の細胞密度は表面の表皮細胞が 1.96 ± 0.05 × 10⁵ 個/cm²、裏面が 4.86 ± 0.11 × 10⁵ 個/cm²、葉肉細胞が 1.38 ± 0.19 × 10⁶ 個/cm² であった (図-2)。個葉 1 枚あたりの細胞数は 3.96 ± 0.14 × 10⁷ 個と推定された。

胚葉の DNA 複製頻度は 9 月に 15.9 ± 1.1%、10 月に 12.4 ± 1.3%、11 月に 11.7 ± 0.7% であった (図-3, 4)。8 月にも胚葉の測定を試みたが、胚葉と軸を区別して測定できなかった。4 月の開芽から開葉中の葉の DNA 複製頻度は 4 月 11 日に最大の 21.7 ± 0.5% が観測され、その後は、経日的に低下し、5 月 19 日以降は DNA 複製を確認できなかった。DNA 複製総数は、期間を 6 月下旬 ~ 9 月下旬 (夏)、10 月上旬 ~ 12 月中旬 (秋)、4 月上旬 ~ 5 月下旬 (春)、5 月下旬 ~ 6 月下旬 (初夏) の 4 つの期間に区分すると、それぞれ 0.1%、7.2%、92.7%、0% であった (図-5)。1 日あたりの DNA 複製回数は、葉原基から胚葉の発達までの期間は最大で 7.17 × 10⁴ 回/日/葉であり、開葉中の 4 月 30 日に 1.31 × 10⁶ 回/日/葉で、最も大きかった (図-5)。

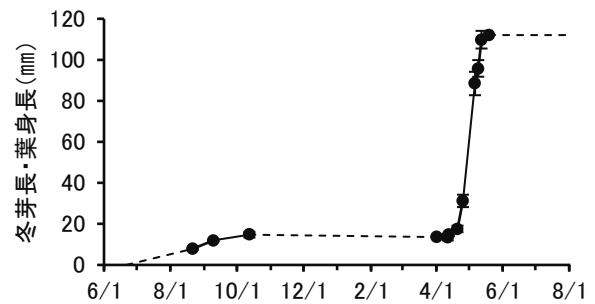


図-1 冬芽長ならびに葉身長の季節変化

11 月までのデータは冬芽長を、4 月以降は葉身長を示す。エラーバーは標準誤差を示す。

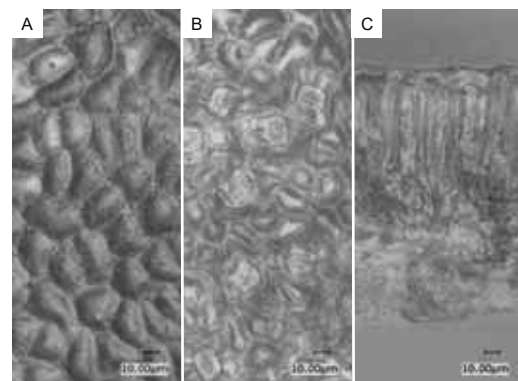


図-2 ブナの葉の細胞の様子

(A)は葉の表面の表皮細胞、(B)が裏面の表皮細胞、(C)が葉の断面上部が表面である。倍率は 1,000 倍、スケールは 10 μm。

考察

ブナの細胞分裂 (DNA 複製回数) の季節変化を調べたところ、個葉の 90%以上の細胞が 4 月の開葉時期に形成されていた (図-5)。先行研究のブナの葉の解剖学的観察によれば⁽¹⁰⁾、開葉から成熟葉に発達するまでの細胞数の増加率は約 7 倍であった。この先行研究と同じ期間で本研究の結果を計算してみると、細胞の増加率は約 6 倍であり、二つの異なる手法による増加率の推定結果はほぼ一致した。また胚葉の発達段階における細胞分裂回数の推定では仮定を置くなどの不確定要素が含まれたが、本推定方法では胚葉段階の過小評価が生じない方法を選んだため、開葉段階に DNA 複製される細胞の割合が大きいのという結論に変わりはないと考えられる。したがって、本研究による DNA 複製回数の季節変化は妥当な結果であると考えられ、ブナの葉を構成する細胞の DNA は、その 9 割以上が開葉時期に複製されることがわかった。

遺伝子の DNA メチル化/脱メチル化の状態は DNA の複製時に決定することが知られている^(15,19)。本研究では個葉を構成する細胞の DNA の 9 割以上が開葉時期に複製されたことから、その 9 割の細胞に存在する FT 遺伝子では DNA メチル化状態が開葉時期に決定すると考えられた。すなわち、開葉時期にあたる 4 月の環境条件は FT 遺伝子の DNA メチル化/脱メチル化の決定に最も大きな影響を与える可能性が高かった。

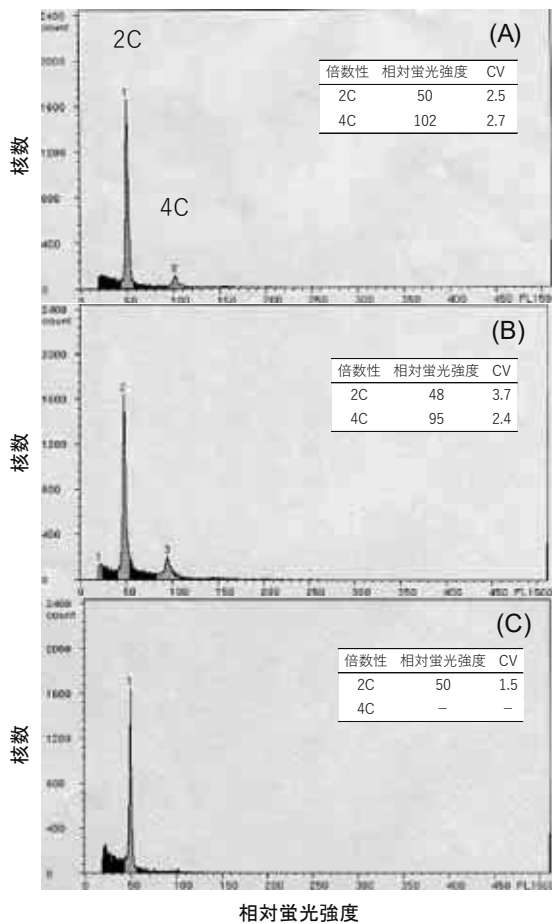


図-3 フローサイトメトリー法による核 DNA 量とその核数のヒストグラム (測定例)

(A)は10月、(B)は4月、(C)は6月の測定例を示す。相対蛍光強度が約50と100付近に検出された2つのピークが2Cと4Cの核数を示し、核数の割合からゲノム重複頻度が求められる。

秋期の落葉後も DNA 複製が確認され、葉の全細胞数の7%のDNAが秋期に複製されていた(図-5)。先行研究では、落葉後から開芽までの環境要因が花成の環境号令として検討されることはなかった。しかし、落葉後もDNA複製が行われるという事実は、推定7%の細胞で数的な割合は小さいが、秋期の環境要因が *FT* 遺伝子の DNA メチル化に影響を与える可能性があることを意味した。

夏期の腋芽の中で発達する胚葉は、DNA 複製頻度が開葉時期と同等の高いレベルであった。しかし、胚葉一枚あたりの細胞数が少ないため、成葉1枚を構成する細胞数の全体に対して夏期に形成される細胞数の割合はわずか0.1%ほどであった。このことから、夏期の環境条件がDNAメチル化/脱メチル化に直接的に影響を与える細胞の割合は成葉1枚あたり0.1%で、その影響の大きさは皆無に近いと考えられた。

同様に、葉の伸長成長が停止した5月下旬から花芽分化が生じる6月下旬~7月上旬までにおいて、DNA複製は検出されなかった。そのため、5月下旬~6月上旬の環境条件がDNAメチル化に影響を与えているとは考えられなかった。

ブナの先行研究では、野外モニタリングと温度操作実験

により4月下旬~5月中旬の開葉時期の温度条件が同年夏期の花成に影響を与えることを報告した⁽⁴⁾。この報告が指摘した開葉時期と本研究が示した葉形成の細胞分裂時期が一致したことは、前述した *FT* 遺伝子の DNA メチル化/脱メチル化によるエピジェネティック制御の決定時期が4月下旬~5月中旬の開葉時期であることを支持した。しかし、Kon and Noda⁽⁴⁾が指摘した開葉時期の温度条件は花成誘導に対する抑制的な関係であり、花成誘導の主要因は他にあると考えられる。今後、開葉時期の内的外的な環境条件を精査することによって、*FT* 遺伝子のエピジェネティック制御を介した花成の誘導要因を明らかにできると考えられた。

以上をまとめると、ブナの個葉を構成する細胞の分裂時期は9割以上が開葉時期であり、この開葉時期が *FT* 遺伝子の DNA メチル化/脱メチル化によるエピジェネティック制御の決定時期として重要であると考えられた。なお、本研究では供試葉の準備が不十分であり、各所からのデータの寄せ集めによって解析を行った点に不備が残る。年変動も含めた再現性の確認を行い、*FT* 遺伝子の DNA メチル化に影響を与える環境条件の検証が必要である。

謝辞

本研究は(独)日本学術振興会科学研究費助成事業(26281030, 26450209)の支援を受けた。デジタルマイクロスコープの使用にあたっては、(株)キーエンス・マイク

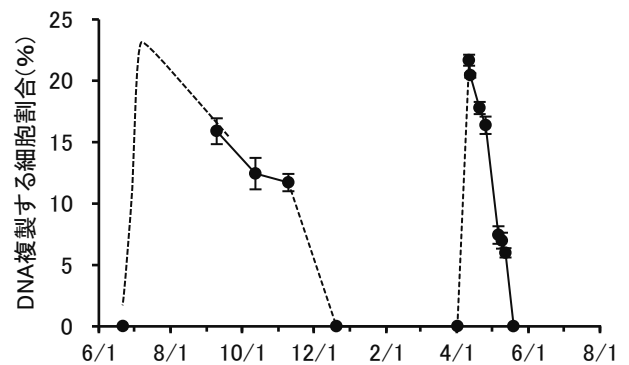


図-4 DNA 複製頻度の季節変化

破線はDNA複製頻度の推定曲線。葉原基の発生時期を6月21日、胚葉の分裂終了を12月20日、開芽前の胚葉の分裂開始時期を4月1日と仮定した。エラーバーは標準誤差を示す。

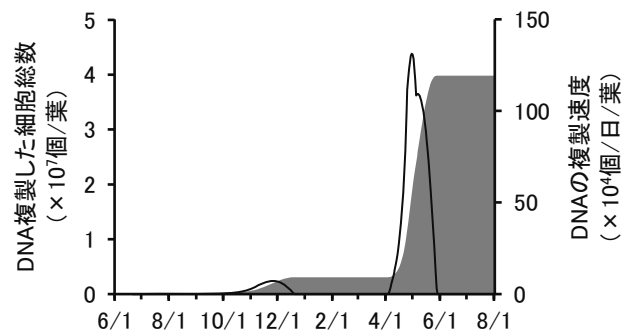


図-5 DNA 複製した細胞総数と複製速度

灰色塗り是个葉あたりの総DNA複製回数、黒線是个葉の1日あたりのDNA複製回数を示す。

ロスコーブ事業部の橋口修氏のご協力とご指導を頂いた。北海道大学農学部造林学研究室の小池孝良教授，渋谷正人准教授，学生諸氏には有益な助言を頂いた。記して謝意を示す。

引用文献

- (1) Corbesier L *et al.* (2007) FT protein movement contributes to long-distance signaling in floral induction of *Arabidopsis*. *Science* **316**: 1030–1033.
- (2) Eschrich W *et al.* (1989) The induction of sun and shade leaves of the European beech (*Fagus sylvatica* L.): anatomical studies. *Trees* **3**: 1–10.
- (3) 橋詰隼人 (1983) ブナの花芽分化期及び花芽の発育経過について (予報). *広葉樹研究* **2**: 41–47.
- (4) Kon H and Noda T (2007) Experimental investigation on weather cues for mast seeding of *Fagus crenata*. *Ecol. Res.* **22**: 802–806.
- (5) 今博計 (2009) ブナにおけるマスティング適応的意義とそのメカニズム. *北海道林業試験場研究報告* **46**: 53–83.
- (6) Kron P *et al.* (2007) Applications of flow cytometry to evolutionary and population biology. *Annu. Rev. Ecol. Evol. Syst.* **38**: 847–876.
- (7) Masaki T *et al.* (2008) Geographical variation in climatic cues for mast seeding of *Fagus crenata*. *Popul. Ecol.* **50**: 357–366.
- (8) Meilan R (1997) Floral induction in woody angiosperms. *New Forests* **14**: 179–202.
- (9) 三上進・北上彌逸 (1983) ブナの花芽及び胚の発育過程とその時期. *林育研報* **1**: 1–14.
- (10) Mishiba K *et al.* (2000) Nuclear DNA content as an index character discriminating taxa in the genus *Petunia sensu* Jussieu (Solanaceae). *Ann Bot* **85**: 665–673.
- (11) Miyazaki Y *et al.* (2014) Nitrogen as a key regulator of flowering in *Fagus crenata*: understanding the physiological mechanism of masting by gene expression analysis. *Ecology Letter* **17**: 1299–1309.
- (12) 斎藤秀之 (2014) 機能ゲノミクスによる林木育種研究の新展開—着花制御の技術開発に向けて—. *北海道の林木育種* **57**: 12–17.
- (13) Suzuki W *et al.* (2005) Mast seeding and its spatial scale in *Fagus crenata* in northern Japan. *For. Ecol. Manage.* **205**: 105–116.
- (14) Uemura A *et al.* (2000) Acclimation of leaf characteristics of *Fagus* species to previous-year and current-year solar irradiances. *Tree Physiol.* **20**: 945–951.
- (15) 牛島俊和・眞貝洋一 (2013) エピジェネティックスクリーワード事典, 分子機構から疾患・解析技術まで. 羊土社, 315pp
- (16) 宇都宮綾 (2003) 産地の異なるブナの葉の発達過程に関する解剖学的研究. 北海道大学農学部卒業論文, 23pp.
- (17) 和田尚之 (2016) 養分がブナの花成に与える影響—開花に向けた2年越しのスケジュール—. 北海道大学農学部卒業論文, 20pp.
- (18) Yamamoto K. (2005) LIA for Win32 (LIA32 ver.0.378). <http://www.agr.nagoya-u.ac.jp/~shinkan/LIA32/>.
- (19) Zhao Y and Chen X (2014) Non-coding RNAs and DNA methylation in plants. *Natl. Sci. Rev.* **1**: 219–229.